



Title	質量分析イメージングによる植物種子中のグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化
Author(s)	生田, 宗一郎
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91902
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (生田 宗一郎)	
論文題名	質量分析イメージングによる植物種子中のグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化
論文内容の要旨	
第1章 緒論 生体内の酵素活性の局在を調べることは、生物の生命現象を理解するために重要である。酵素組織化学は、組織切片上において酵素活性の局在を可視化する手法である。この手法は、酵素活性の局在を調査することができるが、酸化還元反応等の反応により発色する人工基質の設計が容易である酵素に標的が制限されるというデメリットがある。近年、酵素活性の局在を可視化する新しい方法として、質量分析イメージング (mass spectrometry imaging: MSI) を、酵素組織化学に応用した手法が開発された。しかし、MSIを用いた酵素組織化学の手法は植物サンプルに対して適用された報告はない。 γ -aminobutyric acid (GABA) は近年人間の健康への寄与が報告されているため、GABA高含有食品が注目されている。さらに植物は種子の発芽段階でGABAを蓄積するが、GABAの役割は明らかにされていない。そこで本研究ではGABAの合成に関わる酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)に注目し、食品としても消費される植物発芽種子におけるGAD酵素活性局在の可視化法を確立することを目的とした。	
第2章 マメ科植物におけるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化 本章では、MSIを用いた酵素組織化学手法を植物にも適用可能かを検討するために、マメ科植物発芽種子中のGADを対象とし、MSIを用いた酵素組織化学手法の開発を目的とした。種子サンプルとして、モデル植物や食品としても幅広く利用されているダイズ (<i>Glycine max</i>) とアルファルファ (<i>Medicago sativa</i>) を用いた。研究手法として、まずMSIを用いたダイズ発芽種子切片上に基質として重水素標識グルタミン酸をスプレー噴霧により試料表面へ塗布し重水素標識GABAを検出することでGADによる酵素反応を確認した。次に酵素反応条件の最適化をおこなった後に、根部と子葉部を分離し抽出分析を用いてMSI結果の評価をおこなった。さらに、組織特異的なGAD活性の局在を調査した。最後に、アルファルファの発芽種子において本手法の適用可能性を確認した。結果、MSIを用いた酵素組織化学法により、ダイズ種子におけるGAD活性の局在を可視化することに初めて成功し、ダイズの組織内のGAD活性の分布が明らかになった。さらに組織の分離・回収が困難なアルファルファ内の組織間のGAD活性の局在を可視化することに成功し、本手法の拡張性を示すことに成功した。	
第3章 塩分ストレスによるオオムギ発芽種子中のグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化 GABAは、植物において様々な環境ストレスに応答して植物に蓄積する。GABA合成に関わるGADもストレス応答に大きく関わっており、塩分ストレスによって発芽過程でGAD活性値が増加することが報告されている。しかし、塩分ストレスが植物種子のどの組織でGAD活性に影響するのかは明らかにされていない。そこで、オオムギ種子中の塩分ストレスによる部位特異的なオオムギ種子のGAD活性局在への影響を調査することを目的とした。研究手法として、まず抽出分析を用いて発芽段階で塩分ストレスによるGAD活性に対する影響を調査した。次にMSI分析による発芽種子中のGAD局在可視化のための酵素反応条件の検討をおこなった後に、異なる発芽段階における塩分ストレスに曝露された発芽種子におけるGAD活性局在の分布を調査した。さらに種子の胚、糊粉層における塩分ストレスによるGAD活性への影響を調査した。本研究により、塩分ストレスによってオオムギ発芽種子でGAD活性が増加し、その増加が主に種子胚におけるGAD相対活性の増加によることが明らかとなった。さらに抽出分析では分離が難しく、酵素活性の測定が困難な糊粉層において塩分ストレスを曝露された種子でより高いGAD活性を検出することに成功した。	
第4章 総括と展望 本研究はMSIによる酵素組織化学手法を植物サンプルに応用し、双子葉植物であるマメ科植物のダイズ種子とアルファルファ種子、単子葉植物であるオオムギ種子中のGAD活性の局在を可視化する手法を確立することに初めて成功した。また、この手法を塩分ストレスに曝露されたオオムギの発芽種子におけるGAD活性の可視化に適用した。本手法を応用することで、GADが植物の発芽過程や塩分ストレスに対してどのように寄与しているかの解明し、GABA高生産メカニズムの一端を解明できることが期待される。最終的にはGABA高含有食品の開発につながる可能性がある。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

	氏名 (生田宗一郎)	
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査 教授 福崎英一郎 副査 教授 村中俊哉 副査 教授 藤山和仁	

論文審査の結果の要旨

生体内の酵素活性の局在を調べることは、生物の生命現象を理解するために重要である。従来の酵素組織化学的手法において組織切片上で酵素活性の局在を可視化する場合、酸化還元反応等の反応により発色する人工基質の設計が容易である酵素に標的が制限されるというデメリットがある。近年、酵素活性の局在を可視化する新しい方法として、質量分析イメージング (mass spectrometry imaging: MSI) を、酵素組織化学に応用した手法が開発された。しかし、MSI を用いた酵素組織化学の手法は植物サンプルに対して適用された報告はない。 γ -aminobutyric acid (GABA) は、近年人間の健康への寄与が報告されているため、GABA 高含有食品が注目されている。さらに植物は種子の発芽段階で GABA を蓄積するが、GABA の役割は明らかにされていない。そこで本論文では GABA の合成に関わる酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) に注目し、食品としても消費される植物発芽種子における GAD 酵素活性局在の可視化法を確立することを目的としている。

第 2 章において、MSI を用いた酵素組織化学手法を植物にも適用可能かを検討するために、マメ科植物発芽種子中の GAD を対象とし、MSI を用いた酵素組織化学手法の開発結果を報告している。種子サンプルとして、モデル植物や食品としても幅広く利用されているダイズ (*Glycine max*) とアルファルファ (*Medicago sativa*) を用い、MSI を用いた発芽種子切片上に基質として重水素標識グルタミン酸を試料表面へ塗布し重水素標識 GABA を検出することで GAD による酵素反応を確認し概念立証に成功した。開発した方法を用いて、ダイズ種子における GAD 活性の分布を初めて明らかした。さらに組織の分離・回収が困難なアルファルファ内の組織間の GAD 活性の局在を可視化することに成功し、本手法の拡張性を示すことに成功したことを報告している。また、第 3 章において、本研究で開発した手法の有用性を報告している。GABA 生合成に関わる GAD はストレス応答に大きく関わっており、塩分ストレスによって発芽過程で GAD 活性値が増加することが報告されている。しかし、塩分ストレスが植物種子のどの組織で GAD 活性に影響するのかは明らかにされていない。そこで、オオムギ種子中の塩分ストレスによる部位特異的なオオムギ種子の GAD 活性局在への影響を調査することを目的とした。結果として、塩分ストレスによってオオムギ発芽種子で GAD 活性が増加し、その増加が主に種子胚における GAD 相対活性の増加によることが明らかとなった。さらに抽出分析では分離が難しく、酵素活性の測定が困難な糊粉層において塩分ストレスを曝露された種子でより高い GAD 活性を検出することに成功したことを報告している。本論文は MSI による酵素組織化学手法を植物サンプルに応用し、双子葉植物であるマメ科植物のダイズ種子とアルファルファ種子、単子葉植物であるオオムギ種子中の GAD 活性の局在を可視化する手法を確立することに初めて成功した。また、本手法を応用することで、GAD が植物の発芽過程や塩分ストレスに対してどのように寄与しているかの解明し、GABA 高生産メカニズムの一端を解明できることが期待される。最終的には GABA 高含有食品の開発につながる可能性がある。よって本論文は博士論文として価値のあるものと認める。