

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 5 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25514006

研究課題名(和文)植物の抗重力反応における細胞膜ダイナミクスの解明

研究課題名(英文)Cell membrane dynamics in gravity resistance of plants

研究代表者

保尊 隆享 (HOSON, Takayuki)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70135771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の抗重力反応における細胞膜の機能を解明するため、主要成分であるメカノレセプター、膜ラフト、プロトンポンプ、セルロース合成酵素複合体などについて、関連遺伝子の発現解析、可視化による動態解析、並びにT-DNA挿入ラインを用いた機能解析を行った。その結果、重力刺激を受けた植物細胞では、多くの細胞膜成分の合成・生成が遺伝子発現を介して促進されること、それらの成分は細胞膜上に集合体を形成すること、そしてその形成と働きが正常な抗重力反応に必要であることが明らかになった。以上の成果は、植物の抗重力反応機構の理解に大きく寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：The role of the cell membrane in gravity resistance of plants was examined by analyzing gene expression, microscopic dynamics, and physiological functions of major components, mechanoreceptors, membrane rafts, proton pumps, and cellulose synthases. The expression of many genes related to these components was up-regulated and the formation of membrane particles consisting of these components was stimulated, in response to gravity stimulus, which was shown to be necessary for gravity resistance. These results may greatly contribute to our understanding of the mechanism of gravity resistance in plants.

研究分野：植物機能生物学

キーワード：抗重力反応 細胞膜 植物 メカノレセプター 膜ラフト プロトンポンプ セルロース合成酵素

1. 研究開始当初の背景

植物が地球上で効率的に生命活動を営むためには、1 g の重力に抵抗、対抗する必要がある。特に、約 5 億年前に植物の祖先が海から陸上に進出し、陸上植物として多様に進化、繁栄する上では、重力に抵抗するしくみの発達が不可欠であったと考えられる。研究代表者は、この反応を抗重力反応 (Gravity resistance) と名付け、その特性とメカニズムについて解析してきた。その結果、抗重力反応の直接的な担い手は、植物体に力学的強度を与える細胞壁であること、また、抗重力反応における細胞壁の機能は、微小管、液胞、ゴルジ体などの細胞内成分によって支えられていることが明らかになった。

細胞膜は、細胞壁と原形質の間に位置しており、細胞壁とそれらの細胞内成分とを構造的に連絡し、機能的に結びつける働きをしている。このような細胞膜の主要構成成分のうち、機械的刺激受容チャネル (メカノレセプター) は、抗重力反応における重力シグナルの受容を担っており、その機能を薬理的に阻害すると抗重力反応も阻害される。植物のメカノレセプターの候補としては、飯田らによってシロイヌナズナで MCA が単離されている。また、膜ラフトは、重力シグナルが細胞内に交換・伝達される過程に深く関わっており、その形成は重力刺激によって促進されると考えられている。一方、プロトンポンプは、植物細胞における物質輸送、pH 調節、及び電位調節の主翼を担っているが、特にプロトンポンプによる細胞壁 pH の調節は、抗重力反応において細胞壁環境を適切に制御する役割を果たしている。さらに、セルロース合成酵素複合体は、プロトンポンプと並んで植物細胞膜上に高密度に存在しており、抗重力反応においては、その活性化によるセルロース合成レベルの上昇が起こることが重要であると示唆されている。

以上のように、細胞膜を構成する主要タンパク質あるいはタンパク質複合体が抗重力反応において重要な働きをすることは、少しずつわかってきた。しかし、得られた情報は断片的であり、それぞれの細胞膜成分が形成され、ダイナミックな活動を通して機能を発揮するに至る複雑なプロセスについて、統一的理解をするのにはほど遠いのが実情であった。また、これらの細胞膜成分間の構造的、機能的な関係については、そもそも重力シグナルなどの環境刺激が少ない静的な状態にある植物細胞においても、ほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

植物の抗重力反応のメカニズムを理解するためには、重力シグナルの受容から、変換・伝達、そして応答にいたる多くの過程において重要な役割を果たしている、細胞膜の機能を総合的に解明する必要がある。本研究は、抗重力反応への関与が示されている主要

