

キュウリの根の水分屈性と重力屈性に関わる遺伝子の網羅的発現解析

藤井伸治 (東北大), 宮林彩智子 (東北大), 小林啓恵 (東北大), 山崎千秋 (JSF), 宮沢豊 (山形大), 鎌田源司 (AES), 笠原春夫 (JAMSS), 長田郁子 (JAMSS), 嶋津徹 (JSF), 伏島康男 (JSF), 東端晃 (JAXA/ISAS), 山崎丘 (帝京大), 石岡憲昭 (JAXA/ISAS), 高橋秀幸 (東北大)

Transcriptomic analysis of gravitropism and hydrotropism in cucumber roots

Nobuharu Fujii^{1*}, Chiaki Yamazaki², Miyazawa Yutaka³, Motoshi Kamada⁴, Haruo Kasahara⁵, Ikuko Osada⁵, Toru Shimazu², Yasuo Fusejima², Akira Higashibata⁶, Takashi Yamazaki, Noriaki Ishioka, Hideyuki Takahashi¹

¹Grad. School of Life Sci., Tohoku Univ., 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, E-Mail: nobuharu@ige.tohoku.ac.jp; ²JSF, Shin-Ochanomizu Urban Trinity Bldg. 2F, 3-2-1 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062; ³Fac. of Sci., Yamagata Univ., 1-4-12 Kojirakawa-machi, Yamagata 990-8560; ⁴AES, 1-6-1 Takezono, Tsukuba 305-0032; ⁵JAMSS, 1-1-26 Kawaguchi Tsuchiura 300-0033; ⁶JAXA/ISAS, 1-2-1 Sengen, Tsukuba 305-0047; ⁷Grad. Sch. of Med., Teikyo Univ., 2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605

Abstract: Plants express root hydrotropism that bends a root toward the wetter side to obtain more water. Root gravitropism interferes with root hydrotropism. In cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings, root gravitropism suppresses root hydrotropism under the stationary condition. When cucumber seedlings are clinorotated to randomize the direction of cucumber seedlings to gravity vector or when cucumber seedlings are grown under the microgravity condition in spaceflight, cucumber seedlings can express root hydrotropism because of lack of gravitropism. In this study, we conducted RNA-Seq analysis to identify genes that asymmetrically expressed during gravitropism and hydrotropism of cucumber roots. We found 45 genes and 21 genes that asymmetrically expressed in roots during gravitropism and hydrotropism, respectively. Among the asymmetrically expressed genes in roots gravitropism, 9 genes belonged to *Aux/IAA* gene family, *GH3* gene family and *SAUR* gene family that were characterized as auxin-inducible genes. In root hydrotropism, 5 genes among the asymmetrically expressed genes belonged to *Aux/IAA* gene family. Three genes were identical among *Aux/IAA* genes that asymmetrically expressed during root gravitropism and root hydrotropism. Our results suggested that root gravitropism in cucumber seedlings interacts with root hydrotropism by auxin.

Key words: Auxin, Cucumber, Gravitropism, Hydrotropism

1. はじめに

宇宙の微小重力環境を利用した解析による生物の重力応答機構の解明は、宇宙生物学の主要な研究課題の一つである。植物の重力に反応した形態形成として、従来、重力屈性が主に研究されてきた。植物の根は重力屈性を発現させることにより、地下部の器官の根を下側に屈曲・伸長させ、土壤中に深く侵入し、土壤中から水養分を吸収する。生物にとって水分は生存に必要不可欠な成分であり、植物は水分を主に根から吸収している。そして、植物の根はより水分の多い方向へ屈曲・伸長する水分屈性を発現する¹⁾。根の水分屈性は根の重力屈性による干渉を受けるため、根の水分屈性を研究するためには、水分屈性を容易に発現させる実験系を開発する必要があった。根の重力屈性が異常なエンドウの *ageotropum* 突然変異体の根に水分勾配刺激を与えると、根の水分屈性が認められたことから、根の重力屈性の発現

を抑制すると水分屈性を容易に観察できることが明らかになった²⁾。1998年に行われた STS-95 宇宙実験において、キュウリのペグ (重力形態形成) に対する重力の影響が解析された³⁾。その際、以下のキュウリの根の水分屈性が観察された。STS-95 宇宙実験では、発芽孔を下側に向けてキュウリの種子を水分供与体に垂直に差し込み、発芽後、根が気中で成長する容器で芽生えを生育させた⁴⁾。通常の重力 (1G) 条件下では、主根は下側に伸長し、主根から出現する側根は斜め下方向に伸長する⁵⁾。しかし、STS-95 宇宙実験の微小重力条件下で生育させた芽生えの側根は、水分供与体の方向へ伸長した⁴⁾。そして、この側根の水分供与体への伸長生長は、地上で、3D クリノスタット条件下で生育させたキュウリの芽生えでも観察された⁴⁾。したがって、キュウリの芽生えの側根は、重力屈性を抑制すると水分屈性を発現すると考えられた。そして、芽生えの胚軸-根の軸に直交する向き

