

## 重力によるアズキ上胚軸のキシログルカン代謝の調節

大阪市大 曾我康一、新井邦典、若林和幸、保尊隆享  
富山大 神阪盛一郎

### Regulation by gravity of xyloglucan metabolism in azuki bean epicotyls

Kouichi Soga<sup>1</sup>, Kuninori Arai<sup>1</sup>, Kazuyuki Wakabayashi<sup>1</sup>, Seiichiro Kamisaka<sup>2</sup> and Takayuki Hoson<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Geosciences, Graduate School of Science, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Toyama University, Gofuku, Toyama 930-8555  
E-Mail: soga@sci.osaka-cu.ac.jp

**Abstract:** To clarify the regulation mechanisms by gravity of the molecular size of xyloglucans, we examined the effects of hypergravity produced by centrifugation on both synthesis and depolymerization processes of xyloglucans in azuki bean epicotyls. Newly synthesized xyloglucans were deposited into the cell wall as large molecules but they were then demolymerized in the cell wall. Hypergravity inhibited the depolymerization of xyloglucans, whereas it did not influence the molecular size of newly deposited xyloglucans. The gene expression of VaXTHS4, which shows xyloglucan endohydrolase activity, was down-regulated by hypergravity. These results indicate that hypergravity affected mainly depolymerization process. The regulation of xyloglucan depolymerization due to changes in *VaXTHS4* expression may be involved in the regulation by gravity of molecular size of xyloglucans.

**Key words;** Azuki Bean (*Vigna angularis*), Cell Wall Rigidity, Gravity Resistance, Hypergravity, Molecular Mass, Xyloglucan

#### はじめに

地上に暮らす生物は重力の力に抵抗し、対抗できる体を構築しなければならない。植物は、数億年前に陸に上がり直接重力に曝されるようになった時から抗重力反応を発達させてきた (Hoson & Soga 2003)。地球上において植物の抗重力反応を解析する唯一の方法は遠心過重力である (曾我 2004, 2005)。著者らは様々な植物芽生えを遠心過重力環境下で生育させ、誘導される変化を解析してきた。その結果、植物は太く短い茎を構築することと、茎細胞壁の力学的強度を増加させることで重力に対抗していることが明らかになった (Hoson & Soga 2003)。また、これら変化は重力の大きさの対数に応じて起こることを示した。

遠心過重力による茎細胞壁の力学的強度の増加のメカニズムを解析したところ、双子葉植物では、様々な細胞壁構成多糖のうち、キシログルカンの分子量のみが重力の大きさに応じて変化した (Soga et al. 1999, 2000)。このことから、キシログルカンが抗重力多糖として細胞壁を強固にし、体を支える役割を担っていると考えられる (保尊ら 2003)。細胞壁多糖の分子量は合成と分解のバランスで調節されている。過重力がキシログルカン分解酵素活性を低下させることは明らかになっているが (Soga et al. 1999, 2000)、合成に影響を与えるかは明かではない。また、キシログルカ

ンの分子量調節に関わるエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (*XTH*) 遺伝子の発現が過重力によって変化するかも未だ明かではない。そこで、本研究では、アズキ上胚軸を用いて、キシログルカンの合成と分解の両過程と *XTH* の発現に対する遠心過重力の影響を解析した。

#### 材料および方法

##### 植物材料および過重力実験

アズキ種子 (*Vigna angularis* Ohwi et Ohashi cv. Erimowase; Watanabe Saishujou Co.) をプラスチック容器に播種した。暗所、25°C で 5 日間生育させた後、上胚軸が 30 から 35 mm のものを選び、伸長領域に 10 mm の印を付けた。放射性同位体を用いた細胞壁代謝の解析には、鈎状部から 20 mm の所で種子および根を切除したカッティングを用いた。カッティングを 10  $\mu$ Ci の [6-<sup>3</sup>H]-フコースを含む 10 mM MES-KOH 緩衝液 (pH 6.0) の入った試験管に移した。遺伝子発現の解析の場合は、印を付けたインタクトの芽生えを 10 mM MES-KOH 緩衝液の入った試験管に移した。カッティングまたはインタクト芽生えの入った試験管を遠心分離機 (H-28-F; Kokusan Co.) にセットし、暗所、25°C で過重力刺激を与えた。過重力刺激の大きさは、遠心分離機の回転速度で調節した。すべての操作は緑色安全光の下で行った。

### キシログルカンの抽出と合成量の測定

上胚軸の印を付けた部分を切り出し、メタノール中で煮沸することにより固定した。メタノール固定した試料を、細胞壁多糖分画化の前に水に戻した。水に戻した試料を磨砕後、水、アセトン、メタノール:クロロフォルム(1:1)溶液で洗浄した。その後、アミラーゼ処理により、デンプンを除去した。50 mM EDTA、4% KOH、4% KOH + 8 M 尿素でペクチンおよびヘミセルロース I 画分を抽出した。その後、24% KOH で主成分がキシログルカンであるヘミセルロース II 画分を抽出した。この画分の一部を 5 ml のシンチレーションカクテル(ACS-II; Amersham)と混合し、シンチレーションカウンター(LS6500; Beckman Coulter)を用いて放射活性を測定し、キシログルカンの合成量とした。

