

令和元年6月28日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18668

研究課題名(和文) 重金属過剰で誘導されるミトコンドリア選択的オートファジーの分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of organelle-selective autophagy in heavy-metal treated plant cells.

研究代表者

齋藤 彰宏 (Saito, Akihiro)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：10610355

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)：重金属のニッケル(Ni)を加えて生育させたタバコBY-2培養細胞には、Niを集積する小胞様酸性区画(NAVs)が多量に出現することを発見した。本研究ではこのNAVsの形成機構とその意義を明らかにした。解析の結果、NAVsはミトコンドリアを包み込んで分解するオートファジー(マイトファジー)であることが分かった。そこで生細胞のミトコンドリアを可視化するために蛍光タンパク質でミトコンドリアを標識したところ、Ni処理後にオートファジーを阻害すると、異常なミトコンドリア凝集体が出現することが分かった。これらのことからマイトファジーがNi耐性に対して重要な働きを持つことを植物で初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは電子伝達鎖に鉄・銅といった遷移金属を多量に必要とする。このため、これらの遷移金属と競合するニッケルのような重金属がミトコンドリア内に蓄積すると、正常な電子伝達が阻害されて有害な活性酸素種を多量に発生する。私たちは、ニッケルを集積した「不良ミトコンドリア」を植物が直ちに認識し、他の構造とは別に選択的に液胞へ運んで除去する仕組みがあることを発見した。植物ではこれまで報告なかった「不良ミトコンドリア」の認識と除去に関わるオートファジーの分子機構の一端を解明し、オルガネラ品質管理能力を高めた新規の重金属耐性植物の作出につながる成果を得たと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that a large number of acidic vesicular compartments (NAVs), which accumulated higher concentration of Ni<sup>2+</sup>, were generated around vacuoles under excess nickel (Ni) condition. Analysis of protein MS analysis of the purified tonoplast/autolysosomal fraction and transmission electron microscopy provides the evidence that large number of mitochondria are directly sequestered into the vacuoles or autolysosomes in the cells treated with excess Ni. This was further confirmed in vivo by monitoring the co-localization of Red fluorescent protein (RFP) and NAVs in a cell line expressing RFP in mitochondria under excess Ni condition. RNAi silencing of an essential gene for autophagy causing abnormal aggregates of NAVs in the cytosol and led to Ni hypersensitivity. These results first demonstrate the critical importance of the selective clearance of the damaged mitochondria by autophagy to alleviate Ni toxicity in plant cells.

研究分野：植物栄養学・光合成

キーワード：ミトコンドリア 葉緑体 オートファジー 液胞 ミトコンドリア選択的オートファジー 葉緑体選択的オートファジー

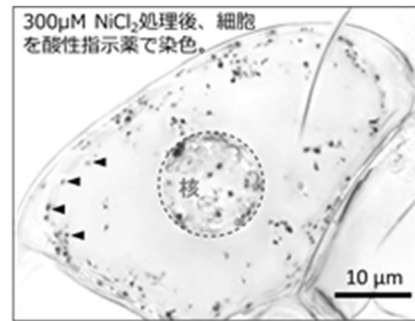
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

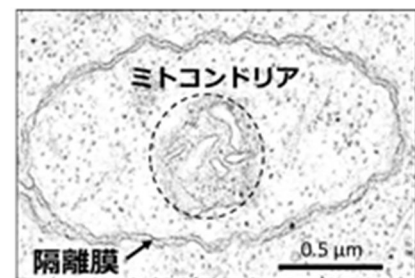
ニッケルは植物の栄養上必須な重金属であるが、適正濃度を超えると激しい細胞毒性を示す。しかし、ニッケルは地球の核を構成する主要元素であり、世界にはニッケルを高濃度に含む土壌が広範に存在する。これらの地域では、作物のニッケル過剰害が深刻な問題となっている。我々は、これまでに植物細胞のモデル系であるタバコ BY-2 培養細胞で、ニッケルを無害化する液胞隔離機構を見出している (Saito et al., 2005、2010)。その一方、BY-2 細胞は細胞内ニッケルの 20% 程度を液胞外部に蓄積するため (Saito et al., 2010)、液胞以外にニッケルを無害化、または隔離する何らかの細胞内コンパートメントがあると予測していた。

この予測に合致して、我々はタバコ BY-2 細胞の原形質でニッケルを高濃度に蓄積する直径 1~2  $\mu\text{m}$  の酸性小胞 (以下、ニッケル集積小胞) を発見した (図 1)。このニッケル集積小胞の形成過程を解析した結果、原形質成分を膜小胞に閉じ込め、液胞へ運び込み分解する「オートファジー (自食)」と呼ばれるシステムが関与することを明らかにした。

そこで、ニッケル集積小胞の内部を複数の手法で解析した結果、いずれの手法でもミトコンドリアやそのタンパク質が特異的に検出された (図 2)。このことから、ニッケル過剰下の BY-2 細胞では通常のオートファジーではなく、ミトコンドリアのみを選択的に分解する特殊なオートファジーが誘導されていると考えられた。これらの知見は、ニッケル過剰に対する植物細胞の新たな適応機構の存在を示唆していた (Saito et al., 論文執筆中、ICOBTE2015 優秀ポスター賞受賞)。過去にこのような観点でオートファジーを研究した事例は他に見られず、植物における新規の重金属適応能力の発見につながると考えられた。



図① ニッケル集積小胞の出現の様子  
矢尻で示したように、液胞周縁部の多数の黒点全てがニッケル集積小胞である



図② 隔離膜に閉じ込められたミトコンドリア  
(ニッケル集積小胞の電子顕微鏡画像)

## 2. 研究の目的

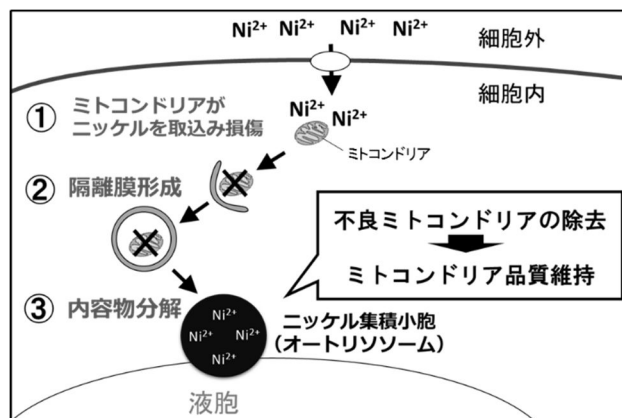
ニッケル集積小胞はミトコンドリアを標的としたオートファジー作用で作られる。本申請課題では、(1)ニッケル集積小胞が担う生理学的意義、および(2)ニッケル集積小胞の形成にかかわる分子機構の 2 点を明らかにすることで、ミトコンドリア選択的なオートファジー機能を高めた新規の重金属耐性植物の作出を目指す。以下に(1)と(2)の研究内容についてまとめる。

### (1) ニッケル集積小胞の生理的意義の解明

ニッケル集積小胞の形成をオートファジー阻害剤で停止すると、ミトコンドリア周縁の活性酸素種が増加することを見出している (Saito et al. ICOBTE2015 ポスター賞受賞)。このことから、ニッケル集積小胞の役割はニッケルを過剰に吸収した「不良ミトコンドリア」を分解することであり、これにより不良ミトコンドリアに由来する酸化ストレスを軽減していると考えられた。

この仮説を検証するため、ニッケル処理した野生型株とオートファジー変異株を用いて、ミトコンドリアの酸化ストレスや呼吸機能を比較する。また、次の(2)に示した方法でニッケル集積小胞の形成に関与する未知遺伝子を同定し、それら遺伝子の過剰発現株、発現抑制株、あるいは破壊株を用いてニッケル耐性やミトコンドリア機能への寄与を明らかにする。

これらの解析により、ニッケル過剰下で不良ミトコンドリアを除去する仕組みが、「ミトコンドリア品質維持」という重要な生理的意義を担っていることを証明する (図 3)。