に水分勾配を与えると、クリノスタット上で生育させた芽生えの根は、水分屈性を発現した⁶⁾。以上の結果から、キュウリの根の水分屈性は、重力屈性による干渉を受け、重力屈性を抑制すると水分屈性が発現すると考えられた。

1920年代に提唱されたコロドニー・ウェント説では、屈性を発現する器官は、環境刺激に応答したオーキシン輸送の制御により、オーキシンの偏差分布を誘導し、屈曲する、と屈性の発現機構を説明し、現在、広く受け入れられている⁷⁾。クリノスタット条件下で水分屈性を発現しているキュウリの根において、オーキシン誘導性遺伝子である *CsIAA1* の発現を解析した結果、*CsIAA1* は高水分側で高発現することが明らかになった⁶⁾。したがって、キュウリの根の水分屈性の発現には、オーキシンの偏差的な分布を伴うと考えられた。

一方、シロイヌナズナの根の水分屈性には、オーキシン輸送を介したオーキシンの偏差分布が関与しない可能性が示唆されている。シロイヌナズナでは、オーキシン排出キャリアである PIN1 タンパク質が維管束細胞の地上部の基部側に局在することにより、地上部の先端で合成されたオーキシンが、維管束を通過して根へと輸送される。地上部の先端で合成されたオーキシンは、PIN1 タンパク質が維管束細胞の根の頂端側に局在することにより、維管束細胞を通過して、根の先端へと輸送される⁸⁾。重力刺激を与えていない芽生えでは、根の先端のコルメラ細胞の外周に均等に PIN3 と PIN7 が局在し、維管束を通過してコルメラ細胞に輸送されてきたオーキシンを均等に細胞外に排出している⁹⁾¹⁰⁾。コルメラ細胞から排出されたオーキシンは表皮細胞の根の基部側に局在するオーキシン排出キャリア PIN2 により、伸長領域に輸送される¹¹⁾。また、オーキシン取り込みキャリアの AUX1 も、コルメラ細胞から伸長領域へのオーキシン輸送に機能していることが示されている¹²⁾。芽生えを横倒して、重力刺激を与えると、コルメラ細胞で発現している PIN3 と PIN7 が、細胞の下側に局在化し、コルメラ細胞の下側にオーキシンを偏差的に輸送し、このオーキシン排出キャリアの局在変化が、根の伸長領域でのオーキシンの偏差分布を誘導すると考えられている⁹⁾¹⁰⁾。オーキシン排出キャリアの PIN2 とオーキシン取り込みキャリアの AUX1 を欠損した突然変異体では、根の重力屈性が異常になるが、根の水分屈性は正常であることが報告された¹³⁾。また、シロイヌナズナの根にオーキシン排出キャリアの阻害剤である 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) や 1-naphthylphtharamic acid (NPA) を処理すると、根の重力屈性は阻害されるが、根の水分屈性は阻害されないことが示された¹⁴⁾。そして、オーキシンマーカ遺伝子の *DR5-GUS* の発現解析の結果、根の重力屈性時には、*DR5-GUS* の偏差的な発現が認められるが、

根の水分屈性発現時には、*DR5-GUS* の偏差的な発現は認められなかった¹⁾。一方、オーキシン作用阻害剤の *p-chlorophenoxyisobutyric acid* (PCIB) を処理すると、シロイヌナズナの根でも重力屈性と同等に水分屈性が低下した¹⁴⁾。これらの結果から、シロイヌナズナの根の水分屈性はオーキシン応答を必要とするが、オーキシン輸送を介した偏差的なオーキシンの分布を伴わないと考えられた。

