

国際宇宙ステーション「きぼう」利用科学実験テーマ 実験成果報告書

実験テーマ名：微小重力環境における高等植物の生活環 (Space Seed)
Life Cycle of Higher Plants under Microgravity Conditions

代表研究者：神阪盛一郎¹⁾

共同研究者：

唐原一郎¹⁾、笠原宏一²⁾、後藤伸治³⁾、曾我康一⁴⁾、蘇雄永 (Woong-Young Soh)⁵⁾、田坂昌生⁶⁾、西内巧⁷⁾、西谷和彦⁸⁾、橋本隆⁶⁾、保尊隆享⁴⁾、山田晃弘⁹⁾、山田 恭司¹⁾、横山隆亮⁸⁾、若林和幸⁴⁾

1) 富山大学大学院理工学研究部 2) 東海大学生物理工学部 3) 宮城教育大学教育学部 4) 大阪市立大学大学院理学研究科 5) 韓国全北大学
6) 奈良先端科学大学院大学 7) 金沢大学学際科学実験センター
8) 東北大学大学院生命科学研究科 9) 東京大学名誉教授

2011 年 11 月

1. 実験概要

はじめに

Space Seed 実験は JEM 一次選定テーマとして 1993 年に採択され、長期間にわたり実験準備を行った結果、2009 年によく宇宙実験を実施することができた。一方、2008 年 4 月～5 月に実施された国際宇宙ステーション (ISS) 内の ESA・Columbus 実験棟での二つの植物実験、すなわち Resist Wall (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、PI: 保尊隆享)、および Cell Wall (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、PI: 西谷和彦) が培養装置・EMCS の不具合で十分な研究成果が得られなかった。このため Space Seed に、これら二つのテーマの実験内容の一部を組み込んで実施することとなった。本報告では、2009 年 9 月～11 月にかけて植物実験ユニット (PEU) を用いてきぼうで実施された Space Seed の成果と今後の解析計画について述べる。Cell Wall 実験に対応する部分を西谷 CI 分、Resist Wall 実験に対応する部分を保尊 CI 分と記載する。

1.1 Space Seed

1G 環境に適応・進化してきた現在の陸上植物がはたして、重力のない宇宙で正常な生活環、すなわち種子から発芽して、茎葉の成長、花芽形成、開花、結実によって次の世代を作ることができるのであろうか。Space Seed ではシロイヌナズナ (野生型 Columbia) の種子から種子への長期栽培が可能な PEU を JAXA と共同開発し、2009 年 9 月から 11 月にかけてきぼうにおいて宇宙実験を行った。その結果、乾燥状態で打ち上げられた種子は給水開始 3 日後に発芽し、その後子葉・ロゼット葉の展開、花茎の抽臺、開花、そして長角果が形成されたことが、地上にダウンリンクされた画像から明らかになった。また、画像から、1G 対照に比べると、花茎の成長速度が μG 区で早いこと、ロゼット葉の老化が μG 区で遅いことが初めて明らかになった。

1.2 西谷 CI 分

陸上環境下で植物体を支える機能を持つ細胞壁は、重力に起因する機械刺激をモニターしながら、細胞壁関連遺伝子群の転写制御を介して、支持組織の強度を調節・最適化しているとする仮説を検証するのが本研究の目的である。そのために、微小重力環境下と、1G 環境下でシロイヌナズナを 32 日間栽培し、固定組織より RNA を抽出し、DNA ライブラリーを作製したのち、イルミナを用いた次世代高速シーケンシング法により、全発現遺伝子の塩基配列を解読し、発現量を定量した。その結果、花茎支持に関与する遺伝子としてこれまで注目していた 16 の遺伝子の内、1 遺伝子の発現が微小重力下で減少し、4 遺伝子の発現が高まることが分かった。

1.3 保尊 CI 分

植物が重力に抵抗して正常な成長を維持する反応 (抗重力反応) における微小管の機能を明らかにするため、「きぼう」の細胞生物学実験装置 (CBEF) を用いてシロイヌナズナ・チューブリン変異体 *tua6* を PEU 内で花茎ステージまで生育させ、成長形質と細胞壁物性の変化を解析した。地上あるいは軌道上の 1G 対照と比べて、宇宙の微小重力環境下では、*tua6* 変異体の花茎の出現時期が早く、それ以降の成長速度や成長量も大きかった。また、このような花茎の成長促進が、細胞壁伸展性の増加によりもたらされることが示された。これらの結果より、重力の作用がない微小重力環境では微小管形成に異常があるチューブリン変異体もより正常に成長する、という仮説が明瞭に支持された。本実験によって、1G の重力に対する抗重力反応において微小管が細胞壁と協調して重要な役割を果たしていることが初めて明らかになった。

2. 実験目的、目標

2.1 Space Seed

植物は長い間重力の影響が比較的小さい水中で進化してきたが、陸上植物の祖先が、今から約4億年前の古生代シルル紀に地球生命体としては初めて陸上に進出した。1*g*という環境は植物の縦方向の成長には抑制的に働くが、陸上植物は支持組織を発達させて、その細胞壁の機械的固さを利用して体を支えることで、茎を高く伸ばすことを可能にした。また、植物は重力ベクトルを指標として茎や根などの器官の成長方向を決める重力屈性という仕組みを獲得した。それによって、植物が根を地下に伸ばし水と養分を吸収し、茎を上へ伸ばして葉を空間に配置し光合成による物質生産を効率よく行うことが可能になった。このように1*g*環境に適応・進化してきた現在の陸上植物がはたして、重力のない宇宙で正常な生活環、すなわち種子から発芽して、茎葉の成長、花芽形成、開花、結実により次の世代を作ることができるのであろうか（神阪 2002）。生理学、形態学、遺伝学的な手法を用いて、植物の生活環における重力の影響を解明することが、Space Seedの目的である。

2.2 西谷 CI 分

植物は陸上に進出し、維管束植物として大型化する過程で、自重を支えることのできる強靱な二次細胞壁を進化させた。植物の地上部の支持機能の調節には、二次細胞壁の合成や再編に関わる細胞壁関連遺伝子群の転写制御が中心的な役割を担っている（Nishitani 2005, Imoto et al. 2005）。これまでの我々の研究により、シロイヌナズナの二次細胞壁の構築に関わる遺伝子には、力学的な荷重にตอบสนองして、転写がされるものがあることが明らかとなっている（Yokoyama & Nishitani 2006, Koizumi et al. 2007）。これらの事実に基づき、我々は「陸上植物は、自身の地上部に掛かる荷重をモニターし、それに最適化した支持組織を作るしくみがある」とする仮説を提唱してきた（Yokoyama & Nishitani 2006, Koizumi et al. 2007, Koizumi et al. 2009）。

Cell Wallはこの仮説をISSでのシロイヌナズナの栽培実験を通して実証し、植物の支持組織の調節における細胞壁動態の役割を分子レベルで実証することを目的としたものである。この実験を具体化するうえで、これまでの我々の知見を基にして、シロイヌナズナ地上部の支持組織で発現するCesA7遺伝子を初め、二次細胞壁合成に関わる遺伝子群に着目し（Koizumi et al. 2009, Nishitani et al. 2009）、これまでの宇宙実験での経験を生かして、微小重力環境下でシロイヌナズナを育成・固定・回収し、遺伝子発現を包括的に解析する実験計画を立てた（Koizumi et al. 2007, Kamada et al. 2009）。

2.3 保尊 CI 分

植物体、特に成熟器官の成長や発達に対する重力の作用は十分に解明されていない。我々は、重力刺激によってチューブリン遺伝子の発現レベルが上昇することから（Soga et al. 2008, 2009）、細胞骨格の一種である微小管が重力に対する植物の反応において重要な働きをすることを考えた。実際、シロイヌナズナ・チューブリン変異体の茎器官はねじれや矮性などの成長の異常を示すが、過重力環境下ではこのような形質が強くなった。すなわち、チューブリン変異体では、重力に抵抗して正常な成長を維持する能力が低下していると考えられる。この仮説を検証するため、「きぼう」の微小重力環境においてチューブリン変異体を花茎ステージまで生育させ、成長形質と成長調節機構の変化を解析した。重力の影響がない微小重力環境では、チューブリン変異体もより正常に成長することが予想された。

3 実験理論、仮説、実験手法

3.1 Space Seed

3.1.1 地上予備実験

2004年にJAXAと共同開発したPEUの設計モデルを富山大学の人工気象器およびつくば宇宙センターのCBEFに設置して、シロイヌナズナの栽培実験を行い、PEUの設計モデルとCBEF機能の改良を行った。

3.1.2 PEUのフライトモデルの開発

2004年～2009年まで、CBEFとPEUを用いて、計16回、シロイヌナズナの栽培実験を、筑波宇宙センターと富山大学で行い、得られたデータをもとにPEUの設計モデルの改良を行った。

3.1.2.1 PEUフライトモデルの仕様

PEUは、シロイヌナズナの種子の発芽から結実までの約70日間、CBEF内でほぼ自動的に植物の生育実験を行えるように設計された。PEUの大きさは幅24cm、高さ11cm、奥行き17cmの立方体である(図1A)。この中に、透明なポリカーボネイト製の植物栽培容器(5cm立方)(図1B)、観察用CCDカメラ、発光ダイオード(LED)照明、換気ポンプ、給水ポンプ、給水用バッグ(容量、100ml)、赤外線反射方式の水分センサーが設置されている。さらに、栽培容器内に温度・湿度センサーを設置して、環境モニタリングを可能にした。



図1A PEU外観(上部に放熱フィンを設置)

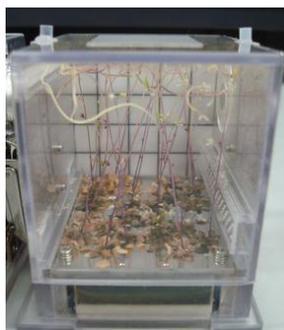


図1B 植物栽培容器(60日の栽培後)



図1C 苗床の被覆版(種子24粒を播種)

3.1.2.2 播種の方法

苗床のロックウール表面に、播種用の24個の小孔が開けられているステンレス製の被覆版(図1C)を設置して、過剰な水分蒸発を防いだ。播種は、シロイヌナズナの種子をロックウール上にアラビアゴムで接着した。具体的には、少量の1%(w/v)アラビアゴム水溶液をスポット状にロックウール(厚さ10mm)表面に塗布し、そこに種子を接着して、打ち上げ時の振動によって種子がはがれないようにした。スペースシャトルの打ち上げ時の振動を考慮して、接着した種子がはずれないかを、振動試験で確認した。

3.1.2.3 生育肥料

植物栽培容器の底に20mgの粉末ハイポネクス(N:P:K=6.5:6.0:19.0、微量成分を含まず)を均等に広げ、その上にロックウールのブロックをおいた。過剰の生育水が微小重力環境では水滴となって飛散することを考えて、赤外線反射方式の水分センサーによって、水分量を測定し、給水ポンプを作動させることによって、ロックウール中の水分量を自動制御した。微小重力環境での栽培容器中の水の状態に関しては、航空機による実験であらかじめ調べられた。3回の航空機実験の結果、微小重力下でも水分センサーと給水システムは正常に機能することが確認された。

3.1.2.4 PEU 栽培容器内の環境制御

植物栽培容器内の温度は、CBEF の温度制御系と PEU の補助ヒーターによって 23.5°C に設定された。栽培容器内の湿度は、換気ポンプで CBEF 内の空気を取り込むことによって下限 70%、上限 80% になるように自動調節した。なお、栽培容器に由来する水分によって CBEF 内の湿度が上昇するために、CBEF 内に吸湿剤を設置した。また、実験終了時に CBEF 内のガスサンプリングを行い、植物の成長に影響を及ぼすエチレンなどの気体の計測が行えるように計画した。

3.1.2.5 PEU の植物生育用および CCD カメラ画像撮影用照明

PEU 開発の初期には、LED ランプのサイズが制約になって照明板を栽培容器天井部に設置することが出来ず、容器側面から照明した。側面光源でも、花が咲き種子が形成されたが、植物の茎が光屈性によって光源方向に曲がる不具合があった。しかしその後、LED ランプが小型化し、栽培容器天井部から照明することが可能になった。また、PEU 開発の初期には、植物に白色光をあてるために赤、緑、青の LED を使用した。しかし、光量不足のために芽生えの胚軸が徒長することから、植物の成長にあまり必要とされない緑の LED を除き、赤と青の LED (赤/青 光量比, 3 : 1) を光源とした。照度は、ロックウールを覆う被覆板中央部で $110 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった。LED ランプの光は指向性が高く、被覆板中央部はもっとも明るく、周辺部は暗くなった。生育容器被覆板上の照明ムラを小さくするために、栽培容器天井部に拡散板 (サイズ, 25 mm x 30 mm ; 拡散角度, 30 度) を設置した。CCD カメラによる栽培容器内の植物の画像撮影時には、赤・青 LED ランプを消灯し、白色 LED ランプを点灯した。

