

氏名	MST. NASRIN AKHTER BANU
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第3756号
学位授与の日付	平成20年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Mitigation effects of proline and glycinebetaine on salt-stressed tobacco BY-2 cells (タバコ BY-2 細胞におけるプロリンとグリシンベタインの塩ストレス軽減効果)
論文審査委員	教授 村田 芳行 准教授 中村 宜督 教授 木村 吉伸

学位論文内容の要旨

Introduction: Salt stress is one of the major environmental stresses limiting crop productivity. Salt stress induces the production of reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) and methylglyoxal (MG) in plant cells. The increased concentrations of ROS, NO and MG are toxic to plants and cause oxidative damage to DNA, proteins, lipids and carbohydrates, and can lead to cell death. The key mechanism for adaptation to salt stress is the accumulation of compatible solutes. Proline and glycinebetaine (betaine) enhance antioxidant defense and MG detoxification systems in plant responses to salt stress, and thereby improve salt tolerance. Proline has been shown to inhibit ROS-mediated apoptotic-like cell death in fungal pathogenesis. In animal cells, betaine has protective effect on oxidative stress-induced apoptosis. Up-regulation of the antioxidant defense and glyoxalase systems provided by proline or betaine could be important in avoiding cellular damage and in inhibiting cell death.

Objectives: To clarify the protective role of proline and betaine in NaCl-induced oxidative damage and cell death in NaCl-unadapted tobacco BY-2 suspension-cultured cells.

Materials and methods: NaCl-unadapted tobacco BY-2 cells cultured in the different media (standard (modified LS medium), 50 mM NaCl, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl, 200 mM NaCl+20 mM proline, and 200 mM NaCl+20 mM betaine media) were used to investigate the effects of proline and betaine on the intracellular ROS, NO, MG and ATP levels, lipid peroxidation, nuclear deformation, DNA fragmentation, membrane integrity and cell death under salt stress.

Results: Salt stress increased H_2O_2 , O_2^- , NO and MG productions, lipid peroxidation, nuclear deformation and degradation, chromatin condensation, DNA fragmentation, depolarization of mitochondrial membrane, apoptosis-like cell death and ATP contents. Both exogenous proline and betaine decreased the accumulation of H_2O_2 and MG, and suppressed lipid peroxidation, nuclear deformation, chromatin condensation, DNA fragmentation and depolarization of mitochondrial membrane induced by severe salt stress. Neither proline nor betaine affected apoptosis-like cell death and G_1 phase population, and increased ATP contents in the 200 mM NaCl-stressed cells. Furthermore, Evans Blue staining experiment showed that salt stress resulted in a significant increase in membrane permeability, whereas both proline and betaine significantly suppressed increment of membrane permeability induced by 200 mM NaCl.

Conclusion: Both proline and betaine provide protection against NaCl-induced cell death by decreasing accumulation of H_2O_2 and MG, and lipid peroxidation as well as improvement of membrane integrity via increased antioxidant defense and glyoxalase systems. The roles of proline and betaine in modulating signal transduction or gene expression are yet to be fully elucidated. Further investigations, including expression of stress-responsive genes, are needed to elucidate the role of proline and betaine in molecular aspects of salt tolerance in higher plants.

論文審査結果の要旨

本論文は、高等植物の耐塩機構を解明するために、タバコ培養細胞を材料として、塩ストレス誘導細胞死に及ぼす適合溶質であるプロリンとベタインの影響を調べ、プロリンとベタインの塩ストレス軽減機構を明らかにしようとしたものである。

タバコ培養細胞に、塩ストレスを与えると、細胞膜の損傷が起きた。また、塩ストレスによって、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、一酸化窒素の産生が誘導された。また、これら活性酸素種によって誘導されるアルデヒド産生、脂質の過酸化やタンパク質の酸化も上昇した。さらに、細胞死に伴うミトコンドリアの膜電位変化、クロマチンの凝集や核の断片化も検出された。そして、これらの現象は、与える塩ストレス濃度の上昇に伴って、より顕著に観察された。

つぎに、これら塩ストレス誘導細胞死に対するプロリンとベタインの影響を、外生プロリンとベタインを用いて調べた。プロリンとベタインは、塩ストレスによって誘導される細胞膜の損傷を抑制した。また、この細胞死に関わるスーパーオキシドアニオン、過酸化水素、一酸化窒素の産生を抑制し、また、その下流で起こるアルデヒド産生、脂質の過酸化やタンパク質の酸化を抑制し、さらに、ミトコンドリアの膜電位変化、クロマチンの凝集や核の断片化を抑制した。

以上の結果から、適合溶質であるプロリンとベタインは、塩ストレス誘導細胞死を活性酸素種の産生を抑制し、その結果、脂質やタンパク質の過酸化を抑制し、最終的に細胞死を抑制していることを明らかにした。また、外生プロリンやベタインによるこれらの効果は、植物の耐塩性向上のために技術開発につながることを期待される。

本研究内容は、学術的な価値のみならず、実用に結びつく技術の基礎となるものである。従って、本審査委員会は本論文が博士（学術）の学位論文に値すると判断した。