

## タバコ細胞壁に局在する酸性ホスファターゼ遺伝子の 単離とその機能解析

物質・生物機能科学専攻 博士課程後期3年次  
海 田 る み (指導教員 金子堯子)

### 1. はじめに

成長している高等植物の細胞は、一次細胞壁によって形作られている。一次細胞壁は、その骨格を構成するセルロース微繊維が壁マトリックスを構成するヘミセルロース、ペクチンや構造タンパク質と水素結合などの非共有結合で架橋されることにより形成されている。この細胞壁ネットワーク構造に関して、構築や再編過程に関与する遺伝子が、1990年以降から次第に明らかにされ、現在ようやく遺伝子発現の水準で解明することが可能となってきた。しかし、細胞膜で合成されるセルロース微繊維が、エキソサイトーシスによって分泌される壁マトリックスとどのような過程を経て網目構造を構築するのか、その機構については明らかにされていない。一次細胞壁に局在する酵素のひとつに、酸性ホスファターゼ (APase) が古くから知られている。APase は幾種類かの植物の細胞壁から 0.4~1M の塩溶液により溶出され、イオン結合で壁の構成成分と結合していることが明らかにされている。それらの酵素学的特性も報告されているが、生理的機能に関する報告例は未だない。

私たちの研究室では、タバコ XD-6 培養細胞の細胞壁に局在する APase が、細胞壁構築の初期に関わっていることを生化学的、細胞生物学的研究から推察してきた。タバコプロトプラストを細胞壁再生培地に移すと、直ちに細胞壁が再生される。その壁再生に伴い、APase も直ちにプロトプラストから再生培地へ分泌され、その分泌量が壁再生の進行に伴って増加することが確認された。一方、本酵素の精製方法が確立され、得られた精製標品を用いて部分アミノ酸配列が決定された。それらはインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) の purple acid phosphatase (PAP) との高い相同性が認められ、本酵素は PAP であることが推測された。本酵素の酵素学的特性も研究されており、それらは PAP の特性と一致することが確認されている。

本研究では、以上の知見を基に、分子生物学的研究法及び化学分析法を組み合わせ、タバコ XD-6 培養細胞の細胞壁に局在する PAP の機能を明らかにすることを目的とした。

### 2. タバコ培養細胞の purple acid phosphatase cDNA の単離

細胞壁 PAP をコードする 4 種類の cDNA クローンをタバコ細胞から単離した。これらを *NtPAP4*, *NtPAP12*, *NtPAP19* および *NtPAP21* と名付けた。

### 3. 細胞壁再生過程におけるタバコ PAP 遺伝子の発現解析

細胞壁再生過程における PAP の発現解析を行った。プロトプラスト壁再生過程における *NtPAP4*, *NtPAP12*, *NtPAP19* および *NtPAP21* 遺伝子の転写レベルの変化を調べた結果、細胞壁再生に伴い、*NtPAP12* および *NtPAP21* の速やかな mRNA の増加が認められた。再生開始から 2 時間後における *NtPAP12* および *NtPAP21* の転写レベルは、それぞれ 4.5 および 3 倍に上昇した。しかしながら、*NtPAP4* は恒常的に発現しており、一方、*NtPAP19* mRNA は検出限界以下であった。タバコ細胞プロトプラストの細胞壁再生の初期段階に、*NtPAP12* および *NtPAP21* の発現が誘導されることが示され、壁再生に関与すると推測される PAP の分子を特定することができた。

#### 4. *NtPAP12* 過剰発現による細胞壁再生への効果

4 種類の *NtPAP* のうち、細胞壁再生に伴って mRNA レベルの増加が最も高かった *NtPAP12* をタバコ細胞に導入し、*NtPAP12* を過剰発現する形質転換タバコ細胞を創出した。プロトプラストにおける細胞壁再生過程を 120 分まで、カルコフロア染色法を用い、蛍光顕微鏡により観察した。形質転換体は野生株と比較して  $\beta$ -グルカンの蓄積が促進された。蓄積の促進は、15 分後から観察され、60 分後には野生株のほぼ 2 倍量に増加した。これらの結果から、細胞壁再生の極めて初期において、*NtPAP12* は細胞膜上の  $\beta$ -グルカンの蓄積に関与していることが示された。

#### 5. 細胞壁再生過程における糖鎖の構造解析

細胞壁再生初期における糖鎖の化学構造を明らかにするため、メチル化分析を行った。その結果、60 分後に再生される細胞壁の主要な糖鎖は、野生株および形質転換体ともに、グルコースが 4 位で結合したグルカンであることが示された。さらに、このグルカンはセロビオヒドラーゼ II により著しく加水分解されたが、セロビオヒドラーゼ I によってはほとんど分解されなかったことから、還元末端がブロックされたセルロースであり、そのグルカン鎖は短いことが示された。また、*NtPAP12* の発現は、再生された壁糖鎖の組成に影響を与えなかった。これらの結果から、*NtPAP12* はセルロースの細胞膜上への蓄積を促進し、それによって、マトリックス糖鎖全体の構築が促進されると結論した。

また、本研究は、細胞壁再生の極めて初期 (60 分) に生成する主な糖鎖がセルロースであることを初めて示した。

#### 6. ま と め

プロトプラスト細胞壁再生系を用いた細胞生物学的研究法、分子生物学的研究法および化学分析法を組み合わせた本研究から、細胞壁 PAP の生理的機能として、一次壁の主構成糖鎖であるセルロースの蓄積に関与していることが推察された。本研究は、細胞壁 APase の機能を初めて示しただけでなく、再生時間 60 分で生成した nascent セルロースを初めて解析したものであると意義づけられる。

#### 発 表 論 文

Kaida R., Sage-Ono K., Kamada H., Okuyama H., Syono K. and Kaneko S.T.

Isolation and characterization of four cell wall purple acid phosphatase genes from tobacco cells.

Biochimica et Biophysica Acta **1625** (2): 134-140, 2003.

#### 遺伝子登録

*Nicotiana tubacum* PAPcDNA, *NtPAP4*, *NtPAP12*, *NtPAP19* および *NtPAP21* を日本 DNA データバンクに登録した。それらのアクセション番号はそれぞれ AB017966, AB017967, AB017968 および AB084124 である。