

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：23604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05562

研究課題名(和文) タペート崩壊での転写・活性酸素シグナルによる時空間的オートファジー制御機構の解明

研究課題名(英文) Critical roles of autophagy and enzymatic ROS production in the regulation of tapetal programmed cell death in rice

研究代表者

来須 孝光 (KURUSU, Takamitsu)

公立諏訪東京理科大学・工学部・准教授

研究者番号：50422499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：葯発達におけるRNAseq解析を実施した結果、オートファジーシステムが、タペート細胞のプログラム細胞死(PCD)制御に関連する転写因子群の発現、代謝ネットワーク、レドックスシグナルと密接に関連していることが明らかになった。一方、葯の各層の活性酸素種(ROS)の動態を可視化解析したところ、時期特異的なROSの一過的蓄積が観察され、タペート細胞のPCD制御に関連する転写因子EAT1およびROS生成酵素変異体では、ROS蓄積やオートファジー動態に異常が見られた。本研究により、イネ葯発達におけるレドックスシグナルとオートファジー、転写ネットワークの関連性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、葯発達や花粉への栄養供給細胞であるタペート細胞のPCD過程において、オートファジー誘導やレドックスシグナルの重要性に着目し、遺伝子発現・ROS蓄積を介した時空間的オートファジー制御機構の解明を進め、PCD進行過程におけるROSシグナルとオートファジー機構の生理的意義・重要性を明らかにすることが出来た。本成果は、栽培イネの花粉発達の新たな仕組みの解明だけでなく、将来的にオートファジー制御による作物の細胞内有害物質の低減化への活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We comprehensively analyzed the effect of autophagy disruption on gene expression profile during the tapetal PCD in rice anther development using high-throughput RNA sequencing. Expression of thousands of genes, including specific transcription factors and several proteases required for tapetal degradation, fluctuated synchronously at specific stages during tapetal PCD progression in the wild type anthers, while this fluctuation showed significant delay in the autophagy-deficient mutant *Osatg7-1*. The state of ROS accumulation was apparently changed and suppressed in the ROS mutant during anther development. The numbers of autophagosome-like structures were reduced in the tapetum of ROS mutant at stage 10 compared to that of control plants. These results suggest that redox signals contribute to anther development as well as promoting pollen maturation, and may be involved in the regulation of tapetal autophagy in rice.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：オートファジー 活性酸素種(ROS) タペート層 プログラム細胞死 花粉発達 イネ 転写ネットワーク 葯分化

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーは、真核生物が普遍的に備えている細胞内の大規模分解・リサイクル機構である。研究開始時点では、イネの花粉成熟に、花粉への栄養供給組織である葯のタペート細胞におけるオートファジーを介した脂質代謝、ジベレリン(GA)蓄積が、プログラム細胞死(PCD)誘導に必須なことを発見し、タペート細胞でオートファジーにより分解される脂肪滴が、イネの花粉への脂質等の供給源として機能する可能性が示唆されていた。

(2) 近年、哺乳動物の多様な組織において、遺伝学的解析から活性酸素(ROS)生成酵素の1種であるNADPH オキシダーゼ(Nox)を介したROS生成が、オートファジー誘導に積極的に関与する可能性が示唆されている。しかし、シグナル因子としてのROSの意義は不明な部分が多く、植物ホモログであるRbohタンパク質とオートファジー誘導の関係性は未開拓の領域であった。併せて、Rbohを介した植物生殖過程におけるROS生成が、植物のストレス適応や発生・分化制御において、重要な役割を果たすことは、幾つかの報告例があるものの、タペート細胞での一過的なROS上昇の時空間的変動や、その生理的意義、そしてシグナル因子としての可能性、PCD制御との関連性を含め、殆ど不明であった。

(3) 植物の花粉等の配偶子形成過程は、高度に遺伝的にプログラムされた巧妙なメカニズムであり、種子の収量、品質と密接に関連している。特に、配偶子形成は、交配育種から活発に研究されている。過去の遺伝学的解析から、『花粉発達に伴うイネ葯のタペート細胞分解は、bHLH型転写因子EAT1(ETERNAL TAPETUM 1)を起点とする転写ネットワークの時間的制御とそれに伴うプロテアーゼ因子群の誘導』が重要であることが明らかにされている。しかしながら、転写ネットワークによるオートファジー制御の可能性や、ROS生成の分子実態・制御機構、或いはレドックスシグナルによるオートファジー制御の可能性を含めて未解明であった。

2. 研究の目的

葯の最内層に存在するタペート細胞は、自身の脂質やアミノ酸を含めた栄養を、PCDによる自己分解により、花粉に供給する重要な機能を担っており、その制御機構の解明は、穀物における稔実制御に直結する。

本研究は、葯発達および花粉への栄養供給細胞である、タペート細胞のPCD過程におけるオートファジー誘導の重要性に着目し、遺伝子発現・ROS蓄積を介した時空間的オートファジー制御機構の解明を進め、PCD進行過程における、レドックスシグナルとオートファジー機構の生理的意義・重要性を明らかにすることを旨とするものである。

3. 研究の方法

(1) タペート細胞におけるオートファジーイメージングについては、タペート時期特異的オートファジー可視化形質転換イネ系統(P450プロモーター::GFP-ATG8a, EAT1プロモーター::GFP-ATG8a)を利用し、bHLH型転写因子EAT1変異体(*eat1*)、Rboh変異体、オートファジー変異体(*Osatg7-1*)のオートファジー動態を検証。

(2) タペート細胞を含めた葯組織におけるROSイメージングについては、NBT染色を利用し、EAT1変異体(*eat1*)、Rboh変異体、オートファジー変異体(*Osatg7-1*)のROS動態を検証。

(3) RNAseqによる転写ネットワークプロファイルについては、複数の変異体を利用し、レドックスシグナル、オートファジーシステムの葯発達過程における転写ネットワークへの寄与度について、網羅的に検証。

(4) Rbohタンパク質のROS生成活性については、HEK293細胞を用いた異所発現系により検証。葯で発現が想定されるリン酸化酵素によるRbohタンパク質のリン酸化活性については、ゲル内リン酸化/Mass解析法により検証。

4. 研究成果

(1) 広範囲な葯発達過程におけるイネタペート細胞のオートファジーの時空間的動態を可視化するために、タペート特異的プロモーターEAT1の制御下で、オートファジー可視化マーカーであるGFP-ATG8を発現するタペート特異的オートファジー可視化イネ系統を作成した。GFP蛍光は細胞質において特異的に検出された。次に、オートファジー活性の時空間的発現を検証するために、3Dモデル構築を行った。GFP蛍光シグナルはクロロフィル自家蛍光の内層で検出され、タペート細胞特異的にドット状のオートファゴソーム/オートファジー関連構造体が観察された(図1左)。葯発達ステージの経時解析から、オートファジーは花粉成熟中の花粉一核期のタペート細胞全体で劇的に誘導されることを見出した。オートファジー変異体(*Osatg7-1*)では、明らかなドット構造の低下が観察されるとともに(図1右)、タペート細胞のPCD制御に関連する転写

因子 EAT1 の変異体 (*eat1*) および Rboh 変異体では、オートファジー動態に異常が観察された。今後は、多様なイネの葯発達に異常を示す変異体群に本技術を適用することで、穀物イネの葯発達のしくみや、その過程におけるオートファジーの重要性を明らかにできると期待される。

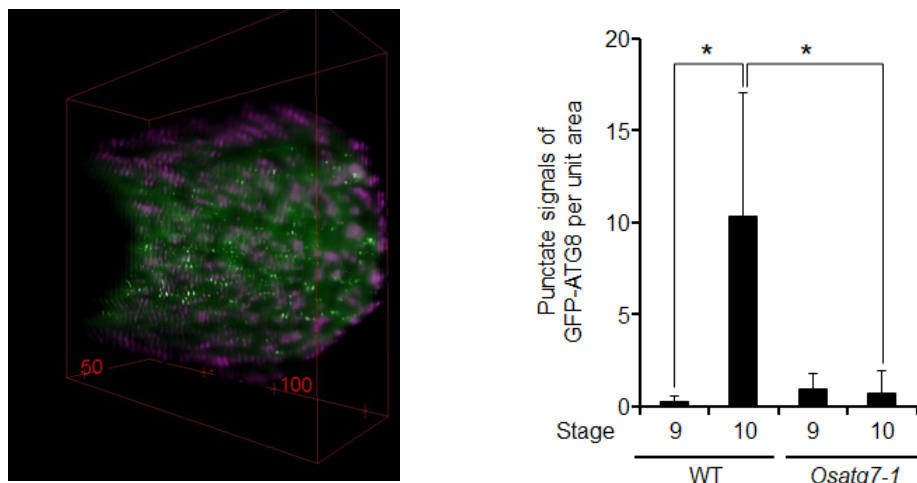


図 1: (左)イネ葯のタペート細胞におけるオートファジーの空間動態、(右)タペート細胞におけるオートファジー誘導とオートファジー変異体におけるドット蛍光シグナルの低下

(2) 各変異体群の花粉発達ステージ毎の葯における遺伝子発現プロファイリングを実施し、各変異体におけるネットワーク変化の相関性と時期特異性の検証を行った。*Osatg7-1* の次世代シーケンサーによる RNAseq 解析、そして複数のバイオインフォマティクス解析手法を用いて、イネ全遺伝子の発現変動を網羅的に解析した結果、オートファジーシステムが、タペート細胞のプログラム細胞死 (PCD) 制御に関連する転写因子群の発現、代謝ネットワーク、レドックスシグナルと密接に関連していることが明らかになった (図 2)。

次に、Rboh 変異体葯の花粉発達ステージ毎の RNAseq データを用いて、発現プロファイリングを実施した。解析の結果、ABCG 型トランスポーター群を含めた 446 個の発現変動遺伝子が同定された。ABCG 型トランスポーターは、花粉壁へのスポロポレニン輸送に関与しており、Rboh 変異体の花粉発達不良の原因に、ABCG 型トランスポーター等の発現異常の可能性が示唆された。

本研究により、イネ葯発達におけるレドックスシグナルとオートファジー、転写ネットワークの密接な関連性が明らかになった。本成果は、栽培イネの花粉発達の新たな仕組みの解明だけでなく、将来的にオートファジー制御による作物の細胞内有害物質の低減化への活用が期待される。

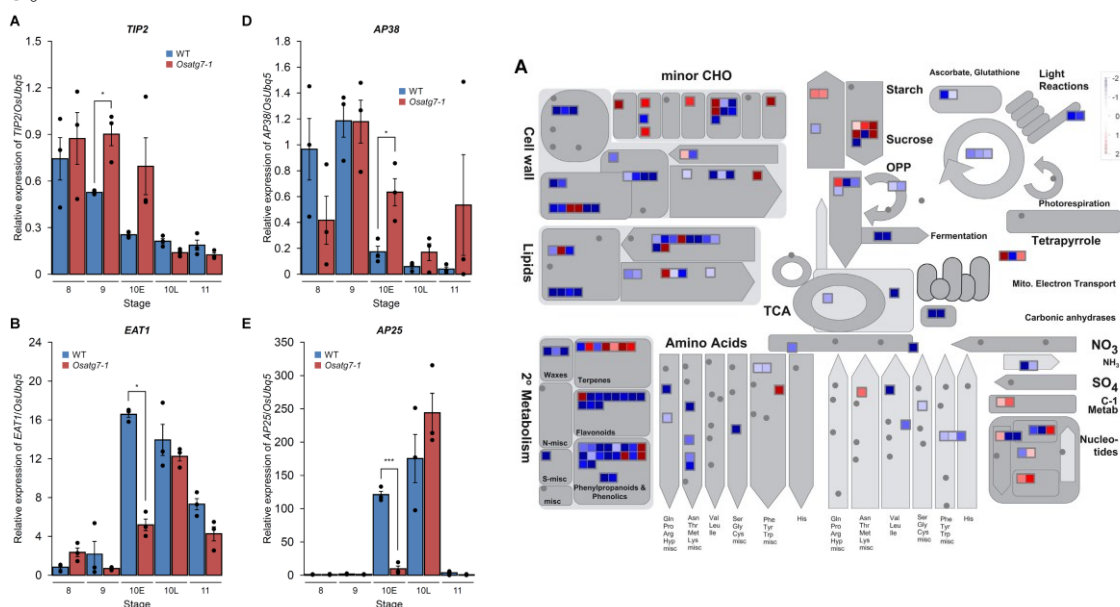


図 2: (左) タペート細胞のプログラム細胞死 (PCD) 制御に関連する転写因子群の発現へのオートファジー欠損の影響、(右) mapman 解析による代謝ネットワークへのオートファジー欠損の影響

(3) EAT1 変異体 (*eat1*)、Rboh 変異体に着目し、葯発達過程およびタペート細胞内における ROS 動態を NBT 染色等により比色定量解析により検証した。解析の結果、イネ葯発達ステージ間のタペート細胞で ROS 動態の変動が観察された。また、各変異体群においては、コントロール株に比べて、明らかな動態変化が観察された。Rboh 変異体のタペート崩壊以前のタペート層形成ステージでの ROS 動態を検証した結果、コントロール株と比べて ROS 蓄積が低下していた。本研究か

ら、ROS 蓄積およびレドックスシグナルがイネの葯発達と密接に関連する可能性が示唆された。

(4) 国際共同研究の一環として、ヘルシンキ大学と ROS 生成酵素 Rboh タンパク質のリン酸化制御に関する共同研究を実施した。研究グループが着目している葯特異的タンパク質について、ゲル内リン酸化/Mass 解析により、Rboh のリン酸化検証を行った結果、葯特異的タンパク質がリン酸化酵素として機能するとともに、Rboh タンパク質におけるリン酸化部位が明らかになった。

一方で、HEK293 細胞を用いた Rboh タンパク質の ROS 生成活性については、Rboh タンパク質の発現が極めて弱く、活性測定が困難であった。N 末付近の配列をコドン最適化することで、大腸菌内でのタンパク質発現は改善されたが、ROS 生成活性は検出されなかった。更なる条件の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sera Yuri, Hanamata Shigeru, Sakamoto Shingo, Ono Seiji, Kaneko Kentaro, Mitsui Yuudai, Koyano Tomoko, Fujita Naoko, Sasou Ai, Masumura Takehiro, Saji Hikaru, Nonomura Ken-Ichi, Mitsuda Nobutaka, Mitsui Toshiaki, Kurusu Takamitsu, Kuchitsu Kazuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Essential roles of autophagy in metabolic regulation in endosperm development during rice seed maturation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 e18544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-54361-1	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 Hanamata Shigeru, Sawada Jumpei, Ono Seiji, Ogawa Kazunori, Fukunaga Togo, Nonomura Ken-Ichi, Kimura Seisuke, Kurusu Takamitsu, Kuchitsu Kazuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of Autophagy on Gene Expression and Tapetal Programmed Cell Death During Pollen Development in Rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 e172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00172	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 来須 孝光、花保 繁、瀬良 ゆり、朽津 和幸	4. 巻 9
2. 論文標題 イネの生殖過程におけるオートファジーの重要性	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 29 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24480/bsj-review.9a5.00131	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 Hanamata S., Sawada J., Toh B., Ono S., Ogawa K., Fukunaga T., Nonomura K.I., Kurusu T., Kuchitsu K.	4. 巻 36
2. 論文標題 Monitoring autophagy in rice tapetal cells during pollen maturation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 99 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.19.0417a	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 Hanamata Shigeru, Kurusu Takamitsu, Kuchitsu Kazuyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Cell Cycle-Dependence of Autophagic Activity and Inhibition of Autophagosome Formation at M Phase in Tobacco BY-2 Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9166 ~ 9166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21239166	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4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 来須孝光、花俣繁、澤田隼平、福永任吾、小川和准、小野聖二郎、賀屋秀隆、土岐精一、野々村賢一、朽津和幸
2. 発表標題 イネ葯タペート層のプログラム細胞死・花粉成熟におけるROS生成・オートファジーの役割
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 来須孝光、澤田隼平、福永任吾、花俣繁、小野聖二郎、賀屋秀隆、土岐精一、野々村賢一、朽津和幸
2. 発表標題 イネ葯タペート層のプログラム細胞死・花粉成熟におけるROS生成・オートファジーの役割
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会(金沢)大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 来須孝光
2. 発表標題 イネにおけるオートファジーと活性酸素シグナルネットワークの生理機能の解明
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会(金沢)大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kurusu T., Sawada J., Fukunaga T., Hanamata S., Ono S., Ogawa K., Kaya H., Toki S., Nonomura K.I, Kuchitsu K.
2. 発表標題 Critical roles of autophagy and ROS in the regulation of tapetal programmed cell death in rice
3. 学会等名 Japan-Finland seminar 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究協力者	野々村 賢一 (NONOMURA Ken-ichi)		
研究協力者	木村 成介 (KIMURA Seisuke)		
研究協力者	朽津 和幸 (KUCHITSU Kazuyuki)		

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		
フィンランド	ヘルシンキ大学		