

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11913

研究課題名(和文) シロイヌナズナの多重突然変異体を利用した重力感受経路の解明

研究課題名(英文) Analysis of a gravity-sensing pathway using Arabidopsis multiple mutants

研究代表者

藤井 伸治 (FUJII, Nobuharu)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：70272002

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)：植物の重力感受機構において、LAZY1タンパク質は重要な役割を果たしていると考えられているが、分子機能は未解明である。本研究では、オオムギの地上部の重力屈性異常serpentina変異体のHvLAZY1遺伝子に新規のミスセンス変異を見出した。そして、野生型のオオムギとserpentina変異体との78個体のF2集団を用いた連鎖解析の結果、見出したミスセンス変異が、重力屈性の欠損と連鎖した。従って、本ミスセンス変異がserpentina変異体の変異原因遺伝子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の重力感受機構におけるLAZY1タンパク質の分子機能については、未解明の重要な研究課題となっている。LAZY1遺伝子の欠損が重力屈性の異常を引き起こすことが、イネ、シロイヌナズナ、トウモロコシ、タルウマゴヤシで示されているが、いずれも遺伝子欠損変異、T-DNA/transposon挿入変異、フレームシフト変異であり、遺伝子産物の機能に重要なアミノ酸配列に関する知見は得られていない。従って、本研究により見出したオオムギのHvLAZY1遺伝子のミスセンス変異はLAZY1タンパク質の分子的特性を明らかにするための知見になると期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been believed that LAZY1 proteins play an important role on sense of gravity in plants. However, the molecular functions of LAZY1 proteins have not been revealed. In barley, agravitropic serpentina mutant were isolated by screening 600,000 M3 plants mutagenized by gamma ray. In this study, a missense mutation in HvLAZY1 gene was found in serpentina mutant. Furthermore, the linkage analysis using by 78 F2 plants that were crossed between WT (Chikurin-ibaraki No. 1) and serpentina mutant indicated that the missense mutation cosegregated with agravitropisc phenotype, suggesting a possibility that the missense mutation caused serpentina mutation.

研究分野：植物生理学

キーワード：重力感受 植物 LAZY1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物の重力刺激に対する応答機構の理解は、国際宇宙ステーション (ISS) などの微小重力条件下でヒトを含めた生物が活動する上で有用である。植物は、細胞内小器官のプラスチドの一種であるアミロプラストが沈降することにより、重力の向きを感受する仕組みを適応・進化させた。この重力を感受する仕組みは動物などの他の生物種には見られない特殊な仕組みであり、植物の重力感受機構を明らかにすることにより、生物の重力感受機構の基本原則と植物の重力感受機構の特殊性を理解することが可能となる。しかしながら、植物の重力刺激を重力シグナルに変換する分子 (重力感受分子) は同定されていない。したがって、植物の重力感受細胞内で、細胞内小器官であるアミロプラストの沈降を感受する分子機構は未解明の研究課題として残されている。そこで、本研究では、植物の重力感受に関する新規の知見を得ることを目的として研究を行った。

2. 研究の目的

植物の重力感受機構は、シロイヌナズナを用いた解析により、アミロプラストの沈降と DnaJ 様タンパク質である ARG1 から構成されていると考えられている。重力感受におけるアミロプラストの沈降の役割は、デンプン合成の欠損によりアミロプラストが正常に沈降しない *pgm* 突然変異体を用いて検討されてきた。しかし、これらの突然変異体で欠損している遺伝子産物は重力刺激を生体内のシグナルに変換する機能を持たないと考えられるため、未同定の重力感受分子の存在が予想される。そこで、本研究では、遺伝学的手法を用いて新規の重力感受を担う分子の同定を試みている。当初、*arg1 pgm* 二重突然変異体中で機能している重力応答性の低下を指標に単離した *enhancer of arg1 pgm (enap)* 突然変異体に注目し解析を行ってきた。しかしながら、マッピング用系統の *arg1 pgm* のアレル突然変異体の *rhg stf1* 二重突然変異体の重力屈性の低下が得られた突然変異体よりも大きく、スクリーニング法の再検討を余儀なくされた。一方、近年、新規の重力屈性異常突然変異体としてイネの地上部の重力屈性が異常な *lazy1* 突然変異体、タルウマゴヤシの根の重力屈性が異常な *negative gravitropic response of roots (ngr)* 突然変異体の突然変異原因遺伝子が同定された。LAZY1、NGR は類似したドメイン構造を含み、重力感受に機能する可能性が予想されているが、分子機能は未解明である。そこで本研究では、イネの *lazy1* 突然変異体に形質が類似しているオオムギの地上部の重力屈性が異常となる *serpentina* 突然変異体がオオムギの LAZY1 遺伝子での変異によって引き起こされるかを検討した。

