

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	清都 晋吾
論文題目	Immunolocalization of 8-5' and 8-8' linked structure of lignin in plant cell walls (植物細胞壁におけるリグニンの8-5'型及び8-8'型構造の免疫局在)		
(論文内容の要旨)			
リグニンは、植物細胞壁の主要構成成分の一つであり、細胞壁に物理的強度、疎水性、病虫害抵抗性を付与するなど、きわめて重要な役割を担っている。リグニンは、3種のモノリグノール（<i>p</i>-クマリルアルコール、コニフェリルアルコール、シナピルアルコール）の脱水素重合により生じる高分子化合物であり、モノマー間に多種多様な結合様式を有する。リグニンの結合様式は非縮合型（C-O-Cエーテル結合）と縮合型（C-C結合）に大別される。そのうち縮合型構造はバイオマスの化学分解処理の障害となる。従って、リグニンの縮合型構造の分布を把握することは、学術的にも、バイオマスの工業的利用の観点からも重要である。本論文ではリグニンの代表的な縮合型構造である、8-5'型及び8-8'型構造に対するモノクローナル抗体（以降、前者に対する抗体をKM1、後者に対する抗体をKM2と呼ぶ。）を用いて、植物細胞壁におけるリグニンのそれらの構造の分布を調べた。 第1章では、リグニンの化学構造と植物細胞壁における機能について述べ、リグニンの化学分析や、放射性同位元素やポリクローナル抗体を用いた局在の可視化などの報告例を挙げながら、本論文の意義と目的を明らかにした。 第2章では、本論文で使用した2種のKM1とKM2について競合阻害ELISAによりその特異性を明らかにした。リグニンの主要な結合様式である、8-<i>O</i>-4'型、8-5'型、8-8'型、及び5-5'型結合の二量体モデル化合物、及びそれらの誘導体を阻害物質として用いた。競合阻害ELISAの結果、KM1は側鎖及び遊離のフェノール性水酸基を持つリグニンの8-5'型構造に特異的に反応すること、KM2は、遊離のフェノール性水酸基を持つリグニンの8-8'型構造にG核、S核の区別なく反応することを明らかにした。 第3章では、キシランがリグニン重合の鋳型となっているという仮説を検証するため、針葉樹であるヒノキの正常材及び圧縮あて材分化中木部について、リグニンの8-5'型構造とキシランの分布を、KM1及び抗キシラン抗体であるLM10（側鎖の少ないキシランに反応）またはLM11（側鎖の多少に関わらずキシランに反応）を同時に用いた二重免疫標識法により調べた。その結果、LM10及びLM11の標識はKM1のそれよりも少し早く出現していた。このことから、キシランの堆積は、リグニンの8-5'型構造の形成よりも早く起こっていることを明らかにした。 第4章では、広葉樹であるミズメ分化中木部について、リグニンの8-5'型及び8-8'型構造の分布と形成過程を、KM1とKM2を用いた免疫標識法によってそれぞれ調べた。木部繊維においては、KM1とKM2による標識は共にS₂層形成初期まで現れず、主に細胞壁形成の後期に増加した。成熟木部において、KM1は道管要素二次壁及び複合細胞間層、特にコーナー部複合細胞間層において高い標識密度を示した。道管要素二次壁及び複合細胞間層はG核リグニンに富むことが組織化学染色により分かっており、8-5'型構造が形成されやすいものと考えられる。一方、KM2は木部繊維			

(続紙 2)

間の複合細胞間層において高い標識密度を示し、木部繊維二次壁や木部繊維と道管要素との間の複合細胞間層では低い標識密度を示した。従って、8-8'型構造は木部繊維間の複合細胞間層において高い頻度で形成され、細胞の種類によって不均一に分布することを明らかにした。

