

氏 名 須田 啓

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2201 号

学位授与の日付 2020 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Analysis of the memory system in *Dionaea muscipula*

論文審査委員 主 査 教授 上野 直人

教授 長谷部 光泰

准教授 野中 茂紀

教授 朽津 和幸

東京理科大学 理工学部

(様式3)

## 博士論文の要旨

氏名 Suda, Hiraku

論文題目 Analysis of the memory system in *Dionaea muscipula*  
(ハエトリソウの記憶機構の解析)

The leaves of the carnivorous plant Venus flytrap, *Dionaea muscipula* (*Dionaea*) close rapidly to capture prey. The closure response usually requires two successive mechanical stimuli to sensory hairs on the leaf blade within approximately 30 seconds. An unknown system in *Dionaea* is thought to memorize the first stimulus and transduce the signal from the sensory hair to the leaf blade. In the short-term memory system of *Dionaea*, the second stimulus to any of six sensory hairs can trigger movement, regardless of which hair received the first stimulus. Previous studies showed that mechanical stimulation of a sensory hair generates action potentials that propagate to both lobes of the leaf. Other studies have shown that leaf closure is blocked by  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitors that should inhibit the increase of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) of leaf cells, emphasizing the importance of  $\text{Ca}^{2+}$  in the response. Based on these results, the mechanism of *Dionaea* memory has been proposed to be as follows: 1)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  increases during excitation; 2)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  or the concentration of some  $\text{Ca}^{2+}$ -activated regulatory molecules must reach a threshold for movement; 3) a single action potential is not enough to increase  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  to the threshold, and at least two action potentials are necessary to trigger movement; 4)  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  decreases after the first stimulus, and after 30 s does not reach the threshold even with a second stimulus. This hypothesis has not been directly tested because of the lack of a method for spatiotemporal calcium monitoring in *Dionaea*.

Since the transformation of *Dionaea* has not been reported, to observe

spatiotemporal cytosolic  $[Ca^{2+}]$  changes in *Dionaea*, I established the transformation method of *Dionaea* using agrobacterium, and produced plants transformed with a construct for constitutive expression of the calcium sensor protein GCaMP6f in the cytosol. Stimulation of a sensory hair to the GCaMP6f transgenic *Dionaea* caused cpEGFP fluorescence increase at the base of the hair, where the sensory cells that generate action potentials are located. Fluorescence spread radially from the sensory hair to the surrounding leaf tissue. Fluorescence increase following a second stimulus propagated at mostly the same area as the first stimulus did, and the leaf closed. Quantification analysis of the fluorescence intensity showed that the first stimulus triggered an elevation in fluorescence intensity, which then gradually decreased, and fluorescence increased additively in response to the second stimulus, and then the leaf closed. The maximum fluorescence intensity after the second stimulus was higher than that reached after the first stimulus. Logistic regression analysis using the standardized fluorescence intensity immediately before the second stimulus ( $F_{res}$ ), and the maximum standardized fluorescence intensity just after the second stimulus ( $F_{max}$ ) showed that both  $F_{max}$  and  $F_{res}$  significantly correlated with leaf closure. These results indicate that there are putative  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  thresholds for immediately before and after the second stimulus that should be met for movement to occur. Decay of the calcium intensity after the  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increase by the first stimulus showed that  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  decreased with time in the leaf, and  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  decayed to the calculated threshold within the time that leaf can retain the memory information. These results indicate that the 30-second length of memory is explained by the decay of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . Artificial  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increase was triggered by immersion of the basal part of petioles in water and the leaves closed. Before the leaf closure,  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  signals reached to the putative threshold. Furthermore, artificial inhibition of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  increase by immersion of the whole leaves in the calcium channel blocker  $La^{3+}$  solution inhibited  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  elevation and leaf movement following the second stimulus. These results support the

hypothesis that leaf movement is triggered only when the  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  surpasses the threshold for the movement.

