

【研究報告】

植物のCa²⁺チャネルによるシグナル伝達と重力感受性との関係

小山里実・渡邊博之

要約

重力屈性が生じるまでには三つの段階があり、はじめに重力刺激の受容、次にシグナルの伝達、最終的に受容した刺激に対する応答が起こる。重力刺激のセカンドメッセンジャーとしてCa²⁺が候補とされていることから、植物のCa²⁺チャネルによるシグナル伝達と重力感受性の関係を考察した。本研究では、3-Dクリノスタットによる疑似微小重力下でのシロイヌナズナ野生株およびCa²⁺透過性機械受容チャネル欠損株の形態を比較した。まず受容段階として根冠コルメラ細胞の顕微鏡観察を行い、重力受容に関連するアミロプラストを確認した。また、重力刺激の応答として形態形成を画像解析したところ、疑似微小重力下における根の屈曲が観察された。野生株は、地上1G条件下と比較し、屈曲角度が疑似微小重力下で高い値を示した。変異株の屈曲角度の平均値は、全ての測定項目において疑似微小重力下で野生株よりも低い値を示すことが確認された。両者の違いは、細胞質Ca²⁺濃度の差であると推測され、重力受容から応答に至るまでのシグナル伝達過程におけるCa²⁺の関与が示唆された。

キーワード：3-Dクリノスタット、微小重力、Ca²⁺透過性機械受容チャネル、シロイヌナズナ、アミロプラスト、重力屈性

緒言

植物は、地球上で環境要因の影響を受けながら成長しており、物理的な刺激の感受や応答機構を備えている。環境要因には光や水分、温度などがあるが、中でも重力は常に一定の条件で植物に影響を及ぼし続けてきた特殊な環境要因である。重力の方向と大きさは安定したものであり、植物は形態形成のために最も信頼できるシグナルとして重力を利用する能力を発達させてきた。地球の1G条件下で進化してきた植物は、重力の方向を基準として成長方向を制御しており、根を重力の方向に、莖葉を重力と反対方向に伸長させる（唐原ら, 2010）。これは重力屈性と呼ばれており、屈性反応が生じるまでには三つの段階があるといわれている。はじめに重力刺激の受容、次にシグナルの伝達、最終的に受容した刺激に対する応答が起こる。

第一段階の重力刺激の受容は、根冠のコルメラ細胞に存在するアミロプラストが重力方向に移動することにより行われると考えられている。高等植物における根の先端部分の根冠は、縦方向に四層の層構造をなしているコルメラ細胞および周辺に存在する周辺根冠細胞から構成

されている（森田ら, 2003）。デンプンを蓄積した色素体であるアミロプラストは、周囲の細胞質より比重が大きく、コルメラ細胞や維管束内皮細胞では重力方向に局在している。また、根冠を取り除くと重力屈性能が失われたことから（桜井ら, 2008）、根冠が重力感受に関わること、アミロプラストが重力センサーとして機能していることが古くから示されている（デンプン平衡石説）。

第二段階のシグナルの伝達では、イオンチャネルの関与が示唆されている。Ca²⁺がセカンドメッセンジャーの候補とされているが、実際にどのように刺激伝達を介するかについては明らかにされていない（豊田, 2002）。

第三段階の刺激応答は、器官において植物ホルモンであるオーキシンの分布が変化し、植物の成長方向が制御されると考えられる。重力ベクトルの方向に応じてオーキシンが輸送され、偏差的な伸長成長により屈曲が起こることが明らかにされている（保尊, 2005）。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、接合フェロモン α -因子の作用により分化する際に、Ca²⁺流入欠乏が起こると致死することが知られている（小島ら, 2000）。Ca²⁺透過性伸展活性化チャネルを欠損した酵母 *mid1* (mating-pheromone induced death 1) 変異体の接合時の

致死性を相補する遺伝子として、シロイヌナズナから *MCA1* (*mid1-complementing activity 1*) が単離された。酵母 *mid1* 変異体において、シロイヌナズナ *MCA1* を発現した際に Ca^{2+} 取り込みが増加し、致死性が相補されることが実証されている (Nakagawa *et al.*, 2007; Yamanaka *et al.*, 2010)。重力、接触などの物理的な刺激は機械刺激と呼ばれ、その受容体の一つに Ca^{2+} 透過性機械受容チャネルがある。*MCA1* とそのアミノ酸配列上 73% 相同性を持つ *MCA2* は、 Ca^{2+} 透過性の機械受容チャネル (mechanosensitive channel: MSチャネル) であると報告されており、シロイヌナズナの機械受容と Ca^{2+} 流入に関連している。

植物は微小重力下で特殊な形態形成を行い、伸長成長に対する重力の影響は植物の種類や器官の違いにより異なる。重力や光といった環境刺激がない場合の屈曲反応は、自発的形態形成と呼ばれている (上田ら, 2012)。宇宙の微小重力下環境で行われた NASA の実験では、植物本来の自発的形態形成が確認された (Hoson *et al.*, 1999)。重力が異なる環境下で植物がどのように形態形成を制御しているかを明らかにすることは、将来の長期宇宙滞在における植物栽培に必須であり、宇宙空間利用および食料生産に繋がっていくと推測される。

本研究では、植物における疑似的な宇宙の微小重力環境を形成する 3-D クリノスタットを用いて、シロイヌナズナの野生株と Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル欠損株の重力感受性を比較することにより、重力刺激のシグナル伝達と Ca^{2+} の関係を考察した。

材料および方法

1. 供試植物

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生株 Col-0 (Columbia-0) および Ca^{2+} 透過性機械受容チャネルを欠損した変異株である *mca1* 欠損株、*mca2* 欠損株、*mca1 mca2* 二重欠損株を用いた。変異株は、東京学芸大学の飯田秀利教授に提供して頂いた。

