

ノ ー ト

## 好塩性植物ビートの塩ストレスに対する細胞内成分の変化

松崎 布菜<sup>1</sup>, 張 経華<sup>1</sup>, 高尾 雄二<sup>1</sup>, 下町多佳志<sup>1</sup>, 山崎 素直<sup>®1</sup>

### Changes in the cellular components of sugar beet under salt stress

Fusa MATSUZAKI<sup>1</sup>, Jinghua ZHANG<sup>1</sup>, Yuji TAKAO<sup>1</sup>,  
Takashi SHIMOMACHI<sup>1</sup> and Sunao YAMAZAKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Environmental Studies, Nagasaki University, 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8521

(Received 30 April 2003, Accepted 15 June 2003)

The acclimation of a plant to a constantly changing environment involves the accumulation of certain organic compounds of low molecular mass, known collectively as compatible solutes, in the cytoplasm. Evidence from numerous investigations of plants strongly suggests that glycine betaine (GB), an amphoteric quaternary amine, plays an important role as a compatible solute under various types of environmental stress, such as high levels of salts and low temperature. In this work, sugar beet (*Beta vulgaris*) was grown at NaCl concentrations of up to 300 mmol/l soil, and the effects of salt on the growth, contents of water, chlorophyll, soluble protein, soluble saccharide and GB in leaf were measured. The addition of NaCl up to 300 mmol/l soil significantly affected the growth, and the contents of water and chlorophyll decreased, whereas the soluble protein and saccharide concentrations in the leaf changed little. On the other hand, the GB concentration increased 6-fold with increasing the salinity of the medium, suggesting that GB is a main osmoprotectant in this plant. The induction of GB was monitored by cultivating the plant seed under salt stress. It was found that the GB originally contained in the seed was lost during the early stage of cultivation, and new GB was synthesized in the stage of germination in a dose-dependent fashion with respect to the salt concentration.

**Keywords :** *Beta vulgaris*; capillary electrophoresis; glycine betaine; salt stress; sugar beet.

### 1 緒 言

植物は、一般に高い塩濃度環境下では吸水阻害である浸透圧ストレスと体内に侵入した塩が代謝を乱す電解質ストレス（イオンストレス）を受ける。その結果、植物細胞は膨圧を失って気孔を閉じ、光合成能が低下して生育が大きく抑制される<sup>1)2)</sup>。一方、陸地で 100 mM を超える塩分が存在しても生活環を全うできる好塩性植物がある。これらの植物は高い塩濃度に適応するために、根における Na の排除能、地上部への移行制御能、Na 集積植物体内の高塩濃度耐性、形態変化による耐塩性の獲得、細胞内の浸透圧調節機能など、様々な耐塩性機構を持っている<sup>3)</sup>。

浸透圧調節機構は最も多くの植物で見られるケースで、

浸透圧を調節する物質（適合溶質）を誘導合成することによって細胞内浸透圧を調節していく仕組みである。この適合溶質としては、水溶性低分子で、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物質で、糖類（マンニトール、フラクタン、トレハロースなど）、アミノ酸、ベタインなどが知られている。その中で、ベタイン類は分子内にカルボキシル基を持つ四級アンモニウム化合物の総称であり、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<sup>4)</sup>。ベタイン類やその関連化合物としては、グリシンベタイン  $\{(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2\text{COO}^-, \text{GB}\}$  をはじめ、 $\beta$ -アラニンベタイン、プロリンベタイン、トリゴネリン、ジメチルスルホニオプロピオン酸塩などが知られている<sup>5)~7)</sup>。これらの適合溶質は塩ストレスだけでなく乾燥ストレス、低温ストレスなどを含めた浸透圧ストレスに共通して深くかかわっていることが

<sup>1</sup> 長崎大学環境科学部：852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

知られている<sup>8)</sup>。

GBはバタイン類のうち最も広く存在し、バタインの名前の由来であるビート（サトウダイコン、*Beta vulgaris*）の糖みつ中に高濃度で含まれている。ビートは高塩培地の中でも正常に生育することができる代表的な好塩性植物である。本研究では、高等植物の耐塩性機構を解明するため、キャピラリー電気泳動などの分析手法を用いて、ビートの生育段階における耐塩性因子のGBの誘導合成と植物の成長、水分、クロロフィル、可溶性タンパク質、可溶性糖類含量の測定を行い、塩ストレス負荷下での応答を調べた。

