

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14761

研究課題名(和文)ハエトリソウの記憶の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the memory in *Dionaea muscipula*

研究代表者

長谷部 光泰 (Hasebe, Mitsuyasu)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授

研究者番号：40237996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：食虫植物ハエトリソウは、葉を閉じることによって小動物を捕らえ、消化、吸収して栄養としている。葉が閉じるには、葉の上に生えた感覚毛を約30秒以内に2回刺激する必要がある。すなわち、ハエトリソウは最初の刺激を約30秒間記憶していることになる。カルシウムセンサータンパク質を発現する形質転換ハエトリソウを作成し、刺激と細胞質カルシウムイオン濃度の時空間変動を解析することに成功した。その結果、最初の刺激で濃度が感覚毛から葉身に向かって上昇した。2回目の刺激で濃度が閾値を超えることで葉が閉じた。その他の実験結果も勘案し、細胞質カルシウムイオン濃度変化がハエトリソウの記憶の分子機構であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳も神経も無いのに、ハエトリソウが刺激を記憶できるということは、100年以上前に発見され、研究者だけでなく、社会的な関心も高かった。しかし、その仕組みは不明だった。今回の実験で植物の記憶がカルシウム濃度の変化によって引き起こされることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The carnivorous plant *Dionaea muscipula* captures, digests, and absorbs small animals for nourishment by closing the leaves. For the leaf to close, the sensory hairs on the leaf must be stimulated twice within about 30 seconds. In other words, the flytrap memorizes the first stimulus for about 30 seconds. We generated a transgenic flytrap expressing a calcium sensor protein and analyzed the spatiotemporal variation in cytosolic calcium ion concentration in response to stimulation. The results showed that the concentration increased from the sensory hairs to the leaf blade at the first stimulus, while the concentration exceeded a threshold at the second stimulus, causing the leaf to close. Taking into account other experimental results, it was found that cytosolic calcium ion concentration changes are the molecular mechanism of memory in flytrap.

研究分野：植物進化学

キーワード：ハエトリソウ 植物記憶 カルシウム メカノセンシング 進化 食虫植物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ハエトリソウは左右に分かれたトラバサミ状の葉身を持つ。この葉身を高速で閉じ合わせることによって小動物を捕え、消化、吸収することにより栄養分として活用している。獲物の感知には左右の葉身それぞれに3本ずつ生えた感覚毛を用いており、この感覚毛に「二度」の連続した接触刺激が与えられると葉身運動が引き起こされる。一度の刺激のみで運動が起こらないのは、雨や小石等の捕食対象以外からの刺激により運動が起こることを防ぎ、無駄なエネルギー消費を抑えるためだと考えられているが、この刺激回数の「記憶」がどのような仕組みによって行われるのかは解明されていなかった。それまでの研究から、感覚毛の刺激によって葉身全域へと伝わる活動電位が発生することが報告されていた[Hodick and Sievers (1988) *Planta* 174, 8-18]。この電気シグナルがカルシウムイオンやジャスモン酸誘導体の濃度上昇を引き起こし、これが二回の刺激によって閾値を超えると運動が発生するという仮説[Hodick and Sievers (1988) *Planta* 174, 8-18; Ueda et al. (2010) *ChemBiochem*. 174, 8-18]が提唱されていた。しかし前者には実験による検証が無く、後者も当該物質の外部投与により「運動」が起こることを確認したのみで、実際に生体内で刺激依存的な濃度上昇や蓄積を起こし、「記憶」として機能するかどうかは不明であった。記憶の実体がこうした同一変化の加算による「閾値」的なものかどうか不明でなく、「一度目の刺激によりなんらかの質的な変化(タンパク質のリン酸化等)が生じ、それが二度目の刺激に対して異なる応答を可能にする」ことも考えられていた。本研究では、この「記憶」機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、ハエトリソウにおいてトランスジェニック技術を確認し、カルシウムセンサーを発現する植物体を作成することにより、葉身のカルシウム動態を可視化し、記憶が「どの部位で」保持されるのかを明らかにすることを目的とした。また、各種の薬剤処理が運動に必要な刺激回数や記憶の持続時間に与える影響を検証し、どのような分子機構が記憶に関与しているかを解明することを目指した。得られた場所と分子機構に関する情報をもとに、電気生理学や組織学、プロテオミクス解析等のより詳細な解析および局所投与実験等による検証実験を行い、ハエトリソウの記憶の分子メカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) ハエトリソウにおけるトランスジェニック技術を確認する。

(2) カルシウムセンサー発現系統の作出によるカルシウム動態のライブイメージングを行う。センサーラインを観察して、生体内におけるカルシウム動態を解析する。2回の刺激それぞれの記憶保持部候補を調べる。カルシウム蓄積量が記憶の実体かを調べる。

(3) 研究当初は、記憶保持部位候補において刺激後に、「静止膜電位の測定」「クライオ SEM-EDX 法による細胞内外のイオン分布解析」「二次元電気泳動によるタンパク質修飾・分解の網羅的解析」「質量分析法による有機小分子分析およびイメージング質量顕微鏡を用いた局在解析」を行うことを計画したが、カルシウムの蓄積量で記憶場所と分子機構を推定できることがわかったので、これらの実験は行わず、正確なカルシウム量変動を時空間的に解析する実験を行った。

(4) ハエトリソウ記憶細胞への生体検証実験

一連の実験により推定した記憶の分子メカニズムが妥当であるかを調べるために、ハエトリソウ生体を用いたモデルの検証実験を行う。カルシウムイオンの蓄積量による閾値モデルが推定された場合には、顕微注入等の手法により記憶細胞の物質量を操作し、応答に変化が出るかを調べる。たとえば、当該物質の量をあらかじめ底上げしておくことにより、一回の刺激のみで運動が起こる等の変化が起こると予想される。また、タンパク質のリン酸化や分解などによる質的変化が細胞応答を変化させると推定された場合は、遺伝子組み換え体を作って、検証する。以上の実験により、記憶に関する分子メカニズムを解明する。

4. 研究成果

本研究ではまず記憶部位の位置を推定した上で、その部位での分子動態変化の解析を目指している。このことから、まず記憶部位の推定に必要なカルシウムセンサータンパク質を発現したハエトリソウ株の樹立に注力し、形質転換効率の向上に取り組んだ。外来遺伝子の導入に用いるアグロバクテリアの感染効率の向上を目指して条件を検討したところ、黄化した葉(暗所で一カ月程度培養した葉)を形質転換の際の外植片として用いるとアグロバクテリアの感染効率が向上することが分かった。次に、形質転換後の組織片の生存率の向上を目指し、培地の組成・培養環境のそれぞれについて条件を検討した。まず培地の組成を検討したところ、培地のpHを上げて培地に緩衝剤の一種であるMES(2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate)を添加すると、生存率が向上することが分かった。一方、培養環境の条件を検討したところ、形質転換後に暗所で培養し続けることで形質転換した組織の生存率が向上することが分かった。また、形質転換技術を用いてカルシウムセンサー蛍光タンパク質 GCaMP6f 発現ハエトリソウ株の樹立に取り組んだところ、GCaMP6f を発現させたハエトリソウ組織の作成に成功した。この時、作成したGCaMP6f 発現組織に接触刺激を与えたところ、蛍光輝度が変化する様子が観察された。このことから GCaMP6f はハエトリソウ組織においてカルシウムイオンの濃度変化を捉えるのに十分大きい解離定数を持つことが分かった。また、葉身への薬剤の添加によって記憶の分子メカニズムを

推定するために、まずトルイジンブルー溶液を葉身へ添加することで水を吸収する組織を推定した。その結果、腺組織においてのみトルイジンブルー溶液が吸収されることが分かった。

次に、1外植片当たりのアグロバクテリア感染細胞の数を増やし、分裂活性の高い細胞に外来遺伝子を導入することが出来れば、全細胞で GCaMP6f を発現した株が樹立出来るのではないかと考え、より多くの細胞に外来遺伝子を導入できる外植片を検討した。その結果、葉を切断して抹消部を用いることが適していることが分かった。この外植片を用いて形質転換したところ、葉身内で均一に外来遺伝子を発現した形質転換シュートの作製に成功した。確立した形質転換技術を用いてカルシウムセンサータンパク質 GCaMP6f を発現させたハエトリソウ株を樹立した。

樹立した株の感覚毛に機械刺激を与えたところ、二度の機械刺激に応答してカルシウムイオンが葉身の細胞に加算的に蓄積すること、蓄積後は経時的に濃度が減少すること、蓄積は葉身および感覚毛の付け根で観察されることが分かり、「カルシウムイオンの蓄積が記憶を形成する」という仮説を支持する結果が得られた。更にハエトリソウの記憶は20秒前後で消失してしまうが、この現象は蓄積直後から濃度減少をはじめカルシウムイオン動態によって説明できることが分かった。以上のことから、カルシウムイオン動態は記憶機構の性質に合致していることが分かった。

また、葉を葉柄部分で切断し、切断面より薬剤溶液を吸収させるという手法によって薬剤溶液を葉身に吸水させることに成功した。カルシウムイメージングの結果が、「カルシウムイオンの蓄積が記憶を形成する」という仮説を支持したことから、この吸水実験系を用いてカルシウムチャンネルブロッカーであるランタンイオンを含んだ溶液を吸水させたところ、ランタンイオンによりハエトリソウの記憶機能と運動機能が失われることが分かり、カルシウムチャンネルの活性がハエトリソウの記憶機能と運動機能に必要であることが分かった。

カルシウムシグナルは、葉身边縁部にある維管束組織と思われる自家蛍光の強い組織付近で止まっていた。この自家蛍光の強い組織が維管束組織と一致するのかを調べるため、ハエトリソウの葉身を透明化する実験系を立ち上げた。透明化標本を作製したところ、自家蛍光の強い組織は維管束組織であることが確認出来た。以上のことから、カルシウムシグナルは葉身边縁部の維管束組織付近まで到達していることが分かった。

次に、カルシウムシグナルが葉身上を伝播する速度を感覚毛から測定したところ、中央脈方向へ3cm/s、それ以外の方向へ1cm/sの速度で伝達することが分かり、カルシウムシグナルは中央脈方向へ速く伝達する性質があることが分かった。接触刺激により発生することが知られている活動電位は6cm/s ~ 17cm/sの速度で伝播することから、カルシウムシグナルの伝達速度は活動電位よりも遅いことが分かった。

シロイヌナズナでは、創傷刺激によって生じたカルシウムシグナルは異なる葉の間で伝達されることから、ハエトリソウのカルシウムシグナルにおいても同様の性質があるのかを調べた。ハエトリソウの葉身に創傷刺激を与えると、接触刺激を与えた際と同様に葉身全体へカルシウムシグナルが伝達し、このカルシウムシグナルはシロイヌナズナの場合とは異なり他の葉へは伝達しないことが分かった。以上のことからハエトリソウでは、創傷刺激によるカルシウムシグナルは接触刺激によるカルシウムシグナルと同様に葉身間を伝達せず、シロイヌナズナのカルシウムシグナルと異なっていた。ハエトリソウの葉身と葉柄の間にはカルシウムシグナルの伝達を阻害する何らかの仕組みが存在する可能性が考えられた。

本研究のこれまでの結果より、2度の接触刺激に応じた細胞内の加算的なカルシウムイオン濃度の上昇と葉身の閉合運動に相関がみられた。そこで、カルシウムイオン濃度と運動がどのように関わるのかを調べるため、葉身が2度の接触刺激で運動しないように運動阻害した条件と、逆に1度の接触刺激で運動してしまう条件において細胞内のカルシウムイオン濃度の変化を調べた。既往研究から、ハエトリソウの運動機構はカルシウムチャンネルブロッカー「ランタンイオン」を葉身に吸収することによって阻害されることが知られてきたことから、ランタンイオンを吸収させた葉身を用いてカルシウムイメージングする実験系を構築した。

イオン交換水を吸収した葉に2度の接触刺激した場合は細胞内のカルシウムイオン濃度が加算的に2度上昇し、運動が見られた。一方、ランタンイオンを吸収させた葉に接触刺激を与えたところ、1度目の刺激では葉身でカルシウムイオンの濃度上昇が見られるものの、2度目の刺激に応じて濃度上昇せず、2度目の刺激で運動しないことが分かった。

一方、既往研究では35 - 40度で高温栽培した株の葉では、1度の刺激に応じて運動することが知られてきた。そこで、4日間40度で栽培した葉に接触刺激を1度のみ与えてカルシウムイメージングをしたところ、室温栽培の葉で見られるような2度の加算的なカルシウムイオンの濃度上昇が見られ、運動が起こった。以上の結果から、ハエトリソウの運動機構が細胞内カルシウムイオン濃度依存的に制御されている可能性が支持された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Hiraku Suda and Mitsuyasu Hasebe
2. 発表標題 Calcium ion mediated memory system in the carnivorous plant <i>Dionaea muscipula</i>
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsuyasu Hasebe
2. 発表標題 Evolution of Carnivory and movement in Plants
3. 学会等名 Japan Taiwan Plant Biology 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須田啓
2. 発表標題 Real-time cytosolic calcium imaging to elucidate the molecular mechanism of memory system in the Venus flytrap
3. 学会等名 9th International Plant Biomechanics Conference, McGill University（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須田啓
2. 発表標題 ハエトリソウとコモウセンゴケの形質転換技術およびハエトリソウのカルシウムイメージング
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 長谷部光泰
2. 発表標題 Evolution of Plant Carnivory and Movement
3. 学会等名 Naito Conference, Sapporo, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷部光泰
2. 発表標題 Evolution of Plant Carnivory and Movement
3. 学会等名 Annual Meeting of the Society of Molecular Biology, Yokohama, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷部光泰
2. 発表標題 Evolution of Plant Carnivory and Movement
3. 学会等名 Academia Sinica, Taipei, Taiwan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷部光泰
2. 発表標題 Evolution of movement and carnivory in flowering plants
3. 学会等名 CDB Workshop, RIKEN CDB, Kobe, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷部光泰
2. 発表標題 Genome biology to understand the evolution of carnivory and movement in plants
3. 学会等名 International Symposium on Evolutionary Genomics and Bioinformatics, Tzu Chi University, Huaren, Taiwan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須田啓 上田千晴 福島健児 真野弘明 豊田正嗣 玉田洋介 長谷部光泰
2. 発表標題 ハエトリグサとコモウセンゴケにおける形質転換技術の確立
3. 学会等名 日本植物学会 第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須田啓 福島健児 真野弘明 豊田正嗣 玉田洋介 長谷部光泰
2. 発表標題 ハエトリソウの記憶機構解明に向けたカルシウムイオン動態観察
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〕

研究室webページ http://www.nibb.ac.jp/evodevo
--

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