

キュウリ芽生えの重力形態形成の制御機構

藤井 伸治 (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)

Regulatory mechanism for gravimorphogenesis of cucumber seedlings

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: Peg formation in the Cucurbitaceae is a unique gravimorphogenesis. When cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) are placed and germinated in a horizontal position, a protuberance, which is called a peg, is formed on the lower side of the transition zone between the hypocotyl and the root. When cucumber seeds were placed and germinate in a vertical position or under microgravity conditions in space seedlings developed a peg on each side of the transition zone. Thus, cucumber seedlings have the potential to develop a peg on each side, and peg formation on the upper side of the transition zone is suppressed in response to gravity when seedlings are grown horizontally on the ground. A phytohormone, auxin induces a peg formation and auxin distribution determines the lateral placement of peg formation in the transition zone. The treatment of seedlings with the inhibitors of auxin efflux such as 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) blocked the suppression of peg formation on the upper side of the transition zone, even if the seedlings germinated in a horizontal position. These results suggested that auxin efflux, which was modified by gravity, was required for a decrease in auxin level on the upper side of the transition zone in cucumber seedlings grown in a horizontal position. Therefore, we examined the localization of cucumber auxin efflux carrier, CsPIN1, which is expressed in the endodermal cells that sense gravity. We found that the accumulation pattern of CsPIN1 in the endodermis of the seedlings grown in a horizontal position differed from those grown in a vertical position. This result implied that CsPIN1 relocalization in the endodermis in response to gravistimulation influenced auxin transport through the endodermis, resulting in asymmetric auxin distribution in the transition zone. Now, we are conducting space flight experiments to demonstrate gravity-responses of CsPIN1 localization. Our experiments will provide a new insight of auxin transport system in response to gravity of plants.

Key words: Auxin, Cucumber, Peg, CsPIN1

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。植物は自身の個体を移動できないので、重力刺激を含めた環境刺激に応答し、形態形成を変化させ、環境に適応している。植物の重力に応答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。植物の地上部の器官である胚軸や茎

は、重力方向の逆側（上側）に屈曲・伸長する負の重力屈性を、地下部の器官である根は、重力方向側（下側）に屈曲・伸長する正の重力屈性を発現する。正と負の重力屈性のどちらでも、器官を横倒し、重力刺激を器官に与えると、器官の上側に比べて、下側により多くのオーキシシンが蓄積する。このオーキシシンの偏差分布により、偏差成長が生じて、器官は屈曲する。植物は重力屈性以外にも、重力刺激に応答し

た形態形成を発現する。本稿では、それらのうち、我々が注目し、研究を行っているキュウリの芽生えの重力形態形成を解説する。

2. キュウリ芽生えの重力形態形成

キュウリ種子を吸水させ、発芽させると、発根し、根が重力屈性により下側に屈曲する。そして、胚軸と根の境界域の下側にひとつの突起（ペグ）を形成する。ペグは種皮を押さえるため、その後の胚軸の伸長により、ペグに押さえられた種皮から子葉・幼芽部が抜け出す。このように、ペグは発芽を促進する役割を果たしている。人為的にキュウリの種子を垂直に置き、発芽させると、境界域の左右に一つずつ、計二つのペグが形成される。したがって、キュウリの芽生えは重力方向に応答し、ペグの形成面を決定していると考えられる。

我々は、ペグ形成に重力刺激が必要か否かを明らかにする目的で、1998年にスペースシャトル ディスカバリーでの微小重力条件下でキュウリの芽生えを発芽させる宇宙実験を行った¹⁾。その結果、微小重力条件下で発芽させたキュウリの芽生えは、境界域の左右に一つずつ、計二つのペグを形成した。本解析結果により、重力刺激はペグ形成に必須ではないことが明らかになった。そして、キュウリ芽生えは、本来、境界域の左右に一つずつ、合計二つのペグを形成する能力を持つこと、及び、キュウリの芽生えを水平に発芽させると、境界域の上側のペグ形成が重力応答により抑制され、下側にのみ、ペグが形成されることが示された。

3. オーキシンによるペグ形成の誘導

植物ホルモンの一種であるオーキシンは、胚のパターン形成、維管束分化、葉序・花序の形成などの形態形成や、重力屈性や光屈性に機能する。オーキシンは主に地上部の先端付近で合成され、根の方向に極性を持って輸送される。キュウリの芽生えが発芽した直後に、子葉を切り取ると、ペグが十分に発達しなくなり、切断面にオーキシンを含む寒天を処理すると、処理するオーキシンの濃度の上昇に伴って、より大きなペグが形成された²⁾。また、子葉と境界域の間に、オーキシン輸送の阻害剤である 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) を処理すると、形成されるペグが小さくなった²⁾。これらの結果から、オーキシンはペグの発達を促進すると考えられた²⁾。我々は、水平に発芽させたキュウリの芽生えの全体にオーキシンを処理すると、境界域の下側だけでなく、上側にもペグが形成されること、オーキシンの作用阻害剤である *p*-chlorophen-oxymisobutyric acid (PCIB) を処理するとペグ形成が抑制されることから、オーキシンがペグ形成を誘導することを示した^{3,4)}。そして、ペグ形成開始期の境界域でのオーキシンの内生量を比較すると、水平に発芽させた芽生えの境界域のペグを形成しない上側のオーキシン量は、ペグを形成する下側、

及び垂直に発芽させた芽生えの境界域の片側のオーキシン量よりも少なかった²⁾。したがって、キュウリの種子を水平に置き、発芽させると、境界域のオーキシンが偏差的に分布し、境界域の上側ではペグ形成に必要な量のオーキシンが蓄積しないため、ペグ形成が誘導されないと考えられた。

キュウリの芽生えからオーキシンで発現が増加するオーキシン誘導性遺伝子 (*CsIAA1*) cDNA を単離し、その mRNA の蓄積を解析した結果、水平に発芽させた芽生えの境界域の上側の *CsIAA1* mRNA 量は、境界域の下側、及び垂直に発芽させた芽生えの境界域の片側の *CsIAA1* mRNA 量よりも少なかった^{5,6)}。また、キュウリの芽生えの組織片に異なる濃度のオーキシンを処理すると、*CsIAA1* mRNA 量は、処理するオーキシンの濃度依存的に増加した。したがって、*CsIAA1* の発現量は、内生オーキシン量を反映していると考えられた^{5,6)}。そこで、1998年に行われた宇宙実験では、微小重力条件下で生育させたキュウリを固定液で保存し、地上に回収し、*in situ* hybridization により *CsIAA1* mRNA の発現を組織化学的に解析した⁶⁾。まず、地上で種子を水平に置き、発芽させたキュウリの芽生えの横断切片では、境界域の下側の皮層と表皮細胞に *CsIAA1* mRNA に対するシグナルが認められたが、境界域の上側にはシグナルが認められなかった。一方、種子を垂直に置き、発芽させたキュウリの芽生えの横断切片では、境界域の全域の皮層と表皮細胞に *CsIAA1* mRNA に対するシグナルが認められた。微小重力条件下で生育させたキュウリの芽生えの横断切片では、地上で垂直に生育させたキュウリと同様に、境界域の全域の皮層と表皮細胞に *CsIAA1* mRNA に対するシグナルが認められた。以上の結果から、水平に発芽させた芽生えでは、重力刺激により境界域の上側で、オーキシン濃度が低く抑えられるため、ペグ形成が誘導されないと考えられた。そして、宇宙実験において微小重力条件下で生育させたキュウリでは、境界域のオーキシン濃度を低下させる重力応答が生じなかったため、ペグ形成に必要なとされるオーキシン濃度が保たれた結果、2つのペグが形成されたと考えられた。

4. オーキシン輸送によるペグ形成面の制御

オーキシンの分布は主にオーキシンの輸送によって制御されている。オーキシンは、細胞内から細胞外へとオーキシンを排出するオーキシン排出キャリアと、細胞外から細胞内にオーキシンを取込むオーキシン取込みキャリアにより、細胞間を輸送される。そして、オーキシン排出キャリアが局在し、オーキシンを細胞外へ排出する向きが、オーキシン輸送の方向を決める。前述の TIBA は細胞のオーキシン排出活性を阻害することにより、オーキシンの輸送を阻害する⁶⁾。キュウリの種子を水平に置き、発芽させる

時に、芽生え全体に TIBA を処理すると、境界域の上側にもペグが形成された⁷⁾。したがって、重力刺激に応答したペグ形成の抑制には、オーキシン排出キャリアが重要な役割を果たしていると考えられた (Fig. 1)。

そこで、我々はキュウリの芽生えの重力感受細胞であると予想される内皮細胞で発現しているオーキシン排出キャリアの同定を試みた。まず、オーキシン排出キャリアの PIN をコードする cDNA (*CsPIN1* から *CsPIN6*) を単離し、それらをプローブとして対応する mRNA の蓄積を解析した。その結果、*CsPIN1* mRNA が境界域での内皮細胞で発現していることを明らかにした^{7, 8)}。そして、*CsPIN1* オーキシン排出キャリアに対する抗体を作成し、縦断切片を用いて免疫組織化学的解析を行った⁸⁾。その結果、垂直に種子を置き、発芽させた芽生えの多くの内皮細胞では、*CsPIN1* は細胞の内側の維管束側に局在していた。一方、水平に発芽させた芽生えの境界域の上側の内皮層の細胞の下側により多くの *CsPIN1* が蓄積していた。さらに、垂直に発芽させた芽生えを横倒し、重力刺激を与えてから 30 分後には、*CsPIN1* は、内皮細胞の境界域の内側 (維管束側) への局在から、下側への局在に変化した。垂直に発芽させた芽生えを横倒した後のオーキシンの内生量の経時的变化を解析した結果、芽生えを横倒してから 30 分後から、境界域の上側のオ

