

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18526

研究課題名(和文) シロイヌナズナT-DNA挿入株を用いた植物特異的なオートファジー欠損株の探索

研究課題名(英文) The search for the plant-specific autophagy deficient strain using arabidopsis thaliana T-DNA insertion lines.

研究代表者

井上 悠子 (INOUE, Yuko)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：40637922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、栄養欠乏条件下で自らの構成成分を分解する真核生物に共通の機構である。植物では、栄養欠乏条件下だけでなく様々なストレスによってオートファジーが誘導されることが分かっている。またシロイヌナズナの根の伸長領域において、栄養存在下でも常にオートファジーが起こっていることも明らかになっているが、その誘導メカニズムはまだ明らかになっていない。そこで本研究では、植物特異的なオートファジー関連遺伝子変異株のスクリーニングを行なった。年度内に新奇のオートファジー関連遺伝子の同定には至らなかったが、発根をマーカーとした一次スクリーニングを継続して行なっている。

研究成果の概要(英文)：Macroautophagy (hereafter autophagy) is well conserved mechanism for eukaryotes which degraded the part of their cell component under nutrient deficient conditions. In plants, autophagy is induced not only under nutrient-starvation conditions but also various stresses. It is understood that autophagy is induced in the Arabidopsis root elongation region even in the presence of nutrients, but the mechanism of the induction is unclear. Therefore, in this study, I carried out the screening of plant-specific autophagy-related gene mutants. Although I could not find the novel autophagy-related genes within the term of research fund, I continue the primary screening.

研究分野：植物生理学

キーワード：オートファジー シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞が栄養を獲得できない条件下におかれた際に、自らの一部を分解することにより細胞構成成分やエネルギーを獲得する機構である。

このメカニズムは真核生物に広く保存されており、90年代に酵母を材料として最初のオートファジー関連遺伝子欠損株の単離がなされたのち、いくつかのオートファジー関連遺伝子群 (Autophagy = ATGs) が同定された。これまでにヒトやマウス、センチュウ、ショウジョウバエなど多くの生物を材料として、ATG 遺伝子のホモログを用いたオートファジー研究が行われてきた。植物においては、シロイヌナズナ、イネなどで ATG 遺伝子のホモログを用いた解析の報告がなされており、栄養飢餓条件下での生命維持以外にも、オートファジーの生理的な意義が存在することが明らかになってきた。例えば、酸化ストレス条件下での変性タンパク質の除去、暗条件下におかれた際の老化の抑制などである。また、私はこれまでに、シロイヌナズナの根端の細胞では、栄養状態とは無関係に、常にオートファジーが誘導され続けていることをすでに明らかにしている。また、その定常的に起こるオートファジーが、根の伸長に貢献していることも見いだした。

しかし、栄養条件をトリガーとしたオートファジー誘導のメカニズムについては酵母を始めとして多くの報告があるにも関わらず、栄養条件に関わらないオートファジー誘導メカニズムについては植物ではほとんど明らかになっていない。酵母の ATG 遺伝子のうち、オートファジーの膜動態の遂行に必要なタンパク質をコードする遺伝子については、植物も含めてほとんどの真核生物で共通であるが、酵母においてオートファジーの誘導に関わるタンパク質をコードする遺伝子は他の生物には存在しないものもある。

植物は様々な環境ストレスに応答してどのようなメカニズムでオートファジーを誘導しているのだろうか。これまでの研究から植物に特異的なオートファジーの誘導条件が報告されているにもかかわらず、その分子機構についてはほとんど不明である。その理由として、植物のオートファジー研究に用いられている変異体が、全て酵母の遺伝子ホモログの欠損株であって、植物のオートファジー誘導に特異的に働く遺伝子が同定されていないことがあげられる。一方で、哺乳動物の分野においてはすでに酵母のオートファジー遺伝子ホモログの解析から発展して、哺乳動物に特異的なオートファジー関連遺伝子の同定と解析が行われている。さらに酵母のホモログであるオートファジー関連タンパク質との相互作用やメカニズムの解明も進んでおり、哺乳動物のオートファジー研究の発展に貢献している。このことを考えると、植物でも植物特異的なオートファジー関

連遺伝子を同定することが非常に重要な課題であると考えられる。しかしこれまでに植物においてオートファジー遺伝子のスクリーニングが行われてこなかった理由のひとつとして、オートファジーの表現系の検出の困難さが挙げられる。これまで多くの報告において、オートファジーの検出法として二重膜構造を持つオルガネラである『オートファゴソーム』を顕微鏡で観察する方法がとられてきた。オートファゴソームはオートファジー特異的に見られるオルガネラであるが (図1)、光学顕微鏡で観察するためには、まずはオートファゴソームに局在する Atg8 タンパク質を GFP と結合することによって可視化しなくてはならず、スクリーニングに用いるのは困難であると考えられた。私たちは非常にシンプルな表現系として、オートファジーを欠損したシロイヌナズナでは発芽の遅延が起こることを見いだした。またシステインプロテアーゼの阻害剤である E-64d を用いて、オートファジーを途中の段階で阻害することにより未分解物を含む顆粒を多数蓄積させ、さらにその外膜を蛍光試薬で染色することにより可視化し、オートファジーを容易に検出する方法もすでに報告しており、この方法によってオートファジーを顕微鏡下で観ることを容易にした (図1)。

そこで、シロイヌナズナ T-DNA 挿入株をこの方法と組み合わせて用いることで、オートファジー欠損株のスクリーニングを行えるのではないかと考えた。さらに、得られた変異体の解析を行うことにより、植物に特異的なオートファジーの誘導メカニズムと環境ストレスとの関連を明らかにすることが可能であり、その知見は今後の植物オートファジー分野の研究の発展に不可欠であると考えた。

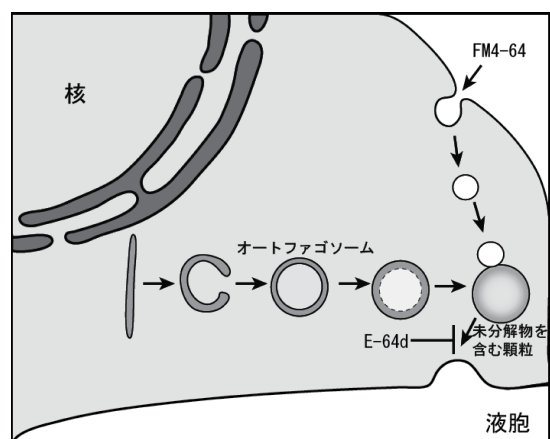


図1：オートファジーの膜動態と解析方法
オートファジーは細胞膜成分が細胞質を包み込んで加水分解酵素を獲得して内容を分解する現象である。この過程に、システインプロテアーゼの阻害剤である E-64d を加えることによって細胞内に未分解物を含む顆粒を多数蓄積させることができる。また、この顆粒の外膜は FM4-64 で蛍光染色

でき、より鮮明に可視化することができる。

2. 研究の目的

私たちはこれまでに、植物を材料として ATG 遺伝子ホモログ欠損株を用いたオートファジーの解析を行ってきた。その解析から、シロイヌナズナの根端細胞では栄養豊富な条件下でもオートファジーが誘導され続けていることを明らかにした。すなわち、オートファジーの主な目的は細胞構成成分の自己分解による栄養の獲得であるが、高等植物では栄養が十分にある条件下でも何らかの生理機能を果たすためにオートファジーが誘導される機構が存在することが示された。しかしながら何をシグナルとしてどのように誘導されるか、またその生理学的な意義に関してはほとんど明らかにされていない。また、植物では、窒素や炭素の飢餓以外にも暗ストレスや酸化ストレスなど様々な条件下でオートファジーが誘導されることがすでに報告されている。しかしこれまでに、植物にのみ存在するオートファジー関連遺伝子はほとんど報告されていない。

