

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04626

研究課題名(和文) 選択的オートファジーによる葉緑体のリサイクルと品質管理の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of recycling and quality control of chloroplasts by selective autophagy

研究代表者

石田 宏幸 (Ishida, Hiroyuki)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60312625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では葉緑体の選択的オートファジーに関わる分子機構についての解明を目的として解析を進め、以下の成果を得た。(1) 既知のATG8相互作用因子であるNBR1、ATG11およびATI1/2のRCB (Rubisco-containing body) 経路ならびにクロロファジー(葉緑体の全分解経路)における役割について明らかにした。(2) RCB経路に異常をきたす新奇突然変異体を順遺伝学により単離した。(3) 葉緑体オートファジーに関わる新奇レセプター候補を共免疫沈降とLC-MS/MS解析により探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物に特有のオルガネラである葉緑体に注目することで、選択的オートファジーのメカニズムについて酵母や動物では得られない基礎的知見を提供した。オートファジーによる葉緑体のリサイクルや品質管理機構は、必須栄養素の体内転流、光合成、バイオマスや有用物質生産などと密接にかかわっている。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の展開に向けても意義深い。

研究成果の概要(英文)：We aimed to reveal molecular mechanisms of selective autophagy of chloroplasts and obtained following results. (1) We revealed roles of known ATG8-interacting proteins, NBR1, ATG11, and ATI1/2 on the RCB (Rubisco-containing body) pathway and chlorophagy (whole-chloroplast autophagy). (2) We isolated novel mutants having abnormality on the RCB pathway. (3) We searched novel autophagy receptors which may act for chloroplast by co-immunoprecipitation and LC-MS/MS analysis.

研究分野：植物栄養生理学

キーワード：オートファジー 葉緑体 シロイヌナズナ 栄養リサイクル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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光合成によるエネルギーで同化・利用して成長する。そのため植物の成長は、自らを取り巻く環境とその変動に強く支配されている。植物は様々な環境下に適応し生存・成長する術を発達させてきた。それらには、「栄養素の細胞内・個体内リサイクル」や「タンパク質・オルガネラの品質管理」の分子機構が含まれる。植物の体内栄養リサイクルにおいては、葉緑体や光合成系タンパク質が基質として特に重要である。それは植物がエネルギー獲得のため窒素などのタンパク質骨格を構成する栄養素の多くを、個体の中では葉に、葉の中では葉緑体に、そして葉緑体の中では光合成機能タンパク質に分配しているためである。また葉緑体は集光電子伝達反応の場であり、強光や酸化ストレス下では生成した活性酸素により障害を受ける。障害を受けた葉緑体はさらなる活性酸素の発生源となり細胞を死に至らしめるため、すみやかに修復・除去される必要がある。そして、これら葉緑体の分解にはオートファジーが重要な役割を果たすことがこれまでに明らかにされた。

