



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高等植物における微小重力に対する応答機構の分子生物学的基礎:微小重力下での植物の瞬間試料凍結装置の開発
Author(s)	島本, 義也; SHIMAMOTO, Yoshiya; 久岡, 由佳 他
Citation	北海道大学農学部農場研究報告, 31, 49-60
Issue Date	1999-03-29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13442
Type	departmental bulletin paper
File Information	31_p49-60.pdf



高等植物における微小重力に対する応答機構の分子生物学的基礎

—— 微小重力下での植物の瞬間試料凍結装置の開発 ——

島本 義也¹⁾・久岡 由佳¹⁾・今野 繁雄²⁾・若澤 幸夫³⁾・高井 宗宏²⁾・飯塚 敏彦⁴⁾

(¹⁾北海道大学農学部植物遺伝資源学講座)

(²⁾北海道大学大学院農学研究科生物生産学講座)

(³⁾北海道大学農学部附属農場植物資源開発部)

(⁴⁾北海道大学農学部応用分子昆虫学講座)

(1999年2月2日受理)

1. 緒 言

高等植物がその進化過程において経験していない宇宙環境に適応できるのか、宇宙環境が高等植物の発育にどのような影響を及ぼすのか、明かではない。宇宙環境の最大の特長である微小重力下で高等植物が発育することは既に観察されているが (Tripathy et. al., 1996), その様相を明らかにする上で、微小重力のストレスに対し、高等植物は、どのように感受し、どのように応答するのか、遺伝子発現の観点から検討する必要がある。

高等植物に微小重力ストレスを処理できる微小重力実験施設 (JAMIC: Japan Microgravity Center, 地下無重力実験センター, 上砂川町, 北海道) が開設され、この施設の自由落下実験装置を利用して、微小重力下で特異的に発現する高等植物の遺伝子のクローニングを試みてきた。自由落下実験装置は、落下直後から10秒間の微小重力環境の後、制動による重力の乱れおよび機械的ブレーキにより過重力がかかる環境になる。したがって、自由落下実験装置を利用して得られた試料の解析は、これらの多様な重力ストレスの処理の総和の結果であるため、微小重力のストレスのみの処理試料を回収する装置の開発が必要である。

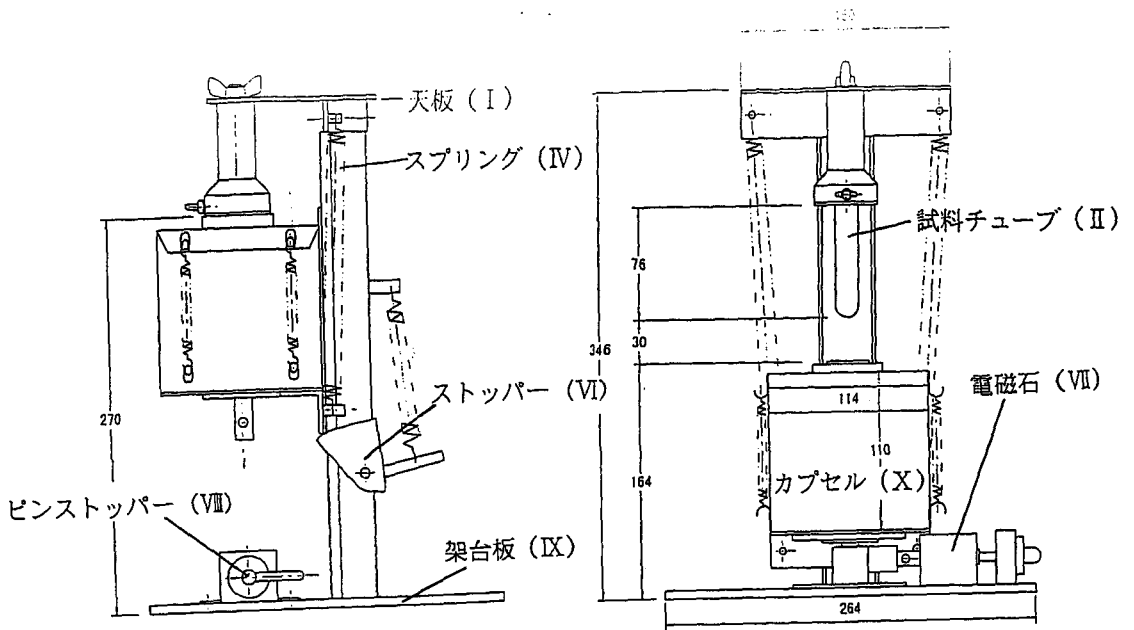
本研究は、自由落下実験装置が落下後の微小重力環境にある間に、搭載試料の高等植物を液体窒素のなかに放り込み、制動による重力の乱れおよび機械的ブレーキによる過重力が負荷される前に搭載試料植物の機能を失活させることによって、

微小重力ストレスのみに応答した遺伝子産物を特異的に単離可能な試料を回収する瞬間試料凍結装置を開発し、この装置を用いてイネの幼植物体に微小重力ストレスを処理した試料と対照試料の遺伝子産物を比較することを目的とした。

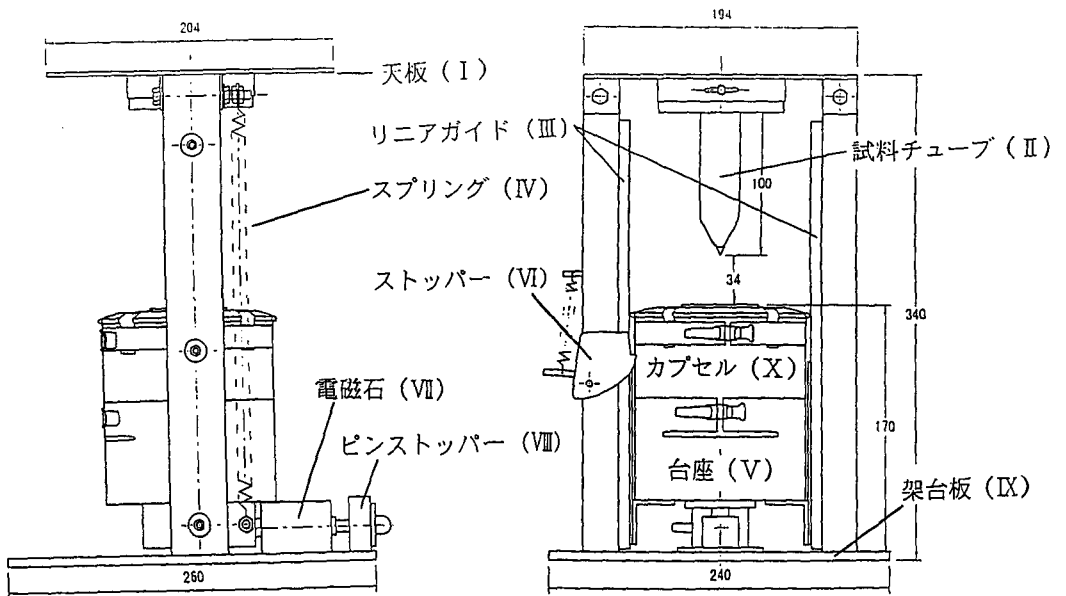
2. 瞬間試料凍結装置の開発

JAMICの自由落下実験装置は、閉山した炭坑の立坑 (710 m) を利用して、その中をカプセルが490 m落下する。カプセルは、外側と内側のカプセルの二重構造を採り、外側と内側の間を真空 (100 Pa) にし、両カプセルが接触しないようにスラストによって空気抵抗を補償しながら加速される。実験材料は内側カプセルの中のラックに乗せられる。自由落下実験装置によって、落下開始と共に微小重力 ($10^{-5}G$) が得られ、10秒間の微小重力環境の後、制動による重力の乱れおよび機械的ブレーキにより過重力 (8 G) が実験供試試料に負荷される。この間、ラックに搭載されたビデオカメラの画像の受信、各種の制御コマンドの送信が可能である。

ラックは奥行き 87 cm, 幅 87 cm, 高さ 88.6 cm であるが、高さと幅を半分に区切って4分割した1/4モジュール (奥行き 87 cm, 幅 43.5 cm, 高さ 44.3 cm) が標準である。1/4モジュールに設置する開発された瞬間試料凍結装置概略図を図1に示した。微小重力環境を経験した植物試料を、制動が始まる前に、搭載した液体窒素が入っているカプセルの中に放り込み、液体窒素により植物試料



瞬間試料凍結装置 1号機



瞬間試料凍結装置 2号機

図1 瞬間試料凍結装置の概略図

を瞬間的に凍結させるための装置である。

1) 構造

本装置は1/4モジュールに設置する架台の天板に、幼植物実生を入れた試料チューブを固定し、下方の架台板に液体窒素を入れたカプセルを固定して落下実験に入り、微小重力が負荷されている状態でカプセルを跳ね上げ、試料チューブを液体窒素に浸せきして試料を凍結させようとするものであり、次の主要部品で構成している。なお、1号機と2号機があるが、形状や寸法は2号機について述べる。

①試料チューブ

試料チューブはポリプロピレン製50 ml 遠沈管（岩城ガラス）を用い、その蓋部をホルダーで挟んで図1のIに示す天板にネジ止めしている。また、図1のIIに示す試料チューブ底面には硬質プラスチックを円錐状に加工して糊付け、図1のXに示すカプセルの液体窒素を覆うラップフィルムを破るようにしてある。

②液体窒素カプセル

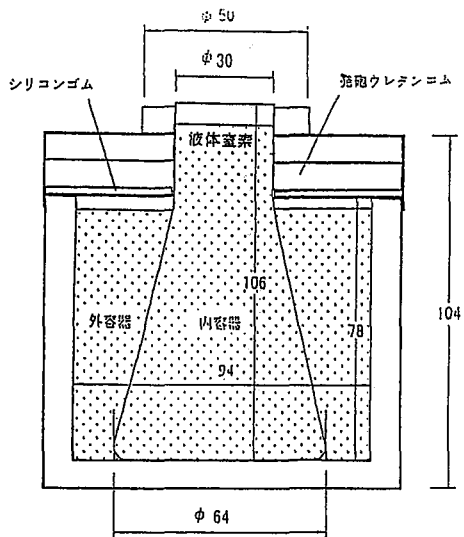
液体窒素を入れるカプセルは外容器（容量：約500 ml）と内容器（容量：約250 ml）の二層構造としたカプセル本体、試料チューブを挿入する穴を持ったカプセル蓋および台座からなる。以下の構造説明では、カプセルを解体した図2にしたがって述べる。外容器は、直径120 mm、高さ100 mmのステンレス製であり、内面に10 mmの硬質発泡ウレタンを貼り付けて断熱し、内容器との間に510 ccの液体窒素を入れて内容器を冷却する。内容器はポリプロピレン製250 ccの三角フラスコを用い、深さ108 mmとして試料チューブが入るように考慮し、天板にネジ止めして外容器との間隔を約15 mm離れるようにしてある。カプセルの蓋は、断熱のほかに凍結しても取り外せるようにするため、全くの試行ながら接触部に厚さ8 mmのテフロンを基材とし、その上面に厚さ2 mmのシリコンゴムおよび厚さ8 mmの発泡ウレタンゴムを貼って断熱作用を付与した。また、試料チューブの入る穴部は、跳ね上げた時に上板に衝突することと、フラスコの内容器を保持する

