

平成 22 年 6 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580015

研究課題名（和文） 塩条件下における作物根の細胞死制御と耐塩性との関係

研究課題名（英文） Relationship between salinity tolerance and the cell death in root of rice

研究代表者

平井 儀彦 (HIRAI YOSHIHIKO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：80263622

研究成果の概要（和文）：塩ストレス下におけるイネの根端の細胞死は茎葉部への Na 移行と密接に関係し、根の抗酸化酵素のカタラーゼとアスパラギン酸ペルオキシダーゼは活性酸素の消去を通じて細胞死の抑制に関与しているものと考えられた。さらに、根における活性酸素の発生量の品種間差には、抗酸化能だけでなく、シアン耐性呼吸も関係しており、活性酸素による根への障害を回避することが、イネの耐塩性に重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The viability of root-tip cells under salinity stress is closely related with the sodium accumulation in shoot of rice. Not only the activity of antioxidants (Ascorbate peroxidase and catalase) but also the activity of cyanide-resistant alternative respiration may relate to decrease the amount of the reactive oxygen species in roots and cell death. This suggests that these activities in roots are important to improve the salinity tolerance in rice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：イネ, 耐塩性, シアン耐性呼吸, 抗酸化能, 細胞死

1. 研究開始当初の背景

イネの耐塩性はNa集積と密接な関係があり、

塩ストレス下のイネでは、バイパスフローと呼ばれるアポプラスト経路を通じて多くの

Na が吸収されることが指摘されており、他の植物とは吸収機構が大きく異なると考えられている。また、塩条件下におかれた植物では、発生した活性酸素による障害を受けることが知られているが、根の活性酸素障害から耐塩性を検討したものはほとんど無い。さらに、塩ストレス下におけるオオムギの根では、細胞死が起こることが知られている。これらのことを考え合わせると、塩条件下での根で生成される活性酸素が、根の細胞死を引き起こし、アポプラスト経路が形成され、Na の流入を引き起こすと仮説を立てた。一方、塩ストレス条件下での活性酸素障害の回避には、抗酸化酵素群の強化が重要と指摘されてきたが、活性酸素の生成抑制についてはほとんど検討されていない。根の活性酸素発生は、その大部分がミトコンドリアにおける呼吸に伴うものであること、また、タバコ培養細胞では、シアン耐性呼吸経路のオルターナティブオキシダーゼの過剰発現がミトコンドリアにおける活性酸素の発生を抑制することが報告されている。このため、シアン耐性呼吸が耐塩性の向上に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

イネの耐塩性向上には塩条件下における根の代謝機能の維持が最も重要であると考え、そのメカニズムの解明を目指す。高塩分条件下での植物の Na 吸収の過程には、Na による根の活性酸素の生成、活性酸素障害による細胞死、死細胞部位におけるアポプラスト経路の形成という段階が存在すると予想しており、この仮説を検討する。さらに、植物種間や各種環境条件下での、活性酸素の消去（抗酸化酵素活性）と生成抑制（シアン耐性呼吸）と耐塩性との関係について検討するとともに、長期の塩条件下で生育するイネでは、耐性を有する値が発生する可能性がありそのこ

とについても検討した。

3. 研究の方法

(1) 塩条件下の根の細胞死と抗酸化酵素活性
イネ品種日本晴を人工気象器で水耕栽培した。7葉期に0, 75, 125mMの塩処理区を設け、12日間生育させた。塩処理1, 3, 6, 12日目根の死細胞量を調べた。死細胞量は、生細胞染色試薬FDAを用い、蛍光顕微鏡で観察し、画像解析により蛍光輝度を定量した。さらに、耐塩性程度の異なる5品種を用い、水耕栽培した。8葉期に0mM, 75mMの塩処理区を設けた。塩処理6日目に個体を採取し、乾物重、器官別Na含有率を調べた。また、根端の生細胞をFDAによりしらべるとともに、根を-80℃で凍結保存し、活性酸素消去酵素（スーパーオキシドディズムターゼ、アスパラギン酸ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、グルタチオンリダクターゼ）の測定に用いた。

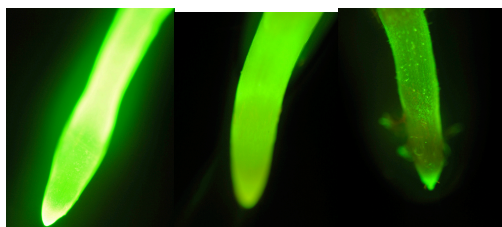
(2) 耐塩性品種IR4595-4-1-13と感受性品種Mangasaを人工気象器で水耕栽培し、6-7葉期に塩処理を6日間行った。6日後に器官別Na含有率を調べるとともに、根の暗呼吸速度および酸素安定同位体比分別によりシアン耐性呼吸を測定した。また、アポプラスト経路からのNa吸収を調べるため、塩処理と同時にアポプラスティックトレーサーには8-hydroxy-1, 3, 6-pyrenetrisulfonic acid, trisodium salt (PTS) を塩処理と同時に与え、茎葉部のPTS含有率を分光蛍光光度計で測定した。さらに根の活性酸素の発生を蛍光試薬をもちいて、蛍光顕微鏡で根の表面を観察し、画像解析により蛍光発光量を定量した。

(3) イネ6品種を水耕栽培し、5.5葉期に塩処理を開始し、器官別Na含有率の経時変化を調べ、Na吸収速度の変化を調べた。また、塩処理15日目の根長を太さ毎に分けて調

