

## E3 ユビキチンリガーゼが関与する植物の細胞間隙形成

石崎 公庸<sup>1</sup>, 河内 孝之<sup>2</sup>

### 1. はじめに

動物は、細胞と細胞の間を満たす体液の循環により、細胞が必要とする酸素 (O<sub>2</sub>) や老廃物である二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) を交換する。一方、体液の循環系を持たない植物では、細胞と細胞の間が気体で満たされた細胞間隙を持つ組織 (通気組織) が多くみられる。呼吸や光合成の基質である O<sub>2</sub> や CO<sub>2</sub> の拡散速度は、気体状態の方が水中よりも 1 万倍程度早く、根や葉の組織内部に張り巡らされた細胞間隙は、植物体内の効率的なガス交換に重要な働きを持つ組織構造と考えられる<sup>1)</sup>。

たとえば、光合成を行う葉の横断切片を観察すると、葉の裏側には葉肉細胞が疎らに存在する海綿状組織がみられる。海綿状組織に構成された細胞間隙は、気孔を介して外部大気と連絡しており、気孔が開けば、葉の葉肉細胞が細胞間隙を介して速やかにガス交換ができる。また細胞間隙は、冠水したイネやトウモロコシの根、またスイレン科の植物の茎や根にもよく発達していることが知られており、低酸素ストレス状態にさらされた組織でのガス交換に重要な構造と考えられている<sup>2)</sup>。

細胞間隙はその形成メカニズムにより、大きく分けて二つのタイプに分けられる。一つは隣接する細胞の接着が離れて形成される離生細胞間隙であり、もう一つは空隙になる部分の細胞が細胞死により除去されることで形成される破生細胞間隙である<sup>2)</sup>。たとえば、前述の海綿状組織にみられる細胞間隙は基本的に離生細胞間隙であり、イネ科作物の茎や根に発達している細胞間隙の多くは破生細胞間隙である。破生細胞間隙の制御では、活性酸素や植物ホルモ

ンであるエチレンが関与しており<sup>3)</sup>、それらのシグナルの下流で細胞死を制御する制御因子もいくつか見つかっている<sup>4)</sup>。一方、離生細胞間隙の形成過程については、隣接する細胞間で共有されている一次細胞壁の再構成が起こると考えられているが、その発生制御の分子メカニズムについては、現在までほとんど知見がない。

近年、筆者らは陸上植物進化の基部に位置する半数体の実験モデルとしてコケ植物ゼニゴケに着目し、アグロバクテリウムを介した高頻度形質転換系<sup>5)</sup>や相同組換えに基づく遺伝子ターゲティング技術<sup>6)</sup>など分子遺伝学研究的基盤技術を構築してきた。そして最近、ゼニゴケを材料に離生細胞間隙形成の制御因子の一つを同定することに成功した<sup>7)</sup>。興味深いことに同定された制御因子は、特異的・選択的なタンパク質分解に関わる E3 ユビキチンリガーゼであった。このことは、離生細胞間隙形成に、ユビキチン-プロテアソーム系を介した分子レベルの制御メカニズムが存在することを示唆している。本稿では、基部陸上植物ゼニゴケを用いた解析により得られた知見を元に、植物における離生細胞間隙形成の制御について考察する。

### 2. ゼニゴケの気室形成と気室形成変異体 *nopperabo 1*

ゼニゴケおよびその近縁種では、外部大気と通じる小さな穴 (気室孔) を備えた細胞間隙 (気室) を持つ同化組織が形成される (図 1)。気室の内部には、葉緑体に富んだフィラメント細胞 (同化糸とも呼ばれる) が存在しており、気孔と海綿状組織を持つ被子植物の葉の構造と類似した特徴を持つ。ただし、気室孔は四つほどの細胞が多層に積み重なったバレル構造をとっており、1 対の孔辺細胞からなる気孔とは構造と進化的な起源が異なる<sup>8)</sup>。

ゼニゴケ目 (Marchantiales) にみられる気室および気室孔の形成については、19 世紀から詳細な組織学研究的蓄積がある<sup>9)</sup>。Apostolakos らは、ゼニゴケの近縁種であるフタバネゼニゴケの気室および気室孔の発生プロセスについて詳細な組織学的解析を行い、気室孔および気室形成は、3~5 個の表皮細胞間の離生細胞間隙の形成から始まると結論づけた<sup>9)</sup>。さらに、気室形成の第一段階とされる離生細胞間隙形成の過程では、隣接する細胞壁近辺で微小管のダイナミックな再構成が観察されることを報告してい

<sup>1</sup> 神戸大学大学院理学研究科 (〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1)

<sup>2</sup> 京都大学大学院生命科学研究所 (〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町)

#### Role of E3 ubiquitin ligase in formation of intercellular spaces in plants

Kimitsune Ishizaki<sup>1</sup> and Takayuki Kohchi<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Science, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan, <sup>2</sup>Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8502, Japan)

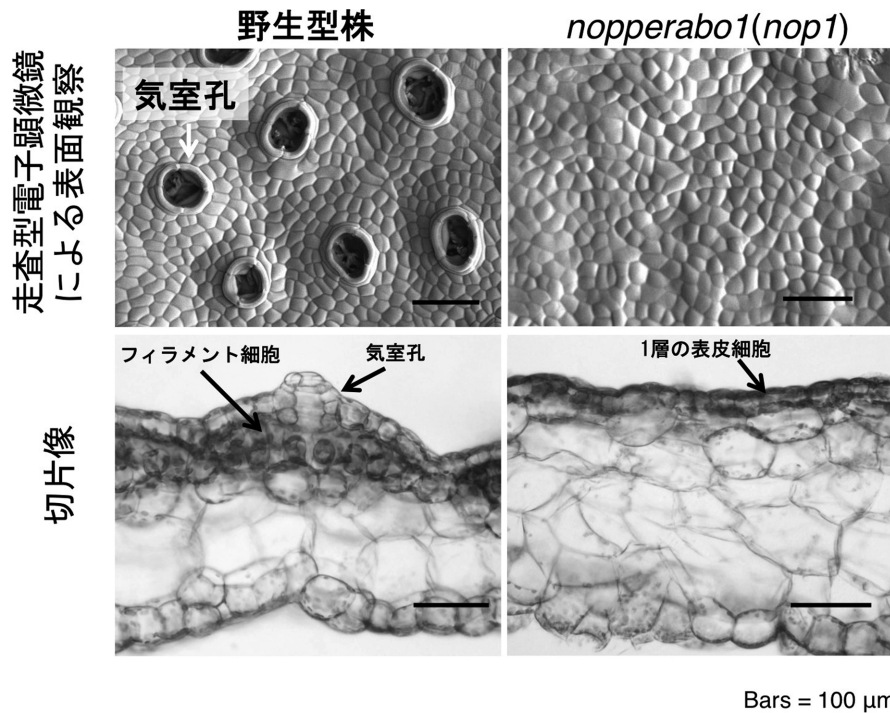


図1 ゼニゴケの気室と *nopperabo1* (*nop1*) 変異体の表現型

ゼニゴケ野生株の葉状体の表面にはガス交換のための気室孔が観察される (左)。葉状体の横断切片を観察すると、気室孔を介して外部大気と連絡する細胞間隙を内部を持った気室の構造がよくわかる。*nop1* 変異体の葉状体では気室の形成がみられず、1層の表皮細胞が観察される (右)。

る<sup>10)</sup>。しかし、気室形成にどのような分子が関わるかについては、まったく報告はなかった。

我々は、ゼニゴケにおいて近年開発された高頻度形質転換系を用い<sup>5)</sup>、外来 DNA (T-DNA) がゲノム中にランダムに挿入された変異系統を作製した。この挿入変異系統約 10,000 系統のスクリーニングから、気室形成が異常となる変異体 *nopperabo1* (*nop1*) を見いだした (図 1)。詳細な組織学的解析から、*nop1* では、気室の第一段階である離生細胞間隙形成がみられないことがわかった。

*nop1* の原因遺伝子を単離するため、野生型株との交配による連鎖解析を行ったところ、挿入された 1 コピーの T-DNA が表現型と連鎖していることが明らかとなった。そこで *nop1* に挿入された T-DNA 近傍のゲノム DNA 断片を単離し解析したところ、ある遺伝子のタンパク質コード領域に T-DNA が挿入され遺伝子構造を破壊していることが判明した。そして T-DNA 挿入領域にコードされる野生型遺伝子のゲノム断片を *nop1* 変異体に導入することで、気室の形成が回復したことから、この遺伝子を *nop1* の原因遺伝子 *NOPPERABO1* (*NOPI*) として同定することに成功した。*NOPI* は、N 末端側に U-box ドメイン、C 末端側に 11 個の Armadillo (ARM) リピートモチーフを持つタンパク質をコードしていた (図 2A)。

### 3. *NOPI* は、細胞膜に局在する PUB-ARM 型 E3 ユビキチンリガーゼをコードする

タンパク質の適切な発現や修飾および分解は、真核細胞のさまざまな機能維持に重要である。その中で、ユビキチン-プロテアソーム系は、ユビキチンで標的されたタンパク質を、プロテアソームというタンパク質分解を機能とするオルガネラで選択的に分解し排除する仕組みであり、シグナル伝達や代謝経路の調節の上で重要な役割を持つ。ユビキチン化の反応は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) という三つの酵素を介するが、特に E3 ユビキチンリガーゼは標的タンパク質を直接認識しユビキチン化を起こさせる酵素であり、ユビキチン-プロテアソーム系の特異性を決める重要な要素である。植物には、ほかの真核生物と比べ多種多様な E3 ユビキチンリガーゼが存在し、さまざまな生理応答や細胞機能で重要な働きを持つ。

近年の研究から、RING ドメインと構造的な類似性を示す U-box ドメインを持つタンパク質はプロテアソームを介したタンパク質分解における E3 ユビキチンリガーゼとして機能することが明らかにされている。植物の U-box

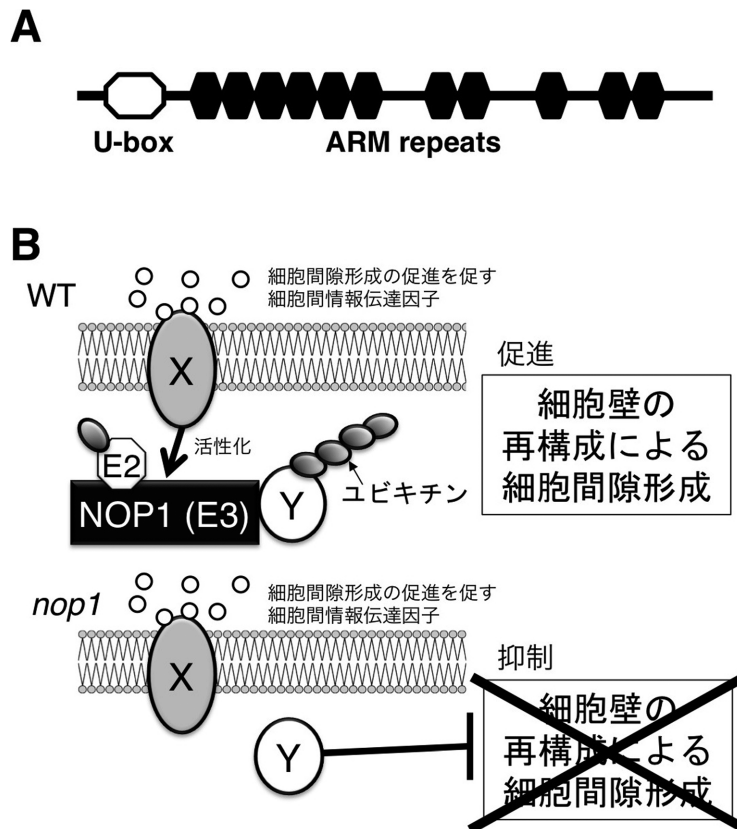


図2 NOP1のドメイン構造と機能モデル

(A) NOP1のドメイン構造. N末端側にU-boxドメインを一つ, C末端側にArmadillo (ARM)リピートモチーフを11個もつ. (B) NOP1による細胞間隙形成の制御モデル. まず離生細胞間隙の形成を促進する信号伝達複合体Xと, 抑制する制御因子Yを仮定する. 野生株の葉状体では, 頂端付近で細胞間隙形成を促進する細胞間シグナル分子がXに受容されるとE3ユビキチンリガーゼであるNOP1が活性化され, 細胞間隙形成の抑制因子Yがユビキチン化されプロテアソームにより分解される. そしてYの量が少なくなることにより細胞間隙形成が促進される. *nop1*では, 細胞間隙形成を促進する細胞間シグナル分子がXに受容されてもYのユビキチン化が起こらず, 細胞間隙形成が常に抑制される.

型ユビキチンリガーゼについては, 本誌に優れた総説があるので参考にされたい<sup>11)</sup>. 一方, ARMリピートモチーフは, 右回り超らせん構造を形成し, タンパク質-タンパク質相互作用に関与することが知られている. 転写調節 ( $\beta$ カテニン) から細胞接着 (プラコフィリン), 核-細胞質輸送 (インポーチン  $\alpha$ ) まで多様な機能に関与するタンパク質機能ドメインである<sup>12)</sup>. PUBタンパク質のうち, C末端にARMリピートを持つグループはPUB-ARMタンパク質と呼ばれ, 植物にユニークなドメイン構成である<sup>11)</sup>. 今回の研究で我々がゼニゴケから見いだしたNOP1は, シロイヌナズナでクラスIIに分類されるPUB-ARMタンパク質, SAUL/AtPUB44およびAtPUB43と高い相同性を示し, ドメイン構造も一致していた.

そこで我々は, 大腸菌を用いてNOP1組換えタンパク質

を発現・精製し, 自己ユビキチン化を指標に *in vitro* での酵素活性を検証した. その結果, NOP1がU-box依存的にE3ユビキチンリガーゼとして機能しうることを確認できた. さらにC末端に蛍光タンパク質を融合したNOP1タンパク質は, *nop1*の表現型を相補し, かつ細胞膜に局在することが明らかとなり, NOP1が主に細胞膜で機能することが示唆された. これらの結果は, NOP1が細胞膜に局在するPUB-ARM型E3ユビキチンリガーゼとして機能し, ユビキチン-プロテアソーム系を介してゼニゴケの離生細胞間隙形成を正に制御することを示唆している.

#### 4. NOP1による細胞間隙形成制御のメカニズム

ゼニゴケの気室は葉状体に規則的に観察される. 気室形



成の最初の段階は、頂端付近の領域で表皮細胞間の局所的な細胞壁再構成により間隙が生じるが、*nop1*では頂端付近での間隙形成の兆しがまったく観察されない。このような規則正しい発生プロセスには、その位置情報を決定する細胞間シグナルによる制御が考えられる。近年、シロイヌナズナにおいて、12アミノ酸のペプチドホルモンである INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA) がロイシンリッチ型受容体キナーゼ HAESA および HAESA-LIKE2 を介して、局所的な細胞間の細胞壁再構成を誘導し、花卉などの組織の離脱や側根の発生を制御することが示された<sup>13)</sup>。また PUB-ARM タンパク質については機能が未知なものが多いのが現状であるが、いくつかの PUB-ARM タンパク質については細胞レベルで自他を識別するメカニズムに関わる受容体様キナーゼと相互作用してその信号伝達を調節することで、さまざまな生理現象を制御する機能を持つことがわかってきた<sup>14)</sup>。

シロイヌナズナの PUB-ARM タンパク質の中で、最も NOPI に近い PUB44/SAUL は、C 末端の ARM リピートモチーフを介して細胞膜に局在するタンパク質と相互作用することが示唆されている<sup>15)</sup>。PUB44/SAUL と細胞間隙形成の関連性はいまだ不明であるが、細胞膜に局在する信号伝達複合体の機能調節に関係している可能性が考えられている。以上のことから、我々は、NOPI についても C 末端の ARM リピートモチーフにより、細胞膜に局在する受容体型キナーゼなどにより構成された信号伝達複合体と相互作用している可能性があると考えている。そして細胞外からのシグナル因子に応答してユビキチンプロテアソームを介した標的タンパク質の特異的分解を制御することで、細胞間隙形成を制御する機能モデルを考えている (図 2B)。

## 5. おわりに

今回の研究により、植物の離生細胞間隙形成には、ユビキチン-プロテアソーム系を介した細胞間信号伝達の仕組

みに関わる可能性がみえてきた。しかしながら、今回見いだした E3 ユビキチンリガーゼが関わる信号伝達系の実体は明らかになっておらず、植物の中では分子レベルの解析が進んでいる被子植物においても、細胞間隙形成を制御する信号伝達経路については、未解明な部分が多い。ゼニゴケにおける気室の発生プロセスは、陸上植物に共通する細胞間隙形成の制御メカニズムとその進化を理解する上で、重要なモデル系となる可能性がある。今後、プロテオーム解析の手法による NOPI のユビキチン化標的タンパク質の同定や、*nop1* 様気室形成異常変異体のスクリーニングと解析を進めることで、細胞間隙形成の新たな制御因子を見いだすことができると期待している。

- 1) Voeseek, L.A., Colmer, T.D., Pierik, R., Millenaar, F.F., & Peeters, A.J. (2006) *New Phytol.*, 170, 213-226.
- 2) Evans, D.E. (2004) *New Phytol.*, 161, 35-49.
- 3) Drew, M.C., He, C.J., & Morgan, P.W. (2000) *Trends Plant Sci.*, 5, 123-127.
- 4) Muhlenbock, P., Plaszczycza, M., Plaszczycza, M., Mellerowicz, E., & Karpinski, S.L. (2007) *Plant Cell*, 19, 3819-3830.
- 5) Ishizaki, K., Chiyoda, S., Yamato, K.T., & Kohchi, T. (2008) *Plant Cell Physiol.*, 49, 1084-1091.
- 6) Ishizaki, K., Johzuka-Hisatomi, Y., Ishida, S., Iida, S., & Kohchi, T. (2013) *Sci. Rep.*, 3, 1532.
- 7) Ishizaki, K., Mizutani, M., Shimamura, M., Masuda, A., Nishihama R., & Kohchi, T. (2013) *Plant Cell*, 25, 4075-4084.
- 8) 嶋村正樹 (2012) 植物科学最前線, 3, 84-113.
- 9) Apostolakis, P., Galatis, B., & Mitros, K. (1982) *Ann. Bot.*, 49, 377-396.
- 10) Apostolakis, P. & Galatis, B. (1985) *Can. J. Bot.*, 63, 744-756.
- 11) 八丈野孝, 白須 賢 (2012) 生化学, 84, 425-431.
- 12) Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K.A., & Coates, J.C. (2010) *Trends Cell Biol.*, 20, 470-481.
- 13) Aalen, R.B., Wildhagen, M., Sto, I.M., & Butenko, M.A. (2013) *J. Exp. Bot.*, 64, 5253-5261.
- 14) Samuel, M.A., Salt, J.N., Shiu, S.H., & Goring, D.R. (2006) *Int. Rev. Cytol.*, 253, 1-26.
- 15) Drechsel, G., Bergler, J., Wippel, K., Sauer, N., Vogelmann, K., & Hoth, S. (2011) *J. Exp. Bot.*, 62, 775-785.

## 著者寸描

## ●石崎公庸 (いしざき きみつね)



神戸大学大学院理学研究科准教授。博士(農学)。

■略歴 1974年石川県に生る。96年京都大学農学部農芸化学科卒業。98年同大学院農学研究科修士課程修了。98~99年(株)大塚製薬工場研究員。2003年京都大学大学院農学研究科博士課程修了。02~04年

日本学術振興会特別研究員。04~06年英国オックスフォード大学ポスドク。06年京都大学大学院生命科学研究科特任助教。08年同助教。13年より現職。

■研究テーマと抱負 植物は、動物とは異なり、移動せず周囲の環境に対応しながら柔軟にたくましく生きている。このような「植物という生き方」の基本的な仕組みを解明するため、ゼニゴケをモデルとした研究に取り組んでいる。

■ウェブサイト <http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-ishizaki/>

■趣味 読書、博物館や植物園めぐり。

## ●河内孝之 (こうち たかゆき)

京都大学生命科学研究科教授。農学博士。

■略歴 1984年京都大学農学部卒業。89年同大学院農学研究科修了。ハーバード医大・マサチューセッツ総合病院博士研究員。京都大学農学部助手。奈良先端科学技術大学院大学助手。助教授を経て、2004年より現職。

■研究テーマと抱負 植物が進化の過程でどのように環境応答と発生制御の仕組みを発達させたかを解き明かしたい。制御因子の遺伝的冗長性の低さや半数体世代が優占的といった特徴をもつ苔類ゼニゴケの急速に分子遺伝学的な研究基盤が整いつつある状況に大いに期待している。

■ウェブサイト <http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/plantmb/>