

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06329

研究課題名（和文）硫化水素と活性酸素種、エチレンのアントシアニン蓄積における役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the roles of hydrogen sulfide, reactive oxygen species, and ethylene in anthocyanin accumulation in lettuce plants

研究代表者

坂本 勝（Masaru, Sakamoto）

近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号：90446378

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：植物のシグナル伝達における硫化水素の役割を明らかにするため、硫化水素処理がレタスのアントシアニン蓄積に与える影響を調査した。まず、硫化水素の処理方法を検討したところ、水耕栽培レタスの培養液に処理することで、葉でアントシアニンの蓄積生じた。次に、より効率的な条件を探索したところ、栄養欠乏条件において、アントシアニンの蓄積が増加した。次に、エチレン前駆体のACCや過酸化水素を共処理することで、硫化水素誘導性のアントシアニン蓄積が促進された。このことから、硫化水素により誘導されるアントシアニン蓄積にエチレンと活性酸素種が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、レタスのアントシアニン蓄積が硫化水素により誘導されることを明らかにした。また、この硫化水素誘導性アントシアニン蓄積現象に活性酸素種とエチレンが関与することが示唆された。これらの結果から、植物における硫化水素を含めた複合的シグナルの一端を明らかになったと考えられる。本成果は、学術的な知見として重要であるほか、硫化水素を用いた高付加価値作物栽培法の開発などへの応用が期待できる。たとえば、硫化水素の性質を利用したアントシアニンなどを多く含む付加価値の高い作物栽培技術や、ポストハーベスト技術、ストレス耐性作物作出など、広く農業分野に普及できる技術にもなりうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To clarify the role of hydrogen sulfide in plant signaling, we investigated the effect of hydrogen sulfide treatment on anthocyanin accumulation in lettuce. First, we investigated the treatment method of hydrogen sulfide, and found that treatment of hydroponically grown lettuce with the nutrient solution caused anthocyanin accumulation in the leaves. Next, we examined for more efficient conditions and found that anthocyanin accumulation increased under nutrient-deficient conditions. Next, co-treatment with the ethylene precursor ACC or hydrogen peroxide enhanced hydrogen sulfide-induced anthocyanin accumulation. This suggests that ethylene and reactive oxygen species are involved in the anthocyanin accumulation induced by hydrogen sulfide.

研究分野：植物生理学

キーワード：硫化水素 アントシアニン 栄養欠乏 エチレン 活性酸素種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

硫化水素は、近年、動物において硫化水素が細胞周期や細胞死、酸化ストレスなど生体内の様々な現象のシグナル分子として機能することが明らかとなっている。植物においても、硫化水素が発芽や側根形成、光合成、花の老化などの生理現象やストレス応答に参与するとの報告が蓄積しつつあり、今後植物の硫化水素シグナル研究が推進されていくことが予想される。植物生体内での硫化水素生成は、果実成熟時などエチレン合成の際に生成されるシアン化カリウムとシステインから *-cyanoalanine synthase* により生成されることが明らかとなっているが、放出される硫化水素の生体内での役割は未解明である。しかし、硫化水素生成を伴う果実成熟時には活性酸素種が生成され、細胞内酸化還元状態が変化することや、動物細胞において硫化水素がSH基の付加反応であるスルヒドリル化を介して酸化還元シグナル系を制御することを考慮すると、硫化水素がエチレンと相互作用し、細胞内の酸化還元状態を制御している可能性が示唆される。また、活性酸素種生成を伴うストレス応答に硫化水素が参与するとの報告がある。例えば、塩・低温ストレスに対して、硫化水素処理がストレス耐性を付与する。同様に、イチゴやブロッコリーの保存時に低下する抗酸化物質が、硫化水素処理により軽減されたとの報告もある。これらのことから、硫化水素が活性酸素種とエチレンと強調して植物のシグナル伝達に関わっている可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、硫化水素などにより誘導されるレタスアントシアニン蓄積現象において、硫化水素と活性酸素種、エチレンの役割を明らかにすることを目的とする。

本研究の学術的な特色は、現状でまだ未解明な点が多い植物の硫化水素のシグナルを明らかにする点である。硫化水素が様々な植物の生理現象に参与するとの報告はあるが、活性酸素種とエチレンの2因子を絡めて論じたものはないという点で学術的な独自性と創造性が高いといえる。活性酸素種とエチレンと研究報告から、一般に活性酸素種がエチレンより上流で、生理現象のシグナルとして機能すると考えられる。硫化水素とエチレンについては、協調して気孔閉鎖に参与するとの報告の他、果実成熟時には拮抗して作用するとの報告もある。硫化水素と活性酸素種に関しては、気孔シグナルにおいて硫化水素が活性酸素の上流で機能するとの報告や、活性酸素生成をともなう酸化ストレスに硫化水素が抑制的に作用するとの報告がある。このように硫化水素と他の2因子との関係は、生理現象ごとにより異なることが考えられる。本研究のレタスの硫化水素誘導性アントシアニン蓄積現象は、硫化水素が参与するとの報告はまだなされておらず、他の2因子を含めてその生理的役割を明らかにすることは新規性が高い研究といえる。

本研究で明確になるであろう基礎的研究データは、硫化水素の性質を利用したアントシアニンなどを多く含む付加価値の高い作物栽培技術や、ポストハーベスト技術、ストレス耐性作物作出など、広く農業分野に普及できる技術にもなりうる。

3. 研究の方法

(1) 処理方法

レタス(品種、レッドウエーブ)種子を水に浸漬したキューブに播種し、光周期 明期 16 時間、暗期 8 時間、PPFD100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 湿室光環境下で 1 週間催芽を行った。1 週間後から、大塚ハウス A 処方 1/2 倍培養液の処理を開始し、水耕栽培装置で光周期 明期 16 時間、暗期 8 時間、PPFD150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で栽培を行った。播種後 2 週間の水耕栽培レタスに硫化水素発生剤の硫化水素ナトリウムを、濃度を変えて、スプレー処理、(一過的)浸漬処理、間接暴露処理、水耕液処理を行った。エチレン前駆体の ACC、エチレン阻害剤の STS、過酸化水素は、水耕液に共処理を行った。栄養欠乏処理は、播種 2 週間後の栽培装置の培養液を水に置換することで行った。

(2) 生育解析

硫化水素処理後の植物体の葉数、葉長、茎径、茎長、地上部と地下部の新鮮重、乾物重、水分含量を計測した。

(3) 成分分析

アントシアニンは、葉を 90%エタノール・塩酸に浸漬して 24 時間静置することで抽出した。溶出したアントシアニンは、分光光度計で 533 nm の吸光度を測定し、シアニジン-3-グルコシド(分子量: 170.12)当量として算出した。

総フェノールは、葉を 90%エタノール中で破碎し、遠心分離後の上清を回収した後、フェノール溶液と 5%炭酸ナトリウムを加えて、暗所で 30 分静置して反応を進めた。反応液を分光光度計で 760 nm の吸光度を測定した。総ポリフェノール量は、没食子酸(分子量: 170.12)当量として算出した。硫化水素は、葉をリン酸カリウムバッファー(EDTA 入り)で破碎し、遠心分離後の上清に、リン酸バッファーと DTNB(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid))を加えて反応させ、412 nm の吸光度を測定した。

4. 研究成果

硫化水素の処理方法を検討したところ、水耕液処理に硫化水素ナトリウムを添加するともっとも効率的に葉でのアントシアニン蓄積が誘導された。

次に、最適な硫化水素ナトリウムの処理濃度を検討した。処理濃度を0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 mMと変化させて水耕液に処理をしたところ、0.3 mMの濃度でもっとも葉でのアントシアニン蓄積が認められた(図1)。よって、以降は0.3 mMの硫化水素ナトリウム処理により実験を行った。

次に培養液組成の影響を検討したところ、培養液処理下(大塚ハウスA処方1/2倍液)で硫化水素処理を行うよりも、栄養欠乏条件(水処理)下で顕著な蓄積現象が認められた(図2)。

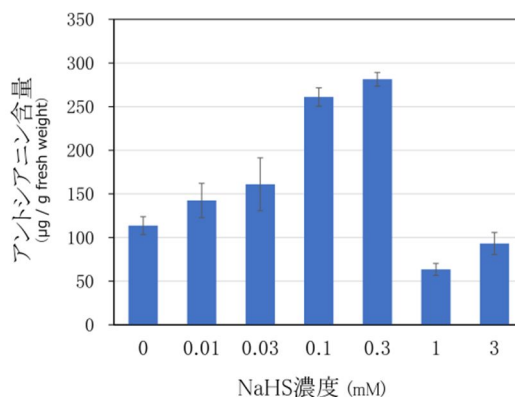


図1 水耕液への硫化水素ナトリウム(NaHS)処理濃度がレタス葉のアントシアニン蓄積に与える影響。



図2 培養液および栄養欠乏条件下の水耕栽培レタスの水耕液に硫化水素ナトリウム(NaHS)処理2日後のレタスの地上部の様子。

そこで、この栄養欠乏時のレタスの生理的な変化を観察したところ、栄養欠乏単独でもアントシアニン蓄積が誘導されることが明らかとなった。また、栄養欠乏時の硫化水素を定量したところ、アントシアニン蓄積時に根部で含量が増加することが明らかとなった(図3)。次に、栄養欠乏時の硫化水素誘導性アントシアニン蓄積現象においてエチレンと活性酸素種の関与を薬理的に調査した。硫化水素ナトリウムにエチレン前駆体の ACC を共処理するとアントシアニンの蓄積が促進された。このことから、硫化水素誘導性アントシアニン蓄積にエチレンが関与していることが考えられた。

次に、硫化水素ナトリウムにエチレン阻害剤の STS を共処理するとアントシアニンの蓄積に変化は生じなかった。よって、エチレンシグナルの下流で硫化水素がアントシアニン蓄積に関与する可能性が示唆された。さらに、硫化水素ナトリウムに過酸化水素を共処理するとアントシアニンの蓄積が促進された。このことから、硫化水素誘導性アントシアニン蓄積に活性酸素種がシグナルとして関与していることが考えられた。

また、異なる植物種において、栄養欠乏と硫化水素処理が与える影響を、ハツカダイコンを用いて調査した。

播種後3週間の水耕ハツカダイコンに栄養欠乏条件処理と硫化水素処理を行い、1週間後に生育や形態を調査した。その結果、栄養欠乏処理により、地上部の生育が抑制されたが、塊根の生育は抑制されず、効率的に光合成産物が塊根に転流することが示唆された。一方、硫化水素を加えた処理区では、地上部や塊根の生育に影響を与えなかった。また、いずれの処理においても塊根のアントシアニン蓄積に影響を与えなかった。この結果から、レタスとハツカダイコンでは、硫化水素に対する応答が異なることが示唆された。

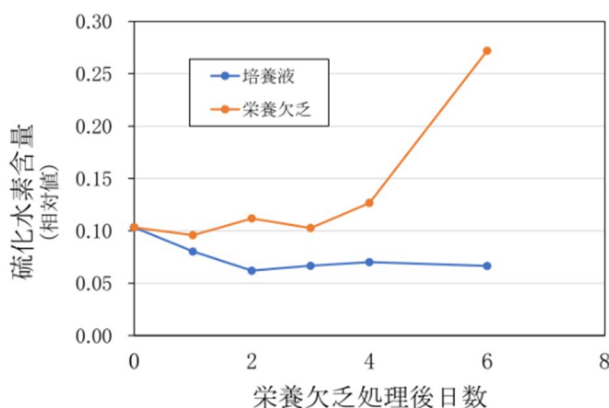


図3 栄養欠乏処理後のレタス根の経時的な硫化水素含量の変化。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakamoto Masaru, Komatsu Yoshiki, Suzuki Takahiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Nutrient Deficiency Affects the Growth and Nitrate Concentration of Hydroponic Radish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Horticulturae	6. 最初と最後の頁 525 ~ 525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/horticulturae7120525	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------