

# Environmental stress-induced hierarchical architecture in secretion of a hollow fiber from plant protoplasts

田川, 聡美

<https://hdl.handle.net/2324/2236315>

---

出版情報：九州大学, 2018, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名 : 田川 聡美

論文題名 : Environmental stress-induced hierarchical architecture in secretion of a hollow fiber  
from plant protoplasts

(環境ストレス応答として植物プロトプラストから分泌される中空繊維の  
階層的構築プロセス)

区 分 : 甲

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文では、「大過剰の  $\text{CaCl}_2$  が添加された酸性の培地」という環境ストレスで誘導される植物プロトプラストの  $\beta$ -1,3-glucan (カロース) 中空繊維分泌現象について、細胞壁形成との相関を検討した。すなわち、繊維分泌が細胞壁形成阻害を伴うことに着目し、プロトプラストの細胞壁再生をモニターすることにより、逆に壁阻害による分泌繊維の形成過程を細胞レベルの観点から明らかにすることを目的とした。

第一章では、このカロース中空繊維の産生現象が、植物共通の現象であるかどうかを検証した。本現象は、これまで樹木由来のプロトプラストにおいてのみ認められていた。そこで、草本植物のシロイヌナズナとタバコ BY-2 の懸濁培養細胞由来のプロトプラストを用いて検討した。その結果、草本植物においても細胞壁形成が阻害された際に、本現象が確認され、植物共通のストレス応答現象であることが示唆された。

第二章では、プロトプラストの細胞壁形成に重要な役割を果たすセルロースとカロースに着目し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いてプロトプラストの一次壁形成の経時的な観察を行い、細胞表層のナノ表面観察を原子間力顕微鏡により行った。その結果、本ストレス条件において、セルロースマイクロフィブリルの合成が抑制されるとともに、カロースが細胞外へ産生されることが可視化により明らかになった。さらに、セルロースマイクロフィブリルの配向制御に関与する表層微小管を蛍光タンパク質で標識し、その動態を調べた結果、ストレス培養下では、表層微小管が不安定な状態で存在することが分かった。このことは、表層微小管の不安定化が、細胞壁形成阻害に寄与していることを示唆した。

第三章では、表層微小管のカロース中空繊維の形成プロセスへの関与を調べた。カロース合成酵素は膜タンパク質であるため、本現象において表層微小管の関与が推定された。そこで、分泌繊維周辺の蛍光標識された微小管の CLSM 観察を行った結果、繊維の産生部位を囲むように微小管が存在する様子が認められた。さらに、微小管重合または、脱重合促進剤を培地に添加して、微小管形成の人工的制御を検討したところ、カロース中空繊維の径が変化し、壁形成阻害のみならず、繊維形態形成への表層微小管の関与の可能性が示された。

第四章では、ボトムアップ手法、ならびにトップダウン手法を用いて、カロース中空繊維を構成するユニット (ビルディングブロック) を明らかにした。ボトムアップ手法として、 $\beta$ -1,3-glucan の自己組織化阻害を検討した。すなわち、アニリンブルーフルオロクローム (ABF) を培地に添加し、プロトプラストを培養したところ、カロース中空繊維にねじれがなくなるという形態変化が認められ、同時に、微細なナノファイバー状物質が繊維の周辺に出現した。一方、ダウンサイズ手法として水中カウンターコリジョン (ACC) 法を用いた。ACC 法とは、試料分散水を高速、高圧で対向衝突させることにより、マイクロサイズの素材を水のみで比較的マイルドにナノ微細化する手法である。ストレス培養で得られたカロース中空繊維を ACC 法に供したところ、ABF 培養で得られたものと同様の形態を示すナノファイバー状物質が認められた。このことは、ナノファイバー状物

質が、カロース中空繊維を形成しているビルディングブロックであることを示唆する。また、ABFは $\beta$ -1,3-glucanの疎水面に相互作用し自己組織化阻害を引き起こしているものと考えられたため、このナノファイバー状物質の自己組織化には、疎水性相互作用が寄与しているものと推定された。

第五章では、本現象における細胞壁阻害の環境要因をより明確にするために、 $\text{Ca}^{2+}$ 以外のイオン、pH、ならびに $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に対する細胞壁形成、および繊維産生の変化を調べた。試料細胞は、モデル生物として研究され、ストレス応答や細胞壁形成に関する研究報告が多いシロイヌナズナを用いた。この結果、 $\text{Ca}^{2+}$ が細胞壁形成阻害、ならびに繊維産生に極めて影響を与えることが明らかになった。

以上の研究は、環境ストレス応答としての植物プロトプラストにおけるカロース中空繊維の産生現象について、i) 高等植物に共通した現象であること、ii) 大過剰の $\text{Ca}^{2+}$ による細胞壁形成阻害が主要要因であること、iii) 表層微小管の状態に影響を受けること、iv) 中空繊維の自己組織化にカロースナノファイバーの疎水性相互作用が寄与している可能性があることを明らかにした。さらに、これらの結果は、植物細胞壁研究に新たな観点をもたらすこと、生物マテリアルデザインとして生物由来多糖の三次元階層構造体形成プロセスの提案など、さらなる展開が期待される。