

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658061

研究課題名(和文)宇宙農場のためのクリノスタット微小重力装置を用いた作物栽培基盤研究

研究課題名(英文) Study on effects of pseudo-microgravity (PMG) environment to soybean root growth and symbiosis for R/D of space agriculture

研究代表者

横山 正 (Yokoyama, Tadashi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70313286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズをモデル作物として、微小重力環境下で生じる根の変異を、形態学的・分子生理学的手法で解明すると共に、その変異が根粒菌との共生に与える影響を評価し、さらに、クリノスタットで使用可能なin-situ根観察技術開発を試みた。その結果、疑似微小重力環境において、ダイズの細胞周期が早まり、根の細胞数が増加し、根部の長さが長くなることが分かった。また、側根数が増加し、ARF8とPGP1等の側根発生に關与する遺伝子群の発現量の変化が対応した。さらに、ダイズの根粒原基数が増加した。また、土壌のコンダクタンス検出により、ダイズの根伸長増加に伴う静電容量の変化を検出した。

研究成果の概要(英文)：In this project, changes of plant morphology of Soybean under pseudo-microgravity (PMG) environment produced by a 3-D clinostat were compared with ground-grown control samples. As a result, root length, number of lateral root and proliferation activity of root cells for PMG-grown soybean were increased. These observation were close relationship to gene expressions between arf8 and pgp1. Furthermore, the number of root nodule primordium on PMG-grown sample was increased. To develop an in-situ method for measuring root elongation by capacitance detection, two electrodes; one of them is attached to the stem and the other is inserted in to the soil. The capacitance which changes with depth of root elongation was successfully detected in dry soil and wet soil.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 植物栄養・土壌学

キーワード：クリノスタット 宇宙農業 根の変異 疑似微小重力 根伸長計測

1. 研究開始当初の背景

現在、国際宇宙ステーションや深宇宙探査など宇宙空間に長期間滞在する計画が進行し、これに対応する自給自足可能な食料確保の技術が求められている。その1つとして宇宙農場の建設が提案されている。米国では、1990年代にバイオスフィア2が有人閉鎖生態系として実験され、日本では青森県六ヶ所村の(財)環境科学研究所で閉鎖生態系の研究が行われている。また、ロシアの宇宙基地ミールや、欧州宇宙機関の国際宇宙ステーション「コロンバス」で、シロイヌナズナや小麦の栽培試験が行われている。しかしながら、宇宙空間の特徴の一つである微小重力環境が農作物の生育に与える影響は殆ど分かっていない。

2. 研究の目的

生物窒素固定により窒素肥料を節約できるダイズに着目し、宇宙空間の特徴の一つである微小重力環境がモデル作物としたダイズの生育に与える影響を解明することを目的に、大型のクリノスタットの構築及び、それを用いた植物栽培試験を行い、疑似微小重力下ではダイズの生育にどのような影響があるのか、特に根の生育や、ダイズと根粒菌との共生現象に焦点を絞って解明する。また、クリノスタットで使用可能な *in-situ* 根観察技術開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) クリノスタットの作成

図1と2に、本研究で使用した3D-クリノスタット装置の写真と概略図および育成容器内座標系の定義を示す。aの育成容器に試料を設置し、bとcの2つのモータを駆動させ、2軸でaの育成容器を回転させることにより、微小重力環境を模擬することができる。なお1軸目のモータへの電力供給はdのスリッピングを介して行われ、2つのモータの回転速度はインバータにより制御可能となっている。図1に示すように、本研究で用いるクリノスタット装置は、育成容器のサイズがマメ科植物に対して十分に生育可能なサイズである。



図1 クリノスタット装置

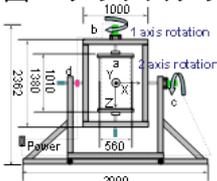


図2 クリノスタット概略図

(2) 疑似微小重力の作出

育成容器内座標系の原点においては重力ベクトルの時間平均が0になることが望ましい。また、容器周縁部においては、遠心加速度が発生するために、重力と遠心力の和の時間平均が0とならないことが予想される。そこでクリノスタット装置の性能を評価するため、育成容器内における重力加速度の時間平均および遠心加速度を計測した。測定には市販の無線加速度センサ(ATR-Promotions社製:WAA-006)を用いた。このセンサは3軸の加速度と3軸の角速度を測定でき、測定データをリアルタイムに無線送信できる。

まず、生育容器内座標系の原点にセンサを設置し、装置第1軸・第2軸とともに5rpmで回転させ加速度を計測した。測定開始時を $t = 0$ として、サンプリング周期 $t = 0.1s$ で60分間計測した。測定した加速度データを用いて、 $t = 0$ から t までの加速度の時間平均 $\bar{g}(t)$ を、式(1)を用いて算出した。

$$\bar{g}(t) = \frac{\Delta t}{t} \sum_{i=0}^{t/\Delta t} a_i \quad (1)$$

各軸の時間平均の測定結果を図3に示す。X軸、Y軸は0に収束し、Z軸は-0.08Gに収束した。

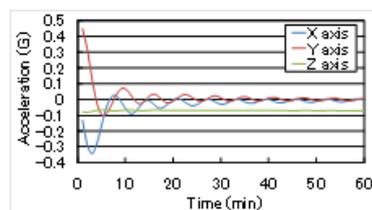


図3 クリノスタット中心部の加速度次に、遠心加速度を計測するため、センサを $X=250\text{ mm}$ (育成容器側面, $Y=Z=0$) に設置し、各軸を5rpmで回転させ60分間角速度を計測した。測定角速度 ω から、遠心加速度 a_r を式(2)を用いて算出した。

$$a_r(t) = r\omega(t)^2 \quad (2)$$

ここで r は各軸からセンサ位置までの距離であり、X軸について0、Y、Z軸について250mmとなる。図4に育成容器側面における各軸まわりの遠心加速度を示す。Z軸まわりで7.5mG、Y軸まわりで4.5mGを中心に振動した。またX軸まわりにおいては定義から $a_r=0$ となった。このように、遠心加速度はmG~10mGのオーダーであることがわかった。また、容器内試料に加わる全加速度ベクトルのノルムは0.08G程度であり、そのほとんどがZ軸方向加速度の影響によるもので、遠心力の影響はほとんど無視できることがわかった。

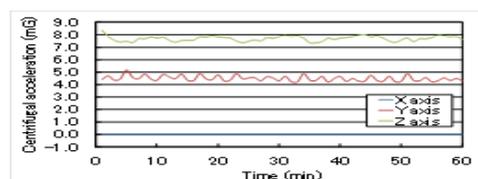


図4 クリノスタット中央の遠心加速度

(3) 根長計測

本実験では、ダイズの野生型品種 (Williams82) を用いた。人口培地を用いた材料調整では乾熱滅菌したパーミキュライトを 50ml のファルコンチューブ 24 本に詰め、滅菌処理を行い、最大溶水量の約 60% に相当する N-Free 培養液 (Table.4.1) を各々のファルコンチューブに入れた。その後、Williams82 の種子を 30 本の 50ml ファルコンチューブに 1 個ずつ播種した。種子は、播種に先立ち 10 倍希釈の次亜塩素酸ナトリウムで 5 分間表面殺菌し、蒸留水で殺菌液を洗い流した。植物体は本学、農学部における自然光ファイトロン内 (温度: 昼/夜=25/18 度) で 3 日間生育を行い、クリノスタット生育容器内 (疑似微小重力環境) と、対照実験として生育容器外 (地上環境) において各試料を 15 個体ずつ設置した。7 日間クリノスタットを運転させ生育した後、それぞれの処理区での地上部、根部の長さ、側根数を計測した。また、クリノスタットの回転速度は 2 軸共に 5rpm とした。

(4) 細胞のサイズ等の計測

(3) の 7 日間栽培したダイズサンプルを、ホルマリン・酢酸・アルコール混合液 (F.A.A. 固定液) に 48 時間浸漬し、根端から 5cm ~ 6cm の部分を切り取った。脱水・パラフィン誘導・包埋処理を行った後に、ミクロトームで連続切片を作成した。作成した連続切片をスライドガラスに伸展後、チオニン染色で、細胞の木化部分を染色した。その後、サンプルをオイキットで封入後、光学顕微鏡下で可視化した。各処理区 3 個体ずつを用い、1 個体に対し、任意の 10 個の細胞の縦と横の長さを計測した。

(5) 側根数が増加する現象に関与すると推定した遺伝子の発現解析

ダイズの根部を、各処理区毎に 4 個体ずつを用い、また解析対象は側根発現や形成に関する遺伝子とし、かつダイズに相同性のあるものを選択した。

Name	DDBJ number	Mutant
SLR	NM_117535 ^{*1}	LRE inhibition
ARF6	AF013467	LRE inhibition
ARF8	NM_123060	LRN increase
PGP1	NM_129247	LRN decrease
PGP19	NM_113807	LRN decrease
AUX1	NM_129368	LRN decrease

*1: TAIR number LRE: Lateral root expression
LRN: Lateral root number

表 1. 評価対象にした遺伝子群

RNA の抽出においては、Total RNA 抽出試薬である RNAiso (TaKaRa) の RNA 抽出のフローチャートに基づき行った。次に上記試料を対象に SuperScript 逆転写酵素 (ライフテクノロジー ジャパン) を用い、逆転写反応を行った。また、KOD-Plus-Neo 試薬 (東洋紡績株式会社) のマニュアルに基づき RT-PCR を行った。処理区間で発現量が一定である遺

伝子として ubiquitin を用いた。逆転写反応において、DNA のコンタミチェックが必要なため、ubiquitin では逆転写酵素添加の有無下での実験を行い、逆転写酵素が無い条件下での増幅バンドが無いことを電気泳動で確認し、転写量は、画像処理ソフト ImageJ (National Institutes of Health) により処理区間での輝度を計測し数値化した。

(6) 静電容量による植物根伸長の in-situ 計測法

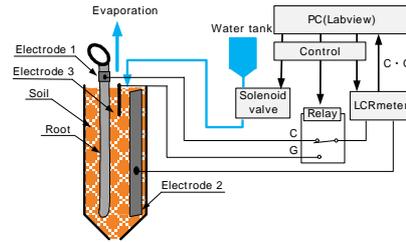


図 5. 静電容量による植物根伸長の in-situ 測法の概略図

図 5 に、本研究で構築した実験装置を記載した。ダイズ品種レンシック (Williams82 の後継品種) をパーミキュライトに播種し、栽培を行った。図 5 に記載の装置において、水分量制御を行った上で根伸長増加に伴う静電容量変化を検出できるか検証した。Plant 電極は、茎と電極間を長期的に安定して接触させるために、アルミホイルの内側には導電性ジェルを塗布し、外側は剛性のある導電性テープで覆った。実験には予備実験と同一の装置を使用した。3 個体 (a)-(c) を育成し、それぞれの静電容量・コンダクタンスを測定した。Soil 電極の形状による違いを調べるために (a) では予備実験と同じ半円筒電極、(b)、(c) では直径 1mm、長さ 45mm の針電極を用いた。これ以外の育成環境は同一である。また Plant 電極を取り付けた時点における根伸長を調べるために、これらとは別にダイズ種子 (d) を植え、発芽した時点での根伸長を測定した。

4. 研究成果

(1) 重力屈性の観察

前節で示したように、育成容器内試料に加わる加速度は 0 にはならず z 軸方向に -0.08G 程度となった。この値が植物の重力屈性に与える影響を調べるため、発芽したりヨクトウ (*Vigna radiata* モヤシマメ) 6 個体をクリノスタット装置生育容器内の 2 軸中心位置に設置し、12 時間作動させた。その後、それぞれの位置での試料の重力屈性を観察した。また、クリノスタット装置の回転速度は 1 軸、2 軸ともに 5rpm とする。図 6 に、それぞれの試料位置における試料の屈性方向を示した。矢印の方向は屈性方向を示し、長さは屈性した角度の大きさを示している、この結果より、植物体の重力屈性方向にばらつきが観察さ

れ、宇宙実験で得られた結果と同様な結果が得られた。そのため、本研究で利用するクリノスタット装置は微小重力環境を模擬できていることが実証された。

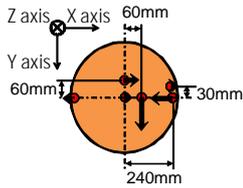


図6. モヤシマメで観察された重力屈性

(2) 根長の変化

測定した地上部長・根長を図7に示した。エラーバーは植物体の全長での標準偏差(n=15)を示す。模擬微小重力下における地上部、根部の長さはともに通常重力下に比べ31.0%増加した。また、地上部長さはTukey-Kramer法検定(T-K検定)により危険率5%未満で有意差を示した。根の伸長は、細胞伸長と細胞数の増加の積によって規定されるため、根部が伸長した要因として根部の細胞形態、もしくは細胞数が変化している可能性が考えられた。

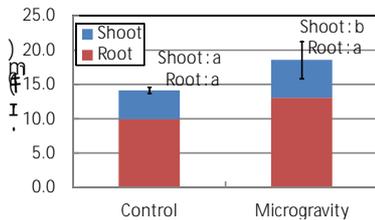


図7. クリノスタットと通常重力下で生育させたダイズの地上部と根の長さの比較

(3) 根細胞サイズの計測

(2)のクリノスタット区で生じた根伸長の原因を調査するため、両処理区での細胞の大きさを比較した。図8に通常重力下と模擬微小重力下での細胞観察写真を示した。また、図8に記載したように細胞の横と縦の長さを定義し、計測した結果を図9に示した。エラーバーは標準偏差(n=30)を示している。T-K検定(危険度5%)を行ったところ、各方向の長さには有意差は認められなかった。前述のように根部の伸長要因として細胞伸長もしくは細胞数の増加が挙げられるが、実験結果より細胞伸長は起きておらず、模擬微小重力下での根伸長の主要因は細胞数の増加である可能性が考えられた。一般に細胞数の増加は細胞分裂の頻度によって引き起こされ、また細胞分裂は細胞周期により定義されるため、模擬微小重力下では細胞周期が短縮され、細胞分裂の頻度が増加し、細胞数が増加したことが考えられた。この細胞周期の変化に関してはさらなる検証が必要である。

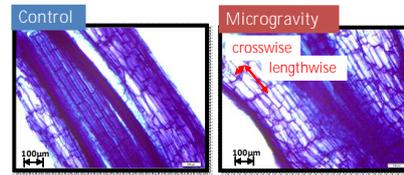


図8. 実験に用いたダイズの無処理区とクリノスタット区の根の比較写真

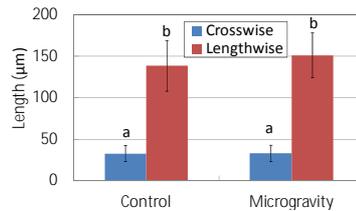


図8. 無処理区とクリノスタット区の根細胞の縦と横の長さの比較

(4) 側根数変化

(3)の結果から、疑似微小重力環境では根伸長が生じることから、根粒菌を接種した場合、根粒着生数に影響を与える可能性が示唆された。そこで、さらに、根粒着生数に影響する側根の疑似微小重力下での形態的变化の有無を調査した。

まず、地上環境と微小重力環境での側根数の変化を観察するため、今までと同様にダイズ品種Williams82の15個体を7日間クリノスタットで生育させた後、無処理区とクリノスタット区における全側根数を、根の部位別での側根発生数として計測した。図10に処理区間の全側根数を示した。エラーバーは標準偏差(n=15)を示している。模擬微小重力下では通常重力下に比べ側根数が29.6%増加したが、T-K検定(危険率5%)を行った結果、有意差は認められなかった。

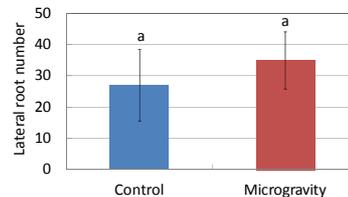


図10. 各処理区間での全側根数の比較

図11に根を上部から1cmずつ分割して、各位置での側根数を計測した結果を示す。縦軸が根の上部からの位置、横軸が側根数である。根の上部から1cm毎の側根数は0~7cmまで通常重力下に比べ、模擬微小重力下の側根数の方が多結果となった。以上の結果から、疑似微小重力下では、根全体としての側根数は変化しないものの、地表付近では増加する傾向があることが分かった。

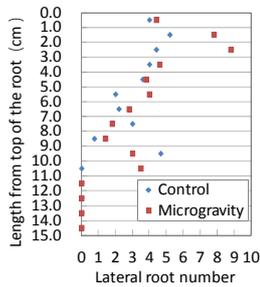


図 11. 根の基部から 1cm ごとに区分したときの、各部位に分布した側根数の変化

(5) クリノスタット環境で、側根発生に関する遺伝子群に発現変化が生じているか

(4) では疑似微小重力環境下において地表付近の側根数が増加する傾向が示された。この原因として、側根形成に関わる遺伝子の発現等が模擬微小重力環境下で変化している可能性も考えられた。そこで、表 1 に記載した側根形成にかかわる遺伝子の発現が、通常重力下と模擬微小重力下でどの様に異なるか解析した。図 12 に、通常重力下と模擬微小重力下の各遺伝子の発現強度を電気泳動写真の輝度の強弱で数値化した。エラーバーは標準偏差を示している、SLR, ARF6, ARF8, PGP19, AUX1 の遺伝子は、模擬微小重力下では通常重力下に比べ減少した。

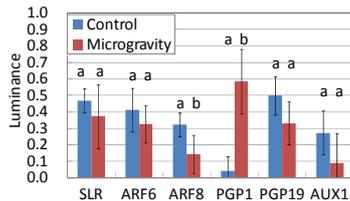


図 12. 側根形成に関わる遺伝子群の通常重力下と模擬微小重力下での遺伝子発現強度

PGP1 は通常重力下では発現しなかったが、模擬微小重力下では発現した。さらに、SLR, ARF6, PGP19, AUX1 では T-K 検定において両処理区に有意差はなかったが、ARF8 と PGP1 においては有意差が示された。

図 13 に、模擬微小重力下での遺伝子発現強度と通常重力下の遺伝子発現強度の比 (模擬微小重力下での遺伝子発現強度 / 通常重力下の遺伝子発現強度) を示した。SLR や ARF6 では相対輝度値が 20% 減少しているが、図 12 において両処理区での有意差が認められなかったことから、両処理区で遺伝子発現の強度に関しての差異はないと推定された。一方、側根数を制御する PGP19 や AUX1 においては、発現強度はそれぞれ 33%, 67% 減少する傾向が示され、両処理区での有意差は見られなかったが側根数制御に影響を与える可能性が示された。また、PGP1 の発現量は、模擬微小重力下で通常重力下に比べてその発現が約 14 倍に上昇した。このことから、疑似微小重

力環境下で、発根促進等に関する遺伝子群は何らかの影響を受けることが明らかになった。

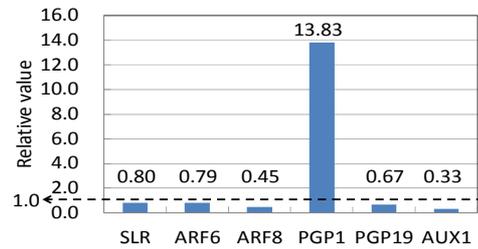


図 13. 模擬微小重力下での遺伝子発現強度と通常重力下の遺伝子発現強度の比 (模擬微小重力下での遺伝子発現強度 / 通常重力下の遺伝子発現強度)

(6) 模擬微小重力下での根粒着生数に関して

ダイズの発芽後、 4.1×10^7 細胞/ml のダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) USDA110 株を含む N-free 植物培養液を添加し、根粒菌接種を行った。接種後、それぞれの処理区に設置し、生育させた。クリノスタット装置の回転速度は 2 軸共に 5rpm とした。また、根粒菌が感染し根粒原基等の観察を行うために、生育期間を 10 日間とした。各処理区のダイズサンプルは、採取後 FAA 液で固定し、根をトルイジンブルーで染色し、根粒原基数を実体顕微鏡で計測した。根粒原基数を図 14 に示した。図 15 に於いて、T-K 検定 (危険率 5%) による有意差は認められなかったが、疑似微小重力環境下では通常重力環境に比べ、根粒原基数が 29.7% 増加した。以上の結果より、クリノスタット装置による疑似微小重力環境下で、根粒菌とダイズ (Williams82) の共生応答が行われること、及び根粒原基数が増加する傾向があることが分かった。

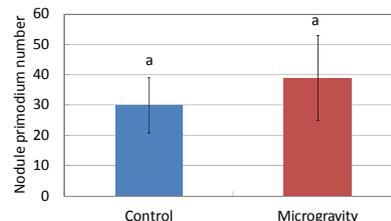


図 14. 通常重力下及び模擬微小重力下で形成された根粒原基数

(7) 静電容量による植物根伸長の in-situ 計測法の開発

図 16 に、発芽後 Plant 電極を装着し、静電容量測定の時変化を示した。(a) は播種から 2 日後に発芽し、コンダクタンスが $400 \mu S$ をとるよう水分量制御を行った。測定開始後、20 時間から 80 時間に渡りコンダクタンスがおおよそ $400 \mu S$ に保たれており、その間にも静電容量は $0.8nF$ から $0.9nF$ へと変化した。これは根伸長の増加によるものと

考えられた。しかしながら、測定開始から 20 時間まで、さらに 80 時間から測定終了まで、水分量制御を行っているにも関わらず、コンダクタンスが目標値からずれた。このことから、検出しているコンダクタンスは土壌水分含量以外の要因でも変化することが推定された。(b)では播種から 4 日後に発芽した。コンダクタンスは $80 \mu S$ となるよう水分量制御を行い、20 時間から 90 時間に渡ってコンダクタンスを一定に保つことができた。一方、静電容量は $0.70 nF$ から $0.82 nF$ へと増加しており、土壌水分量変化の影響を除去した上で、実際のダイズ根伸長増加に対する静電容量変化を検出することができたと考えた。(c)では播種から 4 日後に発芽し、測定開始から測定終了までの 90 時間に渡り、コンダクタンスを目標値である $100 \mu S$ に保つことができた。しかし、静電容量は測定開始から 20 時間前後で上昇したのち、次第に減少した。(a), (b)の静電容量を比較すると Soil 電極の形状によって測定される静電容量に変化は無いことが分かる。また、(a)と(b), (c)のコンダクタンスを比較すると Soil 電極に半円筒電極を用いた場合よりも、針電極を用いた場合の方が測定されるコンダクタンスが安定していることが分かった。発芽した時点(播種から 2 日経過)で引き抜いた(d) (別にダイズ種子を植え、発芽した時点での根伸長を測定したもの)の根伸長は 20mm であった。この結果より、(b)の Plant 電極取り付け後の根伸長増加量を測定し、根伸長の増加量[mm]に対する静電容量の増加量[pF]を求めると、 $0.52 mm/pF$ となった。

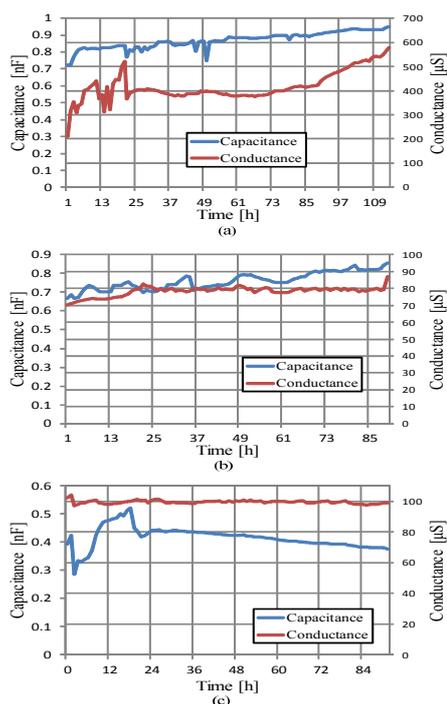


図 15. 根の伸長に伴う静電容量変化と土壌水分含量に伴うコンダクタンス変化の関係

この結果から、ダイズを用いた実験により、水分量を制御した環境下で、ダイズの生育に伴う根伸長増加を静電容量の変化で、in-situ に測定することが出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~plantnut/sub1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 正 (Yokoyama Tadashi)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：70313286

(2) 研究分担者

梅田 倫弘 (Umeda Norihiro)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：60111803