

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03281

研究課題名(和文) ユビキチン様オートファジー蛋白質との相互作用を介した異常オルガネラ認識機構

研究課題名(英文) Abnormal organelle recognition mechanism through interactions with ubiquitin-like autophagy proteins

研究代表者

吉本 光希 (Yoshimoto, Kohki)

明治大学・農学部・専任教授

研究者番号：40399316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーはオルガネラを含む細胞質成分を液胞に送り込み分解する液胞内分解機構の一つである。申請者はこれまでに、植物が光合成を行なう中でオートファジーを発動し、緑葉ペルオキシソームの品質管理を行うことで細胞の恒常性維持に貢献していることを見出したが、オートファジーがどのようにして異常オルガネラを認識し、それを過不足なく分解するのか、その機構は明らかでなかった。本研究課題の目的は、ダメージを受けたオルガネラが、いつ、どのようにして認識されて分解されるのか、そのメカニズムを共免疫沈降実験などにより分子レベルで明らかにすることであり、その結果をもとに緑葉ペルオキシソームの品質管理機構の解明を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一度大地に芽生えたと動くことのできない植物が、過酷な環境に適応するために、細胞内分解系をどのように利用してオルガネラの品質を保っているのかを分子レベルで明らかにすることで、植物の巧みな生存戦略の一端を紐解くことができると考える。さらに、その分子機構を従属栄養生物のそれと比較することは進化を考えるうえでも大変重要で興味深い問題である。また、植物オートファジーの研究からペルオキシソームの品質管理の分子機構に迫る点は独創的であり、学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is the major system responsible for the vacuolar degradation of organelles and cytosolic macromolecules. I have so far discovered that plants activate autophagy during photosynthesis and control the quality of green leaf peroxisomes, contributing to the maintenance of cellular homeostasis. However, it was not clear how autophagy recognizes abnormal organelles and degrades them neither too much nor too little. The purpose of this research project is to elucidate when and how damaged organelles are recognized and degraded, and to clarify the mechanism at the molecular level by such as co-immunoprecipitation experiments. Based on the resultant results, I tried to elucidate the quality control mechanism of green leaf peroxisomes.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：オートファジー オルガネラ 分解 品質管理

1. 研究開始当初の背景

芽生えた場所で生涯を過ごす植物は、変化する環境の中で乾燥や高温、土壌元素の欠乏といった様々な非生物学的ストレスや生物学的ストレスに適応しながら生きていくことが求められる。これら環境ストレスの耐性機構の一つとしてオートファジーが挙げられる。オートファジーはタンパク質やオルガネラを丸ごと分解する細胞内自己分解系の一つで、以前は選択的細胞内分解機構・ユビキチンプロテアソーム系と対比され、非選択的な細胞内分解系と考えられていた。しかし、近年のオートファジー研究の発展に伴い、オートファジーの選択的基質の存在が明らかになってきた。

植物において、熱、塩、干ばつストレスなどが原因で生成された変性タンパク質の凝集体や、生育過程において障害を受けたオルガネラが、オートファジーにより選択的に分解されることで、細胞内の恒常性や各オルガネラの品質の維持が図られていることが報告されている。また、暗所による糖飢餓条件下では、オートファジーが葉緑体の一部を選択的に分解することで栄養供給に働いていることも最近報告された。このように、選択的オートファジーは植物の環境応答にとって重要であると考えられるが、分解基質がどの様に特異的に認識され選択的に分解されるのか、その分子機構はほとんど分かっていなかった。

