

ヘミセルロース改変イネを用いた塩ストレス応答に関する研究

菊田 遼 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

植物は外界の環境から塩や乾燥といったストレスを受け、あらゆる生理・生化学的な反応を生じる。特に塩ストレスの場合、多くは植物の生長や成育に影響を及ぼし、農業の現場においても減産を引き起こす深刻な要因となっている。塩ストレスにより細胞外の Na^+ 濃度が増加すると細胞内に Na^+ が流入し、細胞質における Na^+ 濃度が上昇する。高濃度の Na^+ は植物にとって有害であり、この Na^+ を細胞外へと排出または液胞内に隔離するため複数の Na^+ 輸送体が活性化される。この活性化には、NHX 型遺伝子や SOS (Salt Overly Sensitive) 遺伝子といった特定の遺伝子の発現が必要であることがわかっている。特に SOS5 に関して、細胞表層に局在する GPI アンカータンパクをコードしていることが明らかにされ、細胞壁構造に重要な chitinase-like protein (AtCTL1) が塩ストレスに重要であることが示される。また、細胞壁中のペクチンとカルシウムイオンの結合が塩ストレスにより妨げられ、細胞壁構造に変化が生じるという報告もされている。このように塩ストレス応答の一部が細胞壁構造と関係している可能性が示唆されているが、細胞壁構造と塩ストレスとの関係はほとんど理解されていないのが現状である。

そこで本研究では、塩ストレス条件下で細胞壁構造の変化を調査するのではなく、細胞壁改変植物を用いて塩ストレス条件下での生理学的解析を行うことで、細胞壁構造が塩ストレス応答において果たす役割を調査することをを行った。そして、細胞壁の主骨格であるセルロース微繊維の間を架橋する多糖類の中で、最も主要であるヘミセルロースに注目して研究を行った。ヘミセルロースとは、セルロース微繊維やペクチンとともに細胞壁を構成する主要な多糖類であり、単子葉植物のモデル植物であるイネの細胞壁のヘミセルロースは、キシログルカンや 1,3- β -D-グルカン、キシランにより構成される。特にキシランがセルロース微繊維を架橋し細胞壁の強度に関係していると考えられている。現在までに、本研究においてヘミセルロース改変イネにおいて、細胞壁構成が変化することで、物理的強度や病害応答性が変化することがわかっている。これらのヘミセルロース改変イネを用いて、塩ストレス条件下での応答を調査することで、細胞壁構造が塩ストレスに対して果たす役割を明らかにすることを本研究の目的としている。

試料および方法

研究材料には、モデル植物であるイネ (*Oryza sativa*: 品種 日本晴) を用いて水耕栽培における塩ストレス条件の検討を行った。水耕栽培はインキュベーター内で 17 日間行い、うち 3 日間塩ストレス処理を行った。塩ストレス処理前後のイネをサンプリングし地上部と地下部の生重量 (fresh weight: FW) と乾燥重量 (dry weight: DW) の測定を行った。50, 80, 100, 120 mM の塩スト

レスで条件検討を行った。次にヘミセルロース改変イネを用いて、条件検討で得られた濃度の塩ストレス条件で同様に水耕栽培を行った。ヘミセルロース改変イネには、キシラナーゼ過剰発現体、キシロシダーゼ過剰発現体、アラビノフラノシダーゼ過剰発現体を用いた。

結果および考察

水耕栽培による塩ストレス処理を行うにあたって、耐塩性の変化したものをスクリーニングする濃度の調査を行った。50 mM NaCl では、0 mM のものと大きく変わらない生長量を示し、100 mM 以上になるとほぼ致死性になってしまった。そのため、塩ストレスに対して耐性を持つ、持たないとされる系統の生育の違いを調査する塩濃度として 80 mM NaCl を設定した。

キシラナーゼ過剰発現体において、野生型の地上部では、葉先が水分を失い色も淡くなり、生重量がストレス処理前と比較して 90% 前後であった。これは脱水などの生理傷害が塩ストレスによりおこり、成長が阻害されていることが示された。

一方で、キシラナーゼ過剰発現体の地上部ではやや成長が見られ、第 2, 3 葉は水分を失っているものの、一番新しい第 4 葉は成長している様子が見られた。地下部に関しては、野生型は生重量がストレス処理前と比較して成長がほぼ見られないが、過剰発現体では塩ストレス条件下であっても約 30% の成長増加が見られた。同じく、キシロシダーゼ過剰発現体においても、塩ストレス条件下でも水分が失われることなくよく成長し、約 30% の成長増加が見られた。地下部についても同様の結果が得られた。アラビノフラノシダーゼ過剰発現体に関しては、野生型と比較して耐塩性が上がるといえる有意な差は得られなかった。

本研究により、ヘミセルロース改変による細胞壁構造の変化したイネでは、耐塩性が向上するということが明らかとなった。細胞壁構造が耐塩性に対して機能を有している可能性が考えられる。キシラナーゼ、キシロシダーゼ、アラビノフラノシダーゼはヘミセルロースを構成しているキシランを分解する酵素である。ヘミセルロース改変イネであるこれらの過剰発現体では、共通してヘミセルロース量が減少し、一方でセルロース量が増加していることがわかっている。しかし、本研究の結果からセルロース量だけが耐塩性を向上させるとは言えないことが示唆された。今後は、①耐塩性が向上したサンプル、特に根の分裂組織の細胞形態観察、②染色による Na^+ の細胞質内あるいは液胞内への取り込みの可視化、③耐塩性に重要である Na^+ 輸送体などの発現解析を行っていきたいと考えている。