

## Space Seed – 微小重力環境下におけるシロイヌナズナの生殖成長

須藤宇道 (富山大・院・理工), 唐原一郎 (富山大・院・理工), 山口 駿 (富山大・理・生物), 玉置大介 (兵庫県立大・院・生命理学), 矢野幸子 (宇宙航空研究開発機構), 谷垣文章 (宇宙航空研究開発機構), 島津 徹 (日本宇宙フォーラム), 福井啓二 (日本宇宙フォーラム), 笠原春夫 (有人宇宙システム株式会社), 梶田大輔 (有人宇宙システム株式会社), 山内大輔 (兵庫県立大・院・生命理学), 竹内美由紀 (兵庫県立大・院・生命理学), 峰雪芳宣 (兵庫県立大・院・生命理学), 上杉健太郎 (高輝度光科学研究センター), 笠原宏一 (東海大・生物理工・生物工学), 山田晃弘 (東京大), 西谷和彦 (東北大・院・生命科学), 保尊隆享 (大阪市立大・院・理), 西内 巧 (金沢大・学際科学実験センター), 神阪盛一郎 (富山大・院・理工)

### Space Seed - Reproductive growth of Arabidopsis under Microgravity

Takamichi Suto<sup>1</sup>, Ichirou Karahara<sup>1</sup>, Takashi Yamaguchi<sup>2</sup>, Daisuke Tamaoki<sup>3</sup>, Sachiko Yano<sup>4</sup>, Fumiaki Tanigaki<sup>4</sup>, Toru Shimazu<sup>5</sup>, Keiji Fukui<sup>5</sup>, Haruo Kasahara<sup>6</sup>, Daisuke Masuda<sup>6</sup>, Daisuke Yamauchi<sup>3</sup>, Miyuki Takeuchi<sup>3</sup>, Yoshinobu Mineyuki<sup>3</sup>, Kentaro Uesugi<sup>7</sup>, Hirokazu Kasahara<sup>8</sup>, Mitsuhiro Yamada<sup>9</sup>, Kazuhiko Nishitani<sup>10</sup>, Takayuki Hoson<sup>11</sup>, Takumi Nishiuchi<sup>12</sup>, Seiichiro Kamisaka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, Gofuku, Toyama, 930-8555 Japan

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, University of Toyama, <sup>3</sup>University of Hyogo, <sup>4</sup>Japan Aerospace Exploration Agency, <sup>5</sup>Japan Space Forum, <sup>6</sup>Japan Manned Space System Ltd., <sup>7</sup>Japan Synchrotron Radiation Research Institute, <sup>8</sup>Tokai University, <sup>9</sup>University of Tokyo, <sup>10</sup>Tohoku University, <sup>11</sup>Osaka City University, <sup>12</sup>Kanazawa University

E-Mail: karahara@sci.u-toyama.ac.jp

Abstract: Gravity is considered to be one of the most important environmental factors for growth and development of plants throughout their life cycle. We have designed an experiment, which is called Space Seed, to investigate the effects of microgravity on the seed to seed life cycle of plants. We have carried out this experiment using a newly developed apparatus, which is called the Plant Experiment Unit (PEU) and installed in the Cell Biology Experiment Facility (CBEF) onboard International Space Station (ISS) KIBO module. The CBEF is equipped with a turntable generating artificial gravity to perform 1-G control experiment as well as micro-G experiment on board. *Arabidopsis* seeds sown on dry rockwool in 8 PEUs were transported from Kennedy Space Center to the ISS by Space Shuttle Discovery in STS-128 (17A) mission. This experiment was started on September 10, 2009 and terminated on November 11, 2009. *Arabidopsis* seeds successfully germinated, and the plants passed through both vegetative and reproductive processes, such as formation of rosette leaves, bolting of inflorescence stems, flowering, formation of siliques and seeds. Morphometric analyses of the plants on board were performed and obtained parameters were compared among micro-G plants, 1-G control, and the ground control.

