

令和元年8月30日現在

機関番号：32658

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07127

研究課題名(和文)新しい植物神経伝達様システムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel neurotransmission-like system in plants

研究代表者

山本 紘輔 (YAMAMOTO, Kosuke)

東京農業大学・生命科学部・助教

研究者番号：80803254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、植物の神経伝達様システムという新しい植物情報伝達システムを提唱している。植物においてはアセチルコリン(ACh)とACh分解酵素の2者の存在が認められている。本研究では、未発見の植物ACh受容体(AChR)遺伝子の発見を目指し、初めにAChRリガンドに最も結合する植物のスクリーニングを行った。その結果、ハーブ類において動物細胞と同等のリガンド結合能を示した。次に同試料を用いて薬理試験を行った結果、d-ツボクラリンに対して親和性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物アセチルコリン受容体(AChR)の存在については、未解明であった。本研究の成果により、ハーブ類の植物においてAChRリガンドに対する結合能を見出すことができ、植物においてもAChRの存在が示唆された。申請者らが提唱している植物の神経伝達様システムが植物の重力屈性応答に関与することが推測されており、植物AChR遺伝子を発見し、そのメカニズムを解明することにより、将来的には、本シグナル伝達系を制御し、重力を感知しない植物の作出、さらには、完全制御型植物工場においてデッドスペースである壁や天井を利用した作物の“三次元栽培”などが可能となり、生産効率の向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have proposed the plant neurotransmission-like system as novel signal transduction system in plants. Acetylcholine (ACh) and ACh-hydrolyzing enzyme (AChE) have been widely recognized in plants. On the other hand, the direct evidence of the molecules and genes responsible for ACh receptor (AChR) in plants had not yet been identified. This project, therefore, aims to identify AChR gene in plants. First, we explored plant materials having high binding ability against AChR ligands. Herb plants exhibited high ability against AChR ligands, comparable to animal cells. Next, we demonstrated that d-tubocurarine bound with high affinity to herb plants by characterizing as to its pharmacological profile.

研究分野：環境農学

キーワード：アセチルコリン アセチルコリンエステラーゼ アセチルコリン受容体 植物 神経伝達 遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物の神経伝達システムは、神経伝達物質である ACh が AChR に結合することにより起こり、筋収縮を作動させる役割を持つ。動物における AChR は 2 種類あり、主に自律神経・運動神経末端に存在し、イオンチャンネルが内在するニコチン性 ACh 受容体(nAChR)と、主に副交感神経末端に存在し、代謝調節型の G タンパク質共役受容体の一種であるムスカリン性 ACh 受容体(mAChR)が存在する。このシグナル伝達が遮断されると生命維持が困難となる。また、アルツハイマー病や多系統萎縮症で認められる本シグナルの伝達速度の低下がヒトの認識、自律神経、神経筋機能の低下に繋がっている。AChE は、ACh を分解することにより、ACh 量を調節し、その伝達を終結させる役割を担っている。そのため、シグナル伝達速度が低下しているアルツハイマー病の治療時に AChE 活性を阻害する薬剤が医薬品として用いられている(Soreq H and Seidman S (2001) Nat Rev Neurosci)。

植物の ACh は、現在まで 65 種の植物から発見されているが(Roshchina VV (2016) Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer)、植物の AChE 遺伝子は発見されていなかった(Yamamoto K (2017) Neurotransmitters in plants: possible physiological functions. CRC Press, Accepted)。申請者らは、トウモロコシとマメ科牧草サイラトロ幼苗から高純度に AChE 酵素タンパク質を精製し、その部分アミノ酸配列を解析後、完全長植物 AChE 遺伝子の発見に世界で初めて成功するとともに(Sagane Y. et al., (2005) Plant Physiol.; Yamamoto K. et al., (2008) Planta)、AChE 遺伝子が植物の耐暑性応答や重力屈性反応を正に制御することを示唆した(Yamamoto K et al., (2011) J Plant Physiol; Yamamoto K et al., (2015) Biochem Biophys Res Commun)。以上、ACh・AChE の 2 者は、植物において、環境適応に重要な役割を担っていることが考えられる。そこで、申請者らは、さらに植物にも動物と同様な神経伝達様システム(仮称)が存在するという仮説を提唱した。

植物の AChR に関する研究は、動物 AChR のリガンドや阻害剤を植物に処理し、葉緑体からのカチオンの流出や根からの酢酸の取り込み促進等の生理的变化を観察するに留まっており(Roshchina VV (2016) Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer)、AChR に相当する植物の関連遺伝子は発見されていない。そこで本研究では、AChE-ACh-AChR の 3 者からなる新しい植物情報伝達システムの存在を明らかにする一端として植物 AChR 遺伝子の発見を目指す。

