

平成21年5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年～2008年

課題番号：19570031

研究課題名（和文）根冠コルメラ細胞に重力感受・応答機能を付与する分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism conferring function of gravity-responses to columella cells in root tip

研究代表者 藤井 伸治 (FUJII NOBUHARU)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：70272002

## 研究成果の概要：

本研究では、重力屈性と光屈性との干渉作用を利用した実験系を用いて単離された 44 系統の各突然変異体の突然変異原因遺伝子の同定を試みた。ラフマッピング、塩基配列の比較、および相補性検定の結果から、30 系統は *AUX1* 遺伝子に、7 系統は *PIN2* 遺伝子に、2 系統は *ARG1* (*Altered Response to Gravity1*) 遺伝子に、1 系統は *PGM* (*Phosphoglucomutase*) 遺伝子に突然変異が生じていると考えられた。今後、突然変異遺伝子が未同定の 4 系統の突然変異遺伝子を同定することにより、根に重力応答性を付与する新しい分子を同定できると期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学

キーワード：植物生理・分子

## 1. 研究開始当初の背景

植物の根は根冠コルメラ細胞で重力刺激を感受し、そのシグナルを伸長領域に伝達することにより重力屈性を発現し、環境に適応している。根冠コルメラ細胞が重力刺激に応答するために機能的に分化するためには、以下の機構が必要であると考えられる（括弧内に各機構を担う遺伝子での突然変異により、根の重力屈性が異常となるシロイヌナズナの突然変異体を記した）。

## 1) デンプン粒を含む沈降性アミロプラスト

の分化 (*pgm*, *adg1* 突然変異体)。2) コルメラ細胞での重力刺激の感受機構 (*arg1*, *arl2* 突然変異体)。3) コルメラ細胞から伸長領域へのオーキシンを介した重力刺激の伝達機構 (*pin2*, *pin3*, *aux1*, *axr4* 突然変異体)。

これらのうち、1) については *pgm* 突然変異体、*adg1* 突然変異体はそれぞれ、デンプン合成が欠損するため、アミロプラストが正常に沈降しなくなり、重力に対する応答性が低下する。2) については同定されている *arg1*,

ar12 突然変異原因遺伝子は DnaJ 様タンパク質をコードし、分子シャペロンとしての機能が予想されるにとどまっている。3) については、AXR4 により細胞膜へ輸送されるオーキシン取り込みキャリア AUX1, およびオーキシン排出キャリア PIN2, PIN3 がこのオーキシンの輸送を担うことが明らかにされているもの。これらのオーキシン取り込み・排出キャリアの機能制御は未解明のままである。

根の重力に対する初期応答の異常なシロイヌナズナ突然変異体では重力屈性が完全に消失しないため、突然変異体のスクリーニング・遺伝解析のための効率的な形質評価が行えず、根の重力応答に関する遺伝学的解析が立ち後れている。この問題を克服し、より高感度に根の重力屈性の異常を検出するため、重力屈性と光屈性との干渉作用を利用した実験系に注目した。シロイヌナズナの根は正の重力屈性を示すとともに、負の光屈性を示す。野生型のシロイヌナズナの根では、下側から光を照射した場合、重力屈性が光屈性に比べて強く発現する結果、根は下方向に伸長する。一方、重力感受性が低下する突然変異体では、同じ条件下で、光屈性が強く発現し、根は上方向に伸長する。したがって、本実験系を用いることにより、根の重力屈性の低下を感度良く検出でき、新規のシロイヌナズナの根の重力屈性が異常な突然変異体の単離と、その遺伝学的解析が可能になると期待される。この重力屈性と光屈性との干渉作用を利用した実験系を用いて、EMS 処理で突然変異を誘発した 10 万株のシロイヌナズナ (Columbia) の M<sub>2</sub> 個体をスクリーニングし、44 系統の突然変異体を単離した。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の未解明の研究課題を明らかにすることを目的とし、44 系統の各突然変異体の突然変異原因遺伝子の同定を試み、新規重力屈性異常突然変異体の取得の有無を確認した。これとともに、突然変異原因遺伝子を同定したいくつかの突然変異体について、遺伝解析と特性解析を行った。

