

未利用地域の森林再生を目的とした樹木に特異的な環境適応機構の解明

Physiological functions and mechanisms in the specific adaptations of tree plants to environmental multi-stresses

長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授・柴田勝

Masaru SHIBATA

Associated Professor, Department of Materials Engineering, Nagaoka National College of Technology

研究の概要

大気 CO₂ の増加を抑制し、地中の炭素源（化石燃料等）の消費を極力抑えるためには、CO₂ の効率的なリサイクルが重要である。大気 CO₂ の削減と共に CO₂ を再生可能な炭素源として用いるためには、無尽蔵な太陽エネルギーと植物の光合成による大規模な生物学的 CO₂ 固定が有効である。

現在、樹木が生育しづらく未利用な状態で放置されている広大な地域が世界各地に存在している。太陽エネルギーのほとんど利用されていない環境ストレスの厳しい地域の森林再生を図ることにより、大規模で効率的な大気中の CO₂ の生物学的固定が可能である。このために、従来行われてきた草のストレス耐性遺伝子を導入した組換え樹木ではなく、樹木が持っている樹木特異的な環境適応能力を高めることで、劣悪な条件下で定常的に生育できる樹木の開発を行うことで、大気中の CO₂ 削減を目指した太陽エネルギーの有効利用を目指す。また、樹木はパルプの原料となり得ることから、大気 CO₂ の 2 次的利用が可能である。このように、森林を介した大気 CO₂ の積極的な利用を図ることができる。

In order to suppress CO₂ concentration in the atmosphere, we have to restrain the mass consumption of fossil fuel such as petroleum and coal. The research and the development of processes for reuse of CO₂ are very important. Inorganic CO₂ can be regenerated to usable organic CO₂-derivatives as a carbon source by photosynthesis facilities of higher plants. Vast area is not suitable for the growth of trees, and it is not almost utilize as farmland and plantation area. In the sterile regions with various stresses, the regeneration of forest is one of the effective operations of the large-scale CO₂ biological fixations. So far, the transgenic tree plants have been prepared by introducing stress tolerance genes from the herbaceous plants to reduce CO₂ concentration in the atmosphere. But the transgenic trees can not grow under the multi-stress conditions, and those are not planted in the field without the social consensus. Therefore, we noticed the inherent/specific adaptation mechanisms of tree plants against environmental multi-stresses. The proposed study is carried out to clarify the difference in stress sensitivities between tree plants, on the basis of the functions and the mechanisms in the specific adaptation of trees to environmental stresses, and to identify the most suitable tree species to reforest in severe conditions. The positive recycles of atmosphere CO₂ through the forests can efficiently reproduce the usable carbon sources.

1. 研究目的

環境ストレスによる樹木の枯死要因として光合成の光阻害があり、活性酸素によるタンパク質・脂質などの酸化・分解が挙げられる。現在、光合成阻害の直接的な原因である活性酸素に着目した研究では以下の3因子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。

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、樹木は草本植物と同様な機構によりストレス耐性を示すと考えられており、葉内での機構に違いがあるのかさえ明確ではない。樹木のマルチストレスに対する耐性の獲得、阻害軽減に関するストレス生理学的な基礎的な情報が不足している。森林再生に最適な樹種の育成を行うためには、樹木本来のストレス耐性能力の生理を明確にし、高める必要がある。このため、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について調べた。また、樹木に特異的な環境応答・木本植物の代謝制御（オルガネラ間のネットワーク）とストレス耐性能力との関係を詳細に調べることで、実際に環境ストレス耐性の分子育種を行うために有用な遺伝子を明らかにする。

樹木葉の光合成と葉内代謝とは密接に関係しており、多くの樹種では季節的な葉内代謝変化が起き、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している。本研究において、以下の2項目について調べる。1「樹木に特異的な環境応答」として樹木に特徴的に見られる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「オルガネラネットワーク」毒性の強い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(Mit)でのエネルギー散逸機構との関係を明らかにするために必要なキノン redox 測定系などの構築を行う。

半乾燥地などの未利用地域の森林再生には樹木本来の適応能力を高めることにより得られる樹木の植林により、大気 CO₂ を生物的（樹木）に固定することで再生・利用可能な炭素源とすることができる。樹木のストレス耐性能力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は、ストレス耐性品種の作出や耐性木の選抜育種に応用できる。

2. 研究経過

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、nonphotochemical quenching(NPQ)の主成分である violaxanthin cycle 色素を増加させている（図1）。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。しかし、これらの樹木に対して特異的な色素変化が光合成に与える影響、色素変化を起こすタンパク質は明確ではない。

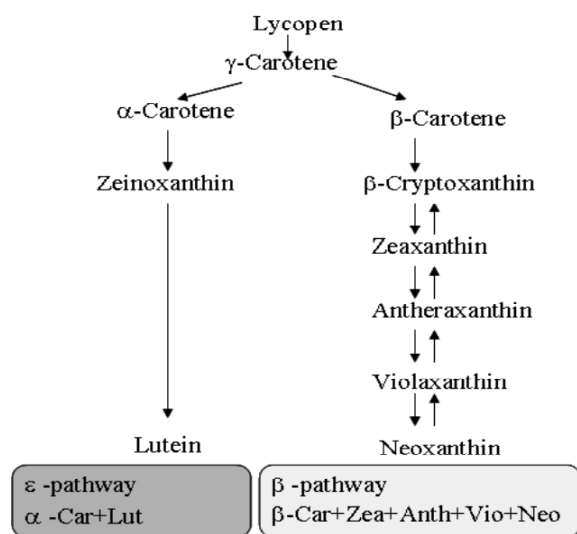


図1. 高等植物の色素合成経路

さらに、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 Mit でのエネルギー散逸機構との関係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、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、Mit 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方法を確立するために、葉緑体のプラストキノン、Mit のユビキノン（UQ）に注目した。

成熟したカキの葉を用いてカロチノイド組成に与える影響および色素置換のタンパク質の同定を行った。また、クロロフィル蛍光法により反応中心の色素組成の違いが葉緑体電子伝達・光合成のエネルギー利用効率に与える影響を調べた。さらに、葉片を用いた各オルガネラの電子伝達鎖に係わるキノン類の高感度・同時測定系を作成し、光強度の違いによるキノン redox について調べた。

3. 研究成果

色素変化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の分離を必要とする。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 および抗酸化剤、金属キレート剤により膜の単離・洗浄を行うことで、ほぼ色素を結合したタンパク質複合体の分離が可能となった。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、その色素分析を行い、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を示した。

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 $\alpha+\beta$ Car) 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。

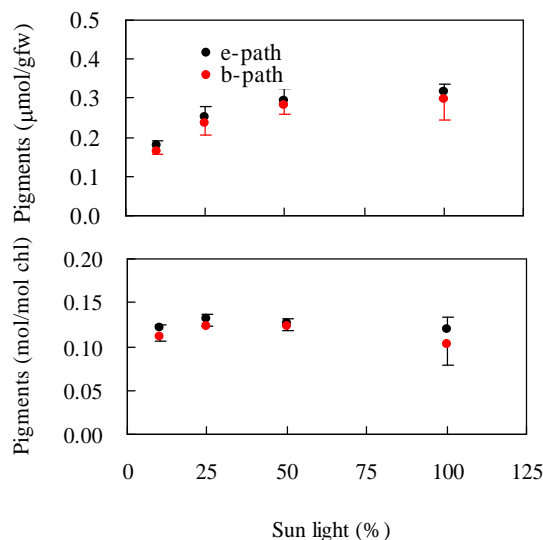


図 2. 成熟葉における生育光強度の違いによる色素 β, ϵ -pathway 色素の変化

これらの色素は直接、光合成に影響することから、クロロフィル蛍光の測定により RC, LHC のダイナミックな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。open PSII の光利用効率 (F_v'/F_m') が光強度および β -Car 比率に依存しており、弱光では F_v'/F_m' は β -Car 比率に依存せず一定であった。しかし、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 (図 3)。これらの結果は、弱光生育には β -Car 比率を低くし、 α -Car 比率を高めることで、葉内の過剰エネルギーを軽減していることを示している。

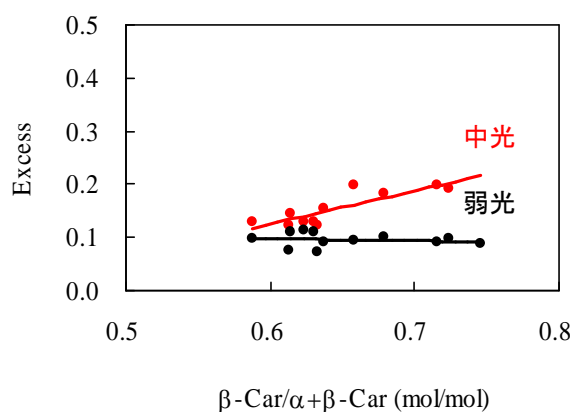


図 3. 反応中心に含まれる Carotene) 変化が過剰光エネルギー (excess) 値に与える影響

また、光照射中の光利用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。

抗酸化物質であるトコフェロール(TQH)について新たな予想外の結果を得た。植物の TQH は葉緑体に局在しているが、ヤツデ葉の TQH は、一般的な α -TQH 以外に γ , δ -TQH が大量に含まれており、さらに葉緑体以外に分布していた (図 4)。低温ストレス阻害の防御に効果的な TQH は、葉緑体の過酸化防御が主な機能だと考えられてきたことから、本結果は葉緑体以外のオルガネラに TQH が機能している可能性を示唆している。

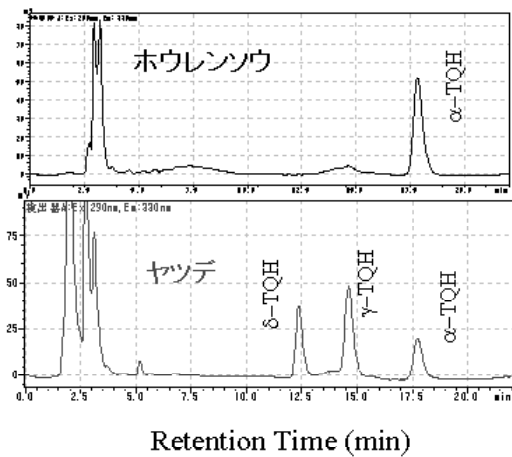


図 4.植物葉片のトコフェロール HPLC チャート

Mit による葉緑体の過剰還元力の散逸過程・能力について、電子伝達成分であるキノン類の測定系を構築し、部位特異的な阻害剤などにより電子伝達活性を阻害した場合のキノン redox から調べた。葉緑体チラコイド膜での電子伝達鎖の plastoquinone (PQ) と ubiquinone (CoQ) 検出の感度・葉内濃度・高濃度の分析阻害物質の問題から、葉片の CoQ の正確な定量的が難しかった。THP 逆相カラムを用いて高速液体クロマトグラフィ(HPLC) post-column platinum reduction 法により、CoQ および PQ の酸化型・還元型の高感度・同時測定系を作成し、最適化することで、10mg 以下の葉片でキノン redox 測定が可能となった。光強度に対するキノン redox を行ったところ、葉緑体電子伝達成分の PQ は光強度と共に還元型にシフトし、CoQ は

光強度に関係なく、還元型であった。しかし、非光合成条件下で葉内のデンプンを消費させることで CoQ redox は酸化型にシフトした。

4. 今後の課題と発展

樹木に特異的な環境応答がマルチストレスに対してどの程度有効なのか、そして、乾燥地域などの樹木への色素サイクルの有効性を明らかにする。反応中心タンパク質と色素の再構成実験を行い色素の意義を明確にした後、光強度以外の色素組成変化を誘導する因子を特定し、ストレス負荷実験・応答反応の時間的スケールを明らかにすることで、実際の環境中での変化にどのように対応しているのかを示す。そして、今回得られた結果が、色素サイクル機構を持つ他の樹木で同様に行われているのかを調べることで樹木に対して本反応が一般的であるかを明確にする。

樹木の intact Mit 単離とその特性を明らかにし草本植物との違いを示す。また、葉緑体電子伝達による Mit 呼吸の制御・植物 Mit の alternative oxidase による過剰エネルギーの散逸過程について検討を行う。

このような研究により、外来の有用遺伝子を導入したシングルストレス耐性樹木ではなく、樹木特異的な応答を利用することで野外環境に適応したマルチストレス耐性木が得ることができれば、未利用な半乾燥地域などの広大な地域を利用した大気二酸化炭素の固定につながることを期待される。

5. 発表論文リスト

Low efficiency of PSII by carotene exchange in *Diospyros kaki*. (色素関係) (投稿準備中)

Distribution and functions of various tocopherols accumulating in leaves tree *Fatsia japonica* (TQH 関係) (投稿準備中)