

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570222

研究課題名(和文)植物細胞に特有の液胞の形成・拡大とそれらに伴うオートファジーの解析

研究課題名(英文)Autophagic processes involved in the formation and enlargement of plant vacuoles

研究代表者

森安 裕二 (MORIYASU, Yuji)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：20200454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：液胞形成とオートファジー経路の関係を調べた。シロイヌナズナにおいて、マクロオートファジー経路が既存の液胞の拡大化に寄与していることを明らかにした。一方で、タバコ培養細胞から調製したプロトプラストから液胞を取り除くと液胞が再形成されるが、その過程は、マクロオートファジーとは別のオートファジー経路によって細胞質が分解されることによって形成されることを示した。シロイヌナズナ根の先端部の細胞では、マクロオートファジー経路とは別のオートファジー経路が実際に起こっていた。

研究成果の概要(英文)：We have examined relationship between the formation and enlargement of plant vacuole and autophagic processes. We have shown that the macroautophagy pathway contributes to the enlargement of pre-existing vacuoles in Arabidopsis root cells. On the other hand, the precursor structure of the central vacuole seems to be formed through an autophagic process that is different from conventional macroautophagy. We have revealed that such a novel autophagic process play a role in the generation of vacuoles in miniprotoplasts, in which the central vacuole has been removed.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：オートファジー 液胞形成 リソソーム 細胞成長

1. 研究開始当初の背景

一般に、植物の細胞は動物の細胞よりも大きい。これは、植物細胞が液胞というオルガネラを発達させ、細胞の充填材として利用していることに因ると考えられる。酵母細胞にも液胞は存在するが、酵母の液胞は細胞体積の約2割であり、液胞が細胞体積の9割以上を占める植物細胞とは状況が大きく異なる。液胞内のタンパク質濃度は細胞質基質の約1/100と低いため、液胞を用いた細胞成長は植物にとって経済的である。植物は、液胞を発達させ細胞を大きくすることで、個体としても大きく成長し、より広い生存エリアを獲得するという成長戦略をとってきたと考えられる。これは動物や菌類にはない植物の特徴の一つである。

植物細胞における液胞の形成とその拡大のメカニズムに関しては、十分に理解されていないが、オートファジーと呼ばれる細胞質分解経路を通して液胞が形成されると考えられている。

オートファジーの中で主要な経路であるマクロオートファジーは、酵母を用いた研究でその経路が特定され、その進行に必須な遺伝子(ATG遺伝子)が同定されている。マクロオートファジーではまず、細胞質の一部が新規の膜構造によって隔離されオートファゴソームというオルガネラが形成される。その後、オートファゴソームがリソソーム(または液胞)と融合することでプロテアーゼなどの加水分解酵素を獲得してオートリソソームへと変換し、オートリソソーム(または液胞)内で細胞質が分解される。

私はこれまでに、植物のオートファジーのメカニズムとその生理的意義を調べてきた。その中で、オートファジーが液胞の形成とその拡大と密接に関連していることを示す以下の3つの結果を得た。

(1)タバコ細胞から液胞を取り除いた細胞モデル(ミニプロトプラスト)を作製できる。このミニプロトプラストを培養すると液胞が再形成された。この時、プロテアーゼ阻害剤で処理すると、形成された液胞内に細胞質未分解物が蓄積した。また、この未分解物の蓄積はマクロオートファジーの阻害剤3-メチルアデニン(3-MA)では阻害されなかった(Yano et al. 2007a)。この結果は、ミニプロトプラストで起こる液胞形成は細胞質の分解を伴っており、この細胞質分解はマクロオートファジーによるものではないことを示している。

(2)植物の根では液胞の形成・拡大が恒常的に起こっており、オートファジーも恒常的に起こっていた(Moriyasu et al. 2003, Inoue et al. 2006, Yano et al. 2007b)。

ただ、(1)(2)の結果は、以下の不明な点を残

していた。

(1)については、3-MAがミニプロトプラスト内のマクロオートファジーを阻害しているという証明が不完全である。

(2)については、オートファジーと液胞の形成・拡大との間の平行関係は示されたが、両者の因果関係が証明されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、液胞の形成(新規に液胞が作られること)と液胞の拡大(既存の液胞が大きくなること)を区別して解析し、以下の3点を明らかにすることを目的とする。

(1)マクロオートファジーが完全に阻害されているにも関わらず、液胞はオートファジーに伴って形成されることを明らかにする。すなわち、液胞は新奇のオートファジーに伴って形成されることを証明する。さらに、液胞がどのオルガネラからどのように作られるかを明らかにする。

(2)ATG遺伝子破壊株が利用できるシロイヌナズナの根を用いて、マクロオートファジーが欠損すると液胞の拡大化が遅延することを示し、マクロオートファジーが液胞拡大の原因になっていることを証明する。

3. 研究の方法

(1)ミニプロトプラスト培養中に起こる液胞形成過程とマクロオートファジーを蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で解析した。

GFP-Atg8タンパク質の恒常的発現によりオートファゴソームを可視化したタバコ細胞よりミニプロトプラストを調製し、3-MA処理によりオートファゴソーム形成が阻害されるかどうかを調べた。また、E-64存在下では、形成される液胞に細胞質の残骸が蓄積するが、この蓄積に3-MAは影響を与えないことを確認した。さらに、液胞形成過程を電子顕微鏡で解析した。

液胞型H⁺-ATPase阻害剤コンカナマイシンで処理して形成途中の液胞のpHを上げ、加水分解を阻害した場合にどのようなことが起こるかを調べた。

(2)①シロイヌナズナ野生株・オートファジー欠損株(*atg5*株)の根の断片を培養して液胞の形成・拡大や根の成長を測定・比較した。

シロイヌナズナ *atg5* 株の芽生えより根先端を切り出して培養し、その成長を野生株と詳しく比較した。根の細胞の大きさを顕微鏡下で測定し、オートファジー欠損により根の細胞が小さくなることを確認した。

(2)②シロイヌナズナ根における液胞形成・拡大過程を電子顕微鏡で詳しく観察した。

4. 研究成果

(1)タバコ BY-2 細胞より調製したミニプロトプラスト（液胞が脱落させてプロトプラスト）を培養すると液胞が再形成される。電子顕微鏡で観察すると形成される液胞内には細胞質の未分解物と考えられる構造が見られた。膜透過性システインプロテアーゼ阻害剤 E-64d で処理して液胞内でのタンパク質分解を阻害すると、液胞膜で囲まれた液胞の形成それ自体は阻害されなかったが形成される液胞内には細胞質の未分解物の蓄積がさらに増加した。さらに、液胞型 H⁺-ATPase を阻害することにより形成される液胞の酸性化を阻害し結果として液胞内の加水分解酵素の活性を低下させるコンカナマイシンで処理すると、形成される液胞内には、細胞質ゾルと同様な構造が満たされていた。このような E-64d やコンカナマイシンの効果に対して従来用いられてきたオートファジー阻害剤 3-MA は影響を与えなかった。オートファゴソームのマーカータンパク質である GFP-Atg8 融合タンパク質を恒常的に発現する BY-2 細胞より調製したミニプロトプラストでも液胞形成は同様に起こった。この過程では、GFP-Atg8 タンパク質が局在するオートファゴソームが観察され、栄養飢餓状態に置くとその数は増加した。ミニプロトプラスト内で起こるオートファゴソームの形成は 3-MA によってほぼ完全に阻害された。以上の結果は、ミニプロトプラスト内においては液胞は従来のオートファジーとはことなるオートファジーによって形成されることを示している。

(2)シロイヌナズナの野生株(WT)と *ATG5* 遺伝子が破壊された *atg5-1* 株、*atg5-2* 株の芽生えより根端 5 mm を切り取り、3%ショ糖を含む 1/2MS 培地で 23°C、1 日間培養した。WT の根は 2.9 mm 伸びたのに対し、*atg5-1* が 2.0 mm、*atg5-2* が 2.1 mm しか伸びず、WT と *atg5* 株の間には統計学的に有意な差があった。培養 1 日後の根断片の細胞を明視野顕微鏡で観察すると、*atg5* 株は WT に比べて、根端から約 400 μm 以降の表皮細胞が小さく、細胞の最大長も短かった。明視野観察では根端から 400 μm 以内の表皮細胞は観察が難しかったので、ヨウ化プロピジウムで細胞壁を蛍光染色して根冠に隠れた細胞も観察した。すると根端から 100-300 μm の伸長領域の表皮細胞においても *atg5* 株は WT より細胞が小さく、細胞伸長が遅いことが分かった。さらに、ショ糖を含まない培地で培養するとオートファジーはさらに活性化し、ショ糖を含む培地で培養したときよりも WT と *atg5* 株で細胞の大きさの差がより開いた。以上の結果はオートファジーが根の細胞伸長に寄与することを示している。

エンドサイトーシスを介して液胞膜を染める FM4-64 で根断片の液胞を観察すると、根端から 200 μm 以内の細胞は液胞が未発達だったが、*atg5* 株の細胞では WT よりもさらに小さい液胞が多かった。しかし、根端から約 200 μm 以降の液胞が発達した細胞では液胞の大きさに違いが見られなかった。シロイヌナズナの胚軸から誘導した培養細胞においても、WT よりも *atg5* 株で小さい液胞が多く存在した。これらの結果は、細胞伸長初期の液胞が大きくなる過程にオートファジーが寄与することを示唆している。

FM4-64 で根断片を染色すると、WT では液胞膜が染まるのと同時に液胞内に FM4-64 が顆粒状になって蓄積した。これに対して *atg5* 株では液胞膜のみが染まった。この結果は、液胞が直接陥入することで液胞膜や細胞質を液胞内に取り込むマイクロオートファジーという通常とは別のオートファジー経路が WT に存在し、この経路に Atg5 タンパク質が関与していることを示唆している。興味深いことに、WT の細胞では染色 18 時間後に液胞膜が再び染色された。これは、液胞内に顆粒状に蓄積した膜成分が液胞膜に戻る可能性を示唆している。

以上の結果は、液胞の形成を介して細胞伸長に寄与するというオートファジーの新しい機能を示しており、Atg5 タンパク質が通常のオートファジー経路に加えて、マイクロオートファジーと呼ばれる別のオートファジー経路に必要であることを示唆している。

マクロオートファジーに必須であると考えられている *ATG5* 遺伝子が破壊されたシロイヌナズナ *atg5* 株と野生株の芽生えの根端部分の細胞を電子顕微鏡で比較観察した。マクロオートファジー経路で特徴的な構造である isolation membrane やオートファゴソームと類似の構造が野生株や *atg5* 株の分裂組織付近の細胞に同様に観察された。

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 3 件)

① Klionsky, D.J., -----, Moriyasu, Y., -----, Zuckerbraun, B. (2012) [査読有]
Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes.
Autophagy 8: 445-544.

② Oh-ye, Y., Inoue, Y., Moriyasu, Y. (2011) [査読有]
Detecting autophagy in Arabidopsis roots by membrane-permeable cysteine protease inhibitor

E-64d and endocytosis tracer FM4-64.
Plant Signaling and Behavior 6: 1-4.

③ Takatsuka, C., Inoue, Y., Higuchi, T., Hillmer, S., Robinson, D.G., Moriyasu, Y. (2011) [査読有]

Autophagy in tobacco BY-2 cells cultured under sucrose starvation conditions: Isolation of the autolysosome and its characterization.
Plant and Cell Physiology 52: 2074-2087.

[学会発表] (計 20 件)

① 迎恭輔、井上悠子、森安裕二 (2013, 9/13-9/15)

ヒメツリガネゴケ乾燥耐性能の制御にオートファジーが関与する
日本植物学会第 77 回大会 (北海道大札幌キャンパス、札幌)

② 佐藤麻衣、迎恭輔、高橋勝利、井上悠子、森安裕二 (2013, 9/13-9/15)

ヒメツリガネゴケを用いた暗条件下で誘導される老化機構の解析
日本植物学会第 77 回大会 (北海道大札幌キャンパス、札幌)

③ 佐藤友哉、児玉豊、石崎公庸、河内孝之、井上悠子、森安裕二 (2013, 9/13-9/15)

ゼニゴケ葉状体における暗誘導老化
日本植物学会第 77 回大会 (北海道大札幌キャンパス、札幌)

④ 樋口智哉、高松宇咲、井上悠子、森安裕二 (2013, 9/13-9/15)

タバコ培養細胞 BY-2 における栄養飢餓にตอบสนองした液胞膜動態とオルガネラ分解
日本植物学会第 77 回大会 (北海道大札幌キャンパス、札幌)

⑤ 鹿山友里紗、井上悠子、森安裕二 (2013, 9/13-9/15)

BY-2 ミニプロトプラストを用いた液胞形成メカニズムの解析
日本植物学会第 77 回大会 (北海道大札幌キャンパス、札幌)

⑥ Inoue, Y., Moriyasu, Y. (2013, 8/25-8/30)
The pathway of autophagy in tobacco BY-2 cells.
10th International Congress of Plant Pathology (Beijing, China)

⑦ Watanabe, Y., Oh-ye, Y., Kaneko, Y., Inoue, Y., Moriyasu, Y. (2013, 3/21-3/23)

An autophagic process involved in the genesis of vacuoles in Arabidopsis root cells.
第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山大津島キャンパス、岡山)

⑧ Moriyasu, Y. (2012, 10/21-10/26)
Autophagy pathways in tobacco BY-2 cells and

their roles.

10th International Congress on Plant Molecular Biology (Jeju Island, Korea)

⑨ Nagamine, M., Hiratsuka, N., Inoue, Y., Moriyasu, Y. (2012, 10/21-10/26)

Formation and degradation of oil body in cultured tobacco cells.
10th International Congress on Plant Molecular Biology (Jeju Island, Korea)

⑩ Oh-ye, Y., Moriyasu, Y. (2012, 10/21-10/26)
Contribution of autophagy to vacuole expansion and cell elongation in the roots of Arabidopsis thaliana.

10th International Congress on Plant Molecular Biology (Jeju Island, Korea)

⑪ 高塚千広、森安裕二(2012, 9/15-9/17)

タバコ培養細胞におけるショ糖飢餓にตอบสนองした 2 種類のオートファジーの解析
日本植物学会第 76 回大会 (兵庫県立大姫路書写キャンパス、姫路)

⑫ 樋口智哉、森安裕二(2012, 9/15-9/17)

タバコ培養細胞におけるオートファジー経路の解析
日本植物学会第 76 回大会 (兵庫県立大姫路書写キャンパス、姫路)

⑬ 佐藤麻衣、田野智也、野村翔平、森安裕二 (2012, 9/15-9/17)

ヒメツリガネゴケを用いた環境にตอบสนองして誘導される細胞死の解析
日本植物学会第 76 回大会 (兵庫県立大姫路書写キャンパス、姫路)

⑭ 高木宣広、岩崎良輔、森安裕二 (2012, 9/15-9/17)

炭素飢餓に陥ったタバコ培養細胞 BY-2 で起こる RNA 分解
日本植物学会第 76 回大会 (兵庫県立大姫路書写キャンパス、姫路)

⑮ Takatuka, C., Moriyasu, Y. (2012, 3/19-3/21)

Two types of autophagy in tobacco BY-2 cells under sucrose starvation conditions.
The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing (Todaiji Culture Center, Nara, Japan)

⑯ Sato, M., Tano, T., Takezawa, D., Moriyasu, Y. (2012, 3/19-3/21)

Dark-induced senescence in Physcomitrella patens.
The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing (Todaiji Culture Center, Nara, Japan)

⑰ Higuchi, T., Takatsuka, C., Tokunaga, M.,

Kaneko, Y., Moriyasu, Y. (2012, 3/19-3/21)
Autophagy in tobacco BY-2 cells: interaction of
autophagosomes with the central vacuole.
The 1st International Symposium on Plant
Environmental Sensing (Todaiji Culture Center,
Nara, Japan)

⑱ Kaneko, Y., Tokunaga, M., Moriyasu, Y.
(2012, 3/19-3/21)
Elemental analysis on rapidly frozen plant cells
in low-vacuum cryo SEM.
The 1st International Symposium on Plant
Environmental Sensing (Todaiji Culture Center,
Nara, Japan)

⑲ 長嶺麻里、平塚直樹、森安裕二 (2011,
9/19-9/20)
タバコ培養細胞におけるオイルボディー分
解機構の解明
第24回植物脂質シンポジウム（東京大駒場
キャンパス、東京）

⑳ 大塚由布実 (2011, 9/17-9/19)
シロイヌナズナの根の細胞における液胞形
成、細胞伸長とオートファジーの関連につ
いて
日本植物学会第75回大会年会（東京大駒場
キャンパス、東京）

〔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

森安裕二 (MORIYASU, Yuji)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号：20200454

(2)研究分担者

金子康子 (KANEKO, Yasuko)
埼玉大学・教育学部・教授
研究者番号：30194921

(3)連携研究者

()

研究者番号：