

発表番号 13

浸透圧調節因子による植物の塩ストレス応答機構と

その農業生産への応用

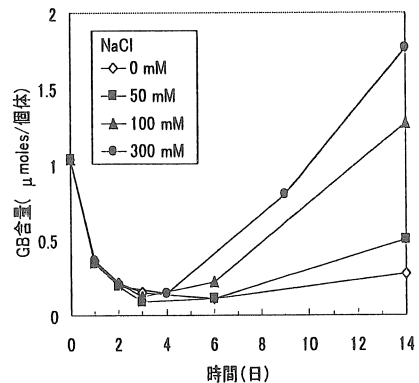
助成研究者 山崎 素直 (長崎大学環境科学部)
 共同研究者 高尾 雄二 (長崎大学環境科学部)
 同 張 経華 (長崎大学環境科学部)

【目的】 今世紀最大の問題の一つは食糧問題である。急増する世界人口に見合う食糧を確保するには、優良農地のみならず環境ストレスの強い地域を農地として有効利用すること、さらにそれは環境を破壊することのない持続可能な農業として行なわれなければならない。そのためには植物本来の形質を有効利用することが必要である。本研究では広大な塩類土壌地帯での作物生産に着目し、植物の耐塩性機構を検討した。塩ストレス下で好塩性植物ビートと塩生植物シチメンソウの育成を行い、栽培方法の検討および浸透圧調節因子(適合溶質)の一つであるグリシンベタイン($(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ (GB))のキャピラリー電気泳動法を用いた分析を中心に、植物の生育段階における塩ストレス応答を調べた。

【方法】 実験植物は0、50、100、300 mMの塩ストレス下で栽培し、栽培方法を検討した。ビートでは、水耕栽培、シャーレ培養、土耕栽培、シチメンソウでは土耕栽培を行った。栽培した植物のGB含量、葉面積、水分含量、クロロフィル含量、可溶性タンパク質含量、可溶性糖類総量の測定を行い、植物の生育段階における塩ストレス応答を考察した。

【結果と考察】 ビートは土耕栽培で発芽率が90%以上であった。ビート土耕栽培の試料を分析した結果、種子および発芽前まではGBは減少し、発芽後増加すること、また、GBの増加は培地塩濃度依存的に増加することが分かった(図)。このことから、ビート種子には1個体あたり $1\mu\text{mol}$ 程度のGBが含まれており、これが培養開始から発芽前までは培地中へ溶出するために減少すること、発芽期を境に植物によるGBの生合成が活発に行なわれ、塩ストレスに対応していることが分かった。なお種子に含まれるGBの大部分は種子を取り囲む殻の部分に集積されていることが確かめられた。

また、培地塩濃度の増加により、葉の生育量、葉中の水分含量およびクロロフィル含量が減少した。このことは細胞が膨圧を失い気孔を閉じるので、光合成が低下し生育は抑制されてクロロフィル含量が減少したと考えられる。培地塩濃度に対する可溶性糖類総量、可溶性タンパク質含量は培地塩濃度による大きな差は見られなかった。ビートは好塩性植物であるが、さらに耐塩性の弱い作物でのストレス応答がどうなっているのか、また、耐塩性のない作物にGBを投与して耐塩性を付与できるかなど、今後の研究が必要である。



図：培地塩濃度に対するビート種子の発芽期におけるGBの変化

30

助成番号 0230

浸透圧調節因子による植物の塩ストレス応答機構とその農業生産への応用

助成研究者 山崎 素直 (長崎大学環境科学部)

共同研究者 高尾 雄二 (長崎大学環境科学部)

同 張 経華 (同外国人客員研究員)

1. 研究目的

植物は一般に高い塩濃度環境下では吸水阻害である浸透圧ストレスと体内に侵入した塩が代謝を乱す電解質ストレス (イオンストレス) を受ける。その結果, 植物細胞は膨圧を失って気孔を閉じ, 光合成能が低下して生育が大きく抑制される¹⁾²⁾。一方, 陸地で 100 mM を超える塩分が存在しても生活環をまっとうできる好塩性植物がある。これらの植物は高い塩濃度に適応するために, 根における Na の排除能, 地上部の移行制御能, Na 集積植物体内の高塩濃度耐性, 形態変化による耐塩性の獲得, 細胞内の浸透圧調節機能など, さまざまな耐塩性機構を持っている³⁾。

浸透圧調節機構はもっとも多くの植物で見られるケースで, 浸透圧を調節する物質 (適合溶質) を誘導合成することによって細胞内浸透圧を調節していく仕組みである。この適合溶質としては, 水溶性低分子で, 代謝されにくく, かつ高濃度細胞内に蓄積しても代謝系の酵素活性を阻害しない物質で, 糖類 (マンニトール, フラクタン, トレハロースなど), アミノ酸, ベタイン類などが知られている。その中にベタイン類は, 分子内にカルボキシル基を持つ四級アンモニウム化合物の総称であり, 高等植物においてアカザ科, イネ科, ナス科などに広く存在している⁴⁾。ベタイン類やその関連化合物としては, グリシンベタイン (GB, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$) をはじめ, β -アラニンベタイン, プロリンベタイン, トリゴネリン, ジメチルスルホニオプロピオン酸塩などが知られている^{5)~7)}。これらの適合溶質は塩ストレスだけでなく乾燥ストレス, 低温ストレスなどを含めた浸透圧ストレスに共通して深く関わっていることが知られている⁸⁾。

GB はベタイン類のうち最も広く存在し, ベタインの名前の由来であるビート (サトウダイコン, *Beta vulgaris*) の糖蜜中に高濃度で含まれている。ビートは高塩培地の中でも正常に生育することができる代表的な好塩性植物である。本研究では, 高等植物の耐塩性機構を解明するため, キャピラリー電気泳動など分析手法を用いて, ビートの生育段階における耐塩性因子の GB の誘導合成と植物の成長, 水分, クロロフィル, 可溶性タンパク質, 可溶性糖類含量の測定を行い, 塩ストレス負荷下の応答を調べた。

2. 研究方法

装置と試薬： 分光光度計は島津製 UV-160 を用いた。キャピラリー電気泳動装置は、Waters Quanta-4000E を用い、使用したキャピラリーは 75 μm i.d. \times 60 cm (有効長 50 cm)、検出は 254 nm で行った。測定温度 25°C で、サンプリングは落差法 10 cm \times 10 s で行い、印加電圧は 15 kV とした。

エステル化用の *p*-ブロモフェナシルブロミドは東京化成製を使用した。標準品の GB、タンパク質定量用キットおよび他の試薬はすべて和光純薬製の試薬特級のものをを用いた。脱イオン水は Milli-Q (日本ミリポア製) を使用した。試料は乳鉢中で液体窒素を用いて粉碎した。

ビートの栽培および試料の採取： 実験用ビート種子は北海道産飼料用ビート (シュガーマン G, 2002 年 10 月ホクレン農業協同組合連合会より供与いただいた) を使用した。

ビートの土耕栽培は市販の種まき専用培養土 (大石物産) 2 L を入れたプランター中で行った。4 つの容器に対して、それぞれ NaCl 含量が 0, 50, 100, 300 mM となるように NaCl 溶液を加えた。殻 (外種皮) つきの種子を 6 時間水に浸漬してから種まきを行い、コイトロン (KG-50HLA 型, 小糸工業株式会社製) 内に入れた。培養条件の設定は温度 25°C, 湿度 55%, 照明 12 時間 ON/OFF ごと変換した。1 日に 1 回 0.1% のハイポネックス栄養液をそれぞれに 250 ml 加えた。発芽率は 90% 以上であった。

試料の採取については生育応答調査に対して一週間目、他の分析は二週間目の葉あるいは全株を採取した。

植物の生育応答調査： 葉面積を測定して生育量とした。4 つの容器ごとビートの葉を 6 枚ずつ無作為に採取し、400 倍に拡大コピーして葉の形に切り取ってから重さを測定し、これをコピー紙の比重 (重量/面積) で除して葉面積を求めた。

水分含量： 採取したビートの葉を 1 g 量り、80°C のオーブンで 24 時間乾燥後、乾燥重量を量って水分含量を換算した。

クロロフィル含量： 葉 0.3 g を乳鉢ですりつぶし、80% アセトン溶液 10 ml を加えてクロロフィルを抽出した。抽出液を遠心し、上清液の吸光度 645 nm (A_{645}) および 663 nm (A_{663}) を測定した⁹⁾。

クロロフィル濃度は次式から求めた。

$$C (\text{g/L}) = 0.00805A_{663} + 0.0203A_{645}$$

可溶性タンパク質： 粉碎した葉 1 g に対して、4 ml の緩衝液 (35 mM, KH_2PO_4 ; 400 mM NaCl; 10 mM 2-mercaptoethanol; 1M NaOH にて pH 7.6 に調整) を加え抽出した¹⁰⁾。遠心分離 (5000 rpm, 15 分, 4°C) した上清 50 μl をタンパク質定量キットを用いて 600 nm の吸光度を測定した。

可溶性糖類： 粉碎した葉 1 g に対して 10 ml の水で抽出した。遠心分離機にかけ、上清 0.1 ml を試験管にとり、0.2%アントロン硫酸溶液を 2 ml 加えて、よく攪拌してから 10 分後に 620 nm の吸光度を測定した⁹⁾。

GB の分析： ビートの殻つき種子は 10 個、発芽後の幼植物は殻を含めて全株 10 本を乳鉢ですりつぶし、10 ml の水を入れ恒温槽で 80°C、20 分間抽出した。抽出液を *p*-ブロモフェナシルブロミドを用いてエステル化した後、50 mM、pH 3.5 のリン酸塩泳動液を使用して、キャピラリー電気泳動装置により分析した¹¹⁾¹²⁾。

3. 結果と考察

3・1 塩ストレスに対するビートの応答

植物は進化の過程でさまざまな環境ストレスに対して速やかに反応して適応する機構を獲得してきた。培地の塩濃度の増加は植物の成長、細胞の種々生理機能に大きな影響を与える。図 1 に異なる土壌塩濃度に対するビートの応答として、生育量、水分含量、クロロフィル量、可溶性タンパク質量、糖含量および GB 含量の変化を示した。

図 1a に生育量を示す。培地塩濃度の増加に伴って葉面積は明らかに減少することが示された。すなわち、好塩性植物であっても強い塩環境中で生育妨害を受けることを示唆している。水分含量の変化(図 1b)は、培地塩濃度 0~100 mM の範囲であまり変化しないが、300 mM になると減少した。この結果から、好塩性植物のビートは 100 mM までの塩ストレスを受けても細胞内の水分を維持しているが、その以上の塩濃度下では細胞内の水分は急速に失われることが分かった。培地塩濃度に対するクロロフィルの量的変化を図 1c に示す。培地塩濃度の増加とともに、クロロフィル量は減少傾向を示した。これらの結果は、高等植物は塩ストレスを受けると、水含量の減少、光合成の低下、そして生育が大きく阻害されることを示している。

葉中の可溶性タンパク質の量的変化を図 1d に示す。培地塩濃度 0~100 mM の範囲で、タンパク質量は少々増加したが、300 mM まで減少が見られた。可溶性糖類の変化も調べた(図 1e)。植物の葉に含まれる可溶性糖類には、主に単糖類としてグルコースとフルクトース、二糖類としてショ糖、多糖類としてフルクトサンなどがある。筆者の別の実験で塩感受性植物である大根、レタスおよび豆類では培地塩濃度に対抗して糖類総量が増加する傾向が見られたが、好塩性植物のビートでは 50 mM NaCl で少々変動した以外、減少の傾向を呈していた。

図 1f に GB の変化量を示す。培地塩濃度の増加とともに、GB は種子一個あるいは一株にあたり 0.25 μ mole から 1.75 μ mole まで約 6 倍の増加を示した。なお、ここでいう種子一個体あるいは一株とは、殻(外種皮)に覆われ内部に通常 2,3 個の種子を含むものを一

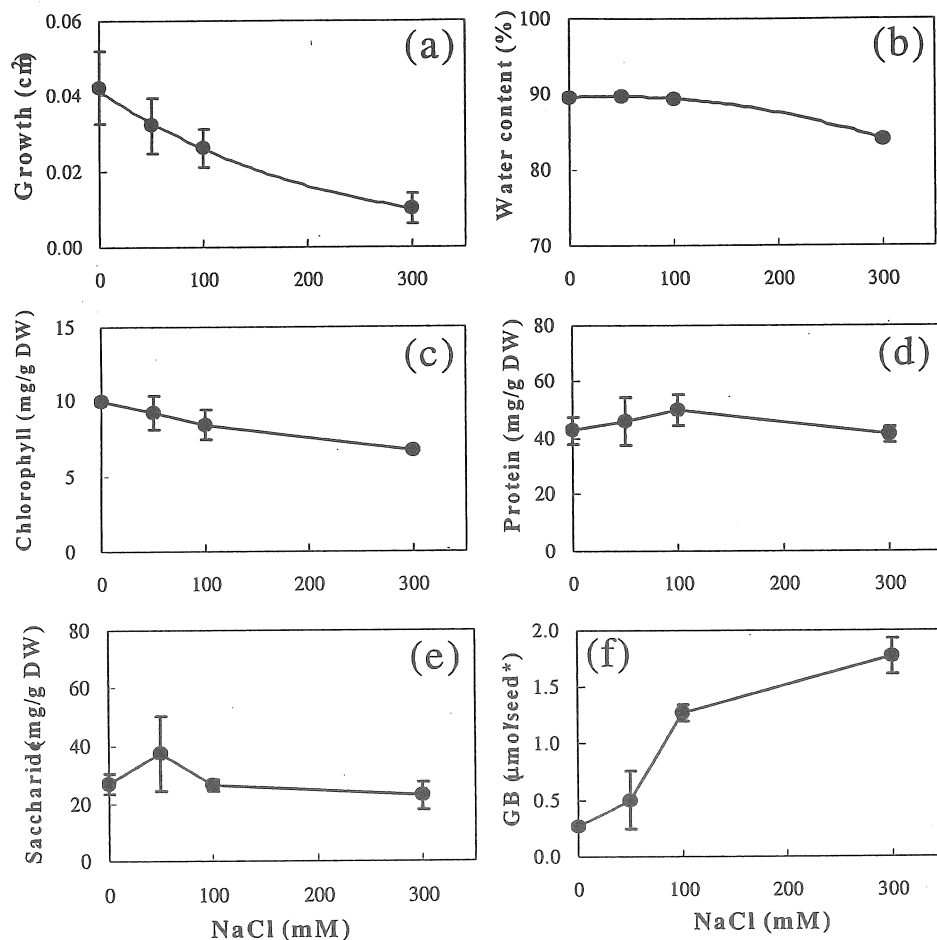


Fig. 1 Responses of sugar beet to salt stress on growth (a) and cellular components; water (b), chlorophyll (c), soluble protein (d), soluble saccharide (e) and glycine betaine (GB) (f). The values are the average of those obtained by three separate leaves except (b). *: seed or seedling

個体といい、その発芽した幼植物を一株と表現した。殻が硬く分離できなかったために殻ごと播種した。また、塩濃度 0 mM は殻つき種子そのものの GB 量を示す。図 2 にビート葉中の GB を分析したときのキャピラリー電気泳動図を示す。緒言に述べたように、高等植物中に糖類、アミノ酸、ベタイン類など適合溶質が広く存在しているが、好塩性植物ビートでは、GB が主な適合溶質として塩ストレス応答していることが示された。

