



## 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 (I) : 特に3次元クリノスタットにより作出された擬似微小重力環境を用いた解析

大阪府立大学大学院・理学系研究科

星野 友紀・宮本 健助・上田 純一\*

Plant growth and development, and auxin polar transport in space (I) : Based on the analysis using simulated microgravity conditions on a three-dimensional clinostat

Tomoki Hoshino, Kensuke Miyamoto and Junichi Ueda\*

Graduate School of Science, 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: Plant shoots grow to the direction away from the gravity vector under 1 g conditions on earth. On the other hand, 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. In epicotyls of 2.5-d old etiolated pea seedlings, whose embryo axes in seeds were set in a horizontal position opposite to the direction of gravity, increased expression of an auxin-inducible gene, *PsIAA4/5*, was observed in the elongated side of epicotyls grown in a horizontal or an inclined (inclinal) position. Activities of auxin polar transport and gene expression of *PsPIN1* encoding a facilitator protein of auxin polar transport were respectively asymmetrical in proximal and distal side of epicotyls, it being much higher in proximal side than in distal one. Auxin polar transport in the proximal side of epicotyls grown in an inclined (inclinal) position was significantly lower than in those grown in a horizontal position as well. Simulated microgravity conditions on a 3D clinostat were substantially changed the activities of auxin polar transport in proximal and distal side of epicotyls observed under 1 g conditions. These results strongly support the idea that gravistimulation induces changeable auxin polar transport and one-way lateral auxin distribution in epicotyls in early growth stage of etiolated pea seedlings.

**Key words;** Automorphosis, Auxin Polar Transport, Clinostat, Gravistimulation, Efflux Facilitator Protein, Growth and Development, Influx Facilitator Protein, Microgravity, Pea, *PsAUX1*, *PsPIN1*

### はじめに

黄化エンドウおよび黄化トウモロコシ芽生えを宇宙微小重力環境下あるいは3次元クリノスタット上の擬似微小重力環境下で発芽、生育させると、地上部の負の重力屈性反応が阻害され、芽生えは自発的形態形成を示すとともに、上胚軸および幼葉鞘におけるオーキシン極性移動が著しく影響されることが示された (Ueda *et al.* 1999, 2000, Shimazu *et al.* 2001, Miyamoto *et al.* 2005)。特に、黄化エンドウ芽生えにおいては上胚軸のオーキシン極性移動の低下が認められる。さらに、地上1g環境下においてオーキシン極性移動阻害剤を外生的に処理すると自発的形態形成に類似した芽生えの成長、発達が認められる。以上の事実は、オーキシン極性移動が黄化エンドウ芽生えの重力応答反応に密接に関わっていることを強く示唆している (Miyamoto *et al.* 2005)。また、3次元クリノスタットを用いて作出された擬似

微小重力環境下における自発的形態形成様の成長、発達の経時的解析結果から、黄化エンドウ芽生えにおける自発的形態形成は、芽生えの初期成長過程における重力応答反応の阻害によるものであることが示唆された (Miyamoto *et al.* 2005)。

オーキシン極性移動においては、オーキシン極性移動を司ると考えられる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らはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた研究から、オーキシン極性移動システムにおいてオーキシンの efflux carrier 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 influx carrier 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)。

黄化エンドウ芽生えを対象とした著者らの先行研究において、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) によっても *AtPIN1* 遺伝子と高い相同性を示す *PsPIN1* が分離されている。

本研究では、STS-95 宇宙実験で用いた黄化エンドウ芽生えを対象として、芽生えに与える 1 g の重力方向をさまざまに変化させるとともに、3次元クリノスタット上の擬似微小重力環境を利用して、黄化エンドウ芽生え上胚軸の負の重力屈性反応、あるいは芽生えの自発的形態形成とオーキシンの動態との関係を分子レベルの解析を導入しながら明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

植物材料には、著者らが 1998 年に実施した STS-95 植物宇宙実験に合わせて黄化エンドウ (*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、胚の軸方向が水平方向 (horizontal) あるいは反重力斜め方向 (inclined (inclinational)) となるように乾燥種子をロックウールに置床した。植物の育成、および各種化学物質の処理については、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、また、オーキシン極性移動能の測定には放射性 IAA を用い、既に報告された方法に従った (Oka *et al.* 1995, Ueda *et al.* 2002)。

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 (Hoshino *et al.* 2005) 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.* 2006a, 2006b)。

## 結果および考察

### 1. 1 g 重力刺激の方向変化および3次元クリノスタット上の擬似微小重力環境と黄化エンドウ芽生えの初期成長、発達

胚が水平方向 (horizontal) あるいは反重力斜め方向 (inclined (inclinational)) となるように乾燥エンドウ種子をロックウールに置床し、地上 1 g 環境下あるいは3次元クリノスタット上の擬似微小重力環境下の暗所で 48~60 時間生育させた。その結果、1 g 環境下においては、芽生え上胚軸はそれぞれ反子葉

側 (distal) あるいは子葉側 (proximal) に屈曲し、負の重力屈性反応が認められた。擬似微小重力環境下においてはいずれの場合にも芽生え上胚軸は子葉から離れる方向に伸長し、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 (Fig. 1)。

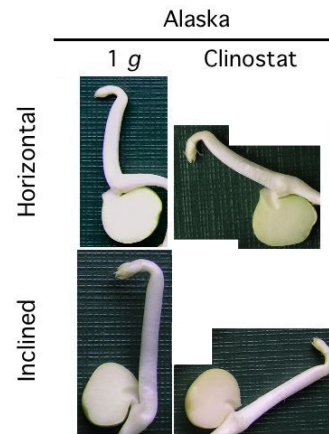


Fig. 1. Growth and development of the 1<sup>st</sup> internode of etiolated epicotyls in the early growth stage of pea seedlings grown under 1 g or simulated microgravity conditions on a 3D clinostat.

