

## キュウリ芽ばえの内皮におけるオーキシン排出キャリア CsPIN1 タンパク質の重力応答性

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

### The gravity-modified localization of CsPIN1 protein in endodermis of cucumber seedlings

Nobuharu Fujii, Kenichi Yanai, Takuya Hotta, 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 a cucumber seedling grows in a horizontal position, a peg develops on the lower side of the transition zone between the hypocotyl and the root. In contrast, a cucumber seedling grown in a vertical position forms a peg on each side of the transition zone. We have suggested that the transition zone responds to gravistimulation, to decrease auxin and to suppress the peg formation on the upper side. To understand the mechanism for the gravity-regulated distribution of auxin in the transition zone, we investigated the localization of CsPIN1 auxin efflux carrier in the transition zone by immunohistochemical analysis. CsPIN1 proteins accumulate not only in vascular tissue but also in endodermis, which has been suggested as a gravisensing tissue. Furthermore, we found that the localization pattern of CsPIN1 protein in endodermis of the transition zone of horizontally grown cucumber seedlings differs from that of vertically grown seedlings. These results suggest that the gravity-modified localization of CsPIN1 in endodermis regulates auxin distribution in the transition zone of cucumber seedlings.

**Key words;** auxin, auxin efflux carrier, CsPIN1, cucumber, endodermis, peg

#### 【はじめに】

植物は、環境変化に応答・適応することで様々な環境下での生存を可能にしている。その中でも、植物の重力応答は、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応答した形態形成の1つである。ウリ科植物の種子は水平に静置して発芽させると、胚軸と根の境界領域 (Transition zone ; TR 領域) の下側に突起状組織であるペグを形成する<sup>1)</sup>。ペグは子葉が脱皮する際に下側の種皮を押さえつけ、胚軸がフックを形成しながら上に伸長するため、子葉の種皮からの脱皮を容易にしている。種子を水平に置いて発芽させた場合、芽ばえは TR 領域の下側の面に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では、多くの個体で TR 領域の両側に1個ずつ、合計2個のペグを形成する。このように、TR 領域でのペグ形成面は発芽直後に重力依存的に決まることから、ペグ形成は重力形態形成であることが示されてきた。我々は、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 TR 領域の両側に1つずつペグが形成されることを明らかにした<sup>2)3)</sup>。したがって、キュウリ芽ばえは重力非依存的に TR 領域の両側に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

刺激に応答して TR 領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」という新たな概念を提唱した<sup>2)3)</sup>。

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 TR 領域の上側にもペグ形成が誘導されること<sup>4)</sup>、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 TR 領域の上側においてオーキシン量が減少すること<sup>4)</sup>、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 TR 領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<sup>4)6)7)8)</sup>。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、TR 領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<sup>5)</sup>。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<sup>5)9)</sup>。したがって、キュウリの TR 領域において内皮細胞が重力刺激に反応して、オーキシン排出キャリアの局在が変動し、TR 領域の上下でオーキシンの偏差分布が形成され、その結果ペグの形成面が決定されると考えられた。そこで、本研究では TR 領域における重力刺激に反応したオーキシンの動態変化を理解するために、TR 領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 TR 領域における CsPIN1 タンパク質の局在と重力に反応した動態変化を免疫組織化学染色法により解析した。

### 【結果】

キュウリの胚軸と TR 領域では、内皮が4本の維管束それぞれの外周に形成される。免疫組織化学解析の結果より、ペグ形成が開始される吸水後24時間目の垂直・水平置き芽ばえの TR 領域において、CsPIN1 タンパク質に対する顕著なシグナルが維管束と皮層の最内層である内皮において認められた。維管束細胞では、縦断面において根端側に面した基部側の細胞膜に CsPIN1 タンパク質の局在が認められたことから、ペグ形成時の TR 領域では、子葉側から根側への維管束を通ったオーキシンの極性輸送が行なわれていることが示唆された。これは、従来から報告されているオーキシンの極性輸送と一致する結果であった<sup>10)</sup>。TR 領域の縦断切片の解析結果より、内皮細胞では根端側に面した基部側の細胞膜、維管束に面した側の細胞膜、子葉側に面した頂端側の細胞膜にシグナルが認められ、極性を持った CsPIN1 タンパク質の局在が認められなかった。一方、横断切片では、隣り合う内皮細胞のうち、TR 領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 CsPIN1 タンパク質のシグナルが認められ、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。このように、TR 領域の内皮での 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。この結果より、TR 領域の内皮細胞における CsPIN1 タンパク質の局在パターンは、重力依存的に変化すると考えられた。そこで、これを検証するため、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継時的変化を解析した。

その結果、CsPIN1 タンパク質の重力に反応した変化には、重力刺激後120分の時間を必要とすることがわかった。

### 【考察】

本研究の結果から、重力感受細胞である内皮細胞における重力刺激に反応したオーキシン排出キャリアの動態変化がはじめて明らかになった。すなわち、キュウリの芽ばえの TR 領域では、CsPIN1 オーキシン排出キャリアタンパク質に依存した内皮を通るオーキシンの横輸送経路が存在することを見出すとともに、重力刺激に反応してこのオーキシンの横輸送経路は変動することを発見した。したがって、重力形態形成時に重力刺激に反応して形成されるオーキシンの偏差分布には、内皮細胞での重力刺激に反応した CsPIN1 タンパク質の局在変化が関与すると考えられた。そして、キュウリ芽ばえの TR 領域での重力刺激に反応した CsPIN1 オーキシン排出キャリアタンパク質の局在変動によるオーキシンの偏差的分布の形成に関して、次のようなモデルが考えられた。垂直置き芽ばえの TR 領域の各維管束周辺の内皮の両末端へは、ほぼ同数の内皮細胞からオーキシンが排出されるために、各内皮の末端から髄方向へ排出されるオーキシン量は等しいと考えられる。一方、水平置き芽ばえでは、各維管束周辺の内皮の上下の各末端へは、上側では少ない数の内皮細胞から、下側では多くの内皮細胞からオーキシンが排出されるために、髄方向へ排出されるオーキシン量が、内皮の上側の末端で少なく、下側の末端で多くなると考えられる。したがって、水平に発芽させたキュウリ芽ばえの TR 領域の上側に位置する維管束周辺の内皮の上側の末端から表皮・皮層に輸送されるオーキシンは少なく、下側に位置する維管束周辺の内皮の下側の末端から表皮・皮層に輸送されるオーキシンが多いために、TR 領域にオーキシン勾配が形成されると考えられる。すなわち、重力刺激に反応した TR 領域の内皮細胞での CsPIN1 タンパク質の局在変動によって、表皮・皮層の上下にオーキシンの偏差分布が引き起こされ、ペグの形成面が決定される可能性が示唆された。

### 【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-IAA* 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.
  - 10) Galweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., Palme, K. (1998) Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in Arabidopsis vascular tissue. *Science.* 282: 2226-2230.