



細胞壁タンパク質エクспанシンによる浮稲節間の伸長調節

笹山, 大輔

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Date of Publication)

2010-12-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4551

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004551>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

細胞壁タンパク質エクспанシンによる浮稲節間の伸長調節

平成 21 年 1 月

神戸大学大学院自然科学研究科

笹山大輔

目次

緒論	1
第1章 浮稲の節間伸長における酸が誘導する成長とエクспанシンの作用の関与	
緒言	29
材料と方法	30
結果	35
考察	39
図表	46
第2章 エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性と壁構造との関係	
緒言	55
材料と方法	57
結果	61
考察	65
図表	70
第3章 エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性とフェノール酸化合物の沈着との関係	
緒言	84
材料と方法	85
結果	88
考察	94
図表	98
総合考察	116
摘要	121
謝辞	125
引用文献	126

緒論

作物としての浮稲

イネ (*Oryza sativa* L.) は、コムギやトウモロコシとともに世界で広く利用されている穀物である。その大部分はアジアで生産されているが、アメリカ、ラテンアメリカ、ヨーロッパ、アフリカ、オーストラリアでも生産されており、それぞれの地域に適したさまざまなタイプのイネが栽培されている。水田で栽培され、成長に比較的多くの水を必要とするイネは水稻 (lowland rice) と呼ばれており、一方、水稻に比べて必要とする水分量が少なく、畑状態での栽培が可能なイネは陸稲 (upland rice) と呼ばれている。これらの水要求度の違いはそれぞれの自然環境と結びつき、稲作の地域性を生み出している。アジアの稲作では水稻生産がもっぱらであり、陸稲はほとんど栽培されていないが、アフリカやラテンアメリカでは陸稲の生産が盛んに行われている。また、水稻生産が灌漑農地において行われる場合 (irrigated rice) と、水の供給を雨水に頼る天水栽培による場合 (rainfed rice) とがあり、これらもまた自然環境に合わせて選択されている。

イネはさまざまな水分環境で栽培されているが、その中で浮稲 (floating rice あるいは deepwater rice) と呼ばれるグループのイネは、極度の深水条件下でも成長することが可能であり、1日 20-25 cm の速度で草丈が伸長し、4 m の水深のもとで 7 m

にまで達したとする報告もある (Vergara et al. 1976)。浮稲の定義はさまざまであり、例えば Calting (1992) によれば、浮稲は 50 cm 以上の水深で少なくとも 1 ヶ月は生存できるという能力によって現代のほとんどのイネとは一線を画するグループであるとされている。IRRI (2002) では、浮稲は水深 1 m を超える深水条件が最長で 5 か月も続くような環境でも栽培可能な作物であると紹介されている。また、IRRI (2002) では、1 m 程度までの水位上昇に適応可能な品種を *deepwater rice*、それよりもさらに深い水深にも適応可能な、著しい伸長能力を持つ品種を *floating rice* と呼んでいる。これらのように、定義や用語には研究者の間でしばしば不一致がみられるものの、いずれにせよ浮稲は急速に成長することによって深水条件に適応するグループのイネである、という認識は共通しているようである。

その高い深水適応能力から、浮稲は雨期に大規模な洪水が発生し、それによる深水状態が長期間続くような地域において栽培されている。浮稲の栽培は、乾季の終わりから雨季の初期にかけて、施肥なしの散播による直播で始まる。発芽から幼苗期はどちらかという土壌水分が少ないために、この時期に乾燥耐性を示す個体が自然に選抜されてきたとされている (井之上 1987)。雨期になると河川が氾濫して増水し、浮稲は節間組織を伸長させることによって上昇する水位に対応する。このときの水深は地域によってさまざまに異なるため、それぞれの地域の水深に適応する個体が自然に選抜されてきたと考えられる。水位の上昇によって多くの雑草は枯

死する一方、浮稲は葉を水面よりも上に保ち、光合成や呼吸を十分なレベルに維持し、また氾濫水が供給する栄養分を利用することで生存・成長することができる。やがて水が引くと、浮稲は自身を支持することができずに倒伏してしまうが、葉鞘基部の負の重力屈性によって起き上がる。また、水が引く頃の日長に反応して幼穂が形成され、葉枕部の屈曲反応は穂を食害や水没による害から保護するのに役立っている。

2004-2006 年の世界における浮稲の栽培面積はおよそ 420 万 ha であり、世界の全稲作面積の 2.8%に相当する (IRRI 2008)。浮稲はアジアとアフリカのみで栽培されており、その栽培面積の約 80%はアジアであり、約 350 万 ha に相当する。アジアで浮稲が栽培されている地域は東南アジア・南アジアに集中しており、主な国としてバングラデシュ (117 万 ha)、ミャンマー (49 万 ha)、ベトナム (22 万 ha)、カンボジア (19 万 ha)、ネパール (12.5 万 ha)、タイ (5 万 ha) などがあげられる。これらの国は、ガンジス川・ブラマプトラ川 (バングラデシュ)、イラワジ川 (ミャンマー)、メコン川 (ベトナム・カンボジア)、チャオプラヤ川 (タイ) といった大河川を有し、それらのデルタ地帯が浮稲栽培の中心となっている。浮稲栽培のもう 1 つの地域であるアフリカでは、浮稲栽培面積はおよそ 70 万 ha と見積もられ、西アフリカ地域で栽培されているようである。主な国としてはマリ、ニジェール、ギニア、ブルキナファソ、ナイジェリアなどがあげられる。

浮稲の収量は総じて低く、1 m 程度の水位には適応可能な浮稲品種 (deepwater rice) の収量は最大でも 4 t / ha 程度である (IRRI 2002)。灌漑による水稻生産に比べれば低い水準といえるが、例えば適切な草型を導入することによる収量の改善の可能性が指摘されている。一方、最大 5 m の厳しい水位条件にも適応可能な高い深水適応性のある浮稲品種 (floating rice) の収量はおよそ 1.0~2.5 t / ha とされており、これらの品種では、急激な水位上昇に適応して生存する能力が最も優先されるため、育種などによる収量の向上は難しいようである。アジアにおける浮稲栽培面積は徐々に減少しており、1980 年頃は 500 万 ha (3.9%)、1990 年代で 370 万 ha (2.8%) と見積もられ (Huke and Huke 1997)、そして前述したように 2004-2006 年においてはおよそ 350 万 ha にまで減少している。これは浮稲の収量の低さ、あるいはその作期の長さのために作付強度の増加による収量増加が見込めないことから浮稲栽培が敬遠され、灌漑を利用した短期間で高収量を得ることが可能な品種の 2 期作栽培や乾期の稲作へと移行しているという背景があるようである (IRRI 2002)。しかしながら、浮稲は低投入の持続的農業の特徴を備えており、また深水の農業生態系においては唯一栽培可能な穀物であり、いまなお重要な作物といえるだろう。高い収量性と、浮稲のもつ深水条件に対する高い適応性を併せ持つイネ品種を作出することは、食糧増産の一助となると考えられ、浮稲の深水適応性の解明は重要な研究課題であるといえる。

浮稲の深水適応性—節間伸長の植物ホルモンによる調節

浮稲のもつ高い深水適応性は、深水条件下で促進される急激な節間伸長に基づく。例えば日本の栽培品種では、節間伸長は生殖成長期における幼穂分化から出穂にかけての間にみられる現象であるが、浮稲では栄養成長期の比較的早い段階から伸長節間が形成される。発育に伴って最初に伸長する節間は伸長最低節間 (LEI, lowest elongated internode) と呼ばれている。LEI の位置は栽培条件によってある程度変動するものの、それぞれの品種に固有であり、深水適応性 (浮稲性) の指標とされている (井之上 1987)。近年、いくつかのグループにより LEI を司る QTL の同定が試みられており、第 3 染色体および第 12 染色体に座乗することが明らかにされている (Nemoto et al. 2004, Kawano et al. 2008)。

深水条件下の浮稲節間の急激な伸長は、エチレン、ジベレリン、アブシジン酸の反応鎖によって調節されていると考えられている (Kende et al. 1998, Sauter 2000 参照)。Métraux and Kende (1983) は、バングラデシュ在来浮稲品種の Habiganj Aman II を材料として節間伸長の研究を行い、深水条件下において節間内のエチレン濃度が増加すること、エチレンの投与は節間伸長を促進することを見出した。これらはインタクトの植物体を用いた実験であったが、Raskin and Kende (1984a) は、植物体から切り出した、最上位節間を含む茎切片を実験に用い、この茎切片を深水処理

すると節間の急速な伸長や節間内エチレン濃度の増加が誘導されること、また茎切片をエチレン処理することによっても節間の伸長が促進されることを示し、茎切片でみられる節間伸長反応はインタクトの植物体における伸長反応と同様であることを報告した。これらの結果から、茎切片は節間伸長研究における有用な実験系として今日もなお用いられている。深水条件下で節間内エチレン濃度が増加するのは、空気中に比べて水中でのエチレンの拡散速度が約 10000 倍低いこと (Musgrave et al. 1972) と深水条件下の節間組織においてエチレン合成が促進されること (Raskin and Kende 1984a, Cohen and Kende 1987) に起因すると考えられている。次に、Raskin and Kende (1984b) は、茎切片を用いて深水条件下の節間伸長におけるジベレリンの役割を検討した。ジベレリン合成阻害剤で前処理した浮稻茎切片では、深水処理やエチレン処理では節間伸長が生じず、ジベレリンを投与することによってのみ節間伸長が回復し、またエチレンは節間組織のジベレリンに対する反応性を増加させる作用をもつことが示された (Raskin and Kende 1984b)。これらの結果から、深水条件下の節間伸長を最終的に導く植物ホルモンはジベレリンであると考えられている。エチレンによる節間組織のジベレリンに対する反応性の増加は、ジベレリンの拮抗物質であるアブシジン酸の節間内含量のエチレンによる低下によってもたらされると説明されている (Hoffmann-Benning and Kende 1992, Azuma et al. 1995)。近年、この節間内アブシジン酸量の減少に関与していると考えられるアブシジン酸不活性

化酵素遺伝子が単離されている (Yang and Choi 2006)。

上述した反応鎖において、エチレンは節間の伸長を促進し、アブシジン酸はそれに対して抑制的な作用を示す。近年、これらの植物ホルモンが節間伸長に及ぼす作用が、湿度条件によって変化することが明らかにされている。高い湿度条件では、エチレンとジベレリンはともに茎切片に投与することによって節間伸長を誘導するが、低い湿度条件ではエチレンによって誘導される節間伸長は阻害される一方で、ジベレリン酸による節間伸長は低湿度による影響をほとんど受けない (Azuma et al. 1991)。このような差はイネ実生においてもみられ、エチレンは高湿度条件では葉の成長を促進し、低湿度条件では抑制するのに対し、ジベレリンは湿度に関係なく葉の成長を促進する (Azuma et al. 2007)。したがって、エチレンは浮稲の成長を促進あるいは抑制する両方の作用をもっており、それは周囲の水分条件によって異なっており働くことが示唆される。その後の調査により、低湿度におけるジベレリン酸による節間伸長の促進には、インベルターゼ合成の促進によって細胞内への糖の取り込み量を増加させることによる浸透調節が関係していることが示唆された (Azuma et al. 1997)。一方、エチレンが低湿度では節間を伸長できないのは、低湿度条件でエチレンが誘導する蒸散の促進が原因の 1 つであると考えられる (Azuma et al. 2003a)。蒸散の促進によってアポプラスト内は減圧状態となり、それが細胞外の水ポテンシャルの低下をもたらし、細胞の伸長に必要な膨圧が得られないために節間伸長が生

しない可能性が示唆されている。アブシジン酸は浮稲茎切片の節間伸長を抑制すると報告されている（Hoffman-Benning and Kende 1992, Azuma et al. 1995）が、低湿度条件ではエチレンとジベレリンの共存下でアブシジン酸は節間伸長をむしろ促進することが示されている（Azuma et al. 2003b）。この現象は、アブシジン酸による気孔の閉鎖によって、低湿度条件でエチレンが促進する蒸散が抑制されることにより、細胞伸長に必要な膨圧が得られたためであると説明されている。

浮稲の深水適応性—細胞学的研究

浮稲節間の深水条件下での急激な伸長は、節間組織基部にある介在分裂組織における細胞分裂活性の増加と、それによって新たに形成された細胞の伸長促進とに基づく成長反応である（Métraux and Kende 1984）。空気中で栽培した浮稲植物体と部分的な深水条件で栽培した植物体それぞれから得た節間組織中の細胞の詳細な比較により、深水条件は介在分裂組織における細胞周期を24時間から7時間に減少させ、また細胞伸長が生じる部位を増加させることが示された（Bleecker et al. 1986）。

Sauter and Kende（1992）は茎切片を用いてジベレリンによる節間伸長誘導の細胞学的な研究を行い、ジベレリンはまず介在分裂組織における細胞伸長を促進し、その細胞成長の結果として細胞分裂が促進されるという仮説を提案した。しかしながら、部分的に深水処理した植物体を用いた分子生物学的手法による調査では、節間組織

の成長に先立って細胞周期の調節に関与するいくつかの遺伝子の発現が誘導されることが見出され、深水条件は細胞周期を直接的に活性化することが示唆されている (Lorbiecke and Sauter 1998)。深水条件による細胞周期の活性化における植物ホルモンの関与についてはまだ明らかにされていないようである (Sauter 2000)。

細胞壁による細胞伸長の調節

深水条件下における浮稲節間の伸長促進は、分裂組織における細胞分裂活性の増加に加えて、細胞伸長の促進を伴う。細胞伸長は、植物の成長において不可欠のプロセスであり、その原動力は細胞内外の水ポテンシャル差に基づく細胞の吸水である。細胞内の水ポテンシャルは、細胞内浸透溶質に起因する浸透ポテンシャルと、細胞壁によって生じる壁圧とによって調節される。液胞に蓄積された溶質は細胞内の浸透ポテンシャルを低下させ、これは細胞の吸水の原動力として働く。一方、細胞壁は細胞の吸水を抑制し、無制限の吸水による細胞の破壊を防ぐ役割を果たしている。吸水を抑制することにより細胞壁に生じる膨圧によって、細胞壁は細胞 1 つ 1 つの形状を安定させる働きを担うことにもなり、また力学的な強度を与えることで植物細胞、さらには植物体の構造を維持するのに役立ち、病原菌などの外敵に対しては防壁となる役割をも果たしている。

細胞壁は形成される時期によって一次細胞壁と二次細胞壁とに分類されており、

植物細胞の成長中に形成される細胞壁が一次細胞壁、細胞の成長が停止した後にさらに付加される細胞壁が二次細胞壁と呼ばれている。二次細胞壁は一次細胞壁に比べて厚い構造をもつのが一般的であり、セルロースやリグニンの含有率が高い。二次細胞壁の沈着は、細胞壁の物理的強度をさらに増加させることにより、細胞や植物体の構造維持、そして外敵に対する防壁という細胞壁の役割はより確固なものになる。しかしながら、一次細胞壁では成長中の植物細胞を覆っているために、それが常に強固な性質のままでは細胞の吸水が生じにくく、例えば深水条件下の浮稲の節間伸長のような急速な成長反応は生じ得ない。細胞の伸長がより効率よく達成される際には、細胞壁は細胞の吸水によって引き延ばされる、すなわち細胞壁が伸展することが不可欠である。したがって、成長中の組織においては、細胞壁は植物体の構造維持を担う役割を果たすとともに、必要に応じて部分的あるいは選択的に柔軟性をもち、伸展性を備えることによって、細胞の吸水を可能にするメカニズムがなければならない。このような強度と伸展性という相反する性質を両立させる一次細胞壁の構造は多くの研究者によって模索されてきた。

細胞壁の構造モデルと伸展のメカニズム

細胞壁の主成分である多糖類は、セルロース、ペクチン、そしてヘミセルロースの3つに大きく分類される。セルロースはグルコースが β - (1 $\rightarrow$ 4) 結合によって直

鎖状に連なった高分子を基本構造とし、地球上で最も多量に存在する炭水化物である。ペクチンは酸性糖であるガラクトuron酸を主として形成される多糖であり、ガラクトuron酸が連なったホモガラクトuronナン、そしてガラクトuron酸と中性糖のラムノースからなる多糖であるラムノガラクトuronナン I (ペクチン中で最も多い分子とされる)、さらに複雑な構造を持つラムノガラクトuronナン II などが知られている。

ヘミセルロースはセルロースとペクチン以外の多様な多糖類の総称である。ヘミセルロースとして見出される多糖の種類は植物によって異なり、例えば、 β - (1 $\rightarrow$ 4) 結合によって連なったグルコースを主鎖とし、側鎖としてキシロースが結合した構造をもつキシログルカン¹は、単子葉植物よりも双子葉植物の細胞壁に多く含まれている。また、グルコースが β - (1 $\rightarrow$ 3) 結合および β - (1 $\rightarrow$ 4) 結合によって連なった多糖である β - (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4) グルカンはイネ科植物細胞壁に特徴的なヘミセルロースであり、これが双子葉植物でみつかった例はほとんどない。細胞壁は、これらの多糖類からなるネットワークによって形成されており、主構造となる結晶性のセルロースからなるミクロフィブリル（微繊維）がヘミセルロースやペクチンからなる親水性多糖のマトリックスに埋め込まれた構造をもつと考えられている (Cosgrove 2005)。一次細胞壁の多糖マトリックスを構成するのは、分岐しながら長く連なったポリマーであり、そのポリマーどうしが非共有結合や物理的なもつれなどによって相互作用し、マトリックス全体で凝集性のネットワークを形成してい

と考えられている。

細胞壁構造のモデルが提案されるとともに、壁の構造と伸展性との関係についての検討が行われるようになった。細胞壁を構成する多糖類であるセルロース、ペクチン、ヘミセルロースのうちどの成分が細胞壁の伸展性と関連があるのか、どのような変化によって細胞壁が伸展性を得るのかといった細胞壁伸展のメカニズムはまだ解明されておらず、現在も研究が続けられている。Chanliaud et al. (2002) は、セルロースを合成する細菌である *Acetobacter xylinus* を用いて、それらがセルロースを合成する際に培養液に様々な非セルロース性多糖を加えることで細胞壁に類似した素材を作成させ、それらの力学的性質を調査し、細胞壁の構造と物理的伸展性（外力による伸展能力）の関係を検討した。培養液に多糖を加えず合成したセルロースのみを含む素材は、約 450 kPa (= 4.5 kg/cm²) もの高い圧力を加えても破砕せずに耐えられる強固な素材であったが、一次細胞壁にみられるような伸展性はほとんど持っていなかった。一方、*A. xylinus* の培養液にペクチンあるいはヘミセルロースであるタマリンド由来のキシログルカンを加えて合成した素材は、セルロースのみの素材に比べてかなり低い圧力で破砕する程度に強度は減少した（ペクチン-セルロース複合体は約 75 kPa、キシログルカン-セルロース複合体は約 10 kPa、ペクチン-キシログルカン-セルロース複合体は約 40 kPa でそれぞれ破砕した）が、物理的伸展性はペクチンやキシログルカンを付加することで増加し、最大ではセルロースのみ

の素材の3倍程度にまで達した。これらの実験結果は、ミクロフィブリルを形成するセルロースは細胞壁の強固な性質の大部分を担っており、細胞壁の物理的伸展性にはミクロフィブリルを覆いそれらの空間的位置を決めているペクチンやヘミセルロースなどのマトリックスポリマーの存在が必要であるとする考えを支持する。セルロースミクロフィブリルどうしをつなぎとめていると考えられているのはヘミセルロースであり、ヘミセルロースはセルロースと結合して強くかつ弾力性のあるネットワークをセルロースとともに形成する役割を担っているようである (Cosgrove 2005)。ペクチンは、ペクチンポリマー間のカルシウム架橋などを介して親水性の高いゲル構造を形成することが知られており、少なくとも間接的に、細胞壁構造のネットワーク化に寄与していると考えられる。あるいは、セルロースミクロフィブリルどうしをつなぎとめる役割を担っているのは、ヘミセルロースではなくペクチンであると提案する研究者もいる (Zhao et al. 2008)。

では、マトリックスポリマーは細胞壁の伸展にどのように関与しているのか。多くの研究によって細胞壁伸展のメカニズムに関していくつかのモデルがあげられてきた中で、主流となったモデルの1つが、マトリックスを構成する多糖の加水分解による壁伸展のメカニズムである。このモデルが提案するのは、マトリックスを構成する多糖に加水分解酵素が選択的に作用することにより、例えばミクロフィブリルと結合し、その位置を保持しているマトリックス多糖を切断することにより、細

胞壁の伸展がもたらされるというメカニズムである。細胞壁は、植物の種類や齢によって変動するものの、その質量の約 10%がタンパク質で占められており、細胞壁のマトリックス多糖に作用することのできる加水分解酵素も多数存在する (Fry 1995, Carpita 1996, Cosgrove 1999) ため、それらが細胞壁の構造変化を導くことによって細胞壁の伸展が調節されるという仮説は有力であると思われた。この仮説を検討するため、いくつかの加水分解酵素について、細胞壁の伸展を引き起こす能力が *in vitro* で調査されたが、調査された加水分解酵素の大部分は細胞壁の伸展を誘導しないか、あるいは伸展するものの短時間で細胞壁を切断することが報告された (Cosgrove and Durachko 1994, Cosgrove 1999)。したがって、細胞壁に存在する加水分解酵素は、持続的な細胞壁伸展を誘導する“細胞壁のゆるみ (cell wall loosening)”を引き起こす因子とは考えられないとされた。しかしその一方で、最近になって細胞壁の伸展を誘導する加水分解酵素も発見されている。アズキ (*Vigna angularis* Ohwi) 上胚軸から単離され、キシログルカンヒドラーゼと名づけられた酵素は、キシログルカンの加水分解に関わる新しいタイプのエンドキシログルカントランスフェラーゼであり (Tabuchi et al. 2001)、加水分解活性がありながら細胞壁の伸展を引き起こすことが示された (Kaku et al. 2002)。また、Yuan et al. (2001) は *Trichoderma reesei* からエンド-1,4- β グルカナーゼである Ce112A を単離し、これもまた加水分解酵素であるにもかかわらず細胞壁の伸展を引き起こすことを示した。

したがって、加水分解酵素によって細胞壁の伸展が引き起こされる可能性は完全に否定されているわけではない。このメカニズムが植物の成長に関与しているのかについては、さらなる調査が必要であるといえる。

細胞壁のゆるみを引き起こす因子，エクспанシン

多糖加水分解酵素による細胞壁伸展メカニズムのモデルに代わって注目されているのが、エクспанシンと名付けられた細胞壁タンパク質による細胞壁伸展の可能性である。今日提案されているこのモデルのきっかけとなったのは、植物器官の成長を促進する水素イオンの作用の発見である。Bonner (1934) は、pH 4.1 の酸性条件におけるエンバク (*Avena sativa* L.) 子葉鞘切片の成長が、pH 7.2 の条件下に比べて 8 倍も大きいこと、低 pH によって細胞壁の伸展が誘導されることを示した。多くの植物において子葉鞘の伸長成長はオーキシン処理によって促進されることが知られているが、Nitsch and Nitsch (1956) はオーキシン (インドール酢酸 : IAA) の投与に関係なく水素イオンが子葉鞘における細胞伸長を促進することを報告した。Rayle and Cleland (1970) はエンバク子葉鞘切片の伸長成長に最適な培養液の pH が約 3.0 であり、このときの最大成長速度および細胞壁の伸展が、最適な濃度の IAA によって引き起こされる伸長成長に匹敵することを示し、IAA と低 pH による成長促進作用が細胞壁のゆるみを導く一続きの反応であることを示唆した。その後、子

葉鞘切片に外部から IAA を供給することによって引き起こされる成長は細胞内から細胞壁への水素イオンの排出，すなわち細胞壁の酸性化を伴うことが示され，この酸性化が細胞壁のゆるみを引き起こし，IAA による成長を可能とする“酸成長仮説 (acid-growth theory)”が提案された (Rayle 1973, Rayle and Cleland 1992)。細胞壁の酸性化は原形質膜の H^+ -ATPase によって行われると考えられている。トウモロコシ (*Zea mays* L.) 子葉鞘を用いた実験で，IAA は原形質膜内の H^+ -ATPase 量を急速に増加させること，IAA によって増加した H^+ -ATPase 量はタンパク質合成阻害剤の cycloheximide や mRNA 合成阻害剤の cordycepin によって急激に減少すること，子葉鞘の成長速度の変化はこれらの原形質膜 H^+ -ATPase 量の増減と相関を示すことが見出され，オーキシンによる細胞壁の酸性化は遺伝子発現レベルで調節されているプロセスであると結論された (Hager et al. 1991)。

次に，細胞壁の酸性化が細胞壁のゆるみを導くメカニズムについての研究がすすめられた。伸長中の植物の組織を凍結および解凍し，細胞を破壊することによって膨圧を除去した細胞壁切片を一定張力下においてその伸展量を測定すると，細胞壁は酸性条件に反応して急速に伸展し，少なくとも 24 時間もの長時間にわたって伸展し続ける (Cosgrove 1989)。この酸により誘導される細胞壁伸展が，細胞壁の酸性化による物理的な粘性の変化のみに依存するのか，それとも酵素反応を必要とするのか調査された。その方法として，キュウリ (*Cucumis sativus* L.) 胚軸から調製

した細胞壁を材料とし、異なる温度条件下における細胞壁マトリックス多糖の粘性の変化と酸が誘導する細胞壁伸展が調査された。20°C と 30°C とでの比較した結果、酸による細胞壁伸展性の温度変化は、マトリックス多糖の粘性の温度変化よりも大きいことが明らかになった。また、酸による細胞壁伸展性は、細胞壁を短時間熱処理することによってほぼ完全に失われた。これらの結果から、酸が誘導する細胞壁伸展は、酸性化による細胞壁多糖類の物理的特性の変化のみによるのではなく、酵素反応の特徴を持っていると結論づけられた (Cosgrove 1989)。したがって、細胞壁の伸展性を pH 依存的に変化させる細胞壁タンパク質が存在することが予想された。

予想された通り、熱処理によって内生のタンパク質を失活させたキュウリ実生細胞壁切片（酸による伸展性を失う）に、キュウリ実生の細胞壁からのタンパク質粗精製物を酸性条件下で投与すると、細胞壁の伸展が誘導されることが示された (McQueen-Mason et al. 1992)。この粗抽出物をさらに精製することによって、細胞壁の酸による伸展を誘導する活性を持つ分子量 29 kD と 30 kD の 2 つの新規のタンパク質が得られ (McQueen-Mason et al. 1992)、後にエクспанシンと名付けられた (Cosgrove and Li 1993)。エクспанシンが細胞壁のゆるみを引き起こす作用が、セルロースミクロフィブリルをつなぎとめているマトリックスポリマーの加水分解に起因する可能性が調査されたが、細胞壁の主要構成多糖に対するエクспанシンの

加水分解活性は見出されていない (McQueen-Mason et al. 1992, McQueen-Mason and Cosgrove 1995)。その後の調査により、エクспанシンはセルロースマイクロフィブリルとマトリックス多糖類との間の水素結合を切断することによって細胞壁のゆるみをもたらし、細胞の吸水に伴う細胞壁の伸展を可能とすることが示唆されている (McQueen-Mason and Cosgrove 1994)。

その後、エンバク子葉鞘 (Li et al. 1993)、トマト葉 (Keller and Cosgrove 1995)、トウモロコシ根 (Wu et al. 1996) など、さまざまな種・組織・器官においてエクспанシンが見出された。また、被子植物のみならず、裸子植物 (Hutchinson et al. 1999)、シダ植物である *Regnellidium diphyllum* や *Marsilea quadrifolia* (Kim et al. 2000)、コケ植物である *Physcomitrella patens* (Schipper et al. 2002)、さらにはタバコ培養細胞 (Link and Cosgrove 1998) にもエクспанシンが存在することが報告され、現在ではすべての陸上植物およびおそらく藻類にエクспанシンが存在すると考えられている (Li et al. 2002)。一方、植物以外の生物からもエクспанシンの特徴的なアミノ酸配列を備えたタンパク質は発見されている (Laine et al. 2000, Xu et al. 2000, Saloheimo et al. 2002) ものの、活性のあるエクспанシンをもつと報告されているのは植物寄生性の線形動物 *Globodera rostochiensis* の1例のみである (Qin et al. 2004, Kudla 2005)。

エクспанシンは植物細胞の成長の鍵となる内生の調節物質であると考えられ

ており、それは次の4つの証拠に基づいて支持されている (Cosgrove 2000)。1つ目は、エクспанシンは pH 依存の様式で *in vitro* での細胞壁の伸展を誘導する (McQueen-Mason et al. 1992, McQueen-Mason and Cosgrove 1995) ということである。2つ目は、エクспанシンを生きた細胞に与えると、細胞の伸長を促進するということである (Fleming et al. 1997, Cosgrove 2000)。これは、エクспанシンが張力下の細胞壁切片 (*in vitro*) においてだけでなく、生きた細胞の細胞壁 (*in vivo*) でも機能することができることを示している。一般にエクспанシンは細胞壁の中では非常に量の少ない構成成分で、例えばキュウリ実生においては、エクспанシンは乾燥重量にして細胞壁のおよそ 5000 分の 1 の割合でしか含まれないが、1/10000 のような少ない量を投与しても細胞壁伸展が誘導されるとされている (Cosgrove 2000)。3つ目は、エクспанシン遺伝子が成長調節において機能するために適時・適所で発現しているということである (Cho and Cosgrove 1997c)。そして最後に、アンチセンス法によりエクспанシン遺伝子の発現量を減少させると成長が阻害されたことがあげられている (Cho and Cosgrove 2000)。以上のことから、エクспанシンが実際の植物体で細胞壁伸展を触媒しているという考えは確実視されており、壁の伸展は細胞の成長に不可欠な現象であるため、エクспанシンは細胞成長を司る因子であると考えられるだろう。当初は、植物細胞の伸長成長におけるエクспанシンの役割が注目されたが、今日ではそれに加えて、葉原基の初期発達 (Fleming

et al. 1997, Reinhardt et al. 1998, Pien et al. 2001), 果実の軟化 (Rose and Bennett 1999), 寄生植物における吸器発達 (O'Malley and Lynn 2000) にもエクспанシンが関わっていることが報告されている。

