

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19272

研究課題名（和文）植物の重力応答に関わる未知の分子基盤の解明と成長制御技術の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the unknown molecular basis of the gravitational response in plants and development of growth control technology

研究代表者

久米 篤（Kume, Atsushi）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：20325492

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：重力を変化させて植物を栽培することにより植物の成長促進の鍵となる新規な遺伝子を見出し、制御網を解析し、重力による成長調節がどのような分子機構により制御されるのかを明らかにすることで、重力応答統御システムの全貌解明に迫ることを目的とした。過重力栽培装置を新たに作成し、ヒメツリガネゴケの栽培実験を実施した。過重力による成長促進効果には応答の閾値となる過重力が存在することが示唆され、AP2/ERF転写因子群が応答に関与していた。仮根の細胞内のカルシウムイオン動態は2Gから $\mu$ Gの重力変化に応答していた。サトイモ科ウキクサも過重力環境で成長が促進されたが、それには気孔開度の変化が関与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球の生物にとって重力（G）は最も変動しにくい環境要因の1つであり、特に陸上では水中とは異なり浮力によるサポートが非常に小さいため、地球の1Gに特化した形態形成が行われている。しかし、その制御機構を明らかにするためには、何らかの方法でGを変化させた環境と比較することが必須である。本研究成果では、遠心栽培実験によってG増加による成長促進機構の一端が解明され、これまで未知だった重力応答遺伝子の発現によって1G環境における成長促進が可能であることが示された。また、これらは陸上植物の進化過程の理解にとどまらず、地球とは異なったG環境にある宇宙において、植物栽培を最適に行うために重要な知見と考えられた。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to identify novel genes that play a key role in promoting plant growth by cultivating plants under varying gravitational forces. We also analyzed the regulatory network of the genes to elucidate the molecular mechanism of growth regulation by gravity.

We constructed a new hypergravity cultivation apparatus and conducted a series of experiments. The growth-promoting effect of hypergravity was suggested to have a threshold of hypergravity response, and a group of AP2/ERF transcription factors were involved in this response. Intracellular calcium ion dynamics in rhizoid responded to gravity changes from 2G to  $\mu$ G. Growth of Araceae was also enhanced in the hypergravity environment, which involved changes in stomatal aperture.

研究分野：植物生理生態学

キーワード：重力応答 過重力栽培装置 遺伝的解析 宇宙農業 パラボリックフライト 国際宇宙ステーション  
ヒメツリガネゴケ ウキクサ

## 1. 研究開始当初の背景

地球の生物にとって重力加速度（G）は最も変動しにくい環境要因の1つである。特に陸上では水中とは異なり浮力によるサポートが非常に小さいため、生物の立体構造は一定の重力環境を前提とした形態形成が行われている。また、重力によって細胞外及び細胞内の対流による物質輸送も促進されており、葉緑体やミトコンドリアなどの細胞小器官もその影響を受けている。しかし、これまで光、温度、水分等を調節して植物を栽培する技術は広く利用されてきたが、G（遠心力）の大きさを変化させて栽培する技術はほとんど開発されてこなかった。重力は遠心力を利用して調節することが可能であるものの、通常の遠心装置では連続光を照射し長期間栽培することは考慮されていなかった。そこで、安定した遠心力を加えながら適切に光を照射し、植物を長期間栽培できる過重力植物栽培装置を独自に開発し、ヒメツリガネゴケ（*Physcomitrium patens*）を過重力下で数週間連続栽培した。その結果、予想外にも植物全体の成長量（バイオマス）が増えることを見出した（写真-1; Takemura et al. 2017）。一方、国際宇宙ステーション ISS「きぼう」実験棟内で実施された $\mu$ G環境下ではその逆の応答反応が確認されたものの、重力応答は必ずしも線形ではないことが明らかになりつつあった（久米ほか 2020）。そのため、過重力環境で変動する遺伝子やその応答様式の解明が求められており、植物の重力応答と光合成や成長との関係についての遺伝的解析や、成長促進の原因となる遺伝子の解明が課題となっていた。

このような背景から、植物の重力応答研究については、 $\mu$ G環境における長期栽培実験の解析や、月面基地構想や深宇宙探査ゲートウェイ構想への対応、さらには宇宙ステーションや火星での植物栽培技術への応用も期待された。また、ヒメツリガネゴケの仮根の頂端細がどのように重力刺激を感受し、細胞内のシグナル伝達を行っているかを解明するため、パラボリックフライト（放物飛行）を利用して重力刺激に応答する  $Ca^{2+}$ シグナリングを観察する実験も検討されていた。

すなわち、植物の重力変化による成長応答を明らかにするため、地上の過重力栽培実験、「きぼう」船内実験やパラボリックフライト実験の結果を利用し、 $\mu$ G から 10G までの重力応答を総合して理解することで、重力による植物の形態形成や成長制御の分子機構を明らかにし、その全体像を理解することが求められていた。

## 2. 研究の目的

重力を変化させて植物を栽培することにより植物の成長促進の鍵となる新規な遺伝子を見出し、その制御網を解析し、重力による成長調節がどのような分子機構により制御されるのかを明らかにすることにより、重力応答統御システムの全貌解明に迫ることを目的とした。

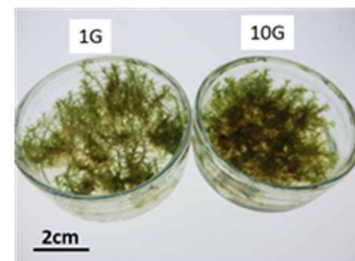
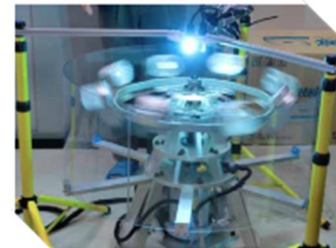


写真-1 ヒメツリガネゴケをシャーレに植えて、過重力栽培装置で1ヶ月培養した実験例。

### 3. 研究の方法

#### 1) 遠心(過重力)栽培装置の作成:

改良型の過重力栽培装置(MK5型)を制作し、ヒメツリガネゴケの遺伝子改変個体の栽培を行った。パンデミックの影響のため、2021年中頃より、栽培装置を作成するために必要な部品が入手できない状況になった。そのため、2023年4月からの実験開始となった。

#### 2) 重力環境(G)を変化させた栽培

モデル植物であるヒメツリガネゴケ(コケ植物)、シロイヌナズナ(双子葉植物)とコウキクサ(単子葉植物)について様々な過重力条件下での長期栽培を行い、成長応答を解析した。様々な重力環境で栽培することで、重力に対する植物応答の線形性を確認し、応答の閾値の存在もしくはフィードバック制御の影響を評価した。これらの実験は、主に富山大学に設置されている既存の過重力栽培装置を利用して実施した。

#### 3) RNA-seqによる遺伝子発現変動解析

重力を変化させて長期栽培したヒメツリガネゴケの地上部、地下部のそれぞれで、次世代シーケンサーを用いたRNA-seqを行い網羅的な遺伝子発現解析を行った。また、地上栽培実験に加えて宇宙栽培実験より回収できた $\mu\text{G}$ 、1Gで栽培したサンプルを用いて、RNA-seq解析を行い、網羅的に遺伝子の発現変動を調べた。地上部では、成長を決定する重要な因子である光合成に着目し、光合成活性の制御に関わる遺伝子群を探索した。

#### 4) 細胞レベルおよび個体レベルにおける重力応答メカニズム解明

光合成に影響する細胞 $\text{CO}_2$ 透過性やオルガネラの形態観察を電子顕微鏡によって詳細に行った。重力変化は浮力を通じて原形質流動に影響し、葉緑体やミトコンドリアの細胞内分布や分裂様式にも影響を与え、細胞代謝に影響を及ぼす可能性がある。そこで、ライブイメージングにより、ミオシン突然変異体等の原形質流動の変化と重力応答、成長との関係を調査した。重力変化時の細胞内カルシウムイオン動態を明らかにするために、パラボリックフライト中のカルシウムイオンの細胞内濃度( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ )を蛍光プローブによるライブイメージング解析した。

#### 5) 陸上植物への一般化

ヒメツリガネゴケと同様に、シロイヌナズナを過重力栽培することにより根の成長が促進される。そこで単子葉植物のモデル草本としてウキクサ類を対象として実験を行った。過重力長期栽培により変化した組織を探索し、重力変化に応答した成長特性を探索した。

### 4. 研究成果

#### 1) 遠心(過重力)栽培装置の作成

改良型の過重力栽培装置(MK5型)を制作した(写真-2)。本装置では廃熱効率を高めた設計となっており、通気特性も改善されている。そのため、容器全体を閉じて栽培することが可能になった。BMS植物育成培養容器プラントボックスが利用できるバケットサイズとなっており、コケだけでなく、より背の高い高等植物での栽培実験も可能となっている。また、対象実験用の光源モジュールも作成している。本装置を利用して、北海道大学でヒメツリガネゴケの栽培実験を実施した。



写真-2 過重力栽培装置  
(MK5型)

## 2) 重力環境(G)を変化させた栽培

過重力栽培装置を用い、通常の10倍の重力加速度(10G)環境で長期間植物を栽培することで、ヒメツリガネゴケやシロイヌナズナの成長が促進され、ヒメツリガネゴケではコロニー全体のバイオマスが増え、光合成速度も高まるという現象を発見していた。本研究では新たに、3G、6Gという過重力条件での栽培を実施し、光合成速度や成長は6G以上で促進されることを見出し、これらの応答には閾値が存在することを見出した。

## 3) RNA-seqによる遺伝子発現変動解析

ヒメツリガネゴケの茎葉体の10G栽培と1Gコントロール栽培のそれぞれのRNA-seqにより1Gに比べて10Gで発現変動する遺伝子群(DEG)を網羅的に探索した。その結果、発現が上昇するもの、減少するものをそれぞれ79個、16個同定することに成功した。DEGの中で転写因子に注目したところ9種類の転写因子の発現が10Gで上昇していたがそのうちの8種類は同じファミリーに属するAP2/ERF転写因子であることがわかった。また茎葉体の地上部(シュート)と地下部(仮根)に分けて1Gと10Gの発現遺伝子の比較を行ったところ、細胞壁の機械的強度調整に関わる遺伝子がDEGとして新たに同定できた。興味深いことにこの組織別RNA-seq解析においてもやはりAP2/ERF転写因子群の発現が有意に変動することがわかった。

またJAXAらとの共同研究によりISSによる長期栽培実験を行い、微小重力環境下で光合成活性や成長、遺伝子発現変動を解析した。これらの結果は近いうちに公表予定である。

地上過重力実験により同定したDEGに見出した8種類のAP2/ERF転写因子のうち、最もよく発現変動したAP2/ERF転写因子の過剰発現ヒメツリガネゴケを作成した。その結果、過剰発現体では、10Gと同様に葉緑体のサイズが大きくなり、光合成活性が上昇し、バイオマスも増えることを見出した。以上の結果もまもなく論文投稿予定である。

また特に過重力に強く応答し著しく成長を促進させた仮根に注目し、仮根先端にある頂端幹細胞での遺伝子発現変動を調べた。その結果、抗酸化作用に関わる遺伝子の発現が有意に変動していることがわかり、今後この遺伝子の重力応答に関わる機能を調べる。

## 4) 細胞レベルおよび個体レベルにおける重力応答メカニズム解明

重力変化時の細胞内カルシウムイオン動態を明らかにするために、パラボリックフライト中のカルシウムイオンの細胞内濃度( $[Ca^{2+}]_c$ )を蛍光プローブによるライブイメージング解析した。その結果、仮根の頂端幹細胞で、2Gでは1Gに比べて蛍光輝度が高くなり、また2Gから $\mu G$ になると蛍光輝度が低下する傾向があった。この結果は、2Gで $[Ca^{2+}]_c$ が一過的に上昇し、その後、 $\mu G$ で減少することを示唆している。また、このような重力変化に応じた $[Ca^{2+}]_c$ の動態は、細胞の先端領域、中央領域のどちらでも観察されたことから、重力応答時では先端領域のみならず細胞中央領域でも短時間に $[Ca^{2+}]_c$ が調節される可能性が示された。今後は、超小型イメージング装置が遠心栽培装置に搭載可能か、さらにイメージング可能かどうか検討し、イメージング解析が可能であれば過重力のカルシウムイオンの細胞内変化の再現性を調べる予定である。

国際宇宙ステーション内で育てたヒメツリガネゴケの試料を軌道上で化学固定し、地上でパラフィンに包埋し、SPring-8での屈折コントラスト $\mu CT$ 撮影を行い、仮根系の立体再構成を試みた。連続するCTスライス上で、仮根と見られる線状構造の解析を行い、自動でのセグメンテーションを試行した。構造抽出するため、ImageJの輪郭抽出と機械学習プラ

グインである TWS を用いた。線状構造を手動でラベルした正解画像と自動セグメンテーションによる予測画像を比較して抽出精度を評価し、TWS が最も正解画像と一致していることを見出した。しかし、TWS の予測結果を細線化し表面モデルを描画したところ部分的に不自然な構造のつながりがみられたため。より精度の高いセグメンテーション法の模索と表面モデルからの形態データの定量法の検討も今後の課題である。

## 5) 陸上植物への一般化

4 属 4 種のウキクサ類( *Spirodela polyrhiza* ウキクサ、*Lemna minor* コウキクサ、*Wolffia globosa* ミジンコウキクサ、*Wolffiella hyalina* ウ斯巴ウキクサ ) を 10G の過重力環境で栽培することで水生植物であるウキクサ類の過重力応答について調べた。10G 環境下で 10 日間栽培したところ、コウキクサとミジンコウキクサについては、1G 対照区に比べて成長量にほとんど変化は見られなかったが、ウキクサとウ斯巴ウキクサでは、葉状体数及び乾燥質量の有意な増加が見られた。この結果は、過重力処理がウキクサとウ斯巴ウキクサの純生産量を何らかの理由で促進させたことを示している。

次に、ウキクサ類の中でも大型で根を有するウキクサを用いて更に過重力処理の影響を詳細に調べた。細胞壁組成は重力環境によって変化することが知られているため、ウキクサ葉状体のリグニン及びセルロース含有量について調べたところ、リグニン含有量は 6 - 8%DW、セルロース含有量は 25 - 28%DW と、1G 対照区、10G 処理区ともに有意な差は見られなかったが、10G 処理区においてリグニン及びセルロースが多く含まれる傾向が見られた。また、形態変化については、根の長さ和本数が 10G 処理区で有意に増加していたが、葉状体の面積については 1G 対照区と有意差は見られなかった。

最後に、気孔開度及び気孔密度が過重力処理によって影響を受けるかどうかを調べた。その結果、10G 処理区で栽培したウキクサの葉状体において、気孔開度及び気孔密度が有意に増加することがわかった。また、10G で栽培したものを 1G に戻して栽培を続けたところ、新しく形成された葉状体では、気孔開度及び気孔密度が 1G 環境のみで栽培したものと同程度にまで低下していた。このように、ウキクサが過重力環境下で成長量が増加するのは、気孔開度及び気孔密度が増大することにより、二酸化炭素の取り込み量が増えたことに起因すると考えられた。これまで、気孔開度や気孔密度が重力環境によって変化するという報告はなく、今後より詳細に検証していく必要がある。

### <引用文献>

Takemura K, Kamachi H, Kume A, Fujita T, Karahara I, Hanba YT (2017) A hypergravity environment increases chloroplast size, photosynthesis, and plant growth in the moss *Physcomitrella patens*, *Journal of Plant Research*, 130, 1, 181-192, <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0879-z>

久米 篤、藤田 知道、蒲池 裕之、半場 祐子、日渡 祐二、唐原 一郎、小野田 雄介、横井 真希、ヴィアチェスラヴォヴァ アリサ、山下 祐輝、安田 柚里、中澤 誠、新濱 梨奈、浅野 加杜己、達 かおる、平山 桃菜、笠原 春夫、鈴木 智美、島津 徹、鎌田 源司、コケ植物を用いた宇宙実験 スペース・モスの活動報告, 第 34 回 宇宙環境利用シンポジウム, 2020.01, <http://id.nii.ac.jp/1696/00046409/>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaura Ryohei, Tamaoki Daisuke, Kamachi Hiroyuki, Yamauchi Daisuke, Mineyuki Yoshinobu, Uesugi Kentaro, Hoshino Masato, Suzuki Tomomi, Shimazu Toru, Kasahara Haruo, Kamada Motoshi, Hanba Yuko T, Kume Atsushi, Fujita Tomomichi, Karahara Ichirou	4. 巻 71
2. 論文標題 Three-dimensionally visualized rhizoid system of moss, <i>Physcomitrium patens</i>, by refraction-contrast X-ray micro-computed tomography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 364 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfac041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Karahara Ichirou, Yamauchi Daisuke, Uesugi Kentaro, Mineyuki Yoshinobu	4. 巻 72
2. 論文標題 Three-dimensional visualization of plant tissues and organs by X-ray micro-computed tomography	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfad026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤田知道	4. 巻 7
2. 論文標題 コケ分子生物学を用いたSDGsへの取り組み	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 24-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 久米篤	4. 巻 7
2. 論文標題 コケ植物を活用した宇宙植物実験システム	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 40-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 日渡祐二, 達ローレンスかある, 蒲池浩之, 唐原一郎, 半場祐子, 久米篤, 藤田知道, 鈴木智美, 嶋津徹	4. 巻 -
2. 論文標題 パラボリックフライトにおける重力に応じたヒメツリガネゴケ細胞内カルシウムイオン動態のライブイメージング解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 宇宙環境利用シンポジウム 第37回: 令和四年度	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 半場 祐子, 竹村香里, 北島佐紀人, 山下祐輝, 横井真希, 篠澤章久, 前田彩友子, 安井祐太郎, 坂田洋一, 蒲池浩之, 小野田雄介, 唐原一郎, 久米篤, 笠原春夫, 鎌田源司, 嶋津徹, 鈴木智美, 矢野幸子, 藤田知道	4. 巻 -
2. 論文標題 転写因子AP2はヒメツリガネゴケの重力変化に対する光合成・成長応答に関与する	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 宇宙環境利用シンポジウム 第37回: 令和四年度	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 前田彩友子, 半場祐子, 蒲池浩之, 藤田知道
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケの転写因子AP2過剰発現体の過重力応答
3. 学会等名 日本生態学会第69回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Yamashita, Maki Yokoi, Chiyo Jinno, Marcel Pascal Beier, Akihisa Shinozawa, Yoichi Sakata, Hiroyuki Kamachi, Yuko T. Hanba, Ichirou Karahara, Yuji Hiwatashi, Atsushi Kume, Tomomichi Fujita
2. 発表標題 Moss Physcomitrium patens Responds to Both Microgravity and Hypergravity and Changes Its Gene Expression
3. 学会等名 The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木智哉、唐原一郎、半場祐子、小野田雄介、久米篤、藤田知道、蒲池浩之
2. 発表標題 水生植物ウキクサ類の成長に及ぼす過重力の影響
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蒲池浩之、小野田雄介
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケ茎葉体の機械的特性における重力の影響
3. 学会等名 日本植物学会85回大会関連集会 -スペース・モス(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木 真太郎、山下 祐輝、半場 祐子、蒲池 浩之、唐原 一郎、久米 篤、藤田 知道
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケは重力の大きさに応答して成長量を変化させる
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日渡祐二、遠かおる、蒲池浩之、唐原一郎、半場祐子、久米篤、藤田知道、鈴木智美、嶋津徹
2. 発表標題 パラボリックフライトにおける重力に応じたヒメツリガネゴケ細胞内カルシウムイオン動態のライブイメージング解析
3. 学会等名 第37回 宇宙環境利用シンポジウム
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 半場祐子, 竹村香里, 北島佐紀人, 横井真希, 篠澤章久, 前田彩友子, 安井祐太郎, 坂田洋一, 蒲池浩之, 小野田雄介, 唐原一郎, 久米篤, 笠原春夫, 鎌田源司, 嶋津徹, 鈴木智美, 矢野幸子, 藤田知道
2. 発表標題 転写因子 AP2 はヒメツリガネゴケの重力変化に対する光合成・成長応答に関与する
3. 学会等名 第37回 宇宙環境利用シンポジウム
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	日渡 祐二 (Hiwatari Yuji) (10373193)	宮城大学・食産業学群・教授  (21301)	
研究分担者	蒲池 浩之 (Kamachi Hiroyuki) (40262498)	富山大学・学術研究部理学系・准教授  (13201)	
研究分担者	藤田 知道 (Fujita Tomomichi) (50322631)	北海道大学・理学研究院・教授  (10101)	
研究分担者	唐原 一郎 (Karahara Ichirou) (60283058)	富山大学・学術研究部理学系・教授  (13201)	
研究分担者	富田 祐子(半場祐子) (Hanba Yuko) (90314666)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授  (14303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------