

キュウリ導管液タンパク質の根における産生と全身的輸送

作田 千代子・佐藤 忍

筑波大学生物科学系

要旨: 高等植物の根や茎葉などの諸器官は、維管束系によって結ばれている。この維管束は篩部と木部からなり、その主な構成要素である篩管は地上部から地下部へ、導管は地下部から地上部への物質輸送の経路を形成する事により、個体全体としての発生や生理状態の維持に貢献していると考えられる。導管は、分化した後に死んだ木部細胞の細胞壁からなる細胞外空間で、この内部には導管液が流れており、この液体は導管を通じて植物体内に行き渡り、植物体の全ての細胞に供給されている。

従来、導管液には、無機イオンや低分子有機物質のみが含まれると考えられ、注目を浴びてこなかった。しかし、近年、カボチャ導管液中には1mlあたり18.6 μ gものタンパク質が含まれ、SDS電気泳動によって分離すると、低分子量から高分子量まで約50本ものバンドが確認できることが見出された (Sato et al., 1992)。しかしながら、これらのタンパク質のうち、同定されたものはペルオキシダーゼのみであった (Biles and Abeles, 1991)。本研究では、根や導管の個体機能における新たな役割を見出すことを目指し、導管液中を流れるタンパク質の正体を明らかにし、次にその産生部位を同定し、さらにその輸送される部位とその存在様式を解明し、機能の推定を行う事を目的とした。

キーワード: *in situ* hybridization, 維管束, タンパク質, 導管液, 免疫組織化学

研究材料

研究材料として、ウリ科植物のキュウリ (霜不知地這) を用いた。その理由としては、ウリ科植物は、多量の導管液を得られる上に、そのために特別な操作をする必要がなく、また、その中でもキュウリは形質転換が容易に行えるため、遺伝子を得てからの解析に利点が多いことがあげられる。キュウリ導管液は、播種後40日間栽培したキュウリの茎を、地面から10cm程度のところで切断し、根側の切り口から滴る液を氷上にて回収した。

キュウリ導管液タンパク質遺伝子のクローニング

キュウリの導管液タンパク質 (Xylem Sap Protein; XSP) 遺伝子群のクローニングは以下の手順で行った。キュウリ導管液全体をラットに免疫し、抗導管液血清を調製後、キュウリ根の mRNA から合成した cDNA 発現ライブラリー (200万プラーク) をこの抗血清でスクリーニングし、24種類に分類されるポジティブクローンを得た。XSPは根で合成され、導管を介して地上部へ運ばれると考えられるため、根での

みあるいは根で非常に発現が強いこと、また、導管内は細胞外空間 (アポプラスト) であるため、そこに存在するタンパク質は分泌タンパク質であることが必要な条件であると考えた。そこで、根での強い発現を基準に、まず8種類の導管液タンパク質遺伝子の候補 (XSP-1, -4, -5, -6, -9, -10, -15, -16) を選抜した (Sakuta et al. 1998)。さらに、これらのクローンについて部分塩基配列を決定し、相同性のある遺伝子を検索したところ、XSP-4, -10, -15がグリシンリッチプロテイン (Glycine-Rich Protein; GRP) と、XSP-6がシステインプロテアーゼインヒビター (シスタチン)、XSP-9がフォスファターゼ、XSP-16がレクチン、と相同性が高いことが明らかとなった。この中から、根での発現が特に顕著で、植物では細胞壁への蓄積も報告されており、分泌タンパク質の可能性の高いグリシンリッチプロテインをコードしている、XSP-4と-10を、キュウリ根特異的グリシンリッチプロテイン、Cucumber Root Specific Glycine-Rich Protein (CRGRP) -1と-2と改名し、その後の解析に用いた。CRGRP-1と-2は、塩基およびアミノ酸配列において相互に高い相

同性を示したが、グリシンリッチドメインの長さやグリシン含量は異なっていた。ゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーションによる解析で両者が互いにクロスハイブリダイズする事から、以後の発現解析では、両者を共に CRGRPs として検出することとした。

CRGRPs タンパク質の産生部位の特定

CRGRPs 遺伝子の器官ごと(根、茎、葉、茎頂部、地上部の total RNA, 地上部全体の mRNA) の発現解析を行った。その結果、成長した植物体では根でのみ特異的に発現していることが明らかとなった(図1)。これは、導管液タンパク質が根で合成され、地上部へ輸送されるという仮説と一致する。

CRGRPs タンパク質の産生部位の特定をするために、根の発達と CRGRPs の発現の関係を調べた。播種後1週間のキュウリ実生の胚軸を、茎頂から4cmのところまで切断し、これを20倍に希釈したMS液体培地に挿して不定根を誘導した。キュウリ実生の胚軸は、培養開始後3日目で切り口の付近が膨らみ、4日目に不定根が胚軸の表皮を突き破って伸長し、4日目以降、不定根は数を増しながら伸長していった。胚軸切断後0, 1, 2, 3, 4, 6, 10, 15日目の胚軸から total RNA を抽出し、ノーザンハイブリダイゼーションによる発現解析を行ったところ、CRGRPs は共に2-3日目でごく弱い発現が認められたが、4日目から急に発現が強まり、その後、引き続き緩やかに発現が強まっていた。この4日目は不定根が表皮を突き破って伸長し、根の維管束組織の形成が認められる時期と一致していることから、CRGRPs の発現は

維管束組織の発達と関連があることが示唆された(Sakuta et al., 1998)。

そこで、根の部位ごとの機能と CRGRPs の産生との関係を調べるため、播種後5日目の実生の主根を5ヶ所に分け、それぞれの部分から total RNA を抽出し、発現解析を行ったところ、CRGRP の遺伝子の発現は根毛帯で特に強く、根端や伸長帯では弱く、また、根の基部では発現がほとんど認められなかった(図2)。さらに CRGRPs をプローブとした *in situ* hybridization により、発現組織の特定を行ったところ、主根の根毛帯では、導管を囲む維管束柔組織細胞において、特に強い発現がみられることが判明した(図3)。またそれよりやや先端部では中心柱内の柔組織細胞全体で弱く発現していることがわかった。根の基部では発現は認められなかった(Sakuta and Satoh, 2000)。

以上の遺伝子発現解析から、CRGRPs は、根の根毛帯の柔組織細胞で特異的に合成され、細胞外に分泌された後、根内における水の流に乗って導管中に輸送されることが考えられた。

CRGRPs タンパク質の転送先と存在様式

次に、根で合成され、導管液中へ分泌された CRGRPs タンパク質が、どこに輸送され、どのような存在様式を示すかを明らかにするため、以下の実験を行った。

大腸菌の発現系を用いて CRGRP-1 タンパク質を合成し、それを抗原として抗 CRGRP-1 血清を作製した。これを用いて、イムブロッティングを行ったところ、導管液において、CRGRP-1 と-2 の推定アミノ酸サイズに相当する2本のバンドと高分子量にスマアなシグナルが得ら

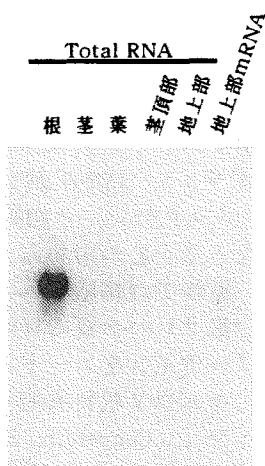


図1 CRGRPs の器官ごとの発現
播種後、約一ヶ月の植物体の各器官から total RNA を抽出し、発現解析を行った。CRGRPs は、根に特異的な発現を示した。(Sakuta and Satoh, 2000)

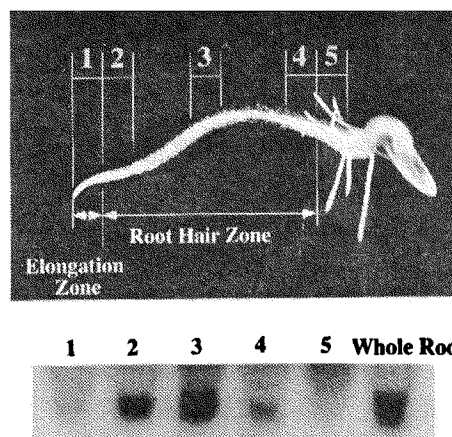


図2 根の部位ごとの CRGRPs の発現
播種後5日目のキュウリの実生の主根を、図のように5つの部分に分け、それぞれから total RNA を抽出し、発現解析を行った。根毛帯の中央部で特に強く発現している。(Sakuta and Satoh, 2000)

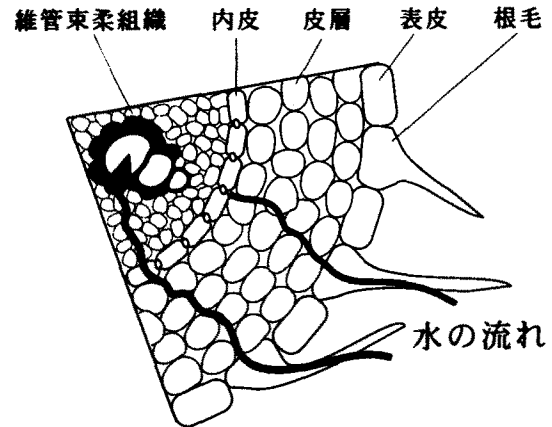
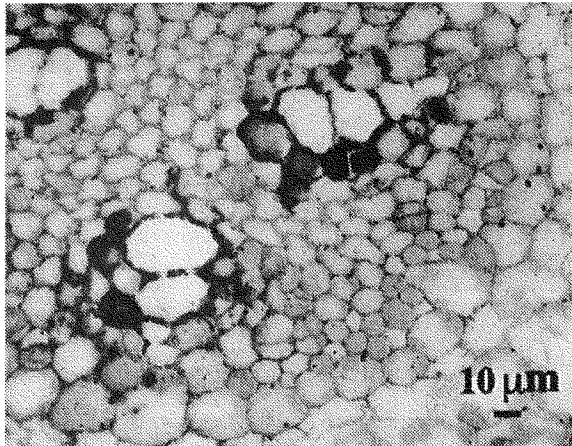


図3 CRGRPs を発現している組織の特定
 播種後5日目の実生の根毛帯中央部(図2の3番)における CRGRPs の *in situ* hybridization の結果、metaxylem を囲む維管束柔組織細胞に強いシグナル(黒く染まっている部分;模式図の黒塗りの部分)が認められた。(Sakuta and Satoh, 2000)

れた。キュウリの各器官から抽出したタンパク質に対しては、展開葉でのみ弱いバンドが確認された。この結果から、CRGRPs が導管液中を確かに流れていることが確認された。

この抗血清を用いた免疫ヒストケミストリーによって、CRGRPs がどの組織に蓄積しているかを調べたところ、葉、茎、根の導管の壁と、茎の perivascular fibers (つる性の植物に存在する維管束を取り囲む厚膜細胞) の細胞壁にシグナルが確認された(図4)。この結果は、前述の免疫プロットングで CRGRPs が導管液と展開葉以外では検出されなかった事実と矛盾する。これはタンパク質の抽出に用いた SDS を含む抽出バッファーでは、蓄積した CRGRPs が溶出できないことを示している。そこで、組織を抽出バッファーにより十分に洗浄(煮沸、超音波処理)し、抽出バッファーで溶出できる物質を組織片から洗い出した後に、免疫ヒストケミストリーを行った。その結果、洗浄した組織片では、洗浄していない組織片と同じかむしろ強いシグナルが得られた。この事は、SDS を含む抽出バッファーでも、いったん蓄積した CRGRPs を溶出することができない事を示唆している。これらのことから、先の矛盾は CRGRPs が不溶化することによって生じていることが明らかになり、導管液中を可溶性の状態であって流れてきた CRGRPs が、導管の壁や perivascular fiber の細胞壁中で不溶化・蓄積すると考えられた。展開葉は、最も多量の導管液が流れ込んでいる器官であり、未だ不溶化していない CRGRPs が多量に存在するため検出できたと考えられる。また、CRGRPs の局在が見られた導管の壁と perivascular fiber の細胞壁は、フルオログルシン塩酸塩でよく染まる

ことから、ともにリグニン化しており、高い強度を有する部位と考えられる(Sakuta and Satoh, 2000)。

植物体における、導管液タンパク質 CRGRPs の機能の推定

グリシンリッチドメインを持つタンパク質、グリシンリッチプロテインには、動物の毛や皮膚のケラチンのように分子間結合により不溶化する性質を持つものが多く、前述の導管液に対する免疫プロットングで、CRGRP-1 と-2 に相当するバンドより高分子側にスミアなシグナルがみられたのも、CRGRPs の分子間相互作用の存在を示唆していると考えられる。グリシンリッチドメインを持つ CRGRPs も、動物の表皮におけるケラチンの働きと同様に、これらの壁の弾性と強度を保つことに関係している可能性が考えられる。

以上の研究から、グリシンリッチプロテインが、根の維管束内の特異的な組織で合成され、水の流れに乗って全身に輸送され、導管の壁や perivascular fiber の細胞壁の補強と維持に役立っている可能性が示された。導管は死んだ細胞の壁から成り立っており、植物体内での水の流れは、絶えず導管から外側へ向かっている。このことを考えると、導管の壁を維持・補強するのに、導管の周りの細胞が寄与することは困難であり、導管液の流れを用いた本システムは、理にかなっていると考えられる。

