

イネの発達過程におけるペクチン制御機構の機能解析

鈴木 靖章 (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】

高等植物に特徴的な構造である細胞壁は細胞形態のみならず発生や器官形成にも大きく関与することが知られている。細胞壁を構成する主成分のうち、ペクチンはその性質や存在量が制御されることで細胞接着性を高めるなどの細胞壁の特性を変化させる機構に関与することが報告されている。まずペクチンはゴルジ体においてペクチンメチルトランスフェラーゼ (PMT) により高度にメチル化された流動性の高い状態で合成される。やがて細胞壁へ小胞輸送されたメチル化ペクチンは、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、ゲル化することによる質の変化が起き、細胞接着性を高めるなどの細胞壁の特性を変化させる機構に関与することが報告されている。シロイヌナズナのような双子葉植物ではペクチンが全細胞壁中の約 35% と多く存在するものの、その機能欠損変異体は致死となり、ペクチン制御の植物発達への機能を解析しにくい。一方で単子葉植物のイネは、全細胞壁中のペクチンは約 5% と非常に少ないものの、分裂組織や生殖組織といった発達に重要な組織に局所的に多量のペクチンを含んでいることが報告されている。

OsPMT10, *OsPMT16* 変異体を用いた解析から、花粉管のメカニカルガイダンスと生殖組織の形態形成に、ペクチンのメチル化度調節が必須であることが示されている。しかし分裂組織における詳細なペクチンの分布・機能は単子葉植物・双子葉植物を問わず未だに解明されていない点が多い。そこで PME 阻害作用を持つことが近年報告された茶カテキンの主成分である EGCG (没食酸エピガロカテキン) を用いた投与実験を行うことで、イネの発達過程においてペクチンのメチル化調節がどのような機能を有するかについて考察する。本研究では分化の開始点である分裂組織においてペクチンが適切なメチル化度を維持することが重要であるという仮説に基づき、栄養生長期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】

実験には全ゲノム配列が解読されているイネ (*Oryza sativa* 品種: Nipponbare) を採用した。解析には、変異によって発現・器官形成などへの影響がこれまでに確認されている欠損変異体の *pmt10*, *pmt16*、過剰発現変異体の *PME3-FOX*, *PG-FOX* (*PG*: ペクチン分解酵素)、*PMT16::GUS* を使用した。

【方法】

1. EGCG 投与と表現型の観察

異なる濃度の EGCG ((-)-Epigallocatechin gallate) を含む KIMURA B 培地を用いて水耕栽培 (インキュベーター内) し、1 週間の伸長量、ペクチン制御に関わるいくつかの遺伝子由来の酵素活性や発現量の変化を WT と変異体とで比較した。

2. ペクチン局在・蓄積調査

植物体根をルテニウムレッド染色し、実体顕微鏡で観察した他、カルバゾール硫酸法を用いた糖定量を行うことでペクチンを

可視化・数値化した。

3. EGCG の及ぼす PMT 発現への影響

EGCG を投与・生育させた *OsPMT16::GUS* に対して GUS 染色法を行い、メチル化の阻害がペクチンの制御機構へ与える影響について調査した。

【結果】

1. EGCG 投与と表現型の観察

WT ではシュートでは伸長が抑制されるのに対して、根では伸長が促進された。また *PME3-FOX* を使用した場合は、WT の無処理と EGCG 処理 (50 μ M) でほぼ同様な表現型を示したほか、無処理では WT に比べてさらに根での伸長が抑制されていた。

2. ペクチン局在・蓄積の比較

ペクチンの局在は変化しないものの、PME 阻害を行うとより顕著な蓄積が観られた。この蓄積は糖定量でも傾向が観られた。

3. EGCG の及ぼす PMT 発現への影響

GUS 染色の結果、根端分裂組織では PME の阻害によって PMT の発現が抑制されていた。一方で茎頂分裂組織では PME 阻害の有無に関わらず PMT の発現が検出できなかった。

【考察と今後の展望】

PME3-FOX, WT (-EGCG, +EGCG) の水耕培養結果から、脱メチル化活性が下がるほど、根の伸長が促進されることが考えられる。しかし、*OsPMT16::GUS* の発現解析にて、PME 阻害により発現が抑制されていたことから、細胞壁で作用しているペクチンの酵素を阻害することによってゴルジ体内でペクチンをメチル化する機構が何らかの負の制御を受けることがわかる。従って、現在私はメチル化をそもそも受けていないペクチンが蓄積することで根の伸長促進を行うのではないかと考えている。今後は根における免疫抗体染色によるペクチンの種類の特定や茎頂分裂組織での解析、また PME Inhibitor 発現イネを使った調査や光条件の検討を行いたい。

本研究室で蓄積された PME と PMT の遺伝子調節イネの研究とあわせて、これらの課題を調査することで、様々な発達過程におけるペクチンのメチル化調節がどのような機能を有するかについて考察できると考えている。

【仮説】

