

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380155

研究課題名（和文）気候温暖化に耐性をもつ寒地型牧草品種の作出

研究課題名（英文）Development of heat stress tolerant pasture grass

研究代表者

杉山 修一 (SUGIYAMA SHUICHI)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：00154500

研究成果の概要(和文): 温暖化の進行とともに寒地型牧草は適作地が北上し牧草生産に大きな影響が出ることが予測されている。本研究では、イネ科寒地型牧草間の高温ストレス耐性の差異を熱ストレス下で発現するヒートショック蛋白質(HSP)との関係で解明を行った。その結果、どの種でも高温にさらされるとHSPの合成が短時間で行われるが、寒地型牧草種間の高温ストレス耐性の種間差をHSPだけでは説明できなかった。高温ストレス傷害は、高温下で発生する活性酸素種による酸化ストレスが原因であることが実験から示され、HSPの機能である損傷分子の修復以外に活性酸素種の生成を抑えることも重要であることがわかった。

研究成果の概要(英文): It is expected that C3 herbage grass have severe damage in their yield and growth under forecasted climate warming. In this study, interspecific differences in heat stress tolerance among C3 grasses was investigated from the view point of expression of heat shock protein. All C3 grass showed HSP expression shortly after heat exposure. However, interspecific difference in heat tolerance can not be explained by the expression pattern of heat shock protein. A part of this study revealed involvement of oxidative stress as a cause for heat stress damage. This data suggest the future direction of this research.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	12,300,000	3,690,000	15,990,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学， 畜産学・草地学

キーワード：寒地型牧草，温暖化，高温耐性，ヒートショック蛋白質

1. 研究開始当初の背景

(1)近年、地球規模での気候温暖化が叫ば

れているが、日本でも温暖化は着実に進行している。温暖化は、永続的な栽培が行われる草地で特に大きな影響を受けるものと考えられる。実際、酪農地帯の栃木県那須地域の多くの草地では、寒地型牧草種が衰退し始め、代わりに C4 雑草が進入し、草地の荒廃が進行している。

(2) 今後の温暖化の進行にともない、徐々に草地の荒廃が生じるものと思われ、何らかの対策が急務である。温暖化による草地衰退の抑制に最も効果的な方法は、耐性品種を育成することである。しかし、温暖化で植物が障害を受ける生理的メカニズムはよく分かっていないし、温暖化耐性品種も育成されていない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、温暖化条件でも衰退しない高温ストレス耐性をもつ寒地型牧草を育成することを目的にした研究である。

(2) 生物は高温ストレスにさらされるとヒートショック蛋白質(HSP)を合成し、損傷を受けた蛋白質を修復することで高温から生物を保護していることが知られている。本研究では、高温耐性に熱ストレスタンパク質の発現がどのように関わっているか、熱ショックタンパク質の発現変化により温暖化条件下でも衰退しない高温耐性をもつ寒地型牧草品種の育成が可能かどうかを明らかにすることに焦点をあてた。

(3) まず、C3型牧草種がC4型牧草種に比べ、高温耐性が低い原因を、生長速度や光合成機能の温度反応の差異と熱ショックタンパク質の発現解析を通じて明らかにすること。

(4) 遺伝子組換え技術が確立され、ゲノムの塩基配列情報も集積されているペレニアルライグラスを材料に、品種間で高温耐性に差がないか？ もし、生じているなら、どのようなメカニズムで変異が生じているかを熱ショックタンパク質の発現解析と光合成機能の温度反応を通じて明らかにすること。

## 3. 研究の方法

(1) 主要寒地型牧草 16 種を供試し、高温ストレス耐性の評価法を確立するため、40 条件下で 2 週間育てた植物の葉のクロロフィル蛍光、イオンの漏出度、脂質の酸化度 (MAD

法) を測定した。さらに、高温下での生育に伴う、過酸化水素の蓄積量、活性酸素消去酵素のアスコルビン酸パーオキシダーゼ活性 (APX) と小分子熱ショックタンパク質 (smHSP) のウェスタンブロットによる発現解析を行い、高温ストレス耐性に関する生理的・分子的メカニズムを明らかにしようと試みた。

(2) 代表的な寒地型牧草であるペレニアルライグラスについて気候温暖化に対するストレス耐性の品種間差異が生じる生理的メカニズムを解明するため、山梨酪農試験場の圃場での越夏性の評価で高い品種 (Yatsu-24) と低い品種 (Norlea) を用いて、再現性のある室内での温暖化ストレス条件の検討を行った。長期間の中程度の高温条件 (36 /30 , 60 日) と短期間の高温 (40 /36 , 14 日) の二つの温度処理区を設け、ストレス障害の指標として 光化学系 II の機能損傷を表すクロロフィル蛍光、葉組織からのイオン漏洩度、生体膜の過酸化度を測定した。

## 4. 研究成果

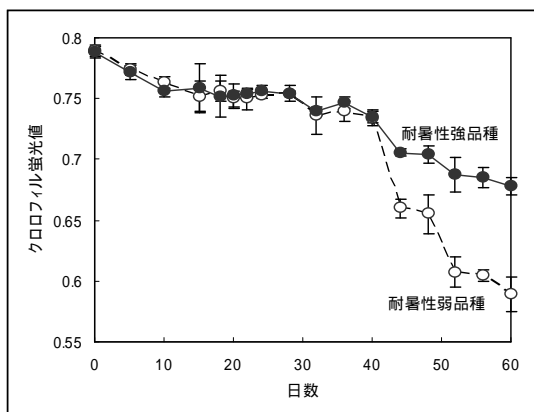
(1) 非ストレス環境における種間比較では、非葉面積 (SLA) が大きい草種ほど損傷の原因となる過酸化水素量が高く、脂質の酸化度も高い傾向を示した。また、熱ストレスを与えてからの植物の損傷度の変化を観察した場合も、SLA の大きい植物の方が小さい植物よりもイオン溶出度、脂質の酸化度とも高く、熱ストレスに弱い傾向がみられた。

(2) 熱処理を与えてから 24 時間以内の短期的な変化では、どの植物も損傷は確認されなかった。同時に、ストレス耐性遺伝子の 1 つであるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX)、低分子量熱ショックタンパク質 (smHSP) の発現も確認された。したがって、熱ストレス初期ではストレス耐性遺伝子の働きによって損傷が抑えられ、その影響はストレス耐性遺伝子の能力を超えないものであるといえる。

(3) 熱処理 11 日以上での長期的変化の観察で

は、APX の高い活性が確認されたものの脂質の酸化度も高かった。しかし、APX, smHSP の発現だけでは脂質の酸化のされやすさを説明することはできなかった。これは、APX, smHSP 以外のストレス耐性遺伝子も大きく関係していることを示唆している。さらに、mRNA の発現のパターンの違いが植物によって異なったことから、ストレス耐性遺伝子の発現戦略自体が植物で異なることが示唆された。

(4) ペレニアルライグラスの越夏性の高い品種 (Yatsu-24) と低い品種 (Norlea) は、2つの高温ストレス条件で同じ反応を示したが、長期間-中程度の高温処理でより一貫性のある差を示した。40 の条件に1週間おいてもペレニアルライグラスは機能損傷を示さないが、36 程度の温度に40日以上さらされると機能損傷が見られた。このことから短期的な高温にさらされるよりもある程度の高温条件が長期間続くことが温暖化による寒地型牧草の衰退に関係していることがわかった。機能損傷として、光化学系IIの損傷、生体膜の過酸化度や膜からのイオン漏洩が生じたので、温暖化ストレスは、高温により光合成の電子伝達系からの電子漏洩による活性酸素の生成とそれによる生体膜の酸化や膜蛋白質の機能低下が関係していることが示唆された。



## 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 11 件)

Sabreen S. and Sugiyama S. Cadmium

Phytoextraction capacity in eight C3 herbage grass species. *Grassland Science* 54: 27-32.2008 (査読有り)

Sabreen S. and Sugiyama S. Trade-off between cadmium tolerance and relative growth rate in 10 grass species. *Environmental and Experimental Botany* 63: 327-332. 2008, (査読有り)

Hossain M.Z. and Sugiyama S. Effects of chemical composition on the rate and temporal pattern of decomposition in grassland species leaf litter. *Grassland Science* 54: 40-44.2008, (査読有り)

Sugiyama S. Hossain M.Z. and Okubo A. The relationships between soil microbial diversity and plant community structure in semi-natural grasslands. *Grassland Science* 54: 117-124. 2008, (査読有り)

Kondo S, Meemarka S, Ban Y, Moriguchi T, Harada T. Effects of auxin and jasmonates on 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase and ACC oxidase gene expression during ripening of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 51: 281-284. 2008 (査読有り)

Wang A, Tan D, Tatsuki M, Kasai A, Li T, Saito H, Harada T. Molecular mechanism of distinct ripening profiles in apple fruit of 'Fuji' and its early maturing sports. *Postharvest Biology and Technology* 52: 38-43. 2008, (査読有り)

Sugiyama S. and Shimazaki T. (2007) Increased cell wall content and freezing resistance and snow mold resistance during cold acclimation of winter wheat under field conditions. *Plant Production Science* 10: 383-390. (査読有り)

Hossain M.Z., Okubo A. and Sugiyama S. Local variation in soil microbial community structure in artificial and semi-natural grasslands. *Grasslands Science* 53: 165-171.2007, (査読有り)

Wang A, Tan D, Takahashi A, Li T, Harada T. MdERFs, two ethylene response factors

involved in apple fruit ripening. J. Exp. Bot. 58: 3743-3748. 2007, (査読有り)

Kudo H, Harada T. graft-transmissible RNA from tomato rootstock changes leaf morphology of potato scion. HortScience 42: 225-226. 2007, (査読有り)

Sugiyama S. (2006) Responses of shoot growth and survival to water stress gradient in diploid and tetraploid populations of *Lolium multiflorum* and *L. perenne*. Grassland Science 52: 155-160. 2006 ,(査読有り)

[学会発表](計 5 件)

Sugiyama S. Competitive size hierarchy, reproductive allometry, and adaptive strategies of annual plants. "Size and Reproduction in Plant Populations." Symposium in Ecological Society of America 93<sup>rd</sup> annual meeting. 2008年8月16日 Milwaukee, USA

Sugiyama S. (2007) Phenotypic plasticity of meristems to light and soil nutrients: interspecific difference and consequences on plant growth. JAPAN-USA Cooperative Science Program supported by JSPS "Phenotypic plasticity in response to environmental changes: Scaling from the molecular to ecosystem levels. 2007年10月23日~26日, Nikko, Japan.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

杉山 修一 (SUGIYAMA SHUICHI)  
弘前大学・農学生命科学部・教授  
研究者番号:00154500

### (2)研究分担者

原田 竹雄 (HARADA TAKEO)  
弘前大学・農学生命科学部・教授  
研究者番号:10228645

### (3)連携研究者

なし