

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03693

研究課題名(和文) 高CO₂環境における個葉光合成機能の制御：糖センシングとシステミック応答の役割研究課題名(英文) Regulation of leaf photosynthesis at elevated CO₂: roles of sugar-sensing and systemic regulation

研究代表者

寺島 一郎 (Terashima, Ichiro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：40211388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：高CO₂条件下で起こりやすい光合成のダウンレギュレーションの原因は、葉における炭水化物の蓄積とされてきた。本研究では、シロイヌナズナやマメ科の作物を用い、高CO₂条件や若い葉の摘葉処理により、非構造的な糖ばかりでなく構造的な糖の含量も増加し、それに伴い葉肉細胞の細胞壁が著しく肥厚すること、それにほぼ逆比例して、CO₂の葉緑体への拡散コンダクタンスも減少することを明らかにした。ツククサの剥離表皮を葉肉に移植する実験系を洗練した。低CO₂/光照射時には、葉肉から気孔への開口促進シグナルが、高CO₂や暗処理時には、開口抑制/閉口促進シグナルがアポプラスト液相を拡散することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大気CO₂濃度が上昇している、CO₂は光合成の基質であるにもかかわらず、CO₂濃度の上昇は光合成や植物の成長はそれほど促進しない。世界の人口増に見合う、安定した食糧供給を可能にするためには、高CO₂環境で高い生産性を示す好CO₂作物の創出は必須である。そのためには、まず、高CO₂応答の全貌を分子生理学レベルで知る必要がある。本研究では光合成のダウンレギュレーションのメカニズムのうち、葉肉コンダクタンスの低下の原因をほぼ特定した。デンプンの蓄積ではなく、細胞壁の肥厚であった。また、気孔のCO₂応答における葉肉シグナルの実在を証明し、その重要性を指摘した。

研究成果の概要(英文)： We found that not only non-structural carbohydrates but also structural ones accumulated when Arabidopsis and some legume plants were grown at high CO₂. Cell walls thickened considerably by two to three folds and the mesophyll conductance measured by the carbon isotope discrimination method decreased with the increase in the cell wall thickness. Contrary to the widely-held view, starch accumulation per se did not decrease the mesophyll conductance.

Stomata are often thought to move autonomously by the activity of stomatal guard cells. Here, we developed an experimental system in which the epidermal strips prepared from *Commelina communis* leaves placed on the mesophyll pre-treated in various ways. Stomatal opening in the epidermal strips was enhanced when the mesophyll segments were pre-treated at low CO₂ and/or in the light. The leaf segment placed at high CO₂ and/or in the dark produced negative signal(s). These mesophyll signal(s) enhanced stomatal responses.

研究分野：植物生理生態学・植物生理解剖学

キーワード：大気CO₂濃度の増加 光合成ダウンレギュレーション 葉肉シグナル 葉肉コンダクタンス 糖センサー 気孔

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

南極の氷床コアの解析によれば、過去 80 万年間に氷期/間氷期が 8 回繰り返り、大気 CO₂ 濃度は、氷期の 180~200 ppm、間氷期の 260~280 ppm と規則正しく推移してきた。現在は間氷期にあたり、産業革命までの CO₂ 濃度はこれまでの間氷期と同レベルの 280 ppm で安定していた。しかし、産業革命以降は急激に上昇し、現時点で 400 ppm を超え今世紀半ばには 470~570 ppm になると予想されている (IPCC 2013)。このように、現生の植物は、その祖先がすくなくとも過去 80 万年以上にわたって経験したことのないような高濃度の CO₂ に曝されている。

大気 CO₂ 濃度の上昇問題は 1980 年代から憂慮され、植物を大気の 2 倍の CO₂ 濃度で栽培して解析するいわゆる CO₂ 倍加実験が、世界の多くの研究室で行われた。CO₂ は光合成の基質であるにもかかわらず、倍加処理は光合成や植物の成長をそれほど促進しない。光合成速度や成長速度の低下がおこることもある。高 CO₂ への応答が良好でないのは、植物が 80 万年以上も続いた CO₂ 環境に適応した状態であるためかもしれない。

