

## 宇宙環境下における植物の成長・発達とオーキシン極性移動 (II): 特に重力応答突然変異体 *ageotropum* エンドウを用いた解析

大阪府立大学大学院・理学系研究科・生物科学専攻 宮本 健助・星野 友紀・上田 純一

Plant growth and development, and auxin polar transport in space (II): Based on the analysis using an agravitropic pea mutant, *ageotropum*

*Kensuke Miyamoto\*, Tomoki Hoshino and Junichi Ueda*

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

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

Abstract: Introducing mutants in graviresponse is important to know how gravity regulates morphogenesis of plants. To elucidate the role of auxin polar transport in gravimorphogenesis of plants, effects of gravistimulation on growth and development, and auxin polar transport in *ageotropum* pea seedlings showing abnormal gravitropic response were studied in comparison with those in Alaska pea seedlings. As well as etiolated Alaska pea epicotyls, amyloplasts sedimented to the direction of gravity were observed in *ageotropum* epicotyls. When embryo axes of *ageotropum* seeds were set in a vertical (parallel to the direction of gravity) or a horizontal (perpendicular to the direction of gravity) position and grown under 1 g conditions in the dark for 6.5 days, their epicotyls showed automorphosis-like bending to the direction far from the cotyledons regardless of the conditions of seed germination. The automorphosis-like bending of etiolated *ageotropum* epicotyls was not affected by a simulated microgravity conditions on a 3-D clinostat. The activities of auxin polar transport of the 2nd internodes of 6.5-d-old etiolated *ageotropum* pea seedlings grown under 1 g conditions were lower than those of Alaska pea seedlings grown under 1 g conditions. The activities of auxin polar transport of the 2nd internodes in 6.5-d-old etiolated *ageotropum* pea seedlings were little affected by a simulated microgravity conditions on the 3-D clinostat, although those of Alaska pea seedlings were substantially affected. These results strongly support our previous idea that normal auxin polar transport is required for the normal graviresponse of epicotyls in etiolated pea seedlings.

**Key words;** *Ageotropum* pea, Agravitropic mutant, Alaska pea, Automorphosis, Auxin Polar Transport, Clinostat, Simulated microgravity conditions

### はじめに

著者らが行った STS-95 宇宙実験や地上基礎実験において、黄化エンドウ芽生えを宇宙微小重力環境下あるいは3次元クリノスタット上の擬似微小重力環境下で発芽、生育させると、自発的形態形成を示すと共に、上胚軸におけるオーキシン極性移動の低下が示されている (Ueda *et al.* 1999, 2000, Shimazu *et al.* 2001, Miyamoto *et al.* 2005ab)。さらに、地上 1 g 環境下においてオーキシン極性移動阻害剤を外生的に投与することにより自発的形態形成に類似した成長・発達が認められた (Miyamoto *et al.* 2005a)。これらの結果は、オーキシン極性移動が黄化エンドウ芽生えにおける自発的形態形成に密接に関わっていることを強く示唆する。

オーキシン極性移動の制御には、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極性移動を司る分子の関与が示唆されている

(Estelle 1998, Muday and Murphy 2002, Friml and Palme 2002)。これまでにシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた研究から、オーキシン極性移動システムにおけるオーキシン排出キャリアーとして *AtPIN1* 遺伝子産物の重要性が (Gälweiler *et al.* 1998, Luschnig *et al.* 1998, Müller *et al.* 1998, Muday and Murphy 2002)、また、取り込みキャリアーとして *AtAUX1* 遺伝子産物の重要性が指摘されている (Bennett *et al.* 1996, Marchant *et al.* 1999, Swarup *et al.* 2001)。黄化エンドウ芽生えにおいても著者らの先行研究においてオーキシン極性移動関連遺伝子として *PsPIN2* (Hoshino *et al.* 2003) および *PsAUX1* (Hitotsubashi *et al.* 2003) が、また Chawla と DeMason (2003) によって *AtPIN1* と高い相同性を示す *PsPIN1* が分離されている。著者らは、重力ベクトル変化による重力刺激を与え、黄化エンドウ芽生えの初期重力応答反応におけるこれらオーキシン極性移動関連遺伝子の発現を解析した結果から、*PsPINs* 遺伝子の

発現が重力刺激の影響を受けることを示している (Hoshino *et al.* 2006)。しかしながら、黄化エンドウ芽生えの自発的形態形成とオーキシン極性移動との関係を分子レベルで解明するには、微小重力環境下におけるオーキシン極性移動関連遺伝子の動態の解析が重要であり、宇宙ステーションや擬似微小重力模擬装置である3次元クリノスタットの適用が有効な手段となる。

一方、自発的形態形成を示す重力応答突然変異体におけるオーキシン極性移動の解析は、重力応答におけるオーキシン極性移動の役割に関する多大な分子情報を与えるものと期待される (Olsen and Iversen 1980ab, Roberts 1987, Kiss and Sack 1990)。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重力屈性異常を示す突然変異体として *ageotropum* エンドウが知られており (Blixt *et al.* 1958) 古くから根の重力屈性や水分屈性の研究に適應されてきた (Olsen and Iversen 1980ab, Takahashi and Suge 1991, Takahashi *et al.* 1991)。しかしながら、その上胚軸の形態形成とオーキシン極性移動との関連については、ほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では *ageotropum* エンドウを用い、種々の重力環境における上胚軸の成長・発達およびオーキシン極性移動を調べ、重力屈性におけるオーキシン極性移動の重要性を検証することを目的とした。

## 材料および方法

**エンドウ (*Pisum sativum* L.) 種子** - アラスカエンドウ種子は、渡辺採種場 (岩手県小牛田) から購入した。*ageotropum* エンドウは、東北大学大学院、高橋秀幸教授から供与いただいたものを元に、大阪府立大学大学院理学系研究科の実験圃場において栽培し採種したものを使用した。

**成長実験** - 一連の実験は著者らが 1998 年に実施した植物宇宙実験 (STS-95) に準じた条件で行った (Ueda *et al.* 1999)。培養には、Plant Growth Chamber (NASA) を模したアクリル製植物培養容器と支持体としてロックウール (ミニポット、日東紡績) を用いた。本研究では、ベクトル方向を変えた重力刺激を与える目的で、エンドウ乾燥種子中の胚の軸が水平方向あるいは垂直方向になるように種子をロックウールに置床した (図 1 参照)。蒸留水 (180 ml) を給水した後、植物培養容器全体をジップロックバッグに収め、暗所、25℃、1g 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。一定期間の培養の後、上胚軸の成長方向および長さを測定した。

**擬似微小重力環境の作出** - 擬似微小重力環境は 3 次元クリノスタット (CS2、日本医科器械製作所) および回転期間中の積算重力方向成分がゼロになるように回転方向ならびに回転速度を制御できる回転制御システム (南出システムエンジニアリン

グ) を用いて作出した。

**オーキシン極性移動能の測定** - オーキシン極性移動能の測定は、6.5 日齢黄化芽生え第 2 節間を対象に、放射性インドール酢酸を用い、すでに報告した方法に従って実施した (Ueda *et al.* 1999)。

**沈降性アミロプラストの観察** - ロックウールに生育した状態の芽生えの上胚軸に縦に切れ目をいれ、そこにヨウ素・ヨウ素カリウム溶液を注入した。一定時間の後、切り口切断面の組織におけるデンプン顆粒の状態を光学顕微鏡を用いて観察した。

## 結果および考察

### *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸の成長・発達

エンドウ種子を重力方向に対して水平あるいは垂直に播種し、暗所、25℃で発芽・生育させた。1g 環境下で発芽・生育させた場合、アラスカエンドウ芽生え上胚軸は、水平に播種したものでは上胚軸基部における子葉側の偏差成長によって、垂直に播種したものでは反子葉側の偏差成長によって、反重力方向に伸長した (図 1 参照)。また、3 次元クリノスタット上の擬似微小重力環境下で発芽・生育させた場合、播種した胚の向きにかかわらず、子葉から離れる方向に傾いて伸長し、いわゆる自発的形態形成を示した。

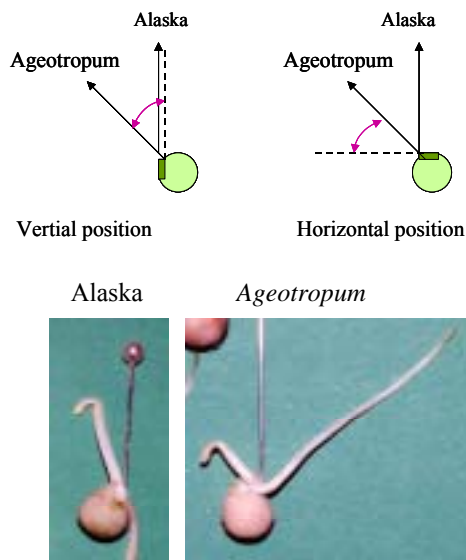


Fig.1 Growth and development of etiolated Alaska and *ageotropum* pea seedlings grown under 1g conditions. Upper: Schematic figures of etiolated Alaska and *ageotropum* pea seedlings. Dry seeds were set in a vertical (left) or a horizontal position (right). Lower: 3.5-d-old etiolated Alaska and *ageotropum* pea seedlings grown in a horizontal position.

一方、*ageotropum* エンドウ種子を 1g 環境下で発芽・生育させた場合、播種した胚の向きにかかわらず、上胚軸は子葉から離れる方向に傾いて伸長した

(図 1)。また、3次元クリノスタット上で発芽・生育させた *ageotropum* エンドウ芽生えの上胚軸の成長方向は、1 g環境下でのそれとほぼ同様であった(結果省略)。

1 g環境下において、アラスカエンドウと *ageotropum* エンドウの上胚軸の成長方向を経時的に測定した結果、いずれも発芽直後には上胚軸は子葉から離れる方向に傾いて伸長し、その成長方向に有意な差は認められなかった。しかしながら、時間の経緯と共に *ageotropum* エンドウの上胚軸がほぼその角度を保ったまま伸長したのに対し、アラスカエンドウでは負の重力屈性によってその成長方向が反重力方向へと速やかに変化していった(結果省略)。

*ageotropum* エンドウ芽生えの根においては、重力感受にかかわる根冠コルメラ細胞の形態や沈降性アミロプラストの動態に、正常な重力屈性反応を示すものと差がないことが報告されている(Olsen and Iversen 1980ab)。本研究においても、*ageotropum* エンドウ上胚軸において沈降性アミロプラストが観察されることが確認された(図 2)。この結果は、上胚軸における自発的形態形成様の成長・発達、重力感受に関わるとされるスタトリスの異常によってもたらされたものではないことを示唆する。

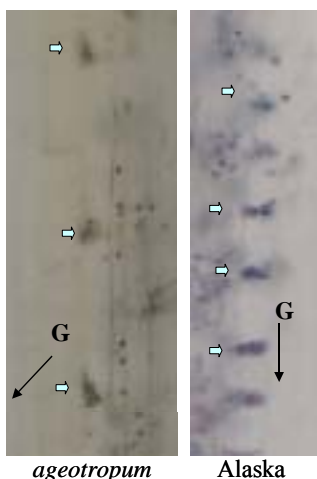


Fig. 2 Orientation of statoliths in epicotyls of 3-d-old etiolated pea seedlings. Allow with “G” indicates the direction of gravity.

以上の結果から、上胚軸の成長方向は重力刺激の影響を受けず、極めて自発的形態に類似の成長・発達を示すことから、*ageotropum* エンドウは自発的形態形成制御機構の解析に有用な重力応答突然変異体であることが示唆された。

### 黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸のオーキシン極性移動能

STS-95 宇宙実験において、種子を垂直に播種し、6.5 日間暗所で生育させた黄化アラスカエンドウ芽生え第 2 節間のオーキシン極性移動能は、地上 1 g 環境下で生育させたものに比べ著しく低下していた(Ueda *et al.* 1999, 2000)。そこで、胚の向きを垂直

に播種し 6.5 日間暗所で生育させた黄化芽生えの第 2 節間を対象に、そのオーキシン極性移動能をアラスカエンドウのそれと比較した。その結果、*ageotropum* エンドウ芽生えのオーキシン極性移動能はアラスカエンドウのそれに比べ低く、約 70%程度であった(結果省略)。この結果は、正常なオーキシン極性移動能と重力屈性反応との間には密接な関係があることを強く支持している。

さらに、*ageotropum* エンドウのオーキシン極性移動能に対する重力ベクトルの変化およびクリノスタット上の擬似微小重力の影響を調べた結果、アラスカエンドウのそれが種々の重力刺激によって影響されたのに対して(Miyamoto *et al.* 2005, Hoshino *et al.* 2006)、いずれの重力環境下においても重力刺激の影響を受けなかった(結果省略)。

我々は、黄化アラスカエンドウ芽生えの初期成長過程における重力応答反応には重力によって制御されているオーキシン極性移動に起因するオーキシンの不均等分布が重要な役割を果たしていることを指摘している(Hoshino *et al.* 2006)。6.5 日齢黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え第 2 節間のオーキシン極性移動能は種々の重力刺激の影響を受けなかったことから、正常な重力応答には重力刺激にตอบสนองするオーキシン極性移動が必要であるという我々の仮説が支持される。

従来より、オーキシンが極性的に移動する過程には、細胞内から細胞外への排出に関わるキャリアタンパク質をコードしていると考えられている *PIN* 遺伝子、および細胞外から細胞内への取り込みに関わるキャリアタンパク質をコードしていると考えられている *AUX1* 遺伝子とが関与すると考えられている。我々の先行研究の結果、黄化エンドウ芽生えの初期成長過程において *PsPINs* 遺伝子の発現はオーキシン極性移動能とよく関連していることから、実際、*PsPINs* 遺伝子産物が細胞内から細胞外へのオーキシンの排出に重要な役割を担っていることが示唆されている。今後は、*ageotropum* エンドウ芽生えにおいて、オーキシン極性移動関連遺伝子、特に *PsPIN1* 遺伝子に着目した分子生物学的解析が望まれる。

### 謝辞

本実験遂行にあたり東北大学大学院、高橋秀幸教授より *ageotropum* エンドウ種子を供与いただきました。ここに深く感謝の意を表します。

### 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.
- Blixt, S. T., Ehrenberg, L. and Gelin, O. (1958)

- Qualitative studies of induced mutations in peas. I. Methodological investigations. *Agr. Hort. Genetica*, **16**, 238.
- 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., Miyamoto, K. and Ueda, J. (2006) Requirement for 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.
- Kiss, J. Z. and Sack, F. D. (1990) Severely reduced gravitropism in dark-grown hypocotyls of a starch-deficient mutant of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol.*, **64**, 1867-1873.
- Luschnig, C., Gaxiola, R. A., Grisafi, P. and Fink, G. R. (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Dev.*, **12**, 2175-2187.
- 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.
- Miyamoto, K., Hoshino, T., Yamashita, M. and Ueda J. (2005a) 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., Hoshino, T., Hitotsubashi, R., Yamashita, M. and Ueda, J. (2005b) Automorphosis-like growth in etiolated pea seedlings is induced by the application of chemicals affecting perception of gravistimulation and its signal transduction. *Adv. Space Res.*, **36**, 1263-1268.
- 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.
- Olsen, G. M. and Iversen, T.-H. (1980a) Ultrastructure and movements of cell structures in normal and an ageotropic mutant. *Physiol. Plant.*, **50**, 275-284.
- Olsen, G. M. and Iversen, T.-H. (1980b) Growth and curvature in seedlings of *Pisum sativum* and an ageotropic mutant. *Physiol. Plant.*, **50**, 269-274.
- Roberts, J. A. (1987) Mutants and gravitropism. In: *Developmental mutants in higher plants*, Thomas, H. and Grierson, D. eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 135-153.
- Shimazu, T., Yuda, T., Miyamoto, K., Yamashita, M. and Ueda, J. (2001) Growth and development in higher plants under simulated microgravity conditions on a 3-dimensional clinostat. *Adv. Space Res.*, **27**, 995-1000.
- 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.
- Takahashi, H. and Suge, H. (1991) Root hydrotropism of an agravitropic pea mutant, *ageotropum*. *Physiol. Plant.*, **82**, 24-31.
- Takahashi, H., Suge, H. and Jaffe, M. J. (1991) Agravitropic growth and its relation to the formation of the plumular hook in etiolated shoots of the pea mutant, *ageotropum*. *J. Plant Physiol.*, **138**, 216-222.
- 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.