

キュウリ導管液レクチンの根における産生と活性 — 葉における概日時計とジベレリンの関与 —

小田 篤・佐藤 忍*

筑波大学生物科学系

要 旨: 高等植物の導管液中には水、無機塩類、ホルモン類などの他に、多糖やタンパク質などの高分子物質が存在する。これまでに我々は、キュウリ根導管液中にメジャーに存在するタンパク質 (XSP30) に着目し、研究を行ってきた。根特異的な XSP30 の発現は光周期に依存して日周変動し、その振幅はジベレリンによって制御された。また、XSP30 の遺伝子発現は成熟した根維管束組織 (木部柔組織、内鞘) で特異的に起こっていた。さらに、XSP30 は N-アセチルグルコサミンに結合するレクチン活性を持っており、キュウリ葉肉細胞中の高分子の糖タンパク質に XSP30 が結合する糖鎖が多く存在していた。以上の結果から、成熟した根維管束において産生される導管液レクチンが地上部器官の生理状態に影響を与えている可能性が考えられた。

キーワード: 導管液、レクチン、キュウリ、概日時計、ジベレリン

The production of Xylem Sap lectin in Cucumber Root and Its Activity : Atsushi ODA and Shinobu SATOH
(*Institute of Biological Science, University of Tsukuba.*)

Abstract: Xylem sap contains macromolecules such as proteins and polysaccharides. We have analyzed the root specific gene expression of a xylem sap protein (XSP30) in cucumber. The expression of XSP30 in roots oscillates in a diurnal pattern. The amplitude of the diurnal expression is regulated by leaf gibberellin. The XSP30 promoter directed specific expression of a β -glucuronidase reporter gene in xylem parenchyma and pericycle cells in the central cylinder of mature transgenic hairy roots. The lectin activity of XSP30 was analyzed by lectin blot coupled with immunological detection of XSP30. The recognition site of XSP30 was N-acetylglucosamine of the glycoproteins. We also found that the glycoproteins having the recognition site of XSP30 were abundant in leaf parenchyma cells. From these result, we discuss the possible functions of the xylem sap lectin.

Keyword: xylem Sap, Lectin, Cucumber, circadian clock, Gibberellin.

はじめに

高等植物では、葉や茎は地上空間に、また根は土壤中にとそれぞれ全く異なる環境下に存在し、それぞれの機能が完全に分化している。そのため、地上部器官は水分や無機栄養素の供給を根に頼っており、また逆に根は同化産物などのエネルギー源を葉からの供給に頼っている。したがって、植物の各器官は互いに不足する要素を補い合い、情報をやりとりして全体として調和のとれた状態を保つことが個体維持にとって不可欠である。そこで、高等植物は物質と情報の輸送経路として篩管と導管からなる維管束系を発達させてきた。中でも篩管は主に葉から芽や根などへ同化産物だけでなく、葉で合成される花成ホルモン (florigen) などの情報伝達物質の輸送経路としても機能している (Bernier, 1988)。一方、根と地上部器官をつなぐ導管は、

以前は土壤中の水や無機栄養素を輸送する経路として考えられてきた。しかし、根は、土壤の水分状態や地上部の生理状態を受け、サイトカニンやアブシジンを生産し、これらの物質が地上部に導管を介して輸送されることにより、植物体の生理状態の維持に積極的に関与していることが報告されている (Beveridge et al., 1997; Kato et al., 2002; Kuroha et al., 2002; Liang et al., 1997)。また、キュウリの穂木にカボチャの根を接ぎ木すると、穂木の花成を抑制する効果があることから、根が花成に関わる因子を生産している可能性が報告されている (Satoh, 1996)。さらに、近年の研究により導管液中にはアミノ酸や糖類、有機酸などの多種多様な有機物質が存在することが明らかになってきた (Zornoza et al., 1996; Schurr and Schulze, 1995; Satoh et al., 1998)。さらに、導管液中に

2003年9月5日受付

*連絡先 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1 筑波大学生物科学系 (植物生理学研究室)
Fax: 029-853-4672 E-mail: satoshi@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

は多糖やタンパク質などの高分子有機物質が存在することが明らかになってきている (Sato et al., 1992; Campbell et al., 1995; Iwai et al., 2003). しかし、それらの機能と生産を制御する機構に関する知見は極めて乏しかった。

