

セルロースの生合成における最近の進歩*

伊 東 隆 夫**

Recent Advances in the Biosynthesis of Cellulose*

Takao Itoh**

(昭和60年9月19日受理)

I. はじめに

セルロースが世界中で最も豊富な有機物質であることは古くより知られている事実であるが化石資源の枯渇化が叫ばれる昨今において、改めてセルロースの生物高分子 (biopolymer) 資源としての重要性が見直されてきている。

セルロースはバクテリアから高等植物に至る様々な生物によって生産されるが、とりわけ木材中に多くの畜積がみられる。木材細胞の一次壁中ではセルロースはヘミセルロース、ペクチン、タンパク質等のマトリクス中にマイクロフィブリルの形をなして分散しており、強度と伸展性を合わせ持っている。一方、二次壁ではマトリクスの割合は減少し、高結晶性のセルロースマイクロフィブリルの交差ラメラの堆積ならびにリグニンの沈着により引張強度と剛性が付与される。このようにして畜積されるセルロースは木材中の40%余りを占め、細胞壁中で最も有用な成分であり、紙・パルプ・その他のセルロース原料としてきわめて重要な資源となっている。

ところがセルロースが生体によってどのようにして生成されるのか、すなわちセルロースの形成の仕組みについては十分解明されていない。これはセルロースという物質が生体によって生成されるのが当り前のように考えられ、その成因に余り目を向けて来なかったことも原因しているのではなからうか。セルロースの応用面の研究もさることながら、セルロースの成因に立ち入ってこそ、生体高分子としてのセルロースを一層深く理解でき、引いては天然資源であるセルロースの合理的かつ有効な保続的利用に資するものと考えられる。

本稿ではセルロース研究の歴史に始まり、これまでに知られているセルロースの諸性質について簡単に触れ、主として最近明らかにされてきている原形質膜上のセルロース合成顆粒体の性質とそれのセルロースマイクロフィブリル形成との関連性について既往の成果を検討した。

II. セルロース研究の歴史的背景

Nehemiah Grew は1682年に既に植物細胞壁中にリボン状の繊維を観察しているがセルロースの物理・化学的性質の研究は19世紀以降の光学機器および技法の進歩に待たなければならなかった。すなわちアクロマティック対物レンズは光学顕微鏡の分解能を大幅に改良し、偏光顕微鏡は光学顕微鏡の分解能を超える構造の解析を可能にした。

Anselme Payne は酸の加水分解やアルカリ処理に強い植物の構造物はデンプンと異性体の有機分子からなるとした。この Payne の研究を検討したフランスアカデミー委員会によってこの分子に“セルロース”

* 第40回木研公開講演会 (昭和60年5月10日, 大阪) において講演。

** 木材生物部門 (Research Section of Wood Biology)

という名前がつけられた (Schwenker, 1978)¹⁾。ここにセルロースの研究が始動したのであるがまず最初に挙げられる研究者は Carl von Nägeli である。同氏はデンプン粒の膨潤および偏光顕微鏡でのデンプンとセルロースの複屈折の観察によりデンプンとセルロースの結晶化度を推定した上で植物細胞壁中では小さなセルロース分子が粒状結晶ミセルとして集合し、これが規則的に並んでいるといういわゆる“ミセル説”を提唱した。

化学的にはセルロースは当初高分子だとは考えられず、共有結合よりもファンデルワールス力による小さな分子の集合によって生ずるコロイド状態にあると考えられていた。セルロースが高分子であるのは粘度測定法や超速心法を用いて高分子量の測定を行なったことおよび正確なメチル化分析によってわかってきた。

このようなセルロース高分子からなる細胞壁が機械的あるいは化学的に 100~1,400 nm 幅のフィブリルにこわれることが報告されたが、このフィブリルが真の構造なのかあるいは単に構造上の弱い部分の線にすぎないのかははっきりしなかった²⁾。すなわち当時X線回折によって得られるデータの上限である 0.5 nm より大きく光学顕微鏡の分解能の 250 nm より小さい構造については推論の域を越えなかった。このギャップを埋めるには電子顕微鏡の開発を待たねばならなかった。ワタでつくられたる紙の無染色の電子顕微鏡写真が1940年に発表され^{3,4)}、続いて得られたバクテリアセルロースの高分解能写真は同セルロースが長細い 20 nm 幅の糸からなることを示した⁵⁻⁷⁾。電子顕微鏡用の試料作製技法の一つであるメタルシャドウイング法が開発されて以後、セルロースの構造研究は一段と進歩した。すなわちこの方法は当時観察できなかった植物や藻類の細胞壁中の個々のフィブリル(マイクロフィブリル)を可視化できた。このマイクロフィブリルがセルロースであることは電子線回折法によって確認された。当初セルロースマイクロフィブリルはいずれも 25~30 nm の直径を有すると考えられていたがその後の研究では後に触れるようにマイクロフィブリルの幅は種によって異なり 2~30 nm と多様であることがわかってきた。そして今や in vitro でセルロースが合成されようとしている。

III. セルロース生産生物

どのような生物がセルロースの構造ならびに生合成の研究に用いられてきたかを調べることによってセルロース生産生物に関する大雑把な概念が得られるであろう(表1)。

表1 セルロース生産生物

MYCOTA		<i>Micrasterias</i>
Bacteria	<i>Acetobacter</i>	<i>Closterium</i>
Slime mold	<i>Diclyostereum</i>	<i>Spirogyra</i>
	<i>Acytosterialia</i>	Mosses <i>Funaria</i>
	<i>Polysphondylium</i>	Higher plants <i>Psilotum</i>
Fungi	Oomycetes	<i>Equisetum</i>
	Ascomycetes	<i>Ginkgo</i>
PLANTAE		Pine seedlings
Algae	<i>Glaucozystis</i>	Corn roots, coleoptiles
	<i>Pleurochrysis</i>	Radish roots, protoplasts
	<i>Fucus</i>	Mung bean hypocotyls
	<i>Oocystis</i>	<i>Gossypium</i> (cotton fiber)
	<i>Vaucheria</i>	ANIMALIA
	<i>Eremosphaera</i>	Protozoa <i>Acanthamoeba</i>
	<i>Chaetomorpha</i>	Prochordata <i>Tunicates</i>
	<i>Valonia</i>	

菌界ではバクテリア、粘菌類、菌類などにセルロースを生産する生物が知られている。

1. バクテリア

とりわけ酢酸菌の一種である *Acetobacter xylinum* が有名で Hestrin⁸⁾ の研究以来セルロースの研究に頻繁に用いられてきている。

2. 粘菌類

この仲間は光合成をしない原核生物 (eucaryotes) として知られておりその中でセルロースを形成する生物として *Polysphondylium pallidum*, *Dictyostelium discoïdum*, *Acytostelium leptosomum* が知られている⁹⁻¹²⁾。

3. 菌類

下等菌類の仲間の Oomycetes と Hyphochytridiomycetes がセルロースを生産することが知られており¹³⁾, さらに高等菌類に属する Ascomycetes の仲間もセルロースを生産することが知られている¹⁴⁾。

植物界にはセルロース性の細胞壁を有する種類が多く藻類もその例外ではない。地衣類やコケ類もセルロースを生産するがセルロース生産量で最も多いのは高等植物群である。

4. 藻類

緑藻類の仲間は低セルロース壁を有することが知られており *Valonia*¹⁵⁾ を始め *Boergesenia*¹⁶⁾ *Boodlea*¹⁷⁾, *Oocystis*¹⁸⁾, *Chaetomorpha*¹⁹⁾, *Micrasterias*²⁰⁾ *Closterium*²¹⁾ 等でセルロースマイクロフィブリルの構造並びに生合成の研究が幅広く行なわれてきている。さらに褐藻類の *Fucus*, *Pelvetia*²²⁾ や *Pleurochrysis*²³⁾ もセルロースを生産する。特に *Pleurochrysis* は、外衣としてセルロース性の scale を有しておりセルロース生合成に関して、特徴的な生物として注目されている。

5. 地衣類・コケ類

これらの仲間はセルロースを有しているはずであるがセルロースの研究材料としては余り用いられてはいない。

6. 高等植物

樹木 (木材) がこのグループに属する関係上、セルロースの蓄積量は他のグループに比べて圧倒的に多い。それゆえに高等植物に関してのセルロースの性質ならびに生合成経路を明らかにしたいとする傾向が研究者にみられる。従って表 I に示されているように非常に多くの種類がセルロースの研究に用いられてきている。特にワタ (*Gossypium hirsutum*) の繊維細胞は90%以上のセルロースからなる壁を有することにより、高等植物の中でも最も頻繁にセルロースの研究に用いられてきている。

動物界にもセルロース生産生物の存在することが知られており、それらはアメーバ類の一部とホヤ類にみられる。

7. アメーバ類

原生動物の中のアメーバ類に属する *Acanthamoeba castellanii*²⁴⁾ がセルロースを生産することが知られている。

8. ホヤ類

軟体動物のホヤ類の仲間にセルロースを生産する生物が知られており²⁵⁾, そのマイクロフィブリルの形態については Wardrop によって詳しく報告されている²⁶⁾。

以上にみてきたように、セルロース生産生物は、菌界、植物界、動物界の三界に広く分布しており、幅広い生物群においてセルロースが生産されることがわかるであろう。その中でも、酢酸菌、バロニア、ワタ (繊維) は過去において最も頻繁に天然セルロースの研究に用いられてきたまた現在でもよく用いられておりセルロース生合成の研究に欠かすことのできない生物と言える。

IV. セルロースマイクロフィブリルの寸法

セルロースは言うまでもなく D-グルコースが β -1,4グリコシド結合した直鎖状高分子、すなわち β -D-

(1,4)-グルカンであり分子間ならびに分子内で OH 基を介在して水素結合することにより強固な結晶構造を形成し、さらに立体的に規則的な高次構造をとっている。

表2に示したようにこれまでに報告されている最小のフィブリルは 1.5 nm でサブエレメンタリーフィブリルと呼ばれ, Quince slime²⁷⁾ や形成層細胞²⁸⁾で観察されている。また, 高等植物細胞の一次壁では 2.0~2.5 nm, ワタやラミーでは 5~6 nm の結晶の幅を有する²⁹⁻³¹⁾。セルロースの研究に古くより用いられているバクテリアマイクロフィブリルは Nieduszynski and Preston³²⁾によれば 7.5 nm, また, Brown ら³³⁾によれば 1.6~5.8 nm の値が得られている。一方動物界に属するホヤの一種のセルロースマイクロフィブリルでは 12~13 nm と比較的大きい値が報告されている²⁶⁾。バクテリアセルロースに匹敵するくらい古くよりセルロース研究の標準的な材料として用いられているバロニアについては Caufield³⁴⁾によれば 12~14 nm, Harada and Goto³⁵⁾によれば 15~20 nm × 7~10 nm, Preston³⁶⁾によれば 15~35 nm (平均 25 nm), Itoh and Brown³⁷⁾によれば 12~20 nm となっており, 大まかに 20 nm と考えられる。さらに *Chaetomorpha* や *Boergesenia* ではバロニアよりも大きい約 30 nm という値が報告されている^{36,38)}。これらの結果をまとめた表2から一見してわかるようにマイクロフィブリルの幅は生物の種類によって, また同一細胞でも生長段階の違いによって異なり, セルロースが多様性に富んだ一面が伺える。

表2 異なった生物におけるマイクロフィブリルの幅

Organism	Microfibril Width (nm)
Wood cambium	1.5
Primary Wall of Plants	2-2.5
Secondary Wall of Wood	5-10
Quince Slime (<i>Cydonia vulgaris</i>)	3-5
Cotton & Ramie	5-6
Bacteria	7.5
"	1.6 × 5.8
Tunica	12-13
Valonia	20
Boergesenia & Chaetomorpha	30

これに反して, ミクロフィブリルよりもさらに小さな単位の 3.5 nm の大きさのエレメンタリーフィブリルが酢酸菌, 高等植物一次壁, 大きなマイクロフィブリルのほぐれた個所にみられることからエレメンタリーフィブリルがあらゆる生物から生産される天然セルロースの基本単位となっておりミクロフィブリルの大きさの違いはエレメンタリーフィブリルの数と詰り具合 (packing) によっている (Blackwell and Kolpak, 1976)³⁹⁾ と考えられた。しかしエレメンタリーフィブリルはマイクロフィブリルの ① 湾曲しているところ, ② こわれたところ (fractured ends), ③ 超音波処理や摩擦によって分散したところ, ④ 引き伸ばされたり変形したところによくみられるので, 機械的アーティファクトによって生じたものであろうと考えられるようになった。また, サブエレメンタリーフィブリルが ① ホモジナイズしたワタのリントー (1.0~1.5 nm)⁴⁰⁾ ② quince slime (0.8~1.0 nm)²⁷⁾, ③ 樹木形成層や超音波処理したバロニア (1.0~2.0 nm)²⁸⁾, ④ 一次壁 (2.0~2.5 nm)⁴¹⁾ や *Pleurochrysis* (1.2~1.6 nm)⁴²⁾, ⑤ タバコプロトプラスト (1.2~1.4 nm)⁴³⁾ でみられるのでエレメンタリーフィブリルがセルロースの基本構造と考えることに対して疑問を抱く研究者が多い。X線回折法によって 3.5 nm の結晶に帰属する小角散乱のデータが得られないこともエレメンタリーフィブリル説に反する事実として挙げられるであろう。特に, 最近杉山ら⁴⁴⁾が初めて観察に成功したバロ

ニアマイクロフィブリル横断面の結晶微細構造ではエレメンタリーフィブリルの存在は認められず幅 20 nm のマイクロフィブリルが基本単位になっているという結果はマイクロフィブリル内の分子鎖配列を理解する上に貴重な貢献をした。

V. ミクロファイブリルの重合度

ところでマイクロフィブリル内ではグルコースが長さ方向にいくつぐらい連なっているのだろうか、これを知るには重合度を調べてやればよい。表 3 はいろいろな生物からのセルロースの重合度を示す。バクテリアは研究者によって多少結果が異なるが比較的小さな値を示す^{45,46)}。ワタでは伸長中のものは 2,000～6,000 と重合度の範囲が広いがワタの二次壁では 13,000～14,000 とほぼ一定の高い重合度値を示す⁴⁷⁾。木材中のセルロースは裸子植物起源であろうと被子植物起源であろうと 8,000 余りというほぼ同じ重合度値を示す⁴⁸⁾。中でもバロニアは 26,500 という著しく高い重合度の値が得られている⁴⁹⁾。グルコース分子の主軸方向の長さは 5 Å であるのでバロニアのグルコース鎖の長さは 13 μm 強に過ぎない。実際のバロニアマイクロフィブリルの長さはこのグルカン鎖の長さよりもはるかに長いので一本のマイクロフィブリル内に分子鎖がと切れている部分が必ず存在するはずである。すなわち、マイクロフィブリル形成過程で分子鎖の合成が終りかつまた再開する。マイクロフィブリル内にそのような末端が存在することは Mühlethler によればマイクロフィブリル内の非晶域が原因と考えられている。セルロース生合成の間に何によって分子鎖の始まりや終りが規制されるのかについては現在のところまったくわかっていない。

表 3 異なった生物における重合度

Material	d.p. of cellulose
<i>Acetobacter xylinum</i>	2,000–3,700; 5,700
<i>Gossypium hirsutum</i> (cotton fiber)	
Primary cell wall	2,000–6,000
Secondary cell wall	13,000–14,000
<i>Acanthamoeba castellani</i>	2,000–6,000
<i>Valonia</i>	26,500
Seed hairs	10,350
Bast fibers	9,550
Wood from angiosperms	8,200
Wood from gymnosperms	8,450

VI. ミクロファイブリル内の分子鎖配列

フィブリル状構造を有するセルロースの高次構造を一層詳しく調べるにはどうしても X 線によって解析してやらなければならない。

セルロースの X 線回折図はすべての fiber pattern 同様分散し、回折スポットが line broadening や arching を示す。こういった特徴はフィブリルの結晶構造が不完全であることを物語る。赤道面上の line broadening は子午線上の line broadening よりも大きく、従って一本の繊維内のセルロース結晶の長さは幅よりも大きい。回折スポットの arching は繊維軸内での結晶の不完全な配列を表わしている。回折図のデータを説明するためにマイクロフィブリルの構造に関する様々なモデルが考えらてきた。初期の X 線解析学者は Nägeli のミセル説を修正して直鎖セルロース (extended cellulose chains) が 5×60 nm の個々の結晶ミセルをつくりこれが集合してフィブリルになると仮定した^{51,52)}。やがて分子量の決定によりセル

ロース分子は 60 nm よりも長いことがわかり、散乱X線回折図は長い鎖が格子の完全度の違う領域を通過するものからなることによって説明がついた。これに基づきマイクロフィブリルの構造についての総状ミセル説 (fringe micell model) が仮定されたがこれは長い鎖が繊維軸に沿って結晶部と非晶部とを交互に通過するというものであった⁵³⁾。

電子顕微鏡が開発されて以後マイクロフィブリルの構造はさらに詳細に調べられ Frey-Wyssling (1954) はマイクロフィブリルが4本 (1本の大きさは 3×7 nm) の直線上の結晶からなり非晶性のマトリクス中に埋め込まれていると仮定した⁵⁴⁾ (図1)。さらに Frey-Wyssling and Mühlethaler (1963) は 3.5 nm 幅の elementary fibril が規則的に並んだものからマイクロフィブリルが構成されていると考えた⁵⁵⁾。これに対して、Preston and Cronshaw (1958) は一本のマイクロフィブリルはただ一つの結晶芯を有しこれがセルロースやヘミセルロースの非晶性マトリクスで囲まれていると仮定した⁵⁶⁾ (図1)。Mühlethaler によればはっきりとした非晶領域はモデルには必要ないとしている⁵⁰⁾。一方 Stöckmann (1972) によればマイクロフィブリル内の非晶性領域は重合と結晶化が同時に行なわれるときの結晶格子の周期的な再配列によって生じるとされている⁵⁷⁾。

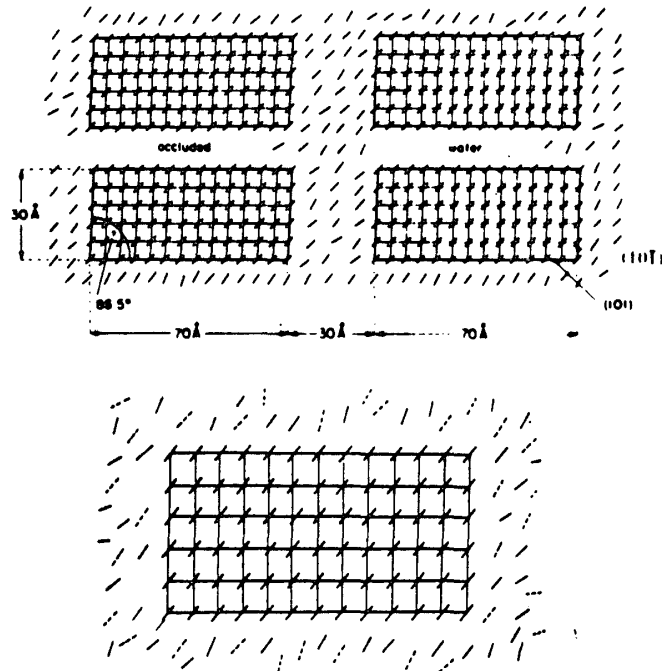


図1 Frey-Wyssling (1954)⁵⁴⁾ によるマイクロフィブリルの構造モデル。1本のマイクロフィブリルは4本の結晶部分とそれを取りまく非晶部分からなる (上側)。Preston and Cronshaw (1958)⁵⁶⁾ によるマイクロフィブリルの構造モデル。1本のマイクロフィブリルはただ一つの結晶芯を有する (下側)。

上記のモデルはすべて直鎖グルカンを念頭に置いたものであるが Meyer and Misch (1937) は統計上の理由によりセルロースが逆平行鎖を有すると仮定している⁵⁸⁾。ところが逆平行鎖モデルによってマイクロフィブリルができるには2つの異なった酵素が必要となるという制約がある^{59,60)}。逆平行鎖を説明するものに折りたたみモデルがあり合成ポリマーやセルロース誘導体によくみられる^{61,62)}。しかしこのモデルは Muggli ら (1969)⁶³⁾ により否定されるに至った。

