

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650089

研究課題名(和文) 環境を捕えダイナミックに変動する原形質連絡のシグナル伝達・分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of cell-cell communication via plasmodesmata

研究代表者

藤田 知道 (Fujita, Tomomichi)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50322631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間コミュニケーションは、個体を統制する上で重要であり、植物では原形質連絡がその役割を担っている。しかし、その制御については、まだよくわかっていない。

申請者らは、ヒメツリガネゴケの原系体に着目し、光変換型蛍光タンパク質Dendra2を用い、細胞間コミュニケーションを定量解析する方法を開発し、研究を進めた。その結果、ストレスホルモンであるアブシジン酸の存在に依存してDendra2の細胞間移動が抑制され、その制御に重要なABAシグナル伝達系の制御因子を2種類同定することができた。

研究成果の概要(英文)：Cell-cell communication via plasmodesmata is important to control growth and environmental response in plants. However, the molecular mechanism is largely unknown.

We developed a quantitative method to analyze cell-cell communication by using a photoconvertible fluorescence protein, Dendra2 in protonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, and studied a regulation of Dendra2 movement. We found two factors that are involved in abscisic acid signaling play a key role to control abscisic acid-dependent suppression of Dendra2 movement.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：plasmodesmata physcomitrella patens abscisic acid

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物において、細胞どうしのコミュニケーションは、細胞の運命制御や環境応答など、個体を統制する上でさまざまな局面で非常に重要である。動物では隣り合った細胞間のコミュニケーションはギャップ結合などにより制御されている。一方、植物では構造の全く異なる連絡通路が存在し、原形質連絡とよばれている。

原形質連絡は細胞壁を貫く数十ナノメートルの小さなチャンネルであり、植物独自の細胞間コミュニケーション手段であり、イオンなどの低分子からタンパク質や mRNA などの情報高分子が、このチャンネルを介して移動している(Lucas and Lee, 2004)。近年、原形質連絡を介した情報のやり取りが受動的で一定なものでなく、ダイナミックに変化していることがわかってきた。原形質連絡は、発生段階あるいは周囲の環境変化に応じて、数や形を変化させ、通過できる分子のサイズやタイミングを制御していることが明らかになってきた(Maule, 2008; Lucas et al. 2009)。しかし、どの因子が原形質連絡の数や形の変化を制御するのか、あるいはそれらを制御するシグナル因子はわかっておらず、原形質連絡を取り巻く分子制御機構の大部分は現在でも謎である(Burch-Smith & Zambryski, 2012)。

申請者らはコケ植物(ヒメツリガネゴケ)の原糸体は細胞が直鎖状につながっているため、細胞間コミュニケーションの研究に非常に優れた実験系となることに気づき、光変換型蛍光タンパク質に着目した細胞間コミュニケーションの定量解析法を開発してきた(Kitagawa and Fujita, 2013)。この過程で、アブシジン酸(ABA)が蛍光タンパク質の細胞間移動を1時間以内に抑制することを見出した。さらにこの制御には ABA シグナル伝達因子の Abscisic Acid Insensitive3(ABI3)は関与せず、ABI1 が関わることも見出した。

2. 研究の目的

本研究は、細胞間コミュニケーションを制御するホルモンとして ABA が重要であることを指摘し、それには ABI1 を経由したシグナル伝達系が重要であることを示す。さらにこのシグナル伝達系のターゲットに着目すること等により、原形質連絡の制御に直接関わる因子を明らかにし、未だ謎だらけの原形質連絡の分子制御系を世界に先駆けて解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ABA による原形質連絡の制御に ABI1 (PP2C フォスファターゼ) が関わることを示す。

ヒメツリガネゴケの *abi1* 遺伝子破壊株は ABA に対して高感受性を示すことが報告されている(Komatsu et al. 2009)。そこでこの株を入手し、*Dendra* を構成的に発現する *abi1*

遺伝子破壊株 (*abi1*KO/*Dendra* 株)を作成し、ABA 添加時の *Dendra* の細胞間移動を調べる。野生型に比べて、ていのうどの ABA でも *Dendra* の移動度の抑制がかんさつできるはずである。このようにして ABA に非感受性のドミナントネガティブ変異型 *abi1-1*/*Dendra* 株により得られた結果と合わせることで、ABA による原形質連絡の制御に ABI1 が関わることを示す。

(2) ABA 以外の環境ストレスも ABI1 を介した原形質連絡の制御に関わるのか。

Dendra を構成的に発現する *abi1-1*/*Dendra* 株や *abi1* KO/*Dendra* 株に、ABA 以外のストレス処理(塩、浸透圧、低温、乾燥、重金属など)を施し、*Dendra* の移動度の変化を調べる。これによりどのようなストレスが、ABI1 を介した原形質連絡の制御に関わっているのか明らかにする。

(3) ABA による原形質連絡の変化は、どのような微細構造変化に起因しているのか。

ABA による *Dendra* の細胞間移動の停止は、1時間以内で観察できたことから、このような制御は、原形質連絡の数の減少によるものとは考えにくく、原形質連絡の精微な構造変化によるものだと考えられる。そこで透過型電子顕微鏡により、ABA の有無に応じた微細構造の変化を調べる。微細構造の変化を正確に観察するため、化学固定法、(加圧)急速凍結置換法などを検討し、最適の観察条件を決定し、微細構造の変化を調べる。また微細構造の顕著な変化(原形質連絡のネック部分の閉鎖など)とともに、カロースの蓄積が原形質連絡の開口度を調整している可能性も考えられ(Roberts, 2005)、免疫電顕等によりこの可能性を検討する。

(4) ABA による原形質連絡の制御に ABA 受容体 PYR や SnRK2 キナーゼも関わるのか。

ABI1 が関わる ABA のシグナル伝達系は PYR 受容体と SnRK2 キナーゼとの複合体により制御されていることが近年明らかにされてきた(Umezawa et al. 2010)。それぞれのコンポーネントはヒメツリガネゴケでもよく保存されており、ABA による原形質連絡の開閉制御が ABI1 とともに PYR 受容体、SnRK2 キナーゼを介している可能性は十分高い。そこでこのことを明らかにするため、*Dendra* 発現株からプロトプラストを調整し、PYR や SnRK2 の機能抑制型(RNAi コンストラクト)や過剰発現型あるいは機能亢進型(キナーゼの恒常活性化型コンストラクト)を一過的に導入し、再生個体(20細胞程度の再生原糸体)において ABA による *Dendra* の細胞間移動の変化を調べる。このように一過的遺伝子導入系を利用することにより、遺伝子の機能解析を効率的かつ迅速に実施できる点は、本研究の利点であり、ABA による原形質連絡の制御が PYR/ABI1/SnRK2 を介したものであるかどうか

かを明らかにする。

(5) ABAによる原形質連絡の開閉制御に直接関わる因子(直接制御因子)候補の選抜。

これまでの研究により、①原形質連絡に局在するものや、原形質連絡の制御に関与する因子がいくつか同定あるいは推定されている(Burch-Smith & Zambryski, 2012)。一方、②PYR/ABI1/SnRK2の下流で働くいくつかの因子も明らかになりつつある(Hauser et al. 2011)。そこでこれら因子の機能に対する阻害剤等(例えば、アクチン重合阻害剤、活性酸素除去剤、カロース合成阻害剤など)の影響をDendraラインで調べ、どの因子がABA依存的な原形質連絡の開閉制御に関わる可能性が高いのかを検討する。①および②で共通の因子が見出せれば、それが原形質連絡を直接制御する有望な候補因子となる。それぞれの因子の遺伝子発現制御(ABA応答性)やタンパク質のドメイン構造の情報(細胞膜表層や原形質連絡に局在する可能性)なども総合的に調査し候補因子を選抜し、解析の優先順位を決定する。

(6) ABAによる原形質連絡制御を司る直接制御因子を特定する。

(5)でリストアップした候補遺伝子に対して順次(4)と同様の方法で、候補遺伝子の機能抑制コンストラクトや過剰発現コンストラクトをDendra発現株から調整したプロトプラストに一過的に導入し、ABA依存的なDendraの移動度の変化を調べ、この制御に関わるものを同定する。

(7) ABAによる原形質連絡制御に直接制御因子は必要十分か、どのように機能するのか。

(6)で同定した直接制御因子の機能喪失と機能獲得の表現型を調べる。具体的には誘導的RNAiや遺伝子破壊あるいは誘導的過剰発現をDendra発現株に対して作成し、ABA依存的なDendraの移動の変化を定量的に調べる。さらにDendraの移動制御に必要なドメインやアミノ酸残基などを予測し、それらの変異体を作成し解析する。必要に応じて生化学的手法などを導入し機能解析を行う。

(8) 直接制御因子とABI1、SnRK2の関係を明らかにする。

直接制御因子の機能抑制コンストラクトや過剰発現コンストラクトを前年度までに作成済みのabi1 KO/Dendra株やabi1-1/Dendra株から調整したプロトプラストに一過的に導入し、ABA依存的なDendraの移動の変化を調べ、直接制御因子とABI1の遺伝学的関係を明らかにする。同様な手法によりSnRK2と直接制御因子の関係も調べる。ABI1、SnRK2はそれぞれフォスファターゼ、キナーゼであることから、直接制御因子がこれらの基質となっている可能性についても生化学的手法を導入するなど、検討する。

(9) ABAによる迅速な原形質連絡制御に関わる分子機構について論文発表する。

ストレスやABAが、ABI1などを介したシグナル伝達経路により、どのように原形質連絡を制御し細胞間コミュニケーションを制御しているのか、その分子機構を考察し、論文発表する。

4. 研究成果

(1) ABAによる原形質連絡の制御にABI1が関わることをヒメツリガネゴケのabi1遺伝子破壊株、およびabi1-1ドミナントネガティブ株のそれぞれにDendraを構成的に発現するコンストラクトを導入し、Dendraの細胞間移動を調べた。その結果、実験ごとのばらつきが大きく、ABAがABA依存的な原形質連絡の制御に関わっているとは、統計的にはいえないことがわかった。このようにabi1の変異株で、細胞間コミュニケーションが非常に不安定になる現象は、非常に興味深く、今後この理由を追跡しても良いのではないかと考えられた。

(2) ABA以外のストレス処理として、塩、浸透圧などを施し、Dendraの移動度の変化を現在も継続して調べている。

(3) ABAによるDendraの細胞間移動の停止は、1時間以内で観察できたことから、このような制御は、原形質連絡の数の減少によるものとは考えにくく、原形質連絡の精微な構造変化によるものだと考えられた。そこで透過型電子顕微鏡により、ABAの有無に応じた微細構造の変化を化学固定法により調べた。また、カロースの蓄積が原形質連絡の開口度を調整している可能性も考えられこの可能性をアニリンブルー染色により検討した。これまでのところいずれの手法からも明確な結果を得ることはできていない。

(4) ABAによる原形質連絡の制御にABI1以外の因子が関わる可能性を検討した。その結果、ABAのシグナル伝達系因子のうち、SnRK2キナーゼおよびABI3転写因子が関わっている可能性を示唆するデータを得ることができた。引き続き、両者のABA依存的な原形質連絡制御における遺伝学的関係を調査する。

(5) ABAによる原形質連絡の開閉制御に関わる制御系に関するヒントを得るため、各種阻害剤、例えば、アクチン重合阻害剤、活性酸素除去剤、カロース合成阻害剤などの影響をまずは、Dendraラインで調べた。しかし、明瞭な結果を得ることが現在までのところできていない。

(6) ABAによる原形質連絡制御の抑制を報告した総説を発表した。に関わる分子機構について論文発表する(Kitagawa and Fujita, 2015)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Fujita, T. (2015) Plasmodesmata: function and diversity in plant intercellular communication. *Journal of Plant Research*, 128, 3-5. DOI: 10.1007/s10265-014-0697-0. 査読有

2. Kitagawa, M. and Fujita, T. (2015) A model system for analyzing intercellular communication through plasmodesmata using moss protonemata and leaves, *Journal of Plant Research*, 128, 63-72. DOI: 10.1007/s10265-014-0690-7. 査読有

3. Kitagawa, M. and Fujita, T. (2013) Quantitative imaging of directional transport through plasmodesmata in moss protonemata via single-cell photoconversion of Dendra2, *Journal of Plant Research*, 126, 577-585, DOI 10.1007/s10265-013-0547-5. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. アブシジン酸シグナル伝達経路を介した原形質連絡の制御
友井拓実、北川宗典、坂田洋一、藤田知道、第 57 回日本植物生理学会年会 H28/3/18-20、岩手大学 (岩手県盛岡市)

2. アブシジン酸シグナル伝達経路を介した原形質連絡の制御
友井拓実、北川宗典、坂田洋一、藤田知道 日本植物学会第 79 会大会 H27/9/6-8、新潟コンベンションセンター (朱鷺メッセ) (新潟県新潟市)

3. Abscisic Acid-dependent Regulation of Plasmodesmata Function
Munenori Kitagawa, Takumi Tomoi, Yoichi Sakata, Mayuko Sato, Kiminori Toyooka, Hitoshi Sakakibaral, Tomomichi Fujita、第 56 回日本植物生理学会年会 H27/3/16-18、東京農業大学 (東京都世田谷区)

4. Molecular analysis of signaling related to abscisic acid-dependent plasmodesmatal regulation
Takumi Tomoi, Munenori Kitagawa, Yoichi Sakata, Tomomichi Fujita、第 56 回日本植物生理学会年会 H27/3/16-18、東京農業大学 (東京都世田谷区)

5. Intercellular communication through plasmodesmata in protonemata of the moss *Physcomitrella patens*
Munenori Kitagawa, Miharuru Ayabe, Takashi

Murata, Tomoaki Nishiyama, Kiminori Toyooka, Mayuko Sato, Makoto Terauchi, Taizo Motomura, Yoshikatsu Sato, Mitsuyasu Hasebe, Tomomichi Fujita, MOSS2014 International Conference H26, Sep25-28, 2014 Capital Normal University, Beijing (China)

6. アブシジン酸依存的な原形質連絡制御におけるシグナル分子の解析
友井拓実、北川宗典、坂田洋一、藤田知道 日本植物学会第 78 会大会 H26/9/12-14、明治大学 (神奈川県川崎市)

7. アブシジン酸依存的な原形質連絡を介する細胞間情報伝達制御
北川宗典、友井拓実、坂田洋一、豊岡公德、佐藤繭子、榊原均、藤田知道 日本植物学会第 78 会大会 H26/9/12-14、明治大学 (神奈川県川崎市)

8. Regulation of cell-cell diffusion of macromolecules via plasmodesmata in filamentous tissue of the moss *Physcomitrella patens*,
Munenori Kitagawa, Kiminori Toyooka, Mayuko Sato, Tomoaki Nishiyama, Makoto Terauchi, Taizo Motomura, Takashi Murata, Yoshikatsu Sato, Mitsuyasu Hasebe, Tomomichi Fujita, EMBO Workshop, 24-29 August 2014, Bischoffsheim, (France)

9. Regulation of cell-cell diffusion of macromolecules via plasmodesmata in filamentous tissue of the moss *Physcomitrella patens*
北川宗典、藤田知道、第 55 回日本植物生理学会年会 H26/3/18-20、富山大学 (富山県富山市)

10. 細胞の分化状態に応じた原形質連絡を介する分子輸送制御
北川宗典、綾部美晴、豊岡公德、佐藤繭子、西山智明、寺内真、本村泰三、村田隆、佐藤良勝、長谷部光泰、藤田知道、日本植物学会第 77 会大会 H25/9/13-15、北海道大学 (北海道札幌市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 (以下) で、本件研究成果を一般に紹介した。

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/PlantSUGOI>

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/PlantSUGOIne/news/%E7%B4%B0%E8%83%9E%E9%96%93%E3%82%B3%E3%83%9F%E3%83%A5%E3%83%8B%E3%82%B1%E3%83%BC%E3%82%B7%E3%83%A7%E3%83%B3%E3%81%AE%E7%89%B9%E9%9B%86%E5%8F%B7%E3%81%8Cjpr%E3%82%88%E3%82%8A%E7%99%BA%E8%A1%8C/>

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/PlantSUGOIne/news/%E5%8E%9F%E5%BD%A2%E8%B3%AA%E9%80%A3%E7%B5%A1%E3%81%AB%E9%96%A2%E3%81%99%E3%82%8B%E8%A7%A3%E8%AA%AC%E8%A8%98%E4%BA%8B%E3%81%8Ccon-line%E3%81%A7%E5%85%AC%E9%96%8B%E3%81%95%E3%82%8C%E3%81%BE%E3%81%97/>

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/PlantSUGOIne/news/%E5%8E%9F%E5%BD%A2%E8%B3%AA%E9%80%A3%E7%B5%A1%E3%81%AE%E5%88%B6%E5%BE%A1%E3%81%AB%E3%82%88%E3%82%8B%E7%B4%B0%E8%83%9E%E9%96%93%E3%82%B3%E3%83%9F%E3%83%A5%E3%83%8B%E3%82%B1%E3%83%BC%E3%82%B7%E3%83%A7/>

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/PlantSUGOIne/news/%E7%B4%B0%E8%83%9E%E9%96%93%E3%82%B3%E3%83%9F%E3%83%A5%E3%83%8B%E3%82%B1%E3%83%BC%E3%82%B7%E3%83%A7%E3%83%B3%E3%81%AE%E8%AB%96%E6%96%87%E3%81%8Cjpr%E6%9C%80%E5%84%AA%E7%A7%80%E8%AB%96%E6%96%87/>

<http://www.sci.hokudai.ac.jp/PlantSUGOIne/news/%E6%97%A5%E6%9C%AC%E6%A4%8D%E7%89%A9%E7%94%9F%E7%90%86%E5%AD%A6%E4%BC%9A%E5%B9%B4%E4%BC%9A%EF%BC%88%E7%AC%AC%EF%BC%95%EF%BC%95%E5%9B%9E%EF%BC%89%E3%81%A7%E3%82%B7%E3%83%B3%E3%83%9D%E3%82%B8%E3%82%A6/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 知道 (Fujita Tomomichi)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号：50322631

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

本村 泰三 (Motomura Taizo)
北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授
研究者番号：30183974