

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06230

研究課題名(和文)植物の老化過程における葉緑体DNA分解の生理的意義の解明

研究課題名(英文)Physiological role of chloroplast DNA degradation during leaf senescence

研究代表者

高見 常明(Takami, Tsuneaki)

岡山大学・総合技術部・技術専門職員

研究者番号：70614254

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)：植物が持つ葉緑体には独自のDNAが存在し、その量は植物の発達過程や組織特異的に制御されている。一方で葉緑体DNAが分解されることに対する生理的意義については議論の余地を残している。また種子植物においてオルガネラDNA分解酵素が広く保存されており、その機能も多様化していることも考えられる。本研究では葉緑体DNA分解の生理的意義の解明を目的にモデル植物のシロイヌナズナ(双子葉類)とイネ(単子葉類)を用いて研究を行い、オルガネラDNA分解が遺伝子発現制御を介し植物の老化に関与していることと、植物種によってオルガネラDNA分解による植物の成長に与える寄与度が異な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

オルガネラDNA研究は酵母や藻類を用いて主に複製、安定性、修復などに関する知見が報告されているが、分解に焦点を当てた研究は少ない。このような研究動向の中で、本研究によってオルガネラDNA分解と植物の老化との関係性が明らかとなった。また単子葉類のイネを用いて研究を行った結果、オルガネラDNA分解酵素DPD1は広く種子植物に保存されているが、その寄与度は植物種により異なっていることが明らかとなった。これらの成果を基盤とすることで作物の育種・品種改良への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chloroplasts contain own DNA, and the amount of chloroplast DNA (cpDNA) is regulated in a tissue-specific manner and during leaf senescence. However, the physiological role of cpDNA degradation remains unclear. In addition, organelle exonuclease, DPD1, is widely conserved in seed plants, and its function may be diversified. In this study, we conducted several experiments using model plants *Arabidopsis thaliana* (dicot) and rice (monocot) for investigating the physiological role of cpDNA degradation. Our results suggested that organelle DNA degradation affects process of leaf senescence through regulating gene expression. Based on our results, the contribution of organelle DNA degradation for plant fitness is varied in plant species.

研究分野：植物生理学

キーワード：オルガネラDNA 葉緑体 光合成 老化

1. 研究開始当初の背景

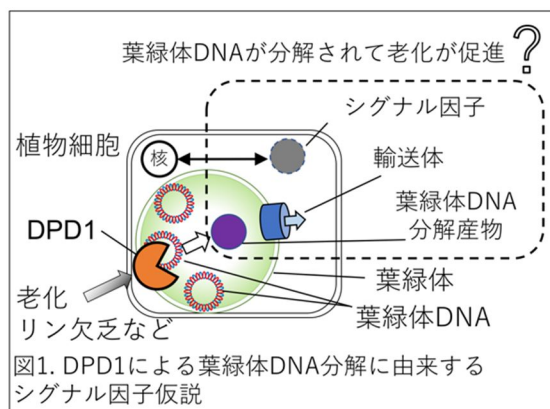
1960年代に色素体(葉緑体)とミトコンドリアにDNA(オルガネラDNA)があることが明らかとなった。葉緑体には非常に多くのDNAがあるが、成熟葉や成熟花粉では葉緑体DNAがほとんど観察されない例が報告されており、組織により変動または消失すると考えられている。申請者の所属する研究室では、シロイヌナズナの花粉に着目し、「花粉のオルガネラDNAが分解されない」突然変異体を単離し、この原因遺伝子を通してオルガネラヌクレアーゼDPD1を同定した。DPD1は色素体とミトコンドリアに共局在し、Mg依存性の3'エキソヌクレアーゼ活性を有し、加えて配偶体で発見されたことから片親遺伝現象への関与考えられたが、そのような結果は得られなかった。これらのことから配偶体に限らずオルガネラDNA分解の生理現象を明らかにする目的で研究を開始し、その過程でDPD1が欠損することで老化の遅延やリン欠乏処理による生育低下、リン欠乏応答遺伝子群の発現低下、リン再分配能低下など多面的に植物の成長が攪乱されることを明らかにされてきた。

これらの結果は葉緑体DNA分解されることで適切に葉の老化が進行することを示唆しており、葉緑体DNA分解が起こることと植物の生活環が密接に関係しているという仮説をたてオルガネラDNA分解の生理的意義を明らかにすること目的とし研究を行った。

2. 研究の目的

これまでに *dpd1* 変異体を用いた解析からオルガネラDNAが植物の成長過程や組織特異的に分解されることを明確に示してきた。しかしながら葉の老化過程や花粉の成熟過程といった植物の生活環においてオルガネラDNAが分解される生理的意義に対しての解答は未だ得られていない。

線形動物・線虫の精子ミトコンドリアではミトコンドリアDNA(mtDNA)が初めにエンドヌクレアーゼGにより分解され、その後オートファジーにより精子ミトコンドリアが分解されるモデルを提唱されている。また近年、バクテリアや高等植物においてDNAの構成要素であるヌクレオチドやヌクレオシドがセカンドメッセンジャーとして栄養飢餓時の緊縮応答と関わっていることが報告されている。以上のことから、DPD1による葉緑体DNAの分解によって分解産物あるいはそれらに関連するシグナル因子が核とクロストークと作業仮説を立て、葉の老化過程に担っていることを明らかにすることを目的とした。



3. 研究の方法

本申請ではシロイヌナズナ *dpd1* 変異体とオートファジー変異体(*atg* 変異体)の二重変異体表現型解析および構築した栄養飢餓により老化を誘導する栽培系を用いてトランスクリプトーム解析とメタボロミクス解析を行い、葉緑体DNA分解産物が引き起こす現象の作用機作の解明を試みた。またイネ *DPD1* 破壊株を用いた遺伝子発現解析、農業形質、リアルタイムPCRによる葉緑体DNAの定量、顕微鏡による花粉中のオルガネラDNAの観察などの表現型解析により単子葉類において *DPD1* が欠損したときの影響を評価した。

4. 研究成果

(1)シロイヌナズナ二重変異体を用いたメタボロミクス解析によるシグナル伝達因子の探索とトランスクリプトーム解析による老化抑制について

本研究で用いた *atg* 変異体(*atg5* 及び *atg7*)は野生株である Col よりも早く老化する表現型を示す。これに対して *dpd1* 変異体は Col と比較して老化の遅延が認められる。これらの理由から *atg* 変異体と *dpd1* 変異体の二重変異体を作成し、その表現型解析を通してオルガネラDNA分解の生理的意義を明らかにすることを試みた。

まず初めに実験系の再現性を保つ目的で、*atg* 変異体が示めす老化表現型を誘導する栽培条件を検討した。富栄養な固形培地で生育させたのち貧栄養固形培地(栄養飢餓条件)に植え替えることで再現性の高い老化誘導栽培系を構築した(図2上図)。*atg* 変異体に *dpd1* 変異が導入されると *atg5 dpd1* 二重変異体では *atg5* 変異体の老化表現型は抑制されるのに対し、*atg7 dpd1* 二重変異体ではその抑制は認められなかった(図2上図)。

次にこの栽培系を用いて二重変異体、それぞれの株を栄養飢餓処理しメタボロミクス解析、トランスクリプトーム解析を行った。メタボロミクス解析においては各株間において差は認められず、当初想定していたシグナル因子の探索を行うことは困難であった。この原因として処理前

と処理後の解析サンプルを使用したために代謝系が処理培地に順応してしまった可能性があり、想定していた代謝産物の変化を捉えることができなかったと考えられる。タイムコース実験により代謝変動を解析するなどの改善が必要であると考えられる。

