

ノ ー ト

有明海沿岸に生育する塩生植物シチメンソウの成分分析

和田 紀子¹, 張 経 華², 陣野 信孝³, 大久保 明¹, 山崎 素直^{®2}

Component analysis of a halophyte, *Suaeda japonica*, grown on the shore of Ariake Sea

Noriko WADA¹, Jinghua ZHANG², Nobutaka JINNO³,
Akira OKUBO¹ and Sunao YAMAZAKI²

¹ Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657

² Faculty of Environmental Studies, Nagasaki University, 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8521

³ Faculty of Education, Nagasaki University, 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8521

(Received 7 May 2003, Accepted 3 July 2003)

The adaptation of a halophyte, *Suaeda japonica*, in a saline environment was surveyed by analysing the cellular components, such as the major inorganic and organic constituents, as well as glycine betaine between halophytic and non-halophytic plants grown along the seashore of Ariake Sea. In contrast to non-halophytes, a remarkable accumulation of salt in leaf cells of halophytes, *Suaeda* and *Artemisia*, was accompanied by the accumulation of a compatible solute, glycine betaine. In a culture experiment under saline conditions, glycine betaine looked to be most effectively induced in the concentration of salt of around 250 mM NaCl.

Keywords : Ariake Sea; capillary electrophoresis; glycine betaine, halophyte; *Suaeda japonica*.

1 緒 言

有明海は閉鎖的内湾でありながら大きな潮位(最大 6 m)により十分な酸素供給が行われ, その沿岸には広大な干潟が発達し, 多彩な生物層をはぐくみ海産資源の宝庫といわれてきた。しかしながら江戸時代から始められた有明海北部の干拓は既に湾全面積の 20% 以上に及び, 潮位の低下と農業排水による水質汚染により海産資源の異常が頻繁に報告されるようになった。満潮時には海水で冠水する干潟には, 海産生物のみならず, そこに特有な塩生植物群落が生育してきたが, これも干拓や淡水化事業により危機的状况にある。その中でシチメンソウ (*Suaeda japonica*) は有明海沿岸にのみ生育している日本の代表的な塩生植物で,

環境庁(2000)により絶滅危ぐ(惧)II類に指定されている¹⁾。干潟植物の生理・生態を知ることは干潟を保全し, 豊かな海を取り戻す第一歩と考える。

アカザ科に属するシチメンソウは1年生草本で塩生植物の中で耐塩性が最も強く, 塩沼地や汽水域では他の塩生植物より優占してその最前線に生育する。海水濃度に等しい塩濃度に対応できる理由のひとつに浸透圧調節能が挙げられる。シチメンソウは根から取り込んだナトリウム(Na)を葉の細胞質内の液胞に蓄積し, 葉緑体中にはグリシンベタインなどの適合溶質を誘導・蓄積することによって浸透圧を調節しながら光合成能を維持していると言われている²⁾。

グリシンベタイン ($(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$, GB) は低分子で水溶性に富み, 代謝されにくく, かつ高濃度細胞内に蓄積しても代謝系の酵素活性を阻害しない特徴を持ち, 高等植物においてアカザ科, イネ科, ナス科などに広く存在している。この適合溶質は塩ストレスだけでなく乾燥スト

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科: 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

² 長崎大学環境科学部: 852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

³ 長崎大学教育学部: 852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

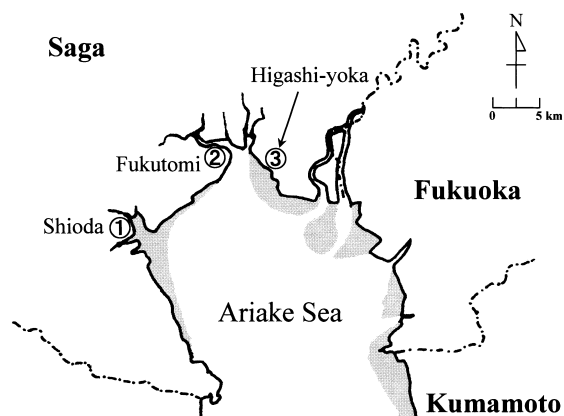


Fig. 1 Sampling sites along the seashore of Ariake Sea

レス、低温ストレスなどを含めた環境ストレスに深くかかわっている³⁾⁴⁾。そこで、本研究では、有明海沿岸で採取したシチメンソウとその周辺に生育している植物及び土壌と水について分析を行い、植物の生育に対する塩の影響を観察した。また、実験室内でシチメンソウを栽培して、高塩ストレス負荷下における応答を調べ、シチメンソウの耐塩性因子 GB の誘導・合成と耐塩性に関する生理学的特徴を解析した。

2 実験

2.1 装置と試薬

pH 及び導電率 (EC) メーターは堀場製 D-20 シリーズを使用した。分光光度計は島津 UV-3100PC を、原子吸光度計は島津 AA-6200 を用いた。キャピラリー電気泳動装置は大塚電子製 CAPI-3300 を使用した。

エステル化用の *p*-プロモフェナシルプロミドは東京化成製を使用した。標準品の GB 及び他の試薬はすべて和光純薬製の特級試薬を用いた。脱イオン水は Milli-Q (日本ミリポア製) を使用した。

2.2 試料の採取

2001 年 10 月 5 日、佐賀県内の 3 か所についてサンプリングを行った。採取地点を Fig. 1 に示す。

- (1) 鹿島市塩田町塩田川河口 (百貫橋下流) の河川敷
- (2) 杵島郡福富町六角川河口 (住ノ江橋下流) の河川敷
- (3) 佐賀郡東与賀町大授掬の海浜公園

分析試料としては、シチメンソウのほか共生する塩生植物のフクド (*Artemisia fukudo*) 及びその塩沼地の水と土壌を採取した。更に既に干拓された周辺の畑などからアシ (*Phragmites australis*)、イネ (*Oryza sativa*)、クズ (*Pueraria lobata*)、セイタカアワダチソウ (*Solidago altissima*) 及びダイズ (*Glycine max*) を採取した。植物試料は全株を採取した。水試料は表層水をポリエチレン瓶に採取し、研究室の

冷蔵庫に保存した。土壌は深さ約 20 cm まで掘り、混合してポリエチレン袋に入れ冷蔵庫に保存した。

2.3 シチメンソウの育成

実験用シチメンソウ種子は 2000 年の冬、場所 (3) で採取した種子を使用した。その土耕栽培は 25℃ の自然光ガラス温室で行った。市販の培養土 (Scotts Metro-Mix 350) を 3 つのプランターに入れては (播) 種した。2 週間後、その容器に対して、それぞれ NaCl 含量が 0, 250, 500 mM となるように NaCl 溶液を加えた。3 日間に 1 回 0.1% のハイポネックス栄養液をそれぞれに加えた。栽培の時期ごとにシチメンソウの葉を採取し分析した。

2.4 分析方法

水分含量: 植物試料の葉を 1 g 量り、80℃ のオーブンに入れ 24 時間で乾燥させた。その後、乾燥重量を量って水分含量に換算した。

元素分析: Na, K は原子吸光光度法で測定した。植物試料はホットプレートを用いて硝酸分解を行った。土壌試料は、120℃ のオーブンで十分に乾燥させ粉碎した土壌 1 g に対して水 10 ml を加えて 5 分間振とうし、上澄みを取り希釈してから測定した。一方、塩化物イオン分析には、植物試料 0.5 g を磁製の乳鉢と乳棒で粉碎し、10 ml の水を加えて 80℃ の湯浴中で 30 分抽出した。乳鉢からの塩化物イオンの溶出がないことを確かめた。2000 × g で 10 分間遠心分離し、上澄みをキャピラリー電気泳動法によって分析した⁵⁾。

