

平成30年6月6日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14637

研究課題名(和文) 高等植物における好塩性の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of halophily in higher plant

研究代表者

東江 栄 (Agarie, Sakae)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：50304879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：塩生植物は一般の作物が枯死するNaCl条件下で成長が促進される。この好塩性のメカニズムを、アイスプラントの懸濁細胞を用いて調べた。細胞の分裂及び肥大両方にNaClの効果がみられた。細胞分裂関連遺伝子B2型サイクリン依存性キナーゼ、イオン輸送関連遺伝子のカチオントランスポーターMcHKT1、液胞H<sup>+</sup>-ATPaseのVmac1、及び液胞Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターMcNHX1等の発現量がNaCl処理で増加した。また、ミトコンドリアのATP合成がNaClによって促進された。これらの成果はNaClを積極的に活用する新しい耐塩性作物の作出にとって重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：A halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* L. enhances their growth under salinity condition that cause other plants to die. To elucidate the mechanism of the phenomena called halophily, we analyzed the growth response of suspension cultured cells grown in the medium containing NaCl. The salt promoted cell growth was associated with the intercellular accumulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. The expression of cation transporter McHKT1, vacuole H<sup>+</sup>-ATPase Vmac1, and vacuole Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter McNHX1 was induced with NaCl treatment. The cell cycle-synchronized cells also showed a significant increase in the activity of cell division and the expression of gene of B2 cyclin dependent kinase was induced under salinity condition. In addition, ATP synthesis of mitochondria increased up to 34-61% with increase of salt concentration. These new findings seem to contain important suggestions for the generation of new salt-tolerant crops that actively utilize NaCl.

研究分野：作物学

キーワード：アイスプラント イオン輸送 ATP合成 塩生植物 好塩性 細胞分裂 同調化 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

NaCl は塩害の主要因であり、作物を含む多くの植物は NaCl によって生育が著しく阻害される。しかし、塩生植物のような耐塩性の高い植物の中には、作物の枯死する NaCl 条件下で生育が促進するものがある (図1)。

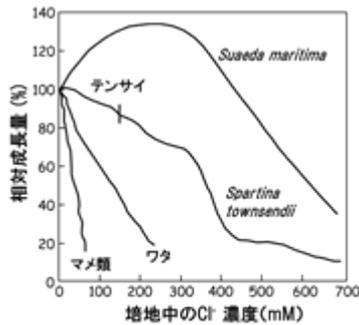


図1. 各種作物の耐塩性 (Greenway and Nunns, 1980より改変).

このような「好塩性」反応はいくつかの種で報告されているが、生理的メカニズムは明らかにされていない。ハマミズナ科のアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) は、海水の約2倍近い濃度の NaCl を含む土壌で生育可能な耐塩性の高い塩生植物で、耐塩性メカニズムを調べるモデル植物として用いられる。申請者が野菜として初めて市場に流通させ、最近では広く認知されるようになった。本種もいくつかの塩生植物と同様に NaCl によって成長が促進され、成長量は 100mM 程度の NaCl で最大となる (図2; 東江, 2004)。塩生植物の *Chenopodium*

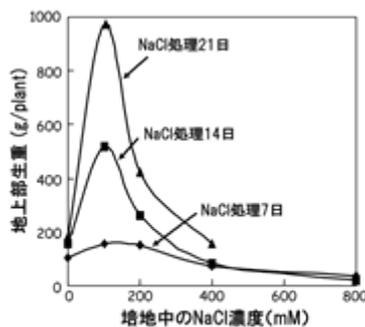


図2. アイスプラントの成長に及ぼす NaCl の影響 (東江, 2004).

