

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04509

研究課題名(和文) 熱帯低湿地環境造林のための樹木の根圏低酸素ストレス耐性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of rhizospheric hypoxia stress of trees for environmental reforestation in tropical wetland

研究代表者

小島 克己 (KOJIMA, Katsumi)

東京大学・アジア生物資源環境研究センター・教授

研究者番号：80211895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：根圏低酸素ストレス耐性種の *Melaleuca cajuputi* の低酸素環境下の根での炭素の利用状況を調べるため、リグニン合成などの芳香族化合物合成経路の酵素活性と代謝物質測定およびトランスクリプトーム解析を行った。フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)活性およびPAL遺伝子の発現量が低酸素処理初期に低下したが、低酸素処理後14日目にはPAL活性が回復した。*M. cajuputi*の根圏低酸素耐性にPAL活性の一時的な低下とその後の回復が関連している可能性がある。8種の熱帯樹木の根圏低酸素ストレスへの通気組織形成等の形態的な応答には種間差があり、耐性との関連は明瞭でなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the carbon utilization in roots of *Melaleuca cajuputi*, a rhizospheric hypoxia-tolerant tree species, under rhizospheric hypoxia, analyses of enzymatic activities and metabolites in the metabolic pathways related to aromatic compounds such as lignin and transcriptome analysis were performed. The activity and RNA expression level of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) were reduced shortly after the hypoxia treatment, but the enzyme activity recovered by 14 days after the treatment. The transient reduction and recovery of PAL activity upon rhizospheric hypoxia may relate to the high tolerance of this species to the rhizospheric hypoxia. Morphological responses such as aerenchyma development under rhizospheric hypoxia stress varied among the examined eight tropical tree species, which showed no clear relation with the extent of their tolerance to the stress.

研究分野：林学、造林学、樹木生理学

キーワード：植物 ストレス 林学 酵素 遺伝子 根圏低酸素 熱帯樹木 芳香族代謝

1. 研究開始当初の背景

東南アジアには低湿地が広く分布するが、農業開発の失敗や森林火災により放棄された荒地が増えている。こういった荒地は、植物に様々な環境ストレスが生じる劣悪な環境であることが多く、ストレス環境下での植生回復を目的とした環境造林により、放棄された低湿地の荒地を修復し、生物生産性を回復させる取り組みに期待が寄せられている。しかし、低湿地に植栽すると造林木は湛水環境に晒され、湛水環境に耐性のない樹木は生育できない。湛水環境の克服は困難な課題であり、低湿地の造林技術については開発の途上にある。また、今後は気候変動による海面上昇によって河川の排水効率が低下するとともに、豪雨などの異常気象の頻度が増加する可能性が高い。このため洪水への対応が必要となる面積が拡大すると予想され、湛水条件は、湿地以外の場所でも造林に際して考慮すべき環境条件になりつつある。

湛水環境への造林に際しての問題として、根の呼吸が制限される根圏低酸素ストレスが挙げられる。根圏低酸素ストレスに対する東南アジア産樹種の応答性に関する知見が非常に限られており、造林技術開発に利用できる段階にない。しかし、東南アジアの低湿地の自然植生は森林であり、これらの樹木は根圏低酸素ストレスに適応する機構を備えているはずである。その機構の解明により、湛水環境での環境造林技術の開発を効果的に進める必要がある。

根圏低酸素ストレスにより、多くの植物種ではエネルギー通貨であるアデノシン三リン酸(ATP)の生産が不足し、細胞活性が低下する。その不足を補うために、低酸素環境下でアルコール発酵などの嫌気呼吸が誘導されることが多くの植物種で知られている。しかし、嫌気呼吸は好気呼吸に比べてATP生産効率がきわめて低いため、ATPの不足を回避するにはエネルギー源である糖などをエネルギー代謝に大量に供給するかATP生産効率のより高い経路を活用することが大前提となる。