そこで我々の研究室を中心として、導管液中に存在するタンパク質について解析が進められてきた。導管液中には傷害修復に関わると考えられるペルオキシダーゼ (Biles and Abeles, 1991) や、生体防御に関わると考えられるキチナーゼ (Masuda et al., 2001), 導管壁の構造的な補強に関わると考えられるグリシンリッチプロテイン (Sakuta et al., 1998; Sakuta and Satoh, 2000) が存在することが明らかになってきている。さらに最近の我々の研究により、キュウリ根導管液中に最も多くに存在する分子量 30k のタンパク質 (XSP30) の遺伝子クローニングが行われ、そのタンパク質はヒマメ種子に存在し毒性を示すリシンなどのガラクトース結合レクチンと相同性を持っていた (Masuda et al., 1999). レクチンは糖鎖を認識して結合するタンパク質で、リシンはガラクトース結合レクチン領域 (B 鎖) と毒性の元となるリボソーム不活性化領域の (A 鎖) から構成されるタンパク質である (Peumans et al., 1995). リシンはガラクトース結合領域により捕食者が持つ糖鎖に結合することでその毒性を増していると考えられているが、XSP30 は毒性の元となる A 鎖が存在しない、植物では新規なレクチン様タンパク質であった (Masuda et al., 1999). これらのことから、XSP30 が植物体内で生体防御以外の何らかの生理現象に重要な働きを担っていることが予想された。そこで、我々は XSP30 の産生制御機構とレクチン活性を解析することで、地上部器官と根のクロストーク機構を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。

XSP30 の地上部器官依存的遺伝子発現

キュウリ植物体の根、茎、葉、種子における XSP30 の発現を解析した結果、XSP30 の発現は根のみで見られた。XSP30 の根特異的な発現は、播種後 4 日目の若い植物体においてはほとんど見られないものの、その後、播種後 18 日目にかけて誘導された。このことから XSP30 の発現が植物体の発達と関わりが深いことが明らかになった。また、その発現は、地上部が受ける光周期に依存して、暗期直前に発現量が最大となり明期中頃に最小となる日周変動リズム性を示し、そのリズム変動の振幅は植物体が成長

するに従って増幅された (図 1)。しかし、同じキュウリ導管液中に存在するグリシンリッチプロテインをコードする CRGRP-2 の発現にはそのようなリズム性は見られなかった。また、導管液中の XSP30 タンパク質量も光周期に依存して明期の終了時に最大となり、暗期中に減少するリズム変動性が見られ、遺伝子発現とその産物の量には相関性があることが明らかになった。さらに、連続明条件下または連続暗条件下においても、XSP30 の発現リズムは少なくとも二周期にわたり維持された。シロイヌナズナにおいて硝酸トランスポーター (Nrt) の遺伝子発現が根において日周変動することが知られているが、これらの周期性は地上部から輸送されるエネルギーに依存して明期の中間に発現量はピークとなることが報告されている (Lejay, et al., 1999)。しかし、根における XSP30 の発現が地上部から輸送されるエネルギーが減少し始める明期の終了時にピークを迎えることや、日周変動性が連続明暗条件下でも少なくとも 2 周期維持されたことから、根における XSP30 の発現は地上部で形成される 24 時間周期の概日時計の情報が根に送られることによって制御されていることが明らかになった (Oda et al., 2003a)。

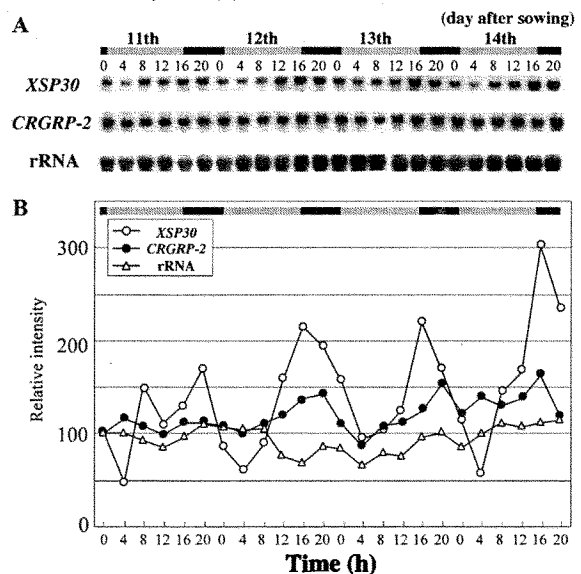


図 1 光周条件下の根における導管液タンパク質の遺伝子発現 16 時間明期、8 時間暗期の光周条件下で生育させた播種後 11 日目から 14 日目のキュウリ植物体の根における XSP30、CRGRP-2 の遺伝子発現の調査 (A) とその定量 (B) を行った。

