

学 位 論 文 題 名

Study on the mechanisms of plant adaptation to phosphorus deficient conditions
—with special reference to secretory response of plant roots to acquire phosphate

(リン欠乏条件に対する植物の適応機構
—特にリン酸を獲得する根の分泌的応答に関する研究)

学位論文内容の要旨

植物の生育にとってリンは不可欠な要素の一つである。地球上にはリン欠乏土壌が広く分布しており、農耕地の大部分の土壌がリン欠乏土壌である。土壌中に含有されるリンの形態としては有機態リンと無機態リンがあり、そのうち有機態リンは全リンの約 30-80%を占め、イノシトールリン酸塩、核酸、ヌクレオチド、リン脂質、レシチンなど植物に直接吸収されない形態で存在する。一方、無機態リンはリン酸鉄、リン酸アルミウム、リン酸カルシウムなどの難溶性リン酸化合物として沈殿している。したがって、リン欠乏は食糧生産の重要な制限要因になっている。窒素肥料と違ってリン酸肥料の原料であるリン鉱石資源の埋蔵量には限りがあり、しかも人工的に合成できないので、全地球的なリン資源の枯渇問題が食糧生産にとって無視できない問題になっている。一方、植物はリン欠乏を感知した場合、その根から酸性ホスファターゼや有機酸などを分泌し、土壌中の有機態リンの無機化や難溶性の無機リン酸化合物の可溶化をもたらし植物のリン酸吸収を促進することが知られているが、その実態についてはまだ不明な点が多い。そこで本研究は、低リン耐性が高いルーピンと低いトマトに重点をおいて、酸性ホスファターゼと有機酸などの分泌性機能物質の分泌特性、性質と機能および低リン耐性に関与する体内のリン要求性との関係を明らかにすることを目的として実施した。得られた結果は次の通りである。

1. いろいろなリン酸濃度の水耕実験を行い、ルーピンとトマトの低リン耐性、低リン培地条件での根からの酸性ホスファターゼ、フィターゼ及び有機酸などの分泌ならびに体内リン要求性を比較検討した。その結果、軽度のリン欠乏条件で、ルーピンとトマトともにその根から無機リン酸を獲得するための機能性物質—酸性ホスファターゼ、フィターゼ及び有機酸

の分泌が誘導された。低リン条件における根の酸性ホスファターゼと有機酸の分泌の誘導はルーピンでトマトより約3倍高かった。それに対して、フィターゼ分泌の誘導はトマトでルーピンより約2倍高かった。これらの機能性物質の分泌は植物のリン欠乏を軽減する重要なレスキュー機能であると考えられた。

2. 低リン条件で生育したルーピンとトマトの分泌物を含む培養液から DEAE-Sepharose CL 6B column イオン交換グロマトグラフィー、Bio-Gel P-200 ゲルろ過、調製用電気泳動などの方法によって分泌性酸性ホスファターゼを単一なバンドにまで精製した。精製したトマトの分泌性酸性ホスファターゼは分子量およそ 68 kD のサブユニットから構成された二量体であり、等電点 5.3 であり、至適 pH 5.6 であった。一方、ルーピンのそれは分子量およそ 72 kD のサブユニットから構成された二量体であり、等電点 4.8 であり、至適 pH 4.3 であったが、比活性をはじめとする大部分の酵素学的な性質には大差は見られなかったことから、トマト根分泌物中の酸性ホスファターゼの活性がルーピンのそれより低いのは主にその分泌量が少ないことによるものと考えられた。

3. リン濃度を異にする水耕実験を設定して体内リン含有率および外部培養液のリン濃度とルーピンとトマトの生育との関係を解析した。その結果、リン欠乏症状が誘発される限界外部リン濃度と内部リン含有率はトマトでルーピンよりかなり高く、正常な生育を維持するためのリン要求性はトマトでルーピンより約3倍高かった。このことから、リンに対する高い要求性がトマトの低リン耐性が低い主要な支配要因であると考えられた。リン供給が低い土壌条件ではトマト根の酸性ホスファターゼと有機酸の分泌能がルーピンより低いことも低リン耐性が低い要因になると理解された。

4. 根圏土壌を約 0.5 mm に画分した Rhizo-box を用いて、殺菌及び非殺菌の低リン条件で生育したルーピンの分泌性酸性ホスファターゼと有機酸の根圏における分布状況ならびにそれらが根圏におけるリンの動態にもたらす影響を調べた。その結果、低リン条件でルーピンの根から分泌された酸性ホスファターゼと各種有機酸は根から 2.5-3 mm の根圏範囲に分布しており、分泌性酸性ホスファターゼは土壌中の有機態リン化合物からかなりの量のリン酸を放出し、分泌性有機酸は難溶性リン酸化合物からかなりの量のリン酸を溶出した。以上の結果から、これらの分泌性機能物質は植物のリン吸収に大いに貢献していることが明らかとなった。

5. 低リン条件で生育したトマトの根（約 1 キロ）の抽出物から、硫安沈殿、DEAE-Sepharose CL 6B column 陰イオン交換グロマトグラフィー、Bio-Gel P-200 ゲル濾過、FPLC と調製用電気泳動の 5 つのステップによって、リン欠乏によって誘導されたフィターゼを単一なバンドにまで精製した。精製したフィターゼは分子量およそ 82 kD、等電点 5.3 であり、

ダイズの種子から精製したフィターゼに比べて、Glycine、Serine、Alanine、Threonine の含有率が高かったが、Systeine、Leucine の含有率は低かった。この酵素はフィチンを始め、ピロリン酸や ATP などに高い触媒効率を示した。

6. 透析チューブを用いて、低リン条件で水耕培養をした16种植物の分泌性タンパクを集めてフィターゼの活性を調べるとともに、免疫的な手法を用いて分泌性フィターゼの同定とその特性を検討した。その結果、低リン条件で水耕した16種の植物の根分泌物からフィターゼ活性が検出され、そのうちの7种植物の分泌物から分子量およそ30-35 kDのフィターゼがフィターゼの抗体によって検出された。本研究によって初めて植物の根からフィターゼが分泌されることが証明された。土壌中の有機態リンの約30-50%がフィチン態であることから、分泌性フィターゼは植物のフィチン態リンの利用において重要な役割を果たしていると考えられた。

7. 本研究の結果から酸性ホスファターゼ、フィターゼ及び有機酸などの分泌能が高く、土壌中のリンを有効に利用できる植物種及び品種の選抜と品種育成が土壌中のリンの効率的利用やリンのリサイクル利用のために重要であることを指摘した。また、酸性ホスファターゼとフィターゼを含む新‘酵素肥料’の開発を提案した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 但 野 利 秋

副 査 教 授 本 間 守

副 査 教 授 波 多 野 隆 介

学 位 論 文 題 名

Study on the mechanisms of plant adaptation to phosphorus deficient conditions
—with special reference to secretory response of plant roots to acquire phosphate

(リン欠乏条件に対する植物の適応機構

—特にリン酸を獲得する根の分泌的応答に関する研究)

本論文は、図 33、表 15、引用文献 147 を含む総頁数 157 の英文論文であり、別に参考論文 3 編が添えられている。

植物の生育にとってリンは不可欠な要素の一つである。地球上にはリン欠乏土壤が広く分布しており、農耕地の大部分の土壤がリン欠乏土壤である。一方、植物はリン欠乏を感知した場合、その根から酸性ホスファターゼや有機酸などを分泌し、土壤中の有機態リンの無機化や難溶性の無機リン酸化合物の可溶化をもたらして植物のリン酸吸収を促進することが知られているが、その実態についてはまだ不明な点が多い。そこで本研究は、低リン耐性が高いルーピンと低いトマトに重点をおいて、酸性ホスファターゼと有機酸などの分泌性機能物質の分泌特性、性質及びそれらの機能を明らかにすることを目的として実施したものである。得られた結果の概要は次の通りである。

1. 軽度のリン欠乏条件で、ルーピン、トマトともにその根から酸性ホスファターゼ、フィターゼ及び有機酸の分泌が誘導された。根の酸性ホスファターゼと有機酸の分泌の誘導はルーピンでトマトより約 3 倍高かった。それに対して、フィターゼ分泌の誘導はトマトでルーピンより約 2 倍高かった。これらの機能性物質の分泌は植物のリン欠乏を軽減する重要なレスキュー機能であると考えられた。

2. 低リン条件で生育したルーピンとトマトの分泌物を含む培養液から分泌性酸性ホス

ファターゼを単一なバンドにまで精製した。精製したトマトの分泌性酸性ホスファターゼは分子量およそ 68 kD のサブユニットから構成された二量体であり、等電点 5.3、至適 pH 5.6 であった。一方、ルーピンのそれは分子量およそ 72 kD のサブユニットから構成された二量体であり、等電点 4.8、至適 pH 4.3 であったが、比活性をはじめとする大部分の酵素学的な性質には大差は見られなかったことから、トマト根分泌物中の酸性ホスファターゼの活性がルーピンのそれより低いのは主にその分泌量が少ないことによるものと考えられた。

3. リン欠乏症状が誘発される限界外部リン濃度と内部リン含有率はトマトでルーピンよりかなり高く、正常な生育を維持するためのリン要求性はトマトでルーピンより約 3 倍高かった。このことから、リンに対する高い要求性がトマトの低リン耐性が低い主要な支配要因であり、リン供給が低い土壌条件ではトマト根の酸性ホスファターゼと有機酸の分泌能がルーピンより低いことも低リン耐性が低い要因になると理解された。

4. 根圏土壌を約 0.5 mm に画分した Rhizo-box を用いた研究の結果、低リン条件でルーピンの根から分泌された酸性ホスファターゼと各種有機酸は根から 2.5-3 mm の根圏範囲に分布しており、分泌性酸性ホスファターゼは土壌中の有機態リン化合物からかなりの量のリン酸を放出し、分泌性有機酸は難溶性リン酸化合物からかなりの量のリン酸を溶出した。以上の結果から、これらの分泌性機能物質は植物のリン吸収に大いに貢献していることが明らかとなった。

5. 低リン条件で生育したトマトの根の抽出物から、リン欠乏によって誘導されたフィターゼを単一なバンドにまで精製した。精製したフィターゼは分子量およそ 82 kD、等電点 5.3 であり、フィチンを始め、ピロリン酸や ATP などに高い触媒効率を示した。

6. 透析チューブを用いて、低リン条件で水耕培養をした 16 种植物の分泌性タンパクを集めてフィターゼの活性を調べるとともに、免疫的な手法を用いて分泌性フィターゼの同定とその特性を検討した。その結果、低リン条件で水耕した 16 種の植物の根分泌物からフィターゼ活性が検出され、そのうちの 7 种植物の分泌物から分子量およそ 30-35 kD のフィターゼがフィターゼの抗体によって検出された。本研究によって初めて植物の根からフィターゼが分泌されることが証明された。土壌中の有機態リンの約 30-50% がフィチン態であることから、分泌性フィターゼは植物のフィチン態リンの利用において重要な役割を果たしていると考えられた。

7. 本研究の結果から酸性ホスファターゼ、フィターゼ及び有機酸などの分泌能が高く、土壌中のリンを有効に利用できる植物種及び品種の選抜と品種育成が土壌中のリンの効率的利用やリンのリサイクル利用のために重要であることを指摘した。また、酸性ホスファターゼとフィターゼを含む新「酵素肥料」の開発を提案した。

以上のように、本研究がりん欠乏条件下で生育する場合に発現する根からの酸性ホスファターゼ、フィターゼ及び有機酸の分泌特性、それらの諸性質ならびにリン酸吸収における役割を解明したものであり、得られた知見は学術的に高く評価される。

よって審査員一同は最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者李明剛は博士（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。