

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

総合研究大学院大学

生命科学研究科 基礎生物学専攻

柴田 美智太郎

目次

略語表	3
序論	4
実験材料と方法	11
結果	18
考察	32
引用文献.....	38
謝辞	49
図・表	50
発表論文リスト	79

略語表

2,4-DB	: 2,4-dichlorophenoxybutyric acid
APEM	: aberrant peroxisome morphology
APX	: ascorbate peroxidase
ATG	: autophagy-related
CAPS	: cleaved amplified polymorphic sequences
CAT	: catalase
CBB	: Coomassie brilliant blue
Col	: Columbia
COX2	: cytochrome c oxidase 2
DTT	: dithiothreitol
GFP	: green fluorescent protein
GO	: glycolate oxidase
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
HPR	: hydroxypyruvate reductase
PAS	: pre-autophagosomal structure
PED	: peroxisome defective
PEUP	: peroxisome unusual positioning
PEX	: peroxin
ppt	: precipitate
PTS	: peroxisome targeting signal
RBCL	: large subunit of RuBisCO
roGFP	: redox-sensitive GFP
SD	: standard deviation
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
SE	standard error
SHM	: serine hydroxymethyltransferase
SSLP	: simple sequence length polymorphism
sup	: supernatant
TAIR	: The Arabidopsis Information Resource
THI	: 3-ketoacyl-CoA thiolase

序論

本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、細胞内小器官の1つであるペルオキシソームの動態の解析を行った。その解析を通して、ペルオキシソームとオートファジーとの関連が見出された。本章においてそのペルオキシソームとオートファジーについて、現在までの知見、および本研究の目的を記述する。

1-1 ペルオキシソームとは

ペルオキシソームは、真核細胞に存在する一重膜に囲まれた直径 $1\mu\text{m}$ ほどのオルガネラである。植物では、その機能は細胞の種類や成長段階によって分化しており、グリオキシソーム、緑葉ペルオキシソーム、根ペルオキシソームと呼ばれることもある(Kamada et al., 2003)。

1-1-1 グリオキシソーム

グリオキシソームは、脂肪酸の β 酸化系とグリオキシル酸回路の酵素を蓄積したペルオキシソームの一形態である。カボチャやシロイヌナズナのような脂肪性種子植物では、種子中に蓄えられた貯蔵脂質を分解し、発芽のためのエネルギーを産み出すのに関与している (Figure 1) (Tolbert and Essner, 1981; Goepfert and Poirier, 2007)。そのため、脂質代謝に異常があるペルオキシソーム変異株では、貯蔵脂質から発芽のエネルギーを産み出せないため、正常に発芽できないものが多い(Hayashi et al., 1998; Graham, 2008)。

1-1-2 緑葉ペルオキシソーム

緑葉ペルオキシソームは、グリコール酸経路の酵素を蓄積したペルオキシソームの名称である。光合成反応に付随して起こる光呼吸経路の一部を担っており、光合成細胞におけるペルオキシソームは主に緑葉ペルオキシソームである (Figure 2) (Tolbert and Yamazaki, 1969; Hayashi and Nishimura, 2006)。この光呼吸系の変異株の多くは、通常の大気条件下では光照射により、顕著な生育阻害を受ける。一方、高 CO₂ 濃度条件下で生育させることによって、その表現型を回復させることができる (Somerville, 2001; Foyer et al., 2009)。

1-1-3 根ペルオキシソーム

根のペルオキシソームは、長らく機能がわかっていなかったが、ポリアミンの異化作用が行われていることが、近年当研究部門により明らかにされている (Kamada-Nobusada et al., 2008)。

1-1-4 ペルオキシソームに共通する代謝

上述のように、ペルオキシソームは生育ステージや組織によって機能が分化し、独自の代謝系をもつ一方、共通する機能も存在する。それは過酸化水素をはじめとする活性酸素種が産生される代謝と、それを分解する反応を行っていることである。例えば、 β 酸化系ではアシル CoA 酸化酵素 (acyl-CoA oxidases, ACXs) (Kirsch et al., 1986)、グリコール酸経路ではグリコール酸酸化酵素 (glycolate oxidase, GO) (Nishimura et al., 1983)、ポリアミンの合成ではポリアミン酸化酵素 (Kamada-Nobusada et al., 2008) による触媒過程で過酸化水素が発生する。特に、C₃ 植物の光合成細胞におけるペルオキシソームでは、膨大な量の過酸化水素が産生され、ミトコンドリアの 2 倍量、葉緑体の 50 倍量の過

酸化水素が産生されると見積もられている(Foyer and Noctor, 2003)。

一方、ペルオキシソームにおける活性酸素種の分解系において、その中心的役割を担うのがカタラーゼ (CAT) である。CAT は過酸化水素を不均化し、無毒の水と酸素に分解する反応を触媒する(Loew, 1900)。CAT はペルオキシソームタンパク質の 10~25%を占めており(Reumann et al., 2004)、他のペルオキシソームタンパク質や膜脂質を酸化ストレスから守っていると考えられている(Yanik and Donaldson, 2005)。また、CAT はグリオキシソーム、緑葉ペルオキシソーム等、すべてのペルオキシソームに共通して存在するため、ペルオキシソームのマーカー酵素 (タンパク質) として利用されている。過酸化水素の分解を触媒する酵素は、他にもペルオキシソーム膜に局在するアスコルビン酸過酸化酵素 (ascorbate peroxidase, APX) が存在するが、抗酸化にはあまり寄与していないと報告されている(Narendra et al., 2006)。

1-1-5 ペルオキシソームへのタンパク質輸送機構

ペルオキシソームタンパク質はすべて核ゲノムにコードされており、細胞質で翻訳されペルオキシソームへと輸送される。ペルオキシソームへの輸送は PEROXINs (PEXs) と名付けられたペルオキシソーム形成因子が関わっている(Hayashi and Nishimura, 2006; Hu et al., 2012)。ペルオキシソームのマトリックスタンパク質の多くのは、ペルオキシソーム局在シグナル (peroxisome targeting signal, PTS) 配列を持っている。PTS 配列には C-terminal 側の PTS1、N-terminal 側の PTS2 と 2 種類ある。これらの配列はレセプターである PEX5、PEX7 にそれぞれ認識される。植物では、PEX5 と PEX7 は輸送するタンパク質 (cargo protein) と一緒に複合体を形成し、ペルオキシソームの膜上で PEX13、PEX14 に認識されてペルオキシソーム内へと取り込まれていく(Hayashi and

Nishimura, 2006; Hu et al., 2012)。

1-1-6 ペルオキシソームの動態

ペルオキシソームへのタンパク輸送機構の性質を利用して、ペルオキシソームを可視化することが可能である。当研究部門では、以前に GFP と PTS1 を融合させたコンストラクトを導入しペルオキシソームを可視化した形質転換シロイヌナズナ (GFP-PTS1 植物) を作出した。そして、その植物を用いたライブイメージング解析により、ペルオキシソームがアクチンフィラメントに沿って運動していることや環境変化によってペルオキシソームがその形態を変化させていることを明らかにしてきた(Mano et al., 2002)。さらに、GFP-PTS1 株を親株として変異原処理を行い、ペルオキシソームの形態に着目した順遺伝学的アプローチにより、*aberrant peroxisome morphology (apem)* と名付けた変異株を単離してきた。これまでにそれらの変異株の解析を通して、ペルオキシソームとミトコンドリアの分裂に必要な DYNAMIN-RELATED PROTEIN 3A (DRP3A) や、複数のペルオキシソーム形成因子を明らかにしてきた(Mano et al., 2004; Mano et al., 2006; Goto et al., 2011; Mano et al., 2011)。これらの発見は GFP-PTS1 株を親株として用いた蛍光観察による変異株のスクリーニング法が、ペルオキシソームの動態に関わる分子機構を明らかにする強力な方法であることを示している。

1-2 オートファジーとは

オートファジーは、プロテアソームと並ぶ細胞内の分解系の 1 つである。細胞質の構成成分を液胞やリソソームに運び込んで分解するシステムの総称で、

オートファゴソームという構造を形成して液胞やリソソームに輸送する「マクロオートファジー」、液胞やリソソームに分解基質が直接陥入する「マイクロオートファジー」、細胞質のタンパク質をシャペロンがほぐしてリソソーム膜のチャネルを通過させる「シャペロン介在性オートファジー」の 3 種類が知られている (Figure 3) (水島・吉森編 オートファジー)。シャペロン介在性オートファジーを除くオートファジーは真核生物に広く保存されており、酵母や動物細胞を中心に研究が進められている。植物での知見は多くはないが、少なくとも「基質を液胞へ輸送し分解する」ということが明らかとなっている (Inoue et al., 2006)。

1-2-1 ATG 遺伝子群

これまでに酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を中心にオートファジー不能を示す変異株の選抜が行われ、それらの解析から *AuTophagy-related* (ATG) 遺伝子が同定されてきた。現在、36 個の ATG 遺伝子が報告されている。そのうちシロイヌナズナのゲノムで確認されているものは、ATG1、ATG2、ATG3、ATG4、ATG5、ATG6、ATG7、ATG8、ATG9、ATG10、ATG12、ATG13、ATG16、ATG18 の 14 個であり、これらはいずれもマクロオートファジーおよびマイクロオートファジーに共通して必要なコア因子と考えられているタンパク質をコードする遺伝子である (Meijer et al., 2007)。

1-2-2 選択的オートファジー

長い間オートファジーは非選択的な分解系であると考えられてきたが、現在では選択的なオートファジーも存在することが知られている。オルガネラ分解に関しては、マイトファジー (ミトコンドリア)、レティキュロファジー (ER)、

そしてペキシファジーと呼ばれるペルオキシソーム特異的な分解がよく知られている(Kraft et al., 2009; Johansen and Lamark, 2011)。植物では、葉緑体のストロマタンパク質が RuBisCO-containing bodies (RCBs)と名付けられたオートファジー系で分解されていることが報告されている(Ishida et al., 2008)。

選択的オートファジーには、ATG8 や ATG11 と基質とをつなぐアダプター因子など、先に述べたコア ATG タンパク質に加えて特別な因子が必要であることが知られている(Johansen and Lamark, 2011)。しかしながら、その因子は生物種間できわめて保存性が低く(Meijer et al., 2007)、植物での研究報告は少ない。唯一の報告例は NBR1 という ATG8 と相互作用するタンパク質に関するもので、このタンパク質は例外的に広く生物種で保存されている(Johansen and Lamark, 2011)。

1-2-3 ペキシファジー

ペルオキシソーム特異的なオートファジーであるペキシファジーの知見は、主に *Pichia pastoris* と *Hansenula polymorpha* という 2 種類のメタノール資化性酵母を用いた研究によって得られた(Dunn et al., 2005; Sakai et al., 2006; Manjithaya et al., 2010)。メタノール資化性酵母のメタノール代謝はペルオキシソームで起こる。通常、これらの酵母のペルオキシソームは、未成熟な状態で存在している。一方、メタノールを唯一の炭素源とする培地で育てると、ペルオキシソームが成熟化し細胞質の大部分がペルオキシソームに占められるほどになる。メタノール培地で育てたメタノール資化性酵母をグルコース、あるいはエタノールを含む培地に移すと、ペルオキシソームによるメタノール資化作用は不要となるが、この時、ペルオキシソームはオートファジーにより速やかに分解される(Veenhuis et al., 1983; Tuttle et al., 1993)。

ペルオキシソームを特異的に分解するためのアダプターとして、メタノール資化性酵母では、ペルオキシソーム膜タンパク質である Pex3、Pex14、および Atg8、Atg11 と結合する Atg30 が報告されている(Farre et al., 2008)。しかし、Atg30 はメタノール資化性酵母にしか保存されていない。また、Pex3 および Atg8、Atg11 と結合する Atg36 が *S. cerevisiae* で報告されたが、やはり近縁のサッカロミケス科でしか保存されていない (Motley et al., 2012)。

1-3 本研究の目的

当研究部門では、ペルオキシソーム可視化植物体 GFP-PTS1 株の観察を通して、ペルオキシソームの細胞内局在が環境依存的に変化していることを明らかにしてきた。光合成細胞である葉肉細胞において、光条件下ではペルオキシソームが葉緑体と接着している様子が観察される一方、暗所では球状になって葉緑体から離れたペルオキシソームが観察される (Oikawa et al. unpublished results)。加えて、光条件下ではペルオキシソームは葉緑体間を活発に移動する様子が観察されたが、暗所条件下ではペルオキシソームはほとんど運動していなかった。

そこで、当研究部門では上述のような環境依存的に変化するペルオキシソームに関わる分子機構を明らかにするために、ペルオキシソームの局在に着目した変異株のスクリーニングを試みた。*apem* 変異株の取得の際に用いた変異原処理した GFP-PTS1 種子のプールから、葉肉細胞においてペルオキシソームの局在パターンが野生株とは異なった変異株を選抜し、*peroxisome unusual positioning (peup)* 変異株と命名した。そしてその一つである *peup1* 変異株を本研究で解析した。

実験材料と方法

2-1 実験材料と生育条件

本研究では、野生型として Columbia (Col-0) をバックグラウンドにもつシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*) を用い、コントロール株としてペルオキシソームが可視化された GFP-PTS1 株 (Mano et al., 2002) を用いた。 *peup* 変異株は、GFP-PTS1 株を親株として EMS 処理して作製された変異体のプール (Mano et al., 2004) から単離された。T-DNA 挿入株 (*atg2-1* [SALK_076727]、*cat2-1* [SALK_076998]、*cat3-1* [SALK_092911]) は Arabidopsis Biological Resource Center から入手して使用した。T-DNA 挿入株のジェノタイピングおよび後述の *peup1* 遺伝子のシーケンシングに用いたプライマーは表 1 に示している。Mt-GFP 株 (Feng et al., 2004) は有村博士 (東京大学)、*shm1-1* 変異株は高橋博士 (The Australian National University) から供与していただき、roGFP-PTS1 株は坂本博士 (岡山大学) と吉本博士 (Institut National de la Recherche Agronomiqu [INRA]) が作製したものを供与していただいた。

播種の際には、種子をエタノールで処理した後、種子滅菌液 (0.02% Triton X-100、2% NaClO) で 5 分間滅菌した。その後、滅菌水で 3 回洗浄し、発芽培地 (1.53 mg ml⁻¹ Murashige and Skoog salts、1%(w/v) sucrose、100 µg ml⁻¹ myo-inositol、1 µg ml⁻¹ thiamine-HCl、0.5 µg ml⁻¹ pyridoxine-HCl、0.5 µg ml⁻¹ nicotinic acid、0.5 mg ml⁻¹ MES-KOH, pH5.7、0.8% agar) に播種した。4°C 暗所で 24 時間インキュベートし、プレートを 22°C 長日条件 (16h 明/8h 暗) で生育させた。発芽後 2 週間程度で、バーミキュライト : パーライト = 2 : 1 で混合した土に植物体を移し、長日条件で生育させた。

2-2 共焦点顕微鏡

顕微鏡観察には LSM510 META (Carl Zeiss) および A1R (Nikon) 共焦点レーザーキャニング顕微鏡を用いて行った。

本葉を観察する際には、観察の前に葉を注射器で脱気した後、植物インキュベータに移し、スライドガラス上で 30~60 分間光を照射したものを観察に用いた。

2-3 PEUP1 遺伝子の同定と *peup1-1* の塩基置換の検出

peup1-1 変異株を親株である GFP-PTS1 株と 3 回バッククロスを行った後、異なるアクセッションである Landsberg *erecta* と掛け合わせた。合計 302 個体の F2 世代で *peup1* 変異型の表現型を示す個体を選抜し、CAPS、SSLP マーカー (Konieczny and Ausubel, 1993; Bell and Ecker, 1994) を用いて遺伝子多型を検出した。CAPS、SSLP マーカーは Cereon Genomics database (<http://www.arabidopsis.org/Cereon/index.jsp>) の情報に基づいて作製したものと、田坂博士 および森田博士 (奈良先端科学技術大学院大学) から供与していただいた NARAMAP マーカー (Toyota et al., 2011) を用いた。マップベースクローニングにより *PEUP1* 遺伝子座は MVE11 と MLD14 という BAC クローンの中に絞り込んだ。この間には 78 個の遺伝子が存在し、シーケンシングにより *At3g19190/ATG2* に塩基置換を発見した。*peup1* の原因遺伝子が *At3g19190* であることを確認するために、*peup1-1* と *atg2-1* を掛け合わせて相補性テストを行った。

peup1-1 変異株と野生株 (Col) とを掛け合わせた F2 世代から、蛍光をもたない株に対して以下のジェノタイピングを行った。*peup1-1* 変異によって *KpnI*

の認識配列上に変異が生じるため、野生株は *KpnI* で切断されるが、*peup1-1* は切断されない。これを利用して *peup1-1* のジェノタイピングを行い、GFP-PTS1 遺伝子をもたない（ペルオキシソームが GFP で可視化されていない）*peup1-1* 変異株を作製した。

2-4 プロトプラストの単離とペルオキシソーム数の計測

プロトプラストの単離は Tape-*Arabidopsis* Sandwich method(Wu et al., 2009)を改変して行った。発芽後 3 週間の植物体の第 6 葉または第 7 葉の葉をサンプリングし、葉の表皮細胞を 2 種類のテープ（タイムテープ[Time med]、メンディングテープ[3M]）を用いて剥離した。細胞壁を消化するために、酵素液（1%(w/v) Cellulase Onozuka R-10、0.25%(w/v) Macerozyme R-10、0.4 M mannitol、20 mM MES, pH5.7）に浸し、30 分間暗所で穏やかに振盪し、プロトプラスト化を誘導した。プロトプラストを含んだ溶液を 100 x *g* で 1 分間遠心し、上清を取り除いた。洗浄液（0.4 M mannitol、20 mM MES, pH5.7）で 2 回洗い、直ちに顕微鏡観察を行った。

プロトプラストの蛍光観察は共焦点レーザー顕微鏡を用い、プロトプラストの上から下までの画像を取得して Z スタック画像を作製した。その Z スタック画像に対して maximum intensity projection を行い、その画像を用いてペルオキシソーム数の計測を行った。

2-5 電子顕微鏡観察

発芽後 3 週間の植物体から第 6 葉、もしくは第 7 葉をサンプリングし、固定

液 (4%(w/v) paraformaldehyde、1%(w/v) glutaraldehyde、0.06 M sucrose、0.05M cacodylate buffer, pH7.4) に浸した。超薄切片の作製、顕微鏡観察、免疫金粒子標識は Hayashi et al. (1998) に従った。

2-6 イムノブロット解析

総タンパク質を、3 週齢の植物の本葉 2~3 枚から SDS バッファ (10 mM HEPES-KOH, pH 8.0、1% (w/v) SDS、EDTA-free protease inhibitor cocktail [Roche]) 中でホモジナイズして抽出した。

可溶性画分と不溶性画分との分画は、Asano et al. (2004)の方法に従って行った。3 週齢の植物の本葉 2~3 枚を抽出 バッファ(10 mM HEPES-KOH, pH 8.0, EDTA-free protease inhibitor cocktail [Roche])でホモジナイズし、4°C、20,000 x *g*で 10 分間遠心した。その上清を可溶性画分とした。上清を取り除いた後の沈殿を抽出バッファで 2 回洗浄を行った後に、SDS バッファで可溶化し、それを不溶性画分とした。

タンパク質濃度は Bradford ULTRA (Novexin)を用いて測定後、SDS-PAGE に供した。ウェスタンブロット解析のメンブレンは polyvinylidene difluoride membrane (Millipore)を用い、semidry electroblotting system (BioCraft)で転写を行った。1 次抗体として、 α -CAT (希釈率 1:6,000) (Yamaguchi et al., 1984)、 α -GFP (1:5,000) (Mitsuhashi et al., 2000)、 α -APX(1:5,000) (Arai et al., 2008)、 α -RBCL (1:5,000) (Nishimura and Akazawa, 1974)、 α -GO (1:3,000) (Nishimura et al., 1983)、 α -PEX14 (1:3,000) (Hayashi et al., 2000)、 α -COX2 (1:1,000) (Agrisera)、 α -ATG8 (1:500) (Abcam)を用い、2 次抗体には horseradish peroxidase-coupled antibodies against rabbit IgG (1:5,000) (ECL system; GE

Healthcare)を用いた。検出試薬には Chemi-Lumi One super (Nacalai Tesque)を用いた。

2-7 分画遠心

分画遠心操作は Yamada et al. (2008, 2013)の方法に従い、以下の手順で行った。

3 週齢の本葉をサンプリングし、3 倍量の抽出バッファ (50 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 0.4 M sucrose, EDTA-free protease inhibitor cocktail [Roche])を加え、剃刀を用いて切り刻んだ。その抽出液をミラクロスでろ過した後、4°C、1,000 x *g*で 10 分間遠心した。沈殿を元の溶液量と等量の抽出バッファで再懸濁し、P1 画分とした。上清は新しい遠心管に移し、4°C、8,000 x *g*で 20 分間遠心した。沈殿は先ほどと同様に抽出バッファで再懸濁し、P8 画分とした。上清は新しい遠心管に移し、4°C、100,000 x *g*で 1 時間遠心した。沈殿は抽出バッファで再懸濁し、P100 画分とした。上清もチューブに回収し、S100 画分とした。

回収した P1、P8、P100、S100 画分のサンプルに対してイムノブロット解析を行った。

2-8 CAT 活性の測定

15 μ l の 3% (v/v) 過酸化水素水と 3 μ l の可溶性画分、もしくは可溶化前の不溶性画分を、1 ml の 50 mM K-phosphate buffer, pH 5.7 に加えた。直ちに溶液を混合し、CAT 活性を測定した。CAT 活性は分光光度計 (U-2900, Hitachi) を

用いて、240 nm の吸光度の減少を最初の 10 秒間測定することによって求めた。CAT タンパク質の量はイムノブロットのバンド強度を測定することによって見積もり、比活性を算出した。

2-9 roGFP2 を用いた酸化還元状態の測定

roGFP-PTS1 株と *GFP-PTS1* 遺伝子をもたない *peup1-1* 変異株とを掛け合わせ、roGFP-PTS1 *peup1-1* 変異株を作製した。

酸化還元状態は A1R 共焦点顕微鏡を用いて測定した。測定条件として、2Ex 1Em mode を使い、roGFP2 を 405 nm あるいは 488 nm の波長で励起し、500-550 nm バンドパスフィルタでそれぞれの蛍光を測定した。それぞれの波長について 20 μm 程度の深さの Z スタック画像を取得し、maximum intensity projection で画像を重ね合わせた。ImageJ (v. 1.46i <http://imagej.nih.gov/ij>) を使い、405 nm、488 nm それぞれの画像からバックグラウンドを引いた後、405 / 488 nm のレシオ画像を作製した。

2-10 ATG8 の一過的発現

At4g21980 (*ATG8a*) の cDNA は Table 1 に示されているプライマーセットと PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Takara Bio) を用いて増幅した。そのフラグメントは Gateway クローニング (Invitrogen) を使い、まず TOPO PCR クローニングによりエントリークローンを作製し、次いで LR 反応により pmCGW というベクターに導入し、mCherry との融合遺伝子を作製した。作製したコンストラクトは *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1Rif^R に導入し、High-

throughput transient transformation of *Arabidopsis* seedlings 法 (Marion et al., 2008)を用いて GFP-PTS1 株、*peup1-1* 変異株に導入した。

結果

3-1 *peup1* 変異株の単離とその表現型

peup1 変異株は、ペルオキシソームが可視化された形質転換植物体 GFP-PTS1 株に対して EMS 処理を行い、得られた変異株プールの中からペルオキシソームの局在パターンに異常を示す変異体として選抜された。

親株である GFP-PTS1 株では、可視化されたペルオキシソームは細胞内に散らばって観察される (Figure 4A)。一方、*peup1* 変異株は GFP-PTS1 株で観察されるようなペルオキシソームに加えて、ペルオキシソームの凝集体が観察された (Figure 4A 矢印)。また、植物個体の表現型として、*peup1* 変異株は親株と比較して生育が阻害され、かつ老化が促進された (Figure 4B)。通常、野生株の本葉は発芽後 7 週間程度経過してから枯れ始めるが、*peup1* 変異株の本葉は 4 週間程度で枯れ始めた。

3-2 *peup1* 変異はペルオキシソームの機能には大きく影響しない

peup1 変異株におけるペルオキシソームの凝集体形成が、ペルオキシソームの機能に影響を及ぼしているかどうかを検証した。ペルオキシソームの代表的な機能として、発芽初期における貯蔵脂肪の分解を行う β 酸化と、光合成反応に付随する光呼吸があげられる。

まず、貯蔵脂肪の分解が正常に行われているかどうかを調べた。*ped1* 変異株をはじめとする脂質の代謝に異常を示す変異株の多くは、培地中にショ糖を添加しないと正常に発芽することができない (Hayashi et al., 1998)。そこで、ショ糖を含む培地と含まない培地とで発芽試験を行ったところ、*peup1-1* 変異株は

ショ糖がなくても正常に発芽することができた (Figure 5A)。

また、2,4-dichlorophenoxybutyric acid (2,4-DB) に対する耐性を確認した。培地に添加された 2,4-DB は、ペルオキシソームの β 酸化によってオーキシンの 1 つである 2,4-D へと代謝され、この過剰なオーキシンの影響により根の成長が著しく阻害される (Hayashi et al., 1998; Zolman et al., 2000)。一方、*ped1* 変異株のような β 酸化系の変異株では 2,4-D への代謝が起こらず、その結果、根の成長は阻害されない。*peup1-1* 変異株を 2,4-DB を含む培地で生育させたところ、*peup1-1* 変異株は 2,4-DB 耐性を示さなかった (Figure 5B)。これらの結果は、*peup1* 変異株の β 酸化系は正常に機能していることを示している。

続いて、光呼吸系への影響について検証した。光呼吸系の変異株は、高 CO_2 条件下では正常に生育できるものの、通常の大気条件下では生育が著しく阻害される (Hayashi and Nishimura, 2006)。また、通常の大気条件下では光合成効率が低下し、その結果、光化学系 II の量子収率 (F_v/F_m) の低下として反映される。そこで、GFP-PTS1 株および *peup1-1* 変異株の F_v/F_m 値を比較した。光呼吸系の変異株である *shm1-1* 変異株は、高 CO_2 条件から通常の大気条件に植物体を移すと、 F_v/F_m 値は急速に減少していった (Figure 5C)。しかしながら、GFP-PTS1 株および *peup1-1* 変異株ではそのような減少は見られなかった (Figure 5C)。この結果は、*peup1* 変異株において、光呼吸系も正常に機能していること示している。

3-3 *peup1* 変異株の原因遺伝子の特定

マップベースクローニング法により、*peup1* の原因遺伝子の同定を試みたところ、*At3g19190* の遺伝子座に一塩基置換を発見した (Figure 6A)。*At3g19190*

はシロイヌナズナのオートファジー関連遺伝子 2 (*Arabidopsis* Autophagy-related 2, AtATG2) をコードしている。これまでに、*peup1* に関して 2 つのアリル (*peup1-1*、*peup1-2*) が単離されており、どちらも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 (Figure 6B)。DNA の塩基配列からアミノ酸配列を推定した結果、*peup1-1* は 1310 番目のトリプトファンが終止コドンに、*peup1-2* は 1654 番目のトリプトファンが終止コドンへと変わる変異が生じていた (Figure 6A)。

peup1 変異株の原因遺伝子が AtATG2 であることを確認するために、AtATG2 の T-DNA 挿入株 (*atg2-1*; SALK_076727) を入手し、その *atg2-1* 変異株に GFP-PTS1 遺伝子を導入した *atg2-1* GFP-PTS1 株のペルオキシソームの形態を観察したところ、*atg2-1* GFP-PTS1 株も *peup1-1* や *peup1-2* と同様にペルオキシソーム凝集体が観察された (Figure 6C)。加えて、*peup1-1* と *atg2-1* との相補テストを行ったところ、F1 世代でペルオキシソームの凝集体が観察された (Figure 6D)。*peup1-1* 変異は劣勢変異であるので、この結果は *peup1-1* と *atg2-1* がアリルであることを示している。以上の結果から、*peup1* の原因遺伝子は At3g19190 すなわち AtATG2 であると結論付けた。

酵母における研究から、ATG2 は、ATG18 および ATG9 と結合し、オートファゴソーム形成に不可欠な因子であることが明らかとなっているが (Shintani et al., 2001; Stromhaug et al., 2001; Wang et al., 2001; Obara et al., 2008)、具体的な分子機能は依然として不明である。シロイヌナズナにおいては、ATG2 は少なくともオートファジー系に必要とされる因子であることのみ報告されている (Inoue et al., 2006)。

また、AtATG2 の cDNA をクローニングし、その塩基配列を調べたところ、シロイヌナズナのデータベースサイト TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) にお

いて公開されているものとは異なるスプライシングパターンがあることがわかった (Figure 7)。Wang et al. (2011) も *AtATG2* のスプライシングパターンについて、我々が検出した配列とまったく同じ配列を報告している。本研究では TAIR 上に公開されているスプライシングパターンを確認できず、また他の生物種の *ATG2* cDNA との比較からも、TAIR 上のスプライシングパターン予測は誤りではないかと推察される。

3-4 *peup1* 変異株ではペルオキシソームの分解が阻害されている

オートファジーはオルガネラの分解機構としても知られている。ATG2 はオートファゴソーム形成に必須の因子と考えられていることから、*peup1* ではペルオキシソームの分解が抑制されていることが示唆された。もしペルオキシソームの分解が抑制されるのであれば、変異株では、ペルオキシソーム数が増加すると予想される。そこで、*peup1* 変異株からプロトプラストを単離し、一細胞あたりのペルオキシソーム数を GFP-PTS1 株と比較した (Figure 8A)。GFP-PTS1 株では一細胞あたり、約 50 個のペルオキシソームが計測された。一方、*peup1-1* 変異株では約 80 個のペルオキシソームが計測され、予想通りペルオキシソーム数が増加していた (Figure 8B)。さらに、*peup1-1* 変異株で観察されたペルオキシソームを、GFP-PTS1 のようにドット状に存在しているものと凝集体を構成しているものとを区別して計測を行った。その結果、ドット状に存在するペルオキシソーム数は両者の間で有意差はなかったが、*peup1-1* 変異株では、ドット状に存在するペルオキシソームに加え凝集体を構成するペルオキシソームが存在していることが明らかとなった (Figure 8B)。この結果から、*peup1* 変異株では、オートファジーによるペルオキシソームの分解が抑えられていることが

示唆された。

酵母や動物細胞では、ミトコンドリアもオートファジーによって分解されることが報告されている。そこで *peup1-1* 変異株のミトコンドリアを GFP で可視化した植物体 *peup1-1* Mt-GFP 株を作出し、ミトコンドリアについても同様の解析を行った。コントロールである Mt-GFP 株のミトコンドリアは一細胞あたり 160 個程度存在していた。一方、*peup1-1* Mt-GFP 変異株においてもコントロール株と同程度のミトコンドリアが計測された (Figure 9)。この結果から、*peup1* 変異は少なくともミトコンドリアの個数に対しては影響を与えないことが示唆された。

3-5 *peup1* 変異株にはペルオキシソームタンパク質が過剰に蓄積する

プロトプラストを用いた解析から、*peup1* 変異株ではペルオキシソームの分解が抑制されていることが予想された。そこで、*peup1* 変異株の本葉から総タンパク質を抽出し、*peup1* 変異によるタンパク質の蓄積への影響を調べた。CAT、GO、hydroxypyruvate reductase (HPR) をペルオキシソームのマトリックスタンパク質のマーカースとして、PEX14 および APX はペルオキシソームの膜タンパク質のマーカースとして、そのタンパク質量を調べた結果、調べた全てのペルオキシソームタンパク質において *peup1* 変異株の方が GFP-PTS1 株よりも増大していた (Figure 10A)。この結果は、*peup1* 変異株においてペルオキシソーム数が増加していたこと (Figure 8) と一致している。また、これらのペルオキシソームタンパク質をコードする遺伝子の顕著な発現上昇は認められなかったため (Figure 10C)、*peup1* 変異株におけるペルオキシソーム数の増加 (Figure 8) およびペルオキシソームタンパク質の過剰な蓄積 (Figure 10A) は、ペルオ

キシソームの増殖が促進された結果ではなく、ペルオキシソームの分解が抑制された結果であると結論づけられた。一方、ミトコンドリアタンパク質である cytochrome *c* oxidase subunit 2 (COX2) や葉緑体のタンパク質である ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (RBCL)には、親株と *peup1* 変異株において蓄積の差は見られなかった (Figure 10A)。この結果は、ミトコンドリアの数や形態に異常が見られなかった結果 (Figure 9) と一致し、*peup1* 変異がペルオキシソームに対してのみ強く影響していることを示唆している。

3-6 ペルオキシソーム凝集体にはカタラーゼが濃縮されて蓄積している

peup1 変異株におけるペルオキシソーム凝集体を、より詳細に調べるために電子顕微鏡により観察を行った。GFP-PTS1 株の葉肉細胞では単独のペルオキシソームが葉緑体の近傍に存在しているのが観察された (Figure 11)。一方、*peup1-1* 変異株の葉肉細胞では、蛍光顕微鏡観察と同様にペルオキシソームの凝集体が観察された (Figure 11)。さらに、凝集体を構成する多くのペルオキシソームには、内部に電子密度の高い領域が観察された。興味深いことに、この *peup1* 変異株で観察される電子密度の高い領域が、凝集体を構成するペルオキシソーム間で向かい合って存在する様子が高頻度で観察された (Figure 12)。この電子密度の高い領域は、*peup1-1* 変異株でも単独で存在しているペルオキシソームにはほとんど観察されなかった (Figure 11)。これらの結果は、電子密度の高い領域がペルオキシソームの凝集と関係があることを示している。

そこで、*peup1* 変異株のペルオキシソームに存在する電子密度の高くなった領域の正体を調べるために、免疫電子顕微鏡観察を行った (Figure 13)。抗体は

ペルオキシソームのマトリックタンパク質である GO、HPR、CAT、そして外来遺伝子産物である GFP に対する抗体を用いた。これらのうち、CAT だけがペルオキシソームの通常の領域に加えて電子密度の高い領域にも存在することが明らかとなり (Figure 13C)、電子密度の高い領域には CAT が濃縮されて存在していることが示唆された。

ミトコンドリアについても電子顕微鏡により観察したが、GFP-PTS1 株および *peup1* 変異株のミトコンドリアとの間に明確な違いは認められなかった (Figure 11)。

3-7 凝集したカタラーゼは不活性化している

電子顕微鏡観察の結果、*peup1* 変異株のペルオキシソーム凝集体には CAT が濃縮して存在していることが示された。これは CAT がタンパク質凝集していることを示唆している。このことを検証するために、GFP-PTS1 株および *peup1-1* 変異株から抽出した総タンパク質を、可溶性画分と不溶性画分とに分画し、ウェスタンブロット解析した。GFP-PTS1 株および *peup1-1* 変異株のどちらにおいてもマトリックタンパク質である GO と GFP-PTS1 タンパク質は可溶性画分から検出され、膜タンパク質である PEX14 と APX は不溶性画分から検出された (Figure 14A)。しかし、CAT に関しては、GFP-PTS1 株のサンプルでは主として可溶性画分から検出されたが、*peup1-1* 変異株のサンプルでは可溶性画分に加え、不溶性画分からも検出された (Figure 14A)。この結果は、*peup1* 変異株では CAT が凝集タンパク質となって蓄積していることを示しており、CAT が電子密度の高い領域の構成成分であることを強く示唆している。

続いて、可溶性画分および不溶性画分の CAT 活性を測定した (Figure 14B)。

得られた CAT 活性をウェスタンブロット解析により試算された CAT タンパク質量(Figure 14C)で除算し、相対的比活性を算出した (Figure 14D)。面白いことに、可溶性画分においては GFP-PTS1 株と *peup1-1* 変異株の CAT の相対的比活性は同程度だった。一方、*peup1* 変異株の不溶性画分から検出された CAT は、その比活性が低下していることがわかった。この結果は CAT が凝集タンパク質になって不活性化していることを示している。

3-8 *peup1* 変異株のペルオキシソームは酸化状態になっている

不活性化した CAT が *peup1* 変異株のペルオキシソームの凝集体に蓄積していたことから、CAT の基質である過酸化水素がペルオキシソームに蓄積していることが予想された。そこで、reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein 2 (roGFP2) (Dooley et al., 2004; Hanson et al., 2004; Meyer et al., 2007; Choi et al., 2012) を用いて、ペルオキシソームの酸化還元状態を調べた。roGFP2 は 405nm と 488nm の 2 種類の励起波長によって、緑色の蛍光を放つ 2 波長励起 1 波長測光型の蛍光タンパク質である。405nm と 488nm で励起された時に発せられる蛍光強度が、酸化還元状態に応じて変化することから、405nm と 488nm それぞれで励起した時の蛍光強度を測定し、それらの比を計算することで酸化還元状態をモニターすることができる(Dooley et al., 2004)。例えば、酸化状態だと、roGFP 蛍光の比 (405/488 nm) は増加する。そのため、roGFP を葉緑体やミトコンドリア、ペルオキシソームなどの輸送シグナルを付加して融合タンパク質として発現させることにより、各種オルガネラの酸化還元状態をリアルタイムで測定することが可能となる(Schwarzlander et al., 2008; Rosenwasser et al., 2010)。そこで、roGFP2 に PTS1 シグナルを付

加した融合遺伝子を野生株に発現させた植物体 roGFP-PTS1 および、GFP 蛍光を持っていない *peup1-1* 変異株に発現させた植物体 *peup1-1* roGFP-PTS1 を作出し、ペルオキシソームの酸化還元状態の解析を行った。

通常の生育条件下で、roGFP-PTS1 株のペルオキシソーム内における 405/488 nm の比の値は、ペルオキシソーム 1 つあたり平均して 0.822 ± 0.266 だった。一方、*peup1-1* roGFP-PTS1 変異株の凝集体を形成するペルオキシソームでは 1.17 ± 0.183 という値だった。Figure 15A では酸化還元状態を画像で示し、Figure 15B には 405/488 nm 比を分布図で示している。これらの結果は、*peup1* 変異株のペルオキシソーム凝集体がコントロール株よりも酸化的な状態であることを示しており、過酸化水素が蓄積していることを示唆している。一方、*peup1* 変異株においても凝集体を形成していないペルオキシソームの一部はコントロール株と同程度の酸化還元状態だった (Figure 16)。これらの結果は、*peup1* 変異株では、凝集体を形成するペルオキシソームは酸化的状态になっていることを示している。また、*peup1* 変異株のペルオキシソーム凝集体は、外から加えた過酸化水素処理に対して敏感に影響されることが示された (Figure 17)。この結果は、*peup1* 変異株におけるペルオキシソーム凝集体はその機能が損なわれ、劣化したペルオキシソームの集合体であることを示している。

3-9 過酸化水素の蓄積はペルオキシソームの凝集体を誘導する

ペルオキシソーム凝集体は、不活性化した CAT が蓄積し酸化的状态になっていたことから、ペルオキシソーム凝集体と過酸化水素に何らかの関係があることが示唆された。このことを直接的に調べるために、GFP-PTS1 株に過酸化水素を処理しペルオキシソームの挙動を観察した。0.1 % (v/v) 過酸化水素水に

GFP-PTS1 株の葉を 10 分間浸し、その後、共焦点顕微鏡で観察したところ、ペルオキシソームが伸びて変形し、一部では小さな凝集体を形成し始めている様子が観察された (Figure 18 中央)。この観察結果は、*peup1* 変異株におけるペルオキシソーム凝集の原因が過酸化水素であることを示唆している。

続いて、CAT 活性の低下による過酸化水素の蓄積がペルオキシソーム凝集の原因となっているかどうかを検証するために、CAT 活性の低下している変異株を作製し解析することとした。*CAT* のアイソザイムはシロイヌナズナゲノムに 3 つ (*CAT1*、*CAT2*、*CAT3*) 存在する。*CAT1* は主に種子や生殖器官で発現しており、*CAT2*、*CAT3* は葉で強く発現している (Frugoli et al., 1996; Mhamdi et al., 2010)。ただし、*CAT3* は発現しているものの、葉に認められる CAT 活性は主として *CAT2* に依存している (Mhamdi et al., 2010) (Figure 19)。そのため、*cat2* ノックアウト株を CAT 活性低下株として以後の解析に用いることにした。

まず、*CAT2* 遺伝子に T-DNA が挿入された変異株 *cat2-1* (SALK_76998) を入手し、それに *GFP-PTS1* 遺伝子を導入した植物体 (*cat2-1* GFP-PTS1) を作製した。そして、*cat2-1* GFP-PTS1 変異株の本葉のペルオキシソームを観察したところ、いくつかの細胞でペルオキシソームが凝集体を形成している様子が観察された (Figure 18 右)。*cat2* 変異株では植物個体に過酸化水素が蓄積することが既に報告されており (Hu et al., 2010)、この結果は、*cat2* 変異株では内在的な過酸化水素の蓄積によってペルオキシソームが凝集体を形成しことを示唆している。

3-10 オートファゴソームマーカーである ATG8 はダメージを受けたペルオキシソームに局在する

オートファジーによるペルオキシソームの分解が選択的なものかどうかを調べるために、オートファゴソームマーカーとしてよく用いられる ATG8 の細胞内局在を調べた。GFP-PTS1 株において mCherry-ATG8a は細胞質に拡散し、一部が明るい球状の構造を取っていた。この構造物は前オートファゴソーム構造体 (PAS) と呼ばれるオートファゴソーム膜の形成起点であると考えられている (Suzuki et al., 2001)。通常の条件下において、ATG8 の球状構造とペルオキシソームは共局在しなかった (Figure 20A 上段)。一方で、ATG8 の球状構造は *cat2* 変異株および *peup1* 変異株のペルオキシソーム凝集体とはかなりの高頻度で共局在していた (Figure 20A 中段および下段)。また、*peup1* において凝集体を形成していないペルオキシソームは ATG8 の球状構造とは共局在していなかった。

さらに、オートファゴソームとペルオキシソームとの共局在を遠心分画によっても確認した (Figure 20B)。ペルオキシソームタンパク質である CAT と PEX14 は主として P1 および P8 画分から検出されたことから、これらがペルオキシソーム画分であると考えられた。CAT は S100 画分からも検出されたが、これは抽出操作の途中で壊れたペルオキシソームに由来していると考えられる。オートファゴソームマーカーとして用いた ATG8 は、GFP-PTS1 株のサンプルからは主として P100 および S100 画分から検出された。一方、*peup1* 変異株のサンプルでは P100、S100 画分よりも P1 および P8 画分に ATG8 が検出された。これらの結果は ATG8 が *peup1* 変異株においてペルオキシソーム凝集体と共局在していることを示唆し、Figure 20A の観察結果を強く支持するものである。

次いで、ATG8 とペルオキシソームとの相互作用を客観的に評価するために、ATG8 と共局在するペルオキシソームの割合を顕微鏡画像から算出した (Figure 21 および 22)。凝集していないペルオキシソームについて、ATG8 の球状構造の近傍に局在していたのは、GFP-PTS1 株では~17%、*cat2* 変異株および *peup1* 変異株では~30%だった (Figure 22A)。ペルオキシソーム凝集体については、90%以上が ATG8 の球状構造と共局在していた (Figure 22B)。これらの結果は、ダメージを受けたペルオキシソームに対して選択的にオートファジーによる分解が行われていることを強く示唆している。

3-1-1 カタラーゼの凝集体はペルオキシソーム分解に必須ではない

cat2 変異株においてペルオキシソームの凝集体が観察されたが、これは過酸化水素による影響に加えて、*peup1* 変異株と同様に、ペルオキシソームの分解が抑制されている可能性が考えられた。もし *CAT2* がオートファジー分解に必要な因子であるならば、ペルオキシソーム分解が阻害されペルオキシソームの凝集体が細胞質に蓄積するからである。そこで、*cat2* 変異株でペルオキシソームが増加しているかどうかを検討した。*cat2-1* GFP-PTS1 変異株ではペルオキシソーム凝集体が観察されたものの、ペルオキシソーム数の合計は GFP-PTS1 株 (Figure 8) とほぼ同じであった (Figure 23A)。一方、オートファジー欠損株である *atg2-1* と掛け合わせた *atg2-1 cat2-1* GFP-PTS1 変異株では、*cat2-1* GFP-PTS1 株よりも凝集体を形成しているペルオキシソームの分だけその数が増加していた。つまり、*atg2* 遺伝子依存的にペルオキシソーム数が増加していることが明らかとなった。

さらに、*cat2* 変異株においてペルオキシソームタンパク質が過剰に蓄積して

いないかウェスタンブロットによって調べた。*cat2* 変異株には、まだ *CAT3* が存在しているので、*cat2 cat3* 二重変異株も作出してペルオキシソームタンパク質の蓄積を調べた。Figure 23B に示されているように、いずれも *ATG2* 遺伝子依存的にペルオキシソームタンパク質の蓄積が見られ、*CAT2* や *CAT3* 遺伝子の欠損は、ペルオキシソームタンパク質の蓄積に影響しなかった。これらの結果から、*CAT* の欠損はペルオキシソームの分解を妨げず、*CAT* が存在しなくてもオートファジーによるペルオキシソーム分解が起きていると結論づけた。

3-12 カタラーゼの凝集体はペルオキシソームの凝集体形成にも必須ではない

これまでの研究から、過酸化水素がペルオキシソームの凝集を引き起こしていることが明らかとなったが、ペルオキシソームを凝集させている直接的な因子は依然として不明である。電子顕微鏡観察 (Figure 11 および Figure 12) では、ペルオキシソームの電子密度が高くなった領域が互いに向かい合ってペルオキシソームが凝集している様子が観察されたことから、凝集した *CAT* がペルオキシソームを繋ぎ止めているのではないかと考えられた。そこで、*CAT* を完全に欠損させた *peup1* 変異株を作出し、ペルオキシソームが凝集体を形成するかどうかを検証した。遺伝子多型検出の容易さから、*peup1-1* ではなく T-DNA 挿入変異株 *atg2-1 GFP-PTS1* を用い、*atg2-1 cat2-1 cat3-1 GFP-PTS1* 株を作出した。ところが、蛍光観察を行ったところ、外来遺伝子のサイレンシング効果によるのか、*GFP* 蛍光は全く観察できず、ペルオキシソームの凝集体の有無が判定できなかった。そこで、電子顕微鏡観察を行い、ペルオキシソームの凝集体が存在するかどうかを調べたところ、*atg2-1 cat2-1 cat3-1 GFP-PTS1* 株にペル

オキシソームの凝集体が観察された (Figure 24)。ペルオキシソームの凝集体が観察される頻度は *peup1-1* と同等であったことから、*atg2* 変異株において CAT の有無はペルオキシソームの凝集体形成に大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。加えて、*atg2-1 cat2-1 cat3-1* GFP-PTS1 株で観察されたペルオキシソームの凝集体には電子密度の高くなった領域は観察できなかった。この結果は、電子密度の高くなった領域が CAT の凝集した領域であることを支持している。

考察

本研究では、ペルオキシソームの凝集体を持つ *peup1* 変異株の解析を行った。そこから得られた結果に基づいて、オートファジーによるペルオキシソーム分解の生理的意義と変異株におけるペルオキシソームの凝集体形成機構についてモデル図を作製した (Figure 25)。詳細を以下の項目で説明する。

4-1 ペルオキシソームの品質管理におけるオートファジーの役割

光合成組織におけるペルオキシソーム内では、主として光呼吸系に由来する過酸化水素が発生している。その過酸化水素を消去する主要な酵素は CAT であるが、CAT は基質である過酸化水素によって不活性化することが古くから知られている (Williams, 1928)。実際に、あらかじめ過酸化水素処理を行ったサンプルの CAT 活性は、過酸化水素処理を行っていないサンプルと比較して半分以下に低下する (Figure 26)。本研究から、*peup1* 変異株におけるペルオキシソームの凝集体は、過剰な過酸化水素によってダメージを受けたペルオキシソームの集合体であることが明らかとなった (Figure 15-18)。過酸化水素はプログラム細胞死などを導くシグナル分子としても機能するので (Alvarez et al., 1998; Gechev and Hille, 2005)、過酸化水素を適切に制御できないペルオキシソームの存在は、植物の生育に悪影響を及ぼすと予想される。*peup1* 変異株においてそのような有害なペルオキシソームが蓄積していたことは、野生株では有害なペルオキシソームはオートファジーによる分解で選択的に取り除かれているということを示唆している。哺乳類細胞において、*atg2* 変異体の細胞内には不完全な隔離膜が蓄積することが知られている (Velikkakath et al., 2012)。この不完

全な隔離膜にはすでに ATG8 が局在している。したがって、*peup1* 変異株において ATG8 がペルオキシソーム凝集体の周辺部にのみ蓄積していたという結果 (Figure 20) は、ペルオキシソームの凝集体がオートファジーによって選択的に分解されることを示唆しており、オートファジーはダメージを受けたペルオキシソームを分解することによって、ペルオキシソームの品質管理の役割を果たしていると考えられる。

4-2 *peup1* 変異株におけるペルオキシソーム凝集体の形成機構

本研究では、過剰量の過酸化水素がペルオキシソームの凝集体形成を誘導することを明らかにした (Figure 18) が、この発見は Sinclair et al. (2009) が報告したペロキユール形成との関係を示唆している。彼女らは、シロイヌナズナの葉に過酸化水素を滴下すると、ペルオキシソームが変形し、ペロキユールと呼ばれる伸長した構造を取ることを示した (Sinclair et al., 2009)。実際、*peup1* 変異株において凝集体を形成するペルオキシソームは、しばしばペロキユールのような伸長した構造を取っており、過酸化水素の蓄積は、ペロキユールのような伸長した構造を経てペルオキシソームの凝集体形成を導いていく可能性を示唆している。*peup1* 変異株ではオートファジーによる分解が起こらないので、過酸化水素によってダメージを受けたペルオキシソームは、徐々に大きな凝集体となっていくのだと考えられる。

しかしながら、凝集体形成に関わるペルオキシソーム同士をつなぎとめる接着剤様因子は未同定である。電子顕微鏡観察では、凝集した CAT タンパク質がペルオキシソームの接着面に局在する傾向が観察されたことから (Figure 12)、CAT がその接着因子ではないかという仮説を立てた。しかしながら、葉に CAT

タンパク質が存在しない *atg2cat2cat3* 三重変異株においても、葉肉細胞にペルオキシソームの凝集体が観察されたことから (Figure 24)、ペルオキシソームの凝集体形成に凝集 CAT タンパク質は必須ではないことが明らかとなった。しかしながら、過酸化水素は CAT のみならず多くのタンパク質や膜脂質を酸化するので (Siddique et al., 2012)、電子顕微鏡で観察された電子密度の高い領域の周辺には過酸化水素により変性した様々なタンパク質や脂質が蓄積している可能性も考えられる。したがって、過酸化水素によって変性した CAT 以外のタンパク質や脂質がペルオキシソームの凝集体形成に関わっていると思われる。

4-3 オートファジーによるペルオキシソームの品質管理

peup1 変異株では、ダメージを受けたペルオキシソームが顕著に蓄積していたにもかかわらず、グリオキシソームや緑葉ペルオキシソームの活性に明白な低下は見られなかった (Figure 5) これは、*peup1* 変異株において活性のあるペルオキシソームも、野生株と同様に存在していたためだと推察される (Figure 8, 11, 16)。一方で、*peup1* 変異株は老化が促進され、生育もわずかながら阻害されていた (Figure 4B)。この老化の促進という表現型は他の *atg* 変異株でも観察され、過酸化水素も蓄積していることが報告されている (Yoshimoto et al., 2009)。しかし、どのオルガネラに由来する過酸化水素か不明であった。*peup1* において凝集体を形成する劣化ペルオキシソームは、カタラーゼが失活した結果、過酸化水素を蓄積しているため (Figure 11, 14, 15)、おそらくは最終的に過酸化水素がペルオキシソームから細胞質へと漏れ出し、細胞にダメージを与えていると考えられる。さらには過酸化水素がシグナル分子として機能し、プログラム細胞死を引き起こしているのかもしれない。過酸化水素の発生源として

は、ペルオキシソームの他に葉緑体とミトコンドリアが考えられる。しかしながら、葉緑体とミトコンドリアの数や形態については、コントロール株と *peup1* 変異株との間に有意な違いを見出すことができなかったことから (Figure 9-11)、これらのオルガネラの過酸化水素レベルは正常に制御されているものと考えられる。したがって、*peup1* 変異株における老化の促進という表現型は、オートファジー不全によって蓄積した過酸化水素を制御できない劣化ペルオキシソームが原因の1つになったと考えられる。

序章に既述したように、酵母や動物細胞ではオートファジーによるペルオキシソーム分解は既に知られており、ペキソファジーと名付けられている。ペキソファジーは主としてメタノール資化性酵母を用いた研究から、不要になったペルオキシソームを分解する系だと考えられていた。しかし、最近メタノール資化性酵母においてダメージを受けたペルオキシソームもオートファジー系で分解されているという結果が示され、メタノール資化性酵母でもペキソファジーが品質管理機構としても機能していることが示唆された (van Zutphen et al., 2011)。植物では、メタノール資化性酵母のようにペルオキシソームが不要になる環境条件はほとんど存在しないので、植物におけるペキソファジーは冗長になったペルオキシソームを取り除く機構というよりは、劣化ペルオキシソームを分解して活性の高いペルオキシソームだけを残すという品質管理機構が主な生理的機能と考えられる。

ペルオキシソームの品質管理機構に関わる因子として、Lon プロテアーゼも知られている。Lon プロテアーゼは *Escherichia coli* で発見され (Charette et al., 1981)、その後広く生物に保存されているタンパク質であることがわかった。ペルオキシソームに局在する Lon プロテアーゼはラットで最初に発見された (Kikuchi et al., 2004)。シロイヌナズナでは、存在が確認された4つの Lon プ

ロテアーゼのうち Lon2 がペルオキシソームに局在することが報告されている (Ostersetzer et al., 2007)。ATP 依存的 Lon プロテアーゼは AAA(+)スーパーファミリーに属し、異常になったペルオキシソームのマトリックスタンパク質を選択的に分解するプロテアーゼとして機能すると同時に、タンパク質のリフォールディングを補助するシャペロンとしての機能ももつ(Aksam et al., 2007; Bartoszewska et al., 2012)。最近、*Penicillium chrysogenum* Lon (Pln)が、酸化されたタンパク質を特異的な基質として認識し分解することによりペルオキシソームの品質管理を行っていることが示された。面白いことに、*pln* 変異株のペルオキシソームは、*peup1* 変異株で観察されたような電子密度の高い領域を含んでいた(Bartoszewska et al., 2012)。シロイヌナズナにおける LON2 の機能はまだよくわかっていないが、最近 LON2 が、劣化したペルオキシソームのマトリックスタンパク質を分解し、かつオートファジーと相補的に機能していることが示唆された(Lingard and Bartel, 2009; Farmer et al., 2013)。また、最近、当研究部門でも、ペルオキシソーム膜に過剰に蓄積したペルオキシソームレセプター (PEX7) はプロテアソームによって特異的に分解されることを明らかにした(Cui et al., 2013)。このように、オートファジーに加えて、Lon やプロテアソームのようなペルオキシソームの品質管理機構が機能するために、*peup1* 変異株においても、ペルオキシソームの機能が顕著に低下しなかった (Figure 5) と推定される。

4-4 何がオートファジーを介したペルオキシソームの分解シグナルか？

本研究において、オートファジーがペルオキシソームの品質管理機構として機能していることが示された。しかしながら、どのような機構で劣化したペルオ

キシソームが選択されているのかはいまだに未解明である。

当初、凝集タンパク質になった CAT がオートファジーに対する分解シグナルとなっていると考えたが、*cat* 変異株を用いた解析 (Figure 23) から、CAT の存在はペルオキシソーム分解に必須ではないことが明らかとなった。しかし、これは CAT が唯一のシグナルではないことを示したに過ぎない。なぜなら上述したように、電子密度の高くなった領域、すなわちカタラーゼの凝集の周りには CAT 以外のダメージを受けた物質が蓄積していることが示唆されているからである。凝集タンパク質や活性酸素種によって酸化したタンパク質が、オートファジーの特異的分解基質となっているという報告があり (Toyooka et al., 2006; Xiong et al., 2007)、これらの物質がオートファジーに対してペルオキシソームの分解シグナルとして機能している可能性は否定できない。今後は CAT を含め、凝集タンパク質や酸化タンパク質、酸化脂質など不特定の物質がシグナルとなっている可能性も検証しなければならない。

酵母におけるペキシソファジーでは、序章で述べたように Atg30 や Atg36 などのペルオキシソームとオートファジーとをつなぐアダプター因子が発見されている (Farre et al., 2008; Motley et al., 2012)。植物においてもこのようなアダプター因子を発見、解析することが、今後の植物ペキシソファジー研究の重要なテーマである。これまでに植物で唯一報告されているアダプター因子 NBR1 は、シロイヌナズナにおいてユビキチン化された凝集タンパク質と ATG8 とをつなぐ分子であることが明らかとなっている (Zhou et al., 2013)。本研究から、*peup1* 変異株では、CAT をはじめ様々なペルオキシソームタンパク質が凝集したり酸化されたりすることが示唆されたので、この NBR1 が劣化したペルオキシソームとオートファジーとをつなぐアダプター因子かもしれない。今後は NBR1 にも着目して研究を進めていきたい。

引用文献

水島昇, 吉森保. (2012). オートファジー 化学同人 ISBN: 978-4-7598-1505-4

Aksam, E.B., Koek, A., Kiel, J.A., Jourdan, S., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J. (2007). A peroxisomal lon protease and peroxisome degradation by autophagy play key roles in vitality of *Hansenula polymorpha* cells. *Autophagy* **3**, 96-105.

Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., and Lamb, C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**, 773-784.

Arai, Y., Hayashi, M., and Nishimura, M. (2008). Proteomic identification and characterization of a novel peroxisomal adenine nucleotide transporter supplying ATP for fatty acid β -oxidation in soybean and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 3227-3240.

Asano, T., Yoshioka, Y., Kurei, S., Sakamoto, W., Sodmergen, and Machida, Y. (2004). A mutation of the *CRUMPLED LEAF* gene that encodes a protein localized in the outer envelope membrane of plastids affects the pattern of cell division, cell differentiation, and plastid division in *Arabidopsis*. *Plant J.* **38**, 448-459.

Bartoszewska, M., Williams, C., Kikhney, A., Opalinski, L., van Roermund, C.W., de Boer, R., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J. (2012). Peroxisomal proteostasis involves a Lon family protein that functions as protease and chaperone. *J. Biol. Chem.* **287**, 27380-27395.

Bell, C.J., and Ecker, J.R. (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**, 137-144.

Charette, M.F., Henderson, G.W., and Markovitz, A. (1981). ATP hydrolysis-dependent

- protease activity of the Lon (capR) protein of *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **78**, 4728-4732.
- Choi, W.G., Swanson, S.J., and Gilroy, S.** (2012). High-resolution imaging of Ca²⁺, redox status, ROS and pH using GFP biosensors. Plant J. **70**, 118-128.
- Cui, S., Fukao, Y., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M., and Nishimura, M.** (2013). Proteomic analysis reveals that the Rab GTPase RabE1c is involved in the degradation of the peroxisomal protein receptor PEX7 (peroxin 7). J. Biol. Chem. **288**, 6014-6023.
- Dooley, C.T., Dore, T.M., Hanson, G.T., Jackson, W.C., Remington, S.J., and Tsien, R.Y.** (2004). Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. J. Biol. Chem. **279**, 22284-22293.
- Dunn, W.A. Jr., Cregg, J.M., Kiel, J.A., van der Klei, I.J., Oku, M., Sakai, Y., Sibirny, A.A., Stasyk, O.V., and Veenhuis, M.** (2005). Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. Autophagy **1**, 75-83.
- Farmer, L.M., Rinaldi, M.A., Young, P.G., Danan, C.H., Burkhart, S.E., and Bartel, B.** (2013). Disrupting autophagy restores peroxisome function to an *Arabidopsis lon2* mutant and reveals a role for the LON2 protease in peroxisomal matrix protein degradation. Plant Cell **25**, 4085-4100.
- Farre, J.C., Manjithaya, R., Mathewson, R.D., and Subramani, S.** (2008). PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. Dev. Cell **14**, 365-376.
- Feng, X., Arimura, S., Hirano, H.Y., Sakamoto, W., and Tsutsumi, N.** (2004). Isolation of mutants with aberrant mitochondrial morphology from *Arabidopsis thaliana*. Genes Genet. Syst. **79**, 301-305.
- Foyer, C.H., and Noctor, G.** (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. Physiol. Plant. **119**, 355-364.

- Foyer, C.H., Bloom, A.J., Queval, G., and Noctor, G.** (2009). Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 455-484.
- Frugoli, J.A., Zhong, H.H., Nuccio, M.L., McCourt, P., McPeck, M.A., Thomas, T.L., and McClung, C.R.** (1996). Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* **112**, 327-336.
- Gechev, T.S., and Hille, J.** (2005). Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J. Cell Biol.* **168**, 17-20.
- Goepfert, S., and Poirier, Y.** (2007). β -oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 245-251.
- Goto, S., Mano, S., Nakamori, C., and Nishimura, M.** (2011). *Arabidopsis* ABERRANT PEROXISOME MORPHOLOGY9 is a peroxin that recruits the PEX1-PEX6 complex to peroxisomes. *Plant Cell* **23**, 1573-1587.
- Graham, I.A.** (2008). Seed storage oil mobilization. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 115-142.
- Hanson, G.T., Aggeler, R., Oglesbee, D., Cannon, M., Capaldi, R.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J.** (2004). Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* **279**, 13044-13053.
- Hayashi, M., and Nishimura, M.** (2006). *Arabidopsis thaliana*-a model organism to study plant peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1382-1391.
- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., and Nishimura, M.** (1998). 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of *Arabidopsis* have defects in glyoxysomal fatty acid β -oxidation. *Plant Cell* **10**, 183-195.
- Hayashi, M., Nito, K., Toriyama-Kato, K., Kondo, M., Yamaya, T., and Nishimura, M.** (2000). *AtPex14p* maintains peroxisomal functions by determining protein targeting to three kinds of plant peroxisomes. *EMBO J.* **19**, 5701-5710.

- Hu, J., Baker, A., Bartel, B., Linka, N., Mullen, R.T., Reumann, S., and Zolman, B.K.** (2012). Plant peroxisomes: biogenesis and function. *Plant Cell* **24**, 2279-2303.
- Hu, Y.Q., Liu, S., Yuan, H.M., Li, J., Yan, D.W., Zhang, J.F., and Lu, Y.T.** (2010). Functional comparison of catalase genes in the elimination of photorespiratory H₂O₂ using promoter- and 3'-untranslated region exchange experiments in the *Arabidopsis cat2* photorespiratory mutant. *Plant Cell Environ* **33**, 1656-1670.
- Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., and Moriyasu, Y.** (2006). *AtATG* genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in *Arabidopsis* root tip cells. *Plant Cell Physiol.* **47**, 1641-1652.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R., and Mae, T.** (2008). Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an *ATG* gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.* **148**, 142-155.
- Johansen, T., and Lamark, T.** (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**, 279-296.
- Kamada-Nobusada, T., Hayashi, M., Fukazawa, M., Sakakibara, H., and Nishimura, M.** (2008). A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1272-1282.
- Kamada, T., Nito, K., Hayashi, H., Mano, S., Hayashi, M., and Nishimura, M.** (2003). Functional differentiation of peroxisomes revealed by expression profiles of peroxisomal genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **44**, 1275-1289.
- Kanai, M., Hayashi, M., Kondo, M., and Nishimura, M.** (2013). The plastidic DEAD-box RNA helicase 22, HS3, is essential for plastid functions both in seed development and in seedling growth. *Plant Cell Physiol.* **54**, 1431-1440.

- Kikuchi, M., Hatano, N., Yokota, S., Shimozawa, N., Imanaka, T., and Taniguchi, H.** (2004). Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease. *J. Biol. Chem.* **279**, 421-428.
- Kirsch, T., Loffler, H.G., and Kindl, H.** (1986). Plant acyl-CoA oxidase. Purification, characterization, and monomeric apoprotein. *J. Biol. Chem.* **261**, 8570-8575.
- Konieczny, A., and Ausubel, F.M.** (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* **4**, 403-410.
- Kraft, C., Reggiori, F., and Peter, M.** (2009). Selective types of autophagy in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 1404-1412.
- Lingard, M.J., and Bartel, B.** (2009). Arabidopsis LON2 is necessary for peroxisomal function and sustained matrix protein import. *Plant Physiol.* **151**, 1354-1365.
- Loew, O.** (1900). A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science* **11**, 701-702.
- Manjithaya, R., Nazarko, T.Y., Farre, J.C., and Subramani, S.** (2010). Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1367-1373.
- Mano, S., Nakamori, C., Kondo, M., Hayashi, M., and Nishimura, M.** (2004). An *Arabidopsis* dynamin-related protein, DRP3A, controls both peroxisomal and mitochondrial division. *Plant J.* **38**, 487-498.
- Mano, S., Nakamori, C., Nito, K., Kondo, M., and Nishimura, M.** (2006). The *Arabidopsis pex12* and *pex13* mutants are defective in both PTS1- and PTS2-dependent protein transport to peroxisomes. *Plant J.* **47**, 604-618.
- Mano, S., Nakamori, C., Hayashi, M., Kato, A., Kondo, M., and Nishimura, M.** (2002). Distribution and characterization of peroxisomes in *Arabidopsis* by visualization with GFP: dynamic morphology and actin-dependent movement. *Plant Cell Physiol.* **43**, 331-341.

- Mano, S., Nakamori, C., Fukao, Y., Araki, M., Matsuda, A., Kondo, M., and Nishimura, M.** (2011). A defect of peroxisomal membrane protein 38 causes enlargement of peroxisomes. *Plant Cell Physiol.* **52**, 2157-2172.
- Marion, J., Bach, L., Bellec, Y., Meyer, C., Gissot, L., and Faure, J.D.** (2008). Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* **56**, 169-179.
- Meijer, W.H., van der Klei, I.J., Veenhuis, M., and Kiel, J.A.** (2007). *ATG* genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy* **3**, 106-116.
- Meyer, A.J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J.P., and Hell, R.** (2007). Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J.* **52**, 973-986.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., and Noctor, G.** (2010). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* **61**, 4197-4220.
- Mitsuhashi, N., Shimada, T., Mano, S., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2000). Characterization of organelles in the vacuolar-sorting pathway by visualization with GFP in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* **41**, 993-1001.
- Motley, A.M., Nuttall, J.M., and Hettema, E.H.** (2012). Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **31**, 2852-2868.
- Narendra, S., Venkataramani, S., Shen, G., Wang, J., Pasapula, V., Lin, Y., Korniyev, D., Holaday, A.S., and Zhang, H.** (2006). The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development. *J. Exp. Bot.* **57**, 3033-3042.

- Nishimura, M., and Akazawa, T.** (1974). Studies on spinach leaf ribulosebiphosphate carboxylase. Carboxylase and oxygenase reaction examined by immunochemical methods. *Biochemistry* **13**, 2277-2281.
- Nishimura, M., Akhmedov, Y.D., Strzalka, K., and Akazawa, T.** (1983). Purification and characterization of glycolate oxidase from pumpkin cotyledons. *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 397-402.
- Obara, K., Sekito, T., Niimi, K., and Ohsumi, Y.** (2008). The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J. Biol. Chem.* **283**, 23972-23980.
- Ostersetzer, O., Kato, Y., Adam, Z., and Sakamoto, W.** (2007). Multiple intracellular locations of Lon protease in *Arabidopsis*: evidence for the localization of AtLon4 to chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **48**, 881-885.
- Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoerberichts, F.A., Vidorpe, M., Gakiere, B., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Van Breusegem, F., and Noctor, G.** (2007). Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. *Plant J.* **52**, 640-657.
- Reumann, S., Ma, C., Lemke, S., and Babujee, L.** (2004). AraPeroX. A database of putative *Arabidopsis* proteins from plant peroxisomes. *Plant Physiol.* **136**, 2587-2608.
- Rosenwasser, S., Rot, I., Meyer, A.J., Feldman, L., Jiang, K., and Friedman, H.** (2010). A fluorometer-based method for monitoring oxidation of redox-sensitive GFP (roGFP) during development and extended dark stress. *Physiol. Plant.* **138**, 493-502.
- Sakai, Y., Oku, M., van der Klei, I.J., and Kiel, J.A.** (2006). Pexophagy: autophagic

- degradation of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1767-1775.
- Schwarzlander, M., Fricker, M.D., Muller, C., Marty, L., Brach, T., Novak, J., Sweetlove, L.J., Hell, R., and Meyer, A.J.** (2008). Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J. Microsc.* **231**, 299-316.
- Shintani, T., Suzuki, K., Kamada, Y., Noda, T., and Ohsumi, Y.** (2001). Apg2p functions in autophagosome formation on the perivacuolar structure. *J. Biol. Chem.* **276**, 30452-30460.
- Siddique, Y.H., Ara, G., and Afzal, M.** (2012). Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *Dose Response* **10**, 1-10.
- Sinclair, A.M., Trobacher, C.P., Mathur, N., Greenwood, J.S., and Mathur, J.** (2009). Peroxule extension over ER-defined paths constitutes a rapid subcellular response to hydroxyl stress. *Plant J.* **59**, 231-242.
- Somerville, C.R.** (2001). An early Arabidopsis demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration. *Plant Physiol.* **125**, 20-24.
- Stromhaug, P.E., Bevan, A., and Dunn, W.A. Jr.** (2001). GSA11 encodes a unique 208-kDa protein required for pexophagy and autophagy in *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* **276**, 42422-42435.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y.** (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of *APG* genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* **20**, 5971-5981.
- Tolbert, N.E., and Yamazaki, R.K.** (1969). Leaf peroxisomes and their relation to photorespiration and photosynthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **168**, 325-341.
- Tolbert, N.E., and Essner, E.** (1981). Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J. Cell Biol.* **91**, 271s-283s.

- Toyooka, K., Moriyasu, Y., Goto, Y., Takeuchi, M., Fukuda, H., and Matsuoka, K.** (2006). Protein aggregates are transported to vacuoles by a macroautophagic mechanism in nutrient-starved plant cells. *Autophagy* **2**, 96-106.
- Toyota, M., Matsuda, K., Kakutani, T., Terao Morita, M., and Tasaka, M.** (2011). Developmental changes in crossover frequency in *Arabidopsis*. *Plant J.* **65**, 589-599.
- Tuttle, D.L., Lewin, A.S., and Dunn, W.A., Jr.** (1993). Selective autophagy of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *Eur. J. Cell Biol.* **60**, 283-290.
- van Zutphen, T., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J.** (2011). Damaged peroxisomes are subject to rapid autophagic degradation in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Autophagy* **7**, 863-872.
- Veenhuis, M., Douma, A., Harder, W., and Osumi, M.** (1983). Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes. *Arch. Microbiol.* **134**, 193-203.
- Velikkakath, A.K., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N., and Mizushima, N.** (2012). Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol. Biol. Cell* **23**, 896-909.
- Wang, C.W., Kim, J., Huang, W.P., Abeliovich, H., Stromhaug, P.E., Dunn, W.A., Jr., and Klionsky, D.J.** (2001). Apg2 is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways. *J. Biol. Chem.* **276**, 30442-30451.
- Wang, Y., Nishimura, M.T., Zhao, T., and Tang, D.** (2011). ATG2, an autophagy-related protein, negatively affects powdery mildew resistance and mildew-induced cell death in *Arabidopsis*. *Plant J.* **68**, 74-87.
- Williams, J.** (1928). The decomposition of hydrogen peroxide by liver catalase. *J. Gen. Physiol.* **11**, 309-337.

- Wu, F.H., Shen, S.C., Lee, L.Y., Lee, S.H., Chan, M.T., and Lin, C.S.** (2009). Tape-*Arabidopsis* Sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods* **5**, 16.
- Xiong, Y., Contento, A.L., Nguyen, P.Q., and Bassham, D.C.** (2007). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **143**, 291-299.
- Yamada, K., Nagano, A.J., Nishina, M., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M.** (2008). NAI2 is an endoplasmic reticulum body component that enables ER body formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**, 2529-2540.
- Yamada, K., Nagano, A.J., Nishina, M., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M.** (2013). Identification of two novel endoplasmic reticulum body-specific integral membrane proteins. *Plant Physiol.* **161**, 108-120.
- Yamaguchi, J., Nishimura, M., and Akazawa, T.** (1984). Maturation of catalase precursor proceeds to a different extent in glyoxysomes and leaf peroxisomes of pumpkin cotyledons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 4809-4813.
- Yanik, T., and Donaldson, R.P.** (2005). A protective association between catalase and isocitrate lyase in peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **435**, 243-252.
- Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Ohsumi, Y., and Shirasu, K.** (2009). Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 2914-2927.
- Zhou, J., Wang, J., Cheng, Y., Chi, Y.J., Fan, B., Yu, J.Q., and Chen, Z.** (2013). NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses. *PLoS Genet.* **9**, e1003196.
- Zolman, B.K., Yoder, A., and Bartel, B.** (2000). Genetic analysis of indole-3-butyric acid

responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics* **156**, 1323-1337.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、本当にお忙しい中、終始適切なお指導を賜り、便宜を図って頂きました西村幹夫教授に心より感謝の意を表します。また常日頃適切なお指導とご助言を頂きました及川和聡博士に深く感謝致します。

研究において適切なお助言と激励を頂きました林誠教授（長浜バイオ大学）、真野昌二助教、山田健志助教をはじめとする高次細胞機構研究部門のみなさまに深く感謝いたします。また、共同研究者として適切なお助言賜りました大隅良典教授（東京工業大学）、吉本光希博士（INRA）に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、NARAMAP を供与してくださった森田美代教授（名古屋大学）、*roGFP2* を供与してくださった坂本亘教授（岡山大学）、Mt-GFP 株を供与してくださった有村慎一博士（東京大学）、*shm1-1* 変異株を供与してくださった高橋俊一博士（The Australian National University）に深く感謝いたします。

透過型電子顕微鏡写真を撮影していただいた近藤真紀技官、顕微鏡の利用およびご指導頂いた光学解析室の亀井保博特任准教授、斎田美佐子技官に深く感謝いたします。植物の栽培において便宜を図って頂いたモデル植物研究支援室の難波千恵子技官、諸岡直樹技官、鈴木恵子さんに深く感謝いたします。

最後に、日々私を叱咤激励してくださった高次細胞機構研究部門の皆様にく御礼申し上げます。

图 · 表

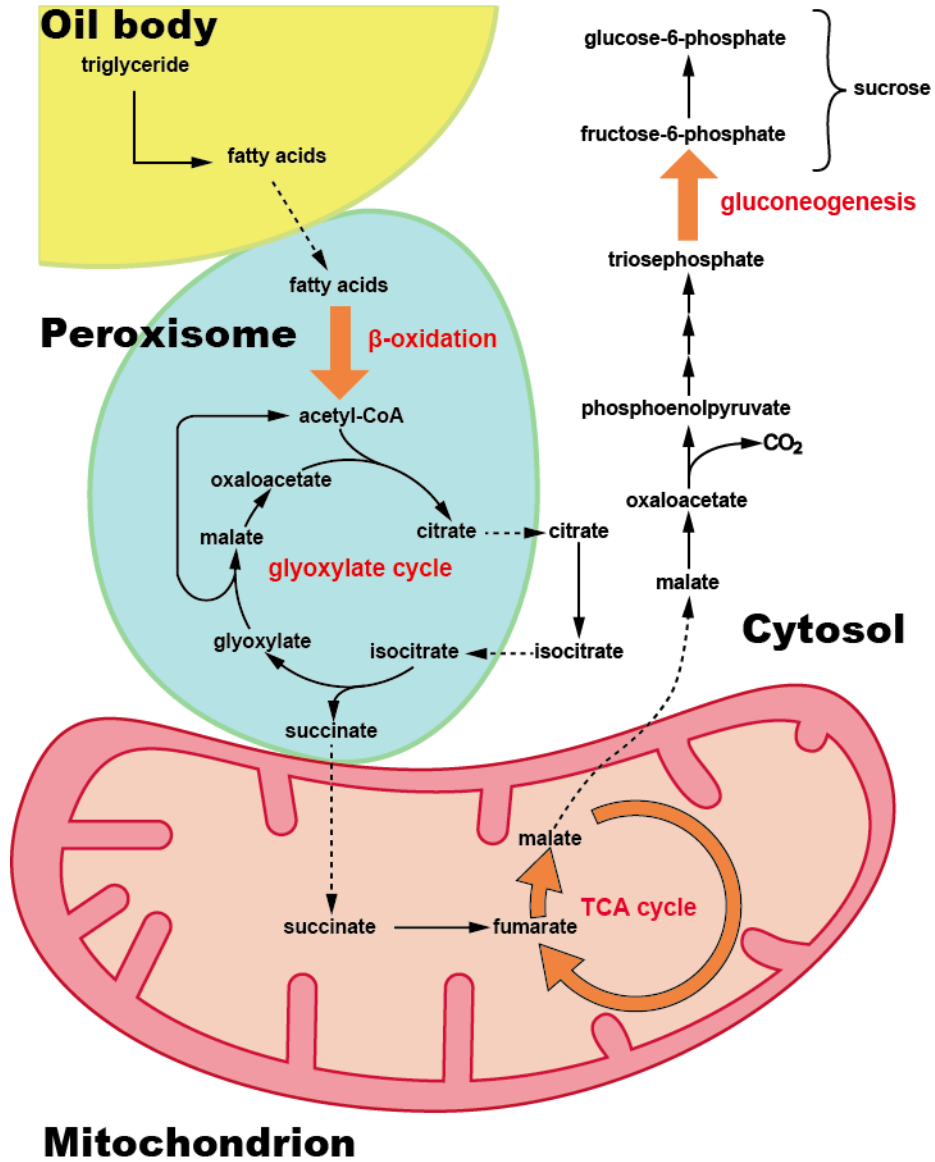


Figure 1. Metabolic Pathway of Storage Oil to Sucrose

Storage oils in oil bodies are converted to soluble sugars via peroxisomes and mitochondria during germination.

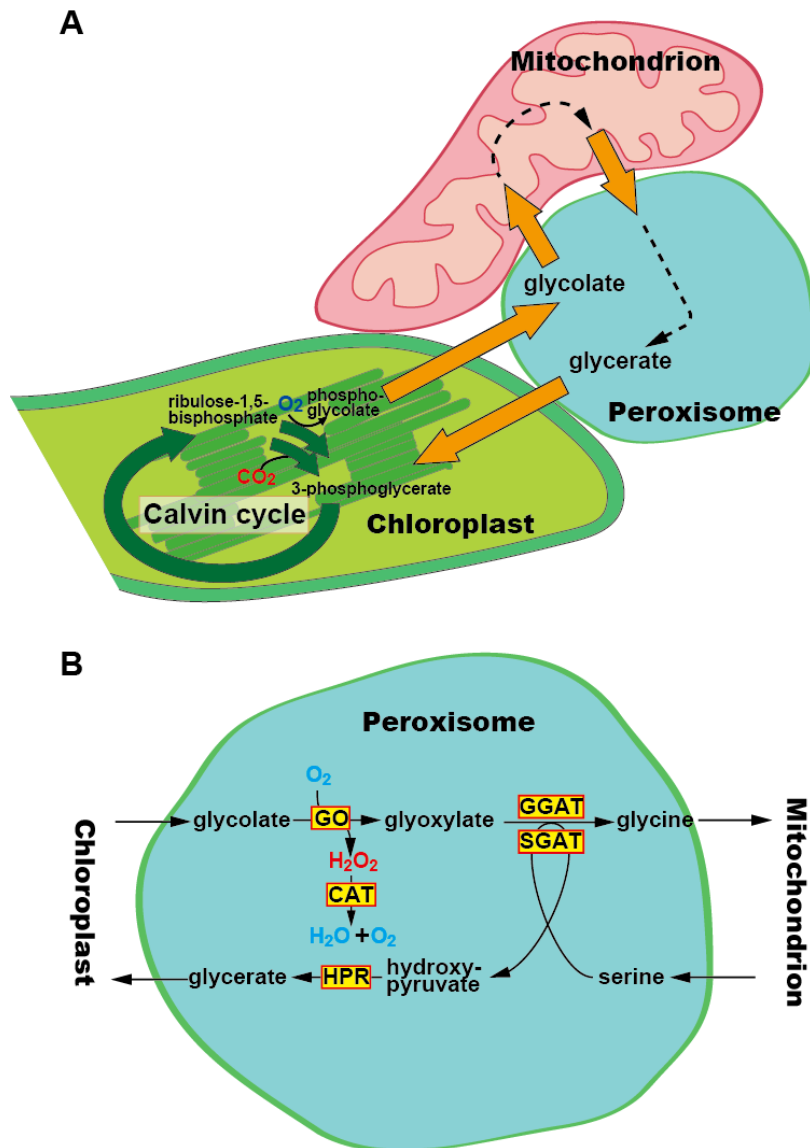


Figure 2. Photorespiratory Pathway and the Core Reactions in a Leaf Peroxisome

(A) The photorespiratory pathway is composed of chloroplast, peroxisome, and mitochondrion. The organelles often stay in close physical proximity to each other in photosynthetic cells.

(B) The core pathway of photorespiration in a peroxisome. The red squares represent enzymes for photorespiration in peroxisomes. GO, glycolate oxidase; CAT, catalase; GGAT, glutamate-glyoxylate aminotransferase; serine-glyoxylate aminotransferase; HPR, hydroxypyruvate reductase.

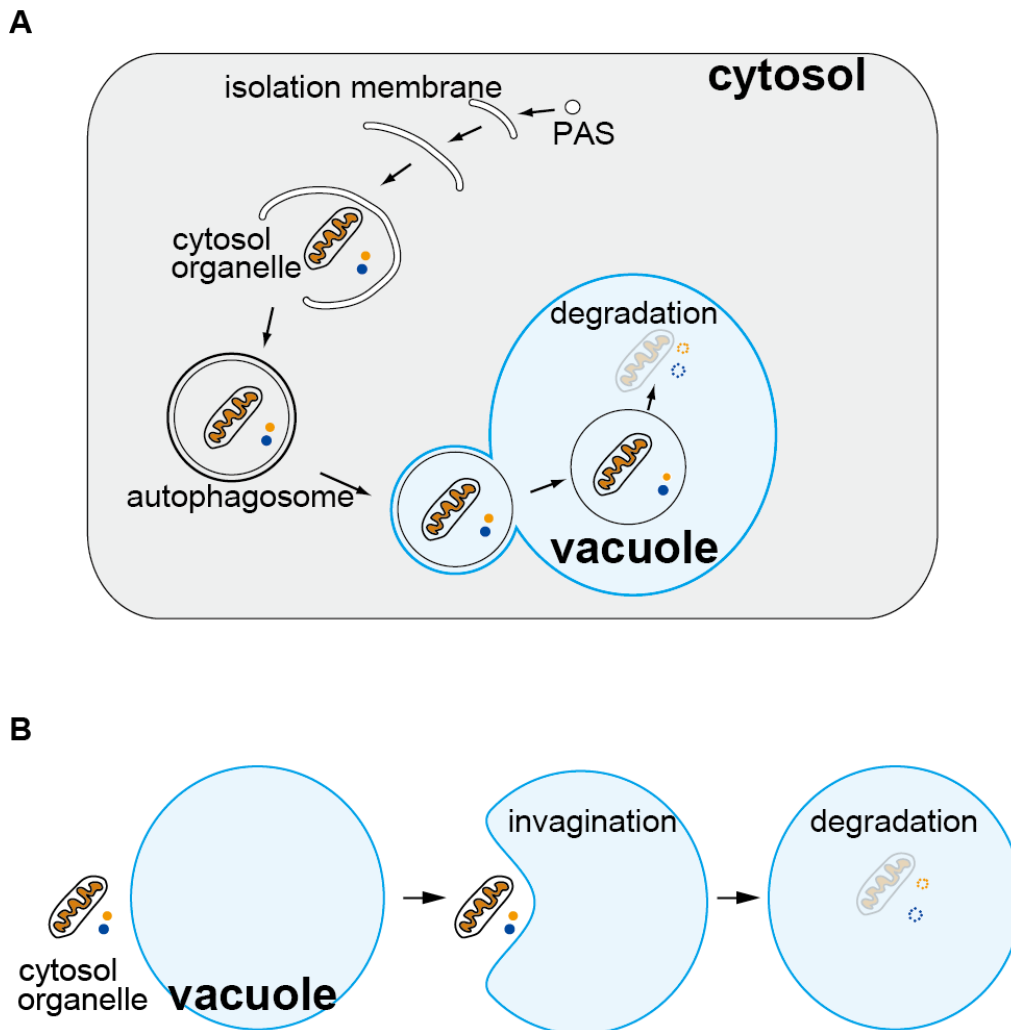


Figure 3. Schemes of Macro- and Micro- Autophagy

(A) Macroautophagy proceeds by the following steps; ATG proteins assemble at pre-autophagosomal structure (PAS), and form isolation membrane. The newly synthesized membrane engulfs the target proteins and/or organelles, and forms an autophagosome. The autophagosome fuses with a vacuole and undergoes degradation with its cargo in the vacuole.

(B) Microautophagy proceeds by the following steps; proteins and/or organelles directly invaginate into vacuole and undergo the degradation. These steps are also supported by same ATG proteins with macroautophagy.

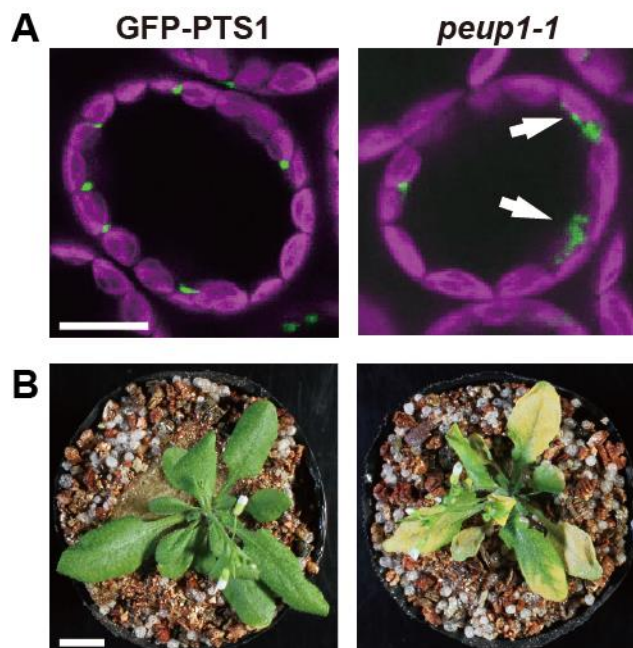


Figure 4. Phenotype of the *peup1* Mutant

(A) Confocal images of the mesophyll cells in a leaf of 3-week-old GFP-PTS1 plant (left) and the *peup1-1* mutant (right). GFP fluorescence from peroxisomes and autofluorescence from chloroplasts are shown in green and magenta, respectively. Arrows indicate the peroxisome aggregations. Bar = 10 μm .

(B) Growth of 40-day-old GFP-PTS1 plant (left) and the *peup1-1* mutant (right). Bar = 1 cm.

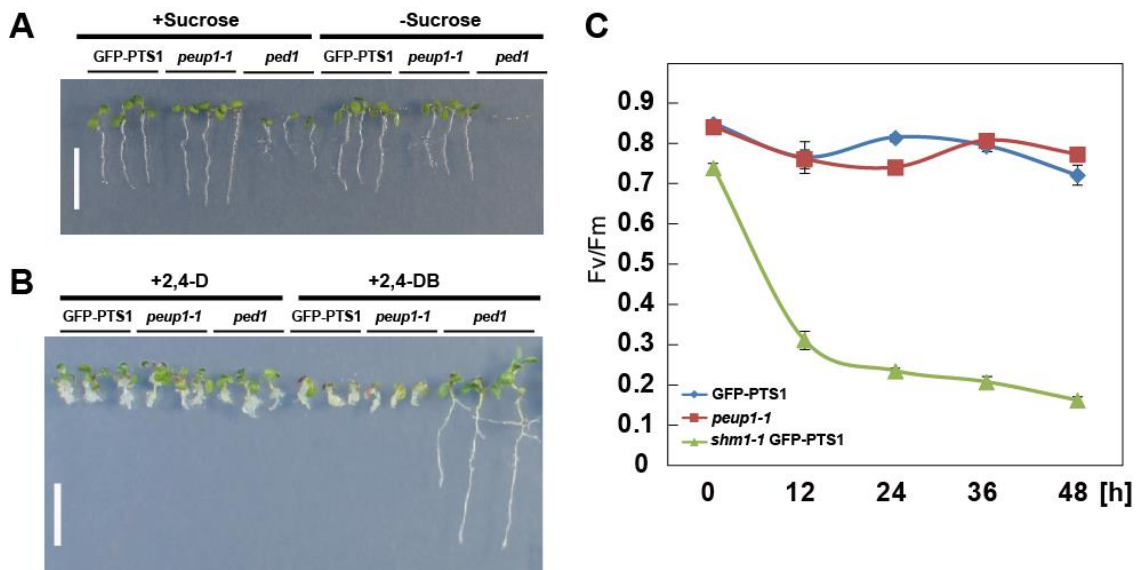


Figure 5. Analyses of Peroxisomal Functions in the *peup1* Mutant

(A) Comparison of post-germinative growth among the parent plant GFP-PTS1, *peup1-1*, and *ped1*. Seedlings were grown for 6 days under constant illumination, in 1% CO₂, on medium with or without sucrose. The photograph was taken after the seedlings were removed from the medium and rearranged on an agar plate. *ped1* is a control for the β -oxidation-deficient mutant. Bar = 1 cm.

(B) Resistance to 2,4-D and 2,4-DB. Seedlings were grown for 13 days under constant illumination, with 1% CO₂, on medium supplemented with 2,4-DB (0.5 μ g/ml) or 2,4-D (0.05 μ g/ml). Bar = 1 cm.

(C) Effect of strong irradiation on maximal quantum yield of photosystem II (Fv/Fm). Fv/Fm was measured with PAM-2100 (WALZ) when the plants were transferred from mild conditions (light intensity, 120 μ mol \cdot s⁻¹m⁻²; CO₂ concentration, 2000 ppm) to severe conditions (light intensity, 600 μ mol \cdot s⁻¹m⁻²; CO₂ concentration, 400 ppm). Sixth or seventh leaves of 3-week-old plants were used for this experiment. The horizontal axis shows the time after transfer to severe conditions. The results shown are mean values \pm SE of three independent experiments.

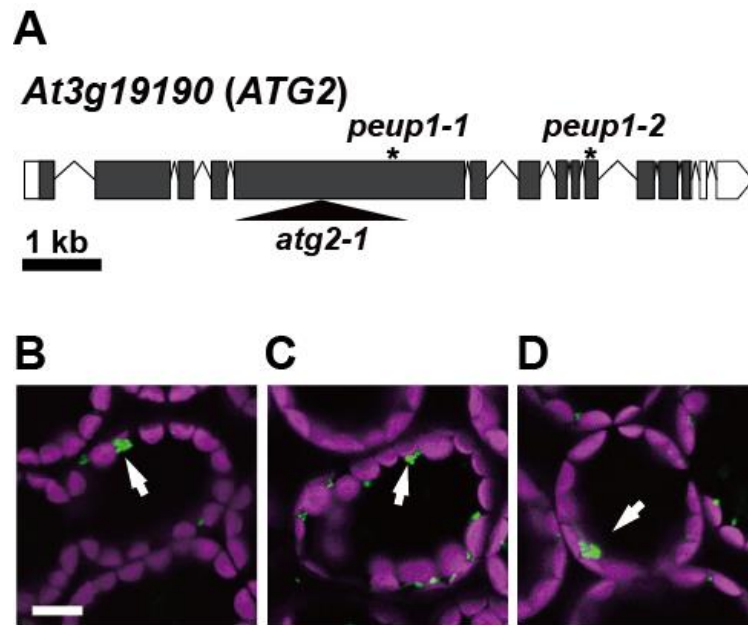


Figure 6. Identification of *PEUP1* Gene

(A) Structure of *At3g19190/ATG2* gene. The open and closed boxes indicate the untranslated and coding regions, respectively. The asterisks indicate nucleotide substitutions in the *PEUP1* gene of *peup1-1* and *peup1-2*. G4935A and G6830A mean that the 4,935th and 6,830th guanosine residues are substituted to adenosine, respectively (Nucleotide residue 1 corresponding to the adenosine of the first methionine codon). The triangle represents the position of the T-DNA insertion in the *atg2-1* mutant. The untranslated regions are based on information obtained from the TAIR database (<http://www.arabidopsis.org>).

(B) to **(D)** Confocal images of leaf cells of the *peup1-2* mutant **(B)**, the *atg2-1* mutant harboring *GFP-PTS1* **(C)**, and F1 progeny obtained from crossing between *peup1-1* and *atg2-1* mutants **(D)**. GFP fluorescence from peroxisomes and autofluorescence from chloroplasts are shown in green and magenta, respectively. Arrows indicate the peroxisome aggregations. Bars = 10 μm .

A

cds-DB	TCGTGCCTTGAGCTGGAATTATCTGGG-----	4433
cds-seq	TCGTGCCTTGAGCTGGAATTATCTGGG GTCAGTTCCTGTATGAAACCTTTCCAATTGGC	4464
genome	TCGTGCCTTGAGCTGGAATTATCTGGGGTGCAGTTCCTGTATGAAACCTTTCCAATTGGC	5640
cds-DB	-----	
cds-seq	GAAATATGTACCTCTAAATTATCTCTCATGGTCCAAGATTTTATCTTTATGATAGAAGC	4524
genome	GAAATATGTACCTCTAAATTATCTCTCATGGTCCAAGATTTTATCTTTATGATAGAAGC	5700
cds-DB	-----	
cds-seq	GACAATGCACCTTGGACATTG -----	4547
genome	GACAATGCACCTTGGACATTGGTAATTGAGGTTTTTCACTCTTATCATCATAAGATAGAT	5760

B

cds-DB	-----	
cds-seq	----- GTTACGGGTCGCTTTACTCCCTATACTGTTACATCTTCATC	4699
genome	ATGAACTGCTTCCTCCAGGTTACGGGTCGCTTTACTCCCTATACTGTTACATCTTCATC	6480
cds-DB	-----CTTCTTTGGAGCTAACAGCCTAGAAAAGCCTGTTG	4579
cds-seq	AAAGTCAGCTGGATTTTCTCATCAG CTTCTTTGGAGCTAACAGCCTAGAAAAGCCTGTTG	4759
genome	AAAGTCAGCTGGATTTTCTCATCAGCTTCTTTGGAGCTAACAGCCTAGAAAAGCCTGTTG	6540

C

cds-DB	---- ATTATTTCTCCTTTTCAGT CTTGATCCTGAACATAAAAAGGAATCCATGGAAAAAT	5476
cds-seq	-----TCTTGATCCTGAACATAAAAAGGAATCCATGGAAAAAT	5635
genome	TGTAGATTATTTCTCCTTTTCAGTCTTGATCCTGAACATAAAAAGGAATCCATGGAAAAAT	8520

Figure 7. Alignment of Partial Nucleotide Sequence of *At3g19190/ATG2*

(A)-(C) The cds-DB and genome indicate cDNA and genomic sequences, respectively, based on the data from TAIR. The cds-seq indicates the cDNA sequence based on the cloned cDNA of *ATG2*. The red and blue letters indicate exons and an intron, respectively, as determined by sequencing by this study. The numbers indicate the position of the nucleic acid from the start codon.

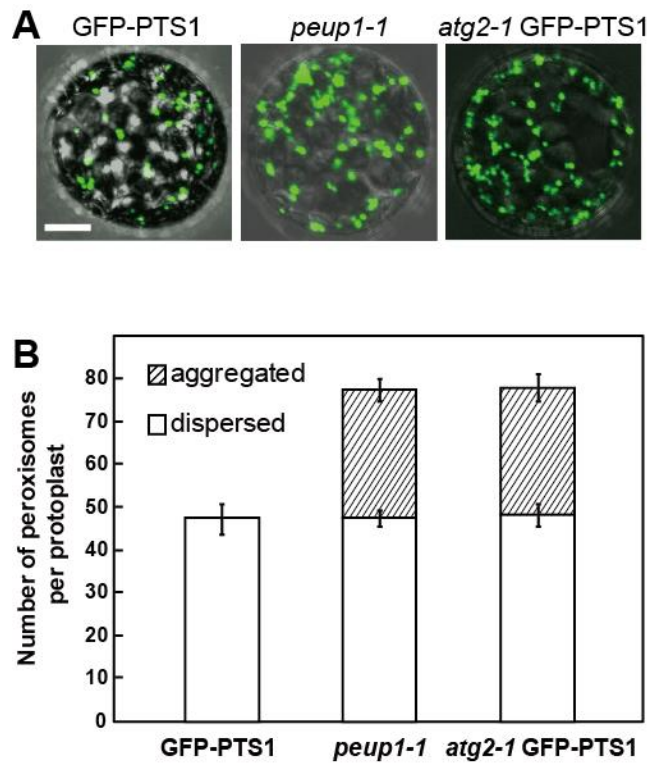


Figure 8. Number of Peroxisomes in the *peup1* Protoplast

(A) Merged images of differential interference contrast and GFP fluorescence images of protoplasts from leaves of GFP-PTS1, *peup1-1*, and *atg2-1* GFP-PTS1 plants. Peroxisomes are shown in green. Bar = 10 μ m.

(B) The numbers of peroxisomes in a protoplast from the GFP-PTS1, *peup1-1*, and *atg2-1* GFP-PTS1 plants. Open and striped bars indicate the numbers of dispersed and aggregated peroxisomes, respectively. Error bars represent SE (n = 17).

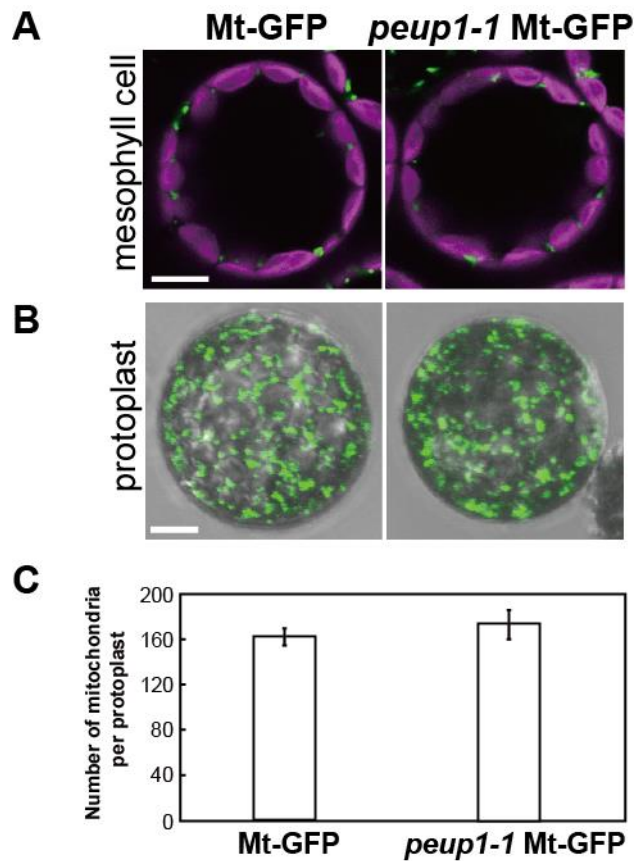


Figure 9. Morphology and Number of Mitochondria in the *peup1* Mutant

(A) Confocal images of mesophyll cells in 3-week-old wild-type plants expressing mitochondria-targeted GFP (Mt-GFP) and *peup1-1* expressing Mt-GFP (*peup1-1* Mt-GFP). Autofluorescence from chloroplasts and GFP fluorescence from mitochondria are shown in magenta and green, respectively. Bar = 10 μ m.

(B) Merged images of differential interference contrast and GFP fluorescence images of protoplasts from leaves in the Mt-GFP plant and the *peup1-1* Mt-GFP mutant. The photographs were taken by confocal microscopy, and maximum projection from top to bottom of a protoplast was carried out. Mitochondria are shown in green. Bar = 10 μ m.

(C) The number of mitochondria in a protoplast from Mt-GFP and *peup1-1* Mt-GFP plants. Error bars represent SE (n = 22).

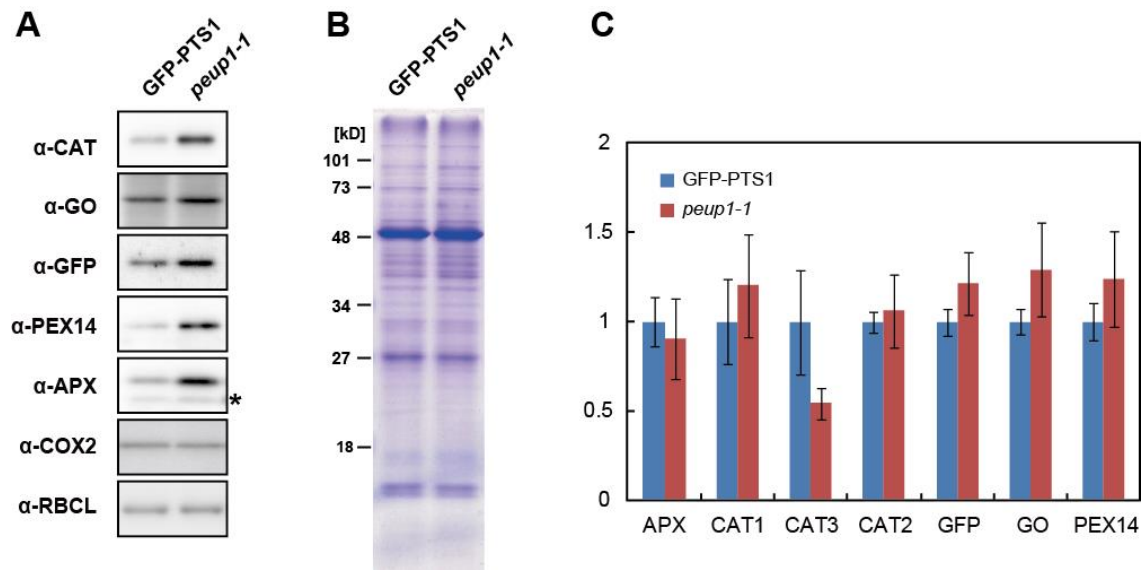


Figure 10. Levels of Peroxisomal Proteins in the *peup1* Mutant

(A) Immunoblot analysis of proteins prepared from GFP-PTS1 and *peup1-1* plants. Crude protein extracts were prepared from the leaves of 3-week-old plants and subjected to SDS-PAGE followed by immunoblot using the antibody indicated in left side of each panel. The asterisk in α -APX indicates a nonspecific band.

(B) CBB staining image of the proteins loaded in this immunoblot. Numbers on the left indicate the molecular mass.

(C) Expression of genes encoding peroxisomal proteins. The graph shows the relative gene expression levels between GFP-PTS1 plant and *peup1* mutant. Error bars represent SD.

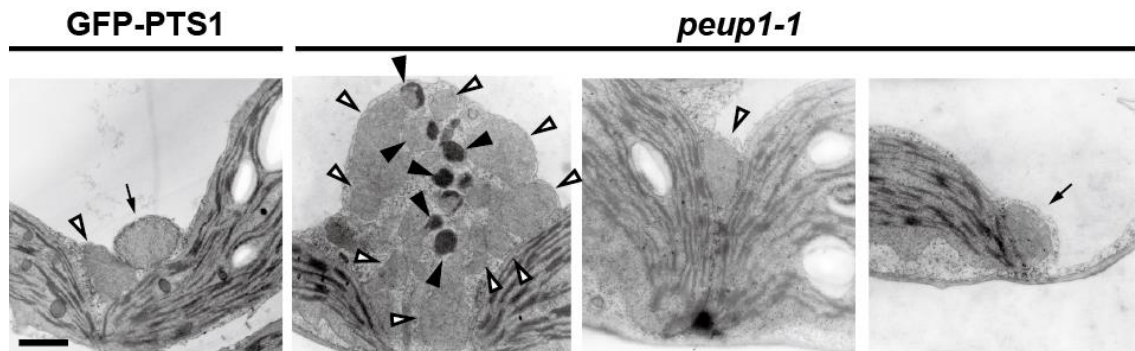


Figure 11. Electron Microscopic Observation of Mesophyll Cells in the *peup1* Mutant

Mesophyll cells in GFP-PTS1 (left) and in *peup1-1* (three images on the right). Open and solid arrowheads indicate normal peroxisomes and peroxisomes containing an electron-dense region, respectively. Arrows indicate mitochondria. Bar = 1 μm .

peup1-1

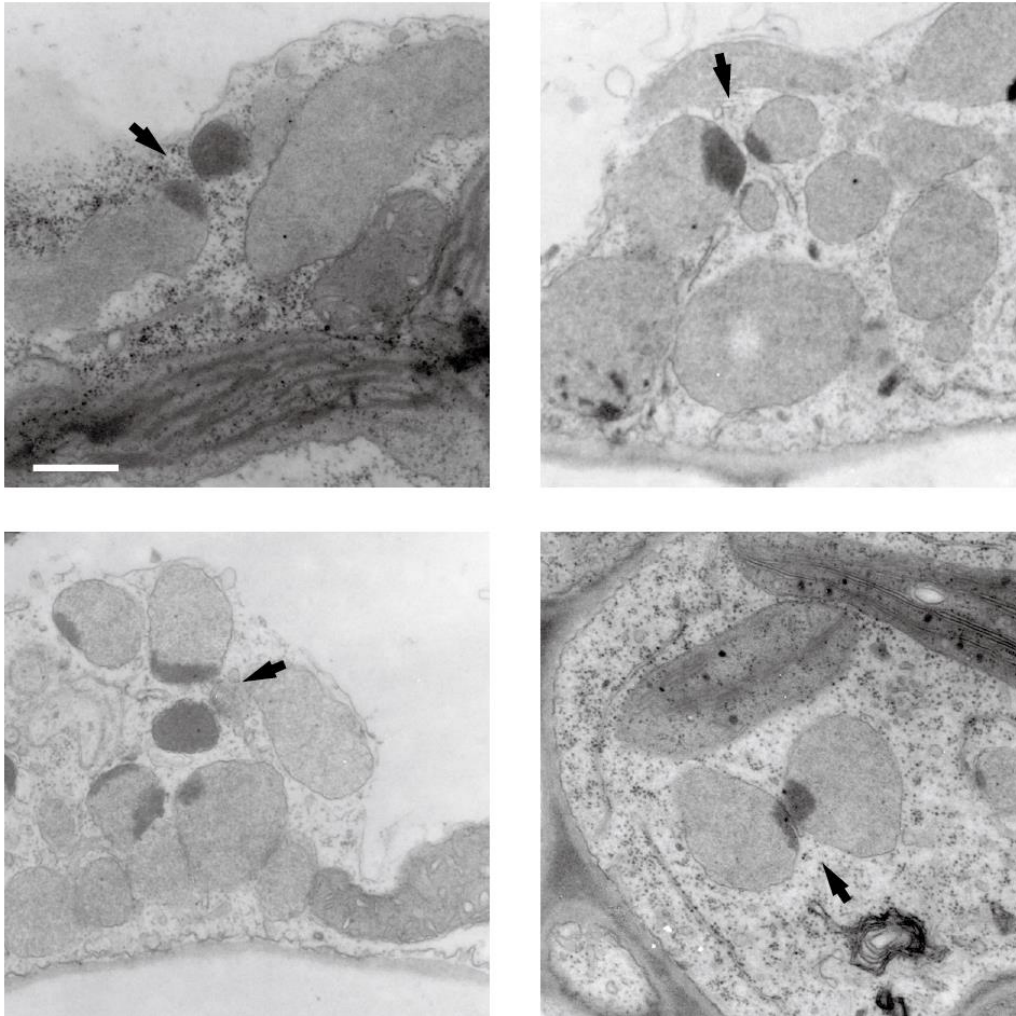


Figure 12. Pattern of Electron-dense Regions in Aggregated Peroxisomes of the *peup1-1* Mutant

Electron microscopic images of mesophyll cells in the *peup1-1* mutant. The electron-dense regions of the peroxisomes in the aggregation are frequently located face-to-face (arrows). Bar = 1 μ m.

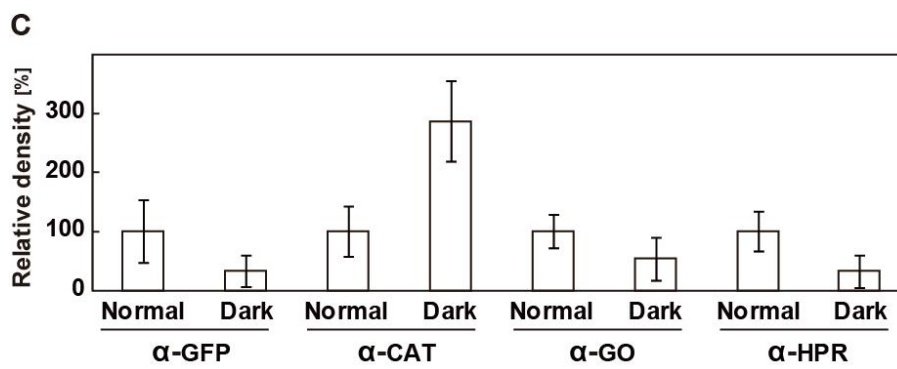
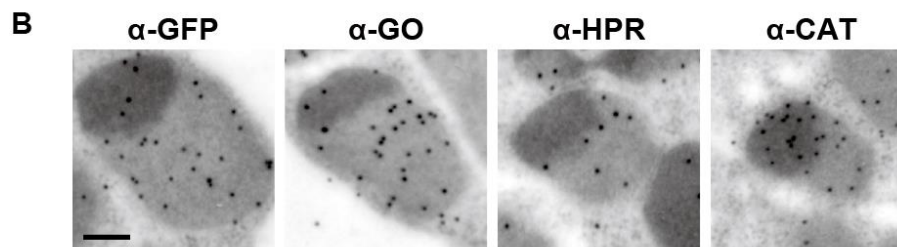
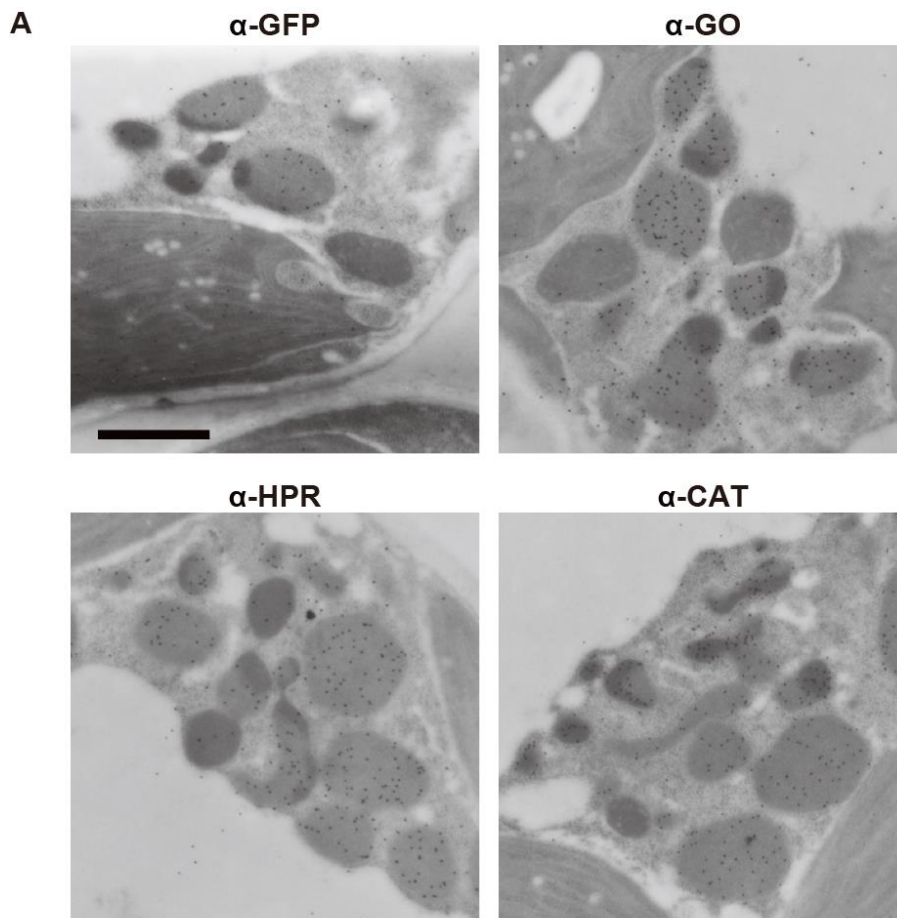


Figure 13. Immunoelectron Microscopic Analysis of Peroxisome aggregates in the *peup1* Mutant

(A) Immuno-electron microscopic images of mesophyll cells in *peup1-1* using antibodies against GFP-PTS1 (α -GFP), glycolate oxidase (α -GO), hydroxypyruvate reductase (α -HPR), and catalase (α -CAT). Black dots in the images are immunogold particles. Bar = 1 μ m.