な細胞膜タンパク質 (タンパク質複合体) である、メカノレセプター、膜ラフト、プロトンポンプ、セルロース合成酵素複合体を中心に、それぞれの合成・形成、動態、機能について、組織的な解析を行うとともに、それら成分間の相互作用の実態や、各々の働きを統合して実際の反応をもたらすシステムについても理解することを目的とした。そのために、1 g および過重力環境下で生育させたシロイヌナズナ芽ばえを主な試料として、細胞膜成分関連遺伝子の発現解析、それぞれの成分の可視化を通じた動態の細胞学的解析、並びにそれらに関連する T-DNA 挿入ラインを用いた生理学的解析を組み合わせ、抗重力反応における細胞膜ダイナミクスを総合的に解析した。

3. 研究の方法

(1) 植物試料及び重力環境

植物試料として、シロイヌナズナの野生型、プロモーターGUS 形質転換体、GFP ライン、及び T-DNA 挿入ライン (遺伝子欠損系統) を用いた。主に、これらのラインの芽ばえを 1 g 及び過重力条件 (300 g) 下で生育させ、解析に供した。一部の解析では、花茎も試料とした。また、マイクロアレイ解析では、宇宙の微小重力環境で生育した試料のデータも参照した。

(2) 遺伝子発現解析

MCA 遺伝子のプロモーターGUS 形質転換体を作成し、GUS 染色レベルを解析した。また、様々なラインを用いて、DNA マイクロアレイ解析を実施した。

(3) 動態解析

細胞膜タンパク質類の GFP ラインの芽ばえを生育させ、蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡を用いて、その動態について観察した。適切な GFP ラインが得られなかった細胞膜タンパク質については、特異的な抗体を入手し、蛍光抗体法により動態を解析した。

(4) 機能解析

T-DNA 挿入ライン (遺伝子欠損系統) の芽ばえを生育させ、成長形質及び細胞壁の特性の解析により、抗重力反応能力を評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞膜成分の合成・形成

抗重力反応におけるメカノレセプターの機能を明らかにするため、候補遺伝子である MCA1 及び MCA2 のプロモーターGUS 形質転換体を作成し、両遺伝子の発現に対する重力刺激の影響について詳細に解析した。MCA 遺伝子の発現は茎頂、茎根遷移部、並びに根端において高く、成長に伴って低下した。両形質転換体の芽ばえを 1 g 及び 300 g 条件下で生育させて、GUS 染色のレベルを比較したところ、過重力環境下では濃く染色されてい

た。過重力環境下での染色レベルの経時変化を調べると、生育後でも処理開始前とほぼ同程度であり、過重力環境下では *MCA* 遺伝子の発現レベルが高く維持されていることがわかった。このような過重力環境下での GUS 染色レベルの上昇は、特に *MCA2* で顕著であった。

MCA 遺伝子の発現レベルの維持が様々な機械的刺激により一般的に引き起こされかどうかを調べるため、接触刺激や高浸透圧刺激を与えて解析したところ、これらの条件下では、*MCA* 遺伝子の発現は対照と同様に成長に伴って低下した。一方、メカノレセプターの阻害剤であるガドリニウムイオンで処理をした芽ばえでは、過重力環境下でも 1 g 環境と同様に *MCA* 遺伝子発現の低下が見られた。これらの結果より、メカノレセプターを介した *MCA* 遺伝子の発現調節が抗重力反応における重力応答に特異的に関与していることが示された。

細胞膜成分の形成・代謝、あるいは機能に関わる遺伝子群の発現に対する重力刺激の影響を明らかにするため、DNA マイクロアレイ解析を実施した。*MCA* 遺伝子の発現は、芽ばえの成長に伴って低下したが、過重力環境下では高く維持されており、プロモーター GUS 解析の結果が支持された。また、膜ラフト構成タンパク質及びその合成に関わるタンパク質、セルロース合成酵素複合体、そして後述の AGP 及び FAD の主要なメンバーをコードする遺伝子の発現が過重力環境下では上昇する傾向が見られた。一方、宇宙の微小重力環境で生育したシロイヌナズナのマイクロアレイ解析の結果を見ると、これらの遺伝子の多くでは発現レベルが低下しており、上述の細胞膜成分の抗重力反応への関与が支持された。これに対して、プロトンポンプ遺伝子群の発現は、過重力環境及び微小重力環境下でも比較的安定であった。抗重力反応におけるプロトンポンプの機能は、遺伝子発現レベル以外の過程で制御されていることが示唆された。

