

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506015

研究課題名(和文)重力刺激による細胞壁多糖再構成におけるオーキシンの機能解明

研究課題名(英文)The analysis of auxin function in reconstruction of cell wall polysaccharide by hyper gravity.

研究代表者

鈴木 優志 (Suzuki, Masashi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：30342801

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)：シロイヌナズナの花茎に過重力処理を行うと花茎の伸長が抑制された。この時、オーキシニン応答性遺伝子であるAux/IAA19遺伝子の発現は過重力処理により減少していた。これらのことから「過重力刺激がオーキシシンを抑制し、その結果、花茎の伸長が抑制された」というモデルを構築したが、オーキシニン過剰変異体の野生型の間でキシログルカンの分子量に違いが見られず、抗重力におけるオーキシシンと細胞壁多糖の再構成や細胞伸長の関係は、今後はより慎重な解析が必要となってくると考えている。

一方で、過重力に反応して発現が変動する細胞骨格系の遺伝子が見つかり、細胞骨格系を含めた抗重力反応システムの解析の重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：The elongation of floral stem of Arabidopsis was inhibited by hyper-gravity. The expression of Aux/IAA19, an auxin responsive gene, was also inhibited by hyper-gravity. Auxin is known to loosen cell wall. From these results, we speculated that hyper-gravity down regulates auxin and then the elongation of floral stem of Arabidopsis was inhibited by down regulated auxin signal. However, molecular sizes of xyloglucan were not different between wild type and auxin accumulated mutant. To understand the relationship between auxin and reconstruction of cell wall polysaccharide and cell elongation on gravity resistance, more detailed analyses have to be performed.

On the other hands, the expression of some genes encoding cytoskeletal proteins, such as myosins, was affected by hyper-gravity. We consider that the total analyses of gravity resistance system including cytoskeleton is important.

研究分野：植物分子生物学・分子遺伝学

キーワード：オーキシシン 細胞壁 重力 シロイヌナズナ 支持領域 伸長領域

## 1. 研究開始当初の背景

オーキシンはダーウィンによって植物の成長を制御するものとしてその概念が提唱された最も古典的な植物ホルモンである。そのはたらきは胚発生から老化に至るまで植物の一生を通じて多岐にわたる。環境応答という観点でもオーキシンは光シグナルや重力シグナルを伝える情報伝達物質として重要な役割を果たしている。重力屈性においては、平衡細胞におけるデンプン粒の沈降によって重力シグナルが感知され、それがオーキシン輸送過程の修飾を通して成長領域におけるオーキシンの不均等分布を生みだし、結果として偏差成長を引き起こされることはよく知られている。重力屈性の理解が進む一方で、陸上植物が示す重力応答にはもう一つ、重力の力に抵抗するために強固な身体を構築し、自重を支えながら茎を上方向に伸長させる「抗重力」という反応がある。しかし、地上では重力そのものを取り除くことが難しいせいもあって、抗重力研究は世界的に見ても研究例が多いとは言えず、抗重力による植物の形態形成を制御するための分子機構は未解明な部分が多い。

これまでの研究の中で、申請者らはリグニンの生合成に関わる遺伝子発現がオーキシンで抑制されることを見出した。リグニンは植物の二次細胞壁を構成する主要な成分であり、植物の剛性を高めるのに重要な働きをしている。一方、細胞壁の「ゆるみ」を制御する *XTH* 遺伝子の発現はオーキシン生合成阻害剤で抑制された。さらに、シロイヌナズナおよび Mung Bean 花茎を切り分けてオーキシン内生量を定量した結果、茎頂側から基部側へのオーキシン濃度勾配が存在することを見出した。こうした知見から申請者らは、オーキシンは抗重力反応を負に制御するシグナル分子である可能性があると考えている。

## 2. 研究の目的

オーキシンはもっとも古典的な植物ホルモンであり、植物の発生・成長を内的に制御するだけでなく、光や重力など外界の環境刺激を伝達して外環境への適応に重要な役割を果たす。本研究は、環境刺激として重力に注目する。重力刺激は細胞壁多糖の再構成を通じて抗重力反応を引き起こすことが知られている。抗重力反応には植物ホルモンの一つであるオーキシンの関与が示唆されているが、重力刺激の下流で細胞壁多糖の再構成を制御するシグナルネットワークは大部分が明らかになっていない。本研究ではオーキシンを介した重力シグナルによる細胞壁多糖の再構成メカニズムを明らかにすることを目的とする。

重力とオーキシンとの関わりについてはいくつかの報告がある。オーキシン応答性プロモーター::*GUS*を導入したシロイヌナズナを用いて過重力処理による花茎のオーキシ

ン増加が示されている (Tamaoki et al. (2011) *J. Exp. Bot.* 62, 5463-5469)。一方で、過重力処理をしたアズキ上胚軸ではアポプラストの pH が 0.8 ほど上昇することが報告されている (Soga et al. (2000) *Plant Cell Physiol.* 41, 509-514)。このことは細胞膜上のプロトン ATPase 活性が負に制御されたことを意味するが、オーキシンはプロトン ATPase を活性化するので、アズキ上胚軸では過重力処理はオーキシンレベルを減少させている可能性がある。これらの研究からはオーキシンの生合成・輸送・情報伝達が重力刺激に応じてどのように制御され、抗重力反応においてオーキシンがどのような役割を果たすのかについて決定的な証拠は得られていないように思える。本研究ではオーキシンを介した重力シグナルによる細胞壁多糖の再構成メカニズムを分子遺伝学と分子生物学で明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 過重力処理方法の確立

シロイヌナズナ野生型 Col-0 株の種子を 1/2MS 培地に播種し、14 日間恒明条件で育成した。花茎の長さが 4-5 cm 程度に育った植物の葉と腋芽を切除し、土を詰めた 50 mL ファルコンチューブに植え換えた。コントロール条件は 1g 下で静置し、過重力処理は遠心分離機を用いてファルコンチューブを遠心し、24 時間の 15g 処理を行った。

### (2) 過重力処理花茎における遺伝子の発現解析

過重力処理後、花茎を上部 2 cm とそれより下部に切り分け、それぞれから RNA を抽出した。細胞壁関連遺伝子、細胞骨格系遺伝子、重力シグナル遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法で解析した。

### (3) 過重力処理花茎におけるオーキシン量の解析

過重力処理後、花茎を上部 2 cm とそれより下部に切り分け、それぞれから RNA を抽出した。オーキシン応答性遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法で解析した。

### (4) オーキシン変異体の細胞壁多糖解析

シロイヌナズナ野生型 Col-0 株及びオーキシン生合成遺伝子である *YUC1* の過剰発現体 (オーキシン高蓄積変異体) から 0.02% NaBH<sub>4</sub>, 24% KOH でキシログルカンを抽出し、TSKgel G5000PWXL カラムを用いて分子量を解析した。

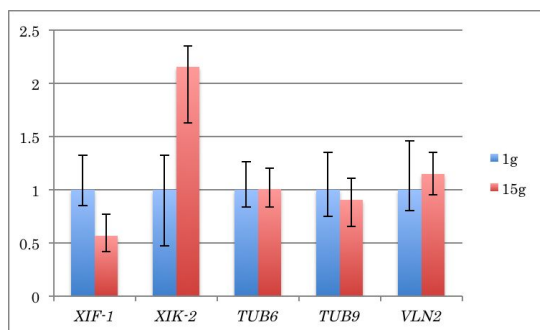
## 4. 研究成果

(1) 抗重力反応のメカニズムを調べるために、まず過重力刺激を与える育成システムを確立した。ファルコンチューブで花茎の長さが 5 cm 程度に育成したシロイヌナズナを、ファルコンチューブのまま遠心分離器で 24 時間遠心し 15 g の重力を与えた。遠心分離機は himac CR21 (日立工機社) を使い、スイングローターで 500rpm の遠心を行った。フ

