

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H05050

研究課題名（和文）選択的クロロファジー誘導制御の分子基盤

研究課題名（英文）Regulation mechanisms of selective chlorophagy

研究代表者

泉 正範 (Izumi, Masanori)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員

研究者番号：80714956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,000,000円

研究成果の概要（和文）：植物細胞において光合成を担う細胞小器官（オルガネラ）の葉緑体は、過剰な光エネルギーによる障害に常にさらされている。本研究では、光による障害を受けた葉緑体が、細胞内分解系「オートファジー」によって除去される経路（クロロファジー）の詳細なメカニズムに着目した研究を展開し、その分解を引き起こす誘導要因と、実際に細胞内で起こる輸送過程を明らかにした。また、分解対象となった葉緑体の標識や輸送に関わる可能性がある遺伝子を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉緑体には大量の栄養素が含まれており、植物は時に葉緑体を積極的に分解することでそこに含まれる栄養素を回収、再利用しながら成長する。また障害を受けた葉緑体を除去することは、光に由来するダメージ（光ストレス）を軽減するためにも重要であると考えられる。本研究では、代表者らが見出した、光障害を受けた葉緑体を除去するクロロファジー、を対象に、その駆動プロセスを明らかにし、制御に関わる未知の遺伝子候補を得ることに成功した。今後その具体的な遺伝子機能が明らかになっていくことで、葉緑体分解を人為的に制御し、作物の栄養利用効率や光ストレス耐性を向上させる取り組みが可能になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In plants, chloroplasts are exposed to the damage caused by sunlight during photosynthesis-dependent growth. After photooxidative damage, chloroplasts are degraded in their entirety via an autophagy pathway termed chlorophagy. This study addressed the induction mechanisms and molecular players for chlorophagy that degrades photodamaged chloroplasts. Through the combination between reverse genetics approaches and microscopy observations, we revealed that what types of chloroplasts are targeted as a selective substrate of chlorophagy. Furthermore, to find the unknown genes regulating chlorophagy, we performed forward genetics analyzes, and identified some candidate genes that are specifically required for chlorophagy.

研究分野：植物栄養学

キーワード：葉緑体 オートファジー クロロファジー 植物

## 1. 研究開始当初の背景

植物は、太陽光エネルギーを利用して大気中の CO<sub>2</sub> から有機物を生産する光合成により成長する。この光合成を担うのが、植物細胞に特有の細胞内小器官（オルガネラ）の葉緑体である。葉緑体には多量の栄養素が投資されており、植物は古くなった葉の葉緑体成分を一度分解し、派生する栄養素、特に多量栄養素である窒素を再利用しながら成長していく。また、葉緑体は晴天時の太陽光を利用しきれないため、余剰光エネルギーによる障害を日常的に受けている。この光障害は、特に耕作に不向きな寒冷や乾燥を伴う複合ストレス下では致死にも至るダメージにつながる。このようなストレス環境で光合成機能を維持し育つためには、障害を受けた葉緑体成分は適切に分解・除去される必要があると考えられる。以上のように、葉緑体の分解は、作物の栄養利用とストレス耐性に深く関わる重要な現象である。

このような学術的重要性から本研究の代表者らは葉緑体の分解機構に着目してきた。そして、モデル植物シロイヌナズナが光による障害を受けた際に、真核生物に保存される細胞内分解系であるオートファジーによって葉緑体が丸ごと液胞へ輸送、分解される現象（クロロファジー）が起こることを発見していた。一方で、様々な生物種におけるオートファジー研究の進展から、ある状況に陥ったオルガネラだけを選び取って分解する「選択的オートファジー」が、細胞内成分の品質管理を担うことが示されてきており、クロロファジーについてもある状況となった葉緑体だけを識別し分解する選択的な分解系として機能している可能性は高いと考えられた。しかしながら、クロロファジーが、どのような状況に陥った葉緑体を分解しているのか、分解対象の葉緑体と非分解対象の葉緑体をどう見分けているのか、その過程でどのような遺伝子が機能しているのか、といった誘導制御の詳細な分子機構は全く未解明であった。

## 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本研究では、主にクロロファジーの誘導因子や基質識別に関わる可能性がある遺伝子の変異株を用いてその遺伝子の関与を調査する逆遺伝学解析（項目 1）と、ランダムな遺伝子変異を誘発した植物系統群からクロロファジー活性が異常となる変異株を単離し、その原因遺伝子を明らかにする順遺伝学解析のアプローチ（項目 2）によって、クロロファジーの誘導要因、基質選択性を解明するとともに、そこに関わる未知の遺伝子を同定することを目的とした。さらにその成果を基盤に、クロロファジーの活性を人為制御することができるか、それによって植物のストレス耐性や体内栄養利用効率を改変することができるか、についても知見を得ることを目指した解析（項目 3）を行った。

