

ラッカセイの子房柄における重力屈性と光・水分・接触屈性の相互作用： 新規分子機構の解明と宇宙栽培に向けた実験系の開発

近藤 悠（千葉大学大学院園芸学研究院 附属宇宙園芸研究センター），高橋 秀幸（千葉大学大学院園芸学研究院 附属宇宙園芸研究センター），出口 亜由美（千葉大学大学院園芸学研究院），鎌田 源司（株式会社 エイ・イー・エス ）

Elucidation of novel mechanism for gravitropic response in peanut gynophore: For its verification by spaceflight experiments and future peanut cultivation in space

Haruka Kondo*, Hideyuki Takahashi, Ayumi Deguchi, Motoshi Kamada ...

* Chiba University, Graduate school of Horticulture, Research Center for Space Agriculture and Horticulture, Matsudo, Chiba 271-8510

E-Mail: kondoh@chiba-u.jp

Abstract: Plant tropism is a unique strategy for adapting to the surrounding environment, by which plant organs grow toward a suitable direction in response to external stimuli such as gravity, light, touch, and moisture gradients. The sensory mechanisms vary for each stimulus, while the mechanism of differential growth for bending is different or mutual among tropisms. Accordingly, gravitropism could interfere with other tropisms by either common or different processes of the response depending on the type of tropism. Under microgravity conditions in space, therefore, tropic response other than gravitropism might be enhanced or suppressed. If mechanisms for these processes are revealed, it will lead to the development of innovative technology for controlling plant growth in space. The peanut (*Arachis hypogaea* L.) to be used in this study exhibits a unique characteristic in gravity response; gynophore shows positive gravitropism to develop seeds in soil. However, mechanistic aspect of this gravitropic response as well as its interaction with other tropisms in gynophore remain largely unknown. In this study, we elucidate the gravitropic response unique to peanut gynophore and its interaction with phototropism, hydrotropism and thigmotropism, aiming at conducting spaceflight experiments and developing a novel technique of peanuts cultivation, for supplying nutritionally superior food in space.

Key words; Peanut, Gravitropism, Auxin redistribution, PIN

1. はじめに

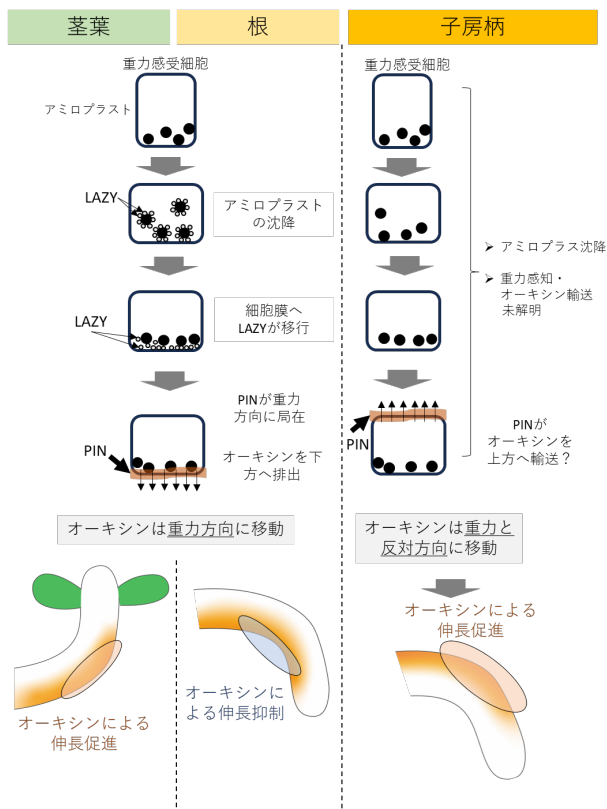
人類の宇宙長期滞在・居住に向けて、宇宙での食料生産は重要な課題の一つである。これまで、宇宙生命科学の研究は、シロイヌナズナやコケなどの小型のモデル植物を利用して行われてきたが、十数年後の人類月面居住を目指す現状では、実際に食料となる穀物や豆類、野菜の栽培技術開発を見据えて動き出さなければならない段階である。本研究では、宇宙での食料自給をいち早く実現させるために、脂質エネルギー源等、栄養学的にも優れ、NASA が宇宙における食料候補作物としても挙げているラッカセイを研究対象とする。研究は 2 段階で構成され、「第 1 段階」をラッカセイの特異な重力屈性の植物分子生理学的な理解、「第 2 段階」を水分屈性や光屈性を利用した成長制御技術の開発として、最終的にはラッカセイの宇宙生産に向けた栽培基盤の構築を目指す。

