

6. プロトプラストが生合成するカロース繊維の高次構造形成

馬越チーム 森林総合研究所 近藤哲男

1. はじめに

植物細胞中においてカルシウムイオン (Ca^{2+}) の役割は重要と考えられているが、これまでのところ植物生理分野における知見が主である。すなわち『 Ca^{2+} は主として細胞壁が細胞質などのアポプラスト間隙の部分にイオン吸着されて存在し、細胞質内への取り込み速度が小さく、濃度も低い。細胞はむしろ Ca^{2+} レベルを低く保っている』とされている。しかし、細胞壁形成などの二次代謝の Ca^{2+} の影響については、あまり研究されていない。

本研究方針である、低エネルギー型高次構造形成としての天然高分子高次構造形成のシステムを解明し、それから人工システム化を開発することを考えると、この植物体における Ca^{2+} の二次代謝（細胞壁形成）への影響を調べることは極めて重要である。そこで、本研究ではまず、 Ca^{2+} のみならず他の二価のイオンとして Mg^{2+} との比較をしながら、従来からの研究で用いられた添加量よりはるかに多量の添加条件下で、プロトプラストがどのような二次代謝挙動を示すかを検討した。その結果、樹木プロトプラストが大過剰の Ca^{2+} 存在下で、約2ヶ月の誘導期間を経た後、繊維状物質を生産し始めることを見出した。しかも、この現象は Ca^{2+} の存在下において顕著にあらわれる特異的現象で、他のイオンにはみられないものであることも併せて明らかとなった。これは、一種の低エネルギー型の高分子生産システムとして考えられるため、さらに現象そのものを解明することにより、システム化が可能ではないかと期待できる。

また、生合成された繊維は、 β -1,3グルカン鎖であるカロースからなる、数ミクロン幅の巨大繊維（マイクロフィブリルとして）であることが判明した。一方、プロトプラストが繊維物質を生産するのに、高 Ca^{2+} 濃度下では約2ヶ月という長期誘導期間を要したため、さらにその生産促進条件を検討し、二酸化炭素により誘導期間がかなり短縮されることを明らかにした。

2. 高 Ca^{2+} 濃度下でのカロース繊維生産ならびに形成

試料として、シラカバ (*Betula platyphylla* var. *japonica*)、カラマツ (*Larix Kaempferi*) のプロトプラストを用い、pHの変化と Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の2価のイオンの添加量の変化に対する代謝挙動を調べた。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の添加量、pHを変化させると、プロトプラストは約3ヶ月で細胞壁のみならず、ひも状物質（図1）を細胞外に向かって生産し始めた。この物質はこれまでの研究においてプロトプラストの Ca^{2+} 添加培養中では認められていない未知の物質であり、また生産はpHにも依存することが示唆された。pHは約3.5～4.6と酸性側、さらに Ca^{2+} 添加量は0.05～0.1M、すなわち初期の細胞量の推定約200倍（w/w）がこれまでのところ最適条件であった。培養開始から2ヶ月目までは何の変化も見られず、現在のところ、このような新規物質を、いつの時点でプロトプラストが生産し始めるのかについては、正確には分かっていない。

そこで、この物質を同定するために、カルコフルオールによる染色（ β -1,4ならびに1,3-glucanの同定法）、アニリンブルー染色（ β -1,3が主、 β -1,4でも染色）をほどこし、顕微鏡観察した（図2）。また、偏光顕微鏡により複屈折性を調べた。いずれの染色も正であり、また同時にプロトプラストのまわりに形成される細胞壁（セルロース（ β -1,4-グルカン））ほど強くはないが、複屈折性を示した。これらのことより、生産された物質は、 β -1,3グルカンの可能性が強いが、 β -1,4グルカンの可能性も残されていた。そこで、 β -1,4-glucanaseと β -1,3-glucanaseにより、

酵素分解挙動を調べたところ、 β -1,3-glucanaseにのみ分解された。これにより、ひも状物質が β -1,3グルカン鎖のカロースであることが濃厚になったので、さらに、 β -1,3グルカンに特有な抗体 (β -1,4グルカンには抗体がないとされている) で処理した後、蛍光染色して、蛍光顕微鏡で観察すると、明白な蛍光を示した。以上のことから、ひも状物質が β -1,3グルカン鎖のカロースであると考えられる。

また、ひも状物質はプロトプラストのある一点から出ているようであり、細胞膜上に生産をつかさどる酵素群 (セルロース生産でいうターミナルコンプレックス) の存在の可能性を示唆している。

以上の現象は Ca^{2+} に特異性が強く、さらにプロトプラストの樹種差については、シラカバのみならず、カラマツを調べた結果、同様にひも状物質を生産するものの培養期間は3週間と短く、樹種差を示した。

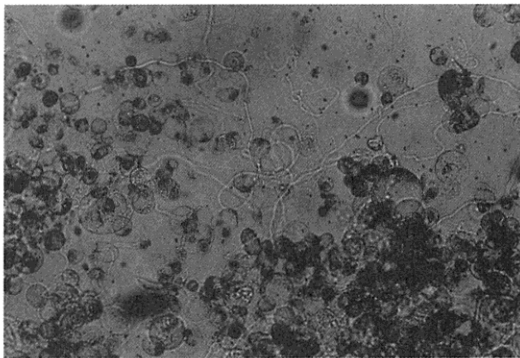


図 1 培地への多量 Ca^{2+} 添加により、シラカバのプロトプラストから生産されたひも状物質。

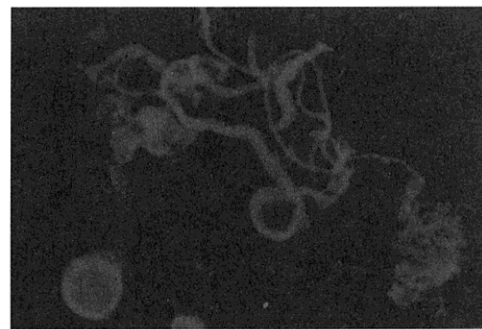


図 2 カルコフルオールにより染色された上記のひも状物質。

このカロース繊維は、幅が μm オーダーであり、これまでにこのようなサイズの巨大なカロースファイバーは発見されていない。したがって、その繊維構造を明らかにする必要があり、現在検討中である。

3. 高 Ca^{2+} 濃度/ CO_2 下でのカロース繊維生産ならびに形成

誘導期間を短くし、繊維状物質の生産を促進させるための改良を行なった。本 Ca^{2+} 過剰な系では、細胞分裂を極めて低く抑えることで、生産が促進される傾向がみられたので、同様のコンセプトでの条件を検討した。まず、細胞融合の際に用いる手法と同様の電気ショックを系に加え、物質生産を検討したが、顕著な効果を得ることができなかった。次に、5% CO_2 (通常大気下の約20倍弱の CO_2 濃度) 下で、pHの変化と Ca^{2+} の添加量に対する繊維物質の生産状態を検討したところ、培養後約2週間から、図3に示すように極めて活発な (見かけ上 Ca^{2+} だけの場合の10倍位) 繊維生産を始めることがわかった。

図 3 高 Ca^{2+} 濃度/ CO_2 下でのカロース繊維生産の光学顕微鏡写真

100 μm



4. カロース繊維生産機構の検討

本現象のキーポイントは、プロトプラストが繊維を生産することにある。そのためには、セルロースのマイクロフィブリル形成と同様に、細胞膜上にカロース合成酵素が単独で存在するのではなく、酵素が高次構造形成する必要があると考えられる。その存在形態を明らかにするには、合成酵素に対するプローブとなる抗体の合成が必須である(図4)。合成酵素に典型的と考えられるアミノ酸15残基程度のドメインを数カ所ピックアップして、人工ペプチドを合成した。それらを抗原としてウサギに注入し、その血清を得て精製したのち、カロース合成酵素の抗体と考えられるフラクションを得た。現在、抗体の精製が完了したところである。

予備実験として、カロース生産している細胞の急速凍結電子顕微鏡観察を行い、図5に示すような像を得た。予備実験であるが、上記のターミナルコンプレックスのように、カロース繊維生産に関しても、特異な合成酵素の集合形態が存在し、その形態に基づき繊維の分子集合状態が決定される可能性を示している。したがって、上記の抗体により、細胞膜上の合成酵素のローカリゼーションの電子顕微鏡を用いる検討が可能となった。

図4 セルロース生産における細胞膜上に生産をつかさどる酵素群(ターミナルコンプレックス)の存在形態を示す模式図

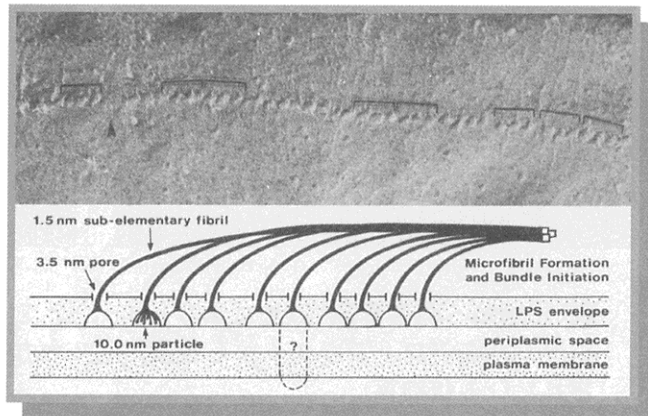
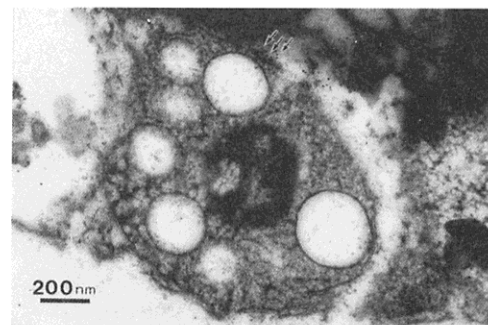


図5 カロース生産している細胞の超薄切片における急速凍結電子顕微鏡写真。(連続切片のうち細胞膜表面付近)。矢印はカロースの抗体の2次抗体が沈着していることを示す。これにより、この部分は何らかカロース生産に関与することが示される。



5. おわりに

この特異な条件でのプロトプラストの繊維物質生産は、極めて新規でこれまでに見られず、一般の理解を得るには、明らかにしなくてはいけない事柄が多い。とくに、このカロースの巨大繊維の高次構造解析、生合成時におけるCO₂の影響、さらに生産機構について明らかにすることは重要であり、現在検討中である。また、「はじめに」にも述べたように、この繊維生産現象は、CO₂を用いた低エネルギー型の高分子生産システムの一つとして考えられるため、現象そのものを解明することにより、システム化が可能であると期待している。