

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25514005

研究課題名(和文) 植物の抗重力反応機構の解明：細胞形態の制御におけるアクチン繊維の役割

研究課題名(英文) Understanding the mechanism of gravity resistance in plants: Roles of actin filaments in regulation of cell shape

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・准教授

研究者番号：00336760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アズキならびにシロイヌナズナ芽ばえを過重力環境下で生育させると、重力が大きくなるにつれて、茎細胞の長軸の長さが減少し、短軸の長さが増加した。両芽ばえのアクチン繊維の動態を解析したところ、過重力環境下では、細胞内に放射状に広がるアクチン繊維の角度が1g対照とは異なっていた。また、太いアクチン繊維を持つ細胞の割合が過重力処理により増加した。さらに、アクチン繊維を破壊した芽ばえでは、過重力による細胞形態の変化が小さくなった。以上のことから、アクチン繊維の動態変化が、重力による茎細胞の形態制御に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Elongation growth was inhibited and lateral expansion was promoted by increasing the gravitational force in the epidermal cells of azuki bean epicotyls and Arabidopsis hypocotyls. Hypergravity modified the angles between filaments in radially distributed actin filaments of both seedlings. Also, the percentage of cells with thick actin filaments was increased under hypergravity conditions. When actin filaments were disrupted, effects of hypergravity on the modification of cell shape were reduced. Thus, changes in the dynamics of actin filaments may be involved in the regulation by gravity of growth anisotropy of shoot organs.

研究分野：宇宙植物学

キーワード：抗重力反応 過重力 アクチン繊維 表層微小管

1. 研究開始当初の背景

陸生植物が地上の1g環境下で生きていくためには、重力に対抗できる体を構築する必要がある。植物は約5億年前に初めて陸に上がった際に、このような反応を獲得し、また、この反応が植物が地上で進化・繁栄する上で重要な役割を果たしたと考えられている。この反応の存在は古くから認識されていたにもかかわらず、反応を示す名称もなく、その特性や機構の解析も行われていなかった。私たちは、この反応を抗重力(gravity resistance)と名づけ、その特性と機構を遠心分離機を用いた過重力環境や宇宙の微小重力環境を利用して解析してきた。その結果、重力の大きさの対数に応じて、茎を太く短くすることが植物の重力に対抗するメカニズムのひとつであることがあきらかになった。

植物細胞に見られる表層微小管は細胞膜直下に存在する微小管で、細胞膜上で合成されるセルロース微繊維の並びを調節することにより細胞の形、ひいては植物体の形態を制御することが知られている。重力による茎の形態変化における表層微小管の役割を検討したところ、表層微小管の配向変化が関与していることが示された。すなわち、重力の大きさに応じて、表層微小管の配向が細胞長軸に直交する向き(横向き)から平行な向き(縦向き)に変化し、細胞の成長方向が変わり、茎が太く短い形態になることがあきらかになった。さらに、この微小管の配向変化には、微小管の枝分かれとその切断が関与している可能性を示した。また、抗重力反応における重力刺激の受容には原形質膜上の機械的刺激受容イオンチャンネル(メカノレセプター)が関与することをあきらかにした。

微小管と並ぶ主要な細胞骨格であるアクチン繊維は、表層微小管の安定性や配向を調節することにより、または、微小管とは独立した機構で、植物細胞の形態制御に関わっていることが報告されている。しかしながら、重力によるアクチン繊維の動態変化の詳細は不明である。また、抗重力反応において、表層微小管の配向調節が表層微小管とアクチン繊維の相互作用によっているのか否かも不明である。

2. 研究の目的

植物は重力に打ち勝って成長するために、表層微小管を横向きから縦向きに変化させることにより細胞の成長方向を変え、茎を太く短くし、体を丈夫にしている。アクチン繊維は微小管とともに植物細胞の形態を調節する細胞骨格として知られているが、その役割に関しては不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、まず、さまざまな重力環境下で生育させたアズキならびにシロイヌナズナ芽生えの茎表皮細胞において、アクチン繊維の配向や太さなどの動態を、表層微小管の配向と比較しながら、詳細に解析する。

また、微小管を構成するチューブリンなどの遺伝子発現は、生育環境の重力の大きさに応じて変化するが、アクチンの遺伝子発現も同じように変化するのか否かを確認する。さらに、アクチン繊維を破壊した芽生えの細胞形態ならびに表層微小管の配向の解析、逆に、微小管を破壊した芽生えの細胞形態ならびにアクチン繊維の動態の解析を行う。また、アクチン繊維の動態などの変化を引き起こす刺激受容が「抗重力反応」の刺激受容に関与しているメカノレセプターによっているのかを検証する。以上の実験により、アクチン繊維が、植物の「抗重力反応」において、どのような役割を担っているのかをあきらかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) アクチン繊維の動態解析

1g環境下で生育させたアズキ、および、シロイヌナズナ芽生えを遠心分離機を用いた過重力環境下(10~300g)で0.5~24時間、生育させ、茎表皮細胞の長軸ならびに短軸の長さを顕微鏡下で測定した。これらの芽生えのアクチン繊維を蛍光ファロイジンにより染色し、生育環境の重力の大きさや生育時間によって、アクチン繊維の配向や束化の程度(太さ)などに変化がないかを解析した。また、同様の解析を、赤色蛍光タンパク質によって、アクチン繊維を可視化した形質転換シロイヌナズナでも行った。以上の実験により、まず、重力によりアクチン繊維の動態が変化するのか否かを確認した。

(2) アクチン遺伝子の発現解析

1g環境下で生育させたシロイヌナズナ芽生えを300gの過重力環境下で0.5~24時間、生育させた。これらの芽ばえにおいて、アクチンの遺伝子発現が、変化するのか否かをリアルタイムPCRによって解析した。

(3) 刺激受容機構の解析

メカノレセプターの阻害剤であるガドリニウムイオンならびにランタンイオンで処理をした芽生えを300gの過重力環境下で生育させた。これら芽ばえにおいて、アクチン繊維の動態とアクチン遺伝子の発現を解析することにより、それら変化の刺激受容にメカノレセプターが関与しているのか否かを検討した。

(4) アクチン繊維と微小管との相互作用

過重力環境下で生育させた芽生えのアクチン繊維を蛍光ファロイジンにより染色し、アクチン繊維の動態を解析した。また、同時に、表層微小管を抗チューブリン抗体を用いて染色し、配向を観察した。さらに、アクチン繊維と表層微小管を蛍光タンパク質で可視化したシロイヌナズナを作出し、両細胞骨格の過重力環境下での動態を解析した。また、

両細胞骨格の片方を破壊したときの他方の動態や細胞形態を解析した。以上の実験により、重力による細胞形態の調節において、表層微小管とアクチン繊維の相互作用により、表層微小管の配向が調節されている可能性について検討した。

4. 研究成果

(1) アクチン繊維の動態解析

過重力環境下で生育させたアズキ、およびシロイヌナズナの芽ばえでは、重力の大きさが大きくなるにつれて、茎が太く短くなった。茎の表皮細胞の長軸と短軸の長さを測定したところ、成長中の上部の細胞において、特に、長軸の長さが減少し、短軸の長さが増加した。

上記の条件で、表皮細胞のアクチン繊維を蛍光ファロイジンにより染色し、繊維の動態を観察した。その結果、重力環境にかかわらず、上部の成長中の細胞においては、放射状に分布するアクチン繊維が多かったが、放射状の繊維を持つ細胞の割合は、基部に向かって減少した。過重力によって、放射状に伸びる繊維の角度が変化した。角度の変化は、核につながっているアクチン繊維で特に顕著に見られ、細胞上部では、細胞長軸に平行な繊維が多く見られるようになった。一方、細胞下部では、角度の大きな変化は見られなかった。同様の傾向は、赤色蛍光タンパク質でアクチン繊維を可視化した形質転換シロイヌナズナでも観察された。

1 g 環境でも、過重力環境でも、茎の上部から基部に向かって、アクチン繊維の密度が低下し、繊維の太さが増加した。過重力によって、繊維の密度は大きく変化しなかったが、繊維の太さが増加した。同様の傾向は、赤色蛍光タンパク質でアクチン繊維を可視化した形質転換シロイヌナズナでも観察された。

以上のように、過重力により細胞形態が変化する際に、アクチン繊維の動態が変化することが示された。

(2) アクチン遺伝子の発現解析

アクチン遺伝子ファミリーの発現量をリアルタイム PCR によって解析した。1 g 環境下において、多くのメンバーの発現は、生育期間の間に変化しなかったが、増加するものと減少するメンバーもあることが示された。過重力環境下で生育させても、多くのメンバーの発現は、1 g のものと変わらなかったが、過重力によって、わずかではあるが、増加するものと減少するメンバーもあることが示された。

微小管を構成するチューブリン遺伝子は、程度の差はあるものの、すべてのメンバーの発現が過重力によって増加する。また、微小管の動態変化に関わる MAP65 やカタニンなどの微小管結合タンパク質の発現は過重力によって変化する。したがって、微小管の動態

変化は、微小管を構成するチューブリン、ならびに、MAP65 やカタニンなどの微小管結合タンパク質の発現変化を介していると考えられている。しかしながら、本研究により、アクチン遺伝子の発現は、過重力によって大きな変化を受けないことが示された。アクチン繊維は微小管とともに植物細胞の形態を調節する細胞骨格として知られているが、アクチンの動態変化は、アクチン遺伝子の発現変化を介していないと思われる。

(3) 刺激受容機構の解析

メカノレセプターの阻害剤であるガドリニウムイオンならびにランタンイオンで処理をした芽生えを 300 g の過重力環境下で生育させた。ガドリニウムイオンならびにランタンイオンで処理をした芽ばえでは、過重力環境下でも、茎が太く短くならなかった。すなわち、過重力による茎細胞の形態変化を引き起こす刺激の受容は、メカノレセプターが関与していることが確認された。

太いアクチン繊維を持つ細胞の割合は、過重力によって増加したが、ガドリニウムイオンならびにランタンイオンで処理をした芽ばえでは、過重力環境下でも増加は見られなかった。したがって、過重力によるアクチン動態の変化においても、刺激の受容にメカノレセプターが関与していると思われる。

(4) アクチン繊維と微小管との相互作用

アクチン繊維を蛍光ファロイジンにより染色し、表層微小管の配向を抗チューブリン抗体で染色した試料を用いて、アクチン繊維の動態と表層微小管の配向変化の関係を調べた。過重力による表層微小管の横向きから縦向きへの配向変化は、上部の成長中の細胞で見られた。ところが、過重力によるアクチン繊維の太さなどの変化は、上部だけでなく基部でも観察された。すなわち、過重力により表層微小管の配向が大きく変化する部位でも、アクチン繊維の動態変化は見られたが、表層微小管の配向変化があまり見られない部位でもアクチン繊維の動態変化は見られた。同様の結果は、アクチン繊維と表層微小管を蛍光タンパク質で可視化したシロイヌナズナでも見られた。よって、過重力によるアクチン繊維の動態変化と表層微小管の配向変化は独立して起こっている可能性が高いと思われる。

アクチン繊維と微小管との相互作用に関して、さらに確かめるために、両細胞骨格の片方を破壊したときの他方の動態や細胞形態を解析した。その結果、片方の細胞骨格を破壊すると、細胞形態に対する過重力の影響は小さくなった。また、片方の細胞骨格を破壊しても、もう一方の細胞骨格の過重力による変化は観察された。したがって、それぞれの細胞骨格が過重力による細胞形態の変化に異なる役割を持っていると思われる。

以上のように、本研究によって、過重力によって、細胞形態が変化の際に、アクチン繊維の動態が変化することが示された。さらに、刺激受容には、メカノレセプターが関与していることが示された。また、過重力による細胞の形態変化におけるアクチン繊維と微小管の関係に関しては、それぞれの細胞骨格の役割は異なっている可能性が高いものの、さらなる検証が必要であることが示された。

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)

Mabuchi A, Soga K, Wakabayashi K, Hoson T. Phenotypic screening of Arabidopsis T-DNA insertion lines for cell wall mechanical properties revealed ANTHOCYANINLESS2, a cell wall-related gene. *Journal of Plant Physiology*, 査読有、Vol. 191, 2016, p.29-35.
DOI: 10.1016/j.jplph.2015.11.011

Soga K, Biology Club, Kurita A, Yano S, Ichikawa T, Kamada M, Takaoki M. Growth and morphogenesis of azuki bean seedlings in space during SSAF2013 program. *Biological Sciences in Space*, 査読有、Vol. 28, 2014, p. 6-11.
DOI: 10.2187/bss.28.6

Hoson T, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T, Karahara I, Yano S, Tanigaki F, Shimazu T, Kasahara H, Masuda D, Kamisaka S. Growth stimulation in inflorescences of an Arabidopsis tubulin mutant under microgravity conditions in space. *Plant Biology*, 査読有、Vol. 16(S1) 2014, p. 91-96.
DOI: 10.1111/plb.12099

Soga K. Resistance of plants to gravitational force. *Journal of Plant Research*, 査読有、Vol. 126, 2013, p. 589-596.
DOI: 10.1007/s10265-013-0572-4

Zhang Y, Soga K, Wakabayashi K, Hoson T. Effects of gravistimuli on osmoregulation in azuki bean epicotyls. *Advances in Space Research*, 査読有、Vol. 51, 2013, p. 458-464.
DOI: 10.1016/j.asr.2012.09.013

[学会発表](計11件)

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第 29 回大会、2015 年 9 月 26 日～27 日、帝京大学(東京都・板橋区)

馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、小竹敬久、保尊隆享 . 細胞壁物性を指標としたシロイヌナズナの抗重力反応関連遺伝子の探索 . 日本宇宙生物科学会第 29 回大会、2015 年 9 月 26 日～27 日、帝京大学(東京都・板橋区)

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第 29 回大会、2015 年 9 月 26 日～27 日、帝京大学(東京都・板橋区)

曾我康一、大阪市大生物部、栗田あかね、矢野幸子、市川智洋、鎌田源司、高沖宗夫 . 「アジアの種子 2013」宇宙教育実験におけるアズキ芽ばえの成長と形態の変化 . 日本宇宙生物科学会第 28 回大会、2014 年 9 月 22 日～23 日、大阪府立大学(大阪府・堺市)

曾我康一、大阪市大生物部、栗田あかね、矢野幸子、市川智洋、鎌田源司、高沖宗夫 . 「アジアの種子 2013」宇宙実験：微小重力環境下でのアズキ芽ばえの成長と形態 . 日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12 日～14 日、明治大学(神奈川県・川崎市)

村上愛、加藤志朋、曾我康一、若林和幸、橋本 隆、保尊隆享 . 微小重力環境下におけるシロイヌナズナ胚軸の表層微小管動態 - Resist Tubule 宇宙実験 . 日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12 日～14 日、明治大学(神奈川県・川崎市)

大阪市立大学生物部、栗田あかね、矢野幸子、曾我康一 . 教育プログラム「アジアの種子 2013」宇宙実験のためのアズキの生育条件および茎の破断試験方法の検討 . 日本宇宙生物科学会第 27 回大会、2013 年 9 月 27 日～28 日、筑波大学(茨城県・つくば市)

村上 愛、加藤志朋、曾我康一、若林和幸、橋本博文、山下雅道、長谷川克也、東端 晃、矢野幸子、星出彰彦、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、鎌田源司、嶋津 徹、村中俊哉、橋本 隆、保尊隆享 . シロイヌナズナ胚軸における表層微小管動態に対する微小重力の影響 - Resist Tubule 宇宙実

験 .日本宇宙生物科学会第 27 回大会、2013 年 9 月 27 日 ~ 28 日、筑波大学(茨城県・つくば市)

加藤志朋、村上 愛、曾我康一、若林和幸、橋本博文、山下雅道、長谷川克也、東端 晃、矢野幸子、星出彰彦、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、鎌田源司、嶋津 徹、村中俊哉、橋本 隆、保尊隆享 . シロイヌナズナ胚軸における表層微小管配向と細胞成長 - Resist Tubule 宇宙実験 . 日本宇宙生物科学会第 27 回大会、2013 年 9 月 27 日 ~ 28 日、筑波大学(茨城県・つくば市)

Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Hoson T. Roles of cortical microtubules and microtubule-associated proteins in gravity-induced growth modification of plant stems. 34th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 2013 年 6 月 23 日 ~ 28 日、穂の国とよはし芸術劇場プラット(愛知県・豊橋市)

Hoson T, Kato S, Murakami M, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto H, Yamashita M, Hasegawa K, Higashibata A, Yano S, Matsumoto S, Kasahara H, Osada I, Kamada M, Shimazu T, Muranaka T, Hashimoto T. Understanding the mechanism of gravity resistance in plants by the Resist Tubule space experiment. 34th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 2013 年 6 月 23 日 ~ 28 日、穂の国とよはし芸術劇場プラット(愛知県・豊橋市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/pphys/index.html>

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・准教授
研究者番号 : 00336760

(2)連携研究者

保尊 隆享 (HOSON, Takayuki)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号 : 70135771

(3)連携研究者

若林 和幸 (WAKABAYASHI, Kazuyuki)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号 : 10220831