

氏 名	大 宮 泰 徳
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1126 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	Molecular and Biological Analysis of Endo-1,4- β -Glucanases in Poplar (ポプラエンド-1,4- β -グルカナーゼの分子生物学的解析)

論文調査委員 (主 査) 教 授 酒井富久美 教 授 藤 田 稔 教 授 東 順 一

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、樹木のセルロース代謝に関わる遺伝子の発現機構を解明するために、ポプラ由来のエンド-1,4- β -グルカナーゼの分子生物学的研究を行ったものである。ポプラ培養細胞から、本酵素のアミノ酸配列に基づく構造遺伝子およびその発現調節領域を単離し、その組織特異的発現様式について解析した。また、本セルロース分解酵素は、樹木細胞の初期の成長をコントロールするだけでなく、形態形成に関与している可能性を解析した。

第一章では、ポプラ培養細胞を用い、細胞壁画分から、エンド-1,4- β -グルカナーゼ PopCel 2 を電気泳動的に単一な純度にまで精製し、その N 末端アミノ酸配列および本酵素の諸性質を決定した。この酵素の主たる基質は、非結晶性セルロースであり、結晶性セルロースは分解しないことが示された。

第二章では、2 種類のエンド-1,4- β -グルカナーゼに対応する cDNA を単離し、予想されるアミノ酸配列の解析により、PopCel 1 は既報のポプラ培養細胞の培地中に遊離の状態で存在するエンド-1,4- β -グルカナーゼ、PopCel 2 は細胞壁に強く結合しているエンド-1,4- β -グルカナーゼにそれぞれ対応する cDNA であると同定した。両者の塩基配列は 90%、アミノ酸配列では 92% の相同性があり、非常によく似ていた。PopCel 1 および PopCel 2 に対する mRNA は、細胞分裂・増殖が盛んな培養 2 日目から 4 日目に著しく発現し、対数増殖期に減少した。両 mRNA はスクロース存在下で誘導され、オーキシンによってさらに発現が高められることがわかった。また、mRNA の誘導時に大量のセロオリゴ糖が遊離した。細胞にスクロースおよびオーキシンを与えることによって、セロオリゴ糖の遊離が認められた。誘導されたエンド-1,4- β -グルカナーゼがセルロースの非結晶領域にアタックし、セロオリゴ糖を遊離することが示唆された。

第三章では、PopCel 1 および PopCel 2 に対するゲノム DNA をそれぞれ単離し、ポプラに対する器官特異的発現を解析した。ともに発現調節領域には、スクロース合成酵素等の上流に共通なスクロース応答性領域 (SURE) およびオーキシン応答性領域 (AuxRE) のコア配列が存在した。PopCel 1 および PopCel 2 の発現調節領域それぞれ約 1 kbp をレポーター遺伝子 β -glucuronidase (GUS) につなぎ、アグロバクテリウム法によってポプラおよびアラビドプシス形質転換植物体を作出した。ポプラ形質転換体の様々な組織や成長段階における発現パターンを GUS 染色により観察したところ、PopCel 1 および PopCel 2 は幼植物体の成長初期の基本組織で発現したが、互いに異なった部位で発現し、かつ相補的であった。すなわち、PopCel 1 は葉脈および樹幹で発現していたが、PopCel 2 は葉肉で発現し、樹幹では全く発現していなかった。葉肉での発現パターンは細胞分裂のパターンと非常に良く一致していた。根においても、PopCel 1 は維管束および根冠の伸長領域で発現し、PopCel 2 は根端の伸長領域で発現していた。一次壁における発現を解析するために、PopCel 2 の発現調節領域をアラビドプシスへ導入した。PopCel 2 は孔辺細胞の形成初期に発現し、孔辺細胞の肥大成長とともに発現が消失した。さらに、幼胚軸の伸長領域で強く発現することが認められた。

以上の結果から、ポプラのエンド-1,4- β -グルカナーゼは、非結晶性セルロースを分解し、植物細胞の伸長・肥大成長を引き起こしていることが示された。セルロースは樹木のみならず高等植物の骨格を形成している主構成成分である。エンド-

1, 4- β -グルカナーゼが器官特異的に発現することによって生じる生分解機構が、植物体の形態形成にも関与していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

セルロース分解酵素であるエンド-1, 4- β -グルカナーゼは、植物のものについて器官の脱離や果実の成熟など、細胞の生分解の関連で研究が行われてきた。一方、本酵素は植物の成長にも重要な役割を演じていることが知られている。本論文は、増殖の盛んなポプラ培養細胞が産生する本酵素について、その遺伝子の発現調節領域の構造と機能を分子生物学的手法により解析し、植物の伸長成長のみならず形態形成にも関与していることを示したものであり、評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. ポプラ培養細胞の細胞壁画分からエンド-1, 4- β -グルカナーゼ PopCel 2 を新たに単離し、培地画分の酵素 PopCel 1 と同じく、結晶性ではなく非結晶性のセルロースを分解することを明らかにした。

2. これら2種類の酵素に対応する cDNA, PopCel 1 および PopCel 2 をそれぞれ単離した。両者の塩基配列は 90%, アミノ酸配列では 92% の高い相同性があることを明らかにするとともに、両酵素間における三次元構造の相違を推定した。

3. PopCel 1 および PopCel 2 遺伝子の発現は細胞分裂・増殖の盛んな比較的培養初期に見られ、スクロースで誘導され、オーキシンでさらに高められることを明らかにした。

4. PopCel 1 および PopCel 2 のゲノム遺伝子を単離し、構造を明らかにした。さらに、それらの上流発現調節領域の単離と構造解析を行い、スクロース応答性領域 (SURE) およびオーキシン応答性領域 (AuxRE) のコア配列を明らかにした。

5. 両遺伝子の発現調節領域と GUS レポーター遺伝子のキメラ遺伝子を構築し、ポプラおよびアラビドプシス形質転換植物におけるレポーター遺伝子の詳細な組織学的追跡観察を行い、両遺伝子が幼植物体の基本組織の互いに異なった部位で相補的に発現することを明らかにした。また、発現の時期とパターンの解析から、植物細胞の分裂、伸長・肥大成長および器官形成への両酵素の関与を示した。

以上のように、本論文は、植物のセルロース分解酵素の分子生物学的研究によりその器官特異的な発現様式を解明し、植物の成長における重要な役割について示したものであり、植物生理学、分子細胞生物学および植物細胞構造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。