

植物の成長戦略と重力 — 自発的形態形成と頂芽優勢の観点から —

宮本 健助（大阪府大・高等教育）*，岡 真理子（鳥取大・農），上田 英二（大阪府大・院・理学系），
上田 純一（大阪府大・院・理学系）

Plant growth strategy under gravistimulation: Relevance to automorphogenesis and apical dominance

Kensuke Miyamoto^{1*}, Mariko Oka², Eiji Uheda³ and Junichi Ueda³

¹ Faculty of Liberal Arts and Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan; ² Faculty of Agriculture, Tottori University, 4-101 Koyamacho-minami, Tottori 680-8553, Japan; ³ Department of Biological Science, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

* Corresponding author, E-mail: miyamoto@las.osakafu-u.ac.jp

Abstract:

Plants possess three kinds of vegetative organs; leaf, stem and root. The growth of these organs is concentrated in localized region of cell division named meristem. In a young plant, the most active meristems are located at the tip of the stem and root, and the node. The formation of apical hook, the arc-shaped transient structure formed in the process of seed germination on top of the shoot of dicotyledonous seedlings, is believed to play an important role in the protection of shoot apical meristem from physical barriers such as soil during seed germination. The growth of axillary buds having apical meristems for branch of shoots is inhibited by actively growing shoots (apical dominance) and the inhibition is released by the removal of shoot apex (decapitation). The purpose of the present study is to clarify the role of gravistimulation in 1: the formation of apical hook, and 2: in controlling growth of axillary buds in response to decapitation. 1: Time-course studies with normal Alaska pea (*Pisum sativum*) and an agravitropic pea mutant, *ageotropum*, under the 1-G conditions and on a 3-D clinostat revealed that the process of formation is controlled by some intrinsic properties of the plumule, but not by gravistimulation, since when the epicotyl emerges from the seed coat, the hook is formed in both pea varieties. On the other hand, in Alaska pea seedlings the formed hook is sustained or enhanced by gravistimulation, resulting in a delay of hook opening compared with that on a 3-D clinostat. These strongly suggest that gravistimulation plays an important role in maintaining arc-shaped hook formed in early germination process. Application of auxin polar transport inhibitors suppressed the sharp hook, suggesting that the hook formation involves auxin polar transport probably asymmetrically distributed across the plumular axis. The expression of *PsPIN1* gene in apical hook region in Alaska pea seedlings was suppressed on a 3-D clinostat, but not in *ageotropum* pea seedlings. 2: The induction of growth of axillary buds at cotyledonary nodes by the decapitation at 5 mm below the 1st internode in etiolated Alaska pea seedlings was substantially enhanced on a 3-D clinostat, but suppressed by the application of auxin to the place of removed shoot apex. Decreased level of endogenous auxin at cotyledonary nodes by 3-D clinostat rotation was proposed by the results of preliminary experiments. Together with the finding that auxin polar transport substantially affected by microgravity conditions in space (STS-95 space experiments), these results suggesting important roles of gravity-controlled auxin polar transport in protection and controlling growth of meristems provide valuable information for considering plant growth strategy in space.

Key words; *ageotropum* pea, Alaska pea, apical dominance, auxin polar transport, hook development, gravity, 3-D clinostat, plant growth strategy

はじめに

陸上植物（以下、植物と称する）の基本体制は、一本の主軸（茎および主根）と、これから派生する数多くの副軸（枝、葉、側根など）から成っている。種子中の胚においてすでにその軸性は形成されており、頂端に分裂組織（茎頂分裂組織と根端分裂組織）が存在する。加えて、植物は分裂組織として側芽、側根の原基を有している。通常、頂芽が活発に成長しているときには側芽の成長は抑制された状態にあ

り、いわゆる頂芽優勢を示す。植物種子が発芽し成長、形態形成していくためには、茎頂・根端分裂組織を適切に維持すること、そして側芽の成長を制御することが重要となる。

発芽に始まる植物の栄養成長にとって、地面に対して茎を上に向かって伸ばして効率的に光を受けるように葉を空間配置して光合成を行い、主根を地中方向に、側根を横方向に伸ばすことによって多くの水分や養分を土壌から得ると共に、地上部を支える

姿勢をとることが大切となる。このため植物は、地球上では大きさや向きが変わらない重力を利用して、巧みに器官を運動させて姿勢を制御する仕組みや、強固な細胞壁を構築して重力に抗する体制を発達させてきた。このような重力刺激に応答した反応の制御に、植物ホルモンのオーキシンが密接にかかわっていると考えられている (Thimann 1937; Hoson *et al.* 2003)。

