

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6月1日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380091

研究課題名（和文） *Melaleuca cajuputi* の湛水耐性機構の解明研究課題名（英文） Flood-tolerant mechanism in *Melaleuca cajuputi*

研究代表者

小島 克己（KOJIMA KATSUMI）

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（和文）：熱帯の湿地に生育する樹種である *Melaleuca cajuputi* は、樹体に使う糖を減らし、その分の糖をエネルギー代謝に使うことで、湛水による酸素不足で根がエネルギー（ATP）不足になることを防いでいた。その糖の配分変化は生育段階で異なることが明らかとなった。また湛水が長期に及ぶと、茎や根に空洞が形成されることで根の酸素欠乏が緩和されていた。*M. cajuputi* は無酸素条件でも ATP を生産することができるミトコンドリアを持っていることもわかった。

研究成果の概要（英文）：In flooded roots of *Melaleuca cajuputi*, a tree species in tropical swamps, lower allocation of sugars to body constitution and their higher allocation to energy metabolism allowed high energy status. The manner of changes in sugar allocation was different between two kinds of seedlings with different growth stages. When flooded conditions were prolonged, lacunae formed in stem and roots mitigated oxygen shortage in roots. In addition, it was found that *M. cajuputi* has mitochondria that can generate ATP under anaerobic conditions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：*Melaleuca cajuputi*・低酸素・エネルギー代謝・木質化・通気組織・メタボローム・ミトコンドリア・スーパーコンプレックス

1. 研究開始当初の背景
東南アジアでは、湿地の土地利用の最適化が

求められている。湿地を林地として利用する場合、湛水条件は、湿地環境の中で植物の生

育に最も影響を与える環境条件であり、これに対する造林木の耐性機構の解明が造林技術の開発には欠かせない。

湛水環境下では、陸生植物の根は十分な酸素を得られず、呼吸が制限されてエネルギー(ATP)不足の状態となり、ストレスを受ける。湛水環境のような低酸素条件下で、湛水耐性を持つ植物は、通気組織形成などの形態的な適応や、解糖系とアルコール発酵系の代謝経路の賦活化によって、根を高いエネルギー状態に保っていると考えられている。しかし、形態変化によるエネルギー代謝への影響や、解糖系の賦活化などの代謝反応のエネルギー状態への寄与は未だ不明な点があり、また全ての高等植物に共通する現象ではないため、湛水ストレスへの代謝応答と耐性との関連の解明を進める必要がある。さらに、低酸素条件下での機能的意義をほとんど無視されてきたミトコンドリアについても、無酸素下で ATP を生産する機能を有する可能性があることから、湛水耐性との関連を調べる必要がある。

高い湛水耐性を備えたフトモモ科樹木の *Melaleuca cajuputi* Powell を材料として、低酸素条件下での解糖-アルコール発酵系の応答を調べてきたが、この代謝経路だけ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ていない。

2. 研究の目的

本研究では、湿地環境の中で最も植物の生育に影響を与える低酸素条件下での樹木の適応機構を包括的に明らかにすることを目的とし、*Melaleuca cajuputi* を主な実験材料として、細胞質における炭素代謝およびミトコンドリアの TCA 回路と電子伝達系に焦点を絞り、無酸素条件下での主要 ATP 生産経路の検索を行う。これらにより、植物の無酸素条件下での新規の ATP 生産機構を解明し、湛水耐性植物 *Melaleuca cajuputi* の耐性機構を明らかにし、湿地造林技術の確立に対し基礎科学上の貢献をする。

3. 研究の方法

(1) 低酸素条件下での炭素代謝

自然光ガラス室(昼/夜:30°C/25°C)で、未木化苗(播種後2~3カ月)および木化苗(播種後6~7カ月)を、通気組織の形成を促すために培養液中の酸素濃度を2 mg/L以下にした区と、約7 mg/Lの対照区を設けて3週間水耕栽培した。前者の苗の地際の茎の空隙率が後者の苗よりも高くなり、それぞれを高空隙苗、低空隙苗とした。木化・未木化、高空隙・低空隙の組み合わせでできた4種類の苗を、それぞれ培養液中の酸素濃度が約7 mg/L(対照区)と、0.1 mg/L以下(低酸素区)の2区に分けて48時間の処理を施した。

