

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380015

研究課題名（和文）環境修復技術の確立をめざした塩生植物の塩集積機構の解明に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Fundamental study on mechanisms of salt accumulation in a halophyte aimed at establishing a phytoremediation technique

研究代表者 東江 栄（AGARIE SAKAE）

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：50304879

研究成果の概要：アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.)の塩集積細胞であるブラッター細胞の形成に関わる遺伝子として、トライコーム形成関連遺伝子及び機能未知遺伝子を単離した。液胞膜タンパク質を二次元電気泳動法で網羅的に解析し、NaClの集積に関与するタンパク質を同定した。塩ストレスに伴うCAM型光合成の誘導にグルタチオンが関与していることをCAM型欠損突然変異体の解析から明らかにした。またCAMの鍵酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼキナーゼ遺伝子のプロモーター領域を単離し、CAMの誘導に関与すると考えられるシス因子を推定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	5,400,000	1,620,000	7,020,000

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：野生植物資源

1. 研究開始当初の背景

近年、塩害が農業上重要な問題となっている。世界全耕地面積の約20%、灌漑地の約50%が塩類集積土壌という試算もある。佐賀県は全耕地に占める干拓地の割合が高く、全干拓地約5万ヘクタールのうち約3万ヘクタールが塩分の影響をうけているといわれる。塩害地域における農業施策として耐塩性機構を付与した新規作物の育成や、塩集積能の高い植物を用いた土壌からの除塩が考えられるが、その基礎となる高耐塩性植物の耐塩性機構については不明な点が多く、それらの利用に関する実用的な取り組みはほとんど行なわれていない。

アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.)はザクロソウ科の1年生草本で海水と同程度の塩を含む土壌においても生育できる耐塩性の高い塩生植物である。本種は、最適条件下において個体あたり約14g、乾物ベースで約40%のNaClを地上部に蓄積する。これは1ヘクタールあたり約2トンのNaClを土壌から除去する計算になる。このような高い塩集積能は、液胞の高い塩集積能に加え、本種のもつ塩集積細胞であるブラッター細胞の機能による。また、塩ストレスにともない光合成型をC3型からストレス耐性の高いCAM型に変換するが、これも本種のストレスに対する適応反応の一つと

考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、塩生植物の塩吸収能を利用した塩類集積土壌からの除塩技術の確立、及び新規耐塩性作物の創生を最終目標に、アイスプラントの塩集積機構を塩集積細胞の形成機構及び光合成変換機構の解析をとおして明らかにしようとしたものである。

具体的には、塩の吸収・蓄積能力を左右する要因として、葉身の液胞とブラッダー細胞の特性を、また耐塩性を左右する要因として光合成の変換機構を解析し、関連タンパク質・遺伝子の単離解析を試みた。

3. 研究の方法

1) ブラッダー細胞を形成しない突然変異体の解析

我々がはじめて単離したブラッダー細胞欠損突然変異体から RNA を単離し、サブプレッション・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法によってブラッダー細胞を形成する遺伝子を単離し、塩基配列を決定するとともに発現量を調べた。また同様に他種ですでに報告のあるイオン恒常性やトライコム・繊維形成に関わる遺伝子をアイスプラントから単離し、その発現量を野生株と変異株とで比較した。

2) 光合成変換機構の解析

塩ストレスにともない C3 型から CAM 型へ光合成型を変換する機構を明らかにするために、NaCl 存在下においても光合成型を変換しない CAM 型欠損突然変異体を用いて CAM 関連遺伝子の発現制御に及ぼす酸化ストレスの影響を調べた。また数種 CAM 型光合成関連遺伝子の転写開始点上流の転写調節領域を単離し、塩基配列を決定するとともに発現制御様式を解析した。さらに、CAM 型光合成において重要な役割を果たす液胞の機能を明らかにするために液胞膜を単離し、液胞膜タンパク質の発現を二次元電気泳動法を用いて網羅的に解析した。

3) 形質転換法の確立

遺伝子組み換え技術の基礎となる培養細胞からの植物体再分化法を検討した。胚軸を外植体としたカルスの誘導に最適なオーキシンの種類と濃度、及び地上部再分化に及ぼすホルモンの種類と濃度をそれぞれ検討した。

4. 研究成果

1) ブラッダー細胞を形成しない突然変異体の解析

アイスプラントの体表面に形成される塩集積細胞（ブラッダー細胞）の機能を調べる

ため、ブラッダー細胞欠損突然変異体の塩ストレス下における生長量、NaCl 吸収特性及びイオン含量比等を調査し、ブラッダー細胞がアイスプラントの耐塩性、塩蓄積ならびにイオン恒常性に重要な役割を果たしていることを明確にした (Agarie et al., 2007)。ブラッダー細胞の形成に関する分子機構を明らかにするために、シロイヌナズナのトライコム形成遺伝子 (TTG1, GL2, TRY, CPC, AN, TFCA, WRM and CRK) 及びワタの繊維形成遺伝子 (RDL, MYB2, SUT1, EXP1, ABP, MAPK, RAC1, ACT1, PFN1, CER6, EF1A4, ACY, FDH, SCP, TUA6, TUB1, ACT, CesaA and Susy) 等と相同性の高い遺伝子をアイスプラントから単離し、発現量をブラッダー細胞欠損変異株と野生株とで比較した。その結果、変異株では、トライコムの発達に関与する GL2 及び MYB2 の発現量が低下し、トライコム形成の阻害に関与する TRY 及び CPC の発現量が増加することを明らかにした。さらに、サブプレッション・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法によって、野生株に特異的に発現する遺伝子として 18 個の cDNA 断片を取得し、逆に変異株に特異的に発現する遺伝子として 21 個の cDNA 断片を得た。塩基配列を決定して相同性検索を行ない、このうち 17 個は機能未知の遺伝子であることを明らかにした。発現解析の結果、WM10 及び WM28 が野生株で強く発現し、逆に変異株では MW3, MW11, MW21 及び MW29, 及び MW31 が強く発現していることを明らかにした (図 1)。さらに変異株と野生株とで発現量に差のみられた 7 つの機能未知遺伝子について全長 cDNA

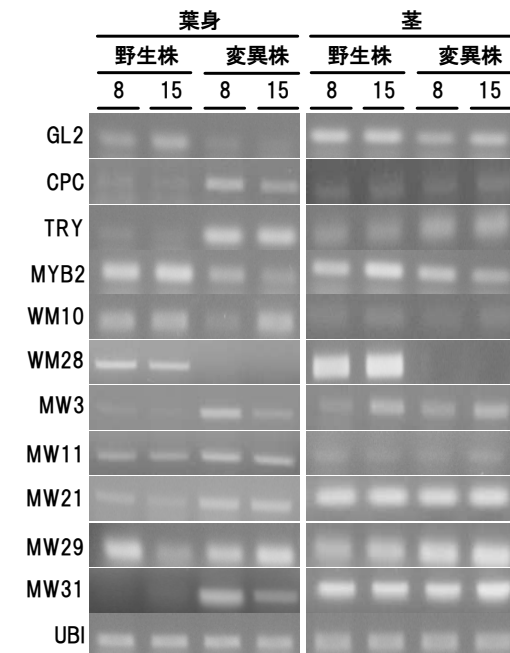


図 1. ブラッダー細胞欠損突然変異体と野生株におけるトライコム形成関連遺伝子及び機能未知遺伝子の発現。

の塩基配列を決定し、WM10, MW11, 及び MW21 がジャスモン酸誘導タンパク質, システインプロテアーゼ, 及びプロテインキナーゼとそれぞれ相同性が高いことを明らかにした。

2) 光合成変換機構の解明

塩ストレスに伴う CAM 型光合成の誘導機構を明らかにするために、CAM の誘導に対する酸化ストレスの影響を調べた。具体的には、塩処理後の CAM 欠損変異体と野生株における過酸化水素含量、グルタチオン含量及び CAM 関連要因（ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) 及びリンゴ酸含量等）の変化を調査し、以下の結果を得た。すなわち、1) CAM の誘導に伴いリンゴ酸の生成量が増加するが、塩処理した葉身のリンゴ酸含量は野生株で徐々に増加したのに対し、変異株では野生株の約 25% 程度であった。2) CAM の指標である PEPC 遺伝子の発現量が変異株で低く、野生株では処理後同レベルで推移したのに対し、変異株では処理後 16 日目に低下した。さらに、3) 野生株では還元型グルタチオンの含量が処理後 8 日目にピークに達し、その後徐々に減少したのに対し、変異株の還元型グルタチオン含量は野生株の約 60% であり、4) 過酸化水素の含量は変異株より有意に高かった。これらのことから CAM の誘導にグルタチオンが関与していることを明らかにした。

アイスプラントは塩ストレス下で光合成型を C3 型から CAM 型に変換する際、リンゴ酸と NaCl を蓄積する二種の異なる液胞を同一細胞中に発達させる。ショ糖密度勾配遠心分離法で液胞膜を効率的に単離する条件を決定し、液胞膜タンパク質を二次元電気泳動法で分離した。タンパク質の等電点と分子量から、NaCl を蓄積する液胞では Na⁺/H⁺ 対向輸送体タンパク質の発現量が増加し、液胞膜カチオン/H⁺ 対向輸送体の発現量が減少すること、またリンゴ酸を蓄積する液胞では、リンゴ酸輸送体とプロトンポンプの発現量が増加すること等を明らかにした。さらに、塩ストレスに伴いアクアポリン、ストレス反応タンパク質、タンパク質分解酵素、自食作用タンパク質、及び小胞輸送タンパク質等の発現量が増加することを見いだした。

