

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32682

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07255

研究課題名(和文)オートファジー破綻植物を用いた順遺伝学による新規暗所誘導型細胞死因子の単離・同定

研究課題名(英文) Isolation/identification of novel darkness inducible cell death factors by forward genetics using autophagy-defective plants

研究代表者

吉本 光希 (Kohki, Yoshimoto)

明治大学・農学部・専任准教授

研究者番号：40399316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーはオルガネラを含む細胞質成分を液胞に送り込み分解する現象であり、液胞内分解機構の中心的な役割を担っている。申請者はこれまでに、オートファジーが破綻すると暗条件下で老化が促進することを見出したが、その具体的な原因は分子レベルで明らかとなっていなかった。本研究課題ではその理由を明らかにすべく、暗条件下で促進する老化表現型が抑制されるようなatg変異体サプレッサーを単離・同定し、その原因遺伝子を特定した。また、植物オートファジーの生理的役割の解明、さらには、暗処理誘導型老化過程の分子機構の解明に向けた研究基盤の確立を試みた。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is the major system responsible for the degradation of organelles and cytosolic macromolecules in the vacuole. So far, I have found that autophagy defective mutants (atg mutants) show dark-induced senescence phenotype. However, the reason why defect of autophagy accelerates the senescence phenotype remains to be elucidated. In this research, I screened suppressors which do not show the accelerated dark-induced senescence phenotype, and isolated 6 independent suppressors. Then, by whole genome sequencings, I identified the putative responsible genes for the suppressors. I also tried to elucidate the physiological functions of plant autophagy under the darkness and further establish research bases for elucidation of molecular mechanisms of dark-induced senescence processes.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：タンパク質分解 老化 細胞死 オートファジー オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

申請者のこれまでの研究から、オートファジーが破綻すると、その植物 (*atg* 変異体) では栄養飢餓・暗条件下に加え、富栄養条件下でさえも老化が促進されることが明らかとなった。申請者は、この自然老化促進の原因は過剰なサリチル酸シグナリングであること、またそのシグナルによってオートファジーが誘導されることを発見した (Yoshimoto et al., *Plant Cell*, 2009)。以上の結果から、植物オートファジーは老齢および病原菌感染時にサリチル酸シグナリングの絶妙なバランスを取るためのネガティブフィードバックループを制御していると結論づけた。

一方で、栄養飢餓や暗処理によって誘導される老化はサリチル酸経路に依存していないことも明らかにしている (Yoshimoto et al., *Plant Cell*, 2009)。なぜオートファジー不能であると栄養飢餓・暗処理誘導型細胞死が誘導されるのであろうか？オートファジーが破綻すると、単に、栄養素のリサイクリングが機能なくなり、栄養不足によって細胞死が促進するとも考えられるが、これまでの私たちのメタボローム解析から、*atg* 変異体ではむしろ遊離アミノ酸が増加していることが明らかとなっている (Masclaux et al., *Plant Cell*, 2014; 未発表データ)。これらの結果は、オートファジーが不能であっても栄養不足に陥っているわけではないことを示すと同時に、何か別の機構の存在を示唆した。“分解”というオートファジーの機能特性から考えると、植物が栄養飢餓・暗条件下に長時間曝されると、細胞死を誘導する何らかの因子“X”が増加してきて、オートファジーが不能であるとその因子が過剰に蓄積することで早期老化が起こるといった図式が推測された。そこで、変異原処理によりその因子に関わる遺伝子に変異が導入されれば早期老化が起こらないサプレッサーがとれるのではないかと考えた。

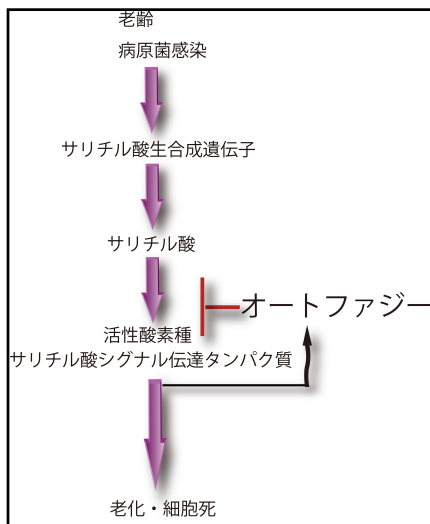


図 1、オートファジーによる

サリチル酸シグナリングの抑制

2. 研究の目的

本研究課題では、これまでの研究成果をもとに、なぜオートファジーの破綻は暗条件下で老化を促進させるのかについて分子レベルで明らかにすることを目的とし、最終的に、植物オートファジーの生理的役割の解明、さらには、暗処理誘導型老化過程の分子機構の解明に向けた研究基盤を確立することを目標とした。

3. 研究の方法

スクロースを含まない MS 培地で 2 週間生育させた植物を 7 日間暗条件下で培養し、再び光条件下に戻して 1 週間後に観察すると、野生型植物は再び濃緑色になり回復するのに対し、オートファジー破綻植物は回復できず枯死してしまう。この表現型を指標に、申請者は既にオートファジー破綻植物のサプレッサー変異体を単離・同定し、その原因遺伝子を特定する。最終的にそれら遺伝子の産物とオートファジーの関係を細胞生物学的、生化学的に解析する。

4. 研究成果

これまでにオートファジー変異体の暗処理誘導型老化促進表現型が回復したサプレッサー (Sup) を 6 独立個体取得し、それらの原因遺伝子の一部を特定した。

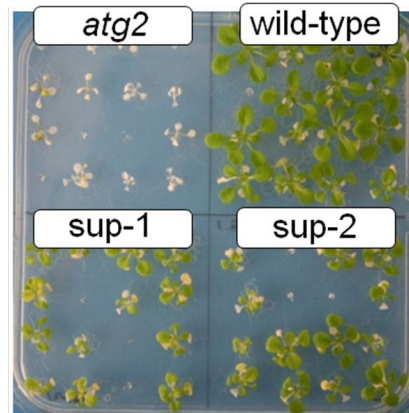


図 2、サプレッサー変異体(代表的な2つ Sup-1, -2)は野生型植物同様、暗処理後も回復する

(1) Sup-73、Sup-66.3 に関して、複数の変異箇所が見つかったため、戻し交配により一ヶ所だけ変異を持つ植物個体を選抜した。現在、分離させた変異体を用いて表現型を精査し、老化表現型を抑制する遺伝子変異の同定を試みている。

(2) 暗処理前と後の切り取り葉を用いてメタボローム解析を行なったところ、Sup-73 では分岐鎖アミノ酸が特異的に減少していることが明らかとなった (未発表)。植物が暗条件下で炭素欠乏に陥った時、デンプンに代わる呼吸基質として分岐鎖アミノ酸の分解物がミトコンドリアの呼吸鎖に電子を供給す

ると提唱されていることから (Araujo et al. *Trends in Plant Sci.*, 2011), Sup-73 では代替ミトコンドリア呼吸経路が活性化されていると推測された。現在、ミトコンドリアの呼吸活性を測定し比較検討を行っている。

(3) Sup-66.3 は植物ホルモンの受容体と思われる遺伝子に変異が導入されていたことから、それら植物ホルモンによってオートファジーが誘導されるのか調査したが、今のところポジティブなデータは得られていない。

(4) Sup-161 はミトコンドリアに局在するタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域に変異を持つことが分かった。現在、その遺伝子の過剰発現植物およびノックアウト植物を作成、取得しつつある。今後はそれら植物の老化表現型を精査することで、暗処理誘導型老化過程の制御機構の解明に新たな手掛かりを与えられると期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- [1] Di Berardino J, Marmagne A, Berger A, **Yoshimoto K**, Cueff G, Chardon F, Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Autophagy Controls Resource Allocations and Protein Storage Accumulation in Arabidopsis Seeds. *J. Exp. Bot.* 査読有, 69, 2018, 1403-1414

〔学会発表〕(計 10 件)

- [1] **吉本光希**, 「植物ペクソファジー: 器官特異的な植物ペルオキシソーム分解によるオルガネラ品質管理機構」, 第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム, 2016 年 11 月 30 ~ 12 月 2 日, パシフィコ横浜, 横浜
- [2] **吉本光希**, 「アンモニウムストレスは 2 つのオートファジー過程に真逆の影響を与える」, 日本植物学会第 81 回大会シンポジウム, 2017 年 9 月 8 日 ~ 10 日, 東京理科大, 野田
- [3] **Yoshimoto K**, 「Physiological meaning of plant autophagy in response to environmental stresses」, Bilateral Closure Symposium of GDRI Integrative Plant Biology Network Program "The developing plant in its environment", 23-25 Oct., 2017, Lyon, France
- [4] **吉本光希**, 「植物ミクロオートファジー ~ 液胞内分解系のバックアップシステムとして ~」, 日本農芸化学会 2018 年度大会シンポジウム, 2018 年 3 月 15 日 ~ 18 日, 名城大学, 名古屋
- [5] **吉本光希**, 「セレクトティブオートファジーによる緑葉ペルオキシソームの品質管理」, 第 59 回日本植物生理学会年会シンポジウム, 2018 年 3 月 28 日 ~ 30 日,

札幌コンベンションセンター、札幌

- [6] 篠崎大樹, Ekaterina Merkulova, Loreto Naya, Celine Masclaux-Daubresse, **吉本光希**, 「鉛欠乏応答における植物オートファジーの重要性」, 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年 3 月 28 日 ~ 30 日, 札幌コンベンションセンター、札幌
- [7] 井上和也, Loreto Naya, 佐藤繭子, 豊岡公德, **吉本光希**, 「択的オートファジーによる緑葉ペルオキシソームの分解機構」, 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年 3 月 28 日 ~ 30 日, 札幌コンベンションセンター、札幌
- [8] 高山恵莉菜, **吉本光希**, 川上直人, 「オートファジーは種子の発芽勢に重要である」, 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年 3 月 28 日 ~ 30 日, 札幌コンベンションセンター、札幌
- [9] 桐野巴瑠, **吉本光希**, 新屋良治, 「分子擬態 - 似せて騙す線虫の寄生戦略」, 第 62 回日本応用動物昆虫学会大会, 2018 年 3 月 25 ~ 27 日, 鹿児島大学, 鹿児島
- [10] 桐野巴瑠, **吉本光希**, 新屋良治, 「マツノザイセンチュウ分泌タンパク質の in planta 機能解析」, 第 129 回日本森林学会大会, 2018 年 3 月 26 ~ 29 日, 高知大学, 高知

〔図書〕(計 2 件)

- [1] **吉本光希**, 「植物の老化」植物学の百科事典 (丸善) pp.480-481, 2016 年 6 月 30 日
- [2] **吉本光希**, 「植物のさまざまな局面におけるオートファジーの生理機能」オートファジー ~ 分子メカニズムの理解から病態の解明まで ~ (南山堂) pp.145-155, 2018 年 1 月 1 日

〔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

吉本 光希 (Yoshimoto Kohki)
明治大学・農学部 生命科学科・准教授
研究者番号：40399316

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()