
助成研究報告書

農学・生物学プロジェクト研究

(2005－2007年度)

好塩性生物の研究 ー基礎と応用

Project Research on Halophilic Organisms

The Salt Science Research Foundation
Project Research Report

平成21年3月



財団法人ソルト・サイエンス研究財団

プロジェクト研究報告書 目次

農学・生物学分野

05B-07B 好塩性生物の研究 ―基礎と応用

| | | |
|---|--|----|
| 1 | はじめに 村田 紀夫 | 1 |
| 2 | 紅藻 <i>Bangia</i> 属淡水産種の好塩性の解明 (05B1 - 07B1) 村上 明男 (神戸大学) | 3 |
| 3 | 海洋性珪藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> の好塩性機構の解明 (05B2 - 07B2) 松田 祐介 (関西学院大学) | 21 |
| 4 | 好塩性酵素の好塩性メカニズムを産業的に利用する (05B3 - 07B3) 徳永 正雄 (鹿児島大学) | 39 |
| 5 | 塩による高品質作物の作出のための植物の塩ストレス状態の定量的評価方法の開発 ーマイクロウェーブを利用した方法 (05B4 - 07B4) 下町 多佳志 (長崎大学) | 55 |
| 6 | 海洋深層水濃縮廃液を活用した高品質高糖度トマトの多段周年栽培の実用化 (05B5 - 07B5) 北野 雅治 (九州大学) | 75 |
| 7 | まとめ 村田 紀夫 | 95 |

CONTENTS

PROJECT of AGRICULTURE and BIOLOGY

Project Research on Halophilic Organisms

| | | |
|---|---|----|
| 1 | Introduction | |
| | Norio Murata | 1 |
| 2 | Halophilicity of Freshwater Bangiacean Red Algae (05B1 - 07B1) | |
| | Akio Murakami (Kobe University) | 3 |
| 3 | Characterization of Salt Response Mechanisms in the Marine Diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (05B2 - 07B2) | |
| | Yusuke Matsuda (Kwansei-Gakuin University) | 21 |
| 4 | Halophilic Mechanisms and Industrial Application of Enzymes from Halophiles (05B3 - 07B3) | |
| | Masao Tokunaga (Kagoshima University) | 39 |
| 5 | Development of a Quantitative Evaluation Method of Plant Response in Salt Stress for High -Quality Crop Production Using Microwave Sensing (05B4 - 07B4) | |
| | Takashi Shimomachi (Nagasaki University) | 55 |
| 6 | Application of Concentrated Deep Seawater for Multi-Truss and Year-Round Production of High Quality Tomato (05B5 - 07B5) | |
| | Masaharu Kitano (Kyushu University) | 75 |
| 7 | Conclusion | |
| | Norio Murata..... | 95 |

1. はじめに

プロジェクト研究リーダー 村田 紀夫

多くの生物にとって、高い塩濃度は有害であり、生物の成育・繁殖を抑制し、最終的には地球規模の砂漠化や農業生産性の低下の主要な原因となっている。これに対し、海浜植物や塩分の多い砂漠に生える植物のように、高塩濃度下においてより良く生育・繁殖する生物もまた多い。また海藻類や海産性貝類には塩水中でよく生育するが、淡水中では生育できない生物も多い。このように塩の存在が生育・繁殖に有利に働く生物の一群は好塩性生物と呼ばれる。

当プロジェクト研究「好塩性生物の研究－基礎と応用」の下では、このような好塩性生物の特異な性質がどのようなメカニズムに根ざしているのかを明らか

にする基礎研究と、生物の好塩性を有効利用する方策を開発する応用研究をおこなうことを目的とした。

公募には22件の応募があり、当プロジェクト研究にもっとも相応しいと判断された5件が採択された。プロジェクト研究の開始時においては、助成研究者に、好塩性と耐塩性の違いや、プロジェクト研究の目的が十分に理解してもらえず、順調な滑り出しとは言えなかった。しかし、これらの問題は順次解決されて研究は活発となり、以下の報告のように、好塩性生物の理解と有用性に多くの知見を得られ、「好塩性生物学」という新しい研究分野の基礎を確立することが出来た。

紅藻 *Bangia* 属淡水産種の好塩性の解明

村上 明男

神戸大学・自然科学系先端融合研究環・内海域環境教育研究センター

概要 大型藻類は、その95%以上の種が安定した高塩環境である海洋に限定して生育することから、好塩性生物として位置づけることが出来る。一部の大型藻類は、周期的に干出する潮間帯上部あるいは河口域の塩濃度が不安定な汽水域にも分布を拡大しており、これらの種は水分、温度、塩濃度などの急激な変化に対応するためのストレス耐性や環境馴化能を獲得しているものと思われる。また、稀ではあるが、山間部などの渓流域や湧水域を含めた淡水環境に局所的に分布する大型藻類も知られている。これらの淡水産種の多くは温泉水や石灰岩成分の影響を受けた湧水域周辺に限定して分布する傾向も見られることから、これらの淡水産種の生育要因として特定の水質条件や溶存成分の関与が強く示唆されている。一方、淡水産大型藻の中には、海産の汎存種に近縁種が存在することも明らかにされている。一般的に海藻類と呼ばれているように、大型藻類は海の中で進化・多様化・種分化し、その一部の種が特定の条件を満たす淡水環境に進出、適応してきたものと考えられる。従って、海藻類がどのようにして淡水環境に馴化あるいは適応してきたかは興味深い。淡水環境に適応した大型藻類について、塩をはじめとする溶存成分や水質要因に対する生理応答性を近縁海産種と比較解析することで、大型藻類がもつ好塩性やその仕組みが解明出来るものとする。

プロジェクト研究「好塩性生物の研究－基礎と応用」の分担課題として、標記の研究課題を設定した。原始紅藻綱ウシケリ目ウシケリ科 *Bangia* 属に属する淡水産の稀少種と海産の汎存種について、国内産地から採集した藻体をもとに複数の系統保存株の確立を進めると共に、塩濃度を変えた各種の培地を作成して成長生理学的な比較解析を行った。その結果、海産種は75%濃度の海水を含む培地での成長が最も良いとの結果が得られた。一方、淡水産種は、既存の淡水藻類用培地では死滅したが、25%濃度の海水を含む栄養塩添加培地、あるいは特定の塩成分を豊富に含む特殊な培地でのみ顕著な成長促進が見られた。淡水産種の自生地の水質データなども併せ、*Bangia* 属淡水産種について海産種との比較をしながら、成長の限定要因についての検討を行った。

1. 研究の背景と目的

紅藻、褐藻、緑藻などを含む多細胞体制の大型藻類は、世界で8,000種以上が記載されている。大型藻類の95%以上は海産種から構成され、一般的に海藻類(Seaweeds)と称されるように主に沿岸域の潮間帯から斬深帯の岩上や他生物などに付着して生育する。塩濃度などの水質は水生生物の重要な環境要因であるが、海水の環境に適応・繁栄している海藻類(大型藻類)は、塩環境を好む典型的な好塩生物とみなすことが出来る。一方、海藻類の一部の種は、潮間帯上部、タイドプール、河口域周辺、マングローブ、などの潮汐に伴い塩濃度などの環境条件が大

きく変化する場所にも生育している。これらの生育場所では、陸水や降雨により塩濃度が変化する他、干出による乾燥や直射光(紫外線)への暴露、急激な温度変化、など環境の変動が大きい。これらの環境の攪乱が大きい場所で一部の海藻類だけが生存できるのは、これらの複合的な環境ストレスに対する耐性や適応能が関与するものと思われる。

一方、内陸部や山間地の淡水域では、特定の大型藻類が水質の安定した水環境にまれに局所分布することがある。これらの淡水産大型藻類の分布要因として、電気伝導度やpHに代表される水質要因が深く関与することが示

唆されている。特に、石灰岩地帯などの湧水地では大型藻類の繁殖が安定して持続することが多い。これらの湧水の硬度(電気伝導度)は一般的に高く、カルシウムイオンや炭酸イオンなどが豊富に含まれている。しかし、淡水産の大型藻類は小型で単純な体制をもつものが多いため、海藻類のように目立つことは少ない。従って、特に山間地域の渓流域に局所分布する淡水産藻類の調査は遅れている。

緑藻カワアオリなどの淡水産大型藻の分子系統解析によると、多くの場合淡水産種は海産近縁種の系統の中に含まれる。淡水産種は近縁の海産種から派生したものと推定できる。すなわち、好塩生物である大型藻類(海藻類)の中で淡水の低塩濃度の環境に適応した種が淡水産種として分化したものと考えられる。従って、淡水域に適応した種がもつ生理学的特性を解析し、淡水域での生育を可能にしている環境要因との関係を明らかにすることは、海藻類の好塩性機構の解明にもつながる。形態学的にも分子系統学的にも海産種と類縁の淡水産種の比較解析は特に有効であると思われる。

原始紅藻類に属する *Bangia* 属(ウシケリ目ウシケリ科ウシケリ属)には、日本を含め世界の寒海域から暖温帯海域の岩礁海岸の潮間帯上部の岩に着生(群生)するウシケリ *Bangia fuscopurpurea*、日本周辺の真正紅藻フクロフリ *Gloiopeltis furcat* の藻体上に着生(密生)するフリノウシゲ *B. gloiopeltidicola* が海産種として知られている。ウシケリ科には我々が食用とし、国内外で養殖が盛んに行なわれている *Porphyra* 属(アマリ属)が含まれる。*Porphyra* 属に含まれる種は全て海産である。

Porphyra 属および *Bangia* 属を含むウシケリ科唯一の淡水産種として、タニウシケリ *B. atropurpurea* が古くから知られている。その分布域は北米五大湖(標高~100 m)、中国・パキスタン(~4,000 m)、ヨーロッパ(~650 m)、日本(650~800 m)の特定の産地に点在している。藻体は湖岸の水位線上部や渓流域の飛沫領域の岩上に着生することが多い(Fig. 1 参照)。現在までのところ、タニウシケリの分布は北半球の中緯度地域に限定され、南半球からの報告は皆無である。この中で、中国11地点および国境を接するパキスタン3地点、セルビア2地点における生育状況は詳細に記録されている。国内では、山梨県早川町の雨畑川の支流“奥沢谷”に流れ込む滝や沢に分布

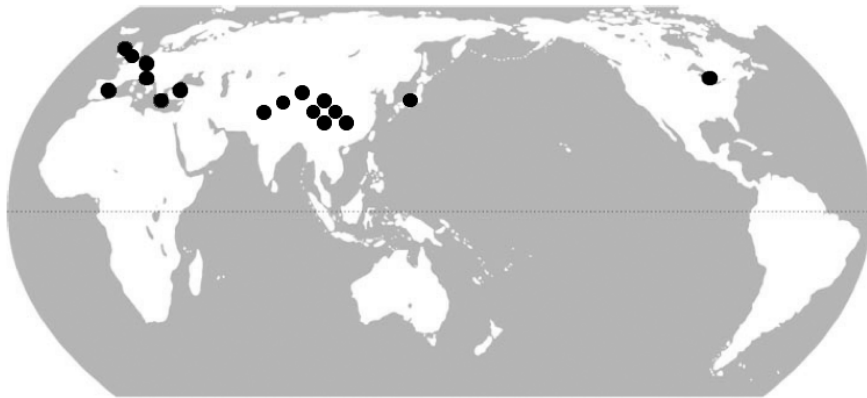
することが1943年の岡田喜一博士の発見以来明らかになっている。また、県境を接する静岡県静岡市の大井川水系の支流である東河内沢1地点に新たな自生地が最近確認された。

海産のウシケリと淡水産のタニウシケリの組織形態は酷似している。日本産の両種の比較解析から、仮根(付着根)の数が倍異なることが唯一の分類形質と報告されている。しかし、仮根数は流速などの生育状況などによって変わる可塑性があると思われ、また採集方法の問題や観察の困難さから有用な分類基準にはなりにくい。海産種と淡水産種を形態学的、細胞学的特徴から区別することは今のところ難しい。このような状況もあり、過去の研究では両種を同種とみなした報告もある。例えば、北米五大湖の淡水産種では、比較的近年になって発見されたため、海産のウシケリがセントローレンス川を遡上する船舶の船体やバラスト石に付着して大西洋から五大湖に移入、適応したとの報告もなされている。しかし、最近の分子系統解析からは海産種と淡水産種はクレードを異にするとの結果が示され、少なくとも近年の人為的要因により淡水産種が出現したとの可能性を否定している。一方で、淡水産種の生育地に関する断片的な情報を整理すると、特定の生育環境(水質)が深く関与していることは明白である。

ところで、現生の紅藻 *Bangia* 属と形態学的特徴が酷似した化石種がカナダ北極域の約12億年前の地層(Hunting 累層)に存在することが1990年に報告され、*Bangiamorpha pubescens* と命名されている。保存状態の良い化石からは、糸状の多細胞体制であるとともに、孢子仮根、細胞分裂の状況も分かることから、真核生物の初期進化の研究対象となっている。この化石種は分類が明確になっている最古の真核生物として、古生物学、海洋生物学、分子系統学の研究分野からも注目されている。

このように原始紅藻 *Bangia* 属は、基礎生物学の研究対象としても重要であるにも関わらず、これまでには分類学的な研究にとどまり生理学的な研究などはほとんど行なわれて来なかった。本研究では、*Bangia* 属2種のタニウシケリ *Bangia atropurpurea* (淡水産種)とウシケリ *Bangia fuscopurpurea* (海産種)について、国内自生地の調査、藻体の採集、培養法の検討、及び培養株の立ち上げを行った。また、確立した培養株について形態学的特徴を比較検討した。さらに、淡水産種タニウシケリの生育を支える

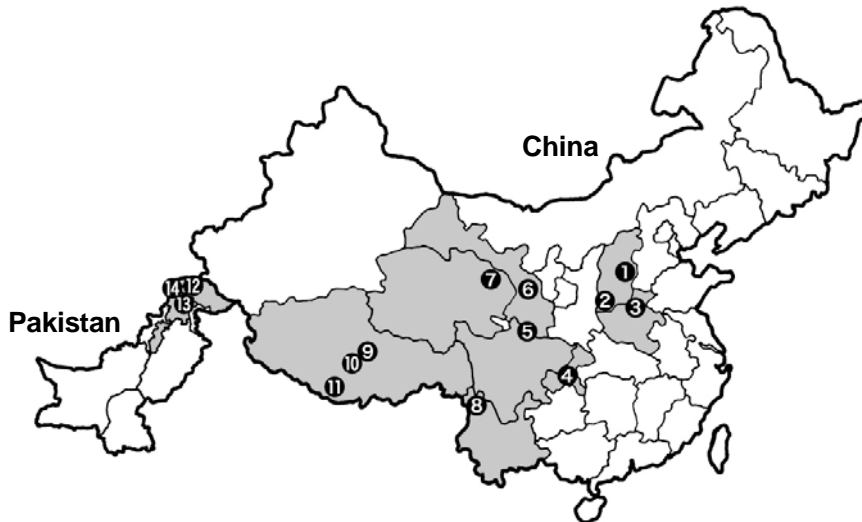
限定要因を明らかにするため、生長生理学的な解析を行った。



Europe



Great Lake



- China ①② 山西省(永濟、平定) ③ 河南省(輝県) ④ 重慶市(北碚) ⑤ 四川省(若爾盖) ⑥ 甘肅省(蘭州)
 ⑦ 青海省(大通) ⑧ 雲南省(徳欽) ⑨⑩⑪ チベット自治区(班戈、申扎、吉隆)
Pakistan ⑫ Gilgit(Nomal・Naltar area) ⑬ Chitral(Arkari Gol) ⑭ Mansehra(Kawai)

Fig. 1. Distribution of freshwater *Bangia*

2. 研究方法

2. 1 藻 株

本研究においては、以下の原始紅藻類 3 種を用いた。*Bangia* 属の種については本研究の中で採集を行ない、日本産の淡水産種と海産種について培養株を作成した。なお、淡水産の *Bangia* については五大湖産の株のみが米国のカルチャーコレクションに保存されている。

2. 1. 1 *Porphyra yezoensis*(海産種)

Porphyra yezoensis (和名:スサビノリ) (紅藻綱・ウシケノリ亜綱・ウシケノリ目・ウシケノリ科・アマノリ属)は、兵庫県農林水産技術総合センターの養殖系統保存株“ナラワスサビノリ HG-4 株”を用いた。PES 培地 (Provasoli's Enriched Seawater) を用い、温度10°C、光強度60~100 $\mu\text{mol photons/sec/m}^2$ 、短日条件下(10 時間明期 - 14 時間暗期の明暗周期)で培養した。海水は淡路島沿岸で晴天時に採水しフィルターろ過後、オートクレーブ滅菌したものを用いた。藻体を三角フラスコ(500 mL)に入れ、HEPAフィルターろ過した空気での無菌的エアレーションにより攪拌培養した。光源には白色蛍光灯(100 V - 20 W, 2 本)を用いた。

2. 1. 2 *Bangia fuscopurpurea*(海産種)

Bangia fuscopurpurea (和名:ウシケノリ, “牛毛藻”) (紅藻綱・ウシケノリ亜綱・ウシケノリ目・ウシケノリ科, ウシケノリ属)は、兵庫県明石市二見町の沖に設置してある浮き流し養殖用のノリ筏の海苔網に“雑藻”として着生していたものを2005年12月に採集した(Fig. 2-2 参照)。また、2007年2月に神奈川県横須賀市荒崎海岸の磯場で干出した岩に帯状に群生している藻体を採集した(Fig. 2-1 参照)。採集した藻体から混生する緑藻ボウアオノリなどの海藻類あるいは微細藻類(珪藻)を実体顕微鏡下で除去することにより単藻化を行なった。単藻化した藻体を保存株として長期間維持するとともに、一部の藻体を各種の実験に供した。培地は PES 培地を用い、温度10°C、光強度10~30 $\mu\text{mol photons/sec/m}^2$ 、短日条件下(10 時間明期 - 14 時間暗期の明暗周期)の条件で静置培養した。保存株用の培養では、透明プラスチック容器(ポリエチレン製)を用いた。また、同じ海産種のフノリウシゲ *Bangia gloiopeltidicota* は、2007年3月に江崎海岸(兵庫県淡路市)の人工護岸に群生するフクロフノリ *Gloiopeltis furcata* (真正紅藻フノリ科)の着生藻の中から分離した(Fig. 2-3)。

2. 1. 3 *Bangia atropurpurea*(淡水産種)

淡水産種の *Bangia atropurpurea* (Roth) Agardh (和名:タニウシケノリ “溪牛毛藻”) (紅藻綱・ウシケノリ亜綱・ウシケノリ目・ウシケノリ科)は2005年5月、2006年4月に東河内沢(静岡県静岡市, 大井川水系の支流)、2008年3月に雨畑川奥沢谷(山梨県早川町, 富士川水系雨畑川の支流)で採集した。これらの藻体をもとに単藻化を行い研究に用いた(Fig. 3-1, -2)。培養には、研究の初期段階にはPES 培地(天然海水)を脱イオン水で 1/4 希釈した希釈海水培地を用いた。その後、本研究の中で検討した結果、市販のフランス原産のミネラルウォーター (Contrex, COURMAYEUR) をベースに栄養塩を添加したものを最終的な培地として開発した。藻体を透明プラスチック容器(ポリエチレン製)に入れ、温度10°C、光強度10~30 $\mu\text{mol photon/sec/m}^2$ 、短日条件(10 時間明期 - 14 時間暗期の光周期)で静置培養した。

2. 2 培 養

2. 2. 1 培養条件

濾過後オートクレーブした天然海水を純水(ミリポア社の純水製造装置 Elix で精製)で段階的に希釈し作成した希釈海水、及び市販のミネラルウォーター (Contrex, COURMAYEUR) を基本的な培養水として用いた。栄養塩類としては PES を標準あるいは 1/4 濃度で加えた。小型培養庫を用い、光強度約35 $\mu\text{mol photons/sec/m}^2$ 、温度 $10.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ を設定し、白色蛍光灯(昼光色, 100 V - 20 W, 2 本)を24時間タイマーでON-OFF制御した短日条件(10 時間明期 - 14 時間暗期の明暗周期)で培養した。

2. 2. 2 培養方法

Porphyra yezoensis の葉状藻体の場合は、コルクボーラー(直径4.5 mm)を用いて藻体を円形にくり抜き、表面組織を傷つけないように留意しながら PES 海水培地を満たした 6 穴マイクロプレートに入れ培養した。

Bangia 属の糸状藻体の場合は、保存培養している大量の藻の塊の中から単列の細胞列の若い藻体を選別し、実体顕微鏡下で藻体の透明な仮根部を齒科用メスで切除し、一本ずつの糸状の藻体に分割した。次に、ガラス細工により先を細く引いたキャピラリーピペットを用いて実験に適したサイズの藻体を選別し、1/4 海水 PES 培地あるいはミネラルウォーター培地に移し、約1日間の前培養を行った。実験培養には 6 穴マイクロプレートを用い、培養庫

内で静置培養した。

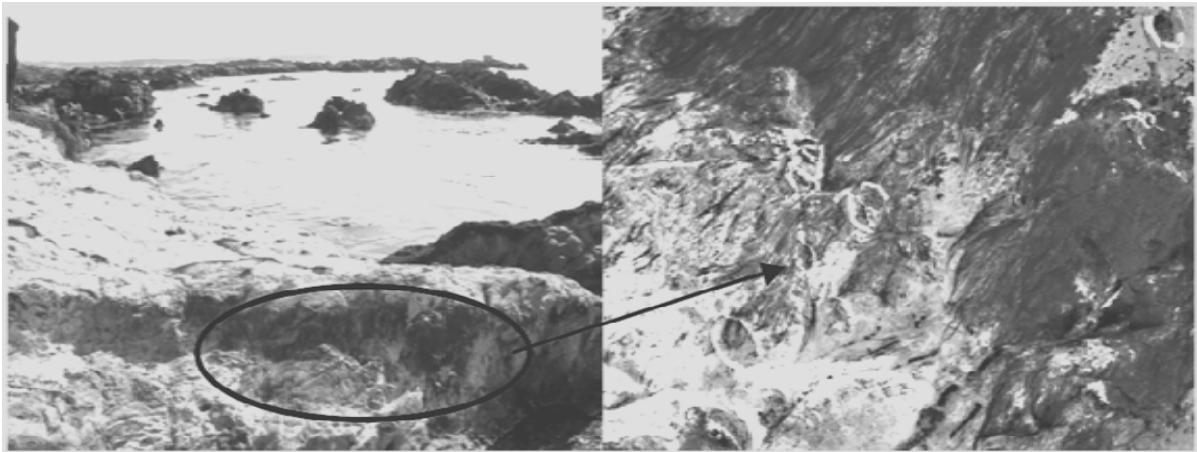


Fig. 2-1. Habitat of marine *Bangia* (*B. fuscopurpurea*) at Arasaki (2007. Feb)



Fig. 2-2. Marine *Bangia* (*B. fuscopurpurea*) on the net used for Nori cultivation float (2005. Dec)

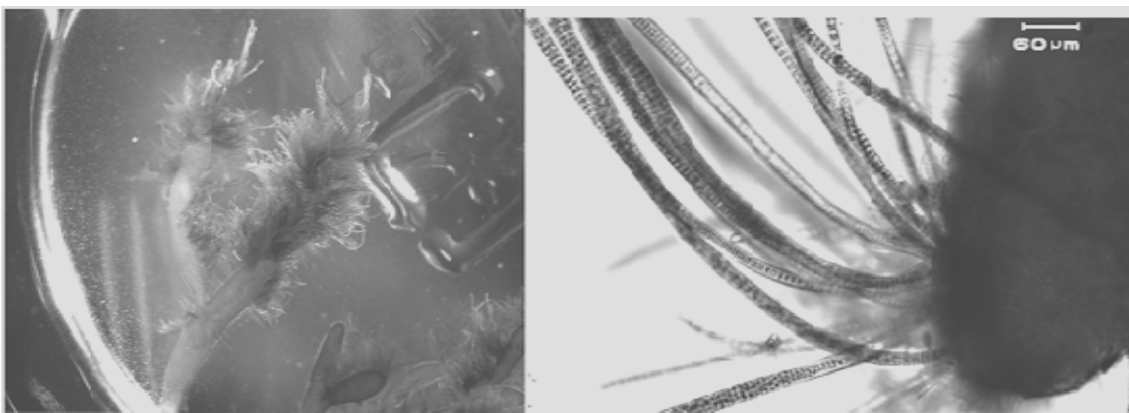
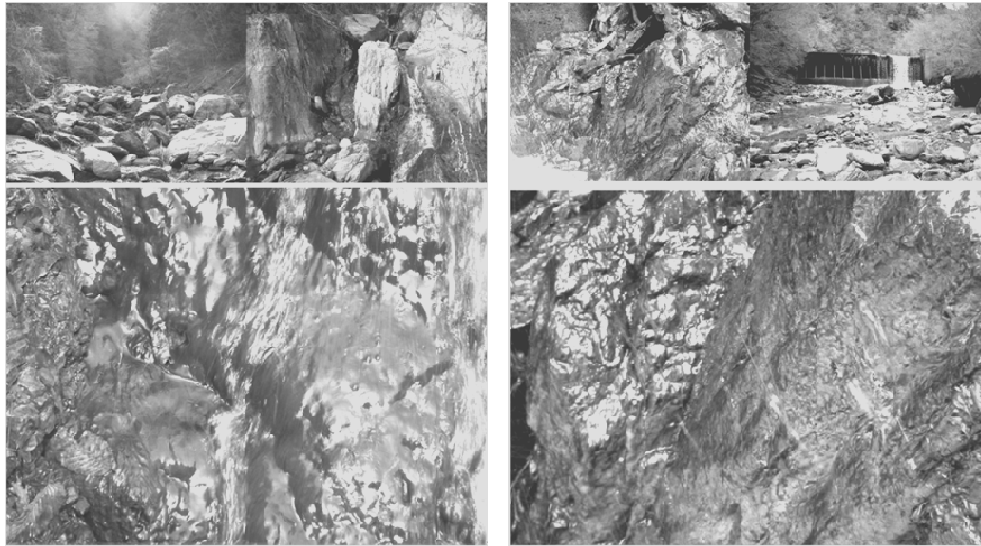


Fig. 2-3. Epiphytic marine *Bangia* (*B. gloiopeltidicota*) on the red alga *Gloiopeltis furcata* (2007. Apr)



Higasikawachi-Sawa (2006.4.27)

Okusawa-Dani (2008.3.29)

Fig. 3-1. Habitat of freshwater *Bangia* (*B. atropurpurea*) in Japan

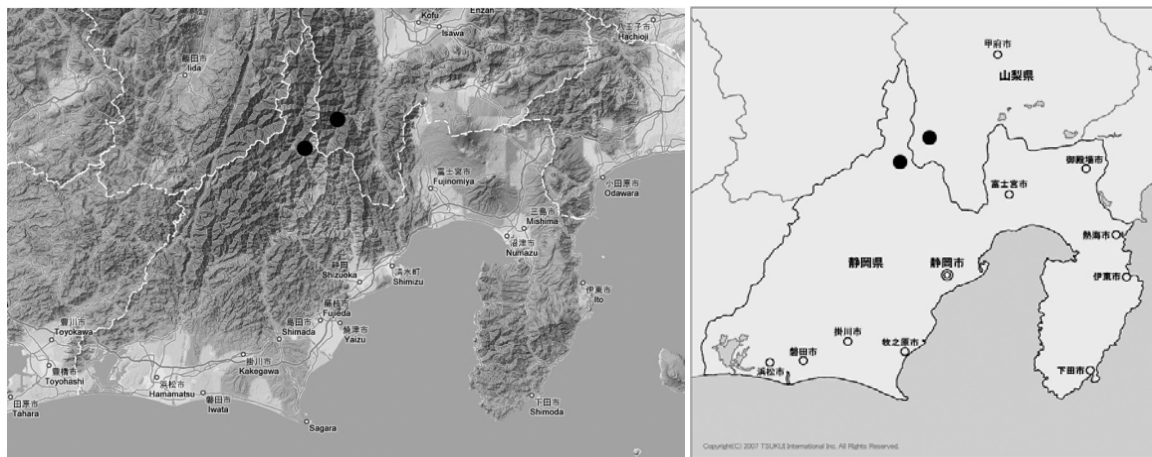


Fig. 3-2. Distribution of freshwater *Bangia* in Japan

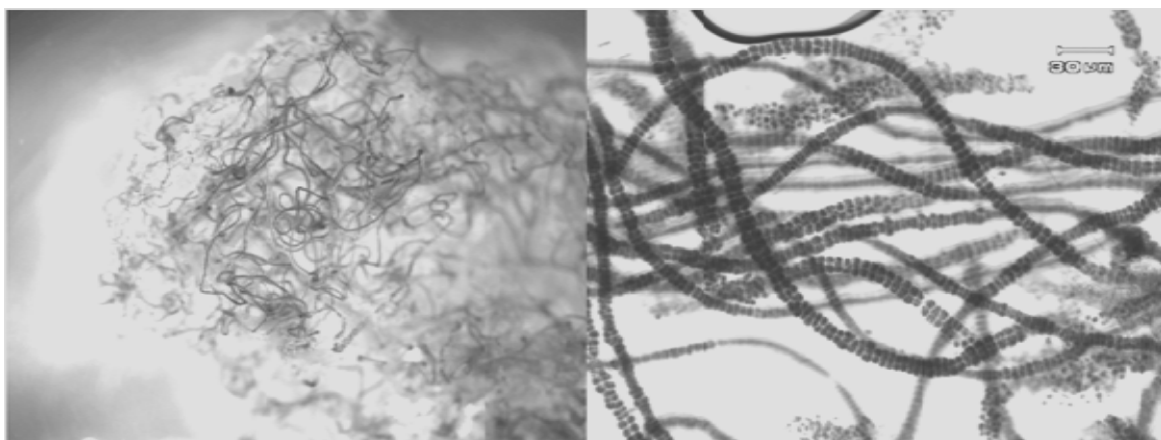


Fig. 3-3. Natural freshwater *Bangia* (*B. atropurpurea*)

2. 2. 3 成長速度の測定

2. 2. 3. 1 *Porphyra* 属

葉状の藻体の形状とサイズを計測するため、実体顕微鏡 (OLYMPUS, SZX12, 接眼×10, 対物×32) で観察し、顕微鏡用デジタルカメラ (OLYMPUS, DP11) で写真を撮影した。写真用スケールとして、コルクボーラーで同様にくりぬいた色上質紙、あるいは厚手の方眼トレース紙を用いた。撮影した藻体およびスケールの写真を同じ倍率でプリントアウトし、藻体のアウトラインを切り抜いて、重量を精密天秤で計測した。スケールと藻体写真の面積比を成長率として用いた。

2. 2. 3. 2 *Bangia* 属

糸状の藻体の形状とサイズを計測するため、実体顕微鏡 (OLYMPUS, SZX12, 接眼×10, 対物×32) で観察、顕微鏡用のデジタルカメラ (OLYMPUS, DP11) で写真を撮影した。実体顕微鏡用のマイクロメーターも同様に撮影した。

撮影した藻体およびスケールの写真を拡大印刷し、藻体の長さはキルビメーター (ペンタイプマップメーター CV-9Jr, 小泉測機) を用いて計測した。写真の拡大率から、各藻体の実際の長さを算出した。また、一部の実験においては、顕微鏡写真をもとに全細胞数と細胞の生死を計測した。

2. 3 顕微分光スペクトル

藻体の生理状態の判断や光合成色素含量の測定のため、個々の藻体組織あるいは個々の細胞ごとの吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定した。正立型蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, BX-50) または倒立型蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, IX70) にグラスファイバー製の光ガイドを装着し、マルチチャンネル・ホトダイオードアレイ検出器 (浜松ホトニクス, PMA-11) により測定した。

3. 研究結果

3. 1 *Bangia* 属淡水産種の分布 (文献調査)

Bangia 淡水産種は 1800 年代に記載されて以降、現在までにヨーロッパ各地、北米五大湖沿岸、中国 11 地点、パキスタン 3 地点、日本 2 地点の産地が報告されている (Fig. 1)。分布域は北半球中緯度地域に限定されている。ヨーロッパでの記載は古くからあるものの現在までに入手できた文献等では産地名の記載だけがあるものが多く、生育地の環境状況や藻体の状態を確認できる文献は少な

い。また、文献に掲載されている写真には、*Bangia* であるかどうか検討の余地が残るものも見られた。一方、イギリスで最近出版された淡水微生物学の教科書には淡水産藻類の代表例として *Bangia* が登場しており、ヨーロッパの淡水フローラにとっては重要な種として認識されている。北米大陸では、五大湖のオンタリオ湖やエリー湖などの湖岸の水位線上部に帯状分布することが報告されている (Fig. 1)。水の流れが弱い湖岸での分布パターンは、他の自生地では見られない特徴である。一方、中国とパキスタンの産地情報や種同定は、文献記載が丁寧であることから信憑性は高い。中国 (四川省やチベット自治区) とパキスタンの自生地は、いずれも標高 4,000 m 以上の高地の渓流域である。また、これらの地域は岩塩の産地であるとともに、湧水や渓流水の硬度がかなり高いことが知られている (パキスタンで市販されているミネラルウォーターの硬度は高い)。

一方、国内の産地は 1943 年に岡田喜一博士が発見した山梨県早川町奥沢谷である (Fig. 3-1, -2)。その後の熊野茂博士による調査から奥沢谷周辺の沢 (滝) の 2、3 箇所に分布することが確認されている。最近になって、早川町と県境を接する静岡県静岡市を流れる東河内沢 (大井川水系) で新たな自生地が洲澤讓氏 (河川生物研究所) によって発見された (Fig. 3-1, -2)。岡田喜一博士が記載しているように早川町の自生地周辺には、塩之上、早塩、草塩、塩島、塩之沢、長塩、など「塩」の付く地名が多く、塩化物の温泉も湧出している。木平英一博士 (名古屋大) が中心となって行なった国内の渓流水質調査によると、早川町内の渓流水の電気伝導度やカルシウム、ナトリウム、マグネシウムなどのイオン成分は、早川町周辺地域の渓流水や全国の渓流水の平均値より有意に高いことが示されている。また、奥沢谷自生地で採水した試水の朴木英治氏 (富山市科学文化センター) による分析結果でも同様な傾向が示されている。

パキスタンの生物調査中に *Bangia* を偶然発見した芳賀卓博士 (北海道教育大・岩見沢校) によると、パキスタンの渓流水の硬度は高く、採集した *Bangia* には石灰質の小さな粒が付着していた。採集地点の写真などの記録は残っていないものの、日本の自生地と同様に川の本流へ沢の水が滝状に流れ落ちる石の表面に着生している様子が酷似しているとのコメントであった。このように、日本、中

国、パキスタン、およびセルビアの自生状況には共通点が多く、またいずれも河口からの距離が離れている標高が高い地点である。これに対し、ヨーロッパ(セルビア以外)と五大湖の自生地では標高が低く、また五大湖の湖岸に帯状分布するなどの生育状況は海産種に類似している。

3. 2 *Bangia* 属海産種と淡水産種の自生地調査

海産のウシケリ *Bangia fuscopurpurea* は、2006年12月に兵庫県明石市二見沖の海苔の養殖筏で使用している網に着生しているものから分離株を作成した(Fig. 2-2)。海苔網には養殖対象のスサビノリ *Porphyra yezoensis* やボウアオノリ *Enteromorpha intestinalis* も付着していたが、*B. fuscopurpurea* が優先種となっていた。また、2007年2月には、神奈川県横須賀市荒崎海岸(三浦半島)の岩礁地帯に干出した状態で付着していた藻体を採集した。写真のように潮間帯上部で *B. fuscopurpurea* のみが優先的に帯状分布していた(Fig. 2-1)。また、紅藻フクロフリの成熟藻体に着生するフリノウシゲ *B. gloiopeltidicola* は、兵庫県淡路市江崎海岸で採集した(Fig. 2-3)。この藻体の培養株の維持は困難で1年後に死滅した。

淡水産の *Bangia atropurpurea* については、2006年4月に東河内沢(静岡県静岡市)、2008年3月に奥沢谷(山梨県早川町)の自生地の環境調査と採集を行なった。東河内沢では、岩の南側の斜面の一隅に緑藻の一種(シオグサ?)と混生した状態で生育していた(Fig. 3-3)。この調査の際に採集した藻体、及び2005年5月に洲澤氏(河川生物研究所)が採集した藻体をもとに培養株を作成した。一方、奥沢谷の自生地調査(2008年3月)では、岩の南側斜面に *Bangia atropurpurea* が見事に群生する状況に遭遇できた。水が小さな滝状に流れ落ちる岩の斜面で、水が飛沫状に飛び散っている箇所だけに局所的に着生するなど、国内2箇所の自生状況は酷似していた(Fig. 3-1)。

3. 3 *Bangia* 属の単藻化と培養株の確立

海産の *Bangia fuscopurpurea* については、付着している海苔網から藻体をナイフで切除し、PES 培地で粗培養しながら付着している微細藻類を寒天プレート中で除去することで単藻化を行った。淡水産 *Bangia atropurpurea* についても、糸状体の組織上に混生している様々な微細藻類やシアノバクテリアを寒天プレートやガラスピペット法を用いた洗浄で除去することで単藻化を進めた。当初の粗培養には、海水を脱イオン水で希釈した PES 海水培地を

用いた。様々な培地を検討する過程で、高硬度のミネラルウォーターが淡水産種の培養に効果的であることが判明したため、最終的にミネラルウォーターに PES の栄養塩成分を添加したものを淡水産種の基本的な培地として採用している。

3. 4 *Bangia* 属培養株の形態学的、分光学的特徴

従来の報告では、海産 *Bangia fuscopurpurea* と淡水産 *B. atropurpurea* は、形態学的な差は少なく(Fig. 4-1)、唯一の違いは淡水産種では有性生殖が観察されていない点である。最近、菊池らは、国内の海産種 *B. fuscopurpurea* と淡水産種(奥沢谷産) *B. atropurpurea* のホルマリン固定の試料を用いた形態学的な比較検討を行ない、付着根の数が淡水産種 24 ± 4 (最大32)に対し、海産種では 13 ± 3 (最大19)と約2倍異なることを報告している。我々も、海産種(明石の海苔網付着)と淡水産種(東河内沢産)について検討したが、採集方法の不備や透明な付着根の観察が非常に困難であった(Fig. 4-2)。また、付着根の数は、生育状況(流速や生育時期)や培養条件下では可塑的に変わる可能性もあるので、両種の一般的な識別方法として採用しにくいと判断した。

両種の細胞構造を顕微鏡下で詳細に観察したところ、葉緑体の形状に有意な差異があることに気がついた。海産種の葉緑体は細胞の中央付近に集中し星形状に存在するのに対し、淡水産種では葉緑体が細胞全体に広がった形状を示した(Fig. 4-2)。図には、両種の培養藻体の顕微鏡写真と葉緑体の形状を模式的に示したが、採集直後の天然藻体ではこの差はさらに歴然としていた。

また、両種の細胞の色調は同様に濃いえんじ色(暗赤色)であるが、多くの藻体を観察する中でその両種の色調の明度に微妙な差があることに気がついた(Fig. 4-1)。顕微分光装置を用い、生細胞の吸収スペクトルを測定し比較したところ、図に示すように海産種よりも淡水産種でフィコエリスリン(R-Phycocerythrin)の相対含量が有意に高いことが示され(Fig. 4-3)、肉眼での観察結果を裏付けた。この差異は天然藻体よりも培養藻体で大きくなった(Fig. 4-3)。両種の培地組成が異なるので一概には比較できないが、本研究で示された葉緑体の形態と色素含量の違いは、淡水産種と海産種の分類の研究において精査する必要があるものと思われる。

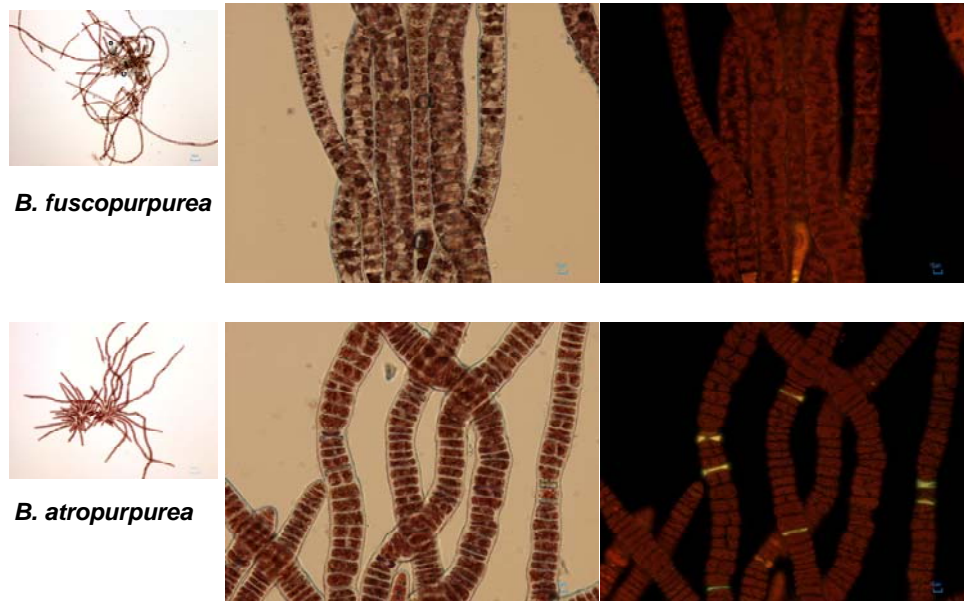


Fig. 4-1. Cultured thalli of marine (*B. fuscopurpurea*) and freshwater (*B. atropurpurea*) *Bangia*

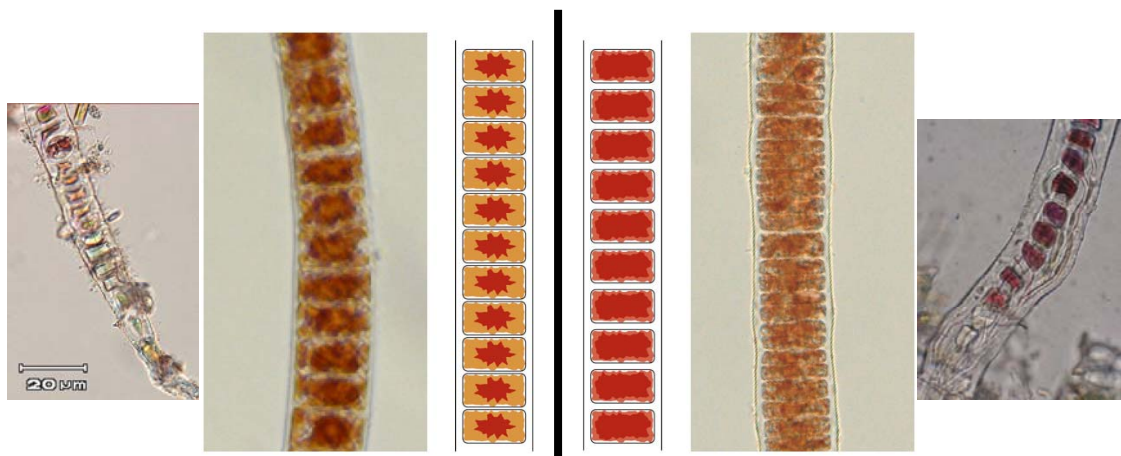


Fig. 4-2. Morphology of marine (left) and freshwater (right) *Bangia*

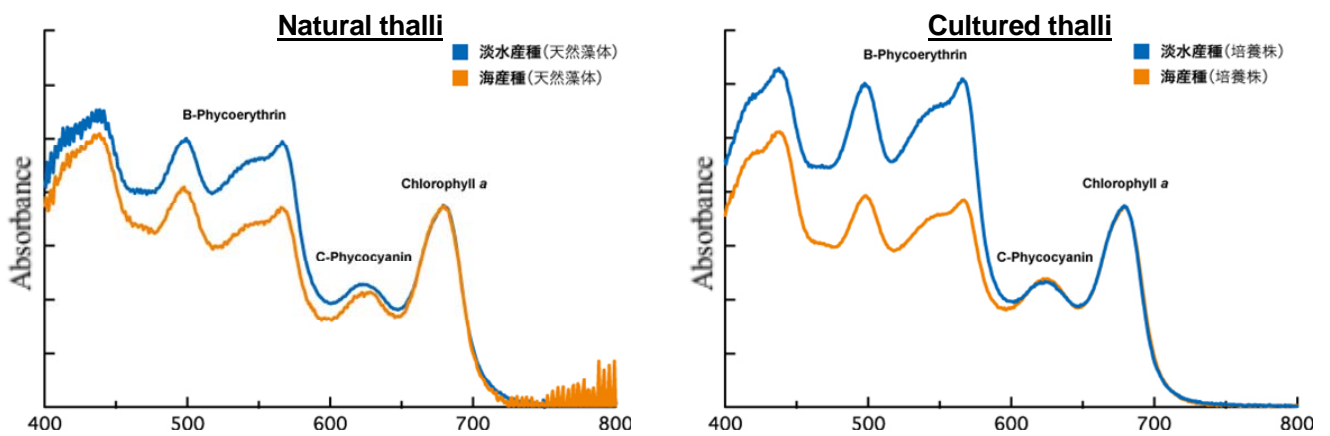


Fig. 4-3. Absorption spectra of freshwater (blue) and marine (orange) *Bangia*

3.5 *Bangia* 属淡水産種の生活史の観察

図鑑や文献等には、海産種 *Bangia fuscopurpurea* の生活史や模式図が詳細に記載されているが、淡水産種については無性生殖が確認されないとの記述があるだけである。そこで、我々が作成した淡水産種(東河内沢産)の培養株 *Bangia atropurpurea* を用いて各生活史段階の観察を行なった。その結果、単列藻体の伸長成長(伸長方向に対して直角の細胞分裂)と成熟(伸長方向に並行した細胞分裂と多列化)、多列藻体の成熟と孢子形成、放出した孢子からの発芽、など無性生殖の各段階が全て確認された(Fig. 5-1)。しかし、これまでのところ有性生殖の過程は確認できていない。また、成熟や成長の環境要因として日長条件(短日/長日)を検討したが、現在までのところ両条件で差は見られず、単列藻体がある一定の長さになると成熟する確率が高いとの結果であった(参照:Fig. 5-2)。

3.6 *Porphyra* 属の成長における塩濃度依存性

Porphyra yezoensis HG-4 株の葉状体を直径4.5 mmの円形状にコルクボーラーで切り抜き、海水を脱イオン水で希釈することで100%(海水原液)から0%(栄養塩を添加した蒸留水)までの希釈系列を作成した培地中で約2週間培養を行い、この間の成長を葉状体の面積から換算した。この際、標準 PES 培地に添加する栄養塩の濃度は希釈海水中でも一定になるように調製した。

その結果、100%海水の場合と比べ60~80%程度の希釈海水中での成長率が約1.4倍高い結果が得られた。ただし、80%海水中でのみ切り抜いた葉状体が高い頻度で枯死する現象が見られたのでさらに検討する余地がある。

3.7 *Bangia* 属海産種と淡水産種の成長における塩濃度依存性

3.7.1 *Bangia* 属の成長量測定法の検討

Bangia 属は基本的に単列の藻体で一方向に伸長成長し、成熟すると多列(2-3列)の藻体になり単孢子を形成し、細胞壁の崩壊により単孢子を放出する(参照:Fig. 5-1)。本研究では培地中の塩濃度など成分を変えた場合の成長量を比較する必要があり、基本的に藻体の長さを指標に成長量として用いることにした。

まず、1-2週間の培養実験の期間中にどのような成長パターンを示すかの予備検討を行った。保存株から良好な状態の藻体の塊を選び、長さの異なる3個体を選別し、伸長成長を約2週間追跡した(Fig. 5-2)。予備検討の培

地として、淡水藻の培養において従来から効果的であると言われている希釈海水(1/4)を用いた。その結果、実験開始後の7日目までは3個体ともに順調な伸長成長が見られた。しかし10日後の計測時には藻体の一部が成熟し、形成した孢子の放出に伴い糸状藻体の一部が崩壊したため、長さを指標とした成長量が正確に読み取れなかった。しかし、成熟と孢子形成は藻体の一部分で留まり、13日目の計測では伸長成長の回復がみられた(Fig. 5-2)。したがって、より正確な成長量の計測には単列の藻体の周辺に散乱した孢子も含めた全細胞数の計測が必要であると判断された。また、後述するように、*Bangia* の藻体は細胞壁が堅固なため細胞が死滅した後もしばらく細胞壁は残存する。そのため、成長の観察においては、藻体の拡大写真を用いて個々の細胞の状態(色調など)を確認する必要があると判断された。