トランスクリプトーム解析については得られた遺伝子発現データを元にクラスタリング分析を行った結果、処理の有無によって2つのクレードにカテゴライズすることができた(図2下図)。興味深いことに栄養飢餓処理区において *atg5 dpd1* 二重変異体は老化の表現型を示す *atg5* 変異体、*atg7* 変異体、*atg7 dpd1* 二重変異体から距離の離れた位置にマップされた。このことは *dpd1* 変異が導入されたことにより遺伝子発現パターンが変化したことを意味している。さらにもの様な遺伝子群が変化したかを調べる目的でエンリッチメント解析やロジスティック回帰分析を行った結果、*atg5* 変異体に比べ *atg5 dpd1* 二重変異体においては老化時に誘導される遺伝子群の発現誘導が抑制されていた。

今後はこれらの遺伝子群の発現抑制のメカニズムを調べる必要がある。

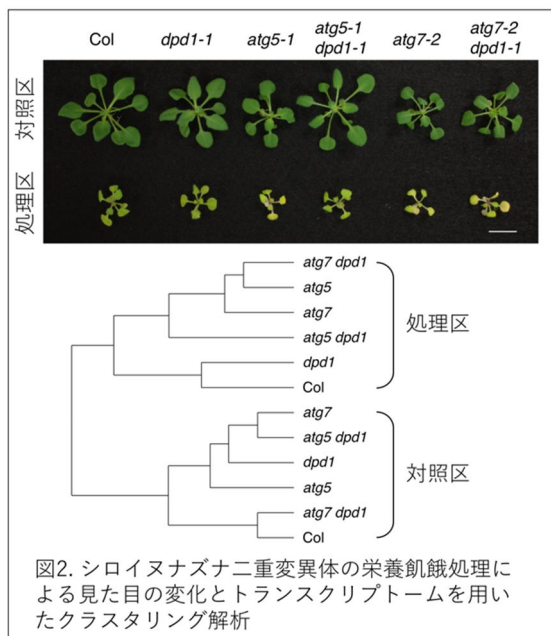


図2. シロイヌナズナ二重変異体の栄養飢餓処理による見た目の変化とトランスクリプトームを用いたクラスタリング解析

(2) イネ DPD1 破壊株を用いた表現型解析について

シロイヌナズナ変異体の解析と並行して、イネにおける DPD1 の役割を明らかにする目的でイネ DPD1 破壊株(GE)を用いて研究を行った。DPD1 は種子植物に広く保存されており、相同性解析からイネには2つの DPD1 ホモログ(*OsDPD1* と *OsDPD1-like*)が存在していることが示され、本研究では2つのイネ DPD1 ホモログを CRISPR-Cas9 により同時に破壊した株を用いた。

まず初めに、これまでにシロイヌナズナやイネを用いた研究で報告されている暗黒処理による老化誘導をイネの止め葉を用いて行い、*OsDPD1* と *OsDPD1-like* の発現誘導を確認した。その結果 *OsDPD1* と *OsDPD1-like* の両者とも老化のポジティブマーカである *OsSGR* と比べて非常に緩やかではあるが発現誘導が認められた。*OsDPD1* と *OsDPD1-like* の発現量を比較すると *OsDPD1* の発現量が高く、イネには2つの DPD1 ホモログが存在するが *OsDPD1* が主に機能していると考えられた(図3上図)。

次に暗黒処理による老化過程における葉緑体 DNA 量を評価したところ GE においても暗黒処理が進むにつれ葉緑体 DNA の減少が認められた。この葉緑体 DNA の減少と相関して GE においても野生株(NB)と同様に暗黒処理によって葉の黄変が認められた(図3下左)。以上の結果から、シロイヌナズナと同様に老化時にイネにおいても葉の老化時に DPD1 ホモログの発現誘導はされるが、葉における葉緑体 DNA 分解には DPD1 以外の因子や要因が存在していることが考えられる。

