

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380087

研究課題名（和文） 環境ストレスに対する樹木の根の代謝制御

研究課題名（英文） Metabolic regulation in tree roots by environmental stress

研究代表者

小島 克己（KATSUMI KOJIMA）

東京大学・アジア生物資源環境研究センター・教授

研究者番号：80211895

研究成果の概要：土壌に起因する環境ストレスが荒廃地の造林を行う上で問題になりやすい。荒廃地造林技術の開発のために環境ストレスに対する樹木根の代謝応答の機構を明らかにする必要がある。本研究では、樹木根の炭素代謝の応答を解析する手法を確立し、実際にいくつかのストレスに対する応答を解析した。その結果、低酸素ストレスやアルミニウム過剰ストレスには解糖系を阻害する作用があることが明らかになり、耐性樹種はその作用を回避する機構を持つことが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2007 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：造林学・樹木生理学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：荒廃地、環境造林、低酸素ストレス、アルミニウムストレス、*Melaleuca cajuputi*、解糖系、樹木

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナやイネなどのモデル植物を用いた植物生理学の研究は、全ゲノム情報を得た後に急速に進歩し、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析といったポストゲノム解析による新たな研究の局面に入った。しかし、先行している数種のモデル植物の機能解析だけでは、多様性に富んだ植物の生活史や環境適応戦略を理解することは困難であり、さらなるモデル植物の候補が提案され、ゲノム解析やポストゲノム解析が行われつつある。

樹木は永年性であり、モデル植物に比べ環境適応力が優れている種があると予想され、

草本のモデル植物では解明できない機能が明らかになる可能性がある。しかし、樹木のモデル植物と言えるものはポプラに限られており、環境ストレス耐性の優れた種がモデル植物として集中的に研究されてはいない。

植物のストレス応答に関する研究では、これまで、乾燥、低温、塩ストレスが主たる対象であった。樹木では大半の研究が乾燥ストレスに関するものである。しかし、実際の農業、林業の場面では、乾燥ストレスの他に土壌に起因する様々なストレスが問題となる。土壌と直接相対する根の研究は非常に遅れており、土壌に起因するストレスに対する根の応答の生理学的研究は、その必要性が高い

緊急の課題となっている。特に、農地のように集約的な土壌改良や土壌管理が行われない林地での森林更新や植生を失った荒廃地の造林の場面では、樹木の根のストレス応答のありようは、その成否を決める要点である。

2. 研究の目的

本研究は、新たなモデル植物を提案するものではなく、樹木の代謝に関する網羅的解析を行おうとするものでもない。モデル植物で明らかになった情報を駆使し、樹木の環境ストレスへの代謝応答に関して、必ずしも網羅的でない古典的な手法を用いて解析し、モデル植物では解明できない機能を環境ストレス耐性樹木から見出そうとするものである。

これまで私たちの研究グループが環境ストレス耐性樹木として選抜してきたフトモモ科の *Melaleuca cajuputi* を材料として、熱帯低湿地荒廃地の環境造林の場面を想定したアルミニウム過剰、湛水といった土壌に起因する環境ストレスに対し、根の解糖系、TCA 回路といった炭素代謝系がどのように制御されるのかを、代謝物の定量、酵素活性の測定を通じて包括的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

糖、有機酸、アミノ酸について、他植物で用いられている抽出法が *Melaleuca cajuputi* の根に適用できるかを検討し、定量法を確立した。

解糖系、TCA 回路の主要な酵素の活性について、他植物で用いられている抽出法および活性測定法が *Melaleuca cajuputi* の根に適用できるかを検討し、定量法を確立した。

