

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18770040

研究課題名 (和文) オートファジー不能植物における細胞死促進因子の同定

研究課題名 (英文) Identification of a cell death inducible factor
in autophagy-defective plants

研究代表者

吉本 光希 (YOSHIMOTO KOKI)

独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：40399316

研究成果の概要：オートファジーは、細胞内タンパク質を液胞に送り込み、分解する現象であり、液胞分解機構の中心的な役割を担っている。申請者は、オートファジー不能植物 (*ATG* 遺伝子破壊株) の表現型解析から、高等植物ではタンパク質のリサイクリング・アミノ酸の供給源としてのオートファジーの生理的役割に加え、細胞死において植物ならではの役割が存在することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	180,000	3,780,000

研究分野：植物分子生物・生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：オートファジー・液胞・オルガネラ・細胞死・老化・タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

オートファジーと呼ばれる細胞の生理機能はすべての真核細胞が普遍的に備えている基本的な細胞内タンパク質分解機構であり、動きを制約されて外部環境に直接さらされる植物において大変重要な役割を果たしていると考えられる。オートファジーの現象が発見されてから約40年間、オートファジー研究は電子顕微鏡観察に依拠した形態学的な観察をもとに解析が進められてきた。しかしながら形態学的解析の限界からそれらは現象論にとどま

り、オートファジーの重要性および分子メカニズムについて深く議論できていなかった。近年、出芽酵母の遺伝学的解析からオートファジーに必須な16個の *ATG* (autophagy-related) 遺伝子群が同定され、それらの遺伝子ホモログが高等植物にも保存されていることが明らかとなった。申請者は、まず最初に、植物にも酵母と同様な機構によるオートファジーがあるかを検証し、二つのユビキチン化に類似した反応系が植物にも存在し、植物オートファジーに必須であることを明らかにした。ま

た、電子顕微鏡観察に依拠しないオートファジーのモニター系を世界に先駆けて確立し、植物においてATGタンパク質に依存したオートファジーが存在することを明確に示した。研究開始当初、植物オートファジーの研究はようやくスタート地点に立ったところだった。

オートファジー不能植物の表現型解析からオートファジー能が欠損すると栄養飢餓条件下で非常に早い時期に老化が促進されること、窒素飢餓条件下で根の伸長が阻害されることが明らかとなった (Yoshimoto et al., Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell*, 16, 2967-2983, 2004) . 加えて、栄養が十分に供給されていてもオートファジー不能植物では自然老化が促進されることも明らかとなった。その後、申請者の研究に追従して、国外の研究者らが他の *atatg* mutantでも老化が促進されることを報告した (Thompson et al., Autophagic nutrient recycling in Arabidopsis directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. 138, 2097-2110, 2005; Xiong et al., AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 42, 535-546, 2005) . さらに、ウイルスに対する抵抗性反応の一つ、過敏感反応細胞死がオートファジーに関連していることを示唆する現象がタバコにおいて偶然にも発見された (Liu et al., Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121, 567-577, 2005) .

2. 研究の目的

オートファジー不能植物の表現型解析から、オートファジーが栄養のリサイクリングに加え、老化・細胞死に何らかの形で関わっていることが示唆された。しかしながら、なぜオートファジーが不能であると上述のような表現型が現れるのかは全く明らかとなっていなかった。したがって、この問題を明らかにすることを目的とした。これにより、植物におけるオートファジーの生理的役割を本当の意味で解明できると考えた。

3. 研究の方法

(1) 富栄養条件下において、オートファジー不能植物の生体内において何が起きているのか？

その手がかりを得るために、野生型植物とオートファジー不能植物において網羅的メタ

ボローム解析および植物ホルモン解析を行い比較した。一次・二次代謝物は gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF/MS) を用いて測定した。植物ホルモンはサリチル酸、ジャスモン酸、ジャスモン酸イソロイシン、ジベレリン (GA₁, GA₄)、オーキシシン、アブシジン酸、サイトカイニン、サイトカイニン誘導体 (trans-zeatin, tZ; dihydrozeatin, DHZ; isopentenyladenine, iP; trans-zeatin riboside, tZR; isopentenyl adenosine, iPR) について liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) を用いて測定した。

(2) 富栄養条件下において、オートファジー不能植物の生体内において分子レベルで何が起きているのか？

この問題を明らかにするために発現解析を行った。オートファジー不能植物の表現型解析から、特に老化あるいは病原体抵抗性反応に関わる遺伝子について着目し、semi quantitative RT-PCR を行った。遺伝子は、老化に関わる SAG12, 病害抵抗性に関わる PR1, PR2, PDF1.2, VSP2, PAL1 を用いた。また、内部標準コントロールとして 18S rRNA を用いた。

(3) 富栄養条件下において、オートファジー不能植物の生体内において細胞レベルで何が起きているのか？

この点を明らかにするために過酸化水素を染色する試薬、3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) を用いて染色を行った。

(4) 種々のホルモン生合成あるいはシグナリングに関わる突然変異体とオートファジー不能植物とを掛合わせ、二重変異体を作製し、老化促進表現型に対する寄与の程度および上下関係を調べた。ここでは、サリチル酸をカテコールに代謝するバクテリア由来のサリチル酸水酸化酵素遺伝子 NahG を過剰発現させた植物、サリチル酸関連変異体 *sid2*, *npr1*, ジャスモンサン関連変異体, *jar1*, *coil*, エチレン関連変異体 *ein2* を用いた。

(5) オートファジー誘導条件の評価
オートファゴソームのマーカータンパク質である ATG8 の N 末端に green fluorescent protein (GFP) を融合させたタンパク質を発現させた植物を用いて、様々な処理条件下で蛍光顕微鏡観察し、オートファジーが誘導されているかを観察した。

4. 研究成果

(1) オートファジー不能植物はサリチル酸を多く蓄積する。

富栄養条件下で4週間生育させたオートファジー不能植物はまだ老化表現型を示してい

ないが、野生型と比べてサリチル酸の蓄積が多いことが明らかとなった。その他の植物ホルモンについては大きな違いは観察されなかった。この結果をサポートするように、サリチル酸によって発現が誘導される老化関連遺伝子 SAG12 および病原体抵抗性関連遺伝子 PR1, PR2 の転写産物が特にオートファジー不能植物において多く蓄積していた。この時、遊離アミノ酸の内生量は野生型とオートファジー不能植物で大きな違いは見られなかった。この結果は、オートファジー不能植物は栄養飢餓状態に陥っていないことを示唆している。

(2) サリチル酸シグナリングを不活化することでオートファジー不能植物の老化促進表現型は抑制される。

サリチル酸をカテコールに代謝するバクテリア由来のサリチル酸水酸化酵素遺伝子 NahG をオートファジー不能植物に過剰発現させると老化促進表現型は抑制されるが、その抑制は NahG によって代謝されないサリチル酸のアナログ, BTH (benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid) を処理することによって解除されることを確認した。このことは、オートファジー不能植物に老化促進表現型を付与しているのはサリチル酸シグナリングのコンポーネントであるということを示唆していた。この結果をさらに確かめるために、サリチル酸合成・シグナリング系の突然変異体に加え、老化に関与していると言われているその他のホルモン、ジャスモン酸やエチレン経路の突然変異体との二重変異体を作成し、観察したところ、サリチル酸関連の突然変異体だけが老化促進表現型を抑制できることが明らかとなった。一方、暗処理によって誘導される黄化促進表現型はサリチル酸関連の突然変異体でも抑制することはできなかった。

(3) オートファジー不能植物では活性酸素種が多く蓄積している。

DAB 染色の結果、オートファジー不能植物では過酸化水素が増大していることが明らかとなった。これは、老化促進表現型がサリチル酸関連の変異体によって抑制された植物体であっても同様に観察された。

(4) サリチル酸アナログ, BTH の添加によりオートファジーが亢進することも見いだした。

(5) 以上の結果から、植物オートファジーは“サリチル酸シグナリングの減衰”に重要な役割を果たしていることが新たに明らかとなった。植物オートファジーのサリチル酸シグナリングへの関与は未だ報告が無く、植物オートファジー研究に大きなインパクトを与えるに違いない。今後は、オートファジー不能植物のサプレッサー等を単離することによって、さらにその詳細なメカニズムに

迫っていく予定である。

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 9 件)

- ① Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T., and Makino, A.: Autophagy plays a role in chloroplast degradation during leaf senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol.*, 149, 885-893, 2009. 査読有
- ② Shin, J.H., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Jeon, J.S., and An, G.: OsATG10b, an Autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. *Mol. Cells*, 27, 67-74, 2009. 査読有
- ③ Ishida, H., and Yoshimoto, K.: Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy. *Autophagy*, 4, 961-962, 2008. 査読有
- ④ Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M. R., and Mae, T.: Mobilization of Rubisco and stromal-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.*, 148, 142-155, 2008. 査読有
- ⑤ Fujioka, Y., Noda, N. N., Fujii, K., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., and Inagaki, F.: In vitro reconstitution of plant ATG8 and ATG12 conjugation systems essential for plant autophagy. *J. Biol. Chem.*, 283, 1921-1928, 2008. 査読有
- ⑥ Fujiki, Y., Yoshimoto, K., and Ohsumi, Y.: An Arabidopsis homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. *Plant Physiol.*, 143, 1132-1139, 2007. 査読有
- ⑦ Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., and Moriyasu, Y.: AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in Arabidopsis root tip cells. *Plant Cell Physiol.*, 47, 1641-1652, 2006. 査読有
- ⑧ 吉本光希: 高等植物のオートファジー, 顕微鏡, 41, 84-86, (2006). 査読無
- ⑨ 吉本光希: 植物オートファジー研究の新展開:植物の atg 変異体, 蛋白質核酸酵素増刊号 ユビキチン-プロテアソーム系と

オートファジー, 51, 1532- 1536, (2006).
査読無

[学会発表] (計 3 件)

- ① 吉本光希, 大隅良典, 白須賢: 植物オートファジーの新たな生理的役割. 日本植物生理学会年会, 3 月 23 日, 2009, 名古屋.
- ② 吉本光希, 白須賢, 大隅良典: 植物オートファジーと細胞死の制御. シンポジウム 植物の生体防御と細胞死, 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会, 12 月 10 日, 2008, 神戸.
- ③ Yoshimoto, K. Shirasu, K., and Ohsumi, Y.: Plant autophagy negatively regulates senescence by eliminating salicylic acid signaling. Gordon Research Conference, Plant Senescence, June 15-20, 2008, Massachusetts, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 光希 (YOSHIMOTO KOKI)
独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究
チーム・基礎科学特別研究員
研究者番号: 40399316

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: