

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650098

研究課題名(和文)植物における左右性の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of left-right asymmetry in plants

研究代表者

橋本 隆 (Hashimoto, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：80180826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アラビドプシス変異株にはねじれる方向が左右どちらかに決まっているものと、左右ランダムにねじれるものがあり、微小管関連因子の変異で左右性が現れる。左右性を考慮した軸器官ねじれモデルを検証するために、根の細胞層特異的に発現するプロモーターを用いて、微小管関連および無関連の細胞伸長制御因子をアラビドプシス植物体の皮層細胞または表皮細胞で発現させた。微小管関連因子を用いた場合、表現型はねじれモデルと部分的に合致する結果となったが、プロモーターの発現特異性やタンパク質の細胞層間移動の問題などから明瞭な結論には至らなかった。微小管と無関係な細胞伸長制御因子を用いた実験は完了せず、実験を継続中である。

研究成果の概要(英文)：Arabidopsis helical growth mutants include those which twist to form right- or left-handed helices in their epidermal cell files and those twist in random directions. Microtubule (MT)-related mutants show fixed handedness. To test a helical growth model of axial organs, MT-related and -unrelated growth regulating genes are expressed in cortex or epidermis of Arabidopsis roots, by using cell layer-specific promoters. When MT-related genes are expressed, twisting phenotypes partially agree with the model, but specificities of the promoters and inter-cell layer movement of the expressed proteins make interpretation difficult. Experiments involving MT-unrelated genes are on-going.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：ねじれ 左右性 微小管 アラビドプシス プロモーター

1. 研究開始当初の背景

生物の左右性は脊椎動物においては普遍的に見られ、内臓の配置、脳の機能分化などに現れる。無脊椎動物や植物では一般的ではないが、巻貝の巻き方、甲殻類のはさみの発達、つる性植物のねじれに散見される。生物個体において上下軸や内外軸が確立される分子機構がよく研究されているのに比べ、左右軸がどのように規定されるかは、まだ充分には解明されていない。例えば、あさがおのツルは右巻きヘリックスをとるが、どのような分子機構でアサガオが右と左を区別できるのかは古典的な謎である。

我々はモデル植物アラビドプシスのねじ

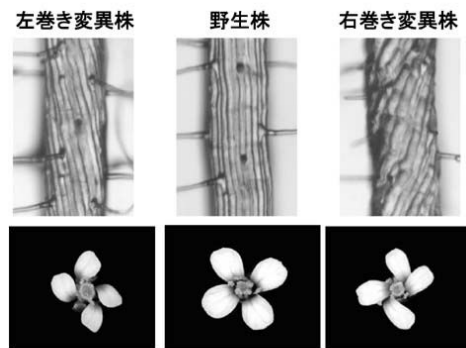


図1 微小管要因のアラビドプシスねじれ変異株。伸長軸器官は右または左のどちらか一方にねじれる

れ変異株を多数単離し(図1)、そのねじれ機構を研究することにより、「ねじれ仮説」を提唱した(Nature 2002, Nature Cell Biol 2010, PNAS 2007, Plant Cell 2004, Development 2000)。この仮説は2段階のモデルから成る。「軸器官のねじれモデル」では、根や茎などの軸器官の内部組織の伸長(縦方向の生長)に対して表皮層の伸長が大きい場合に、軸器官総体の長さを維持するために表皮層が傾く(ねじれる)。傾く方向は基本的にはランダム(右または左の両方)であるが、表皮細胞に左右性の極性情報(微小管細胞骨格の配置)があると、その極性に従い軸器官が右または左のいずれか一方にねじれる。

「微小管のねじれモデル」では、ねじれ

変異株で表層微小管が右または左巻きヘリックス構造をとる根本原因が微小管を構成する原繊維(プロトフィラメント)の本数に由来すると考える。ここではモデルの説明は割愛するが、第一モデルを合わせて、微小管ポリマー分子のミクロ構造が軸器官のねじれというマクロな現象の根本原因となっているとするものである。この第二モデルの検証には、試験管内での表層微小管様パターン形成の再構築が不可欠であり、幾つかの技術的問題を解決する必要がある。

2. 研究の目的

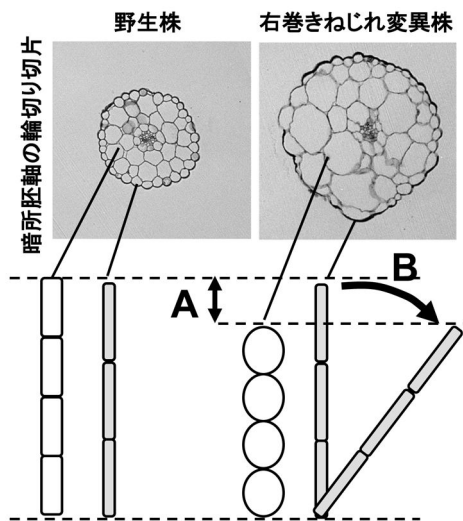


図2 軸器官のねじれモデル

変異株では表皮細胞(グレー)と内部細胞の伸長差(A)がねじれの原因か、それとも表皮細胞の伸長軸の傾き(B)が原因か? 多

細胞生物の発生段階での上下軸と内外軸の決定機構に比べ、左右軸については研究が遅れがちである。特に、植物は左右性を抑制する(左右対称)方向に進化してきたため、つる性植物に見られるような左右性の分子機構は全くわかっていない。我々は左右性が顕在化するアラビドプシスねじれ変異株を多数単離し、それらの詳細な解析から「2段階のねじれ仮説」を提唱した。

本研究では、その第一段階の「軸器官のねじれモデル」(図2)を検証する。すなわち、軸器官の内部組織(維管束など)が外

部組織（表皮細胞層など）に比べ、相対的に縦方向の伸長が抑制された場合に軸器官はねじれ、右または左のどちらの方向にねじれるかは表皮細胞の表層微小管パターンにより決定されるというものである。

3. 研究の方法

軸器官ねじれモデルを検証するために、アラビドプシス植物体軸器官（根、胚軸）の細胞層特異的に微小管制御因子や微小管に無関係な細胞伸長制御因子を発現させ、野生株に方向性のないねじれや方向性のあるねじれを引き起こせるかを調べる。

4. 研究成果

【細胞層特異的プロモーターの検索】

軸器官ねじれモデルを検証するために、細胞層特異的に発現するプロモーターを検索した。表皮細胞（WRKY72 と ATML1）、皮層（C1）、内皮（SCR）、中心柱（SHR）に特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域を用いて、PHS1-KD-GFP をアラビドプシス植物体で発現させた。チューブリンリン酸化酵素である Propyzamide Hypersensitive 1 (PHS1)のキナーゼ領域のみ（PHS1-KD）は、恒常的な微小管脱重合活性をもつ。それぞれのプロモーターは予想される細胞層で発現したが（図3）ATML1 プロモーターは根伸長領域にある表皮細胞の非根毛細胞列で特に発現が強かった。

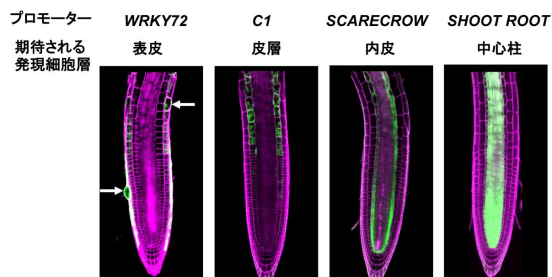


図3 根の細胞層特異的に発現するプロモーターを用いてPHS1-KD-GFPを発現させた。発現誘導にはβ-estradiolを用い、PI染色（赤）とGFP蛍光（緑）を重ね合わせて表示した。WRKY72系統では、発現が強い表皮細胞（矢印）で細胞肥大が見られた。

【微小管不安定化によるねじれ表現型】

皮層、内皮、中心柱で PHS1-KD-GFP を発現させた根では、生育が阻害された。皮層発現の場合は、皮層細胞の表層微小管が顕著に脱重合しており（図4）根の分化領域では左巻きねじれが観察された（図5）。一方、表皮細胞発現の場合は、微小管脱重合の程度が細胞間でばらつきが見られ（図4）分化領域と発現レベルが比較的高い伸長領域の根表皮細胞で細胞肥大が見られた（図3、図5）。

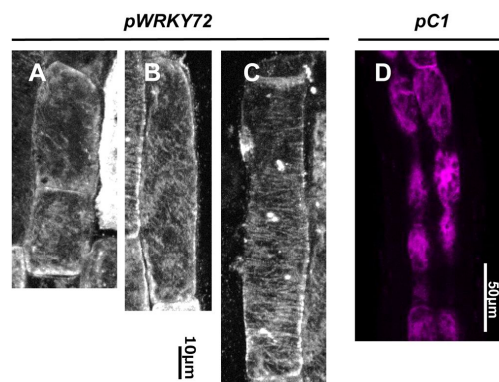


図4 表層微小管の表現型。表皮細胞でPHS1-KDを誘導的に発現させた場合（pWRKY72）、表層微小管はほぼ脱重合した細胞（A）、やや不安定化され斜めに配向した細胞（B）、野生型と同じく横方向に配向した細胞（C）が混在していた。一方、内皮細胞で発現させた場合（pC1）、表層微小管はすべて脱重合した（D）。チューブリン免疫染色（A-C）、mCherry-TUB61による可視化（D）。

