

所 属 生物圏生命科学 専攻 氏 名 杉浦 裕幸

審査委員 前川 行幸, 後藤 正和, 梅崎 輝尚

論文題目 アマモ種子および実生の構造、化学組成、発芽時の貯蔵物質利用に関する研究

(要旨本文)

本研究は、海産顕花植物アマモ (*Zostera marina* L.) 種子の発芽メカニズムを形態学的、生化学的 (化学組成および炭水化物異化) および分子生物学的に明らかにし、アマモ種子やその発芽・実生生長について基礎的知見を得ることで、今後のアマモ場造成における種苗生産技術への寄与を目的とした。

#### 1. アマモ保存種子および実生における保護機構

アマモ保存種子の防御機構を把握するため、種子や胚表面の構造と化学組成について調べた。アマモ保存種子は構造的にも化学組成的にも強固で厚い外種皮、脂質を含み内外の溶質移動を制限しうる薄い内種皮に保護されていた。さらに、胚表面は、セルロースとペクチンに富む細胞壁と脂質 (クチン・ワックス) やタンパク質を含むクチクラ層に覆われていた。微細構造観察の限りでは、このクチクラ層は出芽直後の実生においても認められた。しかし、幼芽鞘から出現した第一および第二本葉には、明確なクチクラ層が認められず、これらの表皮細胞には成葉とほぼ同程度の細胞壁の内側への突出とこれに伴う細胞膜の陥入が認められた。したがって、少なくとも保存種子から出芽直後の実生までは、アマモ個体表面のクチクラ層や細胞壁などの表皮構造が様々な環境要因からの保護的役割を主に担っていることが示唆された。

#### 2. アマモ保存種子および発芽過程での主要なオルガネラの特徴・変化

保存種子および発芽過程における形態および微細構造の特徴・変化を調べた。その結果、①胚内部には保存段階から分化が進んだミトコンドリアがあり、この構造が保存段階から見られる呼吸活性や難貯蔵性種子様の性質をよく反映すること、②貯蔵物質として澱粉粒と脂肪粒が存在し、これらは出芽後までには細胞の液胞化とともに減少していくこと、③出芽後の幼芽では、一部の細胞を除いて細胞質が充実し、小胞体やゴルジ体が認められるとともに、表皮細胞では保存種子では認められないプロプラスチドが出現し、膜構造の合成活性向上を示唆した。

#### 3. 脂肪粒の分布および貯蔵脂質の変化

保存種子中の脂肪粒の分布および発芽過程での含有量変化を組織化学的・生化学的に調べた。脂肪粒は胚全体に分布し、少なくとも 3 種の TAGs と 2 種の SEs が含まれ、前者は保存段階から種皮開裂までの間に、後者は種皮開裂から出芽までの間に、それぞれシュート部でのみ顕著に減少した。

#### 4. アマモ $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の単離

保存種子および出芽後の実生から、縮重プライマーを用いて $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の単離を試みた。1 種類の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の一部、約 900bp 断片の単離に初めて成功し、この断片から推定されるアマモの $\alpha$ -アミラーゼのアミノ酸配列は、既知の陸上植物 $\alpha$ -アミラーゼに高頻度で保存されている領域をいずれも保有していた。アミノ酸配列をもとにした進化系統樹からは、単子葉植物よりも双子葉植物に近い位置に分類された。

#### 5. アマモ発芽過程における炭水化物異化

発芽過程での炭水化物異化について貯蔵澱粉量・低分子糖量および澱粉分解関連酵素の活性を調べた。さらに、発芽段階ごとの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現量変化について調べた。

海水中において、アマモ種子を発芽適温である 15°C で培養すると、保存時に僅かに発現している $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現量が種皮開裂前までに急速に増加し、その後種皮開裂時には $\alpha$ -アミラーゼ活性の増加および澱粉量の減少が認められた。さらに、種皮開裂時において $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の向上も認められたが、グルコースを始めとする低分子糖の細胞内への蓄積が見られなかった。したがって、澱粉の分解によって生じたグルコースは即座にエネルギーや細胞の構成成分として利用されていることが示唆された。その後、出芽段階までは $\alpha$ -アミラーゼ活性が持続し、澱粉の分解が継続したが、第一本葉出現後に実生内部、特にシュート部における低分子糖の蓄積が顕著となり、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現量および $\alpha$ -アミラーゼ活性がともに低下し、澱粉の分解が緩やかとなった。

本研究ではアマモ種子の発芽や実生生長には澱粉の分解が必須であり，この炭水化物異化システムの酵素的または遺伝子的レベルでの制御とこれに伴う形態学および生化学的変化，さらにアマモ種子や実生における保護機構をはじめて明らかにすることができた。本研究で得られた知見は，今後のアマモ場造成における種苗生産のための研究に新たな知見を与えるものである。