

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ～ 2012

課題番号：21380163

研究課題名（和文） 寒地型牧草の温暖化耐性メカニズムの解明と量的遺伝子座の特定

研究課題名（英文） Physiological mechanisms and quantitative genetic loci of tolerance to climate warming in cool season grasses

研究代表者 杉山 修一 (Shuichi Sugiyama)
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）：気候温暖化に耐性をもつ牧草品種の育成のために、牧草が温暖化により被害を受ける生理的メカニズムの解明と温暖化耐性に関わる遺伝子を同定することを目的に研究を行った。牧草の温暖化耐性は、長期間高温に曝されることにより発生する活性酸素により光合成が機能低下することが原因となっており、高い温暖化耐性をもつ品種は、葉が厚く活性酸素の蓄積が少ないという特徴があった。温暖化耐性関与する遺伝子の情報が得られ、今後の品種育成に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to clarify physiological mechanisms of tolerance to climate warming and to obtain genetic information leading to the development of new cultivars with high tolerance. The damage under prolonged warming treatment was related to depression of photosynthesis caused by generation of reactive oxygen species (ROS). The tolerant cultivars had thicker leaves that could be related to depression of the ROS generation. Genetic information, which could contribute the development of tolerant cultivars, was obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
平成 22 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成 23 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成 24 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度	0	0	0
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：

温暖化、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 気候温暖化は、日本でも着実に進行している。申請者が調べたところ、1980 年から

現在まで 7～9 月の平均気温は毎年 0.05℃の割合で上昇している。このような急速な温暖化は国内の農林業に深刻な損害を与えるこ

とが予測され、特に、永続的な栽培が行われる草地で大きな影響を受ける。実際、かつて酪農地帯であった栃木県那須地域の多くの草地は、寒地型牧草種が衰退し、代わりにメヒシバ、ヒエなどの C4 雑草が進入し、草地荒廃が進行している。現在、寒地型牧草が優占している地域でも、今後の温暖化の進行にともない、徐々に草地荒廃が生じるものと予想され、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。そこで、気候温暖化条件下でも衰退しない高温耐性をもつ牧草品種を育成することをめざし、本研究計画を行った。

(2)ペレニアルライグラスを用いた以前の研究成果から、耐暑性の弱い品種は 36°C の高温処理で 40 日を過ぎると急激に光化学系 II の機能が低下し、活性酸素種を蓄積することで光合成機能の低下をもたらすことが解明された。そこで、本研究では、温暖化ストレスを酸化ストレス傷害との関係で明らかにすることを研究の柱とした。

2. 研究の目的

(1)ペレニアルライグラスは牧草以外に芝草としても温帯域で広く使われ、ゲノム解析も進んでいる。高温ストレス耐性のような多くの因子が関与する特性の改良には、分子マーカーを利用した QTL (量的遺伝子座) 育種が効果的である。幸い、共同研究をしている山梨県酪農試験場には、QTL (量的遺伝子座) 解析用のペレニアルライグラス系統が作成されており、メカニズム解析で明らかにした支配因子の量的遺伝子座を分子マーカーを利用した連鎖解析により同定することで、高温耐性をもつ系統を育成する展望が開けると考えた。

(2)本研究では、ペレニアルライグラスの高温耐性に関わるメカニズムとして、

仮説 1 (電子漏洩説)

膜脂質の酸化により葉緑体やミトコンドリ

アの電子伝達系から電子が漏れやすくなり活性酸素の生成が増える。

仮説 2 (抗酸化能低下説)

活性酸素種を除去する物質の量や酵素活性が低下し、活性酸素の生成量が増える

仮説 3 (修復能力低下説)

熱ショックタンパク質(HSP)によるタンパク質の修復機能が低下する。

を考え、耐暑性の異なる品種比較によりこれら 3 仮説を検証することを目的とする。

(3)分子マーカーを利用した耐暑性に支配的な生理因子の量的遺伝子座の特定することも目的とする。

3. 研究の方法

(1)ペレニアルライグラス 40 品種の比較を通じた高温耐性メカニズムを解明する。そのために、世界各地で育成された 4 倍体を含むペレニアルライグラス 40 品種をの温暖化耐性を調査する。なお、これらの品種は、山梨県酪農試験場の圃場で耐暑性が調べられているので、実験室での生理特性と圃場で発現する耐暑性の変異と関係づけることができる。実験室では、グロースチャンバーで 2 ヶ月生育させ、30°C で 72 時間高温に順化させた後、36°C (昼) / 30°C (夜) の条件で 2 ヶ月高温処理を行い、葉組織の H2O2 量、抗酸化物質や抗酸化酵素活性を調べる。

(2)耐暑性が優れる個体と越冬性が優れる個体間での単交配により生じた後代集団 (山梨酪農試験場育成) 180 個体を用いる。これら系統では、SSR マーカー 119, AFLP マーカー 270 の計 400 の分子マーカーを連鎖地図上に乗せている。これらの系統は、分けつからの栄養繁殖を利用して、クローン化し、弘前大学での実験に用いる。QTL 解析系統それぞれの個体について、同様の方法で高温処理を与え、特性解析を行う。分子マーカーの情報と生理因子の間で QTL 用解析ソフトウェア “Map manager” を用いて遺伝子座の位置を絞り込む。

4. 研究成果

(1) 山梨酪農試験場の圃場評価で越夏性の高い品種 (Yatsu-24) と低い品種 (Norlea) と実験室での高温処理耐性は一貫性のある結果を示した。40°C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°C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。

(2) 山梨県酪農試験場で耐暑性が評価された28品種を用いて、グロースチャンバーを用いた制御環境条件下での実験を行い、光化学系 II の蛍光反応 (Fm/Fv) で評価したストレス傷害度はストレス開始後30日まで品種間の大きな差は見られなかったが、40日後に大きな差が見られた。過酸化水素濃度が高いほどストレス障害も大きく、酸化ストレスが耐暑性に大きく関わっていることが示唆された。アスコルビン酸濃度とAPX活性にも正の相関がみられ、耐暑性の高い品種は、活性酸素種を消去する能力が高いことが示唆された。

(3) 植物には光合成システムにC3型とC4型があり、後者のタイプは光合成効率が高く、高温耐性にも優れる。C3型とC4型のイネ科牧草種それぞれ3種ずつを用い、36°Cのチャンバーで40日間高温処理を与え、クロロフィル蛍光による光化学系 II の活性から高温耐性を評価した。また、酸化ストレスの指標であるH₂O₂濃度、脂質の過酸化度などもあわせて調査した。実験の結果、C4型の暖地型牧草は36°Cで40日間処理してもほとんどPSII

の活性は低下しなかった。また、C4型牧草は、脂質の過酸化度も高温処理によりあまり増加しなかった。このことから、C3型に比べC4型牧草は、酸化ストレス耐性が高く、そのことがC4型牧草の高い高温耐性に関係していることが示唆された。また、C4型牧草種は、異なる光合成システムをもつが、それ以外にC3型牧草種に比べ葉が厚く、このことも、C4型牧草種の高温耐性に関係していることが示唆された。

(4) 温暖化耐性の強い品種 (Kangaroo) と弱い品種 (Norlea) を交配して作られたペレニアルライグラスのQTLシステムを用いて温暖化耐性に関わる量的遺伝子座を調べた。用いた系統数は72である。交配に用いた親品種には、40日目のFv/Fm値と過酸化水素濃度に有意差が見られ、親品種の温暖化ストレス耐性は、酸化ストレスにより引き起こされていることが裏付けられた。72の系統間にも処理後40日目のFv/Fm値と過酸化水素濃度に大きな変異が見られた。系統間にはFv/Fm値と過酸化水素濃度に負の相関が見られ、過酸化水素の蓄積の低い系統がストレス障害も低い傾向にあった。しかし、親品種を越える耐性を持つ系統は見られず、多くの系統は親品種の中間に分布した。処理40日目のFv/Fmと有意な関係を示す遺伝子座が、2番目の染色体に発見された。しかし、40日目の過酸化水素濃度と有意な関係を持つ遺伝子座は見つからず、量的遺伝子座の解析は表現型の相関関係とは独立している可能性が示唆された。

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4件)

- ① Wagdi S, Fujimori M., Tase, K and Sugiyama S. (2011) Oxidative stress and physiological damage under prolonged heat stress in C3 grass *Lolium perenne*. *Grassland Science* 57:101-106. (査読有)

- ② Hossain M.Z. and Sugiyama S. (2011) Geographical pattern of soil bacterial and fungal community in northern Japan: influences of distance, vegetation and soil properties. *European J. Soil Biology.* 47 : 88-94. (査読有)
- ③ Wagdi S, Fujimori M., Tase, K and Sugiyama S. (2012) Heat tolerance and suppression of oxidative stress: Comparative analysis of C3 grass *Lolium perenne* populations *Environmental and Experimental Botany* 78:10-17. (査読有)
- ④ Liu GC, Tokida T, Matsunami T, Nakamura H, Okada M, Sameshima R, Hasegawa T and Sugiyama S (2012) Stimulated CH4 emission and responses of methanogenic archaea community in a rice paddy under free-air CO2 enrichment and soil warming *Environmental Microbiology Report* 4:648-646. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Wagdi S. Sugiyama S, Fujimori M. (2010) Tolerance to climate warming in C3 grasses. I. Physiological mechanisms responsible for summer damage in *Lolium perenne* cultivars under fields. 日本草地学会講演会, 2010年3月
- ② Wagdi S. Sugiyama S, Fujimori M. (2010) Tolerance to climate warming in C3 grasses. II. Physiological tolerance under field summer conditions in *Lolium perenne* is associated with tolerance to oxidative stress 日本草地学会講演会、2010年3月
- ③ 中野敬護、杉山修一 (2013) 温暖化ストレスに対するオーチャードグラスの集団分化. 日本草地学会講演会、2013年3月

[その他]

ホームページ等

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