シロイヌナズナの根の水分屈性の解析結果から、キュウリの根の水分屈性において、オーキシン以外の根の水分屈性を引き起こす要因の存在を検討する必要があると考えられた。シロイヌナズナやイネの重力屈性時のマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析が行なわれている¹⁵⁾¹⁶⁾。イネでは重力屈性時のシュートを上側と下側に切り分けて、重力刺激後6時間目の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、オーキシン誘導性遺伝子 (*Aux/IAA*, *SAUR*) が上側に比べて下側で高発現していた¹⁶⁾。また、ジベレリン (GA) 酸化酵素遺伝子が下側に比べて上側で高発現することで、GA が不均等分布していることが示唆された¹⁶⁾。これらの解析結果から、屈性時の遺伝子発現解を網羅的に解析することによって、偏差的に発現する遺伝子群の特性から、屈性を担う要因の特定が可能であると期待された。近年、DNA 塩基配列の大量解析方法が発展・確立し、RNA-Seq と呼ばれる、網羅的な遺伝子発現解析法が開発された¹⁷⁾。加えて、キュウリのゲノム塩基配列が決定された¹⁸⁾。したがって、キュウリでも網羅的な遺伝子の発現解析が可能となった。そこで、本研究では、キュウリの根の水分屈性時と重力屈性時の遺伝子発現を網羅的に解析し、両屈性で偏差的に発現している遺伝子を比較した。

2. 材料と方法

渡辺採種場 (宮城) からキュウリ (*Cucumis sativus* L. cv. *Shinfushinarijibai*) の種子を購入し、実験に供試した。キュウリの根の重力屈性と水分屈性の実験は、Mizuno らの方法に準じて行った⁶⁾。吸水性プラスチックの支持体 (ベルイーター、AION、大阪) にあけた穴に、種子の発芽孔側が支持体の外側に 2 mm 程度出るように種子の子葉側を挿入した。支持体に給水した後、発芽後に下側に発根するように、種子を挿入した支持体をプラスチック容器に取り付けた。根の重力屈性時の遺伝子発現を解析するために、暗所、 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ で静置し、垂直に発芽させた 24 時間齢の芽生えを、そのまま垂直に、あるいは横倒して重力刺激を与えて生育させ、0、1 時間後に、芽生えを支持体ごとピンセットで摘んで取り出し、RNAlater (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) に入れ、 4°C で一晩以上、処理し、RNAlater を組織に浸透させた。根の水分屈性時の遺伝子発現の解析には、暗

所、 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ で静置し、垂直に発芽させた 18 時間齢の芽生えを用いた。芽生えに水分勾配刺激を与えるために、容器内の芽生えの支持体の対面に取り付けたろ紙に飽和 K_2CO_3 溶液を注入し、容器内に水分勾配を形成させた。容器を 2 軸の 3D クリノスタットに搭載し、回転させ、芽生えを $26 \pm 1^\circ\text{C}$ で生育させた。水分勾配処理を開始してから 0、4 時間後に、芽生えを支持体ごとピンセットで摘んで取り出し、RNAlater に入れ、 4°C で一晩以上、処理し、RNAlater を組織に浸透させた。

RNAlater に保存したキュウリの芽生えから実体顕微鏡下で根端 0.5 mm を除き、水分屈性の実験区では、その切断面から 1.5 mm を高水分側と低水分側に、重力屈性の実験区では、切断面から 1.5 mm を上側と下側に縦に切り分けた。RNAlater と Lysing Matrix D (フナコシ、東京) を入れた 2 mL 容量のスクリュウキャップチューブに入れ、一晩 4°C で保存し、植物組織に RNAlater を浸透させた。その後、RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン、東京) を用いて RNA を抽出した。RNA を抽出した後、DNase I 処理を行い、次いで RNeasy MiniElute Cleanup Kit (キアゲン) を用いて、RNA を精製した。水分屈性の RNA-Seq はタカラバイオ株式会社に委託し、重力屈性の RNA-Seq は新学術領域ゲノム支援 (東京大学・鈴木穰先生の研究室) に協力して頂いた。Illumina HiSeqTM 2500 でシークエンスを行い、得られた塩基配列 (FASTAQ ファイル) を TopHat (2.1.10), Bowtie (1.0.0) および SAMtools (0.1.19.0) でキュウリのゲノム塩基配列 (cucumber_ChineseLong_v2.gff3) に対してマッピングした。そして、Cufflinks (2.2.1) 内の cuffdiff を用いて、遺伝子発現量を示す FPKM 値 (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) を算出し、遺伝子発現を比較した。検体間比較の結果、q 値が 0.05 以下の遺伝子群について、Cucurbit Genomics Database 内の http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/tool/GO_enrich.cgi を利用して Gene Ontology (GO) 解析を行った。

