

シロイヌナズナの花序茎頂で高発現する
エンド型キシログルカン転移酵素遺伝子の機能解析

兵頭 秀貴

2001

目次

緒論	3
第1章 均一化cDNAライブラリーを用いたシロイヌナズナの花序特異的に 高発現する遺伝子の系統的単離と解析	6
序論	6
材料と方法	8
結果	11
考察	16
第2章 シロイヌナズナの花序茎頂特異的エンド型キシログルカン転移酵素 遺伝子EXGT-A6の単離とその発現様式	20
序論	20
材料と方法	26
結果	30
考察	50
結論	63
謝辞	66
参考文献	67
論文目録	80

植物と動物の両者の間には多くの相違点が存在する。動物では胚発生の時期からすべての器官が決定され、細胞数増加を通じて器官形成を制御している。一方種子植物の胚では胚軸と幼根よりなる主軸上に根端分裂組織、茎頂分裂組織を持つ子葉が分化している。植物は胚発生以降、植物の茎の先端と根の先端に存在する頂端分裂組織で器官形成を行う。そこでは未分化な細胞が次々に生み出され、分化し、その後細胞が拡大し、各器官の形態形成がなされる。植物は動物の様に細胞数を増加させるだけでなく、細胞の大きさを増加させて成長する。植物の成長過程は一般に組織を構成する細胞の急激な拡大を通じて制御されている。細胞分裂直後にできた植物の細胞は、数十倍から数千倍、時には数万倍にその体積を増加させ、細胞の形を変化させながら器官、組織の形成を行う (Cosgrove, 1997a; Cosgrove, 1997b)。

植物の細胞は周りを細胞壁に取り囲まれている。植物細胞の内部は外部環境の水より高張になっている。植物細胞が水を吸うと、吸水力は低下し、浸透圧も低下するが、体積が増大し、内から細胞壁を押す力が働く。この細胞壁に加わる圧力を膨圧と呼ぶ。膨圧は植物細胞壁の伸展にとって必要な駆動力となる。しかし、細胞壁の粘弾性が高いままであると、細胞壁の力学的強度と膨圧が釣り合ったまま細胞の拡大は停止してしまい、植物は細胞拡大をとまなう生長ができなくなる。植物細胞の細胞拡大を伴った生長には細胞壁の力学的な応力の低下が必要となる。植物は細胞拡大の際細胞壁の強度を巧みに調節することによって細胞壁の可塑性を増す一方、細胞内の水の流入速度を調節することにより細胞が破裂しないように緩やかな細胞拡大を行っている (図1) (Cosgrove, 1997a; Taiz, 1984)。

今までの細胞壁に関する知見はどれも細胞壁の応力低下が細胞拡大、伸長の直接的な原因であることを示してきた (Taiz, 1984)。こうして考えると、植物の成長は細胞壁の力学的性質の変化によりその調節を受けており、その後の植物の分化、形態形成の過程も究極的には細胞壁の構造の変化によって引き起こされているとする見方も可能である。

細胞壁の構築や伸展に関する研究は、最初は細胞壁の伸展制御に関わる酵素の探索や細胞壁そのものの構造成分の解析に焦点が絞られて生化学的、生理学的な方法による研究が行われてきた。これらの研究の流れを通して細胞壁の構造に関する現在の知見は膨大なものとなったが (Carpita et al., 1993; Keeagla et al., 1973; McCann et al., 1990; Tarbott and Ray, 1992)、それにも関わらず未だ細胞生長の分子機構の全容を

理解するには至っていない。その不明な部分が細胞壁構築や伸展の分子過程である。現在では細胞壁構築、伸展の分子過程の研究に焦点が移り、90年代に入ってエキスパンシンやエンド1,4- β -グルカナーゼ、エンド型キシログルカン転移酵素といった細胞壁成分の再構築に関わる酵素の遺伝子単離が相次いで報告され、同時にそのタンパク質としての機能についても解析が進んだ(Cosgrove, 1999; Fry, 1995; Nishitani, 1997)。

植物の細胞壁の機能は一般には見過ごされがちな部分であるが、植物における細胞壁の緩み、再構築に関する事柄は植物にとって特に植物の成長を含めた形態形成において欠くことのできないものである。植物の細胞壁の研究は、動物にはない植物細胞の構造的特徴に着目したもので、植物と動物との根本的相違を探る上で有益な知見が得られると期待される。

本論文においてはシロイヌナズナの茎頂由来均一化cDNAライブラリーより単離したエンド型キシログルカン転位酵素遺伝子EXGT-A6の、花序茎頂の細胞壁における機能を推定した。第1章ではエンド型キシログルカン転位酵素遺伝子EXGT-A6の解析の端緒となったシロイヌナズナ花序茎頂に於いて高発現する遺伝子の系統的な単離について、第2章では主にEXGT-A6遺伝子のクローニングとその構造、発現部位及び発現時期の解析を行った。シロイヌナズナにおけるEXGT-A6の機能を花茎伸長変異株、花成早化変異株、黄化植物体を用いて推定した。EXGT-A6は細胞分裂、細胞伸長活性の高い部分に特異的に発現しており、EXGT-A6は植物の形態を決める上で重要な働きを持つ事が示唆された。

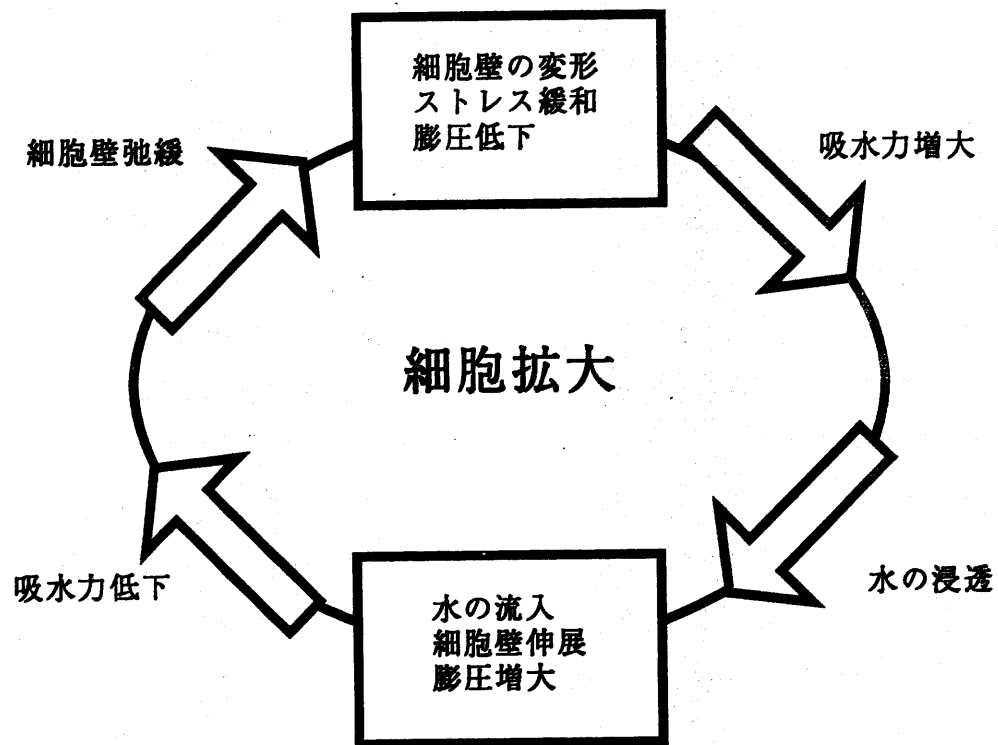


図1. 植物細胞拡大のモデル図 (Cosgrove, 1997aを改変)

第1章 均一化cDNAライブラリーを用いたシロイヌナズナの花序特異的に高発現する遺伝子の系統的単離と解析

序論

高等植物は分裂組織と呼ばれる、細胞分裂の盛んな、新しい細胞を生み出していく組織を持っている。分裂組織は成長途上の若い植物においては一生を通してシュートの先端と根の先端に見られ、これらを特に頂端分裂組織と呼び、シュートの先端部位の頂端分裂組織のことを茎頂分裂組織、根の先端の頂端分裂組織のことを根端分裂組織という。根端分裂組織は根を作り出し、茎頂分裂組織は発生段階に応じて地上部器官を作り出している。植物は花、種子の形成の為に必要なエネルギーや栄養分を蓄える必要がある。その為に栄養成長器官である葉を次々と形成する。この時期を栄養生長期と呼ぶ。そしてその後各種環境条件に応じて茎頂分裂組織は栄養生長分裂組織から花序分裂組織に転換する。花序分裂組織は細胞分裂を繰り返し、花序を成長させるとともに花分裂組織を形成する。これまでに栄養生長期から生殖生長期への移行のメカニズムを明らかにする様々な試みが行われているが、花の形態形成を含めて花序茎頂に特異的な遺伝子の知見は十分であるとはいえない。例えば花の形態形成に関与している数多くの遺伝子の構造、機能が明らかになるにつれ、遺伝子の転写制御や細胞間のコミュニケーションが重要だということが分かってきたが (Clark et al, 1997)、それらの標的となり器官の形質決定に関与する遺伝子の報告はない。

ディファレンシャルスクリーニング法は時期特異的あるいは部位特異的な発現をしている遺伝子の単離に効率的な方法の一つである。今までにも幾つかのグループによって一般的なcDNAライブラリーを利用してディファレンシャルスクリーニング法を用いた、花序茎頂に特異的な遺伝子の単離に関する報告がされている (Kelly et al., 1990; Meeks-Wagner et al., 1989)。しかしながら単離されてくる候補クローンは実験に使用する組織中でのmRNAの発現比率によって大きく左右され (Utsugi et al., 1996; Iuchi et al., 2000)、また幾つもの同じcDNAを持つ候補クローンが単離されてしまい効率が悪い。我々の研究室で作成した均一化cDNAライブラリーは、組織内でのmRNAをその組織内での発現量に関係なく全て同等に扱うことが可能になり非常に効率的である (Kohchi et al., 1995)。実際、本研究室において花序茎頂に特異的且つ低発現性遺伝子の効率的な単離に関する報告がなされている (Takemura et al., 1999)。

本研究は植物の花序茎頂部位において高発現している遺伝子の単離に関するものであり、茎頂部位において高発現をして植物の形質発現を司る遺伝子、言い換えると植物の「かたち」そのもの、つまり植物の形態に直接に関わると考えられる遺伝子を網羅的に単離し花序茎頂の機能を探る目的で均一化cDNAライブラリー（藤重, 1995）を利用してディファレンシャルスクリーニングを行った。スクリーニングの結果シロイヌナズナの茎頂分裂組織においてどのような遺伝子種が高発現しているのかが明らかになった。発現している遺伝子は茎頂分裂組織の発達や、細胞壁の形成にとっても深く関わっているものであった。タンパク質、核酸合成に関わる遺伝子、細胞間シグナル伝達に関わる遺伝子、細胞壁の伸長、発達に関わる遺伝子と相同性を示すクローンが得られた。

材料と方法

植物材料

実験材料として用いたシロイヌナズナ; *Arabidopsis thaliana* (ecotype: Columbia) は研究室のストック由来のものを使用した。栽培方法は春化处理した種子を、滅菌した培養土 (Metro-Mix 350: Scotts-Sierra Horticultural Products Company) に播種し、温室で長日条件 (約23℃、明期16時間、暗期8時間) 下で4-6週間栽培した。ノーザンハイブリダイゼーション分析用にはそれぞれロゼット葉、茎生葉、茎、花、花序の外側 (ステージ7から12の花)、花序の内側 (ステージ6以前の花) の組織を採集し液体窒素で凍結、-80℃で保存した。

ディファレンシャルスクリーニング

本研究室の藤重により構築されたシロイヌナズナのステージ5まで (Smyth et al., 1990) の花序茎頂を含む花の組織において発現する遺伝子が、全て一定の割合で含まれる均一化cDNAライブラリー (藤重, 1995) を利用してディファレンシャルスクリーニングを行った。このライブラリーは合計105枚の96穴タイタープレートに保存されており、そのうちの34枚を使用した。High Density Replicating System (BIOMEK 1000: Beckman) を使用して8×10 cmの一枚のナイロンメンブレン上にタイタープレート34枚分の均一化cDNAライブラリー由来のコロニーを高密度に転写しオートクレーブ (121℃, 1分) とUVクロスリンカー処理によってコロニーのDNAをメンブレンに固定した。ネガティブコントロールとしてベクターのプラスミドを持つクローンを、メンブレン内のポジションコントロールとしてニワトリの核内レセプター X50のクローンを同時に転写した (図2A)。このメンブレンにシロイヌナズナの花芽由来のcDNA、栄養生長期由来で均一化を行ったcDNA (1回均一化サイクルを行ったもの)、栄養生長期由来で均一化を行ったcDNA (3回均一化サイクルを行ったもの) をプローブとしたディファレンシャルハイブリダイゼーションを行い、花芽由来のcDNAでシグナルが見られ (図2B)、栄養栄養生長期由来で均一化を行ったcDNAでシグナルの見られないもの (図2C)、つまりステージ5までの花序茎頂を含む花の組織特異的に発現しているクローンを選り出した。プローブ調製の際にX50も同時にラベルしてハイブリダイゼーション操作を行うことにより得られるX50のシグナルの位置から、

メンブレン上の候補クローンを決定した(図2A)。プローブはPrime-It II Random Primer Labeling Kit (Stratagene) を用いて[α - 32 P]dCTPで標識して行った。65℃で一晩ハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイゼーション操作の後、メンブレンについて室温下で2×SSC、0.1%SDS液 (Church and Gilbert, 1984)で5分の洗浄操作を3回行い、その後65℃で0.2×SSC、0.1%SDS液 (Church and Gilbert, 1984)で15分の洗浄操作を2回行った。

ノーザンハイブリダイゼーション

凍結したシロイヌナズナの組織からAcid-Guanidinium-Phenol-Chloroform (AGPC) 法によりトータルRNAを調製した後 (Chomczynski and Sacchi, 1987)、各々1 μ gのトータルRNAを1%アガロース-ホルムアルデヒドゲル中で電気泳動し、ナイロンメンブレン (Hybond-N: Amersham) に転写後、UVクロスリンカーでトータルRNAをメンブレンに固定した。このフィルターに候補クローンのPCR断片をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。プローブはPrime-It II Random Primer Labeling Kit (Stratagene) を用いて[α - 32 P]dCTPで標識した。60℃で一晩ハイブリダイゼーションを行い、室温下で2×SSC、0.1%SDS液で5分の洗浄操作を3回行った後55℃で0.2×SSC、0.1%SDS液で15分の洗浄操作を2回行った。X線フィルムを増感紙と共にカセットに装着し-80℃で一晩露光した。コントロールとして18S rDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行った。

塩基配列の決定

pBluescript II KS⁺にクローニングされたライブラリーのクローンについて、Dideoxy Chain Terminator (Dye-Primer) 法 (Sanger et al., 1977) でABI 373 DNAシーケンサー (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。解析にはGeneWorks 2.5.1N (IntelliGenetics, Inc.) を用いた。

ホモロジーサーチ

得られた塩基配列を日本DNAデータバンク (DDBJ: DNA Data Bank of JAPAN) のBLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>) プログラムを利用してホモ

ロジサーチを行った (Altschul et al., 1997) 。プログラムはblastx (DNA 配列 vs Protein データベース)、データベースはProtein All(PIR + SWISS-PROT + DAD + PDB) を用いて行った。

結果

ディファレンシャルスクリーニング

シロイヌナズナの花の発生過程の各段階を記載したステージ表より (Smyth et al., 1990)、ステージ5はがく片が花芽を覆い、花卉の原基は殆ど見分けられず、花卉と雄ずいの原基が生じている段階であり、実体顕微鏡で識別可能な段階の組織である。このシロイヌナズナのステージ5までの組織において発現する遺伝子が、ほぼ一定の割合で含まれるように構築された均一化cDNAライブラリーを用いてディファレンシャルハイブリダイゼーションを行い、生殖生長期の組織で高発現している候補クローンを26選び出した。

選抜クローンの番号は2H4、3E4、5E1、9F3、9F12、10C9、11A11、13H3、13H12、14B3、15D1、16D2、18B5、20C11、20H4、22C7、22D7、22G12、25D10、26H10、27F2、30G6、32E11、32H8、33H8、34H10で合計26個であった。次にこれらの選抜クローンが実際に生殖生長期の組織で高発現しているのかをノーザンハイブリダイゼーション分析で確認することにより2次選抜を行うことにした。

ノーザンハイブリダイゼーション分析による候補クローンの選抜

スクリーニングの2次選抜の為に各選抜クローンに対してノーザン分析を行った。シロイヌナズナの葉、茎生葉、茎、花、花序の外縁部分、花序の内部分からトータルRNAに対してクローンのインサートをプローブにしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果栄養生長期の組織で低発現で生殖生長期の組織で高発現している候補クローンを選び出した (図3)。選抜されたクローンは2H4、3E4、5E1、9F3、10C9、11A11、13H12、18B5、20H4、22G12、30G6、32E11、33H8の合計13クローンであった。選抜から除外されたクローンの中には栄養生長期の組織と生殖生長期の組織間でmRNAの蓄積の差が観察されたものの一晩の露光ではシグナルが観察されなかったものや、栄養生長期でもmRNAの蓄積がはっきりと観察されるもの、また全体的にmRNAの蓄積の差が見られないものも存在していた。これは最初のスクリーニングで誤って選抜したものと考えた。次に選抜された13クローン中にどのような遺伝子が含まれているのかを調べるために相同性検索を行った。

相同性検索による候補クローンの評価

得られた13クローンのインサートの塩基配列を決定し、それらを日本DNAデータベースのBLASTプログラムを用いて相同性検索を行った(表1)。6クローン(2H4: L27、9F3: L18、10C9: L1A、13H12: S3A、22G12: S15、33H8: L17)がそれぞれ異なるリボソームタンパク質と相同性を示し、3E4はCTPシンターゼと、11A11はアクアポリン、18B5はERECTAタンパク、20H4は翻訳伸長因子eEF-1、30G6はグリシンリッチタンパク質、そして32E11はエンド型キシログルカン転移酵素とそれぞれ相同性を示した。また、5E1は報告されているどの遺伝子とも相同性を示さないクローンであった。

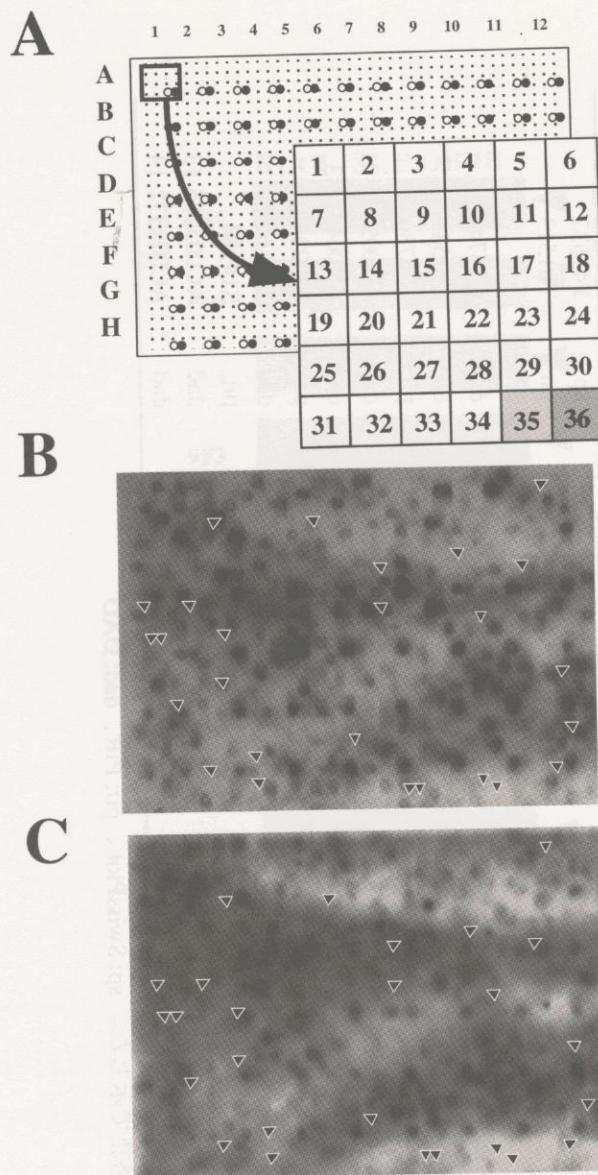


図2. 均一化cDNAライブラリーを用いたディファレンシャルスクリーニング
 A. メンブレン内でのポジション図 (模式図)。8X10 cmのナイロンメンブレンの一部を同時に拡大して示した。メンブレンの左に示すA-Hの文字、上に示す1-12の数字はcDNAライブラリー中のクローンのマイクロタイタープレート内でのポジションを表す。拡大図中の1-36の数字はマイクロタイタープレートの番号を示している。ネガティブコントロールとしてベクターのプラスミドを持つクローンを35番目に、ポジションコントロールとして植物に類似配列を持たない、ニワトリの核内レセプター X50のクローンを36番目に転写した。シロイヌナズナmRNA由来cDNAプローブと同時にX50プローブを加え、ハイブリダイズさせて得られたシグナルのX50に対する位置から、メンブレン上の候補クローンの番号を決定した。B. シロイヌナズナの花序由来の均一化cDNAをプローブに用いて、ハイブリダイズさせ得られたオートラ像。C. シロイヌナズナ栄養生長期由来のcDNAプローブをハイブリダイズさせ、得られたオートラ像。図中の黒矢印は選抜した個々のクローンの位置を示す。

表1. 選抜されたクローンの相同性検索結果

Clone	Putative identification	Organism	Score	Database*	Accession No.
2H4	Ribosomal protein L27A	Arabidopsis	287	sp	P49637
3E4	CTP synthase	Arabidopsis	200	pir	T01513
5E1	-	-	-	-	-
9F3	Ribosomal protein L18	Arabidopsis	371	dad	U15741-1
10C9	Ribosomal protein L1A	Arabidopsis	379	dad	Z17589-1
11A11	Plasma membrane intrinsic protein	Arabidopsis	568	pir	T05780
13H12	Ribosomal protein S3A	Arabidopsis	269	dad	AC009465-21
18B5	Receptor protein kinase, ERECTA protein	Arabidopsis	142	dad	AC004484-3
20H4	Translation elongation factor eEF-1 β' chain	Rice	240	pir	S29224
22G12	Ribosomal protein S15	Arabidopsis	251	dad	Z23162-2
30G6	Glycine-rich protein	Tomato	38	pir	S14984
32E11	Endoxyloglucan transferase	Arabidopsis	482	dad	AC005275-13
33H8	Ribosomal protein L17	Arabidopsis	271	dad	AC002332-14

