

微小重力環境がキュウリ芽生えの発生生理に与える影響

藤井伸治 (東北大・院・生命科学)、山崎千秋 (一財) 日本宇宙フォーラム、宮沢豊 (山形大・理・生物)、鎌田源司 ((株) エイ・イー・エス)、笠原春夫 (有人宇宙システム (株))、長田郁子 (有人宇宙システム (株))、嶋津徹 ((一財) 日本宇宙フォーラム)、伏島康男 (一財) 日本宇宙フォーラム、東端晃 (宇宙航空研究開発機構)、山崎丘 (帝京大・院・宇宙環境医学)、石岡憲昭 (宇宙航空研究開発機構)、高橋秀幸 (東北大・院・生命科学)

Effects of microgravity condition on development and physiology of cucumber seedlings Nobuharu Fujii^{1*}, Chiaki Yamazaki², Miyazawa Yutaka³, Motoshi Kamada⁴, Haruo Kasahara⁵, Ikuko Osada⁵, Toru Shimazu², Yasuo Fusejima², Akira Higashibata⁶, Takashi Yamazaki⁷, Noriaki Ishioka⁶, 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: Cucumber seedlings express a unique gravimorphogenesis; namely, 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, although cucumber seedlings germinated in a vertical position develop a peg on each side of the transition zone. Thus, the lateral placement of peg formation is thought to be regulated by gravity-responses in cucumber seedlings. It has been shown that microgravity condition induces a peg on each side of the transition zone. This result suggested that cucumber seedlings have a potential to form a peg on each side by nature and that the cucumber seedlings grown in a horizontal position on the ground suppress a peg formation on the upper side in response to gravity. Pharmacological research revealed that a phytohormone, auxin induces a peg formation and the regulation of auxin distribution determines a lateral placement of peg formation. To understand how cucumber seedlings regulate auxin distribution in response to gravity, we conducted space experiments termed as CsPINs on the International Space Station (ISS). Our results indicated that CsPIN1 auxin efflux carriers were re-localized to the bottom of endodermal cells in response to 1g centrifugation. The pattern of CsPIN1 localization in the transition zone suggested that endodermal cells in the transition zone transported auxin from the upper to the lower flank of the transition zone when cucumber seedlings were placed in a horizontal position. In addition, under microgravity conditions the localization of CsPIN1 auxin efflux carriers in endodermal cells was detected at the vascular side of the transition zone. This localization of CsPIN1 auxin efflux carriers in endodermal cells might not prevent auxin from accumulating in the transition zone to induce peg formation on each side of the transition zone in cucumber seedlings grown under microgravity condition.

Key words: Auxin, Auxin Transport, Cucumber, Gravimorphogenesis, Microgravity, Peg, Space experiment, International Space Station

1. はじめに

微小重力環境を含めた宇宙環境が生物に与える影響の理解は、人類が宇宙環境で活動するために重要な課題である。そして、重力刺激に対する植物の応答機

構の解明は、微小重力環境下での植物の生理状態の予測に有用であると期待される。そこで、本稿では、植物の重力応答機構を解明するために我々が注目して研究しているキュウリの芽生えの重力形態形成に

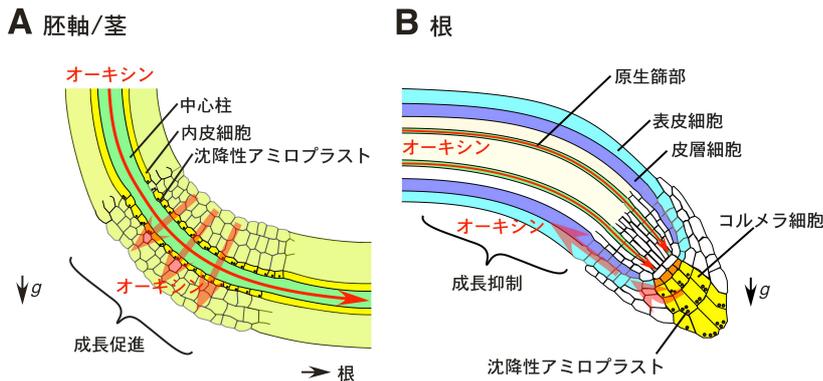


図1. 重力屈性のモデル。胚軸や茎などの地上部 (A) と根 (B) の重力屈性のモデルを模式的に示した。地上部では内皮細胞が、根ではコルメラ細胞がデンプン粒に富むアミロプラストの沈降を感受し、下側にオーキシシンを輸送して、器官の下側により多くのオーキシシンが蓄積する。より多く蓄積したオーキシシンは、地上部では細胞伸長を促進し、根では細胞伸長を阻害して、屈曲を引き起こすと考えられている。

