

重力感受における
アミロプラスト動態制御機構の解析

中村 守貴
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 植物形態ダイナミクス
(田坂 昌生 教授)

平成 23 年 5 月 18 日提出

「目次」

はじめに (p3-p4)

序論 (p5-p6)

材料と方法 (p7-p18)

結果 (p19-p37)

考察 (p38-p45)

図と表 (p46-p90)

参考文献 (p91-p96)

謝辞 (p97)

「はじめに」

芽生えた場所で、一生を移動することなく過ごす植物は、自身を取り巻く様々な環境要因に常に曝されて生存して行かなければならない。植物を取り巻く環境要因には光、水分、気温、病原菌、そして重力など様々なものがある。植物はこのような外部環境に適応するために、様々な環境応答機構を備えている。重力屈性反応は、重力という環境要因に高等植物が適応するための重要な生存戦略の一つであり、この反応により、植物の地上部は重力方向とは逆向きに（負の）、地下部は重力方向（正の）に生長を制御している¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。

重力屈性反応の最も初期のイベントである重力感受において、重力感受細胞が重要な場として機能している。シロイヌナズナの根には、重力感受細胞であると考えられているコルメラ細胞が存在する。このことは、レーザーを用いてコルメラ細胞を破壊した個体では重力屈性能が低下したことから示唆された⁵⁾。コルメラ細胞は縦方向に四層の層構造をなしているが、個々の細胞を選んでレーザー照射を行なった実験から、二層目のコルメラ細胞が最も重力屈性への貢献度が高いということも示された⁵⁾。一方、シロイヌナズナの胚軸や花茎は外側から表皮、皮層、内皮、維管束組織を含む中心柱という同心円状の構造をとっているが（図 1）、近年の分子遺伝学的研究から、内皮細胞が地上部の重力感受細胞であることが示唆された。花茎の重力屈性能を完全に欠損した変異体 *sgr1 / scr* (*shoot gravitropism 1 / scarecrow*), *sgr7 / shr* (*shoot gravitropism 7 / short root*) では、花茎、胚軸、根において正常な内皮細胞層が失われていた。*SGR1 / SCR*, *SGR7 / SHR* は共に GRAS ファミリーに属する転写因子で、これらは根・胚軸・花茎において内皮細胞層の形成に関与すると考えられる。これらの変異体では花茎と胚軸において重力屈性反応を完全に失っていたことから内皮細胞は地上部において重力感受細胞として機能することが示唆された⁶⁾（図 1）。

重力感受のメカニズムについては、現在、根と地上部の共通の重力感受のための仕組みとして「デンプン平衡石仮説」が提唱されている³⁾⁷⁾。デンプンの蓄積により比重が高くなっているアミロプラストは、重力方向の変化に伴って新たな重力方向へ沈降できる。この仮説では、アミロプラストの沈降が重力方向の感知システムの引き金を引くのに重要な役割を果たしていると考えられている。実際、これまでの細胞生物学的な知見より、シロイヌナズナの重力感受細胞内には多数のアミロプラストが存在しており、その大部分が細胞の重力方向側、つまり下部に沈降していることが示されている。シ

ロイヌナズナの *pgm* (*phosphoglucomutase deficient*) 変異体はデンプン生合成に関与するホスホグルコムターゼをコードする遺伝子に変異をもつ。そして、この変異体は色素体内に十分にデンプンを蓄積することができず、アミロプラストが沈降せずに、この変異体の根と地上部は両方とも重力屈性能が低下する⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。一方、1G ではこの変異体のアミロプラストは沈降しないが、5G という過重力条件下に置くとアミロプラストが沈降し、根・胚軸ともに重力屈性反応が回復した¹²⁾。これらの結果から、アミロプラストの重力方向への沈降が重力方向変化を認識することに重要な役割を持つことが示された。以上のことより「デンプン平衡石仮説」は遺伝学的にも強く支持されている。

以上に述べたように、重力感受においてはアミロプラスト沈降が重要な役割を果たすと考えられるが、重力感受の詳細については未だ不明な点が多く残されている。また、アミロプラスト沈降後、どのように重力方向を感知するのかについては、根でも地上部でも知見が乏しい。当研究室では、重力感受の分子メカニズムの解明を目的に、花茎重力異常変異体 *sgr1~sgr8* (*shoot gravitropism1~8*) の単離、解析を行ってきた¹³⁾¹⁴⁾。最近新たに花茎において重力屈性異常を示す *sgr9* 変異体が単離された。しかし、この変異体に対して解析がほとんど進んでおらず、*sgr* 変異体として定義できるかどうかはまだ明らかでなかった。そこで、本研究では、この *sgr9* 変異体について生理学的、細胞生物学的に詳細に解析し、さらに *SGR9* 遺伝子に関して分子遺伝学的解析を行うことで、重力感受のメカニズムの解明を目指した。

「序論」

重力屈性反応の最も初期のイベントである重力感受においては、重力感受細胞が感受の場として機能している。この重力感受細胞は、アミロプラストと呼ばれるデンプンを多量に蓄積したプラスチドを多数含むという特徴をもつ。このアミロプラストはそのデンプンの蓄積により、自身の比重の高さによって、重力方向に沈降するものと考えられている。この性質より、アミロプラストは重力感受において「平衡石」として機能していると考えられ、アミロプラストの重力方向への沈降が重力感受に重要であると考えられている「デンプン平衡石説」が広く受け入れられている³⁾⁷⁾。

実際に、様々な植物種の重力感受細胞において、生きた細胞内のアミロプラストが重力方向に沈降している様子が観察されている^{14) 15) 16)}。アミロプラストが「平衡石」として機能するということから、アミロプラストは重力感受細胞内で静的に細胞下部に沈降していると考えがちだが、実際の生きた細胞内でのアミロプラストは非常に動的であり、その動態は非常に複雑であることがキングヨソウの花茎や、トウモロコシの幼葉鞘により示されている^{15) 16)}。また、モデル植物であるシロイヌナズナの花茎においては、内皮細胞が重力感受細胞として機能することが示されており、生きた花茎の内皮細胞内の観察より、アミロプラストは重力方向、つまり、細胞の下部に沈降している様子が観察された¹⁸⁾。しかしながら、アミロプラストは静的に細胞の下部に留まっているのではなく、これらのアミロプラストは時折、細胞の上方部へ飛び跳ねるように移動する様子が観察されている¹⁸⁾。また、細胞の下部への沈降と、飛び跳ねるような動きは重力刺激後においても観察されることが、シロイヌナズナ花茎内皮細胞の観察から示されている¹⁸⁾。これらの観察結果は、地上部の重力感受細胞内では、アミロプラストは、静的ではなく、むしろ非常に動的であり、これらの動態はおそらく細胞内因子によって影響を受けていることを示唆している。

我々が単離した *sgr2*, *sgr3*, *zig/sgr4*, *grv2/ sgr8* 変異体の解析より、この細胞内因子として、花茎内皮細胞内の液胞膜がアミロプラスト動態に大きな影響を与えていることが示唆されている^{19) 20) 21) 22)}。**SGR2** はホスホリパーゼ **A1** 様タンパク質であり、一部の **SGR2** は細胞内で液胞膜に局在することが明らかにされている¹⁹⁾。**SGR3** は **Qa-SNARE** であり、**ZIG/SGR4** は **Qb-SNARE** である^{20) 21)}。これらの **SNARE** は小胞輸送に関わることが示されている^{20) 21)}。**GRV2/SGR8** は **DnaJ** ドメインを持つタンパク質で、エンドサイトーシスに関わる線虫の **RME-8** のホモログであることから、シロイヌナズナにおいても

小胞輸送に関与する可能性が示唆されている²²⁾。*SGR2*, *SGR3*, *ZIG/SGR4*, *GRV2/SGR8* の分子遺伝学的解析から、これらの因子は液胞膜機能や、液胞膜のバイオジェネシスに関与することが示唆されている。野生型の内皮細胞内には、中心液胞と呼ばれる巨大な液胞が存在しており、この液胞膜はアミロプラストを包みこんでいる。しかしながら、電子顕微鏡による観察から、これらの変異体では、アミロプラストが液胞膜に包まれておらず、重力方向に沈降していないという共通した異常が確認されている^{19) 20) 21) 22)}。さらには、*zig/sgr4* 変異体の生きた細胞の観察から、アミロプラストは液胞膜に包まれていないことが原因で、アミロプラストの動きが制限されて重力方向に沈降できないと推測された¹⁸⁾。これらのことから、液胞膜がアミロプラストの動態、特に重力感受に重要な重力方向への沈降に大きく影響しているものと考えられる。

また、アクチンフィラメント (F-アクチン) もアミロプラスト動態に影響を与える細胞内因子であることが、アクチンの重合阻害剤を用いた薬理学的解析から示唆されている^{18) 23) 24)}。シロイヌナズナ花茎内皮細胞にアクチン重合阻害剤である *LatrunculinB* (*LatB*) を処理すると、アミロプラストの跳躍的な動きは失われ、ほぼ全てのアミロプラストが細胞の下部に沈降することが示されている¹⁸⁾。この結果は、アミロプラストの跳躍的な動きは F-アクチン依存的であり、重力方向への沈降は F-アクチンに非依存的であることを示している。一方で、シロイヌナズナの胚軸に *LatB* 処理した解析によると、F-アクチンはアミロプラスト沈降に対して促進的に働いていると考えられている²⁴⁾。このように、これら薬理学的解析に基づく知見は、矛盾したものとなっている。また、F-アクチンに関しては、アミロプラスト動態のみならず、シグナル伝達に関与するという主張も存在する^{25) 26) 27)}。しかしながら、アクチン重合阻害剤により F-アクチン形成を部分的に阻害しても、重力屈性反応は阻害されないことから、F-アクチンは重力方向を感受する際の、センシング、あるいはシグナル伝達にはおそらく必要ではないとという考えもある^{18) 23)}。以上のように、F-アクチンの重力屈性反応における役割は不明な点が多く残されている。

本研究では、アミロプラスト F-アクチンの同時観察から、アミロプラスト動態と F-アクチンとの関係性を明らかにした。また、新奇に単離された *sgr9* 変異体の分子遺伝学的解析から、*SGR9* はアミロプラストと F-アクチンの相互作用の調節を行なうことで、アミロプラストの沈降に関与する可能性を示した。

「材料と方法」

材料

本研究では、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の Columbia(Col)株を野生型として用いた。*sgr9* 変異体は、Col 株をエチルメタンサルホン酸(EMS)で変異原処理した LEHLE SEEDS 社由来の M2 集団から、当研究室の森田美代博士によって単離された。*fiz1* 変異体は、Col 株を EMS で変異原処理した M2 集団から、加藤壮英博士により単離された²⁸⁾。

植物栽培条件

5% NaClO を用いて滅菌した種子を Murashige-skoog(MS)培地プレート(4.65g/l MS 培地用混合塩, 5g/l gerumgum, 10g/l sucrose, 0.1g/l myo-inositol, 0.05% MES-KOH (pH5.7))に播種し, 4°C, 2 日間, 低温処理を行った。その後, 23°C, 80~120 μ mol/m²s の条件下にあるバイオトロン内で 7 日間~10 日間ほど生育させ, 子葉 2 枚, 幼若葉 2 枚が形成された段階で土壌に植え替えた。植え替えた植物体は, 23°C, 連続白色光の 40~120 μ mol/m²s の条件下にある室内で生育させた。土壌には, パーミキュライトとメトロミックスを 5:2 の割合に混合したものをビニールポットに満たし, 表面にパーライト I 型を薄く重ねたものを用いた。

シロイヌナズナのアグロバクテリウムによる形質転換

植物体の形質転換には Floral dip 法を用いた²⁹⁾。カナマイシン 20 μ g/ml, ゲンタマイシン 15 μ g/ml の LB 培地 300 ml でアグロバクテリウムを約 24 時間, 振とう培養した。5500rpm, 10 分, 23°C で集菌し, 上清の LB 培地を捨てて, 菌体を感染用培地(5% ショ糖, 0.001% ベンジルアミノプリン, 0.05% Silwet L-77)に懸濁した。アグリポットに感染用培地を移し, さやを取り除いて蕾のみにした植物体を 1 分間, 浸けた。その後, 液体を取らずにラップで植物を包み, 約 24 時間後ラップを取り除いた。感染した植物体を生育させた後, T1 種子を回収した。T1 種子を 5% NaClO により 10 分間滅菌した後, 5% NaClO を取り除き, 滅菌済み 0.2% アガロースに種子を懸濁し, 抗生物質入り MS 培地プレート(4.65g/l MS 培地用混合塩, 10g/l agar, 10g/l sucrose, 0.1g/l myo-inositol, 0.05% MES-KOH (pH5.7), 30 μ g/ml kanamycin)に播種した。

シロイヌナズナの花茎重力屈性の測定

花茎が 4~8cm に伸長した植物体を 23°C, 方向性の無い弱光下の簡易スタジオ内で, 1 時間静置した後, 鉢ごと 90 度倒して重力刺激を与えた。新たな重力刺激を与え始めた時を 0 分として, 10 分毎に ZoomBrowser EX ソフトウェア(Canon)の制御下でデジタルカメラ(Canon)を用いて撮影した。花茎の屈曲角度は水平線と花茎の先端の屈曲方向との間の角度とし, 画像データをもとに画像解析ソフト imageJ を用いて計測した。

シロイヌナズナの花茎光指向性成長の観察

ロゼット葉から花茎が抽苔し始めた植物体を 23°C の恒温室内で, 横方向から青色光を照射しながら生育させた。10 日間連続照射し, 伸長してくる花茎の成長方向を観察した。

シロイヌナズナの胚軸の重力屈性の測定

滅菌済み種子を MS 培地プレートに播種し, 3 日間, 4°C で培養した後, 発芽同調を行うため, 1 時間赤色光を照射して発芽を促した。23°C, 暗所でプレートを垂直に立てて 72 時間培養後に黄化芽生えの胚軸の伸長方向をデジタルカメラ(Canon)で記録した。その後, プレートを 90 度回転させて重力刺激の方向を変えて暗黒条件下でさらに 12 時間培養し, 胚軸の屈曲を同様に記録した。胚軸の屈曲角度は水平方向に対する重力刺激後の胚軸の角度と重力刺激前の角度の差を重力刺激後の屈曲角度とし, 画像データをもとに画像解析ソフト imageJ を用いて計測した。

シロイヌナズナの根の重力屈性の測定

滅菌済み種子を MS プレートに播種し, 2 日間, 4°C で培養した後, 発芽同調を行うため, 3 時間赤色光を照射して発芽を促した。23°C, 暗所でプレートを垂直に立てて 4 日培養後に黄化芽生えの根の伸長方向をデジタルカメラ(Nikon)で記録した。その後, プレートを 90 度回転させて重力刺激の方向を変えて暗黒条件下でさらに 18 時間培養し, 根の屈曲を同様に記録した。根の屈曲角度は水平方向に対する重力刺激後の根の角度と重力刺激前の角度の差を重力刺激後の屈曲角度とし, 画像データをもとに画像解析ソフト imageJ を用いて計測した。

シロイヌナズナの花茎の伸長の測定

ロゼットから最初に伸長する花茎の長さが 1cm~1.5cm になった時期から 12 時間おきに花茎の長さを 120 時間(5 日間)測定した。

植物からの DNA 抽出

芽生えの子葉一枚をサンプルとして用いた。ハサミで切り取った子葉をエッペンチューブに移し, 100 μ l の抽出 buffer (200mM Tris-HCl (pH7.5), 25mM EDTA, 0.5% SDS, 250mM NaCl)を添加した。ペッスルで固形物がなくなるまですり潰した後, 200 μ l の 100%エタノールを添加してよく混合し, 15000rpm, 10 分間, 遠心した。上清を取り除き, 70%エタノールを 200 μ l 添加し, 14000rpm, 10 分間, 遠心した。70%エタノールを除去した後, 沈殿物を 65°C の気相インキュベーターで 3 分間乾燥させた。この沈殿を 50 μ l の TE buffer (10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA)によく溶解し, DNA 抽出サンプルとした。

植物からの RNA 抽出

目的とする器官のサンプルを液体窒素で凍結させた。凍結させたサンプルをエッペンチューブに移し, ジルコニアビーズと共に, Tissue Lyser (QIAGEN)で 25/s, 2 分 30 秒間, 攪拌し粉末状にした。引き続き, RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用い, 同社のプロトコールに従い RNA を抽出した。

オリゴキャッピング法

RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)により植物体から RNA を抽出した。得られた RNA 抽出液を鋳型として GeneRacer Kit (Invitrogen)を用いて, 同社のプロトコールに従い 5'末端配列の DNA 断片を PCR 法により合成した。DNA 断片合成の際の *SGR9* 配列特異的プライマーは *SGR9_5RACE_GSP1* と *SGR9_5RACE_GSP1-2* を用いた。得られた DNA 断片を 2%アガロースゲルにより電気泳動した後, アガロースゲルから目的の DNA 断片を回収し, MagExtractor (TOYOBO)により精製した。得られた抽出液をエタノール沈殿により精製した後, pGEM-T Easy Vector System (Promega)を用いて, pGEM-T Easy にクローニングした。5'末端 DNA 断片の塩基配列は, ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems)により解析した。

相補性試験 (*gSGR9* / *sgr9* 形質転換体の作製)

ゲノム DNA を鋳型にして、*SGR9_gF* と *SGR9_gR* をプライマーに用い、*SGR9* 遺伝子と上流約 1.5kb, 下流約 0.2kb を含むゲノム断片を PCR 法により増幅した(*gSGR9*)。増幅した DNA 断片を、ZERO Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen)を用いて、pCR-Blunt II-TOPO にクローニングした (pTOPO Blunt II *gSGR9*)。次に、pTOPO Blunt II *gSGR9* を *XhoI*, *SacI* 処理することで得られた *gSGR9* 断片を、*SaII*, *SacI* を用いてバイナリーベクターである pBIN19 にクローニングした (pBIN19 *gSGR9*)。pBIN19 *gSGR9* をエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに形質導入し、引き続き上述の方法で *sgr9* 変異体を形質転換した。

pSGR9::GUS / *Col* 形質転換体の作製

ゲノム DNA を鋳型にして、*SGR9_gF* と *pSGR9(Bam)_R* をプライマーに用い、*SGR9* のプロモーターとして *SGR9* 遺伝子の開始コドンの上流約 1.5kb の DNA 断片を PCR 法により増幅した(*pSGR9*)。増幅した DNA 断片を、ZERO Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen)を用いて、pCR-Blunt II-TOPO にクローニングした (pTOPO Blunt II *pSGR9*)。次に、pTOPO Blunt II *pSGR9* を *BamHI* 処理することで得られた *pSGR9* 断片を、*BamHI* を用いて pBI101 にクローニングした (pBI101 *pSGR9::GUS*)。pBI101 *pSGR9::GUS* をエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに形質導入し、引き続き上述の方法で *Col* 株を形質転換した。

GUS 染色

植物サンプルに -20°C で冷やしておいた 90% アセトンを加え、15~30 分間、氷上にて静置した。90% アセトンを取り除き、rinse solution (50mM NaPO₄, 5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆) で洗浄した。次に、Staining solution (50mM NaPO₄, 5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆, 0.52 mg/ml X-Gluc) を加え、減圧下に 30 分間置いて GUS 染色液を浸透させた後、37°C でインキュベートし染色した。芽生え、胚軸、根、花のサンプルについては、染色後 70% エタノールに置換し、その後、脱色液 (3ml エタノール, 1ml 酢酸) に置換し、脱色を行なった。脱色後、再度 70% エタノールに置換し、透明化液 (8g 抱水クロール, 1ml グリセロール, 2ml 蒸留水) にて透明化した後に観察を行なった。花茎サンプルについては、染色後 70% エタノールに置換し、その後、脱色液 (3ml エタノール, 1ml 酢酸) に置換し、脱色を行なった。脱色後、70%~100% エタノールシリーズにて脱水処理を行なった後、Technovit 7100 に包埋し、

ミクロトームで横断切片を作製して観察を行なった。

Real-Time RT-PCR

液体窒素を用いて瞬間凍結した植物サンプルから，上述の RNA 抽出法に従って RNA を抽出した。抽出した total RNA 2 μ g に対して DNase (Invitrogen) 処理した後，Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用い，同社のプロトコールにしたがい逆転写反応を行った。逆転写反応産物を鋳型にして，SYBR Premix EX Taq (TaKaRa)を用いて PCR 反応を行い，LightCycler (Roche)により解析した。*SGR9* の器官別発現解析には，*SGR9_real_F*，*SGR9_real_R* をプライマーに用いた。また，*ACT8* の発現量を内部標準にし，プライマーは *ACT8-LC-f*，*ACT8-LC-r* を用いた。

pSCR::cSGR9 / sgr9 形質転換体の作製

液体窒素を用いて瞬間凍結した植物サンプルから，上述の RNA 抽出法に従って RNA を抽出した。抽出した total RNA 2 μ g に対して DNase (Invitrogen) 処理した後，Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用い，同社のプロトコールにしたがい逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型にして *SGR9_cDNA-B-K_F* と *SGR9_cDNA-B-K_R* をプライマーに用いて PCR 法により *SGR9* の cDNA 断片を増幅した。増幅した DNA 断片を，ZERO Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen)を用いて，pCR-Blunt II-TOPO にクローニングした(pTOPO Blunt II BamHI-cSGR9-KpnI)。次に，pTOPO Blunt II BamHI-cSGR9-KpnI を BamHI, KpnI 処理することで得られた cSGR9 断片を，BamHI, KpnI を用いて，*SCR* プロモーターがクローニングしてあるバイナリーベクター pBI300(*SCR*)に導入した(pBI300 pSCR::cSGR9)。次に，pBI300 pSCR::cSGR9 をエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに形質導入し，引き続き上述の方法で *sgr9* 変異体を形質転換した。

SGR9 抗体の作製

pTOPO Blunt II gSGR9 を鋳型にして *SGR9_cDNA_EcoI_F* と *SGR9_cDNA_EcoI_R* をプライマーに用いて PCR 法により *SGR9* の cDNA 断片を増幅した。増幅した DNA 断片を，ZERO Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen)を用いて，pCR-Blunt II-TOPO にクローニングした (pTOPO Blunt II EcoRI-cSGR9-EcoRI)。次に，pTOPO Blunt II EcoRI-cSGR9-EcoRI を EcoRI 処理することで得られた cSGR9 断片を，EcoRI を用いて，タンパク質発現用ベクター pColdII (Takara)にクローニングした(pColdII EcoRI-cSGR9-EcoRI)。

得られたプラスミドを大腸菌 BL21 株に形質導入し、LB 培地 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 100 μ g/ml ampicillin)内で、37 $^{\circ}$ C, 3 時間、OD600 が 0.4~0.6 になるまで液体培養を行なった。次に、培養液を 15 $^{\circ}$ C, 30 分間、静置した後、isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)を、終濃度 1mM になるように加え、15 $^{\circ}$ C, 24 時間培養を行なった。培養後、培養液を 4 $^{\circ}$ C, 4500g, 15 分間遠心し、集菌した。SGR9 組換えタンパク質の His-Tag を利用して精製した後、SGR9 特異的抗体の作製のための抗原として用いた。精製から抗体作製は MBL 社に委託した。

MBPtag を融合した組換えタンパク質 SGR9(RING), SGR9(RING)(C232A), SGR9(RING)(W244A)の作製

pTOPO Blunt II EcoRI-cSGR9-EcoRI を鋳型にして SGR9_RING_F と SGR9_RING_R をプライマーに用いて PCR 法により、SGR9 の RING フィンガードメイン部分のみの部分的な SGR9cDNA 断片を含んだプラスミドを増幅した (pTOPO Blunt II EcoRI-RINGcSGR9-EcoRI)。次に、pTOPO Blunt II EcoRI-RINGcSGR9-EcoRI を EcoRI 処理することで得られた RINGcSGR9 断片を、EcoRI を用いて、タンパク質発現用ベクター pMALp2 (New England Biolabs)にクローニングした (pMALp2 EcoRI-RINGcSGR9-EcoRI)。

次に、SGR9-RING(C232A), SGR9-RING(W244A)を発現するプラスミドを得るため、pTOPO Blunt II EcoRI-RINGcSGR9-EcoRI を鋳型にして C232A アミノ酸置換については SGR9_C232A_F と ZnR2 を、W244A アミノ酸置換については SGR9_W244A_F と SGR9_W244A_R をプライマーに用い、PCR 法により SGR9 の RING フィンガードメイン内に変異を導入した (pTOPO Blunt II EcoRI-RINGcSGR9(C232A)-EcoRI, pTOPO Blunt II EcoRI-RINGcSGR9(W244A)-EcoRI)。次に、pTOPO Blunt II EcoRI-RINGcSGR9-EcoRI を EcoRI 処理することで得られた RINGcSGR9 断片を、EcoRI を用いて、タンパク質発現用ベクター pMALp2 (New England Biolabs)にクローニングした (pMALp2 EcoRI-RINGcSGR9-EcoRI)。

得られたそれぞれのプラスミドを大腸菌 BL21 株に形質導入し、LB 培地内 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% glucose, 10 μ M ZnSO₄, 100 μ g/ml ampicillin)内で、37 $^{\circ}$ C, 2 時間、OD600 が 0.4~0.6 になるまで液体培養を行なった。次に、isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)を、終濃度 1mM になるように加え、37 $^{\circ}$ C, 6 時間培養を行なった。培養後、培養液を 4 $^{\circ}$ C, 4500g, 15 分間遠心し、集菌した。集菌した大腸菌を Lysis buffer(20mM Tris-HCl (pH7.5), 200mM NaCl, 100 μ M ZnSO₄, 1mM DTT)でけん濁し、ソニー

ケーターにより細胞を破砕した。その後，細胞破砕液を 4°C, 9000g, 30 分間遠心し，上清を回収した。上清は，amylodr resin (New England Biolabs)を充填した簡易カラム (QIAGEN)により，4°C 内で精製した。MBP を融合したタンパク質は 10mM maltose を含んだ Lysis buffer により溶出した。

***in vitro* における SGR9 の E3 リガーゼ活性の解析**

E3 リガーゼ活性の解析は Ubiquitinylation Kit (BIOMOL)のプロトコールに従って行なった。反応にはそれぞれ，約 700ng の MBP-SGR9(RING), MBP-SGR9(RING)(C232A), MBP-SGR9(RING)(W244A)を用い，E1 enzyme には human E1, E2 enzyme には human E2 (UbcH5c)を用いた。30°C, 8 時間反応させた後，反応を停止させるため，2x SDS-PAGE sample buffer を加え，95°C, 5 分間加熱処理を行なった。タンパク質は 7.5%のポリアクリルアミドゲル内にて電気泳動により分離し，その後，PVDF 膜に転写した。ユビキチン化されたタンパク質をすすため，SGR9 抗体(1:5000 dilution), あるいは Multi ubiquitin 抗体 (MBL, 商品コード ; D058-3)(7:10000 dilution)で PVDF 膜を 1 時間反応させた。洗浄後，膜を anti-rabbit IgG (GE Healthcare)(1:10000), あるいは，anti-mouse IgG (GE Healthcare)(1:10000)で反応させた。抗原抗体反応は ECL detection system (GE Healthcare)により検出した。

***GFP-gSGR9 / sgr9* 形質転換体の作製**

pTOPO Blunt II gSGR9 を鋳型にして SGR9_ATG_F と SGR9_NPF_R をプライマーに用い，PCR 法により開始コドン直後に SmaI サイトを挿入した (pTOPO Blunt II N 末 SmaI-gSGR9)。次に，pTOPO Blunt II N 末 SmaI-gSGR9 を XhoI, SacI 処理することで得られた SmaI-gSGR9 断片を，Sall, SacI を用いてバイナリーベクターである pBIN19 にクローニングした後 (pBIN19 N 末 SmaI-gSGR9), SmaI を用いて GFP 断片を挿入した (pBIN19 N 末 GFP-gSGR9)。pBIN19 N 末 GFP-gSGR9 をエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに形質導入し，引き続き上述の方法で *sgr9* 変異体を形質転換した。

***gSGR9-GFP / sgr9* 形質転換体の作製**

pTOPO Blunt II gSGR9 を鋳型にして SGR9_CPF_F と SGR9_CPF_R をプライマーに用い，PCR 法により終止コドン直前に SmaI サイトを挿入した (pTOPO Blunt II gSGR9-C 末 SmaI)。次に，pTOPO Blunt II gSGR9-C 末 SmaI を XhoI, SacI 処理することで得られた gSGR9-SmaI 断片を，Sall, SacI を用いてバイナリーベクターである pBIN19 にクローニングし(pBIN19 gSGR9-C

末 SmaI), SmaI を用いて GFP 断片を挿入した(pBIN19 gSGR9-C 末 GFP)。pBIN19 gSGR9-C 末 GFP をエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに形質導入し, 引き続き上述の方法で *sgr9* 変異体を形質転換した。

***gSGR9-GFP (C232A) / Col, gSGR9-GFP (W244A) / Col* 形質転換体の作製**

pTOPO Blunt II gSGR9 C 末 SmaI を鋳型にして C232A アミノ酸置換については SGR9_C232A_F と ZnR2 を, W244A アミノ酸置換については SGR9_W244A_F と SGR9_W244A_R をプライマーに用い, PCR 法により SGR9 の RING フィンガードメイン内に変異を導入した(pTOPO Blunt II gSGR9 C 末 SmaI(C232A), pTOPO Blunt II gSGR9C 末 SmaI(W244A))。次に, pTOPO Blunt II gSGR9 C 末 SmaI(C232A), (W244A)を XhoI, SacI 処理することで得られた gSGR9-SmaI(C232A), (W244A)断片を, SalI, SacI を用いてバイナリーベクターである pBIN19 にクローニングし(pBIN19 gSGR9 C 末 SmaI(C232A), pBIN19 gSGR9 C 末 SmaI(W244A)), SmaI を用いて GFP 断片を挿入した (pBIN19 gSGR9 C 末 GFP(C232A), pBIN19 gSGR9 C 末 GFP(W244A))。pBIN19 gSGR9 C 末 GFP(C232A), (W244A)をエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに形質導入し, 引き続き上述の方法で Col を形質転換した。

共焦点顕微鏡による観察

35S::SGR9-GFP, 及び, *gSGR9-GFP (C232A) / Col, gSGR9-GFP (W244A) / Col, 35S::cSGR9-GFP (C232A) / Col, 35S::cSGR9-GFP (W244A) / Col* の GFP 蛍光観察には共焦点レーザー走査顕微鏡 FV1000 (OLYMPAS)を用いた。GFP 蛍光, 葉緑体の自家蛍光, アミロプラストの自家蛍光は 488nm の波長のレーザーにより励起した。GFP 蛍光は主に 500~510nm, 葉緑体, あるいはアミロプラストの自家蛍光は 640~710nm の波長で検出した。

テクノビット包埋による花茎縦断切片の作成と観察

花茎が 5~7cm に伸長した植物体の茎頂から 2cm~3cm の花茎をサンプルとして用いた。この花茎を 4%パラホルムアルデヒドに浸し, 氷上で 1 時間脱気させながら, また重力方向を保ちながら固定した。エタノール置換を行った後, テクノビット 7100 (Heraeus Kulzer)で置換し, 包埋した。包埋後, ミクロトームにより 3 μ m の縦断切片を作成し, 0.5%トルイジンブルーで数秒染色した後, 水道水で洗い流した。その後, 顕微鏡を用いて, アミロプラストの沈降状態を観察した。

生きた内皮細胞サンプルの準備

花茎サンプルを封入するためのスライドガラスを作製するため、二枚の接着シートを瞬間接着剤 (ARON ALPHA; TOAGOSEI, Tokyo Japan)により接着し、両面テープを作製した。この作製した両面テープを適当な大きさにし、スライドガラスに接着した。シリコンアイソレーター (FastWell FW20; GRACE BIO-LABS)を接着したテープを取り囲むように置き、封入用のスライドガラスとした。次に、サンプルに用いる花茎は 4~8cm に伸長した植物体の茎頂から 1cm~3cm の花茎をサンプルとして用いた。生きた花茎内皮細胞サンプルは、当研究室に在籍していた阪口敬太郎氏の考案した花茎切片作製法により調整した³⁰⁾。両面テープを貼付けた二枚のスライドガラスに、この花茎を挟み込み、レーザーブレイドで重力方向を保ちながら縦方向に二つに切断した。この切断した花茎サンプルに素早く少量の buffer (x1 MS, 1% sucrose, 0.1% agar)を加え、切断面の乾燥を防いだ。この花茎サンプルを重力方向を保ちながら、準備しておいた封入用スライドガラスの両面テープ上におき、シリコンアイソレーター内を buffer (x1 MS, 1% sucrose, 0.1% agar)で満たし、素早くカバーガラスで封入した(図 21)。

Vertical stage microscope system によるライブセルイメージング

本研究におけるアミロプラスト分布、アミロプラスト動態、液胞膜動態、F-アクチン動態の観察は我々の研究室で独自に開発された Vertical stage microscope system により行なった。このシステムは、当研究室に在籍していた、齋藤知恵子博士 (現、理化学研究所)、現在、当研究室に在籍している豊田正嗣博士により構築された (図 20)。

本システムは正立顕微鏡 (BX50, Olympus)を水平方向に 90 度、横倒しにしたものが基本構造となっている。本研究では対物レンズ (UPlanApo 40x, 0.85 NA, Olympus) と油浸対物レンズ(UPlanApo 100x, 1.35 NA, Olympus)を用いて観察を行なった。花茎内皮細胞サンプルは回転式のステージ(model U-SRP, Olympus)にマウントし、重力刺激は、このステージを 90 度回転することにより行なった。明視野像は冷却型 CCD カメラ(model CoolSNAP cf, Photometrics, NIPPON ROPER)で取得し、IPLab image analysis software (Scanalytics, Inc)により画像処理、解析を行なった。蛍光像はニポウディスク走査方式の共焦点スキャナユニット(model CSU10, Yokogawa)にファイバー出力デスクトップレーザー(488nm) (model HPU50101-PFS, FITEL, Furukawa Electric Co., Ltd.), フィルターホイール(model 99A351, Ludl Electronic Products Ltd.), 超高感度冷却型 EMCCD カメラ (model iXON+

DU897E-CS0-#BV, Andor technology)を設置したもので検出し, iQ image analysis software(Andor technology)により画像処理, 解析を行なった。GFP 蛍光とアミロプラストの自家蛍光は 488nm の波長で励起し, GFP 蛍光については 503-552nm の波長域の光を透過するバンドパスフィルター(model Em01-R488-25, Semrock), アミロプラスト自家蛍光については 665-705 nm の波長域の光を透過するバンドパスフィルター(model FF01-685/40-25, Semrock)を介して検出した。タイムラプスイメージングの際の, バンドパスフィルターの交換は filter wheel controller system (model MAC 6000, Ludl Electronic Products Ltd.)により行なった。

アミロプラスト分布のプロット

重力刺激前の花茎内皮細胞内を対物レンズ(UPlanApo 40x, 0.85 NA, Olympus)で 10 秒間隔, 計 5 分間の経時観察した画像をアミロプラストの分布のプロットに用いた。同一の内皮細胞の連続画像のうち, 最初の画像(0min)と, 最後の画像(5min)の内皮細胞内のアミロプラストをプロットした。解析結果の n の数値は 1 細胞を表している。つまり, n=1 に対して, 最初の画像(0min)と最後の画像(5min)のアミロプラストを含むので, n=5 のとき, 10 枚の画像を使用していることになる。個々の内皮細胞は同一の大きさではないため, 目的とする内皮細胞の最大値となる縦幅と, 最大値となる横幅の長方形を, 目的とする内皮細胞をとり囲む最小の長方形とし, この長方形を縦 2, 横 1 の長方形に単純化した。プロットする際のアミロプラストの座標は, アミロプラストのおおよその中心点とし, この単純化した長方形内にアミロプラストの相対的な位置をプロットした。その後, 個々の内皮細胞において相対的にプロットしたものを一つにまとめ, アミロプラストの分布図とした(図 22)。

アミロプラスト動態の定量的解析, 統計的解析

重力刺激前, および重力刺激後の花茎内皮細胞内を対物レンズ (UPlanApo 40x, 0.85 NA, Olympus)で 10 秒間隔, 計 5 分間の経時観察した画像をもとに定量的解析を行なった。定量解析に用いたアミロプラストは 20 秒以上, つまり 2 フレーム以上追跡できるものを用いた。アミロプラストの座標はアミロプラストのおおよその中心点とし, 画像をもとにアミロプラストの x 座標(水平方向), y 座標(垂直方向)を記録した。この座標値は, 画像上のピクセル座標に対応する。アミロプラストの 10 秒間毎の移動距離は, 座標値と画像上の 1 ピクセルあたりの実際の距離をもとに算出した。

10秒間のアミロプラストの移動を 1track と定義した。解析結果の n は track 数を示している。各 track のベクトルを水平(x軸)方向と垂直(y軸)に分解し、各々、 Δx , Δy ($\mu\text{m}/10\text{sec}$)とした。 Δx の負の値は、画像内での左方向への移動を、正の値は画像内での右方向への移動を表している (図 24)。 Δy の負の値は、画像内での上方向(重力方向とは逆)への移動を、正の値は画像内での下方向(重力方向)への移動を表している (図 24)。

各条件におけるアミロプラスト動態を Δx , Δy の値を使ったヒストグラムとして表した。横軸 (Rate of movement ($\mu\text{m}/10\text{sec}$))は移動速度を $0.2\mu\text{m}/10\text{sec}$ 毎に区分した階級を示しており、縦軸 (% of tracks)は総 track 数に対する各階級の track 数の割合を示している。このヒストグラムにおいては、ヒストグラムの中心線に近い階級ほど移動速度が遅いことを示しており、ヒストグラムの両端に近い階級ほど移動速度が速いことを示している。

経時観察中に生じるステージあるいはサンプルのずれは、補正を行なった。経時観察の最初の画像(0min)と、最後の画像(5min)において、任意の座標のずれをもとに計 5 分間の経時観察においてサンプルがずれた距離を求め、10 秒間あたりの平均的なずれを算出した。

重力刺激後のアミロプラストの重力方向への移動を統計的に示すため、重力刺激前の Δy の平均値と重力刺激後の Δy の平均値との間で有意差を検定した(Welch's t test, one-tailed, $P < 0.05$)。

アミロプラストの 30 秒間の移動距離の定量的解析

前述した重力刺激前の Δy ($\mu\text{m} / 10 \text{ sec}$)の定量解析結果をもとに、アミロプラストの 30 秒間の移動距離を定量した。方向性を排除するために、 Δy の値は絶対値を用い、連続した 30 秒間の Δy の絶対値の和を算出し、ヒストグラムとして表した。本解析では、30 秒間のアミロプラストの移動を 1track と定義した。解析結果の n は track 数を示している。ヒストグラムの横軸 (The moving distance of amyloplast of 30 seconds (μm))は 30 秒間のアミロプラストの移動距離を $0.2 \mu\text{m}$ 毎に区分した階級を示しており、縦軸(% of tracks)は総 track 数に対する各階級の track 数の割合を示している。このヒストグラムにおいては、ヒストグラムの点線はアミロプラストのおよその半径である $2.5 \mu\text{m}$ を示しており、この基準線よりも値の小さい階級のアミロプラストを「Lower Rate of Movement (LRM)」, 値の大きい階級のアミロプラストを「Higher Rate of Movement (HRM)」として二つに区分した。

花茎の LatB 処理

20 μ M Latrunculin B (Calbiochem) stock solution は dimethyl sulfoxide で調整した。LatB 処理に用いた花茎は、4cm~8cm に伸長した花茎を用いた。花茎は根元からレーザーブレードにより切断した後、蒸留水中で再度、水切りを行なった。水切り後、20 μ M LatB, あるいは、DMSO を含んだ液体培地(0.5x MS salt mixture, 1% sucrose)を 200 μ l チューブに入れ、切断した花茎の根元をこのチューブに倒れないように差し込んだ。23 $^{\circ}$ C, 連続白色光の 40~120 μ mol/m²s の条件下にある培養室内で 12~14 時間、インキュベートした後、重力刺激を与え、上述した通り、花茎の重力屈性反応を解析した。

pSCR::ACT8^{fiz1} / sgr9 形質転換体の作製

野生型植物の花茎から調整した cDNA を鋳型にして ACT8_cDNA_F と ACT8_cDNA_R をプライマーに用いて PCR 法により ACT8 の cDNA 断片を増幅した。増幅した DNA 断片を、ZERO Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen) を用いて、pCR-Blunt II-TOPO にクローニングした(pTOPO Blunt II ACT8)。次に、pTOPO Blunt II ACT8 を鋳型にして、ACT8_fiz1_F と ACT8_fiz1_R をプライマーに用いて、PCR 法により *fiz1* 変異を導入した ACT8^{fiz1} を含んだプラスミドを増幅した(pTOPO Blunt II ACT8(*fiz1*))。次に pTOPO Blunt II ACT8(*fiz1*)を KpnI 処理することで得られた ACT8^{fiz1} 断片を、KpnI を用いて、*SCR* プロモーターがクローニングしてあるバイナリーベクター pBI300(*SCR*) に導入した(pBI300 pSCR::ACT8(*fiz1*))。pBI300 pSCR::ACT8(*fiz1*)をエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに形質導入し、引き続き上述の方法で *sgr9* 変異体を形質転換した。

「結果」

***sgr9* 変異体の花茎重力屈性反応と地上部の表現型**

野生型 (Col) 種子を EMS 処理した M2 集団より、花茎重力屈性が弱い変異体として当研究室の森田により *sgr9* (*shoot gravitropism 9*) 変異体が単離された。この変異体の花茎重力屈性反応を詳細に解析するために、花茎が 5cm ~ 7cm の植物体を 23°C, 方向性のない弱光条件下で水平に倒すことで重力刺激を与えた。重力刺激後、野生型は 90 分までには 90 度の屈曲を示す。一方、*sgr9* 変異体では、90 分経過したところでは約 50 度の屈曲にとどまった。さらに、重力刺激を与えて 8 時間経過しても花茎の屈曲は 90 度に達することではなく、約 50 度の屈曲にとどまった (図 2)。また、形態上は側枝が横方向に伸長する以外に目立った異常は認められなかった (図 3)。

***sgr9* 変異体の花茎の伸長**

花茎重力屈性反応は伸長成長を伴う反応である。*sgr9* 変異体の重力屈性異常が花茎の伸長成長と関係するかを調べるために、野生型と *sgr9* 変異体における花茎の成長を、長さが 1cm ~ 1.5cm から 12 時間おきに測定した。測定開始から 120 時間後 (5 日後) までの間で両者に成長の違いは見られなかった (図 4)。このことから *sgr9* 変異体の重力屈性異常は花茎全体の伸長異常によるものではないことが明らかになった。

***sgr9* 変異体の花茎の光指向性成長**

植物の屈性反応には重力屈性反応のほかに、光屈性反応が知られている。*sgr9* 変異体の屈性反応異常が重力に特異的なものなのか、あるいは重力と光の両方に共通した屈性反応異常であるのかを解析するために、光指向性成長を観察した。野生型は花茎の先端側のみ青色光に対して光屈性を示し、基部側はほぼまっすぐに上方向に伸長した。*sgr9* 変異体においては基部側から青色光方向に光屈性を示した (図 5)。この光指向性成長が水平方向への光屈性と垂直方向への重力屈性が干渉した結果と考えると、*sgr9* 変異体が野生型よりも大きな屈曲を示したのは、重力屈性異常のため水平方向への光屈性反応への干渉が少なかった結果と解釈できる。このように、*sgr9* 変異体は十分な光屈性を示すことから、おそらく偏差成長には異常はなく、重力屈性に特異的なプロセスに異常を持つ変異体であると考えられる。

***sgr9* 変異体の胚軸の重力屈性反応**

これまでに単離されていた *sgr* 変異体の中には、花茎の重力屈性反応の異常の他に、胚軸の重力屈性反応にも異常を示す変異体も存在することが明らかにされている^{13) 14)}。そこで、*sgr9* 変異体における胚軸の重力屈性反応を解析した。23°C、暗所の条件下において3日間生育させた黄化芽生えの胚軸に、同条件下で90度に倒して重力刺激を12時間与え、屈曲角度を測定した。野生型では上方に45度以上の屈曲反応を示す個体が多数見られたが、*sgr9* 変異体では45度以上の屈曲反応を示す個体はほとんど見られず、屈曲角度が10度以下の個体が多数見られた(図6)。また、野生型の屈曲角度の平均値 37.59 ± 17.94 (平均値 \pm 標準偏差)と、*sgr9* 変異体の屈曲角度の平均値 11.44 ± 16.47 (平均値 \pm 標準偏差)を比較したところ、野生型と *sgr9* 変異体の屈曲角度の平均値の差は統計的に有意であった (*P*-value, Student's *t* test, $p < 0.05$)。つまり、*sgr9* 変異体の胚軸においては、野生型よりも屈性能が低下しているが示された。以上のことから、*sgr9* 変異体は地上部において花茎のみならず、胚軸においても重力屈性反応に異常があることが示唆された。

***sgr9* 変異体の根の重力屈性反応**

これまでに解析された *sgr* 変異体は根の重力屈性が正常であった^{13) 14)}。そこで、*sgr9* 変異体における根の重力屈性反応を解析した。23°C、暗所の条件下において4日間生育させた黄化芽生えの根に、同条件下で90度に倒して重力刺激を18時間与え、屈曲角度を測定した。野生型においては、大多数の個体が新たな重力方向に約90度の屈曲反応を示したのに対して、*sgr9* 変異体においては根の重力方向への屈曲が90度に満たない個体が野生型よりも多数存在した(図7)。しかしながら、野生型の屈曲角度の平均値 84.26 ± 19.63 (平均値 \pm 標準偏差)と、*sgr9* 変異体の屈曲角度の平均値 76.77 ± 26.72 (平均値 \pm 標準偏差)を比較したが、野生型と *sgr9* 変異体の屈曲角度の平均値には統計的に有意な差が認められなかった (*P*-value, Student's *t* test, $p < 0.05$)。以上のことから、*sgr9* 変異体の根においては、花茎や胚軸ほどではないが、重力屈性反応に非常に弱い異常をもつ可能性が示唆された。

SGR9 遺伝子の同定

sgr9 変異体は劣性の変異体である。マップベースクローニング法により、*sgr9* 変異体において5番染色体の北側に位置する遺伝子 At5g02750 にナンセンス変異が確認されていた(図8(A))。しかし、At5g02750 が *sgr9* 変異体の原因遺伝子であることは証明されていなかった。そこで、この遺伝子の上流

域約 1.5kb, 下流域約 0.2kb を含むゲノム断片を *sgr9* 変異体に導入した形質転換体を作製し (*gSGR9 / sgr9*), 相補性試験を行なった。得られた T1 植物のうち 28 系統について重力刺激を与えたところ, そのうち 16 系統が野生型と同様な重力屈性反応を示した。この正常な重力屈性反応を示した系統のうち, 1 系統の T4 個体を用いて詳細な解析を行なった。重力屈性反応のカイネティクスを測定したところ, *gSGR9 / sgr9* は野生型とほぼ同様の重力屈性反応を示し, 重力屈性能が相補されていることが明らかになった (図 9)。以上の結果より, *sgr9* 変異体の原因遺伝子は At5g02750 であると結論づけられた。

アシル変異体を得るために, RING finger ドメイン上流に T-DNA が挿入されていたと表示された SALK の T-DNA ライン (SALK_070204) を入手した。しかし, 実際に T-DNA 挿入部位を PCR で確認することはできなかった。また, 入手した種子をすべて育てたが *sgr9* 変異体に見られるような側枝の伸長方向異常を示す個体は得られなかった。

SGR9 遺伝子の 5'末端の決定

SGR9 遺伝子は TAIR (The Arabidopsis Information Resource) のアノテーションによると, イントロンを持たない 1 エキソン構造であると予測されていた。しかしながら, EST (Expressed Sequence Tag) 情報によると, 3'末端はアノテーション通りだが, 5'末端の配列がアノテーションにより予測されていた開始コドンよりも下流の位置であり, 実際の *SGR9* の開始コドンがアノテーション通りであるかどうかは不明であった。そこで, 予測された遺伝子構造が正しいかどうかを確認するために, 実際に *SGR9* 遺伝子の 5'末端配列を花茎由来の RNA サンプルを用いたオリゴキャッピング法により決定した。その結果, *SGR9* mRNA は予測された開始コドン上流約 30 塩基の部分にキャップ修飾を受けることが示された。また, 3'末端配列については RIKEN の cDNA データベース RAFL により 3'側の cDNA が取られていたことから, 終止コドンはアノテーション通りと判断した。以上の結果から今後使用する *SGR9* 遺伝子の ORF を決定した。

SGR9 タンパク質について

SGR9 は C 末端側に RING finger ドメインを持つ 283 アミノ酸残基からなるタンパク質である (図 9)。これまでの知見により, 多くの RING finger タンパク質が E1, E2 酵素依存的に基質をユビキチン化するユビキチン E3 リガーゼとして機能することが示されている (図 11)³¹⁾。また, RING finger

ドメインは E2 酵素との結合ドメインとして機能することが示されている (図 11)³²⁾。SGR9 の 283 アミノ酸残基の配列をもとに Blast を用いてホモロジー解析を行ったところ、シロイヌナズナゲノム中には相同な遺伝子が存在しなかった。一方、イネのゲノム中には相同な遺伝子 (NCBI:AAS79762) が一つ存在している。シロイヌナズナゲノム中に存在する 446 個ある RING finger ドメインのうち 387 個をクラスター解析し、タンパク質をグループ分けした研究によると、SGR9 は CIP8 (COP1-INTERACTING PROTEIN 8), AIP2 (ABI3-INTERACTING PROTEIN 2) と共に RING-H2 グループの 26 遺伝子からなるクラスター 2.2 として分類された³³⁾。AIP2, CIP8 の RING finger ドメインと SGR9 の RING finger ドメインのアミノ酸配列をアライメントしたところ、Zn に配位する Cys, His 残基が保存されており、また、E2 酵素との相互作用に重要な Trp 残基も保存されていた (図 10)。AIP2, CIP8 のどちらも、その機能解析から RING finger ドメインをもつユビキチン-プロテアソーム経路に関与する E3 リガーゼであることが示唆されている^{34) 35)}。

SGR9 のユビキチン E3 リガーゼ活性の解析

SGR9 タンパク質が E3 リガーゼ活性を示すかどうかを解析するために、SGR9 recombinant タンパク質を用いた、*in vitro* の解析を行なった。

① MBP tag 融合型 SGR9 の作製

これまでの研究による知見から、「maltose binding protein (MBP) は本来の基質ではないが、E3 リガーゼに融合されて物理的近傍に存在すると偽基質として認識されユビキチン化を受ける」ということが知られている³⁶⁾。そこで、*in vitro* において SGR9 の E3 リガーゼ活性を解析するため、全長の SGR9 の N 末端側に MBP を融合させた MBP-SGR9 融合タンパク質を発現するベクター (pMALp2-cSGR9) を作製し、大腸菌 BL21 株内で 1mM IPTG により MBP-SGR9 発現誘導した。しかしながら、MBP-SGR9 は発現したものの、可溶性タンパク質として精製することはできず、全長に MBP を融合したタンパク質では *in vitro* の活性測定に用いることができなかった。

そこで、MBP を融合させた可溶性のタンパク質を得るために、RING finger ドメインを残した部分的な SGR9 との融合タンパク質を作製した。作製した部分的な SGR9 は二次構造予測ソフトウェアの PSIPRED を用いて、ランダムコイル領域で切断するように作製した。SGR9 の RING finger ドメインは全長 283aa のうち、214aa-255aa の領域である。作製したものは、15aa-283aa の領域に MBP を融合させた MBP-SGR9(15-283)、43aa-283aa の領域に MBP を

融合させた MBP-SGR9(43-283), 80aa-283aa の領域に MBP を融合させた MBP-SGR9(80-283), 130aa-283aa の領域に MBP を融合させた MBP-SGR9(130-283), SGR9 の RING finger ドメイン領域が大部分を占める 195aa-283aa の領域に MBP を融合させた MBP-SGR9-RING である。これらの融合タンパク質のうち、可溶性タンパク質として得られたのは、MBP-SGR9(80-283), MBP-SGR9(130-283), MBP-SGR9-RING の三種類のみであった。次に、これら得られた可溶性の MBP-SGR9 融合タンパク質を用いて E3 リガーゼ活性測定を予備実験的に行ったところ、MBP-SGR9-RING が最も強い E3 リガーゼ活性を示した（データは示さない）。よって、本解析においては、MBP-SGR9-RING を用いた。

② *in vitro* における SGR9 の E3 リガーゼ活性の解析

SGR9 の E3 リガーゼ活性を解析するため、MBP-SGR9-RING を human の E1 酵素, human の E2 酵素(UbcH5c), ubiquitin, ATP の存在下で、30°C, 8 時間反応させた。反応後、SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングを行なった。SGR9 抗体にて検出したところ、MBP-SGR9-RING の分子量より高分子側にラダー, およびスメアーが見られた (図 12)。次に、ユビキチン抗体にて検出したところ、MBP-SGR9-RING の分子量より高分子側にラダー, およびスメアーとしてユビキチン修飾が検出された (図 12)。したがって、ラダー, もしくはスメアーとして検出された MBP-SGR9-RING はユビキチン修飾を受けたと考えられる。また、E1 酵素非存在下, あるいは、E2 酵素非存在下において同様の解析を行なったところ、ユビキチン修飾は検出できなかった (図 12)。以上の結果より、MBP-SGR9-RING は E1 酵素, E2 酵素依存的に *in vitro* において E3 リガーゼ活性をもつことが示された。

③ *in vitro* における変異型 SGR9 の E3 リガーゼ活性の解析

RING finger ドメインは 2 つの Zn イオンにシステイン (Cys) あるいはヒスチジン(His) が計 8 つ配位したドメイン構造とる (図 10)。この RING finger タンパク質は大きく C3H2C3 type と C3HC4 type の 2 つのタイプに分類され、SGR9 の RING finger ドメインは C3H2C3 type である。この RING finger ドメインは E2 リガーゼとの結合ドメインとして知られており、E3 リガーゼがユビキチンリガーゼ活性を持つために必要不可欠である³²⁾。これまでの研究により、RING finger ドメイン内の 3 番目のシステイン(Cys)をアラニン(Ala)に置換すると、RING finger ドメインの高次構造が崩れ、E3 リガーゼ活性を失わせることが知られている³²⁾。また、RING finger ドメインの 6 番目の Cys/His

残基から 4 アミノ酸残基後部の Trp は E2 リガーゼとの結合に重要であり、この残基を Ala に置換すると RING finger ドメインはリガーゼ活性を失うことが示されている³²⁾。SGR9 の RING finger ドメインにはその位置に Trp が保存されている (図 10)。

MBP-SGR9-RING が *in vitro* において E3 リガーゼ活性を示したことから、E3 リガーゼ活性を失うことが期待される変異型の MBP-SGR9-RING(C232A), MBP-SGR9-RING (W244A) を作製し、E3 リガーゼ活性が SGR9 の RING finger ドメインに依存したものかどうかを解析した。MBP-SGR9-RING が活性を示した際の条件で酵素反応を行なったところ、MBP-SGR9-RING に対して、変異型の MBP-SGR9-RING (C232A), MBP-SGR9-RING (W244A) はユビキチン修飾が著しく低下しており、ユビキチンラダーとしてはほぼ検出できなかった (図 12)。つまり、変異型の SGR9-RING は野生型よりも著しく E3 リガーゼ活性が低下していると考えられる。したがって、*in vitro* における MBP-SGR9-RING の E3 リガーゼ活性は SGR9 の RING finger ドメインに依存したものであることが示された。また、他のユビキチン E3 リガーゼ活性を持つ RING finger タンパク質と同様に、SGR9 の RING finger ドメイン内の 3 番目の Cys 残基と Trp 残基が、SGR9 の E3 リガーゼ活性に重要なアミノ酸残基であることが示された。

以上の結果より、SGR9 はユビキチン E3 リガーゼとして機能することが強く示唆される。

SGR9 の発現解析

野生型 (Col) の芽生え (7 日目)、花、蕾、鞘、葉、花茎、胚軸、根の 8 つの器官における SGR9 の発現を real-time RT-PCR 法によって解析した。その結果、SGR9 はすべての器官で発現していた (図 13(A))。

次に、発現の組織特異性を調べるために、SGR9 の上流域約 1.5kb をプロモーター領域 (*pSGR9*) にレポーター遺伝子として GUS を連結した DNA 断片を導入した形質転換体を作製した (*pSGR9::GUS*)。得られた形質転換体の花茎の GUS 活性を観察したところ、GUS 染色が観察された。花茎についてより詳細に組織レベルでの観察を行うために、GUS 染色を行った花茎の横断切片を作成した。その結果、GUS 活性は維管束組織の一部で観察されたものの、主に花茎の重力感受組織である内皮細胞層で特に強い GUS 活性が観察された (図 13(B))。また、芽生え (7 日目) における GUS 活性を調べたところ、胚軸で強い GUS 活性が観察された (図 13(C))。さらに詳細に解析するために黄化芽生えの胚軸を用いて GUS 活性を観察したところ、主に維管

束と胚軸の重力感受組織である内皮細胞において GUS 活性が観察された(図 13(E))。また、芽生えの根において、根の重力感受細胞である根冠のコルメラ細胞で強い GUS 活性が観察された(図 13(F))。また、これらの器官以外に、雄蕊の一部においても GUS 活性が観察された(図 13(D))。

内皮細胞特異的プロモーターを用いた *SGR9* の発現解析

これまでの研究により花茎の重力屈性反応において内皮細胞が重力感受細胞であることが示されている。また、GUS による発現解析により、*SGR9* は花茎において内皮細胞でとくに強く発現することが明らかになった。そこで、内皮細胞における *SGR9* の発現が重力屈性反応に重要であるかを解析するために、*sgr9* 変異体内で内皮細胞特異的 *SCR* プロモーターの制御下で *SGR9* を発現させた形質転換体を作製した (*pSCR::cSGR9 / sgr9*)。得られた T1 植物のうち 19 系統について重力屈性を観察したところ、19 系統すべてにおいて重力屈性能を相補した。この相補した系統のうち 1 系統の T3 個体について詳細に解析した。重力屈性反応のカイネティクスを測定したところ、*pSCR::cSGR9 / sgr9* の重力屈性反応は野生型とほぼ同様の反応を示すことが明らかになった(図 14)。以上の結果より、花茎重力屈性反応において、*SGR9* は内皮細胞で発現し、機能することが重要であることが示唆された。

SGR9 の細胞内局在解析

SGR9 の植物体内における本来の局在を調べる目的で、相補性試験に用いたゲノム断片 (*gSGR9*) の開始コドン直下 (N 末端側) に GFP を融合させた形質転換体 (*GFP-gSGR9 / sgr9*) と、終止コドン直前 (C 末端側) に GFP を融合させた形質転換体 (*gSGR9-GFP / sgr9*) を作製した。*GFP-gSGR9 / sgr9* について、得られた T1 植物のうち 41 系統について重力刺激後 90 分の屈曲を観察したところ、17 系統が重力屈性能を相補した。*gSGR9-GFP / sgr9* については、得られた T1 個体 50 系統のうち 25 系統が重力屈性能を相補した。*GFP-gSGR9 / sgr9* と比較して、*gSGR9-GFP / sgr9* が高い確率で重力屈性能を相補したことから、*gSGR9-GFP / sgr9* の相補した系統のうちの 1 系統の T3 個体について詳細に解析した。重力屈性反応のカイネティクスを測定したところ、*gSGR9-GFP / sgr9* の重力屈性反応は野生型とほぼ同様の反応を示すことが明らかになった(図 15)。以上の結果より、形質転換体内には重力屈性反応において正常に機能する *SGR9* と GFP の融合タンパク質 (*SGR9-GFP*) が存在すると考えられる。しかしながら、この形質転換体の花茎内皮細胞内で GFP のシグナルを検出することはできなかった(データは示さない)。GFP

蛍光が見られないことから、SGR9は植物体内においてGFPシグナルが検出できないほど存在量が少ないか、あるいは半減期が短く、代謝回転が速いといった特徴を持つタンパク質である可能性が考えられる。

変異型 SGR9(W244A)-GFP, SGR9(C232A)-GFP の細胞内局在解析

前述したように、SGR9はユビキチンE3リガーゼとして機能する可能性が高い。一般に、RING finger型のユビキチンE3リガーゼには、自己のユビキチン化により半減期が短いものがあることが知られている^{37) 38)}。そこで、SGR9-GFPは半減期が短い特徴をもつ可能性が考えられたことから、SGR9のRING fingerドメイン内にE3リガーゼ活性を失わせると期待されるアミノ酸置換(W244→A)を挿入したSGR9(W244A)-GFP、もしくは(C232→A)を挿入したSGR9(C232A)-GFPをSGR9プロモーター制御下で発現する形質転換体を作製した(*gSGR9 (W244A)-GFP / Col*, *gSGR9 (C232A)-GFP / Col*)。*gSGR9 (W244A)-GFP / Col*, および *gSGR9 (C232A)-GFP / Col*の内皮細胞を観察したところ、GFPシグナルは検出され、SGR9(W244A)-GFP、およびSGR9(C232A)-GFPは内皮細胞内でアミロプラストに局在することが明らかになった(図16(A-H))。

変異型SGR9-GFPの蛍光が検出できたのは、SGR9のRING fingerドメイン内のアミノ酸置換により、E3リガーゼとしての機能が低下し、おそらく自己ユビキチン化の活性も低下したために、SGR9タンパク質が安定化した結果であると解釈できる。また、変異型SGR9-GFPのアミロプラストへの局在は、内生のSGR9の局在部位を直接的に示したものではないが、その可能性は高い。

gSGR9(C232A)-GFP / Col, *gSGR9 (W244A)-GFP / Col* の重力屈性反応

変異型のSGR9(W244A)-GFP、およびSGR9(C232A)-GFPを発現させた形質転換体は、野生型バックグラウンドであるにもかかわらず、T1個体の複数のラインで側枝が横方向に伸長するという、*sgr9*変異体と同様の表現型を示した。そこで、側枝が横方向に伸長したラインのうちそれぞれ1系統のT3個体について、花茎の重力屈性反応を解析した(上述の細胞内局在解析に用いた系統と同様)。*gSGR9-GFP (W244A) / Col*と、*gSGR9-GFP (C232A) / Col*の重力屈性反応のカイネティクスを測定したところ、*gSGR9-GFP (W244A) / Col*および、*gSGR9-GFP (C232A) / Col*は野生型バックグラウンドであるにも関わらず、*sgr9*変異体とほぼ同様の重力屈性反応を示すことが明らかになった(図17)。以上のことから、E3リガーゼ活性を失ったと考えられる変異型

の SGR9(W244A)-GFP, および SGR9(C232A)-GFP は, 内生の SGR9 に対して優性阻害効果を持つことが示唆された。おそらく, 優性阻害効果を示す SGR9(W244A)-GFP, SGR9(C232A)-GFP の局在は, 内生の SGR9 が重力屈性反応において機能する部位を反映していると考えられる。したがって, SGR9 はアミロプラストで機能していると推測できる。

固定した花茎内皮細胞のアミロプラストの観察

SGR9 は内皮細胞のアミロプラストで機能すると考えられる。そこで, アミロプラスト沈降に着目して解析を行なった。まず始めに, 重力方向を保持したまま固定したサンプルのテクノビット切片を作製し, アミロプラストの沈降の様子を観察した。野生型では観察される大部分のアミロプラストが細胞の下部に沈降していた (図 18(A))。一方, *sgr9* 変異体について観察したところ, *sgr9* 変異体には野生型と同様にほぼ全てのアミロプラストが沈降している内皮細胞も見られたが, 沈降していないアミロプラストを 1~数個含む内皮細胞が相当数存在していた (図 18(B), (C))。 *sgr9* 変異体のアミロプラストの分布を半定量的に表すために, 内皮細胞内のアミロプラストの位置を重力方向に従い上, 中, 下の 3 箇所に分類しそれぞれの位置によりアミロプラストの数を計測した。その結果, 野生型では「下」の領域に存在するアミロプラストが 9 割以上であるに対して, *sgr9* 変異体では約 5 割程度であった (図 18(D))。

花茎内皮細胞のライブイメージング

重力屈性反応を理解する上で, 内皮細胞内のアミロプラストの動態, およびその動態に関与すると考えられる細胞内オルガネラ動態を生きた状態で, さらには重力方向を保持したまま捉えることは非常に重要である。これまでに我々は, 生きた花茎の内皮細胞を用いて, 重力方向を保持したままの観察を可能にする, vertical microscope system を構築してきた (図 19)¹⁸⁾。このシステムにより重力方向を保持したままでの細胞内の動態を捉えることが可能になった。さらに本研究では, アミロプラストの自家蛍光と GFP 蛍光の同時イメージングを可能にするシステムを構築した (図 19)。

① アミロプラスト分布

まず, vertical microscope system を用いて生きた状態でのアミロプラストの分布を解析した。分布は内皮細胞を最小の長方形で囲み, 縦 2, 横 1 の長方形に単純化したときのアミロプラストの相対的な分布として表した (図 21

(A), (B))。野生型では，大部分のアミロプラストが細胞の下部に分布しているが，*sgr9* 変異体では，細胞下部への偏った分布は見られず，細胞全体に分散して分布していた (図 21 (C), (D))。以上のことから，固定化した解析と同様，生きた細胞においても *sgr9* 変異体のアミロプラストの沈降異常が示された。

