

氏名	大 熊 英 治
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	農 学
学位授与番号	博甲第2509号
学位授与の日付	平成15年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	The role of proline in salt adaptation of tobacco cultured cells (タバコ培養細胞の塩ストレスへの適応におけるプロリンの役割)
論文審査委員	教授 多田 幹郎 教授 笹川 英夫 教授 景山 詳弘

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

高等植物がNaClストレス下で蓄積するプロリンの役割に関する知見を得るために、LS培地を改変した標準培地で継代培養したタバコ培養細胞(非適応細胞)と100mMのNaClを添加した培地(100mM-NaCl培地)で継代培養した細胞(NaCl適応細胞)を用いて検討した。

始めに、非適応細胞を100mM-NaCl培地で2週間培養し、その間の細胞増殖と細胞内のプロリン濃度及びナトリウムイオン濃度とカリウムイオン濃度の比(K^+/Na^+)の変化を調べた。その結果、細胞増殖は培養開始後10日間は認められず、それ以降に増殖が始まった。 K^+/Na^+ は、培養開始前の細胞では7.5と高い値を示したが、培養開始後に急激に低下し、4日後には3.1に低下し、その後は経時的に増大し、7日目に4.5、10日目以降は6.2に回復した。また、培養開始時は3.3mMであった細胞内のプロリン濃度は、培養開始直後から上昇し、4日目には33.4mMとなり、その後は減少して7日目には12.0mM、10日目以降は4.5mMと培養開始前の濃度と同等の値になり、

K^+/Na^+ の変化との間に逆相関関係が成立した。この逆相関関係と細胞増殖の経時変化から、プロリンは細胞内の代謝系酵素の Na^+ による阻害あるいは失活を防ぎ、 Na^+ 流入の制御機構の修復あるいは構築を促す役割を果たしていると推察した。次に、非適応細胞と適応細胞の原形質膜及び液胞膜の脂質組成を調べ、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の比ならびにステロイドの平面型と非平面型の比が一定に保たれていることから、膜の流動性と透過性には変化がないことが推察され、プロリンは細胞膜の構造と機能の維持にも深く関わっていることが予想された。さらに、10mMのプロリンを添加した100mM-NaCl培地で細胞増殖と細胞内プロリン濃度と K^+/Na^+ を追跡した。その結果、培養開始後2日目に細胞の増殖が確認され、その後、対数的に増殖して、10日目に定常期に至った。しかし、その増殖速度と定常期の細胞量は標準培地でのそれらの約半分であった。細胞内プロリン濃度は、培養開始後から急激に高まり、5日後には198mMと無添加培地での値の約7倍にまで高まった。一方、 K^+/Na^+ については、この間約3.0の低い値が続いた。

以上の結果から、NaClストレス下で蓄積されるプロリンは、 Na^+ の増大あるいは K^+/Na^+ の低下に起因する生命維持に関わる代謝系酵素の阻害あるいは失活を防護するのみならず、その活性化にも関わり、また、細胞膜の構造と機能を維持する役割をも果たしていると推察した。

論文審査結果の要旨

多くの高等植物はNaClストレス下でプロリンを蓄積するが、その生物学的合目的性は明らかにされていない。本研究は、NaClを含まないLS改変培地(標準培地)で継代培養したタバコ培養細胞(非適応細胞)と100mM-NaClを添加した培地(100mM-NaCl培地)で継代培養した細胞(適応細胞)を用いて、プロリンの役割に関する知見を求めることを目的として行われた。

初めに、非適応細胞を100mM-NaCl培地で2週間培養し、その間の細胞増殖と細胞内のプロリン濃度及びナトリウムイオン濃度に対するカリウムイオン濃度の比(K^+/Na^+)の変化を調べた。その結果、細胞増殖は10日間の誘導期を経て始まり、この培養期間中の細胞内のプロリン濃度と K^+/Na^+ は劇的に変化し、それらの間には逆相関関係が成り立っていることを確認した。次に、非適応細胞と適応細胞の原形質膜及び液胞膜の脂質組成を調べ、細胞膜の流動性と透過性には差異がないと推察した。続いて、10mMのプロリンを添加した100mM-NaCl培地での細胞増殖と細胞内のプロリン濃度及び K^+/Na^+ の変動を追跡し、培養開始後2日目に細胞増殖が始まり、その後、対数的に増殖して10日目に定常期に至ることを見出し、さらに、細胞内の K^+/Na^+ は正常な増殖が困難と思われる低い値(3.0)が続いたのに反し、プロリン濃度は培養の開始直後から急激に高まり、5日後には198mMと標準培地での値の約7倍にまで高まることを認めた。

そして、本研究で得たこれらの結果に基づき、プロリンは Na^+ の増大あるいは K^+/Na^+ の低下に起因する生命維持に関わる代謝系酵素の阻害あるいは失活を防ぎ、さらにその活性化にも関わり、また、細胞膜の構造と機能を維持する役割をも果たしていると推察した。

以上の成果は、植物の耐塩性に関わる学問領域に新たな知見を提供し、今後の発展に寄与すると考えられる。従って、論文審査委員会は本論文が博士(農学)の学位論文に値すると判定した。