3. 研究の方法

【供試材料と生育条件】

実験にはオオムギ 竹林茨城 1 号および *serpentina* 突然変異体の種子を用いた。ピンセットを用いて両系統の種子の種皮を除去した後、25°C 暗所で 20 時間、催芽させ、それぞれの実験に供試した。

【DNA の構造解析】

DNA の抽出には Agencourt ChloroPure (BECKMAN COULTER) キットを用いた。2 mL 容量のチューブに採種した葉を入れ-80°Cで一晩凍結した後、直径 7 mm と直径 4 mm のジルコニアビーズ (YTZ@ボール: 株式会社ニッカト) と 150 μ L の Lysis buffer, RNase (10 mg/ μ L) 1.7 μ L を加え、サンプル破砕機 (Tissue Lyser, Qiagen) にて 20 frequency/sec で 2 分間破砕した。振幅の小さい側で破砕した試料を確実に破砕するため、内側の試料の位置を外側になるように試料を設置する位置を変え、さらに 1 分間破砕した。破砕後、サンプルの入った 2 mL チューブを 14,000 rpm、20°C で 20 分間遠心した。サンプルを遠心した後、200 μ L 容量の 8 連チューブに上清を 75 μ L 移し、78 μ L の Bind buffer mix (Bind buffer 3 μ L、2-propanol 75 μ L) を加えた。ピペッティングにより混和し、室温で 4 分インキュベーションし、核酸を磁気ビーズに結合させた。その後、8 連チューブを磁気プレートに移し、2~4 分放置して核酸が結合した磁気ビーズを溶液から分離させ、液体を捨てた。Wash buffer を 150 μ L 加え、ピペッティングにより混和して室温で 1 分インキュベーションした。そして、8 連チューブを磁気プレートに移し、2~4 分放置して核酸が結合した磁気ビーズを溶液から分離させ、液体を捨てた。次に、8 連チューブを磁気プレー



図 1. オオムギの重力屈性異常 *serpentina* 変異体

野生型 (竹林茨城 1 号、写真奥) のオオムギの茎は負の重力屈性を発現し、垂直に生育しているのに対し、*serpentina* 変異体の茎は、倒伏し、横伏成長する (写真手前)。

トから移し 70%エタノールを 150 μ L 加え混和した後、磁気プレート上で磁気ビーズを分離して液体を捨てた。エタノールによる洗浄のステップを2回繰り返した後、1時間風乾させて 50 μ L の TE を加え再度懸濁した。室温で4分インキュベートし核酸を磁気ビーズから分離させた後、チューブを磁気プレートに移し、磁気ビーズを溶液から分離した。そして、核酸を含む溶液を新しいチューブに移した。DNA の濃度を、Nano drop (Thermo Fisher) を用いて測定した後、-20°C で DNA 溶液を保存した。

