

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18370019  
 研究課題名 (和文) シュート重力屈性反応における刺激伝達の分子機構-オミクス研究からの展開  
 研究課題名 (英文) Research of signaling mechanism in shoot gravitropism

研究代表者  
 森田 (寺尾) 美代 (MORITA T. MIYO)  
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：10314535

研究成果の概要：本研究は、これまでに得た様々な変異体をツールとして、オミクスのアプローチを用いるとともに、我々が構築した重力感受細胞の生細胞イメージング系を駆使し、重力感受とそれに引き続いて起こるシグナル変換・細胞間シグナル伝達の分子機構の解明を目的とした。DNA オリゴマイクロアレイを用いて、重力刺激前後で発現変化を示す遺伝子を見だし、重力屈性反応との関連を探るとともに分子マーカーとしての利用を試みた。また、同様にアレイを用いて変異体感での発現遺伝子の比較を行った。その結果、重力屈性に関与する新奇遺伝子の単離に成功した。加えて、変異体の表現型からシグナリングに関与することが予想された遺伝子の解析を行った。その結果、重力受容において予想以上に複雑な制御機構があることを見いだした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	5,100,000	0	5,100,000
19年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
20年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	2,910,000	17,710,000

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物、環境応答、重力屈性、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

重力屈性研究は、刺激受容、物理的刺激から生化学的シグナルへの変換、刺激受容部位から応答部位へシグナル伝達といった、実に多くの生物学における普遍的な問題を含んでいる。植物の屈性反応は古くから多くの植物生理学者の興味を引き、器官の偏差成長に植物ホルモンオーキシンが重要な役割を果たしていることは有名である。近年の植物の分子遺伝学的手法及びリソースの整備に伴い、オーキシンのシグナル伝達

機構・極性輸送については分子レベルで説明されようとしているが、刺激受容から器官の偏差成長に至る屈性の一連の反応の流れの中でオーキシンが関与する時空間的位置は明らかではなかった。更に刺激受容とオーキシンの偏差分布を繋ぐ分子機構に関しては、分子レベルでの知見は殆どなかった。

我々は重力屈性の分子メカニズムを理解するために、シロイヌナズナを用いた遺伝学を中心に研究を進めていた。とくに、地

上部（花茎）について、重力屈性に異常を示す変異体(*shoot gravitropism (sgr)1-9*)を単離し、原因遺伝子のクローニング及び機能解析を行っていた。その結果、地上部における重力感受細胞は内皮細胞であること、内皮細胞中に含まれる色素体（アミロプラスト）が平衡石として重力感受に重要な働きを持つこと、アミロプラストの動態には液胞の正常な機能が必要であることを明らかにし、重力屈性の初期反応（重力感受）についての重要な知見をもたらした。またこれまでに単離した*SGR*遺伝子の重力屈性反応における位置付けも行っていた。そこで、これまでに得た結果と変異体を生かし、マイクロアレイを中心としたオミクス的研究に着手することにした。

## 2. 研究の目的

感受細胞における重力感受から器官レベルで起こる屈曲に至る反応経路は、非常に複雑に分岐したネットワークからなると推測された。従って、複雑な反応経路を解き明かしていくためには、各反応経路をモニターする方法が必要となる。しかしながら重力屈性の評価基準は、初発となる平衡石であるアミロプラスト沈降、オーキシンの分布を間接的にモニターする分子マーカーであるDR5rev::GFP、最終段階である器官の屈曲しかなかった。そこで、目的の一つに、マイクロアレイを用いて重力刺激前後で発現変化が見られる遺伝子を探索し、新たな分子マーカーとして確立することを据えた。また、複雑な反応経路の解明を目指して、重力屈性に関与する因子をより多く単離・解析する必要があると考えた。そこでこれまでに得た変異体のなかで、表現型からシグナリングに関与することが期待された*sgr5*、*sgr9*の詳細な解析を行うことにより、シグナリングに関する新たな知見を得ようと試みた。重力受容直後のシグナリングは、重力受容細胞内で起こると考えられる。そこで、変異体を駆使して重力受容細胞で豊富に発現する遺伝子をマイクロアレイにより探索し、重力屈性との関連を探ることで、重力屈性に関与すると考えられる因子をより多く単離・解析することを試みた。

