

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 長坂 征治

本論文は、世界の耕作可能面積の約 30%を占めている酸性土壌で問題となっている植物の Al 障害、そして、人類の活動によって顕在化し、農業上の問題となっている重金属障害に対して、植物ではなく好熱・好酸性の紅藻である *C. caldarium* の金属代謝をもとに解決法を見いだそうとしており、金属耐性植物の創製に向けた基礎的な研究を行ったものである。特に、Al 耐性については、現在までに多くの研究が為されているが、酸性土壌で生育可能な植物は開発されておらず、これまでとは異なる側面からの研究の必要性が考えられた。*C. caldarium* は、Cd を除く金属に対して高い耐性を持っていた。特に Al に対しては、非常に高い耐性を持ち、200 mM という高濃度の Al 処理存在下でも生育が可能であったことから、Al 耐性を中心にした研究を行ったものである。

本論文は、5 章で構成されており、第 1 章では、序論として研究の背景、目的と意義について述べられている。

第 2 章には、*C. caldarium* の金属耐性の評価と、金属耐性をもとに進められた生化学的な研究について述べられている。*C. caldarium* の金属に対する耐性能の評価から、Cd を除く幾つかの金属に対して高い耐性を保持しているが、100 mM の金属存在下では生育は完全に阻害されている。これに対して、Al には特に高い耐性を示し、100 mM、200 mM という高濃度の Al 存在下でも、対照区に対して 83、58%の生育速度を示す。一方、Al 存在下で培養した細胞内の Al 濃度は非常に低く抑えられており、湿重量あたりの細胞内 Al 濃度 (3.1 ppm) は、培地 (100 mM = 2700 ppm) と比較して約 1000 分の 1 であった。また、培養温度が低い場合、この紅藻はより高い Al 耐性を示し、その時の細胞内の Al 濃度は、通常条件で培養した細胞の約 10 分の 1 に抑えられていた。これらのことから、細胞内の Al 濃度を低くすることで耐性を獲得していると考え、そのための機構が存在していると考えている。さらに、細胞内の Fe 濃度が Al 処理により減少しており、細胞内の Al 濃度と Fe 濃度に逆相関の関係が認められたことから、*C. caldarium* の細胞内に存在している Al が、Fe の吸収機構、あるいは、蓄積機構に関連していると考えている。一方、CCCP (脱共役剤) と Al の同時処理では、CCCP 処理濃度と共に、細胞内 Al 濃度が上昇しており、共役によって得られるエネルギーを利用して、細胞内の Al を排出している、あるいは、培養液中の Al を取り込まないようにしていることが示された。また、細胞膜の ATPase が Al によって阻害されていることから、細胞内の Al 濃度が低く維持する機構に ATPase が関与している可能性が示されている。2 章の最後では、Al 処理細胞の *C. caldarium* 細胞を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察し、葉緑体の変化を認めると共に、核の近傍に高い電子密度を持つ顆粒の存在を見だし、この顆粒に金属が集積されている可能性を示している。

第 3 章では、電子顕微鏡下で認められた顆粒についての解析を進め、構成成分の同定、機能の解析を行っている。コントロール条件で培養した細胞の TEM-EDX での元素分析の

結果、顆粒の構成元素はほとんどが P, O, Fe で占められており、顆粒に含まれている元素の割合はほぼ一定であることが示されている。この結果をもとに行った P, Fe の細胞内マッピングから、両元素の顆粒への局在が示された。一方、Al 処理した細胞の顆粒でも、構成元素の大部分は P, O, Fe であったが、それに加えて Al の存在が認められ、Al 処理細胞内の顆粒に含まれている Fe と Al の割合を合わせると、コントロール細胞の顆粒内の Fe の割合と一致していた。細胞内 Al のマッピング分析において、Al 処理細胞内で、Al が顆粒へ集積していることが示されたことから、*C. caldarium* は、顆粒の Fe を Al と置換して Al を顆粒内へ捕捉することで無毒化していると考えられた。

顆粒の Fe の存在形態を明らかにするために、ESR による分析を行っている。未破碎細胞の ESR スペクトルには、g 値 4.15 に検出される高スピン状態の Fe のシグナルの他に、未同定の非常に強い等方性のシグナルが g 値 2.00 に観察された。細胞破碎液を分画して、ESR スペクトルに等方性シグナルのみが観察される画分を回収し、この画分に対して EDTA 処理を行った。EDTA 処理後の ESR スペクトルでは、等方性のシグナルが減少し、EDTA-Fe³⁺のシグナルが増加していた。*C. caldarium* 細胞内の Fe の多くが顆粒に局在していることから、この等方性のシグナルが顆粒に集積している Fe のものであると考えられた。更に、この等方性の Fe のシグナルが、培地中の Fe 濃度、細胞内の Fe 濃度を反映していたことから、顆粒が、*C. caldarium* 内で、Fe の蓄積機構として働いていることが示されている。また、ESR スペクトルの比較から、等方性シグナルがリン酸化合物と結合した Fe に由来するものであることが示唆され、³¹P-NMR による解析から、顆粒がポリリン酸であることが示された。ポリリン酸の Fe 蓄積機構としての働きは、新たに発見された機能であり、重要な知見であると考えられる。

第 4 章では、cDNA ライブラリーを用いた *C. caldarium* の Al 耐性遺伝子の探索を行っているが、耐性遺伝子の単離には至ってはいない。しかしながら、単離出来なかった原因、今後の課題、改良すべき点について詳細に述べられている。

第 5 章では、得られた結果をもとに総合考察を行っている。

以上のように、本論文は、好熱・好酸性の紅藻を用いて新たな側面から、酸性土壌耐性、金属汚染土壌耐性の植物創製を目標として研究を行っており、この紅藻の有用性を示している。これは、新規性と独創性に富む内容であり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、本論文を博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。