

2017 年度
「きぼう」利用テーマ・船内科学研究に係る
科学成果評価結果
報告書

宇宙航空研究開発機構
有人宇宙技術部門
きぼう利用センター

1. 概要

本資料は、2017年度(2017年10月から2018年2月)に実施した、「きぼう」船内を利用した科学研究テーマの科学成果評価の結果および評価への入力となった対象テーマの成果報告書等を取り纏めたものである。

2. 評価対象

評価対象となったテーマを表1に示す。

これらのテーマは、2012年度～2015年度の間に軌道上実験を実施した3件と航空機実験を実施した1件の科学研究テーマである。

3. 評価の目的、評価指標

「きぼう」で行われた研究成果の達成状況とその意義、分野学術や社会への貢献、波及効果に対する評価を通じて、各々の研究成果のアピールポイントを効果的に情報発信すること、また、きぼう利用に関する改善点、利用の方向性等へ提言を得て、今後の利用計画設定に資することを目的として評価が行われた。この目的に照らし、表2に示す各評価項目に基づき、書類審査、面接審査(成果報告会)が実施され、評価結果は、最終的に、以下の4段階の総合評価指標および提言として取り纏められた。

S: 目標を高度に達成し、特筆すべき成果を上げた。

A: 目標を十分に達成した(エクストラサクセス相当以上)。

B: 目標を達成した(フルサクセス相当)。

C: 目標達成に不足・不十分な点があり、引き続き解析・検討を要す。

4. 評価体制

評価は、生命科学分野あるいは宇宙医学分野のきぼう利用テーマ選考評価委員会(以下、「選考評価委員会」)により実施された。また、分野専門家3名のピアレビューをテーマ毎に設定し、書類審査を併せて行い、選考評価委員会は、これを参考として審査を行った。

ここで、選考評価委員会は、きぼう利用において、応募されたテーマ等の選考、設定された利用テーマ等の評価を行うために設置された JAXA 有人宇宙技術部門長の諮問委員会であり、物質・物理科学分野、生命科学分野及び宇宙医学分野の3分野が設定されている(現在は、物質物理科学分野及び生命医科学分野の2分野)。今回、評価に当たった選考評価委員会の構成員リストを表3に示す。

5. 評価プロセス

研究成果報告の提出から成果評価の公表までの評価プロセスを図4に示す。

6. 科学成果評価に係る文書

本資料に含めるテーマ毎の研究成果報告書、科学成果評価結果等を、表5に示す。

なお、選考評価委員会での成果評価時点から JAXA・HP 公開(現在)までの間に、研究代表者より研究成果報告書内の論文リストの更新依頼があった場合は、研究成果報告書の改訂を行っている。

表1 評価対象テーマ

テーマ名	研究代表者 (評価時)	実験時期(※)	成果評価 (委員会)	分野
重力による莖の形態変化における表層微小管と微小管結合タンパク質 MAP65 の役割 (Aniso Tubule)	大阪市立大学大学院理学研究科 准教授 曾我康一	2013 年 11 月 ～ 2015 年 4 月	2017 年 10 月 27 日	生命科学
生体自己組織化現象を介する重力効果の増幅発現	お茶の水女子大学 教授 最上善広	2013 年 11 月 ～ 2014 年 10 月 (航空機実験のみ)	2018 年 2 月 2 日	
前庭-血圧反射系の可塑性とその対策 (VC-Reflex)	岐阜大学医学系研究科 教授 森田啓之	2012 年～ 2016 年	2017 年 11 月 2 日	宇宙医学

※ 医学実験の地上でのベースラインデータコレクションは含む。その他実験の地上対照実験は含まない。人対象研究については年単位の記載としている。

(注) 2017 年度に成果評価を実施した、宇宙医学分野の1テーマについては、公開時期は別途調整中。

表2 評価項目

科学的・技術的成果	(1) 研究目標の意義および達成度 - 研究目標の意義は高いか(ミッション選定/準備段階移行以降に修正された場合)。また、時間経過により減じていないか。 - 研究目標は達成されたか。サクセスクライテリアに照らした達成度のレベル。
	(2) 実施体制 研究チームおよび JAXA の体制は適切であったか。
	(3) 科学的、技術的成果 - 得られた成果は、国際的なレベルに照らして、高いか。 - 設定された目標を越える成果があったか。
	(4) 活用、波及効果 - 関連科学分野・技術領域への波及効果があったか、また、期待されるか。 - 科学的、技術的に活用が見込めるか、成果活用の意義・重要性は高いか。
	(5) きぼう利用の必然性 きぼうで行う必然性があったか。
総合評価・提言	(6) 総合評価 - 成果インパクト、応用・波及効果などのポテンシャル、他、アピールポイント。 - 今後の宇宙実験に向けての課題、改善すべき点。 - 当該科学分野・領域におけるきぼう利用の発展性、継続の意義。

表3 きぼう利用テーマ選考評価委員会 構成員（評価時）

宇宙医学分野

委員長	松本 俊夫 徳島大学藤井節郎記念医科学センター センター長
委員	本間 研一 北海道大学医学研究科 時間医科学講座 名誉教授
	中村 耕三 国立障害者リハビリテーションセンター 総長
	武田 伸一 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 所長

生命科学分野

委員長	山口 朗 東京歯科大学口腔科学研究センター教授
委員	牛田 多加志 東京大学大学院工学系研究科教授
	大森 正之 東京大学名誉教授
	田村 宏治 東北大学大学院生命科学研究科教授
	中村 幸夫 理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室室長
	諸橋 憲一郎 九州大学大学院医学研究院分子生命科学系部門 性差生物学講座主幹教授

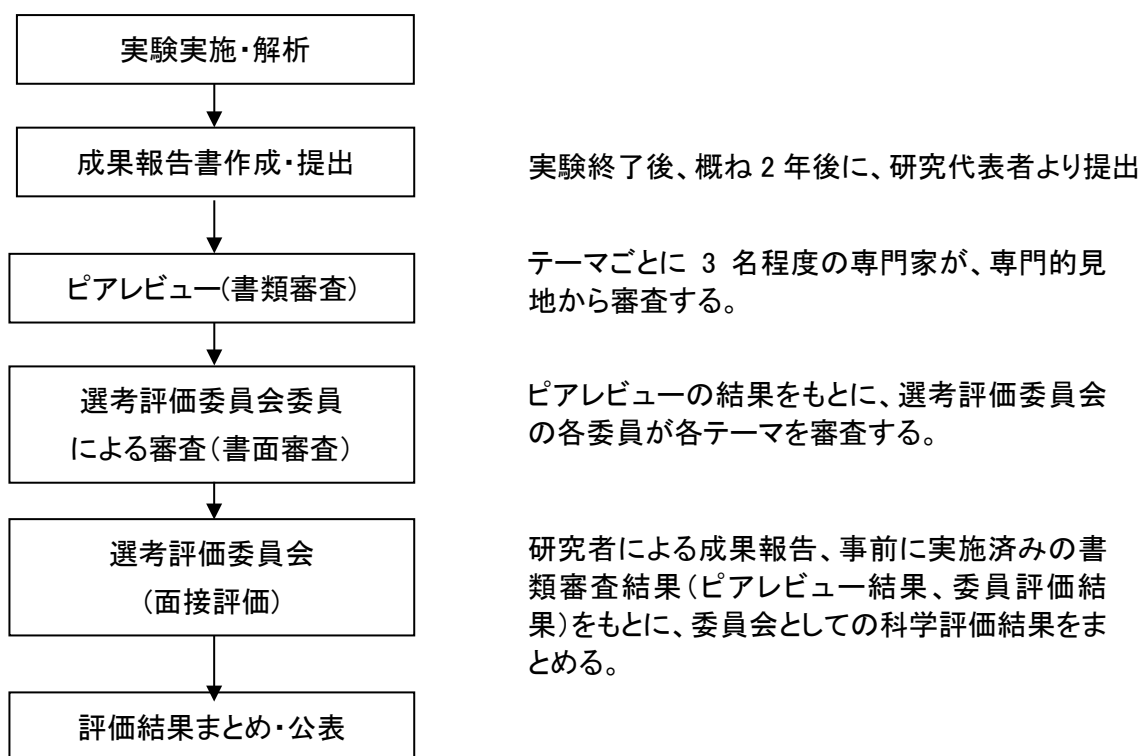


図4 科学成果評価プロセス

表5 添付文書の構成

テーマ名	研究成果 報告書	評価結果	研究成果 概要書(日)	研究成果 概要書(英)
重力による茎の形態変化における表層微小管と微小管結合タンパク質 MAP65 の役割 (Aniso Tubule)	別紙 1-1	別紙 1-2	別紙 1-3	別紙 1-4
生体自己組織化現象を介する重力効果の増幅発現	別紙 2-1	別紙 2-2		
前庭-血圧反射系の可塑性とその対策 (VC-Reflex)	別紙 3-1	別紙 3-2	別紙 3-3	別紙 3-4

(注) 2017 年度に成果評価を実施した、宇宙医学分野の1テーマについては、公開時期は別途調整中。

以上

ISS・ぎぼう利用ミッション
「重力による茎の形態変化における
表層微小管と微小管結合タンパク質の役割 (Aniso Tubule)」
研究成果報告書
代表研究者：曾我康一（大阪市立大学大学院理学研究科）
平成 29 年 9 月（平成 30 年 3 月改訂）

1. 緒言

・研究内容、目標の概要

陸生植物が地上の $1g$ 環境下で生きていくためには重力に対抗できる体を構築する必要がある。研究代表者らは、遠心過重力環境を利用した地上実験から、重力の大きさの対数に応じて、茎を太く短くすることが植物の重力に対抗するメカニズムのひとつであることを示してきた(1, 2)。また、茎の形態変化は、MAP65-1 などの微小管結合タンパク質の働きにより、細胞短軸に平行な細胞質表層微小管(横向きの微小管)を持つ細胞が減少することによってもたらされていることがあきらかになった(3~7)。以上の地上実験の結果より、重力に耐える必要のない宇宙の微小重力環境下では、微小管結合タンパク質の働きにより、過重力環境下とは逆に、横向きの表層微小管を持つ表皮細胞の割合が増加し、茎が細く長い形態になると予想される。この仮説を検証するために、チューブリンならびに微小管結合タンパク質を緑色蛍光タンパク質(GFP)で標識した 5 つのラインのシロイヌナズナを国際宇宙ステーション「きぼう」実験棟にて生育させ、胚軸の成長と表層微小管の動態を「きぼう」に搭載されている蛍光顕微鏡を用いて解析した。

・研究内容の重要性、意義

植物は地球上で重力に抵抗、対抗しながら生活環を営んでいる。植物が重力に対抗できる体を構築する反応は、植物が進化の過程で陸に上がり、直接重力に曝されるようになった数億年前から飛躍的に発達し、植物のその後の陸上での進化、繁栄を支えてきた。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、研究代表者らは、この反応を「抗重力反応(gravity resistance)」と名づけ(8)、その特性と機構を主に遠心分離機を用いた過重力環境を利用して解析してきた(1, 2)。本実験は、地上実験の成果にもとづいて、宇宙環境を利用して抗重力反応の機構を解明するものであり、ほとんど注目されていないにもかかわらず、重要な重力反応である抗重力反応を解析することが大きな特色である。

生物の形は、遺伝的に決定されているが、植物の場合、光などの環境要因によっても制御されている。植物の形は、植物を構築している細胞の形によって、最も直接的に決められている。植物細胞には、細胞膜直下に細胞質表層微小管が存在し、その表層微小管は、細胞壁に新しく付加されるセルロース微繊維の方向を制御することを通して細胞の成長方向を制御し、ひいては細胞の形の制御に働いている。本実験により、表層微小管の配向が宇宙の微小重力から、過重力の幅広いレンジで調節されていることが示されれば、 $1g$ の重力が存在する地球上では、植物は、その重力に応答して、微小管の配向を調節していることになる。すなわち、地上で観察される表層微小管の配向変化は、 $1g$ の重力による反応が起こっている上での反応である。また、 $1g$ の重力による反応によってマスクされているために、地上では見るできない表層微小管の配向変化が存在する可能性も考えられる。本実験により、 $1g$ の重力によって、表層微小管の配向が調節されていることが示されれば、植物形態学上の新たな視点をもたらしうると考えられる。

植物は環境維持・浄化や食糧供給の重要な担い手であり、人類が宇宙環境で長期間滞在するためには、植物を効率的に生育させることが不可欠である。そのためには、植物を用いた宇宙実験を積み重ね、微小重力環境下での植物の反応に関する十分なデータを蓄積する必要がある。将来、宇宙基地などで植物を栽培する際に、茎がひょろひょろと細長く成長してしまうことは好ましくないと思われる。本実験によって、茎形態の制御機構があきらかになれば、それを回避する対策など、宇宙基地での植物栽培のための貴重な情報が得られるものと期待される。

・研究動機、バックグラウンド

植物の抗重力反応を解析するためには、植物の生育環境の重力の大きさを変化させて、その時の反応を調べるのが有効な手段である。落下施設や航空機を利用すれば、地球上で、微小重力環境を作り出すことが出来る。しかしながら、落下施設や航空機を利用した微小重力環境の持続時間は最大数十秒程度であり、長い時間を要する植物の抗重力反応を解析するには適していない。一方、植物の重力屈性などの解析には、緩やかな回転によって重力の方向性を除去するクリノスタットが用いられてきた。しかし、クリノスタットでは、重力そのものを消失させたり、重力の大きさを減少させたりすることは出来ない。実際、クリノスタットに載せても植物の抗重力反応の過程は全く影響されない。したがって、このクリノスタットを用いた実験系も抗重力反応を解析するには適していない。そこで、申請者らは、遠心分離機を用いた過重力環境を利用して、抗重力反応を解析してきた。その結果、植物は、重力の大きさの対数に応じて、茎の細胞壁強度を増加させるとともに、茎を太く短くすることによって重力に対抗していることがあきらかになった(1, 2, 8)。また、重力刺激の受容には原形質膜上のメカノレセプターが関与することを示した(9, 10)。しかし、過重力環境は植物にとってあくまで人工的な重力環境であるため、植物の微小重力に対する反応を解析できて初めて、抗重力のメカニズムが解明されたとと言える。したがって、宇宙の微小重力環境下での実験がどうしても必要になった。

研究代表者は、1998年にスペースシャトル STS-95 において実施された BRIC-RICE 実験(研究代表者:保尊隆享教授)、ならびに、Resist Wall 実験(研究代表者:保尊隆享教授)、Space Seed 実験(研究代表者:神阪盛一郎教授)、Ferulate 実験(研究代表者:若林和幸博士)、Resist Tubule 実験(研究代表者:保尊隆享教授)に実験分担者として参加し、抗重力反応における細胞壁の役割やシグナル変換・伝達のしくみを解析してきた(11~19)。また、アドバイザー/実験担当者として参加した宇宙教育プログラム アジアの種子 2013 においても、抗重力反応における細胞壁の役割を解析した(20)。これらの宇宙実験によって、宇宙の微小重力環境において、茎が細く長い形態になることは示されたが、この過程における表層微小管や微小管結合タンパク質の役割はあきらかになっていなかった。本実験は、微小重力環境での茎の形態変化における表層微小管、ならびに、微小管結合タンパク質の役割をあきらかにしようとするものである。

2. 研究計画

2.1 研究内容、目標

遠心過重力環境で植物を生育させると、重力の大きさの対数に応じて、茎が太く短くなる(図 2-1)。また、このときの細胞の成長方向を規定している表層微小管の配向を解析すると、重力の大きさの対数に応じて、横向きの微小管を持つ細胞の割合は減少し(図 2-2)、一方、縦向きの微小管を持つ細胞は増加した。微小管結合タンパク質のひとつである MAP65-1 は、微小管同士を架橋し、微小管を横向きに維持する働きを持つ。この MAP65-1 のレベルは、重力の大きさの対数に応じて減少した(図 2-3)。また、 γ -チューブリン複合体は微小管の枝分かれに関与しており、枝分かれした微小管の切断にはカタニンが関与している。この枝分かれと切断の繰り返しは、微小管の配向調節に関与しており、これらのレベルは、過重力により一過的に増加した(4~6)。以上の結果から、過重力環境下では、MAP65-1 などの微小管結合タンパク質のレベルが変化することにより、横向きの表層微小管を持つ細胞の割合が減少し、茎が太く短い形態になることが示された。したがって、宇宙の微小重力環境下では、MAP65-1 などの微小管結合タンパク質のレベル変化を介して、横向きの表層微小管を持つ細胞の割合が増加し、茎が細く長い形態になると予想される(図 2-1~2-3)。

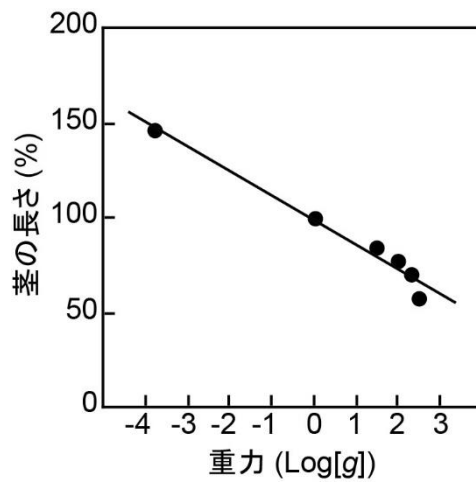


図 2-1 茎の長さに対する重力の影響

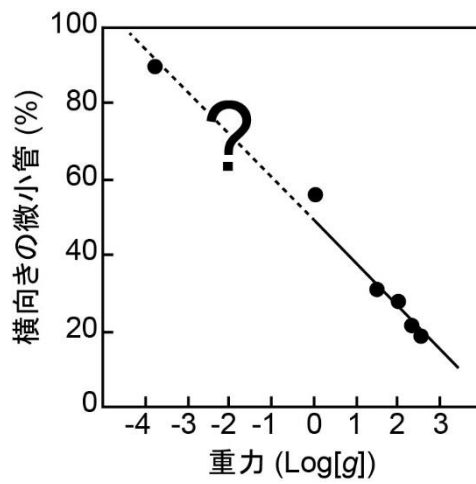


図 2-2 表層微小管の配向に対する重力の影響

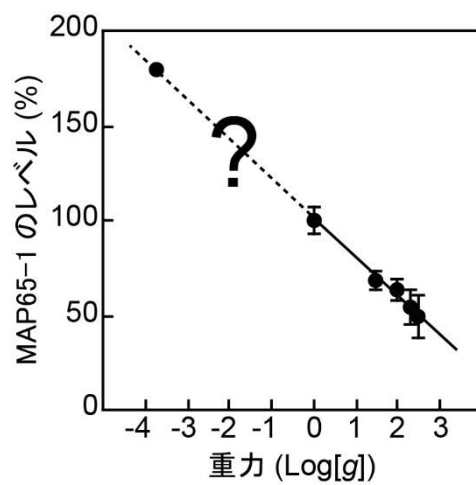


図 2-3 MAP65-1 のレベルに対する重力の影響

本実験は、「きぼう」第 2 期船内実験室利用テーマ追加募集において、実験候補テーマとして採択されたものである。この追加募集では、第 2 期利用期間後半に生ずる可能性のある隙間の利用時間を最大限に活用することを目的に、短期間で準備を行うことが可能で、また、クルーの作業時間が少なく、打ち上げ重量が少なく、試料の地上への回収がないことが条件となっていた。JAXA によって既に開発されていた Cultivation/Observation Chamber は、シロイヌナズナなどの小さな植物を栽培することができる容器で、容器から植物試料を移すことなく、容器のままで、顕微鏡観察を行うことができる。また、「きぼう」実験棟には、地上から操作することができる蛍光顕微鏡が搭載されている。そこで、募集条件を満たしながら、上記の仮説を検証するために、チューブリンならびに微小管結合タンパク質を GFP で標識したシロイヌナズナを Cultivation/Observation Chamber を用いて、「きぼう」にて生育させ、胚軸の成長と表層微小管の動態を「きぼう」に搭載されている蛍光顕微鏡を用いて解析する本実験を提案した。対照実験は、地上で行うこととした。

本実験では、GFP-TUB6、BPP1-GFP、SP1L3-GFP、SPR2-GFP、GFP-MAP65-1 の 5 つの GFP ラインを用いた。これらのうち、GFP-TUB6、BPP1-GFP、ならびに、SP1L3-GFP では、恒常のプロモーターにより融合タンパク質を発現させており、SPR2-GFP、ならびに、GFP-MAP65-1 では、自身のプロモーターにより融合タンパク質を発現させている。GFP-TUB6 は、微小管の構成要素である β -チューブリン 6 と GFP を融合させたものであり、最も直接的に微小管の動態を観察することが出来る。他のチューブリンの GFP ラインと比べると蛍光強度が高く、また、コントラストも高いものの、「きぼう」に搭載されている蛍光顕微鏡では、本実験で用いた他のラインの方がより動態観察に適している。あとの 4 つのラインは、微小管結合タンパク質に GFP を融合したもので、さまざまな実験において、微小管の動態を観察するために用いられているが、微小重力環境下において、地上と同様の挙動を示すかは不明である。このため、4 つの独立したラインを用いることとした。BPP1-GFP は、最も蛍光強度が高く、コントラストも高く、安定して蛍光像を取得することができる。また、SPR2-GFP、ならびに、GFP-MAP65-1 では、自身のプロモーターにより融合タンパク質を発現させているため、蛍光強度を測定することで、それぞれのタンパク質レベルを解析することができる。

以上の 5 つの GFP ラインを 10 回の Run にわけて、生育、観察することにした。本実験は、追加募集において採択されており、隙間時間が生じなければ、実験を行うことができず、10 回の Run すべてが実施されない可能性もあった。そこで、実施される可能性が高い、はじめの 3 回の Run では、最も観察に適した BPP1-GFP のみを観察することとし、すべての Run に BPP1-GFP を含むようにした(表 2-1)。また、軌道上における種子の保管期間を短くし、1 回の打ち上げ重量を減らすために、前半と後半の 2 回にわけて打ち上げた。後半のはじめに、過重力によってレベルが変化することが示されている GFP-MAP65-1 を含むようにした。

具体的な実験は、以下の通りである。GFP ラインの種子を地上で滅菌後、Cultivation/Observation Chamber の支持体上に播種し、乾燥状態で打ち上げた。「きぼう」内に常温保管し、栽培を開始する際に、シリジを用いて水を加えた。軌道上冷凍・冷蔵庫(MELFI)を用いて、2°Cの低温処理を約 4 日間行った。その後、「きぼう」キャビンの蛍光灯の下に容器を約 8 時間置き、遮光バッグに入れ、細胞培養装置(CBEF)を利用し、約 22°Cで約 70 時間生育させた。顕微鏡観察のために水を容器に入れ、容器のネジを締め、プレパラートを作製した。作製したプレパラートを蛍光顕微鏡のステージにセットし、地上からの操作により、5 倍の対物レンズの明視野像を得た。この画像から、試料の位置情報を取得し、観察枠、観察順、露光時間などを決定し、順次、20 倍対物レンズの蛍光像を取得した。すべての画像の取得後に、地上に蛍光像をダウンリンクした。軌道上で生育させたシロイヌナズナは、容器ごと廃棄した。対照実験は、温度などの条件を再現しながら、筑波宇宙センターにて行った。地上対照の顕微鏡画像は、筑波宇宙センターに設置されている地上モデルの蛍光顕微鏡を使用して取得した。また、本実験において確立したシロイヌナズナの栽培方法、ならびに、画像取得方法は、Soga et al. (2015)において報告した。

表 2-1 各 Run で使用した GFP ライン

Run	GFP-ライン	
01	BPP1-GFP	
02	BPP1-GFP	
03	BPP1-GFP	
04	BPP1-GFP	GFP-TUB6
05	BPP1-GFP	SP1L3-GFP
06	BPP1-GFP	GFP-MAP65-1
07	BPP1-GFP	GFP-MAP65-1
08	BPP1-GFP	GFP-MAP65-1
09	BPP1-GFP	SPR2-GFP
10	BPP1-GFP	SPR2-GFP

本実験を行うにあたって、表 2-2 のサクセスクライテリアを設定した。

表 2-2 本実験のサクセスクライテリア

サクセス	クライテリア
ミニマム	宇宙で「微小管結合タンパク質(BPP1)を蛍光観察することで、横向きの表層微小管を持つ表皮細胞の割合が増加して茎が細く長い形態になる」という仮説を検証できること。
フル	上記に加えて、「表層微小管(TUB6)を蛍光観察することで、横向きの表層微小管を持つ表皮細胞の割合が増加して茎が細く長い形態になる」という仮説を検証できること。
エクストラ	地上での実験結果および、Resist Tubule 実験で得られた遺伝子発現データと組み合わせて、重力による茎の形態変化における表層微小管と微小管結合タンパク質の役割の解明がなされること。

BPP1 は、微小管結合タンパク質のひとつで、BPP1-GFP は、蛍光強度が高く、コントラストも高く、「きぼう」の蛍光顕微鏡で安定して蛍光像を取得することができる。BPP1-GFP の融合タンパク質は、表層微小管上に局在し、地上では、表層微小管の動態解析に利用されている。

