

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580211

研究課題名(和文) マングローブのトリテルペノイド合成をとりまく耐塩性制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Study on the physiological significance of triterpenoid in salt tolerance of mangrove

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、塩ストレス負荷時にマングローブで増加するトリテルペノイドという脂質成分が新規に膜成分として塩分に対する防御機能を担っているのではないかと仮説を検証した。トリテルペノイドはマングローブの種類を問わず塩濃度に応じて増加し、しかも真水にもどすことによりもとの濃度にもどるという可逆的な調節をうけていることが明らかになった。また、酵母の膜のテルペノイド濃度が上がると塩存在下での増殖能が影響されることから、この脂質成分が膜成分として塩耐機能をもっていることが示された。さらに、塩ストレス負荷後の緊急の耐塩機構と連携しながらマングローブにおいて長期的な防御機構として機能している可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study examined our postulate that the triterpenoids function against salt stress as a component of membrane lipid. Concentration of triterpenoid in all mangrove species increased with increasing salt concentration irrespective of salt secretor or non-salt secretor, and returned to the initial level after replacement of the salt water with water. Increasing the membrane concentration of triterpenoid in yeast affected its growth rate under salinity condition which directly proved the physiological significance of triterpenoid in salt tolerance. Furthermore, gene expression analysis suggested that the increased triterpenoid represents the long-term salt tolerance mechanism of mangrove in conjunction with the other short-term adaptation system.

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：マングローブ 耐塩性 トリテルペン バリアー 膜脂質 膜透過性

1. 研究開始当初の背景

これまでマングローブ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様ではなく、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

申請者は、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、塩ストレス負荷時にマングローブで増加するトリテルペノイドは植物ステロールに代わる膜脂質として基本的な防御機能を担っている可能性を初めて指摘してきている。本研究は塩ストレス負荷後のマングローブの耐塩性形質発現を、耐塩性脂質であるトリテルペノイド合成の側面から時系列的に解析・整理することにより、トリテルペノイドの機能及びこれを取り巻く耐塩性制御ネットワークを明らかにし、新規塩ストレス耐性作物の創生ひいては食糧増産等に寄与できる基礎知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

塩分負荷に伴うマングローブのテルペノイド濃度変化及び遺伝子発現に関するデータのさらなる蓄積と耐塩性制御ネットワークを明らかにするため網羅的な遺伝子発現解析を行い、総体的な耐塩機構の解明を試みた。以下の研究を実施した。

(1) 塩分負荷に伴うテルペノイド上昇は塩腺から塩分を排出する塩分泌型のマングローブでも認められるかを検証するために、塩分泌型のヒルギダマシと非分泌型のヤエヤマヒルギを塩水処理し、根及び葉のイソプレノイド濃度及びテルペン合成遺伝子の発現を比較した。

(2) 塩分処理後のテルペン濃度上昇が塩分濃度に依存した可逆的な変化であるかを確認するために、マングローブを塩分につづいて真水で処理した場合のマングローブ根と葉のテルペノイド濃度及び遺伝子発現の変化を追跡した。

(3) 塩分を負荷した後のヤエヤマヒルギ根の経時的な(0、1、3、6、30日)遺伝子発現をギガシーケンサーを用いて網羅的に解析した。

(4) メヒルギのトリテルペノイド合成遺伝子(KcMS)及び植物ステロール合成遺伝子(KcCAS)のプロモーター領域の塩基配列をGenomeWalker Universal Kitを用いて決定した。

4. 研究成果

(1) 塩ストレスが及ぼすヒルギダマシ及び

ヤエヤマヒルギのテルペノイド濃度への影響。本研究においては塩腺から塩分を排出する塩分泌型のマングローブとしてヒルギダマシ、非分泌型のマングローブとしてヤエヤマヒルギを用いて、テルペノイド濃度及びテルペン合成遺伝子発現に及ぼす影響を検討した(表1及び2)。

Table 1. Effect of salinity on the isoprenoid content of *A. marina* root

Isoprenoids	Content ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )					
	0% (n=5)	0.5% (n=5)	1.5% (n=5)	2.0% (n=5)	3.0% (n=4)	
Phytosterols	Campesterol	2.8±0.5	9.8±1.0 <sup>a</sup>	8.0±1.0 <sup>a</sup>	11.9±1.7 <sup>a</sup>	12.4±0.8 <sup>a</sup>
	Stigmasterol	16.7±3.0	23.3±4.5	28.0±2.7	32.0±4.0 <sup>a</sup>	35.5±2.0 <sup>a</sup>
	b-Sitosterol	60.5±3.8	69.2±9.6	72.3±6.8	78.6±1.1	102.1±5.6 <sup>a</sup>
	Total	80.0±6.3	102.3±12.8	108.3±8.7	122.5±6.9 <sup>a</sup>	150.0±11.5 <sup>a</sup>
Triterpenoid	b-Amyrin	3.7±0.6	8.7±0.9	9.7±0.6	15.0±2.4 <sup>a</sup>	17.7±2.5 <sup>a</sup>
	Lupeol	66.1±6.7	71.0±7.5	96.2±7.5 <sup>a</sup>	106.3±4.1 <sup>a</sup>	116.7±6.4 <sup>a</sup>
	a-Amyrin	17.2±3.2	22.8±3.8	26.1±3.1	30.6±4.4 <sup>a</sup>	38.7±2.6 <sup>a</sup>
	Total	87.0±5.4	102.5±9.4	132.0±6.4 <sup>a</sup>	151.9±9.3 <sup>a</sup>	173.1±6.7 <sup>a</sup>
Lanosterol	33.0±3.1	10.8±2.8 <sup>a</sup>	11.6±4.3 <sup>a</sup>	9.1±1.1 <sup>a</sup>	9.6±1.1 <sup>a</sup>	

Data are represented as the means ± SE.

<sup>a</sup>Significantly different from 0% at P < 0.05 using Dunnett's test

Table 2. Effect of salinity on the isoprenoid content of *A. marina* leaf

Isoprenoids	Content ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )					
	0% (n=4)	0.5% (n=4)	1.5% (n=4)	2.0% (n=5)	3.0% (n=5)	
Phytosterols	Campesterol	3.5±0.9	1.5±0.2	3.4±0.8	3.0±0.2	3.9±0.8
	Stigmasterol	6.8±0.7	12.4±0.6	13.5±2.5	16.5±2.3 <sup>a</sup>	19.6±1.3 <sup>a</sup>
	b-Sitosterol	25.4±1.9	37.4±4.1	40.5±5.7	57.3±6.7 <sup>a</sup>	65.3±5.2 <sup>a</sup>
	Total	35.7±3.1	51.3±3.9	57.4±3.9	76.8±9.3 <sup>a</sup>	88.8±6.3 <sup>a</sup>
Triterpenoid	b-Amyrin	2.6±0.1	3.9±0.4	10.4±2.7 <sup>a</sup>	19.3±0.7 <sup>a</sup>	20.9±1.8 <sup>a</sup>
	Lupeol	59.1±4.6	74.6±6.3	82.7±9.3	91.9±6.8 <sup>a</sup>	101.1±6.4 <sup>a</sup>
	a-Amyrin	4.5±0.5	5.0±0.4	6.4±1.3	15.5±1.1 <sup>a</sup>	20.6±1.6 <sup>a</sup>
	Total	66.2±4.7	83.5±6.1	99.5±11.5 <sup>a</sup>	126.7±6.9 <sup>a</sup>	142.6±6.1 <sup>a</sup>
Lanosterol	3.8±0.9	1.2±0.3	4.8±2.0	4.4±1.1	5.0±1.4	

Data are represented as the means ± SE.

<sup>a</sup>Significantly different from 0% at P < 0.05 using Dunnett's test

塩分濃度の増加に伴い、塩分泌型のマングローブであるヒルギダマシの根及び葉においてテルペン濃度は上昇した。植物ステロール濃度も同様の傾向にあった。

同様の実験をヤエヤマヒルギについても行った(表3、4)。

Table 3. Effect of salinity on the isoprenoid content of *R. stylosa* root

Isoprenoids	Content ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )					
	0% (n=3)	0.5% (n=5)	1.5% (n=5)	2.0% (n=5)	3.0% (n=5)	
Phytosterols	Campesterol	5.7±2.3 <sup>a</sup>	17.6±0.8 <sup>a</sup>	18.9±0.4 <sup>a</sup>	19.1±1.6 <sup>a</sup>	25.6±1.3 <sup>a</sup>
	Stigmasterol	27.6±2.0	56.5±3.0 <sup>a</sup>	49.4±3.2 <sup>a</sup>	41.3±3.6	51.4±1.9 <sup>a</sup>
	b-Sitosterol	45.7±2.6	53.0±3.8	63.1±4.2 <sup>a</sup>	63.5±3.4 <sup>a</sup>	87.7±2.3 <sup>a</sup>
	Total	79.0±3.6	127.1±6.9 <sup>a</sup>	131.4±6.8 <sup>a</sup>	123.9±8.4 <sup>a</sup>	164.7±5.0 <sup>a</sup>
Triterpenoid	Taraxerol	11.5±2.6	12.1±1.8	14.0±1.7	14.4±1.3	18.9±0.8 <sup>a</sup>
	Germanicol	12.6±0.6	14.9±1.0	15.1±1.3	15.8±0.8	17.6±1.2 <sup>a</sup>
	b-Amyrin	14.4±1.4	20.8±2.3	36.8±1.1 <sup>a</sup>	38.8±1.4 <sup>a</sup>	49.3±1.8 <sup>a</sup>
	Lupenone	3.5±1.3	3.2±1.1	3.1±1.3	0.6±0.3	2.6±1.5
	Lupeol	4.1±0.8	6.7±0.7	9.0±2.6 <sup>a</sup>	9.9±1.1 <sup>a</sup>	10.6±0.5 <sup>a</sup>
	a-Amyrin	11.4±2.8	18.4±1.0 <sup>a</sup>	19.7±0.4 <sup>a</sup>	22.2±0.7 <sup>a</sup>	27.4±1.8 <sup>a</sup>
	Total	57.5±4.1	76.1±5.1 <sup>a</sup>	97.7±2.4 <sup>a</sup>	101.7±2.2 <sup>a</sup>	126.4±5.6 <sup>a</sup>
Lanosterol	14.8±2.8	16.0±2.4	17.5±4.3	18.5±1.0	20.7±1.2 <sup>a</sup>	
Cyloartenol	2.3±1.0	1.0±0.3	2.1±0.8	0.3±0.2	0.6±0.2	

Data are represented as the means ± SE.

<sup>a</sup>Significantly different from 0% at P < 0.05 using Dunnett's test nd, not detected.

塩分負荷によりヤエヤマヒルギの根及び葉においてもテルペノイド濃度が上昇した。また、植物ステロール濃度も塩濃度に依存して上昇した。メヒルギでは塩ストレスにより葉及び根の植物ステロール濃度は減少、オヒルギにおいては明確な相関は認められていない。このような植物ステロールと塩濃度の

相関はヒルギダマシやヤエヤマヒルギのような比較的耐塩性の高いマングローブに特異な反応であることが考えられた(表3、4)