また、根における XSP30 のリズム発現の振幅は地上部の発達とともに増幅されたことから、XSP30 の発現を制御する光周期以外の因子が存在することが予想された。そこで、地上部器官

の一部を切除し根における XSP30 の発現を解析した。その結果、地上部の成熟した本葉を切除すると、根における XSP30 の発現リズムは維持されたものの、その振幅が小さくなる現象が見られた。そこで、根における XSP30 のリズム発現の振幅を増幅する因子が地上部の、特に成熟した本葉に由来すると考え、各種植物ホルモンの阻害剤を地上部器官に投与して根における XSP30 の遺伝子発現を解析した。その結果、XSP30 のリズム発現の振幅を増幅する因子はジベレリンであることが判明した。すなわち、ジベレリン(GA₃)を成熟葉を切除した植物の地上部に投与すると、XSP30 のリズム発現の振幅が回復した。また、ジベレリンの合成阻害剤であるウニコナゾールを地上部に投与すると、根における XSP30 のリズム発現の振幅は投与開始後三日目にはほとんど見られなくなるが、ジベレリン(GA₃)を同時に地上部に投与すると振幅が回復した(図2)。しかし、ウニコナゾールを地上部に処理し、地上部におけるジベレリンの合成を停止させたキュウリにおいて、根にジベレリンを投与して XSP30 の発現を調査した結果、ジベレリンを葉に投与したときのようなリズム発現の振幅を回復させる効果は見られなかった。このことから、根における XSP30 の発現は、葉で産生されたジベレリンの制御下で誘導される何らかの因子が根に送られることによって制御されていることが示唆された(Oda et al., 2003a)。ジベレリンは活発な若い葉で多く生産される植物ホルモンで、低濃度のジベレリンは根の伸長を促進することが報告さ

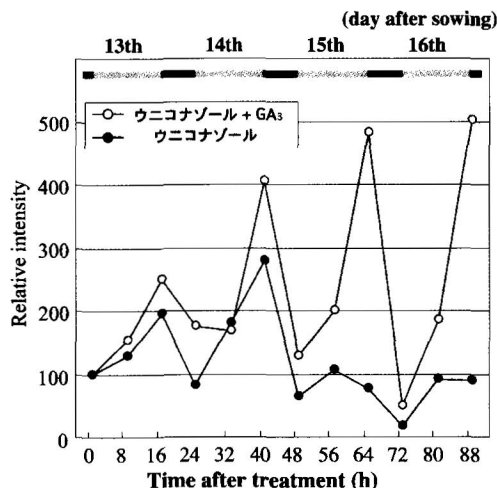


図2 根における XSP30 の遺伝子発現に与えるジベレリンの影響
16 時間明期、8 時間暗期の光周条件下で生育させた播種後 13 日目の植物体のキュウリ植物体の地上部にジベレリンの合成阻害剤ウニコナゾール (10⁻⁴M) とジベレリン (GA₃, 2 × 10⁻⁴M) を投与し、根における XSP30 の遺伝子発現を調査した。

れている (Tanimoto, 1994)。これらのことから、地上部の活発な生理状態に関わる情報がジベレリンを介して根に輸送され、XSP30 の遺伝子発現の活性化を含めた根の生理に深く関与していることが明らかとなった。

XSP30 の維管束組織特異的産生

次に、XSP30 の遺伝子発現を組織レベルで解析するため、遺伝子発現を制御するプロモーター領域の単離を TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction) 法 (Liu et al., 1995) によって行った結果、2242bp のプロモーター領域を含むゲノム DNA のクローニングに成功した。得られたクローンの塩基配列の決定を行い、プロモーターモチーフの解析を行った結果、XSP30 のプロモーター領域中には光周期関連モチーフ、ジベレリン応答モチーフなどが見出された。根における XSP30 の発現は光周期とジベレリンによって制御されていることから、これらのモチーフが有意に働いている可能性が考えられる (Oda et al., 2003a)。得

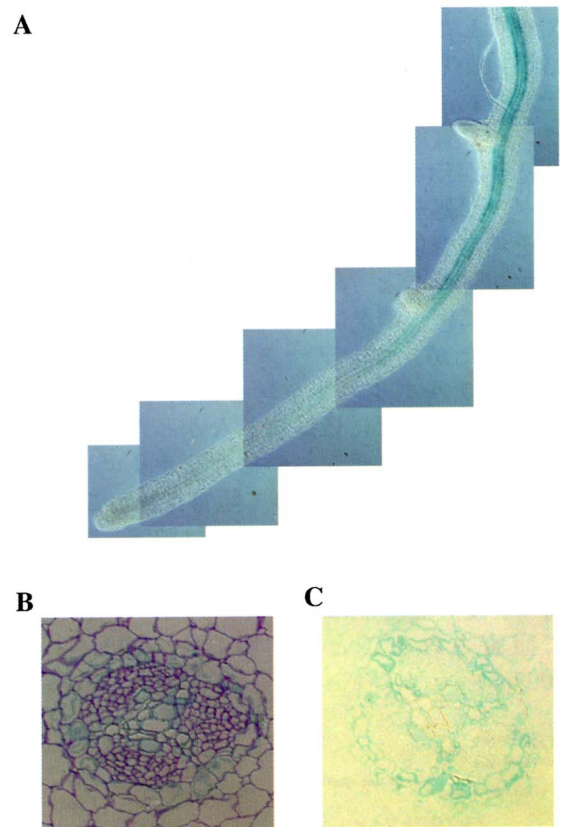


図3 XSP30 プロモーターによる根維管束組織特異的遺伝子の発現誘導
XSP30 プロモーターの下流に GUS レポーター遺伝子を連結した遺伝子をキュウリ毛状根に導入し、形質転換毛状根における GUS レポーター遺伝子の発現の調査 (A)、横断面をトルイジンブルーによって染色した観察 (B) と無染色の観察 (C) を行った。

られた XSP30 のプロモーター820bp の下流に GUS レポーター遺伝子を連結したベクターを構築し、毛状根を誘導するアグロバクテリウム *R1000* によって、キュウリ形質転換毛状根を誘導した。形質転換毛状根において GUS レポーター遺伝子の発現パターンを観察した結果、毛状根の基部側においてレポーター遺伝子の強い誘導が見られたが、先端部に行くに従って誘導性は見られなくなった(図, 3A)。また、組織切片の観察の結果、GUS レポーター遺伝子の発現は根維管束の木部柔組織と内鞘に限られていた(図 3B,C)。これらのことから、XSP30 の発現は水分や無機栄養素の吸収を活発に行っている成熟した根維管束木部柔組織と内鞘の細胞で特異的に起こり、翻訳された XSP30 はシグナル配列によって細胞外に分泌され、水の流れによって導管液中にロードされることが予想された(Oda et al., 2003a)。

XSP30 のレクチン活性

XSP30 のレクチン活性は、既に糖鎖の構造の判明している糖タンパク質への結合を指標として解析した。XSP30 は推定アミノ酸配列の相同性検索からガラクトース結合活性を持つことが予想され、実際にガラクトースを糖鎖に持つ糖タンパク質(アシアロフェツイン)に対する結合活性が示された(図4)。しかし、ガラクトシダーゼ処理によってガラクトースを除去してもその結合能は失われなかった。また、XSP30 はマンノースと N-アセチルグルコサミンのみを糖鎖に持つ糖タンパク質(マメレクチン)に結合したが、マンノースとフコシル化された N-アセチルグルコサミンを糖鎖に持つマメベルオキシダーゼには結合しなかった(図4)。また、マメレクチンへの結合はオリゴ-N-アセチルグルコサミンによって阻害されたことから、XSP30 は相同性検索の結果とは相反して N-アセチルグルコサミンを認識するレクチン活性を持ち、その結合能はフコース側鎖の存在によって阻害されることが判明した(Oda et al., 2003b)。