べた。塩処理期間中のアポプラスト経路からのNa吸収の変化を調べるために、24時間のPTS吸収の変化を経時的に調べた。さらに、根からのNaの排出能力の変化を調べるため、60mMNaCl処理後に地上部を切除し、根をNaClのない培養液に入れて1min, 2h, 8h後に、塩処理後に伸長の根とそれ以外の根に分けて採取し、Na含有率の変化を調べた。

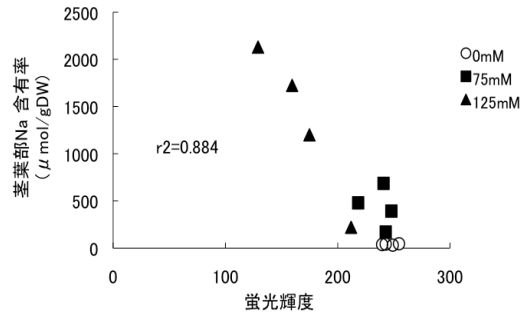
4. 研究成果

(1) 塩条件下の根の細胞死と抗酸化酵素活性 器官別の Na 含有率は、茎葉部では125mMNaCl 処理で高く推移したが、根では、75mM で高く推移した。根端の蛍光輝度は塩ストレス下で低下し、125mM での低下が大きかった。蛍光輝度は、茎葉部 Na 含有率と高い負の相関関係を示したが、根部 Na 含有率との相関は認められなかった。また、品種間の比較においては、根端の蛍光輝度と茎葉部 Na 含有率には負の相関が認められたが、根部 Na 含有率との相関は認められなかった。また、根の抗酸化酵素の活性の品種間差を調べたところ、耐塩性の高い品種で、カタラーゼとアスパラギン酸ペルオキシダーゼの活性が高いことが認められた。以上より、根端の細胞死は茎葉部への Na 移行と密接に関係していることが明らかになるとともに、抗酸化酵素活性が細胞死の抑制に関与しているものと考えられた。



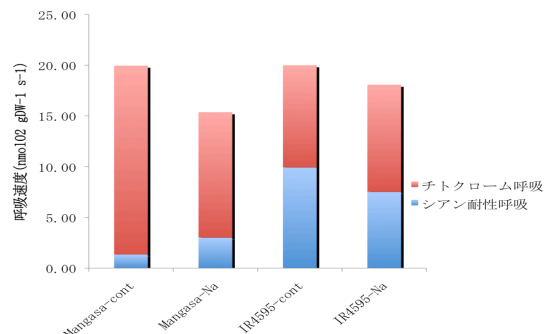
0mMNaCl 75mMNaCl 125mMNaCl

塩処理後の FDA 染色で緑色に蛍光した発色した根端の生細胞の様子



根におけるFDA染色によって示された生細胞の蛍光輝度と茎葉部のNa含有率との関係

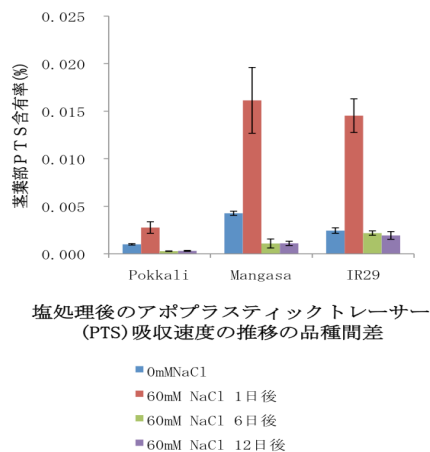
(2) 感受性品種では、Na吸収量が高く、また、細胞間隙のみを通過するアポプラスティックトレーサーの吸収も高かった。根の活性酸素の発生を蛍光試薬で調べたところ、塩ストレス下の感受性品種では、根端において発生量が高まるのに対して、耐塩性品種では、発生が抑制されていた。また、根の暗呼吸速度は両品種で差がないものの、酸素安定同位体比分別により測定したシアン耐性呼吸速度は、耐塩性品種で高いことが明らかになった。以上のことから、塩ストレス下での根の活性酸素の発生量の品種間差には、抗酸化能だけでなく、シアン耐性呼吸も関係しているものと考えられ、活性酸素による根への障害を回避することが、耐塩性に重要であると考えられた。



塩処理6日目の根におけるシアン耐性呼吸とチトクローム呼吸の品種間差

(3) 耐性根の形成

イネ6品種の茎葉部Na含有率は品種間で異なり、Na吸収速度は、いずれの品種でも塩処理期間が長くなると低下したが、その程度に品種間差は認められなかった。根の形態変化を調べるため、塩処理15日目に太さごとの根長を調べたところ、Mangasaで0.17mm以下の根長が低下していたが、Na吸収速度の低下との間に一定の関係は認められなかった。また、Na吸収速度は塩処理日数とともに低下しており、Na排出以外にNa吸収速度の低下に関わる要因があると考えられた。そこで、塩処理後のアポプラスト経路の変化を調べたところ、各品種ともに塩処理6日以降にはアポプラスト経路を通じたNa吸収抑制能が高まったと考えられた。さらに、根からのNa排出の品種間差異を調べたところ、各品種ともに塩処理6時間後と6日後に根からのNa排出は認められなかったが、処理12日後には3品種ともに根でNa排出が起こった。しかし、品種間ではNa排出の程度に明確な差は認められなかった。以上のことから、塩処理直後にはNa吸収速度は高いが、塩処理期間が長くなるとアポプラスト経路を通じたNaの吸収抑制能と根からのNaの排出能が高まり、Na吸収速度が低下すると考えられた。



5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

① Yoshihiko Hirai, The relationship between the viability of root-tip cells and sodium accumulation in rice under salinity stress. 5th International Crop Science Congress 2008. 4.1 韓国済州島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 儀彦 (HIRAI YOSHIHIKO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号：80263622