ペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.) における 低温馴化過程の分子・細胞生物学的研究

学位論文内容の要旨

永年性作物は、低温に一定期間さらされることによって馴化され、凍結に対する耐性(耐凍性)を獲得する。低温馴化の過程では、代謝機能に変化が起こり、凍結に対する適応機構が生じることが知られている。

本研究は、低温に馴化する過程で生じる分子・細胞生物学的変化の解析であり、温帯地域で広く栽培されている永年性の寒地型イネ科牧草である、ペレニアルライグラスを供試材料とした。低温に応答して発現が制御される遺伝子を単離し、その機能を推定することによって、低温馴化の過程を遺伝子の発現機構の観点から明らかにするとともに、低温馴化によって生じる細胞内の変化を、細胞内小器官に着目して解明することを目的とした。内容は以下のように要約される。

1. 低温応答遺伝子の単離

低温馴化の過程で発現が制御されている遺伝子を解析することにより、ペレニアルライグラスにおいて生じる、低温に対する適応機構の一端を解明した。低温処理を施す前後におけるmRNAの発現を比較する、ディファレンシャルディスプレイ(DD)法を利用して、低温処理によって特異的に発現が制御されている遺伝子のcDNAを単離した。得られた遺伝子について、低温馴化の過程における転写産物の蓄積量を調査するとともに、塩基配列を決定して既知の遺伝子との相同性を検索することにより、機能の推定を行った。

得られた低温応答遺伝子群のうち、低温によって発現が誘導された遺伝子には、アミノ酸の膜輸送に関与する遺伝子、ABAおよび塩ストレスへの適応に関与する遺伝子の一部であると推察されるものが存在した。一方、低温によって発現が抑制されるとみられる遺伝子のうち、光化学系に関与する遺伝子群は、低温により一時的に発現が抑制されたのち、低温馴化の過程を経て発現が回復する傾向にあることから、光合成

機能は、低温により一時的に低下したのち、耐凍性の獲得にともなって回復すると推察された。

2. 低温馴化の過程における葉緑体の変化

光合成器官である葉緑体について、低温馴化がおよぼす影響を解明するため、形態の観察および葉緑体DNAのコピー数の調査を行った。超薄切片法による形態の観察の結果、低温馴化の過程において、細胞内に含まれる葉緑体数には顕著な変化は認められなかったが、観察された葉緑体の断面積が増大し、細胞に占める葉緑体の割合も増加していることから、葉緑体の肥大化が示唆された。同時に、細胞に占める液胞部分が減少していることから、細胞内における浸透ポテンシャルの変化の影響が推察された。また、低温馴化された葉緑体の内部構造については、グラナチラコイドの幅の増加、およびストロマチラコイドの膜間の増大によって、葉緑体に占めるチラコイド膜の密度の減少がみられた。葉緑体DNAのコピー数は低温馴化の過程において顕著な変化はみられず、形態変化との関連は得られなかった。

3. 低温馴化の過程におけるミトコンドリアの変化

呼吸器官であるミトコンドリアについて、葉緑体と同様の調査を行った。ミトコンドリアの形態を観察した結果、低温馴化の過程において、細胞内に含まれるミトコンドリアの数には顕著な差異は認められなかったが、ミトコンドリアの断面積は、維管束鞘細胞および葉肉細胞の両方で、低温馴化の開始とともに増大し、4-7日目までに最大値をとるという同調的な変化が認められた。形態変化との明確な関連は得られなかったが、ミトコンドリアDNAのコピー数は低温馴化の過程で増加する傾向がみられた。

本研究において得られた、光化学系に関与する遺伝子群の一時的な発現の低下、および、葉緑体におけるチラコイド膜の減少は、低温が光合成機能の低下をもたらしたことを示唆している。また、葉緑体とミトコンドリアは、低温馴化の開始とともに同調的に断面積が増大し、同時に液胞部分が減少することから、細胞内小器官の形態変化は、細胞内小器官および細胞間相互における、低温馴化にともなう糖類あるいは水分の変化によるものと推察される。以上の結果は、低温馴化がもたらす光合成および呼吸機能への植物生理学的影響を調査する上で、基礎的な知見の一つになると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 島 本 義 也
副 査 教 授 佐 野 芳 雄
副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

ペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.) における 低温馴化過程の分子・細胞生物学的研究

本論文は、図 14、表 5、引用文献 119 を含み、5 章からなる 102 頁の和文論文である。別に参考論文 6 編が添えられている。

寒冷地で栽培される越冬性作物は、秋季の短日・低温に一定期間さらされることによって馴化され、冬季の凍結に対する耐性(耐凍性)を獲得する。この低温馴化の過程において、越冬性作物は代謝機能に変化が起こり、凍結に対する適応機構を構築するが、応答遺伝子の発現および細胞内小器官の形態的变化は明らかでない。

本論文は、温帯地域で広く栽培されている永年生の寒地型イネ科牧草であるが耐凍性が低いペレニアルライグラスについて、低温に応答して発現が制御される遺伝子を単離し、その機能を推定することによって、低温馴化過程を遺伝子の発現機構の観点から検討するとともに、低温馴化過程で生じる細胞内小器官の遺伝子・形態的応答を明らかにした。

論文内容は以下のように要約される。

1. 低温応答遺伝子の単離と機能

低温馴化の過程で発現が制御されている遺伝子を解析することにより、ペレニアルライグラスにおいて生じる低温に対する適応機構を解明した。ディファレンシャルディスプレイ法を利用して、低温処理を施す前後における mRNA の発現を比較し、低温処理によって特異的に発現が制御されている遺伝子の cDNA を単離した。得られた遺伝子について、低温馴化の過程における転写産物の蓄積量を計量するとともに、塩基配列を決定して既知の遺伝子との相同性を検索することにより、その遺伝子の機能を推定した。

得られた低温応答遺伝子群のうち、低温によって発現が誘導された遺伝子には、アミノ酸の膜輸送に関与する遺伝子、ABA および塩ストレスへの適応に関与する遺伝子の一部であると推察されるものが存在した。一方、低温によって発現が抑制されている遺伝子のう

ち、光化学系に関与する遺伝子群は、低温により一時的に発現が抑制されたのち、低温馴化過程を経て発現が回復した。このことにより、光合成機能は、低温により一時的に低下したのち、耐凍性の獲得にともなって回復すると推察された。

2. 低温馴化の過程における葉緑体の応答

低温馴化過程において、光合成器官である葉緑体における形態の観察、および葉緑体 DNA のコピー数の調査を行った。超薄切片法による形態の観察の結果、低温馴化過程において、細胞内に含まれる葉緑体数には顕著な変化は認められなかったが、観察された葉緑体の断面積が増大し、細胞に占める葉緑体の割合も増加していることから、葉緑体の肥大化が示唆された。同時に、細胞に占める液胞部分が減少していることから、細胞内における浸透ポテンシャルの変化の影響が推察された。また、低温馴化された葉緑体の内部構造については、グラナチラコイドの幅の増加、およびストロマチラコイドの膜間の増大によって、葉緑体に占めるチラコイド膜の密度の減少がみられた。このことは、光化学系に関与する遺伝子群の一時的な発現の低下と相俟って、低温が光合成機能の低下をもたらしたことを示唆している。葉緑体 DNA のコピー数は低温馴化の過程において顕著な変化はみられず、葉緑体の肥大化との関連は認められなかった。

3. 低温馴化の過程におけるミトコンドリアの応答

呼吸器官であるミトコンドリアについて、葉緑体と同様の方法で調査を行った。ミトコンドリアの形態を観察した結果、低温馴化の過程において、細胞内に含まれるミトコンドリアの数には顕著な差異は認められなかったが、ミトコンドリアの断面積は、維管束鞘細胞および葉肉細胞の両方で、低温馴化の開始とともに増大し、4-7日目までに最大値をとる同調的なミトコンドリアの肥大化が認められた。ミトコンドリアは、葉緑体と同様に、低温馴化の開始とともに同調的に断面積が増大し、液胞部分が減少することから、これらの細胞内小器官の形態的变化が低温馴化にともなう糖類あるいは水分の細胞内における分布の変化と関連するものと推察される。ミトコンドリア DNA のコピー数は低温馴化の過程で増加する傾向がみられたが、ミトコンドリアの肥大化との明確な関連は認められなかった。

本論文は、ペレニアルライグラスにおける低温馴化過程で生じる分子・細胞生物学的応答を解析したものであり、学術上の貢献が大きいきばかりでなく、越冬性作物の耐凍性育種に多大なる知見を与えるものであり、高く評価される。

よって審査員一同は、富永陽子が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。