

# オートファジーが持つ新しい生理的意義の検証

森安裕二 (理工学研究科・准教授)

## 1 研究の目的

植物の特徴は細胞が大きいことであり、大きな細胞の体積の90%以上は液胞という植物に特有のオルガネラで占められている。このことから、液胞は植物細胞の成長に深く関わっていると考えられている。実際に、多くの植物生理学や細胞生物学のテキストには、「植物細胞の成長には液胞の拡大化が伴っている」と書かれている。しかし、両者に因果関係があるかどうかについては、これまで検討されてこなかった。

オートファジーとは、細胞が自己の細胞質の一部を生体膜で包み込んだ後、液胞やリソソームに輸送して分解する現象である。この現象は、栄養飢餓時の細胞内栄養調達の機能を担っており、さらに、細胞内の変性タンパク質の除去、病原菌感染防御などにも深く関連していると考えられている。

現在の細胞生物学の知識では、液胞の拡大化はエンドサイトーシス経路や液胞タンパク質輸送経路で形成される膜小胞が既存の液胞に融合することで引き起こされると考えられている。しかし私は、オートファジーの進行に伴って形成される膜小胞も液胞と融合することを見出し、オートファジー経路も液胞の拡大化に寄与しているのではないかと考えた。

本研究は、「オートファジーは液胞の拡大化に寄与しており、液胞の拡大化が植物細胞の成長に寄与している」という仮説をたて、これを検証することを目的とした。

## 2 成果

オートファジー阻害剤 3-メチルアデニン(3-MA)はシヨ糖飢餓条件下で起こる細胞成長を阻害した。

生物材料としてタバコ(*Nicotiana tabacum*)培養細胞BY-2株を用いた。シヨ糖と植物ホルモン2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を含むムラシゲ-スクーグ培地で培養していた細胞をシヨ糖を欠いた培地に移すとオートファジーが誘導される(Moriyasu and Ohsumi 1996)が、それと同時に、液胞が拡大し細胞が成長した。オートファジー阻害剤 3-メチルアデニン(Takatsuka and Moriyasu 2004)で細胞を処理すると、シヨ糖飢餓条件下においてもオートファジーは起こらなくなり、同時に細胞成長も抑制された。

すなわち、オートファジーがシヨ糖飢餓条件下で起こるタバコ細胞の成長に寄与していることが示唆された。

オートファジー阻害剤 3-MA は植物ホルモン 2,4-D を欠いた培地中で起こる細胞成長も阻害した。

DNA合成阻害剤を用いて細胞周期を同調させ、細胞分裂直後に培地から2,4-Dを抜くことで細胞を同調的に成長させる植物細胞成長のモデル実験系を構築した。このモデルは、通常の植物体で起こっている細胞の成長を反映していると考えられる。その実験系において、細胞を3-MAで処理すると細胞成長は顕著に阻害された。

すなわち、一般的におこる植物の細胞成長にも、オートファジーが寄与していることが強く示唆された。

3-MA処理以外の方法でオートファジーを阻害する手法を検討した。

タバコ(*Nicotiana benthamiana*, *N. b.*と略す)では、いくつかのオートファジー(ATG)遺伝子の塩基配列が明らかになっている。その中の1つであるATG3遺伝子をノックダウンするためのRNAiベクターを構築した。さらに、細胞内でオートファジーをモニターするために、オートファジーで中心的役割を果たすオルガネラであるオートファゴソームのマーカータンパク質ATG8とgreen fluorescent protein(GFP)との融合タンパク質を発現するベクターを構築した。現在、これらのベクターを用いて、*N. b.*の葉片に遺伝子導入を行なっている。今後、ATG3ノックダウン株を選抜すると

ともに、GFP-ATG8 融合タンパク質を利用してオートファジーをモニターできる株を選抜し、両者を組み合わせて、ATG3 ノックダウン株では、オートファジーが起これず、細胞の成長が野生株に比べて抑制されることを証明する予定である。