エクспанシンスーパーファミリー

単離されて間もなく、最初のエクспанシン cDNA の配列が決定され (Shcherban et al. 1995), グループ 1 アレルゲンと呼ばれるイネ科植物の花粉アレルゲングループ (Smith et al. 1996) との間にわずかな配列の相同性があることが明らかになった。これらの花粉タンパク質は、イネ科植物の花粉により誘導される花粉症や季節的な喘息の原因として 1980 年代半ばに同定されていた (Knox and Suphioglu 1996)。この花粉タンパク質とエクспанシンの相同性は、いくつかの示唆を含んでいる。第一に、グループ 1 アレルゲンが細胞壁のゆるみを引き起こす作用をもっている可能性があるということであり、その *in vivo* での役割は、細胞壁を構造的に柔らかくすることにより、花粉管が柱頭や花柱を貫通するのを促進することであると考えられている (Cosgrove et al. 1997)。この仮説を支持する結果として、トウモロコシのグループ 1 アレルゲンである *Zea m 1* はイネ科植物の細胞壁伸展を誘導する活性を有することが報告されている (Li LC et al. 2003)。イネ科植物以外の植物から抽出した花粉タンパク質にはエクспанシンのような細胞壁を緩ませる活性が見られなかつ

たこと (Cosgrove et al. 1997), エクспанシンと相同性を示す花粉アレルゲンはイネ科植物に限られていたことから第二に示唆されるのは, 花粉において分泌されるエクспанシンによって花粉管の貫通が促進されるというのは, 顕花植物ではイネ科植物にのみ見られる特徴であるのかもしれないということである (Cosgrove 2000)。第三にあげられるのは, グループ 1 アレルゲンはイネ科植物の細胞壁に特異的に働く可能性である。これは, イネ科植物の細胞壁が他の植物の細胞壁とはいくつかの点で異なっているためである。イネ科植物の細胞壁には, 双子葉植物で一般的にみられるマトリックス多糖 (キシログルカンやペクチン) が少なく, 著しく分岐したキシランや β - (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4) グルカンが多く存在する (Carpita 1996)。したがって, イネ科に特異的に存在するこれらの多糖類がグループ 1 アレルゲンのターゲットになっている可能性が考えられる。

このように, エクспанシンファミリー内にサブファミリーが存在することが明らかになり, 最初にキュウリ実生から単離されたエクспанシンと系統学的に関連しているエクспанシンのグループは α エクспанシン, グループ 1 アレルゲンと関連しているグループは β エクспанシンと呼ばれ区別されるようになった。この 2 つのサブファミリーは, 分子量の点で類似しており, およそ 25 から 28 kD である。アミノ酸配列の同一性は 20 から 25% であり, いくつかの特徴を共有している。その特徴としてあげられるのは, シグナルペプチド, N 末端領域に保存されている一

連のシステイン残基，C 末端領域に保存されている一連のトリプトファン残基である。さらに，タンパク質の中央部にはヒスチジン-フェニルアラニン-アスパラギン酸からなる HFD モチーフと呼ばれる保存配列が認められ，この部位は触媒ドメインであると考えられており (Lee and Kende 2002)，ファミリー45 エンドグルカナーゼと低いながらも有意な相同性を示す (Cosgrove 2000)。相違点としてあげられるのは，グリコシル化モチーフの有無である。このモチーフは， α エクспанシンには存在せず， β エクспанシンの配列に存在することがいくつかの報告によって示されているが，エクспанシンの作用におけるグリコシル化の重要性は明らかになっていない (Cosgrove et al. 2002)。

さらに，活性の有無はわかっていないものの， α ， β エクспанシンのような典型的なエクспанシンサブファミリーに類似した配列を有するタンパク質グループも発見されている。Li et al. (2002) がシロイヌナズナで同定した γ エクспанシンは， α ， β エクспанシンの N 末端側のみを持ち，HFD モチーフを持たないタンパク質のグループである。これまでに細胞壁伸展を誘導する活性を示す γ エクспанシンは見つかっておらず (Ceccardi et al. 1998, Li et al. 2002)，これらのタンパク質はナトリウム排出ペプチドとして機能し，植物細胞の水分バランスを調節する可能性が示唆されている (Maryani et al. 2001, Ludidi et al. 2002)。イネで同定された σ エクспанシンサブファミリーは， β エクспанシンの C 末端側のみを持つタンパ

ク質のグループである (Li Y et al. 2003)。この C 末端部はセルロース結合ドメインと相同性があること、そして σ エクспанシンがシグナルペプチドを有することから、 σ エクспанシンは細胞壁に何らかの作用を示すと予想されているが、その機能はわかっていない。

その後、エクспанシンファミリーの命名法が新たに提案された (Kende et al. 2004)。従来、 α エクспанシンと呼ばれていたサブファミリーは EXPA (*EXPA*)、 β エクспанシンは EXPB (*EXPB*) と新たに命名され、個々のメンバーは属と種の頭文字と、発見された順番に従う番号をとって命名されるようになった。例えば、イネ (*Oryza sativa*) の α エクспанシン (EXPA) で最初に発見されたものは OsEXPA1 (*OsEXPA1*) と呼ばれる。この命名法はその後多くの研究において積極的に用いられるようになっている。

現在のところ、その活性が明らかにされていることやグループの大きさの点から、サブファミリーとして十分に確立されているのは EXPA (α エクспанシン) と EXPB (β エクспанシン) の 2 つのグループである。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) とイネは完全なゲノム配列が明らかになっており、それぞれの植物が構成するエクспанシンファミリーについては詳細に調査されている (Li Y et al. 2003)。シロイヌナズナは、エクспанシンタンパク質をコードすると考えられる 38 のオープンリーディングフレーム (ORF) をもち、そのうち 26 個は *EXPA*、8 個は *EXPB*

であるとされている。一方、イネでは 80 個ものエクспанシンの ORF が推定され、*EXPA* は 32 個、*EXPB* は 24 個である。シロイヌナズナが双子葉植物を代表しているとするれば、*EXPB* はイネ科植物において特に多様性を示しているということが考えられ、イネ科植物のマトリックスポリマーにおける細胞壁の特異性と、何らかの関連性を持っているのかもしれないと考えられている (Cosgrove 1999, Li Y et al. 2003)。

浮稲におけるエクспанシン研究

浮稲節間の深水条件下の急激な伸長の植物ホルモンによる調節の研究、そして細胞学的研究が進められるとともに、細胞壁伸展性の変化の重要性も注目されるようになった。Kutschera and Kende (1988) は、深水処理した節間と気中培養した節間とで細胞壁の物理的伸展性を比較し、深水条件下での節間の急速な伸長が、細胞壁伸展性の増加と関係していることを報告した。その後、エクспанシンが細胞壁のゆるみ、すなわち細胞壁伸展性の増加を引き起こす活性をもつとして同定された (McQueen-Mason et al. 1992) ことにより、浮稲の深水条件下での急激な節間伸長にエクспанシンが関与している可能性が検討されるようになった。そして 1997 年に、キュウリエクспанシン (CsEXPA) に対する抗体によるイムノブロットを指標として、浮稲の節間から分子量 24.5 kD の 2 つの EXPA タンパク質が単離された (Cho and Kende 1997a)。この結果をうけて、次にこれらのイネ EXPA タンパク質と細胞

伸長の関連についての研究が行われた。CsEXPA に対する抗体によるイムノブロットに基づき、イネ EXPA は主に浮稲節間の分裂組織や伸長部位に存在していること、深水処理した節間の細胞壁は気中培養した節間の細胞壁に比べて多くのエクспанシンタンパク質を有することが見出された。また、深水処理した節間の細胞壁はイネ EXPA の作用に対する反応性が高いことも示された。以上の結果より、深水条件での急激な節間伸長にエクспанシンが関与している可能性が初めて示唆された (Cho and Kende 1997b)。

イネの α エクспанシン遺伝子 (EXPA) に関する研究も行われている。Scherban et al. (1995) によって 2 つのイネ EXPA の cDNA の全長が得られたのをはじめとして、イネ α エクспанシン遺伝子 (OsEXPA) の cDNA の配列が次々と決定された。Cho and Kende (1997b) によって OsEXPA1, Scherban et al. (1995) によって OsEXPA2 と OsEXPA3 が同定された。Cho and Kende (1997a) が単離した 2 つのイネ EXPA は、単離した段階で 1 つは OsEXPA1 によってコードされていることが明らかになり、もう 1 つは OsEXPA2 と相同性の高い遺伝子によってコードされていることが見出された。この後者の遺伝子は後に 4 番目の OsEXPA として同定された (OsEXPA4; Cho and Kende 1997c)。4 つの OsEXPA は子葉鞘, 根, 葉, 節間によって器官特異的に発現し、成長部位においては OsEXPA1, OsEXPA3, OsEXPA4 の高い発現がみられることが示され、これら 3 つの遺伝子の発現がみられる部位の細胞壁では、酸性条件によって

大きな伸長が誘導されることも示された。したがって、これら 3 つの遺伝子の発現はそれぞれの器官における伸長現象に関与している可能性が示唆されている。また、浮稲節間の急激な伸長を引き起こすジベレリン処理や深水処理においては、節間内で *OsEXPA4* の mRNA の蓄積が誘導されることも示されており、この遺伝子の発現と節間の急激な伸長との関係も注目されている。一方、*OsEXPA2* は非伸長部位で多く発現していることが示され、維管束系の分化や根毛の分化・成長との関連が示唆されている。最新の研究では *OsEXPA1-4* に加えて、イネの EST データベースおよびゲノムデータベースより新たに 22 個のイネ EXPA 遺伝子 (*OsEXPA5-26*) が同定され、それぞれの発現パターンが調査された (Lee and Kende 2002)。新たに同定された遺伝子のうち 5 つは節間や葉で発現しており、3 つは子葉鞘で、9 つは根で、それぞれの器官の成長部位で高レベルに発現していることが示された。EXPB についてもイネ EST データベースおよびゲノムデータベースから 14 個の遺伝子が同定され、浮稲での発現パターンが調査され、これらのうち 5 つの *EXPB* が節間で発現しており、成長部位で特に転写レベルが高いことが示された (Lee and Kende 2001)。

エクспанシンタンパク質の局在性やエクспанシン遺伝子の発現が成長と相関を示すのに対し、エクспанシンを過剰に発現させる試みでは予想とは反する結果が得られている。イネの α エクспанシン遺伝子である *OsEXPA4* の浮稲節間での転写量の増加は、ジベレリン処理あるいは深水による成長速度の増加よりも先に生

じる現象である (Cho and Kende 1997c) ことや深水条件下での子葉鞘の成長促進の際にも OsEXPA4 の mRNA の蓄積がみとめられる (Huang et al. 2000) ことに注目し, Choi et al. (2003) は OsEXPA4 が成長に重要なエクспанシンであることを前提として, 恒常的な発現を誘導するユビキチンプロモーターの制御下で *OsEXPA4* をイネ (cv Taipei 309) で過剰に発現させる試みを行った。その結果, *OsEXPA4* を含まないベクターのみを導入したコントロール植物と比べて, *OsEXPA4* を過剰に発現させた植物のうちで草丈が大きくなった個体は全体の 12%に過ぎず, 大部分はコントロールよりも小さくなった (Choi et al. 2003)。キュウリのエクспанシン遺伝子である *CsEXPA1* を導入し, 過剰に発現させたトマトでも, 同様に成長阻害が生じたことが報告されている (Rochange et al. 2001)。

以上のように, 浮稻のエクспанシンに関してかなりの情報が得られているものの, その多くはエクспанシン遺伝子の発現に関連している。それぞれの組織の成長部位で高レベルに発現しているエクспанシン遺伝子が存在することは, 組織の成長, すなわち細胞伸長に不可欠な細胞壁の伸展にそれらのエクспанシンが関与していることを示唆している。しかしながら, エクспанシン遺伝子を導入した植物体の成長にみられるように, 単にエクспанシタンパク質の量が増加しただけで細胞の伸長成長が促進されるとは限らず, エクспанシンが媒介する細胞壁伸展は, 実際にはより複雑な制御下にある可能性が強い。したがって, エクспанシン

による細胞壁伸展の調節を明らかにするには、個々のエクспанシンに注目した発現量の調査に加えて、それら全てのエクспанシンの作用の総体としてのエクспанシン活性を考慮すべきである。

本研究は、実際に成長が起きている部位において、総体としてのエクспанシン活性とエクспанシンに対する細胞壁の反応性をそれぞれ調査し、浮稲節間の伸長調節におけるエクспанシンの役割を明らかにすることを目的とした。第1章では、深水条件下の茎切片の節間と気中培養した茎切片の節間それぞれにおいて、酸性条件下での節間組織の伸長、細胞壁の酸による伸展（内生のエクспанシンが媒介する細胞壁伸展）、エクспанシン活性、エクспанシンに対する細胞壁の反応性を調査し比較することで、浮稲節間の深水条件下での急激な伸長におけるエクспанシンの関与について検討した。第2章では、深水条件から空気中に移した茎切片の節間と深水条件下に維持した茎切片の節間とで同様の調査を行い、それらと節間伸長速度の変化との関係を検討することにより、浮稲節間の伸長調節におけるエクспанシンの役割について考察した。また、このときの節間細胞壁の組成の変化を分析し、エクспанシンに対する細胞壁の反応性と壁構造との関係を検討した。第3章においても細胞壁のエクспанシンに対する反応性と壁構造の関係について調査を行い、特に細胞壁中におけるフェノール化合物の蓄積がエクспанシンに対する細胞壁の反応性に及ぼす影響について検討した。

第 1 章

浮稲の節間伸長における酸が誘導する成長とエクспанシンの作用の関与

緒言

浮稲節間の成長部位において発現しているエクспанシン遺伝子は多数報告されており、それらの遺伝子のいくつかは深水条件やジベレリンの投与によって発現が上昇することが見出されている (Cho and Kende 1997c, Lee and Kende 2001, Lee and Kende 2002)。これらの結果は、深水条件下での節間伸長にエクспанシンが関与している可能性を示唆するが、これらの遺伝子の産物であるそれぞれのエクспанシンタンパク質が細胞壁のゆるみ（細胞壁伸展性の増加）を導く作用を実際に有しているのかについては未だに明らかではない。さらに、エクспанシンが深水条件下での節間伸長に関与しているとする、節間組織の伸長は酸性条件下で促進されると考えられるが、それを実証した研究はまだない。

そこで、本章ではまず、深水条件下で培養した茎切片の節間と気中で培養した茎切片の節間それぞれにおいて、酸性条件下での節間組織の伸長を調査し、深水条件下での節間伸長にエクспанシンが関与している可能性について検討した。次に、それぞれの節間における酸による細胞壁の伸展性を比較し、エクспанシンが媒介する細胞壁の伸展にどのような差がみられるかについて調査した。最後に、その細胞壁伸展性の差を生じさせる要因を検討するため、細胞壁タンパク質中のエクспанシン活性とエクспанシンに対する細胞壁の反応性を調査した。

材料と方法

植物材料

浮稲 (*Oryza sativa* L. cv. Habiganj Aman II) の穎果を次亜塩素酸ナトリウムおよび少量の Tween 20 を含む消毒液に 30 分間浸した後、水道水に浸して 27°C・暗所で吸水させ、2 日後に播種した。篩った土 10 ℓ に対して化成肥料 (N:P:K = 8:8:8) を 15 g 加えてよく混合したのち、穴付きのポット (1 ℓ プラスチックビーカー) 8 個に均等に入れて圧縮し、ポット当たり 2 粒あるいは 4 粒を播種した。播種後、細かく篩った土をポット当たり 100 ml ずつ加えてならした後に圧縮し、畑状態で栽培した。約 7 葉期 (播種後およそ 1 か月後) に、24 ℓ コンテナに移植した。コンテナ当たり 8-8-8 化成肥料 12.5 g を施肥し、2 ポットずつ移植して湛水状態で栽培した。播種後 2-3 か月後の植物体の主稈および分げつを、上位から数えて第二節の下部 2 cm, 上部 18 cm の部位で切断し、最上位節間を含む長さ 20 cm の茎切片を作成した (Raskin and Kende 1984a)。

茎切片の深水処理

茎切片を 100 ml プラスチックビーカーに立て、ガラスビーズで固定した後、蒸留水で満たした容量 1 ℓ のシリンダ (深さ 50 cm, 内径 5 cm) 内に沈めた (深水処理)。対照として、茎切片を立てたプラスチックビーカーに 30 ml の蒸留水を加え、その

ビーカーを上述したシリンダ内あるいは高さ 60 cm, 内径 20 cm のシリンダ内に固定し, そのシリンダをエチレンフリーの加湿空気を通気した (気中培養)。エチレンフリーの加湿空気は, KMnO_4 でコートしたアルミナ (2-4 mm) をつめた長さ 20 cm のカラム内を通過させた空気を水中でバブリングさせることによって得た (Azuma et al. 2003)。これらの茎切片を 27°C , $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の蛍光灯下で 3 日間培養を行った。

節間切片の伸長の測定

深水処理した茎切片中の節間組織の基部 2 cm の切片を切り出した。その切片を紙やすりで穏やかにアブレイドした後, 回転角度計 (MODEL 1608 ; Shinko Denki, Kobe), トランスデューサー (MD-3000 ; Shinko Denki) とそれに接続したコンピューター (Dimension 4500C ; DELL) を用いて切片の伸長成長を連続的に測定した (図 1.1)。節間切片を 50 mM 3,3-ジメチルグルタル酸 (3,3-DMGA) / NaOH 緩衝液, pH 7.0 中で 30 分間伸長させた後に, 緩衝液を pH 4.5-7.0 の同緩衝液に交換し, 切片の伸長量を測定した。

節間組織の酸が誘導する成長反応についての調査には, 深水処理あるいは気中培養した茎切片中の節間組織の基部 5 cm から 1 cm ずつの切片を切り出して測定に供した。また, 深水処理した茎切片については, 節間組織の最上部 1 cm の切片も切り出した。それらの切片を穏やかにアブレイドした後, 上述した伸長測定装置を用い

て切片の伸長成長を連続的に測定した。節間切片を 50 mM 3,3-DMGA / NaOH 緩衝液, pH 7.0 中で 30 分間伸長させた後, 緩衝液を pH 5.5 の同緩衝液に交換し, 切片の伸長量を測定した。

節間細胞壁の酸による伸展の測定

深水処理あるいは気中培養した茎切片中の節間組織の基部 5 cm を 1 cm ずつの切片に分けて切り出した。また, 深水処理した茎切片については, 節間組織の最上部 1 cm の切片も切り出した。これらの 1 cm 切片を液体窒素で凍結し, -35°C で保存し, 細胞壁伸展の測定および後述するエクспанシン活性やエクспанシンに対する細胞壁の反応性の測定に供した。

細胞壁伸展の測定は, Cosgrove (1989) の方法を参考にして行った。凍結した切片 (長さ 1 cm) の表層を紙やすりでアブレイドした。次に, 節間切片を幅 2 mm となるよう縦方向に切断し, 2 枚のガラス板でプレスした。この節間切片 (長さ 1 cm, 幅 2 mm) を, 角変位トランスデューサーを備えた細胞壁伸展測定装置に固定し, それに接続したコンピューターを用いて細胞壁の伸展 (クリープ) を連続的に測定した (図 1.2)。測定中, 節間切片に対して 10 g の一定張力を与えた。

酸が誘導する細胞壁の伸展の測定は, 以下のように行った。前処理として節間切片を 50 mM N-[2-ヒドロキシエチル] ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸] (Hepes) / Hepes-ナトリウム緩衝液, pH 6.8 中で 20 分間伸展させた後, 緩衝液を 50 mM 酢酸

ナトリウム緩衝液, pH 4.5 に交換して細胞壁の伸展を測定した。

節間細胞壁タンパク質中のエクспанシン活性の測定

Cosgrove and Li (1993) の方法を参考にして、節間細胞壁タンパク質を抽出した。

長さ 1 cm の節間切片 20 個に 1 ml の緩衝液 A (15 mM リン酸ナトリウム, pH 6.0) を加えてホモジナイズした。そのホモジネートを 5 分間遠心分離した。得られたペレットを緩衝液 A による懸濁および遠心分離で 3 回洗浄した。洗浄後のペレットを 1 ml の緩衝液 B (50 mM Hepes, pH 7.0, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 0.2 mM sodium bisulfite を含む) で懸濁し、4°C で 1 時間静置して細胞壁タンパク質を可溶化した。15 分毎に穏やかに混和し、懸濁状態を保った。その後遠心分離を行い、上澄みを集めて 4°C で保存した。遠心分離は全て 4°C, 8500 g で行った。細胞壁タンパク質の定量は、牛血清アルブミン (BSA) をスタンダードとしてブラッドフォード法 (Bradford 1976) で行った。

節間細胞壁タンパク質中のエクспанシン活性の測定は、検定植物材料として播種 4 日後の黄化キュウリ胚軸の先端 1cm 部分を用いて行った。検定植物に浮稲ではなくキュウリを用いたのは、キュウリ胚軸細胞壁がエクспанシンに対してより強く反応するからである (Cho and Kende 1997a)。凍結したキュウリ胚軸を紙やすりでアブレイドし、1 分間ボイルして内生の細胞壁タンパク質を失活させた。この胚軸切片を上述した細胞壁伸展測定装置に固定し、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH 4.5

中で 20 分間細胞壁を伸展させた後、前処理の緩衝液を、イネ節間細胞壁タンパク質を含む同緩衝液に交換して細胞壁伸展を測定した。

エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性の測定

エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性の測定は、播種 4 日後の黄化キュウリ胚軸の先端 4 cm 部分から抽出した細胞壁タンパク質を用いて行った。細胞壁の反応性の測定に浮稲由来のタンパク質ではなくキュウリ由来のタンパク質を用いたのは、キュウリ胚軸から抽出した細胞壁タンパク質の方が、浮稲節間から抽出した細胞壁タンパク質よりも、イネ細胞壁に与えたときのエクспанシン活性が高いからである (Cho and Kende 1997a)。ボイルして内生の細胞壁タンパク質を失活させた節間切片を上述した細胞壁伸展測定装置に固定し、前処理を行った後、キュウリ胚軸由来の細胞壁タンパク質を含む同緩衝液に交換して細胞壁伸展を測定した。

キュウリ胚軸の細胞壁タンパク質の抽出は以下のように行った。キュウリ (*Cucumis sativus* L. cv. Jihai-kyuri) 種子を湿らせたバーミキュライト上に播種し、実生の地上部の長さが 5 cm 以上に達する (およそ播種 4 日後) まで 27°C・暗所で栽培し、胚軸先端 4 cm 部分を切り出して液体窒素で凍結して -35°C で保存した。胚軸切片約 80 本に緩衝液 A を 4 ml 加えてホモジナイズし、洗浄後のペレットを 2 ml の緩衝液 B で懸濁した。懸濁液を上述したように静置して細胞壁タンパク質を可溶化したのち、遠心分離後の上澄みを 4°C で保存した。

結果

節間組織の酸による伸長

3日間深水処理した茎切片の伸長中の節間組織の基部2 cmの切片を用いて、節間の伸長に及ぼすpHの影響を調査した。pH 7.0の緩衝液で30分間前培養を行った後に、pH 4.5-7.0の緩衝液に交換し、節間組織の伸長を30分間連続的に測定した。節間伸長はpH 6.0以下で促進され、pH 5.5の弱酸性の条件下で最大の節間伸長がみられた(図 1.3)。このpHを節間伸長の最適なpHとみなし、次に深水処理した茎切片の節間と気中培養した茎切片の節間とで酸性条件下の伸長量を比較した。これらの茎切片に含まれる節間組織は、3日間の培養によって深水処理では 70.4 ± 2.7 mm (n=18)、気中培養では 1.8 ± 0.2 mm (n=17)伸長した。培養後の茎切片の節間組織基部0~5 cmから長さ1 cmの節間切片を切り出し、pH 5.5での伸長量を上記と同様の方法で測定し、部位別に比較した。また深水処理した節間では、深水処理を行う前から存在していた部位として最上部1 cmから切り出した節間切片の酸性条件下での伸長量も測定した。気中培養した節間では、基部の0-2 cmから得た切片が酸性条件下でごくわずかに伸長したのみであったのに対し、深水処理した節間では基部0-4 cmから得た切片において伸長がみられ、特に0-2 cm部分の切片の伸長は、気中培養した節間から得た切片の伸長と比較して非常に大きかった(図 1.4)。

節間細胞壁の酸による伸展

次に、節間細胞壁の酸が誘導する伸展を調査した。3 日間深水処理あるいは気中培養した茎切片の節間から得た切片を凍結および解凍し、細胞を破壊して膨圧の影響を除去することで、細胞壁伸展を測定するための切片を得た。この切片に 10 g の一定張力を与え、前培養として 50 mM Hepes / Hepes ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) 中で 20 分間伸展させた後、緩衝液を 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) に交換して 30 分間の細胞壁伸展量を測定し、部位別に比較した (図 1.5)。深水処理した節間では、深水処理中に新たに生じた部位である基部 0-5cm において高い細胞壁伸展性が認められ、基部 0-1 cm の部位の細胞壁伸展性が最も高く、基部から遠ざかるにつれて減少した。一方、気中培養した節間では、基部の 0-1cm のみで他の部位に比べて高い細胞壁伸展性がみられた。深水処理した節間と気中培養した節間を比較すると、いずれの部位でも酸による細胞壁伸展性は深水処理した節間の方が高かった。

節間細胞壁タンパク質のエクспанシン活性およびエクспанシンに対する細胞壁の反応性

深水処理した節間および気中培養した節間の細胞壁の酸による伸展性 (図 1.4) は、内生のエクспанシン活性とエクспанシンに対する細胞壁の反応性とによって調節されていると考えられる。そこで、次に節間細胞壁タンパク質中のエクспа

ンシン活性と、エキスパンシンに対する節間細胞壁の反応性を分けて測定し、細胞壁の酸による伸展性に対するそれぞれの寄与を調査した。

節間細胞壁の酸による伸展性の調査と同様に、深水処理した節間および気中培養した節間から長さ 1 cm の節間切片を作成し、それらの節間切片から細胞壁タンパク質を抽出した。細胞壁タンパク質量を切片あたりで比較すると、深水処理した節間と気中培養した節間との間には全ての部位で有意な差はみられなかった（図 1.6）。部位別での変化は、どちらの節間も基部 0-1 cm で細胞壁タンパク質量が最も多く、1-5 cm の各部位では一定量を保っていた。深水処理した節間の最上部 1 cm の部位では、節間基部 0-1 cm に次いで細胞壁タンパク質量が高かった。

これら節間細胞壁から抽出したタンパク質中のエキスパンシン活性の調査を試みた。まず、細胞壁タンパク質の抽出に用いた塩化ナトリウムがエキスパンシン活性にどの程度の影響を及ぼすのかについて検討するため、塩化ナトリウムを投与した条件での酸による節間細胞壁の伸展量を測定した（図 1.7）。塩化ナトリウム濃度の上昇に伴って酸による細胞壁伸展性は減少した。節間細胞壁タンパク質中のエキスパンシン活性を測定する際に、細胞壁タンパク質の抽出液と酸性緩衝液（この場合は 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4.5）を等量混合して測定に供した場合、混合後の緩衝液中の塩化ナトリウム濃度は 0.5 M となる。その条件下でエキスパンシンが媒介する細胞壁の伸展量は、塩化ナトリウムが存在しない場合と比較して、約 25%減少することが予想される（図 1.7）。この程度の阻害は、深水処理した節間と

気中培養した節間それぞれから抽出した細胞壁タンパク質中のエクспанシン活性を比較する上で重大な問題とはならないと判断し、上記の方法によって節間細胞壁タンパク質中のエクспанシン活性を測定することとした。

次に、ボイルすることによって内生の細胞壁タンパク質を失活させたキュウリ胚軸に、酸性条件下で浮稲節間細胞壁タンパク質を（10 μ g）与えることにより誘導される細胞壁伸展量を測定し、それをエクспанシン活性とした。測定の結果を図 1.8 に示す。節間細胞壁のエクспанシン活性は、深水処理した節間と気中培養した節間とで有意な差がなく、両節間共に基部 0-1 cm で最も高く、基部から遠ざかるにつれて徐々に減少した。

節間細胞壁の酸による伸展は、エクспанシンに対する細胞壁の反応性によっても調節されると考えられる。そこで、深水処理あるいは気中培養をした茎切片から、細胞壁伸展性を調査した実験と同様に長さ 1 cm に切り出し、凍結および解凍して調製した節間切片のエクспанシンに対する細胞壁の反応性を調査した。ボイルによって内生のエクспанシンを失活させた節間切片に、キュウリ胚軸由来の細胞壁タンパク質を酸性条件下で与えることによって誘導される細胞壁の伸展量を測定し、エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性とした（図 1.9）。気中培養した節間と比較して、深水処理した節間の基部の 0-4 cm の部位でエクспанシンに対する細胞壁の反応性が高かった。

考察

深水条件下の急激な節間伸長におけるエクспанシンの関与

深水条件下で伸長中の節間組織は、弱酸性条件 (pH 5.0-5.5) に反応してその伸長が促進され (図 1.3), 最適な pH の下での節間切片の伸長量を深水処理あるいは気中培養した茎切片の節間組織で比較した結果, 深水条件下の節間は酸に反応して伸長する部位が拡大し, その伸長量も増大していることが見出された (図 1.4)。このときの酸が誘導する細胞壁の伸展性 (内生のエクспанシンが媒介する細胞壁の伸展性) もまた, 気中培養した節間に比べて深水処理した節間の方が調査したすべての部位で高かった (図 1.5)。これらの結果は, 浮稲節間の深水条件下の急速な伸長がエクспанシンの作用によって媒介されている可能性を示唆する。

酸が誘導する節間組織の伸長は, 実質的には深水処理した節間の基部 0-2 cm のみでみられた (図 1.4) のに対し, 酸が誘導する節間細胞壁の伸展は, その程度には幅があるものの, 深水処理した節間および気中培養した節間の調査した部位すべてで認められた (図 1.5)。また, 本研究の結果, 節間切片の伸長に最適な pH は 5.5 であった (図 1.3) が, 節間細胞壁の伸展は, 中性条件下での伸展に比べて, pH 4.5 あるいはそれ以下で有意に促進されることが報告されている (Cho and Kende 1997a)。このように, 節間組織と細胞壁それぞれの伸長能力の部位別の分布, そして pH 依存性は異なっているが, その差が生じた理由として以下のことが挙げられる。節間

細胞壁の伸展は十分な張力を与えて測定したため、その伸展量は細胞壁が持つ潜在的な伸展能力を表すと考えられる。対照的に、節間組織の伸長量の測定の際には細胞は膨圧を保持しており、張力を与えずに伸長量を測定した。すなわち、この方法によって測定されるのは、細胞の浸透ポテンシャルと細胞壁伸展性によって決定される節間組織の成長能力である。これらの違いによって、酸が誘導する節間組織の伸長の部位による変化や pH 依存性が、酸が誘導する細胞壁伸展性のそれらと完全に一致しないという結果がもたらされたのかもしれない。

深水処理した茎切片の節間と気中培養した茎切片の節間の細胞壁の酸による伸展性の差（図 1.5）をもたらす原因の候補として、節間細胞壁中のエクспанシン活性を比較したが、節間細胞壁タンパク質量（図 1.6）や細胞壁タンパク質中のエクспанシン活性（図 1.8）に差はみられなかった。一方、Cho and Kende (1997b) は、キュウリエクспанシン（CsEXPA1）に対する抗体をプローブとして用いたイムノブロットによって、深水処理した節間および気中培養した節間のエクспанシンタンパク質量を調査し、エクспанシンに対する細胞壁の反応性に加えて、エクспанシンタンパク質量もまた細胞壁の伸展性の調節に関係していると報告した。確かに CsEXPA1 抗体は少なくとも 2 つのイネの EXPA タンパク質を認識することは示されている（Cho and Kende 1997a）が、浮稲節間では少なくとも 5 つの EXPA 遺伝子および 8 つの EXPB 遺伝子が発現しており（Lee and Kende 2001, 2002）、CsEXPA1 抗体がそれらを認識することができるかについては明らかではない。また、Cho and

Kende (1997b) によるイムノブロットの結果では、エクспанシンタンパク質は深水処理した節間および気中培養した節間の基部 1 cm のみに限られており、一方 EXPA および EXPB 遺伝子のいくつかは節間基部 1 cm だけでなく、他の部位でも発現することが報告されており (Lee and Kende 2001, 2002), 本研究においてもそれらの部位でのエクспанシン活性がみられた (図 1.8)。したがって、キュウリエクспанシンに対する抗体を用いたイムノブロットに基づいたエクспанシンタンパク質量は、必ずしもエクспанシン活性の確かな指標にはならないといえるだろう。

エクспанシンに対する細胞壁の反応性は、深水処理した節間の方が気中培養した節間に比べて基部 0-4 cm の広い範囲で高かった (図 1.9)。したがって、深水条件下で伸長中の節間の高い細胞壁伸展性は、エクспанシン活性によってよりも、主にエクспанシンに対する細胞壁の反応性によって調節されていることが示唆される。また、深水処理した節間のエクспанシンに対する細胞壁の反応性が高かった部位は、深水条件下の節間の伸長部位とおおよそ一致する。したがって、深水条件下での急激な節間伸長において、エクспанシンに対する細胞壁の反応性が重要な役割を担っている可能性が示唆される。この可能性について、第 2 章でさらに検討した。

エクспанシンに対する反応性を調節する因子

エクспанシンに対する細胞壁の反応性を調節する因子の 1 つとして考えられる

のは、細胞壁を構成する多糖類の組成である。エクспанシンは、細胞壁のセルロースとヘミセルロースとの間の水素結合を切断することによって細胞壁の伸展を誘導すると考えられている (McQueen-Mason and Cosgrove 1994) ため、ヘミセルロースの組成の変化がエクспанシンに対する細胞壁の反応性の変化をもたらすかもしれない。Azuma et al. (1996) は、深水条件下で急速に伸長中の節間と空気中でゆるやかに伸長中の節間において細胞壁の組成を部位別に分析した。深水処理した節間および気中培養した節間のいずれも、節間の伸長部位に相当する領域では、非セルロース性中性糖のうちでグルコースの占める割合が最も高く、それは本研究でエクспанシンに対する細胞壁の反応性が高かった部位 (図 1.9) にほぼ一致している。一方、すでに伸長を終えた領域ではキシロースの占める割合が高く、そのような部位ではエクспанシンに対する細胞壁の反応性が低かった (図 1.9)。したがって、これらの構成多糖成分の変化が、エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性を調節する可能性が示唆される。この可能性について、第 2 章でさらに検討した。

もう 1 つの候補としてあげられるのは、細胞壁中のフェノール酸化合物である。イネ科植物細胞壁には、フェルラ酸や *p* クマル酸といったフェノール酸化合物がかなりの量存在し、それらはマトリックス多糖類とエステル結合している (Harris and Hartley 1976 ; Shibuya 1984)。フェルラ酸はペルオキシダーゼのカップリング反応によってジフェルラ酸へと変化し、その反応によって細胞壁マトリックスの架橋が形成され、細胞壁伸展性の減少が導かれると考えられている (Fry 1986)。Azuma et al.

(2005a) は、2 日間深水処理あるいは気中培養した茎切片の節間細胞壁中の *p* クマル酸、フェルラ酸、ジフェルラ酸の分布を部位別に調査した。節間細胞壁におけるこれらのフェノール酸化合物の蓄積がみられた部位は、エクспанシンに対する細胞壁の反応性が低かった部位とおよそ一致したことから、両者の間の相関が示唆される。これについては第 2 章および第 3 章でさらに検討を行った。

深水条件下での浮稲節間の急激な伸長と酸成長仮説との関係

本研究において、深水条件下の浮稲茎切片の節間から得た切片の伸長が酸性条件によって促進されること (図 1.3)、深水処理した節間は気中培養した節間よりも酸性条件下での組織の伸長能力 (図 1.4) および細胞壁の酸による伸展性 (図 1.5) が高いことが示された。これらの結果および節間細胞壁の伸展性は酸性条件によって増大すること (Cho and Kende 1997a) から、深水条件下での浮稲節間の急激な伸長反応は、酸成長仮説が提案する細胞伸長のメカニズムに基づく現象である可能性が考えられる。

Rayle (1973) によって提案された酸成長仮説は、植物の細胞伸長のメカニズムを説明する考えである。この仮説では、オーキシンがアポプラストの酸性化を導き、それは原形質膜内の H^+ -ATPase 量の増加に起因する現象であると考えられている (Hager et al. 1991)。そして、アポプラストの酸性化は細胞壁のゆるみを引き起こし、吸水による細胞伸長が可能となると考えられている。Rayle and Cleland (1992) によ

れば、酸成長仮説を支持する証拠は、(1) 細胞伸長を導く植物ホルモンであるオーキシシンを与えた茎切片や幼葉鞘切片では、オーキシシンによってアポプラストへとプロトンが排出され、その結果アポプラスト水の pH が低下すること、(2) オーキシシンに反応して伸長する組織を酸性緩衝液で処理するとオーキシシンによる伸長に匹敵する、あるいはそれを上回る速度の細胞伸長が誘導されること、(3) 中性緩衝液をアポプラストに浸透させるとオーキシシンによる成長が阻害されること、(4) 菌類が持つ毒素であるフシコクシンはアポプラストを強く酸性化する作用を持ち、これによっても急速な細胞伸長が引き起こされること、の4点にまとめられている。そして、酸性条件下で細胞壁のゆるみを導く作用を持つ細胞壁タンパク質として発見されたエクспанシンは、酸成長仮説で提案されている細胞伸長のメカニズムを媒介する因子と考えられている (Cosgrove et al. 2002, Hager 2003)。深水処理した節間は気中培養した節間よりもエクспанシンに対する細胞壁の反応性が高かったこと (図 1.9) から、深水条件下での急激な節間伸長にエクспанシンが関与している可能性は高いと考えられ、この点からも深水条件下での浮稲節間の急激な伸長反応は、酸成長仮説が提案する細胞伸長のメカニズムに基づく現象である可能性が考えられる。

しかしながら、酸成長仮説はオーキシシンを起点とする反応鎖によって誘導される細胞伸長メカニズムであり、現在のところ、深水条件下での節間伸長におけるオーキシシンの役割は不明であり、オーキシシンを単独で投与しても茎切片の節間伸長は促

進されない (Azuma 1990)。また、深水条件によって細胞壁の酸性化が促進されるのか、あるいは原形質膜 H^+ -ATPase 量が増加するのか、ということも明らかではない。これらの調査を通じて、深水条件下の節間伸長におけるエクспанシンの関与をより検討する必要があるだろう。

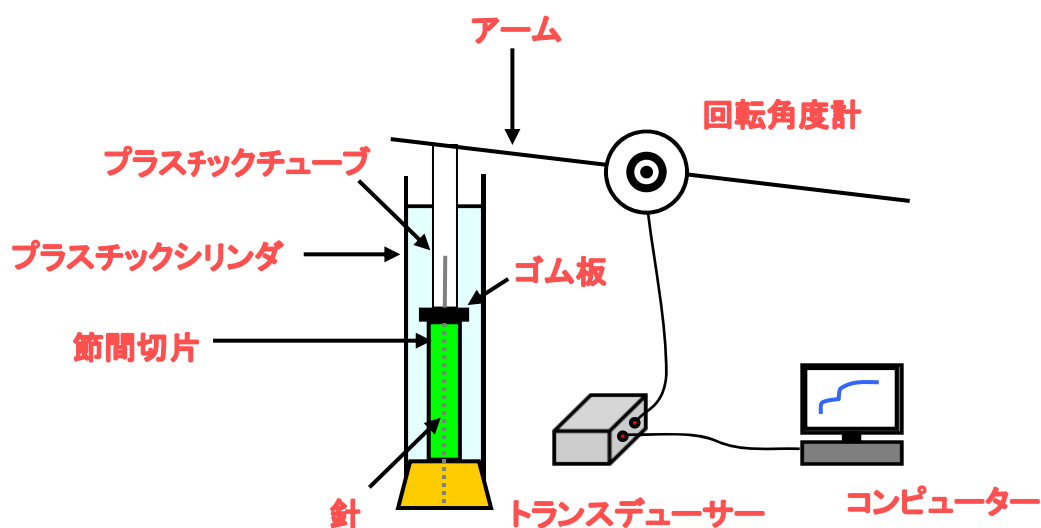


図1.1 節間組織の伸長を連続的に測定する装置の模式図

最上位節間を含む茎切片から切り出した節間切片（長さ 1-2 cm）を測定に供する。プラスチックシリンダ（深さ 5 cm，内径 1 cm）の底にゴム栓をとりつけ，そのゴム栓に針を通し，節間切片を固定する心棒とする。節間切片の中空部に針を通し，切片上端にゴム板を置き，さらにその上にプラスチックチューブ（ストロー）を置き，シリンダ内を緩衝液で満たす。節間切片の伸長に伴ってプラスチックチューブが押し上げられ，プラスチックチューブに接したアームが回転する。このアームの回転角度を回転角度計，トランスデューサー，コンピューターで記録し，アームの回転角度に基づいて節間切片の伸長量をN88BASIC言語によるプログラムによって算出する。

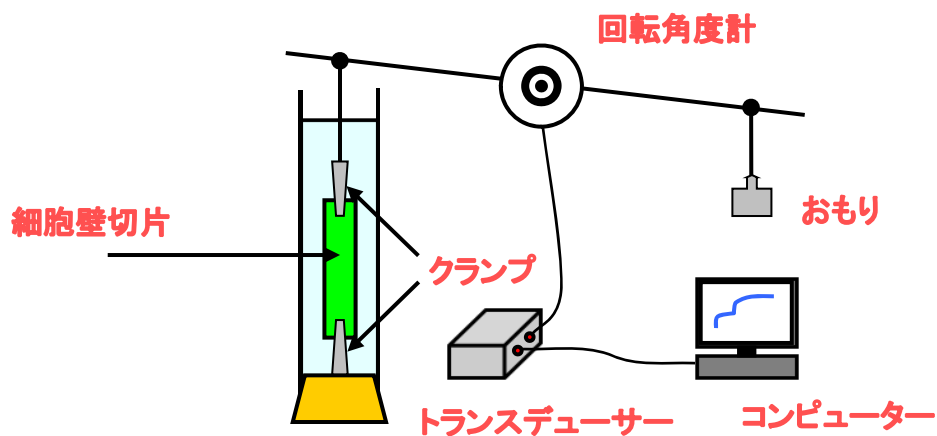


図1.2 節間細胞壁の伸展を連続的に測定する装置の模式図

最上位節間を含む茎切片から節間切片を切り出し、それを凍結および解凍して得た細胞壁切片（長さ 1 cm，幅 2 mm）を測定に用いる。切片を、中央部 5 mmを残してクランプで挟んで固定し、緩衝液に浸し、おもり（10 g）で張力を与えることによる切片の伸びを細胞壁伸展量として測定する。細胞壁の伸展に伴うアームの回転角度を角変位センサー，トランスデューサー，コンピューターで記録し，アームの回転角度に基づいて細胞壁の伸展量をN88BASIC言語によるプログラムによって算出する。

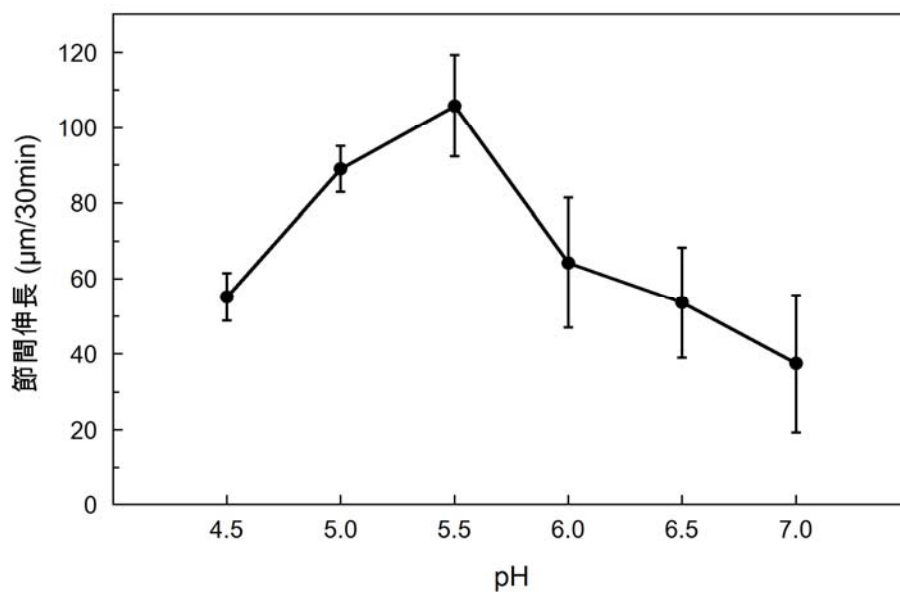


図1.3 節間伸長のpH依存性

3日間深水処理した茎切片の伸長中の節間組織から基部2 cmの切片を切り出し、図1.1に示した装置を用いて節間伸長のpHによる変化を測定した。切片を3,3-DMGA / NaOH緩衝液 (pH 7.0) 中で30分間伸長させた後に、緩衝液をpH4.5から7.0の同組成の緩衝液に交換し、30分間の伸長量を測定した。3反復の平均値と標準誤差を示す。

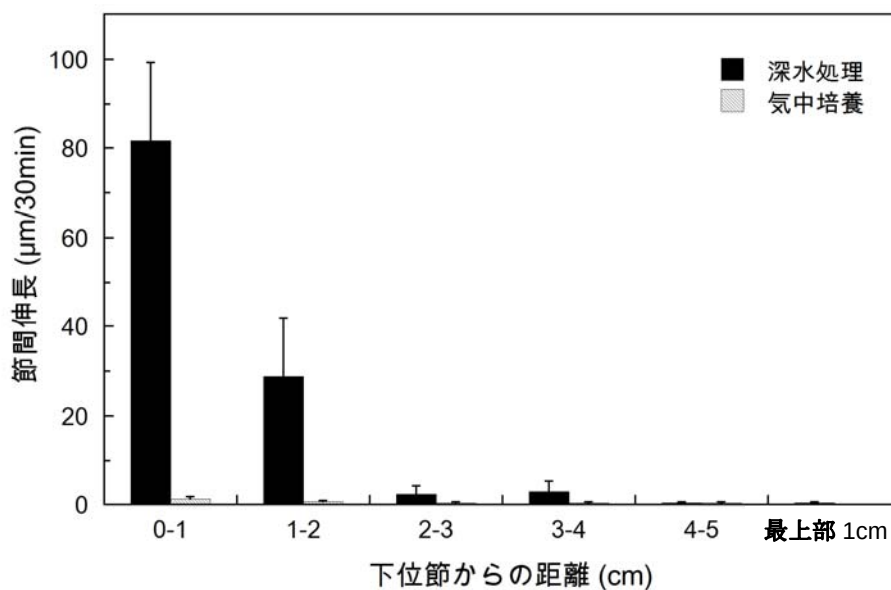


図1.4 深水処理した節間と気中培養した節間の酸性条件中での伸長能力の比較

3日間深水処理あるいは気中培養した茎切片の節間から、部位別に長さ1 cmの切片を切り出し、酸性条件中での伸長量を比較した。深水処理した茎切片からのみ、処理前から存在していた節間の最上部1 cmからも切片を作成した。図1.1に示した測定装置を用いて、切片を3,3-DMGA / NaOH緩衝液 (pH 7.0) 中で30分間伸長させた後に、緩衝液をpH5.5の同組成の緩衝液に交換し、切片の30分間の伸長量を測定した。3反復の平均値と標準誤差を示す。

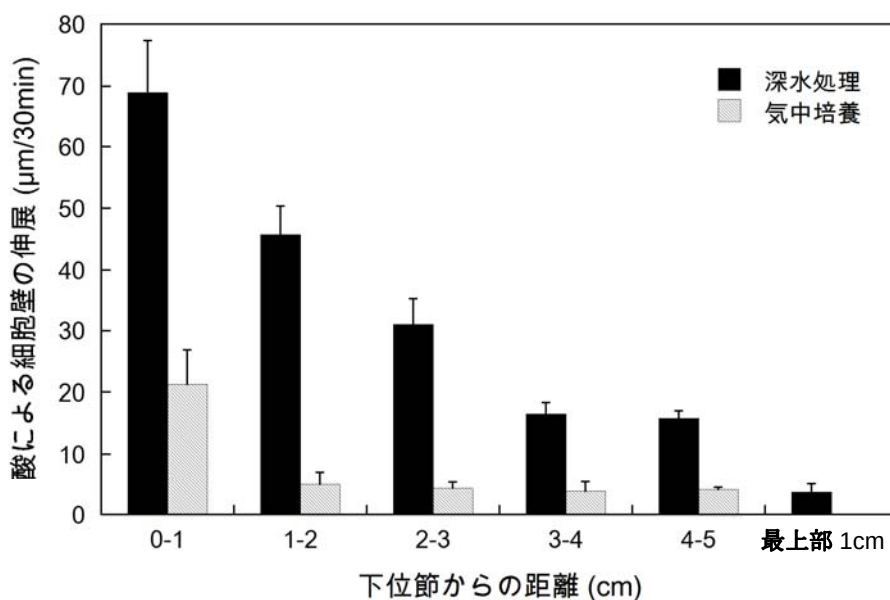


図1.5 深水処理した節間と気中培養した節間における酸による細胞壁の伸展の比較

3日間深水処理あるいは気中培養した茎切片の節間から、部位別に長さ1 cmに切り出し、凍結および解凍して調製した切片を用いて、深水処理した節間と気中培養した節間の細胞壁の酸による伸展性を比較した。図1.2に示した測定装置を用いて切片を50 mM Hepes / Hepes-ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) 中で20分間伸展させた後、緩衝液を50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) に交換して30分間の細胞壁の伸展量を測定した。測定は10 gの張力を与えて行った。3反復の平均値と標準誤差を示す。

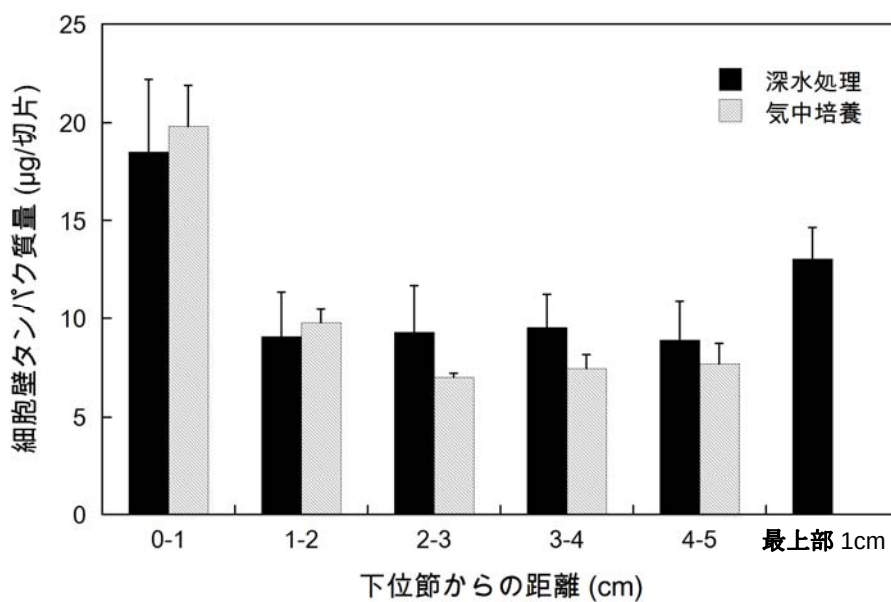


図1.6 深水処理した節間と気中培養した節間の細胞壁タンパク質量の比較

図1.5と同様に節間から部位別に調製した切片中の細胞壁タンパク質を1 M NaClで抽出し、切片あたりの含量を算出し、深水処理した節間と気中培養した節間の細胞壁タンパク質量を比較した。3反復の平均値と標準誤差を示す。

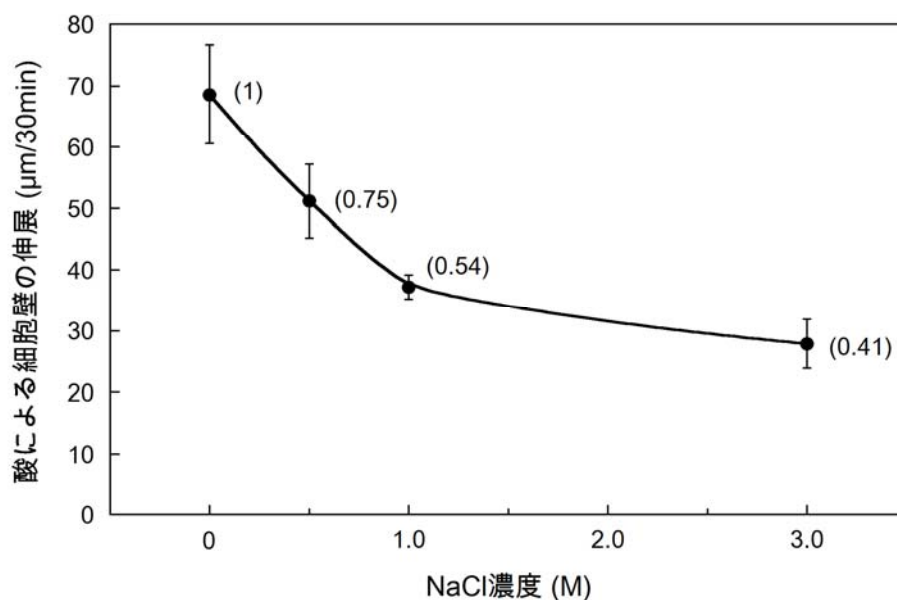


図1.7 エクспанシン活性に及ぼすNaClの影響

3日間深水処理した茎切片の節間の基部 1 cm から細胞壁伸展測定用の切片を調製した。切片を図1.2に示した測定装置を用いて、50 mM HEPES / HEPES-ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) 中で20分間伸展させた後、緩衝液をNaClを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) に交換して30分間の細胞壁の伸展量を測定した。測定は10 gの張力を与えて行った。3反復の平均値と標準誤差を示す。カッコ内の数字は、NaClを与えない条件での酸が誘導する節間細胞壁伸展量を基準とした各々の濃度のNaCl存在下での細胞壁伸展量の割合を示す。

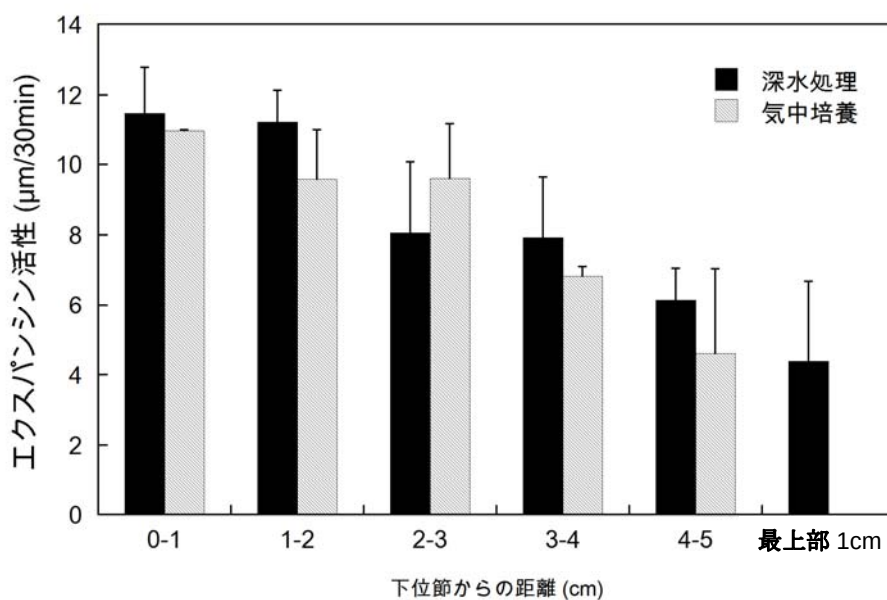


図1.8 深水処理した節間と気中培養した節間の細胞壁タンパク質中のエクспанシン活性の比較

図1.5と同様に節間から部位別に調製した切片から抽出した細胞壁タンパク質中のエクспанシン活性を調査した。熱処理によって内生のエクспанシンを失活させた黄化キュウリ胚軸の先端 1 cm 切片をエクспанシン活性の検定材料に用いた。図1.2に示した測定装置を用いてこの胚軸切片を50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 中で20分間伸展させた後に、緩衝液を各部位の節間細胞壁タンパク質10μgを含む同緩衝液に交換し、その後30分間の細胞壁伸展量を測定し、エクспанシン活性とみなした。測定は10 gの張力を与えて行った。3反復の平均値と標準誤差を示す。

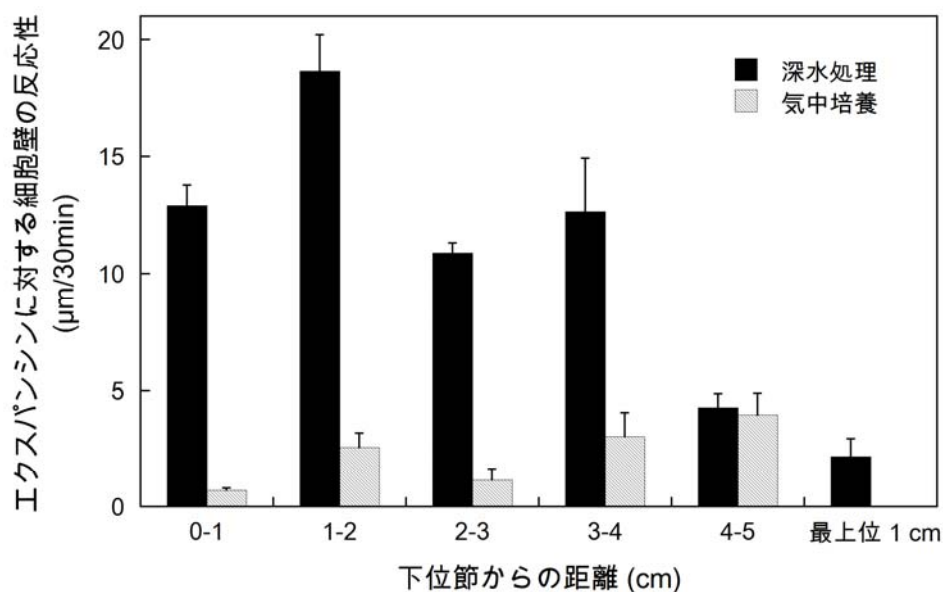


図1.9 深水処理した節間と気中培養した節間におけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性の比較

図1.5と同様に節間から部位別に調製した切片におけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性を調査した。熱処理によって内生のエクспанシンを失活させた節間切片を、図1.2に示した測定装置を用いて50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 中で20分間伸展させた後に、緩衝液を黄化キュウリ胚軸の先端4 cm切片から抽出した細胞壁タンパク質200μgを含む同緩衝液に交換し、その後30分間の細胞壁伸展量を測定し、エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性とみなした。測定は10 gの張力を与えて行った。3反復の平均値と標準誤差を示す。

第 2 章

エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性と壁構造との関係

緒言

第1章では、深水処理あるいは気中培養した浮稲茎切片中の節間の部位別での細胞壁の酸による伸展性、細胞壁タンパク質のエクспанシン活性、エクспанシンに対する細胞壁の反応性を調査し、深水条件下の急速な節間伸長が、内生のエクспанシン活性の変化によってよりもエクспанシンに対する細胞壁の反応性の変化によってもたらされている可能性を示唆する結果を得た（図 1.5, 1.8, 1.9）。本章では、深水処理後に空気中に移した茎切片と、深水処理を続けた茎切片それぞれの節間伸長の経時的な変化、そしてその細胞壁の酸による伸展性、エクспанシン活性、エクспанシンに対する細胞壁の反応性の経時的な変化を調査し比較することによって、エクспанシンが関与する節間伸長の調節のメカニズムについてのさらなる知見を得ることを目的とした。

さらに、本章ではエクспанシンに対する節間細胞壁の反応性と壁構造との関係についての調査も行った。Azuma et al. (1996) は深水処理した茎切片の節間と気中培養した茎切片の節間それぞれの細胞壁組成を調査し、非セルロース性中性糖におけるグルコースの占める割合は節間の基部から上部の古い組織に向かって減少し、一方キシロースは増加することを報告した。第1章での結果において深水処理した節間と気中培養した節間とではエクспанシンに対する細胞壁の反応性に顕著な差がみられ（図 1.9）、深水処理した節間におけるエクспанシンに対する細胞壁の反

応性が高い部位は、グルコースが多量にみられる部位 (Azuma et al. 1996) とおおよそ一致する。エクспанシンは細胞壁のセルロースミクロフィブリルとマトリックス多糖類の間の水素結合に作用し、細胞壁のゆるみを引き起こすと考えられており (McQueen-Mason and Cosgrove 1994)、壁構造の変化がエクспанシンに対する反応性に関係している可能性が高い。本章では、深水条件から空気中に移した節間と、深水処理を続けた節間におけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性の変化と、壁構造の経時的な変化との関係を調査した。

材料と方法

植物材料

供試植物の栽培は第 1 章と同様に行った。

茎切片の培養

浮稲茎切片を 2 日間深水処理した後、一部の茎切片を空気中に移してさらに培養を行った。深水処理および気中培養の方法は第 1 章と同様に行い、27°C, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ の蛍光灯下で培養した。培養後、節間の基部 1-2 cm の部位の切片を切り出し、液体窒素で凍結後、-35°C で保存した。

節間細胞壁の酸による伸展，細胞壁タンパク質中のエクспанシン活性，エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性の測定

凍結保存した節間の基部 1-2 cm の部位の切片を材料として、第 1 章の方法に従い、それぞれの測定を行った。

細胞壁標品の調製

Azuma et al. (1996) の方法を参考に行った。節間切片をメタノール中で 5 分間熱処理したのち、乳鉢、乳棒を用いてすりつぶし、メタノールで懸濁したホモジネー

トを作成した。このホモジネートを 10000 g で 5 分間遠心分離して上澄みを廃棄し、得られた沈殿物をさらに 1 ml メタノールで 2 回洗浄, 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で 1 回洗浄した。洗浄後, 沈殿物に 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を 1.3 ml 加えて懸濁し, 60°C で 10 分間の熱処理した後, 下記のアミラーゼ溶液 0.2 ml を加えて 37°C で一晩振盪培養した。デンプンの分解をヨウ素デンプン反応で確認した後, 沈殿物を蒸留水で 3 回, アセトンで 3 回, クロロホルム/メタノール (1:1, v/v) で 3 回, エタノールで 2 回洗浄し, デシケータ内で乾燥させた。

アミラーゼ溶液はブタ膵臓 α アミラーゼ (Sigma Type-A) 懸濁液 1 μ l を 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) 2 ml に混合して調製した。調製後のアミラーゼ溶液の活性は 21.92 U / ml に相当する。ヨウ素デンプン反応に用いたヨウ素液は, 原液として 1%ヨウ素を含む 10%ヨウ化カリウム溶液を調製し, この原液 10 μ l に対して蒸留水 0.5 ml を混合して調製した。

細胞壁組成の分析

Blakeney et al. (1983) の方法を参考に行った。細胞壁標品約 5 mg を秤量し, 内部標準物質として 1 μ mol の myo イノシトール (20 mM 原液を 50 μ l 加える) を加え, 2 M トリフルオロ酢酸を加えて 120°C で 1 時間加水分解した。加水分解後に遠心分離して上澄みを非セルロース性多糖類画分として回収し, 空気を吹き付けて 50°C で乾燥させた。次に水素化ホウ素ナトリウム/アンモニア溶液 (200 mg の NaBH_4 を

1 M アンモニア溶液 1 ml に溶解する) 50 μ l とジメチルスルホキシド (DMSO) 0.5 ml を加えて 90 分間還元反応を行い, 中性糖をアルジトールに誘導体化した。反応後, 50 μ l の氷酢酸を加えて過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解し, 1-メチルイミダゾールを 100 μ l, 無水酢酸を 1 ml 加えて室温で 10 分間保ち, アルジトールをアルジトールアセテート誘導体にした。2.5 ml の蒸留水を加えて攪拌した後, 0.5 ml のクロロホルムを加えて懸濁後に遠心分離し, クロロホルム層 (下層) を回収し, その糖組成を gas-liquid ガスクロマトグラフ (GC-12A; Shimadzu, Kyoto, Japan) で分析した。カラムはキャピラリーカラムの SP2340 (SUPELCO; 長さ 30 m, 内径 0.25 cm, フィルムシックスネス 0.25 μ m) を用いた。キャリアであるヘリウムガスの流量は 1 mL / min, 分圧は 1.1 kg / cm², 試料気化室および検出温度は 245°C, カラム温度は初期温度 225°C, 最終温度 235°C, 昇温条件 1°C / min で分析した。

2 M トリフルオロ酢酸による加水分解後の細胞壁の不溶性残渣をセルロースとみなし, 蒸留水, エタノールで洗浄後にデシケーター内で乾燥させた。乾燥後の残渣を 72% (v/v) 硫酸に溶解し, 蒸留水で希釈後にフェノール硫酸法 (Dubois et al. 1956) でセルロースを定量した。試料液 1 ml に 5% フェノール溶液 1 ml を加え, 濃硫酸 5 ml を液面に直接滴下して攪拌後 10 分間放置し, 次いで 30°C の水浴中に 10 分間保った後, 試料液の 490 nm の吸光度を測定した。スタンダードとしてグルコースを用いた。

キシロースを投与した節間切片の培養

深水条件で3日間培養した茎切片の節間の基部1-2cmから得た切片を、100 mM キシロース溶液、100 mM グルコース溶液または蒸留水1 mL 中で27°C・暗所で4時間培養した。その後、エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性を第1章の方法で測定した。また、細胞壁中の非セルロース性多糖類の組成を上述のように分析した。

結果

節間細胞壁の酸による伸展，エキスパンシン活性，エキスパンシンに対する反応性の経時的変化

2 日間深水処理した浮稻茎切片を空気中に移してさらに培養を続けると，深水条件に維持した茎切片の節間に比べて，節間の伸長は空気中に移して 1 日目に大きく減少し，2 日目には完全に停止した（図 2.1A）。伸長量のデータから算出した培養 2-4 日目の伸長速度を図 2.1B に示す。節間の伸長速度は深水処理 2 日目に最大値を示し，1 時間あたり約 1.5 mm であった。その後，深水条件下に維持して培養しても節間の伸長速度は低下し，深水処理 4 日目では 2 日目の 25% にまで減少した。一方，深水条件から空気中に移した茎切片では，節間伸長速度がさらに著しく低下し，空気中に移して 2 日目には成長速度はほぼゼロに達した。

深水条件から空気中に移した茎切片および深水条件下に維持した茎切片から節間の基部 1-2 cm の切片を切り出し，その細胞壁の酸による伸展性を調査した。この部位は，深水条件で伸長中の節間の細胞伸長領域に相当する（Bleecker et al. 1986）。酸による細胞壁伸展性は，深水条件で 2 日間培養した茎切片の節間において最も高く，その後深水条件下で培養を続けた茎切片の節間も，深水条件下から空気中に移した茎切片の節間も，培養日数が増えるにしたがって細胞壁伸展性の低下がみられたものの，深水条件から空気中に移した節間における細胞壁伸展性の低下は著しく，

空気中に移してから 2 日目の節間では細胞壁はほとんど伸展しなかった (図 2.2)。

次に、これらの酸が誘導する細胞壁伸展性の変化において、細胞壁中のエクспанシン活性およびエクспанシンに対する細胞壁の反応性の変化がどのように寄与しているかについて調査した。節間基部 1~2 cm の部位の切片から抽出した細胞壁タンパク質量には、培養条件による有意な差は認められず (図 2.3)、その抽出した細胞壁タンパク質 (10 μ g) のエクспанシン活性にも差はみられなかった (図 2.4)。

一方、同部位におけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性は、深水処理 2 日目の節間において最も高く、深水処理を続けた節間では、エクспанシンに対する細胞壁の反応性が緩やかに低下したのに対し、空気中に移した節間では、培養日数の経過とともにエクспанシンに対する細胞壁の反応性が大きく低下した (図 2.5)。

このパターンは細胞壁の酸が誘導する伸展性の変化 (図 2.2) と同様であった。

細胞壁構成糖の調査

エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性と細胞壁構造との関係について調査を行った。深水条件から空気中に移した茎切片の節間および深水処理を続けた茎切片の節間の基部 1-2 cm における細胞壁重量を比較した。深水処理を続けた節間では、細胞壁重量はほぼ一定に維持されたのに対し、深水条件から空気中に移した節間では細胞壁重量が顕著に増加した (図 2.6)。同様に、単位長さあたりのセルロース量および非セルロース性多糖類総量 (ヘミセルロース量) も深水処理を続けた節間で

はほぼ一定レベルであったのに対し，空気中に移した節間では大きく増加した（図 2.7）。細胞壁重量あたりのセルロース量および非セルロース性多糖類量を図 2.8 に示す。細胞壁重量当たりでも，その程度は小さいものの，空気中に移した節間の方が深水処理を続けた節間に比べてセルロースおよび非セルロース性多糖類の増加が認められた。

次に，節間細胞壁の非セルロース性多糖類の構成単糖をガスクロマトグラフィで分析し，それぞれの中性糖を細胞壁重量当たりで定量した（図 2.9）。Azuma et al. (1996) の分析結果と同様に，主要な非セルロース性中性糖としてアラビノース，キシロース，ガラクトース，グルコースが検出された。深水処理 2 日目の茎切片の節間の細胞壁ではグルコースが最も多量に存在する糖であり，次いでキシロースが多かった。培養条件に関係なく，培養 3 日，4 日目における細胞壁中のアラビノースおよびガラクトース量はほぼ一定であり，またグルコース量は徐々に減少したものの培養条件による差はみられなかった。細胞壁中のキシロース量は，節間が深水条件から空気中に移されることによって顕著に増加し，空気中に移してから 2 日目で 2 倍に達した。深水処理を続けた節間でも，処理 4 日目では 2 日目の 1.4 倍に増加した。図 2.10 は，節間細胞壁中の非セルロース多糖類構成糖におけるアラビノース，キシロース，ガラクトース，グルコースの占める割合（相対量）を示す。キシロースの相対量は，節間が深水条件から空気中に移されることによって増加し，また深水条件に維持した節間でも処理 4 日目に増加した。また，グルコースの相対量

は、キシロースと対照的に推移し、節間が空気中に移された後にすみやかに減少し、また深水条件に維持された節間では培養 4 日目に減少した。

キシロースの投与がエクспанシンに対する細胞壁の反応性に及ぼす影響

浮稲節間へのキシロースの投与が、エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性に及ぼす影響について調査した。深水処理 3 日後の茎切片から得た節間基部 1-2 cm の部位の切片を蒸留水中で 4 時間培養した後でのエクспанシンに対する細胞壁の反応性は、深水処理直後の節間と同程度であった（図 2.11A）。キシロースを投与して培養した節間切片では、細胞壁の反応性がやや減少したが、グルコースにはそのような作用はみられなかった（図 2.11A）。このときの節間切片の細胞壁組成の分析は、キシロースを投与して培養した節間切片では、蒸留水中あるいはグルコース中で培養した節間切片に比べてキシロースの相対量がわずかに増加した（図 2.11B）。

考察

節間細胞壁における酸による伸展性，エキスパンシン活性，エキスパンシンに対する反応性の経時的変化

茎切片を長期間深水処理することによって節間の伸長速度は徐々に低下し，また深水条件から空気中に移した茎切片の節間の伸長速度は，深水処理を続けた節間と比べて急激に低下した（図 2.1B）。これらの茎切片の節間の基部 1-2 cm の部位における酸が誘導する細胞壁伸展性もまた同様に低下し（図 2.2），伸長速度と細胞壁伸展性との間には，高い相関が認められた（ $r = 0.998$ ；表 2.1）。このときの節間細胞壁タンパク質量，細胞壁タンパク質中のエキスパンシン活性には，茎切片の培養条件による有意な差がみられず（図 2.3, 2.4），また酸が誘導する細胞壁伸展性や節間の伸長速度との間に相関は認められなかった（表 2.1）。一方，エキスパンシンに対する細胞壁の反応性（図 2.5）は細胞壁伸展性（図 2.2）と類似したパターンで推移し，両者の間には有意な相関が認められた（ $r = 0.931$ ；表 2.1）。したがって，深水条件から空気中に移した茎切片の節間，そして深水条件を維持した茎切片の節間における細胞壁伸展性の減少は，エキスパンシン活性によってよりも，主にエキスパンシンに対する細胞壁の反応性の変化によってもたらされることが示唆される。このような調節は，エンバク子葉鞘（Cosgrove and Li 1993）やキュウリ胚軸（McQueen-Mason 1995）においても報告されており，細胞壁伸展性の一般的な調節

メカニズムの1つなのかもしれない。

エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性とヘミセルロース組成との関係

本章では節間伸長の伸長および停止に伴う節間細胞壁の構成糖の変化を調査し、エクспанシンに対する反応性との関係についても検討した。深水条件から空气中に移すことによって、節間組織の単位長さあたりの細胞壁重量、セルロース量および非セルロース性多糖類総量は増加した（図 2.6, 2.7）。これらの増加は、深水条件から空气中に移された節間におけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性の低下（図 2.5）と関係しているかもしれない。また、Whitney et al. (2000) は *Acetobacter xylinus* が合成するセルロースからなる疑似細胞壁を利用してエクспанシン活性を調査し、セルロースのみからなる合成物はエクспанシンに対してほとんど反応しないことを報告した。したがって、深水条件から空气中に移された節間における単位長さ当たりのセルロース量の増加は特に、エクспанシンに対する細胞壁の反応性の低下に関係していると考えられる。しかしながら、細胞壁量やセルロース量の増加のみによってエクспанシンに対する反応性の減少を説明することはできない。なぜならば、深水条件に維持した茎切片の節間では、これらの量がほとんど変化しなかったにもかかわらず、エクспанシンに対する反応性は低下したからである（図 2.5, 2.6, 2.7）。

次に、細胞壁重量当たりの含量、すなわち細胞壁の組成の変化に着目して調査を

進めた。非セルロース性多糖の構成中性糖のうち、アラビノース、ガラクトース、グルコース含量は、実験期間を通じてほぼ一定であり、培養条件による差はみられなかった（図 2.9）のに対し、キシロース含量は空気中に移した節間でも深水処理を続けた節間でも増加し、キシロースのみがエクспанシンに対する細胞壁の反応性と有意な負の相関を示した（ $r = -0.947$ ；表 2.2）。したがって、キシロースを主とする多糖の増加がエクспанシンに対する細胞壁の反応性の低下に関与している可能性が示唆される。この可能性を検討する試みとして、キシロースを投与して培養した節間切片におけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性を調査した。キシロースの投与はエクспанシンに対する節間細胞壁の反応性に負の作用を及ぼし（図 2.11A）、それは、わずかではあるが、細胞壁中でのキシロースの相対量の増加を伴った（図 2.11B）。この結果は上記の可能性を支持する 1 つの証拠となるが、今後さらなる検討が必要であろう。Azuma et al. (1996) は、節間の非伸長部位におけるキシロースの相対的な増加がアラビノースの増加を伴わなかったことから、これがアラビノキシランの増加を示すわけではないことを示唆した。本研究においても、特に深水条件から空気中に移された節間ではキシロースの増加が顕著であったが、キシロースの増加にアラビノースの増加は伴わなかった（図 2.9）。したがって、これはアラビノキシランの増加というよりも、キシランの増加を反映しているのかもしれない。

グルコースは節間の伸長部位の細胞壁において最も豊富にみられる非セルロース

性中性糖であり (Azuma et al. 1996), 本研究においても例えば深水処理 2 日目の伸長中の節間では最も多量にみられる構成糖であった (図 2.9)。細胞壁の非セルロース性多糖類構成糖としてのグルコース含量は, 空気中に移した節間でも深水条件に維持した節間でもほとんど変化がみられなかった (図 2.9) が, 非セルロース性多糖類中に占める割合を算出した場合, 深水条件から空気中に移された節間ではグルコースの相対量は徐々に減少し, また深水条件に維持した節間でも処理 4 日目には急激な減少が認められた (図 2.10)。このグルコース相対量の変化は, エクспанシンに対する細胞壁の反応性の変化と正の相関を示した ($r = 0.914$, $P < 0.05$)。非セルロース性多糖類構成糖としてのグルコース量はほとんど変化せず (図 2.9), またグルコース相対量の変化は細胞壁中のキシロース含量の変化 (図 2.9) によってもたらされたと考えられるため, グルコースの増減が直接的にエクспанシンに対する細胞壁の反応性を調節しているとは考えにくい, エクспанシンに対する細胞壁の反応性が高く維持されるためには, 非セルロース性多糖類構成糖中でグルコースが最も多量に存在する必要があるのかもしれない。あるいは, グルコースを主とするヘミセルロースがエクспанシンの作用部位なのかもしれない。そのようなヘミセルロースの候補として考えられるのは, イネ科植物細胞壁における主要なヘミセルロースの 1 つであることが知られており (Carpita 1996), また浮稲節間の伸長部位において豊富に存在することが報告されている多糖である β - (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4) グルカンである (Sauter and Kende 1992)。エクспанシンに対する細胞壁の反応性

と β - (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4) グルカンとの間の関係についてはさらなる研究が必要である。

エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性とフェノール酸化合物との関係

Azuma et al. (2005b) は、深水条件で 2 日間培養した後に空気中に移してさらに培養を続けた茎切片および深水条件に維持した茎切片の節間組織における細胞壁中の *p* クマル酸、フェルラ酸、ジフェルラ酸の蓄積について調査した。深水条件に維持した節間では、これらのフェノール酸化合物量は培養 2 日目および 3 日目ではほぼ一定レベルに維持され、4 日目に増加するというパターンがみられた。深水条件から空気中に移された節間では、培養 3 日目にやや増加し、4 日目には顕著に増加した。これらの節間細胞壁中のフェノール酸化合物量の蓄積量の変化と、エクспанシンに対する細胞壁の反応性の変化の相関係数を表 2.3 に示した。フェルラ酸およびジフェルラ酸量の変化は、エクспанシンに対する細胞壁の反応性との間に有意な負の相関を示し、また *p* クマル酸も有意ではないものの高い負の相関がみられた。したがって、これらのフェノール酸化合物の蓄積もまたエクспанシンに対する細胞壁の反応性の低下に関係している可能性が示唆される。この可能性について、第 3 章でさらに検討を行った。

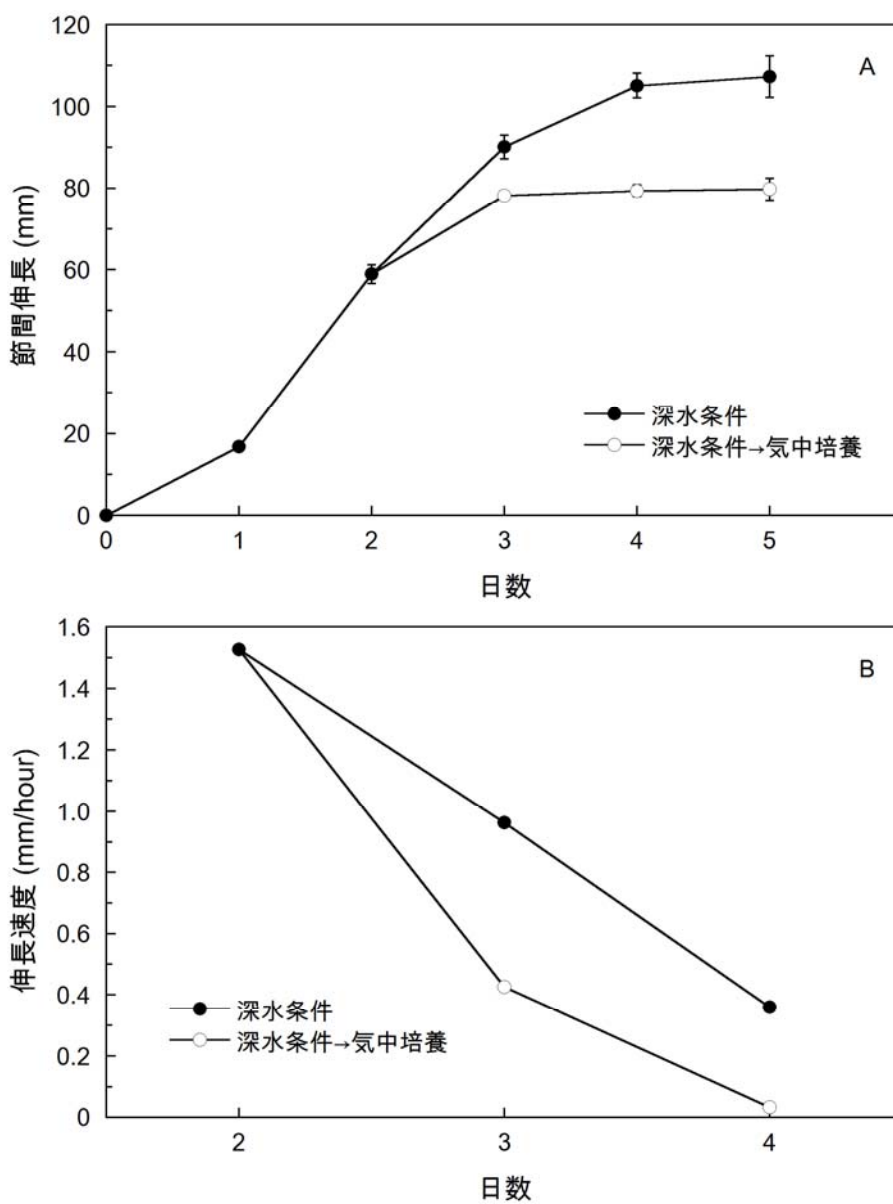


図2.1 深水条件下および深水条件から空気中に移した茎切片の節間の伸長量と伸長速度の経時的変化

最上位節間を含む茎切片を2日間深水処理した後，空気中に移して，あるいは深水条件に維持してさらに培養した。節間伸長 (A) と伸長速度 (B) の経時的変化を示した。49-55の反復の平均値と標準誤差を示す。

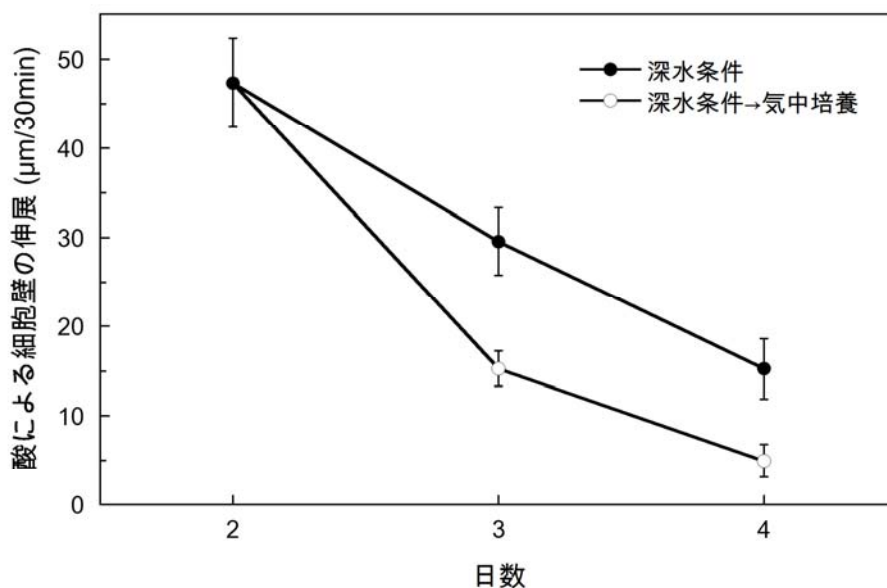


図2.2 深水条件から気中に移した節間および深水処理を続けた節間における酸による細胞壁の伸展の経時的変化

図2.1に示した条件で培養した茎切片の節間の基部1-2 cm を切り出し、その細胞壁の酸による伸展性を、図1.5と同様の方法で測定した。10 gの張力下で、中性緩衝液（pH 6.8）中で20分間前処理したのち、緩衝液を酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）に交換してさらに30分間伸展させた。5-8反復の平均値と標準誤差を示す。

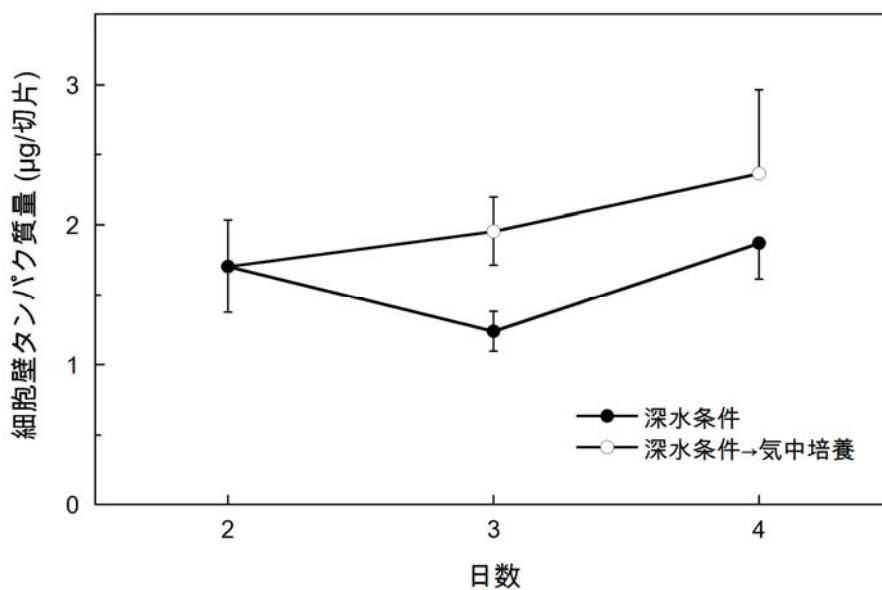


図2.3 深水条件から気中に移した節間および深水処理を続けた節間における細胞壁タンパク質含量の経時的変化

図2.1に示した条件で培養した節間の基部1-2 cm を切り出し，その細胞壁タンパク質を1 M NaClで抽出した。3反復の平均値と標準誤差を示す。

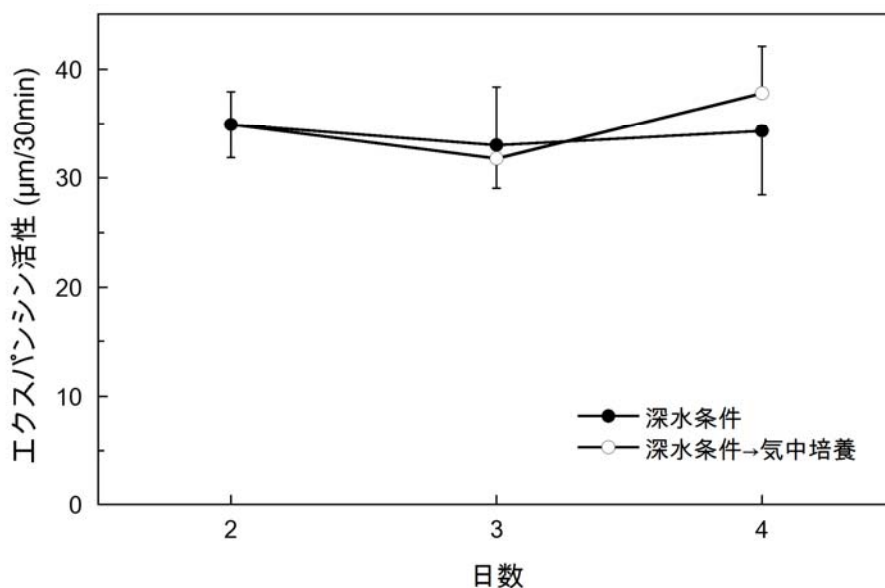


図2.4 深水条件から気中に移した節間および深水処理を続けた節間における細胞壁タンパク質中のエクспанシン活性の経時的変化

図2.1に示した条件で培養した節間の基部1-2 cm を切り出し、その切片から抽出した細胞壁タンパク質中のエクспанシン活性を図1.8と同様の方法で測定した。熱処理によって内生のタンパク質を失活させた黄化キュウリ胚軸の先端1 cm切片を10 gの張力下で、酸性緩衝液（pH 4.5）中で20分間前処理したのち、節間細胞壁タンパク質10μgを含む酢酸ナトリウム緩衝液緩衝液（pH 4.5）に交換してさらに30分間伸展させた。5-8反復の平均値と標準誤差を示す。

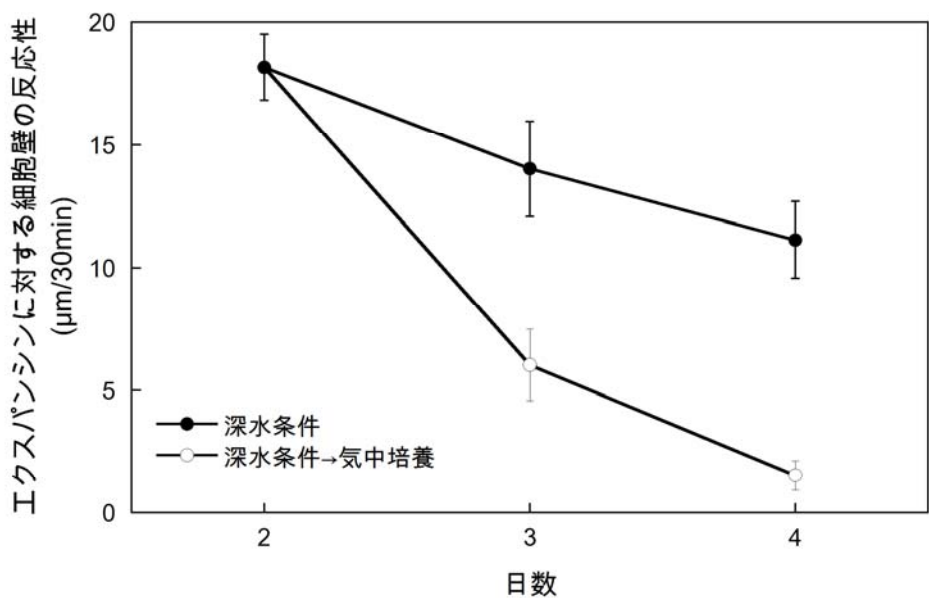


図2.5 深水条件から気中に移した節間および深水処理を続けた節間におけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性の経時的変化

図2.1に示した条件で培養した節間の基部1-2 cm を切り出し、その細胞壁のエクспанシンに対する反応性を図1.9と同様の方法で測定した。熱処理によって内生のタンパク質を失活させた節間切片を10 gの張力下で、酸性緩衝液（pH 4.5）中で20分間前処理したのち、黄化キュウリ胚軸の先端4 cm切片から抽出した細胞壁タンパク質60μgを含む酢酸ナトリウム緩衝液緩衝液（pH 4.5）に交換してさらに30分間伸展させた。5-8反復の平均値と標準誤差を示す。

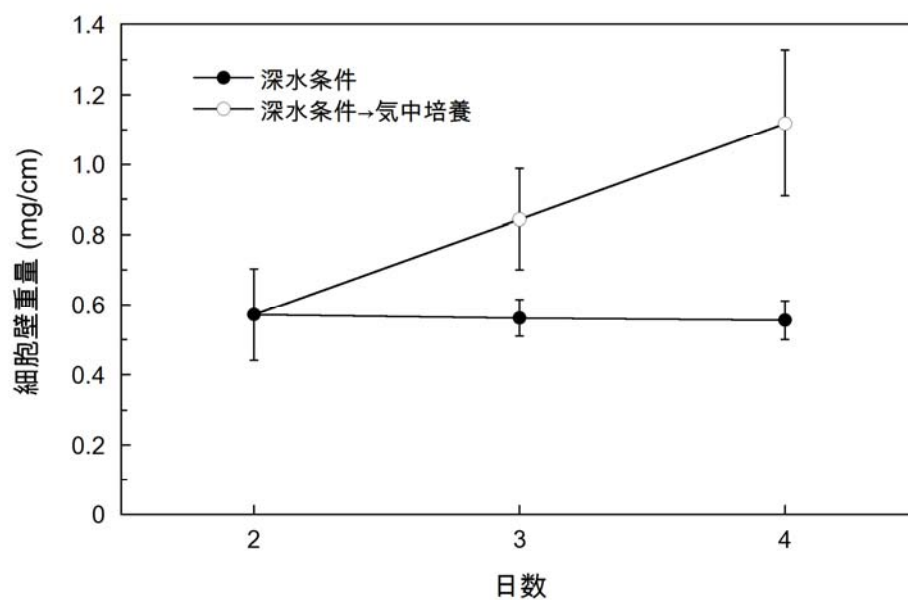


図2.6 深水条件から気中に移した節間および深水処理を続けた節間における細胞壁重量の経時的変化

図2.1に示した条件で培養した節間の基部1-2 cm 切片の細胞壁重量を調査した。3-5反復の平均値と標準誤差を示す。

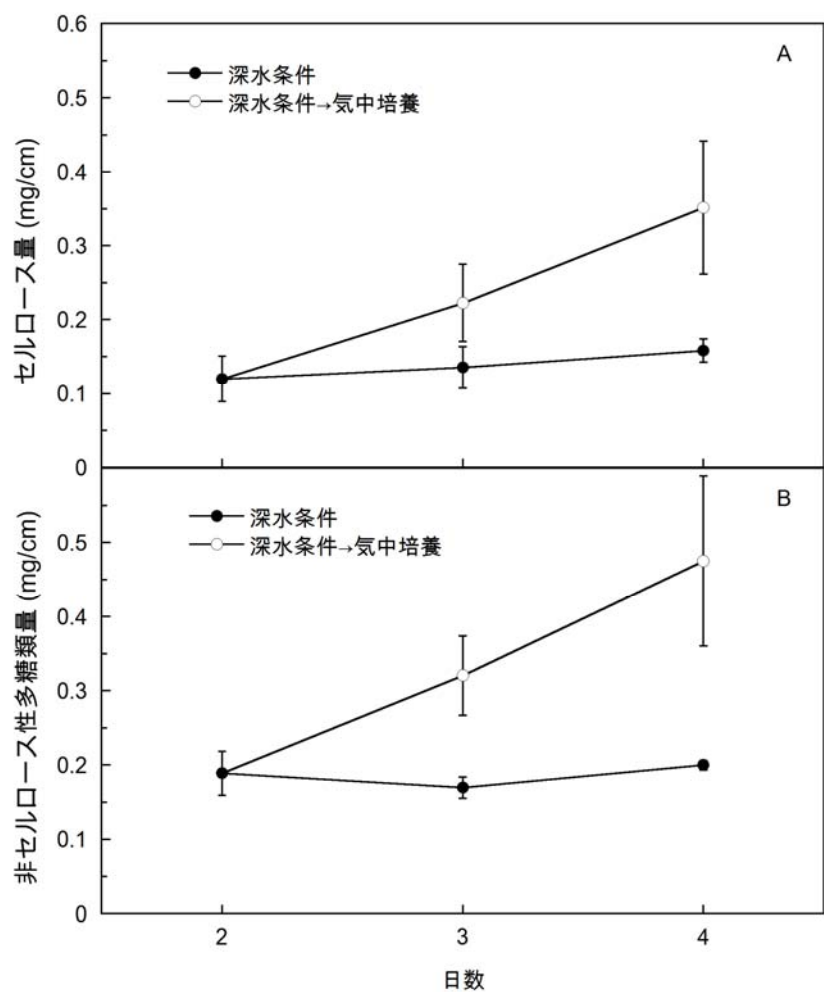


図2.7 深水条件から気中に移した節間および深水処理を続けた節間における長さあたりのセルロース量および非セルロース性多糖類量の経時的変化

図2.1に示した条件で培養した節間の基部1-2 cm 切片から細胞壁標品を調製し、セルロース (A) と非セルロース性多糖類 (B) を定量し、単位長さあたりの量を算出した。3-5反復の平均値と標準誤差を示す。

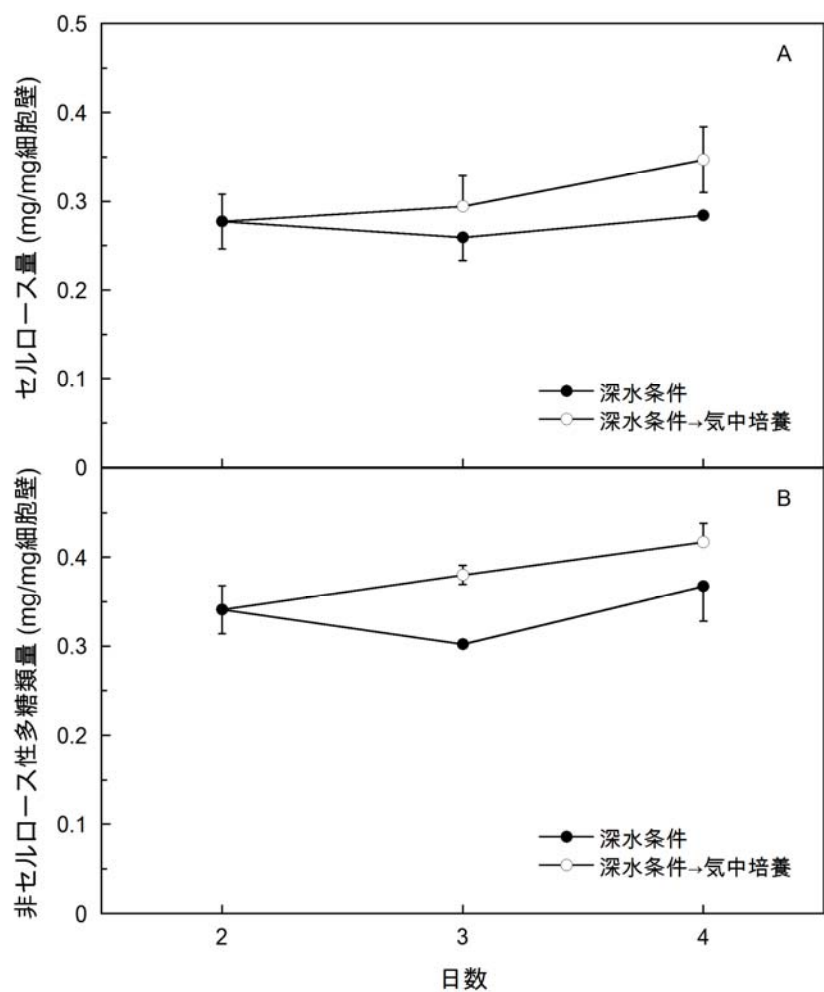


図2.8 深水条件から気中に移した節間および深水処理を続けた節間における細胞壁重量あたりのセルロース量および非セルロース性多糖類量の経時的変化

図2.1に示した条件で培養した節間の基部1-2 cm 切片から細胞壁標品を調製し、セルロース (A) と非セルロース性多糖類 (B) を定量し、細胞壁重量当たりの含量を算出した。3-5反復の平均値と標準誤差を示す。

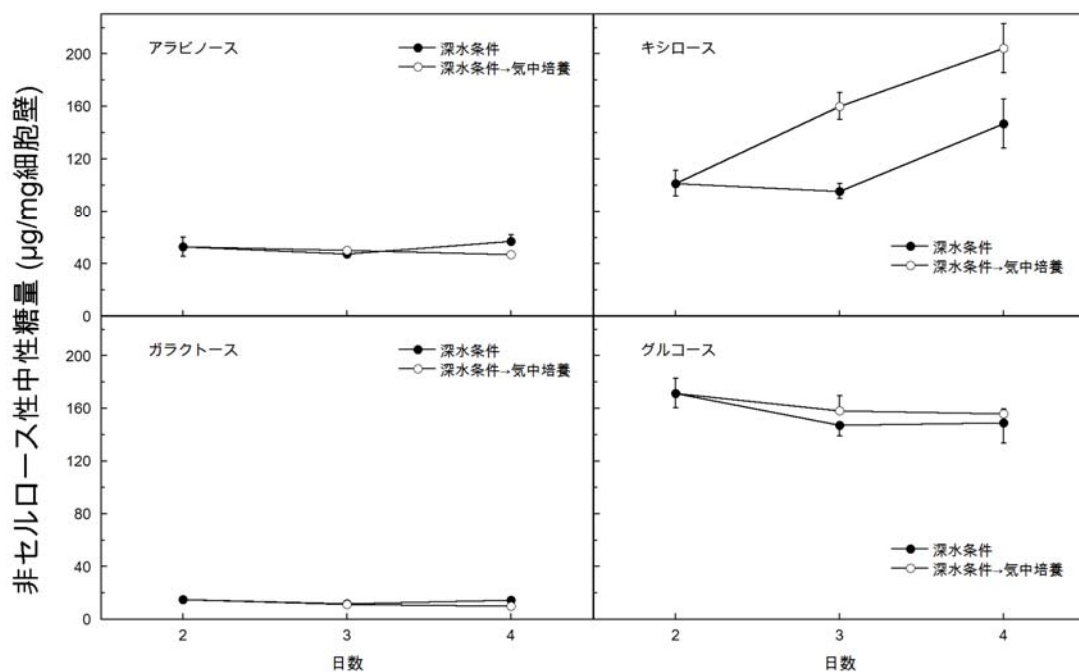


図2.9 深水条件から気中に移した節間および深水処理を続けた節間における細胞壁重量当たりの非セルロース性中性糖含量の経時的変化

図2.1に示した条件で培養した節間の基部1-2 cm切片の細胞壁中の非セルロース性多糖類を構成する中性糖の組成をガスクロマトグラフィで定量し、細胞壁重量当たりの含量を算出した。3反復の平均値と標準誤差を示す。

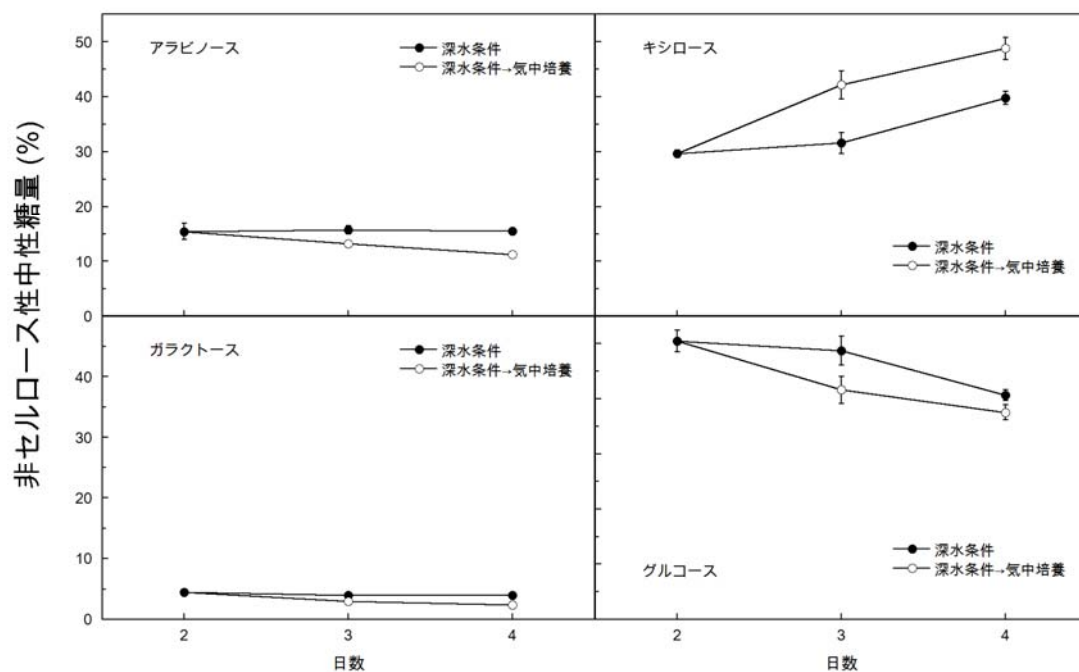


図2.10 深水条件から気中に移した節間および深水処理を続けた節間における細胞壁中の非セルロース性中性糖の相対量の経時的変化

図2.1に示した条件で培養した節間の基部1-2 cm切片の細胞壁中の非セルロース性多糖類を構成する中性糖の組成を分析し、それぞれの糖が占める割合を算出した。3反復の平均値と標準誤差を示す。

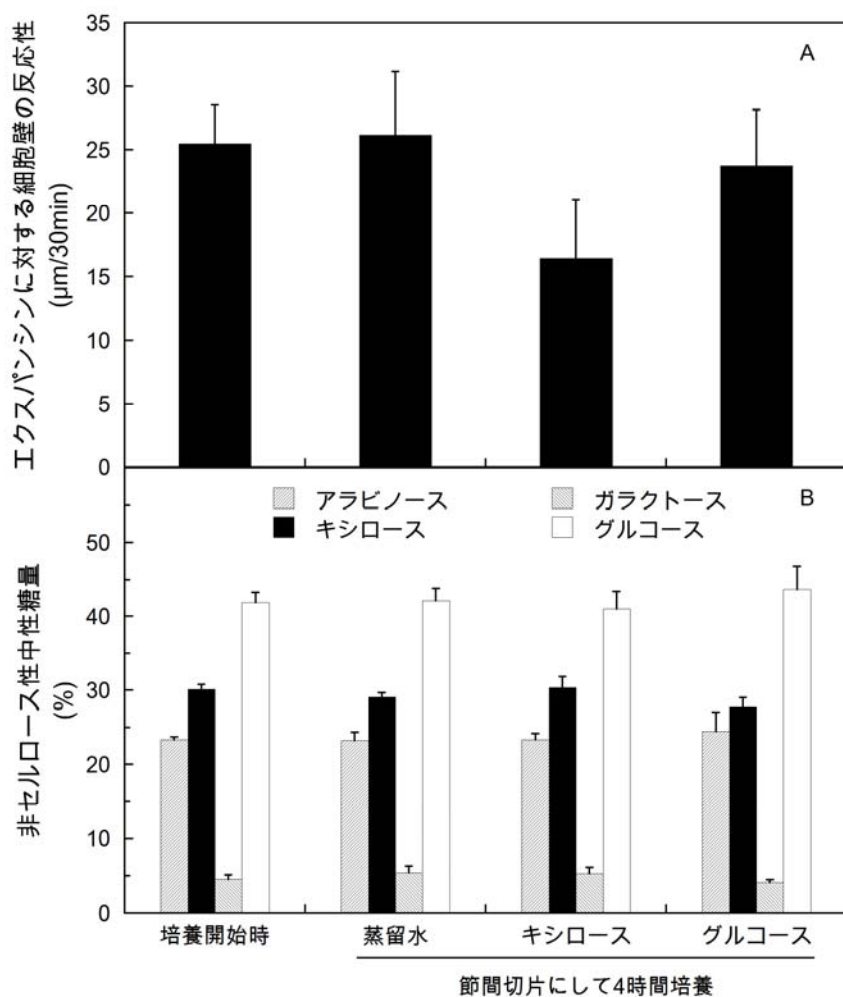


図2.11 キシロースの投与による細胞壁のエクспанシンに対する反応性の変化および非セルロース性中性糖の組成の変化

3日間深水処理した茎切片の節間の基部1-2 cmを切り出し、その節間切片を蒸留水、100 mMキシロース、あるいは100 mMグルコース溶液内で4時間培養し、細胞壁のエクспанシンに対する反応性 (A) と非セルロース性中性糖の相対量 (B) を調査した。(A) は4反復、(B) は3反復の平均値と標準誤差を示す。

表2.1 節間の伸長速度と酸による細胞壁伸展性，エクспанシン活性およびエクспанシンに対する細胞壁の反応性の関係

	伸長速度	酸による細胞壁の 伸展性
酸による細胞壁の 伸展性	0.998 ***	
エクспанシン活性	-0.278	-0.251
エクспанシンに対する 細胞壁の 反応性	0.922 *	0.931 *

図2.1B, 2.2, 2.4, 2.5のデータからそれぞれの相関係数を決定した。***は0.1%, *は5%水準で有意

表2.2 細胞壁の構成糖とエクспанシンに対する反応性との関係

細胞壁構成糖 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 細胞壁)	相関係数
セルロース	-0.817
ヘミセルロース	-0.837
アラビノース	0.434
キシロース	-0.947 *
ガラクトース	0.836
グルコース	0.305

図2.5, 2.8, 2.9のデータからそれぞれの相関係数を決定した。*は5%水準で有意

表2.3 細胞壁中のフェノール酸化合物と細胞壁のエクспанシンに対する反応性との関係

フェノール酸化合物 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 細胞壁)	相関係数
<i>p</i> クマル酸	-0.873
フェルラ酸	-0.969 **
ジフェルラ酸	-0.917 *

図2.5のデータと，Azuma et al. (2005b) のFigs. 2,3,4のデータからそれぞれの相関係数を決定した。 **は1%， *は5%水準で有意

第3章

エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性と

フェノール酸化合物の沈着との関係

緒言

植物の成長の基礎をなす細胞伸長は、吸水を原動力とする現象である。細胞の吸水は、細胞内外の水ポテンシャル差に基づいて生じる。それゆえ、例えばポリエチレングリコールを用いて高浸透圧ストレス下で植物を培養すると、細胞外の水ポテンシャルが低下するために細胞の吸水は妨げられ、植物の成長速度は低下する。この成長速度の低下は一時的な抑制、あるいは可逆的な変化であり、浸透圧ストレス下の植物体を非浸透圧ストレス下に移すと、細胞の吸水が可能となるため、その植物の成長が回復することが知られている。植物体にこのような浸透圧ストレスを与える実験系は、植物の成長における細胞壁伸展性の役割を検討するうえで有用な系の1つとして用いられている（例えば Wakabayashi et al. 1997）。

本研究の第1章および第2章の結果から、エクспанシンに対する細胞壁の反応性が浮稲節間の伸長調節において重要な役割を担っていることが示唆された。本章では、浮稲の節間切片に高浸透圧ストレスを与えてその伸長を停止させた際に、エクспанシンに対する細胞壁の反応性と壁構造にどのような変化が引き起こされるかについて調査し、両者の関係を検討した。

材料と方法

植物材料

供試植物の栽培は第 1 章と同様に行った。

茎切片および節間切片の培養

浮稲茎切片を第 1 章と同様に 27°C , $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$ の蛍光灯下で 3 日間深水処理した後、節間組織の基部 0.5-2.5 cm の部位からなる長さ 2 cm の節間切片を切り出した。節間切片を 0, 50, 100 mM のポリエチレングリコール-4000 (PEG) 溶液 20 ml 中で高浸透圧ストレスを与えて 27°C ・暗所で 1 日培養した。節間切片の培養には 100 ml 三角フラスコを用い、上部をパラフィルムで覆った。

また、節間切片に高浸透圧ストレスを与えた条件で、フェルラ酸あるいは *p* クマル酸を加える処理も行った。100 mM の PEG を与えた条件下で、0, 0.1, 1, 10 mM のフェルラ酸あるいは 0, 1, 10 mM の *p* クマル酸を与えて節間切片を 27°C , 暗所で 1 日培養した。培養後の節間切片を液体窒素で凍結後、 -35°C で保存した。

節間細胞壁の酸による伸展，エクспанシンに対する節間細胞壁の反応性の測定

凍結保存した節間切片の基部 1 cm を切り出し、第 1 章の方法に従い、それぞれの測定を行った。

細胞壁標品の調製および細胞壁組成の分析

凍結保存した節間切片の基部 1 cm を切り出し, 第 2 章の方法と同様に細胞壁標品を調製し, 細胞壁中のセルロースの定量および非セルロース性多糖類の組成分析を行った。

細胞壁中のフェノール酸化合物の定量

Azuma et al. (2005a, b) の方法に従って節間細胞壁中のフェノール酸化合物の定量を行った。細胞壁標品 4-6 mg を秤量し, それに 20 mM シュウ酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0) を 1 mL 加えて 70°C で 2 時間インキュベートした後, 10000 g で 5 分間遠心分離して沈殿物を集め, 蒸留水で 1 回洗浄した。洗浄後の沈殿物に内部標準物質としてシナピン酸を 50 µg 加え, さらに 50 µg / ml の水素化ホウ素ナトリウムを含む 1 M 水酸化ナトリウム溶液を 1 ml 加え, 窒素ガスを吹き込んで密封し, 37°C で 1 昼夜インキュベートした。遠心分離して上澄みを集めた後, メチルイエロー溶液 20 µl (0.02%溶液, 50%メタノールに溶解させる) を指示薬として, 4 N の塩酸を加えて上澄みを pH 2-3 に調節した。次にジエチルエーテル 2 ml を加えて分配し, ジエチルエーテル層を集め, 硫酸ナトリウムを加えて脱水した。脱水後のジエチルエーテル層を減圧下で濃縮乾固させ, -35°C で保存した。

調製後のサンプルを 50%メタノールに溶かし, そのフェノール酸化合物を高速液

体クロマトグラフィ (HPLC) によって定量した。LC-6A (Shimadzu, Kyoto, Japan) と UV 検出器 (SPD-6A ; Shimadzu) およびカラム (Mightysil RP-18 GP Aqua ; Kanto Chemical, Tokyo, Japan ; 長さ 250 mm, 内径 4.6 mm) を組み合わせた HPLC システムを用いた。キャリアは 3%酢酸 (A 液) および 3%酢酸-アセトニトリル (1:1, v/v ; B 液) の 2 つを用いた。キャリアの流速は 1 ml / min, カラム温度は 50°C とした。サンプルを HPLC に注入した後, B 液に以下のような勾配をつけてキャリア溶液中のアセトニトリル濃度を変化させた ; キャリア溶液中の B 液の濃度を 0-5 分後までは 15%に維持し, 30 分後で 25%となるよう直線的に増加させ, 45 分後で 100%となるよう直線的に増加させ, その後 50 分後までは 100%に維持し, 55 分後に 15%となるよう直線的に減少させた。60 分で分析を終了した。320 nm の紫外線吸光度に基づき, サンプル中の *p* クマル酸, フェルラ酸, ジフェルラ酸を定量した。

結果

浸透圧を与えることによるエクспанシンに対する節間細胞壁の反応性の変化と 壁構造の関係

深水条件下で急速に伸長中の節間の基部 0.5-2.5 cm の部位から長さ 2 cm の節間切片を作成した。この部位は節間の伸長部位のみに相当し、細胞分裂組織を含まないため、節間切片の長さの変化はすべて細胞長の変化によるものと考えられる。これらの節間切片を 0, 50, 100 mM の段階的に濃度を変えた PEG 溶液中で、27°C 暗所で 1 日培養した後の長さを図 3.1 に示す。PEG を与えずに蒸留水中で培養した切片は長さが約 10% 増加したのに対し、50 mM の PEG を与えた切片では長さはほぼ変化せず、また 100 mM の PEG を与えた切片では約 10% 減少した。このときの節間切片の細胞壁の酸による伸展性は、PEG 処理開始時の節間（深水によって伸長中の節間）の細胞壁と比較するといずれの節間切片の細胞壁でも伸展性の低下が認められたが、浸透圧を与えて培養した切片は蒸留水中で培養した切片に比べて伸展性が高く維持されていた（図 3.2A）。次にエクспанシンに対する細胞壁の反応性を調査した結果、100 mM の PEG 存在下で培養した切片の細胞壁では、PEG 処理開始時の節間の細胞壁と同程度に反応性が維持されており、一方浸透圧ストレスを与えなかった切片の細胞壁では反応性が著しく低下した（図 3.2B）。

エクспанシンに対する細胞壁の反応性に変化をもたらす要因を調査するため、

異なる浸透圧ストレス下で培養した節間切片の細胞壁構造の変化について分析を行った。節間切片の基部 1 cm の細胞壁重量は、蒸留水中で培養した節間切片では増加したが、その増加は浸透圧の上昇とともに抑制された（図 3.3）。このときの単位長さ当たりの節間細胞壁のセルロース量は、浸透圧を与えなかった切片では顕著に増加したのに対し、PEG を 100 mM 投与して培養した切片ではそのような増加はみられなかった（図 3.4A）。細胞壁重量当たりのセルロース含量もまた、浸透圧を与えなかった切片では増加したが、浸透圧を与えた切片ではその増加が抑制され、深水処理直後の節間と同等のレベルに維持された（図 3.4B）。

次に節間細胞壁の非セルロース性多糖類の構成糖をガスクロマトグラフィで分析した。単位長さ当たりの分析結果を図 3.5 に示す。PEG 処理開始時の節間では、グルコースとキシロースが同程度に最も多量に存在する糖であった。深水処理後に切片にして培養した節間では、最も多量に存在する糖はキシロースであり、また各々の非セルロース性多糖類構成糖は浸透圧の上昇に伴って減少する傾向がみられ、節間細胞壁重量の変化（図 3.3）に類似していた。細胞壁重量あたりの非セルロース性構成糖の組成を図 3.6 に示す。深水処理後に切片にして異なる浸透圧ストレス下で培養した節間の細胞壁ではキシロースが最も豊富に存在する糖であったという点は単位長さ当たりの分析結果（図 3.5）と共通していたが、PEG 処理開始時の節間に比べて PEG の有無に関係なく培養によりグルコースが有意に減少したこと、そして投与した PEG 濃度による各々の非セルロース性構成糖の変化がほとんどみられ

なかったことが特徴的であった（図 3.6）。

最後に HPLC を用いて節間細胞壁中のフェノール酸化合物含量を調査し、*p* クマル酸、フェルラ酸、ジフェルラ酸を定量した。最も多量にみられたフェノール酸化合物はフェルラ酸であった。単位長さ当たりのフェノール酸化合物量は、細胞壁量の変化（図 3.3）と同様に、浸透圧を与えなかった節間切片では顕著に増加したが、浸透圧を与えて培養した切片では投与した PEG の濃度の上昇につれてその増加が抑制された（図 3.7）。細胞壁重量あたりのフェノール酸化合物量についても、このような推移が明らかに認められ、深水処理後に切片にして蒸留水中で培養した節間ではすべてのフェノール酸化合物の蓄積量が増加し、浸透圧を加えて培養した節間切片ではフェノール酸化合物の蓄積は抑制された（図 3.8）。浸透圧を与えることによるフェノール酸化合物の蓄積の抑制は Wakabayashi et al. (1997) によっても報告されており、PEG 4000 を与えて培養したコムギ実生の幼葉鞘は、蒸留水を与えて培養した実生の幼葉鞘に比べて、細胞壁中のフェルラ酸およびジフェルラ酸の蓄積がゆるやかになることが示されている。

フェノール酸化合物の投与がエクспанシンに対する細胞壁の反応性および壁構造に及ぼす作用

深水処理後に高浸透圧ストレスを与えて培養した節間切片は、蒸留水中で培養した切片に比べてエクспанシンに対する細胞壁の反応性が高く維持された（図

3.2B)。このときの細胞壁中のフェノール酸化合物は、浸透圧ストレスを与えずに培養した切片では著しい増加がみられた一方、浸透圧ストレス下で培養した切片では低いレベルに維持された（図 3.7, 3.8）。そこで次に、高浸透圧ストレス下でフェノール酸化合物を与えて節間切片を培養し、エクспанシンに対する細胞壁の反応性と細胞壁中のフェノール酸化合物量について調査を行い、節間細胞壁におけるこれらのフェノール酸化合物の沈着がエクспанシンに対する細胞壁の反応性に及ぼす影響を検討した。

まず、*p* クマル酸を投与する実験を行った。深水条件下で 3 日間培養した茎切片から調製した節間切片を 0, 1, 10 mM の *p* クマル酸を含む 100 mM の PEG 溶液中で 1 日培養した。培養後の節間切片の長さには、投与した *p* クマル酸の濃度による変化はみられず（図 3.9A）、細胞壁のエクспанシンに対する反応性もまた、投与した *p* クマル酸濃度に関係なくほぼ一定であった（図 3.10A）。このときの節間切片の基部 1 cm の細胞壁重量も、*p* クマル酸の投与量によらずほぼ一定に維持された（図 3.11A）。次に切片の単位長さあたりの細胞壁中のフェノール酸化合物の蓄積量（図 3.12A）および細胞壁重量あたりのフェノール酸化合物蓄積量（図 3.13A）を調査した。*p* クマル酸を投与して培養することにより、節間細胞壁中の *p* クマル酸量は増加したが、フェルラ酸およびジフェルラ酸量に変化はみられなかった（図 3.12A, 3.13A）。

次に、節間切片に浸透圧ストレス下でフェルラ酸を投与して培養した時の、エク

スパンシンに対する細胞壁の反応性と壁構造の変化について調査を行った。深水条件下で3日間培養した茎切片から調製した節間切片を0, 0.1, 1, 10 mMのフェルラ酸を含む100 mMのPEG溶液中で1日培養した。培養後の節間切片の長さは、フェルラ酸の有無およびその濃度に関係なく、およそ10%減少した(図 3.9B)。このときのエクスパンシンに対する細胞壁の反応性は、フェルラ酸を与えずに浸透圧ストレス下で培養した節間切片において最も高く維持され、投与したフェルラ酸の濃度の増加に従って低下し、1 mM および 10 mM のフェルラ酸の存在下で最低値に達した(図 3.10B)。

このときのそれぞれの節間切片の細胞壁構造の分析を行った。図 3.11B は浸透圧およびフェルラ酸の存在下で培養した後の節間切片の基部 1 cm の細胞壁重量を示す。フェルラ酸を与えなかった切片で細胞壁量は最も少なく、フェルラ酸の投与量の増加とともに細胞壁量が徐々に増加した。

節間細胞壁中のフェノール酸化合物量を調査した結果を図 3.12B および図 3.13B に示す。細胞壁中の *p* クマル酸は、フェルラ酸の投与によって増加したが、投与するフェルラ酸濃度の増加に伴う変化はほとんどみられなかった。一方、フェルラ酸の投与は細胞壁中のフェルラ酸を顕著に増加させ、その増加は 1 mM 以上の濃度のフェルラ酸を投与することで飽和した(図 3.12B, 3.13B)。細胞壁中のジフェルラ酸もまた、変化量は小さかったものの、フェルラ酸を投与して節間切片を培養することによって同様に増加した。

この部位における細胞壁の単位長さあたりのセルロース量（図 3.14A）は，細胞壁重量（図 3.11B）と同様にフェルラ酸の投与によって増加したが，細胞壁の単位重量あたりのセルロース含量（図 3.14B）は，投与したフェルラ酸によらずほぼ一定であった。細胞壁の非セルロース性多糖類構成糖は，切片の単位長さあたりの各構成糖量（図 3.15）および細胞壁重量あたりの含量（図 3.16）ともに，アラビノース，キシロースはフェルラ酸を投与した切片でほぼ一様に増加する傾向がみられ，またグルコース量はフェルラ酸の投与濃度の上昇につれて増加した。

考察

節間細胞壁におけるフェノール酸化合物量の蓄積がエクспанシンに対する反応性に及ぼす影響

浸透圧ストレスを与えずに蒸留水中で培養した節間切片に比べて、高浸透圧ストレス下で伸長が制限された切片ではエクспанシンが媒介する酸による細胞壁伸展性は高く維持されており（図 3.2A）、このときのエクспанシンに対する細胞壁の反応性についても同様の結果が得られた（図 3.2B）。したがって、第 1 章および第 2 章で得られた考察と同様に、この実験系においてもエクспанシンに対する細胞壁の反応性の変化が酸による細胞壁の伸展性に強い影響を及ぼすと考えられる。本研究の目的は、このようなエクспанシンに対する細胞壁の反応性の変化と壁構造の関係を調査することであり、異なる水ポテンシャル条件における節間切片の伸長応答の違いを分析することではないため、本研究では細胞壁のエクспанシンに対する反応性のみを測定し、エクспанシン活性の調査は行わなかった。水ポテンシャル条件がエクспанシン活性に及ぼす作用についてはいくつかの報告がある。Wu et al. (1996) は、低水ポテンシャル条件の環境にあってもトウモロコシの根が伸長を維持できることは、根の細胞壁のエクспанシンに対する反応性の増加に加えて、エクспанシン活性の増加が関係していることを報告した。また、水耕栽培中のトウモロコシ実生の培養液に 15% (w/w) の PEG 6000 を与えると、葉の成長は一時的

に停止するが、40-50 分後に再開し、その成長再開に先立ってエクспанシン遺伝子の発現が上昇することが報告されている (Sabirzhanova et al. 2005)。これらの報告から、低水ポテンシャル条件の環境において植物組織が伸長するには、エクспанシン活性の増加が必要なのかもしれない、本研究において高浸透圧ストレスを与えた節間切片では伸長がみられなかったため、そのような活性の変化は生じていないかもしれない。

異なる浸透圧ストレス下で培養した節間切片におけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性に差を生じさせる要因を調査するため、細胞壁構造の分析を行った。浸透圧ストレスを与えず、蒸留水中で培養した切片では、単位長さ当たりの細胞壁量 (図 3.3)、セルロース量 (図 3.4A)、非セルロース性多糖類構成糖量 (図 3.5)、フェノール酸化合物量 (図 3.7) はすべて増加した。一方、高浸透圧ストレス下で培養した切片ではこれらの細胞壁重量および細胞壁構成物の増加が抑制され、この抑制はエクспанシンに対する細胞壁の反応性が高く維持されたことと関係していると考えられる。細胞壁単位重量当たりの含量に着目すると、セルロースは蒸留水中で培養した切片でのみ、わずかに含量の増加が認められた (図 3.4B)。したがって、PEG 投与の有無による細胞壁のエクспанシンに対する反応性の差は、細胞壁中のセルロース含量の差に影響しているのかもしれないが、PEG の濃度の差による細胞壁の反応性の差はそれによつては説明できない。また、細胞壁中の非セルロース性多糖類構成糖それぞれの含量 (図 3.6) には浸透圧ストレスによる差が認めら

れなかったため、本実験系においては、エクспанシンに対する細胞壁の反応性の変化に寄与しているとは考えにくい。細胞壁中のフェノール酸化合物含量の分析結果では、*p* クマル酸、フェルラ酸、ジフェルラ酸のすべてが、蒸留水中で培養した切片において最も蓄積し、その蓄積は浸透圧の上昇とともに抑制され（図 3.8）、これらはエクспанシンに対する細胞壁の反応性の変化と対照的であった。したがって、本実験系においてエクспанシンに対する細胞壁の反応性に最も直接的な影響を及ぼした因子はこれらのフェノール酸化合物である可能性が示唆される。

実際に、高浸透圧ストレス下で *p* クマル酸を与えて節間切片を培養した結果、細胞壁中の *p* クマル酸量は増加した（図 3.12A、図 3.13A）が、エクспанシンに対する細胞壁の反応性はほぼ一定であった（図 3.10A）。したがって、細胞壁中の *p* クマル酸の蓄積自体は、エクспанシンに対する細胞壁の反応性に影響しないのかもしれない。

高浸透圧ストレス下でフェルラ酸を同時に与えて節間切片を培養すると、フェルラ酸の投与によるエクспанシンに対する細胞壁の反応性の低下が認められた（図 3.10B）。これらの節間切片は細胞分裂部位を含まず、切片長の変化は細胞長の変化のみによって生じると考えられ、培養後の節間切片の長さはフェルラ酸の多寡に関係なくほぼ一定であった（図 3.9）ため、フェルラ酸の投与によるエクспанシンに対する細胞壁の反応性の低下には、それぞれの節間切片の単位長さあたりの細胞数の違いは寄与していないと考えられる。

このときの細胞壁重量当たりのセルロース量（図 3.14B）および各々の非セルロース性構成糖量（図 3.16）とエクспанシンに対する細胞壁の反応性との相関係数を表 3.1 に示す。セルロース，アラビノース，キシロース，ガラクトースは有意な相関が認められず，グルコースのみが有意な負の相関を示した。しかしながら，グルコースは茎切片中の節間の伸長部位の細胞壁において多くみられる糖であり（Azuma et al. 1996），それらの部位はおおよそエクспанシンに対する反応性が高い部位と一致し（図 1.9），この事実からは，細胞壁中の非セルロース性グルコースの存在は，むしろエクспанシンに対する細胞壁の反応性を高く維持することと関係があると考えられる。これらの内容を考慮すると，本実験系において非セルロース性グルコースがエクспанシンに対する細胞壁の反応性を低下させる役割を担っている可能性は考えにくい。フェノール酸化合物量の分析（図 3.12B, 3.13B）では，フェルラ酸を投与して切片を培養することによる細胞壁中のフェルラ酸蓄積量の増加が認められ，またその増加は 1 mM のフェルラ酸を投与した段階で飽和し，エクспанシンに対する細胞壁の反応性の変化と有意な負の相関を示した（表 3.2）。また，ジフェルラ酸についても有意な負の相関が認められた（表 3.2）。したがって，第 2 章の表 2.3 の結果と一致して，細胞壁におけるフェルラ酸およびジフェルラ酸の蓄積は，細胞壁のエクспанシンに対する反応性を負に調節する役割を担っていると考えられる。

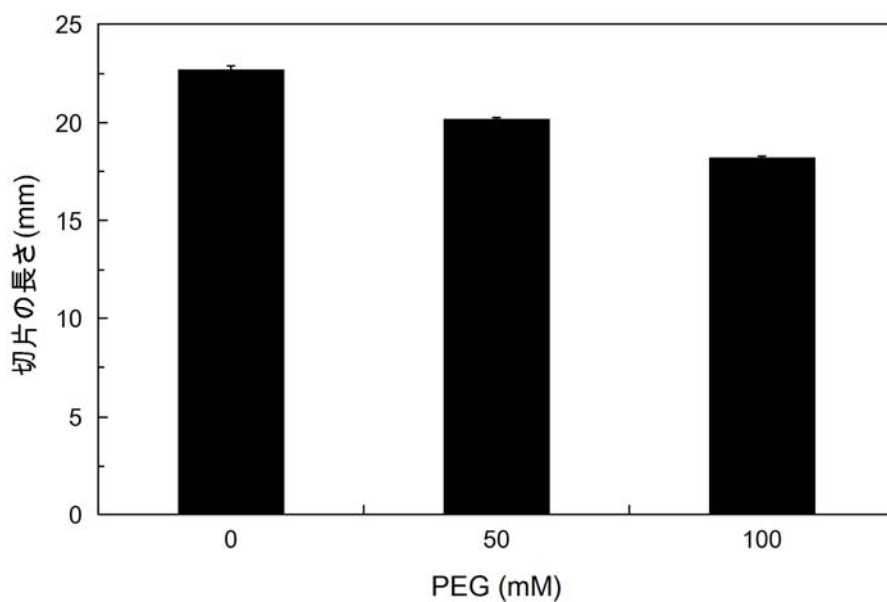


図3.1 節間切片の伸長に及ぼすPEG処理の影響

浮稲茎切片を3日間深水処理した後、節間組織の基部0.5-2.5 cmの部位からなる切片を切り出し、それらの節間切片を0, 50, 100 mMのポリエチレングリコール-4000 (PEG) 溶液20 ml中で、27°C, 暗所で1日培養した。56-58反復の平均値と標準誤差を示す。

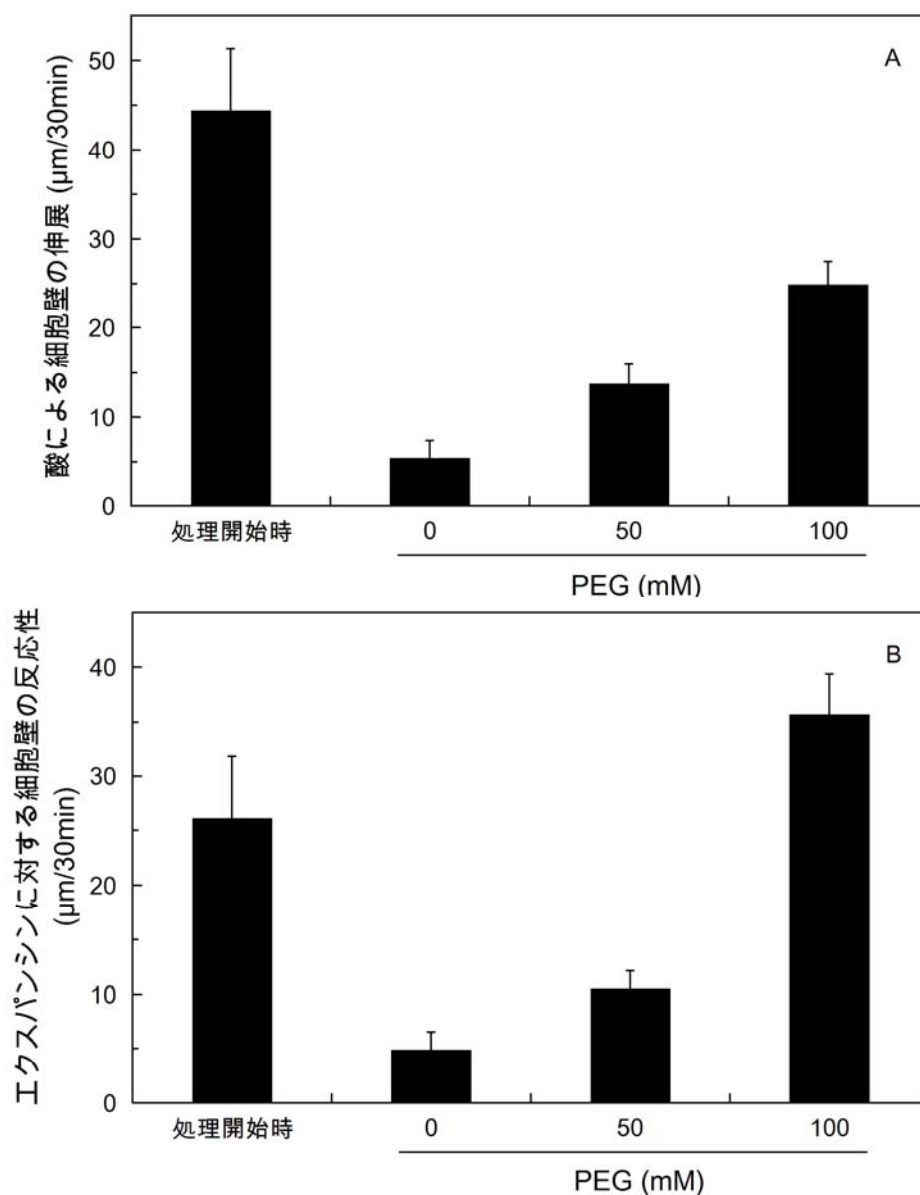


図3.2 PEG処理後の節間切片の細胞壁の酸による伸展およびエクспанシンに対する反応性

図3.1に示した条件で培養した節間切片の基部1 cmを切り出し、その切片における酸による細胞壁の伸展 (A) およびエクспанシンに対する細胞壁の反応性 (B) を測定した。(A) 図1.5と同様に、10 gの張力下で、切片を中性緩衝液 (pH 6.8) 中で20分間前処理したのち、緩衝液を酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) に交換してさらに30分間伸展させた。5-7反復の平均値と標準誤差を示す。(B) 図1.9と同様に、熱処理によって内生のタンパク質を失活させた節間切片を10 gの張力下で、酸性緩衝液 (pH 4.5) 中で20分間前処理したのち、黄化キュウリ胚軸の先端4 cmから抽出した細胞壁タンパク質30μgを含む酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) に交換してさらに30分間伸展させた。5-6反復の平均値と標準誤差を示す。

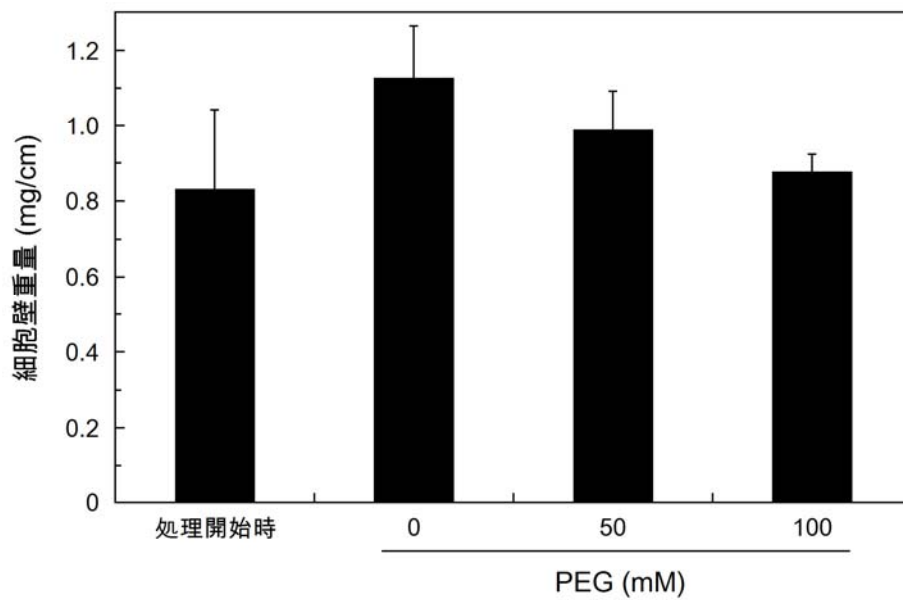


図3.3 PEG処理後の節間切片の細胞壁重量

図3.1に示した条件で培養した節間切片の基部1 cmにおける細胞壁重量を調査した。3-6反復の平均値と標準誤差を示す。

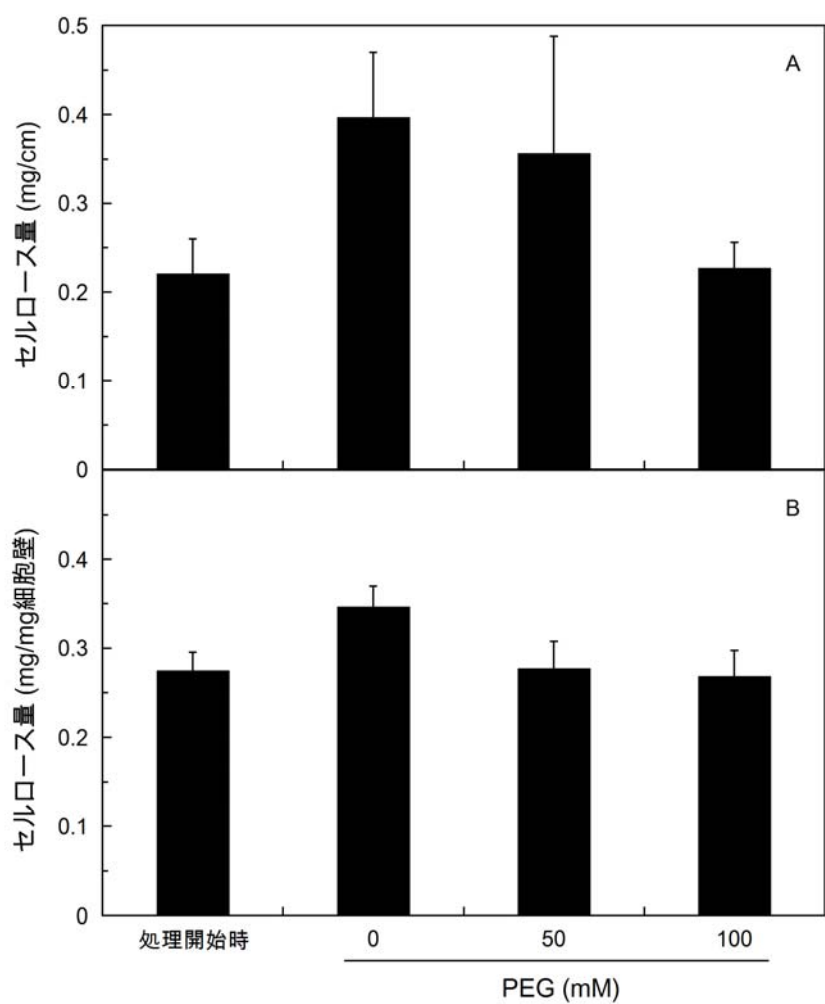


図3.4 PEG処理後の節間切片のセルロース量

図3.1に示した条件で培養した節間切片の基部1 cm切片から調製した細胞壁標品中のセルロースを定量し，単位長さ当たり (A) および細胞壁重量当たり (B) の量を算出した。3-6反復の平均値と標準誤差を示す。

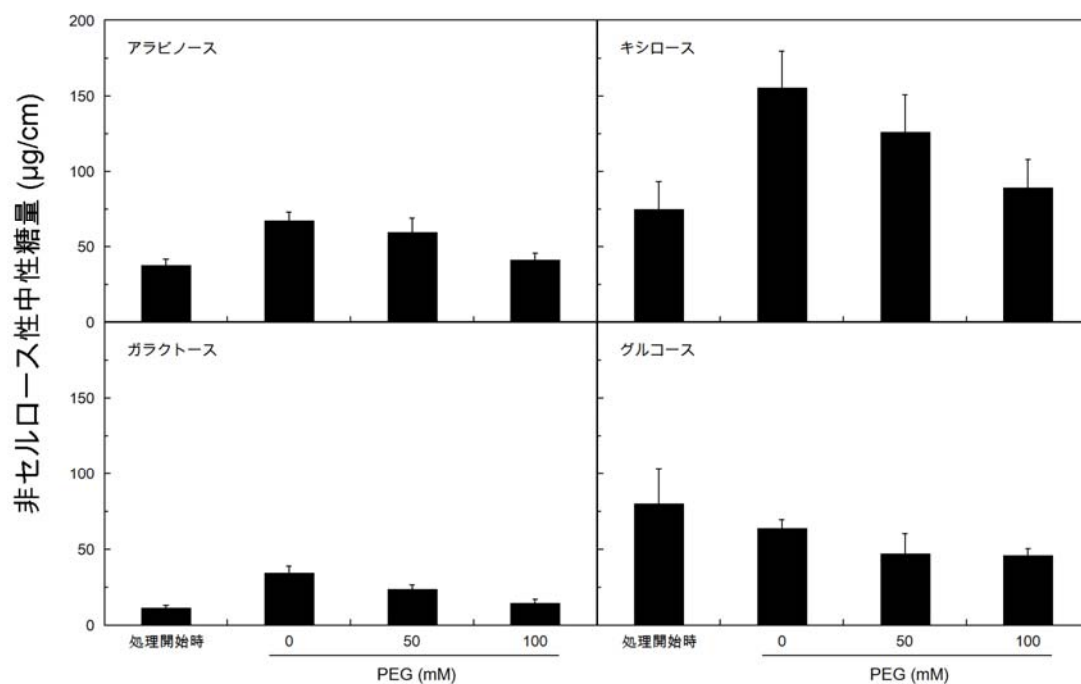


図3.5 PEG処理後の節間細胞壁の非セルロース性中性糖量

図3.1に示した条件で培養した節間切片の基部1 cmにおける細胞壁中の非セルロース性多糖類を構成する中性糖をガスクロマトグラフィで定量し、単位長さ当たりの量を算出した。3-6反復の平均値と標準誤差を示す。

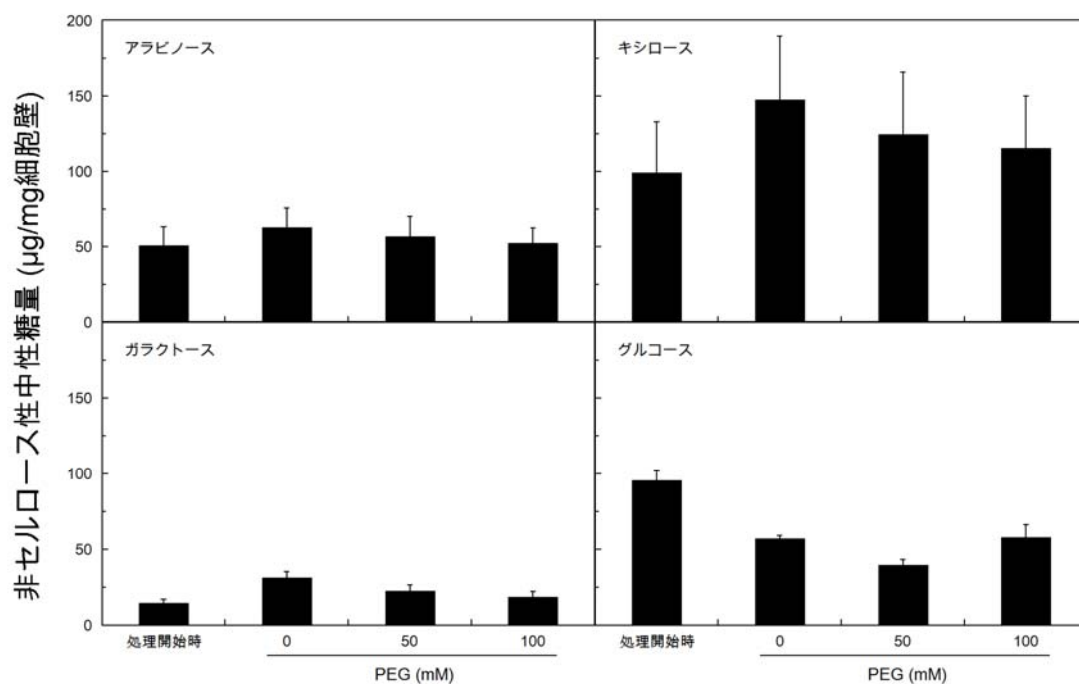


図3.6 PEG処理後の節間細胞壁の非セルロース性中性糖の組成

図3.1に示した条件で培養した節間切片の基部1 cmにおける細胞壁中の非セルロース性多糖類を構成する中性糖をガスクロマトグラフィで定量し，細胞壁重量当たりの含量を算出した。3-6反復の平均値と標準誤差を示す。

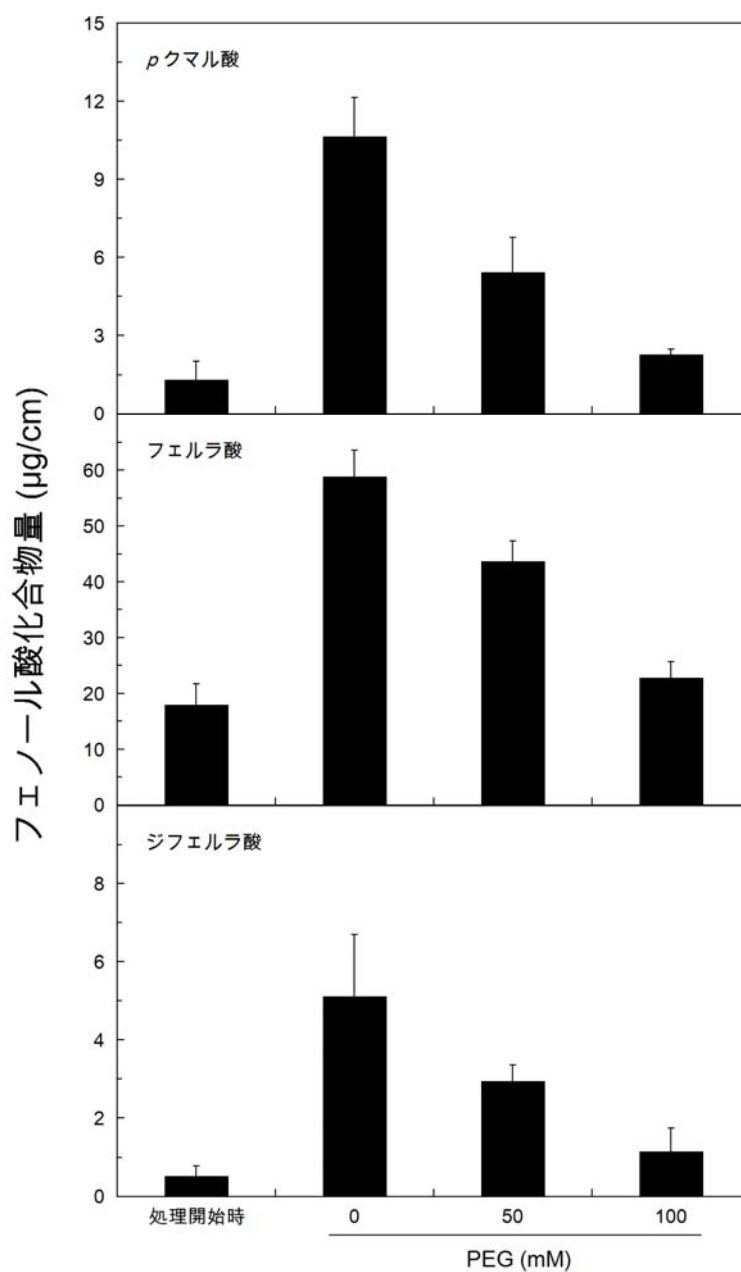


図3.7 PEG処理後の節間細胞壁のフェノール酸化合物量

図3.1に示した条件で培養した節間切片の基部1 cmにおける細胞壁中のフェノール酸化合物をHPLCで定量し，単位長さ当たりの量を算出した。3-6反復の平均値と標準誤差を示す。

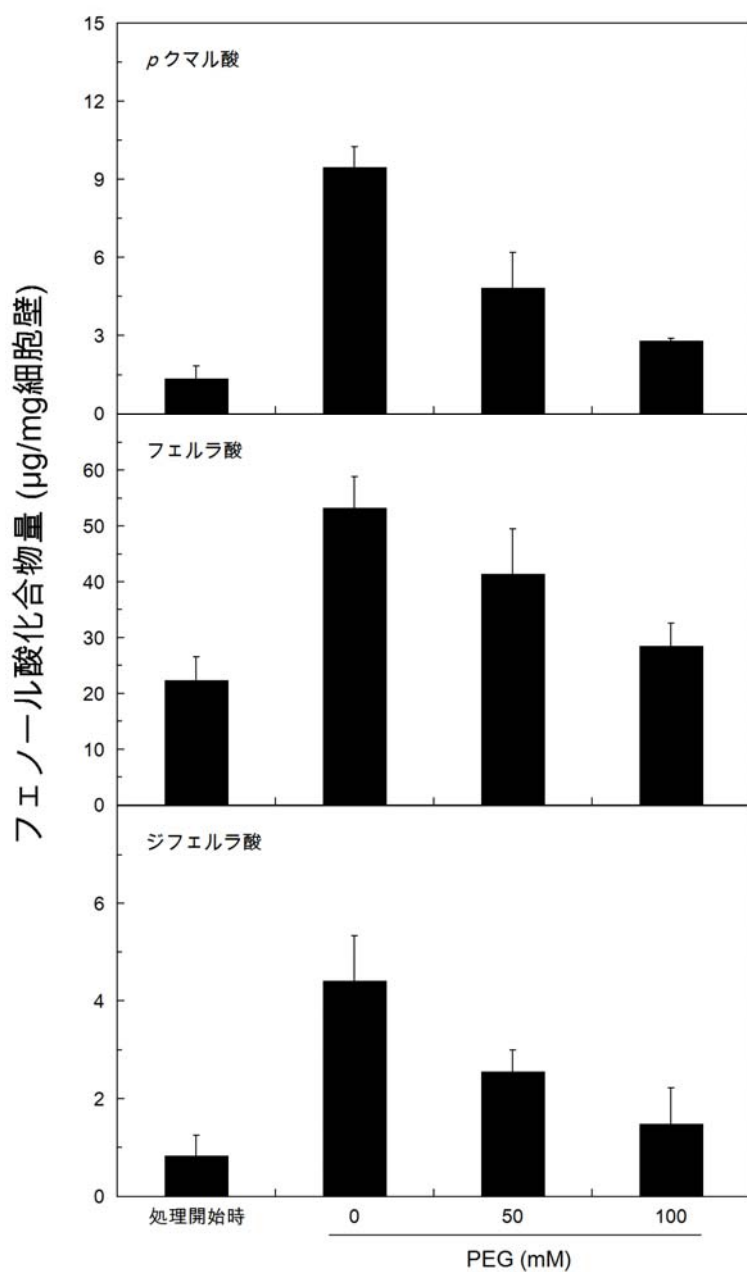


図3.8 PEG処理後の節間細胞壁のフェノール酸化合物の組成

図3.1に示した条件で培養した節間切片の基部1 cmにおける細胞壁中のフェノール酸化合物をHPLCで定量し，細胞壁重量当たりの含量を算出した。3-6反復の平均値と標準誤差を示す。