そこで本研究では、シロイヌナズナの T-DNA 挿入株を材料として、植物に特異的なオートファジーの表現系をマーカーとしたスクリーニングを行って変異体を単離し、さらに同定することを目的とした。

さらに得られた変異体を解析することによって、植物の環境に応答したオートファジー誘導のメカニズムと生理学的な意義を明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

シロイヌナズナ T-DNA 挿入株を約 35,000 株用いて、以下の手順によりオートファジー関連遺伝子欠損株のスクリーニングを行う。得られた株の解析も並行して行い、オートファジー関連遺伝子欠損株の単離を行う。

(1) 一次スクリーニング

シロイヌナズナの種子の発芽は、伸長した根が種皮を突き破る発根から始まる。そのため根の伸長が野生株より遅いことが分かっているオートファジー欠損株では、発芽が遅くなるという表現系が見られる。図 2 に示したように、野生株では発芽処理後 1 日間で、約 90% の種子の発芽が起こることが観察された。一方で、酵母オートファジー関連遺伝子(ATG)のホモログ遺伝子を欠損させた株では発芽処理 1 日後で発芽が見られるものは 10% 以下であった。そこでこの発芽タイミングのずれを利用して、オートファジー欠損株の一次スクリーニングを行った。

シロイヌナズナ栽培用の培地に、T-DNA 挿入株の種子をまき、低温条件下において発芽処理を行う。発芽処理を行なった種子を明

所、21 で培養し、野生株の発芽率がほとんど 100% になり、オートファジー欠損株ではまだ 25% ほどしか発芽していない 1 日半後を選抜タイミングに定め、スクリーニングを行う。方法としてはまだ発芽していない種子を目視で見つけ、シャーレの裏からマジックペンを用いてラベルしておく。さらに一日後、遅れて発芽したものを選抜して新しい培地に移した。

当初は予備実験の結果から、発芽処理後 1 日と 6~8 時間後に選抜時間を定めていた。予備実験では、この時間では野生株は 100% 近く発芽しており、オートファジー欠損株も 25% 以上発芽していた。本実験では同じ欠損株由来の種子を 8 粒は重複してスクリーニングするので、オートファジー欠損株が 25% 以上発芽していたとしても、十分に欠損株を選抜することができると考えた。しかし、T-DNA 挿入株バックグラウンドで同様の実験を行うと、1 日と 6~8 時間後では発芽率が 100% には届かなかった。そこで選抜を行う時間を発芽処理後 1 日半後に変更して行った。

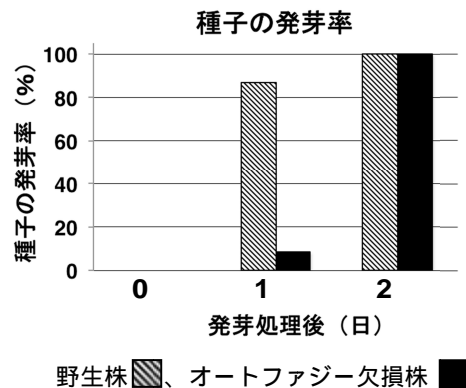


図 2: シロイヌナズナ種子の発芽率

野生株では発芽処理 1 日後に 90% 近くの種子の発芽がみられたが、オートファジー欠損株ではおよそ 10% に留まった。野生株、オートファジー欠損株とも発芽処理後 2 日目までにほとんどすべて発芽した。このことは、オートファジー欠損株の種子の発芽が 1 日ほど遅れること、発芽率そのものには影響しないことを示していた。

(2) 二次スクリーニング

一次スクリーニングの選抜個体を新しい培地に移し、ある程度まで成長させたのち根端から 1 cm ほどをメスで切り取った。根端を傷つけないようにピンセットでつまみとり、ショ糖を含まない MS 液体培地にシステインプロテアーゼの阻害剤である E-64d を加えたものに移して 1 日間培養した。さらに FM4-64 を加えて 1 時間培養後、蛍光顕微鏡で観察した。図 3 に示したように、オートファジーが欠損した個体ではオートファジー

の未分解物の蓄積が起こらない。このことをマーカーとしてオートファジーが欠損した個体の選抜を行った。

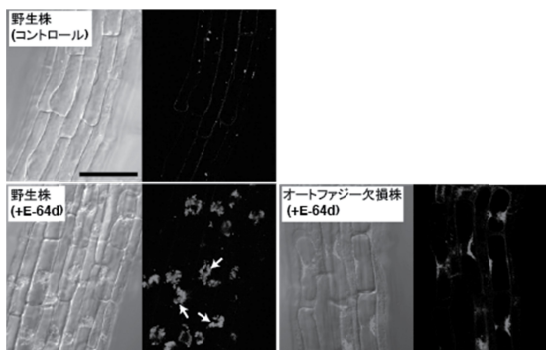


図3：オートファジーの未分解物の観察

発芽後1週間のシロイヌナズナから根端1cmを切り取り、シヨ糖を含まないMS培地にE-64dを加えたものに無菌条件下で移す。1日間培養後、細胞内に未分解物を含む顆粒構造であるオートリソソームが多数蓄積しているのが観察できる(写真中に示した)。この顆粒はオートファジーによって生じた分解途中の構造であることが明らかになっている。また、FM4-64を同時に加えて外膜を蛍光染色することによって蛍光顕微鏡下でさらに鮮明に観察できる。

4. 研究成果

シロイヌナズナのT-DNA挿入株の種子を個体培地に播種し、発芽処理を行ったのち、21で培養して発芽が遅れる個体の選抜によるスクリーニングを行った。

しかし野生株とは異なり、T-DNA挿入株では発芽のタイミングが全体的に遅れること、かなり遅れる個体の数も大変多いことがわかった。理由としては、T-DNA挿入株はすべて何らかの変異体株であること、種子の新しさや保存方法などが挙げられるのではないかと考えられた。そのため一次スクリーニングで選抜しなければならない個体の数がかなり多くなった。そのため当初は同時に行っていた一次スクリーニングと二次スクリーニングを並行して行うのが困難であると考えた。そこでまず時間はかかるものの一次スクリーニングのみを行うことにした。一次スクリーニングによって発芽のタイミングが遅れる個体に印をつけ、ある程度まで育ったらガラスウールに移して成熟するまで栽培を行い、種子の回収を行った。得られた個体の種子をまいて、再現性および二次スクリーニングを行ったが、現時点までにはオートファジー欠損に関連していると思われる個体は得られなかった。

発芽のタイミングが遅れる株が多すぎて種の回収の手間がかかるので、一次スクリーニングを継続する前に手法を再度検討することとした。

そこで、野生株とATG欠損株の発芽のタ

イミングや発芽に関する表現型をさらに詳細に比較し、培地条件を変えることなども行って、野生株とATG欠損株で発芽のタイミングがさらに顕著に開く条件を探すことを試みた。

発芽培地中のシヨ糖濃度および窒素源などを変えてATG欠損株の発芽が遅れる条件を検討した。その結果、シヨ糖濃度が低い、もしくはシヨ糖を含まない培地を用いた方がATG欠損株の発芽が早まって野生株の発芽時期に近づくことが明らかになった。この理由については未だ不明であるが、発芽とオートファジーと栄養条件の関係を考えるために興味深い知見であると思われる。

さらに様々な条件の検討を行い、発芽のための低温処理を1週間以上に伸ばすと野生株とATG欠損株の発芽タイミングが2日間くらいまで伸びることを見いだした。

結果としてスクリーニングは年度内に完遂することはできず、現在もまだ継続している。同定に至った個体が得られなかったため、論文発表等に結びつけることができなかったが、新たに見いだした条件を用いてさらに継続してスクリーニングを行い、最終的には新規のオートファジー関連遺伝子の同定を目指したいと考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 悠子 (INOUE, Yuko)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：40637922

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし