

## 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24年 5月15日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380051

研究課題名（和文） 高地温が助長するイネ幼苗の低温障害の発生機構の解明

研究課題名（英文） The mechanism of chilling injury induced by high root temperature in rice seedlings.

研究代表者

鈴木 健策（SUZUKI KENSAKU）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター・生産基盤研究領域・  
上席研究員

研究者番号：90355280

研究成果の概要（和文）： 地温が高いとイネ幼苗の葉に深刻な低温障害をもたらす。この時葉では先ず硝酸や亜硝酸が蓄積し、その後光化学系Ⅱの  $Q_A$  から  $Q_B$  への電子伝達が完全に遮断された。これに伴い、チラコイド膜内外の  $\Delta pH$  が消滅し、熱放散（活性酸素消去系）が機能なくなり、光化学系Ⅱが過剰還元状態となった。このことが、活性酸素や過酸化脂肪の発生等を経て、チラコイド膜、葉緑体包膜、細胞膜等の生体膜を破壊し、葉を枯死に至らせる原因と推定される。

研究成果の概要（英文）： High root temperature induces severe chilling injury in the leaves of rice seedlings. The first detectable event was the accumulation of nitrate and nitrite in the leaves, followed by the electron transport to be blocked between  $Q_A$  and  $Q_B$  in photosystem II. This was accompanied by the loss of thylakoid  $\Delta pH$ , malfunction of thermal dissipation, and over-reduction of photosystem II. Thus, the consequent generation of ROS and/or lipid peroxide should destroy the membranes such as thylakoid, chloroplast envelope, and cytoplasm, to lead to the leaf death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	11,400,000	3,420,000	14,820,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード：植物成長・生理

## 1. 研究開始当初の背景

自然環境下では気温・地温差が大きく変動するにも関わらず、葉の低温応答に及ぼす地温の影響についての知見はほとんどない。例えばイネでは、地温を常に高く保つことで、夜間の低気温に起因する昼間の光合成の低

下が緩和されるという報告があった程度である。これに対し最近応募者らは、高地温がイネ幼苗の葉に深刻な低温障害をもたらすという予想外の現象を発見した。この現象は次のように進行すると考える。(1) 根から葉への障害原因物質の伝達：イネ幼苗（あきた

こまち)では、地上部・地下部同時に低温(9-10°C)にした場合、根からの吸水が著しく低下する。しかし地上部のみ低温(9-10°C、地下部 25°C)にした場合には根からの吸水は低下せず、葉の含水量は低温処理前よりむしろ高くなる。また、硝酸が低温処理中の水耕液にないとこの障害は発生しないことから、硝酸またはその関連代謝産物の根から葉への過剰供給が、この障害と密接な関係している可能性が高い。(2) 光化学系IIからIへの電子伝達の遮断: 幼苗を光照射下で低温に曝すと直ちに光合成機能の低下が始まる。数時間程度の低温の場合には、これは光化学系IIの光阻害として説明できる。ところが1日以上低気温に曝すと、高地温の場合に限り、光化学系IIから光化学系Iへの電子伝達能力を失う。これは暗・低温条件下でも起こり、これが高地温依存性の低温障害の引き金の可能性がある。このような光合成の低温応答は他に報告が無く、その原因はまだ不明である。(3) 葉の脱色や枯死に至る過程: 地上部・地下部とも低温処理した場合、20-25°Cに戻すと光化学系IIの低温阻害は3時間以内に回復し、その後の可視的障害は、処理期間が1週間の場合でも観察されない。一方、地上部のみ低温処理により光化学系IIと光化学系Iの間に電子伝達の遮断が起きた葉では、光を当てると直ちに光化学系IIの著しい過剰還元と過剰エネルギーの蓄積や熱放散能力の著しい低下が起こる。その1日後には葉の脱色が斑点状またはモザイク状に広がり、脱色部分やその周囲が枯れる。これには、光化学系IIの熱放散能力の喪失と、光化学系IIの過剰還元が誘発する活性酸素の発生が関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

