

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506002

研究課題名(和文) 数理解析による回旋転頭運動の重力応答依存性の証明と新規回旋転頭運動機能分子の同定

研究課題名(英文) Verification of the necessity of graviresponse for circumnutation by mathematical analyses.

研究代表者

宮沢 豊 (MIYAZAWA, Yutaka)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：00342858

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)：高等植物では、茎や根が伸長する際にその先端部を周期的に回旋させる回旋転頭運動が見られる。回旋転頭運動の重力応答依存性については、これまで相反する結論が導かれており。本研究は、回旋転頭運動を、数学的手法を用いて分析することで、回旋転頭運動の重力応答依存性を証明することを目的として研究を行った。野生型植物と重力応答異常突然変異体を用いて実験を実施したところ、野生型で見られる運動と変異体で見られる運動は数学的に分離できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Plant organs display helical growth movements known as circumnutation. Several lines of evidence indicated the necessity of graviresponse for circumnutation, however some contradictory results have been obtained from space-grown plants. In this study, we intended to distinguish circumnutation from other plants movements by mathematical analyses, and verify whether graviresponse is required for circumnutation or not. Mathematical analyses showed that the movement of shoot apex of wild type plants was truly periodic. On the other hand, the movement of shoot apex of agravitropic mutants was not. From these results, we confirmed that circumnutation requires graviresponse. In addition, this newly developed method can distinguish circumnutation from other nastic plant movement, which might be useful for analyzing the results obtained from our space experiment, "Plant Rotation".

研究分野：植物生理学

キーワード：回旋転頭運動 重力応答 突然変異体 宇宙実験

1. 研究開始当初の背景

約5億年前に陸上に進出した植物は、その固着性という性質がゆえに、水中とはまったく異なる陸地での生存を可能にするため、さまざまな能力を獲得してきた。こうした能力のひとつとして、植物は周囲の環境情報を刺激として受容し、自身の形態形成の制御を行う。植物の形態形成に影響する環境情報として最も重要なもののひとつが重力であり、植物は重力屈性により根を重力方向に伸ばすことで水分の獲得を、茎葉を反重力方向へ展開することで大気と光の獲得を容易にしている。これにより植物の独立栄養性を支える光合成を効率的に行うことが可能となった。この重力屈性についてはこれまで多くの突然変異体が取得されるなど研究が進んでおり、根端のコルメラ細胞や茎部の内皮細胞といった重力感受細胞に端を発するシグナルが植物ホルモンのオーキシンの偏差分布を引き起こし、それによる偏差的な成長が器官の屈曲を引き起こすことがわかっている。重力応答は、回旋転頭運動にも関与することが長らく示唆されてきた。回旋転頭運動は、植物の先端部が周期的に旋回しながら成長する運動であり、植物がさまざまな環境ストレスや物理的な障害を絶え間ない運動により回避し、自身の先端部を生存にもっとも有利になるような位置に移動させるために機能すると考えられている。また、回旋転頭運動は周期性を持ち、つる性植物において特に茎頂分裂組織の高い位置への移動を可能にするために必要な運動であると考えられている。このように植物生産を効率的に行うために必要とされる形態形成にもかかわらず、回旋転頭運動の分子機構はほとんど研究されず、どのような分子機構により先端部のらせん状の運動がもたらされるのかは全く理解されていない。さらに、重力応答の必要性についても、必須ではないという報告もなされており、その発現機構に関わる分子機構を明らかにすることが、急務の課題となっている。

2. 研究の目的

我々は、アサガオの茎およびシロイヌナズナ花茎において回旋転頭運動を観察する実験系を構築することに成功し、野生型アサガオとアサガオの重力応答欠損突然変異体の比較から、回旋転頭運動に重力応答が必須であることを示してきた。一方で、回旋転頭運動をしていないと考えられた植物においても、その茎頂は微小な動きを続けるため、この微小な動きをもって回旋転頭運動として報告もある。このような齟齬が生じる大きな理由として、重力応答突然変異体や宇宙空間で見られる植物の先端部の微小な動きを回旋転頭運動と捉えるかどうか、各研究者の主観に委ねられていたことが挙げられる。すなわち、回旋転頭運動の定量的評価がきちんとなされていなかったということである。そこで、本研究は、1) 数理解析を用いた回旋転頭運動の定量的評価法を確立し、

回旋転頭運動に重力応答が必須であるかを検証しに、2) 確立された回旋転頭運動の評価法を用いて、回旋転頭運動に関わる新規分子を同定することを目的とする。また得られた成果をもとに、3) 共同研究者として参加している宇宙実験「Plant Rotation」において、軌道上で得られたデータの定量的解析の実施に貢献することも本研究の目的とする。

3. 研究の方法

材料として、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) とアサガオ (*Ipomoea nil*) を用いた。シロイヌナズナは本研究室で栽培したもので、野生型として Columbia (Col-0)、重力屈性突然変異体としてデンブン合成を欠損した *phosphoglucosyltransferase-1* (*pgm-1*)、内皮細胞を欠損した *shoot gravitropism1* (*sgr1*) を用いた。アサガオについては、野生型として NBRP を通して九州大学から分与された Violet を、重力屈性突然変異体として東北大学から分与された、内皮細胞を欠損した *weeping1* を用いた。遠赤色光下でシロイヌナズナまたはアサガオが植えてあるポットを、植物体同士がぶつからないように十分に間隔を空けて複写台に並べた。また、スケールの基準として、アグリポットに 1cm の線を引いたビニールテープを張り、植物体の先端部とほぼ同じ高さに置いた。植物体とスケールを上部に設置したカメラで、10 分毎にシャッターを切りながら連続 36 時間の撮影を行った。その後、取得した 216 枚の画像データから、画像処理ソフト ImageJ を用いてシロイヌナズナの花茎の先端部、またはアサガオの黄化芽生えの胚軸の先端部の位置と、基準として植物体の根元を一点、二次元の座標にプロットした。プロットしたデータをもとに、任意の座標 (X 軸方向と Y 軸方向) を定め、それぞれについて横軸を時間としたグラフを作成した。このグラフの定量的解析として、Microsoft Excel の分析ツールにあるフーリエ解析を用いて、周波数成分とその大きさを算出した。算出された値から、運動の定量的特性として周波数成分と振幅の大きさを抽出し、野生型および重力応答欠損変異体の間での比較を行った。

4. 研究成果

シロイヌナズナ野生型では、解析に用いた 7 個体のうち、5 個体で正円に近い茎頂の軌道が記録でき、ほかの 2 個体では楕円に近い運動が観察された。得られた軌跡を X 軸方向の動きと Y 軸方向の動きに分解した (図 1)。系統により程度の差はあるものの、観察開始後しばらくは明瞭な運動を示さない個体が多く、おおよそ 12 時間目を境に運動が見られる個体が増加した。また、観察最後の 12 時間における運動は個体差が大きいことも明らかになった。茎頂の位置の時間変化は、7 個体中 5 個体では、最初の 12 時間において大きな運動を示さなかったが、12 時間目以降ではどの個体においても X 軸と Y 軸で周期的な波形が見られたことから、周期的な運動

がおきていることが示された。

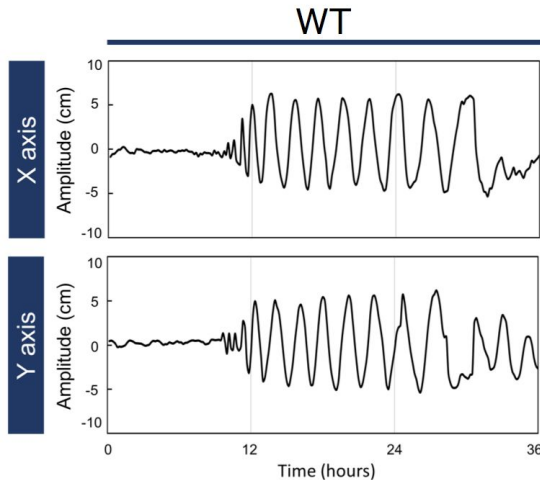


図 1

最後の 12 時間における運動は、周期が伸びる傾向にあり、個体による差も大きいことが明らかになった。このように運動の特性がおおむね 12 時間ごとに変ったことから、36 時間の観察時間を 12 時間ごと 3 つに区切り、それぞれを前期 (Early stage)、中期 (Mid stage)、後期 (Late stage) と分けて詳細な解析を行うこととした。全個体で回旋転頭運動が確認された中期において、波形から茎頂の一回転当たりの時間を求めた。すると、X 軸では平均 154 ± 58 分、Y 軸では 160 ± 59 分で、その振幅の大きさは、X 軸は平均 7.0 ± 2.0 cm、Y 軸では 7.1 ± 1.7 cm であった。この茎頂位置の時間変化のデータを定量的に評価するために、高速フーリエ変換による周波数成分の解析を行った (図 2)。

