

重力シグナルがイネの β -1,3:1,4-グルカン合成活性に与える影響

埼玉大 小竹 敬久、金原 知也、円谷 陽一

大阪市大 曾我 康一、若林 和幸、保尊 隆享

Effects of gravity signal on β -1,3:1,4-glucan synthase activity in rice seedlings

Toshihisa Kotake¹, Tomoya Kimpara¹, Kouichi Soga², Kazuyuki Wakabayashi², Takayuki Hoson², and Yoichi Tsumuraya¹

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

²Department 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: β -1,3:1,4-Glucan is a major cell wall component and responsible for the regulation of elongation growth in rice. We examined the effects of water immersion as a microgravity simulator on β -1,3:1,4-glucan synthase activity in rice seedlings. Water immersion significantly reduced both amount and molecular weight of β -1,3:1,4-glucan in the cell walls, stimulating elongation growth of the coleoptiles. The β -1,3:1,4-glucan synthase activity in the microsomal fraction of coleoptiles underwater was decreased to less than 50% of that of the control. These results indicate that the growth stimulation underwater is mediated by decrease in activity of β -1,3:1,4-glucan synthase as well as increase in activity of β -1,3:1,4-glucan degrading enzymes in the cell walls.

Key words; rice (*Oryza sativa* L.), cell wall, β -1,3:1,4-glucan, β -1,3:1,4-glucan synthase activity, elongation growth, water immersion

はじめに

太古の昔に水中生活を送っていた植物は、数億年前に陸上に進出して以来、地上の1gの重力に抗するべく抗重力反応機構を進化させてきた。重力の大きさに応じて植物の成長や形態は変化することが知られている。例えば、遠心過重力環境下では細胞の縦方向の成長(伸長成長)が阻害される一方で、横方向の成長(肥大生長)は促進され、結果的に植物の茎は太く短くなる(Kotake & Soga 2003)。植物の成長や細胞の形は細胞壁の物理的な性質により支配されており、双子葉植物では細胞壁中のキシログルカンが、またイネ科植物では β -1,3:1,4-グルカンが成長制御に重要である。

β -1,3:1,4-グルカンは、グルコースが β -1,3-結合と β -1,4-結合で結合した分岐のない直鎖状の多糖類であり、分子量は数百

万に及ぶ(Sakurai 1991)。イネ科植物には β -1,3:1,4-グルカンを分解する酵素群が知られ、植物ホルモンや各種環境シグナルにより分解酵素活性が変化することや、分解酵素活性と成長との間には密接な関係があることが示されている(Kotake et al. 2000)。我々はこれまでに、水浸微小重力(微小重量)によるイネ幼葉鞘の伸長促進には、分解酵素群により触媒される β -1,3:1,4-グルカンの減少や低分子化が関与していることを報告している(Chen et al. 1999, Hoson et al. 2002)。しかしながら、水浸環境下での β -1,3:1,4-グルカンの減少や低分子化には、分解酵素群の他に β -1,3:1,4-グルカンの合成酵素も関与している可能性が高い。そこで本研究では、水浸環境下における、 β -1,3:1,4-グルカン合成酵素活性の変化を明らかにした。

方法

植物材料

イネ（コシヒカリ）の芽生えは滅菌条件のもと、暗所、26-28℃で2.5日間育成した後、同じ温度の滅菌水中で12時間水浸処理した。水浸処理したイネは、シュートの長さを測定した後、直ちに液体窒素で凍結し、後に述べる α -1,3:1,4-グルカンの分析及び α -1,3:1,4-グルカン合成活性の測定に使用した。嫌気環境の緩和には、市販の水棲生物用エアープンプを用いた。気泡による物理的な刺激を抑えるために、エアープンプはイネ種子を播種していない部位に設置した。

α -1,3:1,4-グルカンの量および分子量

凍結したイネの芽生えを乳鉢で磨砕後、 α -アミラーゼ処理、熱水抽出、キレート抽出を行い、デンプンやペクチン性の多糖類を除去した。 α -1,3:1,4-グルカンが含まれるヘミセルロースは、0.04% NaBH₄を含む17.5% NaOHにより、100℃で抽出した。ヘミセルロースは酢酸で中和後、透析した。ヘミセルロースに市販のリケナーゼ（ α -1,3:1,4-グルカン特異的に作用する酵素、メガザイム社）を作用させ、 α -1,3:1,4-グルカンに由来する特異的なオリゴ糖（3-O-セロピオシルグルコース、3-O-セロトリオシルグルコース）を遊離した。特異的なオリゴ糖は、HPAEC-PADで分離・定量した。標準には市販の α -1,3:1,4-グルカン（メガザイム社）のリケナーゼ分解物を用いた。

芽生えから抽出したヘミセルロースの分子量は、ゲルろ過カラムを装着したHPLC（島津社）で測定した。標準には市販のプルランマーカ（Shodex）を用いた。

α -1,3:1,4-グルカン合成活性の測定

イネの芽生えのミクロソーム画分は超遠心分離により調製した。イネの芽生えを乳鉢で磨砕後、1,200 x gで15分間遠心分離して細胞壁を除去した。得られた上清を100,000 x gで1時間超遠心分離にかけ、沈殿としてミクロソーム画分を得た。ミクロ

ソームは50 mM Tris-HCl (pH 8.5)、1 mM EGTAに懸濁するとともに、Bradford法（1976）によりタンパク質量を定量した。

α -1,3:1,4-グルカン合成活性は、Tsuchiyara (2004)の方法に従って測定した。

α -1,3:1,4-グルカン合成反応は、ミクロソーム画分を酵素源、2 mM UDP-[¹⁴C]Glcを基質として、200 mM ショ糖、20 mM MgCl₂の存在下、50 mM Tris-HCl (pH 9.0)中で行った。合成産物はリケナーゼにより特異的なオリゴ糖に分解した後、ペーパークロマトグラフィにより分離した。 α -1,3:1,4-グルカンに由来する特異的なオリゴ糖のスポットの放射活性を測定することで、 α -1,3:1,4-グルカン合成活性を定量した。

結果

水浸処理によるイネの幼葉鞘の成長促進

イネの幼葉鞘は寒天上に播種後4日間成長し、第一葉の展開とともにその成長は停止した。本研究では、暗所で播種後2.5日間を育成した後、0.5日間（12時間）水浸処理した。気中と水浸のいずれの環境でも2.5-3.0日にかけて幼葉鞘は顕著に成長したが、水浸処理したイネの幼葉鞘は成長量にして気中対照の約2倍成長した。水浸したイネの幼葉鞘は全体的に細く、水浸によって縦方向への伸長成長が促進されることが示唆された。イネの芽生えには、幼葉鞘と第一葉が含まれていたが、これらを分離する作業によって生じる二次的な影響（地上重力への馴化等）を避けるため、本実験では幼葉鞘と第一葉を分離せずに用いた。

水浸処理による α -1,3:1,4-グルカンの量的減少と分子量低下

細胞壁中の α -1,3:1,4-グルカン量は水浸処理により約30%減少した。また、ヘミセルロースの分子量は顕著に低下した。

α -1,3:1,4-グルカン量の減少や分子量の低下は、細胞壁の粘性を下げ、伸展性を上昇させる。これらの結果は、我々が過去に報告した水浸による α -1,3:1,4-グルカン代謝の変化と一致しており（Chen et al., 1999）、本実験でも良好な水浸微小重力環境が作出されたことが示された。

水浸処理の -1,3:1,4- グルカン合成活性への影響

イネの芽生えの -1,3:1,4-グルカン合成活性は、発芽後 2.0 日から 3.5 日まで上昇する傾向があった。水浸処理しない対照では 2.5 日から 3.0 日にかけて、-1,3:1,4-グルカン合成活性が約 40% 上昇したが、水浸処理した芽生えでは、逆に活性が処理前 (2.5 日) の半分以下となった。この傾向は、タンパク質当たりの活性で比較しても、植物体の生重量当たりで比較しても同様で、水浸によって顕著な -1,3:1,4-グルカン合成活性の低下が起きたと考えられる。

エアレーションによる嫌気環境の緩和

市販のエアポンプにより水浸中のイネ芽生えの嫌気環境を緩和したところ、水浸による芽生えの成長促進は、エアポンプのない場合と比べて半分程度となった。また、-1,3:1,4-グルカン合成活性の低下も緩和された。

考察

長い年月をかけて抗重力機構を獲得した高等植物は、宇宙空間などの微小重力環境に曝されたとき、地上とは異なる反応を示すと予想される。水浸によって得られる擬似的な微小重力環境は、宇宙空間などの微小重力環境とは厳密には異なるが、イネ芽生えは、水浸環境下において顕著な成長促進や -1,3:1,4-グルカンの量的な減少・低分子化を示しており、植物は水浸環境下で、少なくとも部分的には、通常とは異なる重力環境に曝されていると考えられる。

-1,3:1,4-グルカンの減少や低分子化は、細胞壁の緩みを引き起こし、伸長成長を誘導する (Sakurai 1991)。-1,3:1,4-グルカンの低分子化への分解活性の関与については研究例が多いが、合成活性に焦点を当てた研究は少ない。合成酵素により供給される高分子の -1,3:1,4-グルカンは、-1,3:1,4-グルカン全体の分子量を高分子側にシフトさせると考えられ、-1,3:1,4-グルカンの分子量の調節には、合

成活性も重要な因子である。水浸環境では、-1,3:1,4-グルカン合成活性が大幅に低下した。我々は既に、水浸イネでは -1,3:1,4-グルカン分解活性が上昇することを示しており (Chen et al. 1999)、水浸環境では、合成活性の変化、分解活性の変化がともに、-1,3:1,4-グルカンの減少と低分子化に作用していることが示唆された。-1,3:1,4-グルカンの量的な変動と分子量変化は、合成活性と分解活性のバランスにより制御されていると予想される。

イネのゲノムには -1,3:1,4-グルカン分解酵素をコードすると予想される遺伝子群 (-1,3:1,4-グルカナーゼ、-1,4-グルカナーゼ、エキソ-β-グルカナーゼ等) が存在する。最近、シロイヌナズナとイネとの間の比較ゲノム的な研究から、-1,3:1,4-グルカン合成酵素遺伝子、CsIF が推定されている (Burton et al., 2006)。CsIF 遺伝子が -1,3:1,4-グルカン合成活性全体にどの程度寄与しているかは明らかになっていないが、CsIF や関連遺伝子は重力シグナルによる発現制御を受けている可能性がある。今後、-1,3:1,4-グルカン分解酵素遺伝子群及び、-1,3:1,4-グルカン合成遺伝子の発現変化を解析することで、重力シグナルの受容、情報伝達、関連遺伝子の発現変化、-1,3:1,4-グルカンの代謝変化、細胞成長、といった一連の分子機構を明らかに出来るかもしれない。

水浸によって生じた成長変化や -1,3:1,4-グルカン合成活性の低下を解釈するにあたっては、水浸環境がイネに与える様々な因子の影響を個別に評価する必要がある。本研究では水浸環境を一種の疑似微小重力環境として扱ったが、少なくとも水浸によって生じる嫌気 (酸素欠乏) は植物体の成長に影響を与える。本研究では、水浸によって生じる嫌気をエアレーションにより緩和することで、嫌気の影響を評価した。エアレーションにより水浸による成長促進、-1,3:1,4-グルカン合成活性の低下とともに軽減され、水浸によって生じたこれらの変化の一部は嫌気によって引き起こされる可能性が示唆された。一方で、エアレーションでは -1,3:1,4-グルカ

ン合成活性が対照と同程度までは回復しないことから、水浸微小重力により、-1,3:1,4-グルカン合成活性が変化したと考えられる。今後、宇宙空間の微小重力環境や遠心過重力環境で同様の実験を行い、重力シグナルによる -1,3:1,4-グルカン合成活性の変化をより厳密に調べる必要がある。

参考文献

- 1) Bradford, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 2) Burton, R.A., Wilson, S.M., Hrmova, M., Harvey, A.J., Shirley, N.J., Medhurst, A., Stone, B.A., Newbigin, E.J., Bacic, A., Fincher, G.B.; Cellulose synthase-like CslF genes mediate the synthesis of cell wall (1,3;1,4)- β -D-glucans. *Science* **311**, 1940 (2006).
- 2) Chen, L., Kamisaka, S., Hoson, T.; Breakdown of (1 3),(1 4)- β -D-glucans during development of rice coleoptiles in air and under water. *J. Plant Physiol.* **155**, 234 (1999).
- 3) Hoson, T. and Soga, K.; New aspects of gravity responses in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* **229**, 209 (2003).
- 4) Hoson, T., Soga, K., Mori, R., Saiki, M., Nakamura, Y., Wakabayashi, K., Kamisaka, S.; Stimulation of elongation growth and cell wall loosening in rice coleoptiles under microgravity conditions in space. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1067 (2002).
- 5) Kotake, T., Nakagawa, N., Takeda, K., Sakurai, N.; Auxin-induced elongation growth and expressions of cell wall-bound exo- and endo- β -glucanase in barley coleoptiles. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1272 (2000).
- 6) Sakurai, N.; Cell wall functions in growth and development-A physical and chemical point of view-. *Bot. Mag. Tokyo* **104**, 235 (1991).
- 7) Tsuchiya, K., Urahara, T., Konishi, T., Kotake, T., Tohno-oka, T., Komae, K., Kawada, N., Tsumuraya, Y.; Biosynthesis of (1 3),(1 4)- β -glucan in developing endosperms of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant.* **125**, 181 (2005).