

研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

1. 研究課題名

生物的な炭酸同化作用による CO₂ リサイクリングを目指した樹木に
特異的な環境適応能力による光合成制御とストレス耐性機構

2. 研究代表者

柴田 勝（長岡工業高等専門学校 物質工学科 准教授）

3. 研究シーズ探索成果の概要

樹木が備えている環境適応能力・炭酸固定能力を高めることで、劣悪な条件下でも生育可能な樹木の開発を目的とした。

植物の光合成に必須な色素は、光受容による光合成の駆動エネルギーと光エネルギー散逸による光合成の阻害防御の機能を持っている。樹木を対象としたクロロフィルケイ光測定や色素分析などにより、草本植物には見られない樹木特異的な環境応答として複数の色素サイクルを複数見出し、それらが協調して反応することで、生育環境に見合った光利用効率を制御し、環境耐性能を獲得していた。また、植物枯死の大きな要因として、光合成器官の葉緑体で発生する過剰還元力によるタンパク質などの酸化がある。樹木は、光合成の保護・最適化を行うために植物ミトコンドリアにのみ存在するオルタナティブオキシダーゼ（経路）により、葉緑体での過剰エネルギー（還元力）を散逸させていた。

これらの結果から、様々な環境に生育することができる樹木を用いた CO₂ 固定のためには、多様な樹木の環境耐性・応答機構の解明を行うことで、草本植物のストレス応答を基本とした植物の改良ではなく、樹木自身が兼ね備えている適応能力を利用できる可能性があることが確認できた。

4. 研究シーズ探索のねらい

低炭素社会には、CO₂ の効率的なリサイクリングによる化石燃料等の消費を極力抑えることが重要である。大気 CO₂ を利用可能な形にする方法として植物の光合成があり、その炭酸固定能力を高めると共に環境ストレスの厳しい地域の森林を再生し、固定量を増加させることが有効である。樹木が本来兼ね備えている様々な環境に適応する能力を高めることで、劣悪な条件下でも定常的に生育可能な樹木の開発を目的として、環境変化に対して樹木が持つ特異的な環境応答性を示し、その能力を明らかにしようとした【樹木特異的なストレス回避機構】。

さらに、持続的な光合成の維持（最適化）には、葉緑体光合成により生成する余剰エネルギーの散逸機構が必須である。森林科学ではオルガネラネットワークによるストレス枯死回避という考え自体、存在していないが、その重要性は草本植物で十分に認識されている。

これらのことから、葉緑体で発生する過剰エネルギー（還元力）と植物にのみ見られるミトコンドリアによるエネルギー散逸機構との関連を調べることで、ストレス回避機構の一つとしてオルガネラ間のネットワークが長期のマルチストレスに対して有効であるかを明らかにしようとした【オルガネラネットワークによる光合成の最適化】。

5. 研究シーズ探索の方法と成果

5.1 方法

本課題では、樹木が本来備えている環境適応能力を高めることで、劣悪な条件下で生育可能な樹木の開発を目的としている。

ストレス枯死の原因の一つとして光阻害がある。この光阻害により光合成を行う葉緑体では、光合成で利用されるはずの光エネルギーが利用されず、過剰な還元力としてタンパク質などの生体成分を酸化させ、植物の枯死を誘発している。このような枯死に対する環境ストレス耐性を決定する因子として、①過剰なエネルギーを生成しない(生成過程)、②過剰なエネルギーを体外へ逃がす(散逸過程)、③阻害部位の速やかな回復(回復過程)、が重要である。そのために、上記①、②、③の項目について【環境変化に対して樹木のみが持つ特異的な環境応答】を調べ、さらに②の項目に対して【オルガネラネットワークによる光合成の最適化】の実験を計画した。