## 3. 研究の方法

植物材料と生育条件

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) の野生型として Columbia を用いた。種子を滅菌溶液 (0.05% (v/v) Tween20, 5% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム) で 10 分間滅菌処理後、滅菌蒸留水で 3 回洗浄し、MS 無菌寒天培地 (0.215% (w/v) MS 塩, 0.2% (v/v) MS ビタミン, 1% (w/v) スクロース, 0.25% (w/v) グランガム, pH5.8) を分注したプラスチック製角型シャーレ (10×14×1.5 cm: 滅菌 2 号角シャーレ) に播種した。そして、2 日間の低温

(4°C) 処理後、シャーレを垂直に静置し、23 ± 1°C で生育させた。下から光を照射するため垂直にしたシャーレの下面以外をラシヤ紙で遮光し、下側から白色光 (80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup>) を連続照射しながら芽生えを 3 日間、生育させた。次いで、プレート上の芽生えをスキャナー (Canon CanoScan 8800F) により画像として取り込んだ後、ImageJ により、根の屈曲角度を測定した。

オーキシン抵抗性試験は 3 日齢の芽生えを、オーキシンを含まない MS 無菌寒天培地、あるいは 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M の 2,4-D を含む MS 無菌寒天培地に移植し、3 日後の根の長さを測定した。

突然変異遺伝子の座上染色体の決定

シロイヌナズナの Columbia に突然変異誘起剤であるエチルメタンスルホン酸 (EMS) を処理して得られた突然変異体を解析に用いたため、マッピングには突然変異体と Landsberg erecta を交配して得られた F<sub>2</sub> 個体を用いた。F<sub>2</sub> 個体を発芽させるときに、下側から光を照射し、根の伸長方向を解析することにより、表現型を解析し、突然変異遺伝子の遺伝型を解析した。F<sub>2</sub> 集団での解析では、突然変異遺伝子の遺伝型が明瞭に判別できない場合は、各 F<sub>2</sub> 個体から採種した F<sub>3</sub> 集団において同様に解析し、F<sub>2</sub> 個体の突然変異遺伝子の遺伝型を解析した。これとともに、各 F<sub>2</sub> 個体から DNA を抽出し、Monsanto Arabidopsis Polymorphism and Ler Sequence Collections (<http://www.arabidopsis.org/browse/Cereon/index.jsp>) を参考に設計した SSLP (Simple sequence length polymorphism) マーカーによりマッピングを行った。

塩基配列決定

塩基配列の決定のため、各系統から抽出した DNA を鋳型に増幅させた PCR 断片を QIAquick<sup>®</sup> Spin により精製した。これを鋳型として、Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (BECKMAN COULTER) を用いてシーケンス反応を行った。シーケンス反応産物をエタノール沈殿により精製した後、GeXP シークエンサー (BECKMAN COULTER) により塩基配列を決定した。

## 4. 研究成果

根の重力屈性が光屈性により干渉されることを利用して単離した 44 系統の重力屈性突然変異体のうち、ラフマッピング、相補性検定、塩基配列の決定により、40 系統については突然変異原因遺伝子を同定した (表 1)。40 系統の内訳は、ARG1 (2 系統), AUX1 (30 系統), PGM (1 系統), PIN2 (7 系統) であった。

