

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440158

研究課題名(和文) 基部陸上植物における葉緑体型ペプチドグリカンの存在証明と機能解明

研究課題名(英文) Existence of plastid peptidoglycan in basal land plants

## 研究代表者

高野 博嘉 (Hiroyoshi, Takano)

熊本大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：70242104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：藍藻の細胞壁構成要素であるペプチドグリカン(PG)層は、その子孫である葉緑体から消失したものとわかってきたが、我々はPG合成系が現在でもコケ植物の葉緑体において分裂等の基本的な葉緑体機能にかかわることを明らかにしてきた。本研究では、代謝標識法とクリックケミストリーを組み合わせた実験手法によりコケ植物の葉緑体がPG層で覆われていることを示すと同時に、葉緑体型PGに関連する新規遺伝子・タンパク質の同定と解析を行った。

研究成果の概要(英文)：It is believed that, with some exceptions, plastids and mitochondria in eukaryotic organisms have two envelopes without a peptidoglycan wall (murein). However, we previously demonstrated that Mur(ein) genes in the moss *Physcomitrella patens* genome are associated with chloroplast division. In this study, we found the peptidoglycan wall surrounding chloroplasts in the *P. patens* cells using metabolic labeling with a D-Ala-D-Ala dipeptide probe and click chemistry. Moreover, we isolated and analyzed new genes and proteins that are related to plastid peptidoglycan.

研究分野：植物細胞学・形態学

キーワード：葉緑体 植物 形態

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアと葉緑体はそれぞれ原核生物の細胞内共生によって発生したオルガネラであり、分裂によって細胞内でその数を増やす。細胞壁を持つ藍藻の一次共生により生じた植物として、灰色植物・紅色植物および緑色植物が現存している。藻類の小グループである灰色植物の葉緑体はペプチドグリカン(PG)層を持つことが知られているが、他の植物の葉緑体にPG層は見いださないため、PGの消失は灰色植物が分岐した直後に生じたと考えられてきた。我々はコケ植物蘚類のヒメツリガネゴケを用いて葉緑体分裂の研究を進めている時に、各種のPG合成阻害剤処理でコケ植物の葉緑体分裂が阻害され、巨大葉緑体が生じることを発見した。我々は、続いてヒメツリガネゴケのゲノム中にPG合成に必要な十分と思われる遺伝子セットを見だし、その中のMurA、MurE、MraY またはペニシリン結合タンパク質(Pbp)の遺伝子を破壊すると細胞内で巨大葉緑体が出現することを明らかとした。MurEおよびPbp遺伝子破壊ラインの巨大葉緑体の形質は葉緑体移行シグナルをつけた藍藻の相同遺伝子によって相補されることから、少なくともこれらの遺伝子の機能はコケと藍藻で同様であることが明らかとなった。葉緑体の分裂は、FtsZを始めとする藍藻由来のタンパク質と、葉緑体分裂リングやダイナミンといった真核生物特異的な因子との複合システムによって引き起こされる。我々の研究は、コケ植物においてはPG系も葉緑体分裂に関与することを示している。

## 2. 研究の目的

コケ植物がPG合成に必要な十分な遺伝子を持つこと、これらの遺伝子を破壊すると葉緑体分裂異常が生じるという我々の研究は、細菌から持ち込まれたPG合成系が現在でもコケ植物の葉緑体において分裂等の基本的な葉緑体機能にかかわっていることを示唆している。そこで、本研究は、基部陸上植物における葉緑体型PGの存在証明と機能解明を目的とし、コケ植物における葉緑体型PGの可視化を目指すとともに、PG系に関連する遺伝子・タンパク質の同定と解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 葉緑体型PGにおけるD-アミノ酸の機能解析とD-アミノ酸を用いたPGの可視化

葉緑体PGの可視化には、葉緑体が巨大化しているヒメツリガネゴケ *PpDdl* 遺伝子破壊ラインをエチニル基を付加したD-アラニル-D-アラニン(EDA-DA)を含む培地で1週間以上培養し、巨大葉緑体形質が相補された植物体を用いた。植物体を固定、膜透過処理後、