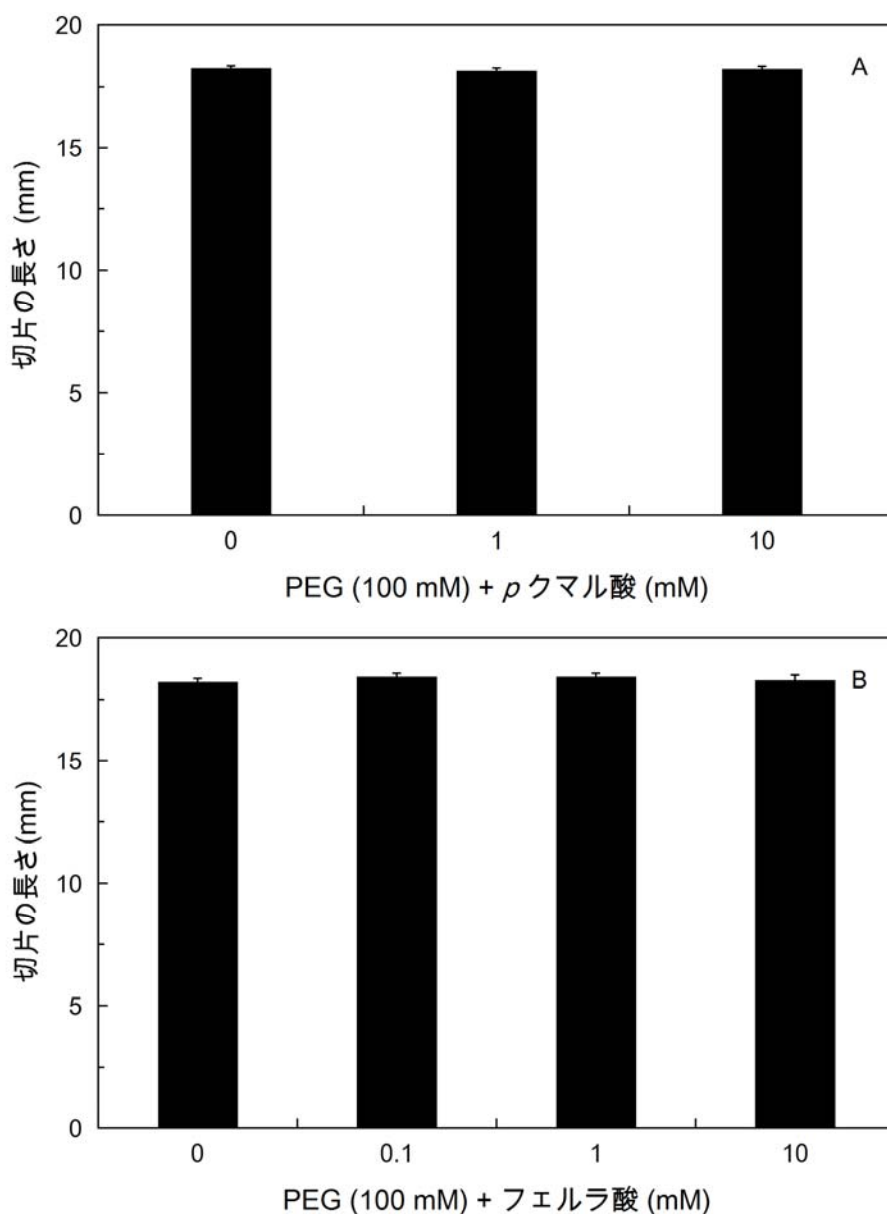


図3.9 PEGおよびフェノール酸化合物を投与して培養した後の節間切片長

浮稲茎切片を3日間深水処理した後、節間組織の基部0.5-2.5 cmの部位からなる切片を切り出した。(A) 節間切片を0, 1, 10 mMの *p* クマル酸を含む100 mMのPEG溶液20 ml中で、27°C、暗所で1日培養した。25反復の平均値と標準誤差を示す。(B) 節間切片を0, 0.1, 1, 10 mMのフェルラ酸を含む100 mMのPEG溶液20 ml中で、27°C、暗所で1日培養した。15反復の平均値と標準誤差を示す。

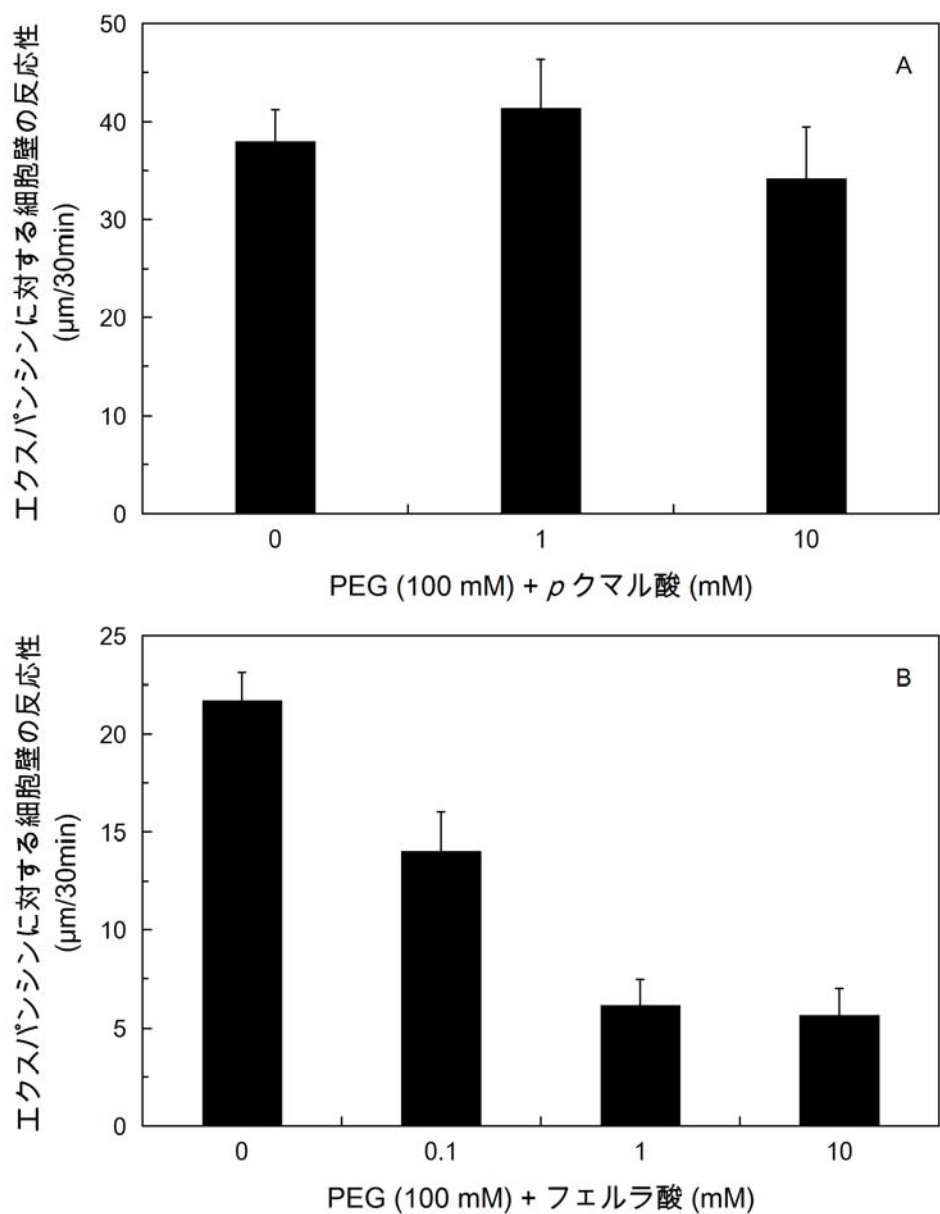


図3.10 PEGおよびフェノール酸化合物を投与して培養した節間切片におけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性

図3.9に示した条件で培養した節間切片の基部1 cmにおけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性を測定した。図1.9と同様に、熱処理によって内生のタンパク質を失活させた節間切片を10 gの張力下で、酸性緩衝液（pH 4.5）中で20分間前処理したのち、黄化キュウリ胚軸の先端4 cmから抽出した細胞壁タンパク質100μgを含む酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）に交換してさらに30分間伸展させた。(A) *p*クマル酸を投与して培養した節間切片。3-4反復の平均値と標準誤差を示す。(B) フェルラ酸を投与して培養した節間切片。7-11反復の平均値と標準誤差を示す。

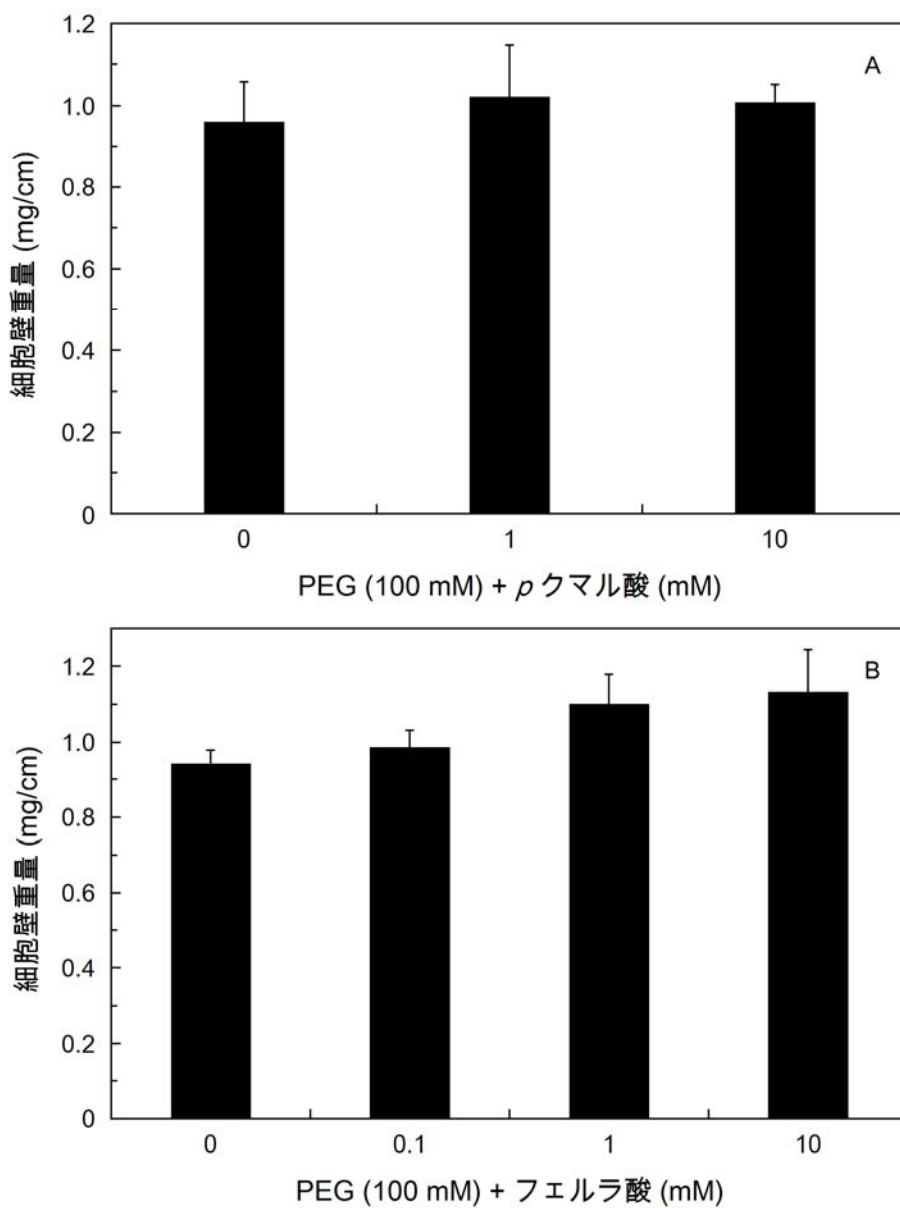


図3.11 PEGおよびフェノール酸化合物を投与して培養した節間切片の細胞壁重量

図3.9に示した条件で培養した節間切片の基部1 cmにおける細胞壁重量を調査した。(A) *p*クマル酸を投与して培養した節間切片。3反復の平均値と標準誤差を示す。(B) フェルラ酸を投与して培養した節間切片。3反復の平均値と標準誤差を示す。

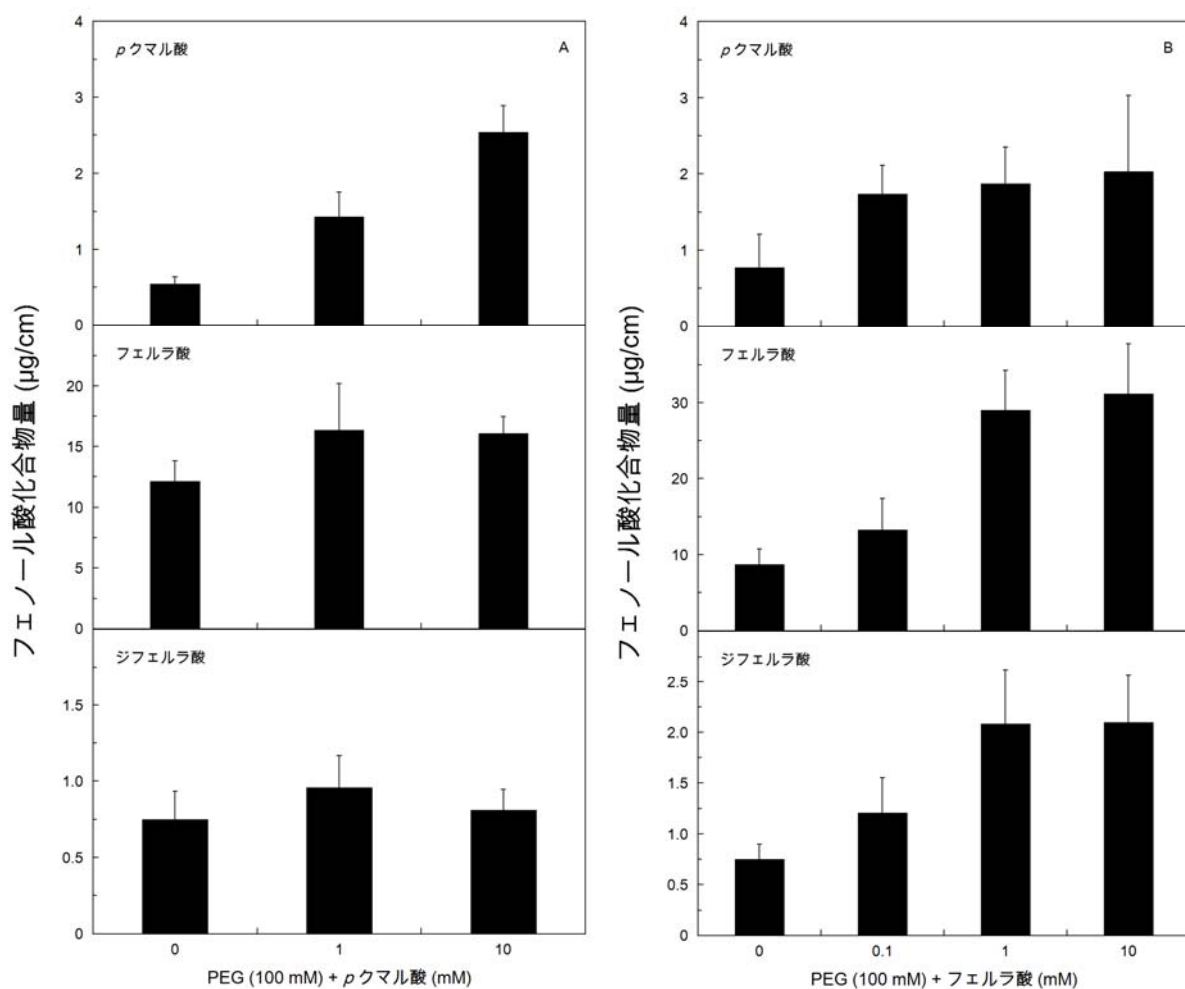


図3.12 PEGおよびフェノール酸化合物を投与して培養した節間切片のフェノール酸化合物量

図3.9に示した条件で培養した節間切片の基部1 cmにおける細胞壁中のフェノール酸化合物をHPLCで定量し、単位長さ当たりの量を算出した。(A) *p*クマル酸を投与して培養した節間切片。3反復の平均値と標準誤差を示す。(B) フェルラ酸を投与して培養した節間切片。3反復の平均値と標準誤差を示す。

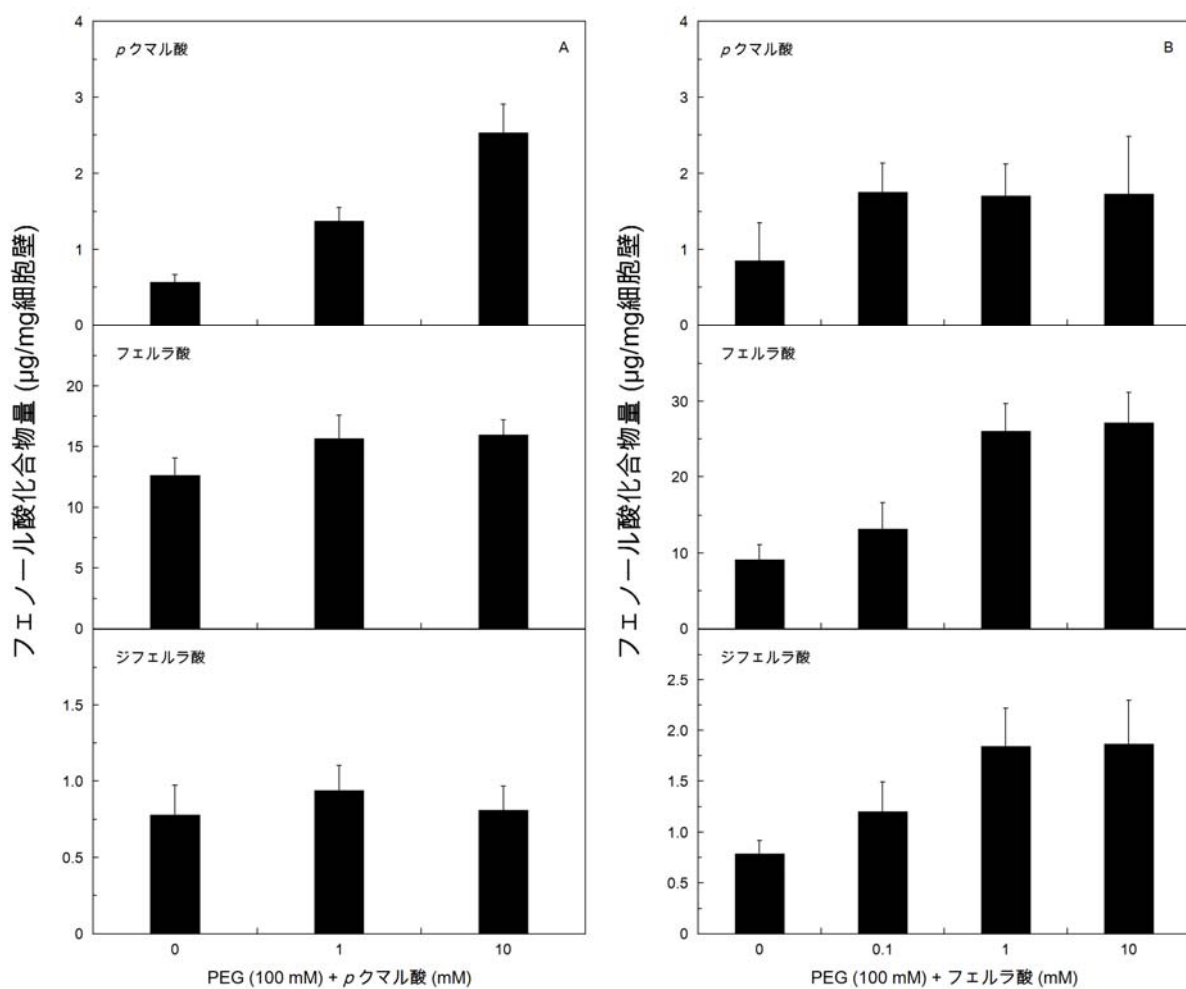


図3.13 PEGおよびフェノール酸化合物を投与して培養した節間切片のフェノール酸化合物の組成

図3.9に示した条件で培養した節間切片の基部1 cmにおける細胞壁中のフェノール酸化合物をHPLCで定量し、細胞壁重量当たりの含量を算出した。(A) *p*クマル酸を投与して培養した節間切片。3反復の平均値と標準誤差を示す。(B) フェルラ酸を投与して培養した節間切片。3反復の平均値と標準誤差を示す。

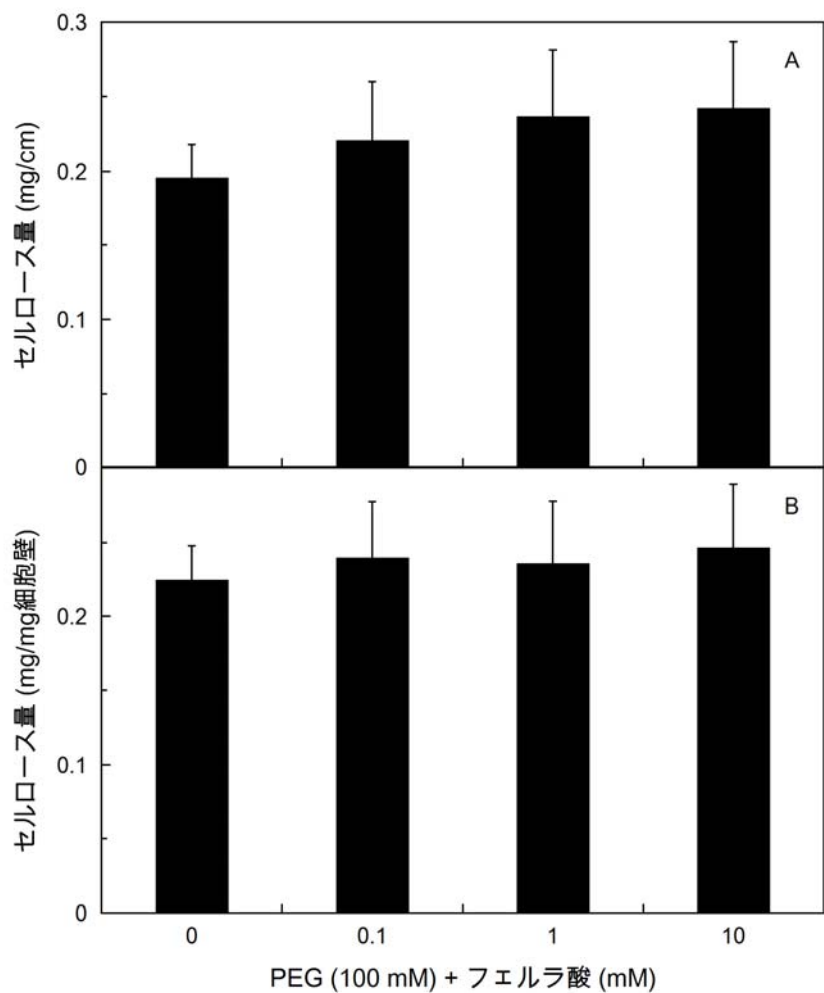


図3.14 PEGおよびフェルラ酸を投与して培養した節間切片における細胞壁のセルロース量

図3.9Bに示した条件で培養した節間切片の基部1 cm切片から調製した細胞壁標品中のセルロースを定量し、単位長さ当たり (A) および細胞壁重量当たり (B) の量を算出した。3反復の平均値と標準誤差を示す。

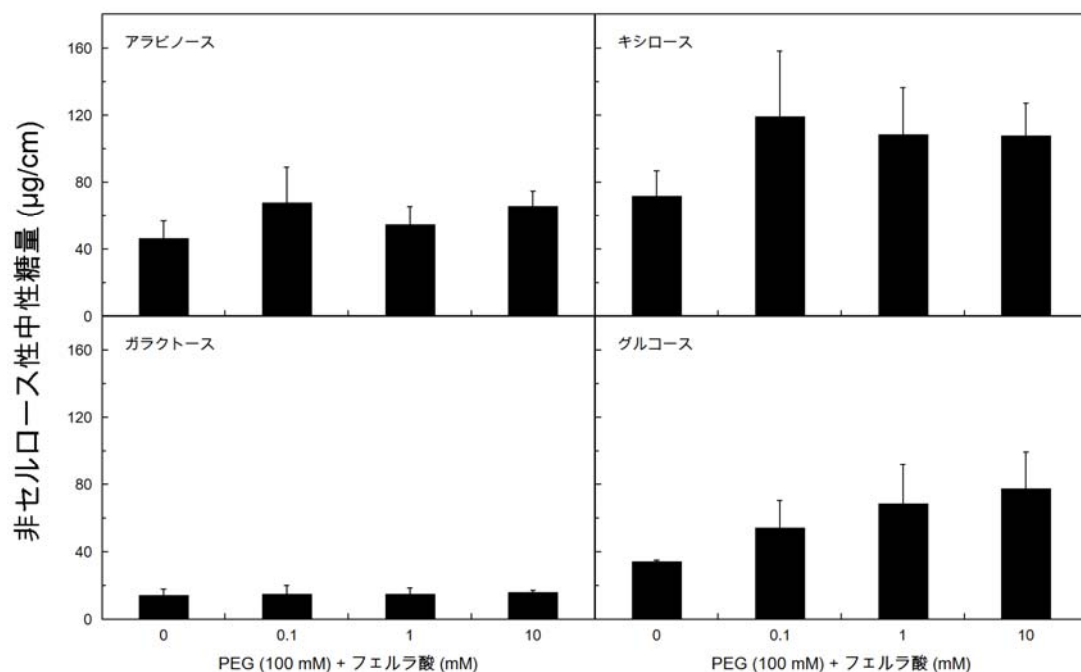


図3.15 PEGおよびフェルラ酸を投与して培養した節間切片における細胞壁の非セルロース性中性糖量

図3.9Bに示した条件で培養した節間切片の基部1 cmにおける細胞壁中の非セルロース性多糖類を構成する中性糖をガスクロマトグラフィで定量し，単位長さ当たりの量を算出した。3反復の平均値と標準誤差を示す。

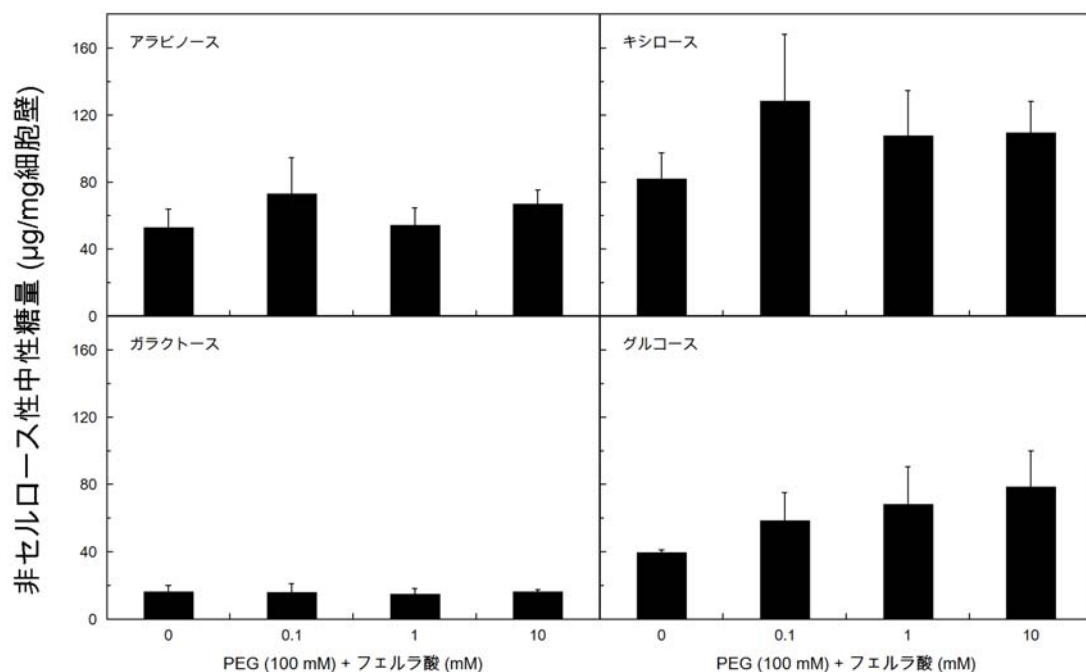


図3.16 PEGおよびフェルラ酸を投与して培養した節間切片における細胞壁の非セルロース性中性糖量の組成

図3.9Bに示した条件で培養した節間切片の基部1 cmにおける細胞壁中の非セルロース性多糖類を構成する中性糖をガスクロマトグラフィで定量し、細胞壁重量当たりの含量を算出した。3反復の平均値と標準誤差を示す。

表3.1 細胞壁の構成糖とエクспанシンに対する反応性との関係

細胞壁構成糖 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 細胞壁)	相関係数
セルロース	-0.804
ヘミセルロース	
アラビノース	-0.239
キシロース	-0.512
ガラクトース	0.414
グルコース	-0.971 *

図3.10B, 3.14B, 3.16のデータからそれぞれの相関係数を決定した。*は5%水準で統計的に有意

表3.2 細胞壁中のフェノール酸化合物とエクспанシンに対する細胞壁の反応性との関係

フェノール酸化合物 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 細胞壁)	相関係数
<i>p</i> クマル酸	-0.841
フェルラ酸	-0.971 *
ジフェルラ酸	-0.995 **

図3.10B, 3.13Bのデータからそれぞれの相関係数を決定した。**は1%, *は5%水準で統計的に有意

エクспанシンによる浮稲節間の伸長調節

本研究では、まず第 1 章において深水条件下での節間伸長にエクспанシンが関与している可能性について検討した。深水処理した茎切片から得た節間切片の伸長は pH 5.5 の弱酸性条件で最大に達した (図 1.3)。この pH 条件での節間組織の伸長反応を、深水処理した節間と気中培養した節間とで部位別に比較したところ、深水処理した節間は気中培養した節間よりも酸による伸長反応が大きいことが見出された (図 1.4)。したがって、浮稲節間の深水条件下での伸長には、節間組織の酸による伸長反応の増大が関与している可能性が考えられ、エクспанシンはその作用を媒介することで急速な節間伸長に寄与している可能性が示唆される。

次に、深水処理した節間と気中培養した節間において、内生のエクспанシンによって媒介される、酸による細胞壁の伸展を比較した。節間深水処理した節間は、気中培養した節間に比べて酸による細胞壁伸展性が高かった (図 1.5)。このときの節間中の細胞壁タンパク質量および細胞壁タンパク質中のエクспанシン活性には差が認められなかった (図 1.6, 図 1.8) が、エクспанシンに対する細胞壁の反応性は、深水処理した節間の方が気中培養した節間よりも高かった (図 1.9)。深水処理した節間において、エクспанシンに対する細胞壁の反応性が高かった部位は基部の 4 cm であり、この部位は節間の細胞分裂部位および伸長部位におよそ一致する。

そして、最上位 1 cm のデータが示すように、すでに伸長を終えた細胞においては、たとえ深水条件下におかれてもエクспанシンに対する細胞壁の反応性が再び増加するということとはなかった。これらの結果から、深水条件下での浮稲節間の伸長には、深水条件下で新たに生じた細胞において、エクспанシンに対する細胞壁の反応性が高く維持されることが重要であると考えられる。