関する最近の成果を解説するとともに、その研究成果から予測される微小重力条件下でのキュウリの芽生えの生理状態を考察する。

2. キュウリ芽生えの重力形態形成

キュウリ種子を水平に置き、発芽させると、胚軸と根の境界域の下側に突起 (ペグ) を形成する。ペグは種皮を押さえるため、その後、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、ペグは子葉の種皮からの脱皮を容易にする。人為的にキュウリの種子を垂直に置き、発芽させると、境界域の左右の一つずつ、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ตอบสนองし、ペグの形成面を決定していると考えられる¹⁾。ペグ形成への重力刺激の影響を明らかにする目的で、1998年に宇宙実験が行われた²⁾。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、境界域の左右の一つずつ、計二つのペグを形成した。本解析結果より、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、境界域の左右の一つずつ、合計二つのペグを形成する能力を持つこと、及び、水平に発芽させたキュウリの芽生えでは、境界域の上側のペグ形成が重力応答により抑制されることが示された。

植物ホルモンの一種であるオーキシシンは、胚のパターン形成、維管束分化、葉序・花序の形成、屈性などの形態形成に機能する。キュウリの芽生えへのオーキシシン処理は、ペグ形成を促進し、オーキシシン作用阻害剤 (*p*-chlorophenoxyisobutyric acid) はペグ形成を抑制することから、オーキシシンはペグ形成を誘導すると考えられる^{1,4,5)}。そして、キュウリの芽生えを水平において発芽させると、境界域の下側に比べて上側でより少ないオーキシシンが検出された⁴⁾。オーキシシンの分布は主にオーキシシンの輸送によって制御されている。種子を水平に置き、発芽させたキュウリの芽生えにオーキシシン排出キャリアの阻害剤 (2,3,5-triiodobenzoic acid) を処理すると、境界域の上側にもペグが形成された⁵⁾。したがって、重力刺激にตอบสนองして、オーキシシン排出キャリアが活性化し、境界域の上側でのオーキシシン量が低

下して、境界域の上側でペグ形成が抑制されると考えられた。

3. 重力感受細胞でのオーキシシン排出キャリアー局在変動

重力屈性では、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) に屈曲する負の屈性を、地下部の器官である根は、重力方向側 (下側) に屈曲する正の屈性を発現する。重力屈性を含めた屈性を説明するモデルとして提唱されたコロドニー・ウェント説が、現在、広く受け入れられている⁶⁾。本説では、重力刺激を受けた器官はオーキシシンの輸送を変化させ、偏差的に分布したオーキシシンが偏差成長を引き起こすと屈性を説明している。そして、重力刺激にตอบสนองして、オーキシシンを偏差的に分布させる仕組みは、シロイヌナズナを用いた解析から明らかにされてきた。シロイヌナズナの根では、維管束系を通して、地上部から根冠へとオーキシシンが輸送される⁷⁾。そして、根冠まで輸送されたオーキシシンは、表皮細胞を通して伸長領域に輸送され、根の伸長成長を調節している⁸⁾。根の重力感受細胞である根冠コルメラ細胞では PIN3/PIN7 オーキシシン排出キャリアーが重力刺激にตอบสนองして細胞の下側に局在し、根の下側へオーキシシンを偏差的に輸送することにより、オーキシシンの偏差分布が形成されることが明らかにされた (図 1A)^{9,10)}。地上部の器官である胚軸においては、PIN3 オーキシシン排出キャリアーが地上部の重力感受細胞である内皮細胞で発現し、重力刺激にตอบสนองして下側に局在し、オーキシシンを下側に輸送すると考えられた (図 1B)¹¹⁾。

4. 宇宙実験での CsPIN1 の局在変化の重力応答性の検討

我々は、キュウリの境界域の重力感受細胞である内皮細胞で発現している CsPIN1 オーキシシン排出キャリアーの局在を免疫組織学的に解析した¹²⁾。その結果、水平に発芽させたキュウリの芽生えの CsPIN1 の局在パターンが、垂直に発芽させた芽生えでの CsPIN1 の局在パターンと異なっていた。本 CsPIN1 の局在パターンの変

動が重力応答によることを証明するため、国際宇宙ステーション (ISS) での微小重力条件を利用した宇宙実験 (CsPINs) を行った¹³⁾。その際、以下の生育条件下でキュウリの芽生えを ISS で生育させた。

- i) 微小重力条件下で発芽させ、ペグの形成面が決定するステージ (24 時間齢) まで生育させた芽生え
- ii) 微小重力条件下で発芽させた 24 時間齢の芽生えを、更に 2 時間、微小重力条件下で生育させた芽生え
- iii) 微小重力条件下で発芽させた 24 時間齢の芽生えに、胚軸-根の軸に対し直交する方向に 1g の遠心力がかかるように、2 時間、遠心した芽生え

これらの条件で芽生えを生育させた後、微小重力条件下で固定し、低温 (4°C) で保存した。そして、芽生えを地上に回収した後、横断切片を作成し免疫組織学的に CsPIN1 の局在を解析した。その結果、微小重力条件下 (i 実験区と ii 実験区) で生育させたキュウリの芽生えの境界域の多くの内皮細胞では、境界域の楕円形の横断面の短軸側に CsPIN1 のシグナルが検出された。一方、胚軸-根の軸に対し直交する方向に遠心力を与えた実験区 (iii 実験区) の芽生えでは、境界域の求心側と側面の多くの内皮細胞では、遠心側に CsPIN1 のシグナルが検出された。本実験結果から、CsPIN1 の局在変化は重力応答であることが証明された¹³⁾。更に、本解析結果から、オーキシン輸送経路が以下のように予想された (図 2)¹³⁾。まず、微小重力条件下で生育させた芽生えでは、境界域の多くの内皮細胞で CsPIN1 は細胞の維管束側に局在し、オーキシンを維管束系に輸送している。宇宙実験での求心側と遠心側は、それぞれ地上での上側と下側に対応するので、キュウリの芽生えを横倒して重力刺激を与えると、境界域の上側と側面の内皮細胞で、CsPIN1 が細胞の下側に局在すると考えられる。そして、境界域の上側の内皮細胞は、オーキシンを維管束細胞側に輸送し、境界域の側面の内皮細胞は、オーキシンを境界域の上側から下側に輸送するオーキシン輸送経路を形成することが示唆された (図 2B)。

シロイヌナズナの根の先端に位置するコルメラ細胞は、縦 4 列、横 3 列、幅 4 列の約 48 細胞の比較的少数の細胞群から構成されているため、縦断切片を用いた解析により、コルメラ細胞群内での PIN3/PIN7 オーキシン排出キャリアーの分布の把握が容易であった^{9,10)}。一方、内皮が重力を感受する胚軸では、維管束の周囲に内皮細胞が分化しており、縦断切片では、維管束の外側に一層ずつ、合計 2 層の内皮層が認められるだけである。したがって、シロイヌナズナの胚軸の縦断切片を用いた解析だけからでは、内皮細胞を重力感受細胞としている器官 (胚軸) での重力刺激に応答したオーキシン輸送経路の変化の十分な理解は困難であった¹¹⁾。同様に、キュウリの

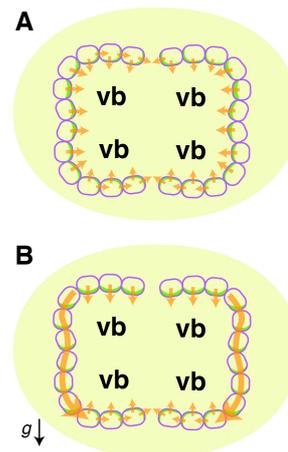


図 2. キュウリの芽生えの境界域における CsPIN1 オーキシン排出キャリアーによる重力刺激に応答したオーキシンの偏差分布形成のモデル¹²⁾。微小重力条件下、あるいは垂直に発芽させた芽生えでは、CsPIN1 は内皮細胞の維管束側に局在する (A)。キュウリの芽生えを横倒して、重力刺激を与えると、境界域の側面の内皮細胞では、CsPIN1 が細胞の下側に局在するため、内皮細胞を通してオーキシンは境界域の上側から下側に輸送される。その結果、境界域のオーキシンは偏差的に分布すると考えられる。矢印でオーキシンの流れを、vb で示した維管束周囲に内皮細胞を模式的に、g で重力方向を示した。

芽生えの境界域での CsPIN1 の局在解析でも、当初は縦断切片を中心に解析していたため、重力感受細胞である内皮を経由するオーキシン輸送経路の理解は不十分だった¹²⁾。宇宙実験の試料の解析では、キュウリの芽生えの境界域の縦断切片ではなく、横断切片を用いた。その結果、縦断切片を用いたオーキシン排出キャリアーの局在解析結果からでは発想し得ない、重力刺激に応答したオーキシンの横輸送経路の発見につながったと考えられた。

