

# 酸性雪ストレスに対する越冬性植物の 応答機構に関する研究

## 学位論文内容の要旨

近年、大陸から排出される大気汚染物質が著しく増加し、東アジアの大気環境に大きな影響を及ぼしている。特に冬季は北西季節風に乗った硫黄酸化物や窒素酸化物などの汚染物質が雪に取り込まれ酸性雪となり、日本列島の日本海側沿岸地方に降下する。酸性雪の降雪、積雪、融雪の過程において、酸性物質は雪氷の結晶表面に局所的に濃縮され易い。そのため、越冬葉を持つ木本植物や越年生の草本植物(越冬性植物)は、積雪層下にて雪氷表面に濃縮された酸性物質と接し、厳冬期には長期間凍結を強いられる。さらに初春には、雪氷表面の酸性物質が溶け込んだ酸性融雪水に植物は浸り、寒暖差の大きな気温変化によって繰り返し凍結融解される。このように酸性雪の積雪層下で越冬する植物は、氷点下温度での凍結脱水に加えて凍結濃縮による強酸性化という複合的なストレスを被るため、酸性雪も酸性雨と同様に植生変化の遠因と考えられる。しかし、越冬性植物に対する酸性雪ストレスの影響やその傷害発生機構を詳細に解析した研究はこれまでに報告されていない。そこで本研究では、酸性雪が環境破壊の一要因として、寒冷地に生育する森林や農作物へ生育阻害を引き起こす可能性について検討するための基礎研究をおこなった。まずは、

(1) 北海道の主要な農作物であり越年生の実験植物として有用かつ扱い易い冬コムギ実生をモデル材料に利用し、組織レベルで酸性雪ストレスの影響を評価する実験系を構築した。そしてこの実験系を利用して、酸性雪ストレスが越冬性植物の生存率にどの程度影響を及ぼすかを検証した。次に、(2) この実験系を改変し、酸性雪ストレスを被った越冬性植物が融雪後の回復ならびに再成長過程においてどのような影響を受けるのかを調べるため、酸性雪ストレス処理後に冬コムギ実生を再成長条件下に置き、回復過程における実生への影響や光照射による傷害発生の有無について検証した。以上のように越冬性草本植物への酸性雪ストレスの影響を調べた後、これらの実験系を常緑針葉樹に適用し、木本植物に対する酸性雪ストレスの影響評価を試みた。本研究では、(3) 野外で採取した枝を用い、酸性雪ストレスが針葉へ及ぼす影響ならびに酸性雪ストレス後の光照射が常緑針葉に及ぼす影響について調べた。

(1) 越冬性植物の緑葉組織に対する酸性雪ストレスの直接的な影響を簡便に評価するために、冬コムギ緑葉の組織切片が希薄な硫酸溶液と接した状態で様々な温度まで凍結処理し、融解直後の緑葉の生存率を測定した。その結果、pH 2.0 (3 mM 相当) の硫酸溶液を添加して-8℃まで凍結処理(酸性雪ストレス処理)すると、純水(pH 5.6)で凍結処理した対照区に比べて生存率が35%程度低下した。さらに、酸性雪ストレス処理温度の低下ならびに処理期間の長さに応じて緑葉の生存率が低下することも判明した。一方、添加した

硫酸溶液を過冷却状態に維持して同様な温度まで冷却した場合や硫酸塩溶液を代用して凍結処理した場合には緑葉の生存率はあまり低下しなかった。以上の事から、細胞外凍結する際には、凍結濃縮に起因する水素イオン濃度の上昇（すなわち pH の低下）が生存率を低下させる主要因であることが示唆された。さらに冬コムギ個体に対する酸性雪ストレスの直接的な影響を評価するために、冬コムギ実生を硫酸溶液中で、もしくは硫酸溶液から作成した細氷を被せた状態で凍結処理をおこなった。その結果、pH 2.0 の酸性雪ストレス処理直後の成熟葉では乾燥重量が減少すると共に、光化学系 II の最大量子収率 (Fv/Fm) の低下やクロロフィル分解の兆候が見出された。

(2) 次に、酸性雪ストレスに曝された冬コムギ緑葉が融雪後の回復過程でどのような影響を受けるのかを調べるために、酸性雪ストレス処理後の冬コムギ実生を再成長条件下、異なる光処理にて生育させた。その結果、pH 2.0 の酸性雪ストレス処理直後に冬コムギを光照射下に置いた場合、純水を用いた対照区や pH 3.0 の酸性雪ストレス処理区に比べて、特に成熟葉において乾燥重量が減少し、Fv/Fm も顕著に低下した。次に、pH 2.0 の酸性雪ストレス処理直後に暗条件にて 1 日間生育させてから光照射下に移したところ、前述の光照射条件での結果に比べ、成熟葉における乾燥重量の減少や Fv/Fm 値の低下が軽減されていた。これらのことから、冬コムギ成熟葉は酸性雪ストレスに対する感受性が高いため、酸性雪ストレス後の再成長条件では光照射によってストレス傷害が拡大することが考えられた。そこで、酸化ストレスの指標である過酸化水素の発生量や脂質過酸化レベルを調べたところ、冬コムギ成熟葉では、酸性雪ストレス直後に光照射下に置くと、暗条件に置いた場合に比べて過酸化水素の発生量や脂質過酸化レベルが顕著に増加していた。また、酸性雪ストレス処理後の若葉でのみ、光照射下であっても抗酸化酵素の一種であるスーパーオキシドディスムターゼ活性が高く維持されていた。これらの結果から、冬コムギ成熟葉は若葉に比べて酸性雪ストレスに対する感受性が高く、抗酸化能も低いために、融雪後の光照射によって著しい光酸化傷害を受けることが示唆された。

(3) 以上のような越冬性草本植物での酸性雪ストレスの実験系を常緑針葉樹に応用し、厳冬期の常緑針葉を用いて針葉の潜在的な酸性雪ストレス抵抗性を調べることにした。その結果、厳冬期の野外から採取したトドマツ、アカエゾマツ、イチイの針葉に対して pH 2.0 の酸性雪ストレス処理を $-20^{\circ}\text{C}$ までおこなっても、純水を用いた対照区に比べて 10%程度しか生存率が低下しなかった。次に、酸性雪ストレス処理した針葉に対する光照射の影響についても調べるため、トドマツ、アカエゾマツ、イチイの当年枝に硫酸溶液から作成した細氷を被せて酸性雪ストレス処理をおこなった後、これらの枝を光照射下に置いて過酸化水素の発生量や脂質過酸化レベルを測定した。その結果、pH 2.0 の酸性雪ストレス処理区のトドマツやアカエゾマツの針葉に比べて、イチイの針葉でのみ過酸化水素の発生や脂質過酸化のレベルがわずかに増加していた。しかし、これらの光酸化傷害の指標のレベルは冬コムギ緑葉での結果に比べると著しく低く、またいずれの樹種においても針葉の乾燥重量に変化はみられなかった。

以上の事から、厳冬期における常緑樹の針葉は冬コムギに比べて酸性雪ストレス耐性が高く、酸性雪ストレス後の光照射に対しても高い抵抗性を持つことが示唆された。しかし、冬コムギを用いたモデル実験の結果を考慮すると、ストレス処理期間の長期化や処理温度の低下、葉齢の違い等の条件変化が常緑針葉のストレス感受性にも影響を及ぼす可能性が十分に考えられる。また、季節変化に伴って生理的、形態的变化が生じることや、同一個体でも組織や器官、齢によってもストレス抵抗性が異なることを考慮すると、今後もさらに様々な実験条件の下でストレス耐性を検証し、そのメカニズムに関する基礎的知見を蓄

積することによって常緑針葉樹の酸性雪ストレス耐性を詳細に評価できるものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 准教授 荒 川 圭 太  
副 査 教 授 藤 川 清 三  
副 査 教 授 小 池 孝 良  
副 査 教 授 山 田 敏 彦 (北方生物圏フィールド  
科学センター)

学 位 論 文 題 名

## 酸性雪ストレスに対する越冬性植物の 応答機構に関する研究

本論文は、6章からなり、図41、表13、引用文献235編からなる総頁147頁の和文論文である。この他に参考論文4編が添えられている。

近年、大陸から排出される大気汚染物質が著しく増加し、冬季には北西季節風に運ばれた硫黄酸化物や窒素酸化物などが雪に取り込まれ、日本列島の日本海側沿岸に酸性雪として降下している。酸性雪中の酸性物質は、降雪から融雪に至る過程で雪氷の結晶表面に局部的に濃縮され易い。そのため、越冬葉を持つ木本植物や越年生の草本植物（越冬性植物）は、冬期に積雪層下にて濃縮された酸性物質と接して長期間凍結を強いられる。また初春には、これらの植物は雪氷表面の酸性物質が溶け込んだ酸性融雪水に浸り、寒暖差の大きな気温変化によって凍結融解される。従って、酸性雪に覆われた植物は、氷点下温度での凍結脱水や強酸性化の複合的なストレスを被るため、酸性雪も酸性雨と同様に植生変化の遠因と考えられる。

そこで本研究では、酸性雪が環境破壊の一要因として、寒冷地に生育する森林や農作物の生育障害を引き起こす可能性を検討するため、越冬性の草本並びに木本植物を用い、酸性雪ストレスに対する応答機構に関する基礎研究を行った。

越冬性植物に対する酸性雪ストレスの影響を簡便に評価するために、まずは冬コムギ緑葉の組織切片が硫酸溶液に接した状態で様々な温度まで凍結処理し、融解直後の緑葉の生存率をアミノ酸漏出法によって測定した。ストレス処理として pH 2.0 の硫酸溶液 (3 mM 相当) を添加して -8℃ まで凍結融解すると、純水 (pH 5.6) で凍結処理した対照区に比べて生存率が 40% 近く低下した。また、処理温度の低下や処理期間の長さに応じて緑葉の生存率は低下した。一方、添加した硫酸溶液を過冷却状態に維持して同様の温度まで冷却した場合や硫酸塩溶液を代用して凍結処理した場合には緑葉の生存率はほとんど低下しなかった。これらの結果から、酸性雪ストレスでは凍結濃縮による細胞外溶液の強酸性化が緑葉の生存率を低下させる主要因となることが示唆された。

次に冬コムギ実生に硫酸溶液を添加して $-4^{\circ}\text{C}$ で一週間の凍結処理を行ったところ、pH 2.0の酸性雪ストレス処理直後の成熟葉では光化学系IIの最大量子収率(Fv/Fm)の低下やクロロフィル分解の兆候が見られた。さらに、酸性雪ストレス処理後の冬コムギ実生を再成長条件下に置き、融雪後の回復初期過程における生育への影響を調べた。pH 2.0の酸性雪ストレス処理直後に冬コムギを照射すると、純水を用いた対照区に比べて、特に成熟葉において過酸化水素の発生量や脂質過酸化レベルが顕著に増加し、Fv/Fmもさらに低下した。これらの結果から、冬コムギ成熟葉は若葉に比べて酸性雪ストレスに対する感受性が高く、融雪後の照射で誘発された酸化傷害によって酸性雪ストレスによる傷害が拡大したことが示唆された。

以上のような冬コムギを用いた酸性雪ストレス実験系を常緑針葉樹に応用し、厳冬期に採取した針葉の酸性雪ストレスに対する応答性を調べることにした。

厳冬期に野外から採取したトドマツ、アカエゾマツ、イチイの針葉に対してpH 2.0の酸性雪ストレス処理を $-20^{\circ}\text{C}$ まで行くと、純水を用いた対照区に比べて10%程度生存率が低下し、さらに処理温度の低下によりその差は大きくなった。

次に、厳冬期に野外からトドマツ、アカエゾマツ、イチイの当年枝を採取し、これに硫酸溶液(pH 2.0)を添加して $-4^{\circ}\text{C}$ で一週間の酸性雪ストレス処理を行った後、再成長条件下に置いて融雪後の回復初期過程における針葉への影響を調べた。トドマツやアカエゾマツの針葉に比べ、イチイの針葉では対照区と比較して過酸化水素の発生量や脂質過酸化レベルが増加し、針葉の先端部が一部褐変する等の変化がみられた。以上の結果から、厳冬期での常緑樹の針葉は冬コムギ緑葉に比べて酸性雪ストレスに対して高い抵抗性を持つものの、酸性雪ストレス処理後の照射によって傷害が発生しうることが示唆された。

本研究では、酸性雪ストレスのシミュレーション実験を通じて酸性雪が北方圏に分布する越冬性の草本、木本植物に与える影響を検証した。酸性雪ストレスに対する応答性は植物種によって異なるものの、酸性雪ストレスによって葉緑体の傷害や活性酸素分子種による酸化傷害が発生し、ストレス解除後も照射により酸化傷害が拡大する危険性を示した。これらの結果より、雪の酸性化が単独もしくは他の環境要因との複合的な効果によって環境破壊の一要因となりうることを考察した。本研究成果はいずれも越冬性植物における酸性雪ストレスに対する応答機構に関する新規の知見であり、学術的に貴重なものである。よって、審査員一同は、稲田秀俊が博士(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。