

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：33702

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770041

研究課題名(和文) 高等植物における Ca^{2+} シグナル・ROSシグナルの同時リアルタイムイメージング

研究課題名(英文) Dual, realtime monitoring of Ca^{2+} and ROS signals in plant cells

研究代表者

古市 卓也 (Furuichi, Takuya)

岐阜女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：80436998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内シグナル伝達において、 Ca^{2+} およびROSはセカンドメッセンジャーとして、協奏的作用を伴って重要な役割を担っている。我々はこれまでの研究において、従来は不可能であった植物細胞内ROS濃度上昇=ROSシグナルのリアルタイム計測を実現する発光タンパク質プローブを実用化した。本研究では、(1)同プローブを Ca^{2+} レポーター発光タンパク質・エクオリンと試料中に共存させること、(2)発光基質アナログの選抜と利用によって発光波長特性を改変すること、(3)分光計測装置を開発することにより、 Ca^{2+} シグナル・ROSシグナルの同時計測システムを構築し、その評価を行った。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) play key roles in intra- / inter-cellular signal transduction. Recent studies revealed that Ca^{2+} -signal and ROS-signal are interplaying for the precise intracellular signal transduction through generating $[Ca^{2+}]_c$ oscillation and playing the other key roles of still unknown. In the present study, we tried to develop a novel method to monitor $[ROS]_c$ and $[Ca^{2+}]_c$ simultaneously using Ca^{2+} - or ROS-sensitive photoproteins and spectrometry of luminescence to clarify the physiological roles and mechanisms of ROS-signal and their interplay with Ca^{2+} -signal in plants.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：細胞内シグナル伝達 活性酸素種 ROS 生物発光 リアルタイム計測

1. 研究開始当初の背景

植物の細胞において、その生育環境からの外的ストレスは主に細胞膜上の受容体によって認識されたのち、細胞質カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_c$) 変化を中心とした化学シグナルに変換される。これにより細胞内の酵素活性制御、遺伝子発現制御を行うことで、細胞は受容したストレスに応じた適応反応を示す。 $[Ca^{2+}]_c$ は定常状態において非常に低く保たれており、ストレスによる Ca^{2+} 透過チャネルの活性化は非常に大きな $[Ca^{2+}]_c$ 上昇 (Ca^{2+} シグナル) を引き起こす。すなわち、特定のストレスに対する応答や生長過程に特異的な Ca^{2+} シグナルの生成・動因機構を解明することは、これら諸過程のメカニズムを明らかにする上で非常に有効であると同時に、得られた知見の活用は有用作物の育種や新しい環境ストレス対処法の策定において有効な戦略と成り得る。我々はこれまでの研究において、オワンクラゲ由来の Ca^{2+} レポーター発光蛋白質・エクオリンを導入した植物個体、培養細胞を用いて様々な環境ストレスに応答した Ca^{2+} シグナルについてその解析を行い、報告してきた。

活性酸素種 (ROS) は DNA の損傷や細胞死を誘導する毒性物質として古典的に知られているが、近年の研究から細胞内 ROS 濃度 ($[ROS]_c$) 上昇 = ROS シグナルが細胞の分裂や分化、細胞内オルガネラ間のコミュニケーションに於いて極めて重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。興味深いことに、気孔の開孔や病原ストレス応答の初期過程に関与する Ca^{2+} シグナルの動因には細胞膜上の膜電位依存型 Ca^{2+} 透過チャネルの活性化に先んじて ROS 生成が起こる。また近年、細胞膜上で活性酸素種生成を行う NADPH oxidase の活性化には Ca^{2+} の結合が必要であることが報告されている。これらの事象は、 $[Ca^{2+}]_c$ 上昇と ROS 生成には双方向の関連性があり、両者が「 Ca^{2+} -ROS ネットワーク」として協奏的に機能することを強く示唆しているが、同時計測による直接的証明が成されていないために、その分子機構は未だ明らかでない。

