

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12380

研究課題名(和文) 塩生植物アッケシソウのバイオ燃料生産能の向上と塩類土壌修復能の評価

研究課題名(英文) Improvement of biofuel production and evaluation of bioremediation for saline soil in Salicornia

研究代表者

岡 真理子 (OKA, Mariko)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：20324999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアッケシソウの成長機構と、塩の蓄積および油脂生成について調べた。さらに、植物ホルモンの影響を調べた。アッケシソウにおいては、NaClによりセルラーゼ活性が上昇し、細胞壁が緩むことで成長が促進されることが示唆された。植物体内のNa含量は、NaCl処理濃度、栽培期間に依存して増加した。乾燥重量あたりの油脂含量はNaClにより変化しなかったが、個体あたりの油脂生産量は増加した。植物ホルモンの影響を調べたところ、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)、ナフタレン酢酸、アブシジン酸は、アッケシソウの新鮮重量および乾燥重量を増加させ、ACCは乾燥重量あたりの油脂含量を増加させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界中に塩害により耕作地の放棄、土地の荒廃、砂漠化の拡大が引き起こされ、深刻な問題となっている一方で、世界の人口は増え続けており、食料の増産が必要とされている。しかしながら、昨今のバイオ燃料の需要拡大により食用作物がバイオ燃料作物として使用され、消費できる食料の減少を招いている。

塩生植物の一つであるアッケシソウは、塩に対して非常に高い耐性を示し、なおかつ種子や植物体に油分を含み、植物体内に塩を蓄積する。このような性質を利用して、塩類集積地においても生育できる油糧作物としての利用や塩集積地からの除塩能力を検討することは、農地の拡大や環境修復に重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the growth mechanisms, salt accumulation, and lipid production in Salicornia. Furthermore, the effects of plant hormones on those physiological processes were investigated. In Salicornia, it is suggested that NaCl promotes growth through increasing cellulase activity followed by plant cell wall loosening. The Na content in the Salicornia plants increased depending on the NaCl concentration and on the cultivation period. However, Na was hardly detected in the seeds and the dried plants after seed formation. Although NaCl did not affect the lipid content based on dry weight, the lipid content based on a plant was increased along with the increase of weight of plants. Regarding the effects of phytohormones, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), Naphthaleneacetic acid, and abscisic acid increased fresh and dry weight of plants. In addition, ACC increased lipid content based on dry weight.

研究分野：植物生理学

キーワード：アッケシソウ 油脂生成 ナトリウム蓄積 植物ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

灌漑により地表面と地下水が土壌孔隙を通じて繋がると、降雨量の少ない地域では、地下水が蒸発してしまうため、地下水中や土壌中の可溶性塩類が表層に蓄積し、塩類集積が起これば作物が育たなくなり、耕作地の放棄、土地の荒廃、砂漠化の拡大が引き起こされ、深刻な問題となっている。このような塩害により世界の灌漑地の 5 分の 1 が劣化しており、年間およそ 273 億 US ドルの経済損失を引き起こしているといわれている。

一方、世界の人口は増え続けており、2050 年には 90 億人に達すると推定されており、食料の増産が必要とされている。しかしながら、地球温暖化を緩和するクリーンなエネルギーと考えられているバイオ燃料の需要拡大により食用作物がバイオ燃料作物として使用され、消費できる食料の減少を招いている。農地の拡大が厳しい現状において、食用作物の作付面積を確保するためには、トウモロコシやサトウキビに代わる新しいバイオ燃料作物の探索が重要であると考えられる。

塩生植物の一つであるアッケシソウはヒユ科の一年性草本で、海水灌漑によっても生育が可能であるほど塩に対して非常に高い耐性を示し、なおかつ種子や植物体に油分を含む。このような性質は、現在農地として利用されていない海岸部の土地や塩類集積で作物の生産ができなくなった農地において油糧作物として利用できる可能性が高い。さらにアッケシソウは体内に塩を蓄積するため、土壌中から塩を除去することが期待できる。

