

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 飯 倉 寛

Al は酸性土壌における作物生育阻害の主要な原因の一つであるが、細胞レベルでの解析は Al の検出感度が低いことからほとんど行われてこなかった。そこで、新たな Al の高感度検出法の確立を試みると共に、細胞内 Al の動態解析を通して細胞レベルでの Al 応答について新たな知見を得ることを目的として研究を行った。

第一章では、Al 処理が細胞内の Fe 含量へ及ぼす影響を細胞内 Al 含量変化の点から考察した。定量には ICP-AES による解析の他に放射化分析法も用いた。Al 処理による細胞内 Al 含量が増加するに従い Fe 含量も増加したが、増加傾向には約 6 時間のタイムラグが生じていた。FDA-PI 二重染色法を用いた viability の検出から、Al の細胞内への急激な流入は細胞膜機能の損傷によるものと考えられた。また、細胞には Al 吸着量に限界値が存在することも示された。次に Al 処理に伴う細胞中の B 含量変化を調べるため PGA による微量ホウ素の高感度測定法を開発した。B は Al と同族元素であることから B による Al 障害の緩和作用が期待されたが、細胞内 B 含量は Al 処理の影響をほとんど受けず、また Al 処理溶液中の B 濃度を変化させても特に細胞増殖度に差はみられなかった。

第二章では Al 処理が細胞周期に与える影響についての解析を行った。細胞は定常期よりも対数増殖期の方が Al 障害を受けやすいことが示され、核に吸着した Al の影響のためではないかと考えられた。そこで、FCM を用いて Al 処理による核の状態変化を解析した。16 時間の Al 処理により通常の $2n$ の核よりも弱い蛍光強度を持つ異常核（断片化 DNA）が確認され、異常核数の増加は Al 処理濃度や Al 処理時間に依存していた。さらに、細胞周期における細胞の Al 感受性に差異があるのかを調べるため、アフィディコリン処理による同調培養も行った。同調した各細胞群に対して Al 処理を行ったところ、S 期と M 期に Al 処理を開始した細胞群に対して DNA の断片化が多く現れることが示された。

第三章では細胞レベルにおける Al 高感度検出法の確立を行った。従来法では細胞内の細部の Al 分布の解析を行うことは非常に困難であったため、高感度の Al 検出が可能な染色法の確立が求められた。高分解能を持つ共焦点レーザー顕微鏡を併用したルモガリオン染色法は、モリン染色法と比べて非常に高

感度の Al 検出が可能であるだけでなく、固定や染色の際に Al の移動や流出が殆ど認められず、観察中の褪色もほとんど認められない点からも、細胞レベルにおける微量 Al 動態解析に非常に優れた手法であることが明らかとなった。

第四章では、確立したルモガリオン染色法を用いて細胞内 Al 動態解析を行った。通常の Al 処理区では時間とともに蛍光強度は一定の増加傾向を示し、細胞内 Al 含量変化と非常に相関が高いことが示された。局在部位については細胞壁（膜）への Al 吸着のみならず、核への高い Al 局在性が示された。それに比して、-Fe 区（A 区）また酸化防止剤添加区（AFD 区）においては Al 蓄積による蛍光強度の増加は低く抑えられていた。しかしながら、約 2 時間の Al 処理で細胞内顆粒への非常に強い Al 局在が認められた。この現象は Fe の有無や過酸化に関わらず生じ、Al 処理時間が 2 時間をすぎると徐々に顆粒が消失していくことが確認された。スライドグラス接着法を用い、同一細胞について膜電位感受性色素 DiOC6 とルモガリオン染色画像との比較検討を行ったところ、蛍光発色の局在様式は非常に類似した傾向が認められたことから、Al が吸着していた顆粒は膜構造をもつ膜小胞であると考えられた。

第五章では Al 処理による Apoptosis 誘導メカニズムについての解析を試みた。FCM 解析で確認された DNA 断片化の原因として第一に考えられるのは、Fe 共存下による過酸化ストレスと考えられる。そこで活性酸素検出試薬 H_2DCFDA を用いて各処理区における細胞内活性酸素の検出を行ったところ、Fe 共存下では徐々に活性酸素量が増加したが、A 区及び AFD 区では活性酸素はほとんど検出されなかった。Al 処理による経時的な DNA の断片化過程を詳細に検討するために、断片化 DNA をビオチン標識後、フルオレセイン標識ストレプトアビジンで蛍光染色した。Al 処理 18 時間後から断片化 DNA が現れ始めたが、興味深いことに AFD 区においても 24 時間後には DNA の断片化が確認された。この結果は酸化ストレス以外にも断片化を誘導するメカニズムが存在することを示すものである。

以上、本論分はタバコ培養細胞を用いて Al 応答の一端を明らかにした成果をまとめたものであり、本研究において得られた知見が今後の Al 応答解析に役立つことが非常に期待される。よって審査委員一同は、本論分が博士（農学）の学位論文として価値あるものであると認めた。