これらの方法の詳細は、4. 研究成果の項で述べる。

確立した方法を、*Melaleuca cajuputi* の根の低酸素、アルミニウム過剰ストレスへの応答に適用した。

4. 研究成果

Melaleuca cajuputi と *Melaleuca bracteata*、*Eucalyptus camaldulensis* の根から、炭素代謝の主要物質である糖と有機酸をエタノールで抽出し、精製することによってガスクロマトグラフ (GC) あるいは高速液体クロマトグラフ (HPLC) による定量を可能にした。エタノールによる抽出物を減圧固化した後に水で再溶解し、水溶液をイオン交換カラムに通過させることによって糖と有機酸を分離・精製した。陽イオン交換カラムと陰イオン交換カラムを連続で通過させてできた画分を糖定量に用い、水溶液通過後に陰イオンカラムに一旦保持されたものをギ酸で溶出させた画分を有機酸定量に用いた。糖定量用の画分を減圧固化した後、固化

試料中のアラビノース、キシロース、フルクトース、グルコース、ソルビトール、イノシトール、スクロース、ラフィノースをトリメチルシリル-オキシム誘導体化してキャピラリー-GC で定量した。二次代謝物を多く含む樹木由来の試料では夾雑物が測定を阻害しやすいが、精製することによって GC 測定時のベースラインを安定させることができた。また、夾雑物の除去によって誘導体化効率が向上することを内部標準物質の回収率から確認した。糖のアノマーが混在することなどから糖と有機酸のピークと重なるという問題が生じたため、陰イオン交換カラムによって両者を分離させることが必須であった。有機酸については、リンゴ酸を糖と同様の方法で GC によって定量し、それ以外の有機酸 (クエン酸、シキミ酸、フマル酸) はフォトダイオードアレイ検出器を接続した HPLC で定量した。これらの測定では、各物質の回収率は 70-90% であった。

Melaleuca cajuputi と *Melaleuca bracteata*、*Eucalyptus camaldulensis* の根を試料として、解糖系の中間代謝物である糖リン酸の定量法を確立した。糖リン酸は過塩素酸で抽出した。トリクロロ酢酸による糖リン酸の抽出法と比べて、過塩素酸による抽出法は、操作が簡便であり回収率が高かった。糖リン酸は極めて微量の成分であるため、それを基質とする酵素反応に共役する NAD(P)H の増減から単純に定量する方法では検出感度の限界が問題となった。そこで、これらの定量に、より検出感度が高い酵素サイクル法を用いることとした。植物、特に樹木には酵素活性の阻害物質が存在するので、糖リン酸の定量がこれらの樹種で可能かどうか検討した。グルコース-1 リン酸、グルコース-6 リン酸、フルクトース-6 リン酸の定量では、NADP⁺ と NADPH の循環系を用いた。NADP⁺ はこれらの糖リン酸を 6-Phosphogluconolactone に変換させる過程で等量生成するので、これを定量することによって糖リン酸を定量することができる。UDP-グルコースと 3-ホスホグリセリン酸の定量では、グリセロール-3 リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸の循環系を用いた。酵素反応により、UDP-グルコースはグリセロール-3 リン酸に、3-ホスホグリセリン酸はジヒドロキシアセトンリン酸に変換する系により定量した。アセチル CoA はアセチル CoA と CoA の循環系を用い、そのとき生成される NADH の生成速度から定量した。どの循環系においても、夾雑物が循環系で用いる酵素反応の障害となった。この問題は抽出液にポリビニルポリピロリドン (PVPP) を添加することによって解消したことから、ポリフェノール系物質が定量の障害となる主な夾雑物であることがわかった。酵素サイクル法によ

る糖リン酸の定量は草本植物でもまだ適用例が少ないが、樹木の根を試料とした場合にも適用できることが確かめられた。また、酵素サイクル法は検出感度が高く、少ない試料液で定量できることから、マイクロプレートリーダーを用いたハイスループット化が可能である。本研究でも、マイクロプレートリーダーによって効率的に測定を進めることができた。

解糖系、TCA 回路の主要な酵素の抽出と活性測定は、抽出過程で PVPP によるポリフェノールの除去を必要とすることと抽出緩衝液のメルカプトエタノール濃度を高くするという改変を除いて、概ね他植物で用いられている方法と同じ手順を進めることができた。また、本研究ではスクロース分解にも着目し、その反応を担う酵素としてインペルターゼとスクロースシンターゼを抽出して活性を測定した。この結果と $^{13}\text{CO}_2$ パルスラベルにより根への光合成産物の転流を解析した結果を合わせて炭素代謝に基質を供給する過程のストレス応答反応を明らかにした。

代謝物の定量と酵素活性の測定で確立した手法を用いて、*Melaleuca cajuputi* の低酸素ストレス耐性の機構を解析した。比較種の *Eucalyptus camaldulensis* では、根のエネルギー状態が低酸素ストレスによって悪化した。エネルギー代謝の基質となるグルコースを培養液に添加することによってこの悪化を防ぐことができた。このような回復効果はスクロースの添加によっては認められず、また低酸素ストレス下で *Eucalyptus camaldulensis* の根にスクロースが蓄積することがわかった。一方、根のエネルギー状態に影響のなかった *Melaleuca cajuputi* では、根にスクロースが蓄積しなかった。根のスクロース分解酵素の活性を測定した結果、このような種間差は低酸素ストレスによって液胞インペルターゼ活性が阻害されるかどうかの違いによることが示唆された。さらに、*Melaleuca cajuputi* ではスクロース分解活性を維持することで *Eucalyptus camaldulensis* で起こるような光合成産物の転流阻害が回避されていると推測された。*Melaleuca cajuputi* は低酸素ストレス下でもエネルギー代謝への基質供給が阻害されることがなく、このことが低酸素ストレス耐性を規定する要素の一つになっていると考えられる。また、*Melaleuca cajuputi* では、解糖系の酵素が低酸素ストレスによって賦活化する傾向にあった。しかし、葉から根への炭素の転流量が増加しなかった、また、スクロース分解時の ATP 消費の減少につながるスクロースシンターゼの活性の増加がみられなかった、あるいは根の呼吸速度の測定の結果や解糖系の中間代謝物の定量の結果から解糖系フラックスが増大している証拠は

なかったことから、解糖系 アルコール発酵系では湛水条件下での *Melaleuca cajuputi* の根の高いエネルギー状態を説明できないことが明らかとなった。したがって、*Melaleuca cajuputi* の強力な低酸素ストレス耐性の機構を解明するためには、本研究で得た知見を土台にしてエネルギー生産経路の詳細を検討する必要があり、今後の課題となる。

アルミニウムストレスに対する 耐性種 *Melaleuca cajuputi* と感受性種 *Melaleuca bracteata* の根の代謝制御の解析を行った。どちらの種もアルミニウムストレスにより解糖系フラックスが低下している可能性が示された。しかし、根のエネルギー状態が悪化したのは感受性種の *Melaleuca bracteata* だけであった。耐性種の *Melaleuca cajuputi* では、解糖系の最下流に位置するアセチル CoA の量がアルミニウムストレス下でも維持されており、TCA 回路におけるエネルギー生産には影響がなかったと推測される。スクロース分解や解糖系最上流部の代謝においても両種にアルミニウムストレスに対する応答の違いが見られた。今後、これらに関連する代謝経路の詳細な解析を行うことにより、*Melaleuca cajuputi* の Al ストレス耐性機構が解明される可能性がある。

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)

[雑誌論文](計6件)

Kogawara, S., Norisada, M., Tange, T., Yagi, H., Kojima, K. (2006) Elevated atmospheric CO₂ concentration alters the effect of phosphate supply on growth of Japanese red pine (*Pinus densiflora*) seedlings. *Tree Physiology* 26: 25-33. 査読あり

Osawa, H., Kojima, K. (2006) Citrate-release-mediated aluminum resistance is coupled to the inducible expression of mitochondrial citrate synthase gene in *Paraserianthes falcataria*. *Tree Physiology* 26: 565-574. 査読あり

Norisada, M., Motoshige, T., Kojima, K., Tange, T. (2006) Effects of phosphate supply and elevated CO₂ on root acid phosphatase activity in *Pinus densiflora* seedlings. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169: 274-279. 査読あり

Kogawara, S., Yamanoshita, T., Norisada, M., Masumori, M., Kojima, K. (2006) Photosynthesis and photoassimilate

transport during root hypoxia in *Melaleuca cajuputi*, a flood-tolerant species, and in *Eucalyptus camaldulensis*, a moderately flood-tolerant species. *Tree Physiology* 26: 1413-1423. 査読あり

Tahara, K., Norisada, M., Yamanoshita, T., Kojima, K. (2008) Role of aluminum-binding ligands in aluminum resistance of *Eucalyptus camaldulensis* and *Melaleuca cajuputi*. *Plant and Soil* 302: 175-187. 査読あり

Tahara, K., Yamanoshita T., Norisada, M., Hasegawa, I., Kashima, H., Sasaki, S., Kojima, K. (2008) Aluminum distribution and reactive oxygen species accumulation in root tips of two *Melaleuca* trees differing in aluminum resistance. *Plant and Soil* 307: 167-178. 査読あり

〔学会発表〕(計 24 件)

則定真利子, 毛塚由佳理, 小島克己, 丹下健. (2007) 高温による根の吸水阻害. 第 1 1 8 回日本森林学会(福岡市・九州大, 2007.4.1-3)

古川原聡, 山ノ下卓, 則定真利子, 小島克己. (2007) 低酸素ストレス下の根におけるエネルギー代謝の制限要因. 第 1 1 8 回日本森林学会(福岡市・九州大, 2007.4.1-3)

田原恒, 今雪将司, 則定真利子, 小島克己, 長谷川功, 佐々木恵彦. (2007) フタバガキ科 4 種の低 pH と過剰アルミニウムに対する応答. 第 1 1 8 回日本森林学会(福岡市・九州大, 2007.4.1-3)

大澤裕樹 (2007) 木本植物に顕著な高アルミニウム耐性の生理学的解析. 第 1 1 8 回日本森林学会(福岡市・九州大, 2007.4.1-3)

大澤裕樹, 松島雄紀, 遠藤いず貴, 丹下健 (2007) 高アルミニウム耐性を示す樹木種の根伸長と有機酸放出との関連. 日本土壤肥料学会 2007 年度東京大会(世田谷区・東京農業大, 2007.8.22-24)

Norisada, M., Kezuka, Y., Kojima, K. and Tange, T. 2007. High root temperature inhibits water and nitrogen uptake. 4th International Symposium on Physiological Processes in Roots of Woody Plants. (Bangor, UK. 2007.9.16-20)

原有香里, 古川原聡, 山ノ下卓, 則定真利子, 小島克己 (2008) アルミニウムストレスがフトモモ科樹木 3 種の光合成産物の分配に与え

る影響. 第 1 1 9 回日本森林学会(府中市・東京農工大, 2008.3.27-28)

古川原聡, 山ノ下卓, 則定真利子, 小島克己 (2008) 低酸素ストレス下の根の代謝. 第 1 1 9 回日本森林学会(府中市・東京農工大, 2008.3.27-28)

長藤慎介, 則定真利子, 山ノ下卓, 古川原聡, 益守眞也, 大澤裕樹, 小島克己, 丹下健 (2008) 高温に対する *Acacia* 属 2 種の根の通水性の応答. 第 1 1 9 回日本森林学会(府中市・東京農工大, 2008.3.27-28)

田原恒, 小島克己, 篠原健司 (2008) *Eucalyptus camaldulensis* の根から放出されるアルミニウム結合物質の解析. 第 1 1 9 回日本森林学会(府中市・東京農工大, 2008.3.27-28)

遠藤いず貴, 大澤裕樹, 丹下健 (2008) *Acacia mangium* の根の伸長に伴い離脱する特徴的な根端細胞の解析. 第 1 1 9 回日本森林学会(府中市・東京農工大, 2008.3.27-28)

池田信輔, 大澤裕樹, 丹下健 (2008) 野外に生育するツバキ科 8 種の地上部におけるアルミニウム集積特性. 第 1 1 9 回日本森林学会(府中市・東京農工大, 2008.3.27-28)

大澤裕樹, 遠藤いず貴, 松島雄紀, 丹下健 (2008) 高アルミニウム耐性を示すクスノキの根の伸長機構の解析. 第 1 1 9 回日本森林学会(府中市・東京農工大, 2008.3.27-28)

遠藤いず貴, 大澤裕樹, 丹下健 (2008) アルミニウム耐性を示す *Acacia mangium* 根端で離脱する組織の形成過程の解析. 日本土壤肥料学会 2008 年度愛知大会(名古屋市・名古屋市立大, 2008.9.9-13)

大澤裕樹, 遠藤いず貴, 松島雄紀, 丹下健 (2008) クスノキ根端のアルミニウム耐性表皮の形態形成解析. 日本土壤肥料学会 2008 年度愛知大会(名古屋市・名古屋市立大, 2008.9.9-13)

小島克己 (2008) 熱帯荒廃地のストレスと環境造林. 公開シンポジウム「環境保全に貢献するスーパー樹木の開発に向けて」(文京区・東京大, 2008.9.29)(招待講演)

原有香里, 古川原聡, 山ノ下卓, 則定真利子, 小島克己 (2009) アルミニウムストレスがフトモモ科樹木の根の炭素代謝に与える影響. 第 1 2 0 回日本森林学会(京都市・京都大, 2009.3.26-28)

長藤慎介, 則定真利子, 山ノ下卓, 丹下健, 小島克己 (2009) 根の高温による *Acacia* 属樹木の生長阻害. 第120回日本森林学会 (京都市・京都大、2009.3.26-28)

田原恒, 橋田光, 大原誠資, 小島克己, 篠原健司 (2009) ユーカリの根に含まれるアルミニウム無害化物質の解析. 第120回日本森林学会 (京都市・京都大、2009.3.26-28)

遠藤いず貴, 大澤裕樹, 丹下健 (2009) *Acacia mangium* 根端における組織離脱の細胞系列解析. 第120回日本森林学会 (京都市・京都大、2009.3.26-28)

松島雄紀, 大澤裕樹, 丹下健 (2009) 木本根端のフラボノイド集積とアルミニウム耐性の網羅的解析. 第120回日本森林学会 (京都市・京都大、2009.3.26-28)

大澤裕樹, 松島雄紀, 遠藤いず貴, 丹下健 (2009) アルミニウム耐性の異なる樹木根のフラボノイドの生化学解析. 第120回日本森林学会 (京都市・京都大、2009.3.26-28)

小島克己 (2009) 熱帯荒廃地の環境ストレスと樹木の応答. 第18回バイオテク林木育種研究会 (京都市・京都大、2009.3.28) (招待講演)

大澤裕樹 (2009) 木本植物に固有な高アルミニウム耐性機構. 第18回バイオテク林木育種研究会 (京都市・京都大、2009.3.28) (招待講演)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 克己 (KATSUMI KOJIMA)

東京大学・アジア生物資源環境研究センター・教授

研究者番号：80211895

(2) 連携研究者

大澤 裕樹 (HIROKI OSAWA)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：90401182

(3) 研究協力者

則定 真利子 (MARIKO NORISADA)

東京大学・アジア生物資源環境研究センター・特任講師

山ノ下 卓 (TAKASHI YAMANOSHITA)

東京大学・アジア生物資源環境研究センター・特任助教

古川原 聡 (SATOSHI KOGAWARA)

(独) 森林総合研究所・特別研究員

田原 恒 (KO TAHARA)

(独) 森林総合研究所・研究員