### 2. 研究の目的

オートファジーとは栄養飢餓などのストレス条件下で細胞質基質を消化オルガネラ（液胞やリソソーム）に輸送して分解する細胞内システムの総称であり、真核生物に普遍的に存在する。オートファジーにはマクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーと呼ばれる主に3タイプが存在するが、植物ではマクロオートファジーとミクロオートファジーが確認されている。マクロオートファジーでは、細胞質の一部が隔離膜によって取り囲まれオートファゴソームが形成される。オートファゴソームは液胞（動物ではリソソーム）と融合し、その内容物は加水分解酵素により分解される。一方、ミクロオートファジーでは、液胞膜の陥入や伸長によって細胞成分が液胞ルーメン内に直接取り込まれる。葉緑体はオートファジーにより「部分的に」(RCB経路で)あるいは「丸ごと」(クロロファジー経路で)液胞に運ばれ分解されるが、その詳細な分子機構はいまだに不明である。本研究では、葉緑体オートファジーにおける基質選択性に関わる分子実態について明らかにするとともに、それらの機構が植物の成長や環境応答性、ストレス耐性に果たす役割について検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 葉緑体オートファジーにおける既知のオートファジーレセプターホモログの役割の解析  
酵母や動物でこれまでに同定された重要因子の植物ホモログと葉緑体オートファジーとの関係について解析した。酵母では、ATG11が選択的オートファジーに特異なアダプターとして重要な役割を果たしている。ATG11はオートファゴソーム膜に局在するATG8との相互作用領域(AIM; ATG8-interacting motif)を持つ。ミトファジー及びペキソファジーにそれぞれ特異なレセプターATG32及びATG30は、ATG11との相互作用によりオルガネラを隔離膜へと誘導する。NBR1は動物にみられるユビキチン化されたタンパク質やオルガネラに対するレセプターである。ここではシロイヌナズナのATG11 (At4g30790)及びNBR1 (At4g24690)のT-DNA挿入欠損変異体 (*atg11*, *nbr1*)を用いて、これら遺伝子の欠損がRCB及びクロロファジーの進行に与える影響について解析した。具体的には、*atg11*及び*nbr1*変異体に葉緑体ストロマにターゲットされるGFP (Cp-GFP)やRubisco-GFPを発現させ、クロロファジーおよびRCB経路の進行を共焦点レーザー顕微鏡でとらえ、それらの進行度合いを数値化し野生型との比較をおこなった。これらと並行して植物で同定され葉緑体オートファジーとの関連性も示唆されているレセプターであるATI1およびATI2(ATG8-interacting protein 1/2)についても同様に検討した。

#### (2) 葉緑体オートファジーに関わる新奇突然変異体の単離と解析

葉緑体オートファジーの中で特にRCB経路について順遺伝学的な解析を行った。葉緑体ストロマにターゲットされるGFP (Cp-GFP)を発現する形質転換体の種子をEMS (エチルメタンサルホン酸)処理して点変異を導入し、変異体集団 (M2種子)を得た。M2植物を蛍光顕微鏡下で観察し、RCB経路に変異があるものについてスクリーニングを行い、マップベースクローニング法により原因変異の同定を行った。

#### (3) 葉緑体オートファジーに関わる新奇レセプターの探索

オートファゴソームに局在しレセプターと相互作用するATG8をマーカーに用いて、共免疫沈降法を中心に葉緑体オートファジーに関わる新奇レセプターの探索を行った。GFP-ATG8やYFP-ATG8を発現する形質転換体を作成した。これらの植物体から総タンパク質を調製し、抗GFP (YFP)抗体結合ビーズと反応させ、ATG8と相互作用する因子を回収した。回収されたタンパク質をSDS-PAGEにより分離後、タンパク質をゲル内でトリプシン消化した。生じたペプチドを回収し、LC-MS/MS解析に供した。

### 4. 研究成果

(1) 葉緑体オートファジーにおける既知のオートファジーレセプターホモログの役割の解析  
NBR1、ATG11、およびATI1/2がノックアウトまたはノックダウンされたT-DNA挿入欠損変異体 (*atg11*, *nbr1*, *ati1/2*)を単離した。これらの変異体にCp-GFPおよびRubisco-GFPを交配導入

し、葉緑体オートファジーをモニターした。*nbr1* 変異体では RCB 経路ならびにクロロファジーの進行が野生体と同程度に起こっていることから、NBR1 はこれら 2 つの葉緑体オートファジー経路には必須または重要ではないことが示唆された。一方、*atg11* 変異体では RCB 経路が顕著に抑制されていることから、ATG11 は RCB 経路において重要な役割を果たす因子であることが示唆された。また興味深いことに *atg11* 変異体ではクロロファジーは野生体と同程度に起こっていた。ATG11 は酵母ではマクロオートファジーには重要であるが、ミクロオートファジーには関与していない。シロイヌナズナでは、膜の動態解析から RCB 経路はマクロオートファジーであり、クロロファジーはミクロオートファジーであることが示唆されている。よって、今回の *atg11* 変異体の解析結果は、酵母と植物におけるオートファジーの基本的な分子機構の共通性を示すものであった。ATI1/2 については、両者が機能重複の関係にあることから、ATI1 が T-DNA 挿入によりノックアウトされ、ATI2 が RNAi により発現が野生体の 10% 以下にノックダウンされた 2 重変異体 (*ati1/2*) を解析した。その結果、*atg1/2* 変異体では RCB 経路ならびにクロロファジーの進行が野生体と同程度に起こっていることから、ATI1/2 はこれら 2 つの葉緑体オートファジー経路には必須または重要ではないことが示唆された。