クリック反応によりEDAにAlexa Fluor 488 azideのアジド基を共有結合させ、共焦点顕微鏡で観察した。

細胞中の遊離アミノ酸の分析は、0-フタルアルデヒドとN-アセチル-L-システインを用いてL型とD型のアミノ酸を分離しUPLCで解析を行った。

*PpYBL036C-1* を始め、遺伝子破壊ラインの作成は、破壊したい遺伝子の5'側領域と3'側領域の間に薬剤耐性遺伝子を組み込んだプラスミドを作成し、これをヒメツリガネゴケのプロトプラストにPEG法で導入して作成した。

### (2) 葉緑体PG分解系の解析

*PpMltB* 遺伝子破壊ラインの相補実験は、*PpMltB*-GFPを発現するプラスミドを作成し、プロトプラストに導入して行った。電子顕微鏡観察は常法に従って行った。*PpMltB*の過剰発現ラインは、過剰発現用プラスミドを常法によりヒメツリガネゴケに導入して作成した。

### (3) 葉緑体PG合成系関連タンパク質の同定

myc タグをつけたPBPを発現するヒメツリガネゴケ植物体の作成は、(2)と同様に行った。葉緑体を単離後、抗myc抗体で免疫沈降することで、PBPと複合体を作っていると考えられるタンパク質を単離し、質量分析法によりそれらのタンパク質を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) 葉緑体型PGにおけるD-アミノ酸の機能解析とD-アミノ酸を用いたPGの可視化

細胞内共生説から考えると、PGは葉緑体包膜間に局在しているはずであるが、灰色植物以外の葉緑体でPG様の構造が観察されたことはなかった。我々の電子顕微鏡観察でもコケ植物の葉緑体にそのような構造は見いだせていない。そこで我々は、病原性細菌クラミジアでinvisible wallと言われているPGを可視化した高感度代謝標識法に注目した。生体のアミノ酸のほとんどがL型である中、細菌のPGがD-アラニンやD-グルタミン酸を使うことはよく知られている。この代謝標識法では、PGの構成要素であるD-アラニル-D-アラニン(DA-DA)にエチニル基を付加(EDA-DA)してPGに取り込ませたのち、アジド化蛍光物質をクリック反応によりエチニル基に結合させ、PGを可視化していた。我々は既にヒメツリガネゴケでD-アラニンの重合を行うD-アラニン:D-アラニンリガーゼ(*Ddl*)遺伝子を見いだしており、作成した*Ddl*破壊ラインで葉緑体分裂が阻害されることから、コケ植物がD-アミノ酸を利用しているという結果を得ていた。この破壊ラインにおいてD-アミノ酸の定量を行い、実際に遊離D-アラニン量が増えていることも明らかにした。*Ddl*破壊ラインにEDA-DAを添加すると、巨大葉緑体が分裂を開始したため、クリック反応を行い、葉緑体の周りを覆

う P G の可視化に成功した。これは緑色植物の葉緑体における最初の葉緑体局在型 P G の観察例である。その結果、ヒメツリガネゴケでは葉緑体の周り全てに P G 層が存在していることを明らかにした。この方法を灰色植物シアノフォラに用い、この生物の葉緑体の周りに存在するペプチドグリカンの可視化にも成功している。この方法を応用すれば、様々な葉緑体からペプチドグリカンを単離することが可能になるかもしれない。

大腸菌ではペプチドグリカンの合成に必要な D-アラニン、ラセマーゼによる異性化により L-アラニンから生成される。D-アラニンを生成する酵素の候補として、酵母でラセマーゼと予想されている YBL036C のヒメツリガネゴケ相同遺伝子 2 つについて、PpYBL036C-1/-2 二重遺伝子破壊ラインを作成したところ、D-アラニル-D-アラニン合成酵素の遺伝子破壊ラインで見られる葉緑体の分裂阻害の形質は観察されなかった。このことは、YBL036C 以外のタンパク質がアラニンの異性化に関係している可能性やラセマーゼ以外のバイパス経路による D-アラニン生成の可能性を示している。

