

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 寒冷圏における光ストレスと北方林の再生・維持機構

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者

原 登志彦（北海道大学低温科学研究所 教授）

主たる共同研究者

田中 歩（北海道大学低温科学研究所 教授）

小川 健一（岡山県生物科学総合研究所細胞機能解析研究室 室長）

3. 研究内容及び成果

3 - 1. 研究内容

21世紀に人類が目指すべき循環型社会の構築には、環境調和型で持続可能な森林の管理が必要であるが、そのためには天然の森林再生・維持機構の理解が必要不可欠である。熱帯林にほぼ匹敵するほどの面積を占める北方林（北緯45～70度に存在する森林）は、地球上の全森林面積の約1/3を占め、その南限に位置する北海道には日本の全森林面積の約1/4が存在する。

寒冷圏における低温や乾燥のストレスは、北方林樹木が受ける光ストレスを増幅させ、植物組織中に有害な活性酸素を生じさせる。この光ストレスが、北方林における天然の森林再生過程にとって重要である北方林樹木のライフサイクル、つまり、(1)「生り年」による多量の種子の生産、(2)それらの種子から芽生えた幼木の生存戦略（生存か枯死か）、(3)フェノロジー（生物季節）の多様性（落葉樹と常緑樹の共存）を制御していると想定し、これら生態学的プロセスを生理・生化学的および分子生物学的に解明することを目指した。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

3 - 2. 研究成果

3 - 2 - 1. 繁殖戦略（生り年）（小川グループ・原グループ）

樹木に比べ短時間で結果が得られる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、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。

リノレン酸の合成酵素FAD3遺伝子を過剰発現した形質転換植物およびリノレン酸の合成に異常をもつ変異体を利用することで、膜脂質のリノレン酸量と花成との関係を調査した。その結果、リノレン酸の分解派生物質の場合とは異なり、膜脂質のリノレン酸量はシロイヌナズナの花成指標（開花時のロゼット葉数）と高い負の相関を示し、リノレン酸はシロイヌナズナにおける花成の抑制因子であることが明らかになった。

膜脂質のリノレン酸量を高めた形質転換シロイヌナズナのDNAマイクロアレイ解析を行ってリノレン酸量により制御される遺伝子群を同定したところ、シロイヌナズナの花成の抑制制御で中心的な役割を担うFLC (Flowering Locus C)遺伝子が含まれていた。

RT-PCRによってリノレン酸量の変異体におけるFLCの転写物量を調べたところ、FLC転写物量のdown-regulationがリノレン酸によって抑制されることが明らかになった。

FLCを中心とする花成抑制メカニズムが普遍的に春化のメカニズムに関与することは十分仮定されるが、FLCのオルソログは他の植物で見出されておらず、他の植物ではどのような因子がFLCの代わりを担うのか未だに明らかにされていない。そこで、遺伝学的にFLCの下流で働き、他の植物でもそのオルソログが見出され、低温刺激によってその発現が促進される花成統御遺伝子LFY(LEAFY)に注目した。

LFYの発現は、リノレン酸量が高くなるにつれて遅延し、花成もそれに応じて遅延した。一般的に、低温期間中にはリノレン酸量が高まることや花成が抑制されること、そして低温期間終了後にはリノレン酸が分解され、花成が誘導されることなどから考えると、リノレン酸自体は低温期間中の花成を抑制し、気温が上昇した後は、その分解物が花成を促進すると考えられた。

シロイヌナズナ花成は、FLCの転写物量によって決定されることが知られているが、そのdown-regulationに関わる因子FCAの変異体ではグルタチオン合成とその代謝に異常があるため花成の遅延が認められる。一方、グルタチオンは活性酸素消去系の因子であり、活性酸素の生成によってその合成が活性化される。

低温による花成の誘導とグルタチオンの代謝との関係を確認するため、トルコギキョウ(春化処理をしない場合、花成はおきない)の抽だいをグルタチオンが促進できるかを試験した。その結果、春化処理無しでもトルコギキョウに抽だいを誘導できることが明らかになった。一方、春化処理を施す際に、新規なグルタチオンの合成を抑制すると春化処理の効果がなくなることも確かめられた。

春化処理直後にトルコギキョウ内の過酸化物質レベルは上昇し、グルタチオンのレベルも上昇した。それに呼応して、グルタチオンの合成系の鍵酵素の活性化が起きていた。春化処理時にグルタチオン合成を抑制すると過酸化物質レベルは上昇するが、春化処理の抽だい誘導効果は消失すること、および他のチオール化合物ではグルタチオンの効果を代替できないことから、春化による花成にはグルタチオンが必要不可欠であることが明らかになった。

一方、集光装置の欠損したch1変異体では、グルタチオンの前駆体が過剰に蓄積し、花成が遅延することを見出したことで、葉緑体がグルタチオン合成の主要な細胞内小器官であることを明らかにした。

北海道立林業試験場(美唄市)構内のクローン集植所に生育する針葉樹(グイマツ、カラムツ、アカエゾマツ、トドマツ)を標準木として月一回のサンプリングを行い、膜脂質のリノレン酸量と花成の決定時期との関係について調査した(2003年5月より、現在も継続中)。

グイマツからLFYと相同な2つの遺伝子LGY1、LGY2を単離した。LGY1、LGY2遺伝子は、どちらもシロイヌナズナLFYとアミノ酸配列にして71%の相同性を有していた。

これら遺伝子の発現部位は、翌年の花器官が形成される芽で高い発現が認められ、葉や長枝ではほとんど発現は認められなかった。また、その発現は、開花した雄花、雌花でも認められたが、翌年の花器官が形成される芽での発現より低いことがわかった。したがって、LGY1及びLGY2遺伝子は、雄花・雌花の両花器官の形成に加え、花芽形成の開始に関与すると考えられた。

LGY1の発現量は花芽形成が開始すると考えられる5月から増加し9月に減少したが、LGY2の発現に季節変動は認められなかった。従って、LGY1遺伝子がグイマツの花芽の決定に関与すると考えられる。

LGY1遺伝子はラジアータマツ(*Pinus radiata*)のPRFLLと高い相同性(99%)を示す。PRFLLはシロイヌナズナの花器官形成に関わるMADS-box遺伝子APETALA1(AP1)およびAGAMOUSのLEAFY結合部位に結合できることが報告されており、上記の結論と矛盾しない。

### 3 - 2 - 2 . 生存戦略(田中グループ・原グループ)

冬季凍結温度下での緑葉の維持機構の最も中心を担う機構は、光エネルギーの散逸である。すなわち、どのようにして吸収した光を熱として散逸するかである。この機構なしには、寒冷圏では常緑樹は生存できない。

イチイの葉緑体を電子顕微鏡で観察した結果、葉緑体は細胞の中心に集まり、かつ(葉緑体)胞膜は膨らみ、近傍の胞膜と接していた。その結果、ストロマの容積が増加し、葉緑体が密に集合していた。

冬季葉緑体の電子伝達を夏の葉緑体と比較した。蛍光測定装置PAMを用いて、光化学系IIの電子伝達成分であるQAの酸化還元速度を調べた。

QAの還元速度は温度によって大きな影響を受けなかったが、QAの再酸化速度は温度によって大きな影響を受け、低温下では、再酸化が極端に阻害された。このことは、低温下の光化学系IIでは、QAまでは電子が流れるが、その後は電子が移動しないことを示している。

様々な照度と温度下でQAの状態を調べたところ、低温下ではQAは低照度条件でも、ほぼ全て還元状態にあった。この場合の問題点は、QAが還元状態にあるにもかかわらず、光エネルギーが反応中心まで到達することである。我々は、反応中心まで伝達されたエネルギーはPhe-とP680+との電荷再結合によって散逸されと考えている。

