

学 位 論 文 題 名

ハイブッシュ・ブルーベリー植物体における
耐凍性変動と低温遭遇により蓄積するタンパク質の研究

学位論文内容の要旨

温帯や亜寒帯に生育する多年生植物の多くは、短日や秋から冬にかけての気温低下に遭遇することにより、冬の厳しい低温環境や氷点下の気温に対する抵抗性（耐凍性）を発達させる。この変化を「低温馴化」とよび、春になって低温耐性が衰退する過程を「脱馴化」とよぶ。ブルーベリーは、生産量において小果樹の上位にランクされる作物であり、消費の増加にともない我が国の栽培面積は、近年数倍に増加している。ブルーベリーの耐凍性に関する研究は、主に花芽を素材にして行われてきた。しかし、花芽以外の器官が凍結傷害を起こすと結果として花芽や葉芽も生育障害を受ける。茎に生じる傷害は特に深刻である。それゆえ、安定した果実生産には、花芽ばかりではなく、枝（茎）を含む植物体全体の耐凍性の向上が必須である。

果樹など木本植物の花芽は分化したのち低温馴化・脱馴化過程を経て開花・結実し、ほぼ1年で発育のプロセスを終了する。一方、茎や根は低温馴化と脱馴化のサイクルを繰り返すことによって年を超えて成長する。そのため、栄養器官には花芽とは違った耐凍性の仕組みがあるものと予想された。本論文は、以上の視点に立ち、ブルーベリーの主要な栽培品種グループであるハイブッシュ・ブルーベリー植物体の、低温馴化過程および脱馴化過程における耐凍性変動の実態ならびに枝における凍害回避機構の解明を試みたものである。その内容を以下に要約する。

1 ハイブッシュ・ブルーベリー植物体における耐凍性の季節変動

植物体各部の耐凍性季節変動の理解は耐凍性増大の仕組みを明らかにする上で重要である。そこで、茎、花芽および根の耐凍性の変動を、年間を通して調査した。その結果、ハイブッシュ・ブルーベリーの茎の耐凍性は、気温が下降し始めてから緩やかに増大し始め、気温の低下とともに増大すること、また反対に、気温の上昇とともに耐凍性が急速に衰退することが明らかとなった。気温の変化と調査した耐凍性変化の様相から、低温馴化の過程では気温の低下に応じて段階的に耐凍性が進行し、脱馴化の過程では耐凍性の増大に関与する仕組みがほぼ同時に消失すると推論した。花芽の耐凍性変動は茎と同様に推移したが、根の耐凍性は年間を通じてほとんど変化しなかった。このことから、地中の安定した温度環境により、根では低温馴化の機構が発達しないものと推察された。

2 当年枝と2年枝の耐凍性ならびに茎を構成する組織における耐凍性の違い

当年枝と2年枝を6月と7月に採取し、プログラムフリーザーを用いて冷却し、凍結温度と生存率との関係を調べた。その結果、2年枝は当年枝の茎と比べ耐凍性が高いことが明らかとなった。この場合、2年枝の茎の生存率は -5°C から -10°C および -15°C から -25°C の温度域で大きな低下を示した。一方、当年枝の茎は 0°C から -10°C の温度域でそのほぼ全てが枯死した。このことから、低温馴化前の当年枝の茎が凍結耐性に関し斉一な組織で構成されているのに比べ、2年枝の茎は耐凍性の弱い組織と耐凍性のより強い組織で構成されていると推定した。

次に、茎の組織切片を凍結した後に作成し、エステラーゼ活性を指標として、各組織の耐凍性を比較した。その結果、2年枝では -20°C の凍結処理後も、樹皮（二次篩部および周皮からなる部分）の組織は生存していた。一方、当年枝組織は -10°C の凍結処理によってほぼ死滅した。低温馴化・脱馴化後の当年枝と2年枝の樹皮組織には強い耐凍性が残されていたことから、低温馴化によって樹皮組織に生じた耐凍性は脱馴化後も維持されるものと考えられた。冬期の枝から樹皮組織を取り除くと、茎組織は死滅した。このことから、樹皮組織は茎全体を保護する役割を果たしているものと思われた。

3 花芽および茎におけるタンパク質組成の季節変動ならびに主要茎タンパク質の同定

ハイブッシュ・ブルーベリーの低温馴化過程で花芽にデハイドリンが蓄積することが知られている。しかし茎のタンパク質については解析が進んでいない。そこで、気温低下とともに茎と花芽に蓄積するタンパク質を電気泳動ゲル上でスクリーニングし、主要なものについて同定を試みた。その結果、茎ではCBB染色によって65, 60, 27, 25, 22および20kDaタンパク質の蓄積が認められた。花芽では65, 60および20kDaのタンパク質が蓄積した。茎と花芽に共通して蓄積する65および60kDaタンパク質はデハイドリンであった。電気泳動像の解析は、低温馴化の過程で、茎には花芽以上に多様なタンパク質が蓄積するとことを示している。豊富に蓄積したタンパク質のほとんどは気温上昇とともに消失したことから、茎に蓄積するタンパク質の多くは、貯蔵物質として萌芽期のアミノ酸（窒素）源として利用される機能をもつタンパク質であると考えられた。

4 キチナーゼタンパク質の組織局在性と凍害防御効果

気温上昇とともに殆どの主要タンパク質が消失したが、茎の27kDaタンパク質は残存した。このタンパク質は低温馴化した茎の樹皮組織に多く分布していた。そのcDNA遺伝子の塩基配列からアミノ酸配列を推定し、類似配列を検索したところ、植物キチナーゼとの高い相同性が認められた。実際に精製したタンパク質にキチナーゼ活性が認められたので、これをBC27 (blueberry chitinase 27-kDa) と命名した。BC27のアミノ末端には20アミノ酸からなるシグナルペプチド様配列が認められた。BC27の凍害防御効果を調べるため、樹皮組織からBC27を抽出し、タバコBY2細胞とそのプロトプラストに添加し、凍結・融解後の生存率を調べた。その結果、プロトプラストに添加したBC27は凍害防御効果を示したが、ブルーベリーにおいて、BC27はエキソサイトシスによって原形質から細胞壁側へ放出され、アポプラストにおいて凍害防御を行っているものと考えられた。

以上のように、本研究によりハイブッシュ・ブルーベリーの茎の耐凍性メカニズムの一部を解明することができた。この結果は今後の高耐凍性品種作出に寄与できるものと思われる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	増田	清
副査	教授	幸田	泰則
副査	准教授	山岸	真澄
副査	准教授	鈴木	卓

学位論文題名

ハイブッシュ・ブルーベリー植物体における

耐凍性変動と低温遭遇により蓄積するタンパク質の研究

温帯や亜寒帯に生育する多年生植物の多くは、短日や秋から冬にかけての気温低下に遭遇することにより、冬の厳しい低温環境に対する抵抗性を発達させる。この変化を「低温馴化」とよび、春になって低温耐性が衰退する過程を「脱馴化」とよぶ。ブルーベリーは、生産量において小果樹の上位にランクされる作物であり、消費の増加にともない我が国の栽培面積は、近年数倍に増加している。ブルーベリーの耐凍性に関する研究は、主に花芽を素材にして行われている。しかし、花芽以外の器官が凍結傷害を起こすと結果として花芽や葉芽も生育障害を受ける。茎に生じる傷害は特に深刻である。それゆえ、安定した果実生産には、花芽ばかりでなく、枝(茎)を含む植物体全体の耐凍性の向上が必須である。

木本植物の花芽は分化したのち低温馴化・脱馴化を経て開花・結実し、通常1年以内の発育のプロセスをもって終了する。一方、茎や根は低温馴化と脱馴化のサイクルを繰り返しながら年を超えて成長する。そのため、栄養器官には花芽とは違った耐凍性の仕組みがあるものと予想される。本論文は、以上の視点に立ち、ブルーベリーの主要な栽培品種群であるハイブッシュ・ブルーベリー植物体の、低温馴化過程および脱馴化過程における耐凍性変動の実態、ならびに茎における凍結回避機構について記述したものである。

本論文は図 38, 表 10, を含む総ページ数 118 の和文論文であり、別に参考論文 1 編が添付されている。論文の内容は以下に要約される。

1 ハイブッシュ・ブルーベリー植物体における耐凍性の季節変動

耐凍性季節変動の理解は耐凍性増大の仕組みを明らかにする上で重要である。そこで、茎、花芽および根の耐凍性変動を調査した。その結果、ハイブッシュ・ブルーベリーの茎と花芽の耐凍性は、気温が下降し始めてから緩やかに増大し始め、気温の低下とともに耐凍性が増大すること、気温の上昇とともに耐凍性が急速に衰退することを明らかにした。気温

の変化と調査した耐凍性変動の様相から、低温馴化の過程では気温の低下に応じて段階的に耐凍性が進行し、脱馴化の過程ではほぼ同時に耐凍性が消失するとした。一方、根の耐凍性は年間を通じてほとんど変化せず、この結果から、地中の安定した温度環境により、根では低温馴化の機構が発達しなかったと考察した。

2 越冬枝の耐凍性および茎を構成する組織における耐凍性の違い

越冬枝(2年枝)とその年萌芽した枝(1年枝)を6月の植物体から採取し、プログラムフリーザーを用いて冷却することによって、耐凍性の違いを調べた。その結果、2年枝は1年枝と比べ耐凍性が高いことを明らかにした。茎の組織による耐凍性の違いを、組織切片上でエステラーゼ活性を検出する方法によって調べたところ、1年枝の組織は -10°C の凍結処理によってほぼ死滅したが、2年枝の茎は -20°C の凍結処理の後でも全ての組織が生存していた。さらに凍結温度を低下させたところ、2年枝の樹皮組織のみが生存を維持した。低温馴化した1年枝でも同様の結果が得られたことから、低温馴化によって樹皮組織に生じた耐凍性は脱馴化後も維持されると推論している。

3 茎におけるタンパク質組成の季節変動ならびに主要茎タンパク質の同定

ハイブッシュ・ブルーベリーの低温馴化過程で花芽にデハイドリンが蓄積することが知られている。しかし茎タンパク質については解析が進んでいない。そこで、気温低下とともに茎に蓄積するタンパク質について同定を試みた。その結果、茎では65, 60, 27, 25, 22および20kDaタンパク質の蓄積を確認した。このうち、65 および 60kDa のタンパク質はデハイドリンであった。電気泳動像の解析によって、低温馴化の過程で、茎には花芽以上に多様なタンパク質が蓄積することを明らかにした。蓄積が確認されたタンパク質のほとんどは気温上昇とともに消失したことから、茎に蓄積するタンパク質の多くは、貯蔵物質として萌芽期のアミノ酸(窒素)源として利用される機能をもつタンパク質であると推定している。

低温馴化の過程で蓄積した多くのタンパク質は、気温上昇とともに消失したが、茎の27kDa タンパク質(BC27 と命名)は残存した。cDNA 遺伝子から予測される塩基配列をもとに類似配列を検索したところ、このタンパク質には植物キチナーゼとの高い相同性が認められた。茎から抽出・精製した BC27 にキチナーゼ活性が確認された。

4 キチナーゼタンパク質の細胞および組織局在性と凍結防御効果

BC27 は低温馴化したハイブッシュ・ブルーベリーの茎の樹皮組織に局在した。コンピュータープログラムによる予測から、BC27 は、アミノ末端の19アミノ酸からなるシグナルペプチドを持ち、細胞質の外に放出されると推定した。この予測は、BC27 が脱馴化の過程で分解を受けない事実によっても裏付けられる。BC27 の凍結防御効果を調べるため、樹皮組織から BC27 を抽出し、タバコ BY2 細胞とそのプロトプラスト懸濁液に添加し、凍結・融解後の生存率を調べた。その結果、プロトプラスト懸濁液に添加した BC27 に凍害防御効果が認められた。一方、細胞懸濁液への添加ではその効果は見られなかった。以上の結果から、BC27 は細胞膜に作用することによって茎の耐凍性増大に機能すると推論している。

この研究によって、ハイブッシュ・ブルーベリーの茎の存在する新規キチナーゼ様タンパク質が同定され、より厳しい低温環境に曝される樹皮の耐凍性機構の一端が明らかにされた。この成果は今後の小果樹植物体の耐凍性研究の進展に大きく貢献すると期待される。よって審査員一同は、菊池 貴が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。