TUB6(β -チューブリン 6)は、微小管の構成要素であり、GFP-TUB6 は、最も直接的に微小管の動態を観察することが出来る。しかしながら、BPP1-GFP などと比べると、蛍光強度が低く、コントラストも低い。

Resist Tubule 宇宙実験(代表研究者: 保尊隆享教授)において、器官や光条件が異なるものの、遺伝子発現の網羅的解析を行うことから、本実験の解析に、遺伝子発現の結果を利用できる可能性が考えられた。

2.2 体制

・研究チーム体制

代表研究者:

曾我康一 大阪市立大学

実験計画の立案、遂行、解析

共同研究者:

保尊隆享 大阪市立大学

解析

橋本 隆 奈良先端科学技術大学院大学

試料準備、解析

若林和幸 大阪市立大学

試料準備、解析

小竹敬久 埼玉大学

試料準備、解析

・JAXA 支援体制

宇宙環境利用センター(現・きぼう利用センター)

きぼう運用チーム

・体制に関する評価

本実験には、JAXA および関連機関から多くの方々にご参画頂き、ご尽力頂いた。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、Run01 では顕微鏡観察の封入剤が観察中に乾燥のため減少したり、また、Run02 では CBEF が不具合のため使用できなかったり、Run05～07 では、栽培/観察容器が顕微鏡ステージにきちんとセットされていなかったり、さらに、Run05 では容器の端の方では対物レンズと栽培/観察容器が接触することが判明したり、また、Run06、07 では通信速度が遅かったり、Run07 では画像取得中に制御システムに不具合が起こったりと、多くの Run でさまざまなトラブルが生じたが、それらにも可能な限り対応して頂いた。問題点としては、体制に人数の余裕がなく、特に、観察作業を実施できる人が限られており、一部の人に過度な負担がかかったことがあげられる。また、観察枠の決定のため、マイクロソフトのエクセルを利用していたが、JAXA 内で使用できるパソコンにインストールされているエクセルのバージョンが、Run のたびに異なっていたり、他社の表計算ソフトしか入っていなかったりすることがあり、使用方法が異なり、観察枠の決定に時間がかかったり、マクロが使用できずに、手入力をしたりした。大きなミスにつながる可能性もあることから、すべての Run で同一の環境を準備して頂きたかった。

2.3 スケジュール

・実験候補選定から飛行後解析まで

2012/02/15	実験候補選定 「きぼう」船内実験室第2期利用テーマ追加募集 候補テーマに採択
2012/07/23	フライト実験準備移行審査(JAXA 内審査会)
2012/08/28	フライト実験準備移行審査(外部評価)
2013/08/04	Run01～05: HTV4 にて打ち上げ
2013/11/26	Run01 軌道上実験
2013/12/20	Run01 地上対照実験
2014/01/17	Run02 軌道上実験
2014/02/21	Run03 軌道上実験
2014/02/28	Run04 軌道上実験
2014/03/07	Run05 軌道上実験
2014/06/26	Run02 地上対照実験
2014/07/10	Run03 地上対照実験
2014/09/21	Run06～10: SpX-4 にて打ち上げ
2014/11/28	Run04 地上対照実験 (発芽・成長が悪く再度実施)
2014/12/19	Run06 軌道上実験
2014/12/24	Run06 地上対照実験 (発芽・成長が悪く再度実施)
2015/02/10	Run07 軌道上実験
2015/02/26	Run08 軌道上実験
2015/03/10	Run09 軌道上実験
2015/04/03	Run10 軌道上実験
2015/09/17	Run04 地上対照実験 (顕微鏡制御 PC 不調のため再度実施)
2015/09/18	Run06 地上対照実験 (レンズ間違いのため再度実施)
2015/10/22	Run07 地上対照実験
2015/12/04	Run09 地上対照実験
2015/12/10	Run08 地上対照実験
2015/12/18	Run10 地上対照実験
2016/02/05	Run05 地上対照実験
2016/02/19	Run04 地上対照実験
2016/03/04	Run06 地上対照実験

3. 実験準備・運用

2012 年 2 月 15 日に、「きぼう」船内実験室第 2 期利用テーマ追加募集の実験候補テーマに採択された。ただし、選定に付帯する条件として、「数多くの微小管結合タンパク質の中から、どのような理由から MAP65 のみに着目したかを明確にする必要がある。」、ならびに、「蛍光観察だけでは定量的な解析が困難であることから、実験結果に定量性を与えられるような工夫が必要である」がついた。当初の計画では、微小管の構成要素であるチューブリンと MAP65 を蛍光タンパク質によって可視化した植物を用いて、表層微小管の動態と MAP65 のレベル変化を解析する予定であったが、付帯条件に対応するために、MAP65 だけでなく、他の微小管結合タンパク質も解析対象とし、重力による茎の形態変化における微小管結合タンパク質の役割の解明を目指すこととした。また、定量的な解析に関しては、構成的に発現するプロモーターを利用して微小管結合タンパク質を発現させた植物を対照とし、定量化を試みることとした。さらに、Resist Tubule 宇宙実験(代表研究者：保尊隆享教授)において、器官や光条件が異なるものの、遺伝子発現の網羅的解析を行うことから、本実験の解析に、遺伝子発現の結果を利用することを検討することとした。

提案時に準備していたシロイヌナズナの遺伝子組換え体は、同一個体内で、微小管の構成要素である α -チューブリン 6(TUA6)と GFP の融合タンパク質と、MAP65-1、または、MAP65-2 と赤色蛍光タンパク質(mCherry)の融合タンパク質を発現させたものであった。これらのラインでは、同一個体内で強制発現させた GFP-TUA6 を内部標準とし、mCherry-MAP65-1/MAP65-2 のレベルを解析することができた。実験候補テーマに採択後に、「きぼう」に搭載の蛍光顕微鏡の地上モデルを用いて、これらのラインの蛍光を観察したところ、ほとんど蛍光が観察されなかった。また、「きぼう」の蛍光顕微鏡には、mCherry 用のフィルターがなく、打ち上げのリソースを準備できないことから、使用するラインを GFP のみとし、「きぼう」の蛍光顕微鏡で観察できるラインを選別することにした。その結果、作成済みのラインから、蛍光強度が高く、コントラストの高い GFP-TUB6、BPP1-GFP、SP1L3-GFP、SPR2-GFP を使用することとした。また、MAP65 に関しては、新たに、GFP ラインを作製し、蛍光強度が高く、コントラストの高いものを選別した。その結果、MAP65-1 では、「きぼう」の蛍光顕微鏡で観察可能なラインが入手出来たが、MAP65-2 では準備できなかったため、MAP65-1 のみを使用することとした。

上述のように選抜した GFP ラインが、野生型と同様に過重力環境下で茎が太く短くなり、また、微小管や微小管結合タンパク質の動態変化を観察できるかを確認した。その結果、すべての GFP ラインにおいて、野生型と同様に、サブアピカル領域(胚軸長において頂端から約 20%の領域)において、300 g の過重力によって、伸長成長が抑制され、肥大成長が促進された(図 3-1)。また、表層微小管の配向を調べたところ、すべてのラインで、野生型と同様に、特に、サブアピカル領域において、過重力によって、横向き微小管を持つ細胞の割合が減少し、縦向き微小管を持つ細胞の割合が増加した(図 3-2)。さらに、過重力によって、MAP65-1 のレベルが減少することを、GFP-MAP65-1 を用いて解析することが出来た(図 3-3)。以上の結果は、Murakami et al. (2016)において報告した。

本実験が実験候補テーマに採択された「きぼう」第 2 期船内実験室利用テーマ追加募集では、第 2 期利用期間後半に生ずる可能性のある隙間の利用時間を最大限に活用することを目的に、短期間で準備を行うことが条件となっていた。上述のように、MAP65 のラインに関しては、作製に時間が必要であったことから、全 10 回の Run の試料の打ち上げを 2 回にわけ、MAP65 を含む 5 つの Run を後半に実施することとした。すなわち、前半の 5 つの Run では、GFP-TUB6、BPP1-GFP、SP1L3-GFP を、後半の 5 つの Run では、BPP1-GFP、SPR2-GFP、GFP-MAP65-1 を解析することとした。前半の試料は、候補テーマに採択から 1 年半の 2013 年 8 月 4 日に HTV4 によって打ち上げられ、後半の試料は、2014 年 9 月 21 日に SpX-4 によって打ち上げられた。

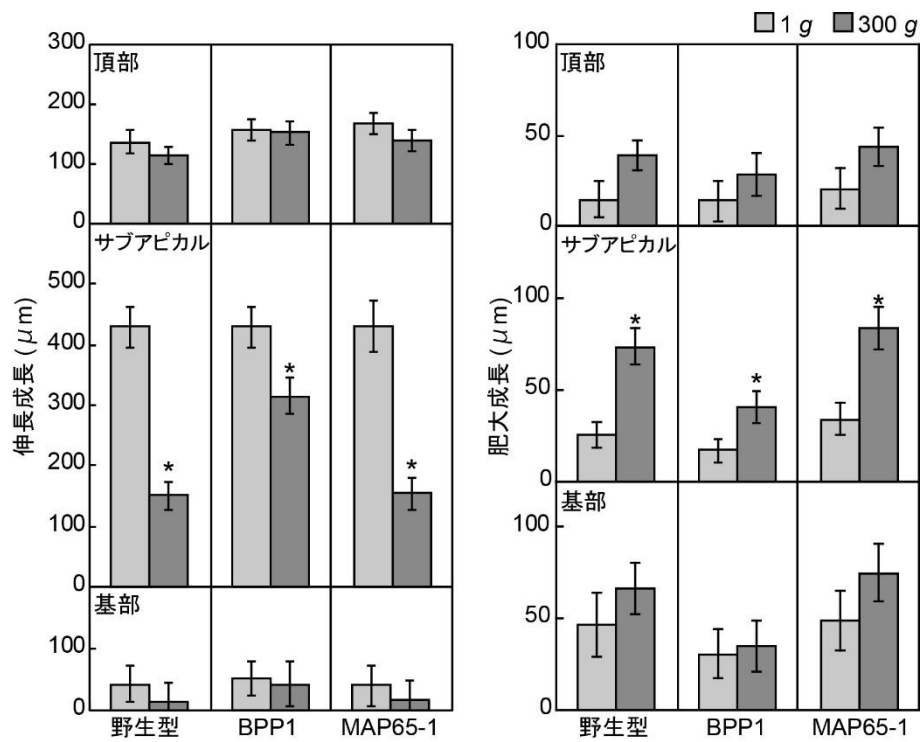


図 3-1 GFP ラインにおける胚軸の伸長成長と肥大成長に対する過重力の影響

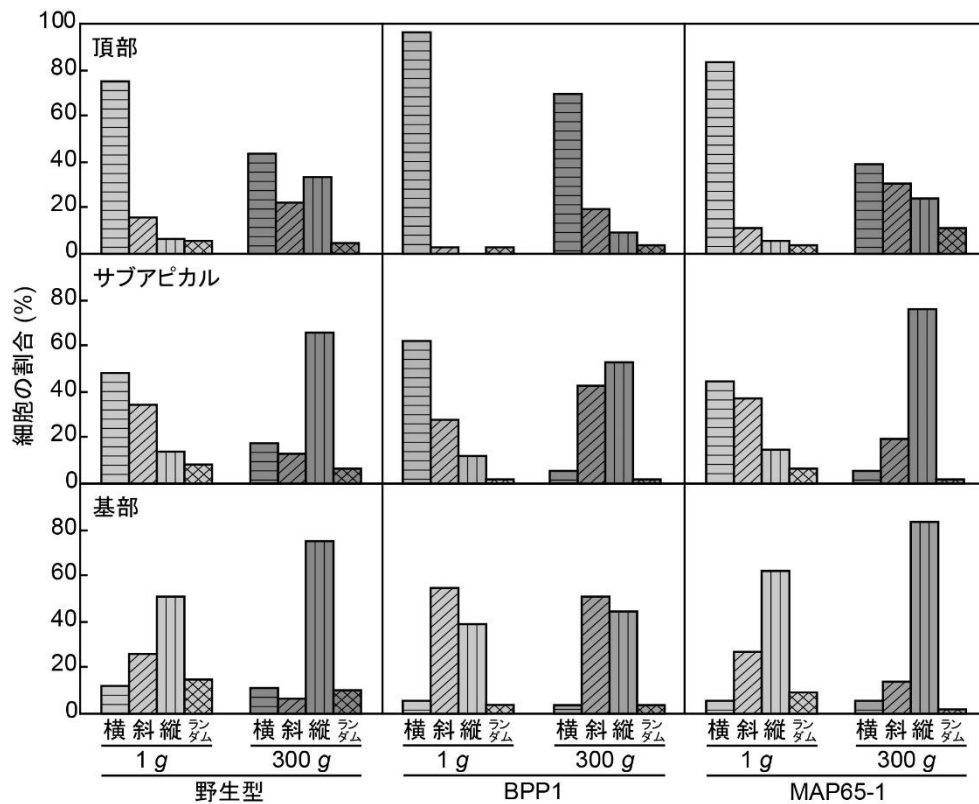


図 3-2 GFP ラインにおける表層微小管の配向に対する過重力の影響

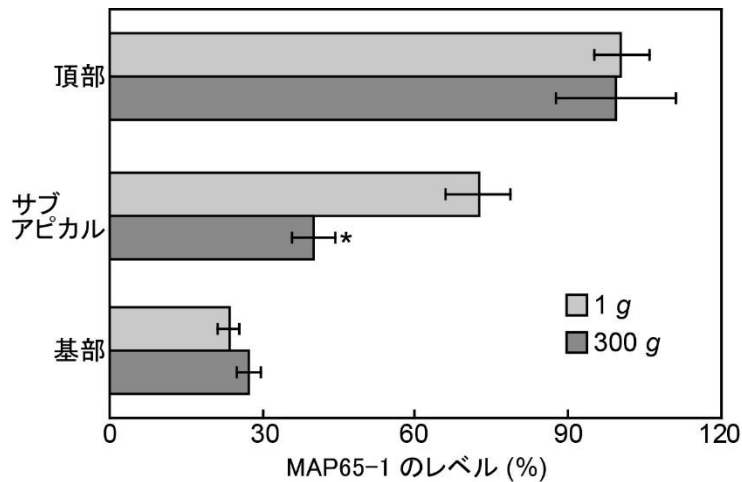


図 3-3 MAP65-1 のレベルに対する過重力の影響

先ほども述べたように、本実験は短期間で準備を行うことが採択条件となっていたため、栽培容器をはじめとして、実験に必要なものは、すべて、既存のものを使用する必要があった。栽培容器は、JAXA によって既に開発されていた Cultivation/Observation Chamber を利用することにした。この栽培/観察容器には、カバーガラスとスライドガラスが装着されており、ネジで容器内の体積を減じ、プレパラートとして顕微鏡観察に用いることができるものである。2013 年 6 月 17 日に、筑波宇宙センターにおいて、顕微鏡観察の条件検討を行うために、容器に水を封入し、ネジを締めていたところ、カバーガラスが割れてしまった。宇宙でガラスが割れることがあれば、非常に危険であるので、割れた原因を検討した。その結果、容器内に入れた水の逃げ場がなく、カバーガラスの、特に、中央部が膨らみ、破損した可能性が高いことが示された。水を封入せずに、容器の体積を減じ、カバーガラスとスライドガラスの隙間の厚さを測定したところ、83~158 μm であり、容器によって大きなばらつきがあった。また、カバーガラスの中央部は、水を入れて膨らむと、260 μm 程度の厚さになることがわかった。これらのことから、本実験では、カバーガラスの破損を避けるために、隙間の厚さが 100 μm 以上のものを使用することとなった。軌道上実験に用いた容器の隙間は、106~141 μm で、平均値は、122.6 μm であった。胚軸の太さは、200 μm 程度であり、カバーガラスが最も膨らんだところでは、カバーガラスとスライドガラスの距離が 400 μm 程度になるものもあった。本実験に用いる顕微鏡は倒立型であり、地上では、重力により試料は、カバーガラス側に落ちてくるが、宇宙では、試料がカバーガラス側に落ちてこず、プレパラート内を浮遊することが予想された。実際、宇宙では、z 軸方向の撮影を行っても、試料が動き、焦点があった画像が得られないこともあった。

2013 年 11 月 26 日に実施された Run01 において、20 倍の対物レンズでの蛍光観察の後に、63 倍の対物レンズを用いて画像を取得しようとしたところ、栽培/観察容器に封入していた水が減少していた(図 3-4 上段)。観察開始から、約 30 時間が経過していたが、地上では、同程度の時間の観察を行っても、これほどの水の減少は見られなかった。「きぼう」の顕微鏡は、ラック内に収納されており、ラック内が強制換気されていた。容器には、2 カ所のフィルターがあり(図 3-5)、そのフィルターに風が当たることで、水が大きく減少することがわかった。フィルター部をカプトンテープにより封ずると、容器に風が当たっても、水の減少が少なくなった。そこで、Run02 以降の実験では、フィルター部をカプトンテープで封ずることとした。その結果、Run02 以降の実験では、図 3-4 下段のように、20 倍の対物レンズでの蛍光観察の後でも、水が十分に残っていた。

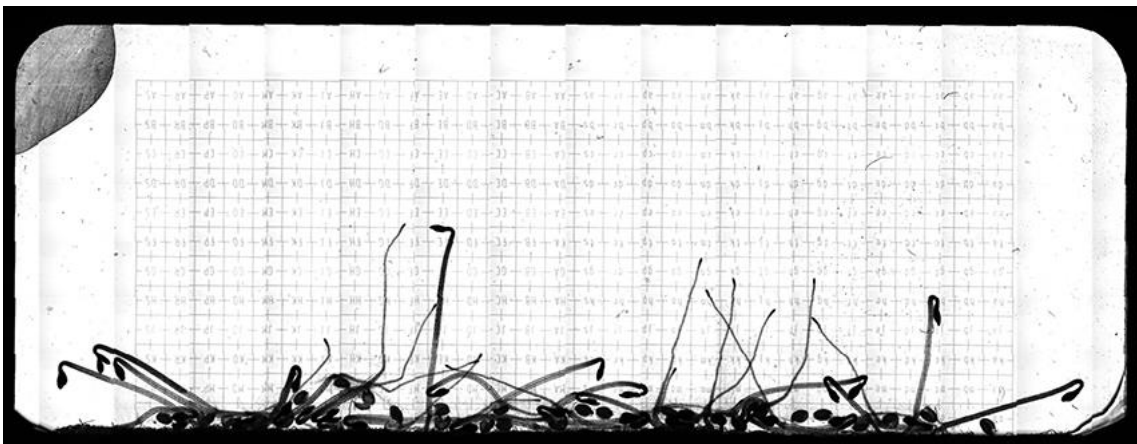
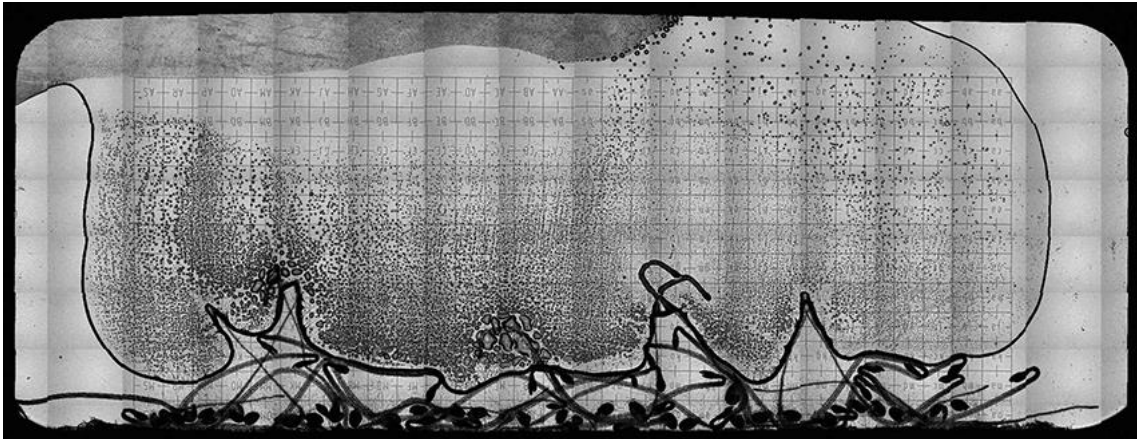


図 3-4 観察終了時の栽培/観察容器内の様子

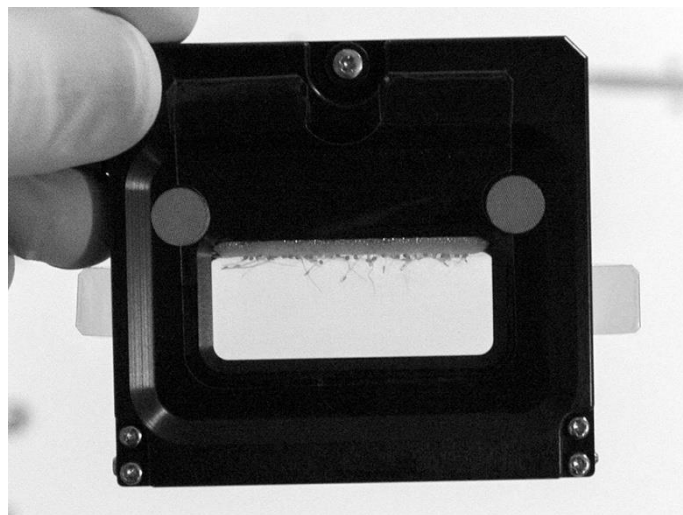


図 3-5 栽培/観察容器

Run01 では、画像データの取得方法に関してもさまざまな注意点が得られた。初回の Run ということもあり、1 本の胚軸ができる限り同一の観察枠に入るように観察枠を大きくした。また、気中に伸長している根の像も撮影しようと、根も観察枠に入れるようにした。そのため、観察枠が非常に大きくなった。ひとつの観察枠は、ひとつのフォルダーに保存されることになっていたが、4 GB を超えるフォルダーは、フォルダーを 2 つに分割しないと地上にダウンリンクできないことがわかった。また、一度にダウンリンクできる容量は、20 GB という制限があることがわかった。さらに、当然ながら、観察枠を大きくすると、撮影に時間が非常に長くなることがわかった。これらの情報を元に、Run02 以降では、観察枠のファイルサイズを考慮しながら、できる限り観察枠を小さくすることとした。すなわち、1 本の胚軸をいくつかの観察枠に分割して撮影することとした。また、根の撮影は行わないこととした。

Run05～07 では、栽培/観察容器が顕微鏡のステージにきちんとセットされておらず、焦点をあわせるのが難しかったり、焦点があわなかったりした。原因を解析したところ、栽培/観察容器の吸水ポートが顕微鏡のステージと干渉して、容器がステージからずれてしまう可能性が考えられた。そこで、以降の Run では、ステージに容器を取り付けるフォルダーに、吸水ポートをカプトンテープにより固定することとした(図 3-6)。「きぼう」の顕微鏡には、2 種類の 20 倍の対物レンズが装着されている。蛍光像の取得は、蛍光像の取得に適した明るいレンズ(PLAN APO 20×/0.70 PH2 HC、作動距離 0.59 mm)を用いて行っていた。Run05 において、栽培/観察容器のフレームに近い、容器の端の方の試料の観察を試みたところ、z 軸を変えても、焦点が全くあわない、同じ画像が取得された。地上モデルの顕微鏡を用いながら、この原因を検証したところ、容器の端の方の試料を観察しようとすると、対物レンズと容器のフレームが接触することがわかった。容器の端の方は、カバーガラスとスライドガラスの間隔が小さく、きれいな画像を取得しやすいが、Run06 以降では、端の試料は基本的に観察しないこととした。非常に良い状態の試料がある場合は、蛍光観察には適していないが、容器とは接触しないレンズ(N PLAN 20×/0.35 PH1、作動距離 6.9 mm)を用いることとした。

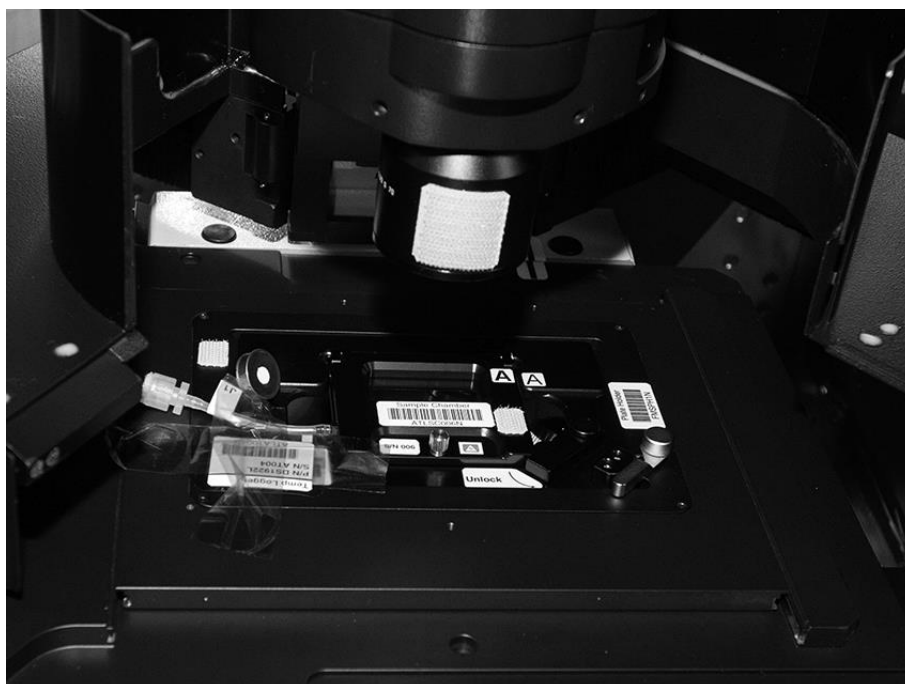


図 3-6 「きぼう」の蛍光顕微鏡にセットされた栽培/観察容器

4. 実験結果および成果

・発芽

前半の 5 つの Run では、GFP-TUB6、BPP1-GFP、SP1L3-GFP を、後半の 5 つの Run では、BPP1-GFP、SPR2-GFP、GFP-MAP65-1 の解析を実施した。前半の Run では、すべての Run において、重力環境にかかわらず、また、ラインにかかわらず、ほぼすべての個体が発芽した。後半の Run では、SPR2-GFP は、前半の Run と同様に、ほぼすべての個体が発芽したが、GFP-MAP65-1 では、Run によって、高い発芽率の時と低い時とがあった。また、前半の Run では発芽率の高かった BPP1-GFP が、後半の Run では発芽率が低く、特に、Run08 では、軌道上のものも地上のものも半分程度しか発芽しなかった。発芽率が低い Run では、顕微鏡観察時に、プレパラート中に多くの微生物が見られた。Run ごとには、発芽率にばらつきがあったものの、重力環境による差は見られなかった。また、すべての Run の結果をまとめて、ラインごとに比較すると、いずれのラインでも、発芽率は、重力環境にかかわらず、約 85%であった。

・成長

発芽率は、地上と宇宙で差はなかったが、芽ばえの形態は、重力環境によって、大きく異なっていた(図 4-1, 4-2)。地上では、いずれのラインも、胚軸は多少の傾きはあるものの、重力の方向と反対方向にまっすぐ成長していた。ところが、宇宙で生育させた胚軸は、ラインにかかわらず、様々な方向を向いて成長していた。地上で生育させた芽ばえの根は、支持体(セルロース製不織布)の表面を這うように成長していた。一方、宇宙の根は、様々な方向を向いており、気中に向かって伸長しているものもあった。宇宙での植物の形態に関しては、様々な宇宙実験において調べられている。コムギの幼葉鞘や、エンドウ、および、アズキの上胚軸は、種子から離れていく方向に成長した(8, 20)。ところが、イネの幼葉鞘は、種子側に曲がって成長した(11, 18)。キュウリの胚軸は、まっすぐに成長したが、シロイヌナズナの胚軸は、様々な方向に成長した(8, 11)。本実験においても、シロイヌナズナの胚軸は、様々な方向に成長した(図 4-1, 4-2)。これらの結果から、宇宙での植物の成長方向は、植物種や茎器官によって異なることが示された。



図 4-1 宇宙で生育させたシロイヌナズナ

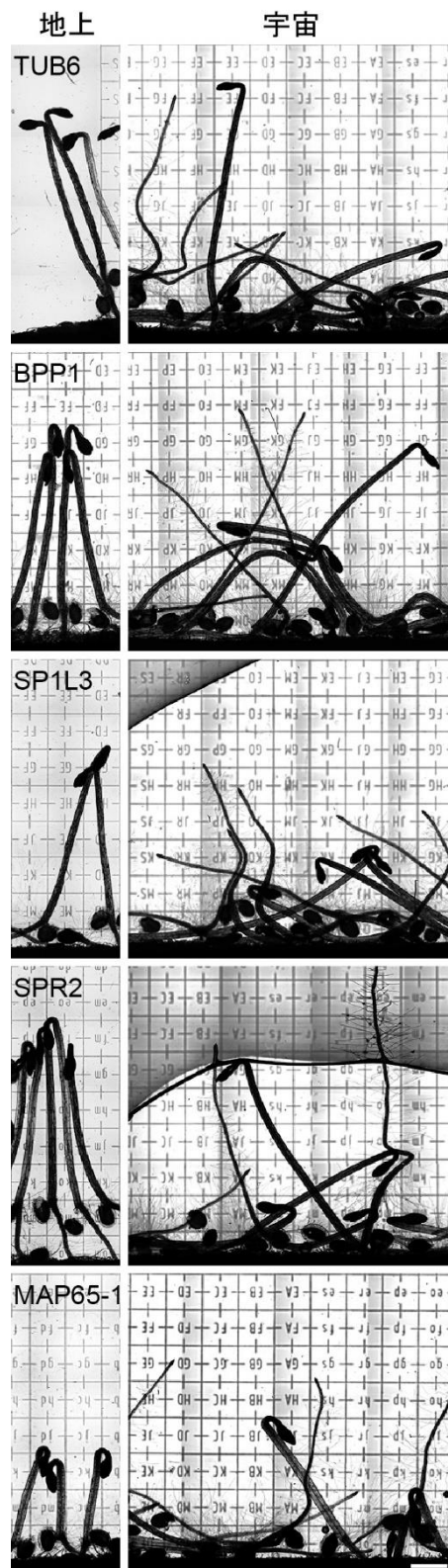


図 4-2 地上と宇宙で生育させたシロイヌナズナ

図 4-3 の左側のパネルは、地上、または、宇宙で生育させた胚軸の長さの実測値を示している。まず、地上での GFP ラインの胚軸の長さを比較すると、GFP-TUB6、BPP1-GFP、SP1L3-GFP、SPR2-GFP の胚軸の長さには、大きな差はなかったが、GFP-MAP65-1 は、他のラインより少し短かった。実験準備の際には、他のラインや野生型と胚軸の長さに大きな差はなかった。プレパラート中に微生物が見られた Run では、発芽率が低く、胚軸の成長も悪かったことから、実験準備の際と違い、胚軸の成長が悪かったのは、微生物の混入が影響しているのかもしれない。地上と宇宙で生育させた胚軸の長さを比較すると、すべての GFP ラインにおいて、宇宙で育てた胚軸の長さが有意に長かった(t 検定, $P < 0.05$)。図 4-3 の右側のパネルは、胚軸の長さを地上対照に対するパーセントで示している。宇宙で生育させた胚軸の伸長成長は、ラインにかかわらず、約 15% の促進が見られた。研究代表者らは、BRIC-RICE 実験において、野生型の胚軸の伸長成長が促進されることを報告している(16, 17)。また、Resist Tubule 実験においても、宇宙で野生型のシロイヌナズナの胚軸の伸長成長が促進されることが示された(21)。これらの結果は、本実験で使用した 5 つの GFP ラインが、野生型と同様に重力に応答することを示している。また、宇宙では、シロイヌナズナ花茎の伸長成長も促進された(15, 21)。これらの知見は、シロイヌナズナでは、微小重力により、胚軸と花茎の両地上器官の伸長成長が促進されることを示している。微小重力は、伸長成長だけでなく、肥大成長にも影響を与えた。宇宙で生育させた胚軸の直径は、すべての GFP ラインで約 15%減少した(図 4-4)。地上と宇宙で生育させた胚軸の太さの違いは、すべての GFP ラインで、統計的に有意な差であった (t 検定, $P < 0.05$)。まとめると、宇宙の微小重力環境では、伸長成長は促進されたが、肥大成長は抑制された。すなわち、宇宙では、シロイヌナズナの胚軸は、細く長くなった。

・表層微小管の動態

シロイヌナズナ胚軸の表皮は、上から下まで約 20 個の細胞で構成されている。また、伸長成長は、頂端からサブアピカル領域で起こる。さらに、過重力によるシロイヌナズナ胚軸の成長方向の変化(伸長成長の抑制、肥大成長の促進)は、主に、サブアピカル領域で見られた(図 3-1)。また、サブアピカル領域では、頂端や基部に比べて、過重力による表層微小管の配向変化が大きかった(図 3-2)。しかしながら、宇宙の微小重力環境において、成長方向や表層微小管の配向の変化がサブアピカル領域のみで見られるかは、わからない。そこで、胚軸全体の蛍光像を取得し、頂部から基部の全細胞の成長と表層微小管の配向を解析することを計画した。栽培/観察容器には、30 個体の芽ばえがあり、すべての個体の全領域を観察するためには、平均 22 枠の、また、多い Run では 40 枠の観察枠を設定する必要がある。また、すべての観察枠の画像を取得するためには、半日から 1 日の時間を要した。そのため、頂部からサブアピカル領域を撮影した後に、中央部から基部にかけての領域の画像を取得することとした。得られた画像を確認すると、プレパラート作製から時間が経つにつれて、表層微小管が断片化し、撮影終了に近いものでは、蛍光はほとんど観察されなかった。正常な表層微小管は、観察開始後から約 7 枠程度の観察枠でしか観察されなかった。そのため、中央部や基部の領域の蛍光像を取得することはできなかった。また、頂部では、ほとんどの画像で、ハレーションが起こっており、表層微小管の動態を解析することはできなかった。したがって、本実験では、サブアピカル領域のみを解析することとした。

研究代表者らは、本実験で用いた GFP ラインの GFP 融合タンパク質が表層微小管上に局在しており、表層微小管の配向解析に利用できることを報告している。しかしながら、微小重力によって、GFP 融合タンパク質の局在が変化する可能性があった。そこで、まず、GFP 融合タンパク質の局在を調べた。図 4-5 は、地上、または、宇宙で生育させた胚軸のサブアピカル領域の表皮細胞における GFP 融合タンパク質の蛍光像である。GFP 融合タンパク質の局在は、地上で生育させた芽ばえと、宇宙で生育させたものとの、ほとんど変わらなかった。すなわち、重力環境にかかわら

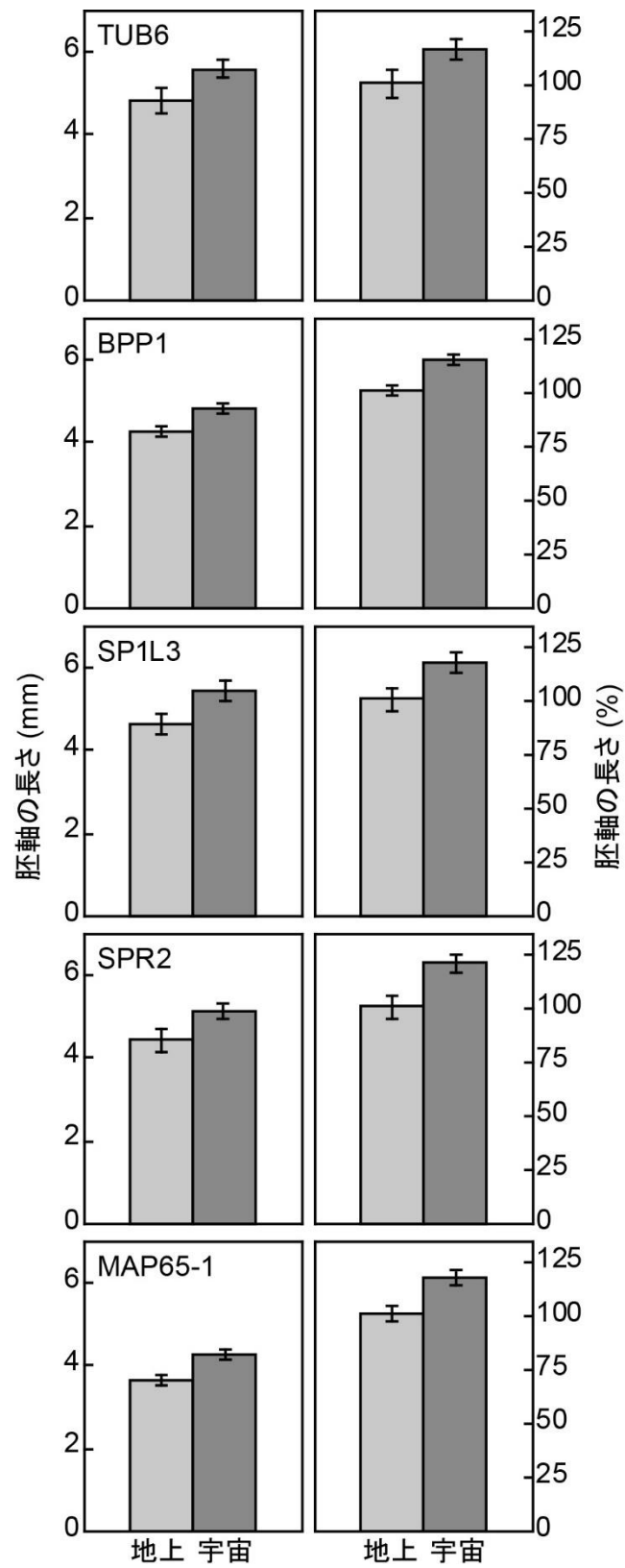


図 4-3 胚軸の長さに対する微小重力の影響

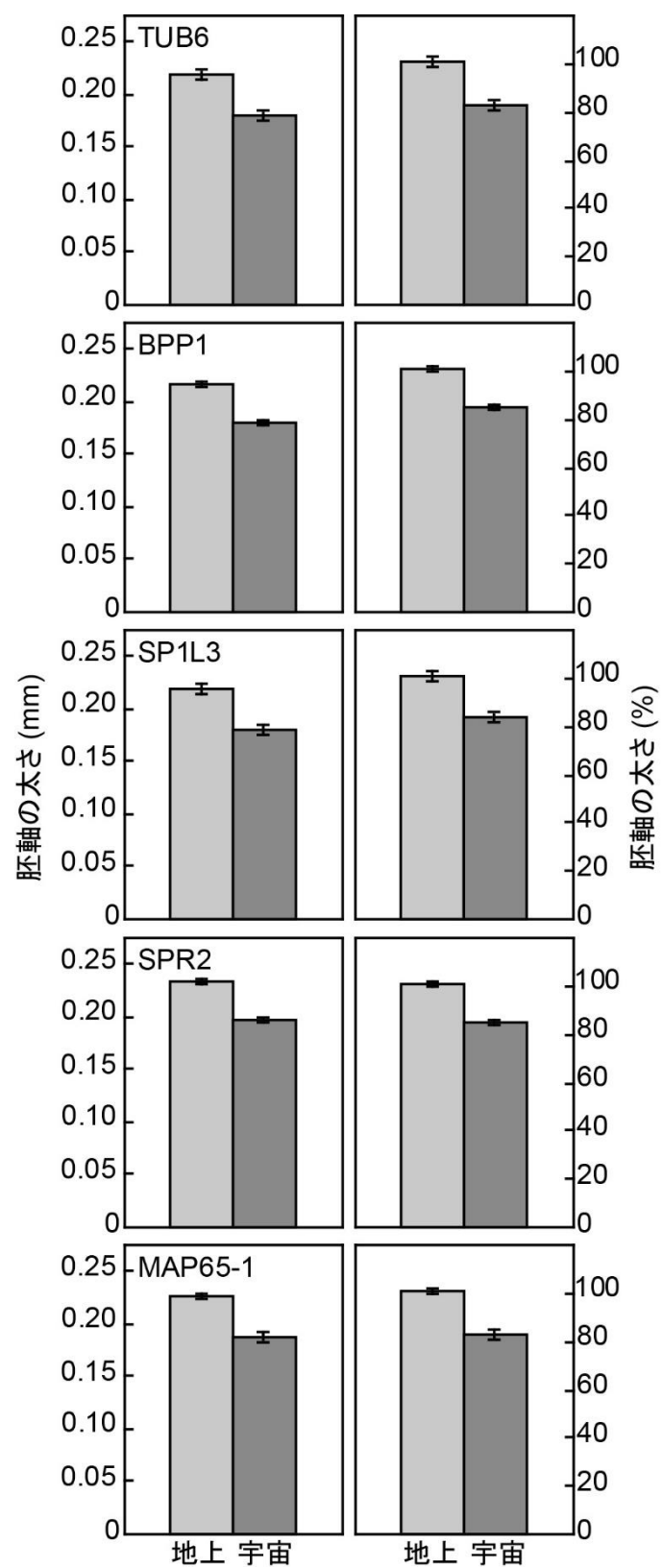


図 4-4 胚軸の太さに対する微小重力の影響

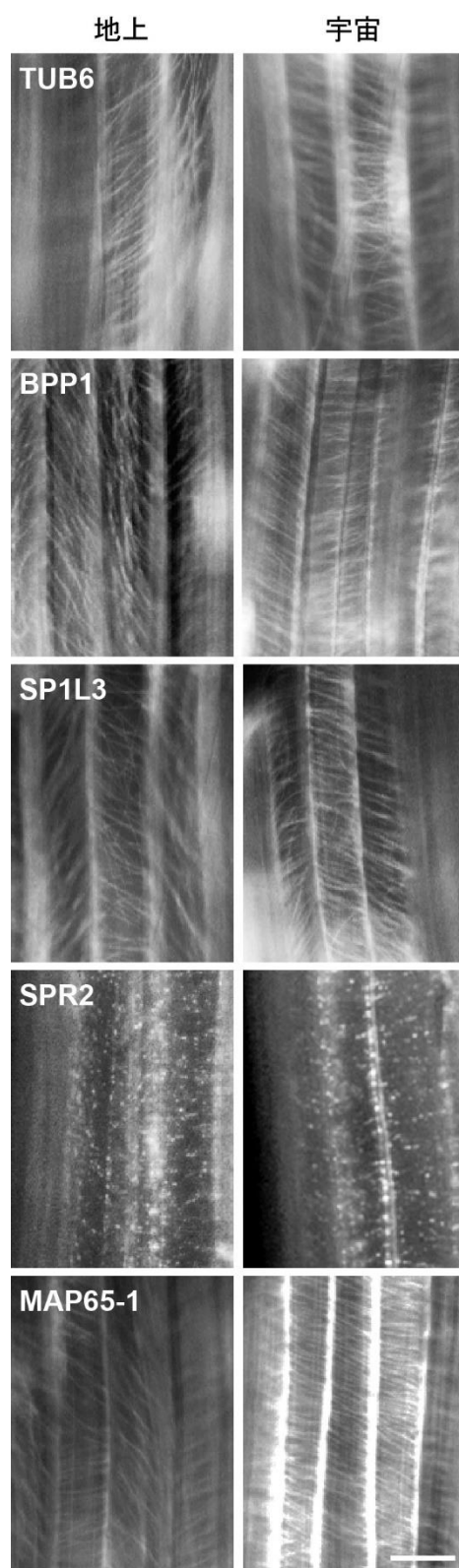


図 4-5 表層微小管の蛍光画像

ず、GFP-TUB6、ならびに、BPP1-GFP、SP1L3-GFP、GFP-MAP65-1 の GFP 蛍光は繊維状に観察され、SPR2-GFP の GFP 蛍光はドット状に観察された。これらの結果から、本実験に用いた 5 つのラインは、宇宙で生育させた場合でも、表層微小管の配向解析に利用できることが示された。

多くの茎器官の表皮細胞では、表層微小管の配向が細胞ごとにおおむね揃っている。そこで、細胞を細胞短軸に対して平行(横向き: $0 \sim 20^\circ$), 斜め($20 \sim 70^\circ$), 直角(縦向き: $70 \sim 90^\circ$), そして、ランダムな向きの表層微小管を持つものの 4 通りにわけ、おのおののパターンの割合を算出した(図 4-6)。地上で生育させた胚軸では、GFP ラインによって、傾向はわずかに異なるものの、横向きの微小管を持つ細胞の割合が高かった。地上の胚軸と同様に、宇宙の胚軸でも、すべてのラインにおいて、横向きの微小管を持つ細胞の割合が最も高かった。しかしながら、横向きの微小管を持つ細胞の割合は、どのラインでも、地上の胚軸より、宇宙の胚軸の方が約 20%高かった。また、斜めの微小管を持つ細胞の割合は、すべてのラインにおいて、宇宙で生育させた胚軸で低下した。これらの結果は、微小重力によって、微小管の配向変化が起こっていることを示している。このことをさらに確かめるために、表層微小管の角度を細胞短軸を 0° として測定した(図 4-7)。地上で生育させた胚軸の表層微小管の角度は、GFP ラインによって、わずかにばらつきがあり、 $28 \sim 37^\circ$ であった。宇宙で生育させたものでは、角度が低下し、 $19 \sim 24^\circ$ になった。十分な細胞数が観察できた BPP1-GFP($n = 158 \sim 191$)、ならびに、SPR2-GFP($n = 39 \sim 82$)、GFP-MAP65-1($n = 59 \sim 148$)では、統計的に有意な差が認められた(t 検定, $P < 0.05$)。一方、あまり多くの細胞を観察できなかった GFP-TUB6($n = 8$)、および、SP1L3-GFP ($n = 6 \sim 18$)では、有意差は認められなかったが、微小重力により角度が小さくなる傾向があった。これらの結果は、宇宙の微小重力環境では、表層微小管が、より横向きになることを示唆しており、実験開始時に設定した仮説を支持する結果である。

研究代表者らは、過重力により、茎の伸長成長が阻害され、一方、肥大成長が促進されることを報告してきた(1, 2)。また、過重力により、表層微小管が横向きから縦向き変化することをあきらかにした(3)。表層微小管の配向変化は、細胞の成長方向を制御している。すなわち、横向きの微小管を持つ細胞の割合が高いと、伸長成長が促進され、縦向きの微小管を持つ細胞の割合が高いと、肥大成長が促進される。これらのことから、過重力によって茎が太く短く(伸長成長の抑制、肥大成長の促進)なるのは、表層微小管の横向きから縦向きへの変化によると考えられる。本実験では、宇宙で、シロイヌナズナ胚軸が細く長く(伸長成長の促進、肥大成長の抑制)なるとき、横向きの表層微小管が増加した。これらの知見は、表層微小管の配向変化が、重力による茎の形態変化に関与していることを示している。

・微小管結合タンパク質のレベル

SPR2-GFP、ならびに、GFP-MAP65-1 では、自身のプロモーターにより融合タンパク質を発現させており、GFP 蛍光を測定することで、タンパク質レベルの変化を解析することができると考えられる。GFP 蛍光により、タンパク質レベルが測定できるかを確認するために、構成的に発現するプロモーターを用いて融合タンパク質を発現させている場合には、宇宙と地上のもので、GFP 蛍光に差がないことを、はじめに確認した。その結果、構成的プロモーターで融合タンパク質を発現させている GFP-TUB6、ならびに、BPP1-GFP、SP1L3-GFP では、地上と宇宙の蛍光強度に差は見られないことが確認できた。次に、自身のプロモーターにより融合タンパク質を発現させている SPR2-GFP、ならびに、GFP-MAP65-1 の蛍光強度を測定したところ、SPR2-GFP の蛍光強度は地上対照と変わらなかったが、GFP-MAP65-1 の蛍光強度は、微小重力環境において約 60%増加した(図 4-5, 4-8)。Resist Tubule 実験(研究代表者: 保尊隆享教授)においても、シロイヌナズナ胚軸の SPR2 タンパク質のレベルは、宇宙でも変化しないことが示されている(21)。また、Resist Tubule 実験では、シロイヌナズナ花茎の頂部、ならびに、基部において、遺伝子発現の網羅的な

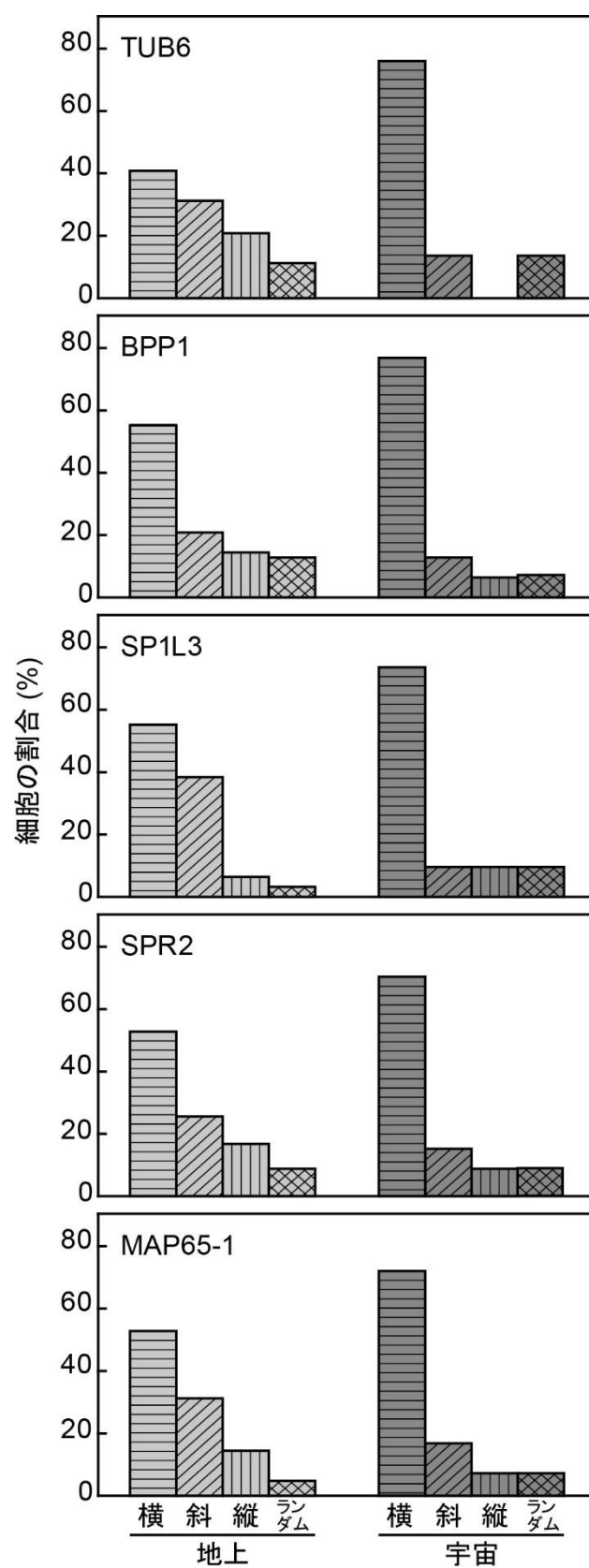


図 4-6 表層微小管の配向に対する微小重力の影響

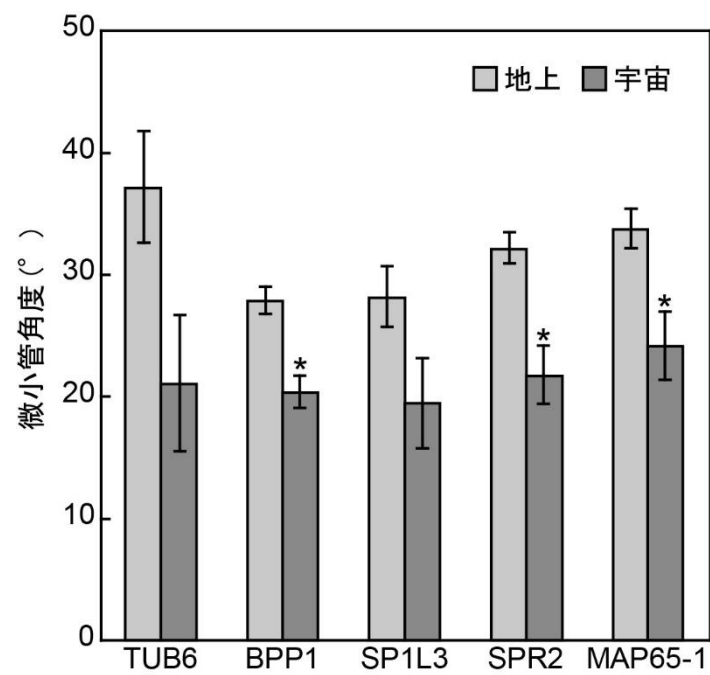


図 4-7 表層微小管の角度に対する微小重力の影響

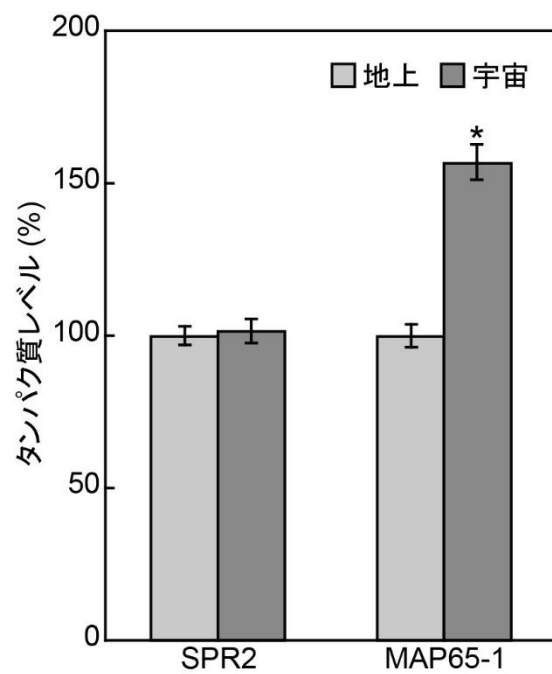


図 4-8 タンパク質レベルに対する微小重力の影響

解析が行われた。その結果、MAP65-1 の発現量が、特に、頂部で大きく変化することが示された。MAP65-1 の転写、ならびに、タンパク質レベルは、過重力により低下した(7, 図 3-3)。したがって、MAP65-1 のレベルは、宇宙の微小重力から過重力の非常に広いレンジで、重力の大きさによって制御されていると考えられる。

MAP65 ファミリータンパク質は、隣接する微小管同士を架橋する働きを持ち、また、微小管を横向きに維持するために必要である。たとえば、頂部の伸長成長が盛んで、微小管が横向きの細胞では、MAP65-1 のレベルが高く、基部の肥大成長が起こっており、微小管が縦向きの細胞ではレベルが低い。また、植物ホルモンのエチレンで処理をし、表層微小管が横向きから縦向きに変化する際には、MAP65-1 のレベルが低下した(7)。さらに、過重力により、表層微小管が横向きから縦向きに変化する時にも、MAP65-1 のレベルが低下した(7)。また、本実験により、微小重力により、横向きの微小管が増加する際に、MAP65-1 のレベルが上昇することが示された(図 4-8)。これらの知見は、MAP65-1 のレベルの変化が、表層微小管の配向調節に関与していることを示しており、実験開始時に設定した仮説を支持する結果である。

本実験では、微小管結合タンパク質のひとつである MAP65-1 のレベル上昇が、微小重力による微小管の配向制御に関与していることが示された。一方で、SPR2 は直接関与しないことが示された。また、研究代表者らは、MAP65-1 のレベル低下が、過重力による微小管の配向制御に関与していることを報告した(7)。さらに、 γ チューブリン複合体、ならびに、カタニンの一過的なレベル変化も過重力による微小管の配向制御に関与していることを示している(4~6)。また、Resist Tubule 実験の網羅的な解析によると、MAP65-1 だけでなく、MAP65-2 や MAP65-3 など、他の MAP65 ファミリーのレベルも、微小重力で変化することがあきらかになった。また、MAP65 以外にも、 γ チューブリン複合体やカタニンなど多くの微小管結合タンパク質のレベルが微小重力により変化した。一方で、SPR2 や EB1 など、そのレベルが変化しないものもあった。これらの知見は、重力による表層微小管の配向制御には、MAP65-1 など多くの微小管結合タンパク質のレベル変化が関与していることを示している。抗重力反応における微小管結合タンパク質の役割を詳細に解析するためには、さらなる宇宙実験が必要である。

・サクセスクライテリアと達成度

本実験では、「重力に耐える必要のない宇宙の微小重力環境下では、微小管結合タンパク質の働きにより、横向きの表層微小管を持つ表皮細胞の割合が増加し、茎が細く長い形態になる」という仮説を検証するために、チューブリンならびに微小管結合タンパク質を GFP で標識した 5 つのラインのシロイヌナズナ「きぼう」実験棟にて生育させ、胚軸の成長と表層微小管の動態を「きぼう」に搭載されている蛍光顕微鏡を用いて解析した。また、本実験を行うにあたって、表 4-1 のサクセスクライテリアを設定した。微小管結合タンパク質である BPP1 に GFP を融合したタンパク質を発現させたライン(BPP1-GFP)は、蛍光強度が高く、また、コントラストの高いため、「きぼう」の蛍光顕微鏡での観察に適している。このため、BPP1-GFP は、全 10 回のすべての Run において、解析対象とした。BPP1-GFP において、GFP 融合タンパク質の局在は、チューブリンを標識したラインである GFP-TUB6 などのラインと重力環境にかかわらず、同様であったため、宇宙においても、BPP1-GFP を利用して表層微小管の配向が解析できることが確認できた。本実験において、BPP1-GFP の胚軸が、宇宙で細く長くなる際に、横向きの表層微小管をもつ細胞の割合が増加することが確認できたため、ミニマムサクセスは十分に達成できたと思われる。また、GFP-TUB6 においても、同様の結果は得られたが、解析できた細胞数が少ないため、微小管の平均角度の低下には統計的に有意差は認められなかった。しかしながら、GFP-TUB6 の胚軸が、宇宙で細く長くなる際に、微小管の平均角度が低下する傾向が見られたことから、フルサクセスは達成できたと考えられる。SPR2-GFP、ならびに、GFP-MAP65-1 を利用した解析から、微小管結合タンパク質

表 4-1 本実験のサクセスクライテリアと達成度

サクセス	クライテリア	達成度
ミニマム	宇宙で「微小管結合タンパク質(BPP1)を蛍光観察することで、横向きの表層微小管を持つ表皮細胞の割合が増加して茎が細く長い形態になる」という仮説を検証できること。	◎
フル	上記に加えて、「表層微小管(TUB6)を蛍光観察することで、横向きの表層微小管を持つ表皮細胞の割合が増加して茎が細く長い形態になる」という仮説を検証できること。	○
エクストラ	地上での実験結果および、Resist Tubule 実験で得られた遺伝子発現データと組み合わせて、重力による茎の形態変化における表層微小管と微小管結合タンパク質の役割の解明がなされること。	○

のひとつである MAP65-1 のレベル上昇が、微小重力による横向きの微小管の増加に関与していることがあきらかになった。一方で、SPR2 は直接関与しなかった。Resist Tubule 実験においても、MAP65-1 のレベルは変化するが、SPR2 のレベルは変化しないことが示された。また、Resist Tubule 実験では、 γ チューブリン複合体やカタニンなど多くの微小管結合タンパク質のレベルが変化することがあきらかになった。地上において実施した過重力実験の結果、過重力によって、表層微小管が横向きから縦向きに変化する際に、MAP65-1 や γ チューブリン複合体、カタニンなどのレベルが変化することが示された。以上の知見から、植物は、微小重力から過重力の広いレンジで、微小管結合タンパク質のレベルを変化させ、表層微小管の配向を制御し、茎の形態を調節していると考えられ、エクストラサクセスは達成できたと思われる。

以上のように、本実験によって、植物にとって非常に重要な重力反応である抗重力反応における表層微小管と微小管結合タンパク質の役割があきらかになった。微小重力環境を利用した解析結果は、Physiologia Plantarum 誌において報告した。また、遠心過重力環境を利用した解析は、Biological Sciences in Space 誌において報告した。さらに、両論文の解説が、Plant Signaling & Behavior 誌に掲載された。また、本実験で確立したシロイヌナズナの栽培方法、ならびに、画像取得方法を、Methods in Molecular Biology シリーズの書籍にて報告した。

本実験によって、地上で観察される表層微小管の配向変化は、1 *g* の重力による反応が起こっている上での反応であることが示された。このことは、1 *g* の重力による反応によってマスクされているために、地上では見ることができない表層微小管の配向変化が存在する可能性を示している。このように、本実験で得られた知見は、植物形態学上の新たな視点をもたらしうと考えられる。また、宇宙では、表層微小管と微小管結合タンパク質の働きによって、宇宙で茎が細く長くなることから、人類が宇宙環境で長期間滞在する際に、植物を地上と同様な形態に維持するためには、表層微小管と微小管結合タンパク質の働きを改変する必要があることが示された。このように、本実験の成果は、将来の宇宙基地での植物栽培のためにも大いに役立つと考えられる。宇宙での効率的な植物栽培のための知識や技術は、地球上での植物生産の向上にも直結しており、本実験の成果は、食料問題や環境破壊の解決にも貢献できるかもしれない。

5. 結言

ISS・きぼう利用ミッション「重力による茎の形態変化における表層微小管と微小管結合タンパク質の役割 (Aniso Tubule)」により、以下の成果が得られた。

- (1) 宇宙の微小重力環境下では、シロイヌナズナ胚軸の伸長成長は促進されたが、肥大成長は抑制された。
- (2) 微小重力により、横向きの表層微小管を持つ表皮細胞の割合が増加した。
- (3) 表層微小管を横向きに維持する働きのある MAP65-1 のレベルは微小重力により増加した。
- (4) SPR2 のレベルは、重力環境にかかわらず一定であった。
- (5) 以上の結果により、「重力に耐える必要のない宇宙の微小重力環境下では、微小管結合タンパク質の働きにより、横向きの表層微小管を持つ表皮細胞の割合が増加し、茎が細く長い形態になる」という仮説が支持された。

[参考文献]

- 1) Soga K (2010) Gravity resistance in plants. *Biological Sciences in Space* 24: 129-134.
- 2) Soga K (2013) Resistance of plants to gravitational force. *Journal of Plant Research* 126: 589-596.
- 3) Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T (2006) Hypergravity induces reorientation of cortical microtubules and modifies growth anisotropy in azuki bean epicotyls. *Planta* 224: 1485-1494.
- 4) 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. *Journal of Plant Research* 121: 493-498.
- 5) Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T (2009) The transcript level of katanin gene is increased transiently in response to changes in gravitational conditions in azuki bean epicotyls. *Biological Sciences in Space* 23: 23-28.
- 6) Soga K, Yamaguchi A, Kotake T, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T (2010) Transient increase in the levels of γ -tubulin complex and katanin are responsible for reorientation by ethylene and hypergravity of cortical microtubules. *Plant signaling & behavior* 5: 1480-1482.
- 7) Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Hoson T (2012) Changes in the transcript levels of microtubule-associated protein MAP65-1 during reorientation of cortical microtubules in azuki bean epicotyls. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 533-540.
- 8) Hoson T, Soga K (2003) New aspects of gravity responses in plant cells. *International Review of Cytology* 229: 209-244.
- 9) Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T (2004) Graviperception in growth inhibition of plant shoots under hypergravity conditions produced by centrifugation is independent of that in gravitropism and may involve mechanoreceptors. *Planta* 218: 1054-1061.
- 10) Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T (2005) Mechanoreceptors rather than sedimentable amyloplasts perceive the gravity signal in hypergravity-induced inhibition of root growth in azuki bean. *Functional Plant Biology* 32: 175-179.

- 11) 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. *Journal of Plant Research* 112: 477-486.
- 12) Hoson T, Soga K, Mori R, Saiki M, Nakamura Y, Wakabayashi K, Kamisaka S (2002) Stimulation of elongation growth and cellwall loosening in rice coleoptiles under microgravity conditions in space. *Plant and Cell Physiology* 43: 1067-1071.
- 13) Hoson T, Matsumoto S, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T, Sonobe S, Muranaka T, Kamisaka S, Kamada M, Omori K, Ishioka N, Shimazu T (2007) The Outline and Significance of the Resist Wall Experiment: Role of Microtubule-Membrane-Cell Wall Continuum in Gravity Resistance in Plants. *Biological Sciences in Space* 21: 56-61.
- 14) Hoson T, Matsumoto S, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto T, Sonobe S, Muranaka T, Kamisaka S, Kamada M, Omori K, Ishioka N, Shimazu T (2008) The Resist Wall experiment on EMCS. *Journal of Gravitational Physiology* 15: 303-304.
- 15) 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 Biology* 16(S1):91-96.
- 16) Soga K, Wakabayashi K, Hoson T, Kamisaka S (2001) Gravitational force regulates elongation growth of Arabidopsis hypocotyls by modifying xyloglucan metabolism. *Advances in Space Research* 27: 1011-1016.
- 17) 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.
- 18) Wakabayashi K, Soga K, Hoson T, Kotake T, Yamazaki T, Higashibata A, Ishioka N, Shimazu T, Fukui K, Osada I, Kasahara H, Kamada M (2015) Suppression of hydroxycinnamate network formation in cell walls of rice shoots grown under microgravity conditions in space. *PLoS ONE* 10: e0137992.
- 19) Wakabayashi K, Soga K, Hoson T, Kotake T, Kojima M, Sakakibara H, Yamazaki T, Higashibata A, Ishioka N, Shimazu T, Kamada M (2017) Persistence of plant hormone levels in rice shoots grown under microgravity conditions in space: its relationship to maintenance of shoot growth. *Physiologia Plantarum* 161: 285-293.
- 20) Soga K, Biology Club, Kurita A, Yano S, Ichikawa T, Kamada M, Takaoki M (2014) Growth and morphogenesis of azuki bean seedlings in space during SSAF2013 program. *Biological Sciences in Space* 28: 6-11.
- 21) 保尊隆享(2017) ISS・きぼう利用ミッション研究成果報告書「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)」

[成果リスト]

論文

- 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 in Molecular Biology p. 307-319. doi: 10.1007/978-1-4939-2697-8_21.
- 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. Biological Sciences in Space 30: 1-7. doi: 10.2187/bss.30.1.
- Soga K, Yamazaki C, Kamada M, Tanigawa N, Kasahara H, Yano S, Kojo KH, Kutsuna N, Kato T, Hashimoto T, Kotake T, Wakabayashi K, Hoson T (2018) Modification of growth anisotropy and cortical microtubule dynamics in Arabidopsis hypocotyls grown under microgravity conditions in space. Physiologia Plantarum 162: 135-144 doi: 10.1111/ppl.12640 (Impact Factor: 3.33; ISI Journal Citation Reports Ranking: 2016: 32/211 (Plant Sciences))
- Soga K, Wakabayashi K, Hoson T (2018) Growth and cortical microtubule dynamics in shoot organs under microgravity and hypergravity conditions. Plant Signaling & Behavior 13: e1422468. doi: 10.1080/15592324.2017.1422468

学会発表

- Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Hoson T. Regulation by gravity of the transcript levels of MAP65 in azuki bean epicotyls. 39th Committee on Space Research Scientific Assembly, Mysore, July 2012.
- Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, 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, June 2013.
- 曾我康一、村上 愛、小竹敬久、加藤壮英、橋本 隆、鎌田源司、山崎千秋、片平ひとみ、鈴木ひろみ、伏島康男、嶋津 徹、笠原春夫、長田郁子、矢野幸子、若林和幸、保尊隆享. Aniso Tubule 宇宙実験: 重力による茎の形態変化における表層微小管と微小管結合タンパク質の役割. 日本宇宙生物科学会第 29 回大会、東京、2015 年 9 月.
- 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 9 月.
- 曾我康一、山崎千秋、鎌田源司、谷川直樹、笠原春夫、矢野幸子、湖城 恵、朽名夏麿、加藤壮英、橋本 隆、小竹敬久、若林和幸、保尊隆享. 宇宙の微小重力環境におけるシロイヌナズナ胚軸の成長と表層微小管動態—Aniso Tubule 宇宙実験. 日本植物学会第 81 回大会、野田、2017 年 9 月.
- 曾我康一、山崎千秋、鎌田源司、谷川直樹、笠原春夫、矢野幸子、湖城 恵、朽名夏麿、加藤壮英、橋本 隆、小竹敬久、若林和幸、保尊隆享. Aniso Tubule 宇宙実験: シロイヌナズナ胚軸の成長と表層微小管動態に対する微小重力の影響. 日本宇宙生物科学会第 31 回大会、前橋、2017 年 9 月.

「重力による茎の形態変化における表層微小管と微小管結合タンパク質の役割(Aniso Tubule)」

平成29年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果(生命科学)

代表研究者；曾我康一(大阪市立大学)

総合評価

B: 目標を達成した(フルサクセス相当)

取得された数多くの画像データの解析に基づき、表層微小管の配向に関する傾向を明らかにした。先行研究である Resist Tubule 実験の実験結果を十分に補完し、フルサクセスが達成されたことは、高く評価できる。実験データがダウンリンク画像のみでサンプル回収がなく、また、余剰クルータイムの活用が前提となった隙間実験として設定された研究計画であったことを鑑みると、サクセスクライテリアの設定基準が高く、エキストラサクセスの達成は、困難であったと言える。

今後は、Resist Tubule 実験で得られた遺伝子発現データと組み合わせて解析を進めることで、重力による茎の形態変化における表層微小管の配向を制御するメカニズムの解明を期待する。

平成 30 年 2 月

きぼう利用テーマ選考評価委員会(生命科学)

ISS・きぼう利用ミッション

「重力による茎の形態変化における

表層微小管と微小管結合タンパク質の役割 (Aniso Tubule)」

研究成果概要書

代表研究者：曾我康一（大阪市立大学大学院理学研究科）

平成 29 年 9 月（平成 30 年 3 月改訂）

研究目標

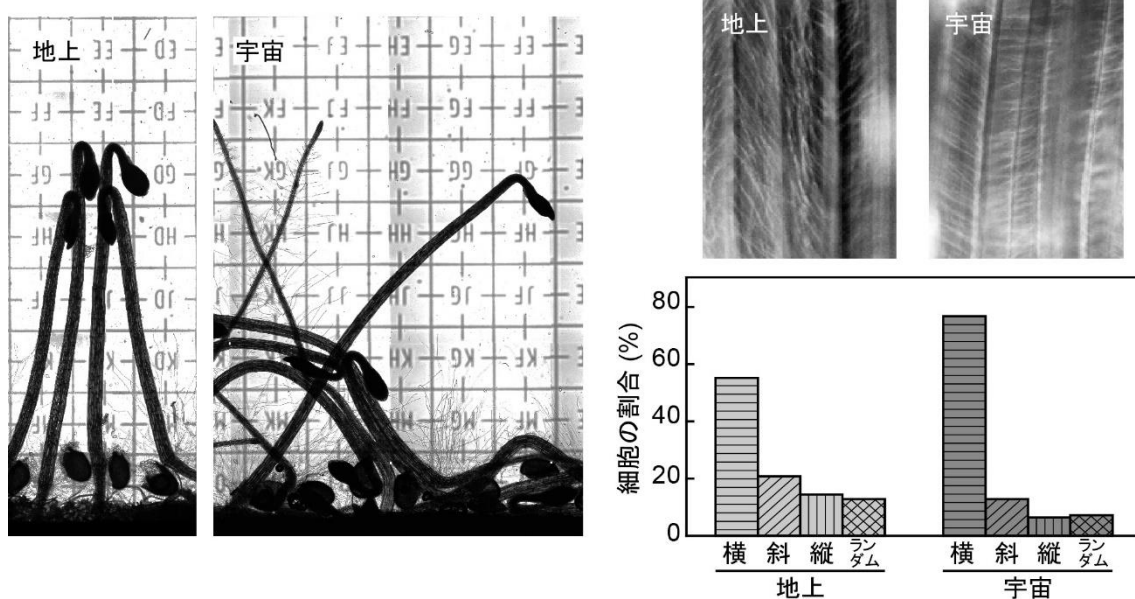
陸生植物が地上の 1 *g* 環境下で生きていくためには重力に対抗できる体を構築する必要がある。研究代表者らは、遠心過重力環境を利用した地上実験から、重力の大きさの対数に応じて、茎を太く短くすることが植物の重力に対抗するメカニズムのひとつであることを示してきた。また、茎の形態変化は、MAP65-1 などの微小管結合タンパク質の働きにより、細胞短軸に平行な細胞質表層微小管(横向きの微小管)を持つ細胞が減少することによってもたらされていることを明らかにした。本実験の目的は、重力に耐える必要のない宇宙の微小重力環境下では、微小管結合タンパク質の働きにより、過重力環境下とは逆に、横向きの表層微小管を持つ表皮細胞の割合が増加し、茎が細く長い形態になるという仮説を検証することであった。

実験内容

上記の仮説を検証するために、チューブリンならびに微小管結合タンパク質を緑色蛍光タンパク質(GFP)で標識した 5 つのラインのシロイヌナズナを国際宇宙ステーション「きぼう」実験棟にて生育させ、胚軸の成長と表層微小管の動態を解析した。胚軸の成長と表層微小管の動態は、「きぼう」に搭載されている蛍光顕微鏡を地上から操作し、画像を取得することにより解析した。本実験で使用した GFP ラインは、GFP-TUB6、BPP1-GFP、SP1L3-GFP、SPR2-GFP、GFP-MAP65-1 である。これらのうち、GFP-TUB6、BPP1-GFP、ならびに、SP1L3-GFP では、恒常的プロモーターにより融合タンパク質を発現させており、SPR2-GFP、ならびに、GFP-MAP65-1 では、自身のプロモーターにより融合タンパク質を発現させている。

