

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770048

研究課題名 (和文) 植物細胞における表層微小管の配向調節機構の解析

研究課題名 (英文) Regulation mechanisms of orientation of cortical microtubules
in plant cells

研究代表者

曾我 康一 (SOGA KOUICHI)

大阪市立大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：00336760

研究成果の概要 (和文)：

重力による表層微小管の配向変化時に見られた *TUBG*、*GCP3*、*KTNI* 遺伝子の一過的な発現増加は、エチレンによって表層微小管の配向が変化する際にも見られた。また、*MAP65-1* の発現は、エチレンや加齢によって表層微小管の配向が変化する際にも、重力の場合と同様に低下した。したがって、表層微小管の配向変化が起こる際には、 γ -チューブリン複合体、カタニン、および、MAP65 のレベルの変化が起こるものと思われる。

研究成果の概要 (英文)：

The reorientation of cortical microtubules from transverse to longitudinal directions was induced by hypergravity, ethylene or aging. The transcript levels of γ -tubulin complex and katanin genes were increased transiently by both hypergravity and ethylene treatments, whereas a decrease in the transcript levels of MAP65 was induced by hypergravity, ethylene or aging in azuki bean epicotyls. These results suggest that the changes in the transcript levels of γ -tubulin complex, katanin and MAP65 are involved in the reorientation of cortical microtubules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：重力・植物ホルモン・成長方向・表層微小管配向・微小管結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

植物は生育環境の重力の大きさに応じて茎の形態を変化させる (Soga et al., 2006)。すなわち、遠心過重力環境下では茎は太く短くなり、宇宙の微小重力環境下では茎は細く長くなる。植物細胞では、細胞質表層微小管が細胞壁に新しく付加されるセルロース微繊維の方向を制御することを通して細胞の伸長方向、ひいては細胞の形を制御していると考えられている。そこで、表層微小管の配向に対する過重力の影響を調べたところ、細胞長軸に直交する微小管(横向きの微小管)を持つ細胞の割合は重力の大きさの対数に応じて減少し、一方、細胞長軸と平行な微小管(縦向きの微小管)を持つ細胞は増加することがあきらかになった (Soga et al., 2006)。また、過重力環境下で生育させた芽生えを 1 g 環境下に移すと表層微小管の配向が縦向きから横向きに変化した。

表層微小管の配向制御には多くの微小管結合タンパク質が関与していると考えられている。そこで、微小管の枝分かれに関与していると考えられている γ -チューブリン複合体 (TUBG, Spc98p (GCP3))、微小管の切断に関与していると考えられているカタニン (KTN1)、および、微小管の束化に関与していると考えられている MAP65-1 の遺伝子発現を解析した。その結果、TUBG、GCP3、KTN1 の発現量は表層微小管の配向変化に先行して、一過的に増加した (Soga et al., 2008, 2009)。また、TUBG、GCP3、KTN1 の発現量は、過重力環境から 1 g 環境に移した際にも一過的に増加した。MAP65-1 の発現量は過重力により減少し、1 g 環境に戻すと、対照と同レベルになった。以上のことから、重力による微小管の配向調節に、 γ -チューブリン複合体、カタニン、ならびに、MAP65 のレベルの変化が関与していることがあきらかになった。

エチレンなどの植物ホルモンは、表層微小管の配向を変化させる。また、茎の頂端と基部では、微小管の配向は異なっている。すなわち、基部の非伸長域では縦向きの微小管を持つ細胞の割合が高い。このように様々な要因によって、微小管の配向が変化することは知られているが、これらの過程に γ -チューブリン複合体、カタニン、ならびに、MAP65 のレベルの変化が関与しているかはあきらかではない。

2. 研究の目的

先に述べたように、重力による微小管の配向調節には、 γ -チューブリン複合体、カタニン、ならびに、MAP65 のレベルの変化が関与している。これらのレベルの変化が、植物ホルモンや加齢によって、表層微小管の配向変化が変化する場合に起こるのかを解析する

ことにより、 γ -チューブリン複合体、カタニン、および、MAP65 のレベルの変化が重力による微小管の配向変化に特異的な反応なのか、または、微小管の配向が変化するには常に起こる普遍的な反応なのかを結論づけることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

暗所で生育させたアズキ芽生えを用い、植物ホルモンであるエチレンの効果と加齢の影響を調べた。エチレンの影響に関しては、上胚軸が 30-35 mm になった芽生えを選び、伸長領域に印をつけ、エチレンの前駆体である 1-Aminocyclopropane-1- carboxylic acid (ACC) で処理をした。処理後に、印を付けた領域の長さ、太さ、表層微小管の配向、および、遺伝子の発現を解析した。加齢の影響に関しては、30-35 mm の上胚軸の頂端から基部までを 3 つの領域にわけ、上記のパラメータを解析した。表層微小管の配向は間接蛍光抗体法により観察した。また、遺伝子発現はリアルタイム PCR を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) エチレンの影響

アズキ芽生えを $10^{-7} \sim 10^{-4}$ M の ACC で処理したところ、ACC の濃度が増加するにしたがって、上胚軸が太く短くなった。培養容器内のエチレンの濃度を測定したところ、ACC の濃度が高くなるにつれて、容器内のエチレン濃度が高くなった。また、表層微小管の配向を観察したところ、ACC の濃度が高くなるにつれて、横向きの微小管を持つ細胞の割合は減少し、一方、縦向きの微小管を持つ細胞は増加した。

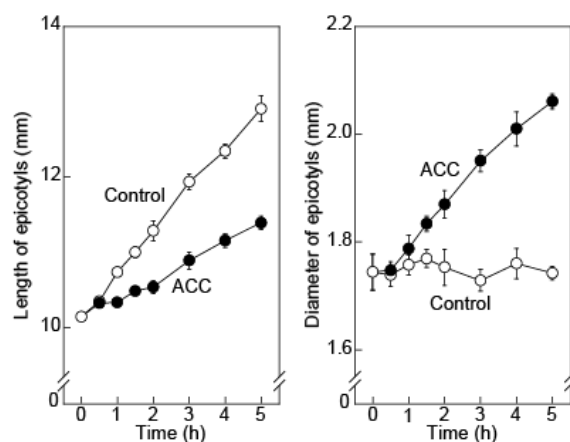


図 1 アズキ上胚軸の長さに対する ACC の影響

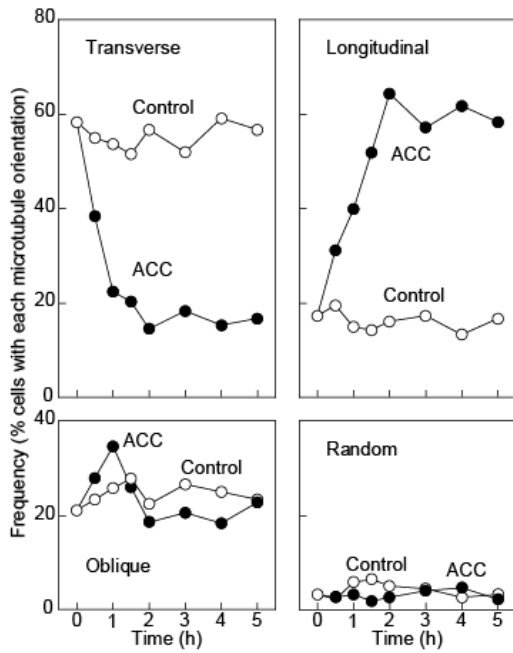


図2 アズキ上胚軸の表層微小管配向に対するACCの影響

次に、 10^{-5} MのACCで処理をしたときの成長と表層微小管の配向の経時変化を調べた。対照でも、ACC処理でも芽生えは、5時間の処理の間にほぼ直線的に伸長した(図1)。しかしながら、ACCで処理したときの伸長成長の速度は対照の半分程度であった。対照の芽生えでは、処理時間の間に上胚軸の太さは変化しなかったが、ACC処理した芽生えでは、時間とともに上胚軸が太くなった(図1)。表層微小管の配向は、成長の変化に先行して、横向きから縦向きに変化した(図2)。次に、*TUBG*、*GCP3*、*KTNI*、および、*MAP65-1*の発現

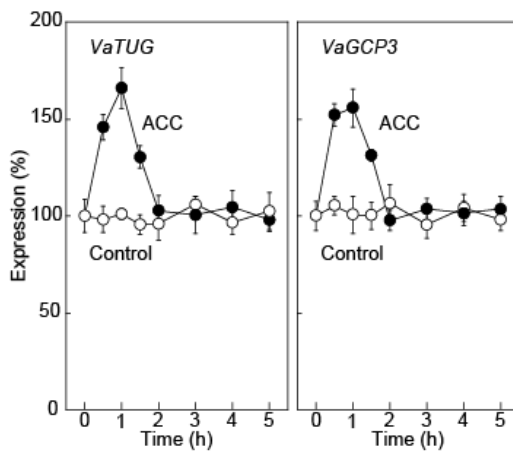


図3 アズキ上胚軸の γ -チューブリン複合体遺伝子の発現に対するACCの影響

量を解析した。*TUBG*、*GCP3*、ならびに、*KTNI*の発現は、表層微小管の配向変化に先行して、一過的に増加した(図3)。3つの遺伝子の発現のピークを比較すると、*TUBG*、*GCP3*と比べて、*KTNI*のピークは遅くなっていた。*MAP65-1*の発現量は時間とともに低下した。これらの変化は、重力によって表層微小管の配向が変化する際に見られたものと同様であった。

(2) 加齢の影響

30-35 mmの上胚軸の頂端から基部までを3つの領域にわけ、長さ、太さ、表層微小管の配向、および、遺伝子の発現を解析した。上部と中央部では伸長成長が見られたが、下部では見られなかった。ところが、肥大成長は下部のみで見られた。上部の伸長領域では、横向きの微小管を持つ細胞の割合が最も高かった。ところが、中央の領域では、横向き、斜め、縦向きの細胞の割合がほぼ同程度であった。下部の非伸長領域では、縦向きの微小管を持つ細胞の割合が高かった。*MAP65-1*の発現量は頂端から基部に向かって低下した。すなわち、表層微小管の配向が横向きから縦向きになるにつれて、*MAP65-1*の発現量は低下した。これは、過重力によって表層微小管の配向が横向きから縦向きになる際に見られた変化と同様である。

(3) 結論

本研究において、植物ホルモンのエチレンや加齢によって表層微小管の配向が変化する際にも、 γ -チューブリン複合体、カタニン、および、MAP65のレベルが変化することが示された。よって、これらの遺伝子発現の変化は重力による微小管の配向変化に特異的な反応ではなく、微小管の配向が変化する際には常に起こる普遍的な反応である可能性が高いと思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Soga K, Yamaguchi A, Kotake T, Wakabayashi K and Hoson T: 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)-induced reorientation of cortical microtubules is accompanied by a transient increase in the transcript levels of γ -tubulin complex and katanin genes in azuki bean epicotyls. *Journal of Plant Physiology*, 査読有、(in press)
- ② Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T: The transcript level of katanin gene is increased transiently in response to changes in gravitational conditions in azuki bean epicotyls. *Biological Sciences in Space*, 査読有、23: 23-28 (2009)

- ③ Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T: Transient increase in the transcript levels of γ -tubulin complex genes during reorientation of cortical microtubules by gravity in azuki bean (*Vigna angularis*) epicotyls. Journal of Plant Research、査読有、121: 493-498 (2008)

〔学会発表〕（計4件）

- ① 曾我康一、山口彩、小竹敬久、若林和幸、保尊隆享：エチレンによるアズキ上胚軸の表層微小管の配向変化と γ -チューブリン複合体およびカタニンの発現増加。第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18-19日、熊本
- ② 樋口紗世子、松本翔平、曾我康一、若林和幸、加藤壮英、橋本隆、保尊隆享：シロイヌナズナ・カタニン変異体の成長と形態に対する重力の影響。日本植物学会近畿支部2008年度大会、2008年12月13日、神戸
- ③ Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T: Transient increase in the levels of γ -tubulin complex in reorientation of cortical microtubules by gravity in azuki bean epicotyls. 37th Committee on Space Research Scientific Assembly, 15 July 2008, Montreal
- ④ Higuchi S, Kumasaki S, Matsumoto S, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T and Hoson T: Effects of gravity on growth phenotypes in MAPs mutants of Arabidopsis. 37th Committee on Space Research Scientific Assembly, 15 July 2008, Montreal

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾我 康一 (SOGA KOUICHI)

大阪市立大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号：00336760