

**I S S ・ きぼう利用ミッション**  
**「植物の抗重力反応機構—シグナル変換・伝達から応答まで (Resist Tubule)」**  
**研究成果報告書**  
**代表研究者； 保尊隆享（大阪市立大学大学院理学研究科）**  
**平成 29 年 2 月**

## 1. 諸言

### ・研究内容、目標の概要

植物が重力に打ち勝って体を支え生命活動を営む「抗重力反応」は、重力屈性と並ぶ植物の主要な重力反応である。しかし、その機構は十分に解明されていなかった。研究代表者らは、地上実験により、過重力に対する植物の抗重力反応では、ステロールを主成分とする細胞膜ラフトと、細胞骨格の1つである表層微小管とが重力シグナルの変換・伝達を担っており、両者の協調的な機能によって、最終的な応答としての細胞壁強度の増加が誘導されることを示した(1, 2)。本実験の目的は、宇宙の微小重力環境を利用して、このような過程が地球上の1gの重力に対する反応でも普遍的に機能していることを実証し、植物の抗重力反応におけるシグナル変換・伝達から応答に至る機構の全容を明らかにすることであった。そのために、野生型シロイヌナズナとともに、膜ラフトや表層微小管の構築に関わる遺伝子の GFP 発現系統及び突然変異体を、「きぼう」実験棟の細胞培養装置(CBEF)内の微小重力並びに1g環境下で生育させて、これらの細胞成分の動態、遺伝子発現、成長形質や細胞壁の性質の変化について詳細に比較、解析した。

### ・研究内容の重要性、意義

地球上で、植物は、重力の力に抵抗、対抗できる丈夫な体を構築して効率的な生命活動を営んでいる。このような反応は、植物がパイオニアとして数億年前に初めて海から陸に上がって以来、陸上で高度に進化、繁栄する上で必要不可欠な役割を果たしてきた。しかし、この事実は、植物科学や重力生物学の分野でもほとんど認識されておらず、この反応を指す適切な名称すらなかった。そこで、研究代表者は、この反応を「抗重力反応(gravity resistance)」と名づけ(1, 3)、そのメカニズムの解明に取り組んできた(4~7)。本研究は、そのような研究の成果に基づいて、宇宙環境を利用して抗重力反応機構の普遍的な機構を解明することをめざしており、独創的で新規性が高いといえる。

生体膜の構造に関しては、長い間流動モザイクモデルを前提とした理解がなされてきた。しかし、近年、実際の膜がより複雑な構造をしており、特にステロールとスフィンゴリン脂質に富むドメイン構造(ラフト)が様々な生理作用において重要な働きを担っていることがわかってきた。植物では、このような膜ラフトの存在と機能がようやく認識され始めたところである。一方、細胞内のオルガネラ間の連絡には、細胞骨格の1つであるアクチンフィラメントが主要な役割をすると考えられていたが、他の細胞骨格である微小管の機能に関する知見は少なかった。膜ラフトと微小管が協調的に機能して、植物の抗重力反応におけるシグナル変換、伝達を担う、という本研究の仮説が検証されれば、細胞機能学上も新規の視点をもたらす得る。

本実験によって抗重力反応におけるシグナル変換・伝達から応答に至る機構が明らかになれば、植物の2つの主要な重力反応の1つである抗重力反応の全容解明に大きく前進することになる。また、抗重力反応を担う膜ラフト、表層微小管、そして細胞壁は、成長調節や重力以外の環境応答などにおいても重要な役割を果たすと考えられており、本実験の成果は、不明な点が多く残されているこれらの生理作用の解明にも役立てることができる。さらに、抗重力反応は、数億年に植物が海から陸に進出し、陸上植物として進化、繁栄す

る上で必要不可欠な役割を果たしてきたので、抗重力反応機構の解明は、植物の進化過程を理解するためにも重要である。

植物は食糧供給や環境維持・浄化の主な担い手であり、人類が宇宙環境で長期間生存するためには、植物を効率的に生育させることが不可欠である。植物は、地上では、抗重力反応のための細胞壁構築に過剰な投資をしており、その必要がない宇宙の微小重力環境では、その分を有用成分の生産に振り向けられる可能性がある。本実験の成果は、将来的に閉鎖系としての自立が要求される月面・火星基地等での長期有人滞在実現に向けて貴重な情報となり得る。植物はまた、地球のすべての生命の生存にも不可欠な役割を担っている。したがって、抗重力反応機構の解明は、植物生産の効率化を通して、地球での人類を含む生命の生存にも貢献することになる。

#### ・研究動機、バックグラウンド

研究代表者は、植物の形態形成や成長調節における重力の役割について幅広く研究してきた。そのための実験手段として、クリノスタット、水浸法、遠心過重力などを用いてきた。クリノスタットは形態形成の解析には有効であり、これを用いて自発的形態形成の存在とメカニズムを明らかにした。しかし、クリノスタットは、重力の方向性をランダム化する装置であって、重力を除去したり、その大きさを変えたりはできないため、成長調節や抗重力反応の解析には使えなかった。そこで、抗重力反応に関する地上実験では、水浸法や遠心過重力環境を用いてきたが、得られた結果に基づいて提唱した仮説は、あくまで微小重力環境での変化を示唆するに過ぎず、それを検証するため真の微小重力環境である宇宙での実験がどうしても必要になった。

研究代表者は、1998 年に最初の宇宙実験として、スペースシャトル STS-95 における BRIC-RICE 実験を行った（8～10）。この実験の当初の目的は、微小重力環境における植物の形態形成や成長の変化を明らかにすることであったが、得られた研究成果は、抗重力反応の存在を明確に認識し、それが重力屈性とは独立した重力反応であるとの概念を確立する基礎となった。その後実施した Resist Wall 実験（国際宇宙ステーション Columbus 実験棟）及び Space Seed 実験（「きぼう」実験棟、PI: 神阪盛一郎教授）では、抗重力反応の特性や基本的な機構を明らかにしてきた（7, 11）。本実験は、これらの研究成果をふまえて、抗重力反応の普遍的な機構の解明をめざすものである。

## 2. 研究計画

### 2. 1 研究内容、目標

今までの地上実験の結果より、過重力に対する植物の抗重力反応は、図1のようにまともられる。まず、重力シグナルは、細胞膜上のメカノレセプター（機械的刺激受容イオンチャンネル）によって受容されると考えられる。この過程は、重力屈性におけるシグナル感受を司る平衡細胞ばかりでなく、植物体を構成する多くのふつうの細胞で起こる可能性が高い。また、植物におけるメカノレセプター候補としては、飯田らによって MCA が単離されている（12）。受容したシグナルの変換・伝達過程は非常に複雑であるが、それぞ





本実験では、このような作業仮説の検証のため、以下の3つの実験を行った。

● 実験1 (Run 1) 「膜ラフトと微小管動態の軌道上オンサイト解析」

膜ラフトと表層微小管に関わる4種のシロイヌナズナ GFP ライン (GFP-RAFT1、TUA6pro-GFP、SPR2-GFP、GFP-MAP4) の種子を地上で滅菌後、V-MEU 装置内の蛍光顕微鏡観察容器の支持体上に播種し、ホルダーにセットして乾燥状態で打ち上げる。軌道上で給水し、4日間冷蔵した後に細胞培養装置 CBEF 内で短時間光照射して発芽を誘導し、さらに3日間生育させる。生育後、膜ラフトの構築と表層微小管の配向をクリーンベンチ CB 内の蛍光顕微鏡 (冷却 EM-CCD) で観察する。

● 実験2 (Run 2) 「膜ラフトと微小管動態の回収後解析」

野生型シロイヌナズナ Columbia の種子を地上で滅菌後、V-MEU 用試料容器内の支持体上に播種して乾燥状態で打ち上げる。軌道上で給水し、4日間冷蔵した後に CBEF 内で短時間光照射して発芽を誘導し、さらに3日間生育させる。生育後、幼植物体を取り出し、KFT を用いてアルデヒド混合液で化学固定し、冷蔵して回収する。地上で、回収試料の膜ラフトと微小管を染色、観察する。

● 実験3 (Run 3) 「ラフトと微小管に関わる変異体の成長解析」

野生型シロイヌナズナ Columbia、膜ラフト変異体 *hmg1*、及び形質変異の程度が異なるチューブリン変異体 *tua4* と *tua6* の種子を地上で滅菌後、PEU 試料容器内の支持体上に播種して乾燥状態で打ち上げる。軌道上で自動給水を開始し、PEU 内で自動制御により30日程度生育させて、花茎の成長を経時的に観察・撮影する。生育後、花茎を取り出し、KFT を用いて RNAlater で処理し、冷凍して回収する。地上で、回収試料の遺伝子発現解析や細胞壁の物理的・化学的性質の解析を行う。

これらの研究項目に対して、以下のサクセスクライテリアを設定した。

サクセス	クライテリア
Minimum Success	<p>・Run-1 (蛍光顕微鏡観察) Inc 39/40 μG群について、種子が発芽し、幼植物体の蛍光顕微鏡観察ができる。</p> <p>・Run-2 (化学固定回収) Inc33/34 μG群について、化学固定して回収された幼植物体の膜ラフトと表層微小管の形成と形態を観察できる。</p> <p>・Run-3 (遺伝子解析) Inc 37/38 μG群について、種子が発芽・育成し花茎を遺伝子保存処理して回収されたサンプルから観察 (細胞壁特性、生理活性、遺伝子発現) ができる。</p>
Full Success	<p>・Run-1 (蛍光顕微鏡観察) Inc 39/40 1G対照群についても幼植物体を得ることができ、蛍光顕微鏡観察がなされる。その結果、微小管と膜ラフトの動態に関して微小重力の影響が比較により見出すことができる。</p> <p>・Run-2 (化学固定回収) Inc33/34 1G対照群についても、化学固定して回収された幼植物体の膜ラフトと表層微小管の形成と形態を観察できる。</p> <p>・Run-3 (遺伝子解析) Inc 37/38 1G対照群についても花茎を得ることができ、遺伝子保存処理と凍結回収できる。その結果、微小重力の影響を観察 (細胞壁特性、生理活性、遺伝子発現) ができる。</p>
Extra Success	Run1, Run2, Run3の結果から、微小管と膜ラフト以外の細胞成分の動態に対する微小重力の影響が仮説どおりであることが示される。

## 2. 2 体制

### ・研究チーム体制

代表研究者：

保尊 隆享	大阪市立大学	研究とりまとめ
-------	--------	---------

共同研究者：

橋本 隆	奈良先端科学技術大学	微小管の機能解析
村中 俊哉	横浜市立大学	膜ラフトの機能解析
園部 誠司	兵庫県立大学	微小管結合タンパク質の機能解析
榊 剛	東海大学	細胞膜動態の解析
若林 和幸	大阪市立大学	細胞壁の機能解析
曾我 康一	大阪市立大学	微小管動態の細胞学的解析

### ・JAXA 支援体制

宇宙科学研究所

高柳 昌弘	ISS 科学プロジェクト室長(当時)	実施責任者（プロマネ）
山下 雅道	宇宙環境利用科学研究系 教授(当時)	研究実施責任者
橋本 博文	宇宙環境利用科学研究系 准教授	計画、調整、運用

有人宇宙環境利用ミッション本部(当時)

有人システム安全・ミッション保証室	安全性、開発保証に関する審査等
宇宙環境利用センター(当時)	「きぼう」船内利用全体とりまとめ
利用リソース、インクリメント運用に係る国際調整	
実験運用インテグレーション	
軌道上実運用	
宇宙飛行士運用技術ユニット	クルー訓練作業

### ・体制に関する評価

本実験には、JAXA 及び関連機関から多くの方に参画し、ご尽力いただいた。実験全体を通して、各チームがそれぞれの機能を十分に果たし、チーム間の連携もスムーズであったと思われる。実験実施中には、Run 1 ではキセノンランプの不具合による顕微鏡観察の中止、Run 2 では KFT からの固定液漏れ、Run 3 では一部の PEU での給水のトラブルによる植物成長の遅延、など様々なトラブルが生じたが、それらにも可能な限り対応していただいた。問題点としては、各チームの構成人数に余裕がなく、一部の人に過重な負担がかかったことがあげられる。

## 2. 3 スケジュール

### ・実験候補選定から飛行後解析まで

2008.02.22	実験候補選定 「きぼう」船内実験室第二期利用に向けた候補テーマに採択
2010.05.21	システム定義審査会（SDR）
2010.06.04	プロジェクト移行審査会
2011.01.21	詳細設計審査会（CDR）
2011.04.28	フェーズ 0/I/II 安全審査会
2012.06.26	Run 2：認定試験後審査会（PQR）
2012.09.07	Run 2：フェーズ III 安全審査会
2012.10.08	Run 2：SpX-1 にて供試体打上
2012.10.15-23	Run 2：軌道上植物栽培運用
2012.10.31	Run 2：SpX-1 にて試料回収
2012.11.06	Run 2：PI 試料受取
2012.11.21	Run 1&3：認定試験後審査会（PQR）
2012.12.20	Run 1&3：フェーズ III 安全審査会
2013.08.04	Run 1&3：HTV-4 にて供試体打上
2013.09.16-10.26	Run 3：軌道上植物栽培運用
2014.04.14	Run 1：SpX-3 にて供試体打上
2014.05.15-24	Run 1-1：軌道上植物栽培・観察運用
2014.05.21	Run 3：SpX-3 にて試料回収
2014.05.26	Run 3：PI 試料受取
2014.06.05-14	Run 1-2：軌道上植物栽培・観察運用
2014.07.14	Run 1-3：Orb-2 にて追加の供試体打上
2014.08.04-13	Run 1-3：軌道上植物栽培・観察運用
2015.03.17-18	Run 1：地上対照実験

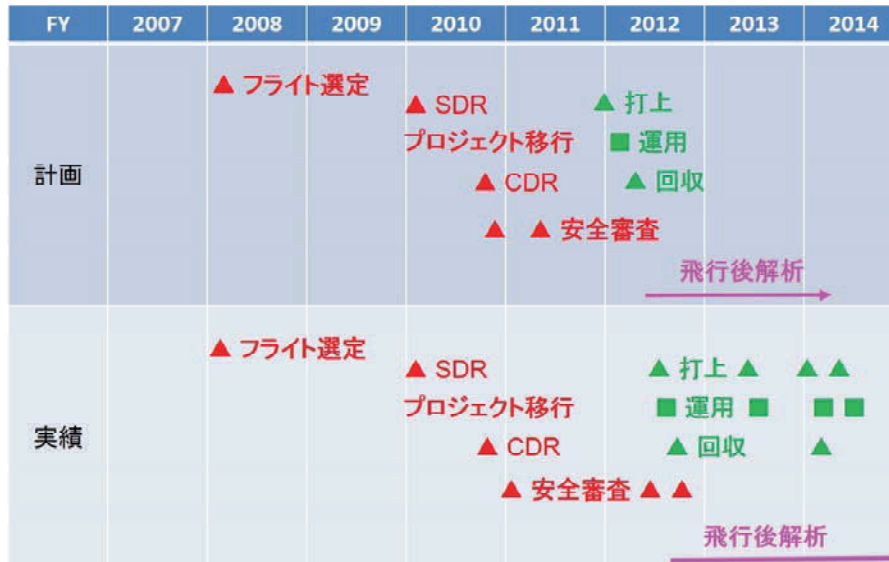
注）Run 1：幼植物体の蛍光顕微観察

Run 2：幼植物体の固定・回収

Run 3：植物体の栽培・固定・回収

・装置・供試体開発段階移行時点の計画と実績

## スケジュール



### 3. 実験準備・運用

・2008年2月22日「きぼう」船内実験室第二期利用に向けた候補テーマとして採択され、宇宙科学研究所 ISS 科学プロジェクト室にて、ベースライン化、実施されることが決まる。

・研究目的を遂行するため、次の3つの実験（Run）に分けて実施する。Run1：幼植物体の蛍光顕微観察、Run2：幼植物体の固定・回収、Run3：植物体の栽培・固定・回収。

・2010年5月21日 システム定義審査会（SDR）、6月4日 プロジェクト移行審査会、2011年1月21日 詳細設計審査会（CDR）、4月28日 フェーズ0/I/II 安全審査会が実施される。

・Run1 の幼植物体の蛍光顕微観察について、軌道上の顕微鏡システムの設計が古く、十分な蛍光顕微観察が行えないため、高感度ユーザーカメラと蛍光顕微観察容器の開発が必須となるが、後者に時間がかかるため、比較的容易に実行可能な Run2 を先に進め、これ以降の各種審査会、打上、運用、回収について Run1&3 と分けて行うことを決める。

・Run2 について、2012年6月26日 認定試験後審査会（PQR）、9月7日 フェーズ III 安全審査会を経て、10月8日 SpX-1 にて供試体打上、10月15-23日 軌道上植物栽培運用、10月31日 SpX-1 にて試料回収、11月6日 PI 試料受取、飛行後解析に至る。

・Run1&3 について、2012年11月21日 認定試験後審査会（PQR）、12月20日 フェーズ III 安全審査会を経て、2013年8月4日 HTV-4 にて供試体打上に至る。

・Run3 について、2013年9月16日～10月26日 軌道上植物栽培運用、2014年5月21日 SpX-3 にて試料回収、5月26日 PI 試料受取、飛行後解析に至る。



- ・ Run2 の試料回収時、KFT に液漏れが認められたため、Run3 では新しく開発された CFB を用いて試料の固定・回収を行った。

- ・ Run1 について、2014 年 4 月 14 日 種子が入った蛍光顕微観察容器のみ SpX-3 にて打上（他の供試体は HTV-4）、2 回（Run1-1、Run1-2）に分けて観察が行われる予定であった。

- ・ Run1-1 について、5 月 15 ～ 24 日 軌道上植物栽培・観察運用が行われた際、2 日目の観察時に軌道上顕微鏡システムの蛍光励起用キセノンランプに不具合（非点灯）が発生し、途中で観察不可能となり、試料も一部、失われた。

- ・ Run1-2 について、6 月 5 ～ 14 日 軌道上植物栽培・観察運用が行われる。

- ・ Run1-1 の不具合で失われた試料の観察を行うため、急遽 Run1-3 を設定し、新たに蛍光顕微観察容器を 7 月 14 日 Orb-2 にて打上、8 月 4 ～ 13 日 軌道上植物栽培・観察運用が実施され、すべての運用が完了。これ以降は観察で得られた画像データの解析を行う。

## 4. 実験結果および成果

### 4. 1 実験結果

#### 4. 1. 1 実験 1 (Run 1) 「膜ラフトと微小管動態の軌道上オンサイト解析」

細胞成分の動態に対する微小重力の影響について明らかにする最も直接的な手段は、標的の細胞成分を何らかのマーカーで標識した植物体を軌道上で生育させ、その場（オンサイト）で観察することである。本実験では、膜ラフトと表層微小管に関わる 4 種類のシロイヌナズナ GFP ラインの芽ばえを「きぼう」実験棟の細胞培養装置 CBEF 内で生育させた後、胚軸をクリーンベンチ CB 蛍光顕微鏡で観察した。使用したラインは、GFP-RAFT1（GFP と膜ラフト構成タンパク質 RAFT1 の融合体を 35S プロモータで強制発現）、TUA6pro-GFP（ $\alpha$ -チューブリン 6 のプロモーターで GFP を発現）、SPR2-GFP（微小管結合タンパク質 SPR2 のプロモーターで SPR2 と GFP の融合タンパク質を発現）、GFP-MAP4（GFP と微小管結合タンパク質 MAP4 の融合体を 35S プロモータで強制発現）である。

#### ・発芽と成長

宇宙軌道上で生物試料の顕微鏡観察を行う際には、操作上の様々な問題点を克服する必要がある。まず、軌道上では、地上で使うようなプレパラートを作成し、利用することが困難である。そこで、シロイヌナズナ芽ばえを発芽・生育させる容器を、試料を入れたまま顕微鏡観察にも直接用いることを検討し、それに適した容器（蛍光顕微観察容器）を新規に開発した。この容器の厚みは、芽ばえの成長のためにはより厚いことが望ましいが、顕微鏡観察にはできるだけ薄い方がよい。また、材質に関しても、ガラスでは安全性に問題が生ずる一方、プラスチックの多くの素材は蛍光を発し試料の観察を妨げるため、選定が難しかった。最終的に開発された容器はそれぞれの要求を満たす基本性能を有し、4 種の GFP ラインすべてが、軌道上で良好な発芽と芽ばえ成長を示した。

図 2 は、胚軸が最も肥厚する GFP-MAP4 の芽ばえの様子を示している。宇宙 1g 環境

では、芽ばえがほぼ上下方向に揃って成長したのに対して、微小重力環境では様々な方向に成長した。これは、自発的形態形成と呼ばれる現象である(8)。微小重力環境で生育した芽ばえでは、胚軸の一部が培地内に入り込んでおり、胚軸全長の測定は困難であった。そこで、成長に関する別の指標として、胚軸の太さの最大値を測定した(図3)。軌道上で生育した胚軸の太さは、4ラインすべてで地上対照より小さい傾向を示したが、差はそれほど大きなものではなかった。また、宇宙1gと微小重力を比べると、GFP-MAP4では微小重力下の方が胚軸が約8%細かった。



図2 宇宙1g及び微小重力環境で生育した GFP-MAP4 の芽ばえ

#### ・ GFP 発現強度

本実験での GFP 蛍光観察における最大の問題は、CB 顕微鏡の性能にあった。この顕微鏡は、「きぼう」実験棟設計当初からの搭載機器であり、その性能は現在使用されている顕微鏡とは比較もできない低いレベルである。本実験の代表者は、20数年前にこの顕微鏡の設計にアドバイザーとして参加した。その際、生命科学における蛍光顕微鏡の必要性を主張した立場上、ぜひ一度は宇宙実験に使用したいと考えていた。そこで、光学系・イメージング解析の専門家の協力を得て、専用光源と EM-CCD 高感度蛍光検出カメラを取り付け、蛍光顕微鏡としての性能の飛躍的な向上を図った。その結果、完全ではないものの、軌道上で GFP 蛍光の観察・解

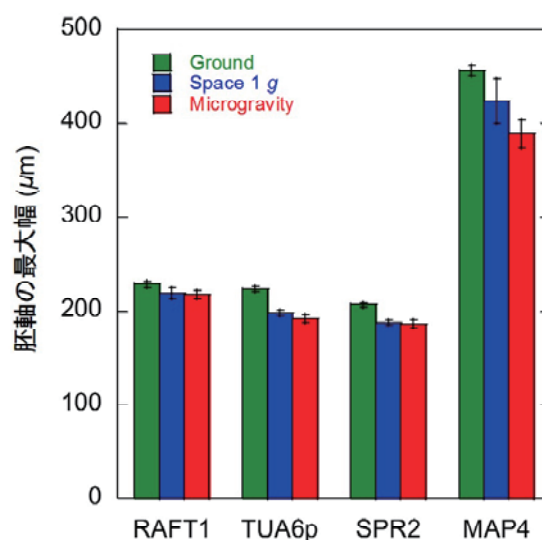


図3 地上及び宇宙で生育した GFP ラインの胚軸の最大幅

析を行うことができた。図4は、TUA6pro-GFP ラインの栽培観察容器全体の明視野及び蛍光顕微鏡像である。

ネイティブプロモーターによる発現ラインである TUA6pro-GFP と SPR2-GFP を用いて、両遺伝子の発現に対する微小重力の影響を解析した（図4、図5）。両遺伝子の発現は、子葉から胚軸上部のフックと呼ばれる若い細胞からなる部域で高く、基部に向かって、加齢に伴う減少を示した。遺伝子発現に対する微小重力の影響を解析するため、フック頂端部から 100  $\mu\text{m}$  毎に蛍光強度を測定した。蛍光強度の絶対値に関しては、試料毎にばらつきが大きく、明確な傾向が見いだせなかった。そこでフック頂端部を 100 とする相対値を算出したところ、TUA6 遺伝子の発現は、微小重力環境下では、地上や宇宙 1g の試料と比べて、より速やかに基部に向かって減少することがわかった（図6）。蛍光強度の減少に関して、地上対照と宇宙 1g との間には差は見られなかった。一方、SPR2 遺伝子の発現は、重力環境に関わらず、ほぼ同程度に基部に向かって減少した（図7）。

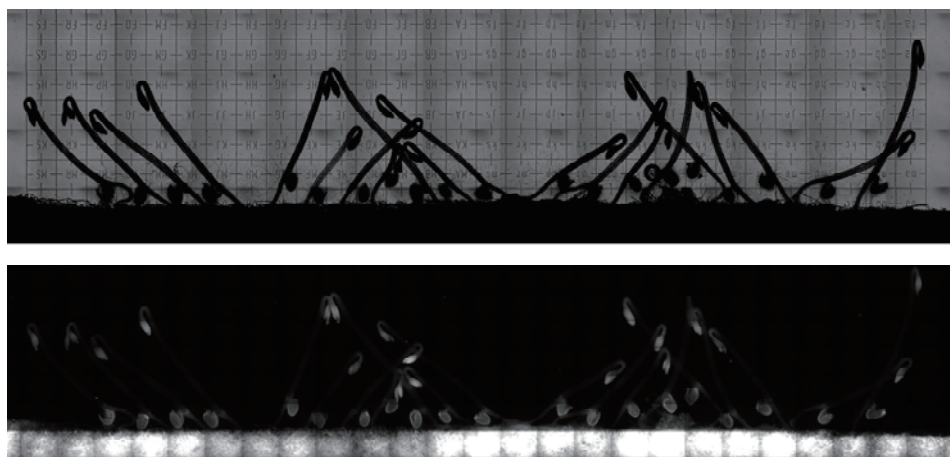


図4 宇宙で生育した TUA6pro-GFP ラインの芽ばえの明視野及び蛍光顕微鏡像

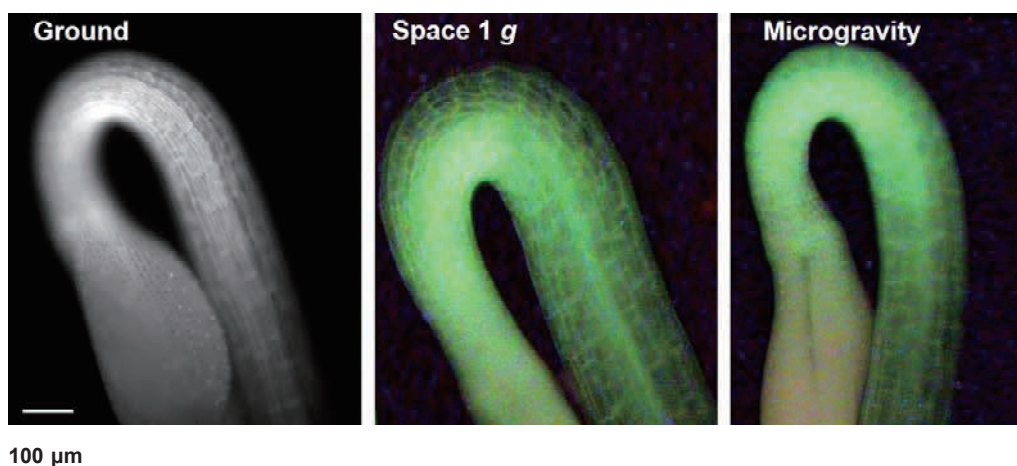


図5 地上及び宇宙で生育した SPR2-GFP ラインの芽ばえの蛍光顕微鏡像

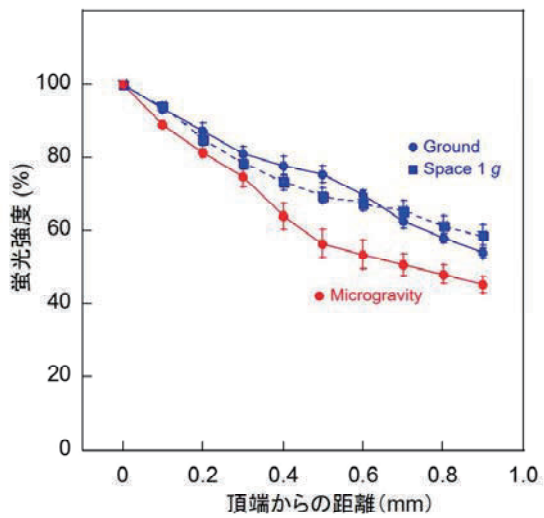


図6 *TUA6* 遺伝子の発現に対する微小重力の影響

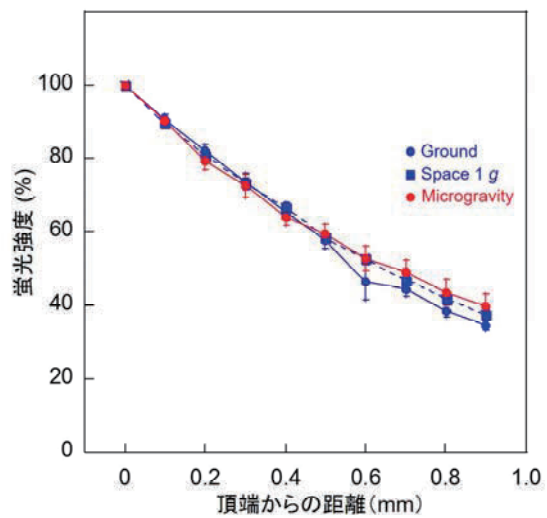


図7 *SPR2* 遺伝子の発現に対する微小重力の影響

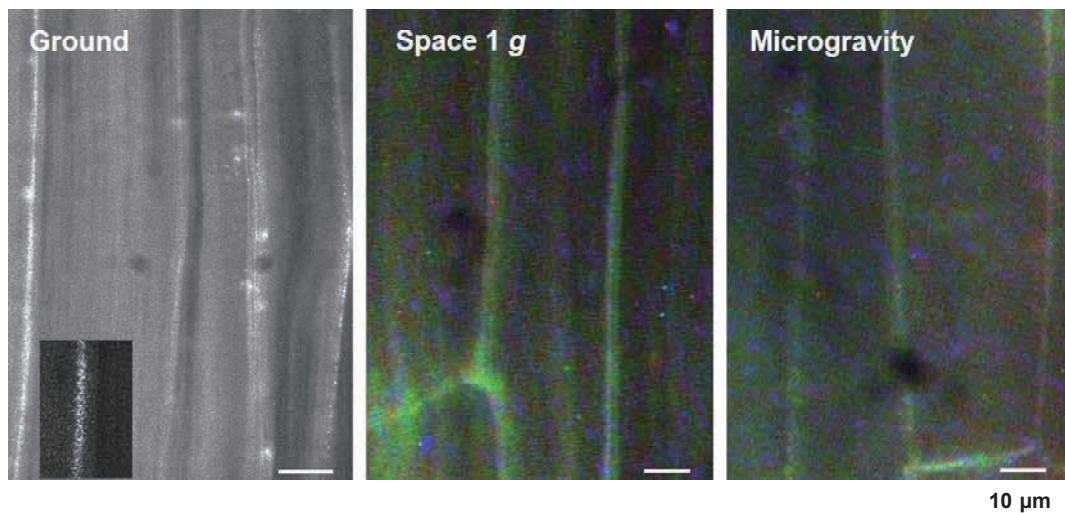


図8 地上及び宇宙で生育した GFP-RAFT1 ラインの芽ばえの蛍光顕微鏡像

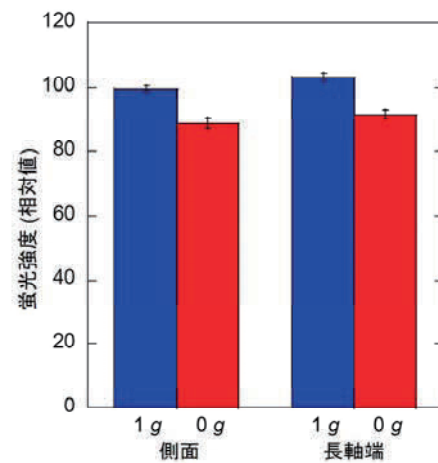


図9 *RAFT1* 遺伝子の発現に対する微小重力の影響



### ・細胞成分の動態

GFP-RAFT1 によるラフト構成タンパク質由来の蛍光は、通常、細胞膜上にドット状に観察される（図 8 左図）。そして、過重力環境下では、このドット状構造体の大きさが増加し、密度も上昇する。本実験で使用した「きぼう」実験棟の CB 顕微鏡では、EM-CCD 高感度蛍光検出カメラを取り付けても解像度に限界があり、明瞭なドット状の蛍光は認められなかった。しかし、細胞膜に沿って強い蛍光が認められたため、蛍光強度を定量化した。その結果、細胞の側面及び長軸端ともに、微小重力下では、細胞膜上の蛍光強度が 10 % 程度減少することがわかった（図 9）。微小重力環境では RAFT1 タンパク質が膜ラフトにリクルートされる過程が抑制される可能性が示唆された。

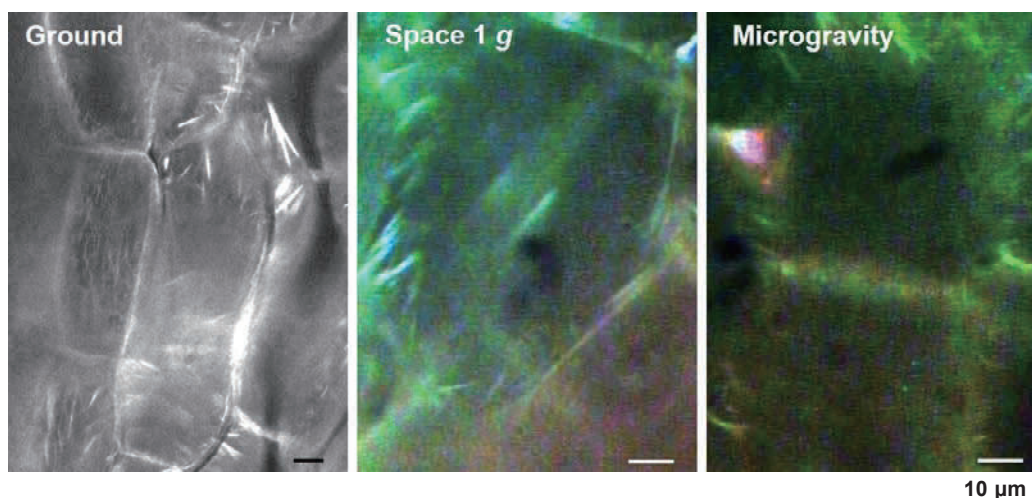


図 10 地上及び宇宙で生育した GFP-MAP4 ラインの表皮細胞の蛍光顕微鏡像

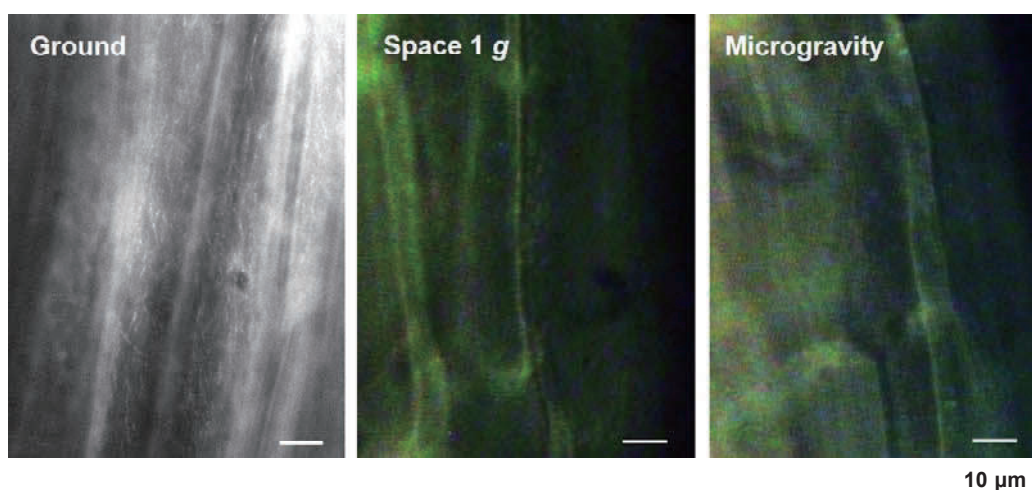


図 11 地上及び宇宙で生育した SPR2-GFP ラインの表皮細胞の蛍光顕微鏡像

微小管結合タンパク質 MAP4 の強制発現ラインである GFP-MAP4 では、細い繊維とそれらが束化した太い繊維が観察され（図 10 左図）、細い繊維の配向が細胞の成長方向と関係することがわかっている。本実験で使用した CB 顕微鏡では、このうちの太い繊維の



みが観察された。微小管は重合と脱重合のバランスの上に存在しており、微小重力環境では繊維として存在し得ない可能性が指摘されていたが、GFP-MAP4 由来の太い繊維は微小重力下でも観察されたので（図10右図）、微小重力が微小管構築そのものに影響するわけではないことがわかった。本実験で観察された太い繊維の配向は、重力環境に関わらずランダム（放射状）であり、微小重力の影響は見られなかった（図10）。一方、SPR2-GFP に関しては、通常の顕微鏡観察では、連続したドットから構成される繊維構造が見られる。「きぼう」実験棟の CB 顕微鏡では、検出感度が低いため、SPR2-GFP に由来する明瞭な繊維状構造は認められず、細胞全体にスミアに広がる蛍光が見られた（図11）。このような蛍光に対する微小重力の影響は明確ではなかった。

#### 4. 1. 2 実験2 (Run 2)「膜ラフトと微小管動態の回収後解析」

細胞成分の動態に対する微小重力の影響を解析するもう1つの実験として、「きぼう」実験棟の CBEF 内で生育させた野生型シロイヌナズナ芽ばえを化学固定して地上に回収した後、研究室の顕微鏡を用いて観察した。地上回収試料を用いた解析では、従来の宇宙実験で指摘されているように、輸送等の操作による影響は避けられない。その反面、4. 1. 1 項で述べたオンサイト観察に伴う様々な問題は解決できる。すなわち、芽ばえをより適した条件で生育でき、GFP 利用実験の場合とは異なって予め解析対象が限定されることはなく、観察に高性能の顕微鏡が使用可能で、観察操作も容易であった。

##### ・発芽と成長

本実験では、野生型芽ばえ栽培容器として V-MEU 試料容器を選定するとともに、培地（支持体）として新たにハトシートを選抜し、使用した。これらは期待通りの性能を示し、軌道上で揃った発芽と芽ばえの成長が得られた（図12）。また、微小重力環境では、実験1の場合と同様に、自発的形態形成が観察された（図12）。

図13は、宇宙 1g 及び微小重力環境で生育した芽ばえ胚軸の、回収後の観察時における長さ太さを示している。微小重力環境では、胚軸の伸長成長が促進されると同時に、拡大成長が抑制され、成長方向の変化が起きていることが確認できた。

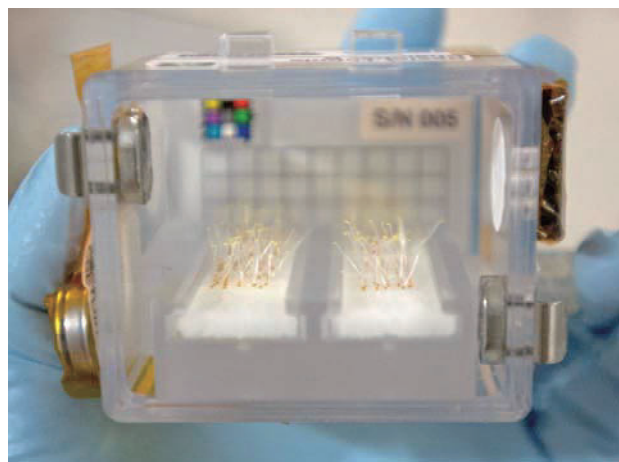


図12 宇宙で生育した野生型  
Columbia の芽ばえ (Run 2)

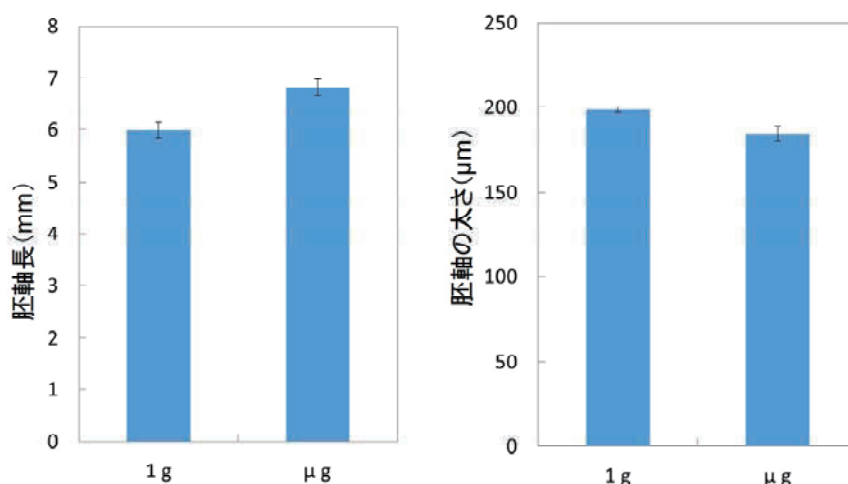


図 1 3 Columbia の胚軸の成長に対する微小重力の影響

#### ・細胞成分の動態解析

実験 1 では、CB 顕微鏡の性能の限界のため、膜ラフトと微小管の動態に対する微小重力の影響に関して、十分なデータは得られなかった。そこで、実験 2 で地上に回収された試料を用いてより詳細な解析を行った。その結果、微小重力環境では、膜ラフトと微小管の動態が過重力環境下とは逆の変化を示すことがわかった。なお、前述のように、実験 2 では良好な発芽・成長が見られたが、試料総数には限りがあったため、得られる成果の重要度を考慮して、表層微小管の配向解析に優先的に使用することにした。

#### ・表層微小管の配向

実験 2 では、SpaceX 社のロケット (SpaceX-1) を初めて使用して試料打ち上げと回収が行われた。ロケットの打ち上げと帰還を含む運用全体は順調に進行したが、回収された固定容器 KFT を開封したところ、一部で固定液の漏れが見つかった。そこで、まず、試料の固定状況を確認するための予備観察を行った。図 1 4 は、微小重力環境で生育し、固定・回収された試料を、チューブリン抗体と微小管結合タンパク質 EB1 抗体で二重染色した蛍光顕微鏡像である。幸いなことに、固定液漏れによる大きな影響はなく、繊維状の微小管構造と、その上に EB1 がドット状に分布する様子が観察できた。

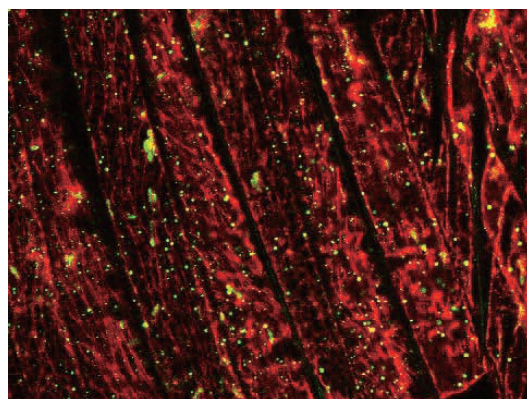


図 1 4 微小重力環境で生育した Columbia 胚軸表皮細胞のチューブリン及び EB1 抗体による二重染色像

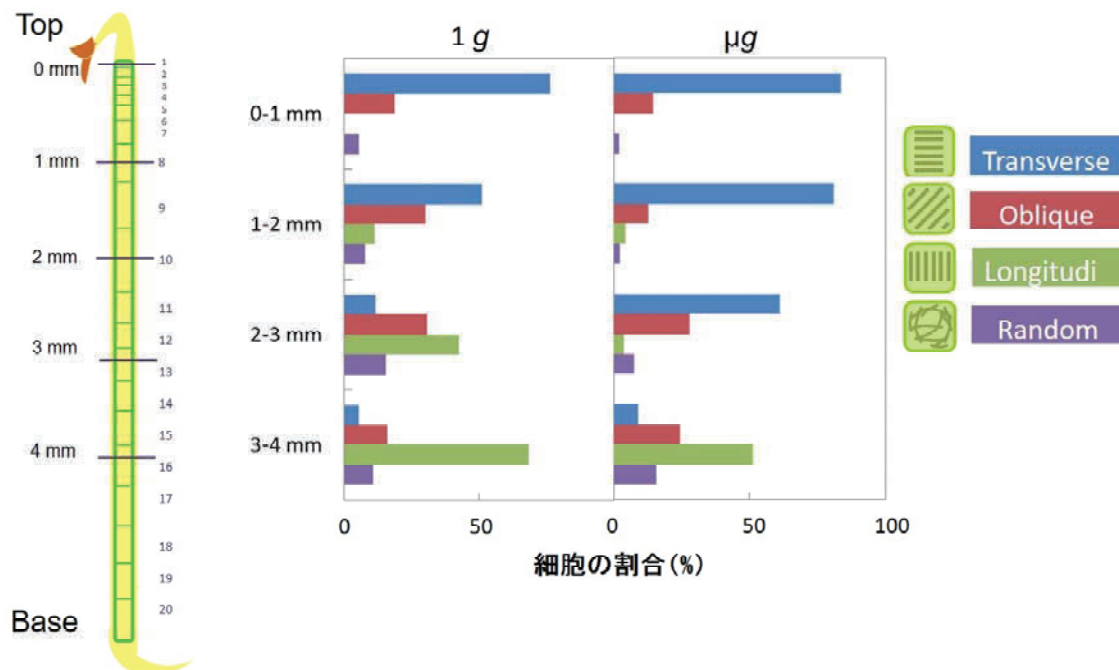


図 1 5 胚軸表皮細胞の微小管配向に対する微小重力の影響

回収試料の胚軸を用いて、表皮細胞の表層微小管配向に対する微小重力の影響を詳細に解析した。宇宙 1g 及び微小重力環境下で生育した胚軸を頂部から 1 mm 毎に分け、それぞれに含まれる表皮細胞における表層微小管の配向を間接蛍光抗体法により観察した。多くの茎器官の表皮細胞では、表層微小管の配向が細胞毎に概ね揃っている。そこで、細胞を、細胞長軸に対して直角（横向き）、平行（縦向き）、斜め、そしてランダムな向きの表層微小管を持つものの 4 通りに分け、各々のパターンの頻度を算出した。重力環境に関わらず、胚軸上部の若い細胞からなる部域（0 - 2 mm）では、細胞長軸に対して直角な表層微小管を持つ細胞の割合が高く、基部の成熟部域（3 mm 以下）では、平行な微小管を持つものが多かった（図 1 5）。植物細胞は、表層微小管の配向と直角な向きに伸長するので、この結果は、若い細胞では縦方向の伸長成長が、一方成熟細胞では横方向への肥大成長が起こる事実と合致している。細胞長軸に対して直角から平行方向への微小管配向の変化は、宇宙 1g 環境下で生育した胚軸では、頂部から 2 mm 付近の部域で起きていた（図 1 5）。これに対して、微小重力環境下で生育した胚軸の同じ部域では、多くの細胞の微小管配向がまだ細胞長軸に対して直角方向であり、直角から平行方向への微小管配向の変化は、その下の頂部から 3 mm 前後の部域で認められた。すなわち、微小重力環境下では、細胞長軸に対して直角から平行方向への微小管配向の変化が抑制されることが明らかになった。

表層微小管配向に対する微小重力の影響をさらに確認するため、より詳細な解析をおこなった。シロイヌナズナ胚軸の表皮は、20 個の細胞から構成されている。この第 2 の解析方法では、各順番の表皮細胞それぞれに含まれる表層微小管 1 本 1 本の配向を、基準線からの角度として定量化した（図 1 6）。例えば、宇宙 1g 環境下で生育した胚軸の頂部

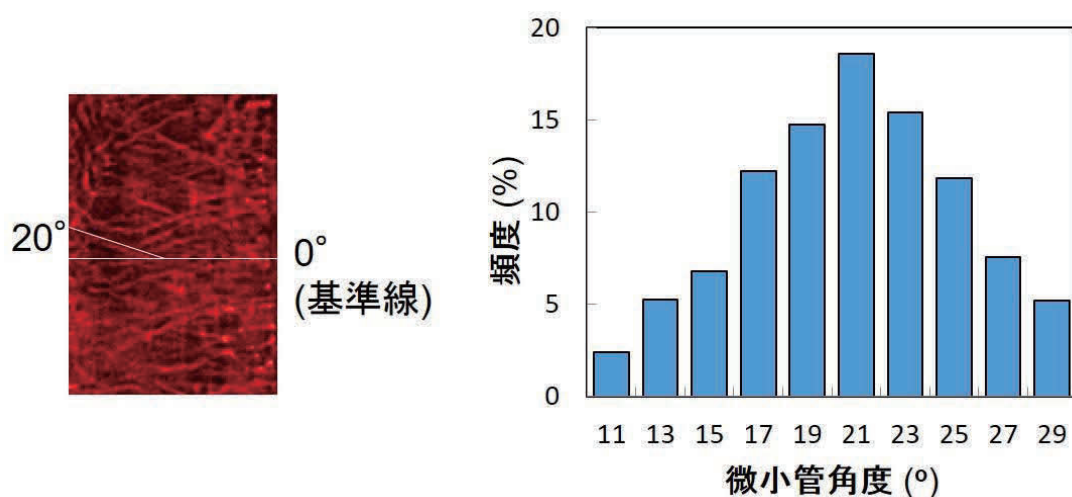


図 1 6 胚軸表皮細胞（頂部から 8 番目）における各微小管の配向角度分布

から 8 番目の細胞における表層微小管の角度を、細胞長軸に対して直角方向を 0° として測定すると、図 1 6 右図のような正規分布を示した。

図 1 7 は、宇宙 1g 及び微小重力環境下で生育した胚軸の頂部から 5 ～ 12 番目の細胞における表層微小管の角度を、それぞれ約 200 個の測定値の平均として算出した結果である。微小管の角度は胚軸の上部から基部にかけて、約 15° から 40° に増加しており、細胞長軸に対して直角から平行への配向変化が起きていることを示している。そして、両重力条件を比較すると、5 ～ 8 番目の細胞までは明確な傾向が認められなかったが、9 ～ 12 番目の細胞では微小重力環境下の方が微小管の角度が有意に小さくなっていた。9 ～ 12 番目の細胞は、頂部から 2 - 3 mm に位置しており、この部域での細胞長軸に対して直角から平行方向への微小管配向の変化が抑制されたことが確認できた。

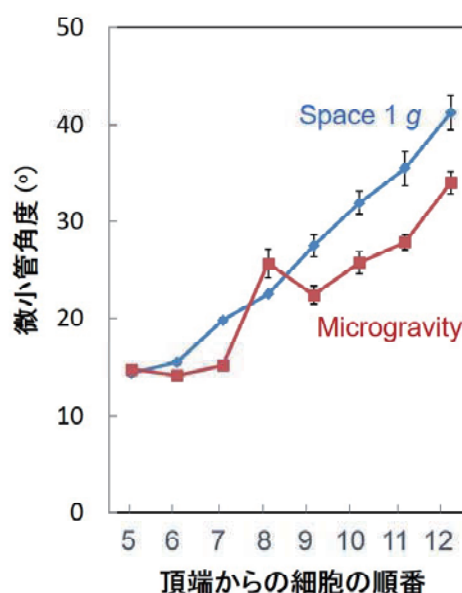


図 1 7 胚軸表皮細胞における微小管の配向に対する微小重力の影響

このような表層微小管の配向変化が細胞成長とどう関わるかについて明らかにするため、胚軸の頂部から基部にかけて、それぞれの順番の細胞の大きさ（長さ）を測定した（図18）。宇宙1g環境で生育した胚軸では、頂部から8～10番目の細胞が最も伸長成長していたが、微小重力環境下では、この部域より基部の広い部域で細胞が長くなっており、微小重力環境では伸長成長が長い期間にわたって維持されることが明らかになった。

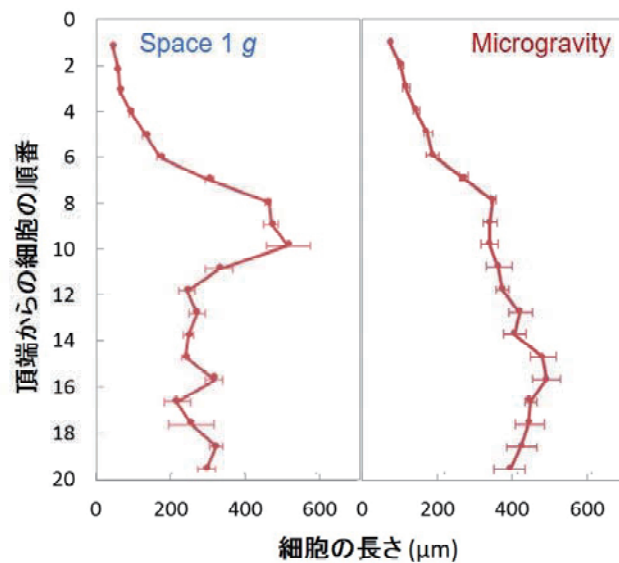


図18 胚軸表皮細胞の長さに対する微小重力の影響

図19は、宇宙1g環境下で生育した胚軸の頂部から5～10番目の細胞における、表層微小管の角度と細胞の長さの関係を解

析した結果である。同じ順番の細胞を見ると、右下がりの相関関係が見られ、微小管の角度が大きいほど細胞は短くなっていた。そして、全体としては、胚軸頂部から基部に向かって、微小管の角度も細胞の長さも大きくなることが示された。この結果も、微小管が細胞成長の方向を規定するという仮説を支持している。

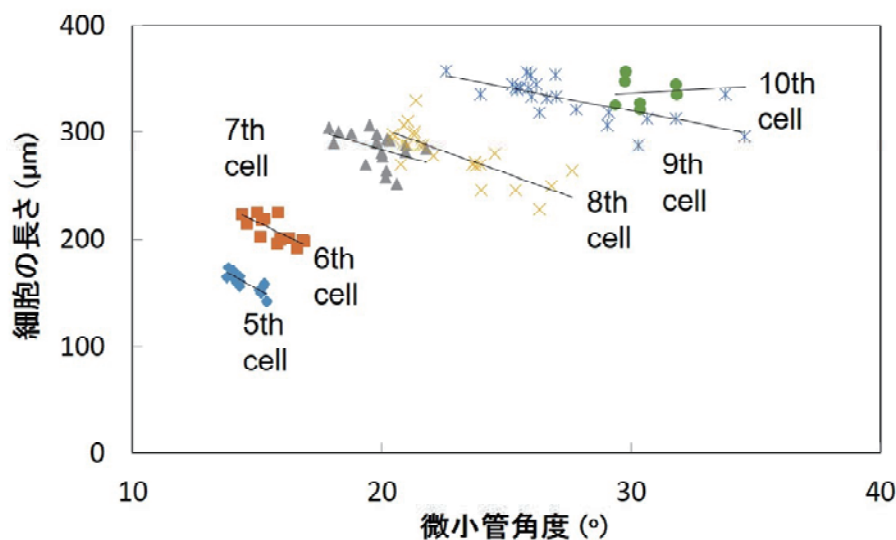


図19 胚軸表皮細胞の長さで微小管角度の関係



#### 4. 1. 3 実験3 (Run 3)「膜ラフトと微小管に関わる変異体の成長解析」

抗重力反応における膜ラフトと表層微小管の機能を検証するため、これらの細胞成分の構築と機能に関わる遺伝子を改変した突然変異体の生育に対する微小重力の影響を解析した。野生型シロイヌナズナ、膜ラフト変異体 *hmg1*、及び形質の程度が異なるチューブリン変異体 *tua4* と *tua6* を「きぼう」実験棟の CBEF 内で生育させ、形態と成長を観察した後、CFB に入れた RNAlater 溶液中で固定し、冷凍して回収した。地上で、回収試料を用いて細胞壁の物理的・化学的性質の測定、並びに遺伝子発現解析を行った。

##### ・成長

本実験で使用できた植物栽培容器 PEU は 4 個に限られていたため、野生型 *Columbia* と *hmg1*、*tua4* と *tua6* とを組み合わせ、それぞれ宇宙 1g 及び微小重力環境下で生育させた。このうち、*Columbia* と *hmg1* の微小重力区に関しては原因不明の不具合があり、発芽・生育が大幅に遅延した（図 20）。特に、*hmg1* では、生育期間を当初の予定の 30 日から 39 日まで延長したにも関わらず、花茎が全く出現しなかった。一方、*tua4* と *tua6* の組み合わせに関しては、宇宙 1g 区、微小重力区とも良好な発芽と成長が見られた（図 21）。全ての系統を通して、微小重力環境では、ロゼット葉がより長時間にわたって緑色に保たれ、アントシアニン形成や

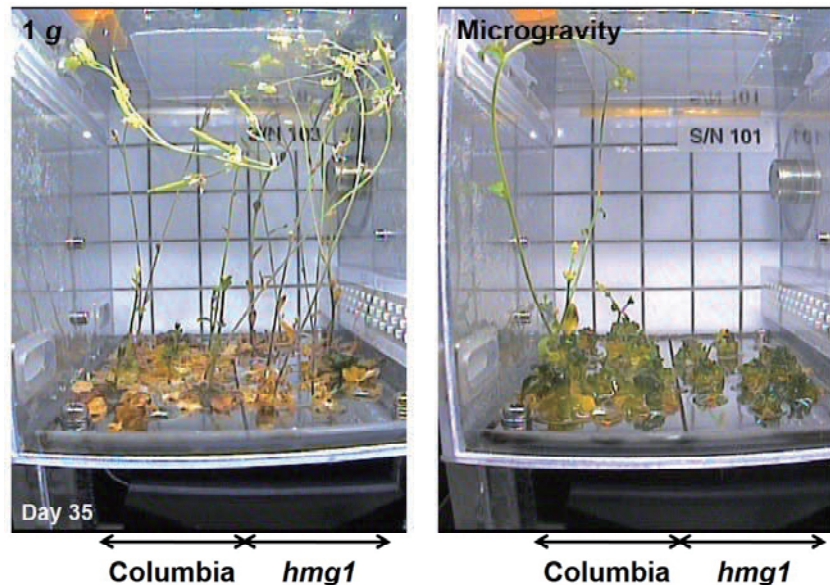


図 20 宇宙 1g 及び微小重力下で生育した *Columbia* と *hmg1*

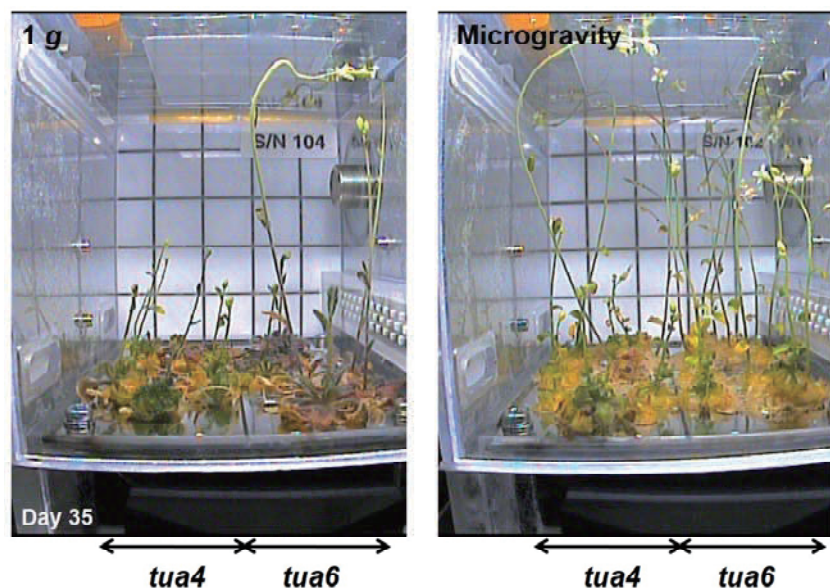


図 21 宇宙 1g 及び微小重力下で生育した *tua4* と *tua6*

枯死の程度が低くなっており、老化が抑制されたことがわかった。

シロイヌナズナでは、花茎の出現時期に個体間でばらつきが大きく、系統や生育環境によっても違いが見られる。本実験でも、早い個体では栽培開始後 22 日目に出現したのに対して、最も遅い個体では 36 日を要した。そこで、花茎の成長を比較するため、各々が出現した日を初日として揃え、以降の長さの増加について、毎日の撮影静止画を用いて定量化した。宇宙 1g 環境下では、野生型の花茎の成長が最も速く、*tua4* では強い、また *tua6* ではわずかな成長抑制が見られた。これに対して、微小重力環境下では、*tua4* の成長が大きく促進された（図 2 2）。

図 2 3 は、それぞれの系統の最終的な長さを比較している。宇宙 1g 環境下では、*tua4* で強い、また *tua6* では弱い矮性化が見られたのに対して、微小重力環境下では、*tua4* では大きく明瞭な、そして *tua6* では小さな成長促進が誘導され、最終長には 3 系統間で大きな差がみられなかった。微小重力環境下では、チューブリン変異体の成長形質が、その強さに応じて軽減されることが確認された。

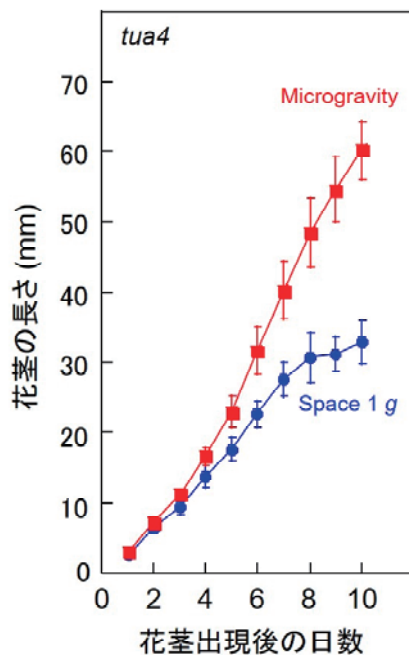


図 2 2 *tua4* 花茎の成長に対する微小重力の影響

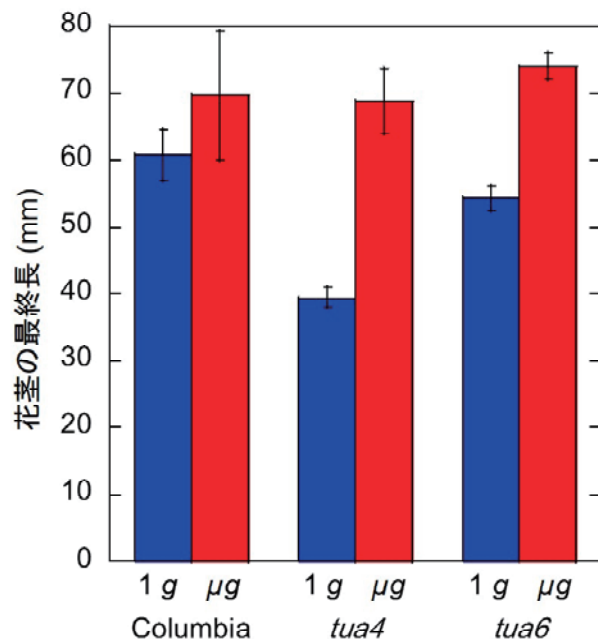


図 2 3 微小重力環境におけるチューブリン変異体花茎の成長促進

#### ・細胞壁の性質

抗重力反応の主要な応答過程は、細胞壁代謝の変化によってもたらされる強度の増加である。十分量の花茎試料が得られた *tua6* を用いて、細胞壁の物性及び構成多糖レベルに対する微小重力の影響を調べた。宇宙 1g 及び微小重力環境で 39 日間生育し、RNAlater 溶液中で冷凍、回収された花茎試料を、頂部から基部にいたる 10 mm 毎の部域に分け、エタノール中で固定した。試料を水に戻した後、引っ張り試験機を用いて stress-strain 法

による物性解析を行った。本実験では、後述の遺伝子発現解析のため、通常の細胞壁分析には使用しない RNAlater を用いて試料を固定したが、エタノール処理などの常法と比べて遜色のない解析データを得ることができた。

測定された細胞壁伸展性は、重力条件に関わらず、頂部の若い細胞からなる部域で大きく、中間部及び基部と比べて、10 倍以上の値を示した（図 2 4）。いずれの部域でも、微小重力環境で生育した花茎では、地上対照及び宇宙 1g 環境と比較して、細胞壁伸展性が大きい傾向にあった。ただし、頂部及び中間部では、差が小さいことに加えて試料間の誤差が大きく、細胞壁伸展性の差は有意ではなかった。これに対して、基部では、微小重力環境で 2 倍以上の伸展性を示し、両対照と比べて有意に大きくなっていた（図 2 4）。

植物細胞壁は、骨格に相当するセルロース繊維と、セルロース間を埋めているマトリックス、そして多糖間に架橋するフェノールや構造的タンパク質から構成される。そこで、物性測定後の花茎各部域の試料から細胞壁標品を調製し、それぞれの成分を定量した。花茎頂部では、宇宙 1g 及び微小重力環境で生育した試料の単位長さ当たりのセルロース及びマトリックス量は、地上対照と比べて 30% 程度少なかったが、宇宙 1g と微小重力環境の間では差は見られなかった（図 2 5）。これに対して、基部では、微小重力環境で生育した試料の単位長さ当たりのセルロース及びマトリックス量は、地上対照の約 40 %、また宇宙 1g の約 55 %程度であり、大きく減少していた（図 2 6）。そして、基部では、細胞

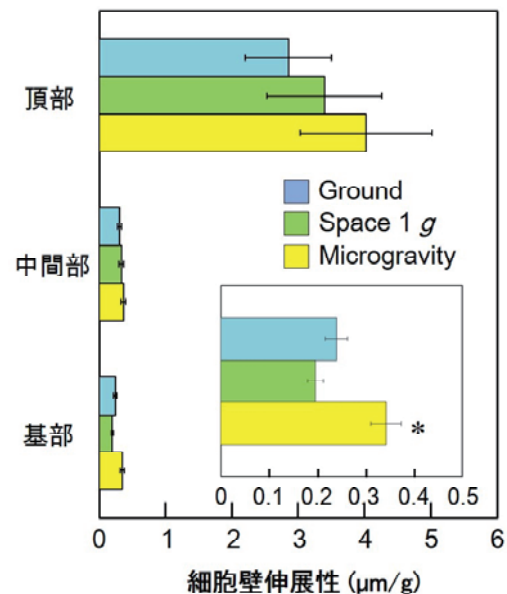


図 2 4 花茎の細胞壁伸展性に対する微小重力の影響

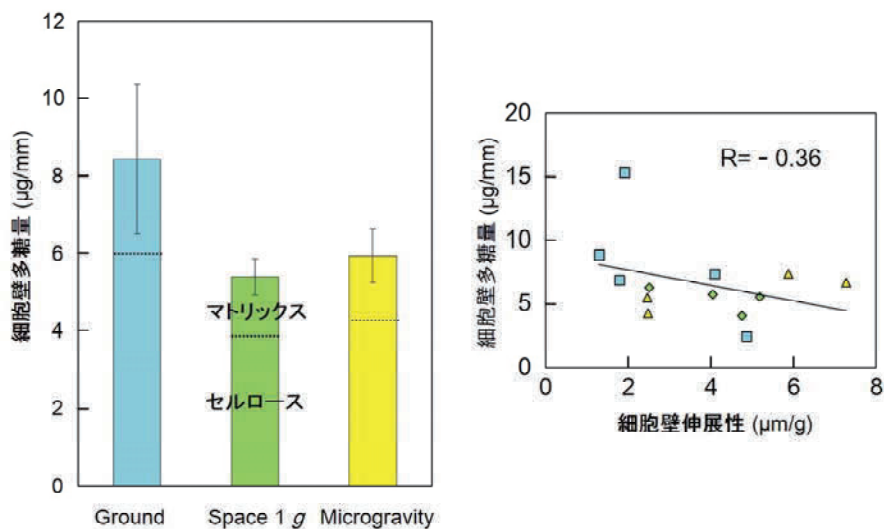


図 2 5 花茎頂部の細胞壁多糖レベルに対する微小重力の影響



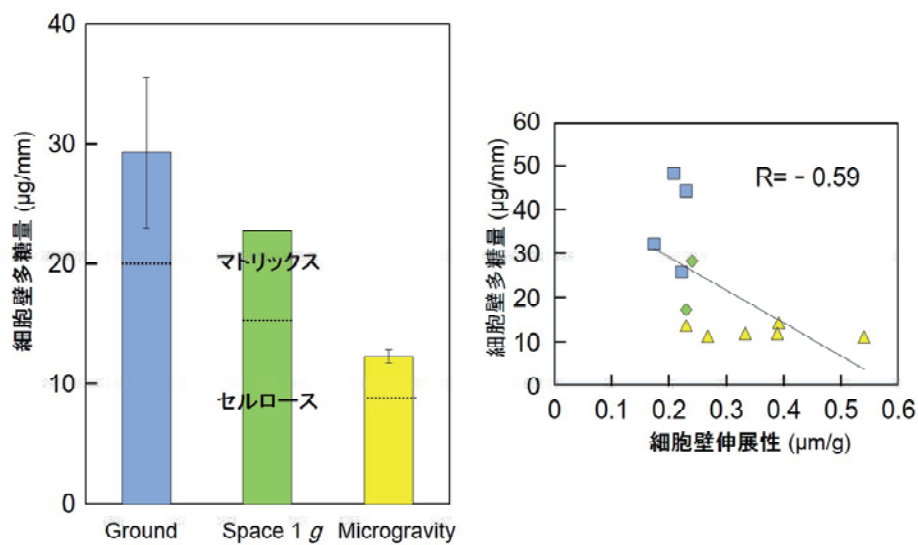


図 2 6 花茎基部の細胞壁多糖レベルに対する微小重力の影響

壁伸展性とこれらの多糖レベルとの間で負の相関が認められた。

細胞壁中のフェノールや及びタンパク質レベルに対する微小重力の影響を調べるため、これらの試料のセルロース画分を可溶化して、紫外部域の吸収を測定した。しかし、いずれの部域でも重力環境による有意な違いは認められなかった。すなわち、微小重力の影響は主に構成多糖類のレベルに現れることがわかった。

