

学 位 論 文 題 名

バレイショ塊茎の細胞肥大に及ぼすジャスモン酸の
作用機作に関する生理学的研究

学位論文内容の要旨

バレイショは、栄養貯蔵器官である塊茎を収穫の対象とする世界的にも食糧生産上重要な作物である。また、生物学的にも種子植物でありながら塊茎によって栄養繁殖する興味ある植物である。従って、塊茎形成機構の解明は、食用塊茎や種イモの生産等、農業上重要な意義を持っている。バレイショの塊茎形成は、短日低夜温条件下において地下部のストロン次頂部髓部柔組織細胞が、伸長生長から肥大生長へと転換することにより開始する。最近の知見では、短日刺激を感受した葉で形成されるジャスモン酸の誘導体が、地下部へ転流し細胞肥大を引き起こすものと考えられている。本研究は、強いバレイショ塊茎形成活性を有するジャスモン酸(JA)が、細胞肥大を誘起する作用を持つことを明らかにし、その作用機作の解明を試みるとともに、バレイショ塊茎形成機構を細胞学的見地から考察することを目的として行ったものである。

ジャスモン酸が細胞肥大を誘起するか否か、バレイショ塊茎髓部柔組織片(直径6 mm×厚さ1 mm)を培養する実験系を用いて検討した。その結果、 $10\mu\text{M}$ ~ $100\mu\text{M}$ のJAを含むホワイト培地上で組織片を 25°C ・暗所にて培養すると、培養開始後1日を経ってから組織片の生重がJAの濃度に応じて顕著に増加し始め、この生重増加が細胞分裂ではなく専ら細胞肥大によることから、JAが細胞肥大を誘起することが明らかとなった。

植物ホルモンのインドール酢酸(IAA)、ベンチルアデニン(BA)、ジベレリン酸、アブシジン酸(ABA)、そして、エチレンの前駆体である1-アミノ-シクロプロパン-カルボン酸(ACC)を、 $0.1\sim 100\mu\text{M}$ (ACCは $1\sim 100\mu\text{M}$)の濃度において組織片に単独で処理した場合、IAAにのみ生重増加作用が認められたが、JAの活性と比べて大変弱いものであった。これらホルモンを $30\mu\text{M}$ のJAと同時に処理した場合、JAによる細胞肥大を促進するものは無く、むしろ、 $10\mu\text{M}$ 以上のBAや $1\mu\text{M}$ 以上のABAは、JAによる細胞肥大を著しく阻害した。JAには2つの不斉炭素があることから4種類の光学異性体が存在する。2本の側鎖がその5員環に対し取る配置によりシス型とトランス型に分けられるが、細胞肥大を誘起するのはシス型であった。これらのことは、JAがバレイショ塊茎細胞の肥大を特異的に誘導する物質であることを示し、また、JAに対する特異的受容体が存在し、この受容体が細胞肥大に大きく関与していることを示唆するものである。

植物細胞の肥大生長は、細胞内浸透圧の増加と細胞壁の伸展性の増大により引き起こされると考えられている。そこで、細胞の浸透圧調節物質と考えられる可溶性糖類の含量を酵素法により測定した。その結果、JA処理後1日目から3日目にかけて、ショ糖含量が急激に増加したが、グルコース、フルクトース含量には変化が見られなかった。無処理区