高地温が植物の葉の低温障害を助長するという現象はこれまで全く知られていなかった。イネ幼苗(あきたこまち)では、地上部だけを低温(10°C)に1日曝すと光合成に著しい変化が起こり、その翌日には葉の脱色や枯死が始まる。しかし地上部・地下部同時に低温(10°C)にした場合、1週間の処理後でも可視的障害は認められない。本研究では、この高地温に依存した低温障害において可視的障害に先立ち必ず起こる特徴的な変化、「光化学系IIと光化学系Iの間の電子伝達遮断」に着目し、その発生機構および、それが可視的障害に至る原因を明らかにする。

## 3. 研究の方法

高地温に依存して起こる葉の低温障害で検出できた最初の特異的な反応は、光合成明反応における光化学系IIからIへの電子伝達の遮断である。本研究では、生理学的解析、生化学的解析等により、遮断発生部位の特定

およびそのメカニズムの解明を行い、高地温により助長される低温障害の発生機構を明らかにする。その際、硝酸との関係に着目するのみならず、光化学系IIから光化学系Iを経てNADPHへ至る「非循環的電子伝達系」と光化学系Iのみに依存する「循環的電子伝達系」との関係に十分配慮しつつ解析を行う。

(1) 研究材料: イネ(あきたこまち)の3葉期の幼苗を用いる。あきたこまちはジャポニカ・イネの中でも比較的低温に強く、種子の入手も容易である。高地温依存性の低温障害が少なくとも5葉期までは同様に起こること、また、3葉期では第3葉、5葉期では第5葉というように常に最も活性の高い葉が著しい障害を受けることを、この品種の収穫年の異なる種子を用いて確認している(未公表データ)。3葉期の幼苗を用いるのは、播種後10日で実験に用いることができること、実験系として最も単純であること(第3葉以外の葉が十分に小さく活性も低いためその影響をあまり考慮する必要がない)こと、種子からの栄養供給が高地温・低気温・暗条件下でも2、3日は期待できること等の理由による。

(2) 低温処理方法: 人工気象室(Conviron社PGR15)内で明期12時間(500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  / 25°C / 75%RH): 暗期12時間(20°C / 12h / 75%RH)周期で10日間水耕栽培し3葉期に達した幼苗を、明期開始1.5時間後に同型の別の人工気象室に移すことで低温処理を開始する。人工気象室内は、葉面付近の温度を昼夜共10°C(85~90%RH)となるよう調節する。照明時の光強度は、葉面レベルで約650~700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるよう2時間に1回程度の頻度で調整する。根の温度は、低気温・低地温(L/L)処理では葉と同様10°Cとなるよう調整し、低気温・高地温(L/H)処理では25°Cとなるよう制御する。

(3) 低温下における光合成機能の比較解析: 高地温・低気温処理後に25°Cで暗順応させてクロロフィル蛍光解析を行うと、光化学系IIの実効量子収率( $\Delta F/F_m'$ )、光化学的消光(qP)、非光化学的消光(NPQ)のいずれも著しい低下を示し、1日以上処理(12h light / 12h dark)の後では $\Delta F/F_m'$ ほぼ0になる。またその時、光化学系Iはほぼ酸化されている。すなわち光化学系IIとIの間の電子伝達が遮断された状態にある。しかし光化学系IIがエネルギー過剰状態になった場合、通常はそれを熱放散により解消する仕組み(キサントフィル回路)が働くはずで、単に光化学系IIの後(電子受容側)が詰まっただけで枯死に至るとは考えにくい。高地温・低

気温の場合、むしろ光化学系Ⅰの「循環的電子伝達」も同時に遮断される可能性が高い。NPQの著しい低下は熱放散能力の喪失を示唆しており、その熱放散にはチラコイド膜内外の水素イオン濃度こう配 ( $\Delta pH$ ) が必要である。また、光化学系Ⅱからの「非循環的電子伝達」活性が極めて低い低温下では、 $\Delta pH$  形成には循環的電子伝達の寄与が極めて高いはずである。そこで、循環的電子伝達が遮断された結果  $\Delta pH$  が消滅し、熱放散の機能が失われ、光化学系Ⅱに過剰エネルギーが蓄積し、それが生体膜の破壊につながると考えられる。この仮説を検証する目的で、低温処理中の非循環的電子伝達、循環的電子伝達、 $\Delta pH$ 、熱放散の比較解析を行う。そのため本研究では、Dual-PAM用のP515/535モジュール ( $\Delta pH$  と zeaxanthin 含量の *in vivo* 解析が可能) を新たに購入し、現有のDual-PAMと組み合わせて使用する。

(4) 硝酸等の葉への転流に及ぼす高地温・低気温の影響： 高地温・低気温に依存した電子伝達遮断およびその後の可視的障害は、低温処理中の水耕液に硝酸がないと起こらないことがわかった。高地温・低気温条件下では、根の代謝活性は潜在的に高いはずであるが、葉からの基質供給は期待できない。このため硝酸がそのまま葉へ転流されるのか、グルタミン等として転流されるかは、種子中に残るデンプンからの基質供給に依存すると考えられる。また、硝酸がそのまま葉へ転流される場合、ほとんどが硝酸のまま葉に蓄積すると考えられる。そこで、現有のイオンクロマトグラフ装置 (カラムは新規購入) を用いた硝酸イオン含量の分析を葉、根および水耕液について行い、また  $^{15}N$  で標識した硝酸を用いた硝酸関連化合物の分析 (当機関の共有分析装置を使用の予定) を葉と根について行うことで実際の硝酸等の挙動を解明し、光化学系間の電子伝達遮断と硝酸の挙動との間にどのような関係があるか知る手掛かりを得る。

(5) 硝酸代謝関連酵素活性の比較解析： 硝酸等の転流の比較解析の結果を踏まえ、葉と根における硝酸還元酵素や亜硝酸還元酵素等の関連酵素活性を比較する。また、必要に応じてリアルタイムPCRを用いた遺伝子発現解析を行う (現有のApplied Biosystems社 StepOneシステムを使用)。

(6) 植物ホルモン等の関与： 硝酸の解析結果次第では、むしろ植物ホルモン等のシグナル伝達の介在が示唆される可能性もある。その場合は、根から地上部への情報伝達に関与することの知られるアブシジン酸やサイトカイニンの量的比較をELISA等により行い、

それらの関与について検証する。

(7) 単離チラコイド膜等における光合成電子伝達部分活性解析： 光化学系ⅡとⅠの間の電子伝達遮断が高地温・低気温処理中に既に起きている場合、その処理条件で葉からチラコイド膜を単離し、非循環的電子伝達の部分反応活性の解析を行う。もしいずれの活性にも特異的な低下の認められない場合は、葉の断片を用いての部分反応活性の解析等により、膜の単離過程で失われる阻害物質等の探索を行う。

(8) 電子伝達関連分子の定性的・定量的解析： 電子伝達部分活性解析特異的に阻害される部分反応があれば、関連ポリペプチドに対する抗体を用いた複合体解析 (Blue-Native PAGE) 等により、該当分子あるいは複合体の量的あるいは質的变化を明らかにする。なお特異的な低下が認められない場合には、他の実験結果を踏まえつつ必要に応じて、循環的電子伝達や熱放散等に関連したポリペプチド等にまで対象を広げ、抗体を用いた解析等により、それらの分子と電子伝達遮断の関係を検証する。

(9) カロチノイド組成の比較解析： Dual-PAMのP515/535モジュールを用いた解析で zeaxanthin 含量に大きな差の認められる場合、逆相液体クロマトグラフィ (ODSカラム) を用いて、第3葉のアセトン抽出液中の熱放散関連カロチノイド組成の比較解析も行う。これにより熱放散能力についてのより正確な把握を行う。

(10) 光合成機能のより詳細な解析： 上記の一連の結果を踏まえ、より詳細な光合成機能解析を行う。例えば低温処理時の光照射の時期を変えた場合 (明から暗、暗から明、常時明、常時暗等) の経時変化、より長期の処理の影響、あるいは養分吸収や吸水に関わる阻害剤等 (水耕液中に添加可能なもの) の影響等をDual-PAM用およびP515/535モジュールの組み合わせにより解析し、個々の事象の因果関係解明の手掛かりを得る。単離チラコイド膜を用いた  $O_2$  との同時測定には旧タイプのPAM (現有の101,102,103システム) を用いる。

