

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02919

研究課題名(和文)ピースミールオートファジーを介したフレキシブルな葉緑体機能衰退のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of flexible decline in chloroplast function mediated by piecemeal autophagy

研究代表者

石田 宏幸 (Ishida, Hiroyuki)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：60312625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、葉緑体のピースミールオートファジーの基本機構について明らかにすることを目的として解析を進め、特に以下の成果を得た。(1) Rubisco-containing body (RCB) の単離方法の確立と新規レセプターの同定を進め、オートファジー隔離膜による葉緑体包膜の選択的な認識機構について知見を深めた。(2) RCBおよびのプラスチドボディーの形成と液胞への輸送における膜動態について、ATG8の動態を中心に明らかにした。(3) RCB経路におけるATG8アイソフォームの役割について、遺伝子やタンパク質レベルでの発現解析やノックアウト変異体の解析により明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

選択的オートファジーのメカニズムについては、動物や酵母の研究が先行するが、本研究では植物にユニークなオルガネラである葉緑体に関する基礎的知見を提供した。葉緑体成分の分解と再利用、および品質管理機構は、必須栄養素の体内移行、光合成、バイオマスや有用物質の生産に密接に関連している。その分子機構の一端を解明したことは、今後の作物の生産性や品質の向上を目指す農学研究において意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the fundamental mechanisms of piecemeal autophagy of chloroplasts and achieved the following results. (1) We established a method for isolating Rubisco-containing bodies (RCBs) and attempted to identify novel receptors, thereby gaining deeper insights into the selective recognition mechanism of chloroplast envelopes by autophagic isolation membranes. (2) We clarified the membrane dynamics involved in the formation and vacuolar transport of RCBs and plastid bodies, focusing on the dynamics of ATG8. (3) We elucidated the role of ATG8 isoforms in the RCB pathway through gene and protein expression analysis and the analysis of knockout mutants.

研究分野：植物栄養学

キーワード：葉緑体 オートファジー 光合成 栄養リサイクル シロイヌナズナ イネ

1. 研究開始当初の背景

植物は光独立栄養生物であり、吸収した無機栄養素及び二酸化炭素を材料に光合成により有機化合物を生合成して成長する。よって植物の成長は、自らを取り巻く環境とその変動に強く支配されている。そのため植物は様々な環境下に適応し成長・生存する術を発達させており、その一つとして細胞及び個体レベルでの栄養リサイクルがある。光合成を行う葉緑体には窒素栄養の多くが分配されタンパク質として機能している。**Rubisco**などの主要な葉緑体タンパク質は葉の老化時や栄養飢餓条件下では分解され、転流窒素源や糖の代替呼吸基質として個体の成長や生存に重要なリソースとなる。オートファジーは様々な発生過程や飢餓などのストレス条件下で働く真核生物に普遍的細胞内分解システムである。葉緑体は特異小胞 **RCB (Rubisco-containing body)** としてピースミール(部分的・段階的)オートファジーにより液胞に運ばれ分解されるが、その詳細な機構は不明であった。

2. 研究の目的

オートファジーはバルクな分解経路としての特徴を持ち、サイトゾルは基本的には非選択的にオートファゴソームに取りこまれる。一方で、凝集タンパク質や特定のオルガネラに対する選択的オートファジーの存在も明らかにされている。選択的オートファジーでは、オートファゴソーム形成に必須なコア **ATG** 因子に加えて、様々なオートファジーレセプターが特定の基質認識に関わる因子として重要な役割を担っている。レセプターにはオートファゴソームに局在する **ATG8** と直接相互作用する領域が存在し、それらの相互作用によって特定の基質がレセプターとともにオートファゴソーム内に取り込まれた後、液胞に運ばれ分解される。本研究では、葉緑体のピースミールオートファジーの基本機構について明らかにすることを目的とした。特に、葉緑体包膜の一部分が、どのようなレセプターを介して、どのようなメカニズムでオートファジーの隔離膜に認識され **RCB** やオートファゴソームを形成するのか、形成された **RCB** はどのような経路や膜動態で液胞内腔にまで輸送され分解されるのか、また、この時の **ATG8** アイソフォームの役割に注目した。

3. 研究の方法

(1) オートファジー隔離膜による葉緑体包膜の選択的な認識機構の解析

シロイヌナズナの野生体および *gfs9-5* 変異体の暗所芽生えを材料とした。播種後 3 日目の暗所芽生えから細胞破碎液を調製し、遠心分離による粗分画を行った後、**OptiPrep** の不連続密度勾配による超遠心分離に供した。**RCB** に富むフラクションを、共焦点レーザー顕微鏡観察で確認した後、抗体磁気ビーズ法により **ATG8** と共免疫沈降するタンパク質を回収した。回収された画分を **SDS-PAGE** に供し、ゲルからタンパク質を回収後、還元アルキル化およびトリプシン消化を行い、生じたペプチドをマス解析に供した。レセプター候補遺伝子の **T-DNA** 挿入によるノックアウト変異体は **ABRC** から取り寄せた。

(2) **RCB** およびのプラスチドボディー (**PB**) の膜動態と液胞への輸送過程の解析

各種蛍光タンパク質を融合させたオルガネラマーカーを発現するシロイヌナズナを材料に、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行い動画や静止画を取得した。

(3) **RCB** 経路における **ATG8** アイソフォームの役割の解析

イネを材料に、**ATG8** がノックアウトされた変異体を **CRISPR/Cas9** に基づくゲノム編集法により作出した。4 種類の **ATG8** 遺伝子配列情報からガイド **RNA** 配列を設計し、コンストラクトを作成した。作成した **CRISPR/Cas9** コンストラクトを、アグロバクテリウムを用いた形質転換法により野生体イネに導入した。変異の確認は、標的部位を **PCR** 増幅後、サンガーシーケンスで行った。**ATG8** の遺伝子発現解析には定量用リアルタイム **PCR**、タンパク質の解析には、**SDS-PAGE** で分画後、特異抗体を用いたウェスタンブロット法を用いた。

4. 研究成果

(1) オートファジー隔離膜による葉緑体包膜の選択的な認識機構の解析

植物組織からの高純度なオートファゴソームの単離方法の確立を目指し、*gfs9-5* 変異体から調製した細胞破碎画分を、**OptiPrep** の不連続密度勾配による超遠心分離に供し、葉緑体(プラスチド)の一部を内包する **RCB** とサイトゾルを内包する一般オートファゴソームを密度の違いに基づきそれぞれ分取した。純度に影響を及ぼすパラメータである破碎緩衝液の組成、超遠心分離の条件、免疫磁気ビーズの種類や免疫反応/洗浄液の組成などについて最適化を行った。単離した **RCB** に富む画分をマス解析に供してレセプター候補の同定を進めた。

葉緑体外包膜に局在する 3 種類のレセプター候補をコードする遺伝子を欠損する変異体を取り寄せ、**RCB** の *in vivo* 観察が可能な *gfs9-5* 変異体との 2 重変異体を作成した。これらの 2 重変異体について、**RCB** 蓄積の有無について共焦点レーザー顕微鏡で解析した。その結果、2 重変異体では、いずれも *gfs9-5* の単一変異体と同様の **RCB** のサイトゾルへの蓄積が確認され、これら 3 種の包膜局在の因子は、**RCB** 形成には必須ではないことが示唆された。

(2) RCB およびのプラスチドボディー (PB) の膜動態と液胞への輸送過程の解析

葉緑体の RCB を介したピースミールオートファジーの過程では、隔離膜が葉緑体表面の突出構造にとりつきくびれを生じさせ、最終的に小胞形成に至る様子が、隔離膜やオートファゴソームのマーカである GFP-ATG8 を用いた解析で確認された。この一連の過程については、高精細なライブセルイメージングで捉えることができた。また RCB が隔離膜の成熟化に伴って葉緑体本体から切り離される過程では、ダイナミンやその他の葉緑体分裂リングのリクルートにかかわる因子群は必須ではなかった。

サイトゾルにプラスチドボディー (PB) を過剰蓄積する *gfs9-5* 変異体においても、同種のマーカである RFP-ATG8 がプラスチド表面の突出構造を覆うように局在していることが確認された。しかしながら *gfs9-5* 変異体において形成後のほとんどの PB には RFP-ATG8 のシグナルは見られなかった。この結果は、*gfs9-5* においてプラスチドボディーはプラスチド本体から切り出される途中や、その直後は RFP-ATG8 でラベルされたオートファゴソーム膜に包まれているが、その後はオートファゴソーム膜が失われた状態で蓄積していることを示唆した。

(3) RCB 経路における ATG8 アイソフォームの役割の解析

オートファジーにおける基質選択性の鍵因子である ATG8 について、CRISPR/Cas9 に基づくゲノム編集法によりノックアウト体を作成した。材料には ATG8 を a~d の 4 種類持つイネを用いた。ゲノムシーケンスにより ATG8 遺伝子上に設計されたガイド RNA 配列上流に欠失が確認された個体を選抜した。遺伝子型を確定させるため、遺伝分離によって Cas9 遺伝子の抜け落ちた個体を選抜後、ノックアウトによる影響を定量 PCR やウェスタンブロットで確認した。さらに、ATG8 シングルノックアウト変異体を交配させ、ATG8 ダブル及びトリプルノックアウト変異体を複数系統確保した。

野生体と ATG8 ノックアウト変異体を用いて、ATG8 の発現解析を行った。葉においては生育段階が進むにつれて全ての ATG8 mRNA 量が増加した。またオートファジーが重要な役割を果たす幼穂では、ATG8 mRNA の総量が他の器官に比べて特に高かった。野生体における ATG8 発現量の割合は、系統 I-ATG8 (a+b+c) が 95%、系統 II-ATG8 (d) が 5%であった。系統 I 内での割合は、ATGa と ATGc が同程度で、ATGb に比べて高かった。*atg8bc* 二重変異体では ATG8a、*atg8d* 変異体では系統 I-ATG8 の mRNA 量が増加した。ATG8 タンパク質は、系統 I では free ATG8 と ATG8-PE 結合型の両方が検出されたが、系統 II ではいずれも検出されなかった。系統 I-ATG8 タンパク質量は *atg8c* 変異により著しく減少したが、*atg8a* や *atg8b* 変異では影響がなかった。以上から基底レベルで存在する ATG8 タンパク質は主に系統 I であり、特に ATG8c の割合が高いことが示唆された。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishida, H., Okashita, Y., Ishida, Hiromi, Hayashi, M., Izumi, M., Makino, A., Bhuiyan, N.H., van Wijk, K.J.	4. 巻 62
2. 論文標題 GFS9 affects piecemeal autophagy of plastids in young seedlings of Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1372-1386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcab084	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 Kikuchi, Y., Nakamura, S., Woodson, J.D., Ishida, H., Ling, Q., Hidema, J., Jarvis, R.P., Hagihara, S., Izumi, M.	4. 巻 183
2. 論文標題 Chloroplast Autophagy and Ubiquitination Combine to Manage Oxidative Damage and Starvation Responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1531-1544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.20.00237	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 Nakamura, S., Hagihara, S., Otomo, K., Ishida, H., Hidema, J., Nemoto, T., Izumi, M.	4. 巻 62
2. 論文標題 Autophagy contributes to quality control of leaf mitochondria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 229-247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcaa162	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 菊地渉, 石山敬貴, 石田宏幸
2. 発表標題 オートファジーはイネ群落における垂直の葉身窒素勾配の形成に寄与する
3. 学会等名 日本土壌肥料学会愛媛大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石田宏幸, 北山僚太郎, 菊地渉, 和泉創大, 鈴木亮大, 小松京平
2. 発表標題 イネの栄養素再利用におけるATG因子の役割
3. 学会等名 第15回オートファジー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤桂, 岡下悠, 石田宏幸
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるプラスチドのオートファジー経路とエンドソーム系の交差性の検証
3. 学会等名 第15回オートファジー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菊地渉, 石田宏幸
2. 発表標題 オートファジーはイネ水田群落における垂直の葉身窒素勾配を形成しバイオマス生産に寄与する
3. 学会等名 第15回オートファジー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北山僚太郎, 和泉創大, 石田宏幸
2. 発表標題 イネの稔性におけるATG8アイソフォームの寄与について
3. 学会等名 第15回オートファジー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菊地 渉, 石田宏幸
2. 発表標題 オートファジーはイネ水田群落の下位葉におけるタンパク質分解に寄与し垂直の葉身窒素勾配を形成する
3. 学会等名 日本植物生理学会神戸年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hiroyuki Ishida, Yu Okashita, Hiromi Ishida, Makoto Hayashi, Masanori Izumi, Amane Makino, Nazmul H. Bhuiyan, Klaas J. van Wijk
2. 発表標題 GFS9 affects piecemeal autophagy of plastids in young seedlings of Arabidopsis
3. 学会等名 10th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村咲耶, 石田宏幸, 萩原伸也, 泉正範
2. 発表標題 デンプン代謝産物の過剰蓄積はオートファジー依存的な葉緑体分解を誘導する
3. 学会等名 日本植物生理学会仙台年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡下 悠, 泉 正範, 牧野 周, 石田宏幸
2. 発表標題 プラスチドボディを異常蓄積する gfs9-5変異体ではオートファジーの活性化が起きている
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村 翼, 和田慎也, 泉 正範, 中村咲耶, 牧野 周, Gad Galili, 石田宏幸
2. 発表標題 シロイヌナズナにおいてATG8-interacting protein (AT11およびAT12)の発現抑制は葉緑体のオートファジーに影響を及ぼさない
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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