

平成22年10月26日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19370022
 研究課題名（和文） 高等植物における重力応答の分子機構：イネ *LAZY* 遺伝子の機能を中心にした研究
 研究課題名（英文） Molecular basis of graviresponses in higher plants: investigation with a particular interest in the function of the rice *LAZY* gene
 研究代表者
 飯野 盛利 (IINO MORITOSHI)
 大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
 研究者番号：50176054

研究成果の概要（和文）：地上部の重力屈性が低下したイネ突然変異体 *lazy1* の原因遺伝子を同定し、その産物 (*LAZY1*) はイネ幼葉鞘において、重力受容とオーキシン不均等分配の間で必須な因子として機能していること、回旋運動にも必須な因子であることを明らかにした。イネ幼葉鞘の重力屈性には *LAZY1* を介するシグナル伝達と介さないシグナル伝達に関与することも示唆された。さらに、シロイヌナズナに存在するホモログ (*AtLAZY1*) の機能について形質転換体を用いて解析し、*AtLAZY1* はシロイヌナズナにおいても地上部の重力屈性に関与していること、主に維管束に沿って発現し、細胞内では主に核に分布することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：After identifying the rice gene responsible for *lazy1* mutation, which causes reduced gravitropism of shoots, it was resolved that, in rice coleoptiles, the gene product (*LAZY1*) functions between graviperception and lateral auxin translocation and is also required for circumnutation. It was suggested that coleoptile gravitropism is mediated by *LAZY1*-dependent and -independent signaling pathways. We subsequently investigated the function of an Arabidopsis *LAZY1* homolog by using transgenic plants. This homolog was found to be involved in gravitropism of Arabidopsis shoots, to be expressed mainly along vascular bundles, and to be localized in the nucleus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：環境応答・運動・重力屈性・回旋運動・シグナル伝達・オーキシン・イネ

1. 研究開始当初の背景

植物は環境に应答して、成長の方向と分布

を調節することによって、その姿勢を制御している。とりわけ重力屈性は、他の屈性と関

連しあいながら、姿勢制御で中心的な役割を担っている (Iino 2006)。重力屈性の機構は古くから研究され、アミロプラストが平衡石となつて重力の方向が受容されるという説 (デンブ平衡石説) およびオーキシンの不均等分配によって屈曲反応が生じるという説 (Cholodny-Went 説) が現在に至るまで議論されてきた。これらの説はシロイヌナズナの突然変異体を用いた近年の研究によって支持され (Morita and Tasaka 2004)、オーキシンの極性移動に関与する PIN1 タンパク質のホモログが重力屈性に関与していることなどが示された (Friml et al. 2002)。我が国では、奈良先端大の田坂らがシロイヌナズナ突然変異体を用いた研究を進め、液胞への小胞輸送が重力シグナルの受容に重要な働きをしていることなどを明らかにした (Saito et al. 2005)。研究開始当初、重力屈性に関与する初期シグナル伝達の分子機構は、多くが未解明の状態であったと言える。

本研究代表者らは、イネ幼葉鞘の光屈性を研究する過程で、暗所で培養した芽生えの幼葉鞘は規則正しい回旋運動をしていることを観察し (Yoshihara and Iino 2005)、重力屈性が弱まった *lazy1* 突然変異体はこの回旋運動を欠損していることを発見した (図 1、Yoshihara and Iino 2006)。この発見を受けて、マップベースクローニングにより *LAZY1* の候補遺伝子を同定し、この遺伝子を *lazy1* 突然変異の原因遺伝子であることを相補性検定と RNA 干渉法により証明した。*LAZY1* は新規タンパク質で、予測アミノ酸配列からは特徴のあるモチーフは検出されず、その機能を推測することはできなかった。*LAZY1* は重力屈性の初期シグナル伝達に関与している可能性があり、その解析はその分子機構を明らかにするための糸口になると期待された。

引用文献

- Friml, J, Wiśniewska, J, Benková, E, Mendgen, K and Palme, K (2002) *Nature* 415, 807-809.
 Iino, M (2006) *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 89-93.
 Morita, MT and Tasaka, M (2004) *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 712-718.
 Saito C, Morita MT, Kato T, Tasaka M (2005) *Plant Cell* 17, 548-558.
 Yoshihara, T and Iino, M (2005) *Plant Cell Environ.* 28, 134-146.
 Yoshihara, T and Iino, M (2006) *Plant Cell Environ.* 29, 778-792.

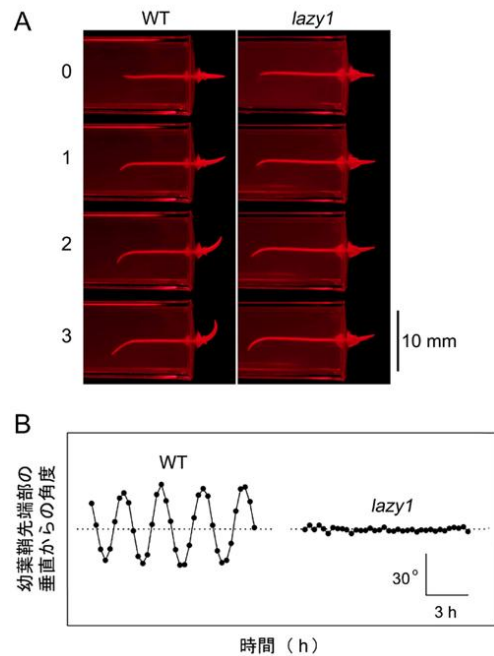


図 1 イネ幼葉鞘の重力応答.

(A) *lazy1* 突然変異体の重力屈性. 赤色光下で育てた芽ばえを 90 度傾けて誘導される幼葉鞘と幼根の重力屈性を野生型品種 (WT) と突然変異体で比較. 数字は横に傾けてからの時間 (h). (B) *lazy1* 突然変異体における回旋運動の欠損.

2. 研究の目的

本研究は、イネ *lazy1* 突然変異体および代表者らが同定した *LAZY1* 遺伝子の配列情報を利用することにより、イネにおける重力刺激受容とシグナル伝達の分子機構を探ることを目的に計画された。また、シロイヌナズナに存在する *LAZY1* ホモログの機能を解析することにより、*LAZY1* 機能の普遍性などを明らかにすることも、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) イネを用いた研究. *lazy1* 突然変異体を用いて、幼葉鞘における *LAZY1* の機能を解析した。その一環として、 ^3H -IAA を用いたトレーサー実験により、重力刺激に応答したオーキシンの不均等分配における *LAZY1* の機能を解析した。植物体における *LAZY1* 発現の分布は、組織切片から抽出した total RNA を用い、real-time RT-PCR で遺伝子発現レベルを定量的に測定することによって調べた。

(2) シロイヌナズナを用いた研究. *LAZY1* ホモログ (*AtLAZY1*) の発現を RNA 干渉法で抑えた形質転換体を作成し、それを用いて *AtLAZY1* の機能を解析した。さらに、

*AtLAZY1*のプロモーター領域と *GUS*遺伝子を連結した融合遺伝子 (*ProAtLAZY1::GUS*) を導入した形質転換体を作成し、*AtLAZY1* 発現の組織特異性を解析した。また、*AtLAZY1* プロモーター・*AtLAZY1* と *EGFP* を連結した融合遺伝子 (*ProAtLAZY1::AtLAZY1-EGFP*) を導入した形質転換体を作成し、*AtLAZY1* の細胞内分布を調べた。

4. 研究成果

(1) イネを用いた研究

- ① *LAZY1* は幼葉鞘の重力屈性において、重力刺激受容とオーキシン不均等分配の間に関与し、オーキシン不均等分配の誘導に必須な因子であることが分かった(図2)。
- ② 幼葉鞘の重力屈性には *LAZY1* を介するシグナル伝達系と、介さないシグナル伝達系が関与し、前者にのみオーキシンの不均等分配が関与していることが判明した(図3)。
- ③ *lazy1* 突然変異体の幼葉鞘は野生型品種にみられる回旋運動を全く示さないことから、幼葉鞘の回旋運動には *LAZY1* を介するシグナル伝達系が特異的に関与するという結論が導かれた(図2)。
- ④ 栄養成長期のイネ個体において、*LAZY1* は葉鞘基部とラミナジョイントで特異的に発現していることが分かった。これらの組織は重力に応答することが知られており、*LAZY1* は地上部における重力応答の共通したシグナル因子であることが示唆された。
- ⑤ *lazy1* 突然変異体の根は正常な重力屈性と回旋運動を示し、*LAZY1* 遺伝子も根ではほとんど発現していなかった。これらの結果から、*LAZY1* はイネの地上部の重力応答に特異的なシグナル伝達因子で、根の重力シグナル伝達には関与していないことが分かった。

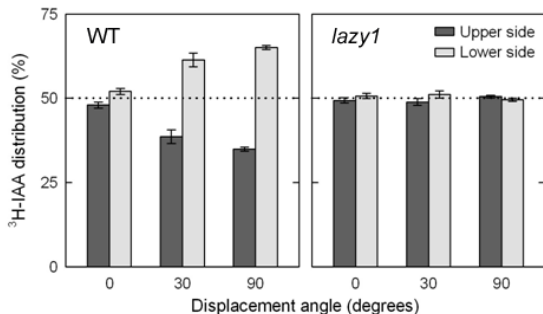


図2 重力刺激によるオーキシン (IAA) の不均等分配. 先端に ^3H -IAA を投与した幼葉鞘を 25 分間、90 度、あるいは 30 度に傾けてから垂直に戻し、基部切り口から寒天片に拡散する ^3H -IAA を測定. WT では幼葉鞘の両側で ^3H -IAA が不均等に分配されたが、*lazy1* では均等に分配された。

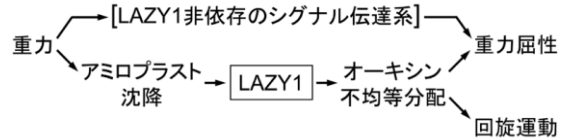


図3 イネ幼葉鞘における重力シグナル伝達。

(2) シロイヌナズナを用いた研究

- ① 分子系統解析から、シロイヌナズナには *LAZY1* と相同性が比較的高いホモログ (*AtLAZY1*) が存在することが示された。
- ② *AtLAZY1* の発現を RNA 干渉法で抑えた形質転換体は側枝が広がる表現型を示し(図4)、また形質転換体の胚軸と花茎は部分的に低下した重力屈性を示した。これらの結果から、*AtLAZY1* はシロイヌナズナにおいても重力屈性に関与することが分かり、*LAZY1* とそのホモログは重力シグナル伝達の普遍的な因子であることが示唆された。
- ③ 胚軸の回旋運動に関してはイネの幼葉鞘の場合とは異なり、*AtLAZY1* の関与は認められなかった。
- ④ *ProAtLAZY1::GUS* を導入した形質転換体を用いて、*AtLAZY1* は主に地上部の維管束で発現していることを明らかにした(図5)。
- ⑤ *ProAtLAZY1::AtLAZY1-EGFP* を導入した形質転換体を用いて、*AtLAZY1* は核に存在することを明らかにした(図6)。

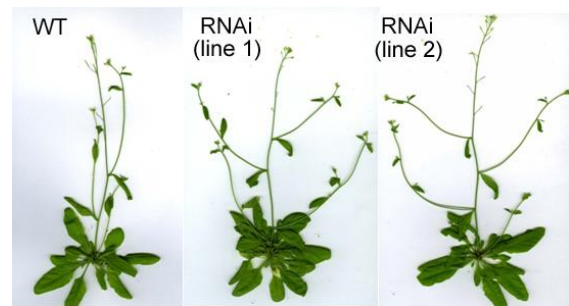


図4 *AtLAZY1* の発現を RNA 干渉法で抑えたシロイヌナズナ形質転換体 (2 系統). 野生型 (WT) に比較し、側枝が広がっている。

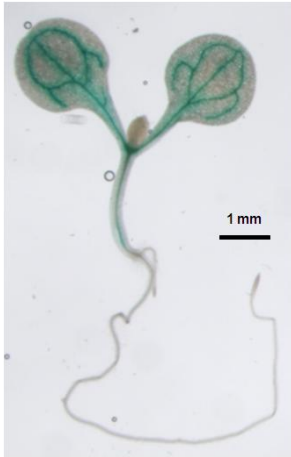


図5 *AtLAZY1* 発現組織の解析. 融合遺伝子 *ProAtLAZY1::GUS* を導入したシロイヌナズナ形質転換体を作成し、GUS の発現部位を調べた. 写真は白色光下で育てた芽ばえ. GUS は地上部の維管束に沿って発現している.

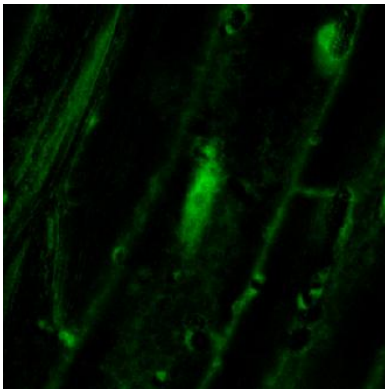


図6 *AtLAZY1* の細胞内分布の解析. 融合遺伝子 *ProAtLAZY1::AtLAZY1-EGFP* を導入したシロイヌナズナ形質転換体を作成し、細胞内における EGFP の蛍光分布を調べた. 核が最も強い蛍光を示している.

