

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15047

研究課題名(和文)ハエトリソウを用いた植物の高速なカルシウムシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of rapid calcium signal propagation in plants using the Venus flytrap

研究代表者

須田 啓 (Suda, Hiraku)

埼玉大学・理工学研究科・その他

研究者番号：40899192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物における接触刺激に応じた高速なカルシウムシグナルの伝達機構はこれまで未解明であった。本研究では、形質転換ハエトリソウを用いてカルシウムシグナルの伝達メカニズムを解析した。その結果、カルシウムシグナルは葉身の表と裏の表皮細胞層、および、葉肉細胞の層の全てで伝播することが示唆された。また、このカルシウムシグナルは電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤で抑制されることが明らかになった。これらの結果から、接触刺激に応じたカルシウムシグナルは活動電位依存的に発生していることが示唆され、シグナルが葉身上を伝播するメカニズムの一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、環境刺激に応じたカルシウムシグナルの伝達機構は理解され始めているものの、接触刺激に応じたカルシウムシグナルはその伝達機構だけでなく現象に関わるメカニズムのほとんどが未解明である。今回得られた結果はカルシウムシグナルが高速で伝播するメカニズムのみならずその前段階で行われる接触刺激の受容機構や後段階で行われる運動機構のメカニズムについても新たな知見を提供するものであり、植物における接触刺激に対する応答機構の全容を解明する新たな糸口となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of rapid calcium signaling in response to mechanical stimuli in plants has not yet been well understood. In this study, we analyzed the mechanism of calcium signal propagation using a calcium sensor protein overexpression line of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). The results suggest that the calcium signal propagates not only in the epidermal cell layers on the adaxial and abaxial sides of the leaf blade but also in the mesophyll cell layers. This calcium signal propagation was diminished by a voltage-gated calcium channel inhibitor. These results suggest that calcium signals in response to mechanical stimuli are generated in an action potential-dependent manner and provide new insights into the mechanism by which calcium signals propagate in plants.

研究分野：生物物理

キーワード：カルシウムシグナル バイオセンサー イメージング 接触刺激 ハエトリソウ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ハエトリソウ (*Dionaea muscipula*) は、左右の葉身を高速で閉じ合わせることで獲物を捕らえる食虫植物である。葉身上には感覚毛と呼ばれる組織が配置されており、葉身は感覚毛への二度の連続した接触刺激に応じて 0.1 秒という高速で運動する。運動に先立ち葉身の細胞膜上を活動電位が伝播するが (Burdon-Sanderson and Page, 1976), どのような分子がその情報伝達を担っているかは大部分が未解明であった。研究代表者らは近年カルシウムセンサータンパク質 GCaMP6f 発現ハエトリソウを樹立し、(1) ハエトリソウの感覚毛に接触刺激を与えるとカルシウムシグナルが葉身上を伝達すること、(2) カルシウムシグナルは植物で観測された中で最も高速な 10cm/sec という速度で細胞間を伝達し、伝達した細胞で次々と細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させること、(3) 細胞内カルシウムイオン濃度がある特定の閾値を超えると運動が引き起こされることを明らかにし、細胞内カルシウムイオン濃度の調節がハエトリソウの運動制御に重要な役割を果たすことを明らかにした (Suda et al., *Nat. Plants*, 2020)。このことから、ハエトリソウにおいては高速なカルシウムシグナルが動き回る獲物を直ちに捕らえるために不可欠であると考えられる。このカルシウムシグナルが葉身上を伝達する経路として考えられるのは、(1) 活動電位などによって細胞膜上にあるチャネルタンパク質が連続的に活性化して細胞間を伝播し、その活動電位に応じて細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させている可能性や、(2) 創傷刺激に応じたカルシウムシグナル (Toyota et al., *Science*, 2018) と同じように細胞間で細胞質同士を繋いでいる小孔の原形質連絡を介して隣接する細胞に伝達している可能性が考えられるが、その経路やメカニズムは未解明である。

2. 研究の目的

接触刺激に応じて細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる機構は植物に普遍的に備わり、例えばシロイヌナズナでは接触刺激に応じたカルシウムシグナルで病害応答を促すことが知られている (Matsumura et al., *Nat. Commun.*, 2022)。しかしながら、神経を持たない植物において接触刺激に応じたカルシウムシグナルによる情報伝達がどのように制御されているのかはその大部分が未解明である。ハエトリソウは接触刺激の受容組織として感覚毛を有しており接触刺激に応じたシグナル伝達を調べる目的に有用であるものの、カルシウムシグナルを生きたまま観測する方法が無かったことからこれまで解析が難しかった。本研究では研究代表者らの有するハエトリソウを用いた形質転換・カルシウムイメージング・薬理実験の技術によって、接触刺激に応じたカルシウムシグナル伝達のメカニズムを解析した。これによって、植物における高速なカルシウムシグナルの伝達機構の新たなモデルを提唱することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) カルシウムシグナルの伝達する組織の評価

正立型共焦点顕微鏡および倒立型共焦点顕微鏡を用いて、GCaMP6f 発現ハエトリソウに接触刺激を与え、接触刺激に応じたカルシウムシグナルが葉身のどの細胞層を伝播するのかを時空間的に観察し評価した。

(2) 阻害剤を用いたカルシウムイオンの流入経路の評価

カルシウムチャネルの阻害剤を GCaMP6f 発現ハエトリソウに添加し、その後接触刺激に応じたカルシウムイオン動態を観察した。これによって、カルシウムイオンがどのような経路で流入しているのかを解析した。更に形質転換技術と CRISPR-Cas9 システムを組み合わせることでゲノム編集によって遺伝子ノックアウト株を作成し、どのような遺伝子がカルシウムシグナルの制御に関わるのか評価することを目指した。

(3) 細胞間連絡を介したカルシウムシグナルの評価

細胞間連絡がカルシウムシグナルの伝達に関わっているのかを評価するためにシロイヌナズナにおいて細胞間連絡の閉鎖に関わる PDLP5 タンパク質の過剰発現株を樹立し、その際の接触刺激に対する応答を調べた。

4. 研究成果

(1) カルシウムシグナルの伝達する組織の評価

正立型共焦点顕微鏡を用いた観察により、表側の表皮細胞層、および表から二層目の細胞層において接触刺激に応じたカルシウムシグナルが観察された。また、倒立型共焦点顕微鏡を用いた観察により、裏側の表皮細胞層においてもカルシウムシグナルが伝達していることが明らかとなった。これらの結果から接触刺激に応じたカルシウムシグナルは表と裏の表皮細胞層、および、葉肉細胞の層の全てで伝播しているとする仮説が支持された。

(2) 阻害剤を用いたカルシウムイオンの流入経路の評価

電位依存性カルシウムチャネル阻害剤である Verapamil を 10mM の濃度で添加したところ、感覚毛で接触刺激を受容する細胞ではカルシウムシグナルが抑制されないものの、その周囲の細

胞群ではカルシウムシグナルが抑制されることが明らかとなった。更に、感覚毛を含む組織を陽イオン濃度の高い溶液で灌流すると接触刺激に依存せずこれら細胞群でカルシウムシグナルが発生することが確認された。これらの結果は、カルシウムシグナルが活動電位による細胞内外のイオン濃度変化依存的に生じている可能性を支持していた。これらの結果に基づき CRISPR-Cas9 を用いたカルシウムチャンネル遺伝子ノックアウト株の樹立を目指したが、大型かつ複数の遺伝子発現カセットを有するベクターではベクター導入効率や蛍光マーカ―遺伝子の発現効率が十分に得られなかったことから蛍光マーカ―による形質転換体の選別が困難であり、現段階の形質転換技術では形質転換株の取得には至らなかった。そのため、形質転換効率の向上を含めた更なる条件検討を引き続き実施していく。

(3) 細胞間連絡を介したカルシウムシグナルの評価

細胞間連絡の閉鎖に寄与するシロイヌナズナ PDLP5 タンパク質を過剰発現させたハエトリソウ株を樹立した。ハエトリソウにおける熱ショック応答タンパク質のプロモーターの単離に成功したことからこのプロモーターで熱刺激依存的に PDLP5 タンパク質の発現を誘導する株の樹立を目指したが、熱刺激を与えない状態でも遺伝子発現が誘導されてしまうことが明らかとなり誘導株の樹立を断念した。そこで、構成的プロモーターを用いて PDLP5 を発現したハエトリソウ株を樹立した。作出した過剰発現株では PDLP5 が細胞の外形に沿って発現している様子が確認された。樹立した株に対して接触刺激を与えたところ、接触刺激に応じた運動能を有することが明らかとなった。今後は PDLP5 発現株で細胞間連絡が閉鎖しているのかや、カルシウムイオン動態の評価を実施する予定である。

以上の結果から、接触刺激に応じた葉身上の高速なカルシウムシグナルは活動電位依存的に発生し、表と裏の表皮細胞層、および葉肉細胞層で伝播していることが支持された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Suda Hiraku, Toyota Masatsugu	4. 巻 69
2. 論文標題 Integration of long-range signals in plants: A model for wound-induced Ca ²⁺ , electrical, ROS, and glutamate waves	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Plant Biology	6. 最初と最後の頁 102270 ~ 102270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pbi.2022.102270	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3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 須田 啓, 浅川 裕紀, 津川 暁, 豊田 正嗣
2. 発表標題 ハエトリソウの高速運動を司るセンサーとアクチュエータ
3. 学会等名 The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須田 啓
2. 発表標題 非モデル植物ハエトリソウを形質転換する ~その条件検討と手法の構築~
3. 学会等名 第39回日本バイオテクノロジー学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiraku Suda
2. 発表標題 Calcium ion-mediated memory and movement system in the Venus flytrap (<i>Dionaea muscipula</i>)
3. 学会等名 Fifth webinar of the IRN France-Japan Frontiers in Plant Biology: Emerging models in plant sciences (招待講演) (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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