

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06715

研究課題名(和文) 接触感知・細胞同調・収縮運動：三役を一つでこなすオジギソウの新規遺伝子メカニズム

研究課題名(英文) Reverse genetic analysis of the rapid movement of the sensitive plant *Mimosa pudica*

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) 3,300,000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分子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。本研究では、変異体がおじぎ運動に異常を示す3つの遺伝子について、その機能解析を行った。カルシウム動態のライブイメージング、遺伝子の過剰発現システムの作出、変異体のレスキュー実験、タンパク質の局在解析や遺伝子発現部位の解析、チャンネル活性の電気生理学解析等の実験を行った結果、これらの遺伝子産物がどのようにおじぎ運動に関与しているかの一端が明らかとなった。また、変異体を用いたトランスクリプトーム解析から新たな運動関連遺伝子の候補を同定できた。

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。本研究の成果は、オジギソウの運動メカニズムの主要部分に対して遺伝子レベルでの知見を世界で初めて与えたものであり、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 analyzed molecular functions of three gene products whose knock-out lines show impaired movements. We conducted in vivo live imaging of calcium ion concentration, generation of overexpression lines, rescue experiments of the mutants, analysis of subcellular localization of proteins, in situ hybridization, and electrophysiological studies on channel activities. We also found several new candidate genes that may contribute to the rapid movement by a comparative transcriptome analysis of wild type and mutant plants.

研究分野：生物学

キーワード：オジギソウ 運動 ゲノム編集 カルシウム ライブイメージング 電気生理学 チャンネル トランスクリプトーム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

オジギソウは、接触等の刺激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非常に速い植物運動であり、その実現には「接触刺激の感知」「細胞間シグナル伝達」「細胞収縮による運動」の 3 要素をすばやく連携させる必要がある。しかし、おじぎ運動のような高速運動は極めて種特異性の高いものであり、モデル植物において比較対象となるような現象が知られていないため、その速さを生み出す分子メカニズムは謎に包まれている。これまでの研究により我々は、非モデル植物であるオジギソウにおいてトランスジェニック個体の作出技術を確立し、 $\text{Ca}^{2+}$  センサータンパク質の導入による  $\text{Ca}^{2+}$  動態のライブイメージングや CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊を可能にした。さらに、オジギソウのゲノム配列を決定し、運動器官である葉枕のトランスクリプトーム解析からおじぎ運動への関与が期待される候補遺伝子を同定した。遺伝子破壊系統を樹立して運動能の解析を行った結果、「機械刺激受容チャネル *MSL10*」「グルタミン酸受容チャネル *GLR3*」「*AS2/LOB* ドメイン型転写因子 *ASLBD1*」の変異体がおじぎ運動に異常を示すことが明らかとなった。

### 2. 研究の目的

本研究では、同定した 3 つの遺伝子 *MSL10*、*GLR3*、*ASLBD1* の機能解析により、おじぎ運動の分子メカニズムの解明を目指す。本研究では非モデル植物であるオジギソウを研究対象として用いているため、現時点でプロトコルが確立された解析技術は非常に少ない。そのため、モデル植物で用いられている各種の研究手法をオジギソウへ応用し、その実験条件を最適化することは重要な課題である。さらに、高速で動くという現象そのものが植物においては異例であり、その解析においては手法の新規開発も必要となる。上述の遺伝子の機能解析と並行し、オジギソウ研究のためのこうした技術開発を行うことも本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

*MSL10* 遺伝子と *GLR3* 遺伝子はそれぞれイオンチャネルタンパク質をコードし、当該チャネルを介したイオンの流入が速い運動や速い情報伝達に直接的に関わっていると推測される。このため、チャネルタンパク質の細胞内局在や分子機能の解析を行い、おじぎ運動においてこれらがどのような役割を果たしているかを検証した。また、チャネルの過剰発現実験や変異体のレスキュー実験などの遺伝学的手法を用い、*in vivo* における機能をより詳細に解析した。

*ASLBD1* 遺伝子は転写因子をコードし、おじぎ運動への影響は葉枕における遺伝子発現の変化あるいは発生学的な変化を介した間接的なものと考えられる。*ASLBD1* に関してはそのターゲット遺伝子を同定することにより、おじぎ運動に関わる新たな候補遺伝子の発見を目指した。

技術開発面では、 $\text{Ca}^{2+}$  動態の高速度リアルタイムイメージング撮影機器のセットアップを行った。並行して、プロモーター-レポーター系統の作出や *in situ* ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現部位の検出を行い、オジギソウにおける当該技術の利用可能性を探った。

### 4. 研究成果

#### (1) 高感度カメラを用いた $\text{Ca}^{2+}$ 伝播の高速度リアルタイムイメージング解析

オジギソウ葉枕では、刺激により誘起された  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが非常に速い速度で細胞間を伝播する。通常の蛍光実体顕微鏡とカメラの組み合わせではこの伝播の様子を十分な時間解像度で捉えることが困難であった。本研究では、高感度高速度カメラ ORCA-Fusion BT とマクロズーム顕微鏡 MVX10 を組み合わせ、秒間 100 フレームで蛍光動画を撮影できるシステムを構築した。これを用いてオジギソウ小葉枕における  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル伝達を観察した結果、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルは接触刺激を加えた点から同心円状に広がり、数十ミリ秒のオーダーで葉枕の端まで到達することが明らかになった。シグナルの伝達速度はおよそ 1.5 cm/s であった。

#### (2) *mssl10*、*glr3* 変異体の正常 cDNA 導入によるレスキュー実験

*MSL10* 遺伝子と *GLR3* 遺伝子の変異体は、それぞれおじぎ運動のスピード低下および細胞間シグナル伝達のスピード低下という表現型を示す。これらの表現型が *MSL10*、*GLR3* 遺伝子の欠損によるものであり、オフターゲット効果等ではないことを確認するために、正常な cDNA 配列を持ったレスキューコンストラクトを作製し、これを変異体に導入した。その結果、*mssl10*、*glr3* のどちらの変異体においても表現型の部分的な回復が認められ、*MSL10*、*GLR3* 遺伝子の機能がおじぎ運動の速さを生み出していることが裏付けられた。

### ( 3 ) *GLR3* 過剰発現系統の作出と表現型解析

*GLR3* 遺伝子の cDNA を恒常発現プロモーターの下流につなぎ、全身で発現する *GLR3* 過剰発現系統を作出した。接触刺激により誘起されるシグナルは、野生型では羽軸を伝わって次々と小葉の運動を引き起こすものの、羽片の付け根にある副葉枕あるいは複葉全体の基部にある主葉枕の部位で止まり、他の羽片や複葉へ伝わることはない。一方、*GLR3* 過剰発現系統ではシグナルがこの部位で停止せず、植物体全体に伝わって全ての葉を運動させることが判明した。また、羽軸を通る際のシグナルの伝達速度も速くなった。変異体の表現型とあわせ、*GLR3* が細胞間的高速シグナル伝達において中心的な役割を担うことが示唆された。

### ( 4 ) *MSL10*、*GLR3* チャンネルの細胞内局在の解析と発現部位

*MSL10*、*GLR3* の C 末端側に蛍光タンパク質 mClover3 をつないだ融合タンパク質の発現系統を作出し、葉枕の運動細胞における細胞内局在を調べた。その結果、*MSL10*、*GLR3* ともに形質膜上に蛍光シグナルが検出された ( 図 1 )。

### ( 5 ) *MSL10*、*GLR3* 遺伝子の発現部位の解析

*MSL10*、*GLR3* プロモーターの下流に蛍光タンパク質あるいは *GUS* 遺伝子をつないだプロモーター-レポーター系統を作出し、両遺伝子の発現部位を解析した。同様の目的で *in situ* ハイブリダイゼーションによる *MSL10*、*GLR3* 転写産物の検出も行った。その結果、*MSL10*、*GLR3* 両遺伝子ともに葉枕の収縮側の表皮細胞と柔細胞に強く発現していることが明らかになった ( 図 2 )。プロモーター-*GUS* 系統を用いた *GUS* 染色では、葉枕内のシグナルに加えて葉柄や羽軸内の維管束にも染色シグナルが認められた。この結果は、*glr3* 変異体において葉枕間のシグナル伝達にも異常が出ることとよく符合すると考えられた。

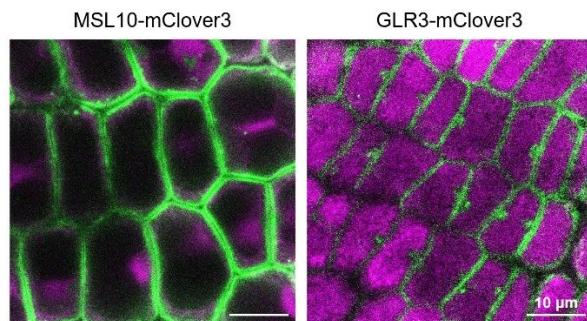


図 1 チャンネルタンパク質の局在解析

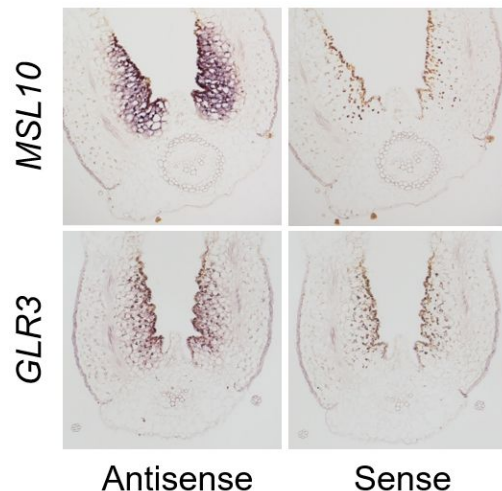


図 2 *in situ* ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現部位の解析

### ( 6 ) 電気生理学的手法を用いた *GLR3* チャンネルのリガンド探索

オジギソウの *GLR3* 遺伝子産物は、配列の相同性からは L-アミノ酸をリガンドとするリガンド開閉型チャンネルであることが予想され、*GLR3* を介した高速シグナル伝達には神経系における化学シナプスのような「リガンドの放出と受容」による伝達様式が使われている可能性が考えられる。一方で、葉枕内で観察されるような高速シグナル伝達には膜電位変化を伴うことが古くから知られており、神経軸索上を流れるのと同様の電気シグナル ( 活動電位 ) が使われているとする仮説が広く支持されている。もし活動電位がシグナルの実体であるならば、オジギソウの *GLR3* チャンネルが膜電位の変化 ( 脱分極 ) により活性化される等の分子メカニズムが想定される。これらの可能性を検証するために、ツメガエルの卵母細胞にオジギソウの *GLR3* チャンネルを発現させ、その活性を電気生理学的手法 ( 二電極法 ) によって検出することを試みた。しかし今回の条件検討の範囲内では、アミノ酸の投与あるいは電位変化のいずれの刺激に対しても *GLR3* チャンネルの応答は検出されなかった ( 図 3 )。 *GLR3* チャンネルの活性測定には、不足している未知因子の共発現あるいは培養細胞等の異なる発現系を用いることが必要と考えられた。

### ( 7 ) 転写因子 *ASLBD1* によって制御される下流遺伝子群の探索

*aslbd1* 変異体と野生型の葉枕（主、副、小）を用い、発現遺伝子のトランスクリプトーム比較を行った。その結果、*aslbd1* 変異体の葉枕において *MSL10*、*GLR3*、*ASLBD1* 自身の遺伝子発現が顕著に低下していることが明らかになり、運動性能の低下は *MSL10* および *GLR3* の発現低下に起因する可能性が示唆された。この他にも *aslbd1* 変異体において発現低下を示す遺伝子がいくつか同定できており、これらの機能解析を行うことでおじぎ運動の分子メカニズムにさらに迫れると期待している。

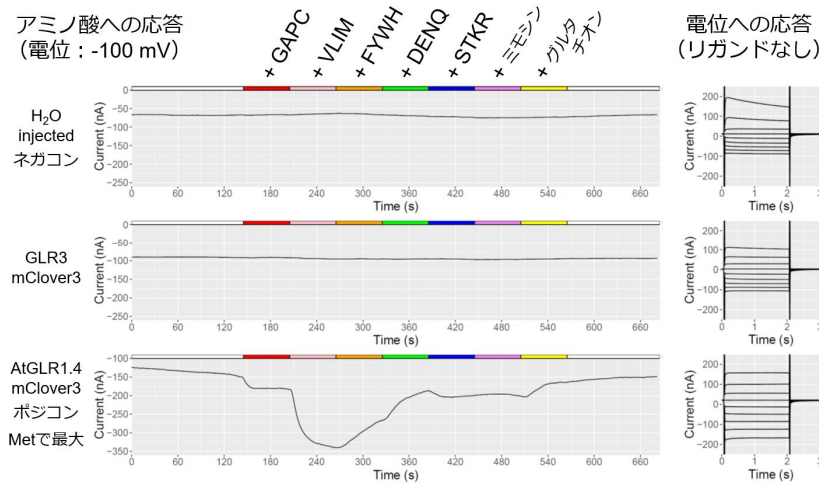
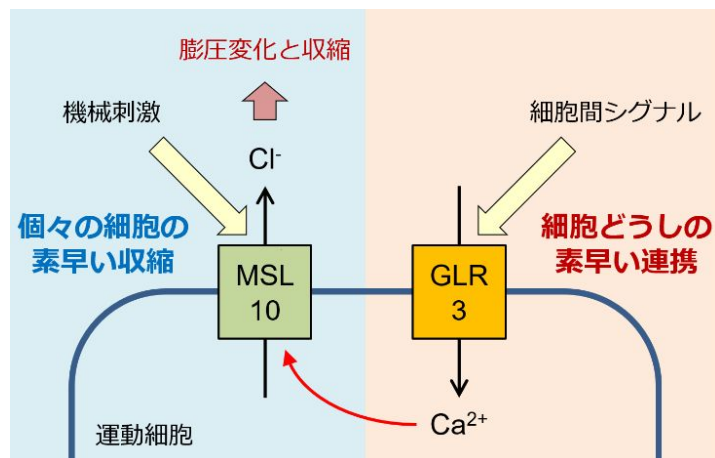


図 3  
オジギソウ GLR3 の  
電気生理学的解析

図 4 おじぎ運動の分子  
メカニズム（モデル）

本研究の成果から、*MSL10* チャンネルは個々の運動細胞をすばやく収縮させる役割を担い、*GLR3* チャンネルは細胞間的高速同調に関する可能性が示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hagihara Takuma, Mano Hiroaki, Miura Tomohiro, Hasebe Mitsuyasu, Toyota Masatsugu	4. 巻 13
2. 論文標題 Calcium-mediated rapid movements defend against herbivorous insects in Mimosa pudica	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34106-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 真野 弘明	4. 巻 93
2. 論文標題 オジギソウのすばやい運動の謎	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 科学	6. 最初と最後の頁 308-311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Suda Hiraku, Mano Hiroaki, Toyota Masatsugu, Fukushima Kenji, Mimura Tetsuro, Tsutsui Izuo, Hedrich Rainer, Tamada Yosuke, Hasebe Mitsuyasu	4. 巻 6
2. 論文標題 Calcium dynamics during trap closure visualized in transgenic Venus flytrap	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 1219 ~ 1224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-020-00773-1	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 該当する

1. 著者名 Mano Hiroaki, Hasebe Mitsuyasu	4. 巻 134
2. 論文標題 Rapid movements in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 3 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-020-01243-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0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 オジギソウの運動に関わるチャネル遺伝子群の機能解析
3. 学会等名 日本植物学会 第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田 真道・真野 弘明・Chao-Li Huang・西山 智明・重信 秀治・長谷部 光泰
2. 発表標題 オジギソウの運動に関与する新規LOB型転写因子の機能解析
3. 学会等名 日本植物学会 第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田 真道・真野 弘明・Chao-Li Huang・西山 智明・重信 秀治・長谷部 光泰
2. 発表標題 オジギソウの運動に関与するAS2/LOB ドメイン型転写因子の機能解析
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会大会
4. 発表年 2021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			
その他の国・地域（台湾）	国立成功大学			