

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580021

研究課題名(和文)耐塩性イネにおけるシアン耐性呼吸の生理学ならびに分子生物学的解析

研究課題名(英文)Physiological and molecular biological analysis of cyanide resistant respiration in salt tolerant rice variety.

研究代表者

平井 儀彦(HIRAI, YOSHIHIKO)

岡山大学・その他の研究科・准教授

研究者番号：80263622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：イネの耐塩性程度にはNa吸収が密接に関係し、耐塩性の向上にはNa吸収抑制が重要である。本研究では、シアン耐性呼吸が細胞pHの制御を通じて、Na⁺吸収抑制に貢献しているかどうかを検討した。その結果、シアン耐性呼吸は、細胞pHの制御を通じてNa⁺吸収抑制に関与することが明らかになった。しかし、この機構が耐塩性の品種間差におよぼす影響は、比較的小さいと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sodium exclusion by roots is important for salinity tolerance of rice. In the present study, the cyanide resistant respiration in rice was investigated whether it relate to the sodium exclusion by roots through the cytoplasm pH adjustment. As the result, the cyanide resistant respiration in rice related to the sodium exclusion in root, but the contribution in the sodium exclusion was low compared to the varietal difference.

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 Na⁺排除

1. 研究開始当初の背景

イネは主要穀物の一つであるが、耐塩性は比較的低い作物に分類されており、耐塩性の向上が求められている。イネの耐塩性の品種間差は主に Na^+ 吸収の大小が関係していることから、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られる。

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、これらの研究のほとんどは、培養細胞あるいは葉を用いた結果であり、これまで根の活性酸素障害から耐塩性を検討したものが少ない。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 ROS (H_2O_2) の発生を抑制することが報告されている。申請者はこれまでに、塩条件下のイネでは、根の活性酸素量が高まり、その発生量が高まる処理では、茎葉部の Na^+ 含有率も高まることを認め、さらに、活性酸素発生量の大小には、活性酸素消去系酵素活性だけでなく活性酸素抑制に関わると考えられているシアン耐性呼吸も関与することを認めた。さらに、耐塩性品種と感受性品種の比較し、根のシアン耐性呼吸を阻害すると耐塩性品種の Na^+ の吸収抑制ができなくなること、根の活性酸素の発生量は耐塩性品種で低いことを認めた。これらのことは、耐塩性品種では根のシアン耐性呼吸の働きにより塩条件下での活性酸素による細胞障害を軽減している可能性を示した。

一方、シアン耐性呼吸は、細胞質の pH 調節に関係するとの報告もある。細胞質のアルカリ化は、細胞外や液胞内との H^+ の濃度勾配を生じさせる。このことは、原形質膜 Na^+/H^+ アンチポーター(SOS)による Na^+ の細胞外への排出、および液胞膜 Na^+/H^+ アンチポーター (NHX) による液胞内への Na^+ の隔離を容易にすると考えられる。つまりシアン耐性呼吸は活性酸素の生成抑制による細胞障害の軽減と同時に、 Na^+ の細胞外排出および液胞内隔離にも貢献している可能性がある。しかし、何れの要因が耐塩性の向上により重要であるかは明らかでない。

2. 研究の目的

本研究は、イネのシアン耐性呼吸が、細胞 pH の制御を通じて、耐塩性に貢献するかどうかを明らかにすることを目的とした。具体的には、根細胞表面ならびにプロトプラストの pH 測定法の確立、細胞質 pH の品種間差、シアン耐性呼吸阻害剤を通じた細胞質 pH の変化、塩条件下における細胞質の pH 調節能が Na^+ 吸収に及ぼす影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 根の Na 吸収部位の検討

水耕栽培したイネの根に塩処理を行い、細胞内 Na を Na 蛍光指示薬で染色し、蛍光顕微鏡を用いて Na 濃度を測定する。細胞内 Na^+ 濃度から、 Na 吸収が盛んな部位を検討した。

(2) 根表面ならびにプロトプラストの pH 測定法の確立

根表面細胞および根からのプロトプラストの pH を蛍光指示薬 SNARF-4F で測定した。1 励起 2 波長の蛍光フィルターを用いて、2 画像を撮影し、画像輝度の蛍光比を算出した。また、 H^+ イオノフォア試薬 CCCP と細胞外部溶液の pH から、細胞質 pH の校正曲線を作成し、それもとに、細胞質 pH を測定した。

(3)細胞質 pH の品種間差

耐塩性品種 IR4595-4-1-13(以下 IR4595)と感受性品種 Mangasa の細胞質 pH も同様に蛍光指示薬で測定した。

(4) シアン耐性呼吸阻害剤を通じた細胞質 pH の変化

上記 2 品種を用い、シアン耐性呼吸の阻害剤 SHAM を培養液に加えて塩処理を行い、細胞質 pH の変化を調べた。

(5) 異なる培養液温度がイネの Na⁺吸収に及ぼす影響

イネの根における Na 吸収には、シンプラストとアポプラストの両経路が存在しており、アポプラスト経路での吸収が多いとされている。アポプラスト経路が主な Na⁺吸収経路である場合は、Na⁺吸収が温度の影響を受けにくいと考えられることから、培養液温度を変えて塩処理を行い、茎葉部 Na 含有率を調べた。

(6) 塩条件下における細胞質の pH 調節能が Na⁺吸収に及ぼす影響

Na⁺排除が細胞質 pH に影響を受ける場合には、培養液 pH により Na⁺吸収が異なると考えられたことから、細胞の pH 調節能の Na 吸収に及ぼす影響を調べた。培養液 pH を 3.5, 5.5, 9.0 として塩処理を行い、同様に Na⁺吸収におよぼす影響を調べた。

4. 研究成果

IR4595 と比較して Mangasa では根端部分と先端から 1cm 付近の両方で強い蛍光が認められ、1cm 付近では木部部分が強く蛍光しており、これらの部分に Na が多く蓄積していることが示唆された。さらに、塩処理と同時にシアン耐性呼吸の阻害剤 SHAM を与えた場合、両品種とも根表面細胞の pH が大きく低下した。このため、シアン耐性呼吸は pH の制御に密接に関与していると考えられた。さらに、Mangasa の根表面では、根端部分と先端から 1 cm 付近の両方で塩処理により pH が大きく低下したのに対して、IR4595 の

根端部分では pH の低下が小さく、1 cm 付近では pH の変化が認められなかった。これらのことから、シアン耐性呼吸は、根の細胞質 pH の制御に密接に関与することが明らかになるとともに、IR4595 では塩条件下でも根表面の pH が高く維持されており、このことが、Na⁺吸収の抑制に貢献しているものと考えられた。

さらに、根表面の pH が根の内部の pH と一致するかどうかを明らかにするため、イネ 2 品種を用いて塩条件下での根表面の pH と、根を磨砕して得られた液の pH を比較するとともに、プロトプラストを作成して、細胞質 pH ならびに細胞質 Na⁺濃度の測定法を検討した。その結果、塩処理 12 時間後の IR4595 の根表面の pH は Mangasa よりも高く、6 時間後と 24 時間後でも同様の傾向があった。2 品種の対照区と塩処理区の根磨砕液の pH は 5.6 から 6.1 の範囲にあり、SNARF-4F による根表面の pH 測定値より低く、品種間差及び塩処理の影響も根表面の測定と異なった。根磨砕液にはアポプラスト液や液胞内部液が含まれると考えられることから、細胞質 pH の測定が必要と考えられた。そこで、葉と根のプロトプラストの作成を試みたが、根のプロトプラストでは、酸性条件での塩処理では生存率が極めて低く、細胞質 pH の校正曲線の作成が困難であった。このため、葉のプロトプラストの細胞質 pH を測定したところ、塩処理 1 時間後に Mangasa で低下する傾向が示され、SHAM 処理では両品種の pH の低下が認められ、根表面の pH 測定とほぼ一致した。以上のことから、シアン耐性呼吸は塩条件下での根細胞の pH 維持に密接に関係すると考えられた。

つぎに、根の Na⁺排除に代謝の影響が大きいかどうかを調べるため、培養液温度を変えて塩処理を行ったところ、耐塩性ならびに感受性品種で、Na⁺吸収は温度に影響され、特に高塩濃度ほど、低温条件で Na⁺吸収は高ま

った。このことは、イネの Na^+ 排除が、代謝に密接に関係することが示した。また、供試した何れの品種でも培養液 pH が高いほど Na^+ 吸収が高まり、このことも Na^+ 吸収が代謝に強く影響を受け、かつ細胞内外の pH 差の影響を強く受けることを示した。このため、培養液 pH が低いと細胞内外の pH 差が大きくなり、原形質膜 Na^+/H^+ アンチポーターによる Na^+ 排除が高まると考えられた。このことは、しかしながら、どの pH でも耐塩性品種は感受性品種よりも Na^+ 吸収が低いことが示された。つまり、原形質膜 Na^+/H^+ アンチポーターは、 Na^+ 吸収抑制を通じて、イネの耐塩性に貢献するものの、 Na^+ 吸収の品種間差における影響は比較的小さいと考えられた。

以上のことから、シアン耐性呼吸は、細胞質 pH の制御を通じて Na^+ 吸収抑制に関与するものの、 Na^+ 吸収の品種間差には、細胞内外の pH 差に依存する Na^+ 排出機構以外の要因の影響が大きいことが示唆され、シアン耐性呼吸による Na^+ 吸収抑制効果も比較的小さいと考えられた。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. Nishida R., Y. Hirai and M. Tsuda
Varietal difference in sodium accumulation of rice in different root temperature. 16th International Workshop on Plant Membrane Biology. P174 2013 年 3 月 26-31 日 倉敷芸文館

2. 西田龍太郎, 平井儀彦, 津田誠; 異なる水温におけるイネのナトリウム吸収関連遺伝子座の検出. 日本作物学会紀事別号 233, p180-181 2012 年 3 月 29-30 日 東京農工大学農学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 儀彦 (HIRAI YOSHIHIKO)
岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授
研究者番号: 80263622

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号: