

ふりがな	こみやま さとし
氏名	小宮山 智
学位	博士(農学)
学位記番号	新大院博(農)第61号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	萌芽前低温期間中におけるチューリップの球根貯蔵炭水化物および根集積窒素の代謝

論文審査委員	主査 教授 大山卓爾
	副査 教授 尾和尚人
	副査 教授 三ツ井敏明
	副査 助教授 末吉 邦
	副査 助教授 野中昌法

#### 博士論文の要旨

チューリップは夏期に球根を低温貯蔵し、冬期に温室で栽培することにより促成栽培が可能であり実用化されている。促成栽培のための低温処理により球根リン片内に貯蔵された澱粉の分解が促進されることが認められているがその生理機構については不明な点が多い。本研究では、チューリップ球根リン片における澱粉分解機構について、チューリップの新球肥大時から収穫、低温処理、植え込み、開花までのリン片内の $\alpha$ -アミラーゼ活性および炭水化物成分濃度に対する低温処理の影響について調べた。さらにリン片から部分精製した $\alpha$ -アミラーゼの酵素学的諸性質を調べるとともに、チューリップから、はじめて $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のDNA部分配列の決定に成功した。また、根の窒素代謝に関しては、 $^{15}\text{N}$ を用いて根の上部、下部で吸収と集積が異なるか否かについて検討を行った。

本論文で明らかにされた主要な点は以下の通りである。

##### 1) 萌芽前低温期間中における球根内炭水化物代謝

低温処理区では低温処理期間中リン片のアミラーゼ活性が徐々に高まり、それに伴いリン片中の澱粉の減少とスクロースおよびフラクトオリゴ糖の増加が見られた。定植後、茎葉部の伸長に伴いアミラーゼ活性は急増し、澱粉の分解が加速され、スクロースおよびフラクトオリゴ糖は消費された。対照区でも夏期にリン片新鮮重当りのアミラーゼ活性が上昇したが、これに伴う澱粉の減少および可溶性糖の増加は認められなかった。

植え込み時のリン片組織を光学顕微鏡で観察したところ、対照区ではリン片柔細胞に澱粉粒が密に集積していたが、低温処理区においては澱粉粒の消失した細胞がランダムに存在した。リン片におけるアミラーゼの酵素活性を澱粉薄膜法により検討したところ、低温処理の有無に係わらず澱粉の存在しない表皮部に強い活性が見られた。リン片組織を表皮部と中心部に分割して各々の $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定したところ、対照区では表皮部のみに活性が見られた。これに対し、低温処理区では表皮部だけではなく内側の柔組織の活性も高かった。以上の結果から、低温処理は澱粉を貯蔵しているリン片中心部柔細胞のアミラーゼの活性を誘導し、澱粉を分解すると考えられた。

## 2) 球根リン片 $\alpha$ -アミラーゼの精製と酵素学的諸性質

チューリップ球根リン片中のアミラーゼを部分精製し、その諸性質について検討を行った。部分精製酵素を可溶性澱粉と反応させ、生じた生成糖を薄層クロマトグラフィーで展開し、得られたパターンから本酵素が $\alpha$ -アミラーゼであることが確認された。本酵素を重合度 2 から 7 のマルトオリゴ糖類に反応させると、マルトース、マルトトリオースは分解されず、マルトテトラオース以上の重合度のオリゴ糖が分解された。本酵素は、EGTA によりカルシウムを除くと不可逆的に失活した。カルシウムは温度安定性にも関わっており、最適温度はカルシウム存在下で 75°C であった。カルシウム存在下で 70°C、15 分の熱処理に対し安定であったが、透析により酵素溶液からカルシウムを除くと熱処理により活性が著しく低下した。本酵素に対する他の二価カチオンの影響を検討したところ、2mM の Mg, Fe, Co は活性に影響を与えなかったが、2mM の Cu, Hg は活性を著しく阻害した。本酵素の最適 pH は 5.0 から 5.6 の範囲であり、pH 5.0 から 10.0 の範囲で活性は安定であった。

## 3) 球根リン片 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の解析

チューリップ $\alpha$ -アミラーゼの遺伝子構造を解析するために、動植物および微生物起源 $\alpha$ -アミラーゼのアミノ酸配列から共通配列を検索し、degenerate プライマーを作成して RT-PCR を行った。その結果、 $\alpha$ -アミラーゼの DNA およびアミノ酸配列の一部が判明した。チューリップ由来 $\alpha$ -アミラーゼは他の植物由来 $\alpha$ -アミラーゼだけでなく、哺乳類や微生物とも類似した構造を持つことが示された。

## 4) 萌芽前低温期間中における根集積窒素の代謝

冬期間チューリップの根への窒素の集積について、根上部と根下部を根分けし、それぞれに  $^{15}\text{N}$  標識の硝酸およびアンモニア (+N 培地) を与える処理を行った。根上部 +N 処理区では、根上部に培地由来窒素が多量に集積したのに対し、根下部には培地由来窒素はほとんど取り込まれていなかった。根盤には培地由来窒素が若干取り込まれていたが、リン片、ノーズに含まれる窒素は、大部分が母球由来窒素であった。根下部 +N 処理区においても、根下部には培地由来窒素が多量に集積していたが、他の部位にはほとんど移動していなかった。この結果から、冬期にチューリップの根では、根上部でも根下部ともに窒素を吸収集積すること、硝酸もアンモニアも同様に吸収同化されること、吸収された窒素は吸収された部位からほとんど移動しないことが明らかになった。根内の遊離アミノ酸についてみると、-N 培地では、根上部および根下部における主要なアミノ酸は母球窒素由来の 4-メチレングルタミンであった。+N 培地では、根に培地窒素由来のグルタミンの集積が顕著に認められた。

### 審査結果の要旨

本論分は、新潟県の特産花卉園芸植物であるチューリップの栄養生理について検討を行った。特に、促成栽培のための低温処理が球根貯蔵澱粉の分解を引き起こす機構について、炭水化物成分の変化、および澱粉分解を担う酵素である $\alpha$ -アミラーゼの諸性質、遺伝子解析等を行った。その結果、チューリップリン片内部の柔細胞に貯蔵されている澱粉は、低温処理によって誘導されたその細胞自身の $\alpha$ -アミラーゼによってランダムに分解を受けるという新たな知見を得ることができた。また、チューリップの $\alpha$ -アミラーゼは、他の植物や動物、微生物の $\alpha$ -アミラーゼと類似性が高いことが明らかにされた。また、チューリップは、冬期間、萌芽前に根に窒素を吸収して集積することが明らかにされているが、吸収した窒素は、根の吸収部位から移動し難いことが明かとなった。

研究業績の主要な部分は、筆頭著者として、日本土壤肥科学雑誌、Soil Science and Plant Nutrition に掲載されており、さらに、国際誌である Acta Horticulture に印刷中である。

チューリップの切り花生産や球根生産との関連で、球根貯蔵炭水化物代謝と根集積窒素代謝について、栄養生理、生化学的手法で研究を行ったものであり、博士(農学)がふさわしいと判断した。

よって、本論分は、博士(農学)の論文として十分であると判定した。