

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07434

研究課題名(和文)液胞形成に伴って起こる新奇オートファジーの機構解明

研究課題名(英文)Studies on autophagy pathways coupled with vacuole genesis

研究代表者

森安 裕二 (Moriyasu, Yuji)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：20200454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞体積の大部分を占める液胞をもつことは植物細胞の特徴の一つである。液胞は他のオルガネラから形成されると考えられているが、統一的な形成のメカニズムは明らかになっていない。タバコBY-2細胞やシロイヌナズナ培養細胞から調製したプロトプラストから液胞を取り除くことができる。このような液胞を取り除いたプロトプラストを培養すると液胞が再形成される。この過程を解析し、液胞形成にはマクロオートファジーと、マクロオートファジーとは異なるオートファジー経路が関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1. 本研究により、マクロオートファジー経路とは異なる「新奇のオートファジー」の存在が明らかにされたと考えられる。2. 私たちは、約4年間かけて作製したATG遺伝子破壊シロイヌナズナ培養細胞を他の研究者に配布することで、植物オートファジー研究に貢献できると考えている。3. 液胞は植物細胞の大部分を占めるオルガネラである。よって、液胞形成の問題は植物細胞の成長の問題、ひいては、植物の成長の問題、私たちヒトの食糧問題と密接に関係する。

研究成果の概要(英文)：Most plant cells have large vacuoles. It is one of the most conspicuous characteristics in plant cells. It has been believed that vacuoles are formed from other organelles in the developmental process of plant cells. The detailed mechanisms, however, remains to be solved. We investigated the process of vacuole genesis in miniprotoplasts, the protoplasts from which vacuoles had been taken away by operation. We found that two autophagic pathways contribute to the formation of vacuoles in miniprotoplasts: one is the macroautophagic pathway and the other is an autophagic pathway that is distinct from macroautophagy.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：液胞形成 オートファジー タバコBY-2細胞 シロイヌナズナ培養細胞 ミニプロトプラスト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーはリソソームや液胞において細胞成分が分解される現象である。その主要経路は哺乳動物や酵母ではマクロオートファジー経路であると考えられており、植物細胞でもマクロオートファジー経路が存在する(Moriyasu and Klionsky 2004)。マクロオートファジー経路では、細胞質の一部が、まずオートファゴソームと呼ばれるオルガネラによって隔離され、次いでリソソームや液胞に運ばれて分解される。マクロオートファジー経路以外のオートファジー経路も存在することが示されているが、その分子機構はわかっていない。

液胞は、細胞成分の貯蔵や分解、さらに細胞の充填材としての役割を担っており、植物の形態形成に必須のオルガネラであるが、その形成機構は十分に理解されていない。液胞は、ゴルジ装置や ER に由来する構造が細胞質を包み込んで分解すること(結果として、形成される液胞内で細胞質が分解されることになるので、「オートファジー」の定義を充たす)により形成される(Marty 1978, Amelunxen and Heinze 1984))という説が提唱されているが、シロイヌナズナ atg 変異株でもほぼ正常な液胞が観察されることから、マクロオートファジー経路は新規の液胞形成に大きく寄与することはないと考えられている。実際に、シロイヌナズナ根端における液胞形成が比較的最近、解析され、液胞は ER に由来する管状のネットワークより形成され、オートファジーの液胞形成への関与は認められないと報告されている(Viotti et al. 2013)。また最近では、Liwen ら(2018)によってエンドソームの融合によって複数の小さな液胞がまず形成され、それらが融合していくことによって大きな液胞が形成されるという説も提唱されている。このように、液胞の形成機構に関する一致した見解はなく、オートファジーが関与するかどうかに関しても未だ不明である。

植物細胞からプロトプラストを調製し、さらにプロトプラストから液胞を取り除いて「ミニプロトプラスト」と呼ばれる細胞モデルを調製することができる(Loerz et al. 1976, 1981)。

私たちは、タバコ BY-2 細胞からミニプロトプラストを調製し、これを培養すると、液胞を再形成して元のプロトプラストに戻ることを確認した。さらに、この液胞再形成の過程で、培養液にプロテアーゼ阻害剤 E-64 を入れて形成途中の液胞内プロテアーゼを阻害すると、形成された液胞の内腔に細胞質が蓄積することを見出した(Yano et al. 2007a)。この結果は、液胞はオートファジーを伴いながら形成されることを示している。さらに、タバコ BY-2 細胞内で起こるマクロオートファジーがオートファジー阻害剤 3-methyladenine(3-MA)で阻害されたのに対して、ミニプロトプラスト内で起こる液胞形成に伴うオートファジーは 3-MA では阻害されなかった。このことは、液胞形成に伴って起こるオートファジーはマクロオートファジーとは異なることを示唆している(Yano et al. 2007a)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、シロイヌナズナ培養細胞やタバコ BY-2 細胞より調製したミニプロトプラスト内で起こる液胞形成に関連して起こるオートファジー経路を解析した。

特に、(1)ATG 遺伝子が破壊されてマクロオートファジー経路が完全に欠損しているシロイヌナズナ培養細胞を用いて、液胞形成に伴ってオートファジーが起こり、それがマクロオートファジーとは異なる新しいタイプのオートファジーであることを証明する；(2)液胞形成に伴って起こるオートファジーを実行する構造の電子顕微鏡像を明らかにする、以上2点を目的とした。

3. 研究の方法

(1)ミニプロトプラストの調製

植え継ぎ5日目のBY-2細胞培養液から細胞を回収し、細胞からプロトプラストを調製した。30% Percoll に懸濁したプロトプラストを 15,000rpm で1時間、遠心することでミニプロトプラストを作製した。

4. 研究成果

(1)タバコ BY-2 ミニプロトプラストを光学顕微鏡で観察した。ミニプロトプラストでオートファゴソームが活発に形成され、液胞形成が進むとオートファゴソームは消失した。マクロオートファジー阻害剤 3-メチルアデニンで処理するとオートファゴソームは始終みられなくなったが、形成される液胞の大きさに差はなかった。すなわち、3-メチルアデニンによりオートファゴソーム形成を阻害しても液胞の形成は阻害されないことを確認した。一方で、液胞除去後30分以内に、核の周辺に酸性構造(小さな液胞)が現れ、これらの小さな構造が融合して液胞が形成されるように見えた。

(2)化学固定法で固定したタバコ BY-2 ミニプロトプラストを電子顕微鏡で観察した。オートファゴソームは、細胞膜周辺の ER あるいは細胞膜そのものを元として形成された板状構造が重なり合って形成されるように見えた。板状構造にはリボソームとは異なる電子密度の高い顆粒が多数、付着していた。板状構造が2枚以上重なることでオートファゴソームが形成されるように見えた。すなわち、電子顕微鏡でオートファゴソームの前駆構造を観察することができた。

(3)本研究の申請時にシロイヌナズナ ATG 遺伝子破壊培養細胞を作製していたが、2017年10月~12月になって野生型培養細胞が混入していることがわかったというトラブルが生じた。2017年

度後半から 2018 年度にかけて ATG5 遺伝子破壊培養細胞(atg5 細胞)を新たに作製し直した。さらに、ATG2 遺伝子破壊培養細胞(atg2 細胞)と野生型培養細胞(WT 細胞)も作製した。

(4)改めて作製したシロイヌナズナ培養細胞のオートファジーに関連した性質を調べた。WT 細胞、atg5 細胞、atg2 細胞をプロテアーゼ阻害剤を入れたシヨ糖飢餓培地で培養することによって、細胞内プロテアーゼ活性を阻害した条件下で栄養飢餓状態にすると、細胞内にすでに存在していた大きな液胞内に細胞質が蓄積した。atg5 細胞や atg2 細胞でも、WT 細胞に比べて量は少ないものの既存の大きな液胞内に細胞質が蓄積した。この結果は、植物細胞は ATG 遺伝子に依存しないオートファジー経路を持っており、この経路が栄養飢餓に応じて亢進することを示している。

(5)液胞形成を行なっているタバコ BY-2 ミニプロトプラストを電子顕微鏡で解析し、プロテアーゼ阻害剤を用いなくても、形成されて間もない小さな液胞には、細胞質が存在しており、その後、液胞内の細胞質が消化されることで液胞が完成することを見出した。すなわち、液胞はオートファジーを介して形成されることを端的に示すことができた。

(6)オートファゴソームのマーカータンパク質である GFP-Atg8 を恒常的に発現している BY-2 細胞より調製したミニプロトプラストにおける液胞形成を蛍光顕微鏡で観察すると、オートファゴソームが液胞の初期構造に取り込まれている様子が観察された。プロテアーゼ阻害剤である E-64d を加えると、液胞内に細胞質が蓄積し、蓄積した細胞質にはオートファゴソームが含まれていた。マクロオートファジー阻害剤 3-メチルアデニンで処理すると、液胞内に細胞質は未処理と同様に蓄積したが、オートファゴソームの蓄積は確認されなかった。液胞は形成された。

一方で、シヨ糖飢餓培地においてミニプロトプラストを培養すると、液胞形成が早く起こることを見出した。飢餓培地中では、マクロオートファジーが亢進しているため、この結果は、マクロオートファジーが液胞形成を促進することを示しており、オートファゴソームが形成中の液胞に融合する(あるいは、取り込まれる)観察と一致する。

