

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04388

研究課題名(和文)重力を指標とした植物の側生器官の成長方向制御の分子機構の解析

研究課題名(英文)Molecular mechanism of growth angle control of lateral organs in response to gravity direction

研究代表者

森田 美代(Morita, Miyo)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：10314535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：重力屈性において感受細胞内のシグナリングに関するDLLsは、側枝を上方に伸長させる。一方、DLLsに相同性を示すものの、DLLsの機能に必須なCDL配列を持たないAtTAC1は、側枝を下方方向に向ける。我々は主軸の重力屈性と側枝の伸長方向制御を統一的理解することを目指し、機能未知のDLLs family 遺伝子CCP1～3も含め、これら遺伝子の構造及び生理機能について解析を行った。

研究成果の概要(英文)：DLLs genes are involved in the signaling process within statocytes in gravitropism of Arabidopsis. The genes also make the lateral shoots grow upward. AtTAC1 shows sequence similarity to DLLs except for lacking CDL sequence which is essential for molecular function of DLLs. Interestingly, AtTAC1 plays a role in downward growth of lateral shoots, that is, an opposite effect on the direction of shoot growth. Our aim is to understand how gravitropism of main axes and plageotropism of lateral shoots are unified. In this study, we determined the gene structures of DLLs family including CCP1-3 and of AtTAC1, and analyzed their physiological functions in growth angle control.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：重力屈性 器官の伸長方向制御

1. 研究開始当初の背景

一般に、植物の主根や主茎(主軸)は鉛直線に沿って成長し、これを正常重力屈性又は単に重力屈性という。一方、側根や側枝など側生器官は多くの場合、重力方向に対して一定の角度を保って成長する性質を持ち、これを傾斜屈性という。重力に対するこれら器官の成長角度はGSA(gravitropic set-point angle)と表される。主軸のGSA 0もしくは180の成長制御(重力屈性)については理解が進んでいる一方で、側生器官のGSA制御については、オーキシンの関与が示唆されているものの、その分子機構は明らかではない。

2. 研究の目的

我々は、シロイヌナズナの主軸を用いて正常重力屈性の分子機構を研究する過程でDLLs遺伝子(DGE1, DGE2, DTL)を見出し、DLLs遺伝子が重力感受細胞において重力シグナリングの中核で機能することをみだしつつあった。その中で、DLLs遺伝子は地上部・地下部いずれにおいても側生器官のGSA制御にも関与することを発見した。さらに、別の研究グループから報告された、側枝のGSA制御に関わるAtTAC1がDLLsと配列相同性を示すことに着目し、側生器官のGSA制御分子機構の解明を通して、主軸の重力屈性と側生器官のGSA制御を統一的に理解することを目指した。

3. 研究の方法

シロイヌナズナゲノム中にDLLs familyメンバーは5遺伝子存在する(DGE1/LAZY1, DGE2, DTL, CCP1, CCP2と命名)。蛋白質全長での互いの相同性は必ずしも高くないが、C端の14アミノ酸配列(CDL:Conserved C-termini in DGE1/LAZY1)は高度に保存されており、分子機能に必須であることを見出している。また、変異体の表現型解析や分子遺伝学的解析から、DLLsは主軸の重力屈性を促進するとともに、側枝や側根のGSAを180°もしくは0°に近づける方向に作用すること、重力感受細胞において重力刺激に応じてオーキシン分配量へと変換する細胞内情報伝達プロセスに機能することが分かっている。一方、AtTAC1の全体的なアミノ酸配列はDGE1に類似性を示すが、CDL配列部分を持たない。また、AtTAC1は、機能欠損により側枝のGSAが180°に近づくと報告されている。従って、少なくとも側枝においては、DGE1, DGE2, DTLはGSAを増加させる方向に機能する因子であり、CDL配列を持たないAtTAC1はGSAを減少させる方向に機能する因子であると考えられる。そこで本研究では、シロイヌナズナ側枝の伸長過程におけるGSA表現型の記述を行うとともに、側枝GSAのさらなる表現型解析に役立つ1Dクリノスタットを用いた観察系を作成する計画を立てた。また、CCP1, CCP2を加えた5つのDLLs family遺伝子とAtTAC1の多重変異体を用い