## 3. 研究の方法

### (1)分子マーカーの確立を目指した研究

重力刺激後の遺伝子発現プロファイルの経時変化をアジレント社の *Arabidopsis III* Oligo-microarray をもちいて、野生型と *sgr2* 変異体間で比較した。*sgr2* は重力感受細胞である内皮細胞内のアミロプラスト沈降に異

常を示す変異体で、重力受容能をほとんど失っていると考えられる。また、我々は花茎を縦方向に二分する技術を確立しており、下

(重力)側と上側とに分けて mRNA を得ることに成功している。重力屈性においては下側と上側でオーキシンの不等分布が起こるとされているが、実は花茎においてはこれを証明するような実験結果は殆どない。従って、転写量に上下差が生じる及び生じない重力刺激応答性遺伝子は、オーキシン不等分布との関係を探る上で非常に興味深い。そこで、上下に二分したサンプル間でも同様にマイクロアレイ解析を行い、上下に勾配を生じるもしくは勾配を生じない重力刺激応答性遺伝子の探索を行った。選抜された候補遺伝子については、野生型・*sgr2* における重力刺激前後の挙動について、RT-PCR を用いてアレイ解析の結果を確認し、重力刺激応答性遺伝子の候補を絞り込んだ。

### (2) *sgr5*, *sgr9* の解析

いずれも花茎の重力屈性能が低下しているが、固定試料を用いた内皮細胞の観察からは、アミロプラストの重力方向への沈降が見られることから、重力感受は正常で、それ以降に異常があると考えられた。また、変異体中で内皮特異的に原因遺伝子を発現させることで重力屈性が回復することから、いずれも重力感受細胞内で起こるイベントに関係すると推測された。*SGR5* は核移行シグナルを持つ Zinc finger 蛋白質をコードすることから、転写因子として機能すると考えられた。*SGR9* は C2HC3-type RING finger を含む蛋白質をコードする。我々は、重力方向を保ったまま顕微鏡観察できる vertical microscope system を構築し、生きた内皮細胞の重力刺激前後での観察が可能になった。これらの変異体で、内皮細胞の詳細な観察を行い、原因遺伝子と重力受容能との関係を明らかにした。

(3) *SGR7/SHR*, *SGR1/SCR* はいずれも転写因子である。*SGR7/SHR* の下流因子であり、内皮細胞特異的発現を示す *SGR1/SCR* の働きで、内皮細胞層が形成される。*eal1* は *SGR7/SHR* の一アミノ酸欠損変異で、内皮細胞は形成されるが、それは重力感受細胞としての機能は喪失している。重力屈性においてシグナリングの初発の場合は、重力受容細胞である内皮細胞である。この細胞中で起こる刺激受容と初期のシグナル伝達のために必要なシステムは、受容細胞としての分化の結果、構築されるものである。そこで、内皮細胞分化不全の表現型を示す3つの変異体(*sgr1/scr*, *sgr7/shr*, *eal1*)を用いて、マイクロアレイにより重力受容細胞として機能に必要な遺伝子の探索を行った。

## 4. 研究成果

(1) 重力刺激により転写が誘導される遺伝子

の探索を、マイクロアレイにより行った。その結果、*IAA5* 遺伝子を含む3遺伝子が確実に重力刺激後30分で発現上昇することを明らかにした。*IAA5* については、更に解析を行い、花茎の重力側でつよく発現することを見いだした。またこの発現誘導はオーキシンの極性輸送に依存することを明らかにした。T-DNA 挿入変異体及びドミナント変異型 *IAA5* 形質転換体の解析から、重力屈性に大きく影響を及ぼすことはないが、遺伝子機能としては重力屈性を負に制御する可能性が考えられた。以上のような性質から、重力屈性をモニターする分子マーカーとしては、現時点で最も早期にオーキシン不等分布を反映するものと考えられた。

