

# 重力によるイネ芽生え細胞壁のフェルラ酸形成の制御機構

## Regulation by Gravity of Ferulate Formation in Cell Walls of Rice Seedlings

**Abstract:** Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cell wall peroxidase (POD) have been shown to be involved in the formation of cell wall-bound ferulic and diferulic acids in graminaceous plants. In rice plants, PAL and POD are encoded by the multi-gene families. In the present study, we chose suitable genes for the analysis of expression level of PAL and POD genes in rice shoots and also determined their analytical conditions. In addition, the contribution of oxalate oxidase (germin) to the formation of diferulic acid in cell walls was examined using isolated active cell wall preparations, because the oxalate oxidase has been shown to produce hydrogen peroxide, a key substance for POD activity.

**Key words:** Cell wall, diferulic acid, oxalate oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase, rice

### 概 要

イネ科植物の細胞壁結合性フェルラ酸とジフェルラ酸の形成には、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) とペルオキシダーゼ (POD) が重要な役割を担っている。PAL と POD には複数の遺伝子が存在し、ファミリーを形成していることから、今年度の研究では、解析対象となる遺伝子の絞り込みと、それら遺伝子の発現解析条件について検討した。また、細胞壁内に存在するシュウ酸酸化酵素 (germin) が POD 活性に必須の過酸化水素の生成・供給を介して、ジフェルラ酸の形成に影響する可能性について、活性細胞壁標品を用いて検討した。

### 1. はじめに

昨年度までの研究で、イネシュートの成長に伴う細胞壁結合性フェルラ酸およびジフェルラ酸量、PAL 活性、細胞壁 (アポプラスト) POD 活性の変化を調べた結果、いずれも、播種後 4 日目から 6 日目にかけて大きく増加し、フェルラ酸量と PAL 活性、ジフェルラ酸量と細胞壁 POD 活性の間で、それぞれ非常に高い相関が見られた。これまでにトウモロコシやコムギ芽生えで、PAL が細胞壁フェルラ酸量の調節において重要な役割を担っていることが示されている [1, 2]。イネシュートにおいても同様の結果が得られ、さらに、細胞壁 POD もジフェルラ酸形成の調節に重要であることが示された。イネでは、PAL や POD はそれぞれ遺伝子ファミリーを形成することから、発現解析を行う際には目的とする遺伝子を選ぶ必要がある。今年度の研究では、先ず解析対象となる遺伝子を絞り込み、それら遺伝子の発現解析条件について検討した。

一方、ジフェルラ酸の形成は細胞壁の POD により触媒されるが、この反応には過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) が必須である。イネ科植物では発芽過程のマーカータンパク質として germin と呼ばれるタンパク質が単離されており、その後の研究で、germin はシュウ酸を分解して過酸化水素を生成するシュウ酸酸化酵素であることが明らかにされている [3]。このシュウ酸酸化酵素は細胞壁に局在していることから [4]、細胞壁内のフェノール化合物代謝に関係する可能性が考えられている [3]。そこで、今年度の 2 つ目のテーマとして、図 1 に示した実験仮説に基づいて、ジフェルラ酸形成

におけるシュウ酸酸化酵素の関与について検討した。

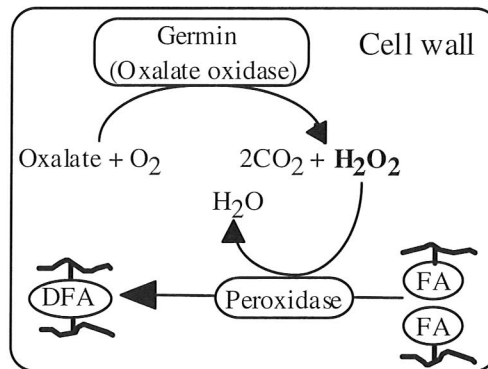


図1 本研究の実験仮説

## 2. 成果の概要

### 2.1. 解析対象遺伝子の選択

イネゲノムデータベース、GenBank などから得られた塩基配列情報を基に、GENETYX, primary structure analysis program SignalP を用いて解析を行った。発現解析のためのリアルタイム PCR 用プライマーは、Applied Biosystems 社のリアルタイム PCR システム付属のプライマー作成ソフト Primer Express により作成した。