3.7.2 *Bangia* 属淡水産種の成長における塩濃度依存性

タニウシケノリ *Bangia atropurpurea* (淡水産種)の成長における塩濃度の依存性を解析した。天然海水をベースに希釈により塩濃度を変えた培地(0, 25, 50, 75, 100%海水)を用いて、約1か月間成長速度(伸長成長)を追跡した(Fig. 6-1)。その結果、75%、100%海水や0%海水の培地ではほとんど成長しなかった。一方、25%~50%海水の培地では、予備実験同様に顕著な成長が観察された。*Bangia* 属の藻体は、細胞壁が厚いため細胞が死滅しても糸状体の組織(細胞壁)はそのまま残るが、個々の細胞は死滅に伴い葉緑体中の光合成色素が分解・消失する。25%や50%海水で生育させた藻体の顕微鏡写真では、ほとんどの細胞が暗赤色の色調を呈し、葉緑体や細胞が健全な状態であることが確認できた(Fig. 6-1, 下段の写真)。一方、0%や100%海水中で1ヶ月間生育させた藻体では、ほとんどの細胞の光合成色素が消失し細胞が死滅したと判断された。一部の細胞は赤色を呈しているが、正常な細胞の色調とは異なり、葉緑体中で遊離したフィコエリスリンが分解されずに残っているものと推測された。75%海水中では、一部の細胞は生存している可能性もあるが大半の細胞は死滅した。約1ヶ月間の成長についての塩濃度依存性をグラフで図示した(Fig. 6-2, 青色)。

3. 7. 3 *Bangia* 属海産種の成長における塩濃度依存性

ウシケノリ *Bangia fuscopurpurea* (海産種) についても、上記の淡水産種と同様に海水培地をもとに塩濃度を変えた培養を行い、成長速度(伸長成長)の比較を行った(Fig. 6-2, 橙色)。その結果、海産種の場合は天然海水(100%)

よりも、75%~50%程度に希釈した海水中での成長促進が確認された(Fig. 6-2)。自生する沿岸域では、河川や降雨による淡水の流入が起こるものの、予想を超えた結果であった。一方、淡水産種が顕著な生育を示した25%海水中では全く成長せずに死滅した。

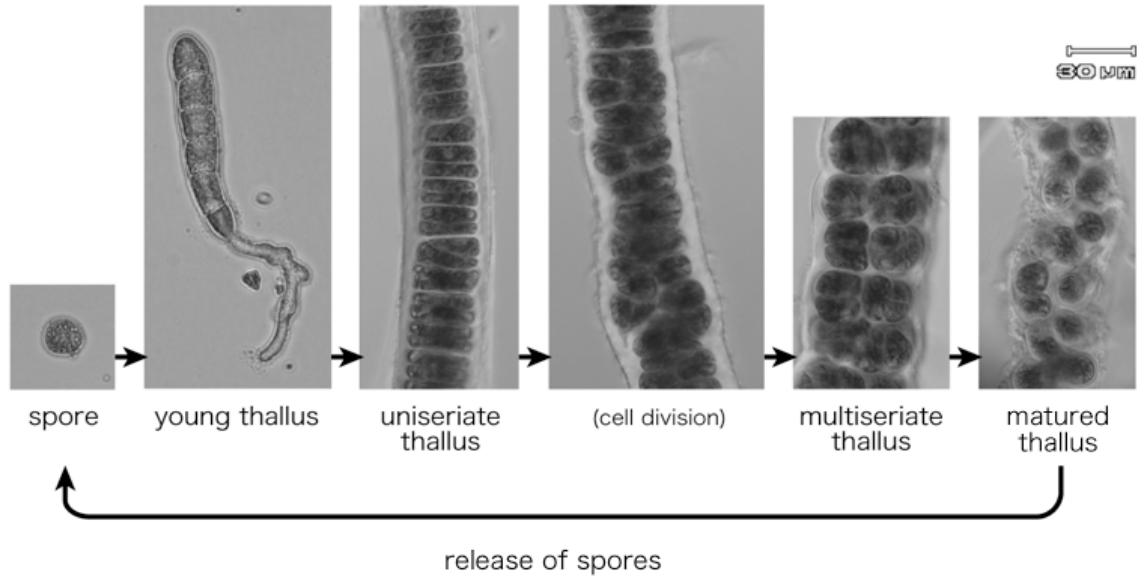


Fig. 5-1. Growth and non-sexual reproduction of freshwater *Bangia atropurpurea*

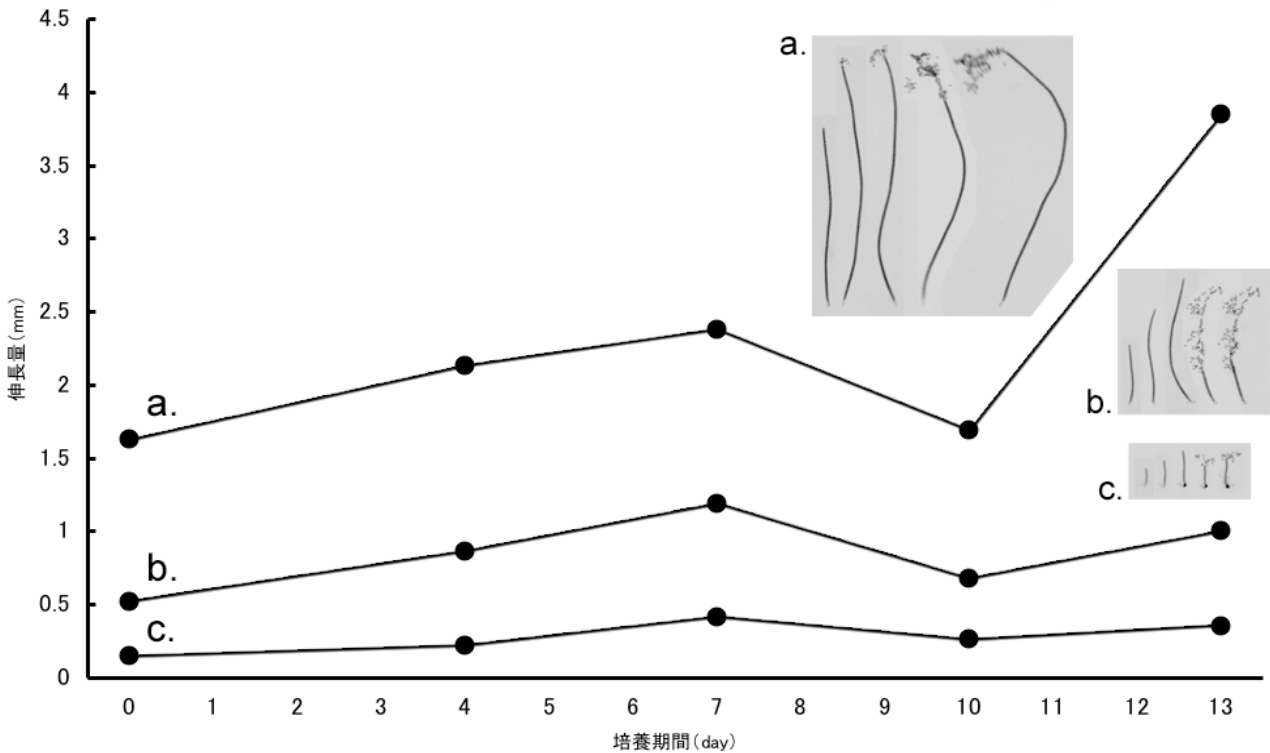


Fig. 5-2. Elongated growth of freshwater *Bangia atropurpurea*

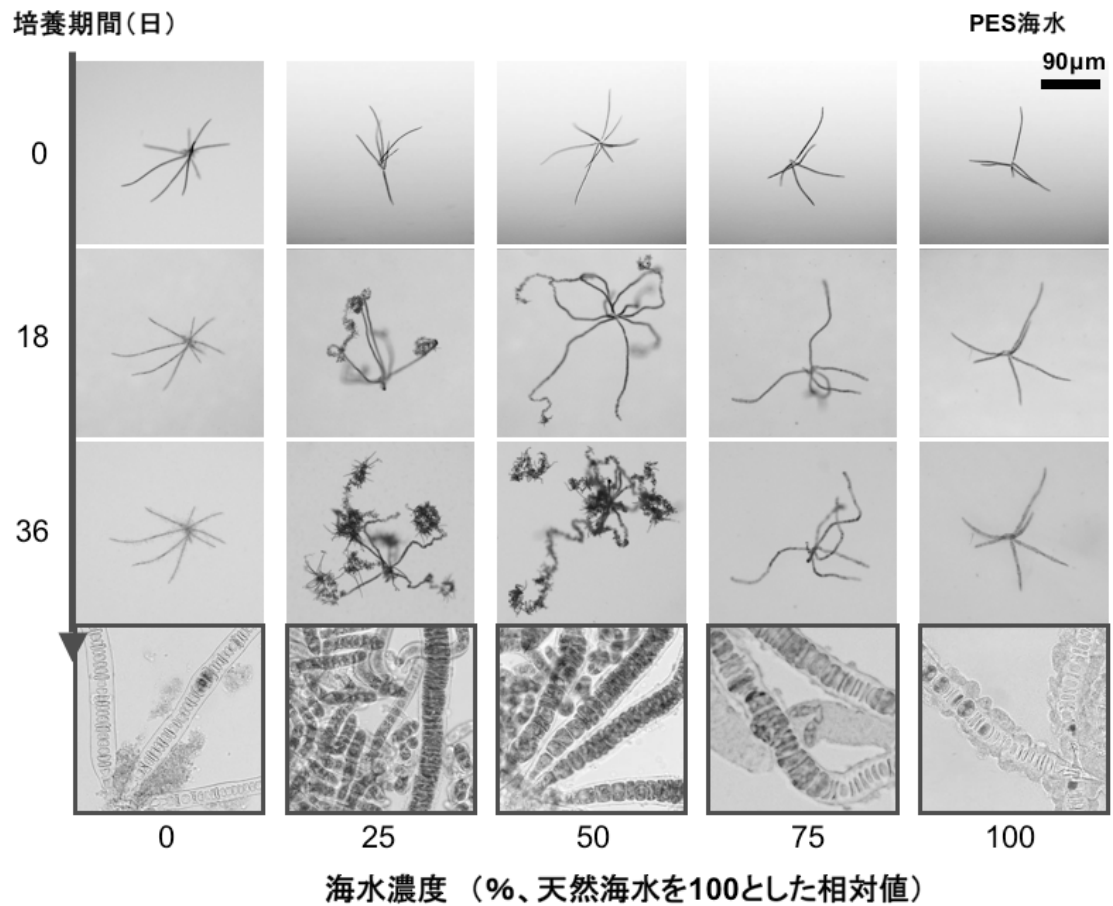


Fig. 6-1. Effect of salinity on growth of freshwater *Bangia*

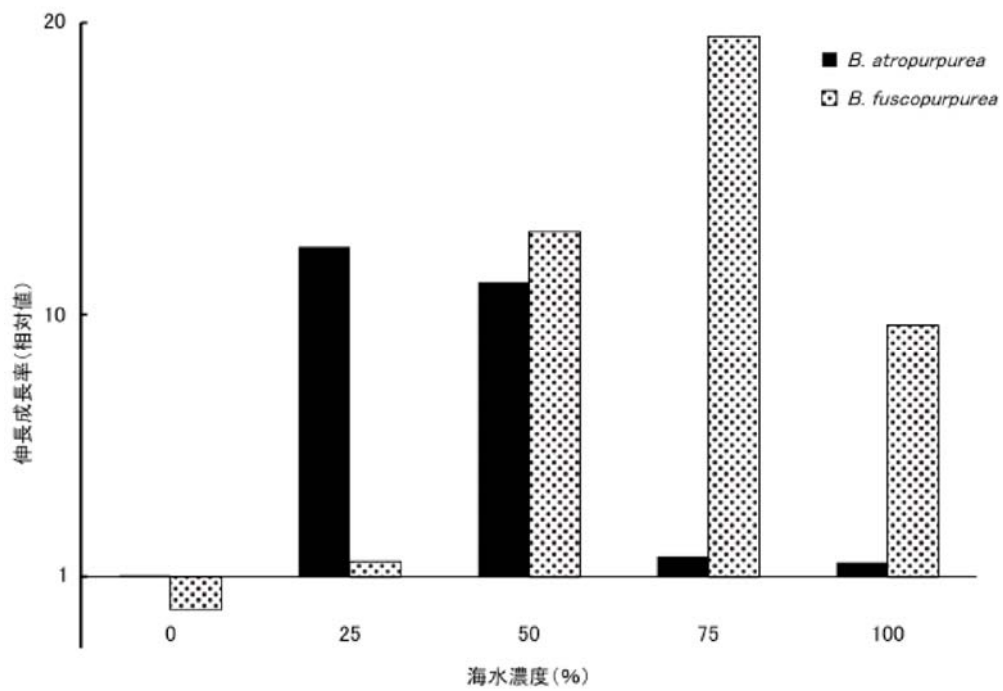


Fig. 6-2. Effect of salinity on growth of freshwater and marine *Bangia*

3. 8 *Bangia* 属淡水産種の成長におけるカルシウムの効果

タニウシケノリ *Bangia atropurpurea* (淡水産種)の培養には、一般に使用されている淡水藻用培地(BG11など)では成長がほとんどみられないものの、前述のように希釈海水を用いると効果的であることが明らかになった。希釈海水は、培養困難な淡水藻を短期的に維持する培地として経験的に用いられていたが、長期間の培養や保存株の維持には問題があった。また、チスジノリやカワモズクなどの淡水紅藻(真正紅藻)の研究においても自生地の水質が検討され、水の硬度が高いなどの記載が見られる。そこで、国内外のタニウシケノリ自生地の断片的な環境情報(高硬度の水質、石灰岩地帯など)を参考に、硬度の高いミネラルウォーター(Contrex, COURMAYEUR)を試用したところ、成長において想像以上の顕著な促進効果が見られた。ミネラルウォーター中では、20 - 25%の希釈海水と比べ2倍以上の成長速度を示した(Fig. 7-1, Fig. 7-2)。また長期間の保存培養においてもミネラルウォーターは効果的で、約3年間にわたりタニウシケノリの培養株を絶やさずに維持できている。一方、50 - 75%希釈海水中での生育が顕著であった海産種のウシケノリ *Bangia fuscopurpurea* についても、念のためミネラルウォーター中での成長を確認したが、予想通り全く成長せずに死滅した(Fig. 7-2)。

以上の結果から、淡水産種タニウシケノリ *Bangia atropurpurea* の成長にはミネラルウォーターに含まれるイオン成分が顕著な成長促進効果を示すものと考えられた。そこで、ミネラルウォーターを希釈した培地で成長を測定することで、なんらかの示唆が得られるものと考えた。その結果、1/10~1/30に希釈したミネラルウォーターでは成長

がほとんど見られず、特定のイオン成分(カルシウムあるいはナトリウム)が成長の維持に関与することとそのイオン成分の閾値が推測された(Fig. 7-3)。

次に天然ミネラルウォーターの組成をもとに人工ミネラルウォーターの作成を試みたが、沈殿が形成するなど成分の再現が困難であった。そのため完全人工海水(ASN-III 培地)中のカルシウム濃度を変えて成長に与える影響を解析した。この実験では、従来の藻体伸長量ではなく、藻体の全細胞の観察・計数を行ない、細胞数の増殖と個々の細胞の生理状態(色調から、正常、色素遊離、死滅の3段階に分類)を解析した。その結果、約5 mg/100 mL以下のカルシウム濃度では、細胞が成長せずに死滅することが明らかになった(Fig. 8-1)。

3. 9. *Bangia* 属淡水産種の誘電緩和スペクトル

これまでの培養実験から、淡水産種タニウシケノリ *Bangia atropurpurea* の成長の維持にはカルシウムなどの特定のイオン成分が関与することが推測された。そこで、細胞内の生理状態を把握するため、タニウシケノリの培地成分(ミネラルウォーターの濃度)を変えた際の細胞内のストレス応答を、長崎大学の下町多佳志博士(本プロジェクト研究の班員)が開発したマイクロウェーブを利用した誘電緩和スペクトル測定装置(最大50 GHz)で測定した。その結果、誘電緩和スペクトルが、細胞内の生体物質の状態が短時間の(ミネラルウォーターの濃度を変える)処理により、顕著に変化する結果が示された(Fig. 8-2)。今のところ、この変化の実態や機構などの詳細は不明であるが、藻体に含まれるタンパク質やアミノ酸などの電解質の存在状態が培地のイオン濃度に応答して変化したものと推測している。

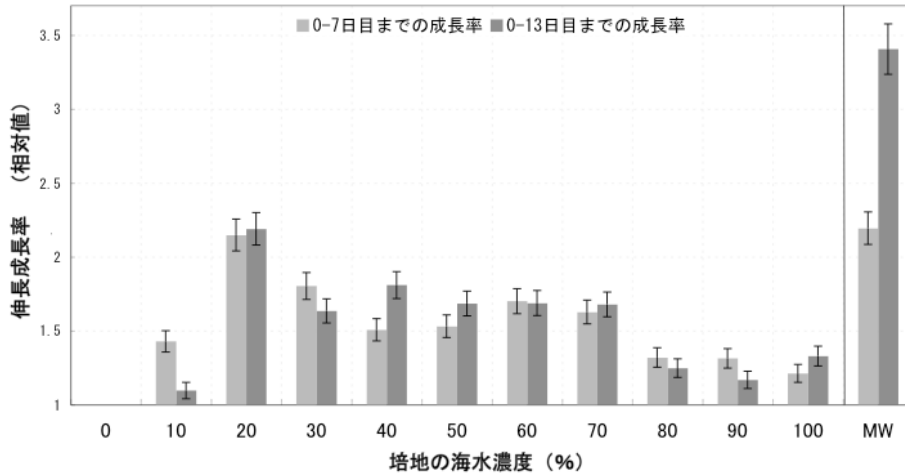


Fig. 7-1. Effect of salinity on growth of freshwater *Bangia*

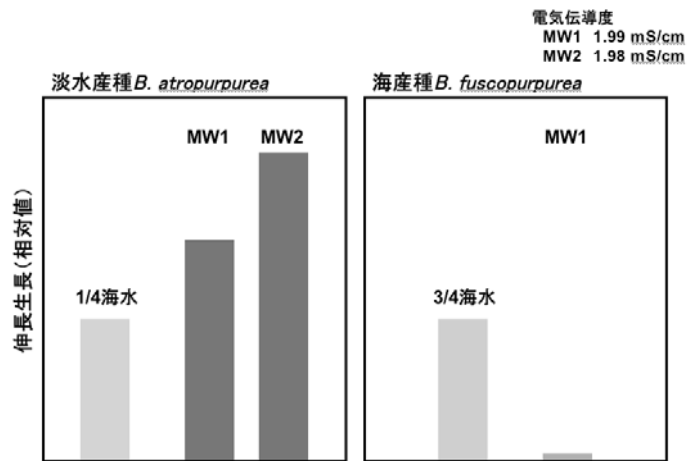


Fig. 7-2. Effect of Mineral water on growth of freshwater and marine *Bangia*

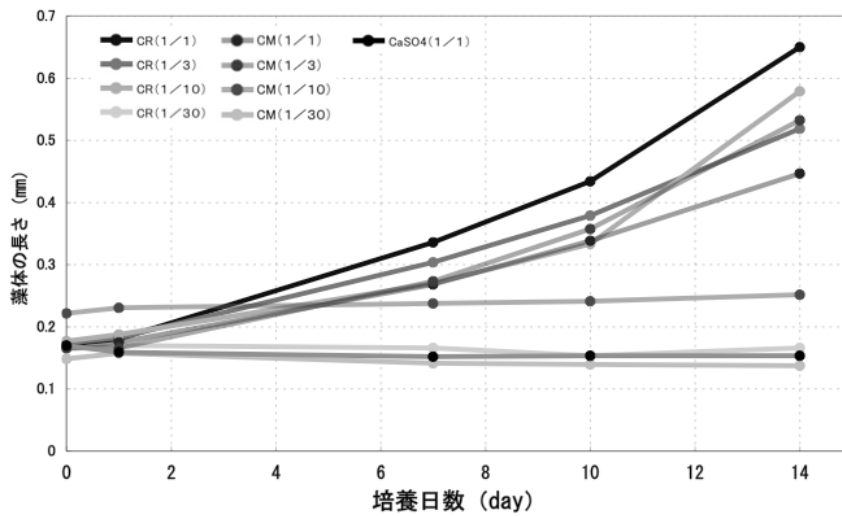


Fig. 7-3. Effect of Mineral water on growth of freshwater *Bangia*

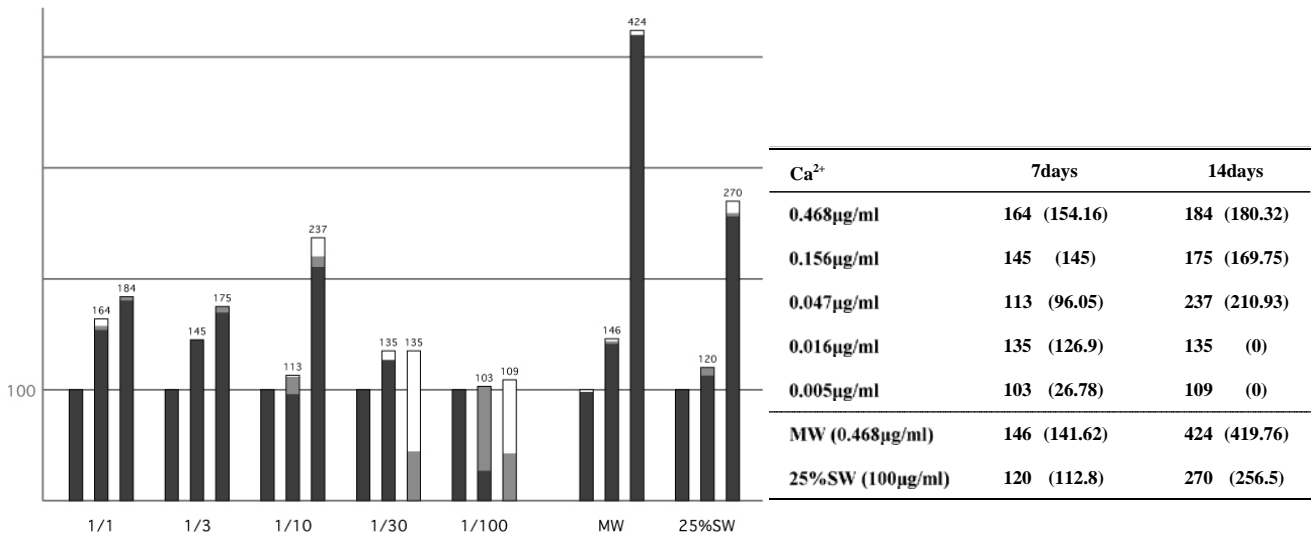


Fig. 8-1. Effect of Ca²⁺ concentration on growth of freshwater *Bangia*

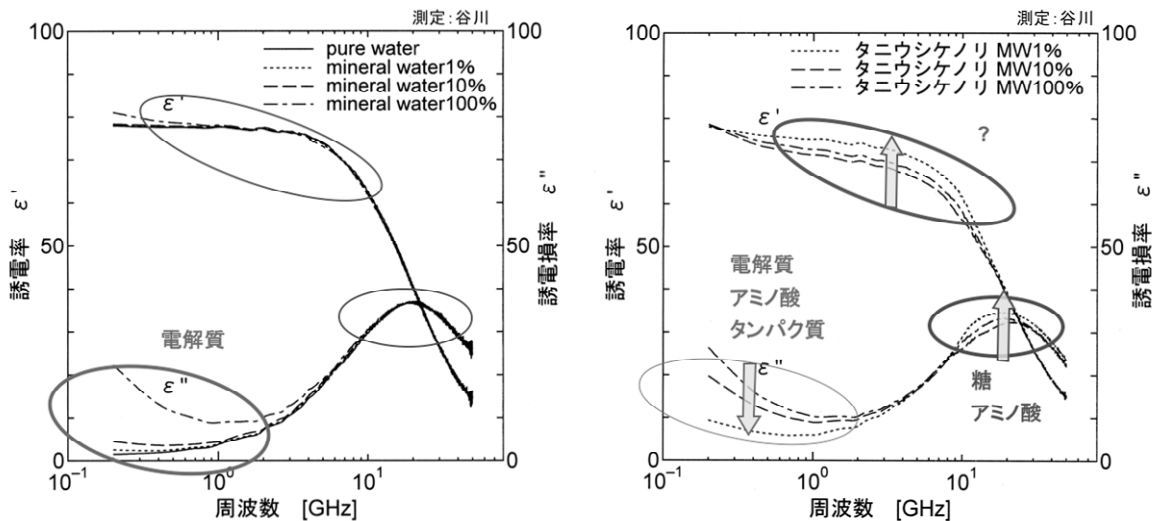


Fig. 8-2. Analysis of high frequency dielectric relaxation spectra of freshwater *Bangia*

4. 考察

本研究では海産藻類の好塩性機構の解明のため、海産種 *Bangia fuscopurpurea* と淡水産種 *Bangia atropurpurea* の両方が存在する原始紅藻をモデルに研究を立ち上げた。既存の培養株が無かったため、本研究の中で自生地の調査、藻体の採集、培養株の立ち上げを行なった。また、特に淡水産種については培養方法や培地の開発から行ない、ようやく安定した培養形態と保存株の確立に成功した。

生理学実験の基礎となる成長速度の測定では、藻体が

糸状・付着性である、藻体の成熟が制御できない、成長に伴い三次元的に藻体が屈曲する、顕微鏡での追跡が困難であるなど、単細胞藻類や葉状体藻類とは異なる解析上の問題が多々あった。しかし、淡水産種についてはミネラルウォーターをベースにした培養が安定したことで、誘電緩和スペクトル、時間分解蛍光スペクトルなどの生理学的、細胞学的解析も可能になった。

淡水産種の培養株の確立と培養の安定化に多くの時間を費やしたため、淡水産種の成長維持についての分子レベルでの解析には踏み込めなかったが、特定のイオン成

分(カルシウムが有力候補)が淡水産種の成長を維持していることが示された。少なくとも、一部の海藻類(大型藻類)が特定の淡水環境へ進出・適応している要因として、生育地の水に含まれる特定成分が密接に関与していることは明らかである。

淡水産種 *Bangia atropurpurea* の培養株を用いた様々な解析を進めることで「海藻類の好塩性とはどのような仕組みで維持されているのか」についての回答も得られるものと思われる。

5. 今後の課題

本研究では主に長期間の培養実験に基づく成長生理学的な解析を進めてきた。また、短時間で起こる生理応答の解析も既に始めており、特定のイオン成分がどのように関わるのかを今後明らかにする予定である。現在、淡水産種 *Bangia atropurpurea* についての時間分解蛍光スペクトルをもとに光合成色素系—反応中心に及ぼす塩やイオンの影響を解析している。一方、国内の生育環境と酷似している中国やパキスタンなどの淡水産種の収集や培養株の確立も残された課題で、淡水産種の起源の解明も含め近い将来進める計画です。

謝 辞

本研究を進める過程でお世話になりました方々(敬称略)に感謝いたします。

二羽恭介(兵庫県農林水産技術総合センター):海産種の藻体の分譲・採集

洲澤譲(河川生物研究所):現地調査、生育地情報、及び藻体の採集・分譲

羽生田岳昭(神戸大学):淡水藻の生育地や渓流水質などの情報提供

熊野茂(国立環境研究所):淡水産紅藻の分類と生育地情報

芳賀卓(北海道教育大):パキスタンの産地情報

木平英一(名古屋大学):全国の渓流水質情報

下町多佳志(長崎大学):誘電緩和スペクトル測定

田中佑二・松田祐介(関西学院大学):セクションング顕微鏡解析

秋本誠志(神戸大学)・横野牧生(北海道大学):時間分解蛍光スペクトル解析

なお、本研究は内田博子(神戸大学)の協力を得て実施しました。

文 献

Belcher J. H. (1960) Culture studies of *Bangia atropurpurea* (Roth) Ag. New Phytol., 59: 367-373

Butterfield NJ (2001) Paleobiology of the late Mesoproterozoic (ca.1200 Ma) Hunting Formation, Somerset Island, arctic Canada. Precambrian Res.111: 235-256

Butterfield, NJ, Knoll, AH, Swett, A (1990) A Bangiophyte red alga from the Proterozoic of arctic Canada, Science, 250: 104-107

Chin-Chin, J (1941) Studies on the freshwater algae of China.VIII. A preliminary account of the Chinese freshwater Rhodophyceae. Sinensia, 12:245-290

Edwards, WM, Harrold, LL (1970) *Bangia atropurpurea* (Roth) A. in western Lake Erie. The Ohio J.Sci. 70:56-57

Gargiulo, GM, Genovese, G, Morabito, M, Culosio, F, De Masi, F (2001) Sexual and asexual reproduction in a freshwater population of *Bangia atropurpurea* (Bangiales, Rhodophyta) from eastern Sicily (Italy) Phycologia, 40: 88-96

Geesink, R (1973) Experimental investigations on marine and freshwater *Bangia* (Rhodophyta) from the Netherlands, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 11: 239-247

Haga, M, Legahri, MK (1995) A freshwater red alga, *Bangia atropurpurea* (Roth) Ag.from Kawai, north-west frontier province, Pakistan, Cryptogams of the Himalayas Vol. 3. Nepal and Pakistan, 29-35

Hanyuda, T, Suzawa, Y, Arai, S, Ueda, K, Kumano, S (2004) Phylogeny and taxonomy of freshwater *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) in Japan. J. Jpn. Bot. 79: 262-268

Hartog, C. D. (1971) The effect of the salinity tolerance of algae on their distribution, as exemplified by *Bangia*, Proceedings of the VIIth International Seaweed Symposium, 274-276

Kikuchi, N, Miyata, M, and Notoya, M (2004) Taxonomy of the genus *Bangia* (Bangiaceae, Rhodophyta) in Japan. Jap.

- J. Phycol. 52(Suppl):163-168
- Leghari, SM (2000) *Bangia atropurpurea* (Roth) C. Ag Rhodophyta from Nomal and Naltar area near Gilgit, Pakistan, Pakistan J. Biol. Sci. 3:2048-2050
- Müller, KM, Sheath, RG, Vis, MS, Crease, TJ, Cole, JM (1998) Biogeography and Systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) based on the Rubisco spacer, *rbcL* gene and 18S rRNA gene sequences and morphometric analyses. 1. North America. Phycologia, 37: 195-207
- Müller KM, Cole KM and Sheath RG (2003) Systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) in North America. II. Biogeographical trends in karyology: chromosome numbers and linkage with gene sequence phylogenetic trees. Phycologia 42:209-219
- Nizamuddin, M (1988) Occurrence of the genus *Bangia* Lyngbye (Bangiales-Rhodophyta) from Chitral, north west of Pakistan. Pak. J. Bot., 20: 45-48
- Sheath, RG and Kathleen MC (1980) Distribution and salinity adaptations of *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta), a putative migrant into the Laurentian Great Lakes. J. Phycol. 16: 412-420
- Sheath, RG (2003) Red algae. in Freshwater algae of north America: Ecology and classification (Edited by Wehr, JD and Sheath, RG, Academic Press) p. 197-210
- Simić, S (2008) New find of the rare and endangered species *Bangia atropurpurea* (Roth) C. Adardh (Rhodophyta) in Serbia. Arch. Biol. Sci. Belgrade 60: 727-731
- 岡田喜一(1944) 日本淡水産うしけのり属ノ一種 たにうしけのりニ就テ, 植物研究雑誌 20:201-204
- 木平英一・新藤純子・吉岡崇仁・戸田任重(2006) わが国の渓流水質の広域調査、日本水文科学会誌、36: 145-149.
- 熊野茂(2000) 世界の淡水産紅藻 (Taxonomy of Freshwater Rhodophyta) 内田老鶴圃
- 廣瀬弘幸・山岸高旺 編(1997) 日本淡水藻図鑑(内田老鶴圃) pp. 933
- 堀輝三(1993) 藻類の生活史集成 第2巻 褐藻・紅藻類 (内田老鶴圃) pp. 396
- 施之新編(2006) 中国淡水藻志 第13巻 紅藻門 褐藻門 科学出版社(北京) pp.208 79:262-268
- 胡鴻鈞・魏印心(2006) 中国淡水藻類 -系統、分類及生態、科学出版社
- 中国科学院青蔵高原総合科学考察隊(1992) 青蔵高原科学考察叢書、西藏藻類、科学出版社

研究成果発表論文

- Hirose, E., Uchida, H. and Murakami A. (2009) Ultrastructural and microspectrophotometric characterisation of multiple species of cyanobacterial photosymbionts coexisting in the colonial ascidian *Trididemnum clinides* (Tunicata, Ascidiacea, Didemnidae). European Journal of Phycology (in press)

Halophilicity of Freshwater Bangiacean Red Algae

Akio Murakami

Kobe University Research Center for Inland Seas

Summary

More than 95% species of macrophytic algae live in marine coastal environments, and can be regarded them as halophilic organisms. But some species of macrophytic algae live in the upper intertidal/splash zones or estuaries, where salinity and other environmental conditions periodically and drastically fluctuate. These species are highly tolerant to low salinity or dehydration. A few rare species of macrophytic algae are found in freshwater environments in high altitudes such as mountain streams or springs in limestone areas. Stable water quality or some specific components must be essential for growth and reproduction in such freshwater species. Morphological and molecular phylogenetic analyses indicate that some freshwater and marine species are very close relatives. Therefore some freshwater species are valuable for study on halophilicity of macrophytic marine algae.

In this study, we searched for the experimental organisms to reveal the halophilicity of macrophytic algae, and found that Bangiacean red algae *Bangia* are useful organisms because of their simple morphology and their fast growth. However, morphologically similar *Bangia* species are divergent in marine and freshwater habitats. In our analyses marine *Bangia* showed maximum growth rate in 50-75% seawater medium with additional nutrients, while freshwater *Bangia* showed maximum growth rate in 25% seawater medium. Furthermore, we found that some ingredients in the mineral water (high hardness) sustained favorable growth of freshwater *Bangia*. These results are suggestive to elucidate the halophilicity of macrophytic marine algae.

海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の好塩性機構の解明

松田 祐介¹, 田中 祐二^{1, 2}, 神田 拓也¹

¹関西学院大学理工学部生命科学科

²現所属 岩手大学農学部附属寒冷バイオフィロンティア研究センター

概要 珪藻は海洋において最も繁栄している藻類であり、海洋に於ける一次生産量の約半分を占めるといわれている。海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* は好塩性機構を有していることが申請者らのこれまでの研究から示唆されているが、塩濃度の低下への応答機構についてはこれまで研究されていなかった。本プロジェクト研究では、海洋性珪藻における好塩性機構を解明することを目的として、塩応答性遺伝子を cDNA-AFLP (Amplified Fragments Lengths Polymorphism) 法を用いて半網羅的に選抜し、その機能を調べることで、珪藻の好塩性の分子機構を明らかにしていく。また電子伝達活性を保持したチラコイド膜を単離し、その活性に対する塩の影響を調べることで、光合成初期過程の塩依存性を明らかにしていく。

単離チラコイド膜の塩応答性

P. tricornutum を 0.5 M NaCl を含む人口海水にて培養し、液体窒素を用いて凍結融解することで電子伝達活性を保持したチラコイド膜を調整し、*p*-BQ を電子受容体として PSII の活性を測定した。この試料の PSII 活性は NaCl、NaF、および Na₂SO₄ の添加によって増大したが、NaBr、NaI、Cholin-Cl、Cholin-SO₄ の添加では観察されなかった。この結果は *P. tricornutum* PSII 活性が Na⁺ によって直接促進されことを示すものである。

cDNA-AFLP 解析

P. tricornutum を 0.5 M NaCl を含む人口海水にて培養し、濁度を指標に生育を調べ、対数増殖期の細胞を低塩 (0.1 M NaCl) に移し、約 2 日間は生育が抑制されるのが観察された (低塩ショック期)。低塩処理前、2 日間の低塩ショック期、およびそれ以降の低塩順化期の細胞から cDNA ライブラリを作製し、cDNA-AFLP 解析に用いた。本年度は、この方法により 74 の塩応答性遺伝子を確認し、クローニングした。このうち 14 は低塩誘導性、40 が低塩ショック誘導性、および 20 が低塩抑制性の遺伝子であり、これら 74 のうち 40% の遺伝子は珪藻特異的な遺伝子であった。また、低塩 (ショック) 誘導性遺伝子の中には Na⁺/solute symporter や Na⁺/H⁺ antiporter を含む 11 種類の輸送体遺伝子も含まれ、珪藻細胞が細胞内 Na⁺、pH、イオン強度のホメオスタシスを低塩環境に応答して積極的に維持していることが示唆された。またストレス応答性遺伝子も多数含まれ、低塩環境が海洋性珪藻類にとってストレスと認識されていることが示唆された。

1. 序論

ナトリウムイオンは地上にあまねく存在し、高等植物に対してはカオトロピック性の強い毒物として作用することが知られている。ナトリウムイオンの陸生植物光化学系への毒性はこれまでもよく調べられており、この過程で塩素イオンがカウンターアニオンとして働くことが考えられてきた

(Greenway and Munns, 1980; Kuwabara and Murata, 1983; Gaxiola *et al.*, 1998; Allakhverdiev *et al.*, 2000)。例えば、淡水性のシアノバクテリア、緑藻、および高等植物では、200 mM を超える高濃度の NaCl は Na⁺/H⁺ 対向輸送体の活性を阻害し、さらに光化学系および呼吸鎖の電子伝達を阻害することが知られている (Blumwald *et al.*, 2000;

Allakhverdiev *et al.*, 2005)。また、過剰のナトリウムイオンの細胞への流入は細胞膜電位を攪乱し、その結果細胞はミネラルイオンの適正な取り込みができなくなることも指摘されている(Niu *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 2000)。一方、塩素イオンはナトリウムイオンストレスに置かれた植物において、細胞内 pH を維持するカウンターアニオンとして働き(Gaxiola *et al.*, 1998)、光化学系の酸素発生系の活性にも必要であることも示されている(de Paula *et al.*, 1986)。これらの植物では一般的にナトリウムイオンストレス下で適合基質や Na^+/H^+ 対抗輸送体の合成が活発になることも知られている(Erdmann and Hagemann, 2001; Tuteja, 2007)。これらの知見は、植物が高 $[\text{Na}^+]$ にさらされると、これを細胞外へ排出あるいは細胞内で中和することによって、塩耐性を獲得することを示している。

上に述べたような耐塩性はしかしながら、淡水性の独立栄養生物や陸生化した高等植物にのみ見られるものであり、生物全体を見渡すとむしろ特殊な生命現象である。例えば哺乳類をはじめとする動物細胞は、その細胞内のホメオスタシスを維持するためにある程度高濃度のナトリウムイオンを細胞内に必要とし、また、アーケアには飽和濃度のナトリウムイオン下を最適生育環境とする一群さえ存在する。これらの生物では、高濃度のナトリウムイオンが膜輸送や酵素機能等のハウスキーピングな生理現象の適正な発現に必須の役割を果たしているものと考えられる。

地球上に生息する独立栄養生物のうち、圧倒的なバイオマスを占めるのは高等植物である。一方、海洋などの水圏に生息する植物プランクトンのバイオマスは全体の 1%にも満たない。しかしながらその有機物生産量を比較すると、陸上生態系とほぼ等量の CO_2 固定が海洋の微細藻類によって行われていることが近年明らかとなっている(Treguer *et al.*, 1995; Falkowski *et al.*, 1998)。中でも海洋性珪藻類は最も繁栄しているグループであり、地球全体の CO_2 固定量の約 25%を担っていると考えられている。このように、海洋に生息する独立栄養生物は、海洋表層で旺盛な光合成を行い、その短い一生を終え、迅速に海底の地質層に有機物を沈降させる“生物ポンプ”の役割を果たし、地球上の物質循環にきわめて重要な位置を占める生物群である。

はたして、これら海洋に生息する主要な一次生産者は、海水中に溶存する 500 mM 近いナトリウムイオンに対して、

どのような生理機構を以って対処、あるいはこれを利用しているのだろうか？海洋に生息する独立栄養生物の基本的な生理機構の塩イオンとの関わりは現在不明である。その生息環境と、進化の過程で植物もまた海水環境から淡水へ徐々に適応した事実を重ね合わせると、海洋性独立栄養生物において高塩環境を積極的に利用する機構が現在も受け継がれている可能性があり、興味深い。本研究では、海洋性珪藻類の一種である、*Phaeodactylum tricorutum* を用いて、様々な塩濃度における細胞の形態形成、生育、光合成等の基本的な生理現象をキャラクタライズし、海洋性珪藻類の塩環境変動に対する挙動を追跡し、その意味を考察することを目的とした。

2. 研究材料および方法

2.1 珪藻の培養

実験材料には海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricorutum* UTEX640 を用いた。培養は Guillard の F 溶液(Guillard and Ryther, 1962; Harrison *et al.*, 1980)を半分の強度で加えた栄養添加人口海水、F/2ASW をベースとし、NaCl 濃度を改変した人工海水を用いて、20°C、連続光(60 - 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)照射下で行った。

2.2 光合成活性の測定

P. tricorutum の細胞を遠心分離にて収穫し、F/2ASW で洗浄後、塩濃度を調節した F/2ASW に再懸濁した。ネット光合成速度および生細胞を用いた光化学系 II の活性測定はクラーク型酸素電極(Hanzatech)および PAM2001 蛍光測定器(Waltz)を用いた。酸素発生は 400 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、20°C で 5 mM の HCO_3^- 存在下 pH 7.0 で行い、0.5 mM 1,4-p-benzoquinone(BQ)の添加および非添加条件で測定を行った。BQ 添加時の酸素発生速度を PSII 活性として計算した。また、PSII 活性はバリアブルフルオレセンスによっても測定した。PAM2001 の設定は、30 分間の暗下処理の後、測定光をレベル 4、アクチニク光をレベル 7、そして飽和光をレベル 11 とした。測定は 20°C で行った。

2.3 RNA の精製および cDNA ライブラリーの作成

低塩処理前、低塩処理初期および後期の細胞を採取し遠心分離で集めた。これらを液体窒素存在下で粉碎し、RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)のプロトコールに従って全 RNA を精製した。得られた全 RNA に対しオリゴ dT(8 ~ 12 塩基)プライマーを用いて逆転写反応を行い

sscDNA (single strand cDNA) ライブラリーを作成した (RT-PCR 用)。また、オリゴ dT (10 塩基) の 5' 側にアダプター配列を付加したプライマーを用いて逆転写反応を行い sscDNA ライブラリーを作成した (cDNA-AFLP 用)。得られたアダプター付加ライブラリーに対しては Terminal deoxynucleotidyl transferase (TAKARA) を用いて 3' 側にポリ G を付加した。上記に対して、オリゴ dC (17 塩基) の 5' 側にアダプター配列を付加したプライマーを用いて DNA Polymerase 反応を行い両末端にアダプター配列を付加した dscDNA (double strand cDNA) ライブラリーを作成した。アダプター配列に対して作成したプライマーセットを用いて PCR を行い、上記で得られた dscDNA ライブラリーを増幅した。後述する cDNA-AFLP 解析にはこれら増幅した dscDNA ライブラリーを用いた。

2. 4 cDNA-AFLP 解析

cDNA-AFLP 解析用の試料は AFLP Microbial Fingerprinting Kit (Applied Biosystems) を、上記の方法で調整した dscDNA ライブラリーに用いることで行った。プロトコルに従い調整した PCR 産物を DNA シーケンス用変性ゲルを用いて分画し、イメージアナライザーを用いてバンドの濃淡を解析することで行った。目的バンドに含まれる cDNA は、まずゲルから回収した断片をクローニングすることでそれらの内部 DNA 配列を確認し、それらをゲノムデータベース (<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>) を用いて同定した。

2. 5 RT-PCR

上記に記した方法で各処理の細胞から RNA を得、これに対して、cDNA-AFLP 解析の結果得られた各候補 cDNA に特異的なプライマーのセットを用いて定量的 RT-PCR 反応を行なった。内部標準には glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase 遺伝子 *gapC2* を用いた。

2. 6 電子伝達活性を保持したチラコイド膜の調整

通常の F/2ASW で生育した細胞を遠心分離によって集め、細胞破碎用緩衝液 (1 M glycine-betain, 50 mM MES (pH 6.5), 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂) にて洗浄した。この細胞を細胞破碎用緩衝液に再懸濁し、1.5 ml ずつ分注した後、液体窒素で凍結し -80°C で保存した。この試料を測定直前に解凍し、遠心分離によって集めたものを、電子伝達活性を保持したチラコイド膜標品として用いた。

2. 7 チラコイド膜を用いた PSII 活性測定

チラコイド膜標品を PSII 活性測定用緩衝液 (0.01 M Tris HCl, pH 6.8) に懸濁し、様々なイオン添加環境下で、クラーク型酸素電極を用い、20°C における酸素発生速度を測定した。電子受容体として 0.5 mM *p*-benzoquinone (*p*-BQ) を用いた。

2. 8 三次元構造予測

PSII 因子、PsbO および PsbU のアミノ酸配列を様々な独立栄養生物間で比較し、そのタンパク質間相互作用領域の酸性度および表在性を検証した。三次元構造予測は PSII の X 線結晶構造が既に分かっているラン藻 *T. elongatus* の PsbO の構造 (mmdbId:36695) をテンプレートデータとして構造予測プログラム Geno3D (http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/geno3d_automat.pl?page=/GENO3D/geno3d_home.html) を用いて行った。

2. 9 細胞内イオンの蛍光染色

細胞内ナトリウムイオンの特異的蛍光標識剤として、50 μg mL⁻¹ の Sodium Green (Molecular Probe) を用いた。また、細胞内塩素イオンの特異的標識剤として 6-methoxy-*N*-ethylquinolinium iodide (MEQ, Molecular Probe) の膜透過型体である、ジヒドロ体を 1 mg mL⁻¹ 用い、膜透過後に生成する MEQ が細胞内塩素イオンを標識するシステムを用いた。また、イオン輸送機構の推定の為いくつかのイオン輸送調節剤を用いた。用いた薬剤とその濃度は結果に記す。

2. 10 レーザースキャニング共焦点顕微鏡観察およびセクション蛍光顕微鏡観察

葉緑体蛍光、Sodium Green、および MEQ の観察はレーザー共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss, LSM510 Meta) およびセクション蛍光顕微鏡 (Applied Precision, Delta Vision) によって行った。

3. 結果

3. 1 Na⁺ が珪藻の生理に与える影響

海洋の平均塩濃度である 0.5 M NaCl を含む人工海水 F/2ASW-0.5 M NaCl で培養した海洋性珪藻、*P. tricornutum* の細胞を低塩濃度 (0.1 M NaCl) に改変した人工海水に移し培養したところ、約 2 日間生育が抑制された (図 1A)。細胞の成育は海水レベルの食塩濃度で最も良好で、1.0 M 程度の高濃度 NaCl まで生育できた (図 1A、

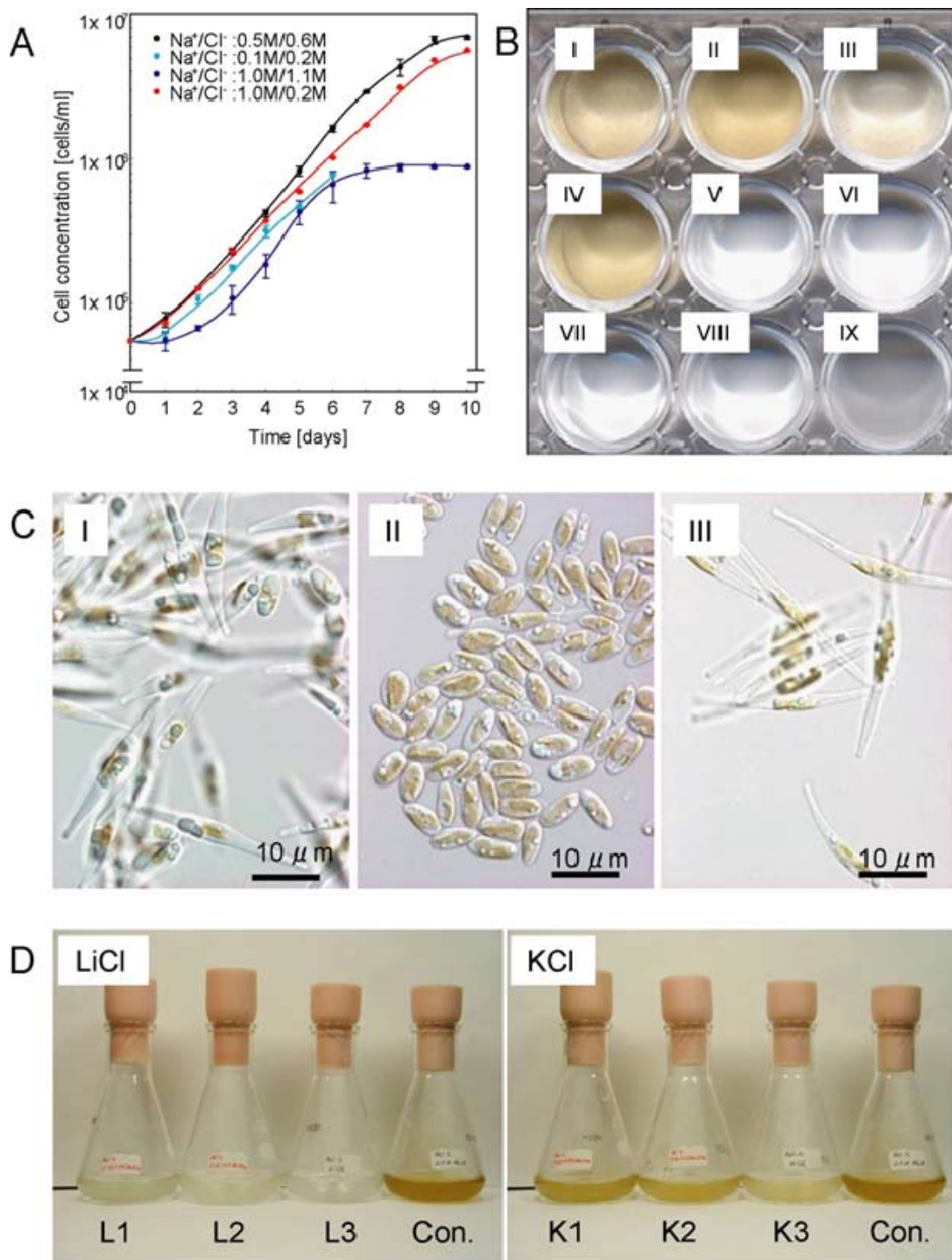


図 1. *P. tricornutum* の成長特性と塩濃度. A, 様々な NaCl を含む F/2ASW における成長曲線. B, I, 0.1 M NaCl; II, 0.5 M NaCl; III, 1.0 M NaCl; IV, 0.5 M Na₂SO₄ における 2 週間培養の結果; V, 0.1 M NaCl + 0.45 M Tris-SO₄ F/2ASW; VI, 0.1 M NaCl + 1.0 M choline-Cl F/2ASW; VII, 0.1 M NaCl + 0.2 M LiCl F/2ASW; VIII, 0.1 M NaCl + 1.0 M Sorbitol F/2ASW. C, I, 0.5 M NaCl; II, 0.1 M NaCl; III, 1.0 M NaCl 存在下の細胞形態. D, 0.2 M LiCl 或いは 0.2 M KCl 存在下に Na₂SO₄ を加えた 2 週間培養液の様子. 1, 2, 3 の番号はそれぞれ最終濃度の Na⁺ が 1.0, 0.5, 0.1 M.