② 重力刺激前におけるアミロプラスト動態の観察と解析

次に，*sgr9* 変異体の生きた内皮細胞内におけるアミロプラスト動態の解析を行なった。vertical microscope system を用いてアミロプラスト動態の経時観察を行なったところ，野生型では，内皮細胞内のアミロプラストは飛び跳ねるような動きをしながらも細胞の下部に偏在していた (図 22(A))。一方 *sgr9* 変異体では，アミロプラストは細胞全体に分散しながら，動き回っている様子が観察され，アミロプラストは重力方向には沈降していなかった (図 22(B))。

次にこれらのアミロプラスト動態の定量的解析を行なった。10 秒間あたりのアミロプラストの動きを 1 track とし，水平方向 (Δx , $\mu\text{m} / 10\text{sec}$) と垂直方向 (Δy , $\mu\text{m} / 10\text{sec}$) に分解して計測した(図 23)。ヒストグラムの横軸 (Rate of movement ($\mu\text{m} / 10\text{sec}$))は移動速度($\mu\text{m} / 10\text{sec}$)を $0.2\mu\text{m} / 10\text{sec}$ 毎に区分した階級を示しており，縦軸 (% of tracks)は総 track 数に対する割合を示している。図中の n は総 track 数を示している。また，このヒストグラムにおいては，ヒストグラムの中心線(ゼロ)に近い階級ほど移動速度が遅い track であることを示しており，ヒストグラムの中心線(ゼロ)から離れた(両端に近い)階級ほど移動速度が速い track であることを示している。つまり，x, y 各方向においてアミロプラストの速度分布を示している。

重力刺激前の野生型においては， Δx , Δy のヒストグラムいずれにおいてもゼロの軸に対して山なりの対照的な分布を示した (図 24(A), (B))。つまり，野生型においては，移動速度の遅い track の割合が多く，低頻度で移動速度の速い track が存在すること示している。*sgr9* 変異体においても， Δx , Δy のヒストグラムはいずれにおいてもゼロの軸に対して山なりの対照的な分布を示した。しかし，野生型と *sgr9* 変異体の分散を比較したところ， Δx , Δy のいずれにおいても差が認められた (*P*-value, F test, $p < 0.05$)。 *sgr9* 変異体は， Δx , Δy いずれにおいても，野生型と比較して移動速度が速い track が相対的に多く，移動速度が遅い track が相対的に少ない (図 24(C), (D))。これらの結果は，*sgr9* 変異体においては，野生型と比較して，アミロプラストの移動速度が水平方向，垂直方向の両方向において増加していることを示して

いる。

③ 重力刺激後におけるアミロプラスト動態の観察と解析

次に、重力刺激を与えた後のアミロプラストの動態の観察と解析を行なった。これまでの研究において、重力刺激後3分間で重力方向を感知していることが明らかにされている³⁹⁾。したがって、重力刺激後3分間に重力方向を感知するためのアミロプラストの移動がおこっていると考えられる。はじめに、重力刺激後3分間のアミロプラスト動態を観察した。野生型においては、重力刺激後、アミロプラストが新たな重力方向へと沈降していく様子が観察された(図 25(A))。一方、*sgr9* 変異体においては、重力刺激を与えたにも関わらず、アミロプラストは新たな重力方向へ沈降せず、重力刺激前と同様、細胞全体を動き回っている様子が観察された(図 25(B))。

次に、重力刺激後のアミロプラスト動態の定量的解析を試みた。重力刺激後においては垂直方向(重力方向)の移動速度(Δy , $\mu\text{m} / 10\text{sec}$)を計測した。また、重力刺激後のアミロプラスト動態を時間的により詳細に解析するため、0-1min, 1-2min, 2-3min に区分して重力刺激前と同様にヒストグラムを作製した。重力刺激後の Δy のヒストグラムにおいては、正の値は新たな重力方向を示しており(図 23)、ヒストグラムの中心線(ゼロ)より右側の track は、重力方向へ移動した track を表している。

野生型においては、0-1min, 1-2min において、 Δy のヒストグラムは重力刺激前と比較して、ゼロの軸に対して右側、つまり正の値側に多くの track 数が検出され、左側、つまり負の値側の track 数の割合は少なく検出された。したがって、ヒストグラムは正の値に偏った非対称な分布を示している(図 26 (B))。重力刺激前と重力刺激後の Δy の平均値($\mu\text{m} / 10\text{sec}$)を比較すると、重力刺激後 0-1min, 1-2min では重力刺激前と比較して、正の値への有意な上昇が見られた(表 1, 図 26(B), 鍵括弧, Welch's t test, one tailed, $p < 0.05$)。したがって、0-1min, 1-2min においては、アミロプラスト全体として新たな重力方向へ移動していることが示された。

一方、*sgr9* 変異体においては野生型とは異なり、0-1min, 1-2min, 2-3min において、 Δy のヒストグラムはゼロの軸に対してほぼ対照的で、野生型のように正の値に偏ったものではない(図 26(D))。*sgr9* 変異体においても同様に Δy の平均値の比較を行なったところ、重力刺激後のいずれ時間帯においても重力刺激前と比較して有意な差が見られなかった(表 1, 図 26(D))。つまり、*sgr9* 変異体では重力刺激後 0-1min, 1-2min, 2-3min のいずれにおいても、アミロプラスト全体として、新たな重力方向への明らかな移動は見られない

ことが示された。

液胞膜マーカー *AtVam3-GFP* を用いた液胞膜の観察

アミロプラストの沈降異常を示す *sgr2*, *sgr3*, *zig/sgr4*, *sgr8* 変異体では、内皮細胞内の液胞膜構造に異常がみられ、アミロプラストが液胞膜に包まれていないという特徴を示すことが電子顕微鏡と蛍光顕微鏡による観察より示されている^{19) 20) 21) 22)}。これらの変異体では、この液胞膜構造の異常によりアミロプラストは重力方向には沈降せず、結果として重力屈性反応に異常を示すと考えられている^{19) 20) 21) 22)}。

sgr9 変異体においてもアミロプラストの沈降に異常がみられたことから、液胞膜動態を解析した。*GFP-AtVam3* を内皮特異的プロモーターである *SCR* プロモーターにより発現させた形質転換体を用いて液胞膜を可視化したラインを用いて液胞膜構造を観察した。*AtVam3* は液胞膜上に局在する SNARE であり、液胞膜マーカーとして様々な解析に用いられている⁴⁰⁾。*vertical microscope system* を用いて観察したところ、野生型では液胞膜がアミロプラストを包みながら動いている様子や、*trans-vacuolar strand (TVS)* の形成がみられ、液胞膜はダイナミックに動いていた (図 27(A))。一方、*sgr2* 変異体では、野生型に見られるような活発な液胞膜の動きは見られず、TVS の形成も見られなかった。また、異常な小胞が蓄積したような液胞構造異常が観察された (図 27(C))。*sgr9* 変異体では野生型と同様に液胞膜の活発な動きや TVS の形成がみられた (図 27(B))。以上のことから、*sgr9* 変異体では *sgr2* 変異体のような液胞膜構造の異常は見られず、*SGR9* は液胞膜とアミロプラストの間の相互作用とは異なった形でアミロプラスト動態に関与していることが示唆された。

アクチン重合阻害剤 *LatB* の重力屈性反応への影響

これまでの研究から、アミロプラストはアクチンフィラメント (F-アクチン) に取り囲まれていることが知られており、アミロプラストの跳躍的な動きは F-アクチン依存的であることが示されている¹⁸⁾。また、F-アクチン形成を阻害すると、ほぼ全てのアミロプラストが重力方向に沈降し、跳躍的な動きがなくなることが示されており、これは F-アクチンがアミロプラスト沈降に対して抑制的に働くことを示唆している¹⁸⁾。*SGR9* は液胞膜とは独立に動態に関与することと (図 27)、*sgr9* 変異体においてアミロプラストが沈降せず (図 21, 22, 24, 25, 26)、跳躍的な動きが増加していたことから (図 24)、次に、F-アクチンに着目して解析を行なった。

まず、薬理学的手法により、*sgr9* 変異体における F-アクチン形成阻害時の重力屈性反応を解析した。切断した花茎に 20 μ M Latlunculin B (LatB) を 12~14 時間処理した後、90 度に傾けることで重力刺激を与えた後の重力屈性反応を解析した。野生型では、LatB 処理時の花茎は未処理時に比べ、屈曲反応はやや遅く、カイネティクスは異なるものの明確な屈曲反応を示した (図 28(A))。

次に、同条件下における *sgr9* 変異体の重力屈性反応を解析した。*sgr9* 変異体の切断した花茎は LatB 処理により、重力屈性反応が回復した (図 28(B))。興味深いことに、LatB 処理した *sgr9* 変異体のカイネティクスは野生型の LatB 処理時のカイネティクスとほぼ同様の反応を示した。このことは LatB 処理により、*sgr9* 変異の影響がほぼ完全に打ち消されたことを示している。

アクチン優性変異体 *fiz1* を用いた遺伝学的解析

次に、さらに F-アクチンと SGR9 との関係解析するため、遺伝学的解析を試みた。*fiz1* (*frizzy shoot 1*) 変異体は栄養器官で多量に発現している *ACT8* の優性変異体として単離された。*fiz1* 変異は 272 番目の Glu が Lys にアミノ酸置換を生じる変異である²⁸⁾ (図 29(A))。272 番目の Glu はアクチン分子の Hydrophobic loop とよばれる重要な領域に位置している。この Hydrophobic loop は G-アクチンの重合や、伸長反応、また、F-アクチンの安定性に重要な領域であることが示されている^{41) 42) 43)}。これまでの研究から、*fiz1* 変異体においては F-アクチンの形成が阻害されていることが示されている (図 29(B), (C), (D))²⁸⁾。したがって、この *fiz1* 変異体と *sgr9* 変異体との遺伝学的解析を進めることで、SGR9 と F-アクチンとの関係をより詳細に解析できると考えた。*fiz1* 変異体のホモ個体 (*fiz1* -/-) は花茎の伸長が悪く、花茎のねじれや伸長阻害など強い表現型を示すことから²⁸⁾、本解析にはヘテロ個体 (*fiz1* -/+) を用いた。

まず始めに、*sgr9 fiz1* -/+ 二重変異体を作製し、重力屈性反応を解析した。*fiz1* -/+ 変異体は F-アクチンの形成が阻害されているにもかかわらず、野生型と比較すると屈曲角度がやや大きくなるものの、野生型とほぼ同様の重力屈性反応を示した (図 30)。次に、*sgr9 fiz1* -/+ 二重変異体について解析したところ、その反応は *sgr9* 変異体で見られる重力屈性異常を明らかに回復していた (図 30)。以上の結果より、*fiz1* 変異による F-アクチンの形成阻害により、*sgr9* 変異体内で引き起こされている異常が抑圧されたと考えられる。

fiz1 -/+変異体, *sgr9 fiz1* -/+ 二重変異体におけるアミロプラスト分布

以上のように, LatB および *fiz1* 変異の導入により *sgr9* 変異体の重力屈性異常が打ち消された。そこで次に, *fiz1* 変異の導入の細胞内のアミロプラスト分布と動態に対する影響をライブイメージングにより解析した。まず, *fiz1* -/+変異体および, *sgr9 fiz1* -/+二重変異体の生きた内皮細胞を用いてアミロプラストの分布を詳細に解析した。*fiz1* -/+変異体においては, 野生型よりも多くのアミロプラストが細胞の下部に分布していた (図 31(B))。一方, *sgr9 fiz1* -/+二重変異体では, *sgr9* 変異体で見られた細胞内に分散していたようなアミロプラストの分布は見られず, 明らかに細胞の下部に沈降してみられた (図 31(D))。

fiz1 -/+変異体, *sgr9 fiz1* -/+ 二重変異体における重力刺激前のアミロプラスト動態の観察と解析

アミロプラスト分布の解析に引き続き, アミロプラスト動態の解析を行なった。*fiz1* -/+変異体ではアミロプラストは野生型と比較すると跳躍的な動きが減少しており, ほぼ全てのアミロプラストが重力方向に沈降しながらわずかに動いていた (図 32 (A))。一方, *sgr9 fiz1* -/+二重変異体では, *fiz1* -/+変異体と同様に跳躍的な動きは減少していた。さらに, *fiz1* 変異の導入により *sgr9* 変異体で観察された分散して動き回っているようなアミロプラストの動きはみられず, 大部分のアミロプラストが重力方向に沈降しており, *sgr9* 変異体にみられたアミロプラストの沈降異常が回復していた (図 32(B))。

次に前述した方法と同様に, これらの変異体のアミロプラスト動態の定量的解析を試みた。*fiz1* -/+変異体においては, Δx , Δy のヒストグラムいずれにおいてもゼロの軸に対して山なりの対照的な分布を示した。しかし, 野生型と *fiz1* -/+変異体の分散を比較したところ, Δy において野生型と *fiz1* -/+変異体には差が認められた (*P*-value, F test, $p < 0.05$)。 *fiz1* -/+変異体では, 移動速度が遅い track が相対的に多い (図 33(A), (B))。これらの結果は, *fiz1* -/+変異体においては, 野生型と比較して, アミロプラストの移動速度が水平方向, 垂直方向の両方向において低下していることを示している。

一方, *sgr9 fiz1* -/+二重変異体においても, Δx , Δy のヒストグラムいずれにおいてもゼロの軸に対して山なりの対照的な分布を示した。しかしながら, Δx , Δy のヒストグラムいずれにおいても, *sgr9* 変異体と比較して, 移動速度の遅い track が相対的に増加していた (図 33(C), (D))。

fiz1 -/+変異体, *sgr9 fiz1* -/+ 二重変異体における重力刺激後のアミロプラスト動態の観察と解析

次に、重力刺激を与えた後のアミロプラストの動態の観察と解析を行なった。重力刺激後3分間のアミロプラスト動態を観察したところ、*fiz1* -/+変異体においては、アミロプラストが新たな重力方向へと沈降していく様子が観察された(図 34(A))。一方、*sgr9 fiz1* -/+二重変異体においても、新たな重力方向へと沈降するアミロプラストが数多く観察された(図 34(B))。

次に前述した方法と同様に、これらの変異体における重力刺激後のアミロプラスト動態の定量的解析を試みた。*fiz1* -/+変異体においては、0-1min, 1-2min, 2-3min において、 Δy のヒストグラムは重力刺激前と比較して、正の値側に多くの track 数が検出された。そして、ヒストグラムは正の値に偏った非対称な分布を示している(図 35(B))。重力刺激前と重力刺激後の Δy の平均値を比較すると、重力刺激後 0-1min, 1-2min, 2-3min において重力刺激前の平均値より正の値への有意な上昇が見られた(表 1, 図 35(B), 鍵括弧, Welch's t test, one tailed, $p < 0.05$)。この結果は、*fiz1* -/+変異体では 0-1min, 1-2min, 2-3min において、アミロプラスト全体として新たな重力方向へ移動していることを示す。

同様に、*sgr9 fiz1* -/+二重変異体においても、0-1min, 1-2min の Δy のヒストグラムは重力刺激前と比較して、正の値側に多くの track 数が検出され、ヒストグラムは正の値に偏った非対称な分布を示している(図 35(B))。重力刺激前と重力刺激後の Δy の平均値を比較すると、重力刺激後 0-1min, 1-2min において正の値への有意な上昇が見られた。(表 1, 図 35(B), 鍵括弧, Welch's t test, one tailed, $p < 0.05$)。これらの結果は、0-1min, 1-2min において、重力刺激後にアミロプラストが重力方向に移動したことを示している。したがって、*fiz1* 変異の導入により、*sgr9* 変異体のアミロプラストの重力方向への沈降が重力刺激後において回復したといえる。

内皮細胞特異的な *fiz1* 型 ACT8 の発現による影響

ここまでに見てきた LatB 処理、および、*fiz1* 変異による F-アクチンの形成阻害の影響は花茎全体に引き起こされている。したがって、これらの方法により *sgr9* 変異体のアミロプラスト沈降と重力屈性能は回復したものの、内皮細胞以外の他の組織、細胞での影響が複合的に反映されている可能性を否定できない。

そこで、次に、*sgr9* 変異体内で内皮細胞特異的 SCR プロモーターの制御下で *fiz1* 型の ACT8 (ACT8^{*fiz1*}) を発現させた形質転換体を作製した

(*pSCR::ACT8^{fiz1} / sgr9*)。得られた T1 植物のうち 46 系統について重力屈性を観察したところ、11 系統が 90 度上に向く屈曲を示した。このうち、より 90 度上を向いて屈曲した 1 系統の T3 個体について詳細に解析した。重力屈性反応のカイネティクスを測定したところ、内皮細胞特異的な *fiz1* 型 ACT8 の発現により、*sgr9* 変異体の重力屈性異常が部分的ではあるが明らかに回復していた (図 36)。以上の結果は、内皮細胞のみの F-アクチン形成阻害で *sgr9* 変異体の異常が部分的に抑圧されたことを示す。なお、*fiz1* 変異の導入と比較して部分的な回復にとどまったことは、SCR プロモーターを用いた場合と、内生の ACT8 プロモーターとの間で、ACT8^{fiz1} の発現量に違いが生じたことが原因の一つである可能性が高い。

移動速度が大きいアミロプラストの運動は F-アクチンの影響を強く受けている

内皮細胞のライブイメージング、および定量解析より、*sgr9* 変異体ではアミロプラストは動き回って、重力方向への偏りが少なく (図 22)、移動速度が増加していることが示された (図 24)。そこで次に、この移動速度の大きい運動の性質をより詳しく調べた。*sgr9* 変異体に加え、野生型、*fiz1* -/+ 変異体、*sgr9 fiz1* -/+ 二重変異体の動きについて、方向性は考慮せず、30 秒間の移動距離を計測して比較し、30 秒間あたりのアミロプラストの移動距離を 1 track とし、ヒストグラムとして表した (図 37)。ヒストグラムの横軸は移動距離(μm)を、縦軸 (% of tracks)は総 track 数に対する割合を示している。図中の n は総 track 数を示している。そして、アミロプラストのおよその半径 $2.5\mu\text{m}$ (ヒストグラム内の点線) を基準に、移動距離が短いアミロプラスト ($\leq 2.5\mu\text{m} / 30\text{sec}$) を「Lower Rate of Movement (LRM)」, 移動距離が長いアミロプラスト ($> 2.5\mu\text{m} / 30\text{sec}$) を「Higher Rate of Movement (HRM)」として 2 つに区分した。

野生型では、LRM が多く検出された。これに加え、HRM も低頻度ではあるが検出された (図 37(A))。一方、*fiz1* /+ 変異体においては、HRM はほとんど検出されなかった (図 37(C))。野生型と *fiz1* -/+ 変異体の運動の分散には差が認められた (*P*-value, F test, $p < 0.05$)。野生型と *fiz1* /+ 変異体を比較するために、*fiz1* /+ 変異体と野生型の % of tracks の差を、ヒストグラムとして表した。ヒストグラムの縦軸の正の値は *fiz1* /+ 変異体で多く見られた値を表しており、負の値は野生型で多く見られた値を表している。LRM では正の値側に高頻度に *fiz1* -/+ 変異体が検出され、また、HRM では負の値側に野生型が多く検出された (図 37(F))。以上の結果より、*fiz1* /+ 変異体では、野生型と

比較して LRM が増加し, HRM が減少していることが示された。おそらく, HRM は正常な F-アクチンを必要とする運動であると考えられる。

sgr9 変異体でも, 野生型と *sgr9* 変異体の運動の分散において差が認められた (*P*-value, *F* test, $p < 0.05$)。しかし, *fiz1* -/+変異体とは対称的に, 野生型と比較して HRM が明らかに多く検出された(図 37(B), (F))。以上の結果より, *sgr9* 変異体においては, HRM が野生型よりも増加し, LRM が減少していることを示された。さらに, *sgr9 fiz1* /+二重変異体においては, *sgr9* 変異体に見られた HRM は明らかに減少し, LRM が増加していた(図 37(D))。この結果は, *sgr9* 変異体に見られた HRM の増加は F-アクチンが原因であることを示唆している。

内皮細胞内の F-アクチンとアミロプラスト動態

これまでの解析から, *sgr9* 変異体内におけるアミロプラスト沈降異常や重力屈性異常が LatB 処理や *fiz1* 変異の導入によって回復したことが示された。そこで, vertical microscope system を用いて, 内皮細胞内のアミロプラストと F-アクチンの同時観察を行なった。内皮細胞内の F-アクチンは CaMV の 35S プロモーターの制御下により, GFP-mTalin を発現させて可視化した²⁶⁾。mTalin は mouse 由来の F-アクチン結合型のタンパク質であり, 植物を含め他の生物種においても F-アクチンを可視化するためのプローブとして広く用いられている^{44) 45)}。

① 野生型の F-アクチンとアミロプラスト動態

野生型の内皮細胞内のアミロプラストと F-アクチンを同時観察したところ, アミロプラストと相互作用している F-アクチンとして, 主に 4 つのタイプの F-アクチンが観察された。その 4 つとは, アミロプラストを包み込んでいるようなメッシュ状の F-アクチン (図 38(E)), アミロプラストと接着した線状の F-アクチンケーブル (図 38(A)), アミロプラストに接する湾曲した F-アクチンケーブル (図 38(D)), そしてアミロプラストを輪のように取り囲んだ ring 状の F-アクチンである (図 38(B), (C))。ring 状の構造はアミロプラストの両端に見られる二つの GFP シグナルのピークとして認識できる(図 38(B), (C)内の黄色の矢印)。

次に, これら 4 つのタイプの相互作用におけるアミロプラストの詳細な動態の観察を行なった。メッシュ状の F-アクチンに包み込まれているアミロプラストは大きな動きは見せず, ほとんどその位置を変えない様子が観察された (図 38(E))。線状の F-アクチンケーブルに接着しているアミロプラスト

は、時折ケーブルに沿って長距離移動する様子が観察された (図 38(A))。この動きはおそらく F-アクチン依存的なアミロプラストの跳躍的な動きを反映しているものと考えられる。湾曲した F-アクチンケーブルと接するアミロプラストは、大きくは動かない様子が観察された (図 38(D))。また、このタイプの F-アクチンはアミロプラスト上を滑らかにすべる様子が観察された (図 38(D))。ring 状の F-アクチンに取り囲まれているアミロプラストは、わずかにその位置を変えながら回転している様子が観察された (図 38 (B))。この ring 状の F-アクチンと相互作用するアミロプラストはしばらく回転しながら動いた後、ring 状の F-アクチンから次第に解離していくような様子が観察された (図 38(B))。また、ring 状の F-アクチンに関して、ring 状の F-アクチンがアミロプラスト上に徐々に形成されていく様子が観察された (図 38(D))。おそらくこれは、ring 状の F-アクチン形成過程であると考えられる。

② *sgr9* の F-アクチンとアミロプラスト動態

次に、*sgr9* 変異体内のアミロプラストと F-アクチンの同時観察を行なった。*sgr9* 変異体において見られる最も顕著な野生型との違いとして、F-アクチンがいくつかのアミロプラストをクラスターとして繫留している様子が観察された (図 39(A))。このような相互作用は野生型においてはほとんど観察されない。この状態にあるアミロプラストはクラスター内で頻繁にその位置を変える。また、その間、アミロプラストを取り囲んでいる F-アクチンのシグナルは頻繁にその強弱を変えている様子が観察された (図 39(A))。したがって、いくつかのアミロプラストが F-アクチンに絡まっているような異常があるものと考えられる。さらに、このクラスターは細胞内をランダムに動き回っている様子が観察された (図 39(A))。

野生型において観察されたアミロプラストと相互作用している4つのタイプ F-アクチンのうち、湾曲した F-アクチンケーブルを除く3つのタイプは *sgr9* 変異体においても観察された。その3つとは、メッシュ状の F-アクチン (図 38(E))、線状の F-アクチンケーブル (図 39(D))、ring 状の F-アクチンである (図 39(C))。しかしながら、この3つタイプのうち、線状の F-アクチンケーブルとの相互作用に関して、野生型との違いを示す様子が観察された。それは、F-アクチンに繫留された2, 3個のアミロプラストのクラスターが線状の F-アクチンに沿って長距離移動する様子である (図 39(B))。このような様子は、野生型においてほとんど観察されない。

③ ring 状 F-アクチンの定量的解析

4つのタイプのF-アクチンのうち、野生型、*sgr9* 変異体の両者において観察される ring 状のF-アクチンは、その評価が容易であることから、この ring 状のF-アクチンの出現頻度を解析した。出現頻度は約1分間に観察されるアミロプラストのうち、ring 状のF-アクチンを形成しているアミロプラストの割合として表した。野生型では、その出現頻度が25%であったのに対して、*sgr9* 変異体では10.5%と、明らかにその出現頻度が低下していた(表2)。このような ring 状のF-アクチンの出現頻度の低下は、多くのアミロプラストがF-アクチンによって絡まっている異常が原因となっているものと考えられる。

fiz1 -/+変異体、*sgr9 fiz1* -/+ 二重変異体のF-アクチン

次に、*fiz1* 変異の導入により、アミロプラストと相互作用しているF-アクチンがどのような影響を受けるかを調べるため、*fiz1* -/+変異体、および、*sgr9 fiz1* -/+二重変異体のアミロプラストとF-アクチンを同時に観察した。

fiz1 -/+変異体においては、細胞表層部のF-アクチンケーブルは観察されたものの、アミロプラストと相互作用している4つのタイプのF-アクチンはほとんど観察されず、アミロプラスト周囲のF-アクチンが明らかに減少していた(図40(A))。このことは、*fiz1* 変異の導入によって、少なくとも、アミロプラストと相互作用するF-アクチンの形成が阻害されているものと考えられる。

次に *sgr9 fiz1* -/+二重変異体を観察したところ、*fiz1* -/+変異体と同様、細胞内表層のF-アクチンケーブルは観察されたものの、4つのタイプのF-アクチンはほとんど観察されなかった(図40(B))。この観察結果は *sgr9* 変異体内においても *fiz1* 変異の導入によってアミロプラストと相互作用しているF-アクチンの形成阻害がおこっていることを示している。さらには、いくつかのアミロプラストがF-アクチンに絡まっているような異常は見られなかった(図40(B))。この結果は、*sgr9* 変異体におけるアミロプラストとF-アクチンの相互作用の異常が、*fiz1* 変異の導入により解消されたものと考えられる。

「考察」

***sgr9* 変異体は新奇の重力屈性異常変異体である**

sgr9 変異体は花茎と胚軸の重力屈性反応に明らかに異常がみられる (図 2, 6)。そして, *sgr9* 変異体の花茎において伸長成長には異常が見られなかった (図 4)。これらのことから, *sgr9* 変異体は, 花茎の重力屈性反応に異常を示す新奇の重力屈性異常変異体であるといえる。さらに, 花茎の光指向性成長に異常が見られなかったことから (図 5), おそらく最終的な偏差生長を示す反応に異常はなく, 花茎において重力屈性に特異的な反応過程に異常があると考えられる。

一方で, これまでに単離, 解析されてきた *sgr1~sgr8* 変異体は花茎, 胚軸のみに重力屈性異常を示しており, 根の重力屈性反応には異常がみられない^{13) 14)}。GUS を用いた発現解析より, *SGR9* は根の重力感受細胞であるコルメラ細胞でも発現していた (図 13(F))。この結果は, *SGR9* が根の重力屈性反応に関与する可能性を示唆する。実際に, *sgr9* 変異体の根の重力屈性反応において, 屈曲角度の平均値は野生型との間にある程度の差があり, 重力屈性能が低下した個体が多数存在していた (図 7)。しかしながら, 野生型と *sgr9* 変異体の屈曲角度の平均値には統計的に有意な差はなかった。以上のことを考慮すると, *SGR9* はコルメラ細胞内で根の重力屈性反応に関与する可能性があるが, その貢献度は, 花茎や胚軸における貢献度に比べて低いと考えられる。

***sgr9* 変異体は機能欠損型の劣性変異体か？**

SGR9 は C 末端側に RING finger ドメインを持つ遺伝子をコードする遺伝子である。*sgr9* 変異体はナンセンス変異を持つ劣性の変異体として単離された。*sgr9* 変異は RING finger ドメインの上流域にストップコドンを生じること, また, 1 エキソン構造をとることから (図 8), RING finger ドメインを欠いた部分的な変異タンパク質を発現している可能性が高い。しかしながら, 仮に変異タンパク質が発現していても機能上重要と思われる RING finger ドメインを欠くことから, ほとんど機能していないと考えられる。また, *sgr9* 変異体のヘテロ個体は野生型と同様の重力屈性反応を示すことから (データは示さない), *sgr9* 変異体は機能が欠損した劣性の変異体と考えられる。

***sgr9* 変異体はなぜ部分的な重力屈性異常を示すのか？**

これまでに単離されている *sgr* 変異体は、重力屈性能を完全に失うもの、あるいは、野生型よりも反応は遅いが最終的には 90 度の屈曲を示すものに分類されていた。しかしながら、*sgr9* 変異体は、野生型よりも反応が遅く、また、重力刺激後長時間経過しても屈曲が約 50 度にとどまるという、他の *sgr* 変異体とは性質を異にする部分的な重力屈性異常を示す (図 2)。

完全に屈性能を失わない理由として最も考えうるのは、SGR9 と重複した機能をもつ遺伝子がゲノム中に存在する可能性である。しかしながら、SGR9 は C 末端側に RING finger ドメインを持つが、その他の領域はユニークであり、全長において相同性を示す遺伝子はシロイヌナズナ中には見つからない。したがって、完全に屈性能を失わないのは、SGR9 に相同な遺伝子の存在によるものではないと考えられる。一方、アミノ酸配列として相同性を示さなくとも、SGR9 と相同な分子機能を持つタンパク質が存在する可能性は残る。RING finger タンパク質である SGR9 は RING finger ドメインにおいて、E2 酵素と結合し、その他の N 末端領域でユビキチン化を受ける基質と結合すると考えられる。したがって、SGR9 と同一の基質を代替的に認識する SCF 複合体のようなものが存在するかもしれない。しかしながら現時点では、このような因子の存在は知られていない。

仮に SGR9 と相同な分子機能をもつ因子が実際には存在しないとすると、なぜ *sgr9* 変異体は部分的な重力屈性異常を示すのか。本解析では、*sgr9* 変異体の重力屈性反応異常は、アミロプラストの沈降異常が原因である可能性が極めて高いことを示した。アミロプラスト観察の結果、*sgr9* 変異体では重力刺激後においても、アミロプラストは細胞内を分散しランダムに動き回っていた(図 25B)。しかしながら、ある一時点でのアミロプラストの細胞内分布を観察した結果からは、野生型ほどではないが、*sgr9* 変異体においても重力方向側への分布の偏りが見えた(図 21D)。*sgr9* 変異体のアミロプラストは、重力刺激後 3 分という短い時間では、重力方向への明らかな移動は見られないが (図 26D)、やがて、程度は低いながらも重力方向へ偏在することができ、これにより、弱いながらも重力方向の変化を感知できるのではないだろうか。重力刺激後のアミロプラストの重力方向への偏りの度合いが、重力屈性反応における花茎の最終的な屈曲角度に反映されているのかもしれない。アミロプラストの偏りの度合いと、最終的な花茎の屈曲角度が、どの程度相関があるのかは、残念ながら良く分かっていない。今後、アミロプラストの分布がどのように細胞内情報に変換され、そして、その情報がどのように花茎の最終的な屈曲角度に反映されるか、器官レベルでの応答を視野に入れて解析し

て行くことが必要となるだろう。

SGR9 が内皮細胞で発現し機能することが花茎重力屈性反応において重要である

花茎重力屈性反応においては、内皮細胞が重力感受細胞として機能する。GUS を用いた発現解析より、*SGR9* は花茎において、内皮細胞層と維管束の一部で発現していることが示された (図 13(B))。そして、内皮細胞特異的プロモーターである *SCR* プロモーターの制御下で *SGR9* を *sgr9* 変異体内の内皮細胞のみで発現させたところ、*sgr9* 変異体の重力屈性能はほぼ完全に相補した (図 14)。このことから、花茎重力屈性反応においては内皮細胞内で発現する *SGR9* の機能が重要であることが強く裏づけられた。

SGR9 は液胞膜動態に影響せずにアミロプラスト沈降に関与する

野生型の内皮細胞においては、アミロプラストは重力刺激前においては細胞の下部に沈降しており、また、重力刺激後、アミロプラストは新たな重力方向へと沈降する (図 22, 24, 25, 26)。一方、*sgr9* 変異体においては、重力刺激前、重力刺激後のいずれにおいてもアミロプラストは重力方向には沈降しないという異常が示された (図 22, 24, 25, 26)。したがって、*SGR9* はアミロプラストの重力方向への沈降に関与しているものと考えられる。

