

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：10106

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14726

研究課題名（和文）シグナリング分子としての細胞外ATPの植物での分泌・受容機構の解明

研究課題名（英文）Extracellular ATP signaling and perception in plant

研究代表者

蔭西 知子 (Kagenishi, Tomoko)

北見工業大学・工学部・研究員

研究者番号：20815633

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：電子スピン共鳴装置を用いて、植物にATPまたはADPを細胞外から添加することで、細胞壁の構築に関わるとされる活性酸素ヒドロキシルラジカルを生成すること、この生成には細胞外ATP受容体DORN1を介さないということがわかった。また、細胞外ATPのシグナリングの経路に関連するとされる根のエンドサイトーシスおよびエキソサイトーシスは、実験に使用される溶媒の一種のエタノールによって攪乱されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、細胞外ATPが根の伸長方向といった屈性を制御するメカニズムには、細胞外ATPによって植物の根から発生するヒドロキシルラジカルによる細胞壁の構築に関わるかもしれないこと、細胞外ATPだけでなく細胞外ADPも植物にヒドロキシルラジカルを生成すること、このヒドロキシルラジカルの生成には、植物の既知の細胞外ATP受容体を必要としないという新たな知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Extracellular ATP (eATP) is a signaling molecule of plants activating several intracellular cascades across the plasma membrane by generating reactive oxygen species (ROS) and calcium influx. Extracellular ADP (eADP) causing cellular responses in roots was also reported. However, the effect of eATP and eADP on ROS response in plant tissues is not well known. Hydroxyl radical is essential for modulating cell wall properties, root growth, and tropisms. To explore extracellularly-generated hydroxyl radicals in roots by eATP and eADP, I observed intact *Arabidopsis thaliana*, maize and *Brassica rapa* roots by the electron spin resonance (ESR) method. In the result, exogenously applied ATP and ADP promoted a generation of hydroxyl radicals from plants root. DORN1 a receptor of eATP defective mutant *dorn1-3* was also produce hydroxyl radicals with exogenously applied ATP. This result show that generation of hydroxyl radicals from plant root does not require eATP receptor DORN1.

研究分野：植物生理学

キーワード：Arabidopsis 細胞外ATP 細胞外ADP 電子スピン共鳴装置 ヒドロキシルラジカル

1. 研究開始当初の背景

ATP は生物共通のエネルギー通貨として知られるだけでなく、細胞外に放出された ATP が神経伝達物質としての機能を有することが示され、細胞外 ATP と呼ばれている。1972 年に神経細胞における細胞外 ATP の存在と機能が提唱されたが [Burnstock 1972 Pharmacol Rev]、長年その存在が疑われてきた。なぜなら ATP はすべての細胞に存在するために、細胞外の ATP が局所的に生理作用を引き起こす事実は受け入れられなかった。しかし、1993 年、哺乳類の脳から、細胞外 ATP の受容体 P2X、P2Y が同定され、情報伝達物質としての細胞外 ATP が注目され始めた。現在ではこれら細胞外 ATP 受容体をターゲットに医薬品の研究・開発が盛んで、実際に販売されている。一方、植物にも細胞外 ATP シグナリングの存在を示唆する報告は古くからあった [Jaffe and Galston 1966 Plant Physiol]。また、傷害、塩、乾燥等のストレスの感受時や、重力屈性時や接触刺激に応じて直ちに植物の根が細胞外 ATP を分泌することや [Dark et al 2011 Plant Signal Behav; Weerasinghe et al 2009 FEBS Lett]、外部から与えた ATP が根の重力屈性を阻害し [Tang et al 2003 Plant Physiol]、花粉管や根毛の成長、根粒菌の共生等を促進する [Tanaka et al 2010 Trends Cell Biol] といった様々な植物組織への生理作用が報告されてきた。しかし、哺乳類の細胞外 ATP 受容体のホモログが植物に見出だされないことなどから、植物の細胞外 ATP シグナリングの存在について長らく不明だった。2014 年、大規模スクリーニングによって植物の細胞外 ATP 受容体 DORN1 (Does not Respond to Nucleotides 1) が同定・報告された [Choi 2014 Science]。その結果、植物の細胞外 ATP 受容体は哺乳類と異なる細胞膜に存在するレクチンキナーゼ様受容体の一つであり、細胞壁-細胞膜接着の働きをすると予想される遺伝子 [Bouwmeester 2011 PLoS Pathog] をコードすることがわかった。しかし DORN1 が細胞外 ATP の受容後にどういった経路で細胞内信号伝達を担うのか、そのシグナリングがどのように植物の成長と屈性に関わるのか不明である。

2. 研究の目的

本研究は、これまで不明だった植物の (1) 細胞外 ATP 放出にいたる細胞内分泌・輸送経路と、(2) 植物の細胞外 ATP 受容体 DORN1 の局在およびその働きを解明するために、主にライブイメージング手法を用いて細胞外 ATP シグナリング経路の解明を目的とした。しかし研究の途中、ライブイメージングに必要な共焦点レーザー顕微鏡の無い研究機関へ自身の所属が異動となり、新型コロナの影響および妊娠出産によって他の機関へ顕微鏡を借りに行くことが難しい状況となると予測した。そこでライブイメージングにあわせて切片作成による植物の根の形態と免疫染色による観察を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞外から根に ATP を与えた際の細胞の形態変化の観察と、細胞外 ATP 受容体 DORN1 とした細胞外 ATP のシグナリングに関連すると考えられる物質の局在を免疫染色で明らかにすることを目的に、包埋切片やホルマウントの手法を比較した。

材料は、シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシ、オオムギを使用した。凍結切片、樹脂切片、パラフィン切片、寒天包埋切片でのサンプル作成を比較するためにそれぞれ、凍結ミクロトーム、ミクロトーム、ビプラトームを用いた。

(2) 植物の根のネイティブな細胞外 ATP 受容体 DORN1 の局在を免疫染色の手法で観察することを目的とし、シロイヌナズナおよび *Brassica rapa* の DORN1 をターゲットとした抗体を設計した。本抗体を抗体受託サービスに依頼し作成した。本抗体を使用するためにシロイヌナズナおよび *Brassica rapa* のホルマウントを行い、観察した。

(3) 細胞外 ATP シグナリング応答時の細胞外 ATP 受容体 DORN1 の局在をライブイメージングで観察することを目的に、シロイヌナズナの DORN1 に蛍光タンパクのレポーター遺伝子 GFP を導入した DORN1-GFP の作成をアグロバクテリウム法で行った。また、重力屈性刺激を与えた際の DORN1 の組織レベルでの発現を確認するために DORN1 プロモーター-GUS を導入した DORN1-GUS と、DORN1 プロモーターに GFP を導入したシロイヌナズナをアグロバクテリウム法で作成した。

(4) 細胞外 ATP の分泌経路にエキソサイトーシスが、細胞外 ATP のシグナリング経路にはエンドサイトーシスが関わるということがこれまでに報告されているが、不明な点が多い。そこで根のエンドサイトーシスおよびエキソサイトーシスの観察を行うために、まず試薬の溶媒に頻繁に使用されるエタノールといった低分子物質によるエンドサイトーシスおよびエキソサイトーシスへの影響を調べた。具体的にはエキソサイトーシスを可逆的に阻害する Brefeldin A (BFA) で処理した植物の根で観察される BFA コンパートメントの数および大きさはエンドサイトーシスのスピードを反映しているとし、エタノール存在時および非存在時の植物の根のエンドサイトーシスのスピードを比較した。また、BFA を洗い流したあとの BFA コンパートメントの数および大