(2) 花茎重力屈性変異体 *sgr5* は弱い重力屈性を示す。その原因遺伝子は、C2H2-type zinc finger protein であること、また核局在することからおそらく転写因子であろうと考えられる。更に、*SGR5* は重力感受細胞である内皮細胞で機能すること、固定試料での観察から内皮細胞内のアミロプラストはほぼ重力方向に沈降していることを示した。以上の結果をまとめ、論文発表を行った。一方で、生きた内皮細胞の観察からは、アミロプラストは自在に動いているが、重力方向には沈降しないことが初めて明らかになった。*sgr9* 変異体もまた弱い重力屈性を示す変異体ある。*sgr9* においても、固定試料では一見アミロプラストが正常に沈降して見えるが、生細胞観察からは、*sgr5* と同様にアミロプラストの動態異常が観察された。*sgr9 sgr5* 二重変異体は重力屈性能を完全に失うと同時に、アミロプラストの動きも極端に制限されることが分かった。この結果から、*SGR5* 及び *SGR9* は遺伝学的には独立の経路で、アミロプラスト沈降及び動態に関与する可能性を示した。以上の結果は、当初の予想を大きく外れるものであった。我々も含め重力屈性研究者は、これまでアミロプラスト動態解析を、主に固定試料を用いて行ってきた。しかしこの結果は、固定試料では把握しきれないアミロプラスト動態制御機構の存在を示す、非常に示唆に富んだものであった。

3) 重力感受細胞(内皮細胞)が正常に形成出来ない3つの突然変異体を用い、マイクロアレイにて野生型植物よりも発現量の低下している遺伝子を探索した。3つの変異体に共通して発現量の低い遺伝子が約30個見いだした。*SGR5* がこの中に含まれていたことから、この探索方法で新奇の重力屈性関連遺伝子が抽出出来ている可能性が示唆された。これらの遺伝子を *Down-regulated Genes in Eall (DGE)* として、入手可能な T-DNA 挿入変異体の表現型解析を行った。*DGE1* の T-DNA 挿入変異体において、花茎重力屈性に弱いながら異常が認められた。*DGE1* は、イ

ネにおいて地上部の重力屈性への関与が示唆されている *LAZY1* と低い相同性を示す。花茎における発現組織は内皮細胞を含んでいた。従って、期待通り重力受容細胞内で発現し、重力屈性に関与する新奇遺伝子を単離できた。*DGE* 遺伝子中で、最も *eall* における発現量の減少率が大きかった *DGE2/AtADF9* は、actin depolymerization factor (ADF)/cofilin ファミリーに属するタンパク質をコードする。これまでの研究からアミロプラスト動態制御にはアミロプラスト周辺のアクチンが関与することを見いだしており、*DGE2/AtADF9* の重力受容への関与が推察された。*DGE3/AtPRA1, F1* の T-DNA 挿入変異体は、単独では目立った表現型が認められなかった。しかし、*sgr5* との二重変異体の重力屈性能は *sgr5* 単独変異体よりも明らかに弱いことが分かった。この事実は、*DGE3/AtPRA1, F1* も新奇重力屈性関連遺伝子である可能性を示唆している。