これまでに解析されてきた他の *sgr* 変異体、*sgr2*, *sgr3*, *zig/sgr4*, *grv2/sgr8* 変異体においても、アミロプラストが重力方向に沈降していないということが示されている^{19) 20) 21) 22)}。これらの変異体においては、そのアミロプラスト沈降の異常は液胞膜動態に起因していることが示されている^{19) 20) 21) 22)}。しかしながら、*sgr9* 変異体においては、*sgr2* 変異体に見られるような液胞膜動態の異常は観察されなかった (図 27)。このことから、*SGR9* は液胞膜動態には影響を与えることなしに、アミロプラストの重力方向への沈降に関与していると考えられる。

野生型におけるアミロプラスト動態と F-アクチンの関係性

野生型の花茎内皮細胞内におけるアミロプラストの動態は静的なものではなく、むしろ非常に複雑な動きを示すことが知られていた(図 22)。本研究では、定量解析に基づき、アミロプラストの動態を、「Higher Rate of Movement (HRM)」と「Lower Rate of Movement (LRM)」の2つに区分した (図 37)。

これまでに、野生型に観察される飛び跳ねるような動きは、アクチン重合阻害剤である LatB 処理により阻害されることが示されていた¹⁸⁾。本研究に

において、*fiz1* /+変異による F-アクチン形成阻害により、HRM の頻度は減少し (図 37(C))、同時に、アミロプラストの飛び跳ねるような動きは阻害されることが示された(図 32)。また、F-アクチンとアミロプラストの同時観察より、この飛び跳ねるようなアミロプラストの動きは、長い線状のアクチンケーブルに依存したものである可能性が示された(図 38(A))。実際に、長いアクチンケーブルは *fiz1* 変異により失われていた(図 40(A))。以上の結果を考慮すると、本研究で定義した HRM は飛び跳ねるような動きを含んでおり、また、多くは長いアクチンケーブルに依存したものであると考えられる。以降はこのような動きを「跳躍的な動き」とよぶ。

一方で、LRM は長いアクチンケーブルには依存しない動きであることが示唆される。実際に、*fiz1* 変異による F-アクチン形成阻害により、HRM は減少していたのに対して、LRM は上昇した(図 37(C))。また、*fiz1* /+変異体ではアミロプラスト周囲の F-アクチンは明らかに減少しており(図 40(A))、ほぼ全てのアミロプラストの重力方向への沈降が野生型よりも促進されていた(図 32)。これらの結果は F-アクチン形成阻害により上昇した LRM はアミロプラスト沈降と深く関連があるものと推測される。したがって、今後は長い F-アクチンに依存しないこのようなアミロプラストの動きを「沈降性の動き」と定義する。

以上、本研究の定量的解析、および、アミロプラストと F-アクチンの観察より、内皮細胞内のアミロプラスト動態は、F-アクチンによって介される「跳躍的な動き」と「沈降性の動き」の間の動的な平衡関係にあるものと推測される(図 41)。野生型の内皮細胞では、沈降性の動きを示すアミロプラストが相対的に多く、そのためにアミロプラストは平均として細胞の下部に存在するのではないかと考えられる(図 41)。一方、細胞下部に存在するアミロプラストの一部は、長い線状の F-アクチンケーブルに接着し、それによって「跳躍的な動き」を示すようになると考えられる(図 41)。

SGR9 は F-アクチンを介したアミロプラストの動的な平衡関係を調節している

sgr9 変異体において、重力刺激前、重力刺激後の両方で、アミロプラストは重力方向へは沈降しておらず、細胞内をダイナミックに動き回っている(図 22)。また、定量解析により、跳躍的な動きの頻度が増加しており、沈降性の動きの頻度が減少している(図 37(B))。この結果より、アミロプラストは *sgr9* 変異体において跳躍的な動きが多くなり、細胞の下部に沈降できなくなっているものと考えられる。この結果は、*sgr9* 変異体において、動態の

平衡関係が野生型と比べて沈降性の動きから、跳躍的な動きへと変化していることを示唆する。

fiz1 変異の導入による F-アクチン形成阻害によって、*sgr9* 変異体のアミロプラスト沈降は回復し (図 31, 32, 33, 34, 35), また、跳躍的な動きが減少し、沈降性の動きが増加した (図 37(D))。これと同時に、LatB 処理、あるいは *fiz1* 変異の導入により、*sgr9* 変異体の重力屈性異常が回復した。これらの結果は、*sgr9* 変異体における跳躍的な動きへの偏りは F-アクチンが原因である可能性を示唆する。実際に、*sgr9* 変異体のアミロプラストと F-アクチンの同時観察を行なったところ、アミロプラストと F-アクチンの相互作用の間に異常があることが示された (図 39(A), (B))。この異常は、複数のアミロプラストが F-アクチンに取囲まれクラスターを形成したものであり、このようなアミロプラストは比較的速い速度でランダムに細胞内を動き回っている (図 39(A))。また、2, 3 個のアミロプラストが F-アクチンに取囲まれた状態でクラスターを形成し、線状の F-アクチンケーブル依存的に長距離移動する様子も観察された (図 39(B))。このような観察結果から、*sgr9* 変異体ではアミロプラストと F-アクチンの相互作用が強まっている可能性が推測される。これらの観察結果は、*sgr9* 変異体において、跳躍的な動きが野生型よりも増加し、また、沈降性の動きが減少していることと矛盾しない。以上の結果より、おそらく、*sgr9* 変異体内においては、F-アクチンとアミロプラスト間の相互作用が強くなる異常を示した結果、動的な平衡関係状態が跳躍的な動きの増加へと変化したのではないかと考えられる。

野生型の内皮細胞において、F-アクチンと相互作用していたアミロプラストの周囲に一つ輪のような ring 状の F-アクチンが形成される様子が観察された。また、アミロプラストがこの ring 状の F-アクチンから滑らかに解離する様子が観察された (図 38(B))。長いアクチンケーブル依存的な跳躍的な動きによって細胞の上方へ運ばれたアミロプラストは、このような解離の様式によって、再び細胞の下部に沈降できるようになるのかもしれない。一方、*sgr9* 変異体においても、同様の ring 状の F-アクチンは観察されたが、その出現頻度は野生型の半分以下に低下していた (表 2)。この結果は、アミロプラストと F-アクチンの相互作用の異常が出現頻度減少の原因となっているものと考えられる。

SGR9 の重力感受における働きについて

上述してきたように、花茎内皮細胞内のアミロプラストの重力方向への沈降は、F-アクチンが介在する動態の平衡関係の状態に大きく依存しているこ

とを提案してきた。LatB や *fiz1* 変異の導入による F-アクチン形成を阻害した状況においても重力屈性反応は阻害されないことから、F-アクチンに依存した跳躍的な動きは重力感受には必須ではないと考えられる。そして、逆に F-アクチン形成阻害時に、沈降性の動きが上昇していた。これらの結果を考慮すると、野生型の内皮細胞では、F-アクチンから解放された状態になったアミロプラストは、自身の比重によって重力方向へ沈降することで沈降性の動きを示すのではないだろうか (図 42)。おそらく、SGR9 はアミロプラストを F-アクチンから解放し、沈降性の動きへと移行させていると考えられる。そして、SGR9 の働きにより沈降性の動きの状態にあるアミロプラストは、重力刺激の方向が変化すると、その変化に応答して新たな重力方向へと沈降できるのではないだろうか。SGR9 がアミロプラストと F-アクチンの相互作用を調節する仕方として、SGR9 が F-アクチンに付着したアミロプラストを解離するのに寄与している可能性と、アミロプラストが F-アクチンと接着することを妨げる役割をもつ可能性の二つを考えている。

花茎内皮細胞の特徴について

一般的に、プラスチドは植物細胞内において F-アクチンによって細胞膜につながれている。また、プラスチドの細胞内の位置調節は F-アクチンに依存したものであることが知られている。葉の葉肉細胞を例にとると、この細胞内の葉緑体は、光刺激に応答して F-アクチン依存的に細胞内の存在位置を変化させる。この機構は葉緑体の光定位運動と呼ばれている⁴⁵⁾。これまでの知見により、この葉緑体の運動は cp-アクチンと呼ばれる葉緑体外包膜上に形成される短い F-アクチンに依存したものであることが示されている⁴⁵⁾。また、葉緑体の外包膜に存在する機能未知の F-アクチン結合性タンパク質 CHUP1 (CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1) の働きにより、この cp-アクチンが形成され、葉緑体はその存在位置を変化させる^{44) 45)}

一方、葉緑体の cp-アクチン依存的な運動とは対照的に、花茎内皮細胞内におけるアミロプラストの重力方向への沈降には、アミロプラストが F-アクチンから解離することが重要である可能性を示した。この解離にはアミロプラストに局在する SGR9 依存的なアミロプラストと F-アクチンの相互作用の調節が重要である。SGR9 が花茎内皮細胞に加えて、胚軸の内皮細胞、根のコルメラ細胞など、他の器官の重力感受細胞でも発現していることを考慮すると、SGR9 の機能により誘導される細胞内のプラスチドの F-アクチンからの解離は、内皮細胞が重力感受細胞として機能するための重要な特徴であると考えられる。

SGR9 はユビキチン E3 リガーゼとして機能する

シロイヌナズナのゲノム中にはおよそ 480 の RING フィンガードタンパク質をコードする遺伝子が存在する。これら、RING フィンガードメインのアミノ酸配列をコンピューター解析によりクラスタリングした研究によると、SGR9 は AIP2, CIP8 と同じクラスターに分類されることが示されている³³⁾。AIP2 は ABA のシグナル伝達経路に関与する E3 リガーゼであり、基質である ABI3 をユビキチン化することでタンパク質分解に関与する³⁴⁾。CIP8 は光形態形成に関与する E3 リガーゼである³⁵⁾。これらの RING フィンガードタンパク質と同様に、SGR9 の RING フィンガードメインも *in vitro* において E1 酵素、E2 酵素依存的にタンパク質をユビキチン化する働きを持つ (図 12)。このことから、SGR9 は重力屈性反応においてユビキチン E3 リガーゼとして機能すると考えられる。また、SGR9-GFP の GFP 蛍光は観察されないのに対して、SGR9 の RING フィンガードメインにリガーゼ活性を失うことが期待される変異を加えた変異型 SGR9-GFP の GFP 蛍光は観察された (図 16)。このことは、変異を加えることにより、SGR9 タンパク質が安定化したものと考えられる。また、おそらく SGR9 は自己をユビキチン化する機能を有するものと考えられる。

SGR9 タンパク質はアミロプラストのどの部位に局在するのか

変異型 SGR9-GFP は内皮細胞内のアミロプラストに局在していた (図 16)。また、変異型 SGR9-GFP の異所的な発現解析から、変異型 SGR9-GFP は芽生えの子葉の葉肉細胞内で葉緑体に局在していた (データは示さない)。これらの結果より、SGR9 はプラスチドに局在するタンパク質と考えられる。実際、葉緑体移行シグナルを予測するプログラム TargetP により、SGR9 は N 末端側に葉緑体移行シグナルを持つと予測される。しかしながら、アミロプラストのどの部位に局在するのかの詳細については不明なままである。

アミロプラストを含む色素体の構造は、主に外包膜、内包膜、この 2 つの膜の間の空間である膜間部、内部構造のストロマとチラコイドから構成される。一般的に、葉緑体移行シグナルを持つタンパク質は、外包膜、内包膜を経由して葉緑体内部にインポートされることが知られている⁴⁶⁾。このことから、SGR9 も葉緑体内部にインポートされ、その機能を果たしているのかもしれない。しかしながら、ユビキチンタンパク質、あるいはユビキチン化したタンパク質は葉緑体内のストロマ画分には存在しないという報告がある⁴⁷⁾。さらに興味深いことに、いくつかの葉緑体移行シグナルをもつタンパ

ク質は、葉緑体内部にインポートされずに外包膜にターゲティングされるといふ報告もある⁴⁸⁾。SGR9がE3リガーゼとして機能することを考慮すると、おそらく、変異型SGR9-GFPは主にアミロプラストの外包膜上に局在しているものと考えられる。したがって、SGR9はおそらくアミロプラストの外包膜上で、アミロプラストとF-アクチンの相互作用を調節しているのではないかと考えている。

SGR9のターゲット因子について

SGR9のRINGフィンガードメインはC末端側の領域に位置する。RINGフィンガードメイン以外の領域、つまりN末端側の領域は、シロイヌナズナ中には似たような配列を持ったタンパク質は存在せず、非常にユニークな配列である。一般的に、RINGフィンガードメインにはE2酵素が結合することから、SGR9についてはN末端領域において基質となるターゲット因子と結合している可能性がある。*sgr9*変異体の観察結果に基づくと、基質となるターゲット因子はアミロプラストとF-アクチンの相互作用の調節を制御している可能性が考えられる。したがって、このターゲット因子としては、F-アクチン関連因子、あるいは、アミロプラストとF-アクチンのアダプターとして機能するタンパク質が可能性として挙げられる。SGR9タンパク質がアミロプラストの外包膜上に局在する可能性を考慮すると、おそらく、SGR9は外包膜上で、F-アクチン関連因子、あるいは、アダプター因子をユビキチン化しているのではないかと考えている。上述した作業仮説(図42)において、このようなターゲット因子を想定すると、SGR9がこれらのターゲット因子をユビキチン化しない状況においては、アミロプラストはF-アクチンとの相互作用を保持した状態にあり、アミロプラストは重力方向に沈降しないものと考えられる。SGR9の働きにより、ターゲット因子のユビキチン化が起これば、おそらく、ターゲット因子のタンパク質分解が誘導され、アミロプラストとF-アクチンの相互作用が解消されるのではないだろうか。

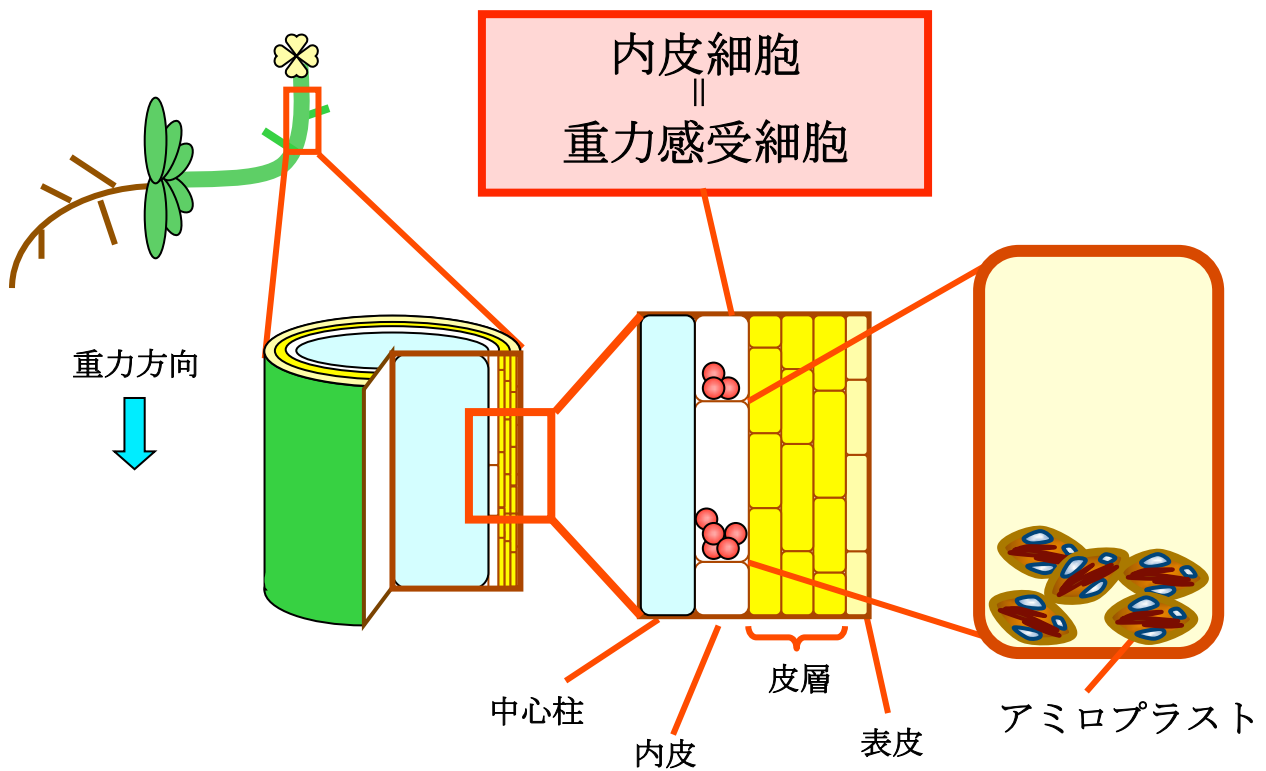
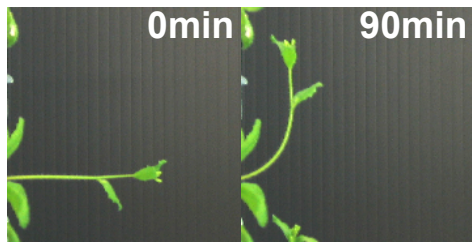


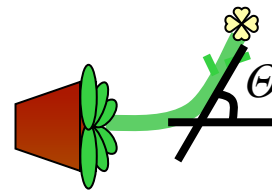
図1 シロイヌナズナの花茎の構造

シロイヌナズナの花茎は外側から、表皮、皮層、内皮、中心柱という同心円上の構造をとる。これまでの研究から、内皮細胞が花茎の重力感受細胞であると考えられている。

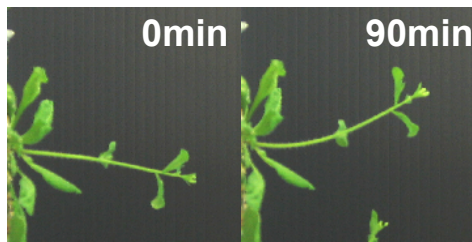
(A) Col



(C)



(B) *sgr9*



(D)

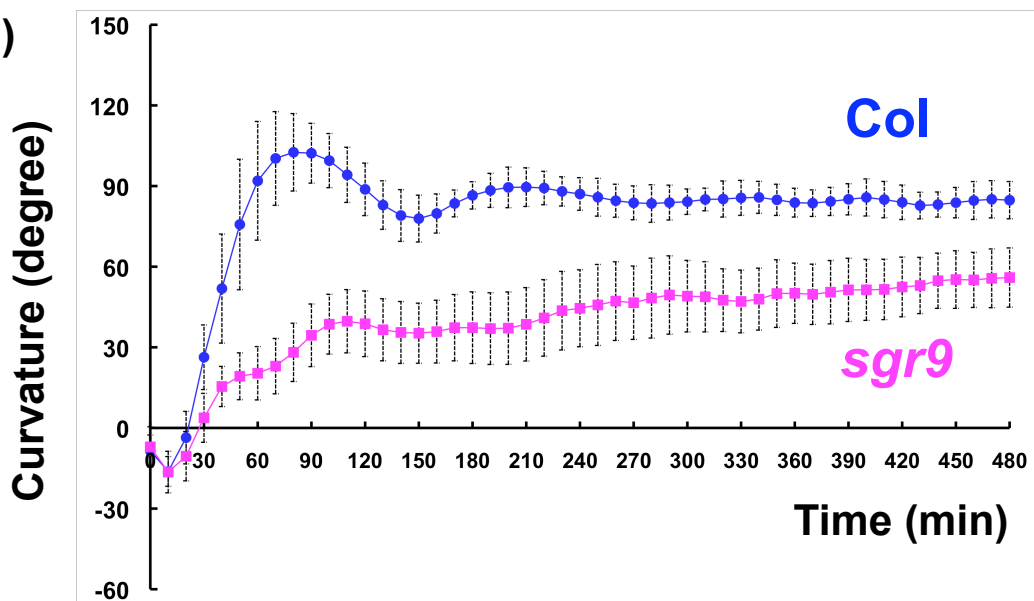


図2 野生型(Col), *sgr9*の花茎重力屈性反応

(A) 野生型(Col), (B) *sgr9*変異体, (C) 花茎屈曲角度の定義, (D) 重力屈性反応カイネティクス。花茎が5~7cmに伸長した植物体を23°C, 方向性のない弱光下において水平方向に倒した。新たな重力刺激を与え始めた時を0分として, 10分後ごとにデジタルカメラで8時間撮影した。屈曲角度を縦軸, 時間を横軸にして, カイネティクスをグラフで表した。野生型においては90分で約90度までの屈曲を示し, その後も90度の屈曲を維持するのに対し, *sgr9*では8時間経過しても約50度の屈曲にとどまる。エラーバーは標準偏差を示している。(Col; n=15, *sgr9*; n=15)

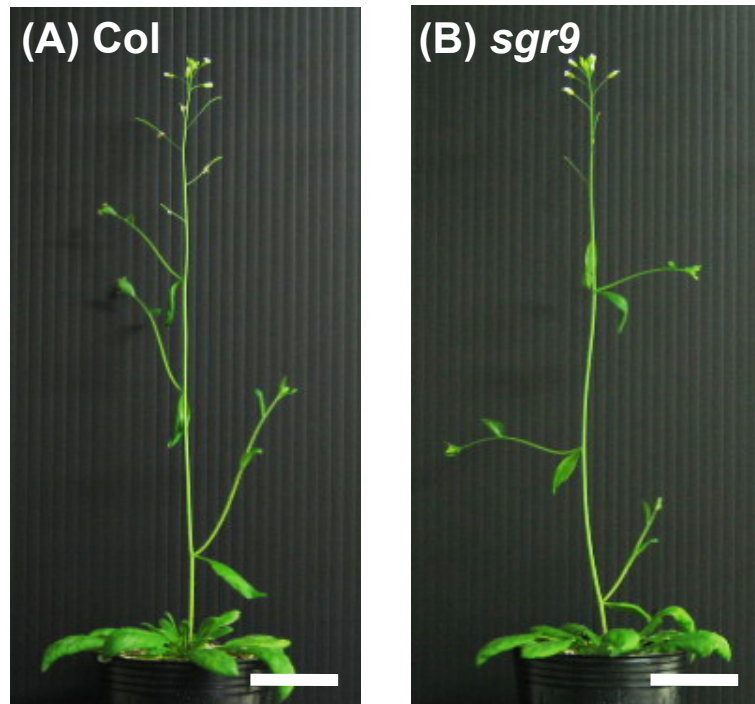


図3 野生型(Col), *sgr9*変異体の表現型

(A) 野生型(Col), (B) *sgr9*変異体。抽台後約5日目の地上部の表現型を観察した。野生型の側枝が上向きに伸長するのに対し, *sgr9*では横方向に伸長する。スケールバーは3cm。

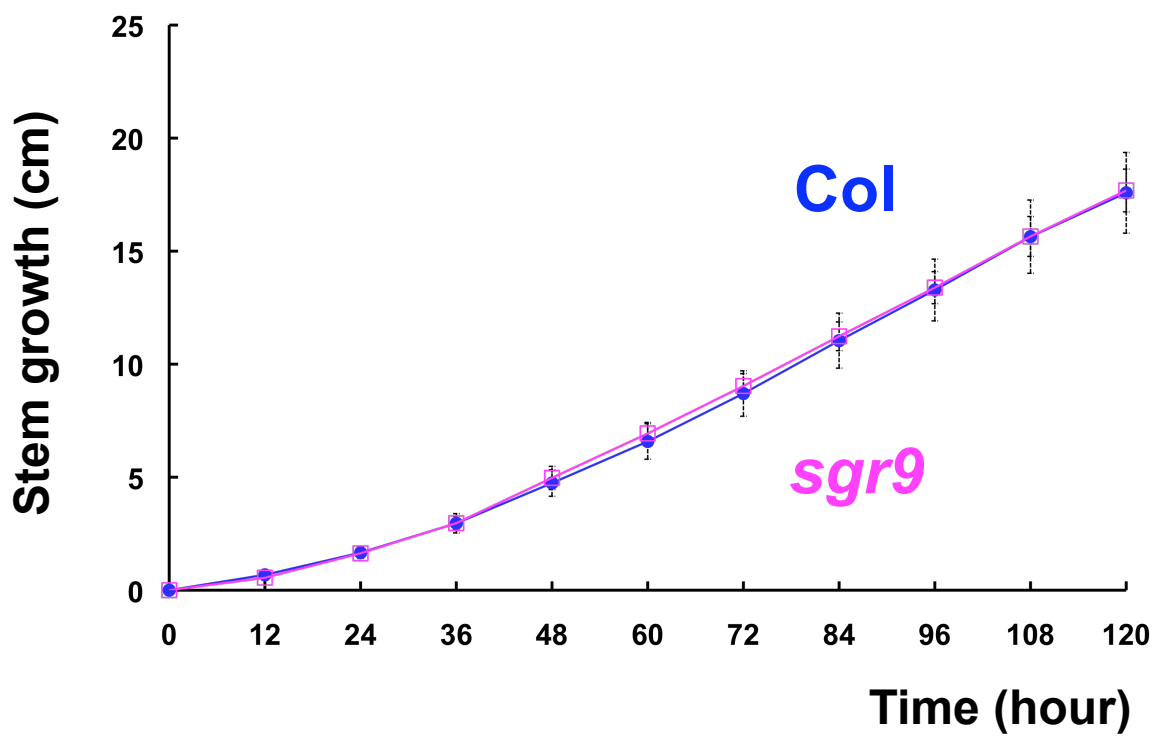


図4 野生型(Col), *sgr9*の花茎の伸長

花茎の長さが1cm~1.5cmの植物体を用い、12時間毎に計120時間(5日間)、花茎の伸長した長さを測定した。野生型と*sgr9*は同様の花茎の成長を示す。エラーバーは標準偏差を示している。(Col; n=5, *sgr9*; n=6)

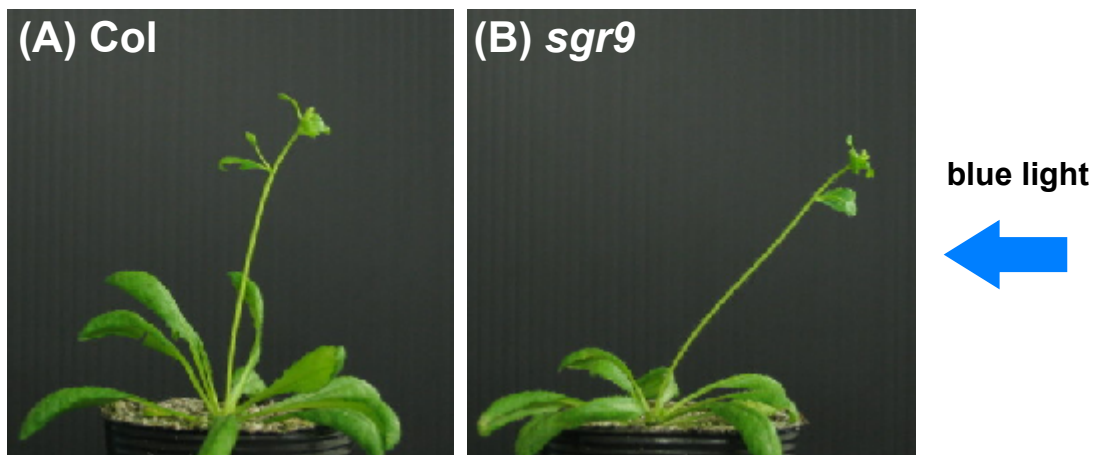


図5 野生型(Col), *sgr9*変異体の光指向性成長

(A) 野生型(Col), (B) *sgr9*変異体。ロゼット葉から花茎が抽苔し始めた植物体を23°Cの恒温室内で、横方向から青色光を照射しながら生育させた。10日間連続照射し、伸長してくる花茎の成長方向を観察した。野生型は花茎の先端側のみ青色光に対して光屈性を示し、基部側はほぼまっすぐに伸長する。*sgr9*においては基部側から青色光方向に光屈性を示す。

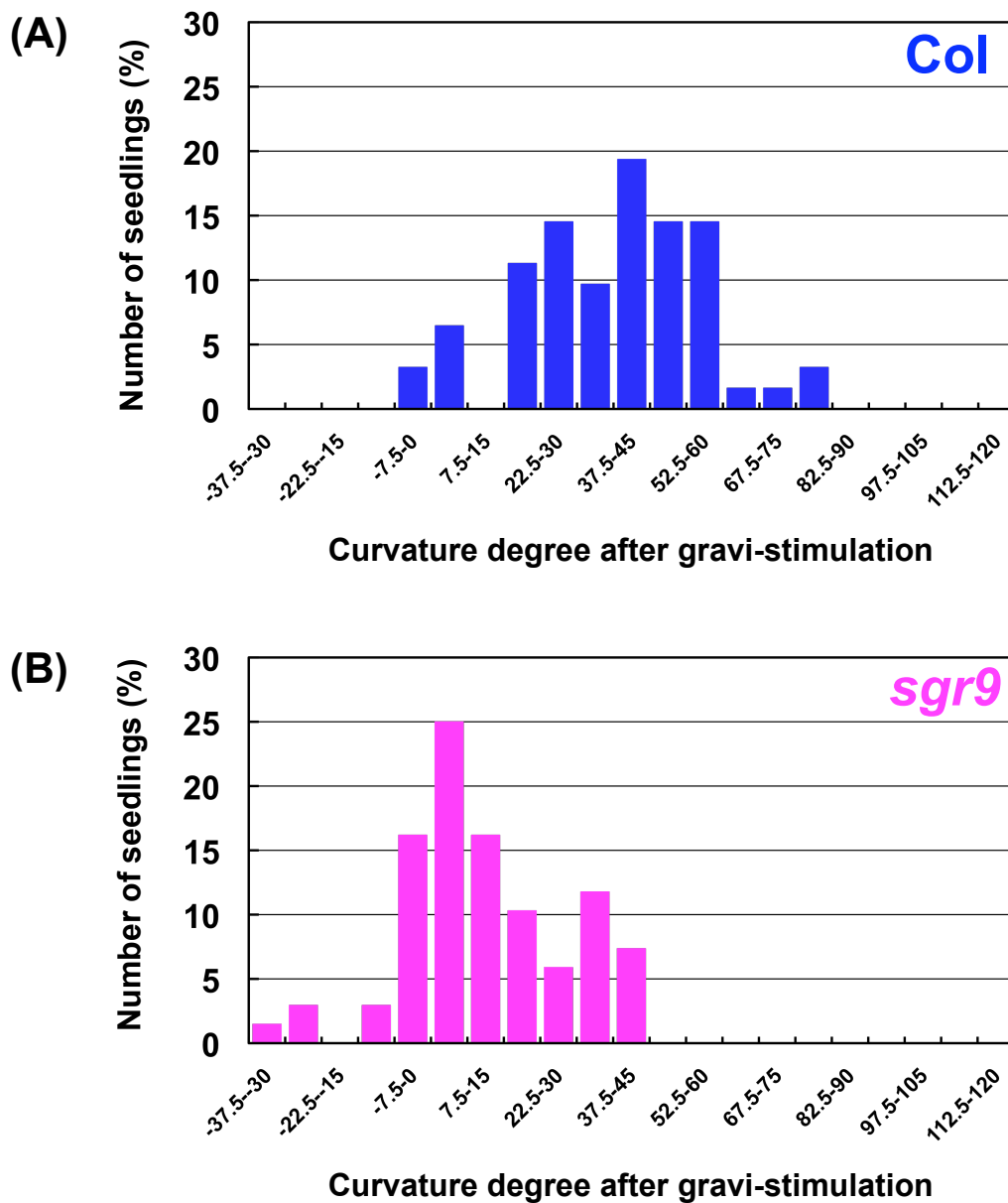


図6 野生型(Col), *sgr9*変異体の胚軸の重力屈性反応

(A) 野生型(Col), (B) *sgr9*変異体。23°Cの暗所で72時間培養した黄化芽生えの胚軸に、90度の重力刺激を与えて暗黒条件下でさらに12時間培養し、胚軸の屈曲を記録した。刺激後の屈曲角度は重力刺激前の屈曲角度と刺激後の屈曲角度の差を測定し、7.5度ごとの区画においてヒストグラムを作製した。*sgr9*では屈曲に異常が見られる個体が存在する。(Col; n=62, *sgr9*; n=68)

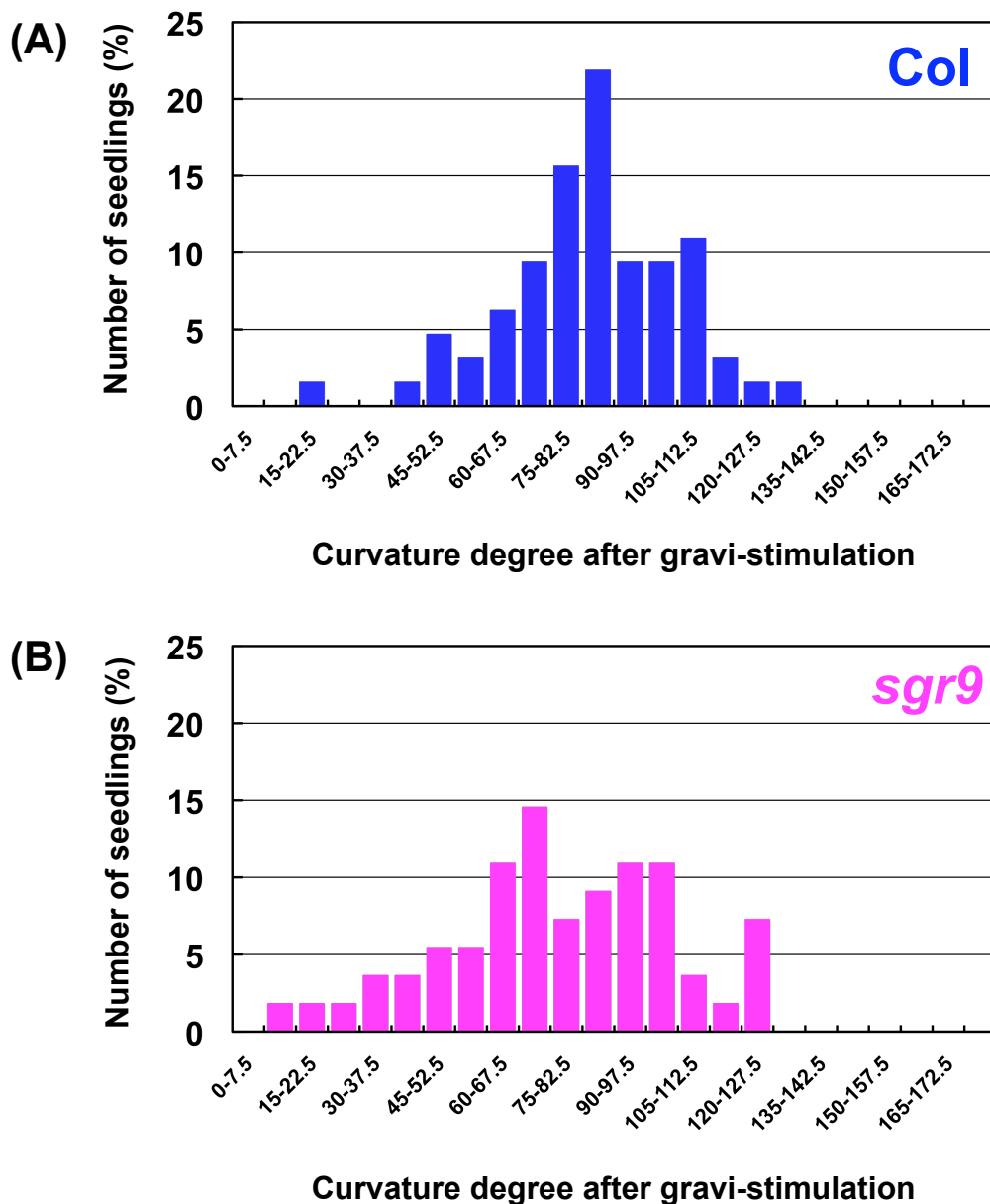


図7 野生型(Col), *sgr9*変異体の根の重力屈性反応

(A) 野生型(Col), (B) *sgr9*変異体。23°Cの暗所で72時間培養した黄化芽生えの根に、90度の重力刺激を与えて暗黒条件下でさらに18時間培養し、根の屈曲を記録した。刺激後の屈曲角度は重力刺激前の屈曲角度と刺激後の屈曲角度の差を測定し、7.5度ごとの区画においてヒストグラムを作製した。*sgr9*では屈曲に異常が見られる個体が野生型よりも多く存在する。(Col; n=64, *sgr9*; n=55)



図8 *SGR9*遺伝子のマップポジションと*SGR9*の構造

*SGR9*遺伝子のマップポジション。マップベースクロニング法により、5番染色体の北側に位置する遺伝子At5g02750にナンセンス変異が確認されていた。*SGR9*はC末端側にRING fingerドメインを持つ283アミノ酸残基からなるタンパク質である。

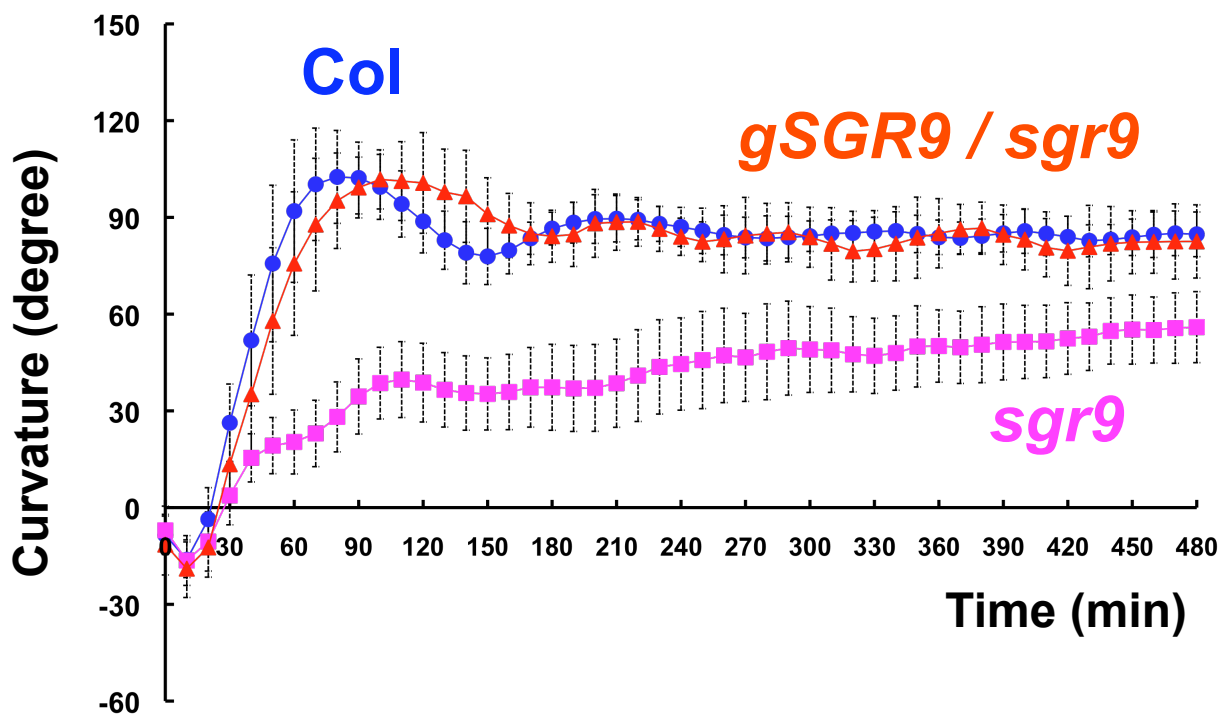


図9 *sgr9*変異体の相補性試験

SGR9遺伝子のORFの上流約1.5kbp, 下流約0.2kbpを含むゲノム断片を*sgr9*に導入した形質転換体(*gSGR9 / sgr9*)を作製し, 相補性試験を行なった。*gSGR9 / sgr9* は野生型とほぼ同様の重力屈性反応を示し, *sgr9*の重力屈性異常が回復した。エラーバーは標準偏差を示している。(Col; n=15, *sgr9*; n=15, *gSGR9 / sgr9*; n=13)

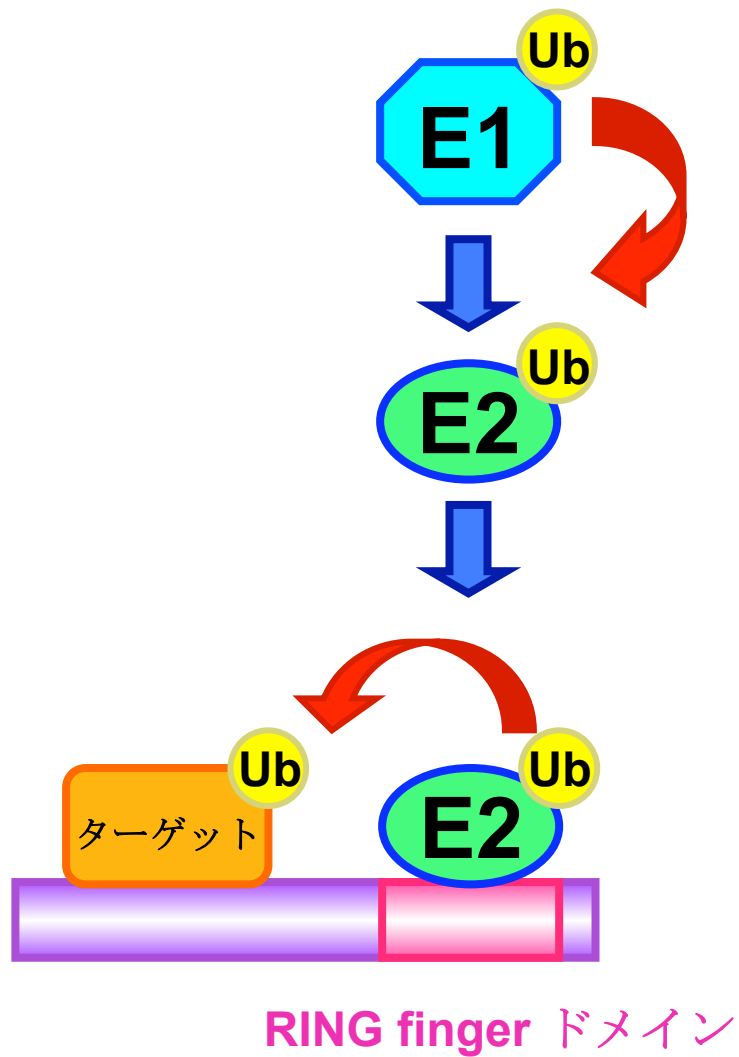


図11 RING fingerタンパク質のユビキチン化

RING finger 型のユビキチンE3リガーゼは、ターゲットとなる基質と結合し、E1, E2酵素依存的に基質のユビキチン化を行なう。また、RING fingerドメインはE2酵素との結合ドメインとして機能する。

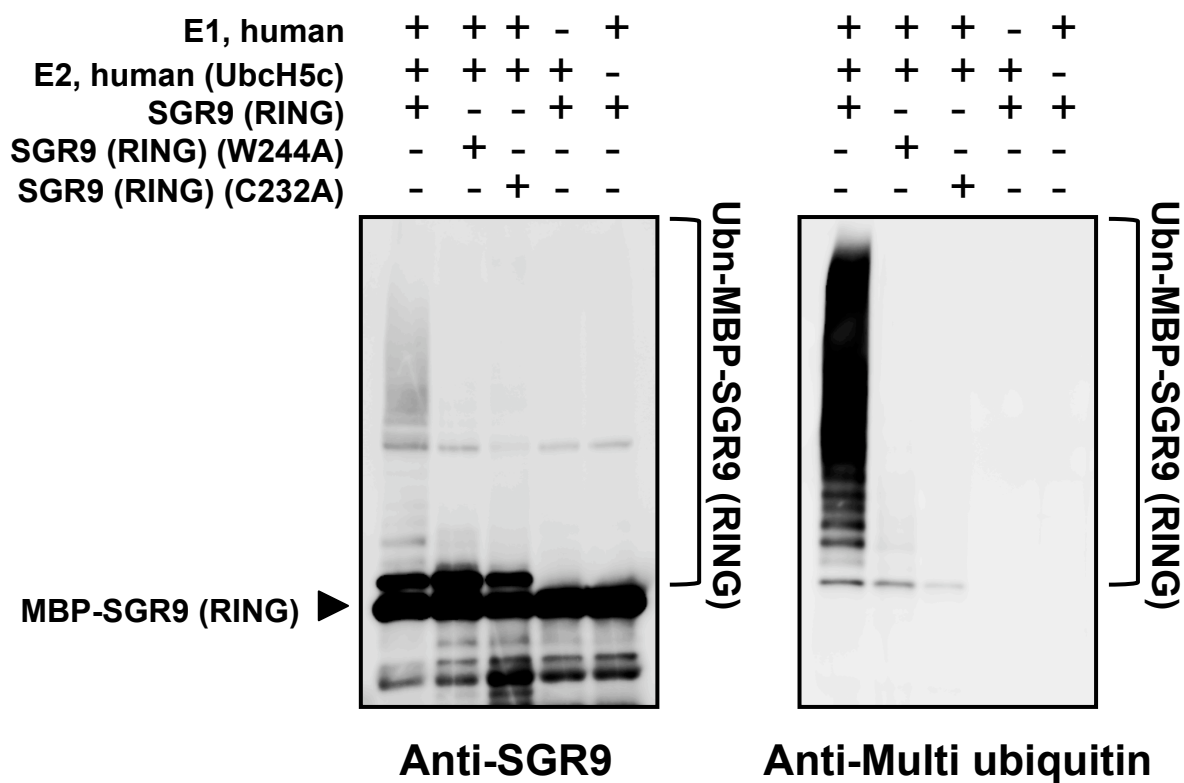


図12 SGR9のE3リガーゼ活性

in vitro ユビキチン化解析には、SGR9のRING fingerドメインにMBP (Maltose binding protein) Tagを融合したリコンビナントタンパク質(MBP-SGR9(RING))を用いた。左側の図はSGR9抗体でユビキチン化したMBP-SGR9 (RING), 変異型MBP-SGR9 (RING)を検出している。右側の図はユビキチン抗体でユビキチン化したMBP-SGR9 (RING), 変異型MBP-SGR9 (RING)を検出している。MBP-SGR9 (RING)はE1, E2の存在下でE3リガーゼ活性を示す。

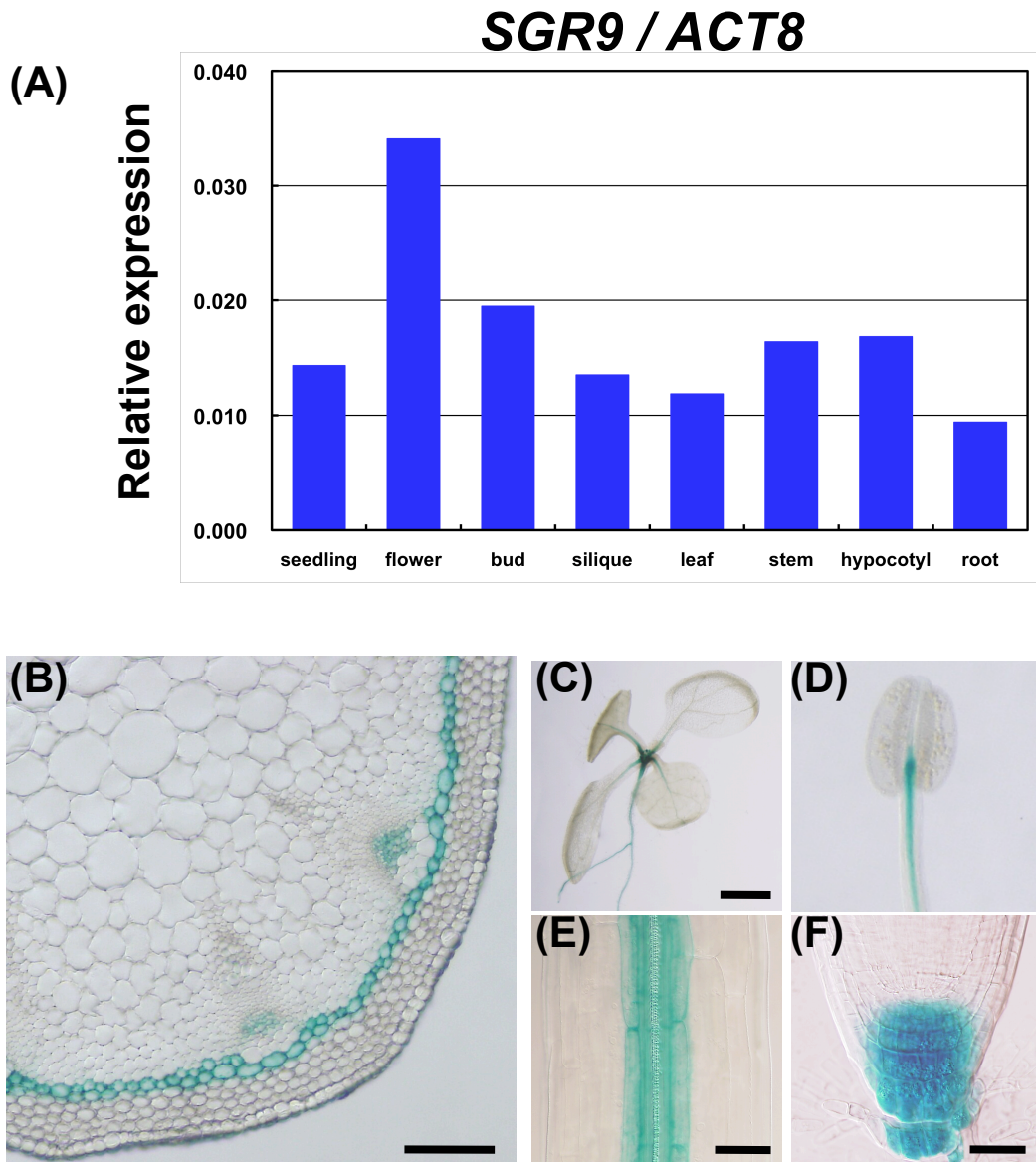


図13 *SGR9*の発現解析

(A) 芽生え (7日目) , 花, 蕾, 鞘, 花, 花茎, 胚軸, 根における*SGR9*の発現をreal-time RT-PCRにより確認した。*SGR9*はほぼすべての器官で発現している。(B-F) (B) 花茎縦断面, スケールバーは100 μ m。(C) 芽生え (7日目) スケールバーは1mm。(D) 雄蕊, (E) 胚軸, スケールバーは50 μ m。(F) 根端。スケールバーは25 μ m。芽生えにおいては胚軸において強いGUS活性を示す。根においては根端のコルメラ細胞層を含む領域でGUS活性が示す。花茎においては内皮細胞層で特に強いGUS活性を示す。

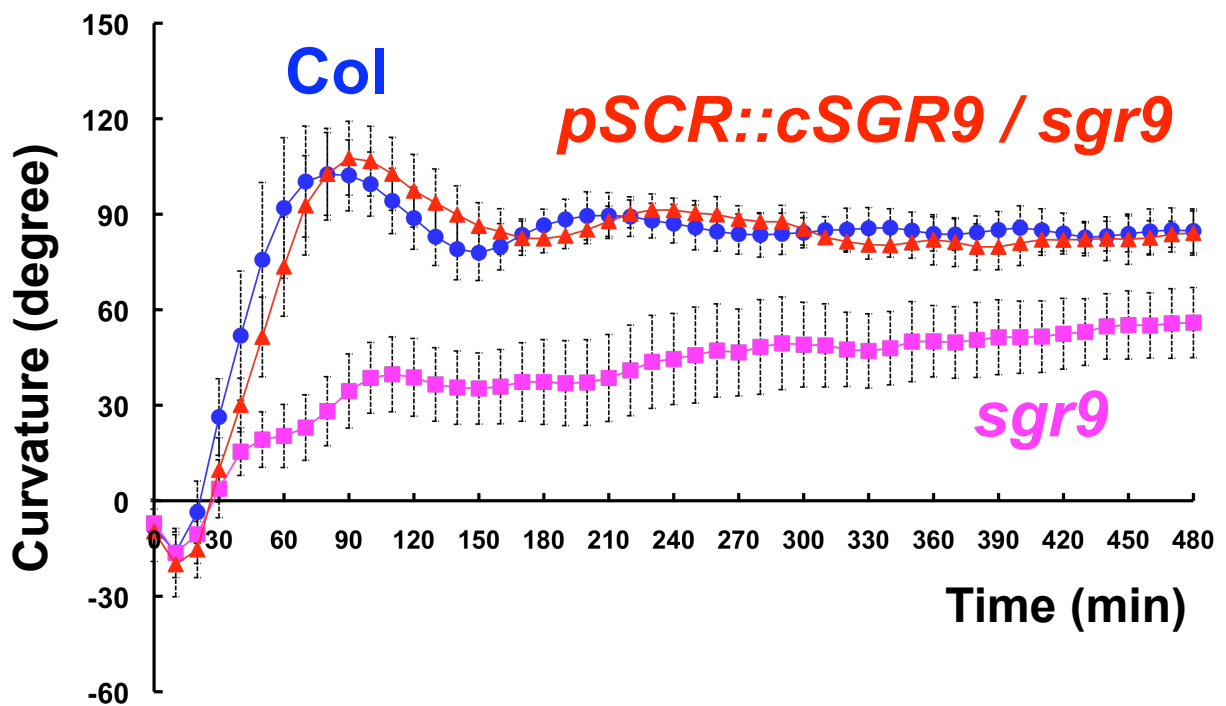


図14 *pSCR::cSGR9*の重力屈性反応

*sgr9*内で内皮細胞特異的*SCR*プロモーターを用いて*SGR9*を発現させた形質転換体(*pSCR::cSGR9 / sgr9*)では重力屈性能が回復する。花茎重力屈性反応においては*SGR9*は内皮細胞で発現し機能することが重要であることが示唆される。エラーバーは標準偏差を示している。(Col; n=15, *sgr9*; n=15, *pSCR::cSGR9 / sgr9*; n=8)

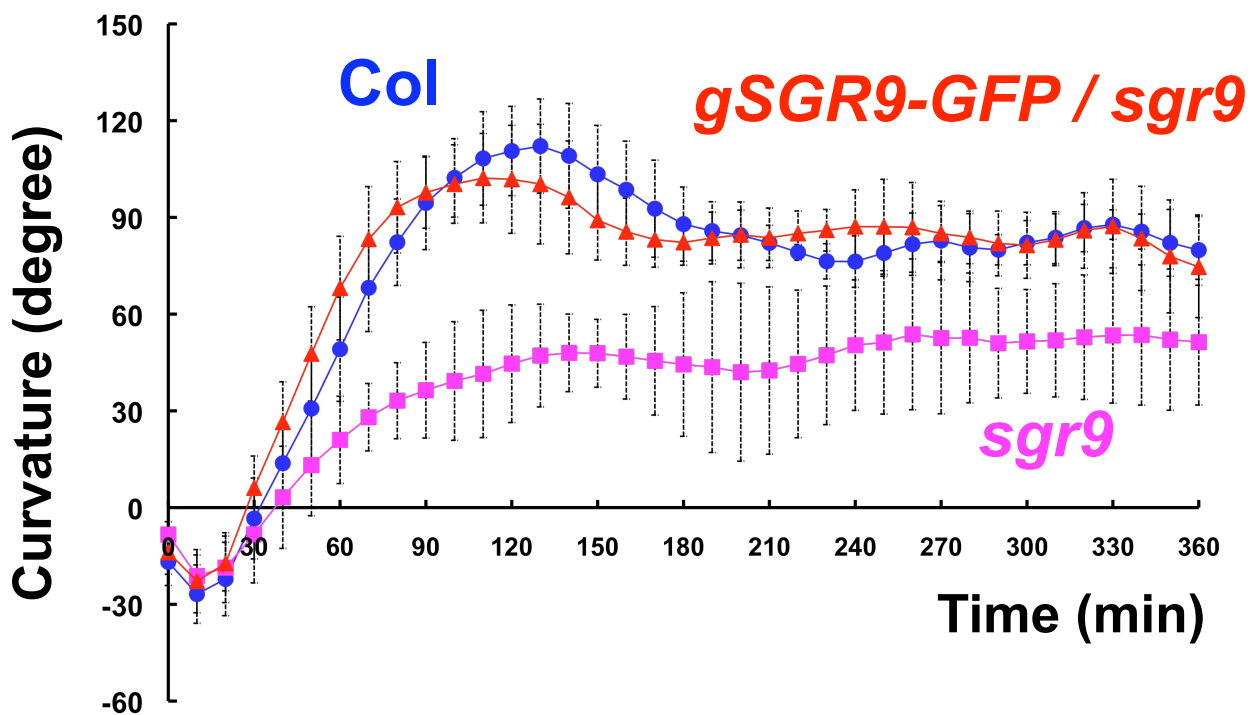


図15 *gSGR9-GFP / sgr9* の重力屈性反応

SGR9の終止コドン直前にGFPを挿入したSGR9-GFPを*sgr9*内で自身のプロモーターで発現させた形質転換体(*gSGR9-GFP / sgr9*)の重力屈性反応を解析した。*gSGR9-GFP / sgr9*は野生型とほぼ同様の重力屈性反応を示す。エラーバーは標準偏差を示している。(Col; n=6, *sgr9*; n=6, *gSGR9-GFP / sgr9*; n=12)

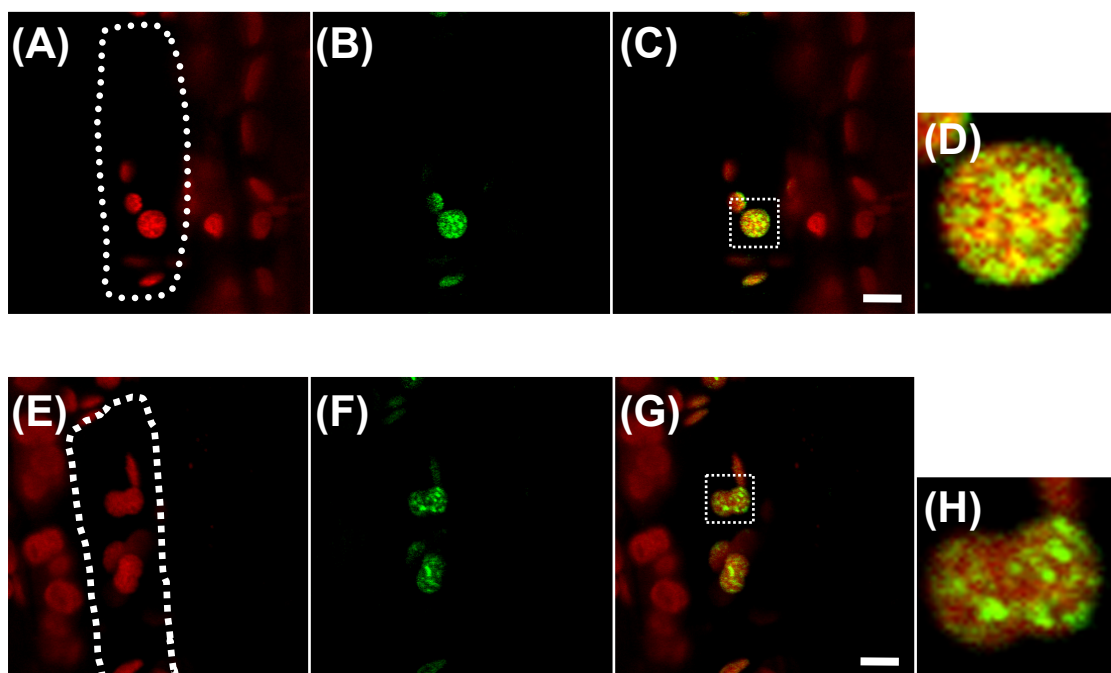


図16 変異型SGR9-GFPの細胞内局在解析

(A-D) SGR9(W244A)-GFPの細胞内局在, (E-H) SGR9(C232A)-GFPの細胞内局在。(A,E) 内皮細胞内のアミロプラストの自家蛍光, (B, F) SGR9-GFP(W244A)あるいはSGR9(C232A)-GFPのGFP蛍光像, (C, G) 自家蛍光像とGFP蛍光像を重ね合わせた像, (D) (C)あるいは(G)内のinsetの拡大像, 変異型のSGR9(W244A)-GFP, SGR9(C232A)-GFPは内皮細胞内でアミロプラストに局在している。(A), (E)内の点線は一つの内皮細胞を示している。(C), (G)内の点線は(D), (H)を示している。スケールバーは5 μ m。

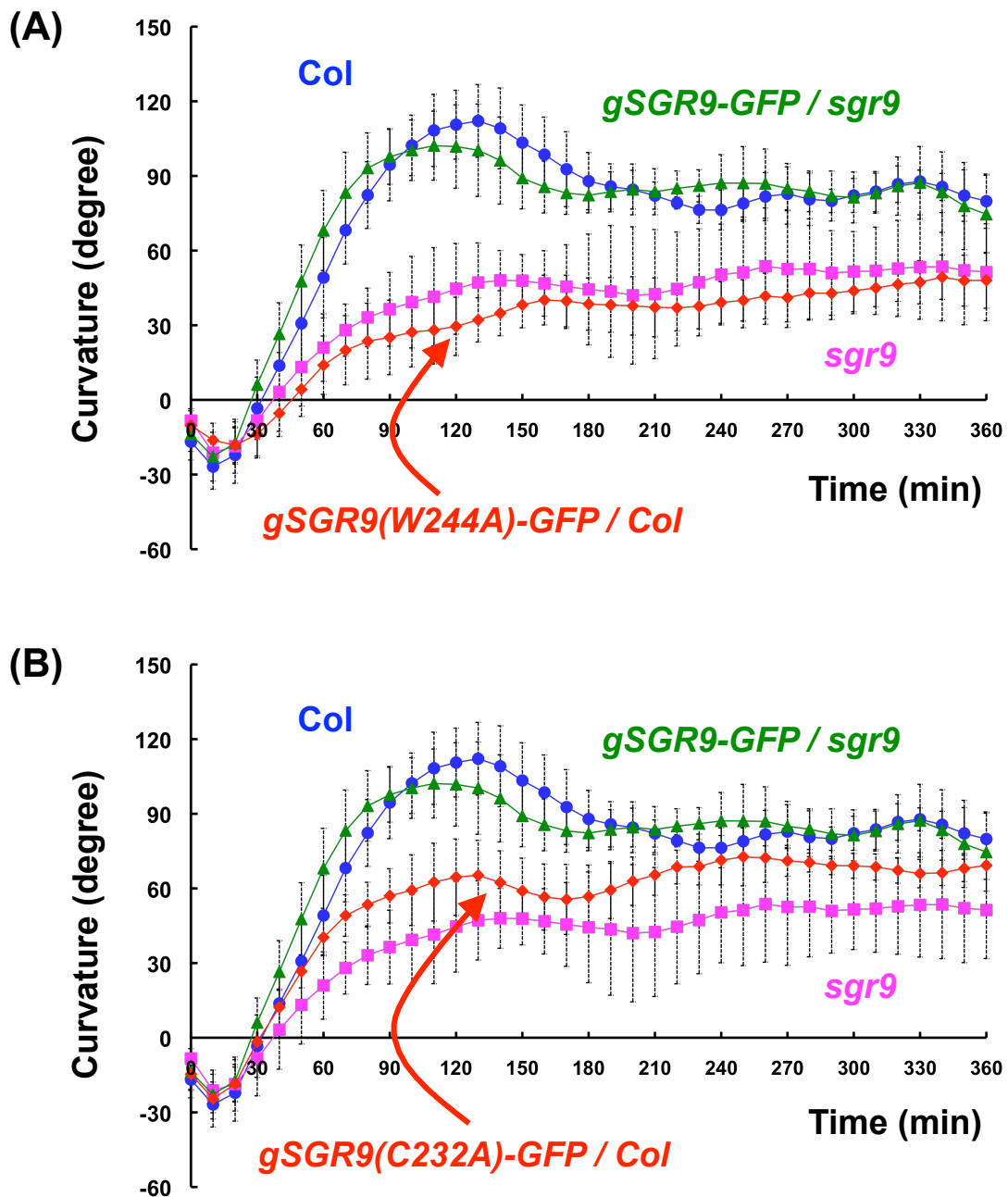
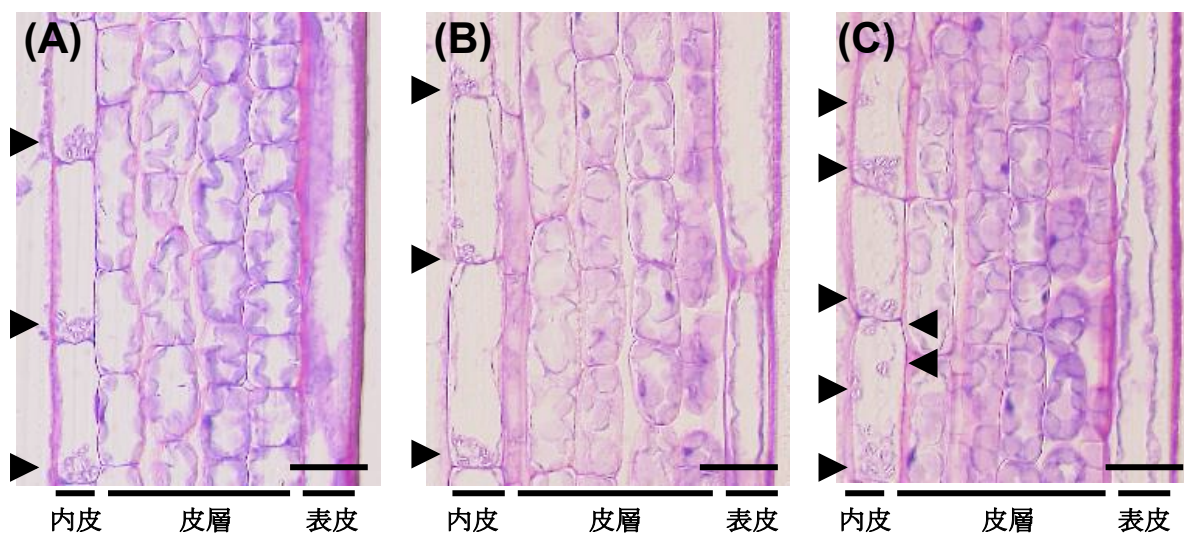


図17 SGR9(W244A)-GFP, SGR9(C232A)-GFPの優性阻害効果

(A) *gSGR9(W244A)-GFP / Col* の重力屈性反応, (B) *gSGR9(C232A)-GFP / Col* の重力屈性反応。(A) 野生型にSGR9-GFP(W244A)を形質導入した形質転換体 (*gSGR9(W244A)-GFP / Col*)は*sgr9*変異体とほぼ同様の表現型を示す。(B) 野生型にSGR9-GFP(C232A)を形質導入した形質転換体(*gSGR9(C232A)-GFP / Col*)は*sgr9*変異体とほぼ同様の表現型を示す。エラーバーは標準偏差を示している。(Col; n=6, *sgr9*; n=6, *gSGR9-GFP / sgr9*; n=12, *gSGR9-GFP(W244A) / Col*; n=8, *gSGR9-GFP(C232A) / Col*; n=10)



(D)

	内皮細胞数	アミロプラストの位置		
		上 (%)	中 (%)	下 (%)
Col	30	0.6%	2.5%	96.9%
<i>sgr9</i>	30	20.6%	24.9%	54.5%

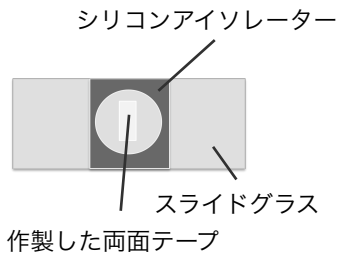
図18 野生型(Col), *sgr9*変異体のアミロプラストの沈降の様子

(A) 野生型(Col), (B) *sgr9*変異体の沈降したアミロプラストだけを含む内皮細胞, (C) *sgr9*変異体の沈降していないアミロプラストを1~数個含む内皮細胞, (D)半定量的なアミロプラストの分布。(A-C) 花茎が5~7cmに伸長した植物体の茎頂から2cm~3cmの花茎をサンプルとして用い, テクノビット切片を作製して観察した。(D) 上, 中, 下のほぼ等間隔で区切ってアミロプラストを計数した。*sgr9*には野生型と同様に沈降したアミロプラストだけを含む内皮細胞の他に, 沈降していないアミロプラストを1~数個含む内皮細胞が相当数存在している。スケールバーは20 μ m

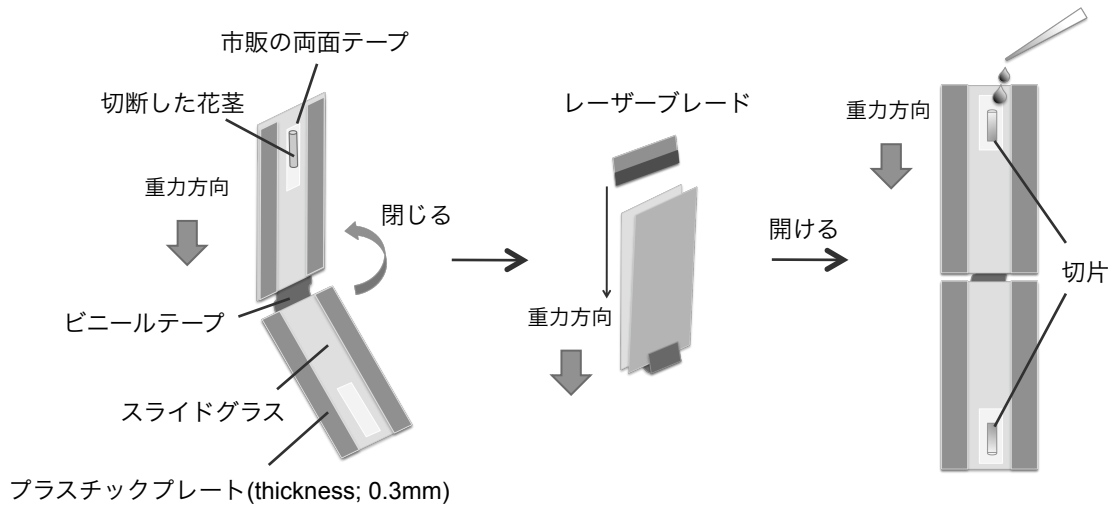


図19 vertical microscope system

一般的な顕微鏡とは異なり，vertical microscope systemでは顕微鏡を横に倒した状態になっている。この様な顕微鏡に共焦点スキャナCSU10，超高感度EMCCDカメラ，フィルターホールを接続した。このシステムにより，リアルタイムで高精細なアミロプラストとGFP蛍光の同時観察が可能となる。



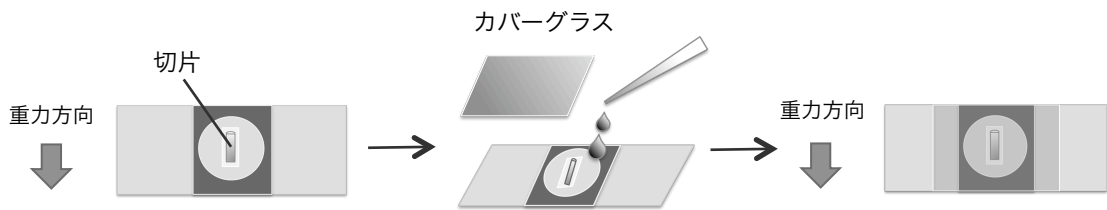
(1) カットした両面テープをスライドガラスに張り付け、シリコンアイソレーターを置く



(2) 切断した花茎を両面テープに貼付ける

(3) レーザーブレードで縦方向にカットする

(4) カットした切片にすぐにバッファーを加える



(5) 切片を両面テープに貼付ける

(6) スライドガラスを傾け、10秒以内にバッファーを満たし、カバーガラスで封入する

(7) スライドガラスを再び起こし、15分間静置した後、観察する

図20 ライブイメージングのためのサンプルの準備

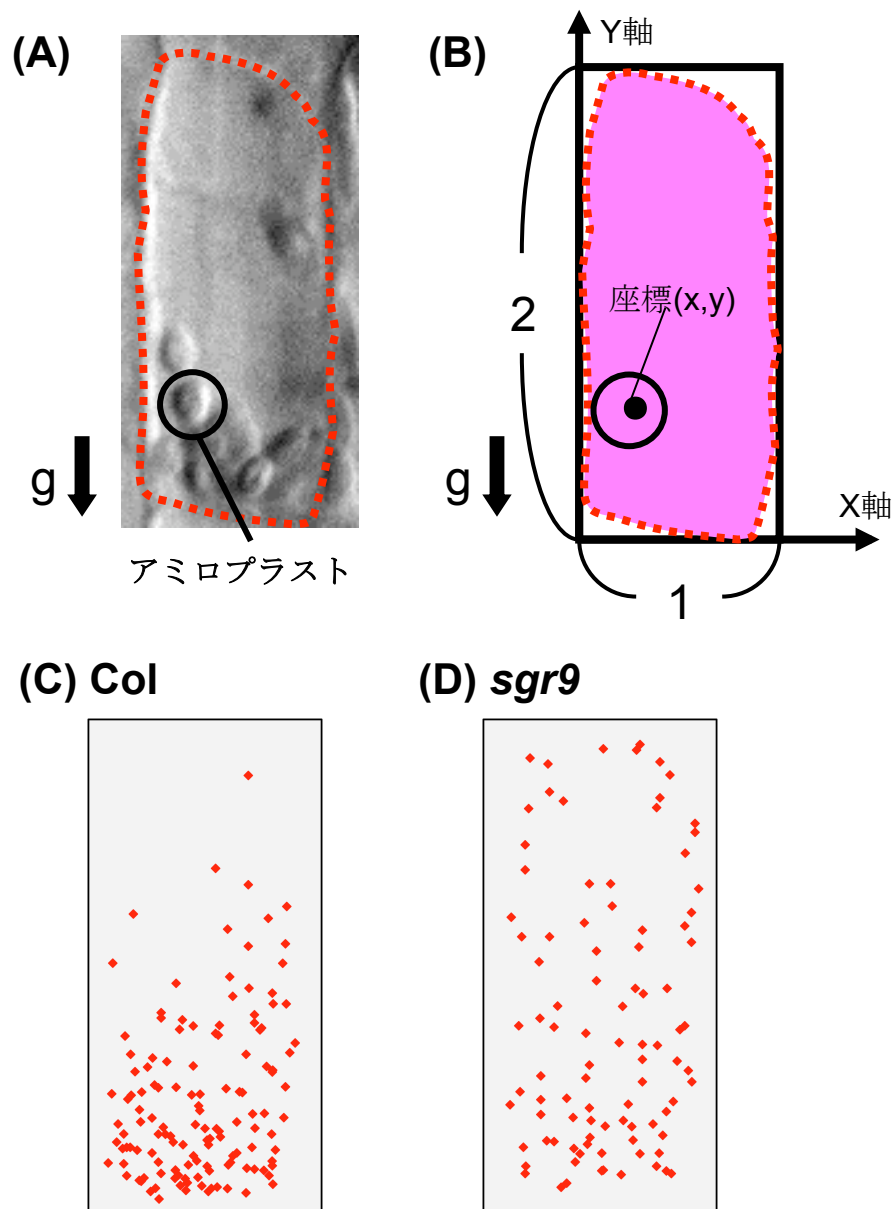
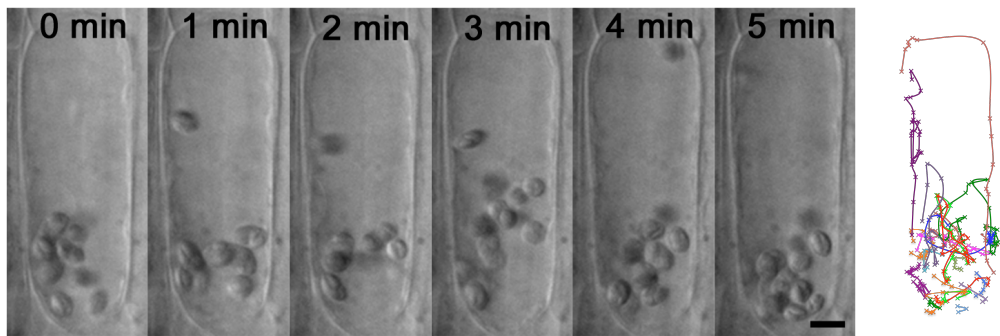


図21 アミロプラストの相対的分布の定量

(A, B) 相対的分布の定量方法。生きた内皮細胞内を最小の長方形で囲み、縦2、横1の長方形に単純化したときのアミロプラストの相対的な分布として表した。(C) 野生型(Col), (D) *sgr9*変異体。野生型においてはアミロプラストは細胞の下部、つまり重力方向側に沈降しているのに対して、*sgr9*変異体においてはアミロプラストは細胞全体に分散したような分布をとる。(Col; n=5, *sgr9*; n=5)

(A) Col



(B) *sgr9*

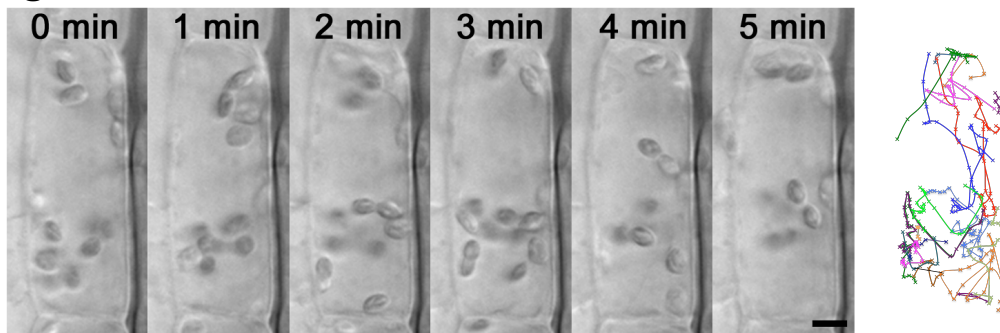


図22 重力刺激前におけるアミロプラスト動態

(A) 野生型(Col), (B) *sgr9*変異体。1分間毎, 計5分間のタイムラプスイメージを表している。右端の図は(A)および, (B)で表したタイムラプスイメージのアミロプラストの軌跡を表しており, 1つのアミロプラストは1つの色に対応する。野生型では, アミロプラストは跳躍的な動きをしながらも細胞の下部に沈降している。*sgr9*変異体では, アミロプラストは細胞全体に分散しながら, 個別に動き回っている様子が観察され, アミロプラストは重力方向には沈降していない。スケールバーは5 μ m。

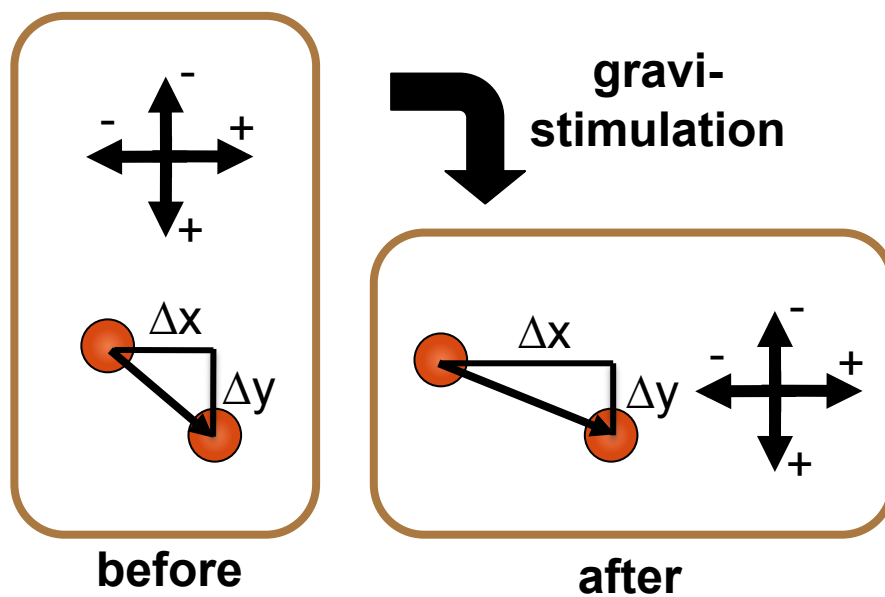


図23 アミロプラスト動態の定量方法

10秒毎に経時観察したアミロプラスト動態を定量解析に用いた。10秒毎のアミロプラストのアミロプラスト動態を Δx と Δy の2つの要素に分けた。 Δx は水平方向の移動を、 Δy は垂直方向の移動を表している。 Δy の正の値は重力方向への値を示している。

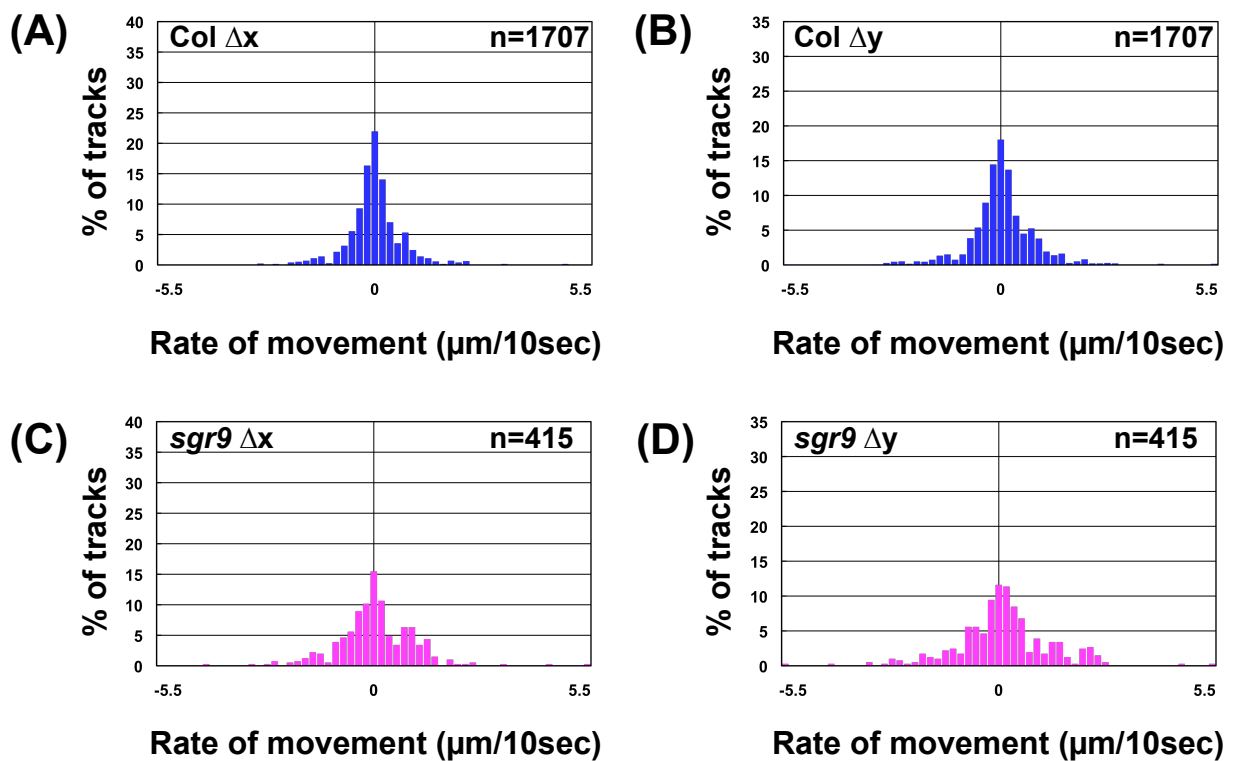
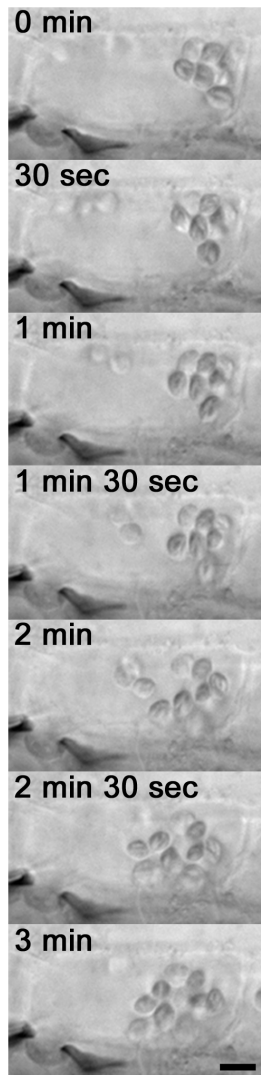
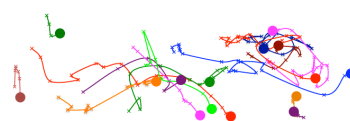
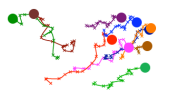
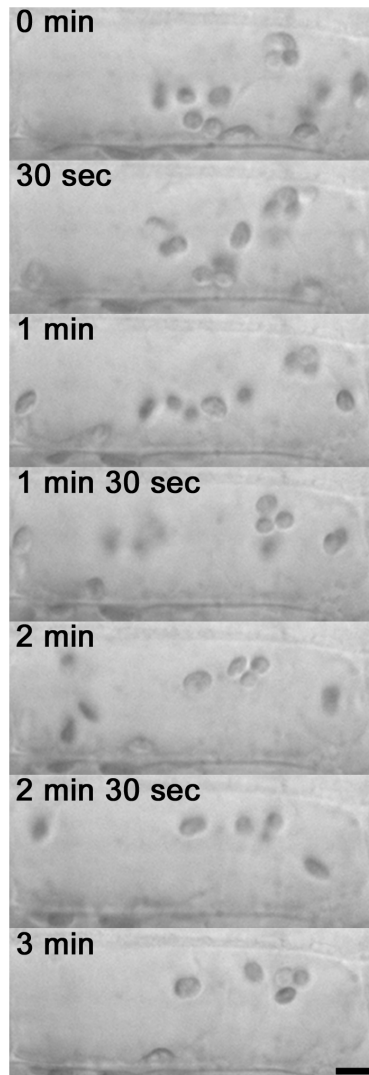


図24 重力刺激前のアミロプラスト動態の定量解析

(A) 野生型(Col)の Δx , (B) 野生型の Δy , (C) *sgr9*変異体の Δx , (D) *sgr9*変異体の Δy 。10秒あたりのアミロプラストの移動距離をRate of movement ($\mu\text{m}/10\text{sec}$)とし、ヒストグラムとして表した。*sgr9*においては、10秒あたりの移動距離が長いアミロプラストの割合が野生型よりも高い。nはtrackの総数を示している。野生型, *sgr9*共に3細胞以上観察した。

(A) Col**(B) *sgr9*****図25 重力刺激後におけるアミロプラスト動態**

(A) 野生型(Col), (B) *sgr9*変異体。30秒毎, 計3分間のタイムラプスイメージを表している。最下の図は(A)および,(B)で表したタイムラプスイメージのアミロプラストの計3分間, 10秒毎の軌跡を表している。1つのアミロプラストは1つの色に対応し, ○はスタートポイントを示している。野生型では, アミロプラストは新たな重力方向に沈降している。*sgr9*変異体では, アミロプラストは細胞全体に分散しながら動き回っているおり, アミロプラストは新たな重力方向には沈降していない。スケールバーは5 μ m。

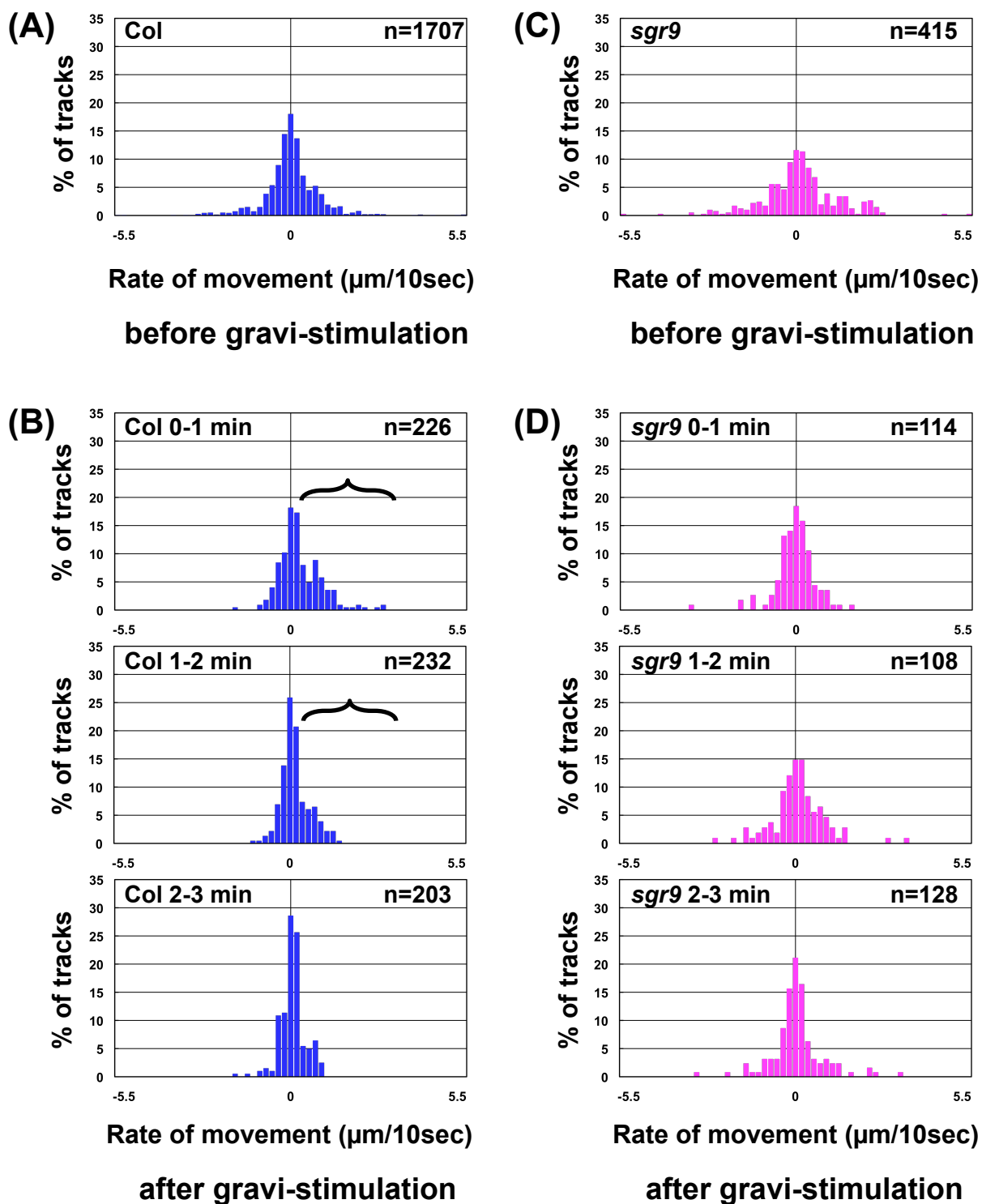


図26 重力刺激後のアミロプラスト動態の定量解析

(A) 野生型(Col)の重力刺激前の Δy , (B) 野生型(Col)の重力刺激後の Δy , (C) *sgr9*変異体の重力刺激前の Δy , (D) *sgr9*変異体の重力刺激後の Δy 。10秒あたりのアミロプラストの移動距離をRate of movement ($\mu\text{m}/10\text{sec}$)とし、ヒストグラムとして表した。*sgr9*においては、重力刺激後の重力方向への移動がおこらない。鍵括弧は重力方向への移動の統計的な有意差を示している(*P*-value; Welch's *t* test, one tailed, $p < 0.05$)。nはtrackの総数を示している。野生型, *sgr9*共に3細胞以上観察した。

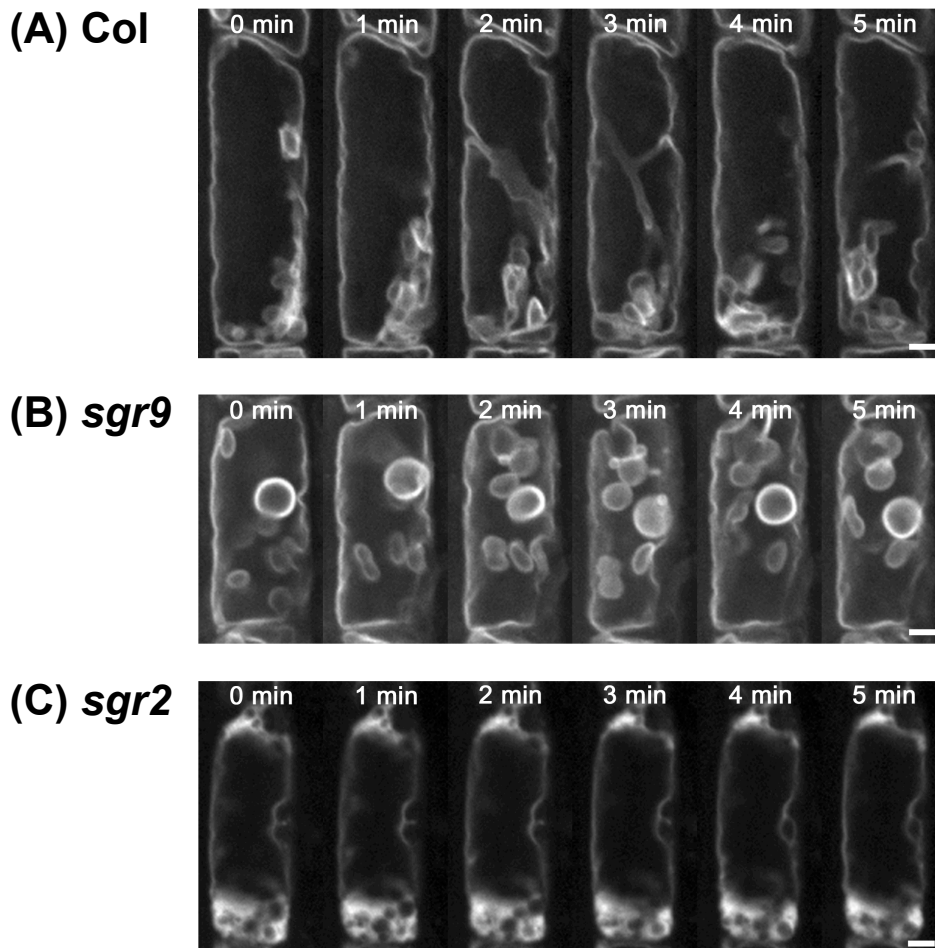


図27 野生型(Col), *sgr9*変異体, *sgr2*変異体の液胞膜動態

(A) 野生型(Col), (B) *sgr9*変異体, (C) *sgr2*変異体。GFP-AtVam3を内皮特異的プロモーターであるSCRプロモーターにより発現させた形質転換体を用いて液胞膜を可視化し, 野生型, *sgr9*, *sgr2*において観察した。1分間毎, 計5分間のタイムラプスイメージを表している。*sgr9*においてはアミロプララストは液胞膜に包まれており, 野生型と目立った違いはなく, *sgr2*のような液胞膜構造の異常は見られない。スケールバーは5 μ m。

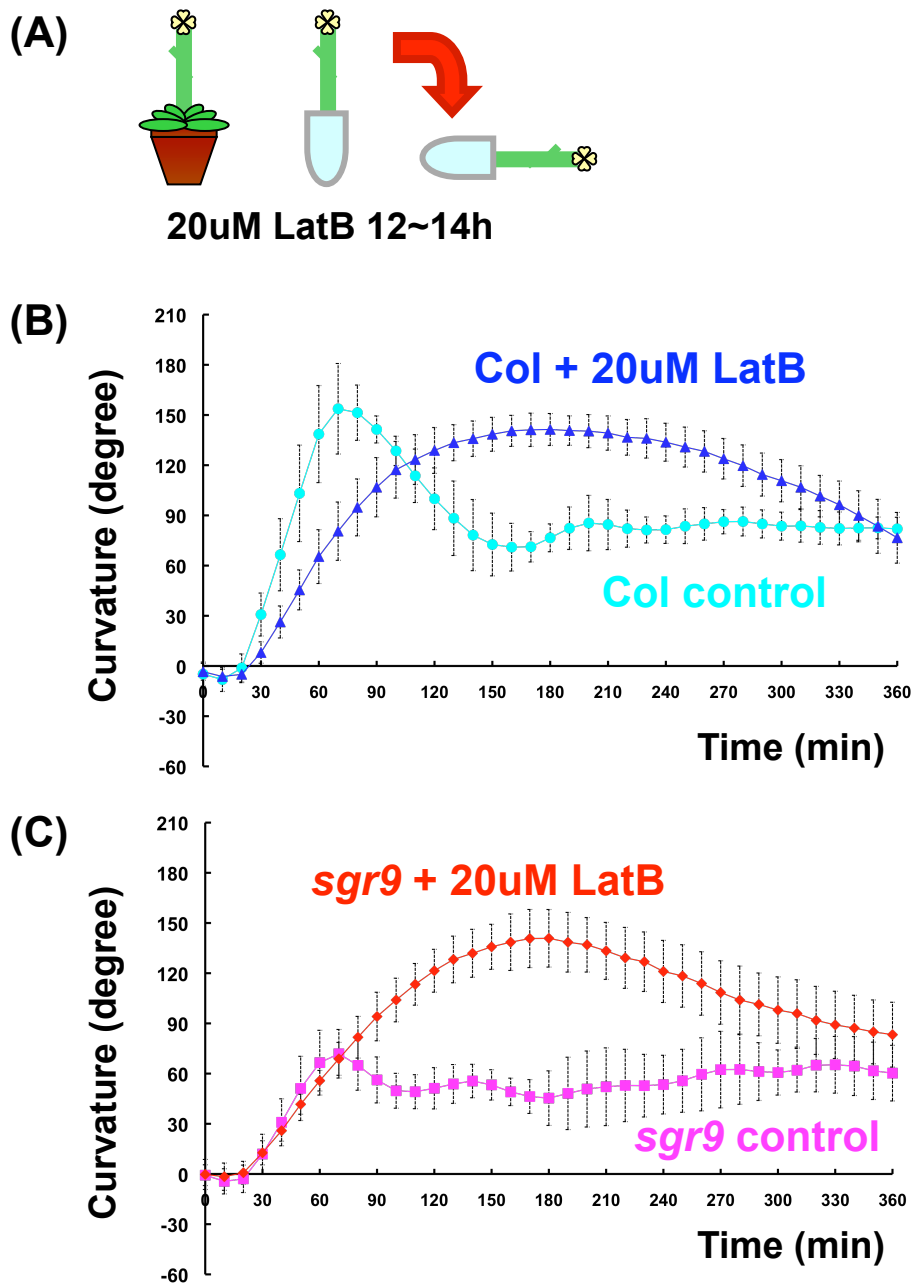


図28 アクチン重合阻害剤 LatB の重力屈性反応への影響

(A) LatB処理方法。切断した花茎に20 μ M LatBを12~14時間処理し、その後重力刺激を与えた。(B) 野生型(Col)にLatB処理したときの重力屈性反応。LatB処理時の花茎は未処理時と比較すると、屈曲反応はやや遅いもののほぼ正常な屈曲反応を示す。(C) *sgr9* 変異体にLatB処理したときの重力屈性反応。LatB処理時の*sgr9*の花茎は重力屈性反応を回復する。興味深いことに、LatB処理時の*sgr9*のカイネティクスは野生型のLatB処理時のカイネティクスとほぼ同様の反応を示す。エラーバーは標準偏差を示している。(Col + LatB; n=10, Col control; n=10 *sgr9* + LatB; n=10, *sgr9* control; n=11)

