



Response mechanisms to a rapid temperature decrease in plant cells

Kadohama, Noriaki

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2013-09-06

(Date of Publication)

2014-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3227号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003227>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



論文内容の要旨

氏 名 角浜 憲明

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Response mechanisms to a rapid temperature decrease in plant cells
(植物細胞の急激な温度降下に対する応答機構の解析)

第1章 序論

温度は生命活動に大きな影響を与える重要な環境要因の一つである。自ら動くことのできない陸上植物は、周囲の温度環境を感知して体内の生理状態を改変させることにより、温度変化の激しい陸上で生存している。しかし、生理的限界を超えた温度では、対応しきれずに温度傷害を生じる場合がある。

イワタバコ科の園芸植物であるセントポーリア (*Saintpaulia* sp.) では、灌水の際に冷水が葉にかかると部分的に変色する現象が古くから知られていた。この変色は、冷水による冷温傷害であると考えられていた。しかし、①水が掛かった際の急激な温度降下で生じること、②葉温が高い葉 (35℃) に常温の水 (25℃) が掛かっても生じること、さらに③葉温を徐々に降下させた場合には低温 (5℃) でも傷害が生じないなど、既知の温度傷害とは異なる特徴があることから、セントポーリアに特有の「温度降下傷害」であると考えられるようになった。温度降下傷害は、葉肉細胞のうち柵状細胞で特異的に生じて細胞死を引き起こすと同時に、柵状細胞内の葉緑体が温度降下後に損傷することから、傷害の原因は葉緑体にあると考えられていた。しかし、傷害の原因を特定した報告はなく、その発生メカニズムは明らかにされていない。

一般的な陸上植物では、降雨や冷風などにより温度降下傷害を生じることはない。セントポーリアの温度降下傷害の発生メカニズムを明らかにすることができれば、一般的な植物が急激な温度降下にどのように対応し、温度降下傷害を回避しているのかについて、新たな知見が得られると考えられる。本研究では、セントポーリア及び近縁のイワタバコ科植物を用いて、温度降下傷害のメカニズムを明らかにし、さらに急激な温度降下に対する温度感受性を決定している分子機構を解析することによって、植物細胞の急激な温度降下に対する応答機構について明らかにすることを目指した。

第2章 セントポーリア葉における温度降下傷害の発生メカニズム

本章では最初に、短時間におけるセントポーリア葉の温度感受性の変動を調査した。30℃に5分間保温した葉を10℃に降下させると葉面積の約20%で傷害が生じたが、10分間保温した葉では温度感受性が高まり、葉面積の約60%で傷害が生じた。一方、20℃に保温した葉では、10分間の保温ではほとんど傷害は観察されず、60分経過後も傷害は葉面積の約20%でのみ生じた。これらの結果は、30℃の葉では10分間という短時間で温度感受性が変動することを示している。

次に、温度降下傷害のメカニズムを細胞レベルで解析した。柵状細胞に含まれる葉緑体の損傷が温度傷害の原因であるというこれまでの研究結果を踏まえ、柵状細胞から単離した葉緑体の温度感受性を調べた。葉緑体が損傷する過程をクロロフィル蛍光測定装置であるPAM (pulse amplitude modulated fluorometer) を用いてモニターすると、柵状

細胞中の葉緑体は温度降下後に損傷してクロロフィル蛍光が消失するのに対して、単離葉緑体は温度降下後も損傷せず、クロロフィル蛍光の消失も見られなかった。これらの結果は、葉緑体が温度降下により損傷するのではなく、柵状細胞内で生じた何らかの生理的变化が葉緑体を損傷させていることを示していた。葉緑体を損傷させている原因を明らかにするため、柵状細胞内で葉緑体と隣接している細胞質基質の pH を pH 感受性蛍光色素 BCECF-AM を用いて観察したところ、温度降下後に pH が低下していた。この pH 低下が酸性の液胞内容物の漏出により引き起こされていると予想し、液胞膜を蛍光色素 FM1-43 で可視化して液胞の動態を観察した。温度降下後、柵状細胞では FM1-43 の蛍光分布が変化したことから、傷害発生に伴う液胞の形態変化が示唆された。葉緑体が細胞質基質の pH 低下により損傷するのかを確認するため、単離葉緑体を pH が低い緩衝液中に懸濁したところ、pH6.0 以下で葉緑体のクロロフィル蛍光が消失し、損傷することが示された。これらの結果は、温度降下により液胞が崩壊して酸性の液胞内容物が漏出し、細胞内 pH が変化することで葉緑体などのオルガネラが損傷するという、温度降下傷害の発生メカニズムを示唆している。

第3章 セントポーリア温度感受性の分子機構の解析

セントポーリア葉の温度感受性の分子機構を明らかにするため、温度変化に伴い存在量が変動するタンパク質をプロテオーム解析により同定した。異なる温度感受性を示す 30℃と 20℃に保温した葉でプロテオームの比較解析を行ったところ、30 種類のタンパク質で存在量に有意差が見られた。30℃の葉では、活性酸素種を解毒化する代謝経路であるグルタチオン-アスコルビン酸回路の構成酵素のうち、アスコルビン酸ペルオキシダーゼが増加する一方、モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼは減少していた。この他、多くの光合成関連タンパク質や、アブシシン酸応答性の RNA 結合タンパク質と相同性のあるタンパク質が減少していた。次に、30℃と 20℃に保温した後 10℃に降下させた葉で比較解析したところ、18 種類のタンパク質の存在量に違いが見られた。30℃で保温した葉でのみ、機能未知のストレス応答性タンパク質が存在していた。この他、タンパク質のフォールディングを安定化させるシャペロニン 10 や、光合成関連タンパク質などの存在量に変動が見られた。さらに、30℃に保温した後 10℃まで急激に降下させた葉と、徐々に 10℃まで降下させた葉で比較解析を行ったところ、機能未知のストレス応答性タンパク質のほか、カタラーゼ、シャペロニン 60 などの存在量が増加していた。一方、多くの光合成関連タンパク質の存在量は減少した。これらの結果は、環境ストレス耐性を付与するタンパク質の変動が温度降下傷害の発生に関与することと、傷害発生に伴い葉緑体が損傷する過程で多数の光合成関連タンパク質が減少することを示唆していた。酸化ストレスや分子シャペロン、植物ホルモンなどの複合的な要因がセントポーリア葉の温度感受性を決定している可能性が考えられる。

第4章 イワタバコ科植物の急激な温度降下に対する温度感受性

セントポーリアに近縁の数種のイワタバコ科植物の葉でも、温度降下傷害が生じることが報告されている。本章では、これらのイワタバコ科植物の葉における傷害を引き起こす温度条件と傷害の発生メカニズム、さらに温度降下に対する感受性と系統関係について調査した。調査に用いた 29 種のイワタバコ科植物のうち、12 種のイワタバコ科植物でセントポーリアと同じ温度条件で傷害が生じた。これらの植物種の生息地や形態学的特徴は互いに異なっていた。温度降下傷害の特徴である葉緑体クロロフィル蛍光の消失や柵状細胞の細胞死、柵状細胞内の pH 変化は、実験に用いた全植物の葉で観察された。また、リボソーム DNA の ITS1 (internal transcribed spacer 1) の塩基配列に基づく分子系統学的解析を行った結果、30℃から 10℃の温度降下により傷害を生じる種は互いに異なる分類群に属していたことから、この実験条件における温度変化に対する温度感受性は系統関係に依存しないことが示唆された。これらの結果から、系統関係や生息地に関わらず、温度降下傷害の発生メカニズムは植物種に依らず共通しているものと考えられる。

第5章 考察

植物の温度応答に関する研究では、生存に不適な高温や低温が着目されてきた。しかし本研究により、セントポーリアをはじめ多くのイワタバコ科植物では、生存可能な温度範囲内での急激な降下も温度傷害の原因になることが示された。また、温度降下傷害を生じないイワタバコ科の葉においても、温度が急降下している間は光合成の阻害が観察され、温度降下が潜在的なストレスになっている可能性も示唆された。植物の温度応答を解析する際には、温度の高低ばかりでなく、温度変化の速度も考慮すべき要因であると考えられる。

これまでに良く知られている温度傷害（高温傷害、冷温傷害、凍結傷害）の場合、傷害を受けた葉は通常は枯死して落葉する。一方、温度降下傷害を受けたセントポーリアの葉は、変色した後も落葉することなく維持される。また、セントポーリアは葉挿しにより無性的に繁殖させることができるが、傷害を受けた葉からの繁殖も可能である。これらの現象は、傷害を受けた葉も栄養器官としての機能を有していることを示している。温度降下傷害は、温度ストレスによる単なる傷害ではなく、ストレス下において生存を有利にする何らかの生理的意義があるのかもしれない。

本研究では、セントポーリアの温度感受性の分子機構を明らかにするために、プロテオーム解析により存在量が変動する多数のタンパク質を同定した。温度降下傷害は柵状細胞で特異的に生じることから、今後、単離した柵状細胞を用いて解析を進めることで、本研究で同定された個々のタンパク質がどのように温度感受性の分子機構に関与して

いるのが明らかになると考えられる。

セントポーリアを含むイワタバコ科植物は非モデル植物であり、利用できる遺伝情報は現在のところ非常に限られている。しかし、温度降下傷害はこれらの植物に特有の現象であることから、モデル植物を用いた解析は困難である。近年、解析技術の進展により、非モデル植物においても遺伝子発現の網羅的解析を行うことが可能になりつつある。温度降下傷害を生じる種と生じない種で遺伝子発現の比較解析を行うことができれば、温度感受性の分子機構について、プロテオーム解析では見えてこなかった新たな知見が得られると考えられる。

氏名	角浜 憲明		
論文 題目	Response mechanisms to a rapid temperature decrease in plant cells (植物細胞の急激な温度降下に対する応答機構の解析)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	三村 徹郎
	副 査	教 授	川井 浩史
	副 査	准教授	深城 英弘
	副 査		
	副 査		印
要 旨			
地球上において植物の生育を決める最も重要な環境要因は、温度と水である。特に陸上では海洋に比べて温度変化が激しく、季節によって大きく変動する場合はもとより、日照などでも短期的に大きな温度変化が生じることがある。動物のような移動能を持たない植物は、このような変化の激しい陸上の温度環境を感知し、生理機能を変化させることで生存を図っているが、対応しきれない場合には傷害を受ける場合がある。四季の移り変わりによる温度変化は、比較的長い時間ゆっくりと気温が変化することから、多くの植物がその変化に適応するための生理機能を進化させてきた。それでも限度を超えた高温や低温、あるいは凍結環境では、その適応能を超えて植物に傷害が生じる。このような長期間の温度変化や極端な温度への植物の適応能については、これまで様々な研究が進められ、分子レベルで適応機構の解析が進められている。 一方で、日照の変化など、比較的短時間で生じる極端な温度変化でも、ある種の植物は傷害を受けることが知られているが、そのような生理現象に関する研究は、これまで十分になされて来なかった。本研究において、学位申請者は、このような短期間で生じる温度変化で傷害を受けることが古くから知られていたアフリカ原産の園芸植物であるアフリカスマイレ (<i>Saintpaulia</i> sp. 以降セントポーリア) に着目し、その温度傷害がどのように生じるかを生理学、細胞生物学、オミクス科学、系統解析学といった幅広い視点から解析を進め、その機構の一端を明らかにすることに成功した。 本論文は、全5章からなる。 第1章では、セントポーリアの示す温度傷害について、これまでの知見の再確認をするとともに、その現象について詳細な説明を行った。セントポーリアは、灌水の際に冷水が葉にかかると部分的に変色する。この傷害は、冷水による低温傷害であると考えられていたが、温度降下の幅に比例して傷害が大きくなることや、葉温が高いときに常温の水がかかった場合でも傷害が生じること、さらに葉温を徐々に降下させた場合には傷害が生じないことなど、通常の低温傷害とは異なり、温度降下幅とその速度が重要な要因となる傷害であり、既知の温度傷害とは異なるメカニズムで生じていると考えられるようになった。傷害を受けた葉では柵状細胞で細胞死が観察される一方、海綿状組織や表皮組織では変化が見られない。また、柵状細胞内の葉緑体は温度降下後に損傷してクロロフィル蛍光が失われることから、温度傷害の原因は葉緑体にあると考えられるようになった。しかし、葉緑体が原因であることを示す具体的な報告はなく、傷害の具体的なメカニズムは明らかにされていない。 そこで、第2章では、温度降下傷害が起こる機構を生理、細胞レベルで解析することを目指した。セントポーリア葉を 30℃に 5 分間保温した後、10℃に温度降下した場合は、葉面積の約 20%で傷害が生じたが、10 分間保温した葉では温度感受性が高まり、葉面積の約 60%で傷害が生じた。一方、20℃に保温した葉を 10℃に温度降下した場合は、10 分間の保温ではほとんど傷害は観察されない。これらの結果は、セントポーリアの葉では極めて短時間 (10 分間) の間に温度感受性が変化することを示し、周囲の温度に応じて葉内の生理的状態を迅速に変化させることで、傷害を			

氏名	角浜 憲明
----	-------

回避している可能性を示すことに成功した。次に、柵状細胞から単離した葉緑体では、温度降下によるクロロフィル蛍光の消失が見られなかったことから、葉緑体が傷害の直接的原因ではないことを明らかにした。温度傷害の原因を追跡するため、柵状細胞内で葉緑体と隣接している細胞質基質の pH を pH 感受性蛍光色素を用いて観察したところ、温度降下後に pH が低下していることを見出した。これらの結果から、酸性である液胞内容物の漏出が葉緑体を損傷させていることが示唆された。そこで、液胞の崩壊が液胞内容物の漏出を引き起こしていると予想し、液胞膜を蛍光色素 FM1-43 で可視化し、温度降下後、柵状組織の細胞では FM1-43 の蛍光分布が変化したことから、傷害に伴う液胞の形態変化を初めて明らかにした。一方、温度傷害を生じない海綿状組織では、蛍光分布は変化しなかった。これらの結果は、温度降下によって柵状細胞の液胞膜が変化すると液胞内容物が漏出し、細胞内 pH が変化することで葉緑体などのオルガネラが損傷し、最終的に細胞死に至るというメカニズムを示すことに成功した。

第3章では、セントポーリア温度感受性の分子機構を明らかにするため、異なる温度感受性を示す葉を用いてプロテオーム比較解析を行い、存在量に有意差のあるタンパク質を同定した。30℃と20℃に保温した葉でタンパク質存在量を比較したところ、30種類のタンパク質で存在量に有意差が見られた。30℃の葉では、抗酸化ストレスタンパク質として知られるアスコルビン酸ペルオキシダーゼが増加していた。一方、光合成に関与する多くのタンパク質や、アブシシン酸応答性の RNA 結合タンパク質と相同性のあるタンパク質が減少していた。次に、30℃と20℃に保温した後10℃に降下させた葉で比較解析したところ、18種類のタンパク質の存在量に違いが見られた。30℃で保温した葉でのみ、環境ストレス応答性の機能未知タンパク質が存在していた。さらに、30℃保温後に10℃まで急激に降下させた葉と、徐々に10℃まで降下させた葉で比較解析を行ったところ、ストレス応答性の機能未知タンパク質のほか、カタラーゼ、シャペロニン60などの存在量が増加していた。

第4章では、このような特異な生理現象が何故進化してきたのかを明らかにするため、セントポーリアに近縁な数種のイワタバコ科植物を用いて温度降下に対する感受性と系統関係について調査した。セントポーリアを含む12種のイワタバコ科植物で温度降下による傷害が見出されたが、形態的特徴、生息地に共通点はなく、また系統との相関も認められなかった。一方、温度傷害の発生に伴うクロロフィル蛍光の消失、柵状組織の細胞死、柵状細胞内の pH 変化は、調査した全種の植物の葉で観察された。これらの結果から、系統関係や生息地に関わらず、温度傷害は細胞内 pH 変化により柵状細胞の細胞死が引き起こされるという共通のメカニズムで発生しているということを明らかにした。

最後に第5章において、全体の考察を行った。

本研究では、これまで葉緑体との関連でのみ解析されてきたセントポーリアの葉が示す温度降下傷害が、柵状細胞特異的な液胞崩壊によることを初めて見出し、さらに温度傷害に関連する分子機構を明らかにするため比較プロテオーム解析を行うとともに、系統解析からイワタバコ科の複数の植物が同じ生理反応を示すことを明らかにすることに成功した。

現時点で、セントポーリアの温度降下傷害の詳細な分子機構が明らかに出来た訳ではないが、温度降下と液胞崩壊という新しい研究視点を持ち込むことに成功したこと、プロテオーム解析から、生理機能に関与する可能性のあるタンパク質を見出したこと、さらにその視点を系統解析まで進めたことなどから、植物の温度感受性解析に価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の角浜憲明は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。

- ・特記事項
- ・特許登録数 0 件
- ・発表論文数 1 編