

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04389

研究課題名(和文) 植物の光応答の空間構造とその制御機構の解明

研究課題名(英文) Spatial structure and mechanisms of plant responses to light

研究代表者

長谷 あきら (NAGATANI, Akira)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：40183082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発した微細組織の網羅的遺伝子発現解析法やレーザー顕微手術法を活用し、植物の主要な光受容体であるフィトクロムによる避陰応答の空間構造を解析した。その結果、子葉と胚軸(茎)で、あるいは葉肉と維管束で応答が大きく異なることが分かった。また、器官や組織間で、植物ホルモンであるオーキシンによるシグナルおよびそれとは独立した未知シグナルのやり取りがあることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の光応答における組織特異性や組織/器官間シグナル伝達に関する知見は限られていたが、本研究を実施することにより、組織や器官ごとの応答が分子レベルでどの程度異なるかが初めて明らかになった。また、避陰応答の空間的制御において、オーキシンや新規シグナルが果たす役割が明らかとなり、植物の光応答の空間構造に関する理解が深まった。これらの知見は、光受容体の働きを人為的に調整し植物の性質を改善する上で欠かせない。

研究成果の概要(英文)：We developed novel methods to monitor gene expression in micro-tissue pieces and to perform micro laser dissection for the spatial analysis of the shade avoidance response. By adopting those method for the analysis of the shade avoidance response, we found that the responses substantially differed between cotyledon and hypocotyl or between mesophyll and vasculature. Furthermore, we revealed that auxin and an unknown signal independent of auxin play pivotal roles for the spatial regulation of the shade avoidance response.

研究分野：植物生理学

キーワード：フィトクロム 遺伝子発現制御 長距離シグナル ネットワーク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

固着生活を営む植物は、その生き方に適した環境応答能を身につけている。その重要な特徴として、個々の細胞が高い環境応答能をもつことが挙げられる。例えば植物の主要な光受容体であるフィトクロムは、ほとんど全ての組織・器官で発現している。近年、細胞内におけるフィトクロムの作用機構に関する分子レベルの研究は大いに進展し、光を吸収したフィトクロムが核内に移行し特定の転写因子と相互作用することで遺伝子の発現を調節することが明らかにされた。一方、個体レベルの応答を考えると、まだまだ多くの謎が残されている。例えば、植物はフィトクロムを用いて他の植物の陰（以下「緑陰」と表記）を検知し、避陰応答として知られる様々な生理応答を示す。

避陰応答や他の光応答が個体レベルでどのように制御されているかについては、部分照射による研究などが行われてきた。例えば、上記の避陰応答の一つである胚軸伸長の促進は、主に子葉における光受容の結果起こることが知られている。しかしながら、子葉から胚軸へどのようにシグナルが伝達されるかについては、多くの謎が残されている。最近、我々や他のグループの研究により、この過程において、子葉で合成されたオーキシンが胚軸へ輸送されることで伸長成長が促進されるとなどが示されたが、光刺激を受容する器官である子葉と長距離シグナルを受け取る胚軸において遺伝子発現応答などの分子レベルの応答がどのように異なるかについてはまだまだ知見が不足している。さらに我々は最近、レーザー顕微手術の手法をこの問題に応用することで、オーキシンとは異なるシグナルが子葉から胚軸へと伝えられる可能性があることを見出したが、その実体や、その作用機構については全く分かっていない。

加えて、植物の細胞応答が空間的にどのように統合されるかを理解するには、組織間のシグナル伝達にも目を向ける必要がある。例えば、光環境に応じて花芽形成を誘導する FT タンパク質は、葉内の維管束において誘導される。我々は、この応答を制御するフィトクロム B を組織特異的に発現させ、その作用を比較することにより、この応答の光受容は維管束ではなく葉肉組織で行われることを発見した。また、青色光の受容体であるフォトトロピンが、表皮組織で光受容し葉の扁平性を制御することも示した。このように、器官内の光受容は、組織間でのシグナルのやり取りを介して空間的に組織化されていると考えられるが、それがどのように進行し、そこにどのような分子・細胞レベルの機構が関わるかについては、知見が決定的に不足している。

### 2. 研究の目的

上に述べた問題を解決するには、部分照射や顕微手術などの技術に加えて、植物を構成する様々な領域において、分子レベルでどのような応答が進行しているかを明らかにすることが必要である。分子生物学の進展により、細胞レベルの応答を読み出す強力な方法として、遺伝子発現をモニターする技術が発達し、その結果、原理的にはゲノムにコードされる全ての遺伝子の発現を同時に観測することが可能となった。このような網羅的解析方法を利用し、避陰応答の過程において様々な領域でどのような遺伝子発現応答が引き起こされているかをマップ化することにより、光応答の空間構造について重要な知見が得られると期待される。また、我々はレーザー顕微手術により、他の組織に対する影響を最小限に抑えつつ、子葉と胚軸の連絡を切断することに成功している。このような手法の応用をさらに進めることで、組織や器官間のシグナル伝達に関する理解が深まることが期待される。

以上の考えに従い、本研究では、1) 領域特異的な網羅的遺伝子発現解析手法を確立し、これを応用することで植物体内の異なる領域の応答を比較し、その特徴を明らかにするとともに、2) 顕微手術によって切り出した組織を用い、光シグナルの組織間伝達を再現する実験系の再現を目指す。対象とする具体的光応答としては、これまでの経験を活かし、避陰応答による胚軸伸長制御や花芽形成制御に注目して研究を進める。

### 3. 研究の方法

#### 1) 植物材料と光処理

植物材料としては、明暗サイクルで生育させた播種後 4 日目のシロイヌナズナの芽生えを用いた。用いた株は、野生株 (accession Ler, Col) に加えて、*taa1*、*pif4pif5*、*pif7* 変異体である。避陰応答を誘導する光処理としては、明期終了直後に遠赤色光のパルス照射を行った (EOD-FR 処理)。部分照射は、遠赤色光 LED (ピーク波長 730 nm) の先端にアクリルファイバーを取り付けて行った。部分照射の有効性を確認するために、*phyB-GFP* を *PHYB* プロモーターの制御下で発現する遺伝子導入シロイヌナズナ *Bpro7* 株を用いた。また、フック解消応答の解析については、芽生えのサイズがより大きく解析がしやすいハクサイの芽生えを用いて解析を行った。

#### 2) 領域特異的な網羅的遺伝子発現解析

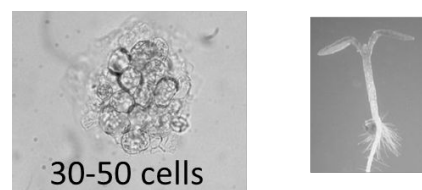
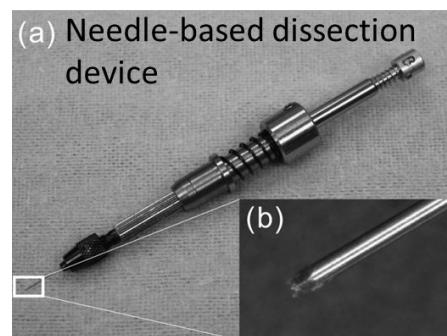


図1 組織片切り出し器具

微細組織の採取は、日立製作所の神原グループと共同で細い注射針をベースに開発した器具を用いた(図1)。また、細胞壁を部分的に消化することにより、子葉から維管束を短時間で単利する方法を確立した。これらの試料について、神原グループが確立した手法でcDNAを合成し、RNA-seq解析による網羅的遺伝子発現解析を行った。また、必要に応じて、qPCR法により特定遺伝子の発現を測定した。

### 3) 顕微手術

顕微手術は、共同研究者である奈良先端大の細川陽一郎博士が開発した装置を用いて、フェムト秒レーザー光を顕微鏡下で集光し、多光子吸収により爆発現象を起こすことで細胞を破壊した(図2)。光の強度やパルス数を調節することにより、シロイヌナズナ芽生えの胚軸や葉柄に、目的とする領域の近傍に対する影響を抑えつつ、高い再現性で穿孔実験が可能となった。

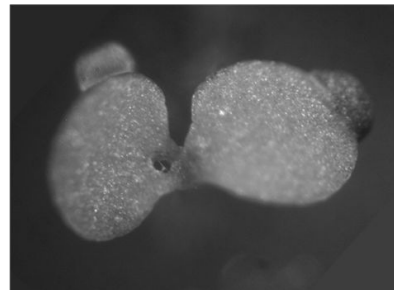
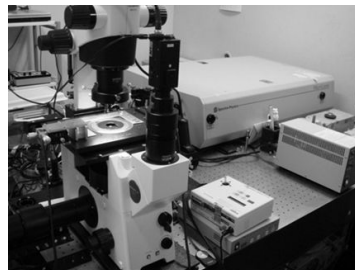


図2 フェムト秒レーザー(上)と子葉柄の穿孔(下)

## 4. 研究成果

本研究により、以下の成果が得られた。

### 1) 子葉と胚軸の遺伝子発現応答の比較

EOD-FRパルス2時間後に、維管束を含む茎頂部の組織と、子葉の微細組織片を採取し、EOD-FR処理によって、どのような遺伝子の発現がどの程度上昇するかを、RNA-seq法により網羅的に比較した。その結果、子葉より茎頂部でより多数の遺伝子が陰刺激に応答していた。それらの内容を調べたところ、多数のオーキシン応答性遺伝子(例; SAURs, GH3.3, IAA19, IAA29)が含まれていた(図3)。一方、子葉でより強く誘導される遺伝子も見いだされたが、その多くは新規の避陰応答遺伝子であった。以上の結果、芽生えにおいては、陰刺激によって、子葉で合成されたオーキシンが胚軸で濃縮され、強いオーキシン応答を誘導することが示唆された。一方、オーキシンに関わらない応答については、その意義や制御機構に関するさらなる解析が必要と考えられる。

### 2) オーキシンを介した子葉と胚軸のコミュニケーション

オーキシンに関する上記の仮説について、子葉のみの部分照射実験を行い、胚軸での強いオーキシン応答が主に子葉における光受容の結果として起こることを確認した。さらにオーキシン合成遺伝子YUCsの発現応答を胚軸と子葉で調べた結果、まず子葉においてYUC9遺伝子が誘導され、さらに、合成されたオーキシンが胚軸上部を含む茎頂部に移動し蓄積することで、二次的にYUC3遺伝子の発現が茎頂部で誘導され、オーキシン応答がさらに強化されることが示唆された。加えて、予想外のことであるが、胚軸に部分照射を行うことで、逆に子葉においてYUC2遺伝子の発現が誘導されることも分かった。以上により、胚軸上部でみられる強いオーキシン応答とオーキシン合成遺伝子の発現誘導の空間的な関係が明らかになった(図4)。

### 3) 胚軸におけるオーキシンに依存しない遺伝子発現応答の解析

レーザー顕微手術による解析の結果、子葉における光受容に続き、オーキシンの合成と胚軸への輸送に加えて、オーキシンとは異なるシグナルが維管束を通じて胚軸へ輸送され、胚軸のオーキシンに対する応答性が上昇することが示唆された。そこで、この現象に子葉や胚軸においてどのような遺伝子発現の変化が関係するかを明らかにするため、オーキシン合成を欠損する変異体における子葉と胚軸における遺伝子発現応答を比較した。その結果、オーキシンの合成がなくとも、多くの遺伝子の発現が胚軸で誘導されることが分かった。興味深いことに、それらの中には、AGPs, EXPs, XTHsなどの細胞壁に関与した遺伝子が多く含まれることが分かった(図5)。これらは子葉から伝達される未知シグナルに応答して発現を変化させることにより、胚軸伸長に関するオーキシン感受性を変化させている可能性が示唆された。一方、未知シグナルの発生源である子葉においてもオーキシンに依存しない遺伝子発現応答が認められたが、そのような応答を示す遺伝子の数は少なく未知シグナルとの関係が示唆されるものは含まれていなかった。

