

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14544

研究課題名(和文) 物理学的・生理学的実験手法を融合した植物個体の力学刺激応答メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism for plant responses to external force by a combination of plant physiological and physical approaches

研究代表者

長谷 あきら (NAGATANI, Akira)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：40183082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の外力に対する応答は、植物生理学の重要かつ興味深いテーマであり、重力屈性や木本における「当て材」の形成はそのよい例である。しかしながら、植物細胞にコントロールされた力学刺激を加えながら細胞応答を観察するような研究はまだ少ない。本研究では、高精度Z軸ステージを用いた実験系を開発し、シロイナズナ芽生えの表皮細胞において、圧迫により可逆的に細胞質の流動性が低下することを示した。また、外液の浸透圧を変化させる実験を行い、この応答が細胞壁や細胞膜にかかる応力の変化によって生じるのではなく、細胞の変形に対する応答であることを見出した。これは新奇の細胞応答であり、今後の研究の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Responses of plants to external forces draw attentions of researchers in the field of plant physiology. Gravitropism and formation of reaction wood are good examples. However, few researches have focused on the cellular response to defined forces applied to the cell due to the lack of a good experimental system. In this project, we established such a system with the aid of precision Z stage and found that fluidity of cytosol was reversibly reduced in the epidermal cells in response to external force in the excised hypocotyl of an Arabidopsis seedling. The analysis in the hypertonic solution revealed that the deformation of the cell rather than the change in tension or stress in the cell was the primary factor to induce the response. This discovery of a novel cellular response is envisaged to lead to a development of new researches.

研究分野：植物生理学

キーワード：細胞応答 力学シミュレーション 原形質流動

1. 研究開始当初の背景

植物の外力に対する応答は、植物生理学の重要かつ興味深いテーマであり、重力屈性や木本における「当て材」の形成をはじめとして、植物が外力に応答することは古くより知られる。重力応答に関しては様々な分子細胞生物学的研究が行われている (Toyota & Gilroy, 2013)。また、典型的な外力応答である接触刺激応答については、カルシウムが重要な役割を果たすことなどが示され、力学刺激センサーが明らかにされる日も近いと考えられている (Chehav et al., 2009)。一方、分子遺伝学的手法を駆使することにより、発生現象においても、自らの成長がもたらすひずみと発生制御の関係が明らかにされつつある (Sampathkumar et al., 2014 など)。しかしながら、コントロールされた条件下で細胞に一定の力学刺激を加えるような実験はほとんど行われておらず、細胞がどのような力に応答しているのか直接観察した例は少ない。

研究代表者は、光をはじめとする環境刺激に対する応答の研究の一環として、GFP 標識したタンパク質の細胞内動態の観察を重ねてきた。その折にスライドグラス上で試料を圧迫すると、タンパク質の細胞内分布が変化する場合があることに気付きこの現象に興味をもった。そこで、簡易圧迫装置を自作して予備的な解析を進め、細胞質ゾル・タンパク質の流動性が、細胞圧迫により可逆的に大きく低下することを示唆する結果を得た (未発表)。分担研究者である奈良先端大の細川陽一郎准教授とは他の研究テーマで知り合ったが、同氏が応用物理学者として植物内で働く応力に興味があることを知り、また、同氏が専門とするフェムト秒レーザーは、植物細胞に機械刺激を与える手段として有望であることが分かり、議論を重ねた結果、本研究を提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発した細胞圧迫装置を用いて、生理学的手法に物理学的手法を組み合わせることで、植物細胞が継続的に与えられた中程度の外力に応答する原理の解明をめざす。これを実現するため、以下の三項目について実験を行う。

1) 細胞圧迫実験系の確立：我々が開発した細胞圧迫装置を用いることにより、圧迫を受けた細胞では可逆的に細胞質タンパク質の挙動が変化することが観察された。そこで、この実験系をさらに発展させ、圧迫刺激と細胞変形の関係について、圧迫の力を測定する系の確立を目指すとともに、それによって細胞がどのように変形するかを実測する。また、この実験系と比較するため、フェムト秒レーザーを用いて細胞外部より瞬間的な外力を加えた場合に細胞がどのように応答するかを観察するための実験系を開発する。

2) 細胞圧迫応答の植物生理学的解析：細胞

を圧迫された状況下で、GFP でラベルした各種タンパク質や、オルガネラの挙動の変化を明らかにし、その生理学的意義について考察する。また、圧迫に対する応答に、傷害に関する植物ホルモンであるジャスモン酸応答や、広く力学応答に関与するとされているカルシウムイオンの濃度変化などについて、レポータータンパク質の挙動を観察することにより検討する。

