

植物科学の新展開

- 分子から群集まで広視野研究をめざす -

シンポジウム「植物科学の新展開」編集委員会(編)



Molecule

ごあいさつ

北海道大学での先端シンポジウムとして「植物科学の新展開：分子から群集まで広視野研究をめざす」を開催できますことを心から喜んでおります。主催は北海道大学 低温科学研究所 植物凍害科学部門で吉田静夫先生のご指導のもと、学生として、あるいはスタッフとして学ばせていただいた仲間です。

21世紀を迎えて科学と社会の両面で研究者に求められることが多くなりました。新しい視点で研究を推進し、意味のある研究に育て上げ、社会に対しても成果を説明することが、研究者の責任と言われるようになっていきます。社会的な財を利用し消費して研究をしているので、これらの要請を受け入れざるを得ません。

しかし今日は、もう少し頭を柔らかくして、学問・研究のはじめの部分、つまり生物を理解する新しい研究のための新しい発想を得るための機会としたいと願っています。分子生物学はテクノロジーと共にいっそう磨きをかけ、数多くの生物のゲノム解析が進み、網羅的解析としてプロテオーム、メタボロームも推進され、そしてナノテクノロジーの成果により一分子観察の成果も生み出されています。これらの研究には多額の予算と労力が必要で、担うべきグループが推進しています。私たちすべての研究者がそれに参加する必要はなく、それらの成果を自らの研究土俵に活かすことで共有できます。

本日の「分子から群集まで広視野研究をめざす」は、具体的な研究は特定の生物、限られた手法でとりくんでいても、研究者としての興味と視野は少しでも高く広くありたいという意味での企画です。もちろん、生態学的視点をもった分子生物学が求められていることも考慮しています。シンポジウムでご紹介いただく研究は、きっと私たちの脳をインスパイアしてくれるはずで、それぞれの研究土俵を充実することにつながるものとおもいます。ご出席いただいたそれぞれの方にとって、ヒントやひらめきが得られますことを祈りつつ、皆さんとの再会を楽しみにしています。

前島正義
名古屋大学生命農学研究科

目次

はじめに	(前島正義・大会委員長)	1
目次		2
	この CD-R について	3
第 I 部 植物科学と低温科学		4
1	細胞膜が変われば冬の寒さなんて平気?! (上村松生・岩手大農学 寒冷バイオ研究センター)	5
2	どのような仕組みで冷温誘導性の細胞質の酸性化は起きるか: 冷温障害機構の解明に向けて (河村幸男・岩手大農学 寒冷バイオ研究センター)	13
3	樹木の低温馴化とは何か? (宇梶徳史・北大低温研 寒冷生物)	20
4	寒さ・雪氷・山岳は植物に何を与えるか: マクロスケールから (佐藤利幸・信州大理学 生物進化 山岳科学)	24
5	寒さで甘くなるジャガイモたちは... (松浦(遠藤)千絵・北海道農業研究センター畑作研究部)	33
6	酸性雨が雪になると植物はどうなるのか (荒川圭太, 稲田秀俊・北大農学研 木材木材生物学分野)	39
	[近況報告・随想]	
7	現場の研究者が楽しく有意義な研究を展開できるよう、ご指導をお願いします (田村 晃・秋田県農試 野菜花卉部)	46
8	吉田先生の背中 (大平 万里・秋田経済法科大学付属高等学校)	50
9	個体としての単純さ・群集としての複雑さ (陶山哲志・産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門)	52
第 II 部 広領域研究を目指して		55
10	分子から個体まで 植物の水輸送を階層的に考える (村井(羽田野)麻理・東北農業研究センター)	56
11	スサビノリにおける細胞膜一次ポンプと膜輸送機構 -到達点と今後の展望- (長谷 昭・北海道教育大函館 生物)	62
12	粘菌ってなにもの? (川田健文・東邦大理学 生物 分子発生)	68
13	アクアポリンの分子生理生態学: それからの 10 年間 (前島正義・名大 生命農学研究科)	74
14	高山多年生草本の休眠 (吉江文男・専修大経済)	79
15	種子が目覚めるとき: 発芽を促すジベレリンの作用 (鷲尾健司・北大院地球環境 環境分子)	84
16	石の下にも 20 年 -埋土種子研究の進展状況- (露崎史朗・北大院地球環境 地域生態系)	93
あとがき	(吉田静夫・北大名誉教授)	101
編集後記	(編集委員)	102

この CD-R について

本シンポジウム要旨は、全てこの CD-R に PDF 形式で収録されています。CD-R は、4-48 倍速対応 650 Mb のものを使用しています。シンポジウム原稿ファイルは全て Dell Precision にて Windows 2000 上の Acrobat ver.5.05 で動作を確認しています。ファイルを開くには、Adobe Acrobat、Acrobat Reader (フリーソフト)、Adobe Reader (フリーソフト)のいずれかが必要となります。2004 年 10 月現在、Adobe Reader が

<http://www.adobe.co.jp/products/acrobat/readermain.html>

のホームページからダウンロード可能です。使用されるコンピュータに、上記ソフトウェアのいずれかをインストールしてご使用ください。

動作等に不都合等がありましたら、事務局の方へ連絡ください。全てのことを解決することは困難だと思われませんが、できるだけ対処したいと思います。

おまけとして、"/photo"のディレクトリに思い出の写真が収録されています。お楽しみください。

事務局

露崎史朗

北海道大学大学院地球環境科学研究科

Tel: 011-706-2283

FAX: 011-706-4954

e-mail: tsuyu@ees.hokudai.ac.jp

第 I 部

植物科学と低温科学

細胞膜が変われば冬の寒さなんか平気?!

上村 松生

(岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター)

はじめに

北海道大学低温科学研究所は、低温環境下における植物の適応現象研究における世界的ハブとして知られている。1979年に大学院修士課程(理学研究科植物学専攻)学生としてその門を叩いてから、すでに25年の年月が過ぎた。それ以来、札幌、イサカ(アメリカ・ニューヨーク州)、神戸、再びイサカ、そして盛岡と場所を変えながら、植物の低温適応機構について研究を続けている。大雑把に言えば、この25年の間に植物寒冷適応機構の研究は、急速に進んでいるが、そのような状況の中で、「自分は、いったい、何に貢献できたのだろうか」と考えることも多い。本稿では、今までの研究結果の一部を紹介し、今後の方向性を探してみたい。

植物の低温耐性獲得機構

温帯性植物の多くは、秋から冬にかけての低温(0以上の凍結しない温度)に反応して、凍結に対する耐性を増大させる。植物によっては、短日条件が必要な場合も存在する。この現象は、低温馴化(Cold Acclimation)と呼ばれ、特定の遺伝子群発現を通じた様々な生理的反応の結果であることが知られている(Weiser 1970, Guy 1990, Thomashow 1999)。それらの生理的反応には、植物ホルモンバランスの変動、細胞壁の硬化、生体膜組成や機能の変動、細胞内における適合溶質(糖、アミノ酸、グリシンベタインなどの中性低分子可溶性物質)の蓄積、不凍タンパク質、氷核タンパク質など凍結現象に影響を与える特定のタンパク質や低分子化合物の合成、などがある(Steponkus *et al.* 1993)。これらの生理的反応は多様であり、一見、なぜ凍結耐性の増大に係わって

いるのかなど見当もつかない。しかし、凍結傷害の初発部位が細胞膜(原形質膜)の機能障害であることを考えれば、究極的には、細胞膜が凍結脱水条件下で安定性を維持し、その機能を損なわないようにするために貢献しているに違いないと私は考えている。

植物細胞が凍結脱水状態において機能維持をする分子機構を理解するためには、第一に、細胞膜に生ずる傷害の分子機構を理解し、ついで、低温馴化過程で起こる多様な変化が傷害発生を回避するためにどのように関与しているのかを知ることが必要であると考えて研究を進めた。

植物の凍結傷害機構

我々は、植物組織(葉や塊茎など)から調製された単離プロトプラスト(酵素を用いて細胞壁を分解し、細胞膜が露出した単離細胞)を材料に、凍結融解過程で発生する傷害機構の解析を進めてきた。単離プロトプラストを用いた実験系は、細胞壁を持つ細胞系や異なった細胞の集団である組織・器官・個体系とは異なる傷害機構を示す可能性も指摘されているが、凍結融解過程における細胞膜の挙動を直接観察できるという大きな魅力を持つ実験系である。さらに、凍結傷害機構が、植物の凍結耐性の程度、低温馴化過程、さらには、凍結温度や凍結融解速度などの条件によって大きく変動することを考えると、プロトプラスト観察によって複雑な植物の低温馴化機構を具体的に理解することは有効であろう。

植物細胞が凍結する場合、細胞内が凍結する場合(細胞内凍結)と細胞外が凍結し細胞内は凍結しない場合(細胞外凍結)の2つが考えられる。通常、野外で起こる凍結は、冷却速度が比較的遅

く、組織内では細胞と細胞の間にある細胞間隙に氷晶が最初に形成される（注：植物の組織、器官などによっては、器官外凍結、過冷却などを起こす植物も知られている）。これは、細胞内に比べ細胞間隙や細胞壁に存在する液体の浸透濃度が低いこと、細胞外には細胞内に比べ氷晶核となる物質が多く存在していることなどの理由が考えられている（Uemura & Steponkus 1989）。一旦、氷晶が形成されると、同じ温度における氷の表面における水ポテンシャルが液体状態の水ポテンシャルよりも低いため、氷晶表面に水分子が引きつけられ、氷晶は成長する（酒井 1982）。その結果、細胞内の水は細胞外に引き出されることになり、細胞は脱水収縮する。凍結過程における脱水収縮により、細胞には温度ストレス、脱水ストレス、機械ストレス、塩濃縮ストレス、酸化的ストレスなど、多様な、そして、大きなストレスがかかることになる（Levitt 1980）。その中でも、脱水ストレスは細胞の生死を決定する最も重要なストレスであると考えられている（Steponkus 1984）。

単離プロトプラストを用いた実験系により、細胞レベルでは、細胞外凍結が誘導する凍結脱水に起因する傷害機構が複数存在することが明らかになった（Steponkus *et al.* 1993, Uemura & Steponkus 1989）。低温馴化前の耐凍性の低い細胞では、凍結温度（あるいは、脱水程度）の違いにより、2つの異なった凍結傷害機構が観察される。一つは、凍結温度が比較的高い場合（50%程度の細胞が傷害を受ける程度）に観察され、凍結過程で収縮するだけでは何ら問題はないが、融解に伴う膨張過程で破裂する（Expansion-Induced Lysis; EIL）ものである。さらに低い温度まで凍結すると、細胞に非常に大きな脱水ストレスがかかり、細胞の各膜系表面に結合していた水分子が失われる。その結果、細胞膜と細胞小器官の膜系が相互作用し、各膜系の独立性や細胞膜半透過性の喪失、そして、細胞死がおこる（Loss of Osmotic Responsiveness; LOR）。この時、生体膜が通常形成している脂質二重層が崩れ、膜内タンパク質の

凝縮や、タンパク質が排除された領域ではヘキサゴナル II 相という脂質相が観察される（図 1）（Gordon-Kamm & Steponkus 1984）。

一方、低温馴化を行い凍結耐性が増大すると、EIL はどのような凍結温度においても観察されない。このような状態では、凍結温度にかかわらず細胞は LOR により傷害を受けるが、低温馴化前の細胞で観察されたヘキサゴナル II 相は全く観察されない。それに変わって、2 つ以上の膜系が

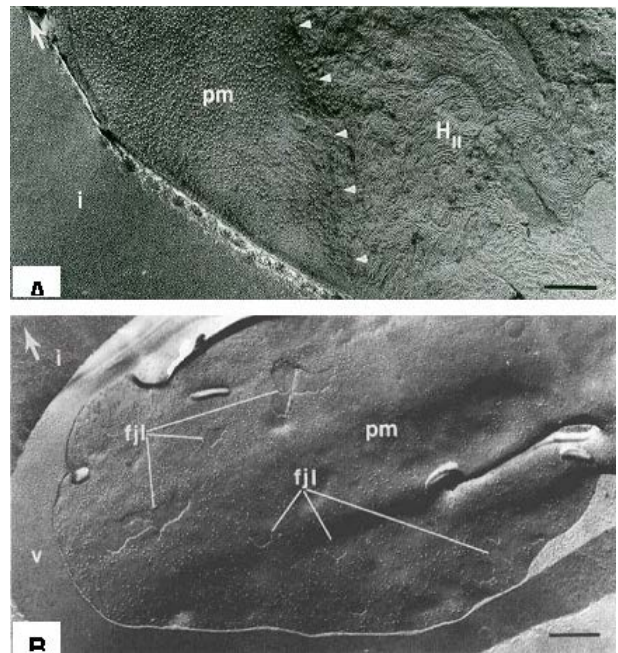


図 1 未馴化 (A) 及び馴化後 (B) のシロイヌナズナの葉から調整されたプロトプラストの細胞膜に見られる凍結脱水に誘導される微細構造。馴化前はヘキサゴナル II 相、馴化後には Fracture-jump Lesion が見られる。図中の略号は pm (細胞膜)、H_{II} (ヘキサゴナル II 相)、v (液胞膜)、i (氷) そして、fjl (Fracture-jump Lesion)。図中のバーは 500 nm (A)、あるいは、1 μm (B)。(Uemura *et al.* 1995)

融合した結果だと思われる微細構造（フラクチャー・ジャンプ構造）が、細胞膜近傍において高頻度で観察されるようになる（図 1）（Fujikawa & Steponkus 1990, Webb *et al.* 1994, Uemura *et al.* 1995）。これらの結果は、低温馴化前後で起こる細胞内外での様々な変動が、細胞膜に関連した凍結傷害発生機構の変化を引き起こし、その結果として、凍結耐性の増大が起こるということを示唆している。では、低温馴化過程で起こるどのよう

な変化が、凍結傷害発生機構の変動に関わっているのだろうか？

低温馴化における細胞膜脂質の役割

凍結下における細胞膜の挙動を規定する要因の一つは、細胞膜組成である。細胞膜は、脂質とタンパク質の混合物であるが、その中で低温馴化（凍結凍性増大）と脂質組成の関係については多くの研究報告がある。1970年代後半から80年代にかけて、吉田静夫先生はオーチャードグラスやクワを材料に純度の高い細胞膜を単離する方法の確立や、低温馴化過程や脱馴化過程における細胞膜脂質組成解析（Yoshida & Uemura 1984, Uemura & Yoshida 1984）を精力的に行われた。これらの論文は現在でも低温馴化と細胞膜脂質の関連における論文にかなりの頻度で引用されている。

低温馴化する多くの植物（ライムギ、シロイヌナズナ、キクイモ、クワ、オーチャードグラスなど）に共通して、低温馴化後には単位タンパク質量当たりの細胞膜リン脂質含量が20～70%も増加する（表1）。その増加の主な原因は、主要リン脂質であるホスファチジルコリン（PC）とホスファチジルエタノールアミン（PE）の増加、特に、不飽和脂肪酸を持つ分子種の増加によるものである（Yoshida & Uemura 1984, Uemura & Yoshida 1984, Uemura & Steponkus 1994）。PCは水和度の高い極性基を持ち、膜構成脂質の中では水分子を

引きつける能力が最も高い。従って、細胞膜におけるPC含量の増加は、凍結脱水過程における膜表面での水分子の維持に大きく貢献し、他の細胞内膜系と細胞膜の脱水誘導性相互作用を抑えているものと考えられる。事実、様々な脂質組成を持つリポソームを用いた乾燥過程における実験系では、PCに富んだリポソームはPC含量の少ないものに比べて膜融合の頻度が少ないことも報告されている（Steponkus *et al.* 1993）。

一方、PEの増加はそれほど単純に説明ができない。PEはヘキサゴナルII相を形成しやすい脂質として知られ、事実、乾燥状態では常温でも容易にヘキサゴナルII相を形成する分子種も多く知られている。PE含量の増加が凍結耐性の増大にどのように関わっているかはまだ明らかではないが、PE含量の増加が単独で意味を持つものではなく、細胞膜脂質全体における構成比や脂質とタンパク質との相互作用などの点において、何らかの意味を持つと予想される。この点について、最近、コムギ実生を用いて、低温馴化過程でPE合成系酵素の一種をコードする遺伝子の発現が増加することが示された（Imai 2004）。この結果も、PEが細胞膜の物理的性質の決定だけではなく、機能制御に関与している可能性を示唆しているものと考えられる。

以上の結果は、細胞膜リン脂質の増加が凍結過程における膜安定性の維持に寄与していることを示唆しているが、それを直接証明したのは、特

表1 低温馴化過程で見られる細胞膜リン脂質の増加

植物	μmol/mg protein		mol% of total lipids		出典
	馴化前	馴化後	馴化前	馴化後	
Winter rye	1.04	1.26	38.7	43.4	Uemura & Yoshida 1984
			36.6	43.3	Uemura & Steponkus 1994
Oat			28.9	39.5	Uemura & Steponkus 1994
Orchard grass	1.11	1.38	50.2	53.1	Yoshida & Uemura 1984
Jerusalem artichoke	1.15	1.50	45.9	46.9	Ishikawa & Yoshida 1985
Arabidopsis			46.8	57.1	Uemura <i>et al.</i> 1995
	0.94	1.12	51.5	55.2	Kawamura & Uemura (unpublished)
Mulberry	1.02	1.72	57.1	69.0	Yoshida 1984

定の脂質から構成されたリポソームを融合したプロトプラストを用い、細胞膜脂質組成を人工的に変化させた場合の凍結傷害機構を解析した研究である (Steponkus *et al.* 1988, Uemura & Steponkus 1989)。低温馴化前の耐凍性の低い植物から単離されたプロトプラストに、不飽和脂肪酸を含む PC からなるリポソームを融合して、細胞膜脂質組成を低温馴化後に近い状態になるように人工的に操作すると、耐凍性は増加した。さらに、この凍結耐性増大は低温馴化前に見られた EIL の発生が完全に回避されること、細胞膜で見られたヘキサゴナル II 相も発生頻度が低下すること、が原因であることが明らかになった (Sugawara & Steponkus 1990)。これらの結果は、低温馴化過程で起こる細胞膜における PC 含量の増加は、凍結傷害発生機構の変動と直接関連していることを示している。

さらに、低温馴化過程において、細胞膜の糖脂質 (グルコセレブロシド、CER) 含量が複数の植物で共通して減少する (Steponkus *et al.* 1993)。CER は水和度が低い脂質で、さらに融点も高い。そのため、温度低下や脱水過程で、水和度が高く融点が高いリン脂質と相分離の状態になり、細胞膜の構造機能に大きな影響を与えるものと考えられている (Cahoon & Lynch 1991)。さらに、CER が多く含まれるリポソームでは、ヘキサゴナル II 相や膜融合が起こりやすいことが試験管内の実験により示されている (Steponkus *et al.* 1993)。従って、低温馴化過程で細胞膜に含まれる CER が減少することは、凍結傷害発生を抑え、凍結耐性増大に貢献しているものと考えられる。

細胞膜には、ステロール脂質も多い。ステロール脂質は、遊離ステロール (FS)、ステリルグルコシド (SG)、および、アシルステリルグルコシド (ASG) の 3 つに分けられる。複数の植物を用いた研究結果では、低温馴化過程におけるこれらステロール脂質の変化に規則性が認められなかった (Steponkus *et al.* 1993)。しかし、耐凍性の高い植物 (ライムギ) と低い植物 (カラスムギ) を比

べた場合、主要ステロール脂質として、ライムギの細胞膜は FS を含んでいるのに対し、カラスムギの細胞膜には ASG が多い (Uemura & Steponkus 1994)。リン脂質共存下で作成されたリポソームの脱水過程における挙動を調べてみると、これら二つのステロール脂質の影響は大きく異なっている (Webb *et al.* 1995)。つまり、ASG を含むリポソームは FS を含むものに比べ、より小さな脱水度でヘキサゴナル II 相転移を引き起こす。すなわち、ASG は FS に比べて、脂質安定性を低下させる働きが大きい。従って、ライムギとカラスムギの耐凍性の違い、言い換えれば、細胞膜の脱水下での安定性の違いの一部は、ステロール脂質組成に依存しているのかもしれない。

低温馴化における細胞膜タンパク質の役割

それでは、細胞膜に含まれる重要なもう一つの成分であるタンパク質が凍結耐性の増大に対して与える影響はあるのだろうか？この問題についても、吉田静夫先生は 1980 年代初めから研究を進められていた。しかし、つい最近まで、低温馴化過程における細胞膜タンパク質 (単離細胞膜画分に存在するタンパク質という意味で用いる) の変動は、二次元電気泳動による解析によって示されていたにすぎず (Yoshida & Uemura 1984, Uemura & Yoshida 1984)。それらの変動するタンパク質の実体や機能を詳細に研究した報告はほとんど存在していなかった。一方、近年急速に発展した分子生物学・プロテオミクス方法を用いて報告されたものを検索しても、低温に応答して変動する細胞膜タンパク質を同定したものは非常に限られていた (Goodwin *et al.* 1996, Brenton *et al.* 2000)。そこで、1999 年から、私たちはシロイヌナズナ細胞膜において低温馴化に応答して変動するタンパク質を網羅的に同定することを開始した (Kawamura & Uemura 2003)。

シロイヌナズナを用いて、低温馴化に応答して約 40 個の細胞膜タンパク質が量的に変動することを明らかにした (図 1)。変動するタンパク質の

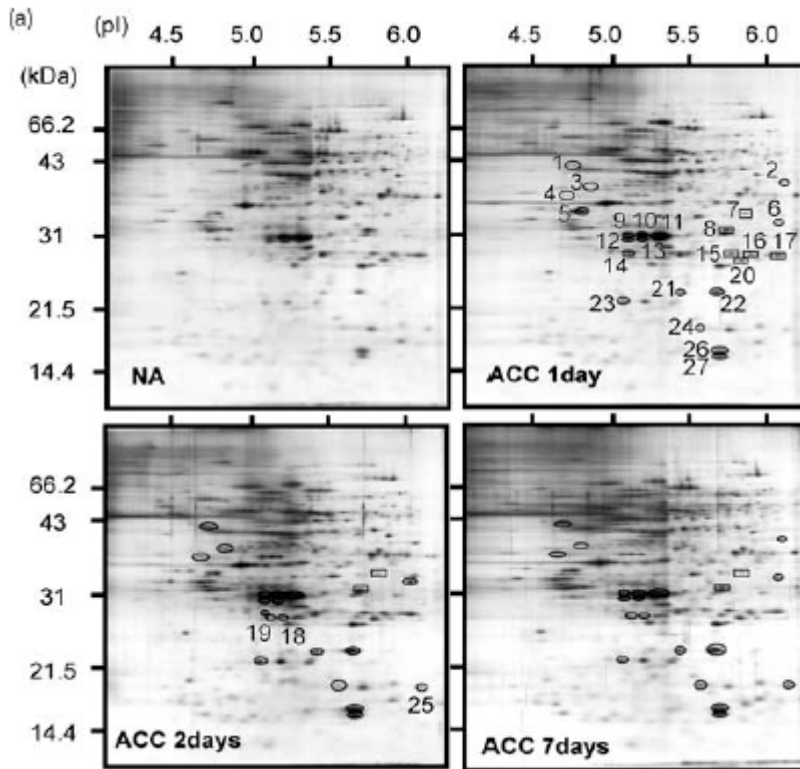


図2 シロイヌナズナの葉から調整された細胞膜画分に存在するタンパク質の2次元電気泳動像。馴化前 (NA) から馴化 1 日後 (ACC 1 day) の間に多くのスポットが量的に変動していることがわかる。ACC 2 day は馴化 2 日目、ACC 4 days は馴化 4 日目、ACC 7 days は馴化 7 日目を示す。(Kawamura & Uemura 2003)

多くは、シロイヌナズナの凍結耐性が大きく増大する馴化 24 時間以内に変動していることも明らかになり、タンパク質変動は非常に早く起こることが示された。同時に行った脂質分析の結果は、馴化 24 時間後では大きな変動がないことを示しており、馴化 24 時間で起こる細胞膜の凍結挙動の変化には細胞膜タンパク質が関与している可能性が示唆された。

ついで、これらの低温馴化過程応答細胞膜タンパク質を質量分析 (マトリックス支援型レーザーイオン化飛行時間型質量分析、MALDI/TOF-MS) によって同定することを試みた。この方法は、ペプチド断片のアミノ酸配列を決定することによるタンパク質同定法に比べて、非常に少ない量で解析することが可能であり、シロイヌナズナのように全遺伝子にコードされているタンパク質に関する情報が揃っている植物では、強力な解析方法となる。MALDI/TOF-MS によってほとんどの

低温馴化応答細胞膜タンパク質の同定に成功し、その中には、膜修復、浸透ストレス防御タンパク質、タンパク質分解、それに、低温や乾燥に応答して出現するタンパク質 (デハイドリンなど) などが含まれていることが判明した。

次に課せられたことは、これらの低温馴化応答細胞膜タンパク質の機能を解析することである。そのために、低温馴化応答細胞膜タンパク質をコードする遺伝子を導入した過剰発現形質転換シロイヌナズナを作成し、形質転換体の凍結耐性や単離プロトプラストの凍結挙動を調べている。現在までに、リポカリン様タンパク質 (AtLCN) やデハイドリンの一種 (ERD14) を過剰発現する形質転換体が野生型に比べて高い凍結耐性を有していることを明らか

かにした (Tominaga *et al.* 2005)。凍結耐性は多くの遺伝子発現制御の結果として表されるものであるため、1 個の機能遺伝子を過剰発現しても、凍結耐性の増大程度は小さい。しかし、AtLCN も ERD14 形質転換体も、再現性のある結果を得ている。さらに興味深いのは、単離プロトプラストを用い、冷却速度を変えて -10 までの凍結過程とその温度からの融解過程について低温顕微鏡観察すると、AtLCN 形質転換体は EIL 発生が抑えられている傾向があること、ERD14 形質転換体はそれに加えて早い冷却速度における細胞内凍結発生が抑えられていることが示唆された。以上の結果は、低温馴化過程で細胞膜近傍に蓄積される AtLCN および ERD14 の機能が異なっていることを示している。さらに、低温馴化応答細胞膜タンパク質の作用分子機構に関する研究を進めることにしている。

おわりに

凍結脱水過程における細胞膜の挙動は、細胞膜自身の組成のみによって決定されるものではない。しかし、以上述べてきたように、低温馴化過程で細胞膜脂質・タンパク質組成が大きく変動するという事実から、これらの変動が凍結耐性増大に置いて大きな役割を担っていることは疑いない。また、変動する脂質やタンパク質成分が果たす凍結耐性増大に対する機能を解析する必要があるのは言うまでもない。

近年の分子生物学的手法の急速な発達によって、耐凍性獲得に関わっている因子が詳細に解析されつつある。低温下で起こる遺伝子発現を網羅的に解析するトランスクリプトーム(マイクロアレイなどを用いる)はその良い例であるが、遺伝子発現プロファイルの解析だけで耐凍性形質を理解することは難しい。低温に応答して発現変動が起こる遺伝子にコードされるタンパク質の機能や、そのタンパク質によって生成される物質の影響を精力的に解析していく必要がある。究極的には、植物の凍結耐性形質を詳細に理解すれば、凍結傷害発生を回避する機構の付加、言い換えれば、凍結耐性増大(付与)作物の育種も効率的に行えるようになると思われる。まだまだ残されている問題は多いが、これからも、少しでも、細胞膜の凍結耐性獲得機構における機能的役割の解明に努めていきたいと考えている。

謝辞

本稿を書く機会を与えて下さった、「植物科学の新展開・分子から群集まで広視野研究をめざす」シンポジウム実行委員会(前島正義委員長)の皆様には感謝いたします。北海道に生まれた時からこのような道に入るのが決まっていたのかもしれないが、現在、まだ研究を続けることができているのは、北海道大学大学院に進み、博士課程から指導していただいた吉田静夫先生の影響が最も大きいと思います。本稿に記された研究成

果は、故 Peter L. Steponkus 教授(コーネル大学)を初めとするコーネル大学滞在時の研究仲間、岩手大学で研究室を立ち上げるころから一緒に行ってきた多くの学生・院生・ポスドク諸君の協力なしには得られませんでした。全員の名前を挙げることはできませんが、この場を借りて全ての方に深く感謝いたします。

参考文献

- Brenton, G., Vazquez-Tello, A., Danyluk, J. & Sarhan, F. (2000) Two novel intrinsic annexins in wheat membranes in response to low temperatures. *Plant & Cell Physiology* **41**: 177-184.
- Cahoon, E.B. & Lynch, D.V. (1991) Analysis of glucocerebrosides of rye (*Secale cereale* L. cv Puma) leaf and plasma membrane. *Plant Physiology* **95**: 58-68.
- Fujikawa, S. & Steponkus, P.L. (1990) Freeze-induced alterations in the ultrastructure of the plasma membrane of rye protoplasts isolated from cold-acclimated leaves. *Cryobiology* **27**: 665-666.
- Goodwin, W., Pallas, J.A. & Jenkins, G.I. (1996) Transcripts of a gene encoding a putative cell wall-plasma membrane linker protein are specifically cold-induced in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **31**: 771-781.
- Gordon-Kamm, W.J. & Steponkus, P.L. (1984) Lamellar-to-hexagonal II phase transition in the plasma membrane of isolated protoplasts after freeze-induced dehydration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 6373-6377.
- Guy, C.L. (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 187-223.
- Imai, R. (2004) Molecular characterization of phospholipid biosynthesis genes during cold acclimation in wheat. *In*: Abstract book of the 7th

- International Plant Cold Hardiness Seminar, Sapporo.
- Ishikawa, M. & Yoshida, S. (1985) Seasonal changes in plasma membranes and mitochondria isolated from Jerusalem artichoke tubers: possible relationships to cold hardiness. *Plant & Cell Physiology* **26**: 1331-1344.
- Kawamura, Y. & Uemura, M. (2003) Mass spectroscopic approaches for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *The Plant Journal* **36**: 141-154.
- Levitt, J. (1980) Responses of Plants to Environmental Stresses, 2nd Ed., Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 1-497.
- 酒井 昭 (1982) 植物の耐凍性と寒冷適応. 学会出版センター. 東京, pp. 1-469.
- Steponkus, P.L. (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology* **35**: 543-584.
- Steponkus, P.L., Uemura, M., Balsamo, R.A., Arvinte, T. & Lynch, D.V. (1988) Transformation of the cryobehavior of rye protoplasts by modification of the plasma membrane lipid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 9026-9030.
- Steponkus, P.L., Uemura, M. & Webb, M.S. (1993) A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat—two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. *In: Advances in Low Temperature Biology* (P.L. Steponkus, ed.), JAI Press, London, Vol. 2, p. 211-312.
- Sugawara, Y. & Steponkus, P.L. (1990) Effect of cold acclimation and modification of the plasma membrane lipid composition on lamellar-to-hexagonal II phase transitions in rye protoplasts. *Cryobiology* **27**: 667.
- Thomashow, M.F. (1999) Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 571-599.
- Tominaga, Y., Nakagawara, C., Kawamura, Y. & Uemura, M. (2005) Effect of plasma membrane-associated proteins on acquisition of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *In: Plant Cold Hardiness* (The proceedings of 7th International Plant Cold Hardiness Seminar; T.H.H. Chen, M. Uemura and S. Fujikawa, eds.), CABI, Oxon (UK), in press.
- Uemura, M. & Steponkus, P.L. (1989) Effect of cold acclimation on the incidence of two forms of freezing injury in protoplasts isolated from rye leaves. *Plant Physiology* **91**: 1131-1137.
- Uemura, M. & Steponkus, P.L. (1994) A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiology* **104**: 479-496.
- Uemura, M. & Yoshida, S. (1984) Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Puma). *Plant Physiology* **75**: 818-826.
- Uemura, M., Joseph, R.A. & Steponkus, P.L. (1995) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiology* **109**: 15-30.
- Webb, M.S., Uemura, M. & Steponkus, P.L. (1994) A comparison of freezing injury in oat and rye: two cereals at the extremes of freezing tolerance. *Plant Physiology* **104**: 467-478.
- Webb, M.S., Irving, T.C. & Steponkus, P.L. (1995) Effects of plant sterols on the hydration and phase behavior of DOPE/DOPC mixtures. *Biochimica et Biophysica Acta* **1239**: 226-238.
- Weiser, C.J. (1970) Cold resistance and injury in woody plants. *Science* **169**: 1269-1278.
- Yoshida, S. (1984) Chemical and biophysical changes

in the plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (*Morus bombycis* Koidz. cv Goroji). *Plant Physiology* **76**: 257-265

Yoshida, S. & Uemura, M. (1984) Protein and lipid composition of isolated plasma membrane from orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) and changes in cold acclimation. *Plant Physiology* **75**: 31-37.

どのような仕組みで低温誘導性の細胞質の酸性化は起きるか： 低温傷害機構の解明に向けて

河村 幸男

(岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター)

はじめに

熱帯、亜熱帯産の植物の多くは低温に敏感で、0~12℃にさらされると栄養成長や生殖成長が阻害され、組織や器官、個体そのものが不可逆的な傷害を受ける。この様な低温傷害は凍結傷害とは異なり温度のみにより生じ、低温傷害と呼ばれる。低温傷害は光条件や湿度などの低温処理条件、またさらされる温度と時間や植物の生育条件に大きく依存する。例えば、光照射のもとで植物を冷やすと、葉は短時間で光合成機能をなくし、肉眼的にも暗黒化の低温処理よりも著しい傷害が現れる。これは、常温では正常に働いていた葉緑体内の活性酸素消去系が低温では機能が低下することによると考えられている。逆に、植物を水分飽和の条件で冷やすと傷害は著しく軽減されることが多い。一方、低温感受性の高い植物では、暗黒-水分飽和の条件で低温にさらしても細胞は短時間で致死的な傷害を受ける。この事は細胞内に低温そのものに敏感な生体膜やタンパク質があることを示しており、それらを明らかにすることは低温傷害機構を知る上で必要不可欠である。一般的に低温傷害は低温にさらされた直後に不可逆的な傷害に至るものではなく、回復可能な初期傷害を経て徐々に二次傷害が誘発されながら、不可逆的な傷害へと進む。植物の低温傷害機構を理解するためには、まず回復可能な初期傷害の機構を知ることが大切と考えられる。

これまでの研究により、ヤエナリ懸濁培養細胞から調整したプロトプラストを暗黒条件下で0℃にさらすと、低温傷害初期過程において液胞のアルカリ化と同時に、細胞質の酸性化が起きることが分かっている (Yoshida 1995)。また、細胞外

の溶液を中性にしても細胞質の酸性化は生じる (Yoshida 1994)。この事から細胞質の酸性化は主に液胞からの H^+ の流出により生じ、液胞膜の H^+ に対する半透過性の消失や H^+ 輸送系の機能障害が原因であると予想されている。液胞膜の H^+ の輸送系は H^+ -PPase (V-PPase)と H^+ -ATPase (V-ATPase)という2つの H^+ 輸送酵素からなり、このうち、V-ATPaseは低温傷害初期過程で急速に失活することが知られている。しかし、V-ATPaseの低温失活と細胞質の酸性化の直接的な因果関係は全く説明できていない。この理由は植物が普段、傷害を受けない温度でどのようにして細胞質のpHを一定範囲に保っているかが全く分かっていないことによる。

自然の中では植物は常に環境の変化、例えば温度変化に曝され、 H^+ 流入速度や流出速度は必ずその影響を受ける。また細胞内の多くの物質輸送は H^+ 濃度勾配を利用しており、輸送物質の量が変化すれば当然 H^+ 流出速度も変化する。この事は、もし植物細胞が H^+ 流出入をうまく調節できる機構を持っていなければ、細胞質のpHを一定に保つことは出来ないことを意味する。このpH調節には遺伝子発現も含まれるであろうが、瞬時に変わる変化に対しては対応しきれないことが予想され、実際にpHを一定に保つためには生化学的な機構が必須であると考えられる。この様にして植物細胞は生化学的なpH調節機構を持っていると推察されるが、これまでこの機構については全く検討されてこなかった。このpH調節機構の観点から低温傷害初期過程における細胞質の酸性化の原因を考え直すと、次のような仮説が考えられる。すなわち、1) 液胞膜にはV-ATPaseもしくはV-PPaseを

含むpH勾配を調節する生化学的な機構が存在し、細胞は環境の様々な変化に対して一定に細胞質と液胞のpH勾配を保つことが出来る; 2) この機構が低温処理により崩壊し、その結果、細胞質の酸性化がもたらされる。この仮説を詳細に検討するために液胞膜小胞を用いて以下の3つの項目について実験を行った。すなわち、1) PPiもしくはATP依存性の液胞小胞内へのpH勾配形成過程の数式モデルの導入し、H⁺流出入を明確にする; 2) ATPもしくはPPi依存性のpH勾配形成過程の温度特性を調べることによりpH調節機構を推定する; 3) ATPもしくはPPi依存性のpH勾配形成過程の低温処理後の変化を検討する。以下に、過去の実験の問題点を含めながら結果を述べる。

過去の報告の実験の問題点

これまでの報告では、植物体の破碎にはPolytronもしくは家庭用ミキサーが使用されてきたが、この方法で単離された液胞膜は非常に傷ついており正確なH⁺輸送活性やH⁺流出が測定できないことが明らかになった。そこでこれらの方法より遙かに穏やかな破碎法である乳鉢乳房による植物体の破碎法を採用し液胞膜の単離を試みた。その結果、従来の方法で得られた膜画分よりも液胞膜H⁺-PPase(V-PPase)のH⁺輸送活性を示すH⁺輸送初速度はおおよそ2倍以上高いことが明らかとなった。また、過去のデータとも比較しても両酵素のH⁺輸送初速度は2倍上昇していることが確認された。同じヤエナリ上胚軸から単離した液胞膜画分を用いたH⁺流出に関しても、Yoshida and Matsuura-Endo (1991)の報告によれば、V-PPaseにより形成された定常状態でのpH勾配はほぼ10分で解消され、Darley et al. (1995)の報告に

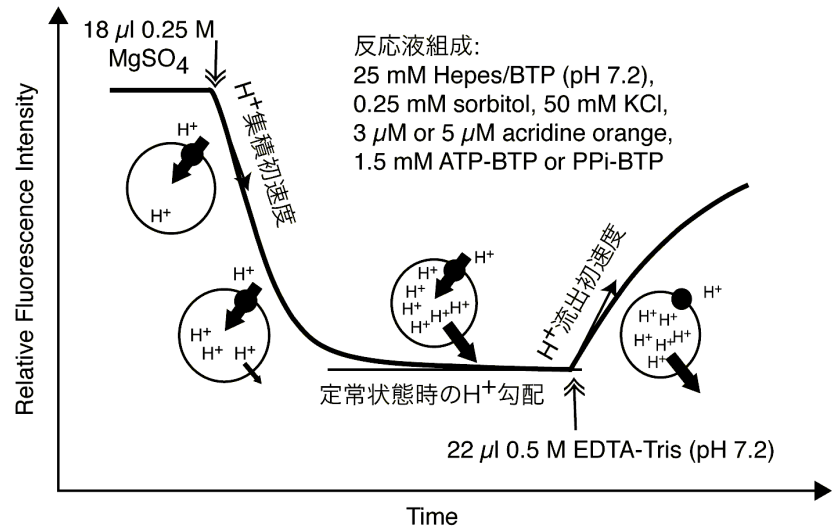


図1 アクリジンオレンジを用いたH⁺勾配測定法の簡略図。アクリジンオレンジは、酸性条件になると多量体を形成し蛍光を発しなくなる。また、一量体では膜を通過できるが二量体以上になると膜を通過できなくなる。その結果、小胞内が酸性化すると小胞内に二量体以上のアクリジンオレンジによる蛍光が低下する。そのため、アクリジンオレンジの蛍光消失によりH⁺勾配が推定できる。H⁺輸送活性の測定はMgSO₄を加えることにより始め、H⁺流出の測定は、定常状態のH⁺勾配をV-ATPaseおよびVPPaseに形成された後、EDTAを加えることによりそれぞれの分解活性を停止させ、始めた。

よればほぼ1分で解消された。しかし今回得られた液胞膜画分では、20分経過後でも、初期のpH勾配の60%を保っていることが確認された。このことは、乳鉢乳房で植物体を破碎することで得られた液胞膜は人為的な作用による水素イオンの流出が従来の膜よりも遙かに押さえられて測定でき、より信頼のある結果が得られることを示している。この液胞膜画分を用いて、アクリジンオレンジを用いた蛍光消失法によりATPもしくはPPi依存性のH⁺集積過程すなわちpH勾配形成過程とH⁺流出の測定を行った(図1)。

H⁺集積過程の数式モデル

アクリジンオレンジの蛍光消失変化の割合をQ(t)とすると液胞膜小胞内の水素イオン濃度変化[H⁺_{in}](t)は下記の式で表れされる。

$$\frac{[H^+]_{in}(t)}{[H^+]_{out}} = \frac{(Vol_{out} + Vol_{in})}{Vol_{in}} \cdot \left(1 + \frac{Ka}{[H^+]_{out}}\right) \cdot \frac{Q(t)}{(1-Q(t))} + 1 \quad \dots (1)$$

ただし、Vol_{in}は小胞内の体積、Vol_{out}は小胞外の体積、Kaはアクリジンオレンジに水素イオンが付加する化学反応の平衡定数である。この式に基づいてPPi又はATP依存性のH⁺集積過程もしくは、PPi

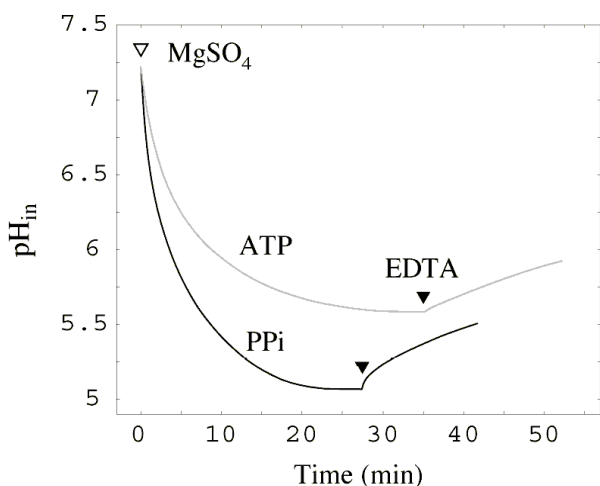


図2 V-PPase もしくは V-ATPase による液胞膜小胞内の pH 変化。MgSO₄ を反応液に入れることにより小胞内への H⁺ 勾配が化学ポテンシャルにより H⁺ 流出をもたらす。H⁺ 流入と H⁺ 流出が釣り合ったところで見かけ上、小胞内の pH 変化が止まる(定常状態)。定常状態になったのち、EDTA を加えることにより Mg²⁺ をキレートし、V-Ppase もしくは V-ATPase による H⁺ 流出を止め、H⁺ 流出のみを測定する。

または ATP 存在下での H⁺ 流出過程における液胞膜小胞内の pH 変化の計算を行った (図2)。次に小胞内への H⁺ 集積過程は下記の式で表せる。

$$H^+ \text{集積速度} = H^+ \text{流入速度} + H^+ \text{流出速度} \quad \dots (2)$$

式の中で示した3つの項のうち、実測できるものは H⁺ 集積速度と H⁺ 流出速度で、H⁺ 流入速度はこれらの差でしか求められない。まず H⁺ 流出速度であ

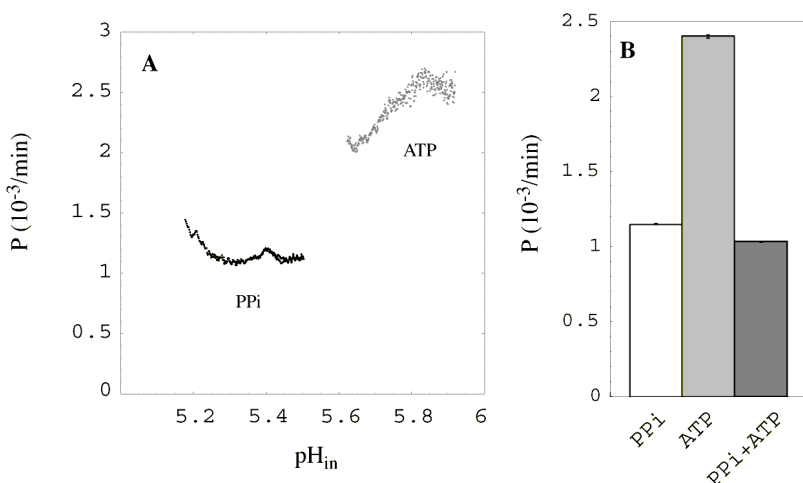


図3 液胞膜小胞の H⁺ 透過性(P)。図2の H⁺ 流出を示すデータを用いて式(3')に基づいて H⁺ 透過率 P の計算を行った。膜の H⁺ 透過率と小胞内 pH の関係を明らかにするために、1分ごとの小胞内 pH とその時の P をプロットした(A)。膜の H⁺ 透過率は小胞内の pH に依存しなかったが、興味深いことに PPI 存在下と ATP 存在下では膜の H⁺ 透過性が異なった。そこで PPI と ATP 存在下で H⁺ 透過率を測定し、その平均値を示した(B)。PPI と ATP 両基質存在下の膜の H⁺ 透過率は PPI のみの時と同じ値を示したので、膜の H⁺ は PPI 依存性であると考えられた。

るが、もし膜の H⁺ 透過率が一定であればフィックの法則に基づいて下記の式で表される。

$$\frac{d[H_{in}^+](t)}{dt} = P \cdot ([H_{out}^+] - [H_{in}^+](t)) \quad \dots (3)$$

pH の式で表すなら式(3)は下記のように変換できる。

$$\beta_i \cdot \frac{dpH_{in}(t)}{dt} = P \cdot (10^{-pH_{out}} - 10^{-pH_{in}(t)}) \quad \dots (3')$$

ただし P は膜の H⁺ 透過率、β_i は小胞内の H⁺ 緩衝能 (internal buffering capacity) を示す。この中で定数項は P と β_i であるが、液胞膜の β_i はすでにいくつかの植物で求められており、その値は小胞内 pH にあまり依存せず、またどの植物でもほぼ同じ値であることが分かっている。そこで H⁺ 透過率である P のみを求めればよく、図2の H⁺ 流出を示すデータを用いて計算できる。膜の H⁺ 透過率と小胞内 pH の関係を明らかにするために、1分ごとの小胞内 pH とその時の P をプロットした (図3A)。その結果、膜の H⁺ 透過率は小胞内 pH に依存しないことが明らかになった。実際にこの値の平均を用いて、シミュレーションを行うと理論的な H⁺ 流出過程はほとんど実験によるものと一致する (data not shown)。興味深いことに PPI 存在下と ATP 存在下

