

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07482

研究課題名(和文) 多様な環境に適応した樹木のみが獲得できた光合成の制御機構とその役割

研究課題名(英文) The role and regulation of photosynthesis in specific responses acquired by trees adapted to various environment conditions

研究代表者

柴田 勝 (Shibata, Masaru)

山口大学・教育学部・准教授

研究者番号：30300560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：樹木のみが備えているマルチ耐性機構を明らかにするために、樹木特異的な光応答に注目した。葉に受けた光を熱などに変換する非光合成反応を表すパラメータには、蛍光や色素組成から得られるNPQ、DPSがあり、これらは全ての植物で直線関係を示すと考えられていた。しかし、樹木では葉の光処理により直線関係を示さなかった。この光応答が樹木特異的かを調べるために同科の草本と樹木で比較を行った。その結果、季節的変動はあるが樹木特異的な応答であることから、さらに、樹木特異的な色素の組成が、光合成反応中心のエネルギー利用効率に影響を与えており、複数の樹木特異的な応答で光利用効率の制御が行われていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify multi-tolerance mechanisms to environment changes in only tree species, we focused on tree specific photoresponses. NPQ and DPS are the parameters of non-photosynthesis reactions such as the heat by the fluorescence and pigment composition, respectively. In all higher plants, it has been thought that a plot of NPQ vs DPS shows a linear relationship. But a normal linear relation was not obtained in tree leaves with light treatments. Photoresponses of herbaceous plants and trees belonging were compared in the same family to investigate whether NPQ/DPS gap is tree specific photoresponse. The obtained results showed that NPQ/DPS gap was a tree specific response with seasonal variation. the corroborated alternation of normal and tree specific pigments affected quantum yield in photosystems. Furthermore, it was found that light utilization efficiency is controlled by multiple tree specific responses.

研究分野：樹木生態生理学

キーワード：光合成 樹木特異的 光応答 色素

### 1. 研究開始当初の背景

森林の保護や再生など観点から、劣悪な環境においても光合成活性が低下せず、成長を維持できるストレス耐性能力の高い樹木の必要性が指摘されている。このため、ユーカリなどに活性酸素を消去する酵素などの遺伝子が導入されたストレス耐性木の作成が行われてきた。しかし、樹木をはじめ多くの組換え植物では代謝が攪乱され、期待した成果は得られていない。このために現在、単一機能のみの強化ではなく、多種多様なストレスに関する遺伝子群の発現、植物ホルモン制御、生態的な適応などの多面的な応答を考慮した研究が行われている。しかし、これらの研究は、未だに草本植物のストレス耐性機構を模倣しているに過ぎず、永年植物である樹木の特異性に着目した研究は極端に少ない。このため、長期にわたるマルチストレス耐性に必要な幅広い代謝応答を調べるには至っていない。

これらのことから、野外で生育する樹木の代謝生理を詳細に調べることで、樹木に特異的な環境応答として、草本植物とは異なる光合成の適応機構・生理を明らかにすることが求められている。

### 2. 研究の目的

樹木のみが獲得した長期生育を可能とするストレス耐性機構は不明である。樹木は、草本植物に比べて多種多様な環境変化を長期に受けることから、樹木特異的なストレス耐性機構が存在すると考えられてきた。しかし、樹木特異的なストレス耐性機構の詳細な研究はほとんど行われていない。

申請者は、シロイヌナズナなどが示す葉緑体での画一的な光合成の制御以外に、多様な適応機構が存在することを示してきた。本申請では、樹木特異的な色素を中心に 8 種類の色素が協調的に働くことで成り立つ 5 種類の特異的な環境応答 (4 種類の色素サイクルと 1

種類の光利用効率制御因子) について、各応答を生化学的 (物質・タンパク質レベル)、生理学的 (エネルギー利用効率、システム変化) に解析し、相互に関連付けることで樹木が生きるために獲得した特異的な適応機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

【植物サンプル】山口県、新潟県、福岡県で採取した草本植物 11 種 (マメ科, バラ科, アオイ科, オトギリソウ科, メギ科, トウダイグサ科, ヒユ科, キョウチクトウ科)、木本植物 16 種 (マメ科, バラ科, アオイ科, オトギリソウ科, メギ科, トウダイグサ科, ブドウ科, ツバキ科, キョウチクトウ科, マツ科, ヒノキ科)、計 27 種 (表 1) を用いた。また、carotene(Car)実験には、山口大学構内のスダジイの当年生葉を用いた。

表 1. 実験に使用した植物サンプル

	草本植物	木本植物
マメ科	シロツメクサ ヌスビトハギ ノササゲ	ネムノキ ヤマハギ フジ
バラ科	ミツバツチグリ キンミスヒキ	ヤマザクラ ハマナス
アオイ科	タチアオイ	ムクゲ
オトギリソウ科	オトギリソウ	キンシバイ
メギ科	トキワイカリソウ	ナンテン
トウダイグサ科	エノキグサ	アカメガシワ
ヒユ科	ホウレンソウ	
ブドウ科		ツタ ノブドウ
ツバキ科		ヤブツバキ チャノキ
キョウチクトウ科	チョウジソウ	キョウチクトウ
マツ科		モミ
ヒノキ科		メタセコイア

【光処理方法】12 時間暗処理した葉を光合成作用光下で Chl 蛍光を測定し、3 時間暗処理した。暗処理後、Chl 測定を行った。

【蛍光測定】2 次元クロロフィル測定器 (FlourCam), 変調クロロフィル測定器 (Pam2000) を用いて蛍光測定を行った。

【色素分析】蛍光測定後、液体窒素により反応を止め、アセトンにより色素抽出、高速液体

クロマトグラフィー(HPLC)により各色素の定量分析を行った。各色素量から  $DPS = (Vio + Anth) / (Vio + Anth + Zea)$  を求めた。

#### 4. 研究成果

DPS と NPQ が直線関係を示さない木本植物について詳細に調べるために、同じ科の草本植物と木本植物における光応答の差異を調べるために、マメ科、バラ科、アオイ科、オトギリソウ科、トウダイグサ科、メギ科の草本・木本植物の葉の色素変化及びクロロフィル蛍光キネティックスを測定し、明・暗条件下での DPS と NPQ を求めた DPS, NPQ の変化量 ( $\Delta DPS$ ,  $\Delta NPQ$ ) を次の式から求めた。

$$\Delta DPS = (DPS_3 - DPS_1) / DPS_2$$

$$\Delta NPQ = (NPQ_3 - NPQ_1) / NPQ_2$$

柴田らにより、31種の植物において  $\Delta DPS$  と  $\Delta NPQ$  の値により草本植物、木本植物で差があることが指摘されており、草本・木本植物共に  $\Delta NPQ$  が 0.006 であるが、草本植物の  $\Delta DPS$  は  $0.159 \pm 0.039$ 、木本植物  $\Delta DPS = 0.558 \pm 0.111$  が報告されている。このため、 $\Delta DPS / \Delta NPQ$  から大きく草本タイプと木本タイプに分けた。その結果、草本植物であるキンミズヒキで木本植物タイプに近い動きがみられた。これは、キンミズヒキが林床植物であり、弱光下で生育しており、色素組成が木本植物に近いことから、木本植物と草本植物の中間的な光応答にあったと考えられる。また、木本植物であるムクゲ、キンシバイ、アカメガシワ、ナンテンにおいて、草本植物に近い  $\Delta DPS / \Delta NPQ$  応答が観察された。木本植物でありながら草本植物の挙動に近い  $\Delta DPS / \Delta NPQ$  を示したのはすべて落葉樹であり、そのサンプル採取時期は落葉期であった。また、試料によっては、一部の色素の分解が見られた。これらの結果は、木本植物の落葉樹において、季節的に草本植物に近い応答を示す木本植物があることが示唆してい

る。このために、5~12月に蛍光測定、色素分析を行い、季節的な  $\Delta DPS / \Delta NPQ$  応答を調べた。

草本植物では、全期間において DPS と共に NPQ が減少した。一方、木本植物では、植物種により異なっていた。フジ、ネムノキ、メタセコイアは落葉時期に近づくと NPQ 低下は DPS に依存したが、キョウチクトウ、モミでは年間を通して NPQ 変化は DPS に非依存的であった。これらの違いは、落葉樹と常緑樹では季節的な光応答の感受性が異なる可能性を示唆しており、落葉期には草本植物に近い応答を示しやすいことが分かった(図1)。

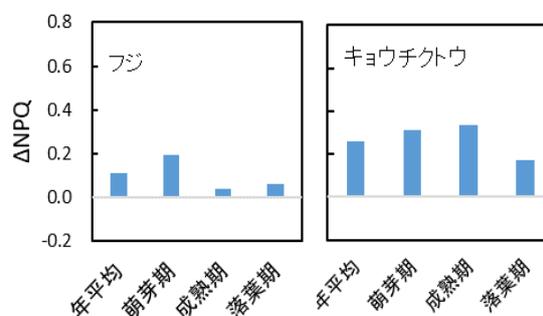


図1. 季節における植物の  $\Delta NPQ$  変化

萌芽期；5~7月, 成熟期；8~9月, 落葉期；10月

木本植物の高 DPS の生理的意義を調べるために、草本植物はハウレンソウ、木本植物はチャノキを用いて光照度時間を変更して実験を行った。チャノキ B は、チャノキ A と比較し高い DPS であった。チャノキ A、ハウレンソウ A, B は 150 秒~200 秒で NPQ が最大値を示し、約 300 秒で一定となった。しかし、チャノキ B の NPQ は約 100 秒で最大となり、約 200 秒で一定になった。また、光処理したチャノキ B のみで、150 秒~200 秒で DPS に依存しない NPQ 変化がみられた。これは、ハウレンソウ A, B、チャノキ A にはない光応答であり、光照射により比較的早い時間で熱放散、光合成を開始できる応答性を獲得したと考えられる。これらの結果は、木本植物の

高 DPS が光合成の光エネルギー利用、初期過程影響していることを示唆していた。

落葉期では、落葉樹の $\Delta NPQ$ が増加しているのに対し、常緑樹では減少していた。この結果は、気温の低下する季節において落葉樹と常緑樹の光応答に大きな違いが現れることを示している。草本植物とは違い木本植物では光照射後に3時間暗処理しても高い DPS が維持されていた。一般的に xanthophyll cycle は強光からの光阻害を回避する機構であることや、森林内で木漏れ日などの光強度の揺らぎにより光阻害を起こすことから、木本植物がすばやく熱放散を誘導するために、高い DPS が維持されていると考えられる。このため、異なる光強度で生育させたチャノキ(遮光なし、50%、90%遮光)に明暗処理の異なる葉片(A:12時間暗処理、B:12時間暗処理した後5分間光照射し、3時間暗処理)に光照射を行い、蛍光測定、色素分析から NPQ, DPS を求めた。

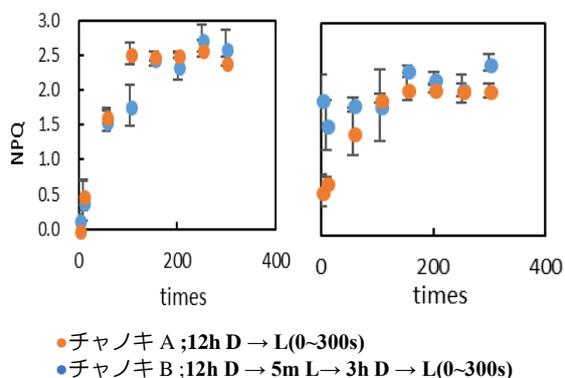


図2. チャノキにおける暗処理後に光照射する DPS, NPQ 変化

遮光なしで生育したチャノキの DPS は、B 処理の葉片で高くなっていった。しかし、A, B の葉片で同程度の NPQ 増加 (0~104 秒) が見られた。50%及び90%遮光で生育したチャノキの DPS, NPQ で同様の結果がみられ、生育光条件には依存しないことが分かった。

これらのことから、木本植物の高 DPS の生理的意義は、光照射時初期の熱放散の誘導で

はないことが明らかになった。このため、暗処理で NPQ に非依存的な DPS 変化を示す木本植物の詳細な蛍光クエンチング解析を行った。ただし、上記の実験と同様な光処理を行った A, B 葉片に対して、光合成作用光の強度が異なる条件(AL = 40%, 100%)での蛍光測定を行った。作用光の強度によらず、A 葉片は B よりも NPQ の立ち上がりが早くなるが、光照射開始 80 秒以降に NPQ が同じ値で一定となった。

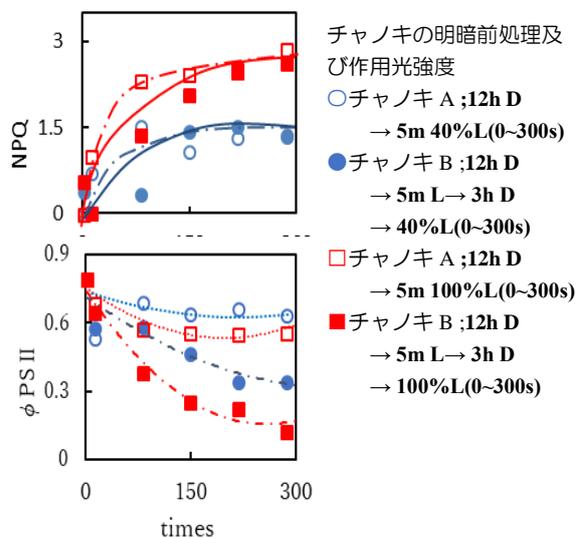


図3. 暗処理後に光照射した際の NPQ,  $\phi PSII$  変化(n=72)

また、光化学系IIの量子収率 $\Phi PSII (=qP \cdot Fv'/Fm')$ は、光強度 AL=40%, 100%ともに、B 葉片で小さくなった。興味深いことに、80 秒で A, B の $\Phi PSII$ の差がほぼ一定となった。光照射時間 0~80 秒では NPQ と $\Phi PSII$ の値が共に経時的に低下していた。 $\Phi PSII$ は、光合成電子伝達や炭酸固定が阻害されることで低下する。このために $\Phi PSII$ を光化学系II(PSII)と PSII 還元側(下流側:Cytb/f complex, PSI, Calvin cycle)を分別して光化学系の評価を行った。B 葉片は、光照射により経時的に PSII 最大量子収率( $\Phi PSII_{max}$ )が低下していた。一般的に、強光への植物の適応としての $\Phi PSII_{max}$ は、熱放散上昇(NPQ 増加)によるものである。しかし、本実験では NPQ は

低下していたことから、植物には NPQ とは異なる蛍光クエンチング成分が葉の光障害防御機構として存在する可能性が示唆された。また、今回の実験で存在を示唆された新たな成分は、植物に約 80 秒間 光照射されると現れ、光強度に依存しないと考えられる。

生育光強度の違いによる  $\alpha$ -Car 含有量変化を調べるために、それぞれの生育光強度で遮光開始から 0, 9, 20, 30, 40 日目に実験を行った。 $\alpha$ -Car の指標として  $\alpha$ -Car/( $\alpha$ -Car+ $\beta$ -Car) を用いた。遮光処理に使用した寒冷紗には保温効果があることから、生育光強度のみに依存する変化を調べるために生育光強度が 100% の  $\alpha$ -Car 含量を基準にする必要がある。このために、処理による色素変化を 0 日目の  $\alpha$ -Car 含量を基準とした。遮光処理 40 日のステージ①, ②ともに生育光強度 35~45% に  $\alpha$ -Car 含量の最小値があり、生育光強度の低下により  $\alpha$ -Car 含量の増加がみられた。小倉ら(2000)はモミの生育光強度の低下により  $\alpha$ -Car 含量が増加することを報告しており、今回得られた結果は樹種に関係なく弱光依存による  $\alpha$ -Car 含量増加を示唆するものであった。しかし、モミでは遮光率と共に  $\alpha$ -Car 含量増加を示したが、ステージ①では生育光強度 10% 以外は  $\alpha$ -Car 含量が減少し、ステージ②は遮光処理したもののすべて  $\alpha$ -Car 含量が増加していた。モミでは、生育温度が 30°C 以下では  $\alpha$ -Car 含量の減少がみられたが 10°C 以下になると  $\alpha$ -Car 含量が増加しており、本実験のステージにおいて生育温度に対する同様の応答が起きたことが考えられる。つまり、生育光強度・生育温度双方の影響を受けたことにより、 $\alpha$ -Car 含量が安定しなかったことが考えられる。

$\alpha$ -Car と光化学反応・熱放散の関係性については、葉の光利用効率の指標として  $\Phi$ PSII、反応中心 (RC) のエネルギー利用効率の指標に  $F'v/F'm$ 、光照射下での機能的な RC(open PSII)存在比率として qP を用いた。各パラメ

ータは、 $\Phi$ PSII=  $F'v/F'm \times qP$  で関係付けられている。熱放散の指標としてクロロフィル蛍光測定によって得られる NPQ を用いた。

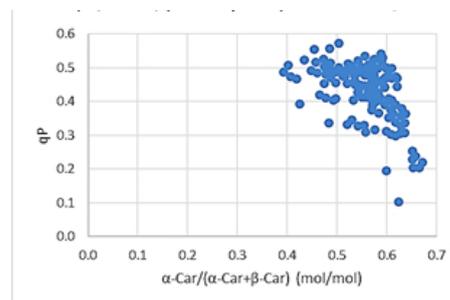


図 4. 全 Car に占める  $\alpha$ -Car 比が、qP に与える影響

$\alpha$ -Car と qP において負の相関がみられた (図 4)。一方、 $\alpha$ -Car と NPQ において正の相関を示した。 $\alpha$ -Car 含量の増加に伴い qP が減少し、NPQ が増加することから、 $\alpha$ -Car 含量の増加により光化学反応を行うことができる RC が減少し、熱放散が大きくなったと考えられる。さらに、色素間では  $\alpha$ -Car 含量の増加により Xan 含量が増加することで、Xan 依存の NPQ (熱放散の指標) が大きくなった可能性がある。 $\alpha$ -Car vs qP、 $\alpha$ -Car vs NPQ において共に負の相関がみられた。 $\alpha$ -Car 含量の増加による qP・NPQ の減少は、 $\alpha$ -Car 含量の増加により、open PSII が減少し、熱放散も減少を示している。しかし、 $\alpha$ -Car vs qP、 $\alpha$ -Car vs NPQ から得られた結果は、 $\alpha$ -Car と qP、NPQ との関係と異なっていた。これらの違いは、クロロフィル蛍光測定において、励起光強度が弱いために見かけ上 qP、NPQ ともに減少したためだと考えられる。実際に、励起光強度の上昇につれ qP は減少し NPQ 上昇していくことが明らかになっている。本実験では、励起光を 358 ( $\mu$ mol photon/  $m^2s$ ) に設定していることから、大きな変化が見られず、その結果、見かけ上双方が減少した可能性がある。そのため、励起光に 1000 ( $\mu$ mol photon/ $m^2s$ ) の光を照射すればステージ①②ともに同様の結果が得られると考えられる。

本研究では、生育温度が 10°C以下の場合、生育温度の影響を受けること、励起光の光強度により  $\alpha$ -Car 含量と  $qP \cdot NPQ$  が同じ相関を示すことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

- 1 : 柴田勝ら, 色素に依存しない樹木特異的なNPQ変化, 日本植物学会 第72回大会, 新潟, 2015.
- 2 : 柴田勝ら, 新しい定量的樹勢診断法の開発 3. 収量構成要素とアロメトリによる新規な収量予測法の開発, 平成 28 年度日本茶業学会研究発表会, 静岡, 2016.
- 3 : 柴田勝ら, キサントフィルサイクルに依存しない樹木特異的なNPQ, 第 128 回日本森林学会大会, 鹿児島, 2017.
- 4 : 野口 (舟山) 幸子, 野口航ら, 低リン環境に適応したルピナス 2 種の呼吸特性と有機酸分泌, 第 64 回日本生態学会大会, 東京, 2017.
- 5 : 野口 (舟山) 幸子, 野口航ら, シロバルピナスとホソバルピナスの呼吸特性と有機酸分泌, 第 3 回植物の栄養研究会, 横浜市, 2017.
- 6 : 柴田勝ら, 新しい定量的樹勢診断法の開発 4 収量予測の理論と実証, 平成29年度日本茶業学会研究発表会, 静岡, 2017.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田 勝 (Masaru Shibata)

山口大学・教育学部・准教授

研究者番号 : 30300560

### (2) 研究分担者

野口 航 (Noguchi Ko)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号 : 80304004

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号 :

### (4) 研究協力者

なし ( )