

# 過重力条件下におけるアラビノガラクトタン-プロテインの遺伝子発現

埼玉大 小竹 敬久、五十嵐 俊、円谷 陽一

大阪市大 曾我 康一、若林 和幸、保尊 隆享

## Expression of arabinogalactan-proteins under hypergravity conditions

Toshihisa Kotake<sup>1</sup>, Shun Igarashi<sup>1</sup>, Kouichi Soga<sup>2</sup>, Kazuyuki Wakabayashi<sup>2</sup>, Takayuki Hosono<sup>2</sup>, and Yoichi Tsumuraya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Life Science, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, 255 Shimo-okubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570

<sup>2</sup> Department of Biology and Geosciences, Graduate School of Science, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585

E-mail: kotake@molbiol.saitama-u.ac.jp

**Abstract:** Arabinogalactan-proteins (AGPs) are a family of proteoglycans found in the plasma membrane and cell walls of higher plants. AGPs are implicated in many physiological processes such as cell elongation, cell-to-cell signaling, cell adhesion, cell death, and stress responses. The effects of hypergravity on expression of AGP species were examined using AGPs visualized with GFP. The expression level of a classical AGP significantly decreased in the inflorescence meristem under hypergravity conditions. The expression level recovered within 2 hours after transfer to 1 g condition. The results indicate that expression level of the AGP is regulated by the magnitude of gravity.

**Key words;** *Arabidopsis thaliana*, arabinogalactan-protein, cell wall, gene expression, hypergravity.

はじめに

およそ 4 億年前に地上に進出して以来、植物は過酷な環境に適応すべく、重力応答反応を進化させて来たと考えられる。植物には重力屈性の他に、抗重力反応と呼ばれる重力応答反応が存在する。重力の向きに対する反応である重力屈性に比べ、重力の大きさに対する反応である抗重力反応は未解明な部分が多い (Hosono and Soga 2003)。アラビノガラクトタン-プロテイン (AGP) は高等植物に普遍的に存在する細胞外プロテオグリカンであり、細胞伸長や細胞接着、細胞間情報伝達、ストレス応答など様々な生理現象に関与することが知られている (Fincher et al. 1983, Nosnagel 1997)。AGP はヒドロキシプロリンやセリン、トレオニンに富んだコアタンパク質とアラビノガラクトタン (AG) 糖鎖から構成され、糖鎖が重量の 90% 以上を占める。また多くの AGP

コアプロテインの C 末端には原形質膜にアンカリングされるグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー付加シグナルがあり、細胞表面や細胞壁に存在すると考えられている。個々の細胞が強固な細胞壁に覆われている植物細胞においては、隣り合う細胞壁との接着や原形質膜と細胞壁との接点が成長・分化に重要である。AGP 分子種の一つに変異をもつ *sos5* 変異体では、適切な細胞接着を形成できないために根の組織形態が乱れることが報告されている (Shi et al. 2003)。AGP は高等植物には普遍的に存在する一方で、単細胞性藻類には見られないことから、植物が水中から陸上に進出する過程で、地上の重力 (1g) 環境に適した形態形成を行うために発生・発達したと予想される。興味深いことに、ポプラでは引張あて材で AGP 様遺伝子の発現が誘導される (Lafarguette et al. 2004)。AGP

は環境因子に応答して細胞壁の構築・代謝の制御している可能性がある。しかしながら AGP は分子種が多く (Schultz et al. 2002)、重力応答反応に関係する AGP 分子種は未だ同定されていない。

本研究では、5 種類の AGP 分子種を緑色蛍光タンパク質 (GFP) により生きた植物で可視化し、過重力環境下における発現変化を詳細に解析した。本研究では、一部の AGP 分子種が重力の大きさに応答して発現することが明らかになった。

