

氏 名	鈴木 木 潔
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1158 号
学位授与の日付	平成 12 年 11 月 24 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	Ultrastructural Analysis of Plant Cell Walls by Using Deep-Etching and Immunolabeling Techniques (ディープエッチング法と免疫標識法を用いた植物細胞壁の超微細構造解析)
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

植物細胞壁は植物体において個々の細胞を取り巻く精巧な細胞外マトリックスである。植物細胞壁の構造を明らかにすることは細胞の生命活動と細胞壁の組成あるいは構造間の関連性、および細胞壁の物理的な性質を解明することにつながる。本論文は、ディープエッチング (DE) 法により細胞壁の立体構造を可視化し、免疫標識法によって細胞壁成分の分布を微細構造レベルで明らかにすることに研究の焦点を合わせており、主な内容は以下の通りである。

第一章ではポプラプロトプラストから再生した細胞壁構造とその機能についてまとめている。培養10日目の細胞は多くが分裂直前の状態であり、この細胞壁を DE 法で観察した結果、細胞壁は二層から構成されることが明らかになった。原形質膜に隣接する内層はセルロースマイクロフィブリルによって原形質体をタイトに巻き付けるように堆積しており、外層は空隙の大きな網状構造から成り立っていた。また様々な発達段階の細胞を低浸透圧下に移したところ、プロトプラストや培養3日目の細胞の多くは破裂したが、培養10日目以後の細胞はほとんど破裂しないことが判明した。これらの結果は、原形質膜をおおうセルロースの薄いラメラ構造が細胞の破裂を防ぐだけでなく、細胞分裂を引き起こすために必要な構造であることを示唆していた。

第二章では DE 法によりタケの細胞壁構造を三次元的に可視化した結果についてまとめている。発達段階の異なったホテイチク (タケ亜科) 節間の繊維細胞壁と柔細胞壁の立体構造を DE 法を用いて観察した。DE 像から測定されたタケ細胞壁中の空隙の平均径を *Eucalyptus tereticornis* や *Pinus thunbergii* と比較した結果、柔細胞の一次壁を除いて、タケの一次壁・二次壁におけるそれぞれの空隙の平均径が他の二種と比較して最も小さかった。従って、タケ繊維細胞壁のセルロースマイクロフィブリル間の空隙が小さいことは、一般的な木本植物よりもタケのほうがりグニン堆積量が少ないことに対する根拠の一つであることが示唆された。

第三章ではトウモロコシの根、茎、葉に多く含まれるグルクロノアラビノキシラン (GAXs) の分布についてまとめている。合成キシロペンタオースとトウモロコシ芽生えから抽出した分岐度の高い GAXs (hsGAXs) を用いて、分岐度によって認識の異なる二種類の抗キシラン抗体を作製した。前者の抗体 (抗キシロペンタオース抗体) は分岐度の低いキシラン鎖を認識し、もう一方 (抗 hsGAX 抗体) は分岐度の高いキシラン鎖を認識する抗体である。これらの抗体は互いの抗原と交差反応することはなかった。免疫染色した結果、hsGAXs はトウモロコシ組織の未木化細胞壁中に主に分布していた。一方、分岐度の低いキシランはすべての組織の木化細胞壁に均一に分布しており、リグニン堆積との関連性が示唆された。

第四章では第二章と同様のタケ節間における主なヘミセルロースとペクチンの分布を様々な発達段階で明らかにしたことについてまとめている。タケ節間中の (1→3), (1→4)- β -グルカン、キシラン、キシログルカン、ペクチンは一連の発達過程において組織ごとに分布を変化させることが明らかになった。

第五章では免疫金標識法と DE 法を組み合わせた方法を確立することによってタバコプロトプラストから再生した細胞壁中のキシログルカンの分布を立体的に可視化したことについてまとめている。培養3時間経過した細胞においてセルロース

ミクロフィブリル上にキシログルカンがすでに堆積していることが明らかになった。また、培養120時間後の細胞において束になったセルロースミクロフィブリル上にキシログルカンが多く分布していることが明らかになった。本法は他の細胞壁多糖の分布を明らかにすることに対しても有効であると考えられる。

以上の結果は、植物細胞壁の構造や成分の分布を超微細構造解析法により調べ、これらの構造や成分が細胞壁の発達に影響することを示す重要な知見を含んでいるものとする。

論文審査の結果の要旨

細胞壁は植物細胞をとりまき、植物の外敵や浸透圧（あるいは膨圧）から保護する役割を持つことが知られているが、超微細レベルでの細胞壁構造や成分の分布については未解明な点が多い。本論文はディープエッチング法と免疫標識法を用いて細胞壁の超微細構造レベルでの構造の変化と成分の分布を調べたものであり、評価される点は以下の通りである。

- (1) ポプラプロトプラストから再生した細胞壁は二種類の壁構造によって構成されていることを明らかにした。外層はネットワーク構造を示し、単に物理的に引き伸ばされた構造であるが、内層はセルロースミクロフィブリルがタイトに堆積した薄層で、細胞の破裂を妨げるだけでなく、細胞分裂に重要な構造であることを示した。
- (2) 細胞壁の発達段階に伴って、タケ細胞壁の立体構造を可視化した。DE像から計測された空隙の大きさを二種の本植物のものと比較した結果、タケにおいて最も小さいことを明らかにした。これらの種類において、空隙の大きさとリグニン含有量の違いから、細胞壁中でのセルロースミクロフィブリルの堆積量がリグニンの堆積量を前もって制限していることを推定した。
- (3) トウモロコシのGAXsの分布は分岐度の違いによって組織ごとに異なり、分岐度の高いGAXsは主に未木化細胞壁に分布し、分岐度の低いキシランは木化細胞壁に分布することを明らかにした。
- (4) ホテイチクの細胞壁中のヘミセルロースおよびペクチンは、細胞壁の発達に伴って分布を変化させることを明らかにした。分岐度の低いキシランは木化直前から堆積を始めることを明らかにした。(1→3), (1→4)- β -グルカン、伸長成長中と考えられる節間において多数の組織に分布することを明らかにした。キシログルカンの分布部位は伸長成長領域とほとんど一致せず、師部細胞壁と木化細胞壁に分布していることを明らかにした。ペクチンは未木化一次壁だけでなく師部と原生木部の二次壁に局在することを明らかにした。
- (5) DE法と免疫標識法を組み合わせた三次元構造中での壁成分局在部位の可視化法を開発した。タバコプロトプラスト培養3時間後にはキシログルカンがすでに堆積しており、培養120時間後には束になったセルロースミクロフィブリル上にキシログルカンが多く分布していることを明らかにした。

以上のように、本論文はDE法と免疫標識法を用いて、植物細胞壁の超微細構造および壁成分の分布についてのナノオーダーでの解析を行うことによって植物細胞壁構造に関する重要な知見を得たものであり、樹木細胞生物学、樹木生理学、木材構造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12年10月12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。