This study shows that (1) the first mechanical stimulus to a sensory hair increases  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  in the leaf tissue responsible for movement, (2) the elevated  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  decreases two-phase exponentially after the first stimulus, (3) the second stimulus additively increases  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ , (4)  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  meets a putative threshold for movement after the second stimulus, and (5) the time course of  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  decay after the first stimulus and the putative  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  threshold for movement are consistent with memory system in *Dionaea*. Further studies on *Dionaea* leaf movement using reverse genetics will reveal the molecular mechanisms of calcium dynamics to trigger the movement especially on the relationships of  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  change to mechanical stimuli, action potentials, and turgor changes to trigger the movement.



## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 須田 啓

論文題目 Analysis of the memory system in *Dionaea muscipula*

食虫植物は、葉で小動物を誘引、捕獲、消化、吸収することにより、貧栄養で根から十分な栄養を得られない土地でも生育できる植物である。ハエトリソウは北米東部に自生し、葉の表面にある6本の感覚毛を2回連続して機械刺激すると、約0.3秒の速さで葉が二つ折りに閉じ、獲物を捕獲することが知られている。1回目と2回目の機械刺激間隔が約30秒以上開くと葉が閉じなくなることから、ハエトリソウは1回目の機械刺激を約30秒間記憶していると考えられている。植物としては特異な記憶機構であることから、その分子機構について多くの研究が行われてきた。先行研究によって、機械刺激によって活動電位が誘導され葉身を伝導することがわかり、カルシウム阻害剤で葉の運動が阻害されることから、細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) 変化と運動、記憶が関連しているのではないかと考えられてきたが、ハエトリソウにおいて  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  をリアルタイムで測定する方法が無く、刺激応答におけるその動態はわかっていなかった。

須田氏は、ハエトリソウの形質転換体作成に向けた試行錯誤の結果、暗所で生育させると高効率で形質転換が可能になることを発見し、カルシウムセンサータンパク質 GCaMP6f 遺伝子を導入した形質転換ハエトリソウの作出に成功した。そして、センサータンパク質と  $Ca^{2+}$  の結合によって生じる cpEGFP 蛍光変化が感覚毛への機械刺激でどのように変化するかを詳細に観察し、その結果、感覚毛に1回機械刺激を与えると、cpEGFP 蛍光が感覚毛で検出され、その後、周辺の細胞、さらに葉のほぼ全域に伝播することを見出した。また、この1回目の刺激で葉は閉じることはなく、2回目の機械刺激を与え、1回目の最高蛍光輝度よりも高い輝度が検出された際に、初めて葉が閉じることを確認した。須田氏は定量解析のため蛍光輝度を標準化し、ロジスティック回帰分析することで、2回目の刺激の直前と直後に運動を引き起こす  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  の閾値があると推定しました。1回目の刺激で上昇した cpEGFP 蛍光は徐々に減少し、30秒以上経つと、2度目の刺激でも閾値を超えないことがわかった。さらに、傷害刺激を与えた葉でも  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  が閾値に達すると葉が閉じること、カルシウムチャンネル阻害剤で処理すると  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  上昇が抑制され、2回の刺激でも運動が起こらないことを明らかにした。これらのことから、ハエトリソウの葉の運動は、(1) 感覚毛に対する1回目の機械刺激で葉の  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  が上昇する、(2) 上昇した  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  は1回目の刺激後徐々に減少する、(3) 2回目の機械刺激で可算的に  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  が上昇する、(4) 2回目の機械刺激後、 $[Ca^{2+}]_{cyt}$  が閾値に達し、運動が引き起こされる、(5) 1回目の刺激後の  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  の減少により、30秒以上たつと2回目の刺激を与えても閾値を超えることができず、ハエトリソウの短期記憶をうまく説明できると考察した。

本博士論文は、ハエトリソウという非モデル生物の形質転換技術を確立し、興味深い生

命現象解明への道を開いた点が大きく評価できる。また、ハエトリソウの運動機構と記憶が細胞内カルシウムイオン濃度変化によって説明できることを実証した初めての研究であり、今後の分子機構解明への糸口になるとともに、植物の運動研究全般にインパクトを与えるものであり、博士論文に値する研究であると判断した。