

イネとシロイヌナズナで異なる根の伸長に対するペクチンメチル化度の影響

石戸 美帆 (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わ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壁の粘性を上昇させるなどの物理的特性を変化させる機構に関わ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、高度にメチル化された流動性の高い状態であるメチル化ペクチンとして合成された後、アポプラストである細胞壁へ小胞輸送される。細胞壁において、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、カルシウムイオンと架橋を形成することが可能となる。カルシウム架橋を形成したペクチンは、カルシウムイオンを抱え込むことによりゲル化し細胞壁の特性を変化させる。シロイヌナズナのような双子葉植物ではペクチンが葉の全細胞壁中の約 35% と多く存在する一方で、単子葉植物のイネは、約 5% と非常に少ないことが報告されている。一方で、いずれも根においては、ペクチンを多く含むこともわかっている。しかし根の伸長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。現在までに本研究室では、イネ (*Oryza sativa*) を用いて、根の伸長とペクチンメチル化度の研究を 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行っている。その結果、イネでは EGCG 処理によって PME 活性は抑制され、根の伸長は促進された。ペクチンの染色と定量的結果、EGCG 処理を行ったイネでは根のペクチン量が増加していた。そこで本研究では、よりペクチン含量が多いことで知られるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いて、同様の EGCG 投与によって PME 活性の抑制実験を行うことで、ペクチン制御が根の伸長に及ぼす影響について明らかとすることを目的に実験を行った。このことにより、ペクチンメチル化度とペクチン量の変化が根の伸長に及ぼす影響における、双子葉植物と単子葉植物の相違点について考察した。

【方法】

1. EGCG 投与と根の伸長の観察

0 および 50 μM の濃度で EGCG ((-)-Epigallocatechin gallate) を含む Murashige-Skoog 培地を用いて、インキュベーター内で 23°C で水耕栽培し、1 週間の伸長量を測定した。

2. PME 活性の測定

各サンプルを Tris-HCL buffer (20 mM, pH 7.5) ですりつぶし、15,000 rpm で 10 分間遠心した後、上清を除き洗浄を行った。操作を繰り返し上清を除いた後、10% の NaCl を含む Tris-HCL buffer (20 mM, pH 7.5) を加え、4°C 条件下で 1 時間攪拌した。その後、15,000 rpm で 15 分間遠心し、上清を酵素液とした。基質には 0.3% のペクチン (89% メチル化) 1 ml、0.01% BTB 溶液 0.5 ml、DW 1.2 ml を混合した溶液を用い、酵素液 0.3 ml を加

え、A620 で 10 秒毎に 60 回測定し、吸光度の減少速度の傾きを PME 活性とした。

3. ペクチン染色

<脱メチル化ペクチンの染色>ルテニウムレッドは、主に脱メチル化ペクチンを染色し、メチル化ペクチンは染色されにくい。植物体(根)を 0.01% ルテニウムレッドを用いて 5 分間染色し、実体顕微鏡で観察した。

<全ペクチンの染色>メチル化ペクチンを NaOH 処理によりけん化することによりメチル基を除去することで、全てのペクチンをルテニウムレッドで染色することが可能となる。

0.1 M NaOH 溶液を調節し、根サンプルを 1 分間浸し、蒸留水で洗浄した。その後、脱メチル化ペクチンの染色と同様にルテニウムレッドによる染色を行った。

【結果と考察】

シロイヌナズナでは、EGCG 処理により約 40% の根の伸長の阻害が観察された。また、EGCG 処理により、PME 活性が約 68% 減少しており、PME 活性の阻害が確認された。ペクチン染色を行った結果、EGCG 処理を行ったシロイヌナズナの根では、ペクチン量の減少が観察された。脱メチル化ペクチンについては、EGCG 処理によって分裂領域の染色レベルが低下した。脱メチル化ペクチンはカルシウムと架橋を形成するため、分裂領域のカルシウム-ペクチン架橋のレベルも低下していることが考えられる。また、全ペクチン染色では、EGCG 処理によって伸長領域の染色レベルが低下していた。伸長領域に含まれるメチル化ペクチン量が特に低下していることが考えられる。

イネでは EGCG 処理によって根の伸長は促進され、根先端部のペクチン量が増加していた。シロイヌナズナと比較し、EGCG による PME 活性の阻害が、根の伸長に与える影響は逆になっている。PME 阻害によるペクチン合成への影響が、双子葉植物と単子葉植物とで反対になっていることは興味深い。しかし、ペクチン量が多くなったイネの根の伸長は促進され、ペクチン量が少なくなったシロイヌナズナの根の伸長は阻害されたことから、根の伸長とペクチン量とは正の相関があることが示唆された。

