

国際宇宙ステーション (ISS) と植物宇宙実験 (その 3)

— Auxin Transport 宇宙実験の実際 —

宮本 健助 (大阪府立大学高等教育推進機構教授)

山本 良一 (帝塚山大学名誉教授)

上田 純一 (大阪府立大学名誉教授)

1. はじめに

2020 年は新型コロナウイルス感染症「COVID-19」による終息の見えないパンデミックに見舞われた年であった。そのような中、12 月 6 日未明 (日本時間) に宇宙航空研究開発機構 (JAXA)・「はやぶさ 2」プロジェクトによる宇宙科学に関する偉業のニュースがもたらされた (<https://www.isas.jaxa.jp/missions/spacecraft/current/hayabusa2.html>)。「はやぶさ 2」は小惑星「イトカワ」の表面物質を持ち帰ることに成功した「はやぶさ」の後継機として、2014 年 12 月 3 日に HII-A ロケットで打ち上げられ、2018 年夏に小惑星「リュウグウ (Ryugu)」に到着し、「リュウグウ」が太陽の周りを一周あまり公転する約 18 か月間そこに滞在し、その間、その探査、人工クレーターの生成、人工クレーターへの 2 回のタッチダウン (着陸) と地下物質のサンプル採取など、数々の世界初の偉業を成し遂げた。2019 年に「リュウグウ」を出発し、太陽の周りを 1 周弱回った後、地球大気圏突入軌道に軌道修正し、2020 年 12 月 5 日 14 時 35 分、地球からの距離約 22 万 km のところで「リュウグウ」の砂が入ったとみられる直径 40 cm ほどのカプセルを分離した。12 月 6 日午前 2 時 28 分頃にカプセルが大気圏に再突入したことが、火球により確認された。カプセルは、6 日午前 4 時 47 分にオーストラリアのウーメラ砂漠地帯 (Woomera Prohibited Area) で発見・回収され、今後、神奈川県相模原市にある JAXA・宇宙科学研究所で解析される予定とされる。6 年間にわたり約 52 億 km を飛行した「はやぶさ 2」本体は、地球大気圏突入軌道を離れ、更に 100 億 km を飛行して 11 年後の 2031 年に地球と火星との間を回る直径 30 m の小さな小惑星「1998KY26」に到着する見通しであるという。

「リュウグウ」は、先行機「はやぶさ」が探査した小惑星「イトカワ」と同じ岩石質の小惑星でありながらより始原的な天体で、そこには太陽系が誕生した今から約 46 億年前の有機物や含水鉱物が残されていると考えられている。「リュウグウ」から採取した試料を分析することによって、太陽系空間にあった有機物や水がどのようなものであったのか、そして、どのように相互作用し共存してきたのかが明らかにされれば、太陽系の成り立ちと生命の起源の秘密にも迫ることができるかも知れない。「はやぶさ 2」のカプセルが「リュウグウからの玉手箱」という言われ方をしていることにも納得させられる。

また、2020 年は、アメリカ航空宇宙局 (National Aeronautics and Space Administration, NASA) を中心とし、アメリカの民間宇宙飛行会社・スペース X 社、JAXA、欧州宇宙機関、カナダ宇宙庁、オーストラリア宇宙庁などの国際的パートナーによって実施される月面着陸計画 (アル

テミス計画) が大きく動き始めた年でもある。スペースシャトルが退役して以来途絶えていたアメリカの有人宇宙船がスペース X 社により開発され、「クルードラゴン」と名付けられたその 1 号機が、11 月 16 日にアメリカ・フロリダ州ケネディ宇宙センターから、同社のファルコン 9 ロケットで国際宇宙ステーション (International Space Station, ISS) に向けて打ち上げられた。アルテミス計画では、2024 年までに「最初の女性を、次に男性を」月面に着陸させること、さらに、2028 年に月面基地を設置することを目標としている。加えて、中国も独自の月探査・月面基地計画を活発化させており、宇宙開発競争が急速に激しさを増してきている。

しかしながら、人類の長期間にわたる宇宙利用を可能にするには、単にヒトを宇宙空間に送り込むだけではかなわず、そこでの生活圏を確立する必要がある。そのためには、ヒトをはじめとする従属栄養生物の生命活動を支える光独立栄養生物である植物を、持続的に生育させることが必須となる。それにはまず、宇宙環境下における植物の成長・発達を十分に明らかにする必要がある。

地球上の物体全てに対して、地球の「重力」が作用している。宇宙環境利用にとって、「重力」がどのようにして植物の姿勢を制御 (具体的には、地球上で育てた植物の茎は地面・地球の中心とは反対の方向、すなわち反重力方向に、一方、根は地中に、すなわち重力方向に成長する) しているかのメカニズムを明らかにすることは、極めて重要である。帝塚山大学人間環境科学研究所紀要「人間環境科学」Vol. 27 (2020 年) に掲載された「国際宇宙ステーション (ISS) と植物宇宙実験 (その 2) - 宇宙開発と植物 -」に記載のとおり、我々は ISS 上の宇宙環境を利用した、JAXA の ISS・きぼう利用ミッション「宇宙環境を利用した植物の重力応答反応機構および姿勢制御機構の解析」を主たる研究目標として当該宇宙実験を提案したところ、2010 年にその提案が採択され、その後、図 1 に示すとおり、さまざまな実験条件を克服してようやく 6 年後の 2016 年～2017 年に ISS の軌道上実験を実施する機会を得ることができた。

