

## 植物の重力応答反応におけるオーキシン極性移動の重要性

上田 純一（大阪府大院・理）\*、黒田 裕一（大阪府大院・理）、鎌田 源司（（株）EAS）、  
岡 真理子（鳥取大・農）、宮本 健助（大阪府大・高等教育）、上田 英二（大阪府大院・理）、  
東端 晃（JAXA）

### Important role of auxin polar transport in graviresponse of plants

*Junichi Ueda<sup>1\*</sup>, Yuichi Kuroda<sup>1</sup>, Motoshi Kamada<sup>2</sup>, Mariko Oka<sup>3</sup>, Eiji Uheda<sup>1</sup>, Kensuke Miyamoto<sup>4</sup> and Akira Higashibata<sup>5</sup>*

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

<sup>2</sup> Future Development Division, Advanced Engineering Service Co., 1-9-13 Yaesu, Chuo-ku, Tokyo 103-0028, Japan

<sup>3</sup> Faculty of Agriculture, Tottori University, 4-101 Koyamacho-minami, Tottori 680-8553, Japan

<sup>4</sup> Faculty of Liberal Arts and Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

<sup>5</sup> Tsukuba Space Center, Japan Aerospace Exploration Agency, 2-1-1 Sengen, Tsukuba 305-8505, Ibaragi, Japan

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

**Abstract:** The purpose of this study is to verify the hypothesis that auxin polar transport is essential for graviresponse in plants, focused on the mode of action of auxin polar transport on graviresponse of etiolated Alaska pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. Automorphogenesis of etiolated Alaska pea seedlings together with reduced auxin polar transport in epicotyls was observed in true microgravity conditions in space (BRIC-AUX on STS-95 in 1998). On Earth, a potent inhibitor of auxin polar transport, 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA), substantially induced automorphogenesis-like growth and development in etiolated Alaska pea seedlings. Similar powerful inhibitors of auxin polar transport, *N*-(1-naphthyl)phthalamic acid (NPA) and 9-hydroxyfluorene-9-carboxylic acid (HFCA), were found to phenocopy automorphogenesis-like epicotyl bending in etiolated Alaska pea seedlings. However, an inhibitor of auxin action, *p*-chlorophenoxyisobutylic acid (PCIB), had little effect. Auxin polar transport in the proximal side of the 1<sup>st</sup> internodes to the cotyledons, but not in the 2<sup>nd</sup> internodes, in etiolated Alaska pea seedlings was significantly higher than in the distal side. Gene expression of *PsPINs* but not *PsAUX1* was significantly higher than that in the distal one. TIBA did not affect gene expression of *PsPIN1*, *PsPIN2* and *PsAUX1* in the proximal and the distal sides of epicotyls to the cotyledons. In addition, altered localization of *PsPINs* proteins in plasma membrane was observed in hook region but not in middle region of epicotyls in etiolated Alaska pea seedlings, suggesting the lateral auxin distribution from the distal to the proximal sides in epicotyls and resulted in normal graviresponse of etiolated Alaska pea seedlings.

**Key words;** *ageotropum* Pea Mutant, Alaska Pea, Automorphogenesis, Auxin Polar Transport, Endogenous Levels of Auxin, Gene expression, Immunohistochemistry, Inhibitors of Auxin Polar Transport, *PsPINs*

### はじめに

植物の重力応答反応は、植物の重力屈性としてよく理解されており、例えば暗所で生育させた植物の芽生えの地上部（莖）は反重力方向に、また、地下部（根）は重力方向に成長することが知られている。筆者らは、1998年にSTS-95植物宇宙実験を実施し、宇宙微小重力環境下における黄化Alaskaエンドウ芽生えの成長、発達および上胚軸におけるオーキシン極性移動を解析した。その結果、宇宙微小重力環境下においては、黄化Alaskaエンドウ芽生えは自発的形態形成を示すこと、その場合、上胚軸におけるオ

ーキシン極性移動が低下していることを明らかにした（Ueda *et al.* 1999, 2000）。同様の現象は、地上1g環境下において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での実験や重力応答突然変異体である黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え（Takahashi and Suge 1991）を用いた実験においても示された（Hoshino *et al.* 2005, 2006a, 2006b, 2007, 2008, Miyamoto *et al.* 2005）。本研究においては、黄化Alaskaエンドウ芽生えの重力応答反応におけるオーキシン極性移動の重要性を、芽生え上胚軸中のオーキシン移動の動態、オーキシン極性移動関連遺伝

子発現および免疫組織化学的手法によるオーキシン極性移動関連分子の細胞内動態の観点より調べることをとした。

### 材料および方法

**植物材料** — 実験植物の育成は STS-95 植物宇宙実験に準じた条件で行った (Ueda *et al.* 1999, 2000)。アクリル製植物培養容器 (8 x 6.5 x 5.5 cm) に支持体としてロックウール (日本ロックウール株式会社) を詰め、12~15 粒の Alaska エンドウ (*Pisum sativum* L.) あるいは重力応答突然変異体である *ageotropum* エンドウ (Takahashi and Suge, 1991) 乾燥種子を、胚の向きが重力と垂直あるいは水平となるように (すなわち胚が水平あるいは垂直に) 播種し、種子全体が埋まる程度に埋め込み、蒸留水約 40 ml を給水した。給水後、植物培養容器全体をジップロックバッグに納め、暗所、23.5°C、1 g 環境下で、発芽、生育させた。3.0~3.5 日齢黄化エンドウ芽生えから地上部を切り出し、オーキシン極性移動を調べた。また、遺伝子発現解析あるいは内生オーキシンレベル分析については、芽生えを液体窒素を用いて凍結した。免疫組織化学用試料については適切な化学固定剤を用いて化学固定した。

**オーキシン極性移動能の測定** — 3.0~3.5 日齢黄化エンドウ芽生え上胚軸第 1 節間におけるオーキシン極性移動能の測定には放射性 IAA を用い、既に報告した方法に従った (Ueda *et al.* 1999, 2000)。

**オーキシン極性移動関連遺伝子 *PsPINs* および *PsAUX1* の発現解析** — 3.0~3.5 日齢黄化 Alaska および黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え地上部 (頂端鉤状部、子葉側および反子葉側上胚軸) から ISOGEN (ニッポンジーン) を用い、全 RNA を抽出した。ノーザン解析あるいは semi-quantitative RT-PCR 法によって、オーキシン極性移動関連遺伝子の発現解析を行った。

**内生オーキシンの定量** — 3.0~3.5 日齢黄化エンドウ芽生え上胚軸を、頂端鉤状部、子葉側上胚軸および反子葉側上胚軸に切断後、80%エタノールを用いて内生オーキシンを抽出した。d5-IAA を内部標準とし、常法に従いジエチルエーテルを用いて溶媒分画を行った後、ジエチルエーテル可溶性酸性画分のメチル化物を対象として、ガスクロマトグラフ質量分析計 (Finnigan GCQ) を用いて内生オーキシンを定量した。

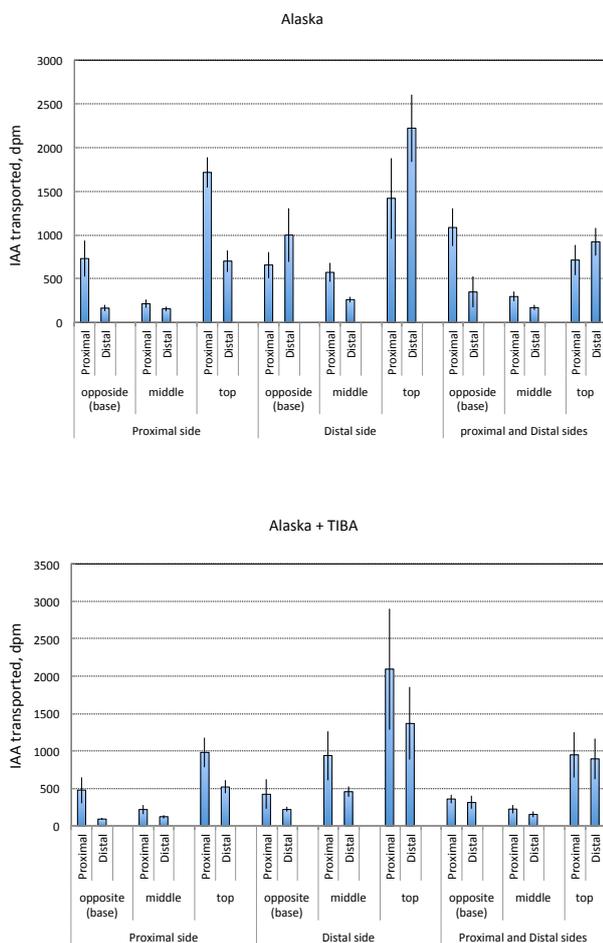
**免疫組織化学** — *PsPINs* タンパク質と高い相同性を示す *ZmPIN1a* タンパク質の推定アミノ酸配列に基づき、*PsPIN1* に対するポリクローナル抗体を作成した。化学固定した 3.0 日齢黄化 Alaska エンドウ芽生えを対象として *PsPIN1* の免疫組織化学的検出を実施した。

### 結果および考察

既に報告してきたとおり (Hoshino *et al.* 2005, 2006a, 2006b, 2007, 2008, Miyamoto *et al.* 2005, 2011, Ueda *et al.* 1999, 2000, 2011, 2012, 2014)、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いては、黄化 Alaska エンドウ芽生えは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。10  $\mu$ M のオーキシン極性移動阻害剤を黄化 Alaska エンドウ芽生えに外生的に投与すると、同様な自発的形態形成様の成長、発達を示した。*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、芽生え上胚軸は子葉から離れる方向約 45°の角度で真っ直ぐに伸長し、自発的形態形成様の成長、発達を示した。また、黄化 Alaska および黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸第 1 節間におけるオーキシン極性移動は、黄化 Alaska エンドウに比べ黄化 *ageotropum* エンドウでは約 50%であった。この場合、いずれの芽生えにおいても子葉側上胚軸のオーキシン極性移動は反子葉側に比べて有意に高い値を示した。*PsPIN1* 遺伝子の発現も反子葉側上胚軸に比べて子葉側で高く、オーキシン極性移動との間に正の相関が認められた。一方、*PsPIN2* および *PsAUX1* 遺伝子の発現については、子葉側、反子葉側で大きな差は認められなかった。d5-IAA を内部標準物質として、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて黄化 Alaska および黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸第 1 節間における内生オーキシンを定量した結果、新鮮重量あたりの内生オーキシン量は、黄化 *ageotropum* エンドウに比べて黄化 Alaska エンドウの方が高い値を示した。また、何れの黄化芽生えにおいても、新鮮重量あたりの内生オーキシン量は頂端鉤状部で最も高く、ついで *PsPIN1* 遺伝子発現やオーキシン極性移動と同様に、反子葉側上胚軸に比べて子葉側で高い値を示した (以上結果省略)。

上記のとおり黄化 Alaska エンドウ芽生え上胚軸第 1 節間において、子葉側では反子葉側に比べて、内生オーキシンレベル、オーキシン極性移動およびその関連遺伝子である *PsPIN1* の発現が高い値を示すことが明らかになった。本研究ではその機構を明らかにするために、切片の形状を調整し、放射性オーキシンを切片の頂端側の子葉側あるいは反子葉側のみから取り込ませ、切片の頂端側、中程および基部側の子葉側および反子葉側で検出される放射活性を測定した。その結果、上胚軸頂端側から取り込ませた放射性オーキシンは、他端すなわち基部側においては、反子葉側に比べ、子葉側で高い値を示した。また、反子葉側から取り込ませた場合、オーキシンは速やかに子葉側に移動し、他端ではやはり子葉側で高い値を示した

(Fig. 1A)。一方、オーキシン極性移動阻害剤である  $10 \mu\text{M}$  TIBA 存在下で育てた黄化 Alaska エンドウ芽生えにおいては、子葉側および反子葉側から取り込ませた場合、他端では子葉側および反子葉側で同程度の放射活性が認められ、また、その値は TIBA を与えない芽生えから調整した切片より低い値を示した。しかしながら、反子葉側から取り込ませた場合は、TIBA を与えないものと同様に、オーキシンは速やかに子葉側に移動し、その結果、他端では子葉側で高い値を示した (Fig. 1B) 以上の事実は、免疫組織化学的手法によって検出した PsPINs の細胞内および組織内分布からも支持された (結果省略)。



**Fig. 1** Auxin transport and/or movement in the 1<sup>st</sup> internode of etiolated Alaska pea epicotyls. Radio-labeled IAA was only incorporated from proximal and/or distal side in the apical side of the segment prepared from the 1<sup>st</sup> internode of etiolated Alaska pea seedlings grown in the presence (B, lower) or absence (A, upper) of  $10 \mu\text{M}$  TIBA.

