

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 : Changes in the activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cell wall peroxidase (POD) were studied in dark-grown rice shoots. The amounts of cell wall-bound ferulic (FA) and diferulic acids (DFA) in rice shoots greatly increased from 4 to 6 days after planting (Annual Report; Wakabayashi 2004). The activity of PAL per shoot increased by 5-fold from day 4 to 6. There was a close correlation between the FA level and PAL activity. Similarly, the activity of cell wall POD per shoot progressively increased during this period, and the activity changed in parallel with the increase in DFA content. These results suggest that both PAL and cell wall POD are involved in determining the level of wall-bound phenolic acids in rice shoots.

Keywords : Cell wall, ferulic acid, diferulic acid, peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase, rice shoot

概 要

今年度の研究では、イネshootの成長過程でのフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) と細胞壁結合型ペルオキシダーゼ (POD) の活性の変化について検討した。昨年度の研究で、イネshoot細胞壁結合性のフェルラ酸 (FA) とジフェルラ酸 (DFA) 量は、播種後4日目から6日目にかけて大きく増加することを明らかにした (2004年度成果報告書、若林)。この4日目から6日目にかけてPAL活性は急速に増加し、6日目では4日目の5倍の活性を示した。PAL活性と細胞壁のFA量との間で非常に高い相関が見られた。一方、細胞壁POD活性も、PALと同様にこの期間に大きく増加した。POD活性は、細胞壁のDFA量と同じパターンの変化を示した。以上の結果から、PALと細胞壁PODの活性はイネshoot細胞壁のフェノール化合物量の調節に直接的に関与していると考えられる。

1. はじめに

昨年度までの研究で、実験材料としてイネを用いる場合の生育条件が確立され、さらに、芽生えshootの成長、shoot細胞壁の多糖類量とフェノール化合物量の分析から、播種後4日目から6日目にかけて成長が速く、細胞壁構成成分の増加量が大きいことが明らかになった。特に、研究目的であるフェルラ酸、ジフェルラ酸量は、この期間に20数倍に増加することが示された (図1)。さらに、昨年度の研究で、ジフェルラ酸をアイソフォームごとに分けて定量するシステムが確立され、イネshootでは5-5, 8-O-4, 8-5 formの3種が主要アイソフォームであり、これら3種の量比は4~6日目ではほぼ同じであることが示された。

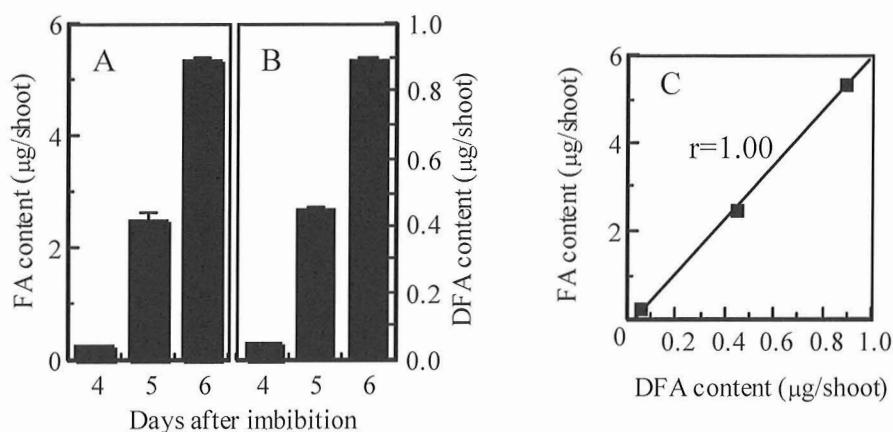


図1 イネshoot細胞壁のフェルラ酸量 (A)、総ジフェルラ酸量 (B) 及びフェルラ酸と総ジフェルラ酸量との相関 (C)

イネshootでのフェルラ酸、総ジフェルラ酸量は4～6日目の間に大きく増加したが、両者の間では非常に高い相関がみられたことから (図1)、イネshootにおいても、これまで報告された他のイネ科植物 (穀類) 芽生えと同様に、ジフェルラ酸の生成量はフェルラ酸量に依存すると考えられる。フェルラ酸は、フェニルアラニンを出発物質として細胞質内のフェニルプロパノイド経路で合成され、最初のステップを触媒するフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) が律速段階となっている。これまでの研究から、PAL活性が細胞壁フェルラ酸量の調節において主要な役割を担っていることが示されている [1-3]。課題研究では、重力条件 (微小重力) がPAL活性にどのように影響するのかを明らかにすることが主要な目的の1つである。一方、ジフェルラ酸は、細胞壁中でのフェルラ酸のカップリング反応により形成され、この反応はアポプラスト (細胞壁) ペルオキシダーゼ (POD) により触媒される。従って、細胞壁PODがジフェルラ酸形成の制御において重要な役割を持つ可能性が考えられ、細胞壁POD活性に対する微小重力の影響についての解析も研究課題としてあげられている。今年度は、これまでに確立された条件で生育させた4～6日目のイネshootを用いて、この期間でのPALと細胞壁PODの活性変化について検討した。

