

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	早川 啓亮
題 目	塩生植物シチメンソウ (<i>Suaeda japonica</i> Makino) におけるベタシアニンの合成機構および生理機能に関する研究 (Studies on the biosynthesis mechanisms and physiological functions of betacyanin in <i>Suaeda japonica</i> Makino.)
<p>近年、塩類集積土壌の拡大が問題となっている。高塩環境下で生育可能な塩生植物は、塩害地域における利用価値の高い資源として期待される。塩生植物の耐塩性機構の解明はまた新規耐塩性作物を作出する上で有用な知見となる。</p> <p>シチメンソウ (<i>Suaeda japonica</i> Makino) は有明海干潟に自生する耐塩性の高い植物である。本種は生育段階や環境条件の変化に応じてベタシアニンを蓄積し葉身を赤色に変化させる。ベタシアニンの蓄積は環境ストレスによって誘導されることからストレス適応反応の一つと考えられるが、その特性についてはほとんど調べられていない。近年、ベタシアニンは発色効率の高さやその抗酸化能から、天然色素として有望視されている。本研究は、シチメンソウにおけるベタシアニンの合成機構及び生理機能を調べ、あわせて食品添加物としての可能性を検討した。</p> <p>ベタシアニンの誘導要因を明らかにするために、シチメンソウの紅葉する時期の環境条件を調べ、それを基にベタシアニンの蓄積する環境条件を制御環境下で再現した。ベタシアニンの蓄積は、気温が低下する時期に顕著となった。紅葉の度合いは個体密度の高い群落で、また土壌窒素含量の低い土壌で著しかった。ベタシアニンの合成は、制御環境下では低温、強光、及び低栄養条件下で促進された。ベタシアニンを蓄積しない突然変異体について二次元電気泳動を用いてベタシアニン誘導処理に伴うタンパク質の挙動を調べ野生株と比較した。その結果、ベタシアニンの合成に、ポリフェノールオキシダーゼ、及び 4,5-ドーパジオキシゲナーゼ等が関与していることが推察された。</p> <p>ベタシアニンの生理機能を明らかにするために、ベタシアニンの局在部位、及び活性酸素の消去に及ぼす作用を調べた。その結果、ベタシアニンは表皮細胞に多く蓄積し可視光を吸収すること、また抗酸化能が高く、酸化ストレスによるクロロフィルの分解、及び過酸化水素によるタンパク質の酸化を抑えることがわかった。以上の結果から、ベタシアニンは、シチメンソウの葉内に到達する入射光量を制限し、かつ抗酸化物質として活性酸素を消去して光酸化ストレスを防いでいると考えられた。</p> <p>シチメンソウのベタシアニンを HPLC-MS によって精査したところ、シチメンソウには少なくとも 15 種類のベタシアニンがあり、その中で質量分析比 (m/z) 989 のベタシアニンが最も多いこと、これはベタニジン、フェルラ酸、マロン酸、グルコース、及びグルクロン酸等から構成されており、新規のアシル化したベタシアニンであること等が明らかになった。また、純化したベタシアニンは、pH、温度、及び強光いずれに対しても安定で、天然色素及び食品添加物として有望であることが明らかとなった。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Keisuke Hayakawa
題 目	<p>Studies on the biosynthesis mechanisms and physiological functions of betacyanin in <i>Suaeda japonica</i> Makino. (塩生植物シチメンソウ (<i>Suaeda japonica</i> Makino) におけるベタシアニンの合成機構および生理機能に関する研究)</p>
<p>Salinity is one of most important factors limiting crop productivity. Soil salinization in arable land is an increasing problem in many irrigated, arid and semi-arid areas of the world. Halophytes can survive in hypersaline environment where no crops of agricultural interest can grow, and they have been expected as agricultural resources in the harsh environmental conditions.</p> <p><i>Suaeda japonica</i> Makino is an annual hydrohalophyte that inhabits salt marshes in the Ariake Sea, Japan. <i>S. japonica</i> changes leaf colors from green to red at different growth stages in response to change of environmental conditions. Red color corresponds to the accumulation of red pigment, betacyanin. Betacyanin has been expected as a new natural colorant due to the high coloring efficiency and antioxidant capacity. In this study, we investigated the environmental factors and proteins associated with the induction of betacyanin, physiological function related to the alleviation of reactive oxygen species of the betacyanin in <i>S. japonica</i>, and possibility of betacyanin as a new food additive.</p> <p>We surveyed the environmental factors during the season when <i>S. japonica</i> leaves turn red, and cultured plants in artificially controlled conditions to determine the factors inducing betacyanin accumulation. In natural conditions, betacyanin accumulation occurred with the lowered temperature, and the degree of leaf reddening was higher with community of higher population density and in the soil of lower nitrogen. In artificially controlled conditions, betacyanin synthesis was promoted under low temperature, high light intensity and lower nutrients.</p> <p>Protein profiling analyzed by two-dimensional electrophoresis in the leaves of wild type and mutant lacking betacyanin synthesis showed that proteins that have the same molecular weight and isoelectric point with those of polyphenol oxidase and 4,5-DOPA-dioxygenase were associated with betacyanin synthesis.</p> <p>Betacyanin mainly accumulated in the epidermal tissues and upper palisade mesophyll, and betacyanin absorbed visible light, indicating that it served as a light filter reducing excess energy absorbed by mesophyll tissues. Betacyanin showed high scavenging capacity of free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), and reduced hydroxyl radical-induced chlorophyll bleaching and hydrogen peroxide-induced protein oxidation. These results indicate that betacyanin prevent the photooxidation stress by the decreased generation of reactive oxygen species as an antioxidant.</p> <p>The HPLC-MS analysis showed that <i>S. japonica</i> has at least 15 kinds of betacyanin, and the most abundant ion signal at m/z 989 was a novel acylated betacyanin, which was composed of betanidin, ferulic acid, malonic acid, glucose and glucuronic acid. The purified betacyanin was stable at a pH range from 3 to 7, temperature (4°C - 40°C) and high light (1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), indicating that betacyanin of <i>S. japonica</i> has a potential as natural colorant and food additive.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	早川 啓亮
審査委員	主査 佐賀 大学 教授 谷本 静史
	副査 佐賀 大学 教授 野瀬 昭博
	副査 琉球 大学 教授 川満 芳信
	副査 琉球 大学 准教授 小西 照子
	副査 佐賀 大学 准教授 駒井 史訓
審査協力者	香川 大学 准教授 東江 栄
題目	<p>塩生植物シチメンソウ (<i>Suaeda japonica</i> Makino)におけるベタシアニンの合成機構および生理機能に関する研究 (Studies on the biosynthesis mechanisms and physiological functions of betacyanin in <i>Suaeda japonica</i> Makino.)</p>
<p>有明海の干潟に自生する塩生植物シチメンソウ (<i>Suaeda japonica</i> Makino)は、生育段階や環境条件の変化に応じてベタシアニンを蓄積し、紅葉する。本研究では、ベタシアニンの合成機構及び生理機能を調べるとともに、食品添加物としての可能性について検討した。</p> <p>ベタシアニンの蓄積は、低温時に顕著となり、また紅葉の度合いは密植や窒素含量の低い土壌で著しかった。制御環境下では、ベタシアニン合成は、低温、強光および低栄養条件下で促進された。ベタシアニンを蓄積しない突然変異体につき、二次元電気泳動で蛋白質の挙動を調べた結果、ベタシアニン合成に、ポリフェノールオキシダーゼ、4,5-ドーパジオキシダーゼ等が関与していることが推察された。</p> <p>ベタシアニンの生理機能を明らかにするために、ベタシアニンの局在部位及び活性酸素の消去に及ぼす影響を調べた。その結果、ベタシアニンは表皮細胞に多く蓄積し、可視光を吸収すること及び過酸化水素による蛋白質の酸化を抑えることがわかった。以上の結果より、ベタシアニンは、シチメンソウの表皮下の光量を制限し、かつ抗酸化物質として活性酸素を消去して光酸化ストレスを防いでいると考えられた。</p> <p>シチメンソウのベタシアニンをHPLC-MSによって精査したところ、少なくとも15種類のベタシアニンが存在し、その中で質量分析比(m/z) 989のベタシアニンが最も多いこと、これは、ベタニジン、フェルラ酸、マロン酸、グルコース及びグルクロン酸等から構成されており、新規のアシル化したベタシアニンであること等が明らかとなった。また、精製したベタシアニンは、pH、温度及び強光のいずれに対しても安定であり、天然色素及び食品添加物として有望であった。</p>	