3.1.3 PEU を用いた地上での植物栽培試験

フライトモデルを製作するための PEU の機能確認試験は、2008 年 4 月~6 月にかけて PEU を、筑波宇宙センターでは CBEF 内に、また富山大学では温度 23°C、湿度 50% に設定された人工気象器内に設置して、ほぼ同時並行的に行われた。使用された PEU はつくば、富山でそれぞれ 3 装置であった。

3.1.3.1 PEU フライトモデルでのシロイヌナズナの成長

各 PEU にエタノール殺菌した 24 粒の野生型 Columbia 種子を播種した。実験開始 3 日目に発芽し、その 3 日後に本葉 (ロゼット葉) が生じた。花茎のボルティング (抽臺) は実験開始約 3 週間目にはじまり、4 週間目に最初の開花が見られた。莢 (長角果) 形成は約 5 週間目からはじまり、最初に形成された長角果が成熟にともない緑色から茶色になったのは約 7 週間目であった。実験開始 57 日目に給水ポンプを停止して乾燥運転を開始し、PEU の運転は実験開始 70 日目に終了した。

3.1.3.2 成長パラメータの計測

PEU 運転終了時に、播種した種子の発芽率、花をつけた個体数、胚軸長、花茎長、長角果数を測定した。また、長角果は一つずつ薬包紙に包み、シリカゲルを入れた容器で約 1 ヶ月間乾燥した。種子の発芽試験は、ひとつひとつの長角果を直径 5cm のシャーレの中の濾紙上に置き、長角果をピンセットで破って種子を濾紙上に広げ、ハイポネクス (6-10-5) の 1/1000 希釈栄養液を 0.7 ml 加え、暗所 4°C で 3 日間放置し、その後 22°C で $130 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で 4 日間培養した。

PEU の植物栽培容器に播種した種子の発芽率は富山 95.8%、つくば 97.2% であった。胚軸

長は、1.2 mmで富山とつくばでほぼ同じであった。花茎長は、富山では52.3 mm、つくばでは63.6 mmで、両者には統計的には有意の差がなかった。栽培容器当たり花をつけた個体は、富山で23、つくばで22であった。形成された個体あたりの長角果の数も3個で、富山とつくばで差がなかった。よく伸長した花茎は先端部が栽培容器天井に達し、その後天井部をはうように伸長していた。天井部はLED照明板に近く、設定温度23.5°Cよりも温度が高いと思われるが、花や長角果、種子の形成は行われた。PEU内で形成された種子には小さい未熟種子が約10%含まれていた。サイズから判断して成熟したと考えられる種子の発芽率は、PEU装置間でばらつきがあったが、ほぼ90%であった。



図2 化学固定キット (KFT)

3.1.3.3 顕微鏡観察用固定・包埋

光学顕微鏡：ISSのきぼう内で収穫された植物試料は、化学固定キット (Kennedy Space Fixation Tube : KFT) (図2)でFAA固定液 (formaldehyde : 1.8% 酢酸 : 5.0% : エタノール : 45%)中に浸漬した。地上回収後の試料を長さ2~3 mm程度に切除し、リン酸緩衝液 (pH 7.4、0.1M)で数回洗浄した。エタノールシリーズ (50、50、60、70、80、90、99.5、100、100%、各20分)で脱水した後、Technovit 7100樹脂により試料を包埋した。各条件で成育したシロイヌナズナ花茎の横断面および花茎から伸長した小花柄 (pedicel) 分岐部の縦断面を厚さ約6~7 μm で薄切し、トルイジンブルー-0で染色後、光学顕微鏡により観察した。
電子顕微鏡：KFT容器中の前固定液 (0.5% Glutaraldehyde, 2.0% Paraformaldehyde in 0.1 M Phosphate Buffer (pH 7.4))に浸漬されている試料を長さ2~3 mm程度に切除し、リン酸緩衝液 (pH 7.4、0.1M)で数回洗浄した。2.0% OsO₄ in 0.1 M Phosphate Buffer (pH 7.4)で2時間後固定し、その後リン酸緩衝液で洗浄した。アルコール脱水 (50、70、80、90、95、99.9、100、100、100%)した後にLR White (medium)に包埋した。各条件で成育したシロイヌナズナ花茎横断面を厚さ60~70 nmに薄切し、酢酸ウランおよび酢酸鉛による電子染色、さらに炭素蒸着の後に透過型電子顕微鏡 (JEM1210, 日本電子)により観察した。

3.2 西谷CI分

3.2.1 播種・育成

シロイヌナズナの野生型 (以後 WT) 種子と、二次壁形成に関わる遺伝子であるCesA7のプロモーターとGUS遺伝子を融合した遺伝子を導入した形質転換体 (以後、CesA7)を、それぞれ6粒、合計12粒をPEUに播種したものを3組用意し、各々、ISS内JEM (きぼう)の微小重力環境下、ISS内JEMの遠心加速器による1g重力環境下、および、地上の1g環境下に設置し、2009年9月10日に給水を開始し、10月13日までの33日間、温度、重力、光、給水などのパラメータを管理、記録しながら生育実験を行った。

フライト予定の33日間の生育では、当初予定していた花茎の抽臺は見られなかったが、フライトスケジュールの制約上、回収を行わざるを得なかったため、それぞれの実験区画について、地上部組織全体をKFTに回収した。

3.2.2 固定

WTの地上部をKFT内でRNAlater (Ambion)により固定、CesA7植物はKFT内でホルムアル

デヒドにより固定し、地上に回収するまで凍結保管した。

3.2.3 RNA 調整

WT 植物の資料回収はシロイヌナズナ地上部組織内の全 mRNA シークエンスを次世代シーケンサーを用いて定量的に解読するためには、高精製度かつ 10 μ g 以上の total RNA が必要である。そのため、まず、RNA later で -80°C 凍結保存していたシロイヌナズナを材料として total RNA 精製法を検討し、ConcertTM Plant RNA Reagent (Invitrogen, 12322-012) を用いた Small scale RNA isolation 法と、DNaseI, amplification grade (Invitrogen, 18068-015) を用いた DNase 処理法を採用する事により、高純度・高収率が得られることを確認し、この方法でサンプルから RNA 抽出を行い、Agilent 2100 Bioanalyzer およびアガロース電気泳動により純度を評価した。その結果、ISS 内 JEM の微小重力環境下、と地上の 1g 環境下のものについては、分析に必要な純度の RNA が得られたので (図 3)、これらのサンプルについて、次世代シーケンサーによる解析を進めることとした。一方、ISS 内 JEM の遠心加速器による 1g 重力環境下で生育させた対照区の RNA の純度は不十分であったため、次世代シーケンサーの解析を断念した。

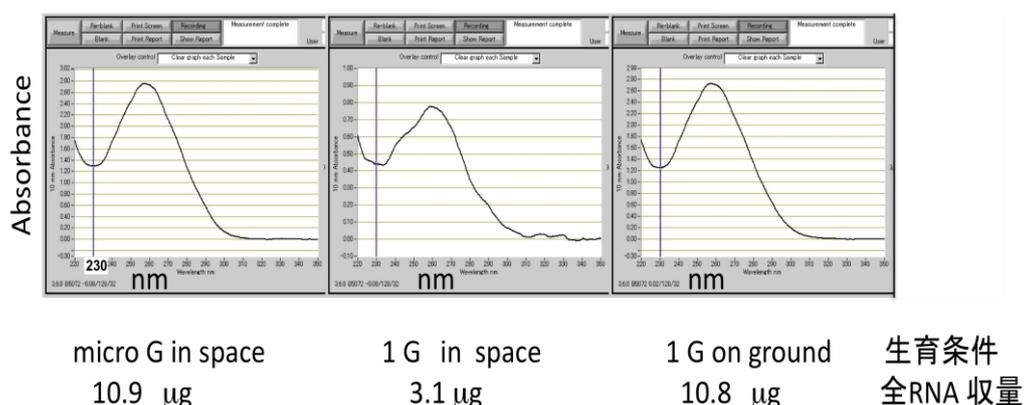


図 3 野生型 (WT) シロイヌナズナ地上部の全 RNA の純度評価と収量

3.2.4 RNA 配列解読のための cDNA ライブラリーの作製

マニュアル mRNA Sequencing Sample Preparation Guide Rev.D (イルミナ社) に従い、

1. Total RNA (2.5 μ g) より PolyA+RNA を単離
2. 60-200bp 程度に断片化
3. 断片化した RNA を鋳型としてランダムプライマーを用いて逆転写
4. RNaseH と DNA polymerase I を用いて二本鎖 cDNA を合成
5. 両末端の平滑化・リン酸化処理、3' -dA 突出処理後、アダプターを連結
6. アガロースゲル電気泳動を用いてサイズ選別
7. PCR による増幅 (18 サイクル)

の手順で mRNA-Seq. Sample Pre Kit (イルミナ社) を用いてライブラリーを作製した。

3.2.5 クラスター形成と高速シーケンズ解析

作製した DNA ライブラリーを鋳型として、Cluster Station, Cluster Generation Kit (イルミナ社) を用いてクラスター形成を行い、Genome Analyzer Iix, Sequencing Kit (イルミナ社) を用いて、クラスターを形成する鋳型 DNA の塩基配列の決定作業を行った。

3.3 保尊 CI 分

3.3.1 地上予備実験

様々なチューブリン変異体を過重力環境下で生育させ、茎器官の成長と形態の変化を調べた。チューブリン変異体の茎器官は、1G 下でもねじれや矮性などの成長の異常を示したが、過重力環境下では重力の大きさに依存してこのような形質が強くなった。

3.3.2 宇宙実験

チューブリン変異体の 1 つである *tua6* (A281T, *Lefty*) 種子を PEU 内に播種し、「きぼう」CBEF 内の 1G 及び微小重力環境、並びに地上（富山大学および筑波宇宙センター）で 33 日間生育させた。生育期間中、PEU に内蔵した GCD カメラにより花茎の成長を継続的に撮影した。33 日間生育後の試料は、RNA later 溶液を含む KFT 容器に入れて固定し、凍結状態のまま地上に回収した。

3.3.3 飛行後解析

軌道上で撮影された静止画像より、*tua6* 変異体のねじれ形質の変化を調べた。また、同様に、花茎の成長に関わる 4 つの形質を測定した。さらに、地上回収試料を用いて、成長調節を司る細胞壁の物性に対する微小重力の影響を解析した。

4. 宇宙実験計画の流れ

4.1. 全体計画

Space Seed 実験は 1992 年に募集された、JEM 一次選定テーマ募集において採択され、1998 年の宇宙実験実施（当時の予定）に向けて宇宙実験準備が開始された。採択当時は培養装置の仕様も決定しておらず、装置仕様の設定と植物実験供試体（PEU）の開発が同時並行で進められた。1998 年に実験計画書がベースライン化されて、供試体・容器等の器具類開発が具体化した。供試体開発と軌道上手順が詳細化され、2007 年の秋に Increment19（当時は 2009 年前半）でのフライト実験を目指して実験計画が具体化した。Space Seed 実験では乾燥状態の種子を日本で植物栽培容器にセットして打ち上げるが、化学固定剤は、米国 NASA のケネディー宇宙センターの実験室で準備した。2009 年 4 月に筑波宇宙センターで培養容器にアラビドプシスを播種して、米国に輸送して NASA 側の最終チェックの後、スペースシャトル 17A (STS-128) に搭載された（打上の 1 ヶ月前）。化学固定剤は神阪 PI らがケネディー宇宙センターで調製した後、化学固定キット（Kennedy Space Fixation Tube : KFT）に充填され、冷蔵庫に収納して 2009 年 8 月 28 日に打ち上げられた。ISS にドッキング後、種子は室温、化学固定剤は冷蔵庫で保存された。2009 年 9 月 10 日から培養を開始し、33 日目の 10 月 3 日、および 62 日目の 11 月 11 日に植物体を収穫して、化学固定、冷蔵保存した。スペースシャトルの打ち上げ遅延などで、サンプル回収が遅れ、ようやく 2010 年 4 月 19 日に地上に帰還した。

4.2. 実験準備

4.2.1 実験用供試体（PEU）

神阪 PI との調整を通じて、実験要求を明確化し、1996 年から具体的な開発が開始され、1997 年から LED 照明ユニット、培養容器を用いた生育試験を神阪研究室で実施することにより検証作業を進めた。その検証作業の中で、光拡散板の追加、支持培地の選定など多くの設計仕様が設定された。それらの仕様を元に、1999 年には地上試験用供試体が完成し、筑波宇宙センターおよび神阪研究室での生育試験が開始された。地上試験用供試体での生育試

験の結果、植物体の成長方向を制御する為には、LEDユニットの設置位置を側面から上面に変更する必要があることが分かった。給水量、換気量、光量の詳細な検討が行われ、2005年からフライトモデルの製作が開始された。

4.2.2 化学固定

植物試料の化学固定にはNASAが開発したKSC Fixation Tube(図2)を用いた。

4.3 射場作業

4.3.1 種子の播種

フライト実験用のアラビドプシス種子は、富山大学の神阪研究室(Wild)、大阪市立大学の保尊研究室(*lefty*)および東北大学の西谷研究室(GesA7)で準備され、全て筑波宇宙センターに送られた。筑波宇宙センターにおいて、神阪研究室のメンバーによって2009年4月8日に播種作業を実施し、CCDマイクロスコープで種子が確実に播種されていることを確認した(図4-1)。試料容器は冷蔵温度で米国フロリダ州ケネディー宇宙センターまで輸送された。



図4-1 ロックウール上に播種されたシロイヌナズナの種子

4.3.2 植物実験供試体(PEU)の引き渡し

播種された植物栽培容器をケネディー宇宙センターに輸送し、輸送後に再度マイクロスコープを用いて種子の播種状況を確認した。その後、輸送後に機能確認を実施したPEUに植物栽培容器を組み込んだ。神阪PIの立会の元、NASA側の最終チェックの後、1999年4月23日にNASAに引き渡した。NASA側で保管後、スペースシャトルSTS-128(17A)に搭載された。

4.3.3 化学固定キットの引き渡し

神阪PI、唐原CIによって1999年8月20日~21日に化学固定試薬が調製され、8月22日にKFTに充填して打ち上げ準備を完了した。8月23日にNASA側に引き渡し、スペースシャトルのミッドデッキ・ロッカーに収納された。悪天候の影響で打上が遅延していた、スペースシャトル・ディスカバリー号(STS-128:17A)は8月28日午後11:59(米国東部時間)に打ち上げられた。

4.4 軌道上実験運用

4.4.1 実験開始まで

STS-128 で打ち上げられた PEU はきぼう内で室温保管され、KFT は軌道上冷凍冷蔵庫 (MELFI) 内で+2°Cで保管された。

4.4.2 実験開始

NASA のニコル・ストット宇宙飛行士により、PEU はきぼう内に設置されている CBEF の微小重力実験部に 4 個、遠心力により 1*g* を発生する人工重力実験部に 4 個が設置された。2009 年 9 月 10 日午後 9:38 (日本時間) に地上からのコマンドで PEU の運転が開始された。PEU における自動給水 (初期給水は 20ml)、LED 照明、湿度維持 (換気制御) はきぼう内のラップトップコンピュータのコマンドで開始された。初期給水後は、水分センサーによるフィードバック制御による自動給水モードで運転された。植物栽培容器内が 23.5°C となるように CBEF 温度が設定された。また、地上からのコマンド操作で 1 日に 2 回、全容器 (8 個) の観察画像がダウンリンクされた。

4.4.3 発芽～短期実験収穫まで

給水から 3 日目の 9 月 13 日に一部容器での発芽が観察され、14 日には全容器での発芽が確認された。全 PEU で予定通りに植物は成長し、19 日目には一部容器で花茎の立ち上がり (抽臺、ボルティング) が見られ、その後全ての容器で抽臺が見られた。

CBEF の温調ファンの電流異常が見られたが、大きな支障は無かった。予定より、湿度上昇が大きかった為、20 日目に除湿器を交換した。また、微小重力部の PEU1 個の水分センサーが不調となり、フィードバック制御からシーケンス制御に切り替えて、一定量の給水を毎日実施した。さらに 2 個の PEU で給水量が想定より多いことが分かった。きぼう内では植物の画像が見られないため、1 週間ごとに画像を宇宙飛行士に送った。

4.4.4 短期実験収穫、化学固定

給水から 33 日目の 10 月 13 日午後 6:31 に PEU の運転を停止し、ニコル・ストット宇宙飛行士により短期実験の収穫が行われた。微小重力実験部、人工重力実験部から各 2 個の PEU を取り外し、容器を取り出してハサミで花茎を切り取り、KFT を用いて化学固定 (RNAlater、グルタルアルデヒド・パラフォルムアルデヒド、ホルマリン・酢酸・エタノール混合液) した。全ての KFT を MELFI+2°C に収納した。RNAlater 固定分は 5 日後に MELFI-95°C に移動して凍結保存した。

4.4.5 短期実験収穫～長期実験収穫まで

短期実験収穫の翌日、10 月 14 日に長期実験の PEU4 個に追加給水を実施した。また、除湿器を交換した。34 日目に人工重力部の PEU2 個が何らかの要因で停止した為、再起動して実験を継続した。さらに、37 日目の 10 月 17 日に人工重力部からの植物画像のダウンリンクが不可能となった。そのため、37 日目以降は微小重力物の植物画像のみしか得られていない。

4.4.6 長期実験収穫、化学固定

給水から 62 日目の 11 月 11 日午後 17:10 に PEU の運転を停止し、ニコル・ストット宇宙飛行士により長期実験群の収穫が行われた。予定どおりに、一部の植物体を収穫して KFT で

化学固定した後に、MELFI の+2°C部で保管した。残りの植物体は植物栽培容器に入れたまま MELFI で冷蔵保管 (+2°C) した。図 4-2 に各 PEU 内の温度データを、図 4-3 に各 PEU の平均湿度を示す。

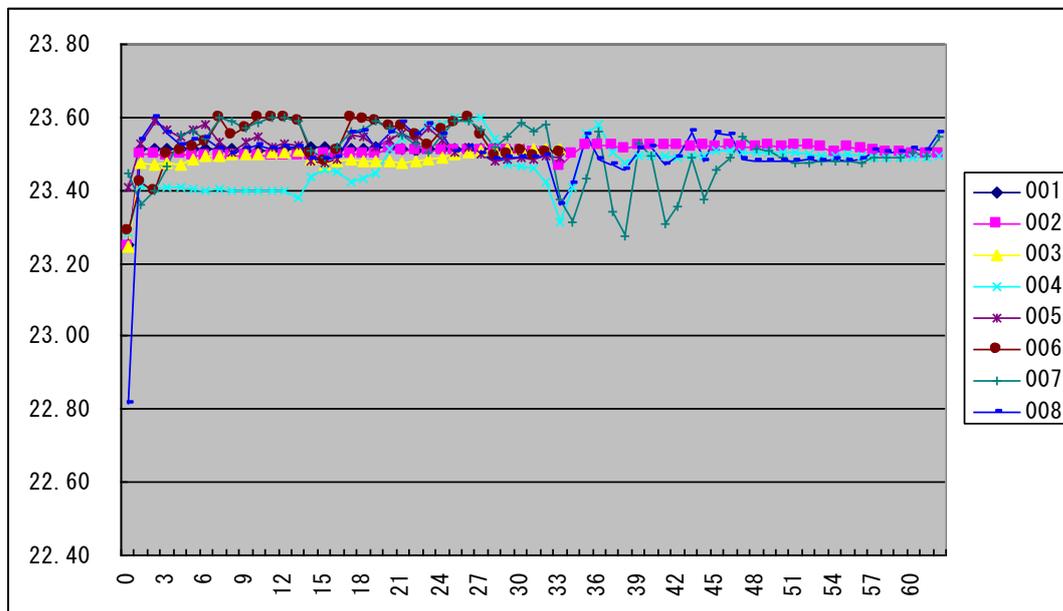


図 4-2 各 PEU 内の温度データ

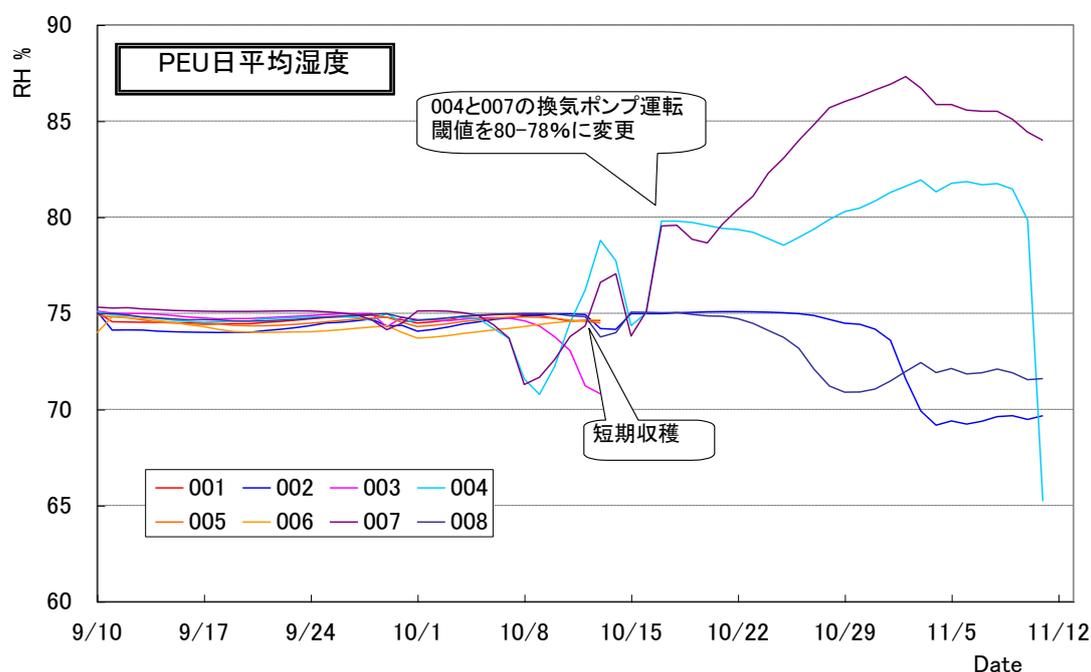


図 4-3 各 PUE 内の平均湿度

4.4.7 フライトサンプルの回収、輸送

軌道上 MELFI で保管されていたサンプルは、回収のスペースシャトル・フライトの打ち上げが遅延したが、2010年4月20日午前9時08分(米国東部夏時間)にスペースシャトル・

ディスカバリー号で回収された。4月23日にケネディー宇宙センターを発送し、冷蔵・冷凍温度で輸送され、4月27日に筑波宇宙センターに到着した。

4.5 実験後解析

4.5.1 フライトサンプルの配分

フライト実験で得られた植物サンプルは下記の表のように代表研究者、各共同研究者に配分されて、各々の解析に供せられた。

a) 培養容器（冷蔵保存での植物体地上部、種子、地下部）

実験群	試料種	担当
長期 μ G Wild	Columbia Wild	神阪
長期 μ G Wild	Columbia Wild	神阪
長期 1G Wild	Columbia Wild	神阪
長期 1G Wild	Columbia Wild	神阪

b) 容器底部（冷凍保存での地下部）

実験群	試料種	担当
短期 μ G Wild/CesA7	Columbia CesA7	唐原
	Columbia Wild	
短期 1G Wild/CesA7	Columbia CesA7	
	Columbia Wild	
短期 μ G Lefty/ Wild	Columbia lefty	
	Columbia Wild	
短期 1G Lefty/ Wild	Columbia lefty	
	Columbia Wild	

c) KFT（冷蔵・冷凍状態で化学固定された植物体、地上部）

実験群	試料種	固定剤	担当
短期 μ G Wild/CesA7	Columbia CesA7	KFT Formaldehyde	西谷
	Columbia Wild	KFT RNALater	西谷
短期 1G Wild/CesA7	Columbia CesA7	KFT Formaldehyde	西谷
	Columbia Wild	KFT RNALater	西谷
短期 μ G Lefty/ Wild	Columbia lefty	KFT RNALater	保尊
	Columbia Wild(1/2)	KFT Formalin Acetic Acid Ethanol	唐原
	Columbia Wild(1/2)	KFT Glutaraldehyde Paraformaldehyde	笠原
短期 1G Lefty/ Wild	Columbia lefty	KFT RNALater	保尊
	Columbia Wild(1/2)	KFT Formalin Acetic Acid Ethanol	唐原
	Columbia Wild(1/2)	KFT Glutaraldehyde Paraformaldehyde	笠原
長期 μ G Wild	Columbia Wild	KFT Glutaraldehyde Paraformaldehyde Long	笠原
長期 1G Wild	Columbia Wild	KFT Glutaraldehyde Paraformaldehyde Long	笠原

4.5.2 解析計画

各研究者の解析計画を次に記した。

各研究者の解析計画

解析項目	解析方法・手段	担当
外観観察	目視でダウンリンク画像、軌道上写真を解析する	神阪
微細構造観察	化学固定試料を用いて、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡により微細構造を観察する	笠原
収率、稔性	回収した種子を発芽させて解析する	唐原
突然変異	回収した種子の突然変異の割合を調べる	唐原
物理的解析	回収した植物体の物理的性質(引張り強度等)を解析する	保尊
生化学的解析	回収した植物体の生化学的性質(キシログルカン等)を解析する	西谷

5 実験によって得られた成果

5.1 Space Seed

5.1.1 実験結果

5.1.1.1 微小重力がシロイヌナズナの発芽および栄養成長に与える影響

シロイヌナズナは吸水した後発芽し、ロゼット葉を展開しながら栄養成長を行った。軌道上での種子の発芽は μG あるいは $1G$ 区で実験開始 3 日目に観察された。吸水開始から 62 日目に収穫しそのまま地上に降ろした植物において、それぞれの容器ごとに発芽率を調べ

表 1 微小重力がシロイヌナズナの発芽率および花茎のボルティング率に与える影響

	Chamber	Germination (%)	Bolting (%)	No. of bolted plants
Toyama $1G$	99	91.7	90.9	17
	9A	77.8	100	16
Tsukuba $1G$	010	83.3	75	16
	012	66.7	100	12
Space $1G$	007	87.5	90.5	19
	008	100	66.7	12
Space μG	002	100	16.7	4
	004	89.5	76.5	13

た。その結果、発芽率は実験区による大きな違いは見られず、発芽は宇宙実験区においても問題なく誘導できたこと、また微小重力の影響は特に見られないことがわかった(表 1)。

次に微小重力が栄養成長期間の長さに与える影響を調べた。ダウンリンクされた画像で判断する限り、ロゼット葉発生のタイミングには μG と宇宙 $1G$ 区ではっきりとした違いは認められなかった。ロゼット葉の枚数は栄養成長期間の長さに反映するため、その指標として用いられている(Koornneef et al. 1991)。吸水開始から 33 日目および 62 日目に固定した試料を用いてロゼット葉の枚数を調べた。地上対照区については 富山およびつくばの実験区の間で分散および中央値に有意差が無かったため、データをプールし宇宙 $1G$ および μG との間で多重比較した。その結果、実験区の間には有意な差は見られなかった(図 5)。

ロゼット葉に関しては二つの興味深いことが認められた。一つは、葉の茂り方である(図6)。1G区では大きく成熟したロゼット葉は被覆板の表面に接して葉が平たく配置されているが、 μ G区では葉が被覆板の上でこんもりと盛り上がったように茂っていたことである。この原因は、1G区では葉柄が葉の重みを十分に支えることができないためと考えられる。

もう一つの葉の変化は、クロロフィルの分解による葉の黄色化(老化)である。花茎が抽臺を始める時期には、地上実験でも緑色のロゼット葉の黄色化が始まる。これは、クロロフィルの分解によると考えられる。興味深いことは、きぼうの μ G区の方が1G区に比べると葉の黄色化が遅いことである(図6)。

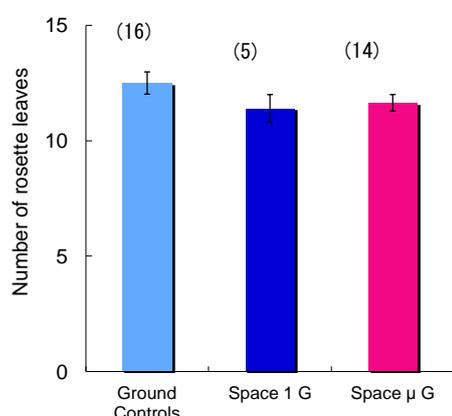


図5 微小重力がロゼット葉の数を指標とする栄養成長に与える影響。Mean \pm SE, 括弧内は試料数。地上対照区のデータはプールしてTukey-Kramer HSD testを行った(P>0.05)。

5.1.1.2 微小重力がシロイヌナズナの生殖成長に与える影響

シロイヌナズナはロゼット葉形成すなわち栄養成長を終えた後、ロゼット葉は老化して、退色をはじめるとともに花茎が抽臺して生殖成長期に入った(図6)。各実験区において最終的に花茎が抽臺した個体の割合を調べたところ、 μ G区においては Chamber No. 2 のみ極端に低かったが、それ以外は実験区による顕著な差はみられなかった(表1)。

次に各実験区において花茎の抽臺のタイミングを調べた。ダウンリンクされた画像で判断すると、最初の開花(Boyesら(2001)による成長ステージ No. 6.00(Boyes et al.))が確認されたのは μ G区では実験開始後20日目、宇宙1G区では早くとも27日目、地上対照区では22日目であった。28日目にダウンリンクされた画像において、抽臺した個体の割合を容器ごとに調べ、実験区の間で比較した。有意差は見られなかったものの、 μ G区では他と比べてその割合がやや高くなる傾向が見られた(図6および7)。次に各実験区における花茎の長さを、吸水開始後33日目に固定した試料において調べたところ、 μ G区では宇宙1G区と比べて花茎長が有意に大きかった(図8)。しかし、花茎の上部と基部の横断切片を光学顕微鏡で観察したが、内部組織の構造には顕著な重力の影響は認められなかった(図9)。

次に、大阪市大の保尊・曾我両博士との共同研究により、吸水開始後33日目に固定した試料の上部と基部より切片を切り出し、微小重力がシロイヌナズナ花茎における細胞壁の力学的性質に与える影響を調べた(表2)。

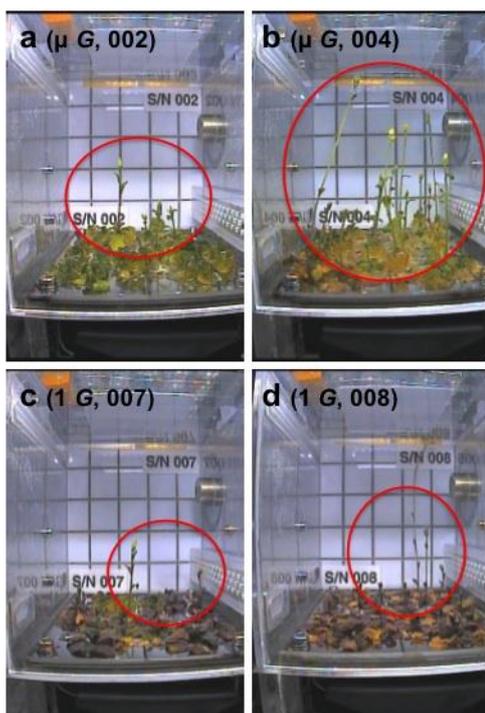


図6 微小重力下におけるシロイヌナズナのボルティング。吸水開始後28日目の画像。a, b: μG 。c, d: 1G。丸で囲まれた部分はボルティングした個体。

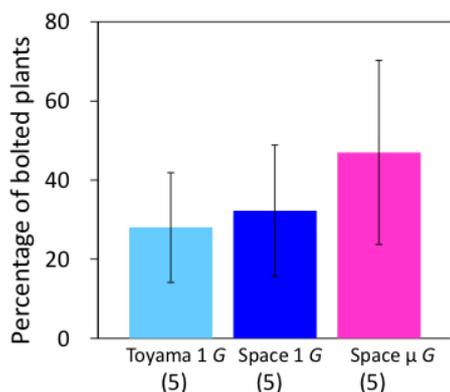


図7 微小重力がシロイヌナズナ花茎のボルティングの早さに与える影響。吸水開始後28日の画像において調べた花茎のボルティング率。Mean \pm SE, 括弧内は試料数。Tukey-Kramer HSD test ($P > 0.05$)。

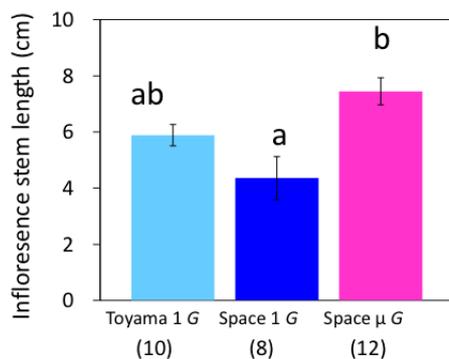


図8 微小重力が花茎の成長に与える影響。吸水開始後33日に固定された試料において調べた花茎の長さ。Mean \pm SE, 括弧内は試料数。Tukey-Kramer HSD testの結果をアルファベットで示した。同じ文字でつながっていない場合は有意な差がある ($P < 0.05$)。

上部、基部でそれぞれ3つの実験区において、力学的性質を表すパラメータとして、伸展性 Extensibility、最小緩和時間 T_0 、緩和速度 R の値に有意差があるか否かを、Tukey-Kramer HSD test により検定したが、いずれのパラメータにおいても有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。また、 μG 区と宇宙 1G区の間で Student t-test を行った場合でも、いずれのパラメータについても、また先端部・基部にかかわらず、両実験区の間

意差は見られなかった。しかし、 μG 区においては、先端部・基部いずれにおいても、宇宙1G区と比べると伸展性は大きくなる傾向がみられ、また T_0 が小さくなる傾向、つまりゆるみの程度がやや大きくなる傾向が見られた。実験の制約で試料数が少なく、 n を増やせば有意差が出た可能性がある。

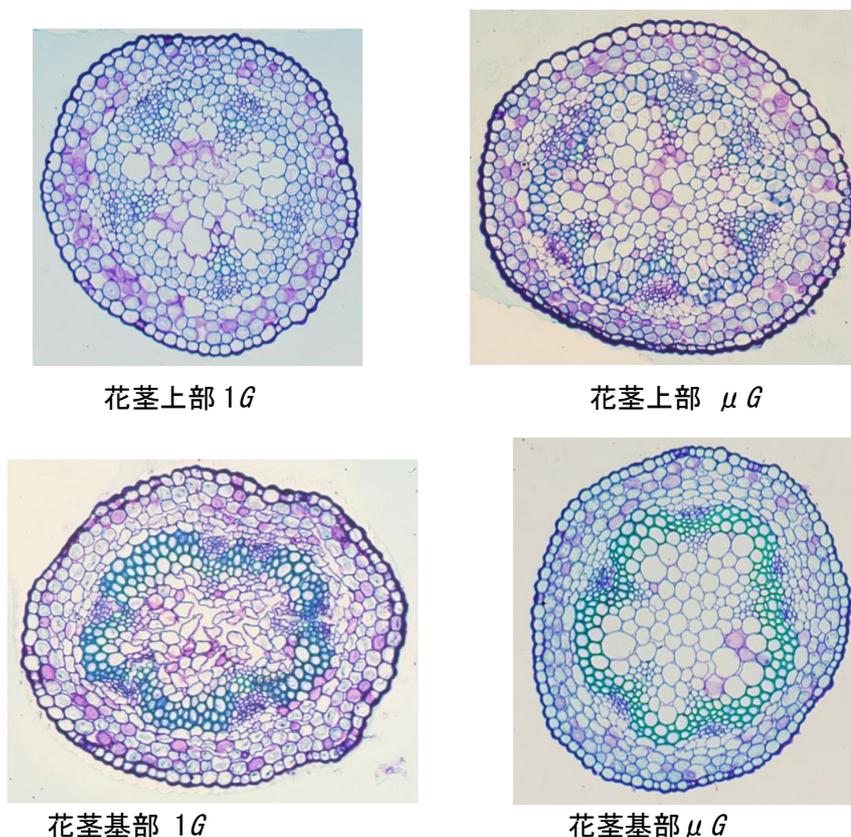


図9 軌道上の花茎上部および基部の横断切片の光学顕微鏡写真

表2 微小重力がシロイヌナズナ花茎における細胞壁の力学的性質に与える影響

	Basal			Apical		
	Toyama 1 G	Space 1 G	Space μG	Toyama 1 G	Space 1 G	Space μG
Cell wall extensibility ($\mu m/g$)	0.49 \pm 0.04	0.46 \pm 0.03	0.52 \pm 0.03	0.52 \pm 0.04	0.47 \pm 0.05	0.56 \pm 0.02
Minimum stress-relaxation time (T_0 , ms)	38.6 \pm 0.6	37.0 \pm 1.9	36.1 \pm 0.8	36.8 \pm 0.4	35.8 \pm 2.8	32.8 \pm 1.5
Relaxation time (R, %)	5.4 \pm 0.5	5.3 \pm 0.2	5.6 \pm 0.2	4.5 \pm 0.4	5.0 \pm 0.2	5.0 \pm 0.1
n	4	4	6	4	4	6

吸水開始から 62 日目に冷蔵庫に入れ、地上に降ろしてきた試料を観察したところ、いずれの実験区においても長角果が形成されており、宇宙においてもシロイヌナズナは生活環を全うしていた (図 10)。

微小重力が長角果形成に及ぼす影響を調べた。前述したように各実験区において花茎の最終的な抽臺率は異なっていたので (表 1)、抽臺した個体あたりの長角果数を調べたところ、実験区の間には大きな違いはみられなかった (表 3)。

次に微小重力のシロイヌナズナの花および長角果の形態に対する影響を調べた(図11)。いずれの実験区においても、雌薬、雄薬、花卉は形成されており顕著な違いはみられなかった。また、きぼうでも柱頭に花粉が付着し、花粉管の伸長が確認された(図12)。一方、長角果は地上と比べて宇宙の実験区 μG と宇宙 $1G$ 区で短くなっていた。

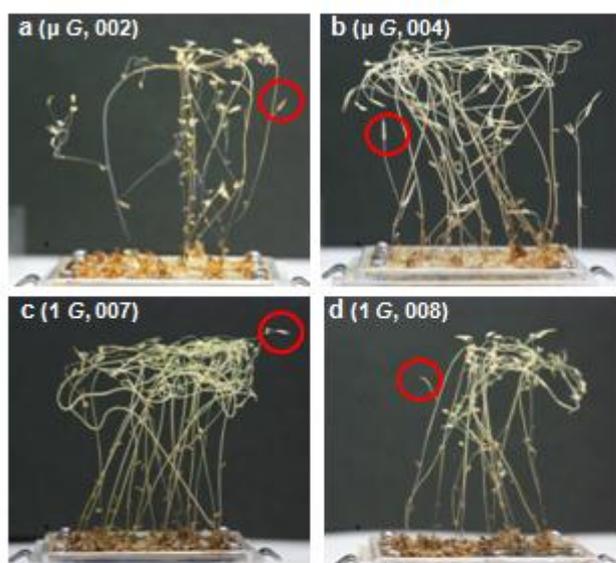


図10 きぼうで62日間生育させたシロイヌナズナ。地上で容器を開けて撮影した。丸で囲まれた部分は長角果を示す。

表3 軌道上の1Gおよび μG 条件下における長角果および種子の形成

	Chamber	Number of siliques	Number of siliques / bolted plant (mean \pm SE)	Number of siliques with seeds	Number of siliques with seeds / bolted plant (mean \pm SE)	Number of seeds
Toyama 1G	99	53	3.5 \pm 0.7	24	1.6 \pm 0.4	255
	9A	67	4.3 \pm 0.6	44	2.8 \pm 0.4	549
Tsukuba 1G	010	58	3.4 \pm 0.4	36	2.0 \pm 0.2	439
	012	40	3.3 \pm 0.4	36	2.8 \pm 0.5	432
Space 1G	007	62	3.2 \pm 0.3	14	0.5 \pm 0.2	66
	008	44	3.6 \pm 0.5	1	0.1	1
Space μG	002	15	3.8 \pm 1.1	0	0	0
	004	73	5.4 \pm 0.8	13	0.9 \pm 0.4	26

長角果の長さを定量した結果、まず、宇宙実験区(きぼう内で生育させた μG および宇宙 $1G$ 区)においては、地上対照区と比べて長角果は短くなる傾向が見られた(図13)。しかし宇宙実験区において、 μG と宇宙 $1G$ 区の間には有意な差はみられなかった。

次に各実験区において生育させた、シロイヌナズナの種子を含む長角果1つあたりの種子数を調べた。地上対照区については富山およびつくばの実験区の間で分散および中央値に有意差が無かったため、データをプールし宇宙 $1G$ および μG との間で多重比較した。その結果、種子を含む長角果1つあたりの種子数は、有意ではないが地上対照区と比べて宇宙実験区においては低下する傾向が見られた。宇宙 $1G$ 区と μG 区を比べると、やはり有意差はみられなかったが、 μG の方が低下する傾向が見られた(data not shown)。

種子の重量に与える微小重力の影響を調べた。地上対照区については、72個の種子を無

作為抽出して調べた。宇宙 1*G* 区の 008 容器と μG 区の 002 容器については試料数が極端に小さいため除外し、各実験区の間で Nested ANOVA を行ったが、いずれの組み合わせにおいても有意差は見られなかった ($P > 0.05$) (図 14)。一方で、宇宙実験区において宇宙 1*G* 区の 007 容器と μG 区の 004 容器、宇宙 1*G* 区に比べて μG 区の方が種子は重くなる傾向が認められた (Mann-Whitney *U* test、two-tailed、 $P < 0.05$)。

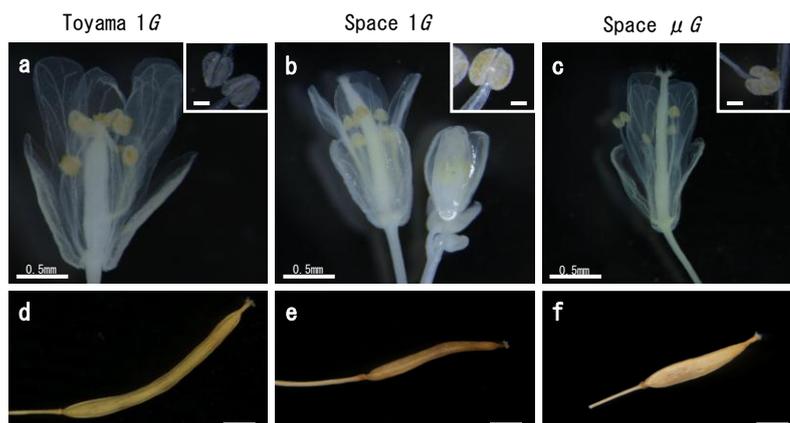


図11 微小重力がシロイヌナズナの花および長角果の形態に対する影響。
花(a, b, c)は33日目に固定した試料, 長角果(d, e, f)は63日まで生育させ地に降ろしてきた試料のもの。インセットはやくの拡大図。

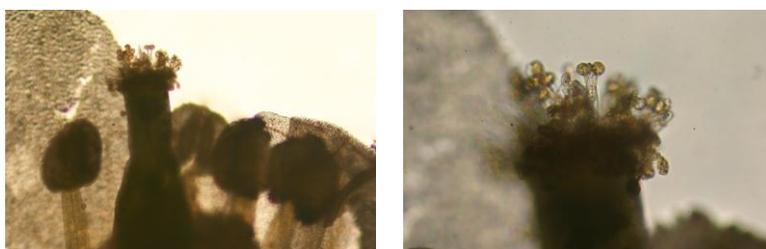


図 12 柱頭への花粉の付着

なお、形成された種子が発芽するか否か、またそれらの芽生えの成長については現在順次調査中である。preliminary であるが、現時点における一部の発芽率の結果は、地上実験区においては、つくば 1*G* 区で 75% (n=16)、富山 1*G* 区で 72% (n=32)、宇宙 1*G* 区で 0% (n=8)、 μG 区で 0% (n=8) となっている。宇宙実験区で収穫された種子の発芽率は地上実験区と比べて低い傾向が見られる。

5.1.2 考察

本研究では、軌道上においける吸水開始から種子形成までの完全自動制御に成功した。Seed-to-Seed 実験としては、ISS 以前では *Arabidopsis thaliana* (Merkys and Laurinavicius 1983)、*Brassica rapa* (Musgrave and Kuang 2003) に続くもので、ISS におけるものとしては *Arabidopsis thaliana* を用いた Link ら (2003) のものに続くものである (Link et al. 2001)。これらの Seed-to-Seed 宇宙実験では、1*G* 対照実験は地上で行わ

れ、重力の効果を厳密に調べるために軌道上で1*G*対照実験を行ったのは、Space Seedが初めてであった。

発芽：微小重力が栄養成長に与える影響については、まず発芽率については実験区による大きな違いは見られなかった(表1)。このことは、発芽には重力の影響がほとんど認められないという、クリノスタットを用いた実験(Miyamoto et al. 1999)や過重力実験の結果(Waldron and Brett 1990)と一致する。また、ロゼット葉の枚数は実験区間に有意差は見られなかったことから(図5)、微小重力下でも栄養成長の期間の長さは影響を受けないことが示唆された。この結果は過重力環境においてもロゼット葉の枚数は変化しなかったという結果とも一致する(Brown et al. 1976)。

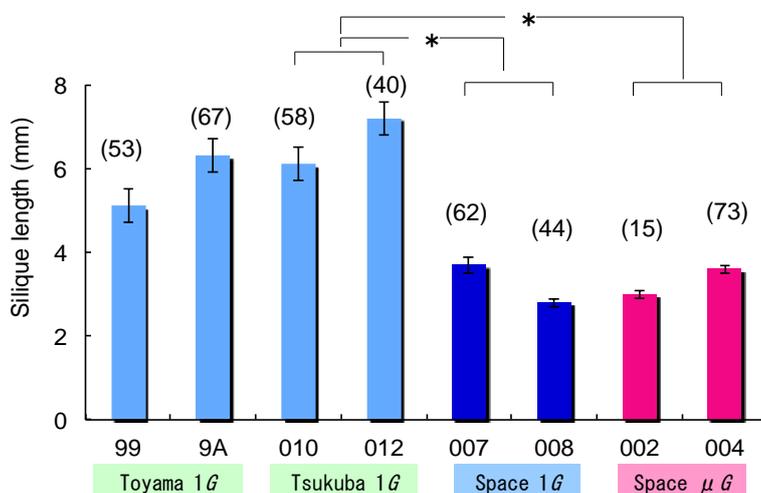


図13 宇宙で形成されたシロイヌナズナの長角果の長さ。Mean±SE, 括弧内は試料数。
Nested ANOVAで有意差が見られた($P>0.05$)ところは*で示した。

ロゼット葉：ロゼット葉の空間的配置が重力の影響を受けることが分かった(図6)。すなわち、きぼうの微小重力下では葉柄が斜め上方に伸び、1*G*下では苗床にほぼ平行して伸びていた。このことは、葉の自重が葉柄の伸びる方向に影響していることを示唆している。従って、葉柄支持組織の発達が重力で変化している可能性がある。この点については、光学・電子顕微鏡を用いて形態解析を現在進めている。

もう一つの葉の変化は、クロロフィルの分解による葉の黄色化(老化)である。花茎が抽臺を始める時期には、地上実験でも緑色のロゼット葉の黄色化が始まる。これは、クロロフィルの分解によると考えられる。興味深いことは、きぼうの μ *G*区の方が1*G*区に比べると葉の黄色化が遅いことである(図6)。植物ホルモンであるエチレンは葉の老化を促進する。また機械的なストレスはエチレンの合成を誘導するという事実から、 μ *G*の機械的ストレスが小さい環境ではエチレンの合成が抑制されて、その結果、葉の老化が抑制されたと考えられる。また、過重力刺激をシロイヌナズナに与えるとエチレン関連遺伝子の発現が増加することから、1*G*による老化促進がエチレン関連遺伝子の発現変化を介していることが示唆される。

抽臺：微小重力が生殖成長に与える影響については、まず各実験区において最終的に花茎

が抽臺した個体の割合を調べたところ、 μG 区においては極端に低かった1容器以外は実験区による顕著な差はみられなかった(表 1)。しかし、原因は現時点で不明であるが、抽臺を行う時期に微小重力が何らかの影響を与えたという可能性は残される。

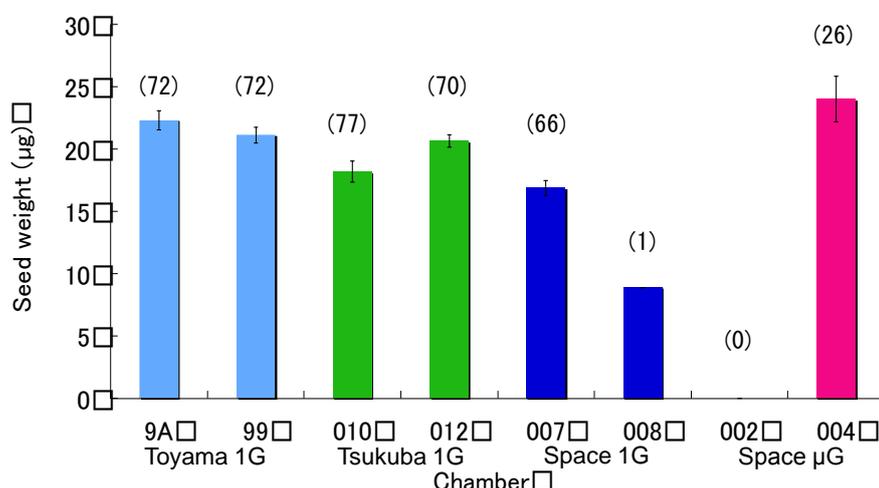


図14 シロイヌナズナの種子の重量に与える 1Gおよび μG の影響。Nested ANOVA ($P > 0.05$)。

微小重力下においてはきぼう 1G区と比べて抽臺のタイミング(図 6 および 7) および開花のタイミングがやや早くなる傾向が見られた。また微小重力下においては宇宙 1G区と比べると、花茎長が μG 区において有意に大きかった(図 8)。この原因としては、抽臺の開始が早まったことが寄与している可能性はある。一方で、シロイヌナズナにおいて、過重力環境下では花茎の成長が抑制されること(Tamaoki et al. 2006)、微小重力下では胚軸の成長が促進されることも報告されていることから(Hoson et al. 1999)、花茎の成長速度も早まった可能性が考えられ、これについては現在ダウンリンク画像を解析している。

