

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07130

研究課題名(和文) 陸上植物における葉緑体型ペプチドグリカン合成系遺伝子の進化に関する研究

研究課題名(英文) Research on evolution of the homologous gene conserved in land plant which functioned in bacterial peptidoglycan synthesis

研究代表者

武智 克彰 (Takechi, Katsuaki)

熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・准教授

研究者番号：70515501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細菌のペプチドグリカン(PG)合成遺伝子群の中で、MurE相同遺伝子は全ての陸上植物に保存され、葉緑体分裂と葉緑体分化に機能していた。これまで陸上植物の進化において、シダ植物から種子植物が登場する過程で、葉緑体分裂から葉緑体分化へと機能分化したと予測されていたが、ヒメツリガネゴケや裸子植物を用いた研究で、葉緑体分化型のMurEは少なくともコケ植物が分岐した時点で既に登場し、葉緑体分裂型MurEも裸子植物まで存在している可能性が推測された。また葉緑体分裂型MurEと葉緑体分化型MurEの機能に重要な変異箇所を絞ることができた。

研究成果の概要(英文)：We found that MurE homologs among the genes which participated in bacterial peptidoglycan synthesis were conserved in all land plants and were functioned in the chloroplast division or development. In complementation analysis using MurE genes in moss *Physcomitrella patens* and seed plants, we presumed that MurE functioned in the chloroplast development emerged when land plant evolved at the latest, and also one functioned in the chloroplast division was conserved in pteridophyte, although MurE gene conserved in land plants were considered to functionally differentiated from chloroplast division to chloroplast development between pteridophyte and spermatophyte during the evolution of green plants. We could narrow down the mutations of three amino acids which were probably essential in MurE functioned in each chloroplast division and development.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：葉緑体 植物進化 ペプチドグリカン

1. 研究開始当初の背景

我々は細菌のペプチドグリカン(PG)合成系遺伝子群がコケ植物に存在し、それらが葉緑体分裂に関与していることを発見していた。植物細胞の葉緑体の祖先と考えられている藍藻には細胞壁構成成分として PG 層が存在し、細胞外部との浸透圧差や外圧に耐えるための物理的防御構造として機能している。PG 層はまた、細胞分裂への関係も知られている。藍藻の子孫である緑色植物の葉緑体や、同じく細菌を祖先とするミトコンドリアにおいて PG 層の痕跡が見いだされないことから、共生細菌の PG 層は細胞内進化の過程で消失したのと考えられてきた。我々は細菌の PG 合成系を阻害する各種抗生物質処理によりコケ植物の葉緑体が巨大化することを見だし、続いてヒメツリガネゴケから全 10 種類の PG 合成系遺伝子発見した。そこで、*MurA*、*MurE*、*Ddl*、*MraY*、ペニシリン結合タンパク質(Pbp)の遺伝子について、相同組換えによる破壊実験を行ったところ、阻害剤処理と同様に巨大葉緑体が出現することを明らかにした。各遺伝子破壊ラインの巨大葉緑体形質は、藍藻の相同遺伝子を導入することにより相補できることも示しており、これらの結果はヒメツリガネゴケが PG 合成系を持ち、葉緑体分裂に用いていることを強く示唆している。また我々は、これまでヒメツリガネゴケ葉緑体に PG が含まれることを予測していたが、PG そのものの構造を電子顕微鏡等で可視化することはできていなかったが、細菌クラミジアにおいて PG を可視化した代謝標識法を用いてヒメツリガネゴケ葉緑体に PG が存在することを明らかにした。

細菌と同様に分裂に PG 系を用いる葉緑体の存在の普遍性を調べるために、各種の緑色植物に対し抗生物質処理を行ったところ、陸上植物の姉妹群となるシャジクモ藻綱ヒメミカズキモからシダ植物小葉類まで葉緑体分裂に影響が生じることがわかった。このことは、PG 合成系を含んだ葉緑体分裂システムが藻類からシダ植物まで一般的に用いられている可能性を示唆している。一方、全ゲノムが決定された被子植物のシロイヌナズナには *MurE*、*Ddl*、*MraY*、*MurG* の 4 種類の PG 合成系遺伝子しか保存されておらず、阻害剤処理による葉緑体分裂阻害も起きないことから、被子植物では PG 合成系が機能していないと考えられる。更に我々はシロイヌナズナ *MurE* ホモタグラインでは葉緑体が発達せずにアルビノとなり、この表現型は藍藻やヒメツリガネゴケの *MurE* を導入しても相補されないこと、葉緑体の遺伝子発現調節が異常となっていることを明らかにし、シロイヌナズナでは *MurE* が機能転換していることを示した。最近、シダ植物小葉類イヌカタヒバと裸子植物球果類オウシュウトウヒにおいてゲノム情報が部分的に明らかになり、PG 合成系遺伝子が保存されていることが分

かった。また予備的な実験ではあるが、裸子植物カラマツには阻害剤の影響が現れないという結果を得ている。このことは、シダ植物または裸子植物以降、植物が登場する進化の過程で、葉緑体分裂における PG の機能が消失し、不必要になった遺伝子が欠落していくと共に、一部の遺伝子は機能を変えつつ別の細胞機能にリクルートされていることを示唆している。

2. 研究の目的

基部陸上植物のコケ植物では、PG 合成系遺伝子は葉緑体分裂に関与するが、被子植物シロイヌナズナには一部の遺伝子しか保存されておらず、葉緑体分裂に関与しない。それでは陸上植物の進化のどの段階で PG 合成系遺伝子群が欠落し、葉緑体分裂に関与しなくなったのであろうか？また残された遺伝子はどのような変異が生じることにより機能転換したのであろうか？本研究では、コケ植物と被子植物の間に位置する裸子植物のゲノムに PG 合成系遺伝子が全て保存されているか遺伝子の同定を行い、PG 合成系遺伝子群の完全性を明らかにする。また、ヒメツリガネゴケ葉緑体 PG の可視化に成功した新規の PG 標識法を用いて、陸上植物の祖先となった緑藻の車軸藻綱の葉緑体における PG の存在を確認する。次に被子植物に残された PG 合成系相同遺伝子 *MurE* がどのように進化し機能転換するに至ったのかを解明するため、主に裸子植物を用いて、以下の 2 つの研究を行う。1 つ目は裸子植物の *MurE* 遺伝子を、ヒメツリガネゴケとシロイヌナズナのそれぞれの遺伝子欠損ラインに導入し、表現型の相補を解析することで裸子植物の遺伝子がヒメツリガネゴケとシロイヌナズナの遺伝子のどちらの機能を持つのかを遺伝学的に明らかにする。2 つ目は、機能相補解析の結果や、推定アミノ酸配列のアライメント解析をもとに、タンパク質のドメイン置換解析や、保存されたアミノ酸の点変異解析を通じて、どこに変異が起きることによってタンパク質の機能転換が生じたのかを推定し、ゲノムに残された *MurE* の進化について解明する。

3. 研究の方法

(1) 緑色植物における葉緑体 PG の可視化

ヒメツリガネゴケの葉緑体 PG の可視化に成功した手法と同様の代謝標識法を用いて、陸上植物の系統につながる車軸藻綱のクレブソルミディウムの葉緑体 PG の可視化を試みた。*Ddl* 遺伝子破壊株が存在しないクレブソルミディウムでは、PG の可視化のためには、まず *Ddl* 阻害剤である D-サイクロセリンを処理する必要がある。この処理により、クレブソルミディウムでは PG の構成分子である D-アラニル-D-アラニン (DADA) が合成されず、PG 合成が停止し、葉緑体分裂阻害を起因とする細胞分裂が阻害生じる。この状態で、DADA にエチニル基を結合させた

E-DADA を取り込ませた後、細胞分裂が回復することを確認した上で固定し、Click 反応によりアジド基を持った Alexa Fluor 488 を結合させ、その蛍光を顕微鏡下で観察することにより、PG の存在を確認した。

(2) ヒメツリガネゴケ PpMurE2 の機能解析

Phytozome のヒメツリガネゴケゲノムデータベース ver.3.3 より新たな *MurE* 相同遺伝子を見だし、*PpMurE2* と命名した。*PpMurE2* の機能を調べるために、相同組換えによる遺伝子破壊を行った。また、大腸菌温度感受性 *murE* 変異株 TKL-11 による機能相補解析を行った。TKL-11 は制限温度下では分裂が抑制され増殖しない。TKL-11 に *PpMurE2* を導入することで、制限温度下で増殖が回復するかを調べた。さらに *PpMurE2* 全長配列に GFP 遺伝子を融合させた遺伝子を、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーターにより発現させ、タンパク質の細胞内局在を解析した。