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	早川 啓亮
審査委員	主査 佐賀 大学 教授 谷本 静史
	副査 佐賀 大学 教授 野瀬 昭博
	副査 琉球 大学 教授 川満 芳信
	副査 琉球 大学 准教授 小西 照子
	副査 佐賀 大学 准教授 駒井 史訓
審査協力者	香川 大学 准教授 東江 栄
実施年月日	平成22年 7月 13日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・ <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成22年7月13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。</p> <p>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	早川啓亮
<p>主な質疑応答</p> <p>【質問1】ベタシアニンが蓄積するとストレス耐性が向上するとのことであるが、ベタシアニンを蓄積しないミュータントが生存できているのは何故か？</p> <p>【解答1】ベタシアニン合成欠損変異株は、ナリングニンやケルセチンなど抗酸化能の高い物質の生成量が高かった。これらの物質がベタシアニン含量の低下を補っていると考えられる。しかし、低温、強光、低栄養といったベタシアニンの合成を誘導する条件下においたときの枯死率は変異体で高かったので、ストレス耐性は野生株で高いと考えられる。</p> <p>【質問2】ベタシアニンが春と秋に蓄積するのはなぜか？本研究の結果から考えられることは何か。</p> <p>【解答2】ベタシアニンの蓄積は、強光、低温、及び栄養状態の悪化等の条件が組み合わさって引き起こされる。春と秋にはこれらの条件が最適になると考えられる。</p> <p>【質問3】有明海干潟で光が最も強いのは夏だと思われるが、ベタシアニンが光阻害の発生する条件下で合成されるなら、夏季に葉が緑になるのはなぜか？</p> <p>【解答3】土壤の栄養状態がよければ強光下においても葉は緑になる。有明海干潟の土壤窒素含量は9月に高かったので、葉身が緑色になったと考えられる。</p> <p>【質問4】ベタシアニンの生合成を調べるために行なったタンパク質の二次元電気泳動の実験で、4番と名付けられたタンパク質の量が変異体で少ない。このタンパク質の機能は分かっているのか？</p> <p>【解答4】葉緑体 ATP シンターゼと推定される。ベタシアニンの合成に関与するチロシナーゼは葉緑体に輸送されて機能するが、輸送には ATP を必要とする。変異株は輸送に必要な ATP の生成量が少ないと考えられる。</p> <p>【質問5】チロシナーゼの活性が変異株と野生株とで異なるのか？</p> <p>【解答5】PAGE 酵素活性染色を行なったところ、変異株にもチロシナーゼはあるが、チロシンの酸化活性を欠損していることが明らかになった。</p> <p>【質問6】4番のタンパク質はベタシアニン合成に特異的なものか？</p> <p>【解答6】ATP 合成に関わる酵素なので、ベタシアニンの合成に特化したものではない。今後、タンパク質の質量分析等を行ないさらに詳しく調べたい。</p> <p>【質問7】ベタニジンに糖を付与してベタシアニンにするグリコシルトランスフェラー</p>	

ぜの遺伝子は単離されている。タンパク質の分子量と等電点は推定できるはずだが。

【解答 7】グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子情報の報告があったが、タンパク質の情報は報告されていなかった。質量分析の結果、変異株の抽出液にはベタニジンがなかった。ベタニジンの生成能を欠失した変異株と考えられる。

【質問 8】天然色素として利用する際に問題となる収率は、ビートと比較してどうか？

【解答 8】収率は高くない。しかし、安定性は高い。ベタシアニンは有機酸が付加すると安定性が上昇することが報告されているが、シチメンソウに最も多く含まれるベタシアニンはフェルラ酸やマロン酸等の有機酸が結合しアシル化しているため安定性が高いと考えられる。ビートの主なベタシアニンであるベタニンは、グルコースのみが結合していて、シチメンソウのベタシアニンより安定性が低いと考えられる。

【質問 9】ベタニジンにグルコースとグルクロン酸が結合してベタシアニン（アマランチン）となるようだが、ベタニジンのどこに結合しているのか？

【解答 9】ベタシアニンの炭素骨格の第 5 位か 6 位と推察されるが、詳細は不明。NMR 解析等を行なうことで明確にできると思われる。

【質問 10】質量電荷比 m/z 989 の物質が 3 つあるのは何故か。

【解答 10】異性体と思われる。質量は同じでも、基本骨格であるベタニジンにマロン酸、フェルラ酸、グルコース、及びグルクロン酸の結合する部位が異なっていると考えられる。

【質問 11】HPLC で分離したベタシアニンの抗酸化能がリテンションタイム 27 分と 32 分で高いのは、そこに含まれるベタシアニンの含量が高いからということか？

【解答 11】それぞれに含まれるベタシアニンの含量が高いからであろう。後者については、質量分析によりアマランチンにフェルラ酸とマロン酸が結合した新しいベタシアニンであることを明らかにした。

【質問 12】ベタシアニンの光吸収度を測定した実験で、光強度を $1500 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ から開始したのはなぜか？

【解答 12】 $1500 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ は干潟の夏季における最大光強度である。この時期の光強度が一年を通じてほぼ最大であると考えられたため。

【質問 13】表皮に蓄積したベタシアニンが表皮下に到達する光量を低下させ、過剰光エネルギーの影響を軽減すると推察しているが、葉内のベタシアニン含量を考慮すると、ベタシアニンの効果が発揮されているとは考えにくいがどうか。

【解答 13】シチメンソウ個葉の光・光合成関係と葉内ベタシアニン含量から考慮すると、光合成速度の低下は大きく低下しないと考えられるが、過剰な光の吸収を抑えるという

意味では、生理的な意義があると考えられる。

【質問 1 4】夏は光強度が強く光阻害が引き起こされやすいと考えられるが、ベタシアニンが蓄積しないのはなぜか？光強度ではなくて紫外線等の光質も関係しているのではないか。

【解答 1 4】夏の土壌の栄養状態が、紅葉の時期に比べて良好であるためと推察される。アイスプラントでは紫外線がベタシアニンの合成を誘導する。シチメンソウも同様な機能をもつと考えられるが、今回は調べていない。今後の参考にしたい。

【質問 1 5】培養細胞を用いた実験では、光質がベタシアニンの合成に及ぼす影響を調べている。培養細胞と個体とではメカニズムが異なると思われるが、光質の影響はあると考えられるか。

【解答 1 5】今回は光質の影響については調べていない。光強度の影響もあったが、温度や栄養条件等の影響も大きかったので、光質の影響があったとしても他の要因との複合効果だと思われる。

【質問 1 6】春と秋とでベタシアニンの成分が異なるように見受けられた。これは成分の種類が異なるのか、あるいは種類は同じで含量が違うのか？

【解答 1 6】種類が違う。春に合成されていたものが秋には合成されなくなるか、逆に秋にだけ合成されるものがある。

【質問 1 7】春と秋で合成様式の異なる成分の代謝経路や、合成に影響を及ぼす環境要因を調べることで、ベタシアニンの合成誘導に関与する環境要因を限定することができると考えられるがどうか？

【解答 1 7】今後の参考にしたい。