著者らは、1998年に実施された STS-95 植物宇宙実験や3次元クリノスタットを用いた地上基礎実験において、宇宙微小重力あるいは地上擬似微小重力環境下で発芽・生育した黄化エンドウ芽生え上胚軸のオーキシン極性移動が低下することを見出し、オーキシン極性移動が重力の制御下にある現象であることを示してきた (Ueda *et al.* 1999, 2014; Miyamoto *et al.* 2005)。しかしながら、分裂組織の成長・発達の制御に対する重力の影響は、ほとんど明らかにされていない。本研究では、分裂組織に着目し、エンドウ芽生えを対象に3次元クリノスタットを用いて、茎頂分裂組織の保護機能を担う頂端鉤状部 (hook) の成長・発達、および頂芽切除により誘導される側芽の成長・発達に対する重力の影響を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

【植物材料および培養方法】— 上胚軸鉤状部に関する実験における植物培養方法は、これまでの方法に準じた (Miyamoto *et al.* 2015)。エンドウ (*Pisum sativum* L.) 乾燥種子を、アクリル樹脂製の培養容器 (内寸 9 x 4.8 x 5.8 cm³、なお、上面 4 箇所ミリシールで覆った直径 1 cm の換気口を有する) 中、種子の支持体としてロックウールシート (日本ロックウール) に播種し、蒸留水 (40 ml) を給水した後、1-G 環境、あるいは3次元クリノスタット上の擬似微小重力環境下、暗所、23.5 °Cで、発芽・生育させた。培養一定時間ごとに黄化エンドウ芽生えを採取し、写真撮影を行い、写真画像をもとに上胚軸鉤状部の開度を測定した。

また、頂芽切除により誘導される側芽成長に関する実験では、STS-95 植物宇宙実験で使用した植物培養容器 (PGC) を模して作成したアクリル製培養容器を用い、それに準じた方法で培養を行った (Miyamoto *et al.* 2005)。4日齢黄化芽生えの第一節の下 5 mm の部位で頂芽を切除した後、乾燥を防ぐため切り口にラノリンを塗布した。頂芽切除後の芽生えを、1-G 環境、あるいは3次元クリノスタット上の擬似微小重力環境下、暗所、23.5 °Cで、6日間生育させ、子葉節部位から伸長してきた側芽の長さを測定した。

なお、擬似微小重力環境の作出は、2軸の3次元クリノスタット (CS-2、日本医化器械製作所) と回転制御装置 (Model CL-CS1、南出システムエンジニアリング) を用い、回転期間中の積算重力方向成分がゼロとなるように回転方向並びに回転速度を制御した (Hoson *et al.* 1997; Miyamoto *et al.* 2005)。

【オーキシン極性移動関連遺伝子の発現解析】— オーキシン極性移動関連遺伝子の発現解析は Hoshino らの方法に従って行った (Hoshino *et al.* 2006a,b)。黄化 Alaska および黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸鉤状部から ISOGEN (ニッポンジーン) を用い全 RNA を抽出し、Prime ScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) を用いて RT-PCR を行った。Go Taq Green Master Mix (Promega) を用い、得られた cDNA と、*PsPIN1* および *PsAUX1* 遺伝子配列に基づき設計したプライマーを用いた semi-quantitative RT-PCR を行った。得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供し、目的のバンドの強度をデンシトグラフを用いて定量化することによってオーキシン関連遺伝子の発現解析を行った。

結果および考察

【茎頂分裂組織の保護機能を担う茎頂鉤状部の成長・発達に対する擬似微小重力の影響】

暗所下における発芽種子の成長初期過程で、双子葉植物は茎の先端部に鉤状部を発達させる (MacDonald *et al.* 1983; Takahashi *et al.* 1988)。この茎頂鉤状部の構造は、土中での茎伸長を容易にするとともに、土中の物理的障壁から茎頂分裂組織を保護するという重要な役割を果たしていると考えられている (Taiz and Zeiger 2010)。

昨年度の本シンポジウムにおいてすでに報告したように、子葉地下型植物である Alaska エンドウの乾燥種子中の幼芽先端には未発達ながら既に鉤状部が存在し、この種子中の未熟な鉤状部は、発芽・成長に伴い、上胚軸が種皮の外に出現する段階までに強固な鉤状部を形成し、形成された鉤状部はその後維持・展開の過程へと移っていった。一方、重力応答変異体 *ageotropum* エンドウでは、種子中の幼芽先端に存在する未発達な鉤状部が強固な鉤状部形成過程を経た後、Alaska エンドウに比べて早く維持・展開の過程に移行した。Alaska エンドウ種子をクリノスタット上の擬似微小重力環境下で発芽・生育させると、重力応答変異体 *ageotropum* エンドウでみられる頂端鉤状部の成長・発達に類似した成長・発達を示したが、一方、*ageotropum* エンドウ鉤状部の成長・発達は、その影響を受けなかった。

