

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506017

研究課題名(和文) エチレンシグナリングを介した植物の重力応答反応の解析

研究課題名(英文) Role of ethylene signaling in the regulation of gravity responses in plants

研究代表者

若林 和幸 (Wakabayashi, Kazuyuki)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10220831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物が重力環境の変化に应答する過程におけるエチレンシグナリングの関与について検討した。黄化イネ芽生えを遠心過重力環境下で生育させると、1g対照に比べてエチレン生成量が増加することが示された。シュートにおける遺伝子発現を調べたところ、過重力条件下で発現レベルが変化する遺伝子が230個程度見いだされ、発現が増加するものにはエチレン合成に関わる複数の酵素遺伝子が含まれていた。一方、過重力下での生理形質の変化として、シュートでは伸長が抑制され肥大が促進されることで成長方向の変化が誘導されたが、この過程にはエチレンシグナリングは関与していないことが示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, I investigated the role of ethylene signaling in the modification of plant growth and development in response to alterations of the magnitude of gravitational force. When etiolated rice seedlings were grown under hypergravity conditions, the ethylene production of seedlings was promoted as compared to that grown at 1 g. The analysis of gene expression levels in shoots showed that there were about 230 genes whose expression levels were changed substantially under hypergravity conditions. Hypergravity increased the expression levels of some genes involved in the ethylene biosynthesis. On the other hand, hypergravity suppressed elongation growth and promoted lateral growth of rice shoots. The obtained data suggest that the ethylene signaling is not directly involved in the modification of growth anisotropy induced by hypergravity.

研究分野：植物機能科学

キーワード：重力 イネ エチレン 過重力 成長

## 1. 研究開始当初の背景

植物は重力の方向性だけでなくその大きさを感知しており、重力の大きさの変化に応じて様々な代謝過程を調節し、成長や形態などを柔軟に変化させる。刺激を受容して応答反応が起こる過程では、何らかの因子(メディエーター)が受容と応答反応の間を介在すると考えられており、植物でのメディエーターとしては、植物ホルモンが重要な役割を担っていることが示されている。これまでに、重力の大きさに対する応答反応でも、オーキシンがメディエーターとして機能することが示されている( )。しかし、重力変化に対して植物が示す反応が、全て一つの植物ホルモンによって介在されているとは考えにくく、オーキシン以外の植物ホルモンの関与が考えられているが、いまだ明らかになっていない。

植物ホルモンの1つであるエチレンは、ガス状の化合物で、多くの植物種で伸長成長を抑制し肥大を促進する働きや、葉などの器官の老化促進(緑葉の黄化促進)、果実の成熟促進など様々な生理作用を持っている。植物が風や接触などの物理的な刺激を受けるとエチレンが生成し、それにより植物体は背丈が低くがっしりした形態になる。さらに、生化学的作用として、セルラーゼやポリガラクトツロナーゼなどの細胞壁代謝に関わる酵素類やフェノール化合物の重合に関わるペルオキシダーゼなどの酵素の合成を誘導する働きを持つことが知られている。

植物を1gよりも大きい重力環境(過重力環境)下で生育させると、茎の伸長成長が抑制されて肥大が促進されることや( )、細胞壁に含まれるペルオキシダーゼ活性が上昇すること、イネ科植物では細胞壁中の重合型フェノール化合物量が増加することが示されており( )、エチレンの生理作用と類似した現象が見られる。これらの結果や知見から、重力環境が変化する際の応答反応において、エチレンがメディエーターとして働いている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物が重力環境の変化に応答する過程におけるエチレンシグナリングの関与(役割)を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、(1)過重力環境下で生育させた植物でのエチレン生成量の分析と、(2)過重力下で生育させた植物あるいは薬剤処理によりエチレン生成を増加させた植物を用いて、遺伝子発現プロファイルの解析を行った。

植物材料には、イネ(*Oryza sativa* L., cv. Koshihikari)芽生えを用いた。イネ種子を次亜塩素酸ナトリウム溶液中で滅菌した後、吸水させた。吸水種子を、ファルコンチューブ内の寒天培地上に播種した後、暗所、25で生育させた。一定の培養時間や各種処理の終了後に容器から芽生えを取り出し、シュートを切り出した後、その長さとし重量を測定した。

過重力処理は、遠心分離器を用いて行った。上記の方法で播種、生育させた芽生えを、ファルコンチューブごと遠心分離器にセットし、暗所、300gの遠心過重力下で生育させた。

植物体から発生したエチレンの定量は、FID検出器を装着したガスクロマトグラフィー装置で行った。培養あるいは処理の終了後に、培養容器内の気体の一部を採取して、ガスクロマトグラフィーに導入して分析した。過重力処理の場合は、遠心分離機を停止した直後に気体を採取した。

エチレンの生成量は、薬剤(アミノシクロプロパンカルボン酸、ACC)を与えると増大することが知られている。本実験では、ACCを加えた培地で生育させた芽生えの成長、エチレン生成量についても分析を行った(ACC処理、10 μM)。

遺伝子発現解析は、過重力処理あるいはACC処理を行った芽生えから切り出したシュートを用いて、cDNAマイクロアレイ法により行った。

## 4. 研究成果

### エチレン生成

播種後2日間1g環境で発芽・生育させた芽生えを遠心分離器に移して、3日間連続過重力環境下で生育させた時のエチレン生成量を測定したところ、対照(5日間1g条件)と比べて、エチレン量が10~20%増加していた。さらに、播種後3日間1g環境で発芽・生育させた芽生えを用いて、3日目から4日目の1日間過重力処理を行った場合でも、対照と比べて20数%のエチレン量の増加がみられた。一方、ACCを含んだ寒天培地で4日間生育させた芽生えでは、容器内に含まれる

エチレン量が、対照(-ACC)と比べて40~50%増加していた。植物体中のエチレン生合成系では、ACCはエチレンの直接の前駆物質であり、エチレンの生成量はACCレベルに依存することが報告されている( )。これらの結果から、黄化イネ芽生えでは、過重力によってエチレン生成が増加し、処理開始後の比較的早い時期から、生成が促進されると考えられる。また、過重力下でのエチレン生成の増加には、ACC量の増加が関係する可能性が考えられる。

#### 遺伝子発現

遺伝子発現プロファイルの分析には、播種後4日間生育させた芽生えのシュートを用いた。過重力処理は、3日目から4日目の1日間行った。また、ACC処理試料は、ACCを含む培地に播種して4日間生育させたものを用いた。

cDNAマイクロアレイ法により、それぞれのシュートにおける遺伝子発現を調べたところ、対照と比べて過重力条件下で発現レベルが大きく変化する遺伝子が230個程度見いだされた。それらの内、増加するものが約130、逆に、減少するものが100程度あった。これらの中には、オキシゲナーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、メチルトランスフェラーゼなどの代謝過程に関わる酵素遺伝子が含まれていた。

次に、エチレン生成に関係する遺伝子の発現レベルを調べたところ、エチレンの直接の前駆物質であるACCの合成に関わるACC合成酵素遺伝子の発現レベルが、過重力条件下で大きく増加していることが示された。さらに、ACCからエチレンを生成する過程は、ACC酸化酵素によって触媒されるが( )このACC酸化酵素遺伝子の一部も、過重力処理により発現レベルが大きく増加していた。これらの結果から、過重力条件下では、ACC合成酵素とACC酸化酵素の両者の活性が増加して、ACCの生成とACCからエチレンへの変換の両方の過程が促進されることで、エチレン生成量が増加すると考えられる。

一方、ACC処理では、対照と比べて発現レベルが大きく変化する遺伝子が100個程度あり、増加するもの減少するものが、それぞれ50程度あった。エチレン生成に関係する遺伝子では、ACC処理は、ACC合成酵素遺伝子の発現レベルには影響しなかった。ACC酸化酵素遺伝子の一部は、ACC処理により発現レベルが僅かに増加していた。従って、ACCは、エチレン生成系の遺伝子の発現には影響し

ないと考えられる。

次に、過重力処理とACC処理のそれぞれで発現レベルが大きく変化した遺伝子を比較したところ、両処理で共通した変化を示した遺伝子が、10個程度見つかった。それらの中には、細胞壁の構築や代謝に関わる酵素が含まれていた。これまでの研究で、植物を過重力環境下で生育させると、茎細胞壁の構造が変化することが示されていることから( )過重力下での細胞壁構造の変化には、エチレンシグナリングを介した、細胞壁関連酵素遺伝子の発現変化が関係している可能性が考えられる。

#### 成長調節

これまでの研究から、過重力環境下で植物を生育させると、茎では伸長が抑制される一方、肥大が促進されることで、成長の方向性が変化することが報告されている( )。そこで、この成長方向の変化におけるエチレンシグナリングの関与について検討した。

