

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：20200061

研究課題名（和文）植物の巧妙な生存戦略：オートファジー/小胞RCBを介した葉緑体タンパク質の分解

研究課題名（英文）An ingenious strategy for plant survival: Degradation of chloroplast proteins via autophagy and RCB vesicles

研究代表者

石田 宏幸 (ISHIDA HIROYUKI)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：60312625

研究成果の概要（和文）：

本研究では植物の生存戦略として重要な細胞内分解システム、オートファジー、による葉緑体タンパク質の分解のメカニズムや生理的意義について解析した。そして、(1) 葉緑体ストロマタンパク質を含む小胞 RCB の形成がオートファジーに依存したものであること、(2) RCB 形成は葉の炭水化物の飢餓と密接に関わっていること、(3) オートファジーはサリチル酸シグナリングの減衰や活性酸素種の消去を介して葉の老化を負に制御していること、を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We studied mechanisms and physiological functions of a degradation of chloroplast proteins by autophagy as a strategy of plant survival. It was revealed that (i) the production of RCBs which contain stromal proteins of chloroplasts is dependent on autophagy; (ii) the RCB production is closely related to leaf carbon status; (iii) autophagy negatively regulates leaf senescence by controlling salicylic acid signaling and the production of reactive oxygen species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2009 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
年度			
年度			
総計	23,900,000	7,170,000	31,070,000

研究分野：農学、生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学、基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：細胞死、老化、植物、オートファジー、葉緑体

1. 研究開始当初の背景

動物とは異なり、植物は大地に根を張り光合成による独立栄養を営む。よって植物の生長は、自らが置かれた環境に強く支配されている。そのため植物は様々な環境に適応・応答する術を発達させてきた。その中でも、本研究で特に対象とするのは、栄養や光が制限される環境下での生存に重要な「細胞内タン

パク質の分解と窒素・炭素のリサイクル」の分子機構である。植物の葉では、全窒素の約 80% が葉緑体に分配され、タンパク質として主に光合成を担っている。中でも光合成の律速因子の 1 つである CO₂ 固定酵素、Rubisco は単一タンパク質として全窒素の約 30% を占めるなど、そこには植物におけるエネルギーの獲得と栄養素利用の特異性が見て取れる。葉の自然老化 (aging)、あるいは窒素飢

餓や光合成が行えない暗条件で誘導される老化時には、細胞内タンパク質の大部分を占める葉緑体タンパク質が盛んに分解され、窒素や炭素が再利用されることで、細胞機能や個体生長の恒常性が維持される。

また葉緑体では光合成電子伝達反応が進行する際、生体にとって強い毒性を持つ活性酸素種 (ROS) が不可避免的に発生する。さらに集光色素であるクロロフィルはそれ自体が強力な光感光剤であり、結合タンパク質から遊離した状態で光を受けると ROS を発生し、生体高分子の損傷や細胞死を引き起こす。よって葉緑体構成成分の秩序ある代謝は、栄養素リサイクルにとどまらず、個体の生存にとって極めて重要な意味を持つ。

2. 研究の目的

研究代表者と研究分担者らの先行研究により、葉緑体の一部分が本体から切り離され、内容タンパク質が小胞 RCB (Rubisco-containing body) として、オートファジーの機構により液胞に輸送される経路 (RCB 経路) の存在が示唆された。オートファジーは出芽酵母の栄養飢餓時に誘導される、細胞内のバルクなタンパク質分解を担う経路であり、近年、動物や植物においても盛んに研究が展開されている。植物ではモデル植物シロイヌナズナを材料に、オートファジーに必須な遺伝子群 *ATGs* のホモログの同定、オートファジー欠損 (*atg*) 変異体の単離、蛍光タンパク質をレポーターに用いたオートファジーの *in vivo* での可視化系の構築等が進み、植物においても酵母と同様なオートファジーのシステムが機能していることが分子レベルで明らかにされた。さらに *atg* 変異体の表現型として栄養十分の条件であっても葉の早期老化や細胞死の助長が観察されることから、オートファジーが葉緑体成分の恒常的な代謝に重要な機能を果たしていることが示唆されていた。

オートファジーでは生物種を問わず、ミトコンドリアやペルオキシゾームなどのオルガネラは「丸ごと」分解されると理解されている。植物固有のオルガネラである光合成を行う葉緑体が、オートファジー/RCB により、本体は維持されつつ内容物の効率的なバルク分解、リサイクルがなされる、という機構は、植物の生存や柔軟な環境応答性を支える重要な基盤となっている可能性が極めて高いと考えられた。そこで、本研究ではこれまでの研究をさらに発展させ、植物オートファジー及び RCB 経路のメカニズムや生理的意義について分子レベルで明らかにしていくことを目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、本研究では主に以下の3項目について解析を進めた。

(1) RCB 形成不能変異体の単離

RCB が、液胞の分解活性を抑制する阻害剤、コンカナマイシン A の存在下でも液胞に蓄積しない変異体の単離を検討した。葉緑体移行 GFP を発現する形質転換体の種子を EMS で処理し、化学的突然変異を誘起させた。次世代 (M2) の種子を MS 培地下、暗所で 5 日間置いて得られる芽生えの胚軸を材料とし、RCB の可視化が出来るか検討した。

(2) RCB 形成要因の解析

これまでに構築された葉緑体移行 GFP ならびにオートファジーマーカー-GFP-ATG8 を発現する形質転換体を材料に、様々な環境や栄養の条件が RCB ならびにオートファゴソームの形成に及ぼす影響について定量解析した。

(3) オートファジー不能 (*atg*) 植物において老化や細胞死が促進される要因の解析

atg 変異体において早期老化、細胞死が誘導される要因について解析するため、変異体と野生体における植物ホルモンや ROS の蓄積度合いの比較、老化や細胞死関連遺伝子の発現解析を行った。さらに *atg* 変異体と各種植物ホルモンの合成系やシグナリング系遺伝子の変異体や、葉の老化 (クロロフィル分解) の進行が遅延する *stay-green* 変異体を交配し多重変異体を得て、それらの表現型について精査した。

4. 研究成果

(1) RCB 形成不能変異体の単離

暗所で 5 日間育てた芽生えを、シュクロースを含まない MS 培地にコンカナマイシン A を加え暗所で 2 日間置くと、胚軸の細胞においても RCB が形成されることがわかった。また蛍光顕微鏡下でスクリーニングされた変異体を明所に戻し、植物体の再生・次世代種子の獲得ができる条件についても検討し、RCB に関わる変異体の効率的な選抜が十分に可能であることを確認した。EMS 変異処理をした M2 植物、約 6000 個体から蛍光顕微鏡下のスクリーニングにより RCB 形成不能となる変異体を 5 個体単離した。そのうちの 3 個体 (*rcb1*, 2, 3) について原因遺伝子の同定を試みた。*rcb1* については *ATG7*、*rcb3* には *ATG10* にそれぞれ点変異が確認され、RCB がオートファジーに依存した構造体であることが正遺伝学的にも証明された。*rcb2* に関してはシロイヌナズナにシングルコピーで存

在する ATG 遺伝子群には変異は見つからなかった。

(2) RCB 形成要因の解析

RCB 形成に及ぼす栄養（窒素、炭水化物）や環境（光）の要因について解析し、RCB 形成が炭水化物の飢餓と密接に関わっていることを明らかにした。また様々な条件下で、葉緑体ストロマを含有する RCB と葉緑体以外の細胞質成分を含有するオートファゴソームの形成は必ずしも一致しているわけではなく、植物オートファジーにも基質選択性が存在する可能性が示唆された。

(3) オートファジー不能 (*atg*) 植物の老化促進表現型について

オートファジー不能植物の老化促進表現型が過剰なサリチル酸シグナリングによるものであることを明らかにした。また、そのサリチル酸シグナルによってオートファジーが誘導されることも見出し、オートファジーによるサリチル酸シグナリングのネガティブフィードバック機構の存在を明らかにした。

さらにオートファジー不能植物では活性酸素種 (ROS) が高蓄積していることを見出した。これは通常の生育条件下で老化とともに ROS の蓄積が観察され、サリチル酸量を低下させたオートファジー不能植物でもまだなお蓄積が観察された。したがって、オートファジー不能植物では ROS の発生源を分解できないために老化が進行してしまうのではないかという可能性が考えられた。

クロロフィル代謝中間体の過剰蓄積がオートファジー不能植物の老化促進表現型に影響を及ぼしているかを調べるため、クロロフィル分解が起こりにくい変異体とオートファジー不能植物との二重変異体を作製すべく、掛け合わせを行った。今後、葉の老化におけるオートファジーの機能を解析していく上で有用な材料を得た。