現在では天然セルロースマイクロフィブリルが平行な直鎖分子を有するとする考え^{64,65)}が有力となっている。

VII. セルロースの生合成過程および前駆体

これまでに述べてきたようにセルロースは様々な生物で生産され、マイクロフィブリルの大きさも種によって様々である上に重合度も異なる。この変異をセルロースの生合成過程にさかのぼって見た場合果してどのような共通性があるのかが明らかになるであろう。

セルロースの生合成過程は大きく3つに分けて考えることができる。

1. 高分子ポリグルカン鎖の重合
2. グルカン鎖の結晶化
3. ミクロフィブリルの配向決定

①の過程は当然セルロースの前駆体は何なのかという問題を含んでいる。セルロースの前駆体は活性型(activated form)で存在し、最も一般的な活性型の糖の供与体としては糖スクレオチド二リン酸で、中でも GDPG が当初セルロースの前駆体だと考えられた^{66,67)}。

しかし①植物体中の GDPG のレベルはきわめて少ない。すなわち Carpita and Delmer⁶⁸⁾によると分化中のワタの繊維に GDPG がみられず、放射性同位体を用いた実験でも GDPG にラベルがみられなかった。

② UDPG のプールは容易にラベルされ急速な代謝回転を示す。

③ 放射性的 GDPG のグルカンへの取り込みはほんの2~3分だけ直線関係にあり、ときに、GDP マンノースを加えると取り込みが促進されるがこの条件ではグルコンマンナンができる⁶⁹⁾(これに関連して Delmer ら⁷⁰⁾はワタの繊維で GDPG と β -(1 \rightarrow 4) グルカン合成酵素は繊維の伸長期すなわち一次壁形成期の間だけ活性が高く二次壁のセルロース合成が始まると急速に活性が落ちるとしている)。

これらの理由により、比較的最近までセルロースの有力な前駆体と考えられていた GDPG の役割は否定されてきている。

これに反し UDPG がセルロース前駆体であることは確からしい、UDPG からアルカリ不溶の β -(1,4)-グルカンが *in vitro* で合成されたという最初の報告は酢酸菌 (*A. xylinum*) の膜標品を使った Glacer の研究⁷¹⁾にさかのぼる、この観察例は他の研究者によっても何度も繰り返し報告されてきている。ところが高等植物についてはあいまいな点が多く UDPG からの *in vitro* でのセルロース合成の研究の多くは生成物を十分調べずに行なわれた。また近年高等植物では β -(1,3)-グルカンのカロールが wound polymer として生じ β -(1,3) グルカン合成酵素がどの植物細胞にも潜在しており傷害によって活性化されかつ細胞摩擦抽出物 (Cell-free extracts) の調製過程で活性化されることがわかってきた^{72,73)}。Maclachlan ら⁷⁴⁾は高 UDPG 濃度では β -(1,3) グルカンができるが低 UDPG 濃度では β -(1,4) グルカンが増加するとしている。

要するに plant extracts を使って UDPG からのセルロースの *in vitro* 合成は高等植物では証明されたとは言えない。キチンの合成については *in vitro* のマイクロフィブリル生成物が化学的にも特徴づけられておりカイトゾームという細胞小器官によってキチンマイクロフィブリルが形成されることが知られている⁷⁵⁾。さらに生成物は電顕やX線回折によってキチンであることが確認されているがセルロース合成についてはキチン合成と異なり不明確な点が多く残されている。

結論として、*A. xylinum* での *in vitro* と *in vivo* の研究、他の下等生物での *in vitro* の研究から UDPG が恐らくはセルロース合成に関与する β -(1,4) グルカンの前駆体であろうと考えられるが高等植物については GDPG, UDPG いずれについても *in vitro* の証拠は明確でない。しかし UDPG のレ

ベルやその合成能は高等植物の組織細胞で高く、in vivo のラベル実験でも UDPG が高等植物セルロースの前駆体であることを支持している。

VIII. セルロース生合成の場所

これらの成果を考慮してセルロース生合成経路を考えるなら、緑色植物では光合成によって生じたグルコースあるいはシクロロースを利用源とし、また光合成を行えないバクテリアでは周囲の環境から手に入るグルコースを利用して、図2⁷⁶⁾に示されたようないくつかの生化学的反應過程を経由して、活性型の糖である UDPG になり、これから直接にあるいは糖脂質や糖タンパク等の中間体を経て高分子グルカンが形成されるようである。この際に当然のことながらグルコースが重合して高分子グルカンが形成されねばならないし、さらにこれらが結晶化してグルカン鎖の束としてのマイクロフィブリルとなるのであるが、そのような一連の重合、結晶化の行なわれる場所は原形質膜である。原形質膜は脂質とタンパク質からなる厚み約百オングストロームの薄い膜であるがこの膜の中にセルロース合成にあずかるとされる酵素顆粒体が埋め込まれている。電子顕微鏡による注意深い観察結果と Singer and Nicolson⁷⁷⁾らによる流動モザイク説とに基づいて、顆粒体自身が原形質膜中を移動することによってセルロースマイクロフィブリルが後に残されるように形成されることが最近明らかになってきた。バクテリアでは細胞の外で、正確には細胞から少し距離を隔った位置で重合、結晶化することによってマイクロフィブリルが形成されると広く信じられていたが^{7,78~80)}、最近になってバクテリアにおいても細胞膜上の一列に並んだ顆粒体(図3)によってセルロースが合成されることが明らかになった^{33,81)}。しかしながら褐藻類の一種である *Pleurochrysis* では細胞内のゴルジ体という

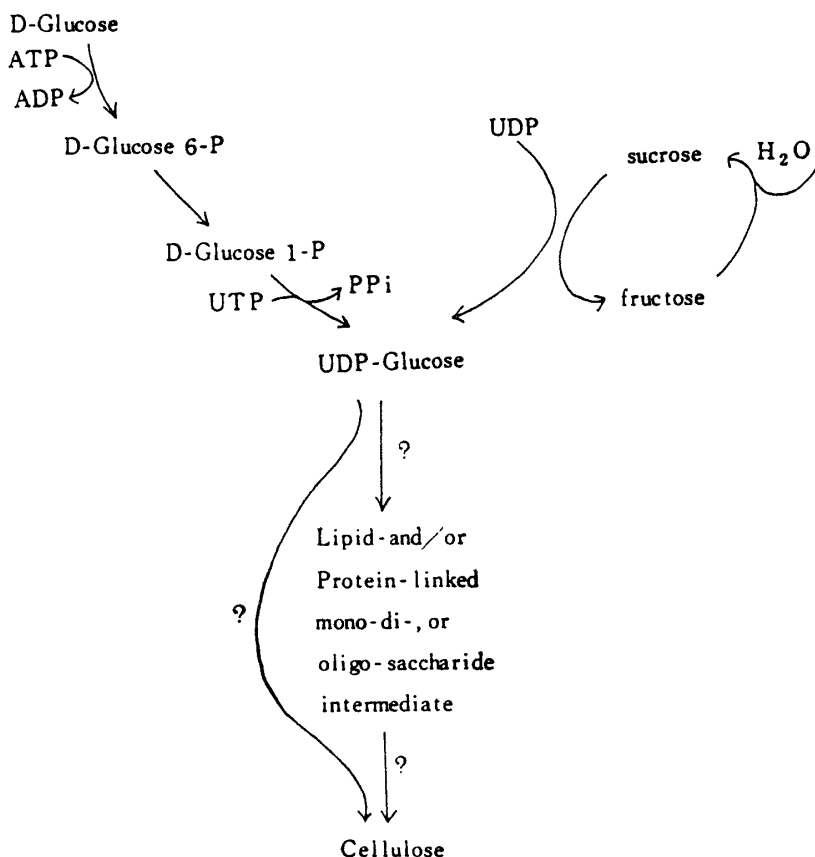


図2 セルロース生合成の経路⁷⁴⁾



図3 *Acetobacter xylinum* の細胞膜上にみられる顆粒列。一列に並んでおりこれらの働きによりバクテリアのセルロースリボンが形成されると考えられている。

細胞小器官の中でセルロースフィブリルがあらかじめ形成されることが証明されており⁴²⁾ (図4), これが原形質膜上ではなく細胞質内でマイクロフィブリルの形成される唯一の例外となっている。

しかしながら *Pleurochrysis* 以外のセルロース生産生物, たとえば高等植物細胞においてゴルジ体内である程度重合したセルロース鎖ができている可能性は十分残されている。この点をより明確にするにはゴルジ画分の精密な化学分析結果を待たねばならない。

IX. セルロース合成顆粒体 (Terminal Synthesizing Complex; TC)

以前は植物やバクテリアのセルロースで見られるマイクロフィブリルの大きさはほぼ同じであることにより生きている細胞質の働きによってセルロースの結晶化がコントロールされているのだと考えられ, さらにパロニアのような海藻で配列のそろったマイクロフィブリルが直交して交差構造をとることはマイクロフィブリルが細胞の指示どおり原形質膜上で生産される証拠だと考えられた。Ranby (1952)⁸²⁾ はセルロースが準安定状態にあるのでセルロース I はグルカン鎖が溶液から結晶化してできるのではなく特殊な酵素系の作用によると考えた。こうしてセルロース生合成の研究は細胞質および原形質膜に注意が注がれフィブリルの結晶化と壁の堆積の機構を探すことに力点が置かれるようになった。

これまでいろいろな方法を駆使してセルロース合成顆粒体を可視化する試みがなされてきたが植物細胞壁の最初のシャドウレプリカが電顕でみられて間もなく Preston ら^{83,84)}により凍結乾燥されたパロニア細胞壁最内層にマイクロフィブリルの末端と結びついた原形質残渣が認められこれがフィブリルの堆積に関与する構造物だと仮定された。

海藻 *Chaetomorpha* での同様の観察により, 同氏はセルロース生合成についての“Ordered granule hypothesis”を提唱し⁸⁵⁾, サブユニット顆粒が直方体状に詰った原形質膜合成顆粒の三次元的配列を考えた(図5)。