これらの結果は、黄化エンドウ芽生えの上胚軸鉤状部の成長・発達過程において、重力はその形成過程よりもむしろ維持・展開過程の制御に大きな役割を果たしていることを示しており、STS-95 植物宇宙実験において 6.5 日齢黄化 Alaska エンドウ芽生えの頂端鉤状部の開度が地上対照のものに比べて大きいという結果を支持するものである (Ueda *et al.* 1999)。

オーキシン極性移動阻害剤の投与によって黄化エンドウ芽生え上胚軸鉤状部の開度は対照に比べ大きくなることから (Miyamoto *et al.* 2014)、頂端鉤状部の成長・発達は、オーキシン極性移動によってもたらされる頂端鉤状部を横切る非対称なオーキシン分布による偏差的細胞伸長によって制御されている可

能性がある。そこで、オーキシン極性移動においてオーキシンの細胞内からの極性的排出を担う PIN タンパク質および細胞内への取込みを担う AUX1 タンパク質をコードする遺伝子の発現に対する擬似微小重力の影響を調べた。その結果、Alaska エンドウを 1-G 環境下で発芽・生育させた場合に比べ、擬似微小重力環境で発芽・生育させると、頂端鉤状部における *PsPIN1* 遺伝子発現が抑制されていた。一方、*ageotropum* エンドウ芽生え頂端鉤状部の *PsPIN1* 遺伝子発現に、ほとんど擬似微小重力の影響はみられなかった。また、Alaska、*ageotropum* エンドウいずれにおいても *PsAUX1* 遺伝子の発現は擬似微小重力の影響をほとんど受けなかった。これらの結果は、オーキシン極性移動関連遺伝子、特に細胞内からの極性的なオーキシン排出を担う PIN 遺伝子の発現を介したオーキシン極性移動の偏差により、頂端鉤状部における内外側の細胞成長速度の違いが生じていることをうかがわせる。

古くより、黄化エンドウの鉤状部形成はエチレンによっても制御されていると考えられている (Goeschl *et al.* 1967; Burg and Burg 1968)。著者らは、Alaska エンドウ芽生えのエチレン生成は 3 次元クリノスタット上で培養することによって抑制されることを報告している (Miyamoto *et al.* 2002)。オーキシンはエチレン生成を促進することから、微小重力環境下においてオーキシン極性移動が低下することによりオーキシン-エチレン相互作用が影響を受けている可能性がある。

【頂芽切除により誘導される側芽の成長に対する擬似微小重力の影響】

植物の茎葉と根の主軸は、それらの側生器官とともに頂端-基部間の構造的極性をもっており、それぞれの器官の成長・発達においては、器官相互作用が働いている。その代表的な現象に頂芽優勢があり、この制御には頂芽で生産されて茎を求基的に極性移動するオーキシンと側芽で生成されるサイトカニンが重要な役割を果たしていると考えられている。

頂芽切除による側芽成長誘導に対する重力の影響を調べる実験系として、第 1 節間の成長段階にある 4 日齢黄化エンドウ芽生えの第 1 節から下 5 mm の部位で頂芽を切除し、側芽の成長・発達を解析する実験系を作成した。この実験系では、長さが異なるものの子葉節から 2 本の側芽が伸長する。この実験系は、明所で生育させた緑化芽生えを用いる実験系に比べ、側芽の成長が早く、影響を認め易いという利点がある。

この実験系を用いて、頂芽切除芽生えをクリノスタット上で生育させると、子葉節からの側芽の成長が促進された (図 1)。この子葉節からの側芽の成長は、頂芽切断部位へのオーキシン投与により阻害された。加えて、予備実験では、擬似微小重力環境下で生育させた芽生えでは子葉節におけるオーキシン濃度の低下も推測されており、擬似微小重力環境下における頂芽切除後の側芽の成長・発達は、芽

生えにおけるオーキシン動態を介して制御されていることが示唆された。今後、内部標準物質を用いた定量解析を予定している。

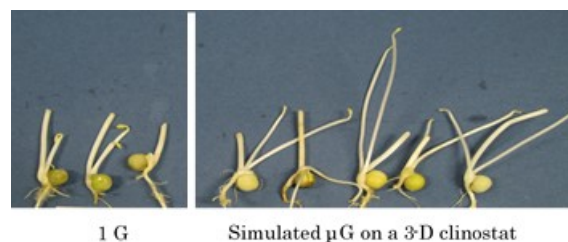


Fig. 1. Effect of simulated microgravity conditions on a 3-D clinostat on axillary bud growth induced by removal of shoot apex in etiolated Alaska pea seedlings. After decapitation of 4-day-old etiolated pea seedlings at 5 mm below the 1st node, decapitated pea seedlings were additionally grown for 6 days in the dark at 23.5 °C. Two lateral shoots elongated from the each cotyledonary node. The shoot length of axillary buds was quite longer in decapitated seedlings grown on a 3-D clinostat than those on 1-G conditions.