表 1 本研究で同定した根の重力屈性異常突然変異体

遺伝子	系統	突然変異
ARG1	30-180①	G2083A (スプライシング部位)
	33-33②	G898A (スプライシング部位)
	10-10	G865A (Trp 190 stop)
	13-19	G627A (Gly 149 Glu)
	14-13	G3143A (Trp 434 stop)
	18-12	G274A (Ala 61 Thr)
	20-27	G2172A (Trp 337 stop)
	22-83	G1951A (Gly 292 Glu)
	23-83②	G1951A (Gly 292 Glu)
	23-194	G147A (Trp 49 stop)
	25-46	C857T (Arg 194 stop)
	25-113	G128A (Trp 43 stop)
	26-1	G128A (Trp 43 stop)
	27-58	G128A (Trp 43 stop)
	30-18②	G3105A (Trp 421 stop)
	AUX1	30-24①
30-148①		G3105A (Trp 421 stop)
31-11②		G3177A (Trp 445 stop)
31-15①		G3177A (Trp 445 stop)
31-46		G3177A (Trp 445 stop)
31-44①		G938A (スプライシング部位)
31-59①		G353A (Gly87Asp)
32-49①		C2366T (Arg 402 stop)
33-28②		G1943A (Trp 289 stop)
33-70②		G3177A (Trp 445 stop)
33-84②		G3177A (Trp 445 stop)
35-26①		G1943A (Gly 138 Glu)
35-71①		G133A (Gly 45 Ser)
37-25		C3212T (Thr 457 Ile)
37-88		C1310T (Thr 252 Ile)
PGM		25-66
	11-16	G2213A (Trp 513 stop)
	33-17②	C1331T (Arg 135 stop)
	35-70②	G3486A (スプライシング部位)
PIN2	19-14	G2186A (Trp 388 stop)
	20-5	C651T (Trp 135 stop)
	21-126②,	C651T (Trp 135 stop)
	34-21	G3484A (スプライシング部位)
未同定	11-5	-
	11-47	-
	21-13	-
	30-61②	-

今後、突然変異遺伝子が未同定の 4 系統 (11-5, 11-47, 21-13, 30-61②) の突然変異遺伝子を同定することにより、根に重力応答性を付与する新しい分子を同定できると期待される。

突然変異遺伝子が *AUX1* 遺伝子であったいくつかの系統について遺伝解析を行った結果、31-11②, 31-46, 33-70②の重力屈性の異常は不完全優性突然変異遺伝子として遺伝することが示唆された。これらの系統では *AUX1* タンパク質の C 末端側の 41 アミノ酸からなるペプチドが欠損していると予想され、この領域のアミノ酸配列が *AUX1* タンパク質の機能制御を担っている可能性が示唆された。したがって、今後、*AUX1* タンパク質の C 末端側の 41 アミノ酸の欠損が不完全優性突然変異となるメカニズムを明らかにすることにより、新しい *AUX1* タンパク質の機能制御機構が明らかになると期待される。

また、突然変異遺伝子が *AUX1* 遺伝子であったいくつかの系統の根のオーキシン抵抗性を解析した結果、31-46 系統は、完全機能欠損型を含めた他の *aux1* 突然変異体に比べて高いオーキシン抵抗性を示した。通常、オーキシン抵抗性は、オーキシンを含む培地とオーキシンを含まない培地に 3 日齢の芽生えを移植し、それぞれの 2 日後の根の伸長を比較することにより検討する。31-46 系統が完全機能欠損型 *aux1* 突然変異体に比べて高いオーキシン抵抗性を示したのは、発芽後 3 日齢までは根の伸長量は野生型と変わらないが、3 日齢以降でのオーキシン無処理区での根の伸長成長が低いためであった。6 日齢の芽生えの根の長さを指標に 31-46 系統の根が短い形質を担う突然変異遺伝子 (*enhancer of aux1*) をラフマッピングした結果、第 5 染色体の長腕に単一劣勢突然変異遺伝子としてマップされた。本解析結果は、発芽後 3 日齢以降に根の伸長成長を促進する機構の存在を示唆している。したがって、*enhancer of aux1* 突然変異に注目した研究により、新たな根の伸長成長制御機構が明らかになると期待される。

## 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 4 件)

① Analysis of gravity-response of auxin distribution in gravimorphogenesis of cucumber seedlings by immunohistochemical staining with anti-auxin antibody. (2009) Fujii N, Watanabe C, Yanai K, Miyazawa Y, Takahashi H. Space Utilization Research, 25: 21-23. (査読無)

② Hormonal interactions during root tropic growth: hydrotropism versus gravitropism. (2009) Takahashi H, Miyazawa Y, Fujii N. Plant Mol Biol. 69: 489-502. (査読有)

