

令和元年6月19日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26506018

研究課題名(和文)重力に応答する植物ホルモン動態からみた植物重力応答反応の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of graviresponse in plants : Relevance to the International Space Station (ISS) space experiment

研究代表者

上田 純一 (Ueda, Junichi)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・客員教授

研究者番号：40109872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：国際宇宙ステーションを利用した植物宇宙実験「Auxin Transport」を実施した。黄化エンドウおよび黄化トウモロコシ芽生えの宇宙実験および地上対照実験サンプルの植物ホルモン動態の解析を行い、宇宙微小重力環境における芽生えの成長、発達とその姿勢制御に対する役割を検討した。その結果、宇宙微小重力環境は、茎におけるオーキシン極性移動ならびに内生オーキシンレベルを低下させるとともに、オーキシン極性移動関連遺伝子の発現には影響しないもののその関連分子の細胞内局在と配向を変化させることによって地上および宇宙1g重力環境下とは異なり、植物の自発的形態形成をもたらすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、新規医薬および農薬の開発に資する基礎的資料となるとともに、長期間にわたる宇宙での人類の生命活動の向上に役立つ宇宙農業や宇宙医療分野への貢献、さらに良好な地球環境維持、発展に期することとなる。

研究成果の概要(英文)：We conducted the “Auxin Transport” space experiment in the International Space Station (ISS), with the principal objective of the growth and development of etiolated pea (*Pisum sativum* L. cv Alaska) and maize (*Zea mays* L. cv Golden Cross Bantam) seedlings under true microgravity conditions in space in relation to plant hormone dynamics, especially auxin. Etiolated pea and maize seedlings grown under microgravity conditions in space showed automorphogenesis. Polar auxin transport and its related membrane proteins were substantially affected by microgravity conditions in space. These results strongly suggest that adequate polar auxin transport is essential for gravitropic response in plants. Possible mechanisms affecting polar auxin transport in etiolated pea and maize seedlings grown under microgravity conditions in space are also proposed.

研究分野：植物生理化学

キーワード：植物 重力応答 植物ホルモン動態 オーキシン極性移動 遺伝子発現 免疫組織化学 抗体 国際情報交換

## 【1】研究開始当初の背景

研究代表者によって1998年に実施されたSTS-95植物宇宙実験 (Ueda et al. J. Plant Res. 112:487-492, 1999・他)ならびにその後の一連の地上基礎実験の結果から、宇宙微小重力環境下で生育させた黄化エンドウ芽生え上胚軸におけるオーキシン極性移動の変動が芽生えの重力応答反応に密接に関係していることが明らかにされている。近年、オーキシン極性移動の分子メカニズムが解析されつつあり、そのタンパク質分子は1991年に研究代表者らによって明らかにされた。研究代表者らの先行研究においても、黄化エンドウ芽生えおよび黄化トウモロコシ芽生えから、オーキシン極性移動に関係するPIN遺伝子群 (*PsPIN1*, *ZmPIN1*(efflux carrier)、*PsPIN2,3* (efflux regulator)) ならびにAUX遺伝子群*PsAUX1*, *ZmAUX1* (influx carrier)が分離され (Hoshino et al. Adv. Space Res., 36:1284-1291, 2005) また、それらの地上および疑似微小重力環境における発現やその機能解析が行われている (Hoshino et al. Plant Cell Physiol. 47: 1496-1508, 2006、Hoshino et al. J. Plant Res. 120: 619-628, 2007、Ueda et al. Biol. Sci. Space 26: 32-41, 2012)。一方、研究代表者らによってオーキシン極性移動を制御する新規化合物の単離、化学構造の決定にも成功している (Ueda et al. Acta Physiol. Plant.. 33: 2251-2258, 2013、Arai et al. Tetrahedron 69: 7001-7005, 2013)。

## 【2】研究の目的

本研究では、植物の重力応答反応とそれに伴う姿勢制御機構を、宇宙微小重力環境下(「きぼう」第2期後半の宇宙実験テーマに採択されている)および3次元クリノスタット上の疑似微小重力環境で生育させた野生型Alaskaおよび重力応答突然変異体*ageotropum*黄化エンドウおよび黄化トウモロコシ芽生えを対象として、オーキシン動態(極性移動およびその関連遺伝子発現、遺伝子産物の細胞内局在、内生オーキシン量の変化等)ならびに重力に応答する新規植物生理活性物質や新規オーキシン極性移動制御物質の動態から明らかにすることを目的とした。

## 【3】研究の方法

研究計画に従って2016年5月～6月にISSを利用した宇宙実験のRun2とRun3が、2017年3月にRun1とRun4が実施された。またこの時期に合わせてそれぞれの地上対照実験が実施された。Run1～Run3は黄化エンドウ芽生え(品種:Alaska)を対象とし、また、Run4は黄化トウモロコシ芽生え(品種:Golden Cross Bantam)を対象とした。各Runの地上帰還サンプルを用いた具体的な実験項目は以下のとおりである。なお、黄化エンドウ芽生え上胚軸の、また、黄化トウモロコシ芽生え幼葉鞘および中胚軸におけるオーキシン極性移動実験はISS内で宇宙飛行士によって実施された。いずれの宇宙実験サンプルも軌道上で試料採取後直ちに摂氏-80度にて凍結し、地上において分析実験に供されるまで解凍されることはなかった。Run1～Run3ではCBEFを用いて宇宙環境(ISS上)で作出した1g(以下「宇宙1g」と称する)およびμg(以下「宇宙μg」と称する)下で生育させた黄化エンドウ芽生え、Run4では宇宙μgで生育させた黄化トウモロコシ芽生えについて、

1. 芽生えの成長解析
2. 芽生え上胚軸あるいは幼葉鞘・中胚軸におけるオーキシン極性移動解析
3. 芽生え各器官におけるオーキシン極性移動関連遺伝子発現解析
4. 芽生え各器官におけるオーキシン極性移動関連遺伝子産物の細胞内局在解析
5. 芽生え各器官における内生植物ホルモンの動態解析(同定および定量実験)

を行った。またJAXA筑波宇宙センターおよび大阪府立大学において、Run1～Run3およびRun4に対する地上対照実験を実施した。

## 【4】研究結果

### 1. 芽生えの成長解析

宇宙  $\mu\text{g}$  環境下で生育させた黄化エンドウ芽生えでは、宇宙 1g 環境下で生育させた芽生えに比べて、上胚軸の成長は促進される傾向にあった。一方、芽生えが示す通常の重力応答反応に比べてその成長方向は大きく変化し、上胚軸は斜め方向に伸長した。これは地上においてオーキシン極性移動阻害剤である TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid) 存在下で生育させた芽生えのそれとほぼ同様であった。芽生え先端鉤状部の角度については、宇宙  $\mu\text{g}$  環境下で生育させた芽生えでは、宇宙 1g および地上 1g 環境下で生育させた芽生えに比べて大きくなること示された。宇宙  $\mu\text{g}$  環境下で生育させた芽生えの根についても自発的形態形成類似の成長、発達が認められた。一方、宇宙  $\mu\text{g}$  環境下で生育させた黄化トウモロコシ芽生えでは、芽生え幼葉鞘および中胚軸とも、その成長が有意に阻害された。比較のために実施した 3 次元クリノスタットを用いた地上対照の芽生えの成長、発達は地上の 1g 対照のそれとほぼ同様であった。これらの事実は黄化エンドウ芽生えと同様、先の STS-95 植物宇宙実験の結果を支持するものである。なお、黄化トウモロコシ芽生えに関する成長実験については、宇宙 1g 環境下で生育させた芽生えを得ることが当初の研究計画に含まれていないこともあり、比較対照となるのは地上 1g 環境下で生育させた芽生えのみであるため、その成長解析結果の比較はより慎重に行う必要がある。今後、地上対照実験を繰り返すとともに、両者の比較について更に精査する予定である。

### 2. オーキシン極性移動解析

宇宙  $\mu\text{g}$  環境下で生育させた黄化エンドウ芽生え上胚軸(子葉側および反子葉側)、宇宙 1g 環境下で生育させた芽生えおよび地上 1g 環境下で生育させた地上対照芽生えの上胚軸(子葉側および反子葉側)におけるオーキシン極性移動を解析した。凍結された状態で地上に帰還した宇宙実験の各サンプルについては、融解を避けるため地上にてドライアイス上で上胚軸を子葉側と反子葉側に半裁し、更に、それら各々の半裁切片を数 mm の断片に調整した後、液体シンチレーションカウンターを用いて各断片における放射活性を測定した。その結果、いずれのサンプルにおいても、芽生え上胚軸の子葉側に比べて反子葉側でオーキシン極性移動の低下が認められた。宇宙 1g 環境下で生育させた芽生えおよび地上対照芽生え上胚軸(子葉側および反子葉側)のオーキシン極性移動はほぼ同様であった。宇宙  $\mu\text{g}$  環境下で生育させた芽生え上胚軸のオーキシン極性移動は、子葉側および反子葉側とも宇宙 1g 環境下で生育させた芽生えおよび地上対照芽生えのそれに比べて有意に低下した。上記いずれの重力環境下でも、芽生えをオーキシン極性移動阻害剤である TIBA 存在下で生育させると、上胚軸(子葉側および反子葉側)のオーキシン極性移動は著しく低下した。一方黄化トウモロコシ芽生えにおけるオーキシン極性移動は、その成長の遅延が認められたこともあり、当初の計画とは異なり宇宙  $\mu\text{g}$  環境下で生育させた芽生えのサンプルが幼葉鞘および中胚軸の両器官を含むものであったので、地上対照サンプルについても同様に切片を調整し、そのオーキシン極性移動を測定した。その結果、いずれのサンプルにおいても、幼葉鞘と中胚軸の接点となる幼葉鞘側で移動したオーキシンの蓄積が認められた。宇宙  $\mu\text{g}$  環境下で生育させた黄化トウモロコシ芽生えでは地上対照のそれに比べて、幼葉鞘と中胚軸の接点となる幼葉鞘側でオーキシンの蓄積が大きくなるとともに中胚軸におけるオーキシン極性移動も大きくなる傾向にあった。

### 3. オーキシン極性移動関連遺伝子発現解析

宇宙  $\mu\text{g}$  環境下で生育させた黄化エンドウおよび黄化トウモロコシ芽生え、宇宙 1g 環境下で生育させた黄化エンドウ芽生えおよび地上対照両芽生え各器官におけるオーキシン極性移動関連遺伝子発現解析結果は以下のとおりである。当初の実験計画に従い、黄化エンドウ芽生えでは、頂芽、

先端鉤状部、上胚軸（子葉側および反子葉側）、子葉節部域（子葉側および反子葉側）、幼根基部および先端部の 8 部域を対象として発現解析を行った。一方黄化トウモロコシ芽生えにおいては、幼葉鞘（先端部および基部）、本葉、中胚軸、幼根（基部および先端部）の 6 部域について解析した。各試料から RNA を抽出後、逆転写反応によって cDNA を得て、Real-time PCR によって各遺伝子発現を定量解析した。比較対象とする house keeping 遺伝子については、黄化エンドウ芽生えでは DEAD-Box、GAPDH および 18S とし、黄化トウモロコシ芽生えでは UPL とした。その結果、PsAUX1 遺伝子発現は DEAD-Box 遺伝子発現に対して、フックでは宇宙 1g に比べて宇宙  $\mu$ g では発現量の低下が認められた。上胚軸（子葉側および反子葉側）においては宇宙 1g と宇宙  $\mu$ g 環境下で生育させた芽生えにおいて、その発現量はほぼ同程度であり、大きな差は認められなかった。上胚軸（子葉節）においては、宇宙 1g 環境下の芽生えに比べて宇宙  $\mu$ g 環境下での芽生えで発現量が低下した。宇宙 1g および宇宙  $\mu$ g 環境下、TIBA 存在下芽生えを生育させると、フック、上胚軸（子葉側および反子葉側）および上胚軸（子葉節）で、発現量が大きくなる傾向にあった。PsPIN1 遺伝子発現は DEAD-Box 遺伝子発現に対して、フック、上胚軸（子葉側および反子葉側）および上胚軸（子葉節）において、宇宙 1g および宇宙  $\mu$ g 環境下で生育させた芽生えではその発現量はほぼ同程度であった。TIBA 存在下で芽生えを育てると、宇宙 1g および宇宙  $\mu$ g 環境下で生育させた芽生えとともに、フック、上胚軸（子葉側および反子葉側）および上胚軸（子葉節）において、その発現量が大きくなる傾向にあった。ZmAUX1 および ZmPIN1a 遺伝子発現は UPL 遺伝子発現に対して、幼葉鞘先端部での発現が大きく、本葉でのそれは小さかった。幼葉鞘先端部では、宇宙 1g に比べて宇宙  $\mu$ g 環境下で生育させた芽生えにおいてその発現量が大きくなる傾向がみられた。以上に加えて、宇宙環境下で生育させた黄化エンドウおよび黄化トウモロコシ芽生えを対象として、発現量が変動する遺伝子を網羅的にスクリーニングすることを目的としてマイクロアレイ解析を実施した。解析は全て終了しているが、その結果については現在精査、検討中であり、速やかに論文として公表したいと考えている。

#### 4. オーキシン極性移動関連遺伝子産物の細胞内局在解析

オーキシン極性移動関連遺伝子発現解析に合わせて、宇宙 1g 環境および宇宙  $\mu$ g 環境下で生育させた黄化エンドウおよび黄化トウモロコシ芽生え、および地上対照両芽生え各器官（遺伝子発現解析で記載のとおり、黄化エンドウ芽生えについては 8 部域、黄化トウモロコシ芽生えについては 6 部域）について、新たに調製した抗 PIN1 抗体を用いてオーキシン極性移動関連遺伝子発現産物の細胞内局在を免疫染色手法によって解析した。その結果、黄化エンドウ芽生えでは、宇宙  $\mu$ g 環境下で育てた芽生えでは宇宙 1g 環境下のそれと比較したところ、オーキシン排出担体である PsPIN1 については、これが細胞膜の基部側に局在している細胞の数が減少し、ランダムな局在を示す細胞が多くなる傾向にあった。この事実が宇宙  $\mu$ g 環境下で育てた芽生えのオーキシン極性移動が低下する原因であると考えられる。一方、オーキシン極性移動阻害剤（TIBA）存在下で生育させた芽生えでは、宇宙 1g 環境および宇宙  $\mu$ g 環境下とも PsPIN1 のシグナル自体が減少するとともに、その膜局在も乱れる傾向にあった。このことは、TIBA が PsPIN1 動態に影響することによってオーキシン極性移動を阻害していることを推察させる。一方、黄化トウモロコシ芽生えについては、宇宙  $\mu$ g 環境下で育てた芽生えの幼葉鞘皮層部細胞においては、維管束方向の細胞膜に ZmPIN1a が鱗(うろこ)状に局在していることが観察された。このことから、この部域においては、オーキシンが外側から維管束方向へ輸送されていることを推察させる。さらにこれが地上 1g 環境にくらべて宇宙  $\mu$ g 環境下でオーキシン極性移動が大きくなることと関係しているのかも知れない。中胚軸においては、地上 1g および宇宙  $\mu$ g 環境下で育てた芽生えとも維管束鞘細胞の細胞膜基部側に ZmPIN1a シグナルが観察され、地上 1g および宇宙 1g 環境の間で特に大きな違いは認めら

れなかった。

#### 5. 内生植物ホルモン類の動態解析と新規オーキシン極性移動制御物質の探索

宇宙  $\mu\text{g}$  環境下で生育させた黄化エンドウおよび黄化トウモロコシ芽生え、宇宙 1g 環境下で生育させた黄化エンドウ芽生えおよび地上対照両芽生え各器官における各種植物ホルモン類の同定、定量を行った結果、極めて少量の試料から遊離型および結合型オーキシン、同ジャスモン酸、アブシジン酸、サリチル酸およびゼアチンをはじめとする 8 種類のサイトカイニン類の同定、定量に成功した。現在芽生えの成長、発達に対するこれら植物ホルモン動態の役割を解析している。

一方、地上対照実験サンプルを対象に植物の重力応答反応に関係する生理活性物質を探索した結果、その候補化合物として  $\beta$ -(isoxazolin-5-on-2yl)-alanine が、また、キク科植物を対象として天然型オーキシン極性移動制御物質を探索した結果、研究代表者らが行った先行研究において既に見出されている 3-hydroxy-4,6,7(H)-germacra-1(10),11(13)-dien-6,12-olide (artabolide) や dehydrocostus lactone に加えて、costunolide、santamarine、atractylenolide II および (+)-eudesma-4(14),7(11)-dien-8-one がその阻害物質として見出された。

#### 【5】主な発表論文等

宇宙実験の成果に関して、既に公表された論文と印刷中の論文、ならびに地上対照実験の成果に関する論文 26 編の内 7 編を以下に記載した。なお学会発表は、国際会議等 3 件、国内学会 49 件の合計 52 件、また、図書は 3 件であった。

#### 〔雑誌論文〕(計 26 件)

Yuta Toda, Kazuho Okada, Junichi Ueda, Kensuke Miyamoto (2019) Effects of dehydrocostus lactone, a naturally occurring inhibitor of polar auxin transport, on epicotyl growth and auxin dynamics in etiolated *Pisum sativum* seedlings. *Acta Agrobotanica* (in press) 査読有り

Kensuke Miyamoto, Marian Saniewski, Junichi Ueda (2019) Gummosis and leaf abscission in Yoshino cherry (*Prunus yedoensis*): Relevance to hormonal regulation and chemical composition of gums. *Acta Horticulturae* 1235. DOI:10.17660/ActaHortic 2019.1235.65 査読有り

Kensuke Miyamoto, Akinori Inui, Eiji Uheda, Mariko Oka, Motoshi Kamada, Chiaki Yamazaki, Toru Shimazu, Haruo Kasahara, Hiromi Sano, Tomomi Suzuki, Akira Higashibata, Junichi Ueda (2019) Polar auxin transport is essential to maintain growth and development of etiolated pea and maize seedlings on 1 g conditions: Relevance to the International Space Station experiment *Life Sciences in Space Research* 20:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2018.11.001> 査読有り

Junichi Ueda, Kensuke Miyamoto, Justyna Góraj-Koniarska, Marian Saniewski (2018) Petiole bending in detached leaves of *Bryophyllum calycinum*: Relevance to polar auxin transport in petioles. *Acta Biologica cracoviencia series Botanica* 60 (2): 25-33. DOI:10.24425/118056 査読有り

Junichi Ueda, Justyna Góraj-Koniarska, Kensuke Miyamoto, Marian Saniewski (2018) Epinasty and/or hyponasty, and petiole growth in *Bryophyllum calycinum*: Focus on the interaction of indole-3-acetic acid and methyl jasmonate. *Acta Biologica cracoviencia series Botanica* 60 (1): 73-81. DOI:10.24425/118049 査読有り

Motoshi Kamada, Kensuke Miyamoto, Mariko Oka, Eiji Uheda, Junichi Ueda, Akira Higashibata (2018) Procedures for chemical fixation in immunohistochemical analyses of PIN proteins regulating polar auxin transport: Relevance to spaceflight experiments. *Life Sciences in Space Research* 18 : 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2018.05.005> 査読有り

Motoshi Kamada, Kensuke Miyamoto, Mariko Oka, Junichi Ueda, Akira Higashibata (2018) Regulation of asymmetric polar auxin transport by PsPIN1 in endodermal tissues of etiolated *Pisum sativum* epicotyls: Focus on immunohistochemical analyses. Journal of Plant Research 131:681–692.  
<https://doi.org/10.1007/s10265-018-1031-z> 査読有り

(他 19 編)

〔学会発表〕(計 53 件)

Junichi Ueda

*Auxin Transport* space experiment on the Japanese Experiment Module “Kibo” in the Internal Space Station  
Invited lectures in the Research Institute of Horticulture, Skierniewice and in Franciszek Górski Institute of Plant Physiology of the Polish Academy of Sciences, Krakow  
September 3 and 5, 2018

Junichi Ueda, Kensuke Miyamoto, Eiji Uheda, Mariko Oka, Motoshi Kamada, Toru Shimazu, Akira Higashibata

Altered Auxin Polar Transport Is Essentially Related to Morphogenesis in Response to Changed Gravity Conditions in Etiolated Pea Seedlings  
11th Asian Microgravity Symposium–2016  
October 25 to 29 (Tuesday to Saturday), 2016  
Hokkaido University Convention Hall, Sapporo, Japan

Tadataka Murayama, Mariko Oka, Eiji Uheda, Junichi Ueda, Kensuke Miyamoto  
Growth and Auxin Polar Transport in Etiolated Pea Seedlings under Hypergravity Conditions  
11th Asian Microgravity Symposium–2016  
October 25 to 29 (Tuesday to Saturday), 2016  
Hokkaido University Convention Hall, Sapporo, Japan

(他 49 件)

〔図書〕(計 3 件)

Junichi Ueda, Marian Saniewski, Kensuke Miyamoto

Bioactive Compounds in Agricultural Soils (Lech W. Szajdak and S.S. Narwal Editors) 2016, Springer Verlag, pp. 175-209.

(他 2 件)

## 【6】研究組織

### (1) 研究分担者

宮本 健助：Miyamoto Kensuke：大阪府立大学：高等教育推進機構：教授：10209942

上田 英二：Uheda Eiji：大阪府立大学：理学部：准教授：20160161

長谷川 宏司：Hasegawa Koji：筑波大学：生命環境系：名誉教授：70094167

繁森 英幸：Shigemori Hedeyuki：筑波大学：生命環境系：教授：70202108

岡 真理子：Oka Mariko：鳥取大学：農学部：准教授：20324999