

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380037

研究課題名(和文) イネの生活環とオートファジー

研究課題名(英文) Roles of autophagy in the life cycle of rice

研究代表者

石田 宏幸 (Ishida, Hiroyuki)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60312625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イネの生活環においてオートファジーが果たす役割について解析を進め以下の成果を得た。(1) オートファジー欠損変異体イネを単離した。(2) 蛍光タンパク質マーカーを発現する形質転換体を作成しイネにおけるオートファジーの可視化・評価系を構築した。(3) 変異体イネでは、生殖成長が遅延し出穂が遅れること、さらには花粉や葯の発達が不完全となり雄性不稔となることを明らかにした。(4) 変異体イネでは、栄養成長期に葉緑体タンパク質の分解や窒素転流が滞り、個体の窒素利用効率や乾物生産が低下することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We aimed to reveal roles of autophagy in the life cycle of rice and obtained following results. (1) We isolated autophagy-defective rice mutants. (2) We established monitoring methods for autophagy by generating transgenic rice expressing fluorescent protein markers. (3) We found that autophagy-defective rice mutants show delayed reproductive growth and heading and they show male sterile phenotype due to incomplete development of pollen and anther. (4) We found that autophagy-defective rice mutants show reduced biomass production and nitrogen use efficiency due to suppression of chloroplast protein degradation and nitrogen remobilisation.

研究分野：植物栄養生理学

キーワード：オートファジー 窒素転流 栄養成長 生殖成長 イネ

## 1. 研究開始当初の背景

光独立栄養生物である植物は吸収した無機栄養素を光合成によって同化、利用し成長する。よって植物の成長は、自らがおかれた環境とその変動に強く支配されている。そのため植物は刻々と変化する環境下で成長の恒常性を図る術を発達させてきた。その一つに体内での栄養素のリサイクルがある。無機栄養素の中でも窒素は、タンパク質の骨格構成要素であるため特に成長の制限要因となる。自然界では無機態窒素の存在量は限られており、農作地では必然的に施肥により窒素が補われる。植物は同化窒素の多くを光合成系タンパク質に投資し、炭水化物を得て生活している。成長に伴い下位葉は老化しタンパク質は分解され、構成窒素は光合成に有利な上位葉に転流し再利用される。登熟過程においては、窒素は種子へ転流し貯蔵タンパク質として次世代へ受け渡される。そして種子の発芽時には貯蔵タンパク質は盛んに分解され、完全独立栄養に移行するまでの栄養源として利用される。

オートファジーは、タンパク質、脂質、オルガネラなどの細胞質成分を分解し、栄養素やエネルギーの供給を担う主経路であり、真核生物に広く保存された細胞内栄養リサイクルシステムである。研究代表者らは、植物の体内栄養リサイクルの基質として最も重要な葉緑体タンパク質が小胞 RCB

(Rubisco-containing body)としてオートファジーにより分解されることを、モデル植物シロイヌナズナで明らかにした。しかしながら、体内の栄養リサイクルとオートファジーの関係について、作物を用いた研究例は皆無であった。

## 2. 研究の目的

イネは我が国をはじめとするアジアの主要穀物であり、単子葉のモデル作物としてゲノム情報や研究ツールの整備が特に進んでいた。そこで本研究では、イネの生活環において、オートファジーが果たす役割について明らかにすることを目的とした。より具体的には、逆遺伝学的に同定したオートファジーに必須の遺伝子(*autophagy-related gene*; *ATG*)を欠損するイネ変異体を単離し、その一生、すなわち発芽、成長、生殖、登熟、の各段階における表現型とその要因について、生理・生化学および形態・細胞生物学の主に2つの方向から解析することで、イネの生活環や成長、そして生産性に、オートファジーがどのように寄与しているのかについて明らかにすることを目的として研究を進めた。

## 3. 研究の方法

(1) 研究材料としてオートファジーに必須の遺伝子 *ATG7* または *ATG9* を欠損する変異体を、Postech の (T-DNA) ならびに農水省 (Tos17) の遺伝子破壊変異体リソースより単離した。

