

キュウリの芽ばえの重力形態形成にともなうオーキシン分布の重力応答性の抗オーキシン抗体を用いた免疫組織学的解析

東北大学大学院生命科学研究科 藤井伸治、渡辺千秋、矢内健一、宮沢豊、高橋秀幸

Analysis of gravity-response of auxin distribution in gravimorphogenesis of cucumber seedlings by immunohistochemical staining with anti-auxin antibody

Nobuharu Fujii, Chiaki Watanabe, Kenichi Yanai, Yutaka Miyazawa and Hideyuki Takahashi
Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Katahira 2-1-1 Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8577

E-Mail: nobuharu@ige.tohoku.ac.jp

Abstract: When cucumber seeds are placed in a horizontal position for germination, resulting seedlings develop a specialized protuberance, termed the peg, on the lower side of the transition zone between the hypocotyl and the root, due to gravistimulation. On the other hand, in our space-flight experiment of STS-95, cucumber seedlings grown under microgravity conditions developed a peg on each side of the transition zone, suggesting that gravistimulation was required for suppressing the peg formation on the upper side of the transition zone. We have shown that auxin induces peg formation. In addition, the decrease in mRNA accumulation of auxin-inducible *CsIAA1* gene was detected in the upper side of the transition zone of horizontally-grown cucumber seedlings, whereas the decrease in *CsIAA1* transcript level was not found in the transition zone of space-grown seedlings. We have therefore proposed that gravistimulation induces the decrement of IAA in the upper side of the transition zone and thus suppresses peg formation. However, the auxin distribution in the transition zone during peg formation is still unknown. To reveal the IAA distribution upon gravistimulation in the transition zone, we are now investigating the auxin distribution by immunofluorescence method using anti-IAA monoclonal antibody and will present our recent results about that.

Key words; auxin, Cucumber, gravimorphogenesis, plant, peg

【はじめに】

植物は、環境刺激にตอบสนองすることで様々な環境下での生存を可能にしている。植物の環境応答の中でも、重力応答は、自身の体制を制御し、生存を有利にするために重要である。ウリ科植物に観察されるペグ形成は重力にตอบสนองした形態形成の1つである。ウリ科植物の種子を水平に静置して発芽させた芽ばえでは、胚軸と根の境界領域の下側にペグと呼ばれる突起が形成される¹⁾。胚軸がフックを形成しながら上に伸長する時に、ペグは下側の種皮を押さえ、子葉の種皮からの脱皮を容易にする。種子を水平に置いて発芽させた芽ばえは、境界域の下側の面に1個のペグを形成するのに対し、垂直に置いて発芽させた芽ばえは、境界域の両側に1個ずつ、合計2個のペグを形成する。このように、ペグ形成は、その境界域での形成面が発芽直後の芽ばえの重力に対する向きにより決まる重力形態形成である。私たちは、ウリ科植物であるキュウリ (*Cucumis sativus* L.) の種子を微小重力下で発芽させると、芽ばえの境界域の両側に1つずつペグが形成されることを明らかにした²⁾³⁾。したがって、キュウリ芽ばえは重力非

依存的に境界域の両側に1個ずつのペグを形成する能力を持つが、1g環境下で種子を水平に置いて発芽させた場合、重力刺激にตอบสนองして境界域の上側におけるペグ形成が抑制されると考えられた。この宇宙実験の結果から「重力による形態形成のネガティブコントロール」と名付けた新たな概念を提唱した²⁾³⁾。

植物ホルモンのオーキシンの添加により、水平に発芽させたキュウリ芽ばえの境界域の上側にもペグ形成が誘導されること⁴⁾、植物ホルモンのオーキシンの定量実験により、水平に置いて発芽させた芽ばえの境界域の上側においてオーキシン量が減少すること⁴⁾、オーキシン誘導性遺伝子 (*CsIAA1*, *CS-ACSI*) とオーキシン抑制遺伝子 (*CsGRPI*) の発現解析より、水平に置いて発芽させた芽ばえの境界域の上側においてオーキシン誘導性遺伝子の発現が減少するとともにオーキシン抑制遺伝子の発現は増加することを示してきた⁴⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。以上の解析結果から、オーキシンはペグ形成を誘導していると考えられる。そして、オーキシン排出キャリアの阻害剤である TIBA または HFCA 処理により、境界域