ため、MCナイロン（MC 901）を使って強度を持たせた。なお、容器に液体窒素を入れた後、蓋表面をラップフィルム（ポリ塩化ビニリデン、Coopラップレギュラー）で覆って気化を防ぐようにしている。さらに台座は、カプセル本体を鋼製バンドで保持しながら、跳ね上げ時に垂直に上昇させるため、架台の柱に取り付いたりニアガイドに従って滑り上がる構造であり、その下面には後述する固定のためのピンストッパーを備えている。

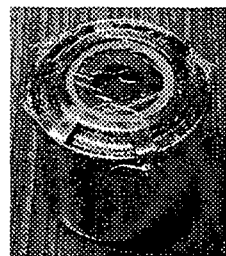
③跳ね上げ機構

カプセルを跳ね上げる機構はカプセル固定部と跳上げ起動部および図1のIVに示す跳上げ用スプリングで構成している。カプセル固定部は、カプセル下面の図1のVIIIに示すピンストッパーに入るピン本体、図1のVIIに示すそのピンを引抜く電磁石（オムロン製）、不用意に跳上がないようにするロック装置が直列に配置してある。跳上げ起動部は、JAMICの落下装置が落下開始信号（操作者が落下開始ボタンを押してから1.504 sec後で、微小重力開始時となる）を利用者に提供しているため、トランジスタを用いたスイッチング回路によって信号を受け、これをタイマー（オムロン製、H3CAソリッドステート・タイマ）に入力して跳上げ時間を規制し、時間切れと共にタイマーの出力によって電磁石を作動させ、落としピンを引き抜く。跳上げスプリングは径12 mm、バネ常数0.0072 Kg/mmのコイルスプリングを用い、天板とカプセル台座の間につなぎ、落としピンが外されると瞬時に跳上げるようにしてある。

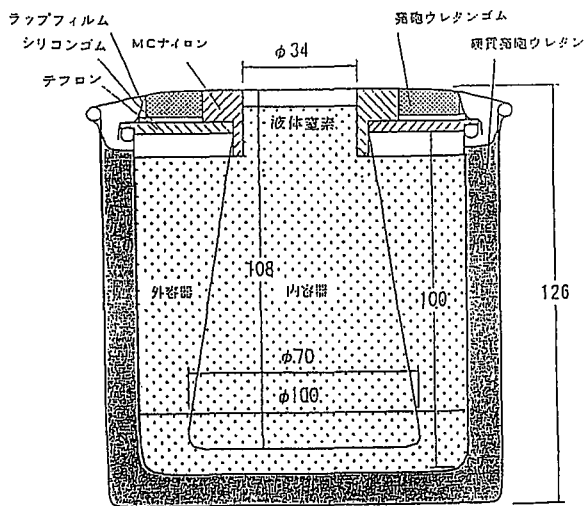
跳ね上げられたカプセルは試料チューブを液体窒素に浸せきすると同時に天板に衝突するため、天板にはカプセル蓋のMCナイロンと同径の緩衝用発泡ウレタンゴムを貼って衝撃を吸収させた。さらに衝突後の跳ね返りを防ぐために、図1のIIIに示す架台リニアガイド上に取り付けた図1のVIに示すバネ仕掛けのストッパーによってカプセルを押さえるようにしてある。これらの動作は微小重力下で行われるため、スプリングのバネ常数、緩衝材の弾性係数などの決定法が明確でなかったが、大気圧下で期待通り作動すれば良いとして試行錯誤の上で決定した。なお、机上での試行



1号機のカプセルの概略図

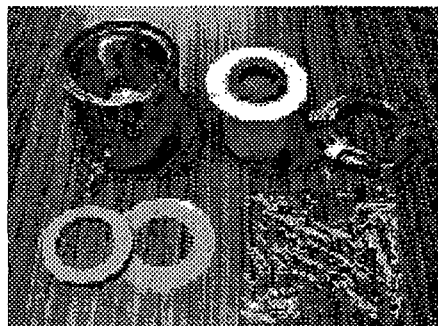


2号機のカプセル (組立時)



2号機のカプセルの概略図

外部容器
鋼製バンド 内部容器 カプセル蓋



発砲ウレタンフォーム ラップフィルム
シリコンゴム

2号機のカプセル (分解時)

図2 瞬間試料凍結装置カプセルの構造

を明確にするため、跳ね上げ制御機構の動作状況を表示する3個のLEDランプを備えて動作確認を容易にしてある。

④試作1・2号機

本装置は、微小重力と8Gという過重力に耐える必要があるため、まず試作1号機によって動作を確認し、基本構造はそのまま次のような改良を加えて上述した2号機を製作した。第1次の落下試験によって1号機は、荷重に耐えて試料を急速凍結させるのに成功した。しかし、1号機はカプセル本体が四角で、内容器と外容器の間隔が不均一であるばかりか、内外容器の底面が接触して液体窒素の気化が早い、試料チューブの容積が15ccのために試料が少ないなどの問題が明らかとなった。そこで2号機は架台を2本柱として跳ね上げ時の動作を安定させ、試料チューブを大きくし、液体窒素を入れるカプセルを円筒形にするなどの改良を行った。この2号機で落下試験を4回実施したが、幾分の改善項目があるものの、当初目標とした機能は果たしている。

2) 落下実験の手順

実験に当たっては、まず図1のXに示すカプセルを下端に押し下げて保持ピンを差し込んでロックし、カプセルの保持ピンロックを外す。次いでカプセル跳上げタイマーの時間を設定してから液体窒素を注入し、この状態で10分間放置し装置全

体を液体窒素の気化したガスの露出により冷却する。モジュール搭載直前に液体窒素を再注入し、図1のIIに示す予め幼植物を入れて置いた試料チューブを天板にネジで固定し、落下試験の開始を待つ。作動確認のためビデオカメラを装置の向かいに搭載し制御モニター室において流し撮り映像を観察した。照明として装置の左右と背面側のラック枠柱にそれぞれランプを設置した。しかし、1回の落下に要する経費が高額なため、実際にはモジュールに入れる前に幾度も模擬実験を繰り返して動作確認をする必要があった。この際はシステムから受信する落下開始信号の代わりに接続端子の特定ピン番号(18-19もしくは20-21)をピンセットで短絡することで行った。なお、落下試験終了後、試料を回収して携帯型凍結庫に入れるまでの時間を考えて、液体窒素の減少経過、試料の凍結に要する時間などについて実験を行い、次の結果を得た。

3) 液体窒素保持時間

カプセル内の液体窒素量減少の時間的経過を推定した。2cm厚さの発砲スチロールを敷いた台秤に液体窒素を満たしたカプセルを乗せ、60分後、90分後、120分後に全重を計測し、計測値からカプセルと発砲スチロールの重量を差し引いた値に液体窒素の比重(0.808g/ml)の逆数を乗じた値を液体窒素の体積とした。結果を図3に示し

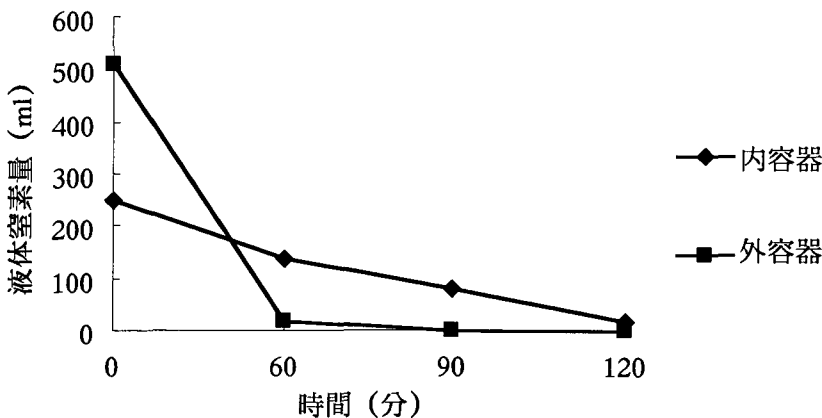


図3 瞬間試料凍結装置2号機カプセルの内容容器および外容器の液体窒素量の変化

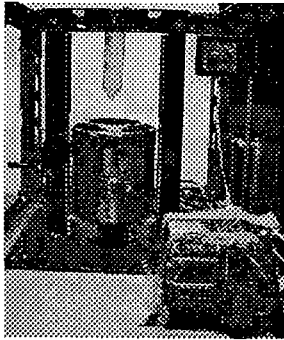
た。

液体窒素注入から60分(想定される微小重力環境時)後に液体窒素量は、外容器は510 mlから2 mlへと、内容器は250 mlから140 mlへと急激に減少し、60分以降の液体窒素は内容器のみに存在した。90分後には液体窒素内容器の液体窒素は80 mlとなり、120分後(想定される実験試料回収時)には液体窒素内容器の液体窒素は18 mlとなり、120分以降では液体窒素は完全に揮発した。

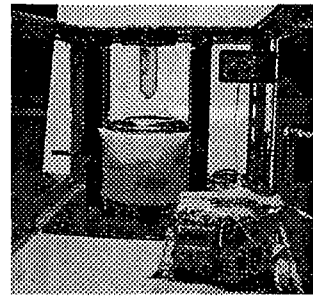
カプセル内の液体窒素の保持時間を向上させるため、カプセルを断熱紙(ウレタンシート、厚さ

7 mm) 1枚で包む(図4写真右)と、60分、90分および120分における残存総液体窒素量が約80 ml増加した(図4)。

JAMICの実験装置は標準的には試料搭載から微小重力処理試料受け取りまで2時間以内で完了する。しかし、当日の作業事情により2時間を越えることもある。このためカプセルは試料搭載から微小重力処理試料受け取りまでを3時間と想定し、その間液体窒素が保持されるよう、断熱効果を増大させる必要がある。改善点としては断熱材の肥厚、空気断熱層の構築が考えられる。



(A) 瞬間試料凍結装置2号機の全体像



(B) 瞬間試料凍結装置2号機のカプセルを断熱紙で包んだ状態

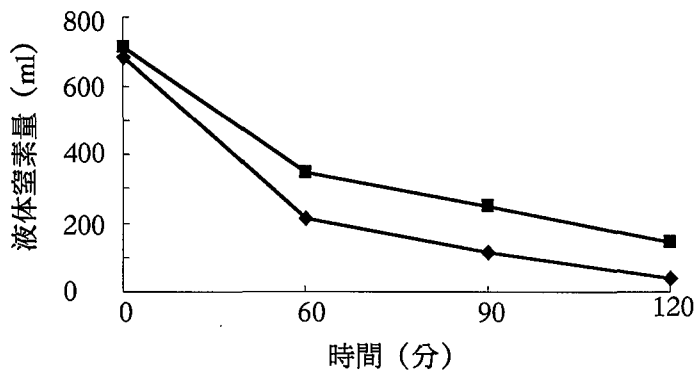
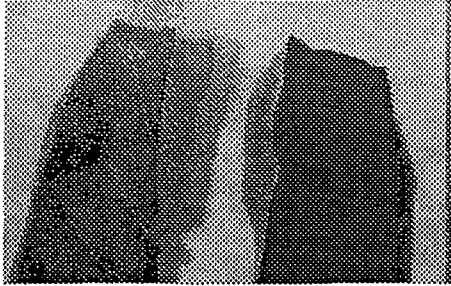


図4 瞬間試料凍結装置2号機のカプセル内液体窒素量の変化(内部容器および外部容器の和)
 ◆— はカプセルが断熱紙で包装されていない時 (A)
 ■— はカプセルが断熱紙で包装されている時 (B)
 開始点の量が異なっているのは実験誤差である。

4) 試料の凍結に要する時間

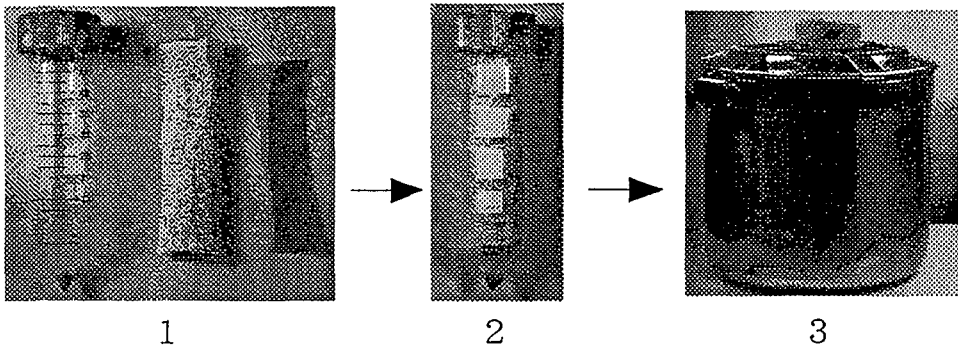
プラタナスの緑色の生葉を液体窒素の中に放り込むと凍結部位は白色化し、凍結したことが容易に判別できる(図5 A)。このためプラタナスの葉



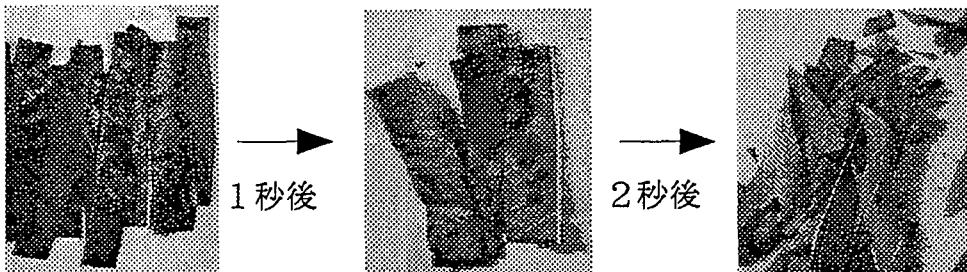
A 左：液体窒素により凍結して白くなったプラタナスの葉
右：凍結していない緑のプラタナスの葉

を用いて凍結に要する時間を測定した。

プラタナスの生葉を 9 cm×1 cm に切り、葉 10 数枚をガーゼで包み、図 1 の II に示す試料チューブにいれて、液体窒素を充填した容器に投入し、投入約 1 秒後および約 2 秒後に容器から試料チューブを回収してガーゼで包んだ葉を取り出し、ガーゼを広げて葉色から試料の凍結具合を確認した(図 5 B)。容器投入約 1 秒後ではプラタナスの葉の数枚のうち、試料チューブの外側に位置する葉の数枚は白色化し、凍結が確認されたが、試料チューブの内側に位置する葉の数枚は緑色のままで凍結していなかった。カプセル投入 2 秒後では試料チューブの外側内側に位置する全ての葉が凍結していた(図 5 C)。したがって、液体窒素の中に入れられた植物試料は 2 秒以内に凍結するものと



B 試料チューブにプラタナスの葉をセットする手順
1 プラタナスの葉(右)をガーゼで包む(中央)、試料チューブ(左)にいれる
2 ガーゼで包まれたプラタナスの葉の入った試料チューブ
3 カプセルに試料チューブを投入した状態



C カプセルに試料チューブを投入した時の液体窒素により凍結したプラタナスの葉
左：凍結していないプラタナスの葉 中央：カプセル投入 1 秒後 右：カプセル投入 2 秒後

図5 瞬間試料凍結装置 2 号機における試料の凍結に要する時間の調査

思われる。

3. 凍結植物試料からの遺伝子産物の抽出

イネの幼植物体を試料チューブに入れた瞬間試料凍結装置を JAMIC の装置に搭載して自由落下による微小重力ストレスを処理し、自由落下中に植物体を凍結させて、凍結試料を回収し、遺伝子産物の抽出を試みた。

材料と方法

1) 供試材料

イネの栽培品種「亀の尾」とその重力感受に関する突然変異体「もつれ亀の尾」である。「亀の尾」は重力軸方向に稈の生長を示すのに対し、「もつれ



図6 実験に供試した「亀の尾」と「もつれ亀の尾」
左：「亀の尾」 右：「もつれ亀の尾」
「亀の尾」が向重力軸方向に稈の生長を示したのに対し、突然変異体は重力軸方向から傾いた方向に稈の生長を示した

亀の尾」は重力軸方向から傾いた方向に稈の生長を示す(図6)。

1997年にポット栽培をし収穫した種子を、濾紙を敷いたシャーレ上に播種し、30℃暗黒条件で1週間生育させた。実生は余分な水分をペーパータオルで除き、液体窒素による凍結後の試料の崩壊と飛散を防ぐためガーゼに包み、試料チューブに静置した。また、試料チューブがカプセルに投入された際、液体窒素の流入により、ガーゼが試料チューブ内で持ち上げられ、試料の凍結が困難に

なることを防ぐため、ガーゼは試料チューブの底部に糸で固定した。

試料チューブを瞬間試料凍結装置にセットし、JAMIC 落下カプセルに搭載して、自由落下による微小重力(10⁻⁵G, 8秒間)を処理した。対照試料は微小重力処理試料と同様の手順で作製し、微小重力を処理せず地上重力下で液体窒素により凍結させた。回収した試料はドライアイス中に保存し、凍結を保った状態で実験室まで輸送した。試料は実験室到着後-80℃のフリーザーに保存した後、RNAの抽出に供した。

2) 全 RNA の抽出

微小重力処理を行った試料と対照試料の両者から全 RNA を抽出した。全 RNA の抽出は Chomczynski and Sacchi(1987)の方法を改変した方法によって行った。生葉 1g を液体窒素中で細破し、抽出用緩衝液(7 M グアニジン塩酸塩, 25 mM クエン酸三ナトリウム, 2% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム) 4 ml, メルカプトエタノール 30 μl およびフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1) 4 ml を加え、よく混合した後、約 2000×g で 10 分間遠心した上清を回収し、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1), クロロホルム:イソアミルアルコール(24:1) で 1 回ずつ処理を行った。回収した上清に 2 倍量のエタノールおよび 1/64 量の 10 M 塩化リチウムを加え、約 8000×g 10 分間の遠心により回収した核酸を滅菌超純水に溶解し、1/4 量の 10 M 塩化リチウムを加えて、氷冷し高分子 RNA を回収した。

3) 微小重力を施した植物体より抽出された cDNA の PCR による微小重力処理に特異的発現を示す遺伝子の検出

全 RNA より宝酒造の「TAKARA RNA PCR Kit (AMV) ver 2.1」を用いて、チミン数塩基と任意の数塩基からなるアダプタープライマーを用いた逆転写反応を行い、cDNA を合成した。逆転写反応は宝酒造のプロトコールに従って行った。得られた cDNA の PCR 反応には、PCR 反応液[試

料 cDNA 200 ng, Gene Taq Universal Buffer, 0.2 mM dNTP Mixture, 0.5 μ M プライマー*2, 0.5 U Taq ポリメラーゼ] 20 μ l を用いた。効率よく多型を検出するため、プライマーは逆転写反応時に用いたアダプタープライマーに相補的な配列 5'GTT TTCCCAAGTCACGAC3' (Tm 52°C) のプライマーとランダムプライマーを混合して用いた。ランダムプライマーとしては (株) ニッポンジーン社 kit A-1 プライマー (12-mer, Tm 34~42°C, 11 種類) もしくはオペロン社 kit AB, kit AC, kit M (10-mer, Tm 34~42°C, 各 20 種類) のプライマーのうち任意の 1 種類を選んで用いた。Taq ポリメラーゼには (株) ニッポンジーン社製の Gene Taq を用いた。PCR 反応の熱サイクルは 92°C 5 分, (92°C 0.5 分, (アダプタープライマー Tm-5)°C 0.5 分, 72°C 1 分, 92°C 0.5 分, (ランダムプライマー Tm-5)°C 0.5 分, 72°C 1 分) を 30 サイクル, 72°C 7 分を行った。サーマルサイクラーはパーキンエルマー社製 Gene Amp PCR System 2400 もしくは 9700 を用いた。得られた PCR 産物は、2% アガロースゲルを担体として 100 V の定電圧下で 50 分間電気泳動させた。その後、トランスイルミネーターの UV 光下でバンドを観察し、微小重力に特異的に発現する断片を探索した。

4. 結果および考察

微小重力処理を 4 回実施した。1 回目, 3 回目と 4 回目は「亀の尾」の幼植物体を, 2 回目は「もつれ亀の尾」の幼植物体を供試した。1 回目, 2 回目と 3 回目は自由落下開始から設定時間の 8 秒後に瞬間試料凍結装置が作動し, 自由落下後の制動前に試料チューブをカプセルに投入することに成功した。4 回目は設定時間 (8 秒) に瞬間試料凍結装置が作動せず, 自由落下後にカプセルが上昇し, 試料チューブはカプセルに投入された。瞬間試料凍結装置が設定時間に作動しなかった原因としては, 液体窒素の冷気によってカプセルを持ち上げるバネが凍りつきカプセルを持ち上げられなかったか, あるいは, 落下開始信号が瞬間試料凍結装置の電磁石に伝わらなかったと考えられる

が, 詳細は検討中である。

1 回目と 2 回目の微小重力処理は落下カプセルへの積み込みから試料回収まで, 2 時間半を要し, 回収時にはカプセル内の液体窒素内容器, 液体窒素外容器とも液体窒素がすべて揮発し, 凍結試料は融解していた。3 回目はカプセルを断熱紙 1 枚で包み (図 5 写真), 液体窒素注入初期の液体窒素の揮発を抑制し, 液体窒素保持時間を向上させた。3 回目は試料の回収まで 2 時間要し, 液体窒素は, 液体窒素外容器にはなかったが, 液体窒素内容器に数 10 ml 残存し, 試料は凍結を保ったまま回収することに成功した。4 回目は試料の回収まで 2 時間要し, 回収したときには液体窒素は液体窒素外容器に 0 ml, 液体窒素内容器に 75 ml 残存していたが, 試料は凍結していなかった。試料が液体窒素によって浮かび上がり, 液体窒素残存高さよりも上に押し上げられたため, 試料が凍結しなかったと考えられる。cDNA の PCR による遺伝子産物の解析の試料には 3 回目の試料を用いた。

植物体イネ「亀の尾」の微小重力処理をおこなった試料および対照試料から全 RNA を抽出し, cDNA を作製して, これを鋳型とし, 一対のプライマーを用いた PCR 反応を行った。用いた 71 種類のランダムプライマーのうち PCR 産物に断片が見られなかったプライマーは 23 種類, 断片の見られたプライマーは 48 種類であった。また断片の見られたプライマーのうち, 対照と微小重力処理間で全く同じ断片が観察されたプライマーは 15 種類, 異なる断片が観察されたプライマーは 33 種類であった。異なる断片が観察されたプライマーのうち, 処理間で共通の断片と異なる断片の両方が観察されたプライマーは 17 種類 (A 01, A 07, OPAC-04, OPAC-19, OPAC-20, OPM-7, OPM-9, OPM-11, OPM-14, OPM-16, OPM-18, OPM-19, OPAB-1, OPAB-3, OPAB-5, OPAB-13, OPAB-15), 異なる断片のみが観察されたプライマーは 16 種類 (A 08, A 10, OPAC-01, OPAC-05, OPM-1, OPM-4, OPM-15, OPM-17, OPM-20, OPAB-6, OPAB-7, OPAB-10, OPAB-11, OPAB-12, OPAB-17, OPAB-18) であった (表 1)。対照と微小重力処理間で差異の見られた断片

表1 微小重力を処理した植物体および対照の植物体のcDNA-PCR多型
観察された全断片数および対照と処理間で差異の見られた断片数

プライマー	塩基配列	全断片数		特異的断片数		プライマー	塩基配列	全断片数		特異的断片数	
		対照	処理	対照	処理			対照	処理	対照	処理
A01	TGC ACT ACA ACA	3	4	0	1	OPM-1	GTT GGT GGC T	1	0	1	0
A02	GGC ATG GCC TTT	0	0	0	0	OPM-2	ACA ACG CCT C	3	3	0	0
A04	ATC AGC GCA CCA	0	0	0	0	OPM-3	GGG GGA TGA G	0	0	0	0
A05	AGC AGC GCC TCA	7	7	0	0	OPM-4	GGC GGT TGT C	0	1	0	1
A06	GCC AGC TGT ACG	6	6	0	0	OPM-5	GGG AAC GTG T	0	0	0	0
A07	TGC CTC GCA CCA	2	4	0	2	OPM-6	CTG GGC AAC T	1	1	0	0
A08	GCC CCG TTA GCA	0	4	0	4	OPM-7	CCG TGA CTC A	4	3	1	0
A09	CCG CAG TTA GAT	2	2	0	0	OPM-8	TCT GTT CCC C	2	2	0	0
A10	ACT GGC CGA GGG	2	0	2	0	OPM-9	GTC TTG GCG A	2	3	0	1
A11	GAT GGA TTT GGG	0	0	0	0	OPM-10	TCT GGC GCA C	0	0	0	0
A12	TTC GGA CGA ATA	1	1	0	0	OPM-11	GTC CAC TGT G	4	5	1	2
OPAC-01	TCC CAG CAG A	0	1	0	1	OPM-12	GGG ACG TTG G	0	0	0	0
OPAC-02	GTC GTC GTC T	0	0	0	0	OPM-13	GGT GGT CAA G	1	1	0	0
OPAC-03	CAC TGG CCC A	4	4	0	0	OPM-14	AGG GTC GTT C	2	3	1	2
OPAC-04	ACG GGA CCT G	3	1	2	0	OPM-15	GAC CTA CCA C	3	1	3	1
OPAC-05	GTT AGT GCG G	2	2	2	2	OPM-16	GTA ACC AGC C	6	3	4	1
OPAC-06	CCA GAA CGG A	0	0	0	0	OPM-17	TCA GTC CGG G	1	0	1	0
OPAC-07	GTG GCC GAT G	0	0	0	0	OPM-18	CAC CAT CCG T	4	2	3	1
OPAC-08	TTT GGG TGC C	0	0	0	0	OPM-19	CTT TCA GGC A	4	2	2	0
OPAC-09	AGA GCG TAC C	0	0	0	0	OPM-20	AGG TCT TGG G	2	0	2	0
OPAC-10	AGC AGC GAG G	0	0	0	0	OPAB-1	CCG TCG GTA G	4	2	2	0
OPAC-11	CCT GGG TCT G	0	0	0	0	OPAB-2	GGA AAC CCC T	0	0	0	0
OPAC-12	GGC GAG TGT G	0	0	0	0	OPAB-3	TGG CGC ACA C	4	1	3	0
OPAC-13	GAC CCG ATT G	0	0	0	0	OPAB-4	GGC ACG CGT T	0	0	0	0
OPAC-14	GTC GGT TGT C	1	1	0	0	OPAB-5	CCC GAA GCG A	7	4	3	0
OPAC-15	TGC CGT GAG A	2	2	0	0	OPAB-6	GTG GCT TGG A	1	1	1	1
OPAC-16	CCT CCT ACG G	6	6	0	0	OPAB-7	GTA AAC CGC C	5	0	5	0
OPAC-17	CCT GGA GCT T	5	5	0	0	OPAB-8	GTT ACG GAC C	0	0	0	0
OPAC-18	TTG GGG GAG A	0	0	0	0	OPAB-9	GGG CGA CTA C	0	0	0	0
OPAC-19	AGT CCG CCT G	3	4	0	1	OPAB-10	TTC CCT CCC A	2	0	2	0
OPAC-20	ACG GAA GTG G	1	2	0	1	OPAB-11	GTG CGC AAT G	1	0	1	0
						OPAB-12	CCT GTA CCG A	1	2	1	2
						OPAB-13	CCT ACC GTG G	3	1	2	0
						OPAB-14	AAG TGC GAC C	1	1	0	0
						OPAB-15	CCT CCT TCT C	4	2	2	0
						OPAB-16	CCC GGA TGG T	1	1	0	0
						OPAB-17	TCG CAT CCA G	2	3	2	3
						OPAB-18	CTG GCG TGT C	0	1	0	1
						OPAB-19	ACA CCG ATG G	0	0	0	0
						OPAB-20	CTT CTC GGA C	0	0	0	0

