

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25514001

研究課題名(和文) 植物の重力の大きさに応答した遺伝子発現の制御機構に関する研究

研究課題名(英文) A study on a mechanism for the regulation of gene expression responding to the magnitude of gravity in plants

研究代表者

小竹 敬久 (KOTAKE, Toshihisa)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20334146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の成長は重力の大きさによって変化する。表層微小管の配向制御に関わるMAP65-1遺伝子の下胚軸における発現・蓄積をGFP融合遺伝子を導入したシロイヌナズナを用いて解析した。MAP65-1の発現は成長の盛んな胚軸上部で高く、逆に基部では低かった。MAP65-1の5'側領域を段階的に削ったところ、この発現には上流1.1～0.7 kbの領域が重要であることがわかった。遠心過重力環境下での発現変化を解析したが、発現の個体差が大きく、重力の大きさへの応答に関わる発現制御領域は特定できなかった。

研究成果の概要(英文)：Using transgenic Arabidopsis harboring genomic MAP65-1-GFP gene, the expression of MAP65-1 was analyzed in the hypocotyl. The expression level in the growing region was high whereas that in basal region was low, indicating that the expression is regulated in relation to the cell elongation. The experiments using 5' region-truncated series suggested that the region from -1.1 to -0.7 kb mainly regulates the expression in the hypocotyl. The region involved in the expression responding to the magnitude of the gravity was not identified, because stable results were not obtained.

研究分野：植物糖鎖生物学

キーワード：重力 微小管 細胞壁

1. 研究開始当初の背景

植物は 4.7 億年前に水中から陸上に進出し、その後、地上の環境に適応しながら、コケ植物や被子植物などに進化したと考えられる。植物が獲得した生理現象の一つが「重力応答反応」であり、これは「重力屈性」とは独立した現象である。「重力屈性」は重力の向きに応答して成長の向きを変化させる現象であるのに対して、「重力応答反応」は重力の大きさに応答して細胞形態を変化させる現象である。また、「重力屈性」は、重力方向の感知やその後起こる偏差成長のメカニズムが解明されているが、「重力応答反応」は、重力の大きさの感知や、それに続く情報伝達、遺伝子発現制御が不明である。植物には、これらで構成される未知の「重力応答反応」情報伝達機構が存在すると考えられる。

表層微小管は、セルロース微繊維の配向を決定し、植物細胞の形や成長を制御する。MAP65-1 は表層微小管の配向制御に関わる因子であり、その遺伝子発現は成長と密接に関係があると予想される。アラビノガラクトタン-プロテイン (AGP) は、成長や分化に関わる細胞表層プロテオグリカンであり、主要な分子種の一つである AGP4 は分裂組織や根の伸長組織で特に強く発現することがわかっている。過重力環境下では細胞成長が阻害されるが、これらの成長に関わる因子が、成長や重力の大きさに応じてどのように発現制御を受けているのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

微小管結合タンパク質 MAP65-1 と植物の細胞表層プロテオグリカンである AGP4 の成長や重力の大きさに応じた発現制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

シロイヌナズナから MAP65-1 と AGP4 それぞれのゲノミック遺伝子を PCR により単離した。塩基配列を確認した後、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子と連結した。MAP65-1 は N 末端に GFP 配列を連結し、AGP4 はシグナル配列の直後に挿入した。これは AGP は N 末端にシグナル配列を、C 末端に GPI アンカーシグナルを持つため、GFP が AGP4 の分泌に影響しないようにするためである。作成したゲノミック MAP65-1-GFP 人工遺伝子とゲノミック AGP4-GFP 人工遺伝子はそれぞれ野生型のシロイヌナズナにアグロバクテリウムを用いて導入した。

本研究では、MAP65-1 や AGP4 の成長や重力の大きさによる発現に関わる 5'側領域を特定するために、それぞれ 5'側領域を 400-500 bp ずつ削ったデリベーションシリーズを作成した(図 1)。MAP65-1 は全長の 5'側領域(2.0 kb)を持つものを PT0 とし、段階的に 5'側領域を削った PT1、PT2、PT3、PT4 を作成した。同様に AGP4 も PT0 ~ PT5 を作成した(図 2)。

