2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月　 ８ 日現在

機関番号：１４６０２
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４５７００４９

研究課題名（和文）物理的刺激による植物体サイズの変化が光合成機能に及ぼす影響：そのメカニズムと意義

研究課題名（英文）Effects of mechanical-stress induced changes in plant body size on photosynthetic function: mechanisms and biological significance

研究代表者
酒井　敦（Sakai, Atsushi）

奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：３０２３５０９８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：植物は、踏み付けなどの物理的ストレスの有無に応じて速やかに体サイズを変化させる。その際、比較的多くの植物種において体サイズの縮小・拡大に連動して植物体内窒素の濃縮・希釈と光合成能力の増大・低下が起こる。特に匍匐茎・地下茎をもつ多年生クローナル植物で連動的変化が成立しやすく、逆に、物理的ストレス耐性が低い植物では、連動的変化の成立範囲が極めて狭い、あるいは結果が不安定、などの傾向があった。
物理的ストレス下では小型化即ち葉面積の減少により個体・群落全体としての光合成生産量は低下する。一方で、小型化には植物体の生存可能性の向上、単位面積当たりの光合成速度の向上というメリットもあることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Plants change their body sizes in response to mechanical stress (MS) such as trampling. During the process of decrease/increase of plant body size in response to the application/elimination of MS, nitrogen within the plant body might be concentrated/diluted accordingly, which, in turn, result in lower/higher photosynthetic potentials. Such a “chain reaction” appeared to be more popular among perennial clonal plants and relatively rare among plants with high MS sensitivity. Under MS, photosynthetic production of a plant/stand as a whole declines as a result of miniaturization. However, increase in photosynthetic potential per area resulting from nitrogen enrichment should partly compensate for the reductions in the total photosynthetic productivity. Moreover, the MS-induced miniaturization was found to increase survivability of plants dramatically under certain circumstances.

研究分野：植物生理学

キーワード：接触形態形成　光合成　窒素　物理的ストレス　踏圧　食害回避　補償光合成

１．研究開始当初の背景

(1) 植物が接触などの物理的刺激に応答して形態形成を変化させる現象を「接触形態形成」とよぶ（Jaffe et al. 1984)。接触形態形成には、物理的ストレスに対応して植物体の力学的強度を高めるという、適応的意義があると考えられる。しかし、接触形態形成が植物の生理機能に及ぼす影響についての研究例はない。一方、植物を特徴づける生理機能である光合成については、葉の窒素濃度と光合成能力との間に高い正の相関が見られる（Hikosaka et al. 1998)。また、「食害」というストレスに応答して光合成機能が高まる「補償光合成」と呼ばれる現象がある。しかし、実際に報告されている補償光合成の現象や提唱されているメカニズムは多種多様である。

(2) 申請者は、ニホンジカが高密度で生息する大台ケ原山（奈良県南部）に自生するミヤコザサを材料に、シカから保護されたササがシカの影響下にあるササよりも光合成能力が低下する現象を見出していた。大台ケ原山のミヤコザサは他地域に自生するものに比べ著しく小型化しているのが特徴であるが、防鹿柵あるいは小型のケージでシカから保護してやると速やかに大型化し、数年かけて本来のサイズを回復することから、これがシカの影響であることは明らかであった。小型化は実際の食害の有無に関わりなく起きており、食害を模した葉の部分切除よりもシカによる攪乱を模した人為的な接触刺激の方がササを小型化させるうえで有効であったことから、大台ケ原山におけるササの小型化は、シカによる踏み付け、攪乱などの物理的刺激による接触形態形成の一例であると考えられた。

防鹿柵やケージでシカから保護され大型化したササは、体サイズに反比例する形で低下し、光合成能力は窒素含量に比例する形で低下していた。これらの変化は、窒素を含む光合成装置（クロロフィルや Rubisco タンパク質など）の量的減少をともなっていた。これらの結果から、シカによる物理的ストレスに起因する接触形態形成で小型化していた大台ケ原のミヤコザサがシカから保護されると、物理的ストレスからの解放に伴う大型化→植物体内窒素の希釈→光合成装置の減少→光合成能力の低下、という連鎖反応が生じたのではないかと推察された（酒井ら、2009)。申請者はこうした一連の結果から、環境応答の一環としての体サイズの調節（接触形態形成）が、体内窒素濃度の変化を介して光合成という生理機能に影響を及ぼし得ること、すなわちこれまで互いに独立の事象として記載されて来た「接触形態形成」と「窒素-光合成連関」や「補償光合成」がリンクし得ることを認識した。

(3) 大台ケ原山で観察された現象は、条件統制が困難な野外において、（おそらく物理的ストレスと推測される）シカのなんらかの影響により小型化していたミヤコザサがシカからの保護に伴い大型化する過程で示す、窒素含量や光合成能力の変化を並行的に測定し、相互の関連やメカニズムについて考察したものである。しかしながら、サイズ変化が本当に物理的ストレスに起因するのか、一連の連動的反応がミヤコザサ以外の植物でも見られる現象なのか、さらには一連の反応の連動メカニズムや、植物の生産性・適応度にとっての意義などについては検討が不十分であった。

２．研究の目的

本研究の目的は、「接触形態形成に基づく体サイズの変化は、体内窒素濃度の変化を介して光合成機能に影響を及ぼす」という現象の普遍性、メカニズム、適応的な意義を詳しく調べることである。　本研究を通じて明らかにしたいことを要約すれば、以下の４点になる。

(a) 大台ケ原のミヤコザサで観察されたのと逆方向の変化、すなわち「物理的刺激→　小型化、窒素含量増加、光合成能力増大」という連動的変化は起こり得るのか？

(b) 物理的刺激の有無に起因する体サイズ、窒素含量、及び光合成能力の連動的変化は、ミヤコザサ以外の植物でも起こり得る一般的な現象か？

(c) 物理的刺激の有無に対応した体サイズ、窒素含量、及び光合成能力の変化、並びにそれらの変化の連動性のメカニズムは、どのようなものか？

(d) 物理的刺激の有無に起因する一連の反応は、植物のパフォーマンスにどのように寄与するのか？

これらの疑問に答えるため、以下のような方針で研究に取り組んだ。(i) 主として条件統制が用意な栽培環境下において、(ii) 定量的な物理的刺激を与えられた、あるいはそれから解放された各種の植物が、(iii) 小型化あるいは大型化する過程で示す光合成能力の変化を測定し、ミヤコザサで観察された「接触形態形成に起因する光合成能力変化」という現象の確認と一般化を試みる。さらには (iv) 光や栄養などの環境要因、あるいは供試植物の遺伝的要因を変化させ、物理的ストレス処理に伴うサイズ、窒素含量、光合成能力の変化の連動性がどのように影響を受けるか検討し、それぞれの反応およびそれらの連動性のメカニズムの解明を目指す。同時に(v) 個体レベル・群落レベルでの生産性についても検討し、一連の反応の適応的な意義についても考察する。

３．研究の方法

(1) 大台ケ原のミヤコザサを用いた検討（シカによる物理的ストレス下での体サイズ変化のメカニズムと意義について）：

防鹿柵内外に生育する大小のミヤコザサの組織切片を作成し、体サイズの変化のメカ

ニズム（細胞数の変化によるものか、細胞サイズの変化によるものか）を検討した。また、体サイズの異なるミヤコザサパッチを作成し、シカによる食害の程度を測定・比較するとともに、自然群落内における体サイズと被食率との関係を調査した。

(2) 多種の自生植物を用いた検討（連動的変化の普遍性と、植物の生活型の影響）：
　自然条件下に於いて「物理的ストレスの有無により体サイズに違いを生じている」と推定可能な大小の個体が入手できた自生植物 11 種を用いて、体サイズの違いと窒素含量・光合成能力の測定・比較を行い、サイズ・窒素含量・光合成能力の連動的変化の一般性を検討するとともに、植物の生活型と連動的変化成立の可否との関係を検討した。

(3) 栽培下のシロツメクサとギョウギシバを用いた検討（物理的ストレスの付加・除去に伴う小型化方向・大型化方向の変化の連動性）：
　ミヤコザサ同様、多年生のクローナル植物であるシロツメクサとギョウギシバを、定量的な踏圧ストレスを負荷しつつ栽培し、小型化・窒素含量増大・光合成能力増大（小型化方向の連動的変化）が見られるか検討した。2 年目には、1 年目の踏圧処理により小型化していた植物を踏圧処理から解放することにより、大型化・窒素含量減少・光合成能力低下（大型化方向の連動的変化）が見られるか検討した。