細胞膜上の Ca^{2+} 透過チャネルの活性化やジスルフィド結合の促進による蛋白質構造変化を誘導するのは細胞質中の ROS であり、その濃度 ($[ROS]_c$) 変化が ROS シグナルとして機能すると考えられている。しかしながら細胞壁画分におけるエステラーゼ活性、巨大液胞を有する植物細胞を対象とした研究に於いては動物細胞実験系で広く用いられる DCFH-DA などの ROS 活性化型蛍光化合物の細胞質への導入は困難であるため、従来法による研究では化学発光指示薬を用いて細胞外で生成または細胞外に放出された ROS が検出されるに留まっていた。また、DCFH-DA などの ROS 活性化型蛍光化合物は ROS との反応により不可逆的な構造変化を行うため、蛍光強度の蓄積が見られる。このことは、細胞生理学的に有意である微細かつ持続的な ROS 生成、

スパイク応答の計測、すなわち直感的理解に繋がるリアルタイム計測を困難としていた。

ヒカリカモメガイ由来のフォラシンは ROS と反応することにより一過的に 490 nm の光を放出する発光蛋白質である。最近、フォラシンが特異的発光基質であるデヒドロセレンテラジンと蛋白質-基質複合体を形成することで機能することに着目し、これを植物細胞内における ROS シグナルのリアルタイム計測を安定かつ簡便に行うことの出来る発光タンパク質プローブとして実用化するため、人工遺伝子および出芽酵母発現系を用いた実証試験を行った。(平成 23 年度研究活動スタート支援による助成を受けて実施。)

2. 研究の目的

フォラシンを Ca^{2+} レポーター発光蛋白質・エクオリンと併用することにより、植物細胞内における Ca^{2+} シグナル・ROS シグナルを同時にリアルタイム計測するための実験試料および測定装置を開発し、実用化する。

3. 研究の方法

これまでの研究において、コドン出現頻度をシロイヌナズナおよび出芽酵母に最適化した人工遺伝子を作成し、これを遺伝子導入することで、フォラシンを発現する酵母を作成した。また、同遺伝子に対して点変異を導入し、発光強度を解析することで発光基質結合部位を同定している。本研究では抗フォラシン抗体を作成し、これらの点変異蛋白質についてウエスタンブロット解析を行った。また、同抗体を用い、フォラシンにおける翻訳後修飾について解析した。

暗箱内に 2 台の光電子増倍管 (フォトン検出装置) それぞれの受光面前方にバンドパスフィルターを設置することで、エクオリン・フォラシンの発光をそれぞれ排他的に計測するため、発光分光計測装置を開発した。主に実施する薬理学的実験について暗箱内での処理を可能とするため、マイクロシリンジを用いた注入ポートを設置した。同装置を用い、出芽酵母およびシロイヌナズナを試料として、同一試料からのエクオリン発光・フォラシン発光をそれぞれ計測した。また、発光基質投与条件について検討した。

4. 研究成果

フォラシンの発光基質であるデヒドロセレンテラジンはエクオリンの発光基質であるセレンテラジンの類似化合物であるが、エクオリンの結晶構造およびデヒドロセレンテラジンを基質とするトビイカ由来の発光蛋白質・シンプレクチンに関する報告より、それぞれ結合の様式が異なるため、基質-蛋白質複合体はそれぞれ排他的に構成されると考えられた。このことを確かめるため、エ

クオリンまたはフォラシンを発現する出芽酵母に対してセレンテラジンまたはデヒドロセレンテラジンを投与し、発光蛋白質の排他的再構成の可否に関する検討を行った。グルコースを含む培地で培養した出芽酵母を用いた場合、デヒドロセレンテラジンを投与した場合においてもエクオリン発現細胞における発光が確認された。これまでの知見から、グルコース代謝時に生成されるエタノールの作用により、デヒドロセレンテラジンがセレンテラジンに構造変化を起こしたと考えられたので、培地中の炭素源をガラクトースに置換したところ、エクオリンの再構成効率は大きく減少した。また、発光基質投与に先立って培地を緩衝液 (pH 6.0) に置換することで、セレンテラジンへの構造変化およびアポエクオリン蛋白質との結合を検出レベル以下まで低下させることが出来た。また、セレンテラジン投与によるフォラシン再構成は見られなかった。