第 2 章では、深水条件から空気中に移した茎切片の節間と深水下に維持した茎切片の節間を用いて同様の調査を行い、エクспанシンによる節間伸長の調節についてさらに検討した。この調査においても、深水条件から空気中に移した節間と深水条件下に維持した節間とでエクспанシン活性に差がみられず（図 2.4）、それと節間の伸長速度（図 2.1B）との間に相関は認められなかった（表 2.1）。エクспанシンに対する細胞壁の反応性は、深水条件下に維持した節間に比べて深水条件から空気中に移した節間ではより急速に低下し（図 2.5）、節間の伸長速度と高い正の相関を示した（表 2.1）。したがって、深水条件から空気中に移すことによる節間伸長の停止（図 2.1A）は、その節間におけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性の低下によって引き起こされたと考えられ、一方深水下に維持した節間では、細胞壁の反応性が比較的高いレベルに維持されたため、節間伸長が継続して生じたと考えられる。このように、浮稲節間の伸長調節にはエクспанシンに対する細胞壁の反応性が重要な役割を担っていることが示唆される。

細胞壁構造がエクспанシンに対する細胞壁の反応性に及ぼす影響

第2章において、深水条件から空気中に移した節間と深水条件下に維持した節間において細胞壁構成糖を分析し、それらとエクспанシンに対する細胞壁の反応性との関係について検討を行った。細胞壁中のセルロース量および非セルロース性多糖類量（図 2.7, 図 2.8），そして非セルロース性中性糖の組成を調査し（図 2.9, 図 2.10），細胞壁中のキシロース量（図 2.9）がエクспанシンに対する細胞壁の反応性と有意な負の相関を示すことを見出した（表 2.2）。したがって、キシロースを主とする多糖の増加は、エクспанシンに対する細胞壁の反応性の低下に関与させると考えられる。

第3章では、高浸透圧ストレス下で培養して伸長を停止させた節間切片においてエクспанシンに対する細胞壁の反応性および細胞壁構造を調査し、それらの関係についてさらに検討を行った。浸透圧ストレス下で培養した節間切片は、浸透圧ストレスを与えなかった切片に比べてエクспанシンに対する細胞壁の反応性が高く維持された（図 3.2B）。このときの細胞壁中のフェノール酸化合物、*p* クマル酸・フェルラ酸・ジフェルラ酸の含量は、浸透圧ストレスを与えなかった切片では増加したのに対して浸透圧ストレス下で培養した切片では低く維持されていた（図 3.7, 図 3.8）。これらの結果から、フェノール酸化合物の蓄積はエクспанシンに対する細胞壁の反応性を低下させる可能性が示唆される。

この可能性を検討するため、フェルラ酸を投与して浸透圧ストレス下で培養した

節間切片においてエクспанシンに対する細胞壁の反応性を調査した。フェルラ酸の投与によってエクспанシンに対する細胞壁の反応性は低下し（図 3.10B），同時に細胞壁中のフェルラ酸やジフェルラ酸は増加し（図 3.12B，図 3.13B），エクспанシンに対する細胞壁の反応性との間に強い負の相関を示した（表 3.2）。したがって，フェルラ酸およびジフェルラ酸は，エクспанシンに対する細胞壁の反応性を低下させる役割を持つ可能性が示唆される。

以上の結果より，エクспанシンに対する細胞壁の反応性を低下させる作用をもつと考えられるのは，細胞壁中のキシロースを主とする多糖，フェルラ酸，そしてジフェルラ酸である。これらの細胞壁構成物質が協働してエクспанシンに対する細胞壁の反応性を低下させるメカニズムとして考えられるモデルを図 4.1 に示した。エクспанシンに対する細胞壁の反応性を最も直接的に低下させる作用をもつのは，細胞壁のマトリックス多糖（非セルロース性多糖類）に結合したフェルラ酸のカップリングによるジフェルラ酸の形成である可能性が高い。ジフェルラ酸の形成は細胞壁のマトリックス多糖どうしの架橋結合を導き，エクспанシンがセルロースとマトリックス多糖の間の水素結合を切断したとしても，マトリックス多糖の架橋によって細胞壁のゆるみ（伸展性の増加）が妨げられるのだろう。そして，キシロースを主とする多糖は，フェルラ酸の主な結合部位としての役割を担っているのかもしれない。その多糖を同定することにより，エクспанシンに対する細胞壁に対する反応性が低下するメカニズムをさらに明らかにすることができるだろう。

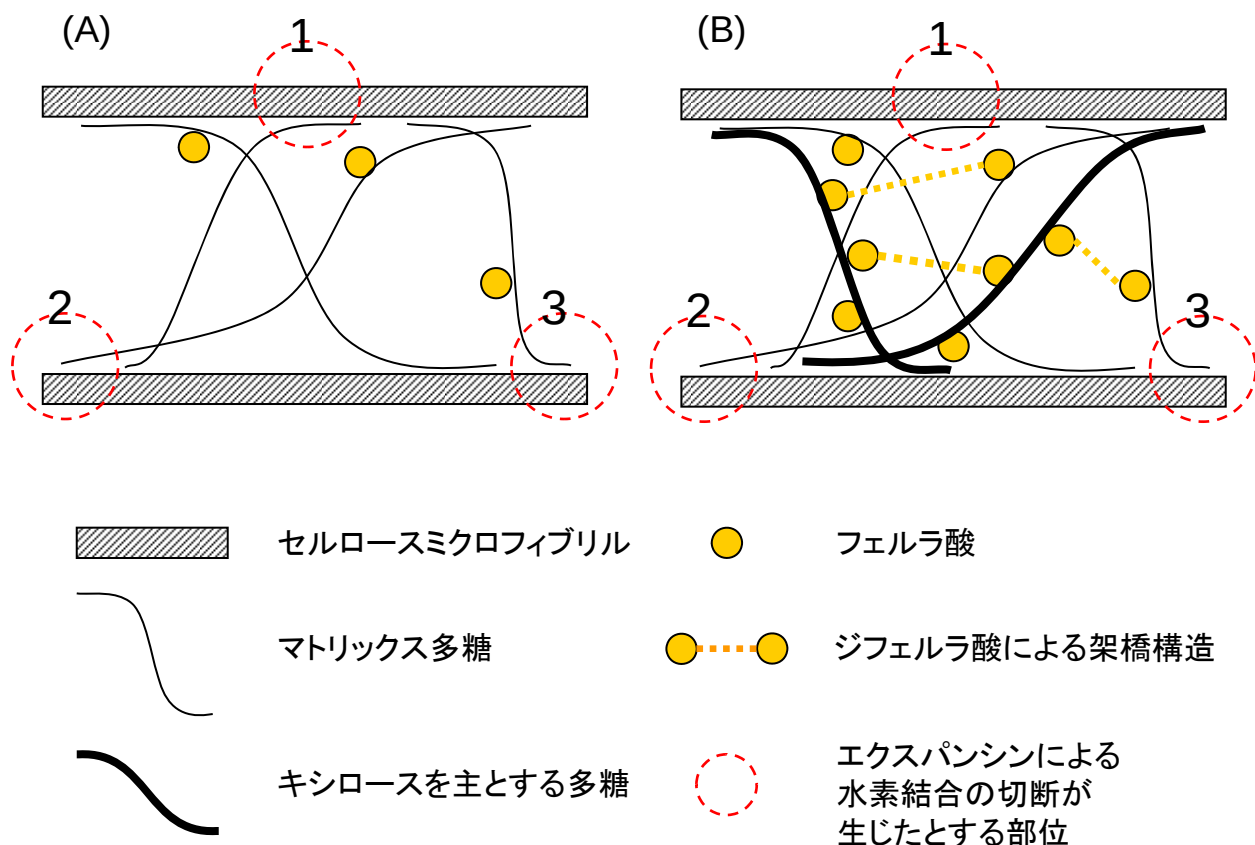


図4.1 キシロースを主とする多糖，フェルラ酸，ジフェルラ酸がエキスパンシンに対する節間細胞壁の反応性の低下を導くメカニズムのモデル

(A) 伸長中の節間の細胞壁のモデル。エキスパンシンによる水素結合の切断が生じたとする3つの部位すべてで細胞壁のゆるみが生じ、細胞壁伸展性が増加する。(B) エキスパンシンに対する反応性が低下した細胞壁のモデル。細胞壁中のフェルラ酸が増加し、それに伴ってジフェルラ酸が形成される。ジフェルラ酸はマトリックス多糖の架橋結合を導き、細胞壁構造が固定される。キシロースを主とする多糖は、フェルラ酸の主な結合部位としての役割を担う。この状態では、エキスパンシンによる水素結合の切断が生じたとする部位のうち、部位1では細胞壁のゆるみが生じるが、部位2および部位3においてはマトリックス多糖どうしがジフェルラ酸によって架橋されているため、細胞壁のゆるみが生じず、エキスパンシンによって媒介される細胞壁の伸展性の増加は(A)よりも小さい。

摘要

浮稲は深水条件下で急速に節間を伸長させる特徴をもち、それによって深水条件を生き抜くことができる。その節間伸長の調節における細胞壁タンパク質エクспанシンの関与について調査した。細胞伸長には細胞壁の伸展が不可欠であり、エクспанシンは酸性条件下で細胞壁の伸展を触媒する作用を持つタンパク質である。

まず、深水条件下での節間伸長にエクспанシンが関与している可能性について検討した。深水処理した茎切片の節間組織から得た切片の伸長に及ぼす pH の影響を調査した結果、節間切片の伸長反応は pH 6.0 以下で促進され、pH 5.5 の弱酸性条件で最大に達した。次にこの pH 条件での節間組織の伸長反応を、深水処理した節間と気中培養した節間とで部位別に比較したところ、深水処理した節間は気中培養した節間よりも酸による伸長反応が大きいことが明らかになった。以上の結果から、浮稲節間の深水条件下での伸長には、節間組織の酸による伸長反応の増大が関与している可能性が考えられ、エクспанシンはその作用を媒介することで急速な節間伸長に寄与している可能性が示唆される。

次に、深水処理した節間と気中培養した節間とで、内生のエクспанシンによって媒介される、酸による細胞壁の伸展を測定し部位別に比較した。気中培養した節間に比べて、深水処理した節間は調査したすべての部位で酸による細胞壁伸展性が高かった。このときの節間中の細胞壁タンパク質量および細胞壁タンパク質中のエ

クспанシン活性には、深水処理した節間と気中培養した節間との間に差が認められなかった。一方、エクспанシンに対する細胞壁の反応性は、ほとんどの部位で、深水処理した節間の方が気中培養した節間よりも高かった。

深水条件から空気中に移した茎切片の節間と、深水条件下に維持した茎切片の節間とで、酸による細胞壁伸展性、エクспанシン活性、エクспанシンに対する細胞壁の反応性を経時的に調査し比較した。深水条件下に維持して培養することにより節間細胞壁の酸による伸展性は低下したが、深水条件から空気中に移した節間ではより急速に伸展性が低下し、これらの変化は伸長速度の変化と非常に高い正の相関を示した。このときのエクспанシン活性は、深水条件から空気中に移した節間と深水条件下に維持した節間とで差がみられず、節間の伸長速度や酸による細胞壁伸展性との相関は認められなかった。エクспанシンに対する細胞壁の反応性は、深水条件下に維持した節間でも低下がみられたが、深水条件から空気中に移した節間ではより急速に低下し、節間の伸長速度や酸による細胞壁伸展性の変化と高い正の相関を示した。これらの結果より、浮稲節間の伸長調節には、エクспанシン活性よりもエクспанシンに対する細胞壁の反応性が重要な役割を担っていることが示唆される。

深水条件から空気中に移した節間と、深水条件下に維持した節間とで、細胞壁構成糖を分析し、それらとエクспанシンに対する細胞壁の反応性との関係について検討を行った。細胞壁中のセルロース量は、深水条件から空気中に移した節間にお

いて顕著に増加し、一方深水条件下に維持した節間ではほぼ一定であった。したがって、深水条件から空気中に移した節間におけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性の低下にはこのセルロース量の増加が関与している可能性が考えられるが、深水条件下に維持した節間におけるエクспанシンに対する細胞壁の反応性の低下は、セルロース量の変化によっては説明できない。次に細胞壁を構成する非セルロース性中性糖の組成を調査した。深水条件下に維持した節間でも、深水条件から空気中に移した節間でも、細胞壁中のアラビノース量およびガラクトース量はほぼ一定であり、またグルコース量は徐々に減少したものの、培養条件による差は認められなかった。細胞壁中のキシロース量は、深水条件から空気中に移されることによって顕著に増加し、また深水処理を続けた節間でも、長期間培養することによってキシロース量が増加し、これらのキシロース量の変化はエクспанシンに対する細胞壁の反応性と負の相関を示した。したがって、キシロースを主とする多糖の増加がエクспанシンに対する細胞壁の反応性の低下に関与している可能性が示唆される。

深水条件下で伸長中の節間組織から得た切片を高浸透圧ストレス下で培養し、エクспанシンに対する細胞壁の反応性および細胞壁構造を調査し、それらの関係についてさらに検討を行った。浸透圧ストレス下で培養した節間切片は、浸透圧ストレスを与えなかった切片に比べてエクспанシンに対する細胞壁の反応性が高く維持されていることが明らかになった。細胞壁構造を調査した結果、細胞壁中のフェ

ノール酸化合物である *p* クマル酸，フェルラ酸，ジフェルラ酸含量は，浸透圧ストレスを与えなかった切片では増加していたのに対して浸透圧ストレス下で培養した切片では低く維持されていた。したがって，これらのフェノール酸化合物の蓄積がエクспанシンに対する細胞壁の反応性を低下させる可能性が示唆される。

この可能性を検討するため，*p* クマル酸を投与して浸透圧ストレス下で培養した節間切片で同様の調査を行った。*p* クマル酸の投与によって，細胞壁中の *p* クマル酸量は増加したが，このときのエクспанシンに対する細胞壁の反応性に変化はみられなかった。したがって，*p* クマル酸の蓄積はエクспанシンに対する細胞壁の反応性には影響を及ぼさない可能性が示唆される。

次に，フェルラ酸を投与して浸透圧ストレス下で培養した節間切片においてエクспанシンに対する細胞壁の反応性を調査した結果，フェルラ酸の投与によるエクспанシンに対する細胞壁の反応性の低下がみとめられた。このときの細胞壁中のフェルラ酸量は，フェルラ酸の投与によって増加し，エクспанシンに対する細胞壁の反応性との間に強い負の相関を示した。また，細胞壁中のジフェルラ酸量とエクспанシンに対する反応性との間にも強い負の相関が認められた。したがって，細胞壁におけるフェルラ酸およびジフェルラ酸の蓄積は，エクспанシンに対する細胞壁の反応性を低下させる因子である可能性が示唆される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり長年にわたって御指導を賜りました神戸大学農学部熱帯有用植物学研究室の伊藤一幸教授，東哲司准教授に謹んで感謝の意を表します。

論文執筆にあたり多大な御助言を賜りました植物栄養学研究室の杵本敏男教授，資源植物生産学の三十尾修司教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり御助言を賜りました熱帯有用植物学研究室の前教授である安田武司名誉教授，細胞機能制御学研究室の南森隆司教授に謹んで感謝の意を表します。

共に研究を遂行して頂いた熱帯有用植物学研究室の定井綾子氏，置塩琢磨氏，池町健太氏，井上義隆氏，伊藤俊輔氏，太田健介氏，樋上稔晃氏に謹んで感謝の意を表します。多くの助言を頂き，時には皆様から刺激を受けることで，研究に邁進することができました。

本研究室の同窓生の西山雅子氏，武村光春氏，内田ゆう子氏，難波早織氏，横山圭氏，木田真理子，踞尾みのり氏，藤原さゆり氏，Atera Evans 氏，曾和祐介氏，西田嶺明氏に謹んで感謝の意を表します。皆様との交流が研究室生活をより豊かにし，研究に邁進する力となりました。

最後に，神戸大学農学部熱帯有用植物学研究室を卒業されました諸先輩方および後輩の皆様，そして関係者各位に感謝の意を表します。

引用文献

Azuma T, Mihara F, Uchida N, Yasuda T, Yamaguchi T 1990. Plant hormonal regulation of internodal elongation of floating rice stem sections. *Jpn. J. Trop. Agr.* **34**: 271-275.

Azuma T, Mihara F, Uchida N, Yasuda T, Yamaguchi T 1991. Influence of humidity of ethylene-induced internodal elongation in floating rice. *Plant Cell Physiol.* **32**: 307-309.

Azuma T, Hirano T, Deki Y, Uchida N, Yasuda T, Yamaguchi T 1995. Involvement of the decrease in levels of abscisic acid in the internodal elongation of submerged floating rice. *J. Plant Physiol.* **146**: 323-328.

Azuma T, Sumida Y, Kaneda Y, Uchida N, Yasuda T 1996. Changes in cell wall polysaccharides in the internodes of submerged floating rice. *Plant Growth Regul.* **19**: 183-187.

Azuma T, Ueno S, Uchida N, Yasuda T 1997. Gibberellin-induced elongation and osmoregulation in internodes of floating rice. *Physiol. Plant.* **99**: 517-522.

Azuma T, Hatanaka T, Uchida N, Yasuda T 2003a. Enhancement of transpiration by ethylene is responsible for absence of internodal elongation in floating rice at low humidity. *J. Plant Physiol.* **160**: 1125-1128.

Azuma T, Hatanaka T, Uchida N, Yasuda T 2003b. Interactions between abscisic acid,

ethylene and gibberellin in internodal elongation in floating rice: the promotive effect of abscisic acid at low humidity. *Plant Growth Regul.* **41**: 105-109.

Azuma T, Okita N, Nanmori T, Yasuda T 2005a. Changes in cell wall-bound phenolic acids in the internodes of submerged floating rice. *Plant Prod. Sci.* **8**: 441-446.

Azuma T, Okita N, Nanmori T, Yasuda T 2005b. Relationship between the deposition of phenolic acids in the cell walls and the cessation of rapid growth in internodes of floating rice. *Plant Prod. Sci.* **8**: 447-453.

Azuma T, Honda T, Sadai A, Sasayama D, Itoh K 2007. Suppression and promotion of growth by ethylene in rice seedlings depends on ambient humidity. *J. Plant Physiol.* **164**: 1683-1687.

Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ, Stone BA 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.* **113**: 291-299.

Bleecker AB, Schuette JL, Kende H 1986. Anatomical analysis of growth and developmental patterns in the internode of deepwater rice. *Planta* **169**: 490-497.

Bonner J 1934. The relation of hydrogen ions to the growth rate of the *Avena* coleoptile. *Protoplasma* **21**: 406-423.

Bradford M 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Nal. Biochem.* **72**: 248-254.

Carpita NC 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 445-476.

Catling D 1992. The deepwater rice plant. In: *Rice in deep water*. Macmillan Press, London and Basingstoke. pp 105-169.

Ceccardi TL, Barthe GA, Derrick KS 1998. A novel protein associated with citrus blight has sequence similarities to expansin. *Plant Mol. Biol.* **38**: 775-783.

Chanliaud E, Burrows KM, Jeronimidis G, Gidley MJ 2002. Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. *Planta* **215**: 989-9966.

Cho HT, Kende H 1997a. Expansins in deepwater rice internodes. *Plant Physiol.* **113**:1137-1143.

Cho HT, Kende H 1997b. Expansins and internodal growth of deepwater rice. *Plant Physiol.* **113**: 1145-1151.

Cho HT and Kende H 1997c. Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *Plant Cell* **9**: 1661-1671.

Cho HT, Kende H 2000. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**: 9783-9788.

Choi D, Lee Y, Cho HT, Kende H 2003. Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants. Plant Cell **15**: 1386-1398.

Cohen E, Kende H 1987. *In vivo* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase activity in internodes of deepwater rice. Plant Physiol. **84**: 282-286.

Cosgrove DJ 1989. Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. Planta **177**: 121-130.

Cosgrove DJ, Li ZC 1993. Role of expansin in cell enlargement of oat coleoptiles. Plant Physiol. **103**: 1321-1328.

Cosgrove DJ, Durachko DM 1994. Autolysis and extension of isolated walls from growing cucumber hypocotyls. J. Exp. Bot. **45**: 1711-1719.

Cosgrove DJ, Bedinger P, Durachko DM 1997. Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**: 6559-6564.

Cosgrove DJ 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **50**: 391-417.

Cosgrove DJ 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**: 321-326.

Cosgrove DJ, Li LC Cho HT, Hoffman-Benning S, Moore RC, Blecker D 2002. The growing world of expansins. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1436-1444.

Cosgrove DJ 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* **6**: 850-861.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.

Fleming AJ, McQueen-Mason S, Mandel T, Kuhlemeier C 1997. Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin. *Science* **276**: 1415-1418.

Fry SC 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**: 165-186.

Fry SC 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 497-520.

Hager A 2003. Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: hitorical and new aspects. *J. Plant Res.* **116**: 483-505.

Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H, Serrano R 1991. Auxin induces exocytosis and

the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta* **185**: 527-537.

Harris PJ, Hartley RD 1976. Detection of bound ferulic acid in the cell walls of the *Gramineae* by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* **259**: 508-510.

Hoffmann-Benning S, Kende H 1992. On the role of abscisic acid and gibberellin in the regulation of growth in rice. *Plant Physiol.* **99**: 1156-1161.

Huang J, Takano T, Akita S 2000. Expression of α -expansin genes in seedlings of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **211**: 467-473.

Huke RE, Huke EH 1997. Rice area by type of culture: south, Southeast and East Asia, a Revised and Updated Data Base. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. pp 1-59.

Hutchinson KW, Singer PB, Diaz-Sala C, Greenwood MS 1999. Expansins are conserved in conifers and expressed in response to exogenous auxin. *Plant Physiol.* **120**: 827-832.

井之上準 1987. 東南アジアの浮稲とその生態. 東南アジア研究 **25**: 51-61.

IRRI 2002. Rice Almanac 3rd edition. Eds: Maclean JL, Dawe DC, Hardy B, Hettel GP. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK. pp 1-253

IRRI 2008. Rice Statistics "Distribution of rice crop area, by environment"
<http://www.irri.org/science/ricestat/data/may2008/WRS2008-Table30.pdf> (2008/10/28
閲覧)

Kaku T, Tabuchi A, Wakabayashi K, Kamisaka S, Hoson T 2002. 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**: 21-26.

Kawano R, Doi K, Yasui H, Mochizuki T, Yoshimura A 2008. Mapping of QTLs for floating ability in rice. *Breed. Sci.* **58**: 47-53.

Keller E, Cosgrove DJ 1995. Expansins in growing tomato leaves. *Plant J.* **8**: 795-802.

Kende H, van der Knaap E, Cho HT 1998. Deepwater rice: a model plant to study stem elongation. *Plant Physiol.* **118**: 1105-1110.

Kende H, Bradford KJ, Brummell DA, Cho HT, Cosgrove DJ, Fleming AJ, Gehring C, Lee Y, McQueen-Mason S, Rose JKC, Voesenek LACJ 2004. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol. Biol.* **55**: 311-314.

Kim JH, Cho HT, Kende H 2000. α -expansins in the semi-aquatic ferns *Marsilea quadrifolia* and *Regnellidium diphyllum*: evolutionary aspects and physiological role in

rachis elongation. *Planta* **212**: 85-92.

Knox B and Suphioglu C 1996. Environmental and molecular biology of pollen allergens. *Trends Plant Sci.* **1**: 156-164.

Kudla U, Qin L, Milac A, Kielak A, Maissen C, Overmars H, Popeijus H, Roze E, Petrescu A, Smant G, Bakker J, Helder J 2005. Origin, distribution and 3D-modeling of Gr-EXPB1, an expansin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *FEBS letters* **579**: 2451-2457.

Kutschera U, Kende H 1988. The biophysical basis of elongation growth in internodes of deepwater rice. *Plant Physiol.* **88**: 361-366.

Laine MJ, Haapalainen M, Wahlroos T, Kankare K, Nissinen R, Kassuwi S, Metzler MC 2000. The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* plays a role in virulence and contains an expansin-like domain. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **57**: 221-233

Lee Y, Kende H 2001. Expression of β -expansins is correlated with internodal elongation in deepwater rice. *Plant Physiol.* **127**: 645-654.

Lee Y, Kende H 2002. Expression of α -expansin and expansin like genes in deepwater rice. *Plant Physiol.* **130**: 1396-1405.

Li LC, Bedinger PA, Volk C, Cosgrove DJ 2003. Purification and characterization of four β -expansins (Zea m 1 isoforms) from maize pollen. *Plant Physiol.* **132**: 2073-2085.

Li Y, Darley CP, Ongaro V, Fleming A, Schipper O, Baldauf SL, McQueen-Mason S 2002. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiol.* **128**: 854-864.

Li Y, Jone L, McQueen-Mason S 2003. Expansins and cell growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 603-610.

Li ZC, Durachko DM, Cosgrove DJ 1993. An oat coleoptile wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta* **191**: 349-356.

Link BM and Cosgrove DJ 1998. Acid-growth response and α -expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco. *Plant Physiol.* **118**: 907-916.

Ludidi NN, Heazlewood JL, Seoighe C, Irving HR, Gehring CA 2002. Expansin-like molecules: novel functions derived from common domains. *J. Mol. Evol.* **54**: 587-594.

Maryani MM, Bradley G, Cahill DM, Gehring CA 2001. Natriuretic peptides and immunoreactants modify osmoticum-dependent volume changes in *Solanum tuberosum* L. mesophyll cell protoplasts. *Plant Sci.* **61**: 443-452.

McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell* **4**: 1425-1433.

McQueen-Mason S, Cosgrove DJ 1994. Disruption of hydrogen bonding between wall polymers by proteins that induce plant wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 6574-6578.

McQueen-Mason S 1995. Expansins and cell wall expansion. *J. Exp. Bot.* **46**: 1639-1650.

McQueen-Mason S, Cosgrove DJ 1995 . Expansin mode of action on cell walls - analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* **107**: 87-100.

Métraux JP, Kende H 1983. The role of ethylene in the growth response of submerged deep water rice. *Plant Physiol.* **72**: 441-446.

Métraux JP, Kende H 1984. The cellular basis of the elongation response in submerged deep-water rice. *Planta* **160**: 73-77

Musgrave A, Jackson MB, Ling E 1972. *Callitriche* stem elongation is controlled by ethylene and gibberellin. *Nature New Biol.* **238**: 93-96.

Nemoto K, Ukai Y, Tang DQ, Kasai Y, Morita M 2004. Inheritance of early elongation ability in floating rice revealed by diallel and QTL analysis. *Theor. Appl. Genet.* **109**:

42-47.

Nitsch JP, Nitsch C 1956. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. *Plant Physiol.* **31**: 94-111.

O'Malley RC, Lynn DG 2000. Expansin message regulation in parasitic angiosperms: marking time in development. *The Plant Cell* **12**: 1455-1465.

Pien S, Wyrzykowska J, McQueen-Mason S, Smart C, Fleming A 2001. Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 11812-11317.

Qin L, Kudla U, Roze E, Goverse A, Popeijus H, Nieuwland J, Overmars H, Jone JT, Shots A, Smant G, Bakker J, Helder J 2004. Plant degradation: a nematode expansin acting on plants. *Nature* **427**: 30

Raskin I, Kende H 1984a. Regulation of growth in stem sections of deep-water rice. *Planta* **160**: 66-72.

Raskin I, Kende H 1984b. Role of gibberellin in the growth response of submerged deep water rice. *Plant Physiol.* **76**: 947-950.

Rayle DL 1973. Auxin-induced hydrogen-ion excretion in *Avena* coleoptiles and its implications. *Planta* **114**: 63-73.

Rayle DL, Cleland RE 1970. Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiol.* **46**: 250-253.

Rayle DL, Cleland RE 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* **99**: 1271-1274.

Reinhardt D, Wittwer F, Mandel T, Kuhlemeier C 1998. Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. *Plant Cell* **10**: 1427-1437.

Rochange SF, Wenzel CL, McQueen-Mason S 2001. Impaired growth in transgenic plants over-expressing an expansin isoform. *Plant Mol. Biol.* **46**: 581-589.

Rose JKC, Bennett AB 1999. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci.* **4**: 176-183.

Sabirzhanova IB, Sabirzhanov BE, Chemeris AV, Veselov DS, Kudoyarova GR 2005. Fast changes in expression of expansin gene and leaf extensibility in osmotically stressed maize plants. *Plant Physiol. Biochem.* **43**: 419-422.

Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, Pere J, Swanson B, Nyssönen E, Bhatia A, Ward M, Penttilä M 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence

similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. Eur. J. Biochem. **269**: 4202-4211.

Sauter M, Kende H 1992. Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. Planta **188**: 362-388.

Sauter M 2000. Rice in deep water: "How to take heed against a sea of troubles". Naturwissenschaften. **87**: 289-303.

Scherban TY, Shi J, Durachko DM, Gultinan MJ, McQueen-Mason S, Shieh M, Cosgrove DJ 1995. Molecular cloning and sequence analysis of expansins-a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**: 9245-9249.

Schipper O, Schaefer D, Reski R, Fleming A 2002. Expansins in the bryophyte *Physcomitrella patens*. Plant Mol. Biol. **50**: 789-802.

Shibuya N 1984. Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. Phytochem. **23**: 2233-2237.

Smith PM, Knox RB, Singh MB 1996. Gene expression and allergen characterization. In: Pollen Biotechnology. Eds. Mohapatra SS and Knox RB. Chapman and Hall, New York. pp 125-143.

Tabuchi A, Mori H, Kamisaka S, Hoson T 2001. A new type of endo-xyloglucan transferase devoted to xyloglucan hydrolysis in the cell wall of azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.* **42**: 154-161.

Vergara BS, Jackson B, De Datta SK 1976. Deep water rice and its response to deepwater stress. In: *Climate and Rice*. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. pp 301-319.

Wakabayashi K, Hoson T, Kamisaka S 1997. Osmotic stress suppresses cell wall stiffening and the increase in cell wall-bound ferulic and diferulic acids in wheat coleoptiles. *Plant Physiol.* **113**: 967-973.

Whitney SEC, Gidley MJ, McQueen-Mason S 2000. Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *Plant J.* **22**: 327-334.

Wu Y, Sharp RE, Durachko DM, Cosgrove DJ 1996. Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol.* **111**: 765-772.

Xu B, Hellman U, Ersson B, Janson JC 2000. Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- β -1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Eur. J. Biochem.* **267**: 4970-4977.

Yang SH and Choi D 2006. Characterization of genes encoding ABA 8'-hydroxylase in ethylene-induced stem growth of deepwater rice (*Oryza sativa* L.). Biochem. Biophys. Res. Commun. **350**: 685-690.

Yuan S, Wu Y, Cosgrove DJ 2001. A fungal endoglucanase with plant cell wall activity. Plant Physiol. **127**: 324-333.

Zhao Q, Yuan S, Wang X, Zhang Y, Zhu H, Lu C 2008. Restriction of mature etiolated cucumber hypocotyl cell wall susceptibility to expansin by pretreatment with fungal pectinases and EGTA in Vitro. Plant Physiol. **147**: 1874-1885.