



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

シロイヌナズナの根部酸性ストレス障害機構の解明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2014-04-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 戸田, 智美 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2508

氏 名 (国籍)	戸 田 智 美 (兵 庫 県)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 甲 第 1 6 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 1 年 9 月 1 0 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	岐 阜 大 学
学 位 論 文 題 目	シロイヌナズナの根部酸性ストレス障害機構の 解 明
審 査 委 員	主 査 岐 阜 大 学 教 授 原 徹 夫 副 査 岐 阜 大 学 教 授 河 合 啓 一 副 査 静 岡 大 学 教 授 久 保 井 徹 副 査 信 州 大 学 教 授 柴 田 久 夫

論 文 の 内 容 の 要 旨

近年、酸性土壌における植物の生育阻害が深刻化しており、酸性ストレスに対する植物の耐性機構の解明が強く望まれている。一般に酸性土壌における植物の生育障害は、可溶化するアルミニウム (Al) と水素イオンの過剰障害が相乗的に作用する複雑な現象によって引き起こされる。従って、植物の Al 並びに水素イオンストレス耐性能を強化することができれば、酸性土壌における安定した作物生産が期待できる。このような背景から、本研究では植物遺伝子工学の有力な研究材料であるシロイヌナズナを取り上げ、酸性ストレス障害メカニズムの解明を目的とし、耐性形質を評価する際に重要なポイントとなるいくつかのモデル実験系の構築とその有用性の実証を試みた。

植物の Al や低 pH 障害に関する研究では、Al イオンの化学的形態が、pH や共存するイオンによって容易に変化するため、栽培中の培地条件の設定や維持が可能な水耕栽培法が適している。そこでまず、シロイヌナズナ幼植物を溶液中で栽培し、根長を測定する簡便な方法を開発した。本法では、幼植物体を固定するための主な支持体として、化学的に安定なナイロンメッシュを用い、根長は顕微鏡下で直接測定した。代表的な系統である Landsberg (Ler) を栽培したところ、幼植物は同調的に生育し、塩化カルシウムのみを添加した単純な溶液中で少なくとも 5 日間は伸長を続けた。4 日目の根長を測定し、低 pH 並びに Al に対する応答を調べたところ、根の伸長は pH5 を下回ると阻害を受け、

pH4.5 では完全に阻害された。また、根の伸長はわずか $1 \mu\text{M}$ の A1 存在下でも著しく阻害され、本植物種が両ストレスに対して、一般作物以上の感受性を有することが明らかとなった。

A1 耐性シロイヌナズナは、本研究で確立した水耕栽培法を適用し、約 2 万粒の EMS 処理変異集団から直接選抜した。獲得した A1 耐性系統 (Al-t) と代表的な生態型 [Ler, Columbia (Col-0), Wassilewskija (Ws)] の低 pH に対する感受性は系統間で明確な差異は認められなかった。一方、 $1 \mu\text{M}$ の AlCl_3 存在下では Ler が 50% の生育阻害を受けたのに対し、Ler 由来の Al-t を含む他の 2 系統は 70% 以上の生育を維持した。次に、非アロフェン型活性 A1 を含む典型的な酸性土壌を用い、4 週間後のロゼット葉の生育を指標として、これらの系統の耐性を比較した。すべての系統で交換性 A1 の増加に伴う生育抑制が観察されたが、阻害程度は系統間で若干異なり、耐性は Ler が最も弱かった。この結果は水耕栽培のそれと概ね一致し、幼植物の一次根を指標とした簡便な評価法が、酸性ストレス耐性評価法並びに A1 耐性植物の選抜法として有用であることが証明された。また、単離した Al-t は A1 ストレスに対してのみ耐性を示す正当な A1 耐性系統であり、その耐性能は遺伝可能な形質であることが示唆された。

FDA-PI 蛍光染色法を用いた顕微鏡観察では、A1 並びに水素イオンストレスによる根部酸性障害発現が異なり、特に水素イオン毒性は、短時間のうちに根端伸長領域に不可逆的な細胞損傷を引き起こす、極めて深刻なストレスであることが明らかとなった。さらに、この特異的障害は、Ca 作用を部分的に代替できる Sr, Ba によって軽減されたことから、水素イオン毒の主なターゲットの一つが、アポプラスト中の Ca 置換である可能性が示唆された。つまり、水素イオン毒は、細胞壁ペクチン多糖の架橋構造における Ca の機能喪失と、それに関連する細胞壁構造の不安定化を引き起こしているものと考えられる。

以上、本研究では、酸性ストレスのうち A1 と水素イオンストレスを厳密に区別する実験系を確立し、両者に特異的な生理的現象を明らかにした。今後、A1 耐性植物だけでなく、水素イオンストレス耐性植物を単離することにより、酸性ストレス耐性機構に関する総括的な知見を獲得することが期待できる。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は第 1 ~ 4 章で構成され、植物遺伝子工学の有力な研究材料であるシロイヌナズナを実験材料として、酸性ストレス、すなわちアルミニウムと水素イオンの過剰障害メカニズムの解明を目的とし、耐性形質を評価する際に重要なポイントとなるいくつかのモデル実験系の構築とその有用性について

て検討したものである。

第1章では、水耕栽培法によるシロイヌナズナ幼植物の酸性ストレスに対する応答を詳細に調査した。栽培中の培地条件の設定や維持が可能な水耕栽培法を用い、幼植物の根長を測定できるナイロンメッシュによる方法を開発した。4日目の根長はpH5を下回ると阻害を受け、pH4.5では完全に阻害され、また、わずか $1\mu\text{M}$ のAl存在下でも著しく阻害され、本植物種が両ストレスに対して、一般作物以上の感受性を有することを明らかにした。

第2章では、酸性ストレスに対するシロイヌナズナの耐性について系統間の差を調査した。Al耐性シロイヌナズナは、本研究で確立した水耕栽培法を適用し、約2万粒のEMS処理変異集団から直接選抜した。獲得したAl耐性系統(Al-t)と代表的な生態型[Ler、Columbia (Col-0)、Wassilewskija (Ws)]の $1\mu\text{M}$ Alに対する応答はLerが50%の生育阻害を受けたのに対し、Ler由来のAl-tを含む他の2系統は70%以上の生育を維持した。次に、非アロフェン型活性Alを含む典型的な酸性土壌を用い、4週間後のロゼット葉の生育を指標として、これらの系統の耐性を比較したところ、Lerが最も感受性が高く、この結果は水耕栽培のそれと概ね一致し、幼植物の一次根を指標とした簡便な評価法が、酸性ストレス耐性評価法並びにAl耐性植物の選抜法として有用であることを証明した。

第3章では、根部酸性ストレス障害のメカニズムを解析した。FDA-PI蛍光染色法を用いた顕微鏡観察では、Al並びに水素イオンストレスによる根部酸性障害発現が異なり、特に水素イオン毒性は、短時間のうちに根端伸長領域に不可逆的な細胞損傷を引き起こす、極めて深刻なストレスであった。この障害は、細胞壁ペクチン多糖の架橋構造におけるCaの機能喪失と、それに関連する細胞壁構造の不安定化を引き起こしているものと推定した。

第4章の総合考察では、酸性ストレスのうちAlと水素イオンストレスを厳密に区別する実験系が必要であり、本研究で考案された水耕栽培方法は両者の生理的現象を明確にすることができ、研究上の有用性を強調した。今後、Al耐性植物だけでなく、水素イオンストレス耐性植物を単離することにより、酸性ストレス耐性機構に関する総括的な知見が得られることが期待された。

以上の論文構成や内容について慎重に審議した結果、得られた知見は植物のストレス障害メカニズムを容易に解析できる方法を示したものであり、ストレス耐性研究におおいに貢献できると考えられ、学術的に価値があるものと判断された。その結果、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があるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文は以下のとおりである。

- 1) Toda, T., Koyama, H. and Hara, T.: A simple hydroponic culture method for the development of a highly viable root system in *Arabidopsis thaliana*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 63: 210-212, 1999.
- 2) Toda, T. Koyama, H., Hori, T. and Hara, T.: Aluminum tolerance of *Arabidopsis thaliana* under hydroponic and soil culture conditions. Soil Sci. Plant Nutr., 45: 419-425, 1999.