### 2. 初期成長過程における黄化エンドウ芽生え上胚軸の重力応答反応とオーキシンの不均等分布

1 g 環境下においては、黄化エンドウ芽生え上胚軸は反重力方向に屈曲し、伸長する。このような植物の茎における屈曲現象は茎細胞の偏差的な成長量に起因し、それにはオーキシンの不均等分布が重要な役割を果たしてい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オーキシンの不均等分布に依存している可能性を想定し、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。その結果、胚が水平方向 (horizontal) あるいは反重力斜め方向 (inclined (inclinational)) となるように種子を置床した場合、上胚軸はいずれも負の重力屈性を示す。この場合、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が示された (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。

### 3. 初期成長過程における黄化エンドウ芽生え上胚軸の重力応答反応とオーキシン極性移動およびその関連遺伝子の発現

さまざまな重力環境の変化に伴って黄化エンドウ芽生え上胚軸が上記のような成長、発達を示す場合の上胚軸におけるオーキシン極性移動を調べた。そ

の結果、第1節間においては反子葉側に比べて子葉側のオーキシン極性移動能が大であり、この子葉側の顕著なオーキシン極性移動は重力刺激の変化に伴ってさまざまに影響されることが示された (Fig. 2)。

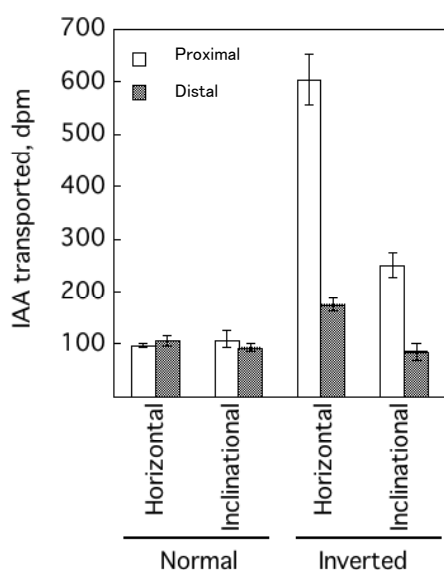


Fig. 2. Auxin polar transport in the proximal or the distal side of the 1<sup>st</sup> internode in etiolated pea seedlings grown under 1g conditions. Embryo axes of dry seeds were set in a horizontal or an inclinational (inclined) position. “Normal” and “Inverted” indicate that [<sup>14</sup>C]IAA was applied to the lower and the upper sides of epicotyl segments, respectively.

シロイヌナズナを用いた分子生物学的研究において、オーキシンが極性的に移動する過程において細胞内から細胞外へのオーキシンの排出に関わる facilitator タンパク質をコードしていると考えられている *AtPIN1*、*AtPIN3* 遺伝子およびオーキシンの細胞外から細胞内への取り込みに関わる facilitator タンパク質をコードしていると考えられている *AtAUX1* 遺伝子が分離されている。我々の先行研究において、エンドウから分離されたそれぞれに高い相同性を示す *PsPIN1*、*PsPIN2* および *PsAUX1* 遺伝子の発現を 1 g 環境下 (horizontal および inclined (inclinational)) および 3 次元クリノスタット上の疑似微小重力環境下と比較した。その結果、種子を horizontal に置床した場合には、*PsPIN1* および *PsPIN2* 遺伝子の発現は芽生え上胚軸の子葉側で強く、特に *PsPIN1* 遺伝子発現の子葉側/反子葉側の比は極めて大きいものであった。*PsAUX1* 遺伝子では子葉側、反子葉側ともほぼ同様の発現を示した。*PsPIN1* 遺伝子の発現は芽生えにおけるオーキシン極性移動能とよく関連していることから、実際、*PsPIN1* 遺伝子産物が細胞内から細胞外へのオーキシンの排出に重要な役割を担っていることが示唆される (Hoshino *et al.* 2006a, 2006b)。

一方、3次元クリノスタット上の疑似微小重力環境下で 48~60 時間生育させた黄化エンドウ芽生え

では、子葉側/反子葉側における *PsPIN1* および *PsPIN2* 遺伝子の発現は 1 g 環境下のそれと比べて低下した。また、その比の値は *PsPIN1* でより低かった。しかしながら、擬似微小重力環境は *PsAUX1* 遺伝子の発現に対してはほとんど影響せず、子葉側/反子葉側の値も 1 g 環境下のそれとほぼ同様であった (Hoshino *et al.* 2006a, 2006b)。

上記のとおり、最近の研究からオーキシン極性移動の制御には PIN タンパク質の動態が重要であることが指摘されてきた。我々の先行研究において指摘したように、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ある。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ーとされる *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 carrier 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を得られ、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。

本研究結果から、高等植物の初期成長過程における (正常な) 重力応答反応にはオーキシン極性移動が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、茎の反重力方向への屈曲に対しては、茎の偏差成長を誘導する内生オーキシンレベルが重要であることが示された。さらに本研究結果から、このような内生オーキシンレベルの調節には、重力によって制御されているオーキシン極性移動が重要な役割を果たしていることが示唆される。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 PIN ファミリー並びに *AUX1/LUX* ファミリーの探索、および *PsPINs* 並びに *PsAUX1* の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。

## 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.
- 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., Bennet 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.