5. 微小重力条件下でのキュウリ芽生えのオーキシン分布の制御

1998 年に行われた宇宙実験では、微小重力条件下で発芽させたキュウリの芽生えを地上に回収し、オーキシン誘導性遺伝子 (CsIAA1) mRNA の蓄積を *in situ* hybridization により組織化学的に解析した³⁾。地上でキュウリの種子を水平に置き発芽させた芽生えでは、ペグを形成する境界域の下側の皮層と表皮細胞に CsIAA1 mRNA のシグナルが認められたが、上側では認められなかった。一方、宇宙実験の微小重力条件下で生育させたキュウリの芽生え、及び、地上でキュウリの種子を垂直に置き発芽させた芽生えでは、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。境界域の重力感受細胞

である内皮細胞は皮層の最内層に位置し、皮層の外側に表皮細胞が位置する。微小重力条件下では、境界域の多くの内皮細胞の維管束側に CsPIN1 のシグナルが検出された。したがって、内皮細胞からはオーキシンは維管束細胞へと輸送され、皮層・表皮細胞側への輸送は限定的であると予想される。しかしながら、微小重力下で生育させたキュウリの芽生えの境界域の皮層・表皮細胞で *CsIAA1* mRNA の蓄積が認められあつたため、内皮細胞での CsPIN1 の局在パターンは、境界域の皮層・表皮のオーキシン濃度の維持・上昇を抑えられないと考えられる。キュウリの種子は扁平であり、地面に播種すると、扁平な面が上下に面する。境界域も楕円形であり、境界域では4本の維管束が分化している。維管束の周辺に分化する内皮層のうち、楕円の短軸に平行に位置している内皮層は連結しているが、長軸に平行に位置している内皮層は連結していない領域がある。通常、オーキシンは地上部の先端で合成され、維管束系を通じて根へと輸送されるため、維管束細胞では高濃度のオーキシンが蓄積していると考えられる。微小重力条件下、あるいは垂直に生育しているキュウリの芽生えの境界域では、境界域の内皮が連結していない領域を、CsPIN1 以外のオーキシン排出キャリアーによる積極的なオーキシンの輸送により、あるいはオーキシン排出キャリアーを介さない受動的な拡散により維管束細胞由来のオーキシンが通過し、皮層・表皮でのオーキシン濃度が維持・上昇した可能性が考えられた。そして、その結果、微小重力条件下で発芽・生育させたキュウリの芽生えでは、境界域の左右に一つずつ、計二つのペグが形成されたと考えられた。

以上のように、これまで我々はオーキシンに注目し、重力応答がオーキシンの分布を制御する仕組みを明らかにした。今後は、オーキシンの動態だけではなく、微小重力条件下での植物の成長に大きく影響を及ぼす要因の発見も視野に入れた研究への展開が望まれる。

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) 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)
- 6) Trewavas, A.J.; What remains of the Cholodny-Went theory? *Plant Cell Environ.*, 15, 761-794 (1992)
- 7) Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. and Palme, K.; Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue, *Science*, 282, 2226-2230 (1998)
- 8) Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. and Palme, K.; *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control, *EMBO J.* 17, 6903-6911 (1998)
- 9) Friml, J., Wisniewska, J., Benková, E., Mendgen, K. and Palme, K.; Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis, *Nature*, 415, 806-809 (2002)
- 10) Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A.R., Tasaka, M., Morita, M.T. and Friml, J.; Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 22344-22349 (2010)
- 11) Rakusová, H., Gallego-Bartolomé, J., Vanstraelen, M., Robert, H.S., Alabadí, D., Blázquez, M.A., Benková, E. and Friml, J.; Polarization of PIN3-dependent auxin transport for hypocotyl gravitropic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 67, 817-826 (2011)
- 12) 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. and Takahashi, H.; Gravistimulation 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)
- 13) Watanabe, C., Fujii, N., Miyazawa, Y., Kamada, M., Kasahara, H., Osada, I., Shimazu, T., Fusejima, Y., Higashibata, A., Yamazaki, T., Ishioka, N. and Takahashi H.; The gravity-induced re-localization of auxin efflux carrier CsPIN1 in cucumber seedlings: spaceflight experiments for immunohistochemical microscopy, *npj Microgravity* 2, 16030 (2016)