従来より植物の地上部および地下部が示す重力屈性は、内生オーキシンレベルの違いによる偏差成長の結果として説明されてきた (Cholodny

1927, Went 1928, Went and Thimann 1937)。重力屈性に代表される植物の重力応答反応は、重力の感受、その情報 (信号) 伝達および内生の植物ホルモンによる成長制御の結果として現れる現象である。しかしながら、一連の研究結果と本研究において見いだされた知見は新たな疑問を提示することになった。すなわち、Alaska エンドウ種子の胚を重力と平行に置床した場合、上胚軸は子葉側に屈曲し、芽生え地上部は反重力方向に伸長する。この場合、何故、内生オーキシンレベルが高い子葉側上胚軸が反子葉側に比べてより伸長せず、芽生え地上部は最終的に反重力方向へ真っ直ぐに伸長するのであろうか。今後は、黄化 Alaska および黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸の異なる重力応答反応機構、黄化 Alaska エンドウ芽生えにオーキシン極性移動阻害剤を投与した場合の重力応答反応機構をそれらの子葉側および反子葉側上胚軸におけるオーキシン動態から明らかにすることが必要である。また、いずれの芽生えの上胚軸においても、子葉側および反子葉側においてオーキシン動態に差異があるにもかかわらず、上胚軸が偏差成長することなく真っ直ぐに伸長するメカニズムを明らかにすることが求められる。幸いこれら一連の研究を進展させた結果、2015 年秋~2016 年には、著者らが提案し、採択された「宇宙環境を利用した植物の重力応答反応機構および姿勢制御機構の解析」が国際宇宙ステーション「きぼう船内実験室第2期利用後半期間候補テーマ」として実施できる予定であるのでその研究成果を合わせて総合的な考察を行いたいと考えている。

## 参考文献

- Cholodny, N. (1927) Wuchshormone und Tropismen bei den Pflanzen. Biol. Zentralbl., **47**, 604-626.
- 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. 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.
- Hoshino, T., Miyamoto, K. and Ueda, J. (2008) 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. *Space Utiliz. Res.*, **24**, 397-400.
- 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.
- 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.
- Miyamoto, K., Uheda, E., Oka, M. and Ueda, J. (2011) Auxin polar transport and automorphosis in plants. *Biol. Sci. Space* **25**, 57-68.
- Takahashi, H. and Suge, H. (1991) Root hydrotropism of an agravitropic pea mutant, *ageotropum*. *Physiol. Plant.*, **82**, 24-31.
- Ueda, J., Miyamoto, K., Uheda, E., Oka, M., Yano, S., Higashibata, A. and Ishioka, N. (2014) Close relationships between polar auxin transport and graviresponse in plants. *Plant Biol.*, **16** (Suppl. 1) 43-49.
- Ueda, J., Miyamoto, K., Uheda, E. and Oka, M. (2011) Auxin polar transport and a graviresponse in plants: Relevance to ABC proteins. *Biol. Sci. Space* **25**, 69-75.
- Ueda, J., Tada, T., Hoshino, T., Miyamoto, K., Uheda, E. and Oka, M. (2012) Isolation of *PsPINs* and *PsAUX1* cDNAs encoding putative auxin efflux and influx carriers and/or facilitators, respectively, from etiolated epicotyls of an agravitropic pea (*Pisum sativum* L.) mutant, *ageotropum*. *Biol. Sci. Space* **26**, 32-41.
- 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.
- Went, F.W. (1928) Wuchsstoff und Wachsthum. *Rec. Trav. Bot. Neerl.*, **15**, 1-116.
- Went, F.W. and Thimann, K.V. (1937) *Phytohormones*. MacMillan, New York.