世界の人口は増加の一途をたどっている一方で、耕地面積は 1960 年以来全く増えていない。このような状況下で安定した食糧供給を行うためには、高 CO₂ 環境で高い生産性を示す好 CO₂ 作物の創出に取り組みなければならない。生態系の保全などのためにも好 CO₂ 植物/樹木の創出/育種が必須である。これらの「解」は環境によって様々に変わりうるので、まず、高 CO₂ 応答の全貌を分子生理学レベルで明らかにし、それらを環境に応じてテラーメイドに利用できるようにしておく必要がある。ところが、植物成長に関わる多くの機能がある中で、さかんに研究されているのは、たとえば気孔の CO₂ 応答性など、のいくつかのテーマのみにすぎない。

2. 研究の目的

本研究では、高 CO₂ 応答全貌の分子生理学的理解のために、1) 糖による光合成ダウンレギュレーション、および、2) 光合成系の CO₂ 応答のシステミック制御に関して、その現象の分子生理学レベルの記載をまず行い、そのメカニズムの解明をめざした。

3. 研究の方法

光合成のダウンレギュレーションの研究では、シロイヌナズナの野生型および気孔が開きがちになる変異体や炭素代謝の変異体、およびマメ科植物のインゲン、ダイズ、アズキなどを用いた。高 CO₂ 条件を含むさまざまな条件でこれらの植物を栽培した。葉への炭水化物の蓄積の解析においては、通常は非構造的炭水化物であるデンプン、スクロース、などの多糖が測定されるが、本研究では特に細胞壁の肥厚に着目して、構造的炭水化物の量を測定した。また、透過型電子顕微鏡によって細胞壁の厚さを測定した。葉肉コンダクタンスは、葉の内部の細胞間隙から葉緑体までの CO₂ の拡散のしやすさであり、細胞壁の厚さには逆比例することが知られている。本研究では、Calvin-Benson 回路の炭酸固定酵素 (Rubisco) が強い安定同位体分別を示すことを利用した、安定同位体法によって葉肉コンダクタンスを測定した。

気孔は低 CO₂ 条件で開き、高 CO₂ で閉鎖する。多くの生理学・分子生理学者は気孔の応答を孔辺細胞の自律的な応答として捉えているが、ガス交換などの手法で葉の光合成を測定している生理生態学者は、孔辺細胞プロトプラストや剥離表皮を用いた研究における気孔応答が生葉の応答よりも著しく小さく遅いことから、葉肉から気孔に何らかの開閉シグナルが送られ、メリハリのある気孔開閉が実現している可能性を信じている。ツククサ剥離表皮と剥離表皮を葉肉上に再移植した実験 (Fujita et al. 2013) をさらに改良した。剥離表皮同士を重ね合わせた実験系や、高 CO₂ 条件を含むさまざまな環境条件で葉片を処理後、表皮を剥離し、そこに暗所においた植物体から新規に剥離した表皮を移植して気孔の応答を解析した。

4. 研究成果

(1) 高 CO₂ などによる葉への炭水化物蓄積と光合成のダウンレギュレーションについて

高 CO₂ 条件下などにおいて栽培した植物と植物を栽培すると、葉に糖が蓄積し、これが光合成のダウンレギュレーションの原因とされる。糖応答は多くの植物について調べられてきたが、応答の強さは植物種や品種によって大きく異なる。われわれが開発した葉大根とハツカダイコンの接木系では、糖がかなり蓄積しても光合成の強いダウンレギュレーションは見られなかった (Sugiura et al. 2015, 2017)。また、ダイズ、アズキ、インゲンを比較したところ、種々の操作によって誘導した糖蓄積による光合成のダウンレギュレーションの度合いが最も大きかったのはインゲンであった。これまでダウンレギュレーションの主要因とされた炭酸固定酵素

