

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570046

研究課題名（和文）植物における D-アミノ酸の生理機能 —コケ植物葉緑体分裂を中心に

研究課題名（英文）Function of D-amino acids on plastid division in plants

研究代表者

高野 博嘉 (TAKANO HIROYOSHI)

熊本大学・バイオエレクトリクス研究センター・教授

研究者番号：70242104

研究成果の概要（和文）：

細菌のペプチドグリカン(PG)は、生物では例外的にD-アミノ酸を必須要素とする。我々はヒメツリガネゴケのPG合成系が葉緑体分裂に関わることを示してきた。本研究ではD-アラニン：D-アラニンリガーゼ(PpDdl)の解析を行った。PpDdlの遺伝子破壊ラインでは巨大葉緑体が出現し、この形質がD-アラニル-D-アラニンの添加で相補されたことから、PpDdl遺伝子がD-アラニル-D-アラニンの合成を介してヒメツリガネゴケ葉緑体分裂に機能することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

It is thought that usage of D-amino acids in organisms is restrictive, although D-amino acids are essential components of bacterial peptidoglycan. We found that plastid peptidoglycan synthesis pathway remains in the moss *Physcomitrella patens*. In this study, we analyzed a *P. patens* homolog of bacterial D-alanine-D-alanine ligase (Ddl). We generated a *PpDdl* knockout line, and its phenotype showed a few macrochloroplasts. D-alanyl-D-alanine supplemented in a medium could suppress chloroplast phenotype. These results suggested that D-alanyl-D-alanine synthesized with *PpDdl* is essential for chloroplast division in *P. patens*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：D-アミノ酸、コケ植物、葉緑体分裂、オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

鏡像異性体は、生体中では厳密に区別されており、通常はその一方が生物活性を持ち、他方は生理活性を持たない。アミノ酸にはグリシンを除いてL型とD型の鏡像異性体が存

在しているが、タンパク質を含めて生体のアミノ酸のほとんどがL型であり、D-アミノ酸の使用は細菌のペプチドグリカンや微生物の生産する抗生物質のようなごく少数の例外と考えられてきた。しかし、近年、D-アミ

ノ酸は微量ではあるもののかなり広く自然界に分布していることが分かってきた。植物においては、D-アミノ酸の存在自体は 1970 年代に指摘されているものの、その生理機能についての報告は出ていなかった。

我々はコケ植物を用いて葉緑体分裂の研究を進めている時に、ペプチドグリカン合成系遺伝子がコケ植物の葉緑体にも存在しており、それが葉緑体分裂と関係していることを発見した。植物細胞内で光合成を行う葉緑体は、単独で生活していたシアノバクテリア(藍藻)の原始真核細胞への共生により生じたと考えられている。藍藻は細胞外部の浸透圧に対抗するために細胞壁として強固なペプチドグリカン層を持つが、その子孫である緑色植物の葉緑体には細胞壁の痕跡は確認されていない。このことから、葉緑体への細胞内進化の過程において、共生した細菌の細胞壁は消失したものと思われる。しかし、細菌のペプチドグリカン合成系に対する各種阻害剤でヒメツリガネゴケを処理すると葉緑体が巨大化するという我々の発見は、基部の陸上植物の葉緑体ではこのペプチドグリカン合成系が残っている可能性を示唆した。次いで、ヒメツリガネゴケからペプチドグリカン合成系遺伝子の単離を試み、最終的に 10 種類の酵素の遺伝子全てを単離することができた。

単離した遺伝子の中からペニシリン結合タンパク質(*Pbp*)、*MurA*、*MurE*、*MraY* について、ヒメツリガネゴケで各遺伝子の破壊を行ったところ、抗生物質処理で見られたような巨大化した葉緑体が出現した。GFP 融合タンパク質を用いた実験はペプチドグリカン合成系が葉緑体に局在することを示しており、これらの結果はヒメツリガネゴケがペプチドグリカン合成系を持ち、葉緑体分裂に使用していることを強く示唆している。ただし、D-アミノ酸の関与については未だ明らかではなかった。

種子植物であるシロイヌナズナではペプチドグリカン合成系遺伝子は *Ddl* を含めて 4 種しか見いだされていない。このことは、種子植物ではペプチドグリカン系が機能していないことを示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、真核植物、特にコケ植物における D-アミノ酸の生理機能について明らかにすることにある。我々はコケ植物ではペプチドグリカン合成系が葉緑体分裂とかわることを明らかにしてきた。細菌のペプチドグリカン合成には D-アミノ酸が使われており、コケ植物において葉緑体分裂に D-アミノ酸が関与しているのかを明らかにしていく。また、D-アミノ酸を生成するラセマーゼについてもコケ植物で解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒメツリガネゴケゲノムからの D-アミノ酸関連遺伝子の探索