では膜の H⁺ 透過率が異なった。しかし、PPI と ATP 両基質存在下の膜の H⁺ 透過率は PPI のみの時と同じ値を示したので、膜の H⁺ 透過率は PPI 依存性であると考えられた (図3B)。この PPI の有無による H⁺ 透過率の差は、PPI 依存性の H⁺ アンチポーター、H⁺ シンポーター、もしくは H⁺ チャンネルの存在によるものかもしれないが、現在のところはっきりとした理由は分からない。

次に、V-PPase もしくは V-ATPase による H⁺ 流入速度と小胞内 pH との関係性を求めるために、式(2)に基づいて H⁺ 集積速度から H⁺ 流出速度を引くことにより算出した

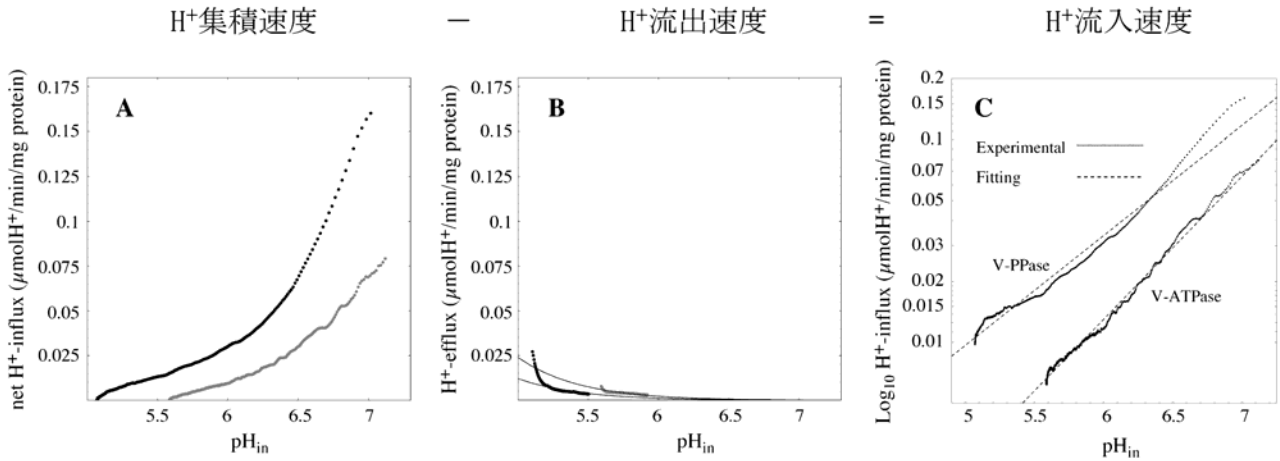


図4 V-PPaseもしくはV-ATPaseによるH⁺流出速度。H⁺流入速度と小胞内pHとの関係を求めるために、式(2)に基づいてH⁺集積速度からH⁺流出速度を引くことにより算出した。その結果、小胞内pHの減少、すなわち小胞内が酸性になるにつれ、V-PPaseまたはV-ATPaseによるH⁺流出速度は直線的に減少することが明らかとなった。

(図4)。その結果、小胞内pHの減少すなわち小胞内が酸性になるにつれ、V-PPaseまたはV-ATPaseによるH⁺輸送速度は直線的に減少することが明らかになった。以上の結果、小胞内pHの時間変化を示す微分方程式は

$$\beta_i \cdot \frac{dpH_{in}(t)}{dt} = 10^{v_b + v_i \cdot pH_{in}(t)} + P \cdot (10^{-pH_{out}} - 10^{-pH_{in}(t)}) \quad \dots (4)$$

となる。左辺はH⁺集積速度すなわち小胞内pHの時間変化、右辺の第一項はH⁺流入速度、右辺の第二項はH⁺流出速度を表す。この式をもとにシミュレーションを行い、実験結果との比較を行うと理論値と実験値はほとんど変わらないことが明らか

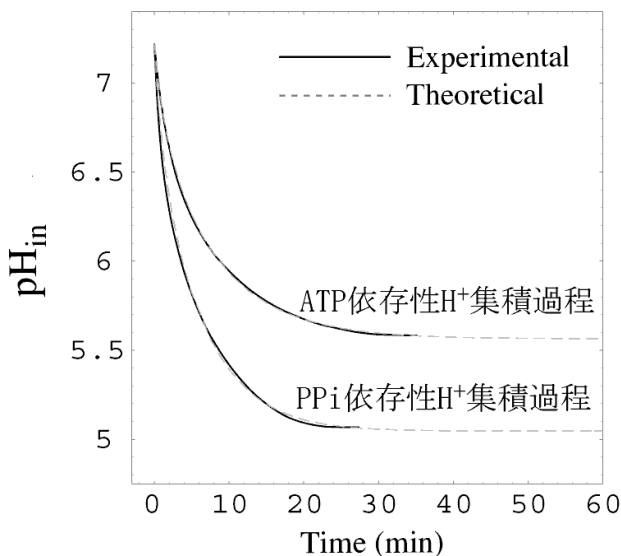


図5 実験値とシミュレーション結果との比較。式(4)をもとにシミュレーションを行い、実験結果との比較を行った。

となった(図5)。この様にして、PPiもしくはATP依存性のH⁺集積過程は式(4)で表され、V-PPaseまたはV-ATPaseによるH⁺流入は液胞内のpHもしくは液胞膜間のpH勾配に依存することが明らかとなった。

PPiもしくはATP依存性のpH勾配形成過程の温度特性

もし生化学的なpH調節機構が存在するなら、液胞膜小胞にもその特徴は残っている可能性は高く、例えば様々な温度でV-PPaseもしくはV-ATPaseによるpH勾配形成過程の測定を行っても最終的なpH勾配は温度に関係なく一定に保たれるはずである。そこでPPiもしくはATP依存性のpH形成過程の温度特性について調べた。温度を0-20℃まで変化させてみると、PPiもしくはATPによるpH勾配形成速度は低温になるにつれ両者とも低下した(図6)。ATP依存性のpH勾配形成能も低温になるにつれ低下し、特に10℃未満になるとその低下は著しくなったが、PPi依存性のpH勾配形成能そのものは低温下でもほぼ一定に保たれた(図6)。しかし、先に示したように膜のH⁺透過率はPPiに依存するため、V-ATPaseによるpH勾配形成はPPi存在下で評価されなければならない。その一方でV-PPaseに特異的な阻害剤がないためにこのような実験は実際には難しい。そこで、

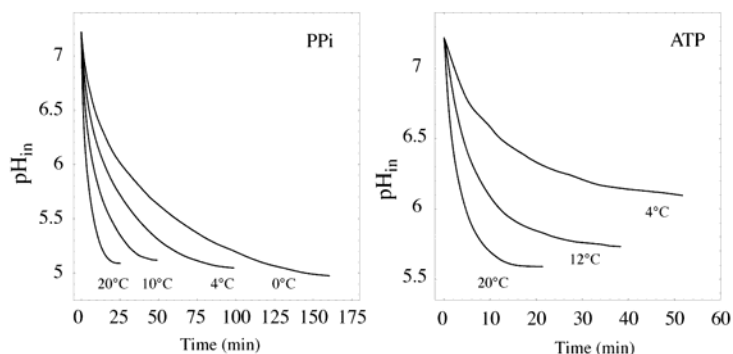


図6 PPiもしくはATP依存性のpH形成過程の温度特性。温度を0°C-20°Cまで変化させて測定した。

シミュレーションにより、V-ATPaseによるH⁺流入とPPi依存性のH⁺流出の組み合わせを評価した。その結果、V-ATPaseは温度変化に対してpH勾配を一定に保つことができないことが予想された (data not shown)。このようにして温度変化に対して液胞膜間のH⁺勾配を一定に保つものは、V-PPaseとPPi依存性のH⁺透過率を調節している“もの”のコンビネーションであることが明らかとなり、生化学的なpH勾配調節機構はPPi依存性の調節機構であることが推定された。

PPiもしくはATP依存性のH⁺集積過程の低温処理後の変化

これまでの報告と同様にヤエナリ黄化実生に対して低温処理を1日行くと、ATP分解活性は80%まで低下する一方で、PPi分解活性はほとんど変化が見られなかった (Yoshida et al. 1989, data

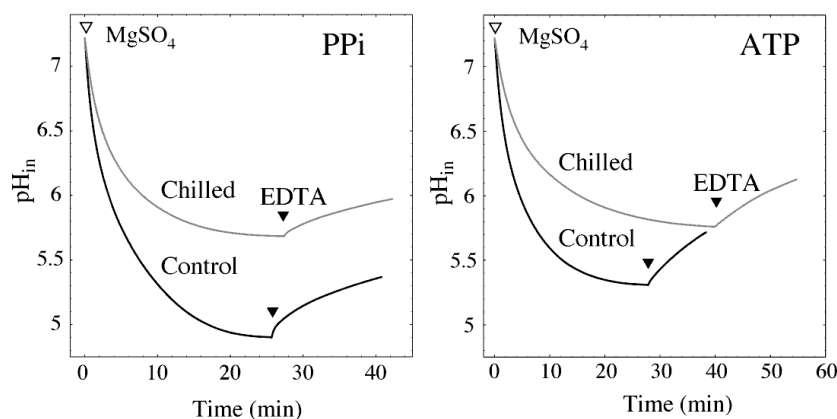


図7 PPiもしくはATP依存性のH⁺集積過程、もしくはH⁺流出過程の低温処理後の変化。PPiまたはATP依存性pH勾配形成能は低温処理により大きく低下し、両過程とも無処理サンプルに対しておおよそ50%にまで低下した。

not shown)。しかし、PPiまたはATP依存性pH勾配形成能は低温処理により大きく低下し、両過程とも無処理サンプルに対しておおよそ50%にまで低下した (図7)。この結果は低温処理によりV-PPaseとV-ATPaseの両H⁺輸送酵素に脱共役が生じることを示唆する。液胞膜間のpH勾配の安定性は、PPi依存性のpH勾配調節機構によりもたらされていると考え、これらの低温誘導性脱共役の中で、PPi依存性pH勾配形成能の低下が直接的に細胞質の酸性化をもたらしている可能性が極めて高いと考えられる。次に低温処理によるpH勾配形成能の低下の原因を詳細に検討するために、低温処理後のPPi依存性のH⁺透過率とV-PPaseによるH⁺流入速度の小胞内pHに対する依存性について検討した。まず、PPi依存性膜のH⁺透過率であるが、低温処理前には小胞内pHに対する依存性を示さなかったが、低温処理後には示すようになり、小胞内pHが酸性化するとH⁺透過率が直線的に増加した (図8)。この事はすなわち、pH勾配が増加するとH⁺が漏れやすくなることを示す。一方、V-PPaseによるH⁺流入速度は低温処理前に示していた小胞内pHに対する感受性が低温処理後に上昇し、小胞内pHが酸性になるとより早くH⁺流入速度が低下した (図8)。この様にして、液胞膜のH⁺透過率とV-PPaseは両者共に低温処理の影響を受け、両者の低温感受性が直接的に液胞膜間のH⁺勾配の低下を招くことが示唆された。

結論と今後

本研究の結果は以下の3つにまとめられる。

- 1) PPiもしくはATP依存性のH⁺集積過程は以下の数式モデルにより表され、V-PPaseまたはV-ATPaseによるH⁺流入は液胞内のpHもしくは液胞膜間のpH勾配により調節されている。

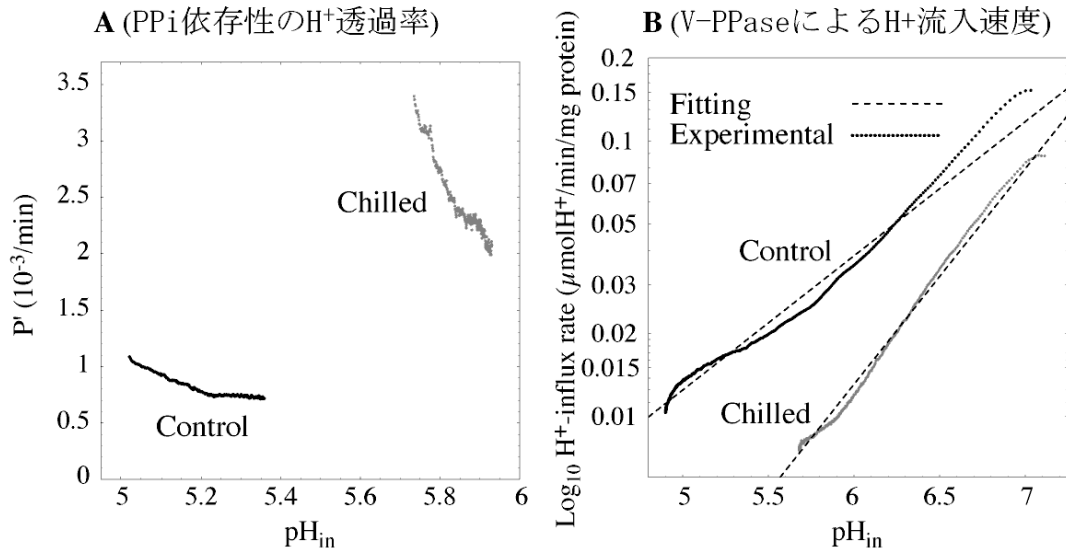


図8 低温処理後の PPI 依存性の H⁺透過率(A)と V-PPase による H⁺流入速度(B)の小胞内 pH に対する依存性。

$$\beta_i \cdot \frac{dpH_{in}(t)}{dt} = 10^{10+\nu_i \cdot pH_{in}(t)} + P \cdot (10^{-pH_{out}} - 10^{-pH_{in}(t)})$$

2) 液胞膜間のpH勾配の安定性には、PPI依存性pH勾配形成機構、すなわちV-PPaseによるH⁺流入調節とPPI依存性の膜のH⁺透過率を調節している“もの”によるH⁺流出調節が少なくとも必要である。

3) 低温処理によりPPI依存性pH勾配形成機構の液胞内pHもしくは液胞膜間のpH勾配に対する感受性が著しく変化し、その結果、液胞膜は十分なpH勾配を液胞膜間で形成できなくなる。

これらの結果により、低温処理による細胞質の酸性化の直接的原因は、従来考えられていたV-ATPaseの低温失活ではなく、PPI依存性H⁺集積機構の液胞内pHもしくは液胞膜間のpH勾配に対する感受性の変化によるものと推察された。しかしこの事はV-ATPaseの低温失活が冷温傷害に全く関係しないことを示すものではない。実際に、シロイヌナズナでは幾つかのV-ATPase subunit mutantが報告されているが、それらは明らかに生育傷害を示す(Schumacher et al., 1999, Padmanaban et al. 2004)。また、V-ATPase subunitのノックアウト mutantは致死的であると推定されている(Padmanaban et al. 2004)。これらの報告はV-ATPaseの低温失活が致死的な、もしくは重大な傷害を引き起こすであろうと推定するには十分な

証拠と思われる。

今後は、1) PPI依存性の膜のH⁺透過率を調節している具体的な“もの”はなにか?、2) PPI依存性の膜のH⁺透過率とV-PPaseのpH調節機構の生化学的なメカニズムの解明、3) PPI依存性の膜のH⁺透過率とV-PPaseの低温感受性のメカニズムの解明、4) V-ATPaseの低温失活が具体的にどのような生理的傷害を引き起こすか?、5) V-ATPaseの低温失活機構の解明、が今後の冷温傷害機構のさらなる理解には必須である。

おわりに

冷温傷害機構については、短いながらも計8年間研究してきましたが、その本質については少しどころか、未だにさっぱり分らないままです。いったい何が難しいのか?冷温傷害機構の研究でもっとも難しい問題は、“どのようにして細胞は死んでいくのか? ”、という問いに正面を向かないと答えられないことにあると思われます。“死”を研究するためには、まず、“生”を知らないとだめなのですが、それこそ生物学の本質的なテーマそのものです。科学を哲学の一分野として捉えるならば、このテーマは何千年と考えつづけられ、今なお答えのない問題です。結局、冷温傷害の研究は“生きていることとはどういうことか? ”、という問いに対して“裏”から考えてい

くようなもののように感じています。この観点から考えると、吉田静夫先生が発見した低温誘導性の細胞質の酸性化は、細胞がまさに“生”から“死”へ転ずるそのときを捉えたもので、哲学的な意味合いも大きく、何度見ても感銘を受ける、数少ない研究のひとつです。現在は、凍結傷害の研究を行っていますが、冷温傷害機構については機会があれば今後とも関わっていきたい研究テーマであり、その中で“生”の本質を垣間見られればと考えています。

謝辞

本稿を書く機会を与えて下さった、「植物科学の新展開・分子から群集まで広視野研究をめざす」シンポジウム実行委員会(前島正義委員長)の皆様には感謝いたします。本稿の研究成果は、Heven Sze 教授(メリーランド大学)の協力のもと得られたものです。この場を借りて深くお礼を申し上げます。最後に、低温植物生理学の面白さとその深みを、私が学生時代に伝えて下さった吉田静夫先生に心から感謝いたします。本研究は日本学術振興会の援助の下に行われました。なお、本文中の図は全て原図です。

参考文献

Darley, C.P., Davies, J.M., and Sanders, D. (1995). Chill-Induced Changes in the Activity and Abundance of the Vacuolar Proton-Pumping Pyrophosphatase from Mung Bean Hypocotyls. *Plant Physiology* 109, 659-665.

Padmanaban, S., Lin, X., Perera, I., Kawamura, Y., and Sze, H. (2004). Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. *Plant Physiology* 134, 1514-1526.

Schumacher, K., Vafeados, D., McCarthy, M., Sze, H., Wilkins, T., and Chory, J. (1999). The Arabidopsis *det3* mutant reveals a central role for the vacuolar

H⁺-ATPase in plant growth and development. *Genes & Development* 13, 3259-3270.

Yoshida, S. (1994). Low temperature-induced cytoplasmic acidosis in cultured mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) cells. *Plant Physiology* 104, 1131-1138.

Yoshida, S. (1995). Low temperature-induced alkalization of vacuoles in suspension-cultured cells of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant Physiology* 36, 1075-1079.

Yoshida, S., and Matsuura-Endo, C. (1991). Comparison of temperature dependency of tonoplast proton translocation between plants sensitive and insensitive. *Plant Physiology* 95, 504-508.

Yoshida, S., Matsuura, C., and Etani, S. (1989). Impairment of tonoplast H⁺-ATPase as an initial physiological response of cells to chilling in mung bean (*Vigna radiata* [L.] Wilczek). *Plant Physiology* 89, 634-642.

樹木の低温馴化とは何か？

宇梶 徳史

(北海道大学 低温科学研究所 寒冷生物圏変動)

秋から冬にかけてのプロセスは低温馴化と呼ばれ、冬の厳しい寒さに耐える為に温帯性落葉樹が用いる生存戦略の1つである。一方で、温帯性落葉樹の低温馴化は、落葉、休眠、そして耐寒性上昇といったプロセスが重なり合う複雑なプロセスであり、また、いずれの現象も全く独立した生物学的現象ではなく、それぞれが密接に関連し合っ、低温馴化という1つの生物学的現象を導き出している。本稿では、筆者が最近まで、クワ (*Morus bombycis* Koidz.) を植物材料として行ってきた研究をベースにして、樹木における低温馴化研究の現状について紹介したい。ちなみに、筆者の現在の研究テーマは、“落葉”がキーワードである。

歴史的に、樹木の低温馴化は、まず、短日条件により成長が停止し、その後、植物が低温に曝されることにより、耐凍性が獲得されるとされる (Fuchigami et al., 1971)。樹木の耐寒性研究者の多くは、この樹木に特徴的な短日条件で耐凍性が獲得されるメカニズムに興味を持っており、この

分野の研究は比較的多い。短日条件で耐寒性が上昇することは、フィトクロム A の過剰発現により短日条件に対して非感受性となった形質転換プラが、短日処理後の耐凍性が野生株と比較して低いことで、直接的に示された (Olsen et al., 1997)。また、デハイドリンなどの耐凍性関連タンパク質が短日条件により誘導されることも報告されている (Karlson et al., 2003)。

一方で、短日条件により誘導される耐凍性は、それほど大きくないことが、シラカンバにより報告されている (Li et al., 2002, 2003)。秋の短日条件が直接的に何らかの機構を通して耐凍性を上昇させているというよりはむしろ、休眠を誘導することにより、結果的に耐凍性も高まっていると考えるのが妥当ではないか。最近、種子休眠の制御因子である ABI3 タンパク質が、秋のポプラの冬芽で同定された (Rohde et al., 2002)。秋の短日条件は、ABA やジベレリンの相互作用を介して冬芽の休眠を制御しているものと推測されている。

一方、樹木の耐寒性が低温処理のみである程度

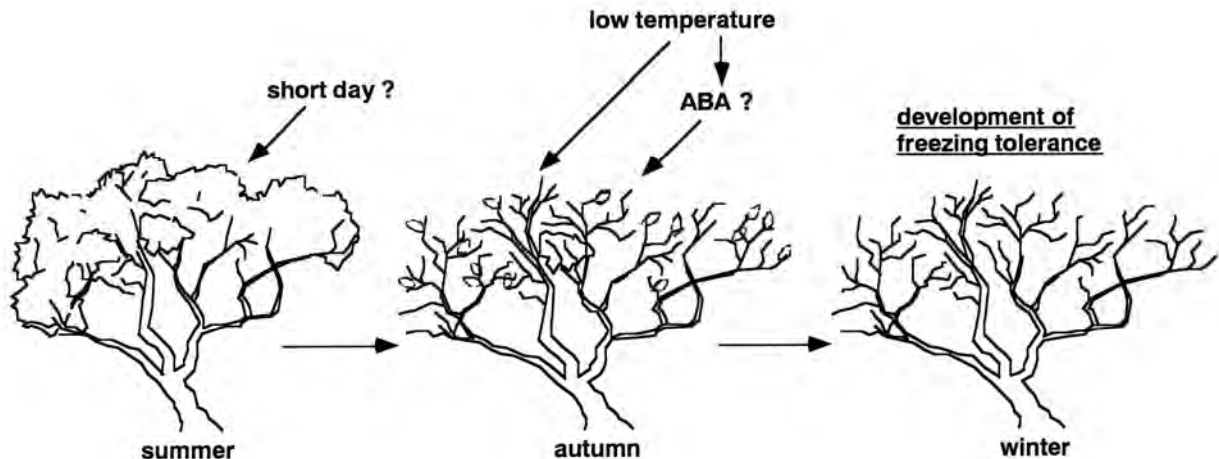


図1 温帯性落葉樹の耐寒性獲得のスキーム。植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) が働いているプロセスに関しては明確な結論は得られていない。

まで獲得できることもよく知られた事実である (Fuchigami et al., 1971)。シラカンバ苗を用いた研究では、低温処理により獲得した耐凍性は、短日条件や ABA 処理したシラカンバよりも高い耐凍性 (-20 以下の) を示した。また、本来、秋には落葉してしまう葉の耐凍性も上昇していた。これらの結果は、ある程度の耐凍性を獲得するだけならば、温帯性落葉樹といえども、休眠や落葉を伴わなくても良いということになる。それでは、なぜ、温帯性落葉樹は、休眠、落葉、そして、耐凍性の獲得というダイナミックな変化を伴うのであろうか？

筆者は、最近まで、温帯性落葉樹の 1 つであるクワ (*Morus bombycis* Koidz.) を主要な研究材料として用いてきた。クワは低温研でも長い間、植物材料として用いられてきた樹種であり、世界的に見ても、耐寒性研究分野においてよく研究されている樹種の 1 つである (Yoshida, 1984、など。文献多数)。また、教科書にも、耐寒性の高い樹種の 1 つである、とも紹介され、耐寒性研究分野ではそれなりに知名度が高い樹種であることが伺い知れる (Staelin and Newcomb, 2000)。筆者の研究は、単刀直入に言えば、クワの耐寒性獲得と関連するタンパク質を同定するということであったが、その結果、冬季に蓄積するタンパク質を 4 つ同定した。これらのタンパク質は、それぞ

れ、低分子量熱ショックタンパク質、グループ 2LEA タンパク質、グループ 3LEA タンパク質、そして PR-10 タンパク質をコードしていた。これらは、小胞体に局在するもの (低分子量熱ショックタンパク質、グループ 3LEA タンパク質) 及び、細胞質と核に局在するもの (グループ 3LEA タンパク質、PR-10 タンパク質) に大別される。耐寒性を獲得しているクワはこのような多種多様なストレス関連タンパク質を溜め込んでいたわけである。

これらのタンパク質をコードする遺伝子は、枝を低温処理することにより転写物の蓄積量が増加する。このことから、秋の気温の低下が、本研究で同定されたタンパク質の蓄積を誘導していることが示唆された。先に述べたように、樹木の耐寒性研究は、その多くが、日長による低温馴化に焦点を当てていた。この結果、樹木の耐寒性獲得プロセスにおける低温の影響を遺伝子レベルで示した例が少なかった。実際、筆者も、低温よりは短日条件の方が、これらの遺伝子の誘導には効果的なのではないかと推測していた時期もあった。本研究により、樹木においても、秋季の低温が耐寒性獲得に重要であることが示唆された。

一方、これらのクワで同定されたタンパク質は

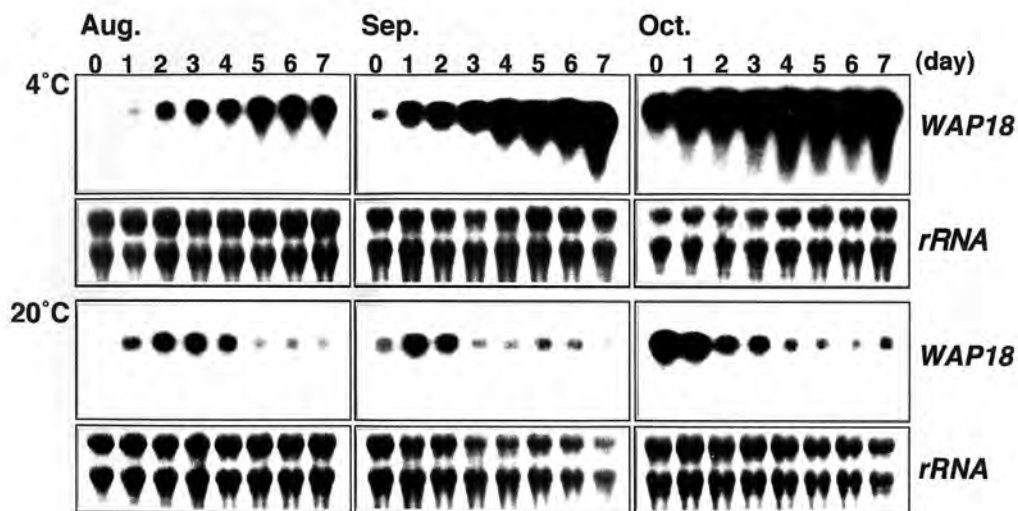


図2 クワに蓄積する PR-10 タンパク質転写物量は低温に反応して増加する。8月と9月では転写物量の増加に違いが見られることから、低温以外の要因も PR-10 タンパク質の蓄積に関与していることが考えられる。

細胞内における蓄積量が非常に多い。筆者は、冬季のクワ細胞中に含まれるタンパク質のうち、蓄積量上位3位のうち、少なくとも2つは今回同定したタンパク質で占めていると推測している。このことから、同定されたタンパク質の幾つかについては、翌年の成長に利用される窒素の貯蔵機能も有していることを示唆している。ここで再度述べたいのは、この窒素貯蔵機能を有するタンパク質の蓄積が、どうやら秋の低温により制御されているらしいということである。

先に紹介した、フィトクロム A 過剰発現ポプラが短日処理に対して鈍感となったことで明らかであるように、樹木の冬芽休眠は秋の短日条件により誘導されると考えられている。筆者の研究で示された、窒素貯蔵機能を有するタンパク質の蓄積が、どうやら秋の低温により制御されているらしいという推測から、秋から冬にかけての季節の移り変わりとともに、以下のことが起きていると推測される。すなわち、まず、短日条件により成長停止し。次に気温の低下が引き金となり、葉からのタンパク質の回収が起こり、それをもとにして、貯蔵タンパク質の蓄積がおこるということである。従って、少なくともクワでは、秋に十分に低温に曝されないと、葉から十分に窒素の回収がおこらず、翌年の成長に影響することが推測される。

しかしながら、この考え方が他の樹木種にもそのまま当てはまるかという点、疑問がないわけではない。ポプラで同定された貯蔵タンパク質 BSP32 は、短日条件にตอบสนองして蓄積することが報告されている (Coleman et al., 1991)。研究例がそれほど多くないので、はっきりしたことは分からないが、結局のところ、ポプラは貯蔵タンパク質の蓄積に主に短日を利用しているのに対して、クワは日長よりも低温も利用しているものと推測される。

筆者はクワにおける環境応答メカニズムを1つのモデルとして、樹木の環境応答機構を推測して

いるが、実際にどのような環境を秋から冬への季節の移り変わりに用いているかは樹木種によって多少のばらつきが存在するようだ。ポプラやシラカンバといった北方林構成樹種は、日長の変化を季節の移り変わりを完治する主要な情報として用いているようだ。一方、温帯～熱帯を主要な分布域とするクワは、日長のみならず、気温の低下も冬の訪れを察知する重要なシグナルとして用いているようだ。この現象は、吉田先生が経験論として話されていたことであり、格段目新しい事実ではないが、徐々にメカニズムを解明できそうな所まで近づきつつある感じがする。日長に対する応答が多様であることは、草本植物でよく知られており、その分子機構が近年、目覚ましい勢いで明らかになりつつある。このような研究の進歩と歩みをともに出来るよう、樹木の環境応答機構を筋道付けて説明できればいいなと思っている。

謝辞

本稿を書く機会を与えて下さった、「植物科学の新展開 -分子から群集まで広視野研究をめざす-」シンポジウム実行委員(委員長 前島正義)各位に感謝いたします。また、これまでの研究が行えるきっかけを与えて下さった北海道大学大学院時代の初期指導教官であった吉田静夫先生に感謝いたします

参考文献

- Coleman G.D., Chen T.H.H., Ernst S.G. & Fuchigami L. (1991) Photoperiod control of poplar bark storage protein accumulation. *Plant Physiology* **96**, 686-692
- Fuchigami L.H., Weiser C.J. & Evert D.R. (1971) Induction of cold acclimation in *Cornus stolonifera* Michx. *Plant Physiology* **47**, 98-103
- Karlson D.T., Zeng Y., Stirm V.E., Joly R.J. &

- Ashworth E.N. (2003b) Photoperiodic regulation of a 24-kD dehydrin-like protein in red-osier dogwood (*Cornus sericea* L.) in relation to freezing-tolerance. *Plant and cell physiology* **44**, 25-34
- Li C., Puhakainen T., Welling A., Viherä-Aamio A., Ernstsén A., Junttila O., Heino P. & Palva E.T. (2002) Cold acclimation in silver birch (*Betula pubescens* Roth.): development of freezing tolerance in different tissues and climatic ecotypes. *Physiologia Plantarum* **116**, 478-488
- Li C., Junttila O., Heino P. & Palva E.T. (2003) Different responses of northern and southern ecotypes of *Betula pendula* to exogenous ABA application. *Tree Physiology* **23**, 481-487
- Olsen J.E., Junttila O., Nilsen J., Eriksson M.E., Martinussen I., Olsson O., Sandberg G. & Moritz T. (1997) Ectopic expression of oat phytochrome A in hybrid aspen changes critical daylength for growth and prevents cold acclimatization. *Plant Journal* **12**, 1339-1350
- Rohde A, Prinsen E, Rycke RD, Engler G, Montagu MV, Boerjan W (2002) PtABI3 impinges on the growth and differentiation of embryonic leaves during bud set in poplar. *The Plant Cell* **14**, 1885-1901
- Stahelin L.A. & Newcomb E.H. (2000) Membrane structure and membranous organelles. *In* Biochemistry & molecular biology of plants. Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R.L eds. P12
- Ukaji N, Kuwabara C, Takezawa D, Arakawa K, Fujikawa S (2001) Cold acclimation-induced WAP27 localized in endoplasmic reticulum in cortical parenchyma cells of mulberry tree was homologous to group 3 late-embryogenesis abundant proteins. *Plant Physiology* **126**, 1588-1597
- Ukaji N, Kuwabara C, Takezawa D, Arakawa K, Fujikawa S (2004) Accumulation of pathogenesis-related (PR) 10 / Bet v 1 protein homologues in mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) tree during winter. *Plant, Cell and Environment* **27**, 1112-1121
- Ukaji N., Kuwabara C., Takezawa D., Arakawa K., Yoshida S. & Fujikawa S. (1999) Accumulation of small heat-shock protein homologs in the endoplasmic reticulum of cortical parenchyma cells in mulberry in association with seasonal cold acclimation. *Plant Physiology* **120**, 481-489
- Yoshida S. (1984) Chemical and biophysical changes in the plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (*Morus bombycis* Koidz. cv. Goroji). *Plant Physiology* **76**, 257-266

寒さ・雪氷・山岳は植物に何を与えるか: マクロスケールから

佐藤利幸 (信州大学理学部・生物科学 山岳科学)

はじめに

寒さは暖地植物の生活史(生活環)に制限を与える。たとえばイネの登熟時期に15C以下では冷害につながる。バナナの皮は冷蔵庫に入ると黒化する。タマシダの葉は-5Cで凍死する。しかしヤナギや針葉樹は-19Cでも生存できる。なぜか?生物の器官・組織・細胞・小器官・高分子・分子レベルでの総合的解明をめざす植物凍害科学部門が30年前の低温科学研究所の酒井・吉田研究室であった。もちろん近くの生理学研究室でも低温貯蔵によるエネルギー保持や細胞越冬のメカニズムの研究が展開していた。

日本の極寒地(北海道北部歌登町)に生まれた自分にとって、「忘れたい寒さや吹雪」を大学の研究所で繰り返すのはいささか抵抗があった。暖地(内地)に憧れ、旭川・札幌へとたどりついた結果が、北大キャンパス北端の大学院生活の始まりであった。高専を中退し高等学校の生物学知識が皆無の自分にとって、理学部の重厚な暗さ・海藻のむなしさ(ピンセットで海からエクトカルプスをつまむ)・生命科学(分子生物学)の難しさに打ちのめされていた。かろうじて好きな緑色の陸上植物(洞穴のシダ植物)に活路を感じつつも、京都での失恋・大学院受験失敗の末路であった。許された研究室はここだけであった。後に早熟の友人(大村氏)から、低温科学研究所とは、人口雪の誕生と線香花火のエッセイで著名な中谷宇吉郎が礎をつくり、雪氷学の基礎・応用研究において世界の中心であること。生物の耐寒性・低温障害メカニズムで酒井・吉田先生が世界的な研究を推し進めていることを教えられた。恥ずかしくも泥縄人生に翻弄してきた自分はその価値を全く知らずに所属することになった(佐藤, 2001)。

時は流れて30年弱、ちょうど大学院入学の1976年以来顕著となった地球温暖化を知った。1996年夏に中部山岳に転勤して早や8年が過ぎた。その間に地球温暖化により亜熱帯の植物群のいくつかが本州暖地(暖温帯)にも侵入する事実を知った。かつては和歌山県南部まで分布していたモエジマシダが名古屋大学構内での生活環が認められ、静岡県南部まで分布していたホウライシダが松本市内で確認された。ここ数年、成田空港や大阪国際空港に降りると、熱帯マレーシアのクアラルンプールやブラジリア空港での「熱帯の臭い」を覚える。すなわち目に見えないミクロの世界でも温暖化が進行しているようである。

さらに、1976年から顕著となった冬期間の温暖化によって、高地山岳に広く分布していた寒地植物が姿を消す事実も報告されている。極寒の故郷歌登町でも-30Cにはならないと聞く。ロシアのオイミヤコン(最寒-71.2Cの記録)近くの女性村長さんも「最近は暖かく-60Cにもならない・・・」とつぶやいた。南日高のアポイ岳では高山草原にハイマツの侵入が顕著と聞く。南アルプス北岳で1986年に発見されたヒメヤナギランやヒイラギデンダも消えたのかも知れない。古くは極東ロシアのグイマツもかつては日本の山地に広く点在していたのであろう。

本抄録では、暖地性植物への生活史制限や分布拡大を阻止する寒さ・積雪・山岳環境ではなく、「寒冷・積雪・山岳環境の植物生活史への恩恵」について、寒地植物群の立場から見直してみる試案である。

ちなみに北海道低地から中部山岳高地に追いやられた自分を、「寒地生物の一例」に見立て、寒地植物の生育場所探しと分布様式についてマ



図1 ツンドラにおける局所植物多様性の調査

クロススケールから考察してみたい。

山岳環境における寒さと雪氷

中部山岳では標高 2500 m 以上（北海道では 1000 m）で森林帯が消え、高山草原となる。その延長上 3000 km のツンドラでは樹木層（胸高直径で幹がない）が欠落して草本層（小型の低木は多い）が広がる（図1）。

「寒さ・雪氷・山岳」これらのキーワードは北北海道に生まれた自分には「ネガティブ・ストレス：辛さや厳しさ」を連想させる。北西日本に生まれた人間にとって、「雪崩れや冷夏」は台風や地震と並んで、人間生活への有害要因と考えやすい。しかしながら、もとより寒冷地に生育する草花にとってはどうであろう。ロシアツンドラの永久凍土の表面は9ヶ月以上も氷の世界である。ロシア語に凍土の言葉はなく、夏の一瞬を「融けた大地」と呼ぶらしい。地下には天然の冷蔵庫をもち、我々と瓜二つのサハ（ヤクート）人が10年先までの食料を確保していた（佐藤, 2000）。蚊のいない凍った冬こそ快適な移動時期とも聞いた。ツンドラの植物は1ヶ月ほどで花をつけ実を結ぶ。温室のような覆いをつけると限られた植物のみが大きく繁茂し、多くの植物が姿を消すとも言われる。

植物にとっての寒さとは

温帯すなわち季節のある地域に生息する植物は春夏秋冬に応じて姿あるいは生理生態的な応答（順応）ができる。人間活動における昼夜の活動や生理反応の年版である。春夏秋冬この慣れ親しんだ季節感も、シベリアとマレーシアでは全く通用しない。極寒の冬と暑い夏しかないシベリアにはツンドラとタイガがある。またマレーシアには冬がない。温度の年較差は日較差より小さい。夜明けと夕暮れはごく短い。夕方を味わう時間はない。またシベリアの夏には夜がない。温帯域（日本）での秋から冬にかけての寒さ到来は、多くの植物に夏緑性の植物季節を教える。これは食害や傷ついた葉（ときには病原菌）を入れ替える準備ともいえる。一般に常緑の針葉樹や広葉樹の光合成速度は夏緑性の葉の約半分である。淡い緑の新緑こそ効率のよい葉なのである。ツンドラのイワベンケイを標本として持ち帰ったがなかなか乾燥できない。60度で1ヶ月間乾燥しても葉の先端から芽を伸ばす始末である。乾燥標本作成をあきらめて新芽をシャーレで培養した。しかし3日で菌類が発生しトロトロに溶けた。さすが菌や病気に出合ったことのないツンドラ産イワベンケイ（CAM植物?）であった。

今年の夏は暑かった。長野県でも1ヶ月近くの30C以上の日があったろうか？マメ（ダイズやクロマメの実入りが少ないと聞く。寒地植物や温帯植物には寒さや涼しさが必要らしい。なぜか？謎はさらに広がっていく。

地点から地球へ

信州へ移ってから8年、ほぼ日本の重心にいる。すなわち日本列島を研究するには地の利を得ている。実際の交通事情はさほど良くはないのだが。一方想い起こすと、北海道北部は北緯45度、北半球陸域の比較研究には最適であった。

1990年秋、ロシアサハリンへ渡った（マリモ墓

参団?：神田隊長)。初めて北海道を北から眺め、礼文島よりもはるか北に人々が住むことを実感した。そして南(暖地)の小島、日本列島に想いをはせる子供たちと出会った。38年間の暖地への憧れが一気に消えうせた。はるか北に広がるロシアの大地に立ってみると、北海道は最寒地ではなく、北半球研究の最地であることを知った。そんな折、信州大学への転勤が待っていた。温暖化に伴って多くの優秀な知人が北海道への転勤を希望したのである。結果として、自分が中部山岳の谷間に遺存分布の地(レリック・レフージア)を求めて転勤した。

さて、北海道からでも信州からでも視野のスケールをどんどん広げてみよう。大雪山から北海道、日本、北東ユーラシア、北半球そして地球へと拡大したときの分布についてシダ植物2種(ウサギシダとイワウサギシダ)を用いて頻度分布を調べると、その出現頻度は波打つように入れ替わる。すなわち範囲を拡大していくと種ごとに分布頻度の個性的な軌跡が得られる。これを種の地点から地球へのスケール軌跡とよび、個性を数量化する試みである(Sato & Takahashi, 1996)。2年後、似たようなことを考えた人がいる(Kunin, 1998)。しかし70種もの植物について、保護すべきスケールをみごとに提言している。残念ながら自分たちの論文は引用されていなかった。

日本の高山ではごく稀な、マルバギシギシやリシリヒナゲシもシベリアではどこにでもある雑草なのである。マルバギシギシはシベリアでの重要な野外調査での青菜となった。絶滅危惧植物の保全を考えるうえでどの地域あるいはどの国における対象

であるかを明確に明示すべきことを実感した。

応答様式の時空間スケール・生物レベルの違い

時間反応、時間を厳密に考えると難しいようであるが、とりあえずクウォーツの振動を基準に考える。その延長としての一日・一週間・一ヶ月・春夏秋冬・一年・十年・一世紀・千年程度を想定する。生理反応にかかる時間は生物レベルで異なる。分子反応は数分、高分子反応には数時間、細胞周期は数日など。植物定着には10年程度の時間が必要であろう。それが分布定着(生活環の継続)するには100-1000年もの時間が必要であろう。

耐寒性や傍雪氷性を考える場合、遠くに残雪を蓄える山岳は単に美しいだけではない。そこに源をもつ春の小川は夏を超えて持続的に田畑を潤す。農作物を育てるのは山岳が見える風景が望ましい。雪のかまくらは外気を遮断できる。トクサの枝に作られるアイスクャンデーはトクサを冬枯れから守る。これらは器官外凍結(石川・酒井氏らの研究参照)に相当する。シダ前葉体の生存は近接する細胞群の凍結や脱水によって凍結水をなくする。高分子(アクアポリン?前島氏の研究参照)の存在は脱水を適切に促進する。雪氷や

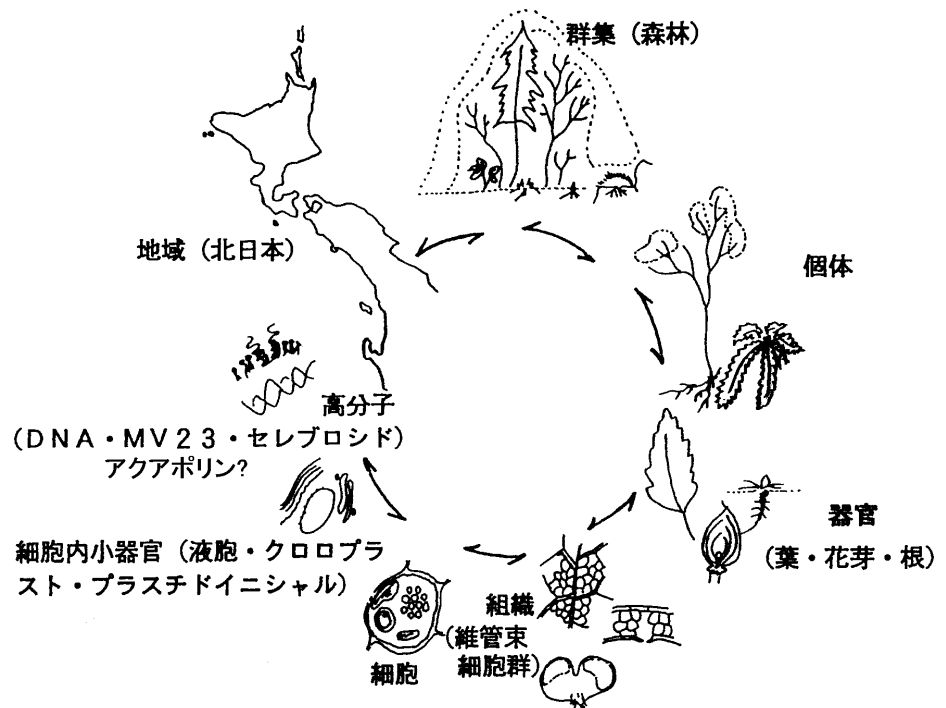


図2 異なる生物レベルからの傍凍(寒)性

積雪は脱水から給水までの空間的スケールに依存して植物成長に寄与しているようである(佐藤, 2001a; 佐藤, 2002: 図2)。

積雪分布と植物の分布の対応もときどき議論されるが、こうした気象的物理環境要因と植物分

布には対応するスケールはごく限られていることも忘れてはいけない。たとえば本州に広く分布するリョウメンシダは北海道では明らかに多雪地帯に対応している。しかし本州では積雪のない南本州にも多産する。このように幾重かの環境フ

