

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24620002

研究課題名(和文)植物の重力感受経路と重力シグナル変換・伝達機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of pathways of gravity-sensing and gravity-signaling in plants

研究代表者

藤井 伸治 (FUJII, NOBUHARU)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：70272002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物の重力感受機構は、アミロプラストの沈降(PGM経路)とARG1経路から構成されている。しかし、重力刺激を生体内のシグナルに変換する重力感受分子は未同定である。本研究では、低速遠心機の利用により作り出した過重力条件下では、シロイヌナズナのarg1 pgm二重突然変異体の重力応答性を検出できることを見出した。そこで、EMS処理したarg1 pgm二重突然変異体のM2個体をスクリーニングし、arg1 pgm二重突然変異体よりもさらに重力屈性能を低下させる4系統の突然変異体を単離した。今後、これらの突然変異体に注目した解析により、植物の重力感受機構の新たな知見が得られると期待される。

研究成果の概要(英文)：Sensing of gravity in plants is composed of amyloplast sedimentation (PGM pathway) and ARG1 pathway. However, a gravity-sensing molecule that converts gravistimulation into intracellular signals has not been identified. In this study, we found that gravity-responses in arg1 pgm double mutants could be detected under the hypergravity condition that was created by a low-speed centrifuge. Therefore, we screened M2 seedlings of arg1 pgm double mutants that were mutagenized with EMS, and isolated 4 lines of enhancer of arg1 pgm mutants that exhibited less gravity-responses than arg1 pgm mutants did. Hereafter, we expect that analysis of these mutants will allow us to obtain a new insight of how plants sense gravity.

研究分野：植物生理

キーワード：植物 重力感受 アミロプラスト 国際宇宙ステーション (ISS) 微小重力 過重力

1. 研究開始当初の背景

生物の重力刺激に対する応答機構の理解は、国際宇宙ステーション (ISS) などの微小重力条件下でヒトを含めた生物が活動する上で有用である。植物は、細胞内小器官のプラスチドの一種であるアミロプラストの沈降により、重力の向きを感受する仕組みを進化させ獲得した。この重力を感受する仕組みは動物などの他の生物種には見られない特殊な仕組みであり、植物の重力感受機構を明らかにすることにより、生物の重力感受機構の基本原則と植物の重力感受機構の特殊性を理解することが可能となる。

シロイヌナズナを用いた研究により、根の重力屈性は、重力刺激を生体情報である重力シグナルへの変換 (重力感受)、重力シグナルに依存したオーキシシン排出キャリアの局在変化によるオーキシシン偏差分布の誘導 (重力シグナル伝達)、オーキシシン偏差分布により引き起こされる偏差成長 (屈曲) の3つの過程に大別される (図1)。重力感受については、デンプン粒に富むアミロプラストの沈降が重力シグナルを発生させるモデル (アミロプラスト平衡石説) が受け入れられている。重力応答におけるアミロプラストの沈降の役割は、デンプン合成の欠損によりアミロプラストが正常に沈降しない *pgm* (*phosphoglucumutase*) 突然変異体を用いて検討されてきた。また、分子シャペロンとしての機能が予想される *DnaJ* 様タンパク質をコードする *ARG1* を欠損することによっても重力応答性が低下することが報告されている。そして、*pgm* 突然変異体と *arg1* 突然変異体の重力屈性の低下に比べ、*pgm arg1* 二重突然変異体ではさらに重力屈性が低下することから、*PGM* 経路と *ARG1* 経路は独立した経路であると考えられている。重力シグナルにより、根の重力感受細胞 (コルメラ細胞) 中に発現しているオーキシシン排出キャリア (*PIN3*、*PIN7*) は細胞の下側に局在化し、コルメラ細胞の下側にオーキシシンを排出する。コルメラ細胞から排出されたオーキシシンを、表皮細胞で発現しているオーキシシン排出キャリア (*PIN2*) とオーキシシン取り込みキャリア (*AUX1*) が伸長領域まで輸送し、伸長領域でのオーキシシンの偏差分布が形成される。オーキシシンはオーキシシン受容体に結合し、オーキシシン応答性遺伝子発現の抑制因子である

