

氏 名 柴田 美智太郎

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1687 号

学位授与の日付 平成26年3月20日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 選択的オートファジーによる植物ペルオキシソームの品質管理機構の解明

論文審査委員 主 査 教授 長谷部 光泰
教授 西村 幹夫
教授 松林 嘉克
教授 江坂 宗春 広島大学

論文内容の要旨

Summary of thesis contents

選択的オートファジーによる植物ペルオキシソームの品質管理機構の解明
(英訳: The mechanism of quality control for peroxisomes by selective autophagy in *Arabidopsis thaliana*)

The positioning of peroxisomes in a cell is a regulated process that is closely associated with their functions. Using this feature of the peroxisomal positioning as the criterion, the screening of peroxisome mutants showing unusual positioning (*peup*: *peroxisome unusual positioning*) has been done in our laboratory. I analyzed one of the *peup* mutants, *peup1*.

The *peup1* mutant houses peroxisome aggregates in the photosynthetic cells, which are absent in wild type. In addition, the *peup1* mutant shows early senescence phenotype. Namely, the *peup1* mutant begins to senesce several weeks earlier than wild type does.

Map-based cloning identified *AUTOPHAGY-RELATED 2 (ATG2)* as the responsible gene for *peup1*. Autophagy is a major degradation system in the cell. ATG2 was initially identified as one of the essential components for autophagosome formation in yeasts. In yeasts and mammalian cells, it is known that organelles such as peroxisomes are degraded by autophagic process. However, the relationship between autophagy and peroxisomes in plants is unclear.

To examine the suppression of peroxisomal degradation in the *peup1* mutant, the number of peroxisomes was counted. The total number of peroxisomes in the *peup1* mutant was increased in comparison to that of the parent plant, GFP-PTS1. However, the numbers of dispersed peroxisomes were almost identical in the GFP-PTS1 plant and the *peup1* mutant. In addition, the *peup1* mutant contained peroxisome aggregates. Accumulation of peroxisomal proteins in the *peup1* mutant was also shown by immunoblot. On the other hand, the expression of the corresponding genes was not enhanced in the mutant. These results clearly show that the *peup1* mutation causes the suppression of peroxisomal degradation.

To investigate peroxisome aggregates in the *peup1* mutant in more detail, electron microscopic analysis was performed. The observation made it clear that most of aggregated peroxisomes contained electron-dense regions. In addition, immuno-electron microscopic analysis demonstrated that the electron-dense region is composed of condensed catalase (CAT). CAT, which is an enzyme localized in peroxisomes, decomposes hydrogen peroxide into water and oxygen molecules. Immunoblot analysis also showed that CAT was highly accumulated in the *peup1* mutant compared to the GFP-PTS1 plant. Moreover, CAT was detected only in the soluble fraction of the GFP-PTS1 plant, whereas it was detected in the insoluble

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

fraction of the *peup1* mutant in addition to the soluble fraction, suggesting that CAT formed a condensed mass in the *peup1* mutant. The enzymatic activity of the CAT in the insoluble fraction was decreased in comparison to that of the soluble fraction, indicating that the CAT in the insoluble fraction was inactivated. Then, the redox states of peroxisomes were examined using reduction–oxidation-sensitive green fluorescent protein 2 (roGFP2), clearly demonstrating that the peroxisome aggregates were more oxidative than peroxisomes in the wild type. To understand the relationship between oxidative stress and peroxisome aggregate, hydrogen peroxide was applied to the GFP-PTS1 plant. The hydrogen peroxide treatment induced peroxisome aggregation in the GFP-PTS1 plant. In addition, CAT-defective mutant also contained peroxisome aggregates. From these results, I conclude that oxidative stress by hydrogen peroxide decreases peroxisomal quality and induces the peroxisome aggregation.

Next, I examined whether the peroxisomes damaged by oxidative stress were selectively degraded by autophagy. ATG8, which is an autophagosome marker, was fused with mCherry (mCherry-ATG8) and used to investigate the subcellular localization. In the GFP-PTS1 plant, mCherry-ATG8a was diffused in the cytosol and observed some punctate structures. The punctate structure is a pre-autophagosomal structure (PAS), which is observed in the isolation membrane-forming site. Under normal conditions, the punctate structures did not colocalize with peroxisomes. However, after hydrogen peroxide treatment, some punctate structures colocalized with peroxisomes. Notably, mCherry-ATG8a strongly colocalized with peroxisome aggregates in the *peup1* mutant. These observations strongly suggest that damaged peroxisomes are selectively degraded by autophagy.

Based on these results, I propose that autophagy is a crucial quality control mechanism for peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*. The early senescence phenotype of the *peup1* mutant may be also caused by the defect in the quality control of peroxisomes which is a major source of many kinds of reactive oxygen species. Therefore, the quality control of peroxisomes by autophagy is a significant mechanism for optimal plant growth.

However, the autophagic machinery of the selectivity is still unknown. I hypothesized that condensed CAT itself was the signal used for the discrimination. To investigate this hypothesis, I examined the number of peroxisomes and the accumulation of peroxisomal proteins in the *cat* mutants. However, these examinations revealed that CAT is unnecessary for the degradation of peroxisomes.

In further studies, I will clarify the molecular mechanisms of how targets for autophagy are selected and reveal plant-unique functions of autophagy.

植物のペルオキシソームは、脂肪酸の代謝、植物ホルモンの合成、光呼吸など、植物が生育する上で重要な代謝反応を担うオルガネラである。ペルオキシソームの最大の特徴は、ペルオキシソーム内の代謝において多量の過酸化水素が産生されるという点である。過酸化水素は活性酸素種の一つであり、ペルオキシソームタンパク質や膜脂質を酸化し、生理機能が低下した、いわば損傷を受けたペルオキシソームを生じさせる。したがって、細胞には損傷を受けたペルオキシソームを取り除き、細胞内環境を正常に保つ機構が備わっていると考えられるが、その実態は明らかにされていなかった。柴田氏は、順遺伝学的アプローチによって、その機構がオートファジーによって担われていることを突き止めた。

シロイヌナズナの *peup1* (*peroxisome unusual positioning 1*) 変異株は、ペルオキシソームの細胞内局在に着目して単離された変異株である。*peup1* 変異株は、ペルオキシソームが凝集体を形成する、という表現型を示す。柴田氏は、本葉の細胞をプロトプラスト化して単離することによって、細胞あたりのペルオキシソーム数を測定し、*peup1* 変異株には通常のペルオキシソームに加えて、凝集体を形成する異常なペルオキシソームが蓄積していることを明らかにした。続いて電子顕微鏡観察や、イムノブロット法などの生化学的手法によって、その異常なペルオキシソームには失活したカタラーゼが蓄積していることを見出した。さらに、酸化還元感受性緑色蛍光タンパク質を用いることでオルガネラ内の酸化還元状態を解析し、ペルオキシソームの凝集体が酸化したペルオキシソームによって構成されていることを明らかにした。これらの知見は、*peup1* 変異株に蓄積する異常なペルオキシソームは損傷を受けたペルオキシソームの塊であることを示している。

続いて、遺伝子マッピングにより *peup1* 変異の原因遺伝子がオートファジー関連遺伝子 2 (*ATG2*) であることを突き止めた。そして、*peup1* 変異株においてペルオキシソームの分解が抑制されていることを示し、*peup1* 変異株がオートファジーの機能欠損株であることを明らかにした。さらにオートファゴソームマーカーである *ATG8* が酸化的なペルオキシソームに対して選択的に局在することを見出し、オートファジーによって、酸化されたペルオキシソームが選択的に分解されていることを示した。これらの知見は、損傷を受けたペルオキシソームを細胞内から除去する品質管理機構の実態がオートファジーであることを示している。

本研究で明らかにされた知見は、特異性の無い分解系であると考えられていたオートファジー系が選択的にペルオキシソームの品質管理に関与するという点を明らかにした点で特筆される。さらにこの成果は、ペルオキシソームのみならず他のオルガネラ品質管理機構の研究にも波及効果があると考えられる。以上より、本研究は学位授与に相応しいと審査員全員が一致して判断した。