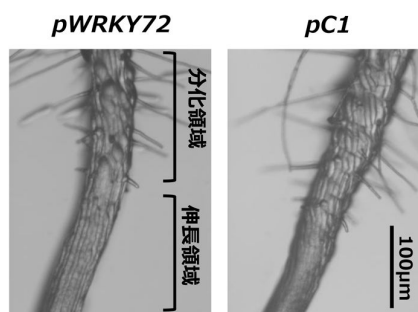


図5 根のねじれ表現型。表皮細胞でPHS1-KDを発現させた場合（pWRKY72）、幾つかの表皮細胞が肥大したが根本体にねじれは見られなかった。一方、内皮細胞で発現させると（pC1）、左巻きのねじれが見られた。

【アクチン繊維異常によるねじれ表現型】

微小管系細胞伸長制御因子ではなく、アクチン系細胞肥大制御因子を用いた実験を開始した。通常組織で発現するアクチンイソフォームとはアミノ酸配列が若干異なり、生殖組織特異的に発現するアクチンイソフォーム ACT1 をアラビドプシス植物全体で恒常的に発現させると、細胞伸長に阻害的に機能し、矮性になると報告されている。

また、通常組織で発現するアクチンイソフォームの優性機能阻害変異 ACT2(fiz1)も細胞伸長が阻害されたアラビドプシス植物になることが報告されている。そこで、ACT1とACT2(fiz1)を全身と細胞層特異的に発現させるベクターを作製、野生型アラビドプシス植物に形質転換した。ACT1を全身および皮層特異的に発現させた植物系統はどちらも目立った生育異常は認められなかった。過去に報告された全身発現植物での矮性表現型との違いがみられた原因は不明であるが、過去論文では Ca35SMV プロモーターが使用され、今回は Ubiquitin10 プロモーターが使用されたことの違い（プロモーターの発現強度）に起因している可能性がある。

一方、ACT2(fiz1)を全身で発現させると、予想通り強度の矮性植物となった。ACT2(fiz1)を皮層特異的に発現させた場合、全身発現の場合ほどではないが、植物は矮性化した。T1世代での表現型観察（地上部のみ）では、表皮細胞層のねじれは観察されていないが、T2世代で根も含めた詳細な表現型の観察が必要である。

【ねじれ変異株の細胞層特異的相補実験】

右巻きねじれ変異株 *spirall1* に細胞層特異的なプロモーター（WRKY72とC1）を用いて SPR1-GFP を発現させて、ねじれ形質が相補されるかを実験した。

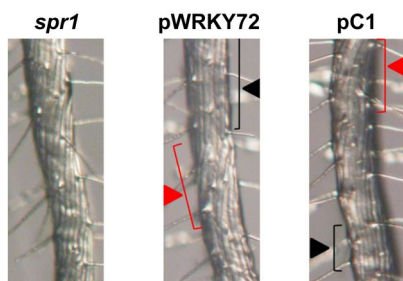


図6 ねじれ変異株の細胞層特異的相補実験。ねじれ変異株 *spirall1* において SPR1-GFP を表皮細胞特異的 (pWRKY72) または内皮細胞特異的 (pC1) に発現させた。どちらの相補系統においても、根のねじれは部分的に相補され、ねじれている部分 (赤矢じり) とまっすぐに伸長する部分 (黒矢じり) が混在していた。

SPR1-GFP は標的とする細胞層に特異的に発現し、細胞間の移動は明瞭には認められなかった。表皮細胞特異的および皮層細胞特異的に発現させた場合のどちらにおいても、ねじれ形質は部分的に相補された (図6)。細胞層特異的発現の効果がはっきりしないのは、使用したプロモーターの発現強度が充分でないためか、SPR1-GFP が部分的に隣の細胞層へ移行した可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

加藤壮英、市村朋子、平井祐貴、足立侑実子、寶金佐和子、藤田智、八木慎宜、橋本隆、「器官のねじれ形質への各細胞層の寄与」、第 57 回日本植物生理学会年会、平成 28 年 3 月 19 日、岩手大学 (岩手県・盛岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/hashimoto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 隆 (HASHIMOTO, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：80180826

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者