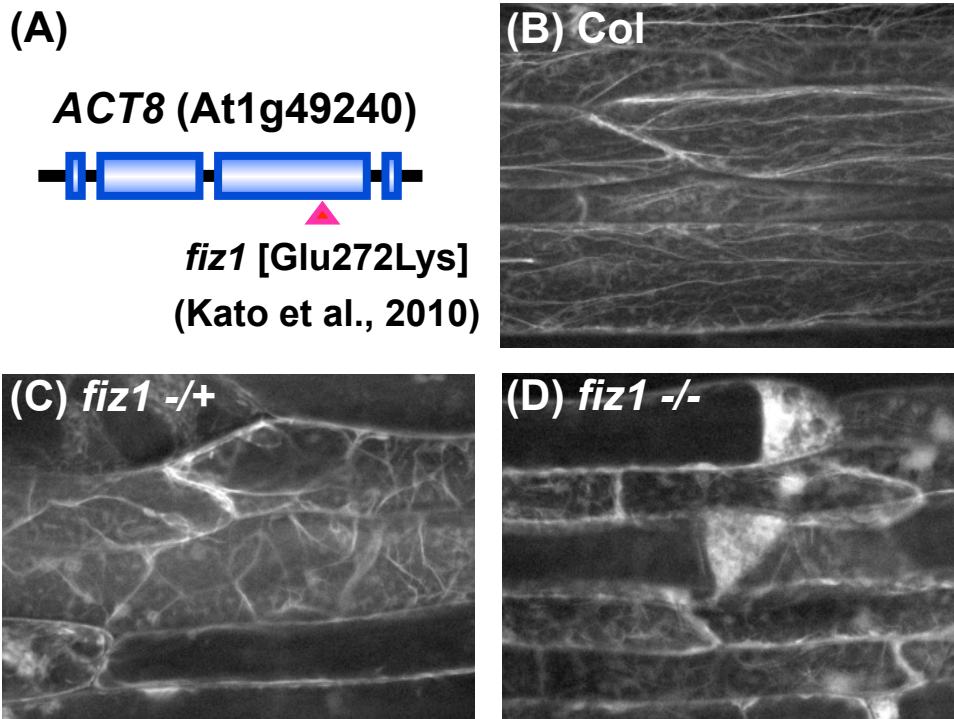


図29 アクチン優性変異体 *fiz1*の原因遺伝子と表現型

(A) アクチン優性変異体 *fiz1*変異体の原因遺伝子はACT8であり，*fiz1*変異は272番目のGluがLysに置換する優性変異である。(B) 野生型 (Col)，(C) *fiz1* -/+, (D) *fiz1* -/-，アクチンフィラメントはGFP-*mtalin*を35Sプロモーターの制御下で発現させて可視化し，葉柄の表皮細胞を観察した。*fiz1* -/+, *fiz1* -/- において，F-アクチンの形成は阻害されている。(Kato et al., 2010, によるデータを引用)

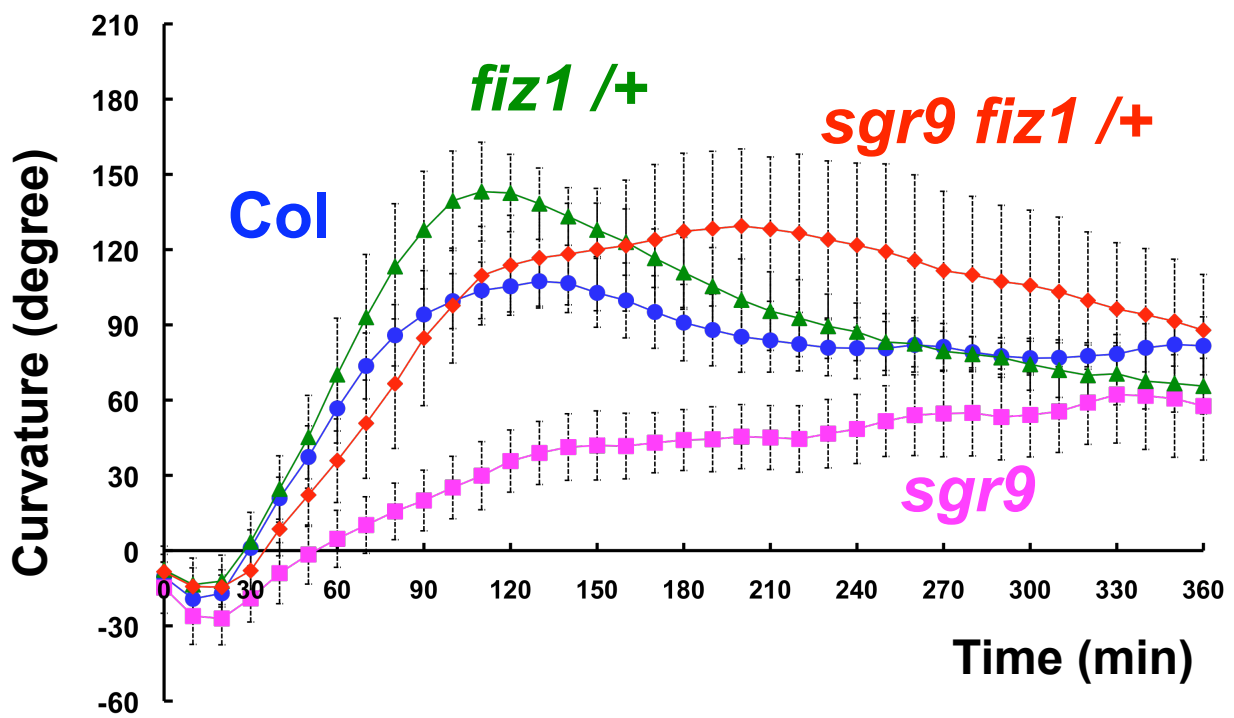


図30 *fiz1*変異による重力屈性反応への影響

sgr9fiz1 /+二重変異体を作製し、重力屈性反応を解析した。*fiz1* /+ はF-アクチンの形成が阻害されているにもかかわらず、野生型と比較すると屈曲角度がより大きくなるものの、野生型とほぼ同様の重力屈性反応を示す。*sgr9 fiz1* /+二重変異体においては*sgr9*で見られる重力屈性異常を明らかに回復する。エラーバーは標準偏差を示している。(Col; n=8, *sgr9*; n=8, *fiz1* /+; n=12, *sgr9 fiz1* /+; n=10)

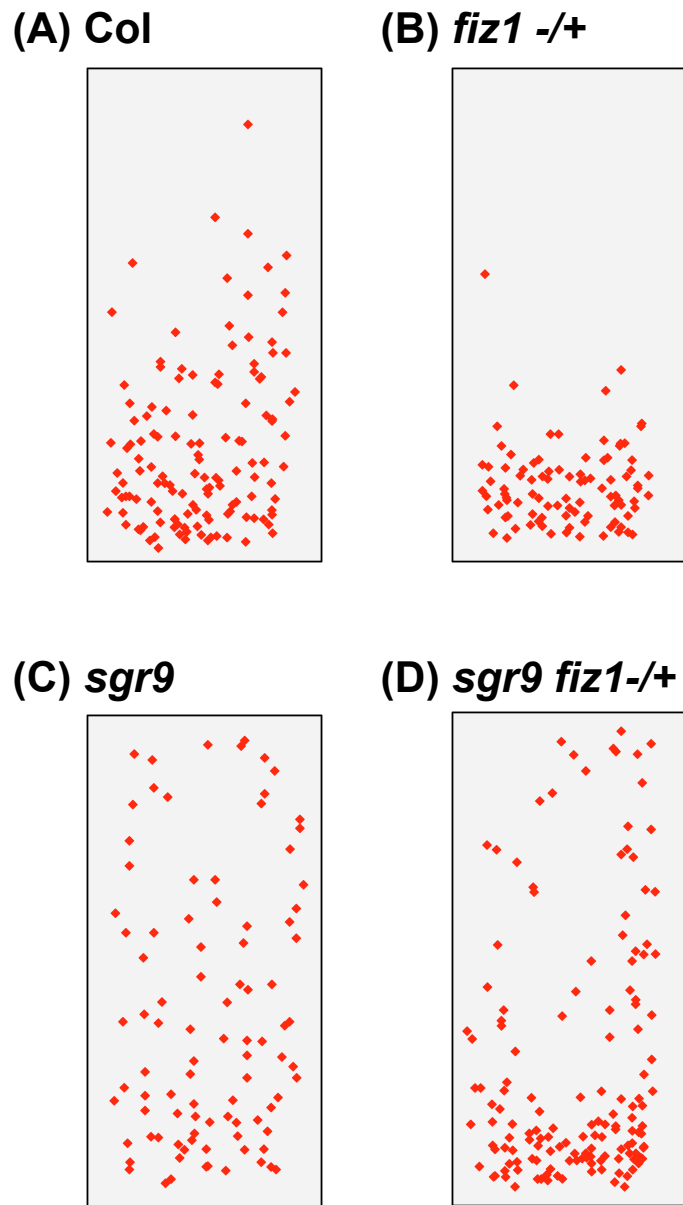
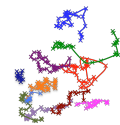
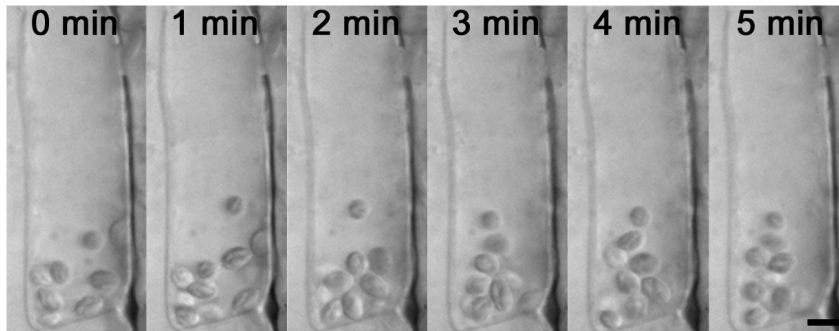


図31 *fiz1*変異によるアミロプラスト分布への影響

(A) 野生型(Col), (B) *fiz1*+/+, (C) *sgr9*変異体, (D) *sgr9fiz1*+/+二重変異体。図23と同様の方法でアミロプラスト分布の定量的解析を行なった。*fiz1*+/+においてはアミロプラストは細胞の下部, つまり重力方向側に沈降している。*sgr9fiz1*+/+二重変異体においてはアミロプラストの大部分が細胞の下部に分布しており, *sgr9*に見られる分散した異常が回復する。(Col; n=5, *sgr9*; n=5, *fiz1*+/+; n=7, *sgr9fiz1*+/+; n=8)

(A) *fiz1* -/+



(B) *sgr9 fiz1* -/+

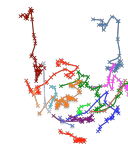
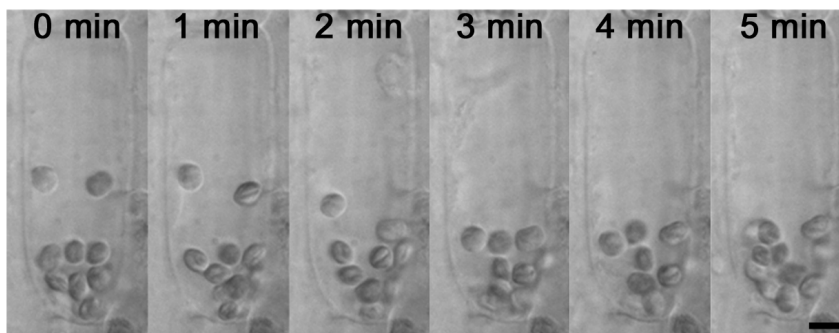


図32 *fiz1*変異によるアミロプラスト動態への影響

(A) *fiz1*/+ , (C) *sgr9 fiz1*/+二重変異体。1分間、計5分毎のタイムラプスイメージを表している。右端の図は (A)および、(B) で表したタイムラプスイメージのアミロプラストの軌跡を表しており、1つのアミロプラストは1つの色に対応する。*fiz1*/+ ではアミロプラストは跳躍的な動き減少しているものの重力方向に沈降している。*sgr9 fiz1*/+ では、*fiz1*/+ と同様に跳躍的な動きは減少し、*sgr9*で見られた沈降異常が、*fiz1*/+ の導入により回復する。スケールバーは5 μ m。

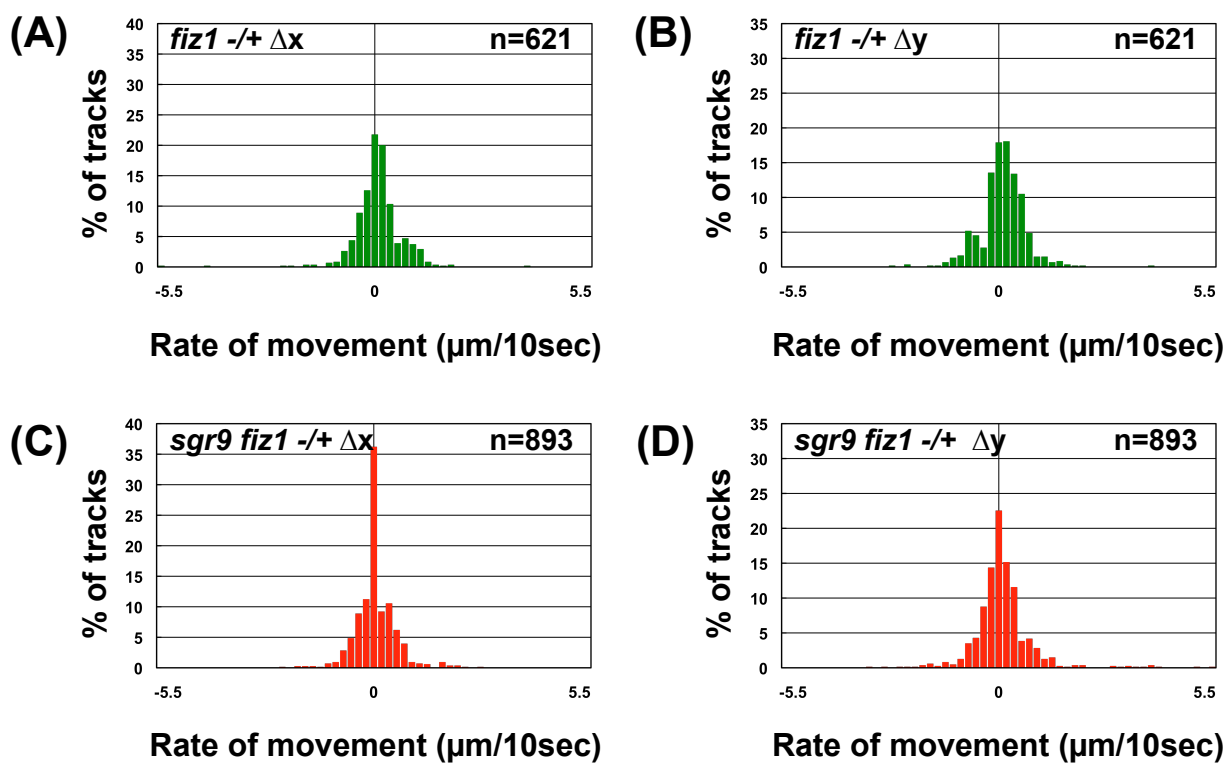
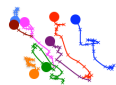
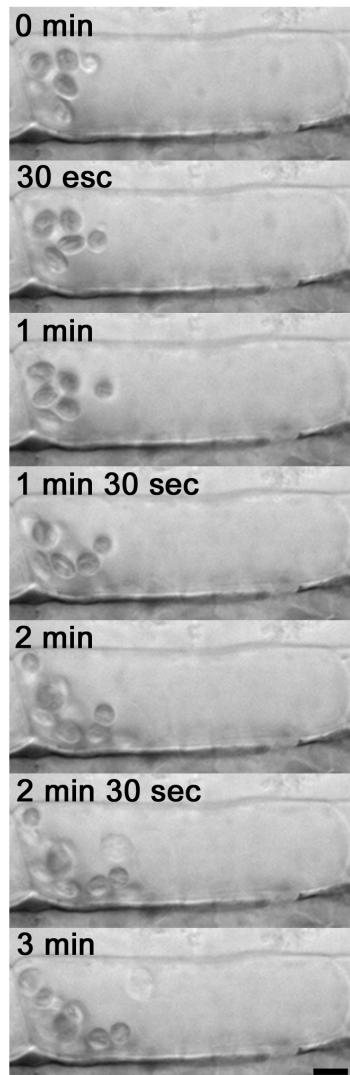


図33 重力刺激前のアミロプラスト動態の定量解析

(A) *fiz1* -/+の Δx , (B) *fiz1* -/+の Δy , (C) *sgr9 fiz1* -/+二重変異体の Δx , (D) *sgr9 fiz1* -/+二重変異体の Δy 。10秒あたりのアミロプラストの移動距離をRate of movement ($\mu\text{m}/10\text{sec}$)とし、ヒストグラムとして表した。*sgr9 fiz1* -/+においては、10秒あたりの移動距離が*sgr9*と比較して明らかに低下している(図27, (C), (D)を参照)。nはtrackの総数を示している。*fiz1* -/+, *sgr9 fiz1* -/+に3細胞以上観察した。

(A) *fiz1* -/+



(B) *sgr9 fiz1* -/+

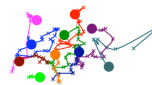
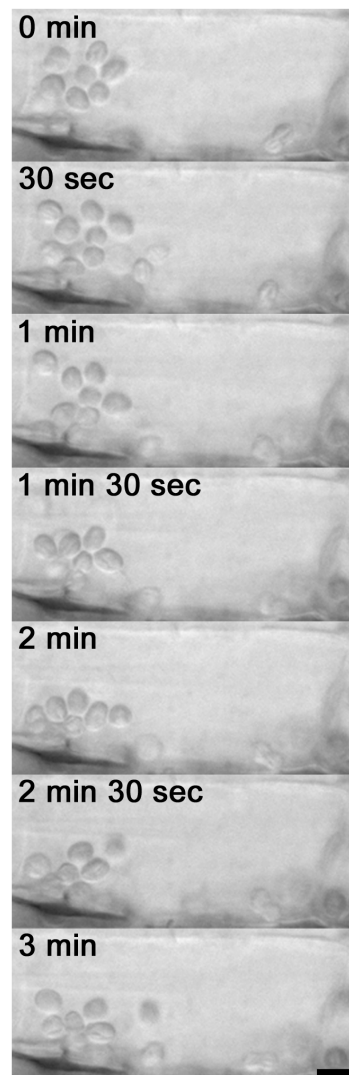


図34 重力刺激後におけるアミロプラスト動態

(A) *fiz1* -/+, (B) *sgr9 fiz1* -/+二重変異体。1分間、計5分毎のタイムラプスイメージを表している。最下の図は (A)および、(B)で表したタイムラプスイメージのアミロプラストの軌跡を表している。1つのアミロプラストは1つの色に対応し、○はスタートポイントを示している。*fiz1* -/+では、アミロプラストは新たな重力方向に沈降している。*sgr9 fiz1* -/+では、アミロプラストは新たな重力方向に沈降しており、*sgr9*のアミロプラスト沈降異常は回復している。スケールバーは5 μ m。

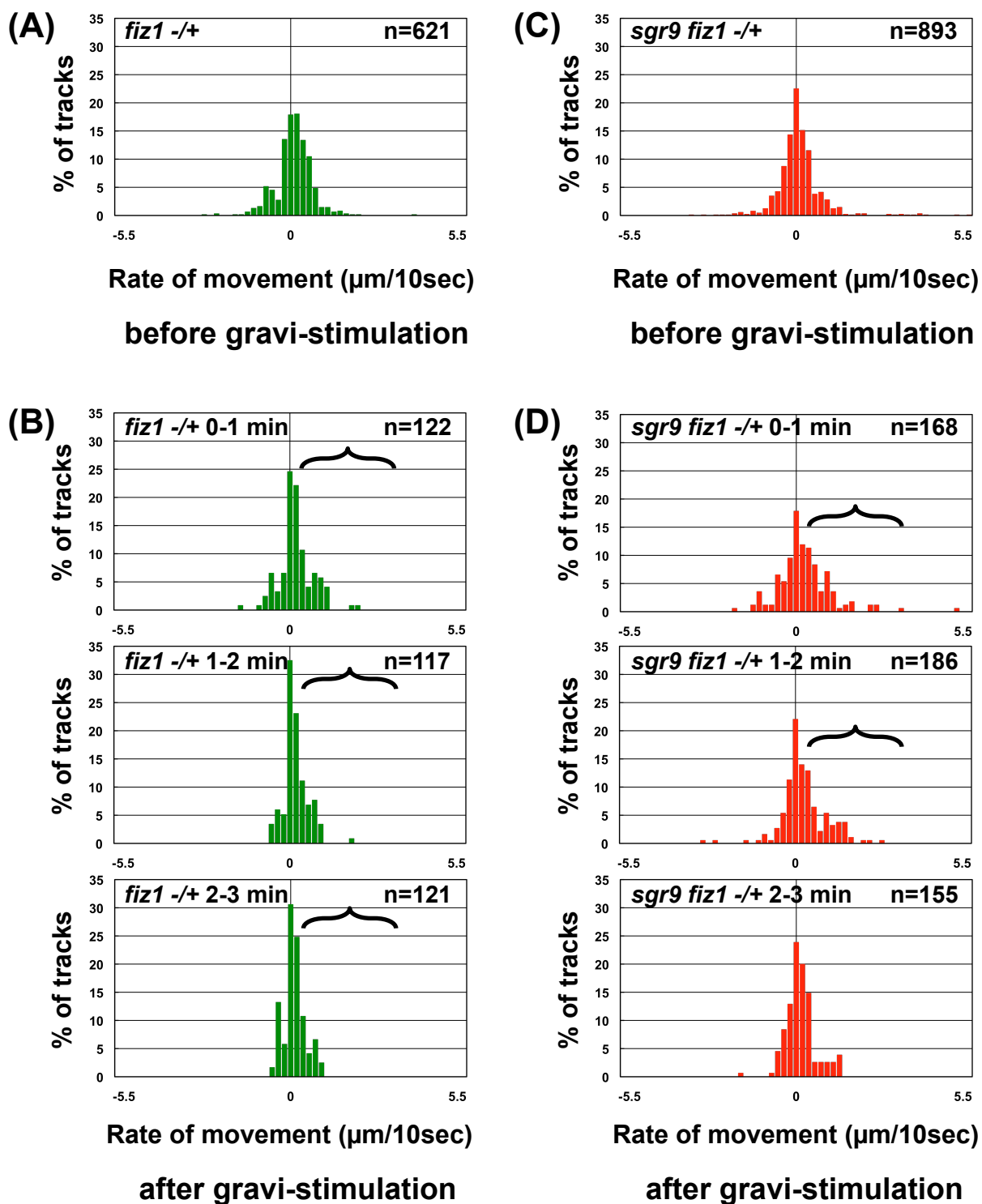


図35 重力刺激後のアミロプラスト動態の定量解析

(A) *fiz1* -/+の重力刺激前の Δy , (B) *fiz1* -/+の重力刺激後の Δy , (C) *sgr9 fiz1* -/+二重変異体の重力刺激前の Δy , (D) *sgr9 fiz1* -/+二重変異体の重力刺激後の Δy 。10秒あたりのアミロプラストの移動距離をRate of movement ($\mu\text{m}/10\text{sec}$)とし、ヒストグラムとして表した。*sgr9 fiz1* -/+においては、重力刺激後の重力方向への移動が回復している。鍵括弧は重力方向への移動の統計的な有意差を示している(P -value; Welch's t test, one tailed, $p < 0.05$)。nはtrackの総数を示している。野生型, *sgr9 fiz1* -/+共に3細胞以上観察した。

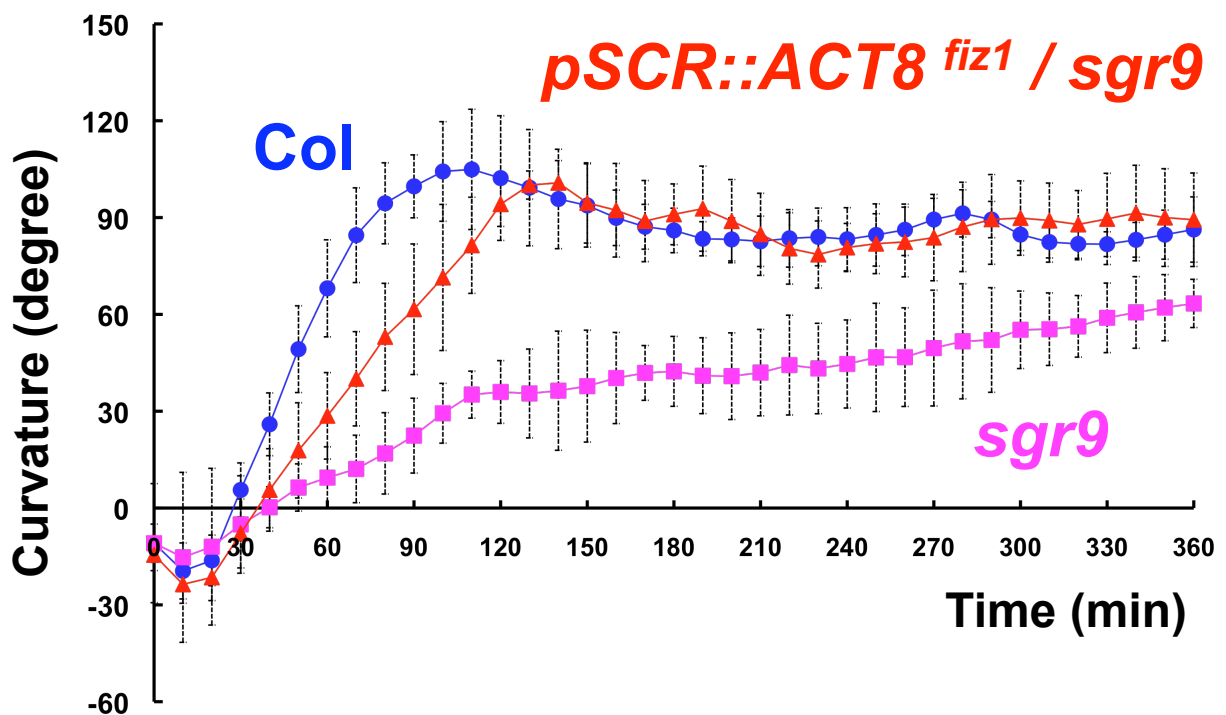
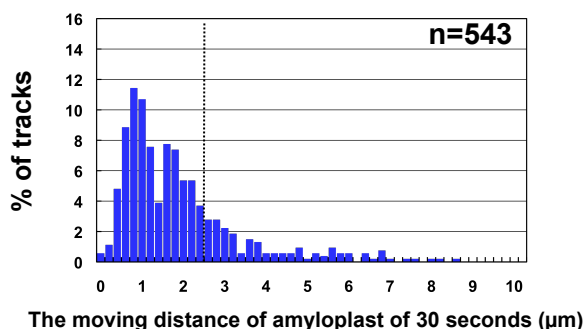


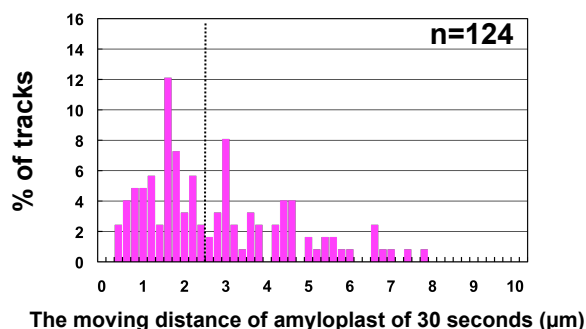
図36 内皮細胞特異的なACT8^{fiz1}の重力屈性反応への影響

内皮細胞特異的SCRプロモーターを用いてfiz1型のACT8をsgr9内で発現させた。得られた形質転換体(*pSCR::ACT8^{fiz1} / sgr9*)では重力屈性能が回復する。エラーバーは標準偏差を示している。(Col; n=7, *sgr9*; n=5, *pSCR::ACT8^{fiz1} / sgr9*; n=9)

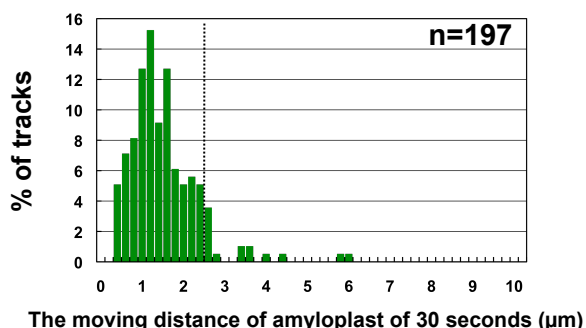
(A) Col



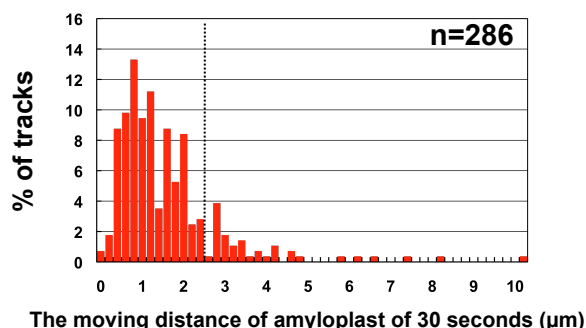
(B) *sgr9*



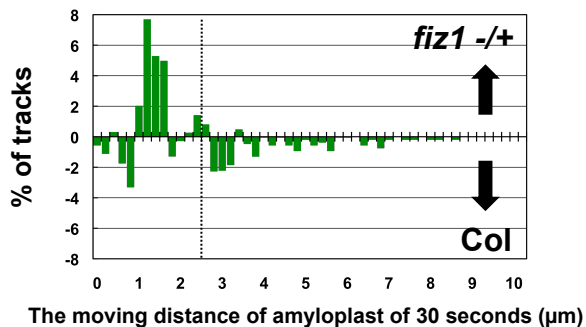
(C) *fiz1* -/+



(D) *sgr9 fiz1* -/+



(E) *fiz1* -/+ - Col



(F) *sgr9* - Col

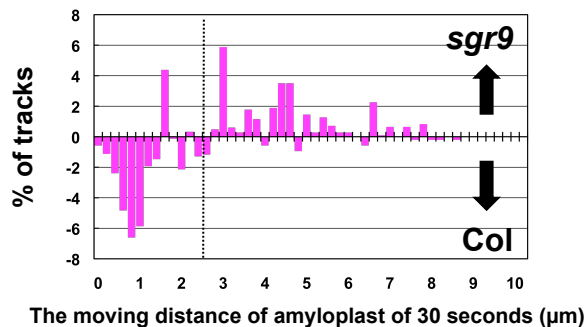


図37 アミロプラストの30秒間の移動距離

(A) Col, (B) *sgr9*, (C) *fiz1* -/+, (D) *sgr9 fiz1* -/+. 30秒間のアミロプラストの移動距離をThe moving distance of amyloplast of 30 seconds (μm)とし、ヒストグラムとして表した。nはtrackの総数を示している。3細胞以上観察した。

(E) *fiz1* -/+とColの差, (F) *sgr9*とColの差。それぞれの区画における% of tracksの値について、それぞれの変異体から野生型を引き算してヒストグラムとして表した。% of tracksの正の値はそれぞれの変異体でより多く見られたtrackを、負の値は野生型でより多くみられたtrackを示している。点線は $2.5 \mu\text{m} / 30 \text{ sec}$ を表している。

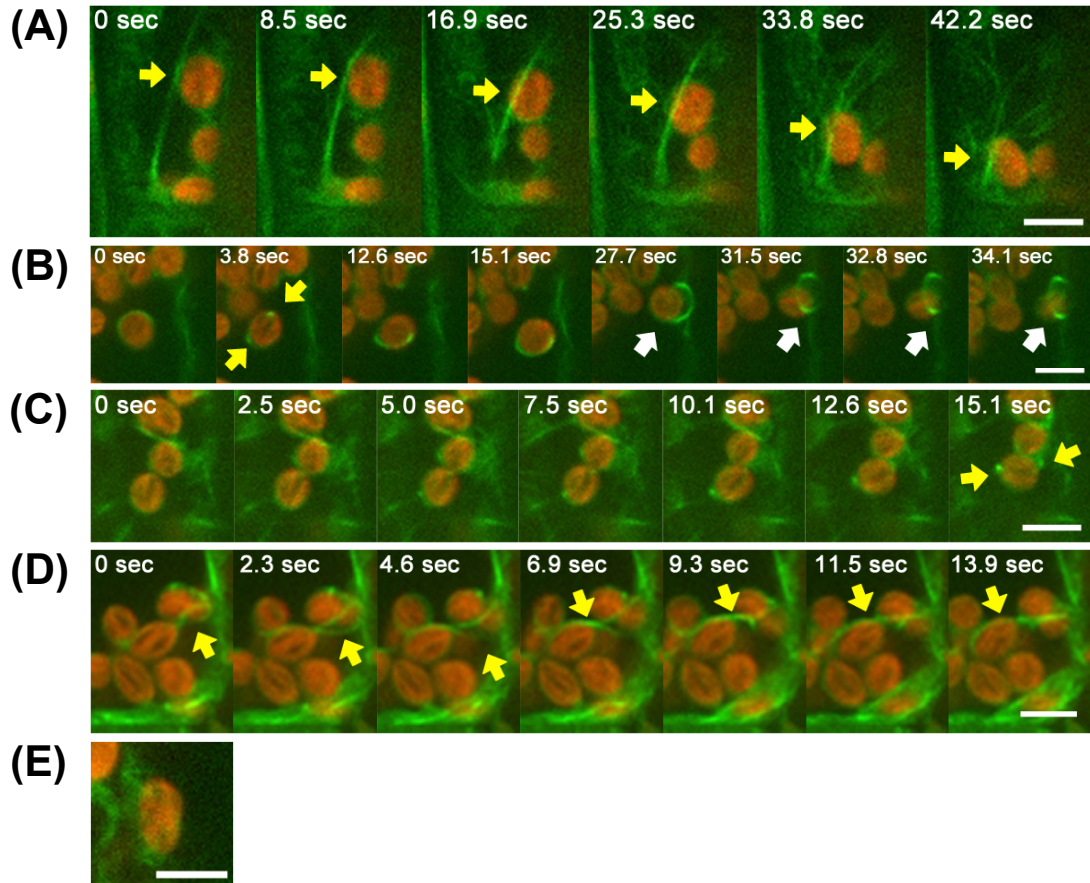


図38 野生型(Col)のアミロプラストとF-アクチン動態

(A-E) 野生型(Col)のF-アクチンとアミロプラスト。(A) 線状のF-アクチンケーブルとアミロプラスト。黄色の矢印は線状のF-アクチンケーブル上を移動するアミロプラストを示している。(B) リング状のF-アクチンとアミロプラスト。黄色の矢印は2つのGFPシグナルとして認識できるリング状のF-アクチンを示している。白色の矢印はリング状のF-アクチンから解放されるアミロプラストを表している。(C) リング状のF-アクチンの形成過程。黄色の矢印は2つのGFPシグナルとして認識できるリング状のF-アクチンを示している。(D) 湾曲したF-アクチンとアミロプラスト。黄色の矢印はアミロプラスト上をスライドするF-アクチンを示している。(E) メッシュワークF-アクチンとアミロプラスト。F-アクチンはGFP-mtalinを35Sプロモーターの制御下で発現させて可視化した。赤色はアミロプラストの自家蛍光、緑色はGFP-mtalin。スケールバーは5 μ m。

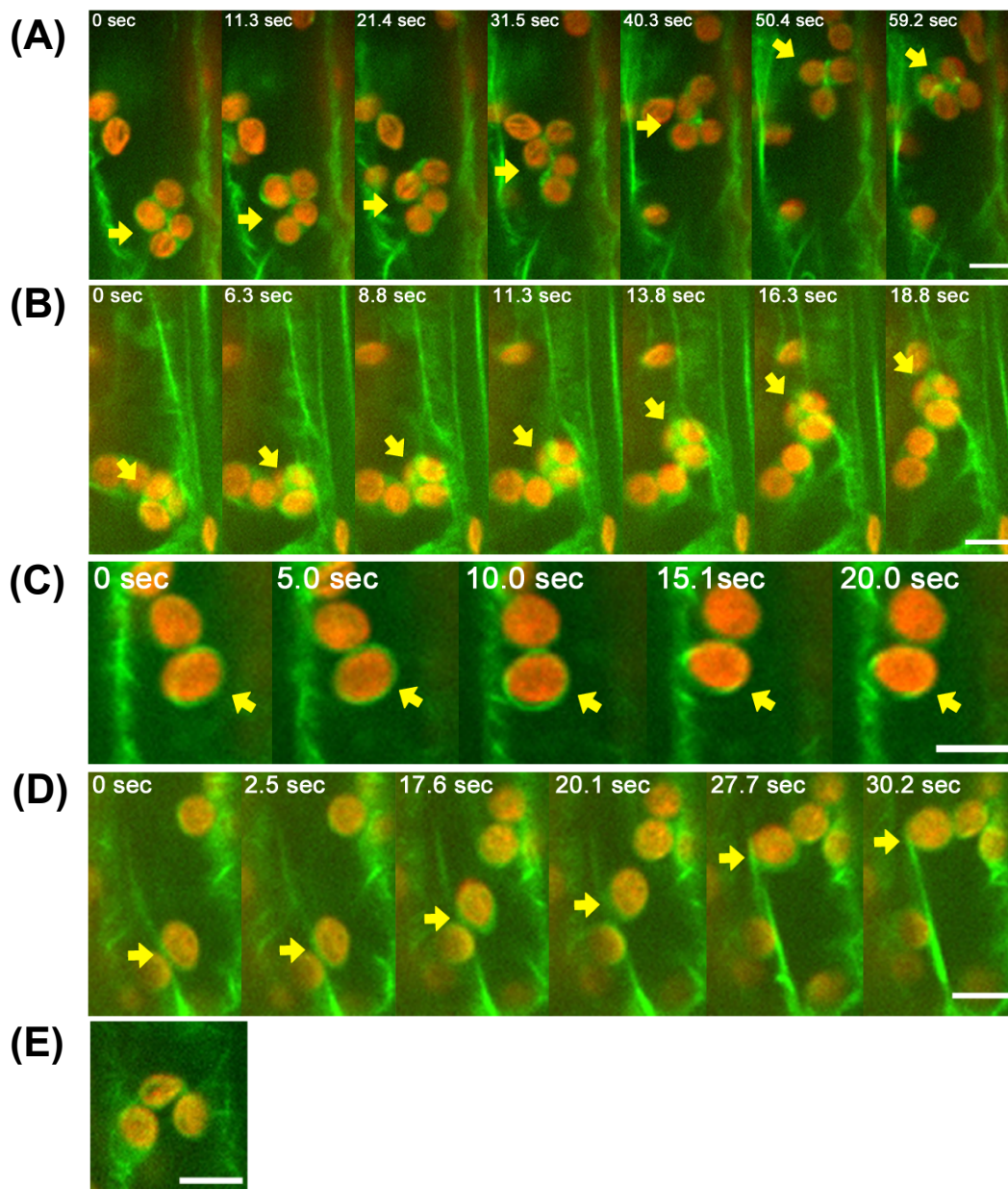


図39 *sgr9*変異体のアミロプラストとF-アクチン動態

(A-E) *sgr9*変異体のF-アクチンとアミロプラスト。(A) F-アクチンに絡まったアミロプラストのクラスター。黄色の矢印はF-アクチンに絡まりながら移動するアミロプラストクラスターを示している。(B) 線状のF-アクチンとアミロプラストクラスター。黄色の矢印はF-アクチンに絡まった状態で線状のF-アクチン上を移動する2, 3個のアミロプラストを示している。(C) リング状のF-アクチンとアミロプラスト。黄色の矢印はリング状のF-アクチンを示している。(D) 線状のF-アクチンケーブルとアミロプラスト。黄色の矢印は線状のF-アクチンケーブル上を移動するアミロプラストを示している。(E) メッシュワークF-アクチンとアミロプラスト。F-アクチンはGFP-*mtalin*を35Sプロモーターの制御下で発現させて可視化した。赤色はアミロプラストの自家蛍光, 緑色はGFP-*mtalin*。スケールバーは5 μ m。

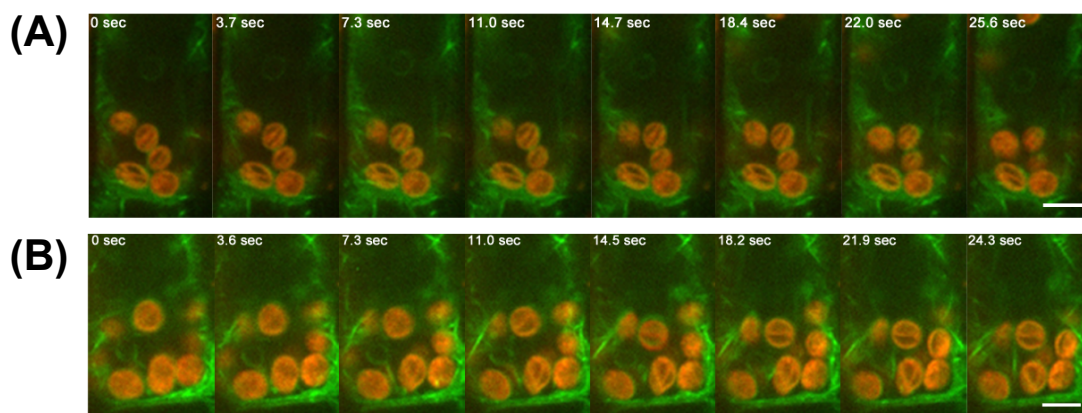


図40 *fiz1* *-/+*, *sgr9fiz1* *-/+* 二重変異体のアミロプラストとF-アクチン動態

(A) *fiz1* *-/+*, (B) *sgr9fiz1* *-/+* 二重変異体。*fiz1* *-/+*, *sgr9fiz1* *-/+*ともに、細胞周縁部のF-アクチンは残っているが、アミロプラスト周囲のF-アクチン形成は破壊されている。F-アクチンはGFP-mtalinを35Sプロモーターの制御下で発現させて可視化した。赤色はアミロプラストの自家蛍光，緑色はGFP-mtalin。スケールバーは5 μ m。

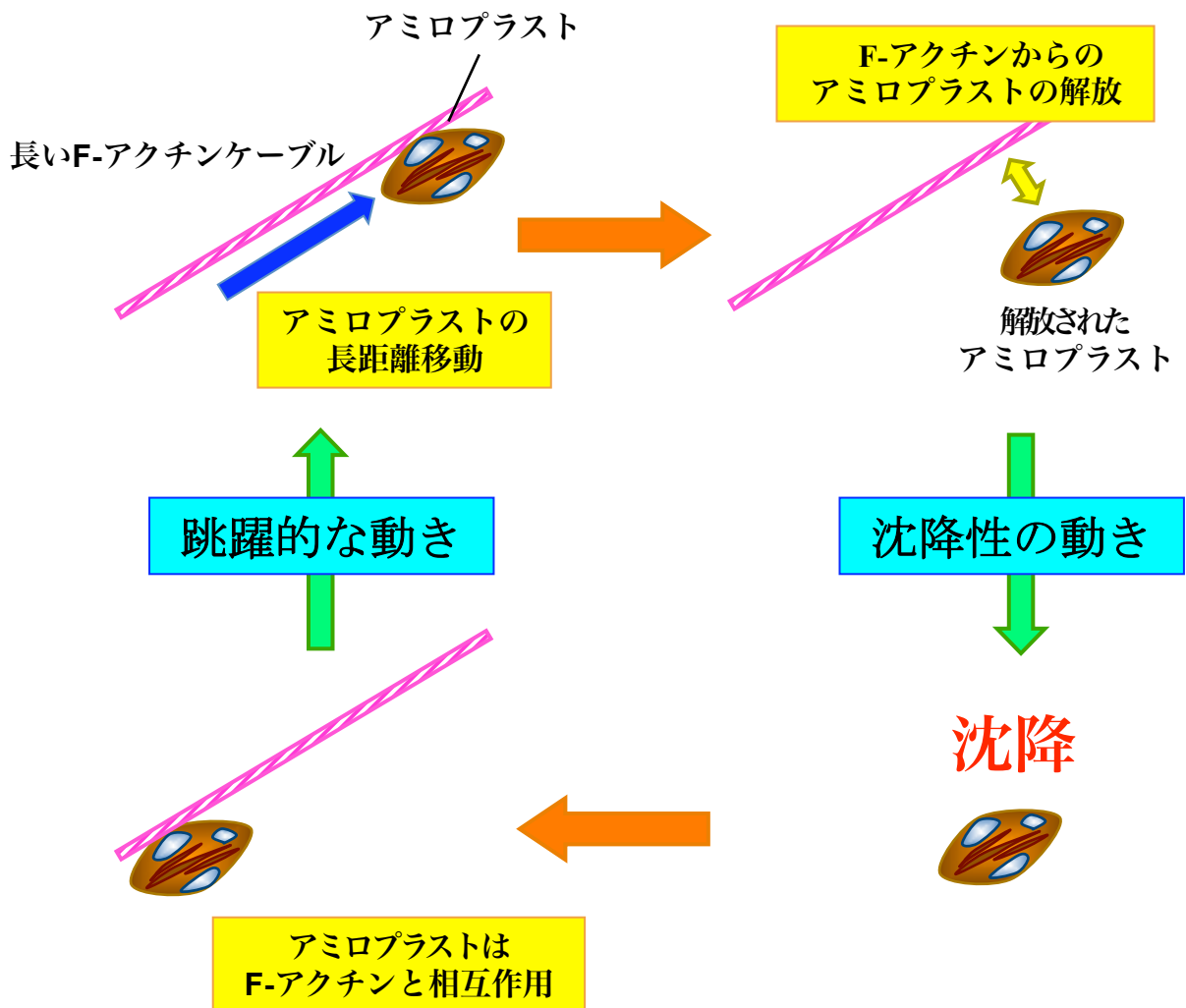


図41 F-アクチンを介したアミロプラストの動的な平衡関係

長いF-アクチンケーブルと相互作用したアミロプラストは跳躍的な動きを示す。F-アクチンから解放されたアミロプラストは沈降性の動きを示す。細胞下部に存在するアミロプラストの一部は、長いF-アクチンケーブルと相互作用し、跳躍的な動きを示すようになる。

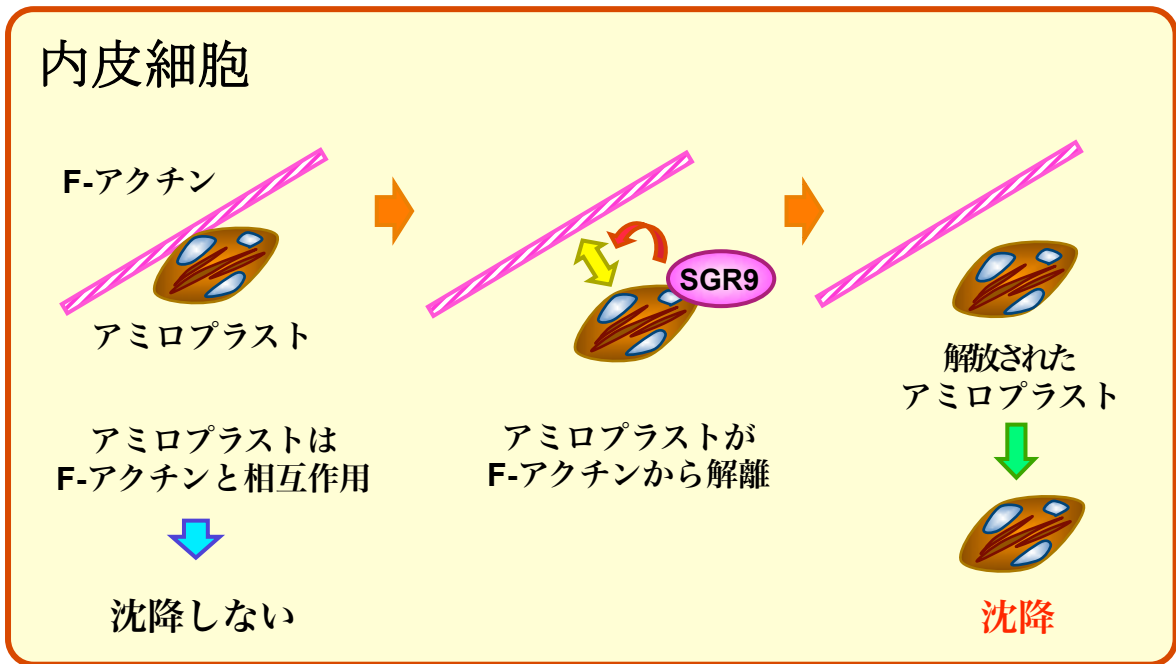


図42 作業仮説

F-アクチンと相互作用しているアミロプラストは重力方向へと沈降せず、細胞内を動き回る。アミロプラスト上に局在するSGR9がF-アクチンとアミロプラストの相互作用の調節をすることで、アミロプラストがF-アクチンから解離する。F-アクチンから解放されたアミロプラストは、自身の比重により重力方向へと沈降する。

表 1 重力刺激前と重力刺激後の Δy の平均値 ($\mu\text{m} / 10\text{sec}$)

	Col	<i>sgr9</i>	<i>fiz1</i> -/+	<i>sgr9 fiz1</i> -/+
	Δy	Δy	Δy	Δy
重力刺激前	0.00 ± 0.92	0.08 ± 1.28	0.03 ± 0.63	0.06 ± 0.80
	Δy	Δy	Δy	Δy
重力刺激後 0-1min	0.29 ± 0.71*	-0.08 ± 0.70	0.20 ± 0.57*	0.24 ± 0.91*
重力刺激後 1-2min	0.16 ± 0.49*	0.05 ± 0.90	0.18 ± 0.41*	0.26 ± 0.76*
重力刺激後 2-3min	0.06 ± 0.43	0.00 ± 0.87	0.12 ± 0.37*	0.12 ± 0.52

野生型とそれぞれの変異体における Δy の平均値を算出した。±は標準偏差 (*, Welch's t test, one tailed, $p < 0.05$)。

表 2 ring 状 F-アクチンの定量的解析

	細胞数	アミロプラストの総数	頻度 (%)
<i>Col / GFP-mTalin</i>	n=7	n=56	25%
<i>sgr9 / GFP-mTalin</i>	n=9	n=86	10.5%

出現頻度は約 1 分間に観察されるアミロプラストのうち，ring 状の F-アクチンを形成しているアミロプラストの割合として表した。野生型では，その出現頻度が 25%であったのに対して，*sgr9* 変異体では 10.5%と，明らかにその出現頻度が低下していた。

表 3 本解析に用いたプライマー

SGR9_5RACE_GSP1; 5'-GTCAGATTCGTGAGGTGTGAAGG-3'
SGR9_5RACE_GSP1-2; 5'-GGTGTGAAGGAGAAAGAGCAGAG-3'
SGR9_gF; 5'-CCGGATCCGGTGAAGTGATCCATCGTGC-3'
SGR9_gR; 5'-CCGGATCCATTAGTCCCAGACTGAAGAGC-3'
pSGR9(Bam)_R; 5'-CCGGATCCCATATTAAGATCTTGTGTGCTTCG-3'
SGR9_real_F; 5'-CCGCCACCTCCTCTCTCTAT-3'
SGR9_real_R; 5'-GGAGTGGTGTTCACGGTGGGA-3'
ACT8-LC-f; 5'-TCAGCACTTTCCAGCAGATG-3'
ACT8-LC-r; 5'-ATGCCTGGACCTGCTTCAT-3'
SGR9_cDNA-B-K_F; 5'-CCCGGATCCATGGAAGACGAAAACACCACAATC-3'
SGR9_cDNA-B-K_R; 5'-CCCGGTACCTTACGCCACGTGTAACCTCGC-3'
SGR9_ATG_F; 5'-GAAGACGAAAACACCACAATC-3'
SGR9_NPF_R; 5'-CCCGGGCATATTAAGATCTTGTGTGCTTCG-3'
SGR9_CPF_F; 5'-CCCGGGTAATCTCAGTTTGCGGTGATGGG-3'
SGR9_CPF_R; 5'-CGCCACGTGTAACCTCGCTAC-3'
SGR9_Csma_B-K_R; 5'-CCCGGTACCTTACCCGGGCGCCACGTGTAACCTCGC-3'
SGR9_W244A_F; 5'-GGAAGTGTATCTTGCCGGCGCTAAGC-3'
SGR9_W244A_R; 5'-AGTGAAAGAAATGCTGACATGGCATTTCACAC-3'
SGR9_C232A_F; 5'-TGTGAAATGCCAGCGCAGCATTCTTTTCAC-3'
SGR9_ZnR2; 5'-CACATCTCTTCCTTCGCTCATCTC-3'
SGR9_cDNA_EcoI_F; 5'-CCCGAATTCATGGAAGACGAAAACACCACAATC-3'
SGR9_cDNA_EcoI_R; 5'-CCCGAATTCTTACGCCACGTGTAACCTCGC-3'
SGR9_RING_F; 5'-GCGTTACGGGCGGTTGAGGTTTTCAACG-3'
SGR9_RING_R; 5'-CATGAATTCGGGAAGGGCGAATTCTGC-3'
ACT8_cDNA_F; 5'-GGTACCATGGCCGATGCTGATGACATTCAACCT-3'
ACT8_cDNA_R; 5'-GGTACCTTAGAAGCATTCTGTGGACAATG-3'
ACT8_fiz1_F; 5'-GAATGAAAGCTGCAGGGATCCACG-3'
ACT8_fiz1_R; 5'-CAACAAATGATGGCTGGAAAAGGAC-3'
SGR9_N末_F; 5'-TAAGAATTCGGGAAGGGCGAATTCC-3'
SGR9_N末_R; 5'-TTCTACTTCTCCGGCGTTTGAAGC-3'

「参考文献」

- 1) **Tasaka, M., Kato, T. and Fukaki, H.** (1999) The endodermis and shoot gravitropism. *Trends Plant Sci.* 4, 103-7.
- 2) **Tasaka, M., Kato, T. and Fukaki, H.** (2001) Genetic regulation of gravitropism in higher plants. *Int Rev Cytol.* 206, 135-54.
- 3) **Morita, M.T. and Tasaka, M.** (2004) Gravity sensing and signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 712-8.
- 4) **Boonsirichai, K., Guan, C., Chen, R., and Masson, P.H.** (2002). Root gravitropism: An experimental tool to investigate basic cellular and molecular processes underlying mechanosensing and signal transmission in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 53: 421-447.
- 5) **Blancaflor, E.B., Fasano, J.M. and Gilroy, S.** (1998) Mapping the functional roles of cap cells in the response of *Arabidopsis* primary roots to gravity. *Plant Physiol.* 116, 213-22.
- 6) **Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Kato, T., Fujisawa, H., Benfy, P.N. and Tasaka, M.** (1998) Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 14, 425-430.
- 7) **Sack, F.D.** (1997). Plastids and gravitropic sensing. *Planta* 203: S63-S68.
- 8) **Casper, T. and Pickard, B.G.** (1989) Gravitropism in a starchless mutant of *Arabidopsis* : implications for the starch-statolith theory of gravity sensing. *Planta* 117, 185-97.
- 9) **Kiss, J.K., Hertel, R. and Sack, F.D.** (1989) Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 177, 198-206.

- 10) **Kiss, J.Z., Guisinger, M.M., Miller, A.J., and Stackhouse, K. S.** (1997). Reduced gravitropism in hypocotyls of starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 38: 518-525.
- 11) **Weise, S.E. and Kiss, J.Z.** (1999) Gravitropism of inflorescence stems in starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Int. J. Plant Sci.* 160, 521-7.
- 12) **Fitzelle, K.J. and Kiss, J.Z.** (2001) Restoration of gravitropic sensitivity in starch-deficient mutants of *Arabidopsis* by hypergravity. *J Exp Bot.* 52, 265-275.
- 13) **Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M.** (1996b). SGR1, SGR2 and SGR3: novel genetic loci involved in shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 945-955.
- 14) **Yamauchi, Y., Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M.** (1997). Mutations in the SGR4, SGR5 and SGR6 loci of *Arabidopsis thaliana* alter the shoot gravitropism. *Plant Cell Physiol.* 38: 530-535.
- 15) **Heathcote, D.** (1981). The geotropic reaction and statolith movements following geostimulation of mung bean hypocotyl. *Plant Cell Environ.* 4: 131-140.
- 16) **Clifford, P.E., and Barclay, G.F.** (1980). The sedimentation of amyloplasts in living statocytes of the dandelion flower stalk. *Plant Cell Environ.* 3: 381-386.
- 17) **Sack, F.D., and Leopold, A.C.** (1985). Cytoplasmic streaming affects gravity-induced amyloplast sedimentation in maize coleoptiles. *Planta* 164: 56-62.
- 18) **Saito, C., Morita, M.T., Kato, T., and Tasaka, M.** (2005). Amyloplasts and Vacuolar Membrane Dynamics in the Living Gravierceptive Cell of the *Arabidopsis* inflorescence Stem. *Plant Cell* 17: 548-558.
- 19) **Kato, T., Morita, M.T., Fukaki, H., Yamauchi, Y., Uehara, M., Niihama,**

M., and Tasaka, M. (2002). SGR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 33-46.

20) **Morita, M.T., Kato, T., Nagafusa, K., Saito, C., Ueda, T., Nakano, A., and Tasaka, M.** (2002). Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 47-56.

21) **Yano, D., Sato, M., Saito, C., Sato, M.H., Morita, M.T., and Tasaka, M.** (2003). A SNARE complex containing SGR3/AtVAM3 and ZIG/VTI11 in gravity-sensing cells is important for Arabidopsis shoot gravitropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100: 8589-8594.

22) **Silady, R.A., Kato, T., Lukowitz, W., Sieber, P., Tasaka, M., and Somerville, C.R.** (2004). The gravitropism defective 2 mutants of Arabidopsis are deficient in a protein implicated in endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *Plant Physiol.* 136: 3095-3103.

23) **Yamamoto, K., and Kiss, J.Z.** (2002). Disruption of the actin cytoskeleton results in the promotion of gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 128: 669-681.

24) **Palmieri, M., and Kiss, J.Z.** (2005). Disruption of the F-actin cytoskeleton limits statolith movement in Arabidopsis hypocotyls. *J Exp Bot.* 56: 2539-2550.

25) **Hou, G., Mohamalawari, D.R., and Blancaflor, E.B.** (2003). Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap actin cytoskeleton. *Plant Physiol.* 131: 1360–1373.

26) **Yoder, T.L., Zheng, H.Q., Todd, P., and Staehelin, L.A.** (2001). Amyloplast sedimentation dynamics in maize columella cells support a new model for the gravity-sensing apparatus of roots. *Plant Physiol.* 125: 1045-1060.

27) **Perbal, G., and Driss-Ecole, D.** (2003). Mechanotransduction in gravisensing cells. *Trends Plant Sci.* 8: 498-504.

28) **Kato, T., Morita, M.T., and Tasaka, M.** (2010). Defects in dynamics and functions of actin filament in *Arabidopsis* caused by the dominant-negative actin *fiz1*-induced fragmentation of actin filament. *Plant Cell Physiol.* 51: 333-338.

29) **Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.

30) 阪口敬太郎 修士論文 (2005) シロイヌナズナ花茎の重力刺激応答性遺伝子群の解析

31) **Stone, S.L., Hauksdottir, H., Troy, A., Herschleb, J., Kraft, E., and Callis, J.** (2005). Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137: 13-30.

32) **Katoh, S., Tsunoda, Y., Murata, K., Minami, E., and Katoh, E.** (2005). Active site residues and amino acid specificity of the ubiquitin carrier protein-binding RING-H2 finger domain. *J. Biol. Chem.* 280: 41015-41024

33) **Kosarev, P., Mayer, K.F., and Hardtke, C.S.** (2002). Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the *Arabidopsis* genome. *Genome Biol.* 3: research 0016.1-12.

34) **Zhang, X., Garreton, V., Chua, N.H.** (2005) The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes Dev.* 19, 1532-43.

35) **Hardtke CS, Okamoto H, Stoop-Myer C, Deng XW.** (2002) Biochemical evidence for ubiquitin ligase activity of the *Arabidopsis* COP1 interacting protein 8 (CIP8). *Plant J.* 30, 385-94.

36) **Matsuda, N., Suzuki, T., Tanaka, K., and Nakano, A.** (2001). *Rma1*, a novel

type of RING finger protein conserved from Arabidopsis to human, is a membrane-bound ubiquitin ligase. *J Cell Sci.* 114: 1949-1957.

37) **Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., and Reimann, J.D.** (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10: 429-439.

38) **Vaux, L.D., and Silke, J.** (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 6: 287-297

39) **Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M.** (1996). Gravitropic response of inflorescence stems in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 933-943.

40) **Uemura, T., Yoshimura, SH., Takeyasu, K., and Sato, M.H.** (2002). Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes Cells.* 7: 743-753.

41) **Kuang, B., and Rubenstein, P. A.** (1997). The effects of severely decreased hydrophobicity in a subdomain 3/4 loop on the dynamics and stability of yeast G-actin. *J. Biol. Chem.* 272: 4412-4418.

42) **Musib, R., Wang, G., Geng, L., and Rubenstein, P. A.** (2002) Effect of polymerization on the subdomain 3/4 loop of yeast actin. *J. Biol. Chem.* 277: 22699-22709.

43) **Shvetsov, A., Musib, R., Phillips, M., Rubenstein, P. A., and Reisler, E.** (2002) Locking the hydrophobic loop 262-274 to G-actin surface by a disulfide bridge prevents filament formation. *Biochemistry.* 41: 10787-10793.

44) **Oikawa, K., Kasahara, M., Kiyosue, T., Kagawa, T., Suetsugu, N., Takahashi, F., Kanegae, T., Niwa, Y., Kadota, A., and Wada, M.** (2003). CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING1 is essential for proper chloroplast positioning. *Plant Cell* 15: 2805–2815.

- 45) **Kadota, A., Yamada, N., Suetsugu, N., Hirose, M., Saito, C., Shoda, K., Ichikawa, S., Kagawa, T., Nakano, A., and Wada, M.** (2009). Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 106: 13106-13111.
- 46) **Soll, J. and Schleiff, E.** (2004). Protein Import Into Chloroplasts. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 5: 198-208.
- 47) **Beers, E.P., Moreno, T.N. and Callis, J.** (1992). Subcellular Localization of Ubiquitin and Ubiquitinated Protein in Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem. 267: 15432-15439.
- 48) **Hofmann, N.R. and Theg, S.M.** (2005). Chloroplast Outer Membrane Protein Targeting and Insertion. 10: 450-457.

「謝辞」

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学，バイオサイエンス研究科，形質発現植物学講座の田坂昌生教授の御指導のもと，平成16年6月から平成23年5月までの約7年間にわたって行なわれました。本研究を遂行するにあたり，常に的確な御助言，御指導を与えてくださった田坂昌生教授に心からお礼申し上げます。また，直接御指導していただき，大変お世話になった，森田（寺尾）美代准教授に心からお礼申し上げます。加えて，本研究を遂行するにあたり，適切なお助言をくださいました古谷将彦助教に深く感謝いたします。また，形質発現植物学講座で出会った先輩方，共に研究に励んだ後輩達，技術補佐の方々に感謝いたします。

本研究に用いた *fiz1* 変異体，および *35S::GFP-mTalin* 形質転換体は，奈良先端科学技術大学院大学，バイオサイエンス研究科，植物遺伝子機能学講座の加藤壮英助教により分与していただきました，深く感謝いたします。また，本研究における細胞内イメージングは当研究室に在籍していた日本学術振興会特別研究員の豊田正嗣博士の多大なるご協力により実現しました，心より深く感謝いたします。本研究における，アミロプラスト動態の定量解析は理化学研究所，齋藤知恵子博士の多大なるご協力により実現しました，心より深く感謝します。

最後に，本研究を行なうにあたり，常に私を見守ってくれた私の家族に心より感謝いたします。