

マングローブ植物を用いた耐塩性機構の研究  
—分子、細胞、高次形態からのアプローチ  
**Studies on the salt tolerant mechanisms  
of mangrove plants,  
-Molecular, Cellular and Morphological approaches.**

三村 徹郎<sup>1</sup>、芦原 坦<sup>2</sup>、高相 徳志郎<sup>3</sup>、小関 良宏<sup>4</sup>  
Tetsuro MIMURA<sup>1</sup>, Hiroshi ASHIHARA<sup>2</sup>, Tokushiro TAKASO<sup>3</sup>, Yoshihiro OZEKI<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>一橋大学商学研究科、奈良女子大学理学部、<sup>2</sup>お茶の水女子大学理学部、  
<sup>3</sup>琉球大学熱帯生物圏研究センター、<sup>4</sup>東京農工大学工学部  
<sup>1</sup>Hitotsubashi University, Nara-Women's University, <sup>2</sup>Ochanomizu University,  
<sup>3</sup>Ryukyu University, <sup>4</sup>Tokyo University of Agriculture and Technology

Salt tolerant mechanisms of mangrove cells were investigated by combining physiological, biochemical, molecular biological and ultra-structural researches. For cellular and molecular biological analysis, a suspension-cultured cell strain of *Bruguiera sexangula* was constructed. Using cultured cells, we found that mangrove cells can differently respond to various NaCl concentrations. Metabolic analysis of compatible solutes of mangrove plants was also performed. cDNA library was isolated from suspension-cultured cells and novel gene for salt tolerance was isolated by newly developed functional screening method. Ultra-structural observation of viviparous seedlings showed the important role of albumen for the salt tolerance. Experimental conditions for regeneration of mangrove plants from cultured cells were examined.

### 1. 研究目的

地球上のほとんど全ての生物存在の基礎には、緑色植物による光合成がある。光合成は、空気中の二酸化炭素と地中から吸い上げた水を、太陽からの光エネルギーを用いて有機物に変換する機構である。しかし、植物も動物も光合成による有機物を利用するだけで生育できるわけではない。生物はその生育のために、外部から様々な無機イオンを吸収しなければならない。こうして、生物が存在するためには、有機物と無機物の両者が相互にバランスして存在することが重要になる。

植物も動物も、生存に必要な無機栄養素に大きな違いはない。しかしながら、その中でNa<sup>+</sup>だけが、動物と植物によって必要性が大きく異なっている。動物において、Na<sup>+</sup>の栄養素としての重要性は改めて考えるまでもないが、植物（特に陸上高等植物）において、Na<sup>+</sup>を必須栄養素とするものはほとんど存在しない。むしろ、植物では塩害といってNa<sup>+</sup>は害になるとされている。沿岸近くで植物が育ち難いのも、灌漑農業を進めていた地域で塩が析出して農作物が育てられなくなっているのも皆、過剰の塩の存在による。

本研究で取り上げたマングローブは、熱帯・亜熱帯の沿岸及び河口近くに分布している樹木

類の総称である。マングローブ植物の顕著な特徴は、高濃度の塩分を含む海水から汽水域にかけて生育する樹木類ということである。近年開発途上国において、環境と開発に関する問題から大きな関心を浴びているマングローブ植物は、環境保護の重要性から、生態学的研究が広範囲に進められている。しかし、その最大の特徴であり、沿岸域での生育を可能にしている耐塩性機構についての分子・細胞生物学的解析は、いまだほとんどなされていない。本共同研究では、我々が世界に先駆けて開発したマングローブの培養細胞系を主として用いながら、細胞生物学、分子生物学の研究手法を中心に、塩ストレス下でのマングローブ植物耐塩性機構の全体像を明らかにすることを目指した。共同研究として、細胞レベルでのイオン・浸透圧代謝の研究（三村徹郎）、イオン・浸透圧調節を支える同化・エネルギー代謝機構（芦原坦）、耐塩性に関する分子の検索と遺伝子の単離（小関良宏）、耐塩性に関する高次形態の解明（高相徳志郎）を進めた。また、培養細胞からの再生系の確立を目指して農林水産省（現横浜国立大学）の笹本浜子博士に研究協力をおおいだ。

植物の耐塩性機構の研究は、現在農業上の要請からも熱心に進められており、作物を中心に、生理学・生化学・分子生物学的研究も大きな成

果を挙げつつある。しかし、もともと強い耐塩性を持つ植物類の研究は、尚現象の記載に留まっていることが多い。マングロープのような特異な生息能をもち、人間環境にも有用な植物の生理機能が明らかになれば、現在進められている、通常の植物（作物）に耐塩性を付与しようという研究もより大きな進展が望めるはずである。

