



ISSN 1349-113X
JAXA-SP-06-032

宇宙航空研究開発機構特別資料

JAXA Special Publication

ISS科学プロジェクト室

植物生理研究プロジェクト EMCS装置利用宇宙実験テーマ

—Cell Wall Resist Wall 研究開発報告—

2007年 3 月

宇宙航空研究開発機構

Japan Aerospace Exploration Agency

序 文

本研究開発報告は、第5回国際公募採択テーマ「微小重力環境下におけるシロイヌナズナの支持組織形成に関わる遺伝子群の逆遺伝学的解析 (Cell Wall)」および「植物の抗重力反応における微小管－原形質膜－細胞壁連絡の役割 (Resist Wall)」に関する平成18年度の研究開発成果をまとめたものである。

Cell Wall および Resist Wall は2006年6月に実験計画のベースライン化を終了し、その後のプログラム評価を経て供試体開発フェーズに移行した。テーマの遂行のためにESAおよびNASAと、ESA＝フライト先導機関、NASA＝リソース提供機関、JAXA＝研究者機関という役割分担を定義した協力協定を締結し、国際協力の下で、JEM運用が本格運用になる2008年前半に、ESAが開発した宇宙実験装置 (European Modular Cultivation System: EMCS) を使用したフライト実現を目指して準備を進めている。現在のシャトルマニフェストでは、2008年2月の1J/Aフライトにて実験供試体一式を打ち上げ、軌道上でシロイヌナズナ生育栽培実験を行った後、クルー操作により収穫し、2008年7月の15Aフライトで試料を回収する予定である。

Cell Wall および Resist Wall の実験目的は、それぞれ、シロイヌナズナの支持組織形成において、細胞壁関連遺伝子群の発現を包括的に解析することにより、数億年前に植物が陸上に進出する際に重力に抗するために獲得した支持組織形成の分子機構を解明することと、シロイヌナズナ突然変異系統を用いて、抗重力反応における微小管－原形質膜－細胞壁連絡の役割を検証することにより、植物における重力に対する力学的抵抗 (抗重力) のしくみを解明することであり、両テーマの宇宙実験により、①植物の“かたち”の制御や抗重力のしくみと重力の関係、②地球上での植物の進化における重力の支配が解明されると期待される。

ISS 科学プロジェクト室 植物生理研究プロジェクト Cell Wall Resist Wall チーム

鎌田 源司 (ISS 科学プロジェクト室)
大森 克徳 (ISS 科学プロジェクト室)
石岡 憲昭 (ISS 科学プロジェクト室)
西谷 和彦 (東北大学大学院 生命科学研究科)
保尊 隆享 (大阪市立大学大学院 理学研究科)

シロイヌナズナの支持組織の細胞壁構築に関与する遺伝子の同定

Identification of genes responsible for cell-wall dynamics in supporting tissues of *Arabidopsis thaliana*

Abstract: Cell wall confers mechanical strength to the plant tissues, and thereby offer support to the aerial portion of the plant body. We have focused our research effort on a set of genes that play important roles in specific aspects of cell wall construction in supporting tissues of the inflorescence stem of *Arabidopsis*. Results from two microarray screenings identified several key candidate genes responsible for cell wall formation in supporting tissues of the inflorescence stem. We examined expression profiles of promoter::GUS fusion constructs for each of the genes. The results indicated that each of the genes exhibited distinct expression patterns in terms of cell specificity. Reverse genetics analysis for function of the genes indicated that glycine-rich protein modifies mechanical strength of the cell wall in protoxylem in basal of the stem, thereby providing a conduit for the translocation of water and nutrients.

Key words: *Arabidopsis*, inflorescence stem, secondary cell wall

概 要

植物は細胞壁の物理的な強度によって自らの体を支えている。我々は、シロイヌナズナ花茎の支持組織の細胞壁構築において重要な役割を担う遺伝子の解析を重点的に進めている。マイクロアレイ法を用いた2種類のスクリーニングによって、花茎支持組織の細胞壁構築に特に重要であると考えられる数種の遺伝子を同定した。プロモーター::GUS 形質転換体を用いた細胞レベルでの発現解析では、各遺伝子が独自の細胞特異的発現を有することを明らかにした。また同定された遺伝子について逆遺伝学的な機能解析を行なったところ、グリシンリッチタンパク質が原生木部の細胞壁の構造に関与していて、それ故、木部における物質輸送に必須なものであることを示唆する結果を得た。

1. はじめに

1 g 重力環境下で、植物は立体的な形態を構築するために自重を支える支持組織を形成する。この支持組織の物理的な強度または柔軟性は、個々の細胞を取り囲む細胞壁の性質に依存するものと考えられている。我々は昨年度までの研究で、花茎の支持組織で特異的に高発現し、かつ重力方向の変化に伴い発現変化を示す細胞壁関連遺伝子群を同定した。本年度は、これらの細胞壁関連遺伝子群の発現を細胞レベルで解析することによって、支持組織において物理的強度に貢献している遺伝子と柔軟性等の性質に関与していると考えられる遺伝子の分類を目指した。またこれらの遺伝子が欠損した突然変異体の表現型を解析することにより、遺伝子産物の植物体における機能の解明も試みた。

