

学 位 論 文 題 名

果樹の耐凍性と凍害に関する生理・生化学的研究

学位論文内容の要旨

本論文は、総頁数 197で和文で記され、図55、表19を含み、内容は緒論、本論、摘要、引用文献 255からなり、末尾に英文要約が付されている。また、別に参考論文19編が添えられている。

果樹は永年性作物で、果実生産が目的であり、所期の目的を達成するためには樹体の越冬が必要である。したがって、寒冷地では果樹の寒冷適応機構の解明が障害的寒冷害及び凍害を克服し、安定生産を図る上で重要な課題となっている。植物の寒冷適応現象に関しては生化学領域から超微形態学まで多分野にわたって検討されているが、まだそれらの機構を根本的に理解できる段階には至っていない。

本論文は、果樹の寒冷適応機構に関与する要因として過酸化物代謝と細胞構造に着目し、リンゴの枝、花芽及びリンゴ培養カルスを用いて、耐凍性と過酸化物分解機能の関係、種間の耐凍性差及び耐凍性変動と過酸化物代謝の関係、耐凍性と細胞内微細構造の関係、凍害と活性酸素の関係及び耐凍性の培養細胞における発現について検討を行い、その成果をとりまとめたものである。

第1章では、リンゴの枝及び花芽における耐凍性とグルタチオン（GSH）とアスコルビン酸を基質とする過酸化物分解機能—グルコース—6—リン酸脱水素酵素（G6PDH）、デヒドロアスコルビン酸還元酵素（DHARD）、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（AsAPOD）及びグルコース—6—リン酸（G6P）等を含む—との関係について述べている。花芽と枝の皮層部及び木部において、過酸化物分解機能は耐凍性の大きさと平行して変動すること、さらに、過酸化物分解機能は霜によって誘導され、その後耐凍性が高まることを認め、過酸化物分解機能の高進が耐凍性増大の原因であることを論述している。また、培養カルスを用いた実験においても、過酸化物分解機能は耐凍性増大と平行して変動することを見だし、過酸化物分解機能が耐凍性増大に重要な役割を果たしていることを示している。

第2章では、リンゴの枝及び花芽における過酸化物の生成系であるプラスチド、ミトコンドリア及びミクロソームにおける電子伝達系のNADH-Cyt c還元酵素（NADH-CcR）とCyt c酸化酵素（CcO）活性の季節変化を調べ、これらの2つの酵素活性は花芽、枝の皮層部及び木部のいずれにおいても冬季に高く、越冬中の細胞では低温下でも活性酸素が生成することを推論している。また、過酸化物の生成系と過酸化物分解機能は耐凍性増大期には均衡しているが、耐凍性減少期には不均衡状態になることから、耐凍性変動が過酸化物代謝に伴う酸化的ストレスと関係している可能性を示唆している。

第3章では、リンゴ属植物の耐凍性の種差及び耐凍性変動と過酸化物代謝との関係が述べられている。まず、リンゴ属植物の耐凍性差と過酸化物代謝との関係を明らかにするために、厳寒期のリンゴ属植物9種（3品種を含む）を用いて、過酸化物分解系と過酸化物生成系の酵素活性を調べ、耐凍性との関係を検討している。そ

の結果、 $\text{NADH-CcR}/\text{G6PDH}$ 比あるいは $\text{CcO}/\text{G6PDH}$ 比を酸化的ストレスの起こし易さを表す指標 (oxidizability index; OI) とすると、木部のOI値とリンゴ属植物の耐凍性との間には高い相関係数が得られ、リンゴ属植物の耐凍性差は木部の酸化的ストレスと密接に関係していることを明らかにした。同様に、春における花芽の耐凍性減少とOI値との間にも高い相関を認め、耐凍性減少が酸化的ストレスの高まりと密接に関係していることを明らかにしている。

第4章では、リンゴ樹の耐凍性と細胞内微細構造との関係が述べられている。まず、枝の皮層部、木部及び花芽細胞の耐凍性と細胞内微細構造を調べ、次のような共通構造の変化が耐凍性変動に伴って起こることを明らかにしている。耐凍性増大期—液胞の小胞化、デンプン粒の消失、ミトコンドリア及びプロテイン・リポドポディー数の増加、ER、ポリゾーム、ジクチオゾームなど蛋白質合成に関与するオルガネラ数の増加、細胞中心部への核の移動と核へのプラスチドの集合。耐凍性減少期—液胞の融合、デンプン粒の増加。さらに、耐凍性を異にする3つのリンゴ樹の花芽を用いて、それらの細胞内微細構造の比較を行っている。その結果、耐凍性増大が速いリンゴ樹ほど細胞中心部への核の移動と核へのプラスチドの集合が速く、プロテイン・リポドポディーの数が多く、そしてデンプン粒の消失が遅い傾向を認めている。

第5章では、凍害は酸化的ストレスが関与するという観点から、リンゴ花芽を用いた検討結果が述べられている。凍死温度まで凍結した花芽ではG6PDH、DHARD及びAsAPODの失活とG6PとGSHの消失が起こり、過酸化物質分解機能が崩壊すること、また、酸素を遮断してから凍死温度まで凍結した花芽ではG6PとGSH含量の低下が抑制され、凍害には活性酸素が関与することが示している。さらに、凍死温度まで凍結した花芽では、 H_2O_2 含量が融解後30分以内に急増し、同時にG6PDHとAsAPODが失活してG6PとGSHが消失することから、過酸化物質分解機能の崩壊が H_2O_2 によることを示唆している。このようなことから、植物の凍害発生機構の一つとして、活性酸素が関与している可能性を述べている。

第6章では、秋に増加するアミノ酸の中で、アルギニンとセリンの生長抑制効果を明らかにした上で、これらの耐凍性増大効果について述べている。すなわち、秋に増加するアルギニン、セリン、プロリン、グルタミン、アスパラギン及びスレオニンのうち、リンゴ細胞の増殖はアルギニンとセリンによって抑制された。次に、リンゴ細胞にアルギニンとセリンを添加して25℃で3日間培養すると、-10℃に耐えられなかった細胞がそれに耐えられるようになり、その時のアルギニンとセリンの最適濃度はそれぞれ100mMと200 mMであった。また、液胞における蛋白質分解阻害剤の3-メチルアデニンとプロピルアミンも耐凍性増大に有効であることを認め、生理的手段により植物の耐凍性を高め得る可能性が示唆されている。

最後に、本論文の内容を総合的に考察している。

以上のとおり、本研究は植物の寒冷への適応機構及び凍害発生機構を解明する上での学術上重要な知見を加えたばかりでなく、生理的手段による凍害予防の可能性を示し、応用面においても高く評価される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 勾 坂 勝之助

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 原 田 隆

学 位 論 文 題 名

果樹の耐凍性と凍害に関する生理・生化学的研究

本論文は、総頁数 197で和文で記され、図55、表19を含み、内容は緒論、本論、摘要、引用文献 255からなり、末尾に英文要約が付されている。また、別に参考論文19編が添えられている。

植物の寒冷適応機構の解明は、障害的寒冷害及び凍害を克服し、農作物の安定生産を図る上で重要である。植物の寒冷適応現象に関しては生化学領域から超微形態学まで多分野にわたって検討されているが、まだそれらの機構を根本的に理解できる段階には至っていない。

本論文は、果樹の寒冷適応機構に関与する要因として過酸化物代謝と細胞構造に着目し、リンゴ樹及びリンゴ培養カルスを用いて、耐凍性と過酸化物分解機能の関係、種間の耐凍性差及び耐凍性変動と過酸化物代謝の関係、耐凍性と細胞内微細構造の関係、凍害と活性酸素の関係及び耐凍性の培養細胞における発現について検討を行い、その成果をとりまとめたものである。

第1章では、耐凍性とグルタチオン (GSH) とアスコルビン酸を基質とする過酸化物分解機能—グルコース—6—リン酸脱水素酵素 (G6PDH)、デヒドロアスコルビン酸還元酵素 (DHARD)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (AsAPOD) 及びグルコース—6—リン酸 (G6P) 等を含む—との関係について述べている。花芽と枝の皮層部及び木部において、過酸化物分解機能は耐凍性の大きさと平行して変動すること、更に、過酸化物分解機能は霜によって誘導され、その後に耐凍性が高まることを明らかにしている。また、培養カルスを用いた実験においても、過酸化物分解機能は耐凍性増大と平行して変動することを見いだし、過酸化物分解機能が耐凍性増大に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。

第2章では、過酸化物の生成系であるプラスチド、ミトコンドリア及びミクロソームにおける電子伝達系のNADH-Cyt c 還元酵素 (NADH-CcR) とCyt c 酸化酵素 (CcO) 活性の季節変化を調べ、これらの2つの酵素活性は花芽、枝の皮層部及び木部のいずれにおいても冬季に高く、越冬中の細胞では低温下でも活性酸素が生成する

ことを推論している。また、過酸化物の生成系と過酸化物分解機能は耐凍性増大期には均衡しているが、耐凍性減少期には不均衡状態になることから、耐凍性変動が過酸化物代謝に伴う酸化ストレスと関係している可能性を示唆している。

第3章では、過酸化物の分解系と生成系活性を示す酵素としてそれぞれG6PDHとNADH-CcRあるいはCcOを選び、それらの比、すなわちNADH-CcR/G6PDH比あるいはCcO/G6PDH比を酸化ストレスの起こし易さを表す指標(oxidizability index; OI)として、このOI値と耐凍性の種差並びに春の耐凍性減少との関係が述べられている。OI値と耐凍性差及び耐凍性変動との間には高い相関係数が得られ、耐凍性は酸化ストレスと密接に関係していることを明らかにしている。

第4章では、耐凍性と細胞内微細構造との関係が述べられている。機能及び耐凍性を異にする細胞を用いて、耐凍性と細胞内微細構造を調べ、次のような共通構造の変化が耐凍性変動に伴って起こることを明らかにしている。耐凍性増大期—液胞の小胞化、デンプン粒の消失、ミトコンドリア及びプロテイン・リポドボディー数の増加、ER、ポリソーム、ジクチオソームなど蛋白質合成に関与するオルガネラ数の増加、細胞中心部への核の移動と核へのプラスチドの集合。耐凍性減少期—液胞の融合、デンプン粒の増加。

第5章では、凍害は酸化ストレスが関与するという観点から、リンゴ花芽を用いた検討結果が述べられている。凍死温度まで凍結した花芽ではG6PDH、DHARD及びAsAPODの失活とG6PとGSHの消失が起こり、過酸化物分解機能が崩壊すること、また、酸素を遮断してから凍死温度まで凍結した花芽ではG6PとGSH含量の低下が抑制され、凍害には活性酸素が関与することが示唆されている。更に、凍死温度まで凍結した花芽では、 H_2O_2 含量が融解後30分以内に急増し、同時にG6PDHとAsAPODが失活してG6PとGSHが消失することから、過酸化物分解機能の崩壊が H_2O_2 によることを明らかにしている。このようなことから、植物の凍害発生機構の一つとして、活性酸素が関与している可能性を述べている。

第6章では、秋に増加するアミノ酸の中で、アルギニンとセリンの生長抑制効果を明らかにした上で、これらの耐凍性増大効果について述べている。また、液胞における蛋白質分解阻害剤の3-メチルアデニンとプロピルアミンも耐凍性増大に有効であることを認め、生理的手段により植物の耐凍性を高め得る可能性が示唆されている。

最後に、本論文の内容を総合的に考察している。

以上のとおり、本研究は植物の寒冷への適応機構及び凍害発生機構を解明する上での学術上重要な知見を加えたばかりでなく、生理的手法による凍害予防の可能性を示し、応用面においても高く評価される。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者黒田治之は博士(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。