

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25514004

研究課題名(和文)シロイヌナズナ花茎の抗重力形態形成における brassinosteroid の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of brassinosteroid in gravity resistance of Arabidopsis inflorescence stem

研究代表者

山崎 千秋 (Yamazaki, Chiaki)

横浜市立大学・木原生物学研究所・客員研究員

研究者番号：30636189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要(和文)：植物の茎は重力の力に抵抗するために強固な体を構築し、耐倒伏性の獲得や姿勢制御を行っている。これまでに、植物の重力に抗うための体作り(抗重力形態形成)の発現に、植物ホルモンの brassinosteroid の関与が示唆されてきたが、植物ホルモンと抗重力形態形成の関わりが明らかになっていなかった。本研究により、シロイヌナズナ花茎において重力を感受して抗重力形態形成を発現する際に、brassinosteroid 依存的な細胞壁の強度調整が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gravitropism is a plant's gravity response, which enables plants to orient their photosynthetic organs upward and to the sunlight. The mechanisms in the gravitropism have been studied extensively, and revealed to be regulated by polar transport of auxin. On the other hand, mechanical resistance is another gravity response distinct from gravitropism. Under hypergravity stimuli, plants increase the rigidity against the gravitational force. We reported that brassinosteroid determines stem rigidity and length of elongation zone that have capability to respond to gravistimulation. In this study, we revealed that brassinosteroid-dependent cell wall regulation is important for mechanical resistance of Arabidopsis inflorescence stems.

研究分野：植物生理学

キーワード：重力応答 シロイヌナズナ brassinosteroid 抗重力形態形成

1. 研究開始当初の背景

陸上植物は、重力の力に抵抗するために強固な体を構築し、自重を支えながら茎を上方向に伸長させている。この「抗重力:gravity resistance」の課程は、植物が陸に上がって直接重力に曝されるようになった数億年前から飛躍的に発達し、その後の植物の繁栄を支えてきたと思われる(保尊 2005)。しかし、抗重力による植物の形態形成を発現するための分子機構は、植物の普遍的な環境応答機構としての重要性にも関わらず、ほとんど分かっていない。

植物ホルモンは多様な植物の形態形成に関わる生理活性物質群であり、その中でもブラシノステロイド (BR) は低濃度で生理作用を示し、細胞伸長、細胞分裂、維管束系の分化など、多様な作用を示すことが知られている。これまでに、イネの BR 生合成変異体 *Osdwarf4* では BR 内生量が減少しており、野生型に比べて短穂・直立葉になることが報告されている (Sakamoto et al. 2006)。また、シロイヌナズナ胚軸においては、BR 処理により胚軸が自立できずに倒伏してしまう一方で、BR 生合成阻害剤 (BRZ) 処理では、胚軸が直立する個体の割合が増加することが報告されている (Vandenbussche et al. 2011)。このように、BR 生合成及び応答は、植物の地上部が強固な体を構築し、重力に抵抗して茎を直立させる際に、重要な役割を果たしていると思われるが、BR が茎の力学的強度の獲得にどのような分子メカニズムで機能するか、そもそも BR 生合成や応答が重力に支配されるのか未解明である。

そのような中、申請者らは、BR 合成酵素をコードする *BR6ox1*、*BR6ox2* 遺伝子が、縦置きに生育させたシロイヌナズナ花茎の基部側で検出されない一方、茎頂側において強く発現しており、また BR 応答性遺伝子 *SAUR-AC1* が茎頂側でのみ強く発現していることを明らかにした (未発表)。加えて、Mung Bean 花茎を切り分けて BR 内生量を定量した結果、茎頂側から基部側にかけて BR 濃度勾配が存在することが判明した (未発表)。花茎の茎頂のみで BR が合成される意義は不明であるが、外生 BR 処理が濃度依存的に茎を倒伏させることを考えると、花茎の BR 生合成領域の調節が茎頂側と基部側の茎の強度特性を決定し、抗重力形態形成の発現に寄与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、抗重力形態形成と BR シグナル伝達の関連性の解明を目的としている。抗重力応答を発現する分子機構には様々な因子が関与し、近年細胞壁のリグニン合成の重要性やオーキシンの関与が示唆されてきたが (Tamaoki et al. 2011)、BR が抗重力形態形成に関与するかは全く解明されていない。今

回の研究課題では、重力に抗う体作りのための BR の関与の分子メカニズムの解明に焦点を絞る。課題をシロイヌナズナ花茎の茎頂部位の BR 生合成領域が重力刺激で支配されるか明らかにすることと、BR シグナル伝達の下流でシロイヌナズナ花茎の強度特性が決定される分子メカニズムを明らかにすることとする。

3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナ花茎が重力を受して抗重力形態形成を発現するまでの各段階において、BR 生合成や応答がどのように関与するかを明らかにする。まず、BR 処理時のシロイヌナズナ花茎の剛性を計測し、花茎の強度と BR の関連性を明らかにする。次に、花茎の茎頂から基部側にかけて存在する BR 濃度勾配が、過重力刺激処理や重力感受変異体において変動するか解析することで、花茎の茎頂域における BR 生合成領域の重力依存的な制御について明らかにする。また、シロイヌナズナ花茎に BR 処理を行うことで花茎が倒伏する実験条件を設定し、花茎の倒伏過程における遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイで網羅的に解析し、抗重力形態形成における BR の機能を明らかにする。