アイスプラントの光合成変換機構を遺伝子の転写レベルで明らかにするために、数種 CAM 型光合成関連遺伝子の転写開始点上流の転写調節領域（プロモーター）を単離し解析した。特に CAM 型光合成における CO₂ 固定酵素である PEPC の発現量の日変化を制御する PEPC キナーゼ遺伝子については、プロモーター領域を約 1.7kb 単離し、その領域に光調節、エチレン応答、及び乾燥応答等に関与する領域、及び Dof 結合サイトが含まれていること

を明らかにした。

3) 形質転換法の確立

ウレア系サイトカイニンであるチジアズロンを用いアグロバクテリウムを介して子葉節に遺伝子が導入できることを明らかにした。この成果を論文として取りまとめた (Sunagawa et al., 2007)。操作がより簡便な胚軸を用いた形質転換法を確立するため、カルスの誘導に及ぼすオーキシシン (IAA, IBA, NAA, 2,4-D 等) とジベレリン (GA₃) の影響を検討した。その結果、カルスの生長量、色及び形状から、胚軸からのカルス形成には、100 μM NAA が最も適していることを明らかにした。100 μM NAA と種々濃度の GA₃ を組み合わせて同様な実験を行なったところ、GA₃ は緑化カルスの誘導には適していたが、地上部の再分化には効果がみられないことを明らかにした。地上部再分化に及ぼす高温ストレス及び培地へのカイネチンの添加の影響等を検討し、いずれも地上部の再分化には効果が少ないことを明らかにした。

4) まとめ

本研究は、高塩環境下における塩集積能力を左右する要因を塩集積機構と耐塩性機構とに分け、それぞれについて関連するタンパク質及び遺伝子の種類や発現様式を調べた。葉身において主要な塩集積器官として機能する液胞については、液胞膜タンパク質を単離して、その種類と発現様式を明らかにし、アイスプラント特有の塩集積器官であるブラッター細胞については、ブラッター細胞の形成に関与する遺伝子を単離した。また、耐塩性機構の一つとして解析した CAM 型光合成誘導制御機構については、グルタチオンの関与を明らかにし、さらに CAM 遺伝子プロモーターを単離してその特性を明らかにした。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Agarie, S., A. Kawaguchi, A. Kodera, H. Sunagawa, H. Kojima, A. Nose and T. Nakahara 2008. Potential of the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* as a new high-functional food as evaluated by polyol accumulation. *Plant Production Science* 12:37-46.
2. Cushman, J.C., S. Agarie, R.L. Albion, S.M. Elliot, T. Taybi and A.M. Borland 2008. Isolation and characterization of mutants of ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*, deficient in Crassulacean acid metabolism. *Plant Physiology*

147:228-238.

3. Agarie, S., T. Shimoda, Y. Shimizu, K. Baumann, H. Sunagawa, A. Kondo, O. Ueno, T. Nakahara, A. Nose, J.C. Cushman 2007. Salt tolerance, salt accumulation, and ionic homeostasis in an epidermal bladder-cell-less mutant of the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum*. Journal of Experimental Botany 58:1957-1967.

4. Sunagawa, H., S. Agarie, M. Umemoto, Y. Makishi, A. Nose 2007. Effects of urea-type cytokinins on the adventitious shoots regeneration from cotyledonary node explant in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Production Science 10:47-56.

[学会発表] (計 3 件)

1. 東江栄・川口晶子・砂川春樹・小島英・中原光久・野瀬昭博. ポリオール生成能からみたアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum*) の高付加価値食材としての可能性. 第 224 回日本作物学会. 2007 年 9 月 27 日. 金沢大学.

2. Cushman, J.C., S. Agarie, R. Albion, R. French, S.M. Elliot, T. Taybi, A.M. Borland. Isolation and characterization of mutants of ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*, defective in Crassulacean acid metabolism. C4 and CAM: from molecular diversity to ecological convergence. 2007 年 7 月 17 日. ケンブリッジ大学 (英国)

3. Agarie, S., M. Umemoto, R. Tsuji, H. Sunagawa, J.C. Cushman, A. Nose. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Mesembryanthemum crystallinum* - a facultative CAM plant. C4 and CAM: from molecular diversity to ecological convergence. 2007 年 7 月 17 日. ケンブリッジ大学 (英国) .

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 水耕栽培方法

発明者: 東江栄、野瀬昭博

権利者: 佐賀大学

種類: 特許

出願番号特願 2008-104632

出願日: 平成 20 年 4 月 14 日

国内・国外別: 国内(日本)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東江 栄 (AGARIE SAKAE)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号: 50304879

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし