

氏 名(本 籍)	さこ　だ　まさ　こ 迫　田　理　子 (鹿児島県)
学 位 の 種 類	博　士 (農　学)
学 位 記 番 号	博　甲　第　968　号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	光によって誘導される生長抑制物質raphanusaninの作用機作に関する研究
主　査	筑波大学教授　農学博士　石　塚　皓　造
副　査	筑波大学教授　農学博士　桑　原　保　正
副　査	筑波大学助教授　農学博士　臼　井　健　二
副　査	筑波大学教授　農学博士　岩　堀　修　一

論 文 の 要 旨

エンパク下胚軸切片を用いた光屈性に関する実験は、植物ホルモンの1つであるオーキシンの活性測定法として現在でも用いられているが、光屈性の機構には2つの説が提唱されている。1つは光によってオーキシンの移動が起き、不等分布が生じて屈性が引き起こされるという説であり、他の1つは光側組織での局所的な生長抑制によるという説である。1986年に長谷川らによりサクラジマダイコン芽生えに生長抑制物質が発見され、raphanusanin〔3-methoxy (methylthio) methyl-2-pyrrolidine-thione〕と命名された。この物質は光によって誘導生成されることから、光屈性との関係が着目された。本研究では、まず生長抑制物質raphanusaninの生物学的意義を明らかにする上で、光屈性におけるraphanusaninの役割について調べることにした。

光屈性刺激（白色光および青色光）を受けたダイコン下胚軸の光・影側における生長量と、それに伴う生長抑制物質raphanusanin, raphanusamideの分布量を高速液体クロマトグラフィ(HPLC)により調べた。dose-response curveより、ダイコン下胚軸の光屈性は光側での生長抑制によって引き起こされていることが判かった。そのときの内生の生長抑制物質を最大屈折曲を引き起こす途上の60分で測定したところ、光側での生長抑制に先行してraphanusaninが増量していた。IAAの不等分布によって光屈性が引き起こされるという従来の説では、その定量は生物検定法によるものでIAAを単一物質として測定していない。そこで、内生IAA量のガスクロマトグラフィによる定量を試みることにした。その結果、IAAは光・影側で全く均等に分布していることが判明した。さらに、IAAの不等分布はオーキシン感受性細胞（上皮）で起こっているかどうかを明らかにするためダイコン下胚軸の光・影側をそれぞれ表皮と皮層組織に分けてIAAの定量を行ったが、IAAの不等分布

は認められなかった。また、拡散性IAAの定量も行った。光屈性刺激を受けたアベナ幼葉鞘の先端から寒天に移行した拡散物を、Wentと同じようにそのまま生物検定法にかけたところ、光側のオーキシン活性は影側の約38%だった。しかし、同じ寒天に含まれる拡散物を物理化学的な測定法で精製してIAAの定量を行ったところ、拡散性IAA量は光・影側で均等に分布していることが分った。以上の結果から、ダイコン下胚軸およびアベナ幼葉鞘の光屈性はIAAの不等分布では説明できず、raphanusaninなど生長抑制物質によって引き起こされている可能性が示された。

次に、raphanusaninの植物界における分布をダイコンの属する *Raphanus* 属および *Brassica* 属、そしてこれまで光屈性の研究によく用いられてきた植物種を中心に調べた。その結果、raphanusaninは *Raphanus* 属にのみ存在することが分かった。

次にraphanusaninの生長抑制機構を探るため、各種生物検定法によって各種植物ホルモンに対する効果を調べたところ、raphanusaninはオーキシンとサイトカイニン作用を抑制したが、ジベレリンに対しては影響しなかった。これらの結果から、raphanusaninはオーキシンとサイトカイニン作用の抑制を通して生長抑制を引き起こしていることが示唆された。特に、raphanusaninがオーキシン作用を抑えたことに注目して細胞レベルおよび分子レベルから研究を行った。

細胞レベルからは、細胞の伸長方向を決定するといわれ、細胞骨格という名称で呼ばれるマイクロチューブル (MT) の配向とオーキシンとの間に相関性のあることが分かっているため、オーキシン (IAA) が仲介するMTの配向性に対するraphanusaninの効果を調べた。伸長生長は表皮細胞の動態に限定されることが分かっているため、オーキシンが伸長を引き起こす際の表皮細胞におけるMTの様子を免疫蛍光学的顕微鏡法によって調べた。IAA処理後30分でダイコン下胚軸切片の生長は有意に促進された。一方、MTの配向はIAA処理後15分で細胞の長軸方向に対して直角 (transverse) に配向していた。しかしこのIAAによって誘導されるMTの配向変化は、同時にraphanusaninを処理することによって有意に抑えられた。また、あらかじめIAAによってtransverseな配向にされたMTに対するraphanusaninの効果も調べた。Raphanusaninによる生長抑制はraphanusanin添加後60分で認められたが、IAAによって誘導されていたMTの配向はすでに添加後30分で抑制されており、つまり細胞の長軸方向に対して平行 (longitudinal) に配向していることが分かった。このように、IAAの誘導する生長促進がraphanusaninを添加することによって抑制されたのに先行して、MTの配向性の変化が起こっていることが明らかとなった。

同じように、raphanusaninのオーキシン作用に対する抑制効果を分子レベルで調べるため、オーキシンによって誘導されるようなタンパク質合成に対する影響を、SDS-ポリアクリルアミドゲル2次元電気泳動法および³⁵S-メチオニンの取り込み試験によって調べた。しかし、2次元電気泳動法を用いてIAAあるいはraphanusaninによって誘導されるような新たなタンパク質の合成または分解を見つけることはできなかった。一方、ダイコン下胚軸切片に *in vivo* で³⁵S-メチオニンを取り込ませたところ、IAAによるメチオニン取り込みの増加が見られ、また同時にraphanusaninを処理することによってその取込みの増加は抑制された。

数種のraphanusanin類縁体を用い、2種類の生物検定法によってそれらの構造活性相関を調べ

た。そのうち抑制活性はraphanusaninやraphanusamide[(E)-3-methoxy-methylene-2-pyrrolidinetione],そしてダイコン緑化芽生えより天然物として初めて単離された(E)-3-(methylthio)methylene-2-pyrrolidinetioneが高かった。なお、抑制活性の発現には環構造にS(チオアミド)を含み、またピロリジンの3位の側鎖があり、6位にSCH₃やOCH₃の存在が必要であることが示唆された。

審 査 の 要 旨

本研究は光によって誘導される植物生長抑制作用物質が植物の光屈性現象の起因物質ではないかという作業仮説のもとで行った研究である。サクラジマダイコンより抽出同定したraphanusaninとオーキシンの機器分析による定量により、光屈性がオーキシンの不等分布によるのではなく抑制物質の生成によるということを明らかにした点は高く評価されて然るべきことと判断した。更にraphanusaninがオーキシンの拮抗作用を持つことを明らかにし、オーキシン作用の抑制を通して作用するという考え方を提起した点は今後の研究の方向に大きく貢献するものと思われる。

この物質が*Raphanus*属にしか認められなかった点は、光屈性という植物が持つ一般的特性を説明し得る唯一の物質ではなかったことを示すものであるが、それぞれの植物種にこの物質とは異なる化学構造の生長抑制物質が存在することが考えられ、この点更なる研究が望まれる。オーキシンとの関係についても分子レベルにおける研究の積み重ねが必要である。

よって、著者は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。