#### ・ 遺伝子発現

遺伝子発現に対する微小重力の影響を解析するため、花茎頂部及び基部試料から total RNA を調製し、委託解析に供した。本実験で得られた試料の量には限りがあり、特に野生型については十分量が得られなかったため、頂部については *tua4* の試料を次世代シーケンサーで、また基部については *tua6* の試料をマイクロアレイにより解析した。先行して実施された実験 2 では、一部の試料で KFT からの固定液の漏れが見つかったため、本実験では JAXA によって急遽開発された固定容器 CFB (chemical fixation bag) が使用されたが、固定並びに試料の保存状態は良好であった。

膜ラフト構築、微小管の構築と配向調節、そして細胞壁代謝に関わる代表的な遺伝子の発現について、微小重力／宇宙 1g の比 (log2 底) として、図 2 7～図 2 9 に示す。抗重力反応では、重力シグナルは細胞膜上のメカノレセプター (機械的刺激受容イオンチャネル) によって受容されと考えられており、その候補遺伝子として *MCA* が単離されている (12)。まず、シロイヌナズナに 2 つある *MCA* 遺伝子の発現を見ると、頂部では両方の、また基部では *MCA1* の発現が微小重力環境下で減少していた (図 2 7)。すなわち、*MCA* が重力シグナルの受容に関わっていることが示唆される。また、花茎基部では、膜ラフト構築に関わる *HMG1*、及び膜ラフト構成タンパク質の 1 つである *Remorin* をコードする遺伝子の発現も微小重力環境下で減少していた (図 2 7)。一方、花茎頂部では、*HMG* 及び *Remorin* 遺伝子の発現変化は明瞭ではなかったが、*HMG* 以降のイソプレノイド合成

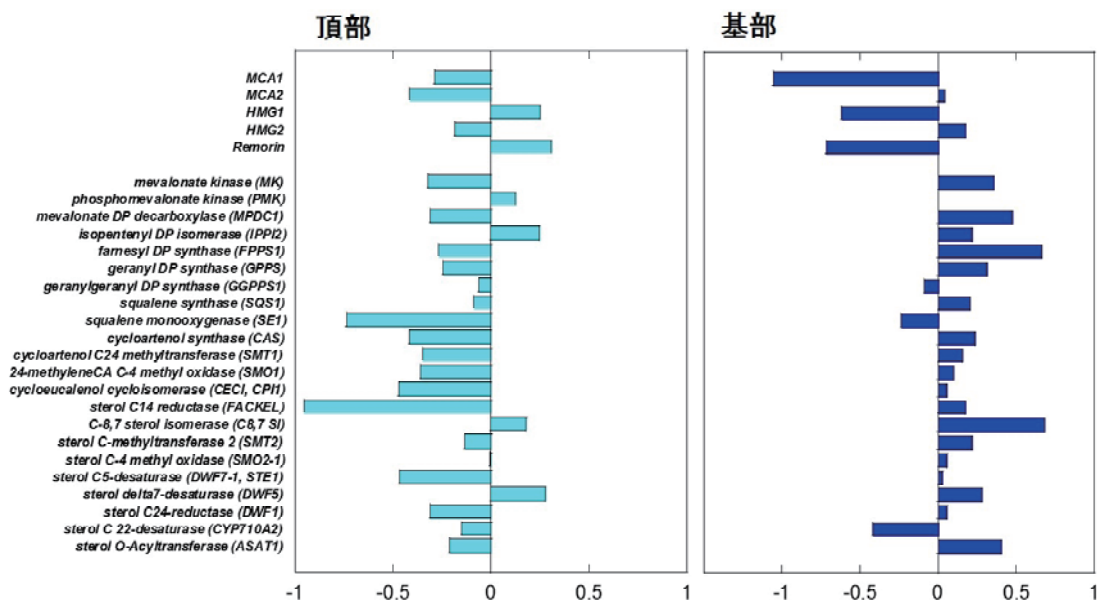


図 2-7 膜ラフト関連遺伝子の発現に対する微小重力の影響  
数値は微小重力／宇宙 1g の比 (log2 底) である

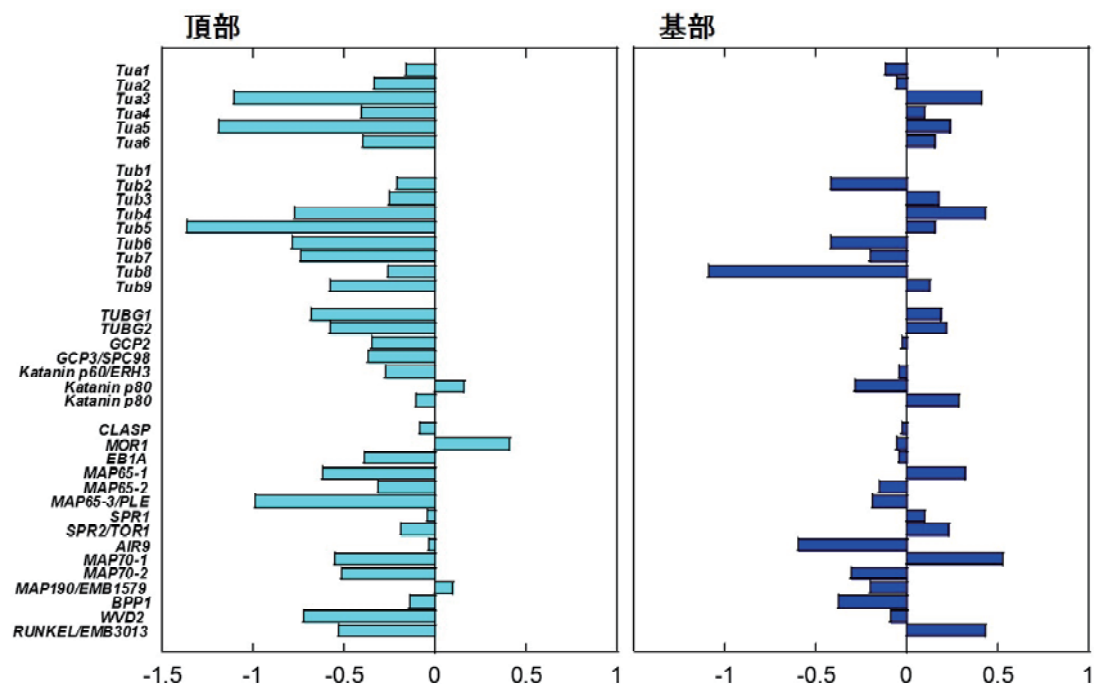


図 2-8 微小管関連遺伝子の発現に対する微小重力の影響

経路に関わる多くの遺伝子の発現が微小重力環境下で減少する傾向が見られた。

図 2-8 は、微小管関連遺伝子の発現に対する微小重力の影響を示している。花茎頂部では、6 つの  $\alpha$ -チューブリン遺伝子 (*Tua1* ~ *Tua6*) と 9 つの  $\beta$ -チューブリン遺伝子 (*Tub1*



～ *Tub9*) すべて、そして微小管配向の変化に関わる遺伝子群 ( $\gamma$ -チューブリン *TUBG*、*GCP*、カタニン) の多くの発現が、微小重力環境下で明らかに減少することがわかった。また、微小管結合タンパク質遺伝子にも、微小重力環境で発現が減少する傾向を示すものがあった。一方、花茎基部では、微小重力環境による明瞭な影響は認められなかった。

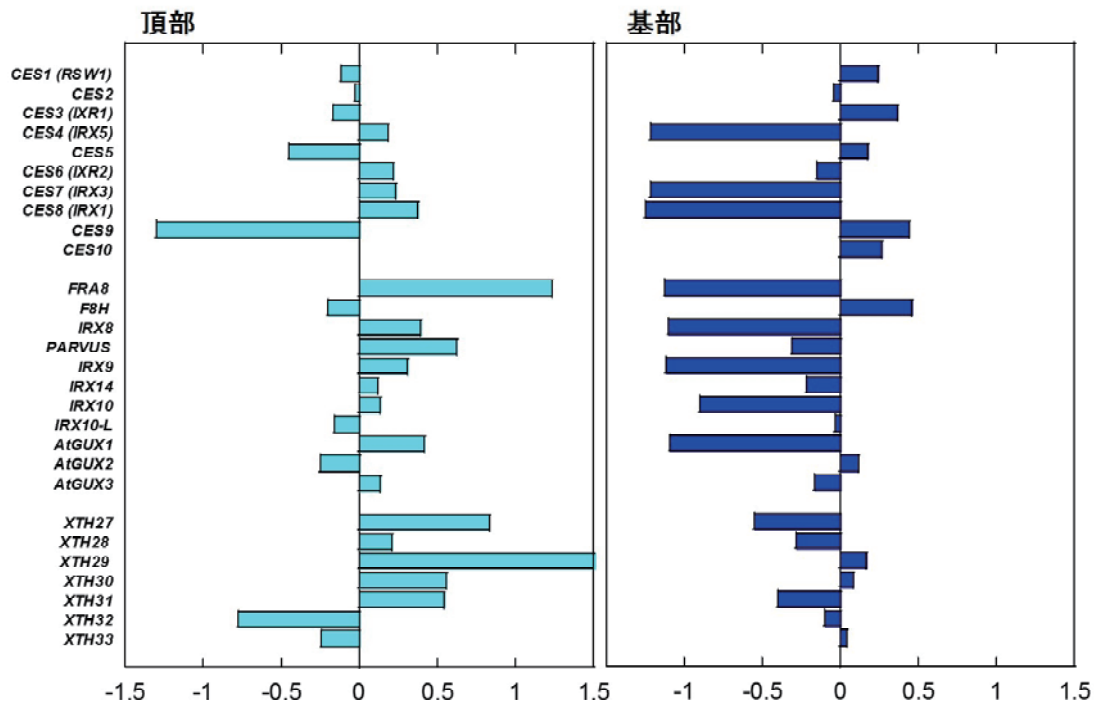


図 29 細胞壁関連遺伝子の発現に対する微小重力の影響

細胞壁関連遺伝子の発現に対する微小重力の影響に関しても、花茎頂部と基部で明瞭な差が認められた (図 29)。頂部では、細胞壁多糖の合成関連遺伝子の発現に関しては一定の傾向が見られなかったが、主要なマトリックス多糖であるキシログルカンの分解に関わるキシログルカン加水分解・転移酵素 XTH の第 3 グループ (XTH27 ～ XTH33) の多くの遺伝子の発現が、微小重力環境で増加していた。一方、基部では、セルロース合成遺伝子 *CES* の内で、特に木部等の支持組織に多い二次細胞壁のセルロース合成に関わる *CES4*、*CES7*、及び *CES8* 遺伝子の発現、またキシランなどのマトリックス多糖の合成に関わる多くの遺伝子の発現レベルが、微小重力環境で低下することがわかった。基部では、頂部とは逆に、*XTH* 遺伝子群の発現には大きな変化は見られなかった。

#### 4. 2 成果

前項では、それぞれの実験 (Run) で得られた結果について、実験の進行に沿って示したが、以下、本実験で対象とした細胞成分毎に得られた成果をまとめる。

#### 4. 2. 1 抗重力反応における表層微小管の機能

本実験では、表層微小管の機能に関して、最も充実した成果が得られた。

*TUA6* 遺伝子の発現は、胚軸頂部から基部に向かって加齢に伴う減少を示したが、微小重力環境下では、地上や宇宙 1g の試料と比べて、減少がより速やかであった（図 6）。実際、花茎頂部では、 $\alpha$ -チューブリンの 6 遺伝子と  $\beta$ -チューブリンの 9 遺伝子のすべて、そして微小管配向の変化に関わる遺伝子群（ $\gamma$ -チューブリン *TUBG*、*GCP*、カタニン）の多くの発現が、微小重力環境下で明らかに減少していた（図 28）。また、胚軸の頂部から 2 mm 付近（頂部から約 1/3）の成長終了部域で起こる、細胞長軸に対して直角から平行方向への微小管配向の変化が、微小重力環境下では抑制されることが 2 種類の解析方法により明らかになった（図 15、図 17）。微小重力環境下では、このような微小管配向変化の抑制に伴って、細胞伸長成長が長い期間にわたって維持され（図 18）、胚軸全体の成長方向も伸長成長を促進するように変化していた（図 13）。さらに、1g 環境下では、野生型の花茎と比べて、*tua4* では強い、また *tua6* ではわずかな成長抑制が認められたが、微小重力環境下ではいずれの系統でもほぼ同程度の成長が認められ、微小重力環境下では、チューブリン変異体の成長形質変異がその強さに応じて軽減されることが明らかになった（図 22、図 23）。以上の結果から、微小重力環境では、チューブリン及び関連遺伝子の発現が抑制され、細胞長軸に対して横向きから縦向きへの表層微小管の配向変化が抑制される結果、細胞の伸長成長が促進され、茎器官の成長も正常に維持されることが示された。これにより、表層微小管が、過重力に対する抗重力反応のみならず、1g に対する抗重力反応においても、重力シグナルの変換・伝達において重要な役割を果たしている、という仮説が明確に支持された。

