

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07411

研究課題名(和文)全組織イメージングとライブイメージングによるオジギソウの速い運動メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the rapid movement of *Mimosa pudica* by using whole-cell imaging and live imaging techniques

研究代表者

真野 弘明 (Mano, Hiroaki)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・特任助教

研究者番号：80376558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：オジギソウは、さわると1秒程度の時間で葉を閉じる「おじぎ運動」を行う。このすばやい植物運動がどのようなメカニズムによって行われているのかはよく分かっていない。これを解明するために、本研究では運動部位の全ての細胞の3次元形状を網羅的に解析し、それらが運動によりどのように変化するかを明らかにした。また、おじぎ運動に関わりそうな15の候補遺伝子について、機能を失わせたオジギソウを作製することでその役割を調べた。その結果、このうちの2つの遺伝子が実際におじぎ運動に重要な役割を果た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

オジギソウは植物においては例外的に速い運動を示す。そのメカニズムの解明は、学術的には「特殊な生物が進化するプロセス」を明らかにする上で重要なモデルとなる。本研究では、オジギソウの運動に関わる遺伝子を世界で初めて同定することに成功し、その解明に向けて大きな前進をもたらした。また、オジギソウの高速運動や高速な細胞間シグナル伝達の仕組みの解明は、将来的にはこれらを利用した新規有用植物の作出等に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：The sensitive plant *Mimosa pudica* folds its leaves in around a second when being touched. It remains largely unknown what mechanisms allow this plant to move so rapidly. To investigate the mechanisms, we conducted a whole-cell 3D imaging of a motor organ and analyzed how individual cells change their volume and shape during the movement. We also conducted a functional analysis of 15 candidate genes possibly responsible for the movement, by producing mutant plants that lack the normal function of each candidate gene. These experiments revealed that two of them actually play essential roles in the movement.

研究分野：生物学

キーワード：オジギソウ 運動 細胞 遺伝子 蛍光タンパク質 イメージング ゲノム編集 トランスジェニック

## 1. 研究開始当初の背景

オジギソウ (*Mimosa pudica*) は、接触および他のさまざまな刺激 (熱・冷却・傷害・電気など) に応答して葉を折りたたむ「おじぎ運動」を行う。おじぎ運動は刺激から 1 秒程度の時間スケールで起こる、植物においては例外的に速い運動であり、その実現には「刺激の感知」「細胞間シグナル伝達」「運動器官の変形」の 3 つを高速で駆動する必要がある。とりわけ、後者 2 つにおいては個々の細胞で起こる変化を細胞間で素早く同調・協調させ、組織・器官レベルのより大きな変化へと統合するメカニズムが重要な役割を果たしていると考えられる。

課題 1: 運動器官である葉枕 (ようちん) の素早い変形に関しては、これまでの研究により、葉枕の片側 (extensor 側) にある運動細胞から  $K^+$  と  $Cl^-$  イオンの流出および水の放出が起こり、運動細胞が収縮することが報告されている。他の膨圧運動のメカニズムからの類推により、おじぎ運動は細胞膜をまたいだイオンの移動とその結果生じる水の浸透によって生じるとするモデルが現在のところ主流となっている。しかし、このモデルに対しては「必要となるイオンの流出速度が速すぎる」という観点から疑問が呈されている。収縮タンパク質や浸透圧勾配に逆らう水の輸送、細胞壁の力学特性の急激な変化など別のメカニズムが関与する可能性が提唱されているものの、これらの仮説に対する実験レベルでの裏付けは現在のところ得られておらず、この問題は おじぎ運動 および 植物運動全般 を通しての未解明課題の 1 つとなっている。

課題 2: オジギソウでは遺伝学的手法が長らく確立されておらず、おじぎ運動に関する遺伝子レベルの知見はほぼ皆無であった。

## 2. 研究の目的

(1) 課題 1 に関して、本研究では当初予想として「葉枕の運動細胞は実際には予想されているほど大きな体積変化を示さない」可能性に着目し、これを可能とするメカニズムとして「細胞の非対称な変形」や「細胞間隙の大きさの変化」等を考えた。これを検証するため、本研究では葉枕を構成する全細胞の包括的 3 次元イメージングを行い、個々の細胞が運動の前後でどのように変化するのかを詳細に調べることにした。

(2) 課題 2 に関して、これまでに我々はオジギソウのトランスジェニック技術を確立し、同種における蛍光タンパク質を用いたライブイメージングおよび CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊を可能にした。これらの技術的進展を背景にして、本研究ではおじぎ運動に関連すると予想される遺伝子をスクリーニングし、その機能を CRISPR/Cas9 によって欠損させることによって運動に影響するものを選別する機能スクリーニング実験を行い、おじぎ運動に関与する遺伝子の同定を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) オジギソウ葉枕の全細胞の包括的 3D イメージング

オジギソウには主葉枕、副葉枕、小葉枕の 3 種類の葉枕が存在する。このなかで最もサイズが小さく、全体のイメージングに適した小葉枕を観察対象として選んだ。また、オジギソウはわずかな刺激により運動を開始してしまうため、運動前の状態を保つことが非常に困難であった。この問題に対処するために、本研究では「スラッシュ窒素を用いた急速凍結置換法」を採用し、運動前の葉枕を瞬時に凍結固定することにより運動前の状態を観察することとした。固定したサンプルを観察する際、組織の透明化や染色などいくつかの前処理が必要となるが、その際に「固定した (死んだ) サンプルが細胞壁の弾性力により運動して閉じてしまい、固定時の状態が失われてしまう」という問題点に直面した。これに関して、全工程で「水をいっさい使わない」染色・透明化のプロトコルを開発し、問題を克服することに成功した。このように調整したサンプルを共焦点顕微鏡で観察することにより、葉枕内の全細胞の形状を 3 次元画像として取り込んだ。そこから自作のプログラムを用いて個々の細胞形状を抽出し (図 1) その体積の変化の様子を解析した。

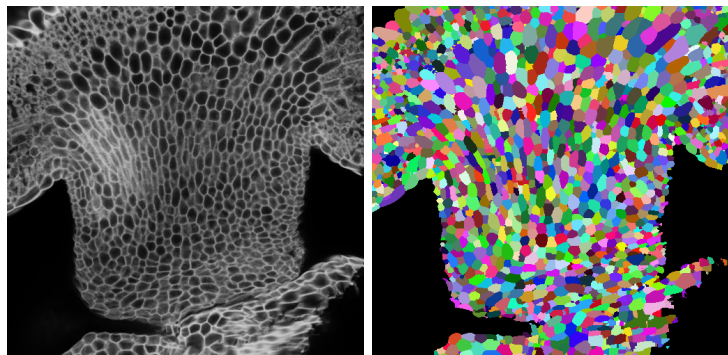


図 1 オジギソウ小葉枕の 3 次元画像と細胞形状の自動抽出

## (2) おじぎ運動に関する遺伝子の機能スクリーニング実験

オジギソウの葉枕は、運動時に収縮する側 (extensor 側) と収縮しない側 (flexor 側) という、運動性の大きく異なる 2 つの領域に分けることができる (図 2)。葉枕とその他の部位の間、および葉枕内の 2 つの領域の間で発現遺伝子を比較することにより、運動に関する遺伝子候補を絞り込むことができると期待される。本研究ではこれらの中でトランスクリプトーム比較を行い、発現量に顕著な差を示す 15 の遺伝子を同定することに成功した。同定した全ての遺伝子に関して CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊システムを樹立し、その表現型の観察を行った。これに関して、表現型観察の定量精度を高めるために小型コンピューターであるラズベリーパイを用いた簡易ロボットを自作し、機械刺激とビデオ撮影を自動で繰り返せるようにした (図 3)。また、表現型が得られた系統において  $Ca^{2+}$  動態をイメージングするため、CRISPR/Cas9 用の T-DNA ベクターにカルシウムセンサーである GCaMP6f を組み込み、表現型観察～イメージングの一連の解析を効率よく行えるようにした。

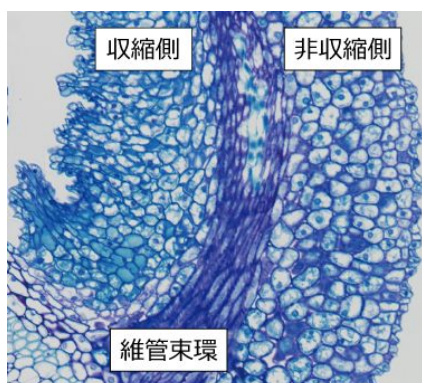


図 2 小葉枕の構造 (断面図)

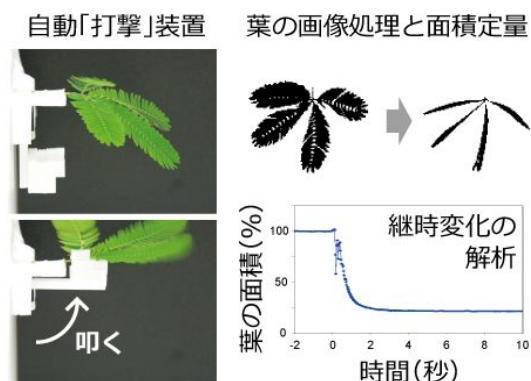


図 3 おじぎ運動の自動定量解析

## 4. 研究成果

### (1) オジギソウ運動細胞の体積変化の解析およびそこから得られた新たな仮説

得られた画像データをもとに運動前後における葉枕運動細胞の体積変化を求めた結果、収縮側 (extensor 側) の運動細胞の体積は運動に伴い、最も変化の大きかった最外層において平均 39% 減少することが判明した。一方で、非収縮側 (flexor 側) の運動細胞の体積は同じく最外層において平均 18% 増加することを見出した。これらの結果、特に extensor 側の細胞が示す 40% 近い収縮率は、運動細胞の変化率として従来想定されていた 10-25% よりも大きく、オジギソウの個々の運動細胞は「実際に大きく収縮している」ことを裏付ける結果となった。この結果は、本研究の当初予想であった「収縮よりも変形等の要素の寄与が大きい」可能性を否定するものであり、オジギソウの速い運動を説明するには別の説明が必要となった。この点に関して、本研究では非収縮側の細胞が大きく膨張する点に着目し、「葉枕の extensor 側の収縮に伴って起こる flexor 側の膨張 (イオン等の移動ではなく、力学的バランスを介した外部圧力の低下によって引き起こされる) により、細胞間連絡プラズモデスマータを介して水とイオンがともに extensor 側から flexor 側へと吸い上げられる」という新たな仮説の着想に至った。このモデルが正しければ、体積減少に対する細胞膜をまたいだイオン輸送の必要量が低下し、収縮タンパク質等の特別なメカニズムを仮定しなくても運動のスピードを説明できる可能性がある。この新しい仮説は、当初考えていた「個々の細胞レベルでの変形」を「プラズモデスマータで繋がった細胞集団レベルでの変形」へと置き換えたものであり、本質的には類似のものと言える。今後、当該仮説の検証、特に今まで注目されていなかったプラズモデスマータの運動に対する役割を明らかにすることにより、植物における例外的に速い運動のメカニズムが明らかになると期待される。

### (2) おじぎ運動に関する遺伝子の同定とその変異体が生ずる表現型

発現比較により得られた候補遺伝子群の機能解析により、おじぎ運動には機械刺激受容チャネル遺伝子およびグルタミン酸受容体型チャネル遺伝子の 2 つの遺伝子が関与することが明らかになった。機械刺激受容チャネル遺伝子の変異体ではおじぎ運動のスピードが大きく低下し、グルタミン酸受容体型チャネル遺伝子の変異体では葉枕間および葉枕内の運動細胞間的高速同調が損なわれた。さらに、グルタミン酸受容体型チャネル遺伝子を全身で過剰発現する植物体を作成した結果、接触刺激によるシグナル伝達が亢進し、1 つの葉を触っただけで植物個体の全部の葉が閉じるという表現型が観察された。これらの結果は、上記の 2 つの遺伝子がオジギソウの運動の鍵となる「個々の細胞の高速運動」と「細胞間的高速シグナル伝達」にそれぞれ重要な役割を果たすことを強く示唆した。今後、これらの遺伝子の機能およびそれらが全体としてどのようなシステムを形成するのかをより詳細に解明することにより、おじぎ運動の分子レベルでのメカニズムを明らかにできると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 真野 弘明、Chao-Li Huang、西山 智明、重信 秀治、豊田 正嗣、長谷部 光泰
2. 発表標題 オジギソウの速い運動を可能にする遺伝子機構の探索
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真野 弘明、Chao-Li Huang、西山 智明、重信 秀治、豊田 正嗣、長谷部 光泰
2. 発表標題 オジギソウの運動を遺伝子レベルで解き明かす
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真野 弘明
2. 発表標題 オジギソウの形質転換とCRISPR/Cas9によるゲノム編集
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真野 弘明、Chao-Li Huang、西山 智明、重信 秀治、豊田 正嗣、長谷部 光泰
2. 発表標題 オジギソウ運動器官に発現する遺伝子群のCRISPR/Cas9による機能解析
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018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	長谷部 光泰  (Hasebe Mitsuyasu)		