*guinoa* Willd.、及び *Sesuviumportu castrum* 等では、好塩性の要因として個葉のイオン含量及び浸透圧調節等が調べられているが、いずれも成長への関与は明確にされていない (Sandro et al., 2006; Wang et al., 2012)。また、イネでは塩及び浸透圧ストレスで ATP 合成酵素である ATP シンターゼをコードする遺伝子の発現量が増加することが示されているが (Zhang et al., 2006) ATP 含量は測定されておらず、詳細は不明である。

申請者は、東北大地震において津波の被害を受けた土壌の除塩を目的に、宮城県及び岩手県の津波被災土壌でアイスプラントを栽培し、NaCl を含む津波被災土壌でより良好に生育することを明らかにした (多田ら,

2012)。NaCl の効果は培養細胞でも観察され、胚軸外植体の成長量は 50-80mM NaCl を含む培地で最大となった (Agarie et al., 2007)。好塩性を作物に付与することができれば、これまでにない高耐塩性作物の作出が可能になり、塩害地域における作物生産性及び除塩効率の向上が期待できると考えられた。

植物組織の大きさは細胞分裂の回数で規定され、成長は細胞分裂の周期から説明できる (図3)。好塩性反応を示す植物では、細

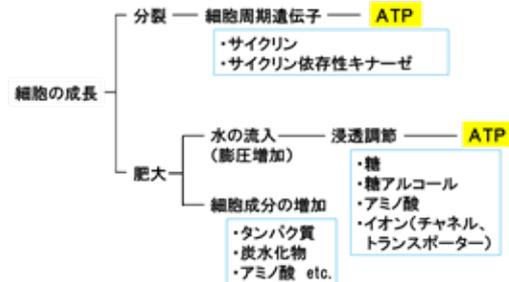


図3. 植物細胞の成長を規定する要因.

胞周期の調整に重要な働きを果たす遺伝子の発現に NaCl が関与していると考えられた。申請者が好塩性の解析に初めて適用した GC/MS によるメタボローム解析では、NaCl 処理に伴い細胞分裂や核酸代謝に関わる中間代謝産物の含量が増加し (東江ら, 2014)、細胞分裂及び核酸代謝に対する NaCl の関与が示唆された。

一方、細胞の肥大は吸水生長であり、細胞外液を液胞内に取り込むことで生じる体積変化とそれに付随する膨圧の増加によって引き起こされる (図3)。吸水成長の原動力となる浸透圧は、ある特定の物質の生成や細胞内への取り込みによって決まる。本研究では、イオンの細胞内への取り込みに関連するトランスポーター及びチャネル等をコードする遺伝子の発現に及ぼす NaCl の関与を明らかにすることを試みた。タバコでは、K<sup>+</sup> が浸透圧調節と同様に細胞周期にも関与していることが示されている。予備試験的に測定した約 20 種類の無機元素のうち、K<sup>+</sup> の含量が Na<sup>+</sup> と Cl<sup>-</sup> の含量と高い正の相関関係にあることを見出した (小西ら, 2014)。K<sup>+</sup> の細胞内への取り込みを促進する NaCl の作用を示すことで、K<sup>+</sup> を介した NaCl の細胞分裂への関与が明確になることが期待された。

細胞周期、イオンの液胞や細胞内への取り込み、浸透調整物質の合成等は、例えば、H<sup>+</sup>-ATPase による H<sup>+</sup> の輸送や関連酵素のリン酸化など、ATP を必要とする反応で制御されている。よって、高塩環境下では ATP 要求量が増加すると考えられる。本研究では異なる NaCl 環境下で栽培したミトコンドリアを単離し、ATP の生成に対する NaCl の作用を明らかにすることを試みた。

これまでの高塩環境下における「生存」を目指した耐塩性研究とは大きく異なり、本研究は NaCl の有効活用による「成長促進」を対象としたものである。先行研究では、光合

成や呼吸等の検討が多く、各器官の相互作用等の影響を排除せずに解析されており、NaClの作用に関する明確な結果が得られなかった。本研究では培養細胞を用い、細胞の成長に対する直接的なNaClの作用を明らかにする。前述したように、高塩環境下では体内のNaClの濃度を適切に保つためにATPの要求量が増加すると考えられる。高NaCl環境下にある塩生植物がATPをどう補填しているのか、かねてから大きな謎であった。高等植物における新しいATP生成機構の存在を明らかにし、NaClを「利用する」耐塩性機構を提示する学術的意義は大きいと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、塩害土壌においても正常に生育する高度耐塩性作物の創出を最終目標に、好塩性の分子機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、細胞の成長を細胞分裂による細胞数の増加と個々の細胞の体積の増加とに分け、それぞれを制御する細胞周期関連遺伝子及び浸透圧調節関連遺伝子の発現に及ぼすNaClの影響を明らかにし、あわせてATP合成に対するNaClの関与を示すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

