

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 2日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011年度

課題番号：21658113

研究課題名（和文）オートファジー制御によるダイズ収量向上法の開発

研究課題名（英文）Improvement of soybean yield with autophagy regulation technique

研究代表者

湯浅 高志 (YUASA TAKASHI)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40312269

研究成果の概要（和文）：植物においてオートファジーは細胞内タンパク質の非選択的分解とアミノ酸リサイクル，老化に働いており，栄養飢餓に反応してオートファジー関連遺伝子(ATG)が誘導されることが知られている。ダイズのオートファジー調節メカニズムを明らかにすることを目的に ATG 発現変動とエチレン応答について解析した。オートファゴソーム形成に関与する *GmATG8* と *GmATG4*，エチレン応答に関与する *GmACCS*，*GmERF* の発現変動を解析した。また *GmATG8i* と *GmEin3* のタンパク質レベルの変動をイムノブロットにより調べた。子葉を切除したダイズ幼植物を富栄養培地で前培養したのち，1)富栄養処理，2)飢餓処理（+プロテアーゼ阻害剤），を行った。富栄養処理では ATG 遺伝子およびエチレン応答遺伝子の発現レベルはほとんど変動しなかった。飢餓処理+プロテアーゼ阻害剤では *GmATG8i*，*GmATG4*，*GmACCS* と *GmERF* の発現レベルは増大した。飢餓処理では *GmATG8i* と *GmEin3* タンパク質レベルも増大した。以上の観察から飢餓処理とあわせてプロテアーゼ阻害剤によるアミノ酸リサイクルの低下が *GmATG8i* の発現調節に関与すること，飢餓ストレスに反応してエチレン合成の促進とエチレン応答シグナルの活性化がダイズ ATG 関連遺伝子の発現調節に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Autophagy functions in non-selective protein degradation amino acid recycling and senescence of plant cells. Some of autophagy-related genes (ATG) in plant appeared to be induced in response to starvation stress. To clarify regulation mechanisms of autophagy in soybean, expression profiles of ATGs and ethylene signaling in soybean were analyzed by RT-PCR and immunoblot with specific antibodies against *GmATG8i* and *GmEin3*. Soybean seedlings were incubated in nutrient-rich medium after the cotyledon was removed. Then the seedlings were subjected to starvation treatment in the presence of protease inhibitors. Starvation stress induced expression of *GmATG8i*, *GmATG4*, *GmACCS* and *GmERF*. Immunoblot showed increase of *GmATG8i* and *GmEin3* protein levels in starvation-treated seedlings. These results suggest that reduction of amino acid recycle by protease inhibitors in addition of the starvation treatment causes up-regulation of soybean ATG expression and that activation of ethylene signaling is involved in regulation of autophagy and ATG expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	0	1,500,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
—年度	0	0	0
—年度	0	0	0
総計	3,000,000	150,000	3,150,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：オートファジー、収量、ダイズ、タンパク質分解、老化、ATG

1. 研究開始当初の背景

ダイズ栽培において環境ストレス要因、遺伝的要因やシンク-ソースのアンバランス等が原因となって青立ち・莢先熟が生じると考えられている。摘莢処理によりシンク-ソースバランスを変化させて青立ち現象を誘導し、それにとまなう遺伝子発現の解析を通じて、ソース器官からの栄養転流を調節して青立ちを抑制する方法を開発することができると考えられる。これまで植物細胞における貯蔵タンパク質プロセッシングにおける分泌型液胞プロテアーゼの役割や機能について多くの研究があるが、植物組織の老化の過程で細胞内オルガネラ・細胞質タンパク質がどのようにして液胞に移行して分解を受けるのかほとんど明らかになっていない。近年、植物の老化にとまなう葉から子実への栄養転流において細胞内タンパク質・オルガネラを小胞（オートファゴソーム）で取り囲み液胞に輸送して非選択的に消化する自食作用（オートファジー）が誘導されることが近年明らかとなってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的として、1)ダイズのオートファジーとその調節メカニズムの分子機構を明らかにすること、2)オートファジーを調節して葉を正常に老化させて効率的に子実へ栄養転流することで収量向上につながる分子育種方法を開発すること、この二つを目的とする。

