

氏 名	たけ だ たくみ 竹 田 匠
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1130 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	FUNCTIONS OF ENDO-1,4- β -GLUCANASE AND XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE IN THE PRIMARY WALL OF HIGHER PLANTS (高等植物の一次壁におけるエンド-1,4- β -グルカナーゼとキシログルカンエンドトランスグルコシラーゼの機能)

論文調査委員	(主 査) 教 授 酒井富久美	教 授 伊 東 隆 夫	教 授 島 田 幹 夫
--------	--------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、植物細胞の一次壁の代謝に関与しているエンド-1,4- β -グルカナーゼ (β -グルカナーゼ) とキシログルカンエンドトランスグルコシラーゼ (XET) の機能を明らかにすることを目的として、ポプラの培養細胞および生理学実験に適したエンドウの上胚軸を用いて行った研究成果をまとめたものである。

第1章では、ポプラ培養細胞における、 β -グルカナーゼの遺伝子発現を調べた。ポプラ培養細胞の対数増殖期初期においてその mRNA の発現が認められた。また、スクロースにより mRNA の発現が誘導された。さらにスクロースとオーキシンの両方を加えることにより mRNA のレベルが高められた。すなわち、オーキシンにより間接的に β -グルカナーゼ遺伝子が誘導されることを明らかにした。

第2章では、エンドウ由来の β -グルカナーゼ EGL 1 のホモログとして新たに β -グルカナーゼ EGL 2 cDNA をクローニングした。EGL 1 を含む植物の β -グルカナーゼの系統樹を作成し、EGL 2 は細胞の伸長成長に関与しているトマト Cel 4 やマツ PrCel 1, マツ ccel 2 と近い距離にあることを認めた。2 種類の β グルカナーゼ EGL 1 および EGL 2 の mRNA 合成量を比較した結果、EGL 1 では第1から第3節間までのすべてにおいて mRNA が蓄積していたが、EGL 2 では第3節間にのみ mRNA の発現が認められた。EGL 2 mRNA は伸長成長の盛んな第3節間において特異的に発現しており、細胞の伸長成長に関与していることが示唆された。

第3章では、ポプラ培養細胞を用いて XET 活性の性質について調べた。XET はドナーとなるキシログルカン分解した後、アクセプターとなる他のキシログルカン分子に転移する反応を触媒する酵素である。アクセプターとして XG 7, XG 14, XG 21, XG 28 を用いて XET 反応を調べた結果、XG 7 や XG 14 などの小さな分子に対して親和性が高く、また反応速度も高くなった。基質 (ドナーおよびアクセプター) の濃度を変えて、酵素の反応速度論的解析を行った。アクセプターとなるキシログルカンオリゴサッカライドの濃度を高くすると、ドナーに対する親和性は変わらないが、反応速度が高くなった。一方、ドナーとなるキシログルカンの濃度を高くすると、反応速度は変わらないが、アクセプターに対する親和性が高くなった。この結果は、XET はアクセプターとドナーを認識する2つの結合部位を持ち、ドナーとなるキシログルカン分解した後、アクセプターとなる他のキシログルカンに転移反応することを示し、酵素と基質の関係は逐次反応機構に従っていることを示した。また、ポプラ培養細胞の増殖中、細胞質および培地中に遊離状態で存在する XET 活性はほとんど変動しなかったが、細胞壁画分の XET 活性は細胞の対数増殖期に誘導された。この結果から、XET は細胞増殖における細胞壁の修飾に関与していることを示した。

第4章ではエンドウの上胚軸における XET について調べた。エンドウの上胚軸切片において、セルロース生合成阻害剤 DCB による XET 活性への影響を調べた結果、オーキシン処理により、細胞壁結合型 XET の活性は増加したが、DCB に

よって XET 活性が減少した。エンドウの上胚軸切片をオーキシシンを含むマニトール等張液中で培養すると、伸長成長が起こらないために mRNA 合成は抑えられた。このことより、オーキシシンにより XET 遺伝子が直接誘導されるのではなく、伸長成長に誘導されて遺伝子発現が起こることが示された。

エンドウ切片では、オーキシシン存在下で XETmRNA の合成が誘導されたが、この合成は 1.0 μ M 以上の DCB により抑えられた。また、イソキサベンやクマリンなどの他のセルロース生合成阻害剤によっても XET の遺伝子発現は抑えられた。これら阻害剤による XET 産生の抑制はセルロース合成の阻害と同じく、速やかに起こっていることが明らかとなった。一方、セルロース合成の阻害や XET の抑制はエンドウ上胚軸の伸長成長を阻害しなかった。すなわち、XET はセルロース生合成と関わりをもつが、細胞の伸長には関与していないことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

植物細胞の一次壁は、植物の伸長成長に重要な役割をはたしている。エンド-1, 4- β -グルカナーゼ (β -グルカナーゼ) およびキシログルカンエンドトランスグルコシラーゼ (XET) は一次壁の代謝に関与する酵素であるが、これらの機能については不明点が多い。本論文は、増殖の盛んなポプラ培養細胞および伸長成長が顕著なエンドウ上胚軸を用いて、これらの酵素の機能を遺伝子発現解析により明らかにしたもので、評価すべき主な点は次のとおりである。

1. β -グルカナーゼの遺伝子発現はポプラ培養細胞の対数増殖期初期に生じ、スクロースにより誘導され、オーキシシンにより間接的に誘導されることを示した。

2. エンドウの β -グルカナーゼ EGL 1 のホモログとして、新規 β -グルカナーゼ EGL 2 の cDNA クローンを単離した。EGL 1 および EGL 2 の分子系統樹分析から、EGL 2 は、細胞の伸長成長に関与する β -グルカナーゼであると報告されているトマト Cel 4、マツ PrCel 1 および ccel 2 と近いことを明らかにした。また、遺伝子発現解析から、EGL 2 は細胞の伸長成長に関与していることを示した。

3. ポプラ XET は、アクセプターとして小さい分子に対して親和性および反応速度が高くなる性質を明らかにした。また、酵素の反応速度論的解析から、XET はアクセプターとドナーを認識する 2 つの結合部位を有し、酵素と基質の関係は逐次反応機構に基づくことを示した。

4. ポプラ培養細胞において、細胞質および培地中に遊離の状態で存在する XET 活性は培養中にほとんど変動しなかったが、細胞壁画分のそれが細胞の対数増殖期に高められたことから、ポプラ XET は細胞増殖における細胞壁の修飾に関与していることを示した。

5. エンドウ上胚軸の XET 遺伝子の転写はオーキシシン処理で誘導されたが、この誘導がセルロース合成阻害剤 DCB、イソキサベンおよびクマリンにより抑制されることを見いだした。また、XET 誘導は酵素活性の増加によっても証明し、オーキシシンにより XET 遺伝子が直接誘導されるのではなく、伸長成長が生じる結果により XET の産生が誘導されることを明らかにし、XET はセルロース生合成と関わりをもつが、細胞の伸長に直接に関与していないことを示した。

以上のように、本論文は、高等植物の一次細胞壁の形成における β -グルカナーゼおよび XET の役割について示したものであり、植物生理学および植物細胞構造機能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 14 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。