(3) イネ重力応答の新規突然変異体の単離

本研究により、*LAZY1* とオーキシン不均等分配が関与しない重力シグナル伝達系の存在が示唆された。その存在を遺伝学的に証明し、またそれに関与する遺伝子を明らかにする目的で、*lazy1* 種子に γ 線照射で新たな突然変異を誘発し、その M2 世代の種子を収穫した。これらの種子を用いて、重力屈性が *lazy1* 突然変異体より低下した（あるいは完全に欠損した）突然変異体を分離する研究を進めている。

(4) *lazy1* 突然変異体の光屈性研究への活用

イネ幼葉鞘の光屈性は極めて弱いため、パルス照射による反応を含めた光量反応曲線を解析するのが困難であったが、イネ *lazy1* 突然変異体を利用することにより、この解析が可能になった。これは、*lazy1* 突然変異体において、光屈性に拮抗する重力屈性が低下していることによる（図7 A）。これまでの解析により、イネ幼葉鞘もトウモロコシ幼葉鞘で示されていたような複雑な光量反応曲線を描くことが明らかになった（図7 B）。さらに、突然変異体・形質転換体を用いて、光量反応曲線で分離される全ての反応成分はフォトトロピン1を光受容体とし、CPT1 が関与するシグナル伝達系の性質を反映していることが明らかになった。

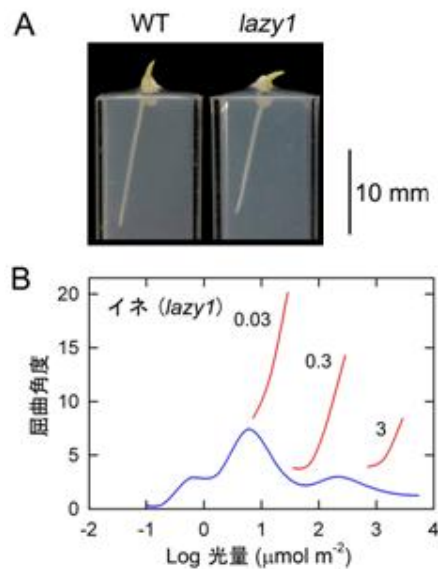


図7 *lazy1* 突然変異体を用いた光屈性の解析.

(A) 右側からの連続白色光により誘導された光屈性. *lazy1* の幼葉鞘は、WT に比較し、大きな光屈性を示す. (B) *lazy1* の幼葉鞘を青色光で片側照射して求めた光屈性の光量-反応曲線. 青線：パルス照射（3 分以内）による光屈性. 赤線：図中に示した強度の青色光 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を用い、照射時間で光量を調節. 屈曲は照射開始から 8 時間の時点で測定.

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 3 件）

- ① 飯野盛利、吉原毅、芳賀健、イネ芽生えの成長とその光・重力制御、植物の生長調節、査読無、Vol.44、No.2、2009、142-153

- ② Yoshihara, T. and Iino, M., Identification of the gravitropism-related rice gene *LAZY1* and elucidation of LAZY1-dependent and -independent signaling pathways, Plant Cell Physiol. 査読有, Vol. 29, No.5, 2007, 678-688
- ③ 飯野盛利、植物は感じて動く (No.3) 重力屈性と光屈性、遺伝、査読無、Vol.61、No.5、2007、14-15

〔学会発表〕 (計5件)

- ① Iino, M., Photomorphogenesis and phototropism of rice seedlings: molecular genetics approaches. Plant Signalling Mechanisms, June 26, 2010, Freiburg, Germany
- ② Yoshihara, T., Spalding, E. and Iino, M., LAZY1 belongs to a novel class of genes involved in gravitropic signal transduction in monocot and dicot plants, Plant Biology 2009 (The American Society of Plant biologist), July 21, 2009, Honolulu, Hawaii
- ③ 張博、飯野盛利、イネ幼葉鞘の光屈性におけるフォトトロピン信号伝達系と光量反応曲線の因果関係、日本植物生理学会、2009年3月22日、名古屋
- ④ Iino, M., Molecular genetic analysis of rice coleoptiles phototropism with special interest in fluence-response relationships, The 4th Asia Oceania Conference on Photobiology, November 24, 2008, Varanasi, India
- ⑤ 吉原毅、飯野盛利、イネの重力屈性と回旋運動を制御する新規遺伝子 *LAZY1* の同定と重力シグナル伝達におけるその役割、日本植物学会、2007年9月7日、野田

〔図書〕 (計1件)

- ① 飯野盛利 (分担著者)、朝倉書店、植物の百科事典 (石井龍一他編集)、2009、40-42

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯野 盛利 (IINO MORITOSHI)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：50176054

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし