

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16164

研究課題名（和文）膜電位の可視化による植物の膜電位シグナリング機構の解明

研究課題名（英文）Development of genetically-encoded voltage indicator for plants

研究代表者

吉成 晃（Yoshinari, Akira）

名古屋大学・高等研究院・特任助教

研究者番号：00829872

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：植物生理に重要な膜電位について、より詳細な知見を得るため、既存の膜電位センサーや自ら作成した新規のセンサー・Genetically-encoded voltage indicator (GEVI)を利用した膜電位イメージング系を確立することを目的とした。本研究により、植物細胞での膜電位イメージングには、pHによる影響を受けにくいGEVIの利用が不可欠であることを示され、将来のPlant-GEVI開発への方向性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、将来のPlant-GEVI開発の指針が示された。また、研究の過程で得られた数多くの新規GEVIは、動物細胞においては良好な応答を示しており、神経細胞における膜電位イメージングなどへの応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish a membrane potential imaging system using existing membrane potential sensors and newly developed sensors, so-called genetically-encoded voltage indicators (GEVIs), in order to obtain a more detailed understanding of the important membrane potentials in plant physiology. This study demonstrated the necessity of using GEVIs in plant cell membrane potential imaging that are less affected by pH and provided insights for future Plant-GEVI development.

研究分野：植物生理学

キーワード：シロイヌナズナ 膜電位 GEVI イメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

植物細胞は、細胞内外の K^+ や陰イオンの濃度勾配とプロトン勾配を調節することで様々な膜輸送体の駆動力を形成する (Hedrich, 2012)。さらにイオン勾配によって生じる膜電位は、電位依存性チャネルの活性を制御している。植物における膜電位変化は、ハエトリグサやオジギソウなどの運動性植物で多く研究されてきたが、近年ではシロイヌナズナなどの非運動性植物の細胞間シグナル伝達にも膜電位が重要な役割を果たすことが分かってきた。シロイヌナズナの葉が虫食いなどにより傷害を受けると、損傷を受けた葉から他の葉へ膜電位変化の波が伝播することが報告されている (Mousavi *et al.* 2013)。この傷害応答に起因する膜電位の変化が伝達されると、傷害を受けていない葉においても昆虫の忌避物質であるジャスモン酸の合成が数分以内に誘導される (Toyota *et al.* 2018)。また、このような全身性の膜電位伝達だけでなく、オーキシンの受容 (Dindas *et al.* 2018) や病原菌エリシターの受容 (Jeworutzki *et al.* 2010) に際しても周辺組織の膜電位の脱分極が報告されており、その生理学的意義について研究が進められている。しかしながら、依然として膜電位変化を伝達する分子機構や膜電位変化に伴って遺伝子発現を制御するメカニズムはほとんど明らかになっていない。膜電位変化の生理学的意義とその制御機構を調べるためには、「いつ」、「どこで」、「どの程度」、膜電位変化が起きるのかを正確にモニタリングする必要がある。

神経の研究分野において、時空間的膜電位モニタリングを可能にしたのが、蛍光タンパク質膜電位センサー (Genetically-encoded voltage indicator, GEVI) である。これまで開発されてきた GEVI は、電位依存性 K^+ チャネルや電位依存性脱リン酸化酵素などを基本骨格として設計されたものである。特に、これらのタンパク質に二種類の蛍光タンパク質を融合した FRET センサー、円循環置換型蛍光タンパク質 (cpFP) を融合した単一蛍光強度センサーが最もよく使われており、膜電位の変化に伴う FRET 効率や蛍光強度の変化を検出することで、膜電位変化を可視化・定量することができる (Knöpfel *et al.* 2015)。しかし、植物の膜電位を観察する上で、既存の GEVI には大きな問題がある。動物の神経細胞の静止膜電位は -70 mV 程度、脱分極時には $+30$ mV 程度まで増加する (Bean, 2007)。一方、シロイヌナズナ根における静止膜電位は -180 mV 程度、グルタミン酸供与による脱分極誘導後も -80 mV 程度である (Qi *et al.* 2016)。動植物間の静止膜電位の値は大きく異なるため、既存の GEVI では植物細胞の膜電位変化を検出することができない。既存の GEVI の感知可能膜電位域は -100 mV \sim $+50$ mV であり (Abdelfattah *et al.* 2016)、植物の膜電位イメージングを実現するためには、既存の GEVI の膜電位感受域を 100 mV 程度、負にシフトさせるか、過分極域で反応可能な植物由来の電位依存性チャネルを利用した新規の GEVI を作る必要があった。

2. 研究の目的

本研究の究極目的は、植物細胞の膜電位イメージングという新たな分野を開拓することである。この目的を達成するため、(1) 植物の膜電位を可視化する Plant-GEVI の開発、(2) 膜電位を伝達する細胞群の同定と、膜電位シグナル伝達を仲介する因子の解析、(3) 植物組織内の静止膜電位分布の解明 (= 膜電位マップ・プロジェクト) という順で研究に取り組んだ。ただし、研究目的 (1) の Plant-GEVI の開発が困難を極め、本研究では、目的 (2) と (3) を実施できなかった。

3. 研究の方法

我々のグループでは、既存 GEVI の一つである FlicR1 を使って、植物組織の膜電位イメージングに取り組んだ実績があったが、膜電位変化に伴う蛍光変化は微弱で、既存 GEVI を植物におけるイメージングに用いるのは困難であることが指摘されていた。そこで私は、FlicR1 にアミノ酸置換変異を導入し、FlicR1 の膜電位反応域を改変した。また、既存 GEVI の中でも特に蛍光変化が大きい、ASAP3 に着目し、植物細胞におけるイメージングを見据え、この改良を試みた。いずれの改変型 GEVI も、名古屋大学農学部の Andres Maturana 准教授との共同研究によって、パッチクランプ法によって HEK293T 細胞における膜電位変化に対する蛍光変化量を定量した。蛍光変化が大きく、植物の膜電位域において反応しうると考えられた GEVI については、植物発現用ベクターに組み込み、シロイヌナズナに形質転換することで、植物細胞における膜電位イメージングに供試した。また、FlicR1 や ASAP3 とは全く異なるタイプであるロドプシン型 GEVI、Archon1 についてもシロイヌナズナに発現させ、その動態を調べた。植物細胞のイメージングには、PDMS で作製した灌流装置等を用い、膜電位変化をもたらす刺激として、 100 mM 塩化カリウム、 1 mM L-グルタミン酸などを用いた。

4. 研究成果

(1) FlicR1 の膜電位反応域を変調する変異の発見

Site-directed mutagenesis 法と HEK293 細胞におけるパッチクランプ解析によって、FlicR1 の膜電位反応域を変調する変異として、第 4 膜貫通ドメインの V220 の W への置換および第 2 膜貫

通ドメインと第3膜貫通ドメインの間のループ領域の延長が有効であることを突き止めた。これらの変異型 FlicR1 では、膜電位反応域が負方向にシフトした。

(2) レシオメトリック ASAP3 の開発

ASAP3 は、細胞外領域に cpGFP を含み、緑色蛍光を呈する GEVI である。植物細胞において ASAP3 タンパク質の蓄積量をモニターするための内部標準として、ロングストークスシフト型の赤色蛍光タンパク質を、ASAP3 の N 末端側に融合することでレシオメトリック型の新規 GEVI、LSSmApple-ASAP3 を作製した。LSSmApple-ASAP3 は、HEK293 細胞において緑色蛍光のみ特異的に反応する一方、赤色蛍光は安定的であったため、植物細胞においてもレシオメトリック膜電位イメージングに活用できると期待された。

(3) 植物細胞において膜電位変化に伴う pH 変化についての発見

変異型 FlicR1 や LSSmApple-ASAP3 は、HEK293 細胞において良好な膜電位反応性を示したため、これらの遺伝子を植物発現用のバイナリーベクターにクローニングし、シロイヌナズナ形質転換体における動態を調べた。その結果、FlicR1 は細胞膜に、LSSmApple-ASAP3 は小胞体膜にそれぞれ局在した。また、1 mM L-グルタミン酸を与えた結果、いずれの GEVI も大きく蛍光レベルが低下することが分かった。興味深いことに、中性バッファー中に L-グルタミン酸を溶解した場合は、この応答が見られなくなることから、L-グルタミン酸供給に伴う FlicR1 や LSSmApple-ASAP3 の蛍光レベル低下は、細胞内 pH 変化に依存するものであることが示唆された。また、100 mM KCl による脱分極処理では蛍光レベルの低下は観察されないことから、これらの GEVI の植物細胞における蛍光変化の主要因は、膜電位変化によるものではないと結論づけた。一方、本研究は、植物が L-グルタミン酸などの刺激に曝されることで、細胞内 pH が変化することを示唆しており、将来、植物細胞における急速な pH 変化の生理学的意義の解明が期待される。

(4) Archon1 を用いた植物膜電位イメージングの試行

Archon1 は、ロドプシン型 GEVI であり、膜電位変化に依存して近赤外蛍光を発することが知られている。Archon1 の活性化には、植物の根細胞ではほとんど生合成されないレチナール分子が必要である。先行研究 (Zhou et al., 2021) を参考に、レチナール合成酵素 MbDio を、P2A 切断部位を介して Archon1-YFP と融合した DNA コンストラクトを作製し、シロイヌナズナ形質転換体における動態を調べた。その結果、シロイヌナズナ根において、YFP 由来の蛍光が液胞膜およびエンドソーム膜に観察され、Archon1 に由来する近赤外光は観察されなかった。この結果は、植物細胞内では、Archon1 が正しくフォールドされない、あるいはレチナール生合成が不十分であったことを示唆しており、Archon1 を用いた植物細胞でのイメージングは困難であることがわかった。しかし、この研究の途上で、植物の細胞核が近赤外の自家蛍光を呈することを発見し、現在はこの近赤外自家蛍光についての解析も行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Isoda Reika, Yoshinari Akira, Ishikawa Yuuma, Sadoine Mayuri, Simon Rudiger, Frommer Wolf B., Nakamura Masayoshi	4. 巻 105
2. 論文標題 Sensors for the quantification, localization and analysis of the dynamics of plant hormones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 542 ~ 557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshinari Akira, Moe-Lange Jacob, Kleist Thomas J., Cartwright Heather N., Quint David A., Ehrhardt David W., Frommer Wolf B., Nakamura Masayoshi	4. 巻 2200
2. 論文標題 Using Genetically Encoded Fluorescent Biosensors for Quantitative In Vivo Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arabidopsis Protocols, Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 303 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0880-7_14	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 該当する

1. 著者名 Yoshinari Akira, Hosokawa Takuya, Amano Taro, Beier Marcel Pascal, Kunieda Tadashi, Shimada Tomoo, Hara-Nishimura Ikuko, Naito Satoshi, Takano Junpei	4. 巻 179
2. 論文標題 Polar Localization of the Borate Exporter BOR1 Requires AP2-Dependent Endocytosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1569 ~ 1580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.01017	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshinari Akira, Hosokawa Takuya, Amano Taro, Beier Marcel Pascal, Kunieda Tadashi, Shimada Tomoo, Hara-Nishimura Ikuko, Naito Satoshi, Takano Junpei
2. 発表標題 AP2-dependent and independent endocytic pathways: differential regulation of polar localization and vacuolar sorting of the borate transporter BOR1
3. 学会等名 IWPMB2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------