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 17 件)

1. Izumi, M., Ishida, H. The changes of leaf carbohydrate contents as a regulator of autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies during leaf senescence. *Plant Signal Behav.* 6: In press (2011) 査読有
2. Izumi, M., Wada, S., Makino, A., Ishida, H. The autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies is

specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 154: 1196-1209 (2010) 査読有

3. Yoshimoto, K. Plant autophagy puts the brakes on cell death by controlling salicylic acid signaling. *Autophagy*, 6: 192-193 (2010) 査読有
4. Nakano, R., Ishida, H., Kobayashi, M., Makino, A., Mae, T. Biochemical changes associated with in vivo RbcL fragmentation by reactive oxygen species under chilling-light conditions. *Plant Biol.* 12: 35-45 (2010) 査読有
5. Kwon, S. I., Cho, H. J., Jung, J. H., Yoshimoto, K., Shirasu, K., Park, O. The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in Arabidopsis. *Plant J.* 64: 151-164 (2010) 査読有
6. Yoshimoto, K. Physiological roles of autophagy in plants: Does plant autophagy have a pro-death function? *Plant Signal Behav.* 5: 194-196 (2010) 査読有
7. Yoshimoto, K., Takano, Y., Sakai, Y. Autophagy in plants and phytopathogens. *FEBS Let.* 584: 1350-1358 (2010) 査読有
8. Van Doorn, W. G., Yoshimoto, K. Role of chloroplasts and other plastids in ageing and death of plants and animals: A tale of Vishnu and Shiva. *Aging Res. Rev.* 9: 117-130 (2010) 査読有
9. 吉本 光希. 植物におけるオートファジー研究の展開. *植物の生長調節*, 45: 24-32 (2010) 査読無
10. Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K. et al. Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol.* 149: 885-893 (2009) 査読有
11. Ishida, H., Wada, S. Autophagy of whole and partial chloroplasts in individually darkened leaves: a unique system in plants? *Autophagy*, 5: 736-737 (2009) 査読有
12. Wada S., Ishida, H. Chloroplasts autophagy during senescence of individually darkened leaves. *Plant Signal Behav.* 4: 565-567 (2009) 査読有

13. Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Ohsumi, Y., and Shirasu, K. Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and innate immune response in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21: 2914-2927 (2009) 査読有
 14. Ishida, H., Yoshimoto, K. et al. Mobilization of Rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.*, 148: 142-155 (2008) 査読有
 15. Ishida, H. and Yoshimoto, K. Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy. *Autophagy*, 4: 961-962 (2008) 査読有
 16. Makino, A. and Ishida, H. Rubisco and photosynthesis in cereal crops. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 58: 127-135 (2008) 査読無
 17. 石田 宏幸, 和田 慎也. 葉緑体タンパク質の分解とオートファジー. *光合成研究* 53: 89-94 (2008) 査読無
- [学会発表] (計 21 件)
1. 石田 宏幸, オートファジーによる葉緑体タンパク質の分解, 日本植物生理学会, 2011年3月22日, 仙台、東北大学
 2. 泉 正範, 角田穂奈美, 鈴木雄二, 牧野周, 石田 宏幸, シロイヌナズナにおける RBCS1A および 3B の変異が葉の Rubisco 量に与える影響の解析, 日本植物生理学会, 2011年3月22日, 仙台、東北大学
 3. 吉本 光希, 他, 植物オートファジーによる細胞死の制御. 日本植物生理学会年会, 2011年3月22日, 仙台市
 4. 吉本 光希, 他, 老化・病原菌感染時における植物オートファジーの役割. 日本植物学会, 2010年9月10日, 春日井市
 5. 泉 正範, 牧野 周, 石田 宏幸, シロイヌナズナにおける Rubisco-containing body (RCB) 形成の栄養要因に対する応答の解析, 日本土壌肥料学会, 2010年9月7-9日, 北海道
6. Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Hanson, M.R., Makino, A. A possible role for plastid stromules in the autophagic transfer of stromal proteins to the vacuole. Gordon Research conference 'Mitochondria and Chloroplasts', 2010年7月11-16日, バルガ, イタリア
 7. Izumi, M., Makino, A., Ishida, H. The autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in Arabidopsis. Gordon Research conference 'Mitochondria and Chloroplasts', 2010年7月11-16日, バルガ, イタリア
 8. Wada, S., Ishida, H., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Makino, A. The impact of autophagic degradation in chloroplasts and other organelles during leaf senescence of Arabidopsis. Gordon Research conference 'Mitochondria and Chloroplasts', 2010年7月11-16日, イタリア
 9. Yoshimoto, K. et al., Plant autophagy negatively regulates cell death by controlling salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response. 21st International Conference on Arabidopsis Research, 2010年6月7日, 横浜市
 10. Izumi M., Makino A., Ishida H. A key factor for the autophagy of chloroplasts; the production of Rubisco-containing bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in Arabidopsis. The 21st International Conference on Arabidopsis Research, 2010年6月7日, 横浜
 11. 吉本 光希, 他, オートファジー能欠損シロイヌナズナにおけるプログラム細胞死の原因は過剰なサリチル酸シグナリングである, 日本植物病理学会大会, 2010年4月20日, 京都市
 12. 吉本 光希, 軸丸 裕介, 神谷 勇治, 草野都, 大隅 良典, 白須 賢, 植物オートファジーはサリチル酸シグナリングを抑制し細胞死に歯止めをかける, 日本植物生理学会, 2010年3月21日, 熊本大学
 13. 泉 正範, 石田 宏幸, 牧野 周, シロイヌナズナにおけるデンプン代謝の変異が RCB の形成に及ぼす影響の解析, 日本植物生理学会, 2010年3月20日,

熊本大学

14. Yoshimoto, K., Ishida, H. et al., The role of autophagy in nutrient starvation and aging. International Symposium on Autophagy, 2009年9月24-28日, 大津プリンスホテル
15. Izumi, M., Ishida, H., Makino, A. The analysis of factors affecting the creation of Rubisco-containing bodies (RCBs), a specific autophagic process for chloroplast degradation in plants. International Symposium on Autophagy, 2009年9月24-28日, 大津プリンスホテル
16. Wada, S., Ishida, H., Yoshimoto, K., et al. The chloroplast degradation in two different pathways in individually darkened leaves of Arabidopsis by autophagy, International Symposium on Autophagy, 2009年9月24-28日, 大津プリンスホテル
17. 泉 正範、石田 宏幸、牧野 周、シロイヌナズナ切離葉における栄養要因がRCBの形成に及ぼす影響の解析、日本土壌肥料学会、2009年9月15日、京都大学
18. 泉 正範、石田 宏幸、牧野 周、シロイヌナズナの切離葉におけるRCBの形成に影響を及ぼす要因の解析、日本植物生理学会、2009年3月22日、名古屋大学
19. 和田 慎也、石田 宏幸、吉本 光希、他、シロイヌナズナ個別暗処理葉におけるオートファジーに依存した葉緑体の分解、日本植物生理学会、2009年3月22日、名古屋大学
20. 泉 正範、石田 宏幸、牧野 周、膜小胞 RCB を介した液胞における Rubisco の分解、日本土壌肥料学会、2008年9月9日、名古屋市立大学
21. 和田 慎也、石田 宏幸、吉本 光希、他、シロイヌナズナの個葉・個体暗処理による老化誘導とオートファジーによる葉緑体分解、日本土壌肥料学会、2008年9月9日、名古屋市立大学

[図書] (計2件)

1. Ishida, H., Suzuki, Y., Makino A. Rubisco turnover and nitrogen in a leaf. *Nitrogen assimilation in plants*, Ohya, T. and Sueyoshi, K. Eds., Chapter 19, pp. 277-285.

Research Sinpost, Kerala, India. (2010)

2. Irving, L.J., Suzuki, Y., Ishida, H., Makino, A. Protein turnover in grass leaves. *Advances in Botanical Research*, Vol. 54, pp. 139-182, Kader, J.C. and Delseny, M. Eds., Elsevier, Amsterdam, Netherlands. (2010)

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 宏幸 (ISHIDA HIROYUKI)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：60312625

(2)研究分担者

吉本 光希 (YOSHIMOTO KOHKI)

理化学研究所・植物免疫研究チーム・基礎科学特別研究員)

研究者番号：40399316

(3)連携研究者

()

研究者番号：