きさはエキソサイトーシスのスピードを反映しているとし、同様にエタノール存在時および非存在時の植物の根のエキソサイトーシスのスピードを比較した。

(5) 細胞外 ATP は根の伸長方向、屈性の決定に関わることが予想されている。根が受けた物理刺激によって根の細胞外に放出された細胞外 ATP が NADPH オキシダーゼを介して活性酸素種の生成を促し、それが細胞外 ATP のシグナリング伝達を担うとされている。そこで、細胞外 ATP と根の屈性の関係を明らかにするためにシロイヌナズナ、*Brassica rapa*、トウモロコシを使い、電子スピン共鳴装置 (ESR) で、ATP を植物の根に添加した際の細胞壁の構成に関わるとされる活性酸素の一種のヒドロキシルラジカルの測定を行った。

(6) 細胞外 ATP の植物での役割を探るため、シロイヌナズナの根に ATP を添加後、植物地上部から放出される揮発性物質の GC-MS 分析を HS-SPME-GC/MS (ヘッドスペース・固相マイクロ抽出法) で測定した。

4. 研究成果

(1) 細胞外から根に ATP を与えた際の細胞の形態変化の観察と、DORN1 といった細胞外 ATP のシグナリングに関連する物質の局在を免疫染色で明らかにすることを目的に、いくつかの包埋切片作成の手法に加えてホルマウントの手法を比較した。イネの凍結切片を作成した結果は、笠原教授 (名古屋大学) との共同研究を通して国際誌に報告された [Honma et al 2020 Commun Biol]。また、Pavlovič 博士 (パラツキー大学、オロモウツ) とそれぞれの共同研究を通して、オオムギの葉タンパク質を抗体免疫染色で観察するプロトコルを確立中であり、本研究結果は国際誌で報告予定である。

(2) シロイヌナズナおよび *Brassica rapa* の細胞外 ATP 受容体 DORN1 に関連する遺伝子配列をターゲットとした抗体を設計し、抗体受託サービスに作成の依頼をした。本抗体の DORN1 への特異性を確かめるためにウェスタンブロッティングで確認した。その結果、複数のバンドが認められ、本抗体が DORN1 に加えて他にも複数の不明タンパク質に結合することがわかった。

(3) 細胞外 ATP シグナリング応答時の細胞外 ATP 受容体 DORN1 の局在をライブイメージングで観察することを目的に、シロイヌナズナの DORN1 に蛍光タンパクのレポーター遺伝子 GFP を導入した DORN1-GFP と、DORN1 プロモーター-GUS を導入した DORN1-GUS の作成をアグロバクテリウム法で作成した。これらの組換え体を利用して細胞外から加えた ATP の影響や、細胞外 ATP を受容した際の DORN1 の局在について今後観察される予定である。

(4) 細胞外 ATP の分泌経路およびシグナリングの経路に関連するとされる根のエンドサイトーシスおよびエキソサイトーシスの観察を行うために、試薬の溶媒に頻繁に使用されるエタノールによるエンドサイトーシスおよびエキソサイトーシスへの影響を調べた。その結果、植物の根に BFA とエタノールを処理することで、エタノールが根のエンドサイトーシスのスピードおよび細胞骨格を攪乱することを明らかにした。さらに、無酸素状態で植物の根がエタノールを生産することを明らかにした。本結果から、エンドサイトーシスの研究では、試薬の溶媒にエタノールを用いる場合はその濃度に、研究に使用する植物を液体培地で長時間処理する際は、その植物の酸素状態に注意すべきであるという知見を得て、報告した [Kagenishi et al 2023 Environ Exp Bot]。

