

「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）「生り年」（数年ごとの森林全体の一斉開花・結実）、（２）幼木の生存・枯死、（３）常緑か落葉か、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の分子生物学的な解明を目指している。平成15年度は、バイオトロンによる室内実験（生理・生化学、分子生物）と野外調査（生態・生理）を本格的に開始した。その結果、（１）開花に関わる重要因子として平成14年度に同定したリノレン酸の挙動と「生り年」との関係、（２）細胞死に関与する因子PAO（フェオフォルビドaオキシゲナーゼ）の同定、（３）常緑樹の冬の光合成機能と落葉樹の葉の老化・落葉過程、などを解明した。これらのこれまでの研究成果に基づき、平成16年度は北方林樹木のライフサイクルに関する上記3つの研究項目についてさらに詳しい室内実験と野外調査を継続し、さらに「生り年」に関する野外における操作実験も新たに行い、我々の仮説をより確実に実証してゆく。

2. 研究実施内容（研究目的、方法、結論などを記述）

（１）北方林の「生り年」（森林全体の一斉開花・結実現象）と光ストレス

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の1つである。光ストレスが北方林の「生り年」を促すと我々は考えており、この生理・生化学的、分子的基盤を解析している。

まず、光ストレスから開花が誘導される分子的メカニズムを詳細に解明し北方林樹木に応用するため、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。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平成14年度に見出した。平成15年度は分子遺伝的にリノレン酸量を変えた形質転換シロイヌナズナを用いて、DNAマイクロアレイ解析を行い、リノレン酸により制御さ

れる遺伝子群を同定した。平成14年度までの解析でリノレン酸は花成の抑制因子であることを見出したが、同定した遺伝子群には花成の抑制因子として知られる遺伝子が含まれており、その遺伝子がリノレン酸によって誘導されることがリノレン酸による花成抑制機構であると考えられた。平成16年度はジーンチップ解析で同定した遺伝子の機能解析を逆遺伝学的に行い、リノレン酸制御下遺伝子のうちライフサイクルと密接な関係にある遺伝子群を特定する予定である。

これまで、樹木では開花などの分子機構の解明は殆ど試みられて来なかった。そこで我々は、北方林樹木において特徴的な表現型を示すクローンに対して上記シロイヌナズナの結果を応用し、北方林の「生り年」の解析に取り組んでいる。そのために、北海道立林業試験場(美唄市)の標準木クローンから2003年4月より毎月一回、葉の採取を行った。標準木クローンとして、常緑針葉樹のアカエゾマツ、トドマツ、落葉針葉樹のグイマツ、カラマツ、落葉広葉樹のミズナラ、ハウチワカエデ、シラカンバの7樹種を用いた。

グイマツ、カラマツについては、毎年多く開花するクローンとほとんど開花しないクローンの解析を行った結果、毎年多く開花するクローンで花成が決定される季節のリノレン酸量が少なくなっていた。また、常緑樹は落葉樹に比べて、リノレン酸量が低く、冬場にもその量は低かった。一般的に耐冷性の機構として脂肪酸の不飽和化が論じられているが、常緑樹はそれとは異なった機構で葉を維持していると考えられた。また、毎年多く開花するクローンに比べ、ほとんど開花しないクローンではリノレン酸含量の季節変動が大きく、特に花成の決定される季節に動きが大きかった。このように樹木でも、シロイヌナズナと同様にリノレン酸量によって花成が制御され「生り年」が起きる可能性が大きいと考えられる。

(2) 北方林樹木の幼木の生存・枯死と光ストレス

北方林の幼木の枯死は光ストレスによって引き起こされると我々は考えている。光ストレスの入り口は、(a) 光合成集光装置(光エネルギー捕捉装置)と (b) クロロフィル合成および分解の中間代謝物である。そこで、これらの課題に取り組み以下の点を明らかにした。

1. 光ストレスと集光装置

集光装置の大きさを制御する遺伝子は、転写と翻訳後に制御を受けることを明らかにした。これらの調節機構を分子遺伝学的に制御することによって、強光下でも大きな集光装置を持った形質転換植物を作成した。しかし、従来の予想に反して、強光に曝しても顕著な光ストレスを受けることはなかった。一方、野外の常緑針葉樹イチイを用いた解析では、冬季に南側の新葉のクロロフィルa/b比が高く集光装置サイズが小さいということを示唆しており(つまり吸収する光の量を減らして光ストレスを回避する)、集光装置と光傷害の関係については更に解析が必要である。

2. クロロフィル代謝中間体と光ストレス

クロロフィル分解に関わる遺伝子、フェオフォルビドaオキシゲナーゼ(PAO)のクローニングにはじめて成功した。この遺伝子は、従来Accelerated cell death 1 と呼ばれたも

のであった。この遺伝子の破壊株は、クロロフィル分解中間体のフェオフォルビドを蓄積することによって、光ストレスによる細胞死を誘導することが明らかになった。現在、北方林樹木の枯死とフェオフォルビドの蓄積の関係を明らかにする研究を計画している。

3. 光ストレスと遺伝子発現

寒冷圏に生育する北方林樹木が受ける光ストレスは低温や乾燥ストレスにより増幅し、植物に有害な活性酸素が生じる。この活性酸素が北方林樹木のライフサイクルを制御しているのではないかという我々の仮説を検証する目的で、常緑針葉樹イチイを用いて、活性酸素により発現が誘導されると予想される遺伝子群の網羅的単離を行った。700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ・4°Cの強光・低温処理を施したイチイ葉を用いて作成したcDNAライブラリーから、ランダムに単離した1000遺伝子の塩基配列を決定したところ、最も多く同定された遺伝子は、活性酸素のスキャベンジャーとして知られるメタロチオネインであった。単離された遺伝子の多くは葉緑体を構成する遺伝子（25%）であったが、アスコルビン酸ペルオキシダーゼやカタラーゼ、Cu/Zn SOD、グルタチオンレダクターゼなど、活性酸素消去系の遺伝子が多く単離された。興味深いことに、単離された遺伝子中には花芽形成に関与するFTと相同性を有する遺伝子が同定された。強光・低温処理を施したイチイ葉からFT相同性遺伝子が同定されたという事実は、北方林樹木の生り年に光ストレスが関与するという我々の仮説を支持するものとして、大変興味深い。「(2) 北方林樹木の幼木の生存・枯死と光ストレス」で得られたこの結果は、「(1) 北方林の生り年と光ストレス」とも関係し、「光ストレスによる北方林樹木のライフサイクル制御」という我々の仮説をさらに支持するものである。

(3) 北方林樹木の落葉・常緑と光ストレス

1. 冬季における常緑針葉樹イチイの光傷害回避機構

常緑針葉樹イチイの冬季低温下での葉緑体の形態と光化学系電子伝達機能について解析した。冬季、イチイの葉緑体包膜は異常に拡大し、隣の葉緑体包膜と重なり合うように接着し、その結果、多くの葉緑体が細胞の中心部分で集合体を作っていた。冬季のイチイを室温で馴化させると、葉緑体が細胞周辺に移動し、高い光合成活性が回復した。次に、熱放散機構の解明に取り組んだ。従来報告されているNPQによる熱放散だけではエネルギーを全て散逸できない。そこで、冬季のイチイの光化学系の電子の流れをPAMで詳しく解析した。その結果、冬季、イチイの葉緑体では、P680⁺とPhe⁻間の電荷再結合によって光エネルギーを散逸し光ストレスを回避しているというモデルを提案した。

2. 落葉広葉樹ミズナラの葉の老化・落葉過程

一斉展葉を行う落葉広葉樹ミズナラを用い、個体の生長や光ストレスが、葉の老化・落葉過程にどのように影響を与えているのか調べた。飽和光下での光合成活性は、高温、低温ともに葉の展開終了後次第に低下した。最大量子収率は、葉の展開終了後から、高温よりも低温で低い値を示した。生重量あたりのクロロフィル量は葉の展開終了後から次第に低下した。一方、キサントフィルサイクルのプールサイズとクロロフィル当たりのチラコイド膜結合型のアスコルビン酸ペルオキシターゼ活性は葉の展開終了後、次第に増加し

たが、高温よりも低温で高い値を示した。北方林の特徴である低温・貧栄養条件下では、高温・富栄養条件下よりも光ストレスを受けやすく、それが落葉広葉樹の葉の老化・落葉の1つの要因になっている可能性がある。

3. 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）を用いて、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を行う。
- 2) 高照度低温域バイオトロンを用いて、強光および低温下における北方林樹木（常緑樹イチイ、落葉樹ミズナラ）の幼木の生存・枯死過程および葉の老化過程の解明を行う。
- 3) 野外の北方林樹木7樹種のサンプルを用いて、気象条件および光ストレスと「生り年」の関係を解明する。

