

【話 題】

耐塩性樹木、その分子育種へのアプローチ

横田 智^{*1}・田原 恒¹・宮澤 真一¹・西口 満¹・毛利 武¹・

掛川 弘一²・楠城 時彦³

はじめに

東日本大震災から早くも5年が経過したが、すさまじい津波の威力はいまだに深く記憶に刻まれている。この時の津波は多くの人命を奪い、建物などを破壊したあげく、農地や林地に高濃度の塩を残していった。津波の猛威に耐えた陸前高田の奇跡の一本松が、その後枯れてしまったのは塩害が原因とされている。それまで、日本の国内では大規模な塩害など生じないと思っていたが、東日本大震災は塩害についての認識を改める契機にもなった。

さて、土壌中の過剰な塩が植物に及ぼす害には2つの面がある(図-1)。第一に、高濃度の塩が土壌水の浸透圧を高めるため、植物は水の吸収が困難になり光合成に必要な水が不足する(浸透圧ストレス)。第二に、土壌に蓄積したナトリウムイオンや塩素イオンなどの有害成分が植物に吸収され、カルシウムやカリウムなどの無機養分の吸収が阻害されて植物の成長を妨げる(イオンストレス)。さらに、塩ストレスを受けた植物では二次的に活性酸素が発生してダメージを大きくする。そのため、耐塩性のメカニズムは、個体、器官、および細胞レベルで生理学、および分子生物学的に研究されてきた(Munns and Tester 2008)。その結果として多くの研究が、塩ストレスを受けた植物の内部にある種の化合物が蓄積することを明らかにした。これらの化合物は適合溶質と呼ばれ、スクロース、プロリン、グリシンベタインなどが含まれる(Flowers et al. 1977; Hasegawa

et al. 2000)。好塩性植物の多くでは、浸透圧調節の機能を果たすのに十分な量のプロリンやグリシンベタインが葉内に蓄積していたと報告されている(Flowers et al. 1977)。また、ある溶質はタンパク質の立体構造を安定化させる働きがあるともされている(Munns 2005)。

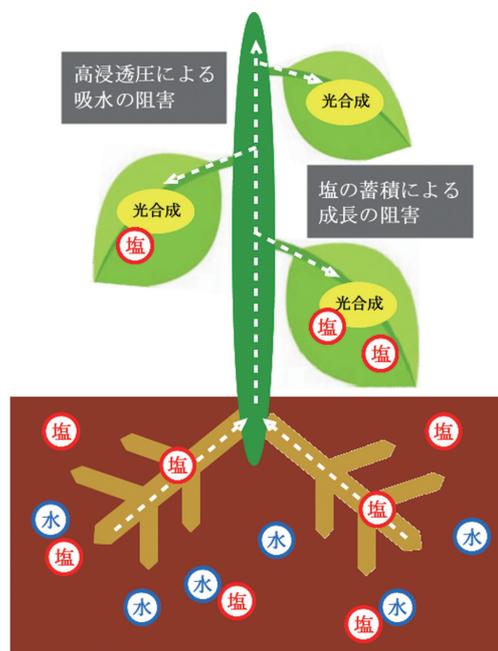


図-1 塩ストレスが植物に及ぼす影響。高塩土壌では高浸透圧のために吸水が困難になり、光合成に必要な水が十分に確保できなくなる。また、植物体内に蓄積した塩によってカルシウムやカリウムなどの無機養分の吸収が妨げられ成長が阻害される。

*E-mail: hayahide@ffpri.affrc.go.jp

¹よこたさとる、たはらこう、みやざわしんいち、にしぐちみつる、もうりたけし
森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域

²かけがわこういち

森林総合研究所森林資源化学研究領域

³なんじょうときひこ

森林総合研究所林木育種センター西表熱帯林育種技術園

RFO と GolS 遺伝子

ラフィノース族オリゴ糖 (RFO) は、ダイズやコムギなどの登熟中の種子内に蓄積しているのが見出され、種子の乾燥耐性に関与していると考えられた (Saravitz et al. 1987; Black et al. 1996, 1999; Brenac et al. 1997; Downie et al. 2003)。その後、RFO の蓄積は高温、低温、乾燥、高塩のような劣悪な環境に曝されたシソ科の植物やシロイヌナズナなどでも観察された (Gilbert 1997; Pattanagul and Madore 1999; Taji et al. 2002; Panikulangara et al. 2004; Peters et al. 2007; Peters and Keller 2009)。こうしたことから、RFO は植物の広範な環境耐性に関わりがあると考えられるようになった。一般には RFO も適合溶質の1つとされ、ハウレンソウから単離されたチラコイド膜を乾燥などから保護したり (Santarius 1973)、植物の酸化ストレスを防止したりする (Nishizawa et al. 2008) 機能が報告されている。