以上、茎頂分裂組織を保護する役割を担う茎頂鉤状部の形成、そして植物の発達した体制を作るために必要な側芽の成長、いずれも重力の支配下にあることが明らかとなった。さらにその制御には重力によって制御されている植物ホルモン、オーキシンが重要な役割を果たしている。

植物の分裂組織は、限られた場所のみ分布する。種子が発芽過程において、いかに土壌などの物理的障壁から物理的に弱い分裂組織を守り成長していくのか、そして仮に頂芽が損傷を受けた場合にいかに側芽を成長させていくのかを明らかにしていくことは、今後の宇宙環境下での植物栽培を考える上では極めて重要な課題である。本結果は、植物ホルモンのオーキシンを介した植物ホルモン相互作用の重要性を示す基礎的資料であり、これを発展させることにより、宇宙環境において人為的且つ効率的な植物の成長・発達の制御が可能となるものと考えている。

参考文献

- Burg, S. P. and Burg, E. A.; Ethylene formation in pea seedlings; its relation to the inhibition of bud growth caused by indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* 43: 1069-1074 (1968).
- Goeschl, J. D., Pratt, H. K. and Bonner, B. A.; An effect of light on the production of ethylene and the growth of the plumular portion of etiolated pea seedlings. *Plant Physiol.*, 42: 1077-1080 (1967).
- Hosono, T., Kamisaka, S., Masuda, Y., Yamashita, M. and Buchen, B.; Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta*, 203: S187-S197 (1997).
- Hosono, T. and Soga, K.; New aspects of gravity responses in plant cells. *Int. Rev. Cytol.*, 229: 209-244

- (2003).
- Hoshino, T., Miyamoto, K., Yamashita, M. and Ueda, J.; Auxin polar transport is essentially required for graviresponse in early growth stage of etiolated pea seedlings. *J. Gravitational Physiol.*, 13: 113-114 (2006a).
- Hoshino, T., Miyamoto, K. and Ueda, J.; Requirement of the gravity-controlled transport of auxin for a negative gravitropic response of epicotyls in the early growth stage of etiolated pea seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 47: 1496-1508 (2006b).
- MacDonald, I. R., Gordon, D. C., Hart, J. W. and Maher, E. P.; The positive hook: the role of gravity in the formation and opening of the apical hook. *Planta*, 158: 76-81 (1983).
- Miyamoto, K., Hoshino, T., Yamashita, M. and Ueda J.; Automorphosis of etiolated pea seedlings in space is simulated by a three-dimensional clinostat and the application of inhibitors of auxin polar transport. *Physiol. Plant.*, 123: 467-474 (2005).
- Miyamoto, K., Yamasaki, T., Uheda, E. and Ueda, J.; Analysis of apical hook formation in Alaska pea with a 3-D clinostat and agravitropic mutant *ageotropum*. *Front. Plant Sci.*, doi: 10.3389/fpls.2014.00137 (2014).
- Miyamoto, K., Yuda, T. and Ueda J.; Effects of simulated microgravity conditions on a 3-dimensional clinostat on hook formation and ethylene production in etiolated pea seedlings. (In Japanese with English abstract), *Space Utilization Research*, 18: 180-183 (2002).
- Miyamoto, K., Yamasaki, T., Oka, M., Uheda, E. and Ueda, J.; Analysis of growth and development of apical hook in etiolated Alaska pea with a 3-dimensional clinostat and an agravitropic pea mutant, *ageotropum*. (In Japanese with English abstract), *Space Utilization Research*, 29: 71-74 (2015).
- Takahashi, H. and Suge, H.; Involvement of ethylene in gravity-regulated peg development in cucumber seedling. *Plant Cell Physiol.*, 29: 313-320 (1988).
- Taiz, L. and Zeiger, E.; *Plant Physiology*, fifth edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland (2010).
- Thimann, K. V.; On the nature of inhibitions caused by auxin. *Amer. J. Bot.*, 24: : 407-412 (1937).
- Ueda, J., Miyamoto, K., Yuda, T., Hoshino, T., Fujii, S., Mukai, C., Kamigaichi, S., Aizawa, S., Yoshizaki, I., Shimazu, T. and Fukui K.; Growth and development, and auxin polar transport in higher plants under microgravity conditions in space: BRIC-AUX on STS-95 space experiment. *J. Plant Res.*, 112: 487-492 (1999).
- Ueda, J., Miyamoto, K., Uheda, E., Oka, M., Higashibata, A. and Ishioka, N.; Close relationships between polar auxin transport and graviresponse in plants. *Plant Biol.*, 16 (Suppl. 1): 43-49 (2014).