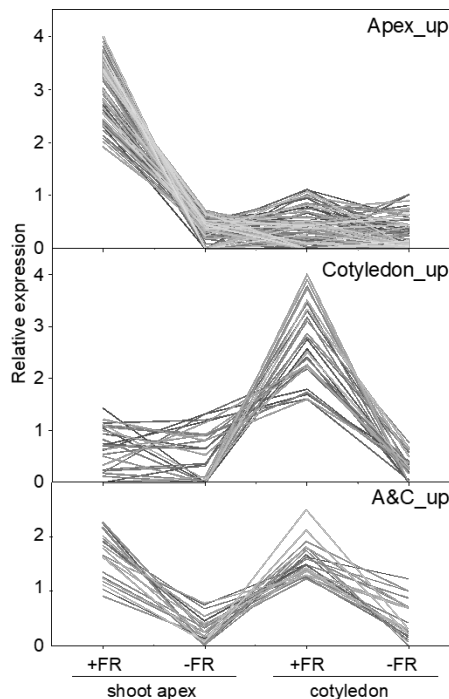


図3 茎頂と子葉における避陰応答遺伝子の発現パターン

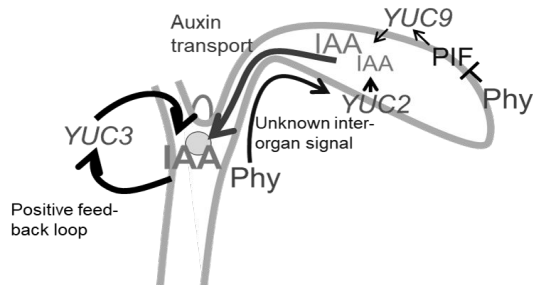


図 4 子葉と胚軸におけるオーキシン合成遺伝子 YUC の発現制御機構

4) 葉肉組織と維管束組織の遺伝子発現応答の比較

以上の解析の結果は、芽生えにおいて、子葉と胚軸という別の器官の応答が大きく異なること、そこにはオーキシンの輸送や未知シグナルの伝達に関わることが明らかになった。そこで、同じような応答の分化が子葉内の異なる組織間でみられるかどうかを、微細組織を用いた網羅的遺伝子発現解析によって詳しく調べた。解析には、維管束を含まない子葉組織片、維管束を含む子葉組織片、および単離した維管束を用いた。その結果、維管束の特に師部において、今まで知られていなかったような多くの遺伝子の発現が強く誘導されることが明らかとなり、子葉内で維管束が主要な光応答部位であることが示唆された。今後、これらの新規避陰応答遺伝子をさらに詳しく解析することにより、維管束での避陰応答の生理学的意義が明らかにされることを期待する。

維管束応答遺伝子には、新規の避陰応答遺伝子に加えて、オーキシン応答性の遺伝子が多数含まれていた。この結果は、子葉と胚軸の場合と同様、葉肉や表皮で合成が誘導されたオーキシンが維管束に輸送、蓄積することを示唆している。

5) 維管束でみられるオーキシン応答の解析

維管束における光応答がどのような仕組みで制御されるかを明らかにするため、部分照射実験を行った。具体的には、維管束を含むような子葉の領域において部分照射を行い、限られた領域の照射によって、どのような遺伝子応答が見られるかを、微細組織を用いた qPCR 解析により調べた。その結果、子葉を全体照射した場合には強く誘導されたオーキシン応答性遺伝子 (IAA1, IAA30, IAA19, IAA29, GH3.3 など) の発現が、部分照射ではほとんど誘導されないことが明らかになった (図 6)。一方、ATHB2 や HFR1 などのオーキシンに依存しない遺伝子の応答は、領域自律的であり、部分照射によっても全体照射と同様の応答が見られた。これらの実験結果から、上記の仮説が正しいことが示唆された。

