植物細胞壁の伸展性の引張り試験機による測定

大阪市立大学 理 学 部 増 田 芳 雄*

はじめに

オーキシン研究の初期、オランダ Utrecht の Heyn¹⁾ はアベナ (Avena, oat, まからすむぎ) 幼葉鞘の細胞壁が植物ホルモン、オーキシンの働きによって伸びやすくなることを発見した。いらい、多くの研究者たちによって、オーキシンが細胞の伸長を誘導するとき、細胞壁の伸びやすさを大きくすることが確認された。オーキシンによって細胞内にいろいろな生化学的変化

図1. 植物細胞の模式図と S, O, W の関係²¹⁾。吸水力 (S) は水飽和の状態では、浸透値 (O) と膨圧 (壁圧, W) が釣り合うためゼロとなる。O が変わらず S が大きくなるためには W が小さくならねばならない。

がおこり、最終的にはそれらの変化が細胞壁の力学的性質の変化につながると思われる。

生長しつつある植物細胞は図1に示すように、一般に大きな液胞をもち、外側は多糖類からなる第1次細胞壁で囲まれている。液胞は糖、無機イオンを含み、ほぼ一定の浸透値 (0.4 モル前後) をもち、水を外界から吸収しようとしている (浸透圧)。外界の浸透値が細胞のそれより低いときは、細胞は浸透圧によって吸水しようとするが (吸水力)、水飽和状態では外側を囲む細胞壁によって抑えつけられている (細胞壁圧—図1参照)。細胞内容が壁圧によって抑えつけられると、これと釣り合った反対圧が生じ、これを膨圧という。第1次細胞壁 (2次肥厚をしていない若い細胞壁) は細胞壁の乾量当りにしてセルロース25~40%、ペクチン質約5%、非セルロース性多糖類約50%を含んでいる¹⁵⁾。セルロースはミセル構造をなし、アベナ幼葉鞘など生長しつつある細胞では、ミセルは細胞の長軸に対して直角に近い配列をしている¹⁵⁾。いま、細胞が定常状態にあるときは、吸水力 S は:

$$S = O - W \quad \left(\begin{array}{l} O: \text{浸透圧} \\ W: \text{壁圧} \end{array} \right)$$

となる (図1)。オーキシンによって細胞が吸水生長するときは当然 S が大きくなる。S が大きくなるためには、O が大きくなるか、W が小さくなるか、その両者がおこらなくてはならない (図1)。オーキシンによって細胞が吸水するとき、O が大きくなるという証拠はない。細胞が水を吸収して大きくなるので、液胞の溶液はうすまり、浸透値はむしろ低下する¹⁷⁾。したがって、オーキシンによって S が大きくなる原因は現在のところ W の低下、すなわち細胞壁のゆるみがおこるためと考えられている。

一定の浸透値をもった細胞は、細胞壁が伸びやすく (ゆるみ) になれば直ちに吸水伸長をおこす。したがって、細胞壁の力学的性質の変化は、細胞の吸水を直接的に支配する。伸長生長が継続するためには、もちろん複雑な生化学的過程が伴わなければならないが、

* Measurement of wall extensibility of plant cells by a tensile-tester;
Yoshio MASUDA: Department of Biology, Faculty of Science, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka

伸長生長が開始 (initiate) するためには細胞壁が伸びやすくななくてはならない。

細胞壁の力学的性質とその測定法

前述の Heyn は屈曲法 (Bending method) を用いて細胞壁の力学的性質をしらべた。屈曲法は Heyn 以後、多くの研究者によってしばしば用いられた。²⁻⁵⁾ この他、原形質分離法 (Plasmolytic method)^{3,6-10)} と引張り法 (Stretching method)^{4,11-13)}、あるいはそれらの変法も多くの研究者によって採用されてきた。¹⁴⁾ これら諸法の詳細に関しては他の総説を参照されたい (図2)。これらの方法に共通した欠点は、実験操作が煩雑で、多くの実験を行なう時に非常な時間、労力、実験者の技術を要することである。このため、実験結果に誤差が入りやすく、方法によっては名人芸的な技術を必要とし、誰にでも簡単に実験できるものではない。¹⁵⁾

最近、Olson らは Instron 社の Extensometer (Instron Universal Testing Instrument, Type B) を採用することによって、これまでに用いられてきた方法の欠点の多くを一挙に是正できる可能性を報告した。¹⁶⁾

図2. 細胞壁の力学的性質の測定法¹⁴⁾

- A = 屈曲法の変法。ジャガイモ塊茎などの貯蔵組織に用いる。
B = 引張り法。
C = 屈曲法。

Instron extensometer は、引張り法を自動的におこなう目的で、元来繊維や金属線の強度や力学的特性をしらべるために開発された装置である (図3)。これと同じ原理に基づく引張り試験機は、わが国においてもすでに10年前から製作市販されている。その一例は東洋測器株式会社の Tensilon tensile-tester である。この引張り試験機の性能は Instron とほとんど同じで、植物組織の試験のためには試料のクランプを改良すればよい。その構造および原理は Instron と全く同様で、移動梁が送りネジによって下方へ移動することで植物組織片に荷重がかかる。固定梁と移動梁にとりつけられたクランプに植物組織片を固定し、移動梁の下方への一定速度による移動によって生じた荷重は、抵抗線ひずみ計 (Wire strain gauge) を用いたロードセルによって電気的シグナルに変えられ、記録計に記録される。

