

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14555

研究課題名(和文) オジギソウの運動機構に関する新仮説の検証

研究課題名(英文) Mechanisms of seismonastic movement in the sensitive plant

研究代表者

長谷部 光泰 (HASEBE, Mitsuyasu)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授

研究者番号：40237996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オジギソウは接触等の刺激に反応して素早く葉を折りたたむ「おじぎ運動」を行う。おじぎ運動と他のより遅い植物運動との差がどのように生じるのかは未だに不明である。これを明らかにするために、我々はオジギソウの運動器官である葉枕について、そのすべての細胞が運動中にどのように変化するのかを明らかにしようと考えた。この目的を達成するために、運動前後の葉枕を素早く凍結して固定し、それを透明化して内部を観察する方法を開発した。また、コンピューターを用いて細胞の形態を自動的に解析する方法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：The sensitive plant *Mimosa pudica* folds its leaves within seconds in response to touch. Despite many efforts to investigate this movement, it still remains unclear what kind of mechanisms allow the plant to move so dynamically unlike many of the other “less motile” plants. We hypothesize that, in addition to the osmotic water redistribution driven by ion efflux, certain elastic forces stored at the organ and/or tissue level accelerate the movement. To test the hypothesis, we plan to deduce mechanical forces present in a tertiary pulvinus by comprehensively analyzing the volume and shape of individual cells and their changes during the movement. To this end, we extensively optimized fixation, staining and tissue clearing methods and succeeded to obtain images that covered the entire region of a tertiary pulvinus with sufficient resolution. We have also been developing computational methods to automatically extract and analyze the volume and shape of thousands of cells in the pulvinus.

研究分野：進化学

キーワード：おじぎ運動 オジギソウ

## 1. 研究開始当初の背景

オジギソウ (*Mimosa pudica*) は、接触および他のさまざまな刺激 (熱・冷却・傷害・電気など) に応答して葉を折りたたむ「おじぎ運動」を行う。おじぎ運動は刺激から1秒程度の時間スケールで起こる、植物においては例外的に速い運動であり、葉の付け根にある運動器官 (葉枕) が一方向に屈曲することによって生じる。この葉枕の屈曲時に、葉枕の片側にある運動細胞の収縮が起こることが知られており、運動細胞からの  $K^+$  および  $Cl^-$  イオンの放出も観察されている。これらの観察結果および他の植物の膨圧運動のメカニズムからの類推により、おじぎ運動はまず 1) 刺激により葉枕片側の運動細胞からイオンの放出が起こり、2) その結果生じた浸透圧変化により水が流出して細胞が収縮し、3) これが器官の屈曲を引き起こす、という仮説が現在の主流となっている。しかし、おじぎ運動に伴う運動細胞の収縮スピードは非常に早く、イオンの流出と浸透圧による水の移動のみによりこれを説明するモデルには疑問が呈されている。こうした問題点に対しては、アクトミオシンのような収縮タンパク質等の関与の可能性が提唱されているが、実験レベルでの裏付けは現在のところ得られていない。これに関して我々は、オジギソウの素早い運動には浸透圧変化による水の移動だけでなく、あらかじめ蓄積された組織レベルでの弾性力が大きく寄与しており、これが運動細胞からの高速な水の流出を引き起こすという仮説を考えた。

## 2. 研究の目的

本研究計画は、上記の仮説の妥当性を検証することを目指して立案された。この目標を達成するためには、オジギソウ葉枕の個々の細胞が運動に伴ってどのように形状変化するのかを包括的かつ定量的に解析し、それをもとに運動時にどのような機械的な力が働いているのかを推定するアプローチが有効と考えられる。しかし、オジギソウの葉枕はいくつかの異なる細胞層により構成される立体的な構造を持ち (図1)、また運動に伴って細胞が三次元的に収縮・変形することが予想されるため、古典的な組織学的手法、例えば切片等の観察による二次元レベルでの解析から全体像を把握することは困難である。また、オジギソウはわずかな刺激に対しても非常に敏感に反応するため、運動前後の経時変化、とりわけ運動開始前の状態を安定的に観察することが非常に困難である。これらの技術的困難により、実際に運動細胞が収縮する割合を定量的に解析した研究は存在せず、おじぎ運動の力学的メカニズムを考察する上でのボトルネックとなっている。こうした状況を踏まえ、本研究ではオジギソウ葉枕の細胞形状の変化を「経時的に」「三次元的に」

「包括的に」解析するための手法を新たに開発し、これを用いておじぎ運動の力学的メカニズムを解明することを目的とする。

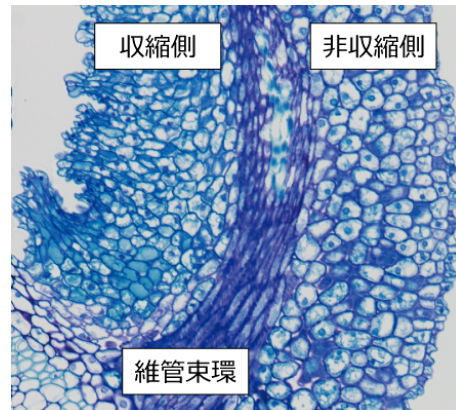


図1 オジギソウ小葉枕の構造

## 3. 研究の方法

### (1) オジギソウ小葉枕を用いた運動器官の包括的イメージング

当該分野のこれまでの研究においては、解析には複葉の基部に存在する主葉枕が主に用いられてきた。主葉枕はオジギソウの3種類の葉枕のなかでは最もサイズが大きく (数ミリメートル)、解剖等の手技を伴う生理学実験などには適しているが、内部組織のイメージングを行う上では逆にその大きさがデメリットとなる。そこで、本研究では小葉の基部に存在し、サイズのより小さい小葉枕 (数百マイクロメートル程度) を研究の対象として用いることとした。

### (2) GFP 発現オジギソウと二光子励起顕微鏡を用いた葉枕のライブイメージング

おじぎ運動における細胞形態の経時変化を観察する上で、生きた植物体を用いた観察ができれば非常に有力な解析手段となる。これまでの研究により我々は、オジギソウにおいて高効率のトランスジェニック技術を確認し、全身の細胞で蛍光タンパク質 GFP を発現するトランスジェニック・オジギソウを作出した。この遺伝学的リソースと組織深部の観察能力に優れた二光子励起顕微鏡を組み合わせ用い、オジギソウ小葉枕の非侵襲ライブイメージングが可能であるかどうかの検討を行った。

### (3) 固定組織および組織透明化手法を用いた葉枕内部の包括的イメージング

近年、動物と植物の双方において、組織透明化処理を用いた組織深部のイメージングが盛んに行われるようになってきている。本研究においても同様の手法を用いた葉枕内

部の観察を計画し、そのための条件検討を行った。具体的には、まず透明化による観察には固定組織を用いる必要があるため、運動前後の葉枕、特に運動開始前の葉枕を迅速に固定するための手法を検討した。次に、得られた固定組織の染色および透明化の方法を検討した。最後に、開いた状態と閉じた状態の小葉枕それぞれに関して、その三次元構造を共焦点顕微鏡を用いて観察した。

#### (4) 三次元画像の自動セグメンテーション手法の開発

小葉枕は少なくとも数千個の細胞から構成され、その三次元形態を1つずつ手でトレースすることは不可能である。そのため、取得画像の解析にはコンピューターを用いた自動セグメンテーションが必要となる。自動セグメンテーションに関しては多数の既存ソフトウェアが存在するものの、三次元画像のセグメンテーションに利用できるものは非常に数が限られ、また汎用的なソフトウェアでは解析条件を変更できる範囲も極めて限定的である。オジギソウ小葉枕のイメージングでは「器官全体の把握」と「個々の細胞の充分な解像」を両立させる必要があり、また後述するように固定および染色方法が極めて特殊であり、得られた画像の処理に関しても特殊かつ詳細な最適化が必要である。これらの要求を満たす既存ソフトウェアが存在しなかったため、本研究では独自に解析プログラムの開発を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) GFP 発現オジギソウと二光子励起顕微鏡を用いた葉枕ライブイメージングの検討

研究計画調書に記載の当初計画に基づき、オジギソウ葉枕のライブイメージングが可能であるかどうかを検討した。しかし、生きたオジギソウ葉枕は組織の不透明度が高く、二光子励起顕微鏡を用いても表面から1~2層の細胞層しか観察できなかった。研究目的を達成するためには今後、この観察範囲の劇的な改善に加え、高速で動く組織を追従してイメージングする方法の開発が必要となる。しかし、これらは現在の観察技術の延長線上では達成が極めて困難と予想されたため、我々は固定組織を用いた解析を中心に進めることとした。