## (2) 葉緑体オートファジーに関わる新奇突然変異体の単離と解析

RCB 経路に異常をきたす変異体を複数種単離した。その中で、RCB が細胞質に蓄積する新奇変異体に焦点を当て、マップベースクローニングならびに相補試験により、この新規変異体の原因遺伝子を特定した。原因遺伝子は *GREEN FLUORESCENT SEED 9/TRANSPARENT TESTA 9 (GFS9/TT9)* であった。この *gfs9/tt9* 変異体に、オートファジーに必須の因子である ATG5 の欠損変異 (*atg5*) を導入すると、オートファゴソームや RCB の蓄積が見られなくなることを確認した。

## (3) 葉緑体オートファジーに関わる新奇レセプターの探索

共免疫沈降法による ATG8 と相互作用する因子のスクリーニングを行った。国際共同研究強化の支援と合わせて、共免疫沈降されたタンパク質について LC-MS/MS 解析により網羅的に同定した。同定されたタンパク質の中でオートファジーレセプターの特徴である推定 ATG8-interacting motif や推定 intrinsically disordered protein region (IDPR) のを持つものを予測プログラムにより絞り込んだ。その中には葉緑体包膜に局在するタンパク質がいくつか含まれていた。それらをコードする遺伝子のノックアウトまたはノックダウン変異体を取り寄せ、遺伝子型の同定を行った。また ATG8-interacting motif を持つタンパク質の中には、mRNA の翻訳制御因子やタンパク質のフォールディングに関わる分子シャペロンが多数含まれており、オートファジーが成熟タンパク質の分解のみならず、タンパク質の翻訳段階での抑制制御にも深く関わっている可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 6 件)

- Izumi Masanori, [Ishida Hiroyuki](#), An additional role for chloroplast proteins? an amino acid reservoir for energy production during sugar starvation, *Plant Signaling & Behavior*, 14 巻、2018 年、1552057 ~ 1552057、[査読有](#)、[doi.org/10.1080/15592324.2018.1552057](https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1552057)
- Hirota Takaaki, Izumi Masanori, Wada Shinya, [Makino Amane](#), [Ishida Hiroyuki](#), Autophagic protein degradation provides substrates to amino acid catabolic pathways as an adaptive response to sugar starvation in Arabidopsis, *Plant & Cell Physiology*, 59 巻、2018 年、1363 ~ 1376、[査読有](#)、[doi.org/10.1093/pcp/pcy005](https://doi.org/10.1093/pcp/pcy005)
- [Ishida Hiroyuki](#), [Makino Amane](#), Impacts of autophagy on nitrogen use efficiency in plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 64 巻、2018 年、100 ~ 105、[査読有](#)、[doi.org/10.1080/00380768.2017.1412239](https://doi.org/10.1080/00380768.2017.1412239)
- Nakamura Sakuya, Hidema Jun, Sakamoto Wataru, [Ishida Hiroyuki](#), Izumi Masanori, Selective elimination of membrane-damaged chloroplasts via microautophagy, *Plant Physiology*, 177 巻、2018 年、1007 ~ 1026、[査読有](#)、[doi.org/10.1104/pp.18.00444](https://doi.org/10.1104/pp.18.00444)
- Eguchi Masatake, Kimura Kazuhiko, [Makino Amane](#), [Ishida Hiroyuki](#), Autophagy is induced under Zn limitation and contributes to Zn-limited stress tolerance in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), *Soil Science and Plant Nutrition*, 63 巻、2017 年、342 ~ 350、[査読有](#)、[doi.org/10.1080/00380768.2017.1360750](https://doi.org/10.1080/00380768.2017.1360750)
- Izumi Masanori, [Ishida Hiroyuki](#), Nakamura Sakuya, Hidema Jun, Entire photodamaged chloroplasts are transported to the central vacuole by autophagy, *Plant Cell*, 29 巻、2017 年、377 ~ 394、[査読有](#)、[doi.org/10.1105/tpc.16.00637](https://doi.org/10.1105/tpc.16.00637)