## 方法

### 植物材料

シロイヌナズナ (Columbia) は MS 寒天培地に播種し、滅菌条件のもとで 2 週間育成した。その後遠心管に移植し、暗所、23-26°C で遠心過重力処理した (Soga et al. 1999, Hoson and Soga 2003)。対照には移植後過重力処理と同じ時間、暗所で育成した植物を用いた。

### ACP 分子種の GFP による可視化と観察

クラシカル AGP 2 種、AG-ペプチド 2 種、ファシクリン様 AGP 2 種の計 6 種類の AGP のゲノミック遺伝子を PCR により単離した。ゲノミック遺伝子には、本来の発現や分子としての挙動が反映されるように、2 kb 程度のプロモーター領域、オープンリーディングフレーム、1 kb 程度の 3' 側領域を含むよう単離した。ゲノミック遺伝子のコアプロテインコード領域に GFP 遺伝子を挿入し、ACP-GFP 遺伝子コンストラクトとした。

アグロバクテリウム法により ACP-GFP 遺伝子コンストラクトをシロイヌナズナに遺伝子導入し、AGP 可視化植物を作成した。AGP-GFP のシグナルは共焦点レーザー顕微鏡 (ニコン TE2000-U) により観察した。

## 結果

### ACP 分子種の可視化

これまでの研究で (小竹他, 2008)、シロイヌナズナの芽生えには重力に発現応答する分子種が少なくとも 3 種存在することが分かっている。今回、これら 3 種と、比較的発現量の高い 3 種の AGP 分子種の可視化を試みた。

ACP-GFP コンストラクトをシロイヌナズナ

に導入したところ、6 種類の AGP-GFP うち、5 種類で GFP シグナルが観察された。観察できなかった 1 種類は、短いオープンリーディングフレーム内にイントロンを持つ遺伝子で、GFP 遺伝子の挿入が、発現に影響した可能性がある。AGP-GFP のシグナルパターンは AGP 分子種毎に異なっていた。興味深いことに、コアプロテインの構造と発現部位・局在の間には相関がなく、相同な構造の AGP 分子種が異なる生理機能を持つことが示唆された。

### 過重力環境下での発現変化

可視化した AGP 分子種のうち、クラシカル AGP に分類される 1 種は、過重力に対して顕著なシグナル強度の低下を示した。この AGP-GFP は、1 g 環境下では、根の分裂組織、地上部の茎頂分裂組織、葉のトライコームで発現が認められた。過重力環境下で育成すると、茎頂分裂組織と葉のトライコームにおけるシグナルが顕著に低下した。葉のトライコームでは、均一だったシグナルがパッチ状に変化した。根における発現は変化しなかった。茎頂分裂組織における過重力による発現低下は、処理後 2 時間以内に観察され、定量的 RT-PCR の結果とも一致した。過重力処理後、1 g 環境にもどすと、1 時間以内に GFP シグナルが回復した。また、メカノレセプター阻害剤であるガドリニウムで処理した後に過重力処理すると、シグナル強度の低下が観察されなかった。このことから、このクラシカル AGP に分類される AGP 分子種は、地上部において、重力の大きさに応答して発現が変化すると考えられる。

## 考察

AGP の生理機能は多岐にわたるが、その具体的な分子機能は未だ不明である。最近、GPI アンカータンパク質の一種、COBRA タンパク質が、セルロースの配向制御に関与することが報告された (Roudier et al. 2005)。AGP の大半は GPI アンカーにより原形質膜に係留されており、同様の分子機能を持つ可能性がある。また、COBRA タンパク質もアラビノガラクトサン糖鎖化を受けるとの予測もある (Seifert and Robert 2007)。植物細胞の形態や成長はセルロース微繊維の配向により支配されていることから、AGP は植物が感受した重力シグナル

の伝達に関わることが考えられる。原形質膜内側に存在する表層微小管の配向が、細胞壁のセルロース配向を制御すると考えられているが、AGPを始めとする GPI アンカータンパク質は、空間的には両者の間に存在する。今後、AGP と表層微小管、セルロース微繊維との関連を明らかにする必要がある。

今回詳細に解析したクラシカル AGP 分子種は、重力の大きさに応じて発現を変化させた。植物にはこの AGP 分子種のように、重力の大きさに応答した発現を示す遺伝子が多数存在すると予想される。これらは、抗重力反応に関連した未知の情報伝達経路により発現を制御されている可能性が高い。今回の AGP-GFP コンストラクトは約 2 kb のプロモーター領域を含んでいることから、現段階では過重力応答に関わる発現制御領域を絞り込むのは困難ではあるが、プロモーター領域を段階的にトランケートすることで、発現応答に重要な領域・配列を特定することが、将来的には可能と考えている。

AGP は糖鎖が重量の 90%以上を占めるプロテオグリカンであることから、遺伝子発現だけでその生理機能を推測することは危険である。実際、植物体内には、AGP の糖鎖代謝酵素が多数存在し (Kotake et al. 2005, Kotake et al. 2006)、生体内では活発に代謝・分解されている。遺伝子発現や細胞内局在に加えて、今後は抗重力反応における AGP 糖鎖の構造変化も調べたい。

#### 謝辞

本研究の一部は財団法人日本宇宙フォーラム・宇宙環境利用に関する地上公募研究による助成を受けて行われた。

#### 参考文献

- 1) Hoson, T., Soga, K.; New aspects of gravity responses in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* **229**, 209 (2003).
- 2) Fincher, G. B., Stone, B. A., Clarke, A. E.; Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **34**, 47-70 (1983).
- 3) Nothnagel, E. A.; Proteoglycans and released components in plant cells, *Int. Rev. Cytol.*, **174**, 195-291 (1997).
- 4) Lafarguette, F., Leplé, J.C., Dejardin, A., Laurans, F., Costa, G., Lesage-Descauses, M.C., Pilate, G.; Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytol.* **164**, 107 (2004).
- 5) Shi H, Kim Y, Guo Y, Stevenson B, Zhu J.-K.; The Arabidopsis *SOS5* locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *Plant Cell* **15**, 19 (2003).
- 6) Schultz C.J., Rumsewicz M.P., Johnson K.L., Jones B.J., Gaspar Y.M., Bacic A.; Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. *Plant Physiol.* **129**, 1448 (2002).
- 7) Soga K., Wakabayashi K., Hoson T., Kamisaka S.; Hypergravity increases the molecular mass of xyloglucans by decreasing xyloglucan-degrading activity in azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.* **40**, 581 (1999).
- 8) 小竹 敬久、五十嵐 俊、曾我 康一、若林 和幸、保尊 隆享、円谷陽一; 重力がアラビノガラクトタン-プロテインの発現に与える影響. *Space Utiliz. Res.* **24**, 382-384 (2008).
- 9) Roudier, F., Fernandez, A. G., Fujita, M., Himmelspach, R., Borner, G. H., Schindelman, G., Song, S., Baskin, T. I., Dupree, P., Wasteneys, G. O. and, Benfey, P. N.; COBRA, an Arabidopsis extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *Plant Cell*, **17**, 1749-1763, (2005).
- 10) Seifert GJ, Roberts K.; The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 137-61 (2007).
- 11) Kotake T., Dina S., Konishi T., Kaneko S., Igarashi K., Samejima M, Watanabe Y., Kimura K., Tsumuraya Y.; Molecular cloning of a  $\beta$ -galactosidase from radish that specifically hydrolyzes  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-galactosyl residues of arabinogalactan-protein. *Plant Physiol.* **138**, 1563 (2005).
- 12) Kotake T., Tsuchiya K., Aohara T., Konishi T., Kaneko S., Igarashi K., Samejima M., Tsumuraya Y.; An  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase/ $\beta$ -D-xylosidase from immature seeds of radish (*Raphanus sativus* L.). *J. Exp. Bot.* **57**, 2353 (2006).