Table 4. Effect of salinity on the isoprenoid content of *R. stylosa* leaf

Isoprenoids	Content ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )					
	0% (n=5)	0.5% (n=5)	1.5% (n=4)	2.0% (n=5)	3.0% (n=5)	
Phytosterols	Campesterol	1.5±0.1	1.8±0.5	1.9±0.2	2.3±0.5	4.2±1.0 <sup>a</sup>
	Stigmasterol	2.0±0.5	3.4±1.0	2.9±0.4	3.8±0.5	5.8±1.7 <sup>a</sup>
	b-Sitosterol	12.8±0.5	20.7±4.3	19.5±2.3	25.9±3.8 <sup>a</sup>	32.5±3.1 <sup>a</sup>
	Total	16.3±0.9	25.9±6.0	24.3±3.2	32.0±4.6	42.5±5.2 <sup>a</sup>
	Triterpenoid	Taraxerol	34.4±1.0	36.3±3.5	41.3±0.6	42.2±2.0
Germanicol		nd	nd	nd	nd	nd
b-Amyrin		36.7±1.7	56.2±3.6 <sup>a</sup>	75.2±2.3 <sup>a</sup>	88.0±0.7 <sup>a</sup>	90.9±4.5 <sup>a</sup>
Lupenone		nd	nd	nd	nd	nd
Lupeol		3.0±0.4	3.2±0.5	3.6±0.3	4.1±0.4	5.2±1.3
$\alpha$ -Amyrin		2.5±0.2	3.2±0.6	4.0±0.2	4.5±0.5	6.9±1.5 <sup>a</sup>
Total		76.6±1.6	98.9±4.3 <sup>a</sup>	124.1±2.4 <sup>a</sup>	138.8±2.3 <sup>a</sup>	155.5±3.8 <sup>a</sup>
Lanosterol		4.5±0.6	5.0±0.6	7.0±0.3	9.3±1.1 <sup>a</sup>	11.7±1.3 <sup>a</sup>
Cycloartenol	1.1±0.3	0.9±0.3	0.5±0.1	0.6±0.0	2.5±1.5	

Data are represented as the means  $\pm$  SE.

<sup>a</sup>Significantly different from 0% at  $P < 0.05$  using Dunnett's test  
nd, not detected.

表5にテルペン及び植物ステロールと塩濃度の相関係数を示す。殆どのテルペンが塩濃度に対して同程度に強く相関しているのに対し、植物ステロールでは -シトステロールの相関が他よりも高い傾向にあった。

Table 5. Correlation coefficient between salt concentration and isoprenoid component in the root and leaf of mangrove trees.

Isoprenoids	<i>A. marina</i>		<i>R. stylosa</i>	
	Root	Leaf	Root	Leaf
Campesterol	0.82	0.55	0.86	0.89*
Stigmasterol	0.90*	0.89*	0.42	0.89*
b-Sitosterol	0.91*	0.92*	0.94*	0.94*
Lanosterol	-0.71	0.57	0.64	0.83
Taraxerol	nd	nd	0.98*	0.97*
Germanicol	nd	nd	0.94*	nd
b-Amyrin	0.96*	0.93*	0.99*	0.95*
Cycloartenol	nd	nd	-0.59	0.53
Lupenone	nd	nd	-0.54	nd
Lupeol	0.97*	0.90*	0.95*	0.97*
$\alpha$ -Amyrin	0.91*	0.88*	0.96*	0.97*

Correlation coefficient in this study was calculated using Excel 2000 for Windows.  
nd, not detected. \*Statistically significant at  $P < 0.05$  using Student's t-test.

次いで、ヤエヤマヒルギの根と葉におけるテルペン (RsM1、RsM2) 及び植物ステロール合成酵素 (RcCAS) の遺伝子発現を調べた(図1、2)

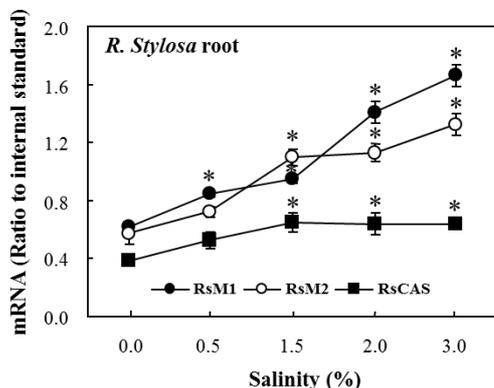


Fig. 1 ヤエヤマヒルギ根における遺伝子発現

塩分濃度に比例して、根のテルペン合成酵素遺伝子の発現は上昇した。植物ステロール合成酵素遺伝子の発現も 1.5%までは塩濃度に比例して上昇したが、以降はプラトーに達

した。

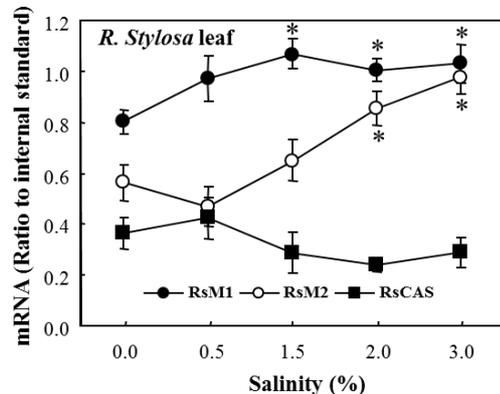


Fig. 2 ヤエヤマヒルギ葉における遺伝子発現

葉においては、テルペン合成酵素 RsM1 は 1.5%塩濃度まで発現は上昇し、以降プラトーであったが、RsM2 は 3%まで塩濃度に比例して上昇した。

植物ステロール合成酵素 RcCAS は塩濃度に依存して低下した。

沖縄の代表的なマングローブ4種 (*B. gymnorrhiza* オヒルギ、*K. candel* メヒルギ、*R. stylosa* ヤエヤマヒルギ、*A. marina* ヒルギダマシ) の根のテルペノイド濃度に及ぼすテルペノイドの影響を図3にまとめた(図3)

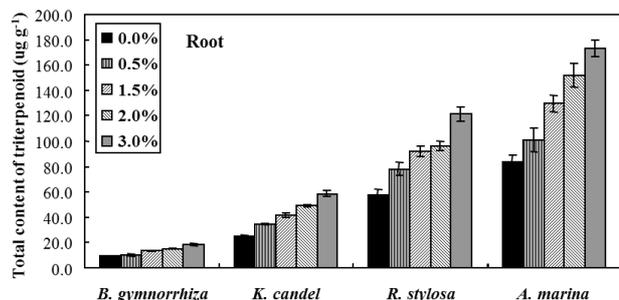


Fig. 3 マングローブ根のテルペノイド濃度

塩分泌の如何を問わず、塩ストレスにより根のテルペノイド濃度は上昇した。また、耐塩性の高いマングローブ程基底レベルのテルペン濃度が高いことも明らかになった。

(2) 塩処理に伴うテルペン濃度上昇が可逆的な変化であるかを検討した。

オヒルギ及びメヒルギを異なる塩濃度条件下で4か月間栽培した後、塩水を真水に置き換えてさらに4か月間維持した。

図4に塩水で4か月間栽培した後、これを真水に置き換えて塩ストレスを解除した場合(白カラム)と継続的に塩ストレスを負荷した場合のオヒルギとメヒルギの根のテルペノイド濃度を示す(図4、5)

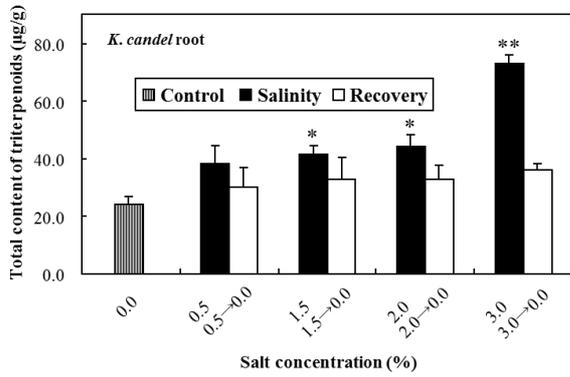


Fig. 4 塩ストレスを継続負荷或いは解除後のメヒルギ根のテルペノイド濃度

これまでの結果同様、塩濃度依存的にメヒルギ根のテルペノイド濃度は上昇した。この上昇は塩水を真水に置き換えることにより、もとのレベルまで低下した。

類似の実験をオヒルギについて行った。オヒルギについても、塩分の増減に応じて根のテルペノイド濃度は変動した。しかしながら、塩分濃度が高い(2%もしくは3%)場合、塩水を真水に置き換えても真水のみで継続栽培した根のレベルまでは低下しなかった。また、植物ステロール濃度についても検討したが、塩濃度依存的な変動は観察されなかった。

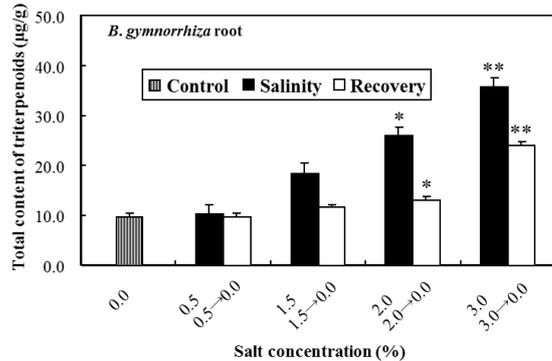


Fig. 5 塩ストレスを継続負荷或いは解除後のオヒルギ根のテルペノイド濃度

メヒルギ根のテルペン合成酵素遺伝子発現を検討した(図6)

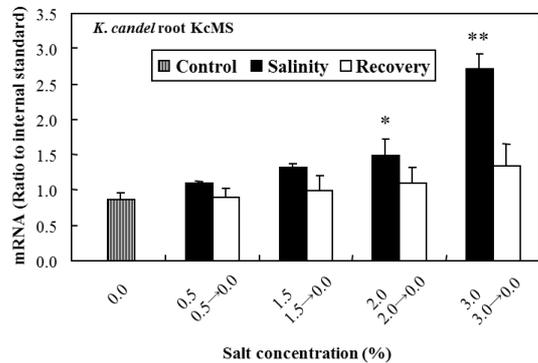


Fig. 6 塩ストレスを継続負荷或いは解除後のメヒルギ根のテルペノイド合成酵素遺伝子発現

メヒルギ根のテルペン合成酵素遺伝子発現のパターンはテルペノイド濃度に類似していた。

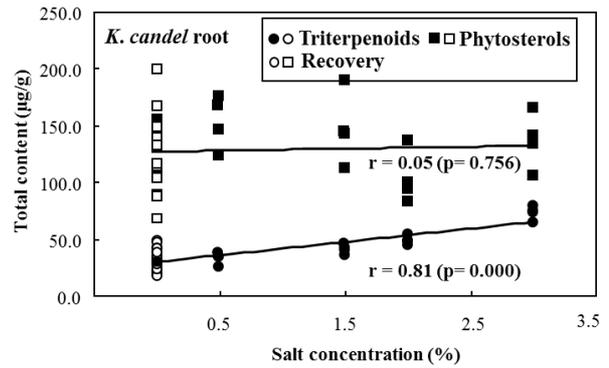
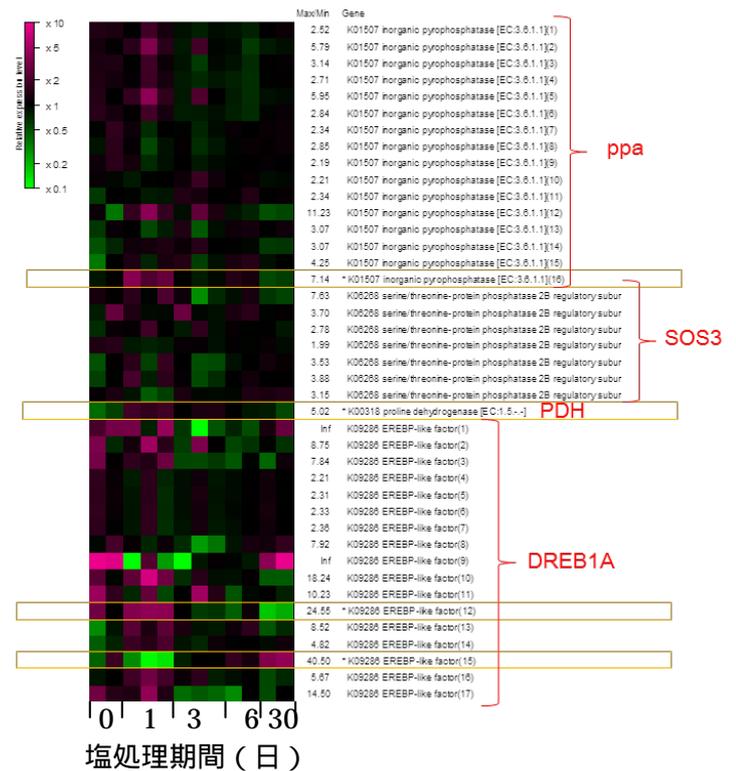


