

氏名	井原由理
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1263号
学位授与の日付	平成14年3月25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	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Molecular analysis of cotton cellulose synthase (ワタセルロース合成酵素に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 酒井富久美 教授 關谷次郎 教授 島田幹夫

論文内容の要旨

セルロースは、自然界では30~200個の分子鎖が水素結合により集合し、結晶領域を有するセルロースマイクロフィブリルを形成しており、植物細胞壁内の形態はセルロースマイクロフィブリルの配向によって決定される。そのため、セルロース合成機構の研究は、植物細胞の基本的な成長や形態形成を明らかにすることにつながる。

セルロース合成酵素遺伝子はセルロース合成細菌 (*Acetobacter xylinum*) から最初に単離された。オペロンは A, B, C, D の4つのサブユニットタンパク質をコードする遺伝子 (*bcsA, B, C, D*) で構成され、サブユニット A がグルコースを UDP-グルコースからグルカン鎖に転移する糖転移酵素であった。一方植物では、*in vitro* での合成活性を得ることが困難であったため、合成機構は長い間不明であった。1996年に Pear らがワタ繊維細胞由来の cDNA ライブラリーよりサブユニット A に対するホモログ (*GhCesA1*) を単離した。またアラビドプシス変異体の解析から、*CesA* の変異がグルカンの合成ではなくマイクロフィブリルの形成を阻害している可能性も示唆された。本論文は、ワタ繊維細胞よりセルロース合成酵素ホモログ遺伝子 *GhCesA2* を単離し、その遺伝子を他の細胞内で発現させ、得られたリコンビナントタンパク質の解析を行ったものである。

第1章では、ワタ繊維細胞由来の cDNA よりバクテリアセルロース合成酵素のホモログ遺伝子を単離した。急激なセルロース合成が起こる時期の繊維細胞から mRNA を抽出して cDNA ライブラリーを作成した。この cDNA のランダムシーケンスを行い、750クローンの部分配列のホモロジー検索により、バクテリアセルロース合成酵素遺伝子と部分的にホモロジーを示すクローンが15個得られた。それらは3つのグループに分類でき (*pcsA2, pcsA3, pcsA4*)、最もクローン数の多い *pcsA2* の全長 cDNA を 5'RACE 法で単離した。*pcsA2* は、Pear らが部分配列を発表した *GhCesA2* と同じ遺伝子であり、3,311bp の塩基配列をもち、125kDa のタンパク質をコードする ORF を有していた。*GhCesA2* は N 末端と C 末端に膜貫通部位をもつ膜タンパク質で、その貫通部位に挟まれた中心ドメインには β -glycosyltransferase に共通のアミノ酸残基 (3つのアスパラギン酸と QxxRW モチーフ) が見いだされた。このドメインはセルロース合成の基質である UDP-グルコースの結合モチーフを有していた。また、その N 末端には、LIM ドメインに似たアミノ酸配列が見いだされたため、*GhCesA2* が他のタンパク質と結合している可能性が示唆された。

第2章では、植物以外の宿主細胞で *GhCesA2* を発現させ、得られたリコンビナントタンパク質を用いて *in vitro* のセルロース合成を試みた。*GhCesA2* の膜貫通部位を除いた中心ドメインのみを酵母細胞 (*Pichia pastoris*) で発現させ、そのリコンビナントタンパク質のグルコース取り込み活性を測定した。そのタンパク質を酵母細胞から抽出し UDP-グルコースと反応させたが、ポリマーの合成は確認できなかった。さらに、ワタ芽生えから脂質画分、水溶性画分および膜画分を抽出し、リコンビナントタンパク質に脂質画分を加えたところ、可溶性画分へのグルコースの取り込み量の増加が認められた。また、脂質画分と水溶性画分を同時に加えると、70%エタノール不溶性画分への取り込み量が増加し、多糖産物の合成が認められた。しかし、この多糖産物は β (1 \rightarrow 4) グルコシル残基を有していなかった。

第3章では、バキュロウイルスを用いて *GhCesA2* を昆虫細胞内で発現させ、発現タンパク質の流体力学的性質を同定した。まず、Sf9細胞内で全長 *GhCesA2* を膜タンパク質として発現させた。バキュロウイルス感染細胞の膜画分を Triton X-100 で可溶化し、Triton X-100 存在下でゲルろ過およびシヨ糖密度勾配遠心に供した。ゲルろ過からの画分のウェスタンブロットニングにより、*GhCesA2*-Triton 複合体のストークス半径を求めた結果、リコンビナントタンパク質は2種類の分子サイズを有していることが判明した。それぞれをシヨ糖密度勾配遠心に供して得られた沈降距離から、複合体の沈降係数および偏比溶を測定した。それらの測定値をもとに、リコンビナントタンパク質の native な状態での分子量を推定し、*GhCesA2* がホモダイマーを形成していることを示した。

論文審査の結果の要旨

セルロースは植物細胞壁の主成分であり、地球上で最も多量に存在する天然高分子物質である。セルロース合成細菌を用いた研究から、その生合成の分子機構が究明されつつあるが、植物ではほとんど明らかにされていない。本論文は、セルロース合成を盛んに行っているワタ繊維細胞を用いてセルロース合成酵素遺伝子をクローニングし、それを異種細胞で発現解析並びに発現タンパク質の酵素機能特性を研究したものであり、評価すべき主な点は以下の通りである。

- 1) 急激なセルロース合成を行っているワタ繊維細胞に焦点を当て、それより構築した cDNA ライブラリーの多数のクローンをランダムにシーケンスをおこなった中から、バクテリアセルロース合成酵素遺伝子のホモログ (*GhCesA2*) を全長のクローンとして単離することに成功した。
- 2) この *GhCesA2* 遺伝子の構造解析から、推定されるタンパク質は9つの膜貫通部位をもち、細胞質側に β -glycosyltransferase に共通のアミノ酸残基を有することを見出し、糖転移酵素であると予想した。また、N末端に LIM ドメインに似た配列を見だし、*GhCesA2* タンパク質が他のタンパク質と結合している可能性を示した。
- 3) *GhCesA2* の中心ドメインを酵母細胞 *Pichia pastoris* 内で発現させ、可溶性タンパク質として得ることに成功した。ワタ芽生え抽出液の存在下で、リコンビナント *GhCesA2* が UDP-glucose から多糖産物を合成することを示した。
- 4) バキュロウイルスベクターと全長 *GhCesA2* のリコンビナント DNA を構築し、昆虫細胞中で膜タンパク質として *GhCesA2* 全長を発現させることに成功した。得られたリコンビナントタンパク質の流体力学的性質を解析し、*GhCesA2* がホモダイマーを形成することを見だし、セルロース合成酵素複合体中で CesA タンパク質がホモダイマーとして存在している可能性を示した。

以上のように本論文は、これまで明らかにされていなかった植物におけるセルロースの合成酵素についての研究成果をまとめたものである。得られた成果はセルロース生合成の分子機構を明らかにする上での新たな知見となるだけでなく、植物細胞の成長や形態形成を明らかにすることにつながるものであり、植物生理学、植物生化学および植物細胞生物学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14年2月14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。