(B) A representative peroxisome from each experiment. Bar = 200 nm.

(C) The densities of immunogold particles in non-electron-dense (Normal) and electron-dense (Dark) regions per peroxisome were calculated from the immunoelectron microscopic images. The results are shown as relative values of density in each experiment using different antibodies. Error bars represent SD. n = 12 (Normal of α -GFP), n = 7 (Dark of α -GFP), n = 24 (Normal of α -CAT), n = 14 (Dark of α -CAT), n = 23 (Normal of α -GO), n = 12 (Dark of α -GO), n = 18 (Normal of α -HPR), and n = 8 (Dark of α -HPR).

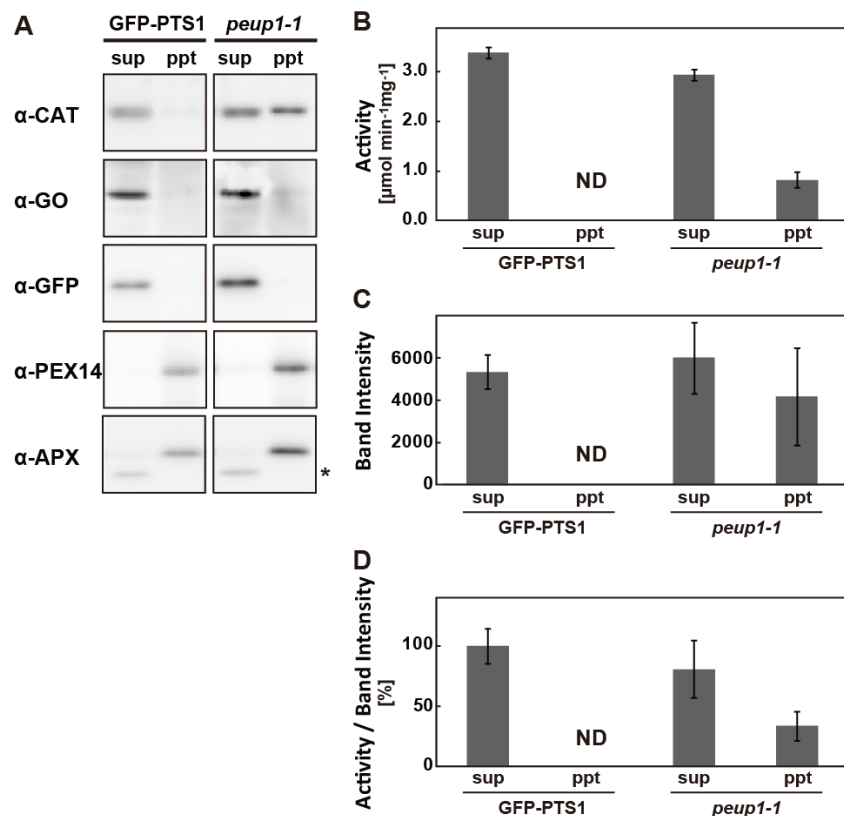


Figure 14. Accumulation of Inactive CAT in the *peup1* Mutant

(A) Total proteins from the leaves of 3-week-old GFP-PTS1 and *peup1-1* plants were separated into supernatant (sup) and precipitate (ppt) fractions and subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using the antibody indicated. The asterisk in α -APX indicates a nonspecific band.

(B) CAT activities in the supernatant and precipitate fractions of the GFP-PTS1 and *peup1-1* plants.

(C) Amounts of CAT polypeptides. The values, which were calculated based on the band intensity, were measured by ImageJ.

(D) Relative activity of CAT. The values of the activity of CAT in **(B)** were divided by the corresponding values of the band intensity in **(C)**. The results are shown as relative values (the sup of GFP-PTS1 was set to 100%).

The results represent the mean values \pm SE of three independent experiments. ND, not detected.

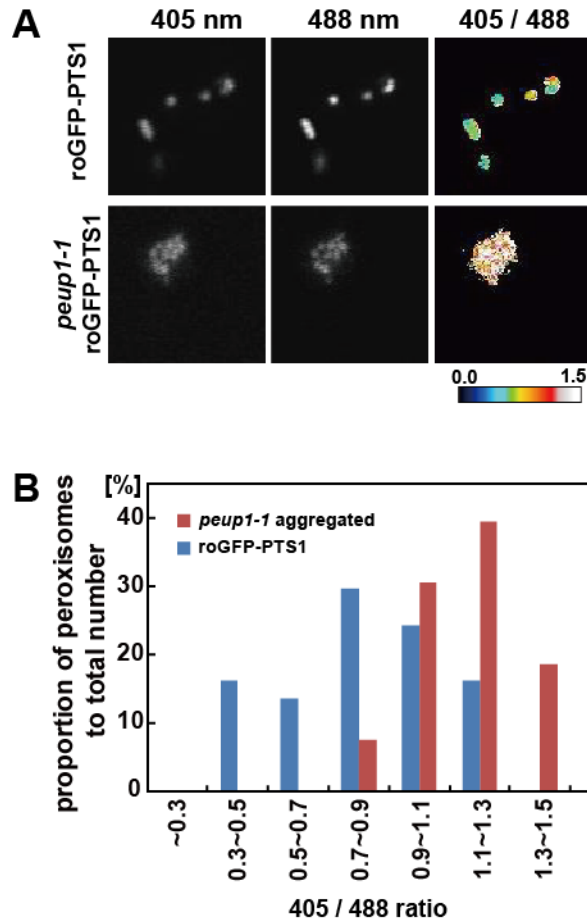


Figure 15. Quantification of Redox State in the Peroxisomes of *peup1* Mutant Cells

(A) Fluorescent images of peroxisomes in roGFP-PTS1 and *peup1-1* roGFP-PTS1 plants. The left and middle panels show fluorescent images excited by 405 nm and 488 nm lasers, respectively. The right panels show the ratiometric images calculated from the left and middle images. Relationships between the ratio and color are shown in the color scale bar below the panels. Blue represents a reduced state, whereas red represents an oxidized state.

(B) Frequency distribution of redox state in peroxisomes. The ratios (405 nm/488 nm) from peroxisome aggregates in *peup1-1* roGFP-PTS1 and dispersed peroxisomes in roGFP-PTS1 were calculated. The histogram indicates the percentage of peroxisomal number, with the ratio that matches the range shown below the graph.

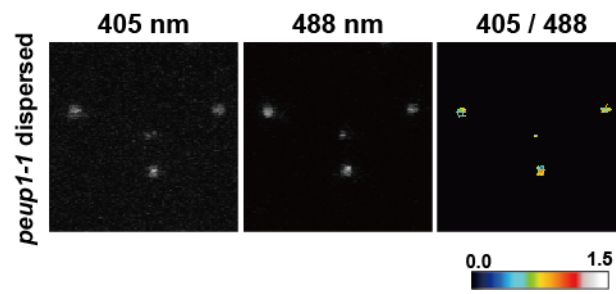


Figure 16. Redox Status in the Dispersed Peroxisomes of the *peup1* Mutant

Some dispersed peroxisomes in the *peup1-1* roGFP-PTS1 showed similar redox status to that of roGFP-PTS1. The pseudo-color indicates the ratio values using the same scale as in Figure 14.

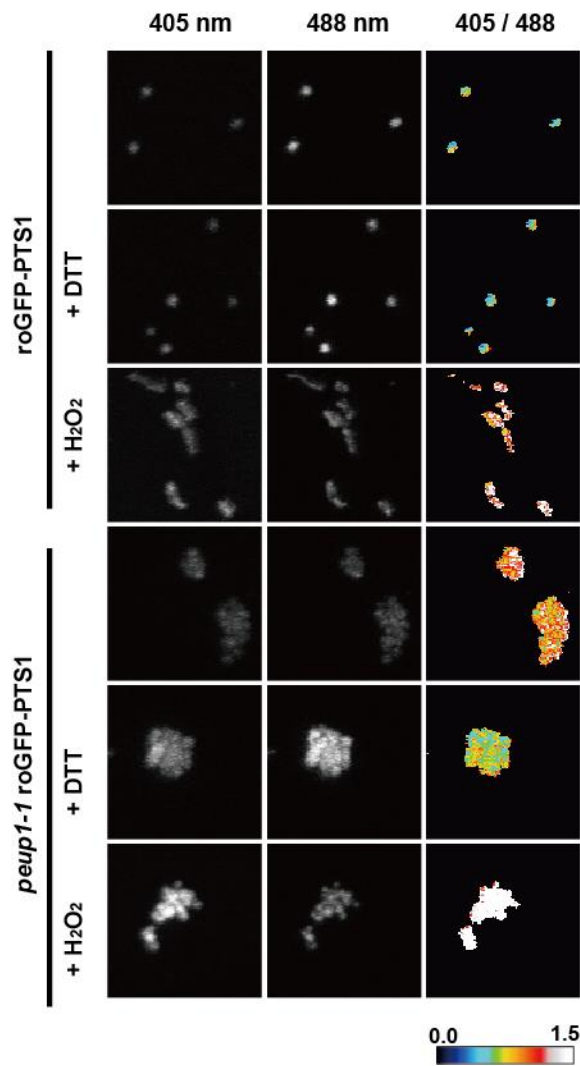


Figure 17. Effect of Hydrogen Peroxide and DTT on Redox Status of Peroxisomes

Images of peroxisomes treated with 0.1% hydrogen peroxide or 20 mM DTT in the roGFP-PTS1 and *peup1-1* roGFP-PTS1 plants. Maximum projections were used for the calculation of the ratio images. The pseudo-color indicates the ratio values using the same scale as in Figure 14.

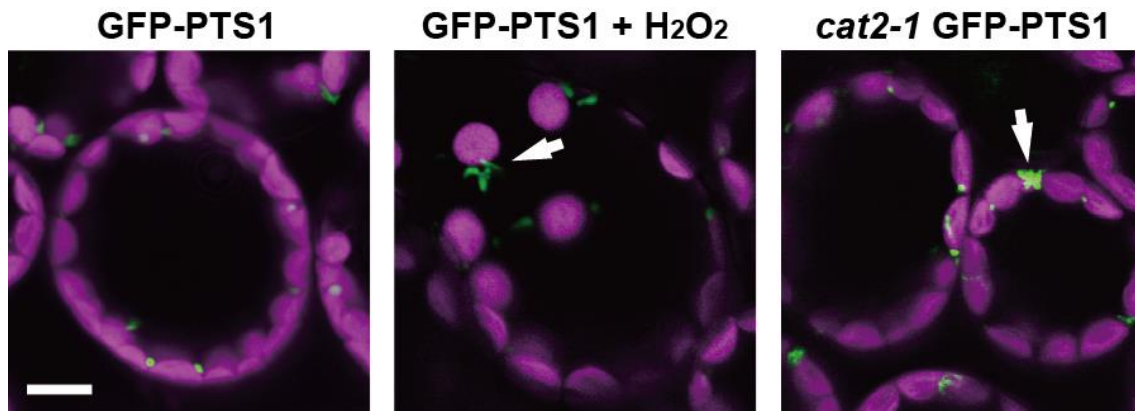


Figure 18. Effect of Hydrogen Peroxide on the Induction of Peroxisome Aggregate Formation

Mesophyll cells in 3-week-old GFP-PTS1 plant before hydrogen peroxide treatment (left panel); mesophyll cells after treatment with 0.1% (v/v) hydrogen peroxide for 1 hr (middle panel). Mesophyll cells in the *cat2-1* mutant expressing the *GFP-PTS1* gene (*cat2-1* GFP-PTS1; right panel). Arrows indicate peroxisome aggregations. Bar = 10 μ m.

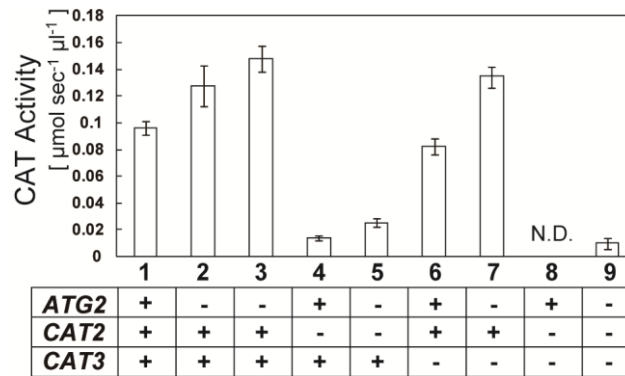


Figure 19. CAT Activities in GFP-PTS1 Plants and Various Mutants

CAT activities were measured in 3-week-old plants. Error bars represent SE of four independent experiments. ND, not detected. Lane 1, GFP-PTS1; lane 2, *peup1-1*, lane 3, *atg2-1* GFP-PTS1; lane 4, *cat2-1* GFP-PTS1; lane 5, *atg2-1 cat2-1* GFP-PTS1; lane 6, *cat3-1* GFP-PTS1; lane 7, *atg2-1 cat3-1* GFP-PTS1; lane 8, *cat2-1 cat3-1* GFP-PTS1; lane 9 *atg2-1 cat2-1 cat3-1* GFP-PTS1.

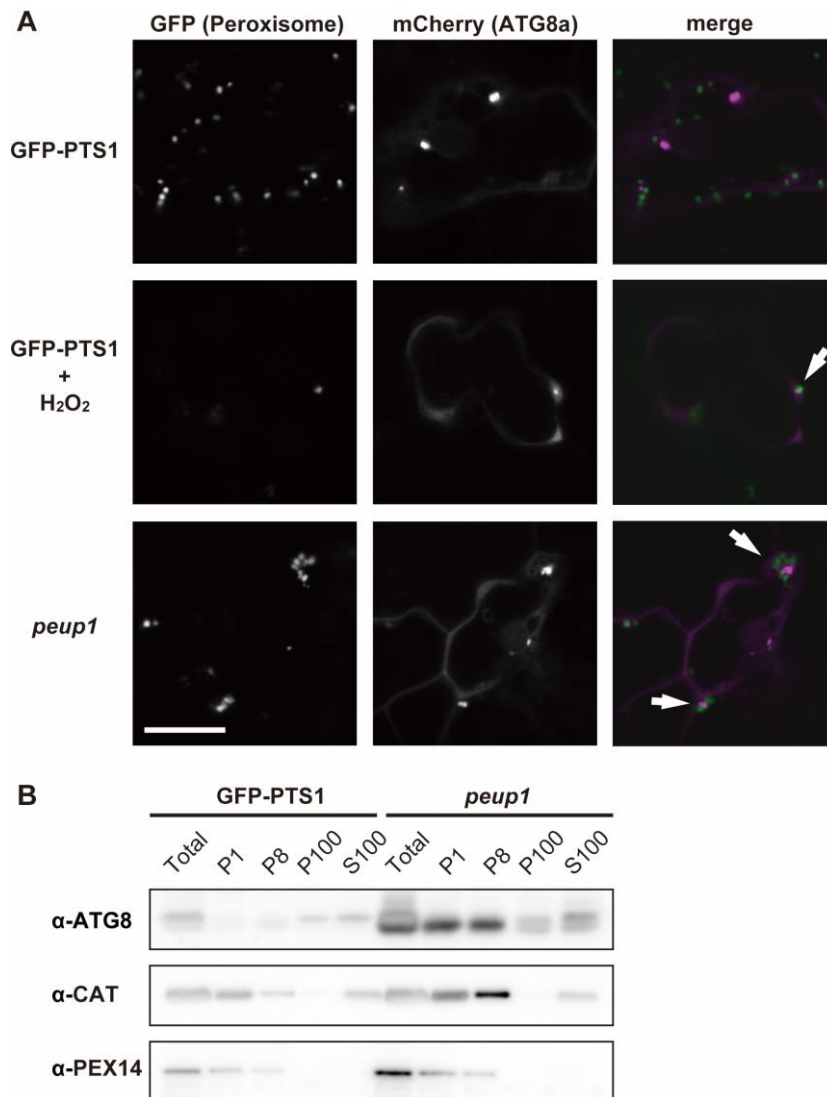


Figure 20. Subcellular Localization of ATG8

(A) Confocal images of leaf cells of a GFP-PTS1 plant and *peup1-1* mutant transiently expressing *mCherry-ATG8a*. Arrows indicate colocalization of peroxisomes and punctuate structures of ATG8. Bar = 10 μ m.

(B) Immunoblot analysis of subcellular fractionation. Total proteins (Total) prepared from the leaves of 3-week-old plants were fractionated into P1, P8, P100, and S100 fractions. The samples were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblot analysis using α -ATG8, α -CAT, and α -PEX14 antibodies. ATG8 is an autophagosome marker, and PEX14 and CAT are peroxisome markers.

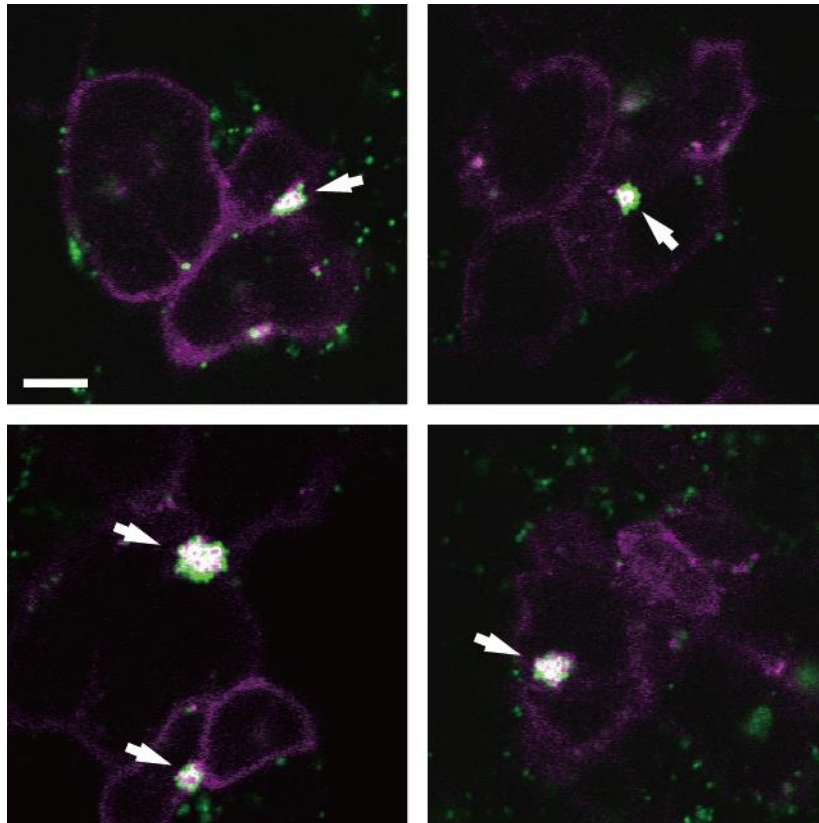


Figure 21. Interaction between Peroxisome Aggregations and ATG8

All four images show cells in the *peup1-1* mutant expressing *mCherry-ATG8a*. Peroxisomes and ATG8 are shown in green and magenta, respectively. Arrows indicate colocalization of peroxisomes and punctuate structures of ATG8 (the overlaps appear white). Bar = 10 μ m.