* データベースは略語で示した。sp: SwissPlot、pir: PIR、dad: DAD

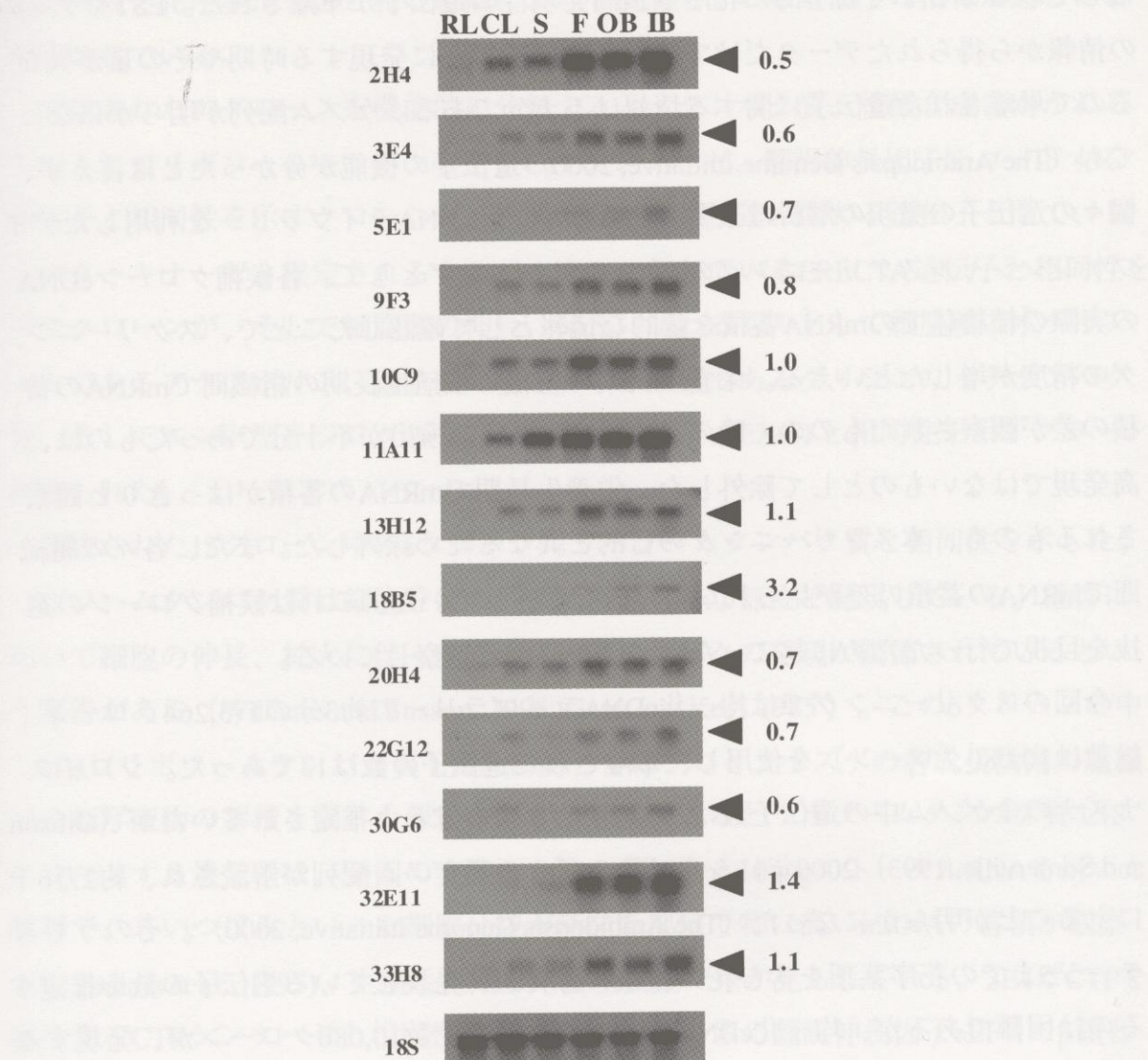


図3. 2次スクリーニングにより組織特異性が観察されたクローンのRNAゲルブロット解析結果

温室で4-6週生育させたシロイヌナズナ (ecotype: Columbia) の各組織由来のトータルRNAを1 μ g使用した。RL:ロゼット葉、CL:茎生葉、S:茎、F:花、OB:花序の外縁部分、IB:花序の内部分。検出された転写産物の大きさ(kb)は図の右に、候補クローンの番号を左側に示す。ローディングのコントロールとして18S rDNAを最下部に示した。

考察

今回のスクリーニングでは均一化cDNAライブラリーを使用したため同じものを重複して取ることなく効率的に花序茎頂高発現性の遺伝子が単離された。ESTやゲノムの情報から得られたデータだけでは、各遺伝子ごとに発現する時期やその量が異なるので単離された遺伝子に関する情報は不十分である。ゲノム配列が明らかになっても (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) 遺伝子の機能が分かったとは言えず、個々の遺伝子の発現の解析は重要である。均一化cDNAライブラリーを利用したディファレンシャルスクリーニングの2次スクリーニングとして、各候補クローンcDNAの実際の植物体でのmRNA蓄積を量的な情報として確認したことで、スクリーニングの精度が増したといえる。栄養生長期の組織と生殖生長期の組織間でmRNAの蓄積の差が観察されたものの一晚の露光ではmRNAの検出が不十分であったものは、高発現ではないものとして除外した。栄養生長期でmRNAの蓄積がはっきりと観察されるものも、本スクリーニングの目的と異なるため除外した。また、各々の組織間でmRNAの蓄積の差が見られないものも存在していた。これは候補クローンの選抜を目視で行ったために起こったのではないかと考察している。

今回のスクリーニングでは均一化cDNAライブラリーの約3分の1(3,264クローン：総数は10,080クローン)を使用し、単離された遺伝子の数は13であった。シロイヌナズナの全ゲノム中の遺伝子数は2万数千余りにのぼると推定されていたが (Gibson and Somerville, 1993) 2000年にシロイヌナズナの全ゲノム配列が解読され、約2万6千に上ることが明らかになった (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。そのうちステージ5までの花序茎頂を含む花の組織に特異的に発現している遺伝子の数を推定するのは困難であるが、均一化cDNAライブラリーの総数10,080クローンが、発現する遺伝子をランダムにクローン化していると考えたと、ステージ5までの花序茎頂を含む花の組織において発現している遺伝子の大部分を含んでいると考えられる

(Takemura et al., 1999)。今回実験には均一化cDNAライブラリー全てではなく、約3分の1の3,264クローンを母数として解析を行った為、残りの均一化cDNAライブラリーを用いて再度ディファレンシャルスクリーニングを行えば更に単離される遺伝子の数が増える事が予想される。シロイヌナズナのEST (expressed sequence tag) の登録配列数は2000年12月の時点で11万2千5百に達している。この数は重複したものも含まれているが、シロイヌナズナの総遺伝子のかなりの部分を含む。それにもかかわらず今回均一化cDNAライブラリーを使用したディファレンシャルスクリーニング

によってシロイヌナズナでは報告されていない遺伝子や未知な遺伝子が単離された。このことは高発現な遺伝子であってもまだシロイヌナズナの中には単離されていないものが存在していることを示し、これまでにシロイヌナズナにおいて遺伝子の組織特異性や花序茎頂を含む花の組織において機能している遺伝子の情報が乏しい事を意味している。

選抜された13クローンを機能的に分類すると、タンパク質、核酸合成にかかわるものとしてリボソームタンパク質や、CTPシンターゼ、翻訳伸長因子をコードする遺伝子と相同性を示すクローンが、細胞間シグナル伝達に関わる遺伝子として、レセプターキナーゼと推定されるタンパクをコードしているERECTA遺伝子と相同性を示すクローンが、そして細胞壁の伸長、発達に関わるものとして細胞膜の水チャンネルであるアクアポリン、細胞壁の構造タンパク質であるグリシンリッチタンパク質、そしてエンド型キシログルカン転移酵素遺伝子、EXGTと相同性を示すクローンが得られた。

選抜された13クローン中の6クローンはリボソームタンパク質と相同性を示した。リボソームタンパク質は細胞分裂の分裂活性の盛んな部位で発現している。植物において細胞の伸長、拡大に伴ってリボソームタンパクの発現が調節されているという報告がある (Williams and Sussex, 1995; Gantt and Key, 1985)。この6クローンの中で9F3 (リボソームタンパク質 L18) に関してはシロイヌナズナの各成長段階の組織での転写産物の蓄積を調べた報告があり、それによるとリボソームタンパク質 L18 をコードする遺伝子は、今回の実験の10倍の量である $10\mu\text{g}$ のトータルRNAを用いた解析で、若いつぼみといった細胞分裂が活発な部位で特に高いmRNAの蓄積が観察され (Baima et al., 1995)、生殖生長期と栄養生長期で差が見られている。3E4はCTPを産生するCTPシンターゼと相同性を、また20H4はイネの翻訳伸長因子eEF-1の β 鎖と相同性を示した (Matsumoto et al., 1992)。これらも核酸合成や翻訳の機構に関する遺伝子で、細胞分裂が盛んな部位に発現していることは理解できる。

幾つかのクローンは頂端分裂組織の発達に深く関わっているタンパク質と相同性を示した。11A11はプラズマ膜に存在している水チャンネルであるアクアポリンと相同性を示した。このタンパク質ファミリーのメンバーは他に液胞膜 (トノプラスト) にも存在していて、細胞間や細胞内での水の輸送に関わり浸透圧調節を行っている (Schaffner, 1998)。Yamadaらはice plant由来アクアポリンのプロモーターにGUSを繋げた実験をタバコで行っており、それによるとプロモーターの活性 (GUSの染色部位) は水輸送が盛んだと予想される、急速に成長している部位に強く見られてい

る (Yamada et al., 1997)。頂端分裂組織の1次細胞壁といった部分では、急激な細胞拡大にともなう細胞伸長が起こる時に細胞内の水の流入が起こるが、水の単純拡散だけでは間に合わず、積極的に水を輸送する水チャンネルを必要としていることが予想される。

18B5はシロイヌナズナのER (*ERECTA*) 遺伝子でレセプターキナーゼと推定されるタンパク質をコードしており、茎頂部分において高発現しているとの報告がされている (Torii et al., 1996; Yokoyama et al., 1998)。このレセプターキナーゼは細胞外にシグナル受容部位を有しており、茎頂部分において器官形成に関わる細胞間シグナルの伝達に関わっているのではないかとと思われる。

30G6はグリシンリッチタンパク質 (GRP) と相同性を示した。グリシンリッチタンパク質はヒドロキシプロリンリッチタンパク質、プロリンリッチタンパク質と同じく細胞壁の構造タンパク質として知られている (Cassab and Varner, 1988; Cassab, 1998)。これらの構造タンパク質は1次細胞壁中に数%含まれているが、はっきりとした機能はまだ不明である (Showalter, 1993)。考えられている機能としては架橋構造を形成して細胞壁の強度を増すということが考えられているが定かではない。

32E11はエンド型キシログルカン転移酵素 (EXGT) と相同性を示した。EXGTは細胞壁の主要構成成分である多糖のキシログルカンの切断、繋ぎ換えをする酵素として近年注目を浴びている酵素である (Nishitani, 1997)。花序茎頂部分の細胞は新しい細胞が次々に生まれているので細胞壁が薄く、固さも充分ではない (Nishitani, 1997)。この細胞壁を一次細胞壁と呼ぶが、この一次細胞壁のセルロース微繊維間を架橋しているキシログルカン切断することによって一次細胞壁の構造が緩み細胞拡大が起こると考えられている (Nishitani et al., 1992)。この遺伝子は花、花序の外側、花序の内側において非常に強く発現しており、またディファレンシャルスクリーニングで同様の方法で頂端分裂組織特異的遺伝子として単離されている *meri-5* (Medford et al., 1991)、既知のシロイヌナズナのEXGTと異なるものであることから花序で発現している新規なアイソザイムではないかと推測した。このクローンは前の30G6と同様、植物の細胞壁構築に必須のタンパク質であり、その発現パターンより、植物の茎頂部位の分裂組織の細胞壁の再編成における生理学的に重要な酵素であると推測される。茎頂分裂組織は新しい細胞を生み出し、器官形成や組織形成といった植物体の最終的な形の決定を司る重要な部分だという事実からも細胞壁構築に関わると予想されるEXGT遺伝子が選抜されたことは合理的であると考えられる。

今回の均一化cDNAライブラリーを用いたディファレンシャルスクリーニングによ

り、どのような遺伝子種がシロイタネの茎頂分裂組織において高発現しているのかが明らかになった。発現している遺伝子は茎頂分裂組織の発達や、その後の細胞の形態形成にとっても深く関わっているものであった。これらの遺伝子によって茎頂分裂組織が細胞分裂、発達の盛んな部分であることを改めて示したことになる。これらの遺伝子の中で特に、*EXGT* 遺伝子と相同性を示した32-E11の、花序茎頂に高発現という特徴と植物体の最終的な形態に深く関わる細胞壁の構築酵素であるという点に特に注目し、以降その単離と発現部位、発現時期の解析を行った。

第2章 シロイヌナズナの花序茎頂特異的エンド型キシログルカン転移 酵素遺伝子EXGT-A6の単離とその発現様式

序論

高等植物の個々の細胞を形作っているのは細胞壁である。細胞壁は植物の形態を表す外部骨格として、又、細胞間のシグナル伝達や防御、そして成長や分化に深い関わりをもっている。植物の細胞壁は大きく分けて一次細胞壁と二次細胞壁に分けることができる。一次細胞壁は細胞分裂後から細胞拡大、成長が停止するまでの細胞の細胞壁のことをいう。いったん成長を終えた細胞はリグニンや多糖が沈着し、細胞壁の厚みを増して行く。この時期の細胞壁を二次細胞壁という。多細胞生物である植物体の中で一次細胞壁は、常に新しい細胞が生み出されている分裂組織の細胞に見られる (Carpita et al., 1993)。分裂組織、特に茎の先端に位置している茎頂分裂組織の細胞は拡大、伸長を経て全体として各々の組織、器官を形作っていく。

拡大、伸長成長を行っている細胞の一次細胞壁の主な構成成分はセルロース、ヘミセルロース (キシログルカン)、ペクチンがその大部分を占め、残りをエクспанシン、エクステンシン等の構造タンパクが加わっている。セルロースは細胞壁の繊維成分であり一次細胞壁に引っぱり強度を与えている。セルロースはセルロース分子間で水素結合を形成し数十本の分子が束状になって会合し、セルロースミクロフィブリルと呼ばれる巨大分子を形成する (Carpita et al., 1993)。双子葉植物におけるヘミセルロースの主成分であるキシログルカンはセルロース同様グルコースが直鎖状に連なった構造をしている。セルロースと異なる点は枝分れの構造としてキシロース側鎖を、キシロース側鎖にはさらにガラクトース側鎖またはフコシルガラクトース側鎖がかなりの頻度で結合している事である (Fry, 1989; Hayashi, 1989; McNeil et al., 1984)。キシログルカンはセルロースの表面に結合し、セルロースミクロフィブリル間に網状の架橋構造を形成すると考えられている。ペクチン分子はちょうどキシログルカン-セルロースミクロフィブリルの高分子複合体の隙間を埋める形で存在している。セルロースはプラズマ膜上のロゼットと呼ばれる合成酵素複合体によって合成され (Kimura et al., 1999; Brown et al., 1996)、キシログルカン、ペクチンといったマトリックス分子はゴルジ体で合成されエキソサイトーシスによって細胞壁空間に運搬される (Moore et al., 1991; Northcote, 1979)。

もう一つ欠くことのできない細胞壁の主要な構成成分は水である。水はマトリッ

クス分子間に存在しており、特に成長途上の一次細胞壁はその大部分が水である。水分子は植物細胞壁中の細胞外液という形で存在し、植物の外部環境中の水よりは高張だが、細胞の内部よりは低張である。このため浸透圧が不均衡になり細胞の内部に大きな膨圧が生じ、細胞壁を外に押す力が働く。膨圧は細胞に水が流入しない様に浸透圧と平衡するまで上昇する。細胞が拡大、伸長をするには細胞壁の構造が緩む過程が必要になってくる。この圧力は成長中の細胞を伸長させる主な駆動力であり、生きている植物組織に機械的な強さを与えるので植物の生存になくてはならないものである (Cosgrove, 1993; Cosgrove, 1997a; Taiz, 1984)。

植物が成長するためには細胞壁が伸長、変形しなければならない。結晶構造をとっているセルロースマイクロフィブリルは伸長できないので、こうした細胞の伸長、変型が起こるにはマイクロフィブリル相互の滑りや隣接したマイクロフィブリルの間隔の拡張が必要である。細胞拡大や伸長で起こる細胞壁の再編には、キシログルカン-セルロース複合体の枠組み全体を再編する過程が必須である。その過程にはキシログルカン架橋の切断や繋ぎ換え反応を触媒する酵素が関与する。分裂組織の一次細胞壁は伸長、拡大の際にある程度その厚さを保ちながら細胞壁の力学的な強さを維持している。分裂組織の一次細胞壁の維持には、ゴルジ体からのエキソサイトーシスによる細胞壁成分の輸送や、細胞分裂の際形成される細胞板、あるいはフラグモプラストの形成が深く関わっており、この細胞壁成分の新たな組み込みにもキシログルカン架橋の切断や繋ぎ換え反応を触媒する酵素が関与していると推定されている (Fry, 1995; Nishitani, 1997)。

この細胞壁のキシログルカン架橋の再編過程を触媒する鍵になる酵素として、90年代初頭から脚光を集めている酵素の1つがエンド型キシログルカン転移酵素 (Endoxyloglucan transferase; EXGT)である。この酵素はキシログルカン架橋をエンド型に切断し、他のキシログルカン分子または水分子に転移することにより細胞壁の弛緩、再構築を行っている と推定されている (図4) (西谷, 1997)。EXGTの他にセルロース-キシログルカン複合体の再編に関わっていると推定される酵素として、以前よりエンド1,4- β -グルカナーゼ (EGase) (図5A)、エキソグリコシルハイドロラーゼ (グリコシダーゼ) (図5B)、エクспанシンが挙げられてきた。

EGaseはセルロースの化学修飾誘導体であるカルボキシメチルセルロース (CMC) の β -1,4結合を切断する。しかしEGaseは*in vivo*での基質が不明な酵素で、その基質の有力候補として挙げられているのが、キシログルカンとセルロース微繊維の表層に存在する非結晶性領域の β -1,4-グルカンである。現在のところ、EGaseに関しては

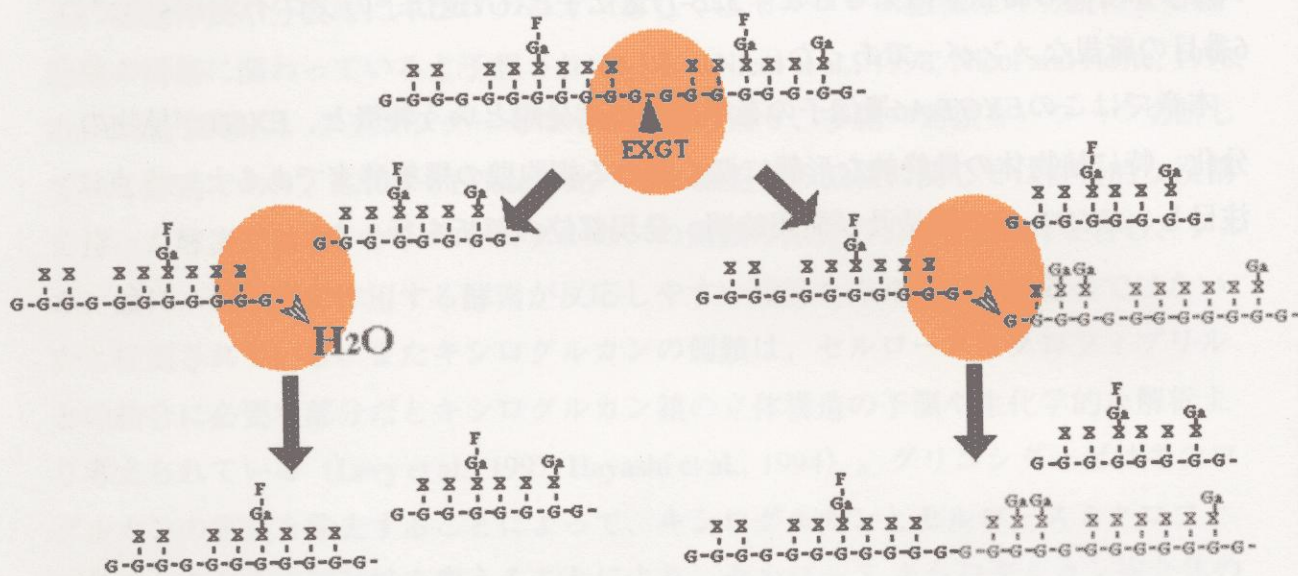
キシログルカンの切断に直接関わっているのかは不明である。シロイヌナズナにおいて胚軸、茎、葉の細胞伸長欠損の結果矮性となる *korrigan(kor)* 変異株の原因遺伝子が EGase の遺伝子であることが明らかとなっている。KOR は原形質膜、細胞板に局在し、細胞伸長や分裂時にキシログルカンもしくはセルロース微繊維の切断による細胞壁の構築に関わっていると予想されている (Nicol et al., 1998; Nicol and Hofte, 1998; Zuo et al., 2000)。グリコシダーゼはその名前の通り、多糖の側鎖を一つ一つ切断していく酵素であり、EXGT や EGase に比べると細胞壁の弛緩に関しては直接的な役割を持った酵素ではないが、キシログルカンの側鎖の除去によって EXGT を含む、グルカン鎖にエンド型に作用する酵素が反応しやすい環境を作り出しているのではないかと推測されている。またキシログルカンの側鎖は、セルロースマイクロフィブリルとの結合に必要な部分だとキシログルカン鎖の立体構造の予測や生化学的な解析より考えられている (Levy et al., 1997; Hayashi et al., 1994)。グリコシダーゼはキシログルカンの側鎖を除去することによって、キシログルカンとセルロースマイクロフィブリルとの会合の親和性を変えることにより、セルロース-キシログルカン複合体の枠組みに変化を及ぼしているという説も提唱されているが定かではない。エクспанシンは早くから報告があるにもかかわらず、その生化学的な酵素反応機構は明らかにされていないが、セルロースマイクロフィブリル-キシログルカン間の水素結合を切断することにより細胞壁の弛緩を引き起こすと考えられている (McQueen-Mason et al., 1992)。トマトにおいて茎頂分裂組織の葉原器が出現すると予想される部位にエクспанシンをコーティングした微粒子を載せると、葉原器が早期に出現することが報告されている (Fleming et al, 1997; Fleming et al, 1999)。最近になって、C 末端側に存在している推定されるセルロース結合ドメインがセルロース微繊維上を移動し、N 末端側の推定される酵素活性ドメインがキシログルカンとセルロース微繊維間の水素結合を切断するという反応モデルが提唱されている (Cosgrove, 2000a; Cosgrove, 2000b)。

しかしながらこれら3つの酵素はいずれも細胞壁の構成成分の分解や分子間の滑りに限定されたもので、それだけではキシログルカンの新たな取り込みによる細胞壁の再編成過程を説明できるものではなかった。細胞内架橋の切断と繋ぎ変えの2つの反応を触媒する EXGT の発見 (Nishitani et al., 1991; Nishitani et al., 1992; Fry et al., 1991; Smith and Fry, 1992) によって、初めて細胞壁の再編、再構築に関する議論が可能になってきた。

第1章のディファレンシャルスクリーニングで選抜されたクローンの中で、エンド

型キシログルカン転移酵素(Endoxyloglucan transferase; EXGT)遺伝子と相同性を示した 32E-11 遺伝子は葉、茎生葉、茎といった栄養生長期の組織では殆ど mRNA の蓄積が見られず、開花した花、頂端分裂組織を含む花序といった生殖生長期の組織において大量の mRNA の蓄積が観察された。32E-11 遺伝子 EXGT 遺伝子のシロイヌナズナでの 6 番目の新規なメンバーであった。

本章ではこの EXGT-A6 遺伝子の花序茎頂に高発現という特徴と、EXGT が植物の分化、特に植物体の最終的な形態に深く関わる細胞壁の構築酵素であるという点に注目し、EXGT-A6 の構造及び発現時期、発現部位の解析を行った。



加水分解反応

糖転位反応

図4. EXGTの加水分解反応、糖転位反応モデル(西谷、1997を改変)
 この酵素はキシログルカン主鎖の β -1,4-グルコシル結合をエンド型で切断し、新しく生じる還元末端を水または他のキシログルカン分子の非還元末端のグルコース残基の4位に結合させる。水に転移すると加水分解反応が、他のキシログルカン分子に転移すると繋ぎ換え反応が起こる。G:グルコース、F:フコース、Ga:ガラクトース、X:キシロース。

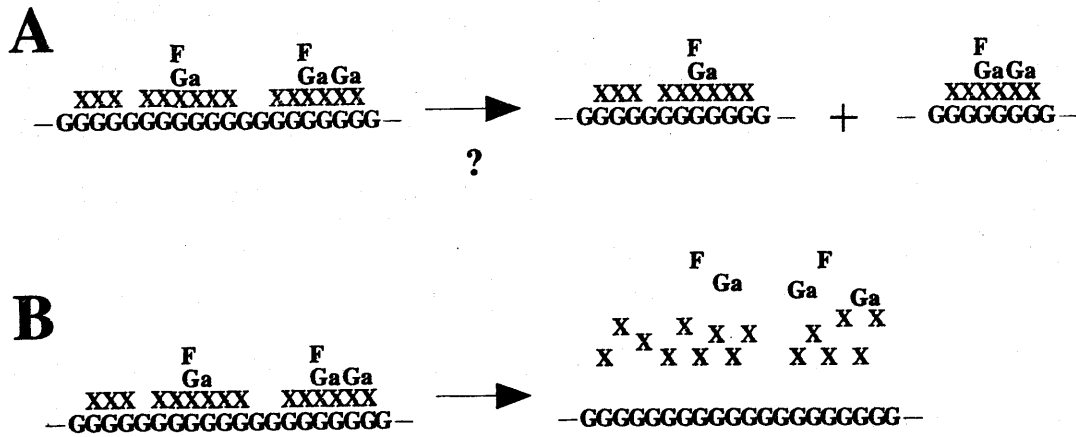


図5.細胞壁の緩みに関与していると考えられている他の酵素の反応モデル

A.エンド1,4- β -グルカナーゼ (EGase) によるキシログルカン鎖の切断モデル。この酵素はキシログルカン主鎖の β -1,4-グルコシル結合をエンド型で切断するのではないかと考えられているが実際に植物内でキシログルカン鎖を基質にしているのか不明である。B.エキソグリコシルヒドロラーゼ (グリコシダーゼ) によるキシログルカン鎖の切断モデル。グリコシダーゼはキシログルカン主鎖の切断は行わず、側鎖の糖鎖を一つ一つ切断する。G:グルコース、F:フコース、Ga:ガラクトース、X:キシロース。

材料と方法

材料

実験材料として用いたシロイヌナズナ; *Arabidopsis thaliana* (ecotype: Columbia) は研究室のストックを使用した。栽培方法は春化处理した種子を播種し、人工気象器で23℃の長日条件（明期16時間、暗期8時間）下で栽培した。2-6日の幼植物体はハイポネックス（HYPONeX: (株) ハイポネックスジャパン）溶液を染み込ませたろ紙を敷いたシャーレ上で栽培した。根組織採集用の植物はMS寒天培地上に滅菌処理した種子を播種し、シャーレを垂直に立てて栽培した。暗黒下で生育させた実生の組織採集用の植物はMS寒天培地上に滅菌処理した種子を播種し、23℃の暗黒下で10日間栽培した。花茎伸長変異株 *acl* (*acaulis*) 1-2、*acl* 2-1、*acl* 3-1、*acl* 4-1 (Columbia) の種子は北海道大学理学部 米田 好文教授から分与して頂き、春化处理後滅菌したメトロミックスに播種し、人工気象器で23℃の長日条件（明期16時間、暗期8時間）下で約60日間栽培した。器官分化変異株 *tfl* (*terminal flower*) 1-1 (Columbia)、*tfl* 1-2

(*Landsberg erecta*) の種子 (CS6167, CS3091) (Alvarez et al., 1992; Shannon and Meeks-Wagner, 1991; Shannon and Meeks-Wagner, 1993) はオハイオ州立大学シロイヌナズナ生物資源センターより供与されたものを同様の条件で約20日間栽培した。シロイヌナズナ野性株の組織を用いたノーザンハイブリダイゼーション分析用には、栄養生長期のシロイヌナズナの発芽後2-14日の全植物体、発芽後8-14日の植物の茎頂部分、胚軸、葉（葉柄を含む）を採集し液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。生殖生長期においては、抽苔直後（発芽後約20日）および発芽後約40日の植物体から組織を採集した。抽苔直後（発芽後約20日）のシロイヌナズナでは、花序茎頂部分を含むつぼみ、開花した花を含むつぼみ、茎生葉、ロゼット葉、茎生葉を含む部分の茎、茎生葉を含まない部分の茎、根の根端部分（根端部分から約1cmの部分）、根の主根部分（側根も含む）の組織を採集、発芽後約40日のシロイヌナズナでは、花序茎頂部分を含むつぼみ、開花した花を含むつぼみ、花柄、茎生葉、ロゼット葉、茎生葉を含む部分の茎、茎生葉を含まない部分の茎、さや（未熟）の組織を採集し、液体窒素で凍結、-80℃で保存した。

暗黒下で生育させたシロイヌナズナ黄化植物組織を用いたノーザンハイブリダイゼーション分析用には子葉（茎頂部を含む）、胚軸の2種類の組織を採集し、同様に-80℃で保存した。花茎伸長変異株 *acl* 1-*acl* 4 及び器官分化変異株 *tfl* 1-1, *tfl* 1-2 の組織を

用いたノーザンハイブリダイゼーション分析用には茎、葉、花序基頂部分を含むつぼみと開花した花の3種類の組織を採集した。

EXGT-A6のcDNAの全長を単離するために用いたシロイヌナズナ (ecotype: Landsberg *erecta*) 花組織由来の λ ZAP II cDNA ライブラリー (CD4-6) はオハイオ州立大学シロイヌナズナ生物資源センターより供与されたものを、EXGT-A6遺伝子を含むゲノムDNAのスクリーニングに用いたシロイヌナズナ (ecotype: Columbia) 由来の λ FIXIIライブラリーは研究室のストックをそれぞれ使用した。

EXGT-A6の全長cDNAクローン、ゲノムDNAクローンのスクリーニング

cDNA及びゲノムDNAクローンのスクリーニングの方法はBenton及びGrunsteinのブランクハイブリダイゼーションの方法に従った (Benton et al., 1977; Grunstein et al., 1975)。プローブにはEXGTと相同性を示したクローン32-E11のNot I-Sse 8387I挿入断片を用いた (1章参照)。

RNAゲルプロット解析

方法は1章と同じである。コントロールとしてアクチン遺伝子 (Act 8) を同様にラベルし、プローブとしてハイブリダイゼーションを行いRNA量が一定である事を調べた (An et al., 1996)。

ゲノムサザンハイブリダイゼーション

シロイヌナズナ (エコタイプColumbia) のゲノムDNA $1\mu\text{g}$ をそれぞれHind III, Eco RI, Bgl II, Bam HIの制限酵素で処理した。1%アガロースゲルで電気泳動を行った後、DNAを変性させナイロンメンブレン (Hybond-N Amersham) へ移しUVクロスリンカーでDNAをメンブレンに固定した。ハイブリダイゼーションは60℃で一晩行った。2 $\times$ SSC, 0.1% SDSで室温で5分間の洗浄を3回行った後、強い洗浄条件 (high stringency: 65℃, 0.2 $\times$ SSC, 0.1% SDS) でメンブレンを15分で2回洗浄したものと弱い洗浄条件 (low stringency: 50℃, 0.2 $\times$ SSC, 0.1% SDS) でメンブレンを15分で2回洗浄したものを用意した。

塩基配列の決定

pBluescript II SK(-)に*Eco* RI-*Xho* Iで挿入されている約1.0 kbの32E-11cDNAとpBluescript II KS(+)に*Sac* Iでクローニングされた4.3 kbの32E-11ゲノムDNAについて塩基配列を決定した。32E-11ゲノムDNAが挿入されたプラスミドは制限酵素*Apa* Iと*Sma* Iで切断しExonuclease IIIを用いて1方向に分解、デリーションプラスミドを作成した (Guo and Wu, 1983)。Mung Bean nucleaseでプラスミドの末端部分を平滑化し、T4 DNA ligaseでプラスミドを連結後大腸菌に形質転換した。デリーションプラスミドを持つクローンからプラスミドを調製し塩基配列を決定した。cDNAの塩基配列、ゲノムDNAの塩基配列共に全領域について両方向から塩基配列を決定した。

CAPSマッピング

シロイヌナズナの染色体上のEXGT-A6遺伝子座を、CAPSマッピング法 (Konieczny and Ausubel, 1993) によって決定した。PCR反応液中には標準的な試薬と鋳型DNAとしてRecombinant inbred (RI) ライン植物体 (Lister and Dean, 1993) のゲノムDNA 100 μ gと合成プライマー 5'EXGT Afa; 5'-GGA ATG CAG ATG ATT GGG CTA CACおよび、3'EXGT Afa; 5'-CCG TTT CAC AGA TCT TGT CTC CATを含む。PCR反応は94℃で1分、50℃で2分、72℃で3分を1サイクルとして25回繰り返した。PCR反応後、増幅されたDNAをAfa I (Takara) で制限酵素処理し、1.5%アガロースゲルで電気泳動を行った。この泳動パターンからColumbia型 (603 bp) とLandsberg *erecta*型 (351 bpと 248 bp) を区別した。100個体のRIラインについて得られたデータをインターネットを利用してNottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC; http://nasc.nott.ac.uk/new_ri_map.html) に送り、遺伝子のマッピングを依頼した。

ウエスタンブロッティング

シロイヌナズナの組織を使用したウエスタンブロッティングにはEXGT-A6 cDNA配列から導かれた、特異性の高い領域に対応するオリゴペプチドKFDELYRSSWAM DHC (28番目から42番目のアミノ酸配列に相当) の合成および抗体作成は (株) サワディーテクノロジーに依頼した。

シロイヌナズナの植物体から花序茎頂部分を含むつぼみ、開花した花を含むつぼみ、茎生葉、ロゼット葉、茎生葉を含む部分の茎、茎生葉を含まない部分の茎の6種類の組織を採集し液体窒素で凍結後凍結プレス破碎装置 (CRYO-PRESS CP-100W: マイクロテックニチオン) で破碎後抽出バッファー (0.1 M Tris-HCl buffer、pH 7.0、1M NaCl) を添加、 $110,000 \times g$ で30分遠心後の上清を実験に使用した。調製した $4 \mu g$ のタンパクを12.5%のSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動してPVDF膜

(Hybond-P, Amersham) にブロットした。タンパク質量の測定にはBio-RadのProtein Assay Kit を使用した (Bradford, 1976) 。ブロッティングバッファー、ブロッティングの条件は日本エイダーのブロッティング装置 (NA-1512) の説明書に従った。シグナルの検出は作成された抗EXGT-A6抗体を一次抗体として、抗ウサギIgG抗体

(biotin conjugated) を2次抗体としてstreptavidin-biotin labeled HRP (horse radish peroxidase) complex 溶液を反応させた。検出にはImmunoStar Kit for Rabbit (和光) を用いた。

結果

EXGT-A6遺伝子の構造解析

EXGTと相同性を示した32-E11の全長cDNAを単離し、構造解析により他のEXGTとの比較を行う為、第1章で述べた32-E11のNot I-Sse 8387I cDNA断片を用いてシロイヌナズナの花のcDNAライブラリーから約0.5~1.0kbの大きさのクローンを得た。最長の断片を持つクローンの塩基配列を決定した。EXGT-A6遺伝子の全長cDNA塩基配列及び推定されるアミノ酸配列を図6に示す。得られたcDNAの塩基配列の長さは1,014bp（ポリA配列を含む）で5'非翻訳領域47bp、3'非翻訳領域97bpを含み、290アミノ酸をコードしていた。推定されるタンパク質の分子質量は33.1kDaであった。推定される最長ORFのアミノ酸配列中のN末端部には、合計5つのメチオニンが含まれていたが、植物の翻訳開始AUGのコンセンサス配列（TAACAAATGGCT）（Joshi, 1987; Lutcke et al., 1987; Kozak, 1986）から最初のATGが開始メチオニンであると推定される。推定されるポリA付加シグナルはポリA開始点から60bp上流に存在していた（図7）。この遺伝子はEXGTと相同性を示し、花序で特異的に高発現するアイソザイムと考えられた。32E-11遺伝子はシロイヌナズナのEXGT遺伝子ファミリーの6番目の新規なメンバーであることからEXGT-A6遺伝子と命名した。また、他のXRPファミリーとのアミノ酸配列の相同性は約30%-50%の範囲であった（図8）。

EXGT-A6の配列のN末端側には疎水性アミノ酸を多く含む部分が存在している。このシグナル配列は配列解釈ソフトであるPSORT (Prediction of Protein Sorting Signals; <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) から25番目のセリンの後で切断されると推定された（Nakai and Horton, 1999）。シロイヌナズナにおいてこのタンパク質はシグナル配列の切断後、アミノ酸の修飾を考慮しないと、30.5kDaの分子量で存在すると考えられる。このシグナル配列はEXGT-A6の小胞輸送に関与していると予想された。EXGT-A6の配列中には膜貫通領域が見られなかったことから、このシグナル配列は細胞壁空間に輸送するシグナルとして機能していることが考えられる。また、配列中にはN-糖鎖の付加シグナルと考えられる配列（NXT/S: Xはプロリン、アスパラギン酸以外のアミノ酸）が2箇所（55番目と109番目）存在している（図6）。また、配列中には他のEXGT間で保存されている4つのシステイン残基（図6丸囲み）及びキシログルカンの切断に関与すると考えられているアミノ酸配列（図6下線部）が認められた（Nishitani, 1997）。しかし、キシログルカンの切断に関与すると考えられている

EXGT-A6のアミノ酸配列は、他のキシログルカン関連タンパク質 (Xyloglucan related protein: XRP) アミノ酸配列と異なっていた (図9)。XRPは共通なアミノ酸配列としてDEID(F/I)EFLGNを含むが、EXGT-A6タンパク質の場合、この共通配列に相当する部分はNEEDFEFLGNであった。

EXGT-A6の構造

次にEXGT-A6遺伝子はシロイヌナズナのゲノム中に相同な遺伝子を有しているのかを調べるためにEXGT-A6のNot I-Sse 8387I cDNA断片 (第1章) をプローブにゲノムサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、強い洗浄条件では各々のレーンに1本のバンドが、弱い洗浄の条件においては強い洗浄条件で観察されたバンドに加えて新たに数本のバンドが確認された。このことからEXGT-A6はシロイヌナズナのゲノム中に弱く相同性を持つ遺伝子を持つものの、高度に保存されたものはないと考えられた (図10)。

シロイヌナズナのλFIXIIライブラリーよりEXGT-A6を含むゲノムクローンの単離を試みた結果、EXGT-A6遺伝子領域を含む12 kbの断片を持つゲノムクローンが得られた。EXGT-A6遺伝子領域を含む4.3 kbのSac I断片の塩基配列を決定したところ、このクローンにはEXGT-A6のコード領域が全て含まれていた。この中には偽遺伝子の配列の一部が含まれていた (図7)。また、EXGT-A6のcDNA配列と比較した結果EXGT-A6遺伝子は4つのエクソンと3つのイントロンを持っていることが明らかとなった。EXGT-A6はシグナル配列に翻訳される部分を第1エクソンに含み、活性中心に相当する部分が第3エクソンに存在した。シロイヌナズナのXTRであるEXGT-A1からEXGT-A5 (Okazawa et al., 1993; Xu et al., 1996; Nishitani, 1997;) においては、EXGT-A1からEXGT-A4がEXGT-A6と同様にシグナル配列に翻訳される部分を第1エクソンに含み、活性中心に相当する部分が第3エクソンに存在している。EXGT-A5は第1エクソンにシグナル配列があり、第2エクソンに活性中心に相当する部分が存在している (図11)。EXGT-A6遺伝子は870 bpのコーディング領域を持っていて、5'非翻訳領域の上流にTATA配列、CAAT配列を推定した (図7)。

また、EXGT-A6のcDNA配列はLandsberg erecta由来でゲノム配列はColumbia由来であった為、2つの配列の間で多型が観察された。多型の観察された部位はEXGT-A6の第4エクソンのコーディング領域と3' 非翻訳領域で、第4エクソンにおいては、最初のATGのAを+1とすると、+987のAがLandsberg型ではTに、+1023のGがLandsberg型で

はAに置換され、3'非翻訳領域には+1246のGがLandsberg型ではAに置換され、+1280から+1281のCA、+1288のTがLandsberg型では欠失していた（図7）。Landsberg erectaとColumbiaの間で多型が観察されたことで、シロイヌナズナのゲノム上におけるEXGT-A6の遺伝子座の決定が可能になり、そしてEXGT-A6の位置から他の既知の細胞伸長変異体との関係を議論できないかと考えCAPS マッピングを行った。実験に使用した100のRI（Recombinant Inbred）ラインのゲノムのうち42がColumbia型を、45がLandsberg erecta型を示した。残りの13ラインについてはどちらかの判別が困難であった為、合計87ラインについてのデータをノッティンガムのシロイヌナズナストックセンターに送り解析を依頼した所、EXGT-A6遺伝子はシロイヌナズナの第4染色体上腕部のg3843マーカーから6.9 cM、GA1 m448A g2616 m506マーカーから2.9 cMの位置にマッピングされた（図12）。しかしながらこの領域上にはこれまでに知られている変異体の遺伝子座がマップされておらず、変異体の遺伝子座とEXGT-A6遺伝子との関連を染色体上の位置から類推することは不可能であった。

シロイヌナズナの各成長段階、各器官でのEXGT-A6転写産物の蓄積

EXGT-A6は1章のノザン解析において、葉、茎生葉、茎といった栄養生長期の組織では殆どmRNAの蓄積が見られず、開花した花、頂端分裂組織を含む花序といった生殖生長期の組織において大量の転写産物の蓄積が観察されている。更にEXGT-A6の経時的な発現を詳細に解析する事を目的として、シロイヌナズナの芽生えから時間経過に従って（発芽後2、4、6、8、10、12、14日）植物個体を採取し、それぞれの全RNAを抽出してノザン解析を行った（図13A）。EXGT-A6転写産物の蓄積は発芽後2-14日の全植物体において確認された（図14A）。図13Aに示す様に更に発芽後8-14日の植物体を葉、胚軸、茎頂部分の3つに分けて解析した結果、葉と胚軸には転写産物の蓄積は観察されず、茎頂部分において転写産物の蓄積が観察された（図14B）。この結果からEXGT-A6は生殖生長期の花序茎頂部を含む花序だけではなく、栄養生長期の茎頂部分においても特異的に発現していることが予想された。生殖生長期移行後の抽苔直後（発芽後約20日）、発芽後約40日目の植物体は各器官ごとに全RNAを抽出してノザン解析を行った（図13B）。抽苔直後の発芽後約20日の植物体においては花序茎頂部分を含むつぼみ、開花した花を含むつぼみにおいて強いシグナルが観察されたのに加えて、茎生葉を含まない部分の茎にもシグナルが観察された。また、茎生葉を含む部分の茎にもわずかながらシグナルが観察された。根の根端部、