## 2 実 験

### 2.1 装置と試薬

分光光度計は島津製 UV-160 を用いた。キャピラリー電気泳動装置は、Waters Quanta-4000E を用い、使用したキャピラリーは 75  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  60 cm（有効長 50 cm）、検出は 254 nm で行った。測定温度 25°C で、サンプリングは落差法 10 cm  $\times$  10 s で行い、印加電圧は 15 kV とした。

エステル化用の *p*-プロモフェナシルプロミド (PBB) は東京化成製を使用した。標準品の GB、タンパク質量用キット及び他の試薬はすべて和光純薬製の試薬特級を用いた。脱イオン水は Milli-Q（日本ミリポア製）を使用した。試料は乳鉢中で液体窒素を用いて粉碎した。

### 2.2 ビートの栽培及び試料の採取

実験用ビート種子は北海道産飼料用ビート（シュガーマン G、2002 年 10 月ホクレン農業協同組合連合会より供与いただいた）を使用した。

ビートの土耕栽培は市販の種まき専用培養土（大石物産）21 を入れたプランター中で行った。4 つの容器に対して、NaCl 固体を水に溶かし、土壌 1 l 当たり塩濃度を 0, 50, 100, 300 mmol になるように加えて、よく混ぜた。殻（外種皮）付きの種子を 6 時間水に浸してから 200 粒ずつは（播）種し、コイトロン（KG-50HLA 型、小糸工業製）内に入れた。培養条件は、温度 25°C、湿度 55%、照明は 12 時間ごとの明暗に設定した。1 日に 1 回 0.1% のハイポネックス栄養液をそれぞれに 250 ml 加えた。発芽率は 90% 以上であった。

試料の採取については生育応答調査に対して 1 週間目、他の分析は 2 週間目の葉あるいは全株を採取した。

### 2.3 分析方法

**2.3.1 植物の生育応答調査** 葉面積を測定して生育量とした。4 つの容器ごとビートの葉を 6 枚ずつ無作為に採取し、400 倍に拡大コピーして葉の形に切り取ってから重さを測定し、これをコピー紙の比重（重量/面積）で除して葉面積を求めた。

**2.3.2 水分含量** 採取したビートの葉を 1 g 量り、80°C のオーブンで 24 時間乾燥後、乾燥重量を量って水分含量を換算した。

**2.3.3 クロロフィル含量** 葉 0.3 g を乳鉢ですりつぶし、80% アセトン溶液 10 ml を加えてクロロフィルを抽出した。抽出液を遠心し、上澄み液の吸光度 645 nm ( $A_{645}$ ) 及び 663 nm ( $A_{663}$ ) を測定した<sup>9)</sup>。クロロフィル濃度は次式から求めた。

$$C(\text{g/l}) = 0.00805A_{663} + 0.0203A_{645}$$

**2.3.4 可溶性タンパク質** 粉碎した葉 1 g に対して、4 ml の抽出用緩衝液を加え抽出した。遠心分離した上清 50  $\mu\text{l}$  をタンパク質量定量キットを用いて 600 nm の吸光度を測定した<sup>10)</sup>。

**2.3.5 可溶性糖類** 粉碎した葉 1 g に対して 10 ml の水で抽出した。遠心分離機にかけ、上清 0.1 ml を試験管に取り、0.2% アントロン硫酸溶液を 2 ml 加えて、よくかくはんしてから 10 分後に 620 nm の吸光度を測定した<sup>11)</sup>。