マイクロアレイ解析により、細胞膜成分間の相互作用を示唆するデータも得られた。*MCA* 遺伝子の欠損系統では、膜ラフト及びセルロース合成酵素関連遺伝子の発現レベルが低下する傾向が見られた。また、膜ラフトの構成成分であるステロール合成に関わる *HMG* 遺伝子の欠損系統では、膜ラフト構成タンパク質に加えて、セルロース合成酵素関連遺伝子の主要メンバーの発現レベルが低下していた。一方、プロトンポンプ遺伝子群の発現は、いずれの欠損体でも比較的安定であった。

(2) 細胞膜成分の動態

抗重力反応に関わる細胞膜成分のうち、膜ラフトの構成タンパク質に関する GFP ラインを用いて、その動態解析を行った。GFP 由来のシグナルは、細胞膜上にドット状に認め

られた。このシグナルは、成長前のフック部分の表皮細胞にはほとんど存在せず、胚軸上部の成長部域では、成長が停止した中央部や基部の細胞と比べて、より多く見られた。このようなドットの分布の特徴は、芽ばえが長く成長した後でも維持されていた。さらに、過重力環境下で生育させた芽ばえ表皮細胞では、対照と比べてドットが大きく、より高密度に分布していた。

この GFP ラインを用いて得られた結果が膜ラフト全体の動態と一致するかを確認するため、膜ラフトを構成する脂質やタンパク質を標的とする数種類の蛍光標識方法について比較、検討した。その結果、フロチリン抗体を用いることにより、GFP ラインと同様に、細胞膜上のドット状のシグナルを安定的かつ効率的に観察できることがわかった。そして、この方法で得られた解析結果は、GFP ライン、あるいは、膜ラフト全体をより広く染色すると考えられるフィリピンやコブラ毒素を用いて得られた知見とよく一致しており、膜ラフトの動態を反映していることが明らかになった。

抗重力反応における膜ラフトの動態について、シロイヌナズナより細胞が大きく観察が容易なアズキ上胚軸を用いて詳細な解析を行った。抗体染色によって膜ラフト分布に対する過重力の影響を解析した結果、膜ラフトが成長部域の細胞に多く分布し、その形成が過重力によって促進されることが確認できた。シロイヌナズナ胚軸を用いて得られた結果とあわせて、膜ラフトが重力環境に応じてその動態を変化させ、抗重力反応における重力シグナルの変換・伝達に深く関与することが明らかになった。

膜ラフト以外の細胞膜成分に関しては、解析に有効な GFP ラインが得られなかった。そこで、それぞれに特異的な抗体を入手し、動態解析を行った。その結果、過重力環境下では、膜ラフトと同様に、他の成分の集合体の形成も促進されることを示唆するデータが得られた。

(3) 細胞膜成分の機能

抗重力反応における *MCA* の機能を明らかにするため、2つの *MCA* 遺伝子の欠損系統の芽ばえの成長に対する過重力の影響をメカノレセプター阻害剤存在下で調べた。*MCA* 欠損系統では過重力に対する感受性が半減していたが、ガドリニウムイオンの共存によりさらに低下することがわかった。すなわち、*MCA* 遺伝子は抗重力反応における重力シグナルの受容において重要な役割を果たしているが、他にもメカノレセプター様のタンパク質が存在する可能性が示唆された。また、イネ芽ばえを用いて同様の解析を行った結果、特に根において、メカノレセプターが抗重力反応における重力シグナルの受容に広く関わっていることが示された。

