

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18570062

研究課題名（和文）穀類の細胞壁マトリックス内ネットワーク形成

研究課題名（英文）Formation of hydroxycinnamate network in cell walls of gramineous plants

研究代表者

若林 和幸（WAKABAYASHI KAZUYUKI）

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10220831

研究成果の概要：イネ科植物のジフェルラ酸形成では、細胞壁結合型ペルオキシダーゼの活性レベルが律速要因の1つであることが明らかになった。この酵素には複数のアイソフォームが存在し、分子サイズは 35 kDa 程度で、弱酸性条件で最大活性を持つことが示された。また、細胞壁のシュウ酸酸化酵素に関しては、過酸化水素の生成・供給を介してペルオキシダーゼ活性に作用し、細胞壁中でジフェルラ酸とリグニンの形成を促進することが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	600,000	4,200,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：植物・細胞壁・フェノール化合物・多糖類・酵素

## 1. 研究開始当初の背景

単子葉イネ科植物に特徴的な細胞壁構造であるフェノール化合物による多糖間ネットワークは、単量体のフェルラ酸が細胞壁中で重合して2量体のジフェルラ酸となり多糖分子間を架橋することで形成される。フェルラ酸の重合は細胞壁ペルオキシダーゼにより触媒されるが、酵素の活性レベルとジフェルラ酸形成との関係については、明確な結果は示されていない。また、イネ科植物細胞壁のフェノール化合物代謝に関わる細胞壁（アポプラスト）ペ

ルオキシダーゼの生化学的性質に関して、ほとんど調べられていない。

一方、イネ科植物芽生えの細胞壁中には germin と呼ばれるタンパク質が含まれ、これ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示されている。ペルオキシダーゼの反応には過酸化水素が必須であることから、細胞壁のシュウ酸酸化酵素は過酸化水素の供給を介して、ジフェルラ酸形成や細胞壁のフェノール化合物代謝に関わっている可能性が考えられているが、いまだ明確にされ

ていない。

## 2. 研究の目的

イネ科植物に特徴的なフェノール化合物による細胞壁多糖間ネットワーク(架橋構造)形成について、架橋となるジフェルラ酸の形成における(1)細胞壁ペルオキシダーゼと(2)細胞壁内のシュウ酸酸化酵素(germin)の役割を検討して、ネットワーク形成のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

植物材料は暗所で生育させたイネ、コムギ及びアベナ芽生えを用いた。細胞壁ペルオキシダーゼの活性は、調製した活性細胞壁標品より塩抽出されるタンパク質画分を用い、グアヤコールを基質として測定した。また、このタンパク質画分を用いてFPLC タンパク質精製システムによりペルオキシダーゼの精製をおこなった。

細胞壁結合性フェノール類(フェルラ酸、ジフェルラ酸)は、アルカリ鹸化(0.1 M NaOH 処理)により細胞壁標品から抽出した後、HPLCを用いて定量した。また、細胞壁のリグニンの定量は、アセチルプロマイド法によりおこなった。

シュウ酸酸化酵素の活性は、4-chloro-1-naphthol を用いた活性染色法により調べた。また、調製した活性細胞壁標品をシュウ酸あるいは過酸化水素溶液で処理した後、上記と同様にアルカリ鹸化により細胞壁からフェルラ酸及びジフェルラ酸を抽出し、HPLCを用いてそれらの量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞壁ペルオキシダーゼ

暗所で生育させたイネ芽生えを用いて、シュートの成長過程での細胞壁のジフェルラ酸及びフェルラ酸量と細胞壁ペルオキシダーゼ活性の変化を調べた。播種後4から6日目にかけて、シュートは5 mm から13 mm に成長し、シュート1本あたりの生重量も2 mg から10 mg に増加した。この時、0.1 M NaOH 処理で細胞壁から抽出されるエステル結合性のフェルラ酸は約25倍に増加したが、ジフェルラ酸の増加は約16倍であった。この生育期間の細胞壁結合型ペルオキシダーゼ活性を測定したところ約8倍に増加した。ジフェルラ酸量の増加とペルオキシダーゼ活性の増加のパターンは類似しており、両者の間で非常に高い相関( $r=1$ )が見られた。従って、細胞