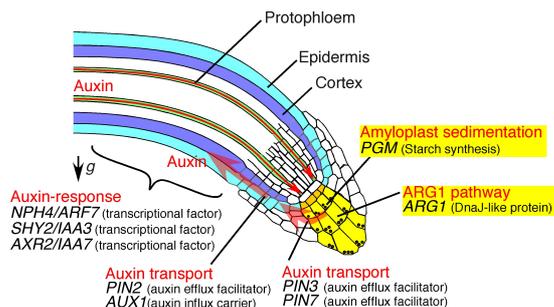


図1 シロイヌナズナの根の重力屈性に機能する遺伝子

Aux/IAA を分解し、オーキシシン応答性遺伝子発現の正の転写因子である *ARF* を脱抑制化し、オーキシシン応答遺伝子の発現を誘導し、オーキシシン応答を引き起こす。その結果、オーキシシンの偏差分布に応じた伸長成長が生じ、根は屈曲する。これらのうち、重力シグナル伝達に機能する分子として、コルメラ細胞で機能するオーキシシン排出キャリアの *PIN3*、*PIN7*、表皮細胞で機能するオーキシシン排出キャリアの *PIN2* とオーキシシン取り込みキャリアの *AUX1*、伸長領域でオーキシシン応答に機能する分子として *Aux/IAAs* と *ARFs* が既に明らかにされている。一方、植物の重力刺激を重力シグナルに変換する分子 (重力感受分子) は同定されていない。したがって、植物の重力感受細胞内で、細胞内小器官 (アミロプラスト) の沈降を感受する分子機構は未解明の研究課題として残されている。

2. 研究の目的

シロイヌナズナの突然変異体を用いた解析から、植物の重力感受細胞における初期の重力応答機構は、アミロプラストの沈降を介する経路 (*PGM* 経路) と *ARG1* 経路から構成されていると考えられている。しかし、これらの突然変異体で欠損している遺伝子産物は重力刺激を生体内のシグナルに変換する機能を持たないと考えられるため、未同定の重力感受分子の存在が予想される。そこで、まず、本研究では *arg1 pgm* 二重突然変異体で残存している重力応答性の検出を試み、過重力条件を利用することにより、*arg1 pgm* 二重突然変異体でも重力応答性を示すことを見出した。そして、突然変異を誘発させた *arg1 pgm* 二重突然変異体の *M₂* 個体をスクリーニングし、*arg1 pgm* 二重突然変異体よりもさらに重力屈性能を低下させる *enhancer of arg1 pgm* (*enap*) 突然変異を持つ系統の単離を試みた。

3. 研究の方法

(1) 植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) の Col (Columbia) 株を野生型として用いた。*arg1-3* 突然変異体を University of Wisconsin-Madison の Patrick Masson 教授より、*pgm-1* 突然変異体を University of Miami の J. Z. Kiss 教授より、*rhg* 突然変異体を奈良先端科学技術大学院大学の田坂昌生教授より、*stfl* 突然変異体を Research Center Juelich の Heike Kofler 博士より譲与していただいた。

(2) 根の重力応答の解析

シロイヌナズナの種子を 95%エタノールで 5 分間処理した後、20%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 10 分間処理し、滅菌水で 2 回洗浄した。プラスチック製角形シャーレ [10×14×1.5 cm、滅菌 2 号角形シャーレ (栄研器材)] に、50 mL の MS 無菌寒天培地 [pH5.7、0.215% (w/v) MS salt (SIGMA)、800 μL

MS-Vitamin (和光純薬)、1.5% 寒天 (和光純薬)を分注・固化させた後、滅菌した種子を30粒播種した。播種後2-3日間、暗所、4°Cで春化处理を行った。春化处理後、暗所で発芽させる実験区では、シャーレの外側をラシヤ紙で覆い、その外側をアルミホイルで包み、遮光した。下側から青色光を照射する実験区では、シャーレの下側以外をラシヤ紙で覆い、シャーレの下側以外を遮光した。25G処理区では、低速遠心機(図2)のサンプル搭載バケットに輪ゴム(6mm幅、折径120mmまたは160mm)でプレートを固定し、270rpmで回転させた。実験には常にプレートの寒天表面と平行に過重力がかかるスイングローターの低速遠心機を用いた。重力刺激を加えて生育させた芽生えの画像をスキャナーで取得し、得られた画像を画像解析ソフト(ImageJ、NIH)で解析し、根の伸長方向を測定した。

根の重力屈性による屈曲の測定は、以下のように行った。上述の方法で播種・春化处理した後、シャーレの上側以外をラシヤ紙で覆い、シャーレの上側以外を遮光し、上側から白色光を照射し、発芽後、光屈性で根が下側に伸張するように生育させた。5日齢の芽生えを、新しいプレートに、プレートの長辺の側面を下側に設置した時、根が水平になるように移植した。そして、スキャナーで芽生えの画像を取得してから、上述したように暗所、あるいは下側から青色光を照射し、1G、あるいは25G条件下で2日間生育させた。その後、スキャナーで芽生えの画像を取得し、得られ

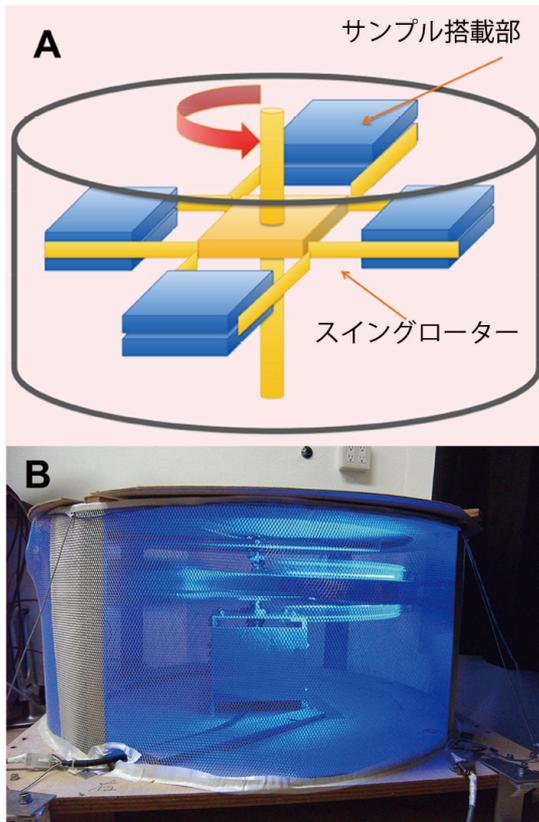


図2 解析に用いた低速遠心機の模式図(A)と青色光を照射しながら遠心している写真。

た画像を画像解析ソフト(ImageJ、NIH)で解析し、根の屈曲角度を測定した。

(3) 突然変異の誘発

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) の *arg1 pgm* 二重突然変異体の種子を0.3% (v/v) のエチルメタンスルホン酸 (EMS) で8時間、処理し、突然変異を誘発した。そして、1ブロックのロックウールあたり20粒のEMS処理した種子を播種し、23°C、連続光下で生育させ、20個体毎に採種した。

4. 研究成果

(1) 過重力条件下における *arg1 pgm* 二重突然変異体の根の重力応答性の検出

根の重力感受経路を構成するアミロプラストの沈降を介する経路 (*PGM* 経路) と *ARG1* 経路は、独立した経路であると考えられていた。すなわち、1G条件下では、*pgm* 突然変異体と *arg1* 突然変異体の各単独突然変異体での重力屈性に比べ、*arg1pgm* 二重突然変異体ではさらに重力屈性能が低下することが報告されていた。本解析でも1G条件下では暗所と及び下側から青色光を照射した両条件下で同様の結果が得られた(図3)。一方、低速遠心機を用いた25G条件下では、*arg1pgm* 二重突然変異体の根の重力屈性の欠損は、*arg1* 突然変異体の重力屈性と同程度にまで回復することを見出した(図3)。したがって、*ARG1* はアミロプラストの沈降 (*PGM* 経路) の下流で機能する可能性もあることが示唆された。これらの解析結果から、低速遠心機は、重力屈性異常突然変異の多重突然変異体の重力屈性能を評価する上で有用であると考えられた。