根の糖(デンプン、スクロース、グルコース、フルクトース、イノシトール、キシロース、アラビノース)、有機酸(ギ酸、酢酸、乳酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、シキミ酸、ガリック酸)、スクロース分解・解糖系中間代謝物(グルコース-6リン酸、フルクトース-6リン酸、UDP-グルコース、グルコース-1リン酸、フルクトース-1,6ビスリン酸、3-ホスホグリセリン酸、アセチル CoA)の濃度を定量し、スクロース分解・解糖系酵素(酸性インペルターゼ、細胞壁インペルターゼ、細胞質スクロースシンターゼ、膜結合型スクロースシンターゼ、UDP-グルコースピロホスホリラーゼ、グルコキナーゼ、フルクトキナーゼ、ATP依存ホスホフルクトキナーゼ、ピロリン酸依存ホスホフルクトキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、アルコール脱水素酵素)の活性を測定した。根のATPとADP、AMPの量を測定し、アデニル酸エネルギー充足率(AEC)を計算した。また、処理中に¹³CO₂を地上部に曝露し、光合成産物の根への転流量と、根の可溶性、構造的、デンプン画分への分配比を求めた。

(2) 無酸素条件下でのミトコンドリアにおけるATP生産

樹木根からミトコンドリアを単離した例が極端に少ないため、ステップグラジエントとセルフグラジエントのパーコール濃度、高張液組成を変えて、ミトコンドリアの単離条件を検討した。

ミトコンドリアのスーパーコンプレックスを分離するために、単離したミトプラストを用いて膜酵素の可溶化に用いる界面活性剤について検討し、さらに電気泳動後のタンパク質のバンドについて、活性染色を行い、各バンドの複合体組成を確定した。膜酵素の可溶化にはジギトニン、Triton X-100、ドデシルマルトシド、エスシン、deoxy-BIGCHAPを用いて可溶化を試みた。

低酸素条件下でのミトコンドリアのスーパーコンプレックス組成の変化を調べるために、木質化した苗を用いて(1)の本処理と同様に空気通気した苗と窒素通気した苗の根からミトコンドリアを抽出し、膜タンパク質を可溶化した後BN-PAGEを行った。

ミトコンドリアの電子伝達系が電子を受け渡すことができる、酸素以外の電子受容体を探索するために、ミトコンドリアの膜間電位測定法を検討した。電位依存性蛍光色素であるTMRMとサフラニンを用いて、ミトコンドリアに投与後、呼吸基質であるリンゴ酸、コハク酸、ピルビン酸を加え、蛍光強度変化を観察した。

ミトコンドリアの無酸素条件下でのATP生産を確認し、また、ATP生産経路を絞り込むために、木質化した苗を用いて(1)の本処理

と同様に空気通気した苗と窒素通気した苗の根からミトコンドリアを抽出し、グルコースと NADP、ヘキソキナーゼ、グルコース 6 リン酸脱水素酵素を投与してミトコンドリアの ATP 放出速度を NADPH 由来の蛍光変化から観察した。反応開始前に、セル内の反応液にグルコースオキシダーゼとカタラーゼを加え、セルのヘッドスペースに窒素を通気することで、無酸素条件を作り出した。

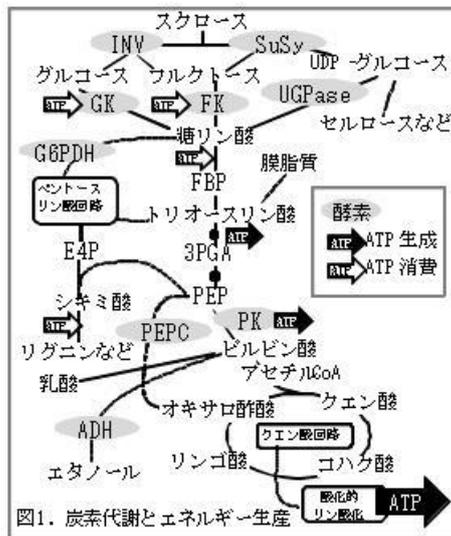
4. 研究成果

(1) 低酸素条件下での炭素代謝

空隙率の大小、木化の有無によらず、いずれの苗においても低酸素区で AEC が 0.8 付近に保たれており、低酸素環境が根のエネルギー状態に与える影響は小さかった。

