

微小重力下における根の水分屈性とオーキシン動態

高橋 秀幸*・藤井 伸治・宮沢 豊

植物は、約4億5千万年前に陸地環境に進出するとき、いかに地上での乾燥ストレスを回避し、重力の存在下で空間的配置を広げるかという課題に遭遇したと考えられる。陸地で固着生物として生活する植物は、そのような各種の環境ストレスを回避するしくみを発達させてきた。そのひとつが伸長方向の制御である。一般に、根は土壤中に発達して養水分を吸収するとともに植物体を支え、茎葉は地上部に発達して光合成を効率的に行う体制を維持する。このような根や茎の伸長方向の制御に機能するのが、屈性 (tropism)、傾性 (nasty)、回旋運動 (circumnutation) などである。屈性は刺激の方向に対する屈曲成長であり、重力屈性、光屈性、水分屈性、接触屈性、電気屈性、磁気屈性、化学屈性などとしてみられる。傾性は刺激の方向とは無関係な成長運動で、オジギソウにみられる接触傾性などでよく知られている。また回旋運動は、茎や根の頂端が首振り運動のごとく連続的に回転しながら伸長する現象で、ほとんどの植物にみられる。植物の姿勢を決めるための伸長方向は、これらの運動によって支配されることが考えられる。中でも重力屈性は植物生理学の中心的課題として古くから研究され、最近宇宙環境を利用した研究、すなわち、宇宙生物学のモデル実験系として注目されている。一方、地球上では常に重力応答が存在し、それが他の成長運動をマスクするように作用する。そのために、植物の機能として重要であるにもかかわらず、これまで研究されてこなかった現象も多い。最近になってようやく、それらを重力屈性から分離するための宇宙実験系も開発され、これまで詳細が不明であった成長制御の仕組みも研究されるようになってきた。ここでは、とくに根の伸長方向を決めるうえで重力屈性と相互作用する水分屈性を取り上げ、その仕組みの解明に向けた宇宙実験計画について紹介する。

重力屈性が水分屈性に干渉する —突然変異体の研究から—

根の水分屈性は、水勾配に応答して水の多い方向に屈曲する現象である。この現象は、地球上では重力屈性から分離することが困難であることから、これまでほとんど研究されてこなかった。¹⁾しかし、筆者らは、重力屈性を欠損した突然変異体および微小重力下での植物の成長



図1. 重力屈性を欠損したエンドウ突然変異体の根における水分屈性。²⁾ 空気湿度を飽和状態にすると培地 (パーミキュライト) と地上の間に顕著な水分勾配が形成されず、根は培地から飛び出すが (A)、空気湿度を下げると、一度飛び出した根が水分屈性によって高水分の培地に戻る (B)。

を模擬するクリノスタットを利用した実験から、根が水分屈性を発現させることを証明した。²⁻⁸⁾ すなわち、重力屈性を発現できないエンドウ突然変異体の根は、水分勾配の存在下で顕著な水分屈性を示したが、野生型のエンドウの根は同一の水分勾配下で重力屈性を示した (図1)。ところが、この野生型のエンドウ植物体をクリノスタット上で回転させることによって、その重力屈性を消去させると、突然変異体と同様に水分勾配に応答して顕著な水分屈性を示すことを見いだした。これらの結果は、地球上では根の重力屈性が水分屈性に干渉して前者が後者をマスクするように作用すること、宇宙の微小重力下では水分屈性と重力屈性を分離できること、そして、宇宙環境における根の伸長方向の制御に水分屈性を利用できる可能性を示すものである。

微小重力下での水分屈性 —宇宙実験から—

さて筆者らは、1998年に打ち上げられたスペースシャトルでキュウリ芽生えを用いた宇宙実験を行った。その

*著者紹介 東北大学大学院生命科学研究科 (教授) 〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1
TEL. 022-217-5714 FAX. 022-723-8218 E-mail: hideyuki@ige.tohoku.ac.jp

概要は本誌でも紹介したが（第80巻，第7号，304-307頁），キュウリ種子を湿った空气中で発芽させ，その形態形成を解析するものであった。^{9,10)} そのためにキュウリ種子をスポンジ状の親水性プラスチック片に差し込み，ポリカーボネート製の閉鎖容器中において，軌道上でプラスチック片に給水した．そのキュウリ種子は地球上とほぼ同様に発芽し，湿った空气中で生育させた70時間齢の芽生えは側根を発達させるまでに成長した．筆者らは，スペースシャトルが地球に帰還後にケネディ宇宙センターの実験室に回収された固定液中のキュウリ芽生えを観察して，2つの驚くべき形態に遭遇した．ひとつはキュウリ芽生えのペグ形成であり，本誌で紹介したとおりである。⁹⁾ いまひとつの驚くべき形態は，宇宙で生育したキュウリ芽生えの根にあった。^{11,12)} キュウリの芽生えは，発芽と同時に主根が重力屈性によって下に伸長する一方で，やがて主根から側根が現れ，それらの側根は重力の支配下にあつて横に伸長する．キュウリでは，側根の伸長方向は明条件下では，やや斜め下方向に伸長するが，暗黒下ではほぼ水平方向に伸長し，根系の広がり確保する．ところが，微小重力下では，側根がシュート側に伸長していたのである（図2A，B）．これは，あたかも万歳をしている人間の手のようであった（胴体・両足を主根に，手を側根に例えていただきたい）．もし地球上でこのようなことが起こったら，根は地上に飛び出てその機能を果たせないことになる．宇宙で何が起こったのか？ 重力屈性突然変異体やクリノスタットによる実験

で「根の水分屈性」の証明に成功していた筆者らは，根が宇宙環境で水分屈性を発現させた可能性を考えた．つまり筆者らは，側根が水供給体でもある種子の支持体に向かって伸びたと考え，容器内で水を含んだ種子支持体と気中の間に湿度勾配が存在するかどうか，宇宙実験の結果をクリノスタットで模擬できるかどうかを検証することにした．その結果，容器中には明らかに水分勾配がみられた．そして，その水分勾配の存在下でも，静置させたキュウリ芽生えの根は重力屈性によって下に伸び，水分屈性を発現させなかった．しかし，クリノスタット上で重力屈性を消去させると，根は顕著な水分屈性を発現させて，宇宙実験の結果をみごとに再現させたのである（図2C，D）．

重力屈性と水分屈性におけるオーキシン動態

植物ホルモンのオーキシンは，その生体内における動態を通して重力屈性や重力形態形成に重要な役割を果たす．したがって，植物の重力応答に関連した宇宙実験ではオーキシン動態をモニターする必要性が出てくるが，宇宙実験で直接オーキシンを定量することは難しい．そこで考えられるのが，オーキシンによって誘導される遺伝子の利用である．これまでに *Aux/IAA*，*SAUR* (*Small Auxin Up-Regulated*)，*GH3* などがオーキシン誘導性遺伝子として報告され，その発現はオーキシン分布とよく一致することが知られている.¹³⁻¹⁵⁾ *SAUR* は横たえられたダイズの胚軸の下側に多く発現し，オーキシンが重力刺激によって不均等分布することを証明している．また，*GH3* の発現をレポーターの β -glucuronidase (GUS) 活性でみるために *GH3::uidA* を導入したタバコの形質転換体では，横になったシュートの下側で GUS 活性の高いことも報告されている．筆者らは，キュウリから *Aux/IAA* 遺伝子として *CsIAA1* をクローニングし，その mRNA は *SAUR* と同様に横になった胚軸の下側で多くなることを，そのレベルがオーキシン濃度依存的に高くなることをみとめ，オーキシン動態を解析するための宇宙実験に使用した.^{11,16)} 同様な目的で，オーキシン誘導性プロモーターを用いた研究もある．*DR5* はそのひとつで，*DR5::uidA* を導入したシロイヌナズナでは，根を横にする数時間後に根端下側に多くの GUS 染色が見られるようになる．最近では，*DR5* の発現を GFP (green fluorescence protein) をレポーターとしてモニターし，オーキシン分布を解析する系統もできている.¹⁷⁾ このように，オーキシン誘導性の遺伝子やプロモーターを用いてオーキシン分布を解析することは，宇宙実験においても有用

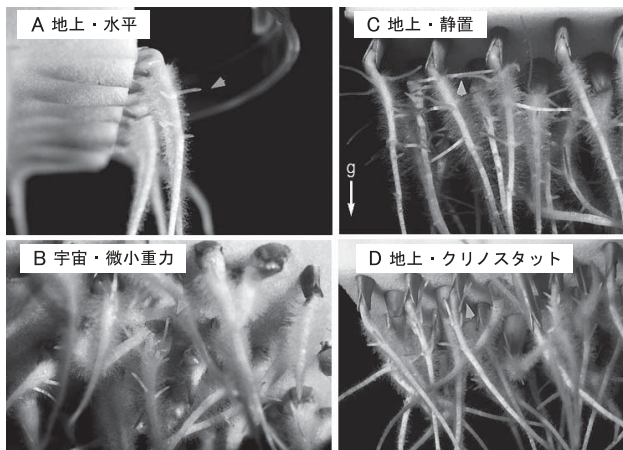


図2. 微小重力下（宇宙）および疑似微小重力下（クリノスタット）におけるキュウリの根の水分屈性。^{11,12)} キュウリ種子を地上で水平に横たえて発芽させると，主根が下に，側根（矢尻）が横に伸長する（A）．微小重力下では，側根が水供給体である支持体に向かって伸長した（B）．Bと同様のものを地上におくと側根は横に伸長したが（C），それをクリノスタットで回転させると側根は水供給体に向かって伸長した（D）．

と考えられる。

根の水分屈性に伴うオーキシシン動態については、筆者らが*CsIAA1*の発現から解析している。¹⁸⁾先にも述べたように、キュウリの根は水分屈性に比較して重力屈性を強く発現し、微小重力下やクリノスタット上で重力屈性の干渉が打ち消されることによって水分屈性を発現できるようになる。このとき、水分屈性の発現が*CsIAA1*の偏差的発現を伴うことが明らかになった。すなわち、根が水分屈性によって屈曲するとき、高水分側で*CsIAA1* mRNAが多くなり、オーキシシンレベルが高くなっていることを示した。このように重力屈性と水分屈性のいずれの場合も、オーキシシンレベルは凹側（下側および高水分側）で高まり、凸側（上側および低水分側）で低下することを示している。また、オーキシシンの作用阻害剤の処理によって根の水分屈性および重力屈性が抑制される事実からも（未発表）、オーキシシン動態が根の屈性に重要な役割を果たすものと考えられる。

シロイヌナズナの水分屈性実験系

筆者らは、近年、シロイヌナズナの根を用いた水分屈性の実験系を開発した。これには2つの理由がある。そのひとつは、水分屈性のメカニズムを解明するためには分子遺伝学的解析が必要であり、そのためにもっとも有用な植物材料がシロイヌナズナであるためである。筆者らは、実際にきわめてユニークな水分屈性突然変異体を単離し、いくつかの変異原因遺伝子を同定している（未発表）。シロイヌナズナを使うもう一つの理由は、それが今後の宇宙実験に推奨されるからである。ここで紹介する水分屈性に関する宇宙実験は第5回ライフサイエンス国際公募宇宙実験として採択されたものであるが、この公募ではシロイヌナズナや線虫が、小型であるとともにゲノム解読の完了したモデル生物であることから、実験生物として推奨されている。

さて、そのシロイヌナズナの根は、エンドウやキュウリの根に比較して、水分勾配に応答して水分屈性を強く発現することがわかった。¹⁹⁾すなわち、図3のように、1%の寒天板に芽生えの根の先端が気中に突き出すように垂直に載せ、それを飽和塩溶液の入ったチャンバーに密閉して寒天と飽和塩溶液の間に水分勾配を形成させた。その結果、シロイヌナズナの根は、飽和塩溶液のかわりに水を入れた対照区では、重力屈性によって湿った気中を下に伸長したが、水分勾配下では重力に逆らうように高水分の寒天に向かって伸長した。このように、シロイヌナズナの根は、地上重力下でも水分屈性が重力屈

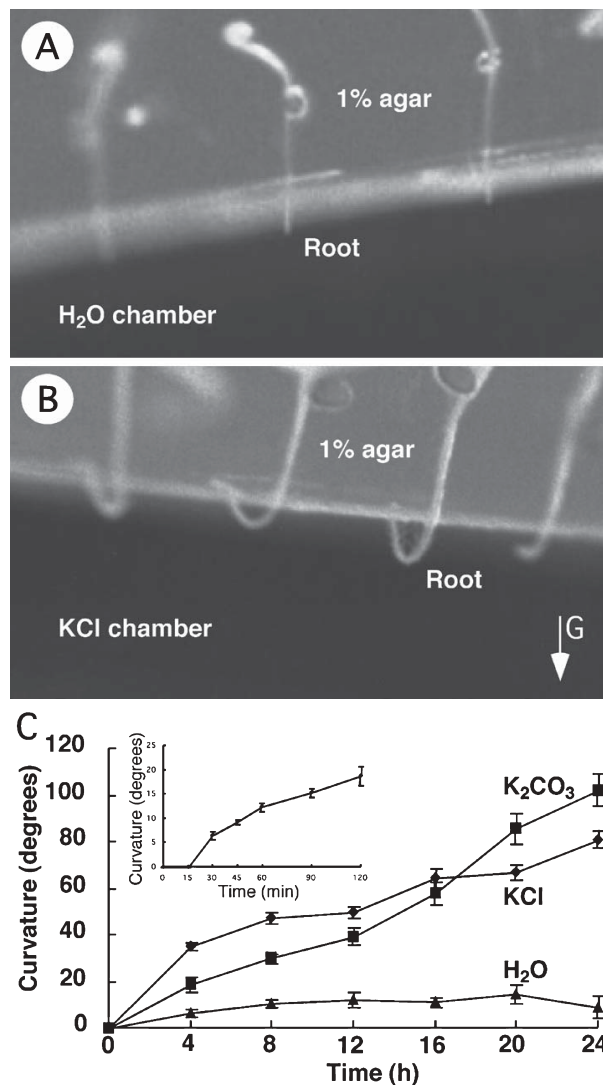


図3. シロイヌナズナの根の水分屈性。¹⁹⁾ 閉鎖容器内に水を入れて空気湿度を飽和状態に保つと根は重力屈性によって下に伸長するが (A)、塩化カリウム飽和塩溶液を容器に入れて寒天と飽和塩溶液の間に水分勾配を形成すると、根は重力屈性に打ち勝って水分屈性を示し、寒天側に伸長した (B)。C は塩化カリウムおよび炭酸カリウムの飽和塩溶液によって水分勾配を形成させた場合と水を入れた場合の水分屈性の経時的変化を示す。矢印 (G) は重力方向を示す。

性に打ち勝つことができる。また、水分屈性による屈曲は水分勾配刺激開始後30分以内にはみとめられ、その屈曲角度が4-8時間後には40-60度に達した。シロイヌナズナの根では、根の重力受容細胞と考えられているコルメラ細胞で、水分勾配（水分ストレス）によってアミロプラストが分解され、それによって重力感受性が低下することもわかった。²⁰⁾シロイヌナズナでは、これが重力屈性の発現を低下させて水分屈性を発現しやすくすることに関与しているものと考えられる。一方、水分勾配（水ポテンシャル勾配）を形成するために1%の寒天板とソ

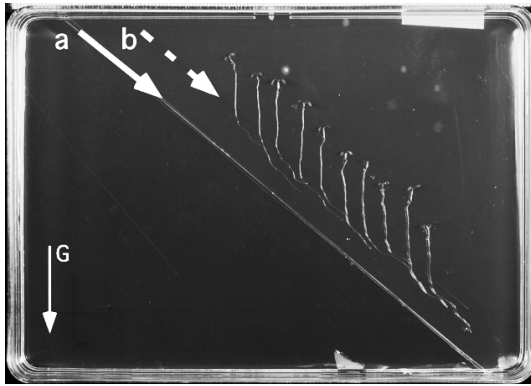


図4. プレーン寒天板 (plain agar) とソルビトール入り寒天板 (sorbitol agar) を張り合わせた培地上で、シロイヌナズナの芽生えをプレーン寒天側に垂直におき、120時間生育させた。実線矢印 (a) は張り合わせた寒天板の境界、破線矢印 (b) は実験開始時の根端の位置を示す。Gは重力方向を示す。根はソルビトール寒天から逃げるように、高水ポテンシャル側 (右側) に屈曲している。

ルビトールを入れた1%寒天板を貼り合わせ、その上にシロイヌナズナの根をおくことによっても、根はソルビトール寒天板と反対方向の水ポテンシャルの高い側に屈曲することもわかった。¹⁹⁾ この実験系は溶液を必要とせず、また、ある程度の振動に耐えられるものとして、宇宙実験系にも適用できると考えられた (図4)。事実、この実験系はクリノスタット上で3次元的に回転させる疑似微小重力実験にも用いることが可能である。

根の水分屈性に関する宇宙実験

これまで述べたように、筆者らは、根が水分勾配を感じて水分屈性を発現する能力を有することを証明するとともに、宇宙の微小重力下では、根が水分勾配に应答して水分屈性を顕著に発現する可能性を示してきた。したがって、宇宙の微小重力下では、根が重力屈性に干渉されることなく、1g環境下に比較して、より強い水分屈性を示すものと考えられる。この宇宙実験は、重力屈性と水分屈性それぞれにかかわるメカニズムを明らかにする糸口になるものと考えられる。

また、これまでの研究から、根は根端で重力および水分勾配を受容し、その後、異なるメカニズムによって不均等なオーキシン分布を誘導し、屈曲するものと考えられた。この仮説は、オーキシン誘導性のプロモーターを用いて、重力および水分勾配によって影響されると考えられるオーキシン分布を、微小重力下および1g環境下で比較解析することによって検証されるものと考えられる。シロイヌナズナでは、多くのオーキシン誘導性遺伝子が単離・同定されている。これらの遺伝子発現を、RT-

PCR解析によって比較することによっても、水分屈性および重力屈性に機能するオーキシン制御分子が見いだされる可能性がある。

さらに、宇宙船などの微小重力下では、人工重力を使用しない限り、根の姿勢制御のために重力屈性を利用することができない。本宇宙実験で、微小重力下で顕著な水分屈性を誘導することに成功し、そのメカニズムの解明が進むことによって、植物育成で必須な根の姿勢の人的制御が宇宙でも可能になり、また、宇宙環境に適した新植物の開発も可能になるものと考えられる。

これらの仮説に基づき、筆者らは国際公募宇宙実験において、シロイヌナズナを用いた宇宙実験により、水分勾配の存在下で重力を排除して水分屈性を純粋に抽出するとともに、その結果としての水分屈性依存的形態形成や重力刺激に应答して分布の変化するオーキシン動態、および水分屈性に伴うオーキシン制御遺伝子発現の変化を1g環境下におけるデータと比較解析することを計画した。すなわち、①微小重力下での根の水分屈性発現強度の重力依存的な変化を、軌道上で撮影した形態写真より検証する、②オーキシン制御遺伝子のプロモーターの下流にレポーターをつないだコンストラクトを有するシロイヌナズナ形質転換体を用い、レポーター遺伝子の挙動を水分屈性におけるオーキシン動態として捉え、水分屈性と重力屈性におけるオーキシン作用の違いを検証する、③オーキシン動態から屈性発現に至る過程にかかわるオーキシン制御遺伝子の発現解析を行う、④微小重力下における根の伸長方向を水分屈性により制御できること、およびその形態形成過程におけるオーキシンの役割を明らかにすることである。これらの実験の具体的な手順の概要は図5に示したとおりである。

以上のような実験は、地上の実験室であればとくに難しいこともなく、日常的にやっていることである。しかし、宇宙実験では地上での実験と異なり、考慮すべき点が多い。中でも、微小重力環境、クルー・タイム (宇宙飛行士が実験操作に割り当てる時間)、軌道上への打ち上げと実験開始とサンプル・データの回収に要する時間、そして宇宙船が備える器機を十分に考慮して実験系と操作手順を考える必要がある。筆者らの宇宙実験を実施するにあたり、とくに問題となるのは、水分勾配による処理前に、微小重力下で芽生えの根を目的の方向と位置にそろえられるか、微小重力下で迅速・的確に水分勾配を形成し、固定液・GUS染色液を注入できるか、そのとき根の伸長方向や位置がずれないように固定できるか、軌

