

パラボリックフライトにおける重力に応じたヒメツリガネゴケ細胞内カルシウムイオン動態のライブイメージング解析

日渡 祐二（宮城大・食産業），達 ローレンス かおる（宮城大・院・食産業），蒲池浩之（富山大・理），唐原一郎（富山大・理），半場祐子（京工繊大・応用生物），久米篤（九大・院・農），藤田知道（北大・院・理），鈴木智美（JAXA），嶋津徹（JSF）

Live-imaging of cytoplasmic Ca^{2+} concentration of the *Physcomitrium* cells in response to gravity during parabolic flights

Yuji Hiwatashi^{*1,2}, Kaoru Lorence Tsuji², Hiroyuki Kamachi³, Ichirou Karahara³, Yuko T. Hanba⁴, Atsushi Kume⁵, Tomomi Suzuki⁶, Toru Shimazu⁷, Tomomichi Fujita⁸

¹School of Food Industrial Sci., Miyagi Univ., Sendai, 982-0215 Japan, ²Graduate School of Agri., Food, Environ., Sci., Miyagi Univ., ³Faculty of Science, Univ. of Toyama, ⁴Faculty of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, ⁵Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., ⁶Japan Aerospace Exploration Agency, ⁷Japan Space Forum, ⁸Faculty of Science, Hokkaido Univ.

*E-Mail: hiwatash@myu.ac.jp

Abstract: Sessile land plants are exposed to various kinds of environmental stresses. Proper responses to the environmental stimuli are essential for the survival of land plants. Gravity is one of the stimuli that influence plant growth. The moss *Physcomitrium patens* exhibits an increase in rhizoid length under hypergravity conditions such as 10 G, indicating that tip growth of rhizoid apical cells is enhanced by gravitational acceleration. However, little is known about the mechanism of signal transduction in the gravitational response of the apical cells. We investigated the role of cytoplasmic calcium ion ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) because it has been implicated as a vital factor in regulating both tip growth and gravitational response. Under hypergravity and microgravity conditions provided by parabolic flights, the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ of the apical cells stably expressing GCaMP6f as a Ca^{2+} probe was observed microscopically. In the apical cells, hypergravity caused a rapid $[\text{Ca}^{2+}]_c$ increase, whereas microgravity led a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ decrease. These results suggest that $[\text{Ca}^{2+}]_c$ is a signalling factor in the moss rhizoids that respond to gravitational changes.

Key words; Plant, moss, *Physcomitrium patens*, hypergravity, microgravity, Ca^{2+} , parabolic flight, Imaging

1. はじめに

陸上植物は一度地面に根を生やすと、その場から動けない固着性の生物である。故に常に周囲の環境からの刺激に適切に応答しながら生存している。植物は約4.9億年前に水中から陸上へ生息域を広げたと推定されている¹⁾が、この植物の陸上進出には、陸上環境に適応するメカニズムの進化が必要だったと考えられる。どのようなメカニズムによって陸上に出現できるようになったかを推定するためには、多様な植物の環境応答メカニズムを解明し、そのメカニズムの普遍性と多様性を把握することが端緒となるはずである。

植物は動物とは独立に進化した重力刺激応答を示し、重力ベクトルに対する成長（重力屈性）や重力の大きさに応じた反応（抗重力反応）を行う。被子植物を用いた解析により、組織や器官レベルで重力応答の分子メカニズムが明らかにされつつある^{2,3)}。しかしながら、細胞レベルの分子メカニズムは不明な点

が多く、また、被子植物以外の植物重力応答の解析例が少ないため、植物進化に伴い、重力応答メカニズムがどのように獲得されてきたかについてはほとんど未解明である。

近年、陸上植物の系統の基部で分岐したコケ植物ヒメツリガネゴケ（*Physcomitrium patens*）では過重力刺激を与えるとバイオマスが増加することが発見された^{4,5)}。ヒメツリガネゴケでは、茎葉構造を持つ茎葉体の基部から仮根（Rhizoid）と呼ばれる糸状の組織が形成される（Fig. 1A）。過重力刺激（~10 G）により、この仮根の成長は促進されるが、どのような細胞内シグナル伝達が活性化し、細胞が重力応答するのかはわかっていない。本研究では、抗重力反応における細胞内シグナル伝達の実体を明らかにするために、カルシウムイオン（ Ca^{2+} ）が関与するシグナル伝達系に着目した。

これまでに我々は、ヒメツリガネゴケにおいて生

きた細胞中の Ca^{2+} 濃度を解析するために、 Ca^{2+} プローブによる Ca^{2+} 可視化ヒメツリガネゴケ系統を作出している。そこで、航空機のパラボリックフライトにおいて作り出される過重力および微小重力条件下で、 Ca^{2+} 可視化系統を顕微鏡で観察し、重力変動に応じた細胞内 Ca^{2+} 濃度を検出することに成功した。本発表では、(1) 重力刺激がヒメツリガネゴケ仮根の先端成長に与える影響、(2) 先端成長における Ca^{2+} の役割を論じ、(3) パラボリックフライトにおける Ca^{2+} 動態のライブイメージング解析について紹介する。

2. 仮根の成長と重力の影響

仮根は、茎葉体基部から形成される糸状組織である⁹⁾。糸状組織の先端には仮根頂端幹細胞が存在し、この頂端幹細胞が頂端側でのみ伸長（即ち、先端成長）しながら、分裂することによって糸状細胞列が形成される（Fig.1B）。ヒメツリガネゴケを遠心しながら25日間育成したところ、2.3 G、4.0 G、7.1 Gの3つの過重力条件で、1 Gに比べて仮根が長くなった⁵⁾。仮根の長さは仮根頂端幹細胞が示す先端成長の伸長速度に依存し、この結果は過重力条件で伸長速度が上昇したと解釈できることから、仮根の伸長速度は、重力刺激により変化すると考えられる。

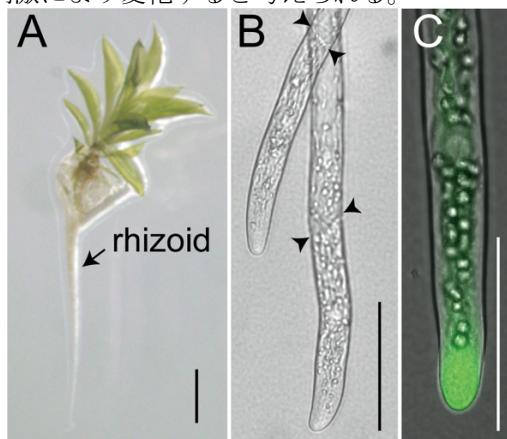


Fig.1 Rhizoids in *Physcomitrium patens*.

(A) Rhizoid (arrow) emerged from a basal part of a gametophore. (B) Rhizoid apical and subapical cells. Arrowheads indicate the position of septa. (C) The GCaMP6f fluorescence (green) in a rhizoid apical cell. A bar in (A) = 1 mm, bars in (B) and (C) = 50 μm .

3. Ca^{2+} の先端成長への関与とイメージング

先端成長する細胞では、細胞内 Ca^{2+} 濃度（以後、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と記載）が変化することが知られている。被子植物の花粉管や根毛の細胞では、先端成長の伸長領域を最大とする $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の勾配が見られ、この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 勾配が伸長速度の変化に相関して周期的に変動している⁷⁾。従って、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は先端成長を制御する細胞内シグナル伝達の構成因子であると考えられている。ヒメツリガネゴケにおいても先端成長を示す細胞で、

FRETを利用した Ca^{2+} プローブ（Yellow Cameleon）により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の分布が調べられた⁸⁾。その結果、先端成長する原糸体頂端幹細胞でも、伸長領域で高い $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が検出され、基部側に向かって徐々に低くなる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の勾配を作っていることがわかった。また、花粉管と同じように、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の周期的変動も検出された。従って、ヒメツリガネゴケにおいても、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が先端成長を制御する因子として機能するようである⁸⁾。

Ca^{2+} イメージングの進展に伴い、高感度かつ検出が容易な Ca^{2+} プローブが開発されている。我々は、ヒメツリガネゴケにおける Ca^{2+} を介したシグナル伝達を高感度に解析するために、 Ca^{2+} を可視化できるプローブとして高輝度・高感度であり、秒単位の Ca^{2+} 変動も検出可能な GaMP6f⁹⁾を選択し、この GCaMP6f を安定的に発現する Ca^{2+} 可視化系統を作出した。GCaMP6f は一波長励起一波長測定タイプの蛍光プローブで、緑色蛍光タンパク質（GFP）を観察できる顕微鏡であれば簡単に Ca^{2+} を可視化することができる。この Ca^{2+} 可視化系統で原糸体頂端幹細胞の先端成長領域を観察したところ、先行研究で示された伸長領域における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の勾配と周期的な変動を検出した。さらに、仮根の先端成長を調べたところ、仮根頂端幹細胞においても同様の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の勾配と周期的な変動が観察された（Fig.1C）。従って、仮根でも伸長領域で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の勾配と周期的な変動が作り出されており、伸長速度の制御に関与している可能性が考えられた。

4. パラボリックフライトにおける細胞内 Ca^{2+} の変動

重力応答において、 Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして細胞内のシグナル伝達に関わっていることが知られている。シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）やアズキ（*Vigna angularis*）の過重力実験では機械受容イオンチャネルの関与が示唆され、 Ca^{2+} が細胞内セカンドメッセンジャーとしてはたらくと考えられている^{10,11)}。パラボリックフライトを利用したシロイヌナズナの重力応答では、 μG の間に植物体を 180° 回転させ、その後 0.5 G から 2 G の重力刺激を与えると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が一過的に高くなることがわかっている¹²⁾。これらの解析から、重力の大きさが変化する場合に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ がセカンドメッセンジャーとしてシグナル伝達に機能することが示唆される。

我々は、重力刺激によって仮根頂端幹細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ がどのように変化するかを明らかにするために、ヒメツリガネゴケ Ca^{2+} 可視化系統が蛍光観察できる顕微鏡システムを航空機内に組み上げ、パラボリックフライト中の重力変化に応じた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変動を解析した。本実験では、航空機 MU-300 に蛍光倒立顕微鏡 DM IL LED（Leica）を設置し、20×対物レンズ PLAN APO 20x/0.7（Leica）で細胞を観察した。観察に用いる Ca^{2+} 可視化系統については、事前にプラスチックベースディッシュ $\mu\text{-dish}$ （ibidi）上の寒天培地で培養

し、顕微鏡のステージに置いた後に、デジタルカメラ HC170HD (Leica) を用いて蛍光像をフルハイビジョン撮影 (1080p) で取得した。その後、画像を画像解析ソフト Fiji で解析した。

パラボリックフライトでは、1 G から 2 G の過重力条件を経た後に、約 20 秒間の μG の微小重力条件となる。この重力変化に応じて、顕微鏡ステージの Z 軸が変化し、細胞の焦点のずれ (フォーカスドリフト) が起きた。特に 2 G から μG への移行時に、顕著なフォーカスドリフトが生じた。そこで、重力変化時にリアルタイムで Z 軸を手動調整することにより、細胞への合焦点を維持した。

合焦点が維持された仮根頂端幹細胞について、重力変化時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変動を調べるために、細胞頂端の伸長領域と細胞中央領域の GCaMP6f 蛍光輝度を測定したところ、複数の細胞で、2 G では 1 G に比べて蛍光輝度が高くなり、また 2 G から μG になると蛍光輝度が低下する傾向があった。この結果は、2 G で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が一過的に上昇し、その後、 μG で減少することを示唆している。また、このような重力変化に応じた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の動態は、細胞の先端領域、中央領域のどちらでも観察された。1 G の通常培養では、細胞先端の伸長領域で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が周期的に変動し、短時間で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が調節されるしくみがあると考えられるが、重力応答時では先端領域のみならず細胞中央領域でも短時間に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が調節される可能性が示された。従って、細胞中央領域でも重力感受後に短時間に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を制御するしくみがあるのかもしれない。但し、先端領域で上昇した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が中央領域に流入している可能性もあり、両者を区別する実験が必要であろう。

以上の解析から、ヒメツリガネゴケ仮根の頂端幹細胞は過重力で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が高くなり、微小重力で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が低くなる可能性があることがわかった。重力感受後のシグナル伝達として、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を過重力の場合には上昇、一方微小重力では低下させて下流のシグナルを調整するしくみが想定される。今後、このような重力応答時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 制御メカニズムを明らかにすることが不可欠であるが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増減させる直接的因子として Ca^{2+} チャネルの機能解析はメカニズム解明の糸口になると思われる。事実、 Gd^{3+} や La^{3+} といった Ca^{2+} チャネル阻害剤処理によりヒメツリガネゴケ先端成長の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 勾配と周期的変動が消失し、伸長が停止することを見出している。 Gd^{3+} や La^{3+} で阻害される Ca^{2+} チャネルが重力応答メカニズム解明のターゲットになるかもしれない。

5. 謝辞

航空機実験は、JAXA の貫井氏、AES の福山氏、DAS の松崎氏のご支援の下で実施しました。紙上を借りて御礼申し上げます。本研究は、JAXA の「きぼう」利用フィジビリティスタディ「宇宙におけるコケ

植物の環境応答と宇宙利用 (スペース・モス)」の一環として実施しました。

参考文献

- 1) Donoghue, P.C.J., Harrison, C.J., Paps, J. and Schneider, H.; The evolutionary emergence of land plants. *Curr. Biol.*, **31**, R1281-R1298. (2021).
- 2) Nakamura, M., Nishimura, T. and Morita, M.T.; Gravity sensing and signal conversion in plant gravitropism. *J. Exp. Bot.*, **70**, 3495-3506. (2019).
- 3) Soga, K.; Resistance of plants to gravitational force. *J. Plant Res.*, **126**, 589-596. (2013).
- 4) Takemura, K., Watanabe, R., Kameishi, R., Sakaguchi, N., Kamachi, H., Kume, A., Karahara, I., Hanba, Y.T. and Fujita, T.; Hypergravity of 10g changes plant growth, anatomy, chloroplast size, and photosynthesis in the moss *Physcomitrella patens*. *Microgravity Sci. Tech.*, **29**, 467-473. (2017).
- 5) Takemura, K., Kamachi, H., Kume, A., Fujita, T., Karahara, I. and Hanba, Y.T.; A hypergravity environment increases chloroplast size, photosynthesis, and plant growth in the moss *Physcomitrella patens*. *J. Plant Res.*, **130**, 181-192. (2017).
- 6) Sakakibara, K., Nishiyama, T., Sumikawa, N., Kofuji, R., Murata, T. and Hasebe, M.; Involvement of auxin and a homeodomain-leucine zipper I gene in rhizoid development of the moss *Physcomitrella patens*. *Development*, **130**, 4835-4846. (2003).
- 7) Hepler, P.K.; Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell*, **17**, 2142-2155. (2005).
- 8) Bascom, C.S., Jr., Winship, L.J. and Bezanilla, M.; Simultaneous imaging and functional studies reveal a tight correlation between calcium and actin networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E2869-E2878. (2018).
- 9) Chen, T.W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohuan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V. et al.; Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, **499**, 295-300. (2013).
- 10) Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S. and Hoson, T.; Gravitropism in growth inhibition of plant shoots under hypergravity conditions produced by centrifugation is independent of that in gravitropism and may involve mechanoreceptors. *Planta*, **218**, 1054-1061. (2004).
- 11) Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S. and Hoson, T.; Mechanoreceptors rather than sedimentable amyloplasts perceive the gravity signal in hypergravity-induced inhibition of root growth in azuki bean. *Funct. Plant Biol.*, **32**, 175-179. (2005).
- 12) Toyota, M., Furuichi, T., Sokabe, M. and Tatsumi, H.; Analyses of a gravistimulation-specific Ca^{2+} signature in Arabidopsis using parabolic flights. *Plant Physiol.*, **163**, 543-554. (2013).