

## 微小重力環境下におけるシロイヌナズナ支持組織形成時の細胞壁動態に必須の遺伝子群解明を目指した逆遺伝学的アプローチ

東北大学大学院生命科学研究所 西谷和彦、横山隆亮

### Reverse genetic approach to exploring genes responsible for cell-wall dynamics in supporting tissues of *Arabidopsis thaliana* under microgravity conditions

Kazuhiko Nishitani and Ryusuke Yokoyama  
Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan  
E-mail, nishitan@mail.tains.tohoku.ac.jp

**Abstract,** Our previous study has identified 16 cell-wall related genes as strong candidates responsible for gravity-regulated formation of supporting tissues of *Arabidopsis thaliana* inflorescence stems (Imoto et al. 2005). In the proposed flight experiments, which is scheduled to be carried out in 2007, we will compare the expression profiles of the 16 gene products between plants grown under a microgravity conditions and a 1 g conditions, and thereby verify the role of gravity signaling in regulation of cell wall construction for supporting tissues using plant material grown and harvested in space.

**Key words,** Arabidopsis, cell wall, gene, gravity, supporting tissue

海水の浮力に支えられながら進化してきた植物が、4億年ほど前に、陸に上がり、大型化の進化圧を受けながら、乾燥した大気環境に適応してきたのが今日の維管束植物である。この過程で植物はいくつもの独自の機能を獲得してきた。その中で、(1) 土壌中の水分や無機塩類を地上部に輸送する長距離輸送システムと(2) 大型化した植物体を支える構造が、維管束植物のボディープランという点では特に重要であったろうと考えられる。これらの体制進化の過程で決定的な役割を演じたと考えられるのが伸展性と強靭さを兼備した細胞壁の進化である。すなわち、伸展性の高い一次細胞壁を持つ細胞が伸長することにより自在に形を作り、それに続いて二次細胞壁を一次細胞壁の内外に沈着させることにより力学的強度と化学的安定性を備えた支持組織を形成する仕組みは、維管束植物が獲得した独自の組織形成の方式である。これにより、維管束植物の大気中での大型化が可能となったと考えられている。また、この過程が1gの陸上環境に最適化されてきたとすれば、その過程には、1g重力シグナルをモニターしながら細胞壁構築を制御する機構が必要であったと推定できる

このような観点から、私たちは、維管束植物の支持機構形成過程に関わる細胞壁動態と重力環境との関係に着目して、それに関わる遺伝子群の役割の解析を、逆遺伝学的手法により包括的に進めてきた。また、これらの研究は第5回ライフサイエンス宇宙実験国際公募の実験課題 “Reverse

genetic approach to exploring genes responsible for cell-wall dynamics in supporting tissues of *Arabidopsis* under microgravity conditions”として採択され、2007年度中に宇宙実験により検証される予定である。目下、その宇宙実験を目指して準備中である。本シンポジウムでは、この宇宙実験計画の基礎となるこれまでの我々の研究の概要を述べると共に、宇宙実験計画についても簡単に紹介する。

#### 細胞壁動態の多様性

維管束植物の細胞壁に共通する特徴は、結晶性のセルロース微繊維がその骨格をなしている点である。セルロース微繊維そのものがすでに高分子の会合体であるが、それが更にマトリックス高分子群により網状に架橋され、巨大な超分子構造を形成している。双子葉植物では、キシログルカン、ペクチン、構造タンパク質が主要なマトリックス高分子成分である。同一の植物種の中でも組織の種類すなわち、細胞型毎によって細胞壁構造は異なる。細胞型毎に異なる細胞壁の構造を細胞壁型と呼ぶことにすると、植物体は、組織の種類に応じた多数の細胞壁型を持つことになる。更に、同一細胞型にあっても、その分化段階に伴って、その細胞壁の構造は常時変化し続ける。このように、複雑で、多様で、しかもダイナミックな構造を持つ細胞壁の機能や動態を理解するには、旧来の生化学的な構造解析は非現実的である。そこで、我々は、この複雑系の動態を解明するに当たり、細胞壁の構造そのものの解析ではなく、その構築、再

編に関わるタンパク質をコードする遺伝子群に着目し、それらの包括的な発現・機能解析を通して、この複雑系の解析を進める方法を取ることにした。

### 細胞壁型特異的遺伝子セット仮説

シロイヌナズナでは、ゲノム情報より推定して、2000 種以上のタンパク質が、細胞壁の構築や再編・維持に直接関与していると推定できる。また、植物の細胞壁関連のタンパク質をコードする遺伝子は、いずれも、ファミリーを形成しているのが特徴である。セルロース微繊維を架橋しているマトリックス多糖であるキシログルカン分子の切断と繋ぎ変えを触媒する機能を持つ XTH (エンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素) は、ファミリー全体の解析が最も進んだ細胞壁関連遺伝子群の一つである(Yokoyama and Nishitani 2001, Rose et al. 2002)。この遺伝子ファミリーの発現解析および機能解析により、遺伝子ファミリーの各メンバーが明確な発現組織特異性と機能分担を示すことを我々は明らかにしてきた(Nakamura et al. 2003, Yokoyama and Nishitani 2004, Yokoyama et al. 2004, Vissenberg et al. 2005, Matsui et al. 2005, Osato et al. *in press*)。これらの事実を基にして私たちは、細胞壁遺伝子ファミリーの発現制御一般に関する仮説を数年まえより提唱している (Nishitani 2002)。この仮説の骨子は以下の通りである。