【環境変化に対して樹木のみが持つ特異的な環境応答】

樹木に特異的な環境応答として、樹木特異的な色素を中心とした複数の色素類の相互置換(色素サイクル)が見出されている。樹木葉では、草本植物にあまり見られない α -carotene (α -Car)を中心とした色素サイクルを中心に樹木に内在的に存在する特異的な反応を見出し、光合成の光阻害からの保護、樹木のストレス耐性付与に機能するかについて調べた。このような組成変化を誘導する環境因子を明らかにするために、温度・光条件の異なる環境に順化させた樹木葉のクロロフィル蛍光を測定し、過剰エネルギーの熱放散(NPQ)、PSII 量子収率(Φ_{PSII})、電子伝達速度(ETR)、最大光合成量子収率を求め、色素分析を行った。

さらに、樹木特異的である多様な色素サイクル間の相互作用を明確にし、光合成への影響について調べ、次いで、ストレス耐性との関係を明確にするために、阻害からの回復過程を含めたストレス耐性能について評価を行った。

【オルガネラネットワークによる光合成の最適化】

植物枯死の原因である葉緑体の過剰還元力を低減させるために、植物ミトコンドリア(Mit)による葉緑体の過剰還元力の散逸が樹木においても行われているかを調べた。特に Mit には植物特異的な呼吸経路として ATP 合成に関与しない電子伝達経路(AOX 経路)が存在している。このことから各オルガネラでの電子伝達鎖成分の酸化還元状態(redox)から光合成と Mit 呼吸との関係を明らかにするために、電子伝達に関与するプラストキノン(PQ)、ユビキノン(UQ)の同時測定法により、葉片のキノ redox の測定を行った。また、年間の Mit 呼吸活性と AOX 量の季節変動を Mit 電子伝達の部分阻害による酸素吸収速度、AOX 定量を行うことにより、AOX 呼吸経路の環境応答性を調べた。

5.2 成果

(樹木特異的な環境応答は色素だけでも予想以上に多様であり、樹木の様々な環境応答機構の発見につながる可能性がある。ただし、試料の取扱い、時間的制約に大きな問題が残っている。)

【樹木特異的な反応による環境ストレス耐性(応答)】

樹木特異的な複数の環境応答を明確にし、それらの応答間の関係を示すと共に、光合成に与える影響をについて調べた。さらに、樹木特異的な環境応答が環境ストレスに対してどの程度有効であるかを示すためにストレス負荷・回復実験を行った。

葉緑体

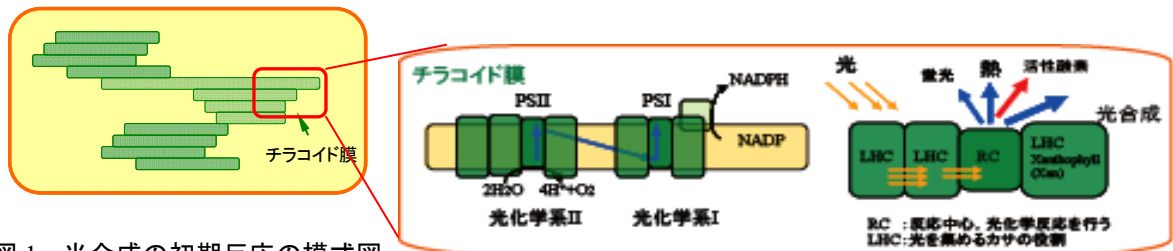


図 1. 光合成の初期反応の模式図

【樹木特異的な反応】 (内在的な反応)

草本植物にはほとんど見られない樹木特異的な環境応答として 4 種の色素置換・交換反応を見出した。色素は、図 1 に示されるように光合成の初期過程として光を受ける素子として機能すると共に、光合成に利用できる以上に受けた光のエネルギーを熱として放散させ、光合成器官を保護する役割を持っている。このために、色素に関する樹木特異的な環境応答が光合成の初期反応(光吸収)(図 1)と光エネルギー利用効率および色素による光防御機構に注目し実験を行った。

【多様な色素サイクル】

多様な色素置換・交換反応の相互関係を調べた結果、各反応は相互に依存していた。相互依存を示す模式図を図 2 に示す。

【① 光合成反応中心の色素変換】

光合成に重要なタンパク質色素複合体の反応中心(RC)の色素が樹木特異的であった。

【② カロチノイド相互置換】

反応中心(RC)と光捕集(LHC)の色素には逆相関および多様な色素間交換した。

【③ Lut の de-epoxidation】

LHC に大量に存在している lutein が、光などの環境因子により変換した。

【④ 緩慢な Violaxanthin 反応】

LHC に多量に存在している violaxanthin の色素変換の多様性があった。

上記①～④の樹木特異的な反応を誘導する環境因子として、生育光強度、生育温度、UV、水ストレスなどの多くの外部環境因子が関わっていた。様々な因子により季節的な周期性を示すことが明確となり、野外生育において季節的な環境変化に対応していることが示唆された。また、それぞれの反応は相互に依存していた(図 2)。

【光合成へ与える影響】

この樹木特異的な色素反応が光合成の光利用効率やストレス耐性にどの程度有効であるか

【色素サイクルによる分類】

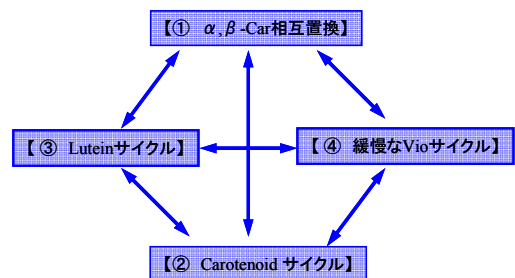


図 2. 各種色素置換・交換反応の相互依存性

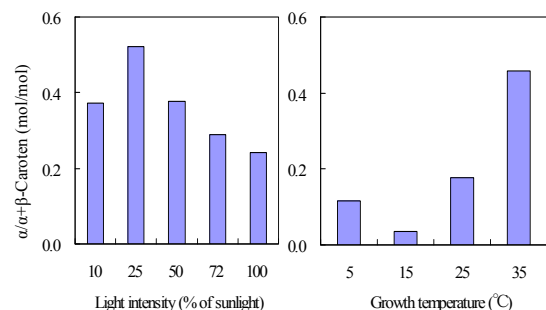


図 3. 生育光強度, 生育温度がゲッケイジュ葉片のカロテン比率 ($\alpha/\alpha+\beta\text{-Car}$)への影響

について実験を行うために、温度・光条件の異なる環境で生育させたゲッケイジュの葉片の色素組成、クロロフィル(Chl)蛍光の測定を行った。

強光・弱光での量子収率(Φ_{PSII})は、生育温度・光強度に関わらず樹木特異的な色素の割合が高いものほど高く、樹木の色素応答により、光利用効率を高める可能性が示された(図3.(A)&(B))。

【ストレス耐性との関係】

高等植物では、光合成器官を保護する重要な機能として、色素による過剰エネルギーの熱放散過程がある。しかし、樹木では、一般的に知られている熱放散機構と異なる機構により過剰エネルギーの放散を行っている可能性が見られた。

ストレス枯死の原因の一つとして光障害があり、この光障害は光合成器官である葉緑体で発生する過剰還元力によりタンパク質などの生体成分を酸化させることで植物を枯死させている。このために、環境ストレス耐性を決定する因子として、
①過剰なエネルギーを生成しない(生成過程)、
②過剰なエネルギーを体外へ逃がす(散逸過程)、
③障害部位の速やかな回復(回復過程)、

が重要である。

このことから、樹木特異的な環境応答によるストレス耐性を上記①~③の観点から調べた。光合成の量子収率や過剰還元力のエネルギー散逸を効率良く行っていた。また、環境ストレスの多くは、水(乾燥)ストレスであることから、水ストレスを負荷し、その色素組成を調べた。その結果、樹木特異的な色素の増加がみられ、過剰エネルギーの熱放散および光利用効率の変化が見られた(図4)。さらに、光障害からの回復過程において、特異的な色素組成が影響を与えるかを調べたところ、組成の変化の前後で回復過程に有意差は見られなかった。

これらの結果から、今回の樹木の色素変換は、①、②に対して有効であったが、③の回復過程には大きな影響を示さないことが明らかとなった。

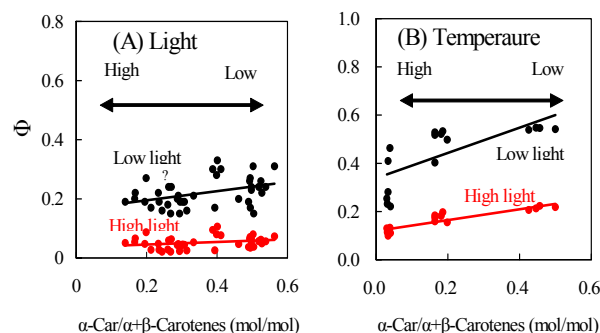


図4. α -Car が光化学系 II の量子収率に与える影響。(A)光強度, (B)温度が異なる環境で生育させた苗を使用。(High light, Low light は光合成を行うために作用光強度を示している)

【オルガネラネットワーク】

(オルガネラネットワークは、電子消費反応の多様性を示しており、草本・木本植物では生育環境、期間が大きく異なることから、同じような作用効果が出るとは限らない。これらのことから、未開拓な樹木生理分野の強化により新しい分野が生まれる可能性がある。)

(オルガネラクロストークによる光合成の最適化)

植物の枯死原因である葉緑体で発生する過剰還元力を制御する方法として、エネルギー(ATP)の生成を行う微小器官であるミトコンドリア(Mit)に注目した(図5)。植物のMitにはエネルギー生成ではなく、エネルギー消費の経路が存在することから、この機能を用いて葉緑体での過剰還元力の消費器官として使用可能であることを明確にし、環境ストレスによる光合成障害の低減への寄与があるかについて調べた。

本実験には生体内での電子の流れを止める試

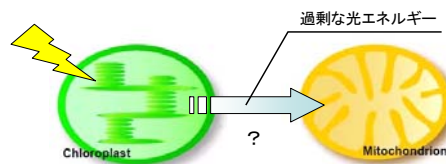


図5. 葉緑体とミトコンドリアの模式図
(葉緑体での過剰還元力の消費オルガネラとしてのミトコンドリアの概念図)

葉(阻害剤)を用いるが、樹木葉は草本植物に比べ阻害剤の取り込み速度が遅く、通常の方法では困難であった。しかし、エゾユズリハの葉片を用いることでMitによる葉緑体過剰還元力の測定可能となった。

植物に特異的であるMitのエネルギー消費経路の酵素であるAOXでのエネルギー消費を抑えた結果、葉緑体でより過剰な還元力が蓄積され、光合成阻害を誘発する可能性が見出された。環境ストレスにより、葉緑体の光合成が低下することで、光合成で使用されていた光エネルギーが余剰の還元力(過剰なエネルギー)として生体成分を過酸化し、植物の枯死を誘発することから、樹木においてもMitによる過剰エネルギーの散逸は、ストレス耐性にとって有効である可能性がある。

実際に、環境ストレス負荷実験により直接的にMitによる葉緑体の保護・阻害軽減の効果を示す必要があるが、植物種の選定や諸条件の設定が難しく、ストレス実験までには至らなかった。

6. 自己評価

樹木特異的な環境応答として、複数の緩慢な環境応答が、協調して機能する可能性を見出した。当初予想よりも数多くの特徴的な応答があり、樹木特異的な色素システム系として機能している可能性があった。これらのことから、イネやシロイヌナズナなどのモデル草本植物のみではなく、樹木の環境適応の多様性を考慮した研究分野が存在することを示唆することができたと考えている。

樹木では、草本植物ではほとんど問題とならない成熟過程の遅さや、葉の展開・寿命などから安定したデータが得られにくい。特に今年は、春先の低温により葉の展開が遅れ、夏の高温により同調させて調整した樹木苗であっても様なものを揃えることが困難であった。このために、実験によっては、その再現性を得るために数ヶ月の追加実験を必要とし、予定していた実験の一部を行うことができなかった。

また、すでに報告されているアクティブキノン解析では、本実験には不十分であることが判明し、急遽、キノン解析法を設定する必要があるがあった。さらに、樹木葉への阻害剤の取り込みが難しく、また、葉が割れるなど草本植物では予想されなかった試料の取扱い・調整の困難さが多数あった。最終的にはエゾユズリハの葉片を前処理することで実験が可能となったが、これにより2ヶ月、実験が遅延した。

7. PO の見解

樹木の特異的なストレス回避機構を解明し、その特異的な環境適応能力を高めることで、幼木を悪環境に馴化させることにより、ストレス耐性機構を導入し、植林とCO₂のリサイクルリングを効率化させるという着想に基づいた研究である。当初の研究構想の2本の柱のうち、ほぼ1本に集中した形となったが、これは、当初の申請時から1年で遂行するには盛りだくさんであると認識指摘していたところであり、加えて希に見る天候不順など研究が進展しにくい環境にもあったことからやむを得ないと思われる。

本研究においては、カロテノイド類の分布が種々のストレス環境下で変化するなど樹木特異

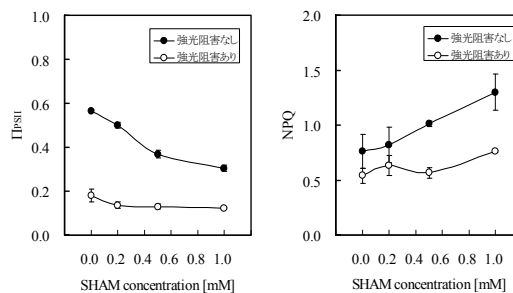


図6. 呼吸鎖阻害と強光阻害による量子収率 (Φ_{PSII}) 及び熱放散 (NPQ) の変化 (average $\pm$ SE(n=3)).

- PSII 光阻害により水分解活性の低下
- Φ_{PSII} 低下は、光利用効率の低下を示す。
- NPQ 増加は、過剰なエネルギー散逸の増大を示す。

的な色素組成と変化を見いだした。色素サイクルによるストレス回避機構に関する当初の目的をある程度達成したといえる。多くの研究者が避けて通る樹木の研究に邁進する挑戦性は評価できる。

現時点では、本研究を応用に結び付けるまでには時間がかかると思われるが、本シーズ探索が拓いたストレス耐性植物の作出という分野自体は、息の長い継続的な取り組みが必要であると考えられるが、それだけの取り組みをするに足る意義のある研究であると認識する。

8. 研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

なし

(2)特許出願

研究期間累積件数： 0 件

(3)口頭発表

①学会

国内 4 件(国際学会 1 件を含)、 海外 0 件

- ・柴田勝・樋山麻美・松本拓太, 樹木特異的な色素サイクルが光合成電子伝達に与える影響日本森林学会 第 121 回大会, 2010 年 4 月 3 日

- ・Akiyama Yuki, Akita Syunsuke and Shibata Masaru, Determination and physiological functions of active quinones in plant intact leaves, 17th Asia Symposium on Ecotechnology, 12th Nov 2010。

- ・柴田 勝・樋山 麻美・遠藤 誠一・津山 孝人 複数の樹木特異的な色素サイクルの温度・光依存性, 第 122 回大会, 2011 年 3 月(申込済)

- ・柴田勝・秋山雄希・樋山麻美, 第 52 回 日本植物生理学会年会 2011 年 3 月(申込済)

②その他

国内 0 件, 海外 0 件

(4)その他の成果(受賞、著書、招待講演、特記事項等)

なし