2. 植物培養方法

種子滅菌後のシロイヌナズナ種子を滅菌水の入ったマイクロチューブに入れ、3日間、暗処理および低温処理 (4℃) し、1/2MS培地に無菌播種した。本研究では根の生育を観察するため、寒天よりも透明度の高いゼランガムを 3 g/L の濃度で用いた。実験容器としてマジエンタボックスを使用し、培地の高さは 6 cm に設定した。

画像解析が行えるように、一つのマジエンタボックス (60 × 60 × 100 mm) に対して 5 粒を間隔をあけて播種した。操作はクリーンベンチ内で行い、マイクロピペット用チップを用いて 1 粒ずつ無菌播種した。

供試植物の培養条件は、栽培日数 8 日間、温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、24 時間連続照射、光強度 $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、光質は赤青 LED 混合照射 (1:1) とし、疑似微小重力下と地上 1G 下で比較した。両試験区とも、3-D クリノスタット内において生育させた (図 1)。

植物における疑似的な微小重力環境は、3-D クリノスタットを用いて植物体に働く重力の方向を連続的に変化させることにより作り出した。植物が動物よりも重力刺激の受容に時間を要することを利用し、植物が重力刺激を受容する前に方向を変化させ、植物に微小重力環境と認識させた (渡邊ら, 2006)。直交した 2 軸により試料ボックスを 3 次元的に回転することが可能なため、横軸と縦軸の各モーターを独立して、内側フレームモーター回転速度 0.4 rpm、試料ボックスモーター回転速度 0.8 rpm に調節した。

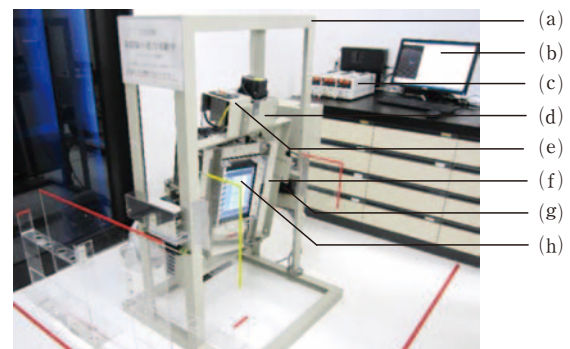


図 1 3-D クリノスタットの構造

- (a) 外側フレーム (固定部)
- (b) 重力加速度モニタリング PC
- (c) DC 電源 (空冷ファン、赤色 LED、青色 LED)
- (d) 内側フレーム (回転部)
- (e) 内側フレーム調整モーターとスピードコントローラー
- (f) 試料ボックス (内部にマジエンタボックスを固定)
- (g) 試料ボックス調整モーターとスピードコントローラー
- (h) 超小型カメラ画像通信タブレット

本研究で用いた 3-D クリノスタットにおける微小重力条件の形成確認は、重力センサー (ZMP 社 6 軸モーショセンサー IMU-Z Lite) を用いた。3 軸加速度センサー、3 軸ジャイロセンサーを搭載しており、X 軸、Y 軸、Z 軸の重力加速度を計測した。培養期間内の重力変化は、スリップリングを通じて接続した PC 上でモニタリングした。重力センサーは、試料ボックス内の供試植物の固定

板中央上部に設置し、重力加速度の測定は1秒間に10回(100 ms) 間隔で行った(図2)。疑似微小重力区での重力加速度の時間平均値は、X軸0.0005G、Y軸-0.0076G、Z軸-0.0056Gで植物における疑似的な微小重力条件を作り出した。上記の条件で実験後、供試植物の根を顕微鏡観察および画像解析し、重力刺激の受容としてアミロプラストの観察、重力応答として形態形成(根の伸長・重力屈性)の解析をした。

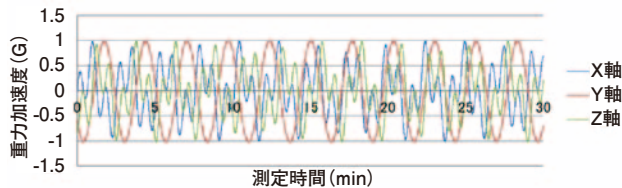


図2 重力加速度の経時変化

3. 蛍光灯区と赤青LED区の生育比較

本研究では、植物培養光源としてLEDを用いたため、蛍光灯区と赤青LED(1:1)混合照射区との生育比較試験を行った。栽培日数8日間、光強度 $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の条件下でチャンバー内において培養した。撮影した画像から、画像処理ソフトImageJを用いて供試植物の根長解析を行った。

4. アミロプラスト観察

供試植物の根を脱気固定し、組織の透明化、ルゴール染色、顕微鏡観察を行った。まず供試植物の根端部を切り取り、バイアル瓶に入った固定液(エタノール:酢酸=9:1)に浸した。試料をデシケーターに移し、真空ポンプで2時間30分脱気をすることで根を固定した。固定液を除いて90%、70%、50%、30%エタノールを各20分ずつ順次入れ替えた。試料を純水で軽くリンスしてから透明化液(抱水クロラル 8 g、グリセロール 1 mL、蒸留水 2 mL)を加えた。24時間処理後の試料をルゴール液に2分間浸して染色した。スライドガラス上に根端部を移し、透明化液を数滴落としてからカバーガラスをかけ、顕微鏡観察した。

5. 疑似微小重力下での根の伸長・重力屈性の評価

重力刺激の応答として形態形成(根の伸長・重力屈性)を画像解析した。根の伸長は、微小重力下で8日間生育したものと、コントロールとして地上1G下で8日間生育した供試植物の根長を比較した。重力屈性における微小重力処理区は、6日間疑似微小重力下(μG)で生育後、

