

Studies on Characterization of Cd-Tolerance in Cultured Cells of Carrot

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 金, 娟玉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2563

氏 名 (国 籍)	金 娟 玉 (大韓民国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 2 2 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 3 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	Studies on Characterization of Cd- Tolerance in Cultured Cells of Carrot
審 査 委 員	主査 静岡大学 教授 久保井 徹 副査 静岡大学 教授 横 田 博 実 副査 岐阜大学 教授 原 徹 夫 副査 信州大学 教授 唐 澤 傳 英

論 文 の 内 容 の 要 旨

カドミウム (Cd) は重金属の中で、生物に対する強い毒性を持っている元素の一つである。そのため、大気、水と土壌のいずれでも、環境基準の指定物質である。植物が Cd の毒性を避ける機構は、従来知られているフィトケラチン (PCs) だけでは説明できない事例もある。

そこで、植物が Cd の毒性を避ける新規機構を明らかにする目的で本研究を行った。植物材料はニンジンの懸濁培養細胞である。その元の株とこれから選抜した Cd 耐性株を比較することによって、Cd 解毒機構を見出す方法を取った。Cd 耐性株の作出方法は長時間 Cd100 μ M 添加培地で生育する株を選抜した。この方法で従来考えていない耐性機構を得られる可能性があるためである。

Cd 耐性株 (CCd1) の 0、40、80、160 μ M Cd 添加培地中での倍加時間はそれぞれ 4.7、4.4、6.4、13 日であった。しかし、野生株 (CW) の倍加時間は、0 と 40 μ M Cd 処理区で 3.8 と 6.3 日であり、より高濃度では全く生育しなかった。次に、細胞中の Cd は、CW の場合には時間の経過に伴って蓄積した、逆に CCd1 の場合には 1 日以降減少した。両株の Cd 蓄積が違う原因を調べるために 20、40、80 μ M Cd を含む培地で 1 日間培養後、さらに Cd なしの培地中で 4 日間培養した。その間、細胞と培地中の Cd 含量を測定した。CW では 20 μ M Cd 処理区の初期段階でのみ Cd 排出が見られた、一方 CCd1 では全処理区で持続的に Cd を排出した。CCd1 は強い Cd の排出力により細胞内の低い Cd 含量を保つことができ、その結果、高濃度の Cd に耐えることができると考えた。

しかし、CCd1 の細胞内には未だ、多量の Cd (CW 細胞では生育できない量) が存在していた。それゆえ、排出能以外の Cd 解毒機構も存在すると考えた。まず PCs の関与を調べた。両株とも、Cd によって PCs が生成したものの、CCd1 の方が CW より低い PCs 含量であったことから PCs は CCd1 の Cd 耐性のおもな原因ではないことが分かった。

一方、多くの植物は Cd ストレス下で活性酸素解毒系に変化 (増加または減少) することが知られている。そこで、ニンジン細胞でも Cd ストレス下で活性酸素解毒機系の応答を調べた。酵素はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、(グアヤコール) パーオキシダーゼ、オキシダーゼ、アスコルビン酸パーオキシダーゼ (APX) とグルタチオンレダクターゼ (GR) の活性を測定し、基質はアスコルビン酸 (AsA) とグルタチオン (GSH) を測定した。APX 活性は CW において $80 \mu\text{M}$ Cd から、CCd1 においては $160 \mu\text{M}$ Cd で減少した。GR 活性は、CW では Cd 処理後直ちに活性が殆どなくなり、逆に CCd1 では増加した。また、AsA は両株とも Cd によって減少するものの、CCd1 の方が CW より高いレベルを保った。同時に CCd1 の方が AsA (還元型)/AsA (酸化・還元型) の比率も高かった。その他の測定項目は変化が見られない、または解釈が不明であった。AsA/GSH 回路の関係する酵素と基質がすべて、CCd1 の方が CW より、強かったまたは多かったことと、Cd が植物害の 1 つの原因が活性酸素との報告があることから、AsA/GSH 回路が Cd 解毒と関わっていると考えた。

上記から、ニンジンの Cd 耐性株は、Cd 排出力と AsA/GSH 回路が活性化するために高濃度の Cd 環境に耐えることができると結論する。なおこれらの機構は野生株にもわずかに見られることから、強弱の違いはあるがニンジンに本来持っていると考ええる。それゆえ、本研究の結果を踏まえると、植物の本来持っているこれらの機能を強化することによって Cd 汚染土壌でも、より人に安全な作物を作ることができ、また Cd と同時に紫外線等によって発生した活性酸素も減少できると期待できる。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は植物がカドミウム (Cd) の毒性を避ける新規機構を明らかにしたものである。植物材料はニンジンの懸濁培養細胞である。Cd 解毒機構の解明は、元の株とこれから選抜した Cd 耐性株を比較することによって、見出す方法を取った。Cd 耐性株の作出方法は長時間 Cd $100 \mu\text{M}$ 添加培地で生育する株を選抜した。この方法で従来考えていない耐性機構を得られる可能性があるためである。

Cd 耐性株 (CCd1) は $160 \mu\text{M}$ の Cd 添加培でも増殖ができるが、野生株 (CW) は $80 \mu\text{M}$ Cd 処理区以上では全く生育ができなかった。Cd は、CW の場合には時間の経過によって蓄積した、逆に CCd1 の場合には 1 日以降減少した。両株の Cd 蓄積が違う原因を調べるために 1 日間 Cd $20 \sim 80 \mu\text{M}$ Cd で処理し、その後 Cd 無添加培地で、4 日間培

養した。その結果、CCd1 では全処理区において Cd を排出が確認できたが、CW ではほとんど排出が見られないことがわかった。これが、CCd1 の Cd 耐性に関与すると考えられる。しかし、CCd1 の細胞内には未だ、多量の Cd (CW 細胞では生育できない量) が残っている。それゆえ、別の Cd 解毒機構もあわせ持っているはずである。まずフィトケラチン (PCs ; 植物の Cd 等重金属の解毒する物質) の関与を調べた。しかし、CCd1の方がCWより低いPCs含量であったことからPCsはCCd1のCd耐性のおもな原因ではないことが分かった。そこで、申請者は活性酸素解毒系の関与を着目した。アスコルビン酸パーオキシダーゼ活性はCWにおいて80 μ M Cdから、CCd1においては160 μ M Cdで減少した。グルタチオンレダクターゼ活性は、CWではCd処理後直ちに活性が殆どなくなり、逆にCCd1では増加した。また、アスコルビン酸(AsA)は両株ともCdによって減少するものの、CCd1がCWより高いレベルを保った。同時にCCd1の方がAsA(還元型)/AsA(酸化・還元型)の比率も高かった。AsA/グルタチオン(GSH)回路の関係する酵素と基質がすべて、CCd1の方がCWより、強かったまたは多かったことと、Cdが植物害の1つの原因が活性酸素との報告があることから、AsA/GSH回路が第2のCd解毒ファクターと申請者は考えた。

ニンジンのCd耐性機構はCd排出力とAsA/GSH回路が関係する点が新規性を持っている。それゆえ、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値があるものと認めた。

なお、基礎となる学術論文は以下の2編である。

○Yeon-ok Kim, Fumiko Takeuchi, Masakazu Hara and Toru Kuboi: Characterization of Cadmium Tolerant Carrot Cells in Response to Cadmium Stress. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46(4), 807-814 (2000)

○Yeon-Ok Kim, Masakazu Hara and Toru Kuboi: Response of an Active-Oxygen Scavenging System to Cadmium in Cadmium-Tolerant Cells of Carrot. *Plant Biotechnology*, in press