(2) *enhancer of arg1 pgm* 突然変異の単離

上述した解析結果より、過重力環境下では *arg1 pgm* 二重突然変異体に残存している重

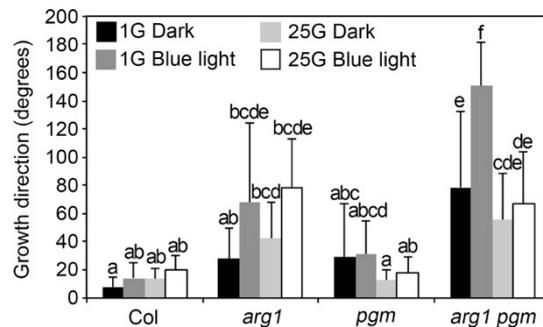


図3 *arg1 pgm* 二重突然変異体の根の重力屈性に対する過重力 (25G) の影響

播種したプレートを、静置 (1G)、あるいは低速遠心機 (25G) に置き、暗所 (Dark)、あるいは下側から青色光を照射して (Blue light)、発芽させた時の、7日齢の芽生えの根の伸長方向を示した。0°が重力方向、あるいは遠心力の方向を、180°が重力、あるいは遠心力の方向の逆方向を表している。Tukeyの多重検定で有意な差異 ($P < 0.01$) が認められた値を異なる英字で、標準偏差をバーで示した。

表 1 EMS 処理した *arg1 pgm* 二重突然変異体の M_2 、及び M_3 個体をスクリーニングした結果

スクリーニングした M_2 個体の数	5831
選抜した M_2 個体の数	204
M_3 種子を採取できた選抜した M_2 個体の数	135
M_3 個体をスクリーニングした系統数	101
M_3 個体で重力屈性の低下が認められた系統数	4

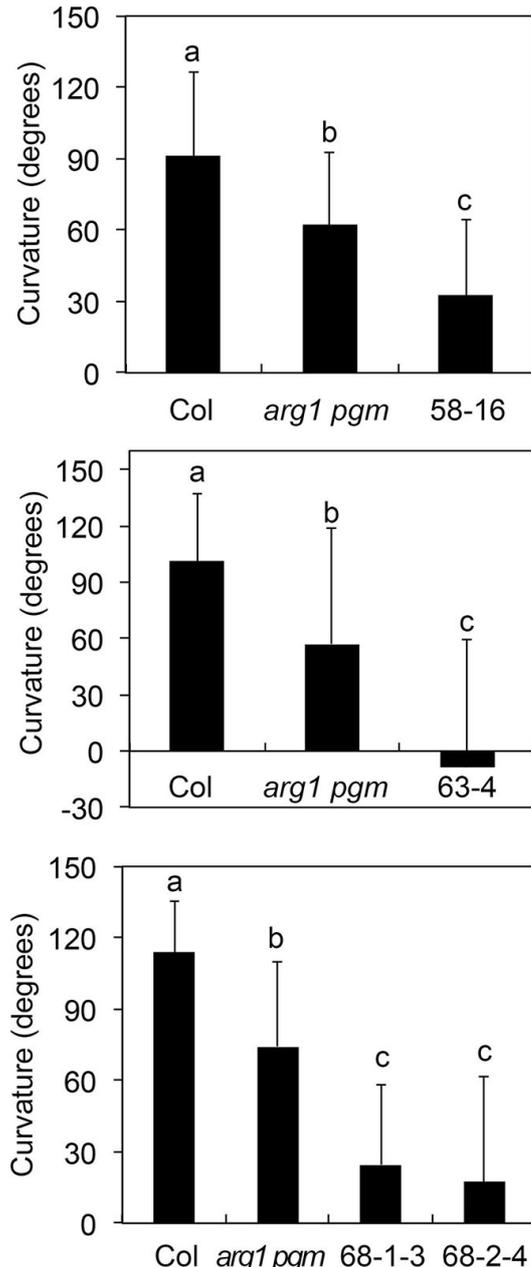


図 4 選抜した 4 系統の根の屈曲角度

5 日齢の芽生えを、根が水平になるように移植し、過重力条件下 (25G) で下側から青色光を照射し、2 日間生育させた後の根の屈曲角度を測定した。遠心力の方向に屈曲した場合、90°が重力、あるいは遠心力の方向の逆方向を表している。Tukey の多重検定で有意な差異 ($P < 0.01$) が認められた値を異なる英字で、標準偏差をバーで示した。