(5) 細胞外 ATP は、根の重力屈性をコントロールすること、DORN1 は、植物の細胞壁と細胞膜の接着に関係することが予想された。本研究では DORN1 と根の屈性の関係を明らかにすることを目的とした。その結果、シロイヌナズナ、*Brassica rapa*、トウモロコシを使った電子スピン共鳴装置で、細胞壁の構成に関わるとされる活性酸素の一種のヒドロキシルラジカルが、細胞外からの ATP で根から生成されること。さらに ATP だけでなく、細胞外から ADP を植物に与えた場合でも生成されること、DORN1 欠損株 *dorn1-3* から ATP でヒドロキシルラジカルが生成されることが分かった。また、ATP および ADP によるヒドロキシルラジカルには濃度依存性が認められた。これまでに DORN1 を介した細胞外 ATP のシグナリングには、スーパーオキシドアニオンが情報伝達物質として利用されることが報告されているが、本研究で細胞外に DORN1 を介さないヒドロキシルラジカルといった活性酸素種の生成メカニズムの存在が示された。本結果は国際会議 [Plant signaling and behavior 2023 symposium, 19 Jun, Seattle] で発表予定である。

(6) 細胞外 ATP の植物での役割を探るため、シロイヌナズナの根に ATP を添加後、植物地上部から放出される揮発性物質の GC-MS 分析を HS-SPME-GC/MS (ヘッドスペース・固相マイクロ抽出法) で測定した。結果、GC-MS の設定のためか、細胞外 ATP による影響と思われるシロイヌナズナの葉から抽出された成分の検出を確定できなかった。

<引用文献>

- Burnstock 1972 *Pharmacol Rev* 24 (3) 509-581
Jaffe and Galston 1966 *Plant Physiol* 41 (6) 1014-1025
Dark et al 2011 *Plant Signal Behav* 6(11) 1855-1857
Weerasinghe et al 2009 *FEBS Lett* 583(15) 2521-2526
Tang et al 2003 *Plant Physiol* 131 147-154
Tanaka et al 2010 *Trends Cell Biol* 20(10) 601-608
Choi 2014 *Science* 343 6168
Bouwmeester 2011 *PLoS Pathog* (3) e1001327
Honma et al 2020 *Commun Biol* 3 617
Kagenishi et al 2023 *Environ Exp Bot* 205 105123

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 K Yokawa, T Kagenish and F Baluska	4. 巻 24
2. 論文標題 Anesthetics, Anesthesia, and Plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Plant Science	6. 最初と最後の頁 12-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tplants.2018.10.006	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 該当する

1. 著者名 K Yokawa*, T Kagenishi*, A Pavlovic, S Gall, M Weiland, S Mancuso and F Baluska (* equally contribution))	4. 巻 122
2. 論文標題 Anaesthetics stop diverse plant organ movements, affect endocytic vesicle recycling and ROS homeostasis, and block action potentials in Venus flytraps	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Botany	6. 最初と最後の頁 747-756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/aob/mcx155	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅原拓也、蔭西知子、陽川憲
2. 発表標題 シロイヌナズナ根の低温感受によるシュートのABA合成促進と気孔の閉鎖
3. 学会等名 2020年度 日本農芸化学会北海道支部 / 第50回 日本栄養・食糧学会北海道支部 合同学術講演会, オンライン
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蔭西知子、Frantisek Baluska、菅原拓也、陽川憲
2. 発表標題 シロイヌナズナの根が低酸素条件下で生成するエタノールによる細胞骨格と細胞膜への影響
3. 学会等名 第50 回記念根研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K Yokawa, T Kagenishi, A Pavlovic, S Mancuso and F Baluska
2. 発表標題 全身麻酔薬はなぜ効くのか：ハエトリグサなど植物を用いた活動電位や細胞膜挙動の可視化
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T Kagenishi and U Kodama
2. 発表標題 Detection of metabolites in chloroplast and peroxisome by immunofluorescence in liverwort and vascular plant
3. 学会等名 JST・ERATO沼田オルガネラ反応クラスタープロジェクト オルガネラ反応クラスター討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北見工業大学 おもしろ科学実験（2件） 「重力屈性；植物の根を空に向かって成長させよう」（2020年度） 「おもっていたより動くとうもろこしの根」（2021年度） https://ojirowashi.office.kitami-it.ac.jp/archive/info
--

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
---------	---------