

氏名	新田 育朗 にった いくろう
学位(専攻分野)	博士 (学術)
学位記番号	博乙第151号
学位授与の日付	平成19年3月26日
学位授与の要件	学位規則第3条第4項該当
学位論文題目	クワ葉に存在する巨細胞の微細構造とカルシウム蓄積能力に関する研究 (主査)
審査委員	教授 杉村順夫 教授 遠藤泰久 教授 古澤壽治

論文内容の要旨

申請論文の中核的内容は3章から構成されており、第1章では「巨細胞の葉組織内分布と炭酸カルシウムの蓄積」、第2章では「cell wall sac形成の時系列的構造変化と炭酸カルシウム結晶の局在性」、第3章では「cell wall sacの炭酸カルシウム蓄積能力」について論述している。

緒論において、これまでの植物界における Biominerization (生体内での無機塩類の結晶化) 研究の動向について記述されている。多くの植物種において、シュウ酸カルシウム結晶が細胞の液胞内で蓄積することは広く知られている。その結晶成長は細胞内外の Ca イオン濃度、Ca イオンチャネル、Ca 結合タンパクなどにより高度に制御されていることが明らかになっている。しかし、炭酸カルシム結晶が蓄積する Biominerization 研究は大きく立ち遅れしており、未だその生物学的実態が解明されていない。本論文では、クワ葉における炭酸カルシウム蓄積の「場」の特定化、「場」形成の起源と発達過程、「場」における炭酸カルシウム蓄積能力について解明することを目的とした。本論である第1章から第3章の要旨は以下の通りである。

クワ葉のカルシウム含量は極めて高いが、そのカルシウムは表皮組織にある巨細胞に炭酸カルシウムとして蓄積している。巨細胞での炭酸カルシウム蓄積の「場」は、細胞壁の内膜が陷入して形成される囊状構造体であり、新たに “cell wall sac” と命名した。この sac は “cap” と名づけられたある特定の細胞壁部位から新たに発生し、原基発生期、形態分化期、肥大成長期、成熟期を経て構造形態が完成する。肥大成長・成熟期において、cap 部位から円柱状の柄を介して大きく肥大化した sac 部が形成され、その内部構造はセルロースラメラ由来の微纖維で満たされていた。また、陷入したセルロースラメラで構成された多層構造の compartment 群が出現した。cell wall sac を X 線分析した結果、柄にはケイ素、sac 部にはカルシウムが部位特異的に検出された。cell wall sac 形成に伴う一連の構造変化には細胞壁分解酵素が関わり、細胞壁構造の緩み、細胞壁セルロースラメラの部分分解が生じていると示唆された。

cell wall sac 内での炭酸カルシウム結晶を観察するために、銀による細胞化学的検出法を新たに開発した。その結果、cell wall sac の周縁部では微細な炭酸カルシウム顆粒が観察され、sac 中心部では、纖維構造に沿って粒子サイズの大きい炭酸カルシウム結晶が高密度に蓄積していた。この結晶形態から、amorphous 炭酸カルシウムと同定した。これらの結果は、cell wall sac に充満するセルロース微纖維が炭酸カルシウムの核形成と結晶成長の「場」であることを示している。

一方、酵素的に分離した巨細胞を用いて、cell wall sac に蓄積する最大許容炭酸カルシウム量

が測定された。その結果、cell wall sac 当たり、120 ng 炭酸カルシウムが蓄積しており、極めて高い蓄積能力を具備していた。この高い炭酸カルシウム蓄積量を支えるためには、継続的なカルシウムイオンの流入が必要となる。カルシウム捕捉蛍光試薬により、巨細胞周辺のイオン動態を調べた。その結果、高濃度のカルシウムイオンが cell wall sac の周縁部に滞留し、その中心部ではイオン濃度が低下し、ケイ素を含む柄の先端部および結晶蓄積部ではその濃度は低かった。この cell wall sac におけるイオン勾配パターンから、カルシウムイオンは cell wall sac 周縁部から供給されていると考えられる。すなわち、カルシウムイオンはアポプラスト（細胞壁およびフリースペース）を経由して cell wall sac 周縁部に供給されていることを明らかにした。これらの結果を基に、組織内に流入したイオンが cell wall sac へ到達する経路をモデル化し、炭酸カルシウム結晶の蓄積との関係について言及した。

炭酸カルシウム蓄積の植物生理学的役割として、葉組織におけるカルシウムイオン濃度の調節に関わっていると考えられる。すなわち、導管を通じて根から取り込まれた過剰のカルシウムイオンと気孔から取り込まれた二酸化炭素由来の炭酸イオンが結合することにより、葉体内に滞留する高濃度カルシウムイオンを低下させることに寄与していると推定される。また、amorphous 炭酸カルシウム結晶は水に溶け易く、蓄積された炭酸カルシウムからカルシウムイオンと炭酸イオンが解離すると想定される。葉体内的カルシウムイオン濃度、炭酸イオン濃度に応じて、この可逆的反応が進行すると考えられる。従って、蓄積した炭酸カルシウムはこれらイオンの regulator と考えられる。また、炭酸イオンは重炭酸イオンになり、巨細胞を取り巻く葉肉細胞に転流した後、carbonic anhydrase により二酸化炭素が生成される可能性があり、炭酸カルシウムが二酸化炭素の補給源になると考察した。

論文審査の結果の要旨

これまでの植物における Biominerization 研究は、液胞内に観察されるシュウ酸カルシウム結晶についての研究が中心であり、炭酸カルシウム結晶が蓄積する Biominerization 研究は著しく立ち遅れていた。申請者は、クワ葉に存在する巨細胞の細胞壁を由来とする囊状構造体に炭酸カルシウム結晶が蓄積することを見出し、新たに cell wall sac と命名した。走査型 X 線顕微鏡、EDX-走査電顕、透過電顕および共焦点レーザー顕微鏡を駆使し、cell wall sac の形成プロセス、sac 内部での炭酸カルシウム結晶の成長プロセスと最大許容蓄積量およびカルシウムイオン動態を明らかにした。すなわち、細胞壁の一部が構造変化し、その内膜が細胞内に陥り、大きく肥大化して cell wall sac が形成されることを示した。この細胞学的变化は、セルロース微纖維を接着しているマトリックス多糖類が酵素により部分分解されて細胞壁構造に緩みが生じて形成されると考えられる。この cell wall sac には、炭酸カルシウムとケイ素が部位特異的に蓄積していた。また、sac 内部には、切断・分岐・解離したセルロース微纖維が充満しており、この微纖維に沿って、炭酸カルシウム結晶が配列していた。cell wall sac 形成に伴うこれら一連の Biominerization 過程を微細な構造変化として捉えており、高く評価できる。加えて、巨細胞のみを酵素的に分離する方法を確立し、単一 cell wall sac に蓄積する炭酸カルシウム量を定量化することに成功した。

一方、炭酸カルシウムの結晶化を支えるためのイオン動態をカルシウム捕捉蛍光試薬で追跡し

た。その結果、cell wall sac 周縁部には、高濃度のイオンが滞留し、微細な結晶が形成されていた。このことから、カルシウムイオンはアポプラストから継続的に供給されていると帰結した。このことは、根から取り込まれたカルシウムイオンはアポプラストを経由して、cell wall sac に到達していることを意味しており、葉組織にカルシウムイオンの sorting 機能が存在することを示している。これらの結果を基に、cell wall sac における炭酸カルシウム結晶の蓄積モデルを導いた。本論文の結果は、Biomineralization 研究に新しい情報を提供すると共に、細胞壁に多量のカルシウム塩が蓄積することは新しい発見であり、細胞壁機能に新たな側面を付加するものである。

学位論文は丁寧に作成されており、論理展開およびその論旨も明解であった。本論文の内容は下記の4編の論文が公表あるいは印刷中である。特に、申請者を筆頭著者にした論文が掲載された *Protoplasma* 228巻 第4号の表紙に、研究成果である微細構造写真が採用されたことは特筆される。

- 1) Y. Sugimura and I. Nitta (2007) Cytological changes during cell wall sac formation in mulberry idioblasts. *Protoplasma* (in press).
- 2) I. Nitta, A. Kida, Y. Fujibayashi, H. Katayama and Y. Sugimura (2006) Calcium carbonate deposition in a cell wall sac formed in mulberry idioblasts. *Protoplasma* 228, 201-208.
- 3) Y. Sugimura, T. Mori, I. Nitta, E. Kotani, T. Furusawa, M. Tatsumi, S-I. Kusakari, M. Wada and Y. Morita (1999) Calcium deposition in idioblasts of mulberry leaves. *Annals of Botany* 83, 543-550.
- 4) Y. Sugimura, I. Nitta, Y. Morita, S. Ishikawa, T. Mori, E. Kotani, T. Furusawa (1998) Microscopic detection of calcium deposited in idioblasts of mulberry leaves. *J. Seric. Sci., Jpn* 67, 445-451.