地上1G下において2日間培養したものと定義した。コントロールである地上1G区は、3-Dクリノスタット内において8日間1G条件下で培養したものとした。供試植物の撮影は、6日後と8日後に試料ボックスから取り出して行い、途中経過は超小型カメラにおけるインターバル撮影によって確認した。疑似微小重力下および地上1G下におけるシロイヌナズナ野生株Col-0、 Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル変異体*mca1*欠損株、*mca2*欠損株、*mca1 mca2*二重欠損株の根長と重力屈性を画像処理ソフトImageJを用いて解析した。重力屈性の測定項目は、シロイヌナズナの基底領域(株元)における屈曲角度(図3-(a))、疑似微小重力下で生じた屈曲角度(図3-(b))、疑似微小重力下から地上1G下へ変化後の屈曲角度(図3-(c))、最大屈曲角度(図3-(d))である。屈曲角度は、ImageJを用いて測定した角度(角度(b)、(c))を、重力方向に向かって真直ぐ生育した場合の角度 180° から引いた値とした。最大屈曲角度は、種子に対して垂直なベスライン(直線L)の間の最大角度と定義した。

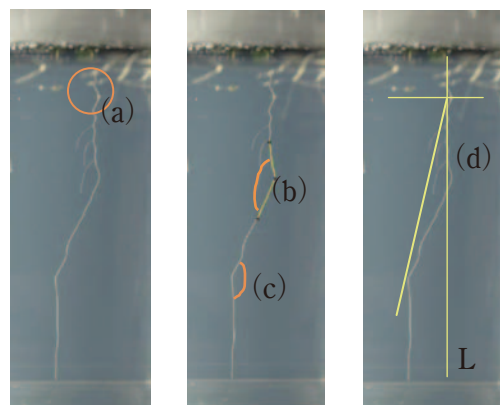


図3 根の屈曲角度の測定値の定義

(微小重力処理区の根: μG 6日間 + 1G 2日間)

- (a) 基底領域
- (b) 微小重力下で生じた屈曲角度
- (c) 疑似微小重力下から地上1G下へ変化後の屈曲角度
- (d) 最大屈曲角度

結果

1. 蛍光灯区と赤青LED区の生育比較

本研究では、植物培養光源として赤青LED(1:1)を用いたため、蛍光灯区との生育比較を行った。地上1G下のチャンバー内で8日間生育した根長を、画像処理ソフトImageJを用いて測定した結果を以下に示した(図4)。各光処理区において、野生株および*mca1*欠損株、二重欠損株で根長に有意な差は示されなかったが、

*mca2*欠損株では蛍光灯区 (FL)・赤青混合区 (RB) の異なる光質下で根の伸長に有意な差を示した。統計処理は多重比較法である Tukey-Kramer 検定を用いて分析した。

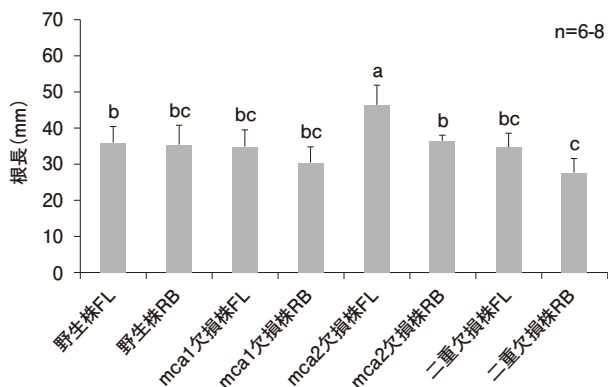


図4 野生株および変異株の各光処理区の根長
Tukey-Kramer 検定；異なる英字間は有意差を示す ($p < 0.05$)

2. アミロプラスト観察

重力刺激の受容段階における差異を調べるために、アミロプラストの顕微鏡観察を行った。6日間、地上1G下で生育させた野生株、*mca1*欠損株、*mca2*欠損株、二重欠損株における根冠の観察 (図5) および疑似微小重力下で生育した野生株のアミロプラスト観察 (図6) を行った。疑似微小重力下で生育した野生株における根の観察は、重力1Gを受けた際に生じるアミロプラスト分布の変化を考慮して、アミロプラスト観察法のルゴール染色から行い、数分以内に処理を行った。顕微鏡観察結果を以下に示した。

重力受容に関与するアミロプラストが、野生株および変異株の根冠コルメラ細胞内に存在していることが確認された (図5)。地上1G下で生育した野生株は、アミロプラストが細胞内で重力方向に局在しているが、疑似微