## (2) 葉緑体 P G 分解系の解析

ヒメツリガネゴケゲノム中に見いだしていた P G 分解系酵素の候補遺伝子 *MltB*(*PpMltB*) について解析を進めた。*PpMltB* 遺伝子破壊ラインは巨大葉緑体の形質を示すが、この形質が野生型 *PpMltB*-GFP によって回復すること、また GFP 蛍光が葉緑体で観察されることから、*PpMltB* が葉緑体で機能し、葉緑体分裂に関わっていることが示唆された。*PpMltB* が機能しなくなれば P G の分解が抑えられると考えられたため、*PpMltB* 遺伝子破壊ラインの葉緑体包膜を電子顕微鏡観察したが、現在のところ顕著な違いは見いだせていない。また、*PpMltB* 強制発現ラインを作成したところ、培養の時間経過に伴い細胞分裂の停止した基部側の細胞で肥大化した葉緑体が観察できるようになった。このことは、葉緑体の分裂停止に伴い、P G 分解による葉緑体形態異常が起きることを示唆しており、P G 分解系と葉緑体形態との関係が明らかとなった。

## (3) 葉緑体 P G 合成系関連タンパク質の同定

細菌の分裂は、FtsZ と共に Pbp や P G 分解系までも含んだ divisome と呼ばれる装置によって引き起こされる。P G 系を持つと考えられる葉緑体において、特別な divisome が存在しているかを明らかにする必要がある。ペニシリン結合タンパク質(PBP)は、細菌の細胞分裂においてペプチドグリカンモノマーを既存のペプチドグリカンに結合する最終合成を司る酵素であり、divisome の一部として各種のタンパク質と協調しつつ働いている。PBP と複合体を作ると予測さ

れるタンパク質を同定するため、myc タグを付加した PBP を発現する形質転換ラインをヒメツリガネゴケで作成した。myc タグに対する抗体で免疫沈降等を行うことにより PBP と複合体を作るタンパク質を取得し、質量分析法により同定したところ、ペプチドグリカン結合ドメインを持つと考えられる機能未知のタンパク質を見いだすことができた。これらのタンパク質はコケ植物の葉緑体でペプチドグリカンと結合しつつ、機能している可能性があり、今後遺伝子破壊ラインの作成等により解析を進めていきたい。

## 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. Hirano, T., Tanidokoro, K., Shimizu, Y., Kawarabayashi, Y., Ohshima, T., Sato, M., Tadano, S., Ishikawa, H., Takio, S., Takechi, K. and Takano, H. (2016) Moss chloroplasts are surrounded by a peptidoglycan wall containing D-amino acids. *Plant Cell* in press
2. Nakahara, J., Takechi, K., Myouga, F., Moriyama, Y., Sato, H., Takio, S., Takano, H. (2015) Bending of protonema cells in a plastid glycolate/glycerate transporter knockout line of *Physcomitrella patens*. *PLoS ONE* 10: e0118804.
3. Higashi, Y., Takechi, K., Takano, H., Takio, S. (2015) Maintenance of normal stress tolerance in the moss *Physcomitrella patens* lacking chloroplastic CuZn-superoxide dismutase. *Am. J. Plant Sci.* 6, 591-601.
4. Li, N., Zhang, W., Takechi, K., Takano, H., Lin, X. (2014) Overexpression of UDP-glucose pyrophosphorylase from *Larix gmelinii* enhances vegetative growth in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 33, 779-791.
5. Higashi, Y., Takechi, K., Takano, H., Takio, S. (2013) Involvement of microRNA in copper deficiency-induced repression of chloroplastic CuZn-superoxide dismutase genes in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* 54, 1345-1355.

[学会発表](計 17 件)

国際学会

1. Liu, P., Takechi, K., Takio, S., Takano, H. "Peptidoglycan related chloroplast division system in the

- moss *Physcomitrella patens*”, Moss2014, Beijing, China, Sep. 25-28, 2014.
- Liu, P., Takechi, K., Takio, S., Takano, H. “Chloroplast division system with peptidoglycan including D-amino acids in the moss *Physcomitrella patens*”, 2nd Int. Symp. Integ. Sci. Mol. Chiral. Biol. Chem. (ISMBCB), Aso, Japan, Nov. 30 - Dec. 1., 2014.
  - Nakahara, J., Takechi, K., Myouga, F., Moriyama, Y., Sato, H., Takio, S., Takano, H. “Bending of Protonema Cells in a Plastid Glycolate/Glycerate Transporter Knockout Line of *Physcomitrella patens*”, 2nd Int. Symp. for ISMCBC, Aso, Japan, Nov. 30 - Dec. 1., 2014.
  - Hirano, T., Tanidokoro, K., Shimizu, Y., Kawarabayasi, Y., Ohshima, T., Sato, M., Tadano, S., Ishikawa, H., Takio, S., Takechi, K., Takano, H., “D-alanyl-D-alanine is required for moss plastid division, but not for *Arabidopsis*”, 2nd Int. Symp. for ISMCBC, Aso, Japan, Nov. 30 - Dec. 1., 2014.

