

## 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 5 月 31 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22770031

研究課題名（和文）高等植物における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 リン酸 (PI3P) と呼ばれるイノシトールリン脂質はホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3 キナーゼ) によって合成され、脂質メッセンジャー分子として生体内の様々な生命現象に関わっている。植物では PI3 キナーゼの欠損株が雄性不稔となることもあり、逆遺伝学を用いた生理機能解明は進んでいない。私は PI3 キナーゼの活性調節因子 Atg6 を使って雄性不稔を回避する遺伝子操作を施し、PI3 キナーゼ活性が著しく低下した *atg6* 変異体植物個体を作成することに成功した。本研究では、この手法によって得られた *atg6* 変異体の表現型解析を通して高等植物における PI3 キナーゼ複合体の明らかな生理機能が明らかになってきた。

研究成果の概要（英文）：ATG6/VPS30, which is a component of yeast phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) complexes, is involved in autophagy and vacuolar protein sorting (VPS) pathway. In higher eukaryotes, however, significance of *ATG6/VPS30* homologues in vesicle trafficking has been in dispute. In this study, I created *atatg6* homozygous Arabidopsis plants, which exhibited severe growth defects. PI3 kinase activity seems to be severely reduced in this mutant. Microarray analyses revealed that numerous genes are induced in *atatg6* mutant. This mutant should serve as a model system for further investigating novel 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
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：オートファジー・液胞・膜輸送・リン脂質・シグナリング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) イノシトール環水酸基のリン酸化部位の組み合わせによって生じる 7 種のホスホ

イノシチドはそれぞれが別個の生命現象を制御しているが、このうち PI3P はホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3 キナー

ぜ)により生成され、酵母細胞ではオートファジーの進行や膜タンパク質のエンドサイトーシスに密接に関わることが知られている。しかし、PI3 キナーゼのノックアウト個体が致死性を示す多細胞生物では PI3P の脂質メッセンジャーとしての役割は殆ど分かっていない。そこで研究代表者は、オートファジー遺伝子 *Atg6* が PI3 キナーゼと複合体を形成することに着目し、*AtATG6* のノックアウトシロイヌナズナの解析からオートファジー制御における PI3 キナーゼの役割を明らかにできると考えた。

(2) 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、*AtAtg6*/PI3 キナーゼ複合体が活性酸素種の発生を伴う花粉発芽の情報伝達系および、花粉発達過程での液胞形態の制御に関わっていることも明らかにしている。

(3) *Atg6*/PI3 キナーゼ破壊株が雄性不稔となることは逆遺伝学的解析の障害となっていたが、最近になり花粉特異的プロモーターを用いた”conditional rescue”によって雄性不稔を回避し、*atatg6* 変異をホモに持つ植物個体を容易に作出する系を確立した。ここで得られた *atatg6* 変異体はオートファジー能を欠損するのはもちろん、細胞形態の異常や著しい生育阻害など多面的な表現型を示した。さらに多様な遺伝子発現を引き起こすことがマイクロアレイ解析により浮き彫りになってきた。

## 2. 研究の目的

(1) *atatg6* 変異体植物の詳細な表現型解析は本研究の中心課題である。まず *atatg6-1* 変異体を用いたマイクロアレイ解析を行ったところ大幅な遺伝子発現の変動が示唆された。そこには予期していない遺伝子群も多数含まれ、それらが実際に PI3 キナーゼの生理作用とどのように結びつくか、逐次検証していく。

(2) 一方、最近得られた *atatg6-2* はより著しい形態異常、生育阻害表現型を示す変異体アレルであり、細胞、組織レベルで緻密な顕微鏡形態観察を行う必要がある。また、PI3 キナーゼの主要な働きと考えられるメンブレントラフィックに焦点を当て、*AtATG6* に依存した膜輸送経路の標的分子を同定する。まずは PI3 キナーゼ阻害剤によってその細胞内局在が影響を受ける液胞貯蔵タンパク質や PIN1 などの膜タンパク質を候補に考えているが、新たな積み荷タンパク質の探索も行う。

(3) 動物では *Atg6* が *Ambral* や *Bif-1* など様々なタンパク質と別個に結合して機能的に異なる PI3 キナーゼ複合体を構成している。このうち UVRAG は植物にも相同遺伝子が見られるが酵母には存在せず、多細胞生物に共通する PI3 キナーゼ複合体の制御分子と考えた。さらに、申請者は植物特異的な *Atg6* 結合因子 2 種も特定しており、これら植物独自の *Atg6* 結合タンパク質を、PI3 キナーゼの活性・局在の制御機構を解明するための鍵分子として注目しており、その機能解析を進める。

## 3. 研究の方法

(1) 以前用いていた *atatg6-1* 変異体は生育が遅く個体サイズも極めて小さいが、予想していたような液胞タンパク質のミスソーティングやオーキシン応答の異常は観察できなかった。そこで、*AtATG6* の機能ドメイン中に T-DNA が挿入された *atatg6-2* 変異体を新たに単離したところ、発芽直後から著しい生育阻害、形態異常が認められた。本研究ではこの *atatg6-2* 植物体を中心とした表現型解析に切り替えることで新たな展開が期待できる。具体的には、

- (i) 透過型電子顕微鏡を用いた形態観察
- (ii) *AtATG6* に依存したメンブレン・トラフィックを調べるマーカーとして、PIN1 の局在変化を調べる。
- (iii) *atatg6-1* 遺伝子破壊株を利用したマイクロアレイ解析で変動が見られた遺伝子のうち、興味あるものについて *atatg6-2* 変異体を使って RT-PCR によって検証する。
- (iv) 細胞周期のマーカー遺伝子を用い、*atatg6* 変異体の生育障害の原因を探る。
- (v) *AtATG6* 欠損株における PI3 キナーゼ活性の低下を確認する。

(2) マイクロアレイ解析により *AtATG6* 遺伝子破壊株で変動が見られた遺伝子群について、RT-PCR による確認作業を進め、逐次、変異体単離や局在観察などを行い、PI3 キナーゼとの関係を探る。

(3) 植物の PI3 キナーゼ複合体と相互作用する新規のタンパク質因子を探索する。*AtAtg6*:GFP 過剰発現体、もしくは他のタグ融合トランスジェニック植物を作出し、植物抽出液中からアフィニティ精製によって生化学的に結合パートナーを捜す。

## 4. 研究成果

(1) オートファジーは二重膜小胞(オートファゴソーム)に包み込まれた細胞質成分が液胞内で分解される現象である。このとき液胞内の分解活性を阻害してやると、オートファジックボディと呼ばれる小胞の状態に残存し、オートファジーの進行を可視化すること

ができる。この系を用い、*atatg6* 遺伝子破壊株でオートファジーが亢進しないことを光学顕微鏡に加え、電子顕微鏡観によっても確認している。さらにオートファジーの進行をより正確に評価するため、オートファジーの分子マーカーである AtAtg8 と呼ばれるオートファジー必須遺伝子と GFP のキメラ遺伝子を *atatg6* 遺伝子破壊株で発現させた形質転換植物を作出した。予想通り、変異体では GFP-AtAtg8 のオートファゴソーム膜局在は観察されなかったが、全体に蛍光シグナルが微弱で顕微鏡観察だけでは不十分と思われる。今後、GFP のプロセッシングを調べるなど他の方法によってもオートファジー能を検討する必要がある。

(2) PI3P 結合プローブである FYVE タンパク質の局在を *atatg6* 変異株でモニターする系を確立し、*atatg6* 変異株で FYVE の液胞膜局在が失われるという期待通りの結果が得られた。

(3) PI3 キナーゼ活性はオーキシン輸送に関わる PIN1 タンパク質のリサイクリングに必要であると考えられてきた。*atatg6* 変異体でエンドサイトーシスを介した PIN1 タンパク質のリサイクリングに影響が出ているか調べるため、PIN1 と GFP の融合タンパク質を *atatg6* 変異体で発現させ、局在観察を行った。PIN1 の極性局在に影響が出ると予想したが、際だった局在パターンの変化は見られなかった。重力応答などオーキシンの関わる生理現象にも目立った支障は出ていない。これまで用いていた変異体アレルでは PI3 キナーゼの活性低下が不十分である可能性がある。

(4) マイクロアレイ解析の結果、様々な遺伝子発現が *atatg6* 変異体で誘導されることも明らかとなった。多岐に渡る遺伝子発現の変動が見られたので、まず、環境ストレス応答や細胞増殖に関わりそうな遺伝子について、RT-PCR による発現解析を行った。RT-PCR においても、調べた遺伝子の多くが *atatg6* 変異体での発現誘導を示しており、マイクロアレイ解析の精度の高さが裏付けられた。老化関連遺伝子として *SAG12* や *DIN2* が *atatg6* 変異体で著しい mRNA レベルの上昇を示した。同様の発現誘導が *atatg2* など他のオートファジー変異体でも確認でき、オートファジーの欠損による早期老化の促進が起きていることを示している。一方、他のオートファジー変異体 (*atatg2*) では発現パターンは影響を受けず、*atatg6* 特異的に発現の誘導が見られる遺伝子も多数見つかった。そのうち、一部のトランスポーター遺伝子ファミリーについて RT-PCR による発現解析を実施した。これらの膜タンパク質がどのような細胞外

刺激に応答しているか、およびその細胞内局在の制御が PI3 キナーゼに依存しているか興味深い。

(5) AtAtg6 結合因子の変異体を用いたマイクロアレイ解析によっても、様々な遺伝子発現の変動が観察されている。その多くは *atatg6* 変異体でも同様の発現パターンの変動を示しており、今後、これらに絞って発現、機能解析を進めることで、植物の PI3 キナーゼ複合体が担うリン脂質シグナリングの一端を明らかにできると期待できる。

(6) AtAtg6 結合因子と PI3 キナーゼ複合体の相互作用を生化学的に調べるため、GST や 6xHis, FLAG タグなどを AtAtg6 や PI3 キナーゼ等に融合させてトランスジェニック植物中で発現させる準備を進めている。現在、様々な形質転換植物体がそろいつつあり、これらを用いてアフィニティ精製を利用したタンパク質間相互作用を調べる計画である。

## 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yasuyo Yamaoka, Yanbo Yu, Junya Mizoi, Yuki Fujiki, Kyoko Saito, Masahiro Nishijima, Youngsook Lee, Ikuo Nishida (2011) *PHOSPHATIDYL SERINE SYNTHASE1* is required for microspore development in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 67, 648-661 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

### ① 藤木友紀、大隅良典、西田生郎

“Physiological significance of BECLIN1/ATG6 in plants” Gordon Research Conference 2012年3月13日 (Ventura, CA, Four Points Sheraton)

### ② 藤木友紀、関藤孝之、柿沼喜巳、大隅良典、西田生郎

「シロイヌナズナ *atg* 変異体における老化プロセスと液胞アミノ酸トランスポーターの働き」  
第29回 日本植物細胞分子生物学会  
2011年9月8日 (福岡・九州大学)

### ③ 藤木友紀、大隅良典、西田生郎

“Physiological significance of phosphatidylinositol 3-kinase complexes in plants”  
Gordon Research Conference  
2011年1月30日 (Galveston, TX)

④ 藤木友紀、大隅良典  
「高等植物の老化・種子形成とオートファジー」  
第33回 分生生物学会年会、第83回 日本  
生化学会大会合同大会  
2010年12月10日(神戸・ポートアイランド)

⑤ 藤木友紀  
「Atg6-ホスファチジルイノシトール3キナー  
ゼ複合体を介したリン脂質シグナリングと生  
理機能」  
第23回植物脂質シンポジウム  
2010年11月27日 (宇治・京都大学)

⑥ 藤木友紀、西田生郎、大隅良典  
「Atg6-ホスファチジルイノシトール3キナー  
ゼ複合体を介したリン脂質シグナリング」  
日本植物学会第74回大会  
2010年9月10日(愛知・中部大学)

⑦ 藤木友紀、西田生郎、大隅良典  
“Roles of Arabidopsis phosphatidyl-  
inositol 3-kinase complex in pollen  
development”  
19<sup>th</sup> International Symposium on Plant  
Lipids  
2010年7月13日 (Cairns)

⑧ 藤木友紀、西田生郎、大隅良典  
“Roles of Arabidopsis phosphatidyl-  
inositol 3-kinase complex in pollen  
development”  
21<sup>st</sup> International Conference on  
Arabidopsis Research  
2010年6月8日 (横浜・パシフィコ横浜)

## 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：