

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03759

研究課題名(和文) イネ胚乳細胞の生長と成熟を制御する小胞体-細胞膜系の解明

研究課題名(英文) Role of endoplasmic reticulum-plasma membrane system in regulation of *Oryza sativa* endosperm development

研究代表者

恩田 弥生 (Onda, Yayoi)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70368463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は環境変動に対するイネ細胞の生長制御機構を明らかにすることを目的とした。酸化ストレス下、イネ細胞は顕著な生長遅延を示し、アクチンのジスルフィド架橋高分子量構造体を蓄積した。酸化ストレス回復期、PDI (Protein Disulfide Isomerase) はアクチン構造体のジスルフィド架橋開裂を触媒しその分解を促進し、PDI還元系が細胞骨格の再編成と細胞の生長に重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境変動下、イネ細胞の生長制御はコメの品質・収量を決定する重要な課題である。本研究はPDI酸化系が小胞体において貯蔵蛋白質のジスルフィド架橋形成を触媒し酸化的折り畳みを促進するだけでなく、PDI還元系がサイトソルにおいてアクチン構造体のジスルフィド架橋開裂を触媒しその分解を促進することを示した。本研究成  
果はオルガネラ運搬や細胞壁構築の駆動基盤である細胞骨格ダイナミクスの新規制御機構を示唆する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we show the key role of thiol-disulfide oxidoreductase, PDI, in actin cytoskeleton structure. When exposed to oxidative stress, *Oryza sativa* cells accumulated intermolecularly disulfide-bonded high-molecular-weight structures of actin. During recovery from oxidative stress, PDI cleaved disulfide bonds in high-molecular-weight structures of actin. Based on these results, we propose a PDI-dependent reductive pathway that promotes degradation of nonnative-disulfide-bonded structures of actin and reorganization of the actin cytoskeleton.

研究分野：植物生化学・分子細胞生物学

キーワード：植物 酵素 ジスルフィド結合

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

イネ(*Oryza sativa*)種子登熟初期、胚乳細胞小胞体は膨満構造を示し、貯蔵蛋白質(グルテリンやプロラミン)の活発な生合成と折り畳みを支えている。一連の折り畳み過程の中で、蛋白質ジスルフィド結合の形成は蛋白質の立体構造と機能発現に重要な反応である。プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)はチオレドキシソ型ドメインから構成されるチオール-ジスルフィド酸化還元酵素であり、基質分子と直接相互作用しジスルフィド結合を導入する。

我々はこれまでに、イネ胚乳細胞において、(i)PDI1;1は貯蔵蛋白質グルテリンのジスルフィド結合形成(酸化)を触媒し、液胞由来蛋白質貯蔵オルガネラへの分別輸送・蓄積を促進する;(ii)一方、PDI2;3は貯蔵蛋白質プロラミンのジスルフィド結合形成を触媒し、小胞体由来蛋白質貯蔵オルガネラへの分別集積を促進する、そして(iii)小胞体においてPDI1;1とPDI2;3が特異的かつ協調的に機能することを明らかにした。PDIを介した電子伝達系において、基質分子から引き抜かれた電子はPDIからフラボ蛋白質ERO1へ伝達され、最終電子受容体である酸素分子を還元し、結果、過酸化水素を産生する。過酸化水素は活性酸素種の一つであり、細胞における情報伝達分子として重要な機能を有する一方、蛋白質・核酸・脂質に重大な傷害を与える。我々はPDIの機能を阻害すると小胞体における過酸化水素発生が低下し、胚乳細胞発達と細胞死誘導が遅延することを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究は、過酸化水素に対しイネ細胞の生長を制御する酸化還元機構を解明し、環境変動下、コメ収量・品質向上を実現する分子基盤を構築することを目的とした。PDI2;3(ドメイン a-a'-b; aは活性ドメイン、bは非活性ドメイン)とは異なり、PDI1;1は4つのチオレドキシソ型ドメイン(ドメイン a-b-b'-a')から構成され、U型構造を示すと考えられる。*in vitro* アッセイ(基質としてRNaseやインスリンを使用)では、PDI2;3と比較してPDI1;1がジスルフィド結合の形成(スルフヒドリの酸化)と開裂(ジスルフィドの還元)の両者を効率的に触媒する。逆遺伝学的解析の結果、PDI1;1が細胞生長に重要な役割を担っている可能性が示唆されたが、その分子機構は不明である。

細胞骨格アクチンはオルガネラ輸送・配置や細胞壁構築を駆動する構造基盤であり、細胞生長と形態形成に必須な細胞構成成分の一つである。アクチンフィラメントはアクチン単量体(4つのサブドメインから構成される球状蛋白質)が非共有結合により重合した螺旋状構造体であり、多様な架橋蛋白質の作用により高次構造(例えば、束状構造や網目構造)を形成する。環境情報に応じてアクチン細胞骨格は絶えず会合・解離して高次構造を再編成し、細胞生長及び防御を最適化している。近年、*in vitro*において、過酸化水素存在下、哺乳類アクチンは酸化されジスルフィド結合を形成し、生じたアクチン二量体はアクチン重合反応を阻害することがわかってきた。しかし、細胞において酸化型アクチンが再編成される分子機構は不明である。本研究では、イネ細胞におけるアクチンの動態と構造再編成におけるPDI1;1の機能を調べ、酸化ストレス下、細胞生長と防御を最適化する分子機構を明らかにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 免疫染色

滅菌したイネ種子をムラシゲスクーグ培地に播種し、グロースチャンバー内で栽培した。芽生えをパラホルムアルデヒド/グルタルアルデヒド固定後、抗PDI1;1抗体もしくは抗アクチン抗体とインキュベートした。蛍光標識二次抗体と反応後、顕微鏡解析を行い蛍光画像を取得した。

#### (2) 電気泳動解析

イネ芽生えを過酸化水素で一定時間処理後、トリクロロ酢酸存在下、速やかに破砕した。得られた抽出蛋白質を非還元/還元二次元電気泳動(まず非還元条件下SDS/PAGE、次に還元条件下SDS/PAGE)により分離した。蛋白質をPVDF膜に転写後、抗PDI1;1抗体もしくは抗アクチン抗体を用いてイムノブロッティングを行った。抗原-抗体複合体はHRP化学発光法により検出した。

#### (3) 免疫沈降及びプルダウンアッセイ

イネ芽生えを過酸化水素で一定時間処理後、細胞抽出液を調製し、抗イネPDI1;1抗体とインキュベートした。得られた免疫複合体は非還元/還元二次元電気泳動により分離後、イムノブロッティング解析を行った。ま

た、アクチン組換え蛋白質の大腸菌発現系を構築した。蛋白質発現を IPTG 添加により誘導後、大腸菌細胞を破砕し、ニッケルカラムを用いて精製標品を得た。PDI1;1 の組換え蛋白質発現系は既に構築済みである。PDI1;1 組換え蛋白質とアクチン組換え蛋白質を用いてプルダウンアッセイを行い、アクチンと相互作用した蛋白質を SDS/PAGE により分離した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PDI1;1 及びアクチンの細胞内分布

イネ芽生えを過酸化水素処理後、過酸化水素非存在下で一定時間栽培し生長を比較解析した。酸化ストレスからの回復期、野生型に比較して PDI1;1 欠損変異型細胞は著しい生長遅延を示したことから、PDI1;1 が細胞生長の回復・維持に重要な役割を担うことが示唆された。

PDI1;1 及び細胞骨格蛋白質アクチンの細胞内局在を免疫染色法により解析した。アクチンは細胞先端に蓄積するとともに細胞内に束状に分布し、PDI1;1 は細胞先端に局在した。しかし、過酸化水素処理後、アクチンと PDI1;1 は脱分極化し網目状に分散した。