3) 計算機シミュレーションを利用した外力応答の解析：1) で開発した装置を用いて、共焦点顕微鏡による Z 軸スキャンを詳細に行い、多数の細胞について圧迫前後の形状を計測する。これをもとに、本研究のような実験条件下で、観察対象としている細胞にかかる応力のパターンや性質を計算機シミュレーションで明らかにする。

以上の研究を進めることで、持続的な力によって変形した細胞の細胞レベルでの力学応答に関する理解が飛躍的に深まることが期待される。

3. 研究の方法

それぞれの項目についての研究方法は以下の通りである。

1) 細胞圧迫実験系の確立：我々はすでに高精度 Z 軸ステージを用いてシロイヌナズナの胚軸に圧力を加え、胚軸全体として数 μm の単位で変形を引き起こすための装置を自作している (図 1)。そこで、この装置によって胚軸表皮細胞がどのように変形しているかを、共焦点レーザー顕微鏡による Z 軸スキャンによって記録する。また、このような変形が起きている時の力を簡易測定するため、マイクロ圧力センサーを用いた測定を試みる。



図 1 ; 胚軸簡易圧迫装置

2) 細胞圧迫応答の植物生理学的解析：圧迫下における、各種の GFP 融合タンパク質や、GFP でラベルしたオルガネラの挙動を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。特に細胞質タンパク質については FRAP 解析を行い、当該の細胞質ゾル・タンパク質の見かけの拡散速度 (原形質流動を含む) を測定する。また、カルシウム濃度とジャスモン酸応答について、それぞれ共同研究により、Cameleon と JAZ1 を蛍光性のレポータータンパク質として利用しその動態を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

3) 細胞レベルで見ると、胚軸のような簡単な機関であっても複雑な力学的構造をもつ。このような構造体に外力を加えたときの変位や応力分布を直感的に予想することは困難である。そこで本研究では、植物体の外力応答を理解するための構造モデルを構築し、面的な圧迫によって生じる応力を有限要素法により計算する。

4. 研究成果

1) 細胞圧迫実験系の確立：細胞に可逆的に外力を加えるために、簡易細胞圧迫装置を開発した。具体的には、シロイヌナズナの芽生えを切出し、共焦点レーザー顕微鏡のステージ上で、高精度Z軸ステージに取り付けたカバーガラスでこれを上から圧迫しその場で蛍光観察を行った。さらに本研究ではマイクロ圧力センサーを組み合わせて圧力を読み取る計画であったが、装置自体のたわみにより、胚軸にかかる圧力を安定して読み取ることが困難であること判明したため、この方向の開発は断念した。

次に、この実験装置を用いて、細胞質の流動性低下が起こる時に細胞がどのように変形しているかを、共焦点レーザー顕微鏡によるZ軸スキャンによって観察した。その結果、胚軸の表皮細胞には外に細胞が飛び出した細胞の列と、細胞と細胞の間で内側に押し込められた細胞列が交互に並ぶことが分かった。また、上記装置で胚軸を圧迫すると、飛び出した細胞列で、圧力を加えているカバーガラスに接触した部分が極端に平坦化するのに対し、内側に押し込められた細胞では変形の程度は軽微であることが分かった(図2)。このような細胞変形は完全に可逆的であり、圧迫を解消すると細胞は速やかに元の形に戻った。

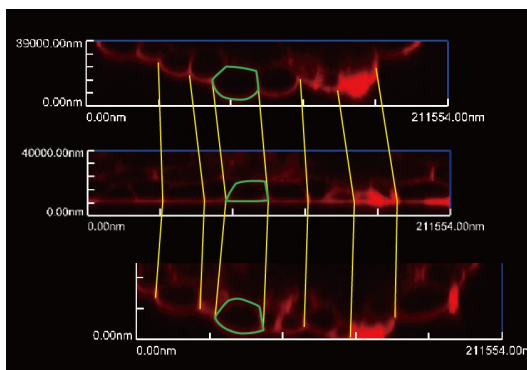


図2；胚軸圧迫時の細胞断面のZ軸スキャンによる観察

また、上記のような持続的細胞変形を引き起こす操作に加えて、フェムト秒レーザーにより短時間の衝撃を胚軸に加えた場合の細胞応答についても観察した。その結果、針などを用いた先行研究と同様、衝撃を加えた場所で局所的な細胞質の集合や細胞骨格の変化が観察されたが、その応答は、上記装置で胚軸を圧迫した時の応答とは大きく異なっていた。