B)。一方、ナトリウムイオン源を Na_2SO_4 とした場合、1.0 M のナトリウムイオン濃度でも海水レベルの食塩濃度と同等の生育を示した(図 1A, B)。また、低塩濃度に移した後の生育過程では紡錘型の細胞が俵型に形態変化しているのが確認された(図 1C)。このことから、海洋性珪藻類が海水レベルの塩濃度をその正常な細胞生理および形態の維持に必要としていることが示唆された。また、リチウムイオンおよびカリウムイオンの存在は 0.2 M 程度でも非常に毒性が高く、細胞の成育がほとんど見られなかったが、ここに Na_2SO_4 を添加すると、濃度依存的にこれらカチオンの生育阻害に対して緩和効果を示した(図 1D)。

塩を強く要求する細胞内代謝として、我々は光化学系 II の水分解系の可能性を考えてきた。生細胞を用いた実験で、ネット酸素発生速度および PSII 活性が 0.5~1.0 M の Na^+ 存在下で活性化され、低 Na^+ 環境では活性低下を起こすこと、および Cl^- は海水レベル以上の高濃度であると Na^+ の効果を相殺し、低 Na^+ 環境であれば Cl^- は PSII 活性に対して著しく阻害的に働く結果が得られた(図 2)。

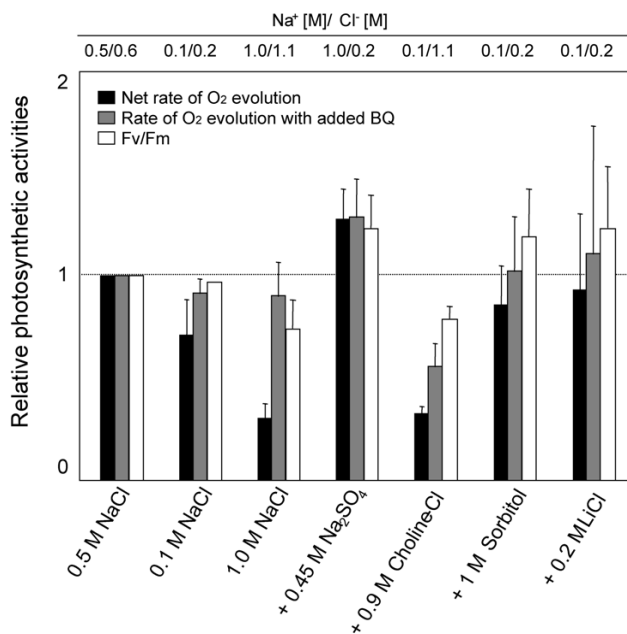


図 2. 様々な塩濃度における光合成速度. それぞれ表示されている NaCl 濃度の F/2ASW で光合成速度を測定した. 右側 4 件の測定に関しては、0.1 M NaCl を含む F/2ASW にそれぞれの薬剤を添加した. 黒はネット酸素発生速度、グレイは $p\text{-BQ}$ 存在下の酸素発生速度、白は PSII のバリアブルフルオレセンスを示す.

3. 2 電子伝達活性を保持したチラコイド膜の調整

F/2ASW-0.5 M NaCl で生育した細胞を遠心分離によって集め、細胞破碎用緩衝液で洗浄した。この細胞を細胞破碎用緩衝液に再懸濁し、液体窒素で凍結し -80°C で保存した。この試料を解凍し、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、葉緑体蛍光が観察された(図 3)。この試料を測定用緩衝液に懸濁し、光を照射すると 0.5 mM $p\text{-benzoquinone}$ 存在下でのみ光依存的な酸素発生が確認された。

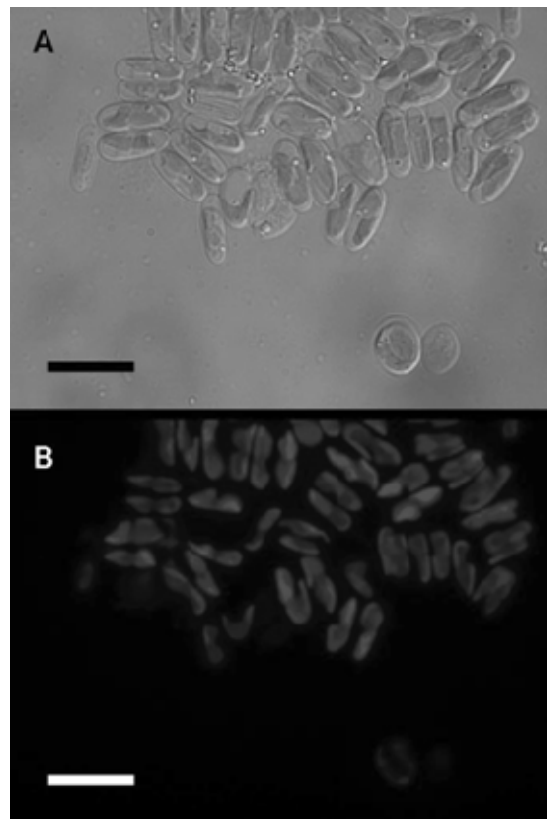


図 3. 凍結融解法により作製した活性チラコイドを含む細胞. A, 明視野, B, 葉緑体蛍光. スケールバー, 10 μm . このプレパレーションは無機炭素依存的な酸素発生をしなかった.

3. 3 調整チラコイドの PSII 活性に対する様々な陽および陰イオンの影響

PSII 測定用試料を測定用緩衝液 0.01 M Tris HCl (pH 6.8) に懸濁し、ここに様々な陽および陰イオンを加えて PSII 活性を測定した。その結果 NaF を添加した場合、 NaCl と非常に似た濃度依存的な PSII 活性の促進効果が観察された(図 4, A)。 NaF 添加による促進効果は、終濃度 0.5 M 以上で顕著に観察され、以降 1.0 M まで濃度依存

的であった(図 4, A)。この 0.5~1.0 M の間の活性促進効果の濃度依存性は NaCl の場合とよく一致した(図 4, A)。一方、Cl⁻ や F⁻ よりも分子半径の大きなハロゲンイオンである Br⁻ および I⁻ の Na 塩を添加した場合、濃度依存的な PSII 活性促進は観察されず、むしろ阻害活性を示した(図 4, A)。また、阻害効果は NaI の方が NaBr に対して有意に高いことが示された。

次に、カオトロピック性を持たないアニオンである SO₄²⁻ および NO₃⁻ の Na⁺ 塩を添加して同様の実験を行ったところ、Na₂SO₄ の添加によって 0.1 M 程度の低濃度から高い PSII 活性促進効果を示し、これは 1.0 M 以上の高濃度域まで濃度依存的に増加した。その促進効果は同じ濃度の NaCl の添加に比して 2 倍以上であった(図 4, B)。一方、NaNO₃ を加えた場合は NaCl よりも酸素発生は抑制された(図 4, B)。しかしながら、NaNO₃ の濃度が高まるにつれ、PSII 活性は徐々に高まる結果となった(図 4, B)。

NaCl および Na₂SO₄ の PSII 活性化効果を検証する為に、

Na⁺ を含まないイオンソースである、Cholin 塩を添加したところ、SO₄²⁻ および Cl⁻ に濃度依存的な PSII 活性促進効果は見られなかった(図 4, C)。

3. 4 表在型 PSII コンポーネントの配列比較解析

PSII のルーメン側を構成する表在タンパク質として知られるポリペプチドのうち、*P. tricornutum* ゲノム上には、核コード型の PsbH、O、P、Q、U および葉緑体コード型の PsbV が見出された。これらの予測される立体構造を、タバコおよびシアノバクテリアで既に調べられている PSII 表在タンパク質の構造を鋳型として構築し、表在電荷のマッピングを行ったところ、PsbH、P、Q、V において鋳型のそれらと *P. tricornutum* 由来の配列では大きな違いは見られなかった。一方、PsbO および U において、*P. tricornutum* 由来の配列で局所的に珪藻特異的と考えられる特徴が見つかった。

PsbU および O の他の PSII タンパク質との相互作用に重要な部位を推定し、その配列を比較解析したところ、PsbU において PsbO との結合に必要な領域に強い正電荷

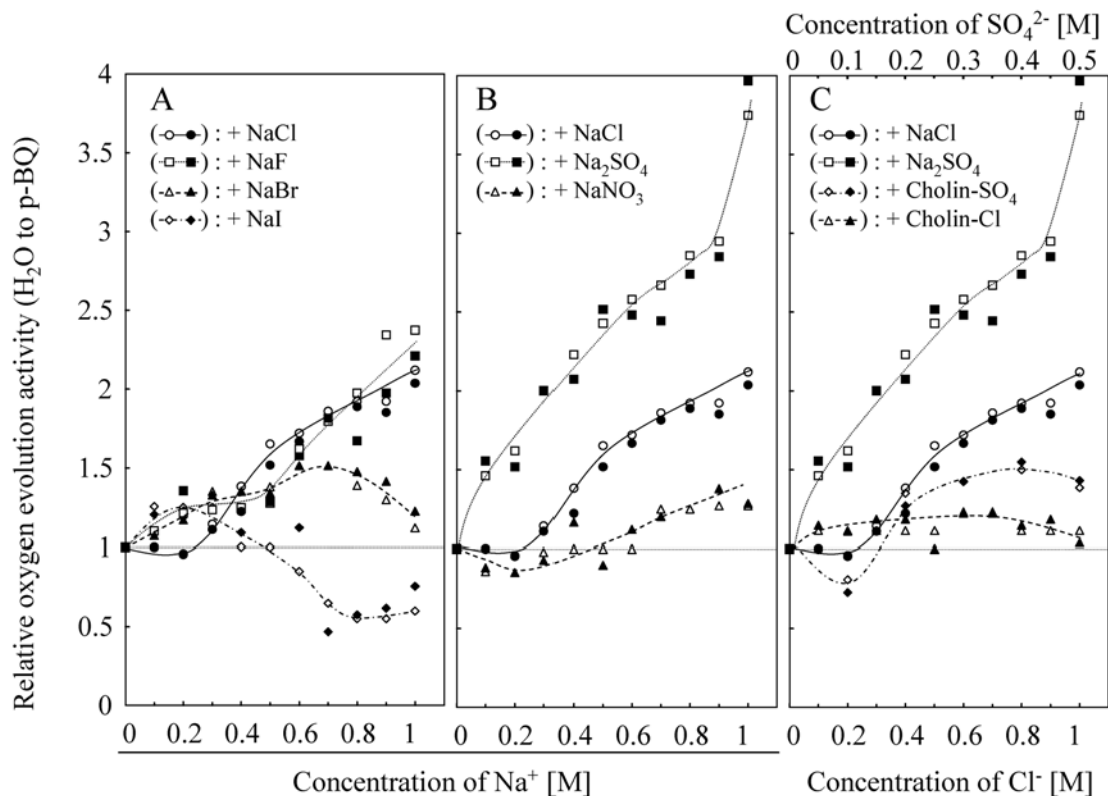


図 4. 凍結融解法により得た、*P. tricornutum* チラコイド膜の様々なイオン存在下における PSII 活性. A, 4 種のハロゲンイオン Na 塩を加えた測定; B, 塩素イオンを 2 種の非カオトロピック性イオンに置換した測定; C, Na⁺ を含まない陰イオン源を用いたコントロール実験. 2 回の測定結果を示す。

を有する Arg 残基が二つ存在することが分かった(図 5, A)。また、PsbU の分子系統樹から、珪藻類は原始紅藻類と同じクレードを形成していた(図 5, B)。

PsbO についても同様に PSII 表在タンパク質との相互作用部位近傍のアミノ酸配列を、他の独立栄養生物のものと比較したところ、D2 タンパクおよび PsbU と相互作用することが知られている領域が、種間で保存性が極めて低くその他の表在タンパク質との結合領域では保存性が極めて高いことが示された(図 6, A)。低保存領域(図 6, A Low conserved region)にはグルタミン酸やアスパラギン酸などの酸性残基が多く集まっていることが示されたが(図 6, A)、特に *P. tricornutum* では酸性度の高いアスパラギン酸の割合が高く、三つタンデムに並んでいる領域を中心に高酸性領域を形成していた(図 6, A)。

PsbU と同様、PsbO も原始紅藻類や渦鞭毛藻類と分子

系統上同じクレードに属していた(図 6, B)。また、タンパク質の等電点を調べたところ、低保存領域の PI は珪藻類で非常に低かった(図 6, B)。

3. 5 PsbO および PsbU の立体構造と表在アミノ酸の特徴

好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* の PsbO および U(図 7, A, B)を鋳型として *P. tricornutum* の PsbO および U の立体モデルをそれぞれ構築し(図 7, C, D)比較した結果、配列比較において酸性アミノ酸が配置していた領域はいずれのタンパクにおいても表面に完全に露出しており(図 7, C, D)、さらにそれぞれの部位は PsbU においては PsbO との結合部位、PsbO においては D2、PsbU との結合部位となっている短ヘリックスであることが示された(図 7, E, F)。

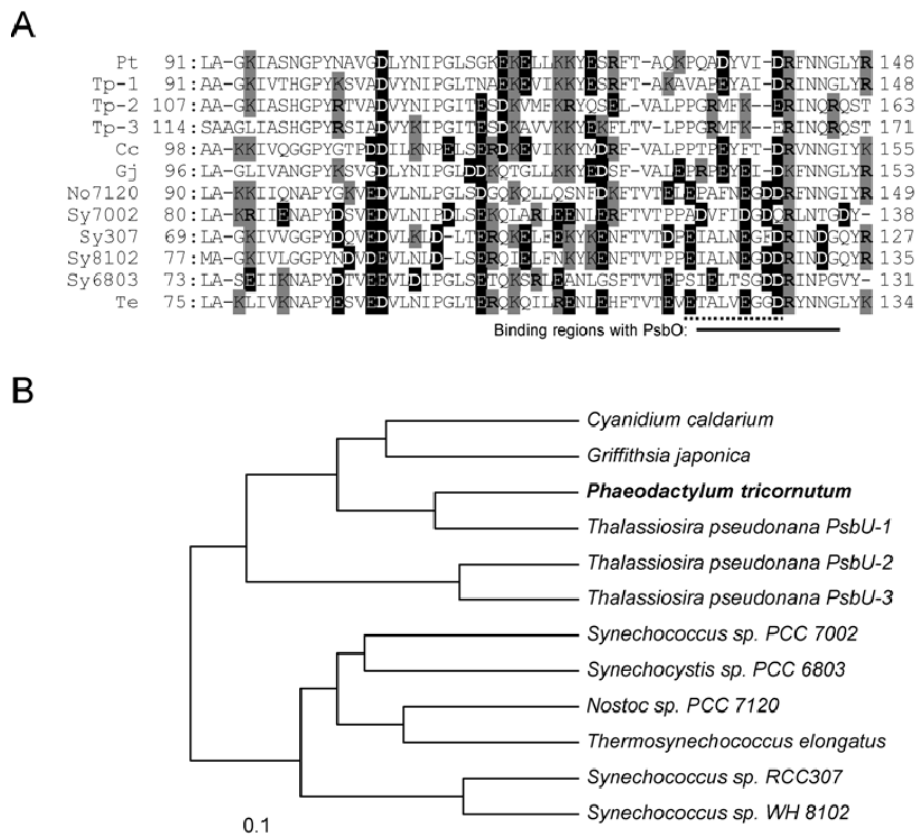
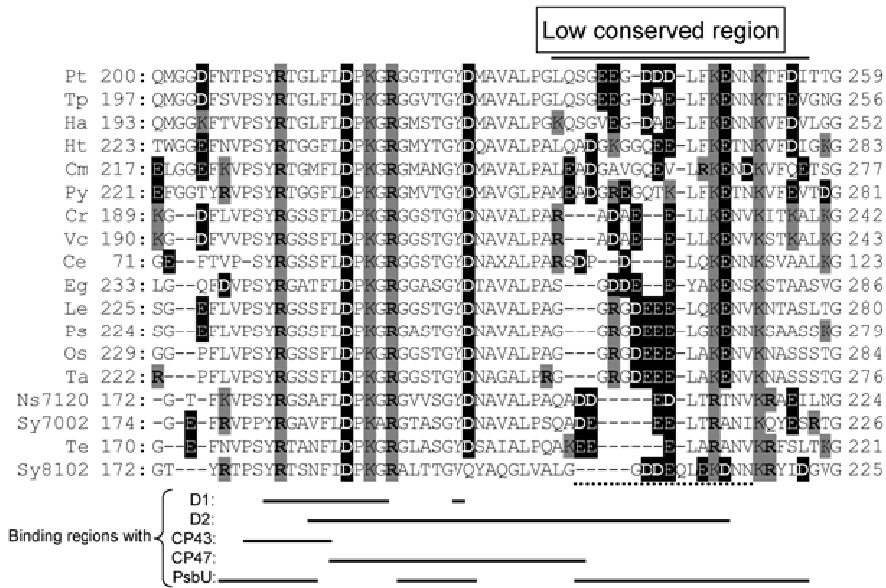


図 5. PsbU アミノ酸配列の比較解析. A, PsbO との相互作用領域近傍におけるシーケンズアライメント. 正電荷アミノ酸を黒地に白抜きで示す. 最も正電荷の強い Asp は太字で示す. 負電荷アミノ酸を灰色地で示す. 最も負電荷の強いアミノ酸 Arg を太字で示す. 実下線、PsbO 相互作用領域. 破下線、短ヘリックスを形成する領域. 起源生物は B にリストした. B, PsbU 配列から見た系統樹.

A



B

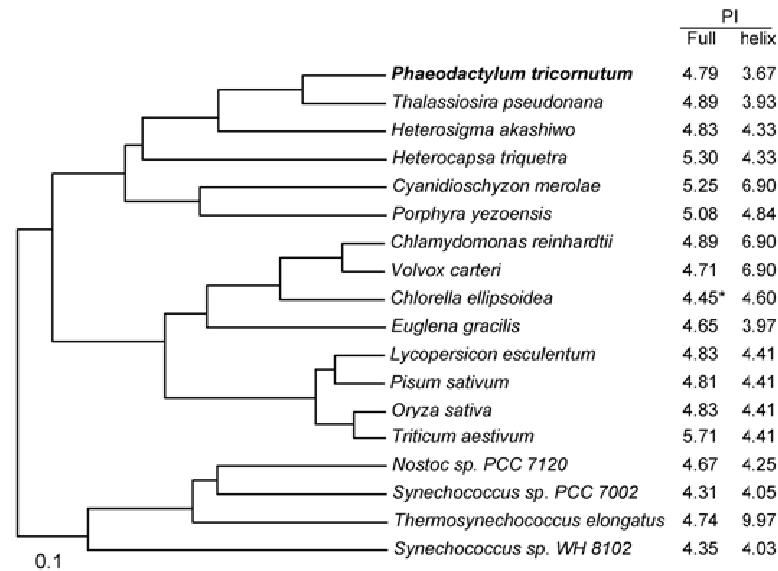


図 6. PsbO アミノ酸配列の比較解析. A, 表在タンパク質相互作用領域におけるシークエンスアライメント. 正電荷アミノ酸を黒地に白抜きで示す. 最も正電荷の強い Asp は太字で示す. 負電荷アミノ酸を灰色地で示す. 最も負電荷の強いアミノ酸 Arg を太字で示す. 実下線, それぞれの PSII コンポーネントとの相互作用領域. 上線, 低保存領域. 破下線, 低保存領域内の短ヘリックス形成領域を示す. 起源生物は B にリストした. B, PsbO 配列から見た系統樹. 右にタンパク全長 (Full) および短ヘリックス領域 (helix) の理論等電点値を示す.

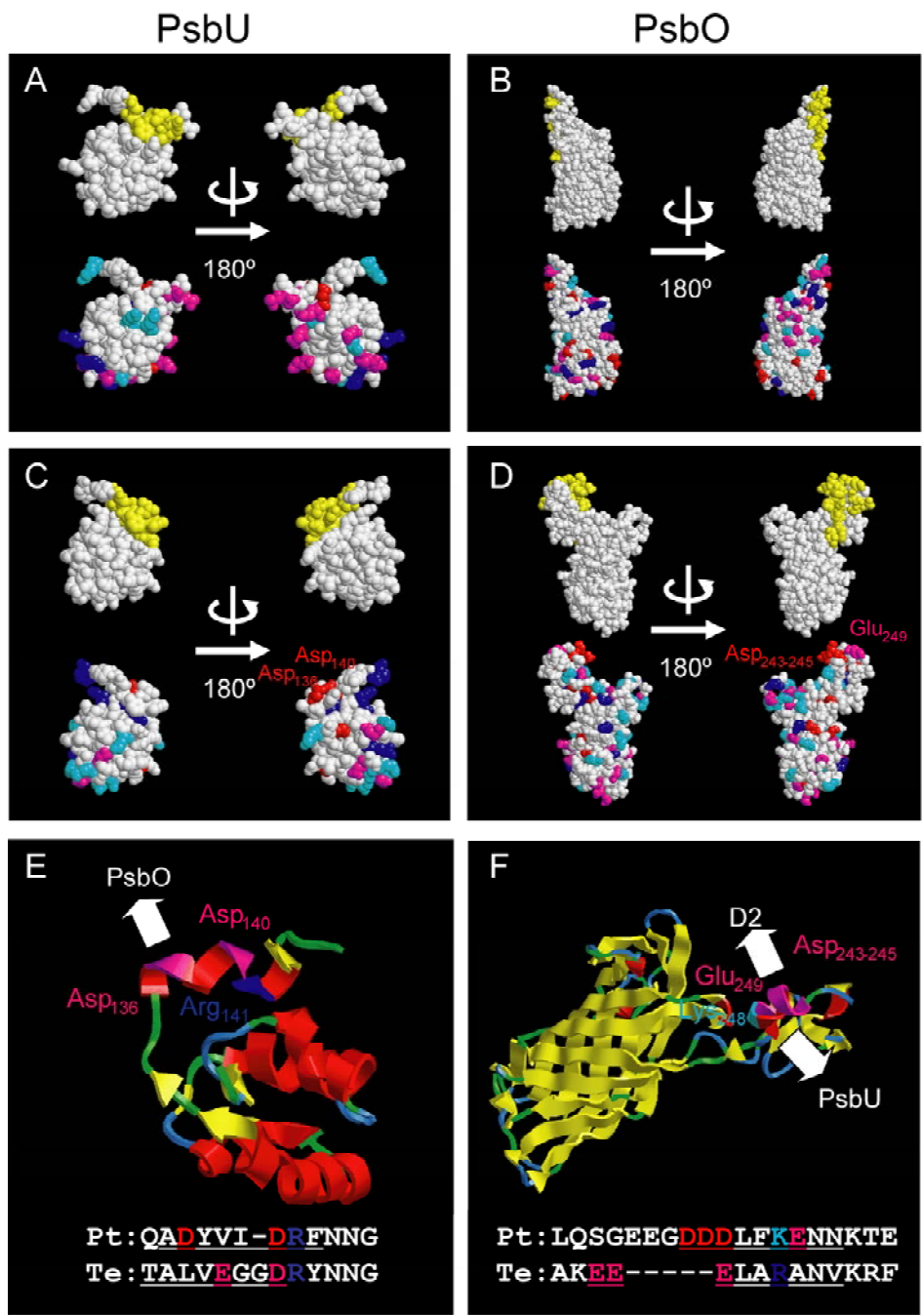


図 7. PsbO および U の表面荷電アミノ酸マッピング. A, B, *T. elongatus* の PsbU および O; C, D, *T. elongatus* の PsbU および O を鋳型とした、*P. tricornutum* の PsbU および O. A~B の黄色い部位はタンパク質相互作用部位、赤はアスパラギン酸、ピンクはグルタミン酸、青はアルギニン、水色はリシン. E, F はそれぞれ PsbU および O のタンパク相互作用領域を拡大したモデル図.

3. 6 cDNA-AFLP 法による半網羅的低塩応答性遺伝子発現解析

通常の塩環境 (0.5 M NaCl)、低塩ショック中 (0.1 M NaCl に 2 日間)、低塩順化後 (0.1 M NaCl で 2 日以上) の細胞をサンプリングし、これらから調整した dscDNA ライブ

ラリーを用いて cDNA-AFLP 解析を行った。その結果、低塩誘導性、低塩ショック誘導性、および低塩抑制性と考えられる遺伝子の産物が多数見出された。AFLP 解析のゲルから断片を回収し、その DNA 配列を確認後、これらの内部配列をもとに新たにプライマーを設計し、その遺伝子

の塩応答性について定量的 RT-PCR の手法を用いて確認した(図 8)。その結果最終的に応答性が確認された遺伝子として、低塩誘導性遺伝子 14、低塩ショック誘導性遺伝子 40、および低塩抑制性遺伝子 20 が残った(図 8)。

低塩誘導性遺伝子は、ヒートショックファクター(HSF)をはじめ、輸送系、糖代謝系、および転写因子等のものが

見られた(図 9)。また、低塩ショック誘導性遺伝子にはやはり HSF やアスコルビン酸合成系酵素などをはじめ、輸送体や糖代謝系の遺伝子が見られた(図 6)。一方、低塩抑制性遺伝子にはカゼインキナーゼやアデノシンキナーゼなどリン酸転移酵素などが見出されたが、多くは機能未知の遺伝子であった(図 9)。

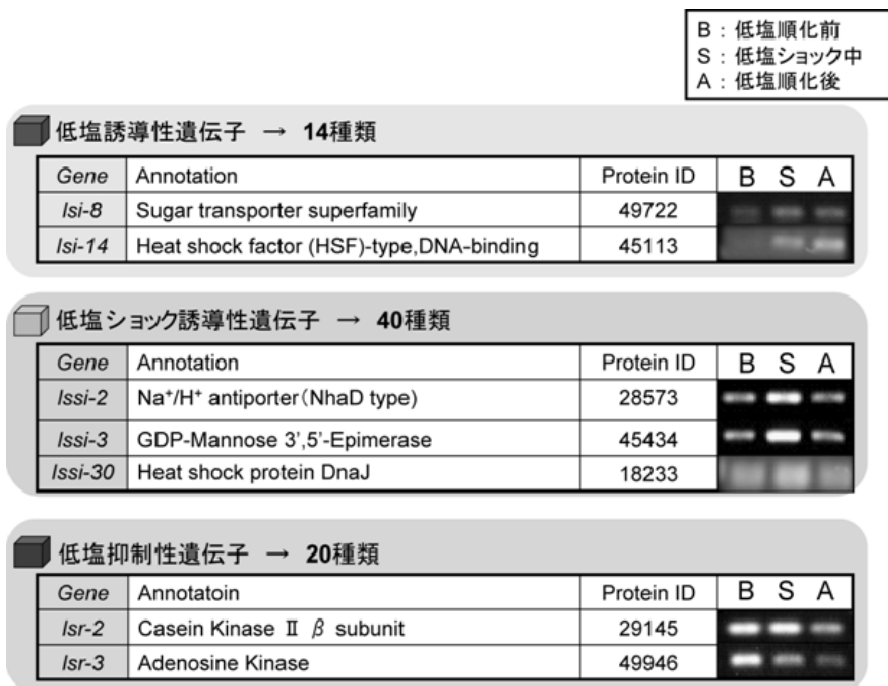


図 8. 塩応答性遺伝子

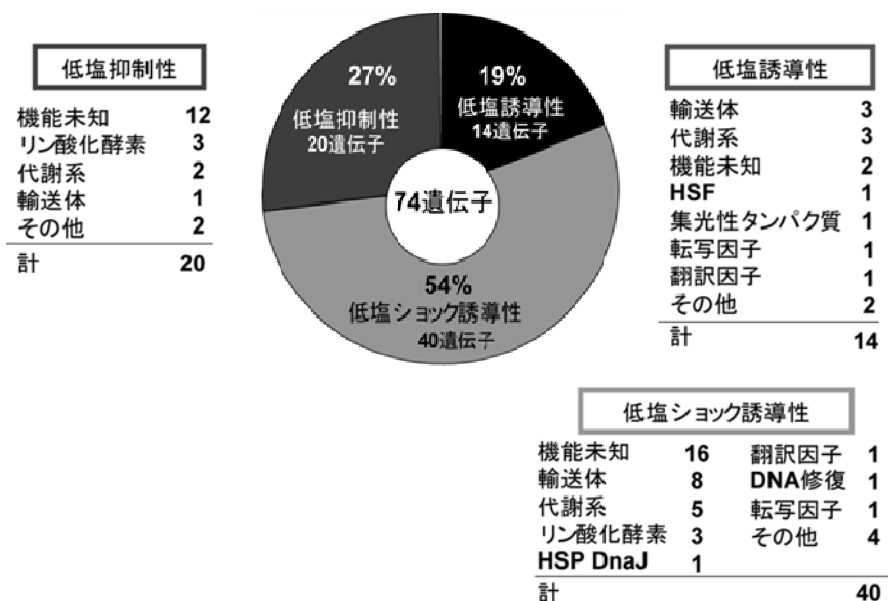


図 9. 低塩応答性遺伝子の分類

3.7 ナトリウムおよび塩素イオンの局在

海水レベルの食塩濃度(0.5 M Na⁺, 0.6 M Cl⁻)で生育した *P. tricornutum* では Sodium green および MEQ の蛍光シグナルがともに葉緑体蛍光の辺縁部に集中して観察され、ストロマおよび細胞質では微弱な蛍光しか観察されなかった(図 10)。これと同様の蛍光局在が低塩濃度(0.1 M Na⁺, 0.2 M Cl⁻)で生育した細胞でも観察された(図 10)。一方、高塩濃度(1.0 M Na⁺, 1.1 M Cl⁻)で生育した細胞では両方の蛍光シグナルが葉緑体蛍光とはほぼ完全にオーバーラップしており、これらの指示薬がストロマに局在していることが分かった(図 10)。同様の局在が高ナトリウムイオン、低塩素イオン環境(1.0 M Na⁺, 0.2 M Cl⁻)で生育した細胞でも観察されたが(図 10)、この細胞では MEQ のシグナルは微弱であった(図 10)。

セクショニング蛍光顕微鏡を用いて、通常海水で生育した *P. tricornutum* における Sodium green および MEQ の局在を更に詳細に調べ比較した。その結果、葉緑体蛍光よりも更に外側の範囲まで両蛍光シグナルが観察された(図 11, A)。葉緑体蛍光および両イオン指示蛍光のイメージをセクショニング観察し、立体画像を構築した後イメージをポリゴン化して境界面を強調した画像を作成した。その結果、葉緑体蛍光は葉緑体の内部にチラコイドの構造を反映していると考えられる不定形の形状を取って観察されたのに対し(図 11, B)、Sodium green および MEQ は葉緑体蛍光を包み込むような形状に観察された(図 11, B)。

この局在関係は葉緑体周辺に局在する蛍光画像の断面図を、立体構築したセクショニング画像より切り出し観察することによってさらに明確に示された(図 11, C)。すなわ

ち、葉緑体の中心部分をチラコイド構造が占めており、Sodium green および MEQ はいずれも葉緑体蛍光を取り囲む非常に薄い層を作って局在しており、ストロマにはわずかにしか見られなかった(図 11, C)。

3.8 イオン局在に対する様々なイオン輸送調節剤の影響

イオン輸送調節剤として Na⁺/H⁺ 交換体のブロッカーである、5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)-amiloride (EIPA) を終濃度 1 mM で、Na⁺/K⁺-ATPase ブロッカーである ouabain (OU) を終濃度 360 μM で、電圧ゲート Na⁺ チャンネルブロッカーの tetrodotoxin (TTX) を終濃度 60 μM で、Cl⁻ チャンネルブロッカー作用が期待できる indonyloxyacetic acid-94 (IAA-94) を終濃度 30 μM で、アニオン透過阻害剤 disodium-4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate (DIDS) を終濃度 0.5 mM で、および Na⁺ イオノフォア monensin (Mon) を終濃度 20 μM 用いて、通常海水生育細胞における Na⁺ および Cl⁻ の局在を観察した。TTX および DIDS を除くすべての薬剤処理で、葉緑体辺縁部への Na⁺ および Cl⁻ の局在が完全に消失した(図 12)。EIPA および Mon 処理が Na⁺ および Cl⁻ の局在を細胞全体に拡散しているように見える(図 12)一方で、OU および IAA-94 処理はストロマ内にイオンを拡散しているように観察された(図 12)。また、OU および IAA-94 処理では Sodium green シグナルが減衰していると考えられた(図 12)。TTX および DIDS による処理では、両蛍光シグナルの局在に変化は見られなかったが、その強度は無処理の細胞に比べて明らかに減衰した(図 12)。

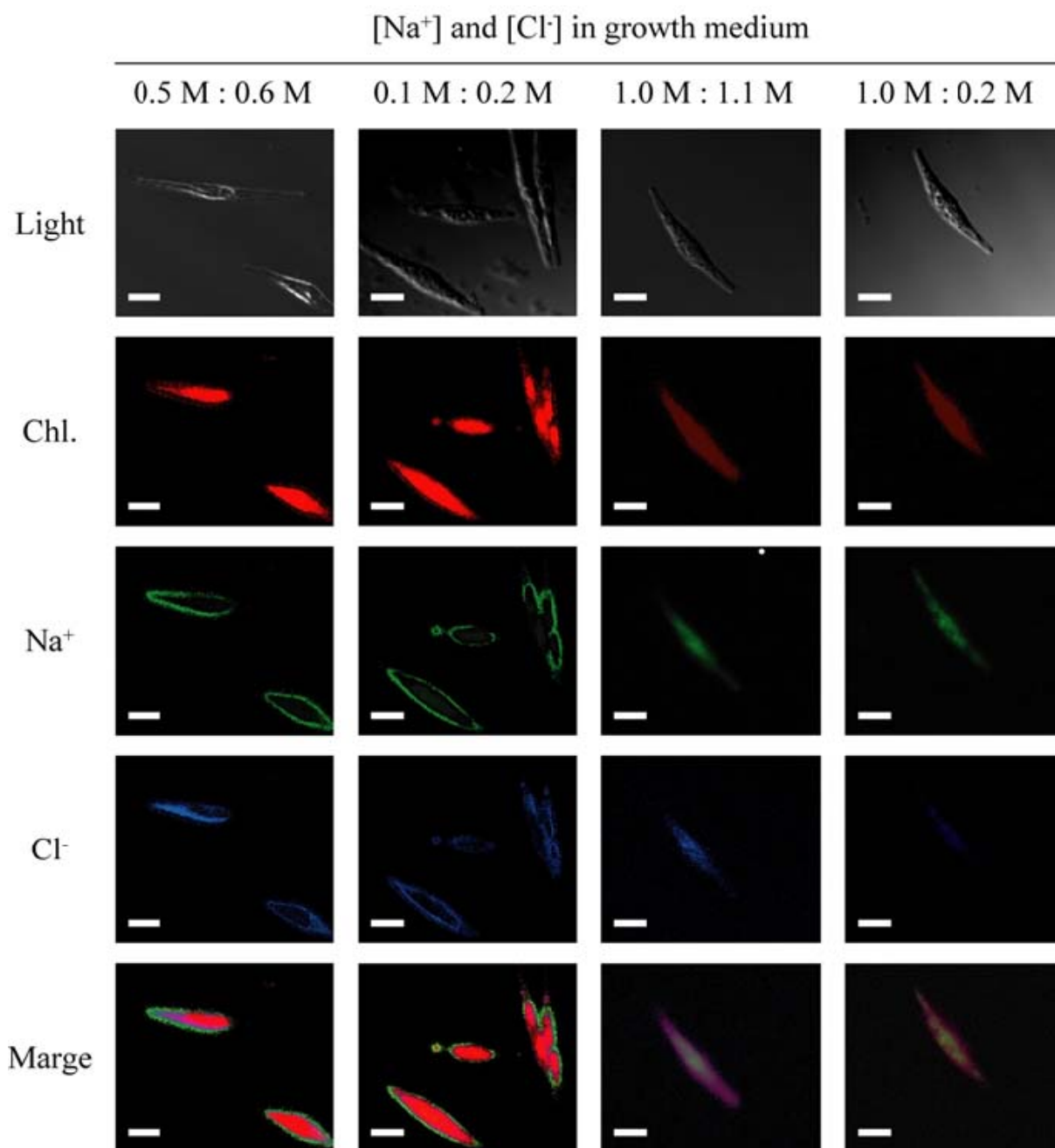


図 10. 様々な塩濃度環境で生育した細胞におけるナトリウムおよび塩素イオンの局在. 培養液中のナトリウムおよび塩素イオンの最終濃度を最上部に示す.

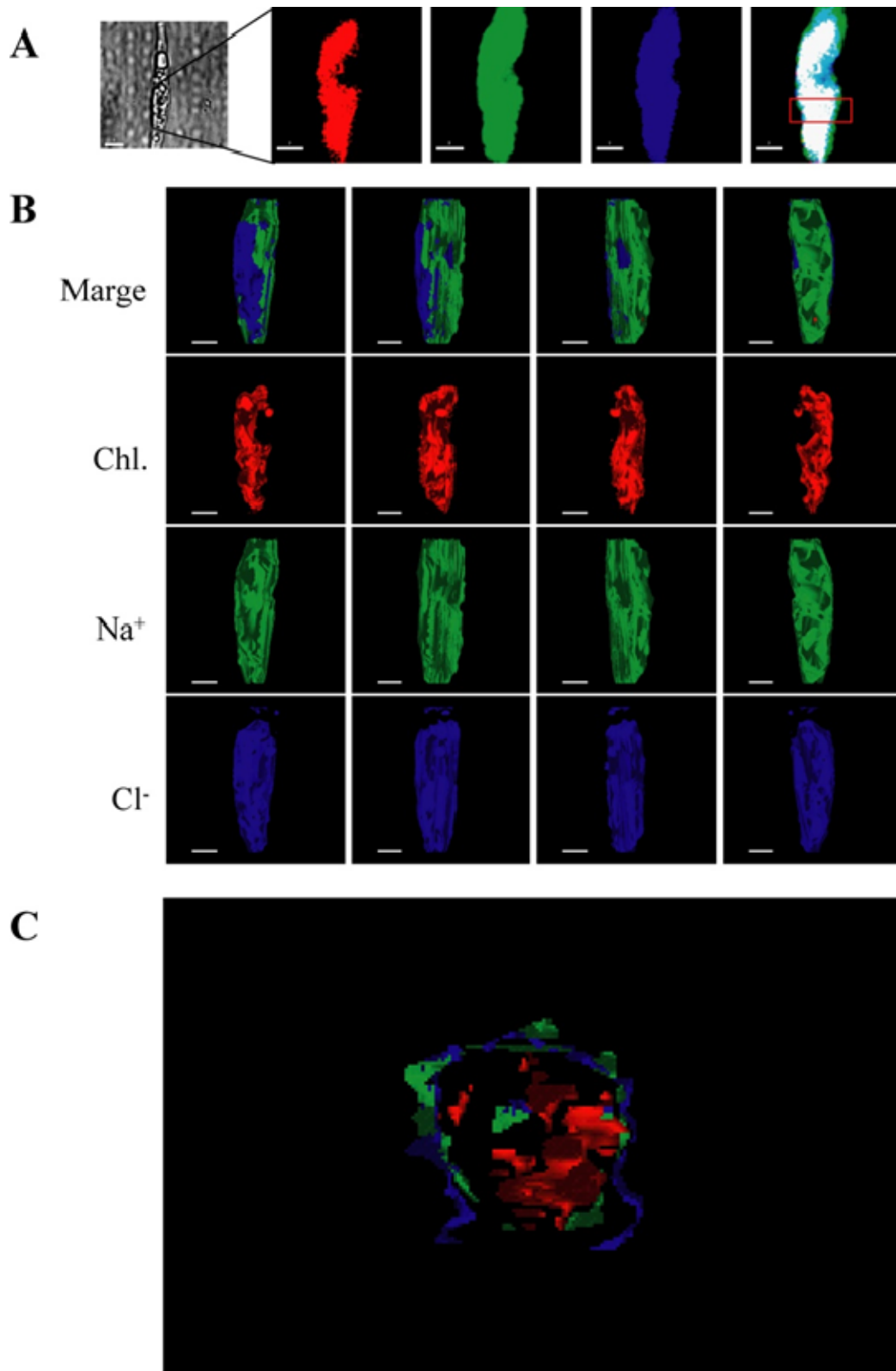


図 11. 通常海水で生育した細胞におけるナトリウムおよび塩素イオン局在のセクショニングイメージによる立体モデル分析. A, 左から明視野、葉緑体蛍光、Sodium green、MEQ のデコンボリューションイメージ、およびマージイメージ. B, 各蛍光イメージのポリゴン化立体画像. 立体モデルは 60° ずつ回転させている. C, A のマージ画像に示した赤枠で切り出した切片の断面図. 切片は 90° 回転させた断面図を示している.

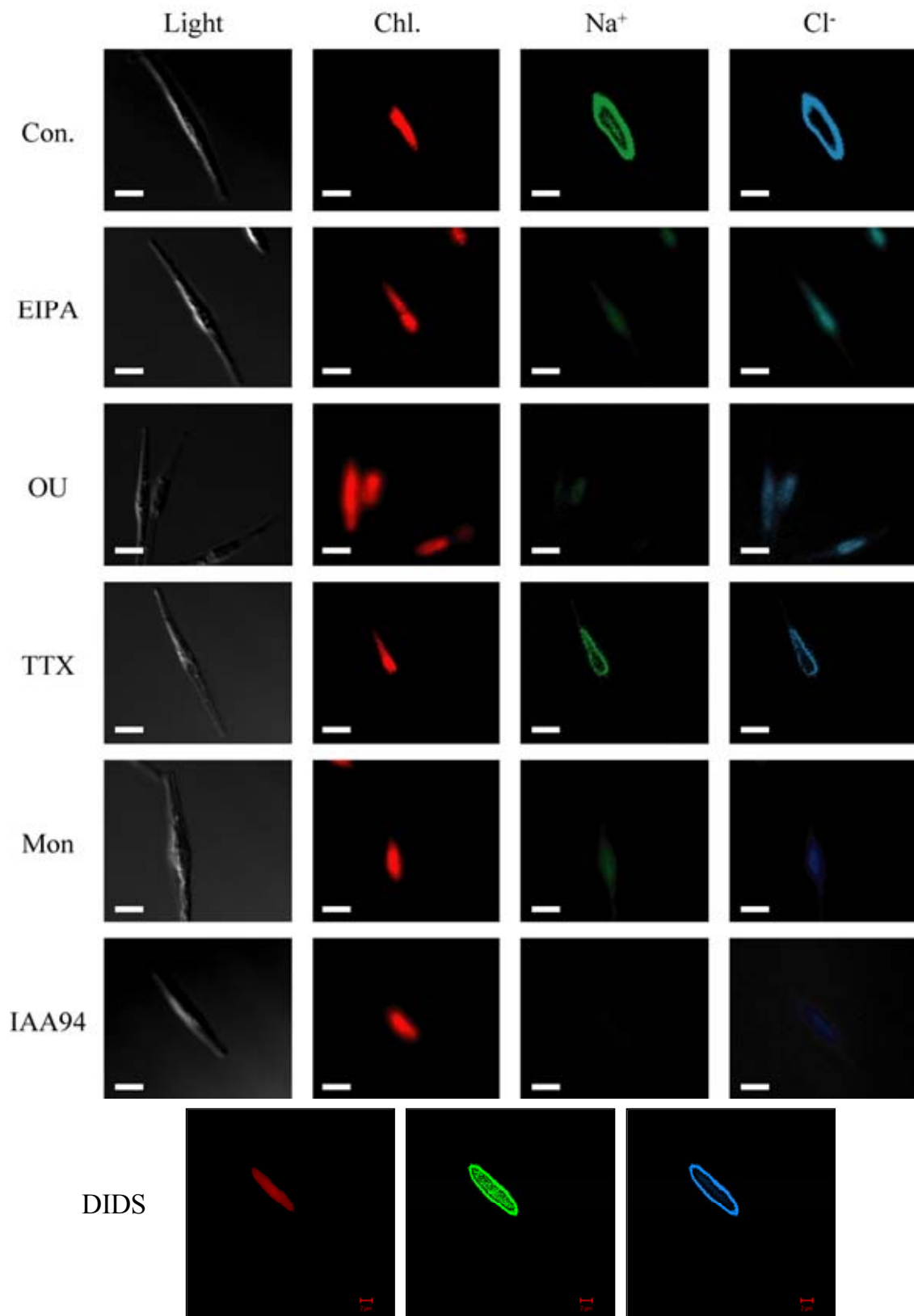


図 12. 通常海水で育成した細胞におけるナトリウムおよび塩素イオン局在に対する各種イオン輸送モジュレーター薬剤の影響. DIDS 処理については明視野画像を省いている.

4. 考 察

4.1 様々な Na⁺ ソース下における PSII 活性

本研究から海洋性珪藻 *P. tricornutum* は高 Na⁺ 低 Cl⁻ 環境でその光合成活性を増大し、PSII が活性化を受ける部位であることが示された(図 1)。また、高塩環境下では細胞内の Na⁺ が葉緑体に流入することが示唆された(図 10)。このことは、*P. tricornutum* の光合成器官が高 Na⁺ 低 Cl⁻ 環境で活性化される可能性を示唆している。すなわち、陸生の植物と対照的な塩応答性を有しており、細胞内生理の円滑な稼動にナトリウムイオンを必要とすることが強く示唆された。これは、細胞の形態変化やストレス応答からも支持される結果となった(図 1)。すなわち、珪藻細胞は高塩環境下では浮遊能力の高い羽状型となったが、低塩環境にさらされると、羽を引っ込め、互いに凝集し、着生型の形態になってしまった。さらに、リチウムイオンやカリウムイオンの生理毒性に対して、ナトリウムイオンによる濃度依存型の緩和が観察された。これらの結果は海洋性珪藻類が好塩性を有していることを強く示唆している。

本研究ではさらに、チラコイド膜の PSII 活性測定法を用い、様々な Na⁺ ソースを様々な濃度で添加した。その結果、NaCl だけでなく、NaF も PSII 活性促進効果を有することが分かった(図 4)。しかし、これより分子半径の大きなハロゲンイオン存在下では PSII 活性への阻害効果が大きいことから、ハロゲンイオンはやはり PSII に対して阻害的に働き、Na⁺ の活性化効果を相殺するものと考えられる。ハロゲンイオンの負の効果は、イオン半径の大きさに従って大きくなるため、これらアニオンのカオトロピック性が PSII 阻害に深く関与することが示唆された。

このことはさらに非カオトロピック性の陰イオンである SO₄²⁻ のナトリウム塩を用いた場合にさらに顕著であった。Na₂SO₄ の添加によって PSII 活性は NaCl の添加に比べて 2 倍程度の活性化を示した(図 4)。この効果はさらに 0.5 M 以上の Na₂SO₄ 添加でも濃度依存的に観察された。しかしながら、NaNO₃ によってはこのような効果は見られなかったため(図 4)、Na₂SO₄ の PSII 促進効果は SO₄²⁻ のアンチカオトロピック効果による可能性も考えられた。しかしながら、SO₄²⁻ のみの添加では PSII 活性促進は全く起こらなかったことから(図 4)、PSII は Na⁺ によって活性化され、Cl⁻ 等のハロゲンイオンは PSII に対して阻害的に働くというこれまでの仮説が強く支持される結果となった。

4.2 立体構造から見た珪藻の PSII ルーメン側

本研究から、海水レベル以上の高 NaCl 環境では、Na⁺ が葉緑体内に進入することが示唆され、これが PSII の安定化或いは活性化に寄与することが考えられたことから、PSII の酸素発生系近傍が好塩性を有する可能性が考えられた。ゲノム情報から得た珪藻 PSII コンポーネント配列から、藍藻 *T. elongates* の PSII を構造鋳型として立体構造を予測した結果、その相同性から非常に確度の高いと考えられる立体構造モデルを構築することが出来た(図 7)。その結果、ルーメン側表在タンパク質の二つ、PsbO および U において、酸性アミノ酸残基の多い領域が見出され、この立体構造予測から *P. tricornutum* の PSII では PsbO および U のタンパク-タンパク相互作用領域の表層が他の独立栄養生物のそれらよりも酸性であることが考えられた。酸性アミノ酸残基は超好塩性微生物のタンパク質表面に見られる一般的特徴で、Na⁺ 存在下でタンパク質の表面構造をより安定化する。このことは、PsbO と PsbU の D2 タンパク質への直接および間接的な相互作用が Na⁺ 存在下でむしろ安定化することを示唆しており、PSII 活性の Na⁺ 要求性の主要因の一つであると考えられる。

4.3 cDNA-AFLP 法による低塩誘導性遺伝子検索

昨年度に引き続き、cDNA-AFLP 法を用いて低塩応答性遺伝子を探索したところ、74 の遺伝子を応答性断片として確認することが出来た(図 8, 9)。これは検出された全断片 598 のうちの約 12%を占めており、低塩環境において 12%程度の遺伝子発現が影響を受けることが分かった。これらのうち、約 75%に当たる 54 の遺伝子は低塩或いは低塩ショックで誘導されるものであり、低塩によって抑制される断片よりもはるかに多かった。この中には Na⁺/solute symporter や Na⁺/H⁺ antiporter を含む 11 種類の輸送体遺伝子も含まれ、珪藻細胞が細胞内 Na⁺、pH、イオン強度のホメオスタシスを低塩環境に応答して積極的に維持していることが伺える。一方、低塩応答性遺伝子のうち、約 40%にあたる遺伝子がどのデータベースともホモロジーを示さない珪藻特異的な遺伝子であった。このことは珪藻類が独自の塩応答機構を有している可能性を示唆しており今後の課題として興味深い。

また、HSF やアスコルビン酸代謝系の酵素遺伝子の誘導が低塩で見られたため、低塩環境は海洋性珪藻類によってストレスとして認識されていることが強く示唆された。

4. 4 ナトリウムイオンと塩素イオンの細胞内局在について

本研究で用いた Sodium green および MEQ はそれぞれナトリウムおよび塩素イオンの特異的蛍光標識剤である。このため、これらの蛍光局在はそれぞれのイオンの存在位置を示していると考えられた。興味深いことにこれらイオンの局在は海水濃度レベル以下の塩濃度では葉緑体の辺縁部に集中しており、この領域に食塩を蓄積する仕組みがあることが示唆された(図 10, 11)。更に高い塩濃度ではこの蓄積は認められず、ストロマ内に両イオンが入り込んでいると考えられた(図 10)。珪藻は二次共生藻であり、この生物グループに特有の四重葉緑体胞膜を有する。蛍光指示薬の局在から、海水レベル程度までの塩濃度環境下ではこの多重膜系を活用して、この中に塩イオンを蓄積、塩濃度勾配を形成し、ストロマ内のナトリウムイオン濃度を適性に維持している可能性が考えられた。

この多重葉緑体胞膜系へのイオン局在に関わる分子メカニズムは現在不明であるが、TTX および DIDS 以外のイオン透過/輸送モジュレーター薬剤が塩イオン局在に大きな影響を与えている(図 12)ことから、いくつかの能動輸送体が能動的に塩イオンの葉緑体周辺での濃度勾配形成に働いていることが考えられる。これに対してナトリウムチャンネルやアニオンチャンネルは葉緑体周辺へのイオン局在に機能していないことが示唆された。OU が局在に大きな影響を与えたことから、これらイオン局在に Na^+/K^+ -ATPase が関わっていることが強く示唆された。

参考文献

- Allakhverdiev SI, Sakamoto A, Nishiyama Y, Inaba M, Murata N 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol* 123: 1047-1056
- Allakhverdiev SI, Klimov VV, Hagemann M 2005. Cellular energization protects the photosynthetic machinery against salt-induced inactivation in *Synechococcus*. *Biochim Biophys Acta* 1708: 201-208
- Blumwald E, Aharon GS, Apse MP 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta*. 1465: 140-151
- Erdmann N, Hagemann M 2001. Salt acclimation of algae and cyanobacteria: a comparison. In LC Rai, JP Gaur, eds, *Algal adaptation to environmental stresses*. Springer, Heidelberg, pp 323-362
- Falkowski PG, Barber RT, Smetacek VV 1998. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science* 281: 200-207
- Gaxiola RA, Yuan DS, Klausner RD, Fink GR 1998. The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4046-4050
- Greenway H, Munns R 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 149-190
- Gullard Ryther 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* Cleve. *Gran. Can J Microbiol.* 8: 229-239.
- Harrison PJ, Waters RE, Taylor FJR 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* 16: 28-35
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 463-499
- Kuwabara T, Murata N 1983. Quantitative analysis of the inactivation of photosynthetic oxygen evolution and the release of polypeptides and manganese in the photosystem II particles of spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 24: 741-747
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol* 109: 735-742
- de Paula JC, Li PM, Miller AF, Wu BW, Brudvig GW 1986. Effect of the 17- and 23-kilodalton polypeptides, calcium, and chloride on electron transfer in photosystem II. *Biochemistry* 25: 6487-6494
- Tréguer P, Nelson DM, Bennekom AJ, DeMaster DJ, Leynaert A, Quéquiner B 1995. The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science* 268: 375-379
- Tuteja N 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol* 428: 419-438

研究成果発表発表論文(2008年12月現在)

1. Hisashi Harada, Daisuke Nakatsuma, Maki Ishida, Yusuke Matsuda (2005) Regulation of the expression of

- intracellular β -carbonic anhydrase in response to CO₂ and light in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol*, 139: 1041-1050
2. Hisashi Harada, Kensuke Nakajima, Kunihiro Sakaue, Yusuke Matsuda (2006) CO₂ sensing at ocean surface mediated by cAMP in a marine diatom. *Plant Physiol*, 142:1318-1328
 3. Yusuke Matsuda, Hisashi Harada, Kensuke Nakajima, Brian Colman (2007) Sensing of Elevating CO₂ in a Marine Diatom. Molecular Mechanisms and Implications. *Plant Signalling & Behavior*, vol 2-2, 109-110
 4. Yoshiko Kitao, Hisashi Harada, Yusuke Matsuda (2008) Localization and targeting mechanisms of two chloroplastic β -carbonic anhydrases in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Physiologia Plantarum* 133: 68-77
 5. Kunihiro Sakaue, Hisashi Harada, Yusuke Matsuda (2008) Development of gene expression system in a marine diatom using viral promoters of a wide variety of origin. *Physiologia Plantarum*, 133: 59-67

Characterization of Salt Response Mechanisms in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*

Dr. Yusuke Matsuda, Dr. Yuji Tanaka, and Takuya Kanda

Department of Bioscience, School of Science and Technology, Kwansei-Gakuin University

Summary

Diatoms are the most dominant phytoplankton in the ocean and contribute to a quarter of the global primary production. In this study, responses of critical cell physiology and biochemical processes to salt concentrations were investigated in the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. Salt responsive genes were also screened and isolated by using the amplified fragments lengths polymorphism (cDNA-AFLP) technique. Cell of *P. tricornutum* could grow in a wide range of NaCl concentrations from 0.1 to 1.0 M. However cells exhibited a benthic oval form when grown in 0.1 M NaCl whereas in 0.5 and 1.0 M NaCl a floating fuciform was observed. In the presence of low (0.2 M) Cl⁻, Na⁺ showed mitigation effects against Li⁺ and K⁺ stresses in a concentration dependent manner. Na⁺ also stimulated PSII activity whereas Cl⁻ was inhibitory to the PSII. The active thylakoid membrane was prepared by freezing in liquid nitrogen and thawing cells grown in 0.5 M NaCl-ASW. *p*BQ-dependent-O₂-evolution rates were measured as the PSII activity. The PSII activity was stimulated by the addition of NaCl, NaF, or Na₂SO₄ whereas there was no stimulation by the addition of NaBr, NaI, Cholin-Cl, or Cholin-SO₄. These results indicate that the PSII in *P. tricornutum* is directly stimulated by Na⁺. *P. tricornutum* cells were grown in artificial seawater containing 0.5 M NaCl (0.5 M NaCl-ASW). Cells at mid-logarithmic phase were transferred to 0.1 M NaCl-ASW. A growth lag for 2 days was observed after starting low-salt treatment. Cells were harvested before the low-salt treatment, during 2 days of the early acclimation period, and the late acclimation period to low-salt after 4 days of the treatment. cDNA libraries were constructed from cells of each stage and cDNA-AFLP analysis was carried out using these cDNA libraries. As a result of cDNA-AFLP analysis, 74 low-salt responsive genes were screened and cloned. Of these, 40, 14, and 20 genes were identified as inducible at the early acclimation stage, the late acclimation stage to low salt, and repressive under low-salt condition, respectively. 40% of these 74 genes were found to be diatom-specific genes. Within the low-salt inducible genes, there were 11 transporter genes including Na⁺/solute symporter and Na⁺/H⁺ antiporter, suggesting that marine diatom cells actively maintain Na⁺, pH, and ionic homeostasis in response to low salt. Also, there were significant numbers of stress responsible genes. These results suggest that low salt environment is recognized as a stress by marine diatom cells. Finally, localization of intracellular Na⁺ and Cl⁻ by using specific fluorescent indicators, Sodium green and MEQ, showed that these ions are likely to accumulate in the four-layered-membrane system surrounding the chloroplast when cells were grown in the ordinary and low-salt seawater.

好塩性酵素の好塩性メカニズムを産業的に利用する

徳永 正雄, 石橋 松二郎, 徳永 廣子, 宮内 まゆみ

鹿児島大学農学部生物資源化学科

概要 本研究は、生育に「塩」を要求する好塩菌とそれが生産する好塩性酵素に関して、「極限環境生物である好塩菌が持つ極限能力を産業に活かす」という最終目標のため、好塩性酵素の好塩性メカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。

高度好塩性古細菌は生育に 2 M 以上の塩環境を必要とし、その酵素の多くは少なくとも 1 M 以上の塩がないと速やかに失活する。一方、中度好塩菌は 0.2 M～飽和食塩水という幅広い塩環境で生育可能で、その酵素は塩がなくても安定なものや塩があるほうが良いものなどさまざまな塩依存性を示す。一方、多くの通常生物由来の酵素は、1 M 程度の塩があると活性が阻害され、十分に機能しえない。本プロジェクトの開始時点で「好塩性酵素は酸性アミノ酸に富み、通常酵素に比べてタンパク質分子表面がマイナス荷電に偏っていて、そのため高い可溶性を示して塩析効果を受けにくく、また通常酵素にとっては重大な変性条件に置かれても好塩性酵素は凝集せず極めて高効率に高次構造を保持・回復する」という特徴を明らかにし、これが好塩性メカニズムの本質であると考え、以下のように本プロジェクト研究においてこの仮説が正しいことを実証してきた。

(1) 高度好塩菌由来の nucleoside diphosphate kinase (NDK) を His-tag を付加することによって大腸菌において初めて大量発現とX線結晶構造解析に成功した。その結果、予想通り蛋白表面の静電ポテンシャルは極端な負に傾き、それにも拘わらずポリペプチド主鎖の構造は非好塩性生物由来のものほとんど変わらず、酸性アミノ酸側鎖は極めて巧妙に配置されていた。

(2) 中度好塩菌由来の NDK (HaNDK) 遺伝子を取得し塩基配列を決定したところ非好塩性細菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株の NDK (PaNDK) とアミノ酸配列で高い相同性を示した (identity 78%, similarity 89%)。HaNDK と PaNDK の熱変性後の構造回復効率を比較することによって好塩性のメカニズムを考察した。熱変性後の構造・活性の可逆性を見るために、両酵素が完全に失活する 80°C で酵素を保温し、一定時間おきにサンプリングして氷上に置き、その後酵素活性を測定した。HaNDK は、変性温度での 60 分間の保温でも 80% の活性を示したが、PaNDK は直ちに失活した。HaNDK は、80°C では一旦変性するが、氷上で冷却することによって瞬時に構造・活性を回復したものと考えられ、中度好塩性菌由来酵素の高い構造可逆性が認められた。PaNDK は凝集体を作り、不可逆的に変性・失活したものと考えられる。

(3) HaNDK は初めての二量体構造であることが分った。HaNDK の 134 番目の Glu を Ala に変えることによって HaNDK は四量体に変換し、逆に PaNDK の Ala を Glu に変えることにより PaNDK の四量体が二量体に変換したことより、134 番目残基が二量体－四量体変換を支配していることが分かった。さらに PaNDK の 135 番目の Ala も Glu に変える (PaNDK/EE) と、この PaNDK 変異体は HaNDK と同程度の好塩性を獲得した。このように、C 末端近辺のアミノ酸配列とサブユニット構造や好塩性に関して極めて興味ある相関関係が得られた。

1. 研究の背景と目的

本研究では、通常生物がとてもし息できないような極限環境でも生息できる「極限環境生物」の一種である好塩菌と、それが生産する好塩性酵素に関して、「極限環境生物が持っている極限能力を産業に活かす」という最終目標のため、好塩性酵素の好塩性メカニズムを分子レベルで解明することを目的として研究を進めた。

好塩性酵素の研究は、日本人の食生活に欠かせない味噌・醤油やその他の塩蔵食品との関連で興味を持たれ、以前から蛋白質レベルの生化学的研究がなされていたが、好塩性メカニズムを解明するには至っておらず、近年、遺伝子レベルの研究が導入されて、詳細な分子レベルの研究が可能になってきた。我々はこのプロジェクトがスタートする時点において、好塩性酵素について以下の(1)～(3)に示した実験結果を得、それを基に好塩性メカニズムの仮説を提唱し、この3年間のプロジェクト研究でその仮説の検証と実用化を計ってきた。すなわち、

(1)好塩性酵素は、「その安定性に高濃度塩を要求し、精製等が困難である」という誤った先入観を覆し、絶対的に安定性に塩を要求すると言われてきた高度好塩菌由来の酵素(nucleoside diphosphate kinase, HsNDK)において^[1]、また特に多くの中度好塩菌由来酵素において、好塩性酵素は必ずしも塩を安定性に要求せず、さらに、塩環境を旨く選ぶことによって、通常生物由来の酵素が示すことができない極めて有用な性質(たとえば、煮沸にも耐える耐熱性など)を示すこと^[2]、

(2)多くの好塩性酵素遺伝子を分離し、その遺伝子情報を用いることにより、好塩性酵素の通常細菌中での大量発現・大量精製が可能であり、好塩性酵素の好塩性メカニズムの解明や、その産業的利用に活用できること^[3]、

(3)真正細菌である中度好塩菌は、0.2 M から飽和の食塩環境まで、極めて幅広い塩環境に適応して生育でき、興味深い性質を示すこと、

などの結果より、「好塩性酵素は酸性アミノ酸に富み、通常酵素に比べてタンパク質分子表面がマイナス荷電に偏っており、そのため高い可溶性を示して塩析効果を受けにくく、また通常酵素にとっては重大な変性条件に置かれても、好塩性酵素はその高い可溶性のため凝集せず、変性環境が取り除かれれば極めて高効率に高次構造を回復・保持する」という特徴を明らかにし、これが好塩性メカニ

ズムの本質であると考え、これを「好塩性メカニズム」の作業仮説として提唱した。

各年度の具体的な研究目標は、

第一年目:耐低塩・高度好塩性酵素 HsNDK の大腸菌における大量発現・精製・結晶化による構造解析、

第二年目:中度好塩菌 *Halomonas* sp.由来の NDK (HaNDK)と非好塩性通常細菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由来の NDK (PaNDK)のタンパク化学的比較検討を行い、中度好塩菌由来細胞質酵素にも上記作業仮説が当てはまるかどうかの検証、

第三年目:上記作業仮説が一般化できると考えられたので、モデル酵素 NDK を用いて、通常酵素 PaNDK に「好塩性を付与」し、この通常酵素をより高機能化する、とし、順次実験を実施した。

2. 研究方法

2.1 大腸菌における His-HsNDK の大量発現、大量精製

N-末端に His-tag (MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH 配列)を付加した His-HsNDK 発現ベクター pET15bHisHsNDK を大腸菌 BL21 (DE3)に形質転換した。His-HsNDK の合成を IPTG で誘導後、集菌し、50 mM リン酸 buffer、pH 8.0、2 mM MgCl₂、3 M NaCl、0.1 mM PMSF 溶液中で超音波破碎した。0.5 M NaCl、10 mM imidazole に調整し、Ni-NTA カラムに掛けた。0.3 M NaCl を含む buffer でカラムを洗浄後、250 mM imidazole で蛋白質を溶出した。溶出画分を 10 mM HEPES、pH 7.0、2 mM MgCl₂、0.3 M NaCl に透析し、4°C で保存した。

2.2 HsNDK の結晶化

結晶化は、18°C、Crystal Screen 1、Crystal Screen 2、Index Screen を使い、ハンギングドロップ法で行った。さらに Additive Screen を用いて条件検討した。基質との共結晶は、2-5 mM の nucleoside triphosphate 存在下で行った。また、結晶を 10 mM nucleoside solution に浸漬して作製した。

2.3 中度好塩菌 *Halomonas* sp. 593 株由来酵素 nucleoside diphosphate kinase (HaNDK)の精製・遺伝子クローニング

高度好塩菌由来 HsNDK の性質から予測して、HaNDK も ATP アガロースカラムに吸着すると考え、ATP カラムによ

る菌株のスクリーニングと精製を試みた。当研究室保有の
中度好塩菌を検索した結果 *Halomonas* sp. 593 株が
HaNDK の精製に最も適していることが判明し、以下この
菌株を使用した。

粗酵素液を 0.2 M NaCl を含む E-バッファー[50 mM
Tris-HCl(pH 8.0), 2 mM MgCl₂]で平衡化した ATP-アガ
ロース(Sigma 2767)カラムにかけ、0.2 M NaCl およびそれ
ぞれ 0.2、0.5、1.0 mM ATP を含んだ E-バッファーで、ATP-
アガロース結合蛋白を溶出させた。さらに、ATP カラムで
精製した HaNDK を 2 M (NH₄)₂SO₄-リン酸バッファー(pH
7.0)に透析後、TSK GEL Phenyl-5PW(TOHSO)カラムに
かけ、0.5 ml・min⁻¹の流速で硫酸濃度勾配で溶出し、均一
な標品を得た。

均一に精製した酵素たんぱく質を用いて、N-末端アミノ
酸配列を決定し、データベースと比較したところ、
Pseudomonas aeruginosa PAO1 株の NDK (PaNDK)と
80%近い相同性を示したことから、ゲノム解析によって塩
基配列が判明している PaNDK 遺伝子をプローブに用い
てサザンハイブリ、コロニーハイブリにより HaNDK 遺伝子
をクローニングした。

2. 4 His-HaNDK、HaNDK、His-PaNDK、PaNDK の大 腸菌における大量発現・精製・性質検討

取得した HaNDK および PaNDK 遺伝子を pET15b およ
び pET3a ベクターに組み込み、それぞれ N-末端に His x
6 タグが付加された His-HaNDK、His-PaNDK および His
タグが付加されていない HaNDK、PaNDK の大腸菌にお
ける発現ベクターを構築した。*E. coli* BL21 (DE3)に形質
転換し、各組み換え酵素を大量発現させて、ATP アガロー
スカラムを用いて精製した。

2. 5 精製標品の分子量は、ゲル濾過-光散乱計で測
定した^[4]。

2. 6 HaNDK および PaNDK の 134 番目、135 番目のア
ミノ酸残基を部位指定変異法で改変し、変異体
HaNDK/AE、HaNDK/EA、HaNDK/AA、および
PaNDK/EA、PaNDK/AE、PaNDK/EE を作成した。NDK/
の後に 134 番目、135 番目残基のアミノ酸を順次一文字表
記で表している。例えば、HaNDK/AE は、E134A 変異を
持った HaNDK 変異体酵素を意味している。これら変異体
のサブユニット構造は、化学架橋剤 ethyleneglycol
-bis(succinic acid-N-hydroxysuccinimide ester)で架橋後、

SDS-PAGE で分析した。

2. 7 酵素活性測定、円偏光二色性(CD)分析、SDS- リアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、蛋白 質量の定量など

NDK 酵素活性の測定、CD 測定はそれぞれ文献に記
載された定法で行った^[1,2]。

SDS-PAGE は、Laemmli の方法^[5]、蛋白質定量は
Lowry の方法^[6]で行った。

3. 研究結果と考察

3. 1 耐低塩濃度/高度好塩性酵素という呼称の提唱

通常生物由来の酵素は、高塩濃度存在下では活性が
阻害される。例えば、ブタ心筋ミトコンドリアの Malate
dehydrogenase や酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の
 α -Glucosidase は、1 M NaCl 存在下で非存在下の約 50%、
2 M NaCl 存在下では、約 20%の活性しか示さない。ところが
好塩性菌が生産する好塩性酵素は、3~4 M NaCl 存在
下でも 100~70%程度の活性を示す。

好塩性酵素は塩環境に適応しているため、塩依存性を
示すもの、すなわち蛋白質構造を安定に保つために塩を
要求するもの、が数多く知られている。特に、高度好塩性
古細菌由来のほとんど全ての高度好塩性酵素は、最低限
1 M 以上の塩の共存下でないと安定な高次構造を保てず
失活する。

我々は、より幅広い塩濃度領域、すなわち、典型的な好
塩性酵素が失活してしまう低塩濃度環境でも安定で活性
を示す好塩性酵素の分離を検討し、「低塩濃度耐性/好塩
性酵素」という呼称を提唱している(Fig. 1)。この種の酵素
は、酵素活性と塩濃度の関係を表したグラフでは、一見耐
塩性酵素と変わらないように見えるが、酵素蛋白に対する
塩の影響は両者で大きく異なる。すなわち、耐塩性酵素は、
「塩非存在下、もしくは塩濃度が低いところが至適であるが、
さらに高い塩濃度存在下でもなんとか活性を示す酵素」で
あるのに対して、我々が分離した低塩濃度耐性/好塩性酵
素は、「もともと高い塩濃度(~2 M 以上)が至適である好
塩性酵素が、低塩濃度でも活性を示す程度の構造安定
性を保っている酵素」と考えられる。

高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* 由来の
nucleoside diphosphate kinase (HsNDK) は、高度好塩菌由
来であるにもかかわらず塩非存在下でも活性を示す初め

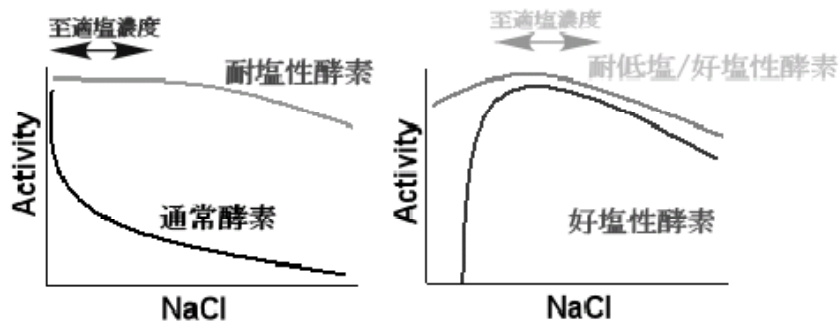


Fig. 1. Schematic illustration of low-salt resistant/highly halophilic enzyme

ての酵素である (Fig. 2)。HsNDK は、高度の好塩性酵素であるにもかかわらず塩非存在下でも安定性と活性を示すという性質は、高度好塩性酵素の低塩濃度条件下での挙動を調べる上で極めて有用な材料である。

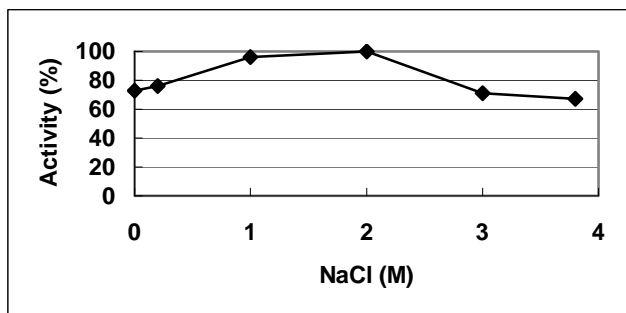


Fig. 2. Enzymatic activity of nucleoside diphosphate kinase (HsNDK) in the presence of salt from extremely halophilic archaon, *Halobacterium salinarum*. HsNDK activity was measured in the presence of 0 - 3.8 M NaCl.

3. 2 His-HsNDK の大腸菌における発現

HsNDK は、塩非存在下でも活性を示すが、いったん変性するとその巻き戻りには高濃度の塩を必要とする^[7]。いったん巻き戻ると塩非存在下でも活性を保っており、このことから HsNDK は、安定性や活性に塩を要求しないが、高次構造の形成には高濃度塩を要求する好塩性酵素である。よって HsNDK を通常細菌である大腸菌を宿主として発現させても蛋白質は可溶性画分に発現されるが、活性を持っておらず、正しく高次構造を形成していないことが考えられた。ところが、この大腸菌を用いた発現において、HsNDK の N-末端に His-tag を付加して発現を試みたところ、驚いたことに、正しく高次構造を形成し、活性を保持した状態で発現されることを見出した (Fig. 3)。

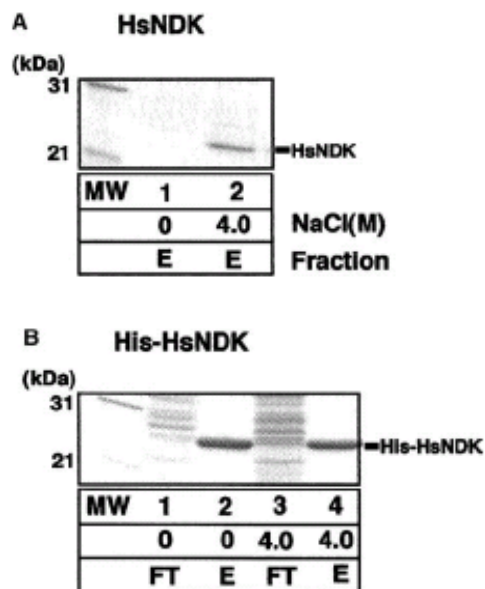


Fig. 3. His-HsNDK expressed in *E. coli* bound to ATP agarose column. E, elution with ATP; FT, flow through fraction.

Fig. 3A に示したように HsNDK は塩非存在下では ATP カラムに結合しない (活性を持たない) が、Fig. 3B に示すように His-HsNDK は、塩非存在下でも ATP カラムに結合し native な活性を保持していることが分かった。His-tag の効果は *in vitro* の巻き戻し実験でも確認できた。すなわち、Fig. 4 に示すように、His-HsNDK (a) は早いスピードで巻き戻すが、His-tag をスロンピンで切り離れた digested-HsNDK (b) は、HsNDK (c) と同様の遅いスピードで巻き戻った。His-tag を付けるという簡単な操作で高度好塩菌由来の好塩性酵素が大腸菌の中でも活性をもった形で発現できることを示した最初の例であり、酵素蛋白の大量調整に道を開くことができた。

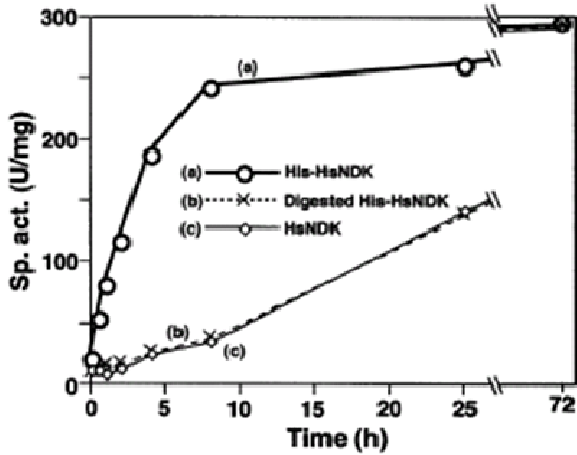


Fig. 4. His-tag facilitated the refolding of HsNDK *in vitro*

3. 3 HsNDK の結晶化と X 線解析

His-HsNDK を大腸菌で大量発現、大量精製し、His-tag を付加したままの状態と His-tag を除去した状態、さらに、基質 (CDP) 分子を結合した状態としていない状態で、結晶作製を検討し、得られた結晶から分子置換法により六量体の構造を決定した^[8]。構造は N-末端から β -構造と α -ヘリックス構造が繰り返す $\alpha\beta$ 混合型構造である。

HsNDK の蛋白質表面の電荷分布を Fig. 5 (A, 横から見

た図; C, 上から見た図) に示した。対照としてヒト NDK を (B, 横から) と (D, 上から) に示すが、HsNDK 表面は、マイナス荷電 (赤色) に富んでいること、ヒト NDK は、それに比べて、中性 (白色) もしくはプラス荷電 (青色) に覆われている領域が多いことを示している。酸性アミノ酸によるマイナス荷電に富んでいることは、好塩性酵素の特徴であるが、HsNDK は一次構造上も高次構造上もこの性質を持っていることが確認できた。

基質 CDP との共結晶の解析結果を Fig. 6 に示す。CDP との結合に関与するアミノ酸残基とその結合様式 (水素結合は青、塩橋は赤、ファンデルワールス相互作用は緑、 π -スタッキングは黄色の矢印) で示してある。CDP のリン酸は、 Mg^{2+} イオンを介して Glu55 と、また活性中心 His119 と結合している。

Fig. 7 に様々な生物の NDK のアミノ酸配列を示している。一番上の列が HsNDK で、二番目に最近ゲノム解析が終了した同じく高度好塩菌である *Haloarcula marismortui* の NDK を示し、以下非好塩性生物である真核生物由来、原核生物由来の NDK を示している。赤色で塗りつぶしたところは、すべての NDK に共通なアミノ酸残基であり、同種のアミノ酸残基に富んでいる領域は赤色文字で表示し

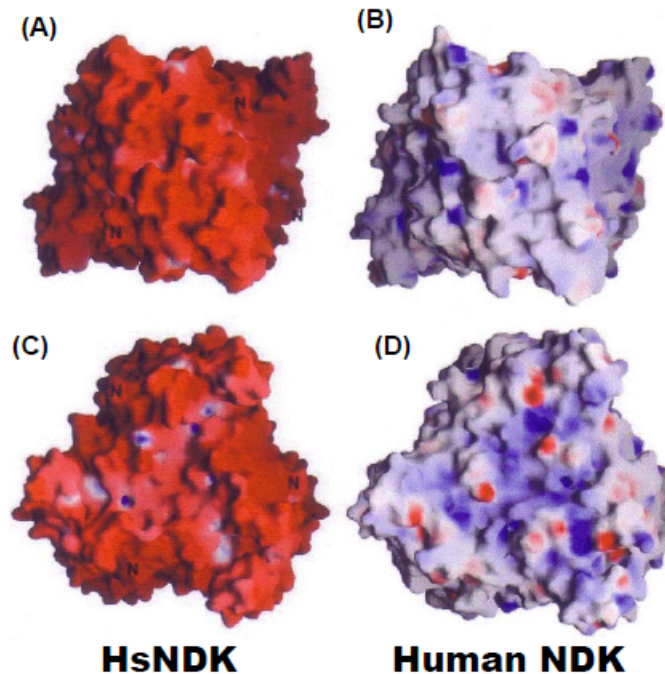


Fig. 5. Electrostatic potential of HsNDK and human NDK. Red, negative; positive, blue. (A) and (C), HsNDK; (B) and (D), human NDK.

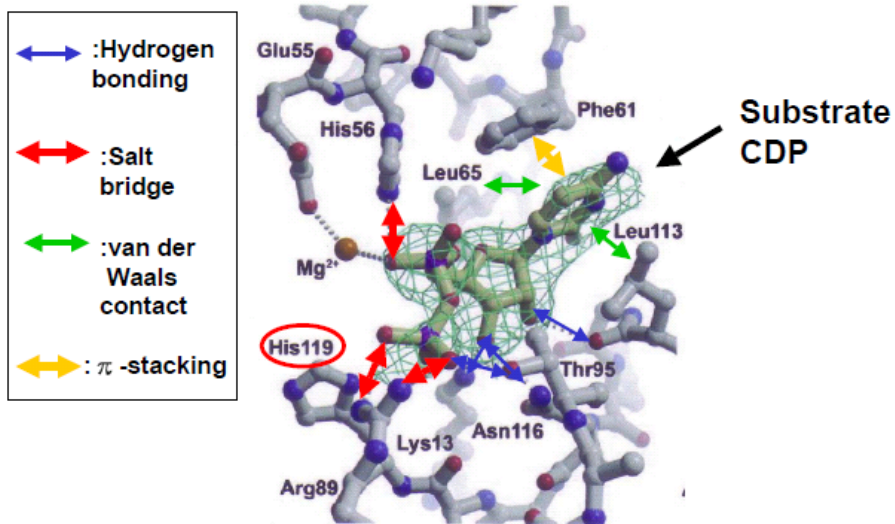


Fig. 6. Binding of substrate CDP at catalytic pocket of HsNDK. His119 is active site of phosphate binding.

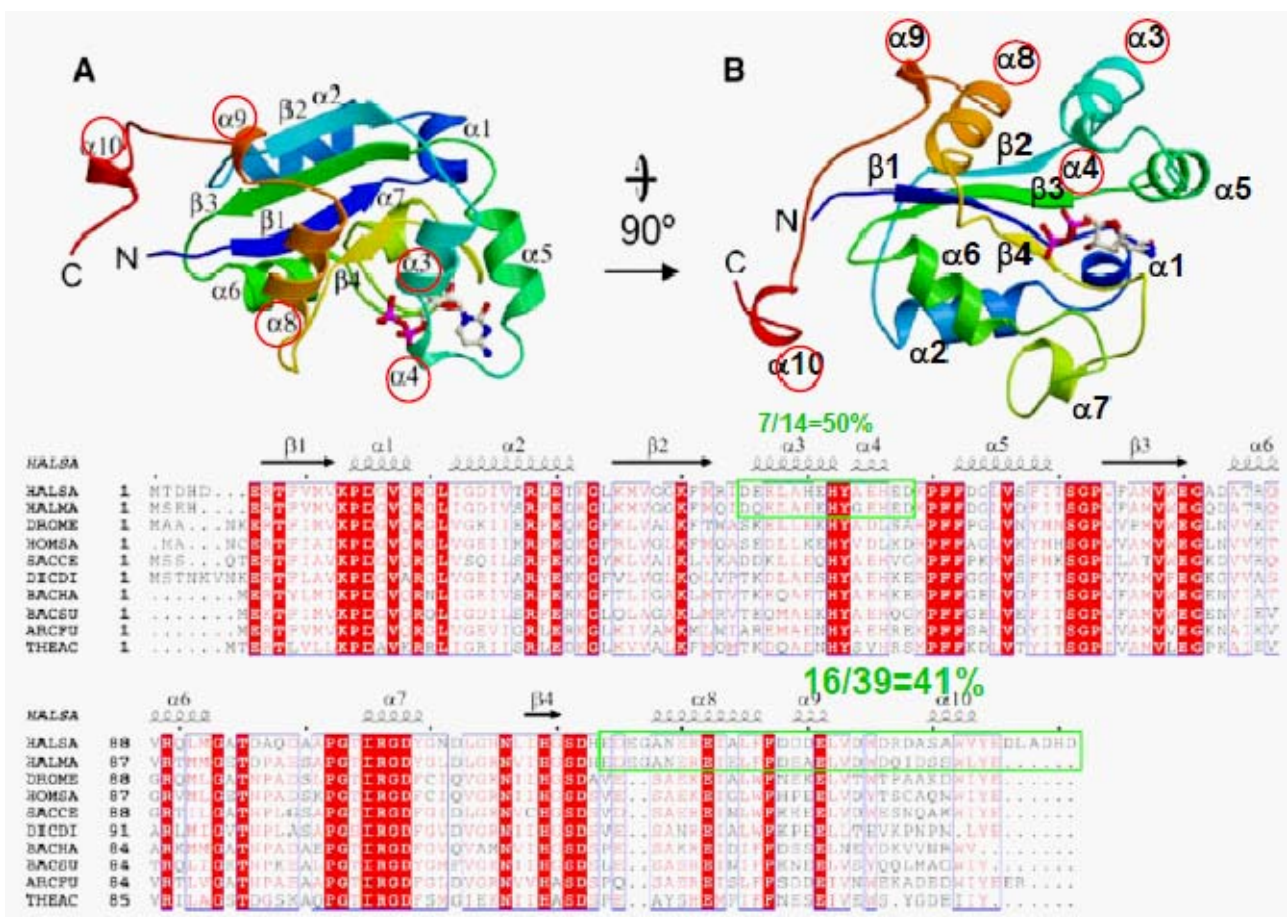


Fig. 7. Alignment of NDKs. Filled in red, identical amino acid residues; red character, highly conserved. Green box, high content of acidic amino acid residues.

ている。全体を見るとC-末端領域の相同性が低いことが観察される。緑で囲んだ部分は、好塩性菌由来 NDK において、特に酸性アミノ酸に富んでいる領域を表しており、C-末端の $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 $\alpha 10$ を含んだ領域と、真ん中より少し N-末端側の $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ を含んだ領域であり、前者が $16/39 = 41\%$ 、後者が $7/14 = 50\%$ もの酸性アミノ酸残基を含有している。高次構造から、両者とも近接した蛋白質表面に位置していることが分かる。Marg らは、好塩性蛋白質への分子進化の一つの手段として、非好塩性の蛋白質に、酸性アミノ酸残基に非常に富んだ短いペプチド配列の挿入を提唱しているが、この領域もそれに当たるものかもしれない。確かに HsNDK の N-末端から 122 番目までの一次配列を、それ以降のアミノ酸配列とを比較してみると前者の酸性アミノ酸含量は $\sim 17\%$ と一般的な好塩性酵素より低く、非好塩性のものに近いが、後者は 35% と極めて高く、蛋白質全体のマイナス荷電に大きく関与している。HsNDK が低塩濃度でも安定なのは、非好塩性 NDK から短い酸性アミノ酸に富む領域の挿入により一気に進化してきたからかもしれない。

Fig. 8 に、今回明らかにした HsNDK のペプチド結合のバックボーンと、すでに報告されているショウジョウバエのそれを重ね合わせた図を示した。極端に酸性アミノ酸の含量が高い $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ や $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 $\alpha 10$ の領域も含めほとんどの部分が重なり合っている、すなわち、側鎖の荷電の大きな違いにもかかわらず、そのバックボーンの構造は良く一

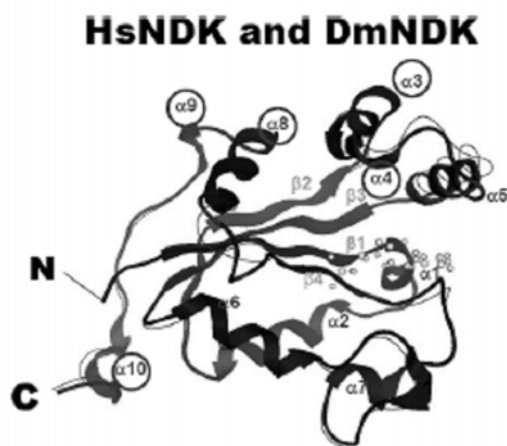


Fig. 8. Superimpose of HsNDK and *Drosophila* NDK crystal structures. Ribbon model, HsNDK; thin line model, *Drosophila* NDK.

致していることが分かる。逆に表現すれば、好塩性蛋白質は実に旨い具合に酸性アミノ酸残基を蛋白質表面に配置しているということになる。このことは、非好塩性通常酵素にうまく酸性アミノ酸残基を導入配置すれば、好塩性を付与し高機能化された酵素を創製できる可能性を示唆している。

3. 4 中度好塩菌 *Halomonas* sp.593 株由来酵素 nucleoside diphosphate kinase (HaNDK) の精製・遺伝子クローニング

2 M NaCl を含む Nutrient Broth で培養した菌体を超音波破碎し、その上澄画分を ATP カラムにかけ、方法の項に記した方法で精製した。この画分を集め、さらに疎水カラムで精製し、SDS-PAGE で完全に均一なタンパク質標品を得た。この N-末端アミノ酸配列を決定したところ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株の NDK (PaNDK) と最も相同性が高かった。そこで、*P. aeruginosa* クロモソーム DNA を調製し、ゲノム解析で判明している PaNDK 遺伝子を PCR で増幅分離した。この断片を pET15b ベクターに連結し、この DNA をプローブに用いて、サザン解析とコロニーハイブリッドで HaNDK 遺伝子の分離に成功した。この塩基配列を決定し、PaNDK とのアラインメントを行い、その結果を Fig. 9 に示した。約 80% のアミノ酸が同一のアミノ酸となり、約 90% のアミノ酸が良く似たアミノ酸であったという高い相同性を示した。

両者のアミノ酸組成を比較すると興味深い事実が判明した。一般に、好塩性酵素は酸性アミノ酸含量が高く、等電点が低いという傾向が知られている。両者の非相同部分約 30 アミノ酸残基で比較すると、酸性アミノ酸の含量は、HaNDK が 9 個、PaNDK が 10 個とほとんど同じレベルであるが、塩基性アミノ酸の含量は、HaNDK では 1 個、PaNDK では 6 個と HaNDK で目立って塩基性アミノ酸が少ないことが分かった (Table 1)。よって、この中度好塩菌由来酵素は、酸性アミノ酸含量が高いというよりは、塩基性アミノ酸含量が低いことによって、酸性化されていると言える。ちなみにアミノ酸配列から計算した等電点は、HaNDK が 4.6、PaNDK が 5.4 と 0.8 ほどの違いがある。

3. 5 His-HaNDK, HaNDK, His-PaNDK, PaNDK の大量発現、大量精製

大腸菌での両酵素の大量発現・大量精製を目的として、各遺伝子を pET15b もしくは pET3a ベクターに挿入し、


```

593 1: M A T E R T L S I I K P D A V A K N V I G E I E S R F E K A G L K I V A A K M L Q L S Q E Q A E G F Y A E H K E R P F F 60
PAO 1: M A L Q R T L S I I K P D A V S K N V I G E I L T R F E K A G L R V V A A K M V Q L S E R E A G G F Y A E H K E R P F F 60

593 61: G D L V G F M T S G P V V V Q V L E G E N A I A A N R D L M G A T N P K E A E A G T I R A D Y A Q S I D A N A V H G S D 120
PAO 61: K D L V S F M T S G P V V V Q V L E G E D A I A K N R E L M G A T D P K K A D A G T I R A D F A V S I D E N A V H G S D 120

593 121: S P E S A A A R E I A Y F F E E S E I C S R -- 141
PAO 121: S E A S A A A R E I A Y F F A A T E V C E R I R 143

```

Fig. 9. Alignment of HaNDK and PaNDK amino acid sequences. 593, HaNDK; PAO, PaNDK.

Table 1. Characteristics of amino acid composition of HaNDK and PaNDK

| | Total AA | Acidic amino acid (D+E) | Basic amino acid (K+R) | Acidic/Basic in non homologous portions | pI |
|-------|----------|-------------------------|------------------------|---|------|
| HaNDK | 141 | 23 | 14 | 10/1 | 4.56 |
| PaNDK | 143 | 22 | 19 | 9/6 | 5.36 |

BL21 (DE3) 株で発現させ、Ni-カラム、もしくは ATP カラムで精製した。精製標品の SDS-PAGE を Fig. 10 に示した。それぞれ均一に精製できた。好塩性酵素の SDS-PAGE 上でのみかけの移動度は、本来の分子量からすれば小さく、見かけの分子量は実際よりも大きく見える(レーン 1,2 vs 6, 5)。

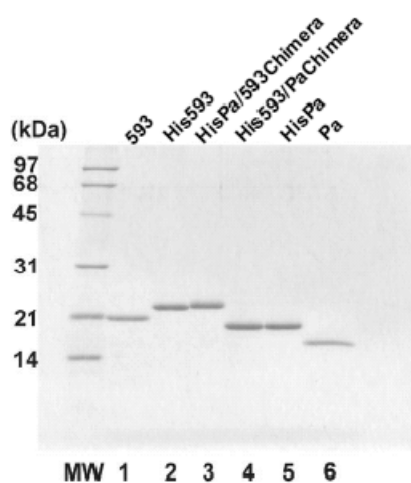


Fig. 10. SDS-PAGE of purified NDK proteins. 593, HaNDK; His593, His-tag-HaNDK; HisPa/593Chimera, His-tag-593/Pa chimeric NDK; His593/PaChimera, His-tag-Pa/593 chimeric NDK; HisPa, His-tag-PaNDK; Pa, PaNDK.

3. 6 HaNDK と PaNDK の至適反応塩濃度、および至適反応温度

中度好塩菌由来の HaNDK と通常細菌由来の PaNDK において、酵素活性に対する塩の影響を調べた。結果を Fig. 11a に示す。0~0.5 M 程度の低塩濃度では HaNDK

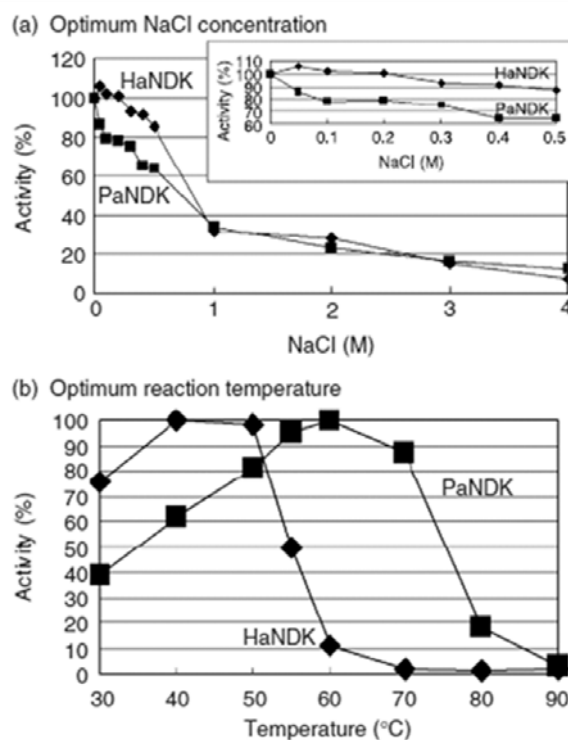


Fig. 11. Optimum salt concentration and reaction temperature for enzymatic activity. The enzymatic activity of HaNDK and PaNDK was measured at 30°C in the presence of various NaCl concentrations (a) or at 30-90°C in the presence of 0.2 M NaCl (b).