図③ ニッケル集積小胞の形成過程の仮説

### (2) ニッケル集積小胞形成の分子機構の解明

ニッケルを過剰集積した不良ミトコンドリアがオートファジーで小胞内に隔離され、そのまま小胞内部で分解されてニッケル集積小胞へ変化すると考えることができる (図 4)。この仮説の立証に向けて、単離ミトコンドリアを用いて金属元素組成の変動を解析するとともに、競合輸

送実験を行い、ニッケルがどの元素輸送体を介して取り込まれるかを検証することにした。さらに、ミトコンドリアとオートファジー経路を蛍光タンパク質で標識し、ミトコンドリアや自食胞の動態をライブイメージングで明らかにする。これらの実験を通して、図 1 に示した ~ までのニッケル集積小胞形成の仮説モデル全体を検証することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### 【タバコ BY-2 細胞由来のミトコンドリア・自食胞の単離と解析】

ニッケル処理後のタバコ BY-2 細胞から、ミトコンドリアを Percoll 密度勾配超遠心法で精製し、ミトコンドリアのニッケル蓄積量を定量した。また、ニッケル処理によるミトコンドリア呼吸鎖タンパク質量 (BN-PAGE・酵素活性) や活性酸素蓄積量 (TBARS 法・蛍光染色法) を解析した。

#### 【タバコ BY-2 細胞のミトコンドリア可視化と継時的追跡】

ミトコンドリア移行ペプチドと RFP を融合した遺伝子を BY-2 細胞に導入し、ミトコンドリアが原形質から酸性の自食胞 (オートリソソーム) に移行する過程を共焦点顕微鏡で可視化した。

#### 【オートファジー関連遺伝子の解析】

RT-PCR によりオートファジー関連遺伝子の発現変動を調査した。また、RNAseq 解析やプロテオーム解析により、この応答にかかわる遺伝子やタンパク質を探索した。

#### 【既知オートファジー関連因子の発現抑制株の解析】

ニッケル集積小胞の生理的役割を明らかにするために、既知オートファジー関連遺伝子の RNAi 株でニッケル集積小胞の形成やニッケル耐性を解析した。

#### 【タバコ細胞以外の実験材料での検証】

新規遺伝子の同定や解析を見据えて、研究基盤の整備されているシロイヌナズナでの解析が可能か調べた。シロイヌナズナ培養細胞、ならびに植物体を重金属処理して、BY-2 細胞と同様のオルガネラ選択的オートファジーが見られるか検証した。

### 4. 研究成果

#### 【タバコ BY-2 細胞由来のミトコンドリア・自食胞の単離と解析】

異常ミトコンドリアを適切に除去 (マイトファジー) することは、特別な発達過程やストレス条件下において植物の生存に直結する。しかし、これまでのところ、植物においてミトコンドリア特異的なオートファジー機構は報告例がない。

今回、我々はニッケル存在下のタバコ細胞で、ミトコンドリア選択的にオートファジーが誘導されることを発見した。ニッケル処理下で生育させたタバコ BY-2 培養細胞の液胞近傍には、ニッケルを集積する小胞様酸性区画 Nickel-accumulating acidic vesicular compartments (NAVs) が多量に出現する。このような小胞様構造は、他の金属ストレスに比べ、ニッケルで特に強く誘導された。この NAVs はエンドサイトーシとオートファジー経路の阻害剤を処理すると形成が阻害されること、また後期エンドソームマーカー AtVSR7/AtVAM3 およびオートファジーマーカー NtATG8 と共局在したことから、この小胞はオートファゴソームとエンドソームが融合したオートリソソームであることが示唆された。

単離した液胞・オートリソソーム画分 (tonoplast/autolysosome fraction) のタンパク質 MS 解析と透過型電子顕微鏡解析の結果、NAVs にミトコンドリアタンパク質が内包されていることが示唆された。そこで、Percoll 密度勾配分画法により、オートリソソームを単離し、オートリソソームの指標酵素活性ならびにウエスタン解析を行った。その結果、ニッケル処理した場合にオートリソソームが有意に増加することが生化学的に明らかになった。しかし、この実験で用いた野生型のタバコ細胞では、ニッケル処理前後で酸化脂質量の増加は確認できなかった。オートファジーが正常に機能している場合には、過度な酸化ストレスが生じないことが示唆された。今後、後述するオートファジー機能を抑制した RNAi 株でこの点を明確にする必要性が残されている。

#### 【タバコ BY-2 細胞のミトコンドリア可視化と継時的追跡】

ミトコンドリアに RFP を発現させた RecA-tagRFP 細胞株にニッケルを加えて培養後、オートリソソームと液胞の融合を阻害する E64d 処理、またはオートファジックボディを集積させる Concanamycin A 処理をすると、細胞質または液胞内に過剰集積した生じた NAVs がミトコンドリア由来 RFP と共局在し、それらはすべて異常なミトコンドリア凝集体となっていることが明らかになった。

#### 【オートファジー関連遺伝子の解析】

RT-PCR 法により、事前にオートファジー関連遺伝子の発現が誘導されるか調査した。その結果、多くのオートファジー遺伝子はほとんど変動しなかったが、隔離膜形成の初期に関与する一部の遺伝子の発現がニッケル処理後 24 時間で増加し、48 時間以降は野生型株と同等の発現量に戻っていることが分かった。このことから、オートファジーの誘導はニッケル処理後のごく短時間

に起きていたと考えられた。

これを踏まえて、培養 24 時間の細胞で RNAseq 解析を行い、より広範囲の遺伝子の発現変動を調べた。その結果、オートファジーに関連する一部の遺伝子の発現がニッケル処理後 24 時間で増加することが分かった。さらに、分解対象を認識するためのアダプタータンパク質 (NBR1)、ユビキチン関連タンパク質、ならびにミトコンドリア呼吸鎖の酸化防御応答が高まっていることが明らかになった。この結果は、タバコ細胞内でニッケルを集積し損傷したミトコンドリアを除去するために、転写レベルでオートファジー誘導が起きていることを示している。

### 【既知オートファジー関連因子の発現抑制株の解析】

オートファジー応答に必須な遺伝子の RNAi 株を複数作出した。これらの株はいずれもニッケル耐性が低下していた。これらの中で *NtATG7* 遺伝子の発現抑制株では、ニッケル量の低下に加えて、酸化ストレスマーカーの増加も確認された。また、オートファジー阻害剤処理と同様に、発現抑制株では NAVs 凝集物が出現し、酸化脂質の過剰集積とニッケル耐性低下を引き越した。これらのことから、NAVs はニッケルを過剰集積した異常ミトコンドリアを分解するオートファジーに由来し、細胞内の酸化ストレスの消去において極めて重要な役割を持つと結論付けられた。

一方で、この発現抑制株でニッケルの局在や液胞隔離能力についてはまだ解析が完了していない。私はこのニッケル誘導性のオートファジーが単にミトコンドリアの除去にかかわるだけでなく、実は細胞内で有害なニッケルを液胞に隔離する仕組み (Saito et al. 2010) にも関連しているのではないかと考えている。この点については今後さらに詳細に明らかにする必要がある。

### 【タバコ細胞以外の実験材料での検証と新たな発見】

タバコ植物体でタバコ BY-2 細胞と同様の解析を行ったところ、葉肉細胞や根の伸長領域では、明確なオートファジー誘導の痕跡を確認できなかった。一方、根端においてはタバコ BY-2 細胞と非常によく似た酸性小胞がみられた。さらに、この根端細胞で RT-PCR 解析ならびに RNAseq 解析を行い、オートファジーが誘導されていることを確認した。このことから、タバコ植物体においても根端のような非光合成組織の分裂組織ではニッケル過剰に反応してオートファジーが誘導されていることが明らかになった。

このほかにオオムギやトマトの葉肉細胞に由来するプロトプラストでも観察を行ったが、明確な酸性小胞の増加は確認できなかった。これらの高等植物は細胞内を観察する実験材料としては取り扱いが難しいため、より詳細な解析はできなかった。

一方、シロイヌナズナ T87 培養細胞において、各種の重金属処理で NAVs のような構造物が細胞内に作られるか調査した。その結果、ニッケル処理では NAVs の集積は見られず、一方でカドミウム処理では大量の酸性小胞が出現した。この T87 細胞株は葉肉細胞に由来するため光合成をおこなうことができる。この点は、胚軸に由来し光合成能力を持たないタバコ BY-2 細胞株とは性質が大きく異なる。重金属に対する応答の違いは、植物種の違い、あるいは光合成組織であるか、非光合成組織であるかによって大きく異なる可能性がある。

これを踏まえて、我々はシロイヌナズナのカドミウム処理で生じた酸性小胞に対して詳細な解析を行っている。その結果、この酸性小胞にカドミウムが微量に含まれていること、またその内部にはミトコンドリアではなく、主に葉緑体または葉緑体ストロマが含まれていることが明らかになった。これは強光あるいは UV 条件で見られる葉緑体選択的なオートファジー (クロロファジーまたはルビスコ含有ボディ) と極めて類似する応答である。カドミウム処理実験では実際には弱光 ( $30 \sim 40 \mu \text{ photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) または暗所で実験をしていたことを踏まえると、光ストレスそのものよりもカドミウムの影響で葉緑体やプラスチドが損傷して葉緑体に対するオートファジーが誘導された可能性が考えられる。この結果は、本題である NAVs の研究から派生した新たな成果であり、カドミウムが葉緑体のどこに損傷を与えてオートファジーを引き起こすきっかけになったのか調査を進めている。これらについても今後、別な論文として発表をする予定である。

### 【まとめ】

ニッケル (Ni) 処理下で生育させたタバコ BY-2 培養細胞の液胞近傍には、Ni を集積する小胞様酸性区画 (NAVs) が多量に出現する。NAVs を多く含む膜画分の Proteome 解析と、透過型電子顕微鏡解析により、NAVs はミトコンドリアを内包する小胞構造であり、ミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) であることが分かった。

ミトコンドリアに RFP を発現させたタバコ細胞株にオートファジー阻害剤を加えて Ni 処理をしたところ、Ni を過剰集積した異常ミトコンドリア凝集物が出現した。オートファジー関連遺伝子を発現抑制した細胞株では、Ni 耐性の低下などが起こることからマイトファジーが Ni 耐性に対して重要な働きを持つことが明らかになった。オートファジーが単にミトコンドリアの除去にかかわるだけでなく、細胞内で有害なニッケルをいち早く液胞に隔離するためにも重要である可能性がある。これら未解明の点については、今後さらに明らかにする必要がある。

ミトコンドリアは電子伝達鎖に鉄・銅といった遷移金属を多量に必要とする。このため、これらの遷移金属と競合するニッケルのような重金属がミトコンドリア内に蓄積すると、正常な電子伝達が阻害されて有害な活性酸素種を多量に発生する。私たちは、ニッケルを集

積した「不良ミトコンドリア」を植物が直ちに認識し、他の構造とは別に選択的に液胞へ運んで除去する仕組みがあることを発見した。植物ではこれまで報告なかった「不良ミトコンドリア」の認識と除去に関わるオートファジーの分子機構の一端を解明し、オルガネラ品質管理能力を高めた新規の重金属耐性植物の作出につながる成果を得たと考えている。

## 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

Mitochondrial autophagy is important for the alleviation of Ni toxicity in tobacco cells Akihiro Saito, Moe Yamaguchi, Minori Tomono, Eitaro Miwa, Takuji Ohyama, Kyoko Higuchi 第59回日本植物生理学会 2018年03月

シロイヌナズナ T87 細胞における葉緑体を標的とした Cd 誘導型オートファジーの解析 齋藤彰宏、神尾智哉、浅野圭亮、山村祥明、大山卓爾、樋口恭子、日本土壤肥料学会関東支部大会(日本大学) 2017年11月

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://dbs.nodai.ac.jp/view?l=ja&u=100000607>

## 6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：樋口 恭子

ローマ字氏名：Higuchi Kyoko

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。