6) フック解消にともなうフック内側と外側組織の遺伝子発現応答の比較

避陰応答は、フィトクロムが不活性化されることによって誘導される応答である。一方、光応答には、脱黄化応答のように、フィトクロムが活性化されることで起こる応答が多数知られている。これらの応答の空間構造に関する知見を得るため、赤色光によるフック解消応答に関する網羅的遺伝子発現解析を行った。フックは、湾曲部の内側と外側の細胞の伸長が異なること、すなわち偏差成長によって形成され、逆方向の偏差成長が起こることによってフックは解消される。そこで、光処理を施したハクサイの芽生えにおいて、フックの内側と外側の組織を別々に採取し、網羅的な遺伝

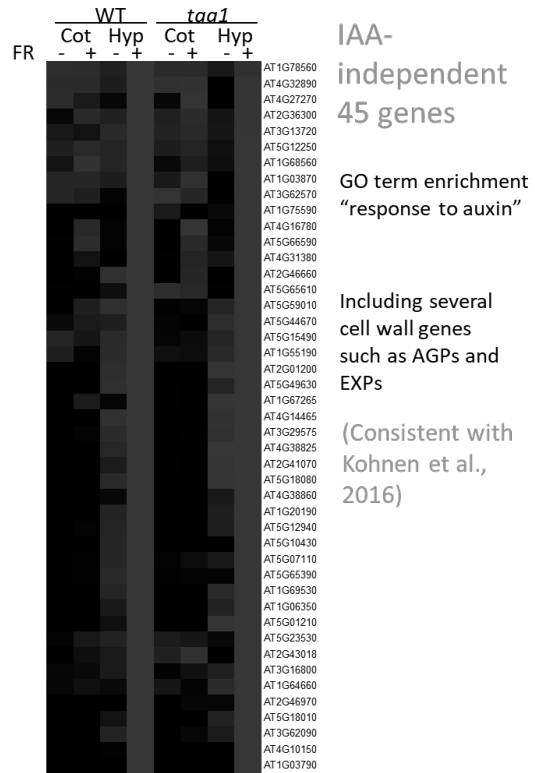


図 5 胚軸におけるオーキシンに依存しない避陰応答遺伝子の発現パターン

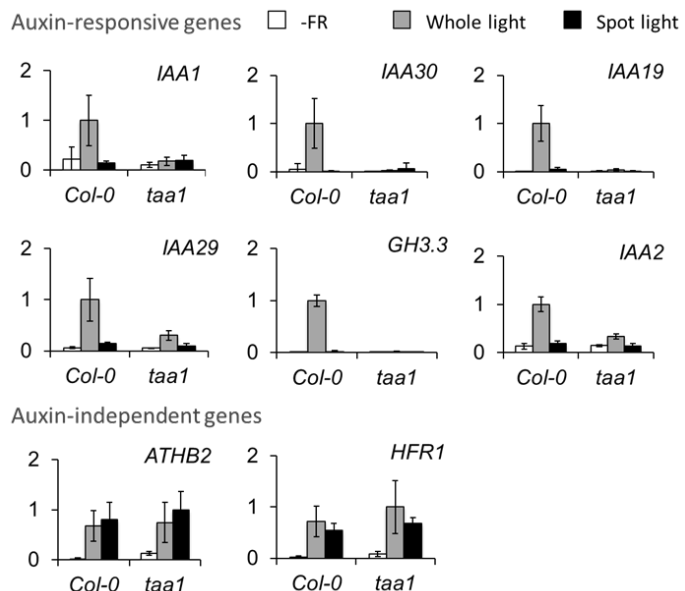


図 6 部分照射と全体照射に対する遺伝子発現応答

子発現解析を行った。

以上の結果、フックの内側と外側で応答の程度が異なる遺伝子が見出されたが、その中に、内側における伸長成長の促進に関わることが予想されるような遺伝子は含まれていなかった。一方、興味深いことに、多数の光合成関連遺伝子の発現がフックの外側でより強く誘導されることが明らかになり、フックの内側と外側という本来は同じような組織でありながら、遺伝子発現応答が部位により異なることが明らかとなった。生理学的な意義は不明であるが、光応答の組織や領域特異性を考えるうえで、非常に興味深い結果である。さらに、顕微手術や部分照射を用いた解析を試みたが、期待したような光応答を観察することはできなかった。

#### 7) 花芽形成応答の組織特異性の解析

我々は、過去の研究において、子葉内の葉肉組織から未知のシグナルが維管束に伝達され、そこで花芽形成を誘導する FT 遺伝子の発現が上昇することを見出している。そこで本研究では、部分照射や、単離組織片で応答を再現する実験系の確立を目指した。しかしながら、短時間の光照射で FT 遺伝子の発現を誘導することは容易ではなく、求めていた実験系の確立は困難であることが判明し、実験計画のなかでこの課題についてはあきらめあった。

以上をまとめると、芽生えの陰刺激に対する遺伝子発現応答においては、まず子葉の葉肉や表皮のような広い領域でオーキシンの合成が誘導され、それが維管束に輸送されて蓄積することにより、維管束でより強い避陰応答が起こることが分かった。また、維管束においては、従来知られていたオーキシン応答性遺伝子の発現誘導に加えて、新規の遺伝子発現応答も見いだされた。これらの発現がどの領域の光受容によって起こるかを明らかにすることは、今後の課題である。また、子葉内で応答を誘導したオーキシンは、さらに胚軸へ移動し、そこで強いオーキシン応答を引き起こすことが明らかとなった。一方、オーキシンとは独立に、子葉から維管束を通じて未知シグナルが伝達され、細胞壁関連遺伝子を含むターゲット遺伝子の発現が誘導されることが示唆された。今後の研究により、未知シグナルの分子的正体が明らかになることを期待したい。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Ortiz-Alcaide M, Llamas E, Gomez-Cadenas A, Nagatani A, Martinez-Garcia JF, Rodriguez-Concepcion M. (2019) Chloroplasts modulate elongation responses to canopy shade by retrograde pathways involving HY5 and ABA. *Plant Cell*. 31: 384-398. 査読有. doi: 10.1105/tpc.18.00617.

Kim S, Mochizuki N, Deguchi A, Nagano AJ, Suzuki T, Nagatani A. (2018) Auxin contributes to the intra-organ regulation of gene expression in response to shade. *Plant Physiol*, 177: 847-862. 査読有. doi: 10.1104/pp.17.01259.

Nagatani A, Mimura T. (2015) Editorial: Emerging Technologies for the Study of Plant Environmental Sensing. *Plant Cell Physiol*. 56: 1249-51. 査読無. doi: 10.1093/pcp/pcv095.

Nito, K., T. Kajiyama, J. Unten-Kobayashi, A. Fujii, N. Mochizuki, H. Kambara and A. Nagatani (2015) Spatial regulation of the gene expression response to shade in Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Physiol*. 56: 1306-1319. 査読有. doi: 10.1093/pcp/pcv057.

Kajiyama, T., A. Fujii, K. Arikawa, T. Habu, N. Mochizuki, A. Nagatani and H. Kambara (2015) Position-specific gene expression analysis using a microgram dissection method combined with on-bead cDNA library construction. *Plant Cell Physiol*. 56: 1320-1328. 査読有. doi: 10.1093/pcp/pcv078.