## 2. 研究経過

### 2-1. 実験材料

マングロープのような木本植物の生理解析を行うことは、生育期間の長さや生育スペースの問題などから、従来の実験室科学だけでは困難な点も多い。この点を克服するために、我々は世界で初めてマングロープ複数種の培養細胞系を開発し、細胞レベルでの耐塩性機構解析に取り組んできた。

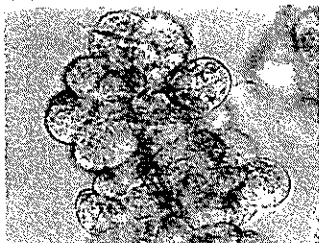


図1：マングロープ植物 *Bruguiera sexangula* の培養細胞系

一方、実験室の解析だけでは、自然界で実際に生じている生理機構との乖離が生じる可能性がある。そこで、国内最大のマングロープ林を有する西表島において、生理形態上の解析を進めるとともに、自然生態下での生育環境をモニターし、実験室での実験条件と比較する事を試みた。

### 2-2. 細胞生理、生化学的解析

ヒルギ科の一種、*Bruguiera sexangula* から確立した懸濁培養細胞系を用いて、塩処理時の細胞内イオン分布をオルガネラ単離法を用いて調べた。また細胞膜、液胞膜におけるイオン輸送系の解析を進めた。西表島に生育するマングロープ植物を用いて、浸透圧調節物質（適合溶質）の合成とエネルギー関連代謝について検討した。

### 2-3. 分子細胞生物学的解析

*B. sexangula* 培養細胞から作成した cDNA がコードするタンパク質の、機能を指標としたスクリーニングを試みた。*B. sexangula* cDNA ライブラリーを大腸菌に導入し、得られた形質転換体の中から耐塩性が強化されたクローンの選抜を試みた。その結果、大腸菌の耐塩性を強化するタンパク質をコードする cDNA を獲得し

た。本研究ではこの cDNA に着目し、その機能解析を試みた。

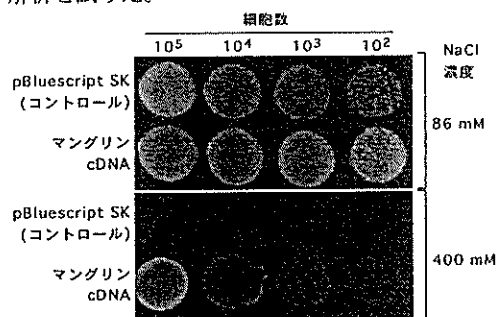


図2：マングリンを導入した大腸菌は高濃度 NaCl 存在下でも生育できる

### 2-4. 形態学的解析

ヒルギ類が示す真性胎生発芽と耐塩性の関係を検討した。特に、胎生芽の胚乳組織が海水由来の塩類を高濃度で集積し、この塩類のために細菌・菌類の胎生芽への侵入を抑えている可能性を調べた。実験材料として *Rhizophora stylosa* を用い、胚と胚乳、これらを取り囲む種皮および果皮の形態を樹脂切片を用いて観察した。透過電子顕微鏡を用いて細胞の微細構造について観察した。更に走査電子顕微鏡を用いて前記の組織の表面構造と断面構造も調べた。

### 2-5. 培養細胞からの再生系確立の検討

*B. sexangula* 培養細胞から、プロトプラストを単離し、細胞増殖のための最適培地ホルモン条件を検討した。ポプラとマングローププロトプラストの電気による細胞融合条件を検討した。また、植物体再分化の可能性を探る為、アブシジン酸、ジベレリン等の内生植物ホルモン及びアミノ酸類の微量定量を試み、ポプラと比較した。

## 3. 研究成果

### 3-1. 培養細胞塩処理時のイオン代謝

*B. sexangula* 培養細胞を異なる濃度の NaCl で処理すると、高濃度処理時の方が、細胞内塩濃度が低下することが分かった（図3 Na<sup>+</sup>濃度）。この時、高塩処理によって、細胞膜に H<sup>+</sup>-ATPase と Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーター活性が誘導され、細胞内の塩が排出されることが明らかとなった。また、塩濃度がそれほど高くない場合は、塩を排出する代わりに液胞に蓄積して細胞質の塩害を防ごうとすることを見いだした。これらの性質が、ヒルギ科植物の根による塩の排出と葉における塩の蓄積に対応するらしい。

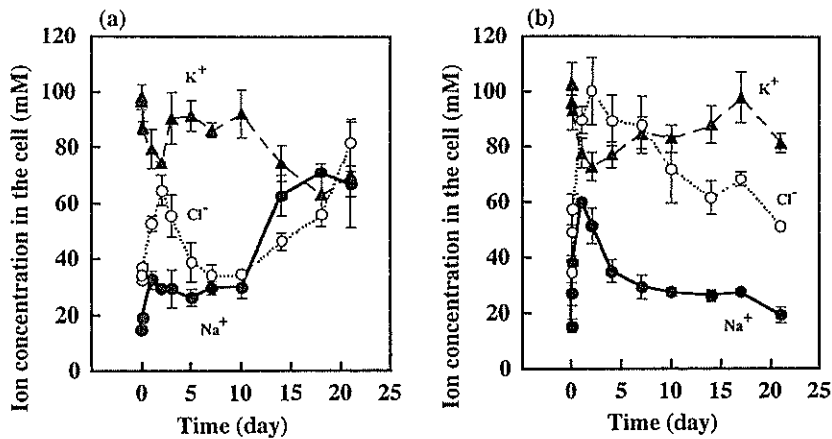


図3：懸濁培養細胞を50mM NaCl(a)、150mM NaCl(b)存在下で培養した際の細胞内イオン濃度の変化

### 3-2. マングローブ細胞の適合溶質

西表島のマングローブ植物の適合溶質を検討した結果、ヒルギダマシの葉では、グリシンベタインが、それ以外のマングローブではマンニトールなどのポリオールが測定された。ヒルギダマシの茎と根にはスタキオースが蓄積されていた。葉、根の遊離アミノ酸のそれぞれ84%、97%がアスパラギンであった。葉を250mM NaClで処理すると、グリシンベタインの含量が約2倍に増加した。ヒルギダマシのエネルギー代謝・炭水化物代謝に関与する多くの酵素類は、*in vitro*ではNaClにより強く阻害され、酵素自体は耐塩性ではない。[1,2-<sup>14</sup>C]エタノールアミンを投与した実験から、ヒルギダマシ葉の細胞質におけるグリシンベタイン生合成経路を明らかにした。さらに、グリシンベタイン合成時のメチル化反応について解析を進めた。

### 3-3. マングローブ植物の耐塩性に関する遺伝子の探索

*B. sexangula* cDNA ライブラリーから大腸菌の耐塩性を強化するタンパク質をコードするcDNAを獲得し全塩基配列を決定した(1019bpで256残基のアミノ酸からなる)。このタンパク質を「マングリン」と命名した。次にマングリンをタバコ培養細胞に導入したところ、150mMのNaClを含む培地で培養した細胞は、全ての形質転換体において、顕著な生育促進が見られた。これらの結果から、マングリンは、原核生物から高等植物に至る、幅広い生物群の耐塩性を強化する機能を有するものと考えられた。

次に、*B. sexangula* 培養細胞におけるマングリンの発現に対するNaClの影響について検討を行った。マングリンはNaClの添加の有無にかかわらず恒常的に発現し、特に細胞懸濁液に100mMとなるようにNaClを添加した場合、約10分でそのmRNA量が增大することが確認

できた。マングリンは酵母やタバコの耐塩性を強化するばかりでなく、*B. sexangula*の耐塩性に対し、何らかの重要な役割を担っているものと考えられた。

### 3-4. *R. stylosa*の胚珠の発生と塩類濃度

*R. stylosa* 各組織の成長過程の詳細を観察し、胚乳では、表皮細胞とこれに接する細胞群の分裂で細胞数を増し、表皮に厚い細胞壁が形成されること、胚に接する胚乳細胞が崩壊する時は、液胞膜の崩壊が同時に起きることを見いだした。また胚では、構成細胞は細胞質に富み、細胞壁には電子染色されない薄層が存在すること、子葉組織の表面は凹凸が著しく、これによる表面積の増大が養分吸収の機能に効果的であると示唆された。各組織の塩濃度調べ、胚軸が果実から露出する段階で増加することを見いだした。

表1：乾物重当たりのNa濃度

	段階1	段階2	段階3
胚	0.43%	0.45%	0.47%
胚乳	0.60%	0.60%	2.49%
種皮	0.90%	0.80%	2.04%
果皮	1.00%	1.10%	1.15%

### 3-5. 培養細胞系からの再生系の確立

*B. sexangula* 培養細胞から単離したプロトプラストの最適培地ホルモン条件を明らかにし、懸濁液による継代培養が可能になった。この分裂増殖に対する、培地中のNaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>濃度を変えた実験から、マングローブの耐塩性がプロトプラストにおいても見られることを明らかにした。

ポプラとマングローブプロトプラストを電気処理により融合させ、融合細胞のカルス増殖を見いだした。しかし、今のところ再分化体は得られていない。*Sonneratia alba*の種子胚から

のカルス増殖に成功した。オヒルギ、メヒルギ胚軸片から、多芽体形成条件を明らかにし、形成過程を組織学的に検討するとともに、無菌培養物を多数得た。

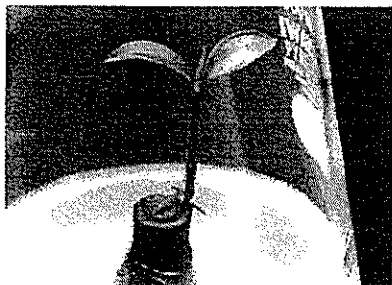


図4：オヒルギ胚軸片から形成された多芽体

#### 4. 今後の課題と発展

##### 4-1. 培養細胞や生育個体細胞を用いた耐塩性機構の生理、生化学、分子細胞生物学的解析

我々が開発した *B. sexangula* の懸濁培養細胞は、高塩処理下で、塩排出と浸透圧調節機能を持つことが明らかとなった。今後は、この細胞系を主たるモデル系として、

- 1) 細胞のイオン調節に働いている膜輸送分子の同定を、生化学的、分子生物学的に進める。
- 2) 塩の排出や輸送、適合溶質の合成など一般の植物よりも多くのエネルギー (ATP) をつかうマングローブ植物に特有なエネルギー供給システムがあるのかについて検討する。
- 3) 新奇に発見した耐塩性関連タンパク質マングリンの有する機能の詳細なメカニズムについて明らかにする。
- 4) マングローブ培養細胞は、NaCl 濃度の変化に対して異なる生理反応を示すが、この NaCl 濃度の認知をどのように行っているかを分子レベルで明らかにする。
- 5) 培養細胞で明らかにした耐塩性機構が、実際の生育個体でどのように機能しているかを明らかにすることを目指している。

##### 4-2. マングローブ細胞から単離した耐塩性機構に関与する遺伝子による、他の植物体への耐塩性の付与

現在、マン格林以外にも植物体に耐塩性を付与できそうな複数の新奇タンパク質遺伝子がマングローブ cDNA ライブラリーから単離されつつある。これらの遺伝子とその解析方法は、高等植物の耐塩性を強化する新しい手段になると期待できる。

##### 4-3. 高次形態と耐塩性機構の関連

本研究では、塩類の集積が胚軸が果実から露

出する段階で生じることが示せた。しかし胚乳に集積する塩類の運搬経路と集積メカニズムの解明と、塩類を集積した胚乳細胞に実際に細菌・菌類の進入を抑える機能があるかも調べなければならぬ。

また、本共同研究では、遺伝子・細胞レベルの研究と高次形態の研究が必ずしも有効には結びつかなかった。しかし、培養細胞で明らかになりつつあるイオン輸送系が、胚乳細胞で機能しているかなどの検討をはじめのことを考えている。

#### 4-4. 今回のまとめと今後の展望

今回の共同研究では、個別の研究、共通の材料を用いた共同研究、個々のグループが持つ実験技術をもとにした共同研究が複数立ち上がった。特に、琉球大学とその他の研究グループの共同研究は、実験室での研究を、現場のマングローブ植物にフィードバックして研究を進めるために極めて意味のあるものとなりつつある。

また、この研究グループをもとにしたマングローブの分子・細胞レベルの研究を二年に渡り西表島の琉球大学熱帯生物圏研究センターにおいて開催することが可能となった。この研究会には、本共同研究に参画しているグループ以外からも、国内のマングローブ研究者に参加を呼びかけ、活発な議論を行うことができた。

今後は、この二年間の成果をもとにして、マングローブの耐塩性機構を分子レベルでより詳細に明らかにするとともに、その機構の生態的意義付け、農学や環境問題への応用などを積極的に進めたいと考えている。

#### 参考文献

[1] Mimura T., Mimura M., Washitani-Nemoto S., Sakano K., Shimmen T., Siripatanadilok S. (1997) Efficient callus initiation from leaf of mangrove plant, *Bruguiera sexangula* in amino acid medium: Effect of NaCl on callus initiation. *J. Plant Res.* 110:25-29.

[2] 三村 徹郎 (1996) マングローブ林の維持・再生のための培養細胞系開発 *地球環境研究* 37:63-79

#### 発表論文リスト

[1] Yasumoto, E., Adachi, K., Kato, M., Sano, H., Sasamoto, H., Baba, S. and Ashihara, H. (1999) Uptake of inorganic ions and compatible solutes in cultured mangrove cells during salt stress. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35, 82-85.

すでに複数の論文を投稿中あるいは投稿準備中である。

また、(社)日本植物学会、日本植物生理学会、日本植物分子細胞生物学会、日本林学会などで発表講演を多数おこなった。