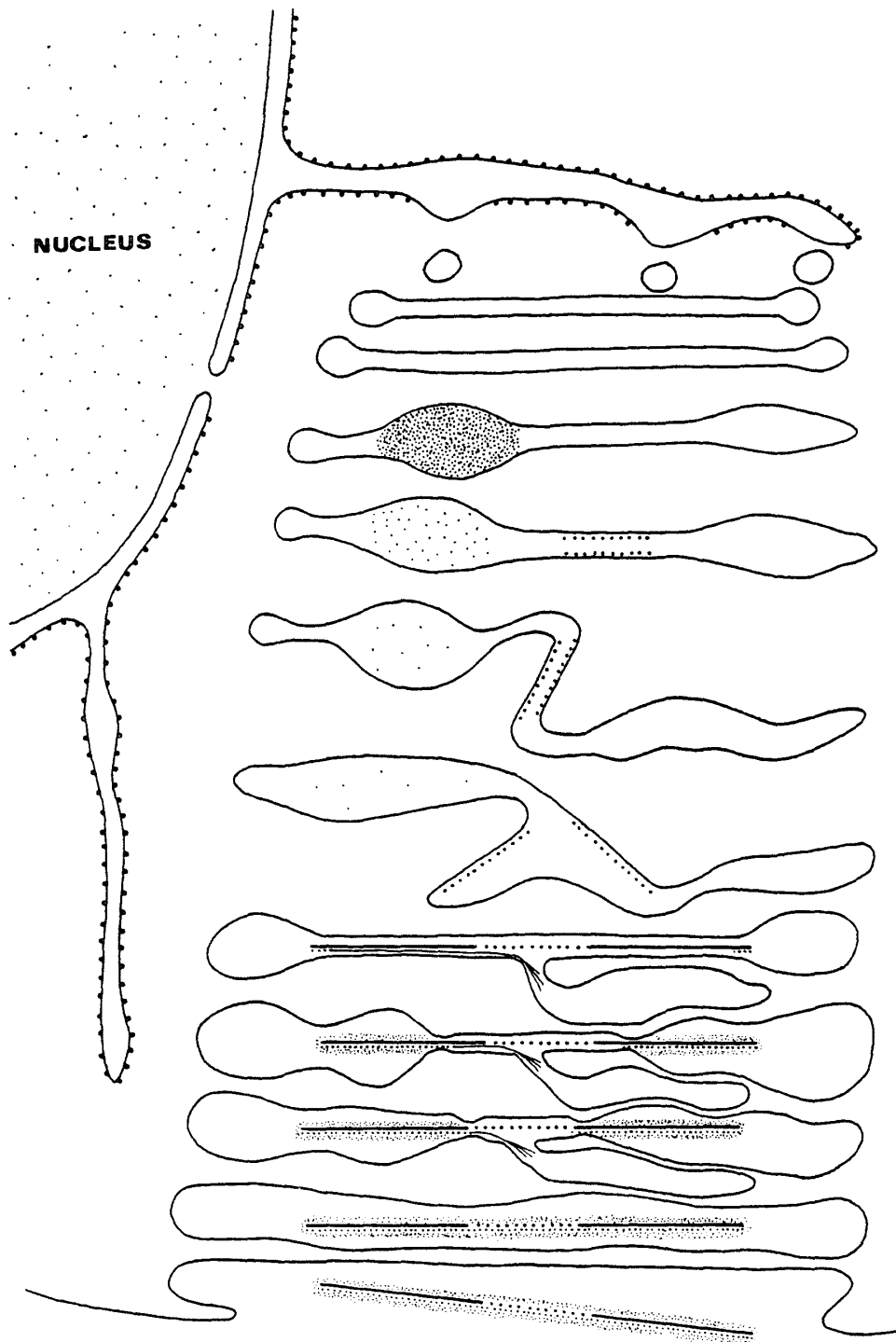


図4 *Pleurochrysis* の一種でセルロースマイクロファイブリルがゴルジ小胞内で熟成することを示す²³⁾。

新たに開発されたフリーズエッチング法を用いて酵母原形質膜上に六角形に配列した顆粒が観察され、そこからグルカンファイブリルが伸び出していたのでこれは Preston の仮説を支持するものと考えられた⁸⁶⁾。同様の機能を有する顆粒がその後セルロース性の壁を有する藻類の原形質膜にみられたが高等植物にはみら

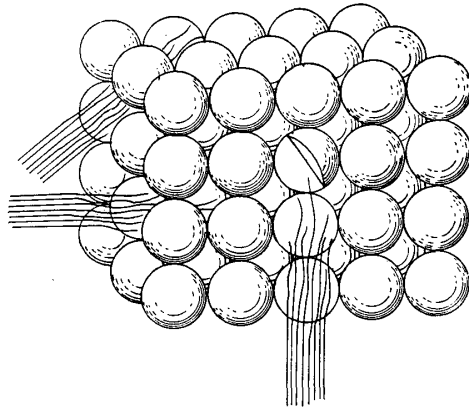


図5 Preston⁸⁵⁾による“ordered granule”説。サブユニット顆粒が立方体状に並び3方向にマイクロフィブリルが形成されると考えられた。

れなかった⁸⁸⁾。Mühlethaler はそのような機能を有する顆粒体は原形質膜面に直角に1本のマイクロフィブリルを合成するが Preston (1964) によって言われたようなマイクロフィブリルを方向づけることはしないと提唱した⁵⁰⁾。

このようにマイクロフィブリルの合成とその配向が別々にコントロールされることはマイクロフィブリルを方向づけると仮定された微小管の役割とよく一致した^{88,89)}。

考えとしては Mühlethaler や Staehelin & Probine らの説明で正しかったが初期のフリーズエッチング研究で観察された顆粒体はフリーズエッチング前にグリセリンのような凍結防止剤を細胞に加えることによって生じたものでありいま一つセルロース合成顆粒体を可視化するには至らなかった。その後凍結防止剤を使わずに急速に凍結されたセルロース合成細胞のフリーズエッチングによって藻類や高等植物で今まで

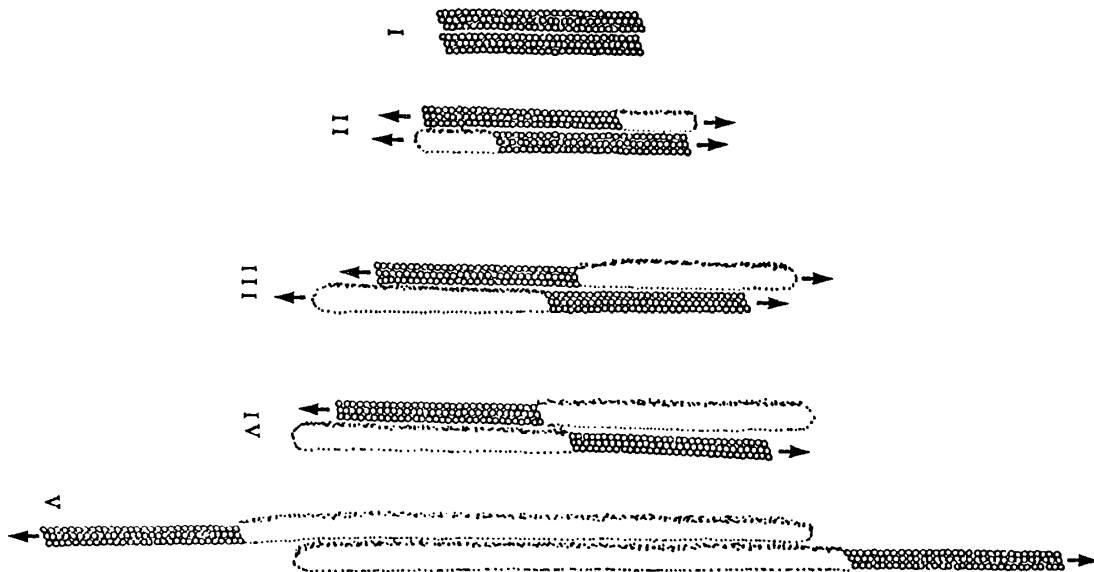


図6 *Oocystis apiculata* の原形質膜面に存在する TC で、TC は原形質膜内を I → II → III → IV → V の順で移動し、その跡に形成されたマイクロフィブリルが残る⁹⁹⁾。

りも一層明白なかつ説得力のある詳細なモデル¹⁸⁾が提唱されてきている。このモデルで以前の仮説と異なる大きな点は TC が流動する原形質膜中を移動すると仮定していることである。すなわち緑藻類の *Oocystis apiculata* で割裂した原形質膜外半分 (EF 面) にマイクロフィブリルの鋳型が見られ、その末端は、各列30個で3列からなる規則的な顆粒配列で終わっている。TC は当初対になって存在し (図6—I), この時点ではマイクロフィブリルの鋳型はみられない。マイクロフィブリルの合成が進むに従って TC は原形質膜中をそれぞれ逆方向に進む (図6 II→III→IV→V) と考えられている。

さらに、原形質膜の PF 面には TC は見られず、代わりに granule band (以 GB と省略、図7) と呼ばれる特殊な構造がみられる。*Oocystis* の原形質膜割裂面ならびに TC や GB 等の立体的位置関係は図7によって理解されるであろう。

