

機関番号：82111

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780034

研究課題名 (和文) 花卉老化におけるオートファジーの役割

研究課題名 (英文) Role of autophagy in petal senescence

研究代表者

渋谷 健市 (SHIBUYA KENICHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き品質解析研究チーム・主任
研究員

研究者番号：10462532

研究成果の概要 (和文)：花卉の老化はプログラム細胞死の一種である。アサガオの老化花卉において、液胞による細胞質構成成分の分解機構であるオートファジーの関連遺伝子が誘導されることを示した。蛍光マーカータンパク質である GFP を用いてオートファジー構造物を可視化し、アサガオ花卉の老化時にオートファジーが誘導されることを確認した。また、アサガオにおいては、オートファジーは花卉老化時のプログラム細胞死の進行を遅らせる働きがあることを示唆した。

研究成果の概要 (英文)：Petal senescence is a type of programmed cell death. We showed that expressions of autophagy-associated genes are induced in senescing petals of Japanese morning glory. The induction of autophagy during petal senescence was confirmed by visualizing autophagic structures with the green fluorescent protein (GFP). Our data also suggest that autophagy delays programmed cell death in petal senescence of Japanese morning glory.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学

キーワード：アサガオ、花卉老化、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、液胞による細胞質構成成分の分解プロセスである。オートファジーは、主に栄養飢餓時のサバイバル機構と考えられているが、逆説的に、細胞死の引き金としての機能も注目されている。花卉の老化においては、アサガオ花卉細胞における電子顕微鏡観察により、老化時にオートファジーが

起きていることが示唆されている。本研究では、アサガオをモデル植物として用い、花卉老化時のオートファジーの誘導様式を解析する。さらに、オートファジーに必須な遺伝子の発現を抑制した形質転換体を作成することにより、オートファジーの花卉老化における役割を明らかにする。

2. 研究の目的

花卉の老化はプログラム細胞死の一種であり、その開始と進行は厳密に制御されている。近年、酵母や動物における分子生物学的な解析から、オートファジーがプログラム細胞死において重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。花卉老化時においても、形態学的な観察からオートファジーが起こることが古くから知られていたが、オートファジーが花卉の老化にどのように関与しているかはわかっていない。本研究では、まず、GFP タンパク質をマーカーとして用い、花卉老化時のオートファジーの誘導を解析する。さらに、オートファジー関連遺伝子の発現を抑制した形質転換体を作成し、オートファジーが花卉老化にどのように関与しているか明らかにする。本研究により、花卉老化におけるオートファジーの役割が解明されれば、花の老化機構に関する理解が前進すると期待される。

3. 研究の方法

(1) アサガオ *ATG8* ホモログの単離と発現解析

オートファジーの誘導に必要なユビキチン様タンパク質をコードする *Autophagy8* (*ATG8*) のアサガオホモログを、EST データベースの検索により単離し、全長配列を決定した。花卉の老化過程における *ATG8* ホモログの発現様式をリアルタイム RT-PCR により解析した。

(2) GFP-InATG8 融合タンパク質発現形質転換アサガオの作出と解析

InATG8 遺伝子のプロモーターまたはカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター制御化で GFP と *InATG8* の融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製し、アサガオに導入した。得られた形質転換体を用いて、花卉老化におけるオートファジーの誘導について解析した。

(3) *InATG8* 発現抑制形質転換体の作出と解析

35S プロモーターの下流に *InATG8* の遺伝子断片を、アンチセンスおよびセンス方向に結合した RNAi コンストラクトを作製した。得られた形質転換体において、オートファジーの誘導と花卉の老化について解析した。

4. 研究成果

(1) アサガオ *ATG8* ホモログの単離と発現解析

アサガオ EST データベースの解析により、アサガオには少なくとも 6 種の *ATG8* ホモログが存在することが明らかになり、*InATG8a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* と名付けた。これらのうち

InATG8a, *b*, *d*, *e*, *f* は花卉で主に発現しており、発現量は花卉の老化に伴って増加し、花卉の可視的な老化が始まる開花後 8 時間前後に最大値に達した (図 1)。これらの結果は、アサガオ花卉の老化時にオートファジーが誘導されることを、遺伝子レベルで確認するものである。

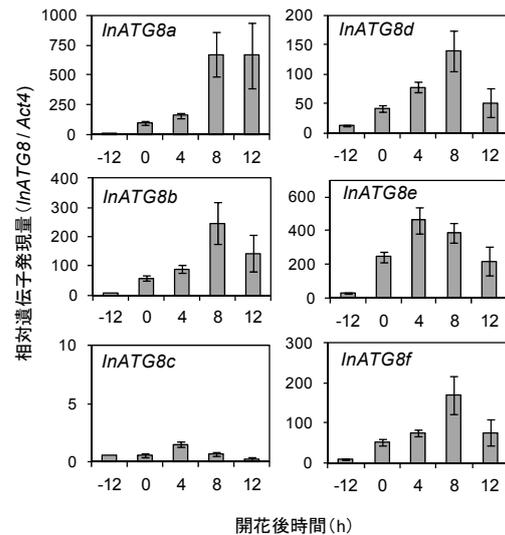


図 1 *InATG8* ホモログの野生型アサガオ花卉における発現

花卉は開花 12 時間前のつぼみ (-12) と、開花後 0 時間から 12 時間まで 4 時間毎に採取した

平均値 ± 標準誤差 (n=3)

(2) GFP-InATG8 融合タンパク質発現形質転換アサガオの作出と解析

GFP-InATG8 融合タンパク質発現コンストラクトには、我々が以前に一つだけ単離し、老化花卉で発現が誘導されることを示していた *InATG8f* を用いた。35S プロモーター制御化で GFP-InATG8f 融合タンパク質を発現する形質転換アサガオを作成した。形質転換アサガオの老化花卉から調製したプロトプラストを蛍光顕微鏡下で観察した結果、GFP シグナルが細胞質と液胞において検出された。この結果は、アサガオの老化花卉細胞において、オートファジーが誘導されていることを確認するものである。さらに、形質転換体の花卉由来のプロトプラストを、オートファジー構造物を染色することが知られている蛍光色素モノダンシルカダベリン (MDC) で染色した結果、GFP シグナルと MDC の染色パタ

ーンが一致した。よって、MDC 染色が、花卉細胞におけるオートファジーの解析にも有効であることが示された。

(3) *InATG8* 発現抑制形質転換体の作出と解析

InATG8f の発現抑制形質転換体 (ATG8fR 系統) を作出した。形質転換体の花卉では、老化時にオートファジーが野生型と同様に誘導され (図 2)、花卉の老化の進行に変化は認められなかった。ATG8fR 系統において、*InATG8f* 以外の *InATG8* ホモログの発現を解析した結果、野生型と同様に誘導されていた (図 3)。*InATG8f* の発現のみを抑制してもオートファジーが抑制されず、野生型と同様な老化が起こるのは、花卉の老化時には複数の *InATG8* ホモログの発現が誘導され、これらのいくつかは同様の機能を持っているからと推察された。複数の *ATG8* ホモログの発現を抑制すれば、オートファジー活性を抑制することができるかと推測される。

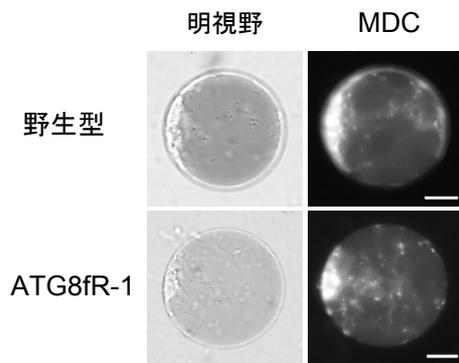


図 2 ATG8fR 形質転換体の花卉におけるオートファジーの誘導
野生型と ATG8fR 形質転換体 (ATG8fR-1) の開花 8 時間後の花卉からプロトプラストを調製し、モノダシルカダベリン (MDC) で染色後、蛍光顕微鏡で観察した MDC で染色されているのがオートファジー構造物
スケールバーは 10 μm

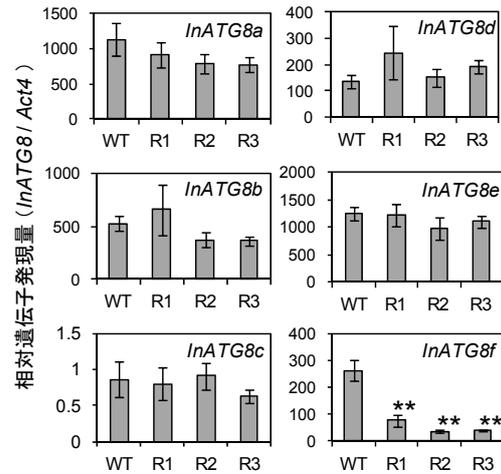


図 3 ATG8fR 系統の花卉における *InATG8* ホモログの発現
花卉は野生型 (WT) および ATG8fR 形質転換体 (R1, R2, R3) から開花後 8 時間に採取した
平均値 \pm 標準誤差 (n=3)
** 1% 水準で有意差あり (Tukey-Kramer 多重検定)

InATG8f の発現抑制形質転換体では、オートファジー活性が抑制されなかった。そこで、オートファジーと花卉老化の関連を解析するために、オートファジー阻害剤であるコンカナマイシン A を開花前日のアサガオのつぼみに処理した。その結果、処理花卉では無処理区に比べて有意に花卉の老化が促進された。同様に、オートファジー阻害剤である 3-メチルアデニン処理がアサガオ花卉の老化を促進することが最近報告されている。さらに我々は、花卉老化が促進される形質を示した老化関連遺伝子 *InPSR26* の発現抑制形質転換体では、オートファジーが抑制されていることを見出している。これらの結果は、オートファジーが花卉の老化制御に関与していること、さらに、オートファジーは花卉老化時のプログラム細胞死の進行を遅らせる働きがあることを示唆している。

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3件)

- ① Shibuya K, Shimizu K, Yamada T, Ichimura K (2011) Expression of autophagy-associated *ATG8* genes during petal senescence in Japanese morning glory. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 80: 89-95 査読有
- ② Shibuya K, Yamada T, Shimizu K, Ichimura K (2009) *InPSR26* encoding a putative membrane protein is involved in programmed cell death during petal senescence of Japanese morning glory (*Ipomoea nil*). Acta Horticulturae 847: 275-278 査読有
- ③ Shibuya K, Yamada T, Ichimura K (2009) Autophagy regulates progression of programmed cell death during petal senescence in Japanese morning glory. Autophagy 5: 546-547 査読有

[学会発表] (計1件)

- ① Shibuya K, Yamada T, Ichimura K (2009) Programmed cell death during flower senescence. The 8th International symposium on the plant hormone ethylene, Cornell University, Ithaca, New York, USA, June 23, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 健市 (SHIBUYA KENICHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き品質解析研究チーム・主任研究員

研究者番号：10462532