

高等植物の茎の物性を支配する遺伝子の単離

Positional cloning of rice *BRITTLE CULM 6* gene

プロジェクト代表者名：小竹 敬久（理工学研究科・助手）

Toshihisa Kotake (Graduate School of Science and Engineering, research associate)

1 研究背景と目的

植物には動物のような骨格器官は存在しないが、代わりに一つひとつの細胞を取り囲む細胞壁が植物体に物理的な強度を与えている。イネのカマイラス (*brittle culm*) 変異体はその名 (鎌要らず) の通り、軽く曲げただけで茎や葉が簡単に折れちぎれてしまう。カマイラス変異体の折れやすい性質は成長が進んだ時期から顕著になることから、カマイラス変異体は二次細胞壁の構築に異常をもつことが予想される。イネのカマイラス変異体には、原因遺伝子座の異なる 5 種類の変異体 (*bc1, bc2, bc3, bc4, bc6*、図 1 参照) が知られ、程度の差はあるものの、共通して折れやすい性質と二次細胞壁におけるセルロース含量の低下を示す。このことはイネの二次細胞壁の構築には少なくとも 5 つの独立した遺伝子が不可欠な役割を果たしていることを示唆している。*brittle culm 6* (*bc6*) は他のカマイラスとは異なり変異遺伝子は優性で、著しいカマイラス形質を示す。本研究では、*bc6* 変異により引き起こされる細胞壁の異常を明らかにするとともに、ポジショナルクローニングにより *BC6* 遺伝子を単離することを目的とした。

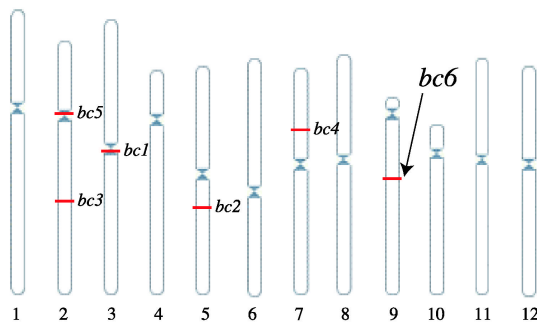


図1 イネのカマイラス遺伝子座

下の数字は染色体の番号を示す。本研究では *BC6* 遺伝子の単離と *bc6* 変異体の細胞壁の解析を行った。

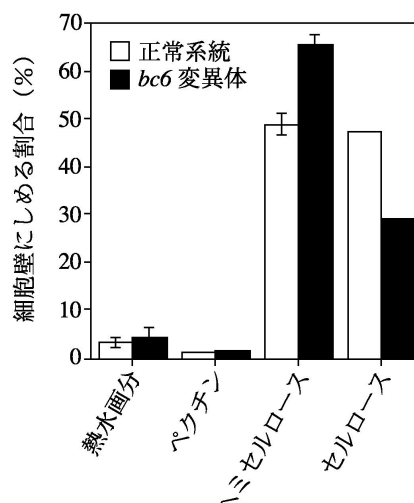
2 *bc6* 変異体のセルロース含量の低下

植物の細胞壁は主に、キレートにより抽出されるペクチン性の多糖類、強アルカリにより抽出されるヘミセルロース性多糖類、最終的に残さとして得られるセルロースで構成されている。また植物の細胞壁はエイジとともに変化し、細胞成長が終わった組織で発達する二次細胞壁には一次細胞壁と比べてセルロースやリグニンの量が多い。カマイラスの折れやすい性質は、二次細胞壁成分の合成異常や細胞壁全体の構築異常に起因すると考えられる。そこでまず、*bc6* 変異体の節間の細胞壁をペクチン、ヘミセ

