

学 位 論 文 題 名

台木用クロダネカボチャにおける根の低温伸長性および  
核酸・タンパク質代謝に関する研究

学位論文内容の要旨

クロダネカボチャ (*Cucurbita ficifolia* Bouché) は高い低温耐性を有しており、低温期におけるキュウリ栽培の接ぎ木苗の台木として広く使用されている。本研究では、クロダネカボチャの根の低温伸長性と根における核酸およびタンパク質の代謝との関連について、低温条件下で生育が抑制されやすいキュウリ (*Cucumis sativus* L.) と比較することにより検討した。内容は次のように要約される。

1. 低根温条件下における生育の変化

クロダネカボチャの根の低温耐性の特徴を明らかにするため、養液栽培により根温12、14、18および23℃で栽培したときの生育状況について、キュウリと比較して調べた。植物体全体の生育と地上部の発育はクロダネカボチャ、キュウリのいずれにおいても、23℃で旺盛となり、低温になるほど阻害された。一方、根の発育は、キュウリでは地上部と同様に23℃で盛んであったが、クロダネカボチャでは14℃で最も速かったため、クロダネカボチャのT/R率は14℃で低い値となることがわかった。以上のような、クロダネカボチャの根の特性を本研究では低温伸長性と称することにした。

2. 低根温条件下で発育した根におけるRNA濃度の変化

クロダネカボチャの低温伸長性とRNA代謝との関係を検討するために、根温12、14、18および23℃条件下で発育したクロダネカボチャおよびキュウリの根におけるRNA濃度の変化を調べた。クロダネカボチャの根における全RNAおよび各種RNAの濃度は、根の低温伸長が最も盛んな14℃で最大となった。また、全RNAおよび各種RNAの濃度は6日間の根部14℃処理

期間中に連続的に増大するが、根温を23℃に変えると2日以内に根部温度処理開始以前のレベルに戻った。これらのことから、クロダネカボチャの根ではRNA代謝は低温伸長性に密接に関与していると考えられる。一方、キュウリのRNA濃度も、根温14℃で最も高かったが、23℃での濃度に対する増大率はクロダネカボチャに比べて低く、また根温を23℃に変えても減少しないことが明らかになった。

### 3. 低根温条件下で発育した根におけるリボヌクレアーゼ活性およびRNAポリメラーゼ活性の変化

2. で認められたクロダネカボチャの根におけるRNA濃度増大の原因を明らかにするために、根部14℃処理開始後のクロダネカボチャおよびキュウリの根におけるリボヌクレアーゼ活性とRNAポリメラーゼ活性の変化を調べた。活性測定時の温度は、酵素反応の最適温度（リボヌクレアーゼ：37℃、RNAポリメラーゼ活性：32℃）および植物体生育時の根温と同じ温度（14℃または23℃）としたが、いずれの結果も、クロダネカボチャおよびキュウリにおけるRNA濃度の変化との関連は認められなかった。そこで、リボヌクレアーゼ活性に対するRNAポリメラーゼ活性の比率（RP/RN）の変化とRNA濃度の変化との関係を調べたところ、酵素反応の最適温度で活性を測定した場合、RP/RNの変化とRNA濃度の変化との関連は認められなかったが、植物体生育時の根温と同じ温度で活性を測定した場合には、RP/RNの変化とRNA濃度の変化との間には密接な正の相関が認められた。以上の結果から、クロダネカボチャおよびキュウリの根におけるRNA濃度はRNAポリメラーゼ活性とリボヌクレアーゼ活性の比率に関連していることが明らかとなり、クロダネカボチャの根における根温14℃条件下でのRNA増大は、RNAポリメラーゼ活性とリボヌクレアーゼ活性の比率の変化によって起こることが明らかになった。

### 4. 低根温条件下で発育した根におけるタンパク質の濃度および組成の変化

クロダネカボチャの低温伸長性とタンパク質代謝との関係を検討するために、根温12、14、18および23℃条件下で発育したクロダネカボチャおよびキュウリの根におけるタンパク質の濃度および組成の変化を調べた。根部温度

処理によるタンパク質濃度の変化の様相は、RNA濃度の場合と基本的に同じであった。クロダネカボチャにおける可溶性タンパク質のSDS電気泳動パターンでは、8種類の低温集積タンパク質（根温12℃、14℃および18℃において量が増大したタンパク質）が見出された。低温集積タンパク質の量は、14℃で特に増大するという傾向はみられなかった。また、これらのタンパク質は根部低温処理開始後3日以内の早い時期に増大した。以上の結果から、クロダネカボチャの根においては、低温集積タンパク質の量の増大は、低温に対する初期的な反応であり、タンパク質濃度の増大が低温伸長性を実質的に高める原因の一つになっていると考えられる。一方、キュウリの可溶性タンパク質では、低根温処理によるSDS電気泳動パターンの変化は認められなかった。

#### 5. 低根温条件下で発育した根における遊離アミノ酸濃度およびリボソームの変化

4.で認められたクロダネカボチャの根におけるタンパク質濃度増大の原因を検討するため、根部14℃処理開始後のクロダネカボチャおよびキュウリの根における遊離アミノ酸濃度およびリボソーム濃度の変化ならびにリボソームのポリソーム化の程度について調べた。クロダネカボチャでは、全遊離アミノ酸濃度とタンパク質生成の基質となるアミノ酸の濃度は、根温14℃処理開始後3日間で約3倍に増大した。また、全リボソーム濃度は根温14℃処理開始後6日間で3.5倍に増大し、リボソームのポリソーム化の程度を示す指標（ポリソーム濃度／全リボソーム濃度、5量体以上のポリソーム濃度／全リボソーム濃度、および5量体以上のポリソーム濃度／ポリソーム濃度）はこの期間に1.3～2.0倍に増大した。いずれの値も、根温を23℃に変えると速やかに処理開始前のレベルに戻った。以上の結果から、クロダネカボチャの根では低温遭遇によって遊離アミノ酸濃度、リボソーム濃度およびリボソームのポリソーム化の程度が変化した結果、タンパク質生成が高まり、タンパク質濃度が増大するものと考えられる。一方、キュウリの根における遊離アミノ酸濃度およびリボソーム濃度の変化ならびにリボソームのポリソーム化の程度は、いずれも根温14℃処理期間中に増大する傾向がみられたが、その

増大率はクロダネカボチャに比べて非常に小さいことがわかった。

## 6. 低根温条件下で発育したクロダネカボチャの根における低温集積タンパク質合成の調節段階

4. で認められたクロダネカボチャの根のタンパク質組成の変化が、転写段階で調節されているのかどうかについて検討するため、根温14℃処理中のクロダネカボチャの根におけるin vivo 標識タンパク質とin vitro翻訳産物との組成を比較した。in vivo 標識タンパク質の2次元電気泳動パターンによると、根温14℃処理によって大きくなったスポットの数は9個であったが、in vitro翻訳産物においては、根温14℃処理によって大きくなったスポットの数は2個であった。このようなことから、クロダネカボチャの低温集積タンパク質のうちの少なくとも2個は転写段階でその生成が調節されているが、大部分の低温集積タンパク質の生成は転写後の段階で調節されているものと考えられる。

以上のように、本研究では、クロダネカボチャの根の低温伸長性について、核酸およびタンパク質の代謝の面からの知見を得ることができた。この成果は、接ぎ木苗台木用の耐冷性植物（品種）の育成や接ぎ木苗の低温下における生育能力を高める栽培技術を開発するための基礎的知見として寄与しうるものと思われる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 田 隆

副 査 教 授 喜久田 嘉 郎

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

## 学 位 論 文 題 名

### 台木用クロダネカボチャにおける根の低温伸長性および 核酸・タンパク質代謝に関する研究

本論文は、緒言、本論 6 章、摘要、引用文献 87、図 45、表 8 を含む 158 頁の和文論文で、別に参考論文 4 編が添えられている。

野菜とくに果菜類の栽培では、吸肥性、低温伸長性、耐暑性、耐湿性の向上ならびに病害回避などの目的で接ぎ木苗が用いられているが、クロダネカボチャ (*Cucurbita ficifolia*) はとくに高い低温伸長性があり、低温期におけるキュウリ (*Cucumis sativus*) 栽培用の接ぎ木苗ではクロダネカボチャが台木として用いられている。

本研究は、クロダネカボチャの低温伸長性と核酸およびタンパク質代謝との関連を、低温条件下で生育が阻害されやすいキュウリのそれと比較しつつ検討することにより、低温伸長性台木植物または品種の育成ならびに低温条件下における果菜類の栽培技術作出のための基礎的知見を得ることを目的として行ったものである。

#### 1. 低根温条件下における生育の変化

養液栽培法により、根温を、12、14、18および 23℃としたときの生育について調べた。地上部の発育は、クロダネカボチャおよびキュウリとも根温23℃の場合に最も旺盛であったが、根の発育は、キュウリでは地上部同様23℃のとき盛んであったのに対し、クロダネカボチャではそれよりはるかに低い14℃で最も速いことが明らかになった。

#### 2. 低根温条件下で発育した根におけるRNA濃度の変化

根温 12、14、18および 23℃条件下で発育させたクロダネカボチャおよびキュウリの根におけるRNA濃度の変化を調べた。クロダネカボチャの根の全RNA濃度ならびにrRNA、mRNAおよびtRNAの濃度は、根の伸長が最も速い 14℃処理区で最大となり、また、それらの濃度は、

根温 14 °C 処理期間中は上昇を続け、根温を 23°C に変えると下降し、2 日以内にもとの状態に戻るなど大きく変化したのに対し、キュウリでは温度を変えてもほとんど変化しないことがわかったことにより、クロダネカボチャでは、RNA 濃度の変化が低温伸長性に関与していることが明らかになった。

### 3. 低根温条件下で発育した根におけるリボヌクレアーゼ活性および RNA ポリメラーゼ活性の変化

植物体生育時の根温と同じ温度で活性を測定した場合には、クロダネカボチャおよびキュウリのいずれの根においても、RNA 濃度の変化と、リボヌクレアーゼ活性に対する RNA ポリメラーゼ活性の比率の変化との間に正の相関が認められ、根温 14°C 条件下での RNA 濃度の増大は、リボヌクレアーゼ活性と RNA ポリメラーゼ活性の比の増大によって説明できることを見出した。

### 4. 低根温条件下で発育した根におけるタンパク質の濃度および組成の変化

根の低温伸長性とタンパク質代謝との関連を検討するため、根温 12、14、18 および 23 °C の条件下で発育させたクロダネカボチャおよびキュウリの根におけるタンパク質の濃度および組成の変化について調べた。この場合、全タンパク質濃度、可溶性タンパク質濃度および難溶性タンパク質濃度の変化の様相は、RNA 濃度の場合と同様であった。また、クロダネカボチャの根における可溶性タンパク質の SDS 電気泳動パターンでは、8 種類の低温集積タンパク質が見出され、これらは根部低温処理開始後 3 日以内の早い時期に増加した。これに対し、キュウリでは低根温処理を行っても可溶性タンパク質の電気泳動パターンは変化しなかった。これらのことから、クロダネカボチャでは、根のタンパク質濃度の上昇が低温伸長性の増大に関与していると考えられる。

### 5. 低根温条件下で発育した根における遊離アミノ酸およびリボソームの変化

クロダネカボチャでは、低根温 14 °C 処理開始 3 日後には、タンパク質生成の基質となるアミノ酸の濃度が約 3 倍となり、6 日後には、全リボソーム濃度が約 3.5 倍になるとともに、リボソームのポリソーム化が 1.3~2 倍に促進された。低根温処理を停止すると、これらの変化は元の状態に戻った。これに対し、キュウリでは、低根温条件下ではそれらがわずかに増大したに過ぎなかった。低根温条件下におけるこれらの変化が低温伸長性を有するクロダネカボチャの根のタンパク質濃度の上昇に関与していることが明らかになった。

### 6. 低根温条件下で発育したクロダネカボチャの根における低温集積タンパク質合成の調節段階

in vivo 標識タンパク質と in vitro 翻訳産物を比較することにより、根

温14℃条件下で発育させたクロダネカボチャの根におけるタンパク質組成の変化が転写段階あるいはその後の段階のいずれで調節されているかについて検討した。2次元電気泳動パターンによると、根温14℃処理によって大きくなったスポットの数は、in vivo 標識タンパク質では9個であったが、in vitro翻訳産物では2個であったことから、低温集積タンパク質のうち少なくとも2個は転写段階で調節されているが、大部分のものは転写後の段階で調節されていることが示唆された。

以上のように、本研究は、クロダネカボチャの根の低温伸長性について、核酸・タンパク質代謝の面から初めて検討したもので、得られた知見は、接ぎ木苗用の耐冷性台木の育成ならびに低温条件下における果菜類栽培技術を作出するための基礎として寄与するものである。

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 神田啓臣は博士（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。