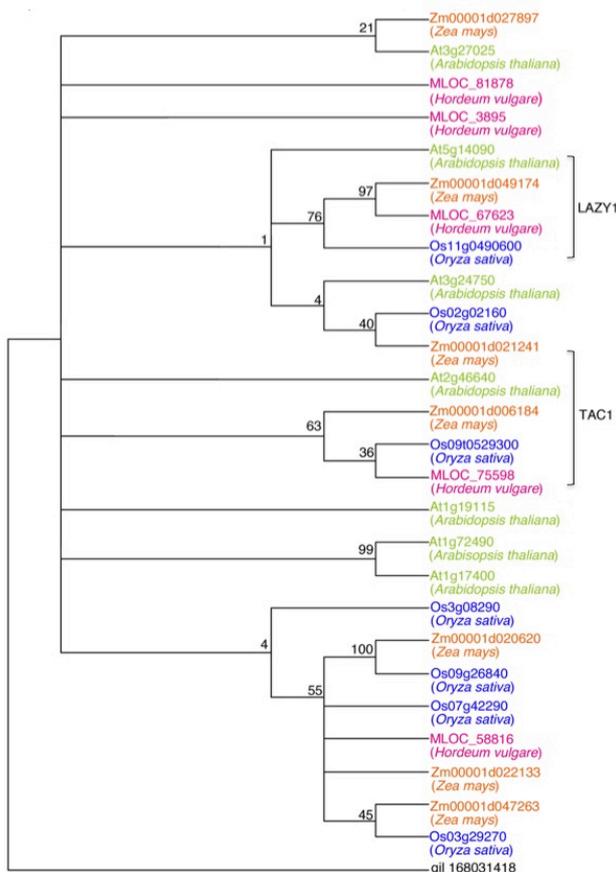
各 PCR につき、鋳型 DNA 2 μ L、滅菌水 9 μ L、5 μ M プライマー (Forward、Reverse) 0.6 μ L、2.5 mM dNTP 1.2 μ L、10 \times Taq buffer 1.5 μ L、*ExTaq* DNA polymerase 0.15 μ L を混和し、94°C (1分) で熱変性した後、94°C (30秒)、55°C (30秒)、72°C (1分30秒) を40サイクル行い、72°C (5分) で反応させた。そして、PCR 産物を 1%アガロースゲル [0.5 \times TAE Buffer、0.005%エチジウムブロマイド] を用い、0.5 \times TAE Buffer 中で 100V、30分泳動し、分離した。電気泳動後、トランスイルミネーターを用いて PCR 産物を検出した。

PCR 産物の精製には GFX PCR Purification Kit (Illustra) を用いた。100 μ L の PCR 産物に、500 μ L の Capture buffer type 3 を加え、溶液を混和した後遠心し、溶液を 2 mL のコレクションチューブ中の GFX MicroSpin column に添加して、14,000 rpm で1分間遠心した。ろ液を捨て、500 μ L の Wash Buffer type1 を加え、14,000 rpm で1分間遠心した。GFX MicroSpin column を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移し、50 μ L の Elution Buffer type 6 をメンブレンに添加して、室温で1分間インキュベーションした。その後、14,000 rpm で1分間遠心し、DNA を溶出した。

シーケンシング反応には GenomicLab DTCS Quick Start Kit (BECKMAN) を用いた。まず、精製した PCR 産物とプライマーとを混合し、シーケンシング反応を行い、その後反応液をエタノール沈殿した。40 μ L の Sample Loading Solution を加えて、サンプルを再び懸濁し、サンプルプレートに移し、ライトミネラルオイルを1滴ずつ加え、GenomeLabTM GeXP (BECKMAN COULTER) を用いて泳動を行い、塩基配列を解析した。

【地上部の重力屈性実験系】

種皮を取り除いたオオムギの種子を 5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に浸漬して表面殺菌し、滅菌水で3回洗浄した後、吸水させた濾紙を敷いたシャーレに播種した。このシャーレを暗箱に入れ、25°C で20時間催芽した。催芽した種子を 3 \times 4 \times 5 cm にカットしたロックウールに植え付け、25°C 明条件で72時間育成させて92時間齢の芽生えを実験に用いた。92時間齢の芽生えをロックウールごと90°横倒し、重力刺激を与え、25°C 明条件で育成した。7日間後にデジタルカメラで芽生えを撮影し、得られた画像と画像解析ソフト ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) を用いて屈曲角度を測定した。得られたデータを、Microsoft Excel software (Microsoft Japan Co. Ltd.) を用いてカイ二乗検定を行い、単一劣勢変異の理論値との適合度を比較して変異原因遺伝子数を検討した。