(4) 踏圧耐性の異なるシバ類４種を用いた栽培実験（物理的ストレスに対する耐性の違いが連動的変化に及ぼす影響、およびサイズ変化のメカニズム）：
　踏圧耐性（踏圧処理によりバイオマスが減少する程度で評価）が異なるシバ類４種（ギョウギシバ、ノシバ、ムカデシバ、バヒアグラス）を、定量的な踏圧ストレスを負荷しつつ栽培し、小型化・窒素含量増大・光合成能力増大（小型化方向の連動的変化）が見られるか検討した。また、葉の組織切片を作成し、体サイズの変化のメカニズム（細胞数の変化によるものか、細胞サイズの変化によるものか）を検討した。

(5) ノシバを用いた栽培実験（光や栄養などの環境要因が連動的変化に及ぼす影響）：
　上記実験(4)において安定して連動的変化を示したノシバを材料に用い、異なる光環境（50% 減光処理、25%減光処理）や栄養環境（投与肥料の濃度を標準の 0.5 倍、1 倍、2 倍、4 倍、8 倍と段階的に変更）の下で定量的な踏圧ストレスを負荷しつつ栽培し、小型化・窒素含量増大・光合成能力増大（小型化方向の連動的変化）の有無と程度を検討した。

(6) シロイヌナズナを用いた栽培実験（モデル植物における連動的変化の成立条件の探索）：
　将来の遺伝学的・分子生物学的解析の可能性を拡げるために、モデル植物シロイヌナズナに種々の強度、頻度、あるいは方法により圧迫処理を加えつつ栽培し、物理的ストレスの付加に伴う小型化・窒素含量増大・光合成能力増大（小型化方向の連動的変化）が安定的に誘起される条件の探索を行った。

４．研究成果

(1) 大台ケ原のミヤコザサを用いた検討（シカによる物理的ストレス下での体サイズ変化のメカニズムと意義）：
　大台ケ原防鹿柵内外に生育する大小のミヤコザサの葉及び稈の組織切片を観察した結果、葉の幅方向および稈の長さ方向のサイズ変化に伴って細胞サイズはほとんど変わらず細胞数が変化していることが分かった。従って、シカによる物理的ストレスに応答したミヤコザサの体サイズ変化は、主として細胞増殖の制御によるものと判断された。
　また、プロテクトケージによる保護期間を変えることで体サイズの異なるミヤコザサパッチをミヤコザサ群落内に作成し、一斉に保護を解除してシカによる食害の程度を測定・比較したデータを解析した結果、群落内で他の植物に比べ僅かでも丈が高いと、シカによる食害を被る可能性が激増する（保護解除後 1～2 週間でほぼすべての葉を喪失する）ことが分かった。さらに、ミヤコザサ自然群落内における体サイズ（稈高）と葉の被食率との関係を調査した結果、自然群落内でも稈高が高いササほどシカによる被食率が高くなる傾向があった。また、過去の無傷稈と食害稈のサイズ測定結果を再度精査した結果でも、食害を受けている稈は無傷の稈に比べてわずかながらサイズが大きい傾向があることが判明した。従って、シカによる物理的ストレスに応答した小型化は、集中的な食害を回避するうえで有効であると判断された。

(2) 多種の自生植物を用いた検討（連動的変化の普遍性と、植物の生活型の影響）：
　自然条件下に於いて「物理的ストレスの有無により体サイズに大小の違いを生じている」と推定された自生植物 11 種を用いて、体サイズの違いと窒素含量・光合成能力の測定・比較を行った。調査対象とした 11 種のうち、オオバコ、ヤブヘビイチゴ、ギョウギシバ、スズメノカタビラ、シロツメクサの 5 種については小型化に伴い窒素含量が増加し光合成能力が増大する傾向が見られた。オオチドメとドクダミの 2 種については窒素含量は変化せず光合成能力のみが増大、カラスノエンドウ 1 種については逆に窒素含量は増大したものの光合成能力は変化せず、部分的に予測と合致しない結果となった。オッタチカタバミ、コウマゴヤシ、およびアップルミントの 3 種については、窒素含量と光合成能

力のいずれも増大傾向を示さず、仮説に合致する傾向は見られなかった。

大台ケ原のミヤコザサも合わせて考えると、12 種中 6 種で完全に、また 3 種で部分的に想定したようなサイズ・窒素含量・光合成能力の差異が検出されたことになる。このことから、サイズ・窒素含量・光合成能力の連動的変化はある程度の一般性を備えた現象であることが示唆された。また、連動的変化が検出された植物はいずれも踏圧ストレスに対する耐性が高そうに思われる、ロゼット型、叢出型、あるいは匍匐型の生活型をもった多年生植物であり、特に匍匐型の多年生クローナル植物において予想と合致する結果が得られやすいように思われた。

(3) 栽培下のシロツメクサとギョウギシバを用いた検討（物理的ストレスの付加・除去に伴う小型化方向・大型化方向の変化の連動性）：

シロツメクサとギョウギシバを、定量的な踏圧ストレス（0.35 kg/cm^2、1 日 0, 1, 2, 4, 8, 16 回処理）を負荷しつつ栽培した結果、いずれの植物についても踏圧ストレスの負荷頻度に応じて植物体サイズ（葉面積、直立茎長、葉柄長）が減少し、葉の窒素含量が増大し、光合成能力が増大する傾向が見られた。2 年目には、1 年目の踏圧処理（1 日 8 回処理）により小型化していた植物を踏圧処理から解放する実験を行った結果、いずれの植物についても踏圧処理を継続した場合に比べて植物体サイズが増大し、葉の窒素含量が減少し、光合成能力が低下する傾向が見られた。

シロツメクサとギョウギシバに関して小型化方向、大型化方向のいずれについても想定されたようなサイズ・窒素含量・光合成能力の連動的変化が観察されたことから、物理的ストレスの有無に起因する体サイズ・窒素含量・光合成能力の連動的変化はミヤコザサ以外の植物でも、また大型化方向のみならず小型化方向への変化についても見られる一般性を備えた現象であることが示唆された。

(4) 踏圧耐性の異なるシバ類４種を用いた栽培実験（物理的ストレスに対する耐性の違いが連動的変化に及ぼす影響、およびサイズ変化のメカニズム）：

植物の性質の違いが物理的ストレスによるサイズ・窒素含量・光合成能力の連動的変化の成立の可否に及ぼす影響を検討するために、踏圧耐性が異なると評価されているシバ類４種（ギョウギシバ、ノシバ、ムカデシバ、バヒアグラス）を、定量的な踏圧ストレス（0.35 kg/cm^2、1 日 0, 1, 2, 4, 8 回処理）を負荷しつつ栽培し、小型化・窒素含量増大・光合成能力増大（小型化方向の連動的変化）が見られるか検討した。地上部バイオマスを無処理時の 50%に低下させるのに必要な踏圧処理回数を指標に踏圧耐性を評価したところ、ギョウギシバ(12.0)、ノシバ(2.3)、バヒアグラス（1.0)、ムカデシバ（0.8）の順になった。2 回の実験を行ったところ、バヒアグラスを除く 3 種では、2 回とも踏圧処理回数に応じて小型化（Shoot/Root 比の低下を伴う)、窒素含量の増大、光合成能力の増大が起きた（踏圧耐性が比較的低いバヒアグラスでは、1 回目の実験でのみ、光合成能力の増大が認められなかった)。また、葉の組織切片観察の結果、いずれの種についてもミヤコザサの場合と同様、葉の細胞の数の変化の方が細胞サイズの変化よりも葉面積の縮小に対する寄与率が高いことが明らかになった。さらに、群落としての光合成速度を測定した結果、いずれの種についても踏圧処理に伴う地上部の小型化により、群落全体としての光合成速度は低下することが分かった。

(5) ノシバを用いた栽培実験（光や栄養などの環境要因が連動的変化に及ぼす影響)：

上記実験(4)において安定して連動的変化を示したノシバを材料に用い、異なる光環境（50% 減光処理、25%減光処理）や栄養環境（投与肥料の濃度を標準の 0.5 倍、1 倍、2 倍、4 倍、8 倍と段階的に変更）の下で定量的な踏圧ストレスを負荷しつつ栽培したところ、踏圧ストレスに伴う小型化・窒素含量増大・光合成能力増大の連動的変化は、幅広い環境下で起きることが確認された。