#### 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 5 件)

- ①. 中村守貴、田坂昌生、森田(寺尾)美代 「高等植物における重力感受の分子機構」生物物理 49巻3号, 116-121, 2009. 査読有
- ②. Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322 (5906): 1380-1384, 2008. 査読有
- ③. Morita, M.T., Saito, C., Nakano, A. and Tasaka, M. *endodermal-amyloplast less 1* is a novel allele of *SHORT-ROOT*. *Advances in Space Research*, 39, 1127-1133, 2007. 査読有
- ④. Morita, M.T., Sakaguchi, K., Kiyose, S., Taira, K., Kato, T., Nakamura, M. and Tasaka, M. A C2H2-type zinc finger protein, *SGR5*, is involved in early events of gravitropism in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J.* 47, 619-628, 2006, 査読有.
- ⑤. 新濱充、森田(寺尾)美代、田坂昌生 「植物の重力屈性の分子機構」植物の生長調節 2006. 査読無

[学会発表] (計 10 件)

- ①. 中村守貴、田坂昌生、森田(寺尾)美代 *SGR9* は重力感受細胞においてアクチンフィラメントとアミロプラストの相互

- 作用を調節する。日本植物生理学会年会第50回大会 2009年3月21-24日 名古屋
- ②. 伏田豊仁、中村守貴、田坂昌生、森田(寺尾)美代 シロイヌナズナ花茎重力屈性に関与する新奇遺伝子の単離とその解析 2009年3月21-24日 名古屋
  - ③. Tasaka, M., Nakamura, M., Morita, M.T. Actin dynamics involved in gravity perception in Arabidopsis inflorescence stems. 37th COSPAR Scientific Assembly, July 13 – 20, 2008. Montreal
  - ④. Nakamura, M., Tasaka, M., Morita, M.T. A possible role of a novel RING finger protein in actin remodeling within statocytes. 19th International Conference on Arabidopsis Research, July 23 – 27, 2008. Montreal
  - ⑤. Nakamura, M., Tasaka, M., Morita, M.T. A novel RING finger protein, SGR9, is involved in the regulation of actin-amyloplasts interaction in Arabidopsis shoot gravitropism. ZOMES V November 11-14, 2008. Yokohama
  - ⑥. 森田(寺尾)美代 重力屈性におけるアミロプラスト動態と重力感受. 日本植物学会第72回大会シンポジウム 2008年9月25-27日, 高知
  - ⑦. Miyo Terao Morita, Moritaka Nakamura, Masao Tasaka Molecular genetic study of shoot gravitropism in Arabidopsis. 第45回日本生物物理学会年会シンポジウム 2007年12月21-23日, 横浜
  - ⑧. 森田(寺尾)美代 第16回バイオイメージング学会学術集会(招待講演)「重力を感じる仕組みを探るー植物の重力感受細胞を視る」 2007年10月31日 東京理科大学
  - ⑨. Miyo T. Morita, Moritaka Nakamura, Chieko Saito, Akihiko Nakano and Masao Tasaka *endodermal-amyloplast less 1* is a novel allele of *SHORT-ROOT*. The 18th International Conference on Arabidopsis Research, June 20-23, 2007, Beijing.
  - ⑩. Moritaka Nakamura, Miyo Terao Morita and Masao Tasaka. Molecular genetic analysis of Arabidopsis *shoot gravitropism 9* mutant. The 53rd NIBB Conference Dynamic Organelles in Plants, June 14-17 2006, Okazaki

[図書] (計 2件)

- ①. Harrison, B.R., Morita, M.T., Masson, P.H., and Tasaka, M. (2007) Signal transduction in gravitropism. *In Plant Tropism* (Blackwell Publishing) p.21- 45. 2007.
- ②. 森田(寺尾)美代 「重力屈性における

重力感受」 Advanced Biomimetics Series 1 プラントミメティックスー植物に学ぶー (甲斐昌一、森川弘道 監修) NTS, 344-350, 2006.

[その他]

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/keihatsu/PROJECTS/重力屈性.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田(寺尾)美代 (MORITA T. MIYO)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授  
研究者番号：10314535

### (2) 研究分担者

田坂 昌生 (TASAKA MASAO)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授  
研究者番号：90179680

### (3) 連携研究者