実験成果

地上と宇宙で生育させた胚軸の長さを比較すると、すべての GFP ラインにおいて、宇宙で育てた胚軸の長さが有意に長かった。また、ラインにかかわらず、宇宙で生育させた胚軸の直径は、有意に減少した。すなわち、宇宙では、シロイヌナズナの胚軸は、細く長くなった。次に、表層微小管の配向を解析するために、細胞を細胞短軸に対して平行(横向き)、斜め、直角(縦向き)、そして、ランダムな向きの表層微小管を持つものの 4 通りにわけ、おのおののパターンの割合を算出した。その結果、すべてのラインで、重力環境にかかわらず、横向きの微小管を持つ細胞の割合が高かった。しかしながら、横向きの微小管を持つ細胞の割合は、どのラインでも、地上の胚軸より、宇宙の胚軸の方が約 20%高かった。また、斜めの微小管を持つ細胞の割合は、すべてのラインにおいて、宇宙で生育させた胚軸で低下した。さらに、細胞短軸に対する表層微小管の角度を測定したところ、宇宙で生育させたものでは、角度が低下した。また、SPR2-GFP と GFP-MAP65-1 のタンパク質レベルを測定するために、GFP 蛍光の強度を測定したところ、SPR2-GFP の蛍光強度は地上対照と変わらなかったが、GFP-MAP65-1 の蛍光強度は、微小重力環境において約 60%増加した。以上の結果から、微小重力環境下で生育させたシロイヌナズナでは、微小管を横向きにする働きのある MAP65-1 のレベルが上昇して、横向きの表層微小管が増加することにより、胚軸が細く長くなったと考えられ、実験開始時に設定した仮説が支持された。



BPP1-GFP の形態と表層微小管の配向

成果の意義

本実験によって、茎の形態変化における表層微小管と微小管結合タンパク質の役割があきらかになった。また、地上で観察される表層微小管の配向変化は、 $1g$ の重力による反応が起こっている上での反応であることが示された。このことは、 $1g$ の重力による反応によってマスクされているために、地上では見ることができない表層微小管の配向変化が存在する可能性を示している。このように、本実験で得られた知見は、植物形態学上の新たな視点をもたらさうと考えられる。また、宇宙では、表層微小管と微小管結合タンパク質の働きによって、宇宙で茎が細く長くなることから、人類が宇宙環境で長期間滞在する際に、植物を地上と同様な形態に維持するためには、表層微小管と微小管結合タンパク質の働きを改変する必要があることが示された。このように、本実験の成果は、将来の宇宙基地での植物栽培のためにも大いに役立つと考えられる。宇宙での効率的な植物栽培のための知識や技術は、地球上での植物生産の向上にも直結しており、本実験の成果は、食料問題や環境破壊の解決にも貢献できるかもしれない。

業績

- Soga K et al. (2015) Hypergravity experiments to evaluate gravity resistance mechanisms in plants. In Plant Gravitropism: Methods and Protocols (Ed. Blancaflor EB). Methods in Molecular Biology p. 307-319. doi: 10.1007/978-1-4939-2697-8_21.
- Murakami M et al. (2016) Roles of MAP65-1 and BPP1 in gravity resistance of Arabidopsis hypocotyls. Biological Sciences in Space 30: 1-7. doi: 10.2187/bss.30.1.
- Soga K et al. (2018) Modification of growth anisotropy and cortical microtubule dynamics in Arabidopsis hypocotyls grown under microgravity conditions in space. Physiologia Plantarum 162:135-144. doi: 10.1111/ppl.12640
- Soga K et al. (2018) Growth and cortical microtubule dynamics in shoot organs under microgravity and hypergravity conditions. Plant Signaling & Behavior 13: e1422468. doi: 10.1080/15592324.2017.1422468

Summary report of the ISS-Kibo utilization mission,
“Roles of cortical microtubules and microtubule-associated proteins
in gravity-induced growth modification of plant stems (Aniso Tubule)”
Principal Investigator; Kouichi Soga (Osaka City University)
Sept., 2017 (Revised in Mar., 2018)

Background and Objectives

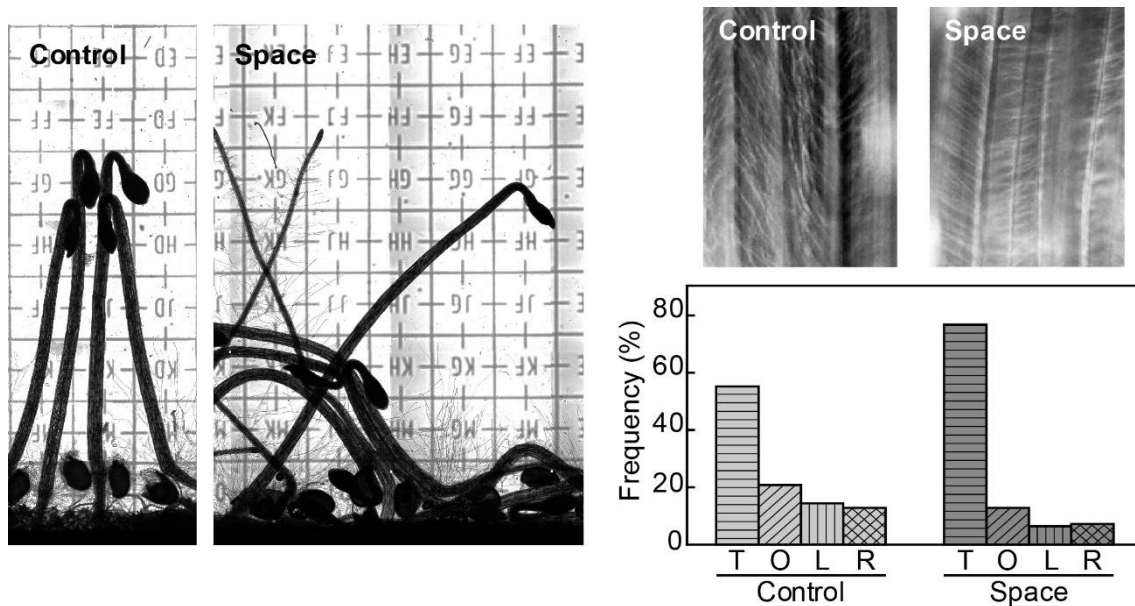
Resistance to the gravitational force is a critical response for terrestrial plants to survive under 1 *g* conditions. The ground-based experiments using conditions of centrifugal hypergravity have indicated that development of a short and thick body is the main mechanism that enables plants to grow against the gravitational force. We have also shown that regulation of cortical microtubule orientation by the action of microtubule-associated proteins (MAPs) such as MAP65-1 is involved in hypergravity-induced growth modification. From these results of hypergravity experiments, it is expected that plants would develop a long and thin body by changing the function of MAPs and the orientation of cortical microtubule under microgravity conditions in space.

Research Operations

To confirm the above hypothesis, we examined the effects of microgravity on the growth anisotropy and cortical microtubule dynamics in *Arabidopsis* hypocotyls, using lines in which microtubules are visualized by labelling tubulin or MAPs with green fluorescent protein (GFP). The growth anisotropy and dynamics of cortical microtubules in hypocotyls were analyzed using a fluorescence microscope equipped in the Kibo Module in the International Space Station (ISS), which was controlled from ground by commanding. Five GFP-expressing lines of *Arabidopsis* were used in the present study: GFP-TUB6-, BPP1-GFP- and SP1L3-GFP-expressing using a constitutive promoter, and SPR2-GFP- and GFP-MAP65-1-expressing using a native promoter.

Results

In all lines, the length of hypocotyls grown under microgravity conditions in space was longer than that grown at 1 *g* conditions on the ground. In contrast, the diameter of hypocotyls grown in space was smaller than that of the hypocotyls grown on the ground. Namely, hypocotyls became longer and thinner in space. The percentage of cells with transverse microtubules was increased in space, irrespective of the lines. Also, the average angle of the microtubules with respect to the transverse cell axis was decreased in hypocotyls grown in space. When the protein levels of MAP65-1 and SPR2, expressed by the native promoter, were determined by analyzing the strength of GFP fluorescence, microgravity increased the levels of MAP65-1, which is involved in the maintenance of transverse microtubule orientation. However, the levels of SPR2 in space were comparable to those on the ground. These results suggest that the up-regulation by microgravity of the levels of MAP65-1 is involved in increase in the transverse microtubules, which may lead to modification of growth anisotropy, thereby developing longer and thinner hypocotyls in space. The results of the present experiment support the hypothesis set at the start of the experiment.



Effects of microgravity on the growth anisotropy and cortical microtubule dynamics in BPP1-GFP line

Publication list

- 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 in Molecular Biology* p. 307-319. doi: 10.1007/978-1-4939-2697-8_21.
- 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. *Biological Sciences in Space* 30: 1-7. doi: 10.2187/bss.30.1.
- Soga K, Yamazaki C, Kamada M, Tanigawa N, Kasahara H, Yano S, Kojo KH, Kutsuna N, Kato T, Hashimoto T, Kotake T, Wakabayashi K, Hoson T (2018) Modification of growth anisotropy and cortical microtubule dynamics in Arabidopsis hypocotyls grown under microgravity conditions in space. *Physiologia Plantarum* 162:135-144. doi: 10.1111/ppl.12640
- Soga K, Wakabayashi K, Hoson T (2018) Growth and cortical microtubule dynamics in shoot organs under microgravity and hypergravity conditions. *Plant Signaling & Behavior* 13: e1422468. doi: 10.1080/15592324.2017.1422468

航空機利用微小重力実験ミッション
「生体自己組織化現象を介する重力効果の増幅発現」
研究成果報告書
代表研究者：最上善広（お茶の水女子大学）
平成 29 年 9 月

1. 実験の目的と概要

1.1 実験目的

これまで、重力は地球上での生命活動を規定する要因であり、生物の大きさやデザイン、さらにはその行動を制限する拘束的な作用力として捉えられてきた。この既成概念から離れ、重力が生体システムとの協同作用を通じて全く新しい能力(特性)を創出できる可能性を提示したい。本研究が目指すのは、個々の構成要素のレベルでは極微弱な応答(重力応答)が、要素間の協同作用と、その産物である動的不安定性を通じて、集団としての「思いもよらない特性」が発現されるという、新しい概念を証明しようとするものである。それによって、地球重力環境と、生命との関わり(発生・進化)を見通す、これまでにない新たな概念形成の萌芽をもたらし、宇宙環境利用の新たな側面を開拓できるものと考えている。

重力も含めた弱い外力の作用が協同現象と動的不安定性を通して増幅される可能性をはじめて示したのは、イリア・プリゴジンである。ノーベル化学賞の核になった研究をもとに、プリゴジンは非平衡状態にある反応系は、電場や重力場のような外部環境要因に対し高い感受性を持つことを指摘した。生命活動は非平衡状態の極めて複雑な反応系によって構成され、多くの動的不安定性を持っている。この特性を通して生命現象の中で重力の効果が増幅され、単なる束縛力以外の作用が発現されと考えられている([1], [2])。しかしながら、この魅力的な仮説は未だ実験的に検証されてはいない。

プリゴジンの仮説はレイリー・ベナール対流(熱対流)に対する理論的研究に基づいている。レイリー・ベナール対流では密度差に基づく空間パターンが形成されるが、それは温度差による流体の移動とそれに伴う重心の上昇がもたらした不安定性に起因する。上昇によるポテンシャルエネルギーの増加は熱ノイズに比べて大きいとは言えず、平衡状態ではその程度の重力の影響は現れない。しかし、温度差によって引き起こされた非平衡性(媒質密度分布の動的不安定性)のために重力の巨視的効果が、薄い液層(数 mm 程度)であっても明らかなパターンとなって出現する。非平衡性が重力の効果を拡大するのである。

一方、生命現象でもレイリー・ベナール対流に対応する、動的不安定性を伴うパターン形成現象—生物対流—が知られている。テトラヒメナやクラミドモナス等の微小生物をシャーレに入れると、はじめは均一に分布しているが、時間とともに次第に局所的な密度の偏りができ、最終的にはシャーレ全体にわたる一定の繰り返しパターンが形成される。レイリー・ベナール対流では、上方への駆動力は外から加えられた熱エネルギーであるのに対し、生物対流では個々の微生物の持つ重力走行行動を引き起こす運動エネルギーである。駆動エネルギーに違いがあるものの、これらが散逸する過程で空間パターンが形成されるという点において、両者は相同の現象である。

生物対流現象は、原生生物などの遊泳性の細胞が示す自己組織化の代表的な例としても知られている。負の重力走行性によって細胞が水面下に移動することにより、細胞を含む高密度の層が上部に形成される。これにより、上が高密度で、下が低密度の不安定な分布が形成される。この不安定な状態が臨界

点を超えると、細胞が塊となって落下する。落下に伴う下降流と、重力走性による上昇流の2つの流れにより、水平方向での密度の揺らぎが生じ、やがては細胞の疎密化に基づく巨視的パターンへと発展する。

生物学からの観点からすれば、生物対流を生み出す自己組織化の過程において、細胞間の相互作用が重要な働きを持つことは十分に想定しうる。しかしながら、これまでの研究は、細胞集団をひとつの連続体として捉え、流体物理学の観点からアプローチするものがほとんどであった。そこでは、対流パターンの形成単位となる細胞は単なる粒子成分であり、個々の細胞の挙動や、その間に生じる相互作用は考慮されていない。生物の現象でありながら非生物的な現象としての扱いに終始していたことになる。

このような研究の流れに対し、我々は生物対流現象における生物要素の重要性に着目した研究を行って来た。その手始めとして、生物対流現象の持つ重力応答特性を明らかにすることを目指し、遠心機を用いた過重力実験や、航空機による微小重力実験を行ってきた。その結果、パターン形成には重力閾値が存在することを明らかにし([3])、従来の理論研究の再考を促すこととなった。加えて、行動変異体が作る対流と比較解析することで、生物対流パターンの重力応答が、個々の細胞の遊泳活性に大きく依存することを、明らかにした([4])。これらの結果は、生物対流パターンの発現とその時間発展には、重力によって組織化された個々の細胞の運動特性が強く反映されていることを示唆している。

このことは、生物対流が生命現象における重力効果の増幅発現作用の検証にとって、恰好の実験システムであることを示唆している。生物対流を作り出す要素間の協同作用と、その産物である動的不安定性への重力の作用を明らかにすることで、生命活動に対する重力の作用の新たな側面を明示することが可能になると考えられる。

本研究では、対流パターンの高精度記録と、画像解析の手法を用いて、微小重力から過重力までの様々な大きさの重力環境下における対流パターンの時空間構造形成に現れる変化を詳細に解析する。併せて、個々の微小生物の重力依存性行動を解析する。微生物レベル(ミクロレベル)での重力応答特性と、それらの集団が形成する生物対流パターン形成(マクロレベル)における重力応答の比較を行う。パターン形成における重力応答が細胞個々の応答よりも大きいならば、協同現象を通じて重力効果の増幅がなされているものと考えられる。これにより、生物対流現象の応答特性と重力感受性を明らかにし、動的不安定性を持つ共同現象の結果としての時空間構造形成における「重力の増幅作用」の仮説の検証を目指す。

1.2 実験概要:

本研究では水棲微小生物、特に原生生物の形成する生物対流を扱う。これまでになされた多くの研究では、重力を実験パラメータとして扱うことはなかった。流体物理学の視点から対流パターンの形成単位となる微生物は単なる粒子として捉えられそれらが持つ重力への応答性や、微生物間の相互作用などはまったく考慮されてこなかった。そのような観点からは、変動重力に対する応答はあまり意味をなさなかったのかも知れない。しかし、対流パターンの形成は、本来独立して活動している個々の微小生物が作り出す共同現象である。個々の微生物の間には、ミクロなスケールでの相互作用がある。その作用が、重力という外力が介在することによって空間的に増幅され、マクロスケールのパターンが出現する。従って、協同現象を支える重力作用の変化が対流パターンの変動を引き起こすことは充分に考えられる。

一方で、生物対流の構成要素である原生生物は単細胞でありながら、重力依存的な行動を可能とする感受機構を持つことが知られている([5], [6], [7], [8])。この機構を考慮に入れるならば、生物対流パターンが原生生物の持つ応答性を介して、重力変動に対して鋭敏に反応することが予測される。

ここで増幅作用が働くとすれば、個々の原生生物のレベル(マイクロレベル)では応答は小さいものの、パターンのレベル(マクロレベル)では大きな変化が現れることが期待される。

本研究では、単細胞生物のテトラヒメナを用い。通常重力(1×g)以下の低重力(partial gravity)環境下での生物対流パターン(マクロレベル)の時空間挙動を詳細に解析する。併せて、個々の原生生物のレベル(マイクロレベル)での重力応答を調べ、それぞれのレベルで象徴的な現象の重力閾値を比較する。例えば、パターンの出現の重力閾値が、原生生物の行動応答(gravitaxis および gravikinesis)の閾値よりも小さいならば、パターン形成において協同現象を通じて重力効果の増幅がなされているものと考えられる。

以上の仮説のもとに、変動重力環境を実現する場として軌道上微小重力環境を想定し、「きぼう」船内実験室利用を申請し、候補テーマとして採択された。

軌道上実験としては、細胞培養措置(CBEF)内の重力発生部を使用し、低重力を与えた時のパターン形成(マクロレベル)と個々の微小生物の遊泳行動(マイクロレベル)の同時記録を行うことを提案した。そのために重力発生部の回転機構上に搭載可能な2台のキャニスターの一方に遊泳行動を記録するための装置を、もう一方に対流パターンを記録するための装置を搭載し、軌道上で培養した試料(テトラヒメナ)を両方の装置に導入し、同一装置上で変動重力を付加した際の応答を記録・解析することとした。

研究の初期は、軌道上実験のためのフィージビリティ・スタディーを行い、培養や画像記録のための装置の検討を行った。これと併せて、生物対流パターンの動的特性を明らかにするために、クラミドモナスが示す、パターン遷移現象(pattern transition response)の解析を行った。

軌道上実験のためのフィージビリティ・スタディーの結果より、装置の制約のために、本研究の「きぼう」船内実験の実施は容易ではないことがわかり、研究実施を航空機利用微小重力実験へとシフトさせた。航空機実験に合わせた実験シナリオと実験装置の開発を行い平成 23,25,26 年度に微小(低)重力実験を行った。

航空機を利用することで、装置への制約が少なくなり、新たな記録装置(後述)の利用が可能となった。また、微小重力実験へのアクセスが容易になり、試料調整に注力できることは大きな利点である。材料や燃焼の実験と異なり、生物材料を扱う実験では試料を適切な状況に維持することが容易ではない。本研究では、軌道上で培養したテトラヒメナを用いた対流形成を予定しているが、軌道上環境下での培養がパターン形成に及ぼす影響が不明である。航空機実験では、このような不確定要素を気にせず、パターン応答への重力変動の効果のみを注視できる。加えて、航空機実験では、試料の状況等を踏まえて、実験パラメータを臨機応変に調整できることも本研究にとっては利点である。

1.3 研究体制

本研究は、下表の体制で実施した。

	氏 名	所 属	分 担
代表研究者	最上善広	お茶の水女子大学	研究総括
共同研究者	奥村 剛	お茶の水女子大学	実験計画と理論構築への助言
	森 義仁	お茶の水女子大学	装置開発と実験運用への助言
	岩本裕之	スプリング8	データ解析方法への助言
	伏島康男	日本宇宙フォーラム	実験装置開発支援
	栗山可奈	日本宇宙フォーラム	航空機実験支援

2. 実験成果

本研究の目的は、生物対流による時空間構造が、重力変動に対してどれほど鋭敏に反応するか、その結果どのような増幅効果を示すかを調べることにある。地上での $1\times g$ バイアスを除外し、地球重力以下の重力(低重力)環境を与えることで、初めて本実験の目的が達成される。地上でも模擬的に微小重力を作り出す施設があるが、これらは時間的に大きな制限がある。

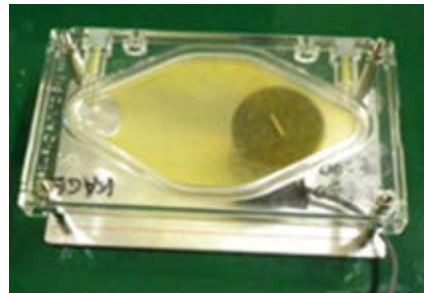


図1. 微小磁気攪拌子と回転駆動機構を組み込んだ DCC 培養容器

2.1 軌道上実験に向けてのフィージビリティ・スタディー

低重力実験を行うためには軌道上実験室を利用することが望まれるが、試料の培養やマイクロレベルとマクロレベルでの記録のための装置が必要となる。宇宙実験のための供試体を用いることを前提にそれらを用いた実験環境構築の可能性を検討した。

培養及び記録用の容器として、DCC(図1)の利用を検討した。

Tetrahymena thermophila を播種($2-3 \times 10^4$ cells/ml)し、静置培養したところ、実験提案で掲げた目標値(1×10^6 cells/ml)には若干及ばないが、パターンを形成できる密度まで培養が可能であることがわかった。ただし、通常のコスモ・振とう培養に比べて、定常期到達に時間がかかる(10日程度)。しかし、その後長期間(1週間程度)は定常期を維持できることがわかった。

マクロパターン記録では、キャニスターの C-C 面、もしくは D-D 面(面の定義は V-MEU 外系図に基づく)に観察容器を配置する必要がある。キャニスターの D-D 面に培養容器を配置することを前提に、撮像光路内にミラーを配置した撮像系を考案し、加重力方向を加味した BBM を作成した(図 2A)。VMEU で使用されている撮像素子と照明用 LED を用い、キャニスター内に装着できる寸法を確保しつつ、生物対流パターンを記録することができた(図 2C)。

マイクロな遊泳記録の方法として、極端な接写装置を用いたところ(図 2B)、テトラヒメナが 20~30 ピクセルで記録できることがわかった(図 2D)。マイクロ撮影用容器について、光学特性と、ガス透過性とを併せ持つことを条

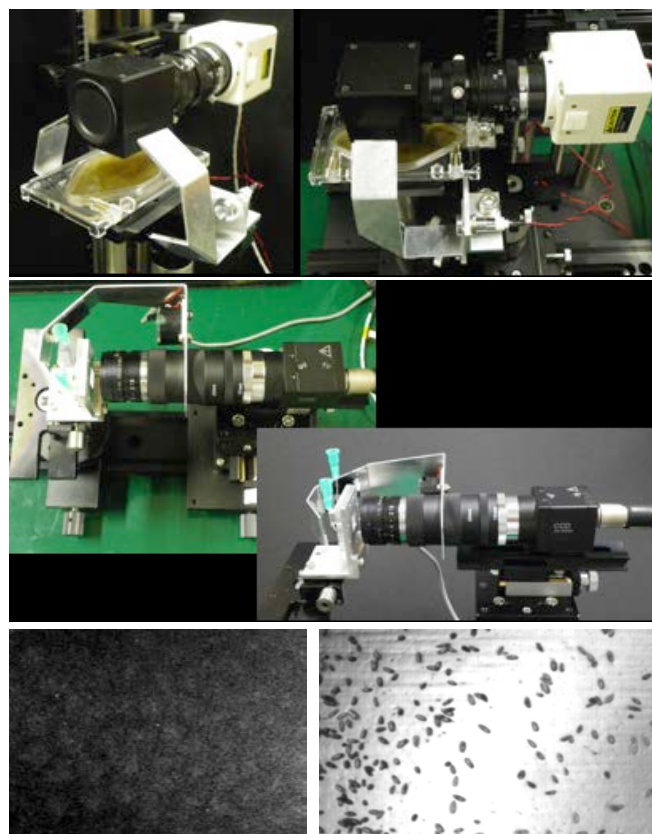


図2. A: マクロ撮像系 BBM。VMEU 搭載用の撮像素子を用い、マクロ撮影を目指した。光路内にミラーをおいて撮像方向を調整している。照明には同じく VMEU 搭載の LED を用い、複数のミラーを組み合わせることで暗視野照明とした。
B: マクロ撮像系 BBM。照明には高輝度の LED を用い、複数のミラーを組み合わせることで透過(明視野)照明とした。
C: マクロ撮像系による生物対流パターンの記録例。
D: ミクロ撮像系による個々の細胞の遊泳行動の記録例。

件として、検討を行った。その結果、プラスチック製のカバースリップを用いることで、閉鎖性を維持したままで数日間細胞の維持が可能な記録容器を考案し、その BBM を作成した。

2.2 生物対流パターンのダイナミズムの解析

生物対流パターンの時空間挙動を研究してゆく過程で、単細胞緑藻のクラミドモナスが示す、興味深い現象を発見した[9]。パターン遷移現象 (pattern transition response) と名付けた現象は、従来報告されたことのない、新規の現象であり、安定したパターンが突然、数分のうちに、パターンサイズの急激な減少を示す (図 3)。パターンのごく一部で起こったサイズの減少は、急速にパターンの全域に伝搬してゆく (図 3c)。このときの伝搬速度はクラミドモナスの遊泳速度よりも有意に高い。

パターン遷移現象を定量的に解析した結果、パターン遷移はクラミドモナスの光応答に関連して誘導されることがわかった。遊泳行動には大きな影響を与えない波長ではあるものの、赤色光 ($\lambda > 640 \text{ nm}$) の照明状況に応じて、パターンサイズの変化が可逆的に誘導された[10]。また、鞭毛の運動性が異なる行動突然変異によってパターン遷移の詳細が異なること[11]が明らかとなり、対流運動の構成要素の運動性が、生理的要因によって制御されることで、パターンの出現過程に大きく影響を及ぼすことが示唆されている。

相転移を思わせるようなパターンの急激な変化は、一見安定して機能している細胞集団がその内部に大きな不安定性を内包している可能性を示唆している。これは、ポジティブ・フィードバックを含むような増幅作用がパターン内部に存在している可能性が考えられる。

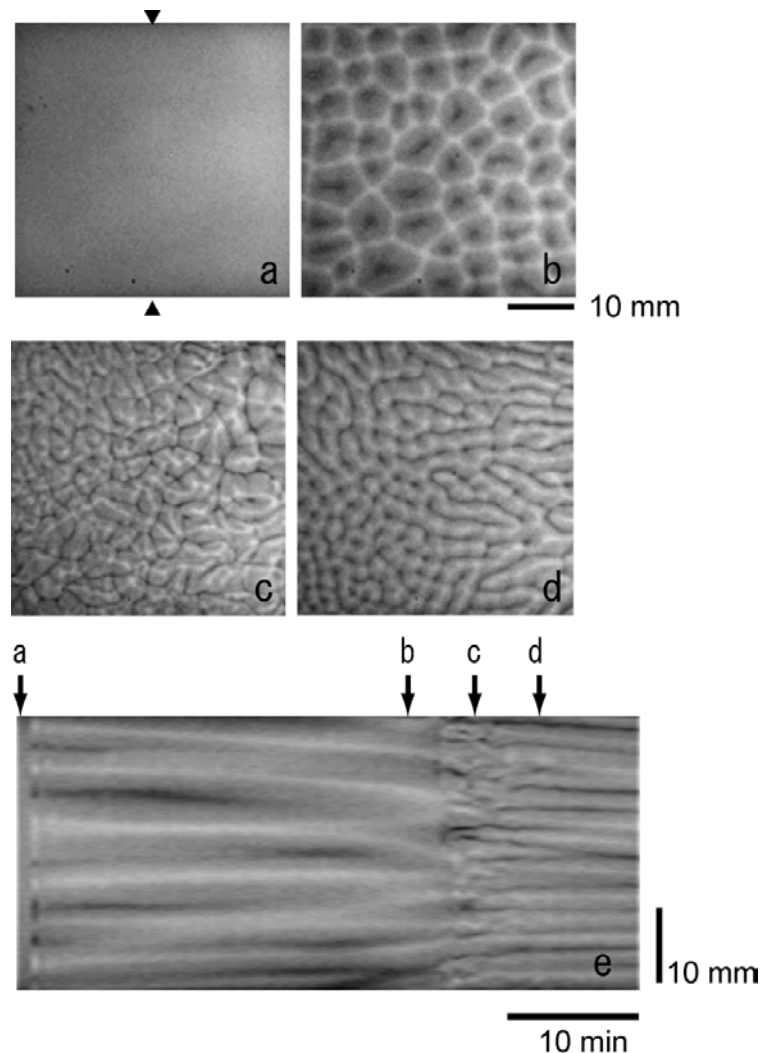


図3. クラミドモナスが示す、パターン遷移応答。

a から d はパターン出現直前からの細胞懸濁液のトップ・ビュー。各々の記録タイミングは時空間プロット (e) に矢印で示されている。e はパターンの時空間発展を示す、時空間プロット。a において三角形で挟まれた直線領域の輝度分布の経時変化を示す (Akiyama et al, 2005 より引用)。

2.3 航空機利用低重力実験

平成 23 年度に行った、「航空機利用実験の有効性」と「航空機実験への遠心加重力装置の応用」に関する検討を踏まえ、航空機による短時間微小重力を利用した実験が実施可能であるかについて検討を行った。「きぼう」船内装置環境の利用を想定した実験では、遠心による重力付加により微小重力から次第に重力を増強し、対流挙動と重力走性行動のそれぞれが出現する閾値を調べることを想定している。これに代えて、航空機利用では、地上重力環境下で既に出現している生物対流パターンと個々の生物の重力走性行動が、低重力環境下に移行することで消失する際の挙動に注目する。

航空機による微小重力の誘導は短時間(20 秒程度)しか維持できないが、これまでに行った微小重力実験により、テトラヒメナの生物対流はその時間内で消失することが示されている[12]。低重力の発生は、微小重力期間内に遠心機により低重力を発生させる方法も検討されたが、航空機のフライト・マヌーバーを調整することで発生させる方法を選択した。航空機の弾道飛行を利用して、通常重力から過重力を経て種々の大きさの低重力(パーシャル G)への移行を行い、テトラヒメナによる対流パターンの消失と重力走性行動の変化を引き起こす閾値を比較することを試みた。

2回の航空機利用実験(平成 25 年 11 月 4 日～14 日、及び平成 26 年 10 月 7 日～16 日)を行い、航空機による低重力環境のもとでの生物対流挙動の記録・解析を行った。

2.3.1 ミクロ・マクロ撮影装置

これまでの研究の過程において、研究手法がなかったために不明であった、生物対流による空間パターンとその内部での個々の細胞(テトラヒメナ)の遊泳を同時記録できる装置の開発を行った(図 4)。

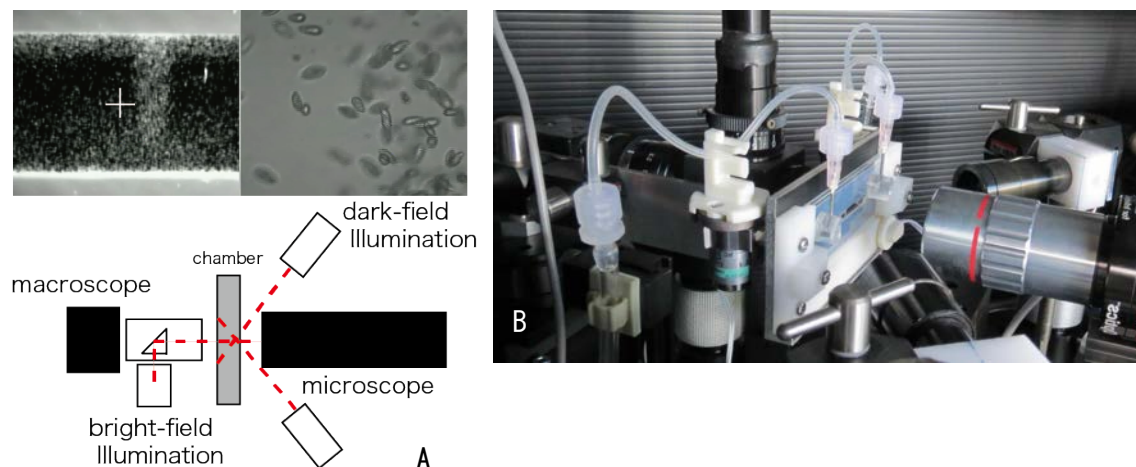


図4. A: ミクロ／マクロ同時記録システム(下)とそれを用いたテトラヒメナの対流パターンのサイドビューの記録例(上)。マクロ記録の十字部分を拡大しミクロ画像を得ている。

B: ミクロ／マクロ記録装置。ステージ部分を軽量化し、機械強度を増すとともに、電動ステージを採用し、操作性を改良した。右にミクロ記録用の対物レンズ、チャンバーを挟んで左側にマクロ記録用のレンズと同軸照明招致を配置している。

作成した記録装置(マイクロ・マクロ撮影装置)では、対流パターンのサイドビューをマクロ撮影と同時に、同一視野内でのマイクロ撮影が可能である。マイクロ撮影用の透過光はマクロ撮影系の光路に入れたハーフミラーを用いて導入し、マクロ撮影用の暗視野照明は、斜光照射によって行われる。斜光照明のための十分な空間を確保するために、マイクロ撮影用の対物レンズは長作動距離のものを用いている。

記録チャンバーには、スライドガラスとシリコンゴムシートを用いた密閉容器(図 4B)を用いた。チャンバーの内径は $4 \times 40 \times 1$ mm(高さ×幅×奥行き)であり、生物対流は上下面ともにシリコンゴムを境界面として形成される。試料のテトラヒメナ(*Tetrahymena thermophila*)は、必要な密度($1.0 \sim 1.5 \times 10^6$ cells/ml)に希釈した後、DCC 内部で攪拌(もしくは別の密閉容器でエアレーション)しながら実験開始まで保持された。その後試料をチューブポンプを用いて試料チャンバーに導入し、対流パターンを誘導した。

2.3.2 ミクロレベル解析

マイクロ撮影系によって記録された画像は、既存の動画画像解析システム(Bohboh)を用いて処理され、個々の細胞(テトラヒメナ)の遊泳行動の解析に供された。このシステムでは、細胞を模したテンプレート(多くの場合は楕円)を設定し、画像とのマッチングを行い、自動追尾を行いながら画像の中心座標を実数化することができる。通常は、かなり希薄な懸濁液での記録に応用されるシステムを、生物対流のような高密度懸濁液での記録に応用できるように測定パラメータ微調整することで、半自動的に高精度の計測が可能となった(図 5)。

遊泳行動の基礎データとして、個々の細胞の遊泳の速度ベクトルを求めた(図 6A)。基本的には3次元行動を2次元で解析する(深さ方向の移動を反映できない)ことになるため、数値は大きくばらつくことになるが、遊泳速度の重力配向角依存性、および遊泳方向の度数分布の概略は、記録時の低重力環境ごとにほぼ同じ傾向を示した。

遊泳速度の総平均(すべての遊泳方向での速度の平均)は、重力加速度が小さくなる(低重力の程度が大きくなる)につれて小さくなる傾向にある(図 6B)。これは重力による推進速度調整(gravikinesis, 後述)を反映している結果と思われる。

速度ベクトルの測定結果を基に、重力依存性行動の二つのパラメーターを求めた。ひとつは、遊泳方向の偏在性を示す、走性(taxis)指標であり、もうひとつは、推進速度調整(kinesis)指標である。

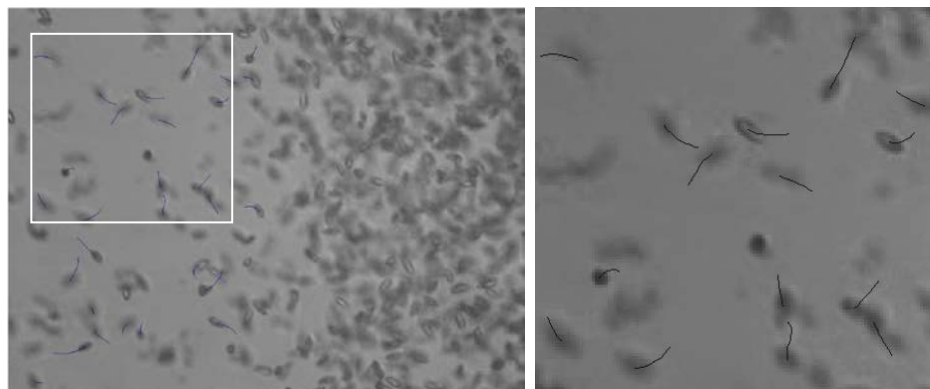


図5. 動画画像解析システム(Bohboh)による個々の細胞の遊泳軌跡の解析例。左の画像の枠内を拡大して自動追尾による遊泳軌跡の取得例を示す。

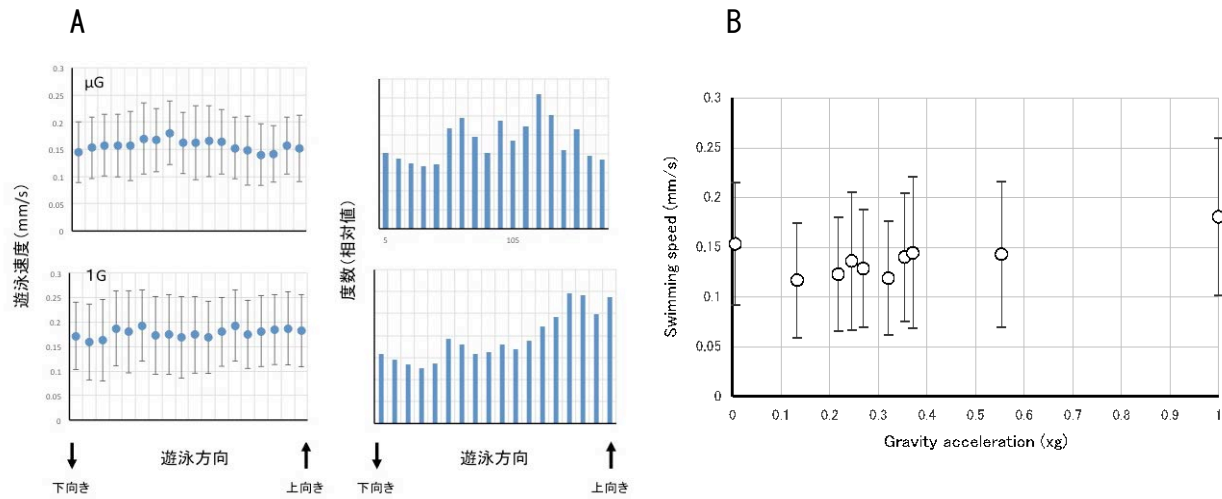


図6. A: 個々の細胞の遊泳行動の解析例。微小重力下(上)と通常重力下(下)のそれぞれにおける, 遊泳方向と遊泳速度(左)と遊泳方向とその頻度(右)。
B: 低重力下における遊泳速度の総平均(すべての遊泳方向での速度の平均)。平均と標準偏差($n > 1000$)を示す。

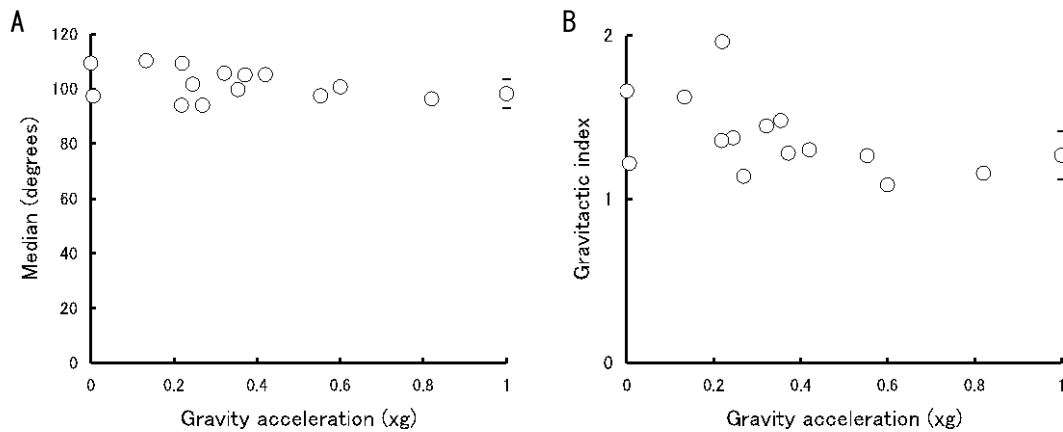


図7. 低重力下における走性指標の変化

A: 遊泳方向の度数分布の中央値を重力加速度に対してプロットしてある。
B: 鉛直上方遊泳頻度と鉛直下方遊泳頻度の比である, gravitactic index を重力加速度に対してプロットしてある。

走性指標として、遊泳方向の度数分布の中央値と、鉛直上方遊泳頻度と鉛直下方遊泳頻度の比である、gravitactic index を求め、それぞれを重力加速度の関数として示した(図 7)。両方の指標ともに、重力加速度の減少に伴って大きく変化することはない。むしろ緩やかな増加傾向を示している。細胞に重力の作用による上向きトルクが作用すると、細胞は上を向く。そして、走性指標の増加は細胞が上向き配向を採るにつれて大きくなる。航空機実験では、低(微小)重力突入前に過重力に晒され、約 20 秒間の過重力期間に多くの細胞が上向きに配向させられることが考えられる。その後、重力が減少することで、上向き配向が緩和されるが、走性指標の増加傾向は、対流を形成している細胞においては、この緩和の過程に重力が逆方向の作用をする可能性を示唆している。

重力場内での微小生物の遊泳は重力による沈降速度を反映したものになる。個々の生物(本研究ではテトラヒメナ)が鉛直上方に泳ぐ際の遊泳速度を V_{up} 、鉛直下方に向かう際を V_{dn} 、それぞれの遊泳方向での推進速度を、 P_{up} 、 P_{dn} とする。 P_{up} と P_{dn} はそれぞれ、繊毛等が作り出す能動的な速度である。ここで、沈降速度(推進力が作用しない場合の速度)を S とすると、それぞれの間に、

$$V_{up} = P_{up} - S \quad (1)$$

$$V_{dn} = P_{dn} + S \quad (2)$$

の関係がある。これらより、

$$P_{up} - P_{dn} = V_{up} - V_{dn} + 2S \quad (3)$$

となる。ゾウリムシなどの繊毛虫では $P_{up} - P_{dn}$ がプラスとなることが知られている。 $P_{up} - P_{dn}$ がゼロではないことは重力依存的な推進力の調整(gravikinesis)が存在していることを示しており、重力による生理活性調節のメカニズムが機能していることを示唆している([5], [6], [7], [8])。

図 8A に $V_{up} - V_{dn}$ を重力加速度の関数として示している。図 8B は、測定値をもとに、 $s = 0.027$ mm/s とした場合([13])の $P_{up} - P_{dn}$ を示している。 $P_{up} - P_{dn}$ 、すなわち推進力調節能力は、重力加速度の減少とともに小さくなっていくことを示している。これはパラボリック・フライト(5th DLR Parabolic-flight Campaign, 2003)において、*Paramecium bicaurelia*を用いた Krause 等(2006)[14]の実験結果と一致している。Krause 等は、フライト・マヌーバーによる低重力を利用したわけではなく、過重力から微小重力までの連続した重力変動のもとでの遊泳を解析している。

また、彼等の測定では、解析上の必要性から細胞密度を極めて低くしてある。この点でも、対流パターン内での遊泳環境とは異なっているが、細胞密度に関わらず同じような応答が見られることは興味深い。ひとつの解釈として、gravikinesis は、細胞内の調整メカニズムによって発現されるが、その発現の際には、周辺の細胞による相互作用(影響)は反映されない可能性が挙げられる。

Krause 等の結果は、ほぼ直線的な減少を示している([14]; Fig 5)が、彼等は微小重力($0 \times g$)での測定値との統計的比較より、 $0.3 \times g$ 付近に gravikinesis 応答の重力加速後閾値があるとしている。図 8B においても、重力加速度に対する $P_{up} - P_{dn}$ の大きさは、 $0.3 \times g$ 付近にトレンドの変化を見いだすことができる。Krause 等([14])の結果と合わせ、この値が、ゾウリムシやテトラヒメナ等の繊毛虫における gravikinesis 応答の重力加速後閾値であることが示唆される。

ここで示唆された、 $0.3 \times g$ という重力加速度閾値は、IML-2(STS-65)での遠心過重力実験で示された値($0.16 \sim 0.3 \times g$)よりも大きな値となっている[15]。これは、パラボリックフライトにおける、重力変動(特にパラボラ突入前の過重力)が重力応答への履歴効果となっている可能性を示唆している。

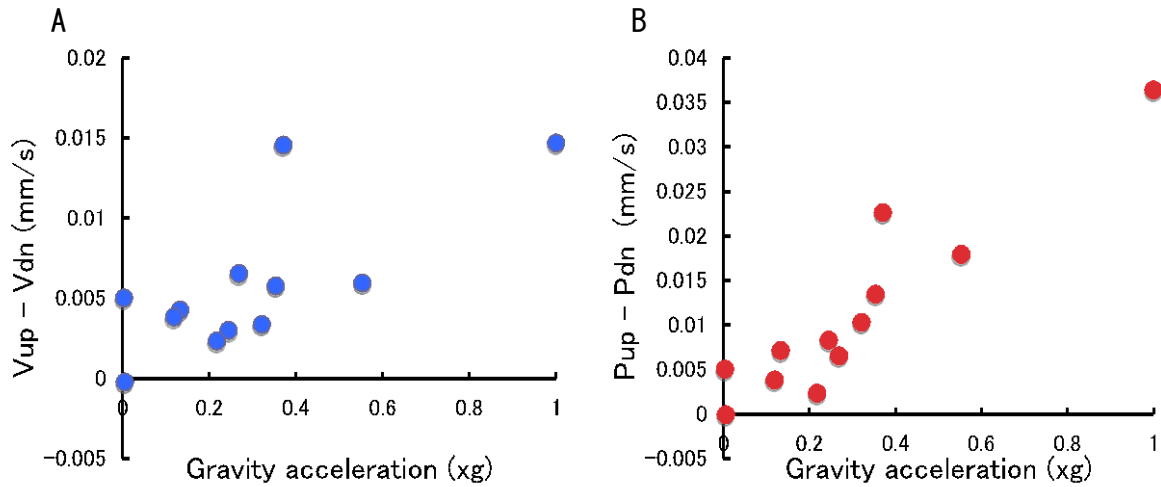


図8. 低重力下における推進速度指標の変化。

A: 鉛直上方の遊泳速度(V_{up})と鉛直下方の速度(V_{dn})の差を重力加速度に対してプロットしてある。 V_{up} と V_{dn} は、それぞれ、鉛直上方 $\pm 30^\circ$ および、鉛直下方 $\pm 30^\circ$ の方向に泳ぐ細胞の遊泳速度の平均値として算出した。

B: $S = 0.027$ mm/sとした場合の P_{up} □ P_{dn} を重力加速度に対してプロットしてある。

2.3.3 マクロレベル解析

航空機実験では、レベルフライト($1 \times g$)で形成された対流パターンに注目し、過重力期間を経て低重力に移行した後に、パターンが消失する過程に着目した。

対流パターンは、個々の細胞が行う負の重力走性による上昇流と、細胞の凝集塊の沈降による下降流(ブルーム)とによって構成されている。 $1 \times g$ のもとでは、定常的なブルームが形成されるが、低重力に曝されることで、このブルームが一過的に消失する(図 9)。時空間プロットに示すように、ブルームが消失するまでの時間は、重力加速度が小さくなるにつれて短くなる。今回の飛行実験では、低重力への移行前に、一定の過重力($2 \times g$)付加を行い、そこで形成されたブルームが消失する過程を解析した。低重力への移行からブルームが消失するまでの時間(ブルームの維持時間)を重力加速度の値に対してプロットしたところ、図 10 に示す結果となった。

ブルームが消失する過程を解析するための基礎となる理論として、Childress 等が提唱した、パターン発現時を模した線型モデル([4], [16])を参考に、以下のモデル(第1次案)を想定した。

今、ブルームの先端のみに着目する。先端部分での細胞密度(n_c)は、ブルーム上部からの下降移動による供給と、先端部分での細胞の散逸遊泳とのバランスで決まり、

$$\frac{dn_c}{dt} = (s - u) n_c - \kappa n_c \quad (4)$$

と表される。4 式において、右辺第 1 項は、下降移動による供給を示し、それは細胞凝集塊の沈降による下方移動を表す速度定数(s)と個々の細胞の遊泳による正味の上方移動を表す速度定数と(u)と周辺密度の積によって表される。一方、第2項は先端部分での細胞の散逸遊泳による減少を示しており、ここではもっとも単純な例として、減少速度が細胞密度に比例するものと仮定している。さらに、

s と u はそれぞれ、凝集塊沈降速度(S_p)と正味の上向き遊泳速度(U)に直接異存する(ディメンジョン・マッチングの比例定数を介した比例関係)と仮定する。ここで、

$$S_p = V\Delta\rho v_c n_c g / R \quad (5)$$

であり、 V は細胞凝集塊の体積、 $\Delta\rho$ は細胞体と外液との密度差であり、 v_c は個々の細胞の(平均)体積を示す[16]。 g は重力加速度であり、 R は粘性抵抗係数に相当し、細胞凝集塊を球(半径 r)とすると、 $V/R = 9\eta/2r^2$ (η は外液の粘性率)となる。また、 V_{up} と V_{dn} は、それぞれテトラヒメナの鉛直上方と鉛直下方に泳ぐ際の遊泳速度を示す。また、

$$U = V_{up} - V_{dn} \quad (6)$$

である。

マイクロ解析の結果から、 U が重力加速度に比例すると仮定すると、4式の右辺第1項は、重力加速度に比例する項として表される。

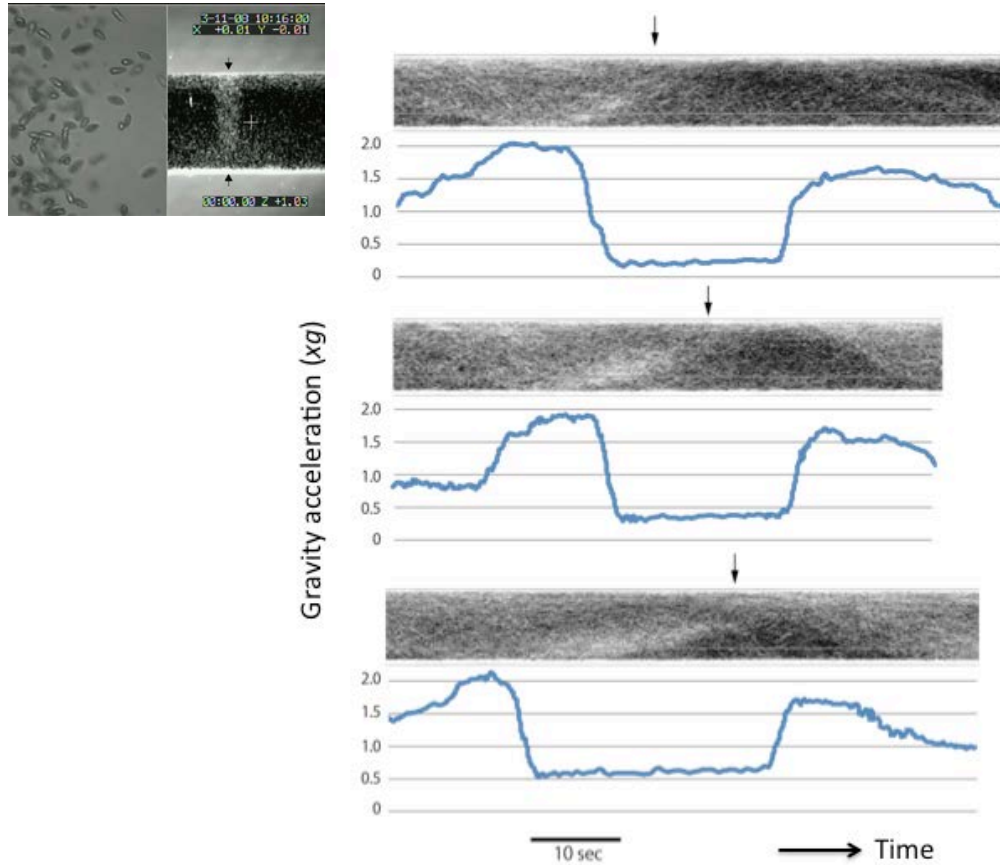


図9. 低重力下での生物対流パターン(プルーム)の消失を示す、時空間プロット。対流による下降流領域(挿入図の矢印で挟まれた部分)の輝度の時間経過を、重力加速度変化とともに示す。下降流パターンに対応する細胞の密集部分が高輝度部分に対応している。矢印は、下降流パターンが消失した時間を示す。