3・2 種子中の GB 蓄積および生育段階での塩ストレスによる誘導合成

植物の生育にともない GB が合成・蓄積されることは示されたが、種子中にもともと GB が存在するか、また、種子の発芽のどの過程で GB 合成が始まるのかという点については、これまで明瞭な説明がなされていない。本研究では、ビートの種子、培養初期段階（土耕

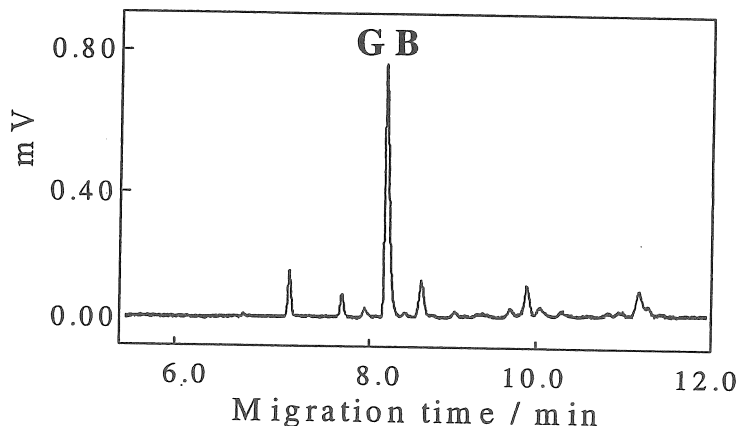


Fig. 2 Electropherogram of a leaf extract of sugar beet detected at 254 nm. The other conditions are described in the reference (11).

栽培を始めてから1~2日目), 発芽段階(3~4日目), 芽生え段階(6~9日目), 生長段階(2週間目)の個体についてGB量の変動を測定した。殻つき種子および幼植物を分析試料とした。図3に異なる土壌塩濃度でのビートの生育に対する個体中のGB含量を測定した結果を示す。土耕栽培では, 培地塩濃度により生育速度が異なるので, 図3に示すように塩濃度0~100 mMでは, 3日目に発芽試料, 6日目に芽生え試料を採取した。一方, 300 mMでは, 4日目に発芽試料, 9日目に芽生え試料を採取した。

種子1個体中には平均1 μmole のGBが含まれていた。初期段階(1~2日目)から発芽段階(3~4日目)にかけてGB量は0.2 μmole 程度まで減少した。以後発芽段階後半から芽生え段階(6~9日目)にかけて全株中のGB量は塩濃度依存的に増加した。特に300 mM NaClでのGBは著しい増加を示した。このことから0~4日までのGBの減少から, ビート種子は初めからGBを保持していること, 栽培中に種子中から溶出すること, さらに溶出すると同時に発芽段階後半の4日目あたりから合成が始まることが分かった。

一方, この種子中に含まれるGBは殻に含まれるのか, 種子そのものに含まれるのかを知るために殻と種子の分離を試みたが, 硬く密着しており分離できなかった。種子からのGB減少を示す図3の実験結果, および殻つき種子を水に浸漬すると容易にGBが溶出してくることから, 恐らくGBは殻のほうに含まれていることが推察されたが, 今後確認実験を行なう予定である。

以上の結果から, ビートは種子中に一定量のGBを蓄積し, 発芽期までそれを消費する。そして幼芽は塩ストレスを感受して, 芽生え期に新たにGBを合成し始めることがわかった。GBはコリンよりコリンモノオキシゲナーゼおよびベタインアルデヒド脱水素酵素による2段階の反応によって合成される。今後, これら酵素の遺伝子の転写レベルの活性増加がどの段階で発現されるかを調べることによってさらに詳細なGB合成発現の仕組みを

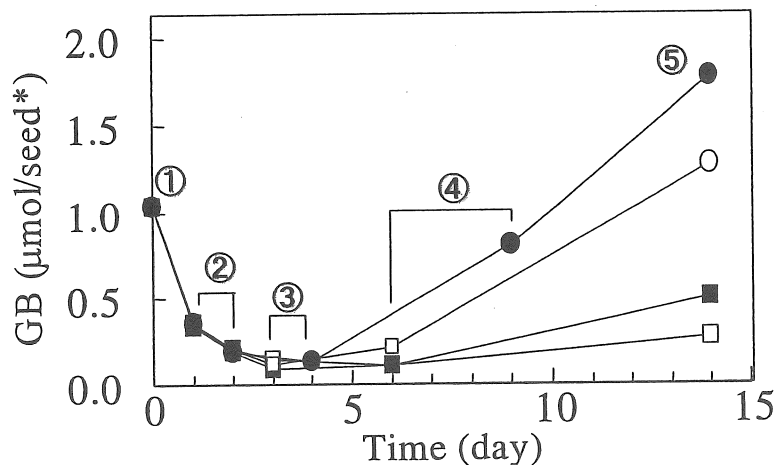


Fig. 3 Release and synthesis of GB during germination of sugar beet under salt stress. □: 0 mM NaCl; ■: 50 mM NaCl; ○: 100 mM NaCl; ●: 300 mM NaCl

解析する予定である。

文献

- 1) T. Liu, J. V. Staden: *Plant Growth Regul.*, **33**, 13 (2001).
- 2) Y. El-Iktil, M. Karrou, M. Benichou: *Agronomie*, **20**, 399 (2000).
- 3) 間藤 徹: *植物の化学調節*, **32**, 198 (1997).
- 4) I. Tozlu, G. A. Moore, C. L. Guy: *Aust. J. Plant Physiol.*, **27**, 35 (2000).
- 5) T. G. Colmer, F. Corradini, M. L. Otte: *Phytochem. Anal.*, **11**, 163 (2000).
- 6) M. Adrian-Romeo, S. J. Wilson, G. Blunden, M. Yang, A. Carabot-Cuervo, K. Bashir: *Biochem. Syst. Ecol.*, **26**, 535 (1998).
- 7) K. D. Nolte, A. D. Hanson, D. A. Gage: *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **122**, 8 (1997).
- 8) 今井亮三: *化学と生物*, **5**, 294 (1996).
- 9) 田村太郎: “*栄養診断のための栽培植物分析測定*”, p. 272 (1976), (養賢堂).
- 10) W. J. Wolf: *J. Agr. Food Chem.*, **18**, 969 (1977).
- 11) 張 経華, 大久保 明, 山崎 素直: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **46**, 275 (1997).
- 12) J. Zhang, X. XU, N. Nishimura, M. Abo, A. Okubo and S. Yamazaki: *Anal. Sci.*, **17** Suppl, i1315 (2001).

Stress-response mechanism by osmoprotectants in plants under saline condition and their application to agricultural production

Sunao Yamazaki, Yuji Takao and Jinghua Zhang
Faculty of Environmental Studies, Nagasaki University
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521

Summary

The acclimation of a plant to a constantly changing environment involves the accumulation of certain organic compounds of low molecular mass, known collectively as compatible solutes, in the cytoplasm. The evidence from numerous investigations of plants strongly suggests that glycine betaine (GB), an amphoteric quaternary amine, plays an important role as a compatible solute under various types of environmental stress, such as high levels of salts and low temperature. In this work, sugar beet (*Beta vulgaris*) was grown at NaCl concentrations up to 300 mM and the effects of salt on the growth, contents of water, chlorophyll, soluble protein, soluble saccharide and GB in leaf were measured. GB was very well determined by low pH capillary electrophoresis, the measuring condition of which we developed previously. With increasing NaCl concentration in the medium up to 300 mM the growth was significantly retarded. Contents of water and chlorophyll decreased, whereas soluble protein and saccharide concentrations in the leaf changed little. On the other hand, GB concentration increased 6-fold with increasing salinity of the medium, suggesting that GB is a main osmoprotectant in this plant. In order to make clear the time when GB is induced in the plant cells, the seeds were cultured under various salt stress conditions and the seedlings were analysed by capillary electrophoresis. It was found that beat seeds originally possess micro levels of GB and it was lost during early stage of cultivation, while new GB was synthesized in the stage of germination in a dose-dependent fashion with respect to salt concentration in the medium.