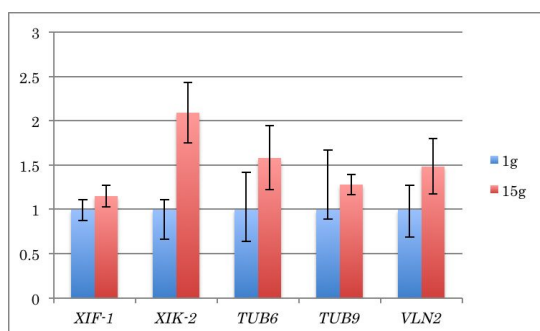
アルコンチューブの反対側には電灯を設置し、1 g のコントロール処理区と光条件を同一にした。24 時間後の花茎の長さを計測し、24 時間の伸長量を計測した。その結果、1 g のコントロール処理区では24時間で1 cm以上の伸長を示したのに対し、15 g 過重力環境下では0.5 cm 以下しか伸長しなかった。このことは花茎の伸長量が重力の影響を受けていることを示している。

(2) 過重力刺激が遺伝子発現に与える影響に注目して解析を行った。細胞壁関連遺伝子では過重力刺激により過酸化酵素遺伝子の *PER64* の発現が減少した。過酸化酵素はリグニン的高分子化に関わる酵素で、本遺伝子発現レベルが減少するということは細胞壁を緩ませて伸長成長を促す方向に働くと考えられ、過重力刺激による花茎伸長の抑制とどのような因果関係にあるのかはなお慎重な解析を必要とすると考えている。そのほか、セルロース合成酵素遺伝子、ペクチン修飾酵素遺伝子、リグニン合成酵素遺伝子などの発現レベルは過重力刺激の有無で大きな変化は見られなかった。

一方、細胞骨格系の遺伝子には興味深い変化が見られた。



過重力による細胞骨格系遺伝子発現変化 (花茎上部)



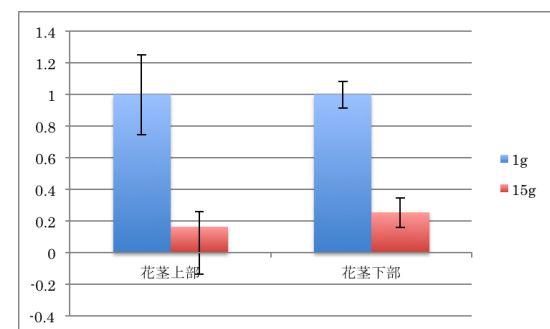
過重力による細胞骨格系遺伝子発現変化 (花茎下部)

ここで、*XIF-1*、*XIK-2* はミオシン遺伝子である。花茎上部では *XIF-1* が過重力刺激で発現が減少し、*XIK-2* は逆に発現が上昇した。一方、花茎下部では *XIK-2* の発現上昇が見られたものの、*XIF-1* の発現量は変わらなかった。

その他、微小管やアクチン遺伝子の発現量に大きな変化は認められなかった。*XIF-1* 遺伝子や *XIK-2* 遺伝子は重力応答に関わることが知られている。*xif xik 2* 重変異体は過剰な重力屈性を示すことが報告されている (Okamoto et al. (2015) *Nature Plants* 1, Article15031) 一方で、*xi1 xi2 xik 3* 重変異体は重力屈性が弱くなるという報告もある (Talts et al. (2016) *Frontiers Plant Sci.* 7, Article1932)。また、これらのミオシン遺伝子は重力屈性刺激によって発現レベルが変わらないことも報告されているが (Talts et al. (2016) *Frontiers Plant Sci.* 7, Article1932)、過重力刺激に対しては発現が応答することが今回の我々の結果により示された。ミオシンはオルガネラの運動にも関わることが知られており、重力に反応した細胞内環境の再構築に機能しているのかもしれない。抗重力反応を理解する上で、今後も注目すべき遺伝子だと考えている。

また、重力シグナルに関わると報告されている LAZY1 という核内タンパク質をコードする遺伝子の発現も過重力に反応して上昇していた。過重力を感知して重力に抗う情報が細胞各所により強く伝わっていることを示していると考えている。

(3) 花茎の伸長にはオーキシンによる細胞壁のゆるみ関与することが知られている。15g 過重力環境下における伸長抑制にオーキシンが関わっているのかどうかを検証するために、オーキシン応答性遺伝子である *Aux/IAA19* の発現を 1g コントロール処理区と 15g 過重力環境下で比較した。*Aux/IAA19* の発現は花茎の先端側でも基部側でも 15g 過重力環境下で減少していた。



過重力による *Aux/IAA19* 遺伝子発現変化

花茎の内生 IAA 量を調べると、過重力刺激により内生 IAA 量が減少している傾向が見られた。このことから、過重力刺激による *Aux/IAA19* 遺伝子の発現抑制はオーキシン感受性抑制というよりもオーキシンの蓄積量が抑制された可能性が高いことを示すと考えている。

このことは過重力が掛かると花茎のオーキシンが減少して細胞強度が増して伸長が抑制されるというモデルを示していると考え

えている。Soga らは、過重力刺激によりアズキ上胚軸のアポプラスト pH が上昇することを示している(Soga et al. (2000) *Plant Cell Physiol.* 41, 509-514)。オーキシンはアポプラストの pH を低下させるので、我々のモデルは、過去の生理実験ともよく合致すると考えている。

(4)そこで、オーキシンが細胞壁組成に与える影響を調べるために、オーキシン過剰蓄積変異体からキシログルカン抽出して、その分子量を野生型由来のキシログルカンと比較した。オーキシン過剰蓄積変異体としては、オーキシン生合成酵素遺伝子である *YUCCA1(YUC1)* 遺伝子の過剰発現体を用いた。本酵素遺伝子の過剰発現体はオーキシン過剰表現型を示し、内生 IAA 量が増加することを既に報告している(Suzuki et al. (2015) *Plant Cell Reports* 34, 1343-1352)。幼植物体から 0.02% NaBH<sub>4</sub>, 24% KOH でキシログルカン抽出し、TSKgel G5000PWXL カラムを用いて分子量を解析した。オーキシンは細胞壁を緩ませて細胞伸長を促進するという報告があるので、*YUC1* 過剰発現体ではキシログルカンの分子量が野生型よりも小さくなっていることが予想されたが、驚いたことに野生型由来のキシログルカンと比べてカラムの溶出時間に差が無く、キシログルカンの分子量はほとんど変わらないという結果が得られた。オーキシンによる細胞伸長の実験はほとんどが単離した胚軸に外からオーキシンを投与したものである。今回、変異体を用いた実験から差が見られなかったことで、オーキシンの濃度や分布状況が細胞壁多糖の再構成や細胞伸長には繊細に関わっていることが示唆され、今後はより慎重な解析が必要となってくると考えている。

以上の結果から、「過重力刺激がオーキシンを抑制し、その結果、細胞壁のゆるみが抑制され、花茎の伸長が抑制された」という単純なモデルで抗重力反応を説明できるかは今後も慎重な解析が必要であり、細胞骨格系を含めた包括的な抗重力反応システムの解析の重要性が示された。

#### 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3件)

Takato S, Takei Y, Mitsui M, Ishida Y, Suzuki M, Yamazaki C, Hayashi K, Ishii T, Nakamura A, Soeno K, Shimada Y Auxin signaling through SCF<sup>TIR1/AFBs</sup> mediates feedback regulation of IAA biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry in press* (doi: 10.1080/09168451.2017.1313694)

Takei Y, Yamazaki C, Suzuki M, Nakamura A, Sato A, Ishida Y, Kikuchi R, Higashi S, Kokudo Y, Ishii T, Soeno K, Shimada Y Small-molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. *The Plant Journal* Vol. 84, 827-837 (2015 年 11 月) (doi: 10.1111/tpj.13032)

