

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「多細胞間での時空間的相互作用の理  
解を目指した定量的解析基盤の創出」  
研究課題「植物ホルモンフローアトラスの構築」

## 研究終了報告書

研究期間 2019年10月～2025年03月

研究代表者：土屋 雄一朗  
(名古屋大学 トランスフォーマティブ生  
命分子研究所 特任教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

研究チーム全体として、オーキシンをモデルケースとして、植物ホルモンの細胞間の移動を可視化する技術開発し、得られたデータから数理モデルを構築する研究を行なった。以下全ての項において、全員参加の議論で多方面から検討し方針を決定した。

### 1-1: プローブ開発

開始当初に得られていたプロトタイプは、*in vitro* でのアンケージングに成功したものの細胞内では機能しなかった。蛍光、消光、アンケージといった複数の光操作を伴う機能を小分子に詰め込むことでユニット間の干渉が起ると想定されたため、まず、南保 G が提案した候補分子を土方 G が量子化学計算により絞り込み、その結果をもとに南保 G が有機合成したプローブを佐藤 G と土屋 G が生体内で機能検証を行うという研究サイクルで開発を進めた。消光ユニットとケージユニットの分割、蛍光分子の選択、細胞内での挙動、植物体への取り込み等の検討を行い、20 を超える候補分子の検証を経て、期待された機能を持つ BLACK-IAA4 の開発に成功した。このプローブを 405 nm の光でアンケージすることで、蛍光分子 BODIPY と繋いだインドール酢酸(IAA)を放出する仕組みである。

### 1-2: 顕微鏡でのアンケージングとイメージング

プローブの開発とともに、顕微鏡下でアンケージし、その後の蛍光の追跡をタイムラプスイメージングで行う条件の検討を佐藤 G を中心に進めた。材料として、フィラメント上に一次元成長を起こすヒメツリガネゴケ、モデル植物であるシロイスナズナ、および非モデル生物の寄生植物であるセイヨウヒキヨモギ(*Pv*)を用いた。プローブを与える条件、アンケージと観察の最適化といった改良をプローブの開発とともに進め、BLACK-IAA4 を開発した時点で初めて、ヒメツリガネゴケの 1 つの細胞でアンケージ後、数秒後に隣の細胞で蛍光が観察されるムービーを撮影することに成功した。さらに取り込み条件等の改良を進め、3 次元組織であるシロイスナズナの根でのアンケージと、その細胞からの BODIPY-IAA の移動を観察することに成功した。

### 1-3: 数理モデルの構築

上記で佐藤 G により得られたムービーデータより細胞ごとに蛍光輝度を取得し、それぞれの細胞の蛍光輝度の時間変化より移動速度のパラメーターをモデリングにより取得する計算方法の開発を土方 G を中心に行なった。この過程で、材料として使っていたヒメツリガネゴケの原糸体が細胞によってかなり異なる挙動を示すことが明らかとなつたため、同一細胞で複数回アンケージすることで試行回数を増やしつつ発生する BODIPY-IAA 量を変化させた条件での挙動を観察する工夫を行なった。当初は、フィッティングより設定した多数のパラメーターの取得を試みたが、パラメーターの初期設定値に大きな影響を受けるため良好なフィッティング結果がられなかつた。そこで、アンケージ細胞からの蛍光の減少、隣接する二つの細胞へのみかけ上の移動、それぞれへの流出と流入、という 3 段階でのフィッティング、およびパラメーターの統一などの単純化を行うことで、隣接する細胞への BODIPY-IAA の移動をミカエリスマテン定数である  $K_m$  と  $V_{max}$  という二つのパラメーターで記述することに成功し、先端側の細胞への移動が早いといふこれまでの予想と一致する結果を得ることができた。

### 1-4: 研究のさらなる展開

開発した BODIPY-IAA は、ケージング機能を持たずともそれ自身が有用なツールであったため、佐藤 G によるヒメツリガネゴケのカウロネマ細胞の分化におけるサイトカインによるオーキシン輸送の制御、青山研究員によるオーキシンの細胞内局在を制御するケミカルスクリーニング、土屋 G での寄生植物の誘引反応におけるオーキシンの局在解析、また寄生植物の吸器形成におけるオーキシンの局在解析、重力応答制御のレポーターとしての利用といった領域内外の共同研究へと発展した。また、本技術は蛍光アブシジン酸へと応用され、土屋 G による気孔への蓄積制御の解析、種子中での種皮から胚への BODIPY-IAA の移動、寄生植物であるストライガにおける ABA 局在解析等で威力を發揮した。さらに、ガス性ホルモンであるエチレンのケージングにも成功し、ガス性シグナル分子投与の精密な制御への道を切り開いた。

## (2)顕著な成果

### <優れた基礎研究としての成果>

#### 1.オーキシンが細胞間を移動する様子を観察することに初めて成功

概要: GFP を利用できるタンパク質とは異なり、低分子化合物の細胞間の移動に関する知見は極めて限られている。本研究で開発した BLACK-IAA は、生きた植物内でのオーキシンの移動を可視化する技術であり、ダーウィンの理論を直接的に証明した世界初の例と言える。本技術を活用することで、輸送体機能の生体内での解析や、ホルモンフローと生理応答の関係性を 1 細胞レベルで解析することへと展開することが期待される。

#### 2.高等植物でのオーキシンフローの可視化に初めて成功

概要: オーキシンの蓄積の変化は高等植物の屈性等様々な生理現象に関連するが、オーキシンの移動を計測する技術なしに議論を進めるのは限界がある。輸送体の発現パターンやオーキシン応答レポーターのパターンから類推する現状を進め、細胞レベルでの輸送を定量化する本技術は植物学にブレークスルーをもたらすものと期待される。

#### 3.寄生植物の新たな能力の発見

概要: 寄生植物の生理・生態の大部分は未解明である。本研究より、ストリゴラクトンが寄生植物の根の重力応答を抑圧すること、未同定の揮発性誘引因子が存在することが初めて確認され、宿主への誘引という新たな生命現象の仕組みの一端が明らかとなった。揮発性誘引因子のシグナル伝達機構の解明や、新たな植物ホルモンの発見へと展開することが期待される。

### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

#### 1.低分子化合物の組織内の移動を細胞レベルで観測する技術

概要: 内生のシグナル分子に限らず、代謝物や薬剤の組織内での移動を可視化する技術は限られており、我々が知る限り、顕微鏡で直接的に観察する手法は存在しない。本研究では植物ホルモンを対象としているが、BLACK 自体はどんな分子にも応用できる汎用性の高いものである。例えば、がん細胞や神経細胞など、複雑でヘテロな細胞群のネットワークにおける低分子化合物の挙動を解析する技術として発展することが期待される。

#### 2.新たな寄生植物防除への展開

概要: アフリカで甚大な被害を引き起こす寄生植物ストライガへの対策として、人工ストリゴラクトンを用いた自殺発芽が注目されてきた。本研究より、揮発性の誘引因子の存在が明らかとなつたため、その構造を決定することで、宿主植物の位置を発見できなくなる薬剤、ストライガの忌避剤の開発や、誘引因子を作らない作物の育種等への発展が期待される。

#### 3.ガス性分子のケージ化

概要: 生体内でのガス性分子のシグナル分子としての機能に関する研究は盛んに行われているが、ガスという性質上、生体への投与を正確に制御するのは困難である。顕微鏡下でピンポイントでガスを発生させる本技術で定量的な解析が可能となり、研究分野を大きく発展させる可能性を秘めたものといえる。

### <代表的な論文>

1. Kakishi Uno, Nagisa Sugimoto, Yoshikatsu Sato\* (2021) N-aryl pyrido cyanine derivatives are nuclear and organelle DNA markers for two-photon and super-resolution imaging  
Nat Commun 12 2650 DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23019-w>

概要: DNA 蛍光染色試薬として新規のピリドシアニンを母骨格とする様々な可視光で励起できる DNA 蛍光染色試薬を開発し、Kakshine と命名した。Kakshine は RNA に対する高い DNA 選択性、高細胞透過性、低毒性という秀逸な性能を示し、オルガネラ DNA 染色性に加え、二光子顕微鏡、蛍光寿命顕微鏡、STED 超解像顕微鏡などの先端顕微鏡システムにも親

和性があり、従来の汎用 DNA 蛍光染色試薬である Hoechst, SYBR-Green に対し圧倒的な優位性がある。

2. Jia Xin Yap and Yuichiro Tsuchiya\* (2023) Gibberellins promote seed conditioning by up-regulating strigolactone receptors in the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Plant Cell Physiol* DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcad056>

概要: ジベレリンは通常の植物の発芽を刺激する植物ホルモンであるが、寄生植物であるストライガにおいては発芽を直接的に刺激せず、ストリゴラクトン受容体の発現を増加させることで、宿主植物が放出するストリゴラクトンを感じて発芽を起こす機能を持つことを明らかとした。

3. Jia Xin Yap and Yuichiro Tsuchiya\* (2024) Assessing Seed Germination Response of Parasitic Plant *Striga hermonthica* with Small-Molecule Probes. *Methods Mol Biol* DOI: 10.1007/978-1-0716-3965-8\_5

概要: 寄生植物ストライガのハンドリング、発芽試験、蛍光プローブを用いた観察に関するプロトコールを執筆した。

## § 2 研究実施体制

### (1)研究チームの体制について

#### ① 土屋グループ

研究代表者: 土屋 雄一朗 (名古屋大学 ITbM 特任教授)

##### 研究項目

- ・蛍光ターンオン型ケージ技術の確立と検証
- ・様々な植物ホルモンへの応用
- ・寄生植物ストライガの寄生能力の解明

#### ② 南保グループ

研究代表者: 南保 正和 (名古屋大学 ITbM 特任准教授)

##### 研究項目

- ・オーキシンをモデルとした蛍光ターンオン型ケージ技術の確立
- ・多重染色を指向したケージド植物ホルモンの開発
- ・ケージドエチレンの開発と機能検証

#### ③ 佐藤グループ

研究代表者: 佐藤 良勝 (名古屋大学 ITbM 特任准教授)

##### 研究項目

- ・新規蛍光オーキシンの評価及び観察系の開発
- ・ケージド蛍光オーキシンの顕微鏡下におけるアンケージング技術の開発
- ・定量的なオーキシンフロー解析技術の開発
- ・プロリン IAA と IAPM24 を用いた細胞間オーキシン輸送の検出

#### ④ 土方グループ

研究代表者: 土方 優 (名古屋大学大学 脱炭素社会創造センター 特任准教授)

##### 研究項目

- ・独自開発分子(BLACK)の細胞間移動を記述する数理モデルの構築
- ・構築した数理モデルを用いた解析

### (2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・ 林 謙一郎 (岡山大学 教授)

オーキシン関連のケミカルプローブの第一人者である林教授より、分子設計や実験設定に関するアドバイスを受けています。また、林教授が進める細菌の酵素を利用したオーキシン発生法などに関して、共同研究という形で貢献している。

- ・ 榎本悟史（北海道大学・助教）  
　　蛍光オーキシン BODIPY-IAA2 を用いたモデル植物ゼニゴケにおけるオーキシン動態の解析について共同研究を進めている。
- ・ 藤田チーム（CREST 内）  
　　南保グループと共同で開発したアルキンタグを付加したオーキシンラマンプローブの観察法の確立について共同研究を進めている。
- ・ 塚田祐基（名古屋大学・助教）  
　　水平光軸顕微鏡システムの作成において、主に  $\mu$ Manager によるソフトウェア制御について共同研究を進めている。
- ・ 西村浩平（名古屋大学・講師）  
　　ケージド Ad-IAA を用いたデグロンシステムの構築に関する共同研究を行っている。
- ・ 森田（寺尾）美代（基礎生物研究所・教授）  
　　BODIPY-IAA を用いた重力応答におけるオーキシン局在変化の可視化に関する共同研究を行っている。
- ・ Charles Melnyk(Swedish University of Agricultural Science・Professor)  
　　BODIPY-IAA を用いた寄生植物の吸器形成過程の可視化に関する共同研究を行っている。