の上側にもペグ形成が誘導されることから、重力刺激に応答したペグの形成面の決定にはオーキシン排出キャリアが重要な役割を担うと考えられる⁵⁾。そこで、キュウリからオーキシン排出キャリアをコードする6種類のcDNA (*CsPIN1* - *CsPIN6*) を単離し、これらのmRNAの蓄積を *in situ* hybridization により解析したところ、重力感受細胞と考えられる内皮において、*CsPIN1* と *CsPIN6* の mRNA の蓄積が認められた⁵⁾⁹⁾。そこで、境界域における重力刺激に応答したオーキシンの動態変化を理解するために、境界域の内皮において発現する *CsPIN1* タンパク質に対する抗体を作成し、ペグ形成開始時の境界域における *CsPIN1* タンパク質の局在と重力にに応答した動態変化を免疫組織化学染色法により解析した。その結果、*CsPIN1* タンパク質のシグナルは、隣り合う内皮細胞のうち、境界域のより髄側に位置する内皮細胞に面する側の細胞膜に認められ、そのシグナルが認められる細胞膜の向きが内皮の途中の細胞で逆転していた。*CsPIN1* タンパク質のシグナルが認められる内皮細胞の細胞膜の向きが逆転する位置は、垂直置き芽ばえではほぼ中間であったのに対し、水平置き芽ばえでは、中間より上側にあった。すなわち、境界域の内皮での *CsPIN1* タンパク質の局在パターンは、垂直置き芽ばえでは対称的であるのに対し、水平置き芽ばえでは内皮の上下で非対称的であった。そして、吸水後24時間目の垂直置き芽ばえを横倒して重力刺激を与えた時の *CsPIN1* タンパク質の局在の経時的変化を解析した結果、*CsPIN1* タンパク質の重力にに応答した変化には、重力刺激後120分の時間を必要とすることがわかった。一方、垂直に発芽させた24時間齢の芽ばえに一定時間の重力刺激を加え、その後、72時間齢まで芽ばえをクリノスタット条件下で生育させ、ペグ形成に必要な重力刺激の時間を解析した結果、2分間の重力刺激により70%の芽ばえでペグ形成の抑制が認められた。さらに、垂直に発芽させた24時間齢の芽ばえに2分間の重力刺激を与え、118分間、クリノスタット条件下で生育させた芽ばえの境界域の内皮での *CsPIN1* タンパク質の局在パターンの変化が認められ、内皮での *CsPIN1* タンパク質の局在パターンの変化は2分間の重力刺激により誘導されることが示された。

以上の結果から、重力感受細胞である内皮での *CsPIN1* オーキシン排出キャリアの局在パターンが重力刺激により変化することにより、オーキシン分布が変化するか否かを検討する必要が生じた。私たちがこれまでオーキシン分布の指標として解析に用いてきたオーキシン誘導性遺伝子 *CsIAA1* mRNA

の解析は、植物体への IAA 処理から *CsIAA1* mRNA の発現上昇まで1時間程度の時間を要することや、*CsIAA1* の発現はオーキシン以外にも組織特異的な発現制御の影響を受ける可能性があることから、*CsIAA1* mRNA レベルの解析では、重力刺激後、短時間で起こる IAA の分布の変化を明らかにすることは困難であった。そこで、本研究では、IAA に対するモノクローナル抗体を用い、免疫組織化学染色を行うことで、ペグ形成の抑制時における TR 領域横断面の IAA 分布を直接的に解析した。

【結果】

まず、ペグ形成を開始する24時間齢の芽生えから切り出した境界域片を、オーキシンを含まないバッファー中でインキュベートしてオーキシン飢餓処理を行った境界域片と、その後、異なる濃度のオーキシンを含むバッファー中でインキュベートしてオーキシン処理を行った境界域片の横断切片に対して、抗 IAA 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、オーキシン飢餓処理を行った境界域片では、IAA に対するシグナルが検出されず、オーキシン処理を行った境界域片では、処理した IAA 濃度依存的に IAA に対するシグナルが増加した。

