

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19380045
 研究課題名 (和文) 植物における細胞内分解系の栄養欠乏による誘導機構
 研究課題名 (英文) Induction mechanism of intracellular protein degradation under nutrient starvation in plants
 研究代表者
 松岡 健 (MATSUOKA KEN)
 九州大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：40222294

研究成果の概要：

オートファジーに関与する可能性が有ることをこの研究課題の開始以前に見出していたプロテインキナーゼの一種について、完全長 cDNA を単離しその塩基配列を決定した。次いで、このキナーゼについて、発現を低下させた形質転換体の作成を行った。その過程で、この抑制体の得られる頻度はコントロールに比べてかなり低く、発現抑制が細胞の増殖に悪影響を及ぼしている可能性を見出した。また、この蛋白質の N-末端側と C-末端側に対する特異抗体を用いて、糖飢餓に際してそのサイズに変化があるか検討し、この蛋白質は糖飢餓の際に発現量とサイズが共に変化することを見出した。

また、ゴルジ装置またはその後期の構造体を蛍光タンパク質標識した細胞について、細胞の増殖過程での蛍光の変化と、ショ糖等の栄養飢餓における分解を検討した。その結果、飢餓による分解を受ける膜タンパク質と受けない膜タンパク質が存在すること、この分解はオートファジー系の阻害剤により阻害されることを見出した。

これらの解析と併せて、ミトコンドリアの機能阻害とオートファジーの関連についての知見のまを進めるとともに、高等生物におけるオートファジーのモニタリング系について他の研究者と共同でそのクライテリアに関するガイドラインの策定を行い、あわせて蛍光タンパク質のオートファジー解析への利用についての実験手法をとりまとめた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 植物栄養学・土壌学

キーワード：植物成長・生理, 応用分子細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

植物は動物と異なり、生育場所から移動出来ない。従って、その生育に必要な栄養素の供給量は、環境の変化によって容易に変化する。例えば、多量の降雨があると、表土中の養分は流亡し、植物は養分欠乏状態にさらされる。一方、生育場所の近傍に動物の排泄物等が存在すると、植物は必要以上の養分にさらされることとなる。そこで、植物はこれらの環境変化に適応する機構を発達させていると考えられるが、その分子レベルでの理解に関しては、窒素レベル上昇という情報の地下から地上への情報伝達に、サイトカイニンという植物ホルモンが関わるということが知られるに過ぎず、栄養欠乏に対する初期応答の機構は殆ど明らかにされていない。

別の観点から、葉菜等の作物を例にとってみる。栄養が十分な栽培過程から、栄養の供給が断たれた収穫後の条件に変化すると、作物は既存の細胞内成分の分解により基礎代謝系を維持しようとする。従って、このような栄養欠乏状態において誘導される、細胞内分解系の機構の理解を図り、それを制御する方法を開発することは、葉作物の収穫後の、人の栄養となる成分の経時的減少を低下させるという、作物の収穫後の品質低下を防ぐ技術に繋がる。

このような飢餓状態において誘導される分解系として、オートファジーが知られる。オートファジーとは、飢餓状態等にさらされた細胞において、細胞内小器官や細胞質が、オートファゴソームという膜構造体につつまれ、それがリソソームや液胞へと輸送され、一括して分解されるというシステムである。この分解系誘導後のオートファゴソームの形成機構とその液胞/リソソームとの融合機構は、酵母、動物において詳細に解析されており、現在までに20以上の関連する遺伝子が同定されている。

植物においても、シロイヌナズナやタバコ培養細胞 BY-2 株において、これら遺伝子産物のホモログをコードする複数の遺伝子がここ数年の間に同定され、それらの機能解析がなされつつある。一方、オートファジーの誘導機構は、動物、酵母においてエネルギー欠乏条件では Tor と呼ばれるプロテインキナーゼが関与することが最近報告されている程度であり、特に植物においては、その制御機構は全く明らかにされていないといっても過言ではなかった。

一方、我々はタバコ培養細胞と蛍光タンパク質凝集体を用いて、植物細胞におけるオー

トファジーによる分解の定量検出系をゆうしていた [Toyooka, K., Takeuchi, M., Moriyasu, Y., Fukuda, H. and Matsuoka, K. (2006) Protein aggregates are transported to vacuoles by macroautophagic mechanism in nutrient-starved plant cells. *Autophagy*, 2: 91-106.]。

2. 研究の目的

さて我々は、タバコ培養細胞BY-2株をモデル細胞として用い、細胞内でのタンパク質輸送、タンパク質修飾及び細胞内分解系の解析を進めている。また、これらの解析のための基礎情報を得る為に、この細胞のEST解析、マイクロアレイ解析を行ない、各種の培養条件下及び異なる培地成分存在下での遺伝子発現パターン情報の所得と、それらの情報を用いた細胞機能変換機構の解析を行なってきた。これらの研究過程において我々は、チトクロームb5と赤色蛍光タンパク質の融合体

(Cytb5-RFP)を発現させたBY-2細胞において、細胞が富栄養状態にある場合はCytb5-RFPが細胞内に赤色の蛍光を放つ凝集体を形成するが、細胞が栄養欠乏になると液胞が蛍光を強く発することこの蛍光の分布の変化は、オートファジーにより凝集体が液胞へと輸送され、部分分解されるためである [Toyooka, K., Takeuchi, M., Moriyasu, Y., Fukuda, H. and Matsuoka, K. (2006) Protein aggregates are transported to vacuoles by macroautophagic mechanism in nutrient-starved plant cells. *Autophagy*, 2: 91-106.]。

また、マイクロアレイ解析から見出された、オートファジー関連遺伝子の発現が誘導される条件の解析を出発点として研究を進めている。同時に我々は、タバコのTorホモログを始めとした複数のプロテインキナーゼについて、アンチセンス法により発現を抑制した際にオートファジーの誘導が異常になるか、Cytb5-RFPの蛍光を用いて予備的なスクリーニングを行い、現在までに、2種のプロテインキナーゼが異なった局面でオートファジーに関与する可能性があることを見出していた。また、ゴルジ装置に局在することを見いだしていたII型の膜タンパク質であるプロリン水酸化酵素の局在化機構の解析の過程で、プロリン水酸化酵素と単量体RFPとの融合タンパク質が示す赤色蛍光は、細胞の増殖期にはゴルジ装置に見いだされるが、細胞の増殖が停止すると、液胞の内腔に見いだされるようになることを観察している。

そこで本研究では、植物における栄養不足呼応したオートファジー誘導のメカニズムを、分子・細胞レベルで明らかにすると共に、植物個体における栄養不足への応答として、オートファジーが個体レベルでどのように制御されているかについて洞察を深め、併せて細胞の機能変換時におけるオルガネラ機能の変換機構へのオートファジーの関与を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

蛍光タンパク質由来の凝集体またはオルガネラに蛍光タンパク質を融合させたコンストラクトを発現しているタバコ培養細胞 BY-2 株を用い、蛍光の液胞への移行と、蛍光タンパク質の切断を指標に、オートファジー系によるタンパク質の分解の検討を進めた。なお、凝集体として用いたタンパク質は、チトクローム b5 と 4 量体からなる RFP の融合タンパク質であり、このタンパク質は、栄養飢餓の際に選択的にオートファジーにより分解されることを既に報告しており、以下に述べる方法以外の、解析の詳細はこの論文に記載の方法を用いた [Toyooka, K., Takeuchi, M., Moriyasu, Y., Fukuda, H. and Matsuoka, K. (2006) Protein aggregates are transported to vacuoles by macroautophagic mechanism in nutrient-starved plant cells. *Autophagy*, 2: 91-106.]。

また、タバコ培養細胞の EST 解析 [Matsuoka, K., Demura, T., Galis, I., Horiguchi, T., Sasaki, M., Tashiro, G., Fukuda, H. (2004) A comprehensive gene expression analysis toward the understanding of growth and differentiation of tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 45: 1280-1289.] の結果から、動物や酵母で栄養応答に関係することが推定されるタンパク質リン酸化酵素サブユニットのホモログを複数見出しており、それらのアンチセンスコンストラクトをタバコ培養細胞 BY-2 株に発現させることにより、オートファジーに関わる可能性のあるプロテインキナーゼのホモログを、本研究の開始以前に見出していた。そこで、この配列 EST 配列を用いて、タバコ BY-2 由来の完全長 cDNA ライブラリー [Toyooka, K., Goto, Y., Asatsuma, S., Koizumi, M., Mitsui, T. and Matsuoka, K. (2009) A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to plant cell exterior. *Plant Cell*, Epub ahead of print] から、PCR と限界希釈法を用いて、完全長 cDNA を単離

した。次いで、ダイオキシにより配列の決定を行った。

それらの配列を元に、エピトープとなると予測されるアミノ酸配列を、N-末端側の領域と C-末端側のキナーゼ領域についてそれぞれ推定し、それらを含むペプチドに対するウサギポリクローナル抗体を作成した。抗原として用いたペプチドにより抗体をアフィニティー精製し、タンパク質の検出に用いた。なお、抗原抗体の複合体は、蛍光標識した 2 次抗体をの蛍光を、Typhoon 9600 イメージアナライザーにより検出する方法によった。

4. 研究成果

オートファジーに関与する可能性が有ることをこの研究課題の開始以前に見出していたプロテインキナーゼの一種について、タバコから完全長 cDNA を単離しその塩基配列を決定した。その結果、このキナーゼ cDNA は約 70kDa のタンパク質をコードすること、このキナーゼの活性ドメインと相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子はシロイヌナズナに複数存在すること、しかしながらこのタンパク質と相同な N-末端側のドメインを有する遺伝子はシロイヌナズナ中では 1 個であることを見出した。

次いで、このキナーゼについて、発現を低下させた形質転換体の作成を行った。その過程で、この抑制体の得られる頻度はコントロールに比べてかなり低く、発現抑制が細胞の増殖に悪影響を及ぼしている可能性を見出した。

また、この蛋白質の N-末端側と C-末端側に対する特異抗体を用いて、糖飢餓に際してそのサイズに変化があるか検討した。その結果、N-末端側の抗体を用いると、70kDa 程度の全長タンパク質が、C-末端側の抗体を用いると、40kDa 程度の切断されたと考えられるタンパク質が検出された。なお、これらの蛋白質の量は、栄養飢餓の際に変化した。

また、ゴルジ装置またはその後期の構造体を、糖の輸送体のホモログや SYP41 のホモログに蛍光タンパク質を融合させたコンストラクトを発現させることにより標識した細胞について、細胞の増殖過程での蛍光の変化と、ショ糖等の栄養飢餓における分解を検討した。その結果、飢餓による分解を受ける膜タンパク質と受けない膜タンパク質が存在すること、この分解はオートフ

ァジー系の阻害剤により阻害されることを見出した。

これらの解析と併せて、ミトコンドリアの機能阻害とオートファジーの関連についての知見のまを進めるとともに、高等生物におけるオートファジーのモニタリング系について他の研究者と共同でそのクライテリアに関するガイドラインの策定を行った。あわせて蛍光タンパク質のオートファジー解析への利用についての実験手法をとりまとめた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Klionsky, D ら 235名うち126番目. Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy in Higher Eukaryotes. *Autophagy* 4:151-175,(2008).査読有。

- ② Ken Matsuoka. Chimeric fluorescent fusion proteins to monitor autophagy in plants. *Methods in Enzymology* 451 541-555 (2009). 査読有。

[学会発表] (計 2 件)

- ① Ivan Galis, 豊岡公德、成澤知子、後藤友美、松岡 健 タバコ培養細胞 BY-2 における呼吸阻害剤によるオートファジーの誘導 日本農芸化学会 2008 年度大会 (2008). 査読無。
- ② 浅妻悟、豊岡公德、後藤友美、松岡 健 日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009). 査読無。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 健 (MATSUOKA KEN)
九州大学 農学研究院 教授
研究者番号：40222294