

機関番号 : 18001

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20580156

研究課題名 (和文) マングローブにおける塩分負荷によるテルペノイド濃度上昇の生理的役割の解明

研究課題名 (英文) Physiological significance of terpenoid in the salt tolerance of mangrove trees

研究代表者 屋 宏典 (OKU HIROSUKE)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号 : 10177165

研究成果の概要 (和文) : 本研究においてはマングローブの耐塩性におけるテルペノイド合成の生理学的役割を明らかにすることを目的とした。

まず、塩ストレス負荷条件下のマングローブ植物体におけるテルペノイド濃度変化と合成酵素遺伝子の発現を追跡するとともに、テルペノイド合成遺伝子発現及び組織中における各テルペノイド成分の濃度と塩分濃度との相関について解析し、マングローブ根においては塩濃度とテルペノイド濃度及び合成遺伝子発現は強く相関するが、葉においては必ずしも相関は認められず、組織によりテルペノイド合成の調節機構及び生理的役割が異なっていることが示唆された。また、酵母へのテルペノイド合成遺伝子の導入はその塩耐性形質に影響することも明らかにされた。これらの知見はテルペノイドが膜脂質として機能するとの仮説を支持する結果と考えられた。最後に、塩ストレスにより特異的に誘導される遺伝子群を解析し、ストレス関連転写因子と一群のテルペノイド合成遺伝子が塩ストレスにより発現上昇していることを見出した。

研究成果の概要 (英文) : Present study aimed to address the physiological significance of terpenoid in salt tolerance of mangrove species. We first examined the relationship between mRNA level of terpenoid synthase and salt concentration of growth conditions, and found positive correlation between these two parameters. Consistent with our previous study, a positive correlation between terpenoid and salt concentration was also noted. These correlations were not observed for phytosterols, which suggested that the physiological function of terpenoid in salt tolerance differed from that of phytosterol. It was also found that expression of terpenoid genes in yeast affected their growth under salinity stress suggesting that terpenoid can function as lipid membrane constituent. Finally, To isolate anti-salt stress genes from mangrove plants, a cDNA library of *R. stylosa* roots was constructed and screened for stress-related genes by polymerase chain reaction (PCR)-based suppressive subtractive hybridization. Significantly increased expression levels were confirmed for 13 transcripts, which suggest that these genes contribute to the salt tolerance of this plant. Among them, two transcription factors and several genes involved in isoprenoid biosynthesis were identified from mangrove trees as salt tolerance genes for the first time.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008	1,600,000	480,000	2,080,000
2009	900,000	270,000	1,170,000
2010	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：森林科学

1. 研究開始当初の背景

マングローブは熱帯・亜熱帯の沿岸域、すなわち汽水域に生育する耐塩性の強い植物であり、この植物より耐塩性因子を分離して農業上有用な作物を作る試みがなされてきているが、まだ実用化には至っていない。マングローブの耐塩性機構は一樣ではなく、進化の過程を経て獲得した様々なメカニズムが関与する複合的事象と想定できる。これはとりもなおさず実用化のためにはあらゆる可能性を想定した総体的な機構解明が重要であることを指摘している。

2. 研究の目的

植物の主な耐塩性機構として①グリシンベタイン等の浸透圧調節物質の蓄積 (Bohnert et al. 1995, Plant Cell) ②特定の機能タンパク質の誘導 (Singh et al. 1987, Plant Physiol; King et al. 1988, Plant Mol Biol; Moons et al. 1995, Plant Physiol; Sugihara et al. 2000, Plant Cell Physiol; Yamada et al. 2002, Plant Cell Physiol) ③細胞内液胞への塩の封じ込め (Mimura et al. 2003, *Planta*) 等のメカニズムが既に提唱されている。これらはいずれも代謝的適応であり、植物自体の構造変化を伴うものではないと考えられる。

一方、植物体を構成する細胞膜はそれ自身が外界に対するバリアーであり、塩ストレス等に対する基本的な防御機能を担っていることが推察される。申請者等はこのように、膜

成分である脂質が塩ストレスにより影響を受けているかもしれないという観点から沖縄産マングローブの脂質分析を行い、塩分負荷によりマングローブのテルペノイド濃度が上昇することを見いだした (Oku et al. 2003, J Plant Res)。さらに、マングローブにおいては植物ステロールに代わりトリテルペノイドが膜構築に関与しており、塩ストレスに対して防御的に機能している可能性を示唆する結果を初めて得ている (Basyuni et al. 2007, J Oceanography)。さらに、これまでのテルペノイド濃度上昇の指標は脂質成分中の組成%であったが、塩分負荷に伴いテルペノイドの組織あたりの絶対濃度も上昇しており、常に塩分にさらされている根においてのみそれが顕著であることも最近解ってきている。これらの成果はいずれもテルペノイドが耐塩性に直接的に寄与していることを示唆している。このような成果を踏まえ、本研究においては塩分負荷に伴うテルペノイド濃度上昇の生理学的役割を明らかにし、マングローブの耐塩性の総体的機構解明を目的とした。