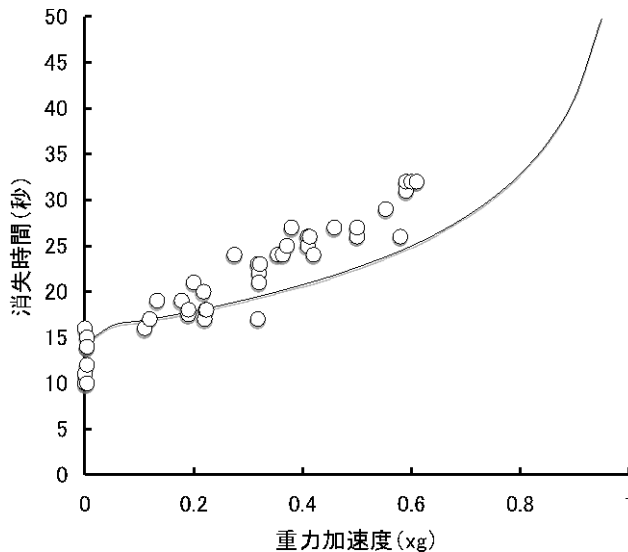


図10. 低重力への移行から対流パターン(プルーム)が消失するまでの時間(消失時間)を重力加速度の値に対して示す。○は実測値を、実線は式4~6に基づく理論モデルにより推定した値を示す。推定の際には、微小重力近傍の測定値とのマッチングを行った。

得られた方程式をもとに、体重力突入時のプルーム内の細胞密度が一定値にまで減少する時間(消失時間)の算出を試みた。微粉方程式の解は、消失時間は重力加速度とともに減少し、微小重力領域は現象は緩やかになることを示している。消失時間は、 $1 \times g$ では無限大である(理論的にはプルームは消失しない)ため、航空機実験のように、低重力維持時間が限られている場合、しきい値となる重力加速度以上ではプルームはその期間内に消失せず、消失時間は測定できないことになる。

確定できないパラメータが複数存在することで、消失時間の絶対値を算出することは難しい。測定結果の多い、微小重力近傍での実測値に適合するように数値解法を行った結果を図10に示す。

この第1次案は、多分に精密さを欠く理論であるが、テトラヒメナの生物対流パターンにおいて、個々の細胞レベルとその集団の挙動に基づくパラメータ(s ,

u , および κ)とパターンの発現・維持との関係を調べる基盤を与えるものとなっている。

図10において、実線は上述の理論に基づく推定値であるが、測定値の多くが理論予測を上回っていることがわかる。このことは、理論においては重力に依存しないとされていたパラメータ(細胞集団の形状や拡散挙動)が重力依存的に変化する可能性を示唆している。

2.3.4 ミクロ解析とマクロ解析の比較

今回の研究では、生物対流を、個々の単細胞生物の遊泳挙動と、それらの集団が作る対流パターンの挙動のふたつのレベルから解析した。それぞれのレベルにおける重力依存的挙動の重力閾値を比較することで、個々の生物のミクロ挙動とマクロ挙動の関連を明示し、自己組織化的な集団化による細胞の重力応答の増幅の可能性を提示することを目的とした。しかし、今回注目したパラメータに関しては、重力閾値の存在を明確には示すことができなかった。従って、閾値の比較から重力応答の増幅効果を示すことはできない。しかし、いくつかの点で、自己組織化を引き起こす重要な要因である、細胞間の相互作用に重力が作用している可能性が示唆されている。

重力走性の強さを示す走性指標は、重力加速度の減少に伴って大きく変化することではなく、むしろ緩やかな増加傾向を示している。航空機実験では、低(微小)重力突入前に過重力に晒され、約20秒間の過重力期間に多くの細胞が上向きに配向させられることが考えられる。この配向分布が低(微小)重力期間に緩和されるが、走性指標の増加は対流を作っている細胞では、いったん誘導された上

向き配向が維持されやすい(緩和しにくい)状況にあることを示している。低い重力加速度下では強調されると考えられる緩和効果が、対流挙動をすることで無効化される可能性が考えられる。細胞の遊泳におけるランダムな方向転換が、配向緩和の過程を引き起こす大きな要因であることを考えると、対流挙動の中の細胞では、そのようなランダム性が抑制されている可能性がある。

一方で gravikinesis は、対流形成による集団化によっても変化しない。この重力応答は、細胞内の機械受容メカニズムによって発現される([5], [6], [7], [8])。従って、自己組織化による対流形成は細胞内の現象には影響を及ぼさないことが推定される。同様のことは、個々の細胞の重力配向特性にも当てはまる。上向き配向の原因となる個々の細胞が持つ物理的要因[17]は維持されたままで、対流形成によって集団としての機能発現に変化が生じる。これを行き起こすのは、集団内での細胞同士の相互作用であろう。

集団化による作用が、ランダム性の抑制(もしくは統一性の促進)を引き起こすのであれば、対流形成にも影響が現れることが予想される。ランダムな挙動は、細胞の拡散的挙動を引き起こす要因であり、ブルームのような細胞の凝集塊の中での細胞の運動を規定する要因である。この性質が重力依存的に変化するのであれば、ブルームの消失時間に関する、実測値とその理論予測との隔たりが説明できるかも知れない。理論予測では単純な仮説として、拡散挙動や、ブルーム形成のパラメータは重力に依存しないとしているが、この過程を疑う必要がある。

今回の研究では、閾値のような明確な指標を通して重力応答の増幅効果を示すことはできなかった。しかし、細胞間の相互作用に重力が作用している可能性が示唆され、その結果、自己組織化を介して集団化することで、新たな機能が発現される可能性を示すことができた。

3. 今後への波及

本研究は、生命機能の発現における自己組織化現象の役割と、その要因としての地球重力の作用を明らかにすることを目指した。重力の存在によって異方化された場における協同現象を通じて、集団としての新たな機能形成の可能性を想定した。

今回の研究によって強く示唆されることになった、細胞間相互作用へ重力が影響を及ぼしている可能性は、今後の重力生物学の展開に対してひとつの指針を与えるものとなっている。本研究で対象としたは微生物集団による現象であるが、この概念は他の生命現象にも拡張し得るものである。シャーレに入った微生物を、細胞内のオルガネラに対比するならば、細胞レベルでの重力応答の基本概念を変えることになる。細胞サイズでの重力の効果は、熱揺らぎを越えることはない、というのがこれまでの常識であった。しかし、重力がオルガネラとの共同作用を通してそれらの相互作用を増幅することができるのであれば、熱揺らぎを凌駕し、細胞単位での重力応答を引き出すことが可能であろう。これにより、宇宙・重力生物学での新たな研究の展開が誘発されることが期待できる。また、今後の宇宙開発に伴い、宇宙環境で生命活動を展開する際に提供すべき重力加速度環境の設定に関して、基礎科学からの基盤を提供できる。

本研究で用いた、航空機による低重力環境の利用は、月や火星などの低重力環境を想定した実験に利用可能である。低重力環境の実現時間は限られるものの、地上模擬実験として、実験実施の簡便性も含めてその有用性を実証できた。

[引用文献]

- [1] Kondepudi and Prigogine (1981); Sensitivity of nonequilibrium systems. *Physica A*, 107,1-24
- [2] Kondepudi, D.K. (1991); Detection of gravity through nonequilibrium mechanisms. *ASGSB Bull.* 1991 Jul;4(2):119-24.
- [3] Mogami, Y., Yamane, A., Gino, A. and Baba, S.A. (2004); Bioconvective pattern formation of *Tetrahymena* under altered gravity. *J. Exp. Biol.*, 207, 3349-3359.
- [4] Childress, W.S. Levandowsky, M. and Spiegel, E.A. (1975); Pattern formation in a suspension of swimming microorganisms: equations and stability theory. *J. Fluid Mech.* 63, 591-613.
- [5] Ooya, M., Mogami, Y., Izumi-Kuroyani, A. and Baba, S.A. (1992); Gravity-induced changes in propulsion of *Paramecium caudatum*: a possible role of gravireception in protozoan behaviour. *J. Exp. Biol.*, 163, 153-167.
- [6] Gebauer, M., Watzke, D. and Machemer H (1999); The gravikinetic response of *Paramecium* is based on orientation-dependent mechanotransduction. *Naturwissenschaften.* 86(7):352-6.
- [7] Takeda, A., Mogami, Y. and Baba, S.A. (2007); Gravikinesis in *Paramecium*: Approach from the analysis on the swimming behavior of single cells. *Biol. Sci. Space*, 20, 44-47.
- [8] 最上善広, 坂爪明日香 (2015); メカノバイオロジー 細胞が重力を感じ応答する仕組み (曾我部正博編) 「重力感知のメカノバイオロジーI:単細胞生物」 pp.101-112, 東京化学同人 (ISBN978-4-7598-1721-8)
- [9] Akiyama, A., Ookida, A., Mogami, Y. and Baba, S.A. (2005); Spontaneous alteration of the pattern formation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Jpn. Soc. Microgravity Appl.*, 22, 210-215.
- [10] Kage A., Hosoya, C., Baba S.A. and Mogami Y. (2013); Drastic reorganization of bioconvection pattern of *Chlamydomonas*: quantitative analysis of the pattern transition response. *J. Exp. Biol.*, 216,4557-4566.
- [11] Kage, A. and Mogami, Y. (2015); Individual flagellar waveform affects collective behavior of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Zool. Sci.*, 32, 396-404.
- [12] Kage, A., Asato, E., Chiba, Y., Wada, Y., Katsu-Kimura, Y., Kubota, A., Sawai, S., Niihori, M., Baba, S.A. and Mogami, Y. (2011); Gravity-Dependent Changes in Bioconvection of *Tetrahymena* and *Chlamydomonas* during Parabolic Flight: Increases in Wave Number Induced by Pre- and Post-Parabola Hypergravity. . *Zool. Sci.*, 28, 206-214.

- [13] Kowalewsky, U., Brauecker, R. And Machemer, H. (1999); Responses of *Tetrahymena pyriformis* to the natural gravity vector. *Microgravity Sci. Technol.* XI/4, 167-172.
- [14] Krause, M., Brauecker, R. and Hemmersbach, R. (2006); Graviresponses of *Paramecium biaurelia* during parabolic flights. *Protoplasma*, 229, 109-116.
- [15] Hemmersbach, R., R Voormanns, R. and Hader, D. P. (1996); Graviresponses in *Paramecium biaurelia* under different accelerations: studies on the ground and in space. *J. Exp. Biol.*, 199: 2199-2205;
- [16] Levandowsky, M., Childress, W.S., Spiegel, A.E. and Hunter, S.H. (1975); A mathematical model of pattern formation by swimming microorganisms. *J. Protozool.* 22, 296-306.
- [17] Mogami, Y., Ishii, J. and Baba, S.A. (2001); Theoretical and experimental dissection of gravity-dependent mechanical orientation in gravitactic microorganisms. *Biol. Bull.*, 201, 26-33.

[本研究による成果の公表]

- (1) Kage, A. and Mogami, Y. (2015); Individual flagellar waveform affects collective behavior of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Zool. Sci.*, 32, 396-404.
- (2) Yokoyama, M., Senoo, M., Kage, A. and Mogami, Y. (2016); Bioconvection of *Tetrahymena thermophila* under partial gravity. The 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, 17-19 November 2016, Okinawa

「生体自己組織化現象を介する重力効果の増幅発現」
平成29年度 航空機利用実験 科学成果評価結果(生命科学)

代表研究者;最上善広(お茶の水女子大学)

評価結果

本研究は、ISS・きぼう利用を目指したフィージビリティスタディであったが、きぼう利用準備に移行することなく、航空機実験による成果創出を目指す計画に変更したものである。本研究では、重力刺激に対して負の走行性を持つ水棲微小生物の集団を用いて「生物対流パターン」に関して初めて系統的研究を行い、優れた成果を得た。特に、低重力の継続時間や制御精度などの航空機弾道飛行実験の制約があったが、重力に依存したパターン変化を明示したことは、原生動物を用いた基礎研究としての意義が高い。

一方、パターン形成の要因となる生体間相互作用のメカニズムは十分に明らかにされなかったので、今後、物理現象としての理論的側面を補強するなどして、この現象のより詳細なメカニズム解明に向けて研究を継続することを期待する。

平成30年2月
きぼう利用テーマ選考評価委員会(生命科学)

ISS・きぼう利用ミッション
「前庭-血圧反射の可塑性とその対策」
研究成果報告書

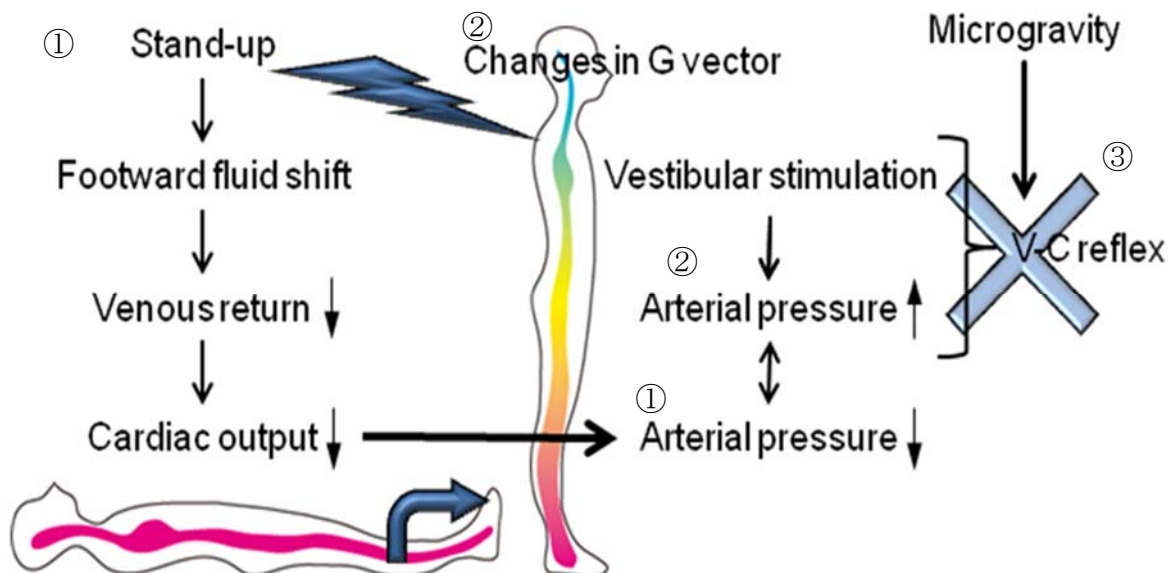
代表研究者: 森田 啓之(岐阜大学)
平成 29 年 9 月



1. 緒言

1.1 研究目標, 背景

臥位から立位へと姿勢変換すると、体の長軸に対する重力方向が変化するため、①体の長軸方向の静水圧差が増加して血液が下方にシフトし、心臓に還ってくる血液量および心臓から駆出される血液量（心拍出量）が減少し、心拍出量と血管抵抗の積である血圧が低下する。この血圧低下は、前庭－血圧反射と圧受容器反射により調節される。すなわち、②姿勢変換による重力変化は内耳にある重力感知器官である前庭を刺激し、前庭－血圧反射を介して血圧を上昇させる。この上昇は素早く起こり強烈であるが、血圧に基づいた血圧調節でないため、誤差が生じる。この誤差は、圧受容器反射により補正される。このように、前庭－血圧反射は起立時の血圧調節に重要な役割を果たしている。しかし、③前庭系は可塑性が強い器官であることが知られており、異なる重力環境－ μG －に曝されると、前庭－血圧反射の調節力が低下し、帰還後、前庭－血圧反射が働かず、起立性低血圧が起こる可能性がある。本実験は、宇宙飛行士を被験者として、飛行前後で前庭－血圧反射の調節力を評価し、この仮説を検証する。



実験背景として、これまで前庭－血圧反射について、ラット及びヒト実験で以下の知見を得ている。

【ラット実験】

- ・2 G あるいは 3 G 環境下の飼育では、前庭－血圧反射の可塑性が起こり、重力変化に対する血圧応答が小さくなる。
- ・過重力環境下で起こる前庭－血圧反射の可塑性は、日々の活動量が低下するため、頭部の動きによる phasic な前庭系への入力が増加することが原因であり、弱い前庭電気刺激を連続的に与えることにより、前庭－血圧反射の可塑性を予防できる。
- ・日々の活動を制限するため、屋根を低くした飼育ケージでラットを飼育し、活動に伴う前庭系への phasic な入力を減少させると、前庭－血圧反射の可塑性が起こる。
- ・末梢の前庭器官を GVS 刺激 (Galvanic Vestibular Stimulation) することにより、重力変化に基づく前庭系の入力をマスクすることが可能であり、重力変化に基づく前庭－血圧反射を遮断することができる。しかも、その効果は、前庭破壊と同程度であり、非侵襲的・可逆的な前庭遮断法として

GVS を使用できる。

【ヒト実験】

- ・健康若年者では、起立時の血圧はよく維持されているが、GVS を用いて前庭系への入力をマスクすると、起立時の血圧低下がみられる。すなわち、ヒトにおいても起立時の血圧調節に前庭－血圧反射が働いていることが証明された。また、日常の活動が低下している高齢者では、前庭－血圧反射が働かず、起立時の血圧低下がみられた。
- ・地上公募研究(2005～2007 年度)において、パラボリックフライト中の血圧変動が GVS によりどのような影響を受けるかを健康成人において調べた。

GVS 関連の最初の報告は、18 世紀末の Volta による「頭部に電流を流すと目眩を感じる」というものである。それ以降 100 年以上にわたり、GVS は前庭系の検査として多くの研究に用いられてきた。

GVS は、前庭検査や前庭への正常な入力遮断のためのツールとしてだけではなく、パイロット訓練、ゲームなどのエンターテインメントとしての使用も増えている。

本研究のオリジナリティは、前庭系を刺激して前庭－眼反射、前庭－脊髄反射などを誘発し、その応答から前庭機能を推定するのではなく、GVS により前庭系にランダムな入力を与えることにより、姿勢変換に伴う前庭系への入力をマスクし、姿勢変換に伴う前庭－血圧反射を遮断することである。本使用法を初めて提案、その有効性を検証することである。

1.2 研究の必要性、意義

これら一連の研究は、地球帰還後の宇宙飛行士におこる起立性低血圧(起立耐性低下)の原因究明と、新たな予防策の確立に役立つ。宇宙の微小重力環境による前庭系の可塑性は、日常動作に伴う前庭系への入力が無くなることが原因と考えられる。これと同様の減少は地上において、日々の活動が低下し、前庭系への phasic な入力が減少するような高齢者でも起こると考えられる。従って、高齢者で頻繁に見られる起立性低血圧および起立時転倒の原因の解明と予防策の確立にも役立つと思われる。

2. 研究計画

2.1 研究目標、内容

本研究では、ISS 滞在宇宙飛行士6名を対象に、仮説「宇宙の μ G 環境により、前庭－血圧反射の可塑性が起こり、帰還後起立耐性が低下する」を検証するため、飛行前後に起立試験を行い、血圧応答を調べる。

前庭系の関与は、GVS により外部から末梢前庭器官を電気刺激することにより起立によって生じる前庭系の入力をマスクすることにより、前庭－血圧反射を起こらなくすることにより以下の仮設が検証されるため、以下のサクセスクライテリアを設定した。

- ・前庭－血圧反射が起立時の血圧調節に関与していれば、GVS-off では起立時の血圧は維持され、強い GVS-on では起立時の血圧は低下。
- ・前庭－血圧反射に可塑性が起こり、反射の機能が低下していれば、GVS の有無にかかわらず血圧が低下。
- ・微弱 GVS-on が前庭系の調節能力を強化、血圧を上げ、廃用機能低下予防のカウンターメジャとなる可能性あり。関連すれば帰還後弱 GVS-on ではその場の血圧低下はなし。

サクセスクライテリア

サクセス	クライテリア
ミニマムサクセス	ISS クルー6 名(n=6)に対し、飛行前、帰還直後、帰還数日経過時に GVS を変化(なし、強い刺激、弱い刺激)させた条件でヘッドアップチルト試験を行い、微小重力環境滞在による前庭-血圧反射の可塑性、及び起立耐性への影響を評価する指標として、 <u>飛行前後での GVS の有無による血圧応答の変化を確認</u> できること。
フルサクセス	ミニマムサクセスに加え、 <u>飛行前、帰還直後、帰還後日数経過時の各時点での GVS の条件(なし/強/弱)に依存した血圧応答の変化を確認</u> でき、仮説「 μ G により前庭-血圧反射の可塑性が起こり、帰還後起立耐性が低下する」の検証、及び GVS 刺激の効果の有無が確認できること。
エクストラサクセス	・飛行後の起立性血圧低下防止の効果的なカウンタメジャにつながるような有効な結果が得られること(弱い GVS 刺激の有効性実証など)。又は、 ・フルサクセスを超える新たな現象の発見に至ること。

2.2 体制

本研究の体制を表 2.2-1 に、作業分担を 2.2-2 に示す。各フェーズにおいて体制、作業分担とも問題なかった。

表 2.2-1 実施体制(実験実施時)

役割	氏 名	所 属	担当
研究代表者	森田 啓之	岐阜大学大学院医学系研究科 教授	研究の統括
共同研究者	山本 義春	東京大学大学院教育学研究科 教授	GVS 装置の改良と実証実験
	田中 邦彦	岐阜医療科学大学保健科学部 教授	改良型 GVS 装置を用いた起立実証実験
	安部 力	岐阜大学大学院医学系研究科 准教授	改良型 GVS 装置を用いた起立実証実験
研究コーディネータ	白川正輝 西川 和香 芝 大 圓入 清二 谷井はるな	JAXA 宇宙環境利用センター 技術領域主幹 JAXA 宇宙環境利用センター 開発員 JAXA 宇宙環境利用センター 主任研究員 JAXA 宇宙環境利用センター 主任開発員 JAXA きぼう利用センター 研究開発員	実施計画策定、装置の安全性評価・運用準備

役割	氏 名	所 属	担当
研究支援	大西 伸和	(一財)日本宇宙フォーラム 宇宙利用事業部 部長	安全性評価, 実験支援
	山中 亜利	(一財)日本宇宙フォーラム 宇宙利用事業部 研究員	

表 2.2-2 作業分担 (実験実施時)

No	作業項目	研究者チーム	JAXA 宇宙環境利用センター
1	実験要求, 運用要求, 実験条件の検討, 策定	○	支援
2	実施計画の策定	—	○
3	実験装置の検討, 製作	○	支援
4	実験装置の安全性の評価, 確認	支援	○
5	運用準備(手順書作成, 宇宙飛行士訓練など), 輸送	支援	○
6	飛行前・飛行後実験実施	○	支援
7	飛行後解析, 成果発表	○	支援

