

キュウリ芽生えの重力応答によりネガティブに制御される形態形成におけるオーキシン勾配制御

東北大・院・生命科学 藤井伸治、渡辺千秋、矢内健一、宮沢豊、高橋秀幸

首都大・理・生物 西村岳志、小柴共一

(独) 宇宙航空研究開発機構 山崎丘、石岡 憲昭

(株) エイ・イー・エス 鎌田 源司

(財) 日本宇宙フォーラム 嶋津 徹

Regulation of auxin distribution for gravimorphogenesis controlled negatively by gravity-responses in cucumber seedlings

Nobuharu Fujii, Chiaki Watanabe, Kenichi Yanai, Yutaka Miyazawa, Hideyuki Takahashi (Tohoku University)

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Katahira 2-1-1 Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8577

E-Mail: nobuharu@ige.tohoku.ac.jp

Nishimura Takeshi, Koshiba Tomokazu (Tokyo Metropolitan University)

Takashi Yamazaki, Noriaki Ishioka (JAXA)

Motoshi Kamada (Advanced Engineering Services Co.,Ltd.)

Toru Shimazu (Japan Space Forum)

Abstract: When cucumber seeds are placed in a horizontal position for germination, resulting seedlings develop a specialized protuberance, termed the peg, on the lower side of the transition zone between the hypocotyl and the root, due to gravistimulation. On the other hand, in our spaceflight experiment of STS-95, cucumber seedlings grown under microgravity conditions developed a peg on each side of the transition zone, suggesting that gravistimulation was required for suppressing the peg formation on the upper side of the transition zone. We considered this as negative regulation of morphogenesis (peg formation) by gravity. We have shown that exogenous auxin induces peg formation and that indole-3-acetic acid (IAA) content in the upper side of the gravistimulated transition zone is less than that in the lower side. Furthermore, inhibition of auxin efflux by TIBA treatment induces the peg formation on the upper side of the transition zone in addition to the lower side. Therefore, we proposed that gravistimulation activates auxin efflux, decreases auxin level and suppresses peg formation on the upper side of the transition zone. To examine this hypothesis, we first investigated the localization pattern of auxin efflux carrier CsPIN1 proteins in endodermal cells that are thought to sense gravity. The results suggested that its localization pattern changed to transport auxin to the lower side of the transition zone 30 min after gravistimulation. We then analyzed IAA contents in the transition zone after gravistimulation using GC-SIM-MS. Results of our quantification of IAA contents indicated that asymmetric IAA distribution was induced 30 min after gravistimulation. These results suggested that auxin efflux carrier CsPIN1 proteins in endodermal cells would induce asymmetric auxin distribution in the transition zone and play an important role in negative regulation of peg formation by gravity.

Key words; Auxin, Cucumber, Gravimorphogenesis, Plant, Peg, PIN

【はじめに】

植物は、環境刺激に応答することで様々な環境下での生存を可能にしている。植物の環境応答の中でも、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。ウリ科植物の種子を水平に静置して発芽させた芽生えでは、胚軸と根の境界域の下側にペグと呼ばれる突

起が形成される¹⁾。胚軸がフックを形成しながら上に伸長する時に、ペグは下側の種皮を押さえ、子葉の種皮からの脱皮を容易にする。種子を水平に置いて発芽させた芽生えは、境界域の下側の面に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生えは、境界域の両側に1個ずつ、合計2個のペグを形成する。このように、ペグ形成は、その境界域での形成面が発芽直後の芽生えの重力に対する向きにより決まる重力形態形成である。私たちは、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、芽生えの境界域の両側に1つずつペグが形成されることを明らかにした²⁾³⁾。したがって、キュウリ芽生えは重力非依存的に境界域の両側に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境界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」と名付けた新たな概念を提唱した²⁾³⁾。

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生えの境界域の上側にもペグ形成が誘導されること⁴⁾、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生えの境界域の上側においてオーキシン量が減少すること⁴⁾、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生えの境界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⁴⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。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、境界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、境界域の上側でのオーキシン排出キャリアの活性化がペグ形成の抑制に重要な役割を担うと考えられる⁵⁾。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⁵⁾⁹⁾。そこで、境界域における重力刺激に応答したオーキシンの動態変化を理解するために、境界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、ペグ形成開始時の境界域における *CsPIN1* タンパク質の局在と重力に応答した動