2. 成果の概要

2.1. 細胞壁関連遺伝子の花茎基部における細胞レベルでの発現解析

2.1.1. 材料および方法

材料は全て実験植物であるシロイヌナズナを用いた。昨年度までにマイクロアレイ法で同定した、花茎基部で高発現を示し、かつ重力方向の変化に伴い発現変化を示す 16 種類の細胞壁関連遺伝子（表 1）の 5' 上流のプロモーター領域（2 ～ 3 kb）をゲノム DNA より PCR 法によって増幅し、サブクローニングした後、下流にレポーター遺伝子である β -グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子を連結した（図 1）。このキメラ遺伝子を、バイナリーベクターにクローニングした後、アグロバクテリウムを介した、形質転換法によって薬剤耐性遺伝子とともにシロイヌナズナ植物体に導入した。抗生物質を用いた選抜によって形質転換体を単離し、これを解析に用いた。形質転換体の花茎（8 cm）の基部を組織固定した後、VIBRATOME を用いて横断切片（70 μ m）にして、GUS の基質である 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid (X-Gluc) を与え、発色部位を正立顕微鏡で観察した。同様に形質転換体の各器官（花、葉、根）の遺伝子発現解析も行った。

2.1.2. 結果

形質転換体を用いて遺伝子発現の解析を行った 16 種類の細胞壁関連遺伝子の全てが、それぞれ固有の発現プロファイルを有していた。このうちセルロース合成やリグニン代謝に関与するセルロース合成酵素遺伝子やペルオキシダーゼ遺伝子は [1]、花茎基部の維管束や維管束間繊維組織で特に強い発現を示していた。またこれらの遺伝子は、二次壁の構築やリグニン合成が見られる花器官や葉の維管束組織においても発現が確認された。 β -1,3-グルカナーゼ、ペクチナーゼ、グリシンリッチタンパク質は、花茎基部の特定の細胞または組織に発現を示した。特にペクチナーゼに関しては、細胞壁の肥厚や硬化が起こらない内皮組織のみで特異的に発現しており、花茎組織の強度以外の特性（柔軟性）に関与している可能性を示す結果となった。

表 1 プロモーター::GUS 形質転換体によって発現解析を行なった細胞壁関連遺伝子

遺伝子ファミリー名	遺伝子名
β -1,3-glucanase	BGL2
β -1,4-glucanase	CEL2
Cellulose synthase	IRX3
	IRX5
Chitinas	CTL2
Galactosidase	BGAL4
Glycine-rich protein	GRP
Laccase	Lac1
	IRX12
	Lac17
Pectinesterase	PMT61
Peroxidase	PER42
	PER64
Polygalacturonase	PG20
	PG43

細胞壁関連遺伝子の5'上流プロモーター領域



図1 プロモーター::GUS 融合遺伝子の模式図

2.2. 突然変異体の解析

2.2.1. 材料および方法

公開されている Salk Institute Genomic Analysis Laboratory のシロイヌナズナ T-DNA タグラインより、花茎の横倒しによって発現が抑制された細胞壁関連遺伝子に T-DNA が挿入されていると考えられる突然変異体のラインを入手して、このうち 7 ラインについてホモジェニアスな突然変異体を分離して、花茎の生長や横倒し時の屈曲パターン、さらに組織形態についての解析を行なった。分離した各突然変異体の花茎の形態を観察するとともに、花茎の切片を作成して組織を観察した。また T-DNA 突然変異体において形態変化を引き起こしたグリシンリッチタンパク質 (GRP) については間接蛍光抗体法や GRP プロモーター::GFP 形質転換体を用いて、タンパク質の局在部位の解析を行なった。また GRP が木部の輸送機能に関与している可能性が示されたため、無機栄養素の T-DNA 突然変異体へ過剰投与によって、輸送機能の低下により生じること考えられる突然変異体の表現型が相補できるかを実験した。

2.2.2. 結果

7 種類の遺伝子のホモジェニアスな突然変異体について、花茎の形態や生長パターンを観察したところ、6 種類の突然変異体については野生型の植物との違いは確認できなかった。また横倒し時の屈曲パターンや組織細胞の形態的な変異は確認されなかった。一方、構造タンパク質の一種であるグリシンリッチタンパク質 (GRP) をコードしている遺伝子の T-DNA 突然変異体については、花茎において顕著な形態変化が認められた。grp 突然変異体は、花茎の抽台までは野生型植物との形態的な違いは観察されなかったが、花茎の伸長に伴い花茎の上部組織が枯死することが確認された。間接蛍光抗体法や GRP プロモーター::GFP 形質転換体を用いて、GRP タンパク質の局在部位の解析を行なったところ、GRP タンパク質は突然変異体で形態変異が認められた花茎上部組織では発現していなく、花茎基部の原生木部の管状要素 (道管) の細胞壁に局在していることが確認された。この結果より、grp 突然変異体の花茎上部で表現型は、GRP タンパク質の欠損によって花茎基部の道管の輸送機能が低下したことによるものではないかと考えられた。そこで grp 突然変異体に過剰の無機栄養素を投与したところ、花茎上部で表現型は部分的に相補されることが確認された。