は異なる mRNA の存在を反映したものと考えられる(図7)。現在実験の再現性について検討中であり、再現性に関して確証が得られた断片に関して、クローニングおよび塩基配列の決定を行い、その機能を解析していく予定である。

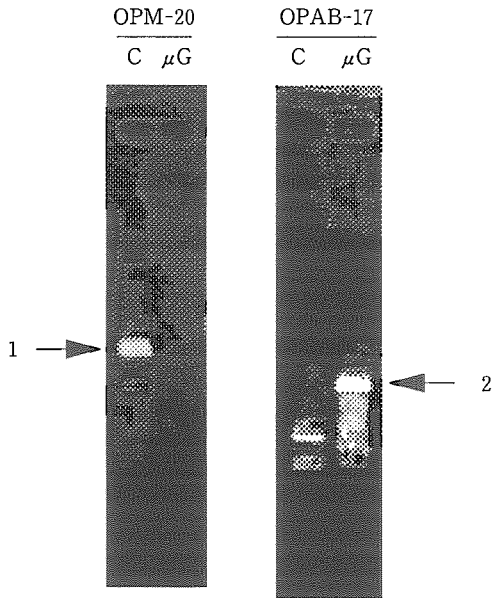


図7 微小重力を処理した植物体および対照の植物体のcDNA-PCRの多型

微小重力処理を行った試料(μG)と微小重力処理を行っていない試料(C)から抽出した全RNAより構築したcDNAを用いてPCRを行った。ランダムプライマーOPM-20を用いたとき、矢印1で示す微小重力処理により発現が抑制された断片が検出され、ランダムプライマーOPAB-17を用いたとき、矢印2で示す微小重力処理により発現が誘導された断片が検出された。

5. 要 約

高等植物における微小重力ストレスに対する応答機構の分子生物学的基礎を明らかにするため、地下無重力実験センターの自由落下施設の微小重力環境下での植物の瞬間試料凍結装置を開発し、こ

の装置を用いて、イネの幼植物体に微小重力を処理し、微小重力を処理した試料と対照試料の遺伝子産物を比較した。微小重力を施した植物体および対照の植物体より抽出されたcDNAのPCRによる遺伝子産物の解析により、微小重力に応答して特異的に発現した遺伝子産物をとらえることが出来た。

謝 辞

本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)から宇宙環境利用推進センター(JSUP)に委託された平成10年度研究基盤施設活用型先導的基礎研究事業「微小重力の生物個体に対する影響の基礎研究」の成果を中心に纏めた。また、本研究の一部は北海道地域技術振興センター(HOKTAC)の援助のもとにおこなわれた。本実験に供試したイネの栽培品種「亀の尾」とその重力感受に関する突然変異体「もつれ亀の尾」は東北大学遺伝生態研究センター・高橋秀幸氏から分譲いただいた。ここに記して謝意を表する。

引用文献

- Abe, K., H. Takahashi and H. Suge (1996) Lazy gene (la) responsible for both an agravitropism of seedlings and Lazy habit of tiller growth in Rice (*Oryza sativa* L.) *Journal of Plant Research* **109**: 381-386
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159
- Tripathy, B. C., C. S. Brown., H. G. Levine and A. D. Krikorian (1996) Growth and photosynthetic responses of wheat plants grown in space. *Plant Physiol* **110**: 801-806
- 吉田薫 (1995) Differential Display (簡易法) 新版 植物のPCR実験プロトコール-核酸の単離法とゲノム・遺伝子発現の最新解析法- 細胞工学 別冊 植物細胞工学シリーズ7: 秀潤社: P 132-137

Molecular Biological Basis of the Responsive Organization to the Microgravity in Higher Plants

— Development of Installation for Instantaneously Freezing Plant Materials
under Microgravity —

Yoshiya SHIMAMOTO¹⁾, Yuka HISAOKA¹⁾, Shigeo KONNO²⁾, Yukio WAKAZAWA³⁾,
Munehiro TAKAI²⁾ and Toshihiko IIZUKA⁴⁾

(¹⁾Laboratory of Plant Genetics and Evolution, Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

(²⁾Experimental Farms, Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

(³⁾Research Group of Bioproduction Engineering, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

(⁴⁾Laboratory of Applied Molecular Entomology, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060-8589 Japan)

(Received February 2, 1999)

Summary

In order to elucidate the molecular biological base of responsive organization to a microgravity in a higher plants, we developed the installation for instantaneously freezing plant materials in microgravity with use of the drop shaft at the Japan Microgravity Center and by the aid of the installation gene products were compared in juvenile plants of rice between microgravity treatment and control. We demonstrated that the gene products specific to microgravity could be detected by means of differential display.