図3. Instron Universal Instrument, type B¹⁹⁾

Tensilon は荷重範囲および用途によって、UTM-I 型から VII 型までであるが、幼葉鞘や茎組織などを用いるためには、UTM-II 型が適当である。一般にアベナ幼葉鞘など植物生組織では、膨圧による縦軸方向への荷重は20~40 g と考えられている。^{17,18)} したがって、殺した材料を用いて膨圧と同程度の荷重をかけて実験するときは、最大50 g くらいの荷重範囲で用が足せる。また、組織が切断する時の荷重をしらべるときは、その荷重は約 100 g に達する。したがって、ゲージの安全度を見積っても 300 g あれば十分であろうし、荷重範囲の小さい方が精度も高い。¹⁸⁾

引張り速度が変わると、データーもやや変化するが、移動梁の移動速度 20mm/min 以下が Instron の場合には一般に採用されている。^{16,18)} 記録計に用いる記録紙の紙巾は 120mm で、目盛は50等分してある。荷重範囲を 0~100 g にしておけば、一目盛 2 g になり、1 g の

変動でも十分に読める。Tensilon II 型の場合、紙送り速度は3通りある。記録紙の横軸はクランプ間距離に換算でき、移動梁の移動速度 2mm/min で紙送り速度 200mm/min なら、記録紙の横軸 10mm がクランプ間距離 0.1mm になる。

植物材料

いままで Instron を用いて行なわれた植物組織の実験で発表されているのは、Olson¹⁶⁾らおよび Cleland^{18,19)}による3論文だけで、材料として用いられたのはアベナ幼葉鞘だけである。このほか、エンドウ茎、キュウリの茎、あるいは藻類細胞も用いることができる(図4)。

図4. 各種植物材料の Instron による荷重—伸長曲線¹⁹⁾

ここではアベナ幼葉鞘についてのみ述べることにする。生きたままの幼葉鞘と、いろいろな方法で殺してから測定したものとを比較すると表1のようになる。¹⁶⁾ Break load (破壊荷重)は、引張って幼葉鞘組織が切れる瞬間の荷重を示し、伸展性 (Extensibility) は、後で述べるが、細胞壁の伸びやすさの一表示法である。

表1. アベナ幼葉鞘の Breaking load (破壊荷重) と Extensibility (伸展性)¹⁶⁾

処 理	Breaking load		Extensibility cm × 10 ³ /g	
	対 照	IAA	対 照	IAA
生 組 織	60	40	1.0	2.0
乾 燥 組 織	145	130	0.23	0.33
メタノール5分	70	50	1.0	2.3
メタノール5分 →プロナーゼ	65	50	1.0	2.3
エタノール5分	75	50	1.0	2.3
沸とう水5分	70	50	1.0	2.3
凍 結	65	45	1.3	2.3

10⁻⁵M IAA 処理 8 時間

乾燥した幼葉鞘の破壊荷重は大きく、伸展性は小さいが、その他の処理は生きたものと同くあまり顕

著な差を示さない。また、沸とうメタノール中で5分処理し、さらにそれをプロナーゼで処理しても、伸展性には変化はない。このとき、幼葉鞘の乾量、N量および処理液中に検出される糖量をしらべると表2のようになる。

表2. アベナ幼葉鞘の乾量、N量の抽出操作による変動^{16,25)}

処 理	乾量 ¹⁶⁾ μg/cm*	N量 ¹⁶⁾ μg/cm*	処理液中に検出された糖	
			還元糖 μg/ml**	全 糖 μg/ml**
無 処 理	630	28		
メタノール	240	12		
メタノール→緩衝液	220	10	trace	6.5
メタノール→プロナーゼ	170	0.5	3	20.5
メタノール→パンクレアチン	111		20	53.0

メタノール処理は沸騰して5分；緩衝液：0.03Mリン酸、pH7.4、エタノール5%を加える。酵素処理は 200μg/ml、37℃、17時間。

プロナーゼ：Streptomyces griseus；パンクレアチン：うしの膵臓

* 値は幼葉鞘の長さ当り、

** 値は処理液一定量当り、5 ml 中で 20mm 幼葉鞘10本を処理、糖量はブドウ糖に換算した。

メタノール中で5分間煮沸すると、乾量、N量とも生組織の半分以下に減少する。さらに Streptomyces griseus のプロナーゼで処理すると、N量はきわめて微量になり、細胞全N量の97%以上が失われる。¹⁶⁾ プロナーゼ処理ののちも検出されるNは細胞壁タンパクによるものと考えられる。残存タンパク (細胞壁タンパク) 中には、細胞全タンパク中にあるヒドロキシプロソンの60%が存在している。したがって細胞壁残存タンパクはヒドロキシプロリンを多量含む構造タンパク¹⁰⁾と考えられ、Lampert のいう“extensin”のようなものかもしれない。プロナーゼ処理によって処理液中に検出される糖の量は少ないが、うし膵臓のパンクレアチン (日本薬局方) 処理ではかなり大量の糖が溶出する。パンクレアチン処理によって細胞壁乾量も著しく減少するから、この酵素標品には多糖類分解酵素がかなり混存しているおそれがある。

