

(様式第9号)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Md. Sanaulah Biswas
審査委員	<p>主査 真野 純一 (印)</p> <p>副査 伊藤 真一 (印)</p> <p>副査 荊木 康臣 (印)</p> <p>副査 石川 孝博 (印)</p> <p>副査 藪田 行哲 (印)</p>
題目	Studies of oxylipin carbonyl signals in triggering programmed cell death in plants under oxidative stress (植物での酸化ストレスによるプログラム細胞死の引き金となるオキシリピンカルボニルの研究)
<p>審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>本論文は、植物細胞において活性酸素(ROS)により引き起こされるプログラム細胞死(PCD)に、過酸化脂質由来の活性カルボニル種が関与することを初めて立証した研究を記載したものである。植物の生物的ストレスや環境ストレスに対する応答のなかでもROSによるPCDは細胞の運命を決定づける重要な応答である。しかし、ROSが植物細胞にPCDを誘発する生化学的メカニズムは未解明であった。著者は、近年の研究から過酸化脂質分解産物である<math>\alpha, \beta</math>-不飽和カルボニル化合物(活性カルボニル種; RCS)が植物のストレス傷害の原因物質であることが示唆されていることを踏まえ、RCSがROSによるPCDを媒介する化学的実体であるとの仮説を検証し、RCSがPCDを誘発する生化学メカニズムを解明した。</p> <p>論文前半ではまずRCSが酸化シグナルとして植物のPCDを引き起こす可能性を検証した。タバコ Bright Yellow-2 (BY-2) 培養細胞に致死濃度の過酸化水素(<math>H_2O_2</math>)を与え、細胞のカルボニル化合物をHPLCにより定量すると、4-ヒドロキシノネナルやアクロレインといったRCS含量が増大したことがわかった。またこのとき細胞死の進行と同時にDNA断片化、TUNEL陽性細胞核の増大および細胞質収縮が認められたことから、<math>H_2O_2</math>による細胞死は典型的なPCDであることを明らかにした。<math>H_2O_2</math>により生じるBY-2細胞のPCDは、カルボニル消去剤であるカルノシンやヒドララジンにより抑制された。これらの消去剤は<math>H_2O_2</math>による細胞内でのROS増大や過酸化脂質増大を抑制しなかったが、BY-2細胞での<math>H_2O_2</math>処理によるRCS増大は抑制した。このようにカルボニル消去剤がRCSを消去することで<math>H_2O_2</math>によるPCDが抑制されたことから、タバコおよびシロイヌナズナの根に<math>H_2O_2</math>またはNaClを与えた実験で、植物体でもオキシリピンカルボニルがPCDを引き起こすことを明らかにした。またNaClにより誘導される根表皮のPCDは、<math>\alpha, \beta</math>-不飽和カルボニル種を特異的に消去するシロイヌナズナ酵素 2-alkenal reductaseの過剰発現により抑制された。この過剰発現株でのROS増大は野生株と同程度であった。これらの結果から、ROSの下流で生成したRCSがPCDを開始させるシグナルとして作用することが示された。</p>	

論文後半では、RCSがPCDを開始させるメカニズムを解明した。代表的なRCSとしてアクロレインを用い、BY-2細胞にPCDを引き起こす致死濃度(0.2 mM)または引き起こさない亜致死濃度(0.1 mM)のアクロレインを与え、PCD開始前の時点での細胞内の生化学変化の差を解析した。PCDに関与するカスパーゼ3様プロテアーゼ(C3LP)は、致死濃度アクロレインでは急速に活性化されたが、亜致死濃度では最大値の半分までしか活性化されなかった。致死濃度ではアスコルビン酸含量が有意に低下したが、これはC3LP活性化より遅い現象であった。細胞内のグルタチオン含量はアクロレイン添加により急速に減少したが、亜致死濃度、致死濃度での違いはなく、PCDの開始に直接関係はないことが分かった。BY-2細胞の抽出液にアクロレインまたはHNEを加えるとC3LP活性が急速に増大したが、 $H_2O_2$ はC3LPを活性化しなかった。すなわち、 $H_2O_2$ 投与により細胞内のC3LP活性が増大したのは、 $H_2O_2$ の直接作用ではなく、下流で作られたアクロレインなどのオキシリピンカルボニルの作用によることが示された。以上の結果から、植物において酸化シグナルの伝達には脂質酸化代謝物とくにRCSが重要な役割を果たしていることを立証した。

植物のROSによる酸化的損傷は、環境ストレス傷害の主因であることが分かっているが、ROSによる細胞損傷の詳細な生化学過程はこれまでほとんど解析されていなかった。本論文では、ROSと膜脂質から派生するRCSがPCDを引き起こす直接的な作用因子であることを、培養細胞および植物個体を用いて明らかにした。また、RCSはきわめてすばやく、C3LPを直接活性化することでPCDを開始させることを明らかにした。以上の成果は、「植物の酸化ストレス傷害」理解に対し、明確な生化学機構を初めて提示したものであり、植物生理学上の重要課題の解明に大きく寄与するものである。本論文は学位論文として要求される水準を十分に満たしている。