RFO はガラクトチノールを前駆体としてラフィノース、スタキオースが合成される (図-2)。ガラクトチノール合成酵素 (GolS) は、UDP-ガラクトースと *myo*-イノシトールからガラクトチノールを合成する反応を触媒する酵素である。RFO の蓄積と同様に、GolS 遺伝子が様々な環境ストレスにตอบสนองして発現することが複数の植物で報告されている (Taji et al. 2002; Downie et al. 2003; Panikulangara et al. 2004; Wilkins et al. 2009; Zhou et al. 2014)。さらに、GolS 遺伝子を過剰発現する組換えシロイヌナズナではガラクトチノールの含有量が増加するとともに、乾燥、高塩、低温に対する耐性が向上したとされている (Taji et al. 2002; Nishizawa et al. 2008)。これらのことから、GolS 遺伝子を用いた組換えポプラ (*Populus nigra*) の作成は、樹木の耐塩性を向上させる研究にも有用であると考えた。

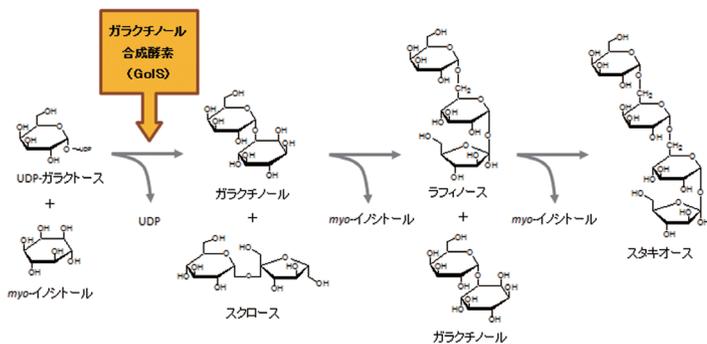


図-2 ガラクチノールとラフィノース族オリゴ糖 (RFO) の合成経路

GolS 組換えポプラの作成と耐塩性テスト

ポプラの GolS 遺伝子 (*PnGolS*) を調べたところ、ゲノム中に 6 種類の遺伝子があり、乾燥や高塩などのストレスを与えることで発現量が増すことが明らかになった (西口ら 2012)。6 種類の GolS 遺伝子の中から特にストレス誘導性の高かったものを選び、アグロバクテリウム法によってポプラに導入して GolS 遺伝子を過剰に発現するポプラを作成した。 *PnGolS* 組換えポプラにおいて導入遺伝子の発現量を定量 RT-PCR で測定した結果、非組換えポプラに比べて 20 万倍以上に増えていた (田原ら 2014)。 *PnGolS* 組換えポプラの葉に含まれるガラクトチノールと RFO の定量結果を図-3 に示した。 *PnGolS* 組換えポプラではガラクトチノール含有量が 0.22 mg g⁻¹ FW となり、非組換えポプラの 5 倍以上に増加するとともに、非組換えポプラでは検出されないスタキオースが検出された (横田ら 2016)。

PnGolS 組換えポプラの耐塩性テストに先立って、非組換えポプラの耐塩性の閾値を調べてみた。異なる濃度の NaCl を添加した肥料液で水耕栽培したところ、25 mM NaCl では有意な苗高成長の低下がないのに対して、75 mM NaCl では 4 週間後の時点で生存している苗はなかった (横田ら 2013)。この結果からポプラの耐塩性の閾値は 50 mM NaCl 程度であると考えた。植物の耐塩性は種によって大きく異なり、耐塩性の高い順に並べるとアルファルファ > オオムギ > イネ・シロイヌナズナとなる。耐塩性の低いイネやシロイヌナズナの閾値は 40 mM NaCl 程度であるとされている (Munns and Tester 2008)。したがって、ポプラの耐塩性はイネやシロイヌナズナと同じレベルであり、ポプラは耐塩性の低い植