PAL については、精製された酵素をもとに塩基配列が決定された PAL 遺伝子 [5] と相同性が高いものを検索した結果、85% 以上の相同性を示すものが 9 個あり、これらをまとめて検出するためのリアルタイム PCR 用プライマーを設計した。

植物の POD に関しては、細胞質内で機能するものと、細胞外に分泌されるタイプが存在する。ジフェルラ酸形成は細胞壁中の POD により触媒されることから、このタイプの POD は分泌型に属する。従って、候補となる POD を選ぶために、次のような絞り込みを行った。まず、アスコルビン酸タイプの POD や葉緑体などの細胞内小器官で機能する POD は細胞質タイプと考えられることから、これらを除外した。一方、細胞外分泌型 POD は class III タイプに属しており、アミノ酸配列上で保存性の高い領域が 3 箇所存在することが報告されている (Box I, Box II, Box III)。また、細胞外分泌型のタンパク質は、N 末端側に分泌のためのシグナルペプチドが付加されていることから、class III タイプ特有の box の有無と分泌のためのシグナルペプチドの有無を調べた。さらに、これまでに報告されている細胞壁結合型 POD の分子量は、ほとんどが 30-40 kDa であることから、この大きさの範囲のものを選んだ。これらの条件により絞り込みを行ったところ、検索したもののの中から、9 個の遺伝子が目的とする細胞壁 POD に該当すると考えられた。ホモロジー検索の結果、6 個は相同性が非常に高いこと (80-98%) が示された。これ以外の 3 個については、それぞれ 50-60% の相同性を示した。そこで、まず、相同性の高い 6 個をまとめて検出するためのリアルタイム PCR 用プライマーを設計した。また、発現解析の際に内部標準として用いる 18S-rRNA 用のプライマーについても、これまでの RT-PCR 用のもものでは増幅サイズが大きいことから、リアルタイム PCR に適したプライマーを新たに設計した。

### 2.2. ジフェルラ酸形成におけるシュウ酸酸化酵素 (germin) の関与

図 1 に示した仮説を検証するために、活性細胞壁標品をシュウ酸あるいは過酸化水素で処理する実験を行った。シュートを氷冷しながら磨砕した後、冷緩衝液で細胞壁残渣を十分に洗浄して活性細胞壁標品を調製した。次に、活性細胞壁標品をシュウ酸あるいは過酸化水素を含む溶液中に懸濁して 37 °C で 18 時間インキュベートした。シュウ酸と過酸化水素は、同じモル濃度を用いた。処理後、活性細胞壁標品を 80% エタノール中で煮沸して固定した後、細胞壁を分画化した。細胞壁から 0.1 M NaOH で抽出される画分に含まれるフェルラ酸およびジフェルラ酸を、HPLC システム (Inertsil ODS-3 カラム) により分離・定量した。

イネ科植物細胞壁のジフェルラ酸には複数のアイソフォームが存在し、8-5, 8-O-4, 5-5の3種が主要成分であることが、これまでの研究で明らかになっている。活性細胞壁標品をシュウ酸処理すると、3種のアイソフォームのすべてが対照に比べて有意に増加した。過酸化水素で処理した場合も同様に3種のアイソフォームすべてが増加しており、シュウ酸と過酸化水素は同程度の促進効果を示した。この結果から、細胞壁のシュウ酸酸化酵素は、過酸化水素を生成・供給することでPODの活性に作用して、細胞壁内でのフェルラ酸のカップリング反応、即ち、ジフェルラ酸形成を促進すると考えられる。

### 3. まとめ

これまでの研究で、イネシュートの成長に伴いPALおよび細胞壁POD活性が大きく増加することが示された。これらの測定はいずれも総活性を調べたものであることから、PALおよび細胞壁POD遺伝子に関しても、この総活性に対応する発現解析を目的としている。昨年度、予備的にPOD遺伝子の発現を調べたが、検出の程度に差が見られ定量性に問題があったことから、今年度、それぞれの遺伝子ファミリーで、複数の遺伝子をまとめて検出するためのプライマーを再設計した。来年度以降、これらを用いてPALおよび細胞壁POD遺伝子の発現解析を行う予定である。