(3) PpMurE1-PpMurE2 ドメインスワップによる機能相補実験

PpMurE1 と PpMurE2 の機能が異なることが (2) 及び (3) の実験で推測されたが、どこの領域に変異が生じることにより機能分化するに至ったのかを明らかにするため、ドメインスワップを行った 3 通りの遺伝子を、PpMurE1 遺伝子破壊株に導入し、葉緑体数の回復程度を調べた。

(4) ヒメツリガネゴケ PpMurE1 遺伝子破壊株を用いた PpMurE2、LgMurE、PaMurE による機能相補解析

PpMurE2、裸子植物カラマツ LgMurE、オウシュウトウヒ PaMurE の機能が、PpMurE1 と同様に葉緑体分裂に関与するのかを調べるために、葉緑体分裂が阻害され巨大葉緑体が生じる *PpMurE1* 遺伝子破壊株において、一過的に過剰発現させ、表現型が相補されるか調べた。

(5) AtMurE T-DNA タグラインを用いた LgMurE、PpMurE2 による機能相補実験

葉緑体分化に関係する AtMurE には、葉緑体分裂に関係する PpMurE1 と異なり N 末端に機能未知領域を含む。カラマツ LgMurE、PpMurE2 にも AtMurE と同様に N 末端側に機能未知領域をもつことから、AtMurE のように葉緑体分化に関与するのではないかと考え、これらの遺伝子を *AtMurE* T-DNA タグラインに導入し、機能が相補されるか調べた。*AtMurE* に T-DNA がホモで挿入されたラインは、アルビノとなるので、LgMurE と PpMurE2 が AtMurE と同様の機能を持てばアルビノ個体は出てこないと考えられる。

(6) シロイヌナズナ AtMurE-PpMurE1 ドメ

インスワップによる機能相補実験

AtMurE の機能未知領域が葉緑体分化に重要であるのか、また細菌 MurE 相同領域の変異が問題なのかを調べるために、PpMurE1 の N 末端に AtMurE の機能未知領域を付加した遺伝子、機能未知領域を欠失させた *AtMurE* 遺伝子を、*PpMurE1* 遺伝子破壊株と、*AtMurE* T-DNA 挿入株に導入し、表現型の回復を調べた。

4. 研究成果

(1) 緑色植物における葉緑体 PG の可視化

陸上植物の系統につながる車軸藻綱のクレブソルミディウムのゲノムには、PG 合成系遺伝子群が全て保存されており、さらに今回の実験で葉緑体 PG の可視化に成功したことから、クレブソルミディウム葉緑体に PG が存在し、葉緑体分裂とともに細胞分裂にも関与していることが明らかとなった。

(2) ヒメツリガネゴケ PpMurE2 の機能解析

GFP を用いた解析から、PpMurE2 は葉緑体局在タンパク質であることが明らかとなった。PpMurE2 の機能を探るため、ヒメツリガネゴケの遺伝子破壊を行ったところ、*PpMurE1* 遺伝子破壊株のような葉緑体分裂阻害は観察されなかったが、葉緑体の分化異常もまた確認されなかった。また *PpMurE2* を *PpMurE1* 遺伝子破壊株に導入し、一過的に過剰発現させても、*PpMurE1* 遺伝子破壊株の巨大葉緑体形質は回復しなかった。さらに、大腸菌 *murE* 温度感受性突然変異体である TKL-11 に導入し、制限温度下で生育させたところ、*PpMurE1* を導入した大腸菌は増殖が回復したが、*PpMurE2* を導入した大腸菌では増殖の回復は見られなかった。以上のことから、PpMurE2 は PG 合成に起因する葉緑体分裂には関与していないと考えられた。

