

氏名	藤野猛史
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1107号
学位授与の日付	平成12年3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	農学研究科林産工学専攻
学位論文題目	Visualization of Molecular Architecture of the Cell Wall during Plant Growth (植物の成長に伴う細胞壁分子構造の可視化)

論文調査委員 (主査) 教授 伊東隆夫 教授 藤田 稔 教授 東 順一

### 論文内容の要旨

本研究は、植物細胞壁の微細構造及び成長に伴う細胞壁構造の変化を明らかにすることを目的としてディープエッチング(DE)法を用いて検討した結果をまとめたもので5章よりなっている。

第1章では、高等植物よりも太いセルロースマイクロフィブリル(CMF)をもつ緑藻(*Oocystis apiculata*)の細胞壁構造をDEにより観察した。外層は薄く平滑な表面を呈し、外側表面には無数の短い突起状構造が観察された。また、中層はCMFが直交して堆積した構造を示し、CMF間の空隙にはCMF間を架橋結合する細い繊維が存在していた。内層は短繊維状物質が密に詰め込まれた構造を呈した。さらに、DEにより細胞外領域に繊維状物質からなる新たな網目状構造が存在することを示した。

第2章では、EDTA、4%と24% KOHによる段階抽出及び酢酸/硝酸混合液(AN)による抽出後、*O. apiculata*の細胞壁構造の変化を観察した。

EDTA処理では変化は観察されなかったが、4%KOH処理により細胞外領域の網目状構造が消失した。24% KOH処理により外層が細い繊維からなる構造に変化した。この処理後においてもCMF間の架橋構造は残存していたが、非セルロース性物質を可溶化するAN処理により消失し、中層のCMF(18 nm)の他に外層の細い繊維(7 nm)が観察された。従って、*O. apiculata*は太さの異なる2種類のCMFを外層と中層にもつこと及びCMF間の架橋構造は非セルロース性物質であることが明らかになった。

第3章では、エンドウ(*Pisum sativum*)の上胚軸における茎の伸長成長に伴う表皮細胞の細胞壁構造の変化を観察した。ペクチンのメチルエステル化度による細胞壁内での分布の違いを高メチルエステル化ペクチンを認識するJIM7抗体と低メチルエステル化ペクチンを認識するJIM5抗体を用いて免疫電顕法により調べた結果、高メチルエステル化度のペクチンは細胞壁全体に、低メチルエステル化度のペクチンは細胞壁の外側半分に局在しており、伸長領域及び伸長終了領域で両ペクチンの分布に差は認められなかった。DEにより細胞壁構造を観察すると、伸長領域では無数の粒状物質によりCMF間が満たされており、細胞壁はほとんど空隙をもたないのに対し、伸長終了領域では粒状物質が消失し、CMF間に空隙が形成され、細胞壁は空隙に富む構造として観察された。EDTA処理により粒状物質が消失したこと及びEDTA抽出物の成分分析から、粒状物質はペクチンであることが示された。以上の結果から、ペクチンが細胞の伸長に伴う細胞壁内の多孔性を制御している可能性を提唱した。

第4章では、EDTA処理されたエンドウの細胞壁構造をDEにより観察した。その結果、伸長領域の細胞壁ではCMF間に架橋構造が存在しないのに対し、伸長終了領域ではCMFが架橋構造により結合されていることを見出したことから、架橋構造は伸長成長の終了に伴い形成されることを明確にした。EDTA処理した伸長終了領域をさらにエンドグルカナーゼで処理したところ架橋構造が消失したこと及びエンドグルカナーゼによる細胞壁分解産物を薄層クロマトグラフィーで分析し

たところ、キシログルカンの分解産物が主に検出されたことから、架橋構造はキシログルカンであることが明らかになった。以上の結果から、CMF間のキシログルカン架橋構造が伸長成長の制御に関与している可能性を示した。

第5章では、ユーカリ (*Eucalyptus tereticornis*) における木化に伴う細胞壁構造の変化を観察し、形成層もしくは拡大帯の細胞壁に認められていた多孔性の構造が、リグニンの堆積に伴い失われることを初めて可視化した。

以上の結果から、DE法は従来の超薄切片法よりもはるかに高解像度で細胞壁の立体的構造を分子レベルで可視化できることを示した。さらに、伸長成長及び分化に伴う細胞壁構造の変化を明らかにし、植物の成長活動により細胞壁の構造が極めて動的に変化していることを初めて明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

細胞壁は植物細胞の形態形成に重要な役割を担っており、構成成分や細胞壁酵素等についての研究は盛んに行われているが、細胞壁自身の立体的構造や成長に伴う構造の変化については未解明である点が多い。本論文は、ディープエッチング(DE)法による細胞壁の微細構造の観察から、その立体的構造の解明に重点をおいて研究したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

(1) 藻類における細胞壁構造を緑藻 (*Oocystis apiculata*) を用いて調べた結果、細胞外領域に新たな網状構造が存在することや、非セルロース性成分が高等植物と全く異なると考えられる藻類においても中層のセルロースマイクロフィブリル(CMF)が架橋構造により結合されていることなどを見出した。さらに、その他の壁層においても詳細な観察を行い、各壁層に特徴的な構造を明らかにした。

(2) *O. apiculata* に様々な化学抽出処理を施した後、細胞壁構造を観察した結果、*O. apiculata* は中層と外層に太さの全く異なるセルロースマイクロフィブリルをもつこと、CMF間の架橋構造は非セルロース性物質からなることなどを明らかにした。

(3) エンドウ (*Pisum sativum*) 上胚軸における伸長成長に伴う表皮細胞の細胞壁構造の変化を観察した。伸長領域の細胞壁では多量の粒状物質が充満して、細胞壁はほとんど空隙のない構造を示すのに対して、伸長終了領域の細胞壁では粒状物質が消失し、細胞壁は空隙に富む構造に変化することを明らかにした。粒状物質はEDTA処理により細胞壁から消失し、抽出物は糖組成の分析からペクチンであったことから、ペクチンが細胞の伸長過程において細胞壁中の空隙の大きさを制御することを提案し、その仕組みについて考察した。

(4) エンドウ上胚軸のEDTA処理後の伸長領域の細胞壁ではCMF間の架橋構造は見られないが、伸長終了領域の細胞壁において架橋構造が存在することを明らかにした。次に、架橋構造の成分を明らかにする試みを行った結果、架橋構造はエンドグルカナーゼ処理により消失することと、主としてキシログルカンの分解産物が検出されたことから、架橋構造はキシログルカンから構成されており、キシログルカンによるCMF間の架橋構造の形成が伸長成長の制御に関与している可能性を示した。

(5) ユーカリ (*Eucalyptus tereticornis*) の木化に伴う細胞壁構造の変化を観察した結果、未木化の細胞壁は多孔性の構造を示すのに対して、木化後の細胞壁ではリグニンの充填により多孔性が急速に失われることを明らかにした。

以上のように、本論文は細胞壁の分子構造が植物の成長に伴い変化していることを電子顕微鏡法により可視化した研究成果をまとめたものであり、木質細胞生物学、植物細胞構造学、バイオマス化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12年2月16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。