

氏 名	とみ なが 永 る み
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1182 号
学位授与の日付	平成 13 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 森 林 科 学 専 攻
学位論文題目	Cellulase-induced Cell Growth in Higher Plants (セルラーゼによる高等植物の細胞成長)

論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 東 隆 夫	教 授 酒 井 富 久 美	教 授 島 田 幹 夫
--------	----------------------	---------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、高等植物の細胞が成長する機構を解明するために、植物細胞の細胞壁の分解に関与するセルラーゼについて、生理学的および分子生物学的研究を行ったものである。

第一章では、エンドウ上胚軸の細胞成長に伴う *in situ* セルラーゼの役割を解明するために、植物ホルモン・オーキシンによる誘導伸長を行った上胚軸からセロオリゴ糖を単離し、その量的変化とセルラーゼ活性との相関性を解析した。

オーキシン処理したエンドウ上胚軸から、低速分画遠心によりアポプラストを調製し、活性炭カラムによる分画およびペーパークロマトグラフィーによりセロオリゴ糖を精製した。この結果、オーキシン処理により、キシログルカン以外にセロオリゴ糖も生成することがはじめて明らかになった。さらに、それらはセロビオースと少量のセロトリオースおよびセロテトラオースであることが薄層クロマトグラフィーおよびろ紙電気泳動によって同定された。

これらのセロオリゴ糖の生成はオーキシン処理後15分で生じ、2時間以降でも増加を示した。その際、キシログルカンの一部可溶化も認められたが、セロオリゴ糖はキシログルカン生合成のアクセプターとならず、セロトリオースおよびセロテトラオースはキシログルカンの生分解からは派生しない。したがって、単離されたセロオリゴ糖はセルロースの分解産物であると結論された。以上の結果から、細胞の成長に伴いセルロースが分解されることがはじめて明らかになった。

第二章では、細胞成長、細胞壁セルロースの分解とセルラーゼの機能の関係をより明らかにするために、ポプラセルラーゼ遺伝子をアラビドプシスへ導入し、セルラーゼを過剰発現する形質転換植物体におけるこの酵素の機能を解析した。

ポプラセルラーゼは成長中の細胞壁で高発現することが知られており、その構造遺伝子 (*PopCel1*) をプラスミド pBE2113 に連結し、アグロバクテリウム法により形質転換アラビドプシスを作成した。形質転換体のフェノタイプは、葉身の長さ、幅ともに野生株のそれらに比べて平均約30%大きくなった。この葉の拡大成長は、細胞数の増加によるものではなく、細胞そのものが大きくなることによるものであることが明らかになった。また、このときの細胞液の浸透圧に大きな変化はみられなかったことから、細胞壁のゆるみによる細胞の拡大成長であることが示唆された。

形質転換体のセルラーゼ活性およびセロオリゴ糖の生成量を測定した結果、葉において野生株より一段と高まっていることが判明した。*PopCel1* 特異抗体を用いたウエスタンブロット分析により、導入した *PopCel1* の発現によるポプラセルラーゼが形質転換体の葉、茎および根のいずれの組織でも生成していた。特に、葉でそのセルラーゼ活性は高く、大半はアポプラスト画分に存在した。

つぎに、形質転換体のセルロースマイクロフィブリルの変化を FT-IR, ^{13}C NMR および X 線回折により解析した。FT-IR 解析では、セルロースのヒドロキシメチル基のコンフォメーションに関与する CH 領域のピークがややシャープになった。 ^{13}C NMR 解析では、グルコースの C6 共鳴線において高磁場成分の割合が減少し、同様の傾向が C4 共鳴線にもみられ、セルロースマイクロフィブリル表面の運動性の高い部分が取り除かれたと考えられた。X 線回折では、回折曲線の幅の減少から、セルロースマイクロフィブリルの結晶性が高まったことが示唆された。これらの解析から、形質転換体では、セルロース

マイクロフィブリルの非晶性成分が減少していることが示された。さらに、細胞壁の伸展性の測定で塑性変形の増加が認められた。

以上のことから、セルラーゼがセルロースマイクロフィブリルの非晶性部分を分解することにより、細胞壁構造に変化が生じ、葉の拡大成長が促進されることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

成長しつつある高等植物の細胞壁は、セルロースマイクロフィブリル骨格とマトリックス多糖類から構成されている。細胞の成長は細胞壁のゆるみによるもので、それに関与する酵素の一つとしてセルラーゼが考えられる。しかしながら、細胞成長とセルラーゼの機能との関係はいまだ明らかにされていない。本論文は、セルラーゼの分解産物であるセロオリゴ糖の単離・同定を成長の旺盛なエンドウ上胚軸を用いて試み、また、ポプラのセルラーゼを過剰発現するアラビドプシス形質転換体を作成し、セルラーゼの機能を解析したものであり、その評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. オーキシンにより細胞成長を誘導したエンドウ上胚軸アポプラストからセロオリゴ糖の単離・精製に成功した。
2. セロオリゴ糖はセロビオースと少量のセロトリオースおよびセロテトラオースであり、セルラーゼの関与によるセルロースの生分解が細胞成長に伴い生じていることをはじめて明らかにした。
3. 成長中のポプラ細胞壁で高発現するセルラーゼの構造遺伝子 *PopCel1* を導入した形質転換アラビドプシスを作成した。形質転換体は葉身の長さ、幅ともに野生株より大きくなり、これが細胞壁のゆるみによる細胞の拡大成長に基づいていることを明らかにした。
4. 導入した *PopCel1* 遺伝子がアラビドプシスで発現し、正しくポプラのセルラーゼが作られ、特にアポプラストに多く存在することを明らかにした。葉部でのセルラーゼ活性の著しい上昇とセロオリゴ糖の生成を明らかにし、形質転換体の葉の拡大成長がセルラーゼの機能によることを明確に示した。
5. 形質転換体のセルロースマイクロフィブリルに生じた微細変化を FT-IR, ^{13}C NMR および X 線回折により詳細に解析し、形質転換体のは非晶性成分のわずかな減少が生じていることを示した。これは、過剰発現のセルラーゼによる非晶性部分の消化で細胞壁構造に変化を生じ、葉の拡大成長を促進したことを示唆した。

以上のように、本論文は、セルラーゼがセルロースマイクロフィブリルに作用し、高等植物の細胞壁のゆるみを誘導して細胞成長を促進することをはじめて示したものであり、植物生理学、分子細胞生物学および細胞構造・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13年2月13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。