

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21435

研究課題名（和文）植物細胞のメカノセンシング機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of mechano-response of plant cells

研究代表者

小田 祥久（Oda, Yoshihisa）

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：30583257

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：物理刺激の受容と応答は細胞の振る舞いを決定づける重要な現象である。植物細胞は周囲の細胞と細胞壁を介して接着しているため、常に周辺組織からの力学刺激にさらされている。そのため植物細胞の力学応答の理解は植物の発生や生理機能を理解する上で重要な情報となる。そこで本研究では1細胞レベルで植物細胞の力学応答を解析する新規実験系を開発し、その仕組みを明らかにするための基盤技術の確立を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では植物細胞に局所的に定量的な力学刺激を加える初歩的な手法を確立した。本手法を様々なタイプの細胞やプローブに対して適用できるように改良することにより、植物細胞の力学応答の詳細な仕組みを解析することが可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Perception of and response to mechanical stimulation is the important question of cellular behaviors. Plant cells adhere to each other via their cell walls and always receive mechanical stimulation from the surrounding tissues. Analysis of the mechanisms underlying the mechano-response of plant cells should further our understanding of plant development and physiological responses. In this study, we aimed to develop new experimental systems to elucidate the mechanical responses of plant cells.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：細胞壁

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

物理刺激の受容と応答は細胞の振る舞いを決定づける重要な現象である。植物細胞は周囲の細胞と細胞壁を介して接着しているため、常に周辺組織からの力学ストレスにさらされている。そのため植物細胞の力学応答の仕組みは、植物の発生における細胞の振る舞いや生理的な応答を理解する上で重要な情報となる。動物細胞の力学応答では細胞膜上のチャネル分子や細胞間相互作用、低分子量 G タンパク質、細胞骨格の寄与が明らかとなって来た。しかし植物細胞の物理環境は動物細胞とは全く異なるため、植物細胞ではこれまでに知られていない力学応答の仕組みがはたらいっていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では 1 細胞レベルで植物細胞の力学応答を解析する新規実験系を確立し、その仕組みを明らかにすることを大目的とした。そのために植物の培養細胞とマイクロニードルを用いた力学測定技術を組み合わせることにより、1 細胞レベルで局所的、定量的に力学刺激を加える方法を確立することを第一の目的とした。さらにこの手法に様々な細胞タイプやレポーターを用い、植物細胞の力学応答を細胞以下のスケールで、リアルタイムで検出することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

マイクロニードルを用いて細胞に力学刺激を与えながら細胞を観察するためにオリンパス社の IX83 電動倒立顕微鏡をベースにシステムを構築した。マイクロニードルのマニピュレーターとして Narishige 社の手動マニピュレーター 2 台を顕微鏡に接続した。マニピュレーターと顕微鏡の接続には特注のアダプターを用いた。観察時の細胞の容器にはエペンドルフ社のガラスボトムディッシュを用いた。マイクロニードルの作成には Narishige 社のガラス管を用いた。

細胞の明視野像および蛍光シグナルは、電動倒立顕微鏡に接続した横河電機社の CSU-W1 スピニングディスク共焦点ユニット、浜松ホトニクス社の ORCA R2 冷却 CCD カメラを用いて撮影した。

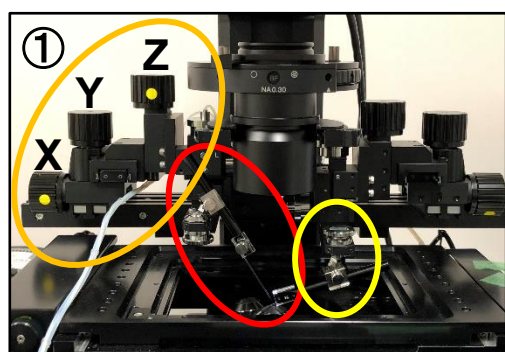
ガラスニードルの整形は SUTTER 社のマイクロピペットプラーを用いて行った。Heat, Pull, Velocity のパラメータを適宜変更して目的の硬さのニードルを作成した。さらにガスバーナーを用いて先端の角度を調節した。

力学刺激を与える細胞としてシロイヌナズナの培養細胞 Col-0(Alex)株およびその形質転換株を用いた。形質転換株は転写因子 VND6 をエストロゲンの添加によって発現させることで細胞の管状要素分化を誘導することが可能な eVND6 株 (Oda et al. 2010) を選んだ。培養細胞は液体 MS 培地を用いて 22°C、暗所、120rpm で振とう培養し、7 日毎に新しい培地に継代した。細胞の力学応答を検出するためにカルシウム濃度に依存して蛍光強度が変化する GCaMP6 を用いた。GCaMP6 をエストロゲン誘導ベクターに組み込み、アグロバクテリアウム法によりシロイヌナズナ培養細胞に組み込んだ。

4. 研究成果

まず適した力学強度をもつマイクロニードルの作成方法を検討した。マイクロニードルは

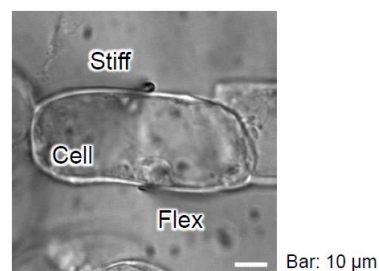
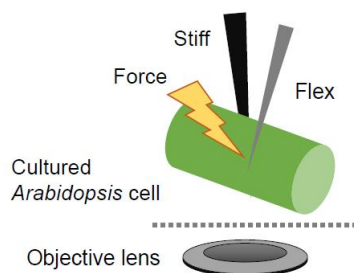
ガラス管を専用のプラー装置を用いて局所的に熱しながら引き延ばすことにより作成する。精度の高いマイクロニードルを作成するために数社のプラー装置を用いて試作した。最終的に上記 SUTTER 社のプラーを選定した。プラー装置の Heat, Pull, Velocity のパラメータを適宜変更して様々な硬さのニードルを作成した。次にこれらのニードルの力学的な強度を決定するためにキャリブレーションを行った。まず、従来から使われていた白金のリファレンスを用いて力学強度のキャリブレーションを行った。この方法でキャリブレーションすることができたが、当初に予想よりもかなり長い時間がかかることが判明した。そこで原子間力顕微鏡 (AFM) 用のカンチレバーを用いてキャリブレーションを試した。数種類のカンチレバーを用いて試行した結果、白金を用いた場合よりも簡便にキャリブレーションできることが判明した。



作成したニードルを上記の顕微鏡のマニピュレーターに取り付け、細胞に対してアプローチする方法を検討した (左図)。20 倍および 40 倍の対物レンズおよび心出し望遠鏡を用いてニードルの先端を確認しながらニードルを視野中央に誘導し、さらにガラスボトムディッシュの底近傍まで位置を調節することで細胞にアプローチすることが可能になった。

次に細胞の力学応答を検証するため、カルシウムセンサーである GCaMP を発現させた培養細胞系を作出した。この細胞をカバーガラスで挟み込むことで力学刺激を加えた。その結果、蛍光シグナルの上昇が確認されたことから、この細胞株を用いて力学応答を検証することにした。次にこの GCaMP 発現細胞をマイクロニードルで挟み込むことで力学刺激を与えた。その結果、マイクロニードルが接触し力学刺激が加わっていると予想される領域の近傍で蛍光シグナルの上昇を検出した。この結果からこのシステムを用いて植物細胞に局所的に力学刺激を加えることが可能であることが判明した。

次にマイクロニードルが細胞に対して与える力学強度の推定を試みた (右図)。明視野で細胞の状態を記録しながら、強度の高いマイクロニードル



と強度の低いマイクロニードルを用いて細胞を挟み込み、力学刺激を加えた。その後、力学刺激を加える前後のニードルの位置と細胞幅の変化から、細胞に実際に加わった力の大きさを推定することができた。

最後に、様々な培養細胞を用いて細胞の力学的な強度を計測した。生細胞と、管状要素に分化して死細胞となった細胞では強度に顕著な差がみられた。また、管状要素においては細胞壁が肥厚した領域と肥厚していない領域においても顕著な差がみられた。今後はこのシステムを様々なプローブを導入した細胞に適用することにより、植物細胞の力学応答の仕組みに迫ることができると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Sasaki Takema, Oda Yoshihisa	4. 巻 2382
2. 論文標題 A Quantitative Method for Evaluating Phragmoplast Morphology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 225 ~ 232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-1744-1_13	査読の有無 無
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10件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木武馬, 山田萌恵, 貴嶋紗久, 比嘉毅, 佐藤繭子, 若崎真由美, 豊岡公徳, 近藤洋平, 堤元佐, 大友康平, 村田隆, 根本知己, 小田祥久
2. 発表標題 二次細胞壁パターンのねじれを抑制する細胞骨格因子の同定
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木武馬, 石崎公庸, 本瀬宏康, 小田祥久
2. 発表標題 微小管付随タンパク質CORD はゼニゴケにおいて細胞分裂面の決定に關与する
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 比嘉毅, 近藤洋平, 出村拓, 福田裕穂, 小田祥久
2. 発表標題 微小管依存的な液-液相分離を介した二次細胞壁パターンの制御
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 貴嶋紗久, 坂本真吾, 光田展隆, 小田祥久
2. 発表標題 直接的なアクチンイメージングを目指した機能的なアクチン修飾法の開発
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小田祥久
2. 発表標題 イメージング共同研究から迫る植物細胞壁の構築機構
3. 学会等名 北海道大学ニコンイメージングセンター 学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 貴嶋紗久, 光田展隆, 小田祥久
2. 発表標題 シロイヌナズナvegetativeアクチン変異株の表現型解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木武馬, 小田祥久
2. 発表標題 新規ゴルジ局在タンパク質HOP1はカロースの蓄積制御を介し細胞板の形成に寄与する
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Molecular basis of cell wall patterning in xylem vessels
2. 発表標題 Yoshihisa Oda
3. 学会等名 From cellular dynamics to morphology (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 貴嶋紗久, 光田展隆, 上田太郎, 小田祥久
2. 発表標題 アクチン・微小管相互作用の理解に向けたシロイヌナズナvegetativeアクチンアイソフォーム変異株の表現型解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植物の道管における細胞壁パターンの構築機構
2. 発表標題 小田 祥久
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020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
研究分担者	島本 勇太 (Shimamoto Yuta) (80409656)	国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・准教授 (63801)	

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