力応答性を検出できることが示された。そこで、EMS (ethyl methanesulfonate) 処理した *arg1 pgm* 二重突然変異体の M_2 集団をスクリーニングし、*arg1 pgm* 二重突然変異体よりも、さらに重力屈性能を低下させる *enhancer of arg1 pgm* (*enap*) 突然変異を持つ系統の単離を試みた (表 1)。5831 個体の M_2 の芽生えをスクリーニングし、135 個体の M_2 個体を選抜し、採種した。それらのうち 101 系統の M_3 個体を解析し、25G 環境下での重力屈性による根の屈曲角度が、*arg1 pgm* 二重突然変異体の根の屈曲角度よりも小さい 4 系統を見出した (図 4)。

今後、*arg1 pgm* 二重突然変異体の重力屈性能をさらに低下させる突然変異の中で新規な重力屈性突然変異 (*enap*) を見出すために、ラフマッピングを行う必要がある。本解析で用いている *arg1 pgm* 二重突然変異体の遺伝背景は Columbia (Col) である。Ler では Col との間で DNA 多型マーカーを作出するための塩基配列の差異の情報が充実しているので、*arg1* と *pgm* の Ler のアレル突然変異である *rhg* (*root hypocotyl gravitropism*) と *stfl* (*starch free1*) の二重突然変異体を作成し、得られた突然変異体とを交配した。今後、 F_2 集団を用いてラフマッピングを行い、突然変異遺伝子の座上染色体を特定する。そして、近傍に既知の重力屈性が異常な突然変異体の突然変異原因遺伝子があれば、その遺伝子の塩基配列を決定し、得られた突然変異が新規の突然変異であるかを検討し、注目して解析すべき新規の重力屈性異常突然変異を特定する。そして、新規の重力屈性異常突然変異に注目した解析を展開することにより、植物の重力応答に関する新しい知見が得られると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

(1) GNOM regulates root hydrotropism and phototropism independently of PIN-mediated auxin transport. Moriwaki T, Miyazawa Y, Fujii N, Takahashi H. Plant Science, 査読有, 215-216, 2014, 141-149
DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.11.002

(2) MIZ1-regulated hydrotropism functions in the growth and survival of Arabidopsis thaliana under natural conditions. Iwata S, Miyazawa Y, Fujii N, Takahashi H. Ann Bot., 査読有, 112, 2013, 103-114
DOI: 10.1093/aob/mct098

(3) Overexpression of MIZU-KUSSEII enhances root hydrotropic response by retaining cell viability under hydrostimulated condition in Arabidopsis thaliana. Miyazawa Y, Moriwaki T,

Uchida M, Kobayashi A, Fujii N, Takahashi H. *Plant Cell Physiology*, 査読有, 53, 2012, 1926-1933
DOI: 10.1093/pcp/pcs129

(4) A possible involvement of autophagy in amyloplast degradation in columella cells during hydrotropic response of *Arabidopsis* roots. Nakayama M, Kaneko Y, Miyazawa Y, Fujii N, Higashitani N, Wada S, Ishida H, Yoshimoto K, Shirasu K, Yamada K, Nishimura M, Takahashi H. *Planta*, 査読有, 236, 2012, 999-1012
DOI: 10.1007/s00425-012-1655-5

(5) Light and abscisic acid signalling are integrated by *MIZ1* gene expression and regulate hydrotropic response in roots of *Arabidopsis thaliana*. Moriwaki T, Miyazawa Y, Fujii N, Takahashi H. *Plant Cell Environment*, 査読有, 35, 2012, 1359-1368
DOI: 10.1111/j.1365-3040.2012.02493.x

(6) *MIZ1*, an essential protein for root hydrotropism, is associated with the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum membrane in *Arabidopsis* root cells. Yamazaki T, Miyazawa Y, Kobayashi A, Moriwaki T, Fujii N, Takahashi H. *FEBS Letter*, 査読有, 586, 2012, 398-402
DOI: 10.1016/j.febslet.2012.01.008