2. 研究の目的

植物の神経伝達様システム(仮称)は、申請者らが提唱した新しい植物情報伝達システムであり、その存在を証明することが研究の目的である。動物の神経伝達システムは、アセチルコリン(ACh)、アセチルコリン受容体(AChR)および ACh 分解酵素(アセチルコリンエステラーゼ、AChE)の 3 者からなり、動物の筋収縮に関わる生命維持に必須である。申請者らは、作物(イネ科・マメ科植物等)からその関連酵素遺伝子、AChE を世界で初めて発見し、熱・重力応答制御(環境適応)に関与していることを報告した。ACh は、既に多くの作物で発見されていることから、植物においては AChE と ACh の 2 者の存在が認められたことになる。そこで本研究では、動物神経伝達システムの構成要素の 1 つである AChR に相当する植物 AChR 遺伝子(仮称)の発見を目指す。本研究により新しい植物情報伝達システムの存在を証明する重要な知見を得ることができる。

3. 研究の方法

(1) 植物実験材料の選定

本実験で重要なのは植物 AChR の精製に適した植物種を入念に選定することである。植物種での ACh 量や AChE 活性を指標に AChR 発現量が多いと推測される植物の種子を入手する。入手した種子を播種し、1 ヶ月後に植物体全体を回収する。その後、乳鉢・乳棒を用いて液体窒素中で粉碎し、その粉末を植物体重量の 10 倍量のタンパク質抽出緩衝液に加え、1 時間振とうする。その後、4、1,000xg、15 分間遠心分離し、得られた上清を再度遠心分離(4、32,300xg、30 分間)する。遠心分離後、得られた沈殿を緩衝液で懸濁し、粗膜画分とする。

上記の粗膜画分を用いて、放射性同位体(RI)標識した動物 AChR のリガンドに対する結合能を指標に実験材料となる植物体を選抜する。その際に、標識していない阻害剤との競合試験を行い、特異的結合であることを検証する。RI リガンドにはムスカリン性 ACh 受容体のリガンドであるトリチウム標識 QNB (最終濃度 10nM)およびニコチン性 ACh 受容体のリガンドである¹²⁵I 標識 プンガロトキシン(¹²⁵I- Bgt)(最終濃度 1nM)の 2 種を使用する。また、競合試験に用いる未標識の阻害剤は、トリチウム標識 QNB(最終濃度 10nM)に対してアトロピン(最終濃度 10 μM)を、¹²⁵I- Bgt(最終濃度 1nM)に対して未標識の Bgt(最終濃度 1 μM)を使用する。

測定方法は以下の通りである。

反応区として、植物体からの粗膜画分に上記 RI リガンドを添加し、反応させる。一方、RI リガンドと共に上記未標識の阻害剤を加えた阻害区も設ける。

室温で 1 時間反応後、ガラスフィルター上に反応液を濾過し、膜画分をフィルター上に回収する。その後、冷却 0.9% NaCl を用いて十分に洗浄する。

膜画分を含むフィルターをバイアルに入れ、液体シンチレーションカクテルを加え、攪拌する。

液体シンチレーションカウンタで放射能の計測を行う。

計測後に、(反応区の DPM) - (阻害区の DPM) を行い、(特異的な DPM 値) を算出する。ポジティブコントロールとしては、AChR が発現する動物細胞の粗膜画分を使用する。このポジティブコントロールの特異的 DPM 値と植物粗膜画分からの特異的 DPM 値を比較することにより、RI リガンドに対する結合能を評価する。

(2) 選定した植物試料を用いた薬理試験

(1) で選定された植物試料を用いて動物 AChR の阻害剤を使用した薬理試験を行う。RI リガンドにはニコチン性 ACh 受容体のリガンドである ^{125}I - Bgt を使用する。競合させる未標識の阻害剤の種類とその使用濃度範囲は、以下の通りある。また測定方法に関しては、(1) と同様の方法で行う。

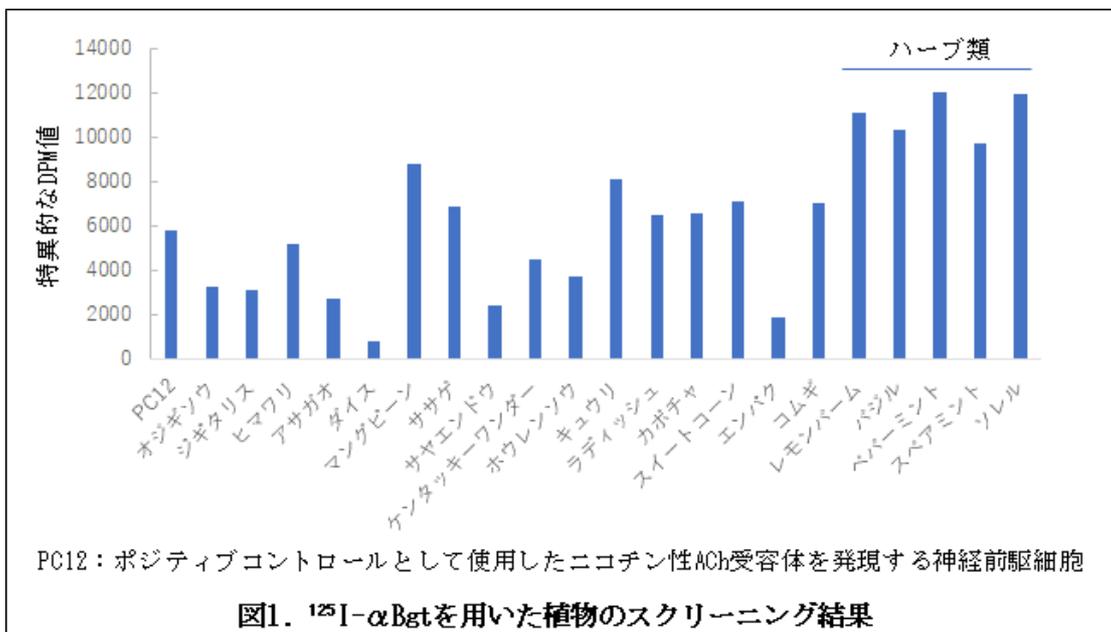
- d-ツボクラリン (使用濃度：3nM-100 μM)
- カルバミルコリン (使用濃度：3nM-100 μM)
- (-)ニコチン (使用濃度：10nM-300 μM)
- メチルライカコニチン (使用濃度：10pM-300nM)

4. 研究成果

(1) 植物実験材料の選定

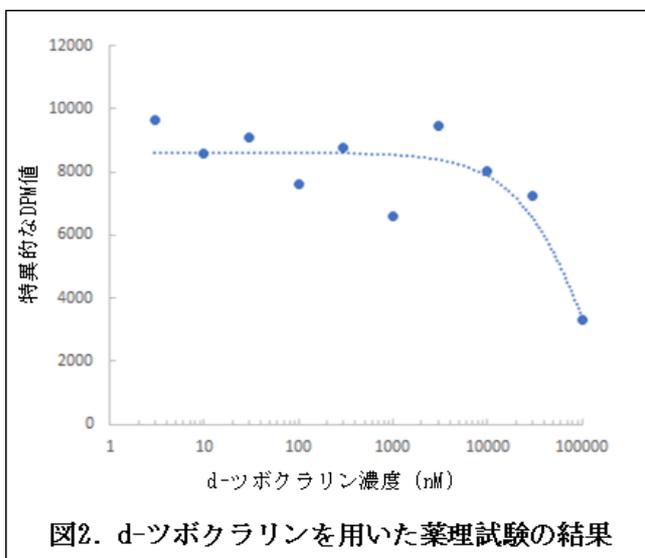
初めに ACh 含有量あるいは AChE 活性が高い種を約 30 種選抜し、それらの粗膜画分を抽出した。その後、RI リガンドに対する結合能のスクリーニングを行った

その結果、ムスカリン性 ACh 受容体のリガンドであるトリチウム標識 QNB に対しては、特異的なシグナルは得られなかった。一方、ニコチン性 ACh 受容体のリガンドである ^{125}I - Bgt に対しては、特異的なシグナルが得られた。特に、ハーブ類の粗膜画分においてポジティブコントロールとして使用した神経前駆細胞(PC12)以上の ^{125}I - Bgt に対する結合能が認められた(図 1)。



(2) 選定した植物試料を用いた薬理試験

次に、上記で特異シグナルが得られたハーブ類の粗膜画分を用いて動物のニコチン性 AChR の阻害剤に対する薬理試験を行った。その結果、d-ツボクラリンに対して親和性を示した(図 2)。これらの結果から、植物においても AChR 様タンパク質の存在が推察され、本タンパク質は動物のニコチン性 AChR の薬理特性と類似することが推測された。



5 . 主な発表論文等

〔図書〕(計1件)

1. Yamamoto K, Momonoki YS. “ Plant acetylcholinesterase plays an important role in the response to environmental stimuli ” In Neurotransmitters in Plants: Perspectives and Applications, ed. Ramakrishna A. and Roshchina V.V., CRC Press. pp9-33, 2018.

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、研究者個人に帰属されます。