

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450087

研究課題名(和文)細胞壁のホウ酸架橋率を指標とした作物のホウ素欠乏診断法の開発

研究課題名(英文)Development of a diagnostic method for boron deficiency in plants using borate cross-linking ratio of pectin in cell walls as an index

研究代表者

松永 俊朗 (MATSUNAGA, Toshiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター土壌肥料研究領域・上席研究員

研究者番号：20355647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年では、植物の必須微量元素であるホウ素の主な機能は、細胞壁ペクチンのホウ酸架橋による細胞壁構造の安定化であることが広く認められている。このホウ酸架橋率を指標とする、迅速・的確な作物のホウ素欠乏診断法の開発を試みた。まず、ホウ素欠乏により黒変障害が起きた鹿児島県農家圃場のソラマメ莢を対象試料として用いて、本診断法が現場作物に適用可能であることを示した。そして、外観症状からホウ素欠乏が疑われる各種作物に対して、本診断法を適用し、ホウ素欠乏判定基準を取りまとめた。

研究成果の概要(英文)：The function of boron in plants is nowadays well established to be the stabilization of cell walls by borate cross-linking of wall pectin. We attempted to develop a diagnostic method for boron deficiency in plants using the borate cross-linking ratio of pectin as an index. Recently, blackening disorder of broad bean pods caused by boron deficiency was observed in farmers' fields in Kagoshima prefecture, Japan. We used the affected broad bean plants as samples to demonstrate the usefulness of the method of diagnosis for boron deficiency occurred in fields. Then we applied the diagnostic method to several crops on which boron deficiency was suspected from the symptom, and finally proposed diagnostic criteria for boron deficiency.

研究分野：土壌肥料学

キーワード：ホウ素欠乏診断 ホウ酸架橋率 植物細胞壁 ペクチン ラムノガラクトuronan

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ホウ素は、植物の必須微量元素の一つであり、作物のホウ素欠乏は、世界的には砂質土壌やアルカリ性土壌で起こりやすい。わが国では、土壌中のホウ酸が降水により溶脱しやすいことから、降水量の多い西南暖地でホウ素欠乏症の発生が多く報告されている。

(2) ホウ素欠乏の作物栄養診断法としては、これまで①外観症状による診断、および②葉などのホウ素含量分析による診断が知られている。①は、既知のホウ素欠乏症状と比較する方法だが、他の原因による類似症状との見分けが難しく、また症状が現れない潜在的欠乏には対応できない。②は、欠乏が疑われる植物体のホウ素含量を分析し、予め求めておいた欠乏限界ホウ素含量あるいは健全な植物体のホウ素含量と比較する方法である。しかし、作物種や部位ごとに大きく異なる欠乏限界ホウ素含量を求めておくことは容易ではないし、また健全な植物体よりホウ素含量が少ないからといってホウ素欠乏とは限らない。このように、これまでのホウ素欠乏診断法には、不十分な面が多く残されている。

(3) 一方、一部の必須元素については、①と②の他に、その元素の生化学的機能にもとづく診断法が知られている。この生化学的診断は、植物体内における必須元素の分子レベルでの機能や動態にもとづく診断であり、精度が高い。例えば鉄では、イネ葉身中の2価鉄含量分析による鉄欠乏クロロシス診断が報告されている (Katyal and Sharma, 1980)。しかし、ホウ素に関しては、長らく植物体内での分子レベルでの機能が知られていなかったため、生化学的診断法は開発されていなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 2005年頃までに、ホウ素の植物体内での主な機能は、細胞壁ペクチンのラムノガラクトuronan II (RG-II) 部分を架橋することにより、細胞壁構造を安定化することであることが明らかにされた (例えば、松永・石井, 2005 の総説)。その成果をもとに、我々は、ホウ酸による細胞壁ペクチンの架橋率 (ホウ酸架橋率) がホウ素欠乏の診断指標になるのではないかと考えた。すなわち、ホウ素十分から欠乏限界の場合、ホウ素はペクチン架橋部位の全てと結合しホウ酸架橋率は1.0となり、余分なホウ素は水溶性として蓄積する。それに対して、ホウ素欠乏の場合は、ホウ素は架橋部位の一部としか結合できず、その分、ホウ酸架橋率は0.5など1より小さな値をとる。したがって、ホウ酸架橋率の値からホウ素欠乏の有無や欠乏度合を診断できるというものである。

