

「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)、(2)幼木の生存・枯死、(3)常緑樹と落葉樹の共存、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 17 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新たに同定した花芽形成関与遺伝子 *LGY* の季節変化と北方林の生り年との関係、(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樹の冬の光傷害回避機構としての ELIP 形成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 18 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。これらの成果を北方林の環境保全と持続可能な開発に役立てたい。

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(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。さらに平成 17 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調節されることをモデル植物で明らかにした。平成 18 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。平成 17 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。

(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。平成 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。

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平成 18 年度に行う予定である。

これまでに道立林業試験場(美唄)の実験苗畑に生育するグイマツから、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 *LGY1*、*LGY2* を単離・同定した。どちらの遺伝子も花器官が形成される芽で高い発現が認められ、花成に関与することが示唆された。これらの遺伝子の発現量の変動を調べたところ、*LGY1* は、花芽を形成し始めると考えられる 5 月から増加し 9 月には減少した。一方、*LGY2* ではそのような季節変動は認められなかった。そこで、*LGY1* 発現量と開花数との関係を調べたところ、平成 16 年 5 月の *LGY1* 発現量と平成 17 年の開花数とに正の相関が認められた。これは 5 月の気象要因がグイマツの開花に影響を与えるという回帰分析の結果と一致する。さらに、平成 16 年と 17 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 月に低温が続いた平成 17 年では、16 年に比べ *LGY1* の発現開始が早まっていた。*LGY1* の発現が 5 月の気温低下によって促進されたことから、グイマツの生り年に *LGY1* の発現の促進が必要であることが示唆される。

平成 18 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因子を絞り込む予定である。

(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阻害されることを見出した。平成 17 年度は、この点についてさらに解析を進めた結果、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強光ストレスの標的になっている事を見出した。また、キュウリの黄化葉に強光ストレスを与えると、最も危険な中間体である Protoporphyrin IX が大量に蓄積した。樹木においても、酸化(強光)ストレスによって、クロロフィル代謝系が損傷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。これら、光ストレスとクロロフィル代謝系の研究を進めていくにあたり、最も大切なことは、代謝系の遺伝子を全て決定し、その調節機構を明らかにすることである。我々は、最後まで不明であったクロロフィル合成系の遺伝子の同定に成功し、クロロフィル代謝経

路を確定した。また、クロロフィル代謝の調節に葉緑体プロテアーゼ Clp が重要な役割を担っていることを明らかにした。この成果をもとに、平成 18 年度はさらにクロロフィル代謝と光ストレス、北方林の幼木の枯死の関係を明らかにしていきたい。

(3) 北方林の落葉・常緑と光ストレス

強光 ($1000\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 栄養供給なしの条件下、二つの生育温度 (25°C 、 10°C) で、落葉広葉樹ミズナラの葉の老化過程を調べた。飽和光下の光合成速度とクロロフィル量は、栄養供給がないと栄養供給がある場合に比べ低くなった。光化学系 II の最大量子収率は、 25°C においても葉の老化に伴って低下し、 10°C では栄養供給があっても葉の展開終了直後から低い値を示していたが、栄養供給がないと更に低くなった。キサントフィルサイクルのプールサイズは 25°C 、 10°C とも葉の老化に伴って増加する傾向が見られた。また、その脱エポキシ化の割合は、 25°C では栄養供給がないと栄養供給がある場合に比べ高くなった。強光かつ栄養欠乏の生育条件では 25°C という生育温度においても葉の老化過程で光ストレス防御応答が起きやすいことが示された。

常緑針葉樹イチイがどのように冬季の光傷害を回避しているかを解析するため、分光学的解析と形態観察を行った。時間分解蛍光測定から、683 nm 付近の蛍光寿命が冬や春に著しく短いことが明らかになった。このことは、冬や春には、捕捉した光エネルギーがカロテノイドなどの色素に渡され、熱として散逸していることを示している。イチイの葉は、春に最も枯死しやすいことが確認されており、春に強い光ストレスを受けていることが示唆される。時間分解や電子顕微鏡観察の結果、常緑樹イチイは、葉緑体の細胞内位置を変えること(平成 16 年度までの成果)に加え、春にエネルギーの散逸を行い、光傷害を回避する仕組みを発達させていることが示唆された。

平成 16 年度には EST 解析により、12 月に採取したイチイ針葉では ELIP (Early Light-Induced Proteins) をコードする EST が非常に多く検出され、その遺伝子数が全 EST の 30% 以上を占めることを明らかにした。平成 17 年度は、さらにイチイ針葉に於ける EST の解析を進めるとともに、ELIP のタンパク質レベルに於ける蓄積を明らかにするため、大腸菌発現系を用いて作製した組換え ELIP タンパク質をウサギに免疫化し、抗 ELIP 抗体を作製した。イチイ針葉から単離した葉緑体画分を用いてウエスタンブロットを行ったところ、ELIP タンパク質の蓄積は冬に採取したチラコイド膜画分のみで検出された。イチイ針葉では、冬にゼアキサンチンの蓄積を伴うことから、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機構に関与することにより、冬の光ストレス回避に寄与すると考えられる。また葉緑体を保持しない木部や根では、ELIP タンパク質の蓄積は見いだされなかったことから、ELIP タンパク質は光ストレスに対する防御を必要とする針葉の組織のみで蓄積していることが示された。

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

- Nishimura N., Hara T., Miyadokoro T., Hoshino D. and Yamamoto S. (2005) Promotion of species co-existence in old-growth coniferous forest through interplay of life-history strategy and tree competition. *Journal of Vegetation Science* 16: 549-558.
- Tripathi S.K., Sumida A., Shibata H., Uemura S., Ono K. and Hara T. (2005) Growth and substrate quality of fine root and soil nitrogen availability in a young *Betula ermanii* forest of northern Japan: Effects of the removal of understory dwarf bamboo (*Sasa kurilensis*). *Forest Ecology and Management* 212: 278-290.
- Akimoto S., Yokono M., Ohmae M., Yamazaki I., Tanaka A., Higuchi M., Tsuchiya T.,

- Miyashita H. and Mimuro M. (2005) Ultrafast Excitation Relaxation Dynamics of Lutein in Solution and in the Light-Harvesting Complexes II Isolated from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Physical Chemistry B* 109(25) :12612-12619
- Akimoto S., Yokono M., Ohmae M., Yamazaki I., Nagata N., Tanaka R., Tanaka A. and Mimuro M.(2005) Excitation energy transfer in the antenna system with divinyl-chlorophylls in the vinyl reductase-expressing *Arabidopsis*. *Chemical Physics Letters* 409:167-171
 - Sustipriatno, Sugiura M., Ogawa K. and Takahashi M. (2006) Improvement of nitrate- and nitrite-dependent growth of rice by the introduction of a constitutively expressing chloroplastic nitrite transporter. *Plant Biotechnol.* 23: 47-54.
 - Nishikawa M. and Ogawa K. (2006) Inhibition of epsilon-poly-L-lysine biosynthesis in Streptomycetaceae bacteria by short chain polyols. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2306-2312
 - Henmi K., Demura T., Tsuboi S., Fukuda H., Iwabuchi M. and Ogawa K. (2005) Change in the redox state of glutathione regulates differentiation of tracheary elements in *Zinnia* cells and *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Physiol.* 46: 1757-1765..
 - Mino M., Misaka Y., Ueda J., Ogawa K. and Inoue M. (2005) Hybrid lethality of cultured cells of an interspecific F1 hybrid of *Nicotiana gossei* Domin and *N. tabacum* L. *Plant Cell Rep.* 24: 179-188.
 - Ogawa K., Matsumoto M. and Ito H. (2005) Fructose-1,6-bisphosphate aldolase is a target protein of glutathionylation in *Arabidopsis* chloroplasts *In* Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives (van der Est, A. and Bruce, D. Ed) Vol. 1. pp. 468-470. Allen Press, Inc., Lawrence, KS.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 2 件 (CREST 研究期間累積件数 : 8 件)