

論文審査の結果の要旨

氏名 篠原 直貴

本論文は2章からなり、第1章では、木部細胞特異的モノクローナル抗体の網羅的単離を目指して、ファージディスプレイサブトラクション法のスクリーニング過程をモニタリングした結果が述べられており、第2章では、単離した3種類の木部分化特異的抗細胞壁モノクローナル抗体を用いて行った、木部分化過程の解析と抗原の特徴付けが述べられている。

細胞壁は、植物を特徴づける構造であり、細胞の分化状態に合わせて変化する。近年の研究から、細胞壁の変化は、分化の結果であるだけでなく原因となりうる例も断片的ながら報告されるようになった。この点で細胞壁の変化を見出すことは、細胞分化を制御する機構を解明する上で、重要な足がかりになると考えられる。しかし、細胞壁成分の多くは、複数の遺伝子産物が働いて作られる多糖やフェノール性物質からなるため、従来行われてきた遺伝子のクローニングを初めとする分子遺伝学的な手法では均一の分子構造を持つ細胞壁成分を多量に得ることはできず、抽出と精製に基づく生化学的な手法では組織・細胞レベルでの細胞壁成分の変化を捉えられない。その点、モノクローナル抗体は、立体構造によってのみ分子を識別するため、特定の構造分子を選択的に単離・精製することを可能にし、さらに、組織・細胞レベルの情報を得るプローブになる。そこで、論文提出者は修士課程から一貫して、維管束分化のモデル実験系であるハクニチソウ培養細胞を用い、分化特異的な抗細胞壁抗体の単離とそれを用いた分化過程の解析を行ってきた。修士課程では、未成熟な管状要素を多く含む培養細胞の細胞壁を抗原として、ファージ抗体ライブラリーの作製ができること、そして、このライブラリーを分化状態の異なる二つの細胞壁でサブトラクションすることにより、木部分化特異的細胞壁成分を認識するモノクローナル抗体を単離できるという予備的な結果を得た。そこで、博士論文では、より多くの抗体を得る目的で抗体の選抜過程のモニタリングを行い、

このファージディスプレイサブトラクション法を改良した。そして、この過程で、分化特異的細胞壁成分を認識する抗体を最終的に3種 (CN8, XD3, XD27) 単離することに成功した。そして、これらのモノクローナル抗体を用いて、抗原分子の特徴付けを行うとともに、ヒヤクニチソウ培養細胞・植物体でのエピトープの局在及び木部分化との関連を解析した。

まず、第1章では、ファージディスプレイサブトラクション法のスクリーニング過程をモニタリングし、ドミナントなエピトープに対するファージ抗体がスクリーニングを繰り返すことで著しく増加することを見出した。そして、目的の特異性を持っていても稀にしかぞんざいしないエピトープに対するファージ抗体は、スクリーニングを繰り返すことで失われやすくなることが明らかとなった。また、スクリーニングの過程では、通常の翻訳様式に従わない non-canonical translational mechanism がはたらき、非サプレス終止変異やフレームシフト変異を抗体遺伝子配列中に含むファージ抗体が選抜されてくることが解り、そのようなクローンを排除するようなスクリーニングを行うことが重要であることが解った。これらの結果から、これまで難しかった多様な分化特異的モノクローナル抗体の単離を短期間のうちに達成できる糸口が見い出せた。そして最終的に、木部分化特異的なモノクローナル抗体3種 (CN8, XD3, XD27) を単離することに成功した。

第2章では、まず、得られた3つの抗体 (CN8, XD3, XD27) の抗原の特徴付けを行った。その結果、CN8 はアラビノガラクタンタンパク質の糖鎖部分を認識していることが示唆された。また、XD3 抗原は、ペクチン性多糖であり、そのエピトープは、ラムノガラクトツロナン1の側鎖の (1→4)-β-D-ガラクトタンであることが明らかとなった。XD27 は、熱水で抽出される成分であり、糖鎖を分解する反応や、プロテアーゼでは分解されないものの、酸性条件にさらすと抗原性が失われることが明らかになった。続いて、これらの抗体を用いて、ヒヤクニチソウ培養細胞及び植物体を用いて免疫局在解析を行った。これらの抗体は、いずれも木部細胞を認識し、特に未成熟な分化段階にある管状要素を認識していることが明らかになった。未分化な管状要素細胞壁を特異的に認識する抗体はこれまでほとんどなく、有効な抗体の単離に成功した点で高く

評価される。続いて、培養細胞と植物体の免疫局在解析の結果を比較した。XD27は管状要素の未成熟な二次細胞壁に特異的に局在し、成熟すると消失するユニークな二次細胞壁特異的な分子を認識することが明らかとなった。CN8, XD3どちらのエピトープも管状要素分化に先立って細胞長軸の先端に局在し、その後次第に拡がった。この局在様式は植物体でも観察された。このことから、管状要素分化過程において、CN8, XD3 どちらのエピトープも未成熟な管状要素に細胞極性を示して局在することが明らかになった。この結果は、管状要素分化の細胞壁形成初期において、その形成が極性をもって行われることを初めて示したもので、世界の注目を集めた。また、細胞レベルの詳細な解析から、CN8とXD3は、組織レベルで未成熟な管状要素以外に木部柔細胞を認識し、培養系においても管状要素以外に培養時間72時間目頃から顕在化する細胞集団を認識することが示された。この結果は、培養系において木部柔細胞が分化していることを強く示唆し、これまで予想されていた単細胞培養系において複数の木部細胞が分化しているという仮説を裏づける有力な証拠となった。

以上ここで得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うのに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、篠原直貴提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。