今後の展望

これまでの研究で、新規グリシンリッチプロテインである CRGRPs が根の維管束柔組織細胞で合成され、導管を通じて地上部へ運ばれ、

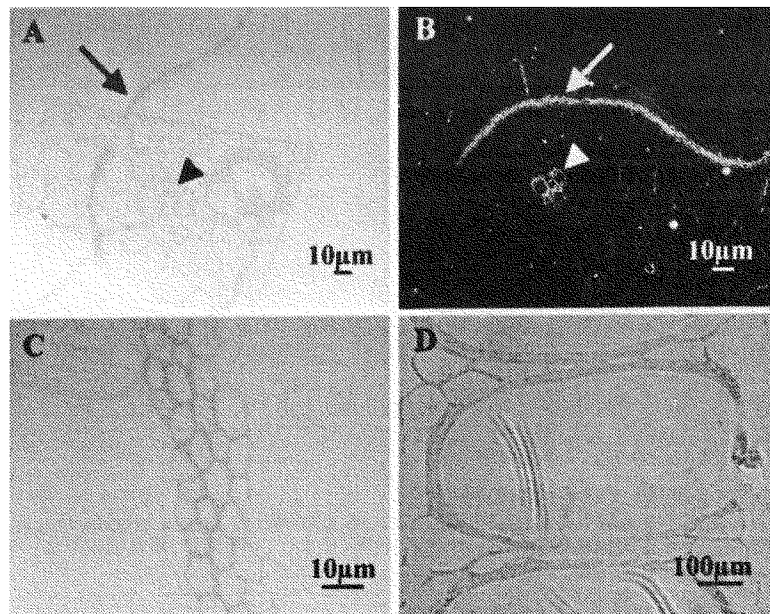


図4 CRGRPs の茎での局在

播種後約1ヶ月のキュウリの茎に対して、イムノヒストケミストリーを行った。導管(矢頭)と perivascular fibers (矢印)の壁にシグナルが認められた。(Sakuta and Satoh, 2000)

A, C, D:イムノヒストケミストリー

B:無処理(暗視野像)

C:perivascular fibers の拡大像

D:導管の拡大像

導管壁に蓄積していることが明らかになった。これは我々の知る限り、導管液タンパク質の産生と全身的な転流についての初めて報告である。しかしながら、その機能はいまだ仮説の段階である。これを明らかにするために、co-suppression と antisense repression の形質転換体を作製し、現在解析を行っている。また、同じくキュウリ導管液タンパク質として同定された XSP30 はレクチンと相同性があり (Masuda et al., 1999), 根での遺伝子発現がリズム変動を示すことからその機能が注目される。その他にも、導管液中には未知のタンパク質が多数存在している。これらの正体を明らかにするために、プロテオーム解析を試みたいと考えている。

最後に、導管液中を流れる有機物質の多様な働きに興味をもたれた方は、「アポプラストを流れる有機物質—根からの情報伝達経路としての導管」(佐藤忍, 1997)をぜひ一読願いたい。

引用文献

Biles, C.L., Abeles, F.B. 1991. Xylem Sap

Proteins. Plant Physiol. 96: 597-601.

Masuda, S., Sakuta, C., Satoh, S. 1999. cDNA cloning of a novel lectin-like xylem sap protein and its root-specific expression in cucumber. Plant Cell Physiol. 93: 33-39.

Sakuta, C., Oda, A., Yamakawa, S., Satoh, S. 1998. Root-specific expression of genes for novel glycine-rich proteins cloned by use of an antiserum against xylem sap proteins of cucumber grafted on rooted squash stock. Plant Cell Physiol. 39: 1330-1336.

Sakuta, C., Satoh, S. 2000. Vascular tissue-specific gene expression of xylem sap glycine-rich proteins in root and their localization in the walls of metaxylem vessels in cucumber. Plant Cell Physiol. 41: 627-638.

Satoh, S., Iizuka, C., Kikuchi, A., Nakamura, N., Fujii, T. 1992. Proteins and carbohydrates in xylem sap from squash root. Plant Cell Physiol. 33: 841-847.

佐藤 忍 1997. 化学と生物 35(10):738-744.

Title: Root-specific gene expression and systematic delivery of novel glycine-rich proteins via xylem sap of cucumber.

Authors: Sakuta, C. and Satoh, S.