

# エンドウ重力応答突然変異体“*ageotropum*”におけるオーキシン極性移動関連遺伝子

大阪府立大学大学院・理学系研究科  
大阪府立大学・総合教育研究機構

多田 朋弘・星野 友紀・上田 純一\*  
宮本 健助

*PsPINs* and *PsAUX1* genes encoding putative facilitator proteins of an efflux and an influx of auxin, respectively, from etiolated epicotyls of an agravitropic pea (*Pisum sativum* L.) mutant, *ageotropum*

Tomohiro Tada<sup>1</sup>, Tomoki Hoshino<sup>1</sup>, Kensuke Miyamoto<sup>2</sup> and Junichi Ueda<sup>1\*</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> Faculty of Liberal Arts and Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

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

**Abstract:** We have isolated novel cDNAs containing the complete open reading frames of a putative auxin influx facilitator, *PsAUX1*, and putative auxin efflux facilitators, *PsPIN1* and *PsPIN2*, from etiolated epicotyls of an agravitropic pea (*Pisum sativum* L.) mutant, *ageotropum*. High levels of homology were found on nucleotide and deduced amino acid sequences among *PsPIN1* (Accession No. AY222857) and *PsPIN2* (Accession No. AB112364) from an agravitropic pea mutant of *ageotropum* and a normal gravitropic pea of Alaska, *AtPINs* from *Arabidopsis thaliana* and others. Phylogenetic analyses based on deduced amino acid sequences revealed that *PsPIN2* from *ageotropum* pea and Alaska pea belonged to a subclade including *AtPIN3*, *AtPIN4* and *AtPIN7*, while *PsPIN1* from *ageotropum* pea and Alaska pea belonged to the same clade as *AtPIN1*. The results were similar for *PsAUX1* and *AtAUX1*, where *PsAUX1* from *ageotropum* pea and Alaska pea belonged to the same subclade as *AtAUX1* and *CsAUX1*. There was no deletion and insertion of nucleotides in these genes from *ageotropum* pea compared to those from Alaska pea. Expression of *PsPIN1*, *PsPIN2* and *PsAUX1* genes in the first internode of etiolated *ageotropum* and Alaska pea epicotyls were almost same during early growth stage of the seedlings. In contrast, *ageotropum* pea seedlings showed automorphosis-like growth observed in true and simulated microgravity conditions in space and on a three-dimensional clinostat, respectively. Auxin polar transport of the first internode of etiolated *ageotropum* pea epicotyls was substantially suppressed to lower than 50 % of that in etiolated Alaska pea epicotyls. These results suggest that reduced auxin polar transport in etiolated *ageotropum* pea epicotyls does not depend on structure and function, and gene expression of *PsPINs* and *PsAUX1* but on different mode of actions of other molecules regulating auxin polar transport and/or dynamics of the products of *PsPINs* and *PsAUX1* genes between *ageotropum* pea and Alaska pea.

**Key words;** *ageotropum* Pea Mutant, Alaska Pea, Automorphosis, Auxin Polar Transport, Efflux Facilitator Protein, Growth and Development, Influx Facilitator Protein, *PsAUX1*, *PsPINs*

## はじめに

1998年に実施されたSTS-95宇宙実験の結果から、宇宙微小重力環境下で生育した黄化エンドウ芽生え上胚軸は自発的形態形成を示すとともに、オーキシン極性移動が低下することが明らかとなった (Ueda *et al.* 1999, 2000)。これらの事実は、植物の形態形成やオーキシン極性移動は重力によって制御される現

象であることを示している。このことは、その後の3次元クリノスタットを用いた一連の地上基礎実験の結果から支持されるとともに、宇宙微小重力環境下で認められる黄化エンドウ芽生え上胚軸の自発的形態形成は、吸水後の子葉節付近での上胚軸の「負の重力屈性」が阻害された結果であることも示された (Miyamoto *et al.* 2005)。さらに上胚軸の「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、反子葉側上胚軸におけるオーキシンの不均等分布の阻害に起因することが明らかにされている (Hoshino *et al.* 2006a, 2006b)。

重力応答異常を示す突然変異体、*ageotropum* エンドウは、野生型エンドウの Weibull's Weitor 品種に X 線を照射することによって得られた突然変異体で、重力刺激を受けても自発的形態形成を示す。*ageotropum* エンドウを用いた先行研究から、黄化エンドウ芽生え上胚軸における負の重力屈性 (正常な重力応答反応) は、上胚軸子葉側のオーキシン極性移動によって制御されていること、また、その極性移動能に応じて変化する上胚軸子葉側および反子葉側の内生オーキシンレベルが重要であることが示されている (Hoshino *et al.* 2006a, 2006b)。

一方、オーキシン極性移動にはオーキシンの細胞内への取り込みと細胞外への排出に関わる様々な分子の関与の重要性が示唆されている (Estelle 1998, Muday and Murphy 2002, Friml and Palme 2002)。Gälweiler らはオーキシンの排出キャリアとしての *AtPIN1* 遺伝子産物の重要性を指摘している (Gälweiler *et al.* 1998, Müller *et al.* 1998)。現在まで、シロイヌナズナゲノム中には *AtPIN1* と相同性を示す遺伝子が 7 個存在し、比較的大きなファミリーを形成していることが知られている (Muday and Murphy 2002)。一方、*AtAUX1* 遺伝子については、これがオーキシンの取り込みキャリアをコードしている可能性が示されている (Bennett *et al.* 1996, Marchant *et al.* 1999, Swarup *et al.* 2001)。著者らの先行研究において、黄化エンドウ芽生えからオーキシン極性移動に関係すると考えられる新規遺伝子、*PsPIN2* (Hoshino *et al.* 2003) および *PsAUX1* (Hitotsubashi *et al.* 2003) が分離された。また、ほぼ時を同じくして Chawla と DeMason (2003) によって *AtPIN1* 遺伝子と高い相同性を示す *PsPIN1* が分離されている。

そこで本年度は、オーキシン極性移動と植物の重力応答反応 (重力形態形成) との関係をも分子レベルで明らかにすることを目的として、重力刺激にตอบสนองせず、自発的形態形成を示す重力応答突然変異体 *ageotropum* エンドウのオーキシン極性移動に注目し、オーキシン極性移動に密接に関係すると考えられる *PsPINs* および *PsAUX1* 遺伝子の構造とその発現を解析することとした。

## 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。アクリル製植物培養容器 (20 x 4 x 25 cm) に支持体としてロックウール (ミニポット、日東紡績株式会社) を詰め、32 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* エンドウの乾燥種子を胚の向きを水平、あるいは斜め上向きになるように播種し、種子全体が埋まる程度に埋め込み、蒸留水 180 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、25 °C、1 g 環境下あるいは 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。3.5 日齢黄化エンドウ芽生えから地上部を切り出し、液体窒素を用いて凍結した。凍結試料は RNA 抽出時まで -80 °C で保存した。

オーキシン極性移動関連遺伝子の分離と塩基配列の決定 — 黄化エンドウ芽生え地上部から ISOGEN (ニッポンジーン) を用い、全 RNA を抽出した。常法に従い、mRNA の polyA<sup>+</sup>tail に Oligo dT-Adaptor Primer をアニーリングさせ、RT-PCR 反応による相補鎖を合成した。なお、*ageotropum* エンドウにおける *PsPINs* および *PsAUX1* の分離に際しては、Alaska エンドウの各遺伝子産物の推定アミノ酸配列において共通性の高い配列を基にプライマーを設計し、使用した。その後、PCR 産物の下流および上流側の未知領域の塩基配列を明らかにするため、それぞれ 3'RACE 法および 5'RACE 法を導入した。RT-PCR、3'RACE 法および 5'RACE 法によって増幅させた cDNA 断片から、目的とする cDNA 断片をアガロースゲル電気泳動によって分離した。TA Cloning Kit (Invitrogen) を用い、常法に従い cDNA のクローニングを行った。T4 DNA リガーゼを用いて PCR 産物とベクターとをライゲーションさせ、これを Competent Cells (大腸菌 INV αF'または TOP10) に加え、ヒートショック処理後、振盪培養した。カナマイシン (25 μg/ml) と X-gal を含む LB 寒天 (1.5%) 培地上で菌体を培養 (37 °C) した後、白色のコロニーを選抜し、カナマイシンを含む LB 培地で増殖させた。常法に従って、大腸菌培養液をアルカリ処理し、大腸菌からプラスミド DNA を単離し、目的の遺伝子の塩基配列を決定した。なお、オーキシン極性移動関連遺伝子の発現解析は real time RT-PCR 法に従った。

オーキシン極性移動能の測定 — 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、既に報告された方法に従った (Oka *et al.* 1995)。

## 結果および考察

Alaska エンドウ種子を胚を水平、あるいは斜め上向きになるように播種し、暗所で発芽、生育させた。その結果、前者では子葉側上胚軸の成長が、また、後者では反子葉側上胚軸の成長がそれぞれ促進され、芽生え上胚軸は正常な重力応答反応を示した。*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、いずれの場合も芽生え上胚軸は子葉から離れる方向約 45° の角度でまっすぐ伸長し、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。Alaska エンドウ種子を 3 次元クリノスタット上で作出される擬似微小重力環境下で同様に播種し、暗所

で発芽、生育させた場合、*ageotropum* エンドウの場合と同様に、いずれの播種方向においても上胚軸は子葉から離れる方向、すなわち自発的形態形成様の成長、発達を示した (Hoshino *et al.* 2008)。

重力刺激に対して正常に応答する Alaska エンドウに加えて (Hoshino *et al.* 2005)、本研究においては、重力応答突然変異体である *ageotropum* エンドウからオーキシン極性移動関連遺伝子と考えられる *PsPIN1*、*PsPIN2* および *PsAUX1* の分離を試み、その完全長 cDNA 配列の決定に成功した (結果省略)。GENETYX-MAC 11.2 を用いて塩基配列に基づく相同性を解析した結果、これらの遺伝子は、シロイヌナズナをはじめとするいくつかの植物においてすでに分離されている *PIN* および *AUX* 遺伝子ファミリーに属するものであることが推察された。推定アミノ酸配列に基づき進化系統樹を作成した結果、*PsPIN1* が *AtPIN1* および *CsPIN1* と同じサブファミリーに属するのに対し、*PsPIN2* は *AtPIN3*、*AtPIN4* および *AtPIN7* サブファミリーに属することが、また、*PsAUX1* は、*AtAUX1*、*CsAUX1* および *AtLAX1* と同じサブファミリーに属し、*AtAUX1* と最も近縁であることが示された (Fig. 1)。これらの結果から、本研究で分離した *PsPIN2* および *PsAUX1* は、それぞれ *AtPINs* と *AtAUX1* と相同な機能を有し、黄化エンドウ芽生えにおけるオーキシン輸送の facilitator タンパク質をコードしているものと推察された。この点については、今後、遺伝子産物の細胞内における存在場所を特定するなどの検証が必要である。

Alaska エンドウに比べ、*ageotropum* エンドウでは *PsPIN1* および *PsPIN2* において若干のアミノ酸の置換 (置換割合はそれぞれ 0.17%、1.46%) があるものの欠失や挿入等の決定的な不具合は認められなかった (結果省略)。また、黄化 *ageotropum* エンドウ芽生えの成長、発達に伴うこれら遺伝子の発現は黄化 Alaska エンドウのそれとほぼ同様であった (結果省略)。以上の結果、*PsPIN1*、*PsPIN2* および *PsAUX1* の機能は未だ明確ではないものの、*ageotropum* エンドウ上胚軸におけるオーキシン極性移動の低下ならびに重力応答反応の異常に基づく上胚軸の形態形成 (の異常) をこれらの遺伝子の構造や発現の側面より特定するのは困難であると考えられる。

一方、シロイヌナズナにおいて、近年 *pin* 突然変異体以外にもオーキシン極性移動が低下している突然変異体が得られ、その原因遺伝子が同定されている。その一つに、動物で発見された多剤耐性 (MDR) 様遺伝子がある。MDR タンパク質は細胞における膜を介した物質輸送に関与していること (Luschnig 2002, Martinoia *et al.* 2003)、また、これがオーキシン極性移動阻害剤である NPA の結合部位を有していること (Murphy *et al.* 2002) から、オーキシンの輸送には *PIN* タンパク質とともに MDR 様タンパク質の重要性が指摘されている。今後は、*ageotropum* エンドウにおいて、オーキシン極性移動と MDR 様タンパク質との関係を明らかにするとともに、*PsPINs* 並びに *PsAUX1* 遺伝子産物に対する抗体などを用い、

これらの遺伝子産物の細胞内分布や機能を詳細に解析することが必要である。

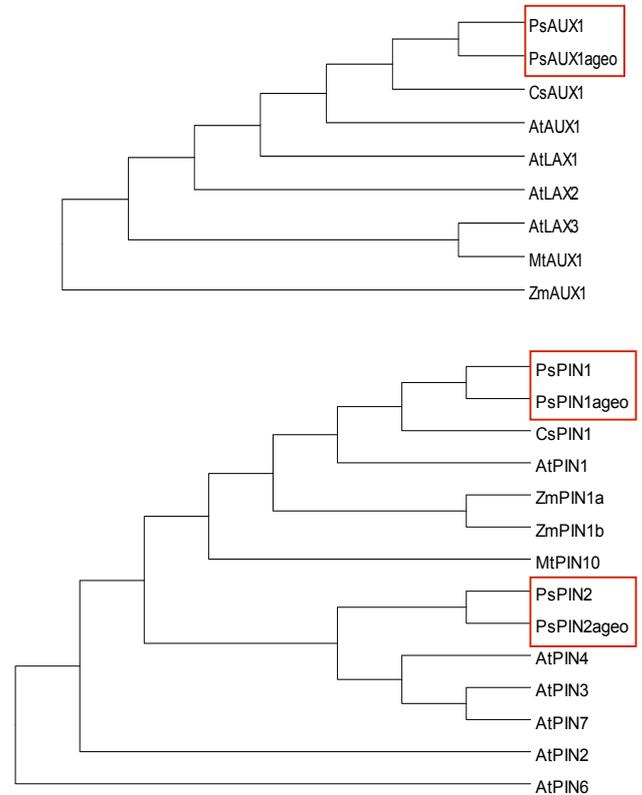


Fig. 1 Phylogenetic relationships based on deduced amino acid sequences of *AUX* genes (upper) and *PIN* genes (lower). *PsAUX1ageo* and, *PsPIN1ageo* and *PsPIN2ageo* indicated the products of *PsAUX1* and *PsPINs* genes isolated from an agravitropic pea mutant, *ageotropum*.

植物の茎における重力応答反応 (屈曲現象) では、茎細胞の偏差的な成長を引き起こすオーキシンの不均等分布が重要であると考えられている。黄化エンドウ芽生えの初期成長過程における重力応答反応としての上胚軸の屈曲も、他の植物の場合と同様に、オーキシンの不均等分布に依存している可能性がある。実際、エンドウのオーキシン応答性遺伝子である *PsIAA4/5* の発現を指標として上胚軸の内生オーキシンレベルを調べた結果、胚を水平あるいは斜め上向きにして種子を置床した場合、上胚軸の成長が相対的に大きくなる側でオーキシンの内生レベルが高くなることが示された (Hoshino *et al.* 2006a, 2006b)。

放射性オーキシン ([1-<sup>14</sup>C]indole-3-acetic acid) を用いて黄化 *ageotropum* エンドウおよび黄化 Alaska エンドウ芽生え上胚軸第 1 節間の子葉側および反子葉側におけるオーキシン極性移動を測定したところ、いずれの芽生えにおいても、また、胚を水平および

斜め上向き、いずれの方向に置床した場合も、オーキシン極性移動は反子葉側に比べて子葉側で大きな値を示した。さらに、芽生えの成長に伴ってオーキシン極性移動は低下する傾向にあった。また、子葉側および反子葉側のオーキシン極性移動は、黄化 *ageotropum* エンドウでは黄化 Alaska エンドウに比べ、きわめて低い値を示した（結果省略）。

一方、オーキシン極性移動阻害剤である TIBA はオーキシン極性移動を低下させるが、この様なオーキシン極性移動阻害剤の投与実験の結果から、黄化 Alaska エンドウ芽生えにおいては子葉側上胚軸のオーキシン極性移動を低下させる（阻害する）ことによって、上胚軸の成長方向を子葉側へ誘導することが可能であることが示された（Hoshino *et al.* 2007）。また、このことは、*ageotropum* エンドウにおいても認められている（Hoshino *et al.* 2007）。以上の事実は、宇宙微小重力環境下での植物の人為的な姿勢制御におけるオーキシン極性移動制御物質の投与の可能性を示している

## 参考文献

- Bennett, M., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schultz, B. and Feldmann, K. A. (1996) *Arabidopsis AUX1* gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, **273**, 948-950.
- Chawla, R. and DeMason, D. A. (2003) PsPIN1, putative auxin efflux protein. Accession no. AY222857, DDBJ/EMBL/GenBank databases.
- Estelle, M. (1998) Polar auxin transport: New support for an old model. *Plant Cell*, **10**, 1775-1778.
- Friml, J. and Palme, K. (2002) Polar auxin transport – old question and new concepts? *Plant Molecular Biology*, **49**, 273-282.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. and Palme, K. (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, **282**, 2226-2230.
- Hitotsubashi, R., Miyamoto, K., Hoshino, T., Tanimoto, E. and Ueda, J. (2003) PsAUX1, putative auxin influx carrier protein. Accession no. AB107919, DDBJ/EMBL/GenBank databases.
- Hoshino, T., Hitotsubashi, R., Miyamoto, K., Tanimoto, E. and Ueda, J. (2003) Putative auxin transport protein, PsPIN2, in etiolated pea (*Pisum sativum* L. cv. Alaska). Accession no. AB112364, DDBJ/EMBL/GenBank databases.
- 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., 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.
- 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.
- Luschnig, C. (2002) Auxin transport: ABC proteins join the club. *Trends Plant Sci.*, **7**, 329-332.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S. T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C. and Bennett, M. J. (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake with in root apical tissues. *EMBO J.*, **18**, 2066-2073.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Muller-Rober, B. and Schultz, B. (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters – more than just detoxifiers. *Planta*, **214**, 345-355.
- 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.
- Muday, G. K. and Murphy, A. S. (2002) An emerging model of auxin transport regulation. *Plant Cell*, **14**, 293-299.
- Müller, A., Guan, C., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennet, M., Wisman, E. and Palme, K. (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.*, **17**, 6903-6911.
- Murphy, A. S., Hoogner, K. R., Peer, W. A. and Taiz, L. (2002) Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **128**, 935-950.
- Oka, M., Ueda, J., Miyamoto, K., Yamamoto, R., Hoson, T. and Kamisaka, S. (1995) Effect of simulated microgravity on auxin polar transport in inflorescence axis of *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Sci. Space*, **9**, 331-336.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K. and Bennett, M. (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes & Dev.*, **15**, 2648-2653.
- 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.