抗 IAA 抗体を用いた免疫組織化学染色により、キュウリの芽ばえの境界域の IAA を定量的に検出していると考えられたので、水平に種子を置いて発芽させた芽ばえと、垂直に種子を置いて発芽させた芽ばえの境界域の横断切片に対して、抗 IAA 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、重力に対する芽ばえの向きが IAA の分布に与える影響を解析した。その結果、IAA に対するシグナルは、垂直に種子を置いて発芽させた芽ばえでは、境界域の上下の表皮細胞の核において同等の強度でシグナルが検出された。一方、水平に種子を置いて発芽させた芽ばえでは、境界域の上側に比べ、下側の表皮細胞の核と細胞質で、より強いシグナルが検出された。

次いで、垂直に発芽させた24時間齢のキュウリの芽ばえを横倒して、重力刺激を与えた後の、境界域での IAA の分布の経時的変化を解析した。その結果、2分間の重力刺激により、境界域の上側に比べて下側の表皮細胞で IAA のシグナルが有意に増加した。

【考察】

本研究で行った抗 IAA 抗体を用いた免疫組織化学染色により、ペグ形成開始期の24時間齢のキュウリ芽ばえの境界域において、IAA は表皮で主に蓄積しており、重力形態形成時には境界域の上側に比べ

て下側の表皮の核と細胞質においてより多くの IAA が蓄積していることが明らかになった。さらに、キュウリ芽ばえに重力刺激を与えてから 2 分の間に境界域の表皮細胞においてオーキシンの偏差分布が誘導されることが示唆された。したがって、重力刺激に応答して、境界域の表皮細胞でオーキシンが偏差的に分布した後に、内皮での CsPIN1 オーキシン排出キャリアの局在パターンが変化することが示唆された。今後、2 分間の重力刺激によるオーキシンの偏差分布の形成を検証するとともに、その重力応答における役割を検証する必要がある。

【参考文献】

- 1) Takahashi, H. (1997) Gravimorphogenesis: gravity-regulated formation of the peg in cucumber seedlings. *Planta* 203: S164-S169.
- 2) Takahashi, H., Mamada, M., Yamazaki, Y., Fujii, N., Higashitani, A., Aizawa, S., Yoshizaki, I., Kamigaichi, S., Mukai, C., Shimazu, T., Fukui, K. (1999) Morphogenesis in cucumber seedlings is negatively controlled by gravity. *Planta* 210: 515-518.
- 3) Takahashi, H., Mizuno, H., Kamada, M., Fujii, N., Higashitani, A., Kamigaichi, S., Aizawa, S., Mukai, C., Shimazu, T., Fukui, K., Yamashita, M. (1999) A spaceflight experiment for the study of gravimorphogenesis and hydrotropism in cucumber seedlings. *J. Plant Res.* 112: 493-496.
- 4) Kamada, M., Fujii, N., Aizawa, S., Kamigaichi, S., Mukai, C., Shimazu, T., Takahashi, H. (2000) A role of auxin in the gravity's negative control of morphogenesis: Accumulation pattern of *CS-IAA1* mRNA in cucumber seedlings grown in space and on the ground. *Planta* 211: 493-501.
- 5) Kamada, M., Yamasaki, S., Fujii, N., Higashitani, A., Takahashi, H. (2003) 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.
- 6) Fujii, N., Kamada, M., Yamasaki, S., Takahashi, H. (2000) Differential accumulation of *Aux/IAA* mRNA during seedling development and gravity response in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Mol. Biol.* 42: 731-740.
- 7) Saito, Y., Yamasaki, S., Fujii, N., Takahashi, H. (2005) Possible Involvement of *CS-ACSI* and Ethylene in Auxin-induced Peg Formation of Cucumber Seedlings. *Ann Bot.* 95: 413-422.
- 8) Shimizu, M., Suzuki, K., Miyazawa, Y., Fujii, N., Takahashi, H. (2006) Differential accumulation of the mRNA of the auxin-repressed gene *CsGRP1* and the auxin-induced peg formation during gravimorphogenesis of cucumber seedlings. *Planta* 225, 13-22, 2006.
- 9) Fujii, N., Hotta, T., Kim, D.H., Kamada, M., Miyazawa, Y., Kim, K.M., Takahashi, H. Isolation of cucumber auxin efflux carrier cDNAs and expression of corresponding mRNA in cucumber seedlings. (2005) *Space Utilization Research* 21: 294-297.