

審査の結果の要旨

氏名 有賀 智子

本論文は、高等植物の鉄 (Fe) 栄養生理に大きく関与している化合物である Fe(III)キレーター (FIC) に着目し、操作が簡便な HPLC ポストカラム法を応用して FIC を高感度かつ網羅的に分析できる新規分析法の開発を行ったものである。また、開発した FIC 分析法を応用して高等植物導管液中の Fe の化学形態を明らかにしている。本論文は 5 つの章からなる。

第 1 章の序論では、高等植物の必須元素である Fe の生体内での役割や根からの Fe の吸収・輸送のメカニズムについて説明し、高等植物体内における Fe 栄養生理には FIC が大きく関与していることを述べている。さらに、FIC の従来の分析法の問題点についても総括すると共に FIC を高感度かつ網羅的に分析できる分析法の必要性について述べており、次章以降の導入の役割を果たしている。

第 2 章では、蛍光検出による HPLC ポストカラム法を応用して新規の FIC 分析法を開発している。FIC の検出には、カルセインブルー (CB) と呼ばれる蛍光試薬が用いられている。CB は Fe(III)と錯体を形成し消光する性質を持つ。Fe(III)と結合し消光した状態の Fe(III)-CB 錯体を含むポストカラム溶液と、カラムによって分離された試料中の FIC を反応コイル内で反応させた。Fe(III)-CB 錯体中の Fe(III)と FIC が結合することで CB が遊離し、その際の脱消光で生じる蛍光を蛍光検出器で検出している。検出感度を左右すると考えられる分析条件について最適化を行った結果、実際にいくつかの FIC が検出可能であり、代表的な FIC であるクエン酸の検出限界も 72 pmol と良好であった。また、FIC と Fe(III)との結合定数 $\log K_{ML}$ と、検出感度を示す数値であるピーク高さ/濃度 (VM) の間には直線的な関係が見出されたことを示しており、この分析法は従来法とは異なり Fe(III)とのキレート能に応じて FIC を選択的に検出できる新規な分析法であることを示している。

第 3 章では、ルミノールを用いた化学発光検出による HPLC ポストカラム法を応用して、極高感度な FIC 分析法の開発を行っている。ルミノールは酸化補助剤の存在下で過酸化水素 (H_2O_2) により酸化され化学発光を発する性質を持つ。分析試料中の Fe(III)-FIC 錯体を

カラムで分離し、ルミノールと H_2O_2 を含むポストカラム溶液とを反応コイル内で反応させた。Fe(III)-FIC は酸化補助剤としての活性を有するため、Fe(III)-FIC の共存下でルミノールが H_2O_2 によって酸化されることで生じる化学発光を化学発光検出器で検出している。検出感度を左右すると考えられる分析条件について最適化を行った上で Fe(III)-FIC の検出限界を求めると、Fe(III)-EDTA では 0.25 pmol、Fe(III)-Cit では 2.3 pmol、植物由来の代表的な FIC であるニコチアミン-Fe(III)錯体では 1.1 pmol であった。これは、従来法の検出感度と比較すると 3 桁向上しており、この分析法は世界一高感度な FIC 分析法であることを示している。

第 4 章では、第 3 章で開発した FIC 分析法を用いてイネ科植物および非イネ科植物導管液中の FIC 分析を行っている。HPLC クロマトグラム上にはいくつかの Fe(III)-FIC 由来のピークが検出された。ピークの中でも、全ての植物種で共通していたピーク (P_{25}) の溶出時間に相当する画分を分取し ESI-TOF-MS 分析を行ったところ、その画分から $\text{Fe}_3\text{-Cit}_3$ 錯体 (m/z 366.46) が検出された。 P_{25} はイネ科植物導管液では主要なピークではなかった一方で、非イネ科植物では主要なピークであったことから、 $\text{Fe}_3\text{-Cit}_3$ は非イネ科植物導管液中の主要な Fe の化学形態であることを示した。また、オオムギ導管液にのみ現れたピーク (P_{32}) のフラクションを分取して ESI-TOF-MS 分析を行った結果、デオキシムギネ酸 (DMA、 m/z 305.13) が検出された。 P_{32} は Fe 充足オオムギから採取した導管液においては主要なピークではなかったが、Fe 欠乏オオムギから採取した導管液では全体の 18% を占める主要なピークであったことから、DMA は特に Fe 欠乏状態においてオオムギ導管液中の主要な FIC として機能していることを示唆した。

第 5 章は総合考察であり、第 2 章と第 3 章で開発した FIC 分析法が今後、植物栄養や植物生理の分野におけるどのような研究に応用可能かを具体的に考察している。

以上、本研究は新規の FIC 分析法を開発した上で、実際にこの分析法が高等植物の Fe 栄養生理に関わる FIC の分析に応用可能であることを示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。