

植物の重力応答反応とオーキシン動態

大阪府立大学大学院・理学系研究科
大阪府立大学・高等教育推進機構
鳥取大学・農学部

上田 純一*・上田 英二・戸田 雄太
宮本 健助
岡 真理子

Graviresponse in plants :Evidence against functional up-regulation of auxin polar transport and endogenous auxin

Junichi Ueda^{1*}, Kensuke Miyamoto², Yuta Toda¹, Eiji Uheda¹ and Mariko Oka³

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

² Faculty of Liberal Arts and Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

³ Faculty of Agriculture, Tottori University, 4-101 Koyamacho-minami, Tottori 680-8553, Japan

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

Abstract: We have already shown automorphosis of etiolated Alaska pea seedlings with lower auxin polar transport grown in space conditions. An etiolated agravitropic pea mutant, *ageotropum*, seedlings also showed automorphosis-like growth and development, and reduced auxin polar transport of the first internode of etiolated epicotyls grown under 1 g conditions. Auxin polar transport in proximal side of the first internode has been shown to be much higher than that in distal one not only in etiolated Alaska but also in etiolated *ageotropum* pea seedlings grown in 1 g conditions. Expression of genes related to auxin polar transport, *PsPINs*, was well coincident with auxin polar transport in the first internode in etiolated Alaska although not in etiolated *ageotropum* pea seedlings. In addition, exogenous application of inhibitors of auxin polar transport such as TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid), NPA (*N*-(1-naphthyl)phthalamic acid) and HFCA (9-hydroxyfluorene-9-carboxylic acid) substantially induced automorphosis-like growth and development with reduced endogenous levels of auxin (indole-3-acetic acid, IAA) in etiolated Alaska pea seedlings grown under 1 g conditions. Endogenous levels of auxin in hook region were highest in etiolated Alaska and *ageotropum* pea seedlings. Respective levels of high and low endogenous auxin (IAA) in proximal side and in distal side of the first internode of etiolated Alaska and *ageotropum* pea seedlings were quite similar to those in auxin polar transport in these sides of epicotyls. Judging from the facts described above, it is possible to say that growth and development, and graviresponse of etiolated pea seedlings are regulated only by auxin polar transport in the proximal side of the first internode of etiolated pea seedlings. These results described above also provide us a very interesting but complicated question why straight growth but no bending of the first internode toward to the direction of distal side not only in etiolated Alaska but also in etiolated *ageotropum* pea seedlings grown under 1 g conditions is substantially observed.

Key words; *ageotropum* Pea Mutant, Alaska Pea, Automorphosis, Auxin Polar Transport, Endogenous Levels of Auxin, Growth and Development, Inhibitors of Auxin Polar Transport

はじめに

動物とは異なり、植物は生存する場所を自身の意志で自由に選ぶことができず固着して生活するため、外部の環境刺激（光、温度、水分、ガス、重力等）を敏感に感受し、それに応答するための運動機構を持っている。一般に植物の運動は、屈性（tropism）、

傾性（nasty）および走性（taxis）にわけられる。屈性とは、環境刺激の方向に対して一定の運動を示す現象を指し、光屈性、重力屈性、接触屈性などがあげられる。植物の示すこの様な屈性現象の中で、歴史的に見ても光屈性が最もよく研究されており、進

化論で有名な C. Darwin は 1880 年に「植物の運動力」(The Power of Movement in Plants)を表し、これが植物ホルモンのオーキシンの発見につながったことは周知の事実である (Darwin 1880)。C. Darwin に始まるこれら一連の研究から、植物の屈性現象は内生オーキシンレベルの偏差分布によって引き起こされる現象であることが示されてきた (Cholodny 1927, Went 1928, Went and Thimann 1937)。しかしながら、この説に異を唱える研究者も少なからず見受けられる。彼らの実験事実や考え方に従えば、植物の屈性(特に光屈性)は、内生オーキシンレベルの偏差分布によって引き起こされる現象ではなく、そこに含まれる植物成長阻害物質の偏差分布による現象であると説明される (Yamamura and Hasegawa 2001)。

植物の示す重力応答反応は、植物の重力屈性としてよく理解されており、例えば暗所で生育させた植物の芽生えの地上部(茎)は反重力方向に、また、地下部(根)は重力方向に成長することが知られている。筆者らは、1998 年に STS-95 植物宇宙実験を実施する機会に恵まれ、宇宙微小重力環境下における黄化エンドウ芽生えの成長、発達および上胚軸におけるオーキシン極性移動の解析実験を行った。その結果、宇宙微小重力環境下における黄化エンドウ芽生えは自発的形態形成を示すこと、その場合、上胚軸におけるオーキシン極性移動が低下していることを見いだした (Ueda *et al.* 1999, 2000)。同様の現象は、地上 1g 環境下において 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での実験や重力応答突然変異体である黄化 *ageotropum* エンドウ (Takahashi and Suge 1991) を用いた実験においても示された。すなわち、擬似微小重力環境下では、黄化 Alaska エンドウ芽生えは自発的形態形成類似の成長、発達を示すとともに上胚軸におけるオーキシン極性移動が低下すること、さらに重力応答突然変異体である黄化 *ageotropum* エンドウは、1 g 環境下において同様の自発的形態形成類似の成長、発達を示し、上胚軸におけるオーキシン極性移動も黄化 Alaska エンドウに比べて低い値を示した (Hoshino *et al.* 2005, 2006a, 2006b, 2007, 2008, Miyamoto *et al.* 2005)。これら一連の研究を発展させた結果、2010 年には、著者らが提案した「宇宙環境を利用した植物の重力応答反応機構および姿勢制御機構の解析」が国際宇宙ステーション「きぼう船内実験室第 2 期利用後半期間候補テーマ」として採択されている。本研究においては、当該宇宙実験の実験計画を策定するために実施された地上予備実験結果から、黄化エンドウ芽生えの重力応答反応とオーキシン極性移動関連遺伝子発現、オーキシン極性移動および内生オーキシンレベルの関係を紹介したい。

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) あるいは同容器 (8 x 6.5 x 5.5 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、前者では 32 粒の、後者では 12 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 (Takahashi and Suge, 1991) 乾燥種子を、胚の向きが垂直となるように播種、種子全体が埋まる程度に埋め込み、蒸留水約 180ml あるいは約 40 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 あるいはオーキシン抽出時まで -80 °C で保存した。

オーキシン極性移動関連遺伝子の発現解析 — 3.5 日齢黄化 Alaska および黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え地上部(頂端鉤状部、子葉側および反子葉側上胚軸)から ISOGEN (ニッポンジーン) を用い、全 RNA を抽出した。ノーザン解析あるいは semi-quantitative RT-PCR 法によって、オーキシン極性移動関連遺伝子の発現解析を行った。

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)。

内生オーキシンの定量 — 3.5 日齢黄化エンドウ芽生え上胚軸を、先端鉤状部、子葉側上胚軸および反子葉側上胚軸に切断後、80%エタノールを用いて内生オーキシンを抽出した。d5-IAA を内部標準とし、常法に従いジエチルエーテルを用いて溶媒分画を行った後、ジエチルエーテル可溶性酸性画分のメチル化物を対象として、ガスクロマトグラフ質量分析計 (Finnigan GCQ) を用いて内生オーキシンを定量した。

結果および考察

Alaska エンドウ種子を、胚が垂直になるように播種し、暗所で発芽、生育させた。その結果、芽生え上胚軸は正常な重力応答反応を示した。既に報告しているとおり、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いては、黄化 Alaska エンドウ芽生えは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。10 μ M のオーキシン極性移動阻害剤を黄化 Alaska エンドウ芽生えに外生的に投与すると、同様な自発的形態形成様の成長、発達を示した。*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、芽生え上胚軸は子葉から離れる方向約 45° の角度で真っ直ぐに伸長し、自発的形態形成様の成長、発達を示した。また、黄化 Alaska および黄化

ageotropum 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は、黄化 Alaska エンドウに比べ黄化 *ageotropum* エンドウでは約 50%であった。

黄化 Alaska エンドウ芽生えにおけるオーキシン極性移動は、上胚軸第1節間および第2節間では異なる様相を示した。すなわち、上胚軸第2節間においては子葉側および反子葉側ともほぼ同様の値を示したが、第1節間においては反子葉側に比べ、子葉側で著しく大きな値を示した (Fig. 1.)。このような関係は、重力応答突然変異体である黄化 *ageotropum* エンドウにおいても同様であった。オーキシン極性移動に密接に関係すると考えられる *PsPINs*, *PsAUX1* 遺伝子発現についても、*PsPIN1* 遺伝子の発現は反子葉側に比べて子葉側で高く、オーキシン極性移動との間に正の相関が認められた。一方、*PsPIN2* および *PsAUX1* 遺伝子の発現については、子葉側、反子葉側で大きな差は認められなかった (Fig. 1.)。

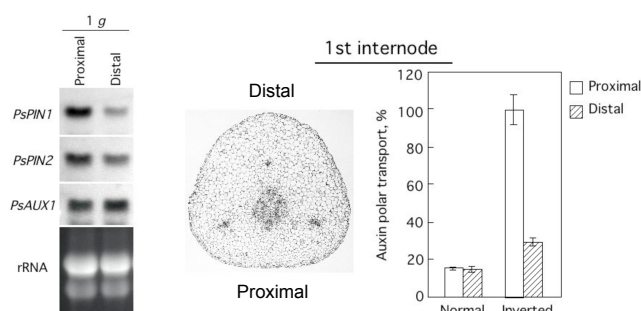


Fig.1. Gene expression of *PsPINs* and *PsAUX1* (left), cross section (middle) and auxin polar transport (right) in proximal and distal sides of the 1st internode of etiolated Alaska pea epicotyls.

従来より植物の地上部および地下部が示す重力屈性は、内生オーキシンレベルの違いによる偏差成長の結果として説明されてきた。重力屈性に代表される植物の重力応答反応は、重力の感受、その情報 (信号) 伝達および内生の植物ホルモンによる成長制御の結果として現れる現象である。従って、最終的には茎あるいは根の細胞において偏差成長が生じるためには植物ホルモンの質的、量的差異が必要となる。植物ホルモンの中で、このような偏差成長と密接に関係するものとしてオーキシン (インドール酢酸) があげられる。オーキシンが重力側および反重力側でしかるべき量的差異を生じるためには、オーキシンの重力側から反重力側への、あるいは反重力側から重力側への組織を横断する移動が必要とされる。このようなオーキシンの横方向への移動を示した実験は、その

ほとんどが放射性オーキシンを用いてその放射性活性を測定することにより、あるいはオーキシン誘導性遺伝子の発現活性により示唆されたものであり、実際、オーキシン (IAA) 分子を直接測定した研究報告は多くない。本研究では、d5-IAA を内部標準物質として、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて黄化 Alaska および黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸第1節間における内生オーキシン量を調べた。その結果、新鮮重量あたりの内生オーキシン量は、黄化 *ageotropum* エンドウに比べて黄化 Alaska エンドウの方が高い値を示した。また、何れの黄化芽生えにおいても、新鮮重量あたりの内生オーキシン量は頂端鉤状部で最も高く、ついで *PsPIN1* 遺伝子発現やオーキシン極性移動と同様に、反子葉側に比べて子葉側で高い値を示した (Fig. 2.)。

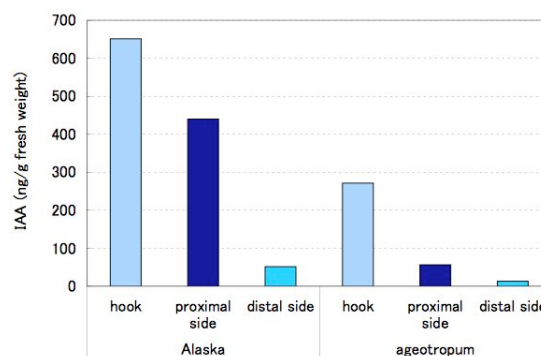


Fig. 2. Endogenous levels of auxin (indole-3-acetic acid, IAA) in proximal and distal sides of the 1st internode of etiolated Alaska and *ageotropum* pea epicotyls.

オーキシン極性移動阻害剤である TIBA 存在下で黄化 Alaska エンドウを発芽、生育させ、オーキシン極性移動関連遺伝子である *PsPINs*, *PsAUX1* 遺伝子発現、オーキシン極性移動およびオーキシン誘導性遺伝子である *PsIAA4/5* 遺伝子の発現量によって内生オーキシン量を調べた。その結果、TIBA (10 μ M) は *PsPINs*, *PsAUX1* 遺伝子発現にはほとんど影響しないものの、濃度依存的に上胚軸におけるオーキシン極性移動を低下させるとともに内生オーキシン量を減少させることが示された。

以上の結果、オーキシン極性移動関連遺伝子、特に *PsPIN1* 遺伝子の発現、オーキシン極性移動および内生オーキシン量はいずれも反子葉側に比べて子葉側で高い値を示すことが明らかとなった。このことと、上胚軸子葉側第1節間のオーキシン極性移

動は黄化 *ageotropum* エンドウに比べて黄化 Alaska エンドウにおいて大きいことを合わせて考えると、黄化エンドウ芽生え上胚軸の重力応答反応は子葉側上胚軸におけるオーキシン動態だけで制御されていることが強く示唆される。今後は、黄化 Alaska および黄化 *ageotropum* エンドウ芽生え上胚軸の異なる重力応答反応のメカニズムをそれらの子葉側上胚軸におけるオーキシン動態から明らかにするとともに、子葉側および反子葉側においてオーキシン動態に差異があるにもかかわらず、上胚軸が偏差成長することなく真っ直ぐに伸長するメカニズムを明らかにすることが求められる。

参考文献

- Cholodny, N. (1927) Wuchshormone und Tropismen bei den Pflanzen. Bio. Zentralbl., **47**, 604-626.
- Darwin, C. (1880) The power of movement in plants. John Murray, London.
- 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. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Takahashi, H. and Suge, H. (1991) Root hydrotropism of an agravitropic pea mutant, *ageotropum*. Physiol. Plant., **82**, 24-31.
- 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.
- Went, F.W. (1928) Wuchsstoff und Wachsthum. Rec. Trav. Bot. Neerl., **15**, 1-116.
- Went, F.W. and Thimann, K.V. (1937) Phytohormones. MacMillan, New York.
- Yamamura, S. and Hasegawa, K. (2001) Chemistry and biology of phototropism-regulating substances in higher plants. The Chemical Record, **1**, 362-372.