**Key words;** Life cycle, Reproductive growth, Microgravity, *Arabidopsis*

#### 1、序論

陸上植物は置かれた環境の変化が不都合であっても、動物と違い逃げるができないため、変化した環境に自らの生活環をうまく順応させながら進化してきた。植物が水中から陸上に進出した際、その体にかかる重力は増加したが、植物は重力に抗して、遺伝子発現の調節を通じて(Tamaoki et al. 2009), 細胞レベルでは細胞壁の力学的性質を変化させ(Hoson et al. 2002, Soga et al. 1999, 2001)、また組織レベルでは支持組織を発達させること(Tamaoki et al. 2006, Nakabayashi et al. 2006, Karahara et al. 2009)などによ

り、重力に適応してきたと考えられる。重力は植物の成長を含め形態形成や代謝過程全般に深く影響を与えていると考えられ、その影響を調べることは陸上植物の進化の仕組みを探る上で重要であるとともに、人類が宇宙進出するためにも必須の課題でもある。

高等植物の生活環ではまず栄養成長が起こり、その後生殖成長が起こる。重力が栄養成長にあたる影響は細胞壁に着目し、短期のものを中心としてこれまでに研究が進められてきたが(保尊ら 2003)、生殖成長に与える影響については特に長期間重力条

件を変化させる実験が必要であるため、まだよくわかっていない。

植物の生活環のうち生殖成長に着目した宇宙実験は何度か行われており、80年代以降 Kosmos、Salyut や Mir においていくつかの植物種の生活環を全うさせることに成功はしており、種子の収量の低下などが報告されている(Mashinsky et al. 1994)。軌道上実験に関する栽培条件の問題については Musgrave ら (1997)により考察された。これらをふまえて一連の実験(STS-51, 54) (Musgrave et al. 1997) をはじめとして、軌道上での栽培条件についてアブラナ(*Brassica rapa* L.)を用いてさらなる検討がなされ改善されてきた(Musgrave et al. 2000)。また国際宇宙ステーションにおいてもシロイヌナズナを用いて Seed to Seed の実験は行われ、種子が収穫された(Link et al. 2003)。しかしこれらの実験の解析結果は地上での対照実験と比較して行われたものであり、軌道上対照区との詳細な比較検討が待たれていた。

そこで軌道上対照区との比較をふまえた上で、植物が宇宙環境において発芽し、栄養成長を行い、花芽の形成・開花・結実といった生殖成長を正常に行い、生活環を全うできるか否かを調べるために、国際宇宙ステーションの「きぼう」での植物の生育実験「微小重力環境下における高等植物の生活環」(通称 Space Seed)が計画され、実施された(神阪ら 2010)。「きぼう」モジュール内に設置した細胞培養装置 (Cell Biology Experiment Facility: CBEF) は微小重力実験区とターンテーブルを持つ人工重力区を備え、庫内の温度・湿度を一定に保つことの出来るインキュベータで、微小重力条件下での対照実験ができることが特徴である。本研究では、このターンテーブルを用いた軌道上 1 G 区、 $\mu$  G 区、および地上対照区の間でまずは植物体の外部形態を比較した。突然変異体と野生型をともに栽培した容器もあるが、ここでは野生型の結果のみに着目した。解析はまだ進行中であるが、現時点でわかっていることを報告する。

## 2、材料と方法

### 植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh ecotype Columbia) 種子を、1% (w/v) のアラビアゴム水溶液でロックウール (ニチアス、東京) (厚さ 10mm) の表面に接着し、スペースシャトルの打ち上げ時に震動によって種子がはがれ落ちることのないようにした。

### 実験装置

きぼうの CBEF には植物実験ユニット ( Plant Experiment Unit: PEU) を設置し、植物はその中のポリカーボネイト製の植物栽培容器 (5 cm 立方) 内で栽培した。PEU には観察用 CCD カメラ、発光ダイオード (LED) 照明、換気ポンプ、給水ポンプ、給水用バッグ (容量 100 ml) 、赤外線反射方式の水分センサーが設置した。さらに植物栽培容器内に温度・湿度センサーを設置して、環境をモニターした。

PEU はきぼうの CBEF 内の  $\mu$  G 区と 1 G 区のターンテーブルにそれぞれ 4 個ずつ取り付け、地上対照区として富山大学と筑波宇宙センターに 4 個ずつ設置した。

### 実験期間

きぼうの CBEF に設置した PEU は 2009 年 9 月 10 日から運転を開始し、地上対照区としては富山では宇宙実験区における不測の事態に対応するため 4 日遅らせて、恒温恒湿インキュベータ (LPH-200-RDS, 日本医化, 大阪) を用い 2009 年 9 月 14 日から開始した。筑波では CBEF を用い 6 月 10 日から運転を開始した。実験開始日を 1 日目として栽培日数を表した。短期実験としては、PEU の運転開始から 33 日目にサンプルを収穫し FAA 固定液中に浸し固定し観察した。長期実験としては PEU を 62 日間運転させ、サンプルを収穫し観察した。

## 3、結果と考察

### 軌道上でのシロイヌナズナの成長の観察

きぼうからのダウンリンクにより画像を取得することで軌道上でのシロイヌナズナの成長を観察し、富山の地上対照区と比較した。種子の発芽は、 $\mu$  G、宇宙 1 G 区、および地上対照区のいずれの場合でも、最も早い個体では実験開始後 3 日目に観察された。実験開始後 10 日目には多くの発芽が確認できた。このことは、発芽には重力の影響がほとんど認められないというクリノスタット (Miyamoto et al. 1999) や過重力実験 (Waldron and Brett 1990) の結果と一致する。

ロゼット葉の発生はいずれの実験区においても実験開始後 7 日目に確認された。発生のタイミングには  $\mu$  G と宇宙 1 G 区ではっきりとした違いは認められなかった。実験開始後 19 日目に花茎の最初のボルティングが  $\mu$  G 区および地上対照区で起こり、宇宙 1 G 区では 21 日目におこった。宇宙 1 G 区では最初のボルティングが 2 日遅れた。ボルティングした個体の割合を 28 日目に容器ごとに調べ、実験区の間で比較したところ、有意差は見られなかったものの、 $\mu$  G 区では他と比べてその割合がやや高くなる傾向は

見られた。また最初の開花 (Boyes ら(2001)による成長ステージ No. 6.00) が確認されたのは  $\mu G$  区では実験開始後 20 日目、宇宙 1 G 区では早くとも 27 日目、地上対照区では 22 日目であった。以上のことから、宇宙 1 G 区と比べると  $\mu G$  区ではボルディングをはじめとする生殖成長の開始がやや早まった可能性が示唆される。

また宇宙 1 G 区では成熟したロゼット葉は被覆板の表面に接して葉が平たく配置されていたが、 $\mu G$  区では葉が被覆板の上でこんもりと盛り上がっているように茂っていた。この原因は、宇宙 1 G 区では葉柄が葉の重みを十分に支えることが出来ないためと考えられる。

#### フライト終了後に行った植物試料の形態計測

宇宙での実験が終了し、地上に降ろされた長期実験の植物栽培容器を開封し、容器ごとに発芽した個体およびボルディングした個体の割合を調べたところ、 $\mu G$  区、宇宙 1 G 区、地上対照区の間で大きな差は認められなかった。栄養成長 期間の指標となるロゼット葉の枚数についても有意な差は認められなかった。

短期実験と長期実験それぞれが終わった試料において、植物体の花茎長を計測した結果、短期実験の場合、宇宙 1 G 区に比べて  $\mu G$  区では花茎長は有意に大きかった。しかし長期実験においては容器ごとのばらつきをこえる有意な差は認められなかった。このことは花茎の初期成長は  $\mu G$  において促進されたが、最終的な花茎長には差がなくなったことを示している。

次に長角果の数および種子数を調べた。ボルディングした個体あたりの長角果の数は、 $\mu G$  区においては他の実験区と比べて多い傾向が見られた。一方、長角果の長さは、宇宙実験区 (きぼう内で生育させた  $\mu G$  および宇宙 1 G 区)においては、地上対照区と比べて有意ではないものの短くなる傾向が見られた。これは地上と宇宙で生育させた場合、長角果の成熟度合いに違いがあったことによると考えられる。

現在、形成された種子に関して、種子数、種子重量、種子の外部形態、SPring-8 の X 線 CT による種子内部構造、発芽能力等を解析中である。

#### 4、まとめ

$\mu G$  区と宇宙 1 G 区いずれにおいても、種子の発芽、ロゼット葉の形成、ボルディング、開花、長角果 および種子の形成が確認され、宇宙においてもシロイヌナズナが生活環を全うすることが確認された。栄養成長の段階では、ロゼット葉の枚数については実

験区間に有意な差はみられなかった。

生殖成長の過程については、短期実験の試料において、宇宙 1 G 区と比べると、花茎長が  $\mu G$  区において有意に大きかったのは、ボルディングの開始が早まったためである可能性が考えられる。また開花のタイミングも  $\mu G$  区において早まる傾向が見られた。従って生殖成長の開始もしくは初期段階は微小重力下において早まるか、もしくは促進される可能性が示唆された。過重力環境下では花茎の成長自体が抑制されることが報告されているので(Soga et al. 1999, 2001, Tamaoki et al. 2006)、成長速度についてはさらなるデータ解析が必要である。

生殖成長の後期におこる長角果形成においては、宇宙実験区内における差よりも、地上対照区と宇宙実験区内の間で顕著な差が確認された。長角果の長さが宇宙実験区で有意に低下した。しかし花の形態は実験区間に顕著な違いは見られず、またボルディングした個体あたりの長角果数は、地上対照区と比べると宇宙実験区ではむしろ多い傾向がみられたので、花芽形成の段階までに、宇宙実験区において負の影響があったとは考えにくい。従って、宇宙実験区ではその後の過程における何らかの原因により長角果の成熟度合いが低下したと考えられる。宇宙実験区においては、実験終了後でも長角果や花茎に緑色を残した試料が地上実験区と比べると多く見られたことから、長角果の成熟が何らかの原因により遅れたため、未熟なまま収穫することになってしまった可能性がある。

#### 5、謝辞

本研究は、科研費 (21570064, 21657011)、(独)宇宙航空研究開発機構および(財)日本宇宙フォーラムの助成を受けたものである。

#### 6、参考文献

- 1) Boyes D. C., Zayed A. M., Ascenzi R., McCaskill A. J., Hoffman N. E., Davis K., Gorchach J. *Plant Cell* **13**, 1499–1510 (2001)
- 2) Hoson T., Soga K., Mori R., Saiki M., Nakamura Y., Wakabayashi K., Kamisaka S. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 1067–1071 (2002)
- 3) Karahara, I., Tamaoki, D., Nishiuchi, T., Schreiber, L., Kamisaka, S., *Biol. Sci. Space*, **23**, 177-182 (2009)
- 4) Link B. M., Durst S. J., Zhou W., Stankovic B. *Adv.*

*Space Res.* **31**, 2237-2243 (2003)

- 5) Mashinsky A., Ivanova I., Derendyaeva T., Nechitailo G., Salisbury F. *Adv. Space Res.* **14**, 13–19 (1994)
- 6) Miyamoto K., Yamamoto R., Fujii S., Soga K., Hoson T., Shimazu T., Masuda Y., Kamisaka S., Ueda J. *J. Plant Res.* **112**, 413–418 (2006)
- 7) Musgrave M. E., Kuang A., Xiao Y., Stout S. C., Bingham G. E., Briarty L. G., Levenskikh M. A., Sychev V. N., Podolski I. G. *Planta* **210**, 400–409 (2000)
- 8) Nakabayashi I., Karahara I., Tamaoki D., Masuda K., Wakasugi T., Yamada K., Soga K., Hoson T., Kamisaka S. *Ann. Bot.* **97**:1083-1090 (2006)
- 9) Soga K., Wakabayashi K., Hoson T., Kamisaka S. *Plant Cell Physiol.*, **40**, 581–585 (1999)
- 10) Soga K., Wakabayashi K., Hoson T., Kamisaka S. *Adv. Space Res.*, **27**, 1011–1016 (2001)
- 11) Tamaoki, D., Karahara, I., Nishiuchi, T., Oliveira, SD., Schreiber, L., Wakasugi, T., Yamada, K., Yamaguchi, K. and Kamisaka, S. *Adv. Space Res.* **44**: 245-253 (2009).
- 12) Tamaoki D., Karahara I., Schreiber L., Wakasugi T., Yamada K., Kamisaka S. *J. Plant Res.* **119**, 79–84 (2006)
- 13) Waldron K.W., Brett C.T. *J. Exp. Bot.* **41**, 71-77 (1990)
- 14) 保尊隆享, 若林和幸, 曾我康一 *宇宙生物科学* **17**, 135–143 (2003)
- 15) 神阪盛一郎, 唐原一郎, 笠原宏一, 山田晃弘, 矢野幸子, 谷垣文章, 笠原春夫, 榎田大輔, 島津徹, 福井啓二, 西谷和彦, 保尊隆享 *生物工程学*, **88**, 288-291 (2010)