過重力下でイネ芽生えを生育させると、処理期間に関わらずシュートの伸長は大きく抑制された。一方、シュートの生重量は、3日間の過重力処理では対照と比べて若干低下していたが、1日間の処理では差は見られなかった。生重量をシュート長で割った値はシュートの太さを表し、この値は過重力処理によって増加した。従って、過重力下ではシュートが肥大し、成長の方向性が変化することが確認された。次に、ACCの影響を調べたところ、シュートの長さとし重量はACC処理によって共に増加しており、生重量をシュート長で割った値は対照と同じであった。従って、ACC処理はイネシュートの伸長抑制や肥大を誘導しないことが示された。

過重力による茎の肥大促進は、個々の細胞が肥大(横方向に拡大)することで起こり、この細胞肥大には、細胞表層微小管の配向変化が関係することが示されている( )。さらに、過重力による表層微小管の配向変化には、微小管結合タンパク質の1つであるMAP65が関係しており、過重力処理によりMAP65遺伝子の発現が減少することが報告されている( )。そこで、イネシュートでの発現を調べたところ、過重力処理により幾つかのMAP65遺伝子の発現レベルが減少していた。一方、ACC処理は、減少が見られたMAP65遺伝子の発現には影響しなかった。以上の結果から、過重力によるイネシュートの伸長抑制と肥大促進の過程には、エチレンシグナリングは関与していないことが示された。

<引用文献>

Takahashi H, Fujii N, Kamada M, Higashibata A, Yamazaki Y, et al. (2000) Biol Sci Space 14, 64-74

Miyamoto K, Uheda E, Oka M, Ueda J (2011) Biol Sci Space 25, 57-68

Hoson T, Soga K (2003) Int Rev Cytol 229, 209-244

Wakabayashi K, Soga K, Hoson T (2009) Biol Sci Space 23, 137-142

Pech J-C, Bouzayen M, Latché A (2004) In: Davies PJ (ed) Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action ! Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 115-136

Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T (2006) Plant 224, 1485-1494

Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Hoson T (2012) Acta Physiol Planta 34, 533-540

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

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

Hoson T, Wakabayashi K. (2015) Role of the plant cell wall in gravity resistance. Phytochemistry 112: 84-90 査読有

Hossain MT, Soga K, Wakabayashi K, Hoson T. (2015) Lead toxicity reduces growth and cell wall extensibility in rice seedlings. Bangladesh J Bot 44: 333-336 査読有

Wakabayashi K, Soga K, Hoson T, Kotake T, Yamazaki T, Higashibata A, Ishioka N, Shimazu T, Fukui K, Osada I, Kasahara H, Kamada M. (2015) Suppression of hydroxycinnamate network formation in cell walls of rice shoots grown under microgravity conditions in space. PLOS ONE doi:10.1371/journal.pone.0137992 査読有

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

Murakami M, Soga K, Kotake T, Kato T, Hashimoto T, Wakabayashi K, Hoson T. (2016) Roles of MAP65-1 and BPP1 in gravity resistance of *Arabidopsis* hypocotyls. Biol Sci Space 30: 1-7 査読有

〔学会発表〕(計18件)

長尾美和、小糸和子、曾我康一、若林和幸、益田晴恵、下中智美、保尊隆享、Pbによるシロイヌナズナ芽生えの成長阻害 日本植物学会第78回大会、2014年9月13日、明治大学、川崎市、神奈川県

村上愛、加藤志朋、曾我康一、若林和幸、橋本隆、保尊隆享、微小重力環境下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13日、明治大学、川崎市、神奈川県

池井戸耀介、加藤志朋、柴田華枝、曾我康一、若林和幸、保尊隆享、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25日、大阪府立大学、堺市、大阪府

保尊隆享、加藤志朋、村上愛、曾我康一、若林和幸、橋本博文、長谷川克也、東端晃、矢野幸子、星出彰彦、嶋津徹、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、山崎千秋、鎌田源司、村中俊哉、橋本隆、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25日、JAXA宇宙科学研究所、相模原市、神奈川県

若林和幸、伊豆本和哉、籠谷裕衣、上田将司、益田晴恵、下中智美、曾我康一、保尊隆享、鉛によるイネ幼葉鞘細胞壁の物性変化と成長阻害 日本植物学会第79回大会、2015年9月7日、朱鷺メッセ、新潟市、新潟県