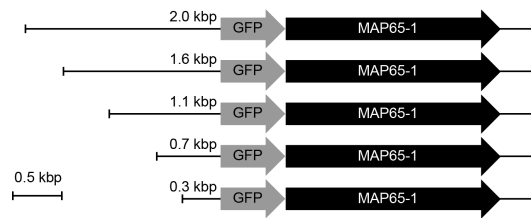


図 1 . MAP65-1-GFP の 5'側領域デリベーションシリーズの模式図。

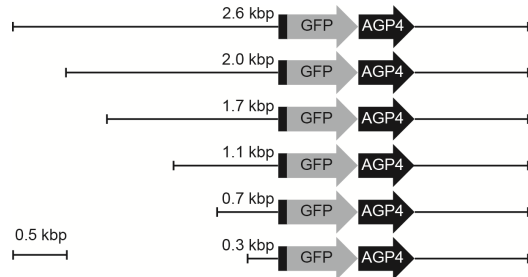


図 2 . AGP4-GFP の 5'側領域デリベーションシリーズの模式図。

4. 研究成果

(1) MAP65-1 可視化植物の作出

まず全長の 5'側領域を含む MAP65-1-GFP 遺伝子をシロイヌナズナに導入することで、MAP65-1 を可視化した。MAP65-1 は微小管に結合するため、表層微小管の配向に従った線状の GFP シグナルが観察された。胚軸の上部、中部、基部で GFP の蛍光強度を比較したところ(図 3)、成長が盛んな胚軸上部で蛍光が強かった。このことから、MAP65-1 の発現は成長と相関があることが示唆された。

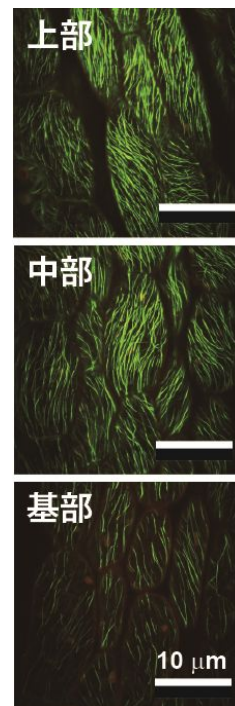


図 3 . MAP65-1-GFP の胚軸の部位別の観察。成長が盛んな胚軸上部で強い GFP シグナルが見られた。

(2) MAP65-1 の 5'側領域デリーションシリーズの発現比較

重力の大きさに応じた発現変化には、特定の 5'側領域が関わると考えられる。この領域を特定することを目指して、5'側領域デリーションシリーズを作成した。図 1 に示したように 5'側領域を 400-500 bp ずつ削ったシリーズ PT0~PT4 を作成し、それぞれをシロイヌナズナに導入した。

胚軸上部での MAP65-1-GFP を観察したところ (図 4) 5'側領域が 1.1 kb 以上残った MAP65-1-GFP 遺伝子を導入した植物では強い蛍光シグナルが観察されたのに対して、0.7 kb 残った植物では弱い蛍光シグナルが観察された。この結果から、成長が盛んな胚軸上部での MAP65-1 発現は、主に上流-1.1~-0.7 kb の領域で制御されていることが示唆された。

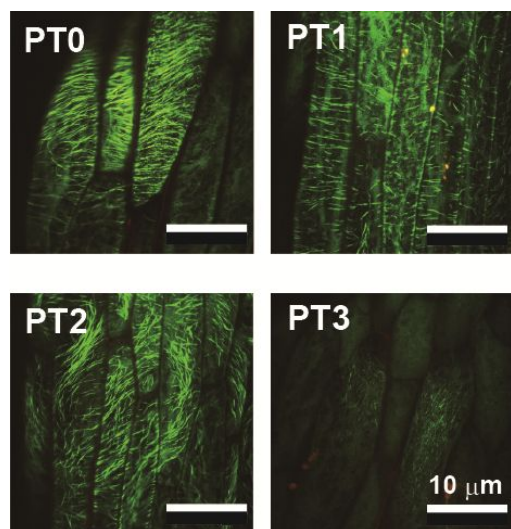


図 4 .MAP65-1 遺伝子の 5'側領域デリーションシリーズの観察。PT0~PT2 では強い蛍光シグナルが見られた。

(3) 遠心過重力環境下での発現比較

MAP65-1-GFP の 5'側領域デリーションシリーズ導入植物の遠心過重力環境下での GFP シグナルを比較した。遠心過重力環境下では、胚軸の成長が抑制されることが分かっており、MAP65-1 の発現が著しく低下すると予測していた。しかしながら、実際に GFP シグナルを観察すると、遠心過重力処理により GFP 強度が低下する傾向は見られるものの、個体ごとのばらつきが大きく ImageJ などで定量した GFP 強度には有意な差が見られなかった。また、デリーションシリーズの比較では、通常環境下 (1 g 環境下) においた胚軸と同様に、PT0~PT2 で強い GFP シグナルが見られた。

(4) AGP4 可視化植物とデリーションシリーズの作出

AGP4 可視化植物はすでに作成していたた

め、本研究では、MAP65-1 同様に、AGP4 の 5'領域を段階的に削ったデリーションシリーズを作成してシロイヌナズナに導入した。AGP4 はもともと根の伸長領域や茎頂分裂組織での発現が強く、これらの領域を重点的に観察した。

根の伸長領域では、デリーションシリーズのうち、5'側領域が 0.7 kb 以上残る PT0~PT4 で強い GFP シグナルが観察された (図 5)。このことから、根の伸長領域の発現には、-0.7~-0.3 kb 領域が重要と考えられる。MAP65-1 可視化植物と同様に遠心過重力環境下における GFP シグナルの変化を観察したが、根の伸長自体が変化せず、GFP シグナルの変化を観察できなかった。また、茎頂分裂組織での GFP シグナルも観察したが、観察の邪魔になる花や蕾を切除する操作に時間がかかり、遠心過重力処理後に速やかに分裂組織を観察できなかった。このため、安定的な結果が得られなかった。

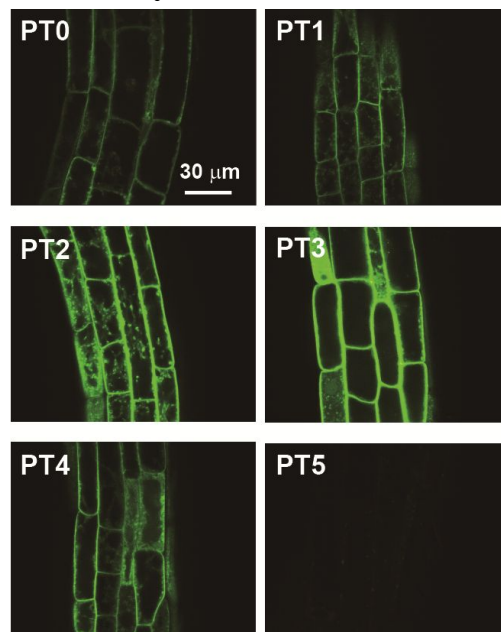


図 5 . AGP4 遺伝子の 5'側領域デリーションシリーズの観察。PT0~PT4 では強い蛍光シグナルが見られた。

本研究では、当初目的とした重力の大きさに応答する 5'側発現調節領域の特定には至らなかったが、少なくとも MAP65-1 に関しては発現と成長との間の相関を確認できた。また、MAP65-1 と AGP4 の 5'側領域のデリーションシリーズは作成できたので、今後、安定した遠心過重力環境の作出やより効率的な観察方法の確立により、発現調節領域の絞り込みを行いたい。

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 2 件)すべて査読有

Kuge T., Nagoya H., Tryfona T., Kurokawa

T., Yoshimi Y., Dohmae N., Tsubaki K., Dupree P., Tsumuraya Y., **Kotake T.** (2015) Action of an endo- β -1,3(4)-glucanase on cellobiosyl unit structure in barley β -1,3:1,4-glucan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79: 1810-1817, doi: 10.1080/09168451.2015.1046365.

Kitazawa K., Tryfona T., Yoshimi Y., Hayashi Y., Kawauchi S., Antonov L., Tanaka H., Takahashi T., Kaneko S., Dupree P., Tsumuraya Y. and **Kotake T.** (2013) -Galactosyl Yariv reagent binds to the β -1,3-galactan of arabinogalactan-proteins. *Plant Physiol.* 161: 1117-1126, doi: 10.1104/pp.112.211722.

〔学会発表〕(計 12 件)

Yoshihisa Yoshimi, Mami Yoshimura, Raijo Yakuwa, Seiji Shibano, Yoshitake Desaki, Naoto Shibuya, Yoichi Tsumuraya, **Toshihisa Kotake**, In vivo degradation of sugar chian of arabinogalactan-proteins using a specific enzyme from fungi, 日本植物生理学会、2016 年 3 月 18 日、岩手県・盛岡市、岩手大学

若林和幸、曾我康一、保尊隆享、**小竹敬久**、小嶋美紀子、榊原均、東端晃、石岡憲昭、嶋津徹、鎌田源司、宇宙の微小重力環境下で生育したイネシュートの細胞壁変化と内生植物ホルモン量、第 30 回宇宙環境利用シンポジウム、2016 年 1 月 19 日、神奈川県・相模原市、JAXA 宇宙科学研究所

吉見圭永、吉村真美、八鍬頼誠、芝野誠二、出先能丈、渋谷直人、円谷陽一、**小竹敬久**、特異的糖鎖分解酵素を利用したアラビノガラクトタン-プロテイン糖鎖の機能探索、東京糖鎖研究会、2015 年 10 月 24 日、神奈川県・横浜市、慶応大学

村上愛、曾我康一、**小竹敬久**、加藤壮英、橋本隆、若林和幸、保尊隆享、MAP65 と BPP1 を介した重力によるシロイヌナズナ表層微小管の配向制御、日本宇宙生物科学会、2015 年 9 月 26 日、東京都板橋区・帝京大学

曾我康一、村上愛、**小竹敬久**、加藤壮英、橋本隆、鎌田源司、山崎千秋、片平ひとみ、鈴木ひろみ、伏島康男、嶋津徹、笠原春夫、長田郁子、矢野幸子、若林和幸、保尊隆享、Aniso Tubule 宇宙実験：重力による茎の形態変化における表層微小管と微小管結合タンパク質の役割、日本宇宙生物科学会、2015 年 9 月 26 日、東京

都板橋区・帝京大学

今泉知枝美、北澤仁成、戸松遥美、吉見圭永、金子哲、Dupree Paul、円谷陽一、**小竹敬久**、AGP の L-アラビノピラノース残基に作用する β -L-アラビノピラノシダーゼ、日本植物学会、2015 年 9 月 7 日、新潟県新潟市・朱鷺メッセ

田中伸和、**小竹敬久**、アラビノガラクトタンタンパク質糖鎖の人為的操作に向けた新たな試み、日本農芸化学会、2015 年 3 月 29 日、岡山県岡山市・岡山大学

Tayebeh Abedi, Akio Iwasaki, **Toshihisa Kotake**, Nobukazu Tanaka, Would UGE gene's overexpression directly influence an alteration of AGP polysaccharide?, 日本農芸化学会、2015 年 3 月 29 日、岡山県岡山市・岡山大学

吉見圭永、菅原優美、堀千明、五十嵐圭日子、堂前直、金子哲、**小竹敬久**、円谷陽一、日本植物学会、2014 年 9 月 12 日 ~ 14 日、神奈川県川崎市・明治大学

Yoshihisa Yoshimi, Yumi Sugawara, Chiaki Hori, Satoshi Kaneko, Kiyohiko Igarashi, Naoshi Dohmae, **Toshihisa Kotake**, Yoichi Tsumuraya, Purification of a protease acting on the core-protein of AGP from winter mushroom, Plant Cell Wall Biology, 2014 年 7 月 27 日 ~ 31 日、オーストラリア・ケアンズ、Grand Chancellor Palm Cove

Toshihisa Kotake, Kiminari Kitazawa, Kazuki Sato, Theodora Tryfona, Yoshihisa Yoshimi, Yoshihiro Hayashi, Susumu Kawauchi, Liudmil Antonov, Hiroshi Tanaka, Takashi Takahashi, Satoshi Kaneko, Paul Dupree, Yoichi Tsumuraya, The target structure of arabinogalactan-proteins, Plant Cell Wall Biology, 2014 年 7 月 27 日 ~ 31 日、オーストラリア・ケアンズ、Grand Chancellor Palm Cove

Masatoshi Yamaguchi, Ami Sato, Mami Yoshimura, Tetsuya Kurata, Maki Yamada-Kawai, Shinji Kawasaki, Yoichi Tsumuraya, **Toshihisa Kotake**, brittle culm 4 mutant decreases in secondary cell wall formation in rice, Plant Cell Wall Biology, 2014 年 7 月 27 日 ~ 31 日、オーストラリア・ケアンズ、Grand Chancellor Palm Cove

〔図書〕(計 1 件)

石井忠、石水毅、梅澤俊明、加藤陽治、岸本崇生、小西照子、松永俊朗(編)、弘前大学出版会、植物細胞壁実験法(石井忠他

編) 2016、全 395 ページ、287-293 (小竹
敬久部分執筆)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小竹 敬久 (KOTAKE, Toshihisa)
埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：2 0 3 3 4 1 4 6

(2)研究分担者

曾我 康一 (SOGA, Kouichi)
大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：0 0 3 3 6 7 6 0