

氏名	たけ うち み ゆ き 竹 内 美 由 紀
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1434 号
学位授与の日付	平成 16 年 5 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科森林科学専攻
学位論文題目	Immunolocalization of Enzymes Involved in Lignin Biosynthesis in Differentiating Poplar Xylem (ポプラ分化中木部におけるリグニン合成酵素の免疫局在) (主査)
論文調査委員	教授 藤田 稔 教授 伊東隆夫 教授 島田 幹夫

論 文 内 容 の 要 旨

リグニンはセルロース、ヘミセルロースとともに樹木においては木部細胞の細胞壁を形成する主要な成分であり、細胞壁にマトリックス成分として堆積する不均一な芳香族高分子である。リグニンの生合成は前駆物質であるモノリグノールの合成、モノリグノールの細胞壁への輸送、そして細胞壁での脱水素重合の3段階に分けられる。モノリグノールの合成やその脱水素重合に関しては、主に反応経路とその反応に関わる酵素についての生化学的・分子生物学的な研究が進められてきた。しかし、細胞内でのモノリグノール生合成の場やその後の細胞壁への輸送、あるいは細胞壁における高分子化の制御については依然不明な点が多い。

そこで本研究では、木化中の細胞において、リグニン合成酵素の分布を明らかにすることで、生物として樹木がこのリグニン合成反応を細胞内のどこで行い細胞壁のリグニン堆積に至るのか、という過程を視覚的に示すことを目的とした。酵素の分布を可視化するためには免疫電子顕微鏡法を用いた。

免疫標識法は、ある物質を動物に投与した場合にその抗原物質に対して特異的に生産される抗体をプローブとして用い、抗原物質の存在を可視化する方法である。免疫電子顕微鏡法ではこれまで電子顕微鏡下では検出が困難であった細胞内での各種タンパク質や糖の分布を微細レベルで観察することが可能となる。

本論文は5章から構成され、主な内容は以下に示すとおりである。

第1章では本研究の背景となる既往の研究について概説し、本研究の意義・位置づけを明確にした。

第2章ではモノリグノール合成に関与する酵素の一つである、カフェー酸 *O*-メチルトランスフェラーゼ (CAOMT) をターゲットとした。ポプラ由来の CAOMT 遺伝子を導入し、大腸菌に発現させたタンパク質を抗原として抗 CAOMT 抗体を得た。この抗体をポプラ試料に適用し、CAOMT が分化中二次木部細胞の細胞質基質に存在することを明らかにした。

第3章および第4章では、モノリグノールの重合過程に注目した。モノリグノールの重合には主にペルオキシダーゼあるいはラッカーゼが関与すると考えられているが、実際に細胞内でのリグニン合成において、それぞれの酵素がどのような役割を果たしているのかは不明である。そこで、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼのそれぞれ1種のアイソザイムについて、細胞内局在からリグニン合成に果たす役割を検討することを試みた。

第3章では酸性ペルオキシダーゼの分布を調べた。すでに一次構造が報告されているペルオキシダーゼの中から、リグニン生合成に関与すると考えられているものを選び、このアミノ酸配列に基づいて抗原となるペプチドを合成した。これをウサギに投与し、目的の抗体を得ることに成功した。この抗体を用いた免疫電子顕微鏡法により、その細胞内分布について検討し、このペルオキシダーゼが原形質膜上に存在することを明らかにした。細胞壁におけるリグニンの高分子化に際し、一部のモノリグノールラジカルは細胞膜で形成されることが示唆された。

一方、第4章ではラッカーゼの分布を調べた。合成ペプチドを抗原として用い、ターゲットとしたラッカーゼを特異的に

認識する抗体を得ることができた。二次壁形成中の木部繊維および道管において、二次壁形成初期には細胞質に標識が観察されたのに対し、二次壁形成後期の木部繊維では標識は細胞壁、特に複合細胞間層と二次壁外層に観察された。ゴルジ装置を経て作られたラッカーゼが二次壁形成後期に細胞壁に運ばれる過程を観察することができ、このラッカーゼが二次壁形成後期に働くことが示唆された。さらに放射柔細胞の最内層に顕著な標識が観察された。木部繊維および放射柔細胞の細胞壁で酵素が特定位置に局在することから、その機能について考察した。

第5章は本研究の総括であるが、ポプラ木部において、モノリグノールのメチル化が細胞質基質で進行すること、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼが細胞壁へのリグニン堆積において異なる役割を持つことを考察した。

論文審査の結果の要旨

維管束植物は木部と呼ばれる組織を持つが、なかでも樹木の幹はそのほとんどが二次木部組織からなる。木部細胞の細胞壁構造や形成過程は木質バイオマス利用の観点からも研究が進められている。不定形の芳香族高分子であるリグニンは木部細胞に特徴的な成分であるが、このリグニンの合成・堆積過程は未だ解明途上にある。

本研究は、木部細胞におけるリグニンの生合成の空間的な経路を明らかにするために、この反応に関わる酵素の細胞内分布に着目している。すなわち免疫電子顕微鏡法により酵素の細胞内局在を視覚的に示した。評価できる点は以下のとおりである。

1. *in vivo*でのリグニン生合成経路を追跡するため、分化段階の順に細胞が並ぶ樹木二次木部を用いた。そして試料作製時に急速凍結固定法を用いて物質の移動を瞬時に止め、目的とするカフェー酸 *O*-メチルトランスフェラーゼ (CAOMT)、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼの本来の細胞内位置での固定を確実にしている。免疫電子顕微鏡法により細胞壁形成過程とそれぞれの酵素の詳細な細胞内分布状態をあわせて検討した。またペルオキシダーゼ、ラッカーゼについては抗体の作製に合成ペプチドを使用した。これらの酵素はアイソザイムが多く存在するために免疫標識法を行う上では抗体の特異性が問題となるが、ターゲットに対して非常に特異性の高い抗体を得ることに成功している。
2. リコンビナントタンパク質を用いてリグニン生合成に関与する CAOMT (*homt1*) に特異的に反応する抗体を作製し、免疫電子顕微鏡法により CAOMT の二次木部形成中細胞における分布状態を明らかにした。すなわちこの COMT の分布には細胞内の特定の部位や膜構造物との関連は見いだされず、細胞質基質遊離状態で存在することを明らかにした。
3. これまでモノリグノール重合に関与する酵素について細胞壁における詳細な分布は検討されていなかった。本論文ではターゲットとしたペルオキシダーゼ (*prxA3a*)、ラッカーゼ (*lac3*) のみをそれぞれ特異的に認識する抗体を用いて免疫電子顕微鏡法を行ない、各酵素の細胞内分布を検討した。それによりこのペルオキシダーゼが二次壁形成中の二次木部細胞の原形質膜上に存在することを明らかにした。また同様の組織においてラッカーゼが細胞壁に送られる過程を追跡、最終的にこのラッカーゼが細胞壁内で細胞間層および二次壁外層への局所的な分布を示すことを明らかにした。

以上のように本論文は、リグニン生合成に関与する酵素である CAOMT、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼのそれぞれの細胞内局在を明らかにし、その反応経路なかでもモノリグノールの重合すなわち細胞壁への堆積が酵素の局在によって制御される可能性を示したものである。その成果は樹木木部の細胞壁形成機構解明に基礎的知見を与えるものとして評価され、樹木細胞学および木質科学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成16年3月24日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。