

宇宙環境下における植物の成長、発達とオーキシン極性移動 (III) : 特に擬似微小重力環境下で生育させた黄化エンドウ芽生え上胚軸の成長、発達に対するオーキシン極性移動阻害剤の影響

大阪府立大学大学院・理学系研究科
大阪府立大学・総合教育研究機構

星野 友紀・上田 純一*
宮本 健助

Plant growth and development, and auxin polar transport in space (III) : Effects of auxin polar transport inhibitors on growth and development of etiolated pea epicotyls grown under simulated microgravity conditions on a three-dimensional clinostat

Tomoki Hoshino¹, Kensuke Miyamoto^{1,2} and Junichi Ueda^{1*}

¹ Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

² Faculty of Liberal Arts and Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

* Corresponding author, E-mail: ueda@b.s.osakafu-u.ac.jp

Abstract: Both true microgravity conditions in space (STS-95 space experiment) and simulated ones using a three-dimensional (3D) clinostat induced automorphosis together with significant inhibition of auxin polar transport in epicotyls of etiolated pea (*Pisum sativum* L. cv. Alaska) seedlings. Increased expression of the auxin-inducible gene *PsIAA4/5* was observed in the elongated side of epicotyls in the early growth stages of etiolated pea seedlings grown in a horizontal or an inclined position under 1 g conditions. Under simulated microgravity conditions on a 3D clinostat, accumulation of *PsIAA4/5* mRNA was found throughout epicotyls showing automorphosis. Polar auxin transport in the proximal side of epicotyls changed when the seedlings were grown in a horizontal or an inclined position under 1 g conditions, but that under clinorotation did not, regardless of the direction of seed setting. Accumulation of *PsPIN1* and *PsPIN2* mRNAs in epicotyls was affected by gravistimulation, but not by clinorotation. Under 1 g conditions, auxin-transport inhibitors made epicotyls of seedlings grown in a horizontal or inclined position grow toward the proximal direction to cotyledons. These inhibitors led to epicotyl bending toward the cotyledons in seedlings grown in an inclined position under clinorotation. Polar auxin transport, as well as growth direction, of epicotyls of the agravitropic pea mutant, *ageotropum*, did not respond to various gravistimulation. These results strongly suggest that alteration of polar auxin transport in the proximal side of epicotyls regulates the graviresponse of pea epicotyls. It is also possible that one-way lateral auxin distribution in epicotyls in the early growth stage of etiolated pea seedlings is responsible for graviresponse of the seedlings.

Key words; *ageotropum* Pea Mutant, Alaska Pea, Automorphosis, Auxin Polar Transport, Clinostat, Gravistimulation, Efflux Facilitator Protein, Growth and Development, Influx Facilitator Protein, *PsAUX1*, *PsPINs*, Simulated Microgravity

はじめに

我々は、植物の成長、発達とそれに深く関係するオーキシンの動態に対する重力の影響を明らかにするために、1998年 STS-95 宇宙実験を実施した。その結果、宇宙微小重力環境下で生育した黄化エンドウ芽生え上胚軸は自発的形態形成を示すとともに、

オーキシン極性移動が低下することが明らかとなった (Ueda *et al.* 1999, 2000)。これらの事実は、植物の形態形成やオーキシン極性移動は重力によって制御される現象であることを示している。その後地上において実施された一連の研究から、宇宙微小重力環境下で認められる黄化エンドウ芽生え上胚軸の自

発的形態形成は、吸水後の子葉節基部での上胚軸の「負の重力屈性」が阻害された結果であることが明らかにされた (Miyamoto *et al.* 2005)。さらに上胚軸の「負の重力屈性」の阻害は、芽生えの初期成長段階での子葉側、反子葉側上胚軸におけるオーキシンの不均等分布の阻害に起因することが示された (Hoshino *et al.* 2006a, 2006b)。

