

## シロイヌナズナを用いた支持組織形成に関わる遺伝子機能解明を目指した宇宙実験 “Cell Wall Experiment” の概要

小泉 健人 (東北大・院・生命科学), 横山 隆亮 (東北大・院・生命科学), 鎌田 源司 (JAXA), 大森 克徳 (JAXA), 石岡 憲昭 (JAXA), 嶋津 徹 (JSF), 西谷 和彦 (東北大・院・生命科学)

### Outline of the Space Experiment “Cell Wall Experiment”, Aimed at Exploring Genes Responsible for Supporting Tissue Formation in *Arabidopsis thaliana*

Kento Koizumi<sup>1</sup>, Ryusuke Yokoyama<sup>1</sup>, Motoshi Kamada<sup>2</sup>, Katsunori Omori<sup>2</sup>, Noriaki Ishioka<sup>2</sup>, Toru Shimazu<sup>3</sup>, and Kazuhiko Nishitani<sup>1</sup>

1 Department of Developmental Biology and Neurosciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan

2 Department of Space Biology and Microgravity Sciences, and ISS Science Project Office, Institute of Space and Astronautical Science, Japan Aerospace Exploration Agency, 2-1-1 Sengen, Tsukuba, Ibaraki 305-8505, Japan

3 Technology and Research Promotion Department, Japan Space Forum, 2-2-1 Otemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004, Japan

**Abstract:** In February 2008, “Cell Wall Experiment” is scheduled to be launched and conducted using EMCS in ISS. The main aim of this experiment is to elucidate the molecular mechanism by which supporting tissues in land plants are constructed and maintained in response to gravitational conditions. In this paper, an outline of our space experiment and biological background are described, together with a perspective of how this project will contribute to both pure and applied life sciences.

#### はじめに

約四億年前、体内の水分の蒸発を防ぐクチクラ層を表皮細胞壁の外郭に獲得した祖先植物は、陸上への進出を開始し、瞬く間に地表を覆い尽くした。植物は、動物とは異なり自発的に移動するという生き方を選択しなかったため、水分や養分、そしてエネルギー源である光を求めて隣接個体と競うために、より高く、大きく成長するという戦略を採用し、大型化の一途をたどった。その際、それまでは水中での浮遊生活に適応していた祖先植物が克服しなければならなかった最大の課題として、1g という重力環境への適応が挙げられる。個体サイズが大型化するに従い、そのような大きな個体を頑強に支えるという必要性が生じた。水中での生活時には存在し得なかった、1g 環境下で“自己を支える”という新たな必要性は、植物が支持組織という、自重の支持に極めて特化した器官を進化させる結果となった。我々の研究室では、圏外宇宙空間や他の惑星地表など、1g 以外の重力環境下で生育できるような植物体のデザインを最終目標に掲げ、支持組織細胞壁の構築における分子機構を明らかにしようとしている。この研究は、第五回ライフサイエンス宇宙実験公募の実験課題“Cell Wall Experiment - Reverse genetic approach to exploring genes responsible for cell-wall dynamics in supporting tissues of *Arabidopsis* under microgravity conditions”として採択され、国際宇宙ステーションに

おいて本年二月に開始されることが予定されている。本稿では、宇宙実験 *Cell Wall Experiment* の概要とそれに至るまでの背景、また本実験に向けて地上で行ってきた予備実験で得られた知見を紹介したい。

#### 重力環境への適応

植物が重力シグナルに対して多彩な応答を示すことは、かなり昔から詳細に報告されてきた。その先駆けとなるのは、ダーウィンの著書『*The Power of Movement in Plant*』だろう。1880年に出版されたこの著書の中では、植物の地上部が反重力方向に成長する姿が、様々な視点から詳細に報告されている。そしてこの研究は、オーキシシンという植物の成長制御ホルモンの発見に繋がった。ダーウィンが報告した重力屈性という植物の特徴は、急速にその分子メカニズムの解明が進められ、現在ではかなりの部分まで理解されるようになった。重力屈性は、植物が重力という信号に対して直接応答する反応であると理解できる。

一方、前述の通り“自己を支える”という概念は重力環境におかれてはじめて登場することを踏まえると、植物が自己支持に特化した構造である支持組織を進化させた過程もまた、重力環境への応答の一つと捉えることが出来る。しかしこのプロセスにおいては、植物は重力信号に直接応答しているわけではない。この場合、植物は重力が存在して初めて登

場する“自身の荷重”という要因に応答していることになり、重力屈性のような応答とは区別する必要がある。植物個体が自己の支持を巧妙に実現する、すなわち支持組織を構築・統御する過程は、これまでに飛躍的に理解が進んだ重力屈性のような反応に比べて、脚光を浴びることが少なかった。陸上植物が高く成長していくプロセスにおいて、重力屈性により成長の方向性を定める必要があるのはもちろんであるが、それには自身の“土台”となる支持組織がしっかり形成されているという大前提がある。以上のような観点から、我々は支持組織に注目し、その構築・維持機構を明らかにしようとしている。

### シロイヌナズナの細胞壁関連遺伝子群

本研究では、シロイヌナズナをモデル植物として、支持組織細胞壁構築機構の解明を目指している。そのための第一段階として、一般に細胞壁の構築・統御に関わっていると推定できる遺伝子群を選抜し、これらを細胞壁関連遺伝子群とした。これらをアミノ酸配列に基づいていくつかの遺伝子ファミリーに分類した結果を表1に示す。

表1. 細胞壁関連遺伝子ファミリー

遺伝子ファミリー名	メンバー数
cellulose synthase	40
callose/glucan synthase	12
$\alpha$ -xylosyltransferase	8
$\alpha$ -fucosyltransferase	10
glycosyltransferase	39
epimerase	5
xyloglucan	33
endotransglucosylase/hydrolase	33
$\beta$ -1,4-glucanase	24
expansin	35
$\alpha$ -fucosidase	2
galactosidase	25
xylosidase	20
$\beta$ -1,3-glucanase	77
chitinase	23
arabinoxidase	2
mannan-hydrolase	8
mannosidase	4
pectatelyase	26
polygalacturonase	67
pectinesterase	111
peroxidase	69
prolyl 4-hydroxylase	10
laccase	17
arabinogalactan protein	25
extensin	38
glycine-rich protein	30
wall-associated receptor kinase	5

これら 765 個の細胞壁関連遺伝子それぞれに対応す

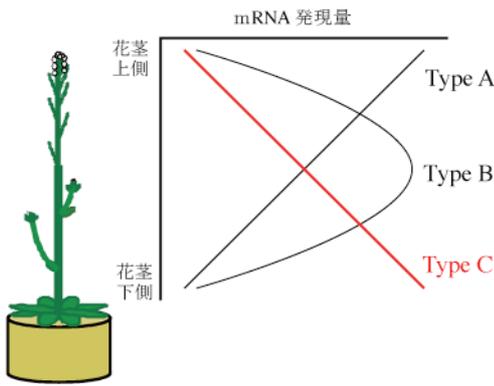
る 70mer のプローブを打ち付けたマイクロアレイチップを独自に開発し、以後の実験に用いた。同一ファミリー内のメンバー同士は例外なく高い相同性を示していることを考慮すると、個々のメンバーを明確に識別できるかどうかはマイクロアレイ解析の課題となる。そこで、このマイクロアレイチップを用いて、植物体の様々な部位から抽出した Total RNA をハイブリダイズさせ、各遺伝子の発現プロファイルを実際に測定したところ、同じファミリーに属しているメンバーであってもそれぞれのメンバーは独自の発現パターンを示すことが明らかとなった。これは、我々のマイクロアレイチップがファミリー内の個々のメンバーを明確に区別出来ていることを意味した。

### 支持組織構築に重要だと推定される遺伝子

支持組織の構築や統御に重要な役割を担っていると考えられる遺伝子を選抜するための実験戦略として、個体にかかる加重量を自在にコントロールしてそのときに発現プロファイルが大きく変化する遺伝子を選抜するというスキームが考えられる。そのための一つのアプローチとして、植物体を遠心分離器に載せて大きな遠心加速度をかけ、擬似的に植物体の重さが増加した状態をつくるといった方法がある。この手法自体は、重力シグナルの影響を解析している研究者の間で頻繁に使われているものである。事実、1992年に我々は遠心分離器により 130 g の過剰な重力を植物体に加えると成長が抑制されることを見いだした。ただし、130 g といった異常に高い重力環境に植物体をおくことで、様々な副次的効果が生じることが想定される。例えば、(1)遠心分離器の振動に起因する機械ストレス、(2)植物体が折れ曲がることによる傷害ストレス、(3)水分輸送の阻害による乾燥ストレス、(4)アポプラスト成分の変化が挙げられる。近年蓄積してきたマイクロアレイ解析の結果によると、過剰な重力環境下で生育させたシロイヌナズナ芽生えにおいて発現が高まった遺伝子の多くが、乾燥ストレス応答性遺伝子や傷害誘発遺伝子として既に同定されていることが明らかになってきた。このように非日常的な環境に植物体をおくことで生まれる副次的効果は多岐にわたると想定され、その影響は無視できないことが次第に明らかとなってきた。そこで、それに代わる別の実験戦略を考え、我々は次の二つのスクリーニングを行い、その両方を満たす遺伝子を選定した。