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、ミズナラ（北方林落葉広葉樹）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）

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。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Watanabe T., Yokozawa M., Emori S., Takata K., Sumida A. & Hara T. (2004) Developing the multilayered integrated numerical model of surface physics-growing plants interaction, MINoSGI. *Global Change Biology* 10: 963-982.
- Nakatsuka T., Ohnishi K., Hara T., Sumida A., Mitsuishi D., Kurita N. & Uemura S. (2004) Oxygen and carbon isotopic ratios of tree-ring cellulose in a conifer-hardwood mixed forest in northern Japan. *Geochemical Journal* 38: 77-88.
- Dolezal J., Stastna P., Hara T. & Srutek M. (2004) Neighbourhood interactions and environmental factors influencing old-pasture succession in the Central Pyrenees. *Journal of Vegetation Science* 15: 101-108.
- Moharekar S.T., Lokhande S.D., Tanaka A., Hara T. & Chavan P.D. (2003) Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. *Photosynthetica* 41: 315-317.
- Takahashi K., Uemura S., Suzuki J. & Hara T. (2003) Effects of understory dwarf bamboo on soil water and growth of overstory trees in a dense secondary *Betula ermanii* forest, northern Japan. *Ecological Research* 18: 755-762.
- Matsuki S., Ogawa K., Tanaka A. & Hara T. (2003) Morphological and photosynthetic responses of *Quercus crispula* seedlings to high-light conditions. *Tree Physiology* 23: 769-775.
- Ono K., Sasaki H., Hara T., Kobayashi K. & Ishimaru K. (2003) Changes in photosynthetic activity and export of carbon by overexpressing a maize sucrose-phosphate synthase gene under elevated CO₂ in transgenic rice. *Plant Production Science* 6: 281-286.
- Ishimaru K., Ono K. & Kashiwagi T. (2004) Identification of a new gene controlling plant height in rice using the candidate-gene strategy. *Planta* 218: 388-395.
- Tanaka R., Hirashima M., Satoh S. & Tanaka A. (2003) The Arabidopsis-accelerated cell death gene ACD1 is involved in oxygenation of pheophorbide a: inhibition of the pheophorbide a oxygenase activity does not lead to the "stay-green" phenotype in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 44: 1266-1274.
- Tokutsu R., Teramoto H., Takahashi Y., Ono T. & Minagawa J. (2004) The light-harvesting complex of photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*: protein composition, gene structures and phylogenic implications. *Plant and*

Cell Physiology 45: 138-145.

- Eggink L.L., LoBrutto R., Brune D.C., Brusslan J., Yamasato A., Tanaka A. & Hooper J.K. (2004) Synthesis of chlorophyll b: localization of chlorophyllide a oxygenase and discovery of a stable radical in the catalytic subunit. *BMC Plant Biology* 2004, 4:5 doi:10.1186/1471-2229-4-5.
- Mino M., Abe S., Suzuki T., Yokoyama H., Kaminaka H., Ogawa K., Morita S., Masumura T., Tanaka K. & Inoue M. (2004) Hydrogen peroxide functions as a cell death signal for hybrid lethality in the F1 of *Nicotiana glauca* x *N. tabacum*. *Plant Science* 167: 267-274.
- Yanagida M., Mino M., Iwabuchi M. & Ogawa K. (2004) Reduced glutathione is a novel regulator of the vernalization-induced bolting in the rosette plant *Eustoma grandiflorum*. *Plant and Cell Physiology* 45: 129-137.
- Nishikawa M. & Ogawa K. (2004) Antimicrobial activity of a chelatable poly (arginyl-histidine) produced by the ergot fungus *Verticillium kibiense*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 229-235.
- Ogawa K., Hatano-Iwasaki A., Yanagida M. & Iwabuchi M. (2004) Level of glutathione is regulated by ATP-dependent ligation of glutamate and cysteine through photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: Mechanism of strong interaction of light intensity with flowering. *Plant and Cell Physiology* 45: 1-8.
- Ito H., Iwabuchi M. & Ogawa K. (2003) The sugar-metabolic enzymes aldolase and triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*: Detection using biotinylated glutathione. *Plant and Cell Physiology* 44: 655-660.
- 松木佐和子・小川健一・田中歩・原登志彦 (2003) ミズナラ実生の異なる光環境に対する形態的・生理的可塑性。 *北海道大学演習林研究報告* 60: 91-100.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：4件 (CREST研究期間累積件数：5件)