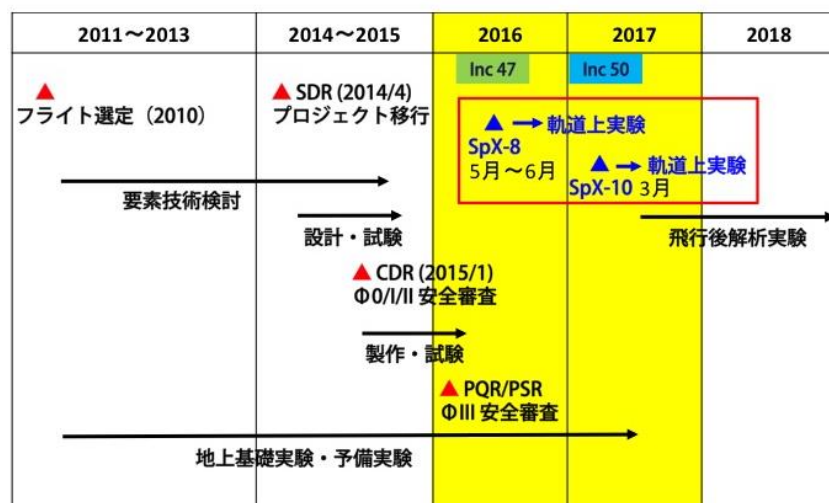


図 1. 「Auxin Transport」宇宙実験が提案・採択され、さらに実施されるまでの時間的経過

我々は先に今般とほぼ同様の研究目的をもって、1998 年にスペースシャトル「ディスカバリー」を利用した STS-95 植物宇宙実験を実施した (Ueda et al., 1999, 2000)。STS とは、Space Transportation System、つまり Space Shuttle の略称 (略号) である。その宇宙実験の結果とその後実施された一連の地上基礎実験の結果から、植物の姿勢制御は植物ホルモンの一つであるオーキシン [Auxin, 天然の化学的本体はインドール酢酸、indole-3-acetic acid (IAA) である] が示す特異な移動、「オーキシン極性移動」に支配されていることが明らかとなった。通常、オーキシンは、植物の茎の先端や若い葉でつくられて、根の方向に一方向に移動する。これを「極性移動」と呼んでいる。今般の宇宙実験「Auxin Transport」(NASA の運用命名法による運用名) では、オーキシン極性移動を実際に司っているさまざまな分子の動態が重力によってどの様に影響を受け、そして、その結果、植物の姿勢がどの様に制御されているかを調べることを大きな目的の一つとした。ここでは、その宇宙実験の実際を中心に記述したい。

まず、簡単に重力 (地球上の物体に作用する地球の万有引力と地球の自転に伴う遠心力との合力) について記しておく。「ピサの斜塔から大小 2 つの金属球を落としてどちらが早く地面に落ちるか？」というガリレオ・ガリレイの行った有名な実験によって、物体の落下速度は物体の重さによらず一定であり同じ高さから落としたものは同じタイミングで地面に落下するが、落下速度は高所から落としたものほど増していくことが明らかにされた。物体の落下速度が単位時間当たりどれだけ速くなるかを示す値が重力加速度 (g : 重力を意味する gravity の頭文字で単位は m/s^2) である。地球上での重力加速度は計測場所によって多少異なるため標準重力加速度 ($9.80665 m/s^2$) が定められており、これを基準とした加速度を大文字の G で表記する。1 G ($= 9.80665 m/s^2$) は地球上の物体に地球の重力がかかっている状態を、0 G は無重力状態を指す。ISS や宇宙船の中では実際には $10^{-6} \sim 10^{-4} G$ ほどの重力がかかっているため微小重力 (μG) と表す (宮本ら、2019, 2020ab を参照されたい)。

2. 研究計画

2.1. 研究目標

今般、筆者らは、重力によって影響される植物の成長・発達、ならびにそれに密接に関係しているオーキシン極性移動の重力制御メカニズムを分子レベルで明らかにするために、エンドウ (*Pisum sativum* L.) とトウモロコシ (*Zea mays* L.) の芽生えを対象に、細胞膜上のオーキシン排出キャリアーである PsPIN1 (Ps はエンドウを意味) と ZmPIN1a タンパク質 (Zm はトウモロコシを意味) をコードする遺伝子の発現とその産物の細胞内局在に焦点を当てて、ISS における宇宙微小重力 (μG) 環境を利用した宇宙実験を行うことを計画した。具体的には、宇宙 μG 環境下で生育した黄化 (暗黒状態で育てられたモヤシ状態を意味) エンドウおよび黄化トウモロコシの芽生えの成長・発達とそれに関連するオーキシン極性移動の詳細を明らかにするとともに、黄化エンドウ芽生え上胚軸 (図 2 左参照、子葉より上の茎) 細胞における *PsPIN1* mRNA、および、

黄化トウモロコシ芽生え幼葉鞘（図 2 右参照、発芽直後に成長する第一葉を保護するイネ科植物に特徴的な器官）細胞および中胚軸（図 2 右参照、幼葉鞘と根との間の器官）細胞における *ZmPIN1a* mRNA の発現に対する宇宙 μ G 環境の影響、さらに PsPIN1 や ZmPIN1a タンパク質の細胞内局在に対する宇宙 μ G 環境の影響を明らかにすることを研究の主たる目的とした。加えて、宇宙 μ G 環境下でオーキシン極性移動が影響されたことによってこれら黄化芽生えにおける内生植物ホルモン動態がどの様に変化するのかについても調べることで、これらの結果を踏まえて重力による植物の姿勢制御のメカニズムを明らかにすることを最終の研究目標とした。

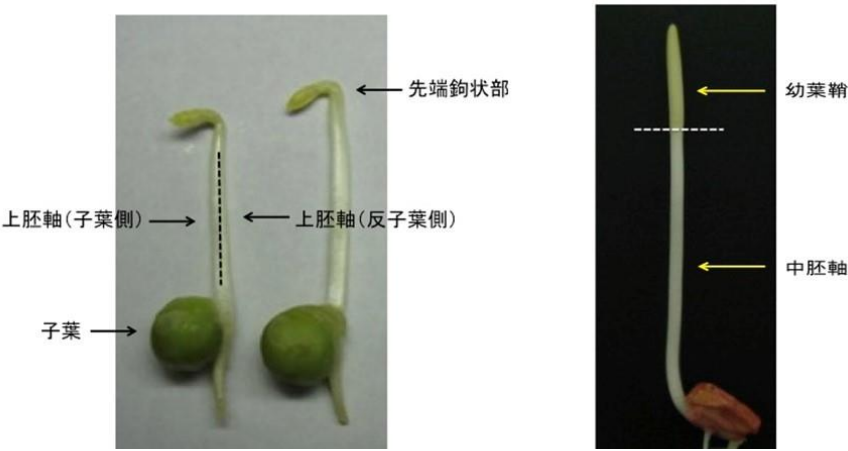


図 2. 3 日齢黄化エンドウ芽生え（左）と 4 日齢黄化トウモロコシ芽生え（右）の写真

2.2. 体制

当該宇宙実験の実施体制は、表 1 のとおりである。

表 1. 「Auxin Transport」宇宙実験の実施体制（順序不同）

実施体制	
研究責任者	
上田 純一	大阪府立大学大学院理学系研究科
共同研究者・研究協力者	
宮本 健助	大阪府立大学高等教育推進機構
上田 英二	大阪府立大学大学院理学系研究科
岡 真理子	鳥取大学農学部
東端 晃・鈴木 智美・山崎 千秋	宇宙航空研究開発機構（JAXA）
嶋津 徹	（財）日本宇宙フォーラム（JSF）
笠原 春夫・佐野 ひろ美	（株）有人宇宙システム株式会社（JAMSS）
鎌田 源司	（株）エイ・イー・エス（AES）

3. 実験準備・運用

3.1. 植物材料

双子葉植物の黄化エンドウ (*Pisum sativum* L. cv. Alaska) 芽生えに対しては、アクリル樹脂製の「pea box」(幅 95 mm × 奥行き 50 mm × 高さ 63 mm、Pea Chamber)、あるいは観察用窓をもつ「pea box」(幅 80 mm × 奥行き 65 mm × 高さ 55 mm、Observation Chamber)を使用した(図3)。いずれも天井に換気用の4つの穴(直径1 cm)を開け、これを疎水性フルオロポア膜(MilliSeal; Merck Millipore, Tokyo, Japan)で覆った。「pea box」の底面に正確に収まるようにロックウール(厚さ: 16 mm、カルチャーマット、(株)日本ロックウール社製)を詰めた。

地上において各「pea box」に12個のエンドウ乾燥種子を、種子がロックウールに完全に埋まるように、また、種子の胚軸(すなわち、胚軸と幼根を結ぶ線)がロックウールの表面に水平になるように埋め込んだ。これらの「pea box」は、SpaceX-8 および SpaceX-10 に搭載され、それぞれ2016年4月9日および2017年2月19日にケネディ宇宙センターからISSに向けて打ち上げられた。

一方、単子葉植物の黄化トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Golden Cross Bantam) 芽生えに対しては、アクリル樹脂製「maize box」(幅 100 mm × 奥行き 62 mm × 高さ 150 mm、Maize Chamber)を使用した(図3)。各「maize box」には通気用に正面に4つ、側面に2つの穴(直径1 cm)を開け、同じ疎水性のフルオロポア膜で覆った。種子の支持体としては、エンドウと同様のロックウールを用い、各「maize box」に20個の種子を、種子の胚軸がロックウール表面に対して垂直となるように正確に埋め込んだ。これらの「maize box」はSpaceX-10に搭載され、2017年2月19日にケネディ宇宙センターからISSに向けて打ち上げられた。

3.2. 軌道上で植物材料を調製するための手順、ならびにサンプル帰還のための手順

研究目的を達成するために、黄化エンドウと黄化トウモロコシ芽生えを用いてISS軌道上実験を実施した。実施に当たっては、実験を実施する宇宙飛行士の作業内容と作業時間の割り振りに従って、実験をRun 1～Run 4の4つの実験に区分して行った。

日本時間の2016年4月9日にSpaceX-8ミッションにおいて開始された最初の実験(Run 2 および Run 3-1 と Run 3-2)は、2016年5月および6月にISS Increment-47で実施された。2017年2月19日のSpaceX-10ミッションでの実験(Run 1 および Run 4)は、2017年3月にISS Increment-50で実施された。それぞれのサンプルは、それぞれSpaceX-9 と SpaceX-10 に搭載された「Cargo Dragon Capsule」によって、2016年8月27日および2017年3月19日に地上に帰還した。ISS搭乗員の作業時間の制約により、Run 2 および Run 3-1 と Run 3-2 の実験はRun 1 の実験よりも早く実施された。具体的な各実験内容は、以下に記載のとおりである。

Run 1: 軌道上で宇宙飛行士が、3個の「pea box」のエンドウ乾燥種子に水 [Milli-Q 純水に高圧滅菌(オートクレーブ)処理を施したもの]、あるいは30 μ M のオーキシン極性輸送阻害剤の一

種であるトリヨード安息香酸 (triiodobenzoic acid, TIBA) (Sigma-Aldrich, MO, USA) を、各 45 mL を給水後、細胞培養装置 (Cell Biology Experiment Facility : CBEF) 内の宇宙 μG 環境区と遠心機による人工 1 G 環境区 (コンパートメント) に配置した。この様な環境下で、黄化エンドウ芽生えを 3 日間 (68 時間 10 分)、暗所、23.5°C で発芽・成長させた。

実験終了時に写真を撮影した後、黄化エンドウの芽生えを、免疫組織化学解析用のサンプルを保存するために特別に設計された化学固定用袋 (化学固定用バッグ : Chemical Fixation Bag : CFB) を使用して固定液で固定した。その後、CFB はプラスチック製の箱に保管され、ISS キャビン内のプラス (+) 2°C 環境、および実験室フリーザー (Minus Eighty-degree Celsius Laboratory Freezer : MELFI) のマイナス (-) 95°C で保存された。

Run 2 : 上記の給水後、ISS の CBEF 内の宇宙 μG 環境下、および CBEF 内の遠心機によって出された人工 1 G 環境下、暗所、23.5°C で 3 日間 (74 時間 20 分)、黄化エンドウ芽生えを成長させた。その後、英国の宇宙飛行士ティム・ピーク (Timothy Peake) 氏は、以下に詳述するように「Auxin tube」を使用してオーキシン極性移動実験を実施した (図 4)。

Run 3-1 および Run 3-2 : 宇宙飛行士は、軌道上でエンドウ観察チャンバー (Observation Chamber) 内の乾燥エンドウ種子に 40 mL の水 [Milli-Q 純水に高圧滅菌 (オートクレーブ) 処理を施したもの] を給水し、CBEF 内の宇宙 μG 環境下および人工 1 G 環境下で、ビデオ測定実験ユニット (V-MEU) 内の暗黒中、23.5°C で芽生えを育てた。3 日 (Run 3-1、74 時間 52 分) および 4 日 (Run 3-2、95 時間 23 分) 後、宇宙飛行士は各チャンバーを取り外し、サンプリングボックスを使用して各サンプルを固定し、その後、サンプルを -95°C で保存するために MELFI に移した。Run 3-2 では、培養期間中の 2 日目から 4 日目まで、CBEF の V-MEU の CCD カメラによって植物の成長・発達を 6 時間間隔で自動的に記録した。

Run 4 : 軌道上で宇宙飛行士が各「maize box」に 120 mL の水 [Milli-Q 純水に高圧滅菌 (オートクレーブ) 処理を施したもの] を給水した後、これを Ziplock バッグに入れて、CBEF 内の宇宙 μG 環境下で芽生えを育てた。黄化トウモロコシ芽生えは、ISS の宇宙 μG 環境下、暗所、25°C で 4 日間 (96 時間 27 分) 成長させた。

写真を撮影後、いくつかの黄化トウモロコシの芽生えはオーキシン極性移動実験に供し、残りは、免疫組織化学解析用のサンプルとして CFB で固定するか、あるいは MELFI で -95°C で凍結した。

STS-95宇宙実験における黄化トウモロコシ芽生えを用いた実験結果を検証するために、地上対照実験を行った。免疫組織化学実験を実施するためにCFBで固定液を用いて固定された芽生

えと、遺伝子発現および内生植物ホルモンレベルの分析のための芽生えは、それぞれ $+2^{\circ}\text{C}$ 、および MELFI 内 (-95°C) で保存された。

軌道上においてオーキシン極性移動実験を行った「Auxin tube」は、そのままの状態でもELFI内の -95°C で保存された。これらのサンプルは、SpaceX-10 によって運ばれた「Cargo Dragon Capsule」によって地球に帰還したが、その間およびその後も保管温度条件を維持するためにドライアイス詰めになされ、そのままの状態でも研究室に送付された。サンプルの帰還および輸送中にサンプルの解凍は認められなかった。

宇宙実験で使用した器具、容器等を図3～4に示すとともに、ケネディ宇宙センターにおける実験準備風景をいくつかの写真で紹介する（図5）。

なお、軌道上での運用実績については、表2に示すとおりである。

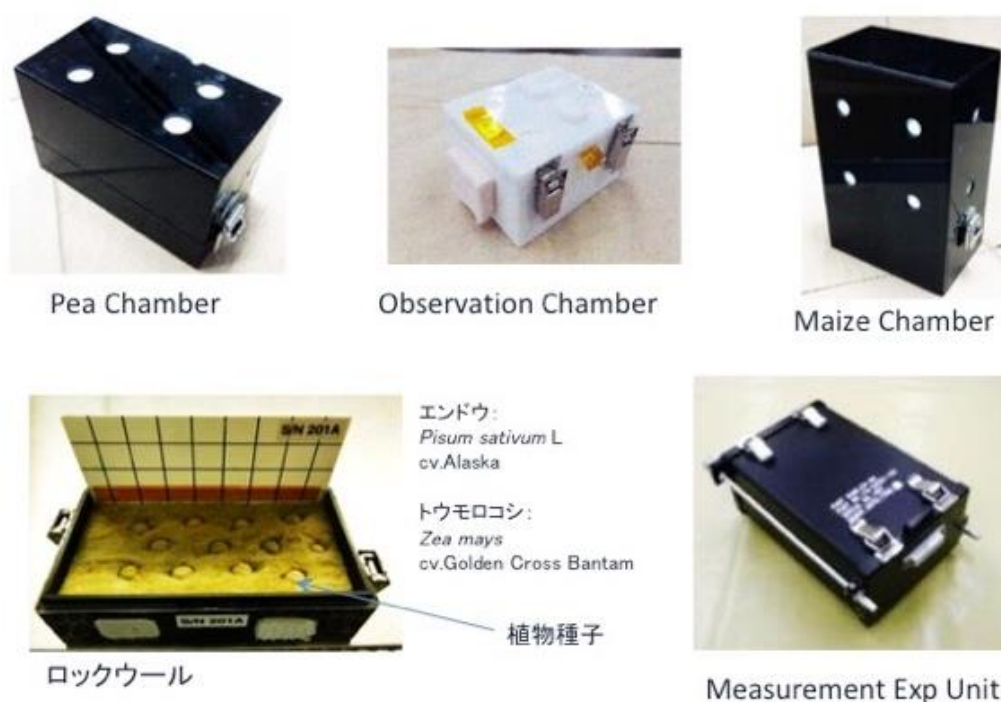


図3. 「Auxin Transport」宇宙実験で使用したエンドウとトウモロコシ培養容器

上段、左：アクリル樹脂製の「Pea Chamber」、中央：観察用窓をもつ「Observation Chamber」、右：アクリル樹脂製「Maize Chamber」。下段、左：「Pea Chamber」中のロックウールにエンドウ種子を植えた状態。1 cm 格子を刻んだプラスチック板は写真画像解析用スケール板。下段右：Measurement Experiment (Exp) Unit：「pea box」を3個を1組、あるいは「maize box」1個をこれに入れ、CBEF 内において培養を行った。



図 4. 「Auxin Transport」宇宙実験で使用した主な装置と器具類および器具収納のための保管バック

上図：左列、上から、試薬（TIBA）溶液を入れたシリンジ。先端には三方コックをとり付けてあり、この溶液を、その下に示す水を入れた袋（Water Bag）に混ぜて、軌道上で溶液を調整した。一番下は、水を入れたシリンジ。右列、上から、オーキシン極性移動させた試料を保管するステンレス製シリンダー（Auxin Transport Cylinder）と、放射性オーキシンを含んだ含水ラノリンを入れたオーキシン極性移動実験用チューブ（Auxin Tube）。一番下は、Sampling Box（試料容器）。

図 4 (続き) .

下図：左から、ハサミ、ピンセット（細型）、ピンセット（中型）、油性ペン（シャープーパーペン：宇宙実験での使用実績があり安全性が確認された油性ペン）、JAXA ステムカッター（葉巻カッターを改良した切片調製用のカッター）、それぞれ 2 個を収納した不燃性の布で作られた保管バッグ。



A: 実験室にて放射性同位元素使用上のための教育訓練
 B: 放射性オーキシシンを入れた「Auxin tube」を調製中の著者（右：宮本、左：上田）
 C: 軌道上実験に供試するための実験試料の NASA 側担当者への引渡し作業

図 5. ケネディ宇宙センターにおける軌道上実験の準備風景

表 2. 軌道上運用実績

Run 2、Run 3 （日付は全て日本時間）			
打上げ：Space X-8 号機 2016 年 4 月 9 日			
Run 2 培養開始	2016 年 5 月 23 日	Run 3-1 培養開始	2016 年 5 月 30 日
Run 2 培養終了	2016 年 5 月 26 日	Run 3-1 培養終了	2016 年 6 月 2 日
		Run 3-2 培養開始	2016 年 6 月 7 日
		Run 3-2 培養終了	2016 年 6 月 11 日
帰還：Space X-9 号機 2016 年 8 月 27 日			

表 2 (続き) . 軌道上運用実績

Run 1、Run 4 (日付は全て日本時間)			
打上げ: Space X-8 号機 2016 年 4 月 9 日			
Run 4 培養開始	2017 年 3 月 7 日	Run 1 培養開始	2017 年 3 月 12 日
Run 4 培養終了	2017 年 3 月 11 日	Run 1 培養終了	2017 年 3 月 15 日
帰還: Space X-10 号機 2017 年 3 月 19 日			

3.3. 軌道上におけるオーキシン極性移動実験の手順

軌道上でのオーキシン極性移動実験は、以前に報告した方法 (Ueda et al., 1999, 2000) に若干の修正を加えて実施された。地上で、2/100 (v/v) に希釈した ^{14}C -IAA (インドール-3-酢酸、 $[1-^{14}\text{C}]$ IAA, 55 mCi / mmol, American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA) を含むラノリン (羊毛蠟や羊毛脂で、羊毛の表面に付着する蠟状物質を精製したもの) 水溶液 (30%, w/w) 20 μL を、1.5 mL エッペンドルフチューブの底に添加した。

上胚軸の子葉側および反子葉側が識別できるように、宇宙飛行士によって子葉側の上胚軸が油性ペン (シャープピーペン) でマークされた。葉巻切りを改造して作製した茎切片調製用のステムカッター (JAXA Stem Cutter) を使用して、3 日齢の黄化エンドウ芽生えから上胚軸第 1 節間切片 (長さ 20 mm) が切除された。放射性 IAA は、切片の基底部側からは実質的に移動しないため、切片の先端側を 1.5 mL エッペンドルフチューブの底の ^{14}C -IAA を含むラノリンに挿入した。結果的に ^{14}C -IAA が切片の先端側から取り込まれることになり、その極性移動が認められることになる。次に、19 時間キャビン温度で切片を含むエッペンドルフチューブを培養した後、極性移動状態をそのまま保持するために、 -95°C の MELFI にこのチューブを移し固定した。

