

学 位 論 文 要 旨

氏 名	砂川春樹
題 目	アイスプラント (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L.) における活性酸素発生抑制機構との関わりからみたベンケイソウ型酸代謝 (Crassulacean acid metabolism) の生理的意義に関する研究 (Studies on the physiological functions of Crassulacean acid metabolism (CAM) in relation to the mechanisms for curtailing production of reactive oxygen species in the common ice plant, <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L.)

CAM植物は、CO₂及び水分の制限された環境下で進化したと考えられている。CAM型光合成は夜間にCO₂を吸収し、有機酸を生成して液胞に蓄積し、昼間に有機酸を脱炭酸して得たCO₂をRuBPカルボキシラーゼで再固定する。昼に気孔を閉じるため水の損失が抑えられ、水利用効率が增加する。一般に、気孔が閉鎖した状態で光が照射されると光エネルギーが過剰となり、有害な活性酸素(ROS)が発生する。CAM植物では昼間の脱炭酸によるCO₂の供給がROSの発生を抑えるという説と、CO₂固定時に発生する酸素がROS生成を促進するという二つの説が提唱されているが、詳細は不明である。アイスプラント(*Mesembryanthemum crystallinum* L.)は、高塩や強光等の不良環境下で光合成型をC3型からCAM型に変換する。本種は古くからCAM型光合成制御機構を調べるモデル植物として多くの研究がなされてきた。しかし、遺伝子の機能解析に不可欠な形質転換法は確立されていなかった。

ROSの発生に及ぼすCAMの機能を、新規に単離されたアイスプラントCAM型欠損突然変異体を用いて解析した。野生株では塩(0.4M NaCl)存在下でCAMが誘導され、夜間にリンゴ酸が蓄積したが、変異株では蓄積しなかった。塩ストレスに伴い両者の葉身にはROSである過酸化水素(H₂O₂)が生成された。H₂O₂含量はいずれの株でも時間の経過に伴い増加したが、野生株ではCAMの誘導に伴い低下した。また、CAM化した野生株では、一日を通じてH₂O₂含量が低く推移した。ROS発生量の指標となるCu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子の転写産物量は野生株で低く、CAM化によってROSの発生が低下することが裏付けられた。以上の結果から、CAMは環境ストレス下における活性酸素の発生を抑え、酸素ストレスの軽減に貢献することが明らかとなった。

効率的なアイスプラントの形質転換法を確立するために、ウレア型サイトカイニンであるチジアズロン(TDZ)及びホルクロロフェニユロン(CPPU)が外植体からの地上部再分化に及ぼす影響を調べた。子葉節、子葉、胚軸、及び根を外植体とすると、子葉節からのみ不定芽が形成された。TDZ及びCPPUはアデニン型サイトカイニン(ベンジルアミノプリン, BA)よりもシュート誘導及び形態形成に対して効果が高かった。多芽体をホルモンフリー培地に置床して発根を誘導し、バーミキュライト及びフロリアライトに定植することで、播種4ヶ月後に稔性のある健全な植物体を得られた。この方法を用いて、アグロバクテリウムを介した外来遺伝子(カナマイシン耐性遺伝子, *npt-HPH*)の導入が可能であった。以上の結果から、子葉節及びTDZを用いた再分化法がアイスプラントの形質転換に有効であることを示した。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Haruki Sunagawa
題 目	Studies on the physiological functions of Crassulacean acid metabolism (CAM) in relation to the mechanisms for curtailing production of reactive oxygen species in the common ice plant, <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L.(アイスペラント (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L.)における活性酸素発生抑制機構との関わりからみたベンケイソウ型酸代謝(Crassulacean acid metabolism)の生理的意義に関する研究)

Crassulacean acid metabolism (CAM) has been thought to evolve under CO₂- and water-limiting environments. CAM is characterized by nocturnal CO₂ uptake, producing organic acids. Decarboxylation of organic acids occurs during the day and the released CO₂ is refixed by Rubisco behind closed stomata, resulting in increased water use efficiency in CAM plants, which is several-fold higher than C₃ and C₄ plants. Generally, reduced carbon gain by stomatal closure leads to form reactive oxygen species (ROS) in the leaf tissues, which can induce a potentially damaging oxidative stress on cellular constituents. Two opposite hypotheses in terms of ROS production in CAM plants have been proposed. ROS may be reduced during the daytime due to CO₂-concentration derived from decarboxylation process, which might reduce over-energization of the photosynthetic machinery. In contrast, the potential for oxidative stress has been thought to increase during the daytime, because internal O₂ concentrations would be increased substantially.

Mesembryanthemum crystallinum L., a facultative halophyte, is widely used as a model plant to study the regulatory properties of CAM. This species shift its photosynthetic mode from C₃ to CAM under abiotic stress factors. However, despite the importance of the model plant, the procedure for production of transgenic ice plant, which is essential for functional genomics, has not been established.

The function of CAM in ROS alleviation were studied using a newly isolated CAM-deficient mutant of a facultative halophyte *M. crystallinum* L. Salinity (0.4 M NaCl) induced nocturnal malate synthesis in the leaves of wild-type plant, but not in the mutant. The content of hydrogen peroxide (H₂O₂) increased as elapse of time after salinity, but it dropped accompanied by the expression of CAM in the wild-type plants. The CAM-performing wild-type plant showed diel fluctuation of malate and significantly lower levels of H₂O₂ than in the mutant. The transcript abundance of a gene encoding plastidic Cu/Zn-superoxide dismutase, a marker of ROS production, was higher in the mutant. These results indicated that CAM may help to alleviate oxidative stress under conditions of environmental stress.

To establish an efficient procedure for transformation of *M. crystallinum*, the effects of urea-type cytokinins, thidiazuron (TDZ) and forchlorofenuron (CPPU) on the adventitious shoot induction were examined. Adventitious shoots were generated only from explants obtained from the cotyledonary node, not from the cotyledon, hypocotyl and roots. Urea-type cytokinins were more effective for the induction and the morphogenesis of adventitious shoots than adenine-type cytokinin, 6-benzyladenine (BA). TDZ (2.5 mg/l) was effective in the induction of the largest number of multiple shoots, the highest frequency of adventitious shoot induction from single explant, and fewer hyperhydric shoots. The regenerated shoots rooted on the MS medium within one month, and it was promoted by transferring to the vermiculite or Florialite. The healthy fertile plant was harvested for four months after sowing. Using the improved regeneration procedure with TDZ, we successfully introduced a kanamycin-resistant gene (*nptII-HPH*) into the cotyledonary node mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. These results indicated that this regeneration procedure could be useful for the genetic engineering of *M. crystallinum*.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	砂川春樹
審査委員	主査 佐賀大学 教授 野瀬昭博
	副査 佐賀大学 准教授 東江 栄
	副査 琉球大学 教授 安谷屋信一
	副査 鹿児島大学 教授 岩井純夫
	副査 佐賀大学 准教授 駒井史訓
審査協力者	
題 目	アイズプラント (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L.) における活性酸素発生抑制機構との関わりからみたベンケイソウ型酸代謝 (Crassulacean acid metabolism) の生理的意義に関する研究 (Studies on the physiological functions of Crassulacean acid metabolisms (CAM) in relation to the mechanisms for curtailing production of reactive oxygen species in the common ice plant, <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L.)
<p>本研究は、活性酸素の発生抑制からみたCAM型光合成の生理的意義を調べ、あわせて遺伝子解析のための植物体再生系の確立を試みたものである。</p> <p>ベンケイソウ型有機酸代謝 (Crassulacean acid metabolism, CAM) 型光合成は、CO₂及び水分の制限された環境に対する適応機構と考えられている。CAM型光合成を行なうCAM植物は、通常の植物とは逆に、夜間にCO₂を吸収して有機酸として蓄積し、昼間に有機酸を脱炭酸して得たCO₂を再固定する。一般に、気孔が閉じ、外気CO₂の供給が不足した状態で光エネルギーが過剰になると有害な活性酸素が発生する。CAM植物ではCO₂再固定時に葉内のO₂濃度が顕著に増加することが示唆されていたが、活性酸素生成との関わりを論じた研究はほとんどない。これらを背景に本研究では、活性酸素の発生に及ぼすCAMの機能を、新規に単離されたアイズプラント (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L.) CAM型欠損突然変異体を用いて解析している。本種は塩ストレス下で光合成型をC3型からCAM型に変換する。本研究ではまず、塩ストレスを与えた個体について、CAM関連酵素、デンプン分解関連酵素、及び解糖系関連酵</p>	

素をコードする遺伝子の発現量を測定し、変異株の生理的特性を調べた。その結果、CAM 関連酵素のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)、PEPC キナーゼ及び NADP リンゴ酸酵素、解糖系関連酵素のホスホグルコムターゼ及びホスホグルコイソメラーゼ等をコードする遺伝子の発現量が変異株で低下していることを明らかにした。塩ストレスに伴い活性酸素である過酸化水素 (H_2O_2) が生成され、時間の経過に伴い増加したが、野生株ではCAMの誘導に伴い低下すること、またCAM化した野生株では、一日を通じて H_2O_2 含量が低く推移することを見出した。さらに、活性酸素発生量の指標となる Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子の転写産物量が野生株で低いことを示し、CAM化によって活性酸素の発生が抑制されることを明らかにした。以上の結果から、CAMは環境ストレス下における活性酸素の発生を抑え、酸素ストレスの軽減に貢献することを示唆した。

本研究で用いた通性CAM植物アイスプラントは、耐塩性の著しく高い塩生植物である。本種は塩ストレス下で光合成型を変換する特性に加え、種々の環境ストレスに対する耐性も高いことから、古くからCAM型光合成制御機構及びストレス耐性機構を調べるモデル植物として用いられてきた。しかし、分子生物学的研究に不可欠な形質転換法は確立されていなかった。本研究では、形質転換法の基礎となる培養細胞からの植物体再分化法を確立することを目的に、培養条件の検討を行なった。まず、胚軸片を外植体として異なるサイトカイニン(ベンジルアミノプリン、カイネチン、ゼアチン、ホルクロルフエニユロン、及びチジアズロン)を含む培地で培養し、カルス形成に及ぼすサイトカイニンの影響を検討した。その結果、サイトカイニンの種類にかかわらずカルスが形成されること、特にホルクロルフエニユロンを含む培地では、数は少ないものの外植体からカルスを經由せず不定芽が得られることを見出した。この結果をうけて、不定芽をより効率に得る条件を検討し、外植体として子葉節が最も適していること、特にウレア型サイトカイニンであるチジアズロンが苗条の誘導及び形態形成に対し効果的であることを明らかにした。また、再分化した幼植物体を発根・馴化させる方法を確認し、約4ヶ月で稔性のある健全な植物体を得ている。さらに、この方法を用いてアグロバクテリウムを介した外来遺伝子の導入が可能であることを示した。

以上のように本研究は、活性酸素の抑制に対するCAMの機能を初めて明らかにし、さらに、CAMモデル植物であるアイスプラントの植物体再分化法を確立した。本研究の成果は、CAM型光合成機構の解明に寄与するものであり、学位論文として十分に価値があるものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	砂川春樹
審査委員	主査 佐賀大学 教授 野瀬昭博
	副査 佐賀大学 准教授 東江 栄
	副査 琉球大学 教授 安谷屋信一
	副査 鹿児島大学 教授 岩井純夫
	副査 佐賀大学 准教授 駒井史訓
審査協力者	
実施年月日	平成22年1月28日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと.) (口答) 筆答	
<p>主査及び副査は、平成22年1月28日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	砂川春樹
<p>主な質疑応答</p> <p>【質問1】 PhaseIII から IV にかけて活性酸素の発生量が少ない。この時に気孔が開いて CO₂ が流入してきたために活性酸素が低下したとは考えられないか？</p> <p>【解答1】 ガス交換のデータで示したとおり、野生株と変異株を比較すると、この Phase の CO₂ 固定量はほとんど同じである。外気 CO₂ が流入したとしても両者同程度であり、活性酸素にみられた差が CO₂ の流入量の差によるものとは考えられない。</p> <p>【質問2】 CAMがあるとうして活性酸素が低下するのか？</p> <p>【解答2】 CAMは、酸化的ペントースリン酸回路、オルタナティブ経路、ミトコンドリア電子伝達鎖の過還元抑制、アスコルビン酸-グルタチオン回路等に関与し活性酸素を低下させると考えられる。</p> <p>【質問3】 SOD 活性が低いということは、活性酸素発生量が低いということではないのか？</p> <p>【解答3】 葉緑体、細胞質、及びミトコンドリアに局在するアイソフォームの活性を合わせた SOD 活性には、両者で差がない。細胞質型の Cu/Zn-SOD の発現量は野生株で低い。</p> <p>【質問4】 変異体は塩ストレスを与えると枯死するのか？生長量は野生株と比較して低くなるのか？</p> <p>【解答4】 同じ材料を用いた共同研究者の論文には枯死するように記載されていたと記憶しているが、私の観察では枯死はしなかった。生長量は野生株より低くなるようだ。先ほど示しように、CO₂ 固定量の低下によるものであろう。</p> <p>【質問5】 アイスプラントで光合成型が C₃ から CAM に変換するメカニズムについてどこまでわかっているのか教えて下さい。</p> <p>【解答5】 塩ストレスに伴いホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) の発現量が劇的に増加する。それにもない CAM 化する。この反応のシグナル伝達系についてはあまり調べられていない。</p> <p>【質問6】 子葉節の調整法について論文の説明では不十分であったように感じた。説明してほしい。</p> <p>【解答6】 本葉展開前の子葉節の部分を実体顕微鏡下で切除し、子葉節の切断面と培地が平行になるように置床した。</p>	

【質問7】アグロバクテリウムに感染させるのは不定芽であるのに何か特別な意味はあるのか？

【解答7】遺伝子が導入できれば不定芽でなくてもよい。再分化活性の高い部位ということで子葉節を用いた。

【質問8】茎頂部分の関わりについて。子葉節をホルモンフリー培地に移した場合、不定芽は分化するのか？

【解答8】分化しない。サイトカイニンを添加した培地で子葉節外植体から分化した苗条は不定芽だと考えられる。

【質問9】形質転換技術を確立して導入したい遺伝子は何か。アイズプラントの遺伝子導入例はないのか？

【解答9】活性酸素の発生に関わる鍵酵素の遺伝子をCAM欠損株に導入し、代謝反応がどのように変化するのか調べたい。アイズプラントではアグロバクテリウムを介して、根やカルスに導入した例はあるが、形質転換個体を得た例はない。

【質問10】今回は主に子葉節を使ってNAAとベンジルアミノプリン、TDZ、CPPUなどのサイトカイニンを用いて培養を行なっている。昨今、様々な培養方法が考案されているが、今後、培養条件で検討したいことは何か？

【解答10】本様展開前の胚軸を用いた実験系を試したい。また今回はオーキシンとしてNAAのみを用いたが、他のオーキシン、例えば2,4-DまたはIAA等と種々サイトカイニンとの組み合わせを検討したい。さらに、高温ショックを与える実験等も行ってみたい。