

平成 22 年 6 月 11 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20770039

研究課題名（和文）ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼを介した膜動態と生理機能解析

研究課題名（英文）Physiological significance of phosphatidylinositol 3-kinase complexes

研究代表者

藤木 友紀 (FUJIKI YUKI )

埼玉大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：00414011

研究成果の概要（和文）：ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3 キナーゼ) は、動物細胞の癌化や小胞輸送、様々なシグナル伝達経路に関与している。一方、植物では PI3 キナーゼの変異体が単離されておらず、その機能解明は進んでいない。本研究では PI3 キナーゼの活性調節因子 Atg6 に着目し、モデル植物のシロイヌナズナで AtATG6 遺伝子破壊株を作出した。その表現型解析を通して植物独自の PI3 キナーゼの高次機能が次第に明らかになってきた。

研究成果の概要（英文）： Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) produces phosphatidylinositol 3-phosphate, a signaling lipid required for various biological pathways, such as autophagy and endocytosis. In plants, the roles of PI3K complexes in cellular activities remain obscure, because no *pi3k* mutant is viable to date. In this study, I created *atatg6* homozygous plants, which exhibited severe growth defects. This mutant should serve as a model system for further investigating the physiological functions of plant PI3K complexes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：オルガネラ・液胞・膜輸送・リン脂質・生殖

## 1. 研究開始当初の背景

(1) イノシトールリン脂質を介したシグナル伝達は細胞の増殖や癌化、エンドサイトーシスなど多様な生命現象に関与している。こ

のうちホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3 キナーゼ) により合成されるホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) については、液胞タンパクの輸送 (VPS 経路) や

オートファゴソーム膜形成を伴うバルクなタンパク分解（オートファジー）などの膜動態における機能が知られている。

(2) 動物のPI3 キナーゼは基質の異なる複数のアイソザイムが存在するが、酵母や植物はホスファチジルイノシトールのみを基質とする III 型 PI3 キナーゼ 1 遺伝子のみを持ち、解析に有利である。しかし植物では PI3 キナーゼの遺伝子破壊が未だ成功しておらず、PI3P に関する知見の多くは単細胞生物である酵母に依存してきた。

(3) 出芽酵母の PI3 キナーゼ (Vps34) は加水分解酵素 CPY の液胞輸送に関わる遺伝子 (VPS) として単離されたが、大隅らは、Vps34 と PI3 キナーゼ複合体を構成する Vps30 (=Atg6) が、オートファゴソームの膜形成にも必須であることを明らかにしている。

(4) 研究代表者は、多様な膜動態を担う Atg6/PI3 キナーゼ複合体が多細胞生物でどのような生命現象に関わっているかに関心を持ち、シロイヌナズナの *ATG6* ホモログ (*AtATG6*) を対象に分子遺伝学的手法を導入した。その結果、PI3 キナーゼの生理機能としては全く予期していなかったことであるが、*AtATG6* が花粉発芽に必須であることを見いだした。PI3 キナーゼを介した花粉発芽のシグナリングは、植物の有性生殖の観点からも大変魅力的なテーマであるが、雄性不稔ゆえに遺伝子欠損をホモに持つ植物個体を得ることができないという課題も残った。

## 2. 研究の目的

(1) PI3 キナーゼによる膜動態の制御を理解するには、その細胞内局在を正確に把握することが必要である。GFP 融合タンパク質などを利用し、植物細胞で AtAtg6/PI3 キナーゼがオートファゴソームの膜新生を含め、どのような膜動態に関わっているか明らかにする。

(2) 花粉発芽のシグナリングにおける PI3 キナーゼ複合体の役割について解析を進める。*atatg6* 花粉内部の小胞輸送オルガネラを中心とした形態観察に加え、RNA 干渉法で花粉特異的に *AtATG6* の遺伝子発現を軽減した形質転換植物を作出することで、花粉管伸長から花粉管ガイダンスに至るステップまでの観察が可能となる。

(3) *AtATG6* 欠損植物体の詳細な表現型解析を進める。形態観察では液胞やエンドソームなどの膜系オルガネラに焦点を当てる。マイクロアレイ解析によっても、*AtATG6* を介した膜動態が担う新たな生理作用が浮き彫りにな

ると期待している。また、AtAtg6/PI3 キナーゼ複合体が多彩な生命現象を制御するために、様々なエフェクターが AtAtg6 の機能調整に働くことが予想される。AtAtg6 と相互作用するタンパク質をスクリーニングし、PI3 キナーゼ複合体としての多様な機能を使い分ける分子基盤を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) AtAtg6/PI3 キナーゼおよび、その産物である PI3P がどのような膜構造体に局在しているかを細胞レベルで明らかにする。GFP 融合タンパクの形質転換植物を作製し、個体レベルで PI3 キナーゼや FYVE タンパクの局在を明らかにする。PI3P の可視化については動物由来の FYVE タンパクが植物でも使用されてきたが、結合特異性などの問題も指摘されている。申請者はシロイヌナズナから FYVE 領域を独自にクローニングしており、オルガネラマーカーとの共局在観察に利用する。なお GFP 蛍光タンパクによる局在観察に問題が生じた場合、AtAtg6 の抗体を作製して免疫電子顕微鏡観察で対処する。

(2) *AtATG6* は花粉発芽に必須であるため、花粉発芽以降の花粉管伸長やガイダンスのステップにおける *AtATG6* の役割を知るには、RNA 干渉法による花粉特異的な *AtATG6* の発現抑制が有効である。花粉特異的プロモーターとしては実用例の多い *LAT52p* の利用を考えているが、効率よい発現抑制ができないときは花粉での発現時期・部位が異なる種々のプロモーターを検討する。また、PI3 キナーゼの下流で働くと予想される新規リン脂質キナーゼの遺伝子破壊株を取得し、花粉の形態観察を行う。

(3) *AtATG6* 遺伝子破壊株の純化作業が終了次第、表現型解析、特に液胞機能や膜系オルガネラに着目した形態観察を慎重に行う。変異体では多様な遺伝子発現が誘導されると予想されるので、マイクロアレイ解析により網羅的な遺伝子発現の変動を調査する。

(4) 酵母ツーハイブリッドのシステムを用いて、PI3 キナーゼ複合体と相互作用する新規なタンパク因子を探索する。複合体形成の検出に最適な条件検討と cDNA ライブラリーの準備はすでに整っている。

(5) 酵母ツーハイブリッドスクリーニングやマイクロアレイ解析で得られた遺伝子群の機能解析（発現部位や細胞内局在、変異体の表現型）を進める。膜動態への関与が示唆されたものを選び、*AtATG6* 欠損株における遺伝子産物の挙動、二重変異体を作製した場合の表現型を検証する。

#### 4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの AtAtg6、および PI3 キナーゼと GFP 融合タンパクの細胞内局在を観察した結果、後期エンドソームに類似したドット状の構造体が観察された。さらに、蛍光抗体染色法による局在観察を行うため、大腸菌で AtAtg6 の発現タンパク質を精製し、抗体作製の抗原とした。得られた抗体は大腸菌の発現タンパク質を認識するものの、植物粗抽出液中では明確な単一バンドを認識せず、さらに抗体の精製を行う必要がある。

(2) PI3P のプローブとしてシロイヌナズナから FYVE 領域をクローニングした。増幅した FYVE 配列と GFP 融合タンパク質はエンドソーム様の局在を示し、飢餓処理を経て最終的に液胞膜まで運ばれた。これは動物由来の FYVE 領域を用いて植物細胞で PI3P トラフィッキングを観察した従来の報告と一致する。この GFP-FYVE の液胞輸送は PI3 キナーゼ阻害剤の投与により阻害されることから、PI3P の局在を反映していると考えられる。この PI3P 結合タンパク質が一部、Atg タンパク質と共局在していることも確認できた。

(3) 上記(1)、(2)で作製した GFP 融合タンパク質を植物体で発現させた形質転換シロイヌナズナを作製した。RT-PCR により GFP キメラ遺伝子の発現は確認できたが、GFP の蛍光が弱く、まだ根端でしか顕微鏡観察を行っていない。プロモーターとしては CaMV 35S および AtATG6 自身のプロモーターも用いてみた。後者の場合は形質転換植物体の稔性低下が見られ、GFP 融合タンパク質が花粉で機能していない結果、生殖に影響を与えている可能性もある。

(4) AtATG6 プロモーター(花粉でも発現する)を用いた AtATG6 の RNA 干渉を行った。数ラインの形質転換植物を得たが、花粉発芽の顕著な異常は認められなかった。ただ、種子収量が低い傾向にあり、実際は花粉管伸長阻害が起きている可能性が高い。また、発現抑制株のなかには塩ストレス条件下での発芽率低下を示したものもあった。ただ、植物体の成長やオートファジー能は一見正常であり、植物個体での RNA 干渉の効果が十分ではないと考えられる。