申請者のそれまでの観察において、オートファジー変異体 (*atg* 変異体) は野生型に比べ、ペルオキシソームの数が増大し、ペルオキシソーム局在タンパク質量も増えていたが、一方で、他のオルガネラにおいては変化がなかった。この結果は、植物の通常の発達過程において、ペルオキシソームだけがオートファジーによって特異的に認識され、分解されていることを示唆している。さらに、電子顕微鏡観察によって、オートファゴソーム前駆体 (隔離膜) までは作ることができると考えられる *atg2* 変異体において、隔離膜がペルオキシソーム周辺に局在しており、それは常に電子密度の高い領域に接していることを見出した (図1)。この発見は、オートファゴソームが異常なペルオキシソームを効率よく認識する何らかの選択メカニズムが存在することを強く示唆するものである。従来、オートファジーは非選択的な分解だと思われていたが、近年の酵母や動物研究において、オートファゴソーム膜上に局在する ATG8 タンパク質が特異的な相互作用することにより、あるタンパク質を選択的に認識し、分解する機構があることが報告されている。したがって、オートファジーによる選択的な緑葉ペルオキシソームの分解機構を解明するため ATG8 タンパク質と相互作用する因子の単離・同定を試みた。

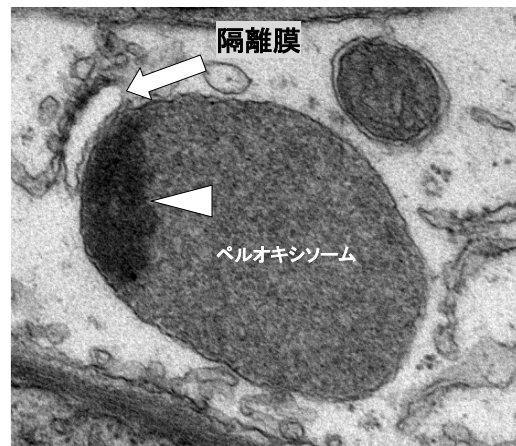


図1. ペルオキシソームの選択的分解
オートファジー不能植物において観察されるペルオキシソームには電子密度の高い領域が存在し(矢印)、それを認識するかのようにオートファゴソーム前駆体の膜構造(隔離膜:矢印)がしばしば検出される。この膜構造体が観察されるのは電子密度の高い領域側だけである。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、ダメージを受けたオルガネラが、いつ、どのようにして認識されて分解されるのか、そのメカニズムを共免疫沈降実験などにより分子レベルで明らかにすることであり、その結果をもとに植物特異的なオルガネラ・緑葉ペルオキシソームの品質管理機構の一端を解明する。

3. 研究の方法

(1) GFP-ATG8e を発現させたトランスジェニック植物を 6 週間、長日条件下で生育させ、その

植物体から緑葉ペルオキシソームを単離した。緑葉ペルオキシソームの単離はパーコールとスクロースを用いた密度勾配遠心法によって行った。チューブの下層から 60%スクロース、36%スクロース、38%パーコールと 36%スクロースを 1:2 の割合で、混合した溶液、2:1 で混合した溶液、38%パーコール、15%パーコールを重層し、その上に全抽出タンパク質サンプルを乗せ、23500 g で超遠心した。単離後、そのペルオキシソーム画分を用いて GFP 抗体で共免疫沈降してくるタンパク質を高感度質量分析器 (LC-MS/MS) で同定した。

(2) コントロール植物および *atg* 変異体を通常培地 (+Zn) で 21 日間水耕生育させた後、-Zn 培地および+Zn 水耕培地に移植し、3 および 5 日後にタンパク質を抽出し、GFP 抗体を用いた共免疫沈降実験に供した。

4. 研究成果

(1) ATG8 アイソフォームの異なる選択性の可能性

シロイヌナズナには 9 つの ATG8 アイソフォームが存在しており、それぞれが機能分担している可能性がある。ターゲットの選択性についてもそれぞれのアイソフォームが異なる分子を認識する可能性が考えられたため、9 種類の ATG8-GFP を植物用ベクターに挿入したコンストラクトをそれぞれ作成した。そのうちの数種類に関しては形質転換シロイヌナズナを作出した。

(2) ペルオキシソーム単離方法の確立

上述の方法で緑葉ペルオキシソームの単離を行ったが、植物の生育状態によっても単離ペルオキシソームの純度に影響があることが分かってきた。葉緑体のコンタミをできるだけ最小限にとどめるため、使用する植物体は一晩暗所に置くのが良かった。葉緑体内に蓄積したデンプンを消費する効果があるためである。デンプンを蓄積した葉緑体は重くなり、緑葉ペルオキシソームと区別しにくくなる。暗処理によって、より純度の高い緑葉ペルオキシソームの単離が可能となった (図 2)。基本的なペルオキシソーム単離方法は Reumann et al., 2007, 19, 3170-3193, Plant Cell を参考にした。

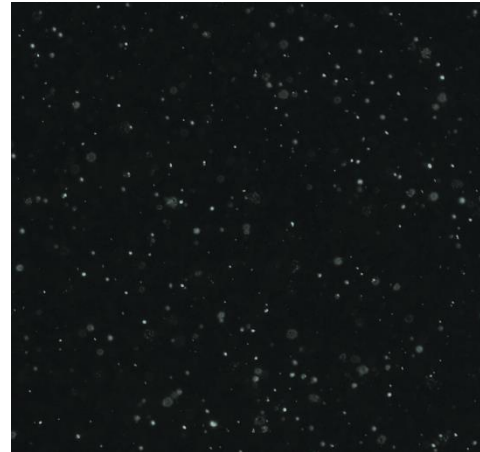


図 2. 高純度単離緑葉ペルオキシソーム

緑葉ペルオキシソーム単離方法を確立するためのコントロール実験として、ペルオキシソーム移行シグナル融合 GFP を発現させたオートファジー変異体を用いて緑葉ペルオキシソームを単離した(白いドット状構造が緑葉ペルオキシソーム。緑葉ペルオキシソームが濃縮されている様子がうかがえる)。

(3) GFP 抗体を用いた共免疫沈降による異常緑葉ペルオキシソーム選択性決定因子単離・同定

9 種類の ATG8 アイソフォームの相互作用因子を一度に探索することは不可能なため、優先順位をつけることとした。緑葉ペルオキシソームは光合成の過程で光呼吸と呼ばれる代謝を担うが、その過程で生じる活性酸素種によってダメージを受け、機能不全となったものがオートファジーによって分解されていると考えられる。また、光呼吸は高二酸化炭素条件下では行われない。そこで、大気 CO₂ 条件と高 CO₂ 条件で遺伝子発現に変動がある ATG8 アイソフォームをパブリックデータベースから検索した。その結果、9 つのアイソフォームのうち特に ATG8e の遺伝子発現が CO₂ 条件で変動することが明らかとなり (大気 CO₂ 条件で発現が上昇し、高 CO₂ 条件で低下)、緑葉ペルオキシソームの機能とリンクしていることから、異常ペルオキシソームの選択性決定にかかわる有力な候補として考えられた。

したがって、ATG8e-GFP 植物を優先的に作出し、その形質転換植物からペルオキシソームを単離した。異常な緑葉ペルオキシソームを認識するためのレセプター/アダプタータンパク質はペルオキシソーム膜タンパク質の可能性が高いことから、膜タンパク質の可溶化条件は非常に重要であると考えられた。したがって、様々な界面活性剤とその濃度に関して、最適条件の検討を行った。界面活性剤として、タンパク質の変性が少ないマイルドな非イオン性の Triton-

X100, *n*-Dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM), および, NP-40 を用いてペルオキシソーム膜タンパク質の可溶化の程度を調べた。その結果、Triton-X100 と DDM の可溶化効率が高かったため、これら二つの界面活性剤について濃度を振り、最適濃度の検討を行った。最終的に、効率よく可溶化できる界面活性剤として 1% Triton-X100 および 1.5% DDM を今後の実験に用いることとした。その後、ペルオキシソームフラクションを用い、GFP 抗体により共免疫沈降を行った。質量分析によって 1000 種類弱のタンパク質に相当するペプチド断片が検出されたが、その中で、ネガティブコントロールでは検出されないが、GFP 抗体結合磁気ビーズで共免疫沈降したサンプルで多く検出されるものを候補とし、さらに、ペルオキシソームに局在するタンパク質やオルガネラの品質維持に機能していそうなものを有力候補として、最終的に 4 つのタンパク質に絞った。その中でも、機能未知であることから、Peroxisome membrane protein (PMP) について更なる解析を行うこととした。

(4) PMP の解析

候補として単離されたタンパク質は、PMP ファミリータンパク質の一つであり、235 残基から成るタンパク質であった。膜貫通ドメイン検索サイト TMHMM を用いて膜貫通ドメインの予測を行った結果、N 末端と C 末端が細胞質に露出した 2 回膜貫通タンパク質であると予測された。さらに、ATG8 との結合に必要とされる AIM(W/Y/F-X-X-L/I/V) の所在を、AIM 配列検索サイト iLIR (<https://ilir.warwick.ac.uk>) を用いて調べた結果、AIM は 11 か所存在した。そのうち 7 か所 (28-33, 75-80, 171-176, 179-184, 186-191, 194-199, 221-226 残基) は細胞質側に露出した領域に存在していると予測され、SMISS-MODEL を使いタンパク質構造予測した結果、7 か所のうち 5 か所 (28-33, 171-176, 179-184, 186-191, 194-199 残基) が構造的にもタンパク質外部に露出すると考えられた。これより、PMP は ATG8e と結合する可能性があると考えられた。

PMP22 ファミリーは 10 個のタンパク質から構成される。マルチシーケンスアライメントプログラム Clustal Omega を用いてマルチアライメントをした結果、ファミリー間での相同性は低く、さらに、膜貫通ドメイン検索サイト TMHMM を用いて膜貫通ドメインの予測を全ファミリータンパク質に対して行った結果、ファミリー間で膜貫通回数に共通性は見られなかった。これに加え、MS 解析においてもこれら PMP ファミリータンパク質は検出されなかったことから、ファミリー内で PMP と機能重複しているタンパク質はないと考えられた。

そこで次に、ATG8e と PMP が結合するか確認するために、FLAG tag (DYKDDDDK) を N 末端に融合したタンパク質 FLAG-PMP を *atg2* GFP-ATG8e にアグロバクテリウム法を用いて導入し、*atg2* GFP-ATG8e UBQ10::FLAG-PMP を作成した。この植物体の葉にクロスリンク処理を施した後、抗 FLAG 抗体磁気ビーズ (Anti-DYKDDDDK MicroBeads) を用いて共免疫沈降実験を行い、その後、抗 ATG8a 抗体を用いてウエスタンブロットングを行った。その結果、GFP-ATG8 が検出された。これより、PMP と ATG8 は結合している可能性が示された。しかし、PMP 欠損変異体における緑葉ペルオキシソームの挙動を調べた結果、野生型の挙動とほとんど変わらなかったため、PMP は選択性付与因子候補ではないかもしれない。

残念ながら選択性付与因子タンパク質の発見には至っていないが、この原因として、ATG8 と相互作用するタンパク質が数百~千個と非常に多く検出されること、また、緑葉ペルオキシソーム

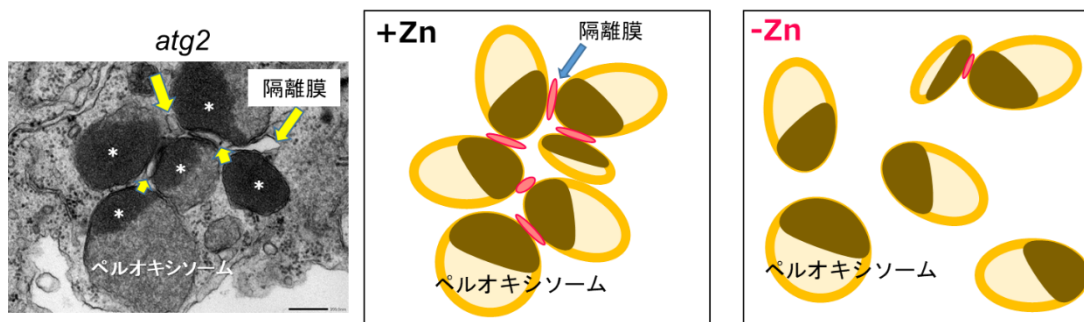


図 3.

ーム分解に関わるレセプター・アダプタータンパク質はペルオキシソーム膜タンパク質でない可能性もあり、候補タンパク質の絞り込みが難しい点が挙げられる。

そのような状況の中、本研究とは全く異なる研究『亜鉛欠乏におけるオートファジーの役割』を行う過程で、偶然にも、レセプター・アダプタータンパク質を絞り込むことができそうな興味深い現象を発見した。上述の *atg2* 変異体では、隔離膜と電子密度の高い異常な領域近傍の膜との結合を介して緑葉ペルオキシソームが凝集することを見出していたが(図 3, 左および中央図)、亜鉛欠乏条件ではその凝集が起こらず、ペルオキシソームが分散していた。この結果は、亜鉛欠乏条件では ATG8 とレセプター・アダプタータンパク質の相互作用がなくなった為と考えられた(図 3, 右図)。そこで、今後は、亜鉛十分条件(+Zn)と亜鉛欠乏条件(-Zn)で Co-IP を行い、+Zn で同定したタンパク質から -Zn で同定したタンパク質をサブトラクトすることで、候補を絞り込み、目的のレセプター・アダプタータンパク質を同定する予定である。

(5) 逆遺伝学的解析による異常ペルオキシソーム選択性決定因子同定の試み

酵母や哺乳類においてもペルオキシソームの選択的分解(ペキシソファジー)が報告されている。哺乳類ペキシソファジーではユビキチン化されたペルオキシソームタンパク質を認識する Neighbor of BRCA1 gene 1 protein (NBR1; カーゴレセプター)が ATG8 と結合することでオートファジーに選択性を与えていると考えられている。NBR1 が植物においても緑葉ペルオキシソームの選択性に寄与しているのか、NBR1 ホモログのノックアウト植物をそれ単離して検証した。もし、NBR1 が植物ペキシソファジーの選択性決定因子であった場合、その変異体では緑葉ペルオキシソームの数が増大しているはずである。しかし、*nbr1* 欠損変異体においてペルオキシソームは高蓄積していなかった(図 4)。加えて、野生型植物と *atg2* 変異体からの単離ペルオキシソームにおいてタンパク質のユビキチン化に差が見られなかったことから NBR1 は植物ペキシソファジーの選択性決定因子ではないと結論づけた。

一方、酵母におけるペキシソファジーのアダプターとして ATG11 が知られている。そこで、植物ペキシソファジーにおける ATG11 ホモログの関与を検証した。*atg11* 変異体を選抜し、緑葉ペルオキシソームの動態を観察したところ、細胞当たりのペルオキシソーム数が野生型よりも多く観察された。この結果は ATG11 が選択性決定因子の可能性を示唆したが、電子顕微鏡によるオートファゴソーム前駆体構造の観察の結果はそれを否定した。

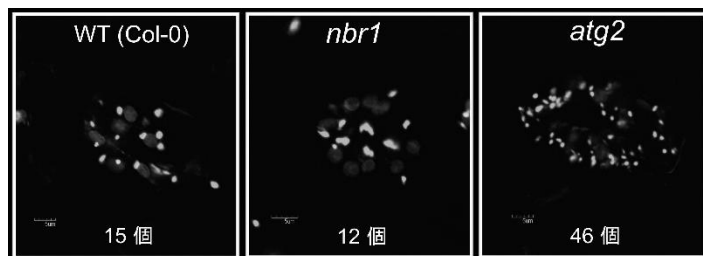


図 4. *nbr1* 欠損変異体におけるペルオキシソームの挙動

atg2 変異体ではペルオキシソーム(輝点)が異常に高蓄積しているが(孔辺細胞当たり 46 個)、*nbr1* 変異体であってもペルオキシソームの数は野生型とほとんど変わらない(それぞれ孔辺細胞当たり 12 個と 15 個)。

た。*atg2 atg11* 二重変異体を作成し、透過型電子顕微鏡により膜構造を観察したところ、*atg11* 変異体バックグラウンドであってもオートファゴソーム前駆体が異常ペルオキシソームに接着していた。このことは ATG11 が植物ペキシソファジーのアダプターでないことを示している。では、どうして *atg11* 変異体において緑葉ペルオキシソームが増加していたのであろう? 別の実験から、酵母では選択的オートファジーのみに機能している ATG11 が、植物ではバルクオートファジーにも関与していることが明らかとなった。つまり、植物では *atg11* 変異体は *atg2* 変異体と同様にオートファゴソーム形成に一部欠損があると考えられた。

以上の結果を踏まえると、植物ペキシソファジーのレセプターないしアダプターは植物特有であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Robert, G., Yagy, M., Lascano, R., Masclaux-Daubresse, C., and Yoshimoto, K.	4. 巻 16
2. 論文標題 A proposed role for endomembrane trafficking processes in regulating tonoplast content and vacuole dynamics under ammonium stress conditions in Arabidopsis root cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Signal. Behav.	6. 最初と最後の頁 e1924977 (1-4)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2021.1924977.	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 Shinozaki, D., and Yoshimoto, K.	4. 巻 26
2. 論文標題 Autophagy balances the zinc-iron seesaw caused by Zn-stress.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trends Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 822-884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tplants.2021.06.014	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 -
1. 著者名 Shinozaki, D., Notaguchi, M., and Yoshimoto, K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Importance of non-systemic leaf autophagy for suppression of zinc starvation induced-chlorosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Signal. Behav.	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2020.1746042	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 -
1. 著者名 Izumi, M., Yoshimoto, K., and Batoko H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Editorial: Organelle autophagy in plant development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front. Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00502	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 Robert, G., Yagyū, M., Koizumi, T., Naya, L., Masclaux-Daubresse, C., and Yoshimoto, K.	4. 巻 105
2. 論文標題 Ammonium stress increases microautophagic activity while impairing macroautophagic flux in Arabidopsis roots	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant J.	6. 最初と最後の頁 1083-1097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.15091	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 Yoshitake, Y., Nakamura, S., Shinozaki, D., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohta, H., and Shimojima, M.	4. 巻 185
2. 論文標題 RCB-mediated chlorophagy caused by oversupply of nitrogen suppresses phosphate-starvation stress in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 318-330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiaa030	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 -

1. 著者名 Oikawa Kazusato, Goto-Yamada Shino, Hayashi Yasuko, Takahashi Daisuke, Kimori Yoshitaka, Shibata Michitaro, Yoshimoto Kohki et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Pexophagy suppresses ROS-induced damage in leaf cells under high-intensity light	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7493-7493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-35138-z	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 齋藤由花、藤森梢、吉本光希
2. 発表標題 オートファジーと概日時計間の相互作用の解析
3. 学会等名 日本植物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳生真子、吉本光希
2. 発表標題 植物におけるマイクロオートファジー関連因子の探索
3. 学会等名 日本植物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳生真子、吉本光希
2. 発表標題 植物における液胞膜動態を介する自己分解機構 “マイクロ” オートファジー関連因子の探索
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本光希
2. 発表標題 アンモニアストレス下におけるマクロ・マイクロオートファジーの膜動態
3. 学会等名 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉竹悠宇志、吉本光希
2. 発表標題 リン酸リサイクルにおけるオートファジーの重要性
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinozaki D., and Yoshimoto K.
2. 発表標題 Wide-range zinc homeostasis management via autophagy in plants
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 篠崎大樹、吉本光希
2. 発表標題 細胞内自己成分分解系オートファジーが担う植物体内亜鉛ホメオスタシス
3. 学会等名 第33回日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉竹悠宇志、吉本光希
2. 発表標題 葉緑体局在DPD1エキソヌクレアーゼ欠損変異体ではクロロファジーが抑制される
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------