

氏名	青原 勉
博士の専攻分野の名称	博士 (学術)
学位記号番号	博理工甲第 766 号
学位授与年月日	平成 22 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	イネの二次細胞壁構築機構に関する研究
論文審査委員	委員長 教授 円谷 陽一 委員 教授 高橋 康弘 委員 准教授 金子 康子 委員 准教授 小竹 敬久

## 論文の内容の要旨

植物の細胞壁は主に若い細胞で発達する一次細胞壁と成長が停止した細胞で発達する二次細胞壁に分類される。セルロース、ヘミセルロース、リグニンが蓄積する二次細胞壁は、特に厚壁組織（繊維細胞組織）や維管束組織（管状要素）で発達し、植物体に物理的強度を与える。例えば樹木の大部分は、繊維細胞組織と管状要素から成る木質細胞で構成されている。木質細胞には多くのバイオマスが蓄えられており、これらバイオマスを有効利用するためにも二次細胞壁構築機構の解明は必要不可欠である。シロイヌナズナでは網羅的に細胞壁変異体の単離・解析が行われ、二次細胞壁構築に関わる遺伝子が多数同定されている。すなわち二次細胞壁成分（セルロース、キシラン、リグニン）の合成酵素や二次細胞壁全体の構築に関わる遺伝子である。しかしながら、これらの遺伝子はいずれも花茎や葉、根で機能しているものであり、イネ科植物特有な器官である節で働く遺伝子は明らかになっていない。その上、イネ科植物の二次細胞壁は、セルロース、グルクロノアラビノキシラン、 $\beta$ -(1,3),(1,4)-グルカン、リグニンで構成され、双子葉植物に多く含まれるペクチンやキシログルカンは極わずかしが含まれていない。イネ科植物と双子葉植物では細胞壁成分が大きく異なるため、同じ器官（節間と花茎など）であっても二次細胞壁構築機構は大きく異なると予想される。イネのカマイラズ (*brittle culm; bc*) 変異体は、若い個体では明確な形質が現れず、生長の終わった組織において顕著であることから、原因遺伝子は二次細胞壁構築に関わっていると考えられている。カマイラズ遺伝子群の機能を解明することで、イネ科植物特有な二次細胞壁の構築・制御についての理解が深まると期待できる。

本研究の第一章では、節のみでカマイラズ形質を示すイネのカマイラズ変異体 *bc5* の細胞壁の性状を調べるとともに原因遺伝子のマッピングを行った。*bc5* 変異体と正常系統の節について細胞壁染色試薬で染色したところ、*bc5* 変異体の節の厚壁組織は、サフラニンやリグニン特異的染色試薬であるフロログルシノールではほとんど染まらなかった。また、透過型電子顕微鏡による観察では、*bc5* 変異体の節の厚壁組織細胞壁は正常系統と比較して明らかに薄く、細胞壁の層状構造が見られなかった。一方、節間の厚壁組織では、正常系統と *bc5* 変異体で違いが見られなかった。これらの結果は、BC5 は節の厚壁組織細胞壁において二次細胞壁構築に関わることを示唆する。細胞壁成分について調べたところ、*bc5* 変異は節のセルロース、ヘミセルロース量に影響し、糖量はそれぞれ正常系統の 53%、65%だった。さらにヘミセルロースの構成糖及び

結合様式分析から、*bc5* 変異体では特にグルクロノアラビノキシランが減少していることが判った。定量的 RT-PCR では、*bc5* 変異がセルロース、キシラン、リグニンの合成に関わる遺伝子の発現レベルを減少させることが示唆された。以上の結果から、*BC5* 遺伝子は、節の厚壁組織においてセルロース、ヘミセルロース、リグニンなどの二次細胞壁成分全体の合成・蓄積を制御していると考えられる。

第二章では、3つのカマイラズ変異遺伝子 *bc1*、*bc3*、*bc6* のダブルミュータント、トリプルミュータントの解析から、節間皮層組織の二次細胞壁構築におけるこれらカマイラズ遺伝子の機能について調べた。これまでセルロースの合成・蓄積における cellulose synthase catalytic subunit (CesA) 以外の分子機能はあまり明らかにされていなかったが、COBRA-like (BC1) や dynamin related-protein 2B (BC3) が CesA9 (BC6) とともにセルロースの合成・蓄積に関わることが明らかになった。各種細胞壁染色試薬による組織観察では *bc1*、*bc3*、*bc6* 変異体はそれぞれ皮層組織で異常が見られ、維管束では異常は見られなかった。これらのカマイラズ遺伝子は、維管束組織よりも皮層組織の二次細胞壁肥厚に重要であることが明らかになった。皮層組織を透過型電子顕微鏡で観察すると、いずれのシングルミュータントでも細胞壁の厚さが正常系統の半分以下になっていた。さらに *bc3* 変異を含むダブルミュータント (*bc1 bc3*、*bc3 bc6*) は、それぞれのシングルミュータントより細胞壁が薄くなったのに対し、*bc1 bc6* 変異体の細胞壁はそれほど薄くならなかった。*bc1 bc3 bc6* 変異体の細胞壁は、*bc3* 変異を含むダブルミュータントと同程度だった。細胞壁成分について調べたところ、*bc3* 変異を含むダブルミュータントは、シングルミュータントと比較すると著しい細胞壁多糖の減少が見られた。*bc3* 変異と *bc1* または *bc6* 変異の組み合わせによる二重変異は、相加的に作用し細胞壁構築異常を引き起こすことが判った。これらの結果から、皮層組織の二次細胞壁構築において BC1 と BC6 はセルロース合成そのものに関与するのに対し、BC3 はこれらとは異なる機構でセルロースの合成を制御すると予想される。

## 論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、論文発表会を平成 22 年 2 月 5 日に開催し、論文内容の審査を行った。審査結果を以下に要約する。

植物の細胞壁は主に若い細胞で発達する一次細胞壁と成長が停止した細胞で発達する二次細胞壁に分類される。セルロース、ヘミセルロース、リグニンが蓄積する二次細胞壁は、特に厚壁組織（繊維細胞組織）や維管束組織（管状要素）で発達し、植物体に物理的強度を与える。シロイヌナズナでは網羅的に細胞壁変異体の単離・解析が行われ、二次細胞壁構築に関わる遺伝子が多数同定されている。すなわち二次細胞壁成分（セルロース、キシラン、リグニン）の合成酵素や二次細胞壁全体の構築に関わる遺伝子である。しかしながら、これらの遺伝子はいずれも花茎や葉、根で機能しているものであり、イネ科植物特有な器官である節で働く遺伝子は明らかになっていない。イネ科植物と双子葉植物では細胞壁成分が大きく異なるため、同じ器官（節間と花茎など）であっても二次細胞壁構築機構は大きく異なると予想される。

イネのカマイラズ (*brittle culm; bc*) 変異体は、若い個体では明確な形質が現れず、生長の終わった組織において顕著であることから、原因遺伝子は二次細胞壁構築に関わっていると考えられている。本研究は、イネ科植物特有な二次細胞壁の構築・制御の仕組みを明らかにする目的でカマイラズ変異体に着目し、細胞壁の性状、カマイラズ原因遺伝子のマッピング、ならびにカマイラズ遺伝子群の機能につてまとめたものである。

### 1. イネのカマイラズ変異体 *bc5* の細胞壁の性状解析と原因遺伝子のマッピング

本研究の第一章では、節のみでカマイラズ形質を示すイネのカマイラズ変異体 *bc5* の細胞壁の性状を調べるとともに原因遺伝子のマッピングを行った。*bc5* 変異体と正常系統の節について細胞壁染色試薬で染色したところ、*bc5* 変異体の節の厚壁組織は、サフラニンやリグニン特異的染色試薬であるフロログルシノールではほとんど染まらなかった。また、透過型電子顕微鏡による観察では、*bc5* 変異体の節の厚壁組織細胞壁は正常系統と比較して明らかに薄く、細胞壁の層状構造が見られなかった。一方、節間の厚壁組織では、正常系統と *bc5* 変異体で違いが見られなかった。これらの結果は、*BC5* は節の厚壁組織細胞壁において二次細胞壁構築に関わることを示唆する。細胞壁成分について調べたところ、*bc5* 変異は節のセルロース、ヘミセルロース量に影響し、糖量はそれぞれ正常系統の 53%、65% だった。さらにヘミセルロースの構成糖及び結合様式分析から、*bc5* 変異体では特にグルクロノアラビノキシランが減少していることが判った。定量的 RT-PCR では、*bc5* 変異がセルロース、キシラン、リグニンの合成に関わる遺伝子の発現レベルを減少させることが示唆された。以上の結果から、*BC5* 遺伝子は、節の厚壁組織においてセルロース、ヘミセルロース、リグニンなどの二次細胞壁成分全体の合成・蓄積を制御していると考えられる。*bc5* 原因遺伝子を特定するために、各種 DNA マーカーを用いたマッピングを行った。*bc5* の原因遺伝子は第 2 染色体の約 2.5 Mb に絞り込むことができたが、この領域はセントロメアの近傍に位置しており、原因遺伝子の同定には至らなかった。

### 2. イネのカマイラズ遺伝子群の機能解析

第二章では、3 つのカマイラズ変異遺伝子 *bc1*、*bc3*、*bc6* のダブルミュータント、トリプルミュータントの解析から、節間皮層組織の二次細胞壁構築におけるこれらカマイラズ遺伝子の機能について調べた。これまでセルロースの合成・蓄積における cellulose synthase catalytic subunit (*CesA*) 以外の分子機能はあま

り明らかにされていなかったが、COBRA-like (BC1) や dynamin related-protein 2B (BC3) が CesA9 (BC6) とともにセルロースの合成・蓄積に関わることが明らかになった。各種細胞壁染色試薬による組織観察では *bc1*、*bc3*、*bc6* 変異体はそれぞれ皮層組織で異常が見られ、維管束では異常は見られなかった。これらのカマイラズ遺伝子は、維管束組織よりも皮層組織の二次細胞壁肥厚に重要であることが明らかになった。皮層組織を透過型電子顕微鏡で観察すると、いずれのシングルミュータントでも細胞壁の厚さが正常系統の半分以下になっていた。さらに *bc3* 変異を含むダブルミュータント (*bc1 bc3*、*bc3 bc6*) は、それぞれのシングルミュータントより細胞壁が薄くなったのに対し、*bc1 bc6* 変異体の細胞壁はそれほど薄くならなかった。*bc1 bc3 bc6* 変異体の細胞壁は、*bc3* 変異を含むダブルミュータントと同程度だった。これらの結果から、皮層組織の二次細胞壁構築において BC1 と BC6 はセルロース合成そのものに関与するのに対し、BC3 はこれらとは異なる機構でセルロースの合成を制御すると予想される。

結論として、本研究ではイネのカマイラズ変異体の細胞壁の性状とカマイラズ遺伝子群の機能を明らかにした。本研究は植物二次細胞壁の構築・制御の仕組みの解明に大きく寄与するものと考えられ、学位論文として合格と判定した。