③ Isolation of root agravitropic mutants of Arabidopsis by experiments using interfering effects of phototropism on gravitropism. (2008) Fujii N, Kanno Y, Yamaguchi H, Miyazawa Y, Takahashi H. Space Utilization Research, 24: 409-411. (査読無)

④ *p*-chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response for gravity-regulated peg formation in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. (2008) Shimizu M, Miyazawa Y, Fujii N, Takahashi H. J Plant Res. 121: 107-114. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

① 藤井伸治、渡辺千秋、矢内健一、宮沢豊、高橋秀幸「キュウリの芽ばえの重力形態形成にともなうオーキシン分布の重力応答性の抗オーキシン抗体を用いた免疫組織学的解析」宇宙利用シンポジウム (第 25 回), 2009 年 1 月 14 日, 15 日, 相模原

② 藤井伸治、矢内健一、堀田拓哉、渡辺千秋、宮沢豊、高橋秀幸「キュウリの芽ばえのペグ形成領域で発現する PIN オーキシン排出キャリア相同遺伝子の同定と局在解析」植物化学調節学会, 2008 年 10 月 28 日, 29 日, 筑波

③ 渡邊千秋、藤井伸治、宮沢豊、高橋秀幸「キュウリ芽生えの重力形態形成に伴う IAA 動態変化の解析」植物化学調節学会, 2008 年 10 月 28 日, 29 日, 筑波

④ 渡邊千秋、矢内健一、藤井伸治、堀田拓哉、宮沢豊、高橋秀幸「キュウリ芽生えの内皮におけるオーキシン排出キャリア CsPIN1 タンパク質の局在及びオーキシンの分布の重力応答性」日本宇宙生物科学会第 22 回大会, 2008 年 9 月 26 日, 27 日, 奈良

⑤ 藤井伸治、菅野佑司、山口弘子、宮沢豊、高橋秀幸「重力屈性と光屈性の干渉作用を利用して単離したシロイヌナズナの根の屈性異常突然変異体の解析」日本宇宙生物科学会第 22 回大会, 2008 年 9 月 26 日, 27 日, 奈良

⑥ 渡邊千秋、藤井伸治、宮沢豊、高橋秀幸「重力形態形成時のキュウリ芽生えにおけるオーキシン分布の免疫組織化学的解析」第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年 3 月 20 日～22 日, 札幌

⑦ 諸橋恵太、矢内健一、堀田拓哉、藤井伸治、宮沢豊、高橋秀幸「キュウリの根の水分屈性と重力屈性に機能するオーキシン輸送機構」第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年

3 月 20 日～22 日, 札幌

⑧ 藤井伸治、菅野佑司、山口弘子、宮沢豊、高橋秀幸「光屈性の重力屈性への干渉作用を利用した実験系によるシロイヌナズナの根の重力屈性異常突然変異体の単離と遺伝解析」第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年 3 月 20 日～22 日, 札幌

⑨ 藤井伸治、菅野佑司、山口弘子、宮沢豊、高橋秀幸「重力屈性と光屈性の干渉作用を利用して単離したシロイヌナズナの根の屈性異常突然変異体の解析」日本宇宙生物科学会第 21 回大会, 2007 年 9 月 27 日, 28 日, 東京

⑩ 渡邊千秋、矢内健一、藤井伸治、堀田拓哉、宮沢豊、高橋秀幸「キュウリ芽生えの内皮におけるオーキシン排出キャリア CsPIN1 タンパク質の局在及びオーキシンの分布の重力応答性」日本宇宙生物科学会第 21 回大会, 2007 年 9 月 27 日, 28 日, 東京

⑪ 藤井伸治、矢内健一、堀田拓哉、宮沢豊、高橋秀幸「キュウリ芽ばえの内皮における CsPIN1 オーキシン排出キャリア局在パターンの重力刺激に応答した変動」日本植物学会第 71 回大会, 2007 年 9 月 7 日～9 日, 野田

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

氏名 藤井 伸治 (FUJII NOBUHARU)  
東北大学・大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号 70272002

### (2) 研究分担者

氏名 宮沢 豊 (MIYAZAWA YUTAKA)  
東北大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号 00342858