

# 研究報告書

## 「植物の全身性クロストークを支える長距離・高速カルシウムシグナルの解明と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 豊田 正嗣

### 1. 研究のねらい

近年、地球温暖化や化石燃料の過剰消費の問題から、バイオマス(光合成産物)の利活用が重要視されている。しかし、世界の栽培面積の 90%が塩害・乾燥・病虫害などの劣悪な栽培環境条件であると言われており、バイオマスの増産には環境耐性強化植物体の創出が求められる。また、全世界で 1 年間に病虫害防除として数千億円以上の予算が投じられているにもかかわらず、穀物の 26-40%が病原菌、害虫、雑草、ウイルスなどにより失われている。これは甚大なバイオマスの損失を意味するだけでなく、有効な病虫害対策が無いことも意味する。これまで主に病虫害対策は化学合成農薬に依存してきたが、人畜毒性や薬剤耐性菌の出現などの様々な問題を抱えており、バイオマスを確保するためには環境低負荷型の新規病害制御剤の開発が必要である。

植物には、動物の神経細胞のような情報伝達に特化した細胞は無いが、器官・組織・細胞間といった様々なスケールで相互シグナル伝達(クロストーク)が行われている。例えば、局所的な CO<sub>2</sub> 濃度や光環境変化が遠く離れた葉の気孔を開閉させたり、光合成速度を変化させたりすることが知られている。しかし、これらのクロストークを担うシグナル分子は明らかになっておらず、CO<sub>2</sub> 資源化およびバイオマス生産能向上ためには、全身性の CO<sub>2</sub> 変化受容/クロストーク機構を理解することが重要である。

本研究では、低倍率(個体レベル)から高倍率(細胞レベル)イメージングを可能にする超高感度 Ca<sup>2+</sup> バイオセンサーおよび生物物理学的手法を駆使して、全身性の長距離・高速シグナル伝達機構の解明を目指す。この研究により、遠く離れた器官の局所的な情報を目的の器官へと伝える植物特有のシステムが明らかになるだけでなく、植物の耐病虫害応答としての全身獲得抵抗性のメカニズムが見えてくる。また、ここで得られた植物のクロストークに関する知見および最新のイメージング法を駆使して、光合成反応の初期受容過程である CO<sub>2</sub> 応答機構を個体(全身)レベルで研究する。更に、長距離・高速 Ca<sup>2+</sup> シグナルを指標にした高感度・リアルタイム・ハイスループット・ケミカルスクリーニング法を開発し、環境耐性強化植物体および新規病害制御剤の創出を目指す。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本プロジェクトは、(1)植物の耐病虫害応答の 1 つである全身獲得抵抗性および全身性クロストークを支える長距離・高速 Ca<sup>2+</sup> シグナルの研究からスタートした。この研究によって、「植物がどのように傷害を受けたことを感受し、その情報を全身に高速伝搬させるのか」が明らか

になった。これらの結果は、環境耐性植物体や新規病害制御剤の創出の足掛かりになるだけでなく、神経を持たない植物の新しい細胞・器官間コミュニケーションシステムの発見へと繋がった。また、ここで得られた基礎データを指標にして、(2)リアルタイム・ハイスループット・ケミカルスクリーニング法を開発し、全身性  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを制御する化合物のスクリーニングを行った。その結果、ウィスコンシン大学(マディソン校)が所有する大規模ケミカルライブラリー(約 51000 種類)の中から、いくつかの有力低分子化合物を単離した。そして、最終年度には「植物がどのようにして大気中の  $\text{CO}_2$  濃度変化を感受して、応答するのか」を明らかにするために(3)  $\text{CO}_2$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  応答機構の研究を行った。独自に開発したガス交換チャンバーを高視野蛍光顕微鏡に組み合わせることで、個体レベルでの  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの可視化に成功した。以上の研究により、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが全身性の傷害抵抗性反応や  $\text{CO}_2$  応答において重要な役割を果たすことが明らかになり、この全身性クロストーク機構を理解し、制御することで二酸化炭素資源化/バイオマスの確保につながると考えられる。

## (2) 詳細

### (1) 全身抵抗性

#### 目標

細胞や組織が傷つけられるという傷害は、植物にとって深刻なストレスであり、その傷害を修復したり抵抗性を上げたりする耐ストレス応答は、生命維持に必須であると共に、光合成産物(バイオマス)を収穫する上でも重要である。植物は昆虫や病原菌による傷害を受けた際、遠く離れた健康な器官でも抵抗性植物ホルモン(ジャスモン酸: JA)を合成させるなど、全身獲得抵抗性の防御機構を活性化させる。例えば、シロイヌナズナの葉に傷害を与えた時、90 秒程度で数 cm 離れた健康な葉で JA 合成が始まる。このような全身獲得抵抗性反応には、局所的なストレス情報を他の器官へと伝える長距離・全身性(システムック)・高速シグナルが関与しているはずだが、その分子実体は明らかになっていない。

本研究は、最近開発された顕微鏡法および超高感度  $\text{Ca}^{2+}$  バイオセンサーを用いて、プロジェクトの根幹を成す  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを介した植物特有の長距離・高速相互シグナル伝達(クロストーク)機構を明らかにする。具体的には、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが、傷害後の全身性 JA 合成をトリガーする分子実体、すなわち局所的な情報を全身へ伝える長距離・高速シグナル分子であるという仮説に立ち、植物の耐病虫害応答としての全身獲得抵抗性の全体像の解明を目指す。

#### 結果

高視野蛍光顕微鏡および高感度  $\text{Ca}^{2+}$  バイオセンサーを用いて、傷害応答性  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルのイメージングを試みたところ、傷害を受けた葉から傷害を受けていない葉に向かって  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが高速伝播することが分かった。この  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルは、維管束の連結パターンに従って特定の葉に伝播し、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが伝播した葉では、JA 合成や抵抗性遺伝子が発現していることが分かった。維管束師部特異的プロモーターを用いた師管内の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行ったところ、この  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルは師管を伝播していることがわかった。さらに、プラズモデスマータに異常がある変異体の  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを解析したところ、伝播速度が遅くなることから、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルはプラズモデスマータを介して細胞—細胞間を伝播することが示唆された。次に、植物がどのように自分が傷つけられたことを感受するのかを調べた。グルタミン酸受容体を欠

損じた変異体では、傷害応答性・長距離・高速  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが起こらないことがわかった。さらに、野生型の葉に、細胞外からグルタミン酸を投与すると長距離・高速  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを引きこせることから、シロイヌナズナにおいて、グルタミン酸が葉の傷害シグナルであり、グルタミン酸受容体が傷害ストレスを  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルに変換する分子実態、すなわち傷害センサーであることが示唆された。

## (2)ケミカルスクリーニング

### 目標

抵抗性誘導剤とは、植物に備わっている防御応答機構を活性化させることで抵抗性を上げる薬剤であり、病害虫に作用しない。そのため耐性菌などを生じるリスクは殆ど無く、環境への負荷が少ない。しかし、従来のスクリーニング法では効果試験に数ヶ月要するなど、日本では数種類しか認可されていない。

これまでの研究結果から、 $\text{Ca}^{2+}$ が全身獲得抵抗性に重要であることが明らかになっている。つまり、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを指標にしたケミカルスクリーニング法を開発できれば、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを制御する化合物、すなわち新しい抵抗性誘導剤が単離できる可能性がある。本研究では、高感度  $\text{Ca}^{2+}$ バイオセンサーおよびマイクロプレートリーダーを用いたリアルタイム・ハイスループット・ケミカルスクリーニング法を構築し、新規抵抗性誘導剤の開発に挑む。

### 結果

高感度  $\text{Ca}^{2+}$ バイオセンサーおよび全自動蛍光マイクロプレートリーダーを用いてリアルタイム・ハイスループット・ケミカルスクリーニング法を開発した。96穴プレート内に  $\text{Ca}^{2+}$ バイオセンサーを発現させたシロイヌナズナを栽培し、自動ピペットシステムで化合物を投与しながら、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを同時測定する。1時間に96種類の化合物をスクリーニングできることから、従来の表現型を観察するスクリーニング法に比べて、飛躍的に高速化できたとと言える。

ウィスコンシン大学(マディソン校)が所有している低分子化合物ライブラリー(約51000化合物)を用いて大規模スクリーニングを行ったところ、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを制御する数十種類の化合物が単離された。その内、数種類はイオンチャネルやトランスポーターに作用する薬剤に類似したものが含まれていることから、細胞膜のイオン性シグナルに関与する因子を標的としたスクリーニングが成功していると言える。最終的なヒット率は0.1%以下であったことから、良好なスクリーニング法が確立できたと考えている。

(1)の研究結果から、細胞外から投与したグルタミン酸が全身性の長距離・高速  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを引き起こし、その後、葉の抵抗性を上昇させることが明らかになっている。しかし、グルタミン酸は葉の表面からの透過率が低いため、そのままの形では投与しづらい。そこで、ケミカルスクリーニングと平行してグルタミン酸を鑄型にしたスクリーニングも行っている。メチル基やベンジル基などを付加したグルタミン酸の生理活性を調べたところ、残念ながら現段階でグルタミン酸よりも活性が高い化合物は見つかっていない。アミノ酸型の抵抗性誘導剤の開発には受容体との結合力と透過性のバランスを考慮する必要がある。

## (3)CO<sub>2</sub>応答

### 目標

植物は大気中の CO<sub>2</sub> 濃度変化を感受し、気孔を開閉させるなどの様々な生理学的反応を示す。しかし、どの組織や細胞が CO<sub>2</sub> 濃度を感受し、どのようなシグナルに変換するのか明らかになっていない。本研究は、Ca<sup>2+</sup>が CO<sub>2</sub> 応答の主要シグナル分子であるという仮説に立ち、CO<sub>2</sub> 応答性 Ca<sup>2+</sup>シグナルを個体(全身)レベルで研究する。

#### 結果

顕微鏡対物レンズ下でガス交換ができる特殊なチャンバーを、3D プリンターおよびガスを透過しない樹脂を用いて作製した。この特殊チャンバーと高視野蛍光顕微鏡を用いて CO<sub>2</sub> 応答性 Ca<sup>2+</sup>シグナルを可視化したところ、CO<sub>2</sub> 濃度が上昇していくと共に葉(主に孔辺細胞)の Ca<sup>2+</sup> 上昇が起こることがわかった。これまでに、孔辺細胞内の Ca<sup>2+</sup> 上昇が気孔の閉合運動に関与することが示唆されていることから、CO<sub>2</sub> の初期応答を観察している可能性が高い。CO<sub>2</sub> 濃度が上昇した時に、孔辺細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度が上昇することで気孔を閉じ、過剰な取り込みを防いでいるのかもしれない。

### 3. 今後の展開

#### (1)全身抵抗性

長距離・高速 Ca<sup>2+</sup>シグナルの発生・伝播メカニズムは明らかになりつつあるが、この Ca<sup>2+</sup>シグナルがどのように抵抗性を上げるのかは明らかになっていない。Ca<sup>2+</sup>シグナルのターゲット因子として Ca<sup>2+</sup>依存性酵素や転写因子を探索し、全身獲得抵抗性の全体像を解明する。

#### (2)ケミカルスクリーニング

リアルタイム・ハイスループット・ケミカルスクリーニング法で単離された候補化合物が、生理学的にどのような役割を持つのかを、マーカー遺伝子の発現やホルモンの合成量を調べることで明らかにしたい。これらの結果に基づき、さらに候補を絞り込み、それをリード化合物として活性を上げるような化合物を合成したいと考えている。

#### (3)CO<sub>2</sub> 応答

局所的な CO<sub>2</sub> 濃度変化が、遠く離れた器官の生理学的反応(気孔の開閉や気孔の密度)を変化させることが知られている。現在、個体レベルでの CO<sub>2</sub> 応答を観察しているが、局所的な CO<sub>2</sub> 濃度変化に対してどのような全身性 Ca<sup>2+</sup> 応答を見せるのか明らかにしたい。

### 4. 評価

#### (1)自己評価

(研究者)

本プロジェクトは 3 つの大きな研究テーマによって構成されている。以下、それぞれの項目に対して自己評価を記載する。

#### (1)全身抵抗性

研究としては予想以上に進展したと考えている。特に、全身獲得抵抗性の初期応答である傷害感受機構に関しては、植物の傷害シグナルおよび傷害センサーの同定できたことから、最も主要な部分は解明できたと思われる。今後は、Ca<sup>2+</sup>シグナルがどのように遠方の器官で抵抗性を上げるのか、そのターゲット因子を確定させていきたいと考えている。研究費の執行に関しても、本研究に必要不可欠であった高視野蛍光顕微鏡を 1~2 年目に導入し、この装置を用いてほぼすべてのデータを取得したことから、適切であったと言える。また、塩ストレス応

答ではあるが、長距離  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルに関して PNAS に発表できたことは評価できると思う。しかし、本プロジェクトの本体である傷害応答性・長距離・高速  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの論文が、未だに受理されていないので、一刻も早く論文として形にしなくてはならないと考えている。

### (2)ケミカルスクリーニング

このケミカルスクリーニング法は、大量の化合物をリアルタイムかつ高速に単離できるシステムとして、本プロジェクト期間内に開発されたものである。 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを指標にすることで、従来の表現型を観察するスクリーニング法に比べて、格段に短時間で化合物をスクリーニングできるようになった。このような新しいスクリーニング法が確立できたことは評価に値する。また、ウィスコンシン大学のケミカルライブラリーから数十種類の候補化合物を単離できたことも重要な結果である。これらの候補化合物の中には、構造がイオンチャンネルに作用するような薬剤に類似しているものを含まれることから、研究としては期待通りの方向へと向かっていると考えられる。しかし、当初の目的であった植物本来の抵抗性を上昇させる環境低負荷型・新規制御剤の開発には至っておらず、今後の更なる研究が必要である。

### (3)CO<sub>2</sub> 応答

二酸化炭素資源化を目指す上で、植物がどのように  $\text{CO}_2$  の濃度変化に応答するのかを明らかにする必要があると考え、3 年目から本研究をスタートさせた。本研究の難所は、顕微鏡下でいかに正確に気体濃度を制御するのか、ということであり、チャンバー作りに時間が割かれた。最終的には 3D プリンターや特殊な樹脂を使うことで、チャンバーを完成させ、 $\text{CO}_2$  濃度依存的な  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの可視化に成功した。全身性の  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを捉えたことは評価に値するが、サイエンティフィックにはデータが未熟であり、今後は二酸化炭素を取り込む孔辺細胞でのイメージングや、変異体の解析などが必要である。

### 総評

全体としては概ね順調に研究は進んだと思われる。しかし、最終年度は 2 回の人事異動があり、アメリカからの機器の移動や新しい研究室の立ち上げなどで、研究に使える時間が殆ど確保できなかった。そのため、追いつけの大切な時期に研究を加速できなかったことが、上記の課題が残った原因の 1 つだと考えている。3 月末までの期間を有効に使い、少しでも目標達成に近づけるように努力したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年 2 回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

#### (研究総括)

豊田氏は、本研究において、全身性長距離・高速カルシウムシグナルの伝達機構及び全身獲得抵抗性を解明し、ケミカルスクリーニング法の開発を目的とした。研究の過程で、豊田氏はカルシウムシグナルの長距離伝播を可視化する技術を開発し、またケミカルスクリーニングシステムも開発した。更に、これらを利用して、グルタミン酸受容体が関与する膜電位反応がカルシウムシグナリングの初発となることを発見し、そのシグナルが篩部を通じて伝播することを明らかにした。この成果は植物における長距離情報シグナル伝達研究に大きなインパクトをもたらすと評価される。一方、そのメカニズムの詳細な解明は今後に残されており、病害虫による被害の解決につながる大きな成果に発展することを期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

#### 論文

1. Nakamura M, Toyota M, Tasaka M, Morita MT (2015) Live cell imaging of cytoskeletal and organelle dynamics in gravity-sensing cells in plant gravitropism. *Methods in Molecular Biology* 1309:57-69.
2. Toyota M, Ikeda N, Tasaka M, Morita MT (2014) Centrifuge microscopy to analyze the sedimentary movements of amyloplasts. *Bio-protocol* 4:e1229.
3. Tatsumi H, Toyota M, Furuichi T, Sokabe M (2014) Calcium mobilizations in response to changes in the gravity vector in Arabidopsis seedlings: Possible cellular mechanisms. *Plant Signaling & Behavior* 9:e29099.
4. Gilroy S, Suzuki N, Miller G, Choi WG, Toyota M, Devireddy AR, Mittler R (2014) A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science* 19:623-630.
5. Choi WG, Toyota M, Kim SH, Hilleary R, Gilroy S (2014) Salt stress-induced Ca<sup>2+</sup> waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:6497-6502.

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主要な学会発表(シンポジウム、招待講演のみ)

1. Toyota M, Gilroy S (2016) Molecular mechanisms underlying wound-induced rapid systemic calcium signaling. *Plant Biology 2016 (American Society of Plant Biologist)*:July 12, Austin, TX, USA.
2. Toyota M, Gilroy S (2015) Mechanical wounding/insect attack-induced, long-distance, rapid calcium signal transduction in plants. *The 53rd Biophysical Society of Japan Annual Meeting*:Sep 13, Kanazawa, Japan.
3. Toyota M, Gilroy S (2015) Visualization of plant-wide rapid calcium signals underlying systemic resistance responses *The 56th Japanese Society of Plant Physiologists Annual Meeting* March 16-18, Tokyo, Japan.
4. Toyota M, Gilroy S (2014) Mechanical wounding/herbivore attack-induced, long-distance, rapid Ca<sup>2+</sup> signal transduction via the phloem. *The 38th Naito Conference "Molecule-based biological systems"*:Oct 7-10, Sapporo, Japan.
5. Toyota M, Gilroy S (2014) Wound-induced rapid systemic Ca<sup>2+</sup> transmission through the phloem. *Keystone Symposia "Plant Signaling: Dynamic Properties"*:Feb 6, Breckenridge, CO, USA.

## 受賞

1. 2014年2月 Keystone Symposia Future of Science Fund Scholarship (USA)
2. 2014年10月 第38回内藤コンファレンス・ベストポスター賞 (Japan)
3. 2015年9月 日本生物物理学会若手奨励賞 (Japan)

## 著書

1. **豊田正嗣 (2015)** 第10章「重力感知のメカノバイオロジーⅢ:植物細胞」. メカノバイオロジー: 細胞が力を感じ応答する仕組み (DOJIN BIOSCIENCE SERIES) (曾我部正博編) 化学同人:pp. 125-139.
2. Kato T, **Toyota M**, Tasaka M, Morita MT (2014) Chapter 1: Mini-History of Map-Based Cloning in Arabidopsis. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology, ed Shavrukov Y (*Nova Science Publishers, Inc., New York, USA*), pp 1-20.

## 採用

1. 2016年6月 名古屋大学高等研究院 S-YLC 特任助教
2. 2016年10月 埼玉大学理工学研究科テニュアトラック准教授