

香川生物 (Kagawa Seibutsu) (19): 59-62, 1992.

オーキシンによるプロトン放出機構

高橋直子・若林和幸*

〒760 高松市幸町1-1 香川大学教育学部生物学教室

Mechanisms of Auxin-induced H⁺ Secretion.Naoko TAKAHASHI and Kazuyuki WAKABAYASHI*, *Biological Laboratory,
Faculty of Education, Kagawa University, Takamatsu 760 Japan*

はじめに

植物ホルモンの1つであるオーキシンの代表的な生理作用として、植物細胞の伸長成長の促進が知られている。このオーキシンによる伸長成長誘導の機構の1つとして酸成長が考えられている (Rayle and Cleland 1970)。これは、茎の成長部位から切り取った切片を酸性溶液中で処理すると切片の成長が促進される現象と、茎切片をオーキシン処理すると切片からのプロトン (H⁺) 放出が誘導される現象から考えられているものである。オーキシン処理により茎組織の細胞内から細胞壁アポプラストに H⁺ が放出され細胞壁内が酸性化する。この酸性化によって、ある種の細胞壁内酵素が活性化され、細胞壁を構成する多糖類の一部が分解される。その結果、細胞壁の力学的性質の変化、すなわち細胞壁のゆるみが引き起こされ、成長が誘導されると考えられている (Taiz 1984, Masuda 1990)。現在、オーキシンによる H⁺ 放出の機構として2つの仮説が考えられている。1つは、オーキシンが原形質膜上に存在する H⁺-ATP アーゼを、直接的に活性化させるというものである (Hager et al. 1971, Kasamo and Yamaki 1974)。もう1つは、オーキシンが核酸-タンパク系に

作用することにより、遺伝子発現を介して、H⁺-ATPアーゼを活性化させるというものである (Theologis 1986 and 1987)。しかし、両仮説共に問題点があり、オーキシンによる H⁺ 放出の機構については、まだ明らかになっていない。

一方、オーキシンによる茎切片の成長誘導では、茎組織のうち、特に表皮組織が重要な役割を持つことが示されている (Tanimoto and Masuda 1971, Kutschera et al. 1987)。表皮を取り除いた茎切片では、オーキシンによる成長誘導が見られず、また、オーキシンによる細胞壁のゆるみは、表皮組織でのみ見られることが報告されている。さらに、オーキシンによる成長誘導の時に見られる、細胞壁構成多糖類 (特に、ヘミセルロース性キシログルカン) の分解が、表皮組織でのみ見られることが、カボチャ下胚軸切片を用い報告されている (Wakabayashi et al. 1991)。以上の報告から、オーキシンによる H⁺ 放出についても組織特異性が考えられるが、この点については明らかでない。

本研究では、黄化カボチャ芽生え下胚軸からの切片を表皮と内部組織に分けることにより、それぞれの組織からの H⁺ 放出に対するオーキシンの効果を調べ、さらに、タンパク質合成や ATP アーゼの阻害剤を用いることにより、H⁺ 放

* 現住所：大阪市住吉区杉本3-3-138 大阪市立大学理学部生物学教室

* Present address: Dept. of Biology, Fac. of Science, Osaka City Univ. Sumiyoshi-ku, Osaka, 558 Japan

出の機構について検討した。

材料と方法

カボチャ (*Cucurbita maxima* Duch. 品種名; 芳香青皮甘栗) の種子を水道水中で10時間吸水させた後、湿ったろ紙上、暗黒下26°Cで、約48時間発芽処理を行った。次に、発芽種子を1/5濃度のHoagland液で、暗黒下26°C、48時間水耕栽培した。カボチャ芽生えのうち、下胚軸が約10cmのものを選び、下胚軸の上(伸長部位)、中、下部(それぞれ、鉤状部の下、約0.5cmから1.5cm、約3.5cmから4.5cm、約6.5cmから7.5cm)の1cmの長さの切片を切り取った。次に、ピンセットで、この切片から表皮組織(Outer tissues)を剥ぎ取り、残りを内部組織(Inner tissues)とした。剥離した表皮組織は、1層の表皮とその下の2~3層の厚角組織から成る多層表皮であった。表皮剥離後の内部組織は柔組織から成っていた。培養液は、1シャーレ4mlで、クエン酸緩衝液(1mM, pH6.5)を基本組成とし、 10^{-5} M インドール-3-酢酸(IAA)、 10^{-4} M シクロヘキシミド(CH)、 10^{-3} M ヴァナジン酸(VO_3)、 10^{-6} M フシコクシン(FC)をそれぞれ組み合わせた。各処理共、それぞれ15切片からの剥離した表皮及び内部組織を用い、暗黒下26°Cで3時間処理を行った。pHの測定は、0時間目及び3時間処理後の培養液のpHを、pHメータ(東亜電工)により測定し、その差を ΔpH として表し、 H^+ 放出の指標とした。切片の切り出し等の操作は、全て安全緑色光下で行った。