3. まとめ

シロイヌナズナの花茎基部の支持組織は、花茎の横倒しによって、増大する花茎上部の重さから解放される。このことから、花茎の支持組織で高発現している細胞壁関連遺伝子のうち、花茎を横倒しにすることによって発現が抑制される細胞壁関連遺伝子は、花茎上部の重さというシグナルを直接受け取り、その重さを支えるための細胞壁を構築するキー遺伝子であるのではないかと考えられた [2]。しかしながら、花茎は多様な細胞タイプから成る組織であり、細胞壁の肥厚や硬化によって支えるための強度に貢献する細胞もあれば、強度には貢献せずに特定の機能をもつ細胞なども存在する。そこで選抜された細胞壁関連遺伝子について、花茎基部における細胞レベルでの発現解析を行い、細胞壁が肥厚や硬化する細胞で発現しているのか、あるいは特殊な機能をもつ細胞で発現しているか等を解析した。この結果、セルロース合成遺伝子、キチナーゼ遺伝子、ペルオキシダーゼ遺伝子が、花茎基部において二次細胞壁の構築やリグニン化がみられる維管束や維管束間繊維組織で高発現していることが明らかになり、これらの遺伝子が、花茎の支持組織の強度に直接貢献するものであることが期待された。一方で、本研究においては、これらの遺伝子が欠損した突然変異体の形態的变化等を確認できなかった。解析した遺伝子のほとんどが遺伝子ファミリーを形成していることから [3]、幾つかの遺伝子が機能を重複しているものと推定している。今後、二重あるいは三重突然変異体を作成することによって、花茎基部の支持組織におけるこれら遺伝子産物の役割が証明されることが期待される。

GRP 遺伝子が欠損した突然変異体は、花茎上部組織の枯死という表現型を示した。GRP タンパク質は花茎基部の管状要素 (道管) の細胞壁に限られていることから、grp 突然変異体では GRP 欠損によって花茎基部の道管機能に障害が起こり、上部組織への物質輸送が滞っているものと推測された。もしこの仮説が正しいのであれば、過剰の無機栄養素を投与することによって、上部組織への無機栄養素量が補填でき、grp 突然変異体の花茎上部で表現型を抑えることができるのではないかと考え、過剰の無機栄養素の投与実験を行なった。この結果、grp 突然変異体の花茎上部で表現型を部分的に抑制することができ、GRP タンパク質が花茎基部の道管の輸送機能に関与するという仮説は支持され

た。今後は花茎基部の管状要素の細胞壁における GRP の具体的な役割を解明していく。

4. 成 果 発 表

4.1. 学術論文

- [1] Osato Y, Yokoyama R and Nishitani K, “A principal role for AtXTH18 in *Arabidopsis thaliana* root growth - a functional analysis using RNAi plants”, *J. Plant Res.*, 119, 153-162, 2006.
- [2] Yokoyama R and Nishitani K, “Identification and characterization of *Arabidopsis thaliana* genes involved in xylem secondary cell walls”, *J. Plant Res.*, 119, 189-194, 2006.
- [3] Suzuki H, Takahashi S, Watanabe R, Fukushima Y, Fujita N, Noguch A, Yokoyama R, Nishitani K, Nishino T and Nakayama T, “An isoflavone conjugate-hydrolyzing beta-glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings. Purification, gene cloning, phylogenetics and cellular localization”, *J. Biol. Chem.*, 281, 30251-30259, 2006.
- [4] Yoshida K, Imaizumi N, Kanako S, Kawagoe Y, Tagiri A, Tanaka H, Nishitani K and Komae K, “Carbohydrate binding module of a rice endo-b-1,4-glucanase OsCel8-1 expressed in auxin-induced lateral root primordial is posttranslationally truncated”, *Plant Cell Physiol.*, 47, 1555-1571, 2006.
- [5] Nishitani K, “A brief history of the XTH gene family”, In *The Science and Lore of the Plant Cell Wall: Biosynthesis, Structure and Function*. ed. Hayashi T., Brown Walker Press, pp. 148-154, 2006.
- [6] 西谷和彦, “植物細胞壁の構造と機能-比較ゲノムからのアプローチ”, *植物の生長調節*, 41, 34-45, 2006.
- [7] 倉澤香澄, 横山隆亮, 西谷和彦, “「プラントミメティックス-植物に学ぶ」第1章 細胞壁と細胞 第一節 植物細胞壁構造の多様性と動態-ゲノム情報からのアプローチ”, (株) エヌ・ティー・エス, pp. 272-278, 2006.
- [8] Nishitani K and Vissenberg, “Roles of the XTH protein family in the expanding cell”, In *The Expanding Cell* ed. by Jean-Pierre Verbelen Springer, pp. 89-116, 2006.