のこれら可溶性糖類の含量は、低い値を保ったまま5日間の実験期間を経過した。このことから、細胞内に蓄積するショ糖が、浸透圧を上昇させていることが示唆された。

植物の細胞壁は、非常に強固なセルロース微繊維間をキシログルカンなどのマトリックス高分子群により架橋された高分子会合体である。細胞壁の形態変化の直接の原因は細胞壁の力学的性質の変化であり、細胞壁構成多糖類の化学構造の変化によりもたらされる。植物ホルモンなどの生長調節物質は細胞壁高分子の化学構造を変化させ、その結果、細胞壁の力学的性質の変化とそれに引き続く細胞生長を引き起こすと考えられている。そこで、細胞壁構成成分のペクチン、ヘミセルロース、セルロースの含量を測定するとともに、細胞壁合成阻害剤がJAによる細胞肥大に及ぼす影響を検討した。さらに、ペクチン、ヘミセルロースの分子分布をゲル濾過クロマトグラフィーにより調べた。その結果、JAはこれら壁成分、とりわけヘミセルロース含量の顕著な増加をもたらした。また、細胞壁合成阻害剤2,6-ジクロロベンゾニトリル(DCB)、クマリン、モネンシン、ガラクトースはJAによる細胞肥大を顕著に阻害した。セルロース合成の特異的阻害剤DCBによる細胞肥大の阻害の程度は、セルロース合成の阻害の程度とよく一致していた。JAはペクチンの分子分布には変化を及ぼさなかったが、ヘミセルロースの構成多糖であるキシログルカンの分子分布に影響を及ぼし高分子種のキシログルカンを出現させた。これらのことから、JAによる細胞肥大には細胞壁合成が伴い、なかでもセルロース合成が不可欠であることが示された。さらに、セルロース微繊維間を架橋し、細胞壁の伸展性を規定していると考えられているキシログルカンが高分子化していることから、JAは細胞壁の量的変動だけでなく、質的変動をももたらし細胞壁の伸展性に影響を及ぼしていることが示唆された。

細胞の伸長・肥大にはキシログルカンの代謝変動が重要であるが、細胞の形や組織の形態は、セルロース微繊維の沈着方向により規定される。その方向は原形質膜直下の表層微小管の配向により制御される。そこで、微小管脱重合剤コルヒチン、微小管重合阻害剤イソプロピルN-フェニルカルバメートの影響を調べたところ、これら阻害剤はJAによる細胞肥大を顕著に阻害した。このことから、JAによる細胞肥大に微小管が関与することが示唆された。そこで、抗 α -チューブリン抗体、FITC標識抗IgG抗体により微小管を蛍光染色し、蛍光顕微鏡によりその配向を調べた。その結果、JA処理後1日目の細胞では、表層微小管が培地接触面に対し平行に並んでいる細胞の頻度が圧倒的に高く、細胞肥大の伸長軸と直角に配向していることが観察された。これは、特に培地接触面側の細胞で顕著に見られ、JAによる細胞肥大が培地接触面側の細胞で顕著なことを裏付けるものであった。一方、無処理区の表層微小管の配向には、JA処理区のような規則性は見られなかった。よって、JAは早い時期に表層微小管の配向を制御し、細胞肥大の方向を決定しているものと推察された。

上記実験結果から、JAの作用機作を以下のように結論した。まず、JAは細胞内ショ糖含量を増加させ、増加するショ糖は、細胞内浸透圧を高め細胞肥大の駆動力となる。一方、JAは表層微小管の配向を制御するとともに、細胞壁構成多糖類の合成を促進し、表層微小管の配向に沿ってセルロース微繊維が細胞壁に沈着する。この沈着方向が細胞の生長方向を決定する。また同時に、キシログルカンが高分子化することによりセルロース微繊維間の結合が緩み、細胞壁の伸展性が増大し顕著な細胞肥大が誘導される。さらに、この時増加するショ糖は、細胞壁合成の前駆物質として供給されるものと考えられた。

バレイショの塊茎形成時において、ショ糖がストロン次頂部に蓄積すること、また、ストロン次頂部髓部柔組織細胞の表層微小管の配向が変化することが報告されているが、本研究により、これら塊茎形成時に見られる現象とJAにより誘導される現象の一致が示され、JA類が塊茎形成時においても上記作用機作により作用していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜久田 嘉 郎

副 査 教 授 木 村 郁 夫

副 査 教 授 生 越 明

学 位 論 文 題 名

バレイショ塊茎の細胞肥大に及ぼすジャスモン酸の 作用機作に関する生理学的研究

本論文は、図36、表5、引用文献168編、総ページ数114頁からなり、6章をもって構成される。

バレイショは食糧生産上重要な作物であるのみならず、植物学的にも種子植物でありながら塊茎によって栄養繁殖する興味ある植物である。バレイショの塊茎形成は、短日低夜温条件下においてストロン次頂部髄部柔組織細胞が、伸長生長から肥大生長へと転換することにより開始する。最近の知見では、短日刺激を感受した葉で生成されるジャスモン酸の誘導体が、地下部へ転流し細胞肥大を引き起こすものと考えられているが、その作用機作に関しては未だ解明されていない。本研究は、強いバレイショ塊茎形成活性を有するジャスモン酸(JA)が、細胞肥大を誘起する作用を持つことを明らかにし、その作用機作の解明を目的として行ったものである。