2.3 スケジュール

図 2.3-1 に実験候補選定から飛行後解析までの計画スケジュールを示す。

本テーマは, 2009 年ライフサイエンス国際公募で候補テーマとして選定された。

2011 年 6 月に実験準備フェーズ移行にかかる外部評価会, 2011 年 9 月実験準備フェーズ移行審査会を実施した。BDC(Baseline Data Collection)実施にあたり, 2012 年 2 月に JSC 安全審査(Test Readiness Review: TRR) 及び多極のヒト実験倫理審査を受審し承認された。被験者となるクルーについて, 事前にインフォームドコンセントを行い, 実験実施の了承を得た。2012年から飛行前後のBDCデータ取得を開始し, 2016 年 に 6 番目の被験者の #3Post-BDC(最終 BDC)を実施しデータ取得を終了した。

年	FY2010	FY2011	FY2012	FY2013	FY2014
月	3	4 5 6 7 8 9 10 11 12 1 2 3	4 5 6 7 8 9 10 11 12 1 2 3	4 5 6 7 8 9 10 11 12 1 2 3	4 5 6 7 8 9 10 11 12 1
		▼ フェーズ移行審査会			
実験要求・運用要求	→ 実験要求・運用要求・実験条件の検討、策定、地上予備実験				
実験装置		→ 地上装置準備・試験・JSC安全審査			
運用準備	▼ Inc.31-32 エントリー	▼ Inc.33-34 エントリー	→		
最初の実験実施時期(予定)			pre-BDC → #1post-BDC → #2post-BDC → #3post-BDC		
		被験者数(n)=6 となるまで継続	pre-BDC → #1post-BDC → #2post-BDC → #3post-BDC		
解析				→	→

図 2.3-1 実験候補選定から飛行後解析までの計画スケジュール

3. 実験準備・運用

3.1 実験準備

図 3.1-1 に示す実験装置コンフィギュレーションを実現するため、国内から JSC へ輸送または JSC 品を借用し、JSC で BDC データ取得可能とした。

各実験装置の仕様を表 3.1-1 に示す。

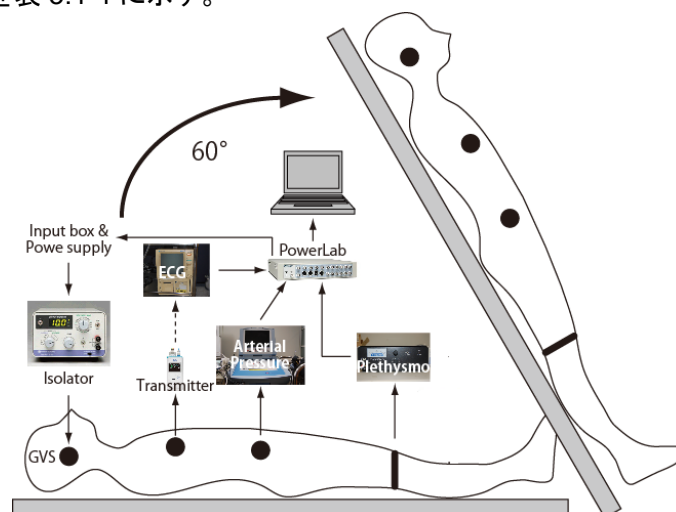


図 3.1-1 実験装置コンフィギュレーション

表 3.1-1 a 実験装置 (JSC 借用品)

実験装置名称	条件	要求事項等
ティルトベッド	0-60° のチルト角に対応 サドル付き。	① サドル: 下肢の筋肉が収縮して筋ポンプが働くことを防ぐため、被験者はサドル用の物に腰をかけ、足が下につかないように工夫したもの。  AES 開発品 ② ティルト角 0°から 60°へと電動で変化させられること  JSC 品 (Omni Technologies, model #OT-9003) を借用。
血圧計 (Finomoter)		Finometer: Finapres Medical Systems, Amsterdam, The Netherlands, もしくは JSC 品借用
心電図計		JSC 品借用。
ストレインゲージプレチスモグラフ		EC6, Hokanson, Bellevue, WA, USA, もしくは JSC 品借用

表 3.1-1b 実験装置 (JAXA 準備品)

器具類名称	数量	使用条件・要求仕様等
GVS 装置	1	ML1101(ADInstruments)及び電源ボックス   Stimulus Isolator Power Supply (Nihon Kohden)
血圧計 (Finometer)	1	Finometer: Finapres Medical Systems, Amsterdam, The Netherlands, もしくは JSC 品借用 
心電図計	1	JSC 品借用 MDE Escort II 

器具類名称	数量	使用条件・要求仕様等
ストレインゲージプレチスモグラフ	1	 EC6, Hokanson, Bellevue, WA, USA, もしくは JSC 品借用
ティルトベッド用サドル	1	JAXA が持ち込む。下肢の筋肉が収縮して筋ポンプが働くことを防ぐため、被験者が腰をかけて足が下につかないようにする。 
PC	1	GVS 刺激の制御, および心電図, 血圧計, ストレインゲージプレチスモグラフのモニタ
PowerLab	1	A-D 変換 
電極	適量	GVS 刺激用, 心電図用
ストレインゲージ	13	ストレインゲージプレチスモグラフに利用 
アイマスク	1	一般的な仕様

3.2 実験運用

本研究は、軌道上でのデータ取得の必要はなく、地上での飛行前後の BDC データ取得を行った。

BDC データ取得は 1 人のクルーに対して、飛行前 1 回 (Pre: L-3 ヶ月以内), 飛行後 3 回 (P1: R+3 日以内, P2: 2 週間 $\pm$ 4 日, P3: 2 $\pm$ 0.5 カ月以内) の合計 4 回行った。

BDC 取得時の実験条件を表 3.2-1 に、実験内容を表 3.2-2 に示す。

表 3.2-1 実験条件

条件	内容	対象被験者
GVS-off+HUT	GVS なしで、チルト試験を実施。	同一被験者に全条件、各 4 回、ランダムに実施。
強い GVS-on + HUT	強い GVS を行いながら、チルト試験を実施。	
弱い GVS-on + HUT	弱い GVS を行いながら、チルト試験を実施。	

表 3.2-2 実験内容

No.	実験内容	要求
1	準備	25 分
	実験室に入室後、被験者にはティルトベッドに横でなってもら(この時のベッドの角度は 0°)。	
2	チルト試験準備	
	Ag/AgCl 電極を両側耳介後部の乳様突起に貼り付け、血圧測定用指尖カフ、心電図電極、ストレインゲージプレチスモグラフを装着する。	
	GVS を開始する。刺激波形はサイン波とし、周波数を 1.5 Hz とする。	
	刺激強度を 0 mA から徐々に強くしていくと被験者は体が陰極側に傾く感覚を自覚し始め、さらに刺激を強くしていくと電極部分にピリピリとした不快感を覚えるようになる。刺激強度は、弱い GVS の場合は、頭部動揺感の閾値(通常 0.2 mA~0.5 mA)以下、強い GVS の場合は、頭部動揺感の閾値と不快感の閾値(通常 3~5 mA)の間に設定する。なお、起立実験 1 回につき GVS は最長 4 分間である。	
	血圧、心電図、下腿容積を連続測定する。アイマスクをする。	
3	チルト試験	93 分
	1 分間の仰臥位データ取得後、ティルトベッドを起こし 60°頭部挙上(HUT)する。2 分間の頭部挙上データ取得後、ティルトベッドを倒して仰臥位に戻し 1 分間観察する。この 4 分間の測定(起立試験)を 1 セットとし、i) GVS-off, ii) 弱い GVS-on, iii) 強い GVS-on で各 4 回、順序をランダムに行う。個体内変動を小さくするためには各 4 回(最大)の実験を行い平均加算する必要がある。 なお、1 回の HUT 試験後、モニタしている血圧が HUT 前の値に戻ってから次の HUT 試験を継続する。チルト試験中、万が一、時間の不足が予測された場合、①強い GVS-on/GVS-off 条件を優先させる、②3 条件×3 回とする、③弱い GVS-off をスキップする、の順位にて実施とする。	
4	片づけ	2 分
合計		120 分

4. 実験結果及び成果

ISS に 156 ± 9 (127–188) 日間滞在した 6 名の男性宇宙飛行士 (38–53 才) を被検者として実験を実施した。実験実施日の身体データを表 4-1 に示す。臥位安静状態での血圧および心拍数は、帰還直後に上昇している傾向があったが、統計学的に有意ではなかった。

表 4-1 実験当日の身体データ

	Pre	P0	P1	P3
身長 (cm)	175.8 ± 3.1	175.5 ± 3.5	175.5 ± 3.5	175.7 ± 3.2
体重 (kg)	78.5 ± 4.6	79.2 ± 4.7	79.4 ± 4.9	78.7 ± 4.8
収縮期血圧 (mmHg)	120.7 ± 2.7	129.3 ± 5.3	131.5 ± 4.5	121.4 ± 5.6
拡張期血圧 (mmHg)	73.6 ± 3.5	78.9 ± 3.9	76.6 ± 3.4	69.9 ± 3.3
平均血圧 (mmHg)	90.2 ± 3.1	98.0 ± 4.6	96.3 ± 3.9	87.9 ± 3.3
心拍数 (bpm)	55.3 ± 2.8	62.5 ± 4.0	59.9 ± 2.4	56.7 ± 2.4

HUT 直後の血圧応答

Pre では HUT 直後に一過性の血圧上昇 (7.1 ± 1.9 mmHg) がみられたが (図 4-1), P1 および P2 では一過性上昇はみられず, HUT 直後に血圧が低下した。HUT 直後 20 秒間の血圧応答の総和 (area under the curve) は, Pre では 96 ± 22 mmHg·20 s であったが, P1 では -64 ± 18 mmHg·20 s と有意に低下し, P2, P3 で徐々に回復した。

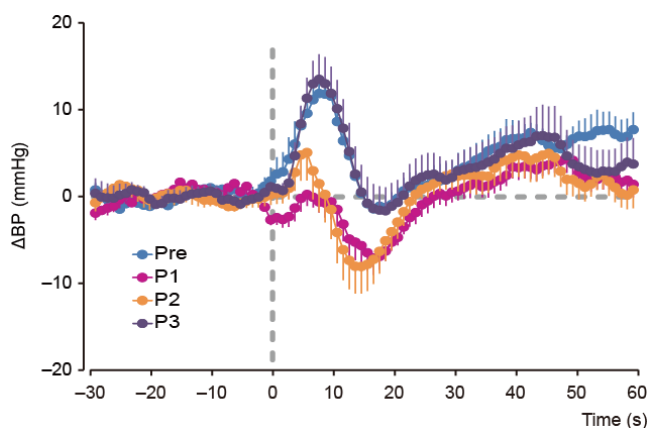


図 4-1 HUT 直後の平均動脈血圧変化

前庭－血圧反射の変化と weak-GVS の効果

前庭－血圧反射の大きさ (GVS-off－strong-GVS) を図 4-2 に示す。Pre では 150 ± 19 mmHg·20 s であったが, P1 (-45 ± 18 mmHg·20 s) および P2 (-46 ± 41 mmHg·20 s) では有意に減少し, P3 は Pre のレベルにまで回復した。一方, GVS-off と weak-GVS の応答の差は, Pre で 5 ± 7 mmHg·20 s であったが, P1 (-82 ± 25 mmHg·20 s) および P2 (-80 ± 40 mmHg·20 s) ではマイナスとなり, weak-GVS の方が HUT 時の血圧が高かった (図 4-3)。

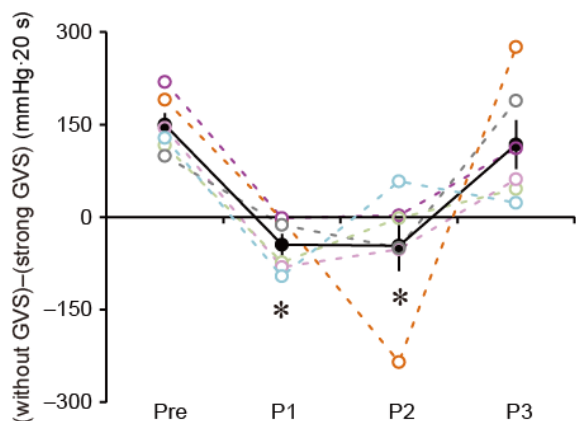


図 4-2 前庭－血圧反射の変化

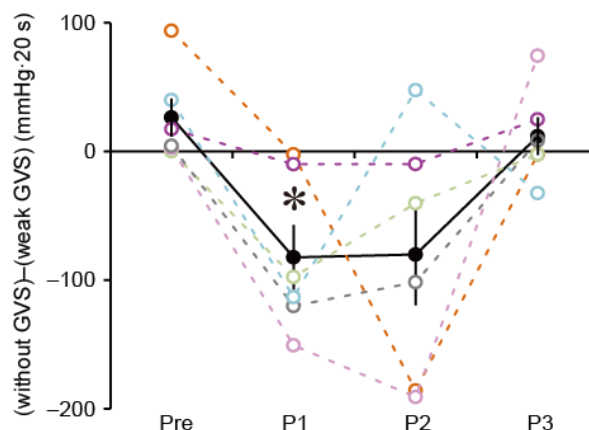


図 4-3 weak-GVS の効果

サクセスクライテリア

サクセス	クライテリア	達成度	説明
ミニマムサクセス	ISS クルー6 名 (n=6) に対し、飛行前、帰還直後、帰還数日経過時に GVS を変化(なし、強い刺激、弱い刺激)させた条件でヘッドアップチルト(HUT)試験を行い、微小重力環境滞在による前庭-血圧反射の可塑性、及び起立耐性への影響を評価する指標として、 <u>飛行前後での GVS の有無による血圧応答の変化を確認</u> できること。	◎	ISS クルー6 名において、飛行前後のデータ全てを欠損なく取得できた。飛行前には GVS なしでは、HUT 直後に血圧が上昇したが、GVS 強では血圧が低下した。この差は帰還直後～2 週間後にはなくなった。
フルサクセス	ミニマムサクセスに加え、 <u>飛行前、帰還直後、帰還後日数経過時の各時点での GVS の条件(なし/強/弱)に依存した血圧応答の変化を確認</u> でき、仮説「 μ G により前庭-血圧反射の可塑性が起こり、帰還後起立耐性が低下する」の検証、及び GVS 刺激の効果の有無が確認できること。	◎	GVS なし GVS 強の HUT 時の血圧応答の差から前庭－血圧反射の大きさが推測できた。その結果、飛行前には前庭－血圧反射が働いて、HUT 時の血圧が維持されたが、帰還直後～2 週間は前庭－血圧反射が全く働かなくなり、HUT 時の血圧が低下した。この結果は仮説を支持するものである。
エクストラサクセス	・飛行後の起立性血圧低下防止の効果的なカウンタメジャにつながるような有効な結果が得られること(弱い GVS 刺激の有効性実証など)。又は、 ・フルサクセスを超える新たな現象の発見に至ること。	○	6 名中 4 名のクルーにおいて、GVS 弱により帰還直後の HUT 時の血圧低下が予防できた。このことは、GVS 弱が起立性低血圧のカウンタメジャとして使用できる可能性を示すものである。

◎: 高度に達成, ○: 達成, △: 一部達成, ×: 未達成

5. 結言

長期宇宙滞在により前庭系の可塑的变化が起こり、帰還後には前庭－血圧反射が全く働かなくなり、起立時に血圧が低下することが示された。また、GVS 弱により帰還後起立時の血圧低下が予防できる可能性が示された。前庭系は、眼球運動、姿勢制御、血圧などの調節以外にも、筋・骨代謝にも関連していることが報告されている。本研究の結果は、宇宙滞在により変化した前庭系の機能を GVS によりコントロールして、宇宙滞在に伴う種々の合併症－平衡障害、起立耐性低下、筋・骨量減－を予防することができる可能性を示すものである。

【参考文献】

Morita H, Abe C, Tanaka K: Long-term exposure to microgravity impairs vestibulo-cardiovascular reflex. Scientific Reports, 6:33405, doi: 10.1038/srep33405, 2016.

掲載論文業績

1. Abe C, Shibata A, Iwata C, Morita H.: Restriction of rear-up-behavior-induced attenuation of vestibulo-cardiovascular reflex in rats. *Neurosci Lett*. 2010 Oct 22;484(1):1-5. (IF: 2.026)
2. Abe C, Tanaka K, Iwata C, Morita H.: Vestibular-mediated increase in central serotonin plays an important role in hypergravity-induced hypophagia in rats. *J Appl Physiol*. 2010 Dec;109(6):1635-43. (IF: 3.484)
3. Iwata C, Abe C, Tanaka K, Morita H. Role of the vestibular system in the arterial pressure response to parabolic-flight-induced gravitational changes in human subjects. *Neurosci Lett*. 2011 May 16;495(2):121-5. (IF: 2.026)
4. Abe C, Iwata C, Shiina T, Shimizu Y, Morita H. Effect of daily linear acceleration training on the hypergravity-induced vomiting response in house musk shrew (*Suncus murinus*). *Neurosci Lett*. 2011. Sep 20;502(3):138-42. (IF: 2.026)
5. Abe C, Kawada T, Sugimachi M, Morita H. Interaction between vestibulo-cardiovascular reflex and arterial baroreflex during postural change in rats. *J Appl Physiol*. 2011 Dec;111(6):1614-21. (IF: 3.484)
6. Tanaka K, Abe C, Sakaida Y, Aoki M, Iwata C, Morita H. Subsensory galvanic vestibular stimulation augments arterial pressure control upon head-up tilt in human subjects. *Auton Neurosci*. 2012 Jan 26;166(1-2):66-71. (IF: 1.846)
7. Morita H, Abe C. Reply to Sauder and Ray. *J Appl Physiol*. 2012 Mar;112(6):1088. (IF: 3.484)
8. Tanaka K, Nishimura N, Sato M, Kanikowska D, Shimizu Y, Inukai Y, Abe C, Iwata C, Morita H, Iwase S, Sugeno J. Arterial pressure oscillation and muscle sympathetic nerve activity after 20 days of head-down bed rest. *Auton Neurosci*. 2013 Oct;177(2):266-70. (IF: 1.846)
9. Morita H, Abe C, Tanaka K. Long-term exposure to microgravity impairs vestibulo-cardiovascular reflex. *Sci Rep*. 2016 Sep 16;6:33405. (IF: 5.228)

口演・講演業績

1. 森田啓之：重力変化により引き起こされる前庭系の可塑性 平成 26 年度 宇宙医学生物学研究ワークショップ第 1 回「宇宙滞在による自律神経・循環機能の変化と対策—ISS での研究成果と、今後の挑戦—」2015.2.20 (東京)
2. 森田啓之：長期宇宙滞在により引き起こされる前庭機能低下とその対策 第 92 回 日本生理学会大会 2015.3.21 (神戸)

3. 森田啓之：重力変化に対する前庭系の可塑性 第 74 回日本めまい平衡医学会総会 2015.11.25（岐阜）
4. 森田啓之：宇宙から帰還後の循環制御と NASA での実験 第 37 回日本循環制御医学会総会 2016.7.9（東京）

競争的資金

1. 森田啓之：前庭系可塑性応答の統合的理解と適応障害対策 新学術領域研究（文部科学省）平成 27 年-31 年
2. 森田啓之：重力変化に対する耳石・前庭系の適応：過重力で微小重力が模擬できるか？基礎研究 C（文部科学省）平成 27 年-29 年

平成29年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果(宇宙医学)

研究課題

前庭-血圧反射の可塑性とその対策(V-C Reflex)

代表研究者; 森田啓之(岐阜大学)

総合評価

A: 目標を十分に達成した(エクストラサクセス相当以上)

宇宙の微小重力環境により前庭-血圧反射の可塑性が起こり、帰還後起立耐性が低下するという仮説が検証され、帰還後のカウンタメジャーとしての GVS (Galvanic Vestibular Stimulation; 前庭系電気刺激) の有効性を示せたことの意義は高い。本研究の重要性は前庭-血圧反射の可塑性に関する生理学的機序の解明にあり、継続すべき課題である。

ただし、起立時の血圧調整は前庭-血圧反射で全ての現象を説明できる訳ではなく、これに関わる因子として、これ以外に血行力学因子、液性因子があり、個人差による要因の究明も必要である。高齢者などを対象とした医療機器開発などへの発展が期待される成果であり、今後、さらなるフォローアップを期待する。

平成 29 年 11 月
きぼう利用テーマ選考評価委員会(宇宙医学)

ISS・きぼう利用ミッション
「前庭－血圧反射の可塑性とその対策 (V-C Reflex)」
研究成果概要書
代表研究者：森田啓之（岐阜大学大学院医学系研究科）
2017 年 11 月

前庭系は姿勢変換時の血圧調節に重要な役割を果たしている（前庭－血圧反射）。しかし、前庭系は可塑性が強い器官であり、微小重力の様な地上の $1g$ とは異なる重力環境に曝されると前庭－血圧反射の調節力が低下して、地上帰還後に起立性低血圧を引き起こす可能性がある。この仮説を証明するため、6名の宇宙飛行士について、127-188日のISS滞在前後に 60° head-up tilt (HUT) を実施し、血圧応答を調べた。また、前庭系への入力をマスクし、HUT時の前庭－血圧反射を遮断する galvanic vestibular stimulation (GVS) を行いながら HUT を実施し、GVS-off と strong-GVS の血圧応答の差から前庭－血圧反射の調節力を推定した。さらに、閾値下の GVS (weak-GVS) により前庭－血圧反射が改善されるかどうかを調べた。起立直後 20 秒の血圧応答は、飛行前 (Pre) では $96 \pm 22 \text{ mmHg} \cdot 20 \text{ s}$ であったが、帰還直後 (P1, R+1-4 d) は $-64 \pm 18 \text{ mmHg} \cdot 20 \text{ s}$ と有意に低下し、2週間後 (P2), 2ヵ月後 (P3) と徐々に回復した。前庭－血圧反射の大きさ (GVS-off - strong-GVS) は、 $150 \pm 19 \text{ mmHg} \cdot 20 \text{ s}$ であったが、P1 ($-45 \pm 18 \text{ mmHg} \cdot 20 \text{ s}$) および P2 ($-46 \pm 41 \text{ mmHg} \cdot 20 \text{ s}$) では有意に減少し、P3は前値にまで回復した。一方、GVS-off と weak-GVS の応答の差は、Pre で $5 \pm 7 \text{ mmHg} \cdot 20 \text{ s}$ であったが、P1 ($-82 \pm 25 \text{ mmHg} \cdot 20 \text{ s}$) および P2 ($-80 \pm 40 \text{ mmHg} \cdot 20 \text{ s}$) ではマイナスとなり、weak-GVSの方がHUT時の血圧が高かった。以上の結果から、宇宙滞在から帰還後、1) HUT時の血圧低下が起こる。2) 前庭－血圧反射は全く働かなくなる。3) これらの変化は2ヵ月をかけて、徐々に回復してくる。4) HUT時の血圧低下に対する countermeasure として、weak-GVSが使用できる可能性が示された。

Summary report of the ISS-Kibo utilization mission,
“Plastic alteration of vestibulo-cardiovascular reflex and its countermeasure
(V-C Reflex)”

Principal Investigator: Prof. Hironobu Morita
(Graduate School of Medicine, Gifu University)

November 2017

The vestibular system is known to have a significant role in controlling arterial blood pressure (AP) upon posture transition (vestibulo-cardiovascular reflex, VCR). However, this system is known to be highly plastic, i.e., if subjects are exposed different gravitational environment, the sensitivity of the system is altered. Thus, it is possible that the sensitivity of VCR is diminished after spaceflight, and then orthostatic hypotension is induced after spaceflight. To test this hypothesis in humans, we investigated the ability of VCR to maintain AP upon 60° head-up tilt (HUT) before and after a 127–188 days stay on the International Space Station (ISS). At pre-spaceflight (Pre), a transient increase in AP (11.9 ± 1.6 mmHg) was observed at the onset of HUT. However, that increase was not seen at 1–4 days after return (P1), when blood pressure decreased by 7.1 ± 1.9 mmHg upon HUT. To transiently interrupt VCR, strong galvanic vestibular stimulation (GVS) was applied, and the magnitude of VCR was evaluated by comparing the HUT-induced AP response with and without strong-GVS. The magnitude of VCR was attenuated at P1 (from 150 ± 19 mmHg·20 s at Pre to -45 ± 18 mmHg·20 s at P1) and recovered to the pre-spaceflight levels at 2 months after return (118 ± 40 mmHg·20 s). Furthermore, whether sub-threshold weak-GVS can ameliorate VCR after the ISS stay was examined. The impaired-VCR was ameliorated if weak-GVS was applied during HUT at P1. These results indicate that long-term exposure to microgravity induces VCR impairment, which may be involved in a mechanism of spaceflight-induced orthostatic intolerance. Furthermore, weak-GVS might serve as a new countermeasure for orthostatic intolerance after return from spaceflight.