

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

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

Effects of gravity on the expression of arabinogalactan-proteins in *Arabidopsis*

Toshihisa Kotake¹, Shun Igarashi¹, Kouichi Soga², Kazuyuki Wakabayashi²,
Takayuki Hosono², and Yoichi Tsumuraya¹

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

² 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), a family of proteoglycans, are commonly found in higher plants and implicated in many physiological processes such as cell-to-cell signaling, cell adhesion, cell elongation, cell death, and stress responses. We examined the effects of hypergravity on expression of AGP species in *Arabidopsis* plants. Several AGP species including classical AGP, AG-peptide, and fasciclin-like AGP showed decreased expression under hypergravity conditions. Visualization of the AGP species with GFP revealed their tissue-specific expression and confirmed the altered expression under hypergravity. The results suggest that AGPs play a role in the gravity response of higher plants.

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

はじめに

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と細胞壁との接点が情報伝達や成長・分化に重要である。アラビノガラクトタン-プロテイン (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) 糖鎖から構成されるプロテオグリカンであり、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 GPI アンカーシグナルがあり、細胞表面や細胞壁に存在すると考えられている。最近の分子遺伝学的な研究から少なくとも一部の AGP は植物の細胞接着に関与することが明らかになった。例えば、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 (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 (1 g) 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。また、ポプラでは引張あて材で AGP 様遺伝子が誘導されることが報告されており (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 の生理機能は多岐に渡る上に分子種が多いこともあり (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、過重力条件下におけるシロイヌナズナ AGP 分子種の発現動態を調べ、重力により発現が変化する分子種 (重力応答 AGP) および、恒常的に発現が高い分子種 (主要 AGP) を同定した。また、コアプロテインを緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識することで、これらの詳細な発現と局在を観察した。

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 10 日間育成した。その後シロイヌナズナの芽生えを遠心管に移植し、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。

定量的 RT-PCR による発現量の測定

過重力処理後、直ちに遠心管から植物 (本葉、子葉、根を含む) を回収し、液体窒素で凍結した。乳鉢で粉碎した後、市販の RNA 抽出試薬 (アイソジェン、ニッポンジーン) を用いてトータル RNA を抽出した。cDNA はオリゴ dT プライマーを用いて、逆転写酵素 (ReverTra Ace、東洋紡) により合成した。定量的 PCR に用いるプライマーは、Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) プログラムにより設計した。PCR 反応は、SYBR Premix ExTaq kit (タカラバイオ) により行い、PCR 反応産物の定量には、Opticon 2 (バイオラッド) を使用した。アクチン (*ACTIN2*) を内部標準として、各 AGP 分子種の相対的な発現量を調べた。

AGP 分子種の GFP による可視化と観察

シロイヌナズナのゲノムデータベースを利用して、AGP 分子種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、プロモーター領域、オープンリーディングフレーム、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、AGP-GFP 遺伝子コンストラクトとした。

アグロバクテリウムにより AGP-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

過重力条件下における AGP 分子種の発現

シロイヌナズナには 40 以上の AGP コアプロ

テイン遺伝子が存在し、これらは配列によって、クラシカル AGP、AG ペプチド、ファシクリン様 AGP 等に分類される。既存の発現データベースを利用して、各 AGP 分子種の相対的な発現強度を調べたところ、シロイヌナズナ芽生えでは少なくとも 13 の AGP 分子種が強く発現していた。これらにはクラシカル AGP、AG ペプチド、ファシクリン様 AGP が含まれていた。そこでこれらについて定量的 RT-PCR で解析し、10 日間育成したシロイヌナズナ芽生えで強い発現を確認できた分子種を主要 AGP に分類とした。

10 日間育成したシロイヌナズナの芽生えを 12 時間遠心過重力 (300 *g*) 処理したところ、3 種の AGP 分子種の発現が対照 (1 *g*) と比べて顕著に低下した。発現の低下は過重力処理後 2 時間以内に認められ、これらの分子種が比較的早い重力応答反応に関与していることが示唆された。3 種の AGP は重力の大きさに応じて発現が変化する重力応答 AGP に分類した。

AGP 分子種の可視化

主要 AGP と重力応答 AGP の発現をリアルタイムでかつ詳細に追うべく、ゲノミック遺伝子に GFP 遺伝子を導入して AGP 可視化植物を作成した。AGP 可視化シロイヌナズナでは AGP-GFP のシグナルが認められ、シグナルのパターンは AGP 分子種で異なっていた。また、AGP-GFP シグナルを詳細に観察したところ、少なくとも根では、分裂組織細胞板に局在する分子種と伸長領域細胞壁に存在する分子種があり、これらの挙動は明らかに異なっていた。コアプロテインの構造と発現部位や局在に相関はなく、個々の AGP 分子種が異なる生理機能を持つことが示唆された。

重力応答 AGP 可視化植物では、過重力処理後、顕著な GFP シグナルの低下が認められた。過重力環境から 1 *g* 環境にもどすと 2 時間後にはもとの発現レベルに回復した。このことから、重力応答 AGP は重力の強さに応じて発現が変化する、またその発現が可逆的であることがわかった。

考察

本研究では AGP には過重力に反応して発現が変化する分子種が存在することが示唆され

た。植物の細胞成長は重力の大きさにより制御されており、微小重力環境では縦方向の成長が促進されるのに対して、過重力環境では横方向の生長が促進される (Hoson and Soga 2003)。これまでの研究から、重力による細胞形態の変化には細胞壁の代謝変化が関わることが示されている (Hoson and Soga 2003)。GPI アンカーにより原形質膜表面にアンカリングされる AGP は糖鎖部分が細胞壁多糖類と相互作用していると予想され、発現や局在が変化することで細胞成長や細胞形態を制御している可能性がある。実際、植物ホルモンであるジベレリンによる成長にはクラシカル AGP の一種が関わることが報告されている (Park et al. 2003)。また、AGP 糖鎖に特異的に結合するヤリブ試薬が成長や分化を抑制することがよく知られている。

コアプロテイン配列が相同な AGP 分子種間でも重力による発現変化や組織発現、局在が異なっていた。このことは、分子種の多い AGP は個々の機能分化が進んでおり、相同な AGP 分子種で異なる生理機能を持つことを示している。AGP の機能を考える上で、糖鎖の修飾、分解も重要である。AGP は糖鎖が重量の 90% 以上を占める上に、クラシカル AGP や AG ペプチドのほとんどは、GPI アンカーモチーフと糖鎖付加モチーフ以外に明瞭な機能ドメインを持たない。AGP は糖鎖構造を多様化することで、機能分化している可能性がある。植物には複雑な構造の AG 糖鎖に作用する糖質分解酵素群があり (Kotake et al. 2005, Kotake et al. 2006)、AGP の機能は、糖鎖の合成・分解酵素によって制御されている可能性が高い。

AGP と植物の生理現象との関係については多くの報告はあるが、AGP の分子機能は未だに不明である。今後は特に分子機能に注目して、植物の重力応答反応における AGP の役割を明らかにしていきたい。

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) 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).

- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) Hoson, T. and Soga, K.; New aspects of gravity responses in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* **229**, 209 (2003).
- 6) Park M.H., Suzuki Y., Chono M., Knox J.P., Yamaguchi I.; CsAGP1, a gibberellin-responsive gene from cucumber hypocotyls, encodes a classical arabinogalactan protein and is involved in stem elongation. *Plant Physiol.* **131**, 1450 (2003).
- 7) Kotake T., Dina S., Konishi T., Kaneko S., Igarashi K., Samejima M, Watanabe Y., Kimura K., Tsumuraya Y.; Molecular cloning of a β -galactosidase from radish that specifically hydrolyzes β -(1 \rightarrow 3)- and β -(1 \rightarrow 6)-galactosyl residues of arabinogalactan-protein. *Plant Physiol.* **138**, 1563 (2005).
- 8) Kotake T., Tsuchiya K., Aohara T., Konishi T., Kaneko S., Igarashi K., Samejima M., Tsumuraya Y.; An α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase from immature seeds of radish (*Raphanus sativus* L.). *J. Exp. Bot.* **57**, 2353 (2006).