態変化を免疫組織化学染色法により解析した。酢酸メタノールにより固定した試料を解析した結果、重力刺激に応答した内皮細胞での *CsPIN1* の局在パターンの変動は認められたが、境界域の上側での *CsPIN1* の活性化やオーキシン量の減少を説明する結果は得られなかった。今回、キュウリの芽生えの境界域をカルノア固定液により固定し、免疫組織化学染色を行った結果、ペグの形成面決定期のキュウリ芽生えの境界域の上側の内皮細胞に顕著な *CsPIN1* シグナルが検出され、境界域の上側の内皮細胞においてオーキシン排出キャリア *CsPIN1* が重力刺激に対して応答していることが示された。さらに、GC-SIM-MS 法により内生インドール-3-酢酸 (IAA) を定量し、*CsPIN1* の局在パターンの変化とオーキシン分布との関連性を検討した結果を報告する。

【結果】

まず、いくつかの固定法により、キュウリの芽生えを固定し、抗 *CsPIN1* 抗体を用いた免疫組織化学染色法を行い、それぞれの結果を比較した。その結果、カルノア固定液を用いた時に、最も強い *CsPIN1* に対するシグナルが得られた。そして、そのシグナルのパターンは、垂直に種子を置き、発芽させたキュウリの芽生えでの境界域では対称であったのに対し、水平置き芽生えでは非対称であり、ペグ形成が抑制される境界域上側の内皮細胞の下側の細胞膜上にシグナルは検出された。次いで、本固定法を用いて、垂直に発芽させたキュウリの芽生えを横倒し、重力刺激を与えた後の *CsPIN1* の局在の経時的変化を解析した。その結果、重力刺激を与えてから10分後では、垂直置き芽生えの *CsPIN1* の局在パターンであったが、30分後には水平置き芽生えの *CsPIN1* の局在パターンに変化した。

上記の *CsPIN1* の局在パターンの変動が、内生 IAA の分布の変動と相関性を示すのかを解析した。まず、境界域を上下、あるいは左右に切り分けた組織片中の IAA を GC-MS を用いて定量した結果、水平置きに発芽させた芽生えのペグ形成が抑制される境界域の上側のオーキシン量は約 40 ng/gFW であり、ペグが形成される境界域の下側および垂直置きに発芽させた芽生えの右側、左側のオーキシン量は 53~54 ng/gFW であった。このことから、ペグの形成誘導のためのオーキシン量の閾値は 40~53 ng/gFW の間にあると考えられた。次に、芽生えに経時的に重力刺激を与えた後に境界域上下を切り分け、IAA を定量した結果、重力刺激30分後に境界域上下で IAA の偏差分布が検出され、特に

境界域下側で IAA 量が増加することが明らかになった。

【考察】

STS-95 の宇宙実験によって提唱された「重力による形態形成のネガティブコントロール」により、ペグの形成面の決定に際し、キュウリ芽生えの積極的な重力刺激への応答は、境界域の上側でのペグ形成の抑制であると予測される¹⁾²⁾。今回、得られた抗 CsPIN1 抗体を用いた免疫組織学的解析結果により、ペグの形成面決定期のキュウリ芽生えの境界域の上側の内皮細胞に顕著な CsPIN1 シグナルが検出され、境界域の上側の内皮細胞においてオーキシン排出キャリア CsPIN1 が重力刺激に対して応答していることが示された。そして、そのシグナルは、内皮細胞の下側の細胞膜に認められたことから、重力刺激に応答した CsPIN1 により境界域の上側の内皮細胞から下側に向けてオーキシンが輸送され、境界域の上側でオーキシンが減少し、ペグ形成が抑制されると予測される。この結論は、オーキシン排出キャリアの阻害剤である TIBA 処理により、水平に発芽させたキュウリ芽生えの境界域の上側においてもペグ形成が誘導される実験結果と矛盾しない⁵⁾。重力刺激後の経時的な解析により、境界域の上側の内皮細胞の下側の細胞膜への CsPIN1 の局在は、重力刺激から 30 分後に認められた。GC-SIM-MS により IAA を定量した結果、IAA の偏差分布も重力刺激から 30 分後に認められた。すなわち、境界域の内皮細胞での CsPIN1 の局在変化と境界域での IAA の偏差分布の形成が一致した。したがって、境界域の上側の内皮細胞において CsPIN1 が機能することにより、重力刺激に応答して境界域の上側のオーキシン量が低下し、ペグ形成が抑制されると考えられる。

【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-IAA1* 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-ACS1* 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.