細胞内成分: クロロフィル量はアセトン抽出法⁶⁾、可溶性タンパク質は Bradford 法⁷⁾、可溶性糖類総量はアントロン硫酸法⁸⁾を用いた。

GB の定量: 試料 1 g を粉碎し 15 ml の水で抽出した。上澄みに対して *p*-プロモフェナシルプロミドを加え 80℃、75 分間加熱することによって GB を誘導体化し、低 pH キャピラリー電気泳動法により測定した⁹⁾¹⁰⁾。

3 結果と考察

3.1 土壌及び水試料の分析結果

試料の採取場所は有明海沿岸及び河川の河口にある干潟のため、水及び土壌は高い塩濃度を示した (Table 1)。水試料の EC 平均値は 24.7 mS/cm、Na 含量は 4.94 mg/ml で海水の約半分の濃度であった。一方、土壌は平均 6.86 mg/g dry weight (DW) の Na を含み、同じ方法で著者らが分析した中国黄淮海平原にある塩類土壌の平均値 (1.5 mg Na/g DW) の 4 倍以上を示した¹¹⁾。一方、栄養元素としては土壌中に多くの K が含まれている。その平均値 0.41 mg/g DW は中国塩類土壌中の約 10 倍となっており、塩性植物にとって豊富な K 源となっている。

Table 1 The pH, EC and elemental contents of water and soil samples collected in Saga, Japan

Sampling site	Water				Soil	
	pH	EC (mS/cm)	Na (mg/ml)	K	Na (mg/g DW)	K
(1) Shioda	7.30	25.8	5.32	0.26	6.38	0.40
(2) Fukutomi	7.13	19.9	4.34	0.20	7.73	0.44
(3) Higashi-yoka	7.07	28.3	5.16	0.25	6.47	0.39
	7.17 ± 0.10	24.7 ± 3.5	4.94 ± 0.43	0.24 ± 0.03	6.86 ± 0.62	0.41 ± 0.02

Average values of duplicate measurements were shown. Abbreviations: EC, electrical conductivity; DW, dry weight

Table 2 The component analysis of plant leaf samples (mg/g DW)

Site ^{a)}	Series	Water, %	Na	K	Cl ⁻	GB	Chl	Saccharide	Protein
(1)	<i>Suaeda japonica</i>	91.2	241	24.0	310	54.3	1.70	58.0	23.9
(2)	〃	90.2	180	19.0	192	38.4	3.06	64.3	22.4
(3)	〃	88.1	160	19.0	226	97.3	1.68	55.5	38.6
		89.8 ± 1.3	194 ± 34	20.7 ± 2.4	243 ± 50	63.3 ± 24.9	2.15 ± 0.64	59.3 ± 3.7	28.3 ± 7.3
(1)	<i>Artemisia fukudo</i>	89.8	120	35.0	126	75.7	2.65	76.5	47.0
(2)	〃	91.1	120	61.7	203	32.3	6.85	(229) ^{b)}	16.8
(3)	〃	90.6	146	26.5	244	13.4	3.40	57.4	28.7
		90.5 ± 0.5	129 ± 12	41.1 ± 15.0	191 ± 49	40.5 ± 26.1	4.30 ± 1.83	67.0	30.8 ± 12.4
	<i>Phragmites australis</i>	53.9	0.78	23.7	13.6	n.d.	3.40	208	57.3
	<i>Oryza sativa</i>	50.9	0.35	15.0	7.11	n.d.	1.26	83.7	25.0
	<i>Pueraria lobata</i>	68.4	0.31	17.4	1.99	n.d.	3.11	73.2	16.2
	<i>Solidago altissima</i>	62.9	1.08	18.0	1.41	n.d.	0.79	126	24.8
	<i>Glycine max</i>	65.5	0.55	14.0	1.28	n.d.	3.72	75.6	60.9
		60.3 ± 7.6	0.61 ± 0.29	17.6 ± 3.4	5.08 ± 4.78		2.46 ± 1.19	113 ± 51	36.8 ± 18.5

Average values of two measurements were shown. Abbreviations: GB, glycine betaine; Chl, chlorophyll; n.d.: not detected; a) Sampling sites (1), (2) and (3) are same as in Table 1. b) The value 229 in parenthesis was omitted for average, because it included certain experimental error.