(2) 実際に、カボチャ幼植物を培地中ホウ素濃度を変えて水耕栽培し、ホウ酸架橋率を求

めた結果、ホウ酸架橋率は、ホウ素十分条件では0.9程度であったのに対して、ホウ素欠乏条件では0.4以下となり、ホウ素欠乏の診断指標としてのホウ酸架橋率の可能性が示された (Matsunaga and Ishii, 2006)。しかしながら、ホウ酸架橋率を指標とするホウ素欠乏診断法が、実際に農家圃場で栽培されている作物に対して、適用可能であるかについての検証は、未だ行われていなかった。

そこで、以下の点を目的として、本研究を行った。

① ホウ酸架橋率を指標とするホウ素欠乏診断法について、農業現場でホウ素欠乏により発生した黒変障害ソラマメへの適用性を検証する。さらに、本診断法が、外観症状からホウ素欠乏が疑われる各種作物のホウ素欠乏診断に適用可能であるかどうかを調べ、作物のホウ素欠乏を精確に判定できる診断法を開発する。

② 各種の作物試料を対象にしてホウ酸架橋率分析を行っていく中で見出される分析上の問題点を解決していくことを通じて、より簡便なホウ酸架橋率の分析プロトコールを作成する。

## 3. 研究の方法

### (1) 作物体試料

ソラマメの黒変障害が発生する鹿児島県阿久根地域で、障害発生5圃場から健全、軽症および重症莢試料、障害無発生2圃場から健全莢試料を各3点採取した。また、障害が発生しない指宿2圃場から健全試料を採取した。凍結乾燥後、各莢ごとに、生育が比較的良好な子実1粒を微粉碎し、分析試料とした。また、外観症状からホウ素欠乏が疑われた各種作物 (ハクサイ、スナップエンドウ、サツマイモなど) について、分析試料とした。

### (2) 全ホウ素、水溶性ホウ素およびホウ酸架橋率の分析

作物体を硝酸分解し、全ホウ素分析試料とし、また、作物体試料を水抽出し、上清を水溶性ホウ素分析試料とし、それら試料のホウ素濃度を、ICP質量分析により定量した。

水抽出残渣をエタノール (99.5) : 水 (4:1, v/v) (2回)、エタノール (99.5)、クロロホルム:メタノール (1:1, v/v)、アセトン、水 (2回) の順で遠心洗浄して、粗細胞壁試料とした。その試料を0.1M NaOHでケン化後、エンドポリガラクトuronase (EPG) 処理して、得られたホウ酸架橋されたRG-II (分子量  $10 \times 10^3$ ) と単量体のRG-II (分子量  $5 \times 10^3$ ) をサイズ排除HPLCにより分離分析した。

### (3) ホウ酸架橋率分析法の簡便化

作物体乾燥法などの分析操作条件について、より簡便な手順に変更して、ホウ酸架橋率を分析し従来の手順による分析結果と比較した。また、細胞壁標準試料の候補として、市販のアップルファイバーについて検討し

た。そして、得られた結果をもとに、「ホウ酸架橋率分析法プロトコール」を取りまとめた。

#### 4. 研究成果

(1) 現地圃場から採取した黒変障害ソラマメ子実の細胞壁をペクチン分解酵素 EPG で処理し、得られたホウ酸架橋 RG-II と非架橋 RG-II をサイズ排除高速液体クロマトグラフィーにより分離分析し、架橋率を求めた。その結果、ソラマメ子実のホウ酸架橋率は、障害無発生圃の健全試料で  $0.96 \pm 0.01$ 、障害発生圃の障害無し試料で  $0.93 \pm 0.05$ 、軽症試料で  $0.73 \pm 0.18$ 、重症試料で  $0.49 \pm 0.09$  であった (図 1)。すなわち架橋率は、ホウ素十分ではほぼ 1.0 であったが、ホウ素欠乏により小さくなり、欠乏程度が大きくなるにつれて 0.5 程度まで低下した。この結果は、ホウ酸架橋率が 0.9 程度の値より小さい場合はホウ素欠乏であること、およびその値が小さいほどホウ素欠乏の程度が大きいことを示している。このように、黒変障害ソラマメを対象試料として、ホウ酸架橋率を指標とするホウ素欠乏診断法の現場適用性を実証することができた。

