

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06704

研究課題名(和文)植物の成長・生殖過程におけるカルシウムシグナル伝達系の解析

研究課題名(英文)Analysis of calcium signaling in vegetative growth and reproduction

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：MID1-COMPLEMENTING ACTIVITY (MCA)は陸上植物特異的タンパク質で、機械ストレス応答時のカルシウムシグナル伝達系に関わる。イネなどでは、細胞の増殖や分化に関わることが報告されているが、MCAが如何にカルシウムイオンを介して細胞増殖・分化を制御するのかは不明であった。この問いに答えるために、本研究ではゼニゴケ*Marchantia polymorpha*のMCAオルソログMpMCAの機能解析を行った。その結果、MpMCAは細胞分裂活性の高い細胞で発現し、細胞内カルシウム濃度を適正に維持することで細胞・組織の三次元構造を制御していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は低温、乾燥、病原菌などの環境ストレスに応答して細胞内カルシウム濃度を上昇させ防御遺伝子の発現を誘導する。この機構については広く研究が進み、それに関わるカルシウムシグナル伝達系の分子実体も明らかになってきた。しかし、植物の成長・発達過程の細胞増殖・分化を制御するカルシウムシグナル伝達系の実体については研究が進んでいない。本研究では、生活史の大半を半数体で過ごすゼニゴケを利用したカルシウムイメージング系を構築し、生理学的・分子生物学的解析を行うことでMpMCAが細胞増殖・有性生殖のカルシウムシグナル伝達系で機能する分子であり、MCAの機能が陸上植物で保存されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：MID1-COMPLEMENTING ACTIVITY (MCA) is a land plant-specific Ca^{2+} signaling component involved in response to mechanical stimuli. In rice and maize, MCA is essential for growth and development. However, how MCA mediates cell proliferation and differentiation via Ca^{2+} signaling remains unknown. In this study, we showed that a *Marchantia polymorpha* MCA, MpMCA was highly expressed in actively-dividing regions. In vivo Ca^{2+} imaging revealed that MpMCA was required for the maintenance of proper $[Ca^{2+}]_{cyt}$ at the apical notch, the egg cells, and the antheridium cells. Mpmca mutant plants showed severe cell proliferation defects in thalli, gametangiophores, and gametangia, resulting in their abnormal development and unsuccessful fertilization. Expression of the *Arabidopsis* MCA1 gene complemented most defects in the growth of Mpmca mutant. Our findings indicate that MpMCA is an evolutionarily conserved Ca^{2+} signaling component regulating the development across the life cycle in land plants.

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 ゼニゴケ カルシウムチャネル ゲノム編集株 細胞増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Ca²⁺は、成長、生殖、ストレス応答などの生理反応に不可欠なセカンドメッセンジャーである。細胞質のCa²⁺濃度は100-200 nMに制御されており、著しい濃度低下は細胞分裂周期の遅延・異常を誘起し、逆に著しい上昇は細胞死を誘導することが知られている[1]。被子植物では外界からのストレスを感知すると、細胞外からCa²⁺の流入または液胞や小胞体などのCa²⁺ストアからCa²⁺の流出が起き、細胞質の一過的なCa²⁺濃度上昇が誘導され、ストレス応答反応が発動される[2]。また有性生殖においては、花粉管伸長時のCa²⁺変動や、胚珠への花粉管誘引時に雌蕊助細胞でCa²⁺オシレーションが誘導されることが明らかになっている。このような「カルシウムシグナル伝達系」に関わるCa²⁺輸送体分子としてcyclic nucleotide-gated channel (CNGC)やglutamate receptors-like channel (GLR)などが同定されてきた[3]。しかし、植物体の栄養成長や生殖過程における「カルシウムシグナル伝達系」については不明な点が多い。

MID1-COMPLEMENTING ACTIVITY (MCA)は、酵母の機械刺激作動性Ca²⁺チャネル活性に必要な因子Mid1を欠損した変異体(*mid1*変異体)を相補する遺伝子としてシロイヌナズナで同定され、機械刺激応答に関わることを示された[4]。一方イネやトウモロコシでは、植物体の成長や発達に関与することが示されてきた[5,6]。しかし、MCAが栄養成長や生殖過程で機能する「カルシウムシグナル伝達系」にどのように関与するかは不明であった。

「基部陸上植物」苔類ゼニゴケは生活環の大半を1倍体で過ごし、白色光下では無性芽による栄養成長で増殖し、長日条件・遠赤色光照射により有性生殖を誘導できる。遺伝子重複が少なく、高効率な形質転換法やゲノム編集法が確立されているので、遺伝子破壊株の作出や表現型観察が容易である[7]。被子植物で観察されるCa²⁺依存的生理反応はゼニゴケでも観察されている。従って、ゼニゴケの野生株と遺伝子破壊株でカルシウムイメージング系を構築し、栄養成長や有性生殖過程を比較解析することで、「カルシウムシグナル伝達系」における遺伝子機能の解析が可能になると期待できる。

2. 研究の目的

本申請の目的は、陸上植物で保存されたCa²⁺輸送体遺伝子MCAの分子生物学的・生理学的・遺伝学的解析により、ゼニゴケの栄養成長や生殖過程に関わる「カルシウムシグナル伝達系」の分子機構を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 材料と生育条件

ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* Tak-1 株 (雄株)、Tak-2 株 (雌株) および Tak-1xTak-2 胞子を材料とし、1/2 Gamborg's B5 medium を含む 1% 寒天培地上あるいは 2,000 倍に希釈したハイポネックスを添加したパーミキュライトで 22 °C で生育させた。葉状体は恒常白色光下 (50~60 μmol photons m⁻² s⁻¹) で生育させ、有性生殖誘導のためには遠赤色光 (30 μmol photons m⁻² s⁻¹) を補光した。

(2) 発現解析

ゼニゴケ MCA 遺伝子 (MpMCA) の遺伝子情報は、*M. polymorpha* データベース (MarpolBase ver. 6: <https://marchantia.info>) からえた。発現解析のためには、MpMCA プロモーターの下流に β-glucuronidase (*GUS*) または *Citrine-NLS* を融合させたレポーターコンストラクト (*proMpMCA:GUS* または *proMpMCA:Citrine-NLS*) を胞子に導入し発現時期・部位を調べた。観察は葉状体と、長日・遠赤色光下において生殖器官形成を誘導させた植物体で行った。

(3) 分子生物学的解析

ゲノム編集株の作出: MpMCA タンパク質には ARPK ドメイン、coiled-coil ドメイン、PLAC8 ドメイン、EF hand 様モチーフなどが含まれる。本研究では、ARPK ドメインと EF hand モチーフをターゲットとした CRYSER/Cas9 によるゲノム編集株を作出した。細胞分裂活性を調べるために、EdU 取り込み実験と MpCYCD 発現活性を調べた[8]。

相補実験: 上記ゲノム編集株ゲノム編集株に CRYSER/Cas9 耐性 MpMCA 遺伝子 (MpMCApro:MpMCA_CDS) や、シロイヌナズナの *AtMCA1* 遺伝子を導入して、被子植物 MCA 遺伝子との機能を比較した。

(4) イメージング解析

Ca²⁺イメージング: MpMCA プロモーターあるいは EF プロモーターの下流に蛍光カルシウムセンサー YC3.60 遺伝子を繋いだコンストラクト (*proMpMCA:YC3.60* または *proEF:YC3.60*) を作製し胞子に形質転換した。ゲノム編集株を用いて、葉状体の成長、生殖過程 (生殖器官形成過程と受精過程) やストレス応答時の Ca²⁺イメージングを行い、野生株と比較して MpMCA 遺伝子が細胞内 Ca²⁺濃度や Ca²⁺動態に及ぼす影響を調べた。

形態観察: 野生株、ゲノム編集株、相補株のそれぞれについて、実体顕微鏡で形態観察を行い形態計測を行なった。無性芽、葉状体、生殖器官をグルタルアルデヒド溶液で固定後、定法に従って電子顕微鏡用サンプルを作成し、光学顕微鏡、電子顕微鏡で観察し MpMCA 遺伝子が細胞機能や組織形成に及ぼす影響を調べた。

(5)生理学的解析

MpMCA 遺伝子が Ca^{2+} 輸送体として機能するかどうかを調べるために、酵母変異株 (K667 株など) による相補試験を行なった。

4. 研究成果

(1) MpMCA の発現解析

ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* の栄養成長と生殖過程で MCA が関与するのかどうかを明らかにするために、ゼニゴケゲノム情報より 1 分子種のシロイヌナズナ *AtMCA1* オルソログ MpMCA 遺伝子を同定した。MpMCA は 482 アミノ酸からなり、N 末端側に被子植物と類似の N 末端側機能ドメイン (膜貫通領域と ARPK ドメイン、EF hand 様モチーフ) と a coiled-coil モチーフ、C 末端側に PLAC8 ドメインを有していた。

MpMCA 遺伝子の発現部位を調べるために、プロモーターアッセイを行った。図 1 に示すように、無性芽と葉状体においてはノッチ付近で、生殖器托では造卵器や未成熟な造精器などの細胞分裂活性が高い部位において MpMCA が高発現であることが明らかになった。

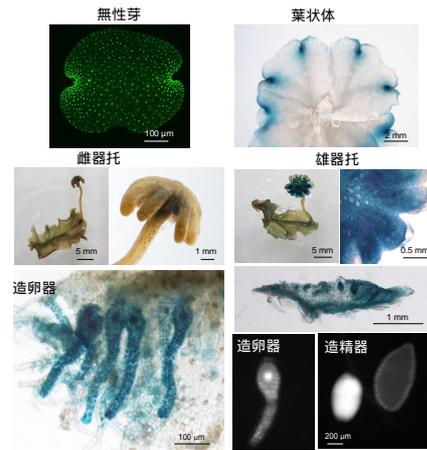


図1 MpMCAp:Citrine-NLS 発現体とMpMCAp:GUS 発現植物体の解析
MpMCA遺伝子は葉状体、雌器托の造卵器、造精器を含む雄器托全体で広く発現していた。特に初期の造精器では強い発現が見られた。

(2) ゲノム編集株と相補株の作出

野生株背景で ARPK ドメインをターゲットにしたゲノム編集株を作出したところ、葉状体の成長阻害、杯状体の形成遅延、二叉分枝の形成異常が観察された。この表現型は、CRYSER/Cas9 耐性 MpMCA 遺伝子導入により相補されたことから、これらの表現型異常が MpMCA によるものであることが示された。そこで MpMCA が細胞分裂に関わっているかどうかを調べるために、EdU 取り込み実験と D-type cyclin (MpCYCD; 1) の発現解析を行った。その結果、ゲノム編集株では野生株や相補株と比較して有意に EdU 取り込み活性と MpCYCD; 1 発現量が減少していた。これらの結果より、MpMCA は葉状体の成長における細胞増殖活性に関与することが示唆された。次に、MpMCA が遠赤色光による有性生殖誘導に関与するかどうかを調べたところ、ゲノム編集株では、雄株でも雌株でも生殖器托形成が遅延あるいは形成阻害された。この発達阻害は相補株では回復したことから、MpMCA は生殖器托誘導過程においても機能することが示唆された。

ゲノム編集株をシロイヌナズナの *AtMCA1* 遺伝子で相補した株では、葉状体の成長阻害が回復し、生殖器托誘導も完全ではないが相補した。このことから、MpMCA 遺伝子の機能は *AtMCA1* により相補されることが示唆された。

(3) イメージング解析

Ca²⁺イメージング

MpMCA 遺伝子が細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) の調節に関わるかどうかを調べるために、*proMpMCA: YC3.60* を発現させた Ca^{2+} センシングゼニゴケを作出し、それを背景としたゲノム編集株を作出した。その結果、葉状体では成長阻害とともにノッチ付近の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の低下が見られた。さらに生殖器托形成過程

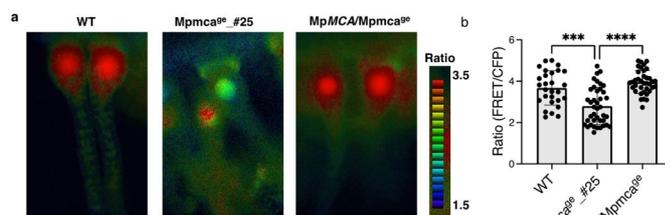


図2 MpMCAp:YC3.60 発現植物体背景のゲノム編集株における卵細胞の $[Ca^{2+}]_{cyt}$
a. 野生株、ゲノム編集株、相補株における造卵器の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 分布を示す Ratio 画像。
b. 野生株、ゲノム編集株、相補株の成熟した卵細胞の Ratio 値の比較。n ≥ 28

において発達遅延・形成阻害が観察され、ゲノム編集株の造卵器の卵細胞 (図 2) と造精器で $[Ca^{2+}]_{cyt}$ が有意に低下していた。これらの結果より、MpMCA 遺伝子は、ノッチ付近や造卵器、造精器の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の制御に関与することが示唆された。

さらに、より広い範囲の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ を調べるために *proEF: YC3.60* 発現植物体を作成し無性芽の吸水発芽時の Ca^{2+} 動態を 18 時間以上観察した。その結果、野生株ではゲノム編集株に比べてノッチ付近だけでなく植物体全体で $[Ca^{2+}]_{cyt}$ が高く、吸水発芽に伴って $[Ca^{2+}]_{cyt}$ が上昇した。また仮根の数も有意に多かった。このことから、MpMCA 遺伝子がノッチ付近だけでなく植物体全体の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の維持にも関与することが示唆された。

形態観察

ゲノム編集株では、葉状体の成長阻害と生殖器托の形成阻害や発達異常が観察され、雌株では野生株の精子と交配しても孢子形成は不完全であった。そこでその原因を調べるために、葉状体のノッチ付近と生殖器托の形態を光学顕微鏡と電子顕微鏡で詳しく観察した。その結果、ノッチ付近の細胞壁の観察では、ゲノム編集株の一次細胞壁の厚さが一様ではないことが明らかになり、細胞の変形も見られた。生殖器托については、図3で示すように雌株では造卵器の卵細胞やその周辺細胞の形態異常が観察され、不稔の原因は卵細胞の異常により正常な受精が成立できないことによると考えられた。雄株でも生殖器托の切片を観察したところ、造精器では細胞の分裂異常や細胞壁の肥厚が観察され、精細胞の形成には至っていないことが明らかになった。

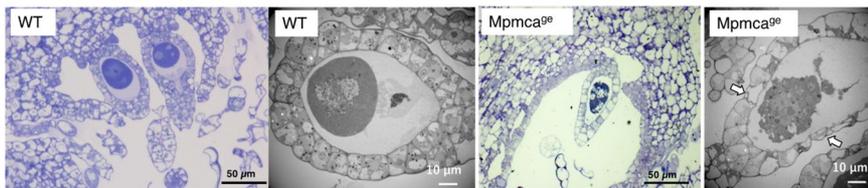


図3 野生株とゲノム編集株の造卵器の光顕像と電顕像

(4) 生理学的解析

MpMCA 遺伝子が Ca^{2+} 輸送体として機能するかどうかを調べるために、液胞の Ca^{2+} 輸送体を欠失した酵母変異株 K667 株に相補試験を行なった。しかし、MpMCA/pYES2 を導入した株でも AtMCA1/pYES2 を導入した株でも Ca^{2+} に対する感受性は上昇し、野生株よりも低濃度の Ca^{2+} 含有培地でしか生育できなかった。このことは遺伝子の導入により細胞外からの Ca^{2+} 流入により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したことによると推察されるが、今後アフリカツメガエルへの MpMCA RNA インジェクションにより Ca^{2+} 透過性テストを行うなど別のアプローチによる機能解析を進める必要があると考えている。

以上の野生株とゲノム編集株を用いた Ca^{2+} イメージングと形態観察の解析結果を纏めると、MpMCA 遺伝子は生活史を通じて分裂活性の高い細胞で発現し、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を適正なレベルに保つことで細胞形態を正常に保ち、細胞増殖を制御し植物体の三次元構造の構築に関わっていることが示唆された。MpMCA 遺伝子はゼニゴケの栄養成長や生殖過程に関わる「カルシウムシグナル伝達系」に含まれ、このような MCA 遺伝子の機能は陸上植物で保存されていることが示唆された。今後、「カルシウムシグナル伝達系」の詳細を解明するためには、MpMCA と相互作用する分子の探索が必須であると考えている。

References

- [1] Hepler PK. Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell*. 2005;17(8):2142-55.
- [2] Resentini F, et al. The signatures of organellar calcium. *Plant Physiol*. 2021;187(4):1985-2004.
- [3] Simon AA, et al. Merging signaling with structure: functions and mechanisms of plant glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Plant Biol*. 2023;74:415-452.
- [4] Nakagawa Y, et al. Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca^{2+} influx and touch sensing in roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3639-44.
- [5] Kurusu T, et al. Plasma membrane protein OsMCA1 is involved in regulation of hypo-osmotic shock-induced Ca^{2+} influx and modulates generation of reactive oxygen species in cultured rice cells. *BMC Plant Biol*. 2012a ;12:11.
- [6] Rosa M, et al. The Maize MID-COMPLEMENTING ACTIVITY homolog CELL NUMBER REGULATORY13/NARROW ODD DWARF coordinates organ growth and tissue patterning. *Plant Cell*. 2017;29(3):474-490.
- [7] Ishizaki K, et al. Agrobacterium-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant Cell Physiol*. 2008;49(7):1084-91.
- [8] Ishida S, et al. Diminished auxin signaling triggers cellular reprogramming by inducing a regeneration factor in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol*. 2022;63(3):384-400.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Hidemasa, Kato Hiroataka, Iwano Megumi, Nishihama Ryuichi, Kohchi Takayuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Auxin signaling is essential for organogenesis but not for cell survival in the liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1058 ~ 1075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koac367	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 -

1. 著者名 Bao Haonan, Sun Rui, Iwano Megumi, Yoshitake Yoshihiro, Aki Shiori S., Umeda Masaaki, Nishihama Ryuichi, Yamaoka Shohei, Kohchi Takayuki	4. 巻 34
2. 論文標題 Conserved CK11-mediated signaling is required for female germline specification in <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1324 ~ 1332.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2024.01.013	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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩野 恵、勝野 達也、河内 孝之
2. 発表標題 苔類ゼニゴケにおける生殖器官のアレイトモグラフィによる解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩野 恵、末次 憲之、西浜 竜一、石田 咲子、木村 緑、飯田 和子、飯田 秀利、永井 健治、河内 孝之
2. 発表標題 苔類ゼニゴケの生殖器官形成過程における MID1- COMPLEMENTING ACTIVITY オルソログの機能解析
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2022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
研究協力者	末次 憲之 (Suetsugu Noriyuki)		
研究協力者	堀江 智明 (Horie Tomoaki)		

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