このように、メタノール処理、プロナーゼ処理によって細胞質のないきれいな細胞壁を調製することができる。残存タンパクが細胞壁の力学的性質にどのような働きをしているか、を調べるとき、このようにして調製した細胞壁を用いるのは都合がよい。また、メタ

図5. アベナ幼葉鞘細胞壁の調製法¹⁹⁾

ノールで細胞を瞬間的に殺すと、そのときの細胞壁の性質が固定され、その後長時間組織を貯蔵できるから、任意の時に測定すればよい。以上の植物材料の調製法は図5にまとめてある。

実 験

メタノール中に保存しておいた材料を十分に水洗したのち、引張り試験機を用いてその伸展性を測定する。クランプ間の距離はあらかじめ一定にしておくが、5 mmくらいが適当である。幼葉鞘組織をクランプに固定するときは、クランプが組織と接触する面にナメシ皮(厚さ約1 mm)を粗い面を外側にして貼布しておく、すべりやチャック切れすなわちつかみのところでの切断がおこらない。幼葉鞘組織を2 mm/minの速度で引張ると、図6にみられるような曲線が得られる。伸長の初期にはあまり荷重がかからない。これは組織をクランプに固定したときに生ずるたるみ(Slack)が原因の一つになっている。やがて伸長と共に直線的に荷重が増加する。細胞膨圧のうち、縦方向にかかる荷

図6. アベナ幼葉鞘の Instron による荷重—伸長曲線¹⁹⁾
30 g 荷重の範囲で引張りをくりかえす。

重が20~40 gであることから、30 gの荷重がかかった時、移動梁のクランプを同じ速度で元にもどす(図8参照)。この往復2つの曲線の差にはっきりした履歴現象(Hysteresis)がみられる。クランプが元の位置にもどったら(距離5 mm)、もう一度引張る。これを30 g 荷重の範囲でくり返すと、第2回以後は何回くり返してもほとんど同じ曲線が得られる(図6, 2nd, 3rd, 4th...)。第1回と第2回以後の曲線の差は、細胞壁が引張られた時のクセのつきやすさを示しており、可塑的な性質を表現しているといわれている。また、第2回以後の曲線は、細胞壁の弾性的性質を示すといわれている。このようにして得られる荷重—伸長曲線(Load-extension curve)を応力—ひずみ曲線(Stress-strain curve)とみなし、細胞壁の力学的性質を定量的に表現する。

応力—ひずみ関係

Olson¹⁶⁾らはInstronを用い、次のようにして細胞壁の伸展性(Extensibility)をあらわした。荷重—伸長曲線のはじめの直線部分を延長した直線の横軸に対するかたむき(図7の曲線と接する破線の横軸に対するかたむき)から $4L/F$ をもとめ、これを伸展性とした。 $4L$ および F は図8に示すとうり、荷重 F に対する直線部分における伸びを示す。

Olsonらによる伸展性の表現は、細胞壁ののびやすさ(Compliance)の値として次のような欠点をもっている。^{18,19)}(1)この伸展性は弾性的および可塑的伸びやすさの両方、つまり伸びやすさ全体を含んだ値である。弾性的(DE)および可塑的(DP)両方のコンプライアンスを分けて測定することが望ましい。(2)応力—ひずみ曲線からコンプライアンスを知るとき、ひずみを受ける細胞壁の厚さ(断面積)が常に一定であるとみなしている。これらの欠点が克服できれば、細胞壁の性質をある程度力学的に解析できるかもしれない。

ClelandはOlsonらの方法を改善して、次のような方法を考えた。コンプライアンス(D)は次式のように表わせる。

$$D = \frac{\text{strain}}{\text{stress}} = \frac{4L/L}{F/A}$$

$4L/L$ は図8からわかるように、荷重 F により、元の長さに対して幼葉鞘がどれだけ伸びたかを示している(L は曲線の直線部分を考えた時、荷重ゼロの時の長さ)。 A は細胞壁の断面積で $M/L \cdot \rho w$ (M/L :単位長

図7. アベナ幼葉鞘の Instron による荷重—伸長曲線¹⁹⁾
第1回目の曲線からコンプライアンス (DT) を計算する。

図8. アベナ幼葉鞘の Instron による荷重—伸長曲線¹⁹⁾
第2回目の曲線から弾性的コンプライアンス (DE) を計算し、さらに DT (図7) から DE を減じて可塑的コンプライアンス (DP) を得る。

表3. 細胞壁の伸びやすさに対するオーキシンの影響*

幼葉鞘 個体番号	水				IAA			
	DP	DE	Ext-1	Ext-2	DP	DE	Ext-1	Ext-2
1	23.9	31.7	1.22	0.725	62.1	34.2	2.25	0.975
2	33.9	32.6	1.50	0.775	46.1	32.6	2.20	0.900
3	28.5	32.2	1.35	0.750	46.8	34.9	2.12	0.975
4	26.6	29.7	1.32	0.700	48.0	35.7	2.12	0.975
5	31.4	31.8	1.43	0.750	47.3	33.9	1.95	0.875
6	35.3	31.9	1.55	0.775	56.6	34.6	2.47	1.030
7	51.1	34.5	1.90	0.825	35.8	32.8	1.95	0.875
8	27.1	30.0	1.33	0.725	55.1	34.4	2.32	0.975
9	26.1	31.0	1.37	0.775	48.1	35.0	2.25	0.975
10	29.6	30.2	1.33	0.700	61.7	35.2	2.50	1.000
11	26.0	31.0	1.32	0.750	50.8	34.3	2.21	0.955
12	29.0	33.0	1.52	0.850	73.0	36.8	2.88	1.075
13	31.8	31.6	1.55	0.800	63.1	35.7	2.45	0.975
14	24.9	29.8	1.32	0.750	69.4	41.6	2.82	1.175
15	28.7	31.1	1.42	0.775	48.4	35.4	2.10	0.950
16	23.7	27.7	1.25	0.700	49.4	34.0	2.05	0.900
17	33.2	30.3	1.45	0.725	54.6	38.1	2.35	1.050
18	32.3	32.3	1.47	0.775	54.3	36.5	2.18	0.950
19	27.4	30.6	1.37	0.725	53.3	35.2	2.20	0.950
20	29.7	32.8	1.50	0.829	57.1	35.4	2.28	0.950
平均	30.0	31.3	1.42	0.759	54.1	35.3	2.28	0.974
標準誤差	±1.4	±0.3	±0.03	±0.010	±2.0	±0.8	±0.05	±0.016

* 水, 10mg/l IAA 2時間処理, 25℃, 暗所; 荷重は40gまで。

さあたりの乾重量 ρ_w : 細胞壁の密度, 1 とする) であらわす。こうすると図7の曲線 (図6の1st) から, 全コンプライアンス DT は:

$$DT = \frac{\Delta L/L}{F} \cdot \frac{M}{L} \cdot \frac{1}{\rho_w}$$

となり, 単位は cm^2/dyne となる。次に第2回, あるいは第3回, 第4回の曲線 (図6の2nd, 3rd, 4th...)

から弾性コンプライアンス DE を同様に定義するとができる (図8)

$$DE = \frac{\Delta L'/L'}{F} \cdot \frac{M}{L} \cdot \frac{1}{\rho_w}$$

可塑性コンプライアンス DP は両者の差:

$$DP = DT - DE$$

となる。細胞壁の力学的性質はその構造やいろいろな構成物によって複雑に規定されており、Cleland の DP , DE にもまだ検討の余地はあるが、現在のところ便宜上これら2つの値で細胞壁の可塑的および弾性的性質を表現している。

第2回の曲線から Olson らの方法で伸展性 (Ext-2) を求めれば、これは DE と比較して考えることができよう。したがって、第1回の曲線から得られる伸展性 (Ext-1) は $DP+DE$ に匹敵しよう。こうして、 DP , DE , Ext-1 および Ext-2 を測定した例を表3に示す。

この表から明らかなように、 DP , DE , Ext-1 および Ext-2 のいずれもオーキシン (インドール醋酸, IAA) で有意に大きくなる。値のばらつきは DP が他の値にくらべ著しく大きい。

得られる値は荷重 F や、引張り速度を変えると変動する。荷重が大きくなるに従って DE は小さく、 DP は大きくなる。また、引張り速度が大きくなると、 DP , DE は小さくなる。しかし、これらの要素の変動はオーキシン効果には直接影響しない。

生長と DP および DE の関係

Cleland は、オーキシンによって DE より DP がより顕著に変化することから (図9), 生長と DP の関係を詳しく調べている。アベナ幼葉鞘の伸長生長と DP の時間変化をくらべると、図10のようになる。

2% ショ糖を 10mg/l IAA に加えると (図10AS), 伸長生長は24時間直線的に進行する。ショ糖を加えず、IAA のみでは (A), はじめ約5時間は同様に伸長す

図9. アベナ幼葉鞘の荷重-伸長曲線に対するオーキシンの影響¹⁹⁾。
オーキシン (IAA: 5mg/l) 処理: 3時間。曲線から DT , DE , DP が計算できる。

図10. アベナ幼葉鞘の伸長生長と DP に対するオーキシンおよびショ糖の影響¹⁸⁾
W: 2.5mMK-maleate 緩衝液; S: 緩衝液 + 2% ショ糖; A: 緩衝液 + 5mg/l IAA; AS: 緩衝液 + 5mg/l IAA + 2% ショ糖

るが、その後伸長率は低下する。 DP をみると、ショ糖の有無にかかわらず、IAA は短時間で DP を増加し、そのまま24時間高い値を保持する。これに対して IAA を加えないものは、ショ糖の有無にかかわらず (緩衝液: W; ショ糖: S), ゆるい DP の低下を示す。したがって、ショ糖添加による5時間以後の高い伸長率は単に DP の変化では説明できない。

IAA による DP の増加は急速にみられ、約1~2時間で最高値に達する (図11)。

図11. DP に対するオーキシン作用の時間的経過¹⁸⁾
IAA: 5mg/l。

伸長生長を誘導する IAA の最適濃度は 1~10mg/l で、高濃度のオーキシンは阻害的であることは古くから知られている。図12にみられるように、100mg/l の IAA は 1mg/l の IAA ほど伸長生長を促進しない。しかし、 DP はむしろ高濃度の IAA によって大きい値を示している。このことから、高濃度のオーキシンの伸長生長に対する阻害的影響は、細胞壁の力学的性質に対する作用以外の作用によっていると考え

図12. オーキシン濃度と伸長生長および DP¹⁸⁾
K-maleate 緩衝液 + 2%ショ糖 ± 5mg/IIAA
オーキシン処理は5時間。

られる。

これらの実験においては、緩衝液に IAA を加え、組織切片を試験液に浮かして IAA の働きをみている。オーキシンによる伸長生長の誘導は10~15分の遅れのものおこることが知られている。したがって、数時間 IAA を与えて細胞壁の力学的性質の変化をしらべる場合、オーキシンによる伸長生長誘導のひきがねとなる細胞壁の変化だけでなく、伸長生長の結果が測定結果に含まれる可能性がある。つまり、伸長生長が2次的に細胞壁の変化に影響するおそれがある。伸長生長の2次的影響を防ぐ1つの方法として、高浸透価の溶液によって細胞の吸水を防いだ条件でオーキシンを働かすことができる。一般には0.25~0.30 モルのマニトール溶液をこの目的に用いる。マニトール溶液中に IAA を加えて組織をインキュベートし、一定時間後組織を IAA を加えない水に移すと、細胞は急激に吸水し、オーキシン前処理の効果 (Residual effect) が明瞭にあらわれる。²⁶⁾

図13. アペナ幼葉鞘の伸長生長と DP に対するオーキシンおよびマニトールの影響¹⁹⁾
IAA: 5mg/l; 5時間処理。

図13でわかるように、マニトール中では IAA は伸長生長を誘導することはできないが、DP は IAA によって有意に増加している。したがって、細胞の吸水を抑えた条件でも IAA は細胞壁の力学的性質を変化させ (DP の増大)、水に移すとオーキシン前処理の residual effect で吸水を示すと考えられる。

ここで問題が一つある。さきにのべたように、オーキシンによる伸長誘導は10~15分でおこり⁵²⁾、生長率は直ちに最大かつ一定になる。ところが、オーキシンによる DP の増加は20分後はじめて有意にみとめられ、1~2時間後ようやく最大一定値に達する。筆者は Tensilon を用いてこの点を検討してみた。²⁵⁾ 伸長生長の細胞壁に対する2次的影響を防ぐため、一部の組織にはマニトール存在下で IAA を与え、DP および DE の時間的変化をしらべた (図14, 15)。DP は、

図14. DP に対するオーキシンおよびマニトールの影響の時間的変化²⁵⁾。IAA: 10mg/l。

図15. DE に対するオーキシンおよびマニトールの影響の時間的変化²⁵⁾。IAA: 10mg/l。

マニトールのない場合 IAA 処理 1 時間以内に有意に大きくなり、急激な DP の増加が IAA 処理時間とともに続く。マニトール存在下では、IAA は 2 時間処理でようやく DP を有意に増加させる。マニトールのない時、DE はオーキシンによって徐々に大きくなるが、マニトール存在下では 30 分処理ですでに最大値に達する。これらの結果から次のことが考えられる。オーキシンによる伸長生長の誘導において、細胞壁の力学的性質の変化がひきがねになっているとするなら、それは DE の増加によって表現される。DP の増加も伸長生長にある役割を果たしていると思われるが、伸長生長誘導のひきがねにはなっていないらしい。

細胞壁ゆるみの機構

オーキシンによってひきおこされる細胞壁の伸びやすさの増加—ゆるみ—は、いままで述べたように、Instron や Tensilon を用いることによって、DP や DE という値で一応の数量化が容易にできる。オーキシンによる細胞の伸長誘導の機作を知ろうとすると、DP や DE の増加がどのようにしておこるか、を明らかにしなくてはならない。植物細胞がオーキシンの働きで伸長するとき、細胞壁にいろいろな生化学的変化がおこることが古くから報告されている。古くは細胞壁ペクチンのエステル^{27,28)}化や、ペクチンからの脱カルシウム²⁹⁾が細胞壁ゆるみをひきおこすと考えられていた。最近、オーキシンによって細胞壁の自己分解が促進され、それが細胞壁のゆるみすなわち伸びやすさの増加^{30~33)}をひきおこすと考えられるようになった。

Maclachlan^{34~36)} らは、エンドウ茎の先端を切除し、ラノリンに含ませたオーキシンを切口に塗付する条件では伸長生長はおこらず、太さの増加がおこることを認めている。このとき、セルラーゼの活性がオーキシンによって特異的に増加する。セルラーゼの活性増加はアクチノマイシンやタンパク合成阻害物質で阻害されるから、オーキシンが核酸代謝を通じてセルラーゼを de novo に合成させた、と報告されている。セルラーゼのほか、 β -1,3-グルカナーゼやペクチナーゼ、ペクチンエステラーゼの活性はオーキシンによって特異的に上昇しないので、エンドウ茎の太さの増加³⁶⁾という生長はセルラーゼで制御されているらしい。アベナ幼葉鞘の場合、オーキシンによる伸展性増加は、細胞壁をセルラーゼで処理しても影響されない¹⁶⁾。したがって、アベナでは、オーキシンが細胞壁成分の分解によって伸展性を増加しているとしても、それはセルラーゼを

介しているとは考えにくい。生きた幼葉鞘にセルラーゼを与えても伸長生長はかえって阻害される。³⁸⁾

筆者らの実験によると、細胞壁を³³⁾ ^{14}C -ブドウ糖で標識したアベナ幼葉鞘を IAA で処理すると、アルカリ可溶の細胞壁成分の標識が減少する。この部分の代謝回転がオーキシンによって速められることは、この成分の分解が伴っていることを意味している。アルカリ可溶な細胞壁成分は、一般にヘミセルロースと総称され、グルカン (β -1,3-および β -1,4-グルコシド結合をもつ)³⁷⁾主成分の 1 つである。Kivilaan^{30,38)} らも、トウモロコシ幼葉鞘細胞壁の自己分解産物が β -1,3-グルカン分解物であると報告している。筆者らはそこで菌核菌から分離した β -1,3-グルカナーゼ⁴¹⁾をアベナ幼葉鞘、エンドウ茎および大麦幼葉鞘に与えたところ、急速に伸長生長が誘導されることを見出した。また、大麦幼葉鞘およびエンドウ茎では、ヘミセルラーゼの活性がオーキシンによって増加する⁴¹⁾。細胞壁の伸びやすさの増加が、オーキシンの働きによって細胞壁成分(ヘミセルロース)の分解によるのであり、外から与えた微生物由来の細胞壁分解酵素(β -1,3-グルカナーゼ)が細胞壁成分を分解することによって伸長生長を誘導するなら、この酵素は細胞壁の伸びやすさを変えるはずである。この推論を確かめる実験を、Tensilon を用いておこなった。まず β -1,3-グルカナーゼ(β -G)による伸長生長の時間的経過をみると、図 16 のようになる。

このとき、前述のように、伸長生長におけるペクチンのエステル化の可能性をしらべるため、菌核菌から

図16. アベナ幼葉鞘の伸長生長の時間経過²⁵⁾
IAA: 10mg/l; β -1,3-グルカナーゼ: 0.1 unit/ml; ペクチンメチル エステラーゼ: 0.05 unit/ml

分離したペクチンメチルエステラーゼ(PM)も用いた。 β -G ははじめ急速に伸長生長を促進するが、1時間以後はあまり目立った促進を示さない。PM は単独ではほとんど影響を示さないが、 β -G と共存させると β -G の働きをほとんど相乗的に助ける。これらの酵素および IAA を 0.25M マニトール中で 30分および 60分間幼葉鞘に与え、その幼葉鞘をメタノール、プロナーゼ処理ののち Tensilon にかけて細胞壁の性質をしらべた(図17)。伸長生長を誘導するもの、すなわち IAA, β -G および β -G+PM は DP を有意には大きくしないが、DE を短時間の処理で増加させる。

これらの結果から、伸長生長の開始は DE の増加で表わされること、および、オーキシンは β -G や β -G+PM と同じような影響を DP, DE に与えることがわかる。PM が単独で DP を大きくすること

図17. DP, DE に対するオーキシンおよび酵素の影響²⁵⁾
アベナ幼葉鞘切片は0.25Mマニトール、30分→0.25Mマニトール+10mg/l IAA, 0.1 unit/ml β -1,3-グルカナーゼ, 0.05 unit/ml ペクチンメチルエステラーゼ処理をし、メタノールで殺す。プロナーゼ処理後 Tensilon を用いて DP および DE を測定。

は、細胞間のミドルメラを構成しているペクチン質に働いた結果による可能性がある。幼葉鞘のような多細胞組織を Tensilon で引張るとき、細胞間のズレが測定結果にきてくるだろう。また、幼葉鞘が伸長するときも、個々の細胞が吸水伸長するとき、細胞間のズレが組織全体の伸長を助けることも考えられる。オーキシンが伸長生長を誘導するときも同様のしくみが考えられる。

むすび

以上のべたように、Instron あるいは Tensilon のような引張り試験機を利用することにより、細胞壁の力学的性質を短時間に正確に測定記録することができるようになった。

実験法や結果の表示法にはまだ検討の余地があることは前述のとおりである。たとえば、組織に一定の荷重をかけた時の伸長の時間的経過は普通の引張り試験機では測定できないが、そのための附属装置をつけることは可能である。読者がお気づきのことを、どんなことでもお知らせ下さるようお願いする。いろいろ検討の余地があるにせよ、Olson らや Cleland の方法で、Instron や Tensilon を用いることによって、細胞壁の力学的性質に対するオーキシンの働きはかなりわかってきた。私達の研究室ではいま、細胞壁のモデルを考えつつある。化学的にはアベナ幼葉鞘の細胞壁は図18に示すような構造をしていると考えられている^{17,54)}。Tensilon による荷重-伸長曲線から細胞壁の力学的モデルを考えることは可能であろう。このような細胞壁模型に基づいて物理的な解析を試み、図18に示すような化学的モデルを用いて、細胞壁ゆるみの機作を分子レベルで解明したいと考えている。筆者らのこ

図18. 第1次細胞壁構造の模式図⁵⁴⁾

セルロース量のちがう細胞壁(右が若い細胞壁)において非セルロース性多糖類が細胞壁のかたさの保持に役立っている有機を示している。

のような研究は、まだスタートしたばかりだが、以下のことがわかりつつある。すなわち、細胞壁がゆるむためには、まず非セルロース性多糖類（ヘミセルロース）の分子的結合が切れなくてはならない。結合が切れたあと細胞壁成分の再合成がどのような役割を果たしているかはまだわからないが、まず多糖類の分解が開始する必要があるらしい。

MacLachlan^{35,36)}のセルラーゼのような例もあるように、細胞壁の酵素的分解はオーキシンが酵素の *de novo* の合成を促していることによっている可能性がある。オーキシン作用に核酸・タンパク代謝が関与している^{40,42~50)}ことは最近多くの研究者によって認められている。

伝令 RNA の合成を阻害するアクチノマイシン D はオーキシンによる伸長生長や RNA 合成を阻害するだけでなく、細胞壁の伸びやすさの増大も抑える^{52,53)}。また、タンパク合成阻害剤もオーキシンによる細胞壁の伸びやすさの増大を阻害する¹⁴⁾。これらの事実は、オーキシンによる細胞壁のゆるみが酵素（恐らく細胞壁成分分解酵素）の生合成を介しておくるという考えを強く支持する。エンドウ茎においてセルラーゼの合成がオーキシンで誘導されること^{34,36)}、エンドウ茎切片や大麦幼葉鞘切片においてヘミセルラーゼの活性がオーキシンによって高められることが知られているだけで、オーキシンによる酵素生合成誘導の証明はまだ十分でない¹⁹⁾。Cleland は、オーキシンは酵素の生合成をひきおこすというより、既存酵素の保護や細胞質から細胞壁への酵素の移動を助ける、と考えている。

このような生化学的解析のため、細胞壁の力学的性質のより正確な定量化が必要であろう。Lockhart のところみているような細胞壁のモデル化が Instron や Tensilon 法の結果に基づいて十分に行なわれることができれば、細胞壁の性質の力学的解析も正確にできるだろう。

筆者らの Tensilon による研究は、朝日科学奨励金によって行なったことを付記し、朝日新聞社に謝意を表する。

文 献

- 1) A.N.J. Heyn: Rev. Trav. bot. Néerl., 28, 1 (1931)
- 2) T. Tagawa and J. Bonner: Plant Physiol., 32, 207 (1957).
- 3) R. Cleland: Physiol. Plant., 11, 599 (1958)
- 4) S. Yoda and J. Ashida: Plant & Cell Physiol., 1, 99 (1960)
- 5) D. J. Morre and J. Bonner: Physiol. Plant., 18, 635 (1965)
- 6) A. Ursprung and G. Blum: Jb. wiss. Bot., 63, 1 (1924)
- 7) H. Burström: Ann. Agricult. Coll. Sweden, 10, 209 (1942)
- 8) H. J. Ketellapper: Acta Bot. Neerl., 2, 387 (1953)
- 9) R. Pohl: Physiol. Plant., 10, 681 (1957)
- 10) Y. Masuda: Plant & Cell Physiol., 2, 129 (1961)
- 11) A. N. J. Heyn: Protoplasma, 19, 78 (1933)
- 12) L. Brauner and M. Hasman: ibid., 41, 302 (1952)
- 13) R. D. Preston and J. Hepton: J. Exptl. Bot., 31, 13 (1960)
- 14) M., Black, C., Bullock, E. N., Chantler, R. A., Clarke, A. D. Hanson and G. M. Jolley: Nature, 215, 1289 (1967)
- 15) 増田芳雄: 生物科学, 13, 2 (1961), 植物生理, 5, 56 (1965)
- 16) A. C., Olson, J. Bonner and D. J. Morré: Planta, 66, 126 (1965)
- 17) 和田俊司: 日本植物学会第32回大会記録 (1967)
- 18) R. Cleland: Planta, 74, 197 (1967)
- 19) ...: Ann. New York Acad. Sci., 144, 2 (1967)
- 20) D. T. A. Lamport: Adv. Bot. Res. 2, 151 (1965)
- 21) H. Tamiya: Cytologia, 8 (1938) 一坂村徹: 植物細胞滲透生理から, 養賢堂 (1952)
- 22) J. A. Lockhart: in Plant Biochemistry, ed. J. Bonner and J. E. Varner. p. 826 (1965)
- 23) ...: C. Bretz, and R. Kenner: Ann. New York Acad. Sci., 144, 19 (1967)
- 24) ...: Plant Physiol., 42, 1545 (1967)
- 25) Y. Masuda: Planta (印刷中)
- 26) R. Cleland and J. Bonner: Plant Physiol., 31, 350 (1956)
- 27) J. van Overbeek: Ann. Rev. Plant Physiol., 3, 87 (1952)
- 28) E. F. Jansen, R. Jang, P. Albersheim and J. Bonner: Plant Physiol., 35, 87 (1960)
- 29) O. V. S. Heath and J. E. Clark: Nature, 177, 1118 (1956)
- 30) A. Kivilaan and S. Lee: Plant Physiol., 41, Suppl. ixix (1966)
- 31) G. A. MacLachlan and J. Perrault: Nature, 204, 81 (1964)
- 32) M. Katz and L. Ordín: Biochim. Biophys. Acta, 141, 126 (1967)
- 33) S. Wada, E. Tanimoto and Y. Masuda: Plant & Cell Physiol., 9, 123 (1968)
- 34) D. F. Fan and G. A. MacLachlan: Can. J. Bot., 44, 1025 (1966)
- 35) G. A. MacLachlan, E. Davies, and D. F. Fan: 6th Intern. Conf. Plant Growth Substances (1967)
- 36) A. H. Datko and G. A. MacLachlan: Plant Physiol., 42, 735 (1968)
- 37) F. W. Parrish and A. S. Perlin: Nature, 187, 1110 (1960)
- 38) S. Lee, A. Kivilaan, and R. S. Bandurski: Plant Physiol., 42, 968 (1967)
- 39) Y. Masuda, and S. Wada: Bot. Mag., 80, 100 (1967)
- 40) Y. Masuda: 7th Intern. Congr. Biochem., Symp. VIII-4, 1 (1967)
- 41) E. Tanimoto and Y. Masuda: Physiol. Plant., 21,

- 820 (1968)
- 42) Y. Masuda: *ibid.*, 12, 324 (1959)
- 43) L. D. Nooden and K. V. Thimann: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 50, 194 (1963)
- 44) J. L. Key, and J. Ingle: *ibid.*, 52, 1832 (1964)
- 45) L. D. Nooden and K. V. Thimann, *Plant Physiol.*, 41, 157 (1965)
- 46) P. Penny and A. W. Galston: *Amer. J. Bot.*, 53, 1 (1966)
- 47) J. L. Key, N. M. Barnett and C. Y. Lin: *Ann. New York. Acad. Sci.*, 144, 49 (1967)
- 48) Y. Masuda: *ibid.*, 144, 68 (1967)
- 49) J. H. Cherry: *ibid.*, 144, 154 (1967)
- 50) Y. Masuda, E. Tanimoto and S. Wada: *Physiol. Plant.*, 20, 713 (1967)
- 51) Y. Masuda and E. Tanimoto: *Plant & Cell Physiol.*, 8, 459 (1967)
- 52) Y. Masuda and S. Wada: *Physiol. Plant.*, 19, 1055 (1966)
- 53) J. Coartney, D. J. Morre and J. L. Key: *Plant Physiol.*, 42, 434 (1967)
- 54) P. A. Roslofsen: *Adv. Bot. Res.*, 2, 69 (1965)

研究体制の公聴会

日 時 昭和43年10月8日午後1～2時
場 所 第7回年会 東大経済学部第一教室

・会誌本号掲載の生物物理学研究所案をもとに、研究所問題に関する公聴会を開きます。多数出席の上、積極的なご意見をお寄せ下さい。

研究体制委員会

昭和43年度総会開催通知

日 時 昭和43年10月8日 午後2～3時
場 所 第7回年会 東大経済学部第一教室
議 題

- ・昭和43年度事業報告および42年度決算、43年度会計中間報告
- ・昭和44年度事業計画および44年度予算