

## 塩ストレス下におけるイネの葉緑体微細構造変化とその生理的意義に関する研究

山根浩二 (近畿大学農学部)

農耕地の表土への塩類集積は作物の生産性を低下させる代表的な環境ストレスの一つである。この塩類集積に起因するストレス環境(以下、塩ストレス)は、乾燥ストレスとイオンストレスが複合したストレスである。さらに、それらのストレス環境が2次的に酸化ストレスを引き起こし、作物の様々な部位に障害が発現すると考えられている。そのため、障害発現機構が複雑であり、障害を引き起こされる生理的な原因は未だ充分には解明されていない。本研究は、葉緑体微細構造変化を詳細に観察することにより、ストレス障害発現機構の一端と、それらの構造変化の生理的意義を明らかにした。なお、それらの実験では、塩ストレス環境としてNaCl過剰培地を用い、さらに塩ストレス感受性イネ品種の日本晴を供試して実験を行った。研究業績の内容は以下のように要約される。

### 1. 葉緑体における障害の発現機構に関する研究

塩ストレス下で生じる葉緑体微細構造変化として、チラコイドの膨潤が観察されている。この微細構造変化に対して、乾燥ストレスとイオンストレスのどちらが強く影響を及ぼすかを明らかにするために、等浸透圧(-1.0 MPa)のNaCl溶液とPEG溶液を用いて水耕栽培でストレス処理を行い、詳細な観察を行ったところ、PEG溶液によるストレスではチラコイドの膨潤は観察されず、NaCl溶液のみでチラコイドの膨潤が観察された。さらに、土耕栽培で緩やかにイネに乾燥ストレス処理を行っても、チラコイドの膨潤は観察されなかった。つまり、チラコイドの膨潤はイオンストレスの影響が強いことを明らかにした(業績1,2)。

チラコイドの膨潤は、活性酸素による酸化ストレスが関与していることが知られている。そこで、活性酸素除去剤を葉に与えた後に塩ストレス処理を行い、葉緑体の微細構造変化を詳細に観察した。その結果、チラコイドの膨潤は過酸化水素( $H_2O_2$ )とヒドロキシルラジカル( $\cdot OH$ )の除去剤を与えたときに抑制され、両者の関与が示唆された。さらに、 $H_2O_2$ の葉緑体内における局在を観察するため、 $CeCl_3$ とdiaminobenzidine (DAB)を用いた電子顕微鏡レベルの組織化学染色を試みた。両物質は $H_2O_2$ と反応して不溶性物質を生じ、電子顕微鏡下で黒色の沈殿物として観察できる。その結果、両染色法において、チラコイド上に反応産物が観察され、チラコイドの膨潤と $H_2O_2$ の蓄積との直接的な関係が明らかになった(業績8)。

葉緑体内における $H_2O_2$ の過剰蓄積は、 $H_2O_2$ の生成と消去のバランスが乱れるためと考えられている。そのため、 $H_2O_2$ を消去するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)とカタラーゼ(CAT)の塩ストレス下における活性を調べた。また、葉緑体内における $H_2O_2$ の生成は二段階の反応で進行し、まず電子伝達系の電子が $O_2$ に渡されてスーパーオキシドラジカル( $O_2^-$ )が生成する。生成した $O_2^-$ は、鉄含有型スーパーオキシドディスムターゼ(Fe-SOD)によって $H_2O_2$ に変換され、 $H_2O_2$ が生じる。このように、SOD活性と $H_2O_2$ 含量には正の相関があるため、Fe-SOD活性を調べた。その結果、Fe-SOD活性は対照区と比較して上昇したが、 $H_2O_2$ を消去するAPX活性は上昇せず、CAT活性は有意に低下した。これらの結果から、塩ストレス下において葉緑体で生成した $O_2^-$ はSODによって効率的に消去されるが、その反応によって生じた $H_2O_2$ の消去が不十分なため、チラコイドの膨潤が生じることを示唆する知見を得た(業績3)。

植物に軽度のストレスを前処理すると、その後のストレス耐性が強化されることが知られている。そこで、葉緑体内で $O_2^-$ を生じさせる試薬であるメチルビオオロゲン(MV)を、障害が起こらない程度に前処理して酸化ストレスに順応させ、塩ストレス下における葉緑体障害が緩和されるかを調べた。その結果、MVを処理したイネでは、塩ストレス下でも抗酸化酵素活性が高く、葉緑体だけでなく、葉全体の酸化ストレス障害が軽減された。そのため、葉緑体をあらかじめ酸化ストレスに順応させておけば、葉緑体だけでなく葉全体の塩ストレス障害を軽減することができ、今後の農業技術への応用の可能性を提示した(業績4)。

チラコイドの膨潤と葉緑体機能変化との関係を明らかにするために、葉緑体内の機能をクロロフィル蛍光から非破壊的に測定できるパルス変調クロロフィル蛍光測定装置(PAM: Pulse Amplitude Modulation)を用いて、クロロフィル蛍光と葉緑体微細構造変化との関係を調べた。その結果、蛍光の最小値である $F_0$ の増加に伴う最大量子収率 $F_v/F_m$ が減少したとき、チラコイドの膨潤が現れることが明らかとなった。 $F_0$ の増加は、光化学系II反応中心の損傷と強く関係しているため、チラコイドの膨潤は、活性酸素による光化学系II反応中心の機能障害と関係していることが明らかとなった(業績5)。

チラコイドの膨潤は、葉の先端部(古い組織)から基部(若い組織)に向けて出現することに着目し、齢にともなう抗酸化酵素活性の変化や $H_2O_2$ の蓄積、組織の塩含量、およびチラコイド膨潤との関係を調べた。その結果、チラコイドの膨潤は、葉組織における過剰な塩の蓄積が直接的な原因ではなく、組織齢に依存した抗酸化能の低下によるものであることを明らかにした(業績6,7)。

### 2. 葉緑体突起構造に関する研究

葉緑体が塩ストレスを受けると、チラコイドの膨潤が起こる前にストロマが肥大した葉緑体突起構造が出現するが、この微細構造変化の生理的意義は不明である。この突起構造を、透過型電子顕微鏡で詳しく観察したところ、突起構造はくびれて葉緑体から切り離されることが明らかとなった。また、突起構造に形と大きさが類似した球形かつ二重の包膜を持ち、ルビスコを含む直径が1.0  $\mu m$ 程度の構造体が細胞質基質や液胞内で観察された。これらの結果から、葉緑体の突起構造は、くびれた後に葉緑体から切り離されて細胞質基質に放出され、最終的に液胞に運ばれて分解されることが示唆され、突起構造は葉緑体自己分解経路の一部であることを明らかにした(業績9)。

以上のように、本研究では、塩ストレス下における葉緑体微細構造変化の観察を基に、葉緑体の自己分解であるルビスコ排出経路の一部とともに、過剰活性酸素が引き起こす障害発現機構とを明らかにした。本研究の成果や手法は、作物のストレス生理学に幅広く応用でき、今後のさらなる研究の進展が期待されることから、日本作物学会研究奨励賞に値するものである。

### 研究業績

1. Yamane, K., Kawasaki, M., Taniguchi, M. and Miyake, H. 2003. Differential effect of NaCl and polyethylene glycol on the ultrastructure of chloroplasts in rice seedlings. *J. Plant Physiol.* 160: 573-575.
2. Yamane, K., Hayakawa, K., Kawasaki, M., Taniguchi, M. and Miyake, H. 2003. Bundle sheath chloroplasts of rice are more sensitive

to drought stress than mesophyll chloroplasts. *J. Plant Physiol.* 160: 1319-1327.

3. Yamane, K., Rahman, M.S., Kawasaki, M., Taniguchi, M. and Miyake, H. 2004. Pretreatment with antioxidants decreases the effects of salt stress on chloroplast ultrastructure in rice leaf segments (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod. Sci.* 7: 292-300.
4. Yamane, K., Rahman, M.S., Kawasaki, M., Taniguchi, M. and Miyake, H. 2004. Pretreatment with a low concentration of methyl viologen decreases the effects of salt stress on chloroplast ultrastructure in rice leaves (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod. Sci.* 7: 435-441.
5. Yamane, K., Kawasaki, M., Taniguchi, M. and Miyake, H. 2008. Correlation between chloroplast ultrastructure and chlorophyll fluorescence characteristics in the leaves of rice (*Oryza sativa* L.) grown under salinity. *Plant Prod. Sci.* 11: 139-145.
6. Yamane, K., Mitsuya, S., Kawasaki, M., Taniguchi, M. and Miyake, H. 2009. Antioxidant capacity and damages caused by salinity stress in apical and basal regions of rice leaf. *Plant Prod. Sci.* 12: 319-326.
7. Yamane, K., Mitsuya, S., Taniguchi, M. and Miyake, H. 2010. Transcription profiles of genes encoding catalase and ascorbate peroxidase in the rice leaf tissues under salinity. *Plant Prod. Sci.* 13: 164-168.
8. Yamane, K., Mitsuya, S., Taniguchi, M. and Miyake, H. 2012. Salinity-induced subcellular accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in leaves of rice. *Protoplasma* 249: 301-308.
9. Yamane, K., Mitsuya, S., Taniguchi, M. and Miyake, H. 2012. Salt-induced chloroplast protrusion is the process of exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts into cytoplasm in leaves of rice. *Plant Cell Environ.* 35: 1663-1671.