2. 成果の概要

2.1. 材料および方法

イネshootの調製

培養容器はポリカーボネートのculture dish (直径 60 mm, 高さ 30 mm) を用い、これに1%寒天 (Bacto-Agar, DIFCO Lab.), 20 mlを加えたものを培地とした。イネ (*Oryza sativa* L. cv Koshihikari) 種子を、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (食品添加物用, Wako Pure Chemical Corp.) 中で1時間滅菌した。水で数回洗浄した後、寒天培地に播種し、暗所、25℃の条件で生育させた。播種後4～6日目にshootを切り取り、その長さとし重量を測定した後、直ちに液体窒素で凍結してフリーザー中 (-80℃) で保存した。播種後の各操作は緑色安全光下で行った。

粗酵素画分の調製

今回の分析では、同一の植物材料を用いてPALとPODの活性を測定する方法について検討した。測定は4日目 (day 4)、5日目 (day 5)、6日目 (day 6) のshootを用いて行い、1試料当たりday 4では22本、day 5は16本、day 6は12本のshootを用いた。

凍結試料 (shoot) を1 mMメルカプトエタノールを含む50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.8) 中で磨砕した後、遠心操作により上清を回収してPAL活性測定に用いた。次に、残渣 (細胞壁) に10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) を加えて洗浄し、続いて、1 M NaClを含む10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) を加えて、細胞壁にイオンの

に結合しているタンパク質を抽出した。この細胞壁結合タンパク質画分を遠心操作により回収してペルオキシダーゼ活性の測定に用いた。抽出液中のタンパク質量はProtein Assay Kit (Bio-Rad Lab. Inc.) を用いて測定した。

酵素活性の測定

PAL活性

PAL活性の測定は、[3]の方法により行った。基質としてフェニルアラニンを用いて反応させた後、HPLCシステム (Inertsil ODS-3カラム, GL Sciencesを使用) により反応生成物のケイ皮酸を定量してPAL活性とした。

細胞壁結合POD活性

基質のグアヤコールを含む反応液に粗酵素液を加えた後、過酸化水素溶液を加えることで反応を開始させた。反応開始後1分から5分まで30秒間隔で470 nmの吸光度を測定した。活性は、470 nmの吸光度が直線的に増加している範囲について、1分間の吸光度の増加量として表した。

2.2. 結果

図2は4～6日目のイネshootのPAL活性を示している。Shoot当たりの活性は、この期間にほぼ直線的に増加し、6日目では4日目の5倍の活性となっていた。一方、単位タンパク質量当たりの活性（比活性）でも、この期間に大きく（約3倍に）増加した。

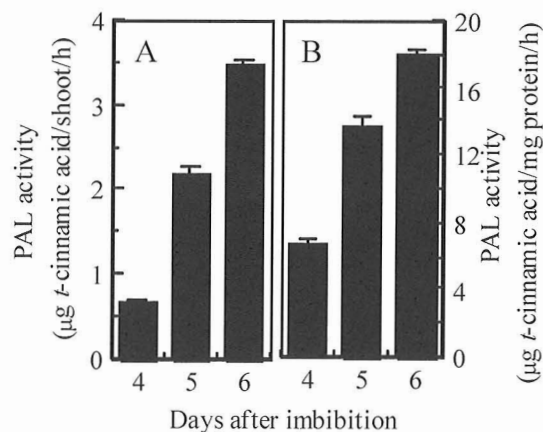


図2 イネshootのフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）活性の変化PAL活性は1時間のassayで生成したt-cinnamic acid量で表す。
A: shootあたりの活性、B: 単位タンパク質量あたりの活性。データは平均値±標準誤差 (n=3)。

図3は4～6日目のイネshootの細胞壁POD活性を示している。Shoot当たりの活性は、この期間に約5倍になっており、特に5日目から6日目にかけて大きく増加した。一方、比活性では、4、5日目はほぼ同程度の活性であったが、6日目では5日目の1.7倍に増加した。