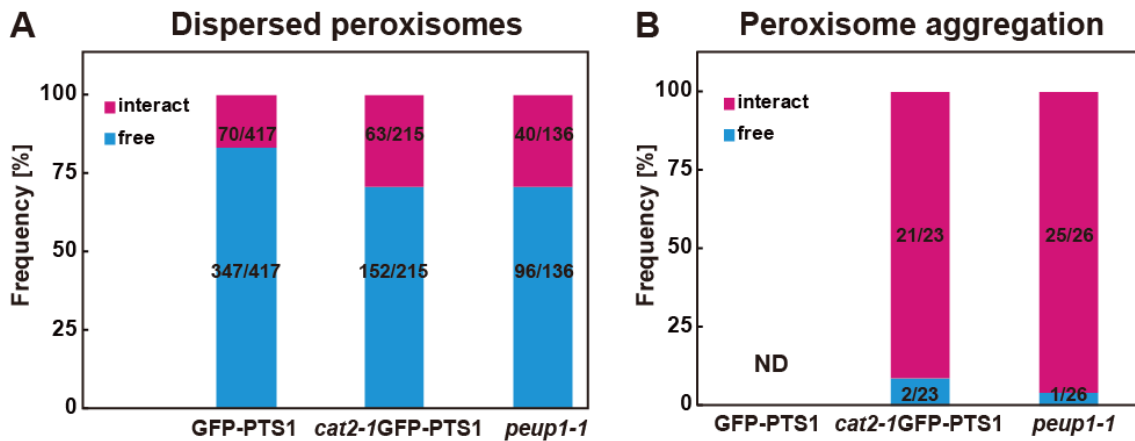


Figure 22. Quantification of the Interaction between Peroxisomes and ATG8

(A) The number of peroxisomes that interact (magenta) or do not interact (blue) with punctuate structures of mCherry-ATG8a was counted. The numerator and the denominator in each bar show the number of classified peroxisomes and the total number of peroxisomes examined, respectively.

(B) The number of peroxisome aggregations that interact (magenta) or do not interact (blue) with punctuate structures of mCherry-ATG8a was counted. A mass of aggregated peroxisomes was counted as a single aggregation. The numerator and the denominator in each bar show the number of classified aggregations and the total number of aggregations examined, respectively.

ND, not detected.

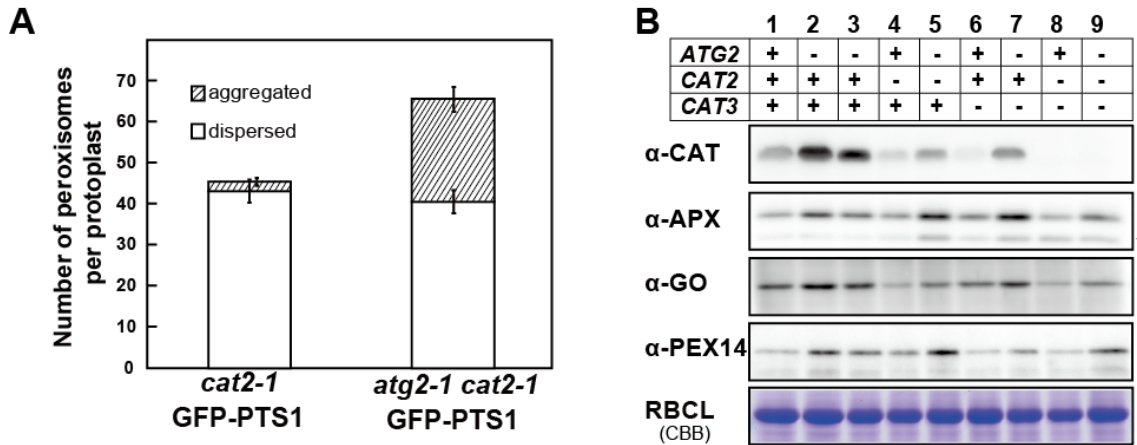


Figure 23. Number of Peroxisomes and Levels of Peroxisome Proteins in *cat* Mutants

(A) Number of peroxisomes in protoplasts from *cat2-1* GFP-PTS1 and *atg2-1 cat2-1* GFP-PTS1 plants. Open and striped bars indicate the number of dispersed and aggregated peroxisomes, respectively. Error bars represent SE (n = 20).

(B) Protein extracts were prepared from leaves of 3-week-old GFP-PTS1 (lane 1), *peup1-1* (lane 2), *atg2-1* GFP-PTS1 (lane 3), *cat2-1* GFP-PTS1 (lane 4), *atg2-1 cat2-1* GFP-PTS1 (lane 5), *cat3-1* GFP-PTS1 (lane 6), *atg2-1 cat3-1* GFP-PTS1 (lane 7), *cat2-1 cat3-1* GFP-PTS1 (lane 8), and *atg2-1 cat2-1 cat3-1* GFP-PTS1 (lane 9). The protein extracts were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting using the antibody indicated in the left side of each panel. The asterisk in α -APX indicates a nonspecific band.

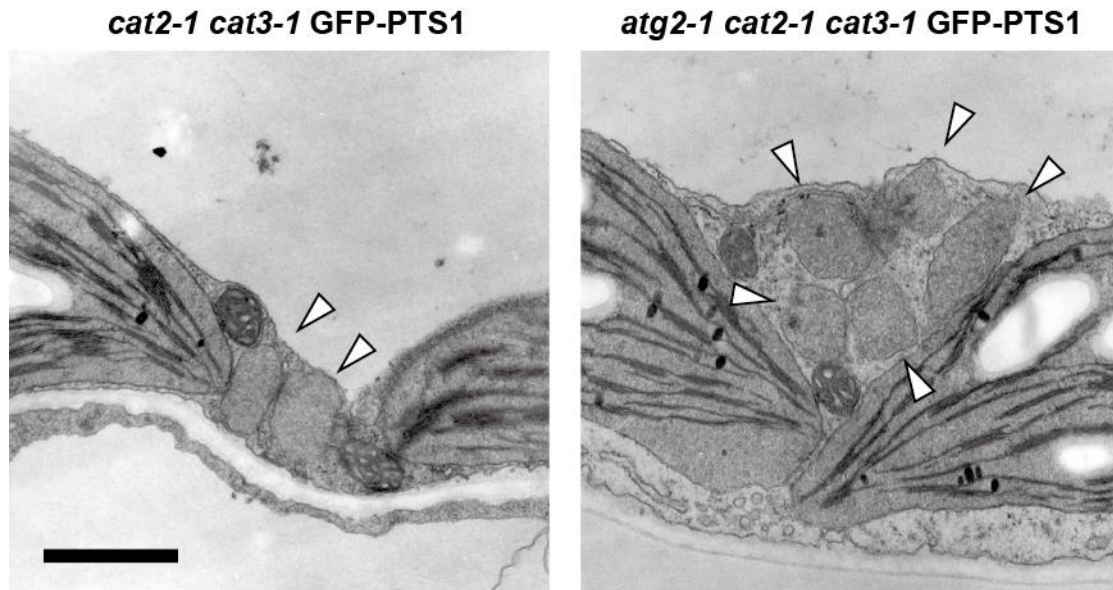


Figure 24. Electron Microscopic Observation of Mesophyll Cells in the *atg2-1 cat2-1 cat3-1* Mutant

Electron microscopic observation was carried out using 3-week-old *cat2-1 cat3-1 GFP-PTS1* and *atg2-1 cat2-1 cat3-1 GFP-PTS1* plants. Arrowheads represent peroxisomes without electron-dense regions. Bar = 1 μ m.

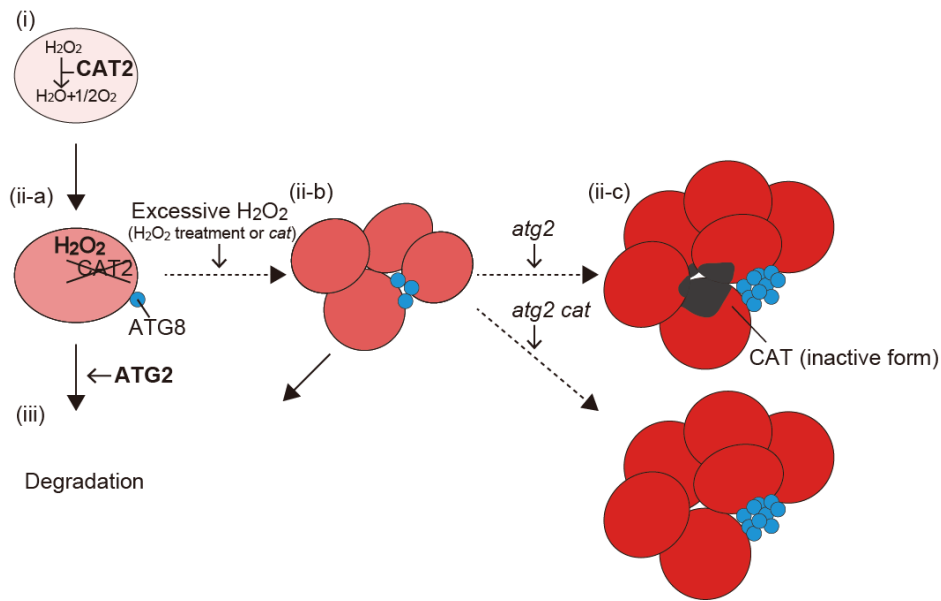


Figure 25. Model of the Quality Control Mechanism for Peroxisomes via Autophagic Degradation and Peroxisome Aggregate Formation in the *peup1*

(i) In a newly synthesized peroxisome, CAT degrades hydrogen peroxide generated by peroxisomal metabolic processes such as photorespiration. (ii-a) CAT is gradually inactivated by hydrogen peroxide, and the peroxisome becomes damaged by the accumulation of hydrogen peroxide. (iii) In the wild-type plant, the damaged peroxisome is targeted by ATG8 and is degraded by an autophagic system involving ATG2. (ii-b) When excessive hydrogen peroxide accumulates in a peroxisome due to such factors as exogenous hydrogen peroxide treatment or the presence of the *cat* mutation, peroxisomes begin to form aggregates. The peroxisome aggregate is eventually degraded by an autophagic system involving ATG2. (ii-c, top) In the *peup1* (*atg2*) mutant, the highly damaged peroxisomes form large aggregates and accumulate in the cytosol. The black regions in the peroxisome aggregate represent condensed CAT. Since the formation of an isolation membrane is not completed in the *atg2* mutant, ATG8 targeting the peroxisome aggregate highly accumulates. (ii-c, bottom) On the other hand, large peroxisome aggregates not containing condensed CAT appear in the *atg2 cat* mutant. The intensity of the red coloring in the peroxisomes represents the level of hydrogen peroxide. Solid and dashed arrows indicate processes in the wild-type and mutants or under artificial conditions, respectively.

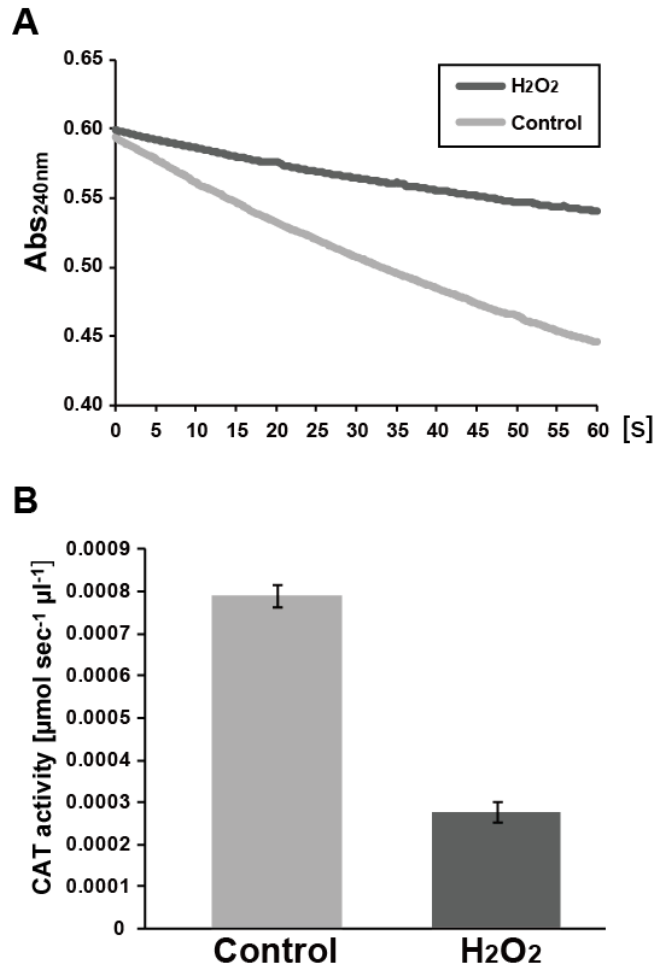


Figure 26. Self-inactivation of CAT

(A) Time course for the reduction of hydrogen peroxide after the addition of enzyme extract. The labels of H₂O₂ and control mean the sample with and without H₂O₂-treatment before measurement of CAT activity, respectively.

(B) CAT activity was calculated from the decrease for the first 10 seconds after adding hydrogen peroxide. The results shown are the mean values ± SE of three independent experiments.

Table 1. Nucleotide Sequences of Primers Used in This Study

Primer name	Sequence	Note
AT3g19190-1-F	5' -CACCTACAGATTTGTGTAGTGG-3'	For sequencing
AT3g19190-1-1R	5' -GGAGGTGCTGGCTTCATTTG-3'	For sequencing
AT3g19190-1-2F	5' -TTGAGGTTGACGAGCTGGAG-3'	For sequencing, For genotyping of <i>atg2-1</i>
AT3g19190-1-2R	5' -GGCTTCCAGAAGCTGATTGG-3'	For sequencing, For genotyping of <i>atg2-1</i>
AT3g19190-1-3F	5' -CTTCTTGTTTTCTACAGTGTGG-3'	For sequencing
AT3g19190-1-R	5' -CTAGCATCACCAACTGAAGC-3'	For sequencing
AT3g19190-2-F	5' -CTGATAAGGAAAGGGCTAAGG-3'	For sequencing, For genotyping of <i>peup1-1</i>
AT3g19190-2-1R	5' -CAGAAGTCGTGTCACTGCAAG-3'	For sequencing
AT3g19190-2-2F	5' -GAAAATGGCCTTCTTTGGGAG-3'	For sequencing
AT3g19190-2-2R	5' -TTTTCTCGAGTGGCGTCTC-3'	For sequencing, For genotyping of <i>peup1-1</i>
AT3g19190-2-3F	5' -GATCACCCAAGAGACTCCTC-3'	For sequencing
AT3g19190-2-R	5' -CATTTCCCCAGCCATAGATTCC-3'	For sequencing
AT3g19190-3-F	5' -GCTCATCACAGAAGAACAATGC-3'	For sequencing
AT3g19190-3-2F	5' -GCCCTCTGACCATGATTAGG-3'	For sequencing
AT3g19190-3-R	5' -CTCTAGAAACAGATTGGGCACC-3'	For sequencing
sensCAT2	5' -GGTACCTCTTCTTCTCCCATG-3'	For genotyping of <i>cat2-1</i> (Queval et al., 2007)
revbisCAT2	5' -TCAGGGAACCTTCATCCCATC-3'	For genotyping of <i>cat2-1</i> (Queval et al., 2007)
CAT3-F	5' -AACGTTTAACCACTGCGTGAG-3'	For genotyping of <i>cat3-1</i>
CAT3-R	5' -CTCAAGAAGAACCGGACCTG-3'	For genotyping of <i>cat3-1</i>
LBa1	5' -TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'	T-DNA specific primer
TOPO_ATG8a_cds-F	5' -CACCATGATCTTTGCTTGCTTGAAAT-3'	For cloning of <i>ATG8a</i>
ATG8a_cds-R	5' -TCAAGCAACGGTAAGAGATCC-3'	For cloning of <i>ATG8a</i>

Table 2. Nucleotide Sequences of Primers Used for Q-PCR

Primer name	Sequence	Note
qCAT1-F2	ATCTCTTCGTTTCAGGTGATGG	For qPCR analysis of <i>CAT1</i> mRNA
qCAT1-R2	AGATCCGGGTCTGGAGTAGC	For qPCR analysis of <i>CAT1</i> mRNA
qCAT2-F2	TTCAAACCCGTGTCTTCTCC	For qPCR analysis of <i>CAT2</i> mRNA
qCAT2-R2	CAGGCGGAGTTGGATACTTC	For qPCR analysis of <i>CAT2</i> mRNA
qCAT3-F	ATTTTCTCAGAGCCCCTGGT	For qPCR analysis of <i>CAT3</i> mRNA
qCAT3-R	GTTTTCTGGGTTAGGTTTTCAACG	For qPCR analysis of <i>CAT3</i> mRNA
qGO-F4	CTTCGAAGGGTTGGATCTTG	For qPCR analysis of <i>GO</i> mRNA
qGO-R4	CTGGTGCTGAAGATCAATGG	For qPCR analysis of <i>GO</i> mRNA
qPEX14-F	GCATTGCTCCCAAATCAAAG	For qPCR analysis of <i>PEX14</i> mRNA
qPEX14-R	CTCTGGAAAGCTGCTGGTTC	For qPCR analysis of <i>PEX14</i> mRNA
qAPX-F	GTGAGGGCGTGAAAGCTAAG	For qPCR analysis of <i>APX</i> mRNA
qAPX-R	CCCATGCGGTAGAAGACATC	For qPCR analysis of <i>APX</i> mRNA
qGFP-F	ATATCATGGCCGACAAGCAG	For qPCR analysis of <i>GFP</i> mRNA
qGFP-R	ACTGGGTGCTCAGGTAGTGG	For qPCR analysis of <i>GFP</i> mRNA
UBQ10-F	GAAGTGGAAGCTCCGACAC	For qPCR analysis of <i>Ubiquitin 10</i> mRNA (Kanai et al., 2013)
UBQ10-R	TTAGAAACCACCACGAAGACG	For qPCR analysis of <i>Ubiquitin 10</i> mRNA (Kanai et al., 2013)

発表論文リスト

報文目録

Shibata, M., Oikawa, K., Yoshimoto, K., Kondo, M., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M., Sakamoto, W., Ohsumi, Y., and Nishimura, M. (2013). Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded via autophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **25**: 4967-4983

参考論文目録

Yoshimoto, K., Shibata, M., Kondo, M., Oikawa, K., Sato, M., Toyooka, K., Shirasu, K., Nishimura, M., Ohsumi, Y. (2014). Quality control of plant peroxisomes in organ specific manner via autophagy. *J. Cell Sci.* (in press)