一方、膜ラフト形成に関わる *HMG* 遺伝子

の欠損系統を用いて、抗重力反応における膜ラフトの機能を検証した。HMG 欠損系統の成長は、1 g 下で既に抑制されていた。また、過重力条件下で生育させたところ、抗重力反応における特徴的な反応である、胚軸の肥大成長や細胞壁多糖の蓄積が十分に起こらないことが明らかになった。これらの結果より、抗重力反応において膜ラフトが重要な機能を果たしていることが支持された。

以上とは別に、純系 T-DNA 挿入ラインを用いて、抗重力反応に関わる遺伝子の網羅的スクリーニングも行った。抗重力反応を表す成長形質や細胞壁物性を指標とした解析の結果、MCA や HMG、あるいはセルロース合成酵素のような既知の細胞膜成分関連遺伝子に加えて、細胞膜と細胞壁の境界に存在するアラビノガラクトタンパク質 (AGP)、及び細胞膜成分である脂肪酸の代謝に関わる脂肪酸不飽和化酵素(FAD)をコードする遺伝子が、抗重力反応において重要な役割を果たしていることが明らかになった。特に、AGP 遺伝子群の中の AGP8、AGP24、AGP40、並びに FAD 遺伝子群の中の FAD8 の T-DNA 挿入ラインは、1 g 下でも抗重力能力が低く、さらに重力刺激を受けても正常な抗重力反応を示さなかった。

(4) 成果と展望

本研究の結果、重力刺激を受けた植物細胞では、メカノレセプター、膜ラフト、セルロース合成酵素複合体などの主要な細胞膜成分の合成・生成が、遺伝子発現を介して促進されること、それらは細胞膜上に集合体を形成すること、そしてその形成と活動が正常な抗重力反応に必要であること、が明らかになった。このような成果は、植物の抗重力反応機構の解明に大きく寄与するものであるといえる。一方、本研究において、細胞膜の複数の成分が集合体(クラスター)を形成することが示唆されたが、GFP を用いた解析では、解像度の点でその動態を解明するのに限界があった。本研究における解析により、各成分を認識する抗体が有効に利用できることがわかったので、今後、免疫電顕等による詳細な解析を実施したい。

細胞膜成分から構成されるクラスターは、抗重力反応以外にも、植物の様々な生理機能を支える役割を果たしていると予想される。その実態についても、ぜひ解明して行きたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Mabuchi A, Soga K, Wakabayashi K, Hoson T (2016) Phenotypic screening of Arabidopsis T-DNA insertion lines for cell wall mechanical properties revealed *ANTHOCYANINLESS2*, a cell wall-related gene. *J. Plant Physiol.* 191: 29-35. 査読有 . DOI: 10.1016/j.jplph.2015.11.011

Hoson T, Wakabayashi K (2015) Role of the plant cell wall in gravity resistance. *Phytochemistry* 112: 84-90. 査読有 . DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.08.022

Kittang Jost A-I, Hoson T, Iversen T-H (2015) The utilization of plant facilities on the international space station - The composition, growth, and development of plant cell walls under microgravity conditions. *Plants* 4: 44-62. 査読有 . DOI: 10.3390/plants4010044

Hoson T (2014) Plant growth and morphogenesis under different gravity conditions: Relevance to plant life in space. *Life* 4: 205-216. 査読有 . DOI: 10.3390/life4020205

Hoson T, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T, Karahara I, Yano S, Tanigaki F, Shimazu T, Kasahara H, Masuda D, Kamisaka S (2014) Growth stimulation in inflorescences of an Arabidopsis tubulin mutant under microgravity conditions in space. *Plant Biol.* 16 (S1): 91-96. 査読有 . DOI: 10.1111/plb.12099

〔学会発表〕(計 13 件)

馬淵敦士、細胞壁物性の制御における ANL2 の役割 . 平成 27 年度近畿植物学会講演会、2015 年 11 月 7 日、大阪市立大学理学部附属植物園 (大阪府交野市)

馬淵敦士、細胞壁物性を指標としたシロイヌナズナの抗重力反応関連遺伝子の探索 . 日本宇宙生物科学会第 29 回大会、2015 年 9 月 26 ~ 27 日、帝京大学医学部 (東京都板橋区)

