



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

シリングリグニン生合成におけるペルオキシダーゼアイソザイムの役割

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 青山, 渉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2598

氏名(本国籍)	青山 渉 (愛知県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第 257 号
学位授与年月日	平成 14 年 3 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	シリングルリグニン生合成におけるペルオキシ ダーゼアイソザイムの役割
審査委員会	主査 静岡大学 教授 西田 友 昭 副査 静岡大学 助教授 堤 祐 司 副査 岐阜大学 教授 篠田 善 彦 副査 信州大学 教授 徳本 守 彦

論 文 の 内 容 の 要 旨

ペルオキシダーゼ (PO) はリグニン生合成の最終段階でモノリグノールの脱水素重合を触媒すると考えられているが、植物内には生理化学的な役割を担っている多くの PO アイソザイムが存在するため、未だリグニン生合成に関与する PO アイソザイムが特定されるには至っていない。この様な背景から、本論文ではシリングル型とグアイアシル型モノリグノールに特異的な PO アイソザイムが広葉樹のシリングルリグニンおよびグアイアシルリグニンの生合成を制御するという仮説に基づき、シリングル型基質に特異性の高い PO アイソザイムのシリングルリグニン生合成における役割を研究した。

本論文では先ず、シリングルリグニンの生合成と PO の基質特異性との関連性を生理学的に検証することを試みた。モデル実験系としてユーカリ (*E. viminalis*) 実生苗に湾曲処理を施すことにより人為的にあてを形成させ、あて形成に伴うリグニン組成変化と PO 画分のシリングルおよびグアイアシル核基質に対する酸化活性の推移を比較した。その結果、あて形成部では湾曲処理 30 日以降にシリングルリグニンの割合が上昇し、これと同調的に細胞壁イオン結合性 PO 画分のシリングル核基質に対する酸化活性が上昇した。これらのことから、本画分中のシリングル核基質特異的 PO アイソザイムとシリングルリグニン生合成の密接な関連性が強く示唆された。

次いで、酵素学的見地からシリングルリグニン生合成における PO アイソザイムの役割を検討した。先ず、ポプラカルスよりシリングル核およびグアイアシル核基質に対して高い特異性を有する PO アイソザイム SyPO と GPO を単離精製し、モノリグノールに対する酸化活性を比較した。その結果、SyPO のみがシナピルアルコールに高い特異性を有し

ていたが、GPO や西洋わさび由来の HRP もフェルラ酸やコニフェリルアルコールをラジカルメディエーターとして共存させるとシナピルアルコールを酸化することが可能であることを明らかとした。次に、エンドワイズ型ポリマー形成の仮説に基づき、*in vitro* におけるシナピルアルコールとシナピルアルコールオリゴマーの脱水素重合反応を行った。その結果、SyPO はオリゴマーを高分子化させ脱水素重合物を生じたことから、シリングルリグニンの生合成に関与する可能性が強く示唆された。一方 HRP では、シナピルアルコール酸化活性として SyPO の等量および 5 倍量に相当する酵素量を用いた場合でも、オリゴマーの脱水素重合が認められず、さらに、コニフェリルアルコールをラジカルメディエーターとして共存させた場合でもオリゴマーを高分子化させることはできなかった。以上のように SyPO がシリングルリグニン生合成へ関与する可能性が支持された一方で、HRP の様なグアイアシル核基質に特異的な PO がシリングルリグニンの生合成に関与する可能性は考え難いとの結論に達した。

最後に、本論文では SyPO の役割を遺伝子レベルで検討することを目的とし、cDNA の単離を試みた。PO に保存性の高い配列を用いてポプラカサスの cDNA ライブラリースクリーニングを行った。その結果得られた PO クローンはいずれも目的とする SyPO の cDNA ではなかったことから、次に RT-PCR による単離を試みた。精製 SyPO の部分アミノ酸配列を解析し、得られたアミノ酸配列に基づき SyPO 特異的プライマーを設計した。ポプラカサスおよびポプラ形成層から調製した RNA とプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、共に SyPO cDNA 断片を得た。さらに、得られた断片の配列情報を基に 3'-RACE を行い、907bp の SyPO 部分配列を単離するに至った。ポプラ形成層においても SyPO 断片が増幅されることから、SyPO がポプラカサスのみならず、木化の盛んな組織で発現していると考えられ、SyPO がリグニン生合成に関与するアイソザイムである可能性をさらに示唆した。なお、この配列を既知の PO 配列と比較した結果、Tomato や Peanut の塩基性 PO と比較的高い相同性があり、酸性ペルオキシダーゼとの相同性は低いことから、新規な木化ペルオキシダーゼであることが期待される。

以上の結果に基づき、本論文では細胞壁イオン結合性でありシリングル核に高い特異性を有する PO アイソザイム (SyPO) が、広葉樹のシリングルリグニン生合成に重要な役割を果たしているものと推定した。

審 査 結 果 の 要 旨

リグニン生合成の最終段階であるモノリグノールの脱水素重合はペルオキシダーゼ (PO) により触媒されると考えられているが、植物内には多くの PO アイソザイムが存在するため、未だリグニン生合成に関与する PO アイソザイムを特定するには至っていない。また、広葉樹には、シリングル型およびグアイアシル型の 2 種のリグニンが存在することから、本論文はシリングル型基質に特異性の高い PO アイソザイムのシリングルリグニン生合成における役割を研究したものである。

まず、シリングルリグニンの生合成と PO の基質特異性との関連を検証する目的で、モデル実験系としてユーカリ (*E. viminalis*) 実生苗に湾曲処理を施すことにより人為的にあてを形成させ、あて形成に伴うリグニン組成変化と PO 画分のシリングルおよびグアイアシル核基質に対する酸化活性の推移を比較した。その結果、あて形成部では湾曲処理 30 日以降にシリングルリグニンの割合が

上昇し、これと同調的に細胞壁イオン結合性 PO 画分のシリングル核基質に対する酸化活性が上昇した。これらの結果から、シリングル核基質特異的 PO アイソザイムとシリングルリグニン生合成の密接な関連性を示唆するに至っている。

次いで、ポプラカルスより各種クロマトグラフィーを用い、シリングル核およびグアイアシル核基質に対して高い特異性を有する2種の PO アイソザイム SyPO と GPO を単離し、モノグノールの酸化を PO アイソザイム間で比較した。その結果、SyPO のみがシナピルアルコールに高い特異性を有していたが、一方で GPO や HRP の様にシナピルアルコールに特異性の低い PO アイソザイムでも、フェルラ酸やコニフェリルアルコールをラジカルメディエーターとして共存させるとシナピルアルコールを酸化しうることを示した。さらに、Sarkanen により提唱されているエンドワイズ型ポリマー形成に基づく高分子リグニン形成過程を想定し、シナピルアルコールとシナピルアルコールオリゴマーの脱水素重合反応を *in vitro* で比較した。その結果、SyPO はオリゴマー基質を高分子化させ脱水素重合物を生成させ得るのに対し、HRP の場合、シナピルアルコールの酸化活性として SyPO の等量および5倍量に相当する酵素量を用いた場合でも、オリゴマーの脱水素重合は触媒し得ないことを見出した。また、コニフェリルアルコールをラジカルメディエーターとして共存させた場合でも、オリゴマーの高分子化は生じないことも明らかとしており、これらの結果は、シリングル核基質特異的アイソザイムである SyPO がシリングルリグニン生合成に関与する可能性を強く示唆している。

生理学および酵素学的検討から SyPO のシリングルリグニン生合成への関与が強く示唆されたため、本論文ではさらに SyPO の cDNA の単離を試みている。先ず、精製 SyPO の部分アミノ酸配列を解析して SyPO 特異的プライマーを設計し、次いでポプラカルスおよびポプラ形成層から調製した RNA とプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、SyPO の cDNA 断片が単離された。さらに、得られた断片の配列情報を基に 3'-RACE を行い、907bp の SyPO 部分配列を単離するに至った。SyPO 断片がポプラカルスのみならずポプラ形成層からも単離されたことは、SyPO が木化の盛んな組織でも発現していることを示している。

以上の様に、本論文は細胞壁イオン結合性でありシリングル核に高い特異性を有する PO アイソザイム (SyPO) が、広葉樹のシリングルリグニン生合成に重要な役割を果たすという新規な知見を明らかにしていることから、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

- 1) Lignification and peroxidase in tension wood of *Eucalyptus viminalis* seedlings. J. Wood Sci. (日本木材学会), 47, 419-424, 2001.
- 2) Sinapyl alcohol-specific peroxidase isoenzyme catalyzes the formation of the dehydrogenative polymer from sinapyl alcohol. J. Wood Sci. (日本木材学会), in press.