

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15501

研究課題名(和文)植物の光障害耐性を支える新奇オルガネラ・オートファジー経路の同定

研究課題名(英文)Identification of organelle-selective autophagy pathways involved in plant tolerance to photooxidative stress

研究代表者

中村 咲耶(Nakamura, Sakuya)

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・基礎科学特別研究員

研究者番号：20845151

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)：植物は太陽光に由来する紫外線B(UVB)や強度の強い可視光による障害に常に晒されており、本研究では、光障害時のオルガネラ除去・分解に寄与する植物オートファジー経路の同定とその機能因子群の解明に取り組んだ。そしてUVB障害時にはミトコンドリアとペルオキシソームがオートファジーによって積極的に分解されることを見出した。特にミトコンドリア・オートファジーに焦点を当てた解析を行い、オートファジーが損傷ミトコンドリアを除去する品質管理機構として機能していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光障害は光合成機能の低下だけでなく、活性酸素種の過剰蓄積や細胞機能の破綻にもつながるため、光障害を受けた細胞内成分を適切に除去・修復することは、植物の生存や作物の生産能力に関わる重要な機構である。本研究では、光障害時の細胞内品質管理機構として機能するオルガネラ・オートファジー経路の同定に成功した。この経路について、さらにその制御機構を解明する研究が発展していくことで、植物における細胞内品質管理能力を高め、作物の生産性・ストレス耐性の向上を図るための応用研究が創出されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Plants are exposed to damages caused by sunlight. Ultraviolet-B (UVB) and High visible light (HL) are harmful factors in sunlight. We previously reported that autophagic degradation of chloroplasts, termed chlorophagy, selectively eliminates photodamaged chloroplasts. Autophagy refers to the process in which cytoplasmic components are transported to lysosomes or the vacuole for degradation in eukaryotes. This study examined if autophagy is involved in the turnover of the other organelles damaged by UVB in leaf mesophyll cells. Live-cell organelle imaging indicated that autophagy contributed to the removal of mitochondria and peroxisomes in UVB-damaged leaves. We further found that dysfunctional mitochondria accumulated in autophagy-deficient mutants exposed to UVB damage. Therefore, this study established a mitochondrion-targeting autophagy (mitophagy) process for the quality control of leaf mitochondria.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：オートファジー オルガネラ シロイヌナズナ 光障害 細胞内品質管理

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞内では、ミトコンドリアなどのオルガネラがエネルギー生産など多様な代謝反応を担っている。各種ストレスによりオルガネラが故障した場合には、速やかに除去し、二次的な障害拡散を防ぐ必要があり、「オートファジー」と呼ばれる細胞内自己分解系がその役割を担うことが、酵母や哺乳類細胞を中心に明らかにされてきた。このような「壊れたオルガネラ」を認識し、オートファゴソームと呼ばれる輸送体を介して、液胞あるいはリソソームへと輸送・分解する経路は特に「選択的オートファジー」と呼ばれている。酵母では、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、小胞体 (ER)、核など様々なオルガネラが、オートファジーによる分解を介して品質管理されている。オートファゴソーム形成に必要な 15 種類のオートファジー関連因子群はコア ATG 遺伝子と呼ばれ、その遺伝子と機能は出芽酵母から植物まで同様の仕組みが保存されていることが分かってきたが、植物細胞における「選択的オートファジー」に関しては、経路自体が同定されていないものが多く、選択的オートファジーが植物オルガネラの品質管理にどの程度寄与するかは、未解明の点が多かった。

植物は太陽光を利用して成長する一方で、太陽光に含まれる紫外線 B (UVB; 波長 280-315 nm) や、光合成に有効な可視光 (波長 400-700 nm) の過剰エネルギー (強光) を主要因とする光障害に常に晒されている。申請者はこれまでに、光合成オルガネラである葉緑体の挙動に着目し、光障害によって損傷した葉緑体がオートファジーによって除去される「選択的クロロファジー経路」を明らかにしてきた。ただし、UVB あるいは強光を個別に付与すると、どちらの条件でも同程度のクロロファジーが起きるが、オートファジー欠損変異体は UVB 障害時により顕著な生育阻害を示すため、特に UVB に起因する障害では、葉緑体以外のオルガネラの除去にまでオートファジーが寄与している可能性が考えられた。以上を踏まえ本研究では、植物の光障害耐性機構としてのオートファジーの役割の全容を明らかにすることを目指し、新奇オートファジー経路の同定とそれらに関わる機能因子群の解明に取り組むこととした。

2. 研究の目的

本研究では、光障害耐性機構として植物オートファジーが担う役割の全容解明を目指し、研究開始当初は植物では明確に定義されていなかったミトコンドリア分解「マイトファジー」を含む植物の新奇オルガネラ・オートファジー経路を同定し、ストレス応答としての重要性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 各種オルガネラ可視化システムを用いた細胞内観察

まず、各種オルガネラ (核、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、小胞体、ゴルジ体) を緑色蛍光タンパク質 (GFP) で可視化した形質転換体を用いて、UVB 障害 (1.5 W m^{-2} , 1 h) あるいは強光障害 ($2,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 2 h) を付与したのち、共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブセルイメージングによりオルガネラ形態観察を行った。野生型およびオートファジー欠損株背景でそれぞれ評価し、光障害後にオートファジー依存的に数およびサイズが変化するオルガネラがないか検証した。解析はすべて、モデル植物シロイヌナズナを用いて行った。

ミトコンドリアなど細胞内を素早く移動し続けているオルガネラの 3D 構造を正確に捉えるため、生体内深部観察と高時間分解能での画像取得の両立が可能な顕微鏡システム「多点走査型二光子励起顕微鏡」を使用した。3D 画像におけるオルガネラの数、サイズの定量については、3D・4D 画像解析ソフト Imaris を使用した。

(2) オートファゴソームマーカー ATG8 との局在解析

オートファジーの誘導に広く必要とされるコア ATG タンパク質群のうち、ユビキチン様タンパク質 ATG8 は、膜脂質 phosphatidylethanolamine (PE) と結合すること、液胞あるいはリソソーム内へと輸送・分解される時点までオートファゴソーム膜上に局在していることから、オートファゴソームマーカーとして用いられている。上記 (1) で見出したオートファジーによって分解されている可能性の高いオルガネラについて、確かにオートファゴソームの積み荷となっているかを調べるため、ATG8 との二重蛍光発現システムを作成し、局在解析を行った。例えば、ミトコンドリアの分解評価においては、ミトコンドリアを GFP で、ATG8 を赤色蛍光タンパク質 (RFP) で可視化したシステム (あるいはその逆の組み合わせ) を作成し、紫外線障害時に共同在するかどうかを観察した。

哺乳類細胞では ATP 産生に必要な膜電位 () が消失したミトコンドリアがマイトファジーで選択的に除去されることが知られている。本解析では、膜電位を保持して機能するミトコンドリアだけを染色する Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) 試薬を用いて、膜電位が低下したミトコンドリアがオートファジー欠損株で蓄積するかを検証した。

(3) 光障害時の選択的オートファジーに必要な鍵因子の絞り込み

選択的オートファジーに関する研究は、酵母や哺乳類で特に進展し、分解対象を認識する高度な

制御機構が明らかになっている。例えば酵母では、酸化したミトコンドリアが ATG32 という特異的な「レセプタータンパク質」によって認識されることで、オートファゴソーム上の ATG8 と結合し、選択的に除去される。この例の他にも、選択的オートファジーでは損傷したオルガネラを分解対象として認識するための「レセプタータンパク質」と ATG8 との相互作用が見られている。植物の選択的オートファジーにおいてもこのようなレセプターが機能することを想定し、その実体を同定するため、上記 (2) で使用した GFP (RFP)-ATG8 可視化システムを用いて、UVB 照射前および照射後のサンプルを GFP (RFP) 抗体による共免疫沈降法でレセプタータンパク質の濃縮・精製を試みた。しかしながらこの実験条件は、このような生化学的なアプローチに適さなかったことから、複数の障害条件に晒したサンプルの遺伝子発現を網羅的に解析・比較する RNA-seq 解析によって、光障害時のオートファジーに関わる鍵因子を絞り込むこととした。

4. 研究成果

まず、光障害 (UVB・強光) 時において、GFP により可視化した各種オルガネラの数・サイズの変化を定量評価した。特に、UVB 障害付与後にミトコンドリアの数が減っている一方で、オートファジー欠損株ではその数が増え、野生株と比較すると、個々のサイズが小さいものが増加していた。また、ペルオキシソームについては、野生株と比べて、UVB 障害前からオートファジー欠損株で数が多く、UVB 障害後にはさらに増加することを見出した。よってオートファジーは UVB 障害時にミトコンドリアとペルオキシソームを積極的に分解していることが示された。他の植物オルガネラ (小胞体、ゴルジ体、トランスゴルジネットワークなど) についても光障害時の変化を調べるために、複数の蛍光波長の蛍光タンパク質による可視化マーカーなどの材料を整備した。これらのオルガネラは、本解析の実験条件下では光障害に対しての目立った変化は確認されなかった。これらの蛍光タンパク質によるオルガネライメージング解析に加えて、蛍光タンパク質を用いない、蛍光プローブによるオルガネラ形態観察法の構築にも取り組んだ。

次に、オートファゴソームマーカー ATG8 との共局在を解析し、緑色蛍光タンパク質あるいは赤色蛍光タンパク質で可視化した ATG8 とミトコンドリアが、UVB 障害付与後に隣接あるいは共局在している様子が観察された。TMRE 染色をした結果、UVB 障害に晒されたオートファジー欠損株では脱分極した損傷ミトコンドリアが細胞質に多く蓄積していることが分かった。これらの結果から、UVB 障害を受けたミトコンドリアの除去にオートファジーが機能していることが示された。

光障害時に機能するオルガネラ選択的オートファジーに必要な因子を同定するため、特にオートファゴソーム上のタンパク質 ATG8 の相互作用タンパク質を共免疫沈降法により同定することを目指したが、損傷を受けたミトコンドリアは短時間で液胞内へと輸送・分解されるように観察されること、また、紫外線障害時には細胞死が頻繁に起きることから、生化学的手法で、目的とするオートファジー関連因子を濃縮することは困難であると判断した。そこで代替のアプローチとして、複数のタイプの光障害後の植物サンプルの遺伝子発現解析を組み合わせること、関連する遺伝子群を絞り込むこととし、そのための多検体 RNAseq 解析を行った。多検体を対象とした RNAseq 解析から得られた結果のデータ分析、比較解析を進めることで、そのようなストレス条件下で機能する候補遺伝子群を絞り込み、それらの機能を評価するための変異体システムの整備を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kusano Shuhei, Nakamura Sakuya, Izumi Masanori, Hagihara Shinya	4. 巻 58
2. 論文標題 Development of 1,8-naphthalimide dyes for rapid imaging of subcellular compartments in plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 1685 ~ 1688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1cc05798g	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, Hagihara Shinya, Izumi Masanori	4. 巻 1865
2. 論文標題 Mitophagy in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129916 ~ 129916
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2021.129916	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, Hagihara Shinya, Otomo Kohei, Ishida Hiroyuki, Hidema Jun, Nemoto Tomomi, Izumi Masanori	4. 巻 62
2. 論文標題 Autophagy Contributes to the Quality Control of Leaf Mitochondria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 229 ~ 247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcaa162	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村咲耶、萩原伸也、大友康平、石田宏幸、日出間純、根本知己、泉正範
2. 発表標題 Plant mitophagy contributes to the maintenance of mitochondrial population and quality in Arabidopsis leaves
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------