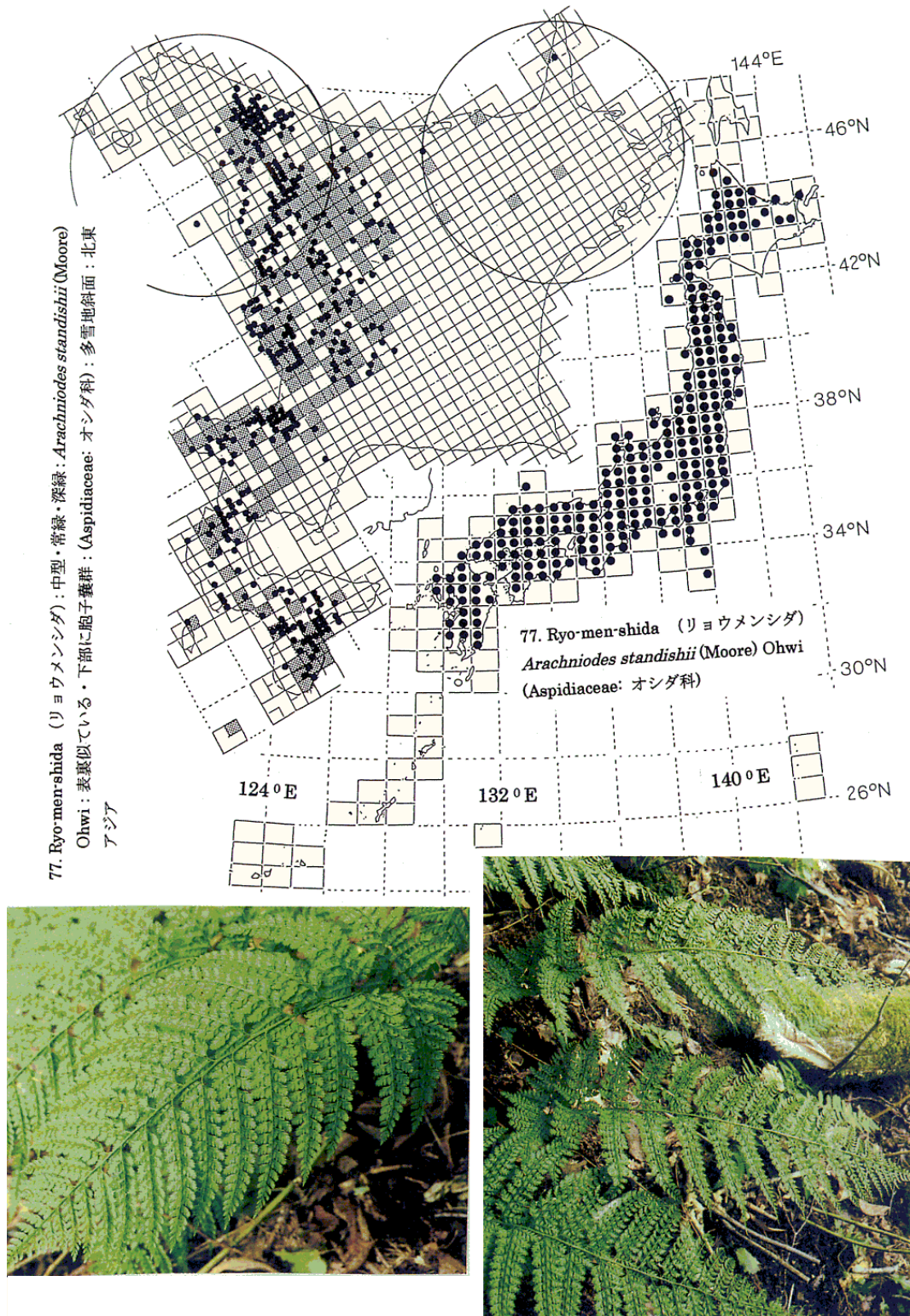


図3 リョウメンシダの分布

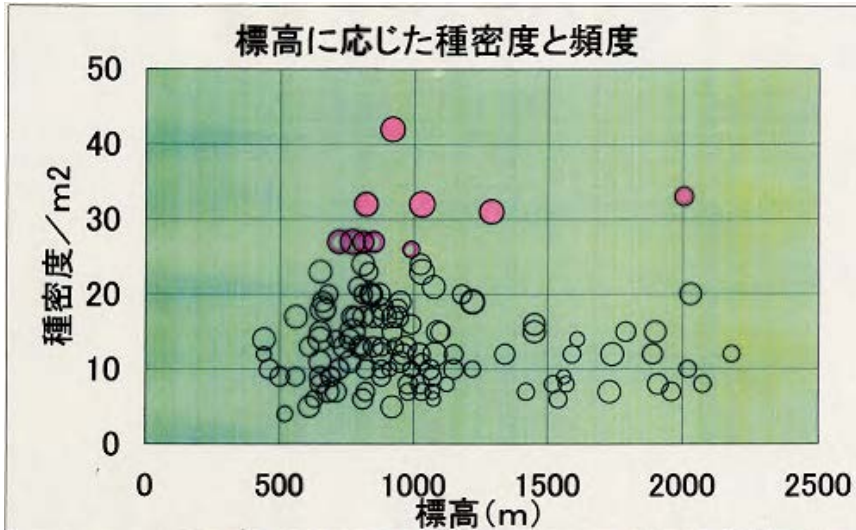


図4 標高別の種密度分布と積算頻度（佐藤・永山、2002；佐藤・中西、2003 から）

イルターがスケールや場所によって複雑に絡み合って植物生活史に係わっているようである（佐藤、2001b；2002：図3）。こうしたスケーリングによる解析のアナロジーは人間の社会活動へも応用できそうである（佐藤、2003）。

シベリアからヒマラヤへの垂直分布

シベリアのおどろくべき局所植物多様性は、単純な2種の水平分布の拡大競争のための実測をめざしたシベリア調査の目的を大きく変えた。1平方メートルに何と30種の種子植物が確認できたのである。コケ・地衣類を入れると50種を超えた（Sato et al., 1997, 1999）。これはヨーロッパアルプスでの50種に匹敵する。うわさによるとモンゴル湿原では65種を超えるイネ・カヤツリグサ科を中心の高い種密度が見られるとも聞く。自分がこれまで確認できた最大種密度は南信州根羽村の42種（種子植物とシダ植物）である（佐藤・永山、2002）。シダ植物に限ってみると信州北西部と信州南西部に局所植物多様性（積算種数）のホットスポットがある（佐藤ら、2000）。

ここではホットスポットと呼ばせてもらうが、地球規模での生物多様性では固有種や大型動物での守られるべき地域のみが強調されており、残念ながらツンドラや東ユーラシア（日本）など全く無視されている（Prendergast et al., 1993; Myers

et al., 2000）。個人的には局所植物多様性においては日本や東シベリアは世界有数と予想している。少なくとも北海道の日高西山麓は4.7平方キロメートルに506種の維管束植物が記録された（高橋・佐藤、2001）。

信州へ赴任して3年後だったと思う。岩槻先生から電話があった。「信州にも高くはないが山があるね。中国雲南省の山岳研究として、立教大学の学術フロンティア：環境変動に対する生命の適応戦略、が始まるので、

優秀な人に限って推薦しようかと・・・」。いつもの厳しく怖い会話から始まる優しい誘いであった。「まだ信州の山、登っていないのですが・・・」。「中部山岳を研究するにも少し大きな山を見ておいたら・・・」。慌てて2-3の中部山岳での局所植物多様性を測定して、翌年ヒマラヤ東麓の雲南省北西部に飛んだ。中国雲南省では約3000m以上から森林がかるうじて残る。4000m付近から高山草原がはじまる。息苦しさのなかビデオ撮影によって、20-25種/m²の種密度を確認できた。4500m以上での計測が待ち遠しい（佐藤・永山、2002；佐藤・中西、2003）。中部山岳では、標高1000m付近と3000m近くで30種/m²の種密度が確認できた。すなわち、里山と森林、森林限界と高山草原のエコトーンに相当するところに高い多種共存域が見えそうである（図4）。

熱帯に多産するシダ植物、これは正しくない。ボルネオのキナバル山（赤道近く）では1500m付近で最も多くのシダ種数が確かめられている（Parris et al., 1992）。キナバル山岳を円錐に近似すると、シダ植物種密度は1500m以上ではほぼ一定である。

マレー半島のクアラルンプール周辺でも1000-1700mでシダ植物の高い種密度が確認された。狭い立法枠5m×5m×5mでの調査によると、

和歌山県や三重県で最も高いシダ植物種密度 (30 spp./ $(5\text{m} \times 5\text{m} \times 5\text{m})$) が確認された (Sato et al., 1999)。狭い範囲では熱帯 (赤道近く) でのシダ植物の種密度が高いわけではない。むしろ暖温帯で最も高いシダ植物の種密度が確認された (Sato et al., 2000; 佐藤, 2003b)。

松本市周辺の標高に応じたオシダ植物葉の形態や細胞サイズを調べると、1000 m付近で脈密度が高く、細胞サイズは 2000 mのほうが大きい傾向が示され、生物レベルに応じた調節が広い垂直分布を可能にしていると考えられる。シダ種数分布においては中部山岳では標高 1000mあたりに最大値が期待できそうである (佐藤ら, 2001, 2002; 中西ら, 2003)。

水平分布から何がわかるか

さて、地球上を水平に見ると緯度の高まりにお

うじてシダ植物は激減する。ツンドラでは 10 種程度であろう。熱帯低地林では隣の木々が決して同種が見られないほどに樹木の種数が豊かである。ところが草本植物やシダ植物は決して多くない。マレーシアのクアラルンプール周辺 (標高 500 m以下) では北海道や信州より 1 ヘクタールあたりのシダ植物は少なく、10 種以下である。標高 1000 m付近で 10 種を超える程度となる。1500 mを超える雲霧帯で 20 種近くなる (Sato et al., 1999a; 佐藤・中西, 2003)。アマゾンや北米のプレーリには極端にシダ植物が少なく、同時に植物種密度は低い。北米西部海岸のオリンピック半島でも $100\text{m} \times 100\text{m} \times 100\text{m}$ の立法枠を想定すると 5 種程度のシダしか見出されない。すなわち広い平原にはシダ多様性や高い局所植物種密度は期待できない。水分循環を促す山岳や地形の複雑性 (標高差や谷密度) が局所植物多様性を支え、同時に

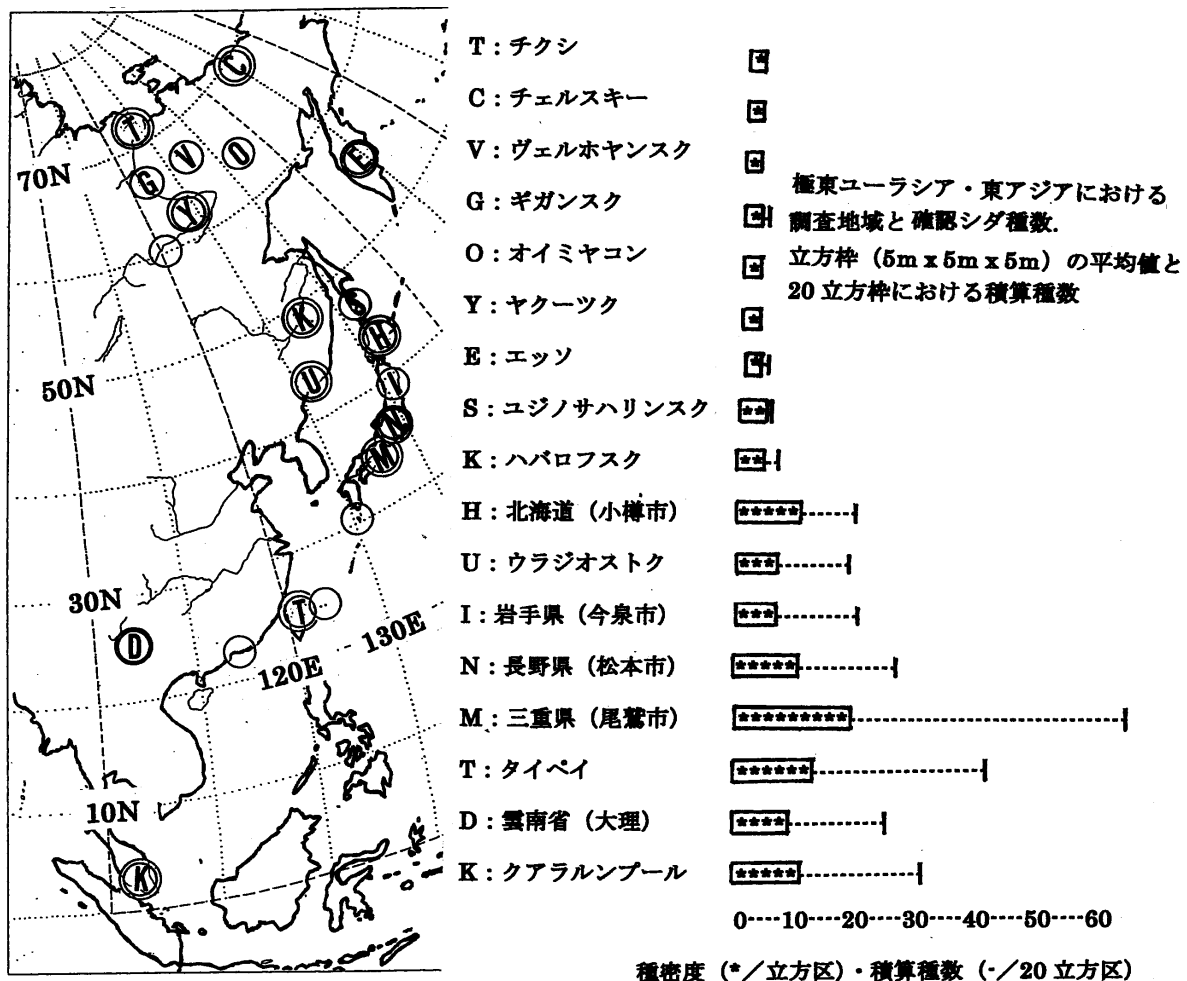


図5 各地域での積算シダ植物種数 (佐藤, 2003b)

植物の遺存分布（レフージア）を宿す環境を準備しているようである。日本列島ではごくまれなカラフトメンマも北海道大雪山系と中部山岳のみの分布が確認されている（佐藤ら, 2000）。

広大なヤクーツク（サハ）州における水生植物（ミクリ属）4種の地理分布をもとに、普通種2種（エゾミクリとチシマミクリ）の環境傾度との対応を調べた結果、7月の水温分布・水質との相関が導かれた。これらは狭い共存域からは全く予想ができない情報である（Takahashi et al., 2001）。また本州ではどこにでもあるように見えるヤマイヌワラビとイヌワラビの分布についても狭い範囲から日本列島への範囲へと拡大して出現頻度の軌跡を描くと明確に両種を区別できることが示されている（福原ら, 2000）。

今後の展望（種密度はなぜ高まるか）

どのように局所植物多様性（ここでは種密度）が定まるのか？まだ素朴で未熟な問題設定でしかないが、有限な地球における人類永続の秘訣を探るために、「生物多様性の創出維持のプロセスとメカニズム」の解明は急ぐべき課題であろう。

まだ空想の域ではあるが（仮説ででない：実験証明ができてこそ仮説となる）以下にその成立条件を列挙してみる。

(A) 埋土種子（露崎氏を参照）を含め、植物種の移入・遺存・種分化が近傍で起こっていること。
(B) 時空間スケールでの植生移行帯（エコトーン）の存在。
(C) ほどほどの攪乱による多種進入の可能性：たとえば人為攪乱（里山）と気象による物理的攪乱（山岳草原）。
(D) 他種を排除しない生活史を営む存在（小型であり、他種への生活空間の準備?）。

これら局所植物多様性を支える要因をまとめると、(A-C)は複数の植物群要素（種子源）の存在であり、(D)は証明が難しいが共存を促す生物要因となる。いずれも定着の偶然を待つ時間が要求される。シダ植物（イワウサギシダやニオイシダ）に限るとツンドラでの生育は古い岩場・岸壁

のみである。タイガ疎林にはヒメドクサとコスギランが点在する。いずれも小指にも満たない極端な小型植物である（Sato et al., 1997; 1999b）。ほどほどの攪乱としたが、崩れ逝く河畔（強い攪乱）の植生はタイガ疎林林床とは全く異なる（Tsuyuzaki et al., 1999; 五十嵐ら, 2003）。これらを思い起こしながら現在、植物定着の空間依存に関する実験的研究を、穴あきブロックを用いて開始したところである（佐藤ら, 2003）。

おわりに

「局所植物多様性（種密度）を創出維持する環境」を考えると、一つには植生の移行帯（エコトーン）を候補に挙げうる。そこにはいくつかの植物要素が混在する。水平分布北限と南限・垂直分布上限と下限にも相当する。

皮肉なことは、ちょうど半世紀の歴史を越えた10年前の低温科学研究所を回想させる。まさに、この同窓会企画を構成するメンバーが集った当時のことである。吉田先生の研究室がまさにそのホットスポットに相当しないだろうか？当時の吉田先生の苦悩は想像を絶するものであったと思う。しかし、純粋科学に対する吉田先生の情熱と努力は分野を越えて伝わってきた。当時、吉田先生が「目的研究所には必ず寿命がある、いつまでも同じ目的は通用しない・・・」とつぶやかれたことを思い出す。泥縄人生を送ってきた自分にとって寂しい言葉であった。「生理・生態学の店をたたむ・・・」と感じたからである。さて、変わりゆく研究所と激動する時代に直面しつつも吉田先生はつねに「真摯に純粋科学への情熱を傾け続けること」を後姿で教えてくれた。そうでなければ、当時の小さな研究室から、これほど繊細多彩な線香花火の輝きを放つ同窓生は育ち得ないと思う。もちろん自分以外の数人はすでに大輪のスターメインへの点火がなされたようであるが。

最後に白状すると、生理生化学と生態進化学分野の違いを装いつつ、弟子ではないと気張ってきた自分ですが、吉田先生には実に20年（大学院5

年・助手 15 年)もの永きにわたり公私ともどもお世話になったのです。博士1年で親が倒れ就職希望したとき研究継続を勧めてくれたこと。変則助手採用に同意してくれたこと。オーストリア留学を薦めてくれたこと。信州大学への推薦状を影から書いてくれたこと。これまでの研究人生の節目すべての恩師であり、現在も継続しているのです。ただただ深く感謝し、この場を借りてお礼申し上げます。

謝辞

本稿を書く機会を与えて下さった、「植物科学の新展開 -分子から群集まで広視野研究をめざす-」シンポジウム実行委員(委員長 前島正義)はじめ準備委員会(露崎史朗氏ら)各位に感謝いたします。また、これまでのシダ植物の比較生活史研究から、寒地植物群(シベリア・ヒマラヤ)の局所植物多様性(種密度)研究への展開のための励ましと自由な時空間(北海道大学低温科学研究所助手時代)を与えて頂いた吉田静夫先生に深く感謝致します。ひとつ謝らなくてはいけないことは、以下につづく日本語の報告書の数々、日本の重心に居てアメリカ合衆国嫌い人間ゆえの意地ではなく、まだ西欧との研究舞台に登場できていないことです。ただ、真の「生物多様性の法則」は東南アジアあたりから発信されることを信じつつ、まだこれからのつもりですが・・・。

参考文献

福原 隆・山本雅道・佐藤利幸(2000)温帯性メシダ属2種(ヘビノネゴザとイヌワラビ)の頻度と共存率・日本列島から松本市周辺へのスケーリング解析. 信州大学環境科学年報 22: 13-23.

五十嵐八枝子・岩花 剛・仙頭宣幸・露崎史朗・佐藤利幸(2003)ロシア北東域における異なる植生型から得られた表層花粉群 古植生復元の基礎資料として. 第四紀研究 42: 413-425.

Kunin, W.E. (1998) Extrapolating species abundance

across spatial scales. *Science* 282: 1513-1515.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-857.

中西由佳・増沢武弘・福原 隆・佐藤利幸(2003)信州中央部の標高に応じたオシダ属の種・個体・葉脈・細胞密度の分布 生物レベル(種・個体・細胞配列)を紡ぐスケーリング解析. 信州大学環境科学年報 25: 97-105.

Parris, B. S., Beaman, R.S. & Beaman, J.H. (1992) The plants of mount Kinabalu; Fern and fern allies. Royal Botanic Garden, Kew, 165pp.

Prendergast, J.R., Quinn, R.M., Lowton, J.H. & Eversham, B. C. (1993) Rare species, the coincidence of diversity hotspots and conservation strategies. *Nature* 365: 335-337.

佐藤利幸(2000)極東ロシアの寒地植物・永久凍土と氷河地形の草花とシダ. 「知られざる極東ロシアの自然」千葉県立中央博物館: 特別展示解説書 pp.140-144.

佐藤利幸(2001a)生命系のための雪氷環境、耐寒性(Frost resistance)の再考 耐寒性・耐凍性より防凍性? いや傍凍性(傍寒性)! 北方山草 20: 47-54.

佐藤利幸(2001b)生態科学における耐寒冷性: 生物レベルの時空間スケールでの再考. ハンドブック生物学データ集. 朝倉書店. pp. 2486-2488.

佐藤利幸(2002)雪は植物分布を決めるか? 2002 年度雪氷防災研究講演会報文集 pp.133-140.

佐藤利幸(2003a)草本植物の広がりとは多様性. 「信州大学: ところかわれば生活かわる一環境で違う植物のくらしー: 編集: 島野光司」. エルネット「オープンカレッジ」第3回: 1-8.

佐藤利幸(2003b)山岳・里山が創出維持する局所の植物多様性. 「山に学ぶ山と生きる」分担執筆. 信濃毎日新聞社. pp.125-137.

- Sato, T. & Takahashi, H. (1996) A quantitative comparison of distribution patterns in two species of *Gymnocarpium* from local to global scaling. *Acta Phytotax. Geobot.* **47**: 31-40.
- Sato, T., Fukuda, M. & Kodama, Y. (1997) A scaling analysis of micro-spatial distribution patterns in plants of tundra and taiga regions in north-eastern Eurasia. Proceedings of 5th International Symposium of Joint Permafrost Studies between Japan and Russia (eds: Inoue G. & Takenaka, A.) NIES, Tsukuba, p.67-75
- Sato, T., Guan, S.L. & Furukawa, A. (1999a) A quantitative comparison of pteridophytes diversity in small scales among different climatic regions in eastern Asia. *Tropics* **9**: 83-90
- Sato, T., Hayasaka, Y., Sakaguchi, H., Fukuhara, T., Yabuki, H. & Kodama, Y. (1999b) Vegetation patterns and phyto-diversity in micro-scales on permafrost of Tiksi tundra, northernmost Sakha (Yakutia, Russia). Activity report of GAME Siberia in 1999 pp. 25-32.
- 佐藤利幸・阪口寿子・早坂祥彦 (2000) 隔離分布するカラフトメンマをとりまくシダフロアの定量比較・遺存分布する寒地植物周辺のスケールリング解析. 信州大学環境科学年報 **22**: 1-12.
- 佐藤利幸・永山葉子・福重洋平 (2001) 長野県におけるシダ植物相のホットスポットについて 信州大学環境科学年報 **23**: 25-32.
- 佐藤利幸・永山葉子 (2002) 中国雲南省における里山の局所植物多様性 ツンドラ・日本温帯との比較 . 立教大学理学研究科学術フロンテア「環境変動に対する生命の適応戦略」2001年度(第1年度)報告書. pp.86-96.
- 佐藤利幸・永山葉子・中山 明 (2002) 信州中央部におけるシダ植物の多様性と共存率 地域および地点から見た種数と頻度 . 信州大学環境科学年報 **24**: 99-105.
- 佐藤利幸・中西由香 (2003) 中国雲南省の局所植物種密度の解析. 立教大学理学研究科学術フロンテア「環境変動に対する生命の適応戦略」2002年度(第2年度)報告書. pp.133-140.
- 佐藤利幸・益永淳二・高橋昌治・常盤哲洋・清澤 浄(2003) 緑の歩道「ささやきの理路」をめざす 局所植物多様性の創出 六角柱穴あき敷石の開発 (実験計画報告). 信州大学環境科学年報 **25**: 107-111.
- 佐藤利幸・島野光司・中西由香・福原 隆・増沢 武弘 (2003) 長野県中央山地におけるシダ植物種密度の標高別分布. 信州大学山岳科学総合研究所年報 **1**: 102-103.
- 佐藤利幸・鈴木啓助・戸田任重 (2004) 長野県低地におけるシダ植物の多様性-天竜川水系のシダ種密度分布特性-. 信州大学環境科学年報 **26**: 91-94.
- Takahashi, H., Volotovskiy, K.V. & Sato, T. (2001) A quantitative comparison of distribution patterns in four common *Sparganium* species in Yakutia, Eastern Siberia. *Acta Phytotax. Geobot.* **51**: 155-167.
- 高橋英樹・佐藤利幸 (2001) 北海道大学農学部附属牧場の維管束植物相. 北大農・牧場研究報告 **18**: 33-122.
- Tsuyuzaki, S., Ishizaki, T. & Sato, T. (1999) Vegetation structure in gullies developed by the melting of ice wedges along Kolyma river, northern Siberia. *Ecol. Res.* **14**: 385-391.

寒さで甘くなるジャガイモたちは...

遠藤千絵

(北海道農業研究センター畑作研究部)

はじめに

ジャガイモは、一般にはイモが休眠期に入ってから収穫し、休眠あけ後も低温に貯蔵することで強制的に休眠を延長できるため、長期にわたって貯蔵が可能な作物である。休眠中は生理的活性が低く作物としての品質変化も少ないと考えられがちだが、様々な環境条件に反応して変化している。特に、低温貯蔵での還元糖の増加は、"Low-temperature sweetening"と呼ばれ、植物科学的にもよく知られている現象である (Isherwood 1973, Burton 1989, Sowokinos 1990)。一般的にも、北海道では昔から、氷室貯蔵したジャガイモを春先に食べるととても甘くておいしいということを皆さんご存知で、甘さを生かした料理法などが家庭で工夫されている。しかし、食品加工の観点から見ると、ポテトチップスなど高温の油加工の際には、増加した還元糖はメイラード反応と呼ばれる現象を通して茶褐色の色素を生成、製品に苦み・焦げ色を生じさせる (Shallenberger *et al.* 1959)。さらに最近、このメイラード反応中に発がん性が疑われているアクリルアミドが生成されると報告され (Mottram *et al.* 2002, Stadler *et al.* 2002)、ジャガイモベースの油加工品で高濃度に検出されたとの報告もなされた (Tareke *et al.* 2002)。このため低温での還元糖の増加は油加工ではマイナスの要因となっている (Burton 1989, Blenkinsop *et al.* 2002, Chuda *et al.* 2003)。通常、油加工業者では、低温貯蔵での糖の増加が低い品種を原料イモとして用いて、8-12 くらいの温度で貯蔵し、長期貯蔵の場合はさらに reconditioning (16-20、2 週間の昇温処理で糖を減少させる) 処理を行って対応している (van Es & Hartmans 1987, Blenkinsop *et al.* 2002)。

北農研センターでは、ジャガイモの用途ごとに多くの品種を育成している。この中には、低温貯蔵における糖の変動が特徴的なものがある。これらの品種・系統を用いて糖変動を詳細に解析することで、"Low-temperature sweetening"のメカニズムを明らかにしていきたいと考えている。本稿ではこれまでに得られた知見の一部を紹介させていただく。

用途別品種を用いて

ジャガイモは用途別に、生食用 (青果として流通するもの)、加工用 (ポテトチップスやフライドポテトなどに加工業者によって加工されるもの)、でん粉原料用 (でん粉精製に用いるもの、精製でん粉は片栗粉として、また練り製品や麺類、菓子類の原料として使用される) の3つに分類することができる。それぞれの用途で求められる品質が異なるため、用途ごとに適した品種が開発されている。本研究では、生食用品種として「男爵イモ」「メイクイン」「キタアカリ」、加工用品種として「トヨシロ」「スノーデン」「ホワイトフライヤー」「ホッカイコガネ」「農林一号」、新しい用途開発を目指して最近育成されたカロチノイドを高含有で肉色がオレンジの「インカのめざめ」、アントシアニン含有で肉色が紫の「インカパープル」「キタムラサキ」、肉色が赤の「インカレッド」等を用いた。これらのイモを4 および20 で貯蔵して糖量を経時的に解析するとともに、ショ糖をグルコースとフラクトースに分解する酵素：酸性インベルターゼについて、その活性および遺伝子発現を解析した。

低温貯蔵における3つの糖変動様式

いずれの品種も 20 貯蔵では糖量は少なく 1 mg/g 生重量以下で推移した。これに対し 4 貯蔵では、糖の変動は品種により「還元糖増加型」「糖量低推移型」「シヨ糖増加型」に分類できることが明らかとなった (Matsuura-Endo *et al.* 2004)。図 1 に「還元糖増加型」としてメークイン、「糖量低推移型」としてホワイトフライヤー、「シヨ糖増加型」としてインカのめざめの糖変動を示す。

「還元糖増加型」では、低温貯蔵開始後、まずシヨ糖が顕著に増加し、貯蔵 2 週間でピークとなりその後減少した。還元糖はシヨ糖より 1 週ほど遅れて増加し始め、貯蔵 60 日位まで増加、その後は同様のレベルで推移した (図 1A)。これまでに調べた品種・系統のうちの大部分が「還元糖増加型」を示すことがわかってきている。これらは Hammond *et al.* (1990) や Zrenner *et al.* (1996) が報告している、いわゆる「易糖化性品種: high sugar-accumulating, cold-sensitive cultivars」に属すると言える。

これに対し「糖量低推移型」では、基本的には「還元糖増加型」と類似の変動パターンを示すが、還元糖量が「還元糖増加型」の 1/4 から 1/6 程度で推移する点が異なっていた (図 1B)。ホワイトフライヤーの父は「ND 860-2」といって、これは「low sugar-accumulating, cold-tolerant breeding line」としてノースダコタ州立大学で育種開発された「難糖化性」系統である (ここでいう "cold-sensitive / -tolerant" の意は「低温貯蔵で還元糖が顕著に蓄積、ゆえに油加工で容易に茶褐色になってしまう/そうではない」の意であり、糖が増加する方が "sensitive" ということで、低温科学の「凍結耐性」と逆になっているのがおもしろい)。現在、この ND 860-2 を母本として、"cold chipping" できる新品种 (つまり 8 より低い温度で貯蔵しても還元糖増加が少なく、白くきれいなチップスが揚げられる品種という意) の開発が各国で盛んに行われている (Richardson *et al.* 1990, Blenkinsop *et al.* 2002)。

一方、「シヨ糖増加型」では、低温貯蔵開始後、

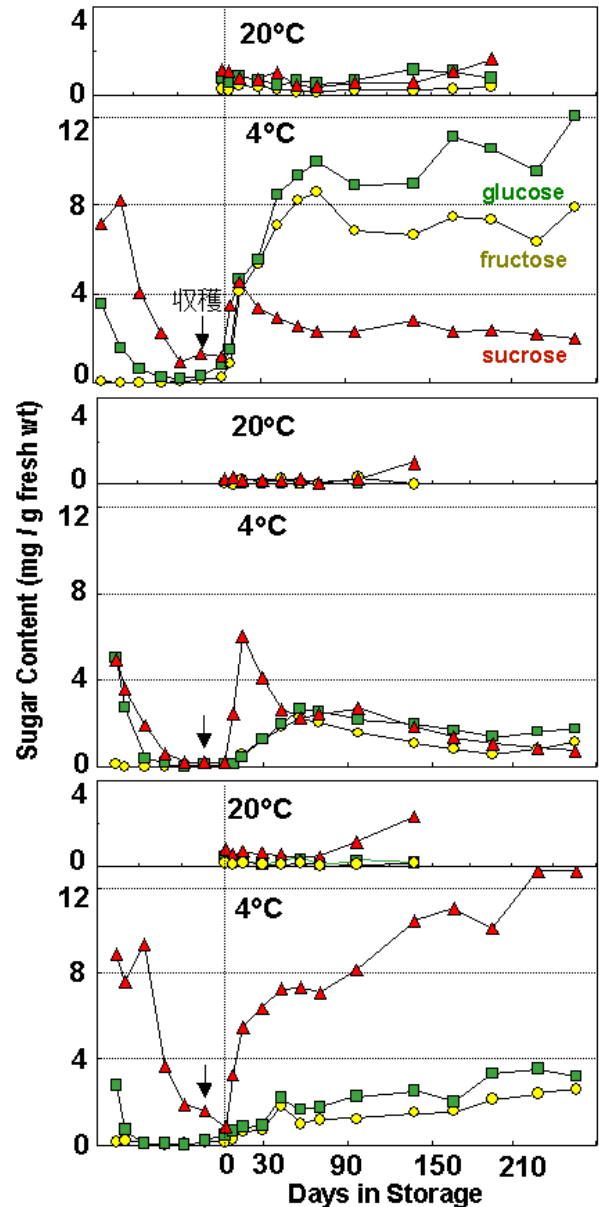


図 1 成生育中および貯蔵中の糖量の変化。図中矢印において収穫、2 週間のキュアリングの後、貯蔵を開始、経時的に塊茎より糖を抽出して HPLC にて定量した。A メークイン、B ホワイトフライヤー、C インカのめざめ。

顕著に増加し始めたシヨ糖は、貯蔵 2 週後も増加を続け、250 日後にはシヨ糖量は他の 2 つのパターンに比べ 6 倍量に達した (図 1C)。

「インカのめざめ」は高カロチノイド含有の 2 倍体品種で (通常の栽培品種は 4 倍体)、その来歴に、アンデスの原産種 *Solanum phureja* と *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* を持つ。高カロチノイドの特性は subsp. *andigena* に由来するが、「シヨ糖が増加し続ける」というきわめてユニークな特性については、どの来歴によってもたらされたのか、

現在解析を行っている。

貯蔵中の酸性インペルターゼ活性の変化

ジャガイモの"Low-temperature sweetening"における、糖代謝関連酵素の研究は数多くあるが、メカニズムについてはまだ完全に解明されていない。大まかには以下のように説明されている。低温貯蔵すると、塊茎細胞のアミロプラスト中の澱粉が分解され、これが細胞質に出て、UDP-グルコースピロフォスホリラーゼとスクロースリン酸シンターゼを介してショ糖となる (Sowokinos 1994, Hill *et al.* 1996)。その後ショ糖は液胞に移動、酸性インペルターゼによってグルコース、フラクトースに加水分解されるが、活性の程度は品種に

よって異なる場合がある (Richardson *et al.* 1990, Zrenner *et al.* 1996)。還元糖は再び細胞質に出て、フォスホフルクキナーゼ (PFK) をへて、解糖系に移っていくが、Hammond *et al.* (1990)は、品種によって PFK の低温感受性に違いがあるため糖蓄積の程度が異なるとしている。本研究においては、「還元糖増加型」と「ショ糖増加型」を比べた場合、後者は貯蔵2週後も「ショ糖があまり分解されていない」とみてとれる。そこで、3つの変動様式を示す各品種でショ糖を還元糖に分解する酸性インペルターゼの活性を解析してみた (Matsuura-Endo *et al.* 2004)。

図2に図1と同様、「還元糖増加型」としてメークイン、「糖量低推移型」としてホワイトフライヤー、「ショ糖増加型」としてインカのみめざめにおける、酸性インペルターゼ活性の変動を示す。いずれの品種も20 貯蔵では活性は低かった。4 貯蔵では、メークインでは活性が貯蔵2週に向けて急激に増加、その後高いレベルで推移した (図2A)。一方、ホワイトフライヤー、インカのみめざめでは4 貯蔵でも活性は低く推移した (図2B, C)。糖変動パターンからみてメークイン/インカのみめざめのインペルターゼ活性の高い/低いはずける結果であった。ホワイトフライヤーでは、2週以降のショ糖の減少は、酸性インペルターゼ以外の酵素、スクロースシンターゼなどが関与している可能性があるかと推測している。またこの品種での貯蔵後期の活性増加は萌芽と平行であり、これらの関係についても解析する必要がある。

次に、酸性インペルターゼの遺伝子発現について

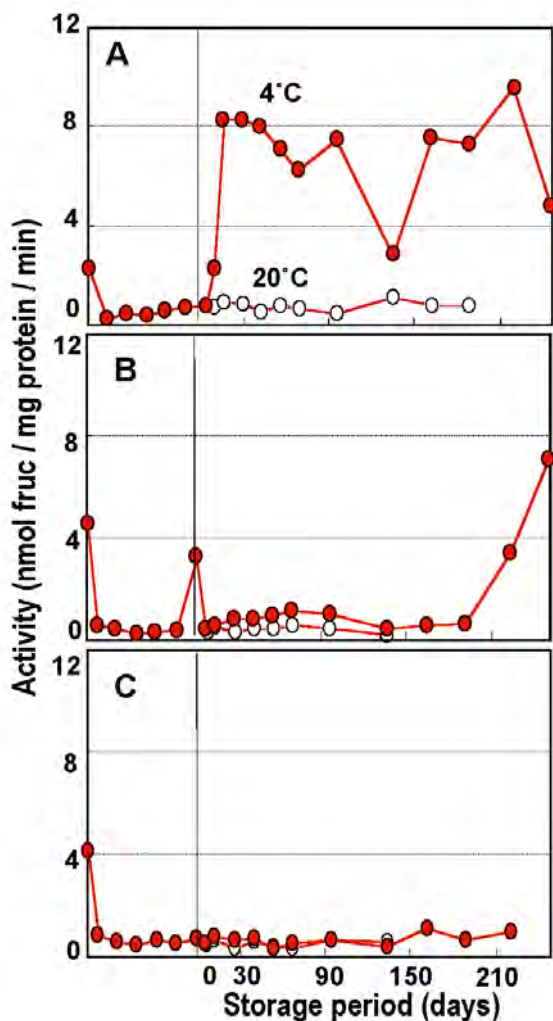


図2 生育中および貯蔵中の酸性インペルターゼ活性の変化。図1と同様の塊茎より酵素粗抽出液を調製して酸性インペルターゼの活性を測定した。A メークイン、B ホワイトフライヤー、C インカのみめざめ。

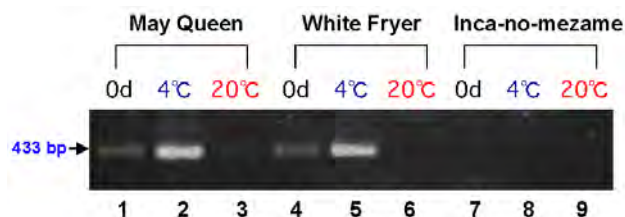


図3 品種による酸性インペルターゼ遺伝子の発現の違い。図1と同様の貯蔵1週目の塊茎より RNA を単離し、酸性インペルターゼの 433 bp フラグメントを用いて RT-PCR 法にて本酵素の遺伝子発現について解析した。

て RT-PCR 法を用いて解析した (図 3)。メークイン、インカのめざめでは本酵素の活性と同様、遺伝子発現の有無が確認できた。が、興味深いことに 4 貯蔵でも活性の低かったホワイトフライヤーでは、本酵素の遺伝子発現はメークインと同程度に認められた。この品種では遺伝子発現以降で本酵素の活性が調節されていると考えられ、今後解析していく予定である。

今後の展望

以上のように、ジャガイモの低温貯蔵における糖変動は、品種により「還元糖増加型」「糖量低推移型」「ショ糖増加型」の 3 つのタイプに分類できること、これらのタイプには酸性インペルターゼ活性が遺伝子発現のレベルで関与することを明らかにしてきた。また、「還元糖増加型」では、貯蔵中の温度を 4 から 20 / 20 から 4 へとシフトすることで、還元糖量に変化、これは酸性インペルターゼ活性の遺伝子発現を伴った変化と一致していることもわかってきている。現在、糖変動タイプごとに酸性インペルターゼ遺伝子について、ゲノミックサザン解析、遺伝子発現をコントロールした形質転換体の作出等を試みており、これらを通して、“Low-temperature sweetening”のメカニズムを明らかにできたらと考えている。また、これら得られた知見を、貯蔵特性の特徴的な新品種の開発や、品種ごとの貯蔵特性を生かした調理加工法の開発等につなげていきたいと考えている。

おわりに

北海道大学低温科学研究所植物凍害科学部門教授・吉田静夫先生、助教授・前島正義先生の指導のもとで、博士後期課程の研究をさせていただいた (1992 年学位取得)。植物が低温に立ち向かう機作はとても魅力的な研究テーマであると感じた。北農研畑作研究部に移り、植物を「作物」「食品」として研究することが増え、とまどいも多くなった。数年前、フィンランドで行われた

Cold hardiness 関連のワークショップに吉田先生とともに参加させていただいた折、先生に「最近どんな研究をしているの?」と尋ねられ「ジャガイモの煮くずれの要因とかを調べています... (Matsuura-Endo *et al.* 2002a, 2002b)」とお話ししたところ、先生が「そりゃあもう、(煮ちゃったら)生き物じゃないじゃない」とおっしゃられ、愕然としたことを昨日のこのように思い出す。なんとか「生き物」としての作物の魅力を探れるような仕事をしよう、そう思ってきたが力不足でなかなかそうはいかない。が、ここで紹介させていただいたジャガイモの "Low-temperature sweetening" は、興味深いテーマであると思っている。アンデス高地原産のジャガイモはやはり他の植物と同様、凍結回避のため糖をためるのだろう。しかし、「作物」としての品種改良を重ねるなかで、ポテトチップス用の品種はチップの色が悪くなるという理由で、「糖を蓄積しない」という選抜を受けてきたのだ (「作物—品種・系統」はそういう意味で、現象を探る上で simplify された優れた系であるといえ、これらを扱えることを大事にしたいと思う)。インカのめざめはアンデス原産の遺伝的バックグラウンドを色濃く残しているから、還元糖でなくショ糖をためるのだとしたら、cryo-protectant として、ショ糖の方が有利なのだろうか...。などとつらつらと考えていると、吉田研究室に入って最初に先生と行った、キクイモプロトプラストを低温顕微鏡下で凍結融解する実験が頭によみがえってくる。あのとき、キクイモ組織片では LT_{50} はグルコース懸濁液よりショ糖懸濁液の方が低かったような...

今後も、「作物」を通して「植物」の魅力を探れるような研究をできる範囲で続けていきたいと考えている。

謝辞

本稿を書く機会を与えて下さった、「植物科学の新展開 -分子から群集まで広視野研究をめざす-」シンポジウム実行委員 (委員長 前島正義先生)

各位に感謝いたします。現在、なんとか研究を続けてこられたのも、吉田静夫先生のご指導があったからだと思います、深く感謝いたします。本当にありがとうございました。また、ここで紹介させていただいた成果は当部・品質制御研究チーム、ばれいしょ育種研究室の研究者・スタッフ・学生の皆さんの協力によって得られたものです。この場を借りて感謝いたします。

参考文献

- Blenkinsop, R.W., Copp, L.J., Yada, R.Y. & Marangoni, A.G. (2002) Changes in compositional parameters of tubers of potato (*Solanum tuberosum*) during low-temperature storage and their relationship to chip processing quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 4545-4553.
- Burton, W.G. (1989) *The Potato*, 3rd Ed., Longman Scientific & Technical, New York.
- Chuda, Y., Ono, H., Yada, H., Ohara-Takada, A., Matsuura-Endo, C. & Mori, M. (2003) Effect of physiological change in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) after low temperature storage on the level of acrylamide formed in potato chips. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **67**: 1188-1190.
- van Es, A. & Hartmans, K. (1987) Starch and sugars during tuberization, storage, and sprouting. *In: Storage of potatoes. Post-harvest behavior, store design, storage practice, handling* (A. Rastovski & A. van Es A, ed.), Pudoc, Wageningen, p. 79-113.
- Hammond, J.B.W., Burrell, M.M. & Kruger, N.J. (1990) Effect of low temperature on the activity of phosphofructokinase from potato tubers. *Planta* **180**: 613-616.
- Hill, L.M., Reimholz, R., Schroder, R., Nielsen, T.H. & Stitt, M. (1996) The onset of sucrose accumulation in cold-stored potato tubers is caused by an increased rate of sucrose synthesis and coincides with low levels of hexose-phosphates, an activation of sucrose phosphate synthase and the appearance of a new form of amylase. *Plant, Cell and Environment* **19**: 1223-1237.
- Isherwood, F.A. (1973) Starch-sugar interconversion in *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **12**: 2579-2591.
- Matsuura-Endo, C., Ohara-Takada, A., Yamauchi, H., Mori, M. & Fujikawa S. (2002a) Disintegration differences in cooked potatoes from three Japanese cultivars: Comparison of starch distribution within one tuber and morphology of tissue. *Food Science and Technology Research* **8**: 252-256.
- Matsuura-Endo, C., Ohara-Takada, A., Yamauchi, H., Mukasa Y., Mori, M. & Ishibashi K. (2002b) Disintegration differences in cooked potatoes from three Japanese cultivars: Comparison of the properties of isolated starch, degree of cell separation with EDTA, and contents of calcium and galacturonic acid. *Food Science and Technology Research* **8**: 323-327.
- Matsuura-Endo, C., Kobayashi, A., Noda, T., Takigawa, S., Yamauchi, H. & Mori, M. (2004) Changes in sugar content and activity of vacuolar acid invertase during low-temperature storage of potato tubers from six Japanese cultivars. *Journal of Plant Research* **117**: 131-137.
- Mottram, D.S., Wedzicha, B.L. & Dodson, A.T. (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* **419**: 448-449.
- Richardson, D.L., Davies, H.V., Ross, H.A. & Mackay, G.R. (1990) Invertase activity and its relation to hexose accumulation in potato tubers. *Journal of Experimental Botany* **41**: 95-99.
- Shallenberger, R.S., Smith, O. & Treadway, R.H. (1959) Role of sugars in the browning reaction in potato chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **7**: 274-277.
- Sowokinos, J.S. (1990) Stress-induced alterations in carbohydrate metabolism. *In: The Molecular and*

Cellular Biology of the Potato (M.E. Vayda & W.D. Park, ed.), CAB International, Wallingford, UK, p. 137-158.

Stadler, R.H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P.A., Robert, M.-C. & Riediker, S. (2002) Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* **419**: 449-450.

Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. & Tornqvist, M. (2002) Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 4998-5006.

Zrenner, R., Schuler, K. & Sonnewald, U. (1996) Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* **198**: 246-252.

酸性雨が雪になると植物はどうなるのか

荒川圭太・稲田秀俊

(北海道大学大学院 農学研究科・木材生物学分野)

はじめに

私(荒川)は平成4年6月1日に北海道大学低温科学研究所の旧植物凍害科学部門の助手として採用され、吉田先生のご指導のもとで植物の寒冷適応機構に関する研究を肌で知る機会を得ました。そして植物が北海道の厳寒期の積雪・風雪の中で越冬する様子を目の当たりにし、耐寒性が植物にとって重要な形質であるという認識を強く持ち続けて現在に至っています。

今回の報告は、耐寒性について研究する中で、水が凍結する現象が植物の生命活動に大きな影響を及ぼすという認識から派生した新しい研究テーマについて取り上げます。

我々が日常生活の利便性や利潤を追求することで文明社会が発展すると共に地球環境に絶大な負荷をかけ続けている。実際、二十世紀後半は地球レベルでの環境破壊が深刻化しており、様々な病巣が露呈しつつある。大気汚染がそのひとつの例であり、我々の生産活動が重化学工業に高く依存し、化石燃料の消費が増加の一途をたどっているのがその原因となっている。そのため、硫黄酸化物(SO_x)や窒素酸化物(NO_x)などが大気中に放出され続け、公害や環境破壊を引き起こすに至っている。これらの大気汚染物質を取り込んだ雨は、二酸化炭素が水に溶解した際のpH 5.6よりも酸性化する。このような雨は酸性雨と呼ばれ、降雨に混じる酸性物質(硫酸、硝酸など)によって、建造物などの住環境や植生・農作物の生産性などに少なからぬ影響を及ぼすことが懸念され、地球規模の環境問題である(片岡、竹内, 1998)。

大気汚染物質を含む降下物は雨に限ったものではない。雪もまた然りである。酸性物質を含んだ雪は酸性雨と同様に定義され、大気汚染が原因

となる環境問題であると考えられる。しかし、降雪そのものが冬季や寒冷地域での気象現象であるため、酸性雨に比べて酸性雪の認知度や関心度は低い。

しかし、酸性物質を含む雨と雪ではその違いは大きいと我々は考えている。すなわち、雪氷は雨に比べて地表面に留まる時間が長い。そのため、酸性雪に覆われた植物は氷点下温度と酸性物質による複合的な環境ストレスを長期間にわたって被ることになる。また、融雪初期には積雪下で貯蔵エネルギーを消費して越冬してきた植物体が酸性融雪水に曝される。この状態で寒暖が繰り返されると、酸性融雪水に接触した状態で凍結融解される。さらに、酸性雪の場合、水が結晶化することによって降雨に含まれていた酸性物質の多くが凍結濃縮された状態で雪氷中に分布することが予想される。融雪水のpH変化を経時的に測定した報告によると、一時的な酸性化が融雪初期のみに限らず融雪期後期にも発生するとのことであった(Susuki 1982, 2000; Fushimi *et al.*, 2001)。このことは、酸性降下物が雪の結晶に一樣に分布しているのではなく、表面や中心部分に局所的に濃縮されていることを示唆する。積雪下で生じる雪氷の再結晶化によっても酸性降下物が濃縮される可能性も十分に考えられる。したがって、酸性雪は酸性降下物の存在様式や挙動が酸性雨の場合とは大きく異なるため、雪解け後の植物の生育に少なからぬ影響を及ぼす環境要因になりうると思った。しかし、酸性雪による植物の影響やその応答性について詳しく検証した例は見ない。

そこで本研究では、酸性雪によるストレスを実験室レベルでシミュレーションし、酸性雪による

越冬性植物の傷害発生機構を解析して酸性雪耐性賦与を目指す。

酸性雪ストレスによる植物組織への影響を評価する方法について

実験材料には越冬性作物である秋播き小麦（冬小麦）であるチホクコムギ（*Triticum aestivum* L. cv. Chihokukomugi）を用いた。播種後約 12 日目の実生を明期 4、暗期 2 の 12 時間周期の条件で 4 週間低温馴化したものを実験に供試した。

酸性雪ストレスを簡便にシミュレーションして植物への影響を評価するために耐凍性試験を応用することにした。厳密には酸性雪で処理するものではないが、積雪下で植物が酸性物質を含む雪や氷の結晶に曝されることを考慮すると、緑葉に接している酸性溶液を凍らせるという酸性凍結様式でも同様の凍結ストレスを模すことができると考えた（Inada and Arakawa 2004）。

低温馴化した小麦緑葉を約 5 mm 幅に切片化したものを、試験管 1 本あたり 50 ± 2 mg FW で分配した。通常の耐凍性試験では、植物試料に純水を添加してから植氷をおこなうが、本実験では純水の代わりに目的の pH に設定した硫酸溶液を添加してから植氷することにした。そこで純水または硫酸溶液 0.3 ml を試験管に分注し、これを液相式のプログラムフリーザにセットして、植氷した後に緩速冷却による平衡凍結をおこなった。

この他に、平衡凍結法による耐凍性試験だけでなく、一定の凍結温度を保ちながら試料を凍結処理する長期凍結法もおこなった。この試験では、目的の凍結温度に冷却するまでは平衡凍結法と同様におこない、その後凍結温度を一定に保ちながら目的の処理期間まで凍結を続けた。

いずれの耐凍性試験でも、試料は 4 の遮光条件下にて融解し

た。

通常の耐凍性試験では、試料の生存率の測定に簡便な電解漏出法を採用するところだが、硫酸存在下では細胞の粗抽出液濃度に比例した電気伝導度値を表わすキャリブレーションカーブが描けなかった。しかし、ニンヒドリン反応によるアミノ酸漏出量の測定では、硫酸存在下でも粗抽出液の濃度にほぼ比例してキャリブレーションカーブが描けたため、いずれの耐凍性試験でも試料の生存率をアミノ酸漏出法で見積もることにした。

また、酸性条件下の過冷却実験では、植氷しないこと以外は基本的に平衡凍結法や長期凍結法と同様におこなった。つまり本実験では、植氷せずに冷却し、外液が凍結しなかった試料のみを用いて生存率を測定した。

以上の方法を用いて、冬小麦緑葉における酸性雪ストレス（厳密に言えば酸性凍結ストレス）による影響について簡便にシミュレーションできるものと考えた。なお、凍結処理条件の植物試料への影響を比較・評価するための指標として、凍結温度に対する生存率を用いたほか、ある温度（ x ）で凍結融解処理した場合の生存率を表わす SR_x 値を用いることにした。

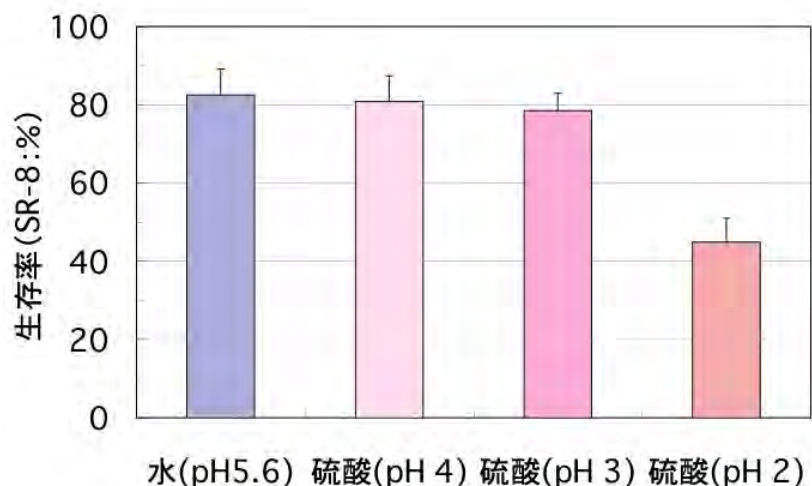


図 1 酸性凍結ストレスによる冬小麦緑葉への影響。酸性雪ストレスのシミュレーション実験として、植氷前に pH2-4 に調整した硫酸溶液を試料に添加して平衡凍結試験をおこなった。融解後の生存率を SR_8 値について求め、酸性条件下での凍結ストレスによる影響を調べた。

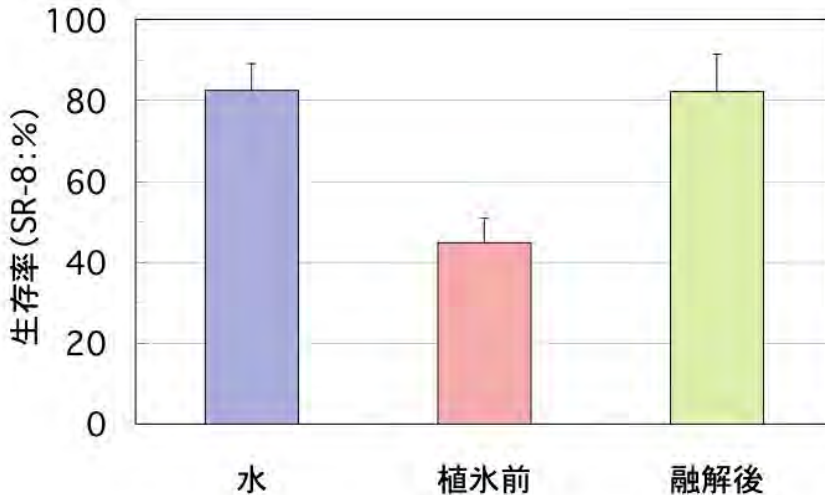


図2 凍結融解後の pH 低下が冬小麦緑葉に及ぼす影響。酸性条件下での平衡凍結試験において、硫酸による pH 低下が凍結融解後の冬小麦緑葉試料の生存率に及ぼす影響を調べるため、アミノ酸漏出処理の直前に pH 2 の硫酸溶液を添加した処理区（融解後）を設け、通常の酸性凍結処理区（植氷前）のものとの SR₈ 値を比較した。なお、対照区（水）には純水にて凍結融解処理したものを示した。

冬小麦に対する酸性凍結ストレス処理の影響について

酸性条件下での平衡凍結による冬小麦への影響

冬小麦緑葉を用いて、酸性条件下で平衡凍結法による耐凍性試験をおこない、純水を用いた通常条件での耐凍性試験（対照区）の結果と比較した。

pH 3 と pH 4 に調整した硫酸溶液を用いた場合では、純水による対照区の結果とほぼ同様の LT₅₀ 値（約-11）であったのに対して、pH 2 の条件では-7.6 であった。また、SR₈ 値を比較すると、pH 3 と pH 4 の条件では 81% と 78% で、対照区（82%）とほぼ同様の結果であった。一方、pH 2 の場合では SR₈ 値は 45% で、対照区と比べて 30% 以上も低下していた（図 1）。このことから、冬小麦緑葉を pH 2 の硫酸共存下で平衡凍結すると融解後の生存率は著しく低下することが明らかになった。

本実験系では、植氷前に添加した硫酸溶液（pH 2）に傷害を受けた細胞から漏出する内容物が混入するなどして、試験管内の水溶液の pH は徐々に上昇した。例えば、pH 2 の硫酸溶液を用いた酸性凍結試験の場合、凍結前は pH 2 であるが、融解後は細胞内物質の漏出により pH 4 弱、アミノ酸漏出処理の後では pH 5 付近であった。それに

対して純水での対照区の場合、凍結前は約 pH 5.6 であるが、融解後は pH 6 弱、アミノ酸漏出処理の後では pH 6.5 付近であった。そこで、硫酸を添加する時期だけを凍結融解後にずらすことによって、本実験系のアミノ酸漏出過程で共存する硫酸の影響について検証した（図 2）。

純水にて凍結融解した後に硫酸を添加してアミノ酸漏出量を測定すると、硫酸未添加のものとはほぼ同様の SR₈ 値を示した。このことから、凍結融解した後は、硫酸の存在は試料の生存率に大きな影響を与えないもの

と考えられた。

これらのことから、平衡凍結法による酸性凍結試験では、凍結融解する過程で硫酸（pH 2）が共存すると冬小麦緑葉の傷害発生が助長されることが明らかになった。

次に、平衡凍結法による酸性凍結試験において温度条件の影響を調べるため、酸性条件下での過冷却実験をおこない、酸性凍結実験での結果と比較した。酸性条件下での過冷却実験では植氷をおこなわないため、植物試料は細胞外凍結せずに温度低下に曝される。そのため酸性条件下での温度低下による影響を生存率測定によって評価したところ、過冷却状態を保っていた試料では、硫酸添加の有無にかかわらず、処理温度が低下しても生存率は高く維持されていた。純水での過冷却処理では SR₈ 値は 90% を超え、酸性過冷却処理でも同値は 85% にも及んでいた。一方、平衡凍結した場合、前述したように酸性条件下では生存率は著しく低下し、対照区の SR₈ 値は 80% 以上であったのに対して酸性凍結実験では 50% 以下であった。

以上のことから、平衡凍結法による酸性凍結試験において植物試料の生存率低下を引き起こす要因は、硫酸共存下で処理温度が低下することよ

りも、むしろ硫酸共存下で凍結融解することにあると考えられる。しかし、pH 3 以上の硫酸溶液が存在するときは平衡凍結法によって凍結融解しても冬小麦にはほとんど影響がなかったことから、平衡凍結という比較的短時間の凍結処理方法では酸性降下物の濃度がある程度高くなければ冬小麦緑葉では傷害発生に至らないことが考えられた。

もちろん、人工酸性雨処理に対する感受性が植物種によって異なるのと同様に (Fowler *et al.*, 1989; Reinikainen *et al.*, 1989; Bäck *et al.*, 1993; Shan *et al.*, 1995; Velikova *et al.*, 1997, 2000; Asai *et al.*, 1998, 2001; Stoyanova, 1998; Stoyanova *et al.*, 1998; Gadallah, 2000; Yu *et al.*, 2002; Gabara *et al.*, 2003) 酸性凍結ストレスに対する感受性も種によって異なる可能性が高く、冬小麦の本品種だけを例にとって酸性凍結ストレス過程での pH 感受性を論ずることはできない。そのため、様々植物品種についても同様な酸性凍結試験をおこなって、酸性雪ストレス感受性を評価することが必要であろう。

酸性条件下での長期凍結による冬小麦への影響

平衡凍結法による評価に続き、長期凍結法でも酸性凍結ストレスの影響について調べた。この長期凍結法では、積雪中で越冬する場合のように、氷点下温度のみならず凍結脱水にて細胞内外で濃縮された溶質に長期間曝されることによる影響を調べることが目的である。シロイヌナズナを純水にて長期凍結した場合、平衡凍結とは異なる様式にて細胞膜の微細構造変化が発生することも知られている (Nagao *et al.*, 2004)。そこで、pH 2 の酸性条件下での凍結処理が冬小麦緑葉に及ぼす影響について、-4 にて7日間ならびに28日間の長期凍結処理をおこなって検証した (図3)。

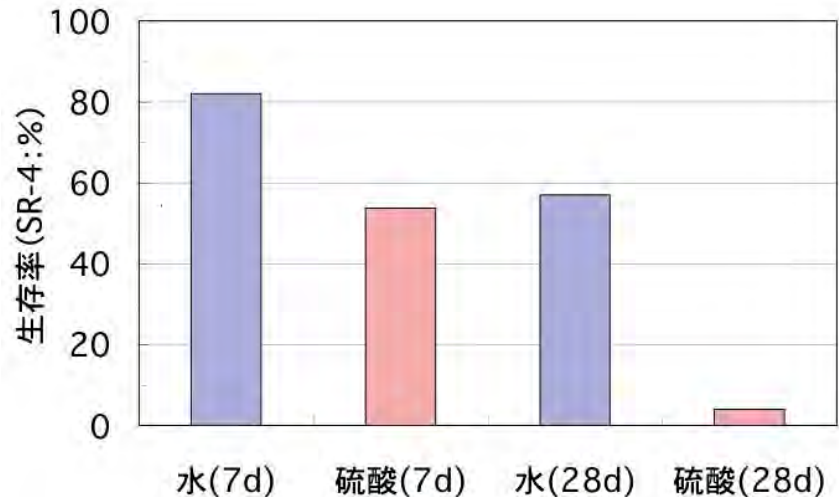


図3 酸性条件下での長期凍結が冬小麦緑葉に及ぼす影響。

硫酸溶液 (pH 2) を植物試料に添加して、-4 にて長期凍結試験をおこなった。処理後7日目と28日目の試料について融解後の生存率 (SR₄ 値) を測定し、酸性条件下での凍結ストレスによる影響を調べた。

-4 での長期凍結処理の場合、硫酸共存の有無にかかわらず、処理日数が長くなるほど冬小麦緑葉の生存率は低下していた。pH 3 や pH 4 で硫酸が共存する場合、いずれも対照区に比べてわずかながらに生存率の低下が促進される傾向にあったが、両者の間には差異は見られなかった (データ未掲載)。pH 2 の条件では、pH 3 や pH 4 の条件に比べて生存率の低下が助長され、処理後7日目の SR₄ 値は対照区よりも30%近く低下し、28日目の SR₄ 値は50%近くも低下していた (図3)。

一方、植氷しないこと以外は同じ条件にて長期的に過冷却を継続した場合、pH 2 の酸性条件下でも生存率の低下はほとんどみられず、対照区と共に生存率は90%以上の値を維持していた (データ未掲載)。

これらの結果から、長期的に酸性凍結ストレスが続くと、pH 2 のみならず、平衡凍結法では大した影響を与えなかった pH 3 や pH 4 の条件でも、氷点下温度に加えて緑葉組織が凍結濃縮された酸性物質に曝され続けることにより傷害発生が助長される可能性が示唆された。

冬小麦実生に対する酸性凍結ストレスの影響について

次に、冬小麦の実生を用いて酸性雪ストレスのシミュレーション実験を試みた。今回は、酸性凍結試験後に実生を再生させ、実生における傷害発生の違いを観察することにした(図4)。なお、本実験系では融けた硫酸溶液が土壌中の根系に与える影響を避けて評価するために、便宜的に地上部だけまたは緑葉の一部だけを酸性条件下で凍結融解処理するように留意した。

その結果、緑葉組織の一部だけ酸性条件におい

知られているため、酸性条件下で凍結融解した実生は再生過程で対照区の実生よりも傷害による影響が大きくなったものと予想される。このことは緑葉組織の一部だけを硫酸溶液に接触させて凍結融解すると、処理部位のみに強く傷害が発生したことからもうかがえる。酸性凍結ストレスに照射条件が加わることによってさらなる活性酸素ラジカルの発生を誘発し、傷害発生頻度の上昇を導くのかも知れない。

考察

本研究では、大気中の酸性降水物を含む降雪・積雪が冬作物に及ぼす影響について試験的に調べるため、酸性雪によって発生するストレスを耐凍性試験を応用することで簡便にシミュレーションして植物組織に与える影響について評価した。前述したように、降雪・積雪中の酸性降水物の存在様式は酸性雨の場合と異なり、局所的に濃縮されている可能性が高い。このような酸性物質を含む積雪に曝される越冬性植物への影響を評価するために、温度低下に平衡した凍結脱水ストレスを受ける過程と、ある温度での凍結脱水ストレスが長期的に継続される過程の二種類について、それぞれ平衡凍結法と長期凍結法を応用した。このような試みに関する報告は前例がなく、酸性物質を含む雪氷による環境ストレスの植物への影響を示唆する研究例として位置づけられるであろう。

酸性凍結ストレスによる植物細胞の傷害発生のメカニズムの詳細については未だわかっていない。冬小麦のような草本植物では、通常、凍結温度に対して細胞外凍結にて応答する(Levitt, 1980; 酒井, 1982; 吉田, 1999)。このような植物細胞が過度の凍結温度に曝されると、凍結過程にて細胞膜などの不可逆的な微細構造変化が発生する(Fujikawa and Steponkus, 1990, Uemura and Steponkus, 1999)。このことが凍結傷害を引き起こす主要因と考えられている。酸性凍結処理では、硫酸共存下で細胞外凍結することで凍結傷害の

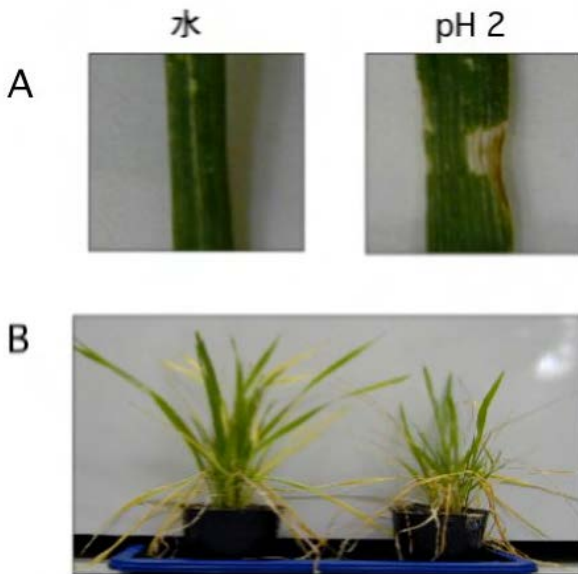


図4 酸性凍結処理した冬小麦実生の再生過程における生育への影響。

A. 硫酸溶液(pH 2)を染み込ませた濾紙で小麦緑葉の一部を挟んでから、鉢植えごと長期凍結試験をおこなった。実生を-4℃にて3日間処理した後、融解してから常温下で再生させた。B. 硫酸溶液(pH 2)で作成した氷で実生の地上部を覆い、鉢植えごと酸性凍結試験をおこなった。この実生を-4℃にて3日間処理した後、融解してから常温下で再生させた。いずれも対照区(水)として純水を用いて同様に処理したものを示した。

で凍結融解処理した場合、処理した部位でのみ著しく傷害が発生していた(図4A)。また、酸性凍結ストレス処理した実生の地上部では傷害が著しく発生して枯死した葉も多く見られ、対照区に比べて生育量も低下していた(図4B)。

このような冬小麦実生を用いた実験系では、緑葉組織を用いた実験系とは異なり、凍結融解後の実生を照射下で常温にて再生させている。照射は凍結融解後の傷害発生を助長することが

発生が助長されることから、凍結濃縮された酸性物質が植物細胞の凍結または融解過程で細胞膜などの微細構造変化を促進するか、もしくはこのような凍結傷害とは全く別のメカニズムでもって氷点下温度にて酸性物質の凍結濃縮が進むにつれて細胞にダメージを与える可能性などが考えられる。現在、酸性条件下での凍結過程における細胞膜の微細構造変化の様式をフリーズフラクチャー電子顕微鏡法にて観察し、細胞膜の傷害発生様式の特徴付けを試みている。

冬小麦緑葉組織を用いた酸性凍結試験によって、酸性雪の降雪・積雪が越冬性植物にとって環境ストレスになりうるということが明らかになった。ただし、酸性雪ストレスに対する感受性を迅速かつ簡便に評価するために、一連の酸性凍結試験では pH 2 という酸性条件に設定しておこなった。今のところ、このような低 pH の酸性雪は野外観測の記録には見当たらない。しかし、pH 4 条件下で 4 週間の長期凍結処理が 1 週間以上続くと傷害発生が助長されはじめることを考慮すると（データ未掲載）、寒さの厳しい地域や降雪地域において、通常に観測される程度の酸性度（pH 4-5）の雪氷が長期間にわたって植物と接触することで融雪後の植物の生産性に影響を及ぼすことも十分に考えられる。植物は越冬中に備蓄していたエネルギーを消費するために融雪後の植物では地上部の消耗が激しい。そのため、積雪中に共存する酸性物質の影響について越冬後の植物の外観だけから判断することは難しい。しかし、本研究の結果をふまえて考えると、降雪・積雪・融雪という一連の自然現象の過程において、酸性物質を含む雪氷は着実に越冬する植物を蝕むに違いないであろう。

大気汚染物質の排出が今後も続くなかで、植物の酸性雪ストレスによる傷害発生機構の解明やそれに対する耐性賦与の試みを今後も継続しておこなうことは、将来的に、大気汚染物質による環境ストレスからのダメージを軽減する方策を見いだしたり、植物生産性の維持や植生回復のた

めに役立つものと期待している。

謝辞

吉田静夫先生は、北海道大学低温科学研究所にて植物の寒冷適応機構という魅力ある研究に従事する機会を与えて頂いたばかりか、長年にわたって懇切なるご指導いただきました。この場を借りて厚くお礼申し上げます。そして、現在もこの研究分野に携わっていただけるのは、吉田静夫先生をはじめ、前島正義先生、佐藤利幸先生、藤川清三先生他多くの方々に万事にわたってご指導ご鞭撻いただいたおかげです。深く感謝申し上げます。

また、吉田先生の門下生や関係者の方々が一同に会するシンポジウム「植物科学の新展開 -分子から群集まで広視野研究をめざす-」に参加することができ、大変嬉しく思います。

参考文献

- Asai, E., Hata, K. and Futai, K. (1998) Effect of simulated acid rain on the occurrence of *Lophodermium* on Japanese black pine needles. *Mycological Research* **102**: 1316-1318.
- Asai, E. and Futai, K. (2001) The effects of long-term exposure to simulated acid rain on the development of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Forest Pathology* **31**: 241-253.
- Bäck, J., Huttunen, S. and Kristen, U. (1993) Carbohydrate distribution and cellular injuries in acid rain and cold-treated spruce needles. *Trees* **8**: 75-84.
- Fowler, D. Cape, J. N., Deans, J. D., Leith, I. D., Murray, M. B., Smith, R. I., Sheppard, L. J. and Unsworth, M. H. (1989) Effects of acid rain on the frost hardiness of red spruce seedlings. *New Phytologist* **113**: 321-335.
- Fujikawa, S. and Steponkus, P. L. (1990) Freeze-induced alterations in the ultrastructure of the plasma membrane of rye protoplasts isolated from

- cold-acclimated leaves. *Cryobiology* **27**: 665-666.
- Fushimi, H., Kawamura, T., Iida, H., Ochiai, M., Nakajima, T. and Azuma, Y. (2001) Internal distribution of acid materials within snow crystals. *Water, Air and Soil pollution* **130**: 1709-1714.
- Gabara, B., Sklodowska, M., Wyrwicka, A., Glinska, S. and Gapinska, M. (2003) Changes in the ultrastructure of chloroplasts and mitochondria and antioxidant enzyme activity in *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves sprayed with acid rain. *Plant Science* **164**: 507-516.
- Gadallah, M. A. A. (2000) Effects of acid mist and ascorbic acid treatment on the growth, stability of leaf membranes, chlorophyll content and some mineral elements of *Carthamus tinctorius*, the safflower. *Water, Air and Soil pollution* **118**: 311-327.
- Inada, H. and Arakawa, K. (2004) Response of wintering plants to acid freeze-thawing. *Plant and Cell Physiology* **45**: S117-S117 Suppl. S.
- 片岡正光、竹内浩士 (1998) 酸性雨と大気汚染. 三共出版.
- Levitt, J. (1980) Responses of Plants to Environmental Stresses, 2nd Ed., Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 1-497.
- Nagao, M., Arakawa, K., Takezawa, D. and Fujikawa, S. (2004) Freezing injury in *Arabidopsis thaliana* leaf. in preparation.
- Reinikainen J. and Huttunen, S. (1989) The level of injury and needle ultrastructure of acid rain-irrigated pine and spruce seedling after low temperature treatment. *New Phytologist* **112**: 29-39.
- 酒井 昭 (1982) 植物の耐凍性と寒冷適応 .学会出版センター.
- Shan, Y., Feng, Z., Izuta, T., Aoki, M. and Totsuka, T. (1995) The individual and combined effects of ozone and simulated acid rain on chlorophyll contents, carbon allocation and biomass accumulation of armand pine seedlings. *Water, Air and Soil pollution* **85**: 1399-1404.
- Stoyanova, D. (1998) Effects of simulated acid rain on anatomy of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Biologia Plantarum* **40**: 581-588.
- Stoyanova, D. and Vellikova, V. (1998) Effects of simulated acid rain on chloroplast ultrastructure of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Biologia Plantarum* **40**: 589-595.
- Suzuki, K. (1982) Chemical changes of snow cover by melting. *Japanese Journal of Limnology* **43**: 102-112.
- Suzuki, K. (2000) Review on snow chemistry in Japan. *Journal of the Japanese Society of Snow and Ice* **63**: 185-196.
- Uemura, M. and Steponkus, P. L. (1999) Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *Journal of Plant Research* **112**: 245-254.
- Vellikova, V., Yordanov, I. and Edreva A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* **151**: 59-66.
- Vellikova, V., Yordanov, I., Kurteva, M. and Tsonev, T. (1997) Effects of simulated acid rain on the photosynthetic characteristics of *Phaseolus vulgaris* L. *Photosynthetica* **34**: 523-535.
- 吉田静夫 (1999) 極限温度に対する生理応答. 植物細胞工学シリーズ 11 植物の環境応答 pp. 24-35 秀潤社.
- Yu, J. Q., Ye, S. F., and Huang, L. F. (2002) Effects of simulated acid precipitation on photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzymes in *Cucumis sativus* L. *Photosynthetica* **40**: 331-335.

現場の研究者が楽しく有意義な研究を展開できるよう、 ご指導をお願いします

田村 晃

(秋田県農業試験場 野菜・花卉部)

はじめに

10月の稲刈りを終わると、秋田の農業の一年はおおかた終了する。11月に初雪が降り、12月から2月中旬までほとんど晴れることがなく、地域全体が真っ白になり、雪に閉ざされる。

秋田は夏期には稲、野菜、花き、果樹など、農家にとって作物の選択肢は豊富にあるが、冬期は非常に少ない。このため、冬期間に農家は出稼ぎや在宅他産業就労などを余儀なくされる。

近年、秋田ではパイプハウスを主体にして施設栽培が普及しつつある。しかし、これらのハウス

の大部分は、冬期には雪に埋もれ遊休化している。周年農業生産体系の確立は、北国に位置する農業試験場の重要なテーマの一つである。冬期に遊休化しているハウスを有効利用し、低コストな葉菜類栽培技術が確立されるならば、周年農業生産体系の一翼を担いうる有力な手段となる。

そこで、1991年から冬期のナバナ(アブラナ科作物で、抽だいした若茎・葉を食する葉茎菜類を総称してナバナと呼んでいる)栽培の試験に取り組んだ。当時、私は植物・作物の凍結に関する知識が全くなかった。1991年12月に寒波が襲来し、



写真1 ナバナの凍結

A: ナバナが凍結している様子。B: 細胞外で形成された氷が表皮を切り裂き、滝のように析出する時もある。
C: まれに氷の芸術がみられる時もある。D: ナバナの若茎が凍裂すると、商品にならなくなる。

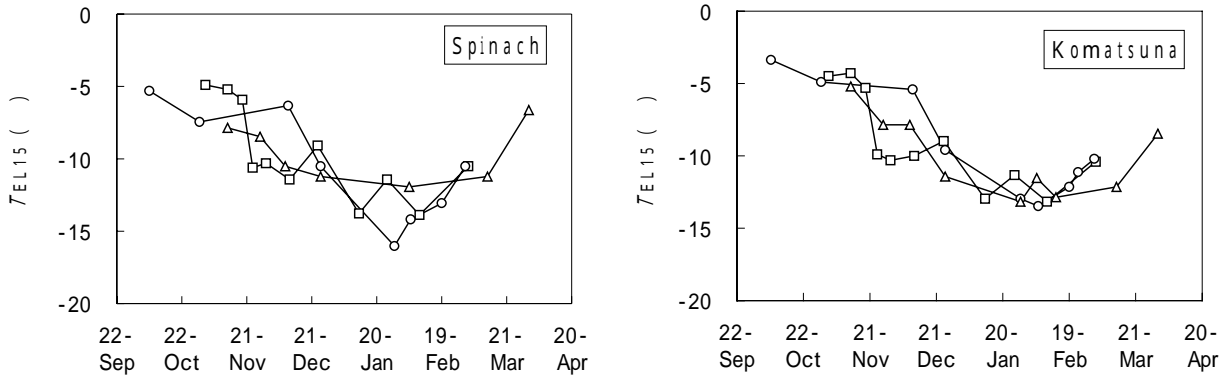


図1 ホウレンソウとコマツナの耐凍性の季節的な変化。供試品種はホウレンソウでソロモン、コマツナでせいせん7号とした。耐凍性は葉身組織が凍結傷害を受け、組織内の15%の電解質漏出が引き起こされる温度(田村, 2000)で表示した。図中の印は○, 1996/97年; □, 1997/98年; △, 1998/99年。

ナバナが凍結した。早朝出勤し、ナバナが凍結して、カチンカチンになっているのをみて、「試験が終わったな」と思った。

しかし、日中暖気になると融解し、回復した。ビックリし、まず、北海道農試に電話し、植物の凍結について問い合わせたところ、「こちらではわからない」とのことであった。そこで、北大の農学部へ問い合わせた。返答は同じであった。そこでさらに、理学部の植物専攻に問い合わせた。そうしたら、「こちらではやっていないが、低温研の吉田静夫先生に問い合わせてみたらどうか」という返答を頂いた。そこで、吉田先生に電話し、お話を伺った。これが、吉田先生との初めての出会いである。そして吉田先生のご好意により、1994年5月~10月にかけての6ヶ月間、低温研で研修させて頂いた。この期間中は雑務が一切なく実験三昧で、楽しく有意義な時を過ごすことができた。指導して頂いた吉田先生、佐藤利幸先生、荒川圭太先生をはじめ、院生の皆さんに大変感謝しております。

ホウレンソウ、コマツナの冬期栽培に関する試験

吉田先生の研究室での研修を終え、秋田農試に帰り、1995年からホウレンソウとコマツナの冬期無加温ハウス栽培の試験に取り組んだ。

農家のホウレンソウ、コマツナの冬期栽培に取り組む気持ちを喚起するためには、まず最初に、農家の冬期栽培に対する不安を取り除く必要が

ある。当時、農家にはホウレンソウやコマツナが凍結すると、傷害を受けたり致死するのではないかと不安があった。そこで、両作物がどの程度の低温に耐えられるのかを明らかにするため、農試ハウス圃場(秋田市)における両作物の耐凍性の季節的な変化を調査した。その結果を図1に示す(田村, 2002)。秋田市は県内でも比較的温暖で、厳寒期の最低気温は-6~-8であるが、両作物の耐凍性は-10以下にまで増大した。1998~2000年にかけて、県内においては最も気温が低下する鹿角市(秋田県北部)で現地試験を行った。現地試験期間中のハウス内最低気温の極値は-17であったが、両作物に凍結傷害はみられなかった。このことから、両作物は秋田の冬を十分に乗り切ることができることが明らかになった。

秋田で冬期の葉菜類栽培を行う場合には、厳しい寒さの中での収穫や除雪作業が伴う。従って、農家の冬期葉菜類栽培に取り組む気持ちを喚起するためには、栽培が可能なことを示すだけでは必ずしも十分ではなく、さらに、冬期の低温条件が葉菜類の品質を高めるための利点であることを示す必要がある。そのため、低温処理が両作物の糖とビタミンC含量に及ぼす影響を調べた(田村, 1999)。実験は両作物を12~15の暖かい条件で育て、収穫期に達してから2~4の低温条件に移して実施した。その結果、低温に遭遇させると両作物の糖とビタミンC含量が急激に上昇することが明らかになった(データ略)。次に、その程

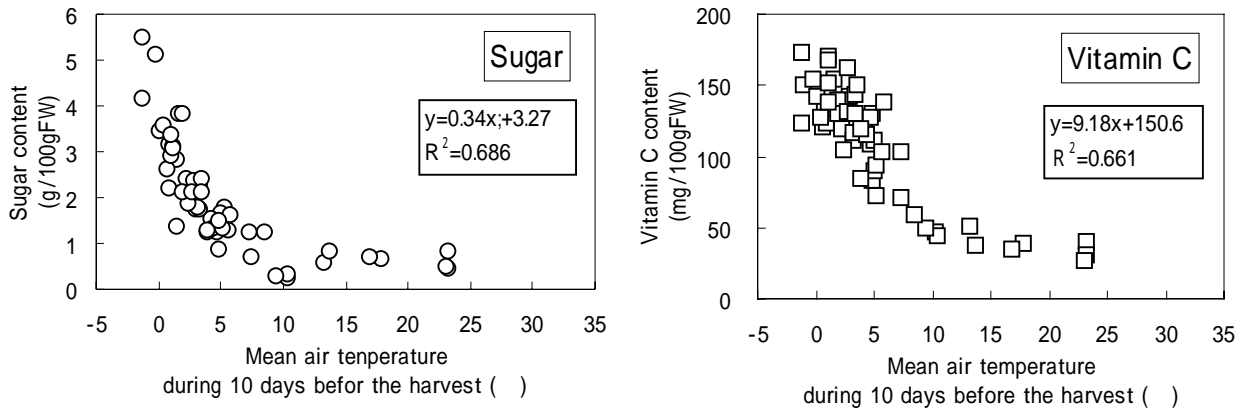


図2 収穫前10日間の平均気温とホウレンソウ葉身の糖およびビタミンC含量との関係

度の低温に、どの程度の期間遭遇すると、どの程度に糖、ビタミンC含量が増加するのかを調査した(田村, 2004)。その結果を図2に示す。

調査の結果、収穫前10日間の平均気温が10以下になるとホウレンソウやコマツナの糖およびビタミンC含量が増加し、収穫前10日間の平均気温が0程度になると、糖およびビタミンC含量が著しく高まることが示された。このことから、糖とビタミンC含量が豊富なホウレンソウとコマツナを生産するためには、ハウス内の気温を秋田の外気温並に低下させる必要があると考えられた。

そこで、ハウスのサイドを開放し、冷たい外気をハウス内に導入する方法を採用した。ただし、ハウス内に強風が入り込んで作物が傷むのを防止するため、サイドに防風ネットを張った。

秋田を含めた北東北地域で消費される葉菜類のほとんどは関東地方以南から移入されている。しかし、北東北地域の冬期の低温を活かし、糖が

増えて美味しく、ビタミンが豊富で栄養価の高いホウレンソウ、コマツナを生産する栽培方法が確立されたと考えている。現在、地産地消の運動と相まって、このような栽培が県内で普及しつつある。この冬期の低温を活かした葉菜類栽培が農家の冬期間の農業所得向上に寄与することを期待している。

大学での基礎研究と現場での応用研究

農業試験場の主要な顧客は農家、農業生産法人など、農産物を生産する人々である。これらの人々の周辺には農業団体、市町村、農業資材等の販売業者など、様々な人々、団体が存在する。したがって、私の顧客は簡単にいうと、生産者とその周囲の関係者である。これらの人々に、有意義な情報や手段を提供することが私の目標になる。しかし、簡単にはこの目標は達成できない。

先に記述したホウレンソウとコマツナの冬期栽培の仕事は、吉田先生や岩手大学の上村松生先生、東北農業研究センターの方々ご指導とご協力によって達成することができたのであり、地方農試でひとりコツコツと実施しているだけでは決して達成できなかった。

農業試験場の目標は、生産者やその周囲の人々に有意義な情報や手段を提供することである。農業を担う若い農家は高学歴者が多くなってきており、また、農家や生産組織の栽培レベル、知識は以前に比べ、格段に向上している。そのため、単に「こうすれば良い」という手段・結果を生産



写真2 ハウスのサイドに防風ネットを張り、開放している様子

者に提供すれば事足りる、という時代は終わり、「なぜこうすれば良いのか」を順序だてて、整理して提供することが必要となっている。そのためには、詳細な現象把握（理学）と現象の克服方法（農学）の双方を明確に示す必要がある。

現場の技術者がひとりで詳細な現象把握とその克服方法を成し遂げるには非常な労力と時間を要するのみでなく、その組織の存立基盤上、困難である。そこで、大学と役割分担をしながら仕事を進めたいと思うのである。また、異なる環境にいる研究者と話し合いながら、仕事を進めるのは異なった角度からの考え方が吸収でき、楽しくなる。実際、これまでも、吉田先生、上村先生、佐藤先生、前島先生などから大きなエネルギーを頂き、また、上村先生からは言葉に尽くせないご厚誼を頂いている。私は、是非、自分と異なる環境にいる方々との連携を大切にしながらしながら、楽しく有意義な仕事をしたいと思っている。

おわりに

私は今後、雪中キャベツ栽培の構想を持っている。といっても、雪の中でスクスクと生長させようというのではなく、秋に定植し、初冬までにキャベツを結球させて、商品としてほぼ完成させ、雪の中から出荷しようというのである。それならば簡単ではないかと考える人もいるかもしれないが、そうではない。雪の中では氷核活性細菌（以後、細菌）がキャベツに悪さをする。この細菌は「なぜ0で繁殖でき、また、細菌がどのようにしてキャベツに侵入するのか」を明確に理解しないと、雪中キャベツの栽培技術は確立できない。他にも様々な課題を抱えている。細菌に簡単に侵されるものと著しく強いキャベツ品種の双方があり、非常におもしろい研究材料は揃っています。興味を持たれる方は、ご一報下さい。

今回、このシンポジウムに日程を合わせる事ができず、出席できないことが非常に残念です。吉田先生からは今後とも長くご指導とお励ましを頂きたいので、くれぐれもご自愛下さるよう、

お願い申し上げます。吉田先生のもとに集う各方面の研究者の皆さん、是非、現場で楽しい仕事ができるよう、今後ともご指導頂きたいので、よろしくお願い致します。秋田から皆さんの楽しい集いの大成功をお祈りしております。秋田の近くにお越しの際は、是非ご一報ください。首を長くしてお待ちしております。

参考文献

- 田村晃. (1999) 寡日射条件下における低温処理がコマツナの糖およびアスコルビン酸含有率に及ぼす影響. 園芸学会雑誌 68: 409-413
- 田村晃. (2000) コマツナとハウレンソウの個体レベルでの耐凍性の評価. 園芸学会雑誌 69: 332-338
- 田村晃. (2002) 無加温パイプハウス栽培におけるハウレンソウとコマツナの秋から早春にかけての耐凍性の变化. 園芸学会雑誌 71: 74-81
- 田村晃. (2004) 栽培期間中の気温がハウレンソウおよびコマツナの糖とビタミン C 含量に及ぼす影響. 園芸学研究 3: 187-190

吉田先生の背中

大平 万里 (秋田経済法科大学附属高等学校)

低温研の創設者であり、生涯一研究者であり続けた中谷宇吉郎は随筆の名手としても知られている。彼の作品に「立春の卵」という有名な一遍がある。立春に卵が立つという報道に端を発し、立春でなくても卵は立ち、なぜ立つのかも検討しつつ、科学の精神をさりげなく綴った名随筆である。この「立春の卵」には、科学の営みを続けてゆくうえで三つの大切な事柄が書かれてあると私は思っている。その三つとは「思い至る事」「やってみる事」「がんばる事」である。

「卵はいつでも立つに違いない」と思い至らないと何も始まらない。当然、思っているだけでは駄目で、実際にやってみないとただの妄想である。しかし、やった事のある人ならわかると思うが、卵を立てるのは意外と難しい。ちょっとしたコツと根気が必要である。それなりにがんばらないと目的は達成されず、妄想は妄想のまま、それまでの常識は変わらない。吉田先生の事を思い返す時、この随筆の事がいつも頭に浮かぶ。

初めて吉田先生とお会いした時、斬新なアイデアや壮大な仮説を惜しげもなく新参者の私に数時間にわたって懇切丁寧に説明して下さった。その量と質に圧倒され、しばらく私は知恵熱状態となってしまった。どこからあの豊かな発想が生まれてくるのか、私などが理解できる訳もないが、ともあれ、「思い至る事」は単なる「思いつき」の蓄積ではなく、一つの「確固たる思想」なのだろうと初対面で痛感したのである。

研究者の多くは、数あるアイデアのうち「攻略できそうな事」を優先的に精選するものである。そして、効率的に研究が進むように日々腐心するのが一般的であろう。しかし、吉田先生は、とにかくすべて「やってみる」のである。少なくとも私にはそう見えた。もちろん、やり残した事は

多々あるに違いない。むしろ吉田先生の構想からすれば、やり残した事の方が多いのかもしれない。しかし時間の許す限り、できることはまずやってみるという超人的な行動力は衰える様子がなかった。ある時、核膜の純粋な単離に苦労していた私は、「どうもうまくいかなくて困っています」と実験中の吉田先生に愚痴をこぼしてしまった。すると、「よし！一緒にやってみよう！」と自身の実験を中断されて、半日あまり私の実験のために苦心して下さった。研究の事となると、瞬時に一生懸命になり熱中してしまうその姿は、吉田先生と共に過ごしたことのある人なら、容易に想像がつくであろう。

「思い至る事」「やってみる事」。この二つを備えている研究者は、それなりにいるに違いない。しかし、「がんばる事」を徹底的に続けてゆける研究者がどれくらい存在するのか私にはわからない。ただ、吉田先生がとことん「がんばる事」を続けている研究者であるという事に異論のある人はまずいないだろう。

ある時、とあるコンタミの問題に悩んでいた私は、コーヒータイムに「どうやったら解決しますかね」と何気なく吉田先生に尋ねた。すると吉田先生は「解決策はね...」とおもむろに話し始め、「解決するまで続けることだよ。」と極めて真剣な笑顔で答えて下さった。そのときは、それなりにがっかりきたような気もするが、結局のところ吉田先生はその精神で数々の難問を解決していったのだろうと思うのである。また、初めて低温研の超遠心機を見たとき、積算回転数が数桁違うことに驚いた。実際、超遠心機のメインテナンスの人が「この遠心機はもう想定積算回転数をとくにオーバーしてるんですけどねえ。こんな遠心機、他にないですよ。」とため息をついてい

た。もちろん、ほとんど吉田先生が回し続けたのである。

今回のシンポジウムに参加される方々ならば、夜遅くまで夢中になって実験を続ける吉田先生の背中をいつも見ていただろうと思う。その背中、植物の低温科学そのものと言ってもいい。その背中から様々な枝が伸び、今回のシンポジウムに結実している訳である。そしてまた、吉田先生自身の中谷宇吉郎の精神を受け継いでいる一人と私は思う。ふと、科学の営みのための事柄として「受け継ぐ事」をつけ加えてもいいかもしれないと、吉田先生からほとんど何も受け継げなかった私がしみじみ思う今日この頃である。

最後に、遠方より今回のシンポジウムの晴れやかな成功を切に願っています。

個体としての単純さ・群集としての複雑さ

陶山 哲志

(産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門)

低温研時代からこれまで

私が理学研究科植物学専攻の修士課程の学生として北海道大学低温科学研究所・植物凍害科学部門に在籍したのは1991年の4月から1993年の3月まで。当時の教官は吉田先生が教授、前島先生が助教授、佐藤先生が助手という構成で、途中から荒川先生が加わりました。この講座に進学を決めたのは単純に学部時代の指導教官(国際基督教大学教養学部理学科・風間晴子教授)に勧められた研究室2つを訪問したさい、一方の研究室ではバリバリの分子遺伝学をやっておりタンパク質や遺伝子を暗号の羅列のように扱うような分野だったこと、それに対してこちらでは具体的なタンパク質であったり細胞内小器官であったりというレベルの研究内容をうかがい、より親しみを覚えたことが最終的な動機だったと記憶しています。進学してからの私も吉田先生の指導の下、液胞膜の分離・ATPaseの精製・抗体作成~ウェスタンブロットングと、分子遺伝とは無縁の学生時代を過ごしました。酵素というものはとにかく鮮度が命だったので、材料であるモヤシを収穫してから破碎にかけ、液胞膜の分画を行い、ATPaseを可溶化して精製を行い、活性や純度の測定を行い・・・今考えると気が遠くなりそうですが、丸三日も不眠不休で作業をしていたことが度々ありました。しかし、不思議と大変だったという思い出よりも、長閑に札幌での生活を過ごしていた記憶の方が鮮明に思い出されます。

その後つくばの工業技術院生命工学工業技術研究所(現・産業技術総合研究所)に勤めてからは、研究対象も植物ではなくバクテリアに変わり、この様な分野で仕事をするからには分子遺伝学と無縁であり続けるわけにもいかず、学生時代に学

んだものとは全然違った実験手法を学んで仕事をするようになりました。単純に言ってしまえば微生物生態学なのですが、環境中から特定の形質を持つ新規バクテリアを分離・培養・そして同定するのにリボゾームRNA遺伝子の分子系統解析を利用したり、環境中微生物の群集構造の消長を特定の遺伝子マーカーを用いて検討したり、さらに特殊な形質を示すバクテリアに関して遺伝子のクローニングや転写量を検討するような実験、組換えによる表現型の変化を確認するような仕事も行っています。大学に比べて研究テーマに予算的な縛りが付いたり政治的に研究テーマの見直しを迫られることも多く、一所に留まっても一貫した研究を続けることは簡単ではないというのが実情です。昨年勤続10年目にしようやく学位を取得することが出来ましたが、1つのストーリーにまとめるのにはかなり無理をした様に思います。

これまで私が植物そして低温傷害というテーマに携わったのはまさに吉田先生と過ごした2年間に限られており、後続の方々の研究内容に関しても十分に把握しているわけではありません。また独立行政法人に移行して以来、私が所属する研究機関では知的財産の扱いがきびしくなっており、現在行っている具体的な研究内容についてお話しするわけにもいきません。従って、本稿は私の研究分野でごく一般的に語られる問題を大まかにご紹介するような雑文であり、植物にも低温にも最新の研究成果にも関係しない内容で恐縮している幸いです。

見えない・わからない・把握しきれない

低温研で植物の低温傷害の研究をしていた時に

は『植物が低温に晒された時に傷害を受けるその初発反応を巡ってどのような機構が引き金になっているのか』という問いかけが中心的な命題になっていました。その中で低温に対して特に感受性が高いマメ科植物やエナリでは液胞膜 ATPase と呼ばれる液胞膜水素イオン輸送系の酵素が速やかに失活するという事象に絡め、その傷害反応のごく初期に液胞膜 ATPase の一部のサブユニットが選択的に外れて細胞質の中に遊離してくるという現象を見いだしました。これは生細胞の中でのみ観察され、精製した液胞膜や酵素標品では観察されない現象であったことから、細胞質の側により低温傷害の初発反応に近い変化（例えば、イオン環境の変化、そしてその上流にはさらに別のイオン輸送系や膜系などの問題が包含されている。）が起こっているという傍証的な結論が得られただけでしたが、細胞の仕組みの複雑さ、底が見えない因果応報の奥深さを実感させられました。

それでは現在私が携わっている微生物生態学の分野はどうでしょうか。植物に比べてずっと単純な構造の生物であるバクテリアが対象ならば、さぞ研究内容や実験系もシンプルだろうと思いきや、決してそんなことはありません。まず最初に普通の研究者はバクテリアと聞いて、大腸菌や枯草菌の様な純粋培養の菌を思い浮かべるだろうと思います。しかし実際の自然界では大腸菌や枯草菌の様に純粋培養できるものは実は極めてマイナーな存在であり、土壌中や水サンプル中のバクテリアの 99% 以上は培養に依存した方法では検出さえできないと言われていています。顕微鏡で観察しても類別することは困難ですし、性状不明なものが無尽蔵に有るわけですから、一つ一つ名前を付けて識別することはほとんど不可能です。植物や動物、目に見える大きさのものであれば、個体ごとに種を特定することも容易でしょうが、相手がバクテリア、しかも純粋培養でない場合には自分の実験材料を生物学的な言葉で言い表すことすら困難です。

もし仮に培養することができて個別に識別することが可能であったとしても、実験室で育てているような単一クローンのバクテリアが自然界に純粋に近い形で存在し、周囲と没交渉で生きているなどということはまず有り得ません。環境中の微生物は 2 者・3 者・さらに多者の間で物質のやりとりを行い、共生的に、あるいは競合的に優先化とフェードアウトを繰り返しています。純粋培養の菌から得られた生理学的な情報はあくまで特殊なケースから得られた限定的なデータとして注釈付きで扱われることになります。『どのような菌が、どれだけ存在するか』また『どのような菌が、どんな働きをしているか』という極めて単純な誰でも思い浮かべるような問いかけが最も難しい問題として残されてしまうわけです。

自然界や様々な環境中の微生物を詳細に記述することは前述した通りほとんど不可能に近い話ですが、微生物群集を集合体として扱い、その群集構造を把握する努力は進められています。その方法の一つが試料から DNA を抽出して遺伝子配列の違いに基づいたグループ分けを行う方法です。このような方法では解像度が高い反面、解析の方法によってはデータの量が膨大になりかえって全体像の把握が困難になるケースがあります。また、DNA の抽出効率や含まれる遺伝子のコピー数が必ずしも細胞毎に一定していないという問題があります。同様に脂肪酸やイソプレノイドキノン等の化学的マーカーを抽出して解析するという方法も用いられていますが、逆に解像度は低く、起源となる微生物量そのものの把握が難しいという点に違いはありません。群集構造の把握という観点からは離れて、起源となる微生物には関係なく環境中の DNA を総体として扱う‘メタゲノム’という発想が近年流行りつつあります。データの収集・解析ともに現状の技術の範囲でカバーしきれるものではありませんが、今後の展開しだいで主流になってくる可能性があります。一方、細胞試料を蛍光ラベルした DNA プローブや抗体で染色して観察するという手法も取られて

います。染色の特異性により、試料全体の中で特定のグループに属するものがどれくらい含まれているかということが推定できます。活性染色や、ラジオアイソトープの取り込み活性などを同時に検出することで『どのような菌が、どんな働きをしているか』という質問には限定的に答えられ

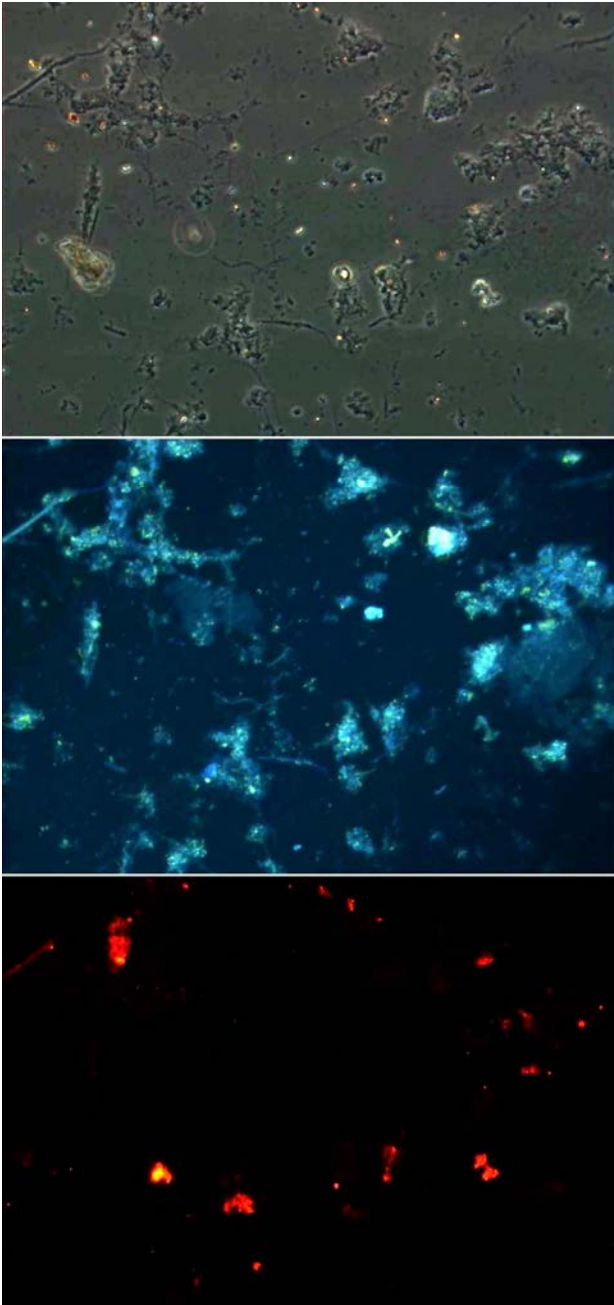


図1 活性汚泥試料（生活廃水処理槽から採取した微生物サンプル）の多重染色。全て同一視野を観察したもの。上段は位相差顕微鏡による明視野観察像。中段はDAPI染色をUV励起で観察したもの。黄色く光っているものはポリリン酸を蓄積した細胞と思われる。下段はCy3で蛍光ラベルした特異的遺伝子プローブによる染色をB励起で観察したもの。各細胞の大きさはおよそ1 μ m程度。

る場合もあります。こうしたサイトケミカルな手法でも染色の効率が問われることになります。染色のポジティブとネガティブを明瞭に区別できるケースばかりではないので、万能な手法ではありません。また、染色により判別できるものは全体のごく一部に限られてしまうことから全体像の把握はなお困難で、いずれにしても残念ながら現状では『どのような菌が、どれくらいいて、どんな働きをしているか』という命題に満足に答えられる段階にはありません。

植物研究の分野に留まっていらっしゃる方が多い中、以上のように私の中心的な興味や研究課題は皆様方のものとは少しかけ離れたものになってしまい、はたしてこのシンポジウムの趣旨に添うものなのかよくわかりません。いえ、たぶん添わないでしょう。けれど無理矢理なこじつけをさせていただければ、未知の困難な課題を解決すること（植物の生理現象を理解することばかり、複雑な微生物生態系を理解することばかりです）それに関して言えば植物の研究も微生物の研究も一貫している、というのが私の考えです。

謝辞

本稿を書く機会を与えて下さった「植物科学の新展開・分子から群集まで広視野研究をめざす」シンポジウム実行委員会の皆様、委員長の前島正義先生に感謝いたします。また、北海道大学大学院修士課程でご指導くださいました吉田静夫先生に深く感謝いたします。

参考文献

野田尚宏・金川貴博（2003）分子微生物生態のこれまでとこれから．日本微生物生態学会誌 18: 38-43

第 II 部

広領域研究を目指して

分子から個体まで 植物の水輸送を階層的に考える

村井（羽田野）麻理
（東北農業研究センター）

はじめに

私は、1993年秋から1997年春まで、修士課程の2年目から博士後期課程3年までの約3年半の間、北海道大学低温科学研究所で学生生活を過ごさせて頂きました。千葉大学園芸学部の修士課程の学生の時に、初めて「植物凍害科学部門」の吉田静夫先生の研究室を訪れました。その時に、ご自作の低温顕微鏡を使って、植物の細胞が冷やされ凍結する様子を見せて頂いた印象は今でも忘れられません。あれから早くも11年が経過しました。振り返ってみると、現在の自分の興味は、低温研で見聞きし学んだことに大きな影響を受けていることに気づかされます。そこで今日は、自分が現在立っている位置を確かめ、これからを展望するために、これまでの11年を振り返ってみたいと思います。

北大低温研で過ごした3年半

大学院博士後期課程での研究テーマは、低温顕微鏡を使ってキクイモ塊茎を材料に、植物細胞の凍結障害メカニズムを追求するというものでした。

丸い1個のプロトプラストが、低温顕微鏡のステージで徐々に冷やされて0℃を下回ると、まず、細胞外の溶液が凍り始めます。顕微鏡視野の彼方から氷の結晶がぐんぐん成長してプロトプラストの近くにまで伸びてくる様子をはじめて目にした時は、南国四国育ちの私は「あー、私はいかに北海道まで来たんだなあ。北海道といえば六花亭のチョコレート、そしてここは雪の結晶の研究で有名な低温研なんだなあ。」と思ったものでした。

さて、温度が氷点下に下がり、プロトプラスト

の外液が凍り始めてから、さらにしばらく見てみると、まん丸だったプロトプラストが、梅干しのようにしぼんでくるではありませんか。これは、細胞の外の溶液の凍結による濃縮効果のために、細胞内の水分が細胞外へ移動して、細胞が次第に脱水するためであると教わりました（細胞外凍結）。細胞外凍結によって細胞から奪われる水の量は半端ではなく、-10℃の凍結によって細胞内の80~90%もの水分が脱水されてしまうほどです。一方、細胞の内部に氷晶が形成される「細胞内凍結」は、特定の条件または特定種類の植物以外にはめったに発生しないということです。毎日キクイモのプロトプラストが凍結脱水により激しくしぼむ様子を観察している内に、「なんで細胞は脱水によってダメージを受けるんだろうか。いったい水ストレスとはどんなストレス何だろうか？」という疑問が生じ、植物と水の相互作用について漠然とした興味を抱くようになりました。

受託学生として低温研に入れてもらった1993年には、植物の乾燥耐性に詳しい荒川圭太先生（現：北大農学部）、またアクアポリンを世界に先駆けて単離された前島正義先生（現：名大生命農学研究科）に指導していただく機会にも恵まれました。このような環境のもとで、植物と水の関係について、もっと勉強したいと思うようになりました。

東北農研センターでの7年半

1997年に就職したのは、岩手県盛岡市にある東北農業試験場の気象評価制御研究室（現：東北農業研究センター農業気象研究室）というところでした。この研究室には、「気象学」と「農作物の栽培技術」という全く異なる研究分野出身の人が

あつまる個性的な研究室でした。これからどのような研究テーマに取り組むべきかと考えていたところ、当時の小沢聖室長（現：国際農林水産業研究センター沖縄支所）に、冬作のハウレンソウやコマツナ「寒締め菜っ葉」が低温でしおれて農業現場で問題になっているから、そのメカニズムについて調べてみないかと勧められました。急な低温にさらされると植物がしおれる現象には、以前から興味があったので、私には願ってもない研究テーマでした。

植物のしおれは、葉からの蒸散が根からの吸水を上回り、葉の膨圧が低下する現象です。そこで、しおれの原因を突き止めるために、まず水の出口である葉からの蒸散に異常がないかを調べることにしました。コマツナの葉の気孔の開度をポロメータという装置を使って調べたところ、低温でも気孔の開閉調節は正常に行われていることが分かりました(Murai & Ozawa 1999)。となると、低温によるしおれは、水の入り口に相当する根からの吸水が抑制されたためと推測されます。

植物はいったい、どのようにして水を吸い上げるのでしょうか？これは植物生理の古典的なテーマであることに加えて、アクアポリンの発見を契機に、分子レベルでの理解が可能になりつつあります。細胞1個レベルでの水輸送に重要な役割を果たすアクアポリンは、植物の組織・器官そして個体レベルでの水輸送にはどのような影響を与えているのでしょうか？それを是非知りたいと思いました。植物の水輸送は、分子レベルから個体レベルへと階層構造をなしていると考え、その階層と階層のギャップをつなぐような研究がしてみたい、と思ったのです。まだまだ、そこまで行っていないのが現状ですが、これまで取り組んだ研究を以下に紹介したいと思います。

低温と植物の水輸送

光合成植物の葉は、一般に太陽光に対して薄く広く展開しており、またその葉の両面には気孔が数多く存在しています。これらの形態は、光と二

酸化炭素を効率よく吸収するのに適していますが、同時に葉から水分を効率的に蒸散させてしまいます。

植物体内を水がスムーズに流れることができれば、蒸散によって失われた水は根からの吸水によってすみやかにおぎなわれるはずですが、実際には植物体内の水の流れにくさ、すなわち「通水抵抗 (hydraulic resistance)」が無視できず、蒸散に吸水が追いつかなくなることがあります。そうになると葉の水分は減少して、植物は水ストレスにさらされてしまいます。

土壤水分がたっぷりある水田で生育するイネにおいても例外ではなく、イネの葉が水分不足になって巻いているのを見たときは驚きました(写真1)。



図1 水田でもイネの葉は水不足になる。東北農研センター試験圃場にて撮影(2002年6月25日(12:00-13:00)、品種名：アキヒカリ)

水ポテンシャルは水の流れる方向の尺度

葉の水分状態の悪化の程度は、「水ポテンシャル」の低下として定量的に評価されます。

水ポテンシャルとは、水の化学ポテンシャル(純水を基準ゼロとする)を水の部分モル体積で割った量として定義されます。化学ポテンシャルはモルあたりの自由エネルギーで、これを部分モ

ル体積で割るわけですから、水ポテンシャルは水の単位体積当たりの自由エネルギー（差）ということになります。つまり、「自由エネルギーの高い方から低い方へと水が移動する」ことになり、水ポテンシャルという指標は水移動の方向性を表すと言えます。

水は、植物の葉から蒸散によって多量に消費されます。多いときには、数時間で植物の含水量と同量の水が蒸散で失われるほどです。植物がしおれずに正常な生命活動を行うためには、葉を高い水ポテンシャル(0 ~ -2 MPa 程度, 相対湿度に換算すると 98 % 以上)に維持する必要があります。根からのさかんな吸水がこれを支えていることとなります。

植物が水を吸いあげるしくみ

それでは、葉の水ポテンシャルの低下が根の吸水を引き起こすまでの過程はどのようになっているのでしょうか？ 実は吸水のメカニズムは古くから研究されているにもかかわらず、いまなお盛んに議論がなされているホットなテーマでもあります。現在もっとも受け入れられている考え方は、「蒸散によって低下した葉の水ポテンシ

ルが導管の内部を負圧にし、これが推進力となって根から水を吸い上げる」という説です（ただし昼間の蒸散時）(Kramer & Boyer 1995)。

吸水速度は、土壌（水耕液）の水ポテンシャルと葉の水ポテンシャルの差に比例し、通水抵抗に反比例するという考え方が、もっとも基本的なモデルとして受け入れられています(Kramer & Boyer 1995)。

$$W = (\psi_G - \psi_L) / r_p \dots \dots (2)$$

ただし、W は吸水速度、 ψ_G は土壌（水耕液）の水ポテンシャル、 ψ_L は葉の水ポテンシャル、そして r_p は植物体の通水抵抗（ $1/r_p = L_p$: 通水コンダクタンス）です。直流電気回路のオームの法則と同様、電気抵抗に相当するのが r_p です。

低温が植物の通水抵抗に及ぼす影響

話を、低温による植物のしおれ現象に戻したいと思います。植物の中での水の通りにくさ（通水抵抗）は温度によってどのような影響を受けるのでしょうか。イネの幼植物を材料にして、器官・部位別の通水抵抗の分布を調べるところ、25 °C の条件では、根の通水抵抗は、地上部と同程度の大きさであるに対して、根の温度低下につれて根の通

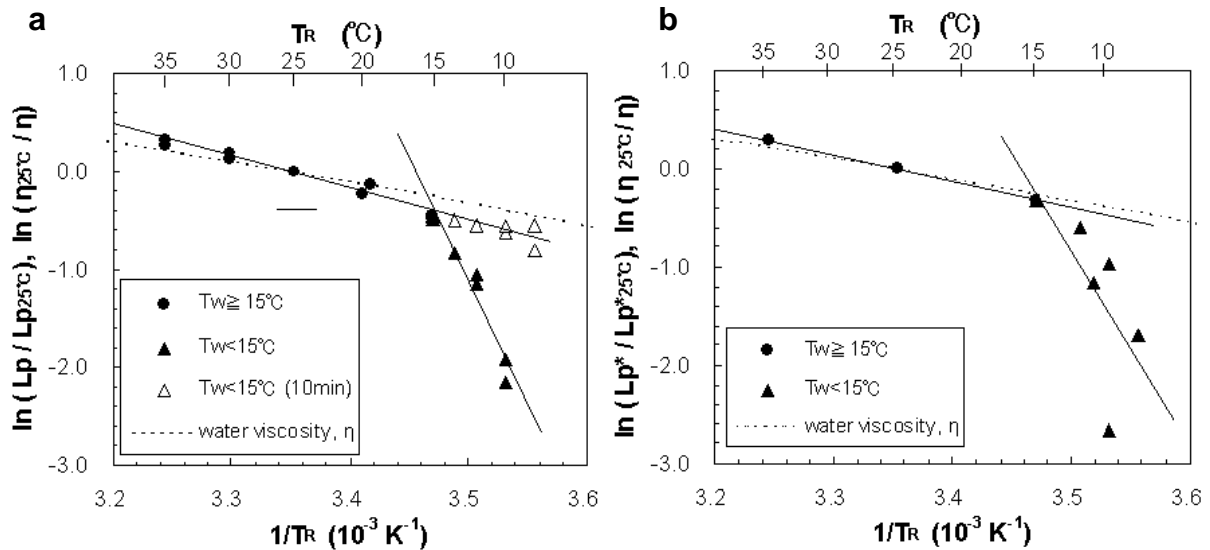


図2 根圏温度に依存したイネ幼植物の根(a)と植物体全体(b)の通水コンダクタンス L_p ($=1/r_p$) の変化。植物体地上部は室温(25 °C)に保ったまま、根の温度 T_R を変化させて、根単独(a)および植物体全体(b)の通水コンダクタンス L_p をプレッシャーチャンバ法で計測した。 L_p は $T_R=25$ °C での値に対する相対値(L_p/L_{p25})として表示した。横軸は絶対温度の逆数、縦軸は L_p/L_{p25} または η_{25}/η の対数として表示。ただし η は水の粘性係数($\text{Pa} \cdot \text{s}$)。○は根圏温度を変化させた後 120 ~ 250 分経過後(平衡値)、△は 10 分後の値をプロットしている。

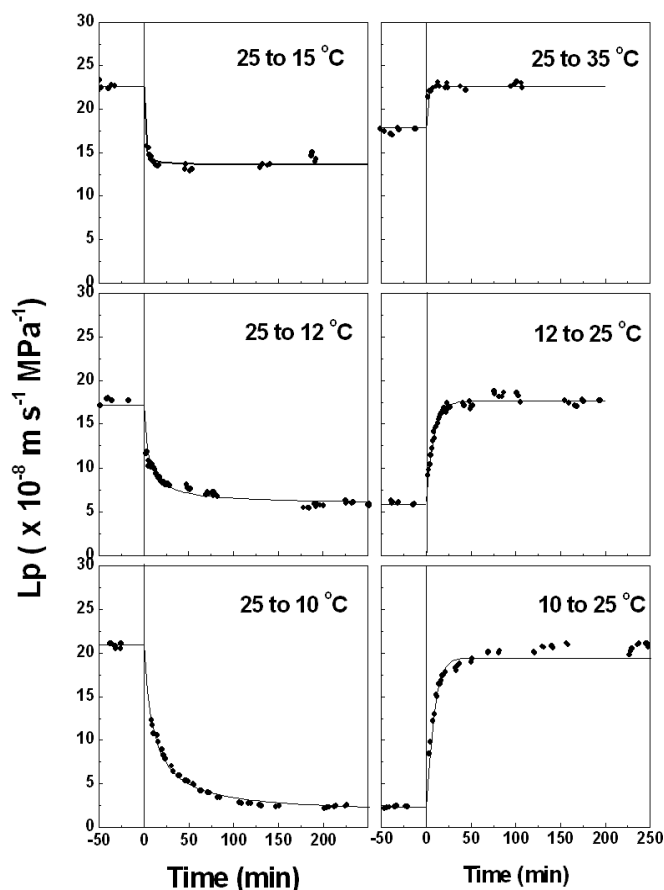


図 3 根圏温度を不連続に変化させた場合の通水コンダクタンス L_p の時間変化

水抵抗は増加すること、さらに根の温度が 15 を下回ると通水抵抗は極端に増加(通水コンダクタンス L_p が低下)し、植物体全体の L_p に大きく影響することがわかりました(図 2)。

次に、温度に依存した通水コンダクタンス L_p の変化がどれくらいの速さで進行するのか見てみると、温度に対する L_p の変化には、数分以内の早い応答と、1 時間以上の緩慢な応答が存在することが明らかになりました(図 3)。早い応答については、 L_p の温度依存性が水の粘性係数より少し大きいということから、粘性係数の温度依存性に代表される水の物理的性質に依存した応答と考えられます。一方、遅い応答は、根の温度が 15 を下回ると発現し、 L_p を大きく低下させます。この緩慢な応答の実体は、生体膜水透過率の変化を反映したものである可能性が高いと推測していますが、今後証明すべき課題と考えています。

通水抵抗の変化が蒸散速度に及ぼす影響

それでは、植物体内の通水抵抗が大きくなると、蒸散速度にどの程度の影響を及ぼすのでしょうか？気温、湿度および根の温度を制御できる人工気象室を使って調べてみました。その結果、例えばイネの根の温度が 15 から 10 に低下することによって通水抵抗が 2 倍に増加すると、蒸散量は 4 割も低下する(気温 25 , 大気飽差 12 hPa, 葉の片面の入力長波放射量 510 Wm^{-2} , 葉の吸収日射量 100 Wm^{-2} の条件) など、通水抵抗の増減は植物の蒸散量にも大きな影響を及ぼすことが確認されました(桑形、村井、濱寄 2003)。

温度低下がもたらす吸水機能低下の生理的メカニズム

根の通水抵抗が温度にこれほど強く依存するのはどうしてなのでしょう？低温では根が水を吸い上げにくくなる生理的メカニズムについて考えてみたいと思います。

土壌中の水が根の表皮から吸われて、根の中心にある導管(水を通すパイプ)にまで至るまでの経路には何層もの生きた細胞が存在しています(図 4)。水が導管にはいつてしまえば中の抵抗が小さいので水はスイスイ流れることができますが、そこまでの経路に存在する細胞、つまり

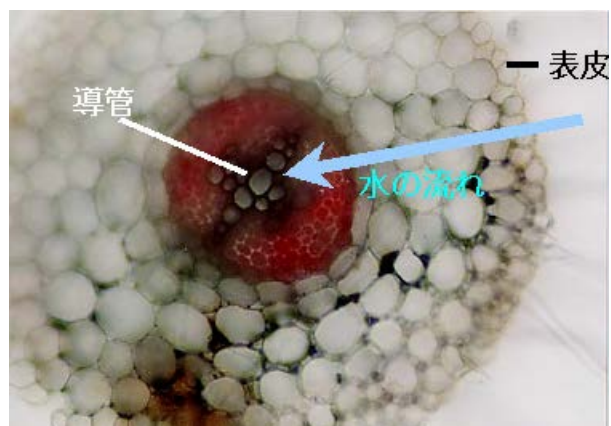


図 4 紅丸カブ芽生えの根の横断面 根が水を吸い上げの場合、導管内部を流れる水経路に比べて、根の表皮から導管に至る水輸送経路の抵抗が大きく、特に細胞を横断する(膜を透過する)際の抵抗が大きいといわれている。

生体膜を透過するとき大きな抵抗がかかってしまいます。低温になると根が水を吸い上げにくくなる原因として、生体膜の水透過率が低温で著しく悪くなってしまう可能性が考えられます。

このことを確かめるためには、個々の細胞の水透過率を調べる必要があると考えました。植物の細胞は外側の細胞膜と内側の液胞膜の二重膜構造となっているので、様々な環境条件下で、それぞれの膜の水透過率がどのように調節制御されているのかも興味深いところです。そこで、プロトプラスト全体の水透過率と、単離した液胞の水透過率をそれぞれ計測し、数値モデルの助けを借りて細胞膜と液胞膜の水透過率を分離評価する方法を考案しました(Suga et al. 2003, Kuwagata & Murai 2004, Murai & Kuwagata 2004)。この方法を用いて若いダイコンの根から単離したプロトプラストを材料に計測したところ、細胞膜・液胞膜とも水透過率は約 $500 \mu\text{m s}^{-1}$ と非常に高い(25 条件下)こと、ただし細胞膜の水透過率に限っては特定の条件により著しく低下することなどが分かってきました。今後は、細胞膜と液胞膜の水透過率が温度の影響をどのように受けるのかを、具体的に調べてみたいと考えています。

生体膜の水透過孔「アクアポリン」の役割

従来、水は生体膜を単純拡散で透過すると考えられていましたが、実はアクアポリン (aqua=水、porin=孔の意味、水チャネルとも呼ばれる。)というタンパク質でできた特殊な透過孔が、生体膜での水の超高速輸送を可能にしていることが明らかになったのは 10 年ほど前のことです(前島先生のページ)。アクアポリンが細胞レベルの水輸送に果たす役割は非常に大きく、アクアポリンの働きの大小によって、細胞 1 個の水透過率が 10 ~ 100 倍もの広い範囲で変化するほどです。

水稻の根に水チャネル活性を阻害する物質 (HgCl_2) を添加すると、吸水速度が激減する(阻害剤添加前の 3 分の 1 以下) (Murai et al. 2001) ことから、イネの吸水機能も細胞膜と液胞膜に存在す

るアクアポリンの機能に強く依存するものと推測されます。

最近、植物の細胞膜のアクアポリンの活性が細胞質 pH の影響を強く受け、細胞質が酸性化すると水を通しにくくなることが報告されました (Tournalre-Roux et al. 2003)。この報告から、低温による根の吸水抑制にも、細胞質酸性化によるアクアポリン機能の低下が関与している可能性が類推されます。もしかしたら、低温による細胞質の酸性化は、膜の水透過率を抑制して細胞の水分状態を一時的に変化させることにより、乾燥および低温順化のプロセスで何らかの役割を果たしているのではないかと想像力を膨らませています。

まとめ

以上ご紹介した断片的な研究結果は、アクアポリン分子を通過する生体膜レベルでのミクロな水の流れが、根・茎・葉の器官レベル、そして植物個体レベルでの通水抵抗にもはっきりとした影響を及ぼし、植物の吸水・蒸散量を左右するらしいということを示唆しているように見えます。ただし、細胞膜と液胞膜の水透過率が実際に温度に対してどのように反応するのか検証する必要があります。また、アクアポリンが具体的にどのように低温下での水輸送に関与しているのかは未解明の課題となっています。さらに、植物個体レベルの水輸送を理解するためには、アクアポリンを介さない水輸送経路つまりアポプラスト経路も含めた水輸送プロセスについて考える必要があります。東北農研センターは、岩手大学の上村松生先生の研究室に近い点でも恵まれています。今後は、植物の耐寒性獲得機構について低温研で教えて頂いたことを役立てながら、植物と水の関係について、研究を続けることができればいいな、と考えています。

謝辞

「植物科学の新展開・分子から群集まで広視

野研究をめざす。」シンポジウムの計画をリードして下さった露崎史朗先生にお礼申し上げます。このシンポジウムに参加できることは大きな喜びです。東北農研センターに就職してもう8年目となりますが、低温研で過ごした3年間は特別に長く感じられます。低温研でお世話になった皆様に心より感謝申し上げます。指導教官の吉田静夫先生からは辛抱強く卒業まで毎日お世話になりました。プロトプラストの観察には今も愛着があり、現在の研究にも大変役立っております。吉田先生から教わったことの中でも特に勇気づけられたことは、新しい研究分野でも躊躇せずチャレンジする行動力を目の当たりにしたことだと思います。本稿で紹介した研究を共同で取り組み、またご助言ご指導下さった東北農研センターの皆様、農業環境技術研究所の桑形恒男さん、愛媛大学農学部の野並浩先生、名古屋大学の前島正義先生はじめお世話になった皆様に心よりお礼申し上げます。

参考文献

- Kramer, P. & Boyer, J. (1995) Water Relations of Plant and Soils. Academic Press, USA, pp.495.
- Kuwagata, T & Murai, M. (2004) A method for measuring osmotic water permeability of plasma- and vacuolar membrane for modeling water transport in higher plants. (1) Theoretical consideration. *International Workshop on Plant Membrane Biology. Abstracts*, p100.
- Murai, M. & Kuwagata T. (2004) A method for measuring osmotic water permeability of plasma- and vacuolar membrane for modeling water transport in higher plants. (2) Experimental Results on Radish (*Raphanus sativus* L.) root cells. *International Workshop on Plant Membrane Biology. Abstracts*, p100.
- Murai, M., Kuwagata, T., Hamasaki, T. and Ishikawa, J. (2001). Effect of root temperature on hydraulic resistance and transpiration on rice plants under various humidity, *Plant Biology 2001. Final Program*, p87.
- Murai, M. and Ozawa, K. (1999). Cold-shock induced wilting and recovery in *Brassica campestris* L. (cv. Komatsuna) grown in unheated greenhouses, *Acta Horticulturae*, **507**: 197-203.
- Murai, M. and Yoshida, S. (1998a). Vacuolar membrane lesions induced by a freeze-thaw cycle in protoplasts isolated from deacclimated tubers of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.), *Plant and Cell Physiology*, **39**: 87-96.
- Murai, M. and Yoshida, S. (1998b). Evidence for the cell wall involvement in temporal changes in freezing tolerance of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers during cold acclimation. *Plant and Cell Physiology*, **39**: 97-105.
- Suga, S., Murai, M, Kuwagata, T. and Maeshima, M. (2003) Differences in Aquaporin Levels among Cell Types of Radish and Measurement of Osmotic Water Permeability of Individual Protoplasts. *Plant and Cell Physiology* **44**: 277-286.
- Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D-T., Bligny, R. & Maurel, C. (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* **425**: 393-397.

スサビノリにおける細胞膜一次ポンプと膜輸送機構 ・ 到達点と今後の課題・

長谷 昭

(北海道教育大学 函館校生物学教室)

はじめに

細胞膜を通過する養分やイオン等の能動輸送には、膜を横切って形成される一価陽イオンの濃度勾配と膜電位が駆動力を与える。その一価陽イオンの濃度勾配の形成にあずかるイオンポンプを、一次ポンプと呼んでいる。一般的には動物の場合はナトリウムポンプ ($\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$)、細胞壁を持つ植物や菌類・藻類の場合はプロトンポンプ (H^+-ATPase) が一次ポンプであり (Gimmler 2000)、いずれもリン酸化中間体をその反応サイクルの途中で生じる P 型 ATPase に分類されている major な細胞膜タンパク質である。私は、15 年ほど前に内地研究員として北大低温科学研究所植物凍害部門 (当時) において、吉田静夫先生から細胞膜の単離法及び細胞膜 H^+-ATPase の分析法を指導して頂いて以来、主に、キクイモ塊茎及びその培養組織を材料として、この酵素の細胞増殖及び栄養成長での役割について調べ、また関連して液胞膜プロトンポンプについても調べて来た (Hase 1993; Ueoka & Hase 1997)。更に北大地球環境科学研究科の奥山英登志研究室との共同研究として、浮水性植物のヒメウキクサのリン酸飢餓応答における本酵素及び関連するリン酸トランスポーターやホスファターゼについても調べてきた (Nishikoori et al. 2001; Hase et al. 2004)。

このように、これまでは主に高等植物を材料として研究を進めて来たが、2000 年 4 月に北大水産学部教授として旧知の嵯峨直恆氏が着任され、特に養殖海苔の「色落ち」等の品質劣化に養

分吸収能が関わっていることが推定されていることから、海苔の細胞膜輸送についての共同研究を開始した。その過程において、思わぬ発見があったので、今後の研究上の課題も含めて紹介したい。尚、この研究は、私自身による実験の他、嵯峨教授の指導のもと、嵯峨研究室の北出幸広氏 (日本学術振興会 PD、主に *in silico* クローニング等を担当)、田畑恵さん (MC1 年、生化学的実験一般)、及び進藤昌樹君 (MC1、cDNA のクローニング) 等との共同研究によって進めてきた。

スサビノリ及びその生活環

まず、研究材料である紅藻スサビノリについて簡単に紹介したい。海苔というアサクサノリの名前を思い浮かべる方が多いと思われるが、今やアサクサノリは絶滅危惧種に指定されている比較的珍しい海藻であり、全国的に養殖され焼海苔

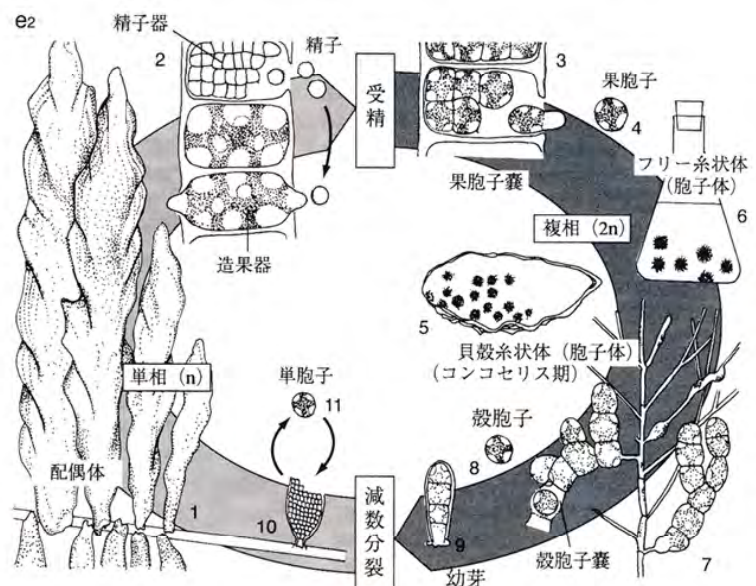


図 1 . アマノリ属の生活環。吉崎・神谷 (1999) より引用。

表 1. スサビノリの配偶体（葉状体）と孢子体（糸状体）から単離した細胞膜画分におけるバナジン酸感受性 ATPase 活性。

Sample	Total ATPase activity	Vanadate-sensitive ATPase activity	Inhibition
			%
		$\mu\text{mol Pi/mg protein/h}$	
Gametophyte	2.05±0.04	0.73±1.00	34
Sporophyte	25.98±4.13	19.87±1.24	76

等加工されているのは、本種スサビノリ *Porphyra yezoensis* である。そのために、水産業上も極めて重要な海藻の一つとなっている。種小名が示すように、もともとは北日本の磯に広く自生し、岩海苔として冬場の重要な漁業資源となってきた。しかし、有明海における赤潮による被害が示すように、養殖海域の環境悪化によって品質や収穫量が大きく低下するために、その克服が大きな課題となっている。

スサビノリが属するアマノリ属の生活環を図 1 に示した。スサビノリは紅色植物門紅藻綱原始紅藻亜綱に属する海産多細胞藻類であるが、食用とする海苔は葉状で単相の配偶体世代である。養殖は糸状で複相の孢子体世代の培養から始まり、貝殻に植え付けて以降の生活環を進行させる。非常に複雑な生活環を有するために、しばしば複数の世代が共存する可能性があるが、本研究では、実験室で維持管理した配偶体（葉状体）と孢子体（糸状体）を材料として用いている。尚、スサビノリについての実験生物としての有利さ、特徴、及び研究の現状等は、文献（嵯峨・田畑 2001）を参照されたい。

スサビノリからの細胞膜の単離と P 型 ATPase の検出

水産業上重要なのは葉状の配偶体であるので、まず葉状体から細胞膜の単離を試みた。幸いなことに、スサビノリの細胞壁はセルロース性であり、かつホモジナイズを困難にする粘液多糖類もほとんど無いので、高等植物に適応してきた方法（分画遠心及び二相分配法）を準用して膜単離を試みた。しかし、スサビノリの細胞壁は予想以上に固く、かつ藻

体が一層の細胞でありかつ極めて薄いために、ポリロンホモジナイザーでは断片化するだけでホモジナイズできなかった。結局は一番原始的な石英砂を加えての乳鉢・乳棒でのホモジナイズとなったが、効率は著しく悪く、膜収量も高等植物に較べれば低いものであり、また肝心のバナジン酸感受性 ATPase 活性もほとんど検出出来なかった。試行錯誤の末、比較的高い pH（8 程度）と 50 mM 以上の NaCl を含む ATPase 反応液を用いることによって、低いながらもバナジン酸に弱い感受性を持つ活性を検出出来た（表 1）。

ここにおいて、予想に反して、スサビノリには P 型 H^+ -ATPase ではなく、 Na^+ -ATPase が細胞膜に存在する可能性が示唆された。次いでスサビノリ

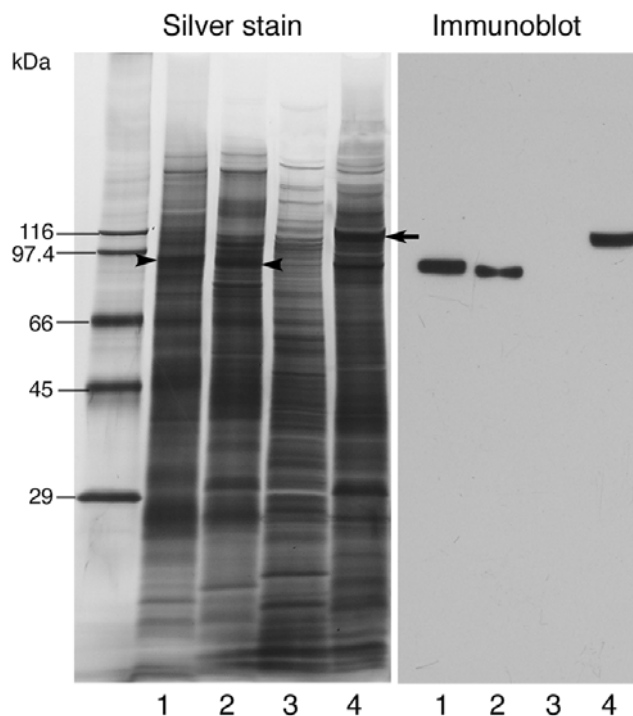


図 2. スサビノリ細胞膜タンパク質における P 型 ATPase の免疫プロット分析。1, 2, 3, 4 はそれぞれキクイモ塊茎培養組織、シロイヌナズナ培養細胞、スサビノリ葉状体、スサビノリ孢子体からの細胞膜タンパク質。

の養殖上重要な世代である孢子体（糸状体）から、同様に細胞膜を単離しバナジン酸感受性活性を分析したところ、バナジン酸で強く阻害される比較的高い活性を持つ膜を得た（表1）。最適 pH や Na^+ 依存性に関しての実験より、やはり Na^+ -ATPase である可能性が示唆された。また、P 型 ATPase に広く保存されている ATP 結合部位の保存配列に対して作製した抗血清を用いた免疫ブロット分析によって、分子量 115k Da の膜タンパク質を検出した（図2）。この膜タンパク質は、葉状体から単離した細胞膜では、免疫ブロット分析で露出時間（化学発光法による）を長くすればかろうじて検出される程度の量しかなく、ATPase 活性の結果とほぼ一致した。尚、この酵素には K^+ 依存性がほとんど無く、また、動物の Na^+/K^+ -

ATPase の特異的阻害剤であるウワバインでは阻害されないので、 Na^+ と逆向きに K^+ を輸送するかどうかは、今の段階では不明である。そこで動物の酵素と区別する意味で Na^+ -ATPase と記述した。

スサビノリ Na^+ -ATPase 遺伝子のクローニング

スサビノリにおいてはゲノムプロジェクトが進行しており、2 万程の EST クローンのデータベースがかずさ DNA 研究所から公開されている。そこで、P 型 ATPase に共通して保存されているいくつかのアミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行い、関連するクローンの情報を得ようとした。幸いなことに、そのうちの 하나가ヒットして *Drosophydra* Na^+/K^+ -ATPase alfa-subunit と注釈が付けられている多数のクローンを得た。その大部分

MAGGDDVTPAGEGGQPRRLSHNELEMARQYSETSARIDTAIEKKKAGKKPTAAEATSDLK	60
KEMEMWEHKVSVEELERKLGTSVANGLTKDDHKMRLERDGNMLSPPKVKPWWYKLLMQF	120
<u>LNFFALLLQVASIMSFVGYALDQSSPDNLYLGVVLYVVVVITALFTFMQEFKSEKTMEKF</u>	180
<u>ANFLPPQTVARRGGLASQVEAATLVVGDVIEVKLGDKIPADIRLVENAKLKVDNSSLTGE</u>	240
<u>SE</u> PQKRTVECTDENPLESKNLAFFGTLAVDGTAVGVVVNTGDRTVFGRIAGLAAGSDAQA	300
TTLQLEIHRFV ^{M3} IIISAVAITLGLIFLIIGFVKGTDIIDNLI ^{M4} FVIGIIVANVPEGLLATVT	360
VSLTTLAKRMAKKNVLVKKLECVETLGS ^{M5} TTTICS ^{M6} DKTGTLTQNRMTIVHAVTDMTIHTTK	420
TATQESTFDFDSPTFKNLFLLACVCAKAKFDAADMAENPNKSIDDRQVNGDASEAGILKF	480
AEKLSVMPPIREKNAQVATIPFNSANKFMVTINKDSMRSDGGLRLCMKGAPE ^{M7} RVLDRCNS	540
IMINGETRDMTDADKATINERLQTLMEGGERVLGFAQMSLDAETYPATFEFDTENPNFPL	600
EGMTFVGLLALLDPPRESVPS ^{M8} SIRTCQTAGVQVIMVTGDHPATAKSIKQVNIITDQTAE	660
DVAKERGVAVSDVDPTTVKAI ^{M9} VVPGSQIRDLESDWDRVLAHEQIVFARTSPQQKLIIVE	720
NCQRLAKI ^{M10} VAVTGDGVNDSPALKRANIGVAMGIAGSDVSKEAADMILLDDNFSSIVSGIE	780
EGRLIFDNLKKSIA ^{M11} YTLSSNIPEISPFLAFIL ^{M12} TGIPQPLTTVLILCIDLGTDM ^{M13} LPAISLA	860
YERAESDIMLREPRNA ^{M14} AVDRLVTRRLISFSYLQIGITQAAAGFMVYLIVFQDYGISTSL	920
PGLDNDRLYA ^{M15} AKADEDKRWLYTELVRPRGESVEREW ^{M16} FD ^{M17} RGSDSSLNPF ^{M18} FTSAV ^{M19} PNFVQQT	980
AERFGDLLPGNDPATNRPTNAQFN ^{M20} NMVKIIGSLTNLPPCVEYECDSGTTVLSNDFACFTQ	1020
PGAVYLTGINTLTTNPAGQCFEMWSRE ^{M21} QQSKVL ^{M22} RRAQTAFFIS ^{M23} IEVQWADV ^{M24} LICKTRY	1080
LSLFQQGFFSNLVNAGLLEETLLGALLVYV ^{M25} PFLHGPFGTQPLRVVH ^{M26} WLPALPFV ^{M27} VIIFS	1140
<u>YDEIRKFLRLGKTKGNKFGMWLYDNTYW</u>	1169

図3. スサビノリの Na^+ -ATPase と推定されるタンパク質のアミノ酸配列。

が糸状体由来であり、またほとんどが同じ配列であったが、同じ遺伝子グループには 119 種類（葉状体 5、糸状体 114）のクローンが分類されていたので（Asamizu et al. 2003）、その中から糸状体由来の任意の 20 クローンを選び、コンピュータ上での連結を試みたところ見事につながり、1,169 アミノ酸、分子量 128,427 のタンパク質をコードする連続した配列を得た（図 3）。ハイドロパシープロットにより、10 回膜貫通型の膜タンパク質であることが予想され（図 3 の M1 ~ M2）、また、P 型 ATPase において共通するほとんどの配列を有していた（図 3 の四角で囲った配列）。そこで、藻類で唯一 Na⁺-ATPase のクローニングが報告されているラフィド藻アカシオモ *Heterosigma akashiwo* からの遺伝子（Shono et al. 2001）及び淡

水性紅藻イデユコゴメ *Cyanidium caldarium* の H⁺-ATPase の配列（Ohta et al. 1997）と詳細に比較したところ、系統的に離れているアカシオモの遺伝子との高い相同性が明らかになった。更に、ほとんどすべての界の真核生物にまたがる 19 生物の P 型 H⁺-ATPase 及び Na⁺-ATPase (Na⁺/K⁺-ATPase) と比較分析した結果、スサビノリの遺伝子は Na⁺-ATPase のクラスターに含まれた（図 4）。

以上のように、非常に幸運なことに、in silico クローニングによって遺伝子の実体が明らかになったので、その配列をもとに PCR プライマーを設計し、RT-PCR を繰り返すことにより、全長をカバーする cDNA クローンを容易に得ることが出来た。その配列は上記の in silico クローニングで得た配列と完全に一致した。しかし、遺伝子面で

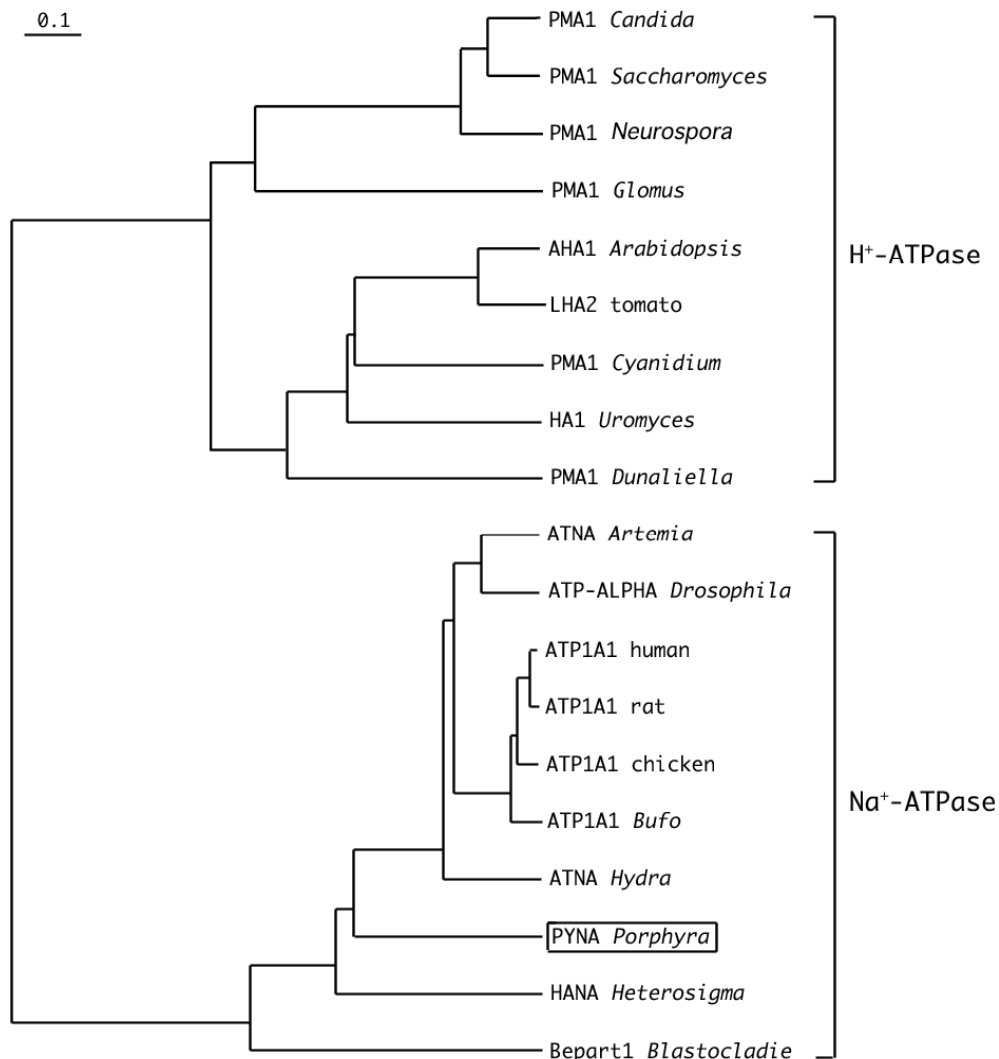


図 4. スサビノリの推定上の Na⁺-ATPase の系統分析。系統樹の作成は UPGMA 法によった。

の急激な進展とは裏腹に、本来的には先行すべき生化学的研究が、材料の難しさ（成長が遅くて分析に必要な材料を得るまでに時間がかかる、固いためホモジナイズ効率が悪く膜の収量が低い、内在性プロテアーゼ等の活性が高く自己崩壊しやすく均質な膜を取りづらい=再現性が悪い等）の壁にぶつかり、四苦八苦している。少なくとも糸状体細胞膜においては、 H^+ -ATPase と思われる膜タンパク質、活性、EST クローンをいずれも検出していないので、本酵素が一次ポンプとして機能している可能性は高いと思われるが、生化学的実験の遅れから、現状ではまだそのことを直接証明する結果を得るには至っていない。

スサビノリにおける P 型 Na^+ -ATPase の発見の意義

「はじめに」でも触れたように、細胞壁を有する高等植物、菌類そしていくつかの藻類においては、海産生物であっても H^+ -ATPase を細胞膜の一次ポンプとして用いている（Gimmler 2000）。 Na^+ -ATPase が一次ポンプとして機能しているのが報告されているのは、藻類としては前出のアカシオモ（Wada et al. 1989, 1992）と単細胞緑藻の *Tetraselmis viridis*（Popova et al. 1998）であるが、前者は細胞壁の無い単細胞藻類であり、実質的に動物細胞のように海水のイオン環境に細胞膜が曝されている。また、後者は高度好塩性の単細胞藻類であり、イオン環境に応じて H^+ -ATPase も一次ポンプとして使い分けていることが報告されている（Pagis et al. 2003）。従って、通常の海水環境化で生育する細胞壁を有する多細胞藻類では、これが初めての一次ポンプ候補の Na^+ -ATPase の検出とクロニングの報告であると思われる。

スサビノリの葉状体における細胞膜一次ポンプは何か？

膜輸送の分子機構の総合的解明のためには、一次ポンプの特徴付けは必須であり、それによってその後の二次輸送体への研究のアプローチの方

法が大きく変わってしまう。特にスサビノリ糸状体の場合は、 Na^+ の対向輸送体が次の研究のターゲットとなり、また EST クローンの中にもそのように注釈されているクローンが見つかりしている。しかし、食用となる葉状体では、細胞膜における P 型 ATPase は、免疫プロットにおいてもかろうじて検出される程度であるし、活性も他の ATPase 活性に埋もれていると思われる結果しか得ていない。また、相同性のある EST クローンも糸状体の 5/114 である。そもそも純度の高い細胞膜が単離されていない可能性もあるが、あまりにもバナジン酸感受性 ATPase 活性が低いので、間接的にしか検証出来ないというのが現状である。

一方、細胞膜の単離・特徴付けの実験と平行して、液胞膜も浮遊遠心法を改良して単離してきた。その特徴付けの過程で、V 型 ATPase の A 及び B サブユニットに対する抗体とクロスするバンドを、葉状体の細胞膜タンパク質にも見出した。このバンドは糸状体細胞膜では検出出来なかった。現在、荒川圭太氏から提供頂いた他のサブユニットに対する抗体をも用いながら、葉状体細胞膜における一次ポンプの同定を行っているところである。

今後の展望

スサビノリにおける細胞膜輸送に関する研究は、実質的に昨年度から始まったばかりであり、程なく一次ポンプ候補の全長の配列が分かるという幸運に恵まれた。しかし、材料自体は高等植物に較べても決して取扱いが簡単なものではなく、生化学的実験に向いている訳でもない。しかも、直接参考に出来る先行研究が極端に少なく、手探り状態で研究を進めているのが現状である。唯一の救いはゲノムプロジェクトの進展であり、今回の成功もそれに負うところが大きい。従って、今後とも一方では生化学的実験の精度を上げながらも、もう一方ではゲノムプロジェクトの成果を活用しつつ、研究を進展させていかなければならないであろう。

謝辞

まずは今回のシンポジウムを準備し、本稿の執筆の機会を叱咤激励しながら与えて下さった、露崎史朗氏に感謝したい。彼なくしてはこの企画はなかったであろう。

私は現所属校に赴任してから今年で 24 年になるが、文字通り 0 からの出発であった。研究上の困難にあえいでいた赴任後 8 年目に、吉田静夫先生に指導を受ける機会を得た。その際に吉田先生及び当時助手だった前島正義先生に教わったテクニックが、自分自身の研究の発展のみならず、複数の研究室との共同研究の道を拓くこととなった。研究成果は微々たるものではあるが、それでもしぶとくローカル大学の零細研究室で研究を継続していただけるのは、その時の賜である。ここに両先生に対して深い感謝の意を表したい。

参考文献

- Gimmler, H. (2000) Primary sodium plasma membrane ATPases in salt-tolerant algae: facts and fictions. *J. Exp. Bot.* **51**: 1171-1178.
- Hase, A. (1993) Changes in protein composition and the H⁺-ATPase activity of the plasma membrane during induction of callus from tuber tissues of Jerusalem artichoke. *Plant Cell Physiol.* **34**: 67-74.
- Hase, A., Nishikoori, M. & Okuyama, H. (2004) Induction of high affinity phosphate transporter in the duckweed *Spirodela oligorrhiza*. *Physiol. Plant.* **120**: 271-279.
- Nishikoori, M., Washio, K., Hase, A., Morita, M. & Okuyama, H. (2001) Cloning and characterization of cDNA of the GPI-anchored purple acid phosphatase and its root distribution in *Spirodela oligorrhiza*. *Physiol. Plant.* **112**: 241-248.
- Ohta, H., Shirakawa, H., Uchida, K., Yoshida, M., Matuo, Y. & Enami, I. (1997) Cloning and sequencing of the gene encoding the plasma membrane H⁺-ATPase from acidophilic red alga, *Cyanidium caldarium*. *Biochim. Biophys. Acta* **1319**: 9-13.
- Pagis, L.Y., Popova, L.G., Andreev, I.M. & Balnokin, Y.V. (2003) Comparative characterization of the two primary pumps, H⁺-ATPase and Na⁺-ATPase, in the plasma membrane of the marine alga *Tetraselmis viridis*. *Physiol. Plant.* **118**: 514-522.
- Popova, L.G., Balnokin, Y.V., Dietz, K.J. & Gimmler, H. (1998) Na⁺-ATPase from plasma membrane of marine alga *Tetraselmis (Platymonas) viridis* forms a phosphorylated intermediate. *FEBS Lett.* **426**: 161-164.
- 嵯峨直恆・田畑哲之 (2001) 海のモデル植物スサビノリ. 植物細胞工学シリーズ 14 「植物のゲノム研究プロトコール」, pp. 208-215.
- Shono, M., Wada, M., Hara, Y. & Fujii, T. (2001) Molecular cloning of Na⁺-ATPase cDNA from a marine alga, *Heterosigma akashiwo*. *Biochim. Biophys. Acta* **1511**: 193-199.
- Ueoka, H. & Hase, A. (1997) Tonoplast H⁺ pumps are activated during callus formation of tuber tissues of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Physiol. Plant.* **100**: 91-101.
- Wada, M., Satoh, S., Kasamo, K. & Fujii, T. (1989) Presence of a sodium-activated ATPase in the plasma membrane of the marine Raphidophycean *Heterosigma akashiwo*. *Plant Cell Physiol.* **30**: 923-928.
- Wada, M., Urayama, O., Satoh, S., Hara, Y., Ikawa, Y. & Fujii, T. (1992) A marine algal Na⁺-activated ATPase possesses an immunologically identical epitope to Na⁺,K⁺-ATPase. *FEBS Lett.* **309**: 272-274.
- 吉崎誠・神谷充伸 (1999) 紅色植物. バイオダイバーシティ・シリーズ 3 「藻類の多様性と系統」 (千原光雄編), pp. 177-193.

粘菌ってなにもの？

川田 健文

(東邦大学理学部生物学科 分子発生生物学研究室)

はじめに

大学院修士課程(理学研究科植物学専攻)学生として北海道大学低温科学研究所にて吉田静夫先生のお世話になったのは1984年からの2年間と記憶している。そのときのメンバーは仁木さん、佐藤さん、石川さん、吉江さん、上村さんそして恵谷君。恵谷君以外はみな既に博士号を取った人ばかりで、年が離れていたのでもっと浮いた存在であったはず(ちなみに、同級生である露崎とは入れ違いになってラボでは重なっていない)。当時の思い出としてはとにかくハードワーカーの吉田先生の仕事ぶりくらいしか記憶がなく、夜中の2時半まで実験するので、こちら意味もなく3時まで実験して帰宅したら夜が明けていたということがよくあった。翌朝吉田先生は8時に来るけど僕はよく寝坊した。

ほかのメンバーと同じくこの分野の仕事を長く続けられていたらここで仕事の紹介をするのが格好いいのだろうが、残念ながらいろいろと興味は移ろうもので、どうしても、遺伝子をいじくる仕事がしたくて、博士後期課程からは別のラボへと移り、学位取得と前後して基礎生物学研究所へスタッフとして赴任し、そこで出会った Jeffrey G. Williams 教授の細胞性粘菌の仕事に興味を持ち英国に留学することになった。ほんの2年くらいのもりで、また植物の分野へ戻ってくるはずが、6年半ロンドンに滞在することになり、結局今もその分野から抜け出せなくなってしまった。そして、何故か恵谷君の母校で教員をしている。

昔の仕事を今から紹介してもしょうがないであろうし、みんな知っていると思うので、本稿では、英国留学以降の研究結果(エッセイ?)の一部を紹介し、今後展望について述べてみたい。た

だし、植物や低温科学とはいささか距離を持ってしまったので、その辺はご勘弁願いたい。

細胞性粘菌とは

いささか前書きが長くなってしまった(長くした)が、北大には細胞性粘菌のラボが長らく存在していたので、我々の世代の人間にとって細胞性粘菌はさほど珍しい生き物ではないかも知れない。

粘菌細胞はアメーバとして単細胞でアメーバを捕食し、栄養源が枯渇するとおよそ10万個の細胞が集合し、多細胞体を形成する。多細胞体は移動体と言うナメクジを形成し、適した場所を求めて動き回り、やがて柄と孢子からなる子実体を形成する(Raper, 1940)。

ここでまず1つ議論すべきこととして、とある教科書には粘菌は多細胞生物ではなく単細胞が集まったものと記されている。確かに、単細胞が集まって多細胞体をつくったのであるが、これは明らかな多細胞体である。何故なら、後生動物にみられる細胞間コミュニケーションに関する分子のほぼ全てが存在するからである(Grimson *et*

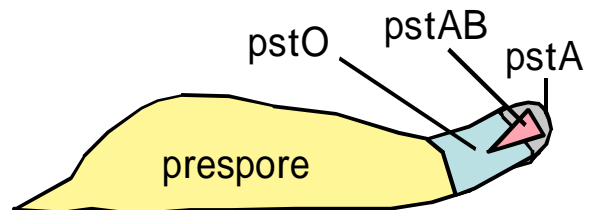


図1 細胞性粘菌の移動体における細胞型 (Shimada *et al.*, 2004b)。細胞性粘菌の移動体には大きく分けて予定孢子細胞と予定柄細胞の2つの細胞型がある。予定柄細胞は *ecmA* 及び *ecmB* 遺伝子のプロモーター断片の発現に基づいてさらに *pstA*, *pstO*, *pstAB* 細胞に分けられる(Jermyn *et al.*, 1989; 1996)。*pstA* 細胞は予定柄細胞領域の前方半分を、*pstO* 細胞は予定柄細胞領域の後方半分に位置する。この図にはその他の細胞型は示されていない。

al., 2000)。さらに、多細胞生物にのみ知られている多くのシグナル伝達経路が粘菌にも存在する。詳しくはここでは述べないことにする。

もう1つの論点は、これは植物か、動物かそれとも菌類かである。結論から言うとどれでもなさそうである。ある部分は植物に近いとか、動物に近いとか、菌類に近いとかあるが、粘菌は粘菌として進化して来たようである。これは、全ゲノム配列の解読によって明らかになった。そして、驚くなかれ、遺伝子構成上動物の中のどの生物と近いかと言うと、ヒトなのである。何故か、ヒトの脳に発現するものの相同遺伝子やヒトの疾患原因になっているものの相同遺伝子が粘菌には存在し、そのうちの幾つかは他のモデル生物には存在しない (<http://dictybase.org/>: Glöckner et al., 2002)。

粘菌を始めたきっかけ

そもそも学生実習のときにこの生き物を扱ったときから興味を持っていたのは事実である。ただ、当時これを材料にするほどの魅力あるテーマには思えなかったので、高等植物の方がよっぽど興味があったのも事実である。それは岡崎に移ってから同じであった。しかしながら、どんなテーマでどんなものを材料にしているか、その分野で世界のトップに立つ人の研究は何か違うとい

うことを思い知らされることになった。当時の基生研の所長であった竹内郁夫先生の招きで来日した Jeffrey G. Williams 教授の面倒をうちのラボで見ることになり、1ヶ月あまり一緒に実験をすることになったことが、その後の運命を大きく変えてしまった。「粘菌の子実体形成においてある転写因子が決定的に重要なはたらきをしているはずで、それを是が非でもクローン化してみたいのだが、未だ成功していない。やってみないか？」

当時、高等植物で転写因子を扱っていていささかその分野にはうさかった僕がこの言葉に心を動かされない訳はない。材料は植物ではないけれど、かねてから興味もあつたしよく知っていた粘菌である。2年くらい武者修行してくるつもりで(ちょっと甘く見ていた)、基生研に籍をおいたままイギリスへと出かけることになった。

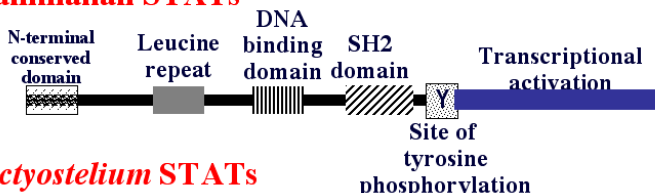
困難を極めた転写因子のクローン化

目的とする転写因子は子実体形成が始まるまで移動体の先端領域に位置する PstA 細胞(図1)という特定での発現を抑制するレプレッサーの活性があり(Ceccarelli et al., 1991)、PKAによってその抑制が解除されることが示されていた(Harwood et al., 1992)。また、そのレプレッサーが結合するプロモーター上の塩基配列もわかっていた(Harwood et al., 1993)。

ここまで条件が揃っているのだから、あとはしめたものである。常法に従って粛々と事を運ぶだけなので、2年もあれば余裕のはずである。ところが、サウスウエスタン法はうまくいかない。One-hybrid 法も1千万クローンをスクリーニングしたのにも関わらず、特異的なものはとれてこない。袋小路に入ってしまった。ここまでで3年以上。当然、この間論文なしである。基生研のポストも既がない。

そのころ、別の *pstO* 細胞特異的な発現に必要な塩基配列が同定され、これに特

Mammalian STATs



Dictyostelium STATs

図2 は哺乳類と細胞性粘菌の STAT タンパク質の一次構造の比較。(Williams, 1999)。STAT タンパク質の特徴的なモジュールとしてC末端側に位置するSH2ドメインがある。そのすぐC末端側のチロシン残基は活性化によるリン酸化とSH2ドメインを介した2量体形成に必要である。このほか、中央には特徴的なDNA結合ドメイン、そのN末端側にはロイシンに富む領域がある。これらは、細胞性粘菌のSTATにも見られるが、C末端に存在する転写活性化領域は細胞性粘菌には見られない。

異的に結合する核内因子を同定することになった。これは、少しの苦勞で検出することに成功し、面白いことに今までさんざんとれなかったレプレッサー配列にも特異的に結合することが判明した(Kawata *et al.*, 1996)。ここまで来たら、既に失うものは何も無し。半年以上もサンプルを集め続け、ようやく生化学的に精製し、対応する cDNA クローン及び遺伝子を得ることに成功した(Kawata *et al.*, 1997)。

最も原始的な SH2 シグナル

驚くべきことに得られた転写因子は SH2 ドメインを有する STAT (signal transducer and activator of transcription)であった(図2)。そのころ、ようやくショウジョウバエにも STAT があるぞという話になった頃で、粘菌なんてと思われていたのでこの情報は瞬く間に世界中を駆け巡ってしまった(最初に見つかったこの細胞性粘菌の STAT は現在 Dd-STATa と呼ばれている)。おそらく、最も原始的な SH2 シグナルと考えられている(Kawata *et al.*, 1997)。もともと、サイトカインシグナルの転写因子として同定されたもので、他の重要な多くの生物現象と関連している。例えば、アポトーシス、細胞運動、ガン化との関わり合いが報告されている(Hou *et al.*, 2002)。例えば、原腸陥入後における細胞運動には STAT が必要である(Yamashita *et al.*, 2002; 2004)。

詳細を話すと長くなるので、割愛させてもらうが、現在 STAT がどのようなシグナルとクロストークをするのかについて、非常に興味を持って解析している。まず、どのような遺伝子が標的になっているのだろうか? マイクロアレイによってピックアップされた遺伝子(Maeda *et al.*, 2003)について *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、標的候補遺伝子を幾つか同定してみた(図3)。これらについて幾つかは解析済みで(Shimada *et al.*, 2004a; 2004c)、幾つかは現在も解析している。

上述の様々な機能との関連で特に注目されるのが、STATa 遺伝子破壊株においてはオーガナイ

ザーに相当する細胞が形成されないことである。標的候補遺伝子の1つとして同定された *as1A* 遺伝子はアセチル CoA 合成酵素の遺伝子に似ているが、そのものではないようである。この遺伝子は細胞性粘菌におけるオーガナイザーと考えられる細胞に特異的に発現し、今までにない発現パターンを示した。この細胞は *pstA core* 細胞と命名され、新しい細胞型として認知された(図4, Shimada *et al.*, 2004c)。STATa 遺伝子を破壊するとこの遺伝子の発現が無くなるので、この細胞型は分化しない。STATa の細胞分化における役割を探るうえで、貴重なマーカー遺伝子となることは間

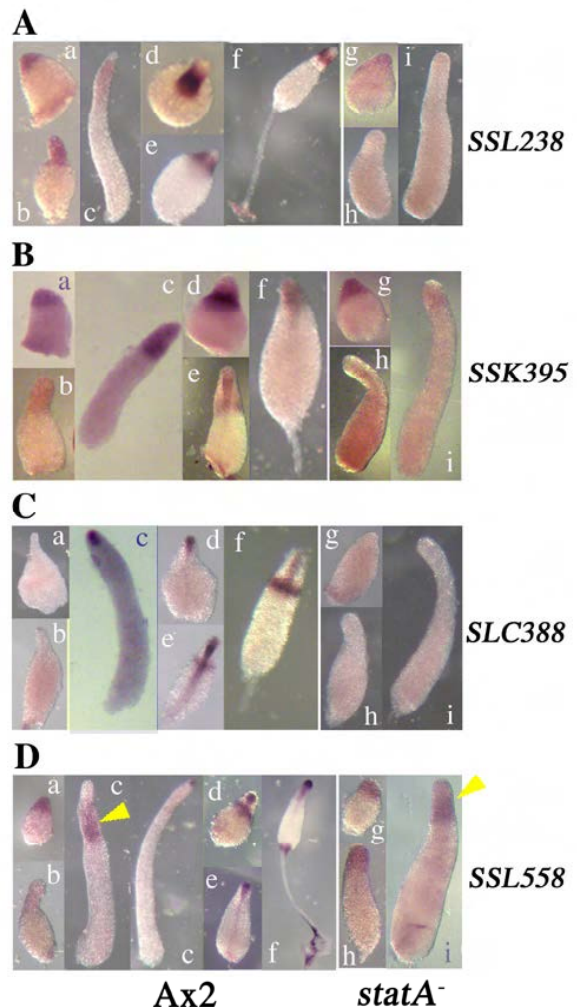


図3 Dd-STATa 遺伝子破壊株において発現が消失または減少する遺伝子の例 (Shimada *et al.*, 2004b)。野生株 (Ax2) と Dd-STATa 遺伝子破壊株における SSL238, SSK395, SLC388 及び SSL558 遺伝子の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーションによって比較した。写真の a-f は Ax2 株の、g-i は Dd-STATa 遺伝子破壊株の異なる発現時期に対応する。

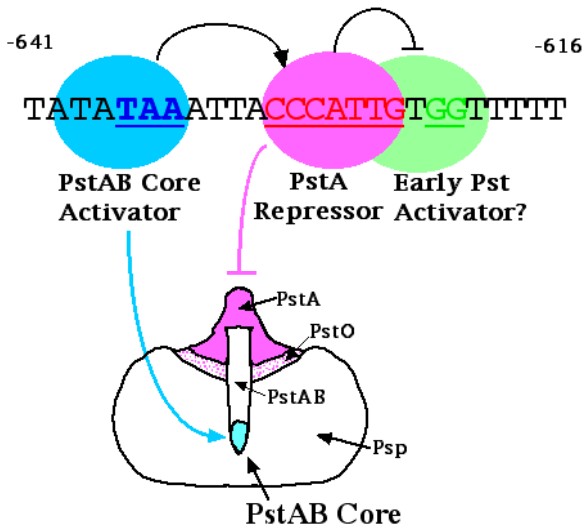


図4 細胞性粘菌のメキシカンハット期における *aslA* 遺伝子の制御と *pstAB* core 細胞の分化モデル (Shimada *et al.*, 2004c)。青で示した *pstAB* core アクティベーターが TAA を中心とした AT に富む配列に結合する。ピンク色で示した CCATGG 配列に結合する *pstA* リプレッサーが存在し、*aslA* 遺伝子の *pstA* 細胞中での発現を抑えている。*pstAB* core アクティベーターは *pstA* リプレッサーより優勢で抑制を解除すると考えられる。このほか、早い時期の予定柄細胞の発現に必要なアクティベーター（緑色）があって GG 配列に結合するものと想像される。*Dd-STATa* 遺伝子破壊株では、*pstAB* core 細胞の分化は見られない。

違いはない。

進化的な考察

最後に、今後の展望を考えてみたい。実は細胞性粘菌を研究材料に用いることの利点は、進化的な考察にあるのかも知れない。STAT シグナル（あるいは SH2 シグナル）は多細胞生物にしか存在しない。この転写因子と関連するシグナルを探っていくことで、多細胞生物出現の謎に少しでも迫れるかもしれない。多細胞生物の出現の時期は化石からある程度推測されているが、なぜどのようにしてというところは全くわかっていない。

現在、*STATa* 部分破壊株を用いて、cDNA を染色体外で過剰発現させる系を確立し、形態が野生株に近くなるマルチコピーサプレッサー遺伝子を 10 数個単離することに成功した。おそらく世界で初めてと思われる。STAT そのものの機能という点でも注目されるが、進化的な観点からも非常に興味深い遺伝子がとれてきた。

植物科学との接点

粘菌に見られる多くの現象は後生動物の原始的なものと考えられることが多い。植物との接点は非常に少ない。セルロース関連遺伝子が粘菌には多くあって、それらの多くは *STATa* 依存的に発現することが明らかになった (Shimada *et al.*, 2004a)。しかしながら、粘菌におけるセルロース（特に移動体期のもの）は、明らかに植物のものとは異なっている。むしろ、細胞運動のための足場としての細胞外マトリックスの役割が大きいと考えられる。

それでも、植物との接点を無理に考えてみることにする。実は、STAT は植物にも存在するらしい。その遺伝子に変異が入ると背丈が短くなって、いわゆる「緑の革命」遺伝子の 1 つと考えられている。つまり、ジベレリンシグナル伝達経路に関係するらしい (Peng *et al.*, 1999)。我々が単離した多くの STAT 関連遺伝子は、植物にも存在する。ジベレリンシグナルに関与するのだろうか？

おわりに

STAT が細胞性粘菌で発見されるまで、この生き物は単なる下等な生き物という認識でしかなかった。STAT の発見によって、後生動物という線引きはどこからなのかという議論さえ生まれて来た (Darnell, 1997)。さらに、ゲノム科学の進歩によってこの生き物がヒトの疾患の研究のモデル生物として欠くことが出来ないものであることが認識されて来た。植物科学の分野にどれだけの貢献が出来るのかは不明であるが、粘菌を使った発見によって様々な分野の研究に貢献できることが夢である。

謝辞

本稿を書く機会を与えて下さった、「植物科学の新展開・分子から群集まで広視野研究をめざす」シンポジウム実行委員会（前島正義委員長）の皆様へ感謝いたします。本稿に記された研究成

果は、Jeffery G. Williams 教授 (Imperial Cancer Research Fund 及びロンドン大学 MRC 研究所、現英国 Dundee 大学) や当時の仲間、前田ミネ子先生 (大阪大学)、大島明子先生 (関西医科大学) をはじめ、東邦大学で研究室を立ち上げるところから一緒に行ってきた唯一の大学院生の島田さんや多くの卒業研究生の協力なしには得られませんでした。この場を借りて全ての方に深く感謝いたします。

参考文献

- Ceccarelli, A., Mahbubani, H. and Williams, J.G. (1991) Positively and negatively acting signals regulating stalk cell and anterior-like cell differentiation in *Dictyostelium*. *Cell* **65**:983-989.
- Darnell, Jr., J.E. (1997) Phosphotyrosine signaling and the single cell:metazoan boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:11767-11769.
- Glöckner, G., Eichinger, L., Szafranski, K., Pachebat, J.A., Bankier, A.T., Dear, P.H., Lehmann, R., Baumgart, C., Parra, G., Abril, J.F., Guigo, R., Kumpf, K., Tunggal, B., Cox, E., Quail, M.A., Platzer, M., Rosenthal, A. & Noegel, A.A. (2002) Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **418**:79-85.
- Grimson, M.J., Coates, J.C., Reynolds, J.P., Shipman, M., Blanton, R.L. and Harwood, A.J. (2000) Adherens junctions and beta-catenin-mediated cell signalling in a non-metazoan organism. *Nature* **408**:727-31
- Harwood, A.J., Hopper, N.A., Simon, M.N., Driscoll, D.M., Veron, M. and Williams, J.G. (1992) Culmination in *Dictyostelium* is regulated by the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, **69**:615-24.
- Harwood, A.J., Early, A. and Williams, J.G. (1993) A repressor controls the timing and spatial localisation of stalk cell-specific gene expression in *Dictyostelium*. *Development* **118**:1041-1048.
- Hou, S.X., Zhen, Z., Chen, X. and Perrimon, N. (2002) The JAK/STAT pathway in model organisms: Emerging roles in cell movement. *Dev. Cell*, **3**:765-778.
- Jermyn, K.A., Duffy, K.T. and Williams, J.G. (1989) A new anatomy of the prestalk zone of *Dictyostelium*. *Nature* **340**:144-146.
- Jermyn, K., Traynor, D., Williams, J. (1996) The initiation of basal disc formation in *Dictyostelium discoideum* is an early event in culmination. *Development*, **122**:753-60.
- Kawata, T., Early, A. and Williams, J. (1996) Evidence that a combined activator-repressor protein regulates *Dictyostelium* stalk cell differentiation. *EMBO J*, **15**:3085-92.
- Kawata, T., Shevchenko, A., Fukuzawa, M., Jermyn, K.A., Totty, N.F., Zhukovskaya, N.V., Sterling, A.E., Mann, M. and Williams, J.G. (1997) SH2 signaling in a lower eukaryote: A STAT protein that regulates stalk cell differentiation in *Dictyostelium*. *Cell* **89**:909-916
- Maeda, M., Sakamoto, H., Maruo, T., Ogihara, S., Iranfar, N., Fuller, D., Morio, T., Urushihara, H., Tanaka, Y. and Loomis, W.F. (2003) Changing patterns of gene expression in prestalk cell subtypes of *Dictyostelium* recognised by *in situ* hybridisation with genes from microarray analyses. *Eukaryotic Cell* **2**:638-645
- Peng, J., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J.W., Gale, M.D. and Harberd, N.P. (1999) 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, **400**:256-61.
- Raper, K.B. (1940) Pseudoplasmodium formation and organization in *Dictyostelium discoideum*. *J Elisha Mitchell Sci Soc* **56**:241-281.
- Shimada, N., Nishio, K., Maeda, M., Urushihara, H. and Kawata, T. (2004a) Extracellular matrix family proteins that are potential targets of Dd-STATa in

Dictyostelium discoideum. *J Plant Res* (in press)

Shimada, N., Maeda, M., Urushihara, H. and Kawata, T. (2004b) Identification of new modes of Dd-STATA regulation of gene expression in *Dictyostelium* by *in situ* hybridization. *Int J Dev Biol* **48**: 679-682.

Shimada, N., Maruo, T., Maeda, M., Urushihara, H. and Kawata, T. (2004c) Evidence that the *Dictyostelium* STAT protein Dd-STATA plays a role in the differentiation of inner basal disc cells and identification of a promoter element essential for expression in these cells. *Differentiation* (in press)

Williams, J.G. (1999) Serpentine receptors and STAT activation: more than one way to twin a STAT. *Trends Biochem Sci*, **24**:333-334.

Yamashita, S., Miyagi, C., Carmany-Rampey, A., Shimizu, T., Fujii, R., Schier, A.F. and Hirano, T. (2002) Stat3 controls cell movements during zebrafish gastrulation. *Dev. Cell*, **2**:363-375

Yamashita, S., Miyagi, C., Fukada, T., Kagara, N., Che, Y.S. and Hirano, T. (2004) Zinc transporter LIVI controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature*, **429**:298 - 302

アクアポリンの分子生理生態学：それからの 10 年間

前島 正義

(名古屋大学 生命農学研究科)

はじめに

それから 10 年半が過ぎた。北海道大学低温科学研究所でお世話になったのは 1988 年から 1994 年の 6 年間。それからの 10 年間は北大時代の研究の種を育てることであった。低温研着任時に、ヤエナリ実生を低温処理すると液胞膜プロトンポンプの機能障害が生ずるので、その原因を探る研究課題を吉田先生より頂いた。松浦千絵さんが液胞膜の H^+ -ATPase を担当し、私は H^+ -pyrophosphatase を担当させていただいた。分子の顔・形がわからないと分子の量的増減もわからず、分子のどこに故障が起きるのかもつかめない、ということで酵素の精製からスタートした。千絵さんは、 H^+ -ATPase の酵素合成量の減少もあるけれど、酵素複合体の崩壊が低温下での活性低下の原因であることを突き止めた (Matsuura et al. 1990, 1992)。吉田先生は、多くの解析の上に、酵素傷害の結果、細胞質のアシドーシスが生じ、低温障害の主因であることを明確に証明され (Yoshida 1994, 1995)、画期的な概念として世界に受け入れられた。

私の担当していた H^+ -PPase (Maeshima & Yoshida 1989) は、低温下でも比較的安定であり、酵素分子自身が安定であることが、その後のパッチクランプ法を用いた実験でも実証された。すなわち、液胞型 H^+ -ATPase は酵素機能を発揮しつつ失活も進行するのに対し、 H^+ -PPase は 2 時間以上、酵素機能を 100% 発揮し続けることができる (Nakanishi et al. 2003)。

さて主題に戻る。私は H^+ -ATPase や H^+ -PPase の精製過程で混入しやすい 23 kDa の液胞膜タンパク質が気になり、これを精製して性質を発表したところ (Maeshima 1992)、来日した UC San

Diego の M. Chrispeels 教授から、「君の VM23 は、私たちが水チャネル (アクアポリン) であると証明した分子にきわめて似ている」と言われた (Maurel et al. 1993)。私自身は何らかの膜輸送分子であると推測したものの何を輸送するのかは確定できず、水チャネルが存在することすら予想しえなかった。明晰な洞察力をもつ P. Agre 教授は 1990 年代の初めにこの分子がアクアポリンであることを証明し、日本人研究者の支えもあり、2003 年度のノーベル化学賞を受賞された (前島 2004)。

ここでは精密装置としてのアクアポリンの特徴、動物と比較した時の植物アクアポリンの特徴、生理生態学的発展の可能性を紹介したい。

超高速輸送装置としてのアクアポリン

アクアポリンは下記の性質をもつ。

- (1) 膜の内外に大きな浸透圧差がある場合、1 分子あたり毎秒 10~30 億の水分子を透過させる。
- (2) アクアポリン経由の水の透過速度は浸透圧差に依存し、浸透圧の低い方から高い方向に水が移動する。輸送方向は固定されていない。
- (3) 明確なゲート (開閉する扉) はないと考え

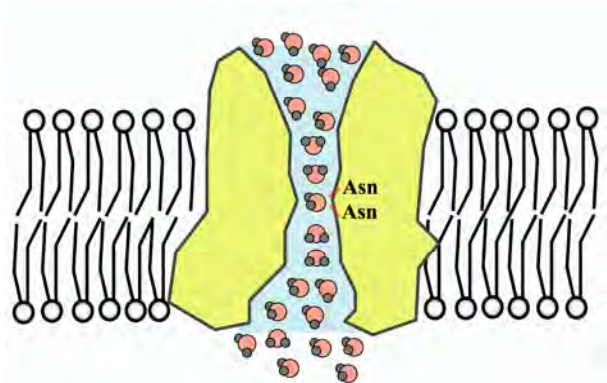


図 1 水チャネル模式図。Asn 残基部分が水を識別する。

られる。しかしゲートの開閉とは異なる機能調節の可能性はある。

(4) 輸送基質は水分子であるが、アクアポリン分子種の中にはグリセロール、尿素等を輸送するものもある。

上記の機能を支える構造的基盤も明らかになっている(図1)(Murata et al. 2000)。

植物アクアポリンの特徴

動物アクアポリンと比較して、植物アクアポリンは次の特徴をもつ(Maeshima 2001)。i) 分子種が多い、ii) タンパク質量として多い、iii) 内膜系である液胞膜にも恒常的に発現している。

シロイヌナズナでは35種、トウモロコシでは31種存在し、ヒトの13種の3倍近い数である(Johansson et al. 2000, Johanson & Gustavsson 2002)。植物アクアポリンは一次構造、局在性等から4つのグループに分けられる。すなわち、PIP(細胞膜型)、TIP(液胞膜型)、NIP(NOD26-like protein)、SIP(small, basic intrinsic protein)である。NIPという名前の由来となっているNOD26はダイズの根粒細胞に共生する根粒菌を包む包膜に局在する分子である。根粒のないシロイヌナズナにも9種存在し、その機能と局在について解析が進められている。SIPの知見はまだ少ない。それぞれの分子種の個性を明らかにしなければならないが、基質の確定、細胞内局在の解析、遺伝子発現細胞の特定など、課題が多い。当研究室でもNIP、SIPの解析を始めたところである。

ダイコンアクアポリン研究の近況

私たちがこれまで対象にしてきた植物はダイコンである。その中のPIP型を6種、TIP型を2種選び、細胞内局在、発現蓄積量の変動、細胞特異的な蓄積、環境に応答した量的変動、そして個々の機能を解析してきた(Higuchi et al. 1998, Fleurat et al. 1997, Suga et al. 2001, 2002, 2003, Suga & Maeshima 2004, 須賀ら 2003)。詳しい紹介はできないので、ポイントを絞って紹介したい。

栄養組織では、型と型TIPが主であり、ダイコン塊根やヤエナリ実生胚軸では液胞膜タンパク質の30-40%を占める主要分子である。中でも型が多い。型いずれも高い水チャネル機能を発揮する。組織全般で発現しており、生理的な変動が少ない点も特徴である。

一方、PIPは1型と2型に分けられる。1型は成長段階での量的変動が少なく、塩・浸透圧ストレスでの変動も少ない。2型は器官、成長段階で量的変動が大きく、ストレスにも敏感である。しかし、具体的な発現組織は1型と区別がなく、形成層、維管束周辺細胞などで顕著な蓄積がみられる。

1型と2型の大きな差異は、その水チャネル機能である。ダイコンの分子を酵母細胞に発現させて、水チャネル機能をストップドフロー分光光度計で測定すると、2型の3種はいずれも活性が高いのに対して、1型はチャネル活性がきわめて低い(図2)。1型にのみ共通なあるアミノ酸1つを

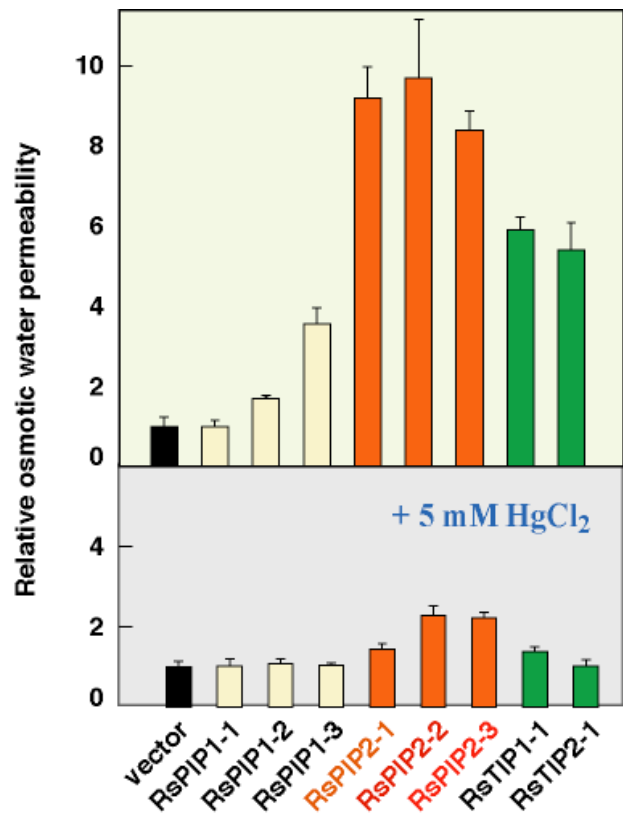


図2 ダイコンの細胞膜(PIP)と液胞膜(TIP)アクアポリンの水チャネル機能。各DNAを酵母細胞で発現させ、膜画分を試料としてストップドフロー法で水透過率を測定した。記号の後ろの1-1などの数字は分子種を示す。縦軸の値が大きいほど水透過率が高い。Hgは水チャネル機能を阻害する。

2型タイプに置換すると水チャネル機能が顕著に増大し、逆に、2型にのみ共通するアミノ酸を1型タイプに置換すると活性は著しく低下する。このことは、1型 PIP は構造的には水チャネルとしての特徴を保持しながらも、水チャネルとしては機能していない可能性を意味している。化学修飾によるスイッチ ON 機構があるのだろうか？ 酵母では活性がないが、植物細胞では活性をしめすのだろうか？ わずかな活性にこそ意味があるのだろうか？ 多くの疑問を抱えながら研究を進めている。

1型については不明の点もあるが、2型 PIP については、その量的変動が細胞膜の水透過率を大きく左右していることは間違いない。

もう一点の特徴は量的な多さである。細胞膜でも、膜タンパク質の10%が PIP である。液胞膜では原形質分離が生じない速やかな水移動が求められる。細胞膜でもわずかな浸透圧差あるいは浸透圧勾配を利用して、組織横断的な速やかな水の流れを確保しなくてはならない。水チャネルはあくまでも受動的な膜輸送装置であり、細胞膜における能動輸送系の活性は、動物に比べたら低い。PIP がとくに多いのは維管束周辺細胞である。これらの部位では道管、篩管と多量の水をやりとりする。植物はわずかな浸透圧差を利用して速やかに大量の水を透過させるために、チャネルの数を増やす道を選んだのだらうと推測する。

アクアポリンの植物生理生態学

アクアポリンをわずかししか発現蓄積しない植物がある。CAM 植物である。オボロヅキ (*Graptopetalum paraguayense*) の多肉葉を分析すると、PIP、TI とともに著しく量が少ない。それを反映して、この植物の細胞膜の水透過率もきわめて低い (Ohshima et al 2001)。その後、サボテン類も含めた他の CAM 植物を解析し、TIP と PIP の量の少なさを確認した。一部の植物には PIP が比較的多く検出されたが、さらに詳しく分析すると水チャネル活性のない1型 PIP であることが判明した

(未発表)。乾燥耐性を獲得し保水機能を維持するために、アクアポリンをごく少量に押さえているものと推測している。

逆に、水性植物でもアクアポリンは少ない。シロイヌナズナの植物体は十分検出できるだけのアクアポリンをもつが、その培養細胞ではきわめて少量しか蓄積しない(未発表)。植物は、水との関わり方によって、アクアポリンの量を厳密に調節しているように見える。生理生態学的研究への基盤になると信じている。

アクアポリンの新しい局面

昨年、アクアポリン機能が細胞質の pH によって調節され、酸性環境化では活性が低下すること (Tournaire-Roux et al. 2003)、さらに PIP の中のある分子種は CO₂ を透過する可能性が高い (Uehlein et al. 2003) という報告が出た。後者の真偽はまだ確定していないと考えているが、光合成機能に依存する植物において、CO₂ を輸送する分子としてアクアポリンがクローズアップされている。

低温研でお世話になっている間に、佐藤利幸さん、露崎史朗さんから生態学的な見方の初歩を教えていただき、植物の耐冷性、耐寒性、耐凍性をアクアポリン分子から分析できるかも知れないと思うようになった。植物の水管理、つまり吸水、蒸散、循環、保水、排水は、すべてではないにしてもアクアポリンを介した水の移動が関わっている。アクアポリン分子を指標として植物体内の水の動きを推測できるのではと期待しても大きな間違いではないように推測している。

アクアポリンを紹介しようとするれば1冊の本になり、私の力量を超えている。私も、新しい知見を魅力的なオリジナル論文として発表し、皆様のご批判を頂けるようにしたい。

謝辞

北大低温研での6年間無くしては現在の研究展開はあり得ませんでした。かけがえのない機会とご指導をいただきました吉田静夫先生に感謝申

し上げます。

本稿で紹介しました最近のアクアポリン研究は、名古屋大学生命農学研究科の須賀しのぶ（現岐阜県研究職員）と大学院生石川文義、小八重善裕、水谷政博によるものです。また、村井麻理さん（東北農業研究センター）にはプロトプラストでの水チャネル活性測定と理論解析で大変お世話になっています。なお、当細胞ダイナミクス研究室では、アクアポリン、 H^+ -PPase のほかに、液胞膜 Ca^{2+}/H^+ exchanger (Kamiya & Maeshima 2004)、 Ca^{2+} -binding protein, Zn transporter などの研究も進めている。

参考文献

- Fleurat-Lessard, P., Frangne, N., Maeshima, M., Ratajczak, R., Bonnemain, J.L. & Martinoia, E. (1997) Increased expression of vacuolar aquaporin and H^+ -ATPase related to motor cell function in *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol.* **114**: 827-834.
- Higuchi, T., Suga, S., Tsuchiya, T., Hisada, H., Morishima, S., Okada, Y. & Maeshima, M. (1998) Molecular cloning, water channel activity and tissue specific expression of two isoforms of radish vacuolar aquaporin. *Plant Cell Physiol.* **39**: 905-913.
- Kamiya, T. & Maeshima, M. (2004) Residues in internal repeats of the rice cation/ H^+ exchanger are involved in the transport and selection of cations. *J. Biol. Chem.* **279**: 812-819.
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. & Kjellbom, P. (2000) The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**: 324-342.
- Johanson, U. & Gustavsson, S. (2002) A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 456-461.
- Maeshima, M. & Yoshida, S. (1989) Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *J. Biol. Chem.* **264**: 20068-20073.
- Maeshima, M. (1992) Characterization of the major integral protein of vacuolar membrane. *Plant Physiol.* **98**: 1248-1254.
- Maeshima, M., Mimura, T. & Sato, T. (1994) Distribution of vacuolar H^+ -pyrophosphatase and the membrane integral protein in a variety of green plants. *Plant Cell Physiol.* **35**: 323-328.
- Maeshima, M. (2001) Tonoplast transporters: organization and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 469-497.
- 前島正義 (2004) ノーベル化学賞のスポットライトをあびたアクアポリン. *化学と生物* **42**: 41-42.
- Matsuura-Endo, C., Maeshima, M. & Yoshida, S. (1990) Subunit composition of vacuolar membrane H^+ -ATPase from mung bean. *Eur. J. Biochem.* **187**: 745-751.
- Matsuura-Endo, C., Maeshima, M. & Yoshida, S. (1992) Mechanism of the decline in vacuolar H^+ -ATPase activity in mung bean hypocotyls during chilling. *Plant Physiol.* **100**: 718-722.
- Marurel, C., Reizer, J., Schoreder, J.I. & Chrispeels, M.J. (1993) The vacuolar membrane protein g-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **12**: 2241-2247.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, JB, Engel, A & Fujiyoshi, Y (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**: 599-605.
- Nakanishi, Y., Yabe, I. & Maeshima, M. (2003) Patch clamp analysis of H^+ pump expressed in giant yeast vacuoles. *J. Biochem.* **134**: 615-623.
- Ohshima, Y., Iwasaki, I., Murakami, M., Suga, S. & Maeshima, M. (2001) Low aquaporin content and low osmotic water permeability of the plasma and vacuolar membranes of a CAM plant *Graptopetalum paraguayense*: comparison with

- radish. *Plant Cell Physiol.* **42**: 1119-1129.
- Santoni, V., Gerbeau, P., Javot, H. & Maurel, C. (2000) The high diversity of aquaporins reveals novel facets of plant membrane functions. *Cur. Opin. Plant Biol.* **3**: 476-481.
- Suga, S., Imagawa, S. & Maeshima, M. (2001) Specificity of the accumulation of mRNAs and proteins of the plasma membrane and tonoplast aquaporins in radish organs. *Planta* **212**: 294-304.
- Suga, S., Komatsu, S. & Maeshima, M. (2002) Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1229-1237.
- Suga, S., Murai, M., Kuwagata, T. & Maeshima, M. (2003) An abundance of aquaporins in specific cells and osmotic water permeability of individual protoplasts of radish. *Plant Cell Physiol.* **44**: 277-286.
- 須賀しのぶ, 石川文義, 村井麻理, 前島正義 (2003) 植物における水の輸送とアクアポリン. *植物の生長調節* **38**: 220-228.
- Suga, S. & Maeshima, M. (2004) Water channel activity of radish plasma membrane aquaporins heterologously expressed in yeast and their modification by site-directed mutagenesis. *Plant Cell Physiol.* **45**: 823-830.
- Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D-T., Bligny, R. & Maurel, C. (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* **425**: 393-397.
- Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefrits, F. & Kaldenhoff, R. (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* **425**: 734-737.
- Yoshida, S. (1994) Low temperature-induced cytoplasmic acidosis in cultured mung bean (*Vigna radiata* [L.] Wilczek) cells. *Plant Physiol.* **104**: 1131-1138.
- Yoshida, S. (1994) Low temperature-induced alkalization of vacuoles in suspension cultured cell of mung bean (*Vigna radiata* [L.] Wilczek). *Plant Cell Physiol.* **36**: 1075-1079.

高山多年生草本の休眠

吉江 文男

(専修大学経済学部)

はじめに

植物は生育不適期に生長停止（休眠）し、凍害や乾燥害から身を守っている。この生長停止の自律性の強さ（自発休眠の深さ）は、暖地の植物に比べ温帯などの寒冷地の植物で強い（自発休眠が深い）ことが知られている（Larcher 1980）。寒冷地植物の休眠が深いのは、秋に生長しても低温のために凍害を受け易くまた光合成も十分に行えないためと考えられる。このように考えると、高山では温度条件が極めて厳しいために、植物が秋に生長するメリットはなく、温帯植物に比べその自発休眠は深いと予想されるかもしれない。しかし、高山多年草の中には、耐凍性が非常に高いものや、また氷点下で光合成を行うものも知られている（Körner & Larcher 1988）。このような耐凍性の高い植物は凍害を受けにくいので、必ずしも深い休眠を発達させる必要はないように思える。では、本当に高山に生育する多年生草本の自発休眠の深さは耐凍性と関係するのだろうか。

もし、休眠の深さが耐凍性に大きく規定されるなら、休眠の深さは耐凍性の指標となる形質と関係するはずである。地上シュート軸の季節型とラウンキエール（1934）の生活形は多年草の耐凍性の指標となる形質である。毎年地上部を作り換える夏緑性のシュートは、何年も生き続ける常緑性のシュートに比べその耐凍性は低い。また、休眠芽の耐凍性は、低温に直接さらされる地表植物で最も高く、低温からよく保護された地中植物で最も低く、半地中植物が両者の中間の耐凍性をもっている（Till 1956; 吉江・酒井 1981）。そして、温帯では夏緑性の地中植物が夏緑性の半地中植物より深い自発休眠

をもつことがすでにわかっている（Yoshie & Yoshida 1989）。

高山には、夏緑性の半地中植物や地中植物の他にも、常緑性の植物や地表植物など様々な季節型と生活形を示す多年草が見られる。休眠の深さをこれらの植物群で比較することで、高山でも休眠の深さが耐凍性に依存したものかどうかを明らかにすることができる。

高山多年草の生活形組成は生育地によって異なることがわかっている（Yoshie 2002）。温帯では休眠の深さと生長 休眠のリズムが生育地で異なる事が知られており、このリズムは生育地の環境条件に適応的な性質と考えられている（Yoshie & Yoshida 1989; Yoshie 1995）。本稿では、高山多年草の休眠と季節型や生活形との関係、および休眠と生育地との関係について調査した結果を中心に述べる。

材料と方法

北アルプス奥大日岳、南アルプス仙丈岳、大雪山系黒岳の森林限界以上の標高に生育する多年生草本から、清水（1982, 1983）に基づき、礫地（砂礫地、岩礫地、岩場など）、草原、そして森林限界の林床、という3つの生育地の少なくともいずれか1つを好む植物68種を選定した。これらの植物の生活形と地上シュート軸の季節型については現地調査により、また休眠状態、休眠芽

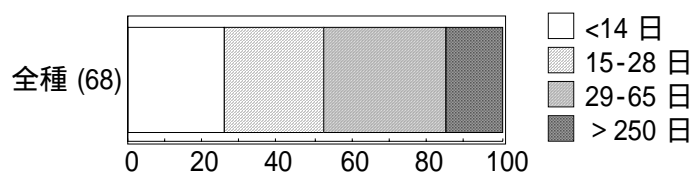


図1 高山多年草の生長再開に要する日数。横軸の単位は%、括弧内は種数を表す。以下の図でも同じ。

の構造については実験室に持ち帰り調査した。調査は1991年から1994年にかけて行った。

実験材料の採取は、気象条件とフェノロジの違いを考慮し、大雪山黒岳では9月下旬に、本州北アルプスと南アルプスでは10月下旬に行った。材料は実験室に持ち帰って鉢植えした後、24で16時間の長日条件下に制御した恒温器で栽培し、36週間の間、休眠芽の開芽または伸長量を調査した。そして、自発休眠の深さは休眠芽の生長再開に要する日数で表した。

休眠の深さは季節型と生活形で異なる

秋に採取した植物を24の長日条件で培養すると、最も早い植物では1週間以内に生長を再開し、最も遅い植物では250日経っても生長を再開しない。前者は浅い自発休眠（強制休眠）を、後者は深い自発休眠をもつ。そして両者の間には様々な休眠の深さを示す植物が認められた（図1）。

休眠の浅い植物は花茎を正常に伸長し正常に

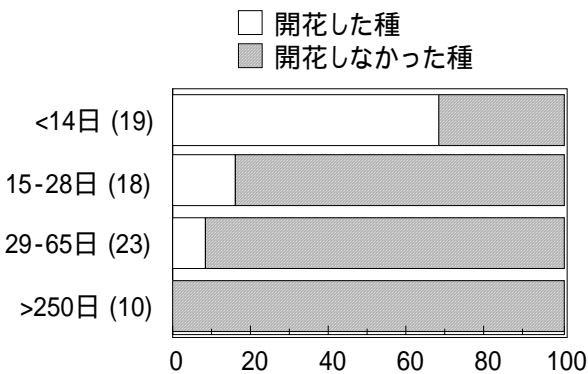


図2 生長再開に要する日数と開花との関係。

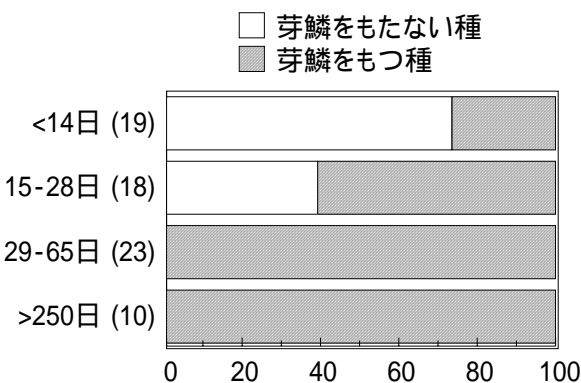


図3 生長再開に要する日数と芽鱗分化との関係。

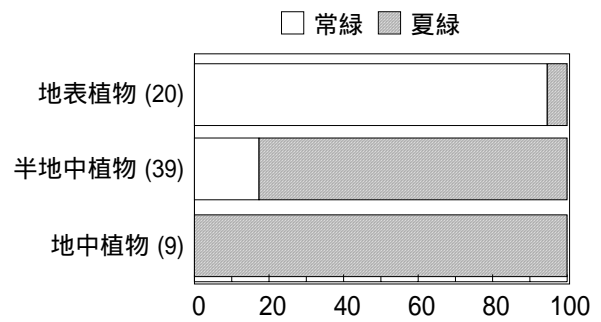


図4 生活形別に見た地上シュート軸の季節型。

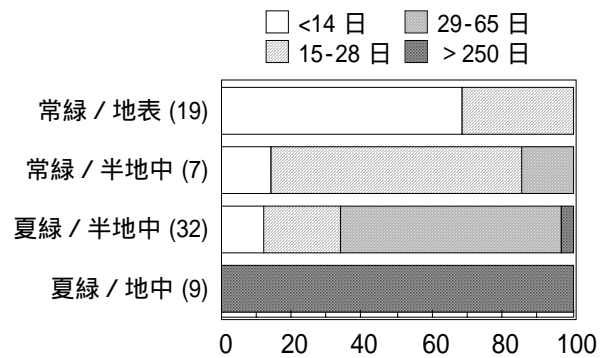


図5 季節型 / 生活形別にみた生長再開に要する日数。

開花するものの割合が高かった（図2）。また、休眠の深さは冬芽の構造（Yoshie 1998）とも密接に関係する。冬芽は芽鱗に被われるものとそうでないものに分かれるが、通常の葉と異なる芽鱗が分化するには比較的深い自発休眠が必要だろう。実際、休眠の深い植物ほど冬芽が芽鱗に被われているものの割合が高かった（図3）。

地上シュート軸の季節型と生活形は密接に関係する。地中植物は全て夏緑性、地表植物は1種を除く全てが常緑性、そして半地中植物では夏緑性のものが常緑性のものより多かった（図4）。そのため両者を組み合わせた4つの植物群で休眠を比較した。その結果、常緑地表植物の休眠が最も浅く、常緑半地中植物、夏緑半地中植物と続き、夏緑地中植物の休眠が最も深かった（図5）。

先に述べたように、植物の耐凍性は夏緑地中植物で最も弱く、次いで夏緑半地中植物、常緑半地中植物と続き、常緑地表植物で最も強い。したがって、得られた結果は耐凍性が低い植物ほど休眠が深くなることを示している。温帯で得られた結果（Yoshie & Yoshida 1989）を考え合わせれば、

自発休眠の深さが耐寒性によって大きく規定されているということは間違いのないと思われる。

休眠の深さは生育地で異なる

休眠の深さは生育地の好みによって変わり、森林を好む植物では休眠の深いものが、礫地を好む植物では休眠の浅いものが、そして草原を好む植物では両者の中間的な休眠の深さを示すものが多かった(図6)。この違いは、礫地を好む植物では常緑地表植物が、草原を好む植物では夏緑半地中植物が、そして林床を好む植物には夏緑地中植物が多いことと関係する(図7)。そして、この結果は、休眠の深さに関係する季節型や生活形が生育地の環境条件に左右される形質であることを示している。

森林限界の林床や草原で夏緑植物が多いのはその高い生産環境と関係すると考えられる。こうした群落は高山でも比較的長い生育期間をもつ

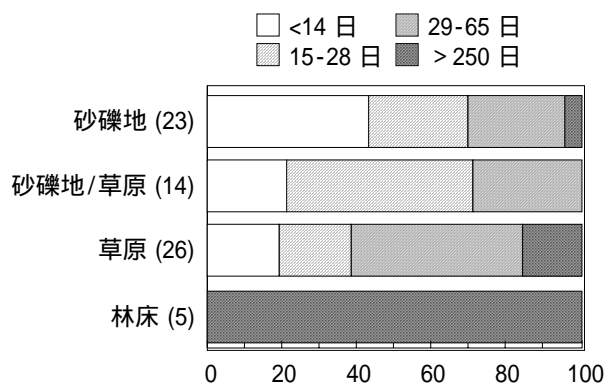


図6 生育地別にみた生長再開に要する日数。

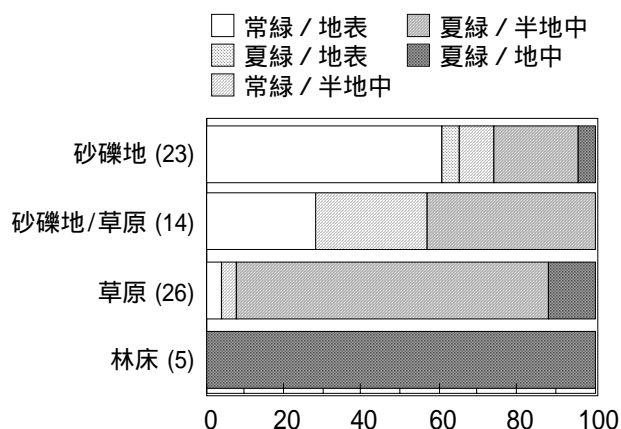


図7 生育地別にみた季節型/生活形組成。

低い標高の安定した栄養条件のよい立地に見られる。そのため、地上シュート軸を毎年作り替える夏緑性というぜいたくなやり方が許される。

夏緑植物の中でも、地中植物は耐凍性が低いため、秋に生長して凍害を受けないように、休眠を深くする必要がある。地中植物が林床に多くみられるのも、この弱い耐寒性に関係するように思える。冷温帯林で見られた(吉江・酒井 1981)ように、林床の落葉層は地中温度の低下を緩和する。そのため、耐寒性の弱い地中植物でも生き残れると考えられる。その結果として、林床を好む植物の休眠は深い傾向を示すのだろう。

礫地は高山でも生育期間の短い標高の高い所や雪解けの遅い所に多く見られ、その土壌は貧栄養である。こうした低い生産環境では、一度作った地上シュート軸を長く使用する(常緑化する)ことが乏しい資源の効率的な利用(節約)につながる。低い生産環境条件では常緑葉をもつ植物の割合が増えることや、常緑植物の葉の寿命が伸びることがすでに知られており、資源の効率的な利用や葉の構築コストの回収に有利なためと説明されている(Chapin 1980; Kudo 1991)。草本植物では、この地上シュート軸の常緑化が、休眠芽を地表にもつ地表植物という形態を導くと考えられる。そして、この常緑地表植物が獲得した高い耐寒性に支えられて浅い休眠という性質が発達し得たと思われる。

浅い休眠は生育期間の短い高山で有利である

浅い休眠は高い耐寒性だけによって生じているのだろうか。地表植物の割合は標高が上がるとともに増えることがよく知られている(Raunkiaer 1934)。つまり、得られた結果は標高が上がるにつれて休眠の浅い植物が増えることを示している。高山植物の休眠については、雪解けが遅い所に生育する植物の休眠が浅いことが知られる(Rübel 1925, Sørensen 1941 から引用)。標高が上がると生育期間は短くなるし、これは雪解けの遅い所でも同じである。高山植物の生長は生育期間

の短さによって大きく制限されるので、この短い生育期間をいかにうまく利用できるかが生存のための1つの鍵になっているのだろう。その点、浅い休眠（強制休眠）という性質は、例えわずかな期間ではあっても秋の温暖な気候条件を臨機応変に利用して少しでも長く生長できるという利点をもつ。生育期間の短縮は、浅い休眠を発達させる環境要因の一つであるように思える。

地表植物の割合は緯度の増加に伴っても増えることが知られている（Raunkiaer 1934）。Sørensen（1941）のグリーンランドの植物の研究を多年草について分析すると、北方に分布する種や雪田種では、地表植物、常緑植物、芽鱗を分化しない植物の割合が増えることがわかる。これらの報告を今回の結果と照らし合わせると、ツンドラにおいても、緯度の増加と融雪の遅れによる生育期間の短縮に伴い休眠の浅い植物が増えることが示唆される。

おわりに

ラウンキエールの生活形は寒さや乾燥からの休眠芽の回避程度を表す生活形で、数ある生活形の中で今も広く使われている。しかし、研究を始めた頃の私には、生活形組成によって表される植物気候や植物群落の構造が何を意味するのか今一つ頭の中でしっくり来なかったし、とてももどかしい感じがしていた。今思えば、それは生活形と植物の生理的な性質との対応関係が十分にわかっていなかったことが原因であった。その点で、生活形は耐凍性だけでなく、耐凍性を通して自発休眠の深さを表す指標にもなるということが理解できたのは、一つの収穫であったと考えている。

謝辞

本稿を書く機会を与えて下さった、「植物科学の新展開-分子から群集まで広視野研究をめざす」シンポジウム実行委員会（委員長 前島正義）各位に感謝いたします。また、苫小牧演習林で行った生活形と休眠の研究だけでなく、当時行ってい

た光合成の研究にもご支援とご指導を頂いた吉田静夫先生に深く感謝いたします。

参考文献

- Chapin, F. S. III. (1980) The mineral nutrition of wild plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **11**:233-260.
- Körner, C. and W. Larcher (1988) Plant life in cold climates. In : *Plants and Temperature* (ed. S. P. Long and F. I. Woodward), The Company of Biologists, Cambridge.
- Kudo, G. (1991) Effect of snow-free duration on leaf life-span of four alpine plant species. *Can. J. Bot.* **70**:1684-1688.
- Larcher, W. (1980) *Physiological Plant Ecology*. Sprinegr-Verlag, Berlin.
- Raunkiaer, C. (1934) *The life forms of plants and statistical plant geography*. Clarendon Press, Oxford.
- Rübel, E. (1925) Alpenmatten – Über winterungsstadien. *Veröffentlichungen Geobot. Inst.* Rübel, Bd. **3** (Schröter Festschrift), Zürich.
- 清水建美 (1982) 原色新日本高山植物図鑑 (I) 保育社.
- 清水建美 (1983) 原色新日本高山植物図鑑 (II) 保育社.
- Sørensen, T. (1941) Temperature relations and phenology of the northeast Greenland flowering plants. *Medd. Grønland*. **125**:1-304.
- Till, O. (1956) Über die frosthärte von Pflanzen sommergrüner Laubwälder. *Flora*, 143:499-542.
- 吉江文男・酒井昭 (1981) 生活形と生育地との関係からみた植物の耐寒性。日本生態学会誌 **31** : 395-404.
- Yoshie, F. and S. Yoshida (1989) Wintering forms of perennial herbs in the cool temperate regions of Japan. *Can. J. Bot.* **67**:3563-3569.
- Yoshie, F. (1995) Interhabitat variation in growth characteristics of temperate herbaceous perennials. *Can. J. Bot.* **73**:735-745.

- Yoshie, F. (1998) Observation of wintering forms and winter bud structures of alpine perennial forbs. *Bull. Assoc. Nat. Sci., Senshu Univ.* **29**:29-52.
- Yoshie, F. (2002) Note on life-form spectrum of alpine perennial forbs. *Bull. Inst. Nat.Sci., Senshu Univ.* **33**:57-64.

種子が目覚めるとき：発芽を促すジベレリンの作用

鷲尾 健司

(北海道大 大学院地球環境科学研究科 環境分子生物学講座)

はじめに

修士課程の2年間を、低温科学研究所・吉田静夫研究室で学んだ。当時の吉田研究室は、先代からの移行期にあり、人の出入りが激しい上に学生数は少なく、実質的な研究活動は、吉田先生個人の力量だけに頼らざるを得ない状況にあった。そのような中、短い期間ではあったが、実に充実した日々を過ごさせて頂いた。元来、淡泊な性格のため人と深く接することはなく、将来の計画など熟考することはなかった自分だが、吉田先生の熱心な指導のもと、密度の濃い研究生活を送るうち、否応なくこの世界に身を置くことになった。

その後、研究の場を北大・理学研究科に移し、現在、同・地球環境科学研究科に所属する身分であるが、その間、数々の著名な研究者と行動を共にし、その研究室の運営にも携わった。しかし、低温科学研究所で味わったような充足感を得ることは未だない。かような純粋極まる研究者集団に一瞬でも所属できたことは、自らの研究人生における至宝でもある。この機会に、吉田研究室を離れた後の私の研究成果を紹介するとともに、その根底に流れる、物事を多角的に捉え、根源まで追求するという、吉田イズムの片鱗を感じてもらえれば幸いである。

ジベレリンとは何か？

ジベレリン (GA) は、ent-gibberellan を基本骨格とするジテルペン一族で、植物の発芽や生体機能を制御する7種の植物ホルモンのうちの1つである (図1)。GAの一般作用は、シュート生長、特に無傷植物の全体的な生長促進とされ、開花促進、種子や芽の休眠打破、単為結実の誘起、葉の

老化抑制など多岐にわたる。近年、日本のグループを中心とした、GAにまつわる合成・代謝経路の精力的な解析により、植物の生活史における当該ホルモンの計画的な消長の全貌が明らかにされつつある (Ogawa et al., 2003; Sakamoto et al., 2004)。これらの知見によれば、GAは単に成長の節目で決められた働きをするのではなく、内的制御因子や外環境からの刺激が鋭敏にGAの合成・代謝系を誘起して、生体内での限局的な活性GAレベルを変化させることにより、植物の発芽や生長を調節するとされている (Hay et al., 2002)。また、他のホルモン、例えばオーキシシンやエチレンが特異的に関わる生理反応でも、その実行段階では、最終的にGAの作用系を介することが知られている (Fu and Harberd, 2003; Vriezen et al., 2004)。つまりGAは、植物が示すおおよそすべての生長反応に必須の植物ホルモンであり、その実作用は、様々な生体情報が統合された後の、実質的な生長実行であると定義できる。

比較的単純な化学構造からなる生体物質が、どのようにして複雑な生命反応につながるのかという疑問は、生物学を専門とする者にとって、とても興味深い問題である。また、成長段階や組織を問わず、普遍的に成長を促進するGAの作用は、

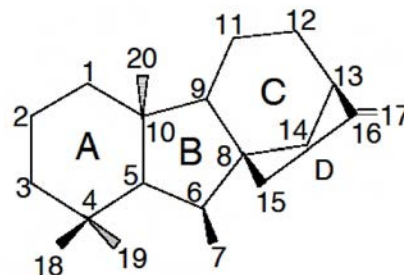


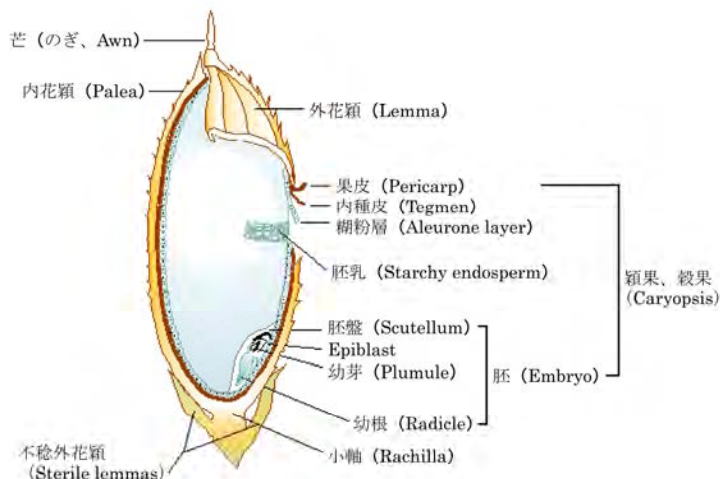
図1 ジベレリンの基本構造。ジベレリンは20個の炭素からなる ent-gibberellan 骨格を基本とし、それに様々な修飾が加えられた化合物の総称である。

作物の増産性とも密接に関連する。これらの背景のもと、我々のグループでは GA の作用が顕著である種子発芽の促進効果に注目し、これを維持する生体ネットワークを明らかにすることで、GA の作用プログラムの基本を把握して、植物の成長原理の理解に資することを目的としている。

発芽を促すジベレリンの作用

コムギ、イネ、トウモロコシなどの穀類 (cereals) の種子は穀実 (grain) とも呼ばれ、発達した内胚乳を持つのが特徴となる (図 2A)。内胚乳には、発芽後、胚の成長を補助する栄養分が豊富に貯蔵

A.



B.

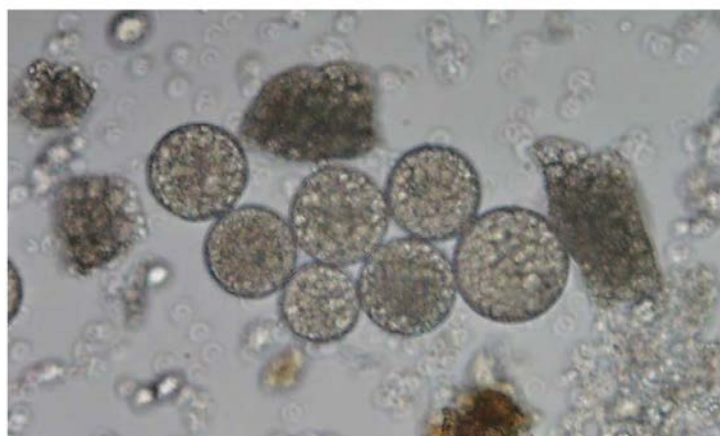


図 2 イネ種子の構造と糊粉層細胞。

A. <http://www.riceweb.org/Plant.htm> より転記、改訂した。イネ種子は、大まかに分けて、将来植物体になる胚と、その成長を補助する胚乳器官からなる。B. イネ種子糊粉層より単離したプロトプラスト。細胞内には多数のデンプン顆粒が観察される。

されている。我々人類は、この穀実のもつ高い栄養価、更には長期保存性や、運搬性、風味などの利点から、全世界で主食として広く栽培している。穀物種子の形態的な特徴としては、まず胚発生を終えた幼植物体が存在する、そして種子形成の過程で子葉の一枚から派生してできる固い壁状の胚盤組織 (scutellum) がある。これらをまとめて胚 (embryo) と呼ぶ。この胚を保護し、囲うようにして胚乳組織が発達する。胚乳は、被子植物の重複受精の結果生じる胚の保護器官であるが、栄養分の貯蔵器官であると共に、発芽プログラムを担う重要な役割も持っている。内胚乳を構成する細胞は、受精後、貯蔵栄養分を蓄積しながら活発な細胞分裂を繰り返した後、プログラム細胞死様の挙動を示して枯死する。しかしながら、その外層に分化する糊粉層組織 (aleurone layer) は、内胚乳が枯死した後も依然として生き長らえて、発芽プログラムに参加する。

種子吸水後、発芽胚でおこる活性 GA レベルの一過的な上昇は、胚盤における高レベルの GA の合成を促す。合成された GA は維管束を伝って糊粉層に到達し、加水分解酵素群の de novo の合成を誘導する。誘導された酵素群は内胚乳に分泌され、そこに蓄えた栄養物質の分解に関与する。そして、易動化した栄養分は胚盤を通じて胚に供給され、結果として発芽を促進する。この穀物種子の GA による発芽促進効果は、近代植物生理学の発祥以来から知られる生理現象であり、シニア向けの教科書でもよく目にする。長い歴史の中で多くの研究者が参画し、有益な学術情報が蓄積された結果、GA の派生箇所、作用点、そして具体的な生理作用が詳細に理解され、ホルモンの作用を研究する上で、とても優れたモデル系となった。

GA の標的となる糊粉層細胞は、植物ホルモンの刺激に対して一元的に応答する。

図 2B に、イネ・糊粉層より単離したプロトプラストを示した。GA の拮抗ホルモンである ABA 存在下では、条件さえ良ければこの細胞は、3 ヶ月程度は生存する。ひとたび GA が作用すると、細胞内に見られる多数のデンプン顆粒は融合して、巨大な central vacuole へと変化する。そして猛烈な加水分解酵素群の発現を伴いながら、わずか 1 週間程度でプログラム細胞死様の挙動を示して死滅する (Bethke et al., 1999)。このように糊粉層組織の運命は、2 つのホルモンにより細胞レベルで二者択一的に制御されている。

ジベレリンによる発芽促進の分子機構

穀物種子で、GA が発現誘導をかけるもっとも代表的なものに、炭水化物分解酵素である α -amylase がある。最大誘導時には、全 mRNA の 20% を占め、産生されるタンパク質は、総タンパク質量の 6 割を超える (Higgins et al., 1982)。そのため、 α -amylase をコードする遺伝子は、初期の植物分子生物学者にとって格好の遺伝子クローニングの対象と成り得た。様々な穀物植物から α -amylase 遺伝子族の構造決定がなされ、それらの遺伝子の発現調節機構の解析が始まりつつある状況で、この分野での私の研究活動が始まった。

イネを材料として、GA により発現誘導を受ける遺伝子産物を探した結果、ペプチド分解酵素である carboxypeptidase 遺伝子を同定した (Washio and Ishikawa, 1992)。この遺伝子は、ゲノム内で小遺伝子族を形成しており、その中でも特定のメンバーが糊粉層特異的な GA による発現誘導を受けることが分かった (Washio and Ishikawa, 1994)。これは、他の加水分解酵素でも同様に見られる遺伝子編成の傾向である。GA 誘導性遺伝子の 5' 調節領域周辺には、transposable element 様の配列が存在し、転位の痕跡が見られることから、ある特定のメンバーが共通の制御配列を持つことにより GA 情報伝達系との連携が生じ、

発芽種子・糊粉層での GA 誘導性を獲得したと解釈されている (Whittier et al., 1987)。

同一の作用系から報告された豊富な GA 誘導性遺伝子のプロモーター情報は、共通シス配列の同定を容易にした。報告された穀物種子の GA 誘導性遺伝子のすべては、TAACAA/GA 配列と pyrimidine box と呼ばれる一組の配列を必ず持ち合わせていた (Huang et al., 1990)。TAACAA/GA 配列は、単独で一般的なプロモーターである CaMV35S プロモーターに GA 応答性を付加できるため、GA 応答性に必須の配列、GARE (gibberellic acids responsive element) として認知された (Skriver et al., 1991)。この配列は、動物系の転写因子のグループである Myb protein の DNA 認識配列と類似性があったので、糊粉層で発現している Myb protein を探索する研究がなされた。そして、自らが GA 誘導性を示し、実際に GARE に結合して標的遺伝子の転写活性化を行う Myb protein、GAMYB (GA regulated Myb related protein) が同定された (Gubler et al., 1995)。この転写活性化因子は、最近行われた遺伝子破壊実験により、発芽過程だけではなく、他の GA が関与する成長過程にも関与することが実証され (Kaneko et al., 2004)、更に穀物以外の植物、例えば Arabidopsis にも機能相同物が見出されることから (Gocal et al., 2001)、GA の作用を普遍的に担う機能因子で

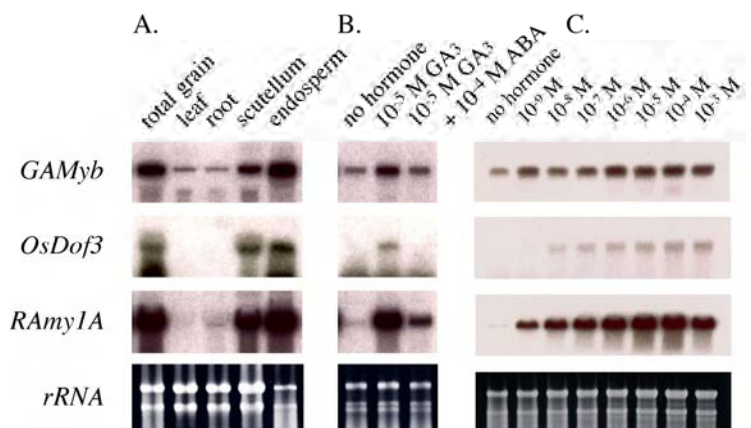


図3 イネ糊粉層 GA 誘導性遺伝子の発現。A. 組織特異的な発現。B. ホルモン応答性。C. ジベレリン濃度依存性。GAMYB と OsDof3 の発現が一致すると、標的遺伝子である α -amylase 遺伝子 (RAmylA) の発現が顕著になるのが分かる。

あると考えられている。

もう一つの配列である pyrimidine box については、我々のグループが、深く関与することになった。Pyrimidine box は、単独での GA 応答性を示さず、その欠損によってホルモン応答性が若干低下するので、ホルモン応答に対する補助的な役割が推定されていた (Gubler et al., 1992; Hooley, 1994)。DNA 結合能を指標にした発現スクリーニングにより、pyrimidine box を特異的に認識する糊粉層タンパク質を同定できた (Washio, 2001)。そのタンパク質は、植物特異的な転写因子である Dof protein であった。Dof protein は、比較的小さな分子量からなり、1 つの zinc finger motif を持つ DNA 結合性タンパク質である。植物ゲノム内で小遺伝子族を形成しており、様々な植物の生理反応に関与する事が知られている (Yanagisawa, 2002)。Dof protein の作用特性は、単独での遺伝子発現調節ではなく、他の因子との共同作業で多彩な生体調節を行うことにある。GARE 配列と pyrimidine box が加水分解酵素遺伝子のプロモ-

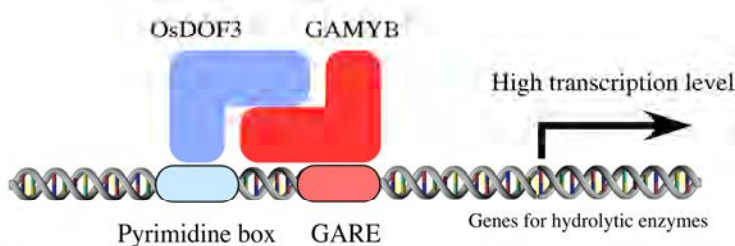
ーター上で、常に近接して観察される事実を考慮して、同定された Dof protein (OsDOF3) が GAMYB の機能性パートナーであると想定した。両者の関係を調べたところ、タンパク質間相互作用を介した物理的な会合と、標的遺伝子の転写活性化における共役効果が確認され、OsDOF3 は、GAMYB の組織特異的な共役因子であると結論した (Washio, 2003; 図 3A)。

興味深いことに、*OsDof3 gene* の発現を調べると、*GAMyb gene* と同様に GA による発現調節を受けていることが分かった (図 3B)。しかし、GA の濃度要求性が異なり、*GAMyb* は低い濃度から応答するのに、*OsDof3* は高い濃度にしか反応しなかった (図 3C)。この結果は、糊粉層での GA の作用に 1 つの解釈を与えてくれる。胚盤由来の高濃度の GA が、糊粉層に持続的に作用することにより high response gene である *OsDof3* の発現が促され、既存の *GAMyb* の機能と共役的に会合することにより転写ユニットが形成され、標的遺伝子の高レベルな発現が可能になると解釈できる (図 4A)。

また、*GAMyb* は、糊粉層以外の組織での GA の作用にも関与する (Kaneko et al., 2004)。低レベルの GA でも発現できる *GAMYB* は、他の組織では *OsDOF3* とは異なる補助因子との共同作業で、糊粉層とは異なる遺伝子セットの発現を制御しているのであろう (図 4B)。

あたかも GA に直接誘導されているかに見えた加水分解酵素遺伝子の発現であるが、よく調べてみると、実際は GA の作用で初発的に発現してくる初期反応遺伝子 (primary response gene) の機能に支えられた、2 次的な反応であることが分かった。植物の生活史における GA の多面的な作用の 1 つの要因として、ホルモンの濃度効果に基づいた初期反応遺伝子間の機能相関が重要であるとの確証を得たが、真の意味でのホルモンによる遺伝子発現制御のしくみを知ろうとするなら、

A. GA-treated aleurone tissues



B. Other tissues

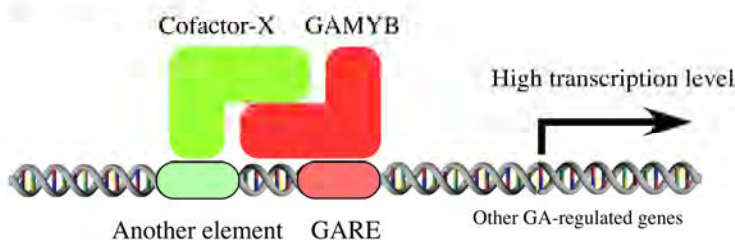


図 4 GAMYB と OsDOF3 による糊粉層特異的な転写装置の構築。A. GAMYB と OsDOF3 は、DNA 結合性とお互いのタンパク質間相互作用により、加水分解酵素遺伝子プロモーター上で会合でき、特異的な転写ユニットを形成する。B. 他の組織では、GAMYB を中心として糊粉層とは異なる転写装置が構築される。その標的遺伝子候補としては、花器官の形成に関与する *LEAFY* (Gocal et al., 2001) 細胞伸長を促す *Expansin* (Lee et al., 2001) などがあげられている。

初期反応遺伝子そのものの発現機構を調べる必要性が浮上してきた。

種子が目覚めるとき

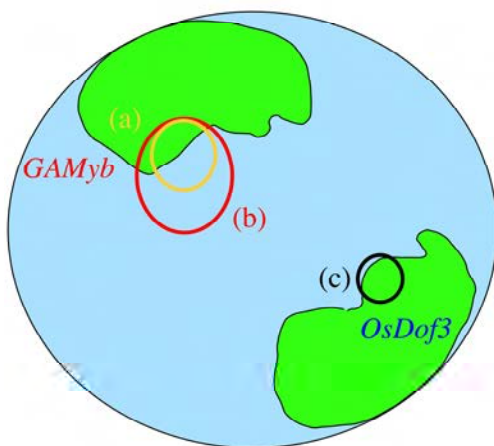
糊粉層での GA の作用は、組織特異的である。根やシュートに外から高濃度の GA を与えても、*GAMyb* や α -Amylase 遺伝子の発現が顕著になることは決してない。このことは、組織学的な要因、胚盤組織からの豊富な GA の供給だけではなく (Kaneko et al., 2002) 標的組織の特性、糊粉層細胞の GA に対する高い感受性が、この組織での GA の作用に必要であることを示唆する。初期反応遺伝子の発現解析を進めるうち、この問題に対する 1 つの解答が見えてきた。即ちそれは、GA はどうやって種子を目覚めさせるのか? という問いにも直結するものであった。

GA 初期反応遺伝子のホルモン応答性は、通常の遺伝子で考えられるような、5'上流域のプロモーター活性には依存していなかった。様々な調節部位が遺伝子領域全体に存在しており、お互いに連携してその発現を支えていた(unpublished data)。特に留意すべき点は、長大な 1st intron に検出された enhancer 作用である。Intron enhancer に関する報告例は少ないが、花器官の形成に関わる重要な

homeotic gene である *AG* (Deyholos and Sieburth, 2000; Hong et al., 2003)、花芽形成の中心抑制因子である *FLC* (He et al., 2003) で詳細な解析がなされている。いずれの遺伝子でも intron enhancer がその遺伝子の発現特性を決定するが、注目すべきことに、そこには遺伝子領域を核内のクロマチン構造の中に押し込め、静的な状態に保つための情報が存在するらしい (Jacobsen et al., 2000; Sheldon et al., 2002)。Large intron は、イントロンとしての一般的な役割とは別に、積極的な遺伝子修飾による遺伝子領域の不活性化 (gene silencing) にも関与する可能性がある (Bastow et al., 2004)。これらの知見を踏まえると、GA が作用して最初におこる核内イベントとは、初期反応遺伝子の単なる転写反応の活性化ではなく、静的な状態にある遺伝子領域の可動化と、動的な状態への移行であると推察できる。

一方、遺伝子修飾と糊粉層を含む胚乳組織の間には、遺伝学的に深い関係が存在する。被子植物の重複受精では、花粉からできる精核の 1 つは、卵と受精して胚をつくる。もう 1 つの精核は、2 つの極核と受精して胚乳へと発育する。極核を含む中心細胞では、維持型の DNA メチル化 (メチル化された C 残基の情報が、DNA 複製時にその

A. Non endosperm tissues



B. Endosperm aleurone tissues

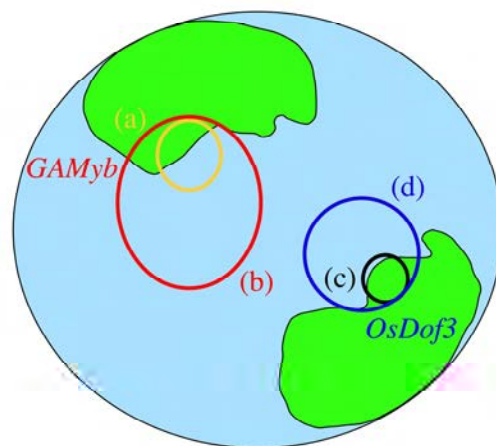


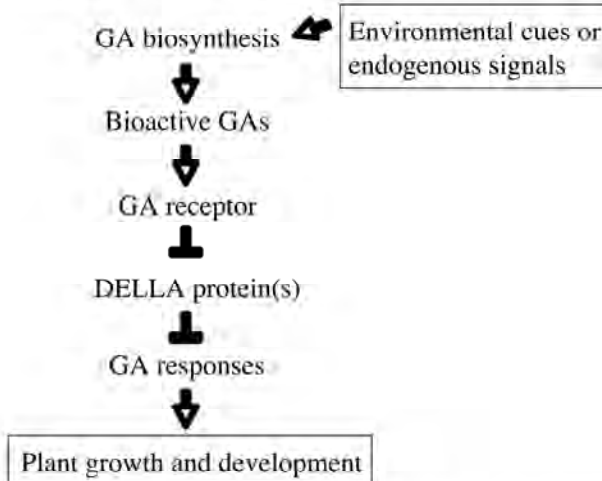
図 5 Interchromatin compartment model に基づく、発芽遺伝子の発現機構の解釈。基本的な考え方は、Williams (2003) に従う。緑は凝縮した chromatin の subdomain を表す。不活性な遺伝子は、この領域に未知の抑制力により拘束されている (tethering)。発現に至るためには、この拘束を断ち切り、RNA 合成酵素や転写因子、スプライシング酵素に富む、chromatin 間隙に移動しなければならない。円の大きさは、遺伝子領域の活性の度合いを示す。

まま受け継がれる反応)が解除されている (Gehring et al., 2004)。この現象の真意は定かではないが、メチル化レベルの変化により、*FWA* など通常の組織では不活性で発現できない imprinting genes の抑制が解除され、種子形成に貢献することが知られている (Kinoshita et al., 2004)。この現象は、やがて枯死する胚乳組織に限定されたものなので、決して次世代には遺伝しない。そのため “one-way control” と呼ばれる。この遺伝現象の、種子形成以降、発芽過程での効果は不明である。しかし、ゲノム DNA のメチル化状態を調べる 1 つの方法である bisulfite sequencing 法で、GA 初期反応遺伝子周辺の DNA メチル化状態を調べてみると、発芽種子の胚と胚乳 (糊粉層) でも、メチル化状態に明確な違いがあることが分かった。さらに、GA の作用による局所的な修飾状態の変化も検出している (unpublished data)。現時点では、観察された DNA メチル化状態の変化と、遺伝子発現との直接の関連性を述べることはできない。しかし、DNA のメチル化修飾が、遺伝子の発現に対して抑制的であるという一般的概

念に基づくと、種子発芽過程での GA の作用について、次のような仮説が成立する。

通常の組織では、発芽に關与する初期反応遺伝子は、核内の不活性領域に拘束状態にある。そのため GA が作用しても発現することはない (図 5A、c)。しかしながら、不活性領域との親和性の弱い *GAMyb* は、少しは発現できる状態にある (図 5A、a-b)。胚乳由来の糊粉層組織では、維持型の DNA メチル化などの抑制作用が予め解除されていて、潜在的に活性状態にある。そして、GA が作用すると残りの抑制作用も解除され、両遺伝子の高レベルの発現が可能となる (図 5B、a-b、c-d)。つまり、発芽に關与する遺伝プログラムは、種子を形成する過程で概ね完了しており、GA は、浅い眠りの発芽遺伝子に作用して、目覚めさせるだけの働きをする。この考えは、分子遺伝学的解析の成果として提唱されている、GA 作用の抑制因子である DELLA protein の機能解除を中心とした、今現在、最も有力な GA の作業モデルである “relief of restrain” model の基本構想を支持するものである (図 6; Silverstone et al., 2001)。

The “relief-of-restrain” model of GA signaling



Silverstone et al., Plant Cell 13: 1555-1565 (2001)

図 6 ギベレリン情報伝達系の作業モデル。GA の作用は、通常抑制状態にある。細胞膜上にある受容体が、活性 GA を認識すると、その情報伝達系の末端で抑制因子である DELLA protein の機能を解除して、GA の作用が発動する。Arabidopsis では、5 種類の DELLA protein が、冗長性を保ちながら機能分担して、その生活史を支えている。イネでは、ただ 1 種類の DELLA protein (SLR1) が、すべての GA の作用を制御する (Ikeda et al., 2001)。

今後の研究計画としては、GA 初期反応遺伝子の静的な状態の形成と維持に關わる機能因子の特定を進めるとともに、GA の情報伝達系との接点を求めて研究を進めて行く。GA 情報伝達系が、如何にして核内の深層にある不活性領域にアクセスして、正確に標的遺伝子の抑制を解除できるのか? ということが興味の対象となろう。一連の研究成果をもとに、GA 作用の基本的なメカニズムを把握して、種子発芽以外の植物が示す生命反応にも応用してみたいと思っている。

広視野研究をめざして

地球環境科学研究科という総合応用科学を基盤とする機関に属していると、自分の研究が世の中の役に立つ

のか?という自問に毎日直面する。発芽という現象に限っても、現代育種の現場では様々な問題が生じている。早い周期でめぐる作物出荷により、本来植物が持っていた遺伝プログラムに異変がおこり、穀物種子の休眠性は年々浅くなっている。そのため穂発芽や未熟発芽を起こしやすくなり、深刻な問題となっている。ジベレリンという植物ホルモン自体は、作物育成に有用であることは疑いない。近代農業で主要穀物の生産性を激増させたのは、GAによる草丈調節を改変した半矮性品種の導入であったのは、周知の事実である(Peng et al., 1999)。この偉業は「緑の革命」と称えられ、半矮性コムギの育成者である N. Borlaug は、その功績により 1970 年にノーベル平和賞を授与されている。この人はまだ健在で、2002 年に米国の Denver で開催された米国植物科学会での特別講演で、その肉声を聞くことができた。

その講演では、主に途上国で続く慢性的な人口増加のため、今世紀半ばには全世界の人口は 80 億人を越えると予想される。これに伴い、主要作物の 40% 強の増産が必須であろうと推定されている。期待される、第 2 の「緑の革命」では、単に作物の生産性を増大させるだけではなく、改変品種の質的な洗練や、地球環境問題の考慮、更には全世界での均等な作物配分が不可欠であるということなどを、熱く語っていた記憶がある。老齡を感じさせない、しっかりとした口調と思考力にも感心したが、何よりも「緑の革命」という偉業が、決して実験室レベルで偶発的に生まれたものではなく、多くの人々の協議の中で緻密に計画された、世界的な学術プロジェクトであったことに感銘を受けた。

自分の研究が世界を救うなどと、軽はずみな妄想を抱くほど若くはないが、いざ第 2 の「緑の革命」という壮大なテーマを心の中に密かに掲げた時、多くの人々の批判に耐え、世の中にたくさんの協議を生むような、完成度の高い説得力のある研究を目指して行きたいという決心が生まれる。これは、私の修士課程時代に吉田先生が語られた

「研究目標はなるべく高く持ちなさい。目標に至ることがなくても、その過程で様々な実験が派生するのが面白いんだよ。」という言葉にも通じるものがある。我々がまだ知らない、植物本来がもつ生命プログラムを理解することにより、植物応用の分野に新たな切り口を提供できたら格別であると、実験の手を少し休め、外の景色に目を移しながら考えている。

謝辞

本稿を書く機会を与えて下さった、「植物科学の新展開・分子から群集まで広視野研究をめざす」シンポジウム実行委員(委員長 前島正義)の皆様には感謝いたします。また、私が研究を始める導引となった北海道大学修士課程時代の指導教官である吉田静夫先生に深く感謝いたします。

参考文献

- Bastow. R., Mylne. J.S., Lister. C., Lippman. Z., Martienssen. R.A., Dean. C. (2004) Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation. *Nature* **427**:164-167
- Bethke. P.C., Lonsdale. J.E., Fath. A., Jones. R.L. (1999) Hormonally regulated programmed cell death in barley aleurone cells. *Plant Cell* **11**:1033-1046
- Deyholos. M.K., Sieburth. L.E. (2000) Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the *AGAMOUS* second intron. *Plant Cell* **12**:1799-1810
- Fu. X., Harberd. N.P. (2003) Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**:740-743
- Gehring. M., Choi. Y., Fischer. R.L. (2004) Imprinting and seed development. *Plant Cell* **16**:S203-S213
- Gocal. G.F.W., Sheldon. C.C., Gubler. F., Moritz. T., Bagnall. D.J., MacMillan. C.P., Li. S.F., Parish. R.W., Dennis. E.S., Weigel. D. et al., (2001) *GAMYB-like* genes, flowering, and gibberellin

- signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**:1682-1693
- Gubler. F., Jacobsen. J.V. (1992) Gibberellin-responsive elements in the promoter of a barley high-pI α -amylase gene. *Plant Cell* **4**:1435-1441
- Gubler. F., Kalla. R., Robert. J.K., Jacobsen. J.V. (1995) Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for MYB transactivation of a high-pI α -amylase gene promoter. *Plant Cell* **7**:1879-1891
- Hay. A., Kaur. H., Phillip. A., Hedden. P., Hake. S., Tsiantis. M. (2002) The gibberellin pathway mediates KNOTTED-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr Biol* **12**:1557-1565
- He. Y., Michaels. S.D., Amasino. R.M. (2003) Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis*. *Science* **302**:1751-1754
- Higgins. T.J.V., Jacobsen. J.V., Zwar. J.A. (1982) Gibberellic acid and abscisic acid modulate protein synthesis and mRNA levels in barley aleurone layers. *Plant Mol Biol* **1**:191-215
- Hong. R.L., Hamaguchi. L., Busch. M.A., Weigel. D. (2003) Regulatory elements of the floral homeotic gene *AGAMOUS* identified by phylogenetic footprinting and shadowing. *Plant Cell* **15**:1296-1309
- Hooley. R. (1994) Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol Biol* **26**:1529-1555
- Huang. N., Sutliff. T.D., Litts. J.C., Rodriguez. R.L. (1990) Classification and characterization of the rice α -amylase multigene family. *Plant Mol Biol* **14**:655-668
- Ikeda. A., Ueguchi-Tanaka. M., Sonoda. Y., Kitano. H., Koshioka. M., Futsuhara. Y., Matsuoka. M., Yamaguchi. J. (2001) *slender* rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene: *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell* **13**:999-1010
- Jacobsen. S.E., Sakai. H., Finnegan. E.J., Cao. X., Meyerowitz. E.M. (2000) Ectopic hypermethylation of flower-specific genes in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **10**:179-186
- Kaneko. M., Itoh. H., Ueguchi-Tanaka. M., Ashikari. M., Matsuoka. M. (2002) The alpha-amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. *Plant Physiol* **128**:1264-1270
- Kaneko. M., Inukai. Y., Ueguchi-Tanaka. M., Itoh. H., Izawa. T., Kobayashi. Y., Hattori. T., Miyao. A., Hirochika. H., Ashikari. M., Matsuoka. M. (2004) Loss-of-function mutations of the rice *GAMYB* gene impair α -amylase expression in aleurone and flower development. *Plant Cell* **16**:22-44
- Kinoshita. T., Miura. A., Choi. Y., Kinoshita. Y., Cao. X., Jacobsen. S.E., Fischer. R.L., Kakutani. T. (2004) One-way control of *FWA* imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. *Science* **303**:521-523
- Lee. Y., Choi. D., Kende. H. (2001) Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Curr Opin Plant Biol* **4**:527-532
- Ogawa. M., Hanada. A., Yamauchi. Y., Kuwahara. A., Kamiya. Y., Yamaguchi. S. (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**:1591-1604
- Peng. J., Richards. D.E., Hartley. N.M., Murphy. G.P., Devos. K.M., Flintham. J.E., Beales. J., Fish. L.J., Worland. A.J., Pelica. F., Sudhakar. D., Christou. P., Snape. J.W., Gale. M.D., Harberd. N.P. (1999) 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**:256-261
- Sakamoto. T., Miura. K., Itoh. H., Tatsumi. T., Ueguchi-Tanaka. M., Ishiyama. K., Kobayashi. M., Agrawal. G.K., Takeda. S., Kitano. H., Ashikari. M., Matsuoka. M. (2004) An overview of gibberellin

- metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol* **134**:1642-1653
- Sheldon. C.C., Conn. A.B., Dennis. E.S., Peacock. W.J. (2002) Different regulatory regions are required for the vernalization-induced repression of *FLOWERING LOCUS C* and for the epigenetic maintenance of repression. *Plant Cell* **14**:2527-2537
- Silverstone. A.L., Jung. H-S., Dill. A., Kawaide. H., Kamiya. Y., Sun T-p. (2001) Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**:1555-1566
- Skriver. K., Olsen. F.L., Rogers. J.C., Mundy. J. (1991) *cis*-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:7266-7270
- Vriezen. W.H., Achard. P., Harberd. N.P., Van. Der. Straeten. D. (2004) Ethylene-mediated enhancement of apical hook formation in etiolated Arabidopsis is gibberellin dependent. *Plant J* **37**:505-516
- Washio. K. (2001) Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin-regulated expression of a peptidase gene following the germination of rice grains. *Biochim Biophys Acta* **1520**:54-62
- Washio. K. (2003) Functional dissections between GAMYB and Dof transcription factors suggest a role for protein-protein associations in the gibberellin-mediated expression of the *RAmy1A* gene in the rice aleurone. *Plant Physiol* **133**:850-863
- Washio. K., Ishikawa. K. (1992) Structure and expression during the germination of rice seeds of the gene for a carboxypeptidase. *Plant Mol Biol* **19**:631-640
- Washio. K., Ishikawa. K. (1994) Organ-specific and hormone-dependent expression of genes for serine carboxypeptidases during development and following germination of rice grains. *Plant Physiol* **105**:1275-1280
- Williams. R.R.E. (2003) Transcription and the territory: the ins and outs of gene positioning. *Trends in Genetics* **19**:298-302
- Whittier. R.F., Dean. D.A., Rogers. J.C. (1987) Nucleotide sequence analysis of alpha-amylase and thiol protease genes that are hormonally regulated in barley aleurone cells. *Nucleic Acids Res* **15**:2515-2535
- Yanagisawa. S. (2002) The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **7**:555-560

石の下にも 20 年 - 埋土種子研究の進展状況 -

露崎 史朗

(北海道大学 大学院地球環境科学研究科)

はじめに

攪乱(disturbance)は、生態学分野では「物理的環境に起因した群集構造を突然変化させる壊滅的な事象」と定義される(White 1979)。ただし、その物理的環境を変化させる原因が生物的環境による場合も含めた意味で用いることが多い。多くの火山噴火は、大規模攪乱の代表格にあげられる。他にも、様々なスケールの攪乱があり、比較的大規模なものでは火災や台風等を、小規模なものでは人を含めた動物による踏みつけ等をあげることができる。これらの攪乱が起こった直後から、植物は様々な手段を用いて攪乱を受けた所へ侵入・定着を始める。その後、環境と種間関係の変化から、定着している種の構成が変化する。その一連の過程を遷移あるいは生態遷移と呼ぶ。火山における遷移に限定した場合には、そこにおける遷移を火山遷移と呼ぶ。

火山遷移初期における群集構造変化やその遷移機構については、露崎(2001)の総説があるので、そちらを参照して欲しい。だが、遷移初期段階は、調査できる場所も期間も限られるため遷移様式をはじめとする群集構造の時間軸に沿った変化には様々なものがあり、遷移機構にいたっては不明の部分はまだ残されているのも事実である。ここでは、遷移初期に植物の種子が「どこからどのように」やってくるのか、という、これがなくては(植物が供給されていなくては)遷移は始まらない、という部分を中心に自分の体験を踏まえて話を進めたい。

1977-78 年有珠山噴火 (さー、やるぞ!)

火山遷移機構を、さらには、できれば全ての遷

移機構を明らかにすることを目標に、現在は研究を進めているつもりである。遷移研究を始める事の発端は、1983 年に北海道大学理学部分類学講座で卒論研究として「有珠山山頂部における植物相」を調べたことである。今後のことを考え、植物相を調べるだけでは群集レベルの変化を知る

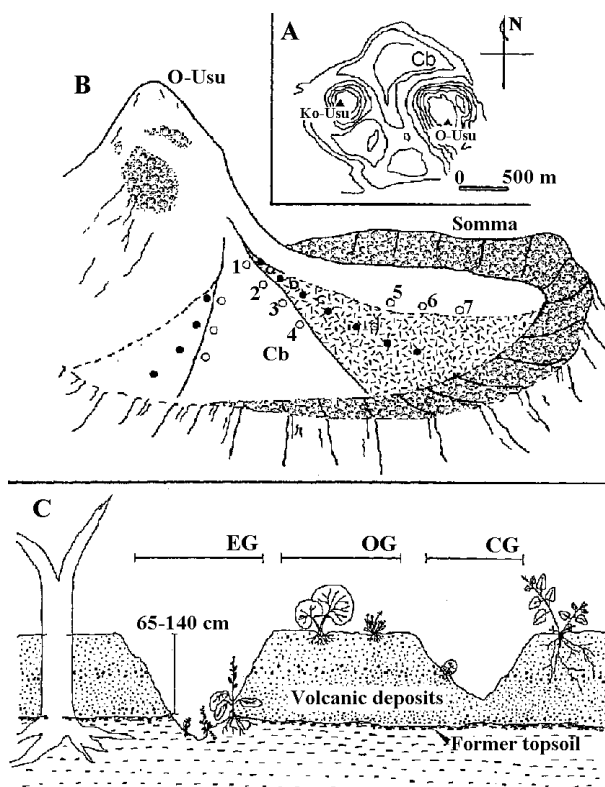


図 1. 主調査地である有珠山概観。A: 有珠山山頂部。O-Usu = 大有珠。Ko-Usu = 小有珠。Cb = 火口原。B: 1983 年に設置し現在まで調査されている永久調査区の配置様式。黒丸がガリー(gully)内部を白丸がガリー外部の調査区を表す。番号は 2 本の調査線のうち 1 本の方での調査区番号。Somma = 外輪山。調査区 1-4 は砂防工事により調査区 6-7 の一部はアカエゾマツ植林により破壊された。C: 有珠山火口原断面模式図。EG = 旧表土(former topsoil, 噴火前に存在していた土壌)の出現したガリー。OG: ガリー外部。CG: 噴火堆積物(volcanic deposits)に覆われ旧表土の出現していないガリー内部。噴火 10 年後に旧表土を採取した場所では噴火堆積物の厚さが 65-140 cm であった。(露崎 原図)

1986



1998



図 2. 1977-78 年噴火後の大有珠北西斜面を 1986 年(上)と 1998 年(下)で撮影したもの。1986 年の写真に見える枯れ木は全て 1977-78 年噴火により枯死したもの。永久調査区は、この下部に設置した(図 1 参照)。1998 年の写真に見える手前の針葉樹は営林署が植えたアカエゾマツ、尾根右手見える薄緑の部分は牧草が吹き付けられたところ。日本では、自然回復に関する研究適地が、このようにして消滅していく。(露崎 撮影)

には不十分なため火口原に調査区を設定し記録を開始した(図 1)。

有珠山は、事前に見事な噴火予測がなされた 2000 年噴火が最近のものとして有名である。有珠山の噴火周期は数 10 年程度で、2000 年噴火の 1 つ前には、噴火規模が 2000 年噴火規模を遥かに上回る大噴火を 1977 年から 1978 年にかけて行っている。その 1977-78 年噴火被害を受けた場所で調査を始めたわけである。それから現在まで 20 年以上にわたりそれらの永久調査区を中心に調査を行ってきた(図 2)。

火山噴火様式を、植物の立場になって噴出物をもとに区分するならば、溶岩主体のものと、火山灰・軽石のような噴火降灰物(噴火堆積物)主体のもの 2 つに分けることができる。両者の大きな違いは、溶岩は冷え固まればほとんど動かないが、噴火堆積物は噴火が収まってからも地表面が降

雨や融雪の際に動く。したがって、土壌栄養が乏しいことは共通しているが、植物は、噴火後も地表移動という継続した攪乱を受ける噴火堆積物上と、地表面はほとんど動かない溶岩上では、侵入した植物は、それらの環境適応様式が大きく異なる。例えば、噴火降灰物の移動に絶えるためには、軟弱な地下部しか発達できない植物は定着できない。

有珠山噴火は、軽石・火山灰が噴火による噴出物の主体であり、調査を始めた 1983 年においてもなお大きな地表面の変動が認められた。特に、侵食によるガリー(gully, 雨裂と訳す人もいる)形成が顕著であった(図 1)。大きなガリーでは、その侵食が噴火以前に形成されていた土壌(former topsoil, 旧表土)に達しているものも認められた。

有珠山における埋土種子(発芽せよ!)

火山においても植物が侵入するには、噴火前から生存していた埋土種子や、地下茎等による栄養繁殖が無視できないスケールで回復に寄与している(Tsuyuzaki 1987)。なお、埋土種子とは、ある地面あるいは土中に存在しているが発芽していない種子すべてのことを指す。1980 年に大噴火をした米国セントヘレンズ山でもこの特徴は一致する(Walker & del Moral 2003)。とりわけ、旧表土の出現したガリーでは旧表土の出現していないガリーには見られない種が 10 種以上認められた。それらの植物は、1 年生草本が多く、種子の長距離散布は無理な形態のものが多かった。となると、これらの種子は旧表土中に存在していたに違いない、ということまでは予測がつく。しかし、最後までてこずったのが、これら埋土種子集団起源の種を決めることであった。

埋土種子起源の種を直接同定するには、発芽実験をすれば良いと当初は簡単に考えていた。しかし、最初の発芽実験は散々だった(Tsuyuzaki 1989)。手当たり次第に噴火前の土を掘り起こし実験室に持ち帰り、鉢に移し水を与えても、わずか 5 種しか発芽しなかった。10 種以上が埋土種子起源で

表 1. 埋土種子集団の調査方法の比較。(露崎(1990)を改変)

	発芽試験法*	直接検鏡法	篩選別法	比重選別法
方法	温室等にてトレイ上に採取した土壌を散布し適宜水を与え種子の発芽を待つ	ピノキュラ下で土壌を観察し種子を見つけたらソーティングする	当たりをつけた種子サイズより大きな目と小さな目の篩を用意し、その2つの篩の間に種子が集まるようにする	高比重溶液に土壌を溶かし種子を浮上させる
長所	操作容易	操作容易	比較的操作容易 処理早い	処理速い 回収率高い
短所	長時間必要(通常数ヶ月) 全ての種子が発芽するとは限らない	処理できる量が非常に少ない	全ての種子を集めるのは困難(特に小さい種子)	操作やや複雑
回収率	低い	高い	サンプルに依存	非常に高い

* Ter Heerdt, et al. (1996)は、推定される最小サイズ種子より目の細かい篩を用いて、種子の入っていないと考えられる土壌を発芽実験に使用しないことにより、処理する土壌量を減らすことを提案した。

ないと辻褄は合わない。そこで、別な方法で旧表土中の種子を取り出す必要があると考えた。集めた文献を整理すると大きく4通りの方法があった(表 1)。この中でも、埋土種子集団全体を扱う場合には、比重選別法が回収率に優れることに気づいた。しかし、プロトタイプといえるこの方法の最初のもは、容器内に土壌を入れ、それに高濃度塩溶液を注ぎ浮上を待ち上澄みを濾過するというもので、処理に時間がかかることも欠点ではあるが、さらに長時間塩漬になることで、種子が死亡する、発芽異常等の種子への負の影響が懸念された。

埋土種子集団の同定 (これでどうだ?)

1987 年は、1977-78 年有珠山噴火開始から 10 年目という人間にとってはキレの良い年であり、大々的に噴火前の土壌(旧表土)を採取し、それから埋土種子集団を抽出することを目論んだ。問題は、埋土種子抽出方法、即ち比重選別法の改善策である。これができないと次のステップに行けない。

比重選別法は通常、高濃度塩溶液、その代表として 50%炭酸カリウム溶液(以降 K_2CO_3)、を種子浮上のために使う。比重は 1.54 と極めて高く、種子に全くダメージを与えないのは無理なこととして、可能な限りダメージを減らす方法を考えた

かった。しかし、塩溶液にどの程度種子をつけていると種子に明らかなダメージが表れるかが全く分からなかった。当時、自分は北海道大学大学院理学研究科博士後期課程の学生で、指導教官であった吉田静夫先生から、種子発芽率が K_2CO_3 にどの程度つけると影響を受けるかを発芽率を用いて示すこと、それ以下の時間で土壌を処理できるように方法を改善すればよい、という示唆を受けた。そこで、 K_2CO_3 に種子を 0, 1.5, 3.0, 6.0 時間つけ、発芽率がどの程度低下するかを観察した(Tsuyuzaki 1993)。その結果、十分給水させた種子では、たとえ 1.5 時間でも発芽率を低下させる種が多いことを確認し、種子を K_2CO_3 につけている時間は 1.5 時間では長すぎるのが分かった。従来の比重選別法では、土壌を K_2CO_3 中に入れ攪拌した後に、種子およびその他有機物が自然に浮上するのを待ち、その種子の浮いた上澄みを濾過し種子を抽出する。浮上は気長に待つしかなく、これでは比重選別法処理時間の短縮は到底できない。

そのとき吉田先生から、遠心を用いれば土壌を素早く沈殿させることにより土壌と有機物を分離させることができるが、事前に種子に遠心の影響がどうかを確認しておくこと、という示唆を受けた。そこで、遠心の影響は種子発芽率にほとんど影響がないことをまず確認し、土壌沈降

を遠心により行うこととした(図 3) (Tsuyuzaki 1994)。この方法は、現在でも試行錯誤を繰り返しながら細かな改良を続けており、現時点の方法なら K_2CO_3 に種子が浸かっている時間は 15 分程度まで短縮されている。(しかし、そのため低温遠心器の遠心ローター1つを、お釈迦様一步手前にしてしまったような気がする。以降は卓上遠心器のみを使用している)。

方法も決まり、いよいよ、1987年春に旧表土を6個所から $50\text{ cm} \times 50\text{ cm} \times 10\text{ cm}$ (縦 × 横 × 厚さ)に切り取り低温科学研究所植物凍害科学部門実験室に持ち帰った。今改めて計算すると、1個の土壌の塊が 25 l 、総計 150 l の土を処理したことになる(今では信じられん)。全ての処理には数ヶ月を要したが、最終的には25種(うち未同定7種)の種子を得ることができた(Tsuyuzaki 1989)。それらの種の多くは、やはり旧表土の出現したガリー(図1のEG)にのみ特異的に出現する種であった。同時に、有珠山における1年生草本のほとんどが埋土種子起源であることも明らかとなった(Tsuyuzaki 1990)。

噴火後20年にあたる1998年に旧表土を採取し、遠心浮上法および発芽試験法により埋土種子集団を調べたところ少なくとも22種の種子が未だ旧表土中で生存していた(Tsuyuzaki & Goto 2001)。これらの種子は、「石の下にも20年」生きていた種子である(正確には「軽石・火山灰の下にも20年」)。

実験的に種子を瓶等につめ土壌中に埋め定期的に取り出すという人為環境下の実験は、ビール博士(Dr. Beal)の実験という有名なものがあり、埋めてから120年を経過したものでも生きていたという報告がある(Telewski & Zeevaart 2002)。しかし、自然状態における種子の長期生存報告は、20年でも稀なようで、米国植物学雑誌の「石の下にも20年」論文が掲載された号のトピック欄に論文内容が紹介されていた(図4)。こうなると「石の下にも30年」をやらねばならないのだろうか。

発芽実験の逆襲 (発芽試験もやるか...)

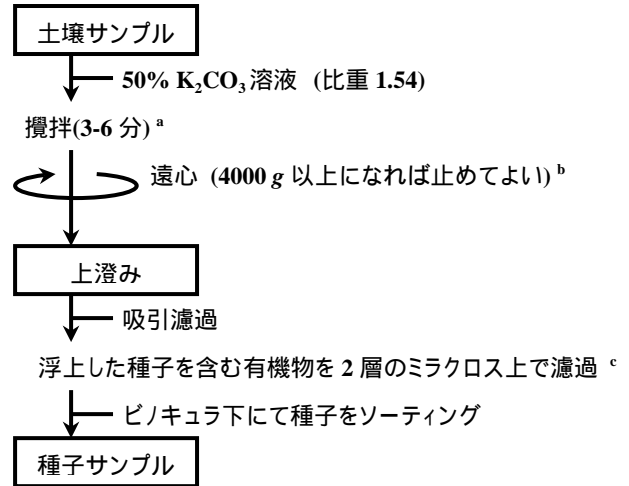


図3. 改良された比重選別法(Tsuyuzaki 1994 を元に作成改良)。個人的には、「遠心浮上法」と呼んで欲しい。a: 最初の頃は、スターラーを用いて攪拌を行ったが、噴火後20年を経過した有珠山旧表土中埋土種子組成調査からプロペラシャフトを使って攪拌している。その場合、攪拌時間は5分以下で十分である。b: 卓上遠心器を使う場合には、スイッチを入れてからローターが止まるまで数分程度となる。c: 濾紙を3層にして行っていたが、途中からミラクロスに変えた。また、この過程でミラクロス上の有機物を十分に洗浄することができる。

発芽試験は、発芽に光を必要とする種子(光発芽種子)を十分に発芽させるため、サンプル土壌をできるだけ薄くして行う必要がある。土壌の厚さが数センチメートルになると、厚すぎて土壌内部に光が十分に届かず光発芽種子は休眠状態のままであり、数ミリ程度の厚さにするのが理想とされる(図5)。それでも、多くの種子の発芽が終了するには数ヶ月待つのが普通となる。また、実験スペースが不十分な場合には、1度目の発芽試験が終了した時点で土壌を十分攪拌し再び発芽実験をするという煩雑な手続きを踏まざるを得ない。発芽試験は、1年を必要とすることもある。

この膨大な場所と時間を必要とする大きな問題を解消するために、土壌中に存在する最小種子サイズが明らかな場合は、それより小さい目の篩を用いて種子が入っていないと考えられる土壌を除去した上で発芽実験を行う方法が提案された(Ter Heerd et al. 1996)。土壌粒形の細かい粘土質土壌では、発芽実験に要する土壌量を大幅に削減できるらしい。有珠でも噴火降灰物にはかなりの火山灰が含まれ、そのようなことも可能かと考

A

Seed bank persistence under volcanic ash

Tsuyuzaki and Goto report on the seed bank status in topsoil of the crater basin 20 years after burial under volcanic ash on Mount Usu, one of the most active volcanoes in Japan, located on Hokkaido Island. They present interesting data regarding natural storage of seeds under volcanic ash, extend longevity records for a number of species, and conclude that the seed bank will persist longer with soil water content between 20 and 40%, no light, and low temperature fluctuations.

B



図 4. A: 米国植物学会誌(American Journal of Botany) 88 巻目次ページで“この号(In this issue)”で紹介された文章全文。この文章は自分が書いた記憶はないが、自分が書いたものより要点が明確な気がする。B: 噴火 20 年後の旧表土中から遠心浮上法で抽出した埋土種子中の優占種であったエゾノギシギシ(*Rumex obtusifolius* L.)の種子。

えていた。ところが、篩を使用した時点で微小な種子は逸出してしまうことが報告され(Traba et al. 1998)、「ケシ粒」(実際はさらに小さな種子もある)のような種子のあるところの土壌を篩処理することは望ましくないことがわかった。これらの論文を読んでいて気づいたことは、発芽試験法を採用する人たちは、その欠点を知りつつも行っているという現状である。換言すれば、発芽試験法による埋土種子推定は、かなりの誤差を含んでいることが、研究者間では暗黙の了解となっている気がしてならない。

これだけの問題を抱えているにも関わらず、多くの埋土種子集団研究が発芽試験のみによって行われている。その理由の 1 つに、海外の大学では広大な温室があるところが多い等、実験スペースが十分な場合、容易でかつ大量の土壌処理が可能ながあげられる。

遠心浮上法 vs 発芽実験法 (仲良くしようぜ)

1987 年の埋土種子調査では、大きな 6 つの土壌の塊を採取したが、統計的により正確な埋土種子集団分布の推定を行うには小サンプルを数多く採取する方が有効と言われるようになった(Gross 1990)。多くの研究が発芽試験法により行われていること、小サンプルを数多くとる必要があるという 2 点を踏まえ、噴火 20 年に行った旧表土中の埋土種子集団測定は 10 年前と方法を大きく変えた。即ち、深さ 1 m 以上のところの旧表土を 100 cc の採土管を用いて約 60 箇所から採取し、採取土壌を 2 分割し、片方を遠心浮上法に、もう片方を発芽試験法にかけ両者の比較を行った(Ishikawa-Goto & Tsuyuzaki 2004)。

結果としては、遠心浮上法は発芽試験法より多い種数と種子数を得ることができ、数では遠心浮上法に軍配があがった。さらに、遠心浮上法で得た種の多くが発芽試験法では発芽しないこと、より小さな種子は比重選別法ではあまり検出できず(悔しい)、それぞれの方法には長所短所があることを示した。特に長期間埋土された種子は、強い非発芽状態となりつつ構造的に脆くなっているため、長期埋土種子集団推定には単一方法を用いることは危険だといえる。

まとめてみると、野外における埋土種子集団を調べる際には、その種子の分布する土をどのようにサンプリングするかというサンプリングデザインが第一の問題となる。ついで、どの方法で埋土種子集団推定を行うかが第二の問題となる。

発芽試験法のみでは絶対に検出することはできなかった「眠れる獅子(休眠したまま起きてこない種子)」が、他の種子選別法により抽出できれば、これまでブラックボックスであった埋土種子集団の動態をより明らかにすることが可能となる(図 5)。これまで埋土種子集団中の種数や種子数は、その場に新しく加わった数(加入数)と死亡数および発芽数の差から推定された。しかし、土壌中の休眠したまま発芽しない種子数を直接測定すれば良いようになる。

抽出された種子の休眠機構を明らかにせねば、

生存要因や寿命決定要因、さらには、これらの埋土種子がなぜそのような形質を獲得進化したのかを説明することはできない。遷移について初期に1年生植物が出現することは、このような種子の休眠特性と大きく関係していると考えられる。しかし、有珠山ではエゾノギシギシ(図4)を始めとする幾つかの種は、多年生草本であるにも関わらず二次休眠状態であった。これらの種は、裸地あるいは荒地に良く出現し、1年生草本の進化を、そして遷移機構を知る糸口となるものなのかも知れない。

今後の展望 (妖怪退治だ!)

埋土種子集団の特性は、生理的にも生態学的にも(図5)、そして分子生物学的にも1要因で説明できるとは現状では思えない。温度と一口に言っても、ウルシ(*Rhus*)の仲間に代表される高温に種子を暴露することにより発芽が促進されるものや、よく知られるように北海道を始めとする四季がある地域の種の多くは春に発芽するには季節認識が必要である。その方法の一つとして、低温を体験せねば発芽を開始しないというものがある(Baskin & Baskin 1998)。また、このような種では春に発芽しないと夏には再び二次休眠に入るという休眠サイクルも知られている。このように、温度の意味は様々である。同様に、化学要因としては、酸素、二酸化炭素濃度、さらにはエチレン

等が発芽の促進あるいは抑制要因としてあげられてきた。

南アフリカ・西オーストラリア・カリフォルニア等の森林火災多発地域から、多くの種が煙誘導種子発芽(smoke-induced seed germination)という煙を浴びることによって発芽が促進される性質を有することが報告された(Baskin & Baskin 1998)。日本からは、このような発芽特性を有する種は未報告であるが、日本に分布する種の幾つかが海外で煙誘導発芽と報告されている(Adkins & Peters 2001)。日本においても、森林火災は皆無ではないにも関わらず、日本の森林火災ではウルシのような熱発芽種子が注目されてきたが、今後、火災によって発生するもう一つの要因、煙の方を分離して研究を進めることが、生態系変化機構の解明には必要なかもしれない。実は、煙誘導発芽が最初に南アフリカで発見された報告は de Lange & Boucher (1990)であり、それからまだ15年程度しか経っていない。この発見は埋土種子の休眠特性が多様であることの1つの証明でもあろう。

2003年秋から長期在外研究員の立場で西オーストラリアを訪れる機会を得た。その際、実際に煙誘導発芽実験を見ることができた。見事なまでに無処理(対照)区土壌と煙処理区土壌では実生発芽数に差があった。2004年春には、西オーストラリア州州都パース内にあるキングズパーク植物科学実験施設の研究者達が、煙中の発芽促進物質を同定したと熱く語っていた(Flematti et al. 2004)。野外での煙発芽促進方法としては、土壌に煙を直接暴露する方法、煙を水中に通過させ発芽促進物質を溶出させた水を散布する方法、がこれまで考案されている。発芽促進物質を特定できた今、この発芽促進物質を直接散布することが計画されている。

煙誘導発芽は、西オーストラリアではボーキサイト採掘跡地において採掘時に表土を残し、そこに煙を浴びせることにより自生種の再生を促すといったような遷移的観点からみた生態系復元への応用が試みられている(図6) (Roche et al.

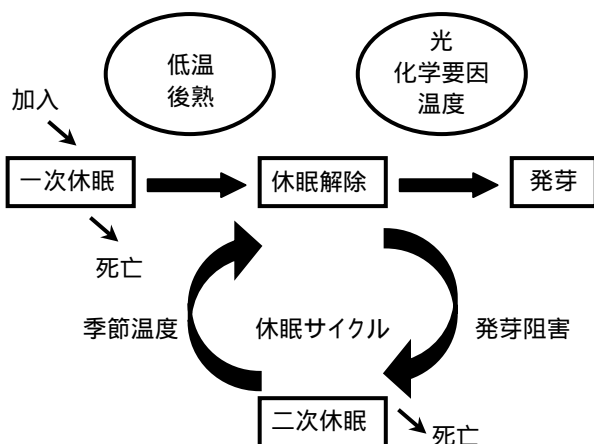


図5. かなり単純化された休眠を行う種子に関する休眠・発芽パターン変化。(Hilhorst & Karssen (2000)を改変)

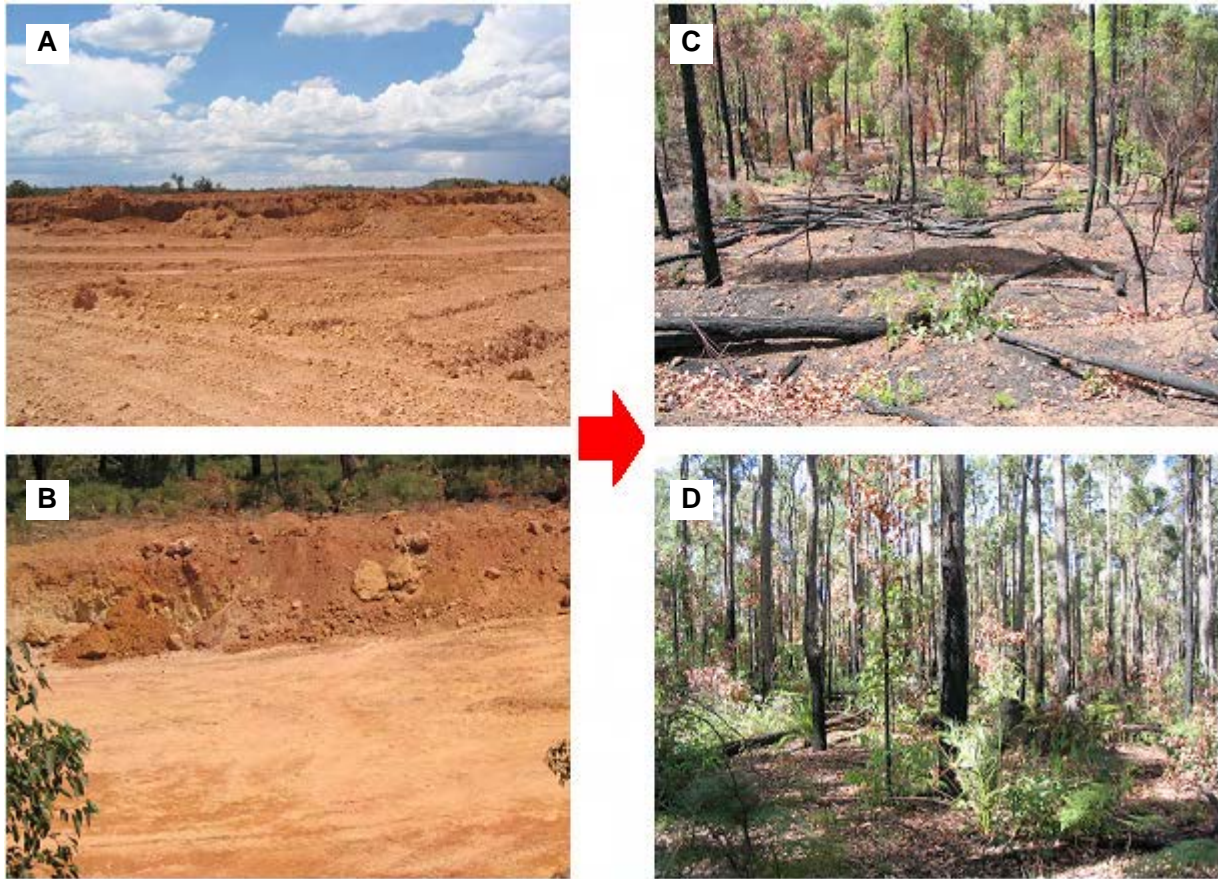


図 6. 西オーストラリアのボーキサイト採掘地における復元の試み。A: ボーキサイト採掘直後の景観。アルミニウムは地表面近くに集積しているため発破をかけ表層のみを採掘する。B: ボーキサイト採掘直後の採掘跡地と未採掘地の境界。まさに、地表面を剥いでいる。採掘を始めたばかりの頃には、そのまま放置したところもあるが、現在では、表土を採掘前に回収しておき採掘後に元に戻す復元促進措置を通常行っている。さらに、必要に応じて植林や在来種の播種を行う。初期には植林主体であったが、徐々に播種主体に方法は移行した。C: 採掘後に復元処置を施し 7 年を経過した採掘跡地。適当に間引きを行い、それらに火をつけ人工火災を行った直後に撮影した。人工火災により、埋土種子の発芽を促進させ、より早い復元を試みている。2003 年が人工火災を始めて行ったとのことで、結果が出るのはまだまだ先になるだろう。D: 採掘を行っていない森林を撮影したもの。樹皮が黒いことから分かるように、天然林では頻りに火災が発生しており、火災は西オーストラリアの生態系構造を決定する重要な要因である。復元目標は、この写真のような森林になることである。(露崎 撮影)

1997)。このように、一つの発見があると、その応用は目覚ましい速度で進むことがある。さらなる様々な種子休眠解除物質の発見や、その野外への応用へ発展していくことは疑いない。種子の発芽特性は、妖怪変化のように多様な変身をするが、これを退治するためには、分子から群集までを含めた広視野での研究が必要となることは間違いない。

なお、これらの内容は随時、以下のウェブページに公開していく予定であり、そちらをも参照されたい。

日本語ホームページ:

<http://hosho.ees.hokudai.ac.jp/~tsuyu/index-j.html>

英語ホームページ:

<http://hosho.ees.hokudai.ac.jp/~tsuyu/index.html>

謝辞

本稿を書く機会を与えて下さった、「植物科学の新展開 -分子から群集まで広視野研究をめざす-」シンポジウム実行委員(委員長 前島正義)各位に感謝いたします。また、これまでの研究が行えるきっかけを与えて下さった北海道大学博士課程時代の指導教官である吉田静夫先生に深謝いたします。西オーストラリアで煙誘導発芽の実際を見ることができたのも、博士時代に起因するものがあるように思えてならない。

参考文献

Adkins, S.W. & Peters, N.C.B. (2001) Smoke derived

- from burnt vegetation stimulates germination of arable weeds. *Seed Science Research* **11**: 213-222.
- Baskin, C.C. & Baskin, J.M. (1998) Seeds - ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination-. Academic Press, San Diego.
- de Lange, J.H. & Boucher, C. (1990) Autecological studies on *Audouinia capitata* (Bruniaceae). Plant-derived smoke as a seed germination cue. *South African Journal of Botany* **56**: 700-703.
- Flematti, G.R., Ghisalberti, E.L., Dixon, K.W. & Trengove, R.D. (2004) A compound from smoke that promotes seed germination. *Science* **305**: 977.
- Gross, K.L. (1990) A comparison of methods for estimating seed numbers in the soil. *Journal of Ecology* **78**: 1079-1093.
- Hilhorst, H.W.M. & Karssen, C.M. (2000) Effect of chemical environment on seed germination. In: Fenner, M. (ed). *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities* (2nd edn). CABI Publishing, London. 293-309 pp.
- Ishikawa-Goto, M. & Tsuyuzaki, S. 2004. Methods of estimating seed banks with reference to long-term seed burial. *Journal of Plant Research* **117**: 245-248.
- Roche, S., Koch, J.M. & Dixon, K.W. (1997) Smoke enhanced germination for mine rehabilitation in the southwestern of Western Australia. *Restoration Ecology* **5**: 191-20.
- Telewski, F.W. & Zeevaart, J.A.D. (2002) The 120-yr period for Dr. Beal's seed viability experiment. *American Journal of Botany* **89**: 1285-1288.
- Ter Heerdt, G.N.J., Verweij, G.L., Bekker, R.M. & Bakker, J.P. (1996) An improved method for seed-bank analysis: seedling emergence after removing the soil by sieving. *Functional Ecology* **10**: 144-151.
- Traba, J., Levassor, C. & Peco, B. (1998) Concentrating samples can lead to seed losses in soil bank estimations. *Functional Ecology* **12**: 975-976.
- Tsuyuzaki, S. (1989) Contribution of buried seeds to revegetation after eruptions of the volcano Usu, northern Japan. *Botanical Magazine, Tokyo* **102**: 511-520.
- Tsuyuzaki, S. (1990) Revegetation dynamics in early successional stages of the volcano Usu, northern Japan, after the 1977-78 eruptions. 北海道大学学位審査論文.
- 露崎史朗 (1990) 埋土種子の研究法 -種子の教材利用-. *生物教材* **25**: 9-20.
- Tsuyuzaki, S. (1993) Seed viability after immersion in K_2CO_3 solution. *Seed Science and Technology* **21**: 479-481.
- 露崎史朗 (1993) 火山遷移は一次遷移か. *生物科学* **45**: 177-181.
- Tsuyuzaki, S. (1994) Rapid seed extraction from soils by a flotation method. *Weed Research* **34**: 433-436.
- 露崎史朗 (2001) 火山遷移初期動態に関する研究. *日本生態学会誌* **51**: 13-22.
- Tsuyuzaki, S. & Goto, M. (2001) Persistence of seedbank under thick volcanic deposits twenty years after eruptions of Mount Usu, Hokkaido Island, Japan. *American Journal of Botany* **88**: 1813-1817.
- Walker, L.R. & del Moral, R. (2003) *Primary succession and Ecosystem Rehabilitation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- White, P.S. (1979) Pattern, process, and natural disturbance in vegetation. *Botanical Review* **45**: 229-299.

あ と が き

オーストラリアに滞在中の露崎氏からはじめて電子メールが届いたのは5月中旬のことでした。それは、10月末にミニシンポジウムを開催するので是非出席して欲しいという内容でした。研究生生活から離れて久しい—老人の私をわざわざ誘ってくれるのだから、きっと特別な意図が隠されていそうですので、すぐには返事をせずに露崎氏を悩ませて仕舞いました。ともあれ、もとの研究室の大勢の良き仲間と再会できる喜びと、そのごの研究展開について個々人から直接お話を伺える格別の期待感から、ついには出席するという返信メールを送って仕舞いました。

私自身は低温研に奉職して以来、植物の寒冷適応機構の生理生化学的な解明を中心に研究を進めたつもりですが、いつの間にか周囲には植物の生命現象の分子生物学的な解明を目指す方々のほかに、北方植物の生き様を生活史や生活型に着目しながら解き明かそうとする人々や、火山噴火後の植生回復と旧表土に埋もれた種子の役割に注目して研究する人など、個性豊かな面々が揃って研究室は活況を呈しておりました。ときには仲間同志で凄まじい激論が戦わされこともありましたが、概ね耳学を通してお互いの学問的好奇心が充足される日々も多かったのではないのでしょうか。いま思いますと、お互いに非常に幅広い研究視野を育むことが出来たのではないかと思うのですが、その反面、大変まとまりに欠けた研究者集団であったのかも知れません。

かつて、同じ屋根の下で研究生生活を共にした研究仲間が、それぞれ優れた能力を発揮して独自の研究領域を開拓し、その第一戦で活躍しておられることを知り非常に嬉しく思います。今後もさらなる大きな目標に向かって邁進されることを強く念願します。

最後に、このような素晴らしい機会を与えて下さる皆様方のご厚意に心底より感謝を申し上げます。

以上

2004年10月

吉田静夫

編集後記

本冊子は、シンポジウム「植物科学の新展開: 分子から群集まで」の企画賛同者による投稿原稿で構成されている。

ところで、本シンポジウム開催は、実は7年前から決まっていたように思える。前島大会会長挨拶中にあるように、この冊子の執筆者は、多かれ少なかれ、北海道大学 低温科学研究所植物凍害科学部門で吉田静夫先生に世話になった面々である。吉田先生が退官なされてから、はや7年が過ぎ、植物凍害科学部門という名前は低温科学研究所からいつの間にか消えてしまった。しかし、本冊子を読まれば、その魂は縄張りを広げながら成長していることが分かる。さらに、この面子を集合せれば、「分子から群集まで」を包含した議論に熱が入るのは必然なことも分かる。これだけ多様な人材を輩出した研究室は他には類を見ないのではないだろうか。そういう訳で、迷うことなく本冊子のタイトルは、「植物科学の新展開 ... 広視野研究をめざす」となった。

改めて内容を読み直すと、大幅な構成の変更は

必要だろうが、大学教養等の生物学で「分子から群集まで」を扱う教科書として十分活用できるものとなっていると思う。そればかりか、個々の報告は自分の研究をベースに、その分野での最先端部分をも紹介している。これらを包含し、かつ最先端科学を目指す新展開を図るには、今まさに一同が一箇所に集まり議論するのも自然の流れだろう。この力の源は、冊子中の随所に書かれているエピソードに起因しているのも確かである。私(露崎)が、吉田先生の言葉で忘れられないのは、

「実験は失敗した時が一番楽しいねー」、
である。これが吉田先生の本音かどうかはさておいて、私は、学生が研究に行き詰まったように見えると良くこの話をし、そして自分にも言い聞かせている。

本当に最後になりましたが、企画から開催に至るまで、紙面が許さないほど多くの方のお世話になりました。皆様にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。7年後には、さらにすばらしい未来を、また皆で語れる場ができることを信じつつ筆を置かせて頂きます。

(編集委員)

2004年10月29日 発行

先端シンポジウム 植物科学の新展開 - 分子から群集まで広域視野研究をめざす -

発行者

シンポジウム「植物科学の新展開」大会会長 前島正義
〒464-8601 名古屋市千種区不老町
名古屋大学生命農学研究科 細胞ダイナミクス研究室

印刷

シンポジウム「植物科学の新展開」事務局
〒060-0810 札幌市北区北10条西5丁目
北海道大学大学院地球環境科学研究科

Community



問い合わせ先: 北海道大学大学院地球環境科学研究科
シンポジウム「植物科学の新展開」事務局 (担当: 露崎)
Tel: 011-706-2283, Fax: 011-706-4954
E-mail: tsuyu@ees.hokudai.ac.jp