第5章では、1年生植物であるアサの種子成熟期の細胞壁について、組織化学染色によりリグニンの分布を調べると共に、ヘミセルロースとリグニンの8-5'型及び8-8'型構造の分布を、抗ヘミセルロース抗体、KM1及びKM2を用いた免疫標識法によってそれぞれ調べた。リグニンの局在を示す紫外線吸収と過マンガン酸カリウム染色により、アサ師部繊維においてリグニン濃度は複合細胞間層で高く、二次壁で低いことが分かった。しかしながら、KM1及びJIM14（抗アラビノガラクトタンタンパク質抗体）は二次壁で高い標識密度を示した。一方で、KM2の標識は同部位で殆ど現れなかった。この結果により、アサ師部繊維二次壁において、8-5'型構造を含むが、8-8'型構造を含まない少量のリグニンとアラビノガラクトタンパク質が存在することを明らかにした。

第6章では、以上の内容を総合して考察し、以下のように結論付けた。各章における免疫標識の結果から、リグニンの8-5'型及び8-8'型構造は、必ずしもリグニン濃度が高い部位に存在するわけではなく、植物種や細胞種により不均一に存在すること、KM1及びKM2は、リグニン濃度が低い細胞壁においても、8-5'型及び8-8'型構造をそれぞれ検出できることを示した。

(論文審査の結果の要旨)

リグニンは複雑な化学構造を持ち、バイオマスを有効に利用するためには、その化学構造の解明が重要となる。本論文はリグニンの中で従来の分解法による分析法では十分に評価されてこなかった縮合型構造のうち、8-5'型構造及び8-8'型構造に着目し、それらに特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて、植物細胞壁中のそれらの構造の分布を調べたもので、評価できる点として以下の4点が挙げられる。

1. 抗体を実験に用いる上で、最も重要なのが特異性である。本論文では8-5'型構造及び8-8'型構造に対するモノクローナル抗体の特異性を様々なリグニンモデル化合物を用いて丹念に明らかにしている。その結果、抗体はそれぞれ8-5'型構造及び8-8'型構造を特異的に認識すること、さらに側鎖の水酸基やフェノール性水酸基の存在が抗体の反応性に重要であることを見いだした。これらの結果は二種類の抗体が、今後様々な木質バイオマスの解析に有用なプローブになり得ることを示している。

2. 針葉樹分化中木部を用いて、抗キシラン抗体と上記の抗リグニン抗体による二重免疫標識を行い、キシランの堆積過程とリグニン中の8-5'型構造の形成過程を同一の切片で調べ、キシランの堆積が8-5'型構造の形成に先立って起こることを明確に示した。この方法は他の多糖類とリグニンの関係を調べる際にも応用が可能であり、木質バイオマスの新しい解析法となり得ることを示している。

3. 針葉樹及び広葉樹の分化中木部を用いて、従来の過マンガン酸カリウム染色法によるリグニンの沈着過程と、抗体による金標識密度の変化を比較することで、リグニン中の8-5'型構造及び8-8'型構造の形成過程を明確に示した。すなわち、これらの構造が細胞壁の木化過程において均一に形成されるのではなく、細胞の種類や部位によって不均一に形成されることを明確に示した。これらの結果は従来の化学分析法では得られない新しい知見である。

4. 繊維植物として重要なアサの種子成熟期の師部繊維細胞壁について、他の顕微鏡法ではリグニンの存在がほとんど検出されない部位（二次壁）に抗体が認識しうる8-5'型構造が存在する可能性を示した。アサと同様に繊維植物として重要な亜麻の師部繊維二次壁では、KM1抗体による標識がほとんど見られない。アサと亜麻の師部繊維二次壁はこれまでリグニンをほとんど含まない点で類似していると考えられてきたが、本論文の結果はアサの師部繊維二次壁は亜麻の師部繊維二次壁と細胞壁構成成分の組成が異なることを明らかにしたもので、重要な知見である。

以上のように、本論文はリグニンの代表的な縮合型構造である8-5'型構造及び8-8'型構造が植物細胞壁中でどのように分布し、形成されるかを明らかにしたもので、樹木細胞学、植物バイオマス化学、木材成分化学に寄与するところが多い。

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27年10月15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。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）