- (1) 植物は数十種類の細胞壁型からなる。
- (2) 細胞壁の構築再編に関わる遺伝子は一般に多数のメンバーを擁するファミリーを形成し、特定の細胞壁型の構築・再編には、その中の特定の数種のメンバーが関与する。
- (3) (2) の遺伝子集合を細胞壁型特異的遺伝子セットと定義する。細胞壁型特異的遺伝子セットの発現を統御する転写制御システムが存在する。
- (4) 同様に他の細胞型の構築には、他の遺伝子セットが存在する。

### 支持組織形成に関わる遺伝子セットの探索

XTH をはじめとする、細胞壁遺伝子ファミリーに関するこれまでの包括的な発現解析の結果は、この遺伝子セットの仮説を支持している。そこで、この仮説を基にして、シロイヌナズナ細胞壁関連遺伝子群の中より、特に重要と考えられる 30 ファミリー、765 遺伝子を選び、それらの遺伝子の発現を識別できる特異的なオリゴ DNA マイクロアレーを独自に設計・製作し、これを用いて、支持組織で発現し、且つ、重力に応答する遺伝子の探索を行った(Imoto et al. 2005, Yokoyama and Nishitani

2006)。

支持組織構築に関わる遺伝子セットの探索には、花茎の中の組織の勾配を利用した。すなわち、花茎は先端から基部にかけ、伸長中の短い細胞からなる伸長域、伸長が終了し、二次壁の沈着など支持組織形成の進む領域へと勾配がみられる。そこで、花茎を区画に分け、それぞれの区画の間で、マイクロアレー法を用いて 765 の遺伝子の発現量を比較した。その結果、花茎に沿った遺伝子の発現パターンは三つのグループに分類することができた。茎頂で発現が高く、基部で低いグループを A、中央部で発現の高いグループを B、茎頂で低く、基部で高いグループを C の遺伝子セットとしてそれぞれを分類した。A, B, C の三つのセットに分類された遺伝子群は、ばらつきはあるものの、概ね全ファミリーに散らばっていた。この結果は、先ほどの細胞壁型遺伝子セット仮説を支持するものである。この内、グループ C 遺伝子セットを支持組織形成に密接に関わる遺伝子群候補とした。

次に、マイクロアレーの結果の信頼性を評価するために、A, B, C の各グループから典型的な遺伝子を選び、定量 RT-PCR の結果と比較した。いずれも、マイクロアレーの結果と致していた。

更に、グループ C の遺伝子が支持組織に関連する遺伝子であることを、検証するために、茎頂の伸長領域 1 cm に印を付け、伸長が停止するまで生育させ、伸長中と伸長停止後の両組織で 765 の遺伝子の発現量をマイクロアレーで比較した。その結果、伸長後に発現が増加する遺伝子として、36 の遺伝子を同定することができた。この 36 の遺伝子を先ほどのグループ C の遺伝子セットと比較したところ、36 遺伝子の内、33 の遺伝子がグループ C の遺伝子と一致することがわかった。この結果を基にして、この 33 種の遺伝子を支持組織形成に関わる確度の高い候補遺伝子セットとした。

### 重力シグナル応答性遺伝子セットの探索

地上で重力加速度を変えるために、花茎を 90° 横転させ、横転により花茎内での mRNA 発現量が変化する遺伝子を同様にマイクロアレー法で調べた。その結果、発現が増加する遺伝子 7 種と発現が減少する遺伝子 19 種を同定した。発現が減少する遺伝子の内、16 種の遺伝子が、先ほどの支持組織形成に関わる候補遺伝子と一致した。すでに述べた通り、支持組織形成に関わる候補遺伝子として同定してきたグループ C 遺伝子群は、いずれも、花茎の基部で高い発現を示した。したがって、今回の結果は、支持組織形成に関わる遺伝子候補の多

くが、花茎を倒すと 30 分以内に mRNA 発現が低下することを示している。

この結果は次のように説明できる。通常の正立状態では、細胞伸長停止後に支持組織構築プログラムが進むはずであったところが、横転により組織にかかる荷重ストレスが変化すると共に、重力屈性反応が開始すると、そのプログラムが停止し、支持組織形成とは逆に、組織の可塑性を増加させるプログラムへと、細胞壁動態モードが切り替えられたと考えれば、この現象を矛盾なく説明できる。また、この結果は、花茎の重力応答性に関わる遺伝子の多くが、支持組織形成に関わる候補遺伝子であることをも示している。以上の結果より、この 16 遺伝子を、重力の制御を受け、支持組織形成に関わる遺伝子候補と結論した (Yokoyama and Nishitani *in press*)。

