「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　寒冷生物圏変動　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、北方林の天然更新・維持機構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」（数年ごとの森林樹木の大量開花・結実による大量の芽生えの供給；繁殖戦略）、（2）幼木の生存・枯死（生存戦略）、（3）常緑樹と落葉樹の混生林の形成（生物多様性）、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を生理・生化学的、分子生物学的に解明し、北方林の持続可能な森林経営と環境保全に応用することを目指している。平成 18 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、新たに同定した開花遺伝子 *LGY1*、 *LGY2* および *DAL2-like* の発現レベルの季節変化、気象条件（温度、降水量）の季節変化と北方林の生り年との関係、（2）春先における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、この現象と北方林の幼木の生存・枯死との関係、（3）北方林における常緑針葉樹 6 種の冬の光傷害回避機構としての ELIP(early light induced proteins)形成（遺伝子レベルおよびタンパク質レベル）および落葉広葉樹2種の葉の老化・落葉過程と光ストレスとの関係、を解明した。また、上記（1）の「生り年」の研究成果を応用し、グイマツ優良株の種子を安定的に生産する技術を考案した。平成 19 年度は、この技術の実用段階への発展を目指したい。

2. 研究実施内容

(1) 北方林の生り年と光ストレス

北海道立林業試験場（美唄）の標準木を用い、平成 15 年 4 月より毎月一回、葉の採取を行っている。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樹種を用いている。採取した葉からクロロフィル量、カロチノイド量、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、グルタチオン量、リノレン酸量の測定、そして花成に関与する遺伝子の発現の

解析を行った。同時に、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も行った。

(1) これまでに、低温による花成誘導を抑制する遺伝子 FLC の発現がリノレン量によって正に制御されることを見出した。さらに 17、18 年度は、花成の決定因子 AP1 のタンパク質としての機能がリノレン酸によって直接負に調節されることを明らかにした。19 年度は *LEAFY* についても同様にリノレン酸によって調節されるかを調べる。16 年～18 年度の北方林樹木（美唄）の調査の結果、リノレン酸量と花芽形成量との間の相関が認められた月は、5 月～7 月であり、リノレン酸が花成の誘導の抑制と決定された後発達を抑制するとしたシロイヌナズナの結論に矛盾しない結果となった。19 年度は、さらに他の樹種の観点を含めてまとめの解析を行う予定である。

(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、これ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。17 年度は、グルタチオンと結合することで生長を調節する因子を見出した。18 年度には、グルタチオンの機能を活用することで様々な植物の花成を促進し、結実も促進できることを見出した。

また、野外操作実験として、道立林業試験場道北支場（中川）の実験苗畑のグイマツ成木の枝に 5 月から 6 月にかけての鍵となる時期に処理時期を 1 週間ごとに変えて枝単位でパラコート処理を行った。これらの操作実験の開花状況の調査を 18 年度に行い、パラコート処理に感受性が高い時期が存在する可能性が示された。引き続き 18 年度も同様の処理を行ったので、18 年度と同様の開花・結実調査を 19 年度も行う予定である。

これまでに道立林業試験場（美唄）のクローン集植所に生育するグイマツから単離した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 *LGY1*、*LGY2* の発現部位および発現開始時期を明らかにした。どちらの遺伝子もその年に開花した花器官より翌年の花器官が形成される芽で高い発現が認められた。芽において *LGY1* は花芽形成が開始すると考えられる 5 月から増加し 9 月に減少する一方、*LGY2* ではそのような季節変動は認められなかった。シロイヌナズナの花器官形成に関わる MADS-box 遺伝子 *AGAMOUS* と相同な遺伝子をグイマツから単離し、その発現部位および発現開始時期を調べたところ、開花した雄花および雌花で発現が高く、芽において 16 年は 7 月から、17 年、18 年は 8 月から発現が認められたことから、グイマツでは 7～8 月に花器官が形成されると考えられた。従って、*LGY1* は花器官が形成されるより前に発現が開始し、花芽形成の開始に関与すると考えられる。これまでに 5 月上旬までの低温がグイマツの生り年に重要であることが回帰分析の結果からわかっている。16 年～18 年の気象観測データおよび *LGY1* 遺伝子発現量の季節変動を比較すると、5 月に低温が続いた 17 年では、16 年、18 年に比べ *LGY1* の発現開始時期が早まっていた。従って、生り年には *LGY1* の発現の促進がまず必要であると考えられる。以上の「生り年」の研究成果を応用し、グイマツ優良株の種子を安定的に生産する技術を考案した。平成 19 年度は、この技術の実用段階への発展を目指したい。

(2) 北方林の幼木の生存・枯死と光ストレス

強光ストレスが植物の生存に及ぼす影響に関しては、不明な点が多い。これまでの研究では、

光化学系を標的としたものが多かった。我々は、これまでにクロロフィル代謝系が強光ストレスによって傷害を受けることを見出した。クロロフィル代謝中間体は、活性酸素類を発生させ、酸化ストレスを生み出す大変危険な物質である。クロロフィル代謝は、北方林樹木の幼木の光傷害そして枯死と密接な関係を持っていると考えられる。我々は、これまでの研究で、強光ストレスによるクロロフィル代謝系の傷害では、クロロフィル合成の調節段階である５－アミノレブリン酸合成酵素が標的になっていることを見出した。その機構を詳細に調べたところ、遺伝子発現や酵素タンパク質の量の減少ではなく、活性阻害が原因であることが明らかになった。

(3) 北方林の落葉・常緑と光ストレス

道立林業試験場（美唄）の実験林から採取した常緑針葉樹アカエゾマツとトドマツでは、冬季にキサントフィルサイクルのプールサイズが増加した。また、クロロフィル合成系の中間代謝物は、春と夏に蓄積がみられたが、冬には減少した。冬には低温ストレスにより、クロロフィル合成が阻害されていると考えられる。

常緑樹は低温条件においてもクロロフィルを保持したまま光傷害を最小限に食い止め早春から光合成を開始することができる。これは他の植物には無い高度な光防御によると思われるがその詳細には不明な点が多い。18 年度は主にピコ秒時間分解蛍光分光法を用いて、常緑樹イチイの葉における励起エネルギー移動過程を検討した。時間分解蛍光スペクトル(TRFS)は時間相関単一光子計数法により測定した。励起波長は 425 nm(クロロフィル励起)とした。また励起波長依存性を見るために定常光による低温蛍光スペクトルも合わせて測定した。測定中サンプルは 77 K に保たれた。夏と秋の葉の TRFS に顕著な違いは見られず、対照サンプルのシロイヌナズナの葉の TRFS と類似していた。一方、冬の TRFS は光化学系 2(PSII)領域の蛍光強度が減少し、減衰も約 2 倍速くなっていた。これは PSII の存在量の減少や PSII での励起エネルギー緩和の促進を反映している。また光化学系 1(PSI)由来のレッドクロロフィルの蛍光もより短波長側にピークを示したことから PSI においても何らかの変化が起きていると考えられる。さらに春の TRFS は PSII 由来の蛍光がほとんど観測されず、PSI 領域の蛍光は冬よりもさらに短波長側にピークを示した。また蛍光スペクトルが顕著な励起波長依存性を示した。

分子生物学と生化学の手法を用いた常緑樹イチイの冬季光傷害の回避機構に関する解析は、冬季にイチイ針葉で発現する遺伝子の解析を中心に行っている。18 年度はイチイの EST を継続して解析するとともに、冬季のイチイ針葉で ELIP (Early Light-Induced Proteins)をコードする EST が非常に多く検出されていることから、常緑針葉樹の冬季光ストレスへの防御戦略における ELIP の機能解析に関する研究を行った。イチイ針葉における *ELIP* 遺伝子の転写物量を定量的 PCR で解析を行い、イチイに存在する3つの *ELIP* 遺伝子（*Elip1*、*Elip2*、*Elip3*）は共に、秋に増加して冬に最大量に達し、春に減少することを示した。またエゾマツやアカエゾマツなど、寒冷圏に生育する常緑針葉樹では普遍的に ELIP を蓄積することをウエスタンブロット解析により明らかにした。一方で、光ストレス防御との関連性が指摘されている D1 や PsbS タンパク

質の蓄積量に大きな変化は見られなかった。このことから、ELIP は常緑針葉樹の冬季の光ストレス防御において重要な役割を果たしていることが示唆された。

3. 研究実施体制

(1)「生態学的解析」グループ

①研究者名

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。

(2)「生理・生化学的解析」グループ

①研究者名

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

(3)「分子生物学的解析」グループ

①研究者名

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. 研究成果の発表等

(1)論文発表(原著論文)

○Tripathi S.K., Sumida A., Shibata H., Ono K., Uemura S., Kodama Y. & Hara T. (2006) Leaf litterfall and decomposition of different above- and belowground parts of birch (*Betula ermanii*) trees and dwarf bamboo (*Sasa kurilensis*) shrubs in a young secondary forest in Northern Japan. *Biology and Fertility of Soils* 43: 237-246.

○Doležal J., Šrutek M., Hara T., Sumida A. & Penttilä T. (2006) Neighborhood interactions influencing tree population dynamics in nonpyrogeneous boreal forest in northern Finland. *Plant Ecology* 185: 135-150.

○Tripathi S.K., Sumida A., Ono K., Shibata H., Uemura S., Takahashi K. & Hara T. (2006) The effects of understorey dwarf bamboo (*Sasa kurilensis*) removal on soil fertility in a *Betula ermanii* forest of northern Japan. *Ecological Research* 21: 315-320.

○Suzuki J., Herben T., Krahulec F., Štorchová H. & Hara T. (2006) Effects of neighbourhood structure and tussock dynamics on genet demography of *Festuca rubra* in a mountain meadow. *Journal of Ecology* 94: 66-76.

○Ma R.J., Du G.Z., Lu B.R., Chen J.K., Sun K., Hara T. & Li B. (2006) Reproductive modes of three *Ligularia* weeds (Asteraceae) in grasslands in Qinghai-Tibet Plateau and their implications for grassland management. *Ecological Research* 21: 246-254.

○Aarti P. D., Tanaka R. & Tanaka A. (2006) Effects of oxidative stress on chlorophyll biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons. *Physiologia Plantarum* 128: 186-197.

○Tanaka A. & Tanaka R. (2006) Chlorophyll metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 248-255.

○Takahashi H., Watanabe A., Tanaka A., Hashida S., Kawai-Yamada M., Sonoike K. & Uchimiya H. (2006) Chloroplast NAD kinase is essential for energy transduction through the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Plant & Cell Physiology* 47: 1678-1682.

○Satoh S. & Tanaka A. (2006) Identification of chlorophyllide a oxygenase in the *Prochlorococcus* genome by a comparative genomic approach. *Plant & Cell Physiology* 47: 1622-1629.

○Kasai T., Suzuki T., Ono K., Ogawa K., Inagaki Y., Ichinose Y., Toyoda K. & Shiraishi

T. (2006) Pea extracellular Cu/Zn-superoxide dismutase responsive to signal molecules from a fungal pathogen. *Journal of General Plant Pathology* 72: 265-272.

○Tanaka A. (2007) Photosynthetic activity in winter needles of the evergreen tree *Taxus cuspidata* at low temperatures. *Tree Physiology* 27: 641-648.

○Aarti D., Tanaka R. Ito H. & Tanaka A. (2007) High light inhibits chlorophyll biosynthesis at the level of 5-aminolevulinate synthesis during de-etiolation in cucumber (*Cucumis sativus*) Cotyledons. *Photochemistry and Photobiology* 83: 171-176.

○Nakagawara E., Sakuraba Y., Yamasato A., Tanaka R. & Tanaka A. (2007) Clp protease controls chlorophyll b synthesis by regulating the level of chlorophyllide a oxygenase. *Plant Journal* 49: 800-09.

○Tanaka R. & Tanaka A. (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 321-346.

(2)特許出願

平成 18年度特許出願:2 件 (CREST 研究期間累積件数:8 件)