NaClによる塩生植物の成長促進効果の分子機構を明らかにするために、(1)同調培養系を確立し、(2)細胞分裂及び肥大に及ぼすNaClの影響を確認し、(3)細胞分裂及び細胞肥大関連遺伝子の発現解析を行い、(4)ミトコンドリアにおけるATP合成能に及ぼすNaClの影響を調査する。それぞれの詳細は以下のとおりである。

### (1)同調培養系の確立

細胞分裂に及ぼすNaClの影響を調べるためには細胞分裂を同調させた培養細胞が必要である。しかし、アイスプラントでは同調培養系が確立されていない。ここではまず、細胞分裂S期制御剤であるアフィディコリンによる細胞分裂の同調化を試み、処理濃度及び処理時間等の最適化を検討した。同調化は、S期、G2期、M期及びG1期のマーカー遺伝子であるHistone H4、CDKB1;1、CDKB2;2、KRP2/ICK2等の発現量及び有糸分裂率により評価した。薬剤処理による同調化が難航した場合はリン酸及びショ糖を欠乏させる処理を適用した。

### (2)細胞分裂及び肥大に及ぼすNaClの影響

同調培養した細胞にNaClを50~500 mMの範囲で処理し、各処理区間で成長量を比較した。細胞の数と大きさをあわせて測定し、成長量を増加させる要因を明らかにすることを試みた。細胞数の測定は、セルラーゼ及びペクトリアーゼ等で細胞を処理し、その後、核を4',6-diamidino-2-phenylindole等で染

色して測定した。

### (3)細胞分裂及び細胞肥大関連遺伝子の発現解析

NaCl処理した細胞からRNAを抽出してcDNAを作成し、サイクリン、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)及びその制御因子であるCDK結合タンパク質(CKS)をコードする遺伝子、すなわちCYCA2;1、CYCB1;1、CYCB2;1、CYCD1;1等の発現量を調査する。これらアイスプラントの遺伝子情報はシロイヌナズナの塩基配列情報を元にして取得した。遺伝子の探索は、米国ネバダ大のJohn C. Cushman博士らが構築したデータベースを用いた。これには約30000個の遺伝子のcDNA全長配列データが収納されており、アイスプラントの遺伝子のほぼすべてをカバーする。発現解析は半定量的RT-PCR法で行った。

また、細胞の肥大(吸水成長)に関わる遺伝子については、(3)と同様に取得した情報を基にcDNAを作成し、液胞の浸透圧調節(特にイオン)及び水の取り込みに関与するタンパク質をコードする遺伝子の発現量を調査した。対象とする遺伝子は、カリウムトランスポーター、カチオントランスポーター、硝酸イオントランスポーター、H<sup>+</sup>-ATPase、水チャネル(アクアポリン)等である。(2)の実験結果とあわせ、生体重の増加に同調して発現量の増加する遺伝子を特定した。

### (4)ミトコンドリアにおけるATP合成能に及ぼすNaClの影響

NaCl処理した(高NaClに順化した)葉身からミトコンドリアを単離し、NaCl濃度の異なる条件下でATP生成量を測定した。また、NaClによる浸透圧の増加の影響をみるために反応液中の浸透圧をマンニトールあるいはポリエチレングリコール等の高分子化合物で増加させ、ATP生成量の変化を測定した。同時に他種のミトコンドリアATPシンターゼ及びNa<sup>+</sup>依存性ATPシンターゼをコードする遺伝子の塩基配列情報を元にこれら遺伝子の単離を試みた。さらに、ATPの生成に関わる解糖系、ATP合成、及びTCA回路の遺伝子も同様に取得した。

## 4. 研究成果

初年度は、(1)アイスプラント同調培養系の確立、及び細胞分裂関連遺伝子の発現解析、(2)細胞の肥大(浸透調節)に関連する遺伝子の発現解析、及び(3)NaCl処理した細胞におけるATP合成能等を解析した。(1)については、シロイヌナズナの細胞分裂制御遺伝子及び細胞周期のマーカー遺伝子と相同性の高いアイスプラントの塩基配列情報を取得しcDNA全長を得た。細胞周期S期におけるDNA複製を阻害する薬剤で懸濁培養細胞を処理し細胞周期を同調化させた。この細胞について細胞周期関連遺伝子のNaCl処理後の発現量を調査したところ、処理区間で明確な差

異は認められなかった。そこで同調培養系の確立を目的に培養系を再検討したところ、0.2 mg/l 2,4-D を含むカルス誘導培地で培養し、500 μm 以下の細胞の選抜を長期間行うことで同調化に適した細胞系を確立できた。

(2)については、カリウムトランスポーター遺伝子(McHAK1, McHAK2, McHAK3, McHAK4, Ktm1)、カチオントランスポーター遺伝子(McHKT1)、硝酸イオントランスポーター(McNRT1)、H<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子(Vmac1)、水チャネル(アкваポリン)遺伝子(McMipC)等の発現量を調べ、100 mM NaCl 処理した細胞で、カチオントランスポーター遺伝子 McHKT1、液胞 H<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子 Vmac1、及び液胞 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター遺伝子 McNHX1 の発現が増加することがわかった。(3)については、NaCl を与えて栽培したアイスプラント葉身から状態のよいミトコンドリアを単離する方法を確立し、ATP 量を測定して、ATP の生成に対する NaCl の関与を明らかにした。

次年度は、(1)ミトコンドリアにおける ATP 合成能をさらに詳細に検討し、(2)細胞周期を同調化した細胞の細胞分裂関連遺伝子の解析、及び(3)浸透圧調整を介した細胞伸長等に及ぼす NaCl の影響を検討した。

(1)については、100mM 及び 400mM NaCl 処理した葉身からミトコンドリアを単離し、NaCl を含む反応液で ATP 合成能を測定した。いずれも NaCl 存在下で ATP 合成量が増加したが、増加量は 350mM NaCl 下で最大となり、対照区より最大で約 60%増加した。この現象は浸透圧だけを高めた反応液では観察されなかったことから、ATP 合成に対する NaCl の直接的な関与が示唆された(図4)。

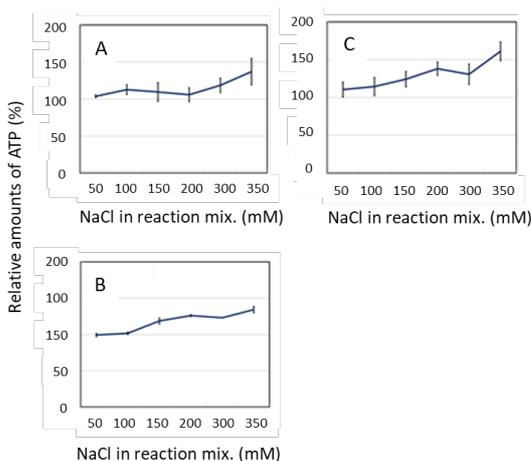


図4. ATP 生成能に及ぼす NaCl の影響。  
A, B, C, それぞれ 0 mM, 100 mM, 400 mM で栽培。

(2)については、前年度アフィディコリンによる同調化が困難であったことから、細胞サイズの小さい、形状の均一化された細胞を得るために長期間(1年以上)一定サイズの細胞を選抜して培養を続け、目的の細胞を得た。この細胞の細胞分裂を一時的に停止させる(細胞分裂を同調化する)ためにショ糖、

リン酸及びオーキシン等を欠乏させる処理を施した。リン酸欠乏処理を 24 時間行った細胞では、S 期のマーカー遺伝子である Histone H4 が発現しておらず、同調化されたことが明らかになった。この細胞の細胞周期に及ぼす NaCl の影響を調べるために、前年度に引き続き G1 期、S 期及び G2 期で働くアイスプラントの遺伝子をそれぞれ 5 種、及び M 期で働く遺伝子を 6 種取得した。(3)については、トランスポーター、チャネル、H<sup>+</sup>-ATPase 等、合計 8 種の遺伝子に加え、新たにアニオンチャネル遺伝子及び K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>トランスポーターを、前年度(2)と同様に取得した。NaCl 処理による細胞の伸長に先がけて、McHKT1 と Vmac1 がそれぞれ処理後 12 時間及び 48 時間後に強く発現することを明らかにした。

最終年度では、前年度一部確立した方法をさらに精査し、3 日間リン酸を欠乏する処理が細胞分裂の停止に最も効果的であることを見出した。リン酸の再施与後 24-26 時間後のにおける分裂指数は約 20%であり、他種で報告された値と同程度であった。この細胞を用いて細胞分裂に関わる遺伝子の発現に及ぼす NaCl の影響を調べた。その結果、11 種の細胞分裂関連遺伝子のうち、B2 型サイクリン依存性キナーゼの発現が NaCl 処理後 2 日以降に増加することを明らかにした(図5)。

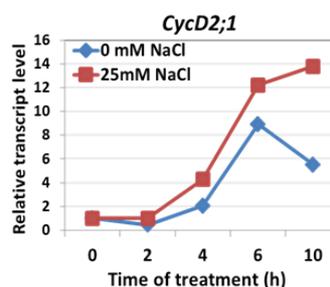


図5. B2 型サイクリン依存性キナーゼ遺伝子の発現量に及ぼす NaCl の影響。

ATP 合成能に及ぼす NaCl の効果の要因を明らかにするため、解糖系、ATP 合成、及び TCA 回路に關与するシロイヌナズナの遺伝子と相同性の高いアイスプラントの遺伝子を 12 種単離した。得られた成果をまとめ国際会議で 2 報発表した。

このように、本研究では、NaCl が細胞の分裂及び肥大に効果があることを初めて明らかにし、前者は、B2 型サイクリン依存性キナーゼの発現の増進によって、後者は、数種のトランスポーター遺伝子の発現量の増進によって促進されることを明らかにした。また、ミトコンドリアの ATP 合成が NaCl によって促進されることを初めて明らかにした。増加率は最大約 60%であった。いずれも前例のない新規な発見であり、NaCl を積極的に活用する新しい耐塩性作物の作出にとって重要な示唆を含む成果であるといえる。

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 1 件)

東江栄, 食料・エネルギー・環境問題に対する塩生植物の可能性, 2015. 調査月報 342: 28-34. (査読無し)

〔学会発表〕(計 4 件)

発表 標 題 【発表確定】

1. Tran, Q. D., Konishi, A., Agarie, S., Halophylism, the promotion of growth by NaCl, in a halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. The Asia-Pacific conference on life science and biological engineering, 2018 年 3 月 26-28 日, 京都リサーチパーク.
2. Tran, Q.D., Konishi A., Agarie S., Cell synchronization and primarily analysis of NaCl-stimulated transcription of some cell cycle-related genes in *Mesembryanthemum crystallinum* under salt-loving phase, Phytogene symposium IX, 2017 年 10 月 20 日, 香川国際会議場.
3. Tran, Q. D., Konishi, A. and Agarie, S., Halophilism in halophytes - NaCl induced gene expression and ATP synthesis-, Phytogene Symposium VIII. 2016 年 10 月 17 日. 香川国際会議場.
4. 小西絢子, Hong Thi Kim, 東江栄, 塩生植物の好塩性機構-膜輸送体遺伝子の発現及び単離ミトコンドリアの ATP 合成能に及ぼす NaCl の影響- 第 241 回日本作物学会講演会. 2016 年 3 月 28 日~29 日. 茨城大学水戸キャンパス.

〔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〕

学会プロシーディングス

Tran, Q.D., Konishi, A., Agarie, S., Halophylism, the promotion of growth by NaCl, in a halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. 2018. Conference proceedings of The Asia-Pacific conference on life science and biological engineering, 392-403. 2018,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東江 栄 (AGARIE, Sakae)

香川大学・農学部・教授

研究者番号 : 50304879

(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 :

(4) 研究協力者

なし ( )