結果と考察

Table 1は、下胚軸の伸長部位の切片から単離した表皮と内部組織を、それぞれ3時間処理した時の、培養液のpHの変化を表したものである。pHの変化は、表皮の方が内部組織に比べて大きく、よりマイナス値になっていたことから、 H^+ の放出量は、表皮の方が内部組織に比べて多いものと考えられた。切片1本当りの表皮の生重量は約14mgであったのに対し、内部組織は約67mgであった。単離した表皮と内部組織から

Table 1. Effects of cycloheximide (CH), vanadate (VO_3) and fusicoccin (FC) on H^+ secretion of isolated outer and inner tissues of squash hypocotyls.

Treatment	ΔpH^*	
	Outer tissues	Inner tissues
Control	-0.30	-0.16
CH (10^{-4} M)	-0.30	-0.05
VO_3 (10^{-3} M)	-0.24	-0.15
FC (10^{-6} M)	-0.47	-0.13
FC + CH	-0.42	-0.12
FC + VO_3	-0.23	-0.11

Isolated outer and inner tissues from upper (0.5-1.5cm) region of hypocotyls were independently incubated for 3 h.

* $\Delta\text{pH} = \text{pH}$ of incubation medium after 3 h treatment - pH of incubation medium before treatment.

の H^+ 放出が、組織からの H^+ の漏出だけであったとすると、表皮に比べ約5倍の体積を持つと考えられる内部組織からの H^+ 放出の方が、表皮に比べ多くなると考えられる。従って、表皮組織からの H^+ 放出は、何らかの能動的な H^+ 放出機構によるものと考えられる。一方、表皮からの H^+ 放出は、タンパク質合成の阻害剤であるシクロヘキシミドでは抑制されず、 H^+ -ATPアーゼの活性阻害剤であるヴァナジン酸でわずかに抑制されていた。この結果から、表皮からの H^+ 放出は、少なくとも、*de novo*のタンパク合成を必要としないシステムである可能性が考えられた。次に、 H^+ -ATPアーゼ(プロトンポンプ)の活性促進効果を持つフシコクシンの効果を調べた。フシコクシンによる培養液の酸性化は、表皮組織でのみ見られたことから、フシコクシン感受性のプロトンポンプは表皮組織のみに存在するものと考えられた。このフシコクシンの効果は、ヴァナジン酸で抑制されており、シクロヘキシミドで抑制されなかったことから、フシコクシンの作用がプロトンポンプの直接的活性化を介した反応であることが確かめられた。

Table 2. Effects of IAA on H⁺ secretion of isolated outer and inner tissues from upper, middle and basal regions of squash hypocotyls.

Region*	IAA (10 ⁻⁵ M)	Δ pH	
		Outer tissues	Inner tissues
0.5 - 1.5 cm (upper)	-	- 0.29	- 0.13
	+	- 0.39	- 0.16
3.5 - 4.5 cm (middle)	-	- 0.36	- 0.17
	+	- 0.39	- 0.17
6.5 - 7.5 cm (basal)	-	- 0.37	- 0.15
	+	- 0.41	- 0.18

Isolated outer and inner tissues were independently incubated for 3 h.

*, Below the cotyledonary node.

