

学 位 論 文 題 名

セイヨウハコヤナギのペルオキシダーゼと
細胞壁構造タンパク質の発現に関する研究

学位論文内容の要旨

セイヨウハコヤナギの懸濁培養細胞より細胞壁酵素と考えられている酸性ペルオキシダーゼ（PCY2-6）をコードする cDNA クローンと細胞壁構造タンパク質と考えられているプロリンリッチタンパク質（PCY3-15）をコードする cDNA クローンを単離した。本研究においては、機能が未だに不明である PCY2-6 と PCY3-15 の mRNA およびタンパク質の植物体における発現と局在を解析した。

1) PCY2-6 と PCY3-15 の遺伝子ファミリーの単離

懸濁培養細胞から PCY2-6 と相同性があるクローンとして 4-14 と O-15 を単離した。シークエンシングの結果、4-14 と O-15 は同一のクローンであったため、これらのクローン名を PCY4-14 と命名した。この cDNA はポリ(A)鎖を含む 875 bp であった。PCY4-14 は 220 アミノ酸残基をコードするが、全長をコードせず、開始コドンを含む 5'末端側が欠けていた。pI は 9.47 であった。PCY4-14 の推定アミノ酸配列は、ペルオキシダーゼにおいて保存性のある近位のヒスチジンと 8 つのシステイン中 5 つのシステインを持っていた。PCY4-14 は塩基性ペルオキシダーゼをコードすると推定された。

PCY4-14 は全長をコードしていなかったため、以降の解析は PCY2-6 と PCY3-15 に関して行った。

2) PCY2-6 mRNA と PCY3-15 mRNA の葉および枝条における発現

PCY2-6 と PCY3-15 は共に細胞壁タンパク質をコードするために、これらの mRNA の発現を細胞壁の発達が異なるセイヨウハコヤナギの葉の未成葉（茎頂から第一葉と第二葉）と成葉（茎頂下 10 cm 以上の葉）、当年生枝条の一次木部形成部（茎頂から 1 cm までの部分）と二次木部形成部（茎頂下 5 ～15 cm の部分）を用いてノーザン解析した。その結果、PCY2-6 mRNA の発現はセイヨウハコヤナギの葉と枝条の全ての部位で検出された。一方、PCY3-15 mRNA の発現は当年生枝条の二次木部形成部でのみ検出された。

ヤマナラシ属のヤマナラシ、ドロノキ、ギンドロにおける PCY2-6 と PCY3-15 mRNA の発現についても、当年生枝条の二次木部形成部を用いてノーザン解析した。その結果、両 mRNA の発現がこれら三種の樹木においても検出された。

枝条において PCY2-6 および PCY3-15 mRNA が共に発現していたため、以降の解析は枝条を用いて行った。

3) PCY2-6 mRNA と PCY3-15 mRNA の枝条における局在

in situ ハイブリダイゼーションによりセイヨウハコヤナギの当年生枝条の一次木部形成部と二次木部形成部における PCY2-6 mRNA と PCY3-15 mRNA の局在を検討した。一次木部および二次木部形成部で PCY2-6 mRNA の局在は樹皮の篩部と皮層で検出され、木部では検出されなかった。このうち、篩部では形成層付近で発現し、皮層では一次木部形成部で全体的に発現し、二次木部形成部では表皮付近で発現していた。一方、PCY3-15 mRNA の局在は一次木部および二次木部形成部で樹皮の篩部と皮層で検出され、木部では検出されなかった。このうち、篩部では形成層付近で発現し、皮層では一次木部形成部で全体的に発現し、二次木部形成部では表皮付近で発現していた。

4) PCY2-6 タンパク質および PCY3-15 タンパク質と抗体の調製

大腸菌発現系の pGEX system で PCY2-6 タンパク質と PCY3-15 タンパク質の調製し、ウサギを用いた抗体の作製に成功した。

5) PCY2-6 タンパク質と PCY3-15 タンパク質の枝条における発現

PCY2-6 mRNA および PCY3-15 mRNA がともに発現した当年生枝条の二次木部形成部から全タンパク質と順次 20 mM Tris、4 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 、0.4 M CaCl_2 の各抽出画分を調製し、ウエスタンブロッティングを行った。PCY2-6 タンパク質は 0.4 M CaCl_2 抽出画分を除く各抽出画分で発現を検出した。また、糖鎖由来と思われる複数のアイソフォームが存在した。一方、PCY3-15 タンパク質は 4 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 抽出画分を除く全ての抽出各画分で発現を検出した。高塩濃度溶液の 0.4 M CaCl_2 の抽出画分で PCY3-15 タンパク質の発現を検出したため、このタンパク質は細胞壁から遊離したと考えられる。

6) PCY2-6 タンパク質と PCY3-15 タンパク質の枝条における局在

免疫組織化学によりセイヨウハコヤナギの当年生枝条の一次木部形成部と二次木部形成部における PCY2-6 タンパク質と PCY3-15 タンパク質の局在を検出した。一次木部形成部において PCY2-6 タンパク質は、樹皮では篩部の形成層付近と表皮で局在し、皮層で局在していなかった。木部では木化に先行して道管で局在し、木化が進行後も局在していた。二次木部形成部において PCY2-6 タンパク質は、樹皮では篩部の篩部繊維と表皮で局在し、皮層では局在していなかった。木部では木化に先行して道管、繊維、放射組織で局在し、木化が進行しても局在していた。一方、一次木部形成部において PCY3-15 タンパク質は、樹皮では篩部の形成層付近の篩管で局在し、皮層と表皮では局在しなかった。木部では木化に先行して道管で局在し、木化が進行すると局在は弱くなった。二次木部形成部において PCY3-15 タンパク質は、樹皮では形成層付近で局在し、皮層や表皮では局在していなかった。木部では形成層付近で局在し、木化が進行すると局在は弱くなった。

以上の結果から、PCY2-6 酸性ペルオキシダーゼは枝条の組織発達に伴い、mRNA が篩部の形成層付近で発現し、タンパク質として木化に関連して木部、篩部の篩部繊維に局在すると考えられる。よって、PCY2-6 酸性ペルオキシダーゼは木部や篩部においてリグニンの生合成やエクステンシンの重合に関わる可能性が示唆された。一方、PCY3-15 プロリンリッチタンパク質は枝条の組織発達に伴い、mRNA が篩部の形成層付近で発現し、タンパク質として形成層付近の木部や篩部に局在すると

考えられる。よって、PCY3-15 プロリンリッチタンパク質はペクチン結合性モチーフを持つために、木化に先行して木部や篩部でペクチンと結合する可能性を示唆した。これらの成果は樹木において新たな知見であり、今後樹木の細胞壁形成機構を解析する上で重要な基礎的知見となる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寺 澤 實

副 査 教 授 三 浦 清

副 査 助教授 藤 川 清 三

学 位 論 文 題 名

セイヨウハコヤナギのペルオキシダーゼと 細胞壁構造タンパク質の発現に関する研究

本論文は、8章で構成され、図 29、総頁数 120 の和文論文で、他に参考論文 3 編が添えられている。

セイヨウハコヤナギの懸濁培養細胞より細胞壁酵素と考えられている酸性ペルオキシダーゼ (PCY2-6) と細胞壁構造タンパク質と考えられているプロリンリッチタンパク質 (PCY3-15) をコードする cDNA クローンを単離し、これらの mRNA およびタンパク質の植物体における発現と局在を解析した。

1) PCY2-6 と PCY3-15 の遺伝子ファミリーの単離

懸濁培養細胞から PCY2-6 と相同性があるクローンとして PCY4-14 を単離した。この cDNA はポリ(A)鎖を含む 875 bp であった。PCY4-14 は 220 アミノ酸残基をコードしていたが、全長をコードしてはいなかった。pI は 9.47 であった。PCY4-14 は塩基性ペルオキシダーゼをコードすると推定された。

PCY4-14 は全長をコードしていなかったため、以降の解析は PCY2-6 と PCY3-15 に関して行った。

2) PCY2-6 mRNA と PCY3-15 mRNA の葉および枝条における発現

PCY2-6 mRNA と PCY3-15 mRNA の発現を細胞壁の発達が異なるセイヨウハコヤナギの未成葉 (茎頂から第一葉と第二葉) と成葉 (茎頂下 10 cm 以上の葉)、当年生枝条の一次木部形成部 (茎頂から 1 cm までの部分) と二次木部形成部 (茎頂下 5 ~ 15 cm の部分) を用いてノーザン解析した。その結果、PCY2-6 mRNA の発現はセイヨウハコヤナギの葉と枝条の全ての部位で検出され、

PCY3-15 mRNA の発現は当年生枝条の二次木部形成部でのみ検出された。

3) PCY2-6 mRNA と PCY3-15 mRNA の枝条における局在

in situ ハイブリダイゼーションによりセイヨウハコヤナギの当年生枝条の一次木部形成部と二次木部形成部における PCY2-6 mRNA と PCY3-15 mRNA の局在を検討した。一次木部および二次木部形成部で PCY2-6 mRNA の局在は樹皮の篩部と皮層で検出され、木部では検出されなかった。一方、PCY3-15 mRNA の局在もまた一次木部および二次木部形成部で樹皮の篩部と皮層で検出され、木部では検出されなかった。

4) PCY2-6 および PCY3-15 タンパク質と抗体の調製

大腸菌発現系の pGEX system で PCY2-6 と PCY3-15 タンパク質の調製し、ウサギを用いた抗体の作製に成功した。

5) PCY2-6 mRNA と PCY3-15 タンパク質の枝条における発現

PCY2-6 mRNA および PCY3-15 mRNA がともに発現した当年生枝条の二次木部形成部から全タンパク質と順次 20 mM Tris、4 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 、0.4 M CaCl_2 の各抽出画分を調製し、ウエスタンブロッティングを行った。PCY2-6 タンパク質は 0.4 M CaCl_2 抽出画分を除く各抽出画分で発現を検出した。一方、PCY3-15 タンパク質は 4 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 抽出画分を除く全ての抽出各画分で発現を検出した。

6) PCY2-6 タンパク質と PCY3-15 タンパク質の枝条における局在

免疫組織化学によりセイヨウハコヤナギの当年生枝条の一次木部形成部と二次木部形成部 PCY2-6 タンパク質と PCY3-15 タンパク質の局在を検出した。PCY2-6 タンパク質は一次木部および二次木部形成部において、樹皮の篩部繊維と木部の道管や繊維で木化に先行して局在し、木化後も局在していた。一方、PCY3-15 タンパク質は一次木部および二次木部形成部において、樹皮の篩部や木部の道管などで木化に先行して局在し、木化が進行すると徐々に局在が弱くなった。

以上の結果から、PCY2-6 酸性ペルオキシダーゼはエクステンシンの重合やリグニンの生合成に関わる可能性が示唆された。一方、PCY3-15 プロリンリッチタンパク質はペクチン結合性モチーフを持つために、ペクチンと結合する可能性を示唆した。これらの成果は樹木において細胞壁形成機構を解析する上で基

礎的知見となる。よって審査員一同は、加藤喜明が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。