

平成21年 6月 16日現在

研究種目：基盤研究(C)	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19580177	
研究課題名（和文）	オルガネラ間の酸化還元・電子移動・エネルギー分配に依存したストレス回避と回復過程
研究課題名（英文）	The processes in tree specific stress adaptation and depending on energy distribution between organelles.
研究代表者	
柴田 勝(SHIABATA MASARU)	
長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授	
研究者番号 30300560	

研究成果の概要：

樹木に特異的な色素 α -caroteneを中心に7種の色素が相互置換している葉の蛍光測定、色素分析を行った結果、色素相互置換が光合成の最適化に強く影響しており、環境変化への樹木特異的な適応機構を示した。また、ミトコンドリア(Mit)と葉緑体の過剰還元力に関する関係を調べるために、葉緑体・Mitの電子伝達鎖のキノンredoxを調べた結果、Mitのキノンredoxは光強度に依存していなかったが、一部の常緑樹では樹種によりそのredoxが大きく異なっていた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 農学
 科研費の分科・細目： 林学，林学・森林工学
 キーワード： 森林生産，樹木生理

1. 研究開始当初の背景

森林保護などの環境保全の観点から酸性雨や土壤汚染などの環境ストレスによる植物の枯死が注目されている。特に樹木の枯死は森林の衰退，砂漠化を招くと共に大気中のCO₂濃度バランスを崩す原因である。このため、塩・乾燥などの厳しい環境条件のもとで光合成活性が低下せず、高い成長を維持できるストレス耐性能力の高い早生有用樹種の探索の必要性が指摘されている。環境ストレスによる樹木枯死の主な要因として光合成の光阻害があり、その直接的な原因は活性酸素によるタンパク質・脂質などの酸化・分解である。

光合成阻害と活性酸素に着目した研究では以下の3つの能力によりストレス耐性が決定すると考えられている。

①活性酸素生成の抑制能力（電子消費能力または光エネルギー散逸能力），②活性酸素の消去能力，③阻害からの回復能力である。

現在までに国内外で分子遺伝学的な手法により、ストレス耐性植物の研究が数多く試みられてきた。しかし、植物が野外で生育するためには多種多様な環境ストレスを受けるためにストレス耐性に有効であると考えられている遺伝子を導入した

植物でさえ、野外では正常に生育しない。さらに、ユーカリのストレス耐性付与の研究により、ストレス枯死の回避には個体の生態学的適応が重要であることが示されている。このため、マルチストレスに関与する遺伝子群やその生理学的・生態学的な複合的な機能解明が必要とされている。

一方、常緑樹は草本植物に比べて葉寿命が長く、多種多様な環境変化・ストレスを受けるが、樹木のマルチストレス耐性に関する研究は断片的にしか行われていない。さらに、樹種間でのストレス感受性の違いがどのような因子により決定されているのかも明らかではなく、樹木に対するストレス生理学的な基礎的情報が極端に不足している。我々は、環境ストレス耐性木の選抜育種を行うために、樹木の環境ストレス耐性がどのような因子により決定されるかを明らかにすることを目的に研究を行ってきた。

樹木葉の光合成と葉内代謝との関係を調べる過程において、多くの樹種では季節的な葉内代謝変化が起きており、特に草本植物にはほとんど見られない色素 (α -カロチン等) を中心に7種のカロチノイドが協調的に環境ストレスに応答することで、上記(I)『活性酸素生成の抑制能力』を飛躍的に向上させている結果を得た。

しかし、樹木の代謝応答がどの程度のストレス回避を行っており、ストレス耐性の樹種間差・個体差に影響しているかについては明らかではない。一方、光合成阻害について単一オルガネラのみによる議論が見直されてきた。定常的な光合成活性を維持するためには、葉緑体とミトコンドリアなどの代謝ネットワークが光合成による過剰エネルギー（還元力）の再分配・散逸過程が重要であることが示されている。

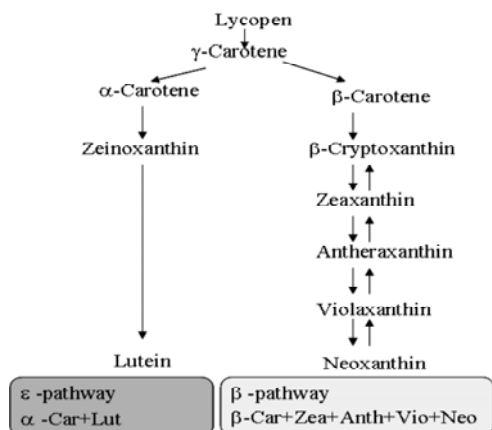


図 1. 高等植物の色素合成経路

2. 研究の目的

環境ストレスの厳しい未利用地域の森林

再生に利用可能な樹木を得るために、樹木本来の環境適応能力や樹種間のストレス感受性の違いを明らかにすることを目的に以下の研究を行った。

(1) 樹木本来のストレス耐性能力を高めるために、樹木に特異的なストレス回避機構を証明すると共に、草本・木本植物との環境適応機構・ストレス耐性機構の違いとその意義を明らかにする。

(2) 活性酸素の発生を抑制するためには、葉緑体内で生じる過剰な還元力を散逸させなければならない。in vivo において葉緑体チラコイド膜とミトコンドリア電子伝達活性の実験から、葉緑体過剰電子の消去にミトコンドリアの機能が重要であることから、活性酸素の生成を抑えるために葉緑体でのエネルギー（還元力）生成機構とミトコンドリアでのエネルギー散逸機構との関係（物質レベルのオルガネラクロストーク）を明らかにする。そのための測定法の開発を含む。

3. 研究の方法

樹木特異的なストレス回避機構について

(1) 色素組成の変化の主要環境因子および色素置換のタンパク質の同定

機能未知の lutein, α -Car を含めた7種の色素総量は年間を通してほぼ一定だが、その組成は大きく変化している (図1)。このような組成変化を誘導する環境因子を明らかにするために、温度・光条件の異なる環境で生育させ、 α -Car が蓄積しやすい樹木であるモミ (常緑針葉), カキノキ (落葉広葉) の葉片の色素・タンパク質分析を行った。また、色素置換のタンパク質を特定するために、葉緑体チラコイド膜の色素-タンパク質複合体を mild-PAGE・ND-PAGE により分離し、抽出後、詳細な色素分析・分光光学的な解析を行った。

(2) 色素組成の違いが葉緑体電子伝達・光合成に与える影響

樹木葉には草本植物には見られない α -Car を中心に全色素組成の 50%以上を変化させるが、この変化はどのような環境ストレス (変化) に対してどの程度、有効であるのかを明らかにする。被陰処理などにより色素組成を調整した樹木の成熟葉に対して低温・乾燥ストレスを与え、光合成活性・クロロフィル蛍光の測定により、NPQ (熱成分), Φ_{PSII} (PSII の量子収率), ETR (電子伝達速度), Fv/Fm を求めた。

葉緑体のエネルギー（還元力）生成機構とミトコンドリアでのエネルギー散逸機構

(3) 照射下でのミトコンドリア CoQ redox の簡易測定法の開発

植物は動物とは異なり、光合成により酸素を発生することから光照射下でのミトコンドリア活性に依存した酸素吸収の測定は難しかった。このために、CoQの酸化還元体をHPLCにより測定されてきたが、UQとplastoquinone (PQ)のピーク分離が不十分であったことから、CoQ redoxの高感度・簡易測定により呼吸鎖での電子伝達の測定方法を確認する必要がある。HPLC法により、CoQおよび葉緑体チラコイド膜のPQのredoxを同時に測定可能な系の構築を行った。

(4) 草本・木本植物の葉片のUQredox

ambient光の下でPQ, UQの酸化還元レベルが、植物種によりどのように異なるかを調べるために草本植物3種(アサガオ, ホウレンソウ, ツユクサ), 木本植物6種(ポプラ, ニシキギ, ゲッケイジュ, ユキツバキ, キャラボク, メタセコイヤ)の当年生葉を用いて実験を行った。

4. 研究成果

一般的に草本植物の葉片にはβ-carotene (β-Car)が含まれている。しかし、樹木葉ではα-carotene (α-Car)がβ-Carと置換する形で存在しており、α-Car量は夏季に増加し、秋・冬季に減少する。それに伴い7種のカロチノイドが相互に入れ替わることでタンパク質内のカロチノイド組成を大幅に変化させ、見かけ上、NPQの主成分であるviolaxanthin cycle色素を増加させていた。そして、過剰なエネルギーを熱として放散させ、活性酸素の生成を抑制する環境応答を示している。

(1) 色素置換のタンパク質の同定

色素置換が行われている部位を同定するには、樹葉片からチラコイド膜を単離し、色素タンパク質複合体を分離後、置換色素の分析を必要とする。しかし、樹木のチラコイド膜は凝集しやすく、色素を結合したタンパク質を分離することができない。このため、カキ葉緑体膜をPVPおよびpercoll密度勾配遠心によりチラコイド膜の精製を行った。次いで、nondenaturing-PAGEにより、色素を結合したタンパク質複合体、7種を分離した。表1に示されているように光化学系II (PSII), PSI反応中心(RC)および光捕集色素タンパク質複合体(LHC)などの6つの色素タンパク質複合体を分離し、その色素分析を行った。カロチンの主な存在部位は、反応中心であることから、光化学系II, Iの全カロチンに対するα-Car, β-Carの比を求めた。その結果、光化学系に関係なく、特定部位で色素変化は起きていないことが示された。

表1. 分離したタンパク質複合体に存在するカロチノイド比率

	Carotenoids			
	alpha/alpha+beta-Car (mol/mol)	xanthophylls (mol %)	carotene (mol %)	
leaf	0.32±0.06	12.6±0.6	32.3±1.6	
thylakoid	0.30±0.02	16.8±0.4	22.9±5.4	
CP I a	CP I a	0.30±0.03	10.4±0.7	8.2±3.3
CP I	CP I	0.28±0.01	6.1±0.3	36.7±5.7
LHC trimer	LHC trimer	0.29±0.04	4.3±0.7	1.1±0.2
LHC dimer	LHC dimer	0.29±0.02	10.6±0.8	11.3±1.9
CP43/47	CP43/47	0.28±0.04	5.5±0.2	11.5±3.2
LHC monomer	LHC monomer	0.25±0.02	8.1±0.9	4.1±1.7
Free Pigment	Free pigment	0.30±0.06	5.6±0.4	13.2±2.0

PS : photosystem
RC : reaction center
LHCP : antenna Chl a/b proteins
CPI : P700-Chl a protein
CPIa : CPI associated with LHC-I
CPa : Chl-protein of PSII RC complex
FP : free pigments

(2) 生育光強度が色素組成に与える影響

樹木は、草本植物とは異なり生育光強度によりCar比率(Car in α+βCar)が変化することから、カキの成熟葉を被陰することでCar比率の異なる葉片を調整し、色素分析を行った。被陰処理により、葉片の色素量、クロロフィルa/b比に変化が見られたが、クロロフィルあたりの色素量はほぼ一定であった。ε-pathwayおよびβ-pathwayの色素量が同調して変化し、草本植物のようにβ-pathwayのみを増加させていなかった(図2)。そして、成熟葉においても生育光強度の低下によりα-Carがβ-Carと置換し、lutein量が大幅に減少した。

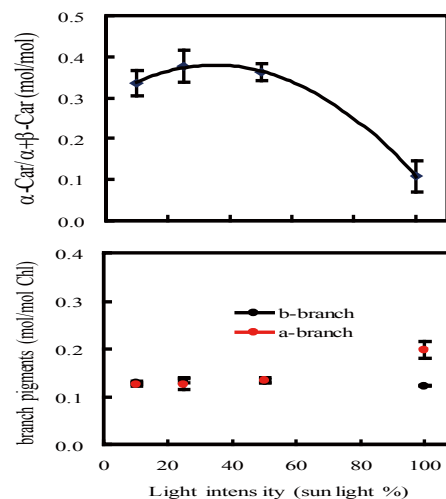


図2. 生育光強度による成熟葉の色素組成変化

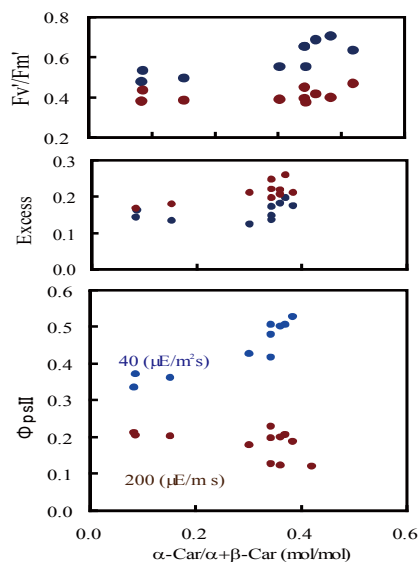


図3. 色素組成変化が葉緑体電子伝達反応に与える影響

(3) 色素組成の違いが葉緑体電子伝達・光合成に与える影響

被陰処理により色素組成を変化させた樹木葉のクロロフィル蛍光の測定を行い、反応中心、光捕集タンパク質の色素変化が光合成のエネルギー利用効率に与える影響を調べた。その結果、弱光では open PSII の光利用効率(F_v/F_m')が β -Car 比率に依存せず一定であったが、中光では β -Car 比率の上昇と共に F_v/F_m' が低下した。また、障害を起こす過剰な光エネルギーの指標である Excess は、弱光で β -Car 比率の低下と共に上昇した。光照射中の光利用効率は色素組成の違いに関係なく同程度であったが、被陰処理と共に NPQ (熱成分) が低下し、 Φ_{PSII} (PSII の量子収率) の低下が見られた。これらの結果は、弱光生育には β -Car 比率を高くし、 α -Car 比率を低めることで、葉内の過剰エネルギーを軽減していることを示唆している。また、温度変化による色素組成の変化があり、被陰処理に比べて影響が大きく、また、より色素サイクルでの置換反応が起こりやすくなっていた。これらの結果は、季節的な環境変動に対する光合成の生理的な樹木の特異的な適応機構が存在しており、機能していることを示唆するものであった。

(4) キノン分析

ミトコンドリアによる葉緑体の過剰還元力の散逸過程・能力について調べるには、それぞれのオルガネラの電子伝達活性を同時に測定すれば可能となる。このことから、電気伝達体である葉緑体のプラストキノン

(PQ), ミトコンドリアのユビキノン(UQ)に注目し、それらの redox 同時測定系の構築を行った。

溶離液はメタノールではなく、溶媒のプロトン性が低いアセトニトリルを主体とした。キノン環を認識して分離を行うアルコール系の溶媒では僅かな分極差、構造の違いを認識することができないために、PQH と UQH-9 の分離度が極端に低下した。そこで、アセトニトリル(CH_3CN)のような非プロトン性溶媒(aprotic solvent)を用いることでキノン環の僅かな違いを認識できるようにした。

また、アセトニトリルの割合を増やすことで UQH の蛍光感度が増大した。溶離液が 100%メタノールの場合と比較して 100%アセトニトリルで測定した場合、UQH-10 では 7.6 倍感度が高かった。しかし、PQH では感度の低下が見られた。一般的にアセトニトリルのような非プロトン性溶媒を用いることで、PQH の蛍光感度が下がると報告がされている。本実験では、微量の葉片を用いて UQH を高感度で検出する必要があることから、非プロトン性溶媒を溶離液の主体とした。アセトニトリル 100%ではキノン類の分離が行えなかったため、アセトニトリル 75%にエタノールを加え、溶離液の調整を行った。

その結果、HPLC 分析条件としてカラムを TSKgel ODS-100V $3\mu m$ (4.6x150mm)、カラム温度 $40^\circ C$ 、溶離液 Acetonitrile/Ethanol=75/25 (v/v)、流速 1.5ml/min とし、検出には 3 波長の吸光度(PQ at 255nm, UQ at 275nm, PQH and UQH at 290nm)、蛍光(Fluorescence at 370nm, excited 290 nm)を設定した。図4に酸化型、還元型の PQ, UQ の HPLC チャートを示す。

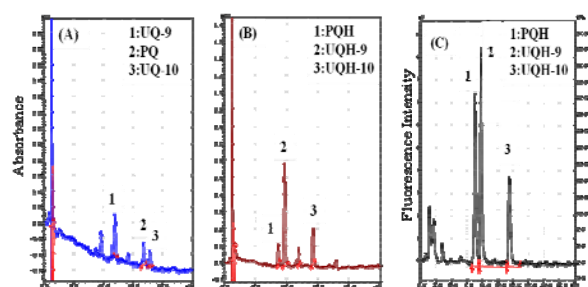


図4. ユビキノン、プラストキノン類の標準化合物の HPLC チャート

(5) 木本・草本植物のミトコンドリア・葉緑体キノン類の redox

植物種によるキノン組成の違いを調べるためにアサガオ(morning glory)、ホウレンソウ(spinach)、ツユクサ(spiderwort)の葉片のキノン類の含量を測定した(表2)。Intact leaf

の UQ は、暗処理においても還元型で存在する比率が高かった。しかし、単離ミトコンドリアの酸化型 UQ は、全 UQ の 98.8% であった。これらのことから、生理条件下での UQ は、常に還元型に偏っていることが示唆された。

表 2. 植物キノン類の酸化還元レベル

	UQ total (nmol/gfw)	UQ/UQ total (mol/mol)	PQ total (nmol/gfw)	PQ/PQ total (mol/mol)	PQ/UQ (mol/mol)
草本植物					
アサガオ	43.4±3.2	0.08±0.03	93.2±4.7	0.23±0.07	2.15±0.14
ホウレンソウ	36.2±0.4	0.13±0.01	88.5±3.2	0.44±0.07	2.44±0.07
ツクサ	23.5±0.5	0.15±0.06	58.1±5.5	0.30±0.12	2.47±0.19
木本植物					
ボブラ	267.0±25.4	0.05±0.01	510.4±76.2	0.30±0.06	1.91±0.03
キャラボク	144.5±4.0	0.06±0.02	313.0±90.7	0.95±0.00	1.60±0.36
ニシキギ	466.2±56.0	0.04±0.01	351.6±49.9	0.72±0.06	0.76±0.07
ユキツバキ	92.9±7.9	0.30±0.00	195.3±13.6	0.92±0.00	2.10±0.04
メタセコイア	96.1±13.7	0.06±0.02	170.0±16.0	0.21±0.01	1.78±0.15
ゲッケイジュ	154.4±47.5	0.16±0.03	1104.8±29.3	0.98±0.00	7.53±0.22

これらのことから、ゲッケイジュなどの比較的、酸化型 UQ が蓄積しやすい樹木を用いて、ミトコンドリアのエネルギー散逸機構について実験が可能であることがわかった。

しかし、KCN, antimycin などのミトコンドリア電子伝達阻害剤と NADH などの電子供与体を用いて、ミトコンドリアに存在する UQ のうち 12% 程度が電子伝達に関与していないことがわかった。また、葉内の UQ 類の内、約 15% 程度がミトコンドリア膜以外に存在していた。これらの結果は、intact leaf を用いた UQ 測定は、ミトコンドリア内膜の UQredox を直接的に示しているのではなく、間接的に示しているに過ぎないことを表している。同様に PQ に対しても葉緑体チラコイド膜で機能する割合は 70% 程度であった。しかし、機能する PQ, UQ(active quinones) の割合をより正確に見積もることは、ミトコンドリアと葉緑体のオルガネラ間の相互作用を調べるために必要となる。現在、photo active PQ, active UQ の測定を行っている。

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 2 件)

- ① 柴田勝, 「プラスチックキノンの抽出と分析」, 光合成研究法 (Ed. 田中歩), 低温科学, 67, 233-243, 2009. (査読無)
- ② 新井田聖次, 柴田勝, 「高速液体クロマトグラフィーを用いた緑色植物のリポフ

イリシティ」, 長岡高専研究紀要, 44(1), 29-35, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 柴田勝, 松本 拓太, 樋山 麻美, 新井田 聖次, 「樹木葉の環境応答としてのカロチノイド相互置換」, 日本森林学会第 120 回大会, 2009 年 3 月 28 日
- ② 吉田啓亮, 秋田駿介, 柴田勝, 寺島一郎, 野口航, 「HPLC による PQ・UQ レドックスの同時分析と AOX 欠損による影響」, 第 50 回 日本植物生理学会年大会, 2009 年 3 月 23 日
- ③ 秋田駿介, 長谷川祥, 柴田勝, 「ミトコンドリア・葉緑体電子伝達系に関わるキノン類の同時測定」, 第 14 回 高専シンポジウム, 2009 年 1 月 24 日
- ④ 長谷川祥, 阿倍悠太, 秋田俊介, 柴田勝, 「植物ミトコンドリアの電子伝達にもなうキノンの酸化還元」, 第 14 回 高専シンポジウム, 2009 年 1 月 24 日
- ⑤ 吉田秀俊, 柴田勝, 竹内麻希子, 「PAM クロロフィル蛍光測定のための簡易装置開発」, 第 14 回 高専シンポジウム, 2009 年 1 月 24 日
- ⑥ 吉田啓亮, 寺島一郎, 柴田勝, 野口航, 「HPLC を用いた光合成系と呼吸系の電子伝達鎖レドックス同時分析」, 日本植物学会第 71 回大会, 2008 年 9 月 26 日
- ⑦ 柴田勝, 葦沢和史, 増田恭次郎, 若杉達也, 山田恭司, 「ゴマ登熟過程におけるトコフェロール蓄積過程と脂肪酸組成変化」, 日本植物学会北陸支部会, 2007 年 6 月 10 日
- ⑧ 葦沢和史, 柴田勝, 増田恭次郎, 山田恭司, 「ゴマ品種・系統間の脂質・トコフェロール含量および組成変化」, 日本植物学会北陸支部会, 2007 年 6 月 10 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 勝 (SHIBATA MASARU)
独立行政法人国立高等専門学校機構長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授
研究者番号 30300560

(2) 研究分担者

野口 航 (NOGUCHI KO)
国立大学法人東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号 80304004