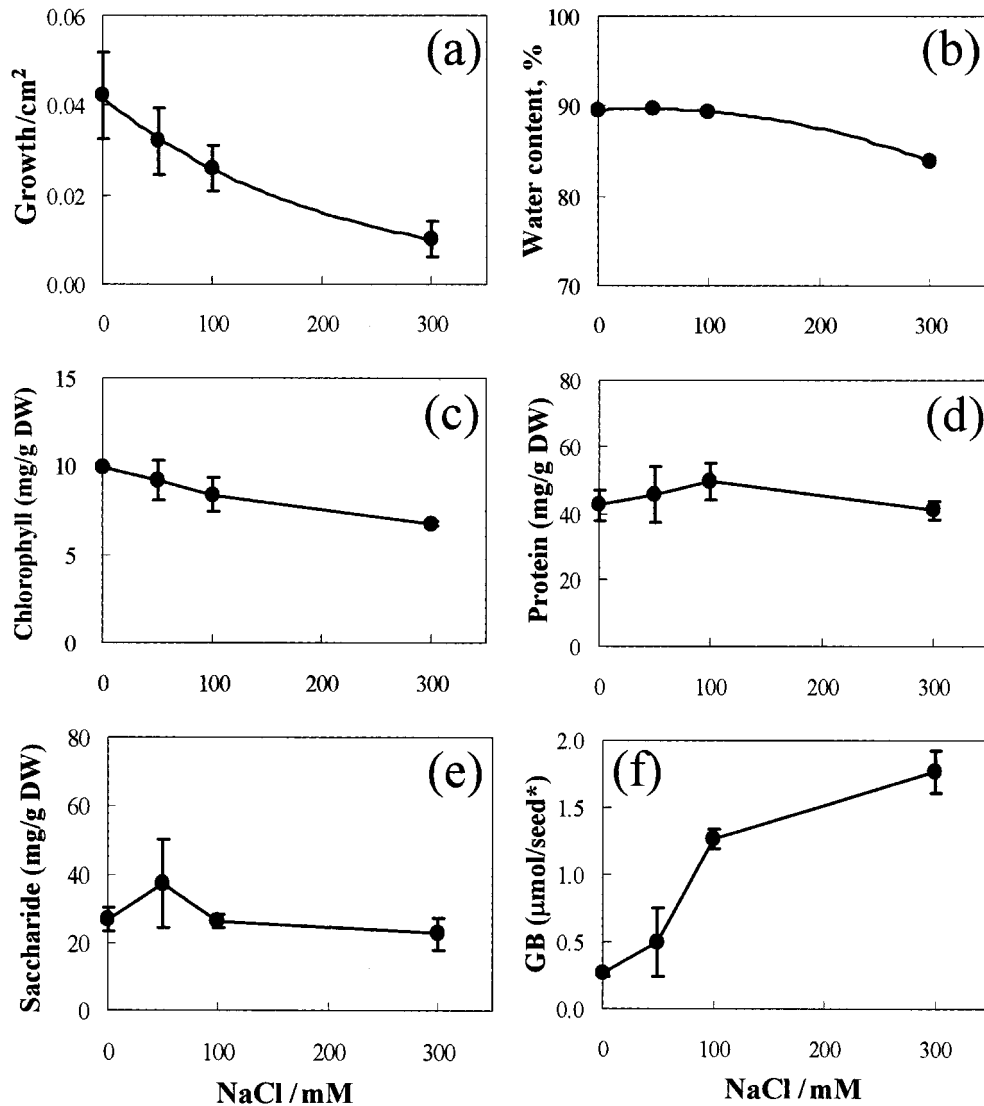
**2.3.6 GB の分析** ビートの殻付き種子は 10 個、発芽後の幼植物は殻を含めて全株 10 本を乳鉢ですりつぶし、10 ml の水を入れ恒温槽で 80°C、20 分間抽出した。PBB を用いて抽出液をエステル化した後、50 mM、pH 3.5 のリン酸塩泳動液を使用して、キャピラリー電気泳動装置により分析した<sup>12)13)</sup>。

## 3 結果と考察

### 3.1 塩ストレスに対するビートの応答

植物は進化の過程で様々な環境ストレスに対して速やかに反応して適応する機構を獲得してきた。培地の塩濃度の増加は植物の成長、細胞の種々生理機能に大きな影響を与える。Fig. 1 に異なる土壌塩濃度に対するビートの応答として、生育量、水分含量、クロロフィル量、可溶性タンパク質量、糖含量及び GB 含量の変化を示した。

Fig. 1a に生育量を示す。培地塩濃度の増加に伴って葉面積は明らかに減少することが示された。すなわち、好塩性植物であっても強い塩環境中で生育妨害を受けることを示唆している。水分含量の変化 (Fig. 1b) は、培地塩濃度 0 ~ 100 mmol/l の範囲であまり変化しないが、300 mmol/l になると減少した。この結果から、好塩性植物のビートは 100 mmol/l までの塩ストレスを受けても細胞内の水分を維持しているが、それ以上の塩濃度下では細胞内の水分は急速に失われることが分かった。培地塩濃度に対するクロロフィルの量的変化を Fig. 1c に示す。培地塩濃度の増加とともにクロロフィル量は減少傾向を示した。これらの結果は、ビートは塩ストレスを受けると、水分含量



**Fig. 1** Responses of sugar beet to salt stress on growth (a) and cellular components; water (b), chlorophyll (c), soluble protein (d), soluble saccharide (e) and glycine betaine (GB) (f). The values are the average of those obtained by three separate leaves except (b). \*: seed or seedling

の減少, 光合成の低下, そして生育が大きく阻害されることを示している。

葉中の可溶性タンパク質の量的変化を Fig. 1d に示す。培地塩濃度 0~100 mmol/l の範囲で, タンパク質量は少々増加したが, 300 mmol/l では減少が見られた。可溶性糖類の変化も調べた (Fig. 1e)。植物の葉に含まれる可溶性糖類には, 主に単糖類としてグルコースとフルクトース, 二糖類としてショ糖, 多糖類としてフルクトサンなどがある。著者らの別の実験で塩感受性植物である大根, レタス及び豆類では, 培地塩濃度に対して糖類総量が増加する傾向が見られたが, 好塩性植物のビートでは 50 mmol/l NaCl で少々変動した以外, 減少の傾向を呈していた。

Fig. 1f に GB の変化量を示す。培地塩濃度の増加とと

もに GB は種子 1 個あるいは 1 株当たり 0.25  $\mu\text{mole}$  から 1.75  $\mu\text{mole}$  まで約 6 倍の増加を示した。なお, ここでいう種子 1 個体あるいは 1 株とは, 殻 (外種皮) に覆われ内部に通常 2, 3 個の種子を含むものを 1 個体といい, その発芽した幼植物を 1 株と表現した。殻が硬く分離できなかったために殻ごと播種した。Fig. 2 に塩濃度 100 mmol/l の培地で 2 週間栽培したビートのエレクトログラムを示す。緒言に述べたように, 高等植物中には糖類, アミノ酸, ベタイン類など適合溶質が広く存在している。好塩性植物ビートには GB が存在することが既に報告されているが<sup>12)</sup>, 培地塩濃度依存的に GB 合成量が増加することを初めて観察した。

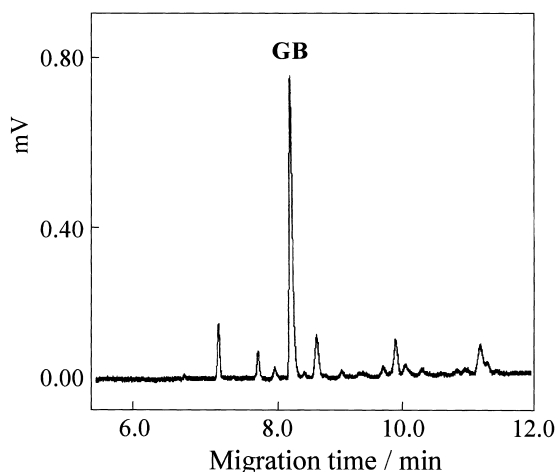


Fig. 2 Electropherogram of a leaf extract of sugar beet detected at 254 nm

Sugar beet was cultured in 100 mmol NaCl/l soil. The other conditions are described in the reference (12). Main peak is GB ester, and the others are esters of some amino acids.

### 3・2 種子中の GB 蓄積及び生育段階での塩ストレスによる誘導合成

植物の生育に伴い GB が合成・蓄積されることは示されたが、種子中にもともと GB が存在するか、また、種子の発芽のどの過程で GB 合成が始まるのかという点については、これまで明りょうな説明がなされていない。本研究では、ビートの種子、培養初期段階（土耕栽培を始めてから 1～2 日目）、発芽段階（3～4 日目）、芽生え段階（6～9 日目）、生長段階（2 週間目）の個体について GB 量の変動を測定した。殻付き種子及び幼植物を分析試料とした。Fig. 3 に異なる土壤塩濃度でのビートの生育に対する個体中の GB 含量を測定した結果を示す。土耕栽培では、培地塩濃度により生育速度が異なるので、Fig. 3 に示すように塩濃度 0～100 mmol/l では、3 日目に発芽試料、6 日目に芽生え試料を採取した。一方、300 mmol/l では、4 日目に発芽試料、9 日目に芽生え試料を採取した。

種子 1 個体中には平均 1  $\mu\text{mole}$  の GB が含まれていた。種子中の GB が定量できたのは調べた限りでは、本報告が初めてである。初期段階（1～2 日目）から発芽段階（3～4 日目）にかけて GB 量は 0.2  $\mu\text{mole}$  程度まで減少した。以後発芽段階後半から芽生え段階（6～9 日目）にかけて全株中の GB 量は塩濃度依存的に増加した。特に 300 mmol/l NaCl での GB は著しい増加を示した。このことから 0～4 日までの GB の減少から、ビート種子は初めから GB を保持していること、栽培中に種子中から溶出すること、更に溶出すると同時に発芽段階後半の 4 日目あたりから合成が始まるのが分かった。GB の溶出については別の実験で確認した。すなわち、種子を水に浸し、その

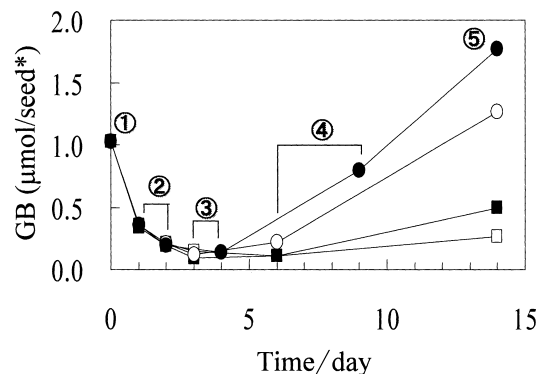


Fig. 3 Release and synthesis of GB during germination of sugar beet cultured under 0 ( $\square$ ), 50 ( $\blacksquare$ ), 100 ( $\circ$ ) and 300 ( $\bullet$ ) mmol NaCl/l soil

①: seed; ②: a stage of before germination; ③: a stage of germination; ④: a stage of after germination; ⑤: a stage of elongation; \*: seed or seedling

浸せき水を測定した結果、1 個体当たり同レベルの GB が溶出されるのを確認した。

一方、この種子中に含まれる GB は殻に含まれるのか、種子そのものに含まれるのかを知るために殻と種子の分離を試みたが、硬く密着しており分離できなかった。種子からの GB 減少を示す Fig. 3 の実験結果及び殻付き種子を水に浸すと容易に GB が溶出してくることから、恐らく GB は殻のほうに含まれていることが推察されたが、今後確認実験を行う必要がある。

以上の結果から、ビートは種子中に一定量の GB を蓄積し、発芽期まではこの内在的 GB が浸透圧調節になんらかの役目を持っていることが考えられた。そして幼芽は塩ストレスを感じて、芽生え期に新たに GB を合成し始めることが分かった。GB はコリンよりコリンモノオキシゲナーゼ及びベタインアルデヒド脱水素酵素による 2 段階の反応によって合成される。今後、これら酵素の遺伝子の転写レベルの活性増加がどの段階で発現されるかを調べることによって更に詳細な GB 合成発現の仕組みを解析する必要がある。

本研究は平成 14 年度財団法人ソルト・サイエンス研究財団の研究助成により行われた。

### 文 献

- 1) T. Liu, J. V. Staden: *Plant Growth Regul.*, **33**, 13 (2001).
- 2) Y. El-Iklil, M. Karrou, M. Benichou: *Agronomie*, **20**, 399 (2000).
- 3) 間藤 徹: *植物の化学調節*, **32**, 198 (1997).
- 4) I. Tozlu, G. A. Moore, C. L. Guy: *Aust. J. Plant Physiol.*, **27**, 35 (2000).
- 5) T. G. Colmer, F. Corradini, M. L. Otte: *Phytochem. Anal.*, **11**, 163 (2000).

- 6) M. Adrian-Romeo, S. J. Wilson, G. Blunden, M. Yang, A. Carabot-Cuervo, K. Bashir: *Biochem. Syst. Ecol.*, **26**, 535 (1998).
- 7) K. D. Nolte, A. D. Hanson, D. A. Gage: *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **122**, 8 (1997).
- 8) 今井亮三: *化学と生物*, **5**, 294 (1996).
- 9) 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).
- 10) W. J. Wolf: *J. Agr. Food Chem.*, **18**, 969 (1977).
- 11) 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).
- 12) 張 経華, 大久保 明, 山崎素直: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **46**, 275 (1997).
- 13) J. Zhang, X. Xu, N. Nishimura, M. Abo, A. Okubo, S. Yamazaki: *Anal. Sci.*, **17** Suppl, i1315 (2001).