## 2. 研究の目的

高塩濃度で生育が可能であるアッケシソウの油脂生産能力および除塩能力に着目し、塩害地域におけるアッケシソウの油糧作物としての活用を目指して基礎的な検討を行う。本研究課題では、アッケシソウを材料として、(1) 油脂生産能の向上させるために、アッケシソウの成長機構を調べる、(2) 植物ホルモンの調節によりバイオマス生産量の高まる条件を検討する、(3) アッケシソウの油脂生成能が高まる条件を調べるために、異なる条件で栽培したアッケシソウの油脂生産を調べる、(4) 除塩能力を評価するために、植物体内へのナトリウムの蓄積を調べることにした。この研究により、塩類集積により作物生産の困難な地域においてアッケシソウの油糧作物としての可能性を探るとともに、塩類集積土壌から除塩することにより、より塩に弱い作物が栽培できる地域を拡大することができる可能性を探る。

## 3. 研究の方法

### (1) アッケシソウの栽培

アッケシソウをパーミキュライトに播種し、 $\text{KNO}_3$  5 mM、Potassium phosphate buffer (pH 5.5) 2.5 mM、 $\text{MgSO}_4$  5 mM、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  5 mM、Fe-EDTA 50  $\mu\text{M}$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  70  $\mu\text{M}$ 、 $\text{MnCl}_2$  14  $\mu\text{M}$ 、 $\text{CuSO}_4$  0.5  $\mu\text{M}$ 、 $\text{ZnSO}_4$  1  $\mu\text{M}$ 、 $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_4$  0.2  $\mu\text{M}$ 、 $\text{CoCl}_2$  0.01  $\mu\text{M}$  を含む培養液を与えて 2 週間生育させた後、上記の培養液に 100 mM あるいは 200 mM の NaCl を加えた培養液で 2 週間から 4 週間水耕栽培した。また、アッケシソウの成長と油脂生成に対する植物ホルモンの影響を調べるために、200 mM の NaCl を加えた培養液にジベレリン ( $\text{GA}_3$ )、カイネチン、ナフトレン酢酸 (NAA)、ジャスモン酸 (JA)、アブシジン酸 (ABA)、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) を  $10^{-7}$  M、 $10^{-6}$  M、 $10^{-5}$  M となるようそれぞれ加え、1 か月間水耕栽培した。

### (2) セルラーゼ活性の測定

地上部 1 g に対して 0.05M クエン酸ナトリウムバッファー (pH 4.8) を 10 mL を加えて摩砕し、粗酵素液とした。綿 0.01 g を試験管に入れ、粗酵素液を 0.5 mL とバッファー 1 mL を加え、 $50^\circ\text{C}$  で 1 時間加熱した。DNS 試薬を 3 mL 加え混和し、10 分間煮沸した。等量の蒸留水を加えて希釈し、分光光度計を用いての 540 nm における吸光度を測定した。

### (3) 油脂の抽出

アッケシソウの地上部と根を恒温乾燥機を用いて、72 時間 80°C で乾燥させた。乾燥させたサンプルを乳鉢ですりつぶし、ソックスレー抽出器を用いて、ヘキサン 160 ml で 70°C、8 時間抽出を行った。エバポレーターを用いてヘキサンを留去した。

### (4) 脂肪酸の分析

ヘキサン抽出した油脂を、脂肪酸分析用メチルエステル化試薬脂肪酸メチル化キット(ナカライテスク)を用いてメチル化した。ガスクロマトグラフィー質量分析計 (SHIMADZU GCMS-QP2010C Plus) を用い、40°C で 5 分間保持し、昇温速度 10°C /分で 240°C まで昇温し、15 分保持した。カラムは内径 0.25 mM 長さ 60 m 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$  の DB-WAX (アジレント・テクノロジー) を用いた。

### (5) ナトリウムの分析

乾燥させた植物試料を試験管に入れ、濃硫酸 1 ml を加えて混合し、一晩放置した。ヒートブロックを用いて 180°C で 10 分間加熱した後、30% 過酸化水素水を 0.3 ml 加え、さらに 30 分間加熱した。溶液が透明になるまで過酸化水素を加え加熱する操作を繰り返した。溶液に蒸留水を加え、50 ml に定容した。ICP 発光分光分析装置 (Rigaku CIROS CCD) で Na の含量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) NaCl によるアッケシソウの伸長成長の促進

アッケシソウの成長に対する NaCl の影響について調べるため、NaCl を含む培養液と含まない培養液を用いて植物を 14 日間水耕栽培したところ、NaCl 無処理区と比較して NaCl 100 mM 処理区において、地上部の高さは 1.26 倍、新鮮重量は 1.97 倍、乾燥重量は 1.49 倍増加した。アッケシソウの実効浸透圧は NaCl 処理によって増加する傾向がみられた。植物体内の含水率は、NaCl 100 mM 処理によって約 1% 増加した。2 週間 100 mM NaCl 処理したアッケシソウの第 1 節の上部と下部で表皮細胞の形状を比較すると、節の上部に対して下部の表皮細胞は 2 倍程度伸長した (図 1)。そのとき、NaCl 処理により細胞数に差はなかった。

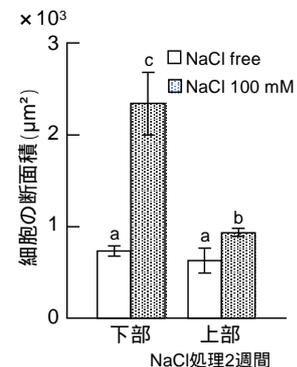


図 1 アッケシソウの第 1 節の表皮細胞の断面積に対する NaCl の影響

植物細胞の伸長は多糖類からなる細胞壁によって制限されており、細胞壁の物性の変化が細胞伸長を規定している。細胞壁の主成分であるセルロース微繊維を分解する酵素であるセルラーゼは、細胞壁に緩みを生じさせる。2 週間 NaCl 100 mM 処理したアッケシソウのセルラーゼ活性は無処理区と比較して約 2 倍高かった (図 2)。また、節の上部よりも下部の方がセルラーゼ活性が高い傾向が認められた。NaCl 処理により細胞の大きさが大きくなるとセルラーゼ活性も高くなっており、細胞の大きさとセルラーゼ活性には正の相関が認められた (図 3)。これらの結果から、

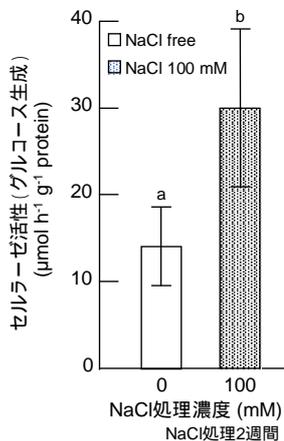


図 2 アッケシソウ地上部のセルラーゼ活性に対する NaCl の影響

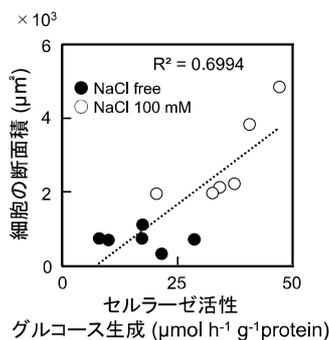


図 3 NaCl 処理したアッケシソウ地上部の細胞の大きさとセルラーゼ活性の相関

セルラーゼにより細胞壁セルロースが分解されて細胞壁の緩みが生じることで、アッケシソウの細胞伸長が促進されることが示唆された。アッケシソウは、高塩濃度環境下において、植物体内の浸透圧を高めて水を吸収するとともに、細胞壁のゆるみを引き起こすことにより、伸長成長を促進していることが示唆された。

(2) アッケシソウの油脂生成に対する NaCl の影響

アッケシソウの地上部の乾燥重

量あたりの油脂含量は、NaCl 無処理区、NaCl 100 mM 処理区、NaCl 200 mM 処理区のいずれにおいても、有意差は見られなかった(図4A)。しかしながら、NaCl 処理して栽培した植物においては、成長が促進されるため、個体あたりの油脂含量は NaCl 処理区で増加した(図4B)。このことから、アッケシソウは NaCl 処理により多くの油脂が採取できると考えられる。

アッケシソウに含まれる脂肪酸として、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、ベヘン酸、マルガリン酸が検出された。地上部におけるパルミチン酸、ステアリン酸の含量は、NaCl 処理区で減少したが、リノール酸、リノレン酸の含量は、NaCl 処理区で増加した。NaCl 無処理区では、飽和脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸で8割以上を占めていたが、NaCl を処理区すると、NaCl 無処理区と比較して、パルミチン酸、ステアリン酸が減少し、不飽和脂肪酸であるリノール酸、リノレン酸が増加した(図5)。

多くの中生植物においては NaCl により、不飽和脂肪酸が減少することが報告されているが<sup>1), 2)</sup>、塩生植物においては NaCl により不飽和脂肪酸が増加することが報告されている<sup>3)</sup>。不飽和脂肪酸は物理化学的な膜の構造や原形質膜の ATPase 活性にも影響を与え<sup>4), 5)</sup>、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターの活性の維持に関与していると考えられている<sup>6)</sup>。アッケシソウにおいては高塩濃度環境下で不飽和脂肪酸を増加させることにより、耐塩性を維持している可能性が示唆された。

(3)アッケシソウの成長および油脂生成に値する植物ホルモンの影響

植物ホルモンの影響

植物ホルモンの影響

植物ホルモンの影響

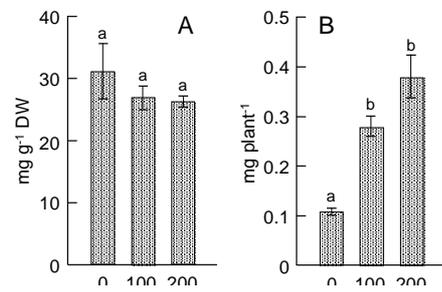


図4 アッケシソウ地上部の油脂含量に対する NaCl の影響  
A: 乾燥重量あたりの油脂含量、  
B: 個体あたりの油脂含量

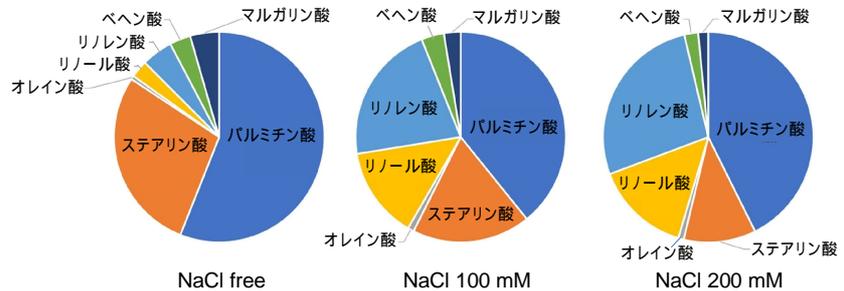


図5 アッケシソウ地上部における脂肪酸の割合

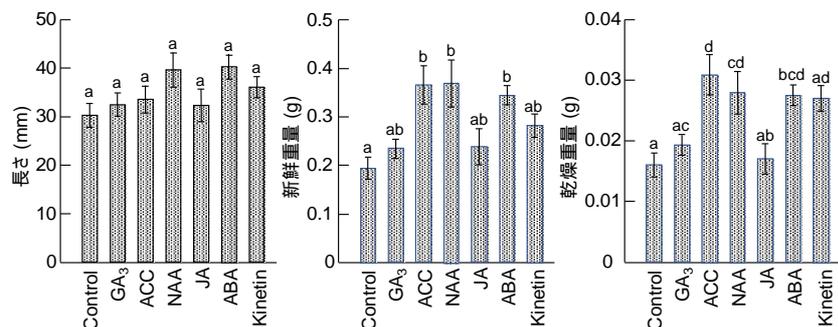


図6 アッケシソウ地上部の成長に対する植物ホルモンの影響  
アッケシソウは NaCl 200 mM を含む培養液で水耕栽培した。各植物ホルモンの処理濃度を 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> としたときの結果を示す。

それぞれの植物ホルモン  $10^{-6}$  M を含む培地で生育させた植物の乾燥重量あたりの地上部の油脂含量を比較したところ、ACC 処理区で最も油脂含量が多く、個体あたりでは control 区と比較して 3 倍程度の油脂が含まれていた(図7)。いずれの処理区においても植物ホルモンを処理せず生育させた植物と同様の脂肪酸が検出されたが、処理した植物ホルモンにより組成比が異なっていた。

#### (4) アッケシソウ植物体内のナトリウム含量

アッケシソウ地上部の Na 含量は、NaCl 処理濃度の増加に伴い増加した。また、NaCl 処理後 3 週間目よりも 4 週間目の植物の方が Na 含量が多かった(図8)。これらのことから、アッケシソウはナトリウムを植物体内外に放出することなく蓄積することが示された。