次に花粉におけるイネ DPD1 ホモログの影響を顕微鏡観察により評価した。多くの被子植物の花粉はその発達過程でオルガネラ DNA が消失していくことが知られており、その分解には DPD1 が必要であることがシロイヌナズナを使った研究から明らかにされている。イネの花粉のオルガネラ DNA を観察した結果、二細胞から三細胞花粉となる過程で NB の花粉では白いドット状のシグナルとして観察されるオルガネラ DNA が消失していることが確認される一方で、GE では三細胞花粉においてもドット状のシグナルが観察されており、イネ DPD1 ホモログが花粉中のオルガネラ DNA の分解に機能していることが確認された。

以上の結果から、DPD1 は広く種子植物に保存されているがその機能については植物種によって差異があることが明らかとなった。

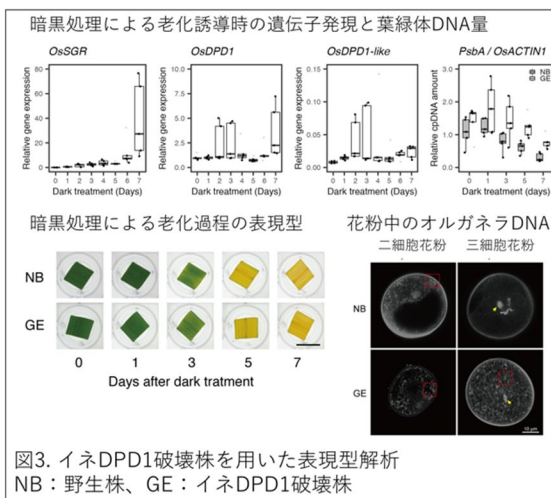
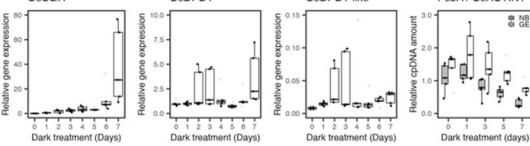
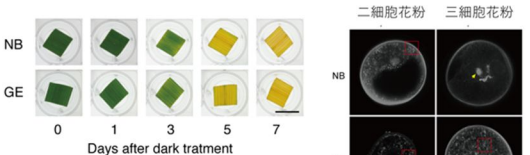


図3. イネ DPD1破壊株を用いた表現型解析
NB: 野生株、GE: イネ DPD1破壊株

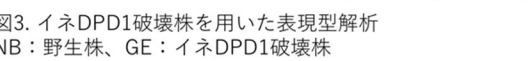
暗黒処理による老化誘導時の遺伝子発現と葉緑体DNA量



暗黒処理による老化過程の表現型



花粉中のオルガネラDNA



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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakamoto Wataru, Takami Tsuneaki	4. 巻 39
2. 論文標題 Maternal plastid inheritance: two abating factors identified	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Trends in Genetics	6. 最初と最後の頁 342 ~ 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tig.2023.03.002	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 Sakamoto Wataru, Takami Tsuneaki	4. 巻 65
2. 論文標題 Plastid Inheritance Revisited: Emerging Role of?Organelle DNA Degradation in?Angiosperms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 484 ~ 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcad104	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高見常明, 坂本亘
2. 発表標題 オートファジー変異株早枯れ表現型のdpd1 変異による抑制に関するトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Md Faridul Islam, Hiroshi Yamatani, Tsuneaki Takami, Makoto Kusaba, Wataru Sakamoto
2. 発表標題 Phenotypic and Transcriptomic characterization of the rice mutant defective in organelle exonuclease DPD1
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高見 常明、坂本 亘
2. 発表標題 オルガネラDNA分解異常が引き起こすオートファジー変異株早枯れ表現型の抑制機構について
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Md. Faridul Islam, Hiroshi Yamatani, Tsuneaki Takami, Makoto Kusaba and Wataru Sakamoto
2. 発表標題 Characterization of rice mutants lacking organelle exonuclease DPD1
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高見 常明
2. 発表標題 オルガネラDNA分解の異常はオートファジー変異体の早枯れ表現型を抑制する
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022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
---------	---------