根圏低酸素ストレスに対する耐性機構としては、代謝応答によるものと後述するような通気組織の発達という形態的な機構が知られているが、耐性の極めて高い熱帯樹木 *Melaleuca cajuputi* Powell では形態的な適応が起こる前のストレス負荷初期の段階でも高いエネルギー状態を維持しており (Yamanoshita et al. (2005) *Journal of Forest Research* 10: 199-204, Kogawara et al. (2014) *Tree Physiology* 34: 229-240)、代謝的な応答のみでもATP不足を回避できると考えられる。樹木に関する報告では、ほとんどの場合、低酸素環境下での代謝による適応としてアルコール発酵のみが扱われてきた。これに対し私たちは、*M. cajuputi* を対象として、エネルギー代謝へのエネルギー源

の獲得様式の面から根圏低酸素耐性機構の解明を目指してきた。その結果、根の可溶性糖画分への新規光合成産物の分配が根圏低酸素環境下で増えることを¹³Cによる標識実験により明らかにした (Kogawara et al. (2006) *Tree Physiology* 26: 1413-1423)。また、*M. cajuputi* よりも低酸素ストレス耐性の低い *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. は根圏低酸素環境で根でのスクロース分解が抑制されるのに対し、*M. cajuputi* はスクロース分解が抑制されず、湛水環境下での根のエネルギー代謝への糖供給が維持されていることを明らかにした (Kogawara et al. (2014) *Tree Physiology* 34: 229-240)。さらに、根圏低酸素ストレス下において、解糖系以外への糖の分配が抑制されていることを示唆する結果を、代謝物量と酵素活性の網羅的解析から得ている。これらは低酸素ストレス環境下においてエネルギー代謝への糖供給を確保するエネルギー生産維持機構として機能している可能性がある。

根圏低酸素環境に対する植物の適応機構としては、低酸素環境下でのエネルギー生産に関わる機構に加えて、低酸素環境を緩和する機構も知られている。湛水環境に適応した植物では、通気組織と呼ばれる空隙に富む組織が根や茎の地際部に発達し、冠水していない地上部から酸素を地下部に供給して低酸素環境を緩和することが知られており、この機能は湛水環境下での長期生育に不可欠であると考えられている。通気組織によって、根圏が無酸素環境であっても根の内部は好気環境に維持されることが様々な樹種で確かめられており、私たちのグループの研究でも、通気組織の発達した *M. cajuputi* の根では、低酸素環境下でのエネルギー状態の維持に必要な解糖系下流域の炭素の流量が少なく、根の内部がより好气的になっていることが示唆されている。私たちが得た結果では、湛水環境に応答した通気組織の発達の仕方が樹種により様々であったことから、水位が大きく変動する実際の湛水環境への適応能力には大きな種間差があると予想される。そのため、樹木の茎と根における通気組織の発達の度合いやそのスピードを明らかにすることにより、湿地における樹種選択や立地区分、育苗などの造林法の開発が可能になる。

2. 研究の目的

本研究では、熱帯樹木の根圏低酸素ストレスに対する応答性を、炭素代謝とエネルギー生産に焦点を当てた[代謝]と、通気組織の形成と効果に焦点を絞った[形態]の両面から理解することにより、低湿地での造林法開発に資する基礎情報を得ることを目的とする。研究が先行している *M. cajuputi* について、根圏低酸素ストレス環境下における糖の利用様式を明らかにし、低酸素ストレスに対する遺伝子発現応答の全体像を把握した上で、発現応答性のある炭素代謝関連遺伝子を

詳細に調べることにより、炭素利用の応答機構を明らかにする。その他のさまざまな熱帯造林候補樹種について、根圏低酸素ストレス耐性を評価した上で、糖の利用様式を明らかにし、通気組織の発達およびその応答性を調べ、*M. cajuputi* と比較することによって各樹種の造林適地特性の情報を得る。

3. 研究の方法

全ての実験は、自然光ガラス室(昼/夜: 30 / 25)において、当年~2年生の実生苗を用いた水耕栽培系で行った。処理は、培養液中の酸素濃度が約7mg/L(対照区)と、0.5mg/L以下(低酸素区)の2区を設けた。

