

ISS・きぼう利用ミッション

「植物の重力依存的成長制御を担うオーキシン排出キャリア動態の解析 (CsPINs)」

研究成果報告書概要書

代表研究者； 高橋秀幸（東北大学大学院生命科学研究科）

平成 29 年 2 月（平成 29 年 11 月改訂）

研究目的

キュウリ芽生えの根と胚軸の境界域にみられるペグ形成は重力によってネガティブに制御され、重力に応答して境界域の上側のペグ形成が抑制され、下側に 1 個のペグが形成される。一方、根は重力のみならず水分屈性を発現するが、地上では重力屈性が水分屈性をマスクするように干渉する。これら重力や水への植物の環境応答では、オーキシン動態が重要な役割を果たすと考えられるが、環境刺激の感受がどのようなメカニズムでオーキシン動態を制御するのかは不明である。このオーキシン輸送の制御にオーキシン排出キャリアが重要な役割を果たすことが知られており、私たちは、キュウリ芽生えの重力形態形成（ペグ形成）に機能し、且つ、重力感受によって局在・発現が変化すると考えられるオーキシン排出キャリアを見出した。また、根の水分屈性では、重力屈性の場合と同様に、伸長帯でオーキシンの偏差分布が誘起されるが、その場合、重力および水分勾配のいずれによってもオーキシン排出キャリアの局在・発現が変化し、その二つのオーキシン動態が競合する可能性が見出された。そこで本宇宙実験では、微小重力 (μG) と遠心による人工重力 (1G) の環境で形態形成（ペグ形成）に働くネガティブコントロールのスイッチをオン・オフさせるとともに、 μG 下で根の水分屈性を重力屈性から分離し、それぞれに機能するオーキシン排出キャリア動態に関する以下の仮説を検証することを目的とした。

仮説 a) キュウリの重力形態形成（重力応答によるペグ形成の抑制）に機能すると考えられるオーキシン排出キャリア (CsPIN1) は、根と胚軸の境界域の重力感受細胞（内皮細胞）において極性をもって局在する。1G 下で境界域が横になると、重力によって制御される CsPIN1 の局在変化がオーキシンを一定方向に積極的に排出し、境界域の上側におけるオーキシンレベルを低下させ、ペグ形成を抑制する。

仮説 b) キュウリ根の水分屈性は重力屈性に干渉される。この重力屈性の水分屈性への干渉は、根の伸長帯でオーキシン勾配の形成を誘導するオーキシン排出キャリア (CsPIN5) の発現を介して行われる。

仮説 c) 根の水分屈性と重力屈性に共通して働く遺伝子、特異的に働く遺伝子が存在する。

実験方法

a) キュウリ種子を支持体に設置して、それをペグ実験容器に入れて打ち上げた。軌道上で給水することで実験を開始し、 25°C ・暗黒下の μG 下と 1G 下（垂直置き）で発芽させた。24 時間後に、それぞれの芽生えを、1G 条件（垂直置き、水平置き）と μG 条件に移し、さらに 2 時間培養した。培養終了後、サンプリング直前に MEU-B 搭載 CCD カメラで画像撮影を行った。タンパク質解析用芽生えを、2 時間の培養後、固定剤（エタノール：酢酸＝63%：5%の混合液）により薬剤処理し、MELFI ($+2^{\circ}\text{C}$) で保存後、冷蔵 ($+4^{\circ}\text{C}$) で回収した。これら回収サンプルを用いて、芽生えの胚軸と根の境界域における CsPIN1 の発現・局在を解析した。

b) キュウリ種子を支持体に設置して、それを水分屈性実験容器に入れて打ち上げた。軌道上で給水することで実験を開始し、 25°C ・暗黒下、1G 条件下で 18 時間生育させた後、5 M NaCl 水溶液を注入して容器内に水分勾配を形成し、さらに 4 時間（タンパク質解析用）および 23 時間（水分屈性観察用）、1G 下と μG 下で培養した。培養中、経時的に MEU-B 搭載 CCD カメラで画像撮影を行った。そして、タンパク質解析用芽生えを、4 時間の培養後、固定剤（エタノール：酢酸＝63%：5%の混合液）により薬剤処理し、MELFI ($+2^{\circ}\text{C}$) で保存後、冷蔵 ($+4^{\circ}\text{C}$) で回収した。これら回収サンプルを用いて、根における CsPIN5 の発現・局在を解析した。

c) キュウリ種子を支持体に設置して、それをペグ実験容器に入れて打ち上げた。軌道上で給水することで実験を開始し、 25°C ・暗黒下、 μG 下で発芽させた。給水 18 時間後、および μG 下ならびに 1G 下でさらに 4 時間、9 時間培養した後に、RNAlater により薬剤処理し、MELFI ($+2^{\circ}\text{C}$) で冷蔵保存し、冷蔵 ($+4^{\circ}\text{C}$) で回収した。これら回収サンプルの根から RNA を抽出して、RNA-Seq による遺伝子発現解析を行った。

結果・考察

1. キュウリ芽生えの重力形態形成を担うオーキシン輸送・再分布のしくみ (Run 2)

宇宙実験区のキュウリ種子の発芽率は100%であった。 μG 下で発芽・生育したキュウリ芽生えの根は、芽生えの長軸方向から逸れて様々な方向に伸長する傾向にあったが、24時間齢の芽生えの長軸方向に1Gを2時間付加する（垂直置きにする）と根は重力方向に伸長し、芽生えが横になるように短軸方向に2時間1Gを付加する（水平置きにする）と、根は重力屈性によって下側に屈曲した。これらの宇宙実験区のキュウリ芽生えの胚軸と根の境界域の横断切片を作製し、CsPIN1抗体を用いて、共焦点レーザー顕微鏡でオーキシン排出キャリアCsPIN1の発現・局在を解析した。その結果、キュウリを μG 下で発芽させた24時間齢の芽生え、また、これをさらに2時間 μG 下で育成した芽生え（26時間齢）では、CsPIN1は境界域における内皮細胞の維管束系側（内側）の細胞膜に局在していた。しかし、 μG ・24時間齢の芽生えの長軸方向に直交するように1Gを2時間付加した場合、CsPIN1の局在は、内皮細胞の下側（重力方向）の細胞膜に変化した。これらの結果から、宇宙環境の μG で育成したキュウリ芽生えに1Gを付加することで、芽生えの境界域は重力刺激に応答して、重力感受細胞（内皮）でCsPIN1の局在を下側の細胞膜に変化させ、そのようなCsPIN1の局在極性を持った細胞が連なった内皮層では、オーキシンが上側から下側に輸送されることがわかった。

2. キュウリ根の重力屈性と水分屈性を担うオーキシン輸送・再分布のしくみ (Run 1)

1G下で発芽させた18時間齢のキュウリ芽生えの根は、その後の μG 下で顕著な正の水分屈性を発現し、一方、1G下では重力屈性によって重力方向に伸長した。これによって、先行して実施したHydro Tropi宇宙実験の結果の再現に成功し、地上クリノスタット実験と比較して、宇宙の μG 下では根が水分勾配に鋭敏に応答し、顕著な水分屈性を発現することがわかった。次に、これら宇宙実験区（18+4時間齢）の芽生え、およびクリノスタットを用いた地上対照実験区の芽生えの根におけるオーキシン排出キャリアCsPIN5の発現を解析した。その結果、宇宙では1G・ H_2O 区の根の種子支持体側と反種子支持体側におけるCsPIN5の発現強度に違いはみられなかったが、 μG 区と1G・NaCl区では、CsPIN5の発現は低水分側よりも高水分側で有意に高かった。CsPIN5は根の根冠および表皮に発現し、それらの基部側の細胞膜に局在することによってオーキシンを根冠から伸長帯に輸送すると考えられるが、CsPIN5の発現は、重力刺激処理によって横になった根の上側、そして水分勾配存在下では根の低水分側で減少することが明らかになった。クリノスタットを用いた地上実験では、オーキシン輸送阻害剤処理の結果やオーキシン誘導性遺伝子の発現解析の結果によって、キュウリ根の水分屈性の発現制御におけるオーキシンの働きが重力屈性の場合に類似することがわかった。これらの結果は、宇宙実験で検証した水分勾配刺激によるCsPIN5の発現変化の事実とともに、重力および水分勾配に応答したCsPIN5を介したオーキシン動態が競合することを明らかにした。

3. キュウリ根の重力屈性と水分屈性を担う遺伝子の網羅的発現解析 (Run 3)

クリノスタットを用いた地上実験で、重力屈性と水分屈性を発現させたキュウリの根で偏差的に発現する遺伝子を、RNA-Seqにより解析した。その結果、重力屈性時に偏差的に発現すると予想される45遺伝子と、水分屈性時に偏差的に発現すると予想される21遺伝子を見出した。そして、GO解析の結果、水分屈性発現時の高水分側と、重力屈性発現時の下側では、CsIAA1を含むオーキシン誘導性遺伝子が特異的に高発現していることが示された。しかし、RNA-Seq解析のために宇宙環境で育成したキュウリ芽生えの根は、明確な水分屈性を示さず、それらから抽出したRNAを用いた遺伝子発現解析でも、明確に偏差的発現を示す遺伝子はほとんどみとめられなかった。この宇宙実験の結果を地上実験で検証したところ、本実験区 (Run 3)でキュウリ芽生えの根が水分屈性を発現しなかったのは、それまでの実験区と異なり、種子を μG 下で発芽させたことに起因すると考えられた。

以上の結果から、キュウリ芽生えの胚軸と根の境界域の内皮に発現するオーキシン排出キャリアCsPIN1が重力に応答して局在を変化させ、その結果、オーキシンは内皮を輸送ルートとして上側から下側に運ばれ、上側でオーキシンレベルが低下することによってペグ形成が抑制されること、またCsPIN5は、キュウリ根において重力および水分勾配に応答して偏差的に発現し、両屈性の原因となるオーキシンの不均等分布を誘導すること、地上では重力と水分勾配によるCsPIN5の動態制御が競合することによって水分屈性が重力屈性の干渉を受けることが明らかになった。