様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２４年　１月　３０日現在

機関番号：82401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2010～2011
課題番号：22770049
研究課題名（和文）　ユビキチン様オートファジー蛋白質を利用した選択的ペルオキシソーム分解機構の解明
研究課題名（英文）　Elucidation of mechanisms of selective peroxisome degradation using an ubiquitin-like autophagy protein

研究代表者
吉本　光希（Yoshimoto Koki）
独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究グループ・研究員
研究者番号：40399316

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、オートファジー不能植物（*ATG* 遺伝子破壊株）の葉において機能不全となった緑葉ペルオキシソームが高度に蓄積していることを見出し、オートファジーが光合成細胞でのペルオキシソームの品質管理に重要な役割を果たしていることを明らかにした。またその選択的分解機構の解明を試みた。

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. I found that dysfunctional peroxisomes were highly accumulated in leaves of autophagy-defective mutants, indicating that autophagy is involved in quality control of leaf peroxisomes in plants. I also tried to elucidate molecular mechanisms for selective peroxisome degradation in *Arabidopsis*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学
科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学
キーワード：オートファジー・液胞・オルガネラ・ペルオキシソーム・細胞内自己分解・品質管理

１．研究開始当初の背景

生物は細胞内タンパク質・構造体の合成と分解を絶えず行い、それらのバランスを見事にとりながら生命を支えている。従って細胞内タンパク質・構造体の適時適切な分解は生命維持において必要不可欠な機能である。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 *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。申請者はこれまでに、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（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）。このことにより、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言える。

申請者のこれまでの研究から、興味深いことに、オートファジー能欠損植物（*atg* 変異体）では栄養飢餓条件下に加え、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。最近、申請者は、この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., Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and innate immune response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009）。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した。しかしながら、その詳細なメカニズム、つまりオートファジーによって分解されるターゲットは未だに不明であった。

ごく最近、申請者はペルオキシソームにターゲットされる緑色蛍光タンパク質、GFPを発現するシロイヌナズナ形質転換体を用いて、*atg* 変異体におけるペルオキシソームを可視化したところ、野生型に比べ、少なくとも3倍以上ものペルオキシソームが蓄積していることを発見した。一方、ミトコンドリアは野生型に比べ、際だった違いは観察されなかった。これらの結果は、オートファジーによる選択的なペルオキシソームの分解機構の存在を示すと同時に、オートファジーによって分解されるターゲットはペルオキシソームで、その分解の破綻が過剰なサリチル酸シグナリングを生じるという可能性を示唆した。

２．研究の目的

複雑なオートファジーの生理的役割について明らかにするためには、様々な角度からのアプローチが必要であると考えられる。本研究では、その予算規模や期間、研究体制を鑑み、特にペルオキシソームの動態に注目し、ペルオキシソームはオートファジーによって選択的に分解されるのか？、もしそうだった場合、どのようにして特異的に認識されるのか？、その認識機構を明らかにする。また、得られた結果から植物オートファジーの生理的役割の解明、さらには、ペルオキシソームの形成過程・機能転換機構の解明に向けた研究基盤を確立することを目的とした。

３．研究の方法

(1) 申請者のこれまでの観察において、*atg* 変異体は野生型に比べ、ペルオキシソームの数が増大していたが、一方で、ミトコンドリアの数においては変化がなかった。この結果は、ペルオキシソームはオートファジーによって特異的に認識され、分解されていることを示唆している。従来、オートファジーは非選択的な分解だと思われていたが、最近になって、酵母や動物細胞においてオートファゴソーム膜状に局在するATG8タンパク質が特異的な相互作用することにより、ある蛋白質を選択的に認識し、分解する機構があることが報告されている。したがって、本研究ではATG8タンパク質と相互作用する蛋白質を単離・同定した。GFP-ATG8を発現させたトランスジェニック植物を用い、GFP抗体で共免疫沈降してくる蛋白質を高感度質量分析（LC-MS/MS）で同定した。

(2) ペルオキシソームだけがオートファジーによって選択的に分解されるのか？ミトコンドリア以外のオルガネラについてもその数量に変化がないのかを、それぞれのオルガネラにターゲットするGFPを用いた形態学的解析とウエスタンブロットによる生化学的解析により確認した。

(3) オートファゴソームとペルオキシソームの同時イメージング解析をすることにより選択的分解機構に迫った。具体的には、GFP-ATG8（オートファゴソームマーカー）、Per-RFP（ペルオキシソームマーカー）を発現する野生体を作製した。また、GFP-ATG8、Per-RFPを発現する *atg5* 変異体にエストロゲン誘導型プロモーター制御下のATG5を導入し、エストロゲン処理後、オートファゴソームとペルオキシソームの挙動を経時的に観察した。

(4) オートファジーはペルオキシソームを恒常的に分解することで品質管理を行っており、*atg* 変異体では機能不全のペルオキシソームが多く蓄積していることが考えられ

る。ペルオキシソームの品質を調べるためにレドックスセンシティブ GFP (roGFP) をペルオキシソームに局在するようなトランスジェニックを作製し、ペルオキシソーム内のレドックス状態を可視化する系を確立した。

(5) 加えて、オートファジー不能植物では光呼吸能力が低下している可能性が考えられた。*atg* 変異体の光合成機能が維持されているかどうかについて高二酸化炭素条件下で生育状態および蛍光測定によって光合成機能を比較検討した。