4. 研究成果

イネ、シロイヌナズナ、オオムギ、トウモロコシの *LAZY1* 遺伝子ファミリーの分子系統解析を行った結果、イネ *LAZY1* 遺伝子 (Os09t0529300)、トウモロコシ *LAZY1* 遺伝子 (Zm00001d049174) に加えてオオムギの遺伝子 (MLOC_67623) が一つのクレードを形成し、MLOC_67623 がオオムギにおける *LAZY1* オーソログ遺伝子であると考えられた (図2)。そこで、MLOC_67623 をオオムギにおける *LAZY1* オーソログ遺伝子 (*HvLAZY1*) として塩基配列を解析した。その結果、

図2. オオムギ (*Hordeum vulgare*)、イネ (*Oryza sativa*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *LAZY1* ファミリー遺伝子群の分子系統解析の結果。ClustalW を用いてアミノ酸配列のアライメント作成を作成し、Neighbor-joining 法によりブートストラップを100反復し、分子系統樹を作成した。また、アウトグループとしてヒメツリガネゴケの遺伝子の gi168031418 を用いた。

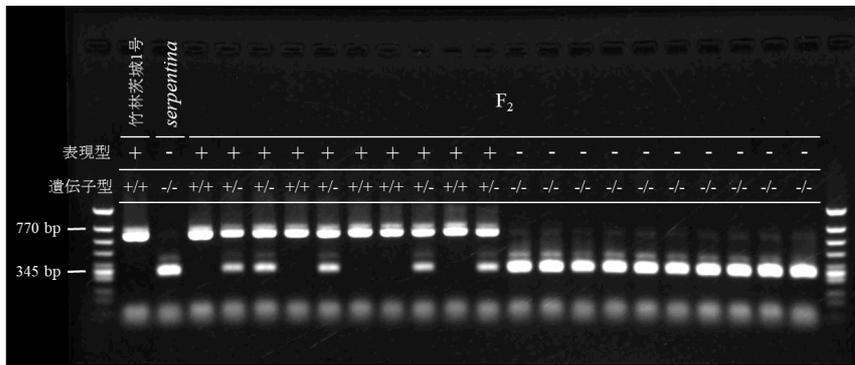


図3. 野生型 (竹林茨城1号) と *serpentina* 変異体の F₂ 集団での重力屈性異常と *HvLAZY1* 遺伝子でのミスセンス変異の連鎖解析。表現型の「+」は正常な重力屈性 (野生型) を、「-」は重力屈性の欠損 (*serpentina* 型) を示した。遺伝子型

の「+」は野生型 (竹林茨城1号) を、「-」は変異型 (*serpentina* 型) を示した。本図では78個体のうち20個体の F₂ 個体での解析結果を示した。

serpentina 突然変異体の Open reading frame (ORF) 内に3ヶ所の塩基置換が認められ、2ヶ所は同義置換、1ヶ所は非同義置換 (ミスセンス変異) であった。

本ミスセンス変異が *serpentina* 変異体における重力応答能力欠損の原因かを検討するため、*serpentina* 変異体の表現型と *HvLAZY1* 遺伝子のミスセンス変異との連鎖を解析した。まず、野生型と *serpentina* 変異体の交配後代 F₂ 世代の78個体の芽生えを用いて横倒し処理実験を行い、重力屈性異常形質の遺伝様式を解析した。その結果、F₂ 個体での表現型の比 (野生型:変異型) は59:19となった。表現型の比を3:1とした場合のカイ二乗検定の結果、 $\chi^2=0.067$ ($P>0.05$) となり、*serpentina* 突然変異が1遺伝子の変異によることが確認された。そして、ミスセンス変異を識別できる CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) マーカーを用いて各 F₂ 個体の遺伝子型を判別し、形質と遺伝子型の連鎖を解析した。その結果、78個体の F₂ 個体で変異形質とミスセンス変異の連鎖が認められた (図3)。この結果から *HvLAZY1* のミスセンス変異が *serpentina* 変異体の重力応答異常表現型の原因である可能性が示された。今後、シロイヌナズナの *lzy1 lzy2 lzy3* 三重変異体の重力屈性の回復を指標に、見出した *HvLAZY1* のミスセンス変異が LAZY1 タンパク質の機能に与える影響を解析することにより、LAZY1 タンパク質の分子的特性が明らかになると期待される