オーキシン極性移動には、オーキシンの細胞内への取り込みと細胞外への排出に関わる様々な分子の関与が示唆されている (Estelle 1998, Muday and Murphy 2002, Friml and Palme 2002)。Gälweilerらはオーキシンの排出キャリアとしての *AtPIN1* 遺伝子産物の重要性を指摘している (Gälweiler *et al.* 1998, Luschnig *et al.* 1998, Müller *et al.* 1998)。現在まで、シロイヌナズナゲノム中には *AtPIN1* と相同性を示す遺伝子が7個存在し、比較的大きなファミリーを形成していることが知られている (Muday and Murphy 2002)。一方、*AtAUX1* 遺伝子については、これがオーキシンの取り込みキャリアをコードしている可能性が示されている (Bennett *et al.* 1996, Marchant *et al.* 1999, Swarup *et al.* 2001)。著者らの先行研究において、黄化エンドウ芽生えからオーキシン極性移動に関係すると考えられる新規遺伝子、*PsPIN2* (Hoshino *et al.* 2003) および *PsAUX1* (Hitotsubashi *et al.* 2003) が分離された。また、ほぼ時を同じくして Chawla と DeMason (2003) によって *AtPIN1* 遺伝子と高い相同性を示す *PsPIN1* が分離されている。

そこで、本研究においては正常な重力応答反応を示す Alaska エンドウならびに重力応答突然変異体である *ageotropum* エンドウを対象として、それらの成長、発達に対する重力刺激とオーキシン極性移動阻害剤の影響を検討することとした。

材料および方法

植物材料には、著者らが 1998 年に実施した STS-95 植物宇宙実験と同様に、黄化エンドウ (*Pisum sativum* L. cv. Alaska) 芽生えを用いた (Ueda *et al.* 1999)。本研究では、上胚軸の重力反応を明確に示す目的で、胚の軸方向が重力方向に垂直 (horizontal) あるいは反重力斜め上方向 (inclined) となるように乾燥種子をロックワールに置床した。植物の育成、およびオーキシン極性移動阻害剤の処理については、従来と同様の方法に従った (Ueda *et al.* 2002)。擬似微小重力環境の作出は3次元クリノスタットにより (Shimazu *et al.* 2001)、また、オーキシン極性移動能の測定には放射性 IAA を使い、既に報告された方法に従った (Oka *et al.* 1995)。オーキシン極性移動関連遺伝子、およびオーキシン応答性遺伝子の発現解析は既に報告された方法に従い、ノーザンブロット法あるいは *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて行った (Hoshino *et al.* 2005, 2006a, 2006b)。

結果および考察

Alaska エンドウ種子を胚が重力ベクトルに対して垂直上向き (horizontal)、あるいはやや斜め上向き (inclined) になるように播種し、暗所で発芽、生育させた。その結果、前者では子葉側上胚軸の成長が、また、後者では反子葉側上胚軸の成長がそれぞれ促進され、芽生え上胚軸は正常な重力応答反応を示した。*ageotropum* エンドウ種子を Alaska エンドウと同様に播種し、暗所で発芽、生育させると、いずれの場合も芽生え上胚軸は子葉から離れる方向約 45° の角度でまっすぐ伸長し、宇宙微小重力環境下で認められる自発的形態形成 (様の成長、発達) を示した。Alaska エンドウ種子を3次元クリノスタット上で作出される擬似微小重力環境下で同様に播種し、暗所で発芽、生育させた場合、*ageotropum* エンドウの場合と同様に、いずれの播種方向においても上胚軸は子葉から離れる方向、すなわち自発的形態形成様の成長、発達を示した (Fig. 1)。

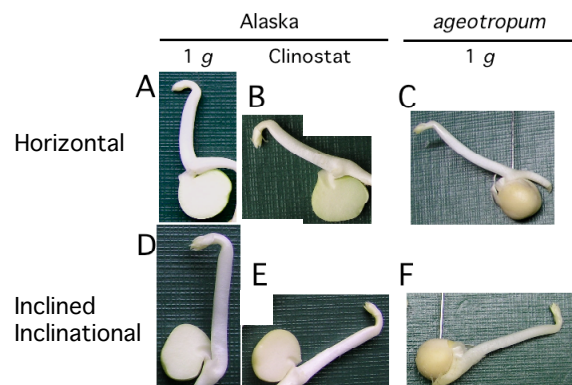


Fig. 1. Growth and development of the 1st internode of etiolated epicotyls in the early growth stage of Alaska and *ageotropum* pea seedlings grown under 1 g or simulated microgravity conditions on a 3D clinostat.

植物の茎における屈曲現象では、茎細胞の偏差的な成長を引き起こす茎でのオーキシンの不均等分布が重要であると考えられている。黄化エンドウ芽生えの初期成長過程における重力応答反応としての上胚軸の屈曲も、他の植物の場合と同様に、オーキシンの不均等分布に依存している可能性がある。実際、エンドウのオーキシン応答性遺伝子である *PsIAA4/5* の発現を指標として上胚軸の内生オーキシンレベルを調べた結果、horizontal あるいは inclined となるように種子を置床した場合、上胚軸の成長が相対的に大きくなる側でオーキシンの内生レベルが高くなることを示された (Hoshino *et al.* 2006a, 2006b)。以上の事実は、上胚軸における内生オーキシンの不均等分布が上胚軸において偏差成長を誘導し、その重力応答反応の原因となっていることを示唆している。

放射性オーキシン ([1-¹⁴C]indole-3-acetic acid) を用いてオーキシン極性移動を測定した結果、黄化

Alaska エンドウ芽生えにおける子葉側上胚軸のオーキシン極性移動は、3次元クリノスタット上で認められる自発的形態形成に類似した成長、発達を示す場合、地上 1g 環境下と比較して低下していた。同様の低下は、地上 1g 環境下で生育させた黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸においても認められた (Fig. 2)。オーキシン極性移動に関してその排出キャリアをコードしている *PsPIN1*、*PsPIN2* および取り込みキャリアをコードしている *PsAUX1* の発現をノーザンブロット法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した結果、*PsPIN1* および *PsPIN2* 遺伝子の発現は、黄化 Alaska エンドウ芽生え上胚軸における不均等なオーキシン極性移動および子葉節基部でのオーキシンの不均等分布と相関していることが示された。

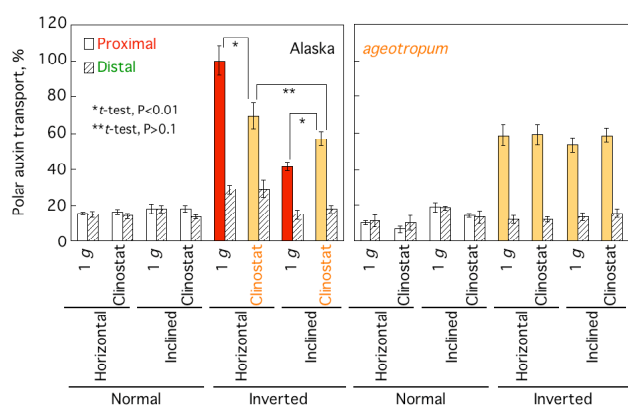


Fig. 2. Auxin polar transport in the proximal or the distal side of the 1st internode in etiolated Alaska and *ageotropum* pea seedlings grown under 1g or simulated microgravity conditions on a 3D clinostat. Embryo axes of dry seeds were set in a horizontal or an inclined position. “Normal” and “Inverted” indicate that [1-¹⁴C]IAA was applied to the lower and the upper sides of epicotyl segments, respectively (Hoshino *et al.* 2007) .

Alaska エンドウを 1g 環境下、暗所で各種オーキシン極性移動阻害剤、すなわち 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA)、*N*-(1-naphthyl)phtalamic acid (NPA)あるいは 9-hydroxyfluorene-9-carboxylic acid (HFCA)存在下で生育させると、宇宙微小重力環境下、あるいは 3次元クリノスタット上で作出される擬似微小重力環境下において認められる自発的形態形成に類似した成長、発達を示した (Miyamoto *et al.* 2005)。本研究において、Alaska エンドウ種子を暗所、horizontalあるいは inclined に播種し、芽生えにオーキシン極性移動阻害剤 (TIBA) を処理することによって上胚軸子葉側のオーキシン極性移動を低下させると上胚軸は子葉側に屈曲した。1g 環境下に比べてオーキシン極性移動が低下する 3次元クリノスタット上での擬似微小重力環境下、暗所で Alaska エンドウ種子を horizontal あるいは inclined に播種し、芽生えに TIBA を処理すると、自発的形態形成に類似した成