3. 結果と考察

キュウリの種子を垂直に置き、発芽させた 24 時間齢のキュウリの芽生えの根の任意の左側と右側、そのまま垂直に 1 時間、生育させたキュウリの芽生えの根の任意の左側と右側、芽生えを横倒してから、1 時間後の根の上側と下側に切り分け、それぞれから RNA を抽出し、RNA-Seq を行った。その結果、それぞれ約 3 千万リードのうち約 95% がマッピングされた。そして、重力刺激を与えてから 1 時間後の重力屈性を発現している根の上側と下側で発現している遺伝子を cuffdiff により比較した結果、45 遺伝子が他の遺伝子に比べ有意に偏差的な発現を示した (p 値の多重性の問題を補正した q 値 < 0.05)。これらのうち 9 遺伝子が、オーキシン誘導性遺伝子群 (*Aux/IAA*

遺伝子群、*GH3* 遺伝子群、*SAUR* 遺伝子群) に属する遺伝子であった¹⁹⁾。根の重力屈性時に偏差的に発現している遺伝子群を GO 解析した結果、オーキシン誘導性遺伝子を内包する遺伝子群のみが同定された。したがって、根の重力屈性時に偏差的に発現する遺伝子群はオーキシン誘導性遺伝子で構成されており、根の重力屈性の偏差成長を引き起こす主要因はオーキシンであると考えられた。一方、重力刺激を与える前、および、重力刺激を与えずに 1 時間生育させた芽生えの根では偏差的に発現を示す遺伝子 (q 値 < 0.05) を見出せなかった。

キュウリの種子を垂直に置き、静置して発芽させた 18 時間齢の芽生えの根の支持体側と反支持体側、18 時間齢の芽生えに水分勾配刺激を与えずに、あるいは水分勾配刺激を与えながら静置条件下で生育させた芽生えの根の支持体側 (高水分側) と反支持体側 (低水分側)、または、水分勾配刺激を与えずに、あるいは水分勾配刺激を与えながらクリノスタット条件下で生育させた芽生えの根の支持体側 (高水分側) と反支持体側 (低水分側) に根を切り分け、それぞれから RNA を抽出し、RNA-Seq を行った。その結果、それぞれ約 5 千万リードのうち約 96% がマッピングされた。そして、cuffdiff により遺伝子発現を比較した結果、水分勾配刺激を与えながらクリノスタット条件下で生育させた芽生えの水分屈性を発現している根の高水分側と低水分側で 21 遺伝子が他の遺伝子に比べ、有意に偏差的に発現していた (q 値 < 0.05)。これらのうち 5 遺伝子が *Aux/IAA* 遺伝子群に属する遺伝子であった。そして、根の水分屈性発現時に偏差的に発現している遺伝子のうち 3 遺伝子は、根の重力屈性発現時にも偏差的に発現していた。なお、この 4 遺伝子には、これ迄、水分屈性を発現しているキュウリの根で偏差的に発現することが示されてきた *CsIAA1* 遺伝子も含まれていた⁶⁾。キュウリの根の水分屈性時に偏差的に発現している遺伝子群を GO 解析した結果、オーキシン誘導性遺伝子を内包する遺伝子群のみが同定された。また、水分勾配刺激を与えながら静置条件下で生育させ、水分屈性の発現を重力屈性が抑制している根でも、18 遺伝子が偏差的に発現していることが示唆された。しかしながら、この 18 遺伝子にはオーキシン誘導性遺伝子は含まれていなかった。そして、水分勾配刺激を与える前、および、水分勾配刺激を与えずに 4 時間生育させた芽生えの根では偏差的な発現を示す遺伝子 (q 値 < 0.05) は見出せなかった。

以上の結果から、キュウリの根の水分屈性時に偏差的に発現する遺伝子群はオーキシン誘導性遺伝子で構成されており、キュウリの根の水分屈性時の偏差成長を引き起こす主要因はオーキシンであると考えられた。同様に、キュウリの根の重力屈性時の偏差成長を引き起こす主要因も、オーキシンであると

考えられ、キュウリの根の重力屈性はオーキシンを介して水分屈性に干渉していると想定された。

我々は、これまでに宇宙実験「きぼう」船内実験室第2期利用選定テーマ「植物の重力依存的成長制御を担うオーキシンキャリア動態の解析 (CsPINs)」のRUN1からRUN3を行った。RUN1では、微小重力条件下でキュウリの根の水分屈性を発現させて、オーキシン排出キャリア (CsPIN5) の局在パターンを免疫組織化学染色により解析する目的に行われた (現在解析中)。RUN2はペグの形成面の決定時に置ける重力感受細胞で発現するオーキシン排出キャリア (CsPIN1) の局在解析を解析する目的で行われた (現在投稿中)。そして、RUN3として、微小重力条件下で生育させたキュウリの芽生えの根での遺伝子発現を網羅的に解析する目的でRNA抽出用のサンプリングを行った。今後、宇宙サンプルを用いた網羅的な遺伝子発現解析により、今回、提唱したキュウリの根における、オーキシンを介した重力屈性による水分屈性の干渉作用を検証する。