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Fujii N, Miyabayashi S, Sugita T, Kobayashi A, Yamazaki C, Miyazawa Y, Kamada M, Kasahara H, Osada I, Shimazu T, Fusejima Y, Higashibata A, Yamazaki T, Ishioka N, Takahashi H 査読有 (2018) Root-tip-mediated inhibition of hydrotropism is accompanied with the suppression of asymmetric expression of auxin-inducible genes in response to moisture gradients in cucumber roots. PLoS ONE 13(1): e0189827. doi: 10.1371/journal.pone.0189827
- ② Morohashi K, Okamoto M, Yamazaki C, Fujii N, Miyazawa Y, Kamada M, Kasahara H, Osada I, Shimazu T, Fusejima Y, Higashibata A, Yamazaki T, Ishioka N, Kobayashi A, Takahashi H 査読有 (2017) Gravitropism interferes with hydrotropism via counteracting auxin dynamics in cucumber roots: clinorotation and spaceflight experiments. New Phytol. 215(4):1476-1489. doi: 10.1111/nph.14689. pmid: 28722158.
- ③ Yamazaki C, Fujii N, Miyazawa Y, Kamada M, Kasahara H, Osada I, Shimazu T, Fusejima Y, Higashibata A, Yamazaki T, Ishioka N, Takahashi H 査読有 (2016) The gravity-induced re-localization of auxin efflux carrier CsPIN1 in cucumber seedlings: spaceflight experiments for immunohistochemical microscopy. NPJ Microgravity. 2:16030. doi: 10.1038/npjmgrav.2016.30. pmid: 28725738
- ④ Kim H-J, Kobayashi A, Fujii N, Miyazawa Y, Takahashi H 査読有 (2016) Gravitropic response and circumnutation in pea (*Pisum sativum* L.) seedling roots. Physiol. Plant. 157(1): 108-118. doi: 10.1111/ppl.12406.

[学会発表] (計13件)

- ① 藤井伸治、宮林彩智子、小林啓恵、山崎千秋、宮沢豊、鎌田源司、笠原春夫、長田郁子、嶋津徹、東端晃、山崎丘、石岡憲昭、高橋秀幸「キュウリの芽生えの発芽時の重力条件により発現が変動する遺伝子の探索」日本宇宙生物科学会第32回大会 東北大学 (宮城県仙台市) 2018年9月21日~9月23日 (ポスター)
- ② 藤井伸治、宮林彩智子、小林啓恵、山崎千秋、宮沢豊、鎌田源司、笠原春夫、長田郁子、嶋津徹、伏島康男、東端晃、山崎丘、石岡憲昭、高橋秀幸「キュウリの根の重力・水分屈性時の偏差発現遺伝子のオーキシン応答性の解析」東北植物学会第7回大会 岩手大学上田キャンパス (岩手県盛岡市) 2017年12月9日, 10日 (ポスター)
- ③ 杉田智樹、宮林彩智子、藤井伸治、小林啓恵、高橋秀幸「キュウリの根の水分屈性は重力