(3) PpMurE1-PpMurE2 ドメインスワップによる機能相補実験

ドメインスワップを行った 3 通りの遺伝子を、*PpMurE1* 遺伝子破壊株に導入し、葉緑体数の回復程度を調べた結果、PpMurE1 の 94 番目のアミノ酸から 301 番目のアミノ酸の間に、葉緑体分裂に重要な配列があることが明らかとなった。

(4) ヒメツリガネゴケ PpMurE1 遺伝子破壊株を用いた PpMurE2、LgMurE、PaMurE による機能相補解析

PpMurE2 を一過的に *PpMurE1* 遺伝子破壊株で発現させた結果については、(2) で記した通りであるが、裸子植物カラマツの *LgMurE* とオウシュウトウヒ *PaMurE* の機能を探るため、同様の実験を行ったところ、*LgMurE* では葉緑体分裂の回復が見られたが、*PaMurE* では回復がみられないという、同じ

裸子植物に保存された *MurE* 遺伝子でありながら、正反対の結果を得た。またゲノム解析が行われたオウシュウトウヒでは、全ての PG 合成系が保存されていることから考えても、PaMurE は細菌型 *MurE* の PG 合成能を持ち葉緑体分裂に関与していることが推測される。カラマツではゲノム解析が行われていないものの、我々は3種類の PG 合成系遺伝子以外の遺伝子は保存されていることを見いだした。カラマツには、もう1つの細菌型 *MurE* 遺伝子が存在する可能性が考えられ、今後、トランスクリプトーム解析を行い未知の *MurE* 遺伝子の同定を試みる。また LgMurE と PaMurE の推定アミノ酸配列のアライメントの比較、並びに実験 (3) において明らかになった細菌型 *MurE* に重要な領域を合わせて考えると、葉緑体分裂に関与する細菌型 *MurE* に重要なアミノ酸は3カ所あることが推測された。今後、この3カ所のアミノ酸に変異を導入し、*MurE* の機能が変化するか調べる。

(5) *AtMurE* T-DNA タグラインを用いた *LgMurE*、*PpMurE2* による機能相補実験

PpMurE1 を *AtMurE* T-DNA タグラインに導入した形質転換体では、T-DNA 挿入ヘテロの T1 ラインから生じた T2 個体群の中に、アルビノ個体が出現したことから、細菌型 *MurE* である *PpMurE1* は *AtMurE* の葉緑体分化能を持たないことが推測された。一方で、*LgMurE* を導入したラインではアルビノ個体が出現せず、*AtMurE* を相補することが可能であった。実験 (4) の結果と合わせて考えると、LgMurE は葉緑体分化能を持った被子植物型 *MurE* であると推測された。さらに *AtMurE* や *LgMurE* と同様に N 末端に機能未知領域をもつ *PpMurE2* を導入したところ、アルビノ個体が出現しないという結果を得た。これはヒメツリガネゴケには、細菌型の葉緑体分裂に関わる *PpMurE1* と被子植物型の葉緑体分化に関与する *PpMurE2* が存在することを示している。現在、導入遺伝子の発現の確認が未調査であるので、早急に確認を行い、本当に導入遺伝子の発現により、*AtMurE* の相補が生じているのかを確定する。

(6) シロイヌナズナ *AtMurE* -*PpMurE1* ドメインスワップによる機能相補実験

AtMurE の機能未知領域に *PpMurE1* を付加した遺伝子を、*PpMurE1* 遺伝子破壊株に導入したところ、*PpMurE1* を導入した時と変わらず、葉緑体数の回復が見られた。また機能未知領域を除いた *AtMurE* (葉緑体移行配列は残している) を導入しても、回復は認められなかった。次にシロイヌナズナ *AtMurE* タグラインに、*AtMurE* の機能未知領域に *PpMurE1* を付加した遺伝子を導入した遺伝子組換え体を作成したところ、T2 世代でアルビノ個体が生じていた。また機能未知領域を除いた *AtMurE* でも同様の結果となったこ

とから、葉緑体分化能を持つ被子植物型の *MurE* の機能には、機能未知領域と *MurE* 相同領域の両方が重要であることが推測された。シロイヌナズナの遺伝子組換え体の実験は、まだ導入遺伝子の発現確認が未調査であるので、早急に確認を行いたい。