壁ペルオキシダーゼの活性レベルが、ジフェルラ酸形成を調節する要因の一つであると考えられる。

次に、イネ科植物の細胞壁ペルオキシダーゼの生化学的性質を明らかにするために、アベナ芽生えを用いて精製をおこなった。暗所で4日間生育した芽生えシュートを磨砕・洗浄して活性細胞壁標品を調製し、これに3 M NaCl を加えて細胞壁タンパク質を抽出した。このタンパク質画分を硫酸(20-80%)沈澱させた後、各種カラムに供した。まず、イオン交換カラム(Mono-S)により2つの活性ピークが得られ、それぞれS-1、S-2画分とした。次に、それぞれの画分を2種類のゲルろ過カラム(Superose-12、次いでSuperdex-75)により分離したところ、両画分ともSuperdex-75上で活性とタンパク質の溶出パターンが一致した。このSuperdex-75後の活性画分は、最初の硫酸沈澱画分に比べて約200倍(S-1画分)、約150倍(S-2画分)に精製された。SDS-PAGE電気泳動と銀染色による分析の結果、S-1画分は36と34.5 kDaの2本のバンドが、S-2画分では38、36.5、34 kDaの3本のバンドが確認された。両画分についてpH依存性を調べた結果、S-1画分はpH6付近で最大活性を示し、S-2画分はpH5.5から7の比較的広い範囲で高い活性を持つことが示された。従って、精製されたアイソフォームは弱酸性域で活性が高いと考えられる。成長中の植物細胞壁のpHは弱酸性(pH5~6)であることから、精製されたアイソフォームは細胞壁中で活性を持ち機能していると推定される。

### (2) シュウ酸酸化酵素

暗所で生育させたコムギ芽生えシュートを用いて、活性染色法によりシュウ酸酸化酵素活性を調べた。これまでの報告では、根では活性染色法により染色される(シュウ酸酸化酵素活性が検出される)が、シュートは染色されないことが示されている。今回、シュートの表面を軽くアブレイドして表面のキューティクル(クチクラ)を取り除く操作をおこなったところ、シュートでも根の場合と同様の染色が見られた(図1)。培養液にシュウ酸あるいは過酸化水素を加えた場合、シュート表面が同程度に染まったことから、与えたシュウ酸はシュウ酸酸化酵素により分解されて、生成した過酸化水素が色素(4-chloro-1-naphthol)の重合反応に用いられたと考えられる。従って、コムギシュートにはシュウ酸酸化酵素活性があることが確認された。

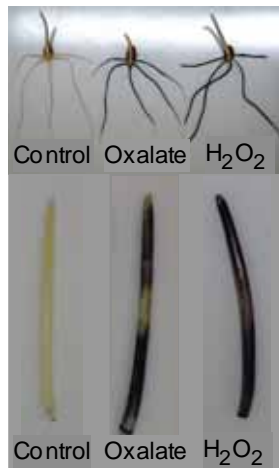


図1 活性染色法によるコムギ根(上図)とシュート(下図)のシュウ酸酸化酵素活性

次に、コムギシュートから調製した活性細胞壁標品をシュウ酸あるいは過酸化水素を含んだ溶液中で処理することで、*in vitro*系で細胞壁中のジフェルラ酸量の変化を調べた。その結果、シュウ酸(OX)あるいは過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)処理によりジフェルラ酸量が増加し、シュウ酸と過酸化水素は同程度の効果を示した(図2)。従って、シュウ酸酸化酵素は、過酸化水素を生成・供給することで細胞壁中のジフェルラ酸形成を促進することが示された。

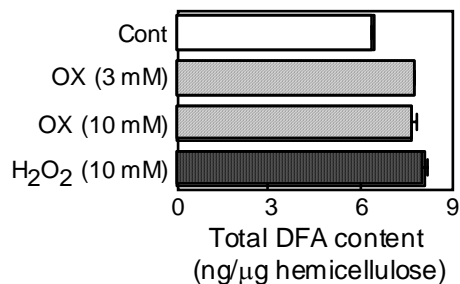


図2 細胞壁のジフェルラ酸量に対するシュウ酸と過酸化水素の影響

一方、シュウ酸あるいは過酸化水素処理により細胞壁のエステル結合性のフェルラ酸量が大きく減少した。そこで、この点を検討するために、コムギ根から調製した活性細胞壁標品を用いた実験をおこなった。上記と同様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したところ、対照に比べてエステル結合性のフェルラ酸量は減少したのに対して、アセチルプロマイド可溶性リグニン量が増加した(図3)。

フェルラ酸量の減少とリグニン量の増加との間で非常に高い相関( $r=-0.93$ )が見られた。従って、過酸化水素の供給が増加すると、細胞壁ペルオキシダーゼの活性が増加して多糖とフェルラ酸の間でエーテル結合が形成され、その結果、弱アルカリ溶液で抽出されるエステル結合性のフェルラ酸量が減少したと考えられる。このエーテル結合性のフェルラ酸の増加が、リグニン量に反映されたと推定される。以上の結果から、細胞壁のシュウ酸酸化酵素は、過酸化水素の生成・供給を介してペルオキシダーゼ活性に作用し、細胞壁中でのジフェルラ酸とリグニンの形成を促進すると考えられる。

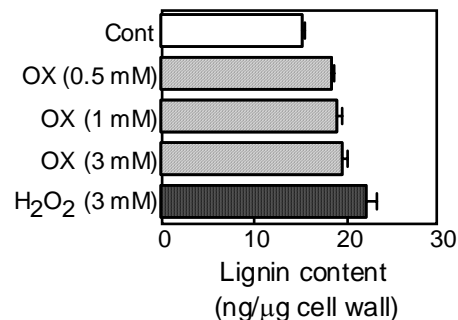


図3 細胞壁のリグニン量に対するシュウ酸と過酸化水素の影響

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計11件)

Wakabayashi K, Nakano S, Soga K, Hoson T: Cell wall-bound peroxidase activity and lignin formation in azuki bean epicotyls grown under hypergravity conditions. *J Plant Physiol* 166:947-954 (2009) 査読: 有  
Ooume K, Inoue Y, Soga K, Wakabayashi K, Fujii S, Yamamoto R, Hoson T: Cellular basis of growth suppression by submergence in azuki bean epicotyls. *Ann Bot* 103:325-332 (2009) 査読: 有

Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T: Transient increase in the transcript levels of  $\alpha$ -tubulin complex genes during reorientation of cortical microtubules by gravity in azuki bean (*Vigna angularis*) epicotyls. *J Plant Res* 121:493-498 (2008) 査読: 有  
Kimpura T, Aohara T, Soga K,

Wakabayashi K, Hoson T, Tsumuraya Y, Kotake T:  $\alpha$ -1,3:1,4-Glucan synthase activity in rice seedlings under water. *Ann Bot* 102:221-226 (2008) 査読: 有

Nakano S, Soga K, Wakabayashi K, Hoson T: Different cell wall polysaccharides are responsible for gravity resistance in the upper and the basal regions of azuki bean epicotyls. *Biol Sci Space* 21:113-116 (2007) 査読: 有

Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T: Effects of hypergravity on expression of *XTH* genes in azuki bean epicotyls. *Physiol Plant* 131:332-340 (2007) 査読: 有

Soga K, Arai K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T: Modifications of xyloglucan metabolism in azuki bean epicotyls under hypergravity conditions. *Adv Space Res* 39:1204-1209 (2007) 査読: 有

Koizumi T, Sakaki T, Usui S, Soga K, Wakabayashi K, Hoson T: Changes in membrane lipid composition in azuki bean epicotyls under hypergravity conditions: Possible role of membrane sterols in gravity resistance. *Adv Space Res* 39:1198-1203 (2007) 査読: 有

Matsumoto S, Saito Y, Kumasaki S, Soga K, Wakabayashi K, Hoson T: Up-regulation of expression of tubulin genes and roles of microtubules in hypergravity-induced growth modification in *Arabidopsis* hypocotyls. *Adv Space Res* 39:1176-1181 (2007) 査読: 有

Hossain MT, Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Fujii S, Yamamoto R, 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* 164:385-393 (2007) 査読: 有

Soga K, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T: Hypergravity induces reorientation of cortical microtubules and modifies growth anisotropy in azuki bean epicotyls. *Planta* 224:1485-1494 (2006) 査読: 有

[学会発表](計14件)

Wakabayashi K, Nakano S, Soga K and Hoson T. Modification of the activity of cell wall-bound peroxidase by hypergravity in relation to the stimulation of lignin formation in azuki bean epicotyls. 37th COSPAR Scientific Assembly, 15 July 2008, Montreal.

Soga K, Kotake T, Wakabayashi K, Kamisaka S and Hoson T. Transient increase in the levels of  $\alpha$ -tubulin complex in reorientation of cortical microtubules by gravity in azuki bean epicotyls. 37th COSPAR Scientific Assembly, 15 July 2008, Montreal.

Matsumoto S, Kumasaki S, Higuchi S, Inoue Y, Kirihata K, Fujie M, Soga K, Wakabayashi K and Hoson T. Development of an efficient procedure for Resist Wall Space Experiment. 37th COSPAR Scientific Assembly, 15 July 2008, Montreal.

若林和幸、曾我康一、保尊隆享. コムギ芽生えの細胞壁フェノール化合物代謝に対するシュウ酸と過酸化水素の影響. 日本植物学会第72回大会、2008年9月26日、高知

桐畑邦章、吉富恭代、曾我康一、若林和幸、四方雅仁、河内孝之、保尊隆享. シロイヌナズナZIM過剰発現体の成長と細胞壁変化. 日本植物学会第72回大会、2008年9月26日、高知

若林和幸、中野紗帆、曾我康一、保尊隆享. アズキ上胚軸における細胞壁結合型ペルオキシダーゼ活性のグラデーションと過重力による変化. 日本宇宙生物科学会第21回大会、2007年9月27日、東京

榊剛、小泉朋子、曾我康一、若林和幸、保尊隆享. アズキ上胚軸における膜ステロール代謝に対する過重力の影響. 日本宇宙生物科学会第21回大会、2007年9月27日、東京

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. 第48回日本植物生理学会年会、2007年3月29日、松山

小泉朋子、榊剛、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. 第48回日本植物生理学会年会、2007年3月30日、松山

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 15 日、熊本

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 15 日、熊本

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 28 日、大阪

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 28 日、大阪

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 -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 28 日、大阪

## 6．研究組織

### (1) 研究代表者

若林 和幸 (WAKABAYASHI KAZUYUKI)

大阪市立大学・大学院理学研究科・

准教授

研究者番号：10220831

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし