

黄化アラスカエンドウ芽生え上胚軸鉤状部の成長・発達に対する重力の影響：3次元クリノスタットおよび *ageotropum* を用いた解析

宮本 健助（大阪府大・高等教育）^{*}，山崎 隆弘（大阪府大・院・理学系），岡 真理子（鳥取大・農），
上田 英二（大阪府大・院・理学系），上田 純一（大阪府大・院・理学系）

Analysis of growth and development of apical hook in etiolated Alaska pea with a 3-dimensional clinostat and an agravitropic pea mutant, *ageotropum*

Kensuke Miyamoto^{1*}, Takahiro Yamasaki², Mariko Oka³, Eiji Uheda² and Junichi Ueda²

¹ Faculty of Liberal Arts and Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan; ² Department of Biological Science, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan; ³ Faculty of Agriculture, Tottori University, 4-101 Koyamacho-minami, Tottori 680-8553, Japan

* Corresponding author, E-mail: miyamoto@las.osakafu-u.ac.jp

Abstract: The formation of apical hook, the arc-shaped transient structure formed in seed germination process on top of the hypocotyl or epicotyl of dicotyledonous seedlings, is believed to be affected by gravity in the dark. However, this notion is mostly based on experiments with the hypocotyl hook, and no detailed studies are available with the developmental manners of the hook, particularly of the epicotyl hook. The present study aims to clarify the dynamics of epicotyl hook formation including the possible involvement of gravity. Time-course studies with normal Alaska pea (*Pisum sativum*) and an agravitropic pea mutant, *ageotropum*, under the 1-g conditions and on a 3-D clinostat revealed that the apical hook forms by the development of the arc-shaped plumule of the embryo existing in the non-germinated seed. The process of formation consists of two stages: development and partial opening, which are controlled by some intrinsic properties of the plumule, but not gravity. Approximately when the epicotyl emerges from the seed coat, the hook is established in both pea varieties. In Alaska the established hook is sustained or enhanced by gravity, resulting in a delay of hook opening compared with on a clinostat, which might give an incorrect idea that gravity causes hook formation. During the hook development and opening processes the original plumular arc holds its orientation unchanged to be an established hook, which, therefore, is at the same side of the epicotyl axis as the cotyledons. This is true for both Alaska and *ageotropum* under 1-g conditions as well as on the clinostat, supporting the finding mentioned above. Application of auxin polar transport inhibitors (2,3,5-triiodobenzoic acid, 9-hydroxyfluorene-9-carboxylic acid and *N*-1-naphthylphthalamic acid) suppressed the curvature of hook, suggesting that the hook formation involves auxin polar transport probably asymmetrically distributed across the plumular axis by some intrinsic properties of the plumule.

Key words: *ageotropum* pea, Alaska pea, Auxin polar transport, hook development, gravity, 3-D clinostat

はじめに

暗所下における発芽種子の成長初期過程で、双子葉植物は茎の先端部に鉤状部 (hook) を発達させる。この茎頂鉤状部の構造は、土中の物理的障壁から茎頂分裂組織を保護すると共に、土中での茎伸長を容易にする役割を果たしていると考えられている (Taiz and Zeiger 2010)。クリノスタット等を用いた実験から、ヒマワリ、クレス、キュウリなどの地上子葉型植物芽生えの下胚軸鉤状部の形成過程において、その形成に重力が重要な役割を果たしていることが示唆されてきている (MacDonald *et al.* 1983; Takahashi and Suge 1988)。

著者らは、1998年に実施された STS-95 植物宇宙実験や3次元クリノスタットを用いた地上基礎実験において、宇宙微小重力あるいは地上擬似微小重力環境下で発芽・生育した黄化エンドウ芽生え上胚軸は子葉節基部で子葉から離れる方向に約 45 度傾い

て伸長すること (自発的形態形成)、また、上胚軸のオーキシン極性移動が低下することを見出し、植物の形態形成やオーキシン極性移動が重力の制御下にある現象であることを示してきた (Ueda *et al.* 1999; Miyamoto *et al.* 2005)。さらに、この黄化エンドウ上胚軸の自発的形態形成は子葉節付近での上胚軸の「負の重力屈性」の阻害によること (Miyamoto *et al.* 2005)、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と反子葉側上胚軸におけるオーキシンの極性移動能の違いに起因することを示唆してきた (Hoshino *et al.* 2006a, 2006b, 2007; Ueda *et al.* 2014)。

加えて、STS-95 植物宇宙実験において、宇宙微小重力下、暗所で発芽・生育した黄化 Alaska エンドウ芽生え上胚軸鉤状部の開度は地上 1-g 対照に比べ大きな値を示すことを見出している (Ueda *et al.* 1999)。このことは、上胚軸鉤状部の成長・発達も重力の制