## 3. 研究の方法

モデル植物シロイヌナズナを用いて、以下 3 項目の解析を行った。クロロファジーを誘導する光障害処理としては、太陽光に近いスペクトルを持つとされるキセノン光源から可視光領域を抽出した強い光を 1-3 時間、土耕栽培した植物に照射する強光処理を用いた。

### (1) クロロファジー誘導要因の逆遺伝学的解析

葉緑体のどの部位の障害がクロロファジー誘導要因となるかを調べるため、葉緑体の各部位の防御に関わる遺伝子の各種変異体について、それぞれクロロファジー検出のための蛍光タンパク質発現システムを整備し、強光処理後の葉緑体の状態とクロロファジー活性を評価した。また、クロロファジーに関わると考えられる細胞内膜系（オートファゴソーム膜や液胞膜）の動態についても、蛍光タンパク質マーカーを利用して調査した。

### (2) 障害葉緑体の標識に関わる新奇因子の同定

ランダムな遺伝子変異を誘発したシロイヌナズナ個体群から、強光処理時にクロロファジーが起きない変異系統を単離する順遺伝学スクリーニングを大規模に展開した。既知のオートファジー関連遺伝子群（ATG 遺伝子群）の変異株ではなく、クロロファジーに特異的に必要となる未知の遺伝子変異株を得るため、暗処理で誘導される別のタイプのオートファジーは通常起こる変異株をさらに選抜した。

得られた変異株については、親株との戻し交配を行い、得られた F<sub>2</sub> 集団を用いて、表現型調査、ゲノム抽出を行い、次世代シーケンス解析による全ゲノムリシーケンスに供することで、その原因遺伝子を絞り込んだ。そして絞り込まれた候補遺伝子を回復させる相補試験を行うとともに、別の変異株系統（T-DNA 挿入変異株や CRISPR/Cas9 によるゲノム編集株）を整備し、クロロファジーへの影響を調査する解析を行うことで、原因遺伝子をさらに絞り込んだ。

### (3) クロロファジー生理機能と人為誘導系の評価

項目 1 や 2 で得られた変異株や、項目 2 で同定したクロロファジー関連遺伝子の過剰発現株を作成し、それら植物系統を用いて表現型や光障害への影響を調査することで、クロロファジーの生理的重要性を評価した。また、後者のクロロファジー関連遺伝子の過剰発現株においては、光

障害なしでもクロロファジーを誘導できるかを調査した。

#### 4. 研究成果

##### (1) クロロファジー誘導要因の逆遺伝学的解析

チラコイド膜や包膜など、葉緑体の各部位の防御に関わる遺伝子の各種変異体を用いた解析から、チラコイド膜の電子伝達系で機能する光化学系Ⅱがより重篤な障害を受けると、異常な膨張形態を示す葉緑体が増加し、かつクロロファジーが活性化することが示された。顕微鏡による経時観察を行った結果、野生株ではクロロファジーが起こるにつれて膨張葉緑体が減少するが、クロロファジーが起こらないオートファジー関連遺伝子の変異株 (*atg5*, *atg7*) では、膨張葉緑体が細胞質に残存し、機能を失った葉緑体が細胞質に蓄積していくことが示された。これらの解析から、膨張葉緑体がクロロファジーの分解対象となることが明らかとなった。

一方、同程度の光化学系Ⅱの障害時でも、包膜の修復に関わる遺伝子の機能増強株では異常形態葉緑体とクロロファジーが減少し、機能低下株ではどちらも増加した。また、浸透圧調節剤を用いた解析から、異常形態葉緑体では包膜を介した膜ポテンシャルに異常が生じていることが示唆された。以上の結果から、光化学系Ⅱの障害が何らかの形で包膜に伝播し、それに伴い包膜を介した膜ポテンシャルの異常が生じることがクロロファジーの直接の誘導要因となっていることが示唆された。

さらに膨張葉緑体と細胞内膜系ののりまをライブセルイメージング解析により詳細に調べたところ、その隔離に液胞膜が直接関わるということが強く示唆された。よってクロロファジーは、分解対象の隔離、輸送に液胞膜に関わるタイプのオートファジーである「ミクロオートファジー」を介した経路であることが示唆され、ここまでの成果を論文として発表した。

さらに、細胞質に形成されるオートファジー膜と相互作用する可能性がある外包膜のタンパク質についても、利用可能な変異株に関して逆遺伝学的にクロロファジーへの関与を調査した。その結果、葉緑体内部へのタンパク質輸送経路となるトランスロコン複合体 (TOC 複合体) においてチャンネルを形成する遺伝子に変異が生じると、クロロファジー活性が大きく向上することを見出した。当該遺伝子のサブドメインの影響を調べた結果、特に外包膜上の穴を形成するドメインの異常の影響が大きいことが示された。また、TOC 複合体に関わる別の遺伝子の変異株では、クロロファジー活性が向上しない遺伝子欠損株も見出された。以上の解析から、クロロファジー誘導過程で葉緑体外包膜上のタンパク質輸送複合体が何らかの具体的な役割を担っている可能性が示された。

##### (2) 障害葉緑体の標識に関わる新奇因子の同定

ランダムな遺伝子変異を誘発したシロイヌナズナ個体群から、強光処理時にクロロファジーが起きない変異系統を顕微鏡観察によって単離し、その遺伝子同定のための解析を繰り返し行った結果、本研究期間内に、5系統のクロロファジー特異的抑制変異株を得た。戻し交配後に行った全ゲノムリシーケンスの結果と、相補試験、他の変異株を用いた解析を組み合わせることで、そのうち4系統については、原因遺伝子である可能性が高い遺伝子まで同定することに成功した。

哺乳類細胞で起こるミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) の1経路では、ミトコンドリアのユビキチン化が、マイトファジーのトリガーになる例が知られていたことから、葉緑体のユビキチン化酵素として報告されていた SP1 や PUB4 については、その変異株を用いてクロロファジーへの影響を調査した。しかしながら、これらユビキチン化酵素が欠損してもクロロファジーが野生株と同様に起きたことから、既知の葉緑体ユビキチン化はクロロファジー誘導、障害葉緑体の標識に関わらないことが示された。オートファジーとユビキチン化酵素 PUB4 の二重変異株は、それぞれの一重変異株よりもより強い表現型を示したことから、むしろオートファジーとユビキチン化が独立に働くことで植物成長やストレス応答を支えているものと考えられた。

##### (3) クロロファジー生理機能と人為誘導系の評価

項目1や2で得られたクロロファジー過剰誘導株やクロロファジー特異的抑制株を用いた表現型解析を行ったが、本研究で得られた変異株で、光ストレスへの耐性が明確に低下する系統は観察されなかった。光障害葉緑体を除去する選択的クロロファジーには、葉の枯死を防ぐ品質管理機構としての役割とは別の役割があることが想定された。また項目2で同定したクロロファジー関連遺伝子のうち、2系統についてはその過剰発現株の作成を完了したが、強光処理無しではクロロファジーは誘導されなかった。実際にどれくらいの遺伝子量が発現しているかなど、詳細に考慮すべき点は複数存在するが、これら遺伝子単体の過剰発現だけではクロロファジーの活性化には不十分である可能性が示された。

以上の成果によって、本研究開始時点では未知であった葉緑体を丸ごと分解するクロロファジーの誘導制御過程における鍵要因や、関わる遺伝子の情報を、研究期間内に明らかにすることができた。今後は、特に本研究で同定したクロロファジー関連遺伝子の具体的な機能が明らかになっていくことで、クロロファジー制御の全体像が明らかになっていくことが期待される。そのような研究が進展することで、クロロファジーを人為制御することで植物の栄養利用やストレス

耐性を向上することを実現する新たな方策を実施することが可能になると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nakamura Sakuya, Izumi Masanori	4. 巻 16
2. 論文標題 Chlorophagy does not require PLANT U-BOX4-mediated ubiquitination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1861769 ~ 1861769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2020.1861769	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 Kikuchi Yuta, Nakamura Sakuya, Woodson Jesse D., Ishida Hiroyuki, Ling Qihua, Hidema Jun, Jarvis R. Paul, Hagihara Shinya, Izumi Masanori	4. 巻 183
2. 論文標題 Chloroplast Autophagy and Ubiquitination Combine to Manage Oxidative Damage and Starvation Responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1531 ~ 1544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00237	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 Nakamura Sakuya, Izumi Masanori	4. 巻 59
2. 論文標題 Regulation of Chlorophagy during Photoinhibition and Senescence: Lessons from Mitophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1135 ~ 1143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy096	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 Nakamura Sakuya, Hidema Jun, Sakamoto Wataru, Ishida Hiroyuki, Izumi Masanori	4. 巻 177
2. 論文標題 Selective Elimination of Membrane-Damaged Chloroplasts via Microautophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1007 ~ 1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.00444	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 中村 咲耶、泉 正範	4. 巻 9
2. 論文標題 壊れた葉緑体はオートファジーで丸ごと除去される	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 植物科学の最前線	6. 最初と最後の頁 36～45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24480/bsj-review.9a6.00132	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 Nakamura Sakuya、Izumi Masanori	4. 巻 14
2. 論文標題 Chlorophagy is ATG gene-dependent microautophagy process	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1554469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2018.1558679	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 Izumi Masanori、Nakamura Sakuya	4. 巻 19
2. 論文標題 Chloroplast Protein Turnover: The Influence of Extraplasmidic Processes, Including Autophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19030828	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29件(うち招待講演 14件/うち国際学会 10件)

1. 発表者名 泉正範、中村咲耶
2. 発表標題 葉緑体分解から読み解く普遍的な膜形態制御機構
3. 学会等名 日本植物学会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Izumi M
2. 発表標題 Selective turnover of photodamaged chloroplasts by autophagy
3. 学会等名 Japan-Finland Seminar 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Izumi M
2. 発表標題 How chlorophagy is executed: Induction and intracellular events
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Mitochondria & Chloroplasts (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura S, Hidema J, Sakamoto W, Ishida H, Izumi M
2. 発表標題 Selective chlorophagy-microautophagic removal of membrane-damaged chloroplasts
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kikuchi Y, Nakamura S, Woodson J, Hidema J, Ishida H, Izumi M
2. 発表標題 Individual contribution of autophagy and chloroplast-associated ubiquitination to chloroplast turnover
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura S, Hidema J, Sakamoto W, Ishida H, Izumi M
2. 発表標題 Regulation mechanism of photodamage-induced chlorophagy
3. 学会等名 Japan-Finland Seminar 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池悠太, 中村咲耶, Woodson Jesse, 石田宏幸, 日出間純, Paul Jarvis, 泉正範
2. 発表標題 シロイヌナズナの葉緑体分解や飢餓応答におけるオートファジーとユビキチン化の相互作用の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村咲耶, 日出間純, 石田宏幸, 泉正範
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるクロロファジー誘導要因と細胞内動態の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Izumi M, Kikuchi Y, Nakamura S
2. 発表標題 Coordination of two types of autophagy for the controlled turnover of chloroplasts
3. 学会等名 East Asian Symposium on Senescence and Chronobiology in Plants (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Izumi M, Nakamura S, Ishida H, Hidema J
2. 発表標題 Autophagy for the Vacuolar Degradation of Entire Photodamaged Chloroplasts
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakamura S, Hidema J, Ishida H, Izumi M
2. 発表標題 Chlorophagy selectively eliminates swollen chloroplasts caused by high visible light-damage in Arabidopsis leaves
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 泉正範、中村咲耶、菊池悠太
2. 発表標題 クロロファジーによる葉緑体の品質管理
3. 学会等名 日本植物生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池悠太, 中村咲耶, 日出間純, 泉正範
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるオートファジーと葉緑体ユビキチン化の相互作用の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉正範
2. 発表標題 環境に応じた葉緑体分解を担う2種のオートファジー経路
3. 学会等名 日本農芸化学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉正範
2. 発表標題 葉緑体を分解する2つのオートファジー経路とその環境応答性の違い
3. 学会等名 日本植物学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 泉正範
2. 発表標題 2つのオートファジー経路による葉緑体成分のリサイクルと品質管理
3. 学会等名 第3回植物の栄養研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村咲耶，日出間純，石田宏幸，泉正範
2. 発表標題 オートファジーによる障害葉緑体の選択的な除去とその誘導メカニズムの解析
3. 学会等名 第3回植物の栄養研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菊池悠太, 中村咲耶, Qihua Ling, Paul Jarvis, 日出間純, 泉正範
2. 発表標題 葉緑体オートファジー誘導に関わる葉緑体包膜修飾因子の探索: ユビキチンリガーゼの関与について
3. 学会等名 第3回植物の栄養研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1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			
英国	オックスフォード大学			
米国	アリゾナ大学			