(11) 障害の標的分子の解析： 上記の解析の結果、障害の標的である可能性の高い構成要素については、必要に応じて純化 (現有のGEヘルスケア社 ÄKTA Explorer 10S等を使用、純化に必要なカラム等は既に揃えてある) を行った後、硝酸およびその関連代謝物や活性酸素種に対する応答を含め、その諸性質について詳細な解析を行う。また、二次的

な変化とは思われるが、ルビスコ（CO<sub>2</sub>固定酵素）への影響を示唆する結果も得ているため、その複合体構造（Blue-Native PAGE 等による）や、活性化率（*in vivo*での活性と最大活性の比）等の解析も行う。

#### 4. 研究成果

高地温が植物の葉の低温障害を助長するというこれまで全く知られていなかった現象の発生機構を明らかにする目的で、3葉期のイネ幼苗を用いて以下の様な研究を行った。

(1) 低温下における光合成機能の比較解析：クロロフィル蛍光と P700<sup>+</sup>の同時解析結果から、高地温・低気温では、光化学系 II と I の間で電子伝達が遮断され、非循環的電子伝達と循環的電子伝達の両方が機能しなくなり、チラコイド膜内外の水素イオン濃度勾配 ( $\Delta$ pH) が消滅し、 $\Delta$ pH に依存した熱放散能力（熱放散に必要な zeaxanthin の再生能力）を喪失することが、高地温依存性低温障害の原因であると考えた。その検証の一環として、光合成解析装置（Dual-PAM）に新規購入の P515/535 モジュールを接続して、暗黒下で低温処理中に葉に 20 分間光を当てて解析し、低地温・低気温では  $\Delta$ pH が維持され zeaxanthin 生成が著しく高まるのに対し、高地温・低気温ではいずれもほとんど消失することを示した。

(2) 硝酸等の葉への転流に及ぼす高地温・低気温の影響：低温処理中の葉、根および水耕液における、無機イオンおよびアミノ酸の変動を調べたところ、低地温・低気温では根から葉へのいずれの転流も認められず、葉では NO<sub>3</sub><sup>-</sup>はほとんど、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>は全く検出できなかった。一方、高地温・低気温では 25°C の場合と同様の転流が認められた。高地温・低気温の葉では NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の特異的な蓄積が葉に起こり、高地温・低気温の葉でのみ NO<sub>2</sub><sup>-</sup>が検出された。その NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の変動パターンが、クロロフィル蛍光パラメータの一つ“Excess”の変動パターンと酷似していた。これは光化学系 II における過剰エネルギー蓄積を示すとされるパラメータであり、高地温依存性の低温障害における、電子伝達障害と NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の密接な関係が示唆される。

(3) 低温障害に及ぼす低温処理前の窒素栄養状態の影響：高地温依存の低温障害は、水耕液が硝酸を含む時に起こる。しかし硝酸飢餓の幼苗を気温 10°C + 地温 25°C 処理 (L/H 処理) すると、より顕著な障害が起こることがわかった。このような条件では、高親和性硝酸輸送体の誘導等により、L/H に特異な葉への硝酸蓄積がさらに促進されるためと考

える。

(4) 低温下における光合成機能の比較解析：高地温に依存した低温障害の最初の反応を特定する目的で、暗条件下で低温処理中の幼苗の葉について、クロロフィル蛍光（光化学系 II）と P700 吸光度変化（光化学系 I）の同時高解像度解析（Q<sub>A</sub> decay と OJIP curve の解析）を行った（図 1）。その結果、低温処理