#### (2) 急速凍結置換法による固定および水を用いない新規の組織サンプル調製法によるオジギソウ葉枕の運動前後の比較観察

運動前後の葉枕の構造を迅速に固定するために、我々はスラッシュ窒素を用いた植物体の急速固定およびアセトン・グルタルアルデヒド溶液を用いた凍結置換固定法を行

った。その結果、運動前後のサンプル、特に開いた状態のサンプルを瞬間的に固定することができるようになった。しかし、これらの固定サンプルを水を含む溶媒に移し替えたところ、細胞はすでに死んでいるにもかかわらず「開いていた葉枕が自発的に閉じてしまう」現象が観察された。これは、「組織レベルで蓄積された機械的弾性力が存在し、これがおじぎ運動に役割を果たす」という申請者の仮説を裏付ける結果である。一方で、この性質は「運動前後の変化を観察する」上での実験上の新たな困難となった。この困難を克服するために、我々は固定・染色・透明化のすべての過程において「水をいっさい用いない」実験手法を新たに開発した。具体的には、固定後の染色操作すべてをメタノールあるいはエタノール溶媒中に行い、組織の透明化には有機溶媒系の透明化試薬であるベンジルアルコール：安息香酸ベンジル混合液(BABB)を利用した。また、これらの無水系に適用できる細胞壁の蛍光染色法を新たに開発した。その結果、開いている葉枕・閉じた葉枕それぞれに対して、固定時の状態を維持したまま内部状態を観察できるようになった。最後に、共焦点顕微鏡を用いた観察により、小葉枕のほぼすべての領域に渡って細胞形態の観察ができることが判明した。

#### (3) 三次元画像の自動セグメンテーション手法の開発と細胞体積の変化率の測定

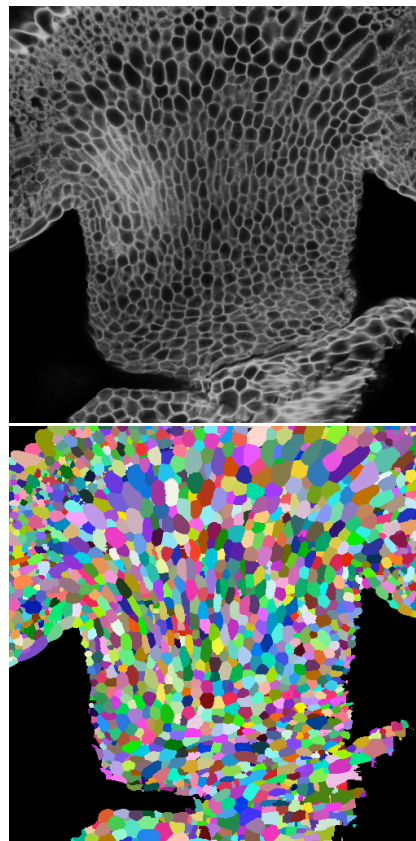


図2 オジギソウ小葉枕のイメージング像と自動セグメンテーション

得られた三次元画像から個々の細胞の形状を自動的に抽出・解析するプログラムの開発に着手し、現在もその開発を継続中である。開発途中のプログラムを用いた予備実験として、おじぎ運動の前後における小葉枕内の細胞の体積比較を行った。その結果、葉枕収縮側の運動細胞の体積（細胞壁に囲まれた領域の体積）は運動に伴い、最も変化の大きかった最外層において平均 39%減少し、一方で非収縮側の運動細胞の体積は同じく最外層において平均 18%増加することを見出した。これらの結果は、オジギソウ運動における細胞の体積変化を包括的かつ定量的に解析した初めての例であり、そのメカニズムの解明に大きく寄与するものである。今後、これらの解析技術を利用して「機械的弾性力」および「浸透による水の流出」のそれぞれがおじぎ運動に果たす寄与の割合を定量的に明らかにし、その成果を論文として発表する予定である。

#### 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）

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 真野 弘明、豊田 正嗣、Simon Gilroy、長谷部 光泰  
逆遺伝学およびイメージングによるオジギソウ運動器官の解析  
第 57 回日本植物生理学会年会  
2016 年 3 月 18 日  
岩手大学 盛岡キャンパス（岩手県盛岡市）

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

長谷部 光泰 (HASEBE, Mitsuyasu)  
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授  
研究者番号：40237996

##### (2)研究分担者

村田 隆 (MURATA, Takashi)  
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・准教授  
研究者番号：00242024

##### (3)研究協力者

真野 弘明 (MANO, Hiroaki)