

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名：津山孝人

2. 養成カリキュラム名：ユーカリ生産性向上のための光合成機能解析

3. 養成カリキュラムの達成状況

カタラーゼ遺伝子導入形質転換ユーカリの評価研究および光合成制御の解析研究に取り組んだ。活性酸素の除去能力を強化することでユーカリの光・酸素毒耐性は向上した。光化学系 サイクリック電子伝達の非破壊解析を可能にした。当初予定はほぼ達成できた。

4. 成果

本研究の目的は、生産性とストレス耐性に優れた実用産業樹木の創出のための戦略を光合成機能の解析により明らかにすることにある。抗酸化酵素カタラーゼを葉緑体に蓄積する形質転換ユーカリを作成することで強光ストレス耐性の強化を試みた。得られた結果を基に耐性ユーカリ作出のための分子育種指針について考察した。

強光照射下の植物では猛毒の活性酸素（一重項酸素、スーパーオキシドアニオンラジカル、過酸化水素）が生成する。従って活性酸素の除去能力を強化することができれば光ストレスに強い植物を作出できると考えられる。本研究では、大腸菌由来のカタラーゼ遺伝子を導入した形質転換ユーカリを作製し光ストレス耐性の解析を行った。抗酸化酵素カタラーゼを葉緑体に蓄積する形質転換ユーカリ（KatE）および野生株の葉片を用いて活性酸素発生剤メチルビオローゲン（MV）に対する耐性を調べた。3 μM または 5 μM の MV 処理により野生株（WT）には可視的な傷害（褐変）が顕著に現れたのに対し、形質転換体（KatE）の殆どの系統は同処理に対してより耐性であった（図1）。MVは光合成電子伝達反応において光化学系I（PSI）の還元側で酸素還元を行う（図2）。通常、葉緑体内で生成した活性酸素 O_2^- （スーパーオキシドアニオンラジカル）は酵素SOD（スーパーオキシドジスムターゼ）およびAPX（アスコルビン酸ペルオキシダーゼ）のはたらきにより H_2O_2 （過酸化水素）を経て水と酸素へと無毒化される。MV処理下では、SODやAPXによる処理能力を超えて活性酸素種が生成するために植物は致命的な酸化的障害を被る。一方カタラーゼ（Cat）はAPXと同様に H_2O_2 を無毒化する。上記の結果は、カタラーゼがAPXの機能を補足したために H_2O_2 による酸化的障害を緩和あるいは回避できたことを示唆している。すなわち、カタラーゼの葉緑体への導入はユーカリ光合成機能の光・酸素毒耐性を強化することを意味する。形質転換体は過酸化水素の生成が原因となる光ストレスに対してより高い耐性を示すと考えられる。

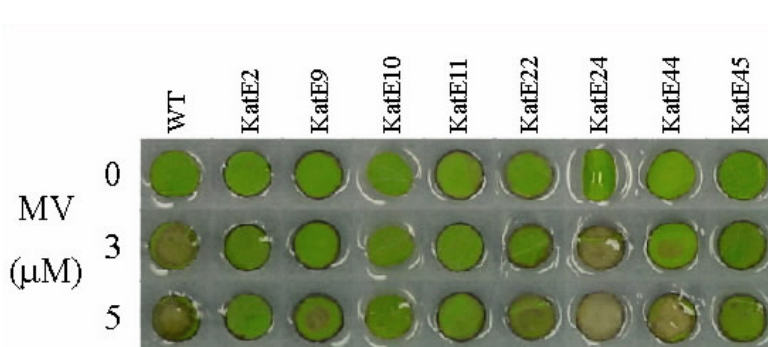


図1 メチルビオローゲン(MV)処理 野生株(WT)および異なる系統の形質転換体(KatE)を用いて光量子束密度 $222 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光照射下 3 または $5 \mu\text{M}$ の MV 処理を 14 時間行った。

PSII	PSI	MV	O ₂	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂ , O ₂	H ₂ O (O ₂)
				SOD	APX	
					Cat	

図2 メチルビオローゲン (MV) およびカタラーゼ (Cat) の作用 MV は光化学系 (PSI) の還元側で酸素を還元する。Cat は H₂O₂ を無毒化する。PS II (I) : 光化学系 II (I)

強光に対する光合成の耐性を比較した(図3) 全天の太陽光に相当する PFD 2,000 μmol photons m⁻²s⁻¹ の照射下では野生株および形質転換ユウカリ (KatE2) のいずれにおいても光合成活性は時間の経過とともに低下した(図3a) 20 時間を経過した頃には光合成はほぼ完全に阻害された。クロロフィル蛍光パラメータΦPSII (光化学系 量子収率) においても両者に差は認められなかった(図3b) 照射下で過酸化水素が発生していたならカタラーゼの機能により光阻害の程度に何らかの差が生じては不思議なことではない。事実、タバコにおいては葉緑体へのカタラーゼの導入により強光耐性が向上する。したがって、ユウカリにおいては強光下で過酸化水素があまり発生しなかった可能性がある。しかしながら、強光照射により光合成が完全に阻害される程の激しい光阻害が起きた(図3a) 光阻害を引き起こした要因が過酸化水素以外の活性酸素であると仮定することで上記の矛盾は説明できる。PFD 2,000 μmol photons m⁻²s⁻¹ の下では電子伝達鎖の還元レベルが極めて高くなる(図3b) これは、光化学系 における一重項酸素の発生が光阻害を引き起こした要因であることを示唆する。

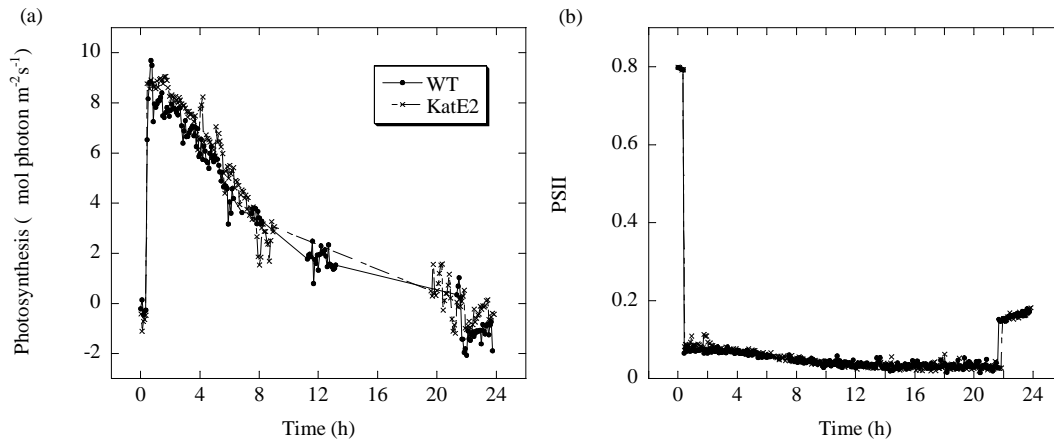


図3 強光照射下での光阻害 (a) 正味の光合成速度 (b) クロロフィル蛍光パラメータΦPSII (光化学系 量子収率)

上記の抗酸化酵素の導入は活性酸素種の消去能力の強化を目的としているが、活性酸素の生成そのものを抑制する能力の強化もストレス耐性植物の作出において同様に有効である。しかし、活性酸素の発生を抑制するメカニズムは未知の部分が多く、耐性強化を目的とした分子育種の方向性は今なお不透明なままである。活性酸素の生成抑制機構の解析を目的として光化学系 サイクリック電子伝達反応の新規解析手法の開発を試みた。その結果、サイクリック電子伝達はクロロフィル蛍光シグナル Low wave を誘導することが明らかとなった。Low wave をサイクリックの指標として電子伝達制御について調べた所、系 サイクリックは強光下で機能不全に陥ることが判明した。この結果は、強光下では活性酸素の生成を抑制することは困難であることを示唆する。

葉緑体への抗酸化酵素カタラーゼの導入によりユウカリの酸素毒耐性は向上したが、光ストレス耐性を強化する結果とはならなかった。カタラーゼ遺伝子の導入はモデル植物では成果を挙げた手

法であるがユーカリに应用することはできなかった。しかしながら本研究の結果から、ユーカリの光阻害は過酸化水素が原因ではないことが示唆された。光化学系 における一重項酸素の発生がユーカリにおいて光阻害を引き起こす要因であることが示唆された。一重項酸素の発生に対処できる形質転換（例えば、 β -カロチン、トコフェロールの過剰発現など）がユーカリの光ストレス耐性を強化する上で有効であると考えられる。

5．成果の対外的発表等

(1) 論文発表

- ・ Tsuyama M, Shibata M, Kawazu T, Kobayashi Y (2004) An analysis of the mechanism of the low-wave phenomenon of chlorophyll fluorescence. Photosynthesis Research in press

(2) 口頭発表

- ・ 津山孝人・河津哲・小林善親 クロロフィル蛍光シグナル“Low wave”による光化学系サイクリック電子伝達の解析 日本植物生理学会 2004 年度年会 八王子 2004 年 3 月 27-29 日

(3) 特許等の出願件数

なし