

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27日現在

機関番号：53101
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21580187
 研究課題名（和文） 樹木に特異的な温度感应性色素サイクルとオルガネラクロストークによる環境適応機構
 研究課題名（英文） Tree specific pigment cycles and organelle cross talks as environmental adaptations
 研究代表者
 柴田 勝（Shibata 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（和文）：

季節的な周期性を示す環境適応機構の一つとして、樹木の葉内では草本植物にはほとんど見られない色素（ α -カロチン、ルテインエポキシド）を中心に8種類のカロチノイドが協調的に応答していた。これらの色素間の変動や光利用効率などを詳細に分析することで、「4種類の色素サイクルと1種類の光利用効率を制御する因子」が機能していたことを突き止めた。このような応答により、草本植物とは明らかに異なる光合成の環境適応機構が樹木に存在していることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Leaves of tree plants contain some specific pigments such as α -carotene and lutein epoxide derivatives that are not involved in herbaceous plants. The alternation in growth condition caused the vibrations of contents and components of the specific pigments in leaves. The biochemical responses to environmental stresses in tree plants were detected as co-operative functions and lutein epoxide cycle. We showed that the energy control through pigments alternations operated as tree specific environmental adaptation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,100,000	4,810,000

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： 樹木・色素・ミトコンドリア・葉緑体・光合成

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、酸性雨や土壌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となる。このた

め、半乾燥地域などの環境条件の厳しい生育不良地域においても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。現在、光合成阻害と活性酸素に着目した研究から、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。

(I) 活性酸素生成の抑制能力（還元力・光エネルギー散逸）

(II) 活性酸素の消去能力

(III) 光阻害からの回復能力

活性酸素を除去する酵素の能力を強化した樹木などが作成されてきたが、野外の多種多様な環境マルチストレスには適応できず、必ずしも野外生育には適していなかった。さらに、常緑樹は草本植物に比べて葉寿命が長く、様々な環境変化にさらされるが、樹木に対するストレス生理学的な基礎的情報が草本植物に比べて極端に不足している。これらのことから、樹木では、特定の機能強化のみではなく、マルチストレスに関与する遺伝子群の解析、生態学的な適応などを併せ持つ複合的な理解が必要である。

(1) このような観点から樹木の光合成と葉内代謝との関係を調べる過程において、季節的な葉内代謝変化として草本植物にはほとんど見られない色素（ α -カロチン）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。さらに、協調的なカロチノイド置換反応は、光受容体である色素の変化であるにもかかわらず生育光環境よりも生育温度により強く影響を受けており、樹木に特異的な生育温度への光合成の最適化機構であることを示唆した。しかし、この代謝応答がどの程度、ストレス回避に関与し、樹種間のストレス感受性の違いに影響しているかについては明らかではない。

(2) 一方、上記(I)の『活性酸素生成の抑制能力』の観点から、持続的な光合成の維持（最適化）には、余剰エネルギー散逸機構が必須である。最近、その一つとして葉緑体以外のミトコンドリア(Mit)などの細胞内微小器官（オルガネラ）での還元力の再分配・散逸過程（オルガネラネットワーク）が重要であることが明らかとなった。しかし、森林科学の分野では、オルガネラネットワークによるストレス枯死回避という考え自体、存在していない。このため、Mit代謝による樹木のストレス耐性について葉緑体の光合成およびMitの呼吸の電子伝達系に注目した。ストレス耐性に関与するオルガネラ間の還元力の散逸過程を調べるには、機能的なUQの酸化還元(redox)と光合成電子伝達活性との定量的な関係を明らかにしなければならない。また、樹木Mitが季節的な光合成の最適化により、マルチストレス

への耐性にどの程度寄与しているのか全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究は、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以下の2項目の研究により樹木の環境応答・樹種間のストレス耐性因子を明らかにすることを目的としている。樹木に特異的な葉内代謝による環境ストレス耐性機構とその役割を明らかにする。

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ために以下の研究を行った。

(1) （樹木に特異的な環境応答）

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・木本植物の環境適応機構・ストレス耐性機構の違いとその役割を明らかにする。

(2) （オルガネラネットワーク）

活性酸素生成の抑制には、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*での葉緑体過剰還元力の消去にMitの機能が重要であることから、葉緑体のエネルギー（還元力）生成機構とMitのエネルギー散逸機構との代謝ネットワークを示し、葉緑体での還元力生成機構とミトコンドリアでの散逸機構との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)：樹木に特異的なストレス回避機構

一般的に草本植物の葉片には α -carotene (α -Car)ではなく β -carotene (β -Car)のみが含まれているが、樹木葉では α -Car が β -Car と置換し、存在している。 α -Car 量は季節的に周期変動し、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、過剰なエネルギーを熱として放散させることで活性酸素の生成を抑制する環境応答を示すことが知られている。

①色素組成が葉緑体電子伝達に与える影響

樹木葉は草本植物には見られない α -Car を中心に季節的に全色素の50%以上を変化させる。この組成変化によるストレス耐性の定量化を行うために、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、その阻害および回復過程を光合成活性、クロロフィル蛍光から、NPQ(熱成分)、 Φ_{PSII} (PSII量子収率)、ETR(電子伝達速度)、Fv/Fm(最大光合成量子収率)を求め、解析を行った。

②光受容体の温度変化を通じた光合成活性・量子収率に与える影響

生育温度により色素組成が大きく変化することから、温度・色素組成・光合成の関

係を明確にするために、色素組成の異なる樹木葉の光合成・電子伝達活性等 (NPQ, Φ_{PSII} , Fv'/Fm') の温度依存性を調べた。

③置換した色素の機能評価

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。色素サイクルにより置換した色素が実際にどの程度、機能するかを調べるために、光ストレスを与えた樹木葉から単離したチラコイド膜を用いて、mild-PAGE により分離・精製した光捕集色素タンパク質複合体 (LHC) の解析を行った。

(2) 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)。

オルガネラ間の物質輸送に基づいたエネルギー (還元力) 移動が植物のストレス回避にとって重要だと認識されているにもかかわらず、野外での環境変化に応答したこれらの相互作用についてはほとんど分かっていない。また、木本植物の光合成、樹木生理分野ではこのような考え方自体、存在していない。これらのことから、ミトコンドリアによる葉緑体の過剰還元力の散逸過程・能力について調べた。

①樹木のミトコンドリアおよび葉緑体のキノン redox と AOX 活性の年変化

植物のミトコンドリア (Mit) のみに存在している電子伝達経路 (AOX 経路) が、余剰エネルギーの消費に関与していることが示唆されてきたが、樹木において AOX の活性、量的な変化については、全く知られていない。このことから、年間の Mit 呼吸活性 (部分阻害) と AOX 量の季節変動を酸素電極、western-blotting により調べた。

②機能的 UQ と電子伝達との関係昨年度開発したプラストキノン(PQ), ユビキノン(UQ)の同時測定法により、葉片の UQ 酸化還元状態(redox)の測定は可能であるが、Mit 呼吸鎖で実際に機能している UQ とリザーバ (plastoglobule 等の顆粒に存在) UQ を分別して測定する必要がある。このためにオルガネラ膜分画後に UQ redox を測定することで、キノンから光合成と Mit 呼吸との関係を明らかにする。

③葉緑体・ミトコンドリアの電子伝達活性に与える諸因子

環境変化に対して UQ や PQ の酸化還元レベルがどの程度、安定であり、電子伝達鎖の酸化還元にはどのような因子が重要であるかを葉緑体の PQ, Mit の UQ の酸化還元状態から比較を行う。このために、HPLC を用いて葉令、葉寿命の異なる植物種に対して、UQ 酸化還元レベルを測定した。

④葉緑体およびミトコンドリア電子伝達鎖の相互 redox

Mit 呼吸活性の阻害が葉緑体の電子伝達に与える影響を調べるために、樹木葉に Mit 電子伝達阻害剤を処理し、二次元クロロフィル蛍光測定装置によりクロロフィル蛍光を経時的に測定した。

4. 研究成果

樹木葉は草本植物には見られない α -Car を中心に季節的に変化させる。この組成変化によるストレス耐性の定量化を行うために、光と温度条件の異なる環境で生育させた樹木葉のカロテノイド含量、それらの組成および葉緑体光合成の光利用効率の測定を行った。

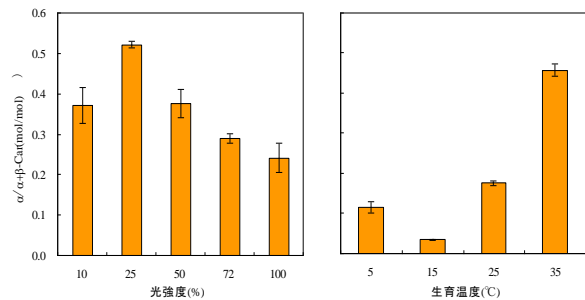


図 1. 生育光強度、生育温度がゲッケイジュ葉片のカロテン比率 ($\alpha/(\alpha+\beta\text{-Car})$) への影響

その結果、強光・弱光での量子収率 (Φ_{PSII}) は、生育温度・光強度に関わらず樹木特異的な色素の割合が高いものほど高く、樹木の色素応答により、光利用効率を高める可能性が示された(図1)。

そして、弱光生育と高温生育の樹木葉の α -Car 含量の増加が観察され、各因子により α -Car 含量が変動することを示した。そして、葉内の α -Car 含量の増加に伴い、電子伝達鎖での弱光に対する光エネルギー利用効率が上昇していた。これらの結果から、樹木は弱光および高温生育において葉内の α -Car 含量を増加させるなどカロテノイド組成を変化させることにより、最適な光合成を維持する機構の存在を示唆することができた。

カロテン ($\text{Car}=\alpha\text{-Car}+\beta\text{-Car}$) の変化において α -Car と β -Car の総量が一定であり、 α -Car と β -Car が相互置換して存在することを示唆していた。実際、各光化学系の反応中心を単離して調べたところ、 α -Car と β -Car の相互置換を示す結果が得られた。次いで、 α -Car から合成される Lut, Lx を含めた α -branch pigments (α -branch) と β -Car から合成される Vio cycle 色素類等の β -branch pigments (β -branch) について、それらの量的関係を調べた。

その結果、反応中心のみに存在する Car と LHC のみに存在するキサントフィル類 (Xan)

は、その存在部位が異なるにも関わらず、樹木特異的な色素である α -Car の量により、高等植物の基本的な色素類の量的なバランスが調整されていた (図 2, 3, 4, 5))。

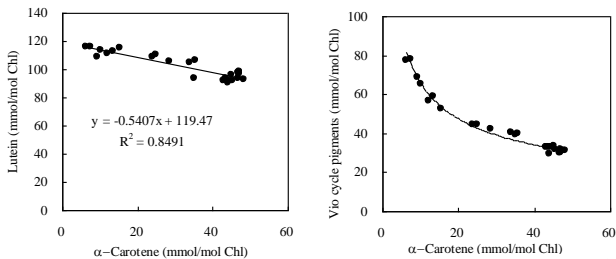


図 2. α -カロテン量の変化がルテイン量に与える影響

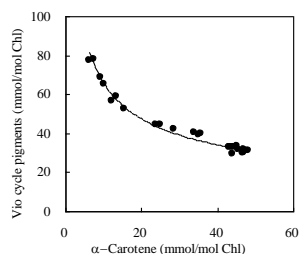


図 3. α -カロテン量の変化がピオラキサンチンサイクル色素量に与える影響

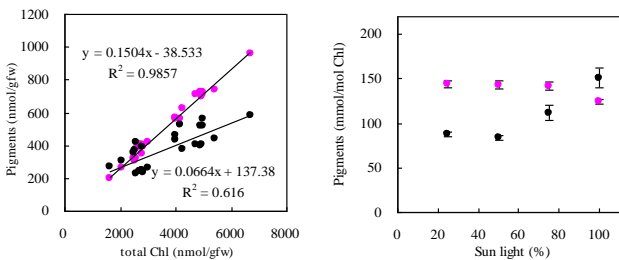


図 4. クロロフィルの増加に伴う ϵ -Path、 β -Path 量変化

図 5. 光強度の変化による ϵ -Path、 β -Path 量変化

以前の研究データから7種の色素相互変換の結果得られるカロチノイドサイクルは、Vio cycle色素(=Vio+Ant+Zea)を増加させるが、これらが実際に機能しているかを調べるために、Vio cycle色素量に対して強光(Vio,max)と暗処理(Vio, min)でのVio変化量(Δ Vio=Vio,max - Vio, min)を測定した。その結果、カロチノイドサイクルにより機能的なVioが増加することが分かった。そして、強光・弱光での量子収率(Φ_{PSII})は、生育温度・光強度に関わらず α -Car割合の高いものほど高く、 α -Carによる光利用効率を高める可能性が示された (図6)。

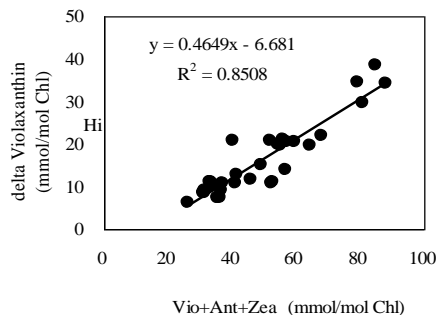


図 6. 光照射に伴う Violaxanthin 変化量

過剰な光エネルギーを熱に変換する機構として寄生植物や一部の樹木においてLutein cycle (Lut \leftrightarrow LxLut cycle)の反応が、 α -Carを持つ樹木葉では、Lxが生成しやすく、比較的Lutein cycleが観察されやすかった。

1-1: 光受容体の温度変化を通じた光合成活性・量子収率に与える影響

生育温度、炭酸ガス濃度、UV 条件、光強度の異なる環境において、グッケイジュまたはモミを生育させ、色素組成および蛍光測定を行った。その結果、生育温度では、その樹木の自生環境に近い温度で最も色素組成が安定し、高炭酸ガス濃度において光合成を律速する葉内のコンダクタンスの低下がみられた。より弱光で色素組成が安定し、その時の光利用効率が有意に上昇していた。

樹木としての色素組成変化の意義として、生育温度、UV 照射、光環境のデータから、この色素組成の変化は、北方系樹木、特に針葉樹で顕著であり、さらに高山または林床などストレス環境において優に樹木特異的な色素組成となることが分かった。このことから、この色素変化は、樹木が持つ多様な環境条件で生きていくための環境適応であることが示唆された。

葉緑体のエネルギー(還元力)生成機構とMitのエネルギー散逸機構との関係(代謝ネットワーク)の関係について、以下の3実験について実験を行った。

ATP生産に共役しないこの経路は葉緑体で使いきれずに過剰になっている電子を効率良く利用すると考えられ、ミトコンドリア(Mit)のAOX経路が光による生育阻害に対してストレス応答機構として働いている事が示唆されている。しかし、AOXがどの程度の過剰電子の散逸に関与しているかは分かっておらず、光合成活性の制御への寄与も明確でない。そこで過剰電子の消費機構としての呼吸鎖の役割について検討するために、阻害剤によって呼吸鎖の電子伝達を制御し、光合成活性およびクロロフィル蛍光を測定した。実験を行った結果、AOX経路が葉緑体で発生した過剰電子の散逸系として機能しており、過剰電子がMitにより適切に消費されることで、光合成の効率を維持していることが示唆された。

樹木のミトコンドリアおよび葉緑体のキノンredoxとAOX活性の年変化

樹木の表皮を20%剥離し、植物のミトコンドリア(Mit)のみに存在している電子伝達経路(AOX経路)を阻害する試薬を作用させ、葉緑体の光合成に与える実験を行った。しかし、年間を通じたその変化については、データが得られていない。酸素電極を用いSHAM濃度変化に対するユズリハの呼吸(O_2

uptake) 速度と光合成 (O_2 evolution) 速度の変化を測定した結果、SHAM 1~2 mM で呼吸、光合成速度に阻害がみられた (図 7)。また、パルス変調蛍光測定器で SHAM 濃度変化に対する光合成効率を示す $\Phi PSII$ と熱放散を示す NPQ の変化を測定した結果、SHAM 0.5~2 mM で NPQ の増加、 $\Phi PSII$ の減少がみられた (図 8)。これらの結果より、Mit の呼吸が阻害されると、葉緑体の熱放散で電子を消費し、光合成の最適化が行われることが確かめられた。その結果、草本植物よりレスポンスは遅いが樹木葉においても、Mit による葉緑体の過還元力の散逸過程が存在することが分かった

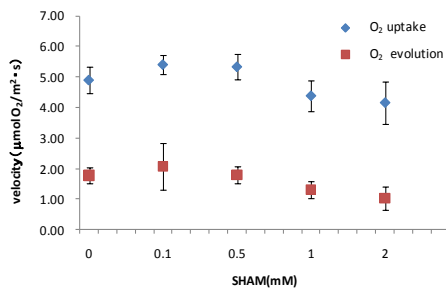


図 7. SHAM 濃度変化に対するユズリハの呼吸速度および光合成速度の変化

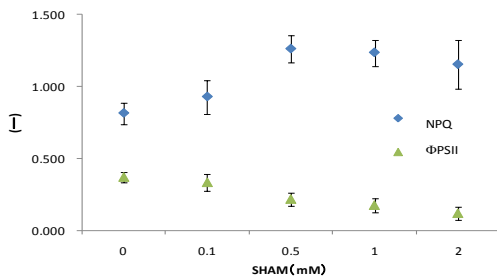


図 8. SHAM 濃度変化に対するユズリハの光合活性の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ① Keisuke Yoshida, Chihiro K Watanabe, Takushi Hachiya, Danny Tholen, Masaru Shibata, Ichiro Terashima, Ko Noguchi, Distinct responses of the mitochondrial respiratory chain to long- and short-term high light environments in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Environment*, 34, 618-628, 2011.