一つめとして、伸長中の花茎を軸方向に数分割し、花茎下側のゾーンでの mRNA 発現量が花茎上部での発現量の 2 倍以上である遺伝子を、独自マイクロアレイチップを用いて選抜した。これは、自身を支える組織である支持組織が花茎の下側で顕著であることを踏まえ、遺伝子の発現場所を頼りにしたスクリーニングである。その結果、765 遺伝子中 45 個が該当し、この発現様式を Type C と称す (図 1)。

図 1. 発現パターンによる細胞壁関連遺伝子の分類



ところで、植物が自身の荷重を支えるために支持組織を進化させたのであれば、自身の荷重から解放された瞬間に、支持組織の構築が促進されなくなり、その結果支持組織形成に関与する遺伝子も発現が低下する可能性に注目し、これを第二のスクリーニングとした。具体的には花茎を横倒しにすることで、花茎下部を、花茎上部の荷重から解放させるという戦略を用いた。ただし、この方法ではあくまでも一時的に荷重が軽減されるだけであり、恒常的に荷重を軽減した状態をつくるためにはやはり宇宙実験を待たなければならない。実際に、約 10 cm に達した花茎を 30 分間あるいは 60 分間 横倒しにすると、細胞壁関連遺伝子群のうち 19 遺伝子の発現が有意に低下した。特に低下の程度が甚だしい遺伝子では、わずか 30 分間の横倒しにより、発現が約 80% も低下していた。そして興味深いことに、これら 19 遺伝子のうちほとんどは Type C 様式の発現を示す遺伝子であり、16 遺伝子が該当した。それらの一覧を以下に示す；

$\beta$  1,3-glucanase/41 ,  $\beta$  1,4-glucanase/2 ,  $\beta$  1,4-glucanase/24 , Cellulose Synthase/8 , Cellulose Synthase/9 , Chitinase/12 , Galactosidase/21 , GRP , Laccase/1 , Laccase/3 , Laccase/17 , Pectinesterase/61 , Peroxidase/60 , Peroxidase/38 , Polygalacturonase/20 , Polygalacturonase/43

これら 16 遺伝子を、支持組織構築・維持に必須だと推定される最重要候補遺伝子として考え、宇宙実験においてもそれらの遺伝子を中心に据えて、実験を行う。

#### 宇宙実験“Cell Wall Experiment”の概要

我々が予定している宇宙実験 “Cell Wall Experiment - Reverse genetic approach to exploring genes responsible for cell-wall dynamics in supporting tissues of *Arabidopsis* under microgravity conditions” は、宇宙航空研究開発機構 (JAXA) の支援の下、2008 年 2 月に開始することが予定されている。この宇宙実験の目的

は、モデル生物であるシロイヌナズナを用いて、支持組織が構築・維持されるメカニズムの分子的な側面を明らかにすることである。植物を宇宙において微小重力環境下で生育させることで、荷重という概念が存在しなくなる。このような環境で育った植物の支持組織の状態を、組織学的観察に加え遺伝子の発現プロファイルや遺伝子産物の分布状態などの観点から解析し、それらを 1 g 環境で生育させたコントロール個体と比較することで、支持組織構築の統御機構の解明を目指す。具体的には、以下の点に注目して微小重力環境生育個体とコントロール個体の比較を行う。

1. 組織学的なパターンの観察
2. 注目する 16 遺伝子について、詳細な遺伝子発現パターンの解明
  - (ア) real time RT-PCR を用いた発現量の定量化
  - (イ) promoter::GUS コンストラクト導入植物を用いた、発現パターンの可視化
3. 遺伝子産物に対する特異的抗体を用いた、タンパク質局在部位の解明

