

キシロシダーゼ過剰発現イネを用いた重力屈性の偏差成長における細胞壁機能に関する研究

納谷 典明 (筑波大学 生物学類)

指導教員：佐藤 忍 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

4億年前の地球において、水中から陸へと植物が進出したとき、浮力のない空気中で、いかに1gの重力に対抗して体を支えるかは、非常に大きな問題であったと考えられる。植物は強固な細胞壁を発達させることによって、この難問を解決してきた。陸上での固着生活を選んだ植物は、効率的に葉に光を受け、根で水を吸収するためには、自分の姿勢を正しく保つための情報源として、重力を利用してきた。その反応システムは、重力に対抗して体を支える「抗重力反応」と、重力を利用して自らの形を整える「重力屈性反応」の2つである。現在までに過重力実験および宇宙での微小重量化で行われた実験により、重力応答には、単子葉イネ科植物では、 β -1,3-1,4-グルカン(MLG)およびキシラン間架橋が重要であることが報告されている。イネの細胞壁のヘミセルロースは、キシログルカンや1,3-1,4- β -D グルカン、キシランにより構成される。特にキシランがセルロース微繊維を架橋し細胞壁の強度に関係していると考えられる。現在までに、本研究においてキシラン分解酵素の過剰発現によって細胞壁改変されたイネ(xylosidase-full length cDNA Overexpressor: xylosidase-FOX)において、葉と茎での細胞壁構成が変化すると同時に、物理的強度や病害応答性が負の方向に変化することが分かっている。特に茎においては、キシランが減るのに対してセルロースが増加していた。そして、重力屈性がコントロールに比べ大きく向上していることが確認されている。MLGは成長に関連した多糖類として多数の報告があるが、キシランに関しては成長が停止した細胞の細胞壁において多くみられる、いわゆる二次細胞壁を代表する多糖類である。それにもかかわらず xylosidase-FOX イネでは重力屈性が向上していたことは興味深い。キシランが、重力屈性における偏差成長において、どのような機能を有しているかを明らかにすることは、成長発達過程における細胞壁機能について、新たな知見を与えるものとなると考えられる。そこで、本研究では、重力屈性能力の向上が見られた xylosidase-FOX イネおよびコントロールの屈曲部位における、キシランをはじめとした種々の細胞壁分布を、免疫組織化学染色によって明らかにすることが本研究の目的である。本研究の作業仮説として、重力屈性による偏差成長の際に、屈曲部の上下で細胞壁の分布や変化が生じていることを期待している。分布や成分の変化があった場合、偏差成長への影響が生じるパターンとして、以下の2点が考えられる。

- ① 下部の細胞壁が特に柔らかくなったことで、下部でより伸長が起こりやすくなった。
- ② 上部の細胞壁が特に固くなったことで、上部で伸長が起こりにくくなり、下部が引っ張られるようにして偏差成長が起こった。

材料と方法

・材料
イネ(*Oryza sativa* 品種:日本晴)を用いた。WT および xylosidase-FOX の第5葉期をインキュベーター内に置き、横たえて偏差成長させたサンプルの屈曲部位を用いた。

・方法
① テクノビット切片作成
インキュベーター内において横たえて偏差成長させた、第5葉期のイネの屈曲部位をサンプリングし、テクノビットに包埋し切片を作成した。イネにはケイ素が多く含まれ非常に硬い組織を有するため、ガラスナイフでの切片作成が困難であった。そのため、タングステンナイフを用いて8~10 μ mの厚さで切片を作成した。

② 組織染色
作成した切片を、トルイジンブルーを用いて染色を行った。

結果と考察

xylosidase-FOX および WT イネの屈曲部位の組織切片の作成、観察を行った。イネの屈曲部位は、テクノビット試料としては比較的大きなものであるため、固定条件の検討を行った。そして、屈曲部位は、茎に葉鞘が巻きついている状態であるため、適切な角度の屈曲部位を観察するための条件検討を行った。

検討した固定、脱水、包埋条件の方法で、健全な組織像を得ることができた。また、屈曲部位を観察するために、葉鞘を固定時に取り除くことも行ったが、屈曲部位の細胞を傷つけてしまう可能性があったため、包埋時に角度を調整し、周辺の葉鞘は、切片作成時に切片一枚ごとにピンセットで除去する方法により、健全な切片を得ることができた。

今後の展望

屈曲部位における屈曲面が観察可能な切片が得られたため、順次切片作成を行うとともに、組織染色および免疫組織化学染色を現在進めている。染色については、以下の5項目について行い、種々の細胞壁分布を調査する。

- ・LM10(抗 xylan 抗体)
- ・LM11(抗 arabinoxylan 抗体)
- ・MLG(抗 MLG 抗体)
- ・Ruthenium Red(ペクチン染色)
- ・Calcofluor White(セルロース染色)

また今後、ガスクロマトグラフィーによる細胞壁量および細胞壁構成糖分析も行う予定である。