(1) *Melaleuca cajuputi* の根圏低酸素ストレス耐性機構

根圏低酸素環境下の *M. cajuputi* の根での炭素の利用状況を明らかにする一環として、リグニン合成などの芳香族化合物合成経路の酵素活性と代謝物量の測定を行い、また、代謝全体を鳥瞰するためにトランスクリプトーム解析を行った。

根圏低酸素環境下での *M. cajuputi* の根の代謝物量と酵素活性の変化を、適宜比較種を交えて調べた。根圏低酸素処理2日後に芳香族代謝に関わる酵素の活性と代謝物量を調べる実験、処理14日間のシキミ酸経路の酵素活性と代謝物量とフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)の時間変化を調べる実験、処理4日後のリグニンへの炭素の配分比を調べる¹³Cを用いた標識実験の3種類の実験を行った。

低酸素処理期間を2日間として芳香族代謝を調べた実験では、*M. cajuputi* と *Eucalyptus camaldulensis* を用いた。解糖系からシキミ酸経路入り口への炭素供給の指標として、グルコース6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)と6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PGDH)の活性を、シキミ酸経路は、シキミ酸脱水素酵素(SKDH)活性とシキミ酸、ガリック酸量を、芳香族代謝は、PALの活性とコピキノ、フィロキノ、ケイ皮酸、シナピン酸、サリチル酸量を測定した。ただし、*E. camaldulensis* はPAL活性とシキミ酸、ガリック酸、コピキノ、フィロキノ量のみ測定した。

低酸素処理期間を14日間として代謝の時間変化を調べた実験では、*M. cajuputi* と *E. camaldulensis*、*Syzygium cinereum*、*S. grande* を用いた。SKDHとPALの活性、シキミ酸とガリック酸濃度を測定した。

¹³C標識実験では、低酸素処理4日後に *M. cajuputi* と *E. camaldulensis* の地上部に¹³CO₂を2時間曝露し、約1日後に根を収穫し、¹³C濃度を測定して、非曝露個体の¹³C濃度と比較することにより、曝露由来の¹³C量を定量した。その際、分画を行い、根における光合成産物のリグニン画分への配分比を求めた。

トランスクリプトームは、*M. cajuputi* を

用い、根圏低酸素処理に対する根の遺伝子発現応答をRNASeq法により解析した。4日間の根圏低酸素処理を各種各処理2個体に施した後、細根から改変CTAB法によりRNAを抽出し、de novoアセンブリにより発現量解析を行った。得られた推定トランスクリプト配列の発現強度のデータを元に、処理区内の発現強度の変動が小さく、処理区間で2倍以上の変動があるものに絞ってアノテーションを行った。

(2) さまざまな熱帯樹木の根圏低酸素ストレスへの応答

熱帯産の8樹種(*Acacia mangium* と *E. camaldulensis*、*Horsfieldia irya*、*H. crassifolia*、*S. cinereum*、*S. grande*、*S. kunstleri*、*S. longiflorum*)について、根圏低酸素環境下での成長、光合成速度(*E. camaldulensis*を除く)、地際近辺の空隙率と、側根のアルコール脱水素酵素(ADH)活性(*A. mangium*と *S. kunstleri*、*S. longiflorum*を除く)を測定した。エネルギー状態の指標として、側根のATPとADP、AMPの量を測定し(*A. mangium*を除く)、アデニル酸エネルギー充足率(AEC)と総アデニル酸量(TA)を計算した。処理期間は、*A. mangium*は12日、*E. camaldulensis*と *S. cinereum*、*S. grande*は14日、*S. kunstleri*、*S. longiflorum*は25日、*H. irya*と *H. crassifolia*は28日とした。また、*H. irya*、*H. crassifolia*については、地際近くの主根と茎のデンプン濃度も測定した。