Table 2 は、下胚軸の各部位でのH⁺放出に対する IAA の効果を示している。どの部位でも、培養液の酸性化は表皮組織で大きくなっていった。IAA の効果は、伸長部位 (0.5~1.5cm) の表皮組織で最も大きく、下部では小さくなっていった。一方、内部組織では各部位とも、IAA の効果はほとんど見られなかった。この結果から、H⁺放出の促進作用において成長の盛んな部位の表皮組織で、IAA に対する感受性が高いものと考えられた。IAA による茎切片の成長促進作用においても、IAA の効果は伸長部位から切り取った切片でしか見られないことから (Sakurai and Masuda 1978, Nishitani and Masuda 1979), IAA による表皮組織からのH⁺放出の促進が成長促進に関与している可能性が示唆された。そこで、次に、IAA の効果が大きい伸長部位の切片からの表皮組織を用い、IAA によるH⁺放出の誘導に対するシクロヘキシミドの影響を調べた (Table 3)。シクロヘキシミドは、Table 1 の結果と同じく、IAA を与えない場合での表皮からのH⁺放出には影響しなかったが、IAA によるH⁺放出の促進を抑えていた。この結果から、表皮組織でIAA によるH⁺放出の促進作用には、*de novo* のタンパク合成が必要であることが示唆された。Theologis (1987) は、オーキシンによるH⁺放出の促進には、オーキシンによって新たに誘導さ

Table 3. Effects of cycloheximide (CH) on IAA-induced H⁺ secretion of isolated outer tissues of squash hypocotyls.

Treatment	Δ pH
-IAA	- 0.38
+IAA (10 ⁻⁵ M)	- 0.53
-IAA+CH (10 ⁻⁴ M)	- 0.38
+IAA+CH	- 0.41

Isolated outer tissues from upper region of hypocotyls were incubated for 3 h.

れる遺伝子が関与している可能性を示しており、*de novo* のタンパク合成の必要性を示唆している。今回の結果は、Theologis (1987) の結果を支持するものと考えられ、さらに、H⁺放出の促進に関与する遺伝子は、表皮組織でのみ誘導されるものである可能性が考えられた。

摘 要

茎組織からのH⁺放出では、表皮が dominant 組織であることが明らかになった。さらに、表皮組織からのH⁺放出には、複数の機構が関与していると考えられた。1 つは、*de novo* のタンパク合成を必要としないシステム、2 つめは、

フシコクシン感受性プロトンポンプを介するシステム, 3つめは, *de novo* のタンパク合成を必要とするシステムである。オーキシンは, 少なくとも, 3つめのシステムを活性化することにより, H^+ 放出を促進している可能性が考えられた。さらに, この3つめのシステムは茎の成長部位で, 活性が高いものと考えられた。

文 献

- Hager, A., H. Merzel and A. Krauss. 1971. Versuche und Hypothesen zur Primarwirkung des Auxins beim Streckungwachstum. *Planta* 100: 47-75.
- Kasamo, K. and T. Yamaki. 1974. Effect of auxin on Mg^{2+} -activated and -inhibited ATPases from mung bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 15: 965-970.
- Kutschera, U., R. Bergfeld and P. Schopfer. 1987. Cooperation of epidermis and inner tissues in auxin-mediated growth of maize coleoptiles. *Planta* 170: 168-180.
- Masuda, Y. 1990. Auxin-induced cell elongation and wall changes. *Bot. Mag. Tokyo* 103: 345-370.
- Nishitani, K. and Y. Masuda. 1979. Growth and cell wall changes in azuki bean epicotyls I. Changes in wall polysaccharides during intact growth. *Plant Cell Physiol.* 20: 63-74.
- Rayle, D. L. and R. Cleland. 1970. Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiol.* 46: 250-253.
- Sakurai, N. and Y. Masuda. 1978. Auxin-induced extension, cell wall loosening and changes in the wall polysaccharide content of barley coleoptile segments. *Plant Cell Physiol.* 19: 1225-1233.
- Taiz, L. 1984. Plant cell expansion: Regulation of cell wall mechanical properties. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 585-657.
- Tanimoto, E. and Y. Masuda. 1971. Role of the epidermis in auxin-induced elongation of light-grown pea stem segments. *Plant Cell Physiol.* 12: 663-673.
- Theologis, A. 1986. Rapid gene regulation by auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 407-438.
- Theologis, A. 1987. Possible link between auxin regulated gene expression, H^+ secretion, and cell elongation: A hypothesis. In D. J. Cosgrove and D. P. Knievel (eds.), *Physiology of Cell Expansion During Plant Growth*. American Society of Plant Physiologist, Rockville, MD, pp. 133-144.
- Wakabayashi, K., N. Sakurai and S. Kuraishi. 1991. Differential effect of auxin on molecular weight distribution of xyloglucans in cell walls of outer and inner tissues from segments of dark grown squash (*Cucurbita maxima* Duch.) hypocotyls. *Plant Physiol.* 95: 1070-1076.