た遺伝学的解析を行うとともに、これら遺伝子の分子遺伝学的解析を進めた。

4. 研究成果

(1) DLLs family 遺伝子の解析

DLLs family 遺伝子、AtTAC1の側枝及び側根のGSA制御における遺伝学的な関係を調べる上で、これら遺伝子の多重変異体の作出が欠かせない。DGE1, DGE2, DTL, AtTAC1はT-DNA挿入変異体をストックセンターより入手していたが、CCP1, CCP2については変異体が存在しなかったため、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集技術により作成を試みた。その結果、フレームシフト変異を導入することに成功し、交配によりCRISPR/Cas9システムをゲノムから取り除いた。現在までに、CCP1, CCP2の単独変異体での表現型、dlls 3重変異体との交配による各4重変異体について、dlls表現型を上回る異常は観察できていない。5重変異体は現在選抜中である。

ゲノム中には、DLLs family 遺伝子とある程度相同性を示すものの、アミノ酸数が少なくかつ機能に必須なCDL配列を持たない遺伝子が予測されていた。本研究開始後に、タルウマゴヤシの根の重力屈性変異体の原因遺伝子のオルソログとしてこの遺伝子が報告され、シロイヌナズナにおいても重力屈性に関与することが示された。これを契機にシロイヌナズナを用いてこの遺伝子の転写産物を詳細に調べたところ、CDL配列を持つタイプを含め、4種のmRNAが検出された。そこでこの遺伝子をCCP3として解析に加え、T-DNA挿入系統2アリル(ccp3-1; C端領域へT-DNA挿入, ccp3-3; 5'-UTR領域へのT-DNA挿入)を入手し、詳細な解析を行った。ccp3-3では、T-DNA挿入位置までのmRNAの発現が確認できたが、ccp3-1アリルはCCP3転写産物が検出できず、ヌルアリルであることが示唆された。既報ではccp3-3のみ表現型が報告されており、dlls ccp3-3 4重変異体の表現型はdllsの根の重力屈性異常を亢進させ、既報の結果と矛盾はなかった。一方でこれまで報告のないccp3-1については、dgel ccp3-1の2重変異体が得られなかったため、CCP3 genome断片を導入して致死性が相補されるかどうか確認し、この表現型が確かにこの遺伝子の欠損に由来することを確認した。以上の結果から、CCP3は重力屈性に留まらず、他のfamily遺伝子と冗長的に発生初期に重要な機能を持つと言える。CCP3のどのタイプのスプライシングが重力屈性において機能するか調べるために、検出された4種類のcDNAを自身のプロモーターに連結し、dlls ccp3-3 4重変異体に導入したところ、CDL配列を持つタイプで重力屈性異常を相補した。今後、発生初期での機能に重要な転写産物について、dgel ccp3-1に同コンストラクトを導入して解析を進める。

(2) *AtTAC1* の解析

At2g46640 の T-DNA 挿入変異体 (*attac1*) の側枝の GSA が 180°により近づくこと報告されているものの、遺伝子の構造や機能的なプロモーター領域など、分子遺伝学的解析に必要な情報は報告されていなかった。我々はまず、この表現型が確かに *At2g46640* に由来するものであることを、ゲノム断片を用いた相補性試験により確認し、機能的な 5'-, 3'- 領域を明らかにした。また側枝において *AtTAC1* のスプライシングバリエーションが多数存在することを示し、バリエーションの中には CDL 様の配列を有すると予測されるものもあったことから、側枝 GSA 制御に機能的な転写産物を同定することにした。4 種の主要な転写産物の cDNA を自身のプロモーター領域下流に連結し、*attac1* の表現型の相補能を確認したところ、CDL を持たないタイプで、かつデータベース上で第 1 イントロンであると予測された領域を含むコンストラクトが相補能を示した。ところがこの cDNA は uORF 様の構造を生じるものであり、翻訳産物との整合性が問題となった。そこで、データベース上にある通りのエクソン-イントロン構造で、CDL を持たないタイプの cDNA を、異なるプロモーターでドライブし、相補性試験を行うことにした。我々は以前、地上部の重力感受細胞である内皮細胞に着目したトランスクリプトーム解析を行っており、*AtTAC1* が内皮において *SHR* の制御下で高い発現を保つことを見出していた。そこで、内皮特異的に強い発現を示す *ADF9* プロモーターを用いて上述の *AtTAC1* バリエーションを導入したところ、表現型を相補したことから、当初予想された通りの CDL 配列を持たないタイプの転写産物が機能的であることを示した。また、この結果から、*AtTAC1* の第 1 イントロンは機能的タンパク質に反映されることはないが、*AtTAC1* の適切な発現を保つには必要であることが示唆された。発現量や発現部位の調節などの機能が考えられるが、今後の課題である。

(3) *dge1* と *attac1* の遺伝学的関係

我々は、まず野生型側枝の伸長過程における器官角度の変遷について記述的解析を行った。野生型側枝は包葉を備えた腋芽から水平方向 (GSA=90°) に伸長し始める。伸長率は先端領域が最も高く、基部に近づくにつれて伸長率は低下する。側枝の伸長とともに GSA は大きくなるが、角度が変わるのは伸長速度が低下した領域で、先端部は寧ろ常に GSA は基部に近い領域よりも小さくなっており、全体として S 字のような形状をとる。野生型における、主茎と側枝の交差部位の角度 (ABP) と側枝が水平面に対してなす最大傾斜角度 (AMI) を側枝の伸長とともに計測した。ABP は側枝が 3~5 cm 時期までにやや増加するが、それ以降は変化しなかった。AMI は側枝が 7~9 cm 時期まで徐々に増加し、そ

れ以降の変化は少なかった。

dge1 は単独で側枝 GSA が 90°に近づく表現型を示す。*dge1* と *attac1* の表現型を同様に調べ、*dge1* は ABP, AMI とともに非常に初期から野生型よりも小さい値を示し、AMI は伸長とともに差が大きくなった。また *attac1* は逆に ABP, AMI とともに非常に初期から野生型よりも大きい値を示し、AMI は 3~5 cm 時期に最も野生型との差が大きくなった。

遺伝学的関係を調べる目的で *dge1 attac1 2* 重変異体で同様に測定したところ、ABP, AMI とともに伸長初期には *dge1* よりも小さい値を示し、*attac1* が *dge1* の表現型を亢進させるような効果が見られた。これは予想外の結果であった。また、後期になると *dge1* と同様の値を示した。全体的には *attac1* の表現型には *DGE1* の機能を必要とするエピスタシスがあると考えられるが、伸長初期にはより複雑な関係性があるのかもしれない。

(4) *DLLs* family 及び *AtTAC1* の発現部位

DLLs 及び *AtTAC1* の機能的関連を考察する上で、発現組織を明らかにする必要がある。そこで、相補性試験より明らかにした機能的プロモーター領域を *GUS* 遺伝子と連結し、野生型に導入し形質転換体を作成した。*CCP3p:GUS* は根においてコルメラ細胞特異的な発現パターンを示した。*ccp3-1* の解析から初期発生への関与が示唆されたため、今後配偶子形成過程、種子形成過程等での発現を調べる必要がある。*AtTAC1p(+1st intron):GUS* を作成し、同様に形質転換体を確立中である。先行して作成した第 1 イントロンを含まない *AtTAC1p:GUS* については、側枝の内皮を含みより内側の数層の組織で発現していた。また、*DGE1p:GUS* についても同様の組織で発現していたことから、*DGE1* と *AtTAC1* は同じ細胞内で機能し、側枝 GSA に対して逆の効果を示すと考えられた。

以上のように、*CCP3* が不可避の解析対象となったこと、*CCP3* 及び *AtTAC1* においてスプライシングバリエーションが存在したこと、*ccp3* 変異体においてアリル特異的な表現型が見られたこと、*AtTAC1* の発現には第 1 イントロンが機能を持つなど、想定外の検討事項が生じたことから、クリノスタットを用いた生理実験などが十分に進めることができなかったが、今後これら遺伝子の解析を進める上で、極めて重要な基礎的情報を得られた点では、大きな進展があったと考えている。

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 8 件)

全て査読有り

1. 古谷将彦、西村岳志、森田(寺尾)美代
2017 年「植物の重力屈性の分子メカニズ

- ムー根が地中に潜り茎が空へ向かうしくみ」**化学と生物** 55: 624-630.
2. Matsuoka K, Sugawara E, Aoki R, Takuma K, Morita MT, Satoh S, Asahina M. (2016) Differential cellular control by cotyledon-derived phytohormones involved in graft reunion of *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 57: 2620-2631. doi:10.1093/pcp/pew177
 3. Mori, A., Toyota, M., Shimada, M., Mekata, M., Kurata, T., Tasaka, M., Morita, M.T. (2016) Isolation of new gravitropic mutants under hypergravity conditions. *Front. Plant Sci.* 7:1443. doi: 10.3389/fpls.2016.01443
 4. Ogawa, T., Mori, A., Igari, K., Morita, M.T., Tasaka, M., Uchida, N. (2016) Efficient *in planta* detection and dissection of *de novo* mutation events in the *Arabidopsis thaliana* disease resistance gene *UNI*. *Plant Cell Physiol.* 57: 1123-32. doi:10.1093/pcp/pew060
 5. Okamoto, K., Ueda, H., Shimada, T., Tamura, K., Koumoto, Y., Tasaka, M., Morita, M.T., Hara-Nishimura, I. (2016) An ABC transporter B family protein, ABCB19, is required for cytoplasmic streaming and gravitropism of the inflorescence stems. *Plant Signal Behav.* 11: e1010947, DOI:10.1080/15592324.2015.1010947
 6. Wang, H., Yang, K., Zou, J., Zhu, L., Xie, Z., Morita, M.T., Tasaka, M., Friml, J., Grotewold, E., Beeckman, T., Vanneste, S., Sack, F., Le, J. (2015) Transcriptional regulation of PIN genes by FOUR LIPS and MYB88 during *Arabidopsis* root gravitropism. *Nat. Commun.* 6, Article number: 8822, doi:10.1038/ncomms9822
 7. Okamoto, K., Ueda, H., Shimada, T., Tamura, K., Kato, T., Tasaka, M., Morita, M.T., Hara-Nishimura, I. (2015) Regulation of organ straightening and plant posture by an actin-myosin XI cytoskeleton. *Nature Plants* 1:Article number: 15031, doi:10.1038/nplants.2015.31
 8. Nakamura, M., Toyota, M., Tasaka, M., Morita, M. T. (2015) Live cell imaging of cytoskeletal and organelle dynamics in gravity-sensing cells in plant gravitropism. *Methods Mol. Biol.* 1309, 57-69. doi: 10.1007/978-1-4939-2697-8_6.
- [学会発表](計 16件)
1. 押田龍一郎「XVE誘導系を用いた重力屈性におけるLZY3の機能解析」第59回日本植物生理学会年会、2018
 2. 近藤 智恵美「側根伸長過程における重力シグナル伝達因子LZY3の発現解析」第59回日本植物生理学会年会、2018
 3. 森田(寺尾)美代「重力シグナリングに関わるLZY及びRLDの機能解析」第59回日本植物生理学会年会、2018
 4. Miyo Terao Morita “Arabidopsis LAZY1 family plays key role in gravity signaling within statocytes in gravitropism and in branch angle control of roots and shoots.” Taiwan-Japan 2017 Plant Biology Conference, 2017
 5. Masahiko Furutani “Arabidopsis LAZY1 family mediates gravity signaling in branch angle control of roots through the interaction with RLD family.” Taiwan-Japan 2017 Plant Biology Conference, 2017
 6. Miyo Terao Morita “Arabidopsis LAZY1 family plays key role in gravity signaling in statocytes in GSA control through the interaction with RLD family.” GDRI meeting “The developing plant in its environment” 2017
 7. Takeshi Nishimura “Regulation of directional change of auxin transport via LALs-RLDs interaction in gravitropism of Arabidopsis roots.” ENPER 2017 meeting, 2017
 8. 久保田 健太「シロイヌナズナ側枝の伸長方向制御に關与する*AtTAC1* 遺伝子の解析」JANPER 2017, 2017
 9. 古谷 将彦「コルメラにおけるLZY依存的なRLDの細胞膜局在化機構」JANPER 2017, 2017
 10. 近藤 智恵美「LZY3タンパク質の偏りを持った発現パターンの解析」JANPER 2017, 2017
 11. Kenta Kubota “Functional analyses of *DGE1* and *TAC1* in Arabidopsis branch angle control” 第58回日本植物生理学会、2017
 12. 森明子「*eal1* エンハンサー変異体を用いた重力屈性の遺伝学的解析」第57回日本植物生理学会、2016
 13. Masatoshi Taniguchi “*DGE1*, *DGE2* and *DTL* genes are involved in gravity signaling in gravity sensing cells of Arabidopsis” 8th Plant Biomechanics, 2015
 14. Miyo Terao Morita “Mechanism of gravitropic signaling in gravity sensing cells ~ From molecular structure to plant organ response ~” JST CREST-PRESTO joint international symposium, 2015
 15. Masatoshi Taniguchi “Functional analysis of *DGE1*, *DGE2* and *DTL* genes involved in gravitropism in Arabidopsis thaliana”, ICAR 2015, 2015
 16. Akiko Mori “Isolation and identification of novel genes involved in gravitropism by using *eal1* enhancer mutants” ICAR 2015, 2015
- {その他}
ホームページ等
<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~per/>

森田(寺尾) 美代 (Miyo Terao Morita)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：10314535

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

谷口 雅俊 (Masatoshi Taniguchi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・研究員
古谷 将彦 (Masahiko Furutani)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・特任助教

西村 岳志 (Takeshi Nishimura)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・特任助教

久保田 健太 (Kenta Kubota)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生

押田 龍一郎 (Ryuichiro Oshida)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生

森 明子 (Akiko Mori)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生

近藤 智恵美 (Chiemi Kondo)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学生