4. 研究成果

(1) *Melaleuca cajuputi* の根圏低酸素ストレス耐性機構

根圏低酸素処理2日後の根で、G6PDHと6PGDH、SKDHの活性に変化はみられなかったが、より下流にあるPALの活性は著しく低下した。また、シキミ酸濃度に変化はみられなかったが、シキミ酸経路から分岐して生成されるガリック酸の濃度は増加していた。また、シキミ酸経路からPALにいたる経路の途中から分岐して生成されるコピキノ濃度に変化はなかったが、フィロキノは根圏低酸素処理によって増加していた。PALによって生成されるケイ皮酸濃度は減少したが、より下流にあるシナピン酸やサリチル酸の濃度は変化しなかった。PALより上流の代謝は維持されているが、PAL以降のリグニン生合成経路中の様々な部位で代謝が滞っていることが示唆された。*E. camaldulensis*では、PAL活性、シキミ酸、ガリック酸、コピキノ、フィロキノの濃度に処理による影響がみられなかった。

根圏低酸素処理14日間の変化では、*M. cajuputi* と *E. camaldulensis*、*S. cinereum* の低酸素処理個体にSKDH活性の低下がみられたが、*S. grande*では活性の低下がみられなかった。*M. cajuputi*は8日目から低下し、14日目での低下がわずかであったのに対し、

E. camaleulensis は 2 日目から低下し、14 日目には対照区の半分程度の活性になっていた。SKDH により生成されるシキミ酸の濃度は、*M. cajuputi* では変動が大きく低酸素処理による濃度の変化は明瞭でなかった。*E. camaleulensis* と *S. cinereum* の低酸素区のシキミ酸濃度は対照区と差がなかった。

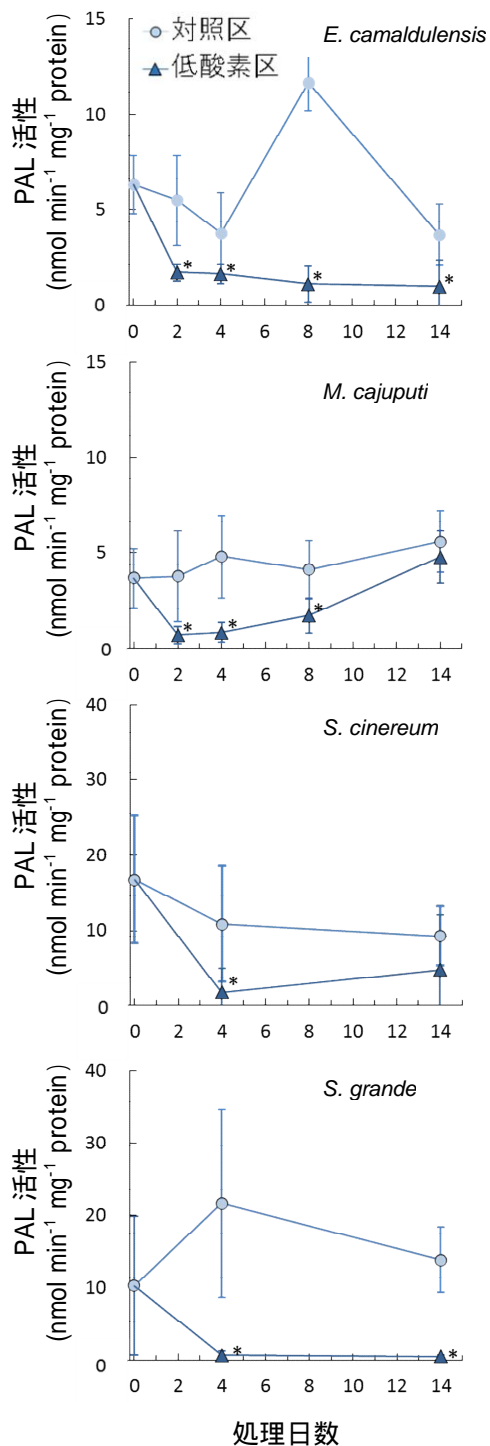


図 1. 根圏低酸素環境が根の PAL 活性に与える影響
誤差棒は標準偏差を表す。*印は処理区間に有意差があることを示す(t 検定, $P < 0.05$)。

grande は低酸素区のシキミ酸濃度が対照区に比べて低かった。いずれの種においても、シキミ酸経路から分岐して生成され、加水分解性タンニンなどの材料となるガリック酸の濃度が低酸素処理により一時的に増加した。低酸素処理初期には全ての種の低酸素区で PAL 活性が低下したが、*M. cajuputi* では処理後 14 日目には PAL 活性が回復しており、*S. cinereum* でも回復した個体が見られた。*E. camaldulensis* と *S. grande* では低酸素処理により PAL 活性が低下したまま回復しなかった。