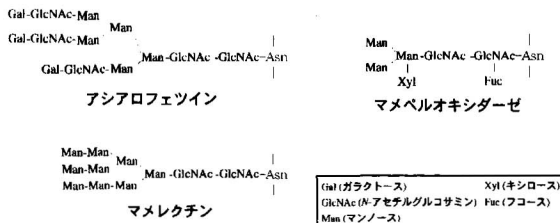


図4 糖タンパク質の糖鎖構造

さらに、植物体内での XSP30 の分布を調査するため、抗 XSP30 抗体を用いて、キュウリ葉における XSP30 の検出を試みたところ、キュウリ植物体には XSP30 の蓄積は見られなかった(図 5 B)。一方、キュウリ葉の葉肉細胞には XSP30 が結合する糖鎖が多く存在していた(図 5 C)。また、キュウリ葉切片をプロテアーゼ処理すると XSP30 の結合能は失われた(図 5 D)。さらに、キュウリ葉の顆粒画分からタンパク質を抽出したところ、XSP30 は高分子のタンパク質群に結合した。これらのことから、XSP30 は葉肉細胞の細胞表面の高分子糖タンパク質に結合する活性を持つが、積極的な分解系が存在し、速やかに分解されることが予想された(Oda et al., 2003b)。レクチンはこれまで、生体防御に関わる報告が多くなされてきているが、一方で、根粒菌の認識にも重要な役割を担うことによって、根の形成にも影響を与えていることが報告されている(Diaz et al., 2000)。また、XSP30 の認識糖鎖である N-アセチルグルコサミンは、最近の研究で分化誘導因子の有力な候補として考えられているアラビノガラクトンプロテインの糖鎖中にも含まれていることから、XSP30 がこれらの因子を介して地上部の分化などの生理現象に深く関わっている可能性があると考えられる(Motose et al., 2000; Oda et al., 2003b)。

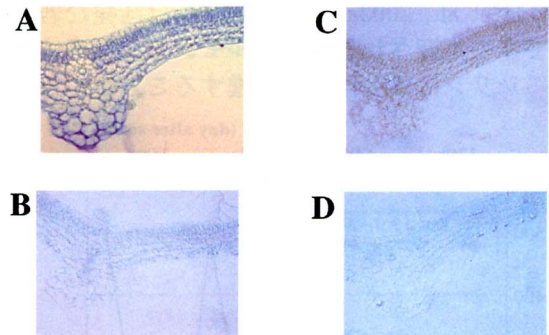


図5 葉組織切片への XSP30 の結合活性

葉組織切片のトルイジンブルー染色(A)。抗 XSP30 抗体によって葉組織中の XSP30 蓄積の検出を行ったがシグナルは見られなかった(B)。XSP30 が結合する糖鎖の存在をキュウリ導管液と抗 XSP30 抗体を用いて検出した結果、葉肉細胞にシグナルが見られたが(C)、XSP30 の結合糖鎖の検出前にプロテアーゼによって組織切片中のタンパク質を分解後、(C)と同様の検出を行ったがシグナルは見られなかった(D)。

おわりに

以上の最近の我々の研究により、成熟した根

維管束において産生される XSP30 は、その産生が日周変動し、振幅が葉で作られるジベレリンによって増幅されることによって、導管液中の量が最適な状態に保たれていると考えられた。さらに、XSP30 は *N*-アセチルグルコサミンを認識するレクチン活性を持ち、葉肉細胞に結合する可能性が示された。日周変動リズムを形成し、ジベレリンを主に合成する葉に、それらの影響を受けて産生された XSP30 が輸送されることから、根で作られる XSP30 は逆に葉をはじめとする地上部器官の生理状態を活性化している可能性が想定される。この機構により地上部器官と根の間では情報交換が行われ、互いの器官の発達と機能の調和を保っている可能性が考えられる。本研究により、地上部器官と根の間におけるクロストークの一端が明らかとなった。今後、遺伝子組み換え植物を作製し、XSP30 を過剰に生産する植物体を解析することなどによって、植物個体における XSP30 の機能を解明し、植物体の地上部と根で活発に行われている情報伝達の意義を明らかにして行きたいと考えている。