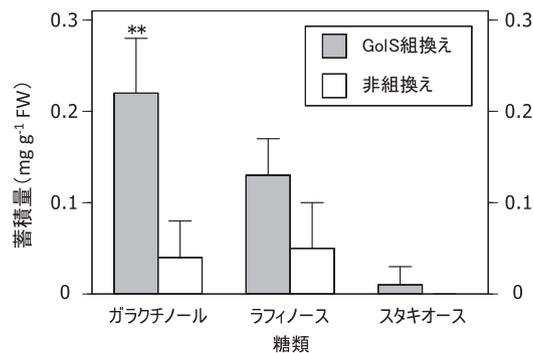


図-3 *PnGolS* 組換えポプラのオリゴ糖類の含有量。ポプラの葉に含まれるガラクトチノールとラフィノース族オリゴ糖を定量した。平均値±標準偏差 (n=3)、**P<0.01 (t 検定) (横田ら 2016)

物に分類される。

PnGolS 組換えポプラの耐塩性テストとして、水耕栽培により4週間、50 mM NaCl 存在下で *PnGolS* 組換えポプラと非組換えポプラの苗高成長量を比較してみた(図-4)。塩処理を開始した当初は、*PnGolS* 組換えポプラと非組換えポプラの成長に差はなかった。しかしながら、塩処理期間が長くなるにつれて非組換えポプラの成長低下が大きくなり、4週間後の *PnGolS* 組換えポプラの苗高成長量は非組換えポプラの約1.5倍になった(横田ら2016)。この結果から、*GolS* 遺伝子による遺伝子組換えは、ポプラの耐塩性向上においても有効であると考えた。

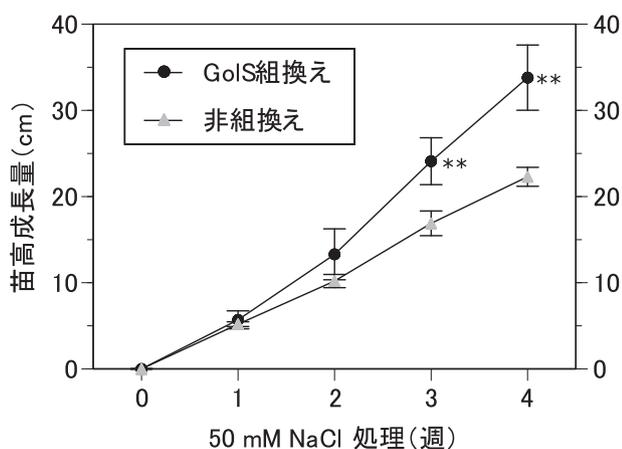


図-4 塩処理が *PnGolS* 組換えポプラの苗高成長に及ぼす影響。苗高 20 cm 程度の苗木を 50 mM NaCl を添加した肥料液で水耕栽培し、4週間の苗高成長量を測定した。平均値±標準偏差 ($n=5$)、** $P < 0.01$ (t 検定) (横田ら2016)。

RFOの機能と耐塩性

ここまでは *GolS* 遺伝子を過剰に発現し、RFOの蓄積を増加させた組換えポプラの耐塩性が向上することを述べてきた。ここからは、RFOの蓄積がなぜ耐塩性につながるのか少し考えてみたい。前述のようにRFOには浸透圧調節、タンパク質の立体構造の安定化、酸化ストレスの防止などの働きがあるとされているが、機能的には未だに不明な部分が残されている。

われわれの研究グループでは、ポプラの耐塩性につながるRFOの機能を明らかにするため、*PnGolS* 組換えポプラの光合成や水分生理に関する測定を行った。光合成速度や葉の搾汁液の浸透圧に関しては、*PnGolS* 組換えポプラと非組換えポプラの間に明らかな違いは見

られなかった。その一方で、蒸散には有意な違いが見られ、非組換えポプラの蒸散速度 $5.5 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ に対して *PnGolS* 組換えポプラは $4.1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ と小さくなっていた(図-5)。*GolS* 遺伝子の過剰発現と蒸散速度の低下との因果関係は今のところ不明である。しかしながら、吸水が困難になる高塩環境において、蒸散による水の消失の少ない *PnGolS* 組換えポプラが、非組換えポプラよりも良好な生育を示す結果になったと推定している。

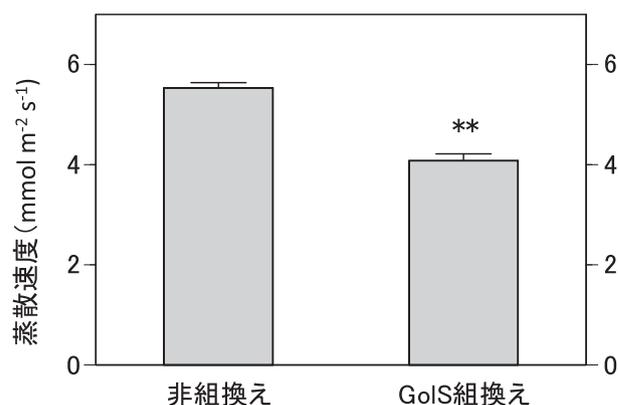


図-5 *PnGolS* 組換えポプラにおける蒸散速度の低下。NaClを含まない肥料液で水耕栽培した苗木の葉で蒸散速度を測定した。平均値±標準偏差 ($n=15$)、** $P < 0.01$ (t 検定)。

おわりに

今回、環境応答遺伝子の一つであるポプラの *GolS* 遺伝子に関する基礎的な研究を通じて、耐塩性樹木の分子育種につながる可能性を示すことができた。しかし、文中で示したように、実験モデル樹木として用いたポプラは本来耐塩性の低い樹木であり、単一の遺伝子の働きを増加させるだけで著しく樹木の耐塩性を向上させることは難しいと考えられる。そのため、作出した遺伝子組換えポプラをただちに塩害地などに植栽することは現実的ではない。今後は、より耐塩性の高い育種母樹の選抜や、複数の環境応答遺伝子の利用など、新たなアプローチを進めていく必要がある。

引用文献

Black M, Corbineau F, Grzesik M, Guy P, Côme D (1996) Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. *Journal of Experimental Botany* 47: 161–169

- Black M, Corbineau F, Gee H, Côme D (1999) Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology* 120: 463–471
- Brenac P, Horbowicz M, Downer SM, Dickerman AM, Smith ME, Obendorf RL (1997) Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed development and maturation. *Journal of Plant Physiology* 150: 481–488
- Downie B, Gurusinghe S, Dahal P, Thacker RR, Snyder JC, Nonogaki H, Yim K, Fukunaga K, Alvarado V, Bradford KJ (2003) Expression of a galactinol synthase gene in tomato seeds is up-regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented. *Plant Physiology* 131: 1347–1359
- Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR (1977) The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 28: 89–121
- Gilbert GA, Wilson C, Madore MA (1997) Root-zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in coleus. *Plant Physiology* 115: 1267–1276
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463–499
- Munns R (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167: 645–663
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651–681
- 西口 満・古川原 聡・横田 智・毛利 武・田原 恒・掛川 弘一・楠城時彦 (2012) 遺伝子組換え樹木の創出のためのポプラ環境ストレス耐性遺伝子の探索. *日林学術講* 123: pb194
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* 147: 1251–1263
- Pattanaagul W, Madore MA (1999) Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in coleus. *Plant Physiology* 121: 987–993
- Panikulangara TJ, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Stransky H, Schöffl F (2004) Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 3148–3158
- Peters S, Mundree SG, Thomson JA, Farrant JM, Keller F (2007) Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker) : both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *Journal of Experimental Botany* 58: 1947–1956
- Peters S, Keller F (2009) Frost tolerance in excised leaves of the common bugle (*Ajuga reptans* L.) correlates positively with the concentrations of raffinose family oligosaccharides (RFOs) . *Plant, Cell and Environment* 32: 1099–1107
- Santarius KA (1973) The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. *Planta* 113: 105–114
- Saravitz DM, Pharr DM, Carter TE (1987) Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. *Plant Physiol* 83: 185–189
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 29: 417–426
- 田原 恒・毛利 武・西口 満・古川原 聡・横田 智・掛川 弘一・楠城時彦 (2014) 環境ストレス耐性の向上を目的とした遺伝子組換えポプラの作製. *関東森林研究* 65: 57–60
- Wilkins O, Waldron L, Nahal H, Provart NJ, Campbell MM (2009) Genotype and time of day shape the *Populus* drought response. *The Plant Journal* 60: 703–715
- 横田 智・田原 恒・西口 満・古川原 聡・毛利 武・掛川 弘一・楠城時彦 (2013) 野生型セイヨウハコヤナギにおける耐塩性の閾値について. *関東森林研究* 64: 113–114
- 横田 智・田原 恒・西口 満・毛利 武・掛川 弘一・楠城時彦 (2016) ガラクチノール合成酵素遺伝子によるポプラの耐塩性の向上. *関東森林研究* 67: 159–160
- Zhou J, Yang Y, Yu J, Wang L, Yu X, Ohtani M, Kusano M, Saito K, Demura T, Zhuge Q (2014) Responses of *Populus trichocarpa* galactinol synthase genes to abiotic stresses. *Journal of Plant Research* 127: 347–358