冬季のエネルギー移動と散逸を調べるため、ピコ秒時間分解蛍光スペクトルを測定した。その結果、冬季は光化学系IIの蛍光が早く減衰することがわかった。また、遅い蛍光成分を解析した結果、冬季には反応中心まで伝達するエネルギーは、夏季のおよそ1/10であった。このことから、光合成色素によって捕捉された多くの光エネルギーは、冬季には反応中心まで届かず、途中で熱に変換されていることが明らかになった。

冬季の光合成は様々な方法で光化学系を光傷害から防御している。冬季には、まず、葉緑体が集合し光合成活性を抑制し、休眠状態にしている。この葉緑体の集合は、捕捉する光の量を減らす役割も担っている。光化学系に捕捉された光エネルギーは、集光装置の中で、多くは熱エネルギーに変換される。この熱エネルギー変換機構によって、反応中心まで届くエネルギーを1/10程度まで減少させている。さらに、反応中心まで届いたエネルギーはP680を励起し、Pheに電子を渡すが、この電子が再びP680に戻ることによって、エネルギーを消費している。すなわち、P680とPhe間でエネルギーを消費しながら、電子を空回りさせている。このように、様々な機構によって、2重3重に光エネルギーを散逸する機構が発達し、冬季凍結温度下でも、光合成装置を守っていることが明らかになった。

クロロフィル代謝系が強光ストレスによって傷害(光傷害)を受けることを見出した。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も明らかになった。また、植物の細胞死に関わる光ストレス関連の重要物質としてフェオホルビド $\alpha$ オキシゲナーゼ(PAO)を同定した。

### 3-2-3. 生物多様性(原グループ・田中グループ)

落葉樹と常緑樹の光ストレス防御応答の季節変化を、常緑針葉樹のアカエゾマツ、トマツ、落葉針葉樹のグイマツ、カラムツ、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ダーゼ活性等に関して3年間の解析を行った。

落葉樹全体としては、展葉時と落葉前に、クロロフィル当たりのキサントフィルサイクルのプールサイズや脱エポキシ化の割合、クロロフィル当たりの膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(tAPX)活性が増加した。

一方、常緑針葉樹のトマツとアカエゾマツに関しては、冬季にキサントフィルサイクルのプールサイズや脱エポキシ化の割合が高くなったが、膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(tAPX)活性は5月の新葉を除き年間を通じてほぼ一定であった。また、クロロフィル合成の中間代謝物であるMg-proto IXとMg-proto IX MEは、新葉が展開する前の4月に増加し、冬季にはそれらの蓄積は低く抑えられていることが判明した。

常緑樹の冬季光ストレス回避の分子メカニズム解析は、イチイ針葉で発現する遺伝子発現解析を中心に実施した。人為的に強光処理( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )を低温(4°C)で施した2003年4月のイチイ針葉から抽出したRNAを用いて、cDNAライブラリーを構築し、1,189の部分塩基配列をEST(expressed sequence tag)としてシーケンスを行ったところ、多くの光ストレス防御に関与するESTが同定された。

一方、冬季光ストレスに馴化した2003年12月のイチイ針葉を用いてcDNAライブラリーを構築し、432のESTをシーケンスしたところ、多くの光ストレス防御に関与するESTが同定されたが、そのプロファイルは、人為的な強光・低温を行った針葉で得られたESTとは異なっていた。とくに冬季のイチイ針葉では、early light-induced proteins (ELIP)をコードするESTが極めて多く検出された。このことから、イチイ針葉の光ストレス耐性獲得にともなう遺伝子発現は季節により異なる可能性が示唆された。

冬季のイチイEST 中には、3つのELIP遺伝子が見いだされた。そのうち、1つの遺伝子(ELIP3)のみで、冬季に同定されたELIPをコードするESTの95%以上を占めた。また定量的PCRにより、3つのELIP遺伝子がともに冬季特異的に発現することを確認した。ELIPタンパク質は、冬に採取したチラコイド膜画分では検出されたが、夏

のチラコイド膜画分では検出されなかった。

さらにELIPタンパク質の冬季特異的な蓄積は、アカエゾマツやトドマツなど6種の常緑針葉樹でも見いだされた。イチイ針葉でも、冬にゼアキサンチン及びアンテラザンチンの蓄積を伴う脱エポキシ化率の増加がHPLCを用いた色素分析によりが確認されたことから、ELIPはゼアキサンチン結合タンパク質として吸収した光エネルギーを熱として放出する非光化学的消光(NPQ)を通じて、冬の光ストレスを回避すると推測された。

#### 4. 事後評価結果

##### 4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

| 論文発表 |    | 招待・口頭・ポスター |    | 報道 | 特許 |    |
|------|----|------------|----|----|----|----|
| 国内   | 国外 | 国内         | 国外 |    | 国内 | 海外 |
| 2    | 74 | 163        | 74 | 10 | 8  | 3  |

論文数は相対的に多いが、専門的なジャーナルが多く、インパクトは高くない。今後、さらに、質の高い、インパクトのある論文を出すことを期待する。

本来、工業所有権に馴染まない課題であるが、特にサブグループにおいて、研究の成果を実用場面へ積極的に活用すべく、的確に知財保護をしている。生り年に係わる遺伝子および代謝物は、ライセンスの可能性も高いことから産業界へ与えるインパクトは大きいと判断し、評価する。

##### 4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

総合的には、北方林の形成機構について光ストレスの重要性を示す知見を得たこと、また、光ストレスと植物の生産との関係について分子レベルで明らかにし分子生態学というべき領域を開いていることは評価できる。しかし、プロジェクト期間である5年の解析だけでは詳細なメカニズムの解明には至っておらず、植物科学全体における研究成果としては、未だ実験的に信頼性の高いレベルに至っていない。今後も、長期的な取り組みが必要な地球環境保全に大きな影響を与える北方樹林の生態系の解明に対して、分子生物学がどのように寄与できるかの試みとして長い目でみる必要がある。今後、さらなる解析の継続により、現在のモデルがさらに実証されることを期待している。

科学技術への貢献に関しては、北方林の形成過程において、光ストレスが関与している可能性をグイマツをモデルに、気象要因と生り年の相関、パラコート処理やグイマツのLFYホモログの発現、さらには、リノレン酸含量の解析により翌年の開花との相関関係が示されたこと、また、イチイを用いて行われた冬期の光障害回避機構の解明(葉緑体の局在性変化、電荷再結合、ELIPの関与等)などの成果を得ている。

今後の展開として、北方林の再生という課題に対して、光ストレスによる制御という視点がほぼ確立されたことより、今後の自然更新による森林再生計画に一定の方針が立てられたこと、また、採取困難な有望樹種からの種子採取等への応用の期待がある。これらの展開は今後の地球環境保全を考えていく上で重要である。従って、長期的な生態系の観察が必要と思われ、今後も継続して調査してほしいとの期待がある。一方、技術・科学的成果を問うCRESTとしては今後の支援は期待できず、他の資金源を確保する必要があるとの意見もあった。

以上のように、地球環境保全を考える上で重要な課題であり成果を期待する意見と、展望が未だ定まっていないことを危惧する意見が拮抗しているが、総合的には、さらなる研究継続により、より明確な展望が切り開かれることを期待したい。

##### 4 - 3. その他の特記事項(受賞歴など)

北方林の持続可能なシステム開発に向けて、MINOSGIモデルを用いた解析の進行、カラマツ・グイマツのF1

雑種の育苗など、総合的な戦略が今後、継続的に展開されることを期待したい。

日本生化学会中国・四国支部優秀研究発表賞：小川健一（2006）。

The Geochemical Society of Japan(Best paper in 2004):原登志彦