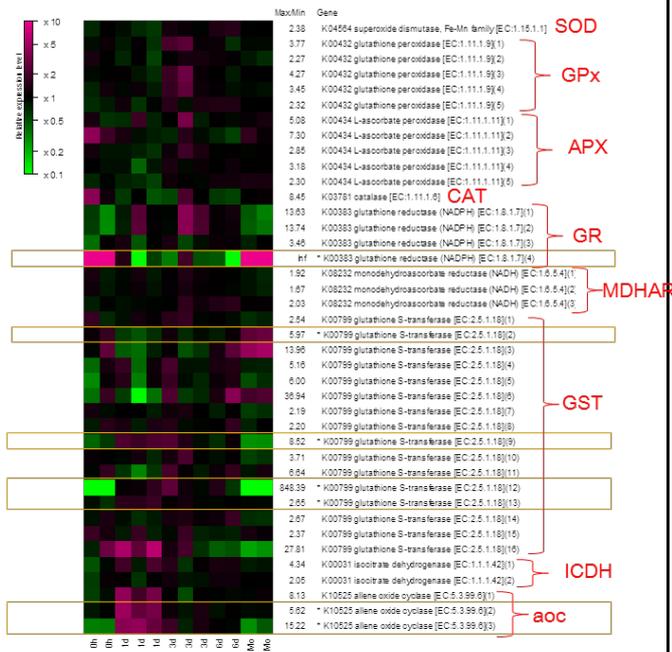
Fig. 7 塩濃度の増減に伴うメヒルギ根のテルペノイド濃度と塩濃度の相関

図7に示すように、塩濃度の増減に応じてメヒルギ根のテルペノイド濃度も変動し、塩ストレス依存的にテルペノイド濃度が制御されていることが示された。オヒルギ根についても同様の結果が得られた。

(3) 塩分を負荷した後のヤエヤマヒルギ根の経時的な(0, 1, 3, 6, 30日)遺伝子発現をギガシーケンサーを用いて網羅的に解析した(図8-1)。既に耐塩性とのかかわりが明らかになっている因子に絞って経日的な変動を解析した。



⇒次ページへつづく



Salinity increases the triterpenoid content of a salt secretor and anon-salt secretor mangrove. *Aquat Bot* 97, 17-23 (2012). (査読有り)

- (5) 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.* 29, 533-543 (2011). (査読有り)

〔学会発表〕(計1件)

- (1) M. Basyuni, S. Baba, H. Oku.  
Characterization of triterpenoid biosynthesis from mangrove plants and its relevance to salt tolerance. 2011 Indonesian-American Kavli Frontiers of Science, 9-11 Juli 2011, Novotel Hotel Bogor.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 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

### (3) 連携研究者

Mohammad Basyuni

琉球大学外国人客員研究員(北スマトラ大学講師)