(7)シロイヌナズナ野生型(WT)細胞、atg5 細胞、atg2 細胞よりミニプロトプラストを単離し、培養すると、液胞が再形成された。WT と atg5 で経時的に観察すると、WT、atg5 のどちらの株でも 3 時間後には粒状の液胞が複数、形成され、24 時間後には大きな液胞が形成された。両者に差は見出せなかった。atg5 細胞ではマクロオートファジー経路が欠損していると考えられるので、この結果は、マクロオートファジー経路が液胞の大きさが増大するスピードには寄与していないことを示している。E-64c で処理すると、WT、atg5 の間で、小さな液胞が現れて大きくなっていくという液胞の形成過程には差が見られなかったが、WT 株では処理後 3h、24h、48h で液胞内に細胞質の蓄積が観察され、atg5 株では細胞質の蓄積は観察できなかった。この結果はマクロオートファジーで中心的な役割を果たすオートファゴソームは液胞形成に参与しているものの、液胞の大きさの増大には寄与していないというタバコミニプロトプラストで得られた結果と一致する。ただ、液胞の形成にはマクロオートファジー経路以外のオートファジー経路が関与するという考えと一致しない。

(8)液胞を形成している最中の BY-2 ミニプロトプラストを電子顕微鏡で解析すると、オートファゴソームが観察できるが、オートファゴソーム以外に、通常のタバコ BY-2 細胞では観察されない「多数のチューブ状の膜胞が絡まった新奇の構造」も観察され、この構造が細胞質を包み込んで分解しているように見えた。「チューブ状の膜胞」にはリボソームが付着していることから rER に由来する構造であると考えられた。3-メチルアデニン処理するとオートファゴソームは消失したが、「新奇の rER 構造」は消失しなかった。これらの結果は、「rER に由来する新奇の構造」がオートファジーを実行することで、新規に液胞が形成されることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sadhu, A., Moriyasu, Y., Acharya, K., and Bandyopadhyay, M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Nitric oxide and ROS mediate autophagy and regulate Alternaria alternata toxin-induced cell death in tobacco BY-2 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ghosh, I., Sadhu, A., Moriyasu, Y., Bandyopadhyay, M., and Mukherjee, A.	4. 巻 62
2. 論文標題 Genotoxicity of nanoscale zerovalent iron particles in tobacco BY-2 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleus	6. 最初と最後の頁 211-219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Abhishek Sadhu, Ilika Ghosh, Yuji Moriyasu, Anita Mukherjee and Maumita Bandyopadhyay	4. 巻 33
2. 論文標題 Role of cerium oxide nanoparticle-induced autophagy as a safeguard to exogenous H ₂ O ₂ -mediated DNA damage in tobacco BY-2 cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 161-177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mutage/gey004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩原和貴 井上悠子 森安裕二
2. 発表標題 タバコBY-2細胞における栄養飢餓に応答した液胞膜動態
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中泉裕貴 大野友也 井上悠子 森安裕二
2. 発表標題 シロイヌナズナ培養細胞を用いた植物オートファジー経路の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田敦成
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケ老化過程における葉緑体の形態変化
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Most Mohoshena Aktar, Hsiuming Liu, Shigeaki Ueno, Yuko Inoue-Aono, Yuji Moriyasu
2. 発表標題 Effect of amino acids on dark-induced senescence in Physcomitrella
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上悠子、森安裕二、増子史織
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケを用いたストレス条件下における老化とオートファジーの関連
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木諭
2. 発表標題 ミニプロトプラストを用いた液胞形成過程の追跡
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮原拓也 高塚千広、井上悠子
2. 発表標題 シヨ糖飢餓条件下に置かれたタバコBY-2細胞で起こる様々なオートファジー経路
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩原和貴、井上悠子、森安裕二
2. 発表標題 タバコBY-2細胞におけるマイクロオートファジー
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森安裕二 井上悠子
2. 発表標題 タバコ培養細胞を用いた植物オートファジーの解析
3. 学会等名 日本植物学会題81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉川知佳 井上悠子 森安裕二
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケのオートファジー変異株における過酸化水素で誘導される細胞
3. 学会等名 日本植物学会題81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 兪羽豊 森安裕二 井上悠子
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケを用いた老化とオートファジーの関連の解析
3. 学会等名 日本植物学会題81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩原和貴 柳澤隆弘 浅沼友紀菜 高松字咲 井上悠子 森安裕二
2. 発表標題 タバコBY-2細胞におけるマイクロオートファジーの観察
3. 学会等名 第59回植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	金子 康子 (Kaneko Yasuko) (30194921)	埼玉大学・教育学部・教授 (12401)	