4.2. 学会発表

- [1] 倉澤香澄, 松井章浩, 斎藤圭, 横山隆亮, 西谷和彦, “シロイヌナズナのエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) 遺伝子ファミリークラス III に属するメンバーの発現と機能の網羅的解析”, 第 47 回日本植物生理学会年会, 2006 年 3 月, 筑波.
- [2] 横山隆亮, 西谷和彦, “シロイヌナズナの道管形成に関与するグリシンリッチタンパク質の機能解析”, 第 47 回日本植物生理学会年会, 2006 年 3 月, 筑波.
- [3] Imoto K, Kwon HK, Yokoyama R and Nishitani K, “Genomic and Proteomic Approaches to Cell Wall Dynamics in *Arabidopsis*”, The 53rd NIBB Conference, June 2006, Okazaki.
- [4] Nishitani K, Gordon Research Conference on Plant Cell Wall, July 2006, New England.
- [5] Kurasawa K, Yokoyama R and Nishitani K, “Functional analysis for the XTH family of genes in *Arabidopsis thaliana*”, 8th international congress of plant molecular biology, Aug 2006, Adelaide.
- [6] Yokoyama R and Nishitani K, “Functional analyses of an *Arabidopsis* glycine-rich protein involved in physical properties of xylem cell wall”, 8th international congress of plant molecular biology, Aug 2006, Adelaide.
- [7] 横山隆亮, 西谷和彦, “シロイヌナズナのグリシンリッチタンパク質の機能解析”, 日本植物学会 70 回大会, 2006 年 9 月, 熊本.
- [8] 倉澤香澄, 横山隆亮, 西谷和彦, “シロイヌナズナの生殖器官形成の過程における XTH の役割”, 日本植物学会 70 回大会, 2006 年 9 月, 熊本.
- [9] 西谷和彦, “国際宇宙ステーションで実施予定の宇宙実験「CELL-WALL」の概要”, 日本宇宙生物科学会第 20 回大会, 2006 年 9 月, 大阪.
- [10] 西谷和彦, “植物細胞壁タンパク質解析に向けたプロテオームとトランスクリプトームの融合”, 第 2 回シンポジウム植物プロテオーム研究の最前線, 2006 年 11 月, 筑波.
- [11] 野上三貴, 星野真紀子, 木下芳子, 井本桂子, 横山隆亮, 西谷和彦, “シロイヌナズナにおいて細胞成長に関与する細胞壁関連遺伝子群の解析”, 日本植物学会東北支部第 19 回大会, 2006 年 12 月, 青森.
- [12] 原吉直, 横山隆亮, 西谷和彦, 石澤公明, “ヒルムシロ殖芽の嫌気耐性における H⁺-ATPase の役割解析”, 日本植物学会東北支部第 19 回大会, 2006 年 12 月, 青森.
- [13] 原田太郎, 横山隆亮, 西谷和彦, 石澤公明, “水生植物ヒルムシロ殖芽の特異な無酸素応答-サブトラクション法で単離した発現が上昇する遺伝子の解析-”, 日本植物学会東北支部第 19 回大会, 2006 年 12 月, 青森.

5. 参考文献

- [1] Brown DM, Zeef LAH, Ellis J, Goodacre R and Turner SR, "Identification of Novel Genes in Arabidopsis Involved in Secondary Cell Wall Formation Using Expression Profiling and Reverse Genetics", *Plant Cell*, 17, 2281-2295, 2005.
- [2] Yokoyama R and Nishitani K, "Identification and Characterization of Arabidopsis thaliana Genes Involved in Xylem Secondary Cell Walls", *Journal of Plant Research*, 119, 189-194, 2006.
- [3] Yokoyama R and Nishitani K, "Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and *Arabidopsis*", *Plant and Cell Physiology*, 45, 1111-1121, 2004.

植物の抗重力反応における微小管－原形質膜－細胞壁連絡の役割

Role of Microtubule-Membrane-Cell Wall Continuum in Gravity Resistance in Plants

Abstract: The present study aims to confirm the hypothesis that the structural or physiological continuum of microtubule-plasma membrane-cell wall is responsible for gravity resistance in plants, by the space experiment using *Arabidopsis* mutants. For this purpose, we have decided the procedure for space experiment in EMCS, such as the optimal method of seed sowing, condition of plant cultivation, and methods of sample fixation and collection. We have also selected one tubulin mutant (*tua6*) and one HMGR mutant (*hmg1*) in the Columbia background for space experiment. Hypergravity suppressed elongation growth, whereas it stimulated lateral expansion of stem organs. These mutants had thicker and shorter hypocotyls than wild-type even under 1 g conditions, and hypergravity did not affect their length or diameter, suggesting that the mutants are hypersensitive to the gravitational force. We expect that such defects of these mutants are rescued under microgravity conditions in space.

