

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07446

研究課題名（和文）発光カルシウムイメージングによる生殖過程の解析

研究課題名（英文）Analysis of reproductive process by calcium imaging system

研究代表者

岩野 恵（Iwano, Megumi）

京都大学・生命科学研究科・研究員

研究者番号：50160130

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：被子植物の生殖過程は、受粉、花粉管の胚珠への誘引を経て、受精へと至る。基部陸上植物ゼニゴケでは、造精器からの精子が造卵器に誘引されて受精へと至る。これらの生殖過程では雄側細胞と雌側細胞間コミュニケーションにカルシウムを介した情報伝達系が関与すると考えられる。本研究では、この情報伝達系の実体解明を目的として、カルシウムイオンに対して親和性の異なる多色のカルシウムセンサーを開発し、細胞質やオルガネラのカルシウム動態をセンシングできる植物を作製した。これらの植物の生理学的・遺伝学的解析により、生殖過程で機能するカルシウム輸送体遺伝子を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内のCa²⁺は、セカンドメッセンジャーとして細胞の増殖、生殖、環境応答などの生理反応に関与する。Ca²⁺濃度の低下は、染色体の凝縮や動原体微小管の安定化を阻害し細胞分裂周期の遅延や異常を引き起こす。また、植物が機械刺激などのストレスを感知すると、細胞外からのCa²⁺流入または液胞、小胞体などのカルシウムストアからCa²⁺放出が起き、機械刺激応答が発動される。従って、カルシウム動態を詳細に解析し、Ca²⁺カルシウム情報伝達系で機能するCa輸送体を解明することは、植物の生理反応全般の理解に必要であり、将来的には植物の生産性の向上に繋がる。

研究成果の概要（英文）：The reproductive process of angiosperms leads to fertilization through pollination and attraction of pollen tubes to ovules. In the liverwort, a base land plant, sperm from the sperm genitals are attracted to the egg maker and lead to fertilization. In these reproductive processes, calcium-mediated signal transduction system is considered to be involved in communication between male and female cells. In this study, to elucidate molecules functioning in this system, we developed multicolored calcium sensors with different affinity for calcium ion and created plants capable of sensing the calcium dynamics of cytoplasm and organelles. Physiological and genetic analysis of the plants searched for calcium transporter genes that function during reproductive processes.

研究分野：植物分子・生理学

キーワード：カルシウム 情報伝達系 イメージング シロイヌナズナ ゼニゴケ 生殖 カルシウムセンサー

1. 研究開始当初の背景

アブラナ科植物では、雌ずいの乳頭細胞に自家花粉が受粉した場合には、花粉の吸水・発芽が阻害され、受精が成立しない(自家不和合)。これに対し、他家の花粉が受粉した場合には、花粉は吸水・発芽して花粉管は乳頭細胞に侵入する。その後花粉管は、胚珠からの誘引物質により胚嚢へ誘導され、受精に至る。これら一連の過程においては、雌蕊と花粉との細胞間コミュニケーションにより適切な花粉が選抜される。研究代表者は、この細胞間コミュニケーションに、 Ca^{2+} や活性酸素が関与することを示し、他家・自家受粉時に機能する雌蕊側 Ca^{2+} 輸送体の実体解明を行ってきた[1, 2]。しかし、生殖過程で機能する Ca^{2+} を介した情報伝達系の詳細は不明であり、 Ca^{2+} 輸送体分子やその調節に関わる分子の実体も不明である。情報伝達系の分子機構を明らかにするためには、花粉と雌蕊細胞の Ca^{2+} 動態を詳細に解析し、細胞学的・遺伝学的解析により候補分子を同定する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、 Ca^{2+} シグナルを高光度・高感度・高分解能で測定できる新規の発光カルシウムイメージング系を開発し、生理学的・遺伝学的解析により、生殖過程における Ca^{2+} を介した情報伝達系で機能する Ca^{2+} 輸送体の実体を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 新規蛍光・発光カルシウムセンサーの開発

これまでに報告されている黄色あるいは緑色発光 Ca^{2+} センサー (NL- Ca^{2+}), GeNL(Ca^{2+}) は、蛍光タンパク質 (Venus, mNeonGreen) とルシフェラーゼの融合タンパク質で、 Ca^{2+} を感知する CaM_M13 がルシフェラーゼを分割する形で挿入されており、発光基質・ Ca^{2+} 存在下でルシフェラーゼからの光が蛍光タンパク質を励起して黄色あるいは緑色蛍光を発する[3,4]。本研究では、多色の蛍光タンパク質と EF hand 領域に変異を導入した CaM_M13 を用いて Ca^{2+} に対して親和性が異なる多色の Ca^{2+} センサータンパク質を開発し、大腸菌発現タンパク質で性状解析を行った。

2) Ca^{2+} センシング植物の作出と Ca^{2+} 動態の観察

上記の Ca^{2+} センサーGeNL(Ca^{2+})や本研究で開発した新規の Ca^{2+} センサーの遺伝子を種々の遺伝子のプロモーター (*35S*, *EF*, *SRK*, *DD2L*, *Act1*) 下流に繋いだコンストラクトを作製した。さらに細胞内オルガネラ内の Ca^{2+} 動態を観察するために、オルガネラ移行シグナルを付加したコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトをシロイヌナズナやゼニゴケに導入した。シロイヌナズナでは花粉や雌蕊生殖細胞の動態を観察し、ゼニゴケでは接触・傷害などの刺激で誘導される Ca^{2+} 変動を主に観察した。

3) Ca^{2+} 輸送体候補の探索

上記の Ca^{2+} センシングゼニゴケを用いて、 Ca^{2+} 輸送体候補遺伝子のゲノム編集株を作出し、 Ca^{2+} 動態による表現型解析を行った。

4. 研究成果

1) 新規蛍光・発光カルシウムセンサーの開発

GeNL(Ca^{2+})の mNeonGreen を mTurquoise2 に置換し、EF hand 領域に変異(E31D, E67D, F92W, E104D, and D133E)を導入することで、低親和性の青色発光 Ca^{2+} センサーCeNL(Ca^{2+})を作製した。大腸菌発現タンパク質での Ca^{2+} に対する K_d 値は $110 \mu\text{M}$ であり、CeNL(Ca^{2+})を小胞体で GeNL(Ca^{2+})を核で同時に発現させた動物培養細胞実験ではヒスタミン刺激後の小胞体での Ca^{2+} 変動が観察できた(Nadim *et al.*, 2018)ことから、植物体でも十分機能することが示唆された。さらに、中程度の親和性の橙色発光 Ca^{2+} センサーOeNL(Ca^{2+})も作製した。

2) Ca^{2+} センシングシロイヌナズナの作出と

Ca^{2+} 動態の観察

シロイヌナズナについては、*35S*, *SRK*, *DD2L*, *Act1*プロモーターの下流に GeNL(Ca^{2+})を繋いだコンストラクトを作製して、植物体全体、あるいは雌蕊乳頭細胞、助細胞、花粉など細胞特異的に発光 Ca^{2+} センサーを発現する植物体をえた。高感度カメラを装着した顕微鏡で撮影した花粉管伸長時の発光画像を図1に示す。花粉管先端では従来の蛍光イメージングで報告されているような Ca^{2+} 変動が観

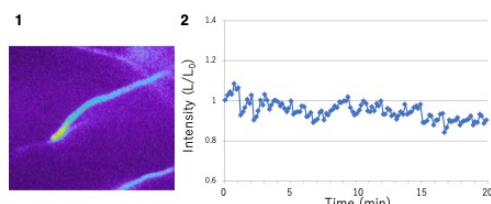


図1 花粉管伸長時の先端部での Ca^{2+} 変動

測された。

察された。さらに、ER 貯留シグナルを付加した小胞体型 *CeNL(Ca²⁺)_110μ* コンストラクトを植物体に導入し小胞体 Ca^{2+} 動態のモニター系も作製した。しかし、シロイヌナズナでは組織によって、クチクラの存在などにより、オルガネラへの発光基質の浸透が低い場合もあり、浸透性のより高い基質の改良が今後の課題として残った。また従来の *semi-in vivo* 受精系では、基質添加による誘導物質の拡散などの問題が生じることから、観察システムの改良も今後必要な課題と考えられた。

3) Ca^{2+} センシングゼニゴケの作出と Ca^{2+} 動態の観察

上記の問題点を解決するために、発光基質の浸透が容易な基部陸上植物ゼニゴケを用いて研究を進めた。プロモーターとしては *35S* プロモーターとメリステム付近で活性が高い *EF* プロモーターを用いた。図2は高親和性 *GeNL(Ca²⁺)_480* 遺伝子を導入したゼニゴケを用いて細胞質 Ca^{2+} 動態を示した実験結果である。ガラス針で傷害ストレスを与えた細胞の核領域(ROI1)と細胞質(ROI2)、傷害ストレスを加えていない隣接する細胞 (ROI3)の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 変化をモニターした。その結果、核付近でのみ顕著な2相性の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇が見られた。またより高親和性の *GeNL(Ca²⁺)_60* 発現個体では、傷害には至らない接触刺激のみでも細胞内の軽微な $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 変化を捉えることができた。従って、本研究により得られた形質転換体を用いることで、一切の励起光を用いることなく細胞内の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 変化を精度良く捉えるシステムができた。

次にゼニゴケのオルガネラでの Ca^{2+} 動態を試みた。初めに *CAM_M13* を含まない葉緑体移行シグナルを付加した *GeNL* 遺伝子をゼニゴケ葉状体に導入した。明視野、488nm 励起による *mNeonGreen* 蛍光像、発光基質添加後の発光像を比較して、*GeNL* が葉緑体に局在することが確かめられた (図3)。次に、葉緑体移行シグナルを付加した *GeNL(Ca²⁺)_480* コンストラクトを作製しゼニゴケに導入し、傷害ストレスによる $[Ca^{2+}]_{chl}$ 変化を観察した。その結果、傷害ストレス直後から葉緑体内の $[Ca^{2+}]$ が著しく上昇し、最終的にストレスを受けた細胞では細胞死が見られた。現在、種々のオルガネラ移行型シグナルを付与した多色の Ca^{2+} センサーを作製して、ストレス応答時のゼニゴケ細胞の $[Ca^{2+}]$ 変動を詳細に調べている。

4) ゼニゴケを用いた Ca^{2+} 輸送体候補の探索

ゼニゴケにおいては生活環の大半は単相世代であり、無性芽の増殖による「無性生殖相」と受精により形成された孢子の増殖による「有性生殖相」からなり、世代時間が短く、長日条件・遠赤色光照射により「無性生殖相」から「有性生殖相」へと人為的にコントロールできる。ゲノム情報や遺伝子発現情報が整備され、高効率な形質転換法、ゲノム編集法が確立されているので、遺伝子ノックアウトラインの作出や表現型観察は容易である。さらに遺伝子重複が少なく、標的遺伝子の機能解析を進める上で有利である。そこで、上記の Ca^{2+} センシングゼニゴケを用いて、 Ca^{2+} 輸送体候補遺伝子のゲノム編集株を作出し、 Ca^{2+} 動態による表現型解析を行った。

ゼニゴケ葉状体の辺縁部にガラス針で傷害ストレスを与えると図5で示すような Ca^{2+} 伝播が生じる。この現象は Gd^{3+} や Ln^{2+} により阻害されたことから、細胞膜上の Ca^{2+} チャネルが関与することが示唆された。そこで、数種の Ca^{2+} 輸送体候補遺伝子についてゲノム編集株を作製し Ca^{2+} 伝播に影響する遺伝子を探索した。その結果、2分子種のゲノム編集株で差が見られた。また1分子種のゲノム編集株では、「無性生殖相」から「有性生殖相」への相転換に異常が見られ、生殖器が形成されない表現型が観察されたことから、生殖過程で何らかの機能をする遺伝子であることが示唆された。そこで、遺伝子の発現部位を確認したところ、造卵器や造精器での発現が確認された。そこで、本遺伝子のプロモーター領域に種々のオルガネラ移行シグナルを付

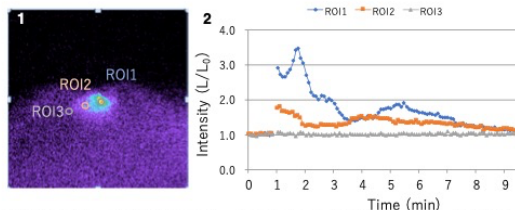


図2 高親和性 *GeNL(Ca²⁺)* 発現ゼニゴケ葉状体における傷害ストレスで誘導される Ca^{2+} 変動
1) 傷害ストレス直後の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 分布。2) 1) 図のROIの $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 変化。

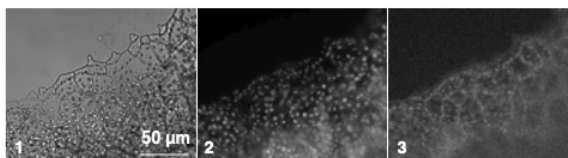


図3 葉緑体型 *GeNL* を発現するゼニゴケ葉状体
1) 明視野像, 2) GFP 励起蛍光像, 3) 発光像。

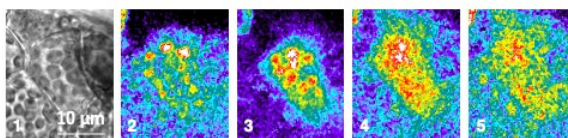


図4 *GeNL(Ca²⁺)* 発現葉緑体における傷害ストレスで誘導される Ca^{2+} 変動
1) 明視野像, 傷害ストレス前(2)と傷害ストレス後10秒ごとの $[Ca^{2+}]_{chl}$ 像(3-5)

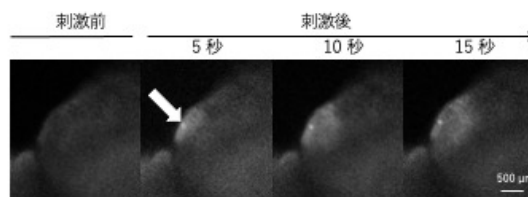


図5 発光イメージングにより観察された $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 伝播

与したコンストラクトを作製し、Ca²⁺センシングゼニゴケを作製した。今後この植物体を用いて造卵器・造精器を含む生殖器托形成過程や、生殖過程における精子・卵細胞間相互作用を生理学的・遺伝学的に解析することで、生殖過程における情報伝達系の実体解明に繋がりたいと考えている。

<引用文献>

1. Iwano *et al.* (2014) A pollen coat-inducible autoinhibited Ca²⁺-ATPase expressed in stigmatic papilla cells is required for compatible pollination in the Brassicaceae. *Plant Cell*. 26(2):636-49. doi: 10.1105/tpc.113.121350.
2. Iwano *et al.* (2015) Calcium signalling mediates self-incompatibility response in the Brassicaceae. *Nat Plants*. 1;1:15128. doi: 10.1038/nplants.2015.128.
3. Saito *et al.* (2012) Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nat. Commun.* 3, 1262. DOI: 10.1038/ncomms2248
4. Suzuki *et al.* (2016) Five colour variants of bright luminescent protein for real-time multicolour bioimaging. *Nat. Commun.* 7, 13718. DOI: 10.1038/ncomms13718

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujii Sota, Tsuchimatsu Takashi, Kimura Yuka, Ishida Shota, Tangpranomkorn Surachat, Shimosato-Asano Hiroko, Iwano Megumi, Furukawa Shoko, Itoyama Wakana, Wada Yuko, Shimizu Kentaro K., Takayama Seiji	4. 巻 5
2. 論文標題 A stigmatic gene confers interspecies incompatibility in the Brassicaceae	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 731 ~ 741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-019-0444-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koide Eri, Suetsugu Noriyuki, Iwano Megumi, Gotoh Eiji, Nomura Yuko, Stolze Sara Christina, Nakagami Hirofumi, Kohchi Takayuki, Nishihama Ryuichi	4. 巻 61
2. 論文標題 Regulation of Photosynthetic Carbohydrate Metabolism by a Raf-Like Kinase in the Liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 631 ~ 643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Sota, Shimosato-Asano Hiroko, Kakita Mitsuru, Kitanishi Takashi, Iwano Megumi, Takayama Seiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Parallel evolution of dominant pistil-side self-incompatibility suppressors in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1404~1412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15212-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hossain Md Nadim, Suzuki Kazushi, Iwano Megumi, Matsuda Tomoki, Nagai Takeharu	4. 巻 13
2. 論文標題 Bioluminescent Low-Affinity Ca ²⁺ Indicator for ER with Multicolor Calcium Imaging in Single Living Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 1862~1871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.7b01014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩野 恵
2. 発表標題 苔類ゼニゴケMCAの成長・生殖過程における機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第 83 回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩野恵、永井健治
2. 発表標題 ライブイメージングのための高光度発光植物の開発
3. 学会等名 第 6 9 回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 発光蛋白質、その基質、及びそれらの使用	発明者 永井健治、岩野恵	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-106866	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 デバイス、及びそれを用いた判定システム	発明者 永井健治、新井由之、岩野恵	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/002591	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	河内 孝之 (Kohchi Takayuki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	永井 健治 (Nagai Takeharu) (20311350)	大阪大学・産業科学研究所・教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関