

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06251

研究課題名（和文）陸上植物に保存された葉緑体ペプチドグリカン関連タンパク質SLHの解析

研究課題名（英文）Research on chloroplast-associated protein, SLH conserved in land plants

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒメツリガネゴケPpSLHsの局在を解析したところ葉緑体周辺部に凝集しており、PpSLH4重遺伝子破壊株の一重膜である巨大小包膜にも局在が認められた。各ドメインがタンパク質の葉緑体局在に与える影響を調べたところ、C末領域及び膜貫通ドメインの存在が正常な局在に必要なものであり、C末領域で未知の葉緑体包膜間タンパク質と相互作用することにより、ドット状局在をすることが予想された。SLHドメインとPGの相互作用を調べたが、相互作用は認められなかった。PpSLHsは、葉緑体内包膜に埋め込まれ、SLHドメイン以外のドメインと包膜間のPGと結合し、内包膜の安定性に関与することが予測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、葉緑体の進化過程において、共生菌がもっていたPG層の進化も重要なファクターではないかと考えた。細菌がもつPG関連タンパク質の多くは、植物には保存されていないが、SLHドメインをもつタンパク質は、陸上植物に広く保存されている。葉緑体の進化において、SLHタンパク質が重要な働きを持っているのではないかと考え、PGを持つヒメツリガネゴケにおいて機能解析を行った。葉緑体内に巨大小包が形成される変異体はこれまで例がなく、この変異体の解析を通じて、葉緑体包膜の動態を維持する未知のシステムの存在が明らかになるだけでなく、葉緑体の進化に至った要因を見いだすことができると考えている。

研究成果の概要（英文）：Analysis of the localization of PpSLHs proteins in *Physcomitrella patens* revealed that they were aggregated around the envelope of chloroplasts, and were also localized in the giant envelope membrane, which is a single membrane in the PpSLH quadruple gene disruptant. Examination of the effect of each domain on chloroplast localization revealed that the presence of the C-terminal and transmembrane domains is necessary for normal localization, and that the C-terminal domain is predicted to interact with unknown chloroplast inter-envelope proteins, resulting in dot-like localization. No interaction was found between the SLH domain and PG. PpSLHs are predicted to be embedded in the chloroplast inner envelope membrane, interact to PG between the domains other than the SLH domain and the envelope membrane, and are involved in the stability of the inner envelope membrane.

研究分野：植物形態学

キーワード：葉緑体 葉緑体内構造 オルガネラ 植物進化

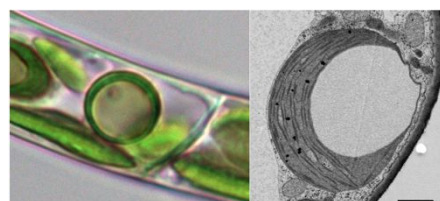
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の葉緑体は、原核生物である藍藻が原始的な真核生物に細胞内共生し、細胞内共生体を経て、細胞小器官に進化したと考えられている。細胞内共生体の例は数多く知られているが、共生菌から細胞小器官へと進化したのは、一部の藻類を除きミトコンドリアと葉緑体のみである。植物の誕生は、地球生命の進化において革新的なイベントであり、植物の誕生なくしては人類も誕生しえなかった。細胞内共生体から葉緑体進化には、共生菌の遺伝子の消失や細胞核への移行、共生菌以外の細菌からの遺伝子の水平伝播、膜透過装置の進化などが重要なファクターとして欠かすことができなかつたと考えられている。藍藻を含む全ての細菌には、物理的防御や細胞形態維持、細胞分裂に機能する細胞壁構成成分としてペプチドグリカン(PG)が存在する。細菌のPGは、内膜と外膜の間のペリプラズム領域に存在し、ペリプラズム内外の様々なタンパク質と結合している。細胞内共生体から葉緑体が進化する過程で、PGや関連タンパク質は消失したと考えられてきたが、我々は、コケ植物において初めて葉緑体包膜間にPGが存在し、細菌と同様に葉緑体分裂に関与することを明らかにした。また、PG合成系遺伝子群のセットが、基部ストレプト植物から裸子植物にいたるまで存在することを見いだした。だが、細菌のPG結合タンパク質のほとんどは、ストレプト植物のゲノムには見いだされない。細胞内共生体から細胞小器官へ進化する過程で、大きく変化した周囲の環境に適応するため、PG結合タンパク質も変化したものと考えられる。一方で、細菌においてPG結合能をもつドメインとして知られるSLH(S-layer homology)ドメインと相同な配列を持つ機能未知のタンパク質が、ストレプト植物に保存されていることを見いだした。元々SLHドメインは、細菌の細胞表面のS-layerに存在するS-layerタンパク質がもつPG結合性ドメインであるが、葉緑体にはS-layerは存在しない。葉緑体PGの機能が進化する際に、PG結合ドメインのみがリクルートされ、葉緑体の進化に影響を与えたのかもしれない。

2. 研究の目的

本研究では、葉緑体PGと結合すると考えられるSLHドメインを持つタンパク質をコードした遺伝子の機能を解析することで、葉緑体進化の分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。ヒメツリガネゴケゲノム中に、SLHドメインと相同の配列をもつタンパク質をコードした遺伝子を4種類見



PpSLHs4重遺伝子破壊ライン原系体(左)と巨大「液胞」状構造をもつ葉緑体の電子顕微鏡像(右)

いだされ、それぞれ *PpSLH1* ~ *4* (*PpSLHs*) と命名した。PpSLHsはN末端から順に、葉緑体移行配列、天然変性領域、1つの膜貫通ドメイン、SLHドメイン、タンパク質間相互作用に関わるcoiled-coil構造、機能未知のC末領域と、SLHドメイン以外にも多くのドメインをもつマルチドメインタンパク質であると推測された。4種類全ての遺伝子を破壊した4重遺伝子破壊ラインを作製したところ、内部に巨大な小胞構造が観察される葉緑体が観察された(右図)。このような葉緑体の表現型をもつ変異体は報告がなく、PpSLHsの機能を

明らかにすることで、葉緑体進化における新規の知見や、膜動態の安定性に関わる新規のメカニズムについて、知見を得ることができると考えている。

3. 研究の方法

(1) PpSLHs の局在解析

PpSLHs は葉緑体で機能するタンパク質であることを示すため、PpSLHs の C 末端側に sGFP を繋いだ融合遺伝子を、野生型ヒメツリガネゴケに導入し、葉緑体での局在を解析した。局在解析の結果、葉緑体周辺部でドット状の局在を示したことから、sGFP の過剰発現によるアーティファクトの可能性が考えられたため、プロモーターをカリフラワーモザイクウイルス 35s プロモーターから PpSLHs 自身のプロモーター配列に変更するとともに、モノマー型の GFP 変異体です mGFP(A206K)を用いて実験を行った。また、PpSLHs4 重遺伝子破壊ラインにおいて PpSLHs-sGFP を発現させ、変異体における PpSLHs の局在を解析した。

(2) PpSLH4 の局在に影響を与えるドメインの解析

PpSLH4をはじめ、全ての PpSLHs はマルチドメインタンパク質であるため、PpSLH4 のそれぞれのドメインを欠損させた遺伝子と sGFP との融合遺伝子を導入することで、タンパク質の局在に及ぼす影響を調べた。

(3) PpSLH の PG 結合能解析

SLH ドメインを持つ PpSLHs にペプチドグリカン結合能があるかを、*in vitro* で解析した。PpSLH4 の全長配列を His タグ融合タンパク質として大腸菌で発現させることができなかったため、SLH ドメインのみの His タグ融合タンパク質として発現させ、枯草菌のペプチドグリカンと結合できるかを調査した。

(4) PpSLH4 重遺伝子破壊ラインで観察される巨大小胞の形態学的解析

巨大小胞膜の構造を調べるため、透過型電子顕微鏡を用いて、小胞構造の観察を行った。

(5) シロイヌナズナに保存された AtSLH の解析

シロイヌナズナには 3 種類の SLH 相同遺伝子 (*AtSLH1*~*3*) が保存されている。これらの機能を調べるために、3 重遺伝子欠損変異体における葉緑体の形態を観察した。また PpSLHs4 重遺伝子破壊ラインに *AtSLH1*~*3* 遺伝子を導入し、巨大葉緑体小胞の形質が相補され、小胞が消失するかを調べた。

4. 研究成果

(1) PpSLHs の局在解析

PpSLH1~4 のいずれも葉緑体包膜周辺部にドット状の局在が認められた。ドット状局在が sGFP を 35s プロモーターによる過剰発現のアーティファクトでないことを確認するため、プロモーターを PpSLHs 自身のプロモーター配列に置き換えても、単量体 GFP である mGFP(A206K) 遺伝子に変更しても、同様な局在を示した。PpSLH4 重遺伝子破壊ラインにおいて PpSLH4-sGFP を発現させたところ、巨大小胞の表現型の相補が確認された一方、消失していない小胞膜状に GFP シグナルが観察されたことより、PpSLH4 は小包膜上にも存在することが示唆された。

(2) PpSLH4 の局在に影響を与えるドメインの解析

PpSLHs の予測アミノ酸配列から、N 末端から順に、推定葉緑体移行配列、天然変性領域、1つの膜貫通ドメイン、ペプチドグリカン(PG)結合能が知られる SLH ドメイン、タンパク質間相互作用に関わる coiled-coil 構造、機能未知の C 末領域をもつことが推測された。sGFP を用いた局在解析の結果、葉緑体周辺部にドット状に局在することが示された点と葉緑体移行配列を有する点から、PpSLHs は葉緑体内包膜に埋め込まれ、包膜間の PG と結合し、内包膜の安定性に関与することが推測された。本研究では、PpSLHs の各ドメインが葉緑体局在に与える影響を調べるために、各ドメインを欠損した配列と sGFP の融合タンパク質を、野生型ヒメツリガネゴケで一過的に発現させ、局在変化を調べた。その結果、天然変性領域、SLH ドメイン、coiled-coil 構造のいずれを欠損させても、局在変化は見られなかった。一方で、膜貫通ドメインを除くと、ドット状構造は消失し、包膜間内部に一様にシグナルが検出された。また C 末領域を除くと、ドットが巨大化した。各ドットの輝度と面積の測定結果から、葉緑体あたりのドットの総輝度は、全長 sGFP を導入した場合と変化がないことから、C 末領域を欠損させても、全長タンパク質と同程度発現していることが分かった。さらに膜貫通領域以降を全て欠損させた場合、C 末領域のみを欠損させた場合と同様の巨大ドットが出現し、膜貫通領域以降を全て欠損させた遺伝子に C 末領域のみを追加すると、全長タンパク質と同様の局在を示したことから、C 末領域及び膜貫通ドメインの存在が PpSLHs の正常な局在に必要であることが示された。特に C 末領域については、欠損すると、PpSLHs タンパク質が凝集し、ドットが巨大化するから、C 末領域内で未知の葉緑体包膜間タンパク質と相互作用していることが考えられた。一方で PG との相互作用が予想される SLH ドメインを除いても PpSLHs の局在に変化が見られないことから、SLH ドメインは局在に影響を与えないことが推測された。

(3) PpSLHs の PG 結合能解析

葉緑体移行配列を除いた PpSLHs 全長タンパク質を大腸菌内で発現させることができなかったため、SLH ドメインのみを大腸菌に発現させた組換えタンパク質を用いて、PG 結合解析を行ったが、PG との結合性は認められなかった。

(4) PpSLHs4 重遺伝子破壊ラインで観察される巨大小胞の形態学的解析

透過型電子顕微鏡を用いて、PpSLHs4 重遺伝子破壊ラインで観察される巨大小胞の観察を行ったところ、巨大小胞は一重の膜で覆われていることがわかった。また小胞内部の電子密度はストロマよりも低く、液胞と同程度であった。小胞が包膜等から発生している様子の観察を試みたが、そのような像は観察できなかった。

(5) シロイヌナズナに保存された AtSLH の解析

シロイヌナズナに保存された SLH 相同遺伝子の *AtSLH1*~*3* の全てが変異した *AtSLHs3* 重変異体の葉肉細胞をプロトプラスト化し、葉緑体の観察を行ったが、ヒメツリガネゴケ 4 重遺伝子破壊ラインのような巨大小胞は観察されなかった。また、葉緑体自体の形態も CoI 株と違いは見いだせなかった。*AtSLH1*~*3* の各遺伝子を、ヒメツリガネゴケ PpSLHs4 重遺伝子破壊ラインに導入し、一過的に発現させたところ、いずれも変異体の巨大小胞形質を相補することが可能であった。このことから、PG をもたないシロイヌナズナでも、ヒメツリガネゴケ PpSLHs と同等の機能を有することが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢渡明花, 緒方玲香, 武智克彰, 高野博嘉
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケ葉緑体のマルチドメイン膜タンパク質PpSLHの葉緑体内局在解析と膜動態
3. 学会等名 九州沖縄植物学会第72回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 緒方玲香, 武智克彰, 高野博嘉
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケのマルチドメインタンパク質PpSLHの各ドメインを用いた葉緑体内局在解析
3. 学会等名 九州沖縄植物学会第71回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒方玲香, 武智克彰, 高野博嘉
2. 発表標題 機能障害で葉緑体内に小胞様構造が出現するPpSLHの局在を決めているドメインの解析
3. 学会等名 日本植物形態学会第34回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒方玲香, 武智克彰, 高野博嘉
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケの葉緑体形態に関与する糖結合性SLHドメイン含有タンパク質の機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒方玲香, 宮崎千里, 武智克彰, 高野博嘉
2. 発表標題 コケとシロイヌナズナが持つSLHドメイン含有葉緑体タンパク質の葉緑体内局在と機能解析
3. 学会等名 九州沖縄植物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高野 博嘉 (Takano Hiroyoshi) (70242104)	熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・教授 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------