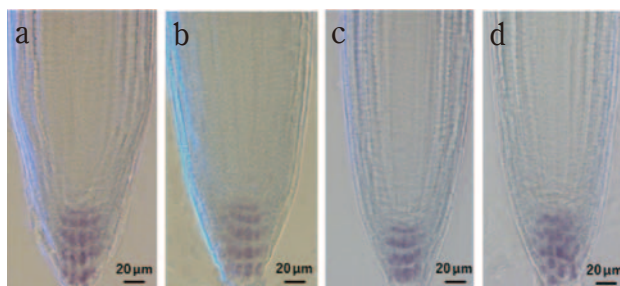


図5 1G下で生育した野生株と変異株の根冠アミロプラストの分布

a: 野生株 b: *mca1*欠損株 c: *mca2*欠損株 d: 二重欠損株

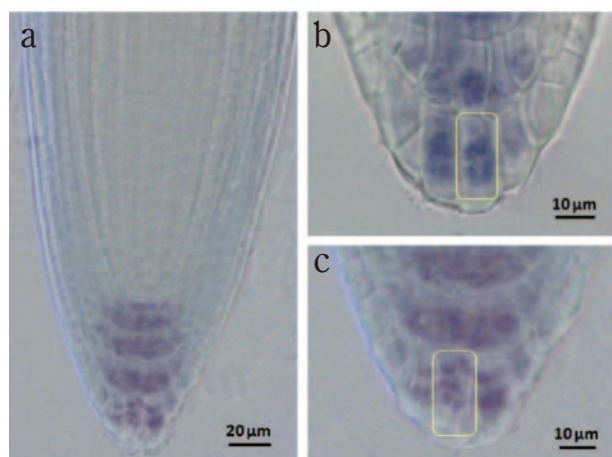


図6 疑似微小重力下と1G下で生育した野生株の根冠アミロプラストの分布

a: 疑似微小重力下で生育した野生株の根冠

b: 重力方向に局在している1G下で生育した根のアミロプラスト

c: 分散分布した微小重力下で生育した根のアミロプラスト

小重力下で生育した野生株では細胞上部にもアミロプラストが存在しており、分散分布が観察された (図6)。

3. 疑似微小重力下での根の伸長・重力屈性の評価

3-1. 根の伸長

重力刺激の応答として形態形成 (根の伸長) を解析した。画像処理ソフト ImageJ を用いて、根長を測定した結果を図7に示した。赤青LED混合照射 (1:1) 下での生育8日後に、試料ボックスから取り出して撮影した画像を用いて解析を行った。疑似微小重力下 (μG)・地上1G条件下で生育した野生株および Ca^{2+} 透過性機械受容チャネルを欠損している *mca1*欠損株、*mca2*欠損株、二重欠損株において、根長の有意な差は認められなかった。

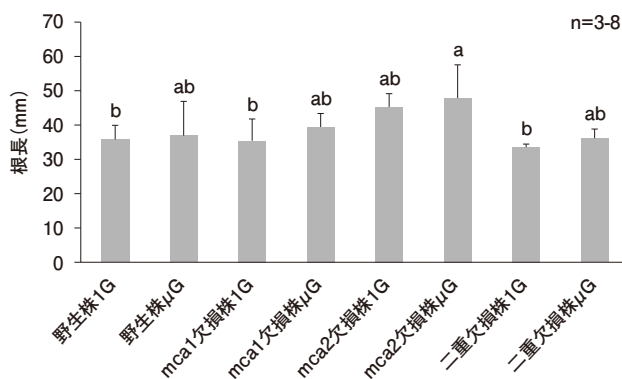


図7 疑似微小重力下および1G下における根長

Tukey-Kramer 検定；異なる英字間は有意差を示す ($p < 0.05$)

3-2. 重力屈性

受容した重力刺激の応答として生じる重力屈性を解析した。疑似微小重力下 (μG)・地上1G下における供試植物の根の屈曲角度を画像処理ソフトImageJを用いて測定した。測定項目は、基底領域における屈曲角度、疑似微小重力下で生じた屈曲角度、疑似微小重力下から地上1G下へ変化後の屈曲角度、最大屈曲角度である。

基底領域における屈曲角度を以下に示した (図8)。地上1G区と比較して、疑似微小重力処理区でのシロイヌナズナ野生株の基底領域における屈曲角度が有意に高い値を示した。

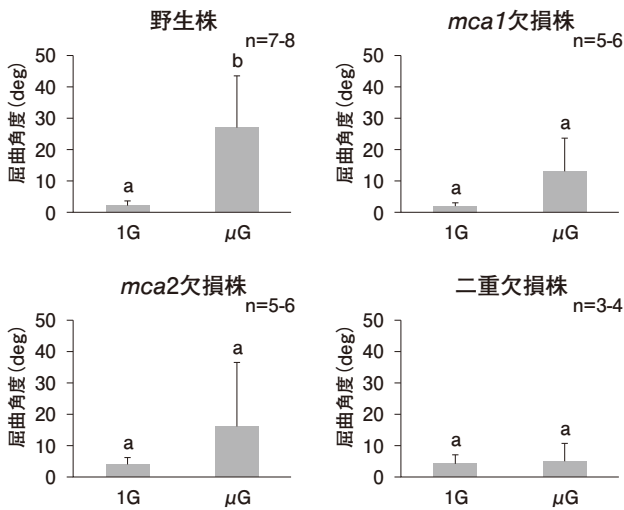


図8 基底領域の屈曲角度

Tukey-Kramer検定；異なる英字間は有意差を示す ($p < 0.05$)

疑似微小重力下で生じた根の屈曲を以下に示した (図9)。疑似微小重力処理区での屈曲角度をコントロールである地上1G区と比較した結果、野生株および*mca1*欠損株において有意に高い値を示した。

疑似微小重力下から地上1G下に変化後の屈曲角度を解析した (図10)。統計処理より、各供試植物において有意な差は検出されなかったが、 Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル欠損株と比較して野生株の平均屈曲角度が高い傾向が示された。

最大屈曲角度の測定結果を以下に示した (図11)。疑似微小重力処理区での生育を地上1G区と比較した結果、野生株の最大屈曲角度が有意に高い値を示した。

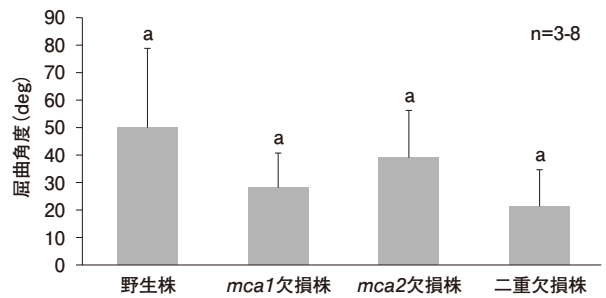


図10 疑似微小重力下から1G下に変化後の屈性

Tukey-Kramer検定；異なる英字間は有意差を示す ($p < 0.05$)

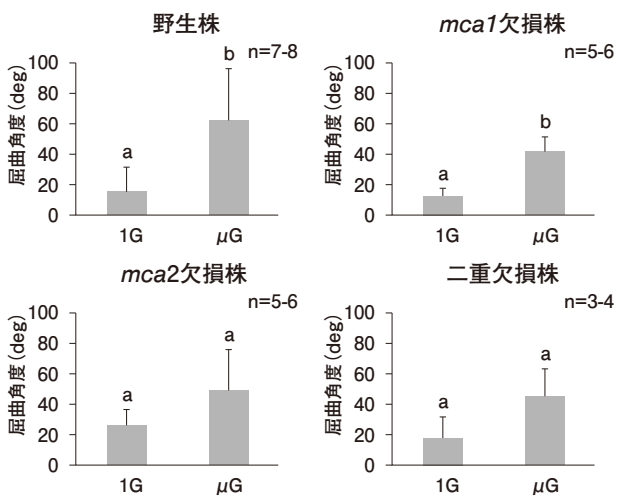


図9 疑似微小重力下の屈曲角度

Tukey-Kramer検定；異なる英字間は有意差を示す ($p < 0.05$)

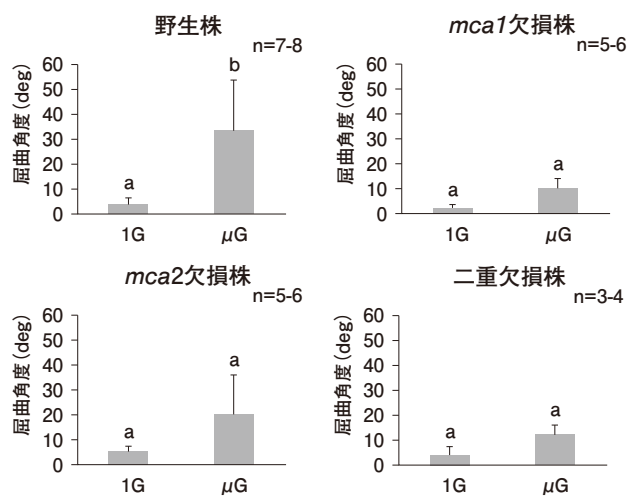


図11 最大屈曲角度の比較

Tukey-Kramer検定；異なる英字間は有意差を示す ($p < 0.05$)

考察

1. 蛍光灯区と赤青LED区の生育比較

植物培養光源として蛍光灯・赤青LED混合照射(1:1)との生育比較を地上1G下で行った結果、野生株および *mca1* 欠損株、二重欠損株では光質による根の生育に有意な差は検出されなかったのに対し、*mca2* 欠損株において蛍光灯区・赤青混合区との間で生育に有意差が生じたことから、光質が根の伸長に影響を及ぼすことが示された(図4)。

植物にとって光は、生命を維持する上で重要な環境要因の一つであり、植物の生育や物質生産には光の波長が関連することが知られている。植物は光刺激を受容し、受けた光の強度や方向、波長などによって形態を調節して環境の変化に適応している。これは光形態形成と称され、光の吸収における応答は、光受容体が起点であると考えられている。植物の光受容体は、赤色光と遠赤色光を吸収するフィトクロム、青色光を吸収するクリプトクロムとフォトトロピンがある。これらは色素蛋白質であり、光の吸収により活性化されて情報を下流の因子に伝えている(長谷, 2002)。

本実験において *mca2* 欠損株の根の伸長に差が生じたことから、供試植物間における光受容体フィトクロム、クリプトクロム、フォトトロピンの感受性が異なると考えられる。また、蛍光灯区・赤青LED区の根長を比較すると、野生株は同様な値を示したのに対し、変異株は全て赤青LED区で低い値を示している。統計処理により有意な差は検出されなかったが、*mca1* 欠損株、二重欠損株において、*mca2* 欠損株と同様に根の伸長抑制傾向が見受けられたことから、赤色光および青色光が形態形成に影響を与えた可能性が考えられる。

2. アミロプラスト観察

重力刺激の受容段階に差異があるかを調べるために、アミロプラストの顕微鏡観察を行った結果、野生株および変異株においてアミロプラストが根冠コルメラ細胞内に存在することが確認された。野生株および変異株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、地上1G下では重力方向に局在していた(図5、図6-b)。シロイヌナズナ *pgm* 変異体は、遺伝子変異から色素体内にデンプンを蓄積することができないため、アミロプラストが十分に細胞の下部へ沈降せず、根と地上部の重力屈性能は低下することが報告されているが(高橋ら, 2012)、本研究で用いた Ca^{2+} 透過性機械受容チャ

ネル欠損株において、重力感受に必要なアミロプラストが観察されたことから、野生株と同様に重力刺激を受容していることが推測された。

また、地上1G下で生育した野生株はアミロプラストが細胞内で重力方向に局在しているのに対し、疑似微小重力下で分散分布が観察された(図6-a、図6-c)。この結果は疑似微小重力下で成長したトウモロコシ根のアミロプラストの動態(早津ら, 2009)と類似していた。アミロプラストは、高密度のデンプン粒を蓄積しており、周囲の細胞質より比重が高いため、重力方向の変化に伴って移動したといえる。アミロプラストが重力方向に沈降することにより重力刺激を受容され、認識した情報が伝達因子を介して下流に伝わると考えられる。

3. 画像解析(根の伸長・重力屈性)