谷村佑介、馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、橋本博文、東端晃、矢野幸子、嶋津徹、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、山崎千秋、鎌田源司、村中俊哉、橋本隆、保尊隆享、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8日、朱鷺メッセ、新潟市、新潟県

村上愛、曾我康一、小竹敬久、加藤壮英、橋本隆、若林和幸、保尊隆享、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日、帝京大学、板橋区、東京都

谷村佑介、馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、橋本博文、東端晃、矢野幸子、嶋津徹、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、山崎千秋、鎌田源司、村中俊哉、橋本隆、保尊隆享、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 日、帝京大学、板橋区、東京都

馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、小竹敬久、保尊隆享、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 日、帝京大学、板橋区、東京都

玉置大介、唐原一郎、西内巧、矢野幸子、谷垣文章、嶋津徹、笠原春夫、榎田大輔、曾我康一、若林和幸、橋本隆、保尊隆享、神阪盛一郎、微小重力環境がシロイヌナズナの花茎におけるトランスクリプトームに与える影響 *lefty* 変異体を用いた解析 日本宇宙生物科学会第 29 回大会、2015 年 9 月 26 日、帝京大学、板橋区、東京都

曾我康一、村上愛、小竹敬久、加藤壮英、橋本隆、鎌田源司、山崎千秋、片平ひとみ、鈴木ひろみ、伏島康夫、嶋津徹、笠原春夫、長田郁子、矢野幸子、若林和幸、保尊隆享、Aniso Tubule 宇宙実験：重力による茎の形態変化における表層微小管と微小管結合タンパク質の役割 日本宇宙生物科学会第 29 回大会、2015 年 9 月 26 日、帝京大学、板橋区、東京都

若林和幸、曾我康一、保尊隆享、小竹敬久、小嶋美紀子、榎原均、東端晃、石岡憲昭、嶋津徹、鎌田源司、宇宙の微小重力環境下で生育したイネシュートの細胞壁変化と内生植物ホルモン量 第 30 回宇宙環境利用シンポジウム、2016 年 1 月 19 日、JAXA 宇宙科学研究所、相模原市、神奈川県

若林和幸、寺澤早紀、上田将司、曾我康一、保尊隆享、水中培養イネシュートの成長と細胞壁組成に対する鉛の影響 日本植物学会第 80 回大会、2016 年 9 月 16 日、沖縄コンベンションセンター、宜野湾市、沖縄県

田邊浩代、乾健一、曾我康一、若林和幸、保尊隆享、アズキ上胚軸表皮細胞におけるアクチンフィラメント動態に対する重力の影響 日本植物学会第 80 回大会、2016 年 9 月 16 日、沖縄コンベンションセンター、宜野湾市、沖縄県

谷村佑介、馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、橋本博文、東端晃、矢野幸子、嶋津徹、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、山崎千秋、鎌田源司、村中俊哉、橋本隆、保尊隆享、シロイ

ヌナズナ花茎の細胞壁物性と多糖組成に対する微小重力の影響 日本宇宙生物科学会第 30 回大会、2016 年 10 月 14 日、愛知医科大学、長久手市、愛知県

田邊浩代、乾健一、曾我康一、若林和幸、保尊隆享、過重力環境におけるアズキ上胚軸表皮細胞のアクチン繊維動態の変化 日本宇宙生物科学会第 30 回大会、2016 年 10 月 14 日、愛知医科大学、長久手市、愛知県

保尊隆享、村上愛、加藤志朋、谷村佑介、馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、橋本博文、山下雅道、長谷川克也、東端晃、矢野幸子、嶋津徹、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、鎌田源司、山崎千秋、村中俊哉、橋本隆、Resist Tubule 宇宙実験による植物の抗重力反応機構の解明-表層微小管の機能 第 31 回宇宙環境利用シンポジウム、2017 年 1 月 16 日、JAXA 宇宙科学研究所、相模原市、神奈川県

若林和幸、曾我康一、保尊隆享、小竹敬久、小嶋美紀子、榎原均、山崎丘、東端晃、石岡憲昭、嶋津徹、鎌田源司、宇宙の微小重力環境下で生育したイネシュートの成長と植物ホルモン量 第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 18 日、鹿児島大学、鹿児島市、鹿児島県

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/pphys/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若林 和幸 (WAKABAYASHI, Kazuyuki)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：10220831

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

曾我 康一 (SOGA, Kouichi)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：00336760