(5) 花粉発芽のシグナリングにおける PI3 キナーゼ複合体の役割として、活性酸素 (ROS) の生成に関与する可能性を示した。動物では PI3P が NADPH オキシダーゼのサブユニットに結合することで ROS 産生を活性化する。植物でも根の重力応答や気孔開閉のシグナリングに ROS が関与しており、PI3 キナーゼ阻害剤により ROS 発生が抑制されることから、ROS

の上流に PI3 キナーゼが働いていると考えられてきた。花粉特異的に発現する NADPH オキシダーゼ遺伝子が花粉管伸長に関係するという報告もある。そこで、PI3 キナーゼの変異体花粉で活性酸素発生の有無を調べたところ、変異体では ROS プローブの蛍光が検出されないという結果を得た。

(6) PI3 キナーゼの下流で働くシグナル伝達因子の候補として、PI(3,5)ニリン酸に着目した。PI3P から PI(3,5)ニリン酸を合成するリン脂質キナーゼ (AtFabI) として、シロイヌナズナには2つの遺伝子が存在する。それぞれ単独の遺伝子破壊株は目立った表現型を示さないが、二重変異体は雄性不稔になることが分かった。詳しく花粉の形態観察を行うと、AtFabI を欠損する花粉は発達過程に異常があることが明らかとなった。おそらくは液胞の形態維持に問題が生じていると考えられる。PI3 キナーゼの変異体花粉においても液胞の形態異常が確認できた。一方、このような形態変化は AtAtg6 の破壊株花粉には見られなかった。また、AtAtg6 や PI3 キナーゼタンパク質の花粉管における局在パターンを観察し、花粉管伸長における PI3 キナーゼ複合体の役割を考察した。

(7) AtATG6 遺伝子破壊株を取得し、純化作業を行った。RT-PCR により AtATG6 遺伝子の発現抑制も確認している。変異体には著しい生育阻害が認められるので、さらに電子顕微鏡で細胞内微小構造の観察を進める予定である。この変異体は栄養を供給した寒天培地ではある程度生育するが、貧栄養条件下では発芽後殆ど生育できずに枯死する。寒天培地で生育させた個体も最終的には種子をつけずに枯死してしまう。

(8) AtATG6 遺伝子破壊株を用いたマイクロアレイ解析を行った。多様な遺伝子発現の変動が観察されたので、それらの遺伝子が実際に PI3 キナーゼのシグナリングとどのように関係しているか関心を持っている。このうち、老化関連遺伝子については RT-PCR により発現量のチェックを行っている。変異体植物では老化マーカー遺伝子の著しい発現上昇が見られた。

(9) 酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、AtAtg6 結合因子の探索を行った。この実験系において、AtAtg6 タンパク質自身はバックグラウンドで転写活性を示してしまい、十分なスクリーニングを行うことができなかった。ただし、酵母ツーハイブリッドで AtAtg6 との結合を確認できたタンパク質も2種同定しており、今後その解析を進める予定である。

## 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)

[学会発表] (計6件)

① 藤木友紀、西田生郎、大隅良典

「高等植物における Atg6-ホスファチジルイノシトール3キナーゼ複合体の生理機能」

日本植物生理学会第51回大会

2010年3月18日 (熊本)

② 藤木友紀、関藤孝之、柏尾慎治、大隅良典、柿沼喜巳

「植物の液胞アミノ酸トランスポーターAvtファミリー」

第32回 日本分子生物学会年会

2009年12月11日 (横浜)

③ 藤木友紀、西田生郎、大隅良典

「シロイヌナズナの老化・種子形成とオートファジー」

日本植物学会第73回大会

2009年9月19日 (山形)

④ 藤木友紀、大隅良典

「ホスファチジルイノシトール3キナーゼによる花粉発芽の制御」

日本植物生理学会第50回大会

2009年3月22日 (名古屋)

⑤ 藤木友紀、大隅良典

「高等植物に見られる Atg6-Vps34-UVRAG 複合体の様々な生理機能」

第81回日本生化学大会・第31回日本分子生物学会年会 合同大会

2008年12月12日 (神戸)

⑥ 藤木友紀、関藤孝之、柏尾慎治、大隅良典、柿沼喜巳

「高等植物の新規液胞アミノ酸トランスポーターの機能的同定」

日本植物学会第72回大会

2008年9月26日 (高知)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤木 友紀 (FUJIKI YUKI)

埼玉大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：00414011

### (2) 研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号：