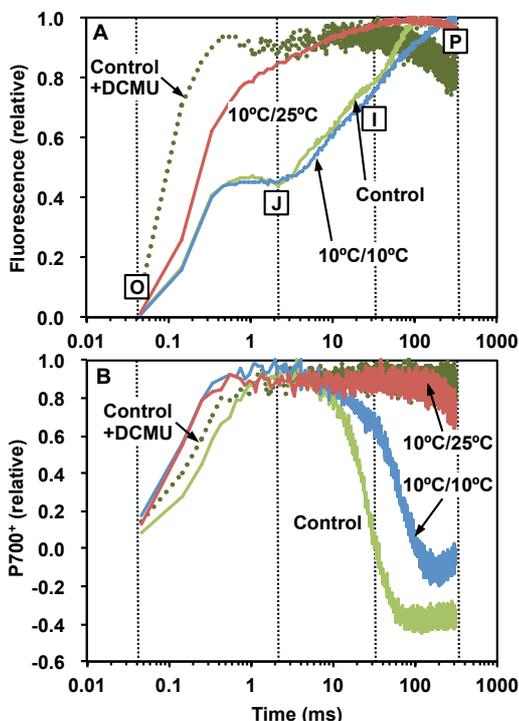


図 1. 暗順応葉に対する飽和光照射開始直後のクロロフィル蛍光 (A) と P700<sup>+</sup>シグナルの同時測定 (B)。幼苗の低温処理は、「気温 10°C / 地温 25°C」および「気温・地温共 10°C」の 2 条件について、暗黒下で 24~30 時間行った。

中で光が当たった直後から、光化学系 II 複合体の Q<sub>B</sub> 付近で電子が遮断されること、光化学系 I は光照射開始後 10-200 ミリ秒に酸化状態のまま（本来なら光化学系 II からの電子で著しく還元される）であることを示す結果を得た。これらの結果から、光の有無に関わらず高地温低気温処理により、電子の流れが Q<sub>B</sub> 付近で遮断されると結論した。

(5) 光化学系 II 複合体構成タンパク質に及ぼす影響：個々の主要構成タンパク質には量的変化がないことを示す予備実験結果を SDS-PAGE を用いたイムノブロッティング解析で得た一方で、複合体の構成に光に依存した変化があることが Blue-Native PAGE を用いたイムノブロッティング解析で明らかになった。低温処理（気温 10°C / 地温 25°C）を暗黒下で 24 時間、照明下で 4.5 時間行ったところ、約 630kDa、約 300kDa、約 240kDa の複合体の量が著しく増加し、後

者2つはCP43を含んでいなかった。光化学系II二量体(約570kDa)と光化学系II単量体(約350kDa)には顕著な変化はなかった。またCP43、CP47、Cyt b<sub>559</sub>の両サブユニットは、いずれも単量体が増加した。これらの変化は高地温依存性の低温障害に依存はしているものの、暗黒下では認められず二次的な変化と考えられる。しかし障害発生機構解明のための重要な手掛かりとなる。

L/H処理を24時間行うと光化学系IIのQ<sub>A</sub>からQ<sub>B</sub>への電子伝達が完全に遮断される。しかし、その葉から単離したチラコイド膜の電子伝達機能は低下しなかった(図2)。ま

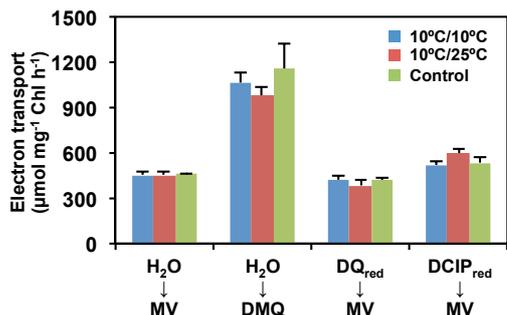


図2. 単離チラコイド膜における光合成電子伝達の部分反応。左から、全電子伝達反応(水からMVまで)、光化学系IIを含む部分反応、チトクロームb<sub>6-f</sub>複合体と光化学系Iを含む部分反応、光化学系Iを含む部分反応。幼苗の低温処理は、「気温10°C/地温25°C」および「気温・地温共10°C」の2条件について、暗黒下で24時間行った。

たその葉から抽出した光化学系構成タンパク質、およびその複合体の構成等に変化はなかった。そこに5時間程度光を当てると、単離チラコイド膜の光化学系IIの電子伝達機能が著しく低下し、抽出液中にCP43の欠如した光化学系II複合体が増加した。またCyt b<sub>559</sub>のβサブユニットの欠落も認められた。L/L処理ではこのような変化はなかった。これらのことからL/H処理を24時間行った場合のQ<sub>A</sub>からQ<sub>B</sub>への電子伝達の遮断は、光化学系IIと硝酸や亜硝酸の可逆的な相互作用によるものと考えられる。またその後の光に依存した光化学系IIの*in vitro*活性の失活も、タンパク質の分解や複合体の解離等を伴わない光化学系II複合体の不可逆的失活の結果と考える。

(6) 結論: 3年間の結果から、L/H処理では、低温の葉に蓄積した硝酸や亜硝酸と光化学系II複合体の間の直接あるいは間接的な作用により光化学系IIのQ<sub>A</sub>からQ<sub>B</sub>への電子伝達が完全に遮断される(図3の1)。この時、非循環的電子伝達のみならず光化学系Iの循環的電子伝達も機能しなくなるため、チラコイド膜内外の水素イオン濃度勾配が消失する(図3の2、3)。その結果、熱放散

(活性酸素消去系)が機能しなくなる(図3の4、5)と共に光化学系IIが過剰還元状態となり、活性酸素や過酸化脂肪を生じ、これによりチラコイド膜、葉緑体包膜、細胞膜等の生体膜が破壊され、葉の枯死に至ると考えられる。すなわち、光化学系Iの循環的電子伝達が低温障害回避に重要な役割を果たすことを明らかにした。なお、葉への硝酸や亜硝酸の蓄積と光化学系IIの電子伝達遮断の関係は今後の課題である。その後の光に依存した光化学系II複合体の変化は電子伝達の*in vitro*活性の失活の原因としては小さいため、チラコイド膜損傷の結果と考える。

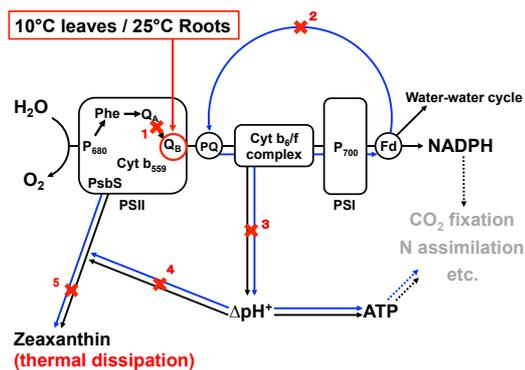


図3. 本研究より推定される高地温依存性の光合成低温障害メカニズム。Q<sub>A</sub>からQ<sub>B</sub>への電子伝達が遮断される(1)。その影響で光化学系Iの循環的電子伝達も機能しなくなる(2)。つまり循環的電子伝達と非循環的電子伝達の両方が機能しなくなるため、チラコイド膜内外の水素イオン濃度勾配(ΔpH<sup>+</sup>)が消失する(3)。zeaxanthin依存の熱放散が機能しなくなる(4~5)。このためQ<sub>A</sub>が過剰還元となり、活性酸素や過酸化脂肪が生ずる。しかしzeaxanthinの欠乏のため、活性酸素消去能も低下し、細胞損傷の原因となる。

### 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1件)

① Suzuki, K., Ohmori, Y., and Ratel, E. (2011) High root temperature blocks both linear and cyclic electron transport in the dark during chilling of the leaves of rice seedlings. *Plant and Cell Physiology* 52(9): 1697-1707. DOI: 10.1093/pcp/pcr104 (査読有)。

[学会発表] (計8件)

① 鈴木健策、大森幸美 (2012.3.16) 低気温環境下において地温はイネ幼苗の光化学系II複合体構成タンパク質に影響を及ぼす。第53回日本植物生理学会年会、京都産業大学(京都市)。

② 鈴木健策、大森幸美 (2011.9.17) イネ幼苗光合成の地温依存性の低気温障害と硝酸

蓄積。日本植物学会第 75 回大会、東京大学（東京都）。

③ Suzuki, K., Ratel, E., and Ohmori, Y. (2010.8.22) Both linear and cyclic electron flows are blocked in the chilled leaves of rice seedlings only when the roots are not chilled. 15th International Congress on Photosynthesis, Beijing, China.

④ 鈴木健策、大森幸美 (2010.3.21) イネ幼苗の低温下の光合成に及ぼす高地温の影響 (3)。第 51 回日本植物生理学会年会、熊本大学（熊本市）。

⑤ 鈴木健策 (2009.9.20) イネ幼苗の低温下の光合成に及ぼす高地温の影響 (2)。日本植物学会第 73 回大会、山形大学（山形市）。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 健策 (SUZUKI KENSAKU)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター・生産基盤研究領域・上席研究員

研究者番号：90355280

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし