

「植物の機能と制御」

平成14年度採択研究代表者

原 登志彦

(北海道大学低温科学研究所 教授)

「寒冷圏における光ストレスと北方林の再生・維持機構」

1. 研究実施の概要

寒冷圏における低温と乾燥は、北方林樹木が受ける光ストレスを増幅させると予想される。この光ストレスが、北方林の自然再生・維持にとって重要である北方林樹木のライフサイクル、すなわち（1）落葉か常緑か、（2）幼木の生存・枯死、（3）生り年、を制御していると我々は考えている。本研究では、これらの生態学的プロセスに関して分子生物学的な解明を目指している。平成14年度は、バイオトロンの整備、室内実験（生理・生化学、分子生物）の準備、野外調査（生態・生理）の準備を行い、予備的なデータ取得を開始した。これらに基づき、平成15年度は北方林樹木のライフサイクルに関するこれら3つの研究項目について実験と調査を本格的に開始する。

（1）北方林樹木の落葉・常緑

北方林では、冬季に落葉する落葉樹と冬季でも緑の葉をつけている常緑樹が共に生育しているなどライフサイクルの多様性は高い。その多様性が生み出されるメカニズムを探るため、常緑樹の冬季の光合成機能の解析を中心に、これら落葉樹と常緑樹の光合成機能の季節変化を調査・解析する。

常緑針葉樹イチイの葉の採取を1ヵ月ごとに継続して野外で行い、活性酸素消去系とレドックス調節系に関わる酵素活性、クロロフィル、キサントフィルサイクル、カロチノイドなどの色素量、グルタチオン量の測定を行った。昨年度採取した落葉広葉樹ダケカンバの測定結果と比較し、落葉広葉樹と常緑針葉樹の間にどのような差異が見られるのかを解析中である。

寒冷圏の常緑針葉樹は冬季凍結温度下でも光合成器官を保持している。しかし、この環境下ではCO₂の固定は行われておらず、そのため光合成器官で補足した光エネルギーを効率良く捨て去る仕組みが必要である。この点を明らかにすることは、寒冷圏樹木の生存戦略を知る上で、最も重要な点の一つである。一般的な光合成の常識によると、捕捉した光エネルギーの量とそれを利用するCO₂固定活性のアンバランスは、活性酸素を発生させ、植物を枯死させるはずである。しかし、常緑針葉樹は冬季でも光傷害を受けず、クロロフィルの褪色も見られない。従って、冬季光合成装置の光傷害回避機構を明らかにする計画である。平成14年度に行った常緑針葉樹イチイを用いた予備的実験によると、夏季の葉

緑体は細胞の周辺に位置しているのに対し、冬季葉緑体は細胞の中心部に集まり、大きな集合体を作っていることが解った。また、冬季の光化学系は、光エネルギー捕捉の機能は夏季とあまり変わらないこと、しかし冬季葉緑体の低温下での光化学系IIの周辺の電子伝達が、通常電子伝達とは違うことが明らかになった。これらの点が冬季葉緑体は低温でも光傷害を受けない仕組みと関係していると考えている。今後、葉緑体の形態と細胞内の位置変化と光化学系IIの電子伝達に焦点をあてて、冬季葉緑体の低温下での生存戦略機構を明らかにする予定である。

葉の老化・落葉は、樹木のライフサイクルを理解する上で重要である。我々は、クロロフィルの代謝が老化の調節や光傷害に重要な役割を担っていると考えており。そこで、キュウリを用いた予備的実験を行ったところ、強光やパラコート処理など植物に酸化ストレスを与えると、クロロフィルの代謝系が部分的に阻害され、クロロフィル合成系の間mediate代謝物が蓄積することを見出した。この中間体は、光増感作用が強く、細胞死を招くので、光ストレスと老化・細胞死が関係することが示唆された。この点を詳細に解明するため、クロロフィル合成や分解に関与する遺伝子の網羅的単離を開始した。EMS処理したシロイヌナズナ変異株を高速液体クロマトグラフィーによって色素分析を行い、クロロフィルの合成や分解に異常のある株をスクリーニングし、その原因遺伝子を決定する。この作業を通じて、まだ単離されていないクロロフィルの合成系や分解系の遺伝子や、それを調節する遺伝子の単離を行う。現在のところ約700株のスクリーニングが完了し、幾つかの変異株の単離に成功している。今後2年以内に3000株のスクリーニングを行い、重要な遺伝子の網羅的単離を試みる予定である。この成果を北方林樹木の葉の老化・落葉の解明に利用する計画である。

(2) 北方林樹木の幼木個体の生存・枯死

幼木がどのような環境条件のもとで生育できるのかは、森林の自然再生とバイオマス生長にとって重要である。北方林では、ギャップ（空所）ではなくて成木の下に芽生えが定着し幼木が生育するという現象を我々は発見したが、このプロセスの生理・生化学的、分子的基盤を解析する。

低温域高照度バイオトロン内において、北方林常緑針葉樹イチイの幼木を強光下で生育させ、枯死過程の追跡の予備的実験を行った。今後、平成14年度のCREST予算で購入したバイオトロンを用い、イチイ幼木および北方林落葉広葉樹ミズナラを強光および弱光、常温および低温の条件下で生育させ、個体の大きさによってその生存・死亡過程にどのような差が見られるのかを明らかにする。そして、その過程に関与する因子を探り、北方林樹木の幼木個体の生存・枯死の分子的メカニズムを解明する予定である。

(3) 北方林の生り年（一斉開花現象）

数年に一度、森林全体が一斉開花・結実する「生り年」は、多量の芽生えを供給するという意味で森林の自然再生・維持にとって重要なプロセスである。光ストレスが北方林樹木の開花を促すと我々は考えており、この生理・生化学的、分子的基盤を解析する。

北海道立林業試験場の標準木（常緑針葉樹2種、落葉針葉樹2種、落葉広葉樹3種）から、

葉を1ヶ月ごとに採取し、(1)と同様な測定を行い、それらの測定結果と生り年との関連を調べる計画で、葉のサンプリングを開始した。

同時に、光ストレスから開花が誘導される分子メカニズムを解明するため、まずはモデル植物シロイヌナズナを用いた分子生物学的解析を行った。その結果、

1. 活性酸素に対する応答に関しては、モデル植物シロイヌナズナを用いることで、活性酸素の定常レベルが高い変異体を同定し、その変異体が不飽和脂肪酸であるリノレン酸の合成欠損株であることを見出した。
2. 形質転換体および同定した変異体を用いた解析から、リノレン酸の含量は活性酸素の定常レベルを制御しており、また逆に活性酸素量によっても制御されることを見出した。
3. また、活性酸素の生成の抑制条件において花成が遅延し、リノレン酸が蓄積するのに対して、リノレン酸の欠損変異体はそのような花成遅延が認められなかった。このことからリノレン酸が花成の抑制因子であり、活性酸素の下流で機能することを見出した。
4. リノレン酸の欠損株は低温下でも常温と同様な時期に花芽をつけることを見出した。このことはリノレン酸が低温環境下における膜脂質の流動性の維持に機能するばかりでなく、花芽の形成を抑制していると考えられ、本プロジェクトにとって北方林樹木のライフサイクルを制御する重要な因子であることがわかった。
5. 1~4を踏まえて、リノレン酸含量を北方林樹木サンプルの解析対象とするために予備的な解析を行った。
6. シロイヌナズナおよびロゼット性が強いトルコギキョウを用いることで、グルタチオン代謝系が低温および光合成によって制御されることを実証し、またグルタチオンが花成を決定することを見出した。
7. グルタチオンの代謝系制御因子については、アクティベーションタギングを用いたスクリーニングを実施し、数百の候補植物体を単離した。
8. DNAマイクロアレイ法によりグルタチオンおよび活性酸素の制御の下流因子を解析した。

(以上、1. ~ 3. の事実を基に特許出願済み)

今後、DNAマイクロアレイ解析によるリノレン酸の下流因子の同定を行う予定である。アクティベーションタギングで得た候補は、今後さらに絞り込み、解析の対象となりうるかを調べる予定である。7. については、ライフサイクルと関連がある因子を候補遺伝子の機能解析を通じて同定する予定である。

以上より、リノレン酸およびグルタチオン代謝系を北方林樹木の解析の新たな対象とする予定であり、北海道立林業試験場の標準木からのサンプルに適用すべく準備を進めている。

2. 研究実施体制

生態学的解析グループ

① 研究分担グループ長：原 登志彦（北海道大学低温科学研究所、教授）

② 研究項目：

「光ストレスによる北方林樹木のライフサイクル制御」の生態学的解析

- 1) 野外のイチイ（北方林常緑針葉樹）を用いた活性酸素および過剰エネルギー消去系の機能の季節変化の解析。
- 2) 強光および低温下における北方林樹木の幼木の生存・枯死過程の解析。
- 3) 野外の標準木のサンプルを用いた光ストレスと生り年の関係の解析。

生理・生化学的解析グループ

① 研究分担グループ長：田中 歩（北海道大学低温科学研究所、教授）

② 研究項目：

「光ストレスによる北方林樹木のライフサイクル制御」の生理・生化学的解析

- 1) イチイを用いて、冬季光合成がどのような機構によって凍結温度下で光傷害を回避しているのかを生理・生化学的、形態学的に明らかにする。
- 2) 光ストレスによってクロロフィルの代謝系が阻害される機構を調べ、北方林落葉樹ミズナラの老化・落葉の機構を明らかにする。
- 3) 老化、特にクロロフィルの分解を担う遺伝子の単離を目的にシロイヌナズナの変異株の単離を行い、北方林樹木へ応用する

分子生物学的解析グループ

① 研究分担グループ長：小川 健一（岡山県生物科学総合研究所、室長）

③ 研究項目：

「光ストレスによる北方林樹木のライフサイクル制御」の分子生物学的解析

光ストレスは植物中の酸化還元（レドックス）状態を変化させ、その状態変化がライフサイクルを制御していると我々は予想している。その制御で、鍵となる活性酸素代謝制御およびグルタチオン代謝制御について研究を行い、北方林樹木のライフサイクル制御に関して解析対象とする因子の同定を試みる。