引用文献

- Bernier, G. (1988) The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 39: 175-219.
- Beveridge, C.A., Murfet, I.C., Kerhoas, L., Sotta, B., Miginiac, E., Rameau, C. (1997) The shoot controls zeatin riboside export from pea roots - evidence from the branching mutant *rms4*. *Plant J.* 11: 339-345.
- Biles, C.L., Abeles, F.B. (1991) Xylem sap proteins. *Plant Physiol.* 96: 597-601.
- Campbell, J.A., Loveys, B.R., Lee, V.W.K., Strother, S. (1995) Growth-inhibiting properties of xylem exudate from *Vitis vinifera*. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 7-13.
- Diaz, C.L., Spaink, H.P., Kijne, J.W. (2000) Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover roots, transformed with the pea lectin gene. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13: 268-276
- Iwai, H., Usui, M., Hoshino, H., Kamada, H., Matsunaga, T., Kakegawa, K., Ishii, T., Satoh, S. (2003) Analysis of sugars in squash xylem sap. *Plant Cell Physiol.* 44: 582-587
- Kato, C., Kato, H., Asami, T., Yoshida, S., Noda, H., Kamada, H., Satoh, S. (2002) Involvement of xylem sap zeatin-O-glucoside in cucumber shoot greening. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 949-954
- Kuroha, T., Kato, H., Asami, T., Yoshida, S., Kamada, H., Satoh, S. (2002) A trans-zeatin riboside in root xylem sap negatively regulates adventitious root formation on cucumber hypocotyls. *J Exp Bot* 53: 2193-2200
- Liang, J., Zhang, J., Wong, M.H. (1997) How do roots control xylem sap ABA concentration in response to soil drying? *Plant Cell Physiol.* 38: 10-16.
- Liu, Y., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Whittier, R.F. (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 8: 457-463
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F.D., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., Gojon, A. (1999) Molecular and functional regulation of two NO₃- uptake systems by N- and C- status of *Arabidopsis* plants. *Plant J.* 18: 509-519.
- 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.* 40: 1177-1181.
- Masuda, S., Kamada, H., Satoh, S. (2001) Chitinase in cucumber xylem sap. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1183-1185.
- Motose, H., Sugiyama, M., Fukuda, H. (2001) An arabinogalactan protein(s) is a key component of a fraction that mediates local intercellular communication involved in tracheary element differentiation of zinnia mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.*, 42: 129-137
- Oda, A., Sakuta, C., Masuda, S., Mizoguchi, T., Kamada, H., Satoh, S. (2003a) Possible involvement of leaf gibberellins in the clock-controlled expression of XSP30, a gene encoding a xylem sap lectin, in cucumber roots. *Plant Physiol.* In press
- Oda, A., Sakuta, C., Kamada, H., Satoh, S. (2003b) Xylem Sap Lectin, XSP30, Recognizes GlcNAc Sugar Chains of Glycoproteins in Cucumber Leaf. *Plant Biotechnol.* 20: 67-74
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J. (1995) Lectin as plant defense protein. *Plant Physiol.*, 109: 347-352
- Sakuta, C., Oda, A., Yamakawa, S., Satoh, S. (1998) Root-specific expression of genes for glycine-rich proteins cloned by use of an antiserum against xylem sap proteins of cucumber. *Plant Cell Physiol.* 39: 1330-1336.
- Sakuta, C., Satoh, S. (2000) Root-specific gene expression of novel glycine-rich proteins and their systemic delivery to the wall of metaxylem vessels via the xylem sap in cucumber. *Plant Cell Physiol.* 41: 627-638.
- Satoh, S., Iizuka, C., Kikuchi, A., Nakamura, N., Fujii,

- T. (1992) Protein and carbohydrates in xylem sap from squash root. *Plant Cell Physiol.* 33: 841-847.
- Satoh, S. (1996) Inhibition of flowering of cucumber grafted on rooted squash stock. *Physiol. Plant.* 97: 440-444.
- Satoh, S., Kuroha, T., Wakahoi, T., Inouye, Y. (1998) Inhibition of the formation of adventitious roots on cucumber hypocotyls by the fractions and methoxybenzylglutamine from xylem sap of squash root. *J. Plant Res.* 111: 541-546.
- Schurr, U. Schulze, E.D. (1995) The concentration of xylem sap constituents in root exudate, and in sap from intact, transpiring castor bean plants (*Ricinus communis* L.). *Plant Cell Environ.* 18: 409-420.
- Tanimoto, E. (1994) Interaction of gibberellin A3 and ancymidol in the growth and cell wall extensibility of dwarf pea roots. *Plant Cell Physiol.* 35: 1019-1028.
- Zornoza, P., Gonzalez, M., Serrano, S., Carpena, O. (1996) Inter-varietal differences in xylem exudate composition and growth under contrasting forms of N supply in cucumber. *Plant Soil* 178: 311-317.