

研究終了報告書

「植物における小分子 RNA 輸送メカニズムの解明」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：濱田 隆宏

1. 研究のねらい

本研究では植物細胞間で「分泌と取り込み」によるsmall RNA輸送経路が存在するかどうかを検証し、植物細胞間におけるsmall RNA輸送メカニズムを生化学・変異体解析・イメージング解析により解明する。これまでの植物研究の知見では、細胞間のsmall RNA輸送はプラズモデスマータ(原形質連絡)と呼ばれる植物独特な細胞間構造によって行われると考えられており、「細胞外への分泌と隣接細胞での取り込み」によって行われているとは考えられていない。

プラズモデスマータが輸送に働いていることを証明したとされる論文では、細胞壁成分であるカロースの高蓄積によりプラズモデスマータの直径を狭め、small RNAの輸送を阻害したと報告している(Vaten et al. 2011, Dev Cell)。この論文で用いられた植物体では、カロースの高蓄積はプラズモデスマータの直径を狭めると同時に、細胞壁全体においてカロース密度の上昇と細胞壁の肥厚が生じる。このカロース密度の上昇と細胞壁の肥厚は「分泌と取り込み」によるsmall RNA輸送経路も阻害すると考えられ、「分泌と取り込み」によるsmall RNA輸送経路が働く可能性が残されている。さらに「分泌と取り込み」によるsmall RNA輸送経路を支持するデータも存在する。第1のデータとして、菌感染時におけるエキソサイトーシスの活性化と細胞外顆粒の内容物の同定が行われたことより(Cai et al. 2018, Science)、少なくとも菌感染時には細胞外にsmall RNAが顆粒として輸送されることが証明されている。第2のデータとして、small RNAの細胞間移行の正遺伝学解析では、細胞間移行に関する変異体として微小管付随タンパク質群(MAPs)変異体が同定されている(Brodersen et al. 2008 Science)。しかしながら、MAPs変異体や微小管脱重合剤ではプラズモデスマータ構造に異常は生じない。さらにタイムラプス観察では微小管とプラズモデスマータの積極的な相互作用は確認されないため、微小管とsmall RNAの細胞間移行の関係も不明なままである。一方、微小管と内膜系は密接な相互作用をしていることは知られており、細胞外小胞の分泌や取り込みにも微小管が関わる可能性がある。

本研究では、このプラズモデスマータを介さないsmall RNA輸送経路の存在を証明し、それに必要な要素を同定することにより、遺伝子組換えによらない新たな植物の制御技術のシーズを生み出すことが可能であると考えている。

2. 研究成果

(1) 概要

植物培養細胞の上清から精製した細胞外小胞の構成成分の同定を行った。プロテオーム解析では、濃縮されることが既に知られていたテラスパニンや膜交通タンパク質群に加え、膜輸送関連タンパク質、細胞壁局在タンパク質、細胞膜タンパク質、プラズモデスマータ関連タンパク質などが同定された。また 40%, 20%, 10%, 5% の Optiprep 溶液を用いた密度勾配遠心による分画を行った。その結果、10-20% 界面画分で細胞外小胞マーカーとして認知されている特定の膜交通因子やテラスパニンが最もよく濃縮されていた。さらに高温処理をした培養細胞の培養上清から精製した細胞外小胞には、ヒートショックタンパク質や翻訳開始因子などのストレス顆粒成分が含まれていた。また Small RNAseq 解析により、細胞外小胞画分に特異的に濃縮されている 21 nt と 24 nt の small RNA の存在を明らかにした。特に濃縮されていた small RNA としては、特定の2種類の natural antisense lncRNA から切り出された siRNA 群と葉の発生に関する miRNA 群が挙げられた。

細胞外小胞の主な分泌経路として Multi-vesicular body (MVB) 経路が考えられるが、膜交通系の阻害剤や変異体を用いた解析では、細胞外小胞の分泌の減少を確認することはできなかった。しかしながら、細胞外小胞プロテオームの結果は、MVB 由来の細胞外小胞が確実に存在することを示しており、例えば膜輸送タンパク質群はユビキチン化され、MVB 経路により細胞外へ分泌されていた。さらにヒートショックタンパク質群の解析でも、同様のユビキチン化を介した MVB 経路によって細胞外に分泌されていた。

本研究ではプラズモデスマータを介さない small RNA の細胞間移行が可能であるかを検証するために、通常時は発現していない miR399 を過剰発現する培養細胞、miR399 の量依存的に GFP タンパク質量が減少するレポーター培養細胞、非形質転換培養細胞の3種類の培養細胞を用いて、それらを共培養することで細胞間移行実験を行った。その結果、レポーター遺伝子の発現減少がタンパク質レベル、mRNA レベルで確認された。この結果は培養細胞間でプラズモデスマータを介さない形での small RNA の移行メカニズムが存在することを意味している。

(2) 詳細

研究テーマ A 「植物細胞から分泌された細胞外小胞の解析」

本研究では多量の細胞外小胞を得られやすい植物培養細胞の上清からの細胞外小胞の精製法の検討、及び構成成分の同定を行った。シロイヌナズナ培養細胞及びタバコ培養細胞の上清を密度勾配遠心法や脂質アフィニティーカラムにより処理し、細胞外小胞画分を得た。得られた画分を脂質を標識する BODIPY TR Ceramide で処理して観察したところ、100 nm から 500 nm 程度の顆粒が確認された。さらに RNA 染色試薬である SYTO RNASelect Green を用いて染色を行ったところ、一部の細胞外小胞のみが染色された。そのため植物の細胞外小胞の大半は RNA を含まないが、一部の細胞外小胞は RNA を含むことが示唆された。

<細胞外小胞のプロテオーム解析>

細胞外小胞画分のプロテオーム解析を行った結果、細胞外小胞に濃縮されると知られているテトラスパニンや膜交通タンパク質群が豊富に含まれていることが明らかになった。また細胞膜に関連する膜輸送関連タンパク質、細胞壁局在タンパク質、細胞膜タンパク質、プラズモデスマータ関連タンパク質なども豊富に同定された。その後、さらに 40%、20%、10%、5%の Optiprep 溶液を用いた密度勾配遠心による分画を行った。その結果、10-20% 界面画分で細胞外小胞マーカーとして認知されている特定の膜交通因子やテトラスパニンが最もよく濃縮されていた。また動物細胞では様々な刺激により細胞外小胞の分泌が活発になることが知られているため、高温処理の効果を調べたところ、5 % Optiprep の軽い分画にヒートショックタンパク質や翻訳開始因子などのストレス顆粒成分が含まれることが明らかとなった。

<細胞外小胞の small RNA 解析>

次に細胞外小胞画分から RNA を抽出し、small RNA が含まれているかどうかを確認した。バイオアナライザー解析では 21 nt と 24 nt の small RNA の存在が確認された。そこで次世代シーケンサーを用いた small RNAseq を行った。培養細胞全体を破碎して抽出した small RNA をコントロールとしてプロファイルを調べると、細胞外小胞画分に特異的に濃縮されている small RNA 群があることが明らかになった。その中でも特定の2種類の natural antisense lncRNA から切り出された siRNA と植物の葉の発生に関する miRNA が多く含まれていた。また密度勾配遠心による分画では 10-20% 界面画分で small RNA の濃度が最も高かった。

研究テーマ B 「植物培養細胞間における small RNA 移行実験」

これまでの研究では、植物細胞は細胞外小胞を確実に分泌しているものの、植物細胞に植物細胞由来の細胞外小胞が取り込まれたという報告はなかった。また植物体内での細胞間 small RNA 輸送はプラズモデスマータを介して行われているというのが定説であり、それ以外の経路で small RNA が輸送されているという知見もなかった。

そこで本研究では、植物培養細胞間での small RNA 移行実験を試みた。実験には miR399 供給培養細胞(通常時は発現していない microRNA を発現する miR399 過剰発現培養細胞)とレポーター培養細胞(miR399 の量依存的に GFP タンパク質量が減少する GFP-SPL3-3' UTR 過剰発現培養細胞)、コントロール培養細胞(非形質転換培養細胞)の 3 種類の培養細胞を用いた。植え継ぎ後4日目のレポーター培養細胞と miR399 供給培養細胞を 2 mL ずつシャーレに取り、4日間共培養すると GFP タンパク質量の減少が確認された。一方、コントロール培養細胞とレポーター培養細胞を共培養した場合には、GFP タンパク質の量の減少は見られなかった。この結果は、GFP mRNA を測定する qPCR 実験でも確認することができた。このことより、独立した植物培養細胞間で miR399 が輸送され、レポーター培養細胞の GFP mRNA が分解したと考えられる。またこの実験は植継ぎ後1日目、2日目、6日目、7日目の細胞では成功しないことや、共培養の日数も最低でも3日間は必要であることが明らかとなった。効率の良い植継ぎ後4日目の培養細胞は対数分裂期の細胞であり、その後の4日間で徐々に細胞伸長期へと移行していく。そのため small RNA の移行は活発な細胞伸長時に見られると

考えている。

研究テーマ C 「細胞外小胞の分泌メカニズムの解明」

植物細胞からの細胞外小胞の分泌経路として最も有力な経路は Multi-vesicular body (MVB)経路である。しかしながらこれまでの研究により、ARF/GEF 阻害剤である brefeldin A を植物体に処理しても、植物体の葉内腔アポプラストに含まれる細胞外小胞の量は変化しなかったと言う報告があった(Rutter et al. 2017 Plant Physiol. 173: 728-741)。その原因として、BFA の処理時間が 20 時間と短く、4週間生育させた植物体の葉内腔には多量の細胞外小胞が BFA 処理前から蓄積されていることが一因であると考えられた。

そこで本研究では、培養細胞を用いて細胞外小胞の分泌経路の解析を行った。細胞外小胞はカバーガラス上に張り付くため、大まかな細胞外小胞数の計測が可能である。そこで培養細胞を新しい培地で数回洗い、細胞外小胞を極力減らした培養細胞から分泌される細胞外小胞の計測を行った。細胞外小胞の可視化には膜染色、もしくは SYP121 などの各種膜交通タンパク質マーカを用いた。しかしながらコントロールと比較して、BFA, Wortmannin, YM201636 などの膜交通系阻害剤の効果は確認できなかった。さらに Tim4 固相化カバーガラスを用いた細胞外小胞の数の計測も行ったが、同じ結果であった。また細胞外小胞が細胞壁にトラップされていることが多いため、プロトプラストを用いた解析も行ったがポジティブなデータは得られなかった。また細胞外小胞との関連は不明であるが、多くの膜交通タンパク質マーカはプロトプラスト化の過程で Hechtian strand に集積し、プロトプラストから飛び出た構造になることが観察された。

本研究の細胞外小胞プロテオーム解析によりヒートショックタンパク質(HSPs)や翻訳開始因子などのストレス顆粒成分が細胞外小胞に含まれることが示された。そこで HSPs を可視化した植物体を作成し高温処理により発現させたところ、HSPs は細胞内顆粒を形成したが細胞外には局在しなかった。その後、室温に戻した場合、2日目までは HSPs は細胞質に拡散していたが、3日後からは細胞質の HSPs 量が減少し始め、6日後には細胞外で顆粒として観察することができた。本研究の細胞外小胞プロテオーム解析では、ユビキチン化によって MVB へと輸送され、最終的に液胞で分解される多くの細胞膜タンパク質群(Mosesso et al. 2019 J Cell Sci 132: jcs232868)やユビキチンリガーゼ、ユビキチンなどが同定された。そのため、MVB から液胞に運ばれるのみならず、細胞外へも運ばれて細胞外小胞になることが示唆されている。植物では HSPs がユビキチン化されてプロテアソームに運ばれて分解されることが知られているが(McLoughlin et al. 2019 Plant Physiol. 180: 1829-1847)、同時に MVB にも運ばれて細胞外小胞として分泌すると考えられる。

3. 今後の展開

本研究では植物の細胞外小胞の特性を調べ、将来的に「植物の miRNA や siRNA などの small RNA を外部から添加し、植物の生育制御を行う技術の開発」に取り組んでいると言える。外部から small RNA を添加することで、開花時期のコントロールや野菜の収量増加、肥料使用量の削減、ウイルスや病害菌への抵抗性の付与など様々な植物の生育制御が可能となる。例えば、現在、多くのエネルギーを使って行われている野菜や花の促成栽培などは、miR172 という花成制御が可能な miRNA 細胞外小胞を使用することで不要となる。またリン酸の吸収を高める miR399 を含んだ細胞外小胞を使用することで、貧栄養土壌でも美味しい野菜を作ることが可能となる。この技術は遺伝子組換えに頼らず、既存の有用品種に適応可能であり、新たなバイオスティミュラント資材として活用できる可能性を秘めている。

これまでの本研究での研究成果では、植物培養細胞間でプラズモデスマータを介さない small RNA 輸送経路が存在することを明らかにした。しかしながら、精製した細胞外小胞を植物体に添加して遺伝子発現を制御する実験には失敗しており、社会実装に至るには厳しい状態だと言える。また本研究では、細胞外小胞の分泌過程についてはある程度の理解が進んだが、取り込み過程の解析では有用な実験系を確立できておらず、今後の課題と言える。植物が分泌する天然の細胞外小胞から学ぶことが多くあると思われるが、それと同時に mRNA ワクチン技術などの新技術を用いた植物細胞への small RNA の導入技術についても開発する必要があると思われる。

4. 自己評価

本研究の最も重要な研究目的である「プラズモデスマータを介さない small RNA 輸送経路が存在するかどうか」については、植物培養細胞を用いた実験系により証明された。この実験系を発展させることで「細胞外小胞の分泌や取込みメカニズムの解明」に繋がるが大いに期待されたが、残念ながら大きな成果は得られていない。また植物培養細胞の培養上清を用いることで、これまでに発表されている植物細胞外小胞研究よりも高い精製度での解析が可能となり、信頼性の高いプロテオーム解析や small RNA seq 解析の結果が得られている。

研究の進め方としては、2019年4月に東京大学から岡山理科大学へと異動したが、研究補助員と研究室所属学生による精力的な研究活動により、私の多岐に渡る様々なアイデアに基づき、多くの実験を遂行することができた。

本研究が社会・経済への波及効果を発揮するためには更なる研究が必要であり、現時点では基礎研究の域を出ていない。しかしながら small RNA を用いた植物生育制御技術には高い将来性があると思われるため、今後の研究継続が必要である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1) 武井 敬仁、麻生 哲平、濱川 正英、奥村 友貴、今見 考志、池田 陽子、渡邊 雄一郎、濱田 隆宏

「植物細胞間における細胞外小胞を介した small RNA 輸送の検証」

日本植物学会第 85 回大会 2021 年 9 月

2) 濱田隆宏「植物における微小管ネットワークの役割」

第 31 回フォーラム・イン・ドージン 2021 年 8 月

3) 武井 敬仁、麻生 哲平、濱川 正英、奥村 友貴、今見 考志、池田 陽子、渡邊 雄一郎、濱田 隆宏

「シロイヌナズナの細胞外小胞に含まれる構成成分の解析」

第 73 回日本細胞生物学会大会 2021 年 5 月

4) 濱田隆宏「植物における細胞外小胞を介した細胞間コミュニケーション経路の探索」

第 72 回日本細胞生物学会大会 ワークショップ 2020 年 6 月

5) 濱田 隆宏、武井 敬仁

「植物の細胞外小胞」 実験医学増刊 Vol. 39 No. 20 「EVs 細胞外小胞の生物学」 羊土社