1. シロイヌナズナ花茎の茎頂特異的な BR 生合成の重力依存性

申請者らの研究室では、縦置きに生育させたシロイヌナズナ花茎において、茎頂側で BR が生合成される一方、基部側では BR が生合成されていないことを解明した。外生 BR 処理により茎の倒伏率が上昇することを考えると、茎頂側の BR 生合成領域が広がると、茎の強度不足となり重力に抵抗する強固な体になれないことが推測される。従って、上流で重力シグナルが BR 生合成領域を制御している可能性が考えられる。そこで、シロイヌナズナ花茎において、茎頂の BR 生合成領域が重力シグナル伝達を介して制御されているか確認するために、重力感受変異体を用い、BR 生合成領域を qRT-PCR で解析し、野生型と比較する。また、抗重力応答はメカノレセプターを介して生じることが推測されるが (Soga et al. 2005)、花茎にメカノレセプター阻害剤処理をしたときの花茎の直立する割合と BR 生合成領域を同様に解析し、BR 生合成領域の制御が重力感受に支配されているか確認する。加えて、遠心装置を用いて植物に過重力刺激を与えると、細胞壁が強固になることが判明しており、これらの芽生えでは細胞伸長が減退することから、BR 生合成部位が縮小していることが推測される。そこで、過重力処理においても同様に解析し、花茎の茎頂特異的な BR 生合成領域が、重力依存的な制御を受けているか明らかにする。

2. シロイヌナズナ花茎の直立/倒伏に対する

る BR 依存性

Vandenbussche らの解析 (2011) により、シロイヌナズナ胚軸への外生 BR 処理により茎の剛性が低下し、倒伏率が上昇することが明らかになっている。このことから、BR が胚軸において細胞壁の強度決定に関与している可能性が示唆されるが、シロイヌナズナ花茎でも同様の知見が得られるか、またどのような分子機構で BR が茎の強度決定を担うか明らかではない。そこで、まず野生型シロイヌナズナの花茎に外生 BR 処理および BRZ 処理を行い、BR 濃度依存的な花茎の倒伏率と剛性の変化を定量する。また、花茎に BR を処理することで人為的に花茎を倒伏させる実験条件を設定し、花茎の茎頂側から基部側にかけて輪切りにして DNA マイクロアレイ解析を行うことで、直立していた花茎が倒伏する過程における時空間的な遺伝子プロファイルを解析する。単離した遺伝子について qRT-PCR 等を行い、花茎の直立と倒伏過程に関わる BR 応答性遺伝子を探索する。更に、抗重力応答の最終過程は、細胞壁の変化が重要だと思われるため、薬剤処理時の花茎を組織固定して横断切片を作成し、細胞壁成分の染色を行い、BR 依存的な細胞壁成分の変動を組織化学的に解明する。

4. 研究成果

1. シロイヌナズナ花茎の茎頂特異的な BR 合成の重力依存性

本課題を解決するため、22 連続光照射下で 4 週間育てたシロイヌナズナを同条件下で過重力 (15 G) 処理を行い、24 時間生育された。その結果、花茎の伸長量が減少し、伸長領域が減少した。この応答に対して、BR 生合成が関与するか解明するため、本研究では過重力処理した花茎の茎頂から 2 cm の先端部と 2 cm 以下の基部に分け、遺伝子発現量をリアルタイム定量 PCR で測定した。この時の BR 生合成酵素遺伝子の発現量から BR 量が変化している証拠は得られなかったが、BR とオーキシンの両方に応答する Aux/IAA1 が先端部で、Aux/IAA19 が先端部と基部の両方で発現量が有意に減少していた。そこで同じ処理をした花茎の IAA 量を LC-MS/MS で測定した結果、内生 IAA 量の減少が明らかとなった。これらの結果から過重力処理に応答した抗重力反応においては BR よりもオーキシンが重要な役割を果たすことが示唆された。

2. シロイヌナズナ花茎の直立/倒伏に対する BR 依存性

植物の茎は、伸長領域が重力応答を示し (屈曲する)、非伸長領域 (支持領域) が重力応答を示さない (屈曲しない) ことが知られている。これまでの研究で我々は、植物ホルモンのオーキシンに加えてブラシノステロイ

ドが、植物の茎の伸長領域、非伸長領域の決定及び重力応答に重要な役割を果たすことを示してきた。本研究において、ブラシノステロイド処理をしたナズナ花茎の伸展性 (引張強度の弱さ) を計測したところ、特にブラシノステロイド処理より非伸長領域から伸長領域に変化した領域において伸展性が上昇していた。また、伸長領域と非伸長領域がそれぞれどのように決定されているかの分子機構を明らかにするために、22 連続光照射下で生育させた 35 日以内のシロイヌナズナ花茎を先端基部-軸方向に 1cm 間隔でマークし、連続光照射直立状態で静置、24 h 後に茎頂部、伸長領域、非伸長領域を含む 5 画分 15 サンプルグループの遺伝子発現をマイクロアレイ解析により網羅的に調べた。支持組織の細胞壁の構築における分子機構に関わることが期待される遺伝子のうち、過重力で発現応答が報告されている遺伝子に着目し、リグニン合成酵素、キシログルカン転移酵素、ペクチン修飾酵素などの遺伝子が伸長領域-非伸長領域の境界付近で発現が変動していることを明らかにした。これらの遺伝子群のうちセルロース、リグニン合成酵素遺伝子にはブラシノステロイド処理による発現変動が見られず、花茎におけるセルロース、リグニンの蓄積量にも変化がなかった。一方でキシログルカン転移酵素とペクチン修飾酵素の遺伝子はブラシノステロイド処理で伸長領域、非伸長領域が変化する部位で有意に発現変化が見られた。これらのことから、シロイヌナズナ花茎が自律的に直立するためにブラシノステロイドが関与しており、ブラシノステロイドは伸長領域、非伸長領域の境界付近における細胞壁の強度をキシログルカンやペクチンの状態を変化させることによって調節していると考えられた。

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. Keita Morohashi, Chiaki Yamazaki, 他 13 名.

Gravitropism interferes with hydrotropism via counteracting auxin dynamics in cucumber roots. 査読有.

New Phytologist in press (2017).

2. Shin Takato, Chiaki Yamazaki, 他 9 名.

Auxin signaling through SCFTIR1/AFBs mediates feedback regulation of IAA biosynthesis. 査読有.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 81(7):1320-1326 (2017).

3. Chiaki Yamazaki, 他 11 名.

The gravity-induced re-localization of auxin efflux carrier CsPIN1 in cucumber

seedlings: spaceflight experiments for immunohistochemical microscopy. 査読有.
Nature partner journal Microgravity 2, 16030 (2016).

4. Yusuke Kakei, Chiaki Yamazaki, Yukihisa Shimada, 他 9 名.

Small molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. 査読有.
The Plant Journal, 84 (4) p827-837 (2015).

5. Masashi Suzuki, Chiaki Yamazaki, Yukihisa Shimada, 他 6 名.

Transcriptional feedback regulation of YUCCA genes in response to auxin levels in Arabidopsis. 査読有.
Plant Cell Reports, 34, p1343-1352 (2015).

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 「オーキシン合成酵素 OsSTAR1 の阻害剤 Pyruvamine を用いたイネオーキシン生合成経路の解析」(発表代表者: 筧雄介)
植物化学調節学会 第 51 回大会, 高知大学 (高知県南国市), 2016/10/30

2. “The relationship of graviresponse to circumnutation in rice coleoptiles: analyses with a gravitropic mutant and space-grown seedlings” (発表代表者: 小林啓恵)
11th Asian Microgravity Symposium, 北海道大学 (北海道札幌市), 2016/10/26

3. 「YUCCA を標的としたオーキシン生合成阻害剤 ~ 作用機構解析の続報」(発表代表者: 山崎千秋)
第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学 (岩手県盛岡市), 2016/3/19

4. 「ブラシノステロイドによる細胞壁強度の制御はシロイヌナズナ花茎の伸長・重力応答領域を調節する」(発表代表者: 筧雄介)
植物化学調節学会 第 50 回大会, 東京大学 (東京都文京区), 2015/10/24

5. “Brassinosteroids-dependent stem cell elongation and the position of inflorescence stem bending upon gravistimulation” (発表代表者: 山崎千秋)
American Society for Gravitational and Space Research 2014, Pasadena (USA), 2014/10/24

6. 「シュートの重力屈性位置決定に対するブラシノステロイドの役割」(発表代表者: 山崎千秋)
第 55 回日本植物生理学会年会, 富山大学 (富山県富山市), 2014/3/19

7. 「新型オーキシン生合成阻害剤 YUCCA 阻害剤の発見」(発表代表者: 山崎千秋)
植物化学調節学会 第 48 回大会, 新潟大学 (新潟県新潟市), 2013/10/31

8. 「YUCCA を標的とする新型オーキシン生合成阻害剤の開発」(発表代表者: 山崎千秋)
日本農芸化学会 2013 年度大会, 東北大学 (宮城県仙台市), 2013/3/26

9. 「オーキシン生合成酵素 YUCCA 阻害剤の発見とその生理作用」(発表代表者: 山崎千秋)
第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山大学 (岡山県岡山市), 2013/3/22

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 千秋 (Chiaki Yamazaki)
横浜市立大学・木原生物学研究所・客員研究員
研究者番号: 30636189

(2) 研究分担者

嶋田 幸久 (Yukihisa Shimada)
横浜市立大学・木原生物学研究所・教授
研究者番号: 30300875

(3) 研究分担者

中村 郁子 (Ayako Nakamura)
横浜市立大学・木原生物学研究所・助教
研究者番号: 40585858