① 未木化苗の炭素代謝

解糖系の上流では、低空隙苗でインベルターゼ (INV) の活性が低酸素処理により低下したが、単糖および糖リン酸の濃度には影響がなかった。高空隙苗では、解糖系上流の酵素活性に低酸素処理による影響はなかったが、単糖および糖リン酸の濃度が増加した。グルコース-6 リン酸脱水素酵素 (G6PDH) の活性が低酸素処理により低下したことから、ペントースリン酸回路への炭素の供給が抑制されたことが単糖および糖リン酸の濃度の増加に寄与したと考えられる。空隙率の大小によらず低酸素処理により解糖系中流の 3-ホスホグリセリン酸 (3PGA) の濃度が増加



した。3PGA の上流のフルクトース-1,6 ビスリン酸 (FBP) の濃度に低酸素処理による影響が認められなかったため、その中間に位置するトリオースリン酸から分岐する膜脂質合成が抑制され、より多くの炭素が解糖系に供給されたと考えられる。低酸素処理による 3PGA の増加率は低空隙苗に比べ高空隙苗で小さかったため、高空隙苗では膜脂質合成の抑制が小さかったと考えられる。ペントースリン酸回路で産生されるエリトース-4 リ

ン酸 (E4P) と、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) からシキミ酸が合成され、シキミ酸から ATP を消費して芳香族アミノ酸やリグニンなどが合成される。空隙率の大小によらずシキミ酸の濃度が低酸素処理により低下したことから、二次細胞壁合成へのリグニンの供給が抑制されたと考えられる。クエン酸回路の有機酸濃度は低酸素処理により低下したが、一部の非湛水耐性種で見られるような著しい低下は認められなかった。発酵代謝に関わるアルコール脱水素酵素 (ADH) の活性が低酸素処理で増加したが、その増加率は低空隙苗に比べて高空隙苗で小さかった。低酸素環境下では、様々な植物においてピルビン酸から乳酸やエタノール等を生成する発酵代謝の活性が高まり、解糖系の活性が高まること知られており、ADH の活性の増加は根内酸素濃度の低下の指標と考えられている。高空隙苗では、低空隙苗よりも ADH の活性の増加率が小さかったことから、空隙が通気組織として機能し、低酸素環境下における根内酸素濃度の低下が低空隙苗に比べ緩和されたと考えられる。

② 木化苗の炭素代謝

低空隙苗では、膜結合型のスクロースシンターゼ (SuSy) の活性が低酸素処理により低下したが、高空隙苗では影響がなかった。膜結合型 SuSy はセルロース合成酵素にその基質となる UDP-グルコースを供給する機能を持っており、低空隙苗ではセルロース合成などへの炭素の供給が抑制されたと考えられる。また、低空隙苗ではフルクトキナーゼ (FK)、UDP-グルコースピロホスホリラーゼ (UGPase) の活性が低酸素処理により低下したが、高空隙苗では影響がなかった。高空隙苗では G6PDH 活性とシキミ酸の濃度が低下したことから、シキミ酸合成経路への炭素の供給が抑制され、リグニンなどの芳香族化合物の合成による ATP 消費が抑制されたと考えられる。¹³CO₂ 曝露実験から、低酸素処理で光合成産物の構造的画分への分配比が減少し、可溶性画分への分配比が増加しており (図 2)、低空隙苗ではセルロース合成の抑制が、高空隙苗ではリグニン合成の抑制がこの分配比の変化の原因のひとつであると考えられる。低酸素処理による構造的画分への分配比の減少は未木化苗でもみられたが、木化苗でより顕著だった。空隙率の大小によらず低酸素処理により 3PGA の濃度が増加したが、FBP の濃度には影響が認められず、膜脂質合成の抑制が示唆された。また、高空隙苗で 3PGA の濃度の増加率が低空隙苗よりも小さかったため、低酸素処理による膜脂質合成の抑制が小さかったと考えられる。ピルビン酸キナーゼ (PK) の活性が低酸素処理により増加したが、その増加率は低空隙苗で高空隙苗に比べて大きかった。低空隙苗では、ト

リオースリン酸より下流の基質レベルのリン酸化による ATP 生産量が増えたと考えられる。空隙率の大小によらず、クエン酸回路のコハク酸、リンゴ酸の濃度は低酸素処理の影響を受けなかった。高空隙苗では低酸素処理による ADH 活性や乳酸濃度の増加率が低

