

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24年 5月 31日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770044

研究課題名（和文） 植物に保存されたアンチホリン関連タンパク質 LrgB の解析

研究課題名（英文） Analysis of LrgB antiholin related protein conserved in plant genome

研究代表者

武智 克彰（TAKECHI KATSUAKI）

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：70515501

研究成果の概要（和文）：

植物に広く保存されている *LrgB* 遺伝子について、シロイヌナズナとヒメツリガネゴケを用いて解析を行った。*LrgB* は、元々細菌のペプチドグリカン分解制御システムに関わる因子の一つであり、葉緑体の祖先であるシアノバクテリアに由来すると考えられる。シロイヌナズナにおいては、葉緑体を介した細胞死制御システムに関与することが示唆されたが、ヒメツリガネゴケでは細胞死に関するデータは得られなかった。遺伝子相補解析の結果から、両者の機能的な差異は見られなかったため、今後、進化の過程で *LrgB* の役割が変化したのかどうか調べていきたい。

研究成果の概要（英文）：

Bacterial *LrgB* gene related to control system for peptidoglycan degradation is widely conserved in plant genome and plant *LrgB* genes are thought to derived from cyanobacteria which is believed as ancestor of plastid. We examined the physiological role of *LrgB* in angiosperm *Arabidopsis* and moss *Physcomitrella*. In *Arabidopsis*, *AtLrgB* functions against new cell death control system in which chloroplast participates, similar to the bacterial *Lrg* system, whereas *Physcomitrella* *PpLrgB* is not found to function against cell death. Although there are the differences of phenotype between both *LrgB* genes disrupted lines, expression of *AtLrgB* gene in the *Physcomitrella* *PpLrgB* disrupted line complemented the phenotype of it. We will examine whether the function of *LrgB* has changed along the plant evolution.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：オルガネラ・細胞壁

1. 研究開始当初の背景

λファージは、宿主の細菌に感染後、複製した娘ファージを宿主外に放出するため、宿主の細胞膜にホリンと呼ばれる膜タンパク質でできた孔を開ける。ホリンによって形成された孔からは、細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン分解酵素が放出され、宿主は溶菌する。宿主内で娘ファージが増殖するまでは、ホリンはそのN末端に2アミノ酸が追加されただけのアンチホリンと二量体を形成しており、孔としての機能は抑制されている。

近年、ファージのホリン及びアンチホリンと同様な機能を持つ膜タンパク質が、いくつかの細菌から見いだされている。黄色ブドウ球菌において、*LrgAB* オペロンがコードする *LrgA* タンパク質が、ペリプラズム領域におけるペプチドグリカン加水分解酵素の活性を抑制し、ペプチドグリカン合成阻害剤であるペニシリンへの感受性も低下させる。また *LrgAB* とのアミノ酸配列での相同性から *CidAB* オペロンも見いだされた。*CidAB* オペロンの *CidA* が欠損すると、細胞外におけるペプチドグリカン加水分解酵素の活性が抑制され、ペニシリンへの感受性も低下した。これらの観察やタンパク質構造の類似性から、*CidA* はファージのホリンと同様に細胞膜に孔を開け、*LrgA* はアンチホリンのように *CidA* の機能を抑制する機能を持っていると考えられている。つまり、外界の環境の変化に应答して、細菌の細胞膜の中で *CidA* から *LrgA* が外れることにより孔が開き、細胞膜内外のプロトン勾配が破壊され、細胞機能は深刻なダメージを受ける。その後、低 pH により活性化されたペプチドグリカン加水分解酵素によりペプチドグリカンが分解され、細菌は溶菌するのではないかと推測されている。*CidA* と *LrgA* によるペプチドグリカン加水分解酵素活性の制御機構は、*Bcl-2* ファミリータンパク質による真核生物のアポトーシス制御機構と類似しており、細菌におけるPCD制御機構ではないかと考えられている。すなわち真核生物のアポトーシス制御機構では、ミトコンドリア外膜に存在する *Bcl-2* ファミリータンパク質の1つ *Bax* が膜の透過性を亢進させることにより、膜間にあるシトクローム *c* や *Smac/Diablo* などのアポトーシス誘導因子が漏出し、アポトーシスが誘導される。一方 *Bcl-2* は、同じく外膜に存在するが *Bax* による膜透過性の亢進を阻害することによりアポトーシスを抑制していることが知られている。

