

氏 名	と 都 こ う 甲 ち ず す 鈴
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1220 号
学位授与の日付	平 成 14 年 1 月 23 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	Interaction of cellulose produced by <i>Acetobacter xylinum</i> with non-cellulosic plant cell wall polysaccharides ( <i>Acetobacter xylinum</i> のセルロースミクロフィブリル形成における細胞壁多糖の影響) (主 査)
論文調査委員	教 授 藤 田 稔 教 授 伊 東 隆 夫 教 授 中 坪 文 明

### 論 文 内 容 の 要 旨

樹木細胞壁において、セルロースは最も多量に含まれ、結晶化したミクロフィブリル (CMFs) として存在し、骨格としての重要な役割を担っている。CMFs の合成時には、周囲に多糖類が存在し、CMFs の構造や堆積に影響を及ぼす可能性があるが、多糖類の種類は多く、直接樹木細胞壁を観察するだけでは解明は困難である。

そこで、本論文では、CMFs を液体培地中に産生する酢酸菌 (*Acetobacter xylinum*) をモデル系として用い、培地中に樹木細胞壁に豊富に含まれるペクチン、キシラン、マンナンを加えて培養し、産生された CMFs の形態、結晶構造とその周囲の多糖類を観察することで、樹木細胞中の CMFs にこれらの多糖類が及ぼす影響を考察した。

第 1 章では、樹木細胞壁を構成する多糖類と CMFs の構造、*A. xylinum* を用いた研究の意義について総括し、本研究の位置づけを明らかにした。

第 2 章では、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用い、様々な試料調製法を適用して各多糖存在下での CMFs の形態変化とその周辺に存在する多糖類を観察した。

通常の培地 (SH 培地)、並びにペクチンを加えた培地で観察された扁平なりボン状へと寄り集まる CMFs は、キシランおよびマンナンを加えることによって緩やかに集合した束へと変化した。また、フリーズエッチング法を用いることにより、これらの CMFs の周囲に細胞壁多糖と思われる物質が観察された。

細胞化学法の適用により、CMFs 周辺の多糖類の分布が明らかとなった。非晶性の多糖類が染色される PATAg 法を用いると、ペクチンを加えた培地では CMFs 自体は染色されず、周囲の非晶性物質のみが染色された。キシラン、マンナンを加えた培地では CMFs に沿って染色された。このことから、ペクチンと、キシラン、マンナンとで、CMFs 周囲での分布の違いが示された。また、抗キシラン抗体、抗マンナン抗体を用いてそれぞれの多糖を標識すると、抗マンナン抗体は CMFs 全体にわたって観察されたが、抗キシラン抗体は CMFs 上に距離を置いて観察され、キシラン、マンナンの分布の違いが示された。

第 3 章では、X 線回折法、電子回折法を用い、CMFs の結晶単位胞の構造変化を観察した。X 線回折法では、ピーク強度の変化から、キシラン、マンナンを加えることにより、選択的面向性が減少することが確認された。また、ピーク幅の変化から、多糖類を加えることにより、結晶が小さくなることが示された。さらに、キシラン、マンナンを加えることでピーク位置が変化したことから、単位胞の面間隔も変化することが示唆された。これらの傾向はマンナンを加えた場合に特に顕著であった。電子回折においては、各培地で一菌体から産生された CMFs に沿って回折像を得ることに成功した。SH 培地ならびにペクチン存在下で産生された CMFs からは、明瞭なスポットが観察された。キシラン存在下で産生された CMFs からは明瞭ならびに不明瞭なスポットが観察された。マンナン存在下で産生された CMFs からは不明瞭なスポットが観察された。これらの結果は TEM による形態観察に一致した。また、これらのスポットから面間隔を算出したところ、X 線回折の結果と同様、キシラン、マンナンを加えることにより面間隔が大きくなった。

第4章では、天然に存在するセルロースIがI $\alpha$ 、I $\beta$ の2種の構造を持つことから、FT-IR法、固体NMR法を用いて両者の存在比の変化を調べた。FT-IR法では、I $\alpha$ 由来のスペクトルがキシランおよびマンナンを加えることにより減少する傾向を示し、特にマンナン存在下で最も減少した。NMR法においてもI $\alpha$ 由来のスペクトルが減少し、また、X線の結果と同様に、結晶が小さくなっていることが示された。これらの結果もまた、キシランよりもマンナンを加えた場合において最も顕著に見られた。

以上の結果から、各多糖類が*A. xylinum*のCMFsに与える影響をまとめ、それらから樹木細胞壁におけるCMFsと各多糖類の関係を考察した。すなわち、キシラン、マンナンがCMFsの構造に影響を与えることが示された。キシラン、マンナン共に形成初期のCMFsが結晶化する際に作用することで変化を与え、形態的にはCMFsがリボン状に集合するのを妨げることが示された。マンナンの与える影響がキシランの与える影響よりも顕著なのは、マンナンがCMFsに沿って全体的に影響するのに対し、キシランは部分的に影響することによることが判明した。これらから、CMFsの形成時に同時に存在する細胞壁多糖類がCMFsの構造やそれらの堆積パターンに重要な役割を担っていることが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

樹木細胞壁は、最も多く存在するバイオマス資源として、多方面に利用されている。一方、その構造と形成過程は解明途上にある。中でも細胞壁中で最も多量に含まれ、有用であるセルロースマイクロフィブリル(CMFs)は、複雑な環境下で合成され、独特の結晶構造と堆積パターンを持つ。

本論文は、樹木細胞壁の形成を、CMFsの形成ならびにそれらと同時期に堆積する多糖類との相互作用という観点からCMFsの構造を解明するため、純粋なCMFsを菌体外に産生する*Acetobacter xylinum*の培地に細胞壁多糖を与えるシミュレーション実験を行い、CMFsに細胞壁多糖が与える影響を明らかにした研究であり、評価できる点は以下の通りである。

1. 樹木細胞壁形成過程を解明するために、3段階のフィブリル構造を逐次構築する*A. xylinum*を用いたシミュレーションを導入している。そして樹木由来の多糖類(ペクチン、キシラン、マンナン)をこの培養系にあえて添加することで、樹木細胞壁形成中におけるCMFsと多糖類との相互作用を追跡している。
2. 各々の細胞壁多糖類は、樹木細胞壁中ではほぼ同時期に堆積するので、CMFsとそれらの関係は樹木細胞を直接観察するだけでは解明が難しい。このシミュレーションでは細胞壁多糖類がCMFs構築に与える影響を、ペクチン、キシラン、マンナンを個別に調査し、その影響の違いを明らかにしている。すなわちマンナンはCMFs構築の初期に作用し、キシランがこれにつづく。ペクチンはほとんど影響しない。
3. CMFsの結晶構造決定に細胞壁多糖類が関わっていることを明らかにしている。多様な生物に存在するCMFsは、生物種により結晶構造が異なることが示されている。既往の研究から、それらの結晶構造の違いを生じさせるのはCMFs合成酵素の配列であり、生物種により2種類に大別できるとされてきた。本研究では、細胞壁多糖類を培地に加えることで、結晶構造が合成酵素の配列にかかわらず変化することを明らかにし、この処理による変化は、樹木細胞壁中のCMFsに近いものとなった。

このように本論文は、樹木由来の細胞壁多糖類がCMFsの構造や堆積に様々なレベルで関わることで、樹木細胞壁特有のCMFs構造を構築していくことを明らかにしており、その成果は、樹木細胞壁形成機構の解明に基礎的知見を与えるものとして評価され、樹木細胞学およびセルロース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13年12月20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。