本研究結果から、これまで葉緑体型 *MurE* は葉緑体分裂から葉緑体分化へと陸上植物の進化の過程の中で、シダ植物から種子植物が登場する過程で機能分化したと推測していたが、葉緑体分化型の *MurE* は少なくともコケ植物が分岐した時点で既に登場しており、葉緑体分裂型 *MurE* も裸子植物に存在している可能性が推測された。ただし、コケ植物の中で葉緑体分化に機能しているかは、本研究では解明することができなかった。

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 4 件)

- (1) Sato N, Toyoshima M, Tajima N, Takechi K, Takano H. Single-Pixel Densitometry Revealed the Presence of Peptidoglycan in the Intermembrane Space of the Moss Chloroplast Envelope in Conventional Electron Micrographs. *Plant & cell physiology* 査読有り 58. 2017.
- (2) Lin X, Li N, Kudo H, Zhang Z, Li J, Wang L, Zhang W, Takechi K, Takano H. Genes sufficient for synthesizing peptidoglycan are retained in gymnosperm genomes, and *MurE* from *Larix gmelinii* can rescue the albino phenotype of arabidopsis *MurE* mutation. *Plant and Cell Physiology* 査読有り 58. 2017.
- (3) Takahashi Y, Takechi K, Takio S, Takano H. Both the transglycosylase and transpeptidase functions in plastid penicillin-binding protein are essential for plastid division in *Physcomitrella patens*. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences.* 査読有り 92. 2017.
- (4) Hirano T, Tanidokoro K, Shimizu Y, Kawarabayashi Y, Ohshima T, Sato M, Tadano S, Ishikawa H, Takio S, Takechi K, Takano H. Moss Chloroplasts Are Surrounded by a Peptidoglycan Wall Containing D-Amino Acids. *The Plant cell* 査読有り 28. 2016.

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 池田 孝介, 工藤 裕美, 加治佐 一朗, 瀧尾 進, 武智 克彰, 高野 博嘉. 「ヒメツリガネゴケゲノム中に存在する2種類の *MurE* 遺伝子の葉緑体分裂・分化における機能」第 59 回日本植物生理学会. 2018年3月28日. 札幌コンベンションセンター
- (2) Kudo H, Lin X, Takio S, Takechi K, Takano H. 「Cross-species complementation assay of macrochloroplast phenotype in moss *murE* mutant and of albino phenotype in *Arabidopsis* ones with larch *MurE* gene」Taiwan-Japan Plant Biology. 2017年11月4日. 台北 (台湾)
- (3) 工藤 裕美, 林 暁飛, 瀧尾 進, 武智 克彰, 高野 博嘉. 「コケで葉緑体分裂に、シロイヌナズナで葉緑体分化に関する *MurE* とカラマツ *MurE* を用いた種間相補解析」第 81 回日本植物学会. 2017年9月8日. 東京理科大学野田キャンパス
- (4) 工藤 裕美, 林 暁飛, 瀧尾 進, 武智 克彰, 高野 博嘉. 「コケで巨大葉緑体形質を示し、シロイヌナズナでアルビノの植物体となる *MurE* 遺伝子破壊ラインのカラマツ *MurE* を用いた種間相補解析」第 29 回日本植物形態学会. 2017年9月7日. 東京理科大学野田キャンパス.
- (5) 平野 隆之, 谷所 幸治, 佐藤 モモ, 只野 慎治, 石川 勇人, 瀧尾 進, 武智 克彰, 高野博嘉. 「ヒメツリガネゴケ葉緑体に存在するペプチドグリカン層」第 79 回日本植物学会. 2015年9月8日. 新潟コンベンションセンター (朱鷺メッセ)
- (6) 平野 隆之, 谷所 幸治, 佐藤 モモ, 只野 慎治, 石川 勇人, 瀧尾 進, 武智 克彰, 高野博嘉. 「ペプチドグリカン層を持つヒメツリガネゴケ葉緑体の観察」第 27 回日本植物形態学会. 2015年9月5日. 新潟コンベンションセンター (朱鷺メッセ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

武智克彰 (TAKECHI, Katsuaki)
熊本大学・大学院先端科学研究部・准教授
研究者番号：70515501

(2)研究分担者

高野博嘉 (TAKANO, Hiroyoshi)
熊本大学・大学院先端科学研究部・教授
研究者番号：70242104