

氏 名 花 岡 秀 樹

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第612号

学位授与の日付 平成14年3月22日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Study of Autophagy in Higher Plant
～ through the analysis of *AtAPG* genes ～

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	村田 紀夫
	教授	西村 幹夫
	教授	大隅 良典
	助教授	塚谷 裕一

Autophagy is an intracellular process for vacuolar bulk degradation of cytoplasmic components. Autophagy is a ubiquitous eukaryotic process and recently, the molecular machinery responsible for yeast and mammalian autophagy has begun to be elucidated at the cellular level. However, the role that autophagy plays at the organismal level are yet to be determined. Therefore, he aimed to study the significance of autophagy in plant for the plant life cycle.

A genome wide homology search revealed significant conservation between yeast and plant autophagy genes. Twenty-five novel plant genes (*AtAPG* genes) were discovered, which are homologous to 12 yeast *APG* genes that are essential for autophagy. Both the functional domains and the amino acid residues essential for yeast autophagy are well conserved in the corresponding *AtAPG* proteins, suggesting that the *Apg* system functions in a similar manner in plants as it does in yeast and mammalian cells.

Next, he searched for *AtAPG* knockout plants in T-DNA insertion lines and identified an *Arabidopsis thaliana* mutant carrying a T-DNA insertion within *AtAPG9*, which is the only homologue of yeast *Apg9* in *Arabidopsis* (*atapg9-1*). *AtAPG9* was predicted to be a transmembrane protein, and reasonably *AtAPG9*-GFP showed the fluorescence of dots dispersed throughout the cytoplasm. *AtAPG9* was expressed in every wild-type organ tested, and not in the *atapg9-1* mutant plants.

In the *Arabidopsis* suspension-cultured cells and root cells that during sucrose starvation, addition of protease inhibitor induced the accumulation of spherical bodies. These spherical bodies were stained with acidotropic dyes quinacrine or neutral red, this phenomena is quite similar to autophagy reported in tobacco suspension cells. This accumulation of spherical bodies was reduced in *atapg9-1*, suggesting that autophagy was defected in *atapg9-1*.

Next, he observed the phenotypes brought about by the null mutation of *AtAPG9* gene. The following phenotypes were complemented by expression of wild-type *AtAPG9* gene, confirming that *AtAPG9* is responsible for them. Under nitrogen starvation conditions, rapid chlorosis was observed in *atapg9-1* cotyledons and rosette leaves. Under carbon starvation conditions, *atapg9-1* also exhibited rapid chlorosis of cotyledons. Hence, in the nutrient limited condition, autophagy is crucial for retarding chlorosis. Furthermore, *atapg9-1* exhibited a reduction in seed sets when nitrogen supply was limited, suggesting that *AtAPG9* is required for efficient nutrient relocalization in as a whole plant.

In detached leaves, nutrient supply to leaves was cut off and senescence was induced artificially. Detached leaves of *atapg9-1* showed accelerated senescence. Microscopic analysis indicated that there was a reduction in the number of chloroplasts in the epidermal side of wild-type leaf mesophyll cells during senescence. Though, this reduction in the number of chloroplasts was also observed in *atapg9-1*, the loss of chlorophyll from each chloroplast was accelerated. In addition to that, morphology of the mesophyll cells was apparently different between wild-type and *atapg9-1* at 6 days after detachment. This result suggests that *AtAPG9* is required for proceeding the leaf senescence process properly.

Even under nutrient growth conditions, the timing of bolting was accelerated in *atapg9-1* plants. He confirmed that the slight nitrogen starvation accelerated the timing of bolting in *Arabidopsis*. Considering together, even though enough nutrient is supplied, loss of *AtAPG9* will cause the slight nitrogen starvation in plant. These results indicate that autophagy is required for maintenance of the cellular viability during nutrient-limited conditions and leaf senescence. Efficient nutrient utilization within a whole plant can be achieved through such a vacuolar degradation process within cells.

論文の審査結果の要旨

オートファジー(自食作用)とは、栄養飢餓等に伴い、細胞質成分が二重膜の構造体、オートファゴソームによって液胞へと輸送され、分解を受けるという現象である。オートファジーは真核生物に普遍的に存在する現象であり、近年、酵母や動物細胞においてオートファジーに関わる分子機構が急速に明らかになりつつある。しかしながら、オートファジーが個体レベルでどのような生理的意義を有しているのかは不明な点が多い。申請者はオートファジーが植物個体の生活環においてどのような役割を担っているかを明らかにすることを目的として研究を行った。

ホモロジーサーチによってシロイヌナズナのゲノム上には、酵母においてオートファジーに必要な APG 遺伝子 15 個のうち 12 個についてホモログが存在することを見いだした。これらシロイヌナズナの APG ホモログ AtAPG タンパク質には、機能に必須と考えられるアミノ酸などは非常によく保存されている。

続いて高等植物におけるオートファジーの生理的機能を明らかにするため、*AtAPG* 遺伝子が破壊されたシロイヌナズナ変異株をスクリーニングし、ゲノム上に1コピーのみが存在する *AtAPG9* 遺伝子の破壊株、*atapg9-1* を得た。

タバコ培養細胞において、プロテアーゼ阻害剤の添加によりタンパク質分解を阻害すると、細胞内に未知の顆粒状構造が蓄積することから、シロイヌナズナの根を用いて同様の実験を行ったところ、*atapg9-1* ではプロテアーゼ阻害剤処理によって細胞内に蓄積する顆粒状の構造体が著しく減少した。また、*atapg9-1* は窒素源欠乏、および炭素源欠乏の両条件下において、葉のクロロシスが野生型株よりも早く誘導された。切り葉を純水上に浮かべ、老化を誘導すると、*atapg9-1* では老化が進行が野生型株と比較して早く進行することが明らかとなった。老化過程をよりくわしく検証するため、顕微鏡による観察を行ったところ、*atapg9-1* の葉肉細胞においては、細胞からの葉緑体の消失、個々の葉緑体からのクロロフィルの消失、両者がともに早く進行することが示された。通常の栄養条件下においても *atapg9-1* では抽台や老化が促進されることが観察された。これらの表現型は *AtAPG9* 遺伝子を破壊株に導入することによって回復した。

以上の結果からオートファジーは栄養飢餓条件下、或いは老化過程での植物細胞の生存に貢献することで、植物個体全体としての栄養素の有効利用に関わっていることが示唆された。

また、*AtAPG9* は 99 kDa の複数回膜貫通型タンパク質と予想され、*AtAPG9* と GFP との融合タンパクは、細胞質中に点状に散在する蛍光像を示した。このことから *AtAPG9* は、植物細胞中のオートファゴソーム形成に重要な新規の膜構造体に局在することが示唆された。この研究は始めて高等植物のオートファジーの関わる遺伝子の解析を行った点でその意義は大きい。

論文の内容に関して植物におけるオートファジーの役割をめぐって疑問がなされ、申請者はこれらの質問に対して的確な返答をし、問題点も良く把握していることが確認された。また植物の生長生理、分子生物学などにも十分な知識を持つことが確認された。この結果審査委員全員一致して花岡秀樹が博士の学位授与に足る学識と能力をもつと判定した。

博士論文は十分なレベルの英語で作成され、既に原著論文が一流専門誌にほぼ受理されていることから英語の能力も十分であると判断した。