次いでエクオリン・フォラシンをそれぞれ再構成させた出芽酵母懸濁液を混合して試料とし、Ca²⁺シグナル・ROSシグナル同時計測に関する検証試験を実施した。天然型のエクオリン、フォラシンの最大発光波長はそれぞれ約 470 nm、490 nm と非常に近接しているために排他的に分光を行う事が出来ないが、蛋白質-基質複合体型の発光蛋白質の発光波長および強度は基質構造に依存している。そこでエクオリンの発光基質として最大発光波長を約 400 nm とするアナログ化合物を選抜して用いた。エクオリン、フォラシンの発光波長域はいずれも最大値から 50 nm 程度で収束することから、430 nm、470 nm を分離域とするバンドパスフィルターを用い、排他的計測の可否について検証を行い、出芽酵母における Ca²⁺シグナル・ROSシグナルの同時リアルタイム計測を行うことに成功した。(論文執筆中) 現在、企業との協同により更に機能を向上させた次世代型測定装置の開発を推進しており、本研究の成果は植物科学研究のみならず、医学等幅広い分野での応用が期待される。

これまでの研究において、点変異導入遺伝子を用いた解析からフォラシンにおけるデヒドロセレンテラジン結合部位を同定している。本研究では、新たに作成した抗フォラシン抗体を用いた発現量解析を行い、全ての点変異導入遺伝子から野生型と等量程度の蛋白質が発現していることを確認した。また、アミノ末端に推定されているプレカーサー配列が酵母においては切断されないこと、少なくとも 2 カ所のアミノ酸残基において糖鎖付加がおきていることを明らかにした。プレカーサー配列を予め除いた短縮遺伝子を導入した酵母においては組換え体の生育が顕著に阻害されており、ヒカリカモメガイにおける成熟型蛋白質は少なくとも酵母において、細胞毒性を発揮する可能性が示された。エクオリンを発現するタバコ培養細胞、シ

ロイヌナズナを用いて同様の解析を行った結果、タバコ培養細胞においてはデヒドロセレンテラジン投与によるエクオリン再構成は見られなかったものの、シロイヌナズナにおいては長時間の処理において次第に発光強度が増大する様子が確認された。薬理的解析から Ca²⁺シグナルのみを動員することが明らかとなっている刺激を用いた検証の結果、予めセレンテラジンを投与することでエクオリンを再構成させた後、デヒドロセレンテラジンを投与することでフォラシンを再構成する、2段階処理が有効であることが明らかとなった。しかしながら測定条件の最適化を進める過程において、2段階処理では実験者の労力および当該実験に係る拘束時間が極めて大きいことも明らかとなった。そこで現在、フォラシンのみを発現するシロイヌナズナを作成し、組換え体の選抜を進めている。今後、エクオリン発現植物、フォラシン発現植物から独立して調整した試料を同一のチューブに入れることで、より簡便で応用性の高い同時計測系の構築を進める予定である。

