

ペクチン分解酵素過剰発現イネを用いた側根形成における細胞壁機能に関する研究

橋川 美怜（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・目的】

植物の細胞壁は、細胞の形態を決定するとともに、器官形成や細胞の保護など多様な役割を担い、植物体全体の形態形成に深く関与している。細胞壁の主成分の1つであるペクチンは、その遺伝子発現量や性質の制御を通じて細胞壁の特性に影響を与え、器官形成や細胞接着に関与する。ペクチンの合成や性質の制御機構として、まずペクチンの主鎖となるホモガラクトuronanがゴルジ体で形成される。このホモガラクトuronanは、ペクチンをメチル化する酵素であるペクチンメチルトランスフェラーゼ (PMT) によって高度にメチル化されることで、流動性の高い状態となる。その後、細胞壁に輸送され、ペクチンを脱メチル化する酵素である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ることで、カルシウムイオンとの架橋構造が形成され、ゲル化が起こる。また、脱メチル化されたペクチンはペクチン分解酵素 (PG) の標的となり、低分子化される。このようにペクチンは、メチル化レベルや分子の大きさの制御を受け、性質が変化することで、細胞壁特性に変化を与えると考えられている。しかし、ペクチンの器官形成に関する報告はまだ少なく、特に根におけるペクチンの機能は十分に解明されていない。一方で、根にはペクチンが豊富に含まれるとされ、根圏の形成や側根の形成などにおいて細胞壁の複雑な制御が必要と考えられる。先行研究では、イネの根における PMT と側根形成の関係が調査されており、*OsPMT* 遺伝子である *OsTSD2* や *OsPMT10* を欠損させた変異体では、野生型と比較して側根密度が高くなることが示されている。これは、PMT の欠損によりペクチンのメチル化が妨げられ、PG によって分解され低分子化が起こりやすい脱メチル化ペクチンが細胞壁に増加し、側根形成に影響を与えたと推測される。そこで本研究では、PG を過剰発現させたイネである *OsPG2-FOX* に着目し、その変異体の表現型を調査することで、ペクチン量の変化が根の器官形成や発達、特に側根の形成に及ぼす影響を評価し、ペクチンの根の器官形成における役割を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】

・実験1. 根の伸長の測定

WT (品種: 日本晴)、PG を過剰発現させた変異体イネである *OsPG2-FOX* の種子を3日間吸水させ、1.0 mM の CaCl_2 水耕液で3日間水耕栽培を行った。また、根の長さを測定した。

・実験2. ルテニウムレッド (RR) による根のペクチン染色

3日間生育させた WT および *OsPG2-FOX* の根を 0.01%RR で5分間染色した。脱メチル化ペクチンを染色した。その後、0.1 N の NaOH で1分間けん化処理した後、再び 0.01%RR で5分間染色し、ペクチンの観察を行った。

・実験3. 側根の計数

実験2で染色したサンプルの根における側根および側根原基の数を数えて、WT と *OsPG2-FOX* で比較した。

・実験4. 免疫蛍光化学染色

3日間生育させた WT および *OsPG2-FOX* の根の先端から 15~20 mm、25~30 mm の領域を切り出し、テクノビット樹脂に包埋した。ミクロトームを用いて、サンプルを包埋した樹脂から 5 μm の根の輪切り切片を作成した。この切片に対して抗 PG 抗体で免疫組織化学染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

【結果】

・根の伸長の測定

OsPG2-FOX では、WT と比較して根の伸長量が増加していた。WT に対して 126%の伸長量を示した。

また、*OsPG2-FOX* の根の先端領域で特徴的な根毛の形成が観察された。

・側根の表現型

OsPG2-FOX は、WT と比較して根に形成される側根の数が多かった。

・免疫組織化学染色

根の先端から 25~30 mm 領域の切片において、*OsPG2-FOX* の内鞘を含む中心柱部分では、PG の蛍光シグナルが WT よりも強く観察された。

【考察】

OsPG2-FOX では、WT と比較して根の伸長量が増加し、根毛の形成にも変化が見られた。*OsPG2-FOX* は、PG が過剰発現しているため、ペクチンの低分子化が進行することが報告されている。この結果から、ペクチンの低分子化により、ペクチン-カルシウムイオン架橋による構造強度の維持が困難になり、細胞壁強度が低下して根や根毛が伸長しやすくなったと考えられる。

また、側根の形成に関して、側根原基の形成が中心柱の内鞘細胞での細胞分裂によって開始し、その後、皮層や表皮を通過して発達することが知られている。本研究では、WT と比較して、*OsPG2-FOX* で側根数が増加していた。また、側根形成の開始する内鞘で PG の特異的な局在が見られた。この結果から、内鞘細胞の細胞壁におけるペクチンの分解や低分子化が活発になり、細胞壁が緩むことで側根の分化が促進された可能性が考えられる。

【今後の展望】

今後は、側根の分化とペクチンのメチル化レベルの制御の関係性を明らかにするため、PME を過剰発現させた *PME-FOX* を用いて根の伸長測定や側根形成の解析を行う予定である。