４．研究成果

(1) 選択的ペルオキシソーム分解機構の分子メカニズムの手掛かりを得るために、オートファゴソーム膜状に局在する ATG8 タンパク質と相互作用する蛋白質を単離・同定した。まず、GFP-ATG8 を発現させたトランスジェニック植物を用い、ペルオキシソームの機能が重要な生育時期でなおかつオートファジーが活発な生育ステージを検討した。様々な異なる生育ステージでオートファゴソームの出現頻度を蛍光顕微鏡下で比較・検討し、その中で最もオートファジーの活性が高いと思われる生育ステージの植物体を用いて GFP 抗体で共免疫沈降を行なった。サンプルを SDS-PAGE して銀染色したところ、コントロールには見られないバンドが多数検出され、ATG8 結合タンパク質候補がいくつか見つかった。それらを高感度質量分析 (LC-MS/MS) で同定した。今後は、それら候補タンパク質が本当に ATG8 タンパク質と相互作用するのか、また、オートファゴソームと共局在するのかなど詳細に調べることで選択的分解機構に迫ってゆく。

(2) ペルオキシソーム以外のオルガネラの数とそのタンパク質量を野生型植物とオートファジー不能植物で比較した。ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、葉緑体の代表的なタンパク質の抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。その結果、オートファジー不能植物において、ペルオキシソームタンパク質は増大していたが、その他のオルガネラのタンパク質は野生型植物と比べほとんど変化がなかった。このときペルオキシソームタンパク質の遺伝子の発現は野生型と比べ変動が見られなかった。以上の結果は、オートファジーはペルオキシソームを特異的に認識し、分解しているということを示唆している。また、ペルオキシソームの増大は特に葉において観察され、根では顕著でなかったことから光合成細胞における緑葉ペルオキシソームが増大していると考えられた。さらに、それぞれのオルガネラにターゲットする GFP を発現させたオートファジー不能植物を作製した。今後は蛍光顕微鏡下でオートファジー不能植物における各オルガネラの挙動を精査する。

(3) ケミカル誘導プロモーターを用いた *ATG* 遺伝子相補植物体を作製し、エストラジオールでオートファジーを誘導後、ペルオキシソームの挙動を精査したところ、ペルオキシソームは液胞に運ばれ、分解されることが明らかとなった。この結果は、オートファジーがペルオキシソームを液胞に輸送し、分解していることを示している。

(4) 電子顕微鏡による微細構造の観察を行い､オートファジー不能植物において蓄積したペルオキシソームには電子密度の高い領域が存在し､そこにはカタラーゼが蓄積していることを発見した。さらに、ペルオキシソーム内のレドックス状態を可視化する系を確立し、野生型植物のペルオキシソームの内部は通常還元状態であるが、オートファジー不能植物のペルオキシソームは比較的酸化状態にあることを明らかにした。

(5) 高二酸化炭素条件下でオートファジー不能植物の表現型が部分的に抑制されることを見出した。

以上の結果から、植物オートファジーは″緑葉ペルオキシソームの品質管理″に重要な役割を果たしていると提唱する。この研究により植物オートファジーの新たな役割が明らかとなり、本分野に大きなインパクトを与えるに違いない。

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５件)

① Yoshimoto, K.: Physiological roles of autophagy in plants: Does plant autophagy have a pro-death function? *Plant Signaling & Behavior*, 5, 494-496, 2010. 査読有

② Yoshimoto, K., Takano, Y., and Sakai, Y.: Autophagy in plants and phytopathogens. *FEBS Let.*, 584, 1350-1358, 2010. 査読有

③ van Doorn, W. G., and Yoshimoto, K.: Role of chloroplasts and other plastids in ageing and death of plants and animals: A tale of Vishnu and Shiva. *Aging Res Rev.*, 9, 117-130, 2010. 査読有

④ Kwon, S. I., Cho, H. J., Jung, J. H., Yoshimoto, K., Shirasu, K., and Park, O.: The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 64, 151-164, 2010. 査読有

⑤ 吉本光希: 植物におけるオートファジー研究の展開,植物の生長調節, 45,24-32,(2010). 査読無

〔学会発表〕(計6件)

① 吉本光希: 日本植物生理学会奨励賞: 植物における細胞内自己分解システム・オートファジーの分子機構とその生理機能に関する研究.日本植物生理学会年会, 3月17日, 2012, 京都.
② 吉本光希, 大隅良典, 白須賢: 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.日本植物学会年会,9月17日, 2011, 東京.
③ 吉本光希, 大隅良典, 白須賢: 植物オートファジーによる細胞死の制御. 日本植物生理学会年会,3月22日, 2011, 仙台.
④ 吉本光希, 大隅良典, 白須賢: 老化・病原菌感染時における植物オートファジーの役割. 日本植物学会年会, 9月10日, 2010, 春日井.
⑤ Yoshimoto, K.: Plant autophagy negatively regulates cell death by controlling salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response. 21st International Conference on Arabidopsis Research, June 7th, 2010, Yokohama, Japan.
⑥ 吉本光希, 大隅良典, 白須賢: オートファジー能欠損シロイヌナズナにおけるプログラム細胞死の原因は過剰なサリチル酸シグナリングである. 日本植物病理学会年会,4月20日, 2010, 京都.

〔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
吉本　光希 (Yoshimoto Koki)
独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究グループ・研究員
研究者番号:40399316

(2)研究分担者

(3)連携研究者