### キシログルカンの分子量の測定

上述のように抽出したキシログルカン画分を、ゲル濾過カラム(TSK-GEL 5000PW; Tosoh Co.)を装着した HPLC(LC-6A, Shimadzu Co.)を用いて分子量に応じて分取した。分取した画分に含まれるキシログルカンの量をヨウ素法で測定し、キシログルカンの分子量を算出した。また、分取した各画分の放射活性を測定することにより新たに合成されたキシログルカンの分子量を測定した。

### XTH 遺伝子の発現解析

上胚軸の印を付けた部分を切り出し、液体窒素で急速に凍結した。Total RNA を RNeasy Plant Mini Kit と RNase-Free DNase Set (Qiagen)を用いて調製した。調製した Total RNA を鋳型とし、random hexamer と High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した。定量的 PCR を SYBR Green RT-PCR Reagents kit と ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて行い、目的遺伝子の発現量を解析した。目的遺伝子の発現量は内部標準である 18S rRNA の発現量で補正した。

### 結果

#### キシログルカンの合成量

キシログルカンを主成分とするヘミセルロース II 画分への $[6-^3\text{H}]$ -フコースの取込量を測定し、キシログルカンの合成量を解析した。1 g 環境では、時間とともに直線的に $[6-^3\text{H}]$ -フコースの取込量が増加した。すなわち、キシログルカンの合成量は時間とともに直線的に増加することが明らかになった。300 g の過重力環境下でも合成量は 1 g 環境と同程度に時間とともに増加した。

### キシログルカンの分子量

キシログルカンの分子量に対する過重力の影響を解析した。まず、キシログルカンに特異的な発色方法であるヨウ素法を用いて現存するキシログルカンの分子量分布を調べた。その結果、1 g 環境下では 5 時間の生育期間の間に分子量は変化しなかった(平均分子量: 1.1 MDa)。ところが、過重力環境下では、時間とともにキシログルカンの分子量が大きくなり、5 時間後には 1.3 MDa になった。本実験では、カッティングを用いているが、得られた結果はインタクト芽生えを用いた場合(Soga et al. 1999)と同様であった。従って、本実験系を用いてキシログルカン合成過程に対する過重力の影響の解析が可能であることが示された。

次に、 $^3\text{H}$  標識されたキシログルカンの分子量分布を調べたところ、重力環境に関わらず現存するキシログルカン(平均分子量: 1.1 MDa)より高分子側(1.6 MDa)に溶出され、過重力は新たに合成されたキシログルカンの分子量に影響しなかった。1 g 環境下では、標識されたキシログルカンの分子量分布は時間とともに低分子側にシフトしたが、過重力環境では低分子化が抑制された。

### XTH 遺伝子の発現

アズキにおいて遺伝子がクローニングされている 3 つの XTH (VaXTHS4, VaXTH1, VaXTH2)の遺伝子発現を解析した。VaXTHS4 の発現量は重力の大きさが大きくなるにつれて低くなり( $R=-0.94$ )、300 g の過重力処理をした芽生えでは 1 g 対照の約半分であった。一方、VaXTH1 および VaXTH2 の発現量は生育環境の重力の大きさに関わらず一定の値を示した。過重力による VaXTHS4 の発現抑制は過重力処理後 1 時間以内に観察された。

### 考察

新たに合成されたキシログルカンの分子量分布を調べたところ、重力環境に関わらず現存するキシログルカンより高分子側に溶出された。1 g 環境下では、 $^3\text{H}$  標識されたキシログルカンの分子量分布は時間とともに低分子側にシフトした。このことから、上胚軸で新たに合成されるキシログルカンは高分子の状態では細胞壁に取り込まれた後、細胞壁中で分解され低分子化することが示された。過重力はキシログルカンの合成量および新たに合成されたキシログルカンの分子量に影響しなかった。ところが、過重力環境ではキシログルカンの低分子化が抑制された。著者らは過重力がキシログルカン分解酵素活性を低下させることを報告し

ている (Soga et al. 1999, 2000)。以上のことから、過重力はキシログルカンの合成過程には影響せず、キシログルカン分解過程を抑制することによりキシログルカンの高分子化を引き起こすと考えられる。

エンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) がキシログルカンの分子量制御に重要な役割を果たしていることが知られている。アズキにおいては、加水分解活性のみを示す VaXTHS4 (Tabuchi et al. 2001)、転移活性のみを示す VaXTH1 および VaXTH2 の 3 つの XTH の遺伝子がクローニングされている。これら 3 つの XTH 遺伝子の発現変化を解析したところ、VaXTHS4 の発現のみが 30 g 以上の過重力により有意に抑制された。VaXTHS4 の発現は重力の大きさの対数に応じて変化した。過重力による VaXTHS4 の発現抑制は 300 g の過重力処理後 1 時間以内に観察された。これらの結果から、アズキの 3 つの XTH 遺伝子のうち加水分解活性のみを示す VaXTHS4 の発現のみが重力の大きさに応じてすみやかに調節されていることが示された。