今回の分析では、同一の植物材料を用いてPALとPODの測定を行うために、PAL活性測定用の粗酵素画分を調製した後の細胞壁残渣から細胞壁タンパク質画分を抽出してPODのアッセイに用いた。この方法により十分に測定可能なレベルのPOD活性が検出され、活性の程度はトウモロコシ幼葉鞘細胞壁のPOD活性[2]と同程度であったことから、今回の調製（抽出）方法により、同一試料でPALと細胞壁POD活性の分析が可能であることが示された。

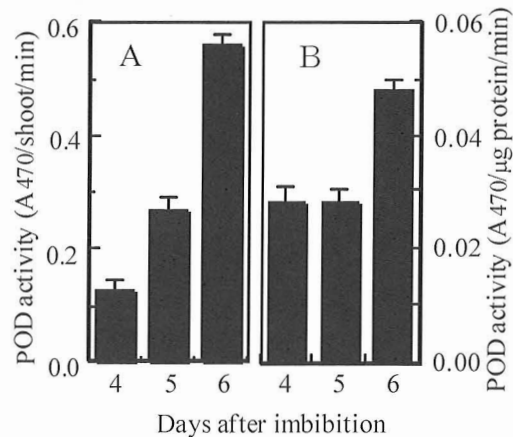


図3 イネshoot細胞壁のペルオキシダーゼ（POD）活性の変化
ペルオキシダーゼ活性は、shoot細胞壁から1 M NaClで抽出したタンパク質画分を用いて測定し、470 nmの吸収の増加量で表す。
A: shootあたりの活性、B: 単位タンパク質量あたりの活性。データは平均値±標準誤差（n=3）。

3. まとめ

今回測定した播種後4～6日目のイネshootのPAL活性は、比活性で比較した場合、暗所で生育させたコムギやトウモロコシ幼葉鞘のPAL活性[2,3]よりも2～3倍高いことが示された。この期間、shoot当たりでは、PAL活性と細胞壁結合フェルラ酸量との間で非常に高い相関がみられたことから（図4）、イネshootにおいても他の穀類と同様、細胞壁フェルラ酸量は主にPAL活性のレベルで調節されたと考えられた[4,5]。

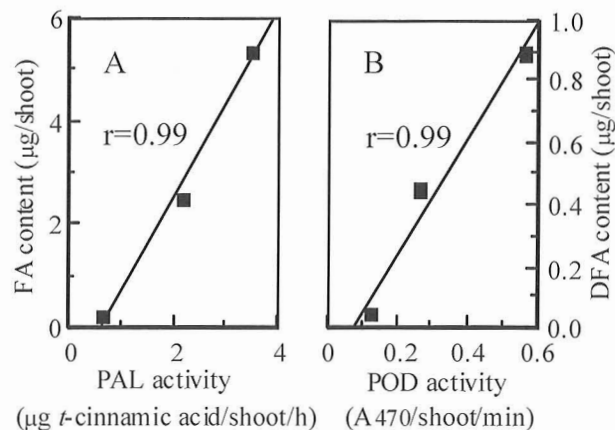


図4 イネshoot細胞壁のフェルラ酸量とPAL活性との相関（A）とジフェルラ酸量と細胞壁ペルオキシダーゼ（POD）活性との相関（B）

これまでの研究から、穀類芽生えのPAL活性は器官の成長と共に増加し、成長停止後に急速に減少すること[3]、成熟が進んだ部位では活性が低いことが示されている[1]。今回の結果では、PAL活性は4～6日目にかけて直線的に増加していたことから（図2）、この期間が、PAL活性に対する重力（微小重力）の影響を調べるために適した生育時期（段階）であると考えられる。

一方、細胞壁POD活性も4～6日目に大きく増加しており、shoot当たりでは、POD活性と細胞壁結合ジフェルラ酸量との間で非常に高い相関がみられた（図4）。この結果は、POD活性のレベルが細胞壁中でのジフェルラ酸形成の調節に関与することを示していると考えられる。上記のPALと同様に、細胞壁PODの活性も4～6日目にかけて大きく増加したことから、この期間が、微小重力の影響を調べるために適した生育時期であると考えられる。昨年度の研究

で、イネshootでは5～6日目に幼葉鞘の長さが最大に達して伸長が止まり、shootが太くなることが示された。細胞壁POD活性も5日目から6日目に大きく増加したことから、細胞壁PODがshootの肥厚過程に関わっている可能性が示唆される。

今年度の研究で、播種後4～6日目にかけてPALおよび細胞壁POD活性が大きく増加したことから、来年度以降は、この期間でのこれら酵素遺伝子の発現について調べ、宇宙実験のための生育時期の検討を進めたい。昨年度、イネの細胞壁POD遺伝子の発現解析のために、データベースをもとに5種の細胞外分泌型POD (class III) について、これらをまとめて検出するためのPCR用プライマーを設計した。これを用いて今年度実験を行ったが、実験ごとに検出の程度に差が見られ、プライマーに問題があると考えられた。イネでは、細胞壁PODと同様、PALにも複数の遺伝子が存在することから、来年度以降の実験では、PALと細胞壁PODについて各遺伝子ごとに発現量の解析を行う予定である。

成 果 発 表

学術論文

- [1] Wakabayashi, K., Soga, K., Kamisaka, S., Hoson, T. "Increase in the level of arabinoxylan-hydroxycinnamate network in cell walls of wheat coleoptiles grown under continuous hypergravity conditions." *Physiol. Plant.*, 125, 127-134, 2005
- [2] Wakabayashi, K., Soga, K., Kamisaka, S., Hoson, T. "Changes in levels of cell wall constituents in wheat seedlings grown under continuous hypergravity conditions." *Adv. Space Res.*, 36, 1292-1297, 2005
- [3] Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Hoson, T. "Hypergravity inhibits elongation growth of azuki bean epicotyls independently of the direction of stimuli." *Adv. Space Res.*, 36, 1269-1276, 2005
- [4] 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, 175-179, 2005
- [5] Hoson, T., Saito, Y., Soga, K., Wakabayashi, K. "Signal perception, transduction, and response in gravity resistance. Another graviresponse in plants." *Adv. Space Res.*, 36, 1196-1202, 2005
- [6] Saiki, M., Fujita, H., Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Yamashita, M., Hoson, T. "Cellular basis for the automorphic curvature of rice coleoptiles on a three-dimensional clinostat: Possible involvement of reorientation of cortical microtubules." *J. Plant Res.*, 118, 199-205, 2005
- [7] 若林和幸 "宇宙実験をプランニングする一特集によせて" *生物工学*, 83, 556, 2005
- [8] 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" *生物工学*, 83, 571-573, 2005

学会発表

- [1] 保尊隆享, 曾我康一, 若林和幸 "植物のもう一つの重力反応: 抗重力" 日本植物学会第69回大会 2005年9月 富山
- [2] 曾我康一, 若林和幸, 神阪盛一郎, 保尊隆享 "植物の抗重力反応 —メカノレセプターを介した表層微小管の配向調節—" 日本植物学会第69回大会 2005年9月 富山
- [3] 奥田真季子, 曾我康一, 若林和幸, 保尊隆享 "浸透ストレスによるアズキ上胚軸の成長抑制とセルロース合成阻害" 日本植物学会第69回大会 2005年9月 富山
- [4] 曾我康一, 若林和幸, 神阪盛一郎, 保尊隆享 "過重力環境下におけるアズキXTH遺伝子の発現変化" 日本宇宙生物科学会第19回大会 2005年9月 東京
- [5] 小泉朋子, 曾我康一, 若林和幸, 鈴木優志, 村中俊哉, 保尊隆享: "植物の抗重力反応における膜ステロールの役割" 日本宇宙生物科学会第19回大会 2005年9月 東京
- [6] 保尊隆享, 神阪盛一郎, 高橋秀幸, 山下雅道, 飯田秀利, 村中俊哉, 橋本 隆, 園部 誠司, 谷本英一, 西谷和彦, 小竹敬久, 若林和幸, 曾我康一 "植物の抗重力反応解明研究班WGの活動報" 第22回宇宙利用シンポジウム 2006年1月 東京
- [7] 曾我康一, 新井邦典, 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キシログルカン代謝の調節" 第22回宇宙利用シンポジウム 2006年1月 東京
- [8] 曾我康一, 新井邦典, 若林和幸, 神阪盛一郎, 保尊隆享 "遠心過重力環境下におけるアズキ上胚軸のキシログルカン代謝の変化" 日本植物生理学会2006年度年会 2006年3月 筑波

参 考 文 献

- [1] Hossain, M.T. "Role of silicon in growth regulation of Poaceae seedlings." Ph. D. Thesis, Osaka City University, 2003
- [2] Parvez, M.M., Wakabayashi, K., Hoson, T., 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

- [3] Wakabayashi, K., Hoson, T., 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
- [4] Wakabayashi, K., Soga, K., Kamisaka, S., Hoson, T. "Changes in levels of cell wall constituents in wheat seedlings grown under continuous hypergravity conditions." *Adv. Space Res.*, 36, 1292-1297, 2005
- [5] 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" *生物工学*, 83, 571-573, 2005