

微小重力場における植物細胞の応答

P I : 佐藤温重 (東京医科歯科大学)
C I : 山田康之 (京都大学)
佐藤文彦 (京都大学)
松島 久 (埼玉大学)
竹田恵美 (大阪女子大学)

要旨

重力場における植物細胞の応答を調べる目的で微小重力下における植物細胞の成長ならびに分化を調べた。今回特に飛行実験用に培養容器を準備したが問題なく使用できることが確認できた。一方、短期間の培養ではあるが、異なる細胞、培地、重力場（微小重力場、1 G）いずれの組み合わせにおいても植物細胞は生育、分化することが認められた。しかし微小重力場で培養した試料、特にカルス増殖培地に置床した茎切片において地上対照区より顕著な生育のバラツキが認められ、また新鮮物重の増加量も微小重力場で培養した試料の方が劣る傾向が認められた。さらに、微小重力場では地上対照区で観測される複数の不定芽の形成は認められなかった。これらの結果は予想されない結果であり、再実験により確認される必要がある。

微小重力下ならびに1 G下で培養した組織および細胞内の微細構造を観察した結果、分化培地で培養した場合、微小重力場で再分化した茎頂は1 G下で分化した茎頂よりもその発達がわるいことを認めた。また、この時の色素体（葉緑体）の発達は1 G下の方がよい傾向がみられた。また細胞骨格を形成する微小管の発達も1 G下の方が優れている傾向が認められた。一方、脱分化培地においても茎の側芽において微小重力下にあるものの方がより色素体の脱分化が進んでる傾向が認められた。

1次ならびに2次代謝に関係する酵素の活性を測定した結果、微小重力下、再分化培地にて培養したカルスにおいてリグニン生合成の律速酵素であるコーヒ酸O-メチル基転移酵素の活性が地上対象区より著しく低いことを認めた。なお、微小重力下と1 G下におけるタンパク質合成活性を35 S-メチオニンで標識したのち2次元電気泳動により分離し比較したが、顕著な違いを検出することはできなかった。

以上の結果は微小重力場が植物細胞の生長、分化に細胞レベルで影響していることを示していたが、微小重力の影響を知るためにはさらなる実験が必要と考えられた。

はじめに

植物は重力を利用し、成長している。こうした重力屈性は植物生理学の重要な研究課題の一つであるが、実際に微小重力下でどのように植物が発育生育するかについてはまだ不明の点が多い。これまでにスペースシャトルなどを用いていくつかの微小重力実験が行われてきた（1－6）が、体細胞からの胚発生誘導や個体を用いた成長実験が主体であり、長期間の微小重力の影響を調べる試みは少なかった。これは一つには植物細胞の環境変化に対する応答が遅く、また実際に微小重力場において高等植物体を栽培するシステムが未完成であった為である。KrikorianとStewardはCosmos782を用いて細胞分化に及ぼす微小重力の影響を調べた。再分化能を有するニンジン培養細胞からの不定胚形成は20日間の微小重力ならびに1Gに加重力するための対照遠心培養の何れにおいても同様に認められた。一方、栄養生長、生殖生長に対する微小重力の影響を調べるために塊茎、球根、挿し芽などが培養されたが、通常栄養生長中に枯死してしまった。これらの実験での問題点は生活環を完結させるための栽培条件が植物個体では設定、維持しがたいことにある。本実験では植物個体を用いる代わりに培養が容易な試験管内器官分化系を用い、微小重力場が植物細胞の成長分化に及ぼす影響を解析することとした。この目的のために培養容器を試作するとともに、実際に飛行試験を行い、微小重力場における植物細胞の応答を地上（1G区）との比較を行った。

本飛行実験では植物組織培養実験でもっともよく用いられるタバコ（*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN）を材料とし、その茎切片、並びに脱分化したカルスを茎葉再分化あるいはカルス増殖培地に植え付け、その増殖、あるいは分化に及ぼす微小重力場の影響を検討した。スペースシャトルの飛行時間が8日間と短いことより、分化ならびに増殖の解析は生化学的分析（組織分化の指標となるリグニン生合成系酵素の活性測定など）ならびに細胞の微細構造の観察を中心に行った。

なお本培養実験を行うにあたり震動などに耐えられる培養容器（図1）が設計されたので、その使用性についても評価した。

実験材料ならびに方法

実験材料としてはタバコ（*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN）の茎ならびに培養細胞を用いた。茎は1.5%蔗糖を含む1/2濃度のLinsmaier-Skoog寒天培地上で約3週間毎に茎の先端、もしくは側芽を切出し移植することにより維持したタバコ無菌植物体を用いた。その培養3－4週間目の小植物体より約5mm厚の茎を切出し培養実験に供した。培養細胞はナフトレン酢酸（NAA）0.1 μ M、ベンジルアデニン（BA）10 μ Mで継代培養している不定芽形成細胞を実験開始2ヶ月前よりNAA 10 μ M、BA 1 μ Mを含む脱分化培地で培養したものをを用いた。何れも培養は25℃、3500－5500 luxで行った。

各々の細胞（茎、培養細胞）からの生長あるいは再分化を観察するために各々の細胞を脱分化培地（NAA 10 μ M、BA 1 μ M）、不定芽形成培地（NAA 0.1 μ M、BA 10 μ M）に一定量植え付け、それぞれを微小重力下ならびに地上にて培養した。なお微小重力下で培養したものも移植後約22時間は積み込み準備のため室温

で地上（ミッドデッキロッカー）に静置され、さらに発射時は2 G程度の加重力に曝された。

微小重力が増殖、分化に与える影響についてまず肉眼観察、ついでカメラによる記録を行った後、新鮮物重の増加を測定比較した。一部の試料に関しては2 %グルタルアルデヒド-50 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）で固定し、低温にて日本に輸送後、オスミウム酸による再固定、脱水、包埋、切片化を行い、透過型電子顕微鏡にて細胞内構造の変化を比較観察した。

一方、微小重力場が遺伝子発現に及ぼす影響を観察するために、脱分化あるいは再分化培地に35 Sで標識したメチオニン（25 μ Ci、1000 Ci/mmol）を加え、同様に培養した。微小重力ならびに1 Gでの対象実験の後、回収し、常法によりタンパク質を抽出後、等電点電気泳動（1次元目）、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（2次元目）による2次元電気泳動をおこなった（7）。泳動後、クマシーブリリアントブルーによる染色を行い、さらにENHANCEを用いて、増感した後フルオログラフィーを行った。

また、分化ならびに増殖におよぼす影響を生化学的に分析するために組織分化の指標となるリグニン生合成系酵素ならびに1次代謝系の酵素の活性測定（8）を行った。

また飛行実験の結果得られた成果を評価するため簡単な回転機をクリノスタットして用いた実験を行った。培養容器を垂直に保持した回転盤に取り付け、約5 rpmにて回転し、重力の効果を打ち消した。

実験結果

飛行実験の進行

フライトサンプルはMET (Mean Ellapsed Time) 7時9分シャトルが安定飛行に移るとともにミッドデッキからスペースラブ内に移動され、22-24.5 Cにて約8日間培養された。この間地上対象実験区もスペースラブ内の温度変化にあわせて温度調節した。MET 7日22時30分スペースシャトルが無事ケネディ宇宙センターに帰還した後、約3時間でフライトサンプルの引渡しを受けた。試料は直ちに冷蔵庫内に保管し、順次肉眼観察、電子顕微鏡観察試料を作成した後、酵素分析のための試料を液体窒素にて凍結し、-20℃にて保存した。なお、フライトサンプルの一部は新鮮培地に移植し、生体保存した。

培養容器の評価

前回の速報において報告したように今回用いた培養容器は飛行実験並びに地上対照実験のいずれにおいても問題を生じることはなかった。すなわち細胞は雑菌による汚染を問題なく生育していた。なお、生体保存した試料の一部に微生物の繁殖が観察されたがこれは帰還後の移植操作の条件が悪かったためのものと考えている。ところで今回用いた培養容器は内部で発生したガスが容器外に直接もれ出ないように極めて精度よく製作されている。このため容器を閉める際にはそれほど問題はでないが、再度開ける際にうまく開きにくいきらいがある。また、密閉度がよいために通常のガラスもしくはプラスチックシャーレよりも僅かではあるが生育が劣るような結果が予備的

な試験で得られている。安全性が重視されなければならないが、今後宇宙基地等で用いるためには使用性についても考慮されるべきである。また、今回の実験は暗所培養で行ったが、今後再分化した植物体の機能をみる上で照明が必要であり、透明プラスチックなど他の材質の利用も考慮する必要があると感じる。

植物細胞の成長、分化

これまでの微小重力場での体細胞胚形成実験（５、６）などの結果から推定して、タバコ細胞は地上同様に成長し脱分化（カルス化）する、あるいは再分化するものと想定された。しかし、重力という一種のストレスから解放されることにより成長が促進される、あるいは組織の機械的強度を保つのに必要なリグニン化活性が低下することなども期待された。

実際に微小重力場で培養した結果、茎切片、カルス試料、再分化培地、カルス増殖培地のいずれの組み合わせにおいても細胞は良好な生育を示した。しかし、脱分化培地において茎切片を培養した場合、地上対象区と比較し明らかな生育のバラツキが微小重力場での試料に認められた（図１）。また新鮮物重の増加量を測定したところ、微小重力場で培養した試料の方が生育が劣る傾向が認められた（表１）。さらに、一つの実験区であるが、微小重力場で培養した試料で地上対照実験では認められなかった根の分化が認められた。また微小重力場では地上対照区で観測される複数の不定芽の形成は認められなかった（図２）。

これらの結果が微小重力場の影響なのか、あるいは微小重力場以外の因子、例えばスペースシャトル内のガス組成などの影響でないのか慎重に検討する必要がある。しかし、クリノスタットを用いた実験から重力が細胞の生長に重要な影響を与えていることが確認された（図３）。

なお、飛行実験に供した試料の一部は日本に輸送され、培養が続けられているが、カルス、不定芽のいずれも現在まで健全に生育あるいは再分化を続けており、微小重力場の影響が阻害的であるとしてもその後の成長を阻害するほどではないことが明らかである。

細胞微細構造

再分化培養 微小重力下ならびに１Ｇ下で培養した組織および細胞内の微細構造を観察した結果、何れの場合にも茎頂点としての組織分化がみられるが、微小重力場で再分化した茎頂は１Ｇ下で分化した茎頂よりも発達がわるいことを認めた（図４）。このことはすでに述べたように１Ｇ下よりも微小重力下で培養した組織において複数の不定芽の発達が認められないことに対応していると考えられた。

一方細胞内の小器官である色素体の発達を観察したところ、全般的にその発達は未成熟であるが、１Ｇ下で再分化してきた不定芽細胞の方が内部構造の発達がよい傾向が認められた（図５）。また１Ｇ下で培養した細胞に細胞骨格を形成する微小管がはっきり観察されたのに対し、微小重力下で培養した細胞では観察が困難であった（図６）。

脱分化培養 一方、脱分化培地においては特に大きな差は認められなかったが、茎の

側芽が伸長した部分を観察すると、微小重力下にあるものの方がより色素体の脱分化が進んでる傾向が認められた（図7）。

1 次および 2 次代謝系の酵素の活性

凍結した試料より常法によりタンパク質を抽出し、1 次代謝（リンゴ酸脱水素酵素；MDH）ならびに 2 次代謝（パーオキシダーゼ；POD、コーヒー酸 O-メチル基転移酵素；COMT）系の酵素の活性を測定した。可溶性タンパク質量ならびに MDH、POD 活性には飛行試料ならびに地上対照実験試料間で差は認められなかったが、微小重力下、再分化培地で培養した培養細胞の COMT 活性が地上対照区より著しく劣ることが明らかとなった。COMT はリグニン生合成の律速酵素であり、この結果は重力が植物細胞のリグニン形成に影響を与えていることを示唆していた。

一方、クリノスタットを用いて重力を打ち消して培養した場合、リグニン生合成の場であるトラケイド細胞の分化が抑制されたことから、飛行試料での結果は重力の影響を反映するものと考えられた（図8）。

³⁵S メチオニンによるタンパク質合成の測定

微小重力下と 1 G 下におけるにおけるタンパク質合成活性を³⁵S-メチオニンで標識したのち 2 次元電気泳動により分離し比較した。用いた細胞により³⁵S メチオニンの取り込みに差があることが認められた；培養細胞の方が茎切片よりも高い取り込みを示した。しかし、飛行試料と地上対照区の差は僅かであった。抽出したタンパク質を 2 次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動ならびにフルオログラフィーにより解析したところ、飛行試料ならびに地上対照実験試料間で顕著な違いを検出することはできなかった（図9）。この結果は飛行実験試料における遺伝子発現が地上対照実験区のものに似ていることを示している。しかし、飛行試料も打ち上げまで約 1 日間、室温で放置されていたことに注意する必要がある、重力が遺伝子発現に及ぼす影響についてはさらなる実験が必要である。

考察

重力が植物の分化や生長を制御していることは疑いないことであるが、一方微小重力場で植物がどのような応答、生育を示すかということに関しては宇宙飛行実験の機会が極めて限られていることより、十分に解明されているとはいえない。これまでの実験により、微小重力下でも根は正常に分化生育し、根としての構造を維持していることが報告されているが、その一方で、根冠におけるアミロプラスト（平衡石）の分布がランダムとなり、それに応じて根の生長方向がランダムとなることが報告されている（1-4）。一方、培養細胞を用いた体細胞胚発生において微小重力は必ずしも阻害的ではないことも報告され（5、6）、微小重力場においても植物細胞は正常に分化、生長できると一般的に考えられてきたように思われる。しかし、我々の実験結果では微小重力場においては複数の不定芽形成は阻害されているようであり、また茎頂組織の発達も悪いことが観察された。また、微小重力下で培養した細胞の微細構造は地上で培養したコントロール細胞といくつかの点で異なっていた。これらの結果は