今年度の研究で、細胞壁のシュウ酸酸化酵素は、過酸化水素の生成・供給を介してジフェルラ酸形成に影響することが示された。従って、細胞壁内の過酸化水素環境の調節においてシュウ酸酸化酵素が重要な役割を担っている可能性が考えられる。今後、シュウ酸酸化酵素活性に対する重力の影響についても興味を持たれる。

来年度の研究では、フライト実験に向けた検討課題として、種子を長期間低温保存した場合の影響について検討する。フライト実験では、吸水種子を寒天に播種した後、低温(4℃)の状態で打ち上げて軌道上で実験(生育)開始まで保存する。これまでの予備実験で、2週間までの低温保存は、芽生えの成長に影響しないことを確認しているが、これ以上の期間については不明である。軌道上での実験開始までの期間が長期化する可能性を考え、2ヶ月間程度までの低温保存の影響について検討する。

## 4. 成果発表

### 4.1. 学術論文

- [1] Hossain MT, Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Fujii S, Yamamoto R and Hoson T, "Modification of chemical properties of cell walls by silicon and its role in regulation of the cell wall extensibility in oat leaves", J. Plant Physiol., in press.
- [2] Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T, "Hypergravity induces reorientation of cortical microtubules and modifies growth anisotropy in azuki bean epicotyls", *Planta*, 224, 1485-1494, 2006.

### 4.2. 学会発表

- [1] Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T, "Role of cortical microtubules in hypergravity-induced modification of growth anisotropy in azuki bean epicotyls", 27th Annual International Gravitational Physiology Meeting, April 2006, Osaka.
- [2] Matsumoto S, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K, Abe T, Ishida T, Hashimoto T and Hoson T, "Growth behavior in tubulin mutants of *Arabidopsis* under hypergravity conditions", 27th Annual International Gravitational Physiology Meeting, April 2006, Osaka.
- [3] Hoson T, Koizumi T, Matsumoto S, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K and Sakaki T, "Role of membrane sterols and cortical microtubules in gravity resistance in plants", 36th COSPAR Scientific Assembly, July 2006, Beijing.
- [4] Soga K, Arai K, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T, "Modifications of xyloglucan metabolism in azuki bean epicotyls under hypergravity conditions", 36th COSPAR Scientific Assembly, July 2006, Beijing.
- [5] Koizumi T, Soga K, Wakabayashi K, Suzuki M, Muranaka T and Hoson T, "Involvement of membrane sterols in hypergravity-induced modifications of growth and cell wall metabolism in plant stems", 36th COSPAR Scientific Assembly, July 2006, Beijing.
- [6] Matsumoto S, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K, Abe T, Ishida T, Hashimoto T and Hoson T, "Up-regulation of tubulin genes and growth phenotype of tubulin mutants in *Arabidopsis* under hypergravity conditions", 36th COSPAR Scientific Assembly, July 2006, Beijing.
- [7] 新井邦典, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, "アズキ上胚軸細胞壁におけるキシログルカンの分子サイズ変化", 日本植物学会第70回大会, 2006年9月, 熊本.