黄化トウモロコシ芽生えの地上部では、中胚軸よりも幼葉鞘のオーキシン輸送の活性が有意に高いことが分かっている (Ueda et al., 2014)。そこで幼葉鞘および中胚軸の両方におけるオーキシン極性移動に対する宇宙 μG 環境の影響を調べるために、幼葉鞘と節 (幼葉鞘と中胚軸の間の接合部) を含む中胚軸からなる切片 (長さ 20 mm) を用いることとした。このように調製した 4 日齢の黄化したトウモロコシの切片を、幼葉鞘側から放射性オーキシンが取り込まれるように、切片の幼葉鞘側をエッペンドルフチューブに挿入し、キャビン温度で 16 時間培養した後、MELFI の -95°C で凍結して固定した。地球への帰還後、ISS で既に凍結された飛行サンプルは、ドライアイスと共に冷凍ボックスに移され、その後、日本の研究室に輸送された。サンプルの帰還および輸送中に、サンプルの解凍は認められなかった。

3.4. サンプル帰還後の地上におけるオーキシン極性移動解析手順

黄化エンドウ芽生えの上胚軸および中胚軸を有する切片におけるオーキシン極性移動は、筆者らの過去の研究においてすでに確立した方法を一部修正して行った。凍結状態で地上に帰還した黄化エンドウ芽生え上胚軸切片を、ドライアイス上で解凍することなく、子葉側と反子葉側

(図2)に縦半分に慎重に分割した。放射性 IAA を含むラノリンに浸した部分を除いた後、各上胚軸切片を基底側から5つのゾーン(長さ3 mm)に分割した。分割された上胚軸切片の小片は、直接液体シンチレーションカクテル(UniverSol ES™, MP Biomedicals, LLC, OH, USA)を含むバイアル瓶に入れ、シンチレーションカウンター(2200CA, Packard Instrument, CT, USA)を用いて放射活性を測定した。切片の他端に移動した放射活性を移動した IAA の量とした。

一方、凍結黄化トウモロコシ芽生えの切片は、長さがほぼ20 mmであったが、切片は節を含む中胚軸および幼葉鞘から成っていたので、放射性標識 IAA を含むラノリンに浸漬した幼葉鞘部分を除いた後、各切片は7つ(中胚軸を3つの領域、節の領域、幼葉鞘を3つの領域)に分割した。地上対照実験においても同様の切片を用いた。

3.5. 地上1 G 環境下での対照実験

地上対照実験は、Run 1～Run 4 の ISS 軌道上実験と同じ手順、およびその各タイムスケジュールに従って、JAXA 筑波宇宙センターならびに大阪府立大学において実施した。

3.6. 宇宙実験の実施と飛行後解析

「Auxin Transport」宇宙実験における試料の化学固定に関するスケジュールを表3に示す。宇宙実験で使用した化学固定液の化学固定前の保管期間は、エンドウ、トウモロコシの場合それぞれ44日と40日であった。化学固定終了後は、直ちに免疫組織化学解析のための処理へと移り、宇宙 μ G 環境下における PsPIN1 および ZmPIN1a タンパク質の局在を解析した。

表3. 「Auxin Transport」宇宙実験の化学固定試料に関するスケジュール(日付は全て日本時間)

Run 1 : 黄化エンドウ芽生えを対象としたスケジュール		
日付	内容	備考
2017年1月30日	nAE50 ¹⁾ 化学固定液調製	
2017年2月19日	SpaceX-10 号機打上	
2017年3月12日	黄化エンドウ芽生え培養開始	
2017年3月15日	黄化エンドウ芽生えの1次化学固定	使用前化学固定液保管 : 44日間
2017年3月19日	SpaceX-10 号機着水	
2017年3月27日	化学固定試料 TKSC ²⁾ 着	
2017年3月28日	1次化学固定終了、新規調製した nAE50 化学固定液による2次化学固定	1次化学固定期間 : 13日間
2017年3月29日	2次化学固定終了、脱水作業	
2017年3月31日	パラフィン置換	
2017年4月3日	パラフィン包埋	

表 3 (続き) .

Run 4 : 黄化トウモロコシ芽生えを対象としたスケジュール

日付	内容	備考
2017 年 1 月 30 日	nAM50 ³⁾ 化学固定液調製	
2017 年 2 月 19 日	SpaceX-10 号機打上	
2017 年 3 月 7 日	黄化トウモロコシ芽生え培養開始	
2017 年 3 月 11 日	黄化トウモロコシ芽生えの 1 次化学固定	使用前化学固定液保管 : 40 日間
2017 年 3 月 19 日	SpaceX-10 号機着水	
2017 年 3 月 27 日	化学固定試料 TKSC 着	
2017 年 3 月 28 日	1 次化学固定終了、Carnoy 化学固定液による 2 次化学固定	1 次化学固定期間 : 17 日間
2017 年 3 月 29 日	2 次化学固定終了、脱水作業	
2017 年 3 月 31 日	パラフィン置換	
2017 年 4 月 3 日	パラフィン包埋	

- 1) nAE50 : 0.1% Nodidet P-40, 5% 酢酸を含む 50%エタノール組成の化学固定液
- 2) TKSC : JAXA 筑波宇宙センター
- 3) nAM50 : 0.1% Nodidet P-40, 5% 酢酸を含む 50%メタノール組成の化学固定液

3.7. 全 RNA の抽出

ISS 軌道上で実施された Run 1、Run 2、および Run 3-1 の各実験から得られた凍結黄化エンドウ芽生え、Run 4 の実験から得られた凍結黄化トウモロコシ芽生えおよび地球上 1 G 環境下で成長した地上対照実験の各芽生えを、同様に凍結し、遺伝子発現解析のための RNA 抽出に使用した。手法の詳細については、Publication list にある Kamada ら (2019) および Oka ら (2020) の論文を参照されたい。

3.8. リアルタイム定量 PCR

Run 1、Run 2、Run 3-1 の各 RNA は ExScript RT 試薬キット (Takara Bio, Shiga, Japan) で逆転写し、iCycler サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて増幅した。相補的 DNA 量は、SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) を使用して測定した。蛍光モニタリングを装着したリアルタイム PCR は、PCR 増幅用のプライマーペアを備えた Light Cycler 96 リアルタイム PCR システム (Roche Diagnostics, Switzerland) を使用して行った。各遺伝子に特異的なプライマーを設計し、リアルタイム PCR を行った。実際の詳細については、以下の Publication list にある Kamada ら (2019) および Oka ら (2020) の論文を参照されたい。

3.9. 膜タンパク質の抽出とウェスタンブロット解析

膜タンパク質の抽出とウェスタンブロット解析については、Run 1 から得られた 3 本の黄化エンドウ芽生えの頂端鉤状部（フック）、上胚軸子葉側および反子葉側の凍結切片、および Run 4 の黄化トウモロコシ芽生えの幼葉鞘の先端（0～3 mm）、幼葉鞘の残存部、中胚軸、本葉、根の先端（0～10 mm）および根の残存領域の 6 つの部域を対象に実施した。手法の詳細については、以下の Publication list にある Kamada ら（2018ab, 2019）および Oka ら（2020）の論文を参照されたい。