〔学会発表〕(計 11 件)

石田 宏幸、石田 ひろみ、泉 正範、林 誠、牧野 周、Klaas van Wijk、GFS9 はシロイヌナズナの暗所芽生えにおけるプラスチックのピースミールオートファジーに關与する、日本植物生理学会、2019 年

江口 雅丈、木村 和彦、牧野 周、石田 宏幸、シロイヌナズナにおける亜鉛栄養制限下でのオートファジーの誘導とストレス耐性への寄与、日本分子生物学会、2018 年

石田 宏幸、植物の栄養リサイクルとオートファジー、第 34 回ユグレナ研究会、2018 年

石田 宏幸、イネの窒素転流と栄養成長におけるオートファジーの役割、日本植物生理学会年会シンポジウム、2017 年

Ishida Hiroyuki、Autophagy of chloroplasts as an adaptive response to sugar starvation in Arabidopsis、International Conference on Arabidopsis (ICAR、シロイヌナズナに関する国際会議)、2016 年

Ishida Hiroyuki、Autophagy provides substrates to amino acid catabolic pathways as an adaptive response to sugar starvation in Arabidopsis、The 17th International Congress on Photosynthesis Research (第 17 回国際光合成会議)、2016 年

Ishida Hiroyuki、Autophagy and nutrient recycling in plants、Finnish-Japanese symposium 2016 (フィンランド - 日本 2 国間シンポジウム)、2016 年

Hirota Takaaki、Izumi Masanori、Wada Shinya、Makino Amane、Ishida Hiroyuki、Chloroplast autophagy as an adaptive response to sugar starvation in Arabidopsis、Gordon Research Conference 'Mitochondria and Chloroplasts (ゴードン会議「ミトコンドリアと葉緑体」)、2016 年

横浜 諒、和田 慎也、菅野 圭一、小島 創一、山谷 知行、牧野 周、石田 宏幸、異なる窒素栄養条件下においてオートファジーの欠損がイネの窒素利用と成長に与える影響の解析、日本植物生理学会、2016 年

泉 正範、石田 宏幸、中村 咲耶、日出間 純、シロイヌナズナの光障害条件におけるオートファジーによる障害葉緑体の除去、日本植物生理学会、2016 年

中村 咲耶、泉 正範、石田 宏幸、日出間 純、光障害を受けた葉緑体を選択的に除去するクロロファジーの特性について、日本植物生理学会、2016 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：牧野 周

ローマ字氏名：(MAKINO, Amane)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院農学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：70181617

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：泉 正範

ローマ字氏名：(IZUMI, Masanori)

研究協力者氏名：和田 慎也

ローマ字氏名：(WADA, Shinya)

研究協力者氏名：江口 雅丈

ローマ字氏名：(EGUCHI, Masatake)

研究協力者氏名：弘田 隆晃

ローマ字氏名：(HIROTA, Takaaki)

研究協力者氏名：横浜 諒

ローマ字氏名：(YOKOHAMA, Ryo)

研究協力者氏名：西村 翼

ローマ字氏名：(NISHIMURA, Tsubasa)

研究協力者氏名：中村 咲耶

ローマ字氏名：(NAKAMURA, Sakuya)

研究協力者氏名：石田 ひろみ

ローマ字氏名：(ISHIDA, Hiromi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。