長、発達が見られず、上胚軸は 1g 環境下で認められる正常な重力応答反応と同様に子葉側に屈曲した。この現象は、種子を inclined に播種した場合に顕著であった。正常な重力応答反応が認められない *ageotropum* エンドウ種子を暗所、horizontal あるいは inclined に播種し、芽生えに TIBA を処理した場合も上胚軸は同様に子葉側に屈曲した。特に、種子を inclined に播種した場合は、あたかも *ageotropum* エンドウが正常な重力応答反応を回復したかのように、上胚軸は子葉側に大きく屈曲した (Hoshino *et al.* 2007)。

以上の結果から、黄化エンドウ芽生え上胚軸における負の重力屈性 (正常な重力応答反応) は、上胚軸子葉側のオーキシン極性移動によって制御されていること、また、その極性移動能に応じて変化する上胚軸子葉側および反子葉側に分布する内生オーキシンレベルが重要であることが示唆された。また、上胚軸におけるオーキシン極性移動のみならず、上胚軸子葉側から反子葉側へのオーキシンの移動にはオーキシンの排出キャリアである *PsPINs* が重要な役割を担うことが推察された。我々が実施した一連の先行研究において、エンドウにおける *PsPINs* 遺伝子もシロイヌナズナと同様にファミリーを形成している可能性が指摘されている。推定アミノ酸配列に基づいた検索結果から、*PsPIN1* タンパク質がオーキシン排出キャリアとされる *AtPIN1* と、また、*PsPIN2* がシロイヌナズナの根においてオーキシンの横移動に関係するとされる *AtPIN3* (Friml *et al.* 2002) と高い相同性を示すことが明らかとなった (Hoshino *et al.* 2005)。オーキシン極性移動が著しく低下したシロイヌナズナ *pin* 突然変異体に関する研究から明らかにされたこのような PIN タンパク質は、オーキシンを細胞外へ排出するためのキャリアタンパク質であると考えられているが、今日までオーキシンが実際に PIN タンパク質と直接に相互作用していることを示す生化学的研究結果は得られていない。

一方、シロイヌナズナにおいて、近年 *pin* 突然変異体以外にもオーキシン極性移動が低下している突然変異体が得られ、その原因遺伝子が同定されている。その一つに、動物で発見された多剤耐性 (MDR) 様遺伝子がある。MDR タンパク質は細胞における膜を介した物質輸送に関与していること (Noh *et al.* 2001, Luschnig 2002, Martinoia *et al.* 2003)、また、これがオーキシン極性移動阻害剤である NPA の結合部位を有していること (Murphy *et al.* 2002) から、オーキシンの輸送には PIN タンパク質とともに MDR 様タンパク質が重要であることが指摘されている。今後は、重力刺激の変化に対応するオーキシン極性移動の変化が内生オーキシンレベルをどの様なメカニズムで制御しているかを解明することが重要であると考えられる。エンドウにおける *PsPINs* 並びに *PsAUX1/LUX* 遺伝子産物に対する抗体などを用い、これらの遺伝子産物の細胞内分布や機能を詳細に解析することが必要である。また、オーキシン極性移動と MDR 様タンパク質との関係を明らかに

し、植物の初期重力応答反応とオーキシン極性移動ならびに植物の形態形成の関係を明らかにすることが望まれる。さらに、本研究において明らかになったように、宇宙微小重力環境下における植物の姿勢制御にはオーキシン極性移動阻害剤の利用が有効であるかも知れない。今後は、この点に関する応用研究も必要であると考えられる。