ルコース、セルロースに分画し、その組成を正常系統のイネである台中65号と比較した(図2参照)。bc6変異体では節間のセルロース含量が正常系統と比べておよそ4割低下しており、bc6変異体の著しい折れやすさ(カマイラズ形質)はセルロース含量の減少に起因することが示唆された。一方でヘミセルロースは増加しており、bc6変異体の細胞壁ではセルロースの減少を他の多糖類で補う補償反応が起きている可能性が高い。セルロース同様に二次細胞壁に蓄積するリグニンについても含量を測定した。bc6変異体の細胞壁では、正常系統と比べてリグニン含量が1割ほど増加していた(bc6、細胞壁1g当たり1.59 ± 0.08 mg; 正常系統、同じく1.43 ± 0.06 mg)。このことは、bc6変異体ではリグニンもセルロース含量の減少を補う補償反応に関与していることを示唆する。これまでリグニンが細胞壁構築に果たす役割は明らかにされていないが、bc6変異体をさらに解析することで細胞壁構築におけるリグニンの役割を解明できる可能性が高い。

図2 bc6変異体の多糖類組成

bc6変異体と正常系統のイネで細胞壁多糖類の組成を比較した。bc6変異体ではセルロースが減少している。



3 bc6変異体における細胞壁成分の異常蓄積

上述の実験から bc6 変異体の節間では細胞壁成分の組成が変化していることが示された。そこで、サフラニン(リグニン等を染色)とファストグリーン(若い細胞壁を染色)で輪切りにした節間組織を染色し、細胞壁成分の変化を組織レベルで観察した。正常系統のイネはファストグリーンに比較的良好に染まり、全体が緑色に染色されたのに対し、bc6変異体はサフラニンによく染まり全体が赤っぽく染色された。このことは、bc6変異体ではサフラニンに染まるリグニンなどが蓄積していることを示唆する。しかしながら、上述したように定量により示されたリグニンの増加は1割程度であり、bc6変異体で異常蓄積しているサフラニン染色物質はリグニン以外の細胞壁成分である可能性もある。今後、サフラニンによる染色の違いが何に起因するか調べる予定で

ある。

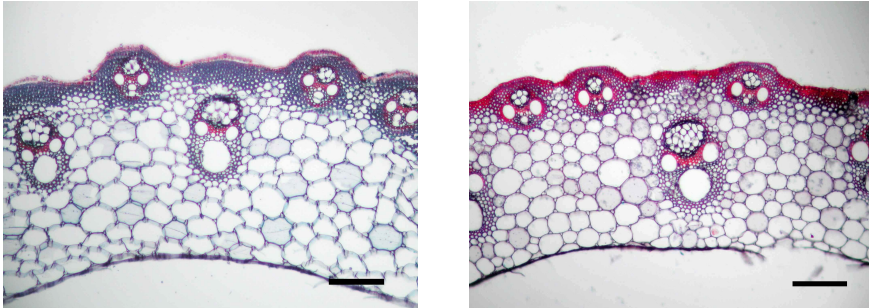


図3 *bc6* 変異体における細胞壁成分の蓄積

正常系統のイネ（左）と *bc6* 変異体（右）の節間切片をサフラニンとファストグリーンで染色した。写真中のバーは 100 μm 。

4 原因遺伝子のマッピングと *BC6* 遺伝子の単離

これまでのリンケージマップから *bc6* 遺伝子は第 9 染色体に存在することが示唆されていた。まず、既存の DNA マーカーを用いた大まかなマッピングを行い、*bc6* 遺伝子が第 9 染色体 55-60 cM 付近に存在すること、原因遺伝子座周辺はインディカゲノムの配列に近いことを確かめた。さらに詳細に遺伝子をマップするために、*bc6* 変異体をジャポニカの正常系統であるとりで 1 号と交配して F₂ 分離集団を作成した。およそ 1000 個体の分離集団について *bc6* 変異近傍の遺伝型を調べ、この領域で染色体組換えを起こしている個体を多数得た。染色体組換え個体についてさらに細かく遺伝型を調べ、各個体の遺伝型と形質を整理し、詳細なマップを作成した。*bc6* 変異遺伝子は、第 9 染色体の 2 つの bacterial artificial chromosome クローン（BAC クローン、図 4 の BAC クローン 3 と 4）の約 150 kb に絞り込まれた。この領域には約 1000 アミノ酸からなるタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム（ORF）が存在していた。

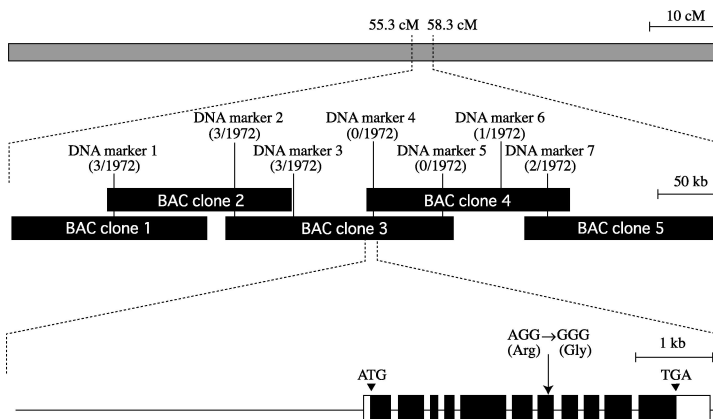


図4 *BC6* 遺伝子のクローニング

bc6 変異遺伝子のファインマップを作成し、原因遺伝子を突き止めた。括弧内は組換えが認められた染色体の数。

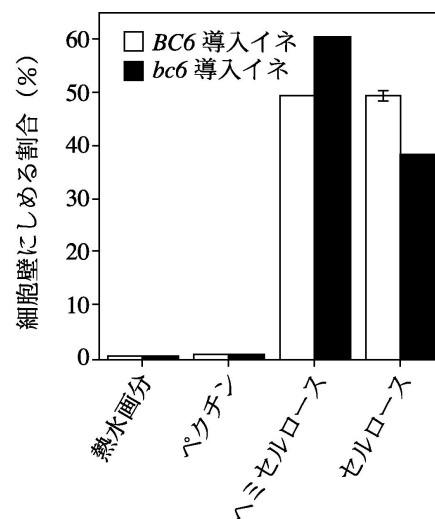
bc6 変異体と正常系統イネそれぞれからこの遺伝子を単離して配列を比較したところ、*bc6* 変異体では通常高度に保存されている領域でアミノ酸残基の置換を引き起こす点突然変異が起きていることが分かった。この遺伝子が原因遺伝子であるか確認するために、以下に示す相補実験を行った。

5 *bc6* 変異遺伝子による形質の相補実験

正常な遺伝子 (*BC6*) および 1 塩基の点突然変異を持った変異遺伝子 (*bc6*、優性の変異遺伝子) それぞれを正常系統のイネである台中 6 5 号に導入し、カマイラズ形質と細胞壁多糖類の組成 (図 5) を調べた。表現形質にはばらつきはあるものの、*bc6* 遺伝子を導入したイネでは明確なカマイラズ形質が現れ、細胞壁中のセルロース含量も低下した。一方、*BC6* を導入したイネではカマイラズ形質は見られず、セルロース含量も変化しなかった。以上の結果から、*bc6* は 1 アミノ酸が置換することで優性のカマイラズ遺伝子となっていることが明らかになった。

図 5 *bc6* 遺伝子の相補実験

正常な *BC6* 遺伝子と *bc6* 変異遺伝子を導入したイネで、細胞壁多糖類の組成を比較した。*bc6* 変異遺伝子を導入したイネではセルロースが減少している。



6 今後の展望

本研究では、第 9 染色体の 55.3-58.3 cM に存在する遺伝子の変異がセルロースの合成異常やカマイラズ形質を引き起こすことが明らかになった。変異遺伝子は優性であるため、変異遺伝子から生じるタンパク質は植物細胞内でドミナントネガティブフォームとなり、二次細胞壁におけるセルロース合成や細胞壁構築を攪乱していると予想される。今後、*bc6* 変異タンパク質によるセルロース合成阻害の分子機構や電子顕微鏡を用いた細胞壁構造の詳細な解析から、イネ科植物の二次細胞壁の成り立ちや生物学的な意義を明らかにしたい。