なお、この成果の詳細については、松永・樗木 (2014) を参照されたい。

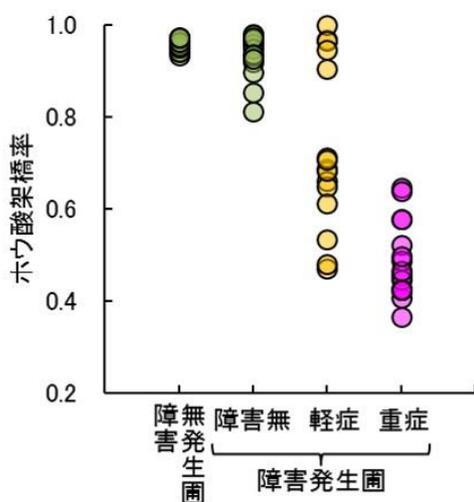


図 1 黒変障害ソラマメ子実のホウ酸架橋率 (松永, 2015)

(2) 外観症状からホウ素欠乏が疑われた各種作物に、ホウ酸架橋率を指標とするホウ素欠乏診断法を適用した。その一例を表 1 に示したが、ハクサイでは、障害葉と健全葉とで、全ホウ素含量に差は見られず、かつどちらにも水溶性ホウ素含量は一定量含まれ、ホウ酸架橋率は 0.9 以上であった。したがって、この生理障害ハクサイはホウ素欠乏ではなく、生理障害の原因はそれ以外と診断できた。一方、スナップエンドウでは、障害葉の全ホウ素含量は健全葉に比べて少なく、水溶性ホウ

素含量は 0 に近く、ホウ酸架橋率は 0.45 と小さかった。したがって、この生理障害スナップエンドウはホウ素欠乏であると診断できた。

表 1 ホウ素(B)欠乏が疑われた作物のホウ素欠乏診断

作物	症状	全B	水溶性B	ホウ酸	診断結果
		含量	含量	架橋率	
		mg/kg	mg/kg		
ハクサイ	葉の縮れ	19.7	5.5	0.94	B十分
	なし	20.5	7.5	0.95	B十分
スナップエンドウ	花振るいで無着莢	4.2	0.2	0.45	B欠乏
	なし	12.2	6.2	0.89	B十分

\* 分析部位は葉

このように、ホウ素欠乏が疑われた様々な現場作物のホウ酸架橋率は、健全試料ではほぼ 1.0 であった。一方、障害試料では 0.5 程度まで低下している場合と、ほぼ 1.0 の場合があり、前者はホウ素欠乏であり、後者はホウ素欠乏ではないと診断した。

これらの結果をもとに、表 2 にホウ素欠乏診断基準を取りまとめた。

表 2 ホウ素(B)欠乏診断基準

ホウ酸架橋率	水溶性B含量	診断結果
0.9 - 1.0	~1mg/kg以上	十分
0.9 - 1.0	~1mg/kg以下	欠乏限界
~0.8	~1mg/kg以下	軽い欠乏
⇕		⇕
~0.3		重い欠乏

(3) ホウ酸架橋率分析手順を、より簡便化するために、作物乾燥操作について、凍結乾燥と 70℃ 通風乾燥とを比較した結果、ホウ酸架橋率分析値に差はなかった。また、特別管理物質、劇物の使用を避けるために、細胞壁調製時のクロロホルム：メタノール抽出の省略、および廃液処理をより簡単にするために、HPLC 溶離液の 0.2M ギ酸アンモニウムの 0.2M 塩化ナトリウムへの変更を行っても、ホウ酸架橋率分析値に差はなかった。

市販のアップルファイバーは、そのまま細胞壁試料として用いることで、ホウ酸架橋 RG-II の標準として使用可能であった。また塩酸処理することにより単量体 RG-II の標準として、使用可能であった (図 2)。

これらの結果をもとに、以下に「ホウ酸架橋率分析法プロトコール」を取りまとめた。

#### 「ホウ酸架橋率分析法プロトコール」

##### ① 細胞壁試料

##### ①-1 細胞壁調製

a) 植物体を凍結乾燥または通風乾燥 (70℃ 程度) 後、微粉碎する。

b) 試料約 20mg を精秤し 1.5 mL チューブに入れ、水 1000  $\mu$ L を加え 1 時間往復振とう後、遠心分離する。上清 700  $\mu$ L を 15mL 遠沈管にとり、上清の残りは捨てる。15mL 遠沈管に水 6.3mL を加えて 10 倍希釈して、冷蔵保存し、水溶性 B 含量分析用の試料溶液とする。水溶性 B 含量を分析しない場合は、水抽出操作は省略可能である。

c) 水抽出残渣に、エタノール (99.5) : 水 (4:1, v/v) 800  $\mu$ L を加え往復振とう (20 分) 後、遠心分離して上清を捨て、残渣を得る。この操作をさらにエタノール (99.5) : 水 (4:1, v/v)、エタノール (99.5)、アセトン、水 (2 回) の順で繰り返して (水処理では、往復振とうは不要)、粗細胞壁とし、冷蔵または冷凍保存する。