今回我々が同定した 16 の遺伝子候補のなかには、花茎の二次壁肥厚に必須の遺伝子として、すでに同定されていた重要な遺伝子、KORRIGAN (Nicol et al. 1998, Szyjanowicz et al. 2004) や CesA 遺伝子 (Taylor et al. 2003, Turner and Somerville 1997), CTL2 (Zong et al. 2002) が含まれていた。このことは、本研究のスクリーニングがこれら重要な遺伝子を逃していないことを示すものである。一方、それら以外の遺伝子については、その機能は未解明の機能未知の遺伝子であった。

これら機能未解明の遺伝子については、現在、その発現および機能解析の両面から解析を進めているところである。その中の 1 つについては、遺伝子の欠損変異体では、花茎が立ち上がらず、また、道管形成不全をおこしていることを明らかにしている。したがって、この遺伝子の産物は花茎を維持する上で必須の機能を担うと考えられる。その詳細については、現在解析を進めているところである。

## 結論

以上、重力の制御を受けながら、支持組織構築に関わる細胞壁関連遺伝子セット候補として、16 数種の遺伝子を特定した。その中には、すでに、支持組織構築に関わる既知の遺伝子が 4 種含まれていたが、その他の 12 の遺伝子は機能未解明の遺伝子であった。これらの遺伝子セットの発現制御は、重力に起因するシグナルと支持組織形成に関わる様々なシグナルの統合を経て、転写制御の過程で発現制御が行われると推測される。したがって、これらの遺伝子群の転写制御を手がかりにして、この遺伝子セットの発現を統括する分子機構の手

がかりを得ることが期待できる。

通道組織や支持組織が維管束植物のボディープランの文字通り根幹を成す部分であるとするれば、今回同定した遺伝子セットの転写を統括する制御システムの分子解剖を通して、維管束植物が陸上の 1 g 重力環境に適応する際に獲得してきた、植物独自の形態形成の仕組みの解明の糸口が得られる筈である。宇宙実験ではこのテーマの解明をめざし、その基盤となる細胞壁型特異的遺伝子セット仮説の検証を目指す。

## 参考文献

- Imoto K, Yokoyama R, Nishitani K: Comprehensive approach to genes involved in cell wall modifications in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **58**, 177 (2005).
- Matsui A, Yokoyama R, Seki M, Ito T, Shinozaki K, Takahashi T, Komeda Y, Nishitani K: AtXTH27 plays an essential role in cell wall modification during the development of tracheary elements. *Plant J* **42**, 525 (2005)
- Nakamura T, Yokoyama R, Tomita E, Nishitani K (2003) Two azuki bean XTH genes, VaXTH1 and VaXTH2, with similar tissue-specific expression profiles, are differently regulated by auxin. *Plant Cell Physiol* **44**, 16-24
- Nicol F, His I, Jauneau A, Vernhettes S, Canut H, Hofte H: A plasma membrane-bound putative endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *EMBO J* **17**, 5563 (1998)
- Nishitani K: A genome-based approach to study the mechanisms by which cell-wall type is defined and constructed by the collaborative actions of cell-wall-related enzymes. *J Plant Res* **115**, 303 (2002)
- Osato Y, Yokoyama R, Nishitani K.: A principal role for AtXTH18 in *Arabidopsis* root growth – a functional analysis using RNAi plants. *J Plant Res*. **119**, (*in press*)
- Rose JKC, Braam J, Fry SC, Nishitani K: The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylase and endohydrolysis, current perspectives and new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol* **43**, 1421 (2002)
- Szyjanowicz P, McKinnon I, Taylor NG, Gardiner J, Jarvis M, Turner S: The irregular xylem 2 mutant is an allele of *korrigan* that affects the secondary cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **37**, 730 (2004)
- Taylor NG, Howells RM, Huttly AK, Vickers K,

- Turner SR: Interactions among three distinct Cesa proteins essential for cellulose synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 1450 (2003)
- Turner SR, Somerville CR: Collapsed xylem phenotype of *Arabidopsis* identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. *Plant Cell* **9**, 689 (1997)
- Vissenberg K, Oyama M, Osato Y, Yokoyama R, Verbelen J-P, Nishitani K: Differential expression of AtXTH17, AtXTH18, AtXTH19 and AtXTH20 genes in *Arabidopsis* roots. physiological roles in specification in cell wall construction. *Plant Cell Physiol* **46**, 192 (2005)
- Yokoyama R, Nishitani K: A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **42**, 1025 (2001).
- Yokoyama R, Nishitani K: Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **45**, 1111 (2004).
- Yokoyama R, Nishitani K: Identification and Characterization of *Arabidopsis thaliana* genes involved in xylem secondary cell walls. *J Plant Res* **119**, (2006) in press
- Yokoyama R, Rose JKC, Nishitani K: A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis. *Plant Physiol* **134**, 1088 (2004)
- Zhong R, Kays SJ, Schroeder BP, Ye ZH: Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene. *Plant Cell* **14**, 165 (2002)