3-1. 根の伸長

重力感受の最終段階である刺激応答における形態形成として根長解析した結果、疑似微小重力下と地上1G下で生育した野生株および Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル欠損株において有意な差は示されなかった(図7)。宇宙の微小重力下で約3日間生育したイネ幼葉鞘およびシロイヌナズナ胚軸において、細胞壁強度が減少したことにより細胞伸長が促進された報告(Hoson *et al.*, 1999)があることから、微小重力処理時間内における成長速度が生育の段階によって異なっているとも考えられる。そのため、時間軸による根の伸長成長の変化を求める必要があるといえる。根長の有意な差は検出されなかったが、微小重力環境下で細胞壁の伸展性が高くなることにより伸長成長が促進された器官の例が報告されていること(保尊ら, 2012)、本研究における疑似微小重力下で生育した根は地上1G下で生育したものよりも根長の平均値がやや高い値を示し(図7)、全ての供試植物において疑似微小重力下での根長が1G下より下回っているものがなかったことから、疑似微小重力下でシロイヌナズナの根における伸長が促進される傾向があるかもしれない。

3-2. 重力屈性

重力刺激の応答として重力屈性を解析した結果、シロイヌナズナ野生株では、疑似微小重力下において根の屈曲が観察された。野生株は、地上1G条件下・疑似微小重力条件下の異なる重力下に応じて形態を変化させることが確認されたが、変異株では有意な差が確認されなかった(図8、図11)。 Ca^{2+} 透過性機械受容チャネル変異株は、基底領域における屈曲角度、疑似微小重力下で生

じた屈曲角度、疑似微小重力下から地上1G下へ変化後の屈曲角度、最大屈曲角度の全ての測定項目について、疑似微小重力処理区で野生株よりも低い値を示した。変異株は疑似微小重力下と地上1G下との間に有意な差を示さなかったことから、Ca²⁺透過性機械受容チャネル欠損株では疑似微小重力環境を認識しにくいと考えられる。

変異株間の屈曲角度を比較すると、疑似微小重力下での *mca2* 欠損株の値が高いように思われるが、*mca2* 欠損株は地上1G条件下においても屈曲が観察されたことから変化としては低いことがいえる。変異株間の比較をするにあたって、その遺伝子産物についてはこれまでに以下の内容が報告されている。

シロイヌナズナ *MCA1* および *MCA2* はパラログであり、アミノ酸配列上73%の相同性を持つ。両者は共通の構造上の特徴（N-halfの推定上の制御領域、EF-hand-likeモチーフ、coiled-coilモチーフ、PLAC8モチーフ、システインリッチ領域、膜貫通セグメント）をもっており、Ca²⁺流入を担うチャンネルをコードする遺伝子であることが確認されている (Nakagawa *et al.*, 2007)。また、放射性⁴⁵Caを用いた試験などから、細胞内におけるCa²⁺蓄積量が測定されており、*MCA2*は*MCA1*と比較してCa²⁺取り込み活性が高いと推測されている。そのため、シロイヌナズナ *mca2* 欠損株では、*mca1* 欠損株よりもCa²⁺流入が弱くなっていると考えられる。二重欠損株のCa²⁺取り込み活性は、シロイヌナズナの根において *mca2* 欠損株と同様な値を示したことが報告されている (Yamanaka *et al.*, 2010)。

本研究において重力屈性を解析した結果、疑似微小重力下で生じた屈曲角度は、野生株および *mca1* 欠損株のみ、地上1G条件下と比較して有意に高い値を示した (図9)。*mca2* 欠損株および二重欠損株では有意差を示さなかったことから、Ca²⁺取り込みが弱いため重力情報を認識しにくい可能性が考えられる。重力屈性の結果(図9)から、疑似微小重力下における屈曲角度は、Ca²⁺の取り込み量に関連することが示唆された。

野生株およびCa²⁺透過性機械受容チャネル欠損株ともに、重力受容に関与するアミロプラストの動態が確認されたことから、受容と応答の間、つまり、重力受容後のシグナル伝達過程が異なると考えられる。野生株と変異株の屈曲角度の違いは、細胞質Ca²⁺濃度の差であると推測され、変異株ではCa²⁺取り込みが弱くなっているため重力情報が伝達されにくいといえる。したがって、Ca²⁺が重力刺激のセカンドメッセンジャーを担っていることが推測され、シグナル伝達におけるCa²⁺の関与が

示唆された。

総合考察

重力屈性が生じるまでには、重力刺激の受容、シグナルの伝達、受容した刺激に対する応答の三つの過程に分けられる。重力受容には根冠コルメラ細胞内に存在するアミロプラストが関与し、最後の応答過程には植物ホルモンであるオーキシンが影響している。そして、両者をつなぐシグナル伝達機構の解明が、重力屈性および植物の重力感受性を理解する上で必要となる。本研究では、植物のCa²⁺チャネルによるシグナル伝達と重力感受性との関係について考察するため、重力受容としてアミロプラストの観察および刺激応答として形態形成の解析を行った。シロイヌナズナ野生株とCa²⁺透過性機械受容チャネル欠損株における、疑似微小重力下および地上1G下での形態を比較した結果、有意な差が示された。野生株は地上1G下と比較し、疑似微小重力下での屈曲角度が有意に高い値を示した。一方、重力の異なる環境下で生育した *mca1* 欠損株、*mca2* 欠損株、二重欠損株の形態において、屈性の変化が生じにくかったことからCa²⁺の取り込みが弱くなっている変異株では、重力刺激のシグナルが伝わりにくい傾向があることが示唆された。顕微鏡観察よりアミロプラストの動態が確認されたことから、重力感受の段階においては野生株と変異株に差はなく、刺激応答における屈曲が生じるまで(シグナル伝達過程)が異なっていると考えられる。

重力受容から刺激応答に至るまでの過程を次のように考察した。植物の根冠において重力を感知しているアミロプラストは、重力方向にしたがってアクチンフィラメントと相互作用しながら細胞内を移動することが報告 (高橋ら, 2012) されており、コルメラ細胞内で、アクチンフィラメントに取り囲まれている様子が観察されている。また、根冠の平衡細胞の底面近くに小胞体が多く存在し、小胞体に沈降したアミロプラストが接触することが示されており (横田, 1999)、小胞体が関与したCa²⁺濃度変化が起こると考えられている (中村ら, 2009)。第一段階の重力刺激の受容において、まずアミロプラストが重力方向へ沈降することにより、Ca²⁺貯蔵器官である小胞体が圧迫され、Ca²⁺が放出する (幸田ら, 2003)。また、細胞核を定位置に保持している細胞骨格のアクチンフィラメントが重力方向に引っ張られる (駒嶺, 2002) ことにより、細胞膜上のイオンチャンネルが伸展したと考えられる。細胞膜上の機械刺激受容体がア

クチンフィラメントと連結している報告がある(森田ら, 2002)。この結果、細胞膜に存在するCa²⁺透過性伸展活性化チャネルからCa²⁺流入が起こる。本研究では、供試植物としてCa²⁺透過性機械受容チャネルを欠損した *mca1*欠損株、*mca2*欠損株、*mca1 mca2*二重欠損株を用いた。Ca²⁺透過性機械受容チャネルは、重力刺激や接触刺激などの物理的な刺激を感受し、細胞膜の伸展によってCa²⁺の流入を許容する伸展活性化チャネル(stretch-activated channel: SAチャネル)である。したがって、細胞膜上で膜伸展にตอบสนองして開口し、細胞内にCa²⁺が取り込まれた結果、イオン性シグナルが細胞質Ca²⁺の増加に伴って伝達され、応答に至るといふ仕組みであると推測される。

通常、細胞質Ca²⁺濃度は10–100 nM程度に維持され、細胞外Ca²⁺濃度はmMレベルであることから、細胞膜内外では数万倍程度のCa²⁺濃度勾配が存在する(濱田ら, 2010)。植物細胞体積の大部分をしめる液胞および小胞体は、細胞外と同等のCa²⁺濃度であることが知られており、Ca²⁺貯蔵庫として機能している。このように、植物の細胞質内Ca²⁺濃度は常に低く保たれているが、アミロプラストが重力方向に沈殿して、小胞体およびアクチン細胞骨格を刺激したことにより、細胞内のCa²⁺貯蔵小器官である小胞体からの放出、Ca²⁺チャネルによる細胞外からの流入が生じ、一過的に濃度が上昇したと考えられる。Ca²⁺は動植物に共通するセカンドメッセンジャーであり、多くの生物種でシグナル伝達に関与することが報告されている(駒嶺, 2002)。本研究の結果から、重力刺激においてもCa²⁺は感受後の情報伝達因子ではないかと考えられる。

シグナル伝達後の屈曲に関与するオーキシンは、茎頂分裂組織や若い葉で合成され、根の方向に向かって極性移動を示す。根において、オーキシンは中心柱を通り先端部に送られ、そこから地上部に向かって皮層細胞を移動する。重力刺激によりオーキシンの濃度勾配が生じ(上田ら, 2003)、その結果、オーキシン極性移動が起こり、不均等分布による偏差成長としての屈曲が生じたと考えられる。植物の器官によりオーキシンの感受性は異なることが知られている。茎や胚軸では、オーキシン感受性が低いことから、上昇した高濃度側で細胞伸長を促進するのに至適なオーキシン濃度となる。一方、根では感受性が高いため高濃度側ではオーキシン過剰となり、細胞伸長が阻害される。そのため、地上部と根において反対方向に屈曲が起こることが報告されている(塩井ら, 2009)。本研究では、根における屈曲を解析した。重力

受容によって伝達された重力刺激によりオーキシン濃度勾配が生じ(山本ら, 2002)、低濃度側で伸長成長が促進され、高濃度側で伸長成長抑制されたことが示唆される。したがって、屈曲方向の内側でオーキシン濃度が高く、外側でオーキシン濃度が低かったため、偏差成長を引き起こして屈曲したと考えられる。

本研究では、シロイヌナズナ野生株およびCa²⁺透過性機械受容チャネルを欠損した変異株を用いて植物の重力感受性について解析を行った。疑似微小重力下での重力受容および受容した刺激に対する応答を観察した結果、重力刺激の伝達にCa²⁺チャネルの活性化が関わっていることが推測された。重力屈性におけるシグナル伝達過程の詳細については、まだ未解明な点が多く残されているが、上記に示した理由から、重力受容から応答に至るまでのシグナル伝達過程におけるCa²⁺の関与が示唆された。

謝辞

シロイヌナズナ変異株を提供して頂いた東京学芸大学飯田秀利教授(現名誉教授)、研究の取り進めに協力頂いた玉川学園高学年森研堂教諭、装置構築に協力頂いた学術研究所前特別研究員布施政好氏に深く感謝の意を表す。

引用文献

- 濱田晴康, 来須孝光, 朽津和幸(2010) 植物のシグナル伝達—分子と応答. 共立出版株式会社: 105
- 長谷あきら(2002) 植物の光受容体とシグナル伝達, 蛋白質核酸酵素 47, 12: 1700–1704
- 早津学, 小野真菜美, 伊豆川朋子, 堀川夏呼, 堀田道子, 笹本浜子, 鈴木季直(2009) トウモロコシ根の重力応答に伴うCaイオン動態の解析. Science Journal of Kanagawa University, 20: 57–64
- Hoson, T., Soga, K., Mori, F., Saiki, M., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Kamigaichi, S., Aizawa, S., Yoshizaki, I., Mukai, C., Shimazu, T., Fukui, K., Yamashita, M., (1991) Morphogenesis of Rice and Arabidopsis Seedlings in Space. Journal of Plant Research, 122: 477–486
- 保尊隆享(2005) 植物の抗重力反応—シグナル受容, 変換・伝達, そして応答. 生物工学 第12号: 565–567
- 保尊隆享, 高橋秀幸, 北宅善昭, 村中俊哉, 園部誠司, 西村和彦, 唐原一郎, 榎剛, 若林和幸, 神阪盛一郎, 山下雅道, 飯田秀利, 橋本隆, 谷本英一, 井上雅裕, 小竹敬久, 久米篤, 曾我康一(2012) 植物の抗重力反応解明. Space Utiliz Res, 28: 201–202
- 唐原一郎, 新谷悠, 玉置大介, 神阪盛一郎(2010) 異なる重力環境がシロイヌナズナの芽生えの成長に与える影響.

- Space Utiliz Res. 26: 173-175
- 小島至, 飯田秀利, 曾我部正博, 佐藤主悦 (2000) 真核細胞でも発見された圧力センサー—機械的刺激を細胞内Ca²⁺の変化として変換. 化学と生物, 38: 350-351
- 駒嶺穆 (2002) 環境応答. 株式会社朝倉書店: 130-145
- 幸田泰則, 三宅博, 桃木芳枝, 大門弘幸 (2003) 植物生理学—分子から個体へ. 三共出版株式会社: 114-115, 160-161
- 森田 (寺尾) 美代, 田坂昌生 (2002) 植物はどのようにして重力方向を知るのか, 蛋白質 核酸 酵素 47, 12: 1690-1694
- 森田 (寺尾) 美代, 田坂昌生 (2003) 高等植物の重力屈性における重力刺激伝達機構, 宇宙生物科学 17, 2: 108-113
- Nakagawa, Y., Katagiri, T., Shinozaki, K., Qie, Z., Tatsumi, H., Furuichi, T., Kishigami, A., Sokabe, M., Kojima, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Iida, K., Terashima, A., Nakano, M., Ikeda, M., Yamanaka, T., Iida, H., (2007) Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots. PNAS, 104, 9: 3639-3644.
- 中村守貴, 田坂昌生, 森田 (寺尾) 美代 (2009) 高等植物における重力感受の分子機構. 生物物理 49: 116-121
- 桜井英博, 柴岡弘朗, 芦原坦, 高橋陽介 (2008) 植物生理学概論. 株式会社培風館: 36-37, 195-196
- 塩井祐三, 近藤矩朗, 井上弘 (2009) 植物生理学. オーム社: 13, 36-37, 68-73, 82-85
- 高橋秀幸, 飯野盛利, 上田純一, 鎌田源司, 神阪盛一郎, 金子康子, 北宅善昭, 曾我康一, 高橋秀幸, 田坂昌生, 藤井伸治, 保尊隆享, 宮沢豊, 宮本健助, 村田隆, 森田美代, 山下雅道 (2012) フロンティア生物の戦略—植物の成長と重力受容システム. Space Utiliz Res, 28: 208
- 豊田正嗣 (2002) 植物の重力(機械)刺激受容機構の解明に向けて. 奈良先端科学技術大学院大学大学院: 3-8, 10, 14
- 上田純一, 上田英二, 戸田雄太, 宮本健助, 岡真理子 (2012) 植物の重力応答反応とオーキシン動態. Space Utiliz Res. 28: 203-205
- 上田純一, 宮本健助 (2003) 高等植物の重力応答反応とその分子的基础—特に黄化エンドウ芽生えの自発的形態形成とオーキシン極性移動について. 宇宙生物科学 17, 2: 116-121
- Yamanaka, T., Nakagawa, Y., Mori, K., Nakano, M., Imamura, T., Kataoka, H., Terashima, A., Iida, K., Kojima, I., Katagiri, T., Shinozaki, K., Iida, H., (2010) MCA1 and MCA2 that mediate Ca²⁺ uptake have distinct and overlapping roles in Arabidopsis. Plant Physiol, 152: 1284-1296.
- 山本興太郎, 立松圭 (2002) 重力に対する反応, 蛋白質 核酸 酵素 47, 12: 1695-1699
- 横田明穂 (1999) 植物分子生理学入門. 株式会社学会出版センター: 159-163
- 渡邊博之, 佐藤幸治, 脇孝一, 水野宗衛, 竹内正男, 柳原直人, 山本庸介 (2006) 高等植物の重力感知に対する光環境の影響に関する研究. 玉川大学学術研究所紀要 12: 43-52

Relationship between Signal Transduction by the Ca²⁺ Channel of Plants and Gravity Sensitivity

Rimi Koyama, Hiroyuki Watanabe

Abstract

There are three stages when the gravitropism is induced in plants. The first is the acceptance of gravity stimuli, the second is the signal transduction, and the third is the response to the received stimuli. Ca²⁺ is regarded as a candidate as the second messenger of gravity stimuli, so we considered the relationship between signal transduction by Ca²⁺ channel and gravity sensitivity in plants. The morphology of wild type and mutants of Ca²⁺ permeable mechanosensitive channel in *Arabidopsis thaliana* under the simulated microgravity by 3-D clinostat system was investigated in this study. The microscopic observation of columella cells of the root cap was performed under the normal 1G gravity and simulated microgravity, and the amyloplasts associated with gravity acceptance was confirmed. The morphogenesis of the wild type and the mutants was analyzed as a response to gravity stimuli, and root bending under simulated microgravity was observed. Wild type showed to be higher bending angles under the simulated microgravity compared with the 1G condition. It was confirmed that the average of the bending angle of the mutants was lower than that of the wild type under the simulated microgravity. The difference between the wild type and the mutants was presumed to be the difference in cytosolic Ca²⁺ concentration. In conclusion, the possibility of Ca²⁺ involved in the signal transduction process from gravitational acceptance to the physiological and morphological responses was strongly suggested in this study.

Keywords: 3-D clinostat, microgravity, Ca²⁺ permeable mechanosensitive channel, *Arabidopsis thaliana*, amyloplast, gravitropism