#### ①-2 細胞壁の標準試料

a) 健康食品として市販されている「アップルファイバー」は、ほぼ細胞壁からなり、標準試料として使用できる。

b) ホウ酸架橋された RG-II の標準：アップルファイバー 20mg 程度を 1.5 mL チューブに入れ、以下の EPG 処理を行う。

c) 単量体の RG-II の標準：アップルファイバー 20mg 程度を 1.5 mL チューブに入れ、0.1M HCl を 1000 $\mu$ L 加え 30 $^{\circ}$ C 1 時間処理し、ホウ酸架橋された RG-II を加水分解する。次に、遠心分離して上清を捨て、残渣に冷 0.1M 水酸化ナトリウム 1000  $\mu$ L を加え攪拌後、直ちに遠心分離し、上清を捨てる。この残渣に、以下の EPG 処理を行う。

#### ② EPG 処理

##### ②-1 ストック EPG 溶液の調製

a) endo-Polygalacturonanase (Megazyme 社) を、マイクロピペットで透析チューブに移し入れ、残りを冷水で透析チューブに洗いこむ。4 $^{\circ}$ C で 50mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH5.0) 1L に対して、一昼夜、透析する。途中で、バッファーを 1 回交換する。なお、この透析は、EPG 試薬溶液中の硫酸を除くためである。

b) 透析後、透析チューブ内の EPG 溶液を適当な容器に洗いこみ、およその液量を求めた後、0.5mL チューブに 100 $\mu$ L 程度ずつ分注し、冷凍保存する (-25 $^{\circ}$ C で数年以上保存可)。EPG 試薬の活性含量が 5,000 Units で、EPG 溶液量が 6mL となった場合の活性は 0.83U/ $\mu$ L となる。

##### ②-2 細胞壁の EPG 処理

a) 粗細胞壁試料が入っている 1.5 mL チューブに、冷 0.1M 水酸化ナトリウム 1000  $\mu$ L を加え、攪拌後、冷蔵庫内で (~4  $^{\circ}$ C)、4 時間ケン化処理を行う。

b) 処理後、酢酸 : 水 (1:9, v/v) 70  $\mu$ L を加えて中和し、遠心分離して上清を捨て残渣を得る。酢酸緩衝液 (4 $^{\circ}$ C、0.1M 水酸化ナトリ

ウムと酢酸 : 水 (1:9, v/v) を 100:7 の割合で混合) 800 $\mu$ L を加え攪拌する。

c) 解凍したストック EPG 溶液を 2.5U 程度 (0.8U/ $\mu$ L の場合 3  $\mu$ L) 加え、5  $^{\circ}$ C で (35 $^{\circ}$ C 等ではホウ酸架橋された RG-II の一部が分解する可能性がある)、一晚、インキュベートする。EPG 溶液は、解凍後 1 カ月は使用可能である。

d) EPG 処理後、遠心分離し、上清を 0.45 $\mu$ m フィルターでろ過して、HPLC 試料管に入れる。

#### ③ HPLC 測定

a) ホウ酸架橋された RG-II (分子量  $10 \times 10^3$ ) と単量体の RG-II (分子量  $5 \times 10^3$ ) をサイズ排除 HPLC により分離分析する。サイズ排除カラムには、充填剤によりシリカ系、ポリマー系、多糖系 (アガロース、デキストラン等) があり、これらカラムは、これまで RG-II の分離分析に用いられている。我々は、高分離能で測定時間が短く、かつ比較的安価で使いやすい YMC Diol-120 (シリカゲル系、 $8 \times 300$  mm) を用いている。溶離液は 0.2M NaCl、流速は 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$  で、試料注入量は 100  $\mu$ L 程度 (適宜増減) である。

b) 検出には、示差屈折率計を用いる。ホウ酸架橋率は、架橋された RG-II のピーク面積の全 RG-II (架橋 RG-II と単量体 RG-II) のピーク面積に対する比として計算して求める。架橋 RG-II と単量体 RG-II のピークがベースライン分離しない場合は、垂直分割などして各ピーク面積を求める。