植物細胞が重力を細胞レベルで感知し、微小重力場と1 G条件では異なった生長、分化を行うことを示している。しかし、上記の相違点全てが細胞が微小重力に曝されたために生じたのかどうかについて現時点で結論するには注意が必要である。ひとつには今回の実験試料が極めて限られているためであり、一方飛行中に微小重力以外の因子、例えば上昇中の加速度や振動などが影響している可能性もある。また35 S-メチオニンの取り込みでは顕著な差が検出できなかったが、この場合飛行まで約1日の前培養が影響している可能性もある。微小重力が植物の分化に及ぼす効果をより詳細に明らかにするためには宇宙でカルス誘導を行う、再分化させる、あるいは軌道の上に遠心機を持込み疑似1 G環境を作成するなどが必要と思われる。また、植物培養細胞の培養には人手が余り掛からないことから、無人のフ라이어を用いた実験も今後有望と考えられる。何れにせよ、今回の実験でも明らかになったように生物実験においては冷蔵庫のスペースや電源などの制約があり、これらの問題を調整することも重要と考えられた。

謝辞

本研究を遂行するにあたり多大の協力を賜った三菱重工業（株）高沖宗夫博士、西敦子氏、ならびに千代田化工（株）安楽城恵一氏、永瀬睦氏に感謝致します。

引用文献

1. Halstead TW, and FR Dutcher. Status and prospects. *Annals Bot*, 54(Sup3):3, 1984
2. Cowles JR, HW Scheld, R Lemay, and C Peterson. Growth and lignification in seedlings exposed to eight days of microgravity. *Annals Botany* 54(Sup3):33, 1984
3. Slocum RD, JJ Gaynor, and AW Galston. Cytological and ultrastructural studies on root tissues. *Annals Botany* 54 (Sup 3): 65, 1984
4. Volkmann D, HM Behrens, A Sievers, Development and gravity sensing of cress roots under microgravity. *Naturwissenschaften* 73:438, 1986
5. Krikorian AD, FC Steward. Morphogenetic responses of cultured totipotent cells of carrot (*Daucus carota* var. *carota*) at zero gravity. *Science* 200: 67, 1978
6. Theimer RR, RA Kudielka, and F Rosch, Induction of somatic embryogenesis in anise in microgravity. *Naturwissenschaften* 73: 442, 1986
7. Takeda S, F Sato, K Ida, Y Yamada. Characterization of polypeptides that accumulate in cultured *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Cell Physiol.* 31: 215, 1990
8. Kuboi T, and Y Yamada, Regulation of the enzyme activities related to lignin synthesis in cell aggregates of tobacco cell culture. *Biochim.Biophys.Acta*, 542: 181, 1978

Table 1 Summary of the growth and differentiation of cells grown under microgravity (0G) and on Earth (1G)

Medium	Materials	Gravity	Inoculum(I) (g FW)	Harvest(H) (g FW)	H/I	Shoot	Root
Callus Formation	Stem	0G	0.29	0.97	3.34	2	-
			0.44	1.29	2.93	1	-
		1G	0.32	1.59	5.00	-	-
			0.23	0.91	3.93	-	-
	Callus	0G	1.73	4.24	2.45		
			2.35	5.70	2.43		
		1G	2.16	5.89	2.73		
			1.05	2.80	2.66		
Shoot Formation	Stem	0G	0.25	0.47	1.88	4	-
			0.49	1.19	2.42	3	3
		1G	0.34	0.96	2.82	7	-
			0.28	0.97	3.46	4	-
	Callus	0G	2.16	3.73	1.73		
			2.22	3.16	1.42		
		1G	1.80	2.66	1.48		
			1.44	2.77	1.93		

Table 2 Summary of the enzyme activities in cells grown under microgravity (0G) and on Earth (1G)

Medium	Materials	Gravity	Protein ($\mu\text{g/g FW}$)	MDH* ($\mu\text{mol/mg protein/min}$)	POD** ($\mu\text{mol/mg protein/min}$)	C-OMT*** ($\mu\text{mol/mg protein/hr}$)
Callus Formation	Stem	0G	0.32	91	22	0.024
			0.43	87	43	0.024
		1G	0.48	58	19	0.033
			0.78	30	10	0.042
	Callus	0G	0.69	35	11	0.021
			1.34	20	6.7	0.021
		1G	0.41	49	16	0.035
			0.43	43	17	0.023
Shoot Formation	Stem	0G	0.67	49	29	0.049
			0.94	28	16	0.041
		1G	0.82	28	23	0.03
			0.85	34	14	0.018
	Callus	0G	0.85	37	19	0.022
			1.04	32	13	0.025
		1G	1.53	34	15	0.26
			1.61	25	11	0.20

* malate dehydrogenase, ** peroxidase, *** caffeic acid O-methyltransferase

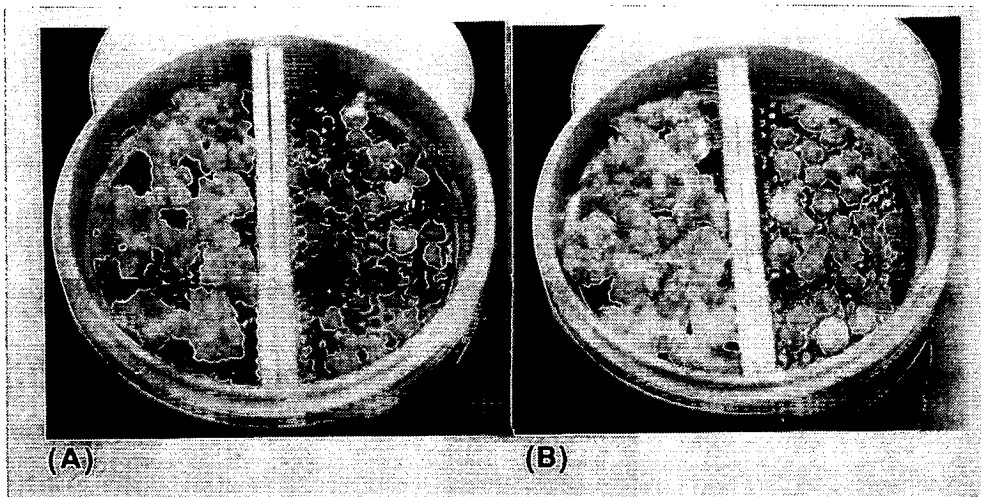


Fig. 1 Tobacco cells which grew on dedifferentiation medium under microgravity (A) and 1 g(B)

In each vessel, the left part was inoculated with cultured cells and the right part was inoculated with stem tissues

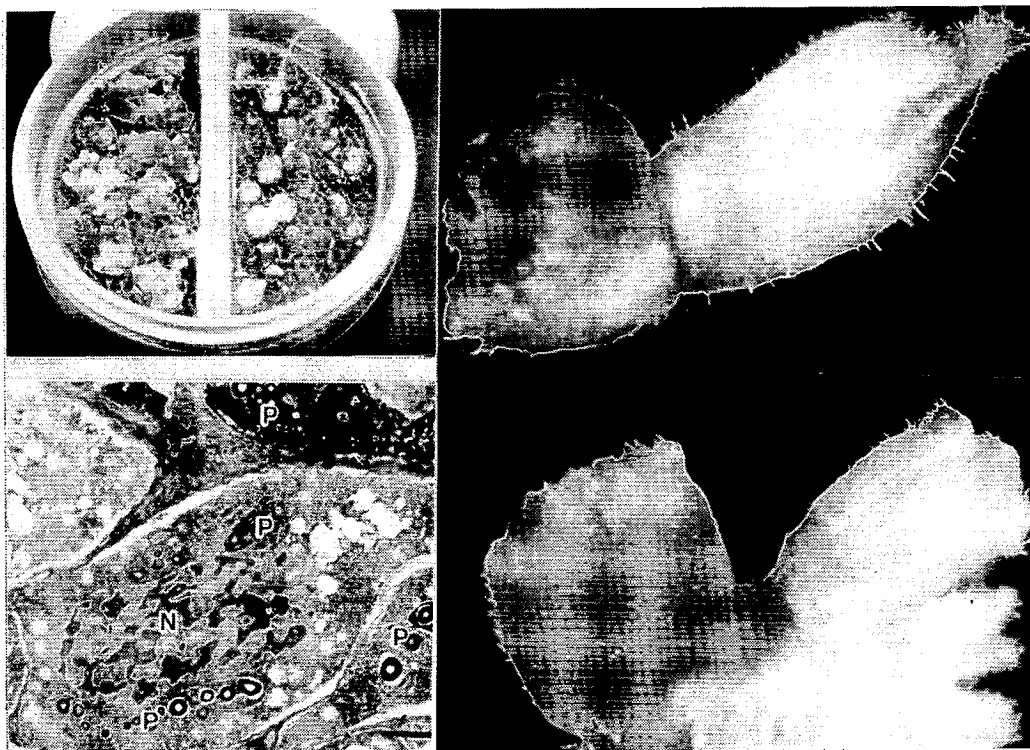


Fig. 2 Regenerating roots and shoots.

Upper left: regenerating roots in flight sample.

Lower left: ultrastructure of root tip in flight sample. Bar indicates 1 μ m.

Upper right: regenerating shoot in flight sample.