長角果：生殖成長の後期におこる長角果形成については、まず宇宙実験区内における差よりも、地上対照区と宇宙実験区内の間で顕著な差が確認され、長角果の長さが地上対照区と比べて宇宙実験区で有意に低下した(図 13)。しかし花の形態は実験区の間で顕著な違いは見られず、また抽臺した個体あたりの長角果数は、地上対照区と宇宙実験区の間で大きな違いは見られなかった(表 3)、花芽形成の段階までの間に、宇宙実験区において何らかの影響があったとは考えにくい。従って、宇宙実験区ではその後の過程における何らかの原因により長角果の成熟度合いが低下したと考えられる。シロイヌナズナにおいては、長角果の発達には受精に依存し(Chaudhury et al. 1997; Meinke and Sussex 1979)、その成熟後の長さは受精し発達した種子の数に、そしてその種子の数は受粉時の胚珠の数に依存する(Meinke and Sussex 1979)。従って、宇宙実験区においては胚珠の発達もしくは受精の過程、あるいはその両方の過程が影響を受けた可能性が考えられる。過重力条件下で花粉管の成長が影響を受けることが報告されており(Musgrave et al. 2009)、このことは受粉から受精の段階に重力が影響することを示唆している。また宇宙実験区においては、実験終了後でも長角果や花茎に緑色を残した試料が見られた(data not shown)。長角果の成熟が何らかの原因により遅れたため、未熟なまま収穫することになってしまった可能性

が考えられる。また正常に果実の乾燥が進むに伴い茶色になるので、乾燥が正常に進行しなかったためという可能性もある。Link ら (2003) の報告では、 μG で収穫した個体当たりの長角果数の平均値は 15-20 の間となっている (Link et al. 2001)。この結果と比べると、本研究の結果はかなり低い。彼らが用いた ADVASC 栽培容器は写真を見る限り PEU と比べてかなり大きいことや、光強度や栄養条件の違いなどがあるため単純には比較できないが、今後の検討課題である。

一方で、長角果の長さを宇宙実験区において比較すると、 μG と宇宙 1G 区の間には有意な差はみられなかった。このことは、微小重力は長角果の長さに影響を与えないことを示唆している。これまでのいわゆる Seed to Seed 宇宙実験においては、宇宙実験区と地上対照区の間で結果が比較されてきたが (Musgrave et al. 2000)、長角果の長さという観点から見れば、地上と軌道上では制御しきれない環境要因の違いが存在することを今回の研究結果は示唆しており、宇宙実験区と地上対照区間の比較には注意が必要であることを強く示唆している。

種子：種子を含む長角果 1 つあたりの種子数は、有意ではないが地上対照区と比べて宇宙実験区においては低下する傾向が見られた。これは長角果の長さが低下したためであると考えられるが、宇宙 1G 区と μG 区を比べた場合にも有意ではないが、 μG の方が低下する傾向が見られた。通常、種子の発達は、緩やかな温度変化、水条件、および養分の供給には依存しない (Meinke and Sussex 1979)。一方、11 日間という短期の宇宙飛行の影響を見た場合は、*Arabidopsis thaliana* 種子の発達には μG の影響はみられなかったものの (Kuang et al. 1996)、軌道上で Mir において全生活環を終わらせた *Brassica rapa* の場合は、軌道上では地上対照区と比べて種子の貯蔵物質の構成が変化することが報告されている (Musgrave and Kuang 2003)。以上の結果を考え合わせると、 μG 環境が種子の発達の開始に影響した可能性がある。一方、今回の実験で収穫された種子の重量については、実験区間に有意差はみられなかったことから (図 14)、いったん種子形成が開始すると地上と宇宙という環境、また 1G と μG という環境の違いに関係なく種子の発達は完了するという可能性が示唆された。

Link ら (2003) は μG で収穫した種子の発芽率は 80-90% を示したと報告している (Link et al. 2001)。宇宙実験区で収穫された種子の発芽率は地上実験区と比べて低い傾向が見られている原因については、収穫後の軌道上から地上に帰還させるまでの間の保管状態も含めて検討が必要である。

花：これまでに短期過重力実験系を利用し、花芽のマイクロアレイ解析を予備的に行った我々の結果では、胚形成に関するポリコームグループに属する 1 つの遺伝子、種子タンパク質をコードする 5 つの遺伝子、また種子貯蔵タンパク質の蓄積を促進することが知られる、アブシシン酸のシグナリングや生合成に関連する 5 つの遺伝子の発現が、過重力刺激により減少することが示唆されている。これらの結果と、今回宇宙試料 μG の試料において見られた種子数の低下傾向との関連性はまだ不明である。東北大・西谷博士と共同で、地上 1G 区と μG 区で生育させた植物のシュート全体から抽出した RNA を用いて行った次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析においては、これらの遺伝子はとくに μG 区において有意に発現変化していなかった。それはシュート全体から抽出した RNA を用いたための可能性があるため、*lefty* 変異体の花芽から抽出した RNA を用いたマイクロアレイ解析の結果を待ちたい。

5.2 西谷 CI 分

5.2.1 実験結果

以上の次世代シーケンサーによる解析結果の概要を表 4 に纏める。

表 4 次世代シーケンサーによる解析結果の概要

項目	μG in space	1G 地上
フィルターパス総リード数	72,668,884	68,318,940
シーケンスリード長 (bp)	75	75
フィルターパス総塩基数 (bp)	5,450,166,300	5,123,920,500

シーケンスデータが得られたので、これを基に以下の手順で解析を進めた(括弧内は使用解析ソフト)。

- 1 データの品質を検証 (fastqc_v0.9.2)
- 2 アライメント及びマッピング (bwa-0.5.9)
- 3 ペアエンドライブラリの挿入サイズ分布を検討 (breakdancer-1.1)
- 4 アライメント及びマッピング (tophat-1.3.1)
- 5 Duplicate Reads 除外 (picard-tools-1.43)
- 6 転写産物及び発現量推定 (cufflinks-1.0.3)

これらの解析により、34133 個の転写産物(遺伝子領域以外も含む)を同定し宇宙の微小重力下と地上の 1G 下での発現量の比較解析を行うことができた。 μG と地上の FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model Per Million mapped fragments)を比較した結果、871 個の遺伝子で有意な差を検出できた。

また、我々がこれまで着目していた花茎支持に関与する 16 個の細胞壁関連遺伝子について特にその発現を比較すると、5 個の遺伝子が発現変化を示していた。すなわち、laccase1/3、GRP、galactosidase をコードする 4 個の遺伝子が μg で発現量が増加し、beta -1,3-glucanase をコードする遺伝子が μG で発現量が減少していた。

一方、2次細胞壁のセルロース合成酵素 (CesA4,7,8) の発現量の変化は認められなかった。また 2次細胞壁の合成を制御している NAC や Myb などの転写因子の変化も認められなかった。

5.2.2 考察

今回の宇宙実験により、宇宙で育成させた植物組織内の遺伝子発現を次世代 DNA シーケンス法で網羅的に解析することに成功した。この方法は、単に、遺伝子の転写の頻度だけでなく、転写される RNA の塩基配列や、転写後の編集などの「転写の質」を正確に解析できる点で、これまでの遺伝子発現の網羅的解析とは質的に異なる。残念ながら、今回は、ISS 内での 1G 対照が得られなかったため、重力によって影響を受ける転写制御過程のみを解析することは困難であるが、幸いにも地上 1G 対照区の解析が上手くいったため、地上 1G と宇宙空間 μG との間の転写の違い一般についての解析が可能である。この点で、今回の次世代シーケンサーによる解析の成功は、宇宙生命科学における遺伝子発現の解析に新しいアプローチを開くものである。このアプローチを応用することにより、宇宙環境が生物に及ぼす影響に関して、新奇な知見が得られると期待される。

一方、当初、予定していた、花茎の支持組織内での遺伝子発現の解析は、フライトスケジュールの制約により、花茎が抽臺するまえに収穫したため、サンプルを得ることができず、実験を完了することができなかった。また、残念ながら、宇宙実験内での 1G 対照が得られなかったため、

今回の実験で明らかとなった遺伝子発現の変化が、すべて重力の影響を反映したものと結論することはできない。この点については今度、更なる宇宙実験が必要となる。

当初注目していた、二次壁形成に関わる *GesA7* 遺伝子の発現が、微小重力と $1G$ で変化がないという結果が得られた。また、ホルムアルデヒド固定し、凍結して回収した植物体組織は、融解により組織の形状が失われ、組織内の GUS 発現の詳細な解析が困難であった。このため、重力と二次壁構築に関わる遺伝子群の転写制御についての結論を得るにはいたらなかった。

5.3 保尊 CI 分

5.3.1 実験結果

チューブリン変異体は、花卉、ロゼット葉、茎器官、根など様々な器官でねじれ形質を示す (図 15)。まず、このような形質に対する微小重力の影響を、PEU 内蔵の CCD カメラ撮影画像を用いて解析することを試みた。残念ながら、このカメラの解像度では解析に耐える画像を得ることはできなかった (図 15)。

次に、撮影された静止画像を用いて、*tua6* 変異体の花茎の成長に対する微小重力の影響について調べた。花茎は播種 23~30 日後に出現し、上方へ向かって成長した。3 つの重力条件間で花茎出現に要する平均日数を比較したところ、微小重力環境では 26.1 日であり、地上対照より 1.0 日、また軌道上対照より 1.6 日短いことがわかった (図 16)。

続いて、播種 33 日後までに出現したすべての花茎の成長のタイムコースを求めた (図 17)。播種 26 日後までの初期成長過程では 3 つの条件間でほとんど差がなかったが、それ以降は、両方の $1G$ 対照と比べ微小重力環境で明らかな成長促進を示した。地上対照と軌道上対照の間にはほとんど違いは見られなかった。

花茎の出現時期にはかなりのばらつきがあるため、花茎の長さの単純な平均を算出すると誤差が非常に大きくなり、成長形質の違いを評価しにくい。そこで、それぞれの環境下での花茎の出現時期をイニシャルとして揃え、それ以降の成長のタイムコースを調べた (図 18)。単純平均の場合と同様に、微小重力環境下では、両方の $1G$ 下と比べ成長量が有意に大きかった。また、地上対照と軌道上対照の間にはほとんど違いは見られなかった。

図 18 のデータに基づいて、花茎出現後の成長速度の継時的な変化を求めた (図 19)。成長速度は、S 字型の成長曲線から予想されるように、花茎出現後 4 日目まで増加し、それを過ぎるといずれの環境下でも減少に転じた。微小重力環境下における花茎の成長速度は、両方の $1G$ 下よりすべての期間で大きかった。また、地上対照と軌道上対照の間で成長速度にはほとんど差は見られなかった。

植物器官の成長調節において主導的な役割を果たしている細胞壁の性質に対する微小重力の影響を明らかにするため、RNAlater 溶液中で凍結したまま地上に回収された *tua6* 変異体試料の細胞壁物性を引っ張り試験機により測定した。解析には、荷重-伸び解析と応力緩和法を連続的に適用するプログラムを用いた。まず、2 回の連続的な測定データに基づいて、可逆的伸展性と不可逆的伸展性を算出したが、今回得られた試料では可逆的伸展性がほぼゼロであり、全細胞壁伸展性の大部分が不可逆的伸展性に由来することがわかった。

図 20 は、花茎頂端部から 10 mm 毎の各部域における全細胞壁伸展性を示している。伸展性は、成長が盛んな頂端部から成長が既に停止した基部に向かって減少した。そして、微小重力環境下で生育した花茎の成長部域の伸展性は、両方の $1G$ 対照と比べて有意に大きかった。特に、部域 2 ではほぼ 2 倍の大きさを示した。全伸展性に関しても、地上対照と軌道上対照の間にはほとんど違いは見られなかった。なお、図 20 に示したデータは、長さ 20 mm 以上の花茎すべての平均であるが、十分に成長した 50 mm 以上の花茎に限定して求めた細胞壁伸展性からも、ほぼ同様の結果が得られた。

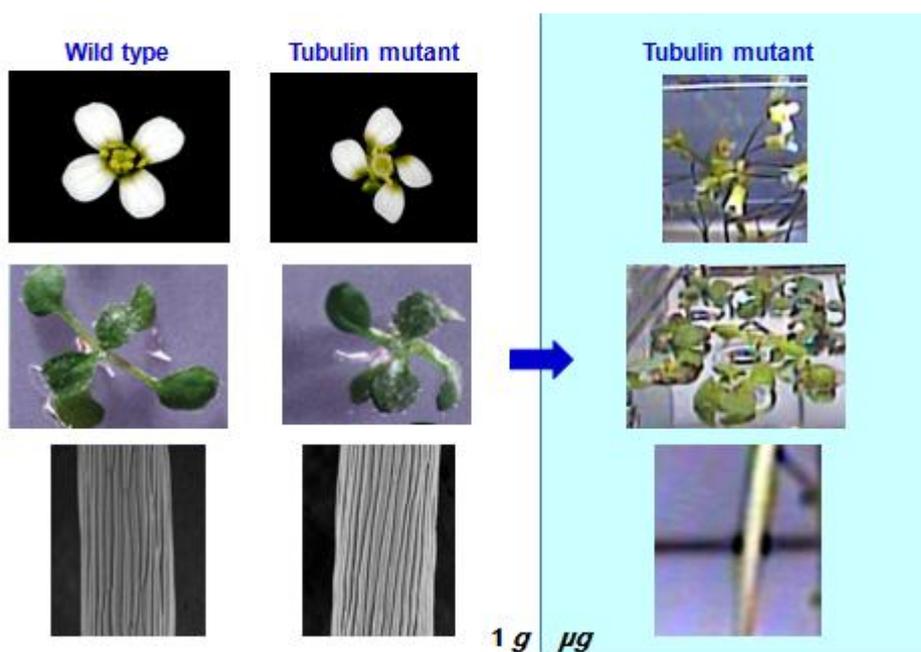


図15 チューブリン変異体のねじれ形質に対する微小重力の影響

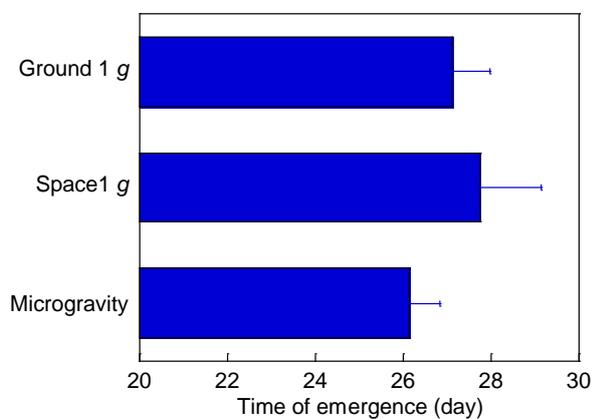


図16 *tua6* 変異体における花茎の出現時期

細胞壁の応力緩和パラメータに対する微小重力の影響を同時に解析した。その1つである最小応力緩和時間は、頂端部から基部に向かって少しずつ増加した (data not shown)。このパラメータに関しては、微小重力環境と両 1g 対照との間で明瞭な差が見られなかった。データは省略するが、応力緩和速度に関してもほぼ同様の結果が得られた。また、50 mm 以上の花茎に限定して求めた応力緩和パラメータについても重力環境による差は認められなかった。

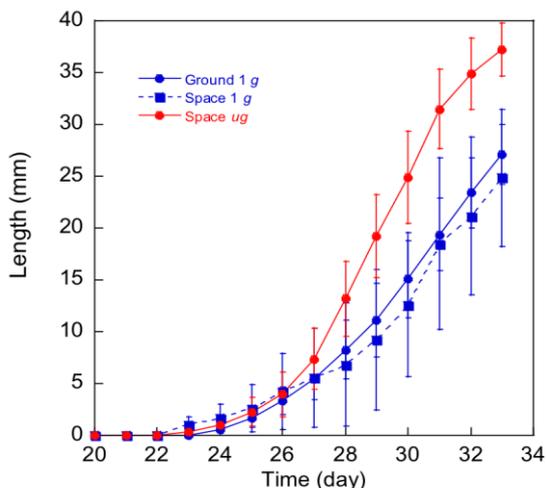


図17 *tua6* 変異体花茎の成長のタイムコース

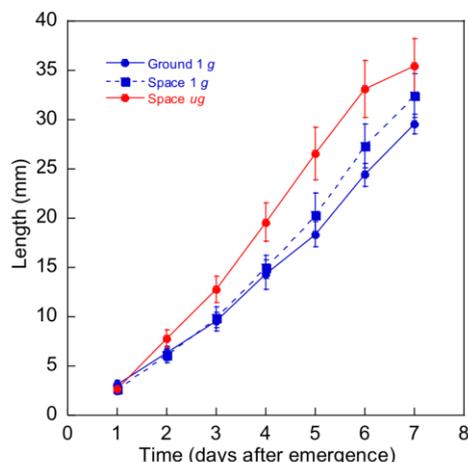


図18 *tua6* 花茎の出現後の成長タイムコース

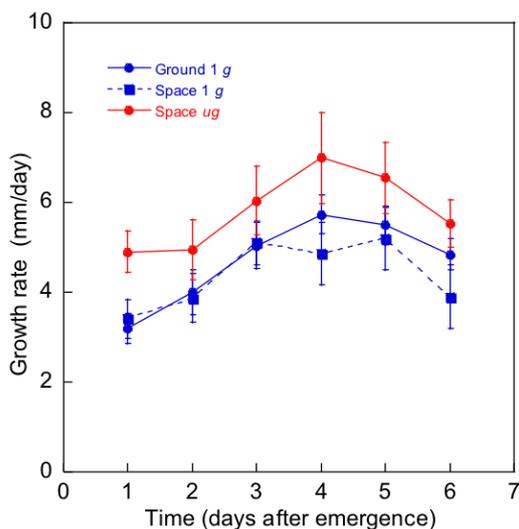


図19 *tua6* 変異体花茎の出現後の成長速度

本実験では、当初、解析を細胞壁物性変化のメカニズムにまで発展させることを計画していた。しかし、物性測定後の試料から全 RNA を抽出し、さらにその残渣から細胞壁多糖を回収してそれぞれ定量したところ、いずれについても花茎の 10 mm の部域 1 本からは十分な量の試料が得られないことが判明した。例えば、本実験の試料から抽出された全 RNA は、研究室内の通常の環境条件下で栽培した対照の数分の一から十分の一程度であり、予定していたリアルタイム PCR による関連遺伝子の発現解析は実施できなかった。

5.3.2 考察

本実験の結果、宇宙の微小重力環境下では、チューブリン変異体 *tua6* の花茎の出現時期が早く、それ以降の成長速度や成長量も大きいことが示された。さらに、このような花茎の成長促進が、細胞壁伸展性の増加によりもたらされることも明らかになった。細胞壁伸展性の解析結果はまた、成長促進が単なる齢の進行の加速によるものではないことを示した。従来、宇宙実験では、地上対照との比較で重力の影響を評価していたが、「きぼう」の軌道上 1G 対照においても、成長形質と細胞壁物性に関してほぼ同様のデータが得られたことから、これらの結果の信頼性は非常に高い。このように、本実験により、重力の作用がない微小重力環境では微小管形成や成長維持に異常があるチューブリン変異体もより正常に成長する、という仮説が支持された。これらの成果により、植物が 1G の重力に抵抗して正常な成長を維持する際に、微小管が細胞壁と協調して重要な役割を果たしていることを、世界で初めて証明できた。

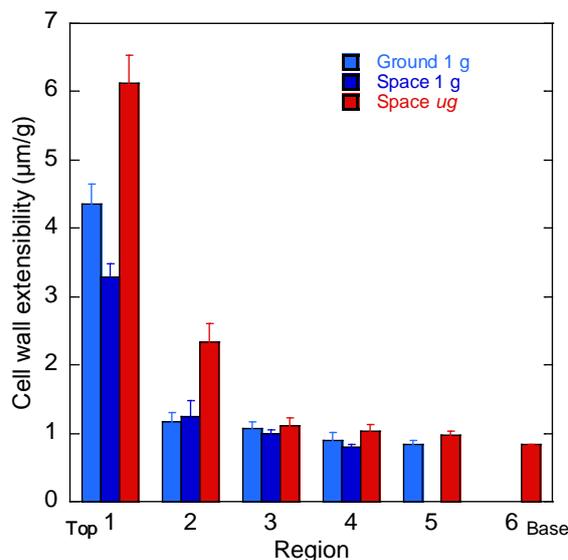


図20 *tua6* 変異体花茎の細胞壁伸展性

我々は、2008年4月～5月にESAのColumbus実験棟で実施されたResist Wall実験において、本実験と同様に、チューブリン変異体を花茎ステージまで生育させる計画を持っていた。しかし、EMCS栽培装置の給水システムの重大な不具合によって水の供給ができず、植物試料の一部が芽ばえ段階まで生育したのに留まった。今回の実験に用いた「きぼう」の細胞培養装置及びPEUは順調に作動し、ほぼ当初の予定通りの生育実験を行うことができた。今後の我が国の宇宙生命科学実験のためにも非常に喜ばしいことである。

6 実験目的・目標に対する達成度、実験成果に対する国際的な水準(自己分析)

Space Seedでは地上実験では予測できなかったことが起こり、そのために一部の目的を達成できなかったが、初期の目的・目標の大部分を達成するとともに、今後の研究の発展に結びつく想定外の実験結果も得ることが出来た。1998年にSTS-95で行われた日本の短期宇宙実験では、暗所で育てられたシロイヌナズナ芽生えの胚軸細胞壁の伸展性が微小重力下で大きくなり、その結果胚軸の成長速度が速くなることが、世界で初めて発見された。STS-95の植物実験では1G対照実験は地上実験であったが、Space SeedではきぼうCBEF内の μG 区と人工重力発生装置による1G区で比較実験が行われ、その結果 μG 区ではシロイヌナズナ花茎の成長が1G区よりも早いことが野生種でも*lefty*突然変異体でも明らかになった。このことは、微小重力における茎成長の促進という現象が、幼植物でもまた開花直前の成熟植物においても見られる普遍性の高い現象であることを改めて示している。また、今回の実験から、細胞壁構築に関わるいくつかの遺伝子発現が微小重力環境で変化することが次世代シーケンシング法で明らかにされた。茎成長・細胞壁物性・遺伝子発現に関する我々の研究は宇宙植物学の中でも世界のトップレベルを行くものであるといえる。さらに、ISSで初めて μG 区と1G区での長期栽培実験に成功し、いくつかの装置のトラブルにもかかわらず、発芽から始まり次世代の種子形成で終わるシロイヌナズナの生活環を完結できたことは意義深いものである。また、微小重力下では葉の老化が遅れるという、微小重力のアンチエイジング効果の発見は想定外のものであった。これらの研究成果は、植物の重力生物学の新しい研究分野を開くものである。自己分析による目標達成度は85%、

研究の水準は国際的極めて高い。

7 今後の発展計画

Space Seed:PI らは、過重力刺激を与えられたシロイヌナズナのマイクロアレイの分析で、花茎では約 300 の遺伝子の発現が 5 倍以上増加し、約 200 の遺伝子の発現が 1/5 以下に抑制されること、また花芽では約 300 の遺伝子の発現が 5 倍以上に促進され、また、約 200 の遺伝子の発現が 1/5 以下に抑制されることを明らかにしている。これらの遺伝子の中には、エチレンやオーキシンなどのホルモン関連遺伝子、細胞壁関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、胚や種子形成に関連する遺伝子などが含まれる。現在、Space Seed で回収された *lefty* の花芽のトランスクリプトームプロファイリングを行うことによって、生殖生長に関わる遺伝子の発現に対する重力の影響を網羅的に解析している。

ロゼット葉に関しては二つの興味深いことが認められた。一つは、葉の茂り方である。1*G* 区では大きく成熟したロゼット葉は被覆板の表面に接して葉が平たく配置されているが、 μG 区では葉が被覆板の上でこんもりと盛り上がったように茂っていたことである。この原因は、1*G* 区では葉柄が葉の重みを十分に支えることができなためと考えられる。葉柄支持組織の形成と形態に及ぼす重力の影響は顕微鏡法によって現在解析中である。

もう一つの葉の変化は、葉の黄色化（老化）である。花茎が抽臺を始める時期には、地上実験でも緑色のロゼット葉の黄色化が始まる。興味深い新知見は、きぼうの μG 区の方が 1*G* 区に比べると葉の黄色化が遅い、ということである。 μG の機械的ストレスが小さい環境ではエチレンの合成が抑制されて、その結果、葉の老化が抑制されたと考えられる。この仮説を証明するために、PI らは Space Seed で地上に回収されたロゼット葉のトランスクリプトームプロファイリングを行うことによって、きぼうの μG 区における葉の老化の遅れの原因を遺伝子レベルで解析中である。また、エチレン関連突然変異体を用いて μG が葉の老化を遅らせる機構を解析する宇宙実験を計画している。

西谷 CI 分: 今回の宇宙実験により、宇宙空間で生育させた植物の遺伝子発現を次世代 DNA シークエンス法で網羅的に解析できることが実証された。この方法を用いることにより、これまでとは全く異なるレベルや質で、宇宙空間を含めた環境に対する植物の応答を詳細に解析する道が開けた。今回得られたシークエンスデータをこれらの視点から、解析しなおす予定である。

保尊 CI 分: 植物が重力に抵抗して正常な成長を維持する抗重力反応における微小管の機能のしくみをさらに理解するためには、微小重力環境における微小管ダイナミクスや細胞形態の変化を軌道上で詳細に解析する必要がある。我々は、現在、この目的のための Resist Tubule 宇宙実験を計画し、実施準備を進めている。

本実験では、当初、細胞壁の物性変化をもたらす構成成分の代謝的な変化やさらにその原因となる遺伝子発現についても情報を得ることを計画していた。しかし、回収された試料の量が予想外に少なく、予定していた花茎各部域 1 本毎の解析は不可能であった。遺伝子発現については、試料をまとめ合わせた上でマイクロアレイ解析に供している。回収された RNA 量の少なさに関しては、RNA later での固定操作や保存過程が影響した可能性もあるが、細胞壁の量も限られていたので、植物試料の生育自体に主な原因があると思われる。今回得られた花茎は、通常的环境下で生育したものより明らかに細く貧弱であった。今後は、細胞培養装置や PEU の改良を通してより良好な生育環境を設定する必要がある。また、この目的のためには、本来、チューブリン変異というバイアスがかかった植物体ではなく、野生型を用いるのが適切である。細胞壁代謝や遺伝子発現の新規高感度解析技術の開発と合わせて、今後の課題である。

8 見えてきた課題、対応案

8.1 実験試料の量的確保

Space Seed、Cell Wall および Resist Wall に共通した課題は、実験植物の不足であった。分析に十分なサンプル数を確保できなかったために、Cell Wall および Resist Wall では十分な RNA を確保できず、予定していた遺伝子関係の解析が出来なかったことは非常に残念なことであった。また、Resist Wall では μG 区における *lefty* 花茎の成長促進が細胞壁の伸展性の増大によっていることが明らかになった。Space Seed でも野生型のシロイヌナズナ花茎の成長促進が μG 区で統計的に有意であることが明らかになったが、細胞壁の伸展性は $1G$ 区に比べると大きくなる傾向が見られたが、統計学的には有意差がなかった。この原因も、サンプル数の不足によっていると考えられる。JAXA の PEU は NASA や ESA の開発した植物栽培装置に比べるとかなり小型である。サンプル数の不足を解消するためには、次世代のより大型の植物実験装置の開発が望まれる。

8.2 PEU および CBEF のさらなる改良

Space Seed の目的の一つが、植物の長期栽培が可能な汎用性のある植物実験装置の開発であった。Space Seed 実験の前半、すなわちはじめの 1 ヶ月間は PEU も CBEF も大きなトラブル無しに栽培実験を行うことが出来た。しかし、4.4.3 項で記したように、実験後半になると PEU および CBEF の機能にいくつかの不具合が発生した。大部分の問題は宇宙飛行士とつくば宇宙センターの Space Seed 支援スタッフの努力で克服できたが、 $1G$ 区の画像が 37 日目からダウンリンク出来なくなった。その原因は、CBEF の $1G$ ターンテーブルを 2011 年 7 月にスペースシャトル (STS-135) で回収し、ターンテーブルのスリップリングを解析したところ、予想されていたように導通不良によることが確認された。長期実験を可能にするような装置のストレステストが必要であるように思われる。

もうひとつの改良しなければならないことは、CBEF の湿度調節機能である。今回の PEU を用いる植物実験では、苗床からの水の蒸発と植物体からの蒸散によって CBEF 内の湿度は上昇した。CBEF は加湿機構を持つが、除湿機構は備えていない。そのために、CBEF 内に除湿器を設置して湿度調節を行ったが、除湿器の能力が想定を下回り、実験後半は PEU 内の湿度を 80% 以下に保つことが出来なかった。Space Seed 実験では長期実験の最後の 9 日間は給水を停止して乾燥運転を行った。しかし、CBEF 内の高い湿度が原因となって、植物栽培容器内の乾燥が予定通りに行われなかった可能性が高い。宇宙で形成された種子を地上に持ち帰り、発芽試験を行っているが、きぼうで形成された種子の発芽能力は非常に低い。収穫後シャトルの運航の都合で植物栽培容器は、きぼうの冷蔵庫で 5 ヶ月以上 2°C で保存されていた。回収した容器内は結露しており、PEU の乾燥運転が目標通りに実施できなかったことが分かった。種子は低温でも湿った環境では、発芽能力を早く失うことが知られている。したがって、宇宙で実った種子の発芽能力が低いことは、CBEF の湿度調節能力によっている可能性がある。市販の人工気象器にも採用されている湿度を一定に保つ機能を CBEF も備える必要があると思う。

9 論文・特許等

Hoson T, Matsumoto S, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T, Sonobe S, Muranaka T, Kamisaka S, Kamada M, Omori K, Ishioka N and Shimazu T (2008) The Resist Wall experiment on EMCS. *J. Gravit. Physiol.* 15: 303-304. Hoson T and Fujii N (2009) Preface: Gravity responses and the cell wall in plants. *Biol. Sci. Space* 23: 113
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.

- Hoson T, Matsumoto S, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T, Sonobe S, Muranaka T, Kamisaka S, Kamada M, Omori K, Ishioka N and 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.
- Hoson T, Matsumoto S, Soga K and Wakabayashi K (2010) Cortical microtubules are responsible for gravity resistance in plants. *Plant Signal. Behav.* 5: 752-754.
- Imoto K., Yokoyama R., Nishitani K (2005) Comprehensive approach to genes involved in cell wall modifications in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 58: 177-192
- Koizumi K, Yokoyama R, Kamada M., Omori K., Ishioka N, Takeoka H., Shimazu T, Nishitani K (2007) Reverse genetic approach to exploring genes responsible for cell-wall dynamics in supporting tissues of *Arabidopsis thaliana* under microgravity conditions. *Biol. Sci. Space* 21: 48-55
- Kamada M., Omori K., Yokoyama R, Nishitani K., Hoson T, Shimazu T, Ishioka N (2009) Preparation and outline of space-based studies on gravity responses and cell wall formation in plants. *Biol. Sci. Space* 23: 115-120
- Karahara I, Ando N, Tamaoki D, Kamisaka S (2008) Effects of long-term hypergravity on growth of *Arabidopsis* seedling, 2008. 13-20 July, 37th COSPAR Scientific Assembly, Montreal, Canada
- Karahara I, Tamaoki D, Nishiuchi T, Schreiber L, Kamisaka S (2009) Effects of altered gravity conditions on lignin and secondary wall formation in herbaceous dicots and woody plants, *Biol. Sci. Space*, 23, 177-182.
- Koizumi K., Yokoyama R, Nishitani K (2009) Mechanical load induces upregulation of transcripts for a set of genes implicated in secondary wall formation in the supporting tissue of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res.* 122: 651-659
- Kotake T, Hirata N, Kitazawa K, Soga K, Tsumuraya Y (2009) Arabinogalactan-proteins in the evolution of gravity resistance in land plants. *Biol. Sci. Space* 23: 143-149.
- Matsumoto S, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T and Hoson T (2010) Gravity-induced modifications to development in hypocotyls of *Arabidopsis tubulin* mutants. *Plant Physiol.* 152: 918-926.
- Miyamoto K, Oka M, Yamamoto R, Masuda Y, Hoson T, Kamisaka S, Ueda J (1999) Auxin polar transport in *Arabidopsis* under simulated microgravity conditions--relevance to growth and development. *Adv Space Res* 23: 2033-2036
- Nishitani K. (2005) Division of roles among members of the XTH gene family in plants. *Plant Biosystems* 139: 98-101
- Nishitani K, Yokoyama R, Koizumi K (2009) Cell wall-related genes involved in supporting tissue formation and transcriptional regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Sci. Space* 23: 121-130
- Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T (2008) Transient increase in the transcript levels of γ -tubulin complex genes during reorientation of cortical microtubules by gravity in azuki bean (*Vigna angularis*) epicotyls. *J. Plant Res.* 121: 493-498.
- Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T (2009) The transcript level of katanin gene is increased transiently in response to changes in gravitational conditions in azuki bean epicotyls. *Biol. Sci. Space* 23: 23-28.
- Tamaoki D, Karahara I, Schreiber L, Wakasugi T, Yamada K, Kamisaka S (2006) Effects of hypergravity conditions on elongation growth and lignin formation in the inflorescence

- stem of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* 119: 79-84
- Tamaoki D, Karahara I, Nishiuchi T, Oliveira SD, Schreiber L, Wakasugi T, Yamada K., Yamaguchi K., Kamisaka S (2009) Transcriptome profiling in *Arabidopsis* inflorescence stems grown under hypergravity in terms of cell walls and plant hormones, *Adv. Space Res.* 44: 245-253.
- Tamaoki D, Karahara I, Nishiuchi T, Wakasugi T, Yamada K, Kamisaka S (2011) Involvement of auxin dynamics in hypergravity-induced promotion of lignin-related genes expression in *Arabidopsis* inflorescence stems, *J. Exp. Bot.* (in press)
- 神阪盛一郎(2002) 国際宇宙ステーションで陸上植物は種子から種子への生活環を完結できるか(<特集>宇宙で植物を育てる) *生物工学誌* 80: 307-311.
- 神阪盛一郎、唐原一郎、笠原宏一、山田晃弘、矢野幸子、谷垣文章、笠原春夫、栢田大輔、嶋津徹、福井啓二、西谷和彦、保尊隆享 (2010) 国際宇宙ステーションでの Space Seed 実験. *生物工学* 88: 288-291.

10 参考・引用論文

- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13: 1499-1510
- Brown AH, Dahl AO, Chapman DK (1976) Morphology of *Arabidopsis* grown under chronic centrifugation and on the clinostat. *Plant Physiology* 57: 358-364
- Chaudhury AM, Ming L, Miller C, Craig S, Dennis ES, Peacock WJ (1997) Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4223
- Koornneef M, Hanhart CJ, Veen JH (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 229: 57-66
- Kuang A, Xiao Y, Musgrave ME (1996) Cytochemical localization of reserves during seed development in *Arabidopsis thaliana* under spaceflight conditions. *Annals Botany (Lond)* 78: 343-351
- Link BM, Wagner ER, Cosgrove DJ (2001) The effect of a microgravity (space) environment on the expression of expansins from the peg and root tissues of *Cucumis sativus*. *Physiol Plant* 113: 292-300
- Meinke DW, Sussex IM (1979) Embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*: A model system for genetic analysis of plant embryo development. *Dev Biol* 72: 50-61
- Merkys AI, Laurinavicius RS (1983) Complete cycle of individual development of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. plants on board the Salyut-7 orbital station. *Dokl Akad Nauk SSSR* 271: 579-512
- Musgrave ME, Kuang A (2003) Plant reproductive development during spaceflight. *Adv Space Biol Med* 9: 1-23
- Musgrave ME, Kuang A, Allen J, van Loon JJWA (2009) Hypergravity prevents seed production in *Arabidopsis* by disrupting pollen tube growth. *Planta* 230: 863-870
- Musgrave ME, Kuang A, Xiao Y, Stout SC, Bingham GE, Briarty LG, Levenskikh MA, Sychev VN, Podolski IG (2000) Gravity independence of seed-to-seed cycling in *Brassica rapa*. *Planta* 210: 400-406
- Waldron KW, Brett CT (1990) Effects of extreme acceleration on the germination, growth and cell wall composition of pea epicotyls. *J Exp Bot* 41: 71-77