

イネの側根形成・発達におけるペクチンメチル基転移酵素の機能解析

重川 羽純 (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)

<導入・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、分化や発生の制御に重要な役割を果たしている。ペクチンはゴルジ体内で合成され、まずペクチンの主鎖が合成されると、次にペクチンメチルトランスフェラーゼ (PMT) により、メチル基が付与され、流動性の高いメチル化ペクチンの状態となり、最終的に細胞壁へと輸送される。メチル化ペクチンは、細胞壁中にて、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、カルシウム架橋を形成、ゲル化する。また、脱メチル化されたペクチンは、ペクチン分解酵素 (PG) のターゲットとなることから、脱メチル化することで、ペクチン分子の大きさも制御を受けることとなる。これらのことによりペクチンの質的、量的変化が起き、細胞壁の特性全体を調節する機構が存在することで、器官形成などに寄与しているとされているが、未だ報告は少ない。例えば、根はペクチンを多く含むことから、根圏の形成や根の伸長成長に重要であるとされているが、詳しい機構は明らかではない。また、特にペクチン量の少ないイネにおける知見は少ない。そして、根におけるペクチンの調節機構について、PMEに関しては多くの報告があるが、PMTの根における働きについての報告は、非常に少ないのが現状である。そこで本研究では、イネの PMT の中で最も発現量の強い *OsPMT10* に着目し、その変異体の表現型の調査を行うことで、根の発生、発達過程におけるペクチンのメチル化制御機構を明らかとすることを目的に調査を行った。

<材料・方法>

● イネの生育

WT(品種: Dongjin)、*OsPMT10*の機能欠損変異体である *ospmt10*、*pPMT10::GUS*の種子を3日間吸水させた後、1.0 mMのCaCl₂水耕液で4-6日間水耕栽培を行ったイネを用いて以下の実験を行った。

● GUS染色法を用いた *OsPMT10*発現部位の観察

*pOsPMT10::GUS*を90%アセトンで固定した後、GUS staining bufferに浸して15分脱気し、37°Cで一晩染色し観察した。

● 表現型の観察

WTと *ospmt10*の根において、個体ごとに根の総数と、そのうち側根を含む根の数を計測し、側根を含む根の割合を計測した。また、根の先端15 mmの領域における側根の数をWTと *ospmt10*でそれぞれ計測し、平均値を算出した。

● ルテニウムレッド(RR)による根のペクチン染色

4-6日間生育させたWTと *ospmt10*の根を0.01%のRRで5日間染色し、脱メチル化ペクチンの観察を行った。その後、0.1NのNaOHで1分間けん化処理した後、再び0.01%のRRで5日間染色し、メチル化ペクチンも含むペクチン全量の観察を行った。

<結果>

● *OsPMT10*発現部位の観察

種子根と側根の根端、側根の原基の組織でGUSの高い染色性が観察された。一方、根の伸長領域は、種子根、側根ともに発現は確認されなかった。

● 側根の表現型

WTと比べて *ospmt10*の方が側根を含む根の割合が高かった。また、根の先端15 mmにおける側根の数を比べた結果、WTと比べて *ospmt10*で側根の数が多かった。種子根の根端の形態は、WTと *ospmt10*で違いはなかった。

● ペクチンの染色レベルとその分布

NaOH処理前のRR染色(脱メチル化ペクチン染色)では、WTと比べて *ospmt10*の方が側根原基と側根の根端において高い染色性がみられた。NaOH処理後のRR染色(全ペクチン染色)においても、WTと比べて *ospmt10*の方が、側根原基における染色性が高かった。

<考察>

GUS染色による *OsPMT10*発現部位の観察により、*OsPMT10*は種子根と側根の分裂組織、そして、側根の原基で発現することから、根の伸長には働かないが、分裂や組織分化が盛んな組織で働く可能性が示された。これらの結果から、*OsPMT10*の変異体である *ospmt10*は、根の長さよりも、種子根の発達や、側根の分化に影響が出ることが予想されたため、本研究では *ospmt10*で、根の発達や分化に着目した観察を行うこととした。*ospmt10*では、側根が生えている根の割合がWTより高く、WTでは側根が観察されることが少ない根の先端15 mmで側根の数が多かったことから、*OsPMT10*が欠損することで、側根の分化が生じやすくなっていることが示唆された。

そこで、ペクチンのメチル化転移酵素である *OsPMT10*と側根の分化との関係性を調査するため、ペクチン染色を行なった。その結果から、*ospmt10*の側根原基では、ペクチン量がWTよりも増加していた。また、その増加は脱メチル化ペクチン量の増加によるものであった。このことから、*ospmt10*で *OsPMT10*が欠損しペクチンへのメチル化の付与が不全となることにより、まずペクチン合成が促進されたと考えられる。そして、ペクチンがメチル化できないことで、脱メチル化ペクチンの状態で、ゴルジ体から細胞壁へ放出された可能性が考えられる。側根原基で、脱メチル化ペクチンが増加したことで、側根の分化がなぜ促進されたかについては、現在解析を進めている。今後、側根の分化とペクチンのメチル化制御の関係性について明らかとするため、組織化学的方法だけでなく、生化学的な解析を進めるとともに、PMEやPGの活性の測定などのペクチン分解制御の解析を行う予定である。