

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18688002

研究課題名 (和文) CAM 植物における乾燥適応機構に関する研究

研究課題名 (英文) Drought resistance mechanisms in CAM plants

研究代表者

近藤 歩 (KONDO AYUMU)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：60340296

研究成果の概要：

ある種の CAM 植物では、乾燥ストレスと光の複合的な要因によって葉肉細胞の葉緑体が集合する。この現象には新たに、青色光や紫外光、およびアクチン繊維が関与していることが示唆された。またこの現象は、乾燥ストレス下で現れる日周的 CO₂ 吸収パターンと関係する可能性が示唆された。さらに本研究によって、乾燥ストレスによる葉緑体の動態様式は光合成型によって異なることが見出された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2007年度	500,000	150,000	650,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	10,100,000	3,030,000	13,130,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学

キーワード：栽培、植物光合成

1. 研究開始当初の背景

21 世紀半ばには、地球上の人口は現在のほぼ倍の 100 億人の時代を迎えると言われている。このような時代にむけて、さまざまな不良環境でも生育できる作物品種を作出することは、きわめて重要な課題である。また、砂漠や塩害地の拡大、気温の上昇など、地球レベルでの環境変動の影響が深刻化しているなかで環境保全、環境再生をはかるための植物の作出が切望されている。

CAM (Crassulacean Acid Metabolism) は、C₃、C₄ 光合成と並ぶ光合成炭素代謝機構の一

つであり、夜間に気孔を開き CO₂ をリンゴ酸として固定し、高温乾燥した日中には気孔を閉じて蒸散を抑え、リンゴ酸の脱炭酸と C₃ 回路による炭素還元を行う。CAM を営む植物 (CAM 植物) は、パイナップルやサボテンなど乾燥地や熱帯に数多く分布することが知られている。耐乾性植物の開発研究を進めていく上で、このような乾燥環境に高度に適応進化を遂げてきた CAM の制御機構を解明することは、極めて重要な知見となる。

2. 研究の目的

最近の研究から、ベンケイソウ科のカランコエ属をはじめとする数種の多肉植物において、乾燥ストレスと光の複合的な要因によって葉肉細胞の葉緑体が集合する現象を見出した。この現象は、一般的に知られている植物、イネ、トウモロコシ、エンドウ、ソバでは見出されず、CAMを遂行する多肉植物のみで見出された。この場合、葉緑体の集合体は細胞内部に塊状体として形成される。このような集合体の形成は、植物ホルモンの一つであるアブシジン酸 (ABA) によっても誘導され、さらに集合体が形成されることで葉の光透過率が著しく上昇することが明らかになった。これらの結果から、CAM植物で見出された葉緑体の集合現象は、乾燥ストレス応答に密接に関連した形態反応であることが示唆された。本研究では、乾燥ストレス下におけるCAM植物の細胞内構造特性ならびに代謝機構を解析し、CAMの新規な代謝経路の存在を明らかにするとともに、CAMの耐乾性機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞内部の葉緑体が塊状体の集合体として形成される際、葉緑体は核を包み込むように集合し、またミトコンドリアもその集合体の中で多く存在することが確認されている。すなわち、この現象は単に葉緑体が集合するだけでなく、ミトコンドリアや核などの細胞小器官の配置、構成なども連動して変化を起している。そこで、葉緑体集合現象時と平常時のCO₂吸収速度およびクロロフィル蛍光を測定することにより葉肉細胞中で光合成代謝にどのような変化が起きているかを調査した。そして、この調査において、本研究で支援されて購入できた光合成蒸散測定装置 (LI-6400R) を使用した。この測定器は小型のチャンバーを備えており、葉面の一部を挟んでその箇所におけるCO₂と水蒸気の交換特性を測定するものである。これはチャンバー内に供給されているCO₂濃度差と通気量、水蒸気差を測定することにより、光合成・蒸散速度をそれぞれ測定できる。また、正確にガス交換とクロロフィル蛍光の同時測定ができる。クロロフィル蛍光を測定することにより、光化学と熱へのエネルギー配分を測定することができ、光から光合成へのエネルギー移動を正確に把握することができる。この機器を人工気象器内に入れ、試料をチャンバーで挟み、24時間測定をした。

(2) 多肉植物における葉緑体の運動機構を明らかにするため、葉緑体集合運動に対する光質の影響や、細胞骨格を担うアクチン繊維と微小管との関わりについて調査した。カランコエ葉の葉片を、蒸留水(対照区)、50 µg/ml

のサイトカラシン B 溶液(アクチン繊維阻害区)、および50 µg/mlのノコダゾール溶液(微小管阻害区)に浸し、12時間遮光した。その後、それぞれの葉を5 µMのABA溶液に移し、青色光、赤色光、紫外光を照射した。

(3) マツバギク (C₃植物)、ポーチュラカ、マツバボタン(C₄植物)、およびカランコエ、シヤコバサボテン (CAM植物) の5種の多肉葉植物を用い、十分に灌水した条件下(対照区)と灌水を停止した条件下(乾燥ストレス区)で、葉緑体集合現象における葉構造の特異性を調査した。葉組織片は、3% (v/v) グルタルアルデヒド-50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) を用い2時間固定し、その後50 mM リン酸緩衝液で洗浄した。さらに、2% オスミウム酸-50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) で2時間固定した。アセトンで脱水後、Spurr樹脂に包埋した。光学顕微鏡での観察には1% Toluidine Blueで染色した準超薄切片を、透過型電子顕微鏡 (JEM-1011) での観察には酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した超薄切片を使用した。

4. 研究成果

(1) カランコエにおいて、灌水停止2週間の乾燥ストレス条件下で日周的な光合成パターンに大きな変化が見出された。暗期でも明期でもCO₂を吸収しない、いわゆるCAMアイドリング現象が見られた(図1)。またこの条件下では、明期で葉緑体の集合体が形成されていた。さらに、クロロフィル蛍光測定の結果、量子収率 (Fv' / Fm') の著しい減少および非光化学消光 (qN) の上昇がみられた。したがって、乾燥ストレス下で葉緑体が集合することにより、過剰の還元エネルギーを熱放散という形で放出していることが示唆された。

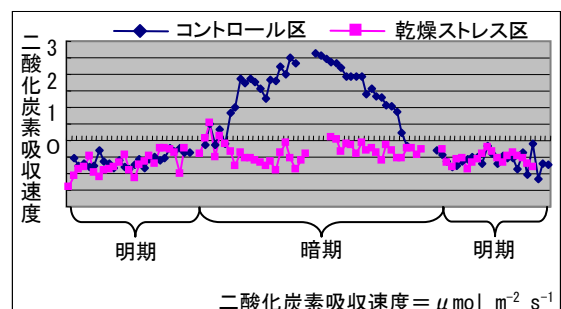


図1. 光合成の日周変化

(2) 多肉植物における葉緑体集合運動には青色光と紫外光が関与していることが示唆された。さらに、青色光を照射した処理区より紫外光を照射した処理区の方が、早く集合体が形成されたことから、葉緑体の集合誘導は、

青色光よりむしろ紫外光に高い反応を示すことが明らかになった。

植物は種々の光受容システムを持ち、その成長、分化などの形態形成の過程が光により制御されている。紫外線もアントシアニンやフラボノイドの合成を誘導するだけでなく、伸長成長を阻害するなどさまざまな形態的な変化を引き起こす。特に、紫外線はDNAに吸収され損傷を与えることは古くから知られており、最近では紫外線によるDNA損傷とそれからの修復機構が注目されている。本実験での葉緑体の集合体は、多数の葉緑体が核を取り囲むように集合して形成していることから、DNAの拠点である核を紫外光から防御する役割を果たしているのかもしれない。

微小管やアクチン繊維の重合阻害剤を用いた実験から、葉緑体の集合運動には、アクチン繊維が関与していることが示唆された。さらに、アクチン繊維阻害区では、光質に関係なく葉緑体の集合が見られなかったことから、葉緑体の集合誘導の情報伝達経路では、光受容の下流にアクチン繊維による制御機構があることが考えられた。

アクチン繊維は細胞内で細胞小器官が移動するのに働いている細胞骨格の一つであり、葉緑体の定位運動では青色光照射部で、アクチン繊維の形態が変化しているのが観察されている。双子葉植物のヒヤクニチソウ (*Zinnia elegans*) では、網目状の構造をとったアクチン繊維束が斑状に分布し、葉緑体同士を、また細胞膜と葉緑体をつないでいるように見える。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) でも、葉緑体を包み込むようなかご状のアクチン繊維束が観察されている。緑藻類のチョウチンミドロ (*Dichotomosiphon tuberosus*) では、葉緑体の運動自身は微小管系細胞骨格によって駆動されているが、青色光に依存して円筒状の細胞の先端に集合した葉緑体には、アクチン繊維束がまとわりついている。本実験ではアクチン繊維自体は観察していないが、今後は顕微鏡下で詳細に調査することが必要であろう。

微小管阻害区では、青色光と紫外光で集合が一部見られたが、対照区程明確ではなかった。微小管は細胞骨格としての細胞の形態維持、液胞や細胞分裂時の染色体の移動などで知られている。また微小管が核を動かすという報告や、微小管とアクチン繊維が、細胞運動の際に連携して働くという報告もあり、微小管と葉緑体運動の関連をさらに詳しく調べることも重要である。

(3) カランコエやシャコバサボテンの葉内には、膨潤した葉肉細胞が密に詰まっていた。そして、十分に灌水した条件 (対照区) で育成した植物では、葉肉細胞の葉緑体は、細胞側面に沿って配列していた (図 2A)。一方、

灌水停止 15 日の条件下 (乾燥ストレス区) では、葉肉細胞の葉緑体が塊状に集合していた (図 2B)。

ハナスベリヒユとマツバボタンの葉内には、 C_4 植物に特有のクランツ (Kranz) 構造が観察された。クランツ構造とは、維管束周辺に多数の大きな葉緑体をもった維管束鞘細胞とそれを放射状に取り囲む葉肉細胞から成る構造である。対照区では、維管束鞘細胞の葉緑体は維管束に求心的に配置され、葉肉細胞の葉緑体は細胞壁面に沿って分散していた (図 2C)。しかし、乾燥ストレス下では維管束鞘細胞の葉緑体の配置に変化はないが、葉肉細胞の葉緑体のみ維管束鞘細胞側に集まった (図 2D)。

マツバギクの葉断面は円形をしており、中央には大きな維管束が観察された。その維管束を取り囲むように葉緑体のない貯水細胞が配列し、そして、葉の表面側に緑色組織が存在した。緑色組織にはクランツ構造は無く、むしろカランコエやシャコバサボテンに類似した膨潤な葉肉細胞が密に詰まっていた。両処理区間において、葉緑体の配置に特異な変化は見出せなかった。

ハナスベリヒユとマツバボタンの両種とも、維管束鞘細胞の葉緑体と葉肉細胞の葉緑体を比較すると、その構造は大きく異なった。維管束鞘細胞の葉緑体はグラナ構造を欠き、一方、葉肉細胞の葉緑体には大きく発達したグラナ構造が存在した。しかし、両葉緑体には共通して葉緑体の二重外膜の下に網目構造が観察された。維管束鞘細胞の細胞壁には、スペリン層は観察されなかった。カランコエ、シャコバサボテンおよびマツバギクの葉肉細胞の葉緑体は、どれも発達したグラナ構造が観察された。また、維管束鞘細胞は、ハナスベリヒユとマツバボタンのそれと比較すると未発達で、その中の葉緑体も小さく少なかった。

以上の結果から、乾燥ストレス下における葉緑体の動態は種によって異なることが示唆された。環境条件によって光合成代謝が変化することもあり、光合成代謝と葉緑体運動の関係を明確に結論づけることは難しいが、本研究で見出された葉緑体の動態反応の差異は光合成タイプによって特徴づけることができた。カランコエやシャコバサボテンでは、乾燥ストレスによって葉肉細胞の葉緑体が集合した。この現象は、これまでに報告してきたことと一致した。クランツ構造を持つハナスベリヒユとマツバボタンの両種では、乾燥ストレス下で葉肉細胞の葉緑体のみが、その配置を変え、維管束鞘細胞に求心的に集まった。近年、単一細胞で C_4 光合成を行う植物の存在が報告されているが、多くの C_4 植物は葉肉細胞と維管束鞘細胞の 2 つの細胞を利用して光合成を遂行している。外気から取り

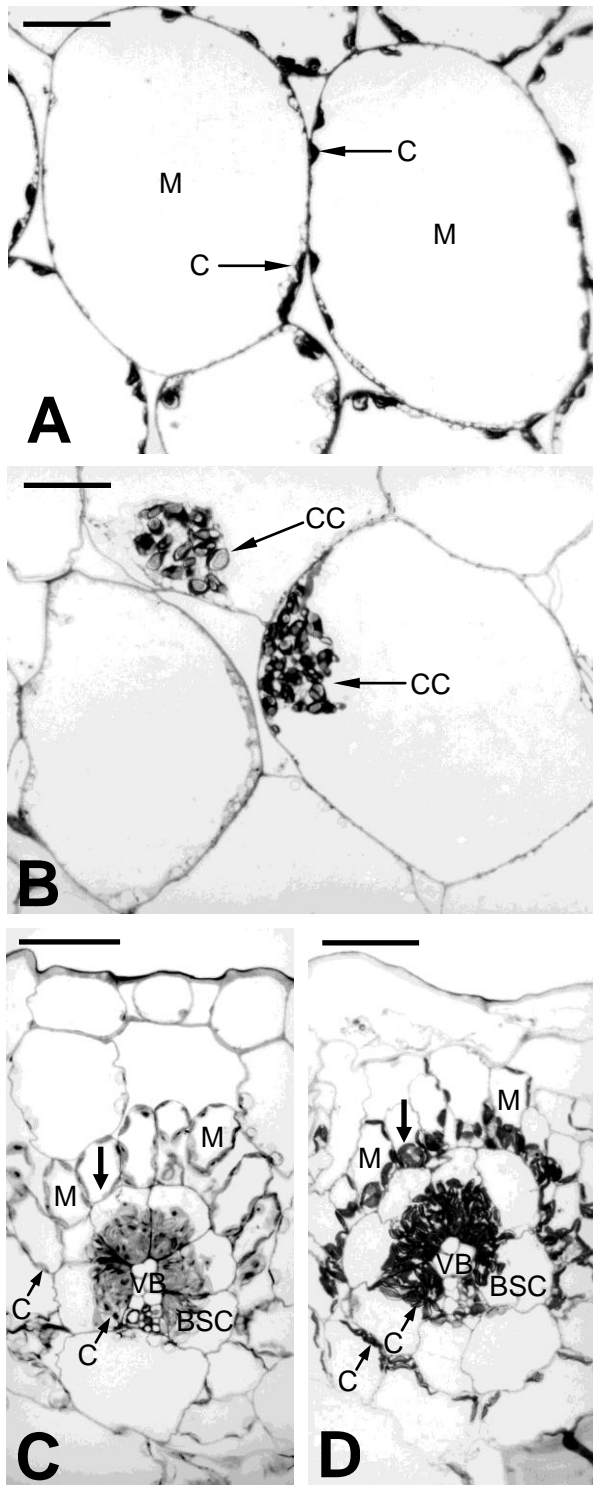


図2. 多肉植物葉断面の光学顕微鏡写真. (A, B) シャコバサボテン, (C, D) マツバボタン. (A, C) 対照区, (B, D) 乾燥ストレス区. BSC, 維管束鞘細胞; C, 葉緑体; CC, 葉緑体の集合体; M, 葉肉細胞; V, 維管束. Bar (A, B) = 100 μm . Bar (C, D) = 50 μm . マツバボタンでは, 維管束鞘細胞の葉緑体の配置に変化はないが, 葉肉細胞の葉緑体は維管束鞘細胞側に集まった (C, D 太矢印).

込んだ CO_2 を葉肉細胞で C_4 化合物に変換し、その C_4 化合物を維管束鞘細胞へと移して脱炭酸することで効率的に高濃度の CO_2 を固定している。しかし一方で、この効率的な CO_2 供給を成立させる細胞の気密精度は明らかでなく、維管束鞘細胞からの CO_2 漏れが指摘されている。Rubisco 含量を低下させた形質転換 C_4 植物では、Rubisco 含量の低下に伴って、維管束鞘細胞の CO_2 濃度は増大するが CO_2 漏れも同時に増大するため、光合成のエネルギー効率が低下することが報告されている。

ハナスベリヒユとマツバボタンでは、維管束鞘細胞の細胞壁はスベリン層を欠いていること、そして維管束鞘細胞を取り囲むように葉緑体が配置されることから、この葉緑体運動は CO_2 漏れと何か関係しているのかもしれない。一般に植物は、過酷な水欠乏下では気孔を閉じて蒸散を防ぐが、同時に外部から葉内への CO_2 供給が滞ることになる。一方、乾燥ストレス時には、維管束から炭素源として有機酸が供給されるという報告もあり、乾燥ストレス時における CO_2 供給と葉緑体の配置の関わりは興味深い問題として残された。

C_4 光合成の成立には、 C_4 光合成回路の獲得以外にも、2種類の葉内細胞（葉肉細胞と維管束鞘細胞）による光合成の機能分担と葉内構造の変化が必要と考えられている。特に、維管束を発達した維管束鞘細胞を取り囲み、それを葉肉細胞が放射状に取り囲む葉内構造（クラント構造）は、 C_4 植物の高い光合成効率の実現に必須とされてきた。しかし、近年になって、2種類のアカザ科植物、*Borszczowia aralocaspica* と *Bienertia cycloptera* が単一細胞型 C_4 光合成回路をもつことが示された (Voznesenskaya et al., 2001, 2002)。両者ともに中央アジアの半砂漠の塩分の多い窪地に生育する多肉植物である。このうち、*B. cycloptera* は、光合成機能細胞の中央に多数の葉緑体が詰まった中心細胞質区画 (CCC; Central Cytoplasmic Compartment) があり、細い細胞質の管で周縁細胞質と繋がるユニークな構造を持つ。

なぜ、他の C_4 植物とは異なる、そのような構造が形成されているのかは明らかではないが、私達が CAM 植物で見出した細胞内構造は、葉緑体の集合体という点で、その CCC と類似している。CAM での構造は、乾燥ストレスと光によって誘導形成される可塑的なものであり、本研究が遂行されることは、植物の乾燥耐性獲得の進化的な一端を解明する糸口にもなると思われる。

ある種の CAM 植物がストレスに応じて細胞内の構造をダイナミックに変化させることは、CAM の多様な環境適応機構を解明していく上でたいへん興味深い。本研究を今後さらに遂行するにあたり、これまで調査してきた光合成関連酵素

の局在やその特性に加えて、葉緑体と他のオルガネラとの関連性も考慮し、細胞内でどのような代謝機構が働いているのかを機能と構造の両側面から空間的に解析していく必要がある。

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)

〔学会発表〕(計1件)

近藤 歩, 乾燥条件下における C_3 , C_4 , および CAM 多肉植物の葉緑体の動態, 日本植物学会, 2008年9月26日, 高知大学朝倉キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 歩 (KONDO AYUMU)
名城大学・農学部・准教授
研究者番号: 60340296