表層微小管の配向の調節には、微小管結合タンパク質 MAPs が関わりと考えられている。本実験の結果、微小重力環境における微小管配向の抑制に  $\gamma$ -チューブリンやカタニンが関わる一方、*SPR2* や *EB1* は直接関与しないことが示唆された。抗重力反応における微小管結合タンパク質の役割の詳細に関しては、共同研究者の曽我が代表者を務める Aniso Tubule 実験が進行中であり、その成果に期待したい。

#### 4. 2. 2 抗重力反応における膜ラフトの機能

抗重力反応における重力シグナルの受容に関わるメカノレセプター *MCA* 遺伝子の発現は、微小重力環境下で減少した（図 27）。微小重力環境下では、花茎基部において、膜ラフト構築に関わる *HMG1* 及び膜ラフト構成タンパク質 *Remorin* の遺伝子の発現、一方、花茎頂部では、*HMG* 以降のイソプレノイド合成経路に関わる多くの遺伝子の発現も減少していた（図 27）。また、微小重力環境下では、GFP-RAFT1 による膜ラフト由来の蛍光強度が減少していた（図 9）。同様の傾向が地上回収試料の解析でも得られた。以上の結果は、膜ラフトが 1g に対する抗重力反応においても、重力シグナルの変換・伝達に働くことを示している。

1g に対する抗重力反応における膜ラフトの機能をさらに確認するため、膜ラフト変異体 *hmg1* の生育に対する微小重力の影響を調べた。抗重力反応の必要がない微小重力環境

下では、*hmg1* 花茎の矮性形質が軽減されることが予想された。しかし、生育期間を当初の予定の 30 日から 39 日まで延長したにも関わらず、微小重力環境下では、*hmg1* の花茎が全く出現しなかった（図 20）。この実験区では、野生型 Columbia でも発芽・生育の遅延が見られたので、給水に何らかのトラブルが生じたと推定されるが、花茎が全く出現しないのは想定外であった。

シロイヌナズナの花茎は、普通の植物の茎とは異なって、生殖器官である花を着けるために形成される。したがって、この結果は、微小重力環境下では *hmg1* 変異体の生殖過程が強く抑制されることを示唆している。*hmg1* は元々生殖能力が低く、1g 下でも通常は不稔となる（13）。一方、微小重力環境下では、野生型シロイヌナズナでも生殖が抑制されることが Space Seed 実験により示されている（16）。この両方の要因が重なって、花茎の出現が強く抑制された可能性がある。この可能性については、今後の宇宙実験で検証したい。あわせて、今回の結果は、宇宙において植物を栽培し生殖による世代交代を行う際には、十分な注意が必要であることを示している。

微小重力環境における膜ラフト関連遺伝子の発現抑制は、*tua4* 及び *tua6* の花茎において認められた。この結果は、微小管から膜ラフトへのシグナル伝達はあまり重要な機能を果たしていないことを示唆している。図 1 に示した仮説においても、逆に、MCA から微小管へのシグナル伝達に膜ラフトが介在することが想定されている。本実験では、*hmg1* の花茎が得られなかったので、膜ラフトから微小管へのシグナル伝達に関しては検証することができなかった。

#### 4. 2. 3 抗重力反応における細胞壁の機能

微小重力環境で生育した花茎では、地上対照及び宇宙 1g 環境と比較して、細胞壁伸展性が大きい傾向にあった。花茎の頂部及び中間部では差が小さく有意ではなかったが、基部では微小重力環境で 2 倍以上の伸展性を示し、両対照と比べて有意に大きくなっていた（図 24）。花茎基部ではまた、細胞壁を構成するセルロース及びマトリックス量が、微小重力環境で大きく減少しており、細胞壁伸展性と両多糖レベルとの間で負の相関が認められた（図 26）。さらに、基部では、セルロース合成遺伝子 *CES* の内で、特に木部等の支持組織を構成する二次細胞壁のセルロース合成に関わる *CES4*、*CES7*、及び *CES8* 遺伝子の発現、またキシランなどのマトリックス多糖の合成に関わる多くの遺伝子の発現が、微小重力環境で減少することがわかった（図 29）。以上の結果から、微小重力環境では、花茎基部で、二次細胞壁構成多糖の合成に関わる遺伝子群の発現が抑制され、多糖レベルが減少して、細胞壁が柔らかく保たれることが示された。これにより、細胞壁が過重力に対する抗重力反応のみならず、1g に対する抗重力反応においても、最終的な応答過程を司ることが明確に支持された。

#### 4. 2. 4 想定外の成果

植物の抗重力反応における最終的な応答過程は、主に、表層微小管の配向を変えて細胞の成長方向を縦向き（伸長成長）から横向き（肥大成長）に変化させる機構と、細胞壁構

成分代謝過程を修飾して細胞壁の強度を増加させる機構、の2つから構成されている。本実験の実施前には、両方の機構が同時に起こることを想定していた（図1）。しかし、本実験の結果、2つの機構が時間的にも空間的にも分離されていることが明らかになった。すなわち、まず、成長終了部域で、微小管配向の変化による茎の肥大促進が誘導され、その後、植物体全体を支える働きをしている基部において、二次細胞壁の合成促進による細胞壁強度の増加が起こり、抗重力反応過程が完結することになる。このように、本宇宙実験の結果、抗重力反応機構が、1g から過重力にいたる広い重力範囲に普遍的に適用できることが示されたのみならず、抗重力反応を構成する2つの機構が時間的、空間的に独立して制御されていることが明らかになった。

#### 4. 2. 5 技術的成果

本宇宙実験では、上記の科学的成果以外に、技術面でも様々な成果が得られた。今後の宇宙実験に有効に利用可能であると思われる。

（1）（植物栽培容器）植物体を生育させてそのまま顕微鏡で観察できる蛍光顕微観察容器が新規開発された。

（2）（培地）宇宙植物栽培用培地としてハトシート（セルロース製不織布）が有効であることが示された。

（3）（顕微鏡操作）地上からのコマンドによって軌道上の顕微鏡観察を行う操作手順が確立された。

（4）（CB 顕微鏡）冷却 EM-CCD の付加により CB 顕微鏡を蛍光顕微鏡として使用することが可能になった。

（5）（固定容器）KFT に代わる生物試料固定容器として、CFB（chemical fixation bag）が新規開発された。

（6）（固定液の保存性）長期保存した固定液（1.5%ホルムアルデヒド+ 0.5%グルタルアルデヒド）の有効性、及び固定液中で液交換なしに長期保存した植物試料の利用可能性が検証できた。

（7）（RNAlater の有用性）：RNAlater が、遺伝子の保存ばかりでなく、生理活性や化学構造の維持にも有効であることが示された。

（8）（試料の効率的使用）1つの RNAlater 固定試料から、遺伝子発現、細胞壁物性、酵素活性、細胞壁化学構造を連続的に分析する操作手順が確立できた。

#### 4. 2. 6 サクセスクライテリアの達成度

実験1～3（Run 1～3）について、Full Success が達成できた。また、4. 2. 4 項に示したように、当初は想定していなかった重要な成果も得られた。



サクセス	クライテリア	達成度
Minimum Success	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Run-1 (蛍光顕微鏡観察) Inc 39/40 μG群について、種子が発芽し、幼植物体の蛍光顕微鏡観察ができる。</li> <li>•Run-2 (化学固定回収) Inc33/34 μG群について、化学固定して回収された幼植物体の膜ラフトと表層微小管の形成と形態が観察できる。</li> <li>•Run-3 (遺伝子解析) Inc 37/38 μG群について、種子が発芽・成育し花茎を遺伝子保存処理して回収されたサンプルから観察(細胞壁特性、生理活性、遺伝子発現)ができる。</li> </ul>	○
Full Success	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Run-1 (蛍光顕微鏡観察) Inc 39/40 1G対照群についても幼植物体を得ることができ、蛍光顕微鏡観察がなされる。その結果、微小管と膜ラフトの動態に関して微小重力の影響が比較により見出すことができる。</li> <li>•Run-2 (化学固定回収) Inc33/34 1G対照群についても、化学固定して回収された幼植物体の膜ラフトと表層微小管の形成と形態を観察できる。</li> <li>•Run-3 (遺伝子解析) Inc 37/38 1G対照群についても花茎を得ることができ、遺伝子保存処理と凍結回収できる。その結果、微小重力の影響を観察(細胞壁特性、生理活性、遺伝子発現)ができる。</li> </ul>	○
Extra Success	Run1, Run2, Run3の結果から、微小管と膜ラフト以外の細胞成分の動態に対する微小重力の影響が仮説どおりであることが示される。	△

#### 4. 3 成果の意義

本実験で得られた成果は、以下のような様々な意義・波及効果を持つ。

##### (1) 抗重力反応機構の解明

クリノスタット等を用いた地上実験では真の微小重力環境を十分な時間設定できないので、1g に対する抗重力反応機構を解析するためには宇宙実験を行う必要があった。本宇宙実験では、「きぼう」実験棟の宇宙環境を有効に利用して、重力屈性と並ぶ植物の主要な重力反応である抗重力反応の普遍的な機構を明らかにすることができた。

##### (2) 生物の進化過程の解明

植物は、数億年前にパイオニアとして海から陸上に進出して以来、陸上植物として多彩に進化、繁栄してきた。その過程に、抗重力反応の獲得は不可欠であった。したがって、本実験の成果は、植物の進化、並びに植物の進出に導かれて陸上で生活するようになった我々動物の進化の道筋を理解するためにも重要である。

##### (3) 他の環境応答機構解明への貢献

抗重力反応と光などの他の環境応答反応とは、シグナル変換・伝達から応答に至る機構の一部を共有している。したがって、本実験の成果は、他の環境応答機構の理解にも貢献できる。

##### (4) 細胞機能解明への貢献

本実験により、抗重力反応における膜ラフト及び微小管の新しい機能が解明された。特に、植物細胞における膜ラフトの機能に関しては、ようやく研究され始めたところであり、本実験の成果は、細胞機能学上も新規の視点をもたらす。



#### (5) 成長調節・形態形成機構の理解への貢献

抗重力反応の最終的な応答を司る細胞壁は、成長調節や形態形成においても重要な役割を担っている。本実験の成果は、これらの生理過程の理解にも貢献できる。

#### (6) 宇宙環境下での植物生産の効率化

月や火星での人類の長期滞在のためには、食糧供給や環境浄化の担い手である植物を効率的に生産することが必要である。植物は、地上では、抗重力反応に過剰な投資をしており、光合成で同化したエネルギーの 50%以上（樹木では 90%以上）を細胞壁として蓄えている。抗重力反応を示す必要がない宇宙の微小重力環境では、その分のエネルギーを有用成分の生産に振り向けられる可能性がある。抗重力反応機構の解明は、宇宙惑星居住の実現や有人宇宙学の確立に不可欠であり、本実験の成果は、抗重力反応機構の改変による「宇宙作物」の作出を通して、この面でも貢献できる。

#### (7) 地球上での植物生産の効率化

宇宙での効率的な植物生産のための知識や技術は、地球上での植物生産性の向上にも直結しており、本実験の成果は、食糧危機や環境破壊などの社会が直面している諸問題の解決、ひいては地球上での人類の長期生存にも寄与できる。

### 5. 結言

ISS・きぼう利用ミッション「植物の抗重力反応機構—シグナル変換・伝達から応答まで (Resist Tubule)」により、以下の成果が得られた。

(1) 表層微小管が、過重力に対する抗重力反応のみならず、1g に対する抗重力反応においても、重力シグナルの変換・伝達において重要な役割を果たしている、という仮説が明確に支持された。

(2) 膜ラフトが 1g に対する抗重力反応においても、重力シグナルの変換・伝達に働くことが示された。

(3) 細胞壁が 1g に対する抗重力反応においても、最終的な応答過程を司ることが明確に支持された。

(4) 抗重力反応を構成する 2 つの機構（微小管配向変化による肥大成長促進、細胞壁強度の増加）が時間的、空間的に分離しており、独立して制御されていることが明らかになった。

#### [参考文献]

- (1) Hoson T, Soga K (2003) New aspects of gravity responses in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 229: 209-244.
- (2) Hoson T, Saito Y, Soga K, Wakabayashi K (2005) Signal perception, transduction, and response in gravity resistance. Another graviresponse in plants. *Adv. Space Res.* 36: 1196-1202.
- (3) 保尊隆享 (2002) 宇宙環境における植物の成長と形態形成. *生物学* 80: 300-303.
- (4) Hoson T, Soga K and Wakabayashi K (2009) Role of the cell wall-sustaining system in

- gravity resistance in plants. Biol. Sci. Space 23: 131-136.
- (5) Hoson T, Matsumoto S, Soga K, Wakabayashi K (2010) Cortical microtubules are responsible for gravity resistance in plants. Plant Signal. Behav. 5: 752-754.
- (6) 保尊隆享 (2005) 植物の抗重力反応ーシグナル受容、変換・伝達、そして応答。生物学 83: 565-567.
- (7) 保尊隆享、曾我康一、若林和幸 (2010) 国際宇宙ステーション実験による植物の抗重力反応機構の解明。生物工学 88: 292-295.
- (8) Hoson T, Soga K, Mori R, Saiki M, Wakabayashi K, Kamisaka S, Kamigaichi S, Aizawa S, Yoshizaki I, Mukai C, Shimazu T, Fukui K, Yamashita M (1999) Morphogenesis of rice and Arabidopsis seedlings in space. J. Plant Res. 112: 477-486.
- (9) Hoson T, Soga K, Mori R, Saiki M, Nakamura Y, Wakabayashi K, Kamisaka S (2002) Stimulation of elongation growth and cell wall loosening in rice coleoptiles under microgravity conditions in space. Plant Cell Physiol. 43: 1067-1071.
- (10) Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T (2002) Stimulation of elongation growth and xyloglucan breakdown in Arabidopsis hypocotyls under microgravity conditions in space. Planta 215: 1040-1046.
- (11) Hoson T, Matsumoto S, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T, Sonobe S, Muranaka T, Kamisaka S, Kamada M, Omori K, Ishioka N, Shimazu T (2009) Growth and cell wall properties in hypocotyls of Arabidopsis *tua6* mutant under microgravity conditions in space. Biol. Sci. Space 23: 71-76.
- (12) Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T, Kishigami A, Sokabe M, Kojima I, Sato S, Kato T, Tabata S, Iida K, Terashima A, Nakano M, Ikeda M, Yamanaka T, Iida H (2007) *Arabidopsis* plasma membrane protein crucial for Ca<sup>2+</sup> influx and touch sensing in roots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 3639-3644.
- (13) Suzuki M, Kamide Y, Nagata N, Seki H, Ohyama K, Kato H, Masuda K, Sato S, Kato T, Tabata S, Yoshida S, Muranaka T (2004) Loss of function of *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1)* in *Arabidopsis* leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels. Plant J. 37: 750-761.
- (14) Ishida T, Kaneko Y, Iwano M, Hashimoto T (2007) Helical microtubule arrays in a collection of twisting tubulin mutants of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 8544-8549.
- (15) Matsumoto S, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T, Hoson T (2010) Gravity-induced modifications to development in hypocotyls of Arabidopsis tubulin mutants. Plant Physiol. 152: 918-926.
- (16) 神阪盛一郎 (2011) 「きぼう」利用科学実験テーマ実験成果報告書「微小重力環境における高等植物の生活環 (Space Seed)」。

## [成果リスト]

### ・学術論文

- 1) Hoson T, Akamatsu H, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto H, Yamashita M, Hasegawa K, Yano S, Omori K, Ishioka N, Matsumoto S, Kasahara H, Shimazu T, Baba SA, Hashimoto T (2012) Objectives, outlines, and preparation for the Resist Tubule space experiment to understand the mechanism of gravity resistance in plants. *Aerospace Technol. Japan* 10: Tp 1-5.
- 2) Yano S, Kasahara H, Masuda D, Tanigaki F, Shimazu T, Suzuki H, Karahara I, Soga K, Hoson T, Tayama I, Tsuchiya Y, Kamisaka S (2013) Improvements in and actual performance of the Plant Experiment Unit onboard Kibo, the Japanese Experiment Module on the International Space Station. *Adv. Space Res.* 51: 780-788. IF: 1.4.
- 3) Hoson T (2014) Plant growth and morphogenesis under different gravity conditions: Relevance to plant life in space. *Life* 4: 205-216. CF: 1.9.
- 4) Hoson T, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T, Karahara I, Yano S, Tanigaki F, Shimazu T, Kasahara H, Masuda D, Kamisaka S (2014) Growth stimulation in inflorescences of an *Arabidopsis* tubulin mutant under microgravity conditions in space. *Plant Biol.* 16(S1): 91-96. IF: 2.2
- 5) Hoson T, Wakabayashi K (2015) Role of the plant cell wall in gravity resistance. *Phytochemistry* 112: 84-90. IF: 2.8
- 6) Kittang Jost A-I, Hoson T, Iversen T-H (2015) The utilization of plant facilities on the international space station - The composition, growth, and development of plant cell walls under microgravity conditions. *Plants* 4: 44-62.
- 7) Murakami M, Soga K, Kotake T, Kato T, Hashimoto T, Wakabayashi K, Hoson T (2016) Roles of MAP65-1 and BPP1 in gravity resistance of *Arabidopsis* hypocotyls. *Biol. Sci. Space* 30: 1-7
- 8) Hoson T, Kato S, Murakami M, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto H, Yamashita M, Hasegawa K, Higashibata A, Yano S, Hoshida A, Matsumoto S, Kasahara H, Osada I, Kamada M, Shimazu T, Muranaka T, Hashimoto T (2017) The mechanism of gravity resistance in plants - Analysis by the Resist Tubule space experiment. *J. Gravit. Physiol.* (in press)

### ・出版

- 1) Soga K, Yano S, Matsumoto S, Hoson T (2015) Hypergravity experiments to evaluate gravity resistance mechanisms in plants. In *Plant Gravitropism: Methods and Protocols* (Ed. Blancaflor EB). *Methods Mol. Biol.* p. 307-319.

### ・学会発表

- 1) Hoson T, Soga K, Wakabayashi K and Kamisaka S. Growth and cell wall changes in stem organs under microgravity and hypergravity conditions. 38th Committee on Space Research

- Scientific Assembly, Bremen, 2010.
- 2) Hoson T, Matsumoto S, Inui K, Zhang Y, Soga K, Wakabayashi K and Hashimoto T. Cellular basis of gravity resistance in plants. 38th Committee on Space Research Scientific Assembly, Bremen, 2010.
  - 3) Hoson T, Soga K, Wakabayashi K and Kamisaka S. Cellular mechanisms of gravity resistance in plants. 日本宇宙生物科学会第 24 回大会, 仙台, 2010 年.
  - 4) 赤松春彦、松本翔平、曾我康一、若林和幸、橋本隆、保尊隆享. 「Resist Tubule」宇宙実験における表層微小管動態の解析方法の検討. 日本宇宙生物科学会第 24 回大会, 仙台, 2010 年.
  - 5) 保尊隆享、神阪盛一郎、高橋秀幸、山下雅道、北宅善昭、飯田秀利、村中俊哉、橋本隆、園部誠司、谷本英一、西谷和彦、井上雅裕、唐原一郎、小竹敬久、榊剛、久米篤、若林和幸、曾我康一. 植物の抗重力反応解明. 第 27 回宇宙利用シンポジウム, 相模原, 2011 年.
  - 6) 保尊隆享. 国際宇宙ステーションにおける宇宙生命科学研究計画. 日本学術会議シンポジウム「生命科学の将来に向けたマスタープラン」, 東京, 2011 年.
  - 7) Hoson T, Akamatsu H, Soga K and Wakabayashi K. The objectives and outlines of the Resist Tubule space experiment. 28th International Symposium on Space Technology and Science, Okinawa, 2011.
  - 8) 保尊隆享. 陸上植物の繁栄を支えた抗重力反応 — その特性とメカニズム. 理化学研究所シンポジウム「きぼう」に夢を乗せて, 和光, 2011 年.
  - 9) 保尊隆享、神阪盛一郎、高橋秀幸、山下雅道、北宅善昭、飯田秀利、村中俊哉、橋本隆、園部誠司、谷本英一、西谷和彦、井上雅裕、唐原一郎、小竹敬久、榊剛、久米篤、若林和幸、曾我康一. 植物の抗重力反応解明. 第 28 回宇宙利用シンポジウム, 東京, 2012 年.
  - 10) Hoson T, Otomi Y, Zhang Y, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T, Iida H and Kamisaka S. Plant perception and response to the signal in gravity resistance. 39th Committee on Space Research Scientific Assembly, Mysore, 2012.
  - 11) Hoson T. Mechanisms of gravity resistance in plants. ISLSWG International Symposium "Plant Biology in Space", Freiburg, 2012.
  - 12) 雑賀遼、曾我康一、若林和幸、橋本隆、保尊隆享. シロイヌナズナ新規チューブリン変異体の成長形質と重力応答. 日本宇宙生物科学会第 26 回大会, 徳島, 2012 年.
  - 13) 加藤志朋、村上愛、曾我康一、若林和幸、保尊隆享. Resist Tubule 宇宙実験のためのシート培地および固定操作方法の検討. 日本宇宙生物科学会第 26 回大会, 徳島, 2012 年.
  - 14) Hoson T, Kato S, Murakami M, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto H, Yamashita M, Hasegawa K, Higashibata A, Yano S, Matsumoto S, Kasahara H, Osada I, Kamada M, Shimazu T, Muranaka T and Hashimoto T. Understanding the mechanism of gravity resistance in plants by the Resist Tubule space experiment. 34th Annual International Gravitational Physiology Meeting, Toyohashi, 2013.
  - 15) Soga K, Kotake T, Wakabayashi K and Hoson T. Roles of cortical microtubules and



- microtubule-associated proteins in gravity-induced growth modification of plant stems. 34th Annual International Gravitational Physiology Meeting, Toyohashi, 2013.
- 16) 保尊隆享. 植物の抗重力反応. 日本農芸化学会関西支部講演会・シンポジウム, 大阪, 2013 年.
  - 17) 馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、保尊隆享. 細胞壁物性を指標としたシロイヌナズナの遺伝子機能解析. 日本植物学会第 77 回大会, 札幌, 2013 年.
  - 18) 村上愛、加藤志朋、曾我康一、若林和幸、橋本博文、山下雅道、長谷川克也、東端晃、矢野幸子、星出彰彦、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、鎌田源司、嶋津徹、村中俊哉、橋本隆、保尊隆享. シロイヌナズナ胚軸における表層微小管動態に対する微小重力の影響 — Resist Tubule 宇宙実験. 日本宇宙生物科学会第 27 回大会, つくば, 2013 年.
  - 19) 加藤志朋、村上愛、曾我康一、若林和幸、橋本博文、山下雅道、長谷川克也、東端晃、矢野幸子、星出彰彦、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、鎌田源司、嶋津徹、村中俊哉、橋本隆、保尊隆享. シロイヌナズナ胚軸における表層微小管配向と細胞成長 — Resist Tubule 宇宙実験. 日本宇宙生物科学会第 27 回大会, つくば, 2013 年.
  - 20) 保尊隆享. 植物の抗重力反応機構. 平成 25 年度近畿植物学会講演会, 奈良, 2013 年.
  - 21) 村上愛、加藤志朋、曾我康一、若林和幸、橋本隆、保尊隆享. 微小重力環境下におけるシロイヌナズナ胚軸の表層微小管動態 — Resist Tubule 宇宙実験. 日本植物学会第 78 回大会, 川崎, 2014 年.
  - 22) 池井戸耀介、加藤志朋、柴田華枝、曾我康一、若林和幸、保尊隆享. 植物細胞における膜ラフトの可視化と重力反応解析. 日本宇宙生物科学会第 28 回大会, 大阪, 2014 年.
  - 23) 保尊隆享、加藤志朋、村上愛、曾我康一、若林和幸、橋本博文、長谷川克也、東端晃、矢野幸子、星出彰彦、嶋津徹、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、山崎千秋、鎌田源司、村中俊哉、橋本隆. 宇宙実験による植物の抗重力反応機構の解明. 第 29 回宇宙環境利用シンポジウム, 相模原, 2015 年.
  - 24) 谷村佑介、馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、橋本博文、東端晃、矢野幸子、嶋津徹、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、山崎千秋、鎌田源司、村中俊哉、橋本隆、保尊隆享. シロイヌナズナ・チューブリン変異体花茎の細胞壁物性に対する微小重力の影響 — Resist Tubule 宇宙実験. 日本植物学会第 79 回大会, 新潟, 2015 年.
  - 25) 馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、小竹敬久、保尊隆享. 細胞壁物性を指標としたシロイヌナズナの抗重力反応関連遺伝子の探索. 日本宇宙生物科学会第 29 回大会, 東京, 2015 年.
  - 26) 村上 愛、曾我康一、小竹敬久、加藤壮英、橋本隆、若林和幸、保尊隆享. MAP65 と BPP1 を介した重力によるシロイヌナズナ表層微小管の配向制御. 日本宇宙生物科学会第 29 回大会, 東京, 2015 年.
  - 27) 谷村佑介、馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、橋本博文、東端晃、矢野幸子、嶋津徹、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、山崎千秋、鎌田源司、村中俊哉、橋本隆、保尊隆享. きぼう実験棟の微小重力環境におけるシロイヌナズナ・チューブリン変異体花茎の成長と細胞壁物性. 日本宇宙生物科学会第 29 回大会, 東京, 2015 年.
  - 28) 田邊浩代、乾 健一、曾我康一、若林和幸、保尊隆享. アズキ上胚軸表皮細胞におけるアクチンフィラメント動態に対する重力の影響. 日本植物学会第 80 回大会, 宜野湾,

2016 年.

- 29) 谷村佑介、馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、橋本博文、東端晃、矢野幸子、嶋津徹、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、山崎千秋、鎌田源司、村中俊哉、橋本隆、保尊隆享. シロイヌナズナ花茎の細胞壁物性と多糖組成に対する微小重力の影響. 日本宇宙生物科学会第 30 回大会, 長久手, 2016 年.
- 30) Hoson T, Murakami M, Kato S, Tanimura Y, Mabuchi A, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto H, Yamashita M, Hasegawa K, Higashibata A, Yano S, Shimazu T, Matsumoto S, Kasahara H, Osada I, Kamada M, Yamazaki C, Muranaka T and Hashimoto T. The Resist Tubule Experiment onboard the Kibo: Growth of Arabidopsis Tubulin Mutants and Reorientation of Cortical Microtubules under Microgravity Conditions. 11th Asian Microgravity Symposium, Sapporo, 2016.
- 31) 谷村佑介、馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、橋本隆、保尊隆享. きぼう実験棟の微小重力環境におけるシロイヌナズナ花茎の成長と細胞壁変化. 平成 28 年度近畿植物学会講演会, 神戸, 2016 年.
- 32) 保尊隆享、村上愛、加藤志朋、谷村佑介、馬淵敦士、曾我康一、若林和幸、橋本博文、山下雅道、長谷川克也、東端晃、矢野幸子、嶋津徹、松本翔平、笠原春夫、長田郁子、鎌田源司、山崎千秋、村中俊哉、橋本隆. Resist Tubule 宇宙実験による植物の抗重力反応機構の解明－表層微小管の機能. 第 31 回宇宙環境利用シンポジウム, 相模原, 2017 年.
- 33) 保尊隆享. 宇宙で植物を育てる. 第 10 回宇宙ユニットシンポジウム, 京都, 2017 年.

#### ・獲得外部競争資金

- 1) 科学研究費助成事業、基盤研究(C)、研究課題名「植物の抗重力反応における細胞膜ダイナミクスの解明」、代表研究者名：保尊隆享、研究期間：平成 25 年～27 年、配分総額：507 万円.

#### ・報道

- 1) 2013 年 2 月 28 日、大阪市立大学学長記者発表「大阪市立大学における国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」での宇宙実験について」、数社が報道.