##### (2) PDI1;1 とアクチンの相互作用

まず、過酸化水素がアクチン構造に与える影響を非還元/還元二次元電気泳動により解析した。その結果、過酸化水素無処理細胞とは異なり、過酸化水素処理細胞ではアクチンを含む分子間ジスルフィド結合高分子量構造体が蓄積することを見出した。

次に、ジスルフィド結合高分子量構造体における PDI1;1-アクチン間相互作用の可能性を調べることを試みた。PDI が触媒するチオール-ジスルフィド酸化還元反応は速やかに進行し、PDI-基質複合体を捉えることが難しい。そこで、トリクロロ酢酸存在下チオール-ジスルフィド交換反応を速やかに停止し、PDI-基質複合体を免疫沈降法により解析した。その結果、PDI1;1 がアクチンを含む高分子量構造体と相互作用していることを見出した。また、組換え蛋白質を用いてプルダウン解析を行い、PDI1;1 がアクチン分子認識能を有することを確認した。

##### (3) アクチン高分子構造体における PDI1;1 の役割

アクチンを含むジスルフィド結合高分子構造体における PDI1;1 の役割を調べた。イネ芽生えを過酸化水素処理後、野生型細胞及び PDI1;1 欠損変異型細胞はアクチンのジスルフィド結合高分子量構造体を蓄積した。続いて、過酸化水素非存在下インキュベートし、アクチン高分子量構造体の蓄積を経時的に解析した。酸化ストレスからの回復期、野生型細胞ではアクチン高分子量構造体の蓄積量が減少するのに対し、PDI1;1 欠損変異型細胞ではアクチン高分子量構造体は蓄積し続けた。これらの結果より、PDI1;1 がアクチン高分子量構造体のジスルフィド結合を開裂(還元)し、アクチン高分子量構造体の分解を促進することが示唆された。

PDI は真核生物(酵母, 哺乳類, 植物)に遍く存在するチオール-ジスルフィド酸化還元酵素であり、ヒトや高等植物(シロイヌナズナ, イネ, トウモロコシ)のゲノムは約 20 の PDI ファミリーメンバーを有する。これまでに PDI ファミリーに属する複数の分子種についてジスルフィド結合形成, 開裂, 異性化触媒活性が示され、小胞体における新生ポリペプチド鎖の折り畳みと品質管理における PDI 分子種の機能が明らかになってきた。PDI ファミリーメンバーは小胞体残留シグナルを有するが、近年、PDI 分子種は小胞体だけでなく他の細胞区画(例えば、サイトゾルや葉緑体)にも局在を示すことが分かってきた。しかし、サイトゾルにおける PDI の活性と機能に関しては不明であった。本研究は、酸化ストレス曝露細胞においてアクチンが分子間ジスルフィド架橋による高分子量構造体を形成すること、サイトゾルにおいて PDI1;1 がアクチン高分子量構造体を認識しその誤ったジスルフィド結合を開裂し、結果、アクチン高分子量構造体の分解を促進することを明らかにした。アクチンは細胞先端に局在し、この極性局在が細胞伸長の駆動に必須である。酸化ストレス下、アクチンはジスルフィド結合高分子量構造体を形成しその局在は脱分極を示すことから、アクチン細胞骨格の再編成が酸化ストレスを克服し細胞生長を維持する上で鍵となる。これらの結果に基づき、PDI1;1 依存的ジスルフィド還元系がアクチン高分子量構造体の分解を促進し、アクチン細胞骨格の再編成と細胞の生長に重要な役割を担うと考えられる。本研究成果は PDI ジスルフィド還元系がオルガネラ運搬や細胞壁構築の駆動基盤である細胞骨格のダイナミクスを制御するという新規機構を示唆するものであり、この点においてインパクトが高い。