3・2 植物試料の分析

干潟及び河口の塩性土壌では優勢に生育するシチメンソウの群間に若干フクドが共生する状態で生育していた。Table 2 に塩生植物のシチメンソウ、フクドと、対照として既に土壌が脱塩されている周辺の干拓農地に生育しているアシ、イネなど5種類の中生植物の葉の分析結果を示す。アシは根から塩を排除する耐塩性植物であるが、ここでは塩濃度の低い土壌に生育していたため中生植物に分類した。

Table 2 に示すように、塩性植物のシチメンソウとフクドでは中生植物に比べて圧倒的に高い塩の集積が見られ、シチメンソウ葉中では平均 437 mg NaCl/g DW、フクドは 320 mg NaCl/g DW となり、それぞれ中生植物 (5.7 mg NaCl/g DW) の 77 倍, 56 倍に達している。葉中の水分含量も中生植物に比べて高く保たれており、K イオンもやや高い傾向が見られた。また、GB の誘導は塩生植物にのみ特徴的に見られた。一方、クロロフィル量やタンパク質量には両者に差が見られなかったが、可溶性糖類量ではフクドの (2) を除けば塩生植物は中生植物よりかなり低い

値を示した。これらのことから、汽水域に生息する塩生植物は葉中の高い塩濃度に対して GB を誘導することによって細胞内の膨圧を維持していることが伺われた。なお、K イオンも浸透圧調節に関与しているといわれているが、中生植物の K 濃度に大差ないことから塩ストレス下で K 濃度が急激に上昇することはないことが分かった。クロロフィル量と可溶性タンパク量が中生植物のそれにそん色なかったことは、塩生植物が塩性環境に適応していることを示しているが、可溶性糖類量が低いことから必ずしも中生植物と同等の生育をしているわけではないこと、光合成で得られた糖類の蓄積が環境ストレス防御へのエネルギーとして使われたことなどが示唆された。

シチメンソウ葉中の Na はモル濃度で 8.4 mmol/g DW、これに対して GB は 0.54 mmol/g DW となり、約 16 分の 1 であった。わずかの GB によって浸透圧調節が行われるのは、取り込まれた Na が細胞中の液胞に蓄積されること、及び光合成や細胞内反応などを行う細胞内の重要機関である葉緑体や小胞体中には GB が誘導されて浸透圧調節が行われることによることが知られている¹²⁾。

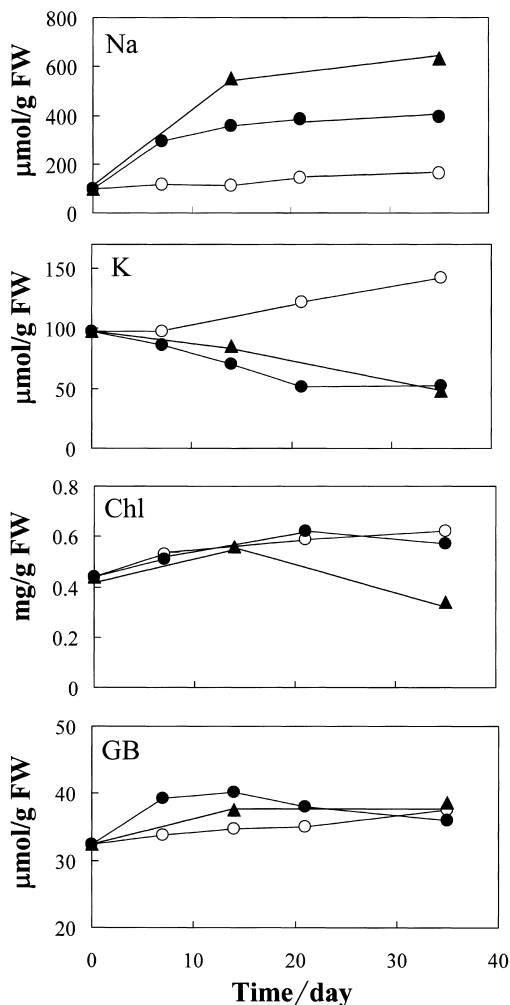


Fig. 2 Changes of cellular components in *Suaeda japonica* cultured in the presence or absence of salt stress

○ : 0 mM NaCl; ● : 250 mM NaCl; ▲ : 500 mM NaCl

2種の塩生植物間では、シチメンソウのほうが塩濃度及びGB濃度も高く、より高塩濃度に適応する傾向を示した。塩生植物のGB誘導量と土壌の塩濃度とは相関していることが知られており¹³⁾、なぜGB濃度の低いフクダが同じ塩濃度の場所に生育しているのかは不明である。両者の生理学的異同については今後検討する予定である。

3.3 塩負荷下で栽培したシチメンソウの応答

シチメンソウの塩ストレス応答を見るために、実験室でシチメンソウ種子を土耕栽培し、2週間後それぞれ0、

250、500 mMのNaCl溶液を加え1か月ほど観測した。Fig. 2にシチメンソウ葉中のNa量、K量、クロロフィル量及び合成されたGB量の経時変動を示した。図の横軸は、塩ストレスをかけた時点として0としている。各点は2点の測定値の平均を示す。シチメンソウは生育とともに培地塩濃度依存的にNaを吸収・蓄積し、逆にK量は対照より減少した。クロロフィルは培地塩濃度250 mMまでは正常であったが、500 mMでは枯れた状態の葉が増加しており、そのうち正常な状態の葉のクロロフィル量を測定したが、2点の測定値は共に減少していた。一方、GBの蓄積量は、250 mMでコントロールに比べ有意に増加したが、時間とともに0と500 mMの場合と同じ濃度に収れんした。このことはシチメンソウには培地塩濃度250 mM前後でGB誘導が最大になるような生理的応答があること¹⁴⁾、またストレスの強さにかかわらずGB濃度は最終的には30~40 μmol/g fresh weight (FW)のレベルに保たれることが分かった。

本研究の一部は財団法人ソルト・サイエンス研究財団の平成14年度研究助成により行われた。

文 献

- 1) 陣野信孝: “有明海の生きものたち”, 佐藤正典編, p. 50 (2000), (海遊舎).
- 2) T. Yokoishi, S. Tanimoto: *J. Plant Res.*, **107**, 385 (1994).
- 3) T. G. Colmer, F. Corradini, M. L. Otte: *Phytochem. Anal.*, **11**, 163 (2000).
- 4) S. D. McNeil, M. L. Nuccio, A. D. Hanson: *Plant Physiol.*, **120**, 945 (1999).
- 5) 大塚電子: *Application Data*, 018 (2000), 技術資料.
- 6) 田村太郎: “栄養診断のための栽培植物分析測定”, p. 272 (1976), (養賢堂).
- 7) M. M. Bradford: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 8) 田村太郎: “栄養診断のための栽培植物分析測定”, p. 290 (1976), (養賢堂).
- 9) 張 経華, 大久保 明, 山崎素直: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **46**, 275 (1997).
- 10) J. Zhang, X. XU, N. Nishimura, M. Abo, A. Okubo, S. Yamazaki: *Anal. Sci.*, **17**, Suppl, i1315 (2001).
- 11) J. Zhang, N. Nishimura, M. Abo, A. Okubo, S. Yamazaki: “塩生植物利用与区域農業持続発展”, 劉 小京, 劉 孟雨編, p. 77 (2002), (気象出版社).
- 12) 間藤 徹: *植物の化学調節*, **32**, 198 (1997).
- 13) S. Yamazaki, J. Zhang, N. Nishimura, T. Tadano: *Proceedings of the International Symposium, “Can Biological Production Harmonize with Environment?”* p. 343 (1999).
- 14) H. Greenway, R. Munns: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 149 (1980).