

植物の発生・生長に関わる細胞壁結合タンパク質の クローニングと機能解析

竹田 浩之

広島大学大学院生物圏科学研究科

Cloning and Functional Analysis of Cell Wall-Bound Proteins Related to Plant Growth and Development.

*Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739- a a*

要 旨

第 1 章 序 論

植物細胞を取り巻く細胞壁は細胞の形態を規定し物理的に支えているだけではなく物質の代謝・循環、シグナル伝達、生体防御など多くの働きを担っている。植物細胞は細胞壁を含む細胞外の空間、アポプラストに多くのタンパク質を分泌している。細胞壁に分泌されるタンパク質にのりいわれているが発生・生長時にそれらがどのようにといてはられている。本論文ではアスパラガス不定胚形成時に発現するペルオキシダーゼとユリ花粉管伸長に関わるグルカナーゼのクローニングと機能解析について述べ

第 2 章 アスパラガス不定胚形成時に発現される細胞壁結合型塩基性ペルオキシダーゼの機能

アスパラガス培養細胞は培地中の植物ホルモン濃度を变化させることで容易に不定胚を誘導させることができる。未分化のカルスと分化した不定胚から、このタンパク質の cDNA を抽出し、その情報をもとに cDNA を RT-PCR によりクローニングした。相同性検索の結果、このタンパク質は植物のペルオキシダーゼと高い相同性が認められたため、AoPOX1 と名付けた。ノザンと導直後から高い発現がみられた。AoPOX1 の機能解析を行うため不定胚細胞壁からネイティブタンパクを抽出・精製し、また AoPOX1 のリコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させた。リコンビナント AoPOX1 はコニフェニル CA) に対し高い基質特異性を示した。CA と AoPOX1 の反応産物の構造解析を GC-MS と ¹H-NMR で行った。反応産物は CA の二量体 (デヒドロジコニフェニルアルコール、DDCA) であった。不定胚のリグニン量は未分化の細胞に比べて増加しておらず、不定胚

DDCAが 10^{-8} レベルで存在していた。以上のことから不定胚形成過程に分泌されたAoPOX1はリグニン高分子を重合せずCAからDDCAを合成している。

第3章 ユリのβ-グルカナーゼ遺伝子のクローニングと発現パターン

花粉管伸長は植物における先端成長のモデルとしてよく知られており、また植物生活環において受粉から受精までに至る重要なプロセスを担っている。Kotakeららは2つのEx β-グルカナーゼ (LP-ExoI、LP-ExoII) を抽出・精製した。花粉管伸長に伴って細胞壁のグルカナーゼ活性が増加していたことから、細胞壁に分泌されるグルカナーゼが花粉管伸長に寄与している可能性が示されている。

Kotakeら (2000) が明らかにしたN末アミノ酸配列をもとにLP-ExoIとLP-ExoIIの全長cDNAをRT-PCRでクローニングした。これらのcDNA

あった。RNAは花粉管伸長に伴って発現した。LP-ExoIIは花粉管伸長に伴って発現していた。

lpCelβ (242) グルカナーゼ (LP-ExoI) のcDNAをRT-PCRでクローニングした。このcDNAはLpCel1の配列親

LpCel1のmRNAは検出されなかった。

mRNA2のRNA

LpCel1

4 CA

! " # \$ %

A A A

! " # \$ % &

2 2 2

A A 2 2 2グルカンも含む。カロースや1,3;1,4-β-グルカンはEx β-グルカナーゼの、非結晶質のセルロースはセルラーゼの基質になりうる。LP-ExoIは花粉管先端から分泌されたあと細胞壁とイオンの結合してとどまっており、グルカンを分解することで先端の

柔軟性 。 *LpCell1* の局在については不明だが、花粉管細胞に
ら、 *LP-ExoI* 同様に壁の柔軟性寄与として の壁 柔
雌蕊の細胞壁を柔らかくして花粉管の進行を助けているかもしれない。

付録 AoPOX1のプロモーター配列

不定胚形成過程で発現する *AoPOX1* のより詳しい発現解析を行うためにプロモーター領域を含む
スパラガスゲノムの5'側領域 約1.5kbをクローニングした。プロモーターモチーフの予測解析による
と、フェニルプロパノイド合成や、酸化ストレス、エチレン応答、そして胚形成に関与する cisエレメン
トが検出された。この , た な よ て *AoPOX1* の時
間的・空間的な詳しい AoPOX1の役割をより明確にする手が
かりになる