#### (5) 塩類集積地での油糧作物としての可能性

単位重量あたりの油脂生成量は、NaCl 処理濃度の違いによる差は認められなかったが(図4A)、個体の重量が大きくなる NaCl 処理区で油脂が多く採取できることが示された(図4B)。脂肪酸組成は、NaCl により不飽和脂肪酸であるリノレン酸やリノール酸が増加したため(図5)、高塩濃度環境下で栽培した場合は、バイオディーゼルとして使用する場合は、採取した油脂の不飽和度を上げる必要がある。一方で、アッケシソウは、ヨーロッパなどでは食用として販売されていることから、食用として用いるならば、体内で合成できない必須脂肪酸であるリノレン酸やリノール酸が増加することは好都合であると考えられる。

植物ホルモン、特にエチレンがアッケシソウの成長と油脂生成に影響を与えることが示唆されたが(図6、図7)、今回の実験では培養液にバクテリアの発生が認められたものもあり、他の要因によることも考えられるため、さらなる検討が必要であると考えられる。

塩類集積地においては土壤中に数 100 mmol/kg~数 mmol/kg のナトリウムが含まれていることが報告されている。岡山県の自生地においては、土壤中に 15 mmol/kg 程度のナトリウムが含まれていた。採取した年や場所によりばらつきは見られたが、 $1\text{ m}^2$  あたり乾燥重量 500~2500 g のアッケシソウが生育していた。塩類集積地と自生地では含まれるナトリウムの量が異なるため、塩類集積地で同等のアッケシソウが生育するかはさらなる検討が必要であるが、仮に土壤中に 200 mmol/kg のナトリウムが含まれており、 $1\text{ m}^2$  あたり乾燥重量 1 kg のアッケシソウが生育したとすれば、70 g 程度のナトリウムが土壤中から植物体内に移動すると換算できる。アッケシソウを適当な時期に刈り取るにより、土壤中のナトリウムを除去できる可能性が示された。

以上のことを踏まえると、アッケシソウは、塩類集積地において、ナトリウムを除去するファイトレメディエーションに用いることができる植物であり、油糧作物の候補となり得る植物であると考えられる。

#### 引用文献

- 1) Bybordi et al., Journal of Food Agriculture & Environment 8, 113-115 (2010)
- 2) Yeilaghi et al., Food Chemistry 130, 618-625 (2012)
- 3) Zhao et al., Plant Biosystems 153, 514-520, (2019)
- 4) Murray et al., Biochimica et Biophysica Acta 1060, 133-158 (1991)
- 5) Kasamo, Journal of plant research 116, 517-523 (2003)
- 6) Zhang et al., PLoS One 7, e30355 (2012)

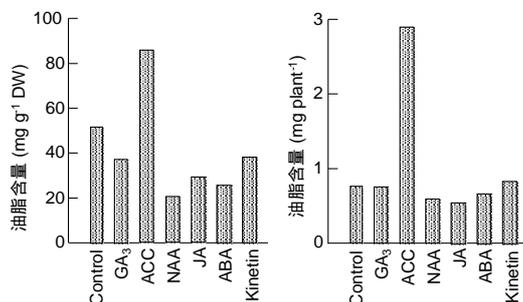


図7 アッケシソウ地上部の油脂生成に対する植物ホルモンの影響

アッケシソウは NaCl 200 mM を含む培養液で水耕栽培した。各植物ホルモンの処理濃度を  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> としたときの結果を示す。

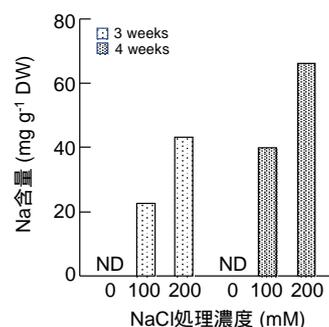


図8 アッケシソウ地上部のナトリウム含量  
ND:検出限界以下

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石倉慧一、吉村祥子、石井瑞穂、岡真理子
2. 発表標題 耐塩性の異なるヒコ科植物における細胞壁分解酵素活性に対する NaCl の影響
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石倉慧一、吉村祥子、石井瑞穂、岡真理子
2. 発表標題 NaClによる塩生植物アッケシソウの伸長促進における 細胞壁分解酵素の役割
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石倉慧一、岡真理子
2. 発表標題 高NaCl環境下で耐塩性の異なるヒコ科植物の成長が異なる要因 特に細胞壁分解酵素の活性に着目して
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮本 健助  (MIYAMOTO Kensuke)  (10209942)	大阪府立大学・高等教育推進機構・教授    (24403)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山口 武視  (YAMAGUCHI Takeshi)  (30182447)	鳥取大学・農学部・教授     (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関