

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660286

研究課題名(和文)植物にATG5/ATG7非依存性のオートファジー経路は存在するか？

研究課題名(英文) Does the plant have an ATG 5- or ATG 7- independent autophagy pathway?

研究代表者

石田 宏幸 (Ishida, Hiroyuki)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60312625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：酵母で同定されたオートファジーに必須のコアATG遺伝子群は植物を含めた真核生物全般で保存されている。しかし、コアATGを欠損するシロイヌナズナ変異体は生活環を完結することから、従来型とは異なる新奇オートファジー経路の存在が示唆される。本研究では、シロイヌナズナにおけるATG非依存性の新奇オートファジー経路の存在について検証した。そしてATG5あるいはATG7を欠損する変異体においても葉の老化時にオートファジーで分解されることが知られる葉緑体の細胞あたりの数やサイズが減少することが確認された。また植物におけるATG非依存性のオートファジーの新奇の可視化方法について検討した。

研究成果の概要(英文)：The core ATG genes which are essential for autophagy in yeast is conserved in all eukaryotic organisms including plants. However, since Arabidopsis mutants which lack core ATG complete their life cycle, the existence of novel autophagy pathways which are different from the conventional-type autophagy. In this study, we examined the existence of ATG-independent novel autophagy pathway in Arabidopsis. We found that the number and size of chloroplasts per cell, which is known to be degraded by autophagy during leaf senescence, decreased in atg5 or atg7 mutants. We also tried to establish novel visualization methods for ATG-independent autophagy pathways in Arabidopsis.

研究分野：植物栄養生理学

キーワード：オートファジー 葉緑体 老化 ATG遺伝子

1. 研究開始当初の背景

独立栄養生物である植物にとって、必須栄養素やエネルギーの体内リサイクルは過酷な環境下での生存戦略の一つとして極めて重要な意味を持つ。これらのリサイクル機構には、オートファジーが、重要な役割を担っていることが明らかになった。オートファジーとは液胞（動物ではリソソーム）を分解の場とするタンパク質やオルガネラなどの細胞質成分の分解機構の総称である。オートファジー研究は、酵母を材料とする分子遺伝学の展開によりオートファジーの進行に必須の遺伝子 *ATG* (*autophagy-related gene*) 群を同定し、その基本的な分子機構を明らかにしてきた。*ATG* のなかでもオートファゴソームの形成に必須な 15 種の中核（コア）因子 (*ATG1-10, 12-14, 16, 18*) は真菌から動物まで広く保存されており、その分子機能も共通している。しかし近年、中核因子である *ATG5* や *ATG7* を欠損するマウスにおいて、種々のストレスによってオートファゴソームが形成されることが明らかとなり、動物におけるオートファジーの多様な姿が示された。

2. 研究の目的

オートファジーは真核生物に共通するタンパク質の分解システムであり、その進行に必須な *ATG* 遺伝子群も高度に保存されている。これまでに色々なモデル真核生物で、*ATG* 欠損 (*atg*) 変異体の表現型が調べられている。例えば酵母では孢子、粘菌では子実体の形成が不能となる。またショウジョウバエでは蛹期、マウスでは初期胚の発生期に死亡するなど、分化や発生の過程で重大な異常が確認される。これに対し、モデル植物シロイヌナズナの *atg* 変異体は、胚発生→発芽→栄養成長→花成→結実、のライフサイクルを基本的には全うできることから、動物で報告されたように従来型とは異なる新奇オートファジー経路の存在が示唆された。しかし植物領域では、オートファゴソームから中心液胞に至るいわゆる「従来型」オートファジー以外の新奇オートファジーについて未だ確かな知見はなかった。本研究では、植物における *ATG* 非依存性の新奇オートファジー経路の存在について明らかにするとともに、その従来型オートファジーとの関係について検証することを目的とした。植物の栄養リサイクルを考える際、特に光合成機能の直接的な最小単位である葉緑体が基質として重要な位置を占める。それは植物がエネルギー獲得のため 70~80%もの窒素を、個体の中では葉に、葉の中では葉緑体に、そして葉緑体の中では Rubisco などの光合成タンパク質に分配しているからである。そこで本研究では特にオートファジー基質として葉緑体に注目した。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナのオートファジー欠損

(*atg*) 変異体を用いた葉緑体オートファジーの逆遺伝学解析

T-DNA 挿入により *ATG5*、*ATG7*、*ATG10* を欠損する *atg5-1*、*atg7-2*、*atg10-1* 変異体を単離した。単離した変異体に葉緑体ストロマにターゲットされる GFP を発現するコンストラクトを交配導入した。変異体は土耕法にて長日条件で栽培した。抽苔後、特定の葉を個別に暗処理することにより老化を誘導した。葉緑体の数とサイズの計測は、葉を固定し遊離させた細胞を光学顕微鏡で観察することで行った。

(2) 新奇オートファジー経路の可視化系構築

3 種類 (35S:mKeima、35S:TP-mKeima、SAG12:SAG12-mRFP) のコンストラクトを Gateway システムを用いた遺伝子クローニング法により作成した。作成したコンストラクトはアグロバクテリウムを介したフローラルディップ法により野生体および *ATG* 欠損変異体 (*atg5-1*、*atg7-2*) に導入して形質転換体を作成した。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナのオートファジー欠損 (*atg*) 変異体を用いた逆遺伝学解析

atg5-1、*atg7-2*、*atg10-1* 変異体について、葉の老化過程における葉緑体サイズの縮小ならびに 1 細胞あたりの葉緑体数の減少について調べた。その結果、これらの *atg* 変異体ではいずれも、葉緑体サイズは野生体と同様に減少した。また 1 細胞あたりの葉緑体数は、*atg5-1* と *atg7-2* は野生体よりも抑制されるものの減少が認められた。*atg10* については、1 細胞あたりの葉緑体数は、野生体と同様に減少した。

次に *atg7-2*、*atg10-1* 変異体における葉緑体の部分的なオートファジーにかかわる Rubisco-containing body (RCB) の形成について調べた。その結果、*atg7-2*、*atg10-1* 変異体では、既に報告されている *atg5-1* 変異体と同様に RCB は全く確認されなかった。以上の結果から、葉緑体は *ATG* 遺伝子に依存したマクロオートファジー経路に加えて、コア *ATG* 遺伝子に依存しない経路によっても分解されていることが示唆された。

(2) 新奇オートファジー経路の可視化系構築

mKeima は pH により蛍光特性が変化し酸性環境でも安定な蛍光プローブとして知られるが、シロイヌナズナに適用した例はこれまでになかった。35S:mKeima では、植物における恒常的過剰発現プロモーターである CaMV 35S プロモーターの制御下で mKeima を発現させ、細胞質基質を一様にラベルした形質転換体を獲得することができた。一方 35S:TP-mKeima では、35S プロモーターで、葉緑体移行シグナルである Rubisco 小サブユニットのトランジットペプチド (TP) を mKeima の N 末端に連結し、

葉緑体（根など非緑色組織の色素体を含む）のストロマ基質を mKeima でラベルする形質転換体の獲得を目指した。しかしながら細胞質の mKeima に比べて、葉緑体ストロマにおける mKeima の蛍光強度は弱く、観察に耐えるものではなかった。蛍光強度が十分な形質転換体を得るため、繰り返し実験を行ったが結果は同様であった。SAG12:SAG12-mRFP では、システインプロテアーゼをコードする SAG12 (senescence-associated gene 12) と mRFP の融合タンパク質を自己プロモーターの制御下で発現させた。これまでに SAG12 は、ATG 非依存性オートファジーの担い手の候補の一つである SAV (senescence-associated vacuole) に局在することが報告されており、SAG12-mRFP は新奇オートファジーのマーカーとなりうると思われた。しかしながら、これまでの報告と反して老化葉の葉肉細胞においては SAG12-mRFP の蛍光シグナルはほとんど検出されなかった。

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)

Izumi, M., Hidema, J., Wada, S., Kondo, E., Kurusu, T., Kuchitsu, K., Makino, A., Ishida, H. Establishment of monitoring methods for autophagy in rice reveals autophagic recycling of chloroplasts and root plastids during energy limitation. *Plant Physiol.*, 査読有, 167: 1307-1320 (2015).
DOI: 10.1104/pp.114.254078

Wada, S., Hayashida, Y., Izumi, M., Kurusu, T., Hanamata, S., Kuchitsu, K., Makino, A., Ishida, H. Autophagy supports biomass production and efficient nitrogen remobilization at the vegetative stage in rice. *Plant Physiol.*, 査読有, 168: 60-73 (2015).
DOI: 10.1104/pp.15.00242

Izumi, M., Hidema, J., Ishida, H. From Arabidopsis to cereal crops: Conservation of chloroplast protein degradation by autophagy indicates its fundamental role in plant productivity. *Plant Signal Behav.*, 査読有, 10: e1101199 (2015).
DOI: 10.1080/15592324.2015.1101199

[学会発表](計19件)

Ishida, H. Autophagy and nutrient recycling in plants, Finnish-Japanese symposium 2016, 2016年9月5 - 10日、Lapland Hotel Riekonlinna (フィンラ

ンド、サーリセルカ)

Ishida, H., Autophagy provides substrates to amino acid catabolic pathways as an adaptive response to sugar starvation in Arabidopsis, The 17th International Congress on Photosynthesis Research, 2016年8月7日 - 12日、MECC Maastricht (オランダ、マーストリヒト)

Ishida, H., Autophagy of chloroplasts as an adaptive response to sugar starvation in Arabidopsis, International Conference on Arabidopsis, 2016年6月29日 - 7月3日、HICO (韓国、慶州)

Hirota, T., Izumi, M., Wada, S., Makino, A., Ishida, H., Chloroplast autophagy as an adaptive response to sugar starvation in Arabidopsis, Gordon Research Conference 'Mitochondria and Chloroplasts' (ゴードン会議「ミトコンドリアと葉緑体」), 2016年6月19 - 24日、Mt Snow Hotel (アメリカ合衆国、バーモント)

横浜 諒、和田慎也、菅野圭一、小島創一、山谷知行、牧野 周、石田宏幸、異なる窒素栄養条件下においてオートファジーの欠損がイネの窒素利用と成長に与える影響の解析、日本植物生理学会、2016年3月18 - 20日、岩手大学(岩手県盛岡市)

泉 正範、石田宏幸、中村咲耶、日出間純、シロイヌナズナの光障害条件下におけるオートファジーによる障害葉緑体の除去、日本植物生理学会年会、2016年3月18 - 20日、岩手大学(岩手県盛岡市)和田慎也、林田泰和、泉 正範、来須孝光、花俣 繁、朽津和幸、牧野 周、石田宏幸、イネの栄養成長と老化葉の窒素リサイクルにおけるオートファジーの役割の解析、日本土壌肥料学会、2015年9月9 - 11日、京都大学(京都府京都市)

江口雅文、吉本光希、木村和彦、泉 正範、和田慎也、牧野 周、石田宏幸、シロイヌナズナにおけるオートファジーが亜鉛欠乏時に果たす役割、日本土壌肥料学会、2015年9月9 - 11日、京都大学(京都府京都市)

横浜 諒、和田慎也、牧野 周、石田宏幸、異なる窒素栄養条件下においてオートファジーの欠損がイネの窒素利用と成長に及ぼす影響の解析、日本植物生理学会年会、2015年3月16 - 18日、東京農業大学(東京都世田谷区)

Izumi, M., Hidema, J., Wada, S., Kondo, E., Kurusu, T., Kuchitsu, K., Makino, A., Ishida, H. Establishment of monitoring methods for autophagy in rice reveals autophagic recycling of

chloroplasts and root plastids during energy limitation, 日本植物生理学会年会、2015年3月16 - 18日、東京農業大学(東京都世田谷区)

江口雅文、木村和彦、和田慎也、泉正範、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナの亜鉛欠乏条件下におけるオートファジーの役割、日本植物生理学会年会、2015年3月16 - 18日、東京農業大学(東京都世田谷区)

弘田隆晃、泉正範、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナの暗処理による炭素欠乏条件下でオートファジーは分岐鎖アミノ酸を代替呼吸基質として供給する、日本植物生理学会年会、2015年3月16 - 18日、東京農業大学(東京都世田谷区)

和田慎也、林田泰和、泉正範、来須孝光、花俣繁、朽津和幸、牧野周、石田宏幸、イネの栄養成長と老化葉の窒素リサイクルにおけるオートファジーの役割の解析、日本植物生理学会年会、2015年3月16 - 18日、東京農業大学(東京都世田谷区)

弘田隆晃、泉正範、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナにおける糖欠乏下でのオートファジーの役割の解析、日本土壤肥料学会、2014年9月9 - 11日、東京農工大学(東京都府中市)

泉正範、石田宏幸、牧野周、日出間純、シロイヌナズナにおける葉緑体オートファジーの機能解析、日本土壤肥料学会、2014年9月9 - 11日、東京農工大学(東京都府中市)

和田慎也、横浜諒、石田宏幸、牧野周、異なる窒素栄養条件下においてオートファジーの欠損がイネの窒素利用と成長に及ぼす影響の解析、日本土壤肥料学会、2014年9月9 - 11日、東京農工大学(東京都府中市)

江口雅文、泉正範、牧野周、石田宏幸、シロイヌナズナにおけるオートファジーの欠損が各栄養素の欠乏時の生存と成長に及ぼす影響の解析、日本土壤肥料学会、2014年9月9 - 11日、東京農工大学(東京都府中市)

Ishida, H., Roles of autophagy in chloroplast recycling. Gordon Research Conference "Mitochondria and Chloroplasts", 2014年6月6 - 11日, Ill Ciocco Hotel (イタリア、バルガ)

石田宏幸、植物の栄養リサイクルと葉緑体のオートファジー、日本農芸化学会シンポジウム、2014年3月30日、明治大学(神奈川県川崎市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/syokuei/index-j.html>

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