本研究は 3 ヶ年で計画されたものであり、筆者らは JAXA 宇宙科学研究所宇宙環境利用専門委員会 2024 年度フロントローディング研究費による助成を受けて、本研究計画の 1 年目に取り組んだ。本稿で

は、1 年目の計画である「第 1 段階」ラッカセイの特異な重力屈性の植物分子生理学的な理解と「第 1 段階」、「第 2 段階」を通じた矮性変異体の作出と養液栽培システムの構築について報告する。

2. ラッカセイ特異の重力屈性

植物は重力や光、水、物理刺激など外部の環境に応答して偏差成長を示す屈性を発現する。茎葉は光を求め正の光屈性および負の重力屈性を示し、反対に根は養水分を得るために負の光屈性と正の重力屈性、さらには正の水分屈性を示す。特に重力屈性に関しては良く研究されており、重力方向の感知と屈曲は植物ホルモンのオーキシンを中心としたメカニズムが提唱されている。これまでに、①重力感受細胞内のアミロプラストの移動・沈降による重力方向の感知、②オーキシン排出担体 PIN による重力方向へのオーキシン極性輸送、③オーキシンの濃度に応じた細胞伸長の促進または抑制、の 3 つの仕組みが明らかにされてきた（第 1 図）。③の過程において、茎葉ではオーキシン濃度が高い細胞の伸長が促進され、根では反対にオーキシン濃度の高い細胞の伸長

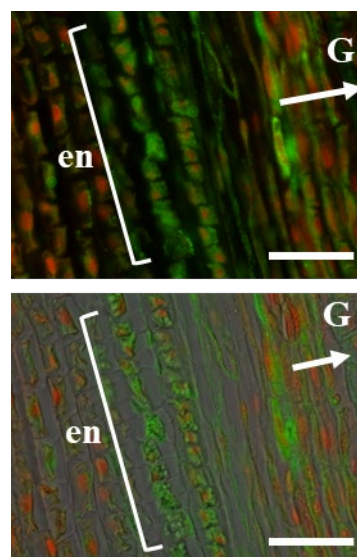


第1図 重力屈性のメカニズム

が抑制されるため、それぞれ負の重力屈性と正の重力屈性を示す。また、最近になって、アミロプラストの沈降による重力感知を担う分子として LAZY の動態が解明されつつある。LAZY はアミロプラストに局在しており、アミロプラストの沈降に伴い細胞膜に移行し蓄積することで、そこに PIN タンパク質を局在させる (Nishimura *et al.* 2023)。すなわち、LAZY は重力感知のセンサーとして働いており、センサーとなる LAZY の変異体では重力屈性の減衰や消失、逆転が観察されている (Taniguchi *et al.* 2017、Yoshihara and Spalding 2020)。

一方で、ラッカセイはこれらの茎葉と根の重力屈性モデルでは説明できないユニークな性質を持つ。ラッカセイは「落花生」の名前が示す通り、地上で花が咲いた後、子房柄と呼ばれる器官を重力方向へ伸長させ、最終的には暗黒である土中に入ることで、初めて莢と種子（ピーナッツ）を形成する。このように子房柄は地上部の器官でありながら、根と同じ正の重力屈性を持つ。一方で、ラッカセイの子房柄は地上部器官として、オーキシンの濃度に対して茎葉と同様の伸長反応を維持している。また、ラッカセイの子房柄の重力感受細胞ではアミロプラストは茎葉や根と同様に沈降する。すなわち、ラッカセイの子房柄において、PIN は沈降するアミロプラストと反対方向に局在し、オーキシンを重力と反対方向に輸送するような仕組みを持つ仮説が考えられる。本研究では、この特異な重力屈性を明らかにするために、

PIN の局在ならびに子房柄のオーキシン反応を精査

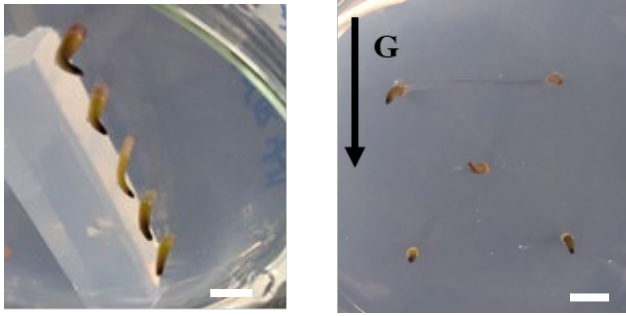


第2図 PIN1 と PIN3 の局在 赤：核 (Propidium iodide 染色) 緑：PIN のシグナル。下段は上段の画像に明視野の画像を重ね合わせた写真。矢印は重力方向を示す。en は内皮細胞を示す。スケールは 100 μ m

した。

(1) PIN の局在

ラッカセイにおける重力屈性の分子メカニズムを明らかにするために、オーキシン極性輸送を担う PIN の子房柄における発現を検証した。ラッカセイの公開ゲノム情報を解析した結果、PIN 様のタンパク質をコードする遺伝子が 24 個存在した。シロイヌナズナでは、これまでに PIN1~8 ままでが同定されており、その配列情報を含めて系統樹を作成することで、24 個の候補遺伝子を AhPIN1、AhPIN2、AhPIN3、AhPIN5、AhPIN6、AhPIN8 に分類し、どれにも該当しないものを AhPIN other とした。茎や葉、根、花、子房柄、土中の未熟莢の 6 つの器官における、RNA の発現を RT-PCR によって確認した結果、子房柄では AhPIN1、AhPIN3、AhPIN5、AhPIN8 に分類される計 10 個の mRNA の発現が確認できた。子房柄における PIN の RNA 発現パターンは同じ地上部である茎と近い傾向を示し、一方、地下部の器官である根において発現していた AhPIN2 は発現していなかった。次に、RNA *in situ* hybridization 法によって子房柄において組織特異的に発現する RNA を調査した。その結果、子房柄で発現していた PIN 遺伝子は共通して、子房柄の先端部の表皮、胚周辺、表皮 3~5 層、維管束において高い発現を示した。また、アミロプラストを有する内皮細胞において AhPIN1 と AhPIN3 の発現が確認された。一方で AhPIN5 および AhPIN8



第3図 *in vitro* 状態の子房柄重力屈性試験

左：20 μ M オーキシシン処理、右：100 μ M TIBA 処理。矢印は重力方向を示す。スケールバーは1 cmを示す。

は内皮細胞でほとんど発現しないか弱い発現を示すのみだった。以上より、ラッカセイにおいて子房柄の重力屈性に関与する PIN は AhPIN1 と AhPIN3 の2種であることが示唆された。AhPIN1 と AhPIN3 の2つの PIN タンパク質に共通したアミノ酸配列を認識する抗体を用いて、免疫組織化学染色を行い、内皮細胞内での局在を観察した。その結果、PIN は細胞膜と沈降したアミロプラスト周辺に局在していた(第2図)。PIN タンパク質はオーキシシン排出担体であり、局在する細胞膜から細胞外へオーキシシンを排出する。そのため、ラッカセイの子房柄では AhPIN1 と AhPIN3 によってオーキシシンが重力方向に極性輸送される可能性が高い。一方で、オーキシシンは重力と反対側に高蓄積することが明らかにされており(Moctezuma and Feldman 1999)、本研究で示された AhPIN1 と AhPIN3 の局在と矛盾する結果となった。茎葉においてオーキシシンの流れは PIN3 とともに ABCB19 によって制御されており、オーキシシンの移動を維管束系に限定する。子房柄は茎と同様に同心円状に配置された維管束系を持ち、それぞれの維管束の外側に内皮細胞を有する。この茎葉と同様の組織構成から PIN だけでなく ABCB も子房柄のオーキシシン輸送に関与している可能性がある。今後は、PIN と合わせて ABCB の局在も観察することで、オーキシシンの大局的な流れを明らかにできるかもしれない。

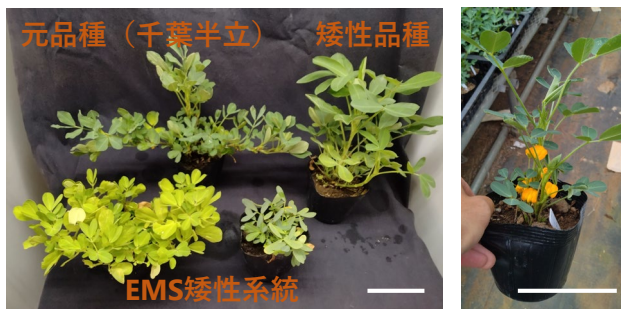
(2) 子房柄のオーキシシンに対する反応

子房柄のオーキシシンに対する反応を検証するために、オーキシシン処理やオーキシシンの輸送阻害剤、オーキシシンの作用阻害剤の処理を行った。また、今後のクリノスタットへの搭載や宇宙実験も見据えて、子房柄を切り離して寒天培地に置床する小型の *in vitro* 実験系でも屈性反応が起こるか検証した。その結果、子房柄を10 mmに切り出した場合でも、植物体上の子房柄と同様に6時間ほどで屈性反応が起こることが確認された。また *in vitro* 試験において、20 μ M のオーキシシンを含んだ寒天培地を子房柄の側面

にあてたところ、オーキシシンを含んだ培地と接する面とは反対方向に屈曲した(第3図 左)。以上より、*in vitro* の状態でもオーキシシンによる偏差成長が起こることが明らかになった。オーキシシンの極性輸送を阻害剤のうち、PIN のリサイクリングを抑制する TIBA (林 2014) および ABCB に結合する働きを阻害する NPA、オーキシシン応答遺伝子の発現を阻害する PCIB をそれぞれ *in vitro* の実験系で処理し、屈性反応を検証した。阻害剤の浸漬処理後に子房柄を水平方向に横たえた。横たえから24時間後 TIBA 区と NPA 区で屈性方向に乱れが生じ(第3図 右)、PCIB 区でも頻度は低いものの屈性方向の乱れが確認された。一方で、屈性の上部成長量と下部成長量の差をとった偏差成長自体は処理区間でほとんど差がなかった。以上より、オーキシシン輸送阻害剤やオーキシシン作用阻害剤の効果が屈性方向の阻害に限定されたことから、これらの阻害剤はオーキシシンの輸送を完全に阻害できていないことが示唆される。オーキシシン輸送阻害剤である TIBA や NPA はそれぞれ PIN と ABCB に作用するが、それぞれの処理において阻害されていない ABCB や PIN が補完的にオーキシシン流れを担っている可能性が考えられる。今後、2つの薬剤の同時処理や濃度の検証、阻害剤を使用した時のオーキシシンの分布を観察することで、この阻害剤の部分的な反応性を説明できるかもしれない。また、TIBA の部分的な阻害効果は(1)のオーキシシンの分布と PIN によるオーキシシンの輸送が一致しないことを支持するものであり、ラッカセイの子房柄における重力屈性では PIN が主体ではない可能性が示唆された。以上より、ラッカセイ子房柄の重力屈性は、センサーを LAZY、オーキシシンの移動を PIN としたモデルでは説明できず、特異なオーキシシンの輸送・分布機構の存在が示唆される。今後は、ABCB など PIN 以外のオーキシシン輸送系やセンサーの LAZY も含めて包括的にオーキシシンの流れを検証していきたい。

(3) オーキシシンイメージングシステムの開発

Moctezuma and Feldman (1999) らは、子房柄におけるオーキシシンの分布をオーキシシンの抗体を用いた免疫染色によって明らかにした。一方で、抗体を用いた免疫染色は多大なコストと労力を要する。そこで、より簡便にオーキシシンの濃度分布を可視化システムの構築を目的として、オーキシシン応答性遺伝子を利用したオーキシシンイメージングシステムの構築に取り組んだ。オーキシシンの早期応答遺伝子として Auxin/Indole-3-Acetic Acid (Aux/IAA) ファミリー、auxin-responsive Gretchen Hagen3 (GH3) ファミリー、small auxin up-regulated RNAs (SAUR) ファミリーが知られている(Bao *et al.* 2024)。これらの遺伝子の発現定量や局在解析により、間接的にオーキシシンの検



第4図 EMS処理によって得られた変異体
スケールバーは9cmを示す

出が可能となる。ラッカセイにおけるこれらの遺伝子のオーキシン応答性を検証し、オーキシンの間接的な検出に利用できる遺伝子の特定を試みた。子房柄に対して外生 IAA を処理し、RNA を抽出、*SAUR* および *GH3* の経時的な発現量の変化をリアルタイム RT-PCR 法で計測した。*SAUR* ファミリーのうち、*SAUR12.2* の発現が処理後 10 分で上昇しその後は 80 分をピークとして減少した。ほかの *SAUR* ファミリーの mRNA は処理後 180 分をピークに上昇するものなど様々な発現パターンが確認された。また、*GH3* ファミリーのうち、*GH3 1.1* は処理 80 分後から上昇し、その後も処理 320 分後まで時間経過とともに上昇し続けた。ほかの *GH3* ファミリーの mRNA では、顕著な発現変動は見られなかった。以上より、*SAUR12.2* と *GH3 1.1* がオーキシンの間接的な検出に使用できる可能性があり、今後はオーキシン免疫染色と当該遺伝子の RNA *in situ* hybridization の比較などを行い、その実用性を検証する。

3. 矮性変異体の作出と養液栽培システムの構築

クリノスタットによる疑似微小重力再現実験や宇宙実験の植物栽培ユニット、いずれにしても植物サイズや重量の制限が存在する。ラッカセイは通常であれば茎が 30cm 以上に伸長し、さらに本研究では開花後の子房柄を研究対象とするため、必然的に植物体のサイズが大きくなる（第4図）。また、矮性品種でも茎の長さは 8 cm に達し、株全体の大きさは 10 cm を容易に超える。そのため、重量やサイズを小さくするために、矮性変異体の作出や専用の養液栽培システムの構築が重要となる。化学突然変異原である EMS を処理した M2 世代の表現型を調査し、実験に適する変異体を選抜した。その結果、節間が短い矮性系統や早期に複数開花する系統が確認された。クリノスタットでは植物体の揺らぎを防止することが重要な課題だが、節間が短い系統は元品種と比較して茎が太く短いため（第4図 左）、揺らぎの減少が期待できる。また、早期に複数の花が開花する系統は（第4図 右）、地際 4 cm 以内に花が 5~6 個咲

くため、トリミングによって宇宙実験で使われている PEU (H 48 mm、W 56 mm、D 45 mm) に収まるサイズに仕立てられる可能性がある。今後はこれらの系統の増殖を行い、表現型の安定性を検証するとともに、クリノスタットによる実験に供試する予定である。

2023 年度の研究において、ラッカセイの水耕栽培が可能であることを確認している。一方で、クリノスタットや ISS の実験では水の流出が問題となるため、ロックウールなどの培地を用いる必要がある。そこで、植物体を支持するための培地と含水による重量を計測し検討したところ、これまで使用されていたロックウールは含水量が多く、かなり重量が増加することが明らかになった。一方で、培土を固化させるアルギン酸ナトリウムを、吸水後も重量の軽いハイドロコーン（発泡煉石）や赤玉土に処理することで、重量を減らしながら、植物体を支持できることが明らかになった。現在、これらの固化培土で栽培試験を行っており、クリノスタット実験への実用性を検証する予定である。

4. おわりに

今年度の本研究の結果、ラッカセイの特異な重力屈性システムはオーキシンと PIN による極性輸送だけでは説明できない可能性が考えられた。この屈性機構を解明するために、矮性系統の作出に用いた EMS 系統を活用し屈性変異体の単離を試みている。また、本稿では詳しく紹介しなかったが、遺伝子導入系の構築も進めており、DR5::GFP レポーター遺伝子の発現応答を利用したオーキシンイメージングシステムやゲノム編集による遺伝子機能の解明などにむけて準備を進めている。また、来年度からはクリノスタットによる実験を本格的に始動する予定であり、重力屈性だけでなくタイトルにあるような光・水分・接触屈性の相互作用を明らかにしていきたいと考えている。

5. 謝辞

本研究は、ISAS 宇宙環境利用専門委員会 2024 年度フロントローディング研究ならびに公共財団法人東洋食品研究所 2023 年度一般研究助成による助成を受けて行われたものです。なお、本研究は微小重力実験アドバイザーとして宇宙航空研究開発機構の橋本博文先生に参画いただいております。

参考文献

- 1) Nishimura, T., Mori, S., Shikata, H., Nakamura, M., Hashiguchi, Y., Abe, Y. et al. Cell polarity linked to gravity sensing is generated by LZ1 translocation from statoliths to the plasma membrane. *Science*, 381, 1006–1010. (2023)

- 2) Taniguchi M., Furutani M., Nishimura T., Nakamura M., Fushita T., Iijima K., Baba K., Tanaka H., Toyota M., Tasaka M. et al. The Arabidopsis LAZY1 family plays a key role in gravity signaling within statocytes and in branch angle control of roots and shoots. *Plant Cell* 29, 1984–1999 (2017)
- 3) Yoshihara T., Spalding EP., Switching the direction of stem gravitropism by altering two amino acids in AtLAZY1. *Plant Physiology* 182: 1039–1051. (2020)
- 4) Moctezuma E., Feldman LJ., Auxin redistributes upwards in graviresponding gynophores of the peanut plant. *Planta* 209: 180–186 (1999)
- 5) 林 謙一郎, 蛍光標識による植物ホルモンの生体イメージング. *Regulation of Plant Growth & Development* Vol.49, No.2, 122-130, (2014)
- 6) Zhu J., Geisler M., Keeping it all together: auxin–actin crosstalk in plant development. *Journal of Experimental Botany* 66, 4983–4998 (2015)
- 7) D. Bao S., Chang S., Li X., Qi Y., Advances in the study of auxin early response genes: Aux/IAA, GH3, and SAUR, *Crop J.*, 12, pp. 964-978, (2024)