

## イネの発達過程におけるペクチンメチルエステル化制御に関する研究

鎌田 志保美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

## 背景と目的

高等植物において細胞壁は物理的構造の維持だけでなく分裂組織の維持や花器官形成といった発生に重要な役割を担っている。細胞壁に含まれる多糖類のひとつであるペクチンは、栄養成長や生殖成長の細胞接着にも関与していることが示唆されている。ペクチンはそのメチルエステル化度を変化させることで細胞壁特性に対して大きく影響する。高メチル化状態のペクチンは流動性が高いが、低メチル化状態のペクチンはカルシウムと結合することが可能となりゲル化し粘度を持つようになる。ペクチンはゴルジ体で生合成される際に、ペクチンメチルトランスフェラーゼ (PMT) によりメチル化された状態で細胞壁に放出される。細胞壁中では、ペクチンメチルエステラーゼ (PME) によって脱メチル化され、カルシウム架橋を形成することで知られている。双子葉植物では、ペクチンのメチル化度の調節によって細胞壁の性質を制御し、細胞壁の硬度や接着性に大きく影響することが知られている。シロイヌナズナの変異体を用いた研究では PME が花粉の発達において重要な働きをすることや PMT の細胞接着への関与が示唆されている。しかし、全身に多量のペクチンを含む双子葉植物ではペクチンの機能欠損により大きな影響を及ぼして致死になることが多い点が問題点である。そこで、植物体全体の割合としては、ほとんどペクチンを含まないが、分裂組織や生殖組織といった植物の発達に重要な組織に局所的に多量のペクチンを含む単子葉植物のイネを用いて、各発達過程におけるペクチンのメチル化制御機能に注目して実験を行った。本研究では分化の開始点である分裂組織や受粉・受精過程における柱頭と花粉、花粉と伝達組織などの細胞接着を求められる生殖組織において、これら組織の形成や発達におけるメチル化度調節の機能の一端を明らかにすることを目的としている。

## 材料と方法

## ・材料

イネ (*Oryza sativa* 品種: Hwayoung, Dongjin, Nipponbare) を用いた。日本の主要な穀物であるイネは全ゲノム配列が解読されており、リソースが豊富などのメリットがあるため単子葉のモデル植物として研究によく利用されている。

## ・方法

本研究室では現在までに相同性検索により T-DNA 挿入変異株 (T-DNA KO) よりスクリーニングした *ospmt10*、*ospmt16* についてペクチンのメチル化度の低下が確認されており、これらは全ての植物種において未同定である PMT 遺伝子の候補であると考えている。そこで、これら2つの遺伝子についてピキア酵母 (*Phicia pastoris*) を用いて組換えタンパク質を作成し、PMT 活性を調査するために、コンストラクトの作成を行った。

また、近年 PME の阻害剤であることが報告された EGCG ((-)-Epigallocatechin gallate) をイネの花と根に投与した。花は、500  $\mu\text{M}$  の EGCG を含む 0.2% 寒天を、開花前の花の内部に直接投与した。投与は毎日行い、2週間後に花の形態と稔実

率を調査した。根は 50  $\mu\text{M}$  の EGCG を含む 1% の寒天培地において発芽率を調べた。また、50  $\mu\text{M}$  の EGCG を含む KIMURA B 培地を用いて水耕栽培を行い、2週間後に地上部や地下部の生長量を調査した。

## 結果

PMT10、PMT16 の活性測定用組換えタンパク質を発現するためにピキア酵母に導入する用のコンストラクトを作成した。現在、組換えタンパク質の発現を行っている。

EGCG を添加した水耕液を用いて栽培した結果、地上部の生長量が抑制されたが、地下部には差がみられなかった。花に EGCG を 1~2 週間投与したところ、稔実率の違いは確認されなかった。

## 考察

メチル化度が低い状態である PME-OX や PMT-KO では栄養成長への影響はみられなかったが、生殖成長を抑制することが分かっている。本研究で用いた PME 阻害剤である EGCG の投与は、メチル化度を高く維持する効果があると考えられる。WT を高メチル化状態にすると栄養成長を抑制するが生殖成長への影響はみられなかった。ペクチンのメチル化度が低く流動性が小さい状態では生殖成長に異常をもたらし、メチル化度が高く流動性が大きい状態では栄養成長に影響をもたらすことがいえる。栄養成長期においてペクチンが豊富である分裂組織においては、脱メチル化することで、ペクチンとカルシウムの架橋を促し、高い細胞接着性を維持することで発生発達に寄与していると考えられる。また、生殖成長期においてペクチンが多い花組織では、メチル化度を高く維持することで流動性のある細胞壁空間を調節し、雌しべの中を花粉管が伸長するなどの機能に貢献している可能性があると考えられる。今後は作成したコンストラクトを用いて PMT のタンパク質を発現させて活性を測定することと EGCG による PME 抑制実験を進めていく予定である。