

称号及び氏名	博士（理学） 星野 友紀
学位授与の日付	平成19年3月31日
論文名	「 Important role of gravity-controlled transport of auxin for a gravitropic response of epicotyls in the early growth stage of etiolated pea seedlings (黄化エンドウ芽生え上胚軸の重力応答反応におけるオーキシン輸送の重要性)」
論文審査委員	主査 上田 純一 副査 徳富 哲 副査 谷田 一三 副査 宮本 健助

## 論文要旨

植物は様々な環境要因、すなわち重力、水分、光、温度、大気圧、ガスなどの影響を受けながら進化、発達してきた。このような環境要因のなかで、植物は、地上の生物すべてに共通して影響を及ぼしている重力を受容し、それに巧みに応答する機構を発達させ、軸性を有する特徴的な形態を築きながら効率的に光を受容するとともに、水分や養分の吸収が可能となるように進化を遂げてきた。このことは、地球上における植物の成長、発達は重力の支配下にある現象であることを示している。植物の重力応答反応の中で古くから研究が行われている重力屈性については、以前より植物ホルモンの一種「オーキシン」の関与が示唆されてきた。オーキシンは、主として茎頂において活発に合成され、茎においては茎組織内を頂端側から基部側へとあたかも重力と同じ方向に求底的に移動する。また、地上部から中心柱付近を通して求底的に根に移動してきたオーキシンは、根冠において皮層に向かって横移動した後、皮層付近を極性側へと求底的に移動する。近年、シロイヌナズナを用いた研究から、細胞膜上に存在するオーキシンの流入および流出キャリアの存在が示唆されており、これらをコードする遺伝子、それぞれ *AUX1* と *PIN1* 並びにそれらの関連遺伝子が分離されている。特に、根における正の重力屈性のメカニズムについては、多くの分子レベルの研究が進められている。その結果、根端の重力感受細胞に局在するオーキシン排出キャリアである *PIN3* が重力に応答してその局在を変化させ、根端でオーキシンが再分配される。再分配されたオーキシンは、根表皮細胞の基部側に局在するオーキシン排出キャリア *PIN2* および同細胞膜全体に局在するオーキシン流入キャリア *AUX1* によって根表皮細胞における根端から極性側に向かう求底的な極性移動能が制御され、最終的に根の正の重力屈性が生じるものと考えられている。一方、地上部における負の重力屈性の制御機構は、未だ不明な点が多い。植物の地上部における重力刺激の感受、その情報伝達、そして屈性に直接関係する地上部細胞の偏差成長を引き起こすメカニズムの解明が望まれる中、地上部の重力屈性にも根の重力屈性と同様に、オーキシン排出キャリアが重要な役割を有することが示唆されている。そこで本論文では、宇宙微小重力環境下で認められる特徴的な自発的な形態形成を示す黄化エンドウ芽生えを対象に、その上胚軸でのオーキシンの移動および蓄積のメカニズムを解析し、「植物の地上部における負の重力屈性の制御機構」を明らかにすることを目的とした。なお、植物の成長、発達に対する重力の影響を明らかにするためには、重力刺激の方向やその大きさを変化させて研究を行う必要があ

る。また、近い将来宇宙での食料生産を可能にし、人類の効率的且つ快適な宇宙環境利用を達成することを目的に、現在までに多くの植物宇宙実験が実施されている。地上においては、擬似微小重力環境を模擬することができるクリノスタットを用いた研究も行われている。このような状況を踏まえて、本論文では、植物の重力応答反応におけるオーキシン極性移動の重要性を明らかにするために、擬似微小重力環境下における植物の形態形成ならびにオーキシン極性移動を詳細に解析するとともに、重力応答反応に異常を示す突然変異体やオーキシン極性移動阻害剤を用いた研究を展開した。以下に本研究によって得られた成果を示す。

1. 植物生理学上、重要な実験植物であるエンドウおよびトウモロコシを対象に、その成長、発達とそれに深く関係するオーキシンの動態に対する重力の影響を明らかにするために、STS-95宇宙実験が実施された。その結果、特に宇宙微小重力環境下で生育した黄化エンドウ芽生え上胚軸は子葉節基部で子葉から離れる方向に約 45 度傾いて成長し、根は気中に向かって上胚軸の成長方向と逆方向に伸長することが示された（自発的形態形成）。さらに、宇宙微小重力環境下においては上胚軸におけるオーキシン極性移動が低下することが明らかとなった。これらの事実は、オーキシン極性移動が重力の支配下であり、植物の重力応答反応にはオーキシン極性移動が密接に関与していることを示している。このような黄化エンドウ芽生えの自発的形態形成の制御機構を明らかにするために、重力刺激の方向を変化させるとともに、クリノスタットを用いた擬似微小重力下において、黄化エンドウ芽生えの初期成長過程に対する重力の影響を詳細に解析した。その結果、黄化エンドウ芽生え上胚軸の自発的形態形成は、吸水後約 48 時間後に認められる上胚軸の子葉節基部での「負の重力屈性」の阻害によって引き起こされることが明らかとなった。このことは、微小重力環境下における黄化エンドウ芽生え上胚軸の自発的形態形成機構を解明するためには、種子吸水直後の上胚軸の「負の重力屈性」の阻害機構を明らかにすることが必須であることを示している。

2. 黄化エンドウ芽生えにおけるオーキシン極性移動の制御機構を分子レベルで明らかにするために、黄化エンドウ芽生えよりオーキシンの移動に関係すると考えられる *PIN* および *AUX1* の分離を試みた。シロイヌナズナの *AtPIN* ファミリーおよび *AtAUX1*, *AtAUX1-like protein* の cDNA の塩基配列に基づいて縮退プライマーを設計し、RT-PCR 法および RACE 法を用いて、新規遺伝子である *PsPIN2* と *PsAUX1* を分離した。推定アミノ酸配列における相同性を比較した結果、*PsPIN2* は *AtPIN3* を含むサブファミリーに属し、*PsAUX1* は *AtAUX1* と高い相同性を示した。また、既に分離されている *PsPIN1* は *AtPIN1* と同じサブファミリーに属することが示された。

3. 黄化エンドウ芽生え上胚軸の自発的形態形成は、芽生えの初期成長過程における上胚軸の「負の重力屈性」の阻害によって引き起こされることから、上胚軸の屈性に対するオーキシンの役割を明らかにするための新たなモデルを提唱した。すなわち、芽生えの初期成長段階では、オーキシンは上胚軸の子葉側に偏って極性移動し、その移動能は重力方向を変化させることによって劇的に変動した。さらにオーキシン極性移動の変化に伴い、上胚軸の偏差成長に対応するように上胚軸においてオーキシンの不均等な蓄積が認められた。初期成長過程の黄化エンドウ芽生え上胚軸における不均等なオーキシン極性移動とオーキシンの不均等分布は、子葉側上胚軸におけるオーキシン極性移動が阻害され、子葉節基部においてオーキシンが横方向へ移動した結果であることを示唆している。実際に放射性オーキシン ( $[1-^{14}\text{C}]$  indole-3-acetic acid) を用いてオーキシンの移動を測定した結果、子葉節基部でのオーキシンの横移動を示す実験結果が得られた。オーキシン極性移動を制御する *PsPIN1*, *PsPIN2* および *PsAUX1* の発現をノーザンブロット法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した結果、*PsPIN1* および *PsPIN2* の発現は、黄化エンドウ芽生え上胚軸における不均等なオーキシン極性移動および子葉節基部でのオーキシンの不均等分布と相関していることが示された。

4. 黄化エンドウ芽生え上胚軸の「負の重力屈性」とオーキシン極性移動との関係をより明確にするために、オーキシン極性移動阻害剤の投与実験および重力応答反応に異常を示す突然変異体を用いた解析を行った。その結果、オーキシン極性移動阻害剤は、地上  $1g$  環境下においてオーキシン極性移動能が高く維持されている場合にのみ上胚軸の負の重力屈性を阻害し、自発的形態形成に類似した成長、発達を誘導した。一方、擬似微小重力環境下においては、 $1g$  環境下で認められるオーキシン極性移動能の変化が阻害された。擬似微小重力環境下におけるオーキシン極性移動が  $1g$  のそれに比べて高い場合、オーキシン極性移動阻害剤は上胚軸の子葉側への屈曲を誘導し、結果として上胚軸は自発的形態形成様の成長、発達を示さなかった。同様に、重力応答反応に異常を示す *ageotropum* においても、オーキシン極性移動を阻害すると上胚軸は子葉側に屈曲した。正常種が自発的形態形成を示す擬似微小重力環境下、あるいは重力応答反応が異常である突然変異体が自発的形態形成を示す  $1g$  環境下においてオーキシン極性移動阻害剤を処理すると、あたかも上胚軸の負の重力屈性が回復したかのような形態を示すことが明らかとなった。以上の結果から、黄化エンドウ芽生え初期成長過程における上胚軸の正常な重力応答は、従来重力に応答するか否か明確でなかったオーキシンの移動が実際重力によって制御され、それによって上胚軸の偏差成長を誘導するオーキシンが上胚軸において不均等に分布した結果生じるものと考えられる。

本研究により、黄化エンドウ芽生え上胚軸における負の重力屈性は、重力刺激に応じて巧みに変化するオーキシンの移動によって制御されていることが明らかとなった。また、オーキシンの移動には、オーキシンの排出キャリアである PsPINs が重要な役割を担うことが示された。さらに、クリノスタットを用いた研究や突然変異体を用いた研究、またオーキシン極性移動阻害剤の投与実験から、実際の宇宙微小重力環境下においても、オーキシンの移動を人為的に制御することによって、植物地上部の成長方向が制御できる可能性が示された。植物の重力応答反応を明らかにすることは、人類による将来の宇宙環境利用にも大きく貢献できるものと考えられる。

## 審査結果の要旨

本論文は、黄化エンドウ芽生えを対象として、植物の重力応答反応におけるオーキシン極性移動の重要性を明らかにするために、クリノスタットを用いた擬似微小重力環境下における植物の形態形成ならびにオーキシン極性移動を解析するとともに、重力応答反応に異常を示す突然変異体やオーキシン極性移動阻害剤を用いた研究を展開し、以下に示す成果を得たものである。

1. 芽生えは上胚軸の子葉節基部での「負の重力屈性」が阻害されることによって自発的形態形成様の成長、発達を示すこと、この場合上胚軸におけるオーキシン極性移動がさまざまに変化することが示された。
2. オーキシンの移動に関係する新規遺伝子である *PsPIN2* と *PsAUX1* を分離することに成功した。推定アミノ酸配列における相同性から、*PsPIN2* は *AtPIN3* を含むサブファミリーに属し、*PsAUX1* は *AtAUX1* との類似性が示された。
3. 芽生えの初期成長段階では、オーキシンは上胚軸の子葉側に偏って極性移動し、その移動能は重力方向を変化させることによって劇的に変動した。さらに上胚軸の偏差成長に対応するようにオーキシンの不均等な蓄積が認められた。*PsPIN1* および *PsPIN2* の発現は、黄化エンドウ芽生え上胚軸における不均等なオーキシン極性移動および子葉節基部でのオーキシンの不均等分布と関連していることが示された。
4. オーキシン極性移動阻害剤は、地上 1g 環境下においてオーキシン極性移動能が高く維持されている場合にのみ上胚軸の負の重力屈性を阻害し、自発的形態形成に類似した成長、発達を誘導することが明らかとなった。一方、擬似微小重力環境下におけるオーキシン極性移動が 1g のそれらに比べて高い場合、オーキシン極性移動阻害剤は上胚軸の子葉側への屈曲を誘導した。
5. 自発的形態形成を示す重力環境下において重力応答反応に異常を示す *ageotropum* にオーキシン極性移動阻害剤を処理すると、あたかも上胚軸の負の重力屈性が回復したかのような形態を示すことが明らかとなった。

以上の成果は、黄化エンドウ芽生え初期成長過程における上胚軸の正常な重力応答が、従来重力に応答するか否か明確でなかったオーキシンの移動が実際重力によって制御され、それによって上胚軸の偏差成長を誘導するオーキシンが上胚軸において横方向に移動し、不均等に分布した結果生じるものであることを示したものであり、植物細胞生理学に寄与するところがきわめて大である。

学位論文審査委員会は、当該論文の審査ならびに最終試験の結果に基づき、申請者に対して博士（理学）の学位を授与することが適当であると結論した。