村上愛、MAP65 と BPP1 を介した重力によるシロイヌナズナ表層微小管の配向制御 . 日本宇宙生物科学会第 29 回大会、2015 年 9 月 26 ~ 27 日、帝京大学医学部 (東京都板橋区)

谷村佑介、きぼう実験棟の微小重力環境におけるシロイヌナズナ・チューブリン変異体花茎の成長と細胞壁物性 . 日本宇宙生物科学会第 29 回大会、2015 年 9 月 26 ~ 27 日、帝京大学医学部 (東京都板橋区)

谷村佑介、シロイヌナズナ・チューブリン変異体花茎の細胞壁物性に対する微小重力の影響 - Resist Tubule 宇宙実験 . 日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 6 ~ 8 日、新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)

保尊隆享、宇宙実験による植物の抗重力反応機構の解明 . 第 29 回宇宙環境利用シンポジウム、2015 年 1 月 24 ~ 25 日、宇宙科学研究所 (神奈川県相模原市)

池井戸 耀介、植物細胞における膜ラフトの可視化と重力反応解析．日本宇宙生物科学会第 28 回大会、2014 年 9 月 22～23 日、大阪府立大学（大阪府堺市）

村上 愛、微小重力環境におけるシロイヌナズナ胚軸の表層微小管動態 - Resist Tubule 宇宙実験．日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12～14 日、明治大学（神奈川県川崎市）

保尊 隆享、植物の抗重力反応機構．平成 25 年度近畿植物学会講演会、2013 年 12 月 7 日、帝塚山大学（奈良県奈良市）

村上 愛、シロイヌナズナ胚軸における表層微小管動態に対する微小重力の影響 - Resist Tubule 宇宙実験．日本宇宙生物科学会第 27 回大会、2013 年 9 月 27～28 日、筑波大学（茨城県つくば市）

加藤 志朋、シロイヌナズナ胚軸における表層微小管配向と細胞成長 - Resist Tubule 宇宙実験．日本宇宙生物科学会第 27 回大会、2013 年 9 月 27～28 日、筑波大学（茨城県つくば市）

保尊 隆享、植物の抗重力反応．日本農芸化学会関西支部講演会・シンポジウム、2013 年 7 月 6 日、大阪府立大学（大阪府堺市）

Hoson T, Understanding the mechanism of gravity resistance in plants by the Resist Tubule space experiment. 34th Annual International Gravitational Physiology Meeting, June 23-28, 2013, Toyohashi Art Center (Toyohashi, Aichi)

〔図書〕(計 1 件)

Soga K, Yano S, Matsumoto S, Hoson T (2015) Hypergravity experiments to evaluate gravity resistance mechanisms in plants. In Plant Gravitropism: Methods and Protocols (Ed. Blancaflor EB). Methods Mol. Biol., Springer, p. 307-319. DOI: 10.1007/978-1-4939-2697-8_21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保尊 隆享 (HOSON, Takayuki)
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：7 0 1 3 5 7 7 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

飯田 秀利 (IIDA, Hidetoshi)
東京学芸大学・教育学部・教授
研究者番号：7 0 1 2 4 4 3 5

村中 俊哉 (MURANAKA, Toshiya)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：6 0 3 4 2 8 6 2

(4) 研究協力者

馬淵 敦士 (MABUCHI, Atsushi)
大阪市立大学・大学院理学研究科・後期博士課程学生

池井戸 耀介 (IKEIDO, Yosuke)
大阪市立大学・大学院理学研究科・前期博士課程学生

村上 愛 (MURAKAMI, Mana)
大阪市立大学・大学院理学研究科・前期博士課程学生

加藤 志朋 (KATO, Shiho)
大阪市立大学・大学院理学研究科・前期博士課程学生

中島 庸平 (NAKAJIMA, Yohei)
大阪市立大学・大学院理学研究科・前期博士課程学生

谷村 佑介 (TANIMURA, Yusuke)
大阪市立大学・大学院理学研究科・前期博士課程学生

藤多 彩加 (FUJITA, Sayaka)
大阪市立大学・理学部・学生