CidA 及び *LrgA* の機能が推定される中、*CidA* 及び *LrgA* とそれぞれオペロンを形成している *CidB*、*LrgB* については、細菌においてもその機能は全く解明されておらず、*CidA*、*LrgA* の補助的な因子として機能する膜タンパク質と推測されている。ゲノム情報から細菌 *LrgB* の相同遺伝子は動物には見いだされないが、現生植物には広く保存されている。一方、*CidAB* や *LrgA* の相同遺伝子は植物ゲノム中にも見いだされていない。またペプチドグリカン分解酵素は、シロイヌナズナゲノム中には見いだされないものの、葉緑体型ペプチドグリカンの存在が示唆されているコケ植物蘚類のヒメツリガネゴケには3種類存在していることを見いだしている。

2. 研究の目的

葉緑体の祖先である藍藻から持ち込まれたと考えられる *Cid/Lrg* のシステムの因子の1つである *LrgB* が、陸上植物でどのような機能を持ち、進化の過程でどう変化したのかをコケ植物のヒメツリガネゴケと被子植物のシロイヌナズナを用いて明らかにすることである。以下の課題について研究を進めた。

- (1) ヒメツリガネゴケ *LrgB* 遺伝子破壊ラインを作成する。
- (2) ヒメツリガネゴケとシロイヌナズナの *LrgB* 遺伝子欠損ライン表現型について相違点、共通点はどこか？
- (3) 植物 *LrgB* の細胞内局在はどこか？藍藻から持ち込まれたものであるとすると、葉緑体包膜だろうか？
- (4) 藍藻、シロイヌナズナ、ヒメツリガネゴケのそれぞれの *LrgB* の機能は保存されているのであろうか？

3. 研究の方法

(1) ヒメツリガネゴケ *PpLrgB* 遺伝子破壊ラインの作出

ヒメツリガネゴケ *PpLrgB* 遺伝子破壊ラインを相同組換え技術を用いて作成した。ヒメツリガネゴケには2種類の *PpLrgB* 遺伝子 (*PpLrgB1*、*PpLrgB2*) が保存されているので、それぞれの単一遺伝子破壊ライン及び二重遺伝子破壊ラインを作出した。

(2) ヒメツリガネゴケ *PpLrgB* 遺伝子破壊ラインの表現型の解析

- ① 原糸体頂端細胞の屈曲度を測定した。
- ② コロニーサイズの測定
- ③ コロニー当たりの茎葉体形成数の測定

(3) ヒメツリガネゴケ *PpLrgB* の局在解析

既にシロイヌナズナ *AtLrgB* については、葉緑体包膜に局在することが報告されている (Ferro et al. 2003)。 *PpLrgB* も同様な局在を示すか、 *PpLrgB* の葉緑体予想移行配列と GFP の融合タンパク質を発現させることにより解析を行った。

(4) シロイヌナズナ *AtLrgB* T-DNA 挿入タグラインの表現型の解析

シロイヌナズナ *AtLrgB* 遺伝子破壊ラインである T-DNA 挿入ラインは、理化学研究所から分与していただいた。

AtLrgB タグラインは、葉の一部が白くなるという表現型を示す (図 1)。



図 1 野生型 (左) と *AtLrgB* T-DNA タグライン (右)

- ① 葉の白色化の年齢特異的な発現パターンを調査した。
- ② *AtLrgB* 遺伝子の組織特異的、年齢特異的発現解析を RT-PCR 及びプロモーター-GUS 発現解析により調査した。
- ③ 透過型電子顕微鏡を用いて、 *AtLrgB* タグラインの白色組織の観察を行うとともに、緑色組織に異常がみられないか観察を行った。
- ④ 死細胞を染色する試薬であるトルイジンブルーで、葉を染色し、白色組織が死細胞であるかどうか確認した。

(5) シロイヌナズナ *AtLrgB* によるヒメツリガネゴケ *PpLrgB* 遺伝子破壊ラインの機能相補解析

シロイヌナズナとヒメツリガネゴケの *LrgB* 遺伝子破壊ラインの表現型は大きく異なっている。そこで、両者の機能が相同であるかどうかを確かめるために、シロイヌナズナの *AtLrgB* を、ヒメツリガネゴケ *PpLrgB* 二重遺伝子破壊ラインに導入し、表現型が相補されるか調べた。

4. 研究成果

(1) ヒメツリガネゴケ *LrgB* 遺伝子破壊ラインの作出

薬剤耐性、PCR によるスクリーニングの後、サザン解析によりゲノム中の *PpLrgB1* 及び *PpLrgB2* 遺伝子領域に、薬剤耐性遺伝子が挿入され、遺伝子破壊されていることを確認した。また RT-PCR により、それぞれの遺伝子

が発現していないことを確認した。二重遺伝子破壊ラインは、 *PpLrgB1* 単一遺伝子破壊ライン中の *PpLrgB2* 遺伝子を破壊することにより作出した (図 2)。