Key words: *Arabidopsis*, Cell wall, Gravity resistance, Membrane sterol, Microtubule, Mutant, Plasma membrane

概 要

本研究の目的は、シロイヌナズナ突然変異系統を用いて、抗重力反応における微小管－原形質膜－細胞壁連絡の役割を検証し、抗重力のしくみを明らかにすることにある。本年度は、EMCSを利用した宇宙実験に備えて、播種方法、植物育成環境、植物観察方法、試料固定及び回収条件などの軌道上操作の手順を検討し、確定した。また、多くのチュープリン並びにHMGR変異体の中から、最も宇宙実験に適した系統として *tua6* 並びに *hmg1* を選定し、遠心過重力環境を用いた予備実験を実施した。過重力環境下では植物茎器官の伸長成長が抑制され肥大成長が促進されるが、これらの変異体は1 g環境下で既に太く短い形状をしており、過重力環境でもそれ以上の伸長抑制や肥大促進が起こらなかった。すなわち、このような変異体は重力に抵抗する能力が低く、1 gの重力にも耐えられないことがわかった。宇宙の微小重力環境では、これらの変異体の形質が回復することが期待される。

1. はじめに

抗重力は、重力屈性と並ぶ植物の主要な重力反応であり、植物が数億年前に初めて陸に上がって以来、陸上で進化、繁栄する上で重要な役割を果たしてきた。しかし、その機構については不明な点が多い。我々は、抗重力における重力シグナルの感受が重力屈性の場合とは独立であり、平衡細胞ばかりでなく多くの一般的な植物細胞において原形質膜上のメカノレセプターの働きで行われることを示した [1-3]。また、最終的な反応として、細胞壁代謝と細胞壁環

境の修飾に基づく細胞壁強度の増加が誘導されることを明らかにした。さらに、重力応答性遺伝子の解析により、シグナル変換・伝達機構において、原形質膜と微小管の構造的、機能的な協調が重要な働きを担うことが示唆された[1-3]。本研究は、シロイヌナズナ突然変異系統を用いて、このような抗重力のしくみを明らかにすることを目的としている。微小管、原形質膜、そして細胞壁の構築や機能に関わる突然変異体を地上で生育させると、いずれも細胞壁の形成が悪く、異常な成長、発達を示す。しかし、強固な細胞壁を形成する必要がない宇宙の微小重力環境では、これらの突然変異系統も野生型と同様に正常に生育する可能性が高い。宇宙実験によってこの仮説が実証されれば、植物の主要な重力反応である抗重力の機構が解明されるのみならず、宇宙並びに地球上での植物生産に貢献できる。

2. 成果の概要

2.1. 宇宙実験における操作手順の確定

本研究に関わる宇宙実験は、本年度ベースライン化が終了し、来年度内の打ち上げ、実施が予定されている。そこで、軌道上操作の各ステップについて検討し、実施のための操作手順を確定した。まず、種子の発芽に関しては、乾燥種子を打ち上げて、軌道上で吸水、発芽させることとし、播種数は1つのPCC（Plant Cultivation Chamber, ESAのMULTIGEN-1実験用に開発された植物栽培容器）当たり7粒と定めた。また、培地にはMS栄養剤（シグマ社製M2909）を加えたZeoponiXを用いることにした。さらに、野生型と比べて変異体では成長の遅れが予想されるので、最大3日間先行して吸水させることができるような手順とした。次に、植物育成環境のうち、温度、湿度、給水、及びガス環境に関してはEMCS/MULTIGEN-1実験の設定環境通りとした。光環境に関しては、50及び75 W/m²の2段階が設定されているが、当初の想定値よりやや高めであり、2007年5月から行うPCC検証モデルを用いた栽培実験によって最終確認することになった。また、当初計画では連続光照射を予定していたが、16時間明／8時間暗の周期をつけることにした。この変更により大きな問題は生じないことを確認した。さらに、成育中の植物体の様子を継続して確認するため、植物育成期間中、毎日1回のビデオ撮影を行い、その画像は地上にダウンリンクするとともに軌道上で録画、保管することになった。最後に、軌道上で生育した植物試料の回収に関しては、胚軸部分以上の植物体全体を用い、遺伝子解析用にはRNAlaterを含むKFT内に、また生化学及び生理学的パラメータ測定用にはZiploc bagに入れて凍結することとした。このような試料の保存の温度条件として、KFTについては-20℃以下、またZiploc bagについては-80℃以下を要求することになった。また地上への輸送回収の際にはシャトル用冷凍庫のリソース関係上ともに-20℃以下を要求することになった。

2.2. 宇宙実験に適したチューブリン変異体の選抜と解析

表層微小管の構築に関わるシロイヌナズナ突然変異体を得るため、EMS処理した種子のM2世代より植物体の構築や長軸方向の成長にねじれを生じた系統の単離を行った。原因遺伝子のマップベース・クローニングにより、約40種類の α -チューブリン及び β -チューブリン遺伝子変異体が単離された。これらはいずれも1アミノ酸置換による変異に由来し、dominant negativeな機構で変異形質を示すことがわかった。これらの変異体のうち、稔性や表現型の明瞭ななどの条件を満たした3種類に関して、さらに詳細な形質の解析を行った。これらの変異体、*tua3* (D205N)、*tua4* (S178 Δ)、*tua6* (A281T)は、1g環境下でも、伸長成長が抑制されるとともに肥大成長が促進されて、太く短い形状をしていた。また、過重力環境下では植物茎器官の伸長成長が抑制され肥大成長が促進されるが、これらの変異体ではそれ以上の伸長抑制や肥大促進が起らなかった。特に、*tua6*の胚軸では、もともと伸長抑制並びに肥大促進が顕著であり、過重力の影響は全く見られなかった。一方、胚軸のねじれについて詳細に調べたところ、過重力環境下では野生型でもわずかにねじれが促進されること、そして変異体では1g下でのねじれが見られ、それが過重力環境下ではさらに強調されることがわかった。特に、*tua6*では、1g下でのねじれが大きく、過重力の影響も最も明瞭であった。以上の結果から、宇宙実験には*tua6* (A281T)を使用するのが最良であることが示された。

2.3. 宇宙実験に適したHMGR変異体の選抜と解析

原形質膜の構築や機能に関わる突然変異体のうち、最も顕著な形質の変化を示すのは、膜ステロールの合成に関わ

る HMGR のノックアウト変異体 *hmg* である。最初に T-DNA 挿入によって得られた *hmg* 変異系統のエコタイプは WS であった。そこで戻し交雑によりバックグラウンドを Columbia に置換した *hmg1* の変異体を作出した。この変異体は矮性化、老化促進、不稔など、WS バックグラウンドのものと同様の形質を示した。さらに、抗重力反応について解析したところ、この変異体は、1 g 環境下でも、伸長成長が抑制されるとともに肥大成長が促進されて、太く短い形状をしていた。また、過重力環境下では植物茎器官の伸長成長が抑制され肥大成長が促進されるが、この変異体ではそれ以上の伸長抑制や肥大促進が起こらなかった。チューブリン変異体の場合と同様に、この変異体も重力に抵抗する能力が低く、1 g の重力に耐えられないものと考えられる。このように、*hmg1* も宇宙実験に適した変異体であることが明らかになった。

3. まとめ

本年度の研究では、播種方法、植物育成環境、植物観察方法、試料固定及び回収条件などの宇宙実験の操作手順を様々な角度から検討し、そのほとんどを確定することができた。また、最も宇宙実験に適した系統として、多くのチューブリン変異体の中から *tua6* を選抜し、HMGR の変異体に関しては Columbia バックグラウンドの *hmg1* を作出した。これらの変異体を用いて予備実験を行ったところ、過重力環境下では植物茎器官の伸長成長が抑制され肥大成長が促進されるが、これらの変異体は 1 g 環境下で既に太く短い形状をしており、過重力環境でもそれ以上の伸長抑制や肥大促進が起こらなかった。すなわち、このような変異体は重力に抵抗する能力が低く、1 g の重力にも耐えられないことがわかった。

本研究に関わる宇宙実験は、本年度ベースライン化が終了し、来年度内の打ち上げ、実施が予定されている。そこで、来年度は PCC の検証モデルを用いた栽培実験を実施する。また、軌道上で生育した植物試料の固定、保管条件は、地上で行う通常の実験の場合とは異なっているので、宇宙実験操作に即した試料分析を行い、想定している分析手順の有効性を確認する。さらに、今回の宇宙実験で得られる試料は、最大でも各処理 7 本とわずかであるので、通常は別々の試料で行う測定を同一試料を用いて連続的に実施する方法を検討し、限られた量の試料より最大限のデータを得る方法を確認する。このようにして、効率的な宇宙実験の実施をめざす。

4. 成 果 発 表

4.1. 学術論文

- [1] Hoson T, “The mechanism and significance of gravity resistance in plants”, J. Gravit. Physiol., 13, 97-100, 2006.
- [2] Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T, “Hypergravity induces reorientation of cortical microtubules and modifies growth anisotropy in azuki bean epicotyls”, Planta, 224, 1485-1494, 2006.
- [3] Nakabayashi I, Karahara I, Tamaoki D, Masuda K, Wakasugi T, Yamada K, Soga K, Hoson T and Kamisaka S, “Hypergravity stimulus enhances primary xylem development and decreases mechanical properties of secondary cell walls in inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana*”, Ann. Bot., 97, 1083-1090, 2006.
- [4] Soga K, Arai K, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T, “Modifications of xyloglucan metabolism in azuki bean epicotyls under hypergravity conditions”, Adv. Space Res., in press.
- [5] Koizumi T, Sakaki T, Usui S, Soga K, Wakabayashi K and Hoson T, “Changes in membrane lipid composition in azuki bean epicotyls under hypergravity conditions: Possible role of membrane sterols in gravity resistance”, Adv. Space Res., in press.

4.2. 学会発表

- [1] Hoson T, “The mechanism and significance of gravity resistance in plants”, 27th Annual International Gravitational Physiology Meeting, April 2006, Osaka.
- [2] Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T, “Role of cortical microtubules in hypergravity-induced modification of growth anisotropy in azuki bean epicotyls”, 27th Annual International Gravitational Physiology Meeting, April 2006, Osaka.
- [3] Matsumoto S, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K, Abe T, Ishida T, Hashimoto T and Hoson T, “Growth behavior in tubulin mutants of *Arabidopsis* under hypergravity conditions”, 27th Annual International Gravitational Physiology Meeting, April 2006, Osaka.
- [4] Nakabayashi I, Karahara I, Tamaoki D, Masuda K, Wakasugi T, Yamada K, Soga K, Hoson T and Kamisaka S, “Effects of hypergravity

- stimulus on primary xylem development and mechanical properties of secondary cell walls in inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana* L.”, 27th Annual International Gravitational Physiology Meeting, April 2006, Osaka.
- [5] Ikushima T, Soga K, Hoson T and Shimmen T, “Dynamic organization of cortical microtubules and cell wall during gravitropism of azuki epicotyl”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 2006, Kyoto.
 - [6] Hoson T, Koizumi T, Matsumoto S, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K and Sakaki T, “Role of membrane sterols and cortical microtubules in gravity resistance in plants”, 36th Committee on Space Research Scientific Assembly, July 2006, Beijing.
 - [7] Soga K, Arai K, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T, “Modifications of xyloglucan metabolism in azuki bean epicotyls under hypergravity conditions”, 36th Committee on Space Research Scientific Assembly, July 2006, Beijing.
 - [8] Koizumi T, Soga K, Wakabayashi K, Suzuki M, Muranaka T and Hoson T, “Involvement of membrane sterols in hypergravity-induced modifications of growth and cell wall metabolism in plant stems”, 36th Committee on Space Research Scientific Assembly, July 2006, Beijing.
 - [9] Matsumoto S, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K, Abe T, Ishida T, Hashimoto T and Hoson T, “Up-regulation of tubulin genes and growth phenotype of tubulin mutants in *Arabidopsis* under hypergravity conditions”, 36th Committee on Space Research Scientific Assembly, July 2006, Beijing.
 - [10] 松本翔平, 隈崎沙緒里, 曾我康一, 若林和幸, 阿部竜也, 石田喬志, 橋本隆, 保尊隆享, “シロイヌナズナ・チューブリン変異体の成長と形態に対する重力の影響”, 日本植物学会第70回大会, 2006年9月, 熊本.
 - [11] 隈崎沙緒里, 松本翔平, 曾我康一, 若林和幸, 阿部竜也, 石田喬志, 橋本隆, 保尊隆享, “シロイヌナズナ MAPs 変異体の成長と形態に対する重力の影響”, 日本植物学会第70回大会, 2006年9月, 熊本.
 - [12] 生嶋利充, 曾我康一, 保尊隆享, 新免輝男, “アズキ上胚軸の重力屈性における屈曲機構”, 日本植物形態学会第18回大会, 2006年9月, 熊本.
 - [13] 保尊隆享, “植物の抗重力反応における微小管—原形質膜—細胞壁連絡の役割”, 日本宇宙生物科学会第20回大会, 2006年9月, 大阪.
 - [14] 小泉朋子, 曾我康一, 若林和幸, 鈴木優志, 村中俊哉, 保尊隆享, “過重力による植物の茎の成長と細胞壁代謝の修飾における膜ステロールの役割”, 日本宇宙生物科学会第20回大会, 2006年9月, 大阪.
 - [15] 松本翔平, 隈崎沙緒里, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, “重力による植物の成長調節における微小管の役割—微小管破壊剤を用いた解析”, 日本宇宙生物科学会第20回大会, 2006年9月, 大阪.
 - [16] 隈崎沙緒里, 松本翔平, 曾我康一, 若林和幸, 阿部竜也, 石田喬志, 橋本隆, 保尊隆享, “重力による茎器官の成長と形態の調節における MAPs の役割”, 日本宇宙生物科学会第20回大会, 2006年9月, 大阪.
 - [17] 中野紗帆, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, “重力による細胞壁代謝調節の茎部域による差異”, 日本宇宙生物科学会第20回大会, 2006年9月, 大阪.
 - [18] 金原知也, 小竹敬久, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, 円谷陽一, “冠水微小重力によるイネ芽生えの β -1,3,1,4-グルカン合成活性の低下”, 日本宇宙生物科学会第20回大会, 2006年9月, 大阪.
 - [19] 保尊隆享, “微小重力下の物質科学と生命科学—植物学の立場から”, 日本マイクログラビティ応用学会第22回学術講演会, 2006年12月, 東京.
 - [20] Hoson T, “Changes in osmotic and cell wall properties of azuki bean epicotyls by submergence as anaerobiosis and as a response to microgravity”, ISPA Japan Pre-Symposium, December 2006, Tsukuba.
 - [21] 生嶋利充, 曾我康一, 保尊隆享, 新免輝男, “アズキ上胚軸における重力屈性の解析”, 基礎生物学研究所研究会「植物細胞における細胞骨格の機能発現：滑り説から50年」, 2006年12月, 岡崎.
 - [22] 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, 若林和幸, 曾我康一, “植物の抗重力反応解明”, 第23回宇宙利用シンポジウム, 2007年1月, 東京.
 - [23] 小竹敬久, 金原知也, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, 円谷陽一, “重力シグナルがイネの β -1,3,1,4-グルカン合成活性に与える影響”, 第23回宇宙利用シンポジウム, 2007年1月, 東京.
 - [24] 保尊隆享, “植物の抗重力反応における細胞壁と細胞膜の機能”, 第9回植物生体膜シンポジウム, 2007年3月, 松山.
 - [25] 曾我康一, 小竹敬久, 若林和幸, 神阪盛一郎, 保尊隆享, “重力によるアズキ上胚軸の表層微小管配向の変化と γ -チューブリン遺伝子発現の増加”, 日本植物生理学会2007年度年会, 2007年3月, 松山.
 - [26] 小泉朋子, 榊剛, 鈴木優志, 村中俊哉, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, “茎器官の抗重力反応における膜ステロールの役割”, 日本植物生理学会2007年度年会, 2007年3月, 松山.

5. 参 考 文 献

- [1] Hoson T and Soga K, “New aspects of gravity responses in plant cells”, Int. Rev. Cytol., 229, 209-244, 2003.
- [2] Hoson T, Saito Y, Soga K and Wakabayashi K, “Signal perception, transduction, and response in gravity resistance. Another graviresponse in plants”, Adv. Space Res., 36, 1196-1202, 2005.
- [3] 保尊隆享, “植物の抗重力反応—シグナル受容, 変換・伝達, そして応答—”, 生物工学, 83, 565-567, 2005.

PCC プロトタイプモデルを用いた地上栽培試験

Ground Cultivation Test for Cell Wall / Resist Wall using PCC prototype model

1. 宇宙実験に使用する PCC-Growth pot lid 位置の確定

Cell Wall / Resist Wall に使用する PCC (Plant Cultivation Chamber) の Growth pot lid の個数および位置間隔は、MULTIGEN-1 実験で使われる 3 個穴または 5 個穴の PCC mini-lid を参考に、図 1 に示す通りに中央に 1 個配置し、それを取り囲むよう 6 個の位置を決め、合計 7 個の lid 穴を設計した。

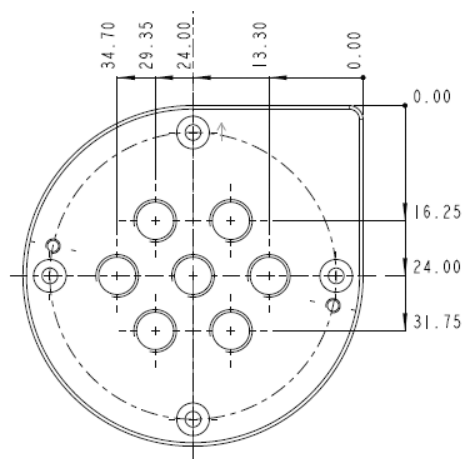


図 1. Cell Wall / Resist Wall-PCC-Growth pot lid

2. Cell Wall / Resist Wall PCC プロトタイプモデルを用いた栽培試験

プラスチック製の PCC プロトタイプを用いて、シロイヌナズナ栽培試験を行った。シロイヌナズナ生育には植物生育用インキュベータ (TOMY: CFH405) を用い、温度 23 °C、湿度 60 %、光量約 75W/m² の 16 時間明期 / 8 時間暗期の昼夜サイクルとした。これらの環境パラメータは、すべて Cell Wall / Resist Wall の実験要求書 (ERD) に合わせた数値である。毎日手動で給水を規定量まで行い、培地中が乾燥することのないように注意した。観察は植物の生育状況のほか、花茎形成後は花茎長の測定も行った。現在まで、野生型 *Colombia* 種子のみを用いた試験を行っている。その結果、生育開始後約 29 日で抽苔し、10cm の花茎が得られるのは生長の早い個体で 35 日後、遅い個体で 40 日後であった (図 2, 図 3)。とくに Cell Wall テーマでは花茎の支持組織形成機構を解析するため、花茎どうしの物理的接触を除外する必要があるが、1g 重力下で行った本栽培試験では花茎どうしの接触はみとめられなかった。

2007 年 5 月から、PCC フライトモデル相当の検証モデルおよび EMCS 宇宙実験を模擬した専用治具装置 ECDK (Experiment Container Development Kit) を用いて完全自動制御下でシロイヌナズナの栽培試験を開始する。また、野生型だけではなく、フライト実験に使用する *tua6* (A281T) および *hmg1* 突然変異体、GUS (β -glucuronidase) 遺伝子タグを導入した形質転換植物を用いて、各ストレインにおける生長プロファイルを取得する予定である。



図 2. 生育開始 29 日後のシロイヌナズナ
ロゼッタ葉が形成され、一部の個体は抽苔している。



図 3. 生育開始 35 日後のシロイヌナズナ
開花がみとめられ一部の花茎では鞘を形成している。

宇宙航空研究開発機構特別資料 JAXA-SP-06-032

発 行 平成 19 年 3 月 30 日

編集・発行 宇宙航空研究開発機構

〒182-8522 東京都調布市深大寺東町7-44-1

URL:<http://www.jaxa.jp/>

印刷・製本 (株)フジブランド

本書及び内容についてのお問い合わせは、下記にお願いいたします。

宇宙航空研究開発機構 情報システム部 研究開発情報センター

〒305-8505 茨城県つくば市千現2-1-1

TEL:029-868-2079 FAX:029-868-2956

©2007 宇宙航空研究開発機構

※本書の一部または全部を無断複写、転載、電子媒体に加工すること禁じます。