Takahashi, K., T. Kozuka, A. Anegawa, A. Nagatani and T. Mimura (2015) Development and application of high resolution imaging mass spectroscope for the study of plant tissues. *Plant Cell Physiol*. 56: 1329-1338. 査読有. doi: 10.1093/pcp/pcv083.

[学会発表](計14件)

Akira Nagatani, Misato Kikuchi, Yukiko Yoshikawa, Yoshito Oka, Yuya Ono, Gabriela Toledo-Ortiz, Keio Kokaji, Minami Matsui, Nobuyoshi Mochizuki, Tomomi Suzuki, Structural basis for the far-red high irradiance response of phytochrome A, International Symposium on Plant Photobiology (ISPP) 2018, Matsue, Japan, Jan. 15-18, 2018, 招待講演, 国際学会

Sujung Kim, Nobuyoshi Mochizuki, Ayumi Deguchi, Atsushi J. Nagano, Tomomi Suzuki, Akira Nagatani, Involvement of auxin in intra-organ regulation of gene expression responses to the shade stimulus, International Symposium on Plant Photobiology (ISPP) 2018, Matsue, Japan, Jan. 15-18, 2018, 国際学会

Akira Nagatani, How does a plant utilize different photoreceptors for the shade avoidance response? Asia and Oceania Conference on Photobiology (AOCP) 2017, Seoul, Korea, Nov. 12-15, 2017, 招待講演, 国際学会

Sujung Kim, Nobuyoshi Mochizuki, Tomomi Suzuki, Akira Nagatani, Non-tissue autonomous regulation of auxin-responsive genes in the shade avoidance response, Taiwan-Japan Plant Biology 2017, Taipei, Taiwan, Nov. 3-6, 2017, 国際学会

Kim Sujung, 望月伸悦, 出口亜由美, 永野惇, 鈴木友美, 長谷あきら, シロイヌナズナの子葉における避陰応答遺伝子のトランスクリプトーム解析, 第58回 日本植物生理学会年会(鹿児島), 2017.03.16-18

櫻井裕子, 望月伸悦, 鈴木友美, 綿引雅昭, 長谷あきら, シロイヌナズナの芽生えにおける避陰応答と低温応答の相互作用, 第58回 日本植物生理学会年会(鹿児島), 2017.03.16-18

Ohnishi et al., Red-light induced local gene expression responses during hook opening, Kyoto-Bristol-Heidelberg Plant Sciences Workshop, Bristol, UK, Feb. 14-17, 2017

Kim Sujung et al., シロイヌナズナの子葉における避陰応答遺伝子の空間的な発現解析, 第80回 日本植物学会大会(沖縄), Sep. 16-19, 2016

A. Nagatani et al, Spatial control of the shade avoidance response, ICAR 2016, Gyeongju, Korea, June 29-July 3, 2016, 招待講演, 国際学会

A. Nagatani, R. Otsuki, Y. Sakurai, N. Mochizuki, T. Suzuki, The First Step to Understanding Light-Responses in natura, 第57回 日本植物生理学会年会(岩手), Mar. 18-20, 2016, 招待講演

A. Nagatani, Inter-organ and inter-tissue communications in the shade avoidance response, Asia and Oceania Conference on Photobiology, Taipei, Taiwan, Nov. 15-18, 2015, 招待講演, 国際学会

A. Nagatani, Spatiotemporal regulation of the shade avoidance response, BHK Symposium, Bristol, UK, Nov. 5-6, 2015, 招待講演, 国際学会

A. Nagatani et al., Spatial control of the shade avoidance response, 11th International Congress of Plant Molecular Biology, Iguazu Falls, Brazil, Oct. 25-30, 2015, 招待講演, 国際学会

A. Nagatani, Spatiotemporal regulation of the hypocotyl elongation in response to the shade stimulus, International Symposium on Plant Photobiology 2015, Austin, May 26-30, 2015, 招待講演, 国際学会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://physiol2.bot.kyoto-u.ac.jp/HP3/index.html>

<http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。