(6) シロイヌナズナを用いた栽培実験（モデル植物における連動的変化の成立条件の探索)：

将来の遺伝学的・分子生物学的解析の可能性を拡げるために、モデル植物シロイヌナズナに種々の強度、頻度、あるいは方法により圧迫処理を加えつつ栽培し、小型化方向の連動的変化が安定的に誘起される条件の探索を行った。極めて低頻度あるいは低強度のストレス負荷範囲では小型化に伴いわずかに窒素含量および光合成能力が向上する傾向が認められたものの、全体としてはストレス強度の増大に伴い窒素含量、光合成能力ともに低下する傾向をしめし、安定して有意な窒素含量および光合成能力増大の効果を得るには至っていない。これは、踏圧処理により地下部の成長が相対的により顕著に阻害され、窒素吸収能力が低下するためと考えられ、ストレス付加法の再検討が必要である。

全体として、物理的ストレスの負荷・解除に起因する植物体サイズの増大・減少に伴い窒素含量および光合成能力の減少・増大が連動的に起こる現象はストレス耐性が高い匍匐茎・地下茎をもつ多年生草本クローナル植物を中心に多くの植物において、また幅広い栄養環境、光環境のもとで観察される、一定の普遍性を備えた現象であると言えよう。また、踏みつけ、折り曲げなどの物理的ストレス下での小型化は主として細胞数の減少すなわち細胞増殖の制御によって行われているよ

うである。これは、従来の接触形態形成の研究で盛んに解析されているのが細胞の伸長成長への影響であることとは一線を画すものである。本研究ではまた、物理的ストレス下での小型化は植物体全体としての光合成生産量を低下させるというデメリットはあるものの、単位面積当たりの光合成速度向上、さらには植物体の生存可能性の向上というメリットもあることがあきらかとなった。

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. Sakai A, Takusagawa M, Nio A, Sawai Y (2015) Cytological studies on proliferation, differentiation, and death of BY-2 cultured tobacco cells. *Cytologia* 80: 1-9.
2. Kanai H, Tajima M, Sakai A. (2014) Effects of salinity on the growth and survival of the seedlings of mangrove, *Rhizophora stylosa*. *International Journal of Plant and Soil Science* 3:879-893.
3. Takusagawa M, Tamotsu S, Sakai A. (2013) Histone H3 is absent from organelle nucleoids in BY-2 cultured tobacco cells. *Cell Biology International* 37:748-754.
4. Sakai A, Yoshimura H (2012) Monoterpenes of *Salvia leucophylla*. *Current Bioactive Compounds* 8: 90-100.

〔学会発表〕（計　6 件）

1．タバコ培養細胞 BY-2 の細胞学：細胞の増殖・分化と死（酒井敦）日本植物学会第 78 回大会　2014.09.13 生田　※日本メンデル協会共催シンポジウム「細胞遺伝学の伝統と新たなる地平」内、キトロギア奨励賞　受賞記念講演
2．接触形態形成が窒素含量の変化を通して光合成に及ぼす影響（田嶋允貴、酒井敦）日本植物形態学会第 26 回大会 2014.09.11 生田
3．接触形態形成と光合成の接点（田嶋允貴、諸岡花奈、森さやか、野中菜乃美、野村美佐子、酒井敦）近畿植物学会講演会 2013.12.07 奈良
4．機械的ストレスに対するシロイヌナズナの応答：サイズ、窒素含量、および光合成機能の変化（酒井敦、野村美佐子、藤澤真帆、熊谷菜摘、田嶋允貴）日本植物学会第 77 回大会　2013.09.13-15 札幌
5．栄養環境の違いが接触形態形成、窒素含量、光合成能力に及ぼす影響（田嶋允貴、遊佐陽一、酒井敦）日本植物形態学会第 25 回大会　2013.09.12 札幌
6．接触形態形成が窒素含量の変化を介して光合成能力に影響を及ぼす現象について：刺激耐性の異なる種間での比較（野中菜乃美、田嶋允貴、酒井敦）日本植物学会第 76 回大会　2012.09.15-17　姫路

〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
酒井　敦　（SAKAI, Atsushi）
奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：30235098