細菌の D-アミノ酸関連遺伝子を用い、全塩基配列が決定されているヒメツリガネゴケゲノムに対して tBlastN 検索を行った。

(2) PpDdl の細胞内局在部位の解析

PpDdl タンパク質の N 末 71 アミノ酸をコードする遺伝子断片、および更に翻訳開始コードンから 3.6kbp 上流までを含む領域を PCR 法によってヒメツリガネゴケゲノム DNA から増幅し、前者は CaMV 35S プロモーター下流に、後者はプロモーターを持たないように sGFP タンパク質コード領域とフレームを合わせて連結したプラスミドコンストラクトを作成した。これを PEG 法でヒメツリガネゴケプロトプラストに導入し、一過的な GFP 蛍光を顕微鏡観察した。

(3) PpDdl 遺伝子破壊ラインの作成

PpDdl 遺伝子の 5'領域および 3'領域をそれぞれ PCR によってゲノム DNA から増幅し、それを p35S-Zeo プラスミドのゼオシン耐性遺伝子の両側に導入したプラスミドコンストラクトを作成した。これをヒメツリガネゴケに形質導入し、PpDdl 遺伝子が置き換わった形質転換植物を作成した。形質転換植物はサザン解析により他の領域への挿入がないことを確認し、ノーザン解析により PpDdl 遺伝子の発現がないことを確認した。

(4) PpDdl 遺伝子破壊ラインの形質と、相補実験

PpDdl 遺伝子破壊ラインの原系体および茎葉体を顕微鏡下で観察を行い、遺伝子破壊による形質を特定した。更に、D-アラニン、L-アラニル-L-アラニンおよび D-アラニル-D-アラニンを添加した培地で生育し、形質を顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

細菌のペプチドグリカン合成には D-アミノ酸(D-アラニンおよび D グルタミン酸)が使われているため、コケ植物葉緑体分裂への D-アミノ酸の関与について解析を進めた。ペプチドグリカン合成系において D-アラニンの重合を行う *Ddl* は、細菌では必須の遺伝子である。ヒメツリガネゴケゲノムの探索と遺伝子発現解析等から、ヒメツリガネゴケで機能している *Ddl* 遺伝子は 1 つと推定できた。PpDdl の細胞内局在を調べるため、PpDdl の予想葉緑体移行配列 71 アミノ酸に GFP をつなぎ、CaMV35S プロモーターで発現させるプラスミドと自己プロモーターで発現させるプラスミドを作製した。作製したプラスミドを導入したヒメツリガネゴケプロトプラストでは、二種類ともで葉緑体に GFP 蛍

光が観察され、PpDdl が葉緑体に局在していることが示唆された。ゼオシン耐性遺伝子を用いて作成した PpDdl の遺伝子破壊ライン (Δ PpDdl#3) では葉緑体分裂が阻害され、野生型の細胞では 45 個程度存在する葉緑体が 2 個まで減少しており、それに伴って葉緑体が巨大化していた(下図)。

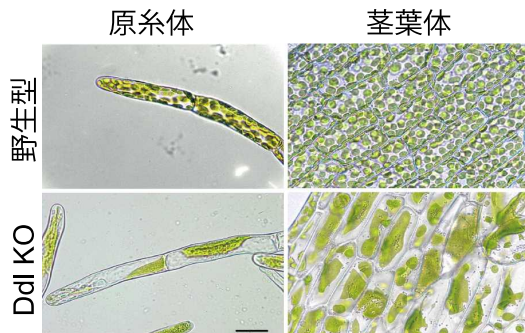


図 PpDdl 遺伝子破壊ラインの形質

野生型と、巨大葉緑体を持つ Δ PpDdl#3、およびペプチドグリカン合成の最初の反応を触媒する *MurA* の相同遺伝子を破壊した Δ PpMurA1/2#140 を D-アラニル-D-アラニン、D-アラニン、L-アラニル-L-アラニンを添加した培地で育て植物体を観察したところ、D-アラニル-D-アラニンを添加した培地で育てた Δ PpDdl#3 の次頂端細胞では葉緑体数が 22.9 ± 9.8 個まで回復していたが、他の場合では葉緑体の増加は見られなかった。これらの結果は、PpDdl 遺伝子が D-アラニル-D-アラニンの合成を介してヒメツリガネゴケ葉緑体分裂に機能している事を強く示唆している。

大腸菌の D-アミノ酸関連遺伝子を用い、ヒメツリガネゴケゲノムから Blast により遺伝子探索を行った。その結果、Asp/Glu ラセマーゼ、セリンラセマーゼおよび D アミノ酸アミノトランスフェラーゼと同性的のある遺伝子を見いだした。また、酵母のアラニンラセマーゼではないかと予測されている遺伝子の相同遺伝子を見いだした。ヒメツリガネゴケでは、これらの遺伝子産物を用いて D-アミノ酸を合成している可能性が示唆された。今後は遺伝子破壊等の実験により、これらの遺伝子の機能を明らかにしていきたい。

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 5 件)

① Matsumoto, H., Takechi, K., Sato, H., Takio, S. and Takano, H. (2012) Treatment with antibiotics that interfere with peptidoglycan biosynthesis inhibits chloroplast division in the desmid

Closterium., PlosOne 7(7): e407342 査読有り

② Yamaguchi, M., Takechi, K., Myouga, F., Imura, S., Sato, H., Takio, S., Shinozaki, K. and Takano, H. (2012) Loss of the plastid envelope protein AtLrgB causes spontaneous chlorotic cell death in *Arabidopsis thaliana.*, Plant Cell Physiol., 53, 125-134 査読有り

③ Sakaguchi, E., Takechi, K., Sato, H., Yamada, T., Takio, S. and Takano, H. (2011) Three *dynamine-related protein 5B* genes are related to plastid division in *Physcomitrella patens.*, Plant Sci., 180, 789-795 査読有り

④ Takano, H., Onoue, K. and Kawano, S. (2010) Mitochondrial fusion and inheritance of the mitochondrial genome., J. Plant Res., 123, 131-138 査読有り

⑤ Takano, H. and Takechi, K. (2010) Chloroplast peptidoglycan. Biochim. Biophys. Acta, 1800, 144-151 査読有り

[学会発表] (計 13 件)

① 山口瑞貴, 武智克彰, 明賀史純, 佐藤博, 滝尾進, 篠崎一雄, 高野博嘉, lesion mimic の形質を示す *atLrgB* ミュータントの解析, 第 76 回日本植物学会, 岡山大学(姫路), 2012 年 9 月 16 日.

② 宇都宮英恵, 武智克彰, 滝尾進, 高野博嘉, ヒメツリガネゴケにおいて *Membrane-bound lytic transglycosylase B (MltB)* 相同遺伝子は葉緑体の分裂・形態形成に関与する, 第 76 回日本植物学会, 岡山大学(姫路), 2012 年 9 月 15 日.

③ Tanidokoro, K., Utsunomiya, H., Takechi, K., Takio, S. and Takano, H. : Mur-related genes for peptidoglycan biosynthesis are related to chloroplast division in the moss *Physcomitrella patens*, Moss2012, NY Botanical Garden (NY), USA, 17 June 2012.

④ Higashi, Y., Takechi, K., Takano, H. and Takio, S. : Maintenance of normal stress tolerance in *Physcomitrella patens* lacking chloroplastic superoxide dismutases, Moss2012, NY Botanical Garden (NY), USA, 17 June 2012.

⑤ 谷所幸治, 武智克彰, 滝尾進, 高野博嘉 : ヒメツリガネゴケにおいて葉緑体分裂に関与する D-アラニン : D-アラニンリガーゼ, 第 53 回日本植物生理学会年会, 京都産業大学(京都), 2012 年 3 月 16 日.

⑥ 山口瑞貴, 明賀史純, 佐藤博, 滝尾進, 武智克彰, 篠崎一雄, 高野博嘉 : 緑化した葉の一部が白色化していくシロイヌナズナ *apg17* タグラインの解析, 日本植物学会第 75

回大会, 東京大学(東京), 2011年9月17日.

⑦ Higashi, Y., Takechi, K., Takano, H. and Takio, S. : Involvement of microRNA in copper-deficiency induced repression of chloroplastic CuZn-superoxide dismutase genes in *Physcomitrella patens*, Moss2011, Black Forest, Germany, 13 Sep. 2011.

⑧ 森山陽介、高野博嘉、河野重行 : 真正粘菌の原始的な性とミトコンドリアの遺伝, 日本植物学会第74回大会シンポジウム, 中部大学(愛知) 2010年9月9日.

⑨ 高野博嘉 : 一次共生植物の葉緑体分裂機構の進化 -細菌細胞壁はどこにいった-, 琉球大学理学部セミナー, 2010年8月12日.

⑩ Tanidokoro, K., Homi, S., Takechi, K., Sato, H., Takio, S. and Takano, H. : Two *MurA* genes for the peptidoglycan biosynthesis are related to chloroplast division in the moss *Physcomitrella patens.*, Moss2010, Sapporo, Japan, 21 July 2010.

⑪ Sakaguchi, E., Takechi, K., Sato, H., Takio, S. and Takano, H. : *Three Dynamine-Related Protein (DRP) 5B* genes are redundant for plastid divisions in *P. patens.*, Moss2010, Sapporo, Japan, 21 July 2010.

⑫ Takano, H. : Evolution of Chloroplast division machinery with peptidoglycan, Seminar in Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia, China, 26 June 2010.

⑬ Takano, H. : Evolution of Chloroplast division machinery with peptidoglycan, Seminar in Inner Mongolia University, Inner Mongolia, China, 23 June 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 博嘉 (TAKANO HIROYOSHI)

熊本大学・バイオエレクトロクス研究センター・教授

研究者番号 : 70242104

(2) 研究分担者

武智 克彰 (TAKACHI KATSUAKI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号 : 70515501

(3) 連携研究者

なし