低酸素ストレス初期では、いずれの種でも PAL 活性が抑制されたので、リグニン合成も減少していたと考えられる。低酸素処理後 14 日目に PAL 活性が回復していた *M. cajuputi* と *S. cinereum* の一部の個体では、リグニン合成も回復した可能性がある。短期的にみると、根圏低酸素ストレス下におけるリグニン合成経路の抑制は、酸素やエネルギーの消費を抑制することで、細胞内でエネルギー不足を緩和するという利点となると考えられる。しかし、リグニンは細胞壁成分として必須であり、リグニンへの炭素供給が低下したままでは根の機能維持に支障を来すので、根圏低酸素環境下での生育という長期的視点では、リグニン合成経路の回復は必要であると考えられる。PAL への基質を供給するシキミ酸経路については、*E. camaldulensis* 以外の 3 種では低酸素ストレス下で代謝が抑制されないか、抑制されてもその程度は軽度であった可能性がある。

^{13}C 標識実験で、*M. cajuputi* と *E. camaldulensis* の対照区では根に転流した標識 ^{13}C のうちリグニンに分配された ^{13}C がそれぞれ 13%、11%であったが、低酸素区ではそれぞれ 6%、4%となり、両種とも低酸素処理によりリグニン画分への新規光合成産物の配分が低下した。

根圏低酸素処理 4 日目のトランスクリプトーム解析では、アノテーションの対象とした

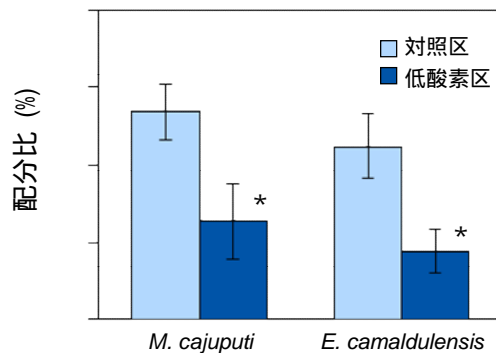


図 2. 根におけるリグニン画分への光合成産物の配分
誤差棒は標準偏差を表す。*印は処理区間に有意差があることを示す(t 検定, $P < 0.05$)。

2072 の推定トランスクリプト配列のうち、1327 配列にアノテーションが付与された。これらの配列は低酸素処理によって発現量が増加したものとあれば減少したものとあったが、1/2 以下に低下した配列には、SKDH、PAL、細胞壁インペルターゼ、カロース合成酵素も含まれていた。

16 倍以上の変動を示した 58 配列に絞ると、低酸素処理によって 47 配列の発現量が増加した。低酸素処理によって発現量が増加した配列の中には、アセトアルデヒド脱水素酵素、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、エチレン応答性転写因子、ADH、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、アデノシルメチオニン合成酵素、熱ショックタンパク質、シトクローム c、UDP-グルクロン酸-4-エピメラーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼにアノテーションされたものが含まれていた。低酸素処理によって発現量が減少した配列には、アセチル CoA 合成酵素にアノテーションされたものが含まれていた。

PAL とカロース合成酵素の発現量の低下は、これまで行ってきた活性測定の結果や、構造的画分への炭素配分の減少という現象と一致し、それぞれ、リグニン合成、カロース合成が遺伝子発現の段階で抑制されていることがわかった。SKDH 発現量の低下は活性の結果と異なるが、これは、発現量が低下したアイソザイムはトータルの活性に影響の少ないもので、より活性もしくは発現量の大きいアイソザイムは処理による影響を受けなかったためと思われる。

