

「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16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）を前年度に引き続き継続して行った。そして、（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および花芽形成に関与する遺伝子の季節変化と「生り年」との関係、（２）クロロフィル代謝系が光傷害の標的となっていることを見出し、この現象と幼木の生存・枯死との関係、（３）常緑樹の冬の光傷害回避機構および落葉樹の葉の老化・落葉過程と光ストレスとの関係、を解明した。以上の研究成果に基づき、平成17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それらのメカニズムに関する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詳しい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

（１）北方林の生り年と光ストレス

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、分子的基盤を解析した。

北海道立林業試験場の標準木から平成15年4月より毎月一回、葉の採取を行った。標準木として、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。採取した葉からクロロフィル量、カロチノイド量、グルタチオン量、窒素量、光合成産物量、アスコルビン酸ペルオキシターゼ活性、グルタチオンレダクターゼ活性、リノレン酸量（分子生物学的解析グループが平成14年度までに明らかにした開花に関わる因子）の測定を行った。

グイマツとカラマツについては、毎年多く開花するクローンとあまり開花しないクローンがあるので、これらの間に色素量、酵素活性、光合成産物量、リノレン酸量に違いが見られるのか調べた。毎年多く開花するクローンでは、5月（花芽形成が決定される時期）のリノレン酸量が少なく、7月のデンプン量が多く、8月のキサントフィルサイクルの脱エポキシ化率が高く、また10月のクロロフィル量とカロチン量が多くなっていた（つまり葉の老化が遅かった）。また、クロロフィル量当たりのチラコイド膜結合型APX活性は5月に高い値を示す傾向があり、花芽形成が決定される時期に強い光ストレスを受けリノレン酸量が少なくなっていることが示唆された。

落葉広葉樹、常緑針葉樹については、生り方の違うクローンが得られていないため、複数年の傾向を見て、生り年の変動と併せて今後解析を行う。平成17年度も継続して調査を行い、開花結実調査の結果および開花に影響を及ぼす気象要因の解析結果と照らし合わせて、開花・結実に影響を与える要因を絞り込む予定である。

また同時に、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。平成16年度は、北方林樹木に応用した若干の結果も含め以下のような結果を得た。

1. 低温による花成誘導（春化）を抑制する遺伝子がリノレン酸量により制御されることを見出した。このことは、リノレン酸量が北方林の開花とも密接な関係があるという我々の仮説をより強く支持するものである。
2. グルタチオンは活性酸素とともに細胞内のレドックス制御因子であり、平成14年度までにグルタチオンがライフサイクルを制御することを明らかにした。平成16年度は、グルタチオンによるライフサイクル制御は糖代謝系を介していることが示唆される結果を得た。この結果も北方林の生り年の解析に応用する予定である。

また、野外操作実験として、道立林業試験場の実験苗畑にグイマツ、カラマツのよく生るクローン各2クローンずつ植栽し、パラコート（10 μ M）とコントロール（脱イオン水のみ）の処理を平成16年5月に行った。開花状況を平成17年度に調べ、光ストレス（パラコートにより誘導される酸化ストレス）が開花にどの程度関与しているのかを解明する。

さらに、花芽形成に関与する遺伝子の発現解析を行った。グイマツから、シロイヌナズナの花芽形成遺伝子*LEAFY*と相同な2つの遺伝子を単離した。どちらの遺伝子も芽（短枝を含む）で発現量が高いことがわかった。これらの遺伝子発現の季節変化を調べたところ、6～8月に高い傾向がみられた。これは、花芽が形成される時期と一致する。

（2）北方林の幼木の生存・枯死と光ストレス

緑化中のキュウリ子葉に強光ストレスを与えると、クロロフィル合成系の複数の酵素が不活性化され、クロロフィル合成の中間体のProtoporphyrin IXやMg-protoporphyrin IXが蓄積することを見出した。これは新しく見出された光傷害の機構である。この傷害の樹木での生理学的役割を解析するため、屋外の北方林・常緑針葉樹イチイにおけるクロロフィル合成中間体の蓄積を調べた。春新しく展開する緑葉に、Mg-protoporphyrin IXが蓄積することを見出した。このことは、野外の樹木においても、春先にクロロフィル代謝系が

光傷害の標的になっていることを示しており、北方林の幼木の生存・枯死にも関与していると予想される。また、この中間体は活性酸素を生産する分子であると同時に、葉緑体シグナル分子でもあるため、樹木において何らかの生理的役割を担っていることが推測される。

(3) 北方林の落葉・常緑と光ストレス

北方林・落葉広葉樹ミズナラの当年生実生を、栄養供給下、強光 ($1000\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) と弱光 ($100\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、高温 (25°C) と低温 (10°C) を組み合わせて生育させ、個体の生長や光ストレスと葉の老化との関連について調べた。強光低温では、光ストレス応答が起こり、それが葉の老化の要因のひとつになっている可能性が示された。

北方林・常緑針葉樹イチイの葉緑体構造の季節変化を詳しく調べた結果、11月頃から葉緑体の部分的な集合が細胞の周辺で始まり、1月にはそれらが細胞の中央に集積し、春には再び周辺に移動することがわかった。さらに吸収した光エネルギーの処理を調べるため、葉緑体のスペクトル解析を行った。吸収スペクトルには大きな季節的な変化は見られなかったが、時間分解スペクトルを解析したところ、冬季と夏期に時間初期にみられる光合成色素間のエネルギー移動に違いが認められた。このことは、夏期と冬季で色素間のエネルギー移動が異なっていることを示している。これら葉緑体の構造とその細胞内の位置や、捕捉した光エネルギーの色素間移動の違いは、冬季葉緑体の光傷害に対する防御機構と予想される。

また、平成15年度に引き続き、DNAマイクロアレイ作成に供する為の網羅的遺伝子同定を行った。平成16年度のEST解析においては、野外で生育するイチイの葉に於いて発現する遺伝子を単離する目的で、8月及び12月に採取したイチイからmRNAを抽出し遺伝子の単離を行った。12月のイチイ葉ではELIP (Early Light-Induced Proteins) が多く見いだされた。冬季のイチイ葉はELIP遺伝子を多く発現することにより、冬季の光ストレスを回避し常緑が保たれていることが示唆された。

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（北方林常緑針葉樹）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

- Takahashi K., Matsuki S., Uemura S. & Hara T. (2004) Variations in the maximum photosynthetic rate of *Betula ermanii* in relation to soil water potential. *Vegetation Science* 21: 103-108.
- Li B., Shibuya T., Yogo Y. & Hara T. (2004) Effects of ramet clipping and nutrient availability on growth and biomass allocation of yellow nutsedge. *Ecological Research* 19: 603-612.
- Dolezal J., Ishii H., Vetrova V.P., Sumida A. & Hara T. (2004) Tree growth and competition in a *Betula platyphylla-Larix cajanderi* post-fire forest in central Kamchatka. *Annals of Botany* 94: 333-343.
- Nagata N., Satoh S., Tanaka R. & Tanaka A. (2004) Domain structures of chlorophyllide a oxygenase of green plants and *Prochlorothrix hollandica* in relation to catalytic functions. *Planta* 218: 1019-1025
- Mimuro M. & Tanaka A. (2004) The *in vivo* and *in vitro* reconstitution of pigment-protein complexes, and its implication in acquiring a new system. *Photosynthesis Research* 81: 129-137.

- Morita-Yamamuro C., Tsutsui T., Tanaka A. & Yamaguchi J. (2004) Knock-out of the plastid ribosomal protein S21 causes impaired photosynthesis and sugar-response during germination and seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* 45: 781-788.
- Inoue H., Tsuchiya T., Satoh S., Miyashita H., Kaneko T., Tabata S., Tanaka A. & Mimuro M. (2004) Unique constitution of photosystem I with a novel subunit in the cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. *FEBS Letters* 578: 275-279.
- Nagata N., Tanaka R., Satoh S. & Tanaka A. (2005) Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of *Prochlorococcus* species. *Plant Cell* 17: 233-240.
- Mino M., Misaka Y., Ueda J., Ogawa K. & Inoue M. (2005) Hybrid lethality of cultured cells of an interspecific F1 hybrid of *Nicotiana glauca* Domin and *N. tabacum* L. *Plant Cell Reports* DOI: 10.1007/s00299-005-0923-2
- Nishikawa M. & Ogawa K. (2004) Occurrence of D-histidine residues in antimicrobial poly(arginyl-histidine), conferring resistance to enzymatic hydrolysis. *FEMS Microbiology Letters* 239: 255-259.
- Senda K. & Ogawa K. (2004) Induction of PR-1 accumulation accompanied with runaway cell death in the *Isd1* mutant of *Arabidopsis* is dependent on glutathione levels but independent of the redox state of glutathione. *Plant & Cell Physiology* 45: 1578-1585.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：6件）