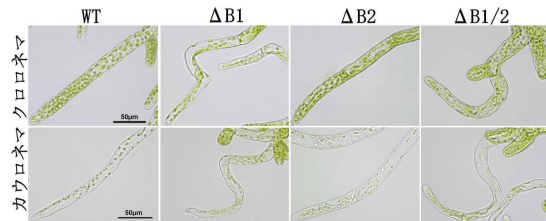


図 2 ヒメツリガネゴケ *PpLrgB1*, 2 単一遺伝子破壊ライン及び二重遺伝子破壊ラインの原系体

(2) ヒメツリガネゴケ *PpLrgB* 遺伝子破壊ラインの表現型の解析

① 原系体頂端細胞の屈曲度

作出した *PpLrgB1* 単一遺伝子破壊ライン及び *PpLrgB1*, 2 二重遺伝子破壊ラインにおいて、原系体の屈曲が観察されたので、屈曲度を測定したところ、クロロネマ細胞、カウロネマ細胞ともに、野生型と比較して有意に屈曲していることが確認された。 *PpLrgB2* 単一遺伝子破壊ラインについては、野生型との差異は認められなかった (図 2)。

② コロニーサイズの測定

コロニーサイズについても測定を行ったところ、 *PpLrgB1* 単一遺伝子破壊ライン及び *PpLrgB1*, 2 二重遺伝子破壊ラインにおいて、継代 7 日目以降、野生型よりも有意に直径が小さくなった。これは原系体細胞の屈曲の結果、コロニーの拡大が抑制されているものと推測される。

③ コロニー当たりの茎葉体形成数の測定

形成される茎葉体の数も、 *PpLrgB1* 単一遺伝子破壊ライン及び *PpLrgB1*, 2 二重遺伝子破壊ラインにおいて、野生型と比較し、約 1/3 に減少していた。

(3) ヒメツリガネゴケ *PpLrgB* の局在解析

PpLrgB の予測葉緑体移行配列をコードした塩基配列の下流に GFP 遺伝子をつなぎ、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターで発現させたところ、葉緑体において GFP の蛍光が観察され、 *PpLrgB* も *AtLrgB* と同様に葉緑体で機能することが考えられた。

(4) シロイヌナズナ *AtLrgB* T-DNA 挿入タグラインの表現型の解析

① 葉の白色化の年齢特異的な発現パターン

葉の部分的な白色化は、子葉及び低位葉でのみ生じ、コーリン葉では生じなかった。白色化のパターンは、ほぼ葉の左右対称に生じ、葉全体の白色化は見られなかった。短日条件により白色化は促進され、連続明期条件では

白色化は観察されなかった。また生育は野生型に比較して遅れるものの、着果、結実し、正常な種子形成にも異常はみられなかった。

②-1 齡特異的発現

AtLrgB タグラインでは、子葉及び低位葉にのみ白色化が観察される。そこで老化の進行が早まった結果ではないかと考え、葉の発生から老化し黄化するまでの間、6週にわたって *AtLrgB* の遺伝子発現を調査したところ、予想とは異なり、葉が緑色の時のみ発現が確認され、黄化した葉（老化葉）では発現は確認されなかった。

②-2 組織特異的発現

葉、茎、花（がく片を含む）、つぼみ、根からトータル RNA を抽出し、RT-PCR により遺伝子発現を調べたところ、根以外において発現が確認された。またより詳細に組織特異的な発現を解析するため、*AtLrgB* プロモーターの下流で GUS 遺伝子を発現するシロイヌナズナ形質転換体を作成したところ、緑色の組織で GUS 発現が確認され、根や花弁など葉緑体が存在しない場所では発現が確認できなかった。また老化した葉においては、弱い発現が観察された。

③ *AtLrgB* タグラインの細胞内構造

透過型電子顕微鏡を用いて、*AtLrgB* タグラインの細胞内構造を観察したところ、白色化した組織の細胞の多くにおいて、正常なオルガネラは観察されず、細胞膜は崩壊し、細胞質の電子密度が高くなっていったため、死んでいるように見えた。緑色組織の細胞においても、葉緑体の電子密度が高くなった異常な形態の葉緑体を持つ細胞が観察された。また連続明期条件下で生育した *AtLrgB* タグラインの細胞内構造は野生型と差異が観察されなかった。

④ トルイジンブルー染色（死細胞染色）

電子顕微鏡観察の結果、白色化している組織の多くが死んでいると思われたので、死細胞染色したところ、短日条件下で生育した *AtLrgB* タグラインの葉の細胞は部分的に染色され死んでいることが確認された（図 3）。しかし連続明期で生育させた場合、死細胞は検出されなかった。また *AtLrgB* タグラインについて、老化マーカー遺伝子である SAG12 の発現を確認したところ、白色化が起きている葉において、発現は確認されず、白色化は老化によって引き起こされているのではないことが分かった。