エネルギー源である糖を多量に消費する高分子糖重合体合成や、酸素やエネルギーを多量に消費するリグニン合成が抑制されることも、*M. cajuputi* の根圏低酸素ストレス耐性に寄与していると考えられる。また、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼのような、基質レベルでの ATP 生産機構も示唆された。

(2) さまざまな熱帯樹木の根圏低酸素ストレスへの応答

A. mangium は、根圏低酸素処理によって 8 日目から気孔コンダクタンスと光合成速度が

対照区に比べて低下し、樹高の相対成長速度も低下した。根の空隙率は 10%未満と低く、12 日間の処理によって増加しなかった。低酸素ストレスにより気孔の閉鎖を伴う光合成速度の低下が起きて成長が阻害されたことから、吸水能の低下が成長阻害の一因である可能性がある。

E. camaldulensis は処理後 14 日目に低酸素区の空隙率が対照区より高く根圏低酸素処理により通気組織の発達を誘導されたが、*S. cinereum* と *S. grande* では空隙率が低いままで通気組織の発達は誘導されなかった。*S. cinereum*、*S. grande* は根圏低酸素処理により成長や光合成速度が低下しなかった。酸素欠乏の指標となる ADH 活性は、3 種いずれの細根でも根圏低酸素処理により上昇し、酸素欠乏の状態にあった。AEC と TA は *S. cinereum* で高く保たれていたが、他の 2 種では根圏低酸素処理によって低下し、特に *E. camaldulensis* の低下が著しかった。3 種の根圏低酸素ストレスに対する耐性は *S. cinereum*、*S. grande*、*E. camaldulensis* の順で高く、その耐性は通気組織の発達では説明がつかなかった。

25 日間の根圏低酸素処理で *S. longiflorum* では、光合成速度と気孔コンダクタンス、樹高相対成長速度が低下したのに対し、*S. kunstleri* では、25 日間の処理期間を通じて気孔コンダクタンス、光合成速度、樹高の相対成長速度に低下がみられなかった。*S. kunstleri* の空隙率は処理区間で差がなく、茎で約 10%、根で約 12%であった。*S. longiflorum* では、対照区の茎と根の空隙率がともに約 3%であり、茎では低酸素処理により空隙率が約 6%に増加した。根のエネルギー充足率は両種とも低酸素区で低下したが *S. longiflorum* が *S. kunstleri* よりも低下の度合いが大きかった。*S. longiflorum* は *S. kunstleri* に比べて根圏低酸素ストレスへの耐性が弱いことが明らかとなった。*S. longiflorum* は低酸素ストレスにより茎の通気組織の形成が誘導されたが、それによる根の酸素環境の改善は限定的であったために細根のエネルギー状態が *S. kunstleri* に比べてより悪化したと考えられる。*S.*