謝辞

本研究の一部は文部科学省科研費 (No. 221S0002) の助成を受けたものです。

参考文献

- 1) Takahashi, H., Miyazawa, Y., Fujii, N.; Hormonal interactions during root tropic growth: hydrotropism versus gravitropism, *Plant Mol. Biol.* 69: 489-502 (2009)
- 2) Jaffe, M.J., Takahashi, H., Biro, R.L.; A pea mutant for the study of hydrotropism in roots, *Science* 230: 445-447 (1985)
- 3) Takahashi, H., Kamada, M., Yamazaki, Y., Fujii, N., Higashitani, A., Aizawa, S., Yoshizaki, I., Kamigaichi, S., Mukai, C., Shimazu, T., Fukui, K.; Morphogenesis in cucumber seedlings is negatively controlled by gravity, *Planta* 210: 515-518 (2000)
- 4) Takahashi, H., Mizuno, H., Kamada, M., Fujii, N., Higashitani, A., Kamigaichi, S., Aizawa, S., Mukai, C., Shimazu, T., Fukui, K., Yamashita, M.; A spaceflight experiment for the study of gravimorphogenesis and hydrotropism in cucumber seedlings, *J Plant Res.* 112: 497-505 (1999)
- 5) Rufelt, H.; Plagiogeotropism in roots, In: Ruhland W(ed), *Encyclopedia of Plant Physiology* vol. 17(2) Springer Berlin 322-343 (1962)
- 6) Mizuno, H., Kobayashi, A., Fujii, N., Yamashita, M., Takahashi, H.; Hydrotropic response and expression pattern of auxin-inducible gene, *CS-IAAI*, in the primary roots of clinorotated cucumber seedlings, *Plant Cell Physiol.* 43: 793-801 (2002)
- 7) Trewavas, A.J.; What remains of the Cholodny-Went theory? *Plant Cell Environ.* 15: 761-794 (1992)
- 8) Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., Scheres, B.; The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots, *Nature* 433: 39-44 (2005)
- 9) Friml, J., Wisniewska, J., Benková, E., Mendgen, K., Palme, K.; Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*, *Nature* 415: 806-809 (2002)
- 10) Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A.R., Tasaka, M., Morita, M.T., Friml, J.; Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 22344-22349 (2010)
- 11) Müller, A., Guan, C., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennet, M., Wisman, E., Palme, K.; *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control, *EMBO J.* 17: 6903-6911 (1998)
- 12) Swarup, R., Kramer, E.M., Perry, P., Knox, K., Leyser, H.M., Haseloff, J., Beemster, G.T., Bhalerao, R., Bennett, M.J.; Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal, *Nat. Cell Biol.* 7: 1057-1065 (2005)
- 13) Takahashi, N., Goto, N., Okada, K., Takahashi, H.; Hydrotropism in abscisic acid, wavy, and gravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*, *Planta* 216: 203-211 (2002)
- 14) Kaneyasu, T., Kobayashi, A., Nakayama, M., Fujii, N., Takahashi, H., Miyazawa, Y.; Auxin response, but not its polar transport, plays a role in hydrotropism of *Arabidopsis* roots, *J. Exp. Bot.* 58: 1143-1150 (2007)
- 15) Taniguchi, M., Nakamura, M., Tasaka, M., Morita, M.T.; Identification of gravitropic response indicator genes in *Arabidopsis* inflorescence stems, *Plant Signal Behav.*, 9: e29570 (2014)
- 16) Hu, L., Mei, Z., Zang, A., Chen, H., Dou, X., Jin, J., Cai, W.; Microarray analyses and comparisons of upper or lower flanks of rice shoot base preceding gravitropic bending, *PLoS One* 8: e74646 (2013)
- 17) Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M.; RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, 10: 57-63 (2009)
- 18) Huang, S., Li, R., Zhang, Z., Li, L., Gu, X., Fan, W., Lucas, W.J., Wang, X., Xie, B., Ni, P., et al.; The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetics* 41: 1275-1281 (2009)
- 19) Abel, S., Theologis, A.; Early genes and auxin action, *Plant Physiol.* 111: 9-17 (1996)