

学 位 論 文 題 名

低温ストレスに対する高等植物の情報発現

学位論文内容の要旨

本論文は和文64頁，図26，表2，引用文献124，10章からなり，他に参考論文6編が添えられている。

低温度は種々の生物に代謝上での影響を与える。北方圏に生育している高等植物は低温環境下でも生存することができるが，このようなストレス条件下における植物の生存のメカニズムはまだ明らかにされておらず，この問題を解決するためにいくつかの研究が為されてきた。

冬期間に過酸化物質除去系に関与する一連の酵素活性の増加することがいくつかの植物において知られている。これらの報告は冬期または低温処理により植物細胞内で過酸化物質の濃度が増加することを示唆している。

本論文では低温処理と活性酸素種の生成との関連を明らかにし，低温環境下での活性酸素種の役割について論じた。

第1章では現時点までの関連研究の歴史と本研究の目的について記し，第2章から第5章までは研究内容と意義について，また第6及び7章では総合的な考察を行っている。

第2章では秋播小麦の葉において低温及び人工的な過酸化処理を与えた場合の酵素活性及び基質濃度の変化について論じている。人工的な過酸化処理は，クロロプラスト内で作用するパラコートまたは細胞質で作用すると考えられるアミノトリアゾール処理により行い，各処理に対する酵素活性や基質濃度の変化からそれぞれの特徴と共通点を示している。低温処理を含めて全ての処理においてグルコース6 磷酸脱水素酵素の活性と糖磷酸エステルの濃度の増加が認められた。これに対してアスコルビン酸とグルタチオンの濃度は処理によって異なる挙動を示した。そしてこれらの結果から過酸化物質に対する応答が細胞質，ミトコンドリア及びクロロプラストでは異なることを示唆している。

第3章では秋播小麦の葉を低温処理した場合，過酸化水素が生成することについて報告している。過酸化水素の濃度は低温処理により数分以内にコントロールの3倍（ $1.5\mu\text{mol/g fresh weight}$ ）に増加し，15～20分後にはもとのレベルに戻った。この結果は低温処理によって過酸

化物が生じ、細胞内が一時的に酸化状態になることを直接的に示している。また光照射下の小麦の葉組織を暗所に移すことによって、処理後1分間程度の間に過酸化水素の濃度が照射していた場合の4分の1程度に低下することも明らかにしている。このことは光合成をする際に過酸化水素が生成していることを示している。さらにキュウリの子葉についても同様な低温処理によって過酸化水素が生じることを示し、この現象が特別な植物において起こる現象ではなく、一般的に起こる可能性を示唆している。

第4章では非光合成組織である秋播小麦の茎組織を用いて、同様に低温処理により過酸化水素濃度が一時的にコントロールの5倍に高まり、その後オシレーション形式で過酸化水素の濃度が変化すること、同時期にアスコルビン酸と還元型グルタチオンの濃度が減少し、デヒドロアスコルビン酸の濃度が増加することを示している。暗所での低温処理により過酸化水素が生成することは、積雪下のような光合成を行っていない状態でも細胞の酸化が起こることを意味し、アスコルビン酸とグルタチオンの濃度変化はこのことを直接的に裏付けいる。さらに KCN や NaN_3 による処理でミトコンドリアの電子伝達系を阻害した場合には、低温処理と同様に過酸化水素が生成し、続いてオシレーション現象が見られること、また酸化的リン酸化の脱共役剤で処理した場合は、さらに低温処理を行っても過酸化水素の生成が見られなくなることを明らかにしている。この結果から、低温処理による過酸化水素の生成は、低温度によって急激にミトコンドリアの電子伝達が阻害され、リークした電子が細胞中の酸素分子と結合することにより superoxide を生じ、superoxide の不均化反応及びアスコルビン酸等による還元反応により過酸化水素が生じることを示している。

第5章では低温処理により細胞内でヒドロキシルラジカルが生じることを示している。ヒドロキシルラジカルは、遺伝子や細胞膜等にダメージを与える非常に反応性の高いラジカルとして知られており、細胞内では過酸化水素から生成する。小麦の茎組織を暗所で低温処理した場合、 -5°C 処理からヒドロキシルラジカルの生成が認められ、処理温度の低下にともなって生成量が増加し、 -20°C 処理では処理後数分以内に著量 ($0.3\mu\text{mol/g}$ fresh weight 以上) のヒドロキシルラジカルが生成することを明らかにしている。このことは低温処理による細胞のダメージがヒドロキシルラジカルにより生じている可能性を強く示唆する結果である。ヒドロキシルラジカルの捕捉剤である dimethyl sulfoxide (DMSO) が、細胞の凍結傷害の保護剤として有効であることが古くから知られており、ここで得られた結果は DMSO の役割を直接的に示したものであり、細胞の低温による傷害の原因を明らかにする上で非常に重要な知見になると考えられる。

第6章及び第7章では、それぞれ低温処理の際の細胞内での活性酸素種の生成と消去について、

実験結果に基づいて総合的な考察を行い、低温ストレスに対し細胞がどのような機構で活性酸素種を生成、または消去し、この反応の生理的意味について幅広く論じている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 匂 坂 勝之助

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 水 谷 純 也

本論文は和文64頁、図26、表2、引用文献124、10章からなり、他に参考論文6編が添えられている。

冬期間に過酸化物除去系に関与する一連の酵素の活性の増加することがいくつかの植物において知られている。これらの報告は冬期または低温処理により植物細胞内で過酸化物の濃度が増加することを示唆している。

本論文では低温処理と活性酸素種の生成との関連を明らかにし、低温環境下での活性酸素種の役割について論じた。

第1章では現時点までの関連研究の歴史と本研究の目的について記している。

第2章では秋播小麦の葉において低温及び人工的な過酸化処理を与えた場合の酵素活性及び基質濃度の変化について論じている。人工的な過酸化処理は、クロロプラスト内で作用するパラコートまたは細胞質で作用するアミノトリアゾール処理により行い、各処理に対する酵素活性や基質濃度の変化からそれぞれの特徴と共通点を示している。全ての処理においてグルコース6 磷酸脱水素酵素の活性と糖磷酸エステルの濃度の増加が認められた。これに対してアスコルビン酸とグルタチオンの濃度は処理によって異なる挙動を示した。これらの結果から過酸化物に対する応答が細胞質、ミトコンドリアおよびクロロプラストでは異なることを示唆している。

第3章では秋播小麦の葉を低温処理した場合、過酸化水素が生成することについて報告している。過酸化水素の濃度は低温処理により数分以内にコントロールの3倍 ($1.5 \mu\text{mol/g fresh weight}$) に増加し、15~20分後にはもとのレベルに戻った。また光照射下の小麦の葉組織を暗所に移すことによって、処理後1 分間程度の短期間に過酸化水素の濃度が照射していた場合の4分の1程度に低下することも明らかにしている。このことは光合成をする際に過酸化水素が生成

していることを示している。さらにキュウリの子葉についても同様に低温処理によって過酸化水素が生じることを示し、この現象が特別な植物において起こる現象ではなく、一般的に起こる可能性を示唆している。

第4章では非光合成組織である秋播小麦の茎組織を用いて、同様に低温処理により過酸化水素濃度が一時的にコントロールの5倍に高まり、その後オシレーション形式で過酸化水素の濃度が変化すること、同時期にアスコルビン酸と還元型グルタチオンの濃度が減少し、デヒドロアスコルビン酸の濃度が増加することを示している。暗所での低温処理により過酸化水素が生成することは、積雪下のような光合成を行っていない状態でも細胞の酸化が起こることを意味し、アスコルビン酸とグルタチオンの濃度変化はこのことを直接的に裏付けている。さらに KCN や NaN_3 による処理でミトコンドリアの電子伝達系を阻害した場合には、低温処理と同様に過酸化水素が生成し、続いてオシレーション現象が見られること、また酸化的リン酸化の脱共役剤で処理した場合は、さらに低温処理を行っても過酸化水素の生成が見られなくなることを明らかにしている。この結果は、低温処理による過酸化水素の生成は、低温度によって急激にミトコンドリアの電子伝達が阻害され、リークした電子が細胞中の酸素分子と結合することにより superoxide を生じ、superoxide の不均化反応及びアスコルビン酸等による還元反応により過酸化水素が生じることを示唆している。

第5章では低温処理により細胞内でヒドロキシルラジカルが生じることを示している。ヒドロキシルラジカルは、非常に反応性の高いラジカルとして知られており、細胞内では過酸化水素から生成する。小麦の茎組織を暗所で低温処理した場合、 -5°C 処理からヒドロキシルラジカルの生成が認められ、処理温度の低下にともなって生成量が増加し、 -20°C 処理では処理後数分以内に著量 ($0.3\mu\text{mol/g}$ fresh weight 以上) のヒドロキシルラジカルが生成することを明らかにしている。この結果は、低温処理による細胞のダメージがヒドロキシルラジカルにより生じている可能性を強く示唆する結果である。またヒドロキシルラジカルの捕捉剤である dimethylsulfoxide (DMSO) が、細胞の凍結傷害の保護剤として有効であることが知られており、ここで得られた結果は DMSO の役割を直接的に示しており、細胞の低温による傷害の原因を明らかにする上で非常に重要な知見になると考えられる。

第6章および第7章では、それぞれ低温処理の際の細胞内での活性酸素種の生成と消去について、実験結果に基づいて総合的な考察を行い、低温ストレスに対し細胞がどのような機構で活性酸素種を生成、または消去し、この反応の意味について幅広く論じている。

以上の研究報告は、高等植物の低温傷害と低温耐性について重要な知見を与える報告であり、

よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者奥田徹は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。