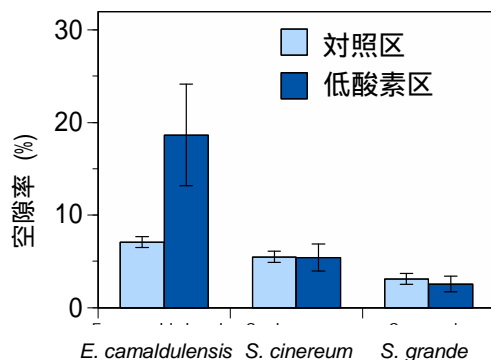


図3. 根圏低酸素処理 14 日後の主根の空隙率
誤差棒は標準偏差を示す。

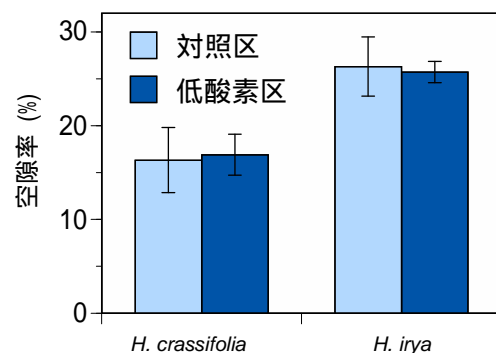


図4. 根圏低酸素処理 28 日後の主根の空隙率
誤差棒は標準偏差を示す。

longiflorum で根圏低酸素ストレスにより気孔が閉鎖したのは、根のエネルギー状態の悪化による吸水能の阻害が一因であると考えられる。*S. kunstleri* は低酸素ストレスにより通気組織の発達が誘導されなかったが、好気環境下で発達している通気組織が低酸素環境での根系の酸素供給に有効に働き、根の吸水能の維持に寄与している可能性がある。

H. crassifolia と *H. irya* はそれぞれ、18%、26%程度と主根の空隙率が高かったが、ともに 28 日間を通して、根圏低酸素処理による空隙率の増加がみられず、ADH 活性が高く保たれていた。両種とも成長に処理間差が無かったが、処理 28 日後では、*H. irya* の根の AEC が回復していたのに対し、*H. crassifolia* は根圏低酸素処理による低下がみられた。

H. crassifolia と *H. irya* の両種とも根圏低酸素処理により光合成速度と気孔コンダクタンスが低下した。*H. irya* では、処理後 21 日目以降に光合成速度が回復したのに対して、*H. crassifolia* では、処理後 28 日目まで光合成速度の低下が認められた。両種ともに根圏低酸素処理個体にクロロシスが生じることはなく、根および茎のデンプン濃度が低下することはなかった。

両種ともに高い空隙率を持っているが、根圏低酸素環境下での、通気組織による根内酸素環境の改善は限定的であったと考えられる。両種でみられた光合成速度の低下は気孔コンダクタンスの低下をともなっており、気孔の閉鎖による二酸化炭素の葉内への取り込みの阻害が光合成速度の低下をもたらしたと考えられる。根圏低酸素処理個体にデンプン濃度の低下がみられなかったことから、両種において、デンプン濃度の低下を引き起こすほどの強度の光合成阻害ではなかったといえる。処理終了時に *H. irya* は根のエネルギー状態が回復しており、葉の光合成速度も回復していたのに対し、*H. crassifolia* ではそれらの回復がみられなかったことから、*H. irya* は *H. crassifolia* に比べて根圏低酸素ストレスに対する耐性が高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

山ノ下卓、則定真利子、小島克己. (2018) タイ南部のクアンクレン湿地に植栽された *Melaleuca cajuputi* の成長. 第 129 回日本森林学会, 高知.

則定真利子、山ノ下卓、小島克己. (2018) *Horsfieldia* 2 種の根圏低酸素ストレスに対する光合成と貯蔵炭素の応答. 第 129 回日本森林学会, 高知.

山ノ下卓、則定真利子、小島克己. (2017) 植栽時期と湛水前処理が熱帯湿地林構成樹種の湿地植栽後の生残に与える影響. 第 128 回日本森林学会, 鹿児島.

則定真利子、山ノ下卓、小島克己. (2017) 湛水前処理が熱帯湿地林構成樹種の苗木の茎と根のデンプン濃度に与える影響. 第 128 回日本森林学会, 鹿児島.

山ノ下卓. (2016) 低酸素環境に曝された樹木根における ATP 生産経路の探索. 第 127 回日本森林学会, 藤沢.

則定真利子、山ノ下卓、小島克己. (2016) 湛水前処理が熱帯湿地林構成樹種の植栽後の光合成に与える影響. 第 127 回日本森林学会, 藤沢.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 克己 (KOJIMA, Katsumi)
東京大学・アジア生物資源環境研究センター・教授
研究者番号: 80211895

(2) 研究分担者

則定 真利子 (NORISADA, Mariko)
東京大学・アジア生物資源環境研究センター・准教授
研究者番号: 00463886

(3) 連携研究者

山ノ下 卓 (YAMANOSHITA, Takashi)
東京大学・アジア生物資源環境研究センター・特任講師
研究者番号: 10463887