(2) オートファジーの進行を生体で可視化するため、オートファゴソームのマーカーとなる GFP-ATG8 および RFP-ATG8、またオートファジーの主要な基質のマーカーとなる Rubisco-GFP および Rubisco-RFP の遺伝子コンストラクトを作成し、野生型イネならびにオートファジー欠損変異体に遺伝子組み換え法によって導入した。得られた形質転換体を材料に、共焦点レーザー顕微鏡によりイネにおけるオートファジーの可視化法を検討した。

(3) イネの主要な生活環(発芽期、栄養成長期、生殖成長期、および受精・登熟期)の中で、オートファジー欠損変異体が示す表現型について解析した。

## 4. 研究成果

(1) オートファジー欠損変異体イネの単離 Postech の (T-DNA) ならびに農水省 (Tos17) の遺伝子破壊変異体リソースからオートファジーに必須の *ATG7* 遺伝子が破壊されたもの (*atg7*) を計2系統、*ATG9* 遺伝子が破壊されたもの (*atg9*) を計2系統単離した。

(2) イネにおけるオートファジーの可視化方法の確立

オートファジーや RCB 経路の *in vivo* での可視化系の構築に必要な形質転換体、GFP-ATG8、RFP-ATG8、RBCS-GFP、及び RBCS-RFP を発現するイネを作出した。これら形質転換体を用いてオートファゴソームや RCB の液胞内での蓄積を共焦点レーザー顕微鏡で観察する実験系を確立した。

(3) オートファジー欠損変異体の表現型解析

### 発芽期

発芽過程の種子の解析において、種子タンパク質の分解には野生型と *atg7* 変異体で差は無く、種子貯蔵タンパク質分解に、オートファジーの明確な関与は認められなかった。その一方で、野生型の乾燥種子、発芽初期の種子で *ATG7* mRNA が検出されたことから、種子の発芽初期にオートファジーが機能している可能性は高いことが示された。

### 栄養成長期

*atg7* 変異体は低窒素栄養条件になるほど野生体に比べ乾物生産が低下した。また *atg7* 変異体では老化葉での Rubisco や主要な可溶性タンパク質の分解が遅延し、個体内の窒素転流が抑制された。

### 生殖成長期

*atg7* 変異体では幼穂形成の遅延がみられた。出穂時期は野生型に比べて 10~14 日の範囲で遅延した。

### 受精・登熟期

単離したイネのオートファジー欠損変異体はいずれも雄性不稔の表現型を持ち、基本的にコメが全く実らなかった。シロイヌナズナとは異なり、イネではオートファジーが花粉の発達過程に必須な役割を果たすことが明らかとなった。

## 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9件)

1. Izumi, M., Hidema, J., Ishida, H. From Arabidopsis to cereal crops: Conservation of chloroplast protein degradation by autophagy indicates its fundamental role in plant productivity. *Plant Signal Behav.* 10, e1101199 (2015), 査読有, DOI: 10.1080/15592324.2015.1101199
2. Wada, S., Hayashida, Y., Izumi, M., Kurusu, T., Hanamata, S., Kuchitsu, K., Makino, A., Ishida, H. Autophagy supports biomass production and efficient nitrogen remobilization at the vegetative stage in rice. *Plant Physiol.* 168, 60-73 (2015), 査読有, DOI: 10.1104/pp.15.00242
3. Izumi, M., Hidema, J., Wada, S., Kondo, E., Kurusu, T., Kuchitsu, K., Makino, A., Ishida, H. Establishment of monitoring methods for autophagy in rice reveals autophagic recycling of chloroplasts and root plastids during energy limitation. *Plant Physiol.* 167, 1307-1320 (2015), 査読有, DOI: 10.1104/pp.114.254078
4. 石田宏幸、植物の栄養リサイクルと葉緑体のオートファジー、*化学と生物*、52, 610-615 (2014), 査読有
5. Kurusu, T., Koyano, T., Hanamata, S. 他 20 人 (Makino, A. を 18 番目, Ishida, H. を 20 番目に含む) OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. *Autophagy*, 10: 1-11 (2014) 査読有, DOI: 10.4161/auto.28279
6. Ishida, H., Izumi M., Wada, S., Makino A. Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* 1837, 512-521 (2014), 査読有, DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.11.009
7. Izumi, M., Hidema, J., Ishida, H. Deficiency of autophagy leads to significant changes of metabolic profiles in Arabidopsis. *Plant Signal Behav.*, 8, e25023 (2013), 査読有, DOI: 10.4161/psb.25023
8. Izumi, M., Hidema, J., Makino, A., Ishida H. Autophagy contributes to nighttime energy availability for growth in Arabidopsis. *Plant*

*Physiol.*, 161, 1682-1693 (2013), 査読有, DOI: 10.1104/pp.113.215632

9. Ono, Y., Wada, S., Izumi, M., Makino, A., Ishida, H. Evidence for contribution of autophagy to the Rubisco degradation during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.*, 36, 1147-1159 (2013), 査読有, DOI: 10.1111/pce.12049

[学会発表](計29件)

1. 横浜諒、和田慎也、菅野圭一、小島創一、山谷知行、牧野周、石田宏幸、異なる窒素栄養条件下においてオートファジーの欠損がイネの窒素利用と成長に与える影響の解析、日本植物生理学会、2016年3月18日~2016年3月20日、岩手大学(岩手県盛岡市)
2. 江口雅文、吉本光希、木村和彦、泉正範、和田慎也、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナにおけるオートファジーが垂鉛欠乏時に果たす役割、日本土壌肥料学会、2015年9月9日~2015年9月11日、京都大学(京都府京都市)
3. 和田慎也、林田泰和、泉正範、来須孝光、花俣繁、朽津和幸、牧野周、石田宏幸、イネの栄養成長と老化葉の窒素リサイクルにおけるオートファジーの役割の解析、日本土壌肥料学会、2015年9月9日~2015年9月11日、京都大学(京都府京都市)
4. 石田宏幸、西村翼、泉正範、Gad Galili、牧野周、シロイヌナズナのRCBおよび葉緑体オートファジーにおけるATI(ATG8-interacting proteins)の役割について、日本土壌肥料学会、2015年9月9日~2015年9月11日、京都大学(京都府京都市)
5. 和田慎也、中村萌、石田宏幸、牧野周、イネの発芽過程におけるオートファジーの役割、日本土壌肥料学会、2015年9月9日~2015年9月11日、京都大学(京都府京都市)
6. 横浜諒、和田慎也、牧野周、石田宏幸、異なる窒素栄養条件下においてオートファジーの欠損がイネの窒素利用と成長に及ぼす影響の解析、日本植物生理学会、2015年03月16日~2015年03月18日、東京農業大学(東京都世田谷区)
7. 和田慎也、林田泰和、泉正範、来須孝光、花俣繁、朽津和幸、牧野周、石田宏幸、イネの栄養成長と老化葉の窒素リサイクルにおけるオートファジーの役割の

- 解析、日本植物生理学会, 2015年03月16日~2015年03月18日, 東京農業大学(東京都世田谷区)
8. 弘田隆晃、泉正範、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナの暗処理による炭素欠乏条件下でオートファジーは分岐鎖アミノ酸を代替呼吸基質として供給する、日本植物生理学会, 2015年03月16日~2015年03月18日, 東京農業大学(東京都世田谷区)
  9. 江口雅丈、木村和彦、和田慎也、泉正範、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナの亜鉛欠乏条件下におけるオートファジーの役割、日本植物生理学会, 2015年03月16日~2015年03月18日, 東京農業大学(東京都世田谷区)
  10. Masanori Izumi, Jun Hidema, Shinya Wada, Eri Kondo, Takamitsu Kurusu, Kazuyuki Kuchitsu, Amane Makino, Hiroyuki Ishida. Establishment of monitoring methods for autophagy in rice reveals autophagic recycling of chloroplasts and root plastids during energy limitation. 日本植物生理学会, 2015年03月16日~2015年03月18日, 東京農業大学(東京都世田谷区)
  11. 江口雅丈、泉正範、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナにおけるオートファジーの欠損が各栄養素の欠乏時の生存と成長に及ぼす影響の解析、日本土壌肥料学会, 2014年9月9日~2014年9月11日, 東京農工大学(東京都小金井市)
  12. 和田慎也、横浜諒、石田宏幸、牧野周、異なる窒素栄養条件下においてオートファジーの欠損がイネの窒素利用と成長に及ぼす影響の解析、日本土壌肥料学会, 2014年9月9日~2014年9月11日, 東京農工大学(東京都小金井市)
  13. 泉正範、石田宏幸、牧野周、日出間純、シロイヌナズナにおける葉緑体オートファジーの機能解析、日本土壌肥料学会, 2014年9月9日~2014年9月11日, 東京農工大学(東京都小金井市)
  14. 弘田隆晃、泉正範、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナにおける糖欠乏下でのオートファジーの役割の解析、日本土壌肥料学会, 2014年9月9日~2014年9月11日, 東京農工大学(東京都小金井市)
  15. Hiroyuki Ishida. Roles of autophagy in chloroplast recycling. Gordon Research conference 'Mitochondria and Chloroplasts', 2014年7月6日~2014年7月11日, バルガ(イタリア)
  16. 石田宏幸、植物の栄養リサイクルと葉緑体のオートファジー、日本農芸化学会シンポジウム, 2014年03月28日~2014年03月30日, 明治大学(神奈川県川崎市)
  17. Masanori Izumi, Hiroyuki Ishida, Amane Makino, Jun Hidema. Autophagy for photodamaged chloroplast in Arabidopsis. 日本植物生理学会 2014年03月18日~2014年03月20日, 富山大学(富山県富山市)
  18. 林田泰和、和田慎也、来須孝光、朽津和幸、牧野周、石田宏幸、オートファジーの欠損がイネの栄養成長と窒素転流へ与える影響の解析、日本植物生理学会, 2014年03月18日~2014年03月20日, 富山大学(富山県富山市)
  19. Masanori Izumi, Takaaki Hirota, Jun Hidema, Amane Makino, Hiroyuki Ishida. Autophagy in plant energy availability. 6th European workshop on leaf senescence. 2013年10月14日~2013年10月18日, ヴェルサイユ(フランス)
  20. Shinya Wada, Yasukazu Hatyashida, Takamitsu Kurusu, Kazuyuki Kuchitsu, Amane Makino, Hiroyuki Ishida. Identification of a rice autophagy defected mutant, OsATG7, and phenotypes in the life cycle. 6th European workshop on leaf senescence. 2013年10月14日~2013年10月18日, ヴェルサイユ(フランス)
  21. Hiroyuki Ishida. Roles of autophagy in Rubisco degradation during leaf senescence. 6th European workshop on leaf senescence. 2013年10月14日~2013年10月18日, ヴェルサイユ(フランス)
  22. 泉正範、日手間純、近藤依里、牧野周、石田宏幸、イネにおける Rubisco-containing body/ オートファジー系の可視化、日本土壌肥料学会, 2013年9月11日~2013年9月13日, 名古屋大学(愛知県名古屋市)
  23. 林田泰和、和田慎也、来須孝光、朽津和幸、牧野周、石田宏幸、イネオートファジー欠損変異体 Osatg7 の生理解析 - (その2) 葉の老化過程における窒素転流への影響について -、日本土壌肥料学会, 2013年9月11日~2013年9月13日, 名古屋大学(愛知県名古屋市)
  24. 和田慎也、林田泰和、来須孝光、朽津和

幸、牧野周、石田宏幸、イネオートファジー欠損変異体 *Osatg7* の生理解析 - (その1) 栄養成長期における個体生育について -、日本土壌肥料学会、2013年9月11日~2013年9月13日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

25. 泉正範、日出間純、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナのエネルギー利用におけるオートファジーの寄与について、日本植物生理学会、2013年3月21日~2013年3月23日、岡山大学(岡山県岡山市)
26. 小野佑樹、和田慎也、泉正範、牧野周、石田宏幸、Autophagy contributes to Rubisco degradation during leaf senescence in Arabidopsis、日本植物生理学会、2013年3月21日~2013年3月23日、岡山大学(岡山県岡山市)
27. 小野佑樹、和田慎也、泉正範、牧野周、石田宏幸、Rubisco 分解におけるオートファジーの貢献度の評価、日本土壌肥料学会、2012年9月4日~2012年9月6日、鳥取大学(鳥取県鳥取市)
28. 泉正範、日出間純、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナ葉の栄養素リサイクルにおいてRCB/オートファジー系が担う役割の解析、日本土壌肥料学会、2012年9月4日~2012年9月6日、鳥取大学(鳥取県鳥取市)
29. Hiroyuki Ishida. Autophagy of chloroplasts during leaf senescence. 10th International Congress on Plant Molecular Biology, 2012年10月21日~2012年10月26日、済州(韓国)

## 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

牧野 周 (MAKINO, Amane)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：70181617