(7) Gravistimulation changes the accumulation pattern of CsPIN1 auxin efflux facilitator in the endodermis of the transition zone in cucumber seedlings. Watanabe C, Fujii N, Yanai K, Hotta T, Kim D-H, Kamada Motoshi, Sasagawa-Saito Y, Nishimura T, Koshiha T, Miyazawa Y, Kim K-M, Takahashi H. *Plant Physiology*, 査読有, 2012, 158, 239-251
DOI: 10.1104/pp.111.188615

〔学会発表〕(計8件)

① 藤井伸治、山川あゆみ、菅村裕子、宮沢豊、山下雅道、高橋秀幸、過重力条件を利用したシロイヌナズナの *arg1 pgm* 二重突然変異体の重力屈性を低下させる突然変異 (*enhancer of arg1 pgm*) の単離、第56回日本植物生理学会年会、2015年3月16~3月18日、東京農業大学(東京都世田谷区)

② 藤井伸治、山崎千秋、宮沢豊、鎌田源司、笠原春夫、長田郁子、嶋津徹、伏島康男、東端晃、山崎丘、石岡憲昭、高橋秀幸、キュウリ芽生えの重力形態形成の制御機構、第29回宇宙環境利用シンポジウム、2015年1月24日~1月25日、宇宙航空研究開発機構(神奈川県相模原市)

③ 藤井伸治、山川あゆみ、菅村裕子、宮沢豊、山下雅道、高橋秀幸、シロイヌナズナの *arg1 pgm* 二重突然変異体に残存した重力屈性を低下させる *enhancer of arg1 pgm* 突然変異体の単離、東北植物学会第4回大会、2014

年12月13日~12月14日、山形大学(山形県山形市)

④ 藤井伸治、山川あゆみ、菅村裕子、宮沢豊、山下雅道、高橋秀幸、シロイヌナズナの *arg1 pgm* 二重突然変異体の重力屈性を低下させる突然変異の単離、日本宇宙生物科学会第28回大会2014年9月22日~9月23日、大阪府立大学(大阪府堺市)

⑤ 藤井伸治、山川あゆみ、宮沢豊、山下雅道、高橋秀幸、シロイヌナズナの *pgm arg1* 二重突然変異体を利用した新規重力屈性突然変異の単離の試み、日本宇宙生物科学会第27回大会2014年9月27日~9月28日、筑波大学(茨城県つくば市)

⑥ 藤井伸治、山崎千秋、宮沢豊、鎌田源司、笠原春夫、長田郁子、嶋津徹、伏島康男、東端晃、山崎丘、石岡憲昭、高橋秀幸、キュウリ内皮細胞における CsPIN1 オーキシン排出キャリアの局在変化の重力応答性、東北植物学会第3回大会2013年12月14日~12月15日、カレッジプラザ(秋田県秋田市)

⑦ Nobuharu Fujii, Chiaki Yamazaki, Yutaka Miyazawa, Motoshi Kamada, Haruo Kasahara, Ikuko Osada, Toru Shimazu, Yasuo Fusejima, Akira Higashibata, Takashi Yamazaki, Noriaki Ishioka, Hideyuki Takahashi, Gravitropism Induces Re-Localization of an Auxin Efflux Carrier, CsPIN1, during Gravitropism of Cucumber Seedlings, 34th Annual Meeting International Gravitational Physiology 2013, June 23 - 28, TOYOHASHI ARTS THEATRE PLAT (Toyohashi, Ehime)

⑧ 藤井伸治、山川あゆみ、千葉元子、宮沢豊、山下雅道、高橋秀幸、シロイヌナズナの多重突然変異体を用いた重力感受・応答に機能する新規分子の探索、日本宇宙生物科学会第26回大会、2013年9月27日~9月29日、阿波観光ホテル(徳島県徳島市)

〔図書〕(計1件)

(1) The role of auxin transport and distribution in plant gravimorphogenesis. Yamazaki C, Fujii N, Takahashi H. In: *Polar Auxin Transport* (eds by R. Chen, F. Baluska), Springer, 2013, pp. 179-199.

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 伸治 (FUJII NOBUHARU)

東北大学・大学院生命科学研究所・准教授

研究者番号: 70272002