

シロイヌナズナの XTH 過剰発現株を用いたサリチル酸応答と細胞壁構造変化に関する研究

齋藤 史織 (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・目的】

植物は一生を通じて乾燥ストレスや塩ストレス、低温ストレスなどの環境変化によるストレス、そして動物・昆虫による食害および病原菌の侵入によるストレスなど、多くのストレスにさらされる。このとき植物は様々な応答をすることにより、それらへの抵抗性を示す。その一例として植物は病原菌に感染すると、微生物感染部位の周りの細胞をすぐさま死なせることによって病原菌への栄養補給を断ち切り、さらに他の部位への侵入を防ぐ。そしてこの防御機構の作動がきっかけとなってその植物は植物体全体を通して多種類の病原菌に対する抵抗性を持つようになり、これを数日間持続させることができる。全身獲得抵抗性と呼ばれるこの現象は植物ホルモンの一種であるサリチル酸のシグナルによって引き起こされると考えられている。このサリチル酸の蓄積は植物に病原菌に対する抵抗性というメリットをもたらす一方で、植物の成長および発達の遅れを生じさせる。植物の成長には植物特有の構造である細胞壁が関わっていると考えられるが、これまでのところ細胞壁の変化とサリチル酸などの病害応答性ホルモンとの関係についてはほとんどわかっていない。

サリチル酸を蓄積することで萎縮するシロイヌナズナ変異株の1つに *siz1* がある。この *siz1* では *XTH8* および *XTH31* の発現が減少していた。エンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) は細胞壁伸展性を制御する重要な酵素であり、シロイヌナズナにおいては33個の遺伝子ファミリーが存在している。この酵素は加水分解活性(XEH)とつなぎかえ活性(XET)の2つの活性を持つことが知られているが、*siz1* において発現が減少していた *XTH31* は、このうち XEH 活性のみを持つ特殊な酵素であることが近年の研究で示唆されている(Kaewthai N et al. 2013)。さらに、この *XTH31* をシロイヌナズナにおいて過剰発現させた変異株を作製すると、その植物体が大きくなることが示されている。そこで、本研究ではこの *XTH31* 過剰発現株を用いて解剖学的観察および生理学的解析を行うことで XTH と細胞壁構造変化の関係およびサリチル酸の蓄積がもたらす細胞壁構造変化を明らかにすることを目的としている。

【材料・方法】

モデル植物として知られているシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生株 (WT: *Columbia*)、およびこれに *XTH31* を過剰発現させた変異株を用いて実験を行った。

1. *XTH31* 過剰発現株の形態学的観察

4週目の WT および *XTH31* 過剰発現株の第5葉の表と裏の表皮細胞を、デジタルマイクロスコブを用いて観察した。また、同条件の葉を FAA (ホルマリン:氷酢酸:50%エタノール=5:5:90) で固定し、テクノビット樹脂に包埋し組織切片を作成した。トルイジンブルーにより染色し、葉断面の組織観察を行った。

2. WT および *XTH31* 過剰発現株の細胞壁構成糖分析

4週目の WT および *XTH31* 過剰発現株 (各20個体) の乾燥細胞壁を調製した。この乾燥細胞壁を、2M TFA で加水分解し、

細胞壁マトリックス画分を得た。また、乾燥細胞壁に対して 50 mM Na₂CO₃, 1M KOH, 4M KOH による分別抽出を行い、ペクチン性画分、ヘミセルロース画分1および2、セルロース画分に分け、ガスクロマトグラフィーを用いて構成糖分析を行った。

3. SA 噴霧時の *XTH31* 発現部位

XTH31::GUS を用いて4週目にサリチル酸 (1mM, 1week) 噴霧した個体としていない個体の GUS 染色性の違いについて観察を行った。

【結果】

1. *XTH31* 過剰発現株の形態学的観察

表皮細胞を観察すると、WT と比べて明らかに *XTH31* 過剰発現株ではその細胞サイズが大きいことが分かった。葉断面の組織観察については現在進行中である。

2. WT および *XTH31* 過剰発現株の細胞壁構成糖分析

WT に比べて *XTH31* 過剰発現株では乾燥細胞壁量が生重量に対して約 60% 少ないことが明らかになった。また、細胞壁マトリックス画分における中性糖量が約 60% 多いことも明らかになった。さらにヘミセルロース性画分に注目すると、特にグルコースが約 81%、キシロースが約 77% 多かった。

3. SA 噴霧時の *XTH31* 発現部位

現在進行中である。

【考察】

・*XTH31* 過剰発現株の表現系

XTH31 過剰発現株は WT に比べて細胞サイズが大きくなるにもかかわらず、その生重量に対する乾燥細胞壁量は少なかったことから、*XTH31* 過剰発現株の細胞は水分含量が非常に高いと考えられる。

・*XTH31* の過剰発現がもたらす影響について

XTH31 過剰発現株は WT に比べてヘミセルロース中のキシロースとグルコース量が非常に多かった。XTH のターゲットとなるキシログルカンが増えていると推測される。*XTH31* はキシログルカンを加水分解する酵素であるにもかかわらず、キシログルカン量が増大していたことは、フィードバックによるキシログルカン合成が生じたためでないかと考えている。今後、キシログルカン合成遺伝子の発現を確認する予定である。