- ② Keisuke Yoshida, Masaru Shibata, Ichiro Terashima, Ko Noguchi, Simultaneous Determination of in vivo Plastoquinone and Ubiquinone Redox States by HPLC-Based Analysis, *Plant Cell Physiology*, vol51, 836-841, 2010.
- ③ Tsuneaki Takami, Masaru Shibata, Yoshichika Kobayashi, Toshiharu Shikanai, De novo biosynthesis of fatty acids plays critical roles in the response of the photosynthetic machinery to low temperature in *Arabidopsis*, *Plant cell Physiology*, 51, 1265-1275, 2010.
- ④ Ryouichi Tanaka, Maxi Rothbart, Seiko Oka, Atsushi Takabayashi, Kaori Takahashi, Masaru Shibata, Fumiyoshi Myouga, Reiko Motohashi, Kazuo Shinozaki, Bernhard Grimm, Ayumi Tanaka, LIL3, an LHC-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis by stabilizing geranylgeranyl reductase, *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 107, 16721-16725, 2010.

〔学会発表〕 (計 14 件)

- ① 坂牧康平, 柴田勝:「季節変化に伴う樹木葉の生理的变化～呼吸による光合成の最適化～」, 第 17 回高専シンポジウム, 2012.1
- ② 柴田 勝, 秋山 雄希:「葉内の光応答性プラストキノンの定量とその酸化還元応答」, 第 17 回高専シンポジウム, 2012.1
- ③ 秋山 雄希, 津山 孝人, 柴田 勝:「葉内の光応答性プラストキノンの分別定量とその酸化還元応答」, 第一回北陸植物学会, 新潟大学, 2011.6.
- ④ 柴田勝・樋山麻美・松本拓太, 樹木特異的な色素サイクルが光合成電子伝達に与える影響, 日本森林学会 第 121 回大会, 筑波大学, 2011.3.
- ⑤ 柴田勝・秋山雄希・樋山麻美, 機能性プラストキノンの定量・定性, 第 52 回 日本植物生理学会年会, 東北大学, 2011.3.
- ⑥ Akiyama Yuki, Akita Syunsuke and Shibata Masaru, Determination and physiological functions of active quinones in plant intact leaves, 17th Asia Symposium on Ecotechnology, 12th Nov 2010.
- ⑦ Keisuke Yoshida, Chikako K Watanabe, Takushi Hachiya, Masaru S Shibata, Ichiro Terashima, Ko Noguchi, Distinct responses of the mitochondrial respiratory chain to long- and short term high light environments in *Arabidopsis thaliana*. 第一回光合成学会, 東京大学, 2010, 6.
- ⑧ 柴田勝・樋山麻美・松本拓太, 樹木特異

的な色素サイクルが光合成電子伝達に与える影響日本森林学会 第 121 回大会, 2010.4.

- ⑨ クロロフィル合成およびトコフェロール合成に関与する, LHC モチーフを持つタンパク質の同定, 田中亮一, Maxi Rothbart, 岡征子, 柴田勝, 明賀丈史, 本橋令子, 篠崎一雄, Bernhard Grimm, 第 51 回 日本植物生理学会年大会, 熊本大学, 2010.3.
- ⑩ 高見常明, 柴田勝, 小林善親, 鹿内利治, 脂肪酸が低温下の光合成電子伝達に与える影響, 第 51 回 日本植物生理学会年大会, 熊本大学, 2010.3.
- ⑪ 柴田勝, 樋山麻美, 松本拓太, 「樹木に特異的な色素サイクルが光合成電子伝達に与える影響」, 日本植物学会 第 72 回大会, 山形大学, 2009.9.
- ⑫ 阿部悠太, 細貝和彦, 柴田勝, 「植物ミトコンドリアによる光合成の最適化について」, 2009 年日本化学会関東支部・高分子学会北陸支部合同新潟地方大会, 新潟大学, 2009.8.
- ⑬ 松本拓太, 樋山麻美, 細貝和彦, 柴田勝, 「木本植物における色素サイクルの生理機能」, 2009 年日本化学会関東支部・高分子学会北陸支部合同新潟地方大会, 新潟大学, 2009.8.
- ⑭ 樋山麻美, 松本拓太, 細貝和彦, 柴田勝, 「樹木葉における光化学系タンパク質複合体の色素組成」, 2009 年日本化学会関東支部・高分子学会北陸支部合同新潟地方大会, 新潟大学, 2009.8.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 勝 (Shibata Masaru)

長岡高専・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)

東京大学・理学研究科・准教授

研究者番号: 80304004