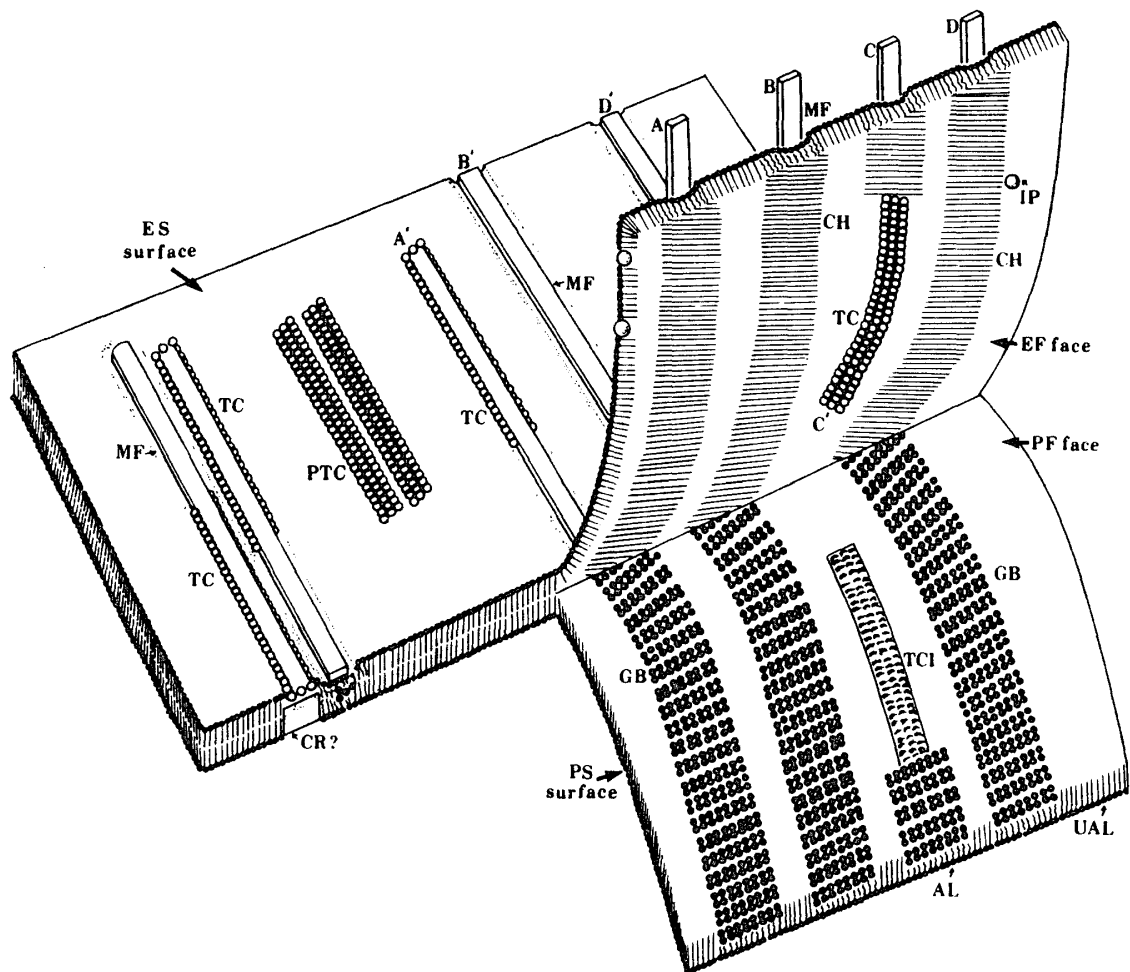


図7 *Oocystis apiculata* のフリーズエッチング法による原形質膜割裂面の模式図¹⁸⁾
 GB: granule band MF: microfibril

TC は PF 面上の GB に沿って移動すると考えられているが、その際、微小管が GB の極在場所をコントロールすることによって、平行性のよいマイクロフィブリルの交差ラメラが合成される可能性が残されている。

Preston の仮説が正しいか否か、あるいはまた *Oocystis* の観察によって得られたセルロースマイクロフィ

ブリル合成のモデルが一般的なものかを検討するために、筆者らは³⁷⁾ Preston の用いたのと同じ *Valonia* を材料にして、原形質膜上の TC の性質を観察検討した。

図8は一次壁形成途上にある原形質膜 EF 面のフリーズエッチング像である。原形質膜面上にランダムに配向するのはマイクロフィブリルの鋳型である。鋳型には多くの末端がみられるが末端部はいずれも TC



図8 *Valonia macrophysa* における一次壁形成中の原形質膜 EF 面で、上に3つ、下に1つ、計4つの TC がみられる。

顆粒からなることがわかる。

図9は原形質膜 PF 面上にみられる TC である。EF 面よりも PF 面の方が TC の形状はより明瞭にみられる。なおバロニアの TC が EF, PF 両面にみられることは図10に模式化されている。二次壁堆積時の原形質膜 EF 面が図11に示されているが平行性のよい二次壁 ミクロフィブリルは当初は間隔を置いて堆積し徐々に間を埋めるようにして一枚のラメラが形成されるのがわかる。同図中央に、ミクロフィブリル末端がみられるが、時に2つの TC が互いに逆方向を向いていることがある。これは同一ラメラ内に合成方向の異なるミクロフィブリルが同時に存在することがわかる。バロニアの TC の性質を *Oocystis* の TC の性質と比べたのが表4である。どちらの TC も直線形 (linear) であること、サブユニットが3列からなること、分布はランダムであること等類似した性質を示す一方で、サブユニットの原形質膜内の位置が *Oocystis* では EF 面にしか見られないのに反しバロニアでは EF 面と PF 面の両方にみられること、TC の平均長が *Oocystis* で 510 nm バロニアで 350 nm と長さに違いがあること、対になった TC が *Oocystis* では存在するがバロニアではみられないこと、Granule band が *Oocystis* では原形質膜の PF 面にみられるのにバロニアではまったくみられない等多くの点で違いが認められている。これらの諸性質を考慮して考えたのが図12に示したバロニアミクロフィブリル合成のモデルである。Preston のモデルと対比した場合、原形質膜の顆粒がミクロフィブリル合成に関するという基本的な点では一致しているものの Preston の考



図9 *Valonia macrophysa* の原形質 PF 面上にみられる TC (矢印)。

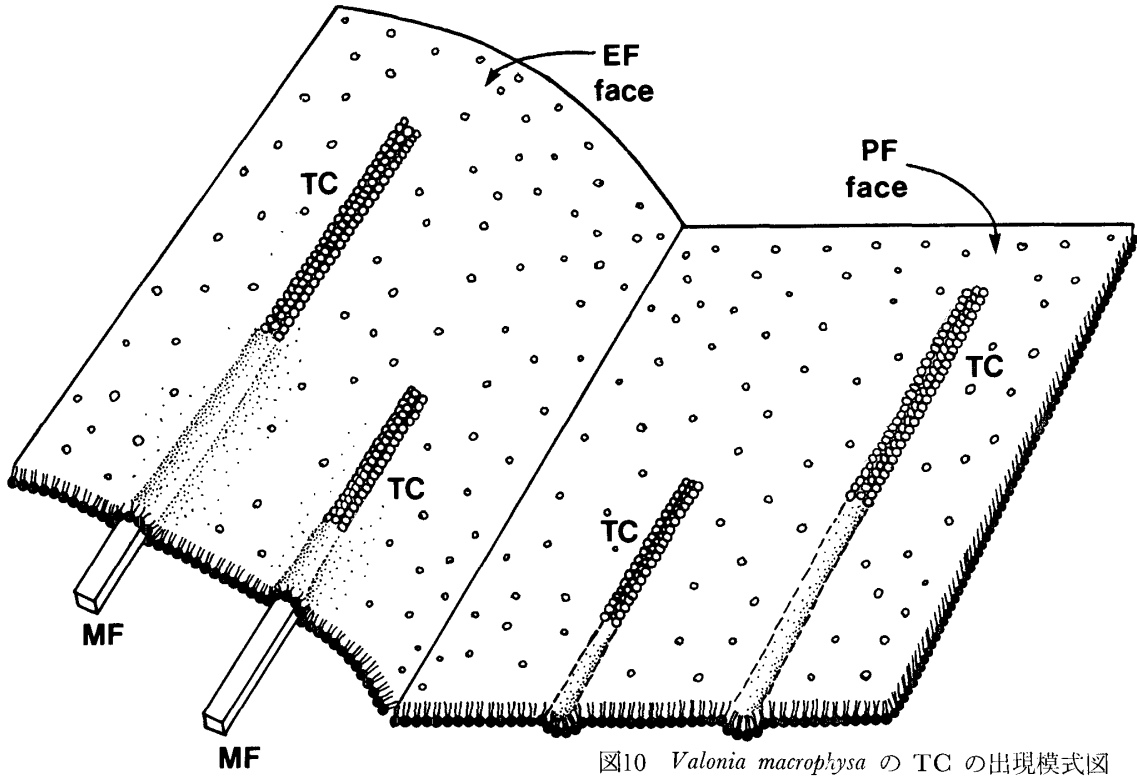


図10 *Valonia macrophysa* の TC の出現模式図
MF=microfibril 図7と比較されたい。



図11 *Valonia macrophysa* の二次壁形成途上にある原形質膜面を示す。マイクロファイブリルは鋳型として互いに平行に走行する。中央のマイクロファイブリル鋳型の先端に TC がみられる。

表4 *Oocystis* と *Valonia* の TC の比較表³⁷⁾

	<i>Oocystis</i>	<i>Valonia</i>
Terminal complex		
Shape	linear	linear
Location within plasma membrane	outer leaflet	transmembrane
Length (nm)	510	350
Subunit arrangement	3 rows	3 rows
Dimension of each subunit (nm)	7.1	9.0-12.0
Subunit number per TC	108	90-120
Paired TC	present	absent
Distribution	random	random
Granule bands	present	absent
Microfibril width (nm)	18.5-22.1	12.0-21.0

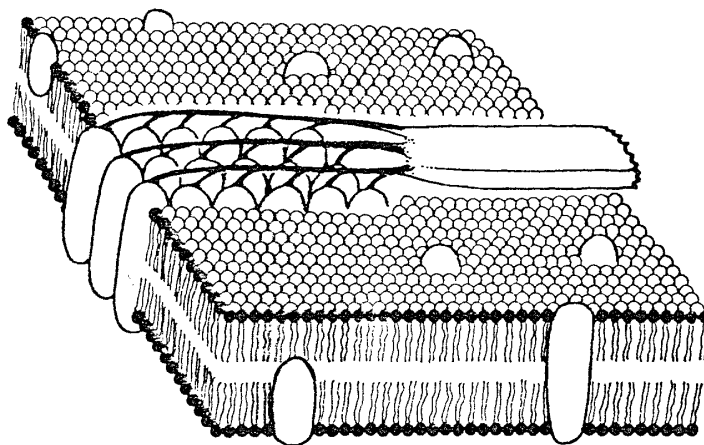


図12 *Valonia macrophysa* におけるセルロースマイクロフィブリル合成の模式図³⁷⁾。TC は transmembrane で3列からなる。

えた顆粒体は直方体状であるのに反し筆者らの観察に基づく直線形であること、Preston は3方向にマイクロフィブリルが形成されるがその際に顆粒体は不動であると考えたが筆者らのモデルではマイクロフィブリルは一方方向にのみ形成され、その際顆粒体が原形質膜上を移動するというものである。

マガタマモ (*Boergesenia forbesii*) の原形質膜上の TC についても調べた結果、バロニアときわめてよく類似した TC を有することが判明した⁹⁰⁾。この場合も TC はやはり PF 面と EF 面の両方にみられ、Granule band なる構造はみられなかった。

上記のように *Oocystis*, バロニア, マガタマモはいずれも直線形 (linear) の TC を有するがある種の藻類ではロゼット形の TC を有することが知られている^{20,21,91,92)}。そこで TC の形態についてこれまで判明しているものを図示すると図13のごとくなる。2, 3, 4はいずれもロゼット形に属するもので実際には①の Globule 形②~④のロゼット形, ⑤の直線形の3種類のタイプの TC がこれまでに観察されている。高等植物ではマイクロフィブリルは PF 面上の6個一組の顆粒体からなるロゼット並びにこれと相補的な位置にある EF 面上の単独 Globule で終わっている^{91,92)}。同様のロゼットがシダの原糸体 (protonema) の先端部でもみられており⁹⁵⁾、これらロゼットがセルロース生合成の機械部分に当たると考えられている。高等植

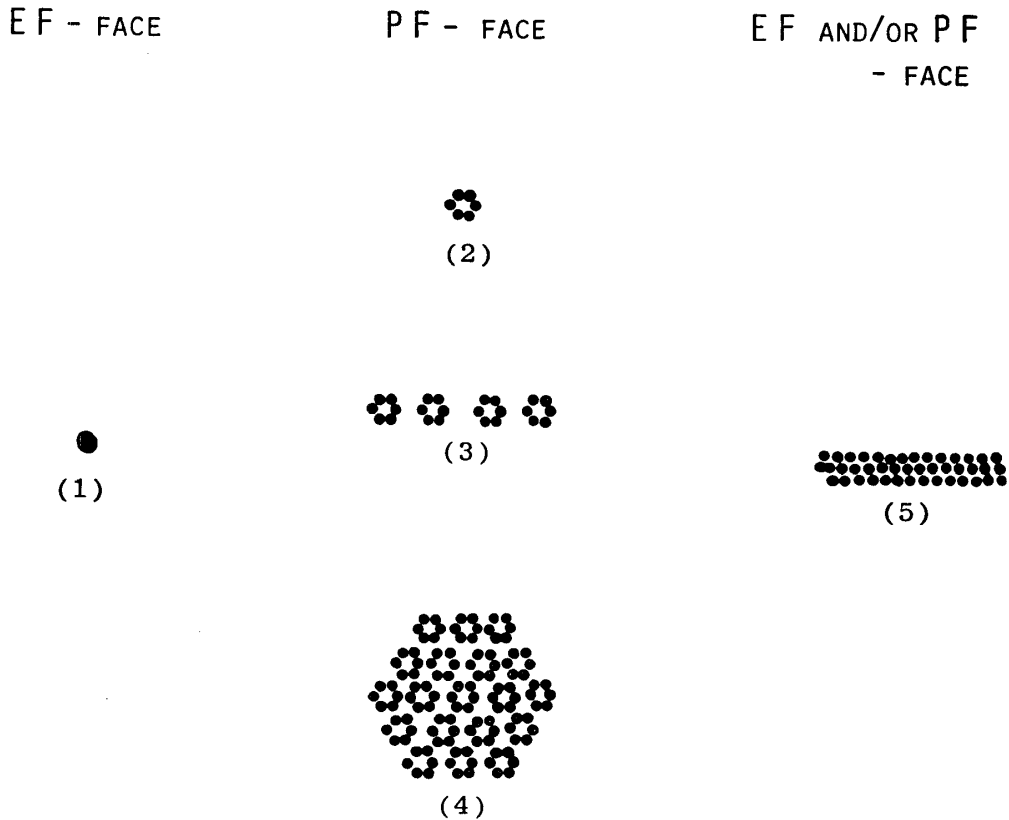


図13 文献に記載のある TC の形
 (1) は globule 形。
 (2), (3), (4) はロゼット形 (rosette)。
 (5) は直線形 (linear)。
 (1) は EF 面, (2), (3), (4) は PE 面,
 (5) は EF and/or PF 面にみられる。

物組織から調製したプロトプラスによる細胞壁再生過程において TC が観察できず、その理由として膨圧が不十分であるとされる一方で TC が実在しない証拠と考えられていた。しかし最近になって高等植物のプロトプラスにおいても TC の存在が確かめられている⁹⁶⁾。形の小さい球状 TC に相当してトウモロコシ⁹³⁾やシダ⁹⁷⁾のミクロフィブリルは *Oocystis* のミクロフィブリルよりも小さい。ミクロフィブリルのい型の末端にみられるロゼットは藻類の *Micrasterias denticulata*²⁰⁾ や *M. crux-meliteusis*⁹¹⁾ の原形質膜 PF 面にも観察されている。*Micrasterias* の一次壁形成中には単独のロゼットがランダムに分布しかつランダムに配列した 6~8 nm の MF が合成される二次壁堆積期には 16列中に 175のロゼットを含んだ TC が観察されロゼットの配列に比例して長いロゼット列からは径の太いまた短いロゼット列からは径の細いミクロフィブリルが帯状に形成される。linear TC, globule, particle rosettes はタンパク質ないしはセルロース合成酵素だとは証されていないがセルロースミクロフィブリルとの超顕微鏡的な関係から酵素ないしはこれに関連した構造であろうと考えられている。しかしながらその一方では TC は原形質膜上のタンパク質が不自然に集合したに過ぎないという見方も皆無ではない。筆者ら⁹⁵⁾はタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを用いてマガタマモのプロトプラス (aplanospore) の TC の消長を調べた。その結果、シクロヘキシミドで処理をすると TC は消失しないがセルロースミクロフィブリルは形成されなかった。さらに阻害剤で処理を行なった後プロトプラスを通常の培地に移しかえてやると TC が時間の経過と共に回復し

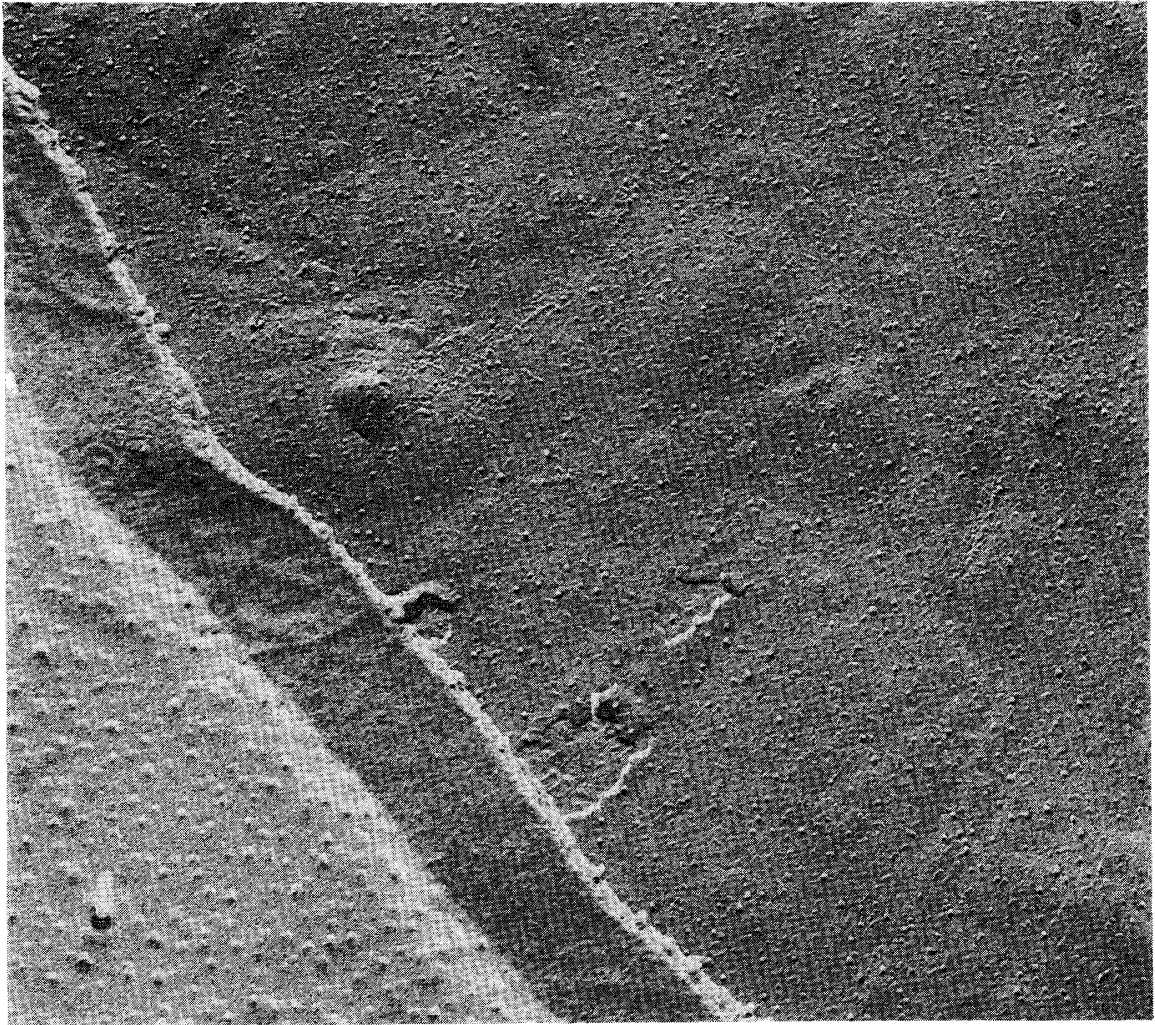


図14 *Boergeresenia forbesii* の thallus を Wounding 後、通常培地 (1 h) + シクロヘキシミド (10 μ M) を含む培地 (4 h) + 通常の培地に戻す (3 h) の処理を行なった細胞のフリーフラクチャー像で原形質膜上に TC が回復すると同時にマイクロフィブリルも見られる。

それに伴ってマイクロフィブリルも徐々に形成されるに至った (図14)。以上の結果よりシクロヘキシミド処理によりタンパク質の合成が阻害されるがために新たな TC 合成は阻害されその結果セルロースマイクロフィブリルは合成されないと推論された。従って、TC は単に原形質膜上のタンパク質分子の不自然な集合によって生じたものではなく、マイクロフィブリルの合成と堆積に関与するタンパク質性の構造体であることがはっきりしてきた。

X. バクテリアセルロースと結晶化阻害剤

Acetobacter xylinum は前述のごとくきわめて有用なセルロース生合成の研究材料であって、通常 2~6 nm 幅のマイクロフィブリルが数本集まって 30 nm ほどのリボン状フィブリルを形成する。ところが蛍光増白剤として知られるカルコフルオール (Calcofluor white ST) あるいはティノパル (Tinopal LPW) を含む培地で生育させてやると通常のフィブリル形成に代って非晶性のフィブリルが帯状に形成される。特に高濃度の蛍光増白剤の下ではシート状のセルロースが形成されるのだがこれらの知見は天然セルロースの形成に

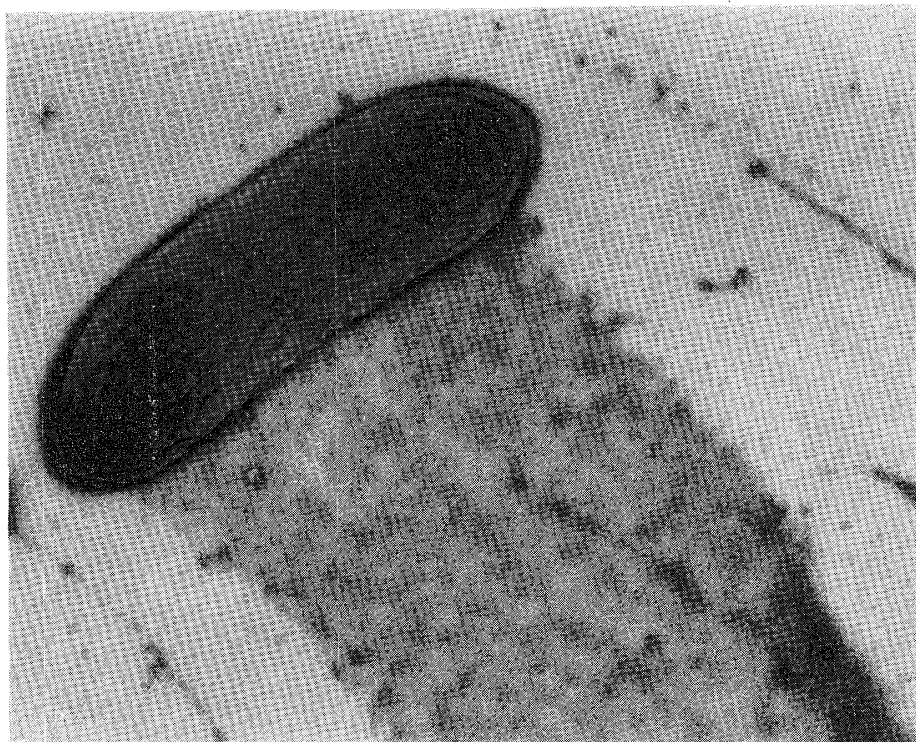


図15 *Acetobacter xylinum* のコンゴレッド (1 mg/ml) 処理によって生じたセルロース性带状産物

関する既往の概念とはかけ離れて特異でかつ興味深い現象である。最近筆者らはセルロース染料として知られるコンゴレッドで処理することによって蛍光増白剤処理と同様の非晶性の微細なフィブリルの帯が形成されることをみている (図15)。X線回折像から判断しても同染料の処理によって生じたセルロースが非晶性であることが確認されている。これらの研究によってカルコフルオールやティノパルあるいはコンゴレッドがセルロースの結晶化阻害剤であって、図16に示される正常のマイクロフィブリル形成時にグルカン鎖の間にこれら阻害剤が入り込み、グルカン鎖が互いに結晶化できなくなる (図16) ことによって方向性のない微細なフィブリルの帯が形成されることが明らかになってきた。このように、セルロースに対して特別の親和性を有するこれら薬品の作用により、少しずつセルロースマイクロフィブリルの生成過程が解明されてきている。

XI. お わ り に

セルロースは古くより研究されているもののその生成の仕組みはいまだ十分に理解されていない。その分子構造は化学に素人の筆者には比較的単純に見えてもいまだ有機合成手法によってセルロース鎖と言えるものはつくられていない。また一本のマイクロフィブリル内でセルロース鎖がすべて一方向なのかあるいは互いに逆方向を向いているのかさえも完全に解決したとは言えないようである。さらに、セルロース合成酵素はいまだ単離されていないし *in vitro* でのセルロースマイクロフィブリル合成すら成巧していない。それだけセルロース合成酵素が不安定であることを物語るものであろう。しかしながら、本稿で触れた、あるいは紙面の都合で触れられなかった成果を含めてセルロースの生合成に関する研究はゆっくりとではあるが着実に実を結びせてきている。したがって上記のような未解決の問題も近い将来必ず解明されるであろう。そうすれば、結晶性やマイクロフィブリルの幅あるいは重合度等の諸性質を思いのままコントロールされた“セルロ

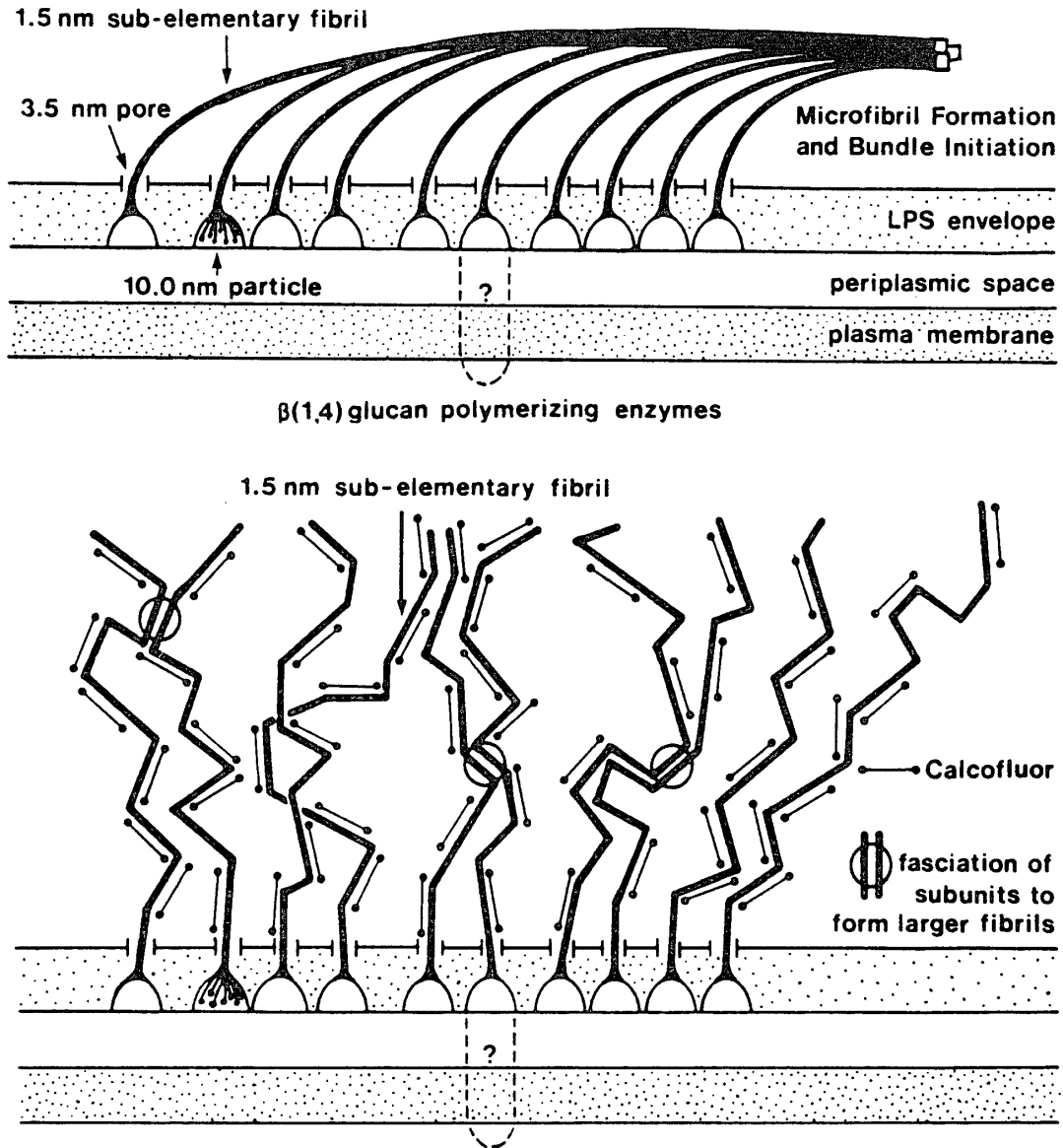


図16 *Acetobacter xylinum* による正常のファイブリン形成模式図 (上側)
Acetobacter xylinum の蛍光増白剤ならびにコンゴレッド処理によって生じる帯状セルロース産物の形成模式図 (下側)¹⁰⁰⁾

ースの人工合成”が可能となり、人為によるセルロース合成工場も夢ではなくなるであろう。

文 献

- 1) SCHWENKER, R.F.Jr.: ACS Cellulose, Paper, and Textile Division **4**, 15~19 (1978).
- 2) PRESTON, R.D.: The Molecular Architecture of Plant Cell Walls, Wiley, New York (1952)
- 3) RUSKA, H.: Kolloid-Z. **92**, 276~285 (1940)
- 4) RUSKA, H. and KRETCHMER, H.: Kolloid-Z. **93**, 163~166 (1940)
- 5) FRANZ, E. and SCHIEBOLD, E.: J. Makromol. Chem. **1**, 3~4 (1943)
- 6) FRANZ, E., SCIEBOLD, E. and WEYGAND, C.: Naturwiss. **31**, 350 (1943)
- 7) FREW-WYSSLING, A. and MÜHLETHALER, K.: J. Polymer Sci. **1**, 172~174 (1946)

- 8) HESTRIN, S., ASCHNER, M. and MAGER, J.: *Nature* **159**, 64~65 (1947)
- 9) GEZELIUS, K. and RANBY, B.G.: *Expt. Cell Res.* **12**, 265~289 (1957)
- 10) GEZELIUS, K.: *Expt. Cell Res.* **18**, 425~453 (1959)
- 11) TOAMA, M.A. and RAPER, K.B.: *J. Bacteriol.* **94**, 1150~1153 (1967)
- 12) FREEZE, H. and LOOMIS, W.F.: *J. Biol. Chem.* **252**, 820~824 (1977)
- 13) BARTINICKI-GARCIA, S.: *Ann. Rev. Microbiol.* **22**, 87~108 (1968)
- 14) ROSINSKI, M.A. and CAMPANA, R.J.: *Mycologia* **56**, 738~744 (1964)
- 15) PRESTON, R.D., NICOLAI, E., REED, R. and MILLARD, A.: *Nature* **162**, 665 (1948)
- 16) MIZUTA, S. and WADA, S.: *Bot. Mag. Tokyo* **94**, 343~353 (1981)
- 17) OKUDA K. and MIZUTA S.: *Proc. 49th Ann. Meeting Bot. Soc. of Japan* (1984)
- 18) BROWN, R.M. Jr. and MONTEZINOS D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 143~147 (1976)
- 19) FREI E. and PRESTON R.D.: *Proc. Roy. Soc. B* **154**, 70~94 (1961)
- 20) GIDDINGS, T.H., Jr., BROWER D.L. and STAEHELIN L.A.: *J. Cell Biol.* **84**, 327~339 (1980)
- 21) HOGETSU, T.: *Plant & Cell Physiol.* **24**, 777~781 (1983)
- 22) PENG, H.B. and JAFFE F.: *Planta* **133**, 57~71 (1976)
- 23) BROWN, R.M., Jr., FRANKE, W.W. KLEINIG, H. FALK H. and SITTE P.: *J. Cell Biol.* **45**, 246~271 (1970)
- 24) TOMLINSON, G. and GANDER J.E.: *Biochem. Biophys. Acta* **63**, 194~200 (1962)
- 25) ENDEAN, R.: *Quart. J. Micros. Sci.* **102**, 107~117 (1961)
- 26) WARDROP, A.B.: *Protoplasma* **70**, 73~86 (1970)
- 27) FRANKE, W.W. and ERMEN B.: *Z. Naturforsch., Teil B*, **24**, 918~922 (1969)
- 28) HANNA, R.B. and CÔTÉ, W.A. Jr.: *Cytobiologie* **10**, 102~116 (1974)
- 29) HEYN, A.N.J.: *J. Appl. Phys.* **26**, 519~526 (1955)
- 30) HEYN, A.N.J.: *J. Appl. Phys.* **36**, 2088 (1965)
- 31) HEYN, A.N.J.: *J. Cell Biol.* **29**, 181~197 (1966)
- 32) NIEDUSZYNSKI, I. and PRESTON R.D.: *Nature* **225**, 274~275 (1970)
- 33) BROWN, R.M. Jr., WILLISON J.H.M. and RICHARDSON C.L.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **73**, 4565~4569 (1976)
- 34) CAUFIELD, D.F.: *Textile Res. J.* **41**, 267~269 (1971)
- 35) GOTO, T., H. HARADA and SAIKI H.: *Wood Sci. Technol.* **12**, 223~231 (1978)
- 36) PRESTON, R.D.: *The Physical Biology of Plant Cell Walls*. Chapman & Halls (1974)
- 37) ITOH, T. and BROWN, R.M. Jr.: *Planta* **160**, 372~381 (1984)
- 38) MIZUTA, S. and WADA S.: *Bot. Mag. Tokyo* **94**, 343~353 (1981)
- 39) BLACKWELL, J. and KOLPAK F.J.: *Appl. Pol. Symp.* **28**, 751~761 (1976)
- 40) FENGEL, D.: *Naturwiss.* **61**, 31~32 (1974)
- 41) ROLAND, J.C., VIAN B. and REIS D.: *J. Cell Sci.* **19**, 239~259 (1975)
- 42) ROMANOVICZ, D.K. and BROWN R.M., Jr.: *Appl. Polym. Symp.* **28**, 567~610 (1976)
- 43) HERTH, W. and MEYER Y.: *Biol. Cell.* **30**, 33~40 (1977)
- 44) SUGIYAMA J., HARADA H. FUJIYOSHI Y. and UYEDA, N.: *Planta* (in press) (1985)
- 45) TAKAI, M., TSUTA Y. and WATANABE, S.: *Polym. J.* **7**, 137~146 (1975)
- 46) MARX-FIGINI M. and PION B.G.: *Biochim. Biophys. Acta* **338**, 382~393 (1974)
- 47) MARX-FIGINI M.: *J. Polym. Sci. Part C* **28**, 57~67 (1969)
- 48) GORING D.A. and TIMELL T.E.: *Tappi* **45**, 454~460 (1962)
- 49) PALMA A., BÜLDT G. and JOVANOVIC S.M.: *Makromol. Chem.* **177**, 1063~1072 (1976)
- 50) MÜHLETHALER K.: *J. Polym. Sci. Part C* **28**, 305~316 (1969)
- 51) MEYER K.H. and MARK H.: *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **61** (A), 593~614 (1928)
- 52) MEYER K.H. and MARK H.: *Z. Physik. Chem. B2*, 115~145 (1929)
- 53) FREY-WYSSLING A.: *Protoplasma* **25**, 261~300 (1936)
- 54) FREY-WYSSLING A.: *Science* **119**, 80~82 (1954)
- 55) FREY-WYSSLING A. and MÜHLETHALER K.: *Makromol. Chem.* **62**, 25~30 (1963)
- 56) PRESTON R.D. and CRONSHAW J.: *Nature* **181**, 248~250 (1958)
- 57) STOCKMANN V.E.: *Biopolymers* **11**, 251~270 (1972)

- 58) MEYER K.H. and MISCH L.: *Helv. Chim. Acta* **20**, 232~244 (1937)
- 59) PRESTON R.D.: *Int. Rev. Cytol.* **8**, 33~60 (1959)
- 60) ROELOFSEN P.A.: *The Plant Cell Wall*. Gebrüder Borntraeger 335pp. (1959)
- 61) MANLEY R.St. J.: *Nature* **204**, 1155~1157 (1964)
- 62) MANLEY R. St. J.: *J. Polym. Sci. Part A-2: Polymer Physics* **9**, 1025~1059 (1971)
- 63) MUGGLI, R. ELIAS, H.G. and MÜHLETHALER, K.: *Makromol. Chem.* **121**, 290~294 (1969)
- 64) GARDNER K.H. and BLACKWELL J.: *Biopolymers* **13**, 1975~2001 (1974)
- 65) SARKO, A. and MUGGLI, D.: *Macromolecules* **7**, 486~494 (1974)
- 66) ELBEIN A.D. BARBER G.A. and HASSID W.Z.: *J. Amer. Chem. Soc.* **86**, 309~310 (1964)
- 67) BARBER G.A., ELBEIN A.D. and HASSID W.Z.: *J. Biol. Chem.* **239**, 4056~4061 (1964)
- 68) CARPITA N.C. and DELMER D.P.: *J. Biol. Chem.* **256**, 308~315 (1981)
- 69) VILLEMETZ C.L. and HELLER J.S.: *Nature* **227**, 80~81 (1970)
- 70) DELMER D.P., BEASLEY C.A. and ORDIN L.: *Plant Physiol.*, **53**, 149~154 (1974)
- 71) GLASER L.: *J. Biol. Chem.* **232**, 627~636 (1958)
- 72) SOUTHWORTH D. and DICKISON D.B.: *Plant Physiol* **56**, 83~87 (1975)
- 73) DELMER D.P., HEINIGER U. and KULOW C.: *Plant Physiol.*, **59**, 713~718 (1977)
- 74) BRACKER, C.E., RUIZ-HERRERA, J. and BARTNICKI-GARCIA, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 4570~4574 (1976)
- 75) MACLACHLAN, G.A.: In "Cellulose and other natural polymer systems", ed. R.M. Brown, Jr. 207~223 (1982)
- 76) DELMER D.P.: *Adv. Carbohyd. Chem. & Biochem.* **41**, 105~153 (1983)
- 77) SINGER S.J. and NICOLSON G.L.: *Science* **175**, 720~731 (1972)
- 78) ASCHNER M. and HESTRIN S.: *Nature* **157**, 659 (1946)
- 79) SCRAMM M. and HESTRIN S.: *J. Gen. Microbiol.* **11**, 123~129 (1954)
- 80) COLVIN J.R., BAYLEY S.T. and BEER M. *Biochem. Biophys. Acta* **23**, 652~653 (1957)
- 81) ZAAR K.: *J. Cell Biol.* **80**, 773~777 (1979)
- 82) RANBY B.G.: *Acta Chem. Scand.* **6**, 101~115 (1952)
- 83) PRESTON R.D. and KUPYER B.: *J. Exp. Bot.* **2**, 247~256 (1951)
- 84) PRESTON R.D., NICOLAI E. and KUYPER B.: *J. Exp. Bot.* **4**, 40~43 (1953)
- 85) PRESTON R.D.: *The Formation of Wook in Forest Trees*, M.H. ZIMMERMANN, ed., Academic Press 1964.
- 86) MOOR H. and MÜHLETHALER K.: *J. Cell Biol.* **17**, 609~628 (1963)
- 87) STAEHELIN L.A. and PROBINE M.C.: *Adv. Bot. Res.* **3**, 1~52 (1970)
- 88) LEDBETTER M.C. and PORTER K.R.: *J. Cell Biol.* **19**, 239~250 (1963)
- 89) PICKETT-HEAPS J.D.: *Dev. Biol.* **15**, 206~236 (1967)
- 90) ITOH, T. O'NEIL R.M. and BROWN, R.M., Jr.: *Protoplasma* **123**, 174~183 (1984)
- 91) NOGUCHI, T. TANAKA, K. and UEDA, K.: *Cell Structure and Function* **6**, 217~229 (1981)
- 92) HERTH, W.: *Planta* **159**, 347~356 (1983)
- 93) MUELLER S.C. and BROWN, R.M. Jr.: *J. Cell Biol.* **84**, 315~326 (1980)
- 94) HERTH, W. *Naturwissenschaften* **71**, 216~217 (1984)
- 95) WADA M. and STAEHELIN L.A.: *Planta* **151**, 462~468 (1981)
- 96) HERTH, W. and Weber, G.: *Naturwissenschaften* **71**, 153~154 (1984)
- 97) REISS, H.: *Planta* **160**, 428~435 (1984)
- 98) ITOH, T. LEGGE, R.L. and BROWN, R.M. Jr.: (unpublished data)
- 99) BROWN, R.M. Jr.: *The third Philip Morris Science Symposium* 52~123 (1978)
- 100) HAIGLER, C.H.: *Doctoral dissertation* (1982)