のほうが明らかに高い相対活性を示し、至適塩濃度も 50 mM とわずかに好塩性を示した。しかし、両酵素とも高い耐塩性はなく高濃度塩存在下では、同様に活性の低下がみられた。中度好塩菌の細胞外塩濃度はかなりの高濃度

に達するが、細胞内塩濃度は、それに比較して低い状態であることを示唆する結果と考えられる。至適反応温度は、HaNDK が 40°C であるのに対して、PaNDK は 60°C と高い熱安定性を示した (Fig. 11b)。

3.7 HaNDK と PaNDK のサブユニット構造

現在まで、グラム陰性細菌由来の NDK はすべて四量体と報告されている。*Halomonas*, *Pseudomonas* ともグラム陰性細菌であるので、そのサブユニット構造は四量体と予測された。そこでゲル濾過-光散乱計により分子量を測定した結果、HaNDK は 30.72 kDa、PaNDK は 63.46 kDa となり、予想に反して、PaNDK は四量体であるが、HaNDK は二量体であるということが判明した (Fig. 12)。二量体で活性を持った NDK は最初の例であり、極めて興味深い。

3.8 中度好塩性酵素の構造可逆性

好塩性酵素は、高いマイナス荷電含量に起因する高い可溶性をもち、疎水的な相互作用が強く働く環境におかれても構造が壊れにくく、また不可逆的な凝集体を作らず、高い構造可逆性を示すというわれわれの仮説を検証する

ため、両酵素の熱変性後の構造可逆性を検討した (Fig. 13)。両酵素が完全に熱変性する 80°C で保温し、20 分毎に一部を取り出し、氷上で冷却後酵素活性を測定したところ、0.2 M NaCl 存在下においては、HaNDK は 60 分処理後では 80%、100 分処理後でも 60% の活性を示したが、PaNDK は、全く活性を示さなかった。一方、2 M という高濃度塩存在下では、両酵素とも活性を示さなかった。

0.2 M NaCl という低塩濃度条件下では、予想どおり HaNDK は高い構造可逆性を示した。2 M NaCl 存在下では、可逆性を示さず、不可逆的な凝集体を形成したと考えられるが、これは、高濃度塩存在下においては、HaNDK 変性体分子間のマイナス荷電どうしの反発が抑えられたことと、さらに、高塩濃度下における塩析効果による疎水の相互作用が高められた結果、不可逆的な凝集体を形成したものと考えられる。

PaNDK の場合は、両塩濃度条件下において、ともに不可逆的な凝集体を形成し、活性を示さなかったものと思われる。

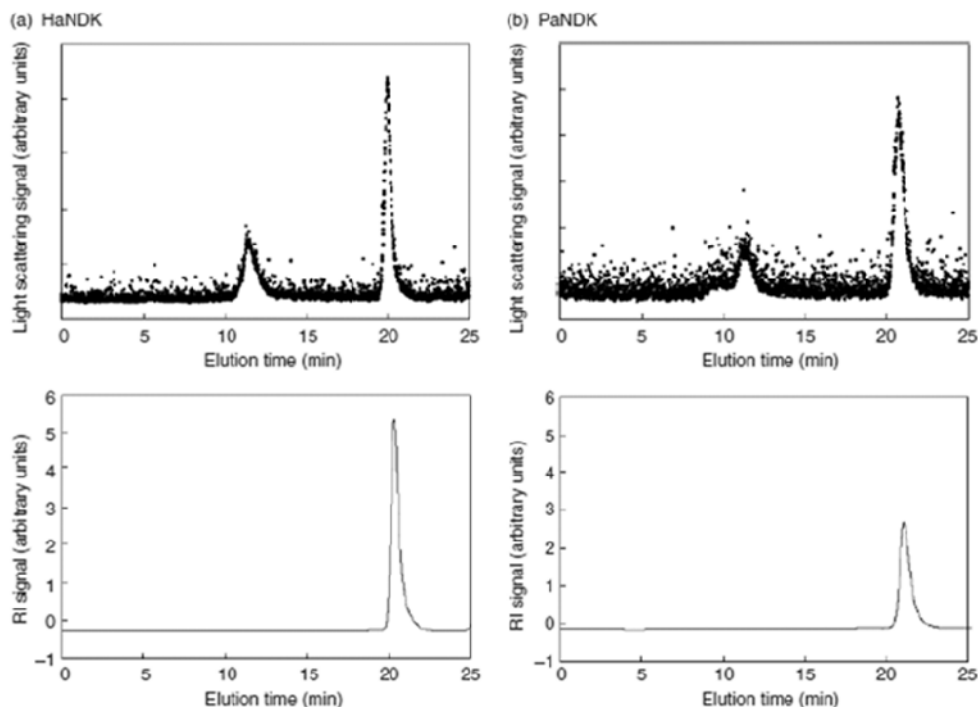


Fig. 12. Molecular mass determination by SEC-MALLS. One hundred micro grams of HaNDK and PaNDK at 1.0 mg ml⁻¹ in standard buffer solution was used in each injection. The same sample was analyzed at least three times, and the average molecular mass was determined. Upper panel, light scattering signal. Lower panel, refractive index signal. Note that the majority of the injected protein eluted at 20 min and some aggregates at ~ 11 min were also present at such a small quantity that they were detectable only by light scattering.

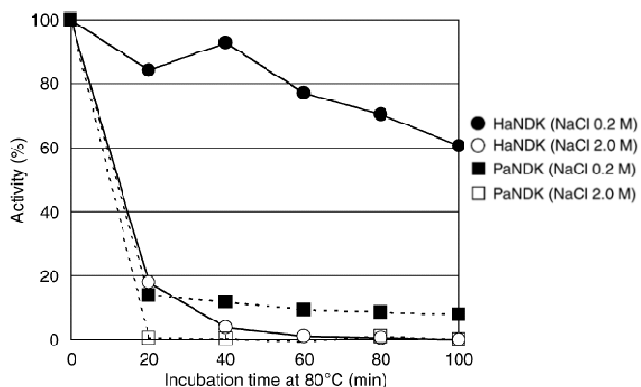


Fig. 13. Time course of residual activity after incubation at 80°C. HaNDK and PaNDK proteins (25 µg/50µl standard buffer solution) were incubated at 80°C for 0-100 min in the presence of 0.2 or 2.0 M NaCl, ice-chilled for 2h, and measured for residual enzymatic activity.

3. 9 HaNDK および PaNDK の二量体-四量体変換メカニズム

グラム陰性菌由来 NDK のサブユニット構造は4量体構造だとされてきた。しかし7項に記したように、HaNDKは二量体構造を取っていた。二量体構造は、すべてのNDKの基本構造であり、このことから考えるとHaNDKは二量体が二つ集まって四量体をつくる過程が何らかの理由で旨くゆかないものと考えられた。そこで唯一結晶構造解析が報告されている *Myxococcus* 由来四量体 NDK の構造をもとに考察したところ、Fig. 14 に示すように、二か所で二量体どうしが相互作用して四量体を形成していると推定された。

HaNDK と PaNDK については、キメラタンパク質の実験

結果などからC末端近辺領域が重要であることが分かった。この領域の 8 個のアミノ酸配列を比較してみると、注目すべき大きな相違点は、134 番目と 135 番目のアミノ酸残基であり、HaNDK の場合は EE であり、PaNDK の場合は AA であった。EE という酸性アミノ酸の並びは好塩性にも寄与している可能性もあり、この二つのアミノ酸の違いに着目して、変異体 NDK を作成した。HaNDK の場合は E を A に変換(野生型 EE に対して、EA, AE, AA)し、一方、PaNDK の場合は A を E に変換(野生型 AA に対して、EA, AE, EE)を作成し、化学架橋によってサブユニット構造を考察した。結果は Fig. 15 に示したが、両 NDK とも 134 番残基が E の場合は二量体、A の場合は四量体を示した。このことから、HaNDK および PaNDK の二量体-四量体は、変換可能であり、それは 134 番残基によって支配されているという明快な結果となった^[9]。

3. 10 通常酵素への好塩性付与による通常酵素の高機能化

好塩性酵素は、高い塩濃度存在下で良く機能することや、高い構造可逆性を持つという有利な性質を持っている。よって、通常酵素に「好塩性を付与する」ことによってこれらの有利な性質を通常酵素に与え、より「高機能化」した酵素の創製を目指した。

前項の実験で、我々は興味深いことに気づいた。すなわち、Fig. 15 および Fig. 16 に示すように、134 番および 135 番残基に酸性アミノ酸を付加すると SDS-PAGE 上でのタンパク質バンドの移動度が本来の分子量を示す移動度に比べて遅くなり、これは好塩性酵素の特徴として我々が

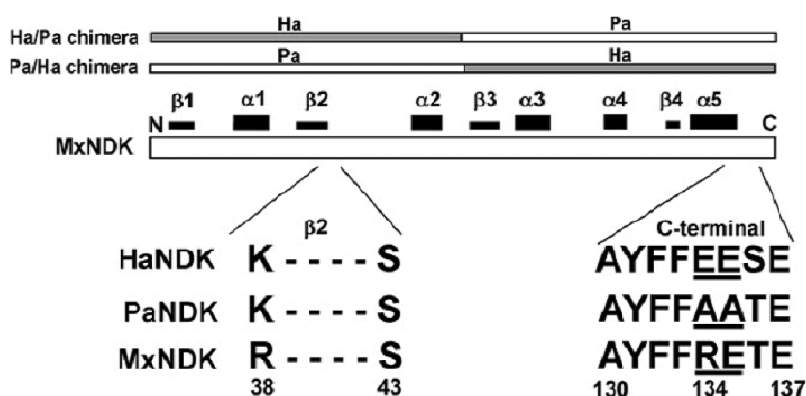


Fig. 14. Sequence comparison of various NDKs. Top, structure of chimeric molecules of HaNDK and PaNDK. Ha, HaNDK; Pa, PaNDK. Middle, structure motif in MxNDK[8]. N, N-terminus; C, C-terminus. Bottom, sequence alignment of HaNDK, PaNDK and MxNDK in the N- and C-terminal region involved in dimer-dimer interaction of MxNDK.

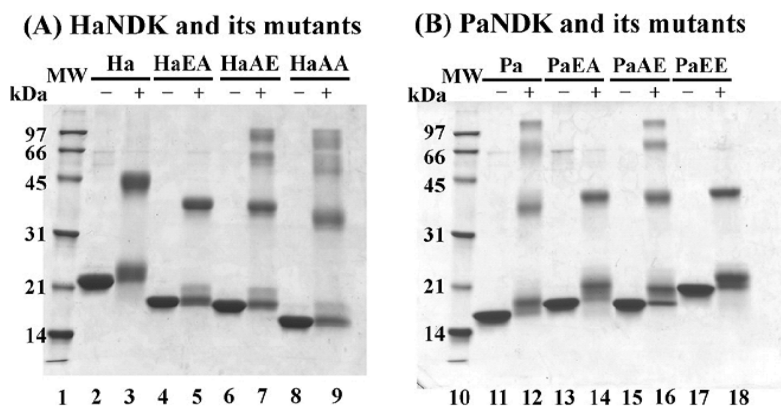


Fig. 15. SDS-PAGE analysis of HaNDK, PaNDK and various mutants. HaNDK and its mutants (A) and PaNDK and its mutants (B) were cross-linked and analyzed by SDS-PAGE.

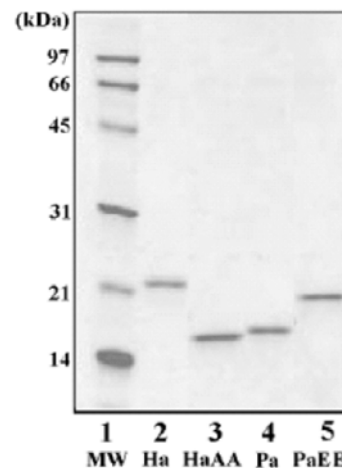


Fig. 16. SDS-PAGE analysis of wild type and mutant NDks. MW, molecular weight marker; Ha, HaNDK/EE wild type; Pa, PaNDK/AA wild type; HaAA, HaNDK/AA mutant; PaEE, PaNDK/EE mutant.

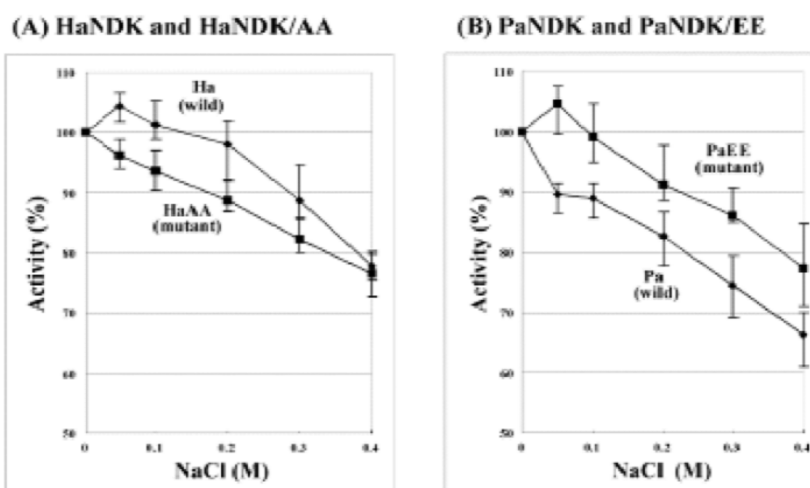


Fig. 17. The NaCl concentration dependence of enzymatic activity. The concentration of KCl in the reaction mixture was 50 mM in this experiment. (A) HaNDK/EE (Ha) and its mutant HaNDK/AA (HaAA) are shown. (B) PaNDK/AA (Pa) and its mutant PaNDK/EE (PaEE) are shown. The vertical bars show the standard deviation of six measurements.

観察していた性質であった。そこで、非好塩性酵素 PaNDK の変異体 PaNDK/EE (PaNDK の 134 番、135 番残基を酸性アミノ酸であるグルタミン酸に変換したもの) が本当に好塩性を示すようになったかどうかを検証するために、好塩性酵素の性質として特徴的な以下の点を検討した。

好塩性酵素が示す特徴は、

1. SDS-PAGE 上でのより遅い移動度、
2. 至適酵素反応塩濃度がより高い、
3. 変性状態からの巻き戻り(活性回復)の効率がより高

い、

4. 塩の存在によって酵素がより安定化される、の 4 点に集約される。

Fig. 17 に至適酵素反応塩濃度の結果を示した。野生型 PaNDK は塩濃度の上昇とともに酵素活性は低下し、非好塩性を示すが、PaNDK/EE 変異体は、50 mM NaCl 存在下で最大活性を示し好塩性を示した。これは好塩性酵素である HaNDK と同等の好塩性であり、一方、134 番、135 番残基のグルタミン酸をアラニンに変換して酸性アミノ酸

を失った HaNDK/AA 変異体は好塩性を失って、塩濃度の上昇とともに酵素活性は低下した。

次に、変性状態からの巻き戻り(活性回復)効率を調べた結果を Fig. 18 に示した。各 NDK を 85°C で 5 分間熱変性させ、その後氷上に置いて酵素活性の回復効率を測定した。変性状態からの可逆的な活性回復は、変性したタンパク質がいかにか不可逆的な凝集体を作りづらいか、すなわち、変性状態でも構造可逆的な可溶性の状態を保てるか、に依存している。凝集体の形成はタンパク質濃度に依

存するので、さまざまな濃度で検討した。例えば、1 mg/ml の結果をみると野生型 PaNDK は、20%程度の活性回復しか示さないが、酸性アミノ酸を導入した PaNDK/EE では、80%の活性が回復し、これは、好塩性酵素 HaNDK と同等の高い効率であった。

さらに、酵素活性の安定性に関する塩の効果測定し、結果を Fig. 19 に示した。一般にサブユニット構造を持つ酵素は、極端にタンパク質濃度を希釈するとサブユニット構造が不安定になり活性が低下する傾向がある。HaNDK

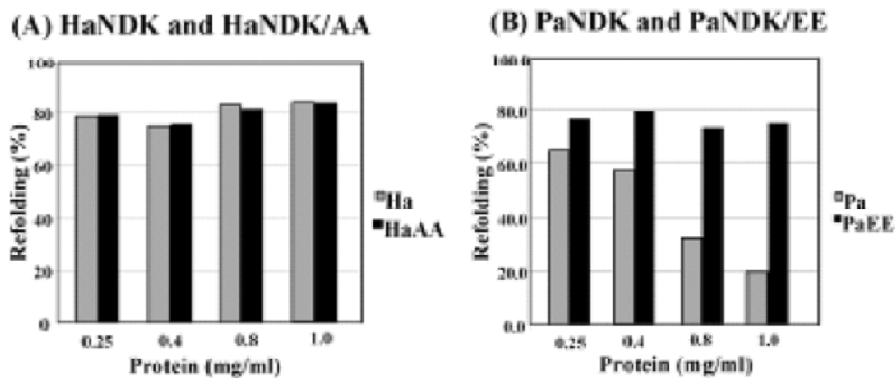


Fig. 18. The refolding efficiency of NDK proteins from heat-denaturation. NDK proteins at protein concentrations of 0.25, 0.4, 0.8, and 1.0 mg/ml were heat-treated at 85°C for 5 min, cooled and kept on ice for 30 min, and then measured for enzymatic activity at 30°C. (A) The gray and black bars represent the HaNDK/EE wild type and HaNDK/AA mutant, respectively. (B) The gray and black bars represent the PaNDK/AA wild type and PaNDK/EE mutant, respectively. All of the experiments were carried out more than three times and the average values are shown.

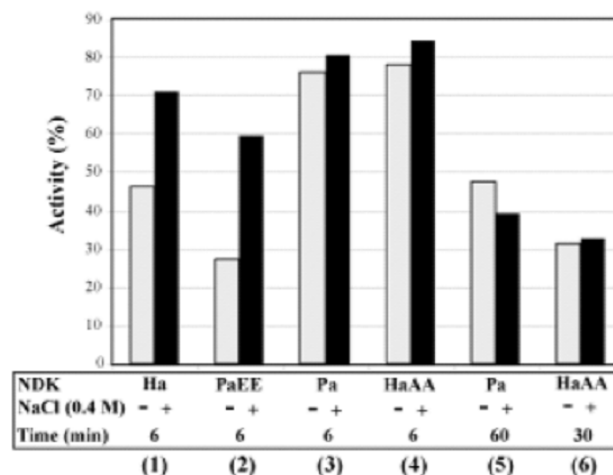


Fig. 19. The effects of 0.4 M NaCl on the dilution-induced inactivation of NDKs. NDKs were incubated at 30°C for the time period (6 ~ 60 min) described in the figure, in the presence (black bars) or absence (gray bars) of 0.4 M NaCl. The enzymatic activity immediately after dilution was taken as 100%. Lane (1), HaNDK/EE (Ha); lane (2), PaNDK/EE (PaEE); lanes (3) and (5), PaNDK/AA (Pa); lanes (4) and (6), HaNDK/AA (HaAA). Average values of more than three experiments are shown.

Table 2. Net charges and pI of NDK proteins

His was not included, as it is deprotonated and hence uncharged at the experimental pH of 7.5. The net charges calculated based on the Arg, Lys, Glu, and Asp contents were identical to those calculated from the theoretical titration curve.

| NDK proteins | pI | Arg + Lys | Glu + Asp | Net Charges |
|---------------------------|------|-----------|-----------|-------------|
| HaNDK (Halophilic) | 4.56 | 14 | 23 | -9 |
| HaNDK/AA (Non-halophilic) | 4.70 | 14 | 21 | -7 |
| PaNDK (Non-halophilic) | 5.36 | 19 | 22 | -3 |
| PaNDK/EE (Halophilic) | 5.01 | 19 | 24 | -5 |

を1,000倍希釈するとこの希釈による不安定化効果が表れ、この実験条件で活性が約46%にまで減少する。この時、0.4 M NaClを共存させると明らかに安定化効果が認められ、活性は71%程度までの減少にとどまる(レーン1)。

PaNDK/EEも同様の結果で、塩により明らかに安定化され、塩非存在下に比べ塩添加条件では、約2倍の活性を示した(レーン2)。一方、非好塩性酵素であるPaNDK野生型や、好塩性を失ったと思われるHaNDK/AAでは、塩による安定化効果は認められなかった。

以上、PaNDK/EE変異体酵素は、上述したすべての好塩性酵素の特徴を示し、「好塩性が付与された」と判断できた^[10]。

好塩性は、ネットのマイナス荷電に依存していることは明らかである。しかし、今回の実験結果は、「好塩性に関して、酸性アミノ酸の特定の位置」の重要性も示唆するものである。Table 2に示したように、好塩性を失ったHaNDK/AAの等電点は4.70と計算され、好塩性を獲得したPaNDK/EEの5.01より、より低い。つまり、より等電点の高いPaNDK/EEの方が、より低いHaNDK/AAより好塩性を示したことになる。すなわち、ネットのマイナス荷電の効果に加え134番、135番残基という「特定の位置」への酸性アミノ酸の導入が大きな効果を発揮しているという結果である^[10]。

今回の結果のみでは一般化は難しいが、今後、「好塩性と酸性アミノ酸の関係」を考える上で、常に留意しなくてはならない重要な問題提起と思われる。

4. 今後の課題

本プロジェクトにおいて、我々の好塩性メカニズムの作業仮説である「好塩性酵素は酸性アミノ酸に富み、通常酵素に比べてタンパク質分子表面がマイナス荷電に偏って

おり、そのため高い可溶性を示して塩析効果を受けにくく、また通常酵素にとっては重大な変性条件に置かれても、好塩性酵素はその高い可溶性のため凝集せず、変性環境が取り除かれれば極めて高効率に高次構造を回復・保持する」を検証してきた。細部については、まだまだ検討しなければならない部分があるが、おおむね上記の作業仮説が正しいことが検証できたと思われる。

この結果を用いて、モデル酵素であるNDKにおいて、非好塩性通常酵素であるPaNDKに好塩性を付与できたことは、好塩性酵素の今後の産業的な利用に向けて大きな成果であると思われる。今後は、実際に産業的、商業的に重要な酵素について、これらの成果を適用し、高機能化された酵素を開発してゆきたい。

文献

- [1] NaCl-activated nucleoside diphosphate kinase from extremely halophilic archaeon, *Halobacterium salinarum*, maintains native conformation without salt. Matsujiro Ishibashi, Hiroko Tokunaga, Kazushi Hiratsuka, Yasushi Yonezawa, Hirohito Tsurumaru, Tsutomu Arakawa, and Masao Tokunaga., FEBS Letters 493, 134-138 (2001)
- [2] Highly efficient renaturation of β -lactamase isolated from moderately halophilic bacteria. Hiroko Tokunaga, Matsujiro Ishibashi, and Masao Tokunaga., FEBS Lett. 558, 7-12 (2004)
- [3] Cloning, expression, and efficient purification in *Escherichia coli* of halophilic nucleoside diphosphate kinase from moderate halophile *Halomonas* sp. #593. Y. Yonezawa, H. Tokunaga, M. Ishibashi, S. Taura, M. Tokunaga., Prot. Expr. Purifi. 27, 128-133 (2003)
- [4] Dimeric structure of nucleoside diphosphate kinase from

- moderately halophilic bacterium: contrast to the tetrameric *Pseudomonas* counterpart. Yasushi Yonezawa, Ken-ichi Izutsu, Hiroko Tokunaga, Hirota Maeda, Tsutomu Arakawa, and Masao Tokunaga, FEMS Microbiol. Lett. 268(1), 52-58 (2007)
- [5] Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Laemmli, U. K., Nature 227, 680-685 (1970).
- [6] Protein measurement with the folin phenol reagent. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
- [7] Activation of halophilic nucleoside diphosphate kinase by a non-ionic osmolyte, trimethylamine N-oxide. Matsujiro Ishibashi, Kentaro Sakashita, Hiroko Tokunaga, Tsutomu Arakawa, and Masao Tokunaga., J. Pro. Chem., 22, 345-351 (2003)
- [8] Structure of a halophilic nucleoside diphosphate kinase from *Halobacterium salinarum*. H. Besir, K. Zeth, A. Bracher, U. Heider, M. Ishibashi, M. Tokunaga, D. Oesterhelt., FEBS Lett. 579, 6595-6600 (2005)
- [9] Residue 134 determines the dimer-tetramer assembly of nucleoside diphosphate kinase from moderately halophilic bacteria. Hiroko Tokunaga, Matsujiro Ishibashi, Fumio Arisaka, Shigeki Arai, Ryota Kuroki, Tsutomu Arakawa and Masao Tokunaga, FEBS Letters, 582, 1049-1054 (2008)
- [10] Engineering of halophilic enzymes: two acidic amino acid residues at the carboxy-terminal region confer halophilic characteristics to *Halomonas* and *Pseudomonas* nucleoside diphosphate kinases. Hiroko, Tokunaga, Tsutomu, Arakawa, and Masao, Tokunaga, Protein Sciences, 2008, in press
- 徳永正雄、石橋松二郎、徳永廣子、荒川 力
Bionics 2, 42-47 (2005)
- (3) Structure of a halophilic nucleoside diphosphate kinase from *Halobacterium salinarum*. H. Besir, K. Zeth, A. Bracher, U. Heider, M. Ishibashi, M. Tokunaga, D. Oesterhelt., FEBS Lett. 579, 6595-6600 (2005)
- (4) Opposing effects of NaCl on reversibility and thermal stability of halophilic β -lactamase from a moderate halophile, *Chromohalobacter* sp. 560. H. Tokunaga, T. Arakawa, H. Fukada and M. Tokunaga, Biophys. Chem. 119, 316-320 (2006)
- (5) Contribution of halophilic nucleoside diphosphate kinase from *Halomonas* sp. 593 to the heat stability of chimeric molecule. H. Tokunaga, Y. Oda, Y. Yonezawa, T. Arakawa, and M. Tokunaga, Protein Pept. Lett. 13, 525-530 (2006)
- (6) Dimeric structure of nucleoside diphosphate kinase from moderately halophilic bacterium: contrast to the tetrameric *Pseudomonas* counterpart. Y. Yonezawa, K. Izutsu, H. Tokunaga, H. Maeda, T. Arakawa, and M. Tokunaga, FEMS Microbiol. Lett. 268, 52-58 (2007)
- (7) A single Gly114Arg mutation stabilizes the hexameric subunit assembly and changes the substrate specificity of halo-archaeal nucleoside diphosphate kinase. M. Ishibashi, S. Tatsuda, K. Izutsu, K. Kumeda, T. Arakawa and M. Tokunaga, FEBS Lett. 581, 4073-4079 (2007)
- (8) Residue 134 determines the dimer-tetramer assembly of nucleoside diphosphate kinase from moderately halophilic bacteria. H. Tokunaga, M. Ishibashi, F. Arisaka, S. Arai, R. Kuroki, T. Arakawa and M. Tokunaga, FEBS Letters, 582, 1049-1054 (2008)
- (9) Engineering of halophilic enzymes: two acidic amino acid residues at the carboxy-terminal region confer halophilic characteristics to *Halomonas* and *Pseudomonas* nucleoside diphosphate kinases. H. Tokunaga, T. Arakawa and M. Tokunaga, Protein Sci., 17, 1603-1610 (2008)
- (10) 好塩性酵素: マイナス荷電が決める好塩性
徳永正雄、徳永廣子、石橋松二郎、荒川 力
生化学 2008 印刷中

研究成果発表論文

- (1) 身近な極限環境微生物ー好塩菌ーと好塩性酵素
徳永正雄、荒川 力、石橋松二郎、徳永廣子
生化学 77, 320-331 (2005)
- (2) 高濃度塩に適応した好塩性酵素
ダメージからすぐ立ち直る“素直な”酵素

Halophilic Mechanisms and Industrial Application of Enzymes from Halophiles

Masao Tokunaga, Matsujiro Ishibashi, Hiroko Tokunaga, and Mayumi Miyauchi

Applied and Molecular Microbiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University

Summary

We have studied halophilism of enzymes from extremely halophilic archaea and moderately halophilic bacteria. Extremely halophilic archaea require salt concentrations greater than 2 M for their growth, and almost all enzymes from these organisms require at least 1 M salts for their stability and activity. Moderately halophilic bacteria can grow in a much wider range of salt concentrations, e.g., from 0.2 M NaCl to saturation and enzymes from these bacteria also show the wide range of salt concentration-dependent characteristics.

Most halophilic enzymes are highly acidic and negatively charged under the physiological conditions. In fact, the amino acid composition of nucleoside diphosphate kinase (NDK) from the cytoplasm of extremely halophilic archaeon (HsNDK) and enzymes from extracellular or periplasmic spaces of moderately halophilic bacteria were characterized by an abundant content of acidic amino acids. We have proposed a working hypothesis for the mechanisms of enzymatic halophilicity as follows: the highly acidic molecular nature of halophilic proteins generates a high solubility and hence tolerance against salting out effects of higher concentration of salts. This property also ensures highly efficient renaturation without irreversible aggregation after heat- or urea-denaturation. This denaturation-resistant property as well as higher activity and stability in the presence of high salt concentrations make halophilic enzymes attractive for the industrial application. Following data were obtained in this three years project:

(1) The crystal structure of HsNDK was solved to a resolution of 2.2 angstrom and the electrostatic surface potential of HsNDK was found to be highly negative as expected from its high contents of acidic amino acid residues.

(2) We have isolated NDK and its gene from moderately halophilic bacterium, *Halomonas* sp. 593 (HaNDK) and compared the enzyme to its counterpart from non-halophilic bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PaNDK).

(3) We demonstrated that HaNDK formed a dimeric structure and this is the first isolation of active dimeric subunit structure of NDK.

(4) Charged state of two residues that are located in the C-terminal region (134th and 135th residues) of HaNDK and PaNDK plays a critical role in determining halophilic characteristic, and we succeeded in donation of halophilic properties to the non-halophilic enzyme, PaNDK.

塩による高品質作物の作出のための植物の塩ストレス状態の定量的評価方法 の開発ーマイクロウェーブを利用した方法

下町 多佳志

長崎大学環境科学部

概要 農業分野では、植物体に意図的なストレス処理を施し農作物の色や味、開花期間などを調節することが古くから行われてきた。近年では、作物に意図的に低温、水や塩ストレス処理を行うことによる高品位農作物の生産も行われるようになってきた。しかし、これらの処理は経験豊富な篤農家の直感的判断により実施されているのが実情であり、誰もが行える処理ではなかった。誰もが簡単に植物のストレス状態の『定量的な』診断が可能になれば、安定した食料生産や高付加価値農産物の効率的生産に寄与するばかりでなく、植物の状態を測定することは環境評価の側面も有しており環境保全分野へ応用可能なセンサとして森林や草原の環境保全と修復の分野でも極めて有効な手段となるであろう。

測定原理が簡単で、製造コストも安価、操作も特別な熟練が不要な植物ストレスセンサの開発を行った(特願 2007-255783 および特願 2004-257760)。同時に、塩による高糖度メロンの栽培実験や諫早湾干拓土壌でホウレンソウを栽培し、土壌中の残留塩類濃度がホウレンソウやメロンの収穫量、栄養成分、有害成分の量に与える影響を調べることで、塩による高品位作物の創出可能性を実験的に検証した。以下に成果を列挙する。

○ 植物の塩環境適応応答による誘電緩和スペクトルの変化に関する基礎研究

2種類の塩生植物を含んだ13種類の植物に関して、塩環境適応応答に伴う誘電緩和スペクトルの変化パターンを調べた結果、植物の誘電的特性はそれぞれ本来有する耐塩性の違いによらず、植物の種固有の誘電的特性から塩性植物のそれへと、あたかも塩生植物になろうとしているかのような変化を示すことを発見した。

○ 塩による高品位農作物栽培技術の開発

メロンおよびホウレンソウを塩環境で栽培することによって、①メロンでは塩処理のタイミングを適切に取ることによって、果実の外観的品質を劣化させることなく、従来の水ストレスによる方法より有効に高糖度化が可能である事、②干拓土壌の土壌中の残留塩類を適切に調整し利用してホウレンソウを栽培することによって収穫量の増加とミネラル、必須アミノ酸、GABA やプロリン、糖、ビタミン C、ポリフェノールなどの栄養成分を顕著に増加させ、同時に硝酸イオンやシュウ酸など有害な成分を減少可能である事、を示した。

○ 植物ストレスセンサの開発

植物の環境適応応答を検出する植物ストレスセンサを開発し現在試作器の段階であるが、植物の水ストレスや塩環境適応応答を非破壊的かつリアルタイムに検出可能な植物ストレスセンサを開発した。

1. 研究の概要

図1に本プロジェクト研究で取り組んだ研究の概要を示す。図1に示すように、本研究は、大きく分けて以下のよう
に三つの取り組みから構成されている。

① 植物が環境適応応答に伴い浸透圧調整物質を誘導合

成することによって変化させる植物体内の水分、強電解質類、アミノ酸類、糖類、蛋白質類などの分子が極性や電気双極子を有していること。それらが電磁波の伝搬特性を支配する複素誘電率を変化させることから、マイクロウェーブによって誘電緩和スペクトルの変化と

して捉えることに関する基礎研究。

- ② 塩環境適応応答を利用した農作物の高品質化技術を開発するために、塩環境適応応答を利用したメロンの高糖度化栽培法と干拓土壌の残留塩類に対する適応応答を利用した機能性ホウレンソウの栽培法の開発。

- ③ ①の研究から得られた知見を利用し、植物の環境適応応答を定量的に捉える「植物ストレスセンサ」の開発と特許出願に関する応用研究。

本報告書は、以上の項目について 3 部構成で報告する。

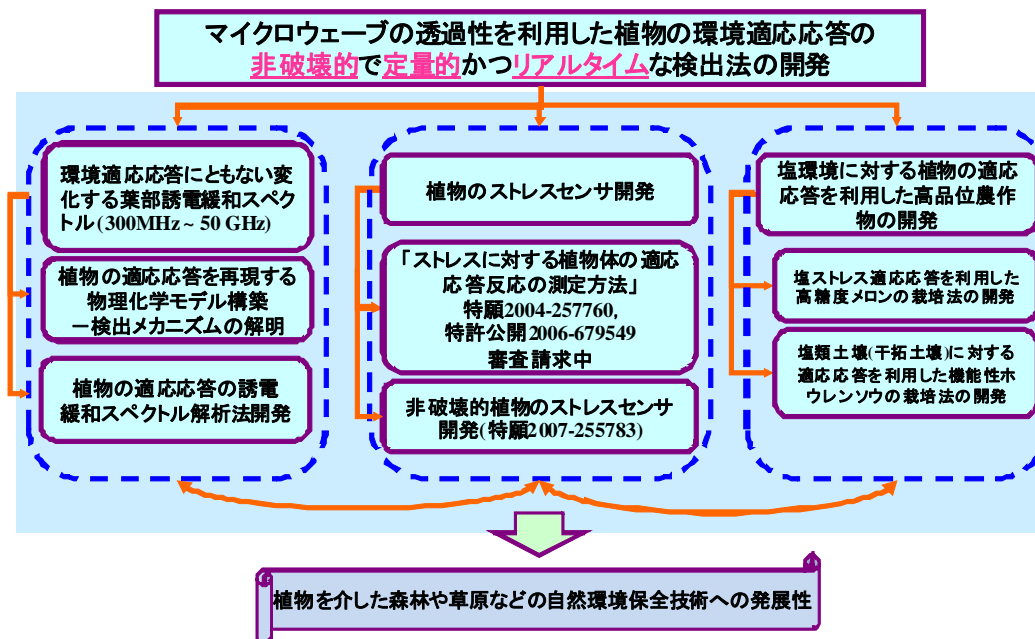


図 1. 研究の概要

第1部 植物の塩環境適応応答の定量的評価方法の開発

1. はじめに

水ストレスや塩ストレスに対する環境適応応答として、植物体内での浸透圧調節物質の誘導合成が知られている。浸透圧調整物質として、強電解質類、アミノ酸類、糖類などがあるが、これらの物質はイオン伝導を有することや、分子が電気双極子を持つことから、それらの量が増減することによって、植物体の複素誘電率($\epsilon = \epsilon' - j\epsilon''$: ϵ' は誘電率、 ϵ'' は誘電損率、 j は複素数、以降、本論文で使用する誘電率は誘電率と真空の誘電率 ϵ_0 との比である比誘電率のことである)の周波数特性である誘電緩和スペクトルが変化すると考えられる(Hewlett Packard Application Note 1217-1, 1992; Pethig, 1984.)。

これまでのマイクロウェーブ応用計測に関する研究は、農業生産物の水分量や密度の測定についての研究(Kraszewski, 1980, 1991, Kraszewski and Nelson, 1995; Nelson, 1992; Schilz and Schiek, 1984; El-royes and Ulaby, 1987)が主流であり、これまで、この原理に着目し、植物の環境適応応答を検出に応用した研究はなかった。著者らの近年の研究を通じて、水ストレスや塩ストレスのような環境ストレスを受けた植物葉部の複素誘電率の変化をマイクロウェーブの透過性を利用して測定することによって、植物の環境適応応答の非破壊的検出が可能であり、植物体内で生じた浸透圧調整物質の増減が複素誘電率の変化として捉えられたことが明らかにされてきた(Shimomachi *et al.* 2001, 2004, 2005)。

本研究の目的は、環境適応応答により生じた植物体の物理化学的な変化をマイクロウェーブの透過性を利用した測定によって、植物体内で生じた環境適応応答を検出することである。

本研究では、様々な植物を一定期間塩環境に適応させた後、マイクロウェーブを用いて植物葉部の複素誘電率を測定し、植物の塩環境適応応答の定量的評価可能性を検証した結果、植物の環境ストレス適応応答の非破壊的・定量的評価可能性を示す成果が得られた。

2. 材料および実験方法

測定に使用した植物は、塩生植物のシチメンソウ、ウラギク、好塩性植物のアイスプラント、ビート、弱耐塩性植物

のカボチャ、ズッキーニ、サラダナ、コマツナ、トマト、ホウレンソウ、ハダイコンである。

実験室での栽培が困難なシチメンソウとウラギクは有明海で採取した。トマト以外の植物は、気温を $25 \pm 3^\circ\text{C}$ とした実験室内で、光強度を成長点で約 $\text{PPF } 200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、12 h/12 h (明期/暗期) とし養液栽培した。トマトは、光強度のみが約 $\text{PPF } 1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と大きく異なるが、Shimomachi ら(2005)の塩ストレス適応応答検出実験で得られた測定結果をそのまま使用した。

液肥は、大塚 1 号および 2 号の A 処方標準溶液(EC は約 0.26 Sm^{-1} に調整)を用いた。培地はロックウール(50 x 50 x 50 mm)を使用した。生長の早いカボチャは播種後 2 週目に液肥の NaCl 濃度を 100 mmol L^{-1} の塩環境にして 2 週間適応させた。生長の遅いアイスプラントは 6 週目に液肥中の NaCl 濃度を 0, 100, 200, 300 mmol L^{-1} とし、6 週間適応させた。トマトとビートは、0, 50, 100, 200 mmol L^{-1} の塩環境に 4 週間適応させた。他の材料は 4 週目に NaCl 濃度で 100 mmol L^{-1} の塩環境に 4 週間適応させた。それぞれの植物は塩環境に適応させた後測定に用いた。植物葉部の複素誘電率の周波数特性(以降、誘電緩和スペクトルと呼ぶ)、ベクトルネットワークアナライザ(Model HP8714ES, Agilent technologies Co., U.S.A)と Open-ended coaxial probe (Agilent 85070D Dielectric Probe Kit, Agilent Technologies Co., U.S.A)により測定した。均一な組織が得られ測定が容易になるので、葉部を粉碎後 25°C に温度調整して測定した。

それぞれの植物の固体数は、トマトとビートが 5、アイスプラントが 5、カボチャが 4、ズッキーニが 5、ホウレンソウが 6、サラダナが 4、コマツナが 4、ハダイコンが 4、ウラギクとシチメンソウが 10 以上であった。

それぞれの植物の固体から均等に葉部を切り取り後、粉碎し誘電緩和スペクトルの測定に用いた。従って、各植物の測定値は、個体数による平均値である。

水ポテンシャルの測定は、Dew point Microvoltmeter (HR-33T, Wescor Inc., U.S.A.) および Sample Chamber (C-52-SF, Wescor Inc., U.S.A.) を用い、 25°C に設定したインキュベータ内で 2 時間保存後測定した。水分量は、 80°C の乾燥炉の中で 96 時間乾燥させた後、乾燥前後の重量

変化を測定して求めた。

3. 結果および考察

Fig. 1 に液肥に 0、50、100、200、300 mmol L⁻¹ の NaCl を加えることにより変化した液肥の誘電緩和スペクトルを示す。NaCl の濃度の増加に伴って液肥の誘電率はわずかに減少し、特に 1 GHz 以下の低周波数域で誘電損率は大きく増加した。これは、液肥に含まれる強電解質の増加を反映したものである (Hewlett Packard Application Note 1217-1, 1992)。また、強電解質 (NaCl) の増加が、液肥の誘電損率を増加させると同時に、誘電率を減少させる効果も示している (Pethig, 1984)。

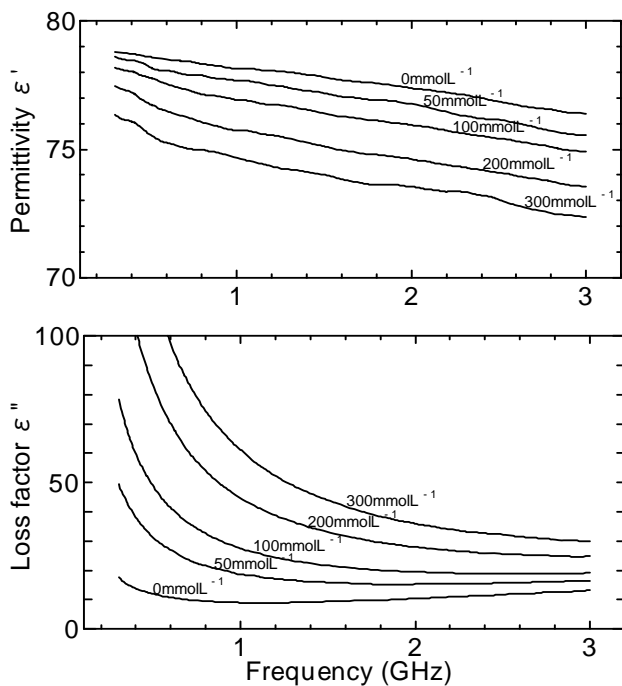


Fig. 1. Effects of NaCl concentrations (mmol L⁻¹) in liquid fertilizer on dielectric properties of liquid fertilizer

Fig. 2 に、純水、塩生植物であるシチメンソウおよび弱耐塩性植物であるカボチャの誘電緩和スペクトルを示す。

植物の誘電率は、純水よりも小さかった。これは、植物体を構成するセルロースなどの繊維質やアミノ酸、タンパク質、糖類等の化学成分と水分の複合作用により生じたと考えられる。

シチメンソウとカボチャの水分量はそれぞれ 89.8%と 89.5%とほぼ等しかったが、誘電率と誘電損率どちらも、シ

チメンソウの方がカボチャよりも大きく、両者の誘電緩和スペクトルは大きく異なった。

このことは、同じ水分量を有する植物であっても、植物の種によって葉部を構成する固有の物質の組成によって異なった誘電緩和スペクトルを持つことを示している。このことから、植物は種類によって異なる固有の葉部複素誘電率を持つと同時に、生息している環境への適応状態を反映し変化することも示唆していると考えられる。

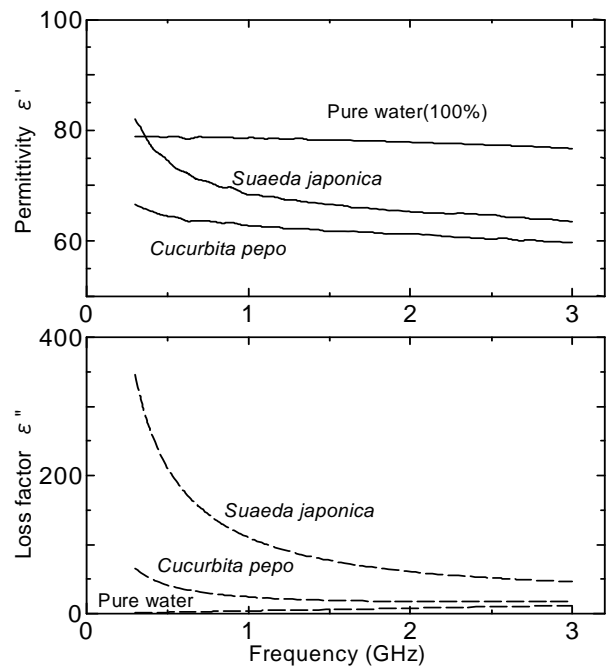


Fig. 2. Dielectric properties of plant leaf and pure water. Water content of *Suaeda japonica* and *Cucurbita pepo* was 89.8% and 89.5% respectively

Fig. 3 に塩環境に対する適応応答によって変化した誘電率および誘電損率の変化を示す。0.3~3 GHz の周波数で平均した誘電率および誘電損率のコントロールからの変化分を図に示した。

塩環境に対する適応応答によってすべての植物の誘電損率は増加した。このことは、植物が体内に NaCl を取り込んだか、あるいは同時に浸透圧調整物質として強電解質を体内に誘導合成したことを示している。Fig. 3 に示した測定結果は、植物が塩環境に対する適応応答を行う過程で、誘電率を約 3 程度減少させるもの、ほとんど変化させないもの、増加させるもの、の 3 種類に分類されることを示している。大きく誘電率を増加させた植物はトマトである。これ

は、栽培時にメタルハライドランプを使用したことから、光強度がほかの植物の栽培時の約 5 倍と非常に強かったことに起因する光合成量の増大に伴った浸透圧調整物質の増加によるのかもしれない。

誘電損率が増加したにもかかわらず、誘電率がほとんど変化しない、あるいは増加したことは、強電解質の増加による効果で減少しなければならない誘電率が維持された、あるいは増加したことは、誘電率を増加させる効果を有するアミノ酸様やタンパク質様の物質が浸透圧調整物質として同時に誘導合成されたことを示唆している (Pethig, 1984)。

塩環境に対する適応応答によって生じた植物葉部の水分量の変化は、約 -3 ~ +1% (コントロールとの差) であった。このことから、水分量の変化が誘電率に与えた影響はほとんど無いと考えられる。

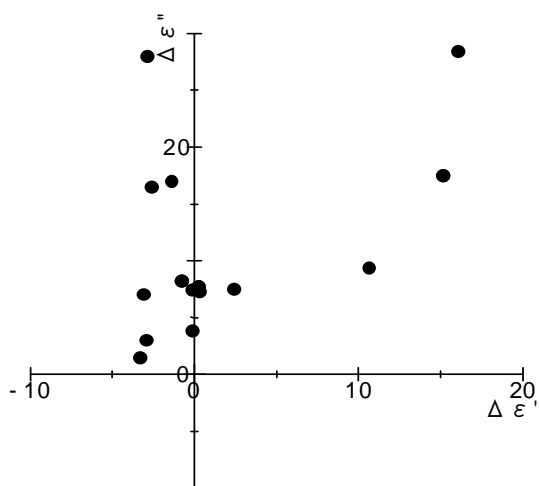


Fig. 3. Changing of permittivity ϵ' and loss factor ϵ'' by plants adaptation responses to salinity environments.

$$\Delta \epsilon' = \epsilon' (\text{after adaptation}) - \epsilon' (\text{control})$$

$$\Delta \epsilon'' = \epsilon'' (\text{after adaptation}) - \epsilon'' (\text{control})$$

Fig. 4 に 0.3~3 GHz の周波数で平均した誘電率、誘電損率およびロスタンジェントと水ポテンシャルの関係を示す。誘電率と水ポテンシャルの関係から、塩環境に適応した植物の誘電率は、同じ値でも水ポテンシャルが減少する傾向を示したが、塩環境の強さとの明確な相関関係は見られなかった。誘電損率と水ポテンシャルの関係からは、塩環境の強さ毎に垂直方向である程度まとまりを見せ、植物葉部の誘電損率を測定することにより、植物の生息し

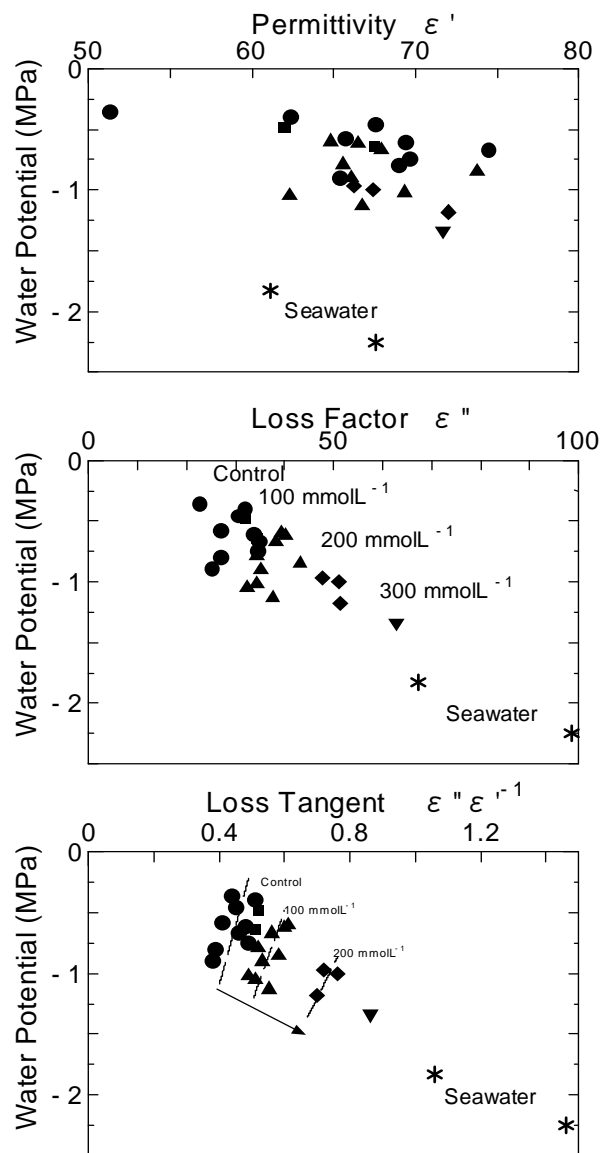


Fig. 4. Relationship between dielectric properties of plant leaves and water potential under saline environment.

(●) Control, (■) 50 mmol L⁻¹ NaCl, (▲) 100 mmol L⁻¹ NaCl, (◆) 200 mmol L⁻¹ NaCl, (▼) 300 mmol L⁻¹ NaCl, (*) Seawater.

ている場所の塩環境をある程度推定可能であることが分かった。また、塩環境が強くなるにつれて植物の誘電的特性は塩生植物の特性へと近づくことがわかった。ロスタンジェントと水ポテンシャルの関係からはその傾向はさらに明確になった。植物はそれぞれ固有のロスタンジェントを持ち、塩環境に適応する過程で Control から塩生植物の方向に向かう直線上 (図中の矢印方向に) で変化した。また、植物の置かれた塩環境の強さに応じて Fig. 4 の破線

で示した直線近辺に各植物の点が存在することを示唆する測定結果が得られた。栽培時の光環境の違いからか、Fig. 3 に示したように塩環境によって誘電率を大きく増加させたトマトも、Fig. 4 上では Control の植物が存在する破線近傍にあったことは、興味深い。

これらの測定結果は、植物葉部の誘電緩和スペクトルを測定・評価することが、植物の生息している場所の塩環境の強さや植物が環境適応応答をどの程度行っているか定量的に把握可能な検出方法として極めて有効な手法と成りうることを示唆していると考えられる。

4. まとめ

塩生植物のシチメンソウ、ウラギク、好塩性植物のアイスプラント、ビート、弱耐塩性植物のカボチャ、ズッキーニ、サラダナ、コマツナ、トマト、ホウレンソウ、ハダイコンのような様々な耐塩性を持つ植物を実験室内で養液栽培を行った。液肥に NaCl を加えることによって一定期間塩環境に適応させ、マイクロウェーブを利用した植物葉部の誘電緩和スペクトルの変化を測定・解析した結果、植物の塩環境への適応応答の非破壊的・定量的評価可能性を示す結果が得られた。

参考文献

Hewlett Packard Application Note 1217-1. (1992): Basis of measuring the dielectric properties of materials.
Kraszewski, A. W. (1980): Microwave aquametry – a review. *J. Microwave Power*, (15)4: 209-220.
Kraszewski, A. W. (1991): Microwave aquametry-needs and

perspectives. *IEEE Trans. on Microwave Theory and Techniques*, Vol. 39, No. 5, May: 828-835.
Kraszewski, A. W. and Nelson, S. O. (1995): Application of microwave techniques in agricultural research. *SBMO /IEEE MTT-S IMOC '95 Proc.:* 117-126.
Nelson, S. O. (1992): Measurement and applications of dielectric properties of agricultural products. *IEEE Trans. on Instrumentation and Measurement*, Vol. 41, No. 1, February: 116-122.
Pethig, R. (1984): Dielectric properties of biological materials: biophysical and medical applications. *IEEE Trans. on Electrical Insulation*, Vol. EI-19, No. 5, October: 453-474.
Schilz, W. and Schiek, B. (1984): Microwave system for industrial measurements. *Advances in Electronics and Electron Physics*, Vol. 55:321-325.
Shimomachi, T., Okamura, N., Takemasa, T., and Takakura, T. (2001): Nondestructive detection of water stress in tomato plants by microwave sensing. *Environ. Control in Biol.* 39: 17-25.
Shimomachi, T., Takemasa, T., Kurata, K., and Takakura, T., (2004): Nondestructive detection of water stress in tomato plants by microwave sensing(2). *Environ. Control in Biol.* 42: 83-90.
Shimomachi, T., Ou, S., Ichimaru, Y., Cho, S., Takemasa, T., Yamazaki, S., and Takakura, T. (2005): Nondestructive Detection of Salt Stress in Tomato Plants using Microwave Sensing, *Environ. Control in Biol.*, 43:33-41.

第 II 部 塩環境適応応答を利用した高付加価値農産物の栽培方法の開発

II-A 干拓土壌の残留塩類がホウレンソウの成長と栄養成分に与える影響

1. はじめに

諫早湾の締め切り後、自然干陸化した諫早湾干拓地の土壌は、海底土を母材とした海成沖積土壌であり、粘土含量が高く、Ca、Mg、K、Na などの置換性陽イオンを豊富に含む(Terai *et al.*, 2006)。土壌中の置換性陽イオンの中で Na イオンは作物の水分吸収や養分の選択吸収を妨害し生理的な要素欠乏障害が発生することから(Iwata, 1984)、干拓地は過剰な塩分を除去した後、農地として利用される(Jinno and Ida, 1988)。

一方で、ホウレンソウの水耕栽培で、液肥を適切な塩環境にすることによって成長率が増加し(Morishita *et al.*, 1984)、0.2 mol L⁻¹の NaCl 添加で生体重の増大と葉の厚みが増すことが報告されている(Robinson *et al.*, 1983)。

また、ホウレンソウでは水ストレスや低温ストレスなどの環境ストレスに適応する過程でアスコルビン酸や糖類を増加させることが知られており(Okano *et al.*, 1991; Tamura, 2004)、適度な塩環境で栽培することによって、人間にとって必要な栄養成分や健康維持に有効な機能性成分を増加させると同時に、収量も増加させることができるかもしれない。

本研究では、干拓土壌の残留塩類による高付加価値ホウレンソウの栽培可能性を調べるため、脱イオン水による水洗によって干拓土壌中の水溶性イオンを溶出させた後、人工海水(Marine Art SF-1, Tomita Pharmaceutical Co., Ltd., Japan)を NaCl 量換算で 3 段階に希釈し、土壌の最大容水量分を 1 回のみ添加することで、置換性の塩類含量を変化させた土壌を作り、その土壌で栽培したホウレンソウの成長と栄養成分の変化を調査した。

2. 材料および実験方法

材料として、ホウレンソウ(*Spinacia oleracea* L.)を用いグロースチャンパー(KG-50HLA, Koito Co., Ltd., Japan)で 7 週間栽培した。10 h/14 h(明期/暗期)、室温 20°C、相対湿度 55%、光強度を成長点で PPF 250 μmol m⁻² s⁻¹の環境条件で栽培した。まず、干拓土壌の残留塩類がホウレンソウの成長に与える影響を調査するため 0.001 m² Neubauer

potに実際の諫早湾干拓地の施肥条件と同じ 23.5 g m⁻² 硫酸を混合した干拓土壌を充填し播種した。播種 3 週後に人工海水(Marine Art SF-1, Tomita Pharmaceutical Co., Ltd., Japan)を NaCl 濃度換算で 0、0.05 and 0.10 mol L⁻¹に希釈し、ポット内の干拓土壌の最大容水量分を 1 回のみ添加した。ホウレンソウが塩環境に適応した後 7 週目に収穫し成長の測定及び栄養成分の分析を行った。全栽培全期間を通じて実際の干拓地の農地の土壌水分量 40%とほぼ同一になるように灌水を行った。

干拓土壌は、諫早湾干拓地の実際の栽培に一度も使用されていない場所の表面から 19 cm の深さまでの土壌を採取し実験に使用した。採取した土壌は水との重量比で 5:1 以上で水洗後使用した。

干拓土壌の塩環境とホウレンソウの陽イオン、必須アミノ酸、プロリン、可溶性糖類、L-アスコルビン酸、ポリフェノール、硝酸イオン、シュウ酸の各含有量の関係を詳細調査した。

3. 結果および考察

NaCl 添加濃度とホウレンソウの成長の関係を示す。地上部と地下部の重量は 0.05 mol L⁻¹ NaCl 濃度で明らかに増加した(at 5% Tukey's HSD Test)。Morishita(1984)らや Mimura(1995)が、水耕栽培したホウレンソウで NaCl 濃度 0.025 mol L⁻¹ から 0.10 mol L⁻¹ で NaCl 処理しない場合よりも成長が良好で有ったことを報告している。彼らが報告したように、干拓土壌においても適切な塩環境下でホウレンソウは成長が促進されることが分かった。

NaCl 添加濃度とホウレンソウ葉部の陽イオン含有量の関係を Table 1 に示す。ホウレンソウの Na イオンの吸収の増加とともに K、Ca、Mg イオン量が減少することが報告されているが(Osawa, 1961)、本研究では Ca、Mg、K や Fe イオンの減少傾向は認められなかった。実験結果より、干拓土壌で栽培されたホウレンソウは通常の土壌で栽培されたホウレンソウ(Kagawa, 2007)よりも大量の陽イオンを含むことが分かった。

NaCl 添加濃度とホウレンソウ葉部の必須アミノ酸、

GABA (γ -Amino butyric acid)、プロリン含有量の関係を Table 3 に示す。ホウレンソウ葉部の総必須アミノ酸量とプロリンは NaCl 添加濃度の増加とともに増加した。プロリンは多くの植物が浸透圧調整物質として使用していることが知られている (Stewart and Lee, 1974)。GABA は、血圧上昇抑制作用とストレス低減作用があるといわれ、人間に有用な機能性成分の一つとして知られている (Uzawa *et al.*, 2002; Abdou *et al.*, 2006)。干拓土壌で栽培されたホウレンソウは、通常の圃場で栽培されたものよりも非常に大量の GABA (約 200 倍) を含有していた (Murayama *et al.*, 2004)。NaCl 添加濃度とホウレンソウ葉部の可溶性糖類、L-アスコルビン酸、ポリフェノール含有量の関係を Table 4 に示す。ホウレンソウ葉部中の可溶性糖類は NaCl 添加濃度の増加に伴い増加した。通常のホウレンソウの可溶性糖類量 0.20 g/100gfw (Takebe *et al.*, 1996) と比較して 0.27 g/100gfw と多量の可溶性糖類を含有することが分かった。L-アスコルビン酸の含有量は、NaCl 添加濃度によってほとんど変化しなかったが 190 mg/100gfw 以上を含有していた。通常のホウレンソウが還元型アスコルビン酸 (L-ascorbic acid) と酸化型アスコルビン酸 (dehydroascorbic acid) を合計して夏期で 20 mg/100gfw、冬期で 60 mg/100gfw であることから (Kagawa, 2007)、干拓土壌で栽培したホウレンソウは極めて多量の L-アスコルビン酸を含有することが分かった。

ポリフェノールは、抗酸化性を示す性質を持ち抗腫瘍作用、血漿コレステロール低下作用を示すことから多様な生理機能を発揮する保健成分として注目されている (Tsushida, 2000)。ホウレンソウ葉部のポリフェノールの含有量は NaCl 添加濃度の上昇とともに増加し、通常のホウ

レンソウが 392 $\mu\text{mol}/100\text{gfw}$ (Fujie *et al.*, 2001) であるのに対し 490 $\mu\text{mol}/100\text{gfw}$ 以上と大量にポリフェノールを含有することが分かった。

Table 5 に NaCl 添加濃度とホウレンソウ葉部の硝酸イオンとシュウ酸イオン量の関係を示す。食品中の硝酸イオンとシュウ酸イオンは人間の健康に有害であることが知られている (Takebe *et al.*, 1995, 1996; Yoneyama, 1982)。そして、可溶性シュウ酸は食味も悪くする (Izumi, 2004; Takebe *et al.*, 1996)。シュウ酸含有量は NaCl 添加濃度と可溶性糖類 0.05 と 0.10 mol L⁻¹ 減少した。硝酸イオン含有量は NaCl 添加濃度と相関関係はなかった。しかしながら、硝酸イオン量は、EU の硝酸イオン含有量の基準を満たした (Maximum level: 250 mg/100gfw harvested 1 April to 31 October and 300 mg/100gfw harvested 1 November to 31 March) (Official Journal of the European Communities, 2002)。可溶性シュウ酸イオンの含有量は、NaCl 添加濃度の増加に伴い減少を示し 0.05 mol L⁻¹ で最小となった。ホウレンソウの水ストレス処理によってシュウ酸含有量が減少することが報告されており (Watanabe *et al.*, 1987)、NaCl 処理がホウレンソウのシュウ酸含有量の低減に類似した効果を持つのもかもしれない。

4. まとめ

本研究は、干拓土壌の塩環境を利用した高付加価値農産物の生産可能性を目指した。栽培実験結果は、適切な干拓土壌中の塩環境を利用することによってホウレンソウの収穫量の増加に伴い人間の健康に有用な機能性成分の増加と人間の健康に有害な成分の減少を同時に実現する栽培方法の実現可能性を示した。

Table 1. Effects of NaCl concentration on spinach growth

| NaCl (mol L ⁻¹) | Shoot (gfw) | Root (gfw) |
|-----------------------------|--------------|-------------|
| 0.00 (Control) | 23.1 ± 5.1 | 5.9 ± 2.6 |
| 0.05 | 29.6 ± 4.7 * | 8.7 ± 2.3 * |
| 0.10 | 24.1 ± 2.3 | 4.3 ± 1.1 |

Mean ± SE (N = 6), *significant at 5% (Tukey's HSD Test)

Table 2. Effects of NaCl concentration on cations in spinach

| NaCl (mol L ⁻¹) | Cations (mg/100gfw) | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---------------------|-------|-----|-------|-------|-------|-----|--------|-----|-------|
| | Ca | | Mg | | K | | Na | | Fe | |
| 0.00 (control) | 113 | ± 2.8 | 169 | ± 7.8 | 1,302 | ± 125 | 66 | ± 0 | 3.6 | ± 3.3 |
| 0.05 | 127 | ± 4.6 | 180 | ± 18 | 1,426 | ± 125 | 143 | ± 20 | 2.2 | ± 1.9 |
| 0.10 | 126 | ± 1.5 | 167 | ± 29 | 1,105 | ± 2 | 190 | ± 41 * | 4.0 | ± 0.6 |

Mean ± SE (N = 12), *significant at 5% (Tukey's HSD Test)

Table 3. Effects of NaCl concentration on essential amino acid, GABA and proline in spinach

| Amino acid (mg/100gfw) | NaCl (mol L ⁻¹) | | | | | |
|---------------------------|-----------------------------|--------|-------|--------|-------|----------|
| | 0.00 (Control) | | 0.05 | | 0.10 | |
| Ile | 28.1 | ± 5.5 | 34.2 | ± 5.8 | 37.0 | ± 8.1 |
| Thr | 27.7 | ± 13.2 | 32.4 | ± 11.2 | 33.7 | ± 19.4 |
| Val | 42.2 | ± 18.2 | 49.9 | ± 19.6 | 40.3 | ± 1.9 |
| Phe | 18.7 | ± 7.5 | 23.0 | ± 6.3 | 21.5 | ± 13.6 |
| Lys | 26.0 | ± 6.7 | 31.0 | ± 6.2 | 30.6 | ± 12.1 |
| Leu | 39.1 | ± 14.9 | 49.0 | ± 16.7 | 49.6 | ± 23.8 |
| Trp | 0.0 | ± 0.0 | 0.0 | ± 0.0 | 0.0 | ± 0.0 |
| His | 9.3 | ± 0.1 | 12.1 | ± 1.5 | 12.2 | ± 2.8 |
| Met | 2.4 | ± 3.3 | 0.0 | ± 0.0 | 0.0 | ± 0.0 |
| Total | 193.5 | | 231.6 | | 224.6 | |
| GABA | 225.7 | ± 35.8 | 213.2 | ± 9.0 | 220.1 | ± 3.1 |
| Pro | 24.8 | ± 1.0 | 50.9 | ± 26.2 | 69.2 | ± 19.1 * |

Mean ± SE (N = 12), *significant at 5% (Tukey's HSD Test)

Table 4. Effects of NaCl concentration on soluble saccharide, L-ascorbic acid and polyphenol in spinach

| NaCl (mol L ⁻¹) | soluble saccharide (g/100gfw) | L-ascorbic acid (mg/100gfw) | polyphenol (µmol/100gfw) |
|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0.00 (Control) | 0.27 ± 0.03 | 196 ± 43 | 491 ± 12 |
| 0.05 | 0.30 ± 0.04 | 190 ± 35 | 491 ± 3 |
| 0.10 | 0.41 ± 0.09 | 202 ± 47 | 615 ± 13 ** |

Mean ± SE (N = 12), *significant at 5%, **significant at 1% (Tukey's HSD Test)

Table 5. Effects of NaCl concentration on nitrate ion and oxalic ion in spinach

| NaCl (mol L ⁻¹) | Nitrate ion (mg/100gfw) | Oxalic acid ion (mg/100gfw) |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 0.00 (Control) | 225 ± 103 | 720 ± 226 |
| 0.05 | 224 ± 45 | 541 ± 108 ** |
| 0.10 | 215 ± 55 | 565 ± 95 * |

Mean ± SE (N = 12), *significant at 5%, **significant at 1% (Tukey's HSD Test)

参考文献

- Abdou, A. M., Higashiguchi, S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H. and Uokogushi, H. 2006. Relaxation and immunity enhancement effects of γ -aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *BioFactors* 26:201-208.
- Fujie, A., Kubota, M., Umemura, Y. and Oba, K. 2001. Vitamin C content, DPPH radical-scavenging activity and polyphenol content in fresh herbs (in Japanese). *Journal of cookery science of Japan* 34(4): 380-389.
- Iwata, M. 1984. Exchangeable sodium (in Japanese). *The Survey of Japanese Agricultural Techniques in Soil Fertilization*: 143.
- Izumi, M. 2004. Seasonal changes in the oxalic acid and potassium contents of spinach and effect of cooking on those contents (in Japanese). *Journal of cookery science of Japan* 37(3): 268-272.
- Jinno, H. and Ida, K. 1988. Studies on the cultivation adaptability of double cropping rice and upland crops in the young sea polder-land of Isahaya (in Japanese). *Bulletin of the Nagasaki Agriculture and Forestry Experiment Station* 1: 1-87.
- Kagawa, Y. 2007. *Standard tables of food composition in Japan. Fifth Revised and Enlarged Edition.*
- Mimura, S. 1995. Growth promotion of spinach in nutriculture by addition of sodium chloride to nutrient solution (in Japanese), *Journal of Shita* 7: 151-155.
- Morishita, T., Segawa, M., Iwahashi, M., Kagawa, K. and Ohta, Y. 1984. Salt resistance of different growth periods of cucumber, maize, and spinach in relation to selective uptake of Ca, Mg, K, and Na (in Japanese). *Journal of the Science of Soil and Manure, Japan* 55: 263-268.
- Murayama, T., Miyazawa, Y., Hasegawa, H. and Furukawa, Y. 2004. National Agriculture and Food Research Organization(NARO)
<http://www.naro.affrc.go.jp/top/seika/2004/tohoku/to04049.html>
- Official Journal of the European Communities. 2002: L86/5-6.
<http://www.dioksyny.pl/files/commission%20Regulation%20563-2002.pdf>
- Okano, C., Watanabe, Y. and Shimada, N. 1991. Effect of intermittent solution supply on water potential of hydro-cultured spinach plants (in Japanese). *Journal of the Science of Soil and Manure, Japan* 62: 549-551.
- Osawa, T. 1961. Studies on the salt tolerance of vegetable crops in sand culture. 4. On the relative salt tolerance and the salt injury of vegetable crops with special reference to the mineral nutrition (in Japanese). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 30: 241-252.
- Robinson, S. P., Downton, W. J. S. and Millhouse, J. A. 1983. Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt-stressed spinach. *Plant Physiol.* 73: 238-242.
- Stewart, G. R. and Lee, J. A. 1974. The role of proline accumulation in halophytes, *Planta*, 120: 279-289
- Tamura, A. 2004. Effect of air temperature on the content of sugar and vitamin C of spinach and komatsuna (crop production & cropping type) (in Japanese). *Horticultural Research (Japan)* 3: 187-190.
- Takebe, M., Ishihara, T., Matsuno, K., Fujimoto, J. and Yoneyama, T. 1995. Effect of nitrogen application on the contents of sugars, ascorbic acid, nitrate and oxalic acid in spinach (*Spinacia oleracea* L.) and komatsuna (*Brassica campestris* L.) (in Japanese). *Journal of the Science of Soil and Manure, Japan* 66: 238-246.
- Takebe, M., Sato, S., Ishii, K. and Yoneyama, T. 1996. Effect of slow-releasing nitrogen fertilizers on the contents of oxalic acid, ascorbic acid, sugars and nitrate in spinach (*Spinacia oleracea* L.) (in Japanese). *Journal of the Science of Soil and Manure, Japan* 67: 147-154.
- Terai, T., Yamada, Y., Ohtsu, Y., Kurokawa, Y., Iino, S. and Yamasaki, K. 2006. Improvement of soil physical and chemical properties by green manure cultivation during early period of farm managements in Isahaya bay polder (in Japanese). *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 77: 321-328.
- Tsushida, T. 2000. Chemical analysis of polyphenol (in Japanese), *The research method for health-promoting benefits of food*: 318-322.
- Uzawa, M., Okuyama, S., Murata, M., Sato, R. and Omori,

- M. 2002. Development of manufacturing process of squash products rich in γ -aminobutyric acid, and an effect of the products on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats (in Japanese). Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology 49: 573-582.
- Watanabe, Y., Yoneyama, M. and Shimada, N. 1987. Effects of water stress treatment on sugars, vitamin C and oxalate contents of spinach (in Japanese). Journal of the Science of Soil and Manure, Japan 58: 427-432.
- Yoneyama, T. 1982. Nitrate, nitrite, N-nitroso compounds in air, soil, water, plant (in Japanese). Science of Health 24:725-729.

研究成果発表論文

- (1) Takashi Shimomachi, Chiaki Kobashigawa, Emi Omoda, Takehiro Takemasa, Kenji Kurata and Tadashi Takakura, Quantitative Estimation Method of Plant Adaptation Responses to Saline Environment using Microwave Sensing, Acta Horticulturae, 797, pp463-468 (2008)

- (2) Takashi Shimomachi, Yoko Kawahara, Kaoru Hamabe and Kei Tamaya, Effect of Residual Salinity on Spinach Growth and Nutrient Contents in Polder Soil, Acta Horticulturae, 797, pp419-424 (2008)
- (3) 下町多佳志, 小橋川千晶, 谷川弘明, 面田絵美, マイクロウェーブによる植物の塩環境適応応答の検出, 土壌の物理性, No. 108, pp5-10 (2008)【審査有り】

特許出願

- (1) 発明の名称「ストレスに対する植物体の適応応答反応の測定方法」
発明者: 下町多佳志, 出願人: 長崎大学学長
提出日: 平成 16 年 9 月 3 日, 出願番号: 特願 2004-257760, 特許公開 2006 年 3 月 16 日 2006-679549
- (2) 発明の名称「植物体の適応応答測定装置及び植物体の適応応答測定方法」
発明者: 下町多佳志, 出願人: 長崎大学学長
提出日: 平成 19 年 9 月 28 日, 出願番号: 特願 2007-255783

II-B 塩処理による高品位メロンの栽培技術の開発

1. はじめに

水ストレスや塩ストレスのような環境ストレスをトマトのような作物に与えることで、高品位化(果実の高糖度化)をはかることは従来から行われてきた。このような植物の環境ストレス適応応答を利用した高付加価値農産物の生産では、本来植物の生育に有害なストレスを利用することから、品質と収量のバランスを実現するためにストレスを与える“適切なタイミング”と“適切なストレス状態の維持”が非常に重要になる。

メロンの栽培には、大きく三つの段階がある。第Ⅰ段階は、定植から受粉までの植物体の基礎が形成される期間、第Ⅱ段階は受粉後、果実が形成され、果実表面にネットを形成させ、メロンの基本的な品質を決定づける重要な時期である。第Ⅲ段階は、ネット完了から収穫までの間で、一般的には水ストレスを与えることにより、最終的な果実の大きさや糖度を調節し、収穫時の品質を決定づける最も重要な期間である。

今回は、塩を利用したメロンの高品位化栽培技術の開発を目的とし、塩ストレスを与えるタイミングを、第Ⅱ段階を終了しメロン果実として基本的な品質がほぼ確立した直後、第Ⅲ段階の開始時に置き、1回だけNaClを含む水を散布することにより、塩ストレスによるメロンの高糖度化実験を行った。栽培実験の結果から、従来から用いられている水ストレスを利用した手法と比較して、果実の大きさや重量などの外観的な品質は同等なままメロンの高糖度を実現することができ、塩ストレスを利用したメロンの高糖度化手法が非常に有効であることが分かった。

2. 材料及び方法

今回の栽培実験は、長崎県総合農林試験場の温室で行った。メロンの品種は、ベネチア秋冬(八江農芸株式会社)を用い、イチゴ栽培用のベンチを利用した隔離土耕を行った。使用した土の配合は、薩摩土 65%、ヤシピート 25%、バーク堆肥 10%とした。土の量はメロン1株あたり22 L、株間は450 mmとした。

本研究で選んだ塩ストレスを与えるタイミングは、第Ⅲ段階開始時である。第Ⅲ段階開始時に、それぞれ、食塩水0 mmol/L(通常の水ストレス)、30 mmol/L(1,800 ppm)、60

mmol/L(3,500 ppm)、90 mmol/L(5,300 ppm)、120 mmol/L(7,000 ppm)のNaCl水溶液をメロン1株あたり3 L(栽培用のベンチのドレインから水が排出されない量)与えた後、メロンの状態を観察しながら通常の水による灌水を行った。一般的に、第Ⅲ段階での灌水量は少量であり、ベンチのドレインから排水はなかったことから、散布した塩のほとんどは、ベンチ内の土中に留まっていると考えられる。各試験区のメロンは12株とした。

メロンを定植後、水ストレスや塩ストレスの影響により変化するメロンの生理状態を反映する第15葉の成長(葉幅、葉長)、SPAD値を7日ごとに測定した。SPAD値は葉部のクロロフィル量の目安であり、葉緑素計(ミノルタ株式会社 SPAD-502)で測定した。

光合成速度および気孔コンダクタンスの測定は、自動キユベットを装備したCiras-1(英国, Model Ciras-1, PP Systems社)を用いた。水ポテンシャルの測定には、Dew point Microvoltmeter HR-33T(米国, Wescor社)およびSample Chamber C-52-SF(米国, Wescor社)を使用した。サンプルチャンバは、25°Cに設定されたインキュベータ内に設置した。葉をパンチしサンプルチャンバに挿入後25°Cに2時間保持した後、水ポテンシャルを測定した。

収穫したメロン果実は5°Cの暗所に7日間保存した後、重量、直径、果肉水分量、Brix糖度、Sucrose、Fructose、Glucoseの各糖類の含有量を測定した。葉部水分量の測定は、80°Cの乾燥炉の中で96時間乾燥させた後測定した。果肉水分量は果肉を凍結乾燥することにより求めた。

3. 結果および考察

Fig. 1にメロン第15葉の葉長、葉幅について定植後の成長と水ストレス処理および塩ストレス処理の関係を示す。Fig. 1.1は、通常の水ストレス処理を行った場合のメロン第15葉の葉長、葉幅の成長過程を示している。Fig. 1.2は、もっとも強い120 mmol/Lの塩ストレス処理を行った場合の第15葉の成長過程を示す。両図より、メロンの生長がほぼ完了した後、水ストレスあるいは塩ストレス処理が実施されたことが分かる。

Fig. 2にFig. 1同様、メロン第15葉の葉部クロロフィル量の目安となるSPAD値と水ストレス処理と塩ストレス処理の

関係を示す。Fig. 2.1 は、通常の水ストレス処理を行った場合のメロン第 15 葉の SPAD 値の変化を示している。Fig. 2.2 は、もっとも強い 120 mmol/L の塩ストレス処理を行った場合の第 15 葉の SPAD 値の変化を示す。Fig. 2 より、葉部のクロロフィル量は、水ストレスあるいは塩ストレスの影響によって急速に減少していることが分かった。ストレス処理

後、目視によっても、時間の経過とともに葉部が徐々に黄化していくことが観察された。水ストレス処理による SPAD 値の低下は約 14、塩ストレスの場合の低下は約 16 であることから、水ストレス処理よりも塩ストレス処理の方がやや強く植物体に影響していると考えられる。

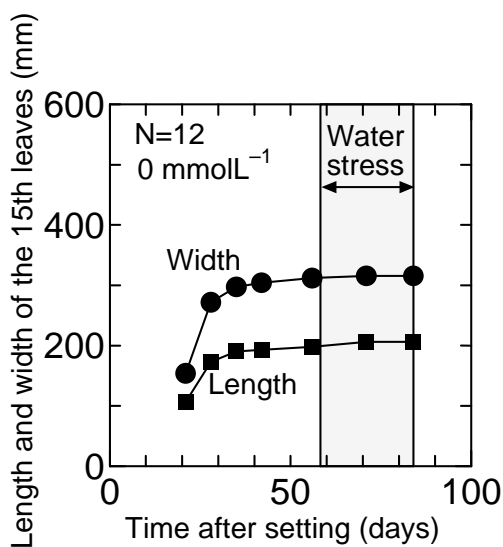


Fig. 1.1. Water stress treatment

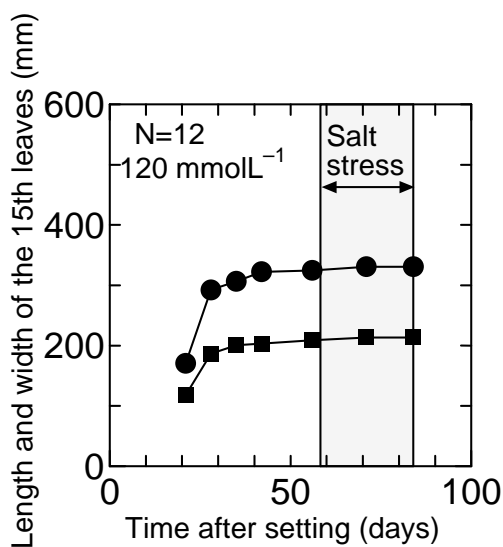


Fig. 1.2. Salt stress treatment

Fig. 1. Relationship between growth of leaves and timing of stress treatments

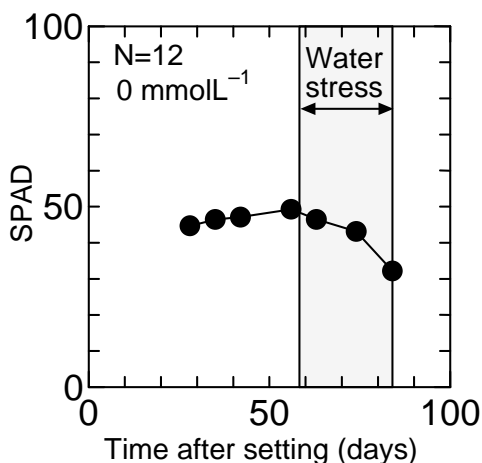


Fig. 2.1. Water stress treatment

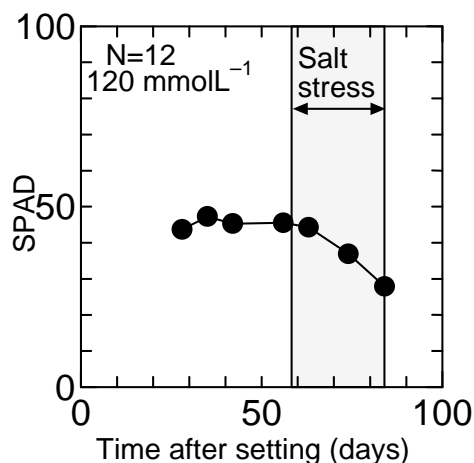


Fig. 2.2. Salt stress treatment

Fig. 2. Relationship between SPAD of leaves and timing of stress treatments

Fig. 3 に塩ストレス処理がメロン第 15 葉の水ポテンシャルに与える影響を示す。塩ストレス処理によって水ポテンシャルが減少することが分かった。午前 10 時に測定した水ポテンシャルは、塩ストレス処理の濃度の増加に伴い緩やかに減少するが、光合成が盛んになっている午後 2 時には、塩ストレス処理の濃度の増加に伴う水ポテンシャルの減少率が大きくなった。午前 10 時における水ストレス区と塩ストレス区の水ポテンシャルの差は最大で約 0.2 Mpa しかないことから、光合成が行われていない夜間は、塩ストレスの影響は大きくないことが予測される。

一方、光合成が盛んに行われている午後 2 時では、両者の差は約 0.5 Mpa とかなり大きくなっており、光合成の行われている時間帯に、塩ストレスが強く作用していることが分かった。

Fig. 4 に、塩ストレス処理濃度とメロン収穫時の果実および第 15 葉の水分量との関係を示す。水ストレス処理および塩ストレス処理による葉部および果実の水分量の変化はほとんど無いことが分かった。

Fig. 5 に光強度 PPF を 0 から $2,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に変化させた時の、水ストレス処理と最も強い塩ストレス処理(濃度 120 mmol/L)を行った場合の、第 15 葉の光合成速度と気孔コンダクタンスの比較を示す。光強度 PPF が $1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ において光合成速度と気孔コンダクタンスは、水スト

レス処理と比較して塩ストレス処理の方が、光合成速度が約 16%、気孔コンダクタンスが約 30%減少することが分かった。塩ストレス処理によって気孔コンダクタンスの減少率の方が光合成速度の減少率よりも大きい(気孔がより閉じている)が、光合成速度は塩ストレス処理によって大きくは減少しないことが分かった。

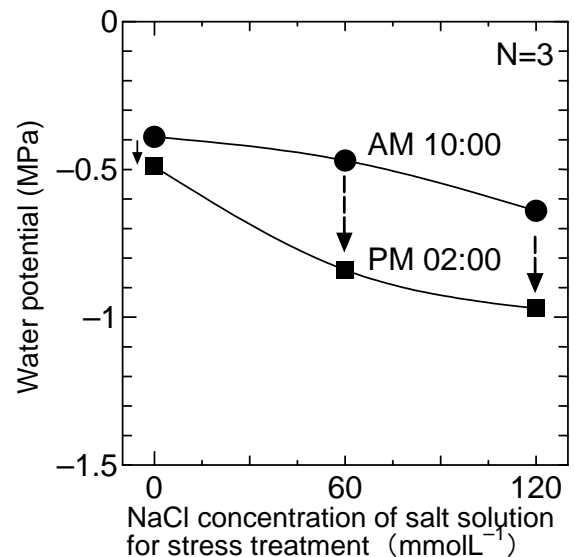


Fig. 3. Effect of salt stress treatments on plant water potential of the 15th leaves

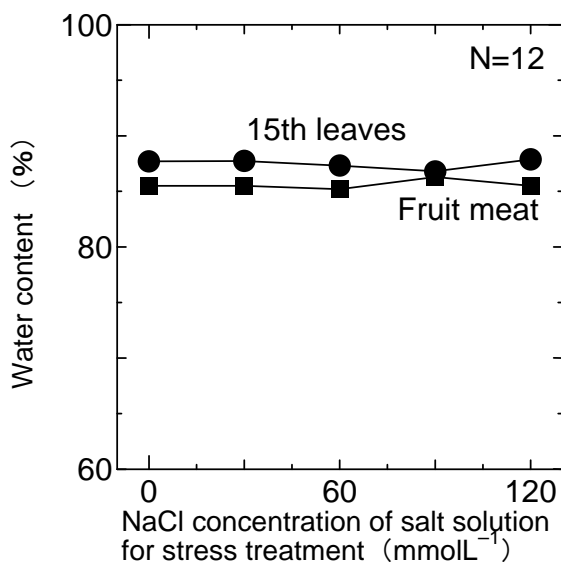


Fig. 4. Effects of between salt stress treatments on plant water content

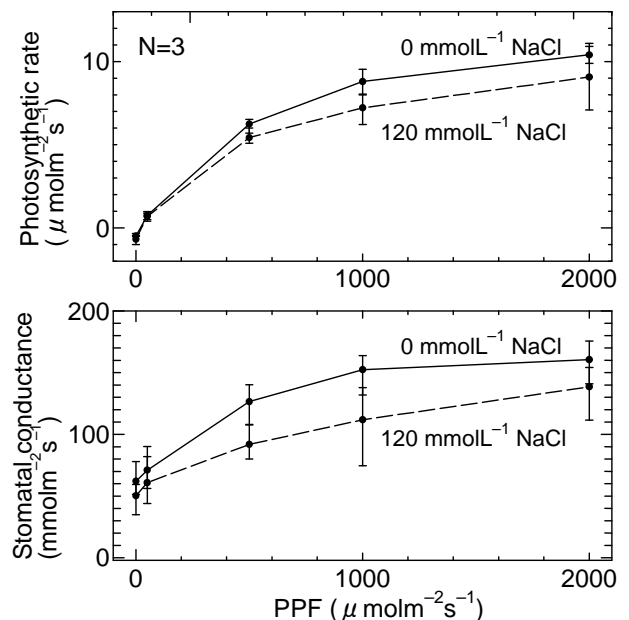


Fig. 5. Effects of salt stress treatments on photosynthetic rate and stomatal conductance

Fig. 6に塩ストレス処理濃度とメロン果実の直径と重量の関係を示す。今回の塩ストレス処理は、メロンの外観的な品質にほとんど影響しなかった。

Fig. 7に塩ストレス処理濃度とメロン果肉に含まれる Brix 糖度や Sucrose、Fructose、Glucose の各糖類の含有量の分析結果を示す。Fig. 7より、最も効果的な塩ストレス処理の塩濃度が60 mmol/Lであることが分かった。塩ストレス処理を行った試験区のメロンでは、すべて従来の水ストレスによる手法よりも高い糖度が得られた。また、塩ストレス処理によって果肉の Fructose、Glucose はほとんど変化しないが Sucrose の量のみが変化することが分かった。同時に測定した Brix 糖度と Sucrose の量は同様の傾向を示し、Brix 糖度の変化は Sucrose 量の変化を捉えたと考えられる。

4. まとめ

今回の研究から得られた成果をまとめると以下のようになる。

(1) 適切な塩ストレス処理が外観的な品質は従来の水ストレスによる手法と同様なまま、メロンの糖度を効果的に上昇

させる事が可能であり、メロンの高品位化に非常に有効な手段であることが示された。

(2) メロン栽培の第Ⅲ段階の最初に、塩ストレス処理を一度のみ行うことで、従来の水ストレスによる高糖度化手法と比べて非常に効果的に高糖度化を実現できた。今回の実験では、最大で 120 mmol/L (7,000 ppm) 濃度の食塩水を使用した。どの塩濃度でも、水ストレス処理の場合よりも高糖度メロンが得られた。塩ストレス処理によるメロンの重量、直径、ネットなどの外観的な品質や果肉水分量など品質面は従来の水ストレスを利用した手法と同様で、糖度により高い高品位メロンを栽培することができた。

(3) 塩ストレス処理によって果肉に増加した糖分は、主に Sucrose である。

(4) メロンを最も効果的に高糖度化できたのは、塩濃度 60 mmol/L (3,500 ppm) 水溶液をメロン 1 株あたり 3 L (10.5 g の塩量) を散布した場合であった。この場合メロン 1 株あたり 22 L の土を使用した事から、土 1 L あたり 0.48 g の食塩を散布したことに相当する。

(5) 塩ストレス処理がメロンに強く影響するのは主に光合成の盛んな昼間と考えられる。

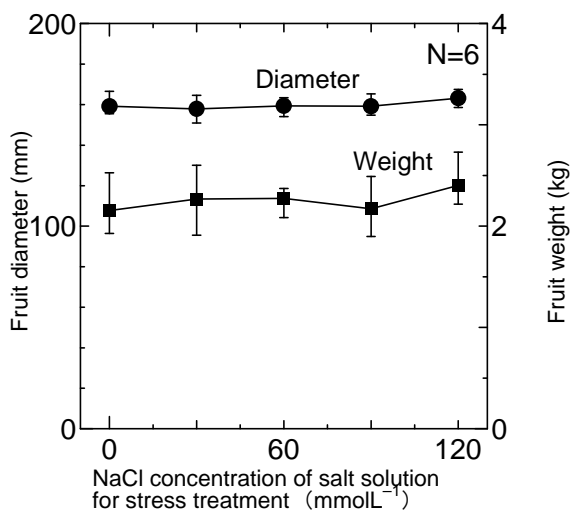


Fig. 6. Effects of salt stress treatments on fruit weight and diameter

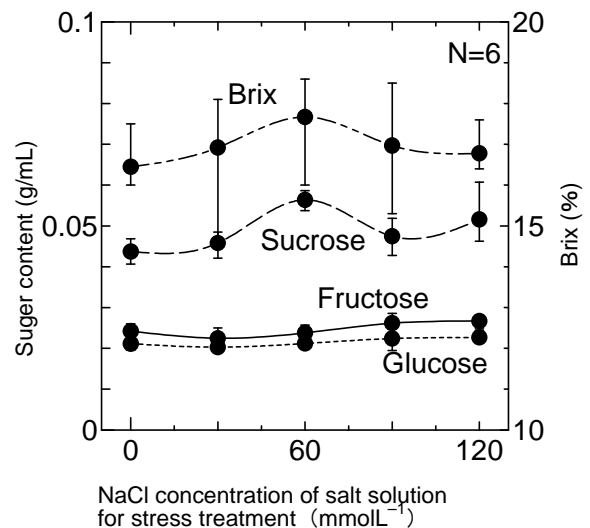


Fig. 7. Effects of salt stress treatments on sugar content of fruit

第 III 部 植物ストレスセンサーの開発

1. はじめに

マイクロウェーブを植物のストレス検出に用いた研究はこれまでほとんど行われてこなかった。マイクロウェーブの農作物の測定応用に関する研究の主流は、水分が誘電率に支配的に作用する性質を利用した水分量や密度の測定に関するものであった。

筆者が着目したのは、植物がストレスを受けて適応応答を通じて誘導合成する多くの調整物質（強電解質、アミノ酸、糖、タンパクなど）が複素誘電率の周波数特性（誘電緩和スペクトル）を変化させる点であった。

筆者は、これまでの研究でマイクロウェーブによって植物葉部の誘電緩和スペクトルを測定し、ストレスを受ける前後の誘電緩和スペクトルの変化から植物のストレス状態を検出する手法の開発に取り組んできた。本稿では、そこで得られたいくつかの知見を紹介したい。

2. マイクロウェーブで何が捉えられるか？

マイクロウェーブの定義はやや漠然としており、一般に UHF 帯 (300 MHz ~ 3 GHz)、ならびに SHF 帯 (3 GHz ~ 30 GHz)、両者の総称、あるいは 1 GHz ~ 10 GHz 程度の漠然とした周波数範囲の事を意味する。図 1 に誘電緩和スペクトルから何を見ることができ示す。筆者らが使用している 300 MHz ~ 50 GHz の周波数域で、強電解質、アミノ酸類、糖類などの浸透圧調整物質の変化を、それ

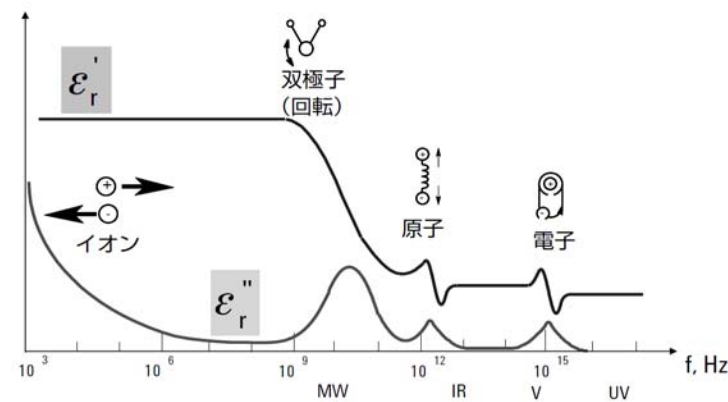


図 1. 誘電緩和スペクトルから何が見えるか

らの分子がイオン電導性や、電気双極子を持っていることから誘電率 ϵ' と誘電損失率 ϵ'' の値の変化として捉えることができる。水分量は、20 GHz 周辺の水の緩和周波数で生じる誘電損失率 ϵ'' の最大値から直接的に捉えることが可能である。

3. 植物の環境適応応答検出の実例

図 2 に水耕栽培されているトマトの給液を停止し水ストレスをかけたときの葉部の誘電緩和スペクトルの時間変化を示す。水ストレスによってトマト葉部の誘電率と誘電損失率が時間経過とともに増加した。

図 3 に水ポテンシャルとトマト葉部の誘電的特性の関係を示す。トマトの水ストレスに対する適応応答によって、水ポテンシャルが減少し、同時に誘電率や誘電損失率が増加した。このことは、トマト葉部の誘電的特性の変化として環境適応応答に伴う浸透圧調整物質質量の変化をマイクロウェーブによって捉えたことを示している。

筆者は、これらの基礎的な研究により得られた知見を応用し植物ストレスセンサを試作した。外観を図 4 に示す。まだ測定周波数や植物葉部のクランプ方法など改良すべき点は多々あるが植物の葉部をセンサーのクリップ状測定部で挟み、数秒で植物のストレス状態を測定することが可能である。

図 5 に実験室内で土耕栽培したトマトを水ストレス状態

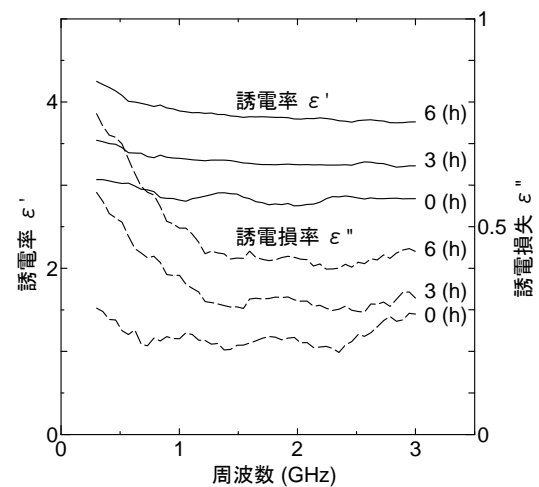


図 2. 水ストレスを受けたトマト葉部の誘電緩和スペクトルの時間変化 (水耕栽培)

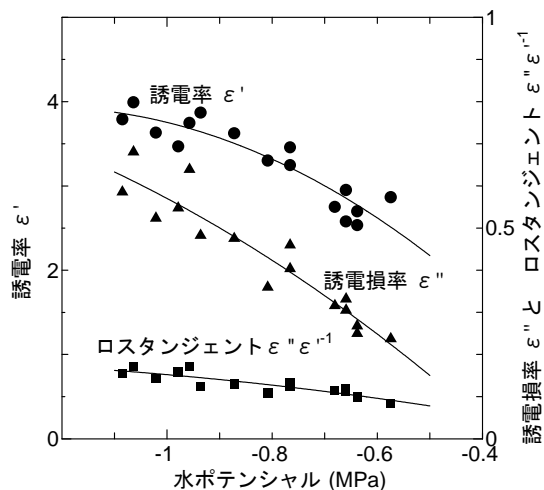


図 3. 水ストレスを受けたトマト葉部の水ポテンシャルと誘電的特性の関係(水耕栽培)

とし、5 日目に再給水した場合の測定結果を示す。水耕栽培と異なり土耕栽培では水ストレスの影響が測定値に現れるのに時間がかかり 3 ~ 4 日目からようやくストレス状態になったことを測定値は示している。5 日目に再び給水すると、ストレス状態からトマトは急速に回復したが、完全にもとの値には戻らず、ストレス履歴も検出された。

4. おわりに

筆者のこれまでの研究成果を紹介した。これらの成果を応用したセンサーが開発できれば、簡単原理で製造コストも安価、熟練操作も不要で簡単操作の植物ストレスセンサの実現も決して夢ではない。作物のストレスコントロールによって高付加価値農産物を生産する農業分野でベテラン農家の勘と経験を定量化し、誰でも高品位農作物の生産を可能にする技術に発展するかもしれない。環境分野では、一定限度を超えた環境の変化が環境ストレスとして植物生理に影響を与える。その影響の程度を定量的に把握することは、その植物の状態を評価することに止まらず、植物を仲立ちとした環境評価の側面も有り環境保全分野への普及も期待できる。近年急速に普及した携帯電話に代表される高周波技術を応用すれば、安価で高性能な携帯型植物ストレスセンサの実現も容易であろう。読者の皆様のご理解とご支援を心からお願いする次第である。



図 4. 植物ストレスセンサーの試作機

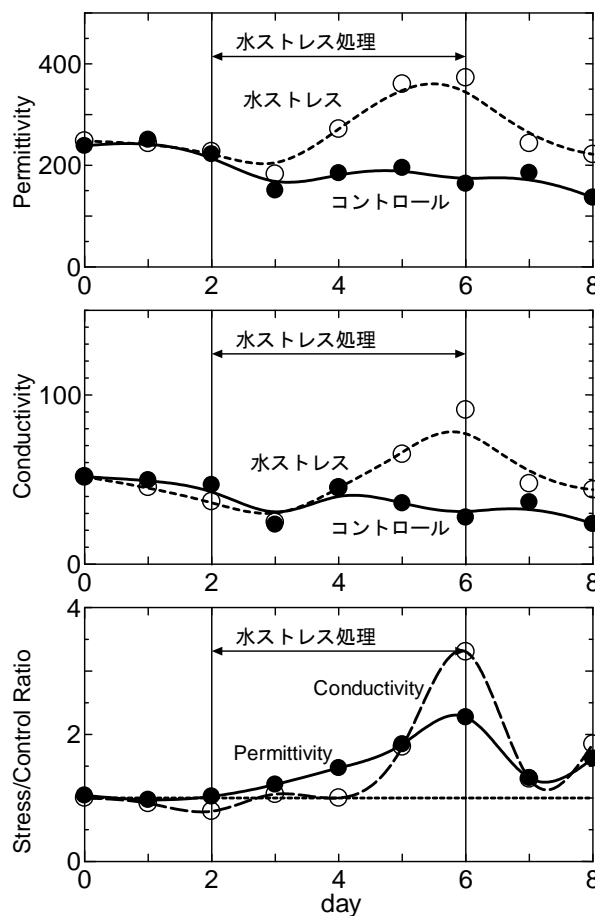


図 5. 植物ストレスセンサーによるトマトの水ストレス状態の測定例(土耕栽培)

Development of a Quantitative Evaluation Method of Plant Response in Salt Stress for High-Quality Crop Production Using Microwave Sensing

Takashi Shimomachi

The Faculty of Environmental Studies, Nagasaki University

Summary

Part I

Quantitative estimation method of plant adaptation responses to saline environment using microwave sensing.

In this study, in order to develop an estimation method of plant adaptation responses to a saline environment using microwave sensing, plants which have different salinity tolerances were examined after being grown hydroponically and exposed to a saline environment for 2, 4 or 6 weeks. Experimental results showed the dielectric relaxation spectra changed as the plant leaves adapted to the saline environment, and there were three main types of spectral change pattern. The plants associated with each of the three types of spectral change pattern did not correlate with the conventional classification of salinity tolerance of the plants (as sensitive crop, moderately sensitive crop, moderately tolerant crop and tolerant crop), suggesting there are patterns of spectral change peculiar to each variety of plant. The patterns of change in dielectric properties on the Cole-Cole plots showed that the dielectric properties of all plant materials changed toward those of a halophytic plant after exposure to a saline environment, as if the plants tried to become halophytic plants. The relationship between dielectric properties of plant leaves and water potentials also showed a similar phenomenon. In addition, the relationship between loss tangent and water potential had a nearly linear relationship. Experimental results showed the potential of using microwave sensing for quantitative estimation of plant adaptation responses to a saline environment and the degree of salinity of the environment in the rhizosphere.

Part II

Development of a quantitative evaluation method of plant response in salt stress for high-quality crop production.

1. Effect of residual salinity on spinach growth and nutrient contents in polder soil.

In this study, the effect of residual salinity in polder soil on plants was investigated, in order to develop a value-added plant production method. Spinach plants were subjected to a saline environment by adding diluted artificial seawater to the soil of reclaimed land with 23.5 g m⁻² ammonium sulfate at NaCl conversion concentrations of 0, 0.05 and 0.10 mol L⁻¹. Diluted seawater equal to the amount of the maximum water holding capacity of the soil was added to the soil three weeks after germination. Afterward, the moisture content of the soil was maintained at about 40% during the experiment. The plants were harvested 4 weeks after starting the saline treatment. The growth of the plants, measured by parameters such as leaf width and number of leaves, was

almost the same, and the fresh weight of both shoots and roots increased compared to the control plants at NaCl treatment concentration of 0.05 mol L⁻¹. Na ion in spinach increased with increase in NaCl treatment concentration, but K, Ca, Mg and Fe ions showed little change. Spinach grown in polder soil contained a large amount of cations, soluble saccharide, L-ascorbic acid and polyphenol compared with field cultivated spinach. Essential amino acid content increased with increase in NaCl concentrations compared with the control. It is well known that the effect of γ -amino butyric acid (GABA), an inhibitory neurotransmitter in humans, has physiological functions such as relaxation, increasing immunity and reducing blood pressure. Spinach cultivated in polder soil contained extremely large amounts of GABA, about 200 times compared with field cultivated spinach regardless of NaCl treatment concentration. Nitrate ion and oxalic acid ion decreased at NaCl concentrations of 0.05 and 0.10 mol L⁻¹, and that nitrate ion level was less than EU standards (250 mg/100gfw harvested 1 April to 31 October and 300 mg/100gfw harvested 1 November to 31 March). In conclusion, experimental results showed that spinach plants cultivated under the appropriate residual salinity in polder soil might have potential to increase the amount of production and nutrients and to decrease components harmful to humans at same time.

2. Production of high quality muskmelons using salt stress treatments.

The objective of this research is to develop a new method to produce high quality muskmelon fruits using plant adaptation responses to a saline environment. Muskmelons (*Cucumis melo* L.) were grown in soil culture on a strawberry bench in a greenhouse to determine the optimum strength and timing of the salt treatment. Muskmelon growth from seeding to harvest was divided into three stages, Stage I (transplanting to pollination), Stage II (pollination to fruit net development) and Stage III (fruit net development to harvest). In this study, the salt treatment was conducted at Stage III, because the basic quality of the muskmelons was almost determined during Stage II. In the salt stress treatment six different levels of NaCl concentration were used, with 3 liters of solution per plant: 0 mmol L⁻¹ (water stress treatment), 30 mmol L⁻¹ (1,800 ppm), 60 mmol L⁻¹ (3,500 ppm), 90 mmol L⁻¹ (5,300 ppm) and 120 mmol L⁻¹ (7,000 ppm). The salt stress treatment was conducted only once, immediately after the end of Stage II. Experimental results showed that the salt stress treatment of 60 mmol L⁻¹ produced the best quality muskmelons, which had highest sugar content. The external quality, size and weight of fruits were similar compared with the case of water stress treatment. All salt stress treatments achieved higher sugar content than with the water stress treatment.

Part III

Development of nondestructive plant stress sensor.

The low-cost nondestructive plant stress sensor which had simple structure and operability was developed. Experimental result showed that this plant stress sensor could detect the degree of salt stress and water stress in tomato plants quantitatively. Concerning this invention, two patents were applied.

海洋深層水濃縮廃液を活用した高品質高糖度トマトの多段周年栽培の実用化

北野 雅治¹, 松岡 孝尚², 松添 直隆³, 圖師 一文⁴, 和島 孝浩³, 日高 功太¹

¹九州大学大学院農学研究院, ²愛媛大学大学院連合農学研究科,

³熊本県立大学環境共生学部, ⁴尚絅大学短期大学部

概要 海洋深層水を原料とする多様な商品の製造過程で排出される濃縮海洋深層水を再利用する高品質トマト生産を検討している。その過程で、濃縮海洋深層水を短期間施用した場合の生理的効果のメカニズムを、塩ストレスに対する植物体の適応機能という観点から明らかにすることも目的としている。2005、2006 年度においては、植物体での浸透圧調節機能と抗酸化機能の発現および果実の高品質化の評価法を確立するとともに、4 段栽培における各段の果房に対して異なる回数(3 回, 2 回, 1 回)の短期間(1 週間)塩ストレス処理を行った。その結果、短期間の断続的な塩ストレス処理によって、浸透圧調節機能や抗酸化機能が発現するが、2 回以下の短期間塩ストレス処理では高品質化の効果は十分ではなかった。そこで、2007 年度においては、各段の果房に対して均等に 3 回の短期間塩ストレスを付与し、果実生長、浸透圧調節機能、抗酸化機能、果実への有用物質(糖, ミネラル, 抗酸化物質など)の集積および食味などに対する効果を、長期間連続塩ストレス処理と比較して検討した。材料植物としては、トマト(*Lycopersicon esculentum* Mill.) 品種「ハウス桃太郎」を用い、NFT 水耕システムを用いた 4 段栽培をおこなった。収穫まで基本培養液(電気伝導度 1.0 dS m^{-1})のまま栽培する区を対照区とし、基本培養液に濃縮海洋深層水を添加して、1 週間の塩ストレス処理を 1 週間間隔で断続的に繰り返す短期間繰り返し塩ストレス処理区と長期間添加する長期間連続塩ストレス処理区を設けた。

濃縮海洋深層水を適度の濃度で施用する 1 週間の塩ストレス処理を、4 段栽培での各果房の果実肥大期に 1 週間間隔で 3 回繰り返す処理によって、多様な項目(糖度, 酸度, ミネラル濃度, 浸透圧調節機能, 抗酸化機能, 食味)において、長期間連続塩ストレス処理と同等以上の均質な高品質化の効果が認められた。多段栽培での長期間連続塩ストレス処理では、極端な小玉果や尻腐れ果が生じるとともに、樹勢の低下も懸念されるが、短期間繰り返し塩ストレス処理によって、これらの低減とさらなる長段栽培への応用の可能性が示唆された。本研究では、海洋深層水のような有用な天然資源を活用して、適度な強度の環境ストレスを適当な期間、植物体に付与することによって、植物が有するストレス適応機能を発現させ、農産物の付加価値を高める栽培技術を提示できた。

1. 研究の背景と目的

海洋深層水に関しては、深層水が有する特性(低温性, 富栄養性, 清浄性, 安定性)を考慮した多目的、多段階利用の取り組みが展開され、深層水を原料とした多様な製品が市販されている(中島, 2002)。海洋深層水を原料とする製品(ミネラル飲料水, 天然塩など)を製造する過程では、深層水に含まれる塩とミネラル成分が高濃度で残存する濃縮深層水が大量に排出され、一部は河川や沿岸域へ

投棄されている。しかしながら、投棄には多くの労力と費用を要するとともに、河川や沿岸域の環境への悪影響が懸念されており、濃縮海洋深層水の効果的な再利用法が求められている。

海に囲まれた日本では、昔から身近にある天然資源として海水や海藻が農業に用いられている。また、海水が多く含まれる干拓地や台風による高潮の被害を受けた低平地の田畑で、品質の良い作物が収穫できる例はよく知られて

いる。なかでも、主要な園芸作物で耐塩性が強いトマトについては、八代市(干拓地)の塩トマトや高知市(沿岸低平地)の徳谷トマトが有名である。さらに、養液栽培においては、培養液に塩化ナトリウムを添加して電気伝導度(EC)を高めることによって、根系に塩ストレスを付与する栽培などが行われている(Adams, 1991; Adams and Ho, 1989; Ehret and Ho, 1986)。これらの栽培で生産されたトマト果実は一般に「高糖度トマト」と呼ばれ、果実が小玉になるにもかかわらず、食味成分(糖, 有機酸, アミノ酸)、機能性成分(リコピン, 還元型アスコルビン酸)などの濃度が高く、食味も良いことから、高値で取引されている。Fig. 1 に示すように、根域での高塩濃度条件によって、根の吸水が抑制され、植物体が水分欠乏に陥り、浸透圧ストレスが誘発される。さらに、高塩濃度条件下では、水分欠乏にイオンストレス(ナトリウムイオンや塩素イオンの過剰)も加わり、葉の光合成が抑制され、過剰な光による光合成系の障害(光阻害)も生じる(Long *et al.*, 1994; Melis, 1999)。植物は光合成により酸素を発生させるために、細胞内の酸素濃度が高く、光合成系の障害によって電子伝達系で生じた余剰電子が活性酸素(スーパーオキシドラジカルや過酸

化水素)を発生しやすく、酸化ストレスが誘発される(Cakmak and Marshner, 1992; Wise and Naylor, 1987)。根域でのストレス要因によって植物体に誘発される浸透圧ストレスと酸化ストレスに応答して、植物体ではそれぞれ浸透圧調節機能と抗酸化機能が発現する。これらのストレス応答は、ストレスシグナルの受容、伝達およびそれに続く多様な遺伝子の発現によってもたらされ、シグナル伝達物質として誘導されるアブシジン酸(ABA)や細胞内の二次的なシグナル伝達を担うカルシウムイオンなどが重要な働きをしている。これらのシグナル伝達物質によって誘導される遺伝子発現によって、水分子、糖、アミノ酸、塩類の膜輸送に関わる膜輸送タンパク質(チャンネル, トランスポーター, ポンプ)、浸透圧調節機能における適合溶質(糖および糖の誘導體, プロリン, グリシンベタイン等)の合成酵素、活性酸素消去系における解毒酵素等の多様な機能タンパク質が合成され(Hasegawa *et al.*, 2000; 幸田ら, 2003)、その結果、収穫対象器官(例えば、トマト果実)に有用物質(糖, 有機酸, アミノ酸, 抗酸化物質等)が高濃度に集積することが期待される。

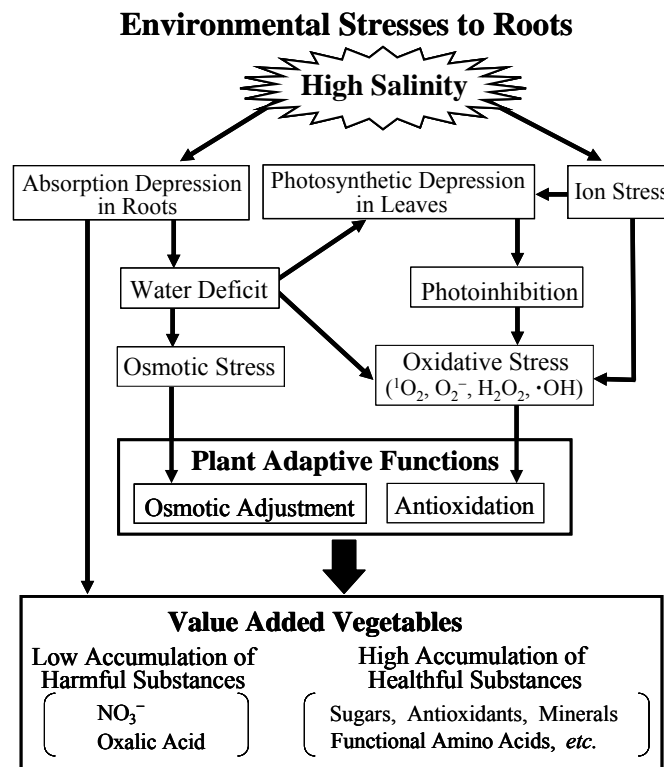


Fig. 1. Application of high salinity stress to roots in the soil-less culture for production of value-added vegetables

植物体における浸透圧調節機能は、低温条件下での凍結回避、吸水制限下での細胞からの脱水防止と細胞内の膨圧維持、高塩濃度条件下での細胞内への塩の侵入防止のために発現するが(幸田ら, 2003)、高塩濃度条件下による吸水制限下において、師管内の溶質濃度を高めて師管内の圧流を維持(師部輸送を維持)するためにも発現することが、トマト果実への師部輸送で確認されている(北野ら, 2005; Kitano *et al.*, 2008; 和島ら, 2006b)。植物体における抗酸化機能は、活性酸素を消去する仕組み(活性酸素消去系)に依存している。活性酸素消去系は、代謝プール(細胞質、葉緑体、ミトコンドリアなど)に存在し、酵素や酸化還元物質の働きで活性酸素を最終的に水に変える系である。活性酸素の中で最も多く発生するスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)は、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD; Super oxide dismutase)によって、酸素と過酸化水素(H₂O₂)に分解される。さらに、過酸化水素は、還元型アスコルビン酸(ASA; Ascorbic acid)とアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX; Ascorbate peroxidase)によって還元されて水になる。この時、ASAは酸化されて酸化型アスコルビン酸(DHA; Dehydro ascorbic acid)に変化するが、デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(DHAR; Dehydro ascorbate reductase)などによって還元され再生する(Asada, 1999; Bowler *et al.*, 1992; Foyer *et al.*, 1994; Shalata and Tal, 1998)。このような浸透圧調節機能や抗酸化機能の過程で産生される有用物質の高濃度集積による野菜の高付加価値化のほか、健康に有害な物質(硝酸やシュウ酸)の低減による高付加価値化も考えられる(Fig. 1)。

このように、適度の塩ストレス処理によって浸透圧調節機能や抗酸化機能を発現させることによって、トマト果実の高付加価値化をもたらすことが期待されるが、長期間の塩ストレス処理が、(1)果実の極端な小玉化、(2)果実へのCaの集積不足による尻腐れの多発、(3)果皮の硬化、(4)樹勢の低下などを引き起こすことが栽培上の問題になっている(Ho, 1996; Cuartero and Fernandez-Munoz, 1999; Dorais *et al.*, 2001)。そこで、これらの栽培上の問題点の解決策および濃縮海洋深層水の再利用法として、トマト果実の肥大最盛期の短期間にだけ培養液に濃縮海洋深層水を施用する高品質トマト水耕栽培を検討している(北野ら, 2005; 北野ら, 2006; 北野ら, 2007; Kitano *et al.*, 2008; 和島ら, 2006ab)。その過程で本研究は、濃縮海洋深層水

の短期間施用による塩ストレス処理の生理的効果のメカニズムを、塩ストレスに対する植物体の適応機能という観点から明らかにするとともに多段周年栽培法を確立することを目的としている。

初年度の2005年においては、塩の短期間施用が繰り返し可能な水耕栽培システムを構築するとともに、塩の短期間施用に伴う活性酸素消去系と浸透圧調節機能の消長、果実への有用物質(糖、ミネラル、抗酸化物質、機能性アミノ酸など)の集積および食味の定量的評価法を導入し、深層水トマトの高付加価値化について調べた。2006年度においては、塩ストレスの短期間処理が繰り返し可能な水耕栽培システムを用いた4段栽培において、繰り返し回数異なる短期間繰り返し塩ストレス処理と長期間連続塩ストレス処理を導入し、果実生長、浸透圧調節機能、抗酸化機能、果実への有用物質(糖、ミネラル、抗酸化物質、機能性アミノ酸など)の集積、食味および尻腐れの発症などに対する効果を比較検討した。最終年度の2007年度においては、4段栽培の各段の果房に3回の短期間塩ストレス処理を導入する栽培法を試み、果実の高付加価値化に対する効果を長期間連続塩ストレス処理と比較して実証し、周年栽培法として提案した。

2. 研究方法

2.1 果実の高付加価値化の評価

2.1.1 材料および栽培方法

材料植物としては、トマト(*Lycopersicon esculentum* Mill.)品種「ハウス桃太郎」を用い、湛液ポット(10 L)による水耕栽培をおこなった。第1果房の上位2節で摘心し、第1果房の果実を4個に制限した。培養液としては、大塚ハウスSA処方液を電気伝導度(EC)1.0 dS m⁻¹にしたものを用いた。処理区としては3種の異なる塩ストレス処理区と塩ストレス処理をしない区(Control区)を設けた。各処理区はそれぞれ4個体(4ポット)とし、合計16個体(16ポット)を栽培した。3種類の塩ストレス区としては、深層水区(DSW区)、表層水区(SSW区)および食塩区(NaCl区)を設けた。塩ストレスをかけないControl区では、収穫時までEC1.0 dS m⁻¹のまま栽培した。各塩ストレス区では、Ca不足による尻腐れが果実内部で発症する果実肥大初期の塩ストレス処理を避け、開花後3週目から2週間の果実肥大最盛期だけ、塩ストレス処理を導入した(北野ら, 2006;

Kitano *et al.*, 2008; 和島ら, 2006ab)。すなわち、DSW 区では濃縮海洋深層水(高知県室戸市採取)を、SSW 区では表層海水(高知県手結海岸採取)を、また NaCl 区では食塩(NaCl)を、果実肥大最盛期の 2 週間だけ培養液に施用し、培養液の浸透ポテンシャルが葉の日中の水ポテンシャルと同程度になるように、EC を 15 dS m^{-1} まで高め、2 週間の塩ストレス処理後は、Control 区と同じ培養液に戻した。Table 1 に、濃縮海洋深層水、表層海水および四つの処理区の培養液の EC、 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} を示す。濃縮海洋深層水は表層海水よりもイオン濃度が 1.5 倍程度高かった。DSW 区では、NaCl 区よりも K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 濃度が高く、特にニガリ成分の Mg^{2+} の濃度上昇が顕著であった。また、DSW 区と SSW 区とは顕著な差は認められなかった。ここで、 K^+ は植物体の浸透圧調節機能に関与し、 Mg^{2+} はニガリの主成分で、 K^+ とともに果実の旨味に関与しているといわれている(吉川, 2002)。また、 Na^+ は海水の主成分であり、 Ca^{2+} は難移動性のために果実への集積不足によって尻腐れが発症するといわれている(Saure, 2001)。

2. 1. 2 果実品質の定量的評価

四つの各処理区から完熟期の果実を 8 個ずつ採取し、5 個を新鮮重、乾物重、糖度、酸度、ミネラル濃度、抗酸化機能、アミノ酸濃度の評価に、3 個を食味による官能試験に供し、果実を 8 等分した切片の対角線上の 2 切片を 1 組として分析試料とした。糖度(Brix)および酸度の測定のために試料をミキサーで均一になるまで混ぜ合わせ、糖度を液体糖度計(PAL-1, ATAGO)および酸度をフルーツテスター(SFT-1, シロ産業)で測定した。

果実内の K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 濃度の測定のために、乾燥試料をミキサーで粉碎した後、0.5 g を電気炉(600°C)で 12 時間焼却した灰を希釈酸(塩酸:硝酸:水=3:1:1)に溶かし、純水を加えて 100 mL 溶液にして分析試料とした。分析には、土壤・作物体総合分析計(SPCA-6210, 島津製作所)を用い、 Mg^{2+} と Ca^{2+} は原子吸光法で、 K^+ と Na^+ は炎光法で測定した。

塩ストレス処理によって植物体にもたらされると考えられる活性酸素に対する抗酸化機能(Fig. 2)に関わる酵素の活性および抗酸化物質の濃度を収穫果実において評価した。まず、活性酸素の中で最も多く発生するといわれているスーパーオキシドアニオン($\text{O}_2^{\bullet-}$)を酸素と過酸化水素(H_2O_2)に変えて不活化するスーパーオキシドアニオン不活化酵素(SOD)の活性を評価した。評価には、SOD Assay Kit-WST(同人化学研究所)とプレートリーダー(NJ-2300, ナルジェヌンクインターナショナル)を用い、水

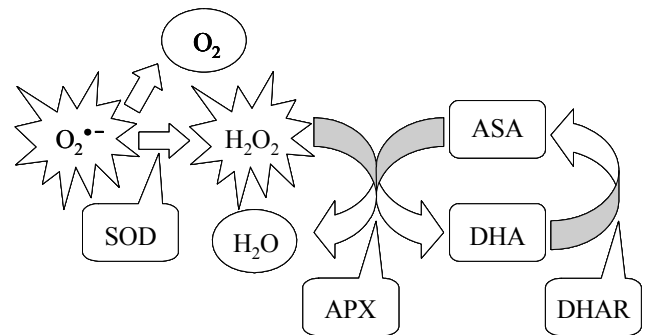


Fig. 2. Reactive oxygen species and antioxidants in plants. $\text{O}_2^{\bullet-}$, superoxide anion; SOD, superoxide dismutase; H_2O_2 , hydrogen peroxide; APX, ascorbate peroxidase; ASA, ascorbate; DHA, dehydroascorbate; DHAR, dehydroascorbate reductase.

Table 1. Electric conductivity (EC) and concentrations of ions in the concentrated deep seawater, the surface seawater and the nutrient solutions under the different salt stress treatments

| | EC (d S m^{-1}) | $[\text{K}^+]$ (mg L^{-1}) | $[\text{Na}^+]$ (mg L^{-1}) | $[\text{Mg}^{2+}]$ (mg L^{-1}) | $[\text{Ca}^{2+}]$ (mg L^{-1}) |
|----------------------------|-------------------------------|--|---|--|--|
| Concentrated deep seawater | 70.5 | 6.3×10^2 | 1.2×10^4 | 1.7×10^3 | 7.6×10^3 |
| Surface seawater | 47.5 | 5.0×10^2 | 0.8×10^4 | 1.1×10^3 | 5.3×10^3 |
| Control | 1 | 129 | 10 | 14 | 63 |
| DSW | 15 | 262 | 2370 | 329 | 173 |
| SSW | 15 | 252 | 2350 | 275 | 170 |
| NaCl | 15 | 129 | 2690 | 14 | 63 |

Control, the non-salt stress treatment; **DSW**, the salt stress treatment with the concentrated deep seawater; **SSW**, the salt stress treatment with the surface seawater; **NaCl**, the salt stress treatment with pure NaCl.

溶性デトラゾリウム塩 (WST-1) の還元による発色を阻害する程度から SOD 活性を評価する方法を採用した (詳細略)。さらに、Fig. 1 に示すように、過酸化水素の不活化に関与する還元型アスコルビン酸 (ASA) と酸化型アスコルビン酸 (DHA) の濃度を、慣行の試料調整法および抽出法に基づいて、HPLC を用いて分析した (詳細略)。

アミノ酸としては、トマトの旨味に関与するグルタミン酸とアスパラギン酸の濃度を、HPLC を用いた慣行法で測定した (詳細略)。また、機能的アミノ酸として、植物体において環境ストレスに対する防御作用を持つ γ -アミノ酪酸 (GABA) および細胞内の塩濃度が上昇した時においてもタンパク質を安定化する機能があるプロリンの濃度を、それぞれ HPLC を用いた慣行法で測定した (詳細略)。

2. 1. 3 食味による官能試験

4 処理区 (DSW 区, SSW 区, NaCl 区, Control 区) で収穫されたトマト果実を、15 名のパネラーに食べさせ、甘味、酸味、旨味および嗜好 (総合評価) について、単純な順位法で評価させた。すなわち、各評価項目について、各処理区のトマトに 1~4 位の順位づけをさせ、15 名の順位の合計で評価した。したがって、15 名全員が 1 位と評価した場合は 15 となり、全員が 4 位と評価した場合は 60 となる。パネラーの熟練度を推定するために、甘味と酸味の食味試験の結果と糖度 (Brix) と酸度の測定値との関係を調べた。さらに、旨味に関する食味試験の結果と旨味に関与するアミノ酸 (グルタミン酸, アスパラギン酸) の濃度との関係を調べた。

2. 2 短期間繰り返し塩ストレス処理栽培法

材料植物としては、2. 1 と同様に「ハウス桃太郎」を用い、ビニルハウスにおいて NFT 水耕システムを用いた 4 段栽培をおこなった。新規に構築した NFT ベッド (勾配 1/70, 長さ 10 m, 幅 30 cm) の 3 列のそれぞれに 40 個体ずつ定植し、第 4 果房の上位 2 節で摘心して、果房当りの果実数を 4 個に制限した。基本培養液としては、大塚ハウス A 処方液を電気伝導度 (EC) 1.0 dS m^{-1} に調整して用いた。3 列の NFT ベッドの一つを対照区 (Control 区) とし、定植から収穫まで EC 1.0 dS m^{-1} の基本培養液のままで栽培した。残りの 2 ベッドを塩ストレス処理区とし、2006 年においては、濃縮海洋深層水を一週間毎に施用することによって、一週間の塩ストレス処理を一週間間隔で断続的に 3 回繰り返す短期間繰り返し塩ストレス処理区 (DSW-S 区) と連続的に長期間施用する長期間連続塩ストレス処理区 (DSW-L 区) を設けた (Fig. 3)。

塩ストレス処理は、第 1 果房の尻腐れの発症を回避するために第 1 果房の受粉 2 週間後から開始した。DSW-S 区では、第 1 果房の果実肥大が活発になる受粉 2 週間後から 1 週間間隔で、培養液の水ポテンシャルが葉の水ポテンシャルと同程度になるように濃縮深層水を基本培養液に施用し、EC を 1.0 dS m^{-1} から 15 dS m^{-1} に高めた (北野ら, 2006; 北野ら, 2007; 和島ら, 2006a)。多段栽培では、1 植物体上に異なる発育段階の果房が同時に存在するので、DSW-S 区では各果房が受けた塩ストレスの時期と回数が異なり、第 1 果房と第 2 果房は 1 週間の塩ストレス処理を

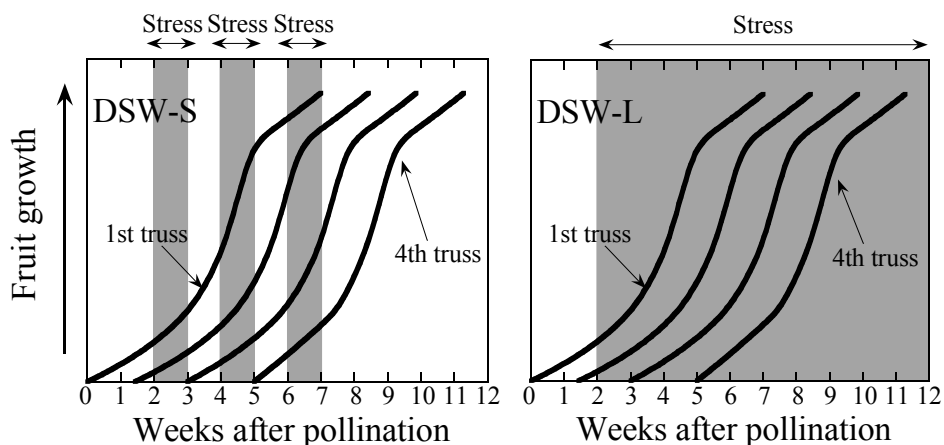


Fig. 3. Schematic diagram of time course of the short-term salt stress treatment (DSW-S) and the long-term salt stress treatment (DSW-L) with the concentrated deep seawater. The gray zone indicates the period of the salt stress treatment: The one-week salt stress treatment was applied three times with intervals of one week.

Table 2. Electric conductivity (*EC*), osmotic potential ($\Psi\pi$) and ion concentration of the nutrient solutions under the different salt stress treatments: Control, the non-salt stress; DSW-S, the short-term salt stress with the concentrated deep seawater; DSW-L, the long-term salt stress with the concentrated deep seawater.

| Treatment | <i>EC</i> (dSm ⁻¹) | $\Psi\pi$ (MPa) | [NO ₃] (mgL ⁻¹) | [PO ₄ ³⁻] (mgL ⁻¹) | [K ⁺] (mgL ⁻¹) | [Mg ²⁺] (mgL ⁻¹) | [Ca ²⁺] (mgL ⁻¹) | [Na ⁺] (mgL ⁻¹) |
|-----------|-----------------------------------|--------------------|--|--|---|---|---|--|
| Control | 1.0 | -0.26 | 397 | 62 | 129 | 14 | 63 | 10 |
| DSW-S | 15.0 | -0.88 | 284 | 44 | 262 | 554 | 217 | 4550 |
| DSW-L | 9.0 | -0.61 | 324 | 50 | 214 | 361 | 162 | 2929 |

3 回、第 3 果房は 2 回、第 4 果房は 1 回だけ受けた。DSW-L 区では、第 1 果房の受粉 2 週間後から第 4 果房の収穫まで、濃縮深層水を基本培養液に添加し、培養液の *EC* を 1.0 dSm⁻¹ から 9 dSm⁻¹ に高め、*EC* 値と塩ストレスの期間との積が DSW-S 区と同程度になるようにした。各処理区 (Control 区, DSW-S 区, DSW-L 区) の培養液は、1 週間毎に新しいものに更新した。Table 2 に各処理区の培養液の特性を示す。濃縮海洋深層水の添加によって、培養液の浸透ポテンシャルが顕著に低下し、Na⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、K⁺ の濃度が著しく上昇し、NO₃⁻ と PO₄³⁻ の濃度は、濃縮深層水の添加による希釈効果によって低下した。

さらに、最終年度の 2007 年度においては、培養液条件は 2006 年度と同じにし、Fig. 4 に示すように、濃縮海洋深層水を一週間毎に施用する塩ストレス処理を一週間間隔

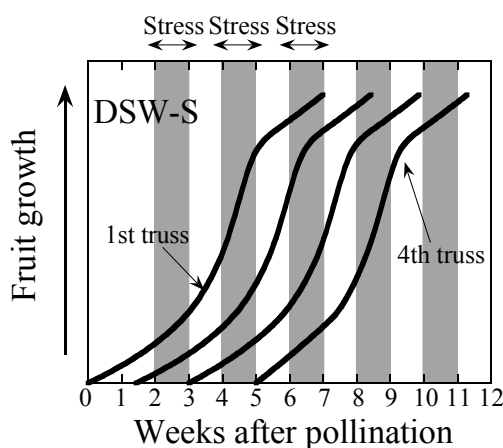


Fig. 4. Schematic diagram of time course of the short-term salt stress treatment (DSW-S) with the concentrated deep seawater. The gray zone indicates the period of the salt stress treatment: The one-week salt stress treatment was applied five times with intervals of one week.

で断続的に 5 回繰り返して、1~4 段までの各果房に均等に 3 回の短期間塩ストレス処理を経験させる短期間繰り返し塩ストレス処理区を DSW-S 区とし、さらに、濃縮海洋深層水を連続的に長期間施用する Fig. 3 と同様の長期間連続塩ストレス処理区 (DSW-L 区) を設けた。

果実品質の定量評価および官能試験は、2006 年度、2007 年度ともに、2005 年度と同様の方法 (2. 1. 2 および 2. 1. 3) でおこなった。

3. 研究結果および考察

3. 1 果実の高付加価値化の評価

Fig. 5 に各処理区の収穫果実の新鮮重、乾物重、乾物率、糖度 (Brix)、酸度および糖酸比を示す。塩ストレス処理により新鮮重は 35% 程度減少し、乾物重も減少する傾向が認められた。しかしながら、乾物重が Control 区よりも有意に減少したのは NaCl 区だけで、DSW 区では乾物重の有意な減少は認められず、乾物率が Control 区よりも有意に高くなった (約 1.4 倍)。Control 区の糖度と酸度はそれぞれ 6 および 0.6% であったが、濃縮深層水の施用によって有意に増加して、DSW 区ではそれぞれ 9 および 1% 以上に達し、Control 区と SSW 区よりも有意に高くなった。糖酸比については各処理区間で有意差は認められなかった。今回の湛液ポット栽培における濃縮深層水の施用効果は、北野ら (2005) および和島ら (2006a) の NFT ベッド栽培の結果とほぼ一致したが、乾物集積の促進効果は NFT ベッドで栽培した方がより顕著であった。

Fig. 6 に各処理区の収穫果実内の K⁺、Na⁺、Mg²⁺ および Ca²⁺ 濃度を示す。果実の旨味に関与するといわれている K⁺ と Mg²⁺ の濃度がともに濃縮深層水の施用によって

上昇した。また、全ての塩ストレス区において、 Na^+ の濃度は一様に著しく増加し、 Ca^{2+} の濃度は著しく減少した。 Ca^{2+} は植物体内では難移動性で主に道管を輸送経路として果実内へ集積されるが、トマト果実の場合、果実へ到達する道管液量は篩管液量に比べて著しく少なく(Ho *et al.*, 1987)、しかも道管内の流れは塩ストレスの影響を受け

やすいので(Araki *et al.*, 2004)、塩ストレス下では果実への Ca^{2+} の集積が著しく抑制されたと考えられる。しかしながら、本研究では、尻腐れが果実内部で発症する果実肥大初期(受粉後2週間)の塩ストレス処理を避けたために、いずれの塩ストレス処理区においても尻腐れの発症は認められなかった。

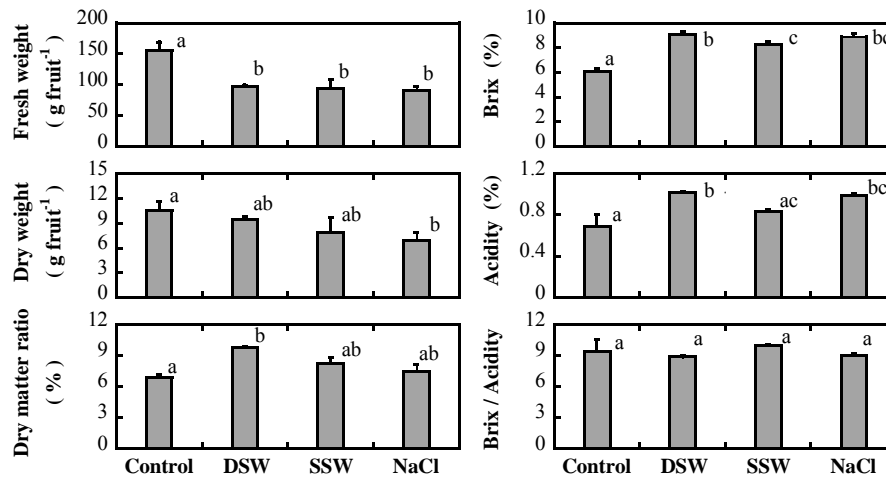


Fig. 5. Fresh weight, dry weight, dry matter ratio, Brix, acidity and ratio of Brix to acidity of harvested tomatoes. Means of five fruits are shown with the standard deviations. Among the four treatments, means with same letter are not significantly different by the least significant difference (LSD) at $P \leq 0.05$. **Control**, the non-salt stress treatment; **DSW**, the salt stress treatment with the concentrated deep seawater; **SSW**, the salt stress treatment with the surface seawater; **NaCl**, the salt stress treatment with pure NaCl.

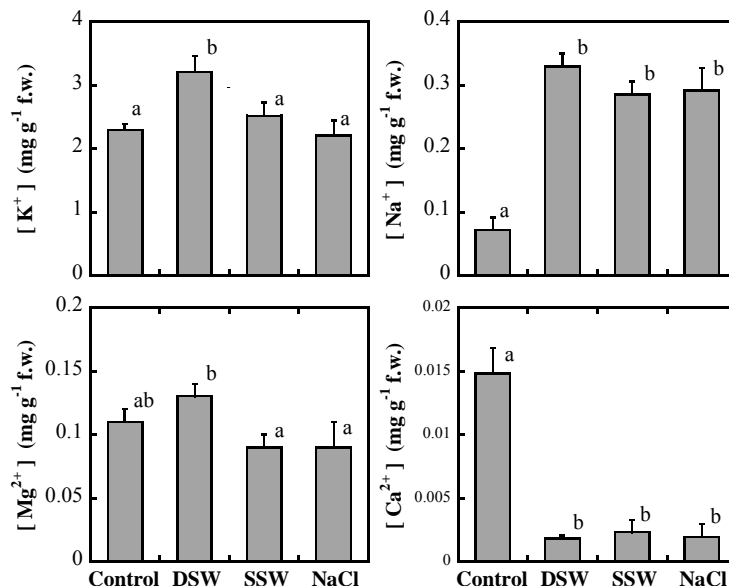


Fig. 6. Concentrations of K^+ , Na^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} in harvested tomatoes. Means of five fruits are shown with the standard deviations. Among the four treatments, means with same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$. **Control**, the non-salt stress treatment; **DSW**, the salt stress treatment with the concentrated deep seawater; **SSW**, the salt stress treatment with the surface seawater; **NaCl**, the salt stress treatment with pure NaCl.

Fig. 7 に各処理区の収穫果実内のスーパーオキシドアニオン不活化酵素 (SOD) の活性を示す。SOD 活性は塩ストレス処理によって高まる傾向が認められ、特に NaCl 区では有意に高まったが、DSW 区と Control 区では有意差は認められなかった。3 種の塩ストレス処理区では、同じ EC 値 (15 dS m⁻¹) に設定したにもかかわらず、DSW 区の SOD 活性が有意に上昇しなかったのは、塩ストレスによって誘発される酸化ストレスが、濃縮深層水の施用によって緩和されたためと推察される。

Fig. 8 に各処理区の収穫果実内の還元型アスコルビン酸 (ASA) と酸化型アスコルビン酸 (DHA) の濃度を示す。ASA と DHA ともに全ての処理区においてほぼ同じ濃度であった。ASA はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) の働きによって、過酸化水素を消去することで消費されて DHA に変わるが、その後 DHA からデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (DHAR) の働きによって ASA に再生される。このことから、トマトでは、過酸化水素消去系での ASA の再生システムが十分に機能していることが示唆された。

Fig. 9 に各処理区の収穫果実内のグルタミン酸、アスパラギン酸、 γ -アミノ酪酸 (GABA) およびプロリンの濃度を示す。グルタミン酸濃度には各処理区間に有意差は認められなかったが、アスパラギン酸の濃度は全ての塩ストレス

処理区で一様に有意に減少した。機能性アミノ酸の GABA とプロリンの濃度は、全ての塩ストレス処理区で有意に増加したが、異なる塩ストレス処理区間で必ずしも有意差は認められなかった。

Fig. 10 に各処理区の収穫果実の食味試験によって評価された甘味、酸味、旨味および嗜好 (総合評価) の順位の合計を示す。全ての評価項目について、塩ストレス処理区は Control 区に比べて有意に高い評価を受けたが、異なる塩ストレス間で必ずしも有意差は認められなかった。また、食味試験による甘味と酸味の評価結果は、糖度 (Brix) と酸度の測定値の傾向と当然ながらよく一致した (データ省略)。

Fig. 11 に各処理区の収穫果実の食味試験によって評価された旨味の順位合計と旨味に関与するといわれているグルタミン酸とアスパラギン酸の比を示す。グルタミン酸とアスパラギン酸の比は、全ての塩ストレス処理において有意に増加し、食味による旨味の評価結果と傾向が一致した。このことから、グルタミン酸とアスパラギン酸の比がトマトの旨味を決定し、塩ストレス処理によってその比が上昇するために旨味が増すことが明らかになった。

以上のように、多様な項目 (糖度、酸度、ミネラル濃度、抗酸化機能、機能性うま味に関与するアミノ酸代謝、食

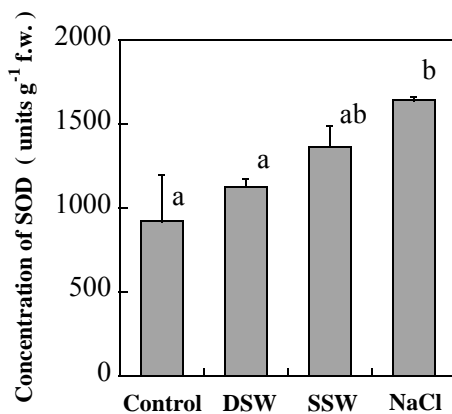


Fig. 7. Activities of superoxide dismutase (SOD) of harvested tomatoes. Means of five fruits are shown with the standard deviations. Among the four treatments, means with same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$. **Control**, the non-salt stress treatment; **DSW**, the salt stress treatment with the concentrated deep seawater; **SSW**, the salt stress treatment with the surface seawater; **NaCl**, the salt stress treatment with pure NaCl.

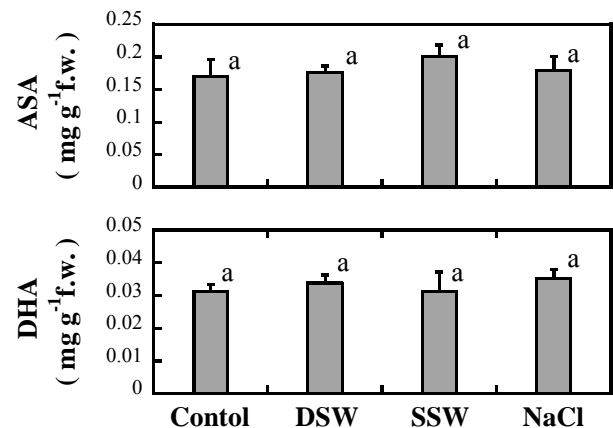


Fig. 8. Concentrations of ascorbate (ASA) and dehydroascorbate (DHA) of harvested tomatoes. Means of five fruits are shown with the standard deviations. Among the four treatments, means with same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$. **Control**, the non-salt stress treatment; **DSW**, the salt stress treatment with the concentrated deep seawater; **SSW**, the salt stress treatment with the surface seawater; **NaCl**, the salt stress treatment with pure NaCl.

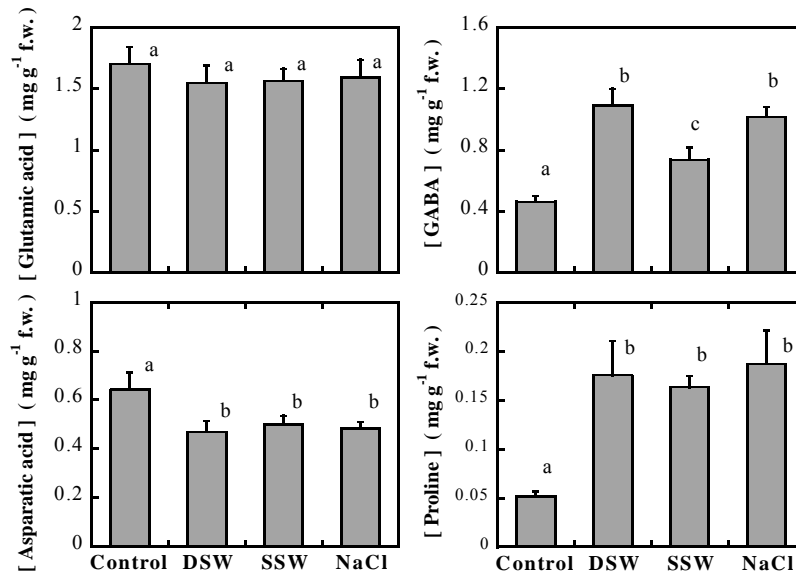


Fig. 9. Concentrations of glutamic acid, asparagic acid, γ -aminobutyric acid (GABA) and proline in harvested tomatoes. Means of five fruits are shown with the standard deviations. Among the four treatments, means with same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$. **Control**, the non-salt stress treatment; **DSW**, the salt stress treatment with the concentrated deep seawater; **SSW**, the salt stress treatment with the surface seawater; **NaCl**, the salt stress treatment with pure NaCl.

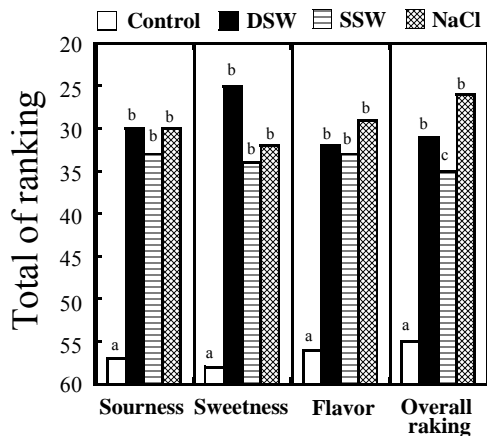


Fig. 10. Sensory evaluations of harvested tomatoes by tasting. Means of five fruits are shown with the standard deviations. Among the four treatments, means with same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$. **Control**, the non-salt stress treatment; **DSW**, the salt stress treatment with the concentrated deep seawater; **SSW**, the salt stress treatment with the surface seawater; **NaCl**, the salt stress treatment with pure NaCl.

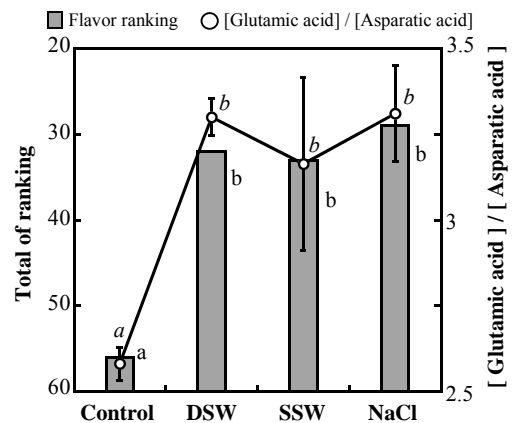


Fig. 11. Relationship of sensory ranking in flavor and ratio of glutamic acid to asparagic acid of harvested tomatoes. Means of five fruits are shown with the standard deviations. Among the four treatments, means with same letter are not significantly different in the flavor ranking and in the ratio of glutamic acid to asparagic acid by the LSD at $P \leq 0.05$. **Control**, the non-salt stress treatment; **DSW**, the salt stress treatment with the concentrated deep seawater; **SSW**, the salt stress treatment with the surface seawater; **NaCl**, the salt stress treatment with pure NaCl.

味)において、濃縮海洋深層水の短期間施用によってトマトの明確な高付加価値化が可能であることが示唆された。また異なる塩ストレス処理区(濃縮深層水区, 表層海水区,

NaCl 区)間では、必ずしも有意な特異性は認められなかったが、塩ストレスによって植物体に引き起こされる酸化ストレスが、濃縮海洋深層水の施用によって緩和される可能

性も示唆された。

3. 2 短期間繰り返し塩ストレス処理栽培法

Fig. 12 に DSW-S 区と Control 区での第 1 果房の上位 2 節から採取した小葉の水ポテンシャル、浸透ポテンシャルおよび膨圧の 1 週間毎の経時変化を示す。葉の水ポテンシャルと浸透ポテンシャルは、1 週間の塩ストレス処理によって有意に低下し、塩ストレス解除期間に回復する傾向が認められた。塩ストレス処理による水ポテンシャルと浸透ポテンシャルの低下幅は同程度であり、その結果、DSW-S 区の葉の膨圧は Control 区とほぼ同レベルに維持され、塩ストレス処理期間中の葉の萎れも認められなかった。このことから、1 週間の断続的な塩ストレス処理によっても、植物体において浸透圧調節機能が発現していることが示唆された。

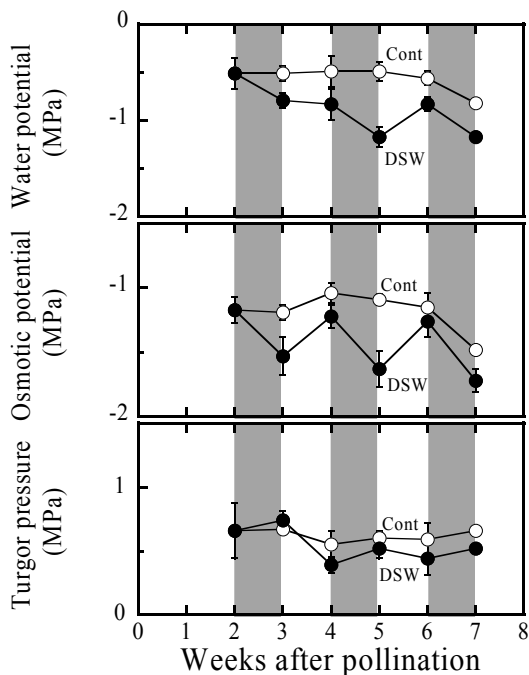


Fig. 12. Time courses of water potential, osmotic potential and turgor pressure of leaflets under the non-salt stress treatment (Control) and the short-term salt stress treatment (DSW-S). The gray zone indicates the period of the salt stress treatment. Means of eight leaflets are shown with the standard deviations.

Fig. 13 に DSW-S 区と Control 区での第 1 果房の果実および第 1 果房上位 2 節から採取した小葉における SOD 活性の 1 週間毎の経時変化を示す。DSW-S 区において 2 回目の塩ストレス処理以降に、果実および葉の両方において SOD 活性が Control 区よりも有意に上昇した。このこ

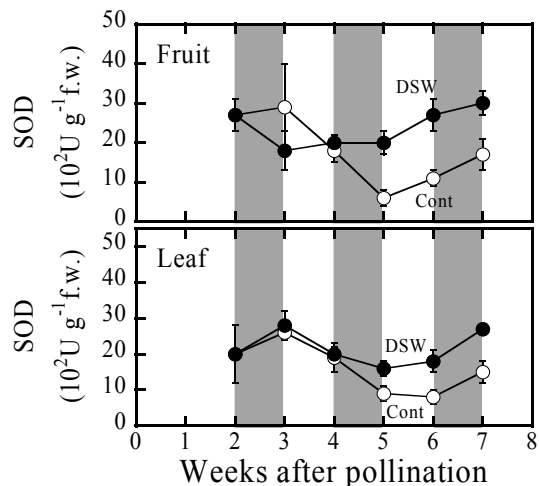


Fig. 13. Time courses of activity of superoxide dismutase (SOD) in fruits and leaflets under the non-salt stress treatment (Control) and the short-term salt stress treatment (DSW-S). The gray zone indicates the period of the salt stress treatment. Means of four fruits and eight leaflets are shown with the standard deviations.

とから、1 週間の断続的な塩ストレス処理によっても、植物体において抗酸化機能が発現していることが示唆された。

Fig. 14 に DSW-S 区と Control 区での第 1 果房の果実の糖度 (Brix) の 1 週間毎の経時変化を示す。果実の糖度はわずか 1 週間の塩ストレス処理で有意に増加し、塩ストレス解除期間中には低下する傾向が認められるものの、DSW-S 区において Control 区と比較して有意に上昇した。前年までの研究では、短期間の塩ストレス処理によっても師部に浸透圧調節機能が発現し、師管液中の可溶性固形物濃度が高まることを明らかにしている (北野ら, 2005; 和島ら, 2006b)。これらのことから、1 週間の断続的な塩ストレス処理によっても、師部に浸透圧調節機能が発現し、果実に糖が高濃度に集積されることが示唆された。

Fig. 15 に DSW-S 区、DSW-L 区および Control 区における各果房からの収穫果実の新鮮重、乾物重および乾物率を示す。塩ストレス処理によって新鮮重は有意に減少したが、DSW-S 区では高品質高糖度トマトの条件である新鮮重 100 g 以上を満足し、1 週間の塩ストレス処理の経験回数が 2 回以下の第 3、第 4 果房では新鮮重の減少幅は小であった。一方、長期間連続的に塩ストレス処理をする DSW-L 区では、上位果房で新鮮重が 100 g 以下の小玉となった。第 1 果房を除いて乾物重も塩ストレス処理によって減少する傾向であったが、減少の程度は新鮮重よりも著

しく小であった。したがって、乾物率は塩ストレス処理によって有に上昇したが、DSW-S 区の塩ストレス処理の経験回数が 2 回以下の第 3、第 4 果房では、乾物率の上昇幅は小であった。

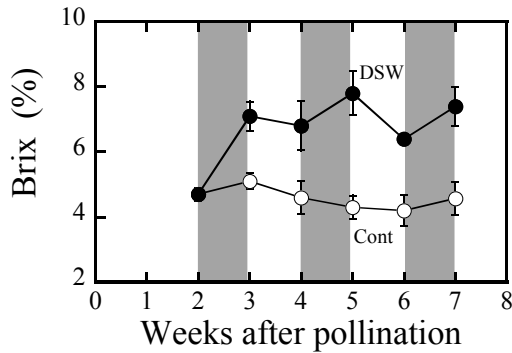


Fig. 14. Time course of sugar content (Brix) of fruits on the first truss under the non-salt stress treatment (Control) and the short-term salt stress treatment (DSW-S). The gray zone indicates the period of the salt stress treatment. Means of four fruits are shown with the standard deviations.

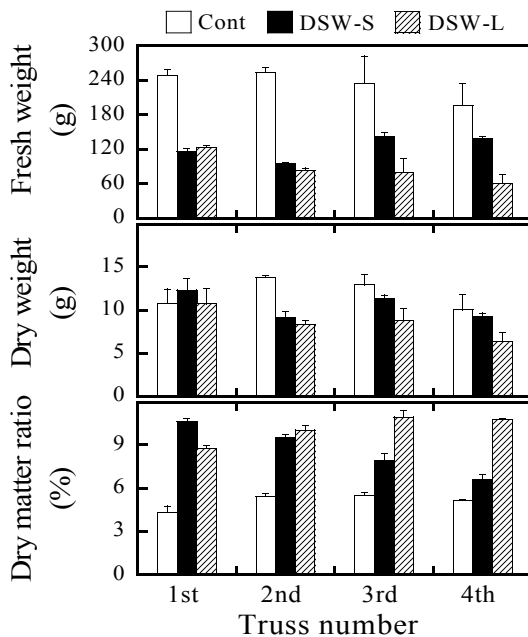


Fig. 15. Fresh weight, dry weight and dry matter ratio of the harvested tomatoes on the 1st to the 4th truss under the different salt stress treatments: Control, DSW-S and DSW-L are explained in Table 1. Means of five fruits are shown with the standard deviations. Among the three treatments, means with the same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$.

Fig. 16 に DSW-S 区、DSW-L 区および Control 区における各果房からの収穫果実の糖度 (Brix) および酸度を示す。糖度と酸度は塩ストレス処理によって顕著に上昇し、Control 区では糖度が 5%程度であったが、DSW-S 区で 1 週間の塩ストレス処理を 3 回経験した第 1、第 2 果房では、DSW-L 区の果房と同様に糖度は 9%程度に上昇した。DSW-S 区の塩ストレス処理の経験回数が 2 回以下の第 3、第 4 果房では、糖度と酸度の上昇は小幅となった。すなわち、DSW-S 区で 1 週間の塩ストレス処理を断続的に 3 回経験した第 1、第 2 果房では、DSW-L 区の長期間連続塩ストレス処理を経験した果房と同程度の高糖度化の効果が認められた。

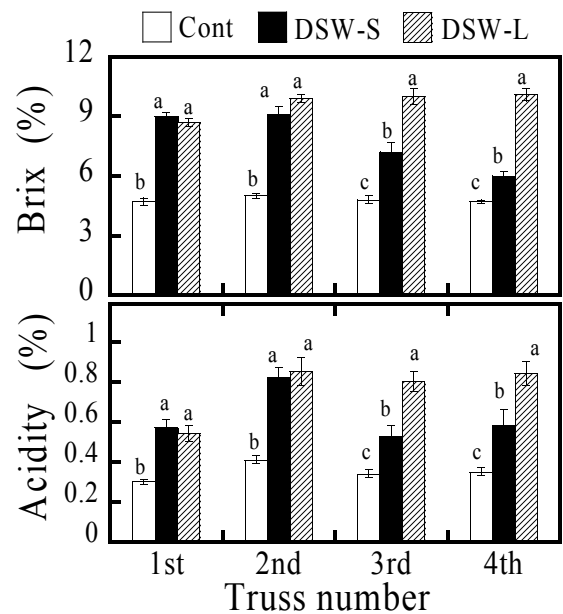


Fig. 16. Sugar content (Brix) and acidity of the harvested tomatoes on the 1st to the 4th truss under the different salt stress treatments: Control, DSW-S and DSW-L are explained in Table 1. Means of five fruits are shown with the standard deviations. Among the three treatments, means with the same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$.

Fig. 17 に DSW-S 区、DSW-L 区および Control 区における各果房からの収穫果実の K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 濃度を示す。 K^+ 、 Mg^{2+} および Na^+ の濃度は、濃縮深層水の施用による塩ストレス処理によって増加する傾向であったが、尻腐れ果の発症に關与する Ca^{2+} の果実内の濃度は他のイオンに比して著しく低く、DSW-L 区全ての果房および DSW-S 区の下位果房において減少した。 Ca^{2+} は植物体

内では難移動性で主に道管を輸送経路として果実内へ集積されるが、トマト果実の場合、果実へ到達する道管液量は師管液量に比べて著しく少なく(Ho *et al.*, 1987)、しかも道管内の流れは塩ストレスの影響を受けやすいので(Araki *et al.*, 2004)、塩ストレス処理下では果実への Ca^{2+} の集積が著しく抑制されたと考えられる。

Table 3 に DSW-S 区、DSW-L 区および Control 区での各果房における尻腐れ果の発症率を示す。塩ストレス処

理によって尻腐れ果の発症率は増加するが、尻腐れが果実内部で発症する果実肥大初期(受粉後 2 週間)の全期間に塩ストレス処理を受ける DSW-L 処理区の上位果房において、尻腐れ果の発症が顕著であった。一方、果実肥大初期の塩ストレス処理を避けた第 1 果房においては尻腐れの発症は認められず、また果実肥大初期にける塩ストレス処理期間が短い DSW-S 区においては、尻腐れの発症が抑制された。

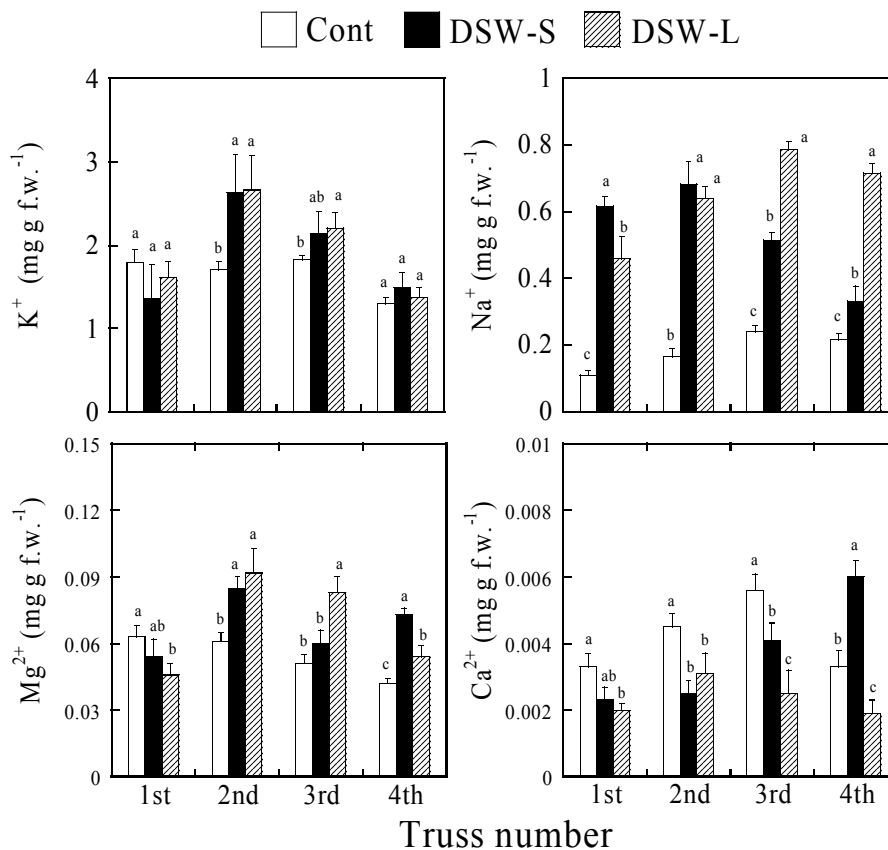


Fig. 17. Concentrations of K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} of the harvested tomatoes on the 1st to the 4th truss under the different salt stress treatments: Control, DSW-S and DSW-L are explained in Table 1. Means of five fruits are shown with the standard deviations. Among the three treatments, means with the same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$.

Table 3. Incidence of blossom-end rot (BER) on the 1st to 4th truss under the different salt stress treatments: Control, the non-salt stress; DSW-S, the short-term salt stress with the concentrated deep seawater; DSW-L, the long-term salt stress with the concentrated deep seawater.

| | Incidence of blossom-end rot (%) | | | |
|---------|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | 1st truss | 2nd truss | 3rd truss | 4th truss |
| Control | 0 | 0.9 | 1.4 | 2.2 |
| DSW-S | 0 | 2.0 | 1.6 | 0 |
| DSW-L | 0 | 3.0 | 4.4 | 8.4 |

Fig. 18 に DSW-S 区、DSW-L 区および Control 区における各果房からの収穫果実のスーパーオキシドアニオン不活化酵素 (SOD) の活性を示す。濃縮深層水の施用による塩ストレス処理によって、SOD 活性は有意に上昇した。DSW-S 区において 1 週間の塩ストレス処理を断続的に 3 回経験した第 1、第 2 果房では、長期間連続塩ストレス処理 (DSW-L 区) と同等の効果が認められたが、ストレス処理の経験回数が 2 回以下の第 3、第 4 果房では、SOD 活性の上昇は DSW-L 区に比して抑制された。過酸化水素を消去する還元型アスコルビン酸 (ASA) の濃度は塩ストレス処理によって増加する傾向が認められ、ASA の還元率 (ASA と酸化型アスコルビン酸 DHA の和に対する ASA の割合) は塩ストレス処理下でも高い値 (約 0.8) であった (データ省略)。ASA はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) の働きによって、過酸化水素を消去することで消費されて DHA に変わるが、その後 DHA からデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (DHAR) の働きによって ASA に再生される。したがって、濃縮深層水による塩ストレス処理下のトマトでは、過酸化水素消去系での ASA の再生システムが機能していると考えられる。

Fig. 19 に DSW-S 区、DSW-L 区および Control 区にお

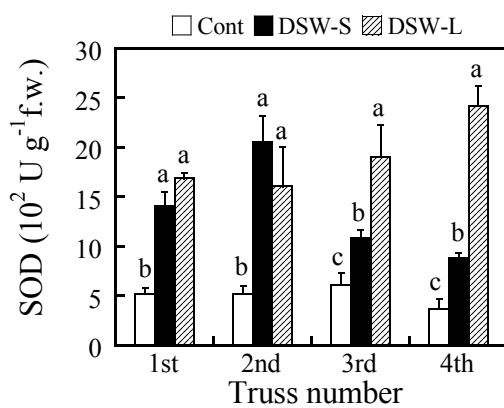


Fig. 18. Activities of superoxide dismutase (SOD) of the harvested tomatoes on the 1st to the 4th truss under the different salt stress treatments: Control, DSW-S and DSW-L are explained in Table 1. Means of five fruits are shown with the standard deviations. Among the three treatments, means with the same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$.

ける各果房からの収穫果実の γ -アミノ酪酸 (GABA) およびプロリンの濃度を示す。

GABA およびプロリンともに、濃縮深層水の施用による塩ストレス処理によって増加する傾向が認められたが、DSW-S 区においてストレス処理の経験回数が 2 回以下の第 3、第 4 果房では、増加幅が減少する傾向が認められた。GABA およびプロリンは、機能性アミノ酸として広く知られているが、植物体内においても環境ストレスに対する防御機能を有している。これらのことから、DSW-S 区の果房では、1 週間の塩ストレス処理を断続的に 3 回経験することで、長期間連続塩ストレス処理 (DSW-L 区) と同等のストレス防御機能が働いていることが示唆された。食味試験においても、塩ストレス処理によって甘味、香り、うま味および嗜好 (総合評価) が有意に高い評価をえたが、DSW-S 区のストレス処理の経験回数が 2 回以下の第 3、第 4 果房においては、食味への効果も小であった (データ省略)。以上のように、多様な項目 (糖度、酸度、ミネラル濃度、浸透圧調節機能、抗酸化機能、機能性アミノ酸、食味) において、濃縮海洋深層水を施用した塩ストレス処理による高品質化の効果が認められたが、多段栽培での長期間連続塩ストレス処理 (DSW-L 区) では、上位の果房で極端な小玉果

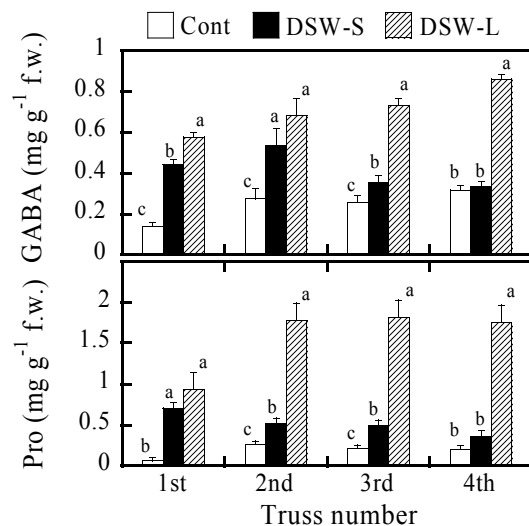


Fig. 19. Concentrations of γ -aminobutyric acid (GABA) and proline of the harvested tomatoes on the 1st to the 4th truss under the different salt stress treatments: Control, DSW-S and DSW-L are explained in Table 1. Means of five fruits are shown with the standard deviations. Among the three treatments, means with the same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$.

や尻腐れ果が生じるとともに、樹勢の低下も観察された。一方、1週間の塩ストレス処理を1週間間隔で断続的に繰り返す処理(DSW-S区)においても、植物体に浸透圧調節機能および抗酸化機能が働き、3回の塩ストレス処理を受けた果房では長期間連続塩ストレス処理と同等の高品質化の効果が得られた。また、塩ストレス処理を長期間連続処理ではなく短期間断続処理にすることで、極端な小玉果や尻腐れ果の発生および樹勢低下を低減する可能性が示唆された。

そこで、Fig. 4に示すように1週間の塩ストレス処理を1週間間隔で断続的に5回繰り返して、第1から第4果房が着果から収穫までに1週間の短期間塩ストレス処理を3回経験する処理をおこなった。

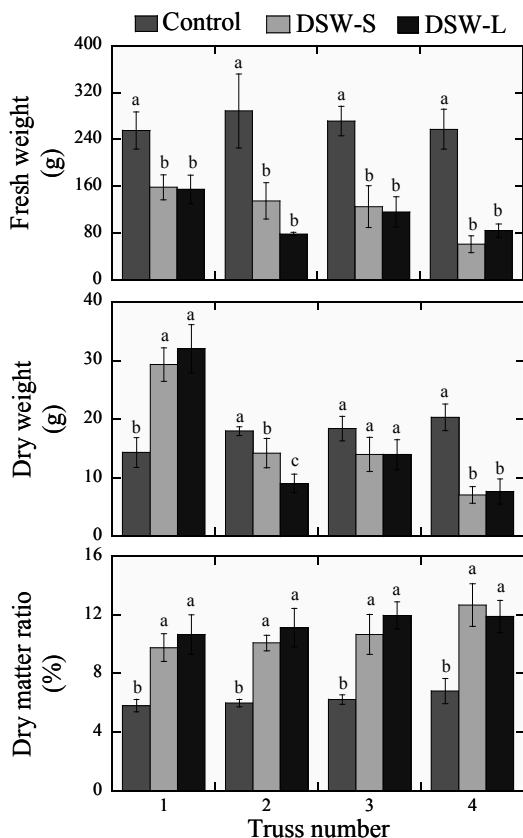


Fig. 20. Fresh weight, dry weight and dry matter ratio of harvested tomatoes on the 1st to the 4th truss under the different salt stress treatments of the non-salt stress condition (Control), the short-term application with the concentrated deep seawater (DSW-S) and the long-term with the concentrated deep seawater (DSW-L). Mean of four fruits are shown with the standard deviations. Among the three treatments, means with the same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$.

Fig. 20に収穫果の新鮮重、乾物重、乾物率を示す。各果房の塩ストレス処理区の新鮮重は、対照区より小となった。しかし短期間繰り返し施用区の果房、特に、第1、2、3果房では100g以上となり、全果房での極端な小玉果は回避された。これは短期間繰り返し施用法の効果と考えられる。一方、第1果房以外の果実の乾物重は、塩ストレス処理によって減少する傾向がみられたが、乾物重の減少は、新鮮重の減少と比べて著しく小であった。その結果、各果房の収穫果実の乾物率は、塩ストレス処理区によって対照区より有意に上昇したが、短期繰り返し施用区と長期間連続施用区との間には有意な差が認められなかった。

Fig. 21に収穫果の糖度と酸度を示す。収穫果の糖度は、各処理区、各果房において6%以上となり、特に、濃縮深層水施用の塩ストレス処理区である、短期間繰り返し施用区、長期間連続施用区は共に10%以上となった。酸度においては、長期間連続施用区の果房はすべて0.5%以上となり、短期間繰り返し施用区でも第1果房から第3果房ま

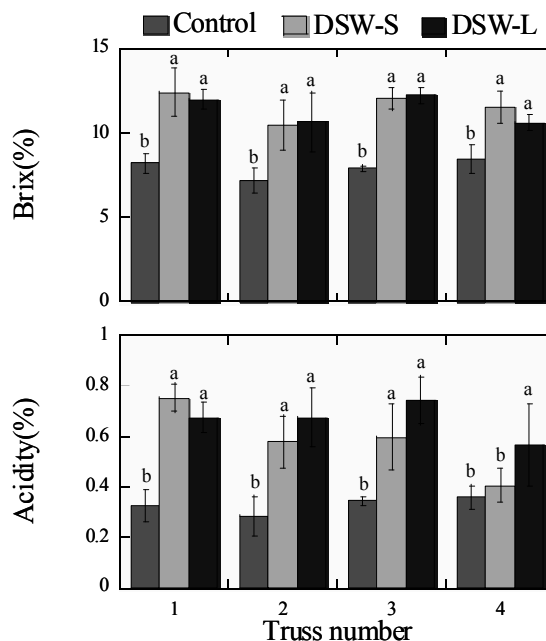


Fig. 21. Brix and acidity of harvested tomatoes on the 1st to the 4th truss under the different salt stress treatments of the non-salt stress condition (Control), the short-term application with the concentrated deep seawater (DSW-S) and the long-term with the concentrated deep seawater (DSW-L). Mean of four fruits are shown with the standard deviations. Among the three treatments, means with the same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$.

で0.5%以上となった。「おいしいトマトの条件」として、糖度6%以上、酸度0.5%以上であることとされている(吉川, 2002)。さらに、糖度8%以上の果実においては、実新鮮重が100g以上のものが高い評価を受けている(田中, 1995)。短期間繰り返し施用区の収穫果は、高い評価を受ける「おいしいトマトの条件」をほぼ満たした。

Fig. 22 に収穫果のイオン濃度(K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+})を示す。旨みに関与するといわれる K^+ , Mg^{2+} 濃度は、短期間繰り返し施用区、長期間連続施用区の収穫果において上昇傾向がみられたが、短期間繰り返し施用区の第4果房では、長期間連続施用区ほどの上昇は認められなかった。一方、濃縮深層水の主成分の Na^+ 濃度は、塩ストレス処理区の収穫果で有意に上昇した。収穫果の Ca^{2+} 濃度は、第1、4果房では短期間繰り返し施用区と長期間連続施用

区ともに対照区より低くなったが、第2、3果房では対照区と有意差はみられなかった。また、短期間繰り返し施用区では、長期間連続施用区より Ca^{2+} 濃度が高くなる傾向がみられ、第2、3果房では短期間繰り返し施用区の方が尻腐れ果の発生が抑えられた。

Fig. 23 に収穫果のSOD活性を示す。短期施用区・長期施用区の収穫果のSOD活性は、第1果房から第4果房までの全ての果房で有意に上昇した。また、全ての果房において、短期施用区と長期施用区との間で有意な差は認められなかった。このことから、濃縮深層水の施用によって塩ストレスを受けた短期施用区・長期施用区の収穫果は、全ての果房において抗酸化機能が発現していることが認められた。

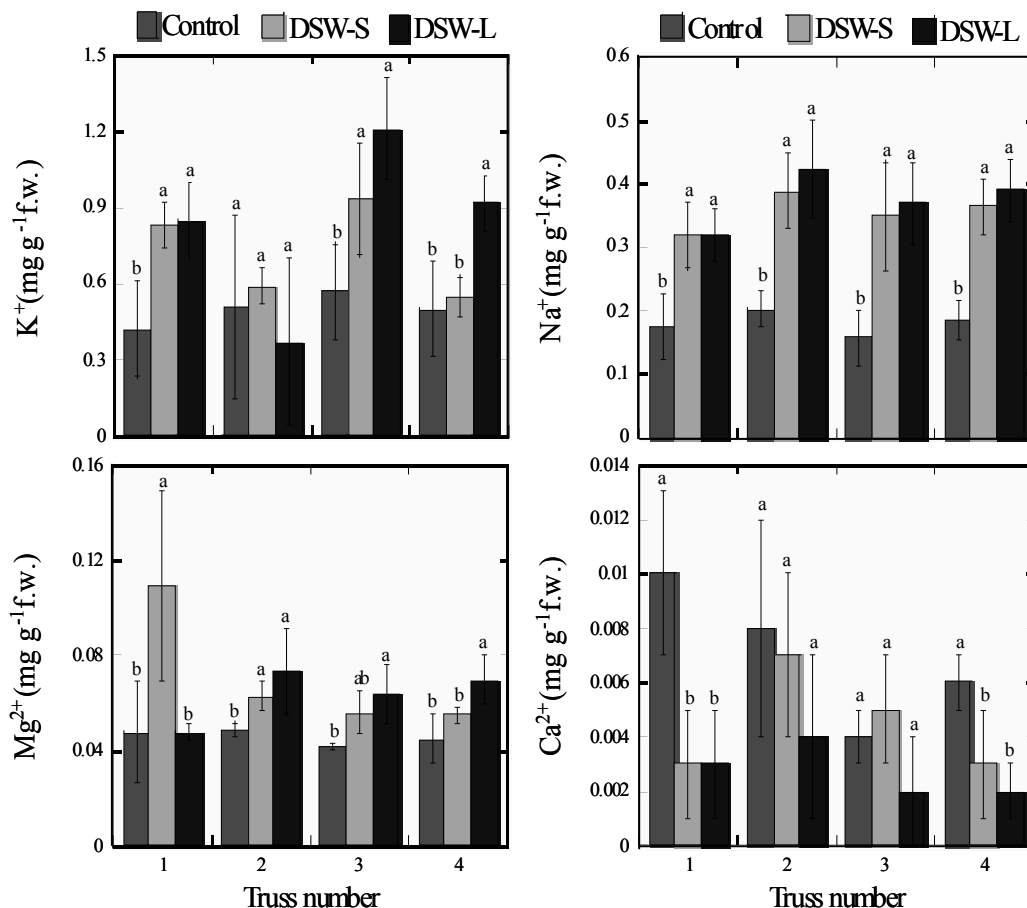


Fig. 22. Concentrations of K^+ , Mg^{2+} , Na^+ and Ca^{2+} in the harvested tomatoes on the 1st to the 4th truss under the different salt stress treatments of the non-salt stress condition (Control), the short-term application with the concentrated deep seawater (DSW-S) and the long-term with the concentrated deep seawater (DSW-L). Mean of four fruits are shown with the standard deviations. Among the three treatments, means with the same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$.

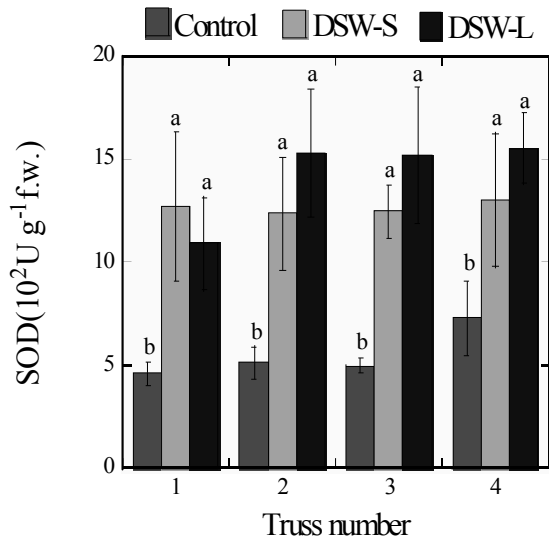


Fig. 23. Concentrations of superoxide dismutase (SOD) of harvested tomatoes on the 1st to the 4th truss under the different salt stress treatments of the non-salt stress condition (Control), the short-term application with the concentrated deep seawater (DSW-S) and the long-term with the concentrated deep seawater (DSW-L). Mean of four fruits are shown with the standard deviations. Among the three treatments, means with the same letter are not significantly different by the LSD at $P \leq 0.05$.

Fig. 24 に収穫果の食味試験結果を示す。濃縮深層水を施用した塩ストレス処理区の第1果房から第4果房の全ての果房で、甘み、酸味、硬さ、旨み、香り、総合評価の全ての項目において対照区より高い評価となったが、どの項目においても、短期間繰り返し施用区と長期間連続施

用区との間に有意差は認められなかった。すなわち、短期間繰り返し施用法において、果房ごとに受ける塩ストレスの回数を3回に揃えたことによって、全ての果房ではほぼ均等に食味の改善が達成できたと考えられる。

以上のように、海洋深層水濃縮廃液を適度の濃度で施用する1週間の塩ストレス処理を、4段栽培での各果房の果実肥大期に1週間間隔で3回繰り返し短期間繰り返し塩ストレス処理(DSW-S区)によって、多様な項目(糖度、酸度、ミネラル濃度、浸透圧調節機能、抗酸化機能、食味)において、長期間連続塩ストレス処理(DSW-L区)と同等以上の均質な高品質化の効果が認められた。多段栽培での長期間連続塩ストレス処理では、極端な小玉果や尻腐れ果が生じるとともに、樹勢の低下も懸念されるが、短期間繰り返し塩ストレス処理によって、これらの低減の可能性も示唆された。4段栽培では、栽培ベッドに苗を定植後、4段果房の果実が収穫されるまでに4~5か月の栽培期間を要する。また、7月~9月の盛夏期の高温条件下では、生育不良、開花受粉不良、病害などが発生しやすく、盛夏期に塩ストレス処理を導入して正常な栽培を実現することは不可能といっても過言ではない。そこで、盛夏期を避けた9月下旬~7月上旬までの期間に、本研究で提案する短期間繰り返し塩ストレス処理によるトマト4段栽培を2作実施することが妥当と考えられる。本研究では、海洋深層水のような有用な天然資源を活用して、適度な強度の環境ストレスを適当な期間植物体に応用することによって、植物が有するストレス適応機能を発現させ、農産物の付加価値を高める栽培法を実用技術として提示できた。

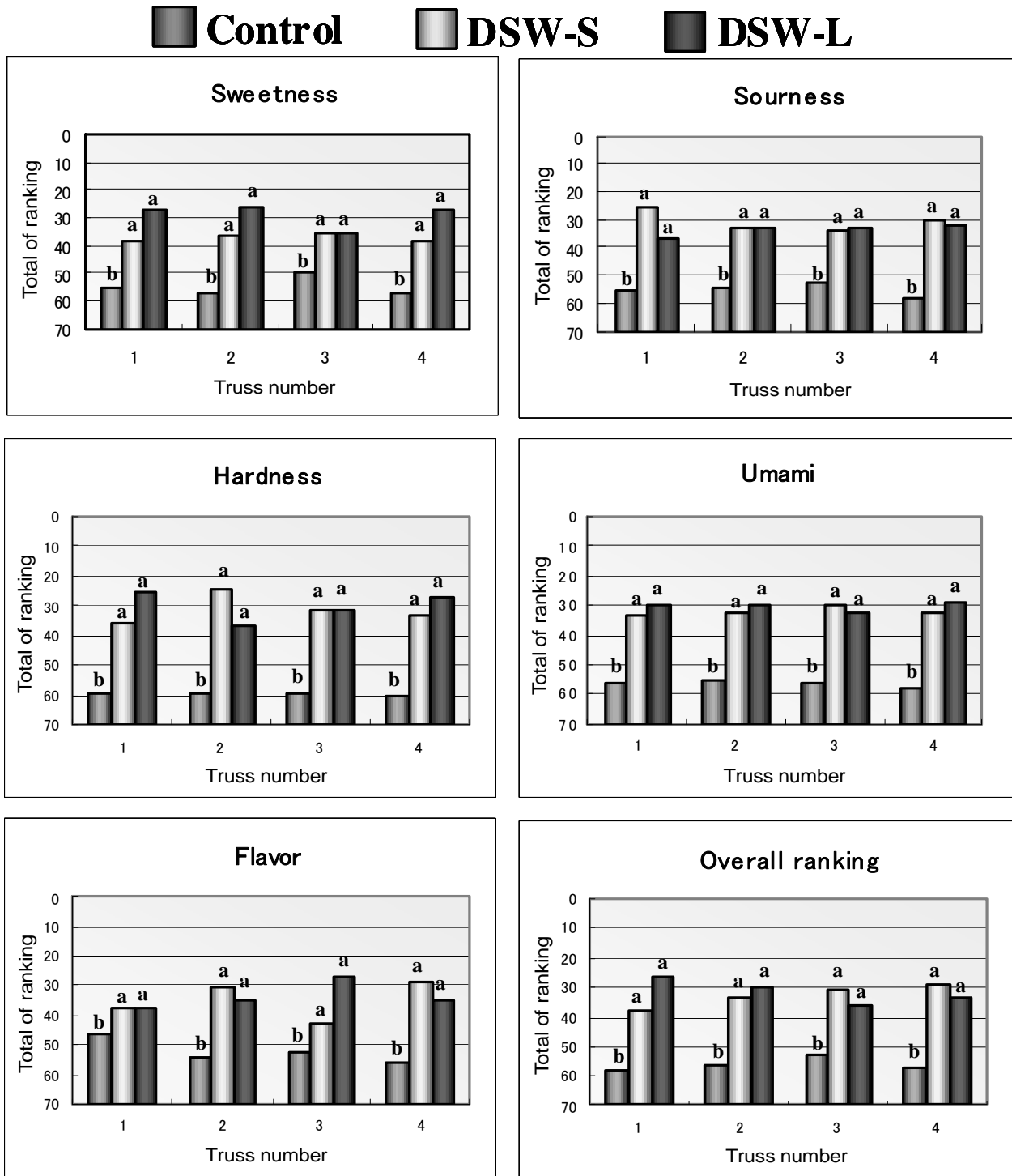


Fig. 24. Sensory evaluation of the harvested tomatoes on the 1st to the 4th truss under the different salt treatments of the non-salt stress condition (Control), the short-term application with the concentrated deep seawater (DSW-S) and the long-term application with the concentrated deep seawater (DSW-L)

文 献

- Adams, P., 1991: Effects of increasing the salinity of the nutrient solution with major nutrients or sodium chloride on the yield, quality and composition of tomatoes grown in rockwool. *J. Hort. Sci.* **66**, 201-207.
- Adams, P., Ho, LC., 1989: Effects of constant and fluctuating salinity on the yield, quality and calcium status of tomatoes. *J. Hort. Sci.* **64**, 725-732.
- Araki, T., Eguchi, T., Wajima, T., Yoshida, S. and Kitano, M., 2004: Dynamic analysis of growth, water balance and sap fluxes through phloem and xylem in a tomato Fruit — Short-term effect of water stress —. *Environ. Control in Biol.* **42(3)**, 225-240.
- Asada, K., 1999: The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 601-639.
- Bowler, C., Montagu, van M., Inze, D., 1992: Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **43**, 83-116.
- Cakmak, I., Marshner, H., 1992: Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.* **98**, 1222-1227.
- Cuartero, J. and Fernández-Muñoz, R., 1999: Tomato and salinity. *Sci. Hort.* **78**, pp. 83-125.
- Dorais, M., Papadopoulos, A. P. and Gosselin, A., 2001: Greenhouse tomato fruit quality. *Hort. Rev. (ed. by Janick, J.)*. Wiley & Sons, New York, **26**, pp. 239-319.
- Ehret, D., Ho, LC., 1986: The effects of salinity on dry matter partitioning and fruit growth in tomatoes grown in nutrient film culture. *J. Hort. Sci.* **61**, 361-367.
- Foyer, CH., Lelandais, M., Kunert, KJ., 1994: Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* **92**, 696-717.
- Hasegawa, PM., Bressan, RA., Zhu, JK., Bohnert, HJ., 2000: Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **51**, 463-499.
- Ho, L. C., Grange, R. I. and Picken, A.J., 1987: Analysis of accumulation of water and dry matter in tomato fruit. *Plant Cell Environ.*, **10**, 157-162.
- Ho, L. C., 1996: Photoassimilate distribution in plants and crops, source-sink relationships. In *Tomato (ed. by Zamski, E. and Shaffer, A. A.)*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 709-728.
- 北野雅治, 松岡孝尚, 河野俊夫 2005: 海洋深層水濃縮廃液の有効利用による高品質トマト生産, 財団法人ソルト・サイエンス研究財団 平成 16 年度助成研究報告書.
- 北野雅治, 松岡孝尚, 松添直隆, 圖師一文, 和島孝浩 2006: 海洋深層水濃縮廃液を活用した高品質高糖度トマトの多段周年栽培の実用化, 財団法人ソルト・サイエンス研究財団 平成 17 年度助成研究報告書.
- 北野雅治, 松岡孝尚, 松添直隆, 圖師一文, 和島孝浩 2007: 海洋深層水濃縮廃液を活用した高品質高糖度トマトの多段周年栽培の実用化, 財団法人ソルト・サイエンス研究財団 平成 18 年度助成研究報告書.
- Kitano, M., Wajima, T., Hidaka, K., Sago, Y., Yasutake, D., Araki, T., Ishikawa, K., Matsuo, T., Zushi, K. and Matsuzoe, N., 2008: High quality tomato production by suitable application of concentrated deep seawater. *Acta Hort.* 801:1437-1444.
- 幸田泰則, 桃木芳枝, 三宅博, 大門弘幸, 2003: 植物生理学—分子から個体へ—. 三共出版株式会社, 東京, 224 pp.
- Long, SP., Humphries, S., Falkowski, PG., 1994: Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 633-662.
- Melis, A., 1999: Photosystem - II damage and repair cycle in chloroplasts: What modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci.* **4**, 130-135.
- 中島敏光, 2002: 海洋深層水の利用 —21 世紀の循環型資源—. 緑書房, 東京, 264 pp.
- Saure, M. C., 2001: Blossom-end rot of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a calcium- or a stress-related disorder? *Scientia Horticulturae* 90:193-208.
- Shalata, A., Tal, M., 1998: The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *lycopersicon*

pennellii. *Physiol. Plant.* **104**, 169-174.

田中和夫, 1995: 2.2.1. (1)トマト. 野菜・果実・花きの高品質化ハンドブック, (社)日本施設園芸協会編, 養賢堂, 東京, pp. 25-28.

和島孝浩, 荒木卓哉, 北野雅治, 松岡孝尚, 石川勝美, 河野俊夫 2006 a: 濃縮海洋深層水の高品質トマト水耕栽培への有効利用 1. 果実品質に対する短期施用の効果. *Eco-engineering*, **18**, 119-124.

和島孝浩, 荒木卓哉, 北野雅治 2006 b: 濃縮海洋深層水の高品質トマト水耕栽培への有効利用 2. 果実への師部輸送に対する短期施用の効果, *Eco-Engineering*, **18**, 181-188.

Wise, R., Naylor, AW., 1987: Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol.* **83**, 278-282.

吉川年彦, 2002: 11. 3. 4. a. トマト. 植物栄養・肥料の事典, 植物栄養・肥料の事典編集委員会編, 朝倉書店, 東京, pp. 555-556.

研究成果発表論文

1) 和島孝浩, 荒木卓哉, 北野雅治, 松岡孝尚, 石川勝美, 河野俊夫 2006: 濃縮海洋深層水の高品質トマト水耕栽培への有効利用 1. 果実品質に対する短期施用の効果. *Eco-engineering* **18**:119-124.

2) 和島孝浩, 荒木卓哉, 北野雅治 2006: 濃縮海洋深層水の高品質トマト水耕栽培への有効利用 2. 果実への師部輸送に対する短期施用の効果, *Eco-Engineering* **18**:181-188.

3) Kitano, M., Yasutake, D., Araki, T., 2007: Measurement of transpiration streams in plants. *Environ. Control Biol.* **45**:223-239.

4) Kitano, M., Wajima, T., Hidaka, K., Sago, Y., Yasutake, D., Araki, T., Ishikawa, K., Matsuoka, T., Zushi, K. and Matsuzoe, N., 2008: High quality tomato production by suitable application of concentrated deep seawater. *Acta Hort.* **801**:1437-1444.

5) 北野雅治, 日高功太, 園師一文, 荒木卓哉 2008: 養液栽培における根への環境ストレスの応用による野菜の高付加価値化, *植物環境工学* **20**:210-218.

6) 日高功太, 北野雅治, 和島孝浩, 安武大輔, M. Affan, F.F., 佐合悠貴, 松岡孝尚, 石川勝美 2009: 濃縮海洋深層水の高品質トマト水耕栽培への有効利用 3. 根の養水分吸収および葉の光合成に対する短期施用の効果, *Eco-Engineering* **21**(in press).

謝辞

本研究は、財団法人ソルト・サイエンス研究財団の農学分野プロジェクト研究「好塩性生物の研究－基礎と応用」の支援を受けて実施した。また、プロジェクトリーダーの村田紀夫先生には、地域資源である海洋深層水の多目的多段階活用を目指した本研究のような応用研究を、応用植物生理の視点から暖かく見守って頂きました。深甚なる謝意を表します。本研究の実施に際しましては、安武大輔君、ジュン・ヤン君、赤石恵理君、鷺尾雄大君、藤原藍君の献身的な協力を得た。衷心より感謝の意を表します。

Application of Concentrated Deep Seawater for Multi-Truss and Year-Round Production of High Quality Tomato

Masaharu Kitano¹, Takahisa Matsuoka², Naotaka Matsuzoe³,
Kazuhumi Zushi⁴, Takahiro Wajima³ and Kota Hidaka¹

¹The Graduate School of Agricultural Science, Kyushu University

²The United Graduate School of Agricultural Science, Ehime University

³Faculty of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto

⁴Shokei University Junior College

Summary

The concentrated deep seawater has been discharged abundantly in the processes manufacturing many kinds of goods from the deep seawater. In this study, a suitable application of the concentrated deep seawater for the high quality tomato production was examined by analyzing effects of the short-term salt stress treatment with the concentrated deep seawater on plant physiological functions and fruit quality with special reference to osmotic adjustment, antioxidation and sensory properties of fruits. Tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) with four fruit trusses were grown in the NFT system with the intermittent applications of the short-term salt stress and the continuous application of the long-term salt stress, where the concentrated deep seawater was applied to the standard nutrient solution. The short-term (one week) salt stress was applied three times to the respective fruit trusses of 1st to 4th at one-week intervals. This three times intermittent applications the short-term salt stress to each fruit truss significantly affected osmotic adjustment and antioxidation in tomato plants and brought the value-added high quality tomatoes enriched in sugar, minerals, antioxidants and flavor etc. Furthermore, the intermittent applications of the short-term salt stress showed the possibility to improve the extreme depression of fruit growth, the higher incidence of blossom-end rot and the depression in plant vigor which were caused by the continuous long-term salt stress treatment. In this study, a new methodology to produce value-added vegetables was demonstrated by applying the natural resource, the environmental stress and plant adaptive functions.

7. まとめ

プロジェクト研究リーダー 村田 紀夫

当プロジェクト研究は、5名の助成研究者が中心となり、それぞれの研究室の共同研究者とともにおこなわれた。以下にその成果を要約する。

基礎研究分野においては、神戸大学の村上明男准教授は「紅藻 *Bangia* 属淡水産種の好塩性の解明」のテーマの下に、紅藻 *Bangia* 属の海産種(ウシケノリ)と淡水産種(タニウシケノリ)を国内の各地から採取して、それらの間の塩要求性を比較した。その結果、ウシケノリとタニウシケノリの好塩性と生育環境の塩濃度との間には高い相関性が成り立っていることを明らかにした。また、タニウシケノリは谷川の水に含まれるカルシウムイオン等の特定のイオンを必要としていることも明らかにし、その培養条件を確立した。今後は、フィールドと実験室を併用する研究の発展が期待される。

関西学院大学の松田祐介教授は「海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の好塩性機構の解明」のテーマの下に、海洋性珪藻の光合成活性に対する種々のイオンの効果を調べた。その結果、この珪藻の好塩性にとってはナトリウムイオンが必須のイオンであるが、塩素イオンは必須でないことを明らかにした。また、塩濃度を下げた時に誘導される低塩誘導性遺伝子群を調べ、新しい遺伝子を多数発見した。高塩誘導性遺伝子に関する研究は非常に多数あるのに対して、低塩誘導性遺伝子の研究はこれまでにない。本研究の低塩誘導性遺伝子の機能解明により、好塩性の機構が分子レベルで解明されることが期待される。

鹿児島大学の徳永正男教授は「好塩性酵素の好塩性メカニズムを産業的に利用する」のテーマの下に、好塩菌の好塩性酵素の特性を調べた。その結果、好塩性酵素の活性は塩に依存しないが、好塩性酵素は熱失活後のアミノ酸鎖の巻き戻し(活性の回復)が著しく早いことを明らかにした。この巻き戻しの速さは、好塩性酵素がタンパク質分子表面に負の電荷を持つ酸性アミノ酸に偏っていることに関係していることを明らかにした。これらの研究により、好塩性酵素の塩要求性に関する種々の重要な事実が明らかになった。今後、産業への応用が期待される。

応用研究分野においては、長崎大学の下町多佳志准教授は「塩による高品質作物の作出のための植物の塩ストレス状態の定量的評価方法の開発—マイクロウェーブを利用した方法」のテーマの下に、塩ストレス状態の程度を生きたままの作物でマイクロウェーブを利用して測定する技術を開発した。また食塩水の散布によってメロンの高糖度化(高品位化)に成功し、さらにハウレンソウを用いて、干拓土壌に残留する塩類による成長促進、高栄養化を実現した。当研究で開発したマイクロウェーブを用いたストレスセンサーの実用化が待たれる。

九州大学の北野雅治教授は「海洋深層水濃縮廃液を活用した高品質高糖度トマトの多段周年栽培の実用化」のテーマの下に、海洋深層水関連の商品の製造過程で排出される濃縮海洋深層水を利用して、高品質高糖度トマトの生産に成功した。しかし、この方法では、トマト果実が小さくなることと、尻腐れが起こるなど、負の効果も起こることが知られている。助成

研究者は、海洋深層水の施肥を一週間間隔に断続的に 3 回繰り返すことによって、これらの問題を克服した。この研究は実用に近い段階に達している。

当プロジェクト研究においては、助成研究者間の共同研究も活発に行われ、情報交換、測定技術の相互利用がはかられた。まだ、その成果は顕在化していないが、将来に多大な効果をもたらすものと期待される。

従来、耐塩性のメカニズム、ないしは耐塩性の増強に関しては、国内外において多数の研究がおこな

われてきた。しかし、生物の好塩性に関する研究は皆無に近い状態であった。本プロジェクト研究により、好塩性のメカニズムの解明が進み、また好塩性を利用した農作物の高品質化をはかることができたことは画期的な成果であると言える。今後、この分野の研究は大いに発展するものと期待されるが、本プロジェクト研究の果たした役割は高く評価される。

最後に、当プロジェクト研究に多大な研究費を支給し、研究の促進に多大な援助をして下さった、ソルト・サイエンス研究財団に、深く感謝申し上げます。

プロジェクト助成研究報告書 (農学・生物学)

Project Research Report (Agriculture, Biology)

平成21年3月

March, 2009

財団法人ソルト・サイエンス研究財団

The Salt Science Research Foundation

〒106-0032 東京都港区六本木7-15-14 塩業ビル

Engyo Bldg. 7-15-14 Roppongi, Minatoku, Tokyo 106-0032, Japan

Tel. 03-3497-5711 Fax. 03-3497-5712

URL <http://www.saltscience.or.jp>

ISBN 978-4-902192-21-6