3. 研究の方法

塩分負荷に伴うテルペノイド上昇の生理学的役割、特に膜脂質成分としての機能及び塩ストレスによる生合成制御機構に焦点をあて、以下点について追究した。

(1) これまでの遺伝子情報をもとに塩ストレス負荷条件下のマングローブ植物体にお

るテルペノイド濃度変化と合成酵素遺伝子の発現を追跡するとともに、テルペノイド合成及び組織中における各テルペノイド成分の濃度と塩分濃度との相関について詳細な解析を行う。

(2) 膜脂質成分としてのテルペノイドの関与を明らかにするため、人工膜モデルであるリポソームへの取り込みを検討する。

(3) テルペノイド合成遺伝子の過剰発現により大腸菌或いは酵母のテルペノイド濃度を人為的に増加させ、耐塩性への影響を明らかにする。

(4) テルペノイド合成遺伝子の発現調節を制御するプロモーター領域の特定及びマングローブに塩ストレスを負荷した際に誘導される遺伝子群の解析を行う。

4. 研究成果

(1) テルペノイド濃度変化と合成酵素遺伝子の発現を追跡するとともに、テルペノイド合成及び組織中における各テルペノイド成分の濃度と塩分濃度との相関について詳細な解析を行った。その結果、塩負荷に伴い根においてはマングローブの種を問わず、テルペノイド生合成酵素遺伝子発現及びテルペノイド濃度が塩分濃度依存的に増加した(図1)。

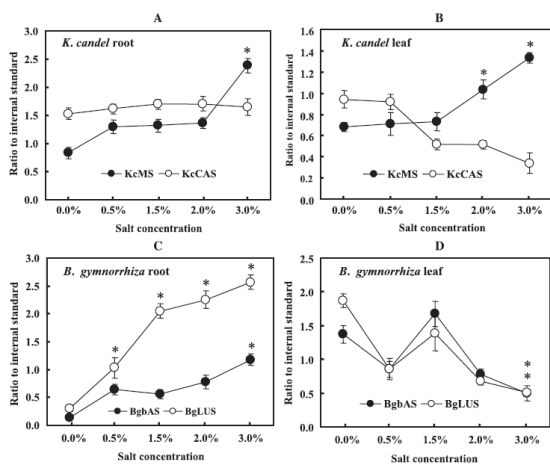


図1 マングローブのテルペノイド合成酵素遺伝子発現に及ぼす塩濃度の影響

しかしながら、葉において、テルペノイド濃度は必ずしも塩分濃度と相関せず、組織によりテルペノイドの生理的役割が異なっていることが示唆された(図2)。他方、植物ステロールは根において塩分濃度依存的な変動は示さず、塩分耐性においてテルペノイドが植物ステロールとは異なる役割を演じていることが示唆された(図2、図3)。

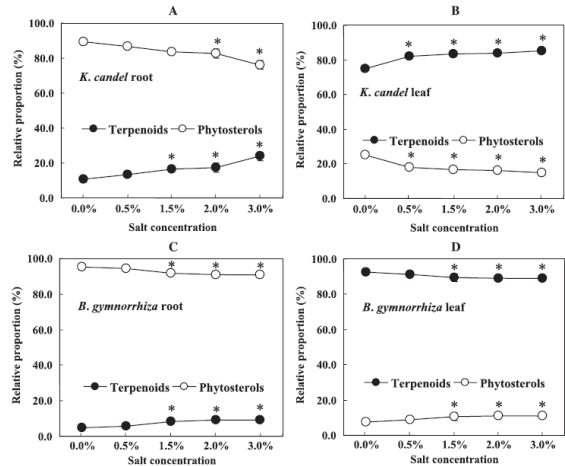


図2 マングローブ葉及び根のテルペノイド相対濃度に及ぼす塩濃度の影響

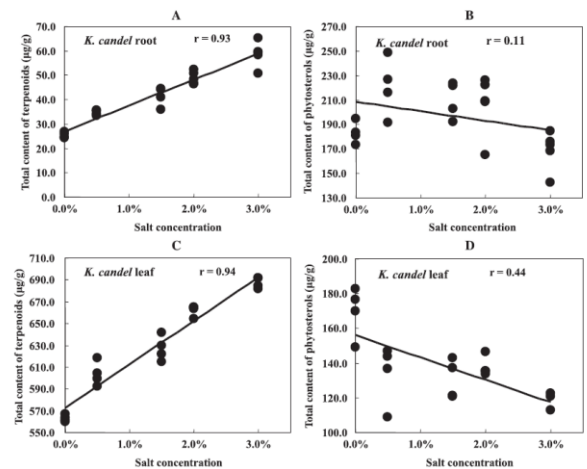


図3 メヒルギ根及び葉におけるテルペノイドと塩濃度の相関

(2) 膜脂質成分としてのテルペノイドの関与を明らかにするため、人工膜モデルであるリポソームへの取り込みを検討した。

実験に使用したテルペノイドのひとつルペオールはリポソーム生成系に混入することによりは植物ステロールの場合と同様に少量ではあるが定量的にリポソームに取り

込まれ、リポソーム生成率を低下させた。このことはテルペノイドが植物ステロール同様に膜成分として機能することを示唆する結果と考えられた。

(3) テルペノイド合成遺伝子の過剰発現により酵母のテルペノイド濃度を人為的に増加させ、耐塩性に及ぼす影響を評価した (図4)。

塩ストレスを負荷していない培養条件下ではコントロール (pYES2 ベクター)、テルペノイド合成遺伝子 (BgbAS) 及びシクロアルテノール合成遺伝子 (KcCAS) をそれぞれ導入した酵母の増殖速度に差異は認められなかった。

これに対し、塩ストレスを負荷した条件下においてはテルペノイド合成遺伝子 (BgbAS) を導入した酵母の増殖はコントロールよりも早く、テルペノイド合成は耐塩性を増加させると考えられた (図4)。一方植物ステロール合成に関与するシクロアルテノール合成遺伝子 (KcCAS) は塩ストレス負荷条件下での酵母の増殖速度を低下させ、耐塩性を減弱させることが示唆された。テルペノイド合成遺伝子及びシクロアルテノール合成遺伝子は 2,3-オキシドスクワレンを基質としてそれぞれ炭素骨格の立体構造が異なるダンマランカチオン及びプロトステリルカチオンを経てシクロアルテノール及びトリテル

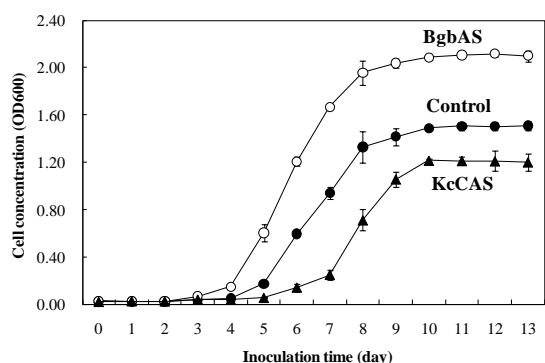


図4 塩ストレス (0.4M NaCl) 負荷条件下での酵母の増殖に及ぼすテルペノイド合成遺伝子発現の影響

ペノイドを生成する。シクロアルテノールの炭素骨格の構造は植物ステロールに類似しており、これとは炭素骨格の構造が異なるトリテルペノイドが耐塩性に関して作用する方向が異なる可能性が示され、今後この結果については酵母細胞内のテルペノイド濃度の変化を含めてより詳細に検討する必要があると判断された。

(4) 最後に、マングローブに塩ストレスを負荷した際に誘導される遺伝子群の解析を行った。本研究では、実験材料としてヤエヤマヒルギ (*Rhizophora stylosa*) を用い、塩ストレス負荷後に根で誘導される遺伝子群を検索・同定した。塩ストレス耐性遺伝子の検索は、Suppression Subtractive Hybridization (SSH) 法を用いた。

SSHにより得られた cDNA ライブラリーから 240 クローンの解析を行った結果、10 カテゴリーに分類される 48 種類の遺伝子が塩ストレスにより誘導されていた。

各カテゴリーから選択した 13 種の遺伝子については Real Time PCR により塩ストレスによる発現上昇を再確認した。そのうち、2 つの転写因子 (MADS, AP2/EREBP) といくつかのイソプレノイド代謝遺伝子が初めてマングローブの塩ストレス耐性遺伝子として同定された (図5)。

これまで塩分負荷によるテルペノイド合成促進については我々のグループ以外からの報告は殆どない。本研究においては比較的長期の塩ストレス負荷をしているのに対し、これまでの殆どの研究は比較的短期の条件が用いられている。このことから、長期の塩ストレスの負荷がテルペノイド遺伝子誘導に必要であり、テルペノイドは長期の塩耐性機構として機能していることが示唆された。

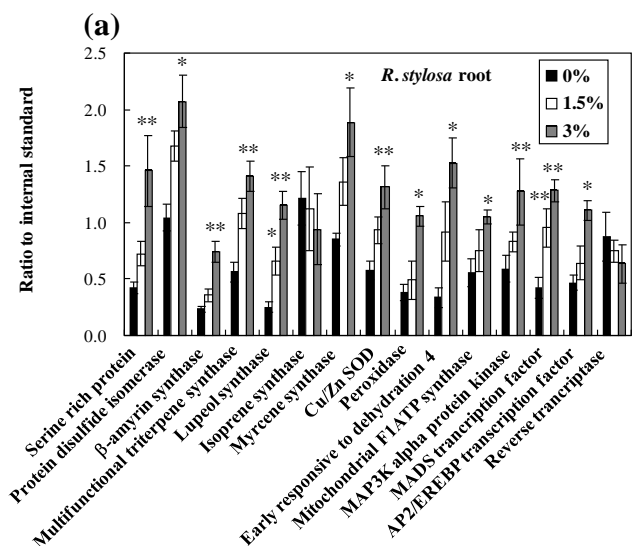


図5 ヤエヤマヒルギ根の遺伝子発現に及ぼす塩ストレスの影響

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① M. Basyuni, Y. Kinjo, S. Baba, N. Shinzato, H. Iwasaki, E. B. M. Siregar, H. Oku Isolation of salt stress tolerance genes from roots of mangrove plant, *Rhizophora stylosa* Griff., using PCR-based suppression subtractive hybridization Plant Mol. Rep. DOI: 10.1007/s11105-010-0257-2 (2010) (査読有)
- ② M. Basyuni, S. Baba, M. Inafuku, H. Iwasaki, K. Kinjo, H. Oku Expression of terpenoid synthase mRNA and terpenoid content in salt stressed mangrove J. Plant Physiol. 166, 1786-1800 (2009) (査読有)

[学会発表] (計7件)

- ① Mohammad Basyuni, Yuji Kijo, Naoya Shinzato, Shigeyuki Baba, Edy BM Siregar, Hirosuke Oku: Isolation of salt stress tolerant genes from

mangrove plant, *Rhizophora stylosa*, using PCR-based suppression subtractive hybridization. JSBBA Conference 2010, Tokyo University, 27-30 March 2010.

- ② Mohammad Basyuni, Shigeyuki Baba, Hirosuke Oku: Mating system and population genetic of *Bruguiera gymnorhiza* and *Kandelia candel* as revealed by microsatellite. IUFRO Kuala Lumpur 2010 held at Legend Hotel, Kuala Lumpur, Malaysia on March 7-12, 2010. Joint International Conference of IUFRO and Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), Forest Research Institute Malaysia (FRIM) and Universiti Putra Malaysia (UPM).
- ③ Mohammad Basyuni, Shigeyuki Baba, Hirosuke Oku: Genetic and terpenoid diversity of the mangrove tree species. International Workshop for Conservation Genetics of Mangroves held on 11-12 February 2010 at the Iriomote Station of the Tropical Biosphere Research Center (TBRC), University of Ryukyus. Co-organized by the Faculty of Science, Chiba University, Iriomote Station of the TBRC, the University of the Ryukyus and International Society for Mangrove Ecosystem (ISME).
- ④ Mohammad Basyuni, Yuji Kinjo, Shigeyuki Baba, Hirosuke Oku: Changes in isoprenoid concentration, sodium and total chlorophyll content in two mangrove plants during long-term salt stress and subsequent relief (Accepted). Combio 2009 Conference held at Christchurch Convention Center, New Zealand, 5-12 December

2009. University of Canterbury,
Christchurch, New Zealand

- ⑤ Mohammad Basyuni, Shigeyuki Baba,
Hironori Iwasaki, Hirosuke Oku: Effect
of salt stress on the expression of
terpenoid synthase mRNA and terpenoid
content in two mangrove species
Kandelia candel and *Bruguiera*
gymnorrhiza. 3rd Asian Symposium on
Plant Lipids (ASPL) at Yokohama Media
Center, 27 - 29 November 2009. Japanese
Association of Plant Lipid
Researchers.
- ⑥ Mohammad, Basyuni, Yuji Kinjo,
Shigeyuki Baba, Hirosuke Oku
Expression of terpenoid synthase gene
from two mangrove plants during salt
stress and subsequent relief to fresh
water. JSBBA Kansai Symposium. 30-31
October 2009. University of the
Ryukyus, Okinawa Japan.
- ⑦ 金城翼史、MohammadBasyuni、馬場繁幸、
屋宏典 サブトラクション法によるヤエ
ヤマヒルギの塩ストレス耐性遺伝子の単
離 日本農芸化学会関西・中四国・西日
本支部/日本栄養・食糧学会九州・沖縄支
部/日本食品科学工学会西日本支部合同
大会 2009年10月30日 琉球大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

屋 宏典 (OKU HIROSUKE)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授
研究者番号：10177165

(2) 研究分担者

岩崎 公典 (IWASAKI HIRONORI)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教
研究者番号：50347134

(H20～H21)