



Title	Cellulose synthase complex : isolation and biochemical analysis of catalytic and structural units composing the rosette
Author(s)	藤井, 聡志
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58007
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【57】

氏名	藤井 聡志
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 23587 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Cellulose synthase complex : isolation and biochemical analysis of catalytic and structural units composing the rosette (セルロース合成酵素複合体：ロゼットを構成する触媒及び構造ユニットの単離と生化学的解析)
論文審査委員	(主査) 教授 小倉 明彦 (副査) 教授 長谷 俊治 准教授 高木 慎吾 講師 石水 毅

論文内容の要旨

セルロースはグルコースが β -1,4結合して出来た糖鎖であり、植物とバクテリアと一部の動物によって産生される地球上で最も多量に存在する有機化合物である。高等植物において、変異体解析による知見からセルロース合成候補遺伝子は多数報告されているが、生化学的解析による知見は乏しいのが現状である。一方、植物細胞膜に存在するロゼットと呼ばれる構造がセルロース合成酵素複合体であると考えられているが、ロゼットの精製に成功した例が無く、セルロース合成の分子メカニズムはほとんどが未知のまま残されている。

私はセルロース合成酵素複体の生化学的解析を目指し、まずロゼットの分離・精製を試みた。最終的に、アズキ芽生え上胚軸を用いて細胞膜の界面活性剤不溶性画分(ラフト)に多数のロゼット様構造を観察する事が出来た。ロゼット様構造の単離法の確立により、これまで不可能だったロゼットの生化学的解析への道を拓いたと言える。しかし、アッセイの条件に様々な界面活性剤、塩、低分子化合物などを検討したが、残念ながら精製ロゼット様構造画分には十分なセルロース合成活性は検出されなかった。このことから、活性を有する触媒ユニットと構造ユニットとが精製過程において分離するのではないかと考えた。

再検討の結果、ロゼット構造画分とは別に細胞膜画分を界面活性剤で処理した後の可溶性画分から、複数の精製ステップを経てセルロース合成活性を保持した画分を得る事に成功した。電子顕微鏡観察により、この画分には78 kDaのUDP-グルコース結合蛋白質が含まれており、スクロース合成酵素である事がウェスタンブロットと質量分析によって示された。UDP-グルコースのみならず、スクロースとUDPを基質としても*in vitro*でのセルロース合成活性が検出された事から、セルロース合成にスクロース合成酵素が大きく寄与している事が示唆された。

この標品と先述した構造ユニットとを*in vitro*で再構成したところ、ロゼット様構造にセルロース合成活性が付加された。免疫電子顕微鏡による解析から、スクロース合成酵素がロゼット様構造に組み込まれている事も示された。以上より、この標品がセルロース合成酵素複合体の真の触媒ユニットであると示唆された。

ロゼットがセルロース合成酵素複合体として機能している事が生化学的に初めて示唆された。それは精製過程で容易に外れる触媒ユニットと細胞膜ラフトに留まる構造ユニットの二つから構成され、触媒ユニットにはスクロース合成酵素が含まれている事が示された。セルロース合成を行う分子メカニズムには合成活性の制御やセルロース合成酵素と細胞骨格蛋白質との相互作用など、様々な機能があると予想されている。本論文における蛋白質精製標品を用いる事でセルロース合成に関わる新規蛋白質の同定及びそれらの機能解析が発展する事が期待される。

論文審査の結果の要旨

藤井聡志君は、陸上双子葉植物アズキを材料としてセルロース合成酵素複体の単離に挑戦した。まず、細胞膜の界面活性剤不溶性画分から、従来電子顕微鏡を用いた形態学的解析によって記載されてきたロゼット様構造に酷似した蛋白質複合体を単離する手法を確立した。これまで明確ではなかったロゼット様構造の詳細を高分解能で可視化することに成功したが、この標品(構造ユニット)には顕著なセルロース合成活性を検出することができなかった。

そこで次に、細胞膜の界面活性剤可溶性画分からセルロース合成活性を持つ標品を部分精製し、この標品の主要成分がスクロース合成酵素であることを明らかにした。*in vitro*でのセルロース合成の定量的解析から、この標品(触媒ユニット)が、

UDP-グルコースだけでなくスクロースとUDPを基質としてセルロースを合成する活性を持つことを示し、セルロース合成におけるスクロース合成酵素の役割を証明した。

さらに、構造ユニットと触媒ユニットとの再構成実験を行ない、ロゼット様構造にスクロース合成酵素が取り込まれること、再構成後のロゼット様構造にはセルロース合成活性が検出され、触媒ユニット単独の場合よりも太いセルロース繊維が合成されていることを明らかにした。植物生理学分野における長年の課題に正攻法で挑戦し、二つのユニットの実体に迫った意欲は非常に高く評価された。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。