

## 「オジギソウの運動を支える植物独自の細胞間情報伝達」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：真野 弘明

## 1. 研究のねらい

オジギソウのおじぎ運動は、植物においては例外的な速さを示すユニークな形質である。おじぎ運動は、葉枕(ようちん)と呼ばれる、葉の基部に存在する運動器官によって担われる。刺激を与えたオジギソウでは、葉枕の片側(収縮側)の細胞(運動細胞)において $K^+$ イオンと $Cl^-$ イオンの放出が起こり、内外の浸透圧差により高く維持されていた細胞の圧力(膨圧)が急速に低下する。その結果、水が押し出されて細胞が収縮し、葉枕が一方向へと屈曲して葉が動く。これらのプロセス全体を1秒程度の時間スケールで完了するためには、個々の運動細胞が素早く収縮することに加え、多数の細胞がなんらかのメカニズムを介して素早く同調する必要がある。しかし、非モデル植物であるオジギソウでは技術的困難により遺伝子レベルの機能解析がいつまで行われておらず、おじぎ運動の分子メカニズムは謎に包まれていた。

これまでに我々は、オジギソウのトランスジェニック技術を確立し、CRISPR/Cas9による遺伝子破壊や $Ca^{2+}$ 動態のライブイメージングを可能にした。葉枕の収縮側に高発現する遺伝子として機械刺激受容型アニオンチャンネル *MSL10* とグルタミン酸受容体様チャンネル *GLR3* を同定し、これらの変異体がおじぎ運動の速度と可動範囲に異常を示すことを突き止めた。さらに、*glr3* 変異体では運動細胞間的高速同調が損なわれること、また *glr3* の過剰発現体では本来ならば葉枕の部位で止まる接触シグナルの情報伝達が植物全体に広がることを見出した。これらの結果から、*GLR3* チャンネルを介した細胞間相互作用が高速同調メカニズムの一部を担うと推測された。従来、植物細胞における高速情報伝達は動物神経のものと類似した活動電位、すなわち「電気シグナル」であると考えられていたが、*GLR3* はアミノ酸を受容して活性化されるリガンド依存性チャンネルの一種であり、分子の相同性からは高速シグナルの実体が「拡散性の分子シグナル」である可能性が強く示唆された。

本研究計画ではこの謎を解明することを目的とし、同定したチャンネルの電気生理学的解析を行ってその活性化のメカニズムを明らかにするとともに、各種生体分子のライブイメージングによる解析や新たな運動関連変異体の作出等を行い、オジギソウの高速運動と高速情報伝達に関わる新しい発見へとつなげることを目指す。

## 2. 研究成果

## (1) 概要

A) 各種生体分子のライブイメージングを行うため、 $Ca^{2+}$ センサー以外の様々な蛍光センサータンパク質を導入したオジギソウを作出した。しかし、オジギソウの運動細胞では刺激直後に急速な pH 低下が起こるらしく、pH センサー以外の様々な蛍光タンパク質で非特異的な蛍光の減弱が認められた。pH 低下に先んじて起こる  $Ca^{2+}$ シグナルの立ちあがりの解析は可能であるが、それ以降のイベントに関してはライブイメージングを行うことは困難と判明した。

B)  $Ca^{2+}$ ライブイメージング動画を直観的に分かりやすく要約するための2次元プロット方法を考案した。さらに、シグナルの伝播速度を主観的な ROI(region of interest)を用いず、ピクセ

ルごとに自動算出する方法を考案した。

C) ツメガエル卵母細胞を用い、二電極法による GLR3 チャネル活性の電気生理学的解析を試みた。様々な条件検討を加えたが、残念ながらオジギソウ GLR3 チャネルからは活性が得られなかった。実験系としてツメガエル卵母細胞の系が当該チャネルの活性検出に向いていないと結論付けた。

D) MSL10 および GLR3 に関する様々な逆遺伝学および分子生物学的な解析を行った。プロモーター解析の結果および In situ hybridization により、これらの遺伝子が葉枕の収縮側の表皮細胞と柔細胞に発現していることを確認した。蛍光タンパク質との融合タンパク質の発現により、これらのタンパク質が形質膜に存在することが示唆された。変異体のレスキュー実験では、*msl10* 変異体では cDNA 発現による表現型の回復に成功した。一方、*glr3* 変異体では期待された表現型の回復が起こらず、ドミナントネガティブ作用等の影響が考えられた。また、シロイヌナズナ *AtGLR3.4* 遺伝子を野生型オジギソウで過剰発現させたところ、オジギソウ遺伝子で見られたようなシグナル亢進の表現型は得られず、これらの相同遺伝子間では種特異的な分子進化等により遺伝子機能に差が生じている可能性が示唆された。

E) 葉枕の収縮側に高発現する機能未知遺伝子 *ITI* を CRISPR/Cas9 で破壊した結果、接触刺激に対する感度が低下するという表現型が得られた。

## (2) 詳細

研究テーマ A 「遺伝子組換えオジギソウを用いた各種生体分子ライブイメージングの試み」運動時の細胞集団の動態解析にはライブイメージングが強力な手段となる。これまでに  $\text{Ca}^{2+}$  センサーを導入したトランスジェニック個体の作出により  $\text{Ca}^{2+}$  動態のイメージングに成功しており、当該手法は本研究計画における中心的な解析手段となっている。同様のイメージングを他の分子に関しても行うことができれば、新しい発見へとつながることが期待される。この目的を達成するために、膜電位、 $\text{K}^+$  イオン、 $\text{Cl}^-$  イオン、活性酸素 (ROS)、pH、ATP、グルタミン酸に対するセンサー蛍光タンパク質を細胞内あるいは細胞外に発現する個体を作成した。並行して、一秒程度の時間スケールで完了するおじぎ運動の蛍光イメージングを行うために、高感度高速度カメラ ORCA-Fusion BT とイメージスプリッティング光学系 W-VIEW Gemini をマクロズーム顕微鏡 MVX10 に組み込み、秒間 100 フレームで二色同時に蛍光を取得できるシステムを構築した。これを用いて作成したトランスジェニック個体の観察を行った結果、この実験系には予想外の困難が存在することが判明した。多くのセンサーにおいて期待される

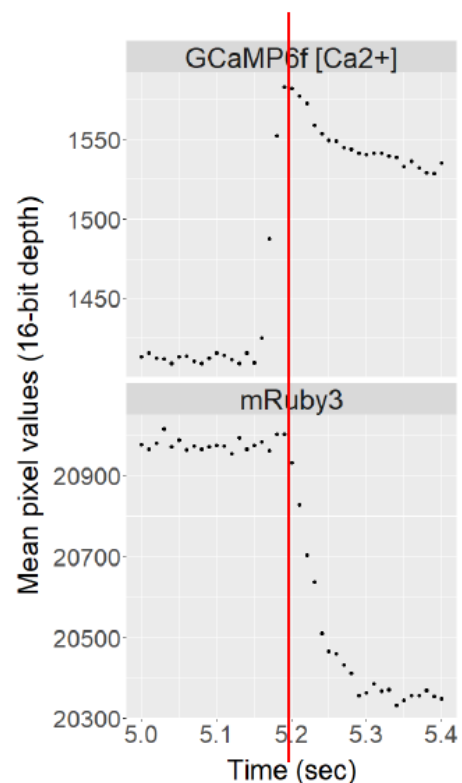


図 1  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇とその後に起こる pH 低下由来の蛍光減弱

挙動とは無関係な蛍光の減弱が認められ、同様の現象は陰性コントロールとして用いた非センサー蛍光タンパク質 (mClover3 および mRuby3) でも確認された (図 1)。一方、pH センサーである pHRed では緑色励起蛍光の上昇が確認されたことから、この現象は「運動に伴い、運動細胞の細胞質 pH が急速に低下する」ことに起因すると推測された。この pH 低下は刺激により  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内流入が起こってから数十ミリ秒後に開始されるものであったため、「 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの立ちあがりの解析に関しては問題なく行える」ものの、それ以降のイベントに関する蛍光イメージングは pH 低下の影響をなんらかの形で排除あるいは補正することが必須であると判明した。この pH 低下の生理的な意味は不明であるが、高速運動に関して何らかの役割を果たしている可能性もあり、今後の解析が必要な課題といえる。

#### 研究テーマ B 「 $\text{Ca}^{2+}$ イメージング動画を要約するプロットとシグナル伝播速度の解析方法」

本研究のライブイメージングでは空間を伝播する蛍光シグナルの 2 次元画像×時間の 3 次元データが得られる。本研究では、その伝播の様子を分かりやすく要約するプロット手法を検討した。前節で述べたように、オジギソウの  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルは立ちあがり部分のみが信頼性のあるデータとなるため、動画の個々のピクセルごとにシグナルの立ちあがり時間を検出し、それを 4 色に色分けしてプロットすることを考案した。さらに、これらの立ちあがり時間 (離散値、ノイズ含み) から伝播速度を自動抽出するために、中心点から一定範囲内にある点群の立ちあがり時間に対する平面フィッティングを行い、その傾きから各ピクセルでの速度を算出できるようにした。これらの方法を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  ライブイメージング動画を解析することにより、研究者個人の主観を排した、より客観的なデータ提示と解析が可能になった。

#### 研究テーマ C 「ツメガエル卵母細胞を用いた GLR3 チャネル活性の電気生理学的解析」

細胞間情報伝達に関わるオジギソウ GLR3 はチャネルタンパク質をコードする。ファミリータンパク質との配列相同性から GLR3 もなんらかの amino 酸を受容して開きリガンド依存性チャネルであると予想されるが、一方で電位依存的に活性化するように分子進化している可能性も否定できず、GLR3 がリガンド依存性であるか電位依存性であるかの解明は「高速シグナルの実体は分子か電気か?」という問題の答えに直結している。この問題に迫るために、ゼノパスの卵母細胞にこれらのチャネルを発現させ、電極を刺して電気生理学的活性を測る二電極法を用いた測定を行った。しかし、オジギソウ GLR3 を発現させた卵母細胞からは amino 酸投与あるいは電圧の変化のどちらに対しても応答が全く得られなかった (図 2)。ポジティブコントロールとして用いたシロイヌナズナ AtGLR1.4 では amino 酸に対して明確な反応が出ており、実験系としては問題なく機能している。しかし、投与する amino 酸の種類、測定時のバス液のイオン組成や pH、GFP 融合の有無、ヘテロ複合体を形成しうるオジギソウの他の GLR チャネルとの共発現やコファクターとして機能しうる CNIH 遺伝子群 (オジギソウ、シロイヌナズナ) との共発現等々、考え得る限りの手を尽くしてみたが目的のチャネルからは反応が検出できなかった。チャネルに融合した GFP の蛍光からはポジコンと遜色ないレベルの発現量が示唆されており、細胞外に FLAG タグをつけたチャネルの蛍光免疫染色の結果ではチャネルは卵母細胞の表面に正しいトポロジーで挿入もされているようであった。活性が出ない原因は不明であるが、「必要であるが未同定のコファクターの欠如」あるいは「カエルの卵母

細胞との相性の問題(フォールディングや翻訳後修飾等のなんらかの影響で活性が出ない)等の可能性が考えられた。

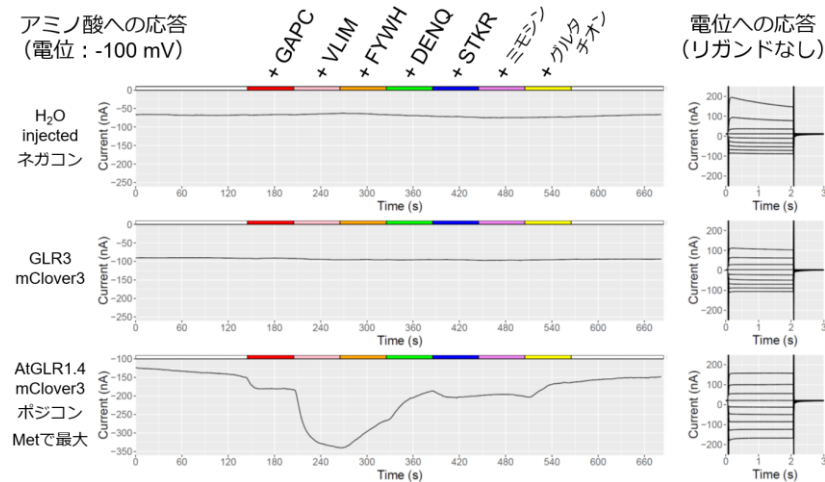


図2  
オジギソウ GLR3 の  
電気生理学的解析。

#### 研究テーマ D 「MSL10 および GLR3 の解析とオジギソウにおける解析技術基盤の整備」

非モデル植物であるオジギソウでは、これまで遺伝子レベルでの研究がほとんど行われておらず、分子生物学的な実験手法の最適化や発生工学的ツールの拡充等の基盤整備が研究進展のためには不可避である。本研究では、*MSL10* および *GLR3* 遺伝子の解析をモデルケースとし、各種既存技術のオジギソウへの適用を行うこととした。(1) *MSL10* および *GLR3* 遺伝子のプロモーターを単離し、プロモーター-レポーター系統の作出を行った結果、両プロモーターの活性は葉枕収縮側の表皮細胞および柔細胞において強く検出された。(2) *In situ hybridization* による mRNA 発現の検出は、液胞が発達した成熟植物細胞においては困難であると一般的に考えられているが、条件検討の結果 *MSL10*、*GLR3* ともに葉枕収縮側の細胞に発現を検出できた。*MSL10* の発現に関しては、昼高く夜低い日内変動を示すことも判明した。(3) タンパク質の局在に関しては、蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現する系統を作出して解析した結果、ともに形質膜に局在することが判明した。*GLR3* 融合タンパク質に関しては、 $Ca^{2+}$ チャンネルブロッカーである  $La^{3+}$ 処理をした葉枕サンプルでのみ蛍光が検出されたことから、(顕微鏡観察時に必要となる)切開等の障害ストレスにより当該タンパク質が急速に分解されることが示唆された。(4) *MSL10*、*GLR3* タンパク質に対するペプチド抗体を作製し使用した結果、発現量の多く安定な *MSL10* に関してはウェスタンブロット、免疫組織染色の双方でシグナルを検出することができた。一方、*GLR3* に関しては計 3 種の抗体を試してみたが今のところポジティブなシグナルは得られていない。(5) CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊系統のレスキュー実験を行った結果、*mssl10* 変異体に関しては内在性プロモーターによる cDNA 発現により運動速度の回復が見られ、当該の遺伝子変異の表現型の主因であることが確認できた。一方、*glr3* 変異体に関しては内在性プロモーターによる cDNA 発現、プロモーターを全エクソン-イントロンを含むゲノム断片の挿入、および過剰発現用のコンストラクトによる全細胞への cDNA 発現の 3 つを試みたが、どれも表現型をレスキューしなかった。これらの結果は、現有の *glr3* 変異遺伝子が何かしらのドミナントネガティブ作用を持っている、あるいは得られている表現型がオフターゲット由来である可能性を示唆している。この問題に関し

ては引き続き解析が必要である。(6) オジギソウ *GLR3* の相同遺伝子の 1 つであるシロイヌナズナ *AtGLR3.4* をオジギソウ野生型において過剰発現させる実験を行ったが、オジギソウ遺伝子を過剰発現させた時に得られたようなシグナル伝達の亢進は認められなかった。これらの結果から、両者の分子機能には何らかの差異があるものと考えられた。

研究テーマ E 「機能未知遺伝子 *ITI* の変異体作出と表現型」

*ITI* (*Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain-related*) は、葉枕の収縮側に高発現している遺伝子として *MSL10*、*GLR3* の次に検出された候補遺伝子である。動物の *Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain* (*ITIH*) タンパク質は血漿中に存在する分泌性の糖タンパク質で、様々なタンパク質との相互作用を介して機能する。一方、植物ではその生理機能はこれまで全く明らかになっておらず、プロテオーム解析により膜タンパク質として存在する可能性が示唆されているのみである。本研究では、この遺伝子の *CRISPR/Cas9* による変異体作出を行った。原因は不明であるが非常に変異が入りにくく、計 6 回の *guide RNA* 設計の末にようやく遺伝子の変異体を得ることができた。表現型を確認した結果、*iti* 変異体では接触刺激に対する感度が低下しているようであった。*ITI* 過剰発現個体も作出したが、こちらは明確な表現型が得られなかった。*ITI* 産物の分子機能については今後、相互作用するパートナータンパク質の同定等により追求していきたい。

### 3. 今後の展開

本研究により得られた成果として、まず非モデル植物であるオジギソウにおいて昨今モデル生物で行われている主要な逆遺伝学および分子生物学的な実験の多くが可能になった点が挙げられる。これらの基盤技術を用い、今後もオジギソウの遺伝子機能に関して研究を続けることにより、速い植物運動や情報伝達のメカニズムに迫れると期待される。

研究テーマ A 「各種生体分子ライブイメージングの試み」に関しては、細胞内 pH の劇的な変化という予想外の困難があることが判明した。pH を並行してイメージングしつつ補正を加える、あるいは pH 変化に頑健なセンサーを選定(あるいは開発)して使用することにより原理的には打開可能であるが、高いフレームレートを要求されるオジギソウの高速運動のイメージングはそもそも技術的に困難な面が大きく、新しい実験系の開発母体としてこの系を用いるのは正直しんどいものがある。他力本願ではあるが、より一般的なモデル植物、モデル生物での技術進展を期待したい。

*GLR3* チャネルの電気生理学実験に関しては、植物でも非常に機能解析が困難なチャネルファミリーとして知られており、本研究でもかなり集中的に労力を投入したが期待した成果は得られなかった。近年、動物の培養細胞を用いたパッチクランプ測定系で植物 *GLR3* ファミリーの解析成功例が報告されてきており、今後は実験系をこれらに移行して解析を進めることで、「植物の高速シグナルは電気か分子か？」の謎に迫れると考えている。

本研究の将来的な方向性として、「オジギソウの運動の知見を活かし、植物を自由自在に動かせるようにする」というものがある。いくつかの運動関連遺伝子を同定し、その解析を行ってきた印象としては、オジギソウの運動はやはり複雑な高次現象であり、関連する因子も非常に多数存在するように見受けられる。今後も解析を続けることで運動のメカニズムは徐々に明らかになっていくと考えられるが、それを利用してフルスクラッチで運動システムを組み上げることは遠い未来のことに

なるだろう。代替のアプローチとして、オジギソウの運動器官の発生メカニズムを解明し、これを異所誘導することで「オジギソウの運動部位を増やし、運動方向を制御する」という計画を現在考案しており、こちらは上手く進めば5-10年程度のタイムスパンで実現する可能性がある。

#### 4. 自己評価

研究目的の達成状況としては、本研究で新しくチャレンジした研究テーマ A「各種生体分子ライブイメージング」および研究テーマ C「GLR3 チャンネルの電気生理学的解析」のどちらも克服の難しい困難に直面し、残念ながら研究期間中での大きな進展にはつながらなかった。しかし、前者に関しては事前予測がそもそも困難であり、後者についても研究開始時点ではモデル植物でも成功事例が数例に限られていた課題であったため、研究計画そのものはおおよそ妥当なものであったと考えている。オジギソウではトランスジェニック個体の作出には時間と労力がかかり、また占有スペースの比較的大きい植物であるため維持にも一定の限界があることを踏まえると、ヘテロ発現系での電気生理実験のような「植物個体を使わない」実験の活用はモデル植物研究にスピード勝負で負けないための数少ない対抗手段であるのは間違いない。他の研究テーマに関しては、地味ではあるが着実に進展はしており、非モデル植物オジギソウでモデル植物と遜色のない実験基盤が整ってきたことは今後のさらなる進展へ向けて重要な成果であると考えている。オジギソウの運動器官は「非常に敏感で」「速く動き」「速くシグナルを伝達する」ことができる非常に特殊な器官であり、その特殊さゆえに通常の実験においてさえ予想外の結果や困難が生じるケースが多々ある。オジギソウでの研究は現時点ではそういった地雷を踏みながら1つ1つ除去していく作業であると言え、実験上のアーティファクトと科学的な真実を区別するためには慎重に実験を繰り返す必要がある。この点において、本人評価としては研究に必要な手順を踏んだ結果と捉えているが、研究の進展が華々しいものでなかったことも事実である。研究をより加速するために共同研究等をもっと有効に活用すべきであったと反省しているが、これに関してはオジギソウの特殊性、特に観察の困難さ等の問題もあり、状況打開のための即効性のあるプランを思いつけなかったことも大きい。

研究成果の波及効果に関しては、まだ多くのデータが未出版であるため研究期間中には大きな波及効果をもたらしていない。今後も継続して研究を進展させ、オジギソウの高速運動と高速シグナル伝達の謎を解明することにより、植物の運動を制御して利用するような産業応用へ道が拓けると期待している。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:3件

1. Hiraku Suda, Hiroaki Mano, Masatsugu Toyota, Kenji Fukushima, Tetsuro Mimura, Izuo Tsutsui, Rainer Hedrich, Yosuke Tamada, Mitsuyasu Hasebe  
Calcium dynamics during trap closure visualized in transgenic Venus flytrap  
Nature Plants (2020) *Nature Plants* 6, 1219–1224

食虫植物ハエトリソウは、捕虫葉にある感覚毛に2度の連続した刺激が加わることで葉が閉

じる。我々は、Ca<sup>2+</sup>センサー蛍光タンパク質を導入したトランスジェニックハエトリソウを作出し、この記憶と情報伝達のメカニズムにおける Ca<sup>2+</sup>動態を解析した。その結果、感覚毛への刺激により葉身で Ca<sup>2+</sup>上昇の伝播が起こり、また 2 度の刺激によって細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が加算的に上昇することが明らかになった。

2. Hiroaki Mano, Mitsuyasu Hasebe

Rapid movements in plants

*Journal of Plant Research* (2021) 134, 3–17

動物の運動は筋肉による「引く」力により引き起こされるが、植物の運動は膨圧による「押す」力とそこから二次的に生み出される組織の弾性力によって駆動される。気孔の開閉や就眠運動などの遅い植物運動では膨圧変化による運動メカニズムが良く研究されているが、より速い一部の植物運動はこれらの単純な延長としては説明できない。運動の加速のための 3 次元構造の利用や多細胞間の素早い情報伝達等の存在が必要になってくる。

3. Takuma Hagihara†, Hiroaki Mano†, Tomohiro Miura, Mitsuyasu Hasebe, Masatsugu Toyota

Calcium-mediated rapid movements defend against herbivorous insects in *Mimosa pudica*

*Nature Communications* (2022) 13, 6412

†両著者はこの論文に同等に寄与した

オジギソウは接触等の刺激で素早く葉を閉じるが、その情報伝達の仕組みおよび運動の適応的意義については分かっていない。我々は、Ca<sup>2+</sup>センサーを導入したトランスジェニックオジギソウを作出し、Ca<sup>2+</sup>上昇の波と表面電位変化が植物内をすばやく伝わることで運動を引き起こすことを見出した。また遺伝子破壊および薬剤処理によって作出した動かないオジギソウは昆虫の食害をより受けやすく、速い運動が食害忌避に効果があることが明らかになった。

## (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のもも含む)

## (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)

真野 弘明・Chao-Li Huang・西山 智明・重信 秀治・豊田 正嗣・長谷部 光泰

オジギソウの運動に関わるチャンネル遺伝子群の機能解析

日本植物学会 第 84 回大会 (2020/9/19)