

## イネの発達過程におけるペクチンアラビノース側鎖合成酵素 OsARAD1 に関する研究

清永 郁香 (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

植物の細胞壁は主にセルロース、マトリックス糖鎖、構造タンパク質で構成されている。マトリックス糖鎖の一群であるペクチン性多糖の主成分であるアラビノースは高等植物が特徴的に有する糖鎖であり、発達過程に大きく関わっている。アラビノース残基はアラビノキシラン、ペクチン、アラビノガラクトタンタンパク質 (AGP) などの細胞壁成分の側鎖として結合しており、中でもペクチンや AGP のアラビノース側鎖は生殖過程に強い関わりを持つと考えられている。これらの事から本研究では、ペクチンアラビノース側鎖の機能に注目して実験を行った。ペクチンアラビノース側鎖は Figure1 に示すように、アラビノース側鎖合成酵素から合成されることが知られており、現在までにシロイヌナズナにおいて CAZy データベースの GT47 ファミリーに属する *AtARAD1* が報告されている。イネゲノム中には *OsARAD1~8* が存在していることが分かっている。シロイヌナズナは双子葉植物であり植物体全体に占めるペクチンの割合が大きいいためペクチンアラビノース側鎖を制御すると栄養成長を含めた全ての発生過程に影響を与えるため致死となる事や、重複遺伝子による相補により表現型が現れないことが報告されている。一方で、単子葉植物では細胞壁全体に占めるペクチンの割合は非常に低いためにペクチンアラビノースを下方制御しても栄養成長には影響がないことが期待できる。そこで、栄養成長器官にはペクチン量が少ないが、生殖成長器官では豊富にペクチンを含むイネを用いてペクチンアラビノース側鎖合成酵素 *OsARAD1* の発現抑制体を作出した。本研究は、*OsARAD1*-RNAi の表現型観察などの解析を行うことで、高等植物の発達過程におけるペクチンアラビノース側鎖の機能を明らかとすることを目的としている。

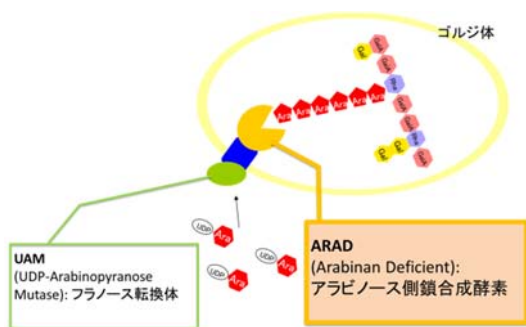


Figure1 アラビノース側鎖生成モデル

### 材料と方法

#### ・材料

イネ (*Oryza sativa* 品種: 日本晴) を用いた。正常株、ベクターコントロールおよび *OsARAD1*-RNAi を特定網室において育成させた。イネの受粉前後の生殖器官 (穎、葯、柱頭、子房)、14 日目実生の葉、茎、根、生殖成長開始後の葉、葉鞘、茎、根をサンプリングし、RT-PCR による発現解析を行った。

#### ・方法

イネゲノムおよび発現データベース (SALAD, Rap DB, RiceXpro) を用いてイネの 8 つの ARAD 遺伝子 (*OsARAD*) を決定した。*OsARAD1* の酵素活性領域にトリガー配列を設計した RNA コンストラクトを、pANDA ベクターを用いて作製した。これを用いて、イネに形質転換を行い、*OsARAD1*-RNAi を作出し、遺伝子導入が確認された個体を特定網室にて生育し、その表現型を調査した。

### 結果と考察

野生型イネの器官別に発現解析をしたところ、*OsARAD1, 4, 6* は、受粉前の葯や柱頭といった生殖組織において特徴的に発現し、その他の遺伝子は極めて発現レベルが低かった。作出された *OsARAD1*-RNAi では、*OsARAD1* 遺伝子の発現レベルが有意に減少していることが確認された。また、その他の ARAD 遺伝子の発現レベルには影響が無かった。

*OsARAD1*-RNAi の表現型の観察を行ったところ、栄養成長には野生型およびベクターコントロールと違いは観察されなかったが、稔実率が約 35% に以下に低下していた。そこで、花の発生過程に注目して調査を行った結果、雌しべには形態的な差がみられなかったのに対し、雄しべの葯における花粉の形成に異常が観察された。成熟花粉形成のマーカーであるデンプン蓄積について調査するために花粉のヨウ素染色を行ったところ、コントロールでは正常にデンプンが蓄積していたのに対して、*OsARAD1*-RNAi ではデンプンの蓄積が著しく低下している花粉が多く確認された。また、走査電子顕微鏡を用いて、花粉の表面構造を観察したところ、表面構造の異常が確認された。そこで、成熟花粉のアラビノース多糖の蓄積を確認するために、アラビノース鎖特異的なモノクローナル抗体である LM6 を用いて、成熟花粉形成期の葯の組織切片に対して免疫組織化学染色を行った。その結果、*OsARAD1*-RNAi では花粉におけるアラビノース多糖の蓄積がコントロールと比較して低下していることが示された。

以上の結果より、*OsARAD1* は成熟花粉形成過程に重要であることが示され、ペクチンアラビノース側鎖が成熟花粉の細胞壁形成に寄与している可能性が示唆された。ペクチンアラビノース側鎖は孔辺細胞の開閉等にも重要であるという報告もあるため、今後は乾燥などを含めた環境ストレス応答の表現型についても調査を行う予定である。