Rubisco が減少するだけでなく、細胞壁の肥厚や葉組織の変形も見られた。葉の光合成における、細胞間隙から葉緑体ストロマまでの CO₂ の拡散しやすさを葉肉コンダクタンスという。細胞壁の肥厚は、葉肉コンダクタンスの低下の主要因であった (Sugiura et al. 2019)。

シロイヌナズナの CO₂ 輸送葉肉コンダクタンスが栽培 CO₂ 環境に依存するかどうかを解析した。葉肉コンダクタンスは、測定時の CO₂ 濃度が高まると低下するが、栽培時の CO₂ 濃度には馴化応答を示さなかった。ABA も葉肉コンダクタンスを低下させる。ABA を作用させると、気孔が閉じ気味になるので、細胞間隙の CO₂ 濃度は低下する。CO₂ 濃度が低下すると葉肉コンダクタンスは増加するが、ABA の場合には逆である。したがって、高 CO₂ と ABA とは、気孔を閉鎖させるという共通性があるが、細胞間隙の CO₂ 濃度は低下する。それでもそのメカニズムは異なることも明らかになった (Mizokami et al. 2019)。

シロイヌナズナ野生型および炭素代謝に関する変異体を高 CO₂ 環境で栽培し、葉の炭水化物含量の効果を解析した。非構造性多糖の増加にともない細胞壁が肥厚し、葉肉コンダクタンスも低下することが明らかになった。一般に、葉緑体にデンプンが蓄積すると葉肉コンダクタンスが低下すると議論されるが、葉肉コンダクタンスの低下は、デンプンの含量には依存しなかった。炭水化物が蓄積するような条件では細胞壁が厚くなり、これが葉肉コンダクタンスを低下させる原因であった。これまで、成熟葉で細胞壁が有意に肥厚することはほとんど報告がなかった。細胞壁の肥厚は、炭水化物が蓄積時の光合成のダウンレギュレーションメカニズムとも捉えられることを提唱した (Mizokami, Sugiura, et al. 2019)。ダイズとインゲンマメを、異なる N 施肥条件で栽培した。また、上位の発生中の若い葉を摘んでシンクを小さくする処理を施した。炭水化物は葉に非構造性多糖類だけではなく構造性多糖類も蓄積した。葉肉コンダクタンスは構造性炭水化物の増加とともに減少した。細胞壁の厚さは 3~4 倍にも増加した。これにほぼ反比例して葉肉コンダクタンスが減少した (Sugiura et al. 2020, in press)。これらの研究は、光合成のダウンレギュレーションには、従来注目されてきた Rubisco 含量の減少だけでなく、細胞壁の肥厚などの構造性多糖の増加による、葉肉コンダクタンスの低下が関与していることが明らかになった。

(3) 気孔の開閉開閉におよぼす葉肉シグナル

剥離表皮を用いた実験では、剥離表皮を溶液に浮かべて実験することが多いが、実験中に多くの気孔腔の溶液が浸潤してしまう。気孔に溶液が浸潤するとその気孔の応答性は小さくなる。これを防ぐために適当な水ポテンシャルをもつゲランガムを用いて、その上で剥離表皮を生理的応答が長時間続く状態に保つことに成功した。気孔の応答において、ゲランガムの水溶液の pH は重要である。気孔開口時には孔辺細胞はプロトンを汲み出し膜電位が過分極することが知られているが、緩衝能の高い緩衝液を使うとその効果が消えるからである。したがって、本研究では、剥離表皮の内側の部分には緩衝液が直接接することがないように工夫した。

赤色光に反応した開口は、緩衝能の高い緩衝液を含むゲランガムに直接おいた場合にはほとんど見られなかったが、剥離表皮同士を葉の内部にあたる面を内側にして重ねると、著しい開口が観察された。また、図に示す、前処理実験では、低 CO₂ 条件、強光で処理した葉片に移植した剥離表皮の気孔ほど速く大きく開いた。また、葉肉と剥離表皮との間にあるサイズ以下の水溶性物質のみを通す透析膜を挟んだ場合には、葉肉から気孔孔辺細胞へ拡散する開口促進物質は 500 Da 以下であり、開口を阻害するあるいは開口を促進する物質は 500 Da よりも大きいことが示された (Fujita et al. 2019)。

研究期間以前の関連文献

- Fujita T, Noguchi K, Terashima I (2013) Apoplastic mesophyll signals induce rapid stomatal responses to CO₂ in *Commelina communis*. *New Phytol* 199: 395-406.
- Sugiura D, Betsuyaku E, Terashima I (2015) Manipulation of the hypocotyl sink activity by reciprocal grafting of two *Raphanus sativus* varieties: its effects on morphological and physiological traits of source leaves and whole-plant growth. *Plant Cell Env* 38: 2629-2640.
- Sugiura D, Watanabe CKA, Betsuyaku E, Terashima I (2017) Sink-source balance and down-regulation of photosynthesis in *Raphanus sativus*: effects of grafting, N, and CO₂. *Plant and Cell Physiology*, 58:2043-2056.

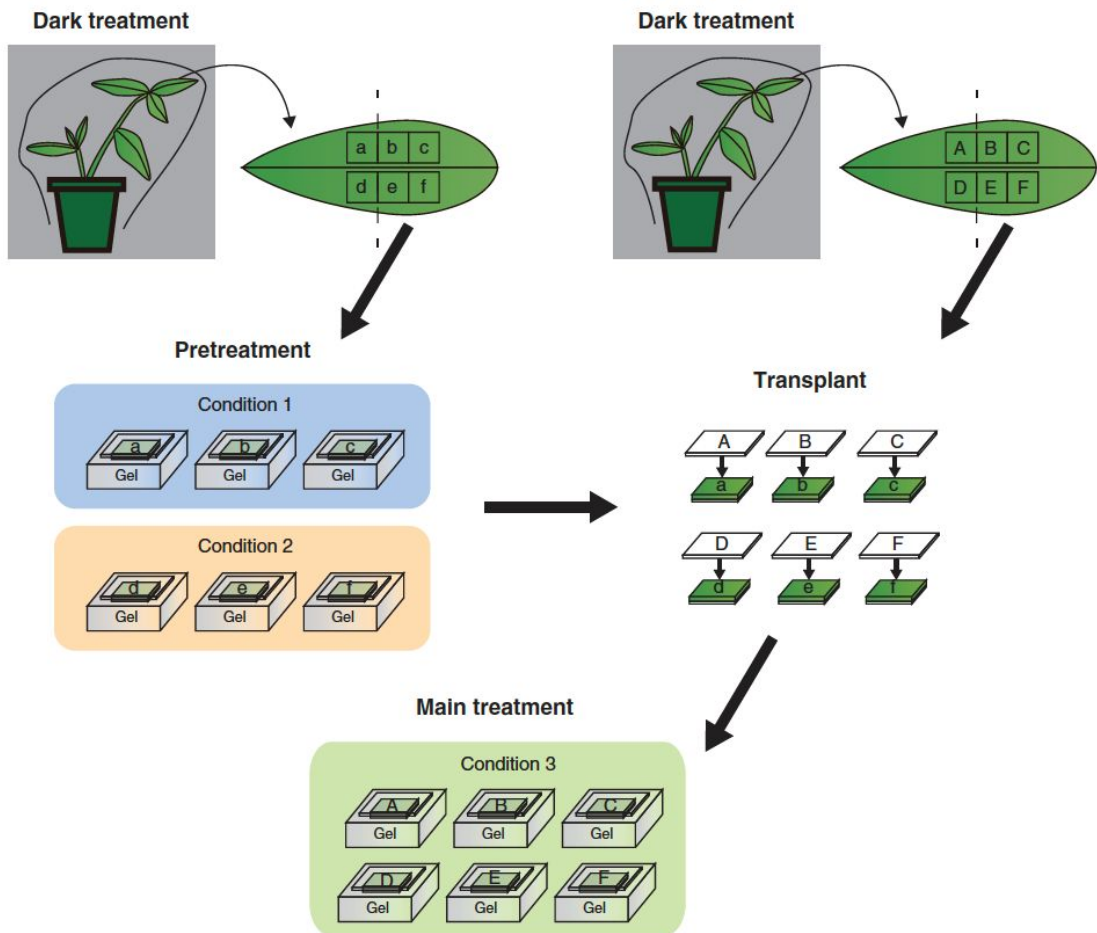


図1 前処理と表皮移植後の処理。さまざまな光 / CO₂条件で前処理後、暗所においた植物から得た剥離表皮を移植して、一定の条件で光を照射した。全処理のCO₂濃度が低いほど、光が強いほど、表皮の気孔は速く大きく開いた (Fujita et al. 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sugiura D, Betsuyaku E, Terashima I	4. 巻 123
2. 論文標題 Interspecific differences in how sink-source imbalance causes photosynthetic downregulation among three legume species. <i>Annals of Botany</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 <i>Annals of Botany</i>	6. 最初と最後の頁 715-726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/aob/mcy204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizokami Y, Noguchi K, Kojima M, Sakakibara H, Terashima I	4. 巻 42
2. 論文標題 Effects of instantaneous and growth CO ₂ levels, and ABA on stomatal and mesophyll conductances.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 <i>Plant Cell and Environment</i>	6. 最初と最後の頁 1257-1269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pce.13484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 木村遼希、寺島一郎、矢守航	4. 巻 28
2. 論文標題 環境変動に対する気孔と光合成の応答	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 光合成研究	6. 最初と最後の頁 28-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 矢守航、河野優、寺島一郎	4. 巻 72
2. 論文標題 環境制御された実験室とは異なる野外の光環境に対する光合成応答	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 遺伝	6. 最初と最後の頁 275-280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Takashi, Noguchi Ko, Ozaki Hiroshi, Terashima Ichiro	4. 巻 46
2. 論文標題 Confirmation of mesophyll signals controlling stomatal responses by a newly devised transplanting method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Functional Plant Biology	6. 最初と最後の頁 467 ~ 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1071/FP18250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiura D, Watanabe CKA, Betsuyaku E, Terashima I	4. 巻 58
2. 論文標題 Sink-source balance and down-regulation of photosynthesis in Raphanus sativus: effects of grafting, N, and CO ₂ .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2043-2056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcx132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kono M, Yamori W, Suzuki Y, Terashima I	4. 巻 58
2. 論文標題 Photoprotection of PSI by Far-Red Light Against the Fluctuating Light-Induced Photoinhibition in Arabidopsis thaliana and Field-Grown Plants.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 35-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcw215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugiura D, Terashima I, Evans JR	4. 巻 ?
2. 論文標題 A decrease in mesophyll conductance by cell wall thickening contributes to photosynthetic down-regulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mizokami Y, Sugiura D, Watanabe CKA, Betsuyaku E, Inada N, Terashima I	4. 巻 70
2. 論文標題 Elevated CO ₂ -induced changes in mesophyll conductance and anatomical traits in wild type and carbohydrate-metabolism mutants of Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 4807-4818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.13484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計20件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 寺島一郎
2. 発表標題 気孔の環境応答への葉肉の寄与: 新しい表皮移植法による検討
3. 学会等名 第9回日本光合成学会およびシンポジウム
4. 発表年 2018年~2019年

1. 発表者名 寺島一郎、河野優、矢守航
2. 発表標題 陰生植物の光化学系Iが示す変動光による光阻害への耐久性について
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年~2019年

1. 発表者名 杉山太一、寺島一郎
2. 発表標題 葉緑体の二酸化炭素定位運動
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年~2019年

1. 発表者名 木村遼希、橋本(杉本)美海、射場厚、寺島一郎
2. 発表標題 気孔応答強化が生産性に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 河野優、矢守航、寺島一郎
2. 発表標題 遠赤色光の補光が光合成に与える影響
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 河野優、矢守航、鈴木祥弘、寺島一郎
2. 発表標題 可視光変動光が光合成系に与える影響と遠赤色光による補光効果
3. 学会等名 日本育種学会第134回大会・第60回シンポジウム
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 河野優、矢守航、鈴木祥弘、寺島一郎
2. 発表標題 Roles of supplementary far-red light in regulation of photosynthesis in fluctuating light in land plants
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 河野優、矢守航、寺島一郎
2. 発表標題 遠赤色光による陸上植物光合成の調節
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 杉山太一、寺島一郎
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケにおける葉緑体の二酸化炭素定位運動
3. 学会等名 第60回日本植物整理学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 木村遼希、橋本(杉本)美海、射場厚、寺島一郎、矢守航
2. 発表標題 気孔応答は変動光条件下におけるバイオマス向上のターゲットとなる
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 河野優、鈴木祥弘、矢守航、寺島一郎
2. 発表標題 可視光変動光が光合成系に与える影響と遠赤色光による補光効果
3. 学会等名 第66回日本生態学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Terashima I
2. 発表標題 Roles of Green lights and far-red light in leaf photosynthesis.
3. 学会等名 NTU-UTokyo Joint Conference Developing Sustainable Future Society in East Asia (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 木村遼希、寺島一郎、矢守航
2. 発表標題 孔応答の最適化は野外光環境における光合成を促進する
3. 学会等名 日本光合成学会第9回年会およびシンポジウム
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 木村遼希、橋本(杉本)美海、射場 厚、寺島一郎、矢守 航
2. 発表標題 気孔開度は光合成誘導反応を律速する シロイヌナズナの気孔応答変異体を用いて、気孔開度による光合成誘導反応の律速を示した
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 河野 優, ドル有生, 藤島航大, 川口ひかる, 鈴木祥弘, 矢守 航, 寺島一郎
2. 発表標題 野外変動光環境下での光化学系Iの応答と光阻害 野外変動光下で植物の二酸化炭素取込速度と電子伝達系の活性を測定した
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 河野 優, 矢守 航, 寺島一郎
2. 発表標題 可視光変動光が光合成に与える影響と遠赤色光による補光効果
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 寺島一郎, 矢守 航, 河野 優
2. 発表標題 超耐陰性植物クワズイモの光阻害耐性機構について 弱光下で栽培したクワズイモは、変動光による光化学系Iの光阻害に耐性を示す
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 吉鴻一, 種子田春彦, 寺島一郎
2. 発表標題 宿主のフェノロジーに依存した完全寄生植物ヤセウツボの最適成長戦略
3. 学会等名 第65回日本生態学会大会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 吉鴻一, 関根恒平, 寺島一郎, 園池公毅
2. 発表標題 光合成からみたボルボックスの生活環と細胞分化
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 木村遼希, 橋本(杉本)美海, 射場厚, 寺島一郎, 矢守航
2. 発表標題 気孔応答を促進するPATROL1 の光合成環境応答における役割について
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2017年~2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Adams III W W, Terashima I eds.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 575
3. 書名 The leaf: A platform for Performing Photosynthesis	

1. 著者名 Oguchi R, Onoda Y, Terashima I, Tholen D	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 97-139
3. 書名 Leaf Anatomy and Function. In The leaf (Adams III W W, Terashima I eds.)	

1. 著者名 Lawson T, Terashima I, Fujita T, Wang Y	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 141-161
3. 書名 Coordination Between Photosynthesis and Stomatal Behavior. In The leaf (Adams III W W, Terashima I eds.)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物生態学研究室

<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~seitaip1/index.html>

新学術領域「植物高CO2応答」

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~plant/shinryoiki/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----