

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 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780054

研究課題名（和文）老化葉における 2 つの異なるオートファジー経路を介した葉緑体分解の制御機構

研究課題名（英文）Mechanisms of chloroplast degradation by two-different autophagic pathways in senescent leaves

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では老化葉で起こる葉緑体のオートファジーによる分解について、膜動態と関連する遺伝子について解析した。得られた結果は、(1) 葉緑体は、RCB 小胞とは異なり、液胞膜の陥入によって液胞内に取り込まれること、(2) 葉緑体オートファジーにはオートファジー関連遺伝子（ATG）4 に加えて ATG2, 5, 7, 10 が関与していること、が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

I studied membrane dynamics and related genes among chloroplast autophagy that occurs in senescent leaves. Results suggested that (i) unlike RCBs, chloroplasts are transferred into the vacuolar lumen by invagination of tonoplasts; (ii) in addition to ATG4, ATG2, 5, 7, and 10 are required for the chloroplast autophagy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード：老化、植物、オートファジー、葉緑体

1. 研究開始当初の背景

葉緑体には葉の全窒素の実に 75-80% が分配され、その大部分がタンパク質として主に光合成機能を担っている。葉緑体は葉の形成・展開に伴い盛んに分裂・伸長を繰り返す、細胞あたりの数・サイズを増加させていく。葉の展開が止まり老化過程に入ると、その分裂・伸長は停止し、細胞あたりの葉緑体の数・サイズは徐々に減少していく。この間、CO₂ 固定酵素、Rubisco に代表される葉緑体タンパク質は分解され、それらを構成していた

窒素は生長部位へ転流し再利用され、最終的には子実に蓄えられ次世代へと引き継がれる。また炭素骨格は呼吸基質として再利用される。植物にとって葉緑体及びその構成成分の分解は、土壌に不足しがちな窒素を体内でリサイクルし、生長の恒常性や環境応答性を確保するという生理的意義がある。しかし、葉緑体機能の衰退は必然的に光合成能力の低下、ひいては乾物生産、子実収量の減少につながる。したがって葉の老化に伴う葉緑体の消長メカニズムを明らかにすることは、植

物の基礎生理の探求から生産性向上を目指す応用研究の展開まで、極めて重要な意味を持つ。研究代表者らは、葉緑体の一部分が本体から切り離され、内容タンパク質が小胞 RCB (Rubisco-containing body) として、オートファジーの機構により中心液胞に輸送・分解される経路 (RCB 経路) の存在を明らかにした。オートファジーは真核生物が普遍的に持つ細胞内のバルクなタンパク質分解を担う経路である。さらに、オートファジー能を欠損する変異体植物では、野生体で見られる葉の老化時の葉緑体数・サイズの減少が抑制されること、野生体では老化が進むと RCB 小胞に加えて縮小した葉緑体本体も液胞に移行することを明らかにした。以上から、葉緑体の液胞への輸送・分解経路には、小胞 RCB を介した部分的なもの、縮小した葉緑体全体が消失する2つの経路が存在し、それぞれの経路が葉緑体のサイズと細胞あたりの数の減少を引き起こす主要因になっていることが示唆されていた。

2. 研究の目的

オートファジーにはマクロオートファジーとマイクロオートファジーと呼ばれる2つの膜動態が大きく異なる様式の存在が知られている。マクロオートファジーでは輸送・分解基質となる細胞質成分が2重膜構造体、オートファゴソームにより取り囲まれた後、オートファゴソームの外膜が液胞膜と融合し、内膜に包まれた内容物が液胞内腔に放出される。一方、マイクロオートファジーでは液胞膜が伸長や陥入により直接基質を取り囲み内腔へと輸送する。意外にも酵母におけるこれら2つの経路に必要な遺伝子 ATG 群は酵母では大部分が重複していることが知られる。葉緑体のオートファジーに関しては、これまでの研究から、RCB 小胞はオートファゴソームを介したマクロオートファジーにより液胞に輸送されることが明らかとなった。しかし、葉緑体本体については膜動態や進行に必要な遺伝子群など基本的なメカニズムが全く不明のままである。そこで本研究では、葉緑体本体のオートファジーに焦点を絞り、

(1) 液胞内腔に至るまでの輸送形態 (膜動態)、(2) 輸送に必要な遺伝子群について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、本研究では主に以下の2項目を中心に解析を進めた。

(1) 葉緑体の液胞への移行様式の解析
葉緑体本体がマクロオートファジーとマイクロオートファジーのどちらの様式で液胞に取り込まれているかについて、ライブセル蛍光イメージングを中心に解析した。オートファゴソームのマーカースとして GFP-ATG8、

液胞膜のマーカースとして GFP- γ TIP を用いた。さらにそれらの2重蛍光観察を行うため RFP-ATG8 及び RFP- γ TIP の発現コンストラクトや形質転換体の作成を進めた。

(2) 葉緑体本体のオートファジーに必要な遺伝子群の特定

これまでに酵母とシロイヌナズナでのゲノム配列の比較から、マクロオートファジーに必要な遺伝子 ATG 群 32 種のうち、16 種について植物ホモログ遺伝子 AtATG 群が同定されている。これらの遺伝子を欠損する変異体における葉緑体数の減少をモニターすることで、葉緑体オートファジーに必要な AtATG 遺伝子群を特定することを試みた。

4. 研究成果

(1) ライブセル蛍光イメージングによる葉緑体の液胞への移行様式の解析

GFP-ATG8 及び GFP- γ TIP を用いて膜動態の観察を重ねた結果、RCB 小胞とは異なり、葉緑体本体は、液胞膜の陥入、すなわちマイクロオートファジーの様式で液胞内部に取り込まれていることが強く示唆された。この膜動態についてさらに検証するため液胞膜とオートファゴソーム膜を同時に蛍光で可視化する形質転換体を用いて明らかにすることを試みた。具体的には、GFP-ATG8 と RFP- γ -TIP を共発現する形質転換体の作出と選抜を進めたが、共発現体において葉緑体の液胞への移行を明確にとらえるまでには至らなかった。

(2) 葉緑体本体のオートファジーに必要な遺伝子群の特定

各種の ATG を欠損する T-DNA 挿入変異体を用いて、変異体の葉の老化過程における葉緑体数の減少をモニターした。その結果、これまでに明らかにされていた ATG4 に加え、ATG2, 5, 7, 10 についても葉緑体本体のオートファジーに関与していることが示唆された。

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2件)

1. Izumi, M., Ishida, H. The changes of leaf carbohydrate contents as a regulator of autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies during leaf senescence. *Plant Signal Behav.* 6: 685-687 (2011) 査読有
2. Izumi, M., Wada, S., Makino, A., Ishida, H. The autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies is

specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 154: 1196-1209 (2010) 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. 泉正範、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナ葉の炭素制限環境における RCB/オートファジー系の生理的意義について、日本植物生理学会、2012年3月16日、京都産業大学(京都市)
2. 石田宏幸、吉本光希、和田信也、泉正範、小野祐樹、牧野周、葉の老化と葉緑体のオートファジー、日本植物細胞分子生物学会、2011年9月6日、九州大学(福岡市)
3. 石田宏幸、オートファジーによる葉緑体タンパク質の分解、日本植物生理学会、2011年3月22日、東北大学(仙台市)
4. 泉正範、角田穂奈美、鈴木雄二、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナにおける RBCS1A および 3B の変異が葉の Rubisco 量に与える影響の解析、日本植物生理学会、2011年3月22日、東北大学(仙台市)
5. 泉正範、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナにおける Rubisco-containing body (RCB) 形成の栄養要因に対する応答の解析、日本土壌肥料学会、2010年9月7日、北海道(札幌市)
6. Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Hanson, M.R., Makino, A. A possible role for plastid stromules in the autophagic transfer of stromal proteins to the vacuole. Gordon Research conference 'Mitochondria and Chloroplasts', 2010年7月11日、バルガ、イタリア
7. Izumi, M., Makino, A., Ishida, H. The autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in Arabidopsis. Gordon Research conference 'Mitochondria and Chloroplasts', 2010年7月11日、バルガ、イタリア
8. Wada, S., Ishida, H., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Makino, A. The impact of autophagic degradation in chloroplasts and other organelles during leaf senescence of Arabidopsis. Gordon Research conference 'Mitochondria and Chloroplasts', 2010年7月11日、バルガ、イタリア

9. Izumi M., Makino A., Ishida H. A key factor for the autophagy of chloroplasts; the production of Rubisco-containing bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in Arabidopsis. The 21st International Conference on Arabidopsis Research, 2010年6月6日、横浜市

〔図書〕(計2件)

1. Ishida, H., Suzuki, Y., Makino A. Rubisco turnover and nitrogen in a leaf. *Nitrogen assimilation in plants*, Ohyama, T. and Sueyoshi, K. Eds., Chapter 19, pp. 277-285. Research Sinpost, Kerala, India. (2010)
2. Irving, L.J., Suzuki, Y., Ishida, H., Makino, A. Protein turnover in grass leaves. *Advances in Botanical Research*, Vol. 54, pp. 139-182, Kader, J.C. and Delseny, M. Eds., Elsevier, Amsterdam, Netherlands. (2010)

〔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
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
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：