

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 古川 純

本論文はAIが植物に及ぼす障害において特徴的である短時間での根伸長阻害に関して、新たな知見を得ることを目的として行った研究である。これまでの研究から、AIによる根伸長阻害は根冠から分裂域、伸長域を含めた根端で生じる障害に起因していることが明らかにされているものの、伸長阻害を引き起こす具体的な作用機構に関しては一定の結論に達していない。本研究では第1章においてAIによる根伸長阻害が細胞で生じた障害の結果であるか、あるいは細胞で障害が発生するよりも早期の応答であるかについて検討した。20 μ M AI処理を施した根の伸長速度では、AI処理開始後2時間で約60%まで低下していたことが示されており、他の伸長阻害と比較しても極めて早く、AI障害に特異的な現象であった。また根端へのAI取り込み量は処理開始後急激な上昇を示しており、伸長阻害が根端におけるAI浸透に起因した現象であることが示唆された。この2時間での伸長阻害が細胞内で生じた障害の結果であるならば、細胞がAIを感知した際に速やかに合成が開始されるCalloseの増加、細胞膜の損傷が伸長阻害以前に検出されると考えられたが、Callose合成量が明瞭な増加を示したのは2時間以降であり、細胞膜の損傷は3時間以降に確認される現象であった。これらの結果からAIによる伸長阻害は細胞で生じる障害よりも初期の現象であることが示唆され、アポプラストにおけるAI障害が短時間での伸長阻害を引き起こしている可能性が高いと考えられた。

伸長帯のアポプラストには細胞伸長を制御する酵素群が存在している。第2章ではこれらアポプラスト蛋白に対するAI障害について解析を試みた。壁成分に結合している酵素による自己分解を検出するオートリシス法での測定では多糖の分解過程に対するAI障害は検出されなかった。しかし、アポプラストからの抽出蛋白を用いた2次元電気泳動法による解析ではAI処理1時間で消失する蛋白SAP27が確認され、アポプラスト蛋白の中にAIに対して特異的な応答を示す蛋白が存在することが明らかとなった。SAP27が持つ機能の同定を目的としてアミノ酸配列解析を行ったが、データベース上に同一な蛋白は存在せず新規蛋白であると考えられた。またSAP27を含む抽出蛋白をオートリシス法での測定に添加し、抽出蛋白の持つ多糖の分解活性を測定したところ、抽出蛋白を添加しなかった場合に比べて壁成分の分解が促進されることが示された。AIと抽出蛋白を共存させた場合にはこの分解促進が抑えられていたことから、抽出蛋白の中に細胞壁成分を分解する蛋白が含まれており、その機能はAIにより阻害されることが明らかとなった。

SAP27はAI処理によりアポプラストからの抽出が妨げられる蛋白であったことから、AIとの相互作用による蛋白不溶化機構の存在が示唆された。この不溶化機構を明らかにするために第3章第1節においてそれぞれ異なる障害機構を持つと考えられる低pH、 La^{3+} ならびに H_2O_2 による伸長阻害とSAP27の不溶化の関連性を検討したが、AI処理以外でのSAP27不溶化は確認されなかった。AIに対する特異的な応答であることが示唆されたため、

有機酸による Al 除去が SAP27 の不溶化を緩和するかどうかを第 2 節で検討した。4 時間の Al 処理を施した後にクエン酸を添加した水耕液に移して 2 時間育成したところ、根伸長速度の一時的な回復、SAP27 の再可溶化が確認され、SAP27 の可溶化が伸長の回復をもたらすことが示唆された。またこの伸長回復時に皮層組織の Al 蓄積量減少が確認され、クエン酸溶液による Al 除去が SAP27 可溶化の要因であることが示唆された。Al が引き起こしたアポプラスト蛋白の不溶化という障害がクエン酸により回復することが示されたことから、植物の有機酸放出が根圏だけでなくアポプラストにおいても Al 障害を緩和することが明らかとなった。

SAP27 の不溶化が Al との直接的な結合により生じる現象であるかどうかを明らかにするために、第 4 章では SAP27 と Al の親和性についての解析を試みた。2 次元電気泳動で分離した蛋白を泳動ゲル上で Al とインキュベートし、蛋白に結合した Al を Morin による蛍光染色で検出するという Al と蛋白の親和性解析法を開発し、アポプラスト蛋白と Al の親和性解析に適用した。本法により Al と高い親和性を持つ蛋白が 8 種確認されたが、その中に SAP27 は含まれず、SAP27 の不溶化機構に Al 親和性は関与していないことが示唆された。また Al 親和性を持つことが示された蛋白のうち 23 kDa の分子量を持つ蛋白のアミノ酸配列を決定し、データベース上での検索を行ったが同一配列を持つ蛋白は存在せず新規蛋白であることが示された。

本研究でクエン酸によるアポプラスト蛋白の機能回復という新たな Al 障害緩和機構が明らかとなったことから、第 5 章ではこの機構の Al 耐性・感受性への関与について検討した。Al 耐性ダイズの福獅子と感受性ダイズのピアフレンドを用いて、根伸長速度、アポプラストへのクエン酸放出量の測定を行った。耐性種において Al 処理後 16 時間でのクエン酸放出量の増加と、それに伴う 18 時間以降における伸長速度の回復が認められ、クエン酸放出に起因した Al 障害の緩和であると考えられた。クエン酸放出と伸長回復に相関が認められたことから SAP27 の可溶化を検証したところ、伸長回復よりも 8 時間早い Al 処理 10 時間において SAP27 の可溶化が確認された。伸長回復と可溶化に時間的相違が見られたこと、さらに 10 時間では Al 感受性種でも SAP27 が可溶化していたことから、耐性種の示した伸長回復に対して SAP27 の可溶化が直接関与していないことが示唆された。鶴の子と福獅子で SAP27 の可溶化と伸長回復が生じる時間が異なっていたことから Lumogallion 染色による伸長帯への Al 浸透度から双方の Al 障害を比較すると、Al 処理 4 時間における Al 蓄積は皮層組織のアポプラストが中心であったのに対し、8 時間はシンプラストへの Al 侵入が認められた段階であった。このことからアポプラストでの Al 障害が中心である 4 時間においては、クエン酸によるアポプラストからの Al 除去ならびに SAP27 の可溶化に伴い速やかな細胞伸長の回復が示されるが、より Al 障害の進行した 10 時間の段階ではシンプラストなどにおける障害の発生により SAP27 の可溶化のみでは伸長回復に至らないものと考えられた。

以上本論文はダイズを用いて Al による伸長阻害機構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 障害の解明に役立つことが大いに期待される。よって審査員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文としての価値を持つものであると認めた。