過重力は新たに合成され細胞壁に取り込まれたキシログルカンの低分子化を抑制した。キシログルカン分解酵素の活性は過重力環境下では低下した (Soga et al. 1999, 2000)。また、VaXTHS4 遺伝子の発現量は過重力によりすみやかに低下した。VaXTHS4 は細胞壁中でキシログルカン分子を加水分解することにより茎細胞壁の強度を低下させる能力を持っている (Kaku et al. 2002)。従って、過重力は VaXTHS4 の発現低下を介してキシログルカン加水分解活性を低下させ、キシログルカンの分子量を高分子化し、茎細胞壁の強度を増加させていると考えられる。

遠心過重力環境下では、植物はキシログルカンを高分子化することにより茎の細胞壁強度を増加させた (Soga et al. 1999, 2000)。ところが、シロイヌナズナを宇宙の微小重力環境下で生育させると、キシログルカンが低分子化することにより胚軸の細胞壁強度が低下した (Soga et al. 2002)。シロイヌナズナ胚軸のキシログルカンの分子量および分解活性は宇宙の微小重力から 300 g の過重力という非常に幅広いレンジで重力の大きさの対数に応じて変化した (Soga et al. 2001)。細胞壁多糖の分子量は合成と分解のバランスで調節されているが、過重力は合成過程には影響せず、分解過程にのみ影響することが本研究により明らかになった。これらの事実は、微小重力も合成過程には影響せず、分解過程にのみ影響するという可能

性を示唆している。また、本研究の結果から過重力によるキシログルカンの高分子化は VaXTHS4 の発現低下を介していると考えられる。従って、宇宙の微小重力環境下でのキシログルカンの低分子化には、VaXTHS4 の発現増加が重要な役割を担っていると考えられる。

本研究のように抗重力反応の応答過程に関しては、いづいぶん理解が進んできた。また、抗重力反応の刺激の受容にはメカノレセプターが関与することが明らかになっている (Soga et al. 2004, 2005)。しかしながら、刺激の変換・伝達過程に関しては、細胞膜と微小管が深く関わるものが示されている (保尊 2005)、まだ未解明な点が数多く残されている。著者らは公募地上研究と宇宙実験によりその全容の解明を目指している (保尊 2005, 曾我 2005, 若林 2005)。

#### 謝辞

本研究の推進に対する宇宙航空研究開発機構ならびに日本宇宙フォーラムの支援に感謝する。

#### 参考文献

- 1) 保尊隆享; 植物の抗重力反応—シグナル受容, 変換・伝達, そして応答—. *生物工学* **83**, 565 (2005).
- 2) Hoson, T., Soga, K.; New aspects of gravity responses in plant cells. *Int. Rev. Cytol.*, **229**, 209 (2003).
- 3) 保尊隆享, 若林和幸, 曾我康一; 植物のもう 1 つの重力反応: 抗重力 - 抗重力多糖の機能. *宇宙生物科学* **17**, 135 (2003).
- 4) Kaku, T., Tabuchi, A., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Hoson, T.; Action of xyloglucan hydrolase within the native cell wall architecture and its effect on cell wall extensibility in azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.* **43**, 21 (2002).
- 5) 曾我康一; 重力による植物の成長調節—遠心過重力を用いた地上実験—. *日本マイクログラビティ応用学会誌* **21**, 74 (2004).
- 6) 曾我康一; 地上での実験手段—遠心過重力環境の有効性—. *生物工学* **83**, 574 (2005).
- 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) Soga, K., Wakabayashi, K., Hoson, T., Kamisaka, S.; Changes in the apoplastic pH are involved in regulation of xyloglucan breakdown of azuki bean epicotyls under hypergravity conditions. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 509 (2000).

- 9) Soga, K., Wakabayashi, K., Hoson, T., Kamisaka, S.; Gravitational force regulates elongation growth of *Arabidopsis* hypocotyls by modifying xyloglucan metabolism. *Adv. Space Res.*, **27**, 1011 (2001).
- 10) Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Hoson, T.; Stimulation of elongation growth and xyloglucan breakdown in *Arabidopsis* hypocotyls under microgravity conditions in space. *Planta*, **215**, 1040 (2002).
- 11) Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Hoson, T.; Graviperception in growth inhibition of plant shoots under hypergravity conditions produced by centrifugation is independent of that in gravitropism and may involve mechanoreceptors. *Planta*, **218**, 1054 (2004).
- 12) Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Hoson, T.; Mechanoreceptors rather than sedimentable amyloplasts perceive the gravity signal in hypergravity-induced inhibition of root growth in azuki bean. *Funct. Plant Biol.* **32**, 175 (2005).
- 13) Tabuchi, A., Mori, H., Kamisaka, S., Hoson, T.; A new type of endo-xyloglucan transferase devoted to xyloglucan hydrolysis in the cell wall of azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.*, **42**, 154 (2001).
- 14) 若林和幸; 穀類(イネ科植物)の細胞壁構築における重力の作用. *生物工程* **83**, 571 (2005).