

## 植物細胞壁の構築を制御する因子の同定

プロジェクト代表者：小竹敬久（理工学研究科・准教授）

### 研究背景および目的

植物が光合成により同化した炭素の大半は細胞壁多糖類として蓄積する。実際、植物細胞壁の主要成分であるセルロースは、地球上で最大のバイオマス資源である。現在、次世代バイオエネルギーの一つとしてセルロース系バイオエタノールが注目されているが、バイオエタノール製造に適したイネ品種はまだ開発されていない。稲わらの細胞壁多糖類の質や量を人為的に制御できれば、バイオエタノールの生産効率や品質が飛躍的に向上する可能性が高い。イネのカマイラズ変異体群 (*bc1*~*bc6*) はポキポキと簡単に折れちぎれる突然変異体で、細胞壁構築遺伝子に変異をもつと予想される。通常、カマイラズ変異体では細胞壁のセルロース量が低下するため、カマイラズ変異体自体はバイオエタノール生産に適さないが、原因遺伝子やそれにより引き起こされる現象を解明することは、バイオエタノール生産に適した品種の開発に非常に有用である。

本研究では、節（茎と茎のつなぎ目）でのみ、折れやすい性質を示す、*bc5* 変異体（図1）を研究の対象とした。

**図1 節のみ折れやすい *bc5* 変異体** *bc5* 変異体（上）と正常なイネ（下）の節の物性を比較した。正常なイネでは折り曲げてもちぎれることはないが、*bc5* 変異体は、簡単にちぎれた。このような性質は、節のみで見られ、茎（節間）や葉では見られなかった。図中のバーは2 cmを示す。



### 材料および方法

*bc5* 変異体の節は、液体窒素中で粉碎後、乳鉢で完全に磨砕した。得られた細胞壁を、熱水、キレート溶液（50 mM EDTA）、アルカリ（17.5% NaOH, 0.04% NaBH<sub>4</sub>）溶液で処理し、遊離した多糖類をそれぞれ、熱水面分、ペクチン画分、ヘミセルロース画分とした。残さは、セルロース画分とした。糖量はフェノール・硫酸法により決定した。

細胞壁多糖類、リグニンの合成に関わる遺伝子の発現は、定量的 RT-PCR により調べた。すでに、二次細胞壁特異的に機能することがわかっている3つのセルロース合成酵素（*CesA*）遺伝子、発現量が高いキシラン合成遺伝子、およびリグニン合成に関わる遺伝子の相対的 mRNA 蓄積量を調べた。

### 結果及び考察

イネの茎（節間）は出穂時に伸長する。節は茎と茎のつなぎ目として機能するが、その細胞壁合成は茎とは異なる制御を受けている可能性がある。*bc5* 変異体は茎でカマイラズ性質を示す、唯一の突然変異体である。*bc5* 変異体の節の折れやすさをエイジ別で調べたところ、カマイラズ性質は出穂前は明確でなく、出穂後2週間以降は顕著であった。また、正常なイネでは、出穂後2週間で節の細胞壁多糖類量が出穂前に比べてほぼ倍増したが、*bc5* 変異体ではこのような増加が見られなかった。一方で、茎や葉の細胞壁多糖類量は正常なイネと *bc5* 変異体で変わらなかった。これらのことから、*bc5* 変異体は節特有の二次細胞

壁（細胞成長後に一次細胞壁の内側に形成される、セルロースに富んだ細胞壁）の合成に異常を有すると予想した。

*bc5* 変異体の節の細胞壁多糖類を正常なイネと比較したところ、*bc5* 変異体の節では、セルロースとヘミセルロースがともに4割程度減少していることがわかった。また、フルオログルシノールを用いたリグニン特異的な組織観察では、*bc5* 変異体の節におけるリグニン蓄積の低下が見られた。これまでに解析された他のカマイラズ変異体 (*bc1, 2, 3, 4, 6*) では、セルロース含量の低下が見られる一方で、ヘミセルロースの含量は変化しないか、むしろ増加している。*bc5* 変異体の節の細胞壁はこの点で他のカマイラズ変異体と明確に異なっており、*bc5* 変異体が二次細胞壁の構築全体に異常を有することが示された。

この仮説を証明すべく、細胞壁成分の合成酵素遺伝子の発現を調べた。*bc5* 変異体の節では、調べた全てのセルロース合成酵素遺伝子（3種）とキシラン合成酵素遺伝子の一部（2種）、リグニン合成系遺伝子の一部（1種）で、顕著な発現量の低下が認められた。*BC5* 遺伝子は、これら二次細胞壁成分の合成を上流で制御する因子をコードすると考えられる。

### 課題と今後の展望

本研究では、*bc5* 変異体の節ではセルロース、ヘミセルロース、リグニンいずれの含量も低下していること、および、それらの合成に関わる遺伝子の発現が低下していることがわかった。これらはイネ科植物の二次細胞壁構築機構を理解する上で重要な成果であると考えられる。一方で、本研究では、*bc5* 変異体の原因遺伝子を単離できなかった。5000 個体の F2 集団を用いたマップベースドクローニングでは、2.8 Mb の領域に *bc5* 変異遺伝子を絞り込むことができたが、これは遺伝子の単離には十分ではない。今後、ゲノムやトランスクリプトームを利用した *bc5* 変異遺伝子の単離を行う予定である。

イネに6種類のカマイラズ遺伝子が存在することが示すように、植物の二次細胞壁構築には多数の因子が関与する。これらの因子が適切な時期・部位で機能することも重要と考えられる。従って、*bc5* 変異遺伝子の単離に加え、細胞壁構築プロセスにおける *BC5* 遺伝子の機能を時空間的に理解することも、優良なバイオマス資源を蓄積するイネの作出に重要と考えている。

### 研究成果（原著論文のみ、関連研究を含む）

- 1) Konishi T., **Kotake T.**, Soraya D., Matsuoka K., Koyama T., Kaneko S., Igarashi K., Samejima M. and Tsumuraya Y. Properties of family 79  $\beta$ -glucuronidases that hydrolyze  $\beta$ -glucuronosyl and 4-O-methyl- $\beta$ -glucuronosyl residues of arabinogalactan-protein. *Carbohydr. Res.* **343**, 1191-1201 (2008)
- 2) Kimpara T. Aohara T., Soga K., Wakabayashi K., Hoson T., Tsumuraya Y. and **Kotake T.**  $\beta$ -1,3:1,4-Glucan synthase activity in rice seedlings under water. *Ann. Bot.* **102**, 221-226 (2008)
- 3) Soga K., **Kotake T.**, Wakabayashi K. and Hoson T. Transient increase in the levels of  $\alpha$ -tubulin complex in reorientation of cortical microtubules by gravity in azuki bean (*Vigna angularis*) epicotyls. *J. Plant Res.* **121**, 493-498 (2008).
- 4) Soga K., **Kotake T.**, Wakabayashi K. and Hoson T. The Transcript level of katanin gene is increased transiently in response to changes in gravitational conditions in azuki bean epicotyls. *Biol. Sci. Space* **23**, 22-27 (2009).