Lower right; regenerating shoot in ground control

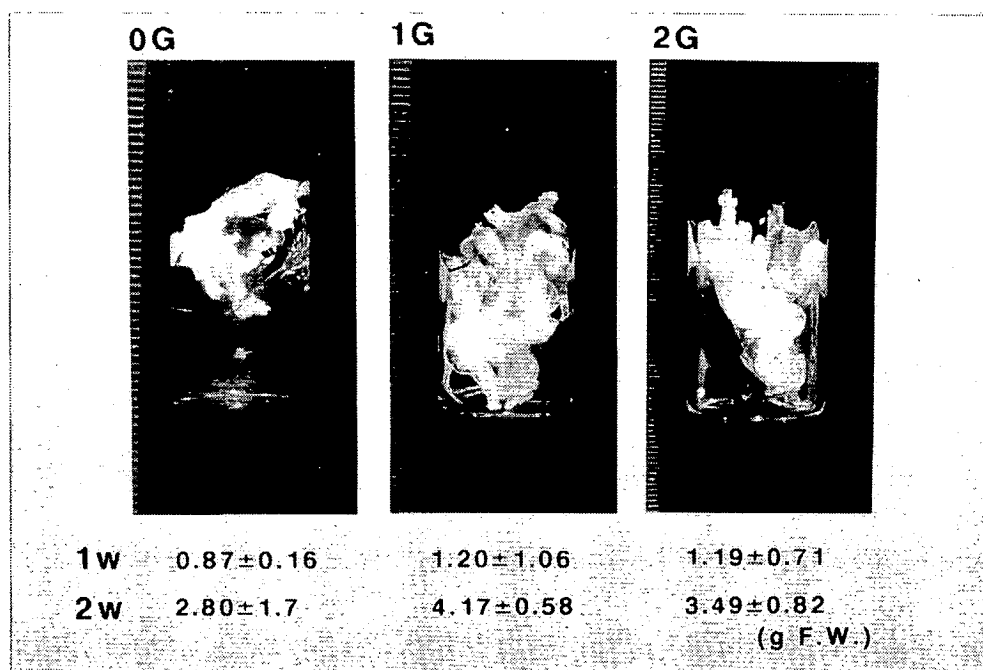


Fig. 3 The growth of leaf tissues cultured in regeneration medium
 0G indicates the culture on a clinostat which rotated at 5 rpm. 2G indicates the culture grown on a centrifuge at 500 rpm.

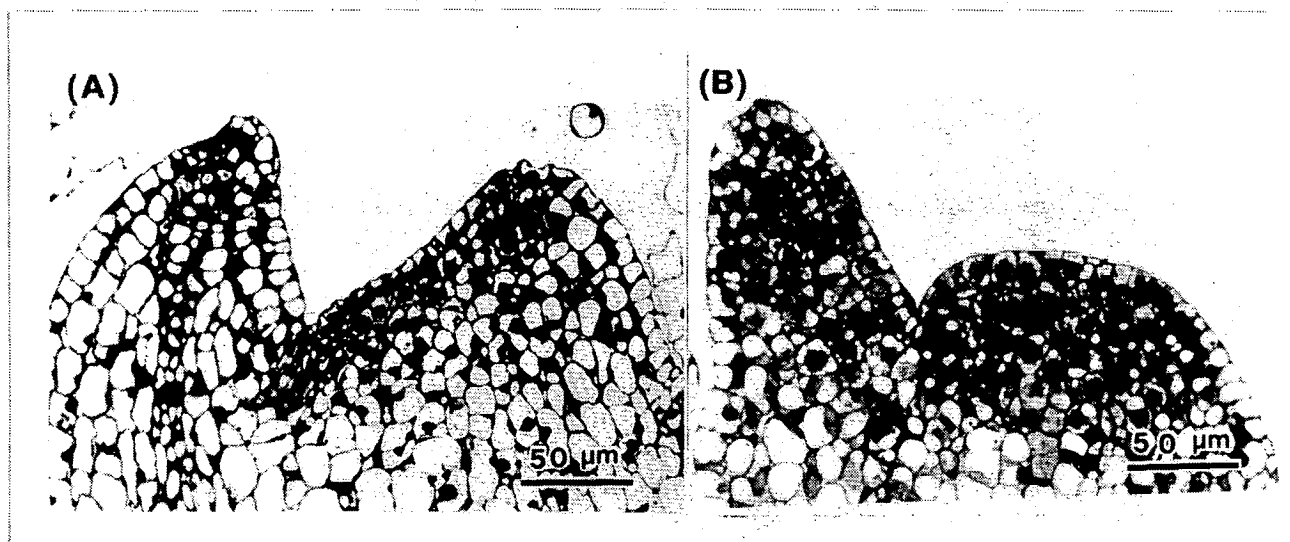


Fig. 4 Meristem of shoot in flight sample (A) and ground control(B)
 Stem tissues were inoculated on regeneration medium and cultivated for 8 days.

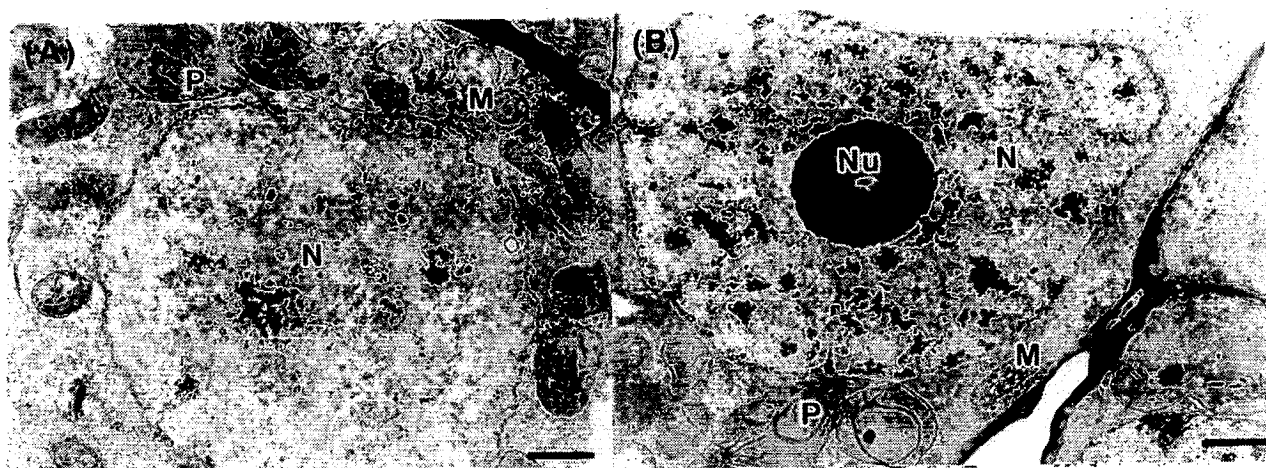


Fig. 5 Ultrastructure of mesophyll cells in the flight sample (A) and ground control (B)

Stem tissues were inoculated on regeneration medium and grown for 8 days. Bar indicates 1 μ m. N: nucleus, Nu: nucleolus, M: mitochondria, P: plastid

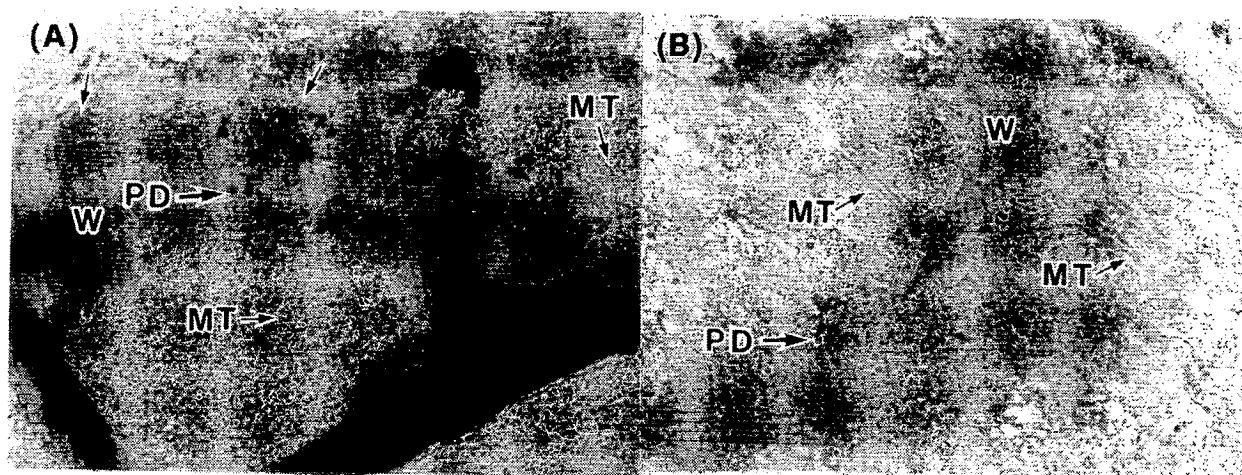


Fig. 6 Microtubules in flight samples (A) and ground control (B)

Stem tissues were inoculated in regeneration medium and cultured for 8 days. Bar indicates 1 μ m. W: cell wall, PD: plasmodesmata, MT: microtubule



Fig. 7 Ultrastructure of mesophyll cells in the flight sample (A) and ground control (B)

Stem tissues were inoculated on dedifferentiation medium and cultured for 8 days. Bar indicates 1 μ m. N: nucleus, Nu: nucleolus, P: plastid