Suzuki M, Yamazaki C, Takei Y, Nakamura A, Ishii T, Soeno K, Shimada Y Transcriptional feedback regulation of YUCCA genes in response to auxin levels in Arabidopsis. *Plant Cell Reports* Vol. 34, 1343-1352 (2015 年 8 月) (doi: 10.1007/s00299-015-1791-z)

[学会発表](計12件)

石山和、箕雄介、山崎千秋、鈴木優志、木村あかり、曾我康一、保尊隆亨、嶋田幸久 Involvement of auxin and brassinosteroid in gravity resistance of Arabidopsis inflorescence stem treated with hypergravity. 第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 16 - 18 日、鹿児島

水野翼、北畑信隆、鈴木優志、浅見忠男 新奇エチレン様活性物質の *Striga hermonthica* 種子発芽誘導活性、植物科学調節学会第 51 回大会、2016 年 10 月 28 - 30 日、高知

石山和、箕雄介、山崎千秋、鈴木優志、嶋田幸久 シロイヌナズナの抗重力反応におけるブラシノステロイドとオーキシンの機能解析、日本植物学会第 80 回大会、2016 年 9 月 16 - 18 日、沖縄

箕雄介、山崎千秋、鈴木優志、中村郁子、佐藤明子、石田遙介、菊池理絵、東昌市、国土祐未子、石井貴広、添野和夫、嶋田幸久 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、第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 - 20 日、岩手

高藤晋、三井麻理江、石田遙介、鈴木優志、箕雄介、山崎千秋、石井貴広、林謙一郎、藤岡昭三、中村郁子、持田恵一、添野和夫、嶋田幸久 SCF<sup>TIR1</sup> 複合体を介したオーキシン生合成のフィードバック制御機構、第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 - 20 日、岩手

鈴木優志、宮崎翔、白井郁也、浅見忠男 5-methyl-3-phenylisoxazole-4-carboxylic acid はオーキシンシグナルを遮断する、植物科学調節学会第 50 回大会、2015 年 10 月 23 - 25 日、東京

高藤晋、三井麻理江、石田遙介、鈴木優志、箕雄介、山崎千秋、石井貴広、林謙一郎、藤岡昭三、中村郁子、持田恵一、添野和夫、嶋田幸久 SCF<sup>TIR1/AFB</sup>

complex を介したオーキシン生合成のフィードバック制御機構、植物科学調節学会第 50 回大会、2015 年 10 月 23 - 25 日、東京

筧雄介、山崎千秋、鈴木優志、曾我康一、保尊隆亨、嶋田幸久 プ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、植物科学調節学会第 50 回大会、2015 年 10 月 23 - 25 日、東京

筧雄介、木村あかり、曾我康一、保尊隆亨、山崎千秋、鈴木優志、嶋田幸久 プラシノステロイドによるシロイヌナズナ花茎の伸長・重力応答領域の決定分子機構の探索、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16-18 日、東京

Suzuki M, Kengoyama Y, Mizuno T, Imamura Y, Kitahata N, Abe K, Okada S, Asami T Development of compounds showing ethylene like activity. 22<sup>nd</sup> International Conference on Plant Growth Substances( 国際学会 ) 2016 年 6 月 21 - 25 日, Toronto, Canada  
Takato S, Sato A, Suzuki M, Kakei Y, Hayashi K, Nakamura A, Soeno K, Shimada Y Feedback regulation of YUCCA gene expression in Auxin biosynthesis through SCF<sup>TIR1/AFB</sup> complex. 22<sup>nd</sup> International Conference on Plant Growth Substances( 国際学会 ) 2016 年 6 月 21 - 25 日, Toronto, Canada

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 優志 ( Suzuki, Masashi )

東京大学大学院・農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号： 3 0 3 4 2 8 0 1

### (2)研究分担者

嶋田 幸久 ( Shimada, Yukihiisa )

横浜市立大学・木原生物学研究所・教授

研究者番号： 3 0 3 0 0 8 7 5