

ペクチン分解酵素過剰発現イネを用いた環境ストレス応答におけるペクチンの機能解析

竹内 春樹 (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】

細胞壁は細胞の最外層に存在し様々な環境ストレスを最初に受ける為、細胞の形の決定や植物体の支持だけでなく、ストレス応答にも関わると考えられているが、どのような機能を有しているのかについての知見は乏しい。細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、ペクチンが主成分となっているが、ペクチン含量は双子葉植物が約 40%と豊富であるのに対し、単子葉植物では約 5%しか含んでいない。このため栄養成長段階および環境ストレス応答において単子葉植物ではペクチンは生理的に重要ではないと考えられてきた。しかしながら単子葉植物であるイネにおいても生殖組織や機動細胞にペクチンが局在していることからイネにおいてもペクチンが生理的に重要な機能を持っていることが示唆されている。

これまでの研究においてイネ由来のペクチン分解酵素であるポリガラクトツロナーゼ (*OsPG*) をユビキチンプロモーターにより恒常的に全身で高発現させたイネ (*OsPG-FOX*) では *OsPG* 遺伝子の高発現およびポリガラクトツロナーゼ活性の上昇が確認された。*OsPG-FOX* イネを弱光条件下 (人工気象機内) で生育させると葉身に細胞間隙が観察され、物理的強度も低下していた。ガスクロマトグラフィーの結果から *OsPG-FOX* イネでは葉身においてペクチンの主成分であるガラクトツロン酸量が減少していたが、その他の細胞壁構成糖には有意差が見られなかった。またこの *OsPG-FOX* イネにイネいもち病菌を感染させると軽度の病斑が多数観察される一方で重症化しにくいという傾向が確認された。このことはペクチンがいもち病菌に対する病害抵抗性に関与していることを示唆している。

そこで本研究では *OsPG-FOX* イネを通常の光強度条件 (特定網室内) で生育させ表現型解析を行い、弱光条件での結果と比較することでペクチンの新たな機能について明らかにすることを目的に実験を行った。

【材料】

イネ (*Oryza sativa* 品種: Nipponbare) を用いた。 *OsPG1-FOX*、 *OsPG1-WT*、 *OsPG2-FOX*、 *OsPG2-WT* 特定網室 (通常光条件) で生育させ必要に応じてサンプリングを行った。

いもち病菌の噴霧試験にはイネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) を用いた。いもち病菌の胞子を約 1.0×10^5 個/ml の濃度に調製し、これを胞子懸濁液とした。

【方法】

1. 生育の様子を観察および物理的強度の比較
それぞれの光条件でのイネの生育の様子を観察し、葉を折り曲げ物理的強度を WT と比較した。
2. トルイジンブルー染色による葉身の形態観察
成熟葉のテクノビット切片を作製し、トルイジンブルーを用いて染色し生物顕微鏡で形態を観察を行った。
3. 糖定量およびガスクロマトグラフィーによる細胞壁分析

イネの第 4 葉から細胞壁を抽出し、TFA 処理によって TFA 可溶画分と TFA 不溶画分に分離した。各画分で糖定量およびガスクロマトグラフィーによる構成糖分析を行った。

4. いもち病菌に対する病害抵抗性反応の解析
イネをそれぞれの光条件で第 5 葉期まで生育させ、第 4 葉または第 5 葉にいもち病菌の胞子懸濁液をエアスプレーで噴霧し、24 時間暗所で保温後、人工気象機で生育させ 3~5 日後に病斑の観察を行った。また病害抵抗性遺伝子の解析を RT-PCR により行った。

【結果】

1. 生育の様子を観察および物理的強度の比較
どちらの光強度条件でも生育速度などに変化は見られなかった。通常光条件で生育させると、弱光条件で観察された葉身の折れやすい形質は観察されなかった。
2. トルイジンブルー染色による葉身の形態観察
OsPG-FOX イネの葉身の切片のトルイジンブルー染色による形態観察の結果、弱光条件で観察された葉身での細胞間隙は通常光条件では観察されなかった。
3. 糖定量およびガスクロマトグラフィーによる細胞壁分析
通常光条件で生育させた *OsPG-FOX* イネの細胞壁分析は現在進行中である。
4. いもち病菌に対する病害抵抗性反応の解析
弱光条件で生育させた *OsPG-FOX* では、感染前から病害抵抗性遺伝子が強く発現していることがわかった。また、通常光条件で生育させた *OsPG-FOX* イネのいもち病菌接種試験を行ったところ、WT と差はなかった。

【考察と今後の展望】

弱光条件で生育させた *OsPG-FOX* イネでは、*OsPG* の高発現による高いポリガラクトツロナーゼ活性に伴って葉でのペクチン量の減少が観察されたが他の細胞壁多糖に変化は見られなかった。このことから葉身におけるペクチン量の減少が、細胞間隙の増加を引き起こしていると考えられ、さらに細胞間隙の増加が葉の物理的強度の低下を引き起こしていると考えられる。いもち病菌に対する抵抗性については軽度の病斑が増加する一方で重症化しにくいという傾向から、ペクチンが減少することでいもち病菌に侵入されやすくなる一方で、ペクチンが分解されて生じたオリゴサッカライドがエリシター活性を持ち、病害応答関連遺伝子の発現量が恒常的に高かったため、病斑の進行が速やかに阻害された可能性が考えられる。

通常光条件で生育させた *OsPG-FOX* イネでは細胞間隙は観察されず、葉の物理的強度の低下も観察されなかったことから、光条件で異なる細胞壁構成および病害抵抗性を示すことが予想される。今後は通常光条件での葉の細胞壁解析およびいもち病菌噴霧試験を進め、弱光条件での結果と比較することでイネにおけるペクチンの新たな機能を明らかにしていきたいと考えている。