主根部分といった根端分裂組織ではシグナルが観察されなかった(図15)。発芽後約40日のシロイヌナズナにおいては花序茎頂部分を含むつぼみ(ステージ6以前の花)、開花した花とつぼみ(ステージ7から12の花)、そして花柄においてシグナルが観察された。茎生葉を含まない部分の茎にもわずかながらシグナルが観察された。また、さやではシグナルが観察されなかった(図15B)。これらのことからEXGT-A6は生殖生長期においては花序茎頂部に加えて花柄、茎生葉を含まない部分の茎といった組織において発現していることが示された。

ウエスタンブロッティングによるEXGT-A6翻訳産物の検出

次にノザン分析で得られたEXGT-A6の発現部位は、タンパク質レベルでも反映しているのかを調べる為、EXGT-A6の抗体を用いて、シロイヌナズナの抽苔直後(発芽後約20日)の植物体の花序茎頂部分を含むつぼみ、開花した花を含むつぼみ、茎生葉、ロゼット葉、茎生葉を含む部分の茎、茎生葉を含まない部分の茎の6種類の組織からタンパク質を抽出し、ブロッティングを行った。46 kDa付近に花序茎頂部分を含むつぼみおよび開花した花を含むつぼみから抽出したタンパク質を含むレーンにバンドが確認された(図16)。茎生葉を含む部分の茎、茎生葉を含まない部分の茎にもわずかにバンドが確認された。またロゼット葉、茎生葉にはバンドが確認されなかった。EXGT-A6の推定されるシグナル配列を除いたアミノ酸配列から予想される分子量は約30kDaであるが、EXGT-A6は2箇所N糖付加サイトを持つので、糖鎖付加による結果46 kDa付近にバンドがシフトしているのではないと思われる。また、30kDa付近に観察されるバンドは、糖鎖修飾を受けていないEXGT-A6であると考えられる。このことからEXGT-A6は花序茎頂を含むつぼみ、開花した花を含むつぼみといった生殖生長器官や花茎に存在して機能している事が示唆された。この事はノザン分析により得られたEXGT-A6の発現部位の結果と一致した。以上のことから以後のEXGT-A6の発現解析はノザン分析で行った。

花茎伸長変異株*acaulis*におけるEXGT-A6転写産物の蓄積

EXGT-A6転写産物の蓄積が生殖生長期の花序茎頂部を含む花序、栄養生長期の茎頂部分といった組織に加えて、新たに花柄、茎生葉を含まない部分の茎といった細胞伸長のポテンシャルが高い組織で観察されたことから、花茎における細胞伸長と

EXGT-A6の発現量との間に相関関係が見られるのではないかと考え、花茎伸長変異株 *acl* (*acaulis*) の各組織についてノザン解析を行った。*acl*変異株は花茎の細胞伸長欠損を示す変異株として知られており、野性株に比べて花の形態は正常であるが花茎が殆ど伸長せず著しい矮性を示す(図17) (Tsukaya et al., 1991; Tsukaya et al., 1993)。これらの変異株 *acl1* から *acl4* の茎、葉、そして花序茎頂を含めたつぼみ、花をあわせた部分の3種類の組織について解析を行った。コントロールとして抽苔直後(発芽後約20日)のシロイヌナズナ野性株の茎、ロゼット葉、開花した花を含むつぼみから抽出した全RNAを使用した。その結果、EXGT-A6転写産物の蓄積は*acl*変異株において野性株に比べ、茎において著しく減少していることが明らかとなり細胞伸長の欠損とEXGT-A6の発現量の低下に強い相関が見られた(図18)。一方葉においては*acl*変異株、野性株共に全くシグナルが見られず、花においては同程度であった。これにより*acl*変異株の花茎伸長の抑制という現象にEXGT-A6が関与していること、すなわちEXGT-A6が花茎伸長に重要な役割を持つことが示された。

花成早化変異株 *terminal flower* における EXGT-A6 転写産物の蓄積

シロイヌナズナの分化形態形成過程におけるEXGT-A6遺伝子の役割を探ることを目的として先の*acl*変異株と同様に、花成早化変異株 *terminal flower* におけるEXGT-A6の器官別発現を野性株と比較した。*terminal flower* (*tfl*) 変異株は花序茎頂が花芽になってしまう為に花序の形成がそこで停止してしまう(図19)。*tfl1-1*, *tfl1-2* の変異株から茎、ロゼット葉、花序全体(開花した花、つぼみを含む)の3種類の組織について解析を行った。コントロールとして抽苔直後(発芽後約20日)のシロイヌナズナ野性株の茎、ロゼット葉、開花した花を含むつぼみから抽出した全RNAを使用した。その結果 *tfl1-1*, *tfl1-2* の変異株の茎においては、EXGT-A6転写産物の蓄積が野性株と比較して減少していた(図20)。ロゼット葉においては*tfl*変異株、野性株のいずれもEXGT-A6転写産物の蓄積が観察されなかった。花序全体の器官では野性株と同程度であった。*tfl*変異株は花序茎頂が花芽になる結果、野性株に比べて早咲きになり、花茎の伸長が早期に停止してしまう(Shannon et al., 1991; Alvarez et al., 1992)。*tfl*変異株の茎におけるEXGT-A6転写産物の蓄積の減少は、*acl*変異株と同様にEXGT-A6が花茎伸長に重要な役割を持つことを示している。

黄化植物体におけるEXGT-A6転写産物の蓄積

EXGT-A6転写産物の蓄積が花柄、茎生葉を含まない部分の茎といった細胞伸長活性が高い組織で観察され、*ac1*変異株を用いた解析により花茎伸長に重要な役割を持つことが明らかとなった。花柄や茎生葉を含まない部分の茎の様に、細胞伸長が盛んな組織の1つに黄化植物体の胚軸を挙げることができる。暗黒下で育てられた黄化植物は、いわゆるもやし状の形態をしており、光の下で生育した植物と比較すると胚軸が伸長し、葉が展開せず、黄色をしている（図21A）。黄化植物体の胚軸伸長は細胞数の増加（細胞分裂）の結果起こるのではなく、個々の細胞が伸長した結果起こることが分かっている。このことから、細胞伸長と細胞分裂の区別が可能な系として黄化植物体の胚軸を用いて、黄化植物体における胚軸伸長とEXGT-A6の発現量との間に相関が見られるのかを検証する目的でノザン解析を行った。23℃の暗黒下で10日間栽培した黄化植物より子葉（茎頂を含む）、胚軸の2種類の組織について解析を行った。コントロールとして野性株のシロイヌナズナの発芽後10日目の植物体の葉、茎頂部、胚軸の組織から抽出した全RNAを使用した。その結果、EXGT-A6転写産物の蓄積は黄化植物体の子葉、胚軸のいずれにも観察されなかった（図21D）。野性株においては茎頂部にEXGT-A6転写産物の蓄積が観察されるが、黄化植物体の子葉（茎頂を含む）にはEXGT-A6転写産物の蓄積が観察されなかった（図21D）。黄化植物体の茎頂は休眠していて細胞分裂を行っていない為に転写産物の蓄積が観察されなかったと考えられる。以上のことからEXGT-A6は細胞分裂を伴わない茎の伸長には関わっていない事が判明した。

CTGTAGAGTGAAGTTTGATTATTATTAGAGAGATAAGTTAAAAAAAAAATGGTCGGTATGG	60
	M V G M D 5
ATTTGTTCAAATGTGTAATGATGATAATGGTGTGGTTGTCTCTTGTGGTGAAGCTGTTT	120
L F K C V M M I M V L V V S C G E A V S	25
CTGGAGCTAAGTTCGATGAGCTTTATCGGTCAAGCTGGGCTATGGATCATTGTGTCAACG	180
G A K F D E L Y R S S W A M D H C V N E	45
AAGCCGAAGTCACAAAACCTCAAGCTTGACAATTACTCTGGAGCTGGGTTTGAATCAAGAA	240
G E V T K L K L D <u>N</u> Y S G A G F E S R S	65
GCAAACTACTTGTGTTGGTAAAGTCTCTATCCAGATTAAAGCTTGTGAGGGTGATTACAGAG	300
K Y L F G K V S I Q I K L V E G D S A G	85
GAACAGTCACCTGCTTTCTACATGCTCTCAGATGGTCCGAACCAACGAATTCGATTTTG	360
T V T A F Y M S S D G P N H N E F D F E	105
AGTCTCTAGGCAACACTACCGCGGAGCCCTTACATAGTCCAGACCAATATCTACGTGAACG	420
F L G <u>N</u> T T G E P Y I V Q T N I Y V N G	125
GAGTTGGAACAGAGAACAAAGACTCAACCTTTGGTTCGATCCCACTGAGTTTCACA	480
V G N R E Q R L N L W F D P T T E F H T	145
CTTACTCAATCCTCTGGAGTAAACGCAAGTGTGTATTATCATGGTAGACGAAACACCGATTC	540
Y S I L W S K R S V V F M V D E T P I R	165
GAGTTCAGAGAATCTTGAAGAGAAAGGTATCCCATTTGCTAAAGATCAAGCAATGGGTG	600
V Q K N L E E K G I P F A K D Q A M G V	185
TTTACAGCTCCATTTGGAATGCAGATGATTGGGCTACACAAGGAGGTCTTGTAAAACTG	660
Y S S I W N A D D W A T Q G G L V K T D	205
ATTGGAGTCACGCTCCCTTCGTTGCTTCTTACAAAGAATTCCAAATCGATGCATGTGAGA	720
W S H A P F V A S Y K E F Q I D A <u>C</u> E I	225
TTCCAATCTACTACTGATCTAAGCAAGTGTAAATGGAGACCAGAAATTTGGTGGGATGAAC	780
P T T T D L S K <u>C</u> N G D Q K F W W D E P	245
CAACTGCTCTGAGCTTAGCCTTCATCAGAAATCATCAGCTTATTGGGTTTCGAGCTAATC	840
T V S E L S L H Q N H Q L I W V R A N H	265
ATATGATTATGATTATTTGTTGATGCTACTAGGTTTCCTGTTACTCTCTTGAAGTCCC	900
M I Y D Y <u>C</u> F D A T R F P V T P L E <u>C</u> Q	285
AACATCATCGTCATTGTAGTTTAGAAATTAGTCAAGAATAAAAAATGGATCAAGAGAACA	960
H H R H L	290
TGTGGTACTCTTTGATGATTCTGTTTAAATGTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1014

図6. EXGT-A6のcDNA配列と推定アミノ酸配列

推定されるアミノ酸配列をcDNA配列の下に示した。細菌の β -1,3,1,4-グルカナーゼでの解析で β -1,4-グルコシド結合の切断の活性中心であると推定されている部位を下線で、EXGTの立体構造に関わると推定される4つのシステイン残基を丸で囲んだ。糖鎖修飾を受けると推定されるN糖付加部位を四角で囲んだ。推定シグナル配列の予想される切断部位を矢印で示す。cDNA配列及び推定されるアミノ酸配列の番号は右に示した。

A

EXGTA6	MVGMDFKCVMMIMVLVVSCEAVSGAKFDELKXSSAMDCVNEGEVTK
TCH4	MAITYLPLFLSLIITSSVSANFQRDVEITWGDGRGQIKNNGELLT
tXETB1	MLLQQLSVLALLLLCPVWADNFYQDATVTFGDQRAQIQDGRLLA
tXETB2	MLLQSLLTIVLVSFVSADNFYQDAVTFGDQRAQIQDGRLLT
EXGTV1	MGSSLWTCLILLSLASASFAANPRTPIDVPFGRNYPVTPAFDHIKYLNGG
BRU1	MAPSSAHNNGFYVLMVLVGI VVSMTVATCAGSFYQDFDLTWGGIDRAKIFNG
NXG1	MPNHLISIFLHLPLIMFSSSCLGQGPSPGYPSQITSLGFDQGYTNL
EXGTA6	LKLDNYSGAGFESRSK-----YLFQKVSIIKLVEGDSAGT
TCH4	-----LSLDEISGSGFQSKNEYLFQKVSIMQMLVPNGSAGT
tXETB1	-----LSLDEISGSGFQSKNEYLFGRFDMQLKLVPGNSAGT
tXETB2	-----LSLDEISGSGFQSKNEYLFGRFDMQLKLVPGNSAGT
EXGTV1	-----SEIQLHLDKYTGTFQSKGSLFGHFSMYIKLVPGDSAGT
BRU1	-----GQLLSLSLDEISGSGFQSKNEYLFGRIDMQLKLVAGNSAGT
NXG1	WGQHQQRVDQGLTILWDSISGSGFQSKINRYRSGYFGANIKLQSGYTAGV
EXGTA6	VTAFYMSDGG--PNHNEFDFFLGNLTGEPIVQTNIIYVNGVGNREQRIL
TCH4	VTTLYLKSPG--TTWDEIDDFELGNSSGEPYTLHTNVYTQGGDKKQQF
tXETB1	VTTFYLSQG--AGHDEIDDFELGNSSGQPYTVHTNVYSQGGNKEQQF
tXETB2	VTTFYLSQG--AGHDEIDDFELGNSSGQPYTVHTNVYSQGGNKEQQF
EXGTV1	VTAFYLSSTN--AEHDEIDDFELGNRTGQPYILQTNVTFGGKGDREQRIL
BRU1	VTAFYLSQG--PTHDEIDDFELGNLSGDPYILHTNIFTQGGKGNREQQF
NXG1	ITSFYLSNNQDYFGKHDEIDDFELGTTIPGKPYTLQTNVTEGSGDYNIIIG
EXGTA6	NLWFDPTTEFHTYSILNSKRSVVMVDETPIRVQKNLEEKIFFAKDQAM
TCH4	KLWFDPTANFHTYITLWNPQRIIFTVDGTFIREFKNMESLGTLPKPKPM
tXETB1	RLWFDPTSPFHTYSIWNNSQRIIFLVDNIPIRVFNHEKLGVAFPKNQAM
tXETB2	RLWFDPTSSPHTYSIWNNSQRIITWNSQRIIFLVDNIPIRVFNHEALGVA
EXGTV1	YLWFDPTTQYHRYSVLWNNYQIVFYVDIYPIRVFKNSNDLGVKFPFNQPM
BRU1	YLWFDPTRNFTHTYSIWKPKQHIIFLVDNTPIRVFKNAEP LGVFPFNQPM
NXG1	REMRILHWFDPDQYHNYAIYWTSEIIFVDDVPIRRYPRKSDATFPLR
EXGTA6	GVYSIWNADIDWATQGLVKTDWSHAPFVASYKEFQIDA-----
TCH4	RMYSIWNADIDWATRGGLVKTDWSKAPFTASYRGFQQA-----
tXETB1	RVYASLWADIDWATQGGRVKTDWSMAPFTASYRNFTNA-----
tXETB2	YPRNQAMRVYASLWADIDWATQGGRVKTDWSMAPFTASYRNFTNA----
EXGTV1	KIYNLWADIDWATRGGLVKTDWSKAPFTASYRGFHI DG-----
BRU1	RIYSIWNADIDWATRGGLVKTDWSKAPFTAYYRNFKALFSSKSTISNS-
NXG1	FLWYGSVWDASWATENGKYKADYRYQPFVGKYEIDFKLGSCITVAASS-
EXGTA6	CEIPTTTILSKNGDQKFWWDEPTVSELSLHQNHQLIWRANHMIYDY--
TCH4	CVWSNGKSS--CPNASKGTTGWSLSQELDSTAQQRMWVQRYNMIYNY
tXETB1	CVWSAASSTSSCGGSKTDSVNNDAQWQTEINGNDRNLRWWQKYM IYN
tXETB2	CVWSAATSTSSCGGSKTDSVNNDETQWQTEINANGRNRIWWQKYM IYN
EXGTV1	CEASVNAKF--CDTQKFWWDQPEFDLDAQWQKLAWRNKYTYNY--
BRU1	CAEYANELDAYRRRLFWVKYFM IYNY---CSDLKRFPGQLPAE--CK
NXG1	CNPASVSPYGLQLQQVAAEMWVQKNYMYNYCDDPTRDHTLTPE--C-
EXGTA6	-CFDATRFPVTPLE-CQHHRHL
TCH4	-CTDAKRFPQGLPKECLAA
tXETB1	YCADAKRFSQGLSPECKRSRF
tXETB2	YCADAKRFSQGSPECKRSRF
EXGTV1	-CTDRKRYSVQVPE-CTDRDRI
BRU1	R-----
NXG1	-----

B

	EXGT-A6	TCH4	tXETB1	tXETB2	EXGT-V1	BRU1	NXG1
EXGT-A6		45	45	45	50	48	33
TCH4			62	62	50	61	37
tXETB1				92	48	64	35
tXETB2					47	63	36
EXGT-V1						50	36
BRU1							35
NXG1							

図8. EXGT-A6と他のXRPとのアミノ酸配列の比較とアライメント

DDBJのデータ解析サービスmalign (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/malwel-j.html>)を利用して作製した。A.EXGT-A6と酵素活性検出の報告がある他のXRPとのアミノ酸配列のアライメント。赤線で示しているのは*Bacillus*属の細菌の β -1,3-1,4-glucanaseの研究で予想されている β -1,4-グルコシド結合の切断の活性中心配列。保存されているシステイン残基を青で示した。配列は上からシロイヌナズナのEXGT-A6、TCH4、トマトのtXETB1及びB2、アズキのEXGT-V1、ダイズのBRU1、ノウゼンハレンのNXG1の配列を示す。B.EXGT-A6と他のXRPのアミノ酸配列間の相同性。相同性を百分率で示した。参考文献およびAccession numbers: TCH4: Xu et al., 1995: U27609; tXET-B1: Arrowsmith et al., 1995: X82685; tXET-B2: Arrowsmith et al., 1995: X82684; EXGT-V1: Okazawa et al., 1993: D16458; BRU1: Zurek et al., 1994: L22162; NXG1: de Silva et al., 1993: S48101

EXGT-A6	YLFGRVSIQIKLVEGDSAGTVTAFYMSSDG---PNHEDFEFLGNLTGEPYIVQTNIYVNGVGNRBQ
TCH4	YLFGRVSMQMKLVPGNSAGTVTTLYLKSPG---TWDEIDFEFLGNSSGEPYTLHTNVYTQKGGKKBQ
tXETB1	YLFGRFIMQLKLVPGNSAGTVTTFYLSSQG---AGHDEIDFEFLGNSSGQPYTVHTNVYSQKGNKBQ
tXETB2	YLFGRFIMQLKLVPGNSAGTVTTFYLSSQG---AGHDEIDFEFLGNSSGLPYTVHTNVYSQKGNKBQ
EXGT-V1	YLFGRHSMYIKLVPGDSAGTVTAFYLSSTN---AEHDEIDFEFLGNRTGQPYLQTNVFTQKGGKDRBQ
BRU1	YLFGRIMQLKLVAGNSAGTVTAFYLSSQG---PTHDEIDFEFLGNLSGDPYLLHTNIFTQKGGKDRBQ
NXG1	YRSGYFGANIKLQSGYTAGVITSFYLNNQDYPGRHDEIDFEFLGTIPGRPYTLQTNVFTQKGGKDRBQ

Bacterial β -1,3-1,4-glucanase

DEIDIEFLG

図9. EXGTの活性中心付近と予想されるアミノ酸配列のアライメント図
下線で示しているのは*Bacillus*属の細菌の β -1,3-1,4-glucanaseの研究で予想されている β -1,4-グルコシド結合の切断の活性中心配列 (Boriss et al., 1990)。配列は上からシロイヌナズナのEXGT-A6、TCH4、トマトのtXETB1及びB2、アズキのEXGT-V1、ダイズのbru1、ノウゼンハレンのNXG1の配列を示す。参考文献およびAccession numbers : TCH4: Xu et al., 1995: U27609, tXETB1: Arrowsmith et al., 1995: X82685, tXETB2: Arrowsmith et al., 1995: X82684, EXGT-V1: Okazawa et al., 1993: D16458, NXG1: de Silva et al., 1993: S48101, BRU1: Zurek et al., 1994: L22162

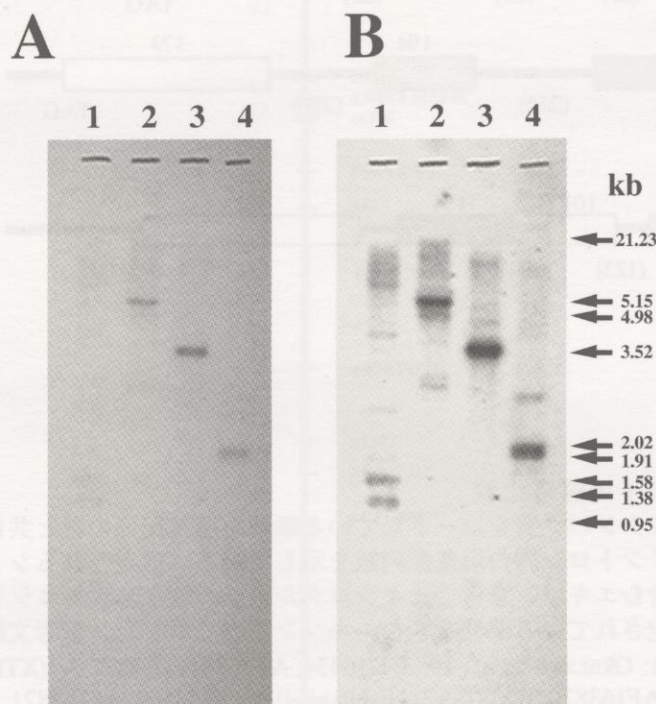


図10. EXGT-A6遺伝子のゲノムサザンハイブリダイゼーション
シロイヌナズナ (ecotype: Columbia) のゲノムDNA 1 μ gをそれぞれ制限酵素で処理した。A. high stringency (2 $\times$ SSC, 0.1% SDS, 室温で5分間の洗浄を3回行った後、65 $^{\circ}$ C, 0.2 $\times$ SSC, 0.1% SDS, 15分で2回洗浄) のオートラ像。B. low stringency (2 $\times$ SSC, 0.1% SDS, 室温で5分間の洗浄を3回行った後、50 $^{\circ}$ C, 0.2 $\times$ SSC, 0.1% SDS, 15分で2回洗浄) のオートラ像。レーン 1 : *Eco*RI処理したもの。レーン 2 : *Bam*HI処理したもの。レーン 3 : *Bgl*II処理したもの。レーン 4 : *Hind*III処理したもの。サイズは右に示した。

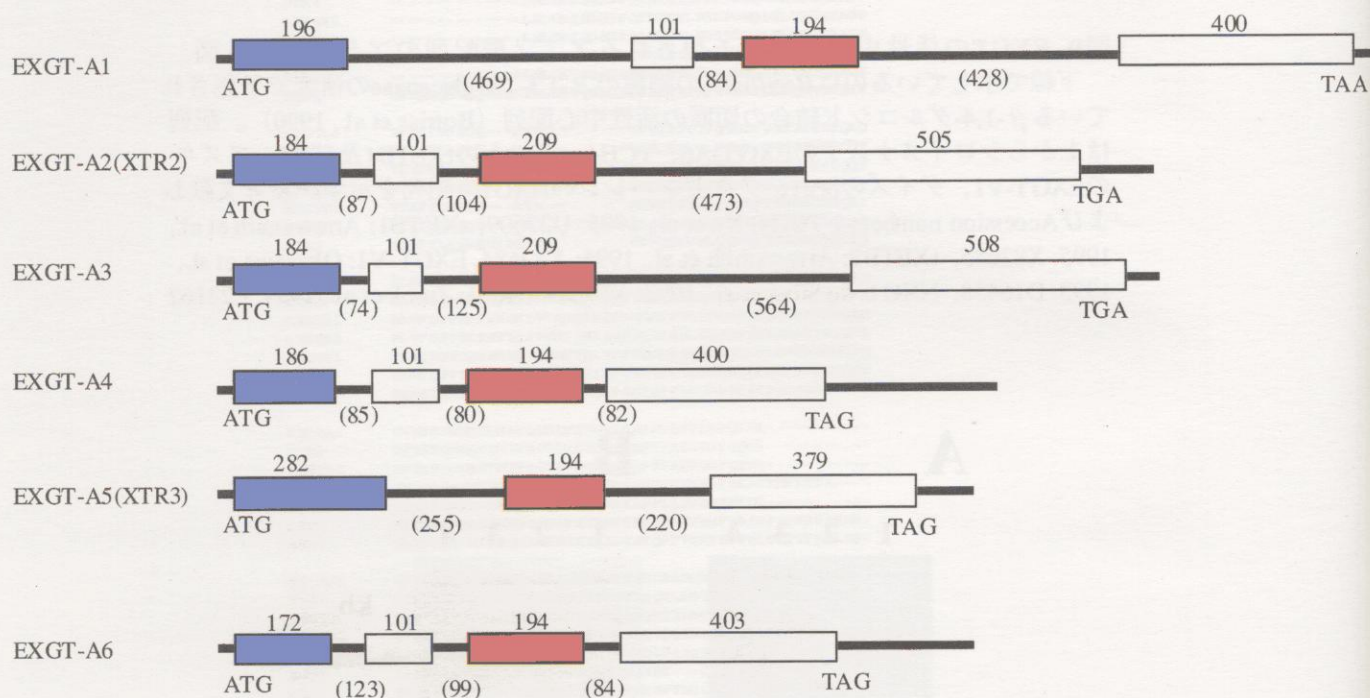


図11. EXGT遺伝子の構造比較

各々のエキソンでタンパク質をコードしている領域を塩基配列の数と共に四角で示した。括弧内の数字はイントロン内の塩基配列数を示している。推定されるシグナル配列をコードしている部分を含むエキソンを青で、キシログルカンの β -1,4-グルコシド結合の切断の活性中心であると推定されている部分を含むエキソンを赤で示した。参考文献およびAccession numbers: EXGT-A1: Okazawa *et al.*, 1993: D16454, AF163819; EXGT-A2(XTR2): Xu *et al.*, 1996: U43487, D63510, AF163820; EXGT-A3: Nishitani, 1997: D63509, AF163821; EXGT-A4: Nishitani, 1997: AB026486, AF163822; EXGT-A5(XTR3): Xu, *et al.*, 1996: U43485, AF163823

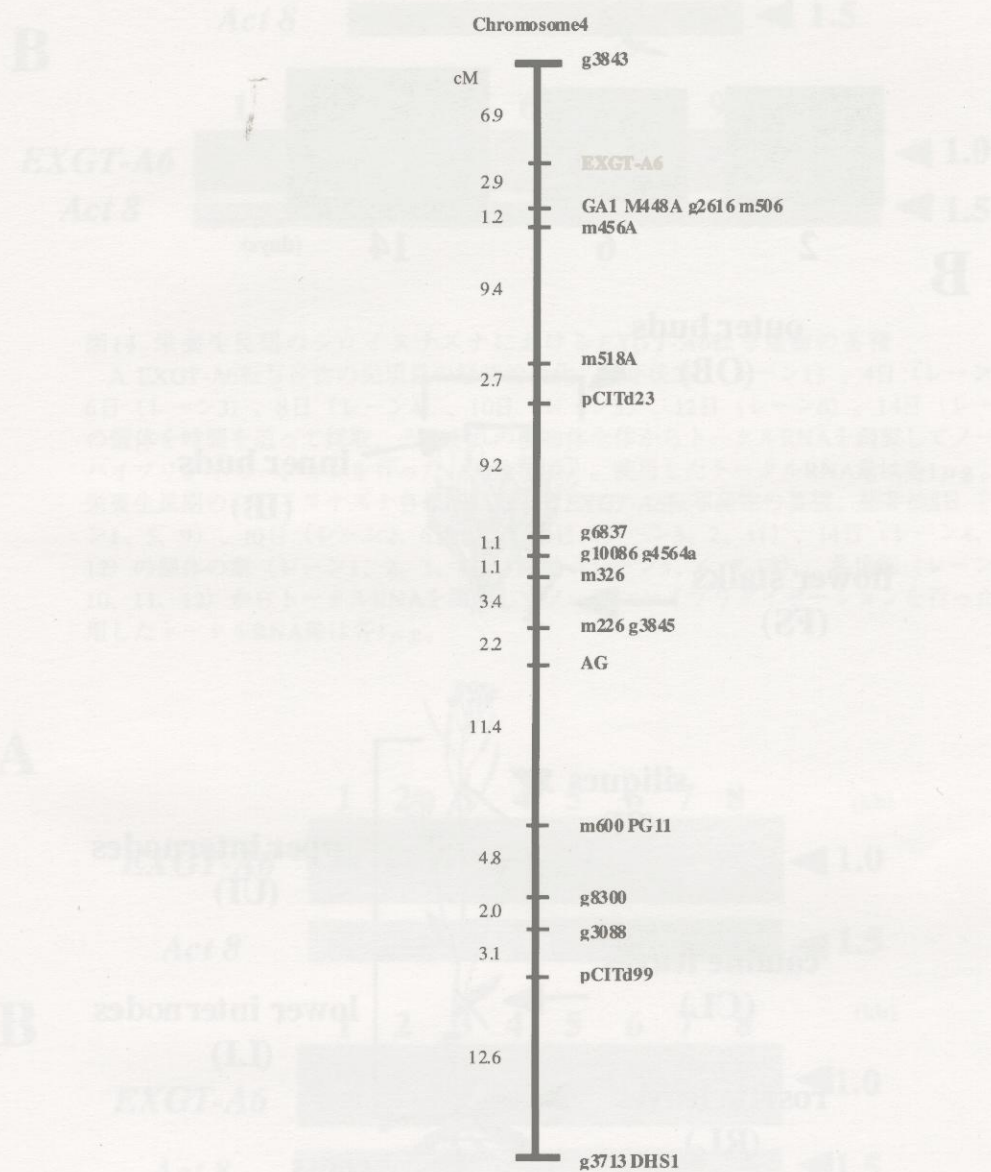


図12. *EXGT-A6*の遺伝子座

CAPSマッピング法 (Konieczny, A., and Ausubel, F. M., 1993) で遺伝子座を決定した。*EXGT-A6*遺伝子は第4染色体のトップ側、g3843マーカーとGA1 M448A g2616 m506マーカーの間にマッピングされた。

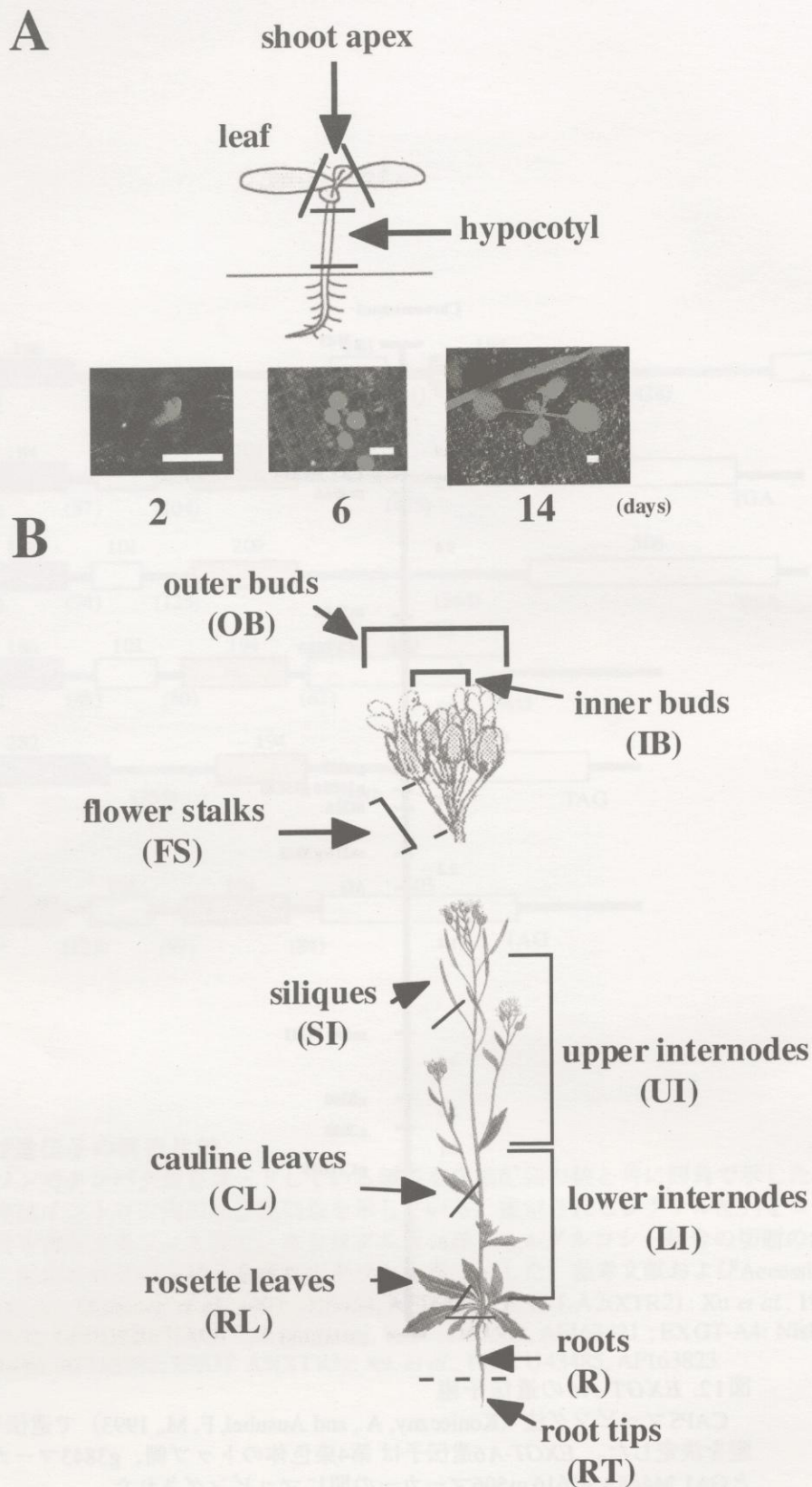


図13. ノーザンハイブリダイゼーション分析に用いたシロイヌナズナ各組織の名称

A. 栄養生長期の各組織の名称。下に発芽後2、6、14日目の植物体の写真を示した。実験には植物体全体と葉 (leaf)、胚軸 (hypocotyl)、茎頂部 (shoot apex) の組織を使用した (方法参照)。横棒は1mm。B. 生殖生長期のシロイヌナズナの各組織の名称。上に花序の拡大図を示した。OB: 開花した花を含むつぼみ、IB: 花序茎頂部分を含むつぼみ、FS: 花柄、SI: さや (未熟)、CL: 茎生葉、RL: ロゼット葉、UI: 茎生葉を含まない茎、LI: 茎生葉を含んだ茎、R: 根の主根部分 (側根も含む)、RT: 根の根端部分 (根端部分から約1cmの部分) (Bowman, 1994)。

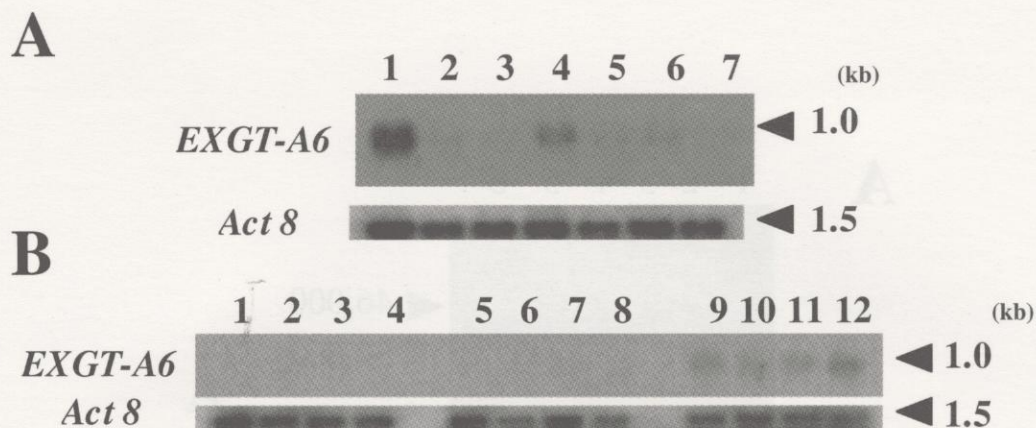


図14. 栄養生長期のシロイヌナズナにおける *EXGT-A6* 転写産物の蓄積

A. *EXGT-A6* 転写産物の発現量の経時的变化。発芽後2日（レーン1）、4日（レーン2）、6日（レーン3）、8日（レーン4）、10日（レーン5）、12日（レーン6）、14日（レーン7）の個体を時間を追って採取、それぞれの植物体全体からトータルRNAを調製してノーザンハイブリダイゼーションを行った（方法参照）。使用したトータルRNA量は各1 μ g。B. 栄養生長期のシロイヌナズナ各組織における *EXGT-A6* 転写産物の蓄積。発芽後8日（レーン1、5、9）、10日（レーン2、6、10）、12日（レーン3、7、11）、14日（レーン4、8、12）の個体の葉（レーン1、2、3、4）、胚軸（レーン5、6、7、8）、茎頂部（レーン9、10、11、12）からトータルRNAを調製してノーザンハイブリダイゼーションを行った。使用したトータルRNA量は各1 μ g。

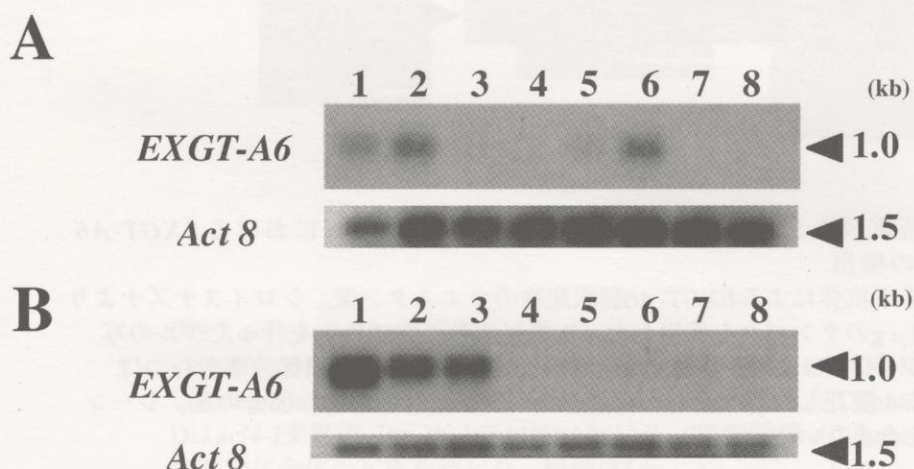


図15. 生殖生長期シロイヌナズナの各組織における *EXGT-A6* 遺伝子転写産物の蓄積

シロイヌナズナの個体から各組織を採取、それぞれからトータルRNAを調製してノーザンハイブリダイゼーションを行った（方法参照）。使用したトータルRNA量は各1 μ g。
A. 生殖生長期（抽苔直後）のシロイヌナズナにおける *EXGT-A6* 遺伝子転写産物の蓄積。レーン1: 花序茎頂部分を含むつぼみ、レーン2: 開花した花を含むつぼみ、レーン3: 茎生葉、レーン4: ロゼット葉、レーン5: 茎生葉を含む部分の茎、レーン6: 茎生葉を含まない部分の茎、レーン7: 根の根端部分（根端部分から約1cmの部分）、レーン8: 根の主根部分（側根も含む）。B. 生殖生長期（開花最盛期）のシロイヌナズナにおける *EXGT-A6* 遺伝子転写産物の蓄積。レーン1: 花序茎頂部分を含むつぼみ、レーン2: 開花した花を含むつぼみ、レーン3: 花柄、レーン4: 茎生葉、レーン5: ロゼット葉、レーン6: 茎生葉を含んだ茎、レーン7: 茎生葉を含まない茎、レーン8: さや（未熟）。

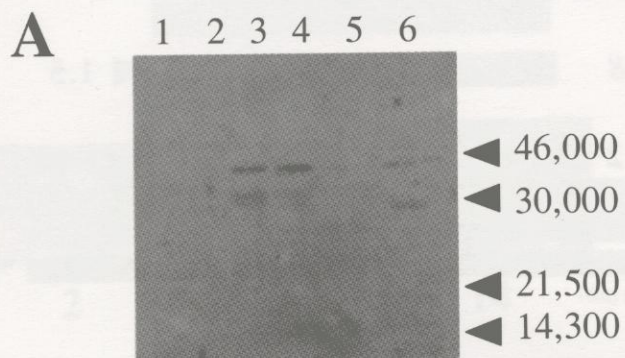


図16. 抽苔直後のシロイヌナズナ (ecotype:Columbia) におけるEXGT-A6翻訳産物の検出

A.ペプチド抗体によるEXGT-A6翻訳産物のウエスタン像。シロイヌナズナより抽出した4 μ gのタンパクを使用した。B.電気泳動後CBB染色を行ったゲルの写真。レーン1:ロゼット葉。レーン2:茎生葉。レーン3:花序茎頂部分を含むつぼみ。レーン4:開花した花を含むつぼみ。レーン5:茎生葉を含む部分の茎。レーン6:茎生葉を含まない部分の茎。サイズは右に示した。

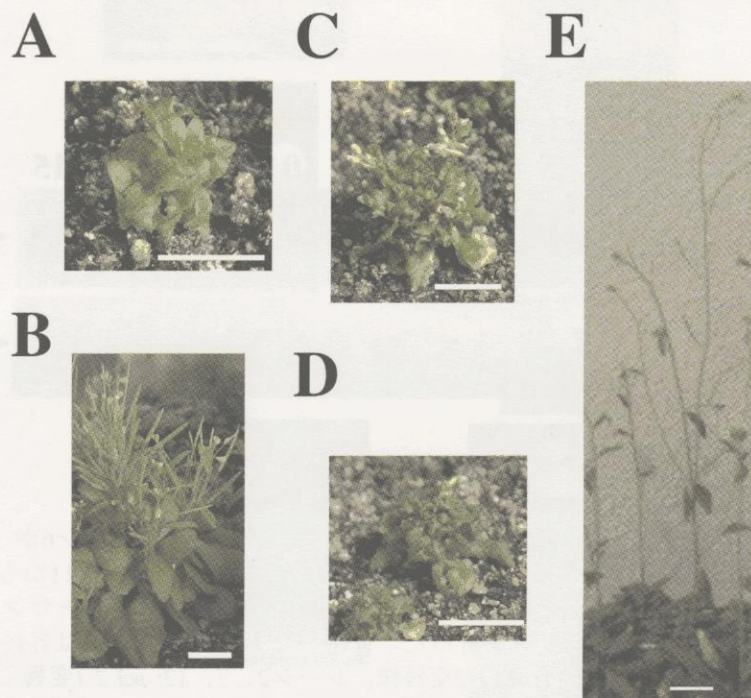


図17. *acl* (*acaulis*)変異株

Aは*acl1-2*変異株 (background:Columbia)。Bは*acl2-1*変異株 (background:Columbia)。Cは*acl3-1*変異株 (background:Columbia)。Dは*acl4-1*変異株 (background:Columbia)。Eは野生株 (Columbia)。各々の植物体全体の写真を示した。横棒は1cm。

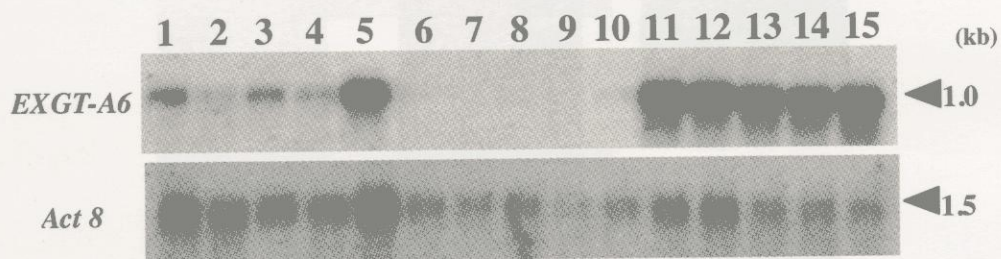


図18. *acl*変異株における *EXGT-A6*転写産物の蓄積

シロイヌナズナの個体から茎（レーン1から5）、葉（レーン6から10）、花序茎頂を含めたつぼみ、花をあわせた部分（レーン11から15）の組織を採取、それぞれからトータルRNAを調製してノーザンハイブリダイゼーションを行った。使用したトータルRNA量は各1 μ g。レーン1、6、11: *acl 1-2*変異株。レーン2、7、12: *acl 2-1*変異株。レーン3、8、13: *acl 3-1*変異株。レーン4、9、14: *acl 4-1*変異株。レーン5、10、15: 野性株。

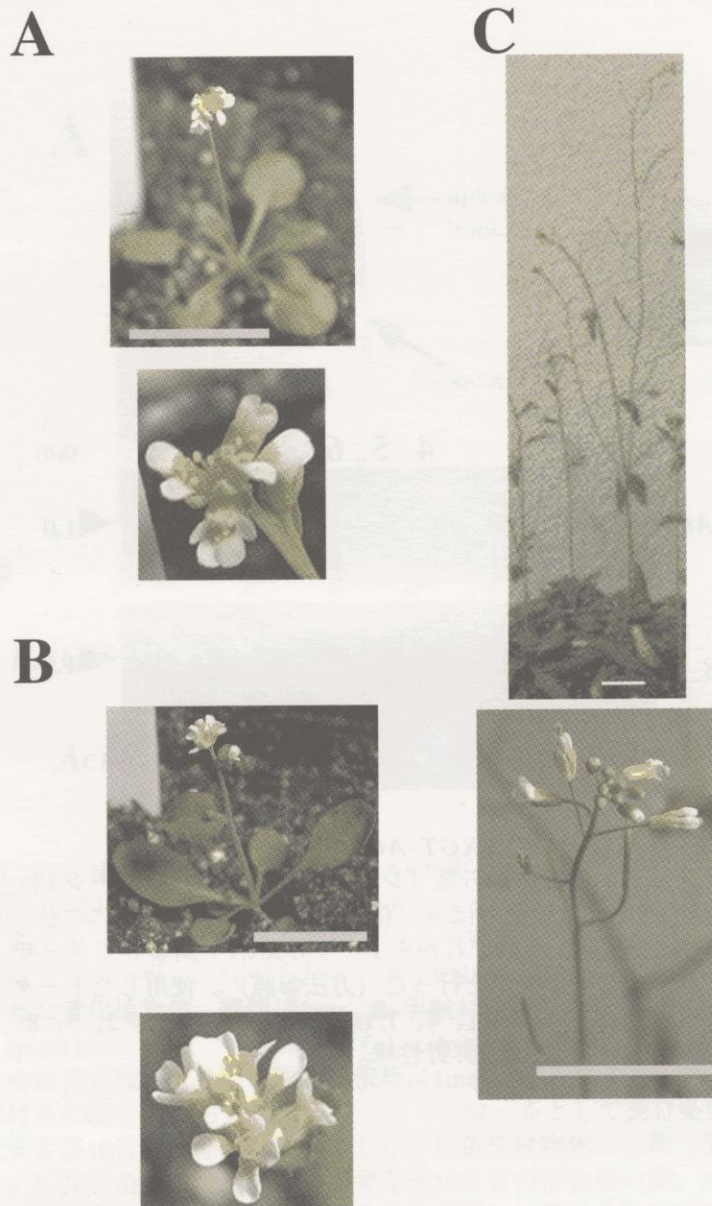


図19. *tf11* (*terminal flower*) 変異株

Aは*tf11-1*変異株 (background: Columbia)。Bは*tf11-2*変異株 (background: *Landsberg erecta*)。Cは野生株 (Columbia)。各々の植物体全体の写真と花序の拡大写真を示した。横棒は1cm。

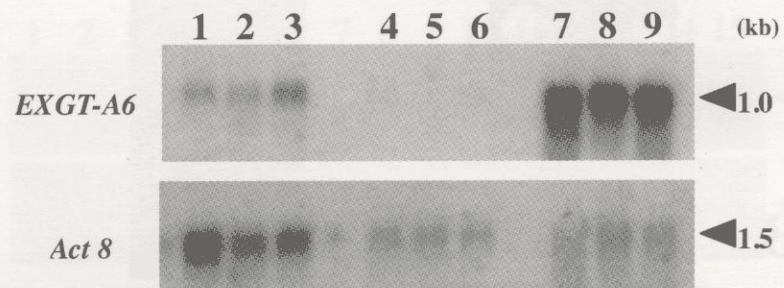


図20. *tfl*変異株における*EXGT-A6*転写産物の蓄積

シロイヌナズナの個体から茎（レーン1から3）、葉（レーン4から6）、花序茎頂を含めたつぼみ、花をあわせた部分（レーン7から9）の各組織を採取、それぞれからトータルRNAを調製してノーザンハイブリダイゼーションを行った（方法参照）。使用したトータルRNA量は各 $1\mu\text{g}$ 。レーン1、4、7: *tfl 1-1*変異株。レーン2、5、8: *tfl 1-2*変異株。レーン3、6、9: 野性株。

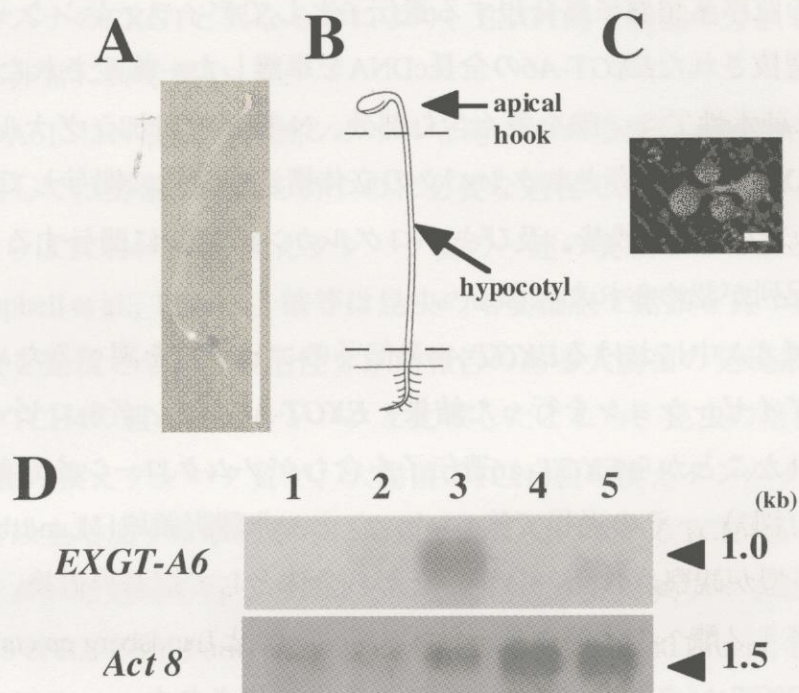


図21. 黄化植物体における *EXGT-A6* 転写産物の蓄積

暗黒下で10日間生育させたシロイヌナズナの黄化植物体から各組織を採取、各々からトータルRNAを調製してノーザンハイブリダイゼーションを行った（方法参照）。使用したトータルRNAは各 $1\mu\text{g}$ 。A. 暗黒下で10日間生育させた黄化植物体。縦棒は1cm。B. 実験に使用した黄化植物体の組織の名称。apical hook: 子葉（茎頂部を含む）。hypocotyl: 胚軸。C. 長日条件下で生育させた発芽後10日目の植物体。横棒は1mm。D. シロイヌナズナ黄化植物体における *EXGT-A6* 転写産物の蓄積。コントロールとして長日条件下で生育させた発芽後10日目の植物体を使用した。1: 黄化植物体の子葉（茎頂部を含む）。2: 長日条件下で生育させた発芽後10日目の植物体の葉。3: 長日条件下で生育させた発芽後10日目の植物体の茎頂部。4: 長日条件下で生育させた発芽後10日目の植物体の胚軸。5: 黄化植物体の胚軸。

考察

シロイヌナズナの花序茎頂部に高発現する遺伝子としてディファレンシャルスクリーニングにより選抜されたEXGT-A6の全長cDNAを単離した。推定されたアミノ酸配列のN末端側には疎水性アミノ酸を多く含む部分、N-糖鎖の付加シグナルと考えられる配列、他のEXGT間で保存されタンパクの立体構造安定化に関与していると推定されている4つのシステイン残基、及びキシログルカンの切断に関与すると考えられているアミノ酸配列が認められた(図6)。

シロイヌナズナゲノム中におけるEXGT-A6遺伝子のコピー数を調べるためにゲノムサザンハイブリダイゼーションを行った結果、EXGT-A6はシングルコピーで存在していると予想されたことからEXGT-A6遺伝子を含むゲノムクローンを単離し、その構造を決定した(図7)。その過程で第4エクソンと3'非翻訳領域にLandsberg erectaとColumbiaの間で多型が観察された。しかしながら全体として塩基の置換、欠失によって翻訳されるアミノ酸への影響は見られず、ColumbiaとLandsberg erectaでは同一のアミノ酸配列のEXGT-A6タンパク質が翻訳されると推定された。

EXGT-A6タンパク質の活性中心のアミノ酸配列は、他のXRPの活性中心付近のアミノ酸配列とは異なっていた。XRPは共通なアミノ酸配列としてDEID(F/I)EFLGNを含むが、EXGT-A6タンパク質の場合、この共通配列部分がNEFDFEFLGNで最初のアスパラギン酸がアスパラギンに、最初のイソロイシンがフェニルアラニンに置換していた(図9)。この保存された共通配列は細菌の β -1,3:1,4-グルカナーゼ類などに見られ(Borriess et al., 1990)、活性部位のアミノ酸残基を別のアミノ酸に変換した細菌の変異株の実験から2番目のグルタミン酸、4番目のアスパラギン酸、6番目のグルタミン酸が必須で、その中でも2番目のグルタミン酸が最も重要で β -1,4-グルコシド結合の切断の活性中心であると推定されている(Juncosa et al., 1994; Planas et al., 1992; Hoj et al., 1992)(図9)。

EXGTファミリーの一つであるTCH4を昆虫の培養細胞で発現させた実験において、保存配列DEID(F/I)EFLGNの中で最も重要な2番目のグルタミン酸をグルタミンに変換すると、活性が2%以下にまで減少することが分かっている(Campbell et al., 1998)。このグルカン鎖切断に重要な3つのアミノ酸残基が他のXRP同様EXGT-A6においても保存されている。また、X線結晶解析の知見から活性部位の前半部分DEID(F/I)は酵素活性部位の下方に位置し、それらの側鎖が活性部位を形作る部分である事が判明している(Keitel et al., 1993)。EXGT-A6は活性中心を挟むアミノ酸が他のXRPとは

異なっており、このことは酵素活性中心の3次元構造に影響を及ぼすと考えられる。EXGT-A6は基質となるキシログルカンに対する特異性や酵素の反応特異性が他のシロイヌナズナのEXGTと異なる事により、EXGT間で機能の分担を行っていることが予想され非常に興味深い。

EXGT-A6にはN-糖鎖の付加シグナルと考えられる配列が2箇所存在している。N糖付加に関しては酵素が機能を持つのに必要な過程であると考えられている。最近CampbellらはTCH4の組み換えタンパク質の一連の実験でこのことについて調べている (Campbell et al., 1998)。彼等は昆虫の培養細胞で糖鎖を持つTCH4の組み換えタンパク質を発現させ、その活性を以前報告のある大腸菌の発現系を用いた、糖鎖を持たないTCH4の組み換えタンパクと比較したところ、昆虫の培養細胞で発現させたTCH4の組み換えタンパク質が、大腸菌のTCH4組み換えタンパク質に比べて酵素活性が20倍以上増加する事、さらに糖鎖修飾を受けているTCH4組み換えタンパク質にグリコシダーゼ処理を行うことによってその活性が98%減少することを明らかにしている (Xu et al., 1995; Purugganan et al., 1997; Campbell and Braam, 1998)。しかし最近になって同じグループによってEXGTのファミリーの中には糖鎖修飾を受けていなくても酵素活性が修飾を受けているものと変化しないものが存在することが報告されている (Campbell and Braam, 1999b)。EXGT-A6は大腸菌の発現系で組み換えタンパク質を発現させても、酵素活性が極めて低く (データは示さず)、EXGT-A6は糖鎖修飾を受ける事によって始めて機能する酵素であると考察している。

当初EXGTは伸長中の組織から発見され、細胞伸長との関連が議論されてきたが、EXGTのファミリー中には成熟した果実中でその発現が観察されるものや

(Arrowsmith et al., 1995; Schroder et al., 1998)、水に浸した根の酸素欠乏時に速やかに生ずる通気組織の形成 (Peschke et al., 1994)、種子中の貯蔵組織分解に関与するもの (Fanutti et al., 1993) が新たに見い出され、伸長部位だけではなく、植物体の各部分で様々な役割を担っている酵素であることが判ってきた。現在までに報告又はゲノム配列の情報等から存在が予想されているEXGTの数は46個で、シロイヌナズナだけでも20に上る (図22) (Campbell and Braam, 1999a; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。これらの酵素遺伝子群は大きな遺伝子ファミリーを形成し、キシログルカン関連タンパク質 (xyloglucan related protein; XRP) ファミリーという名称がNishitaniによって提唱されている (Nishitani, 1995)。XRPファミリーの遺伝子群は単に重複しているのではなく、植物細胞の個性によってXRPを使い分けていると考えられる (Nishitani, 1997; Campbell and Braam, 1999a)。細胞はそれぞれの器官や組織

によって独自の個性を持ち、細胞壁の硬さ、構成成分等も異なる。それぞれの個性に合った細胞壁を構築し、キシログルカンを繋ぎ換えるために複数のXRPが存在し、機能しているのだと考えられる (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。実際幾つかのXRPの組み換えタンパクについてその酵素学的な解析の報告がCampbellらによってされており (Campbell and Braam, 1999b)、シロイヌナズナのXRPの中でも基質特異性、至適温度、至適pHといった酵素反応条件が大きく異なっている事が明らかになっている。

XRPファミリーはアミノ酸配列のC末端配列の構造上の相違から幾つかのサブグループに分けられる。酵素機能からこのファミリーを分類すると、キシログルカンの切断反応を触媒する加水分解酵素のグループと、キシログルカンの糖転移反応を触媒する酵素のグループに分けることができる。加水分解酵素グループのメンバーは、他のグループとはEXGT間で保存されている活性部位付近の配列が異なっている。加水分解酵素のグループのアミノ酸配列の共通した構造上の特徴は、保存されたDEID(F/I)EFLGN配列のN末端側に3つのアミノ酸が、そして保存配列に続くアミノ酸配列中に数個のアミノ酸が付加されている (Xu et al., 1996) 事であり (図9)、この構造上の違いが加水分解酵素のグループと糖転移酵素グループの酵素機能の性質の違いを反映しているのではないかと推測されている。糖転移酵素グループのメンバーはキシログルカンの繋ぎ換え反応によりキシログルカンの架橋切断、架橋の変更、架橋の形成の3つの反応を触媒すると考えられている (図23)。架橋切断反応は細胞壁中のセルロース-キシログルカン複合体と遊離型キシログルカンとの糖転移反応を介して起こり、架橋の変更、形成反応はセルロース-キシログルカン複合体間相互の反応の結果起こる (図23)。

2000年末、シロイヌナズナのゲノムの塩基配列が決定された。XRPファミリーを構成している遺伝子 (endoxylglucan transglycosylase) の総数は20と報告されている (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。これは西谷により命名されたEXGT (endoxylglucan transferase) とFryのグループにより命名されたXET (xyloglucan endotransglycosylase) と相同性を示す遺伝子が含まれておらず、これらを含めると29になることがデータベース解析 (DBGET Database Links Diagram: http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bfind_query? a.thaliana) から明らかとなった。遺伝子の重複は第1染色体のEXGT-A2 (XTR2) を含む領域と第2染色体のEXGT-A3を含む領域、第2染色体のXTR17を含む領域と第4染色体のXTR18、Meri5を含む領域、第3染色体のAt2g23770を含む領域と第4染色体のAt4g13080、At4g13090、XTR7を含む領域、第4染

色体のXTR6、XTR9を含む領域と第5染色体のTCH4、EXGT-A5 (XTR3)、At5g57530、At5g57540を含む領域の間で起きていることがデータベース解析 (MATDB:<http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/thal/db/index.html>) から明らかになった (図24)。染色体の間で重複が見られる遺伝子中で、EXGT-A2 (XTR2) とEXGT-A3はシロイヌナズナのどの組織においても転写産物の蓄積が確認されている (Akamatsu et al., 1999) が、他に重複の見られた遺伝子については詳細な発現解析の報告がなされていないものが殆どで、XRP遺伝子の重複と個々のXRPの機能との類推は困難である。

Campbellらの進化系統解析に使用されているシロイヌナズナの配列中には、完全長ではないもの (XTR2、XTR3) や重複 (XTR11) しているものが含まれていた (Campbell and Braam, 1999a)。今回シロイヌナズナXRPファミリーの、29の推定されるアミノ酸配列から新たに進化系統樹を作成した (図25A)。これらの中でXTR1だけが、活性中心付近のアミノ酸配列DEID(F/I)EFLGNがDEFTIDFEFLGNで、2つのアミノ酸が付加されており、XTRの活性中心付近のアライメントにギャップが生じた。その為、XTR1を除く全てのXRPについても進化系統樹を作成した (図25B)。EXGT-A6は他のEXGTとは離れた位置を示し、これはEXGT-A6がXRPファミリーの進化の初期に分岐し、単に遺伝子重複によって生じたものではないことを示しており、EXGT-A6は他のXRPと酵素の基質特異性や反応条件が異なる事が予想され、その酵素機能に興味を持たれる (図25)。

シロイヌナズナ各部組織でのノーザン分析において、EXGT-A6遺伝子は花および花序茎頂部分を含むつぼみ (花序の外縁部分、花序の内部分) で高発現し、ロゼット葉、茎、茎生葉においては低レベルであることが示されている (第1章)。花、花序茎頂部分を含むつぼみで高発現するという事に関しては今回のノーザン分析においても同様の結果が得られたが、新たに花柄、茎生葉を含まない部分の茎といった細胞伸長の盛んな組織においても発現していることが示された (図15)。根と根端部においてはEXGT-A6転写産物の蓄積は観察されず、根端分裂組織においてはEXGT-A6は機能していないと考えられる。また、若いさやにおいてEXGT-A6転写産物の蓄積が観察されなかったことはEXGT-A6がさやの伸長には関わっていない事を示している。また、胚においてもEXGT-A6が関与していない事が示唆される。

さらにシロイヌナズナの発芽後2-14日の個体から抽出した全RNA、各組織の全RNAを用いて経時的にノーザン分析を行った所、茎頂部分において特異的にEXGT-A6転写産物の蓄積が認められた (図14)。EXGT-A6転写産物の蓄積は葉柄を含む葉に

において観察されなかったことから、EXGT-A6はこの時期の葉の展開、葉柄の伸長には関与していないと思われる。胚軸に関しても同様に考えられる。発芽後2-6日の個体は非常に植物体が小さい為、組織ごとに植物体を分けることができなかったが、恐らくこの時期の植物体においても、茎頂部分において特異的にEXGT-A6転写産物の蓄積が起こっていると予想される。発芽後2日目の植物体全体から抽出した全RNAにおいてEXGT-A6転写産物の蓄積が他よりも多く観察されているが、これはEXGT-A6が2日目の植物体において何らかの重要な役割を担っている事が考えられる。

シロイヌナズナのXRP遺伝子の中で発現の解析がなされているのはごく僅かではない (Medford et al., 1991; Xu et al, 1995; Aubert et al., 1996)。Medfordらはシロイヌナズナと同じアブラナ科のカリフラワーから、ディファレンシャルスクリーニングにより分裂組織特異的に発現しているXRP遺伝子*meri5*を単離した。シロイヌナズナにおいても*meri5*は存在しており、シロイヌナズナ*meri5*のプロモーター::GUS融合遺伝子を導入した植物 (シロイヌナズナ、タバコ、アブラナ) の解析から、10日目の幼植物体の茎頂部と子葉 (シロイヌナズナ、タバコ)、茎及び根の分岐部分 (アブラナ)、花と維管束 (タバコ)、そして全ての植物の根端部分にGUSの蓄積が観察されている (Medford et al., 1991)。Xuらは接触刺激によって発現が誘導されるXRP遺伝子である、*TCH4*のプロモーター::GUS融合遺伝子を導入したシロイヌナズナの解析から、トライコーム、めしべ及びさや、幼植物体の胚軸、維管束、茎頂部と子葉にGUSの蓄積が観察される事を報告している (Xu et al, 1995)。Aubertらはディファレンシャルスクリーニングにより*ATXG* (*AtXTR8*) を単離している。*ATXG*の転写産物の蓄積は、根と茎において観察され、種子の吸水後24時間から96時間の間に特異的に転写産物の蓄積が観察されている (Aubert et al., 1996)。

最近、AkamatsuらはシロイヌナズナのEXGT遺伝子 (EXGT-A1-EXGT-A5) についてその転写産物の蓄積部位の解析を行っている。それによるとEXGT-A1は7日目の幼植物体、根、ロゼット葉、茎生葉を含まない部分の茎、つぼみ、そしてさやにおいて転写産物の蓄積が観察されている。EXGT-A2 (*XTR2*)、EXGT-A3は全ての組織で転写産物の蓄積が観察され、EXGT-A4では根に、EXGT-A5 (*XTR3*) ではさやに特異的な転写産物の蓄積が観察されている (Akamatsu et al., 1999)。この様にEXGTは各々少しずつ異なった独自の発現レベルや発現パターンを示す事が明らかになっている。

EXGT-A6遺伝子は栄養生長期は茎頂部に発現していて、生殖生長期に植物が移行すると急激に発現が増加する遺伝子であり、生殖生長期移行後に花序茎頂部に加えて急激な細胞拡大による花茎の伸長に速やかに働き、細胞の伸長、分化、形態形成

に密接かつ重要な役割を果たす事が示唆された。この事はウエスタン分析によるタンパク質の分布においても支持された(図16)。シロイヌナズナの組織切片を用いた*in situ*ハイブリダイゼーション分析、抗ウサギ抗EXGT-A6抗体を用いたイムノヒスト分析においても、EXGT-A6転写産物の蓄積及びEXGT-A6の分布は花茎及び花柄の表層部分、茎頂部分を含む花序において観察されている(武田、兵頭、未発表)。

また花茎の細胞伸長欠損を示す変異株*acl*でのノザン分析から、EXGT-A6が花茎の細胞伸長に関与していることが示された。*acl*変異株の花茎が極端に短いという表現型は細胞数の欠損ではなく、細胞の伸長の欠損であることが*acl*変異株の花茎切片の解析から既に明らかになっている(Tsukaya et al., 1991; Tsukaya et al., 1993)。従来単離されてきた茎の伸長に関わる変異株は植物の伸長に関するホルモンに関与しているものが多い(Li et al., 1997; Sun et al., 1994; Lincoln et al., 1990)が、*acl*変異株はいずれもジベレリン、ブラシノステロイド、オーキシシンといったホルモン処理によって花茎伸長は回復しない(Tsukaya et al., 1991; Tsukaya et al., 1993; 米田ら、1994)。現在*acl*変異株は*acl1*、*acl2*、*acl3*、*acl4*、*acl5*の5つが見つかっており、*acl5*遺伝子は最近クローニングされ(Hanzawa et al., 2000; 半澤ら、2000)、動物などで細胞増殖、分化を促進する成長調節物質であるポリアミン合成経路中のスperlミン合成酵素遺伝子であることが明らかとなっている。今回実験に使用した*acl1*から*acl4*については、花茎伸長欠損を示す原因遺伝子は未だクローニングされていない。EXGT-A6転写産物の蓄積の減少が*acl*変異株の花茎において観察されたのは、花茎の伸長にEXGT-A6が深く関わっていることを示している。*acl1*、*acl3*、*acl4*の変異株は花茎に加えてロゼット葉も非常に小さく展開せず、波打っている(図17)。この表現型も細胞伸長の欠損によるものである。シロイヌナズナ野生株及び*acl*変異株のロゼット葉においてもEXGT-A6の転写産物の蓄積は観察されていない為、*acl*変異株におけるロゼット葉の細胞伸長の欠損は別のEXGT遺伝子もしくは他の細胞伸長に関わる酵素遺伝子が関与している可能性が考えられる。葉や花茎に対して花は野生株と同様正常に発達しており、このことはノザン分析の結果と一致する(図18)。以上の事から、*acl*変異株を用いた解析において花茎伸長とEXGT-A6の発現量との間に強い相関が見られたことから、EXGT-A6は*acl*遺伝子の下流に位置し、花茎伸長に直接的な役割を担っていると考えられる。*acl*遺伝子は細胞の拡大、特に花茎での細胞の拡大に何らかのきっかけを与え、その結果EXGT-A6の発現が誘導され、細胞壁の再編成が起こる可能性が考えられる。同様に茎頂分裂組織、花においてもEXGT-A6は植物の最終的な形態を決める上で重要な働きを持つと思われる。*acl*変異株は通常の生育条件(22℃)

で著しい矮性を示すが、生育温度を28℃にして生育させると花茎伸長、ロゼット葉の展開が起こり野性型と区別がつかなくなる (Tsukaya et al., 1991; Akamatsu et al., 1999)。この *acl* 変異株の茎伸長回復と *EXGT-A6* の発現量との間に相関がみられるのではないかと予想される。シロイヌナズナの *EXGT* 遺伝子の一つである *EXGT-A1* の転写産物の蓄積は22℃で生育させた7日目幼植物体において野性株に比べて *acl1*、*acl3*、*acl4* 変異株では減少しているが、28℃の条件で生育させた7日目幼植物体においては野性株のレベルにまで *EXGT-A1* の転写産物の蓄積が回復している (Akamatsu et al., 1999)。*EXGT-A1* は当初花茎伸長変異株 *acl5* において転写産物の蓄積が花茎において減少する事から興味を持たれてきた (Hanzawa et al., 1997)。*EXGT-A6* においても同様に温度シフトによって花茎において転写産物の蓄積が増加する事が期待される。

これに対して暗黒下で生育させた黄化植物体の胚軸伸長と *EXGT-A6* との間には全く相関が見られなかった (図21)。黄化植物の胚軸は種子中で胚発生時に形成され、発芽後細胞分裂を経ずに伸長したものである (Cosgrove, 1994)。他の植物ではアズキから単離された *EXGT-V1* 遺伝子転写産物の蓄積が、暗所で生育させたアズキ上胚軸で観察されており、酵素精製もなされている (Nishitani et al., 1991)。また、トマトの *Le EXT* は暗所で生育させた植物体の胚軸で転写産物の蓄積が観察されている (Catala et al., 1997; Okazawa et al., 1993)。黄化植物の胚軸伸長に関わる *EXGT* は、主に細胞分裂を伴わないキシログルカン分子の切断 (水分子に転移する加水分解反応もしくはキシログルカンオリゴマーに転移する糖転移反応の結果) による細胞壁の弛緩 (Lorences et al., 1993; Creelman et al., 1997)、遊離のキシログルカン分子を細胞壁に取り込む結果起こる、細胞壁構造の維持に働くと考えられており (Nishitani et al., 1991; Xu et al., 1995; Catala et al., 1997)、*EXGT-A6* 遺伝子は黄化胚軸における細胞の伸長、拡大に伴うキシログルカンの代謝回転には機能していないと思われる。また *EXGT-A6* は、シロイヌナズナの栄養成長期の植物体の胚軸では転写産物の蓄積が観察されていない (図14)。興味深い事に黄化植物体の子葉 (茎頂を含む) において *EXGT-A6* 転写産物の蓄積は観察されなかった (図21)。長日条件下で生育させた同時期の植物体の茎頂部には *EXGT-A6* 転写産物の蓄積が観察されている。葉においては転写産物の蓄積が観察されていない (図14、図21)。これは、*EXGT-A6* 遺伝子が茎頂部において、光によって誘導される細胞分裂に伴って発現が増加する可能性を示唆している。野性株シロイヌナズナの暗所で発芽した植物体は、光を受けるまで葉の展開を抑制し胚軸の伸長を早める (Chory et al., 1989; Deng et al., 1992)。暗所では茎頂の分裂組織の細胞分裂は停止しており、光条件下に置くことにより茎頂部の

細胞分裂が開始すると考えられる。これは土中の種子が発芽して地上に芽を出し、器官を発達させながら成長していく現象と同じで、EXGT-A6遺伝子は光刺激による細胞増殖、特に茎頂部位における細胞分裂を伴う細胞拡大、伸長を引き起こす遺伝子の下流で働く遺伝子である事が予想される。

更にシロイヌナズナにおけるEXGT-A6の役割を探ることを目的として、器官分化変異株*terminal flower(tfl)*におけるEXGT-A6の器官別発現を野生株と比較した。*tfl*変異株は*acl*変異株ほどではないが、花序茎頂が花芽になる結果として花茎の伸長が早期に停止してしまう為、野生株に比べ矮性で花茎の生長が抑えられている (Shannon et al., 1991; Alvarez et al., 1992) (図19)。*tfl*変異株の茎においてEXGT-A6転写産物の蓄積が野生株と比較して減少していたのは、EXGT-A6が花茎伸長に直接的な役割を担っているという仮説を支持するものである (図20)。*tfl*変異株の花序部分におけるEXGT-A6転写産物の蓄積は野生株と同程度であった。コントロールとして抽苔直後 (発芽後約20日) のシロイヌナズナ野生株の開花した花を含むつぼみから抽出した全RNAを使用した。この組織は花序茎頂を含まない組織である。どちらも開花した花 (一部つぼみを含む) であるのでEXGT-A6は*tfl*変異株の花序部分においては野生株と同様に機能していると考えられる。

本章ではEXGT-A6の遺伝子を単離してその遺伝子構造を決定した。そのコピー数の解析の為にサザンハイブリダイゼーション分析を、EXGT-A6の発現特異性及び発現時期の興味から器官別、経時的な転写産物蓄積の観察を行った。更に花芽・茎の生長異常変異株におけるEXGT-A6の器官別発現を野生株と比較した。その結果EXGT-A6は細胞分裂、細胞伸長の盛んな部分に特異的に発現する新規なEXGT遺伝子であることが明らかとなった。EXGT-A6はXRPの中で糖転移反応酵素のグループに属しているものの、反応中心のアミノ酸配列がグループ中の他のXRPとは異なり、進化系統解析からも他のXRPとは離れた位置を示し、その機能に興味を持たれる。シロイヌナズナのゲノムの全塩基配列が決定され、細胞壁代謝に関連する酵素遺伝子は420以上に上ることが明らかとなり、EXGTだけでなく、エクспанシンや各種グルカナーゼといった細胞壁の伸展性に関わる酵素遺伝子も、複数の遺伝子が含まれていることが明らかとなった (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。しかしながら、ゲノム配列が明らかになっても遺伝子の機能が分かったとは言えない。今後はどのように個々の遺伝子が相互作用しながら、細胞壁の中で機能しているのかを明らかにしていかななくてはならない。また、EXGT-A6の酵素学的な機能に関しては、EXGT-A6が茎頂部位に高発現しているという事実から、EXGT-A6が茎頂部位におい

て果たしている機能の全容解明が待たれる。EXGT-A6の活性からXRPファミリーの中でEXGT-A6がどのような位置付けがなされるのか今後明らかになるだろうと思われる。



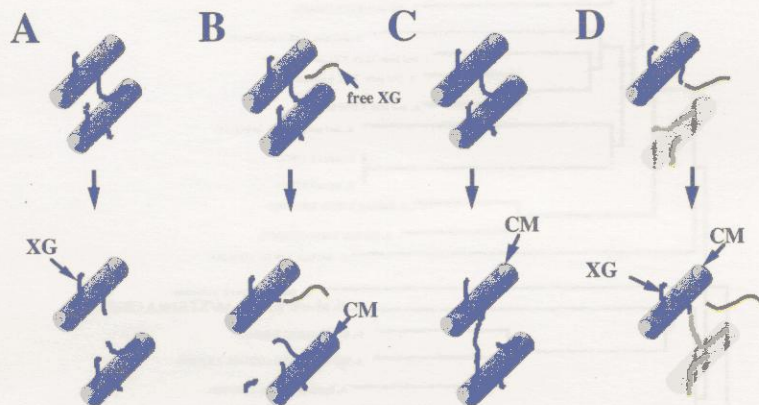


図23. EXGTにより触媒されると考えられるキシログルカン・セルロース微繊維の構造変化の反応素過程(Nishitani,1997)

A. キシログルカン架橋の加水分解による切断。キシログルカンの加水分解酵素グループのタンパク質によって触媒されとされている。B. キシログルカン架橋の糖鎖転移反応による切断。キシログルカンの糖転移酵素グループのタンパク質によって触媒されとされている。C. 糖鎖転移反応によるキシログルカン架橋の変更。D. 糖鎖転移反応によるキシログルカン架橋の形成。B, C, Dの反応は糖転移酵素グループのタンパク質によって触媒されとされている。XG:キシログルカン鎖 CM: セルロース微繊維

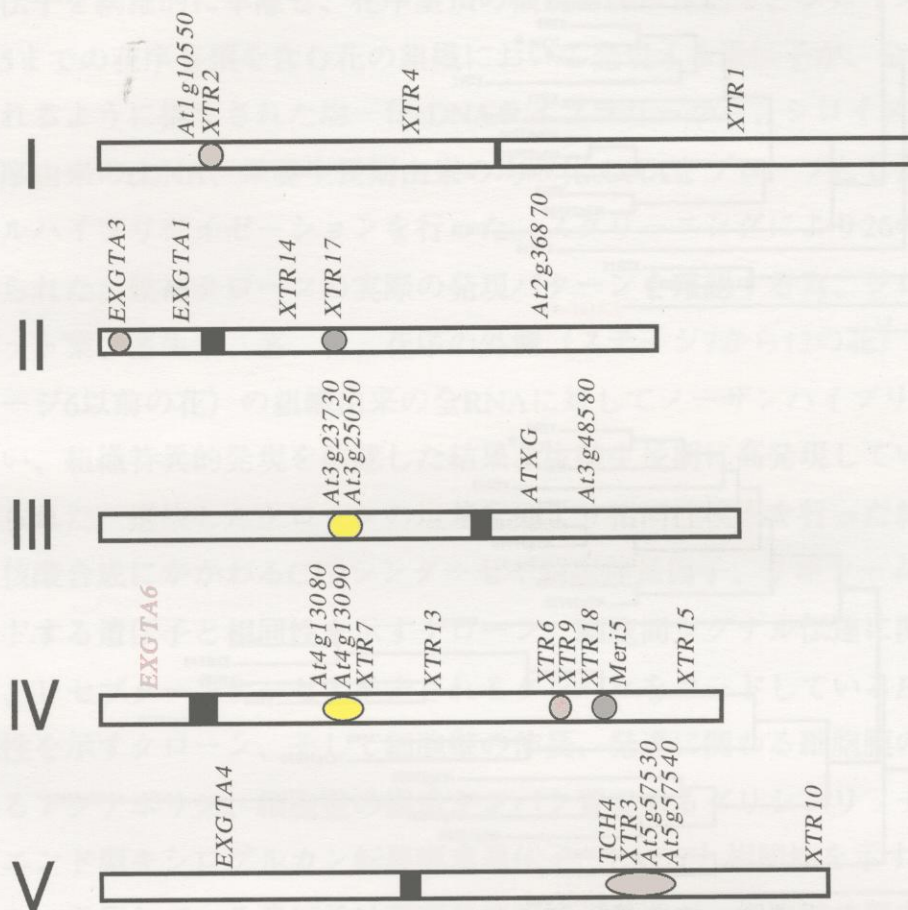
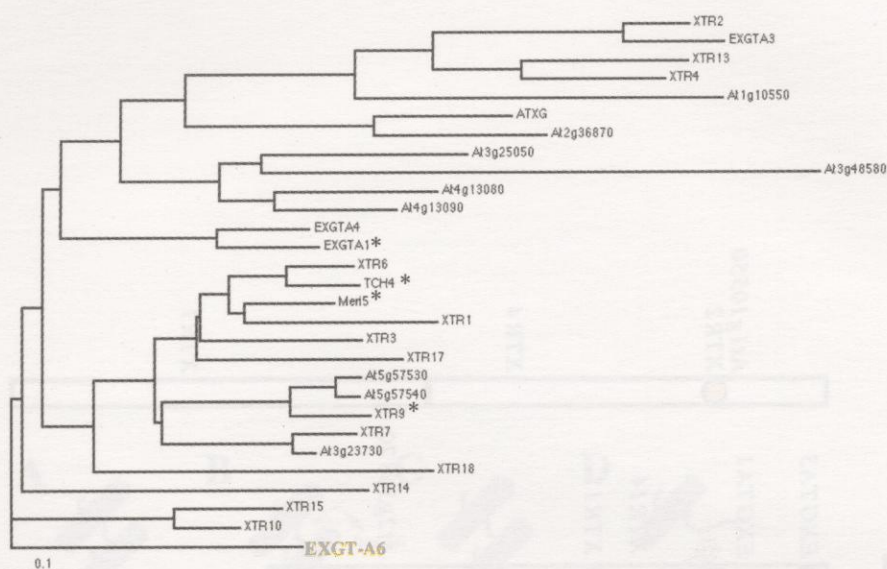


図24. シロイヌナズナの染色体上におけるXRPファミリー遺伝子の位置
インターネット上にシロイヌナズナのゲノム全塩基配列を公開しているMIPS
(munich information center for protein sequences) のデータベース解析 (MATDB:
<http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/tha/db/index.html>) を用いて解析を行った。
ローマ数字は染色体番号を示す。染色体を白棒、セントロメアを白棒内の黒棒
で模式的に示した。染色体間で重複の見られる部分を同色の丸印で示した。

A



B

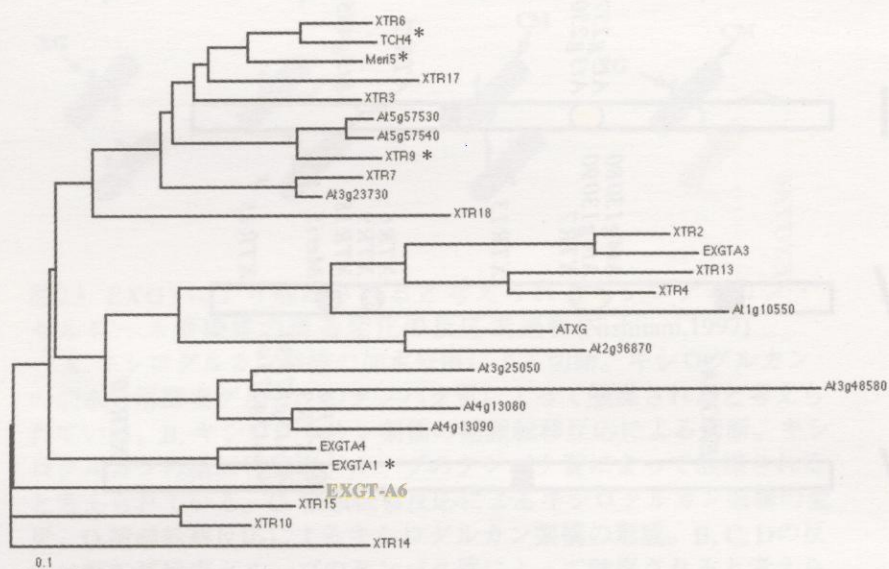


図25. シロイヌナズナのXRPファミリーの進化系統解析

A. XTR1を含む全てのXRPファミリーの進化系統解析。B. XTR1を除く全てのXRPファミリーの進化系統解析。EXGT-A6とシロイヌナズナにおける他のXRPの推定されるアミノ酸配列（シグナル配列を含む）について解析を行った。DDBJのデータ解析サービスCLUSTALW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/clustalw-e.html>) を利用して作製した。新たに見つかったXRPをAccession numberで示した。キシログルカンの加水分解酵素と推定されるグループを括弧で示した。その他のグループのメンバーは糖転移酵素であると推定される。酵素活性が既に報告されているものに*印を示した。EXGTA1、XET9、Meri5: Campbell and Braam, 1999b; TCH4: Xu et al., 1996

結論

本研究では、シロイヌナズナの花序茎頂に高発現して花序茎頂の分化と維持に関わる遺伝子を網羅的に単離し、花序茎頂の機能を探る目的で、シロイヌナズナのステージ5までの花序茎頂を含む花の組織において発現する遺伝子が、全て一定の割合で含まれるように構築された均一化cDNAライブラリーから、シロイヌナズナの花序茎頂花序由来のcDNA、栄養生長期由来の均一化cDNAをプローブとしたディファレンシャルハイブリダイゼーションを行った。スクリーニングにより26の候補クローンが得られた。候補クローンの実際の発現パターンを確認する為、シロイヌナズナのロゼット葉、茎生葉、茎、花、花序の外側（ステージ7から12の花）、花序の内側（ステージ6以前の花）の組織由来の全RNAに対してノーザンハイブリダイゼーションを行い、組織特異的発現を確認した結果、生殖生長期に高発現しているクローンが13得られた。選抜したクローンの塩基配列より相同性検索を行った結果、タンパク質、核酸合成にかかわるCTPシンターゼや翻訳伸長因子、リボソームタンパク質をコードする遺伝子と相同性を示すクローン、細胞間シグナル伝達に関わる遺伝子として、レセプターキナーゼと推定されるタンパクをコードしている*ERECTA*遺伝子と相同性を示すクローン、そして細胞壁の伸長、発達に関わる細胞膜の水チャンネルであるアクアポリン、細胞壁の構造タンパク質であるグリシンリッチタンパク質、そしてエンド型キシログルカン転移酵素遺伝子、*EXGT*と相同性を示すクローンなどであった。発現している遺伝子は茎頂分裂組織の発達や、細胞壁の形成に深く関わっているものであった。このことは、茎頂部の細胞間シグナル伝達、タンパク、核酸合成及び細胞壁の合成が茎頂の分化に必要であることを示している。今回のスクリーニングにより、報告されている遺伝子と相同性を示さない新規なクローンが1つ選抜された。また、同じものを重複して取ることなく効率的に候補クローンが単離された。13クローンのうち10クローンについてはシロイヌナズナで報告のある遺伝子と相同性を示し、2クローンがシロイヌナズナでは初めてのものであった。シロイヌナズナの全ゲノム配列が解読され、さらにシロイヌナズナのESTの登録配列数は2000年12月の時点で11万2千5百に達している。この数は重複したものも含まれているが、シロイヌナズナの総遺伝子のかなりの部分を含む。それにもかかわらず今回均一化cDNAライブラリーを使用したディファレンシャルスクリーニングによってシロイヌナズナでは報告されていない遺伝子や未知な遺伝子が単離された。このことは高発現な遺伝子であっても、まだシロイヌナズナの中には単離されていないもの

が存在していることを示しており、このことは本スクリーニング法が簡便なだけでなく非常に有効な方法であることを示すものである。

EXGTは細胞壁の主要構成成分である多糖のキシログルカンの切断、繋ぎ換えをする事により、細胞壁の伸展性に関与する酵素として近年注目を浴びている。花序茎頂部分の細胞は新しい細胞が次々に生まれているので細胞壁が薄く、固さも丈夫ではない。これを一次細胞壁と呼ぶが、この一次細胞壁のセルロース微繊維間を架橋しているキシログルカンを切断することによって一次細胞壁の構造が緩み細胞拡大が起こると考えられている。このエンド型キシログルカン転位酵素遺伝子 (EXGT) と相同性を示した候補クローンの花序茎頂に高発現という特徴と植物の分化、特に植物体の最終的な形態に深く関わる細胞壁の構築酵素という点に注目し、全長cDNA及びゲノムクローンの単離と発現部位、発現時期の解析を行った。この遺伝子は、XRP (xyloglucan rerated protein) の新規なメンバーであることから、EXGT-A6 遺伝子と命名した。EXGT-A6は花序茎頂部分の細胞壁代謝に深く関わるものと予想された。

シロイヌナズナのcDNAライブラリーからEXGT-A6の全長cDNAを単離した。

EXGT-A6は他のEXGTと同様に、C末端に保存されている4つのシステイン残基や、キシログルカンの切断に関与していると予想されるアミノ酸配列、N糖付加を受けると予想される部位を有し、N末端に疎水性アミノ酸に富むシグナル配列と予想される部分を持っていたが、EXGT-A6は、活性部位と予想されている共通のアミノ酸配列DEID(F/I)EFLGNがNEEDFEFLGNで他のEXGTと異なる部分を有していた。しかしながら、キシログルカンの切断に必須と予想されているアミノ酸残基は、EXGT-A6においても全て保存されており、EXGT-A6は他のシロイヌナズナのEXGTと、酵素の反応特異性が異なる事が予想され、その酵素機能に興味を持たれた。シロイヌナズナのゲノミックライブラリーから4.3 kbのゲノムDNAを含む断片が得られ、EXGT-A6遺伝子についてコーディング領域およびその上流の領域のゲノム構造を明らかにした。EXGT-A6はシロイヌナズナのゲノム中にシングルコピーで存在していた。

シロイヌナズナにおいてEXGT-A6の経時的なノーザン分析を行ったところ、EXGT-A6遺伝子は栄養生長期は茎頂部にのみ転写産物の蓄積が観察され、その後生殖生長期に移行すると急激に発現量が増加するという事が明らかになり、EXGT-A6は植物の形態を決める上で重要な働きを持つと思われる。また、EXGT-A6は根及び根端部には転写産物の蓄積が観察されなかった。さらに、EXGT-A6遺伝子は花序茎頂部に加えて生殖生長期移行後の急激な細胞拡大による花茎の伸長にも働く遺伝子であることが新たに明らかとなった。また、花茎の細胞伸長欠損を示す*ac1*変異株の

解析においてEXGT-A6転写産物の蓄積は、茎において著しく減少しており、細胞伸長の欠損とEXGT-A6遺伝子の発現量の低下に強い相関が見られ、EXGT-A6が花茎伸長に重要な役割を持つことが予想された。EXGT-A6は*acl*遺伝子の下流に位置し、花茎伸長に直接的な役割を担っていると考えられる。花序茎頂が花芽になる結果として、花茎の伸長が早期に停止してしまう*mi*変異株を用いた解析においても同様に茎においてEXGT-A6転写産物の蓄積が減少していた。また、暗所で生育させたシロイヌナズナの黄化植物体を用いた解析から、細胞分裂を伴わない茎の伸長にはEXGT-A6が関わっていない事が明らかとなり、EXGT-A6遺伝子が茎頂部位における、光刺激による細胞分裂を伴う細胞拡大、伸長を引き起こす遺伝子の下流で働く遺伝子である事が示唆された。

これまでにシロイヌナズナの他のEXGT遺伝子についてその転写産物の蓄積部位の解析がなされているが、EXGT-A6の様に細胞分裂、細胞伸長活性の高い部分に特異的に発現する遺伝子は単離されておらず、EXGT-A6が最初であり、花茎における細胞の伸長及び花序茎頂部における分化、形態形成に密接かつ重要な働きを持つ遺伝子であることが示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり、公私共々大変お世話になりました、奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 分化・形態形成学講座 横田 明穂教授並びに京都大学の大山莞爾教授に心より感謝致します。御二人の先生方にはいつも叱咤激励されていたような気がします。横田教授には細胞壁の機能に関して未だ勉強不足であった頃に、興味を持つ機会を頂きました。

また、同講座の河内 孝之助教授、竹村 美保助手には、実験の直接の指導教官として懇切丁寧に御指導と御助言を賜り、心より深く感謝致します。第1章の共同研究者であった京都大学（現田辺製薬）の藤重古都美さん、分化・形態形成学講座（現カゴメ）の大橋康隆さん、金本浩介さんには様々な御助言を賜りまして心から感謝致します。また、一緒にEXGT-A6の実験を行った都築正男さん（現奈良県農業試験場）とは2人で戸惑いながら実験を進めていきました。至らなかった先輩で大変申し訳なく思います。またバイオテクノロジー開発技術研究組合の山川清栄博士とは都築の追試を含め公私共々非常に御世話になりました。山川様とのディスカッションにより本研究が非常に面白い方向に進んでいきました。ここに改めて感謝の意を表したいと思います。また、サンプル採集の際、同組合技術補佐の奥山さん、高津さん、徳田さんにも御世話になりました。ありがとうございました。

また、この研究を行うにあたり、大変お世話且つ非常に有益な御助言を賜りました東北大学大学院 理学研究科（当時鹿児島大学教養部 生物学教室）西谷 和彦教授に心より感謝致します。鹿児島大での実験の合間に、岡本先生と共に桜島の見渡せる温泉に車で連れて行って頂いた事が今でも忘れられません。また、鹿児島大学の研究室で一緒に実験を行った長瀬悟さんとのディスカッションは、同じ分野の研究をしている方と直接お話しする初めての機会でしたので非常に有意義でした。実験の期間中御世話になった西谷研究室の方々にも感謝の意を表したいと思います。

また、直接本研究には関係ありませんが島根大学農学部生物化学研究室（当時）の落合英夫教授、柴田均教授は今ここにある自分にとって今でも非常に大きな拠り所となっています。当時の卒業論文の謝辞に書いた言葉は今でも深く自分の心に刻まれています。大学時代での最初の専門講義が木材のヘミセルロースに関するものだったこと、卒論の実験が光合成サイクル中の糖リン酸化酵素の実験であった事を考えると感慨深いものがあります。今後も先生方との御約束を果たせる様頑張っていきたいと思います。

そして自分を暖かく見守ってくれた両親にも感謝せずにはられません。人から自分達の子供が何をしているのか聞かれて説明するのに苦労した事だと思います。

最後に、長くもあり、短くもあったこの研究室での生活でしたが、この間に公私共々お世話になった方々、そして研究室の皆さん、紙面の都合上一人一人の御名前は挙げられませんが大変感謝しています。どうもありがとうございました。

兵頭 秀貴

参考文献

- Akamatsu, T., Hanzawa, Y., Ohtake, Y., Takahashi, T., Nishitani, K. and Komeda, Y. Expression of endoxyloglucan transferase genes in *acaulis* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **121**, 715-722 (1999).
- Altschul, SF., Madden, TL., Schaffer, AA., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402 (1997).
- Alvarez, J., Guli, CL., Yu, X-H. and Smith, DR. *terminal flower*: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2**, 103-116 (1992).
- An, YQ., McDowell, JM., Huang, S., McKinney, EC., Chambliss, S. and Meagher, RB. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* **10**, 107-121 (1996).
- Arrowsmith, DA. and de Silva, J. Characterisation of two tomato fruit-expressed cDNAs encoding xyloglucan endo-transglycosylase. *Plant Mol. Biol.* **28**, 391-403 (1995).
- Aubert, D. and Herzog, M. A new cDNA encoding a xyloglucan *endo*-transglycosylase-related polypeptide (*AtXTR8*) preferentially expressed in seedling, root and stem of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **121**, 187-196 (1996).
- Benton, WD. and Davis, RW. Screening lambda gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* **196**, 180-182 (1977).
- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
- Borriss, R., Buettner, K. and Maentsaelae, P. Structure of the beta-1,3-1,4-glucanase gene of *Bacillus macerans*: homologies to other beta-glucanases. *Mol. Gen. Genet.* **222**, 278-283 (1990).
- Bowman J eds: in *Arabidopsis an atlas of morphology and development*. 1st Edition Springer-Verlag (1994).

Campbell, P. and Braam, J. Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. *Trends in plant science*. **4**, 361-366 (1999).

Campbell, P. and Braam, J. In vitro activities of four xyloglucan endotransglycosylases from *Arabidopsis*. *Plant J.* **18**, 371-382 (1999).

Campbell, P. and Braam, J. Co- and/or post-translational modifications are critical for TCH4 XET activity. *Plant J.* **15**, 553-561 (1998).

Carpita, NC. and Gibeaut, DM. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**, 1-30 (1993).

Cassab, GI. Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 281-309 (1998).

Cassab, GI. and Varner, JE. Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 321-353 (1988).

Catala, C., Rose, JK. and Bennett, AB. Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4-beta-D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *Plant J.* **12**, 417-426 (1997).

Chrispeels, MJ. Sorting of proteins in the secretory system. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 21-53 (1991).

Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).

Chory, J., Peto, C., Feinbaum, R., Pratt, L. and Ausubel, F. *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* **58**, 991-999 (1989).

Church, GM. and Gilbert, W. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 1991-1995 (1984).

- Clark, SE., Williams, RW. and Meyerowitz, EM. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell* **89**, 575-585 (1997).
- Cosgrove, DJ. Wall extensibility: Its nature, measurement, and relationship to plant cell growth. *New Phytol.* **124**, 1-23 (1993).
- Cosgrove, DJ. Photomodulation of growth. Kendrick RE, Kronenberg GHM eds: in Photomorphogenesis in plants. 2nd Edition Kulwer Academic Publishers pp631-658 (1994).
- Cosgrove, DJ. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* **9**, 1031-1041 (1997a).
- Cosgrove, DJ. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **13**, 171-201(1997b).
- Cosgrove, DJ. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 391-417 (1999).
- Cosgrove, DJ. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 109-124 (2000a).
- Cosgrove, DJ. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**, 321-326 (2000b).
- Creelman, RA. and Mullet, JE. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* **9**, 1211-1223 (1997).
- Deng, XW. and Quail, PH. Genetic and phenotypic characterization of cop1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **2**, 83-95 (1992).
- de Silva, J., Jarman, CD., Arrowsmith, DA., Stronach, MS., Chengappa, S., Sidebottom, C. and Reid, JS. Molecular characterization of a xyloglucan-specific endo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucanase

(xyloglucan endo-transglycosylase) from nasturtium seeds. *Plant J.* **3**, 701-711 (1993).

Emmerling, M. and Seitz, NV. Influence of a specific xyloglucan-nonasaccharide derived from cell walls of suspension-cultured cells of *Daucus carota* L. on regenerating carrot protoplasts *Planta* **182**, 174-180 (1990).

Fanutti, C., Gidley, MJ. and Reid, JS. Action of a pure xyloglucan endo-transglycosylase (formerly called xyloglucan-specific endo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. *Plant J.* **3**, 691-700 (1993).

Fleming, AJ., McQueen-Mason, S., Mandel, T. and Kuhlemeier, C. Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin. *Science* **276**, 1415-1418 (1997).

Fleming, AJ., Caderas, D., Wehrli, E., McQueen-Mason, S. and Kuhlemeier, C. Analysis of expansin-induced morphogenesis on the apical meristem of tomato. *Planta* **208**, 166-174 (1999).

Fry, SC. The structure and functions of xyloglucan. *J. Exp. Bot.* **40**, 1-12 (1989).

Fry, SC. Polysaccharide-Modifying Enzymes in the Plant Cell Wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 497-520 (1995).

Fry, SC., Smith, RC., Renwick, KF., Martin, DJ., Hodge, SK. and Matthews, KJ. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* **282**, 821-828 (1992).

Gantt, JS. and Key, JL. Coordinate expression of ribosomal protein mRNAs following auxin treatment of soybean hypocotyls. *J. Biol. Chem.* **260**, 6175-6181 (1985).

Gibson, S. and Somerville, C. Isolating plant genes. *Trends Biotechnol.* **11**, 306-313 (1993).

Grunstein, M. and Hogness, DS. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3961-3965 (1975).

- Guo, L.H. and Wu, R. Exonuclease III: Use for DNA sequence analysis and in specific deletions of nucleotides. *Methods Enzymol.* **100**, 60-96 (1983).
- Hanzawa, Y., Takahashi, T. and Komeda, Y. *ACL5*: an *Arabidopsis* gene required for internodal elongation after flowering. *Plant J.* **12**, 863-874 (1997).
- Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael, A.J., Burtin, D., Long, D., Pineiro, M., Coupland, G. and Komeda, Y. *ACAULIS5*, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO J.* **19**, 4248-4256 (2000).
- Hayashi, T. Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 139-168 (1989).
- Hayashi, T., Takeda, T., Ogawa, K. and Mitsuishi, Y. Effects of the degree of polymerization on the binding of xyloglucans to cellulose. *Plant Cell Physiol.* **35**, 893-899 (1994).
- Hoj, P.B., Condon, R., Traeger, J.C., McAuliffe, J.C. and Stone, B.A. Identification of glutamic acid 105 at the active site of *Bacillus amyloliquefaciens* 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase using epoxide-based inhibitors. *J. Biol. Chem.* **267**, 25059-25066 (1992).
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol.* **123**, 553-562 (2000).
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907 (1987).
- Joshi, C.P. An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Res.* **15**, 6643-6653 (1987).
- Juncosa, M., Pons, J., Dot, T., Querol, E. and Planas, A. Identification of active site carboxylic residues in *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 14530-14535 (1994).

Keegstra, K., Talmadge, KW., Bauer, WD. and Albersheim, P. The structure of plant cell walls.III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Pyisiol.* **51**, 188-196 (1973).

Keitel, T., Simon, O., Borriss, R. and Heinemann, U. Molecular and active-site structure of a Bacillus 1,3-1,4-beta-glucanase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5287-5291 (1993).

Kelly, AJ., Zagotta, MT., White, RA., Chang, C. and Meeks-Wagner, DR. Identification of genes expressed in the tobacco shoot apex during the floral transition. *Plant Cell* **2**, 963-972 (1990).

Kozak, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292 (1986).

Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, CR. and Brown, RM. Jr. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant vigna angularis. *Plant Cell* **11**, 2075-2086 (1999).

Kohchi, T., Fujishige, K. and Ohyama, K. Construction of an equalized cDNA library from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **8**, 771-776 (1995).

Konieczny, A. and Ausubel, FM. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* **4**, 403-410 (1993).

Levy, S., Maclachlan, G. and Staehelin, LA. Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. *Plant J.* **11**, 373-386 (1997).

Li, J. and Chory, J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**, 929-938 (1997).

Lincoln, C., Britton, JH. and Estelle, M. Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 1071-1080 (1990).

- Lister, C. and Dean, C. Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic makers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **4**, 745-750 (1993).
- Lorences, EP. and Fry, SC. Xyloglucan oligosaccharides with at least two α -D-xylose residues act as acceptor substrates for xyloglucan endotransglycosylase and promote the depolymerization of xyloglucan. *Physiol. Plant.* **88**, 105-112 (1993).
- Lutcke, HA., Chow, KC., Mickel, FS., Moss, KA., Kern, HF. and Scheele, GA. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.* **6**, 43-48 (1987).
- Matsumoto, S., Oizumi, N., Taira, H. and Ejiri, S. Cloning and sequencing of the cDNA encoding rice elongation factor 1beta'. *FEBS Lett.* **311**, 46-48 (1992).
- McCann, MC., Wells, B. and Roberts, K. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *J. Cell Sci.* **96**, 323-334 (1990).
- McNeil, M., Darvill, AG., Fry, SC. and Albersheim, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 625-663 (1984).
- Meeks-Wagner, DR., Dennis, ES., Tran Thanh Van, K. and Peacock, WJ. Tobacco genes expressed during in vitro floral initiation and their expression during normal plant development. *Plant Cell* **1**, 25-35 (1989).
- McQueen-Mason, SJ. and Cosgrove, DJ. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6574-6578 (1994).
- McQueen-Mason, SJ., Durachko, DM. and Cosgrove, DJ. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* **4**, 1425-1433 (1992).
- Medford, JI., Elmer, JS. and Klee, HJ. Molecular cloning and characterization of genes expressed in shoot apical meristems. *Plant Cell* **3**, 359-370 (1991).
- Moore, PJ., Swords, KM., Lynch, MA. and Staehelin, LA. Spatial organization of the

assembly pathways of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *J. Cell Biol.* **112**, 589-602 (1991).

Nakai, K. and Horton, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 34-36 (1999).

Nakamura, S., Mori, H., Sakai, F., and Hayashi, T. Cloning and sequencing of a cDNA for poplar endo-1,4- β -glucanase. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1229-1235 (1995).

Nicol, F. and Hofte, H. Plant cell expansion: scaling the wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 12-17 (1998).

Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H. and Hofte, H. A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **17** 5563-5576 (1998).

Nishitani, K. and Tominaga, R. In vitro molecular weight increase in xyloglucans by an apoplastic enzyme preparation from epicotyls of *Vigna angularis*. *Physiol. Plant.* **82**, 490-497 (1991).

Nishitani, K. and Tominaga, R. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J. Biol. Chem.* **267**, 21058-21064 (1992).

Nishitani, K. Endo-xyloglucan transferase, a new class of transferase involved in cell wall construction. *J. Plant Res.* **108**, 137-148 (1995).

Nishitani, K. The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. *Int. Rev. Cytol.* **173**, 157-206 (1997).

Northcote, DH. The involvement of the Golgi apparatus in the biosynthesis and secretion of glycoproteins and polysaccharides. *Biomembranes*, **10**, 51-76 (1979).

Oh, M-H., Romanow, WG., Smith, RC., Zamski, E., Sasse, J. and Clouse, SD. Soybean *BRU1* encodes a functional xyloglucan endotransglycosylase that is highly expressed in inner

- epicotyl tissues during brassinosteroid-promoted elongation. *Plant Cell Physiol.* **39**, 124-130 (1998).
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, MK., Bell, CJ. and Shimura, Y. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* **3**, 677-684 (1991).
- Okazawa, K., Sato, Y., Nakagawa, T., Asada, K., Kato, I., Tomita, E. and Nishitani, K. Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls. *J. Biol. Chem.* **268**, 25364-25368 (1993).
- Planas, A., Juncosa, M., Lloberas, J. and Querol, E. Essential catalytic role of Glu134 in endo-beta-1,3-1,4-D-glucan 4-glucanohydrolase from *B. licheniformis* as determined by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* **308**, 141-145 (1992).
- Peschke, VM. and Sachs, MM. Characterization and expression of transcripts induced by oxygen deprivation in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.* **104**, 387-394 (1994).
- Purugganan, MM., Braam, J. and Fry, SC. The *Arabidopsis* TCH4 xyloglucan endotransglycosylase. Substrate specificity, pH optimum, and cold tolerance. *Plant Physiol.* **115**, 181-190 (1997).
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467 (1977).
- Schaffner, AR. Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? *Planta* **204**, 131-139 (1998).
- Shannon, S. and Meeks-Wagner, DR. A mutation in the *Arabidopsis* *TFL1* gene affects inflorescence meristem development. *Plant Cell* **3**, 877-892 (1991).
- Shannon, S. and Meeks-Wagner, DR. Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**, 639-655 (1993).

Showalter, AM. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* **5**, 9-23 (1993).

Schroder, R., Atkinson, RG., Langenkamper G. and Redgwell, RJ. Biochemical and molecular characterisation of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwifruit. *Planta* **204**, 242-251 (1998).

Smith, RC. and Fry, SC. Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. *Biochem J.* **279** (Pt 2), 529-535 (1991).

Smyth, DR., Bowman, JL. and Meyerowitz, EM. Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767 (1990).

Sun, TP. and Kamiya, Y. The *Arabidopsis* *GAI* locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**, 1509-1518 (1994).

Taiz, L. Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 585-567 (1984).

Takemura, M., Fujishige, K., Hyodo, H., Ohashi, Y., Kami, C., Nishii, A., Ohyama, K. and Kohchi, T. Systematic isolation of genes expressed at low levels in inflorescence apices of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* **29**, 275-282 (1999).

The *Arabidopsis* Genome Initiative Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815 (2000).

Torii, KU., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, RF. and Komeda, Y. The *Arabidopsis* *ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* **8**, 735-746 (1996).

Tsukaya, H., Naito, S., George, PR. and Komeda, Y. A new class of mutations in *Arabidopsis thaliana*, *acaulis1*, affecting the development of both inflorescences and leaves. *Development* **118**, 751-764 (1993).

Tsukaya, H., Inaba-Higano, K. and Komeda, Y. Phenotypic characterization and molecular

- mapping of an *acaulis2* mutant of *Arabidopsis thaliana* with flower stalks of much reduced length. *Plant Cell Physiol.* **36**, 239-246 (1995).
- Utsugi, S., Sakamoto, W., Ogura, Y., Murata, M. and Motoyoshi, F. Isolation and characterization of cDNA clones corresponding to the genes expressed preferentially in floral organs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **32**, 759-765 (1996).
- Xu, W., Purugganan, MM., Polisensky, DH., Antosiewicz, DM., Fry, SC. and Braam, J. *Arabidopsis TCH4*, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* **7**, 1555-1567 (1995).
- Xu, W., Campbell, P., Vargheese, AK. and Braam, J. The *Arabidopsis* XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression. *Plant J.* **9**, 879-889 (1996).
- Williams, ME. and Sussex, IM. Developmental regulation of ribosomal protein L16 genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **8**, 65-76 (1995).
- Yamada, S., Nelson, DE., Ley, E., Marquez, S. and Bohnert, HJ. The expression of an aquaporin promoter from *Mesembryanthemum crystallinum* in tobacco. *Plant Cell Physiol.* **38**, 1326-1332 (1997).
- Yokoyama, R., Takahashi, T., Kato, A., Torii, KU. and Komeda, Y. The *Arabidopsis* ERECTA gene is expressed in the shoot apical meristem and organ primordia. *Plant J.* **15**, 301-310 (1998).
- Zuo, J., Niu, QW., Nishizawa, N., Wu, Y., Kost, B. and Chua, NH. KORRIGAN, an *arabidopsis* endo-1,4-beta-glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. *Plant Cell* **12**, 1137-1152 (2000).
- Zurek, DM. and Clouse, SD. Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. *Plant Physiol.* **104**, 161-170 (1994).
- 藤重 古都美 (1995) 均一化cDNAライブラリーを用いた植物の花芽分化に関する遺

伝子の単離と解析 京都大学修士論文

半澤芳恵、高橋卓、米田好文(2000) 茎伸長の分子機構. 細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ12 新版植物の形を決める分子機構 岡田清孝、町田泰則、松岡 信監修(秀潤社) pp. 128-137.

米田好文、鳥居啓子(1994) 茎の形成の遺伝的制御. 細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ1 植物の形を決める分子機構 渡邊 昭、島本 功、福田裕穂、内藤 哲監修(秀潤社) pp. 34-40.

西谷 和彦 (1997) アポプラストの枠組みの構築. 化学と生物 35, pp. 790-797.

論文目録

Hyodo, H., Takemura, M., Yokota, A., Ohyama, K. and Kohchi, T. Systematic isolation of genes highly transcribed in inflorescence apices of *Arabidopsis thaliana* from an equalized cDNA library. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1538-1541 (2000).

Hyodo, H., Yamakawa, S., Takeda, Y., Tuduki, M., Takemura, M., Yokota, A., Ohyama, K. and Kohchi, T. Characterization of endoxyloglucan transferase gene *EXGT-A6*, highly transcribed in inflorescence apices of *Arabidopsis thaliana*. in preparation.

参考論文

Takemura, M., Fujishige, K., Hyodo, H., Ohashi, Y., Kami, C., Nishii, A., Ohyama, K. and Kohchi, T. Systematic isolation of genes expressed at low levels in inflorescence apices of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* **6**, 275-282 (1999).