

氏 名 (本 國 籍)	Faezeh Ghanati (イラン・イスラム共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 263 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 3 月 13 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 Boron Tolerance Mechanisms of Suspension-Cultured Tobacco Cells (タバコ培養細胞のホウ素耐性機構に関する研究)
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 横 田 博 実 副査 静岡大学 助教授 森 田 明 雄 副査 岐阜大学 教授 原 徹 夫 副査 信州大学 教授 入 江 鑑 三

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

植物におけるホウ素 (B) の機能や B 欠乏ストレスについてはこれまで多くの研究が行われているが、B 過剰害の要因や高濃度の B に対する耐性機構については不明な点が多い。B 過剰害は乾燥地・半乾燥地の地下水や塩類土壌などに関連して起こることが知られ、農業生産の障害ともなっている。本研究では、作物における B 過剰害の制御、さらに B 耐性作物作出に資することを目的として、植物の B 耐性機構について検討した。

器官間の糖の移動に対する B の影響等を避けるため、培養細胞を材料として用い、まず B 耐性が中程度のタバコの培養細胞から B 耐性細胞を選抜した。そして、この耐性細胞 (BT 細胞) と非耐性細胞を用いて、過剰の B 及び他の元素に対する耐性、細胞壁及び細胞外多糖類の化学的性質、細胞内 B の分布パターン、アニオン含量の変動及びフェノール化合物の代謝について比較検討し、タバコ培養細胞における B 毒性の性質ならびに B 耐性機構について明らかにすることを試みた。

最初に細胞壁の分析を行い、非耐性細胞と BT 細胞の比較を行った。BT 細胞はセルロース及び非セルロース性多糖類が非耐性細胞に比べて少なく、また、キシログルカンの含量及び分子量も BT 細胞で低かった。これらの結果は BT 細胞における細胞壁の緩みと伸長のポテンシャルを示唆している。さらに BT 細胞のペクチンは、ウロン酸のメチルエステル化の程度が大きく、中性糖の含量が多いという特徴を示した。中性糖が多いという BT 細胞の性質は、ペクチンと B との結合能力の増加と細胞質からの積極的な B 排除を示唆している。

BT細胞のエクステンシン (HRGP) 及びBT細胞から培地に放出される糖タンパク (AGP) の量が多いことも、BT細胞の細胞壁の緩みと伸長のポテンシャルを示唆している。これらの糖タンパクはBの結合サイトであることが知られていることから、BT細胞においてより多くのBが排出されると考えられる。B過剰下において、アポプラズム及びシンプラズムのB含量が非耐性細胞に比べてBT細胞で低いこともこれらBT細胞の性質と一致する。

次にBT細胞が示したさまざまな特徴のうち、他の元素に対する耐性について検討した。すなわち、BT細胞は非耐性細胞に比べて過剰のマグネシウム (Mg) とナトリウム (Na) に対する耐性を示した。耐性を示す明確な要因は明らかではないが、過剰条件下でBT細胞の両元素の含量が非耐性細胞に比べて低いことが一要因と考えられた。また、これら元素の過剰条件下ではBT細胞は非耐性細胞に比べて低いレベルの膜脂質の過酸化や高い呼吸率を示した。

BT細胞と非耐性細胞の間には、アニオン、とくにリン酸と硫酸含量にも差がみられた。この性質は、B過剰条件下で選抜した他のB耐性細胞でも観察された。また類似の傾向は非耐性細胞を過剰Bで処理した場合にもみられた。これらの結果は、細胞膜の電気化学的な性質やアニオンキャリアーに対するBの影響を示していると考えられる。

B欠乏時のフェノールの代謝・蓄積については多くの報告があるが、フェノールの代謝に対するB過剰の影響に関する研究は少ない。そこで、BT細胞と非耐性細胞について、組織化学的方法によるフェノール類の蓄積の観察やフェノール代謝関連酵素活性の測定等によってB過剰とフェノール代謝の関係について検討した。BT細胞は、フェノール検出試薬である phloroglucinol 試薬との反応が少なく、細胞壁結合フェノールも少ないという特徴を示した。この傾向はB過剰下でも変化しなかった。一方、非耐性細胞では、B過剰によって細胞の褐変、リグニン含量の増加、細胞壁にエステル結合したフェノール類の増加、スベリンの誘導が観察され、B過剰によってフェノールの代謝が影響を受けていることが明らかになった。さらにフェノールの代謝に関係する酵素である phenylalanine ammonia-lyase、tyrosine ammonia-lyase、peroxidase 及び polyphenol oxidase のそれぞれの活性において、スベリンの誘導、リグニン含量の増加との関連も認められた。

以上の結果をまとめると、BT細胞のB耐性機構として、細胞のB含量、とくに細胞質のB含量を低く維持することがあげられる。この機構には細胞壁の多糖類 (ペクチン) や糖タンパクとのB結合が関連した細胞質へのBの輸送の減少及び細胞からのBの排出が機能していると考えられる。BT細胞と非選抜細胞の細胞壁構成成分の違いから、BT細胞はB過剰ストレス条件下で成長および細胞伸長するより大きな能力を有していることが示唆される。また、BT細胞は過剰なBの他、NaやMgに対する耐性も示した。BT細胞のフェノール代謝は明らかに非耐性細胞と異なり、B過剰による影響がみられなかった。しかし、非耐性細胞ではB過剰に応答してリグニン含量の増加やスベリンの誘導が観察された。このようなB過剰に応答したスベリン誘導は、水分や溶質のアポプラズムにおけるバリアーとして機能している可能性が考えられた。

作物のホウ素（B）過剰害は乾燥地・半乾燥地の地下水や塩類土壌などと関連して起こることが知られ、農業生産の障害ともなっている。その障害機構にも不明な点が多い。このような背景から、本論文では、作物におけるB過剰害の制御、さらにB耐性作物作出に資することを目的として、植物のB耐性機構について検討した。

器官間の糖の移動に対するBの影響等を避けるため、培養細胞を材料として用い、B耐性が中程度のタバコの培養細胞からB耐性細胞を選抜した。この耐性細胞（BT細胞）と非耐性細胞を用いて、タバコ培養細胞におけるB毒性の性質ならびにB耐性機構について明らかにすることを試みた。

最初に細胞壁の分析を行い、非耐性細胞とBT細胞の比較を行った。その結果、BT細胞は細胞壁の緩みと伸長のより大きなポテンシャルを有していることが示唆された。さらにBT細胞のペクチンの性質は、ペクチンとBとの結合能力の増加と細胞質からのB排除能を示唆した。BT細胞のエクステンシン及びBT細胞から培地に放出される糖タンパクの量が多いことも、BT細胞の細胞壁の緩みと伸長のポテンシャルやBT細胞からのより多いBの排出を示唆している。B過剰下において、B含量が非耐性細胞に比べてBT細胞で低いこともこれらBT細胞の性質と一致していた。

BT細胞は非耐性細胞に比べて過剰のマグネシウム（Mg）とナトリウム（Na）に対する耐性を示した。この一要因として、過剰条件下でBT細胞の両元素の含量が非耐性細胞に比べて低いことが考えられた。

また、BT細胞と非耐性細胞の間には、アニオン、とくにリン酸と硫酸含量にも差がみられ、両細胞の細胞膜の電気化学的な性質やアニオンキャリアーの違いを示していると考えられた。

BT細胞と非耐性細胞について、組織化学的方法やフェノール代謝関連酵素活性の測定等によってB過剰とフェノール代謝の関係について検討した。BT細胞は、フェノール含量が低く、細胞壁結合フェノールも少ないという特徴を示した。一方、非耐性細胞では、リグニン含量の増加、細胞壁結合フェノール類の増加及びスベリンの誘導が観察され、B過剰によってフェノールの代謝が影響を受けていることが明らかになった。フェノール代謝に関係する酵素の活性とスベリンの誘導やリグニン含量の増加との間にも関連が認められた。

得られた結果から、本論文では、BT細胞のB耐性機構として、細胞のB含量、とくに細胞質のB含量が低く維持されていることをあげ、これには細胞壁の多糖類（ペクチン）や糖タンパクとBの結合が関連した細胞質へのBの輸送の減少及び細胞からのBの排出が機能していることを示した。細胞壁等の性質から、BT細胞はB過剰ストレス条件下で成長および細胞伸長する能力を有していることも示唆した。また、BT細胞はB以外の元素に対する耐性を有することも示した。B耐性との関わりは明らかではないが、非耐性細胞ではB過剰に応答してスベリンの誘導がおこることを明らかにした。本論文の内容は、B耐性機

構の一端を明らかにしたものであり、作物におけるB過剰害の制御、さらにB耐性作物作出に貢献するものであると考えられる。

以上について、審査委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あるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる論文

1. Faezeh Ghanati, Akio Morita and Hiromi Yokota: Selection and partial characterization of a boron-tolerant tobacco cell line, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 47(2), 405-410 (2001)
2. Faezeh Ghanati, Akio Morita and Hiromi Yokota: Induction of suberin and increase of lignin by excess boron in tobacco cells, *Soil Sci. Plant Nutr.*, in press