- [ 8 ] 松本翔平, 隈崎沙緒里, 曾我康一, 若林和幸, 阿部竜也, 石田喬志, 橋本隆, 保尊隆享, “シロイヌナズナ・チューブリン変異体の成長と形態に対する重力の影響”, 日本植物学会第 70 回大会, 2006 年 9 月, 熊本.
- [ 9 ] 隈崎沙緒里, 松本翔平, 曾我康一, 若林和幸, 阿部竜也, 石田喬志, 橋本隆, 保尊隆享, “シロイヌナズナ MAPs 変異体の成長と形態に対する重力の影響”, 日本植物学会第 70 回大会, 2006 年 9 月, 熊本.
- [ 10 ] 中野紗帆, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, “アズキ上胚軸における細胞壁多糖組成と代謝のグラデーション”, 日本植物学会第 70 回大会, 2006 年 9 月, 熊本.
- [ 11 ] 若林和幸, “イネ科植物の細胞壁構築における重力の役割”, 日本宇宙生物科学会第 20 回大会, 2006 年 9 月, 大阪.
- [ 12 ] 小泉朋子, 曾我康一, 若林和幸, 鈴木優志, 村中俊哉, 保尊隆享, “過重力による植物の茎の成長と細胞壁代謝の修飾における膜ステロールの役割”, 日本宇宙生物科学会第 20 回大会, 2006 年 9 月, 大阪.
- [ 13 ] 松本翔平, 隈崎沙緒里, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, “重力による植物の成長調節における微小管の役割—微小管破壊剤を用いた解析—”, 日本宇宙生物科学会第 20 回大会, 2006 年 9 月, 大阪.
- [ 14 ] 隈崎沙緒里, 松本翔平, 曾我康一, 若林和幸, 阿部竜也, 石田喬志, 橋本隆, 保尊隆享, “重力による茎器官の成長と形態の調節における MAPs の役割”, 日本宇宙生物科学会第 20 回大会, 2006 年 9 月, 大阪.
- [ 15 ] 中野紗帆, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, “重力による細胞壁代謝調節の茎部域による差異”, 日本宇宙生物科学会第 20 回大会, 2006 年 9 月, 大阪.
- [ 16 ] 金原知也, 小竹敬久, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, 円谷陽一, “冠水微小重力によるイネ芽生えの  $\beta$ -1,3:1,4-グルカン合成活性の低下”, 日本宇宙生物科学会第 20 回大会, 2006 年 9 月, 大阪.
- [ 17 ] 保尊隆享, 神阪盛一郎, 高橋秀幸, 山下雅道, 北宅善昭, 飯田秀利, 村中俊哉, 橋本隆, 園部誠司, 谷本英一, 西谷和彦, 井上雅裕, 唐原一郎, 小竹敬久, 若林和幸, 曾我康一, “植物の抗重力反応解明”, 第 23 回宇宙利用シンポジウム, 2007 年 1 月, 東京.
- [ 18 ] 小竹敬久, 金原知也, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, 円谷陽一, “重力シグナルがイネの  $\beta$ -1,3:1,4-グルカン合成活性に与える影響”, 第 23 回宇宙利用シンポジウム, 2007 年 1 月, 東京.
- [ 19 ] 若林和幸, 曾我康一, 保尊隆享, “コムギ芽生え細胞壁のフェノール化合物代謝におけるシュウ酸酸化酵素の役割”, 日本植物生理学会 2007 年度年会, 2007 年 3 月, 松山.
- [ 20 ] 曾我康一, 小竹敬久, 若林和幸, 神阪盛一郎, 保尊隆享, “重力によるアズキ上胚軸の表層微小管配向の変化と  $\gamma$ -チューブリン遺伝子発現の増加”, 日本植物生理学会 2007 年度年会, 2007 年 3 月, 松山.
- [ 21 ] 小泉朋子, 榎剛, 鈴木優志, 村中俊哉, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享, “茎器官の抗重力反応における膜ステロールの役割”, 日本植物生理学会 2007 年度年会, 2007 年 3 月, 松山.

## 5. 参 考 文 献

- [ 1 ] Parvez MM, Wakabayashi K, Hoson T and Kamisaka S, “White light promotes the formation of diferulic acid in maize coleoptile cell walls by enhancing PAL activity”, *Physiol. Plant.*, 99, 39-48, 1997.
- [ 2 ] Wakabayashi K, Hoson T and Kamisaka S, “Osmotic stress suppresses the cell wall stiffening and the increase in cell wall-bound ferulic and diferulic acids in wheat coleoptiles”, *Plant Physiol.*, 113, 967-973, 1997.
- [ 3 ] 小野道之, 小野公代, “Germin と Germin-like protein”, *植物の化学調節*, 34, 148-157, 1999.
- [ 4 ] Vuletic N and Sukalovic VH-T, “Characterization of cell wall oxalate oxidase from maize roots”, *Plant Sci.*, 157, 257-263, 2000.
- [ 5 ] Minami E, Ozeki Y, Matsuoka M, Koizuka N and Tanaka Y, “Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase from rice plants”, *Eur. J. Biochem.*, 185, 19-25, 1989.