3. 研究の方法

福岡県推奨品種であるダイズ(*Glycine max* [L.] Merr. cv. Fukuyutaka)を栽培実験に供試した。九州大学貝塚園場内に設置した 1/5000a ワグネルポットに 5g 苦土石灰、5g 豆化成)を施肥して 2007 年 7 月 19 日、種子を 2 個ずつ播種した。9 月 23 日、子実肥大始(R5)期に全ての節において 0%(コントロール区)、50%(半数摘莢区)、100%(全数摘莢区)の摘莢処理を行った。R5 期を 0 週として生殖成長期間の 8 週間、1 週間ごと葉および子実を採取して液体窒素により凍結した。測定項目として SPAD 値、窒素含量(ケルダール法)、含水率、収量構成要素を測定した。国内外のゲノムデータベースに登録されている植物の EST からシロイヌナズナ ATG 関連分子と相同性を示す遺伝子候補を抽出する。種子芽生えから全 RNA を調製して常法により cDNA を合成し、これをテンプレート DNA として複製エラーの少ない KOD plus DNA ポリメラーゼを用いて PCR および 3'-RACE, 5'-RACE 法により全長 ATG 遺伝

子を増幅してクローニングし、GST 融合組換え体タンパク質を作成して抗 GmATG8i 特異抗体を作成した。ダイズの ATG8 ホモログ (*GmATG8c,d,f,i*)および ATG9 ホモログ (*GmATG9*)の特異的プライマーはダイズ ESTdataBase (<http://compbio.dfci.harvard.edu/>)を元に作製した。それぞれの遺伝子について老化葉、主茎、子実と莢肥大過程における時間的、空間的な発現プロファイルを半定量的-PCR および化学発光試薬を用いた高感度イムノブロットにより解析した。

4. 研究成果

4-1. 青立ち発生における老化とオートファジー遺伝子の関係

コントロール区のダイズは R5 期以後 4 週間で葉の老化が開始し、R5 期後 6-7 週において葉の枯死と子実の登熟が観察された。一方、半数摘莢区と全数摘莢区ではそれぞれ R5 後 6 週および 8 週に葉の老化が遅れて開始した。子実肥大期の SPAD 値および総窒素量の変動からコントロール区では R5 期後 4-5 週で急激に両者の値が減少するのに対し摘莢処理区では SPA 値と総 N 含量低下の度合いが 50%、100%の順で減少したことから、形態観察と同様に摘莢処理にとまなう葉の老化が遅延して青立ち現象が生じたことが示された。RT-PCR においてコントロール区では R5 期後 4 週で顕著な *GmATG8c* と *GmATG8i* の発現上昇が観察された。一方、半数摘莢区では R5 期後 5-6 週目に *GmATG8c* と *GmATG8i* の発現が観察された。また全数摘莢区では *GmATG8c* と *GmATG8i* は摘莢直後から 8 週にかけて常に発現することが示された。

以上の結果は、コントロール区では 4 週目に一過的に強く発現誘導を示す *GmATG8c* と *GmATG8i* が葉の急速な老化と N 栄養転流に関与していることを示唆している。また全数摘莢区では摘莢直後から急速に新しい花芽形成が生じ、それら子実の肥大がコントロール区より遅れて起こるために *GmATG8c* と *GmATG8i* が早期から緩やかに発現したと考えられる。

4-2. オートファジー調節におけるエチレンシグナルの役割

オートファゴソーム形成に関与する *GmATG8* と *GmATG4*、エチレン応答に関与する *GmACCS*、*GmERF* の発現変動を解析した。また *GmATG8i* と *GmEin3* のタンパク質レベルの変動をイムノブロットにより調べた。子葉を切除したダイズ幼植物を富栄養培地で前培養したのち、1)富栄養処理、2)飢餓処理 (+プロテアーゼ阻害剤)、を行

った。富栄養処理では ATG 遺伝子およびエチレン応答遺伝子の発現レベルはほとんど変動しなかった。飢餓処理+プロテアーゼ阻害剤では *GmATG8i*, *GmATG4*, *GmACCS* と *GmERF* の発現レベルは増大した。飢餓処理では *GmATG8i* と *GmEin3* タンパク質レベルも増大した。以上の観察から飢餓処理とあわせてプロテアーゼ阻害剤によるアミノ酸リサイクルの低下が *GmATG8i* の発現調節に関与すること、飢餓ストレスにตอบสนองしてエチレン合成の促進とエチレン応答シグナルの活性化がダイズ ATG 関連遺伝子の発現調節に関与する可能性が示唆された。

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 7 件)

- ①Nang MPSH, Yuasa T, Tanigawa H, Ishibashi Y, Okuda M, Zheng S-H, Iwaya-Inoue M, “Leaf senescence of soybean at reproductive stage is associated with induction of autophagy-related genes, *GmATG8c*, *GmATG8i* and *GmATG4*”, *Plant Prod. Sci.* 14, 141-147 (2011)
- ②Okuda M, Nang MPSH, Oshima K, Ishibashi Y, Zheng S-H, Yuasa T, Iwaya-Inoue M, “Ethylene signal mediates induction of *GmATG8i* in soybean plants under starvation stress”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 1408-1412 (2011)
- ③ Ishibashi Y, Yamaguchi H Yuasa T, Iwaya-Inoue M, Arima S, Zheng S-H, “Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants”, *J. Plant Physiol.* 168, 1562-1567 (2011)
- ④Okuda M, Nang MPSH, Ishibashi Y, S-H Zheng S-H, Yuasa T, Iwaya-Inoue M. Expression profiling of autophagy and ethylene-related genes. *Proc. 7th International Joint Symp. Jpn. Korea 2010*, 7, 150-154. (2010)
- ⑤Nang MPSH, Tanigawa H, Ishibashi Y, Zheng S-H, Yuasa T, Iwaya-Inoue M. “Nutrient starvation differentially regulates *GmATG8i* in soybean seedlings”, *Plant Biotechnol.* 26, 317-326 (2009)
- ⑥Kurauchi E, Imamura M, Hashiguchi Y, Sakamoto T, Ishibashi Y, Yuasa T, Iwaya-Inoue M. “A Function of flower stalk in drought-resistant of cowpea.” *Proc. Japan-Korea Int. Symp. 2009*, 20-25. (2009)
- ⑦ Okuda M, Nang MPSH, Minami V, Ishibashi Y, Yuasa T, Iwaya-Inoue M. “Stress signaling in soybean seedling.” *Proc.*

Japan-Korea Int. Symp. 2009, 30-35. (2009)

[学会発表] (計 8 件)

- ①湯浅高志・Nang Myint Phyu Sin Htwe・石橋勇志・井上眞理, マメ類の葉の老化・栄養転流におけるオートファジーの役割, 日本植物細胞分子生物学会, 2011. 09. 08.
- ②小島花織, 奥田宗広, 山口春香, 石橋勇志, 湯浅高志, 井上眞理, 環境ストレスにตอบสนองしたダイズのガラクトキノール合成遺伝子発現とエチレンシグナル, 日本植物生理学会, 2011. 03. 20.
- ③倉内英梨子, 今村雅和, 橋口祐也, 坂本 貴浩, 石橋勇志, 鄭紹輝, 湯浅高志, 井上眞理, 乾燥ストレス下のササゲの各器官における窒素動態の解析, 日本作物学会, 2010. 09. 04.
- ④奥田宗広, Nang Myint Phyu Sin Htwe, 石橋 勇志, 鄭紹輝, 湯浅高志, 井上 眞理, ダイズ子実の登熟過程におけるエチレンおよびオートファジー関連遺伝子の発現解析, 作物学会, 2010. 09. 04.
- ⑤湯浅高志, オートファジー制御による葉の老化調節とダイズ青立ち現象, 第4回ダイズ研究会, 2010. 03. 15.
- ⑥奥田宗広・Nang Myint Phyu Sin Htwe・石橋勇志・鄭紹輝・湯浅高志・井上眞理, ダイズ子実の登熟過程におけるエチレンおよびオートファジー関連遺伝子の発現解析, 日本作物学会, 2010. 03. 30.
- ⑦奥田宗広, 小島花織, 田島大地, Nang Myint Phyu Sin Htwe, 石橋勇志, 鄭紹輝, 湯浅高志, 井上眞理, ダイズの飢餓応答および葉の老化におけるオートファジーの役割, 第五回ミヤコグサ・ダイズシンポジウム, 2009. 12. 02.
- ⑧奥田宗広, Nang Myint Phyu Sin Htwe, 石橋勇志, 鄭紹輝, 湯浅高志, 井上眞理, ダイズの栄養飢餓ストレスで誘導されるオートファジーとエチレンシグナル, 日本植物生理学会, 2010. 03. 20.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://bbs1.agr.kyushu-u.ac.jp/prweb2/b02/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯浅 高志 (YUASA TAKASHI)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 40312269

(2) 研究分担者

井上 眞理 (INOUE MARI)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：60091394

(3) 連携研究者

無し