

イネ幼葉の冷温障害における活性酸素の関与

¹岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター²(株)北海道グリーンバイオ研究所上村 松生^{1*}, 小野寺秀宣¹, 猿山 晴夫^{2**}

Involvement of Reactive Oxygen Species in Chilling Injury of Rice Leaves

Matsuo UEMURA^{1*}, Hidenori ONODERA¹ and Haruo SARUYAMA^{2**}¹*Cryobiosystem Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan*²*Hokkaido Green-Bio Institute, Naganuma, Hokkaido 069-1317, Japan***Corresponding author, uemura@iwate-u.ac.jp*****岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター客員教授**

To determine how enhancement of a scavenging system of reactive oxygen species is involved in the mitigation or delay of the occurrence of chilling injury, transgenic rice plants that constitutively overexpress wheat catalase were investigated. After chilling treatment (5°C) for up to 8 days, the transgenic rice exhibited less injury than did the wild type. Furthermore, the transgenic rice recovered better from chilling stress than the wild type when they were returned to non-chilling temperatures after the chilling treatment for 2 to 4 days. The advantages of the transgenic rice in chilling tolerance were consistent with the results that, under the chilling process or the rewarming process after the chilling treatment, there were less amount of hydrogen peroxide, less extent of plasma membrane-associated injury, and less amount of lipid peroxides in the transgenic rice than in the wild type. These suggest that the introduction of catalase into rice plants results in increased chilling tolerance as a consequence of increased membrane stability due to effective removal of reactive oxygen species by high activity of catalase transformed.

(Received for publication October 24, 2003)

1. はじめに

熱帯や亜熱帯を起源とする植物の多くは、約12°C以下の凍結を伴わない低温にさらされると障害を受けるものが多い。その障害は、あらゆる生育ステージ（発芽、生長、開花など）で起こる。この障害を一般に冷温障害（Chilling Injury）と呼ぶ。冷温障害

の程度は、温度が低いほど、また、曝される時間が長いほど大きくなり、農作物の生産量にも大きな影響を与えている。

冷温障害が発生する機構については多くの研究があるが、生体膜の機能損失が最も重要な原因であると考えられている¹⁾。温度がある限界（相転移温度）を超えて低下すると、生体膜を構成する脂質成分は液晶相から固相へと相転移し、その結果、膜の透過性や膜結合性酵素の活性損失などの膜機能に対する不可逆的な障害が発生する²⁾。事実、遺伝子組換えによって脂肪酸不飽和化酵素を過剰発現させたタバコにおいて、膜流動性の増加と相転移温度を低下さ

第49回低温生物工学会研究報告22.

[Key words : Rice, Chilling injury, Reactive oxygen species, Catalase, Transgenic plant ; イネ, 冷温障害, 活性酸素, カタラーゼ, 形質転換体]

(140)

せると低温耐性が上昇するという報告が、生体膜脂質の相転移と冷温障害の間の因果関係を裏付けている^{3, 4)}。

生体膜の低温下での不安定化には、膜脂質組成だけではなく他の様々な要因が関わっている。例えば、冷温障害発生の一要因と考えられている活性酸素も、生体膜不安定化に関与していると考えられる。活性酸素（過酸化水素、スーパーオキシドラジカル、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素など）は、ミトコンドリアの電子伝達系や葉緑体の光化学系などの代謝反応によって常に生産されている。これらの活性酸素が大量に存在すると、核酸、タンパク質、脂質などの生体内高分子を酸化し、ついには、機能を失わせてしまう。例えば、一重項酸素は、不飽和脂肪酸と反応して過酸化脂肪酸を生成する。また、過酸化脂肪酸や過酸化水素は、金属イオンや金属タンパク質を触媒として、反応性が非常に高いヒドロキシルラジカルや脂質アルコキシルラジカルを生じ、細胞内における酸化ストレスを増加させる^{5, 6)}。常温下では、細胞内に存在する活性酸素除去系酵素（スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、アスコルビン酸過酸化酵素、グルタチオン還元酵素など）によって活性酸素が効率的に除去されるため障害発生は押さえられているが、低温下でこれらの酵素活性が低下すると活性酸素が蓄積し、酸化ストレスが極度に大きくなり障害発生を引き起こしてしまう。これらの事実から、低温下における細胞内の活性酸素除去系酵素活性を増加させることにより、低温下での活性酸素による酸化ストレスを軽減し低温耐性を増大できる可能性が考えられる。

我々は、以前、冷温に感受性が高い植物であるイネに活性酸素除去系酵素・カタラーゼ（コムギ由来）を恒常発現するように作成した形質転換体が、野生型と比較して冷温耐性が高いことを見出した⁷⁾。本研究では、このカタラーゼを導入した形質転換イネの冷温耐性増大と膜機能の関連を探ることを目的に、カタラーゼ活性、過酸化水素量、膜障害、などについて、低温処理期間、および、低温処理後の回復過程において解析を行った。

2. 材料および方法

2-1. 植物材料

イネ (*Oriza sativa* L. cv. Yuukara) を用いた。コムギカタラーゼをコードする遺伝子⁸⁾を組み込んだ形質転換体の作成は前述の方法によった⁷⁾。イネ種子は、人工気象室内 (25/20°C, 12-hr 明期, 262 μ mol/m²/sec) で20日間生育させ、低温処理前の試料とした。その後、低温処理 (5/5°C, 12-hr 明期, 60 μ mol/m²/sec) を様々な時間行った。低温処理からの回復は、低温処理前のイネ生育条件と同様の条件下で行った。実験は、イネ実生の葉を全てサンプリングし、全体をプールした後に行った。

2-2. 測定方法

カタラーゼ活性は、試料からの粗抽出物 (17,000 g 上清) を用いて、反応液中の過酸化水素の減少を比色法で測定した⁹⁾。過酸化水素量測定は、過酸化水素がチタンと PAR (4-(2-pyridyazo) resorcinol) と共に形成する錯体の量を測定する方法¹⁰⁾、および、生体染色¹¹⁾によって行った。膜障害度の測定は、細胞内からの電解質の漏出率によった¹²⁾。また、過酸化脂質の定量は、脂質が過酸化する際に生成するマロンジアルデヒドと反応して赤色物質を生成するチオバルビツール酸反応量で表した¹³⁾。

3. 結果および考察

3-1. 冷温障害の表現型

コムギカタラーゼを導入した形質転換イネは、低温処理期間における低温耐性が明らかに高かった (data not shown)。野生型では、低温処理4日目から葉が萎れる現象が見られ、その後低温処理の時間が長くなるにつれ、葉の萎れは進行した。一方、形質転換体では、低温処理4日目では全く障害が見られず、8日処理後でも、葉の先がわずかに萎れるだけであった。低温処理後の回復過程においても、低温処理4日後、8日後からの試料において、野生型では急速に葉の萎れや葉先の枯れが急速に進んだのに対し、形質転換体では低温処理8日後から回復したと場合に限って葉先に枯れが見られた。しかし、野生型のように急速に障害が進行することはなかつ

た。同様の結果は、独立に行われた我々の以前の報告とも一致していた⁷⁾。

これらの結果は、導入されたコムギカタラーゼが、低温に対する耐性に加え、低温ストレスから解放された後の回復過程においても有利に働いていることを示している。細胞内の様々な代謝系で発生した活性酸素種は、常温に戻した際の発生に関係する反応系の速度が上昇するため、その影響が大きくなることが考えられる。事実、発生した活性酸素がストレスによって障害を受けた光化学系の修復を妨げているという報告¹⁴⁾もある。従って、導入したカタラーゼにより、低温からの回復過程における障害発生が減少していることが考えられる。

3-2. カタラーゼ活性

コムギカタラーゼを導入することにより、低温処理前のイネにおける可溶性タンパク質抽出画分におけるカタラーゼ比活性は、7~10倍に増加した (Figure 1)。一定の低温処理期間後には、野生型、形質転換体ともにカタラーゼ活性が減少したが、低温処理期間 (8日間) を通して、形質転換体は野生型の数倍高い活性を維持していた。低温処理後の回復過程においては、野生型と形質転換体の間で大きな違いが見られた。それは、低温処理初期の段階 (1ないし2日目) から常温に戻した場合、形質転

換体におけるカタラーゼ活性は低温処理前の状態まで回復したが、野生型では全く回復が見られなかったことである。これは、同時に行われたNativeポリアクリルアミド電気泳動と活性染色を組み合わせた実験結果と一致する (data not shown)。

これらの結果から、低温処理過程、並びに、低温処理後の回復過程で見られる野生型と形質転換体におけるカタラーゼ活性変動の違いは、導入されたコムギカタラーゼに起因すると考えられる。両者ともに低温で失活するものの、コムギカタラーゼは明らかにイネカタラーゼに比較して、低温処理後の残存活性が高く、低温処理からの回復過程における活性回復能力も高いため、野生型に比較して、形質転換体におけるカタラーゼ活性を維持しやすくなっているものと考えられる。

3-3. 過酸化水素

低温処理前においては、野生型、および、形質転換体における過酸化水素量に差は見られなかった (Figure 2)。しかし、低温処理を行うと、野生型の過酸化水素量は常に形質転換体よりも多くなった。また、低温処理後は、低温処理期間6日目を除き、野生型の過酸化水素量は低温処理前より多くなったのに対し、形質転換体においては、低温処理期間を通して、低温処理前の過酸化水素量より多くなるこ

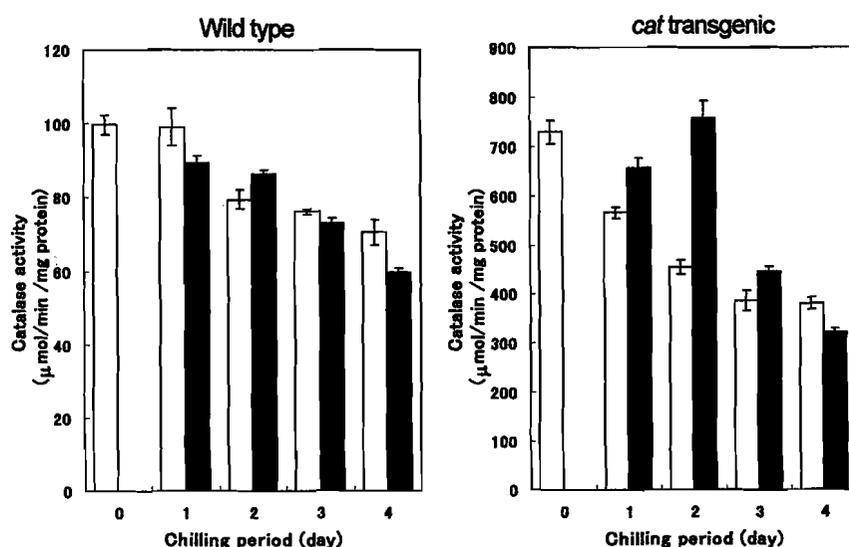


Fig. 1. Catalase activity of the wild type (left panel) and the catalase transgenic (right panel) rice after chilling or chilling-rewarming treatment. White bar, chilling treatment; black bar, rewarming for 1 day after the chilling treatment. Note that the scale of Y-axis is different in the two panels. Data were mean \pm SD of several determinations.

とはなかった。低温処理からの回復過程においても、常に野生型は形質転換体よりも過酸化水素量が多かった。また、野生型は、低温処理2日から回復した場合を除き、回復過程で過酸化水素量が増加したのに対し、形質転換体では6日目を除き、回復過程で過酸化水素量が増加することはなかった。過酸化水素を生体染色によって観察した場合も、同様の結果が得られた (data not shown)。

これらの結果は、明らかに、コムギカタラーゼを導入した形質転換イネにおいて、低温処理過程、および、低温処理からの回復過程で発生する過酸化水素が効率的に除去されていることを示している。しかし、形質転換体におけるカタラーゼ活性は低温処理過程、および、低温処理からの回復過程において、野生型の数倍高い活性を維持していることを考慮すると、両者での過酸化水素量の差は小さい。これは、活性酸素除去系が複数あり、カタラーゼが関与する除去系以外の経路でも活性酸素が効率よく除去されていることを示唆している。しかし、カタラーゼを導入することによって冷温耐性が大きくなっていることは明らかであり、カタラーゼの冷温障害発生回避に関する作用機作を明らかにすることは、イネの冷温障害機構を考える上で意味がある。

3-4. 生体膜、特に細胞膜の障害

葉に発生する冷温障害程度を、細胞膜の構造・機能が維持されているかどうかを示す指標である細胞からの電解質の漏出によって測定した (Figure 3)。低温処理過程においては、野生型を低温処理4日間すると、急激に電解質漏出が見られ、その後一定になるのに対し、形質転換体における電解質漏出度の増加は徐々に起こり、低温処理10日目まで急激な増加は見られなかった。その結果、50%電解質漏出に必要な低温処理日数をみると、野生型では低温処理2日目と4日目の間となるのに対し、形質転換体では低温処理8日目と10日目の間と、6日ほど遅れて起こることがわかった。低温処理からの回復過程においても、野生型では低温処理2および4日目から回復させた場合に電解質漏出増加が見られるものの、形質転換体では4日目から常温に戻しても増加が全く見られなかった。しかし、6日目では大きく増加し、形質転換体でも回復過程で細胞膜に関する障害が進行することが示された。

以上の結果は、低温に対する細胞膜の安定性が、形質転換体において大きく増加していることを示している。特に、低温処理4～8日目でその差が顕著であった。また、低温処理からの回復過程においても、少なくとも低温処理4日目から常温に戻した場合、形質転換体では全く細胞膜障害が進行していな

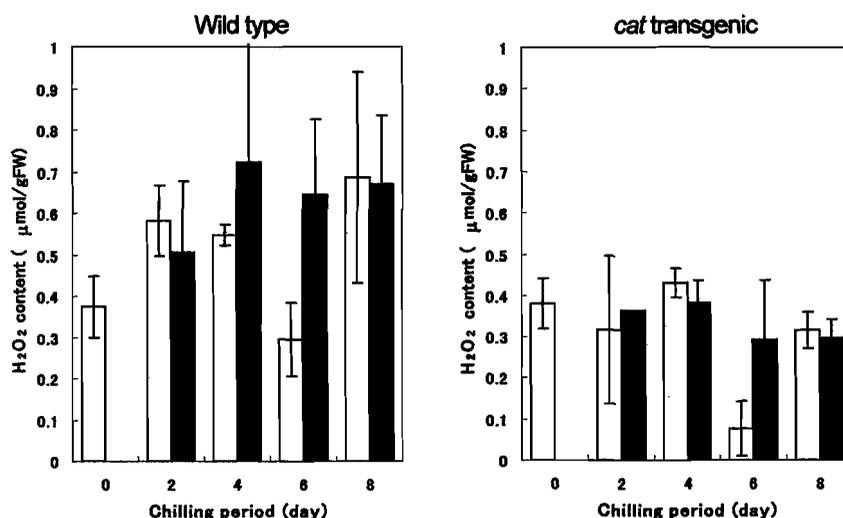


Fig. 2. Hydrogen peroxide content of the wild type (left panel) and the catalase transgenic (right panel) rice after chilling or chilling-rewarming treatment. White bar, chilling treatment; black bar, rewarming for 1 day after the chilling treatment. Data were mean \pm SD of several determinations.

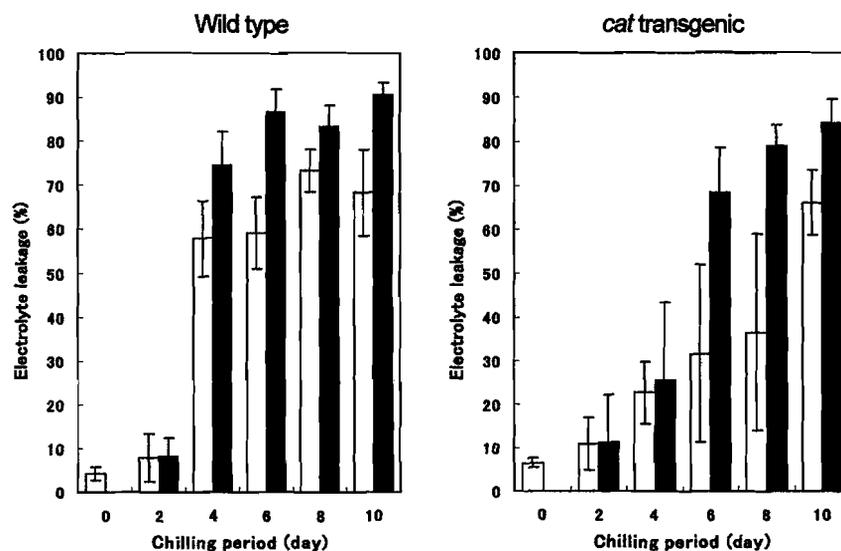


Fig. 3. Electrolyte leakage from the wild type (left panel) and the catalase transgenic (right panel) rice after chilling or chilling-rewarming treatment. White bar, chilling treatment; black bar, rewarming for 1 day after the chilling treatment. Data were mean \pm SD of several determinations.

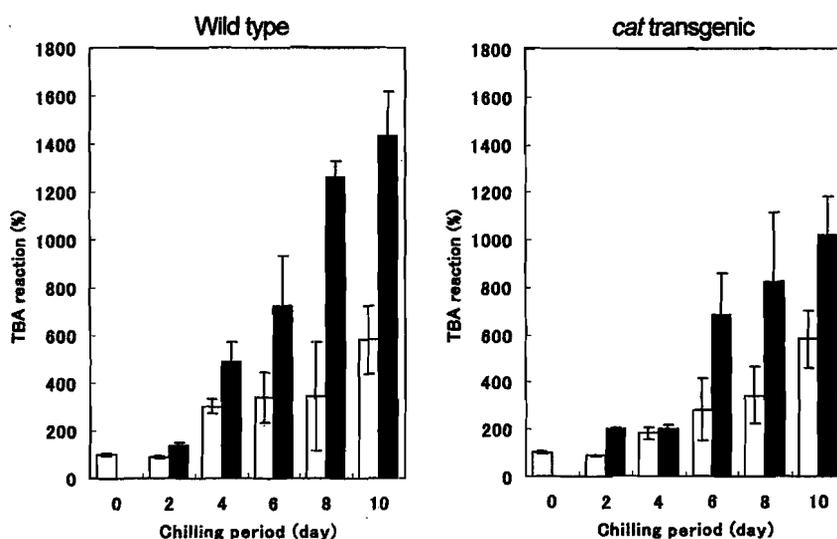


Fig. 4. Relative thiobarbituric-acid reaction activity of the wild type (left panel) and the catalase transgenic (right panel) rice after chilling or chilling-rewarming treatment. White bar, chilling treatment; black bar, rewarming for 1 day after the chilling treatment. Data were mean \pm SD of several determinations.

かった。つまり、形質転換体においては、低温処理時間が余り長くない場合に、細胞膜障害の発生が押さえられ、低温耐性が増大していることを示している。

3-5. 過酸化脂質

電解質の漏出で見られるような細胞膜に関連した冷温障害が膜脂質の過酸化と関連があるかどうかを調べるため、過酸化脂質量の定量（チオバルビツール

酸反応量）を行った（Figure 4）。野生型、および、形質転換体ともに、低温処理前、および、低温処理2日目ではチオバルビツール酸反応量に差が見られなかった。低温処理4日目以降、両者ともチオバルビツール酸反応量が増加したが、低温処理4および6日目では、形質転換体のチオバルビツール酸反応量は野生型に比較して低い水準を維持した。例えば、低温処理4日目では、形質転換体のチオバルビツール酸反応量は野生型の約60%にすぎなかった。しか

し、低温処理時間が長くなると両者の差は再び見られなくなった。低温処理からの回復過程においては、低温処理4日目から回復した場合にのみ大きな差が見られた。野生型では常温に戻したときにチオバルビツール酸反応量が大きく増加した(1.7倍)のに対し、形質転換体ではほとんど変化しなかった(1.1倍)。

従って、低温処理、および、低温処理からの回復過程のいずれにおいても、低温処理時間が比較的短い(4日間)場合に限り、形質転換体における過酸化脂質生成量(チオバルビツール酸反応量)が少ないことが判明した。これは、今まで述べてきた他の低温耐性に関わる指標(表現型、カタラーゼ活性、過酸化水素量、および、電解質漏出度など)と一致しており、導入されたカタラーゼにより、何らかの機構で細胞膜が保護され、冷温障害発生を回避(あるいは、遅延)しているものと考えられる。

4. 摘 要

活性酸素種の一つである過酸化水素を除去する酵素(カタラーゼ)を過剰に発現させたイネ(品種名ユウカラ)を作成し、遺伝子を導入する前の野生型との比較により、イネ幼葉の冷温障害発生と活性酸素の関係性を調べた。低温処理(5℃)開始直後は両者に障害発生度(葉の枯れ具合、電解質漏出度)の差は見られなかったが、4~6日後に形質転換体は野生型と比較して有意に高い障害を示した。過酸化水素量は形質転換体では常に野生型より少なく、しかも、低温処理前の値を超えることはなかった。カタラーゼ活性は低温処理期間を通して形質転換体における活性が高かった。同時期には、形質転換体の過酸化脂質量も、野生型に比べ少なかった。一方、低温処理後の回復過程(25/20℃)においても、障害発生度、カタラーゼ活性、及び、過酸化脂質量において形質転換体と野生型の間に差異が見られた。

以上示されたように、カタラーゼを導入した形質転換体が低温耐性、そして、低温処理後の回復過程における耐性が高いという事実は、導入した遺伝子の発現による高いカタラーゼ活性が、低温下および常温に戻した際に種々の反応によって発生する過酸化水素を効率よく除去し、その結果、生体膜が保護されることに起因していることを示唆している。

5. 文 献

- 1) 吉田:「植物の環境応答:生存戦略とその分子機構」渡邊・篠崎・寺島編, 秀潤社, 東京, p.24 (1999).
- 2) Lyons, L.M.: *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24, 445 (1973).
- 3) Murata, N., O. Ishizaki-Nishizawa, S. Higashi, H. Hayashi, Y. Tasaka and I. Nishida: *Nature*, 356, 710 (1992).
- 4) Kodama, H., T. Hamada, G. Horiguchi, M. Nishimura and K. Iba: *Plant Physiol.* 105, 601 (1994).
- 5) 真野, 浅田:「環境応答・適応の分子機構」篠崎・山本・岡本・岩淵編, 共立出版株式会社, 東京, p.105 (1999).
- 6) Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge: *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd ed). Oxford University Press, Oxford, pp. 936 (1999).
- 7) Matsumura, T., N. Tabayashi, Y. Kamagata, C. Souma and H. Saruyama: *Physiol. Plant.*, 116, 317 (2002).
- 8) Saruyama, H. and T. Matsumura: *DNA Sequence*, 10, 105 (1999).
- 9) Aebi, H.E.: *In* "Method of Enzymatic Analysis", H.U. Bergmayer, J. Bergmayer and M. Grassl, eds., Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 273 (1983).
- 10) Patterson, B.D., E.A. MacRae, I.B. Ferguson: *Anal. Biochem.*, 139, 487 (1984).
- 11) Lee, B.-H., H. Lee, L. Xiong and J.K. Zhu: *Plant Cell*, 14, 1235 (2002).
- 12) Uemura, M., R.A. Joseph and P.L. Steponkus: *Plant Physiol.*, 109, 15 (1995).
- 13) Heath, R.L. and L. Packer: *Arch. Biochem. Biophys.*, 125, 189 (1968).
- 14) Nishiyama, Y., H. Yamamoto, S.I. Allakhverdiev, M. Inaba, A. Yokota and N. Murata: *EMBO J.*, 20, 5587 (2001).