3.10. 免疫組織化学的解析

3.10.1. PsPIN1 抗体および ZmPIN1a 抗体の産生

PsPIN1 の親水性領域のアミノ酸 387～400、すなわち VDGHRETQEDYLEK を固相ペプチド合成法（Eurofins Genomics, Tokyo, Japan）に従って合成した。次に、得られたペプチドを抗原とするために、keyhole limpet hemocyanin に結合し、ウサギに 77 日間免疫した。メーカーの抗体生産手順（プロトコール）に従い、PsPIN1 オリゴペプチドに特異性を示すアフィニティ精製を行って、ポリクローナル抗 PsPIN1 抗血清を得た。

ZmPIN1a 抗体の産生についても同様の手法によって行った。ZmPIN1a の親水性領域のアミノ酸 282～297、すなわち GATPRPSNYEEDPQ GK（accession 番号：DQ836239）を固相ペプチド合成法（Eurofins Genomics）に従って合成した。得られたペプチドを keyhole limpet hemocyanin に結合した後、アジュバントと混合した抗原 2 mg を 77 日間ウサギに免疫した後、得られたポリクローナル抗 ZmPIN1a 抗血清を、メーカーの抗体産生手順（プロトコール）に従い ZmPIN1a 特異的オリゴペプチドに対してアフィニティ精製を行い、ポリクローナル抗 ZmPIN1a 抗血清を得た。

3.10.2. PsPIN1 および ZmPIN1a タンパク質の免疫組織化学

Run 1 実験で、3 日間 ISS の宇宙 μ G 環境および宇宙 1 G 環境で成長させた黄化エンドウの芽生えは、化学的に固定され、ISS および地上帰還後も冷蔵庫で保管温度を 2 °C に維持して JAXA つくば宇宙センターに送付された。黄化エンドウ芽生えのサンプルは、CFB 中で nAE50（50% エタノール、5% 酢酸、0.1% Nonidet P-40 を含む溶液）の化学固定液に 13 日間保存された。黄化エンドウ芽生えのサンプルを CFB から取り出した後、上胚軸領域（子葉側および反子葉側）および頂端フック領域を調整し、二次固定としてこれらのサンプルに新しく調製した nAE50 固定液を浸透させ、4 °C で一晩保存した。エタノールと *tert*-ブチルアルコールシリーズで脱水した後、サンプルを Paraplast Plus（Sigma-Aldrich）に埋め込み、ミクロトーム（RM2135 モデル; Leica Biosystems, Germany）で厚さ 10 μ m の薄片を調製し、シリコンでコーティングされたスライドガ

ラスに置いた。Run 1における5本の独立した黄化エンドウ芽生えを免疫組織化学染色後、PsPIN1タンパク質の蓄積と細胞内局在解析を、ImageJソフトウェアを使用して行った。

ZmPIN1a タンパク質の免疫組織化学についても、実験行程については黄化エンドウ芽生えの場合と同様である。

免疫組織化学的解析の詳細については、以下の Publication list にある Kamada ら (2018ab, 2019) および Oka ら (2020) の論文を参照されたい。

3.11. 統計分析

統計分析は、Rソフトウェアプログラム (R ver.2.14.2; <http://www.r-project.org>; R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を使用して行った。「重力環境」、「TIBAの有無」、および「組織の違い」の違いを確認するために、2因子 (2w) または3因子 (3w) の分散分析 (ANOVA) を統計分析に適用した。平均の比較のために、post-hoc Tukey multiple comparisons testによってその差を調べた。 $P < 0.05$ であれば統計的に有意であるとみなした。

4. 実験結果および成果

「Auxin Transport」宇宙実験は先に示したスケジュールに従って順調に実施することができた。また、サンプル帰還後の地上における各解析実験も問題なく実施することができた。現在まで当該宇宙実験の成果を合計7編の論文および総説として公表したので、ここではその概要を述べることにし、詳細については、Publication list にあげた各論文および和文総説を参照されたい。

宇宙 μG 環境下で3日間成長した黄化エンドウの芽生えは、自発的形態形成を示した。すなわち上胚軸と根は、子葉から離れる方向にそれぞれ45度と20度離れる方向に伸長した。ISS内に設置されている細胞培養装置 (CBEF) の遠心機によって作出した人工1G (以下「宇宙1G」と記述) 環境下では、地上と同様、黄化エンドウ芽生えの上胚軸と根はそれぞれ負および正の重力屈性応答を示した (図6)。

一方、4日齢の黄化トウモロコシ芽生えでは、幼葉鞘はほぼ真っ直ぐに成長したが、中胚軸は宇宙 μG 環境下でランダムな方向に曲がって成長した。対照とした地上1Gの環境下で成長した黄化トウモロコシ芽生えの幼葉鞘および中胚軸は、ほぼ真っ直ぐ上方、すなわち重力ベクトルに反する方向に向かって成長した (図7)。

黄化エンドウ芽生え上胚軸および黄化トウモロコシ芽生えの地上部におけるオーキシン極性移動は、宇宙1G環境または地上の1G環境と比較して、宇宙 μG 環境下でそれぞれ有意に低下あるいは上昇した。オーキシン極性輸送阻害剤、2,3,5-トリヨード安息香酸 (TIBA) は、実際、宇宙1G環境および宇宙 μG 環境下で成長した黄化エンドウの芽生えの成長方向とオーキシン極性移動に影響した。これらの結果は、植物の重力応答反応には、適切 (正常) なオーキシン極性

移動が不可欠であることを強く示唆している。

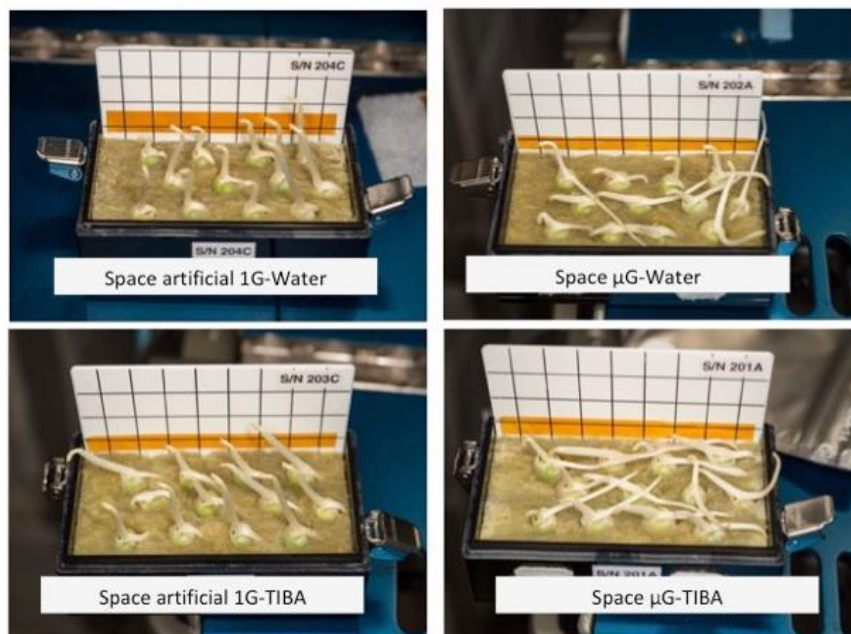


図6. TIBA 存在下（下段）あるいは非存在下（上段）で、宇宙 1G（Artificial 1G）（左列）および宇宙 μ G 環境下（右列）において生育した黄化エンドウ芽生えの上胚軸の成長

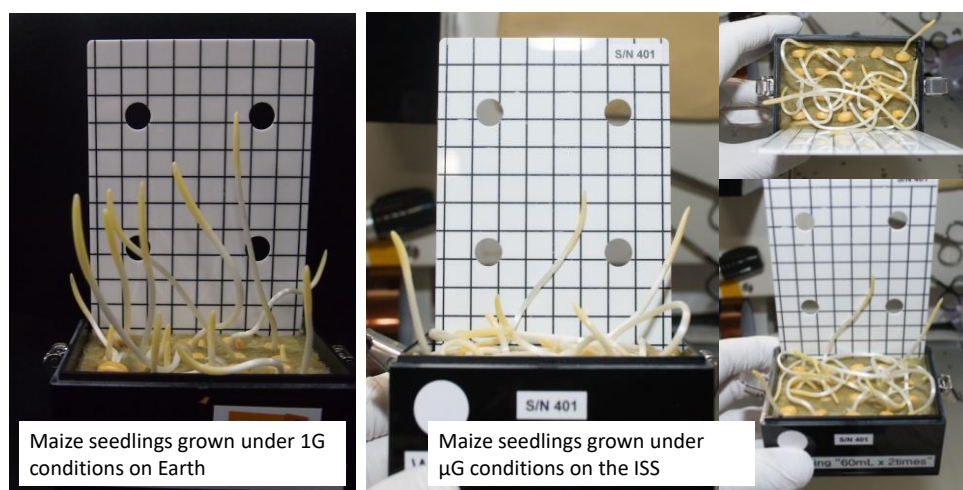


図7. 宇宙 μ G 環境下（on the ISS）（右）、および地上（1G on Earth）（左）における黄化トウモロコシ芽生え（Coleoptile: 幼葉鞘、Mesocotyl: 中胚軸）の成長・発達

重力によるオーキシン極性移動の制御メカニズムを明らかにするために、宇宙 1G 環境下、宇宙 μ G 環境下および地球上の 1G 環境下、暗所で 3 日間成長させた黄化エンドウ芽生えの頂端鉤

状部（フック）および上胚軸細胞における *PsPIN1* 遺伝子発現およびその産物の細胞内局在を調べた。重力環境に関係なく、黄化エンドウ芽生え子葉側上胚軸での *PsPIN1* mRNA の蓄積は統計的な有意差は認められないものの、反子葉側のそれと比較してわずかに高くなる傾向にあった。TIBA は、上胚軸の子葉側と反子葉側の *PsPIN1* mRNA の蓄積に影響しなかった。しかしながら、芽生え先端のフック領域では、TIBA は、宇宙 1 G 環境の場合と比較して、宇宙 μ G 環境下では *PsPIN1*mRNA の蓄積を増加させた。

一方、芽生え上胚軸における PsPIN1 タンパク質の蓄積をウェスタンブロット法によって調べた結果、それは *PsPIN1*mRNA の蓄積とほぼ同様であった。PsPIN1 タンパク質に特異的なポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的解析により、宇宙 1 G 環境下で成長した芽生えの先端およびフック領域の PsPIN1 タンパク質の大部分は、内皮の細胞膜の基底部（根側）に局在していることが明らかになった。逆に、宇宙 μ G 環境下で成長した芽生えでは、PsPIN1 タンパク質の局在は大きく乱れていた。TIBA は、特に宇宙 μ G 環境下で PsPIN1 タンパク質の細胞局在様式（パターン）を大幅に変化させた。

これらの結果は、重力によるオーキシン極性移動の制御メカニズムは、PsPIN1 タンパク質の膜局在化による可能性が高いことを強く示唆している。

地上 1G 環境と比較して、宇宙 μ G 環境下で成長した黄化トウモロコシ芽生えのオーキシン極性移動は促進されるが、このメカニズムを分子レベルで明らかにするために、オーキシン排出キャリアーである ZmPIN1a タンパク質をコードしている遺伝子の発現ならびにその産物動態と細胞内局在に対する宇宙 μ G 環境の影響を調べた。宇宙 μ G 環境下で生育した芽生えの幼葉鞘および中胚軸における *ZmPIN1a* mRNA の蓄積は、地上 1G 環境下で育った芽生えとほぼ同様であった。またその芽生えの幼葉鞘と中胚軸における *ZmPIN1a* タンパク質量は、地上で生育した芽生えのそれと変わらなかったが、宇宙 μ G 環境はそれをわずかに増加させる傾向があった。*ZmPIN1a* タンパク質に特異的なポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的解析により、*ZmPIN1a* タンパク質の大部分が、幼葉鞘および中胚軸の柔組織細胞の細胞膜の基底部（根側）側および細胞膜の基底部側および外側に認められたが、宇宙 μ G 環境は、幼葉鞘の柔組織細胞における *ZmPIN1a* タンパク質の局在化を実質的に変化させ、地上 1G 環境下のものと比べ、*ZmPIN1a* タンパク質が維管束に向かって配向する細胞が多かった。

これらの事実は、黄化トウモロコシ芽生えにおいて、宇宙 μ G 環境がオーキシン極性移動を高めるメカニズムは *ZmPIN1a* 遺伝子発現または *ZmPIN1a* タンパク質量よりも、幼葉鞘の柔組織細胞における *ZmPIN1a* タンパク質の局在の変化に起因する可能性が高いことを示唆している。

5. 宇宙実験のまとめと将来への展望

ISS・きぼう利用ミッション「宇宙環境を利用した植物の重力応答反応機構および姿勢制御機

構の解析 (Auxin Transport)」により以下の成果が得られた。

- (1) 宇宙 μG 環境下では、黄化エンドウおよび黄化トウモロコシ芽生えの成長は阻害されるとともに、自発的形態形成を示した。
- (2) 宇宙 μG 環境は、黄化エンドウおよび黄化トウモロコシ芽生えのオーキシン極性移動を、それぞれ阻害ならびに促進した。
- (3) 宇宙 μG 環境は、黄化エンドウおよび黄化トウモロコシ芽生えにおけるオーキシン極性移動関連遺伝子の発現とその産物量には影響しなかった。
- (4) 宇宙 μG 環境は、黄化エンドウおよび黄化トウモロコシ芽生えにおいて、直接的にオーキシンを排出する分子の細胞内局在に影響した。
- (5) 植物の重力に対する姿勢は、地上部におけるオーキシン極性移動の変化と、それを司るオーキシン排出分子の細胞内局在によって制御されていることが示された。

「人間環境科学」Vol. 27 における「国際宇宙ステーション (ISS) と植物宇宙実験 (その 2) - 宇宙開発と植物 -」においてすでに述べたことの繰り返しではあるが、ここで再度宇宙実験の意義について述べたい。地球上のすべての生物は、エネルギー生産者としての植物の生存なくしては生きることができない。したがって地球外、すなわち宇宙環境で人類が長期にわたって活動するためには、植物が必須のアイテムである。植物は、エネルギー生産とともに酸素を生み出し、またヒトの精神活動に対しても大いに貢献する生き物である。ここで紹介した宇宙における植物の成長と発達のメカニズムを正しく理解することは、宇宙における植物栽培技術の確立に大いに貢献するものと考えられる。さらには地球上における生態系の恒常性の維持や食糧問題への解決に繋がるものと期待される。宇宙植物科学をはじめ、さまざまな宇宙科学分野の学問を発展させるためには、現在の学校教育や社会教育において、宇宙や生物をより深く、またより幅広く理解するための教育プログラムを構築することが是非とも必要である。

謝辞

本稿で紹介した研究成果の一部は、JAXA の The Japan Experiment Module (JEM) utilization program の支援を受けて実施された、ISS 植物宇宙実験「宇宙環境を利用した植物の重力応答反応機構および姿勢制御機構の解析」によるものである。この場をお借りして感謝の意を表する。

Publication list

(原著論文)

Kamada, M., Miyamoto, K., Oka, M., Ueda, J., Higashibata, A. (2018a) Regulation of asymmetric polar auxin transport by PsPIN1 in endodermal tissues of etiolated *Pisum sativum* epicotyls: focus on immunohistochemical analyses. J. Plant Res. 131: 681–692. <https://doi.org/10.1007/s10265-018-1031-z>

- Kamada, M., Miyamoto, K., Oka, M., Uheda, E., Ueda, J., Higashibata, A. (2018b) Procedures for chemical fixation in immunohistochemical analyses of PIN proteins regulating polar auxin transport: Relevance to spaceflight experiments. *Life Sci. Space Res.* 18: 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2018.05.005>.
- Kamada, M., Oka, M., Inoue, R., Fujitaka, Y., Miyamoto, K., Uheda, E., Yamazaki, C., Shimazu, T., Sano, H., Kasahara, H., Suzuki, T., Higashibata, A., Ueda, J. (2019) Gravity-regulated localization of PsPIN1 is important for polar auxin transport in etiolated pea seedlings: Relevance to the International Space Station experiment. *Life Sci. Space Res.* 22: 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2019.07.001>.
- Kamada, M., Oka, M., Miyamoto, K., Uheda, E., Yamazaki, C., Shimazu, T., Sano, H., Kasahara, H., Suzuki, T., Higashibata, A., Ueda, J. (2020) Microarray profile of gene expression in etiolated *Pisum sativum* seedlings grown under microgravity conditions in space: Relevance to the International Space Station experiment “Auxin Transport”. *Life Sci. Space Res.* 26: 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2020.04.005>.
- Miyamoto, K., Inui, A., Uheda, E., Oka, M., Kamada, M., Yamazaki, C., Shimazu, T., Kasahara, H., Sano, H., Suzuki, T., Higashibata, A., Ueda, J. (2019) Polar auxin transport is essential to maintain growth and development of etiolated pea and maize seedlings grown under 1 g conditions: Relevance to the international space station experiment. *Life Sci. Space Res.* 20: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2018.11.001>.
- Oka, M., Kamada, M., Inoue, R., Miyamoto, K., Uheda, E., Yamazaki, C., Shimazu, T., Sano, H., Kasahara, H., Suzuki, T., Higashibata, A., Ueda, J. (2020) Altered localisation of ZmPIN1a proteins in plasma membranes responsible for enhanced-polar auxin transport in etiolated maize seedlings under microgravity conditions in space. *Functional Plant Biology* 47: 1062-1072. <https://doi.org/10.1071/FP20133>.
- Ueda, J. (2020) Comprehensive report on the Auxin Transport space experiment: the analysis of gravity response and attitude control mechanisms of plants under microgravity conditions in space on the International Space Station. *Biol. Sci. Space* 34: 12-33. <https://doi.org/10.2187/bss.34.12>.
- (和文総説)
- 宮本健助 (2020) 「宇宙環境下における植物の成長・発達とオーキシン動態：特に、国際宇宙ステーション実験 “Auxin Transport” の観点から」、植物の生長調節 55(1): 23-31.
- 宮本健助、岡真理子、鎌田源司、上田純一 (2020a) 「植物の自発的形態形成とオーキシン動態－ISS 宇宙実験を中心として－」、植物科学最前線 (BSJ-Review) 11:47. <https://doi.org/10.24480/bsj-review.11a5.00177>.

引用・参考文献

- 宮本健助・山本良一、上田純一 (2019) 「国際宇宙ステーション (ISS) と植物宇宙実験 (その1)－STS-95 植物宇宙実験を中心として－」、人間環境科学 26: 15－35.

宮本健助・山本良一、上田純一（2020b）「国際宇宙ステーション（ISS）と植物宇宙実験（その2）－宇宙開発と植物」、人間環境科学 27: 15－34.

Ueda, J., Miyamoto, K., Yuda, T., Hoshino, T., Fujii, S., Mukai, C., Kamigaichi, S., Aizawa, S., Yoshizaki, I., Shimazu, T., Fukui, K. (1999) Growth and development, and auxin polar transport in higher plants under microgravity conditions in space: BRIC-AUX on STS-95 space experiment. J. Plant Res. 112: 487-492. <https://link.springer.com/article/10.1007%2FPL00013904>.

Ueda, J., Miyamoto, K., Yuda, T., Hoshino, T., Sato, K., Fujii, S., Kamigaichi, S., Izumi, R., Ishioka, N., Aizawa, S., Yoshizaki, I., Shimazu, T., Fukui, K. (2000) STS-95 space experiment for growth and development, and auxin polar transport. Biol. Sci. Space 14: 47-57. <https://doi.org/10.2187/bss.14.47>.

Ueda, J., Sakamoto-Kanetake, M., Toda, Y., Miyamoto, K., Uheda, E., Daimon, H. (2014) Auxin polar transport is essential for the early growth stage of etiolated maize (*Zea mays* L. cv. Honey Bantam) seedlings. Plant Prod. Sci. 17: 144-151. <https://doi.org/10.1626/pps.17.144>.

オンライン文献

JAXA ハヤブサ 2 : <https://www.isas.jaxa.jp/missions/spacecraft/current/hayabusa2.html> （2021 年 3 月 31 日）