図 2 に、例として、アップルファイバー試料のサイズ排除クロマトグラムを示す。

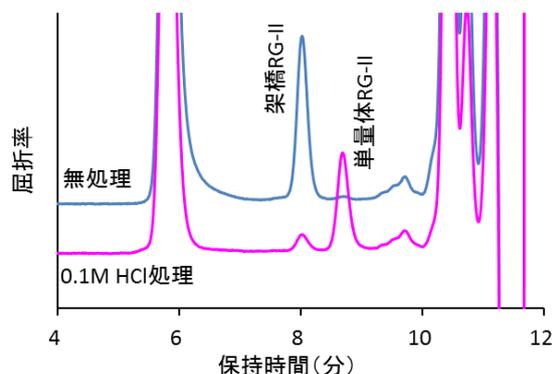


図 2 アップルファイバーの EPG 処理液のサイズ排除 HPLC クロマトグラム

(4) 以上を要約すると、近年では、植物の必須微量元素であるホウ素の主な機能は、細胞壁ペクチンのホウ酸架橋による細胞壁構造の安定化であることが広く認められている。そこで、本研究では、このホウ酸架橋率を指標とする、簡便・精確な作物のホウ素欠乏診断法の開発を試みた。

その結果、まず、ホウ素欠乏により黒変障害が起きた鹿児島県農家圃場のソラマメ莢を対象試料として用いて、本診断法が現場作

物に適用可能であることを示した。そして、外観症状からホウ素欠乏が疑われる各種作物に対して、本診断法を適用し、ホウ素欠乏判定基準を取りまとめた。さらに、よりてきなホウ酸架橋率の分析プロトコールを作成した。

農業現場では、様々な作物生理障害が発生するが、内部黒変など何らかの外観症状がある場合は、ホウ素欠乏が疑われることが多い。そのような作物に本診断法を適用することで、ホウ素欠乏であることが判明すれば、ホウ素肥料の葉面散布・施用など適切な対策をとればよい。一方、ホウ素欠乏でないことが判明すれば、他の原因を探ればよい。

また、本研究で開発した診断法は、細胞壁ペクチンのホウ酸架橋による細胞壁の構造安定化という、植物におけるホウ素の普遍的な機能にもとづいている。そのため、本診断法は、作物種や栽培地域を問わず広く世界的に適用可能であり、今後の普及を期待したい。

#### <引用文献>

- ①Katyal, J. C., and Sharma, B. D., A new technique of plant analysis to resolve iron chlorosis., *Plant and Soil*, 55, 105-119 (1980)
- ②松永俊朗、石井忠、植物におけるホウ素必須性の機構と進化的起源、日本土壤肥料学雑誌、76, 223-228 (2005)
- ③Matsunaga, T., and Ishii, T., Borate cross-linked / total rhamnogalacturonan II ratio in cell walls for the biochemical diagnosis of boron deficiency in hydroponically grown pumpkin, *Anal. Sci.*, 22, 1125-1127 (2006)
- ④松永俊朗、樗木直也、細胞壁ペクチンのホウ酸架橋率を指標とする農家圃場ソラマメのホウ素欠乏診断、日本土壤肥料学雑誌、85, 453-457 (2014)
- ⑤松永俊朗、細胞壁ペクチンのホウ酸架橋率は植物のホウ素欠乏の有用な診断指標となる、化学と生物、53, 812-814 (2015)

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文] (計 2件)

- ①松永 俊朗、細胞壁ペクチンのホウ酸架橋率は植物のホウ素欠乏の有用な診断指標となる、化学と生物、査読無、53 巻、812-814 (2015)
- ②松永 俊朗、樗木 直也、細胞壁ペクチンのホウ酸架橋率を指標とする農家圃場ソラマメのホウ素欠乏診断、日本土壤肥料学雑誌、査読有、85 巻、453-457 (2014)

##### [学会発表] (計 1件)

- ①松永 俊朗、樗木 直也、細胞壁ペクチンのホウ酸架橋率を指標とする作物のホウ素欠乏診断法、日本土壤肥料学会 2015 年度京都

大会、2015 年 9 月 9-11 日、京都大学吉田南総合館 (京都府・京都市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松永 俊朗 (MATSUNAGA, Toshiro)  
農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター土壌肥料研究領域・上席研究員  
研究者番号： 20355647

##### (2) 研究分担者

樗木 直也 (CHISHAKI, Naoya)  
鹿児島大学・農学部・准教授  
研究者番号： 60244266