2) 細胞圧迫応答の植物生理学的解析：上記の装置により細胞を圧迫した状態で、表皮細胞における各種マーカータンパク質の観察を行った。その結果、以下のようなことが分かった。A) 各種細胞質タンパク質 GFP や単独の GFP の観察、さらに、オルガネラの観察などを行い、ここで観察された流動性の低下が特定のタンパク質の性質の変化を反映するのではなく、細胞質全体として流動性(原形質流動と拡散の両方を含む)が低下していることを確認した。B) なかでも phyA タンパク質は、Pfr 型になると細胞質で顆粒状の構造を形成することが知られていたが、圧迫によりこの応答が著しく促進されることが分かった。C) 流動性の低下を定量化するため FRAP 解析を実施し、流動性が低下する条件では細胞質タンパク質の分布が回復するまでの時間が4倍程度遅くなることが確認された(図3)。D) 外液の浸透圧を変化

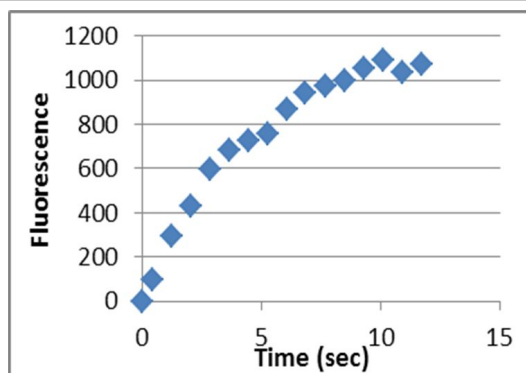
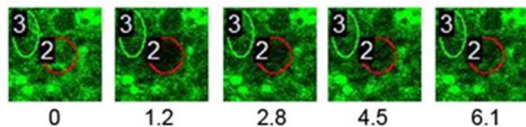


図3；細胞質タンパク質のFRAP解析

させた実験を行い、細胞の膨圧を変化させてもこの応答が変化しないこと、すなわち、この応答は細胞にかかる直接的な応力を反映したものではなく、むしろ細胞の可逆的な変形に反応したものであることが示唆された。E) この応答に細胞骨格が関与する可能性を考え、微小管およびアクチン繊維の観察を行ったが、細胞質の流動性が大きく低下した条件下でもその分布に大きな変化は見られなかった。F) カルシウムイオン濃度の変化が圧迫によって生じているかを YellowCameleon を観察することによって調べたがはっきりした変化は検出できなかった。G) この応答にジャスモン酸が関与するかどうかを、JAZ1-GFP の分解を指標に観察したが、圧力と無関係にジャスモン酸応答が起こるような例があり、はっきりした結論は得られなかった。しかし、ジャスモン酸応答なしでも流動性が低下するような例もあったため、当該応答がジャスモン酸応答の一環として起こる可能性は低いと考えられた。H) また、圧迫処理を1時間程度加えた芽生えを

培地に戻して生育させたところ生育阻害が観察されたが、その表れ方は不安定で、はっきりした結論は得られなかった。

以上まとめると、シロイヌナズナ胚軸の表皮細胞において、可逆的な細胞変形に伴って細胞質の流動性が低下することが分かった。また、膨圧を変化させた実験から、この応答は、細胞にかかる応力の変化というよりは、直接的には細胞の変形に対する応答であることが示唆された。従って、シロイヌナズナの表皮細胞には、自身が変形したことを感知しこれに応答する能力があると推察される。これは、新しいタイプの外力に対する細胞応答であり、今後の研究の発展が大いに期待される。

3) 計算機シミュレーションを利用した外力応答の解析: 当初の計画では計算機シミュレーションで、胚軸を圧迫した場合に細胞にかかる応力などを計算するつもりであった。しかしながら、項目2)において、外液の浸透圧を変化させた実験の結果から、この応答は細胞内の応力変化に応じたものではなく、より直接的には細胞の極端な変形に対する応答であることが示唆されたため、応力の計算は行わなかった。

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2件)

Nagatani A, Mimura T., Editorial: Emerging Technologies for the Study of Plant Environmental Sensing. *Plant Cell Physiol*, 2015, 査読無 56(7):1249-51.

Dietrich D, Nagatani A (32名中26番目), Hosokawa Y (32名中27番目), 他, Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. *Nat Plants*, 2017, 査読有, 3:17057.

〔学会発表〕(計2件)

Nagatani A (10名中1番目), 他, Structural basis for the far-red high irradiance response of phytochrome A, International Symposium on Plant Photobiology (ISPP), 2018年, 松江
菊池美里、鈴木友美、望月伸悦、長谷あきら、フィトクロム分子の高光感度化に対する舌構造の関与、第58回日本植物生理学会年会、2017年、鹿児島

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://physiol2.bot.kyoto-u.ac.jp/HP3/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 あきら (NAGATANI, Akira)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 40183082

(2) 研究分担者

細川 陽一郎 (HOSOKAWA, Yoichiroh)
奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授
研究者番号: 20448088