ーキシンの内生量に比べて下側のオーキシンの内生量が多くなった。したがって、*CsPIN1* の局在の変化により、オーキシンの偏差分布が生じている可能性が示唆された⁸⁾。

我々は、現在、この *CsPIN1* の内皮細胞の下側への局在が重力応答であることを、国際宇宙ステーション内での微小重力環境下を利用した宇宙実験により検証している。本宇宙実験により、*CsPIN1* の重力応答性が明らかになるとともに、重力に応答したオーキシンの偏差分布の制御の機構の新しい概念が提唱されると期待される。

参考文献

- 1) Witztum, A., Gersani, M.; The role of IAA in the development of the peg in *Cucumis sativus* L., Bot. Gaz. 136: 5-16 (1975)
- 2) 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)
- 3) Kamada, M., Fujii, N., Aizawa, S., Kamigaichi, S., Mukai, C., Shimazu, T., Takahashi, H.; Control of gravimorphogenesis by auxin: accumulation pattern of *CS-IAA1* mRNA in cucumber seedlings grown in space and on the ground, Planta 211: 493-501 (2000)
- 4) Shimizu, M., Miyazawa, Y., Fujii, N., Takahashi, H.; *P*-chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response for gravity-regulated peg formation in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings, J Plant Res. 121: 107-114 (2008)
- 5) Fujii, N., Kamada, M., Yamasaki, S., Takahashi, H.; Differential accumulation of *Aux/IAA* mRNA during seedling development and gravity response in cucumber (*Cucumis sativus* L.), Plant Mol. Biol. 42: 731-740 (2000)
- 6) Rubery, P.H., Sheldrake, A.R.; Carrier-mediated auxin transport, Planta 118: 101-121 (1974)
- 7) Kamada, M., Yamasaki, S., Fujii, N., Higashitani, A., Takahashi, H.; Gravity-induced modification of auxin transport and distribution for peg formation in cucumber seedlings: possible roles for *CS-AUX1* and *CS-PIN1*, Planta 218: 15-26 (2003)
- 8) Watanabe, C., Fujii, N., Yanai, K., Hotta, T., Kim, D.H., Kamada, M., Sasagawa-Saito, Y., Nishimura, T., Koshiba, T., Miyazawa, Y., Kim, K.M., Takahashi, H.; Gravitostimulation changes the accumulation pattern of the *CsPIN1* auxin efflux facilitator in the endodermis of the transition zone in cucumber seedlings, Plant Physiol. 158: 239-251 (2012)

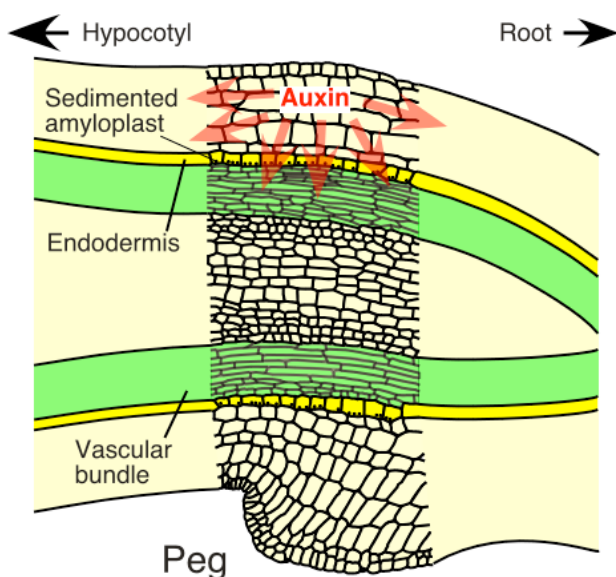


Fig. 1 キュウリ芽生えのオーキシン輸送を介した重力応答によるペグ形成の抑制に関するモデル。水平に発芽させたキュウリの芽生えの境界域の上側で、重力刺激によりオーキシン排出キャリア依存的にオーキシンが減少し、ペグ形成が抑制されると考えられる。沈降性アミロプラスト (Sediment amyloplast) を持ち、境界域で重力刺激を感受すると考えられている内皮細胞 (Endodermis) と、子葉付近で合成されたオーキシンを根の方向へ輸送する維管束 (Vascular bundle) を示した。