#### <引用文献>

Onda et al. Thiol-disulfide oxidoreductase PDI1;1 regulates actin structures in *Oryza sativa* root cells. FEBS Letters (2022) 596: 3015-3023.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Onda, Y., Okino, T.	4. 巻 596
2. 論文標題 Thiol-disulfide oxidoreductase PDI1;1 regulates actin structures in <i>Oryza sativa</i> root cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3015-3023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14445	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 -
1. 著者名 Wada, H., Hatakeyama, Y., Nakashima, T., Nonami, H., Erra-Balsells, R., Hakata, M., Nakata, K., Hiraoka, K., Onda, Y., Nakano, H.	4. 巻 10
2. 論文標題 On-site single pollen metabolomics reveals varietal differences in phosphatidylinositol synthesis under heat stress conditions in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58869-9	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 Wada, H., Hatakeyama, Y., Onda, Y., Nonami, H., Nakashima, T., Erra-Balsells, R., Morita, S., Hiraoka, K., Tanaka, F., Nakano, H.	4. 巻 70
2. 論文標題 Multiple strategies for heat adaptation to prevent chalkiness in the rice endosperm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 1299-1311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/ery427	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 Hatakeyama, Y., Masumoto-Kubo, C., Nonami, H., Morita, S., Hiraoka, K., Onda, Y., Nakashima, T., Nakano, H., Wada, H.	4. 巻 248
2. 論文標題 Evidence for preservation of vacuolar compartments during foehn-induced chalky ring formation of <i>Oryza sativa</i> L.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 1263-1275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00425-018-2975-x	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 中田佳祐、和田博史、恩田弥生、Rosa Erra-Basells、野並浩
2. 発表標題 水ストレスに対するミトコンドリア代謝応答の経時的評価
3. 学会等名 Joint Conference on Environmental Engineering in Agriculture 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakata, K., Wada, H., Onda, Y., Erra-Balsells, R., Nonami, H.
2. 発表標題 In situ picolitre pressure-probe-electrospray-ionization mass spectrometry for monitoring single cell metabolites change
3. 学会等名 Mass Spectrometry and Proteomics 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畠山友翔、中野洋、恩田弥生、野並浩、Rosa Erra-Balsells、中島大賢、平岡賢三、和田博史
2. 発表標題 高温登熟環境下での背白粒発生及び窒素施用による品質改善機構の品種間差異
3. 学会等名 第245回日本作物学会講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Onda, Y.
2. 発表標題 Disulfide bond formation: redox-based regulation of organelle development in plant cells
3. 学会等名 東京工業大学化学生命科学研究so国際フォーラム2018 "Redox regulation of protein functions, transcription, translation and folding" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakata, K., Wada, H., Onda, Y., Erra-Balsells, R., Nonami, H.
2. 発表標題 The role of cytoplasmic streaming in osmotic adjustment in tomato trichome cells under water stress
3. 学会等名 2017 CIGR World Workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 恩田弥生、紙田昂輝、野並浩
2. 発表標題 イネ胚乳細胞における小胞体環境の制御機構
3. 学会等名 日本生物環境工学会2017年大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wada, H., Nonami, H., Tanaka, K., Nakashima, T., Hatakeyama, Y., Nakano, H., Onda, Y., Hiraoka, K., Hakata, M., Morita, S.
2. 発表標題 Development of the on-site live cell metabolomics performable in controlled environment
3. 学会等名 SEB (Society for Experimental Biology) Gothenburg 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hatakeyama, Y., Onda, Y., Nonami, H., Nakashima, T., Nakano, H., Erra-Balsells, R., Hiraoka, K., Wada, H.
2. 発表標題 Nitrogen application reverses heat-induced rice chalkiness: evidence for organelle rearrangement due to the recovery of protein synthesis in endosperm cells
3. 学会等名 SEB (Society for Experimental Biology) Gothenburg 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017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	野並 浩  (Nonami Hiroshi)  (00211467)	愛媛大学・農学研究科・教授   (16301)	

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