

## 高等植物の初期重力応答反応におけるオーキシン極性移動の重要性

大阪府立大学大学院・理学系研究科  
宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研

星野 友紀・宮本 健助・上田 純一  
山下雅道

Important role of auxin polar transport for graviresponse in early growth stage of higher plants

Tomoki Hoshino<sup>1</sup>, Kensuke Miyamoto<sup>1</sup>, Masamichi Yamashita<sup>2</sup> and Junichi Ueda<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup> Japan Aerospace Exploration Agency, Yoshinodai, Sagami-hara, Kanagawa 229-8510, Japan

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

**Abstract:** Plant shoots grow to the direction away from the gravity vector under 1 g conditions on earth. On the other hand, both true microgravity conditions in space (STS-95 space experiment) and simulated ones using a three-dimensional clinostat induced automorphosis together with significant inhibition of auxin polar transport in epicotyls of etiolated pea (*Pisum sativum* L. cv. Alaska) seedlings. In addition, automorphosis-like growth and development of etiolated pea seedlings were induced by the application of auxin polar transport inhibitors of HFCA (9-hydroxyfluorene-9-carboxylic acid), TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid) and NPA (*N*-(1-naphthyl)phthalamic acid), but not by that of PCIB (*p*-chlorophenoxyisobutyric acid), anti-auxin. The activities of auxin polar transport of pea epicotyls were also substantially suppressed by the application of inhibitors of auxin polar transport. In epicotyls of 2.5-fold etiolated pea seedlings, whose embryo axes in seeds were set in a horizontal position opposite to the direction of gravity, activities of auxin polar transport and gene expression of *PsPIN1* encoding a facilitator protein of auxin polar transport were respectively asymmetrical in proximal and distal side of epicotyls, it being much higher in proximal side than in distal one. These results strongly support the idea that auxin polar transport is essentially required for graviresponse in early growth stage of etiolated pea seedlings.

**Key words:** Automorphosis, Auxin Polar Transport, Clinostat, Efflux Facilitator Protein, Growth and Development, Influx Facilitator Protein, Microgravity, Pea, *PsAUX1*, *PsPIN1*

### はじめに

著者らが行った先行研究において、黄化エンドウおよび黄化トウモロコシ芽生えを宇宙微小重力環境下 (STS-95 宇宙実験) 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ともに、上胚軸および幼葉鞘におけるオーキシン極性移動が影響されることが示されている (Ueda *et al.* 1999, 2000, Shimazu *et al.* 2001, Miyamoto *et al.* 2005)。この時、特に、黄化エンドウ芽生えにおいては上胚軸のオーキシン極性移動の低下が認められること、そして、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処理すると自発的形態形成に類似した芽生えの成長、発達が認められることから、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と密接に関わっていることが強く示唆された (Miyamoto *et*

*al.* 2005)。

さらに、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ける自発的形態形成あるいはオーキシン極性移動阻害剤存在下の自発的形態形成様の成長、発達の経時的解析結果から、黄化エンドウ芽生えにおける自発的形態形成が、芽生えの初期成長過程における重力応答反応の阻害によるものであることが示唆された (Miyamoto *et al.* 2005)。

オーキシン極性移動の分子機構には、オーキシン極性移動を司ると考えられる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が関与していることが示唆されており (Estelle 1998, Muday and Murphy 2002, Friml and Palme 2002)。現在まですでに一部の分子についてはその詳細が明らかにされている。すなわち Gälweiler らはシロイヌナズナ (*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の efflux carrier として *AtPIN1* 遺伝子産物の重要性を指摘している (Gälweiler *et al.* 1998, Luschnig *et al.* 1998, Müller *et al.* 1998)。この *AtPIN1* と相同性を有する遺伝子は、現在までシロイヌナズナゲノム中に 7 個存在し、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)。また、*AtAUX1* 遺伝子については、これがオーキシンの influx carrier 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)。

黄化エンドウ芽生えを対象とした著者らの先行研究においても、オーキシシン極性移動に関係すると考えられる *PsPIN2* (Hoshino *et al.* 2003) および *PsAUX1* (Hitotsubashi *et al.* 2003) が分離された。また、Chawla と DeMason (2003) によっても *AtPIN1* 遺伝子と高い相同性を示す *PsPIN1* が分離されている。

本研究では、STS-95 宇宙実験で用いた黄化エンドウ芽生えを対象として、3 次元クリノスタット上の擬似微小重力環境下における自発的形態形成、あるいはオーキシシン極性移動阻害剤存在下における自発的形態形成様の成長、発達、芽生えの初期成長過程における重力応答反応の阻害によるものであること、さらには、このような芽生えの成長、発達が上胚軸のオーキシシン極性移動と密接に関係することに着目し、オーキシシン極性移動関連遺伝子の発現解析の側面から黄化エンドウ芽生えの初期重力応答反応におけるオーキシシン極性移動の重要性を明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

一連の実験には、著者らが 1998 年に実施した植物宇宙実験 (STS-95) に合わせて、黄化エンドウ (*Pisum sativum* L. cv. Alaska) 芽生えを用いた (Ueda *et al.* 1999)。本研究では、上胚軸の重力反応を明確に示す目的で、種子中の胚の軸が反重力側、水平方向になるように種子をロックウールに置床した。植物の育成、および各種化学物質の処理については、従来と同様の方法に従った (Ueda *et al.* 2002)。

擬似微小重力環境の作出は 3 次元クリノスタットにより、また、オーキシシン極性移動能の測定には放射性 IAA を用い、すでに報告された方法に従った (Oka *et al.* 1995, Ueda *et al.* 2002)。

オーキシシン極性移動関連遺伝子、およびオーキシシン応答性遺伝子の発現解析は、従来の方法 (Hoshino *et al.* 2005) に従いノーザンハイブリダイゼーション法を用いて行った。

## 結果および考察

### 1. 自発的形態形成様の成長、発達を示す黄化エン

### ドウ芽生えのオーキシシン極性移動

胚が反重力方向側となるように乾燥エンドウ種子をロックウールに置床し、地上 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 48 ~ 60 時間生育させ、芽生え上胚軸の子葉側および反子葉側におけるオーキシシン極性移動を調べた。その結果、黄化エンドウ芽生え上胚軸第 1 節間におけるオーキシシン極性移動は、そのほとんどが子葉側で生じていた (図 1)。

また、自発的形態形成様の成長、発達を示す 3 次元クリノスタット上の擬似微小重力環境下で生育させた場合には、子葉側でのオーキシシン極性移動の低下が認められた。

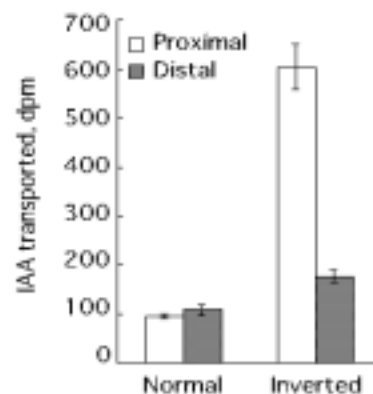


Fig. 1 Asymmetrical activities of auxin polar transport in proximal and distal sides of epicotyls of 2.5-d-old etiolated pea seedlings, whose embryo axes in seeds were set in a horizontal position opposite to the direction of gravity. Segments (1 cm in length) prepared from the 1st internodes of etiolated pea epicotyls were cut into halves of proximal and distal sides to the cotyledons. "Normal" and "Inverted" indicate the auxin transport from basal side to apical one, and apical side to basal one, respectively.

一方、黄化エンドウ芽生えを各種オーキシシン極性移動阻害剤 (TIBA: 2,3,5-triiodobenzoic acid; HFCA: 9-hydroxyfluorene-9-carboxylic acid あるいは NPA: *N*-(1-naphthyl)phthalamic acid) 存在下で生育させた場合、3 次元クリノスタット上の擬似微小重力環境下で生育させた場合と同様に、芽生えは自発的形態形成様の成長、発達を示すことが明らかにされているが、上記のオーキシシン極性移動の低下は、芽生えを TIBA 存在下で生育させた場合にも認められた。

### 2. 黄化エンドウ芽生え上胚軸の初期成長過程での重力応答反応におけるオーキシシン極性移動関連遺伝子の発現

胚の向きを反重力方向、水平になるように種子を置床した場合、芽生えが 1 g 環境下における重力刺激に応答すると、上胚軸の反子葉側の成長に比べて子葉側での成長が相対的に大きくなり、上胚軸は反

重力方向に屈曲し、伸長する。このような植物の茎における屈曲現象は茎細胞の偏差的な成長量に起因し、それにはオーキシンの不均等分布が重要な役割を果たしてい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、オーキシンの不均等分布に依存している可能性を想定し、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内生オーキシンレベルを調べた結果、上胚軸の反子葉側に比べて子葉側でその強い発現が認められた。この結果から、実際にオーキシンは上胚軸の子葉側で多く存在し、この不均等分布が偏差成長の原因となっていることが推察された。

オーキシンが極性的に移動する過程で細胞内から細胞外への排出に関わる facilitator タンパク質をコードしていると考えられている *AtPIN1*、*AtPIN3* 遺伝子、および細胞外から細胞内への取り込みに関わる facilitator タンパク質をコードしていると考えられている *AtAUX1* 遺伝子と、それぞれ高い相同性を示す *PsPIN1*、*PsPIN2* および *PsAUX1* 遺伝子の発現を調べた。

その結果、*PsPIN2* および *PsAUX1* 遺伝子は黄化エンドウ芽生え各器官でその発現が認められるものの、*PsPIN1* 遺伝子の発現は芽生え上胚軸の子葉側で強く、この遺伝子発現の子葉側/反子葉側の比は極めて大きいものであった。*PsPIN1* 遺伝子の発現は芽生えにおける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、*PsPIN1* 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る。

一方、3次元クリノスタット上の擬似微小重力環境下で 48~60 時間生育させた黄化エンドウ芽生えでは、*PsPIN1* 遺伝子発現の子葉側/反子葉側の比が 1g 環境下のそれと比べて著しく低下した。また、*PsIAA4/5* の発現を指標として内生オーキシンレベルを調べた結果、遺伝子発現の子葉側/反子葉側の比は、*PsPIN1* 遺伝子発現の場合と同様、1g 環境下のそれと比べて著しく低下した。

また、3次元クリノスタット上の擬似微小重力環境下で生育させた黄化エンドウ芽生えと同様に、自発的形態形成様の成長、発達を誘導する TIBA 存在下で生育した芽生えでは、*PsIAA4/5* の発現は著しく低下し、内生オーキシンレベルが著しく低下していることが明らかとなった。しかしながら、オーキシン極性移動に関与すると考えられる *PsPIN1* 遺伝子の発現はほとんど影響されなかった。このことは、TIBA によるオーキシン極性移動の阻害は、オーキシン極性移動関連遺伝子の発現阻害によるものではないことを示唆している。

本研究結果から、高等植物の初期成長過程における重力応答反応にはオーキシン極性移動が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、茎の反重力方向への屈曲に対しては、茎の偏差成長をもたらすオーキシンレベルの重要性が示された。上

述の様に、従来よりオーキシン極性移動の分子レベルでの制御における PIN タンパク質の動態の重要性が指摘されてきた。シロイヌナズナと同様、エンドウにおける *PsPINs* 遺伝子もファミリーを形成している可能性があり、推定アミノ酸配列に基づいた検索結果は、*PsPIN1* タンパク質がオーキシン排出キャリアーとされる *AtPIN1* と、また、*PsPIN2* がオーキシンの横移動に関係するとされる *AtPIN3* (Friml *et al.* 2002) と高い相同性を示している (Hoshino *et al.* 2005)。オーキシン極性移動が著しく低下したシロイヌナズナ *pin* 突然変異体に関する研究から明らかにされた *PIN* 遺伝子は、発見された当時、それがオーキシンを細胞外へ排出するための carrier タンパク質をコードしていると考えられた。しかしながら、今日までオーキシンが実際に PIN タンパク質と直接に相互作用していることを示す生化学的研究結果は得られていない。

一方、シロイヌナズナにおいて、近年 *pin* 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見られ、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) 様遺伝子があり、細胞における膜を介した物質輸送に関与していること (Noh *et al.* 2001, Luschnig 2002, Martinoia *et al.* 2003, Geisler *et al.* 2005)。また、このタンパク質がオーキシン極性移動阻害剤である NPA の結合サイトを有していること (Murphy *et al.* 2002) が示されたことから、実際の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も指摘されている。

今後は、エンドウにおける PIN ファミリー並びに *AUX1/LUX* ファミリーの探索、および *PsPINs* 並びに *PsAUX1* の遺伝子産物に対する抗体などを用いた、これらの遺伝子産物の細胞内分布や機能の詳細な解析が必要である。また、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し、植物の初期重力応答反応と形態形成の関係を明らかにすることも望まれる。

## 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.
- Friml, J., Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K. and Palme, K. (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*.

- Nature, **415**, 806-809.
- 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.
- Luschnig, C. (2002) Auxin transport: ABC proteins join the club. Trends Plant Sci., **7**, 329-332.
- 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.
- 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.
- Murphy, A. S., Hoogner, K. R., Peer, W. A. and Taiz, L. (2002) Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphtylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis*. Plant Physiol., **128**, 935-950.
- 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.
- Noh, B., Murphy, A. S. and Spalding, E. P. (2001) Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. Plant Cell, **13**, 2441-2454.
- 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.
- 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.
- Ueda, J., Hitotsubashi, R., Miyamoto, K. and Yamashita, M. (2002) Perception and movement of plant hormones in higher plants under simulated microgravity conditions: Growth and development, and auxin polar transport (III). Space Utilization Research **18**, 168-171.
- 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.