細胞膜上で活性酸素種生成を行う NADPH oxidase の活性化には Ca²⁺の結合が必要であることが報告されており、Ca²⁺チャネルとの機能相関を探索することは高等植物における Ca²⁺-ROSネットワーク解明に向けた重要なアプローチである。我々はこれまでの研究において、シロイヌナズナから機械刺激受容 Ca²⁺透過チャネル候補遺伝子・MCA1 を単離・同定している。本期間中の研究において、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的機能解析を行い、MCA1 が機械刺激受容陽イオン透過チャネルであることを明らかにした。高等植物に重力刺激(方向変化、過重力)を与えると、機械刺激受容陽イオン透過チャネルを介した細胞質への Ca²⁺流入が起こる。航空機実験により得られた 0.5、1、1.5、2 G 環境下での検証により、重力方向変化によって引き起こされる Ca²⁺シグナルの強度は重力強度に依存することが見出された。高等植物の重力感知初期過程においては Ca²⁺シグナルとともに ROSシグナルが生成することが報告されている。今後、重力刺激に応答した ROSシグナルの計測、Ca²⁺シグナルおよび MCA1 との機能相関について解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Nomura, H., Komori, T., Uemura, S., Kanda, Y., Shimotani, K., Nakai, K., Furuichi, T., Takebayashi, K., Sugimoto, T., Sano, S., Suwastika, N., Fukusaki, E., Yoshioka, H., Nakahira,

Y. and Shiina, T. (2012) Chloroplast-mediated activation of plant immunity signaling in *Arabidopsis*. *Nature commun.* 3:926. DOI:10.1038/ncomms1926.

Furuichi, T., Iida, H., Sokabe, M. and Tatsumi, H. (2012) Expression of *Arabidopsis* MCA1 enhanced mechanosensitive channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Plant Sig. Behav.* 7(8): 1022-1026. (Corresponding Author)
Toyota, M., Furuichi, T., Sokabe, M., and Tatsumi, H. (2013) Analysis of a gravistimulation-specific Ca^{2+} signature in *Arabidopsis* using parabolic flights. *Plant Physiol.* 163: 543-554.

Tatsumi, H., Furuichi, T., Nakano, M., Toyota, M., Hayakawa, K., Sokabe, M. and Iida, H. (2014) Mechanosensitive channels are activated by stress in the actin stress fibers, which could be involved in gravity sensing in plants. *Plant Biol.*, 16: 18-22.

Iida, H., Furuichi, T., Nakano, M., Toyota, M., Sokabe, M. and Tatsumi, H. (2014) New candidates for mechanosensitive channels potentially involved in gravity sensing in *Arabidopsis*. *Plant Biol.*, 16: 39-42.
Tatsumi, H., Toyota, M., Furuichi, T., and Sokabe, M. (2014) Calcium Mobilizations in Response to Changes in the Gravity Vector in *Arabidopsis* Seedlings: Possible Cellular Mechanisms. *Plant Signal. Behav. In Press.*

[学会発表](計5件)

Tatsumi, H., Furuichi, T., Nakano, M., Toyota, M., Hayakawa, K., Sokabe, M. and Iida, H. Mechanosensitive channels are activated via actin stress fibers, which may be involved in gravity sensing in plants. *ISLSWG Workshop „Plant Biology in Space“- Satellite Meeting to the Plant Biology Congress 2012* -, Aug 2012, Freiburg, Germany
Iida, H., Furuichi, T., Nakano, M., Toyota, M., Sokabe, M. and Tatsumi, H. New candidate for the mechanosensitive channel that may be involved in gravity sensing. *ISLSWG Workshop „Plant Biology in Space“- Satellite Meeting to the Plant Biology Congress 2012* -, Aug 2012, Freiburg, Germany
Furuichi, T. Roles and mechanisms of calcium signaling in plant environmental responses.

International Conference on Advances in Plant Sciences (Plants2012), Nov. 2012, Chiang Mai, Thailand.

Furuichi, T. Real-time monitoring of the intracellular ROS signal using a novel photoprotein. *The 4th NIBB-MPIPZ-TIL Symposium*, Nov. 2012, Okazaki, Japan.

Furuichi, T. and Kuse, M. Use of a photoprotein from shellfish for the real-time monitoring of cytoplasmic ROS level. 第54回日本植物生理学会年会、岡山

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古市 卓也 (FURUICHI, Takuya)

研究者番号: 80436998