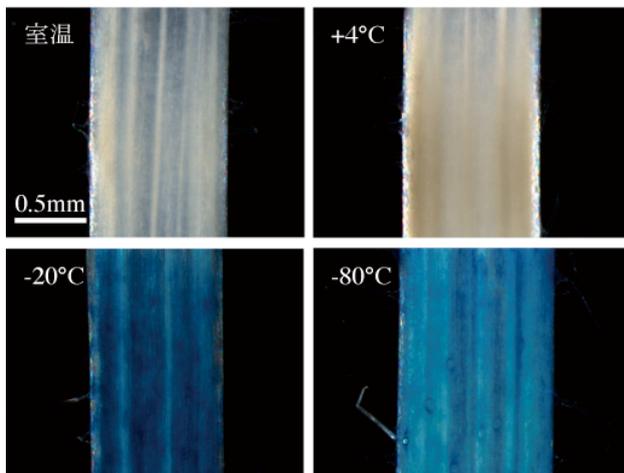
#### 宇宙実験 “Cell Wall Experiment” の流れ

本実験では一貫して、草本植物である *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Ecotype: Columbia) を用いる。宇宙実験に向けた準備として、前述の 16 遺伝子それぞれについて、プロモーター領域をレポーター遺伝子と接続した promoter::GUS コンストラクトを作製し、これを導入した形質転換植物体を作製した。この形質転換体を地上で生育させて GUS 染色を行ったところ、花茎上部よりも花茎下部で強い染色が認められ、16 遺伝子が Type C 様式の発現を示すことを再度確認できた。それらの形質転換体のうちのひとつと、野生型の種子が、地上において Plant Cultivation Chamber (PCC) 内に播種される。PCC が打ち上げられたのち、国際宇宙ステーション (ISS) 上の European Modular Cultivation System (EMCS) 内に PCC がセットされ、それに続いて種子に対する水分供給が開始されることで種子発芽が促進される。なお水分供給は自動化されており、供給速度は秒単位でコントロールされている。野生型個体も形質転換体個体も全て、1 g 環境と微小重力環境の両方において、 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  の温度、 $60 \pm 10\%$  の湿度、明/暗周期 16/8 時間の環境で生育させる。植物が成長している間、PCC 内の温度や湿度をはじめとして植物体の画像などといった様々な情報が逐一記録され、地上に報告されるシステムとなっている。

花茎の長さが約 10 cm に達した時点で、各個体の花茎全体が収穫されるが、この花茎の後処理方法は二種類あり、後で行われる解析の種類に応じて選択する。すなわち、野生型個体は RNA later (Ambion, Inc., Austin, TX) 溶液中に保存し、promoter::GUS 形質転換体については 1/10 ホルマリン (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO; HT501128) 溶液の中に保存する。植物

体の採取が完了してから個体が地上へと回収されるまでの期間が最大で数ヶ月間にも及ぶ可能性を想定し、我々はこれら固定中に長期間入れられた植物体が解析に利用できるかどうかを確認する予備実験を行った。その例として、*promoter::GUS* 形質転換体を 1/10 ホルマリン溶液中に三ヶ月間保存した後の GUS 活性を調べたところ、低温状態で保存されていれば、三ヶ月後でも十分な GUS 活性を確認することができた (図 2)。

図 2. 三ヶ月間ホルマリン溶液中に保存した花茎の GUS 染色像



*Promoter::GUS* 形質転換体植物については、GUS 染色により注目遺伝子の発現パターンを観察する他、支持組織の組織化学的解析を行う。また、遺伝子産物の局在性を明らかにするための免疫組織化学染色も計画している。一方、野生型個体については、花茎を長軸方向に沿っていくつかの領域に分割し、それぞれの領域から独立に RNA 抽出を行い、*real time RT-PCR* の手法を用いて、注目している遺伝子の mRNA 発現量を定量的に解析する。さらに、*in situ hybridization* 法を用いて、各遺伝子の mRNA の局在を正確に調べることも予定している。これらの視点から、微少重力生育個体と 1 g コントロール個体を比較することで、支持組織の構築・維持に伴う分子メカニズムについての洞察が得られることを期待している。

#### おわりに

植物の形態形成において、細胞壁が中心的に働いていることは 19 世紀から頻りに指摘されてきたが、細胞壁構築・維持の統御機構の分子的側面に関する我々の知見は未だ乏しい。主たるその理由の一つは、細胞壁の複雑性にあったと考えられる。また、細胞壁の構造は多様であり、種間でかなり差異がある上、発生段階に応じて構造が変化していく事実も、細胞壁動態を分子的な観点から理解することを困難にしていた原因である。一方、今回独自に開発した、765

の細胞壁関連遺伝子を載せたオリゴ DNA マイクロアレイシステムは、細胞壁構築の分子的側面を網羅的に、且つ詳細に解析することを可能にした。そしてこの強力なツールを用いることで、支持組織細胞壁の構築に中心的役割を担っていると推定される遺伝子を選抜することに成功した。こうして選抜された遺伝子について、宇宙実験において微少重力環境下で植物を生育させたときの発現パターンを解析することで、支持組織の構築・維持の分子レベルでのメカニズムを明らかにできると考えている。またそこで得られる知見を基にして、維管束植物が強靱にしてしなやかな細胞壁を獲得することになった進化プロセスを考察できると考えている。その点で、本宇宙実験は陸上植物の成長の基本過程の解明を目指す基礎研究と言える。

また他方で、本実験は応用研究としての側面もまた持ち合わせている。本研究で得られる知見は、様々な重力環境下で植物を生育させる際に役立つと期待される。圏外宇宙環境や他の惑星の地表において、効率よく作物を栽培し、そこに循環型の人類生存環境を構築する計画は、もはや単なる夢物語ではなく、具体的なプロジェクトとして動き始めている。我々の宇宙実験での知見は、1 g 環境以外での生育に最適化した植物体の設計を可能にするだろう。このように、基礎研究と応用研究の両分野に対する本研究の影響は、人類の未来に大きく貢献すると期待される場所である。