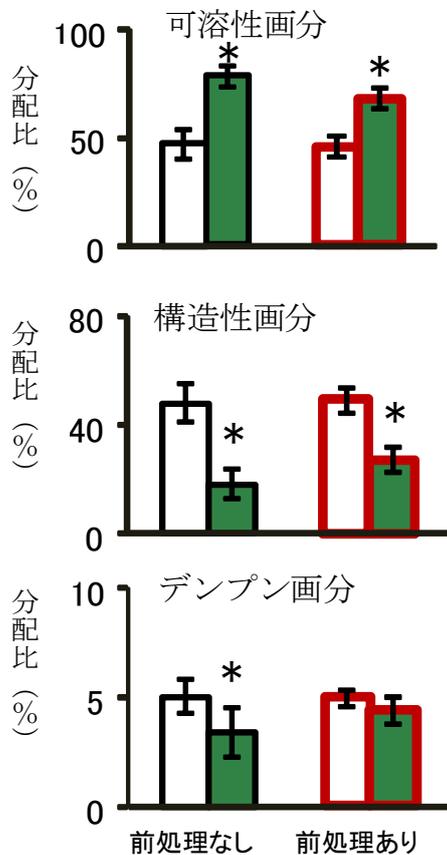


図2. 空気通気(□)もしくは窒素通気(低酸素本処理; ■)した木質化苗の根における光合成産物の分配。縦軸は画分の合計に対する百分率、誤差棒は標準偏差、*は本処理間での有意差(p < 0.05)を示す。

空隙苗よりも小さく、未木化苗と同様に通気組織の発達によって低酸素環境下における根内酸素濃度の低下が緩和されたと考えられる。このため、高空隙苗では、酸化的リン酸化による ATP 生産の障害が緩和され、低空隙苗に比べて全般的に低酸素による解糖系への影響が弱まったと考えられる。

(2) 無酸素条件下でのミトコンドリアにおける ATP 生産

ミトコンドリアの単離・精製を、草本植物で確立された方法を元に試みた。既存の方法の高張液組成ではパーコールグラジエント中にアグリゲーションを起こしてしまい、ミトコンドリアの単離が困難であったが、カリウムをナトリウムに変えることで、アグリゲーションを防ぐことができた。また、草本植物

に比べ、樹木では様々な密度のミトコンドリアがあり、ステップグラジエントでは、プラスチックやペルオキシソームの混入の少ないミトコンドリアを多量に得ることが困難だった。マンニトール高張液を用いたパーコールのセルフグラジエントでプラスチックを取り除き、続いてスクロース高張液を用いたパーコールのセルフグラジエントでペルオキシソームから分離することが可能となった。得られたミトコンドリア画分は、タンパク質量当たりのフマラーゼ活性とチトクローム c オキシダーゼ活性が高く、チトクローム c ペルオキシダーゼ活性は見られなかった。本研究により樹木からのミトコンドリアの単離・精製が可能になったことで、樹木を用いたミトコンドリアの研究の道が開かれた。

膜タンパク質の可溶化条件設定については、deoxy-BIGCHAP、エスシンでは、電気泳動後のタンパク質のバンドが現れなかった。ジギトニン、ドデシルマルトシド、Triton X-100 では、複数のバンドが確認でき、9 g/g-protein の濃度でジギトニンを用いた時が最も鮮明なバンドが得られ、高分子量のタンパク質バンドを可視化できていた。さらに、活性染色と既往の情報から、1500 kDa (複合体 I + III₂; スーパーコンプレックス) や 1000 kDa (複合体 I; コンプレックス)、600 kDa (推定複合体 V; コンプレックス)、500 kDa (推定複合体 III₂; スーパーコンプレックス)、350 kDa (複合体 IV; コンプレックス) のバンドが推定・確認できた。本研究が、樹木のミトコンドリアから電子伝達系のスーパーコンプレックスを分離した初めての例である。

低酸素条件下でのミトコンドリアのスーパーコンプレックス組成について調べたところ、低酸素処理をした苗と対照苗とに組成の差異が認められず、低酸素処理をするとミトコンドリアタンパク質量当たりのスーパーコンプレックス量が減少する傾向にあった(図 3)。低酸素環境下でもスーパーコンプレックスなどの電子伝達系タンパク質が存在していることから、電子伝達系を介した ATP 生成が行われていることが示唆されるが、新たなタンパク質がスーパーコンプレックス中に組み込まれて低酸素下での電子伝達が行われている可能性は低い。

単離したミトコンドリアの膜間電位の蛍光試薬を用いた測定を試みたが、蛍光試薬投入後ミトコンドリアが不溶化し、測定不能だった。

無酸素下でのミトコンドリアの ATP 放出速度を測定したところ、ATP 非存在下でグルコースからグルコース-6 リン酸ができていたことがわかった。また、ADP を基質として ATP が生産されることがわかった。この反応に ATP 合成酵素(コンプレックス IV)が関与しているかは、明らかにできなかった。しかし、

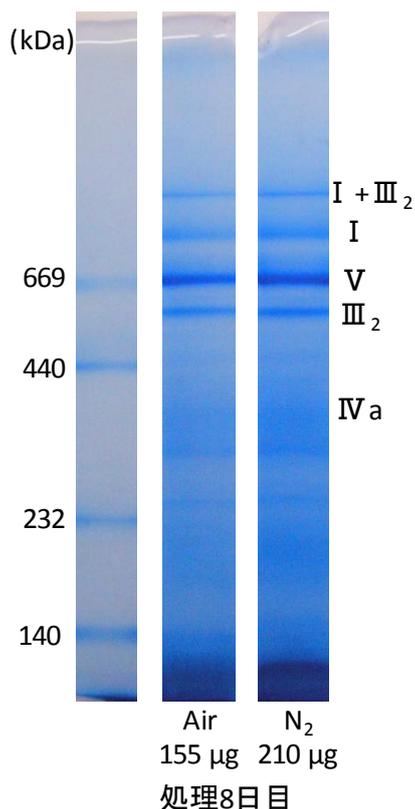


図3. 空気通気もしくは窒素通気した木質化苗の根から単離したミトコンドリアのスーパーコンプレックス組成。左のレーンには分子量マーカー。レーン下に示した重量は、電気泳動したタンパク質量。

低酸素処理をした苗のミトコンドリアタンパク質あたりのグルコース-6リン酸生成速度とATP放出速度は、空気通気した苗よりそれぞれ18倍と13倍速く、低酸素環境によって、どちらの生成経路も賦活化されていた。無酸素条件下で高等植物のミトコンドリアがATPを生産していることを示した最初の例となった。今後、ATP生産に対してのアデニル酸キナーゼや電子伝達系の関与を調べることによって、酸素を必要としないミトコンドリアのATP生産経路を明らかにすることができる。

(3) *Melaleuca cajuputi* の湛水耐性機構

これまでの結果から、低酸素処理による解糖系の顕著な賦活化はみられなかったが、炭素が構造的有機物に少なく配分され、エネルギー代謝に多く配分されることで *Melaleuca cajuputi* は低酸素環境に適応していることがわかった。また、炭素の配分変化は、*Melaleuca cajuputi* の生育段階で異なることが明らかとなった。湛水初期に木質化苗は、セルロース合成の抑制と膜脂質合成抑制によって、未木質化苗は、若干のセルロース合成の抑制と膜脂質合成抑制によって、解糖系

中下流域のエネルギー代謝を高めており、湛水が長期に及ぶと、通気組織の発達とともに、木質化苗は、リグニンなどの芳香族化合物合成の抑制と膜脂質合成抑制によって、未木質化苗は、膜脂質合成抑制によって低酸素環境下で解糖系中流域への炭素供給を高めていると考えられる。解糖系下流まで来た炭素は、一部はエタノールや乳酸などの最終産物となり、一部はミトコンドリアでATP生産に使われることが示唆された。本研究では、測定法の確立などのシステム構築が主となって、ミトコンドリアでのATP生産経路が特定できなかったが、今後、同じシステムを使って酸素を必要としないATP生産経路を特定し、他の樹木での同経路の有無を調べることで、本知見を湿地造林の際の樹種選択、育種、立地選択に生かしていく。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 嘉山友理子, 山ノ下卓, 則定真利子, 小島克己, 根の低酸素環境下における *Melaleuca cajuputi* と *Eucalyptus camaldulensis* の貯蔵炭水化物の動態, 第123回日本森林学会大会, 2011.3.26-28, 宇都宮市.

2. 山ノ下卓, 影山 溪, 古川原聡, 則定 真利子, 小島克己, 生育段階が異なる *Melaleuca cajuputi* の根の低酸素環境における炭素代謝, 第122回日本森林学会大会, 2011.3.26-3.27, 静岡市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 克己 (KOJIMA KATSUMI)
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) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: