

高等植物の生活環と重力環境 — 過重力環境が生殖生長に与える影響 —

富山大・院・理工 玉置大介、唐原一郎、若杉達也、山田恭司、神阪盛一郎
金沢大・学際センター・ゲノム 西内巧、山口和男

Life cycle of higher plants under gravitational condition - Effect of hypergravity on reproductive growth in *Arabidopsis* -

Daisuke Tamaoki¹, Ichirou Karahara¹, Takumi Nishiuchi², Tatsuya Wakasugi¹, Kyoji Yamada¹, Kazuo Yamaguchi², Seiichiro Kamisaka¹

¹Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, Gofuku, Toyama, 930-8555 Japan

²Division of Functional Genomics, Advanced Science Research Center, Kanazawa University Takara-machi, Kanazawa, 920-0934 Japan

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

Abstract: Plant life cycle consists of successive phases of vegetative and reproductive growth. The effects of altered gravity conditions on reproductive growth is poorly understood compared to vegetative growth, although understanding the effects is especially important not only to reveal how plants evolved under gravity on earth but to develop agriculture in space. In the present study, we examined the effects of hypergravity conditions on gene expression during reproductive growth in *Arabidopsis*. Microarray analysis (44K) was performed to identify genes that are modulated in expression in response to hypergravity treatment in flower buds. Plants were grown for 20-26 days before exposure to hypergravity at 300 x g for 24 h. Total RNA was isolated from the flower buds (stage 1-12 according to Smyth et al. (1990)) after hypergravity treatment. Our results showed that several genes involved in reproductive growth were expressed at less than 0.2-fold levels under hypergravity condition, suggesting that expression of genes involved in flower, embryo, and seed development was suppressed under hypergravity.

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

1、序論

植物は動物のように動き回ることができないため、おかれた環境の変化に対してその生活環をいかにうまく順応させるかは、生存のために大きな鍵を握る。植物は、地球上で常にほぼ一定の大きさで存在する重力環境下において生活環を全うできるように進化してきた。従って、重力環境が植物の生活環に与える影響を調べることは、地球上の重力環境が植物の形態形成や代謝過程にどのように関わってきたかという、植物学上の重要な課題の解明のために重要である。

その一方で、人類が宇宙へと進出するためのプランは近年具体化してきており、宇宙での作物生産の実現は、夢の段階から実施の可能性を具体的に検討すべき時期に来ている。その中で植物学者に課せられた課題は、植物が宇宙で正常に生活環を全うすることができるか否かを、またできないとすればその原因を明らかにし、実現への方策を提示することである。高等植物の生活環においてはまず栄養生長が起こり、続いて生殖生長へと移行する。重力環境が栄養生長に与える影響についての研究は、細胞壁に与える影響を中心として、

これまでに比較的進んでいるが(保尊ら 2003)、生殖生長に与える影響についてはまだよくわかっていない。

これまでに生殖生長に着目した宇宙実験は何度か行われている。80年代には saljut においていくつかの植物種を用いて軌道上で生活環を全うさせることに成功してはいるが、種子の収量の低下などの異常が報告されている(Mashinsky et al. 1994)。またこれを含めて、初期の軌道上実験に関する栽培条件の問題について Musgrave らにより考察されており(Musgrave et al. 1997)、これらをふまえて行われた1993年の Musgrave らの一連の実験(STS-51, 54)をはじめとして(Musgrave et al. 1997)、軌道上での栽培条件についてさらなる検討がなされ、改善されてきた(Musgrave et al. 2000)。

筆者らは重力環境が植物の生殖生長に与える影響について解析するために、遠心機による過重力処理を植物に比較的長時間与える実験系を用いて、過重力が栄養生長に与える影響を調べてきた(Tamaoki et al. 2006)。花芽の発達は細かいステージに分かれており、発達の過程で多くの遺伝子が関与する。重力環境が生殖生長における膨大なステ

ップのうち、いずれのステップに影響を与えるのかについて手がかりを得るためには、マイクロアレイ解析が威力を発揮する。そこで我々は、先行研究で得られた知見を検証し、さらに分子レベルまで踏み込むことを目的とし、その第一歩として、マイクロアレイ(44K)を用いて、これまでに確立した長時間の過重力環境が生殖生長における遺伝子発現に与える影響について網羅的な解析を試みた。まだ予備的ではあるが、これまでに得られた結果について発表する。

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、試験管に入れたムランゲ・スチーク寒天培地上に播種し、低温処理後、20-26 日間、23°Cで白色光下 ($130 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) で生育させた。花茎が 5 mm の長さになった植物 (Boyes ら(2001)の発達段階の分類によれば Stage No. 5 に相当する。また Smyth ら(1990)の花の発達段階の分類によると Stage 1-12 に相当する) を選び、遠心機を用いて 25°Cの条件で 300 x g の過重力を茎から根の方向に向けて 24 時間与えた (過重力処理区)。1 x g 対照区としては、25°Cの条件で暗所で 24 時間静置した。植物体はさらに白色光下で 3 日間生育させた。

RNA 抽出

Plant RNA Isolation Mini kit (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)を用いて、1 x g および 300 x g 処理を 24 時間行った直後の植物体の花芽から total RNA を抽出した。

マイクロアレイ解析

Arabidopsis 3 (44k) オリゴDNA マイクロアレイキット (Agilent Technologies, Palo Alto, US) を用いて遺伝子発現プロファイリングを行った。1 x g および 300 x g それぞれの処理条件で抽出した RNA を鋳型として、cDNA 合成し、さらに cRNA の合成時に、蛍光色素(Cy3)で標識し、それぞれ異なるマイクロアレイにハイブリダイゼーションさせた。生物学的には 1 回の実験のみを行った。それぞれのアレイ数値化データから、1 x g 条件における遺伝子発現レベルに対する 300 x g 条件における発現レベルの比 (300 x g / 1 x g : fold change) を算出した。

3、結果と考察

過重力処理直後の花芽において、対照区と比べて 314 の遺伝子の発現が 5 倍以上に増加し、225 の遺伝子の発現が 1/5 以下に減少した。今回は生物学的にはまだ 1 回の実験であるため、過重力刺激によって 5 倍以上または 1/5 以下に発現が変化した遺伝子についてのみ考察する。過重力処理によって 5 倍以上に発現増加した遺伝子には、フェニルプロパノイドやフラボノイド合成に関与する遺伝子が高い割合で含まれていることがわかった。一方、1/5 以下に減少した遺伝子では生殖 (胚および種子の発達)に関与する遺伝子が高い割合で含まれていることがわかった。

過重力刺激によって 5 倍以上発現が変化した遺伝子については以下である。Flavonol synthase や Chalcone synthase のようなフラボノイド合成に関わる 7 つの遺伝子の発現が上昇していることがわかった。このことから過重力刺激によってフラボノイド合成が促進している可能性が示唆された。また 6 つのエクспанシン遺伝子の発現も過重力刺激によって増加した。エクспанシンは細胞壁のゆるみを引き起こすことが知られている (McQueen-Mason and Cosgrove 1994)。過重力刺激によってエクспанシン遺伝子が発現増加したことから、花芽においては過重力刺激によって細胞伸長が促進される可能性が考えられる。このことは形態観察により確認する必要がある。また Lipid transfer protein をコードするいくつかの遺伝子も過重力刺激によって発現が増加した。

過重力刺激によって 1/5 以下に発現が減少した遺伝子には、花および種子の発達に関与する遺伝子が含まれており、過重力処理によって生殖器官の発達が抑制される可能性が示唆された。また種子タンパク質として知られている Late Embryogenesis Abundant (LEA) タンパク質をコードする 5 つの遺伝子の発現が減少していた。LEA タンパク質はアブシジン酸 (ABA)によってその蓄積が誘導されることが知られている (Bostock and Quatrano 1992)。そこで、ABA の生合成およびシグナリングに関与する遺伝子に着目すると、5 つの遺伝子の発現が 1/5 以下に減少していることがわかった。このことから ABA のシグナリングは過重力処理によって抑制的に制御されている可能性が示唆された。ABA は LEA タンパク質だけではなく、貯蔵タンパク質の蓄積を誘導することがわかっているが (McCarty 1995)、本研究の結果より、過重力処理によって ABA のシグナリングが低下し、貯蔵タンパク質の蓄積が抑制される可能性が考えられる。このことは、微小重力環境下においては種

子中のタンパク質を含む有用な貯蔵物質の産出量が増加する可能性を示唆する。一方で、1997年に行われたSTS-84の実験において、種子の形態観察を行い微小重力処理区と地上対象区において比較したところ、微小重力処理区においてはプロテインボディの形態が変化したことや、地上対象区では見られなかったデンプン粒が見られるようになるなど、種子の貯蔵物質の蓄積に変化がoccurすることをMusgraveら(2000)は報告している。本研究の結果はこのMusgraveらの報告を支持している。

重力環境が生殖生長に与える影響についてはまだ余り調べられていない理由の一つに、高等植物の生殖生長は生活環の終盤で起きるイベントであるため、重力環境を長時間変化させる必要があり、それが技術的に困難であったことが挙げられる。特に、宇宙実験の場合、長期間の実験となると宇宙ステーションでの実験の実施が必要となる。そこで私たちは、より信頼性の高い栽培装置と軌道上対照区を用いて、宇宙ステーションで微小重力環境が植物の生活環と生殖生長に与える影響について、より精度の高い実験を行うことを目指して準備している。

本研究は宇宙環境利用科学委員会研究ワーキンググループの研究費支援を得て行われたものである。

参考文献

- 1) Bostock R.M., Quatrano R.S. *Plant Physiol.* **98**, 1356–1363 (1992)
- 2) Boyes D. C., Zayed A. M., Ascenzi R., McCaskill A. J., Hoffman N. E., Davis K., Gorlach J. *Plant Cell* **13**, 1499–1510 (2001)
- 3) McCarty, D. R. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 71–93 (1995)
- 4) Mashinsky A., Ivanova I., Derendyaeva T., Nechitailo G., Salisbury F. *Adv. Space Res.* **14**, 13–19 (1994)
- 5) McQueen-Mason S., Cosgrove D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 6574–6578 (1994)
- 6) Musgrave M., Kuang A., Matthews S. *Planta* **203**, s117–s184 (1997)
- 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 (2006)
- 8) Tamaoki D., Karahara I., Schreiber L., Wakasugi T., Yamada K., Kamisaka S. *J. Plant Res.* **119**, 79–84 (2006)
- 9) Smyth D., Bowman J., Myerowitz E. *Plant Cell* **2**, 755–767 (1990)
- 10) 保尊隆享, 若林和幸, 曾我康一 宇宙生物学 **17**, 135–143 (2003)