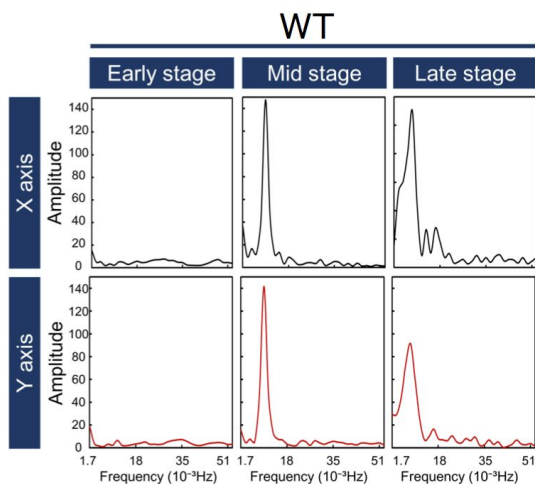


図 2

その結果、前期では 2 個体、中期では全個体において概ね共通した位置に単一のピークが見られた。後期では、中期でみられるようなピークの他に振幅の小さいピークがいくつか確認された。個体ごとに波形と高速フーリエ変換の結果を比較すると、それぞれの運動の特性を周波数成分とその大きさにより

表現できるといった。すなわち、明瞭な動きを示していない個体や時期では、高速フーリエ変換の結果得られたスペクトルにおいても明瞭なピークが出現しなかった一方で、周期的な動きを示している時期においては、明瞭なピークが出現した。したがって、シロイヌナズナの野生型の花茎では、高速フーリエ変換を行うことによって回旋転頭運動を周波数で表すことができ、それが単一のピークとして現れることが示された。

それに対して *sgr1* では、解析に用いた 6 個体すべてにおいて、茎頂の位置がほとんど変化していなかった。プロットを拡大すると、これまでの研究結果と同様に、微小な動きがあることは確認できたが、野生型と比較してもその振幅は小さく、円や楕円の軌道とは言えなかった。さらに、茎頂位置の時間変化のグラフからも、微小な波形は見られたものの、規則性は確認できなかったことから *sgr1* が示す動きに周期性がないことが考えられた (図 3)。この周期性の欠損は、高速フーリエ変換を行った結果からも支持された。すなわち、どの個体においても野生型で見られたような目立ったピークは検出されなかった。これらの結果から、*sgr1* が示した微小な動きは周期性のある運動ではないことが示された。ゆえに、*sgr1* は回旋転頭運動を完全に欠損することが示された。

同様の解析を、重力応答が低下した *pgm-1* 変異体についても行った。その結果、茎頂の軌道が野生型と比べて著しく小さく、拡大しても、野生型でみられたような周期性のある円や楕円の動きは見られなかった。茎頂位置の時間変化をみると、解析に用いた 8 個体のうち前期に微小な動きを表す波形が観察されたものが 6 個体あったが、野生型と異なり、波形に規則性はみられなかった。また、1 個体を除いて中期以降では波形は確認できなかったことから、回旋転頭運動は発現していないことが示唆された。波形データについて高速フーリエ変換を行った結果、野生型と比較してピークは小さく、前期において微小な動きが観察されたものでは、ピークが確認できたものもあるが、その周波数は野生型でみられたものと比較して小さく、個体間での共通性も見られなかった。これにより、シロイヌナズナ花茎においては、回旋転頭運動が重力応答に依存していることが明らかになった。

同様の解析をアサガオ野生型と重力応答欠損変異体の胚軸を用いて実施した。野生型では、解析に用いた個体の胚軸の頂端部の軌道が円や楕円であることが記録できた。シロイヌナズナの花茎と比較すると、その振幅は小さく、同じ軌道をなぞるように動いていたシロイヌナズナと違って、軌道が X 軸または Y 軸方向に移動していたために螺旋状に見られる個体もあった。得られた回旋転頭運動の軌跡を、X 軸方向の動きと Y 軸方向の動きに分解して解析したところ、

X 軸、Y 軸ともに、振幅は時間の経過に伴って大きくなっていった。さらに、シロイヌナズナにおける解析と同様に、観察時間の 36 時間を 12 時間ごとに区切り、撮影開始後の 12 時間から前期 (Early stage)、中期 (Mid stage)、後期 (Late stage) として、それぞれに高速フーリエ変換による解析を行った。その結果、ほとんどの個体で運動が観察された後期では、2 つのピークが観察された。一つ目のピーク (第一ピーク) は、 1.7×10^{-3} から 3.4×10^{-3} Hz の間にあり二つ目のピーク (第二ピーク) は、 16.7×10^{-3} から 21.7×10^{-3} Hz の間に観察された。第二ピークは、回旋転頭運動が見られているときに大きく表れ、振幅のスペクトルの大きさは小さいものの、前期、中期でも運動を示している個体ではみられた。

それに対して、重力屈性突然変異体である *we1* で回旋転頭運動を観察した結果、いずれの個体も円や楕円の運動を示さず、明瞭な回旋転頭運動を示さなかった。これらの軌道を、X 軸方向の動きと、Y 軸方向の動きに分解して解析したところ、多くの個体で周期的な波形は観察されなかった。さらに、高速フーリエ変換による解析を実施したところ、野生型でみられたような特定の周波数領域の 2 つのピークは確認できなかった。各個体におけるピークについて、周波数とその大きさを野生型と *we1* との間で比較した結果、野生型では各個体における第二ピークの周波数は、どのステージでも X 軸と Y 軸でほとんど差がなかった。それに対して、*we1* においては、一部個体で第一ピークが観察されたものの、第二ピークについては X 軸と Y 軸の両方向から共通してピークが得られた個体はなかった。これらの結果から、野生型で出現した第二ピークは回旋転頭運動に密接に関与する周期性をもつもので、かつ重力応答に関与するものであることが考えられた。よって、アサガオの胚軸においても、回旋転頭運動の発現には重力応答が必須であることが示唆された。

本研究より、シロイヌナズナの野生型の花茎、アサガオの黄化芽生えの胚軸における回旋転頭運動は、高速フーリエ変換を用いた解析を実施することで、それぞれ特徴的な周波数成分を持つ運動である一方で、シロイヌナズナの重力屈性能の低下系統である *pgm-1*、重力屈性能の欠損系統である *sgr1*、アサガオで重力屈性の欠損を示す *we1* における回旋転頭運動は野生型で見られるような周期性を持たないことが数学的にも証明された。合わせて本解析により、重力応答突然変異体で観察できた微小な運動に含まれる周波数成分には共通性や規則性が見られないという結果が得られた。このことから、シロイヌナズナの花茎、アサガオの黄化芽生えの胚軸における回旋転頭運動は、少なくとも一つの要因によって制御

され、それは重力応答であることが強く示唆された。さらに、本研究成果は、これまで各研究者の主観によって定義されていた回旋転頭運動の有無を、波形データを数学的に処理することにより、回旋転頭運動を客観的且つ定量的に評価できることを明らかにした。

なお、研究の成果は、共同研究者として参加している宇宙実験「Plant Rotation」での解析において、決定的な結論を導くことに大きな貢献を果たすと考えられる。

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)

Kim H-J, Kobayashi A, Fujii N, Mivazawa Y, Takahashi H (2016) Gravitropic response and circumnutation in pea (*Pisum sativum*) seedling roots. *Physiologia Plantarum* (査読有) 157, pp. 108-118

Yamazaki C, Fujii N, Mivazawa Y, Kamada M, Kasahara H, Osada I, Shimazu T, Fusejima Y, Higashibata A, Yamazaki T, Ishioka N, Takahashi H (2016) The gravity-induced re-localization of auxin efflux carrier CsPIN1 in cucumber seedlings: spaceflight experiments for immunohistochemical microscopy. *npj Microgravity* (査読有) doi: 10.1038/npjmgrav.2016.30

〔学会発表〕(計 4 件)

宮沢 豊 「植物の環境応答と形態形成」第 7 回バイオナノシステムズ研究会 (宮城) 2014 年 12 月 18 日

小林啓恵, 富田優太, Kim H-J, 藤井伸治, 宮沢 豊, 山崎千秋, 矢野幸子, 鎌田源司, 笠原春夫, 嶋津 徹, 伏島康男, 高橋秀幸 「イネ子葉鞘の回旋転頭運動における重力応答とその宇宙実験による検証」日本宇宙生物科学会第 30 回大会, 愛知医科大学 (愛知県, 長久手市), 2016 年 10 月 14 日-15 日

Kobayashi A, Kim H-J, Tomita Y, Mivazawa Y, Fujii N, Yano S, Yamazaki C, Kamada M, Kasahara H, Shimazu T, Fusejima Y, Takahashi H 「The relationship graviresponse to circumnutation in rice coleoptiles: analyses with a gravitropic mutant and space-grown seedlings」11th Asian Microgravity Symposium, Hokkaido University (Sapporo, Japan), 2016 年 10 月 25-29 日

及川睦未, 高橋秀幸, 宮沢 豊 「高速フーリエ変換を用いたシロイヌナズナ花茎における回旋転頭運動重力応答依存性の定量的解析」東北植物学会第 6 回大会, 東北

大学(宮城県,仙台市),2016年12月10日
-11日

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮沢 豊 (MIYAZAWA Yutaka)

山形大学・理学部・教授

研究者番号: 00342858