

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0270

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（国際共同研究強化）

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

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） 10,800,000円

渡航期間： 11ヶ月

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、米国コーネル大学Klaas van Wijk教授との共同研究を進め、以下の成果を得た。（1）順遺伝学により単離したRCB経路に異常をきたす新奇突然変異体の原因遺伝子を同定した。（2）葉緑体オートファジーに関わる小胞Rubisco-containing body (RCB)を密度勾配超遠心法により分画した。（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液体クロマトグラフィー-質量分析法（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し、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の研究だけでは得られない基礎的な知見を提供した。植物のタンパク質代謝研究を先導するKlaas van Wijk教授（米国、コーネル大学）らと強固な国際共同研究ネットワークを構築した。葉緑体のリサイクルや品質管理は、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おり、そのメカニズムの一端を明らかにしたことは、今後の応用的な研究の展開に向けても意義深い。

研究成果の概要（英文）：In this study, with the aim of elucidating the molecular mechanism involved in selective autophagy of chloroplasts, we conducted analysis in collaboration with Professor Klaas van Wijk of Cornell University in the United States and obtained the following results. (1) We identified the causal gene of a novel mutant that has abnormality in the RCB pathway isolated by forward genetics. (2) We fractionated vesicles, Rubisco-containing bodies (RCBs) involved in chloroplast autophagy, by density gradient ultracentrifugation. (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：葉緑体 オートファジー シロイヌナズナ 栄養リサイクル

1. 研究開始当初の背景

葉緑体は植物に特有なオルガネラであり、光合成のために窒素の多くが分配されタンパク質として機能している(引用文献)。光独立栄養生物である植物にとって、栄養リサイクルやオルガネラ品質管理としての葉緑体の分解は過酷な環境下での生存戦略の一つとして重要な意味を持つ。オートファジーは真核生物が共通して持つ、栄養飢餓などのストレス条件下で細胞質成分を消化オルガネラ(液胞やリソソーム)に輸送・分解しアミノ酸などをリサイクルするシステムである。オートファジーはバルクな分解経路であり、細胞質成分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。その一方で、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、小胞体(ER)など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おり、それらはマイトファジー、ペキソファジー、ERファジーと呼ばれている(引用文献)。選択的オートファジーでは、オートファジーの進行に中核的な役割を担うコアATG因子に加えて、オートファジーレセプター/アダプター分子が基質認識に関わる因子として重要な役割を担っており、動物や酵母ではそれらの分子が複数同定されている(引用文献)。

2. 研究の目的

葉緑体タンパク質の分解機構についての研究が進められてきた中で、葉緑体の一部分が本体から切り離され、内容タンパク質が特異小胞RCB(Rubisco-containing body)として、オートファゴソームを介したマクロオートファジーにより液胞に輸送・分解される経路(RCB経路)の存在が明らかにされた(引用文献)。RCBには葉緑体ストロマ(可溶性)タンパク質のみが含まれ、チラコイド膜タンパク質やクロロフィルは含まれていなかった(引用文献)。興味あることに、RCBの形成誘導は葉の発達年齢や栄養状態と密接にかかわっており、さらに他の(葉緑体以外の)細胞成分のオートファジーとは異なること、つまり選択的なものであることが示唆された(引用文献)。本研究では、基課題とともに葉緑体オートファジーの選択性に関わる分子実態とその生理的重要性について、国際共同研究により明らかにしておくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RCB経路に異常をきたす新奇突然変異体の原因遺伝子の同定

葉緑体ストロマにターゲットされるGFP(CT-GFP)を恒常的なプロモーターで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った。変異体は親株との戻し交配、異なるエコタイプとの交配を進め、マップベーススクローニング法により原因遺伝子の同定を行った。相補試験は、同定された原因遺伝子の野生型をコードするゲノム断片ならびにタンパク質コード領域をクローニングし、変異体に形質転換することで行った。

(2) 葉緑体オートファジーに関わる小胞 Rubisco-containing body (RCB) の分画

植物組織の破碎画分を、遠心分離により粗分画した後OptiPrep(iodixanol)の不連続密度勾配による超遠心分離に供し、RCB、サイトゾルを内包する一般オートファゴソームおよびその他のオルガネラを分取した。分取した画分について蛍光マーカーを指標にそれぞれが豊富に含まれる画分を同定した。

(3) 葉緑体オートファジーに関わる新奇レセプター候補の探索

レセプターと相互作用する、オートファゴソームに局在する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。タグタンパク質を付加したATG8(GFP-ATG8aおよびYFP-ATG8e)をシロイヌナズナで発現させるコンストラクトを構築し、これら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。また総タンパク質の代わりに、(2)で調製したRCBあるいはオートファゴソームに富む画分を用いて同様の操作を行った。回収されたタンパク質をSDS-PAGEにより分離後、タンパク質を還元アルキル化しゲル内でトリプシン消化した。生じたペプチドを回収し、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS/MS)解析に供した。MS解析の後、Plant proteomeデータベース(PPDB)により共免疫沈降したタンパク質にアノテーションを加えた。同定されたタンパク質におけるATG8-interacting motif(AIM)やIDPR(intrinsically disordered protein region)をiLIR、hfAIM、およびPONDRなどの公開データベースを活用して検索した。絞り込んだ候補遺伝子のノックアウトおよびノックダウン変異体について種子をABRC(Arabidopsis Biological Resource Center)から取り寄せ、変異体の遺伝子型をゲノムPCR法により同定した。

4. 研究成果

(1) RCB経路に異常をきたす新奇突然変異体の原因遺伝子の同定

RCB経路に異常をきたす変異体を基課題の研究を進める中で複数ライン単離した。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* 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。電子顕微鏡観察の結果、*gfs9* 変異体のサイトゾルにはオートファゴソームや RCB 様の構造体が多数蓄積する様子が確認された。*gfs9* 変異体にオートファゴソームのマーカータンパク質である YFP-ATG8 を導入した。変異体の種子を無栄養培地に播種し暗所で 3 日間生育させた。得られた植物体を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、オートファゴソーム及び RCB が細胞質に異常蓄積しているのを確認した。またウエスタンブロッティングにより *gfs9* では YFP-ATG8 タンパク質が野生型に比べて多量に蓄積していることを確認した。さらに *gfs9* では、内在性の ATG8 が膜脂質であるホスファチジルエタノールアミンと共有結合した膜結合型 (ATG8-PE) として、野生型の 6.5 倍高い濃度で蓄積していることを明らかにした。またこの *gfs9* における内在性 ATG89-PE の高蓄積は、*atg5* の変異導入により解消された。

(2) 葉緑体オートファジーに関わる小胞 Rubisco-containing body (RCB) の分画

YFP-ATG8 を導入した *gfs9* 変異体を材料に、RCB の分画について検討した。*gfs9* における RCB の蓄積に及ぼす発達ステージや生育環境条件について検討した。その結果、栄養飢餓培地での暗所芽生えで特に RCB の蓄積が顕著に起こることが明らかとなった。この条件下で栽培した *gfs9* の組織を材料に、RCB 単離における収率や最終的な純度、インタクトネスに及ぼす諸条件の検討を行い、プロトコルの最適化を行った。RCB は一般的なサイトゾルを含むオートファゴソームよりも密度が高く、Optiprep の不連続密度勾配による超遠心分離ではプラスチド本体に近い画分に分画された。RCB の純度やインタクトネスについては得られた画分を共焦点レーザー顕微鏡で観察するとともに各種オルガネラマーカーを用いたウエスタンブロットにより評価した。

(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。主な材料には YFP-ATG8 を発現する野生型と *gfs9* 変異体を用い、これらの植物体から総タンパク質を抽出し、YFP-ATG8 およびその相互作用タンパク質を抗 GFP 抗体結合磁気ビーズを用いて回収した。さらに、出発材料として (2) で調製した RCB あるいはオートファゴソームに富む画分を用いる工夫をした。共免疫沈降されたタンパク質は、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ルセプターの特徴である推定 ATG8-interacting motif (AIM) や推定 intrinsically disordered protein region (IDPR) 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うとともに、葉緑体オートファジーを評価する蛍光マーカーを導入した。なお 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。

< 引用文献 >

- Makino, A., Osmond, B. (1991) Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiol.* 96: 355-62.
- Klionsky, D.J. et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 12: 1-222.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M. R., Mae, T. (2008) Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.* 148: 142-155.
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N. K., Makino, A., Mae, T. (2003) Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* 44: 914-921.
- Izumi, M., Wada, S., Makino, A., Ishida, H. (2010) The autophagic degradation of chloroplasts via rubisco-containing bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 154: 1196-1209.

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Izumi Masanori, Ishida Hiroyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 An additional role for chloroplast proteins? an amino acid reservoir for energy production during sugar starvation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1552057 ~ 1552057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1080/15592324.2018.1552057	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 Eguchi, M., Kimura, K., Makino, A., Ishida, H.	4. 巻 63
2. 論文標題 Autophagy is induced under Zn limitation and contributes to Zn-limited stress tolerance in Arabidopsis (Arabidopsis thaliana)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Soil Sci. Plant Nutr.	6. 最初と最後の頁 342 ~ 350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2017.1360750	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 Hirota, T., Izumi, M., Wada, S., Makino, A., Ishida, H.	4. 巻 59
2. 論文標題 Autophagic protein degradation provides substrates to amino acid catabolic pathways as an adaptive response to sugar starvation in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1363 ~ 1376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy005	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 Ishida, H., Makino, A	4. 巻 64
2. 論文標題 Impacts of autophagy on nitrogen use efficiency in plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Soil Sci. Plant Nutr.	6. 最初と最後の頁 100 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2017.1412239	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 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田 宏幸、石田 ひろみ、泉 正範、林 誠、牧野 周、Klaas van Wijk
2. 発表標題 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関与する
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口 雅丈、木村 和彦、牧野 周、石田 宏幸
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田 宏幸
2. 発表標題 植物の栄養リサイクルとオートファジー
3. 学会等名 第34回ユークレナ研究会（招待講演）
4. 発表年 2018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

1. 発表者名 石田 宏幸
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本植物生理学会（招待講演）
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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ヴァンウィック クラース (van Wijk Klaas)	コーネル大学・植物科学・教授	
その他の研究協力者	フリソ ジュリア (Friso Giulia)		
その他の研究協力者	ビュイアン ナズムル (Bhuiyan Nazmul)		
その他の研究協力者	石田 ひろみ (Ishida Hiromi)		
その他の研究協力者	泉 正範 (Izumi Masanori)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
その他の研究協力者	和田 慎也 (Wada Shinya)		
その他の研究協力者	江口 雅丈 (Eguchi Masatake)		
その他の研究協力者	西村 翼 (Nishimura Tsubasa)		
その他の研究協力者	中村 咲耶 (Nakamura Sakuya)		
その他の研究協力者	牧野 周 (Makino Amane)		