参考文献

- Bennett, M., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schultz, B. and Feldmann, K. A. (1996) *Arabidopsis AUX1* gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, **273**, 948-950.
- Chawla, R. and DeMason, D. A. (2003) PsPIN1, putative auxin efflux protein. Accession no. AY222857, DDBJ/EMBL/GenBank databases.
- Estelle, M. (1998) Polar auxin transport: New support for an old model. *Plant Cell*, **10**, 1775-1778.
- Friml, J. and Palme, K. (2002) Polar auxin transport – old question and new concepts? *Plant Molecular Biology*, **49**, 273-282.
- Friml, J., Wisniewska, J., Benková, E., Mendgen, K. and Palme, K. (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, **415**, 806-809.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. and Palme, K. (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, **282**, 2226-2230.
- Hitotsubashi, R., Miyamoto, K., Hoshino, T., Tanimoto, E. and Ueda, J. (2003) PsAUX1, putative auxin influx carrier protein. Accession no. AB107919, DDBJ/EMBL/GenBank databases.
- Hoshino, T., Hitotsubashi, R., Miyamoto, K., Tanimoto, E. and Ueda, J. (2003) Putative auxin transport protein, PsPIN2, in etiolated pea (*Pisum sativum* L. cv. Alaska). Accession no. AB112364, DDBJ/EMBL/GenBank databases.
- Hoshino, T., Hitotsubashi, R., Miyamoto, K., Tanimoto, E. and Ueda, J. (2005) Isolation of *PsPIN2* and *PsAUX1* from etiolated pea epicotyls and their expression on a three-dimensional clinostat. *Adv. Space Res.*, **36**, 1284-1291.
- Hoshino, T., Miyamoto, K., Yamashita, M. and Ueda, J. (2006a) Auxin polar transport is essentially required for graviresponse in early growth stage of etiolated pea seedlings. *J. Gravitational Physiol.*, **13**, 113-114.
- Hoshino, T., Miyamoto, K. and Ueda, J. (2006b) 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.
- Hoshino, T., Miyamoto, K. and Ueda, J. (2007) Gravity-controlled symmetrical transport of auxin regulates a gravitropic response in the early growth stage of etiolated pea (*Pisum sativum*) epicotyls: studies using simulated microgravity conditions on a three-dimensional clinostat and using an agravitropic mutant, *ageotropum*. *J. Plant Res.*, **120**, 619-628.
- Luschnig, C. (2002) Auxin transport: ABC proteins join the club. *Trends Plant Sci.*, **7**, 329-332.
- Luschnig, C., Gaxiola, R. A., Grisafi, P. and Fink, G. R. (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Dev.*, **12**, 2175-2187.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S. T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C. and Bennett, M. J. (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake with in root apical tissues. *EMBO J.*, **18**, 2066-2073.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Muller-Rober, B. and Schultz, B. (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters – more than just detoxifiers. *Planta*, **214**, 345-355.
- Miyamoto, K., Hoshino, T., Yamashita, M. and Ueda, J. (2005) 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.
- Muday, G. K. and Murphy, A. S. (2002) An emerging model of auxin transport regulation. *Plant Cell*, **14**, 293-299.
- Murphy, A. S., Hoogner, K. R., Peer, W. A. and Taiz, L. (2002) Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **128**, 935-950.
- Müller, A., Guan, C., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. and Palme, K. (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.*, **17**, 6903-6911.
- Noh, B., Murphy, A. S. and Spalding, E. P. (2001) Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell*, **13**, 2441-2454.
- Oka, M., Ueda, J., Miyamoto, K., Yamamoto, R., Hoson, T. and Kamisaka, S. (1995) Effect of simulated microgravity on auxin polar transport in inflorescence axis of *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Sci. Space*, **9**, 331-336.
- Shimazu, T., Yuda, T., Miyamoto, K., Yamashita, M. and Ueda, J. (2001) Growth and development in higher plants under simulated microgravity conditions on a 3-dimensional clinostat. *Adv. Space Res.*, **27**, 995-1000.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K. and Bennett, M. (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes & Dev.*, **15**, 2648-2653.
- Ueda, J., Hitotsubashi, R., Miyamoto, K. and Yamashita, M. (2002) Perception and movement of plant hormones in higher plants under simulated microgravity conditions: Growth and development, and auxin polar transport (III). *Space Utilization Res.*, **18**, 168-171.
- Ueda, J., Miyamoto, K., Yuda, T., Hoshino, T., Fujii, S., Mukai, C., Kamigaichi, S., Aizawa, S., Yoshizaki, I., Shimazu, T. and Fukui, K. (1999) 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.
- Ueda, J., Miyamoto, K., Yuda, T., Hoshino, T., Sato, K., Fujii, S., Kamigaichi, S., Izumi, R., Ishioka, N., Aizawa, S., Yoshizaki, I., Shimazu, T. and Fukui, K. (2000) STS-95 space experiment for plant growth and development, and auxin polar transport. *Biol. Sci. Space*, **14**, 47-57.