ジャスモン酸が細胞肥大を誘起するか否か、バレイショ塊茎髄部柔組織片(直径6mm×厚さ1mm)の培養系を用いて検討した。その結果、 $10\mu\text{M}$ ~ $100\mu\text{M}$ のJAを含むホワイト培地上で組織片を 25°C ・暗所にて培養すると、培養開始後1日を経ってから組織片の生重がJAの濃度に応じて顕著に増加した。顕微鏡観察の結果、この生重増加が細胞分裂ではなく専ら細胞肥大によることから、JAが細胞肥大を誘起する作用を持つことが明らかとなった。

この様な組織片の細胞肥大が、植物ホルモンにより誘起されるか否か検討した。その結果、インドール酢酸が組織片の生重をわずかに増加させたが、JAの作用と比べると大変弱いものであり、JAがバレイショ塊茎の細胞肥大を特異的に誘導する物質であると考えられた。

植物細胞の肥大は、細胞内浸透圧と細胞壁の伸展性により制御されと考えられている。そこで、細胞の浸透圧調節物質と考えられる可溶性糖類の含量を酵素法により定量した。その結果、JA処理後1日目から3日目にかけて、ショ糖含量が顕著に増加したが、グルコース、フルクトース含量には変化が見られなかった。無処理区のこれら糖類の含量は低い値を保ったまま5日間の実験期間を経過した。このことから、ショ糖が細胞内浸透圧を上昇させている可能性が示唆された。

細胞壁の伸展性の増大は、細胞壁構成多糖類の化学構造の変化によりもたらされ

ると考えられている。そこで、ペクチン、ヘミセルロース、セルロースの含量を定量するとともに、セルロース合成の特異的阻害剤とされる2,6-ジクロロベンゾニトリル(DCB)の影響を検討した。さらに、ペクチン、ヘミセルロースの分子分布をゲル濾過クロマトグラフィーにより調べた。その結果、JAはこれら壁成分、とりわけヘミセルロース含量の顕著な増加をもたらした。DCBはJAによる細胞肥大を顕著に阻害し、その阻害の程度はセルロース合成の阻害の程度とよく一致していた。JAはペクチンの分子分布には変化を及ぼさなかったが、ヘミセルロースの主要な構成多糖であるキシログルカンの分子分布に影響を及ぼし、高分子種のキシログルカンを出現させた。これらのことから、JAによる細胞肥大には細胞壁合成が伴い、なかでもセルロース合成が不可欠であると考えられた。さらに、セルロース微繊維間を架橋し、細胞壁の伸展性を規定していると考えられているキシログルカンが高分子化していることが示された。

細胞の伸長方向は、セルロース微繊維の沈着方向により規定され、その方向は原形質膜直下の表層微小管の配向により制御されと考えられている。そこで、微小管脱重合剤コルヒチン、微小管重合阻害剤イソプロピルN-フェニルカルバメートの影響を調べたところ、これら阻害剤はJAによる細胞肥大を顕著に阻害した。このことから、JAによる細胞肥大に微小管が関与することが示唆された。そこで、間接蛍光抗体法により表層微小管の配向を調べた。その結果、JA処理後1日目の組織片では、表層微小管が培地接触面に対し平行に配向している細胞が多く観察された。3日目の組織片では、1日目に見られた微小管の配向に規定される方向に細胞が肥大しており、細胞長軸に直角に配向している微小管が観察された。一方、無処理区の表層微小管の配向には、JA処理区のような規則性は見られなかった。このことから、JAが細胞表層の微小管の配向を変化させることが示された。

上記実験結果を総合することにより、JAによる細胞肥大の作用機作を以下のように結論した。まず、JAは細胞内ショ糖含量を増加させ、増加するショ糖は細胞内浸透圧を高め細胞肥大の駆動力となる。一方、JAは表層微小管の配向を制御するとともに、細胞壁構成多糖類の合成を促進し、表層微小管の配向に沿ってセルロース微繊維が細胞壁に沈着する。また同時に、キシログルカンが高分子化することにより、セルロース微繊維間の結合が緩み、細胞壁の伸展性が増大し顕著な細胞肥大が誘導される。さらに、この時増加するショ糖は、細胞壁合成の前駆物質として供給されるものと考えられた。

よって、審査員一同は、最終試験の結果と合わせて本論文の提出者、高橋淳を博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。