(5) シロイヌナズナ *AtLrgB* によるヒメツリガネゴケ *PpLrgB* 遺伝子破壊ラインの機能相補解析

ヒメツリガネゴケ *PpLrgB1*、2 二重遺伝子

破壊ラインで *AtLrgB* 遺伝子を発現する形質転換体を作成したところ、原糸体の屈曲については野生型同様に回復していることが観察された。コロニーサイズや茎葉体形成数については、今後測定する予定である。

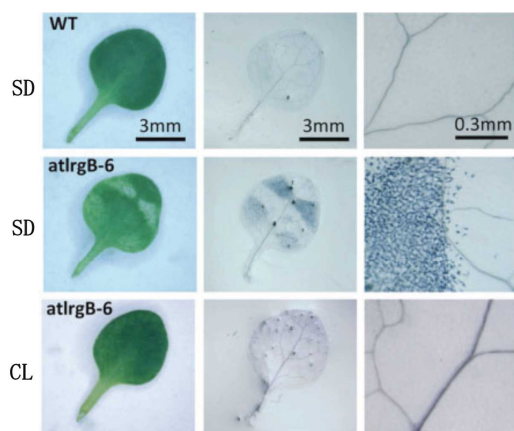


図3 *AtLrgB* T-DNA挿入タグラインにおけるトルイジンブルー染色
SD: 短日条件、CL: 連続明期条件
青く染まった細胞が死細胞を示す。

まとめ

シロイヌナズナに保存された *AtLrgB* の解析結果から、被子植物には葉緑体に関係した細胞死を制御する新奇のシステムが存在することが示唆され、短日条件下において *AtLrgB* は、細胞死を抑制する機能を持っているのではないかと考えられた。これは細菌が持つ Lrg システムに類似している。しかし植物ゲノムには、LrgB 以外の細菌 Lrg システムの相同遺伝子は見いだせないことから、*AtLrgB* がどのような作用機序により細胞死を抑制しているのかは、現在のところ分かっていない。

コケ植物ヒメツリガネゴケの *PpLrgB* 遺伝子破壊ラインの解析から、*PpLrgB* が葉緑体に局在すると予想されるも、その破壊ラインの表現型は葉緑体には直接的に現れず、細胞伸長や茎葉体の形成に異常が観察された。これは、これまでに検出できてはいないが、葉緑体に異常が出たことにより二次的に生じた表現型であるのか、それとも *PpLrgB1* が破壊されたことによる直接的な原因であるのかは分からない。*AtLrgB* を *PpLrgB1*、2 遺伝子破壊ラインで発現させたところ、機能の回復が確認されたことから、*AtLrgB* と *PpLrgB1* の機能は相同であると考えられる。今後、*PpLrgB1* 遺伝子破壊ラインについても、葉緑体に異常が見られないか、また特定の条件下においてシロイヌナズナ同様に細胞死が誘導されないか調べていきたい。

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 2 件）

① Mizuki Yamaguchi, Katsuaki Takechi, Fumiyoshi Myouga, Shinya Imura, Hiroshi Sato, Susumu Takio, Kazuo Shinozaki and Hiroyoshi Takano.
Loss of the plastid envelope protein AtLrgB causes spontaneous chlorotic cell death in *Arabidopsis thaliana*.
Plant and Cell Physiol. 査読有、53: 125-134. 2011.

② Emi Sakaguchi, Katsuaki Takechi, Hiroshi Sato, Takayuki Yamada, Susumu Takio, Hiroyoshi Takano.
Three dynamin-related protein 5B genes are related to plastid division in *Physcomitrella patens*.
Plant Science 査読有、180: 789-795. 2011

〔学会発表〕（計 3 件）

①谷所幸治、武智克彰、瀧尾進、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、2012. 3. 17、
京都産業大学（京都）

②山口瑞貴、井村信弥、鍋島一真、明賀史純、
篠崎一雄、佐藤博、瀧尾進、武智克彰、高野博嘉
緑化した葉の一部が白色化するシロイヌナ
ズナ *apg17* タグラインの解析
日本植物学会第 75 回大会、2011. 9. 17、東京
大学（東京）

③山口瑞貴、井村信弥、鍋島一真、明賀史純、
篠崎一雄、佐藤博、瀧尾進、武智克彰、高野博嘉
緑化した葉の一部が白色化するシロイヌナ
ズナ *apg17* タグラインの解析
日本植物学会九州支部大会、2011. 5. 21、長
崎大学（長崎）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武智 克彰 (TAKECHI KATSUAKI)
熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号：70515501

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高野 博嘉 (TAKANO HIROYOSHI)
熊本大学・バイオエレクトロニクス研究セン
ター・教授
研究者番号：70242104