- を感受する根端に非依存的なオーキシン輸送によって制御される」東北植物学会第7回大会 岩手大学上田キャンパス (岩手県盛岡市) 2017年12月9日, 10日 (ポスター)
- ④ 藤井伸治、宮林彩智子、小林啓恵、山崎千秋、宮沢豊、鎌田源司、笠原春夫、長田郁子、嶋津徹、伏島康男、東端晃、山崎丘、石岡憲昭、高橋秀幸「キュウリの根の重力屈性と水分屈性時に偏差的に発現する遺伝子のオーキシン応答性の解析」日本宇宙生物科学会第31回大会 群馬会館 (群馬県前橋市) 2017年9月20日~9月22日 (ポスター)
- ⑤ 杉田智樹、宮林彩智子、藤井伸治、小林啓恵、高橋秀幸「キュウリの根の水分屈性は重力を感受する根端に非依存的なオーキシン輸送によって制御される」日本宇宙生物科学会第31回大会 群馬会館 (群馬県前橋市) 2017年9月20日~9月22日 (ポスター)
- ⑥ 藤井伸治、山崎千秋、宮沢豊、鎌田源司、笠原春夫、長田郁子、嶋津徹、伏島康男、東端晃、山崎丘、石岡憲昭、高橋秀幸「微小重力環境がキュウリ芽生えの発生理に与える影響」第31回宇宙環境利用シンポジウム 宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究所 相模原キャンパス (神奈川県相模原市) 2017年01月16日, 17日 (口頭)
- ⑦ 宮東みのり、藤井伸治、小林啓恵、高橋秀幸「オオムギ (*Hordeum vulgare*) 突然変異体を利用した植物の重力応答機構の解析」東北植物学会第6回大会 東北大学青葉山北キャンパス (宮城県仙台市) 2016年12月10日, 11日 (ポスター)
- ⑧ 藤井伸治、宮林彩智子、小林啓恵、高橋秀幸「キュウリの根の重力屈性による水分屈性の抑制機構」日本宇宙生物科学会第30回大会 愛知医科大学 (愛知県長久手市) 2016年10月13日 - 15日 (口頭)
- ⑨ Nobuharu Fujii, Chiaki Yamazaki, Yutaka Miyazawa, Motoshi Kamada, Haruo Kasahara, Ikuko Osada, Toru Shimazu, Yasuo Fusejima, Akira Higashibata, Takashi Yamazaki, Noriaki Ishioka, Hideyuki Takahashi "A Pathway that Laterally Transports Auxin from the Upper Side to the Lower Side of the Transition Zone of Cucumber Seedlings via Endodermal Layers is Formed Due to Gravitstimulation" 11th Asian Microgravity Symposium, Hokkaido University (Hokkaido, Sapporo) October 25 to 29, 2016 (Oral)
- ⑩ Sachiko Miyabayashi, Nobuharu Fujii, Akie Kobayashi, Chiaki Yamazaki, Yutaka Miyazawa, Motoshi Kamada, Kasahara Haruo, Osada Ikuko, Shimazu Toru, Fusejima Yasuo, Higashibata Akira, Yamazaki Takashi, Ishioka Noriaki, Takahashi Hideyuki. "Transcriptome analysis of gene expressions during hydrotropic and gravitropic responses in cucumber roots." 第57回日本植物生理学会年会 (岩手) 2016年3月18日~3月20日 (ポスター)
- ⑪ 藤井伸治、宮林彩智子、小林啓恵、山崎千秋、宮沢豊、鎌田源司、笠原春夫、長田郁子、嶋津徹、伏島康男、東端晃、山崎丘、石岡憲昭、高橋秀幸「キュウリの根の水分屈性と重力屈性に関わる遺伝子の網羅的発現解析」第30回宇宙環境利用シンポジウム (相模原) 2016年1月19日~1月20日 (口頭)
- ⑫ 宮林彩智子、藤井伸治、小林啓恵、山崎千秋、宮沢豊、鎌田源司、笠原春夫、長田郁子、嶋津徹、伏島康男、東端晃、山崎丘、石岡憲昭、高橋秀幸「キュウリ根の水分屈性制御遺伝子の探索: 地上クリノスタット実験と宇宙微小重力 実験による解析」日本宇宙生物科学会第29回大会 (東京) 2015年9月26日~9月27日 (ポスター)
- ⑬ 宮林彩智子、藤井伸治、小林啓恵、山崎千秋、宮沢豊、鎌田源司、笠原春夫、長田郁子、嶋津徹、伏島康男、東端晃、山崎丘、石岡憲昭、高橋秀幸「キュウリの根の重力屈性時と水分屈性時に偏差的に発現する遺伝子の比較」日本宇宙生物科学会第29回大会 (東京) 2015年9月26日~9月27日 (ポスター)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)