学位論文題名

低温環境下に於ける秋播小麦のタンパク質代謝

学位論文内容の要旨

本論文は和文115頁、図41、表14、全7章より構成され、末尾に英文による要約及び参考文献63が付されている。また、別に参考論文6編が添えられている。

北海道のような寒冷地に生育する高等植物の多くは低温にさらされると迅速に順化し、越冬が可能な状態となる。冬期間、植物が直面する温度環境は大きく分けて二種類、即ち積雪で保護されるために凍害の恐れのない0℃付近の環境、及び気温の変化に直接さらされて凍害を受ける恐れのある環境に分けることが出来る。0℃付近の非凍結温度下で貯蔵養分を消費しながら長期間にわたり生存する能力（耐寒性）と凍害から細胞を護る能力（耐凍性）とが全く同じ生理機能によってもたらされているとは考えにくく、これらはそれぞれ別個の機能であると考えられる。積雪下に於ける越冬能力を解析する場合、この環境での貯蔵物質の代謝機能を検討することは重要な課題であると考えられる。それは、越冬の全期間にわたって、全ての植物は秋から初冬にかけて蓄えた貯蔵物質を用いて生存することを余儀なくされるからである。このことは、低温環境下に於ける糖代謝をはじめとする細胞内基質代謝、及び細胞内で最もエネルギーを必要とする反応であるタンパク質合成と直接関連する問題である。本論文は、秋播小麦の越冬能力について糖代謝（第2章）、代謝系の酵素活性の変動（第3章）、及び細胞の構造（第4章）等を検討した後、更にタンパク質代謝活性の変動（第5、6章）という面から考察したものである。

1. 越冬能力の異なる秋播小麦の二品種、ホロシリコムギ（耐寒性、強）及び農林61号（耐寒性、弱）を用い積雪下に於ける細胞内基質代謝活性の変動を比較した。即ち、10月から翌年の4月までの炭水化物、糖磷酸エステル、グルタチオン、アミノ酸、無機イオン、及び浸透圧の各レベルの変動を調べた結果、貯蔵炭水化物の消費速度はホロシリコムギの茎では2月16日から3月16日にかけて、 1.3 ないし $1.7 \mu\text{mol}$ ヘキソース g^{-1} fresh weight d^{-1} であるのに対して農林61号の茎では12月26日から1月18日にかけて $10 \mu\text{mol}$ ヘキソースであった。この違いは積雪下に於いて要求される基本的なエネルギー及び物質を供給する一連の代謝機能の差に起因するものと考えられ、越冬能力の差と密接に関係しているものと思われた。グ

ルコース 6 磷酸及びグルタチオン等の細胞内基質を機能的なレベルに長期間維持する傾向は両品種に共通した傾向であった。この傾向は貯蔵炭水化物量が植物体の再生長能力及び浸透圧調節機能に重大な影響を及ぼすレベルまで減少しても続いていた。

2. 越冬中のタンパク質濃度と酵素活性の変動をホロシリコムギ及び農林61号の葉、茎、及びクラウンについて調べた結果、低温環境下に於けるタンパク質合成活性が品種によって大きく異なることが示された。酵素活性の測定結果より、両品種の茎で、過酸化物除去に関与する酵素と考えられる hexokinase, glucosé-6-phosphate dehydrogenase, dehydroascorbate reductase, ascorbate peroxidase 等の活性が低温順化期に高まること、及び積雪下での越冬期間の後期である 3 月下旬から 4 月初旬にかけてライフサイクルの進行に伴う酵素活性の変動が起こっていることが示された。これらの変動は環境の変化に適応するための組織特異的な応答であると考えられた。
3. ホロシリコムギ及び農林61号のクラウンを用いて、これらが越冬期間中に示す細胞内微細構造の変動を電子顕微鏡を用いて追跡した結果、まずホロシリコムギにおける微細構造の変動は 4 つの相に分割することが示された。すなわち第 1 相は、秋における活発な成長期であり、第 2 相は地表が雪に覆われる 12 月より始まり、第 3 相は 1 月下旬より始まる。そして、第 4 相は人工的に越冬環境を継続した場合の 6 月に観察される。農林61号においては、ホロシリコムギにみられた第 2 相及び 3 相は全く見られず、成長期から直接第 4 相に移行するものと思われた。第 2 相及び 3 相にみられる微細構造は農林61号とは対照的に貯蔵炭水化物の浪費を伴わないことが推察されるものであり、従ってホロシリコムギでは越冬中へキソースの消費量を節約することが出来ることが考えられた。生存の限界時期（農林61号では 2 月下旬、ホロシリコムギでは人工的な越冬環境を加えて 8 月まで）には両品種の細胞で同様に原形質分離が観察された。
4. 秋播小麦の低温順化初期は、4 相より構成されるタンパク質代謝活性からなり、主な変動はおよそ一週間の低温処理により完了することが示された。第 1 相は、低温処理開始後 5 時間から 11 時間未満のラグフェーズ、第 2 相は処理 12 時間から 1 日までの低温誘導性タンパク質の活発な合成誘導及び一部の既存タンパク質の合成停止或いは合成活性の調節を行う期間。第 3 相は処理 1 日から 5 日目までの低温誘導性タンパク質の合成が主として進行する時期、及び、第 4 相は処理 7 日以降の定常期であった。実験に用いた苗の耐凍性は処理 7 日目から 9 日目に最大値を示したが、処理 11 日目には、急激に低下した。低温誘導性タンパク質の蓄積レベルは処理 5 日目には最大に達していて、その後処理 11 日目にも高いレベルを維持

していたことから、耐凍性獲得と低温誘導性タンパク質との関係が間接的であることが示唆された。耐寒性の異なる秋播小麦でも低温順化初期のタンパク質代謝に相特異性のあることが示された。耐寒性の高い品種（ホロシリコムギ及びムカコムギ）と耐寒性の低い品種（農林61号及びシロガネコムギ）の間で次のような異なるタンパク質合成活性の違いが見いだされた。即ち、第4相でのタンパク質合成活性は耐寒性の高い品種では、低温誘導性タンパク質に偏ったものであるのに対して、耐寒性の低い品種では大きな偏りがみられなかった。これは、低温環境下で無益な代謝を行わないことが、貯蔵炭水化物の浪費を抑え、結果として耐寒性の維持に貢献しているというという本論文の提出者の作業仮説と一致するものであった。同時にこの結果は耐寒性の高い品種でのみ、タンパク質合成活性にこのような偏りをもたらすシグナル伝達が長時間にわたって可能であることを示唆するものであった。また、耐寒性の低い品種で主要な低温誘導性タンパク質であるC10b及びC12bの合成活性が低いこと及び、C12cの合成活性がほとんどないことが示され、耐寒性を維持する機能に関連している可能性について考察が加えられた。

5. 秋播小麦のクラウン組織を一酸化窒素（NO）及び過酸化水素（ H_2O_2 ）によって処理することにより、2種の低温誘導性タンパク質（C1及びC2）の合成が誘導された。またNO処理によって低温処理により合成活性が低下する9種の既存タンパク質（d5, d12よりd15, 及びd25よりd28）及び合成活性が一時的に低下する1種のタンパク質（pt9）の合成活性が低下した。同様に H_2O_2 によって合成活性が低下する9種のタンパク質（d3, d6, d7, d12, d16, d17, 及びd26よりd28）及び合成活性が一時的に低下する1種のタンパク質（pt5）の合成活性が低下した。低温処理とこれらラジカル及び過酸化物による処理によって、共通するタンパク質の誘導的合成及び、合成活性の低下が起こることは、低温順化時に於ける遺伝子発現の誘導や抑制にラジカル及び過酸化物が関与することを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 匂 坂 勝之助
副 査 教 授 但 野 利 秋
副 査 教 授 本 間 守

本論文は和文115頁，図41，表14，全7章より構成され，末尾に英文による要約及び参考文献63が付されている。また，別に参考論文6編が添えられている。

北海道のような寒冷地に生育する高等植物の多くは低温にさらされると迅速に順化し，越冬が可能な状態となる。越冬能力とは，0℃付近の非凍結温度下で貯蔵養分を消費しながら長時間にわたり生存する能力（耐寒性）と凍害を避け得る能力（耐凍性）の複合したものであり，これらはそれぞれ別個の機能であると考えられる。越冬能力について解析する場合，積雪下での貯蔵物質の代謝機能を検討することは重要な課題であると考えられる。それは，越冬中全ての植物は秋から初冬にかけて蓄えた貯蔵物質を用いて生存することを余儀なくされるからである。このことは，低温環境下に於ける細胞内基質代謝，及び細胞内で最もエネルギーを必要とする反応であるタンパク質合成と直接関連する問題である。本論文は，秋播小麦の越冬能力について糖代謝，代謝系の酵素活性の変動，細胞構造の変動，及びタンパク質代謝活性の変動という面から考察したものである。

1. ホロシリコムギ（耐寒性，強）及び農林61号（耐寒性，弱）を用い積雪下に於ける細胞内基質代謝活性の変動を比較した。即ち，10月から翌年の4月までの炭水化物，糖磷酸エステル，グルタチオン，アミノ酸，無機イオン，及び浸透圧の変動を調べた結果，貯蔵炭水化物の消費速度はホロシリコムギの茎では1.3ないし1.7 μmol ヘキソース $\text{g}^{-1}\text{fresh weight d}^{-1}$ （2月16日から3月16日）であるのに対して農林61号の茎では10 μmol ヘキソース（12月26日から1月18日）であった。この違いは積雪下に於ける一連のエネルギー代謝機能の差に起因するものであり，越冬能力の差と密接に関係しているものと思われた。グルコース6磷酸及びグルタチオン等の細胞内基質は両品種で生存の限界時期まで機能的なレベルを維持した。
2. 越冬中のタンパク質濃度と酵素活性の変動をホロシリコムギ及び農林61号の葉，茎，及びクラウンについて調べた結果，低温環境下に於けるタンパク質合成活性が品種によって大きく異なることが示された。酵素活性の測定結果より，両品種の茎で，過酸化物質除去に関与す

る酵素と考えられるペントースリン酸回路及びアスコルビン酸代謝系等の酵素活性が低温順化期に高まることが示された。これらの変動は環境の変化に適応するための組織特異的な応答であると考えられた。

3. ホロシリコムギ及び農林61号のクラウンが越冬期間中に示す細胞内微細構造の変動を電子顕微鏡を用いて追跡した結果、ホロシリコムギに於いて変動は4相に分けられることが示された。即ち第1相は、秋の活発な成長期であり、第2相は積雪下の12月より、第3相は1月下旬より始まる。そして、第4相は人工的に越冬環境を継続した場合の6月に観察される。農林61号に於いては、第2相及び3相は全く見られず、成長期から直接第4相に移行するものと考えられた。第2相及び3相の微細構造は農林61号とは対照的に貯蔵炭水化物の浪費を伴わないことが推察されるものであり、従ってホロシリコムギでは越冬中、ヘキソースの消費量が少ないものと考えられた。生存の限界時期（農林61号では2月下旬、ホロシリコムギでは人工的な越冬環境を加えて8月まで）には両品種の細胞で同様に原形質分離が観察された。

4. 秋播小麦の低温順化初期は、4相より構成されるタンパク質代謝活性からなり、主な変動はおよそ一週間の低温処理により完了することが示された。第1相は、低温処理開始後5時間から11時間未満のラグフェーズ、第2相は処理12時間から1日までの低温誘導性タンパク質の合成誘導及び一部の既存タンパク質の合成低下期。第3相は処理1日から5日目までの低温誘導性タンパク質の合成が主として進行する時期、及び、第4相は処理7日以降の定常期であった。また、耐凍性獲得と低温誘導性タンパク質との関係が間接的であることが示唆された。

耐寒性の異なる秋播小麦でも低温順化初期のタンパク質代謝に相特異性のあること、及び耐寒性の高い品種ほど第4相でのタンパク質合成活性が低温誘導性タンパク質に偏っていることが示された。これは、低温環境下で無益な代謝を行わないことが、貯蔵炭水化物の浪費を抑え、耐寒性の維持に貢献しているという本論文の提出者の作業仮説と一致するものであった。同時にこの結果はタンパク質合成活性にこのような偏りをもたらすシグナル伝達に品種による差が存在することを示唆するものであった。また、耐寒性の低い品種で、低温誘導性タンパク質、C10b及びC12bの合成活性が低いこと及び、C12cの合成活性がほとんどないことが示され、耐寒性を維持する機能に関連している可能性について考察が加えられた。

5. 秋播小麦のクラウン組織を一酸化窒素（NO）及び過酸化水素（ H_2O_2 ）によって処理す

ることにより、2種の低温誘導性タンパク質（C1及びC2）の合成が誘導された。またNO処理、H₂O₂処理、及び低温処理によって合成活性が低下する共通のタンパク質の存在が認められた。これらの結果は低温順化時に於ける遺伝子発現の調節にラジカル及び過酸化物が関与することを示唆している。

以上、本研究はこれまで断片的にしか知られていなかった高等植物の越冬能力のしくみについて、細胞内基質代謝、物質代謝系、及び細胞内微細構造のそれぞれのレベルから知見を得、これに遺伝子発現のレベルから一貫した説明付けを行ったものであり、今後関連分野の研究にも寄与するところが大きいものと思われる。よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者松田祐介は博士（農学）学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。