

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成26年 6月 27日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 農学研究科・森林科学専攻

職 名・学 年 博士後期課程3年

氏 名 清 都 晋 吾

助 成 の 種 類	平成25年度・若手研究者在外研究支援・在外研究長期助成		
研 究 課 題 名	モノクローナル抗体を用いた亜麻及び麻細胞壁におけるヘミセルロースの堆積と木化		
受 入 機 関	フランス国立農業研究所(INRA Reims)		
渡 航 期 間	平成25年 6月 2日 ~ 平成 26年 6月 1日		
成 果 の 概 要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()		
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	2,500,000円	
	使用した助成金額	2,500,000円	
	返納すべき助成金額	0円	
	助成金の使途内訳	査証取得費用	75,172円
		航空賃	303,452円
滞在費		2,121,376円	
当財団の助成について	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) ビザ取得や学生寮の宿泊費、渡航先での交通費など、これほど費用がかかるとは思いませんでした。ありがとうございました。		

成果の概要/清都晋吾

○モノクローナル抗体を用いた亜麻及び麻細胞壁におけるヘミセルロースの堆積と木化

【概要】

亜麻 (*Linum usitatissimum*) 及び麻 (*Cannabis sativa L.*) は、靱皮繊維が高い機械的性質を持つことから、商業的に重要な繊維作物であり、靱皮繊維に存在するリグニンの性質を明らかにすることは極めて重要である。本研究は、亜麻及び麻の細胞壁について、モノクローナル抗体を用いてリグニン中の特定結合様式の分布及びヘミセルロースの堆積との関連性を明らかにすることを目的とする。

【試料】

(1) 亜麻

亜麻について、種子成熟期の根元付近の茎を、常法によりエポキシ樹脂包埋した。

(2) 麻

2種類の生育条件の麻（高密度播種および水耕栽培でそれぞれ栽培したもの*）について、開花終了期および種子成熟期の試料（エポキシ樹脂に包埋済み）を2種類ずつ、当時フランス国立農業研究所（INRA）に所属していたEva Fernandez氏から譲渡された。

*麻は生育条件によりその繊維の性質や量が大きく変化することが知られている。高密度に播種（100kg/ha）した条件と、水耕栽培（通常、麻は乾燥状態で栽培する）での生育が、二次靱皮繊維に影響を与えることが同氏の研究により明らかになっている。

【実験方法】

包埋試料から500nm厚切片を切り出し、抗リグニン抗体KM1*¹（腹水100倍希釈）を用いて免疫金標識、銀増感および0.1%TBO染色を行い、光学顕微鏡観察およびエピ蛍光による観察に供した。また、各種抗ヘミセルロース抗体（LM10, LM11, LM21, LM5, LM2, JIM14）*²を用いて免疫蛍光標識し、蛍光顕微鏡で観察した。さらに、亜麻の包埋試料から100nm厚切片を切り出し、上記抗体により免疫金標識し、透過型電子顕微鏡観察に供した。

*¹この抗体は当研究室において過去に作製された抗体で、リグニンの8-5'型構造に特異的に反応することが明らかになっている（Kiyoto et al. *Planta*. DOI: 10.1007/s00425-012-1784-x）。

*²これらの抗体の特異性を以下に示す。

LM10:非置換または低置換度のキシラン

LM11:キシラン

LM21:マンナン

LM5:ガラクトン

LM2:アラビノガラクトンタンパク

JIM14:アラビノガラクトンタンパク

【結果と考察】

(1) 亜麻

亜麻の茎横断面をKM1により免疫金標識した結果、靱皮繊維において、標識は二次壁全体に弱く見られ、内腔付近でやや強く見られた。各種抗ヘミセルロース抗体で標識した結果、靱皮繊維は、LM10, LM11, JIM14での標識が殆ど見られなかった。

(2) 麻

麻をKM1により免疫金標識したところ、栽培条件や成長段階にかかわらず、靱皮繊維および木部繊維の全域に強い標識が見られた。一次靱皮繊維と二次靱皮繊維の距離が、水耕栽培条件のほうが高密度播種条件よりも大きいなど、組織構造の変化はみられたが、標識の傾向に特に顕著な差は見られなかった。

同じ試料を、各種抗ヘミセルロース抗体で標識した結果、靱皮繊維二次壁には、LM21、LM2、JIM14による標識が強くと見られた。細胞間層においてはLM11、LM5の標識も見られた。KM1と同様に、どの抗体においても、栽培条件や成長段階によって標識の傾向が大きく変化しなかった。

靱皮繊維二次壁でKM1、LM21、LM2、JIM14の標識が強くと見られたのはこれらの抗原であるリグニンの8-5'型構造、マンナン、アラビノガラクトナンパクが多く存在することを示唆する。また、栽培条件や成長段階によって標識があまり変化しなかったことは、リグニンやヘミセルロースの組成が、それらの条件では変化しないことを示唆している。

(3) まとめ

亜麻と麻の靱皮繊維を比較すると、麻の靱皮繊維二次壁において、KM1およびJIM14の標識が強くと見られたが、亜麻の同部位においてはそれらの標識は余り見られなかった。このことは、亜麻と麻はともに重要な繊維作物でありながら、その靱皮繊維のリグニン構造やヘミセルロースの組成は、大きく異なることを示唆している。ただし、亜麻においてKM1およびJIM14の標識が見られないことは、リグニンの8-5'型構造とアラビノガラクトナンパクの不在を示すものではなく、他の細胞壁構成成分の立体障害によって抗体がエピトープにアクセスできないことが原因の可能性もある。

【結論】

本研究においては、亜麻および麻の細胞壁について KM1 および各種抗ヘミセルロース抗体によって免疫標識をおこない、リグニンとヘミセルロースの分布を調べた。亜麻および麻の靱皮繊維二次壁はそれぞれ異なった標識の傾向を示し、その靱皮繊維のリグニン構造やヘミセルロースの組成が大きく異なることを示唆する結果となった。今後は、免疫標識以外の手法により、この部位における、両植物のリグニンおよびヘミセルロースの構造を調べる予定である。また、上述の他の物質による立体障害が原因で、亜麻の KM1 標識があまり見られなかった可能性を考える必要がある。そのため、帰国前に譲渡された亜麻の試料を、脱ヘミセルロース処理を施した後に包埋し、免疫標識を行い、リグニンの 8-5' 型構造の有無を調べる予定である。