#### 国内学会

- 高野博嘉、「コケ植物の葉緑体を取り囲む藍藻由来の細胞壁構成要素ペプチドグリカン」第30回日本微生物生態学会、土浦、(2015年10月17-20日)招待講演
  - 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、新潟、(2015年9月6-8日)
  - 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、新潟、(2015年9月5日)
  - 平野隆之・谷所幸治・清水泰博・佐藤モモ・只野慎治・石川勇人・瀧尾進・武智克彰・高野博嘉、D-アラニン/D-アラニンはヒメツリガネゴケの葉緑体分裂に必要だが、シロイヌナズナでは必要ない、第56回日本植物生理学会年会、世田谷、(2015年3月16-18日)
  - 中原仁・武智克彰・佐藤博・瀧尾進・高野博嘉、光呼吸に関連する葉緑体グリコール酸/グリセリン酸トランスポーターのヒメツリガネゴケを用いた機能解析、日本植物学会第78回大会、神奈川、(2014年9月12-14日)
  - 松下祐美・武智克彰・瀧尾進・高野博嘉、ヒメツリガネゴケ葉緑体分裂に関する
- ペプチドグリカン合成酵素ペニシリン結合タンパク質複合体の解析、日本植物学会第78回大会、神奈川、(2014年9月12-14日)
- 松下祐美・平野隆之・武智克彰・瀧尾進・高野博嘉、蘇類ヒメツリガネゴケの葉緑体にペプチドグリカンは存在するか、日本植物形態学会第26回大会、神奈川、(2014年9月11日)
  - 高野博嘉、コケ植物におけるペプチドグリカンの葉緑体分裂への関与、第3回マトリョーシカ型生物学研究会、神戸、(2014年7月11-13日)
  - 平野隆之・武智克彰・瀧尾進・高野博嘉、ヒメツリガネゴケの葉緑体分裂におけるD-アラニン-D-アラニンリガーゼおよびアラニンラセマーゼの機能解析、第3回マトリョーシカ型生物学研究会、神戸、(2014年7月11-13日)
  - 松下祐美・武智克彰・瀧尾進・高野博嘉、ヒメツリガネゴケ葉緑体分裂に関与するペプチドグリカン合成酵素ペニシリン結合タンパク質(PBP)複合体の解析、第3回マトリョーシカ型生物学研究会、神戸、(2014年7月11-13日)
  - 中原仁、武智克彰、明賀史純、佐藤博、瀧尾進、高野博嘉、シロイヌナズナにおいてグリコール酸/グリセリン酸トランスポーターをコードする *AtLrgB/PLGG1* のヒメツリガネゴケ相同遺伝子 *PpLrgB* の機能解析、第55回日本植物生理学会年会、富山、(2014年3月18-20日)
  - 中原仁、山口瑞貴、明賀史純、福丸大介、添石清貴、瀧尾進、武智克彰、高野博嘉、シロイヌナズナで細胞死の抑制に関わる葉緑体内包膜局在タンパク質 *AtLrgB* とヒメツリガネゴケ相同遺伝子 *PpLrgB* の機能解析、日本植物学会第77回大会、札幌、(2013年9月13-15日)
  - 宇都宮英恵、武智克彰、佐藤博、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するペプチドグリカン分解系 遺伝子 *PpMltB* の解析、日本植物学会第77回大会、札幌、(2013年9月13-15日)
- 〔その他〕  
特に無し
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
高野 博嘉 (TAKANO, Hiroyoshi)  
熊本大学・大学院自然科学研究科・教授  
研究者番号： 70242104
- (2) 研究分担者  
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