

# 植物の発生・生長に関わる細胞壁結合タンパク質の クローニングと機能解析

竹田 浩之

広島大学大学院生物圏科学研究科

## Cloning and Functional Analysis of Cell Wall-Bound Proteins Related to Plant Growth and Development.

Hiroyuki TAKEDA

*Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan*

### 要 旨

#### 第 1 章 序 論

植物細胞を取り巻く細胞壁は細胞の形態を規定し物理的に支えているだけではなく物質の代謝・循環、シグナル伝達、生体防御など多くの働きを担っている。植物細胞は細胞壁を含む細胞外の空間、アポプラストに多くのタンパク質を分泌している。細胞壁に分泌されるタンパクは千種にもものぼるといわれているが発生・生長時にそれらがどのように働くかということについて多くは解明されていない。本論文ではアスパラガス不定胚形成時に発現するペルオキシダーゼとユリ花粉管伸長に関わるグルカナーゼのクローニングと機能解析について述べる。

#### 第 2 章 アスパラガス不定胚形成時に発現される細胞壁結合型塩基性ペルオキシダーゼの機能

アスパラガス培養細胞は培地中の植物ホルモン濃度を变化させることで容易に不定胚を誘導させることができる。未分化のカルスと分化した不定胚から細胞壁タンパク質を抽出し、両者の組成を比較した。不定胚形成時に発現している38kDaタンパク質のN末アミノ酸配列解析を行い、その情報をもとに全長cDNAをRT-PCRによりクローニングした。相同性検索の結果、このタンパク質は植物のペルオキシダーゼと高い相同性が認められたため、AoPOX1と名付けた。ノザン解析によると不定胚誘導直後から高い発現がみられた。AoPOX1の機能解析を行うため不定胚細胞壁からネイティブタンパクを抽出・精製し、またAoPOX1のリコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させた。リコンビナントAoPOX1はコニフェニルアルコール（CA）に対し高い基質特異性を示した。CAとAoPOX1の反応産物の構造解析をGC-MSと<sup>1</sup>H-NMRで行った。反応産物はCAの二量体（デヒドロジコニフェニルアルコール、DDCA）であった。不定胚のリグニン量は未分化の細胞に比べて増加しておらず、不定胚

培養系の培地にはDDCAが $10^{-8}$ Mレベルで存在していた。以上のことから不定胚形成過程に分泌されたAoPOX1はリグニン高分子を重合せずCAからDDCAを合成しているという結論を得た。

### 第3章 ユリの $\beta$ -グルカナーゼ遺伝子のクローニングと発現パターン

花粉管伸長は植物における先端成長のモデルとしてよく知られており、また植物生活環において受粉から受精までに至る重要なプロセスを担っている。Kotakeらはテッポウユリの花粉管細胞壁から2つのExo- $\beta$ -グルカナーゼ (LP-ExoI、LP-ExoII) を抽出・精製した。花粉管伸長に伴って細胞壁のグルカナーゼ活性が増加していたことから、細胞壁に分泌されるグルカナーゼが花粉管伸長に寄与している可能性が示されていた。

Kotakeら (2000) が明らかにしたN末アミノ酸配列をもとにLP-ExoIとLP-ExoIIの全長cDNAをRT-PCRでクローニングした。これらのcDNA配列はお互い非常に酷似しており、80%以上の相同性があった。LP-ExoIとLP-ExoIIで親和性が低い3'非翻訳領域にプライマーを設計し、半定量的RT-PCRを行った。LP-ExoIIはユリのどの組織でも恒常的に発現していたが、LP-ExoIは花粉特異的に発現していた。

Exo- $\beta$ -グルカナーゼ以外にも植物の生長に関わるグルカナーゼは多く報告されている。その一つ、Endo-1,4- $\beta$ -グルカナーゼ (セルラーゼ) でよく保存されている領域をもとに設計されたプライマーと花粉管RNAを用い、RT-PCRでユリセルラーゼの全長cDNAをクローニングした (LlpCell1)。配列親和性検索の結果、いくつかあるセルラーゼのサブファミリーのうちLlpCell1は分泌型のセルラーゼに属していた。ノザンによる発現解析では、LlpCell1のmRNAは花粉および花粉管で特異的に蓄積しており、花粉以外の組織ではmRNAは検出されなかった。

花粉で発現する遺伝子はその発現時期によってEarly/Late geneの2グループに分けられる。花粉の成熟に伴って発現し始め、成熟花粉中にmRNAが蓄積されるLate geneは花粉の発芽、花粉管伸長に関わるとされている。LP-ExoI、LlpCell1のmRNAは成熟花粉中に大量に蓄積されているLate geneであり、花粉発芽後もずっと発現し続けた。このことから、LP-ExoI、LlpCell1は花粉管の伸長に関わるグルカナーゼであると考えられた。

### 第4章 総合考察

アスパラガス不定胚形成過程で発現、分泌されていたAoPOX1はCAからDDCAを合成していた (2章)。DDCAのような物質はネオリグナンと呼ばれ、生理活性を持つものもある。例えばDDCAのグルコース配糖体、デヒドロジコニフェニルグルコシド (DCG) は細胞分裂を促進する活性が報告されている。動物のがん細胞などは自己が持つ受容体に結合する細胞増殖シグナル分子を分泌することがある。同じ組織内にある自身と同じタイプの細胞を効率的に、しかも同調的に増殖させるこのようなシステムはオートクラインと呼ばれる。アスパラガスの胚的細胞がアポプラストで行うネオリグナン合成はオートクライン的な細胞増殖機構であると思われる。これにより、アスパラガスは同調的な胚組織形成を行っているという仮説を提唱した。

LP-ExoI、LlpCell1といったグルカナーゼが花粉、花粉管特異的に発現していた (3章)。ユリ花粉管の細胞壁はセルロース、カロースの他に1,3;1,4- $\beta$ -グルカンも含む。カロースや1,3;1,4- $\beta$ -グルカンはExo-グルカナーゼの、非結晶質のセルロースはセルラーゼの基質になりうる。LP-ExoIは花粉管先端から分泌されたあと細胞壁とイオニックに結合してとどまっており、グルカンを分解することで先端の

柔軟性を維持していると思われる。*LlpCell1*の局在については不明だが、花粉管細胞壁にとどまるなら、*LP-ExoI*と同様に壁の柔軟性に寄与している可能性がある。花粉管壁に留まらないのであれば、雌蕊の細胞壁を柔らかくして花粉管の進行を助けているかもしれない。

### 付録 AoPOX1のプロモーター配列

不定胚形成過程で発現する*AoPOX1*のより詳しい発現解析を行うためにプロモーター領域を含むアスバラガスゲノムの5'側領域 約1.5kbをクローニングした。プロモーターモチーフの予測解析によると、フェニルプロパノイド合成や、酸化ストレス、エチレン応答、そして胚形成に関わるcisエレメントが検出された。このプロモーター配列とレポーター遺伝子を用いた解析などによって*AoPOX1*の時間的・空間的な詳しい発現の変化をとらえることができれば、AoPOX1の役割をより明確にする手がかりになると期待できる。