御下にあることを示唆している。しかしながら、エンドウに代表される地下子葉型植物の発芽種子の初期成長過程における上胚軸鉤状部の成長・発達に対する重力の影響はほとんど明らかにされていない。

本研究では、重力応答が正常な Alaska エンドウと自発的形態形成様の形態形成を示す重力応答突然変異体 *ageotropum* エンドウを対象とし、3次元クリノスタットを用い上胚軸鉤状部の成長・発達に対する擬似微小重力の影響を調べ、その成長・発達に対する重力の影響を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

【植物材料および培養方法】— エンドウ (*Pisum sativum* L.) の品種 Alaska と野生型 Weibull's Weitor 種に X 線を照射して得られた重力応答突然変異体 *ageotropum* を実験に使用した。アクリル樹脂製の培養容器 (内寸 9 x 4.8 x 5.8 cm³, なお、上面 4 箇所ミリシールで覆った直径 1 cm の換気口を有する) の底面にロックウールシート (15 mm 厚、チビッコエースマット、日本ロックウール株式会社) を詰め、12 粒の乾燥種子を胚の向きが垂直になるように種子全体が埋まる程度に埋め込み、蒸留水 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、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・生育させた。

【上胚軸鉤状部開度および上胚軸傾斜角度の測定】— 培養一定時間ごとに黄化エンドウ芽生えを採取し、写真撮影を行った。拡大した写真画像をもとに上胚軸鉤状部の開度ならびに上胚軸傾斜角度を測定した (Fig. 1 参照)。なお、写真撮影時、鉛直軸方向を規定するために生育状態で芽生えの子葉の部分に針の目印を立てた。

【擬似微小重力環境の作出】— 擬似微小重力環境は 2 軸の 3 次元クリノスタット (CS-2、(株) 日本医化器械製作所) と回転制御装置 (Model CL-CS1、南出システムエンジニアリング株式会社) を用いて作出した (Hoson *et al.* 1997, Miyamoto *et al.* 2005)。回転期間中の積算重力方向成分がゼロとなるように、回転制御装置を用い回転方向並びに回転速度を制御した。

【オーキシン極性移動阻害剤の影響】— 頂端鉤状部の成長・発達に対するオーキシン極性移動の関与を調べる目的で、10 μM に調整した 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA)、9-hydroxyfluorene-9-carboxylic acid (HFCA)、N-(1-naphthyl)phthalamic acid (NPA)、を乾燥種子を播種したロックウールに給水した。

結果および考察

【黄化 Alaska および *ageotropum* エンドウ上胚軸茎頂鉤状部の成長・発達の経時変化】

Alaska エンドウおよび *ageotropum* エンドウ種子を胚が垂直になるように播種し、暗所で発芽・生育さ

せた。一定時間ごとに芽生えを採取し、上胚軸茎頂鉤状部の開度を測定した (Fig. 2)。いずれの種子においても種子中の幼芽先端には未発達ながら既に鉤状部が存在した。Alaska 種子中に既に存在していた未熟な鉤状部は、発芽成長に伴い、上胚軸が種皮の外に出現する段階の約 72 時間後までに強固な鉤状部を形成し、形成された鉤状部は維持・展開の過程へと移っていった。上胚軸が自発的形態形成様の傾斜した成長・発達を示す重力応答変異体 *ageotropum* エンドウにおいても、種子中の幼芽先端には未発達ながら鉤状部が存在し、この鉤状部は形成過程を経た後、維持・展開の過程に移行した。いずれのエンドウの頂端鉤状部も、強固な鉤状部を形成した後、維持・展開の過程に移行するという点で大きな差は認められないものの、*ageotropum* エンドウでは鉤状部の形成がやや早く進行し、また、その後の展開が早いことが明らかとなった。両者の違いは重力に対する応答性の違いによるものと推察された。

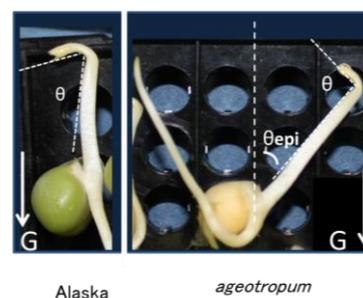


Figure 1. Pea seedlings, cv. Alaska and an agravitropic mutant, *ageotropum*, grown under 1-g conditions in the dark at 23.5°C for 84 h after the supplying water to dry seeds, and definition of hook angle and epicotyl bending (derived from Miyamoto *et al.* 2014).

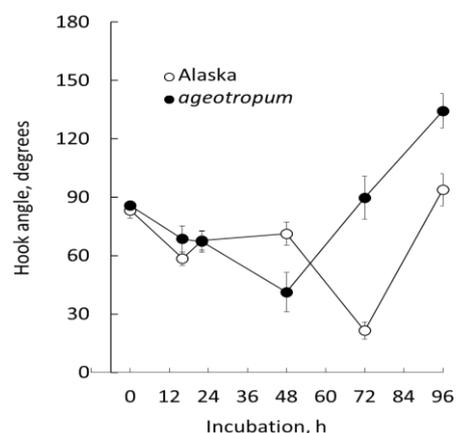


Figure 2. Kinetics of the development of apical hooks in Alaska and *ageotropum* pea seedlings under 1-g conditions. Data points: the means with standard errors (n = 10); time: h after supplying water to dry seeds (derived from Miyamoto *et al.* 2014).

【黄化 Alaska および *ageotropum* エンドウ上胚軸茎頂鉤状部の成長・発達に対する擬似微小重力の影響】

Alaska エンドウにおいてはクリノスタット上においても、発芽初期段階では 1-g 環境下と同様、明確な茎頂鉤状部が形成され、その後、1-g 環境下に比べその開度が大きくなった (Fig. 3)。この結果は STS-95 植物宇宙実験結果を支持し、宇宙環境下で認められた開いた頂端鉤状部の形態を含めて自発的形態形成を理解することが必要であることが明らかとなった。

一方、重力応答変異体 *ageotropum* エンドウでは茎頂鉤状部の形成過程、維持・展開過程、いずれにおいても 1-g 環境下とクリノスタット上で鉤状部の開度に大きな違いは認められなかった。

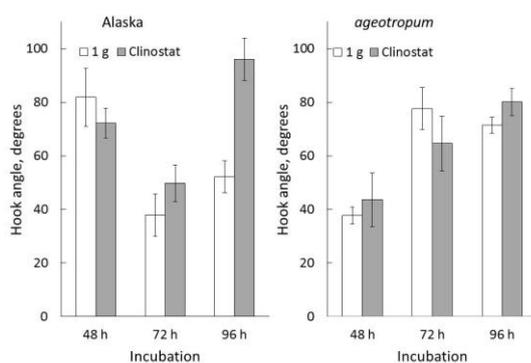


Figure 3. Effects of clinostat rotation on the hook development in Alaska and *ageotropum* pea seedlings. Data bars: the means with standard errors ($n = 8$ to 10); time: h after supplying water to dry seeds (derived from Miyamoto *et al.* 2014)

以上の結果から、黄化エンドウ芽生えの上胚軸鉤状部の成長・発達は、形成過程とその後の維持・展開過程に分けられること、重力は上胚軸鉤状部の形成過程よりもむしろ維持・展開過程の制御に大きな役割を果たしていることが明らかとなった。また、黄化 *ageotropum* は、宇宙環境下で認められた上胚軸の傾斜した伸長成長、および頂端鉤状部の展開が認められたことから、重力による形態形成制御の解析に有用な変異体であることが示された。

【黄化 Alaska および *ageotropum* エンドウ上胚軸の茎頂鉤状部の成長・発達に対するオーキシン極性移動阻害剤の影響】

宇宙微小重力あるいは地上擬似微小重力環境下で発芽・生育した黄化エンドウ芽生えで認められる上胚軸の傾斜した伸長はオーキシンの極性移動と密接に関係しており、オーキシン極性移動阻害剤の投与によって表現模写される (Ueda *et al.* 2014)。オーキシン極性移動阻害剤存在下で発芽・生育させると上胚軸鉤状部の開度は対照に比べ大きな値を示した (Fig. 4)。この結果は、頂端鉤状部の成長・発達は、オーキシン極性移動によってもたらされる頂端鉤状部を横切る非対称なオーキシン分布による非対称な細胞伸長によって制御されていることを示唆する。

一方、黄化エンドウの鉤状部形成はエチレンによっても制御されていると考えられてきている (Goeschl *et al.* 1967, Burg and Burg 1968)。著者らは、STS-95 宇宙実験に準じた方法で PGC 中に播種したエンドウ乾燥種子を吸水後、ジップロックバッグに詰めた状態で培養を行い一定時間後にエチレン濃度を測定したところ、1-g 環境下で生育させた場合にはわずかにエチレンが検出されたものの、クリノスタット上で培養を行った場合にはエチレン濃度は検出限界以下であること、また、培養容器にトルビーカーを用い密封系でエチレン生成に対する擬似微小重力の影響を調べた結果、3 次元クリノスタット上で培養を行った場合には 1-g 環境下で培養を行ったものに比べてエチレン生成量が著しく少ないことを報告している (Miyamoto *et al.* 2002)。また、黄化エンドウ芽生えにエチレンを投与すると明確な鉤状部が形成される。エチレン発生はオーキシンによって誘導されることから、微小重力環境下においてオーキシン極性移動が低下することによりエチレン生成が抑制され、その結果、頂端鉤状部の維持・展開が促進されることが推察される。

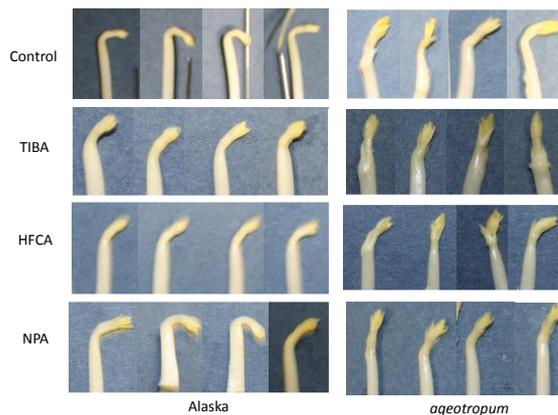


Figure 4. Effects of auxin polar transport inhibitors on the hook development in Alaska and *ageotropum*. Aqueous solutions (10 μM) of inhibitors were individually added to the rock wool blocks embedding dry seeds, and seedlings were grown under 1-g conditions for 96 h after supplying test solution to dry seeds. Plain water was supplied as control.

以上の結果、黄化エンドウ芽生えの上胚軸鉤状部の成長・発達は、形成と維持・展開の過程に分けられること、重力は後者に対して影響を及ぼすこと、そしてオーキシン極性移動がその制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。宇宙環境利用のためには微小重力下におけるエチレンやオーキシンなどの植物ホルモンの動態を理解する必要があり、これにより宇宙環境において人為的且つ効率的な植物の成長・発達の制御が可能となることが期待される。

参照文献

- Burg, S. P. and Burg, E. A.; Ethylene formation in pea seedlings; its relation to the inhibition of bud growth caused by indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* 43: 1069-1074 (1968).
- Goeschl, J. D., Pratt, H. K. and Bonner, B. A.; An effect of light on the production of ethylene and the growth of the plumular portion of etiolated pea seedlings. *Plant Physiol.*, 42: 1077-1080 (1967).
- Hoson, T., Kamisaka, S., Masuda, Y., Yamashita, M. and Buchen B.; Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta*, 203: S187-S197 (1997).
- Hoshino, T., Miyamoto, K., Yamashita, M. and Ueda, J.; Auxin polar transport is essentially required for graviresponse in early growth stage of etiolated pea seedlings. *J. Gravitational Physiol.*, 13: 113-114 (2006a).
- Hoshino, T., Miyamoto, K. and Ueda, J.; 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 (2006b).
- Hoshino, T., Miyamoto, K. and Ueda, J.; 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 (2007).
- MacDonald, I. R., Gordon, D. C., Hart, J. W. and Maher, E. P.; The positive hook: the role of gravity in the formation and opening of the apical hook. *Planta*, 158: 76-81 (1983).
- Miyamoto, K., Hoshino, T., Yamashita, M. and Ueda J.; 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 (2005).
- Miyamoto, K., Yamasaki, T., Uheda, E. and Ueda, J.; Analysis of apical hook formation in Alaska pea with a 3-D clinostat and agravitropic mutant *ageotropum*. *Front. Plant Sci.*, doi: 10.3389/fpls.2014.00137 (2014).
- Miyamoto, K., Yuda, T. and Ueda J.; Effects of simulated microgravity conditions on a 3-dimensional clinostat on hook formation and ethylene production in etiolated pea seedlings. (In Japanese with English abstract), *Space Utilization Research*, 18: 180-183 (2002)
- Takahashi, H. and Suge, H.; Involvement of ethylene in gravity-regulated peg development in cucumber seedling. *Plant Cell Physiol.*, 29: 313-320 (1988).
- Taiz, L. and Zeiger, E.; *Plant Physiology*, fifth edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland (2010).
- Ueda, J., Miyamoto, K., Yuda, T., Hoshino, T., Fujii, S., Mukai, C., Kamigaichi, S., Aizawa, S., Yoshizaki, I., Shimazu, T. and Fukui K.; 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 (1999).
- Ueda, J., Miyamoto, K., Uheda, E., Oka, M., Higashibata, A. and Ishioka, N.; Close relationships between polar auxin transport and graviresponse in plants. *Plant Biol.*, 16 (Suppl. 1): 43-49 (2014).