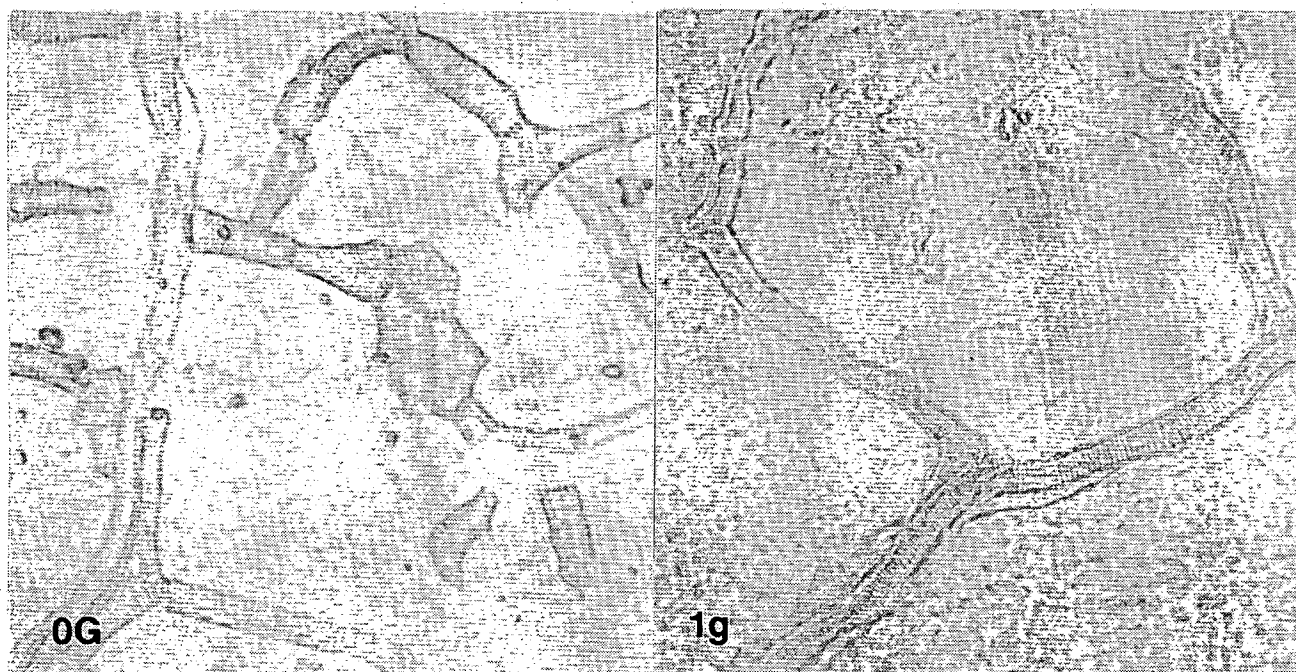


Fig. 8 Tracheid elements in regenerating shoot on a clinostat (0G) and at 1 g

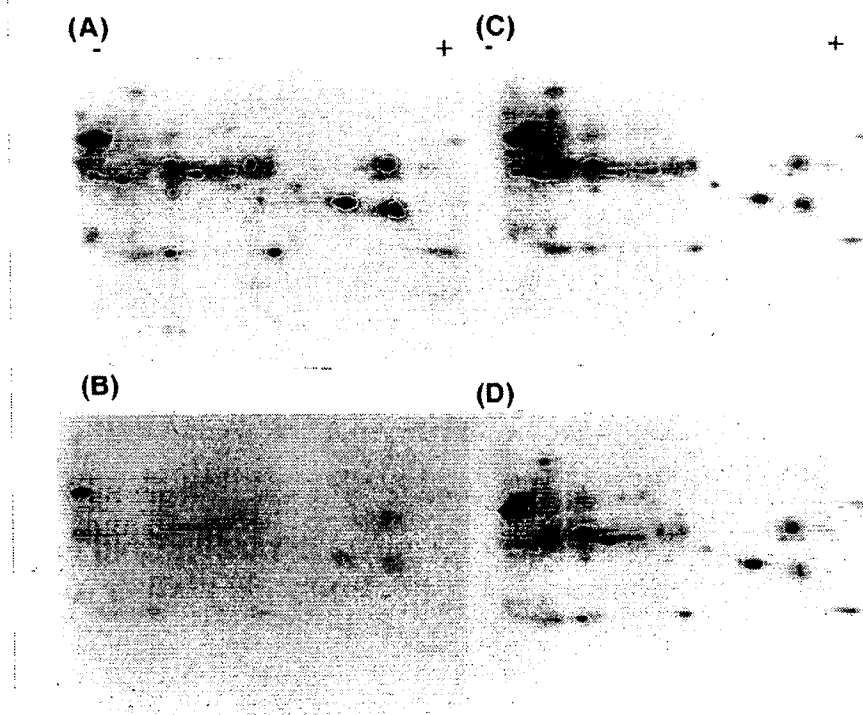


Fig. 9 Fluorogram of ^{35}S -methionine-labeled proteins in the flight sample (A, B) and ground control (C,D)

Cultured cells were inoculated on regeneration medium (A, C) or dedifferentiation medium (B,D) and cultured for 8 days.