

ポプラのラフィノースファミリーオリゴ糖の環境ストレス条件下での消長

掛川弘一*・楠城時彦*・西口 満・古川原聡・毛利 武・田原 恒・横田 智 (森林総研)

要旨：ラフィノースファミリーオリゴ糖 (RFO) は、植物の成長・分化や環境ストレス耐性に関与する。RFO には、ラフィノースおよびスタキオースが含まれるが、これらのオリゴ糖はガラクトチノールから生合成される。さらに、内生ガラクトチノール量は、RFO 産生の律速因子になっている。草本植物では、ガラクトチノールおよび RFO が、乾燥、高塩濃度や低温等の環境ストレスにさらされた細胞を防御するために、適合溶質として機能することが示された。本研究では、樹木における RFO の機能を明らかにするために、乾燥処理時のポプラ (*Populus nigra* var. *italica*) 地上部のガラクトチノールと RFO を分析した。その結果、ガラクトチノール、ラフィノースおよびスタキオースのいずれも、乾燥処理に反応して内生レベルが上昇した。このことから、樹木においても、内生ガラクトチノールおよび RFO 量と乾燥ストレス耐性に相関があることが示唆された。

キーワード：ラフィノースファミリーオリゴ糖 (RFO)、乾燥耐性、適合溶質

Abstract : Raffinose family oligosaccharides (RFO) to which raffinose and stachyose belong are involved in seed development and environmental stress tolerance in higher plants. RFO is synthesized from galactinol that catalyzes a rate limiting step of RFO biosynthesis. In *Arabidopsis*, galactinol and raffinose accumulate in response to drought stress, and a role of RFO as osmoprotectants was shown by transgenic works. To elucidate a function of RFO under environmental abiotic stresses in tree species, we determined sugar content in aerial parts of Lombardy poplar (*Populus nigra* var. *italica*) subjected to drought treatment. Internal levels of galactinol, raffinose and stachyose rose according to duration of the treatment suggesting a correlation between RFO content and drought tolerance in tree.

Keywords : Raffinose family oligosaccharide (RFO), drought tolerance, osmoprotectant

I はじめに

植物は、乾燥、高塩濃度、低温や強光など様々な非生物学的環境ストレスにさらされているにもかかわらず、動物のように積極的に移動してストレスを回避することができない。そのため、環境変化に素早く応答して耐性を発揮するための機能を細胞レベルで発達させている。とりわけ、乾燥は、植物の成長を規定する最大の環境ストレス因子であるため、高等植物は乾燥ストレスに対する応答機構や耐性機構を高度に進化させている。乾燥ストレスを受けた植物細胞では、ストレスシグナルの受容や伝達を担うプロテインキナーゼや転写因子といった制御タンパク質が発現あるいは活性化し、引き続いて実際に細胞の防御に携わる機能タンパク質が発現する。乾燥ストレスによって発現が誘導される機能タンパク質には、植物ホルモンのアブシジン酸 (ABA) の合成酵素、活性酸素を除去する酵素、水やイオンの輸送に関与するタンパク質や適合溶質の合成酵素などがある (1)。

適合溶質とは、細胞質において浸透圧調節を担う化合物を指すが、中にはストレス時にタンパク質を防御する機能を持つものもある。ストレスに反応して蓄積する適合溶質の種類は、植物種によって様々である。一般的に、乾燥ストレスに反応して植物細胞内に蓄積する適合溶質としては、プロリン、グリシンベタイン、ソルビトール、スクロースやオリゴ糖などが知られている (2)。草本植物のシロイヌナズナでは、オリゴ糖の一種であるラフィノースファミリーオリゴ糖 (RFO) が、RFO の前駆体である糖アルコールのガラクトチノール (図-1) と共に、乾燥、高塩濃度や低温といった環境ストレスに反応して細胞内に蓄積し、ストレス耐性の向上に寄与することが示された (3)。ガラクトチノールおよび RFO が、乾燥ストレスを受けた植物において適合溶質として機能することにより、細胞内の浸透圧調節やタンパク質の保護に関与すると考えられる。本研究では、樹木における RFO の消長を明らかにするため、乾燥ストレス処理を行ったポプラ苗を用いて内生ガラク

Koichi KAKEGAWA*, Tokihiko NANJO*, Mitsuru NISHIGUCHI, Satoshi KOGAWARA, Takeshi MOHRI, Ko TAHARA, Satoru YOKOTA (Department of Molecular and Cell Biology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki 305-8687 JAPAN), Analysis of raffinose family oligosaccharides (RFO) under stress conditions in poplar

*These authors contributed equally to this work

チノールおよびRFOを定量した。

II 材料と方法

1. 材料およびストレス処理 ポプラ (セイヨウハコヤナギ, *Populus nigra* var. *italica*) の無菌培養苗雌株 30 本を供試体として用いた。ポプラ新条を寒天培地入りのプラスチック製ポットに移植し、25°C一定、相対湿度 60%、16 時間明期/8 時間暗期の人工光下で無菌培養した。6 週間培養した苗に対して、培養時と同一の環境下でポットの蓋を完全に開けて放置することにより乾燥処理を行った。処理後の苗の地上部の生重量を計測した後、アルミ箔で包んで液体窒素で速やかに凍結し、分析に使用するまで-80°Cのディープフリーザー内で保存した。

2. オリゴ糖の定量分析 供試体を液体窒素中で摩砕し、80%エタノールで 90°C、10 分間の抽出を 3 回行った。遠心分離後、得られた抽出液を減圧濃縮し、クロロホルムで脱脂して水層を回収した。水層は陽イオン交換樹脂 (Dowex 50Wx8, ダウケミカル社製) で処理した後、減圧濃縮して定量用サンプルとした。サンプル中のガラクトチノールおよび RFO は高速液体クロマトグラフィーにより以下の条件で分析した。機種: Shimadzu LC-10A (島津社製)、カラム: COSMOSIL Sugar-D (4.6 x 250 mm, ナカライテスク社製)、溶離液: アセトニトリル/水=75/25、流速: 1 ml/min、カラム温度: 30°C、検出器: Shimadzu RID-6A (島津社製)。

III 結果と考察

植物の種子の分化や環境ストレス耐性に関与することが知られている RFO は、ガラクトチノールを前駆体として生合成される (図-1)。ガラクトチノールの合成を触媒する酵素はガラクトチノールシンターゼであり、この酵素が RFO 産生の律速因子となっている (3)。樹木におけるストレス時の RFO の消長を調べるため、乾燥処理したポプラ苗のガラクトチノールおよび RFO を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析した結果、内生のガラクトチノール、ラフィノースとスタキオースをそれぞれ検出することができた (図-2)。また、maltotetraitol が、内部標準として適当な物質であることがわかった。

次に、乾燥ストレス条件下におけるガラクトチノールおよび RFO の蓄積量を経時的に調べた。乾燥処理 3 日で、ガラクトチノール (565.8 μ g/gFW)、ラフィノース (123.3 μ g/gFW) およびスタキオース (21.7 μ g/gFW) のいずれも内生レベルの上昇が見られた。乾燥処理 5 日では、ガラクトチノール量は減少に転じた (315.8 μ g/gFW)。一方、ラフィノース (460 μ g/gFW) とスタキオース (114.2 μ g/gFW) は、乾燥処理 3 日目よりさらに内生レベルが上がっていた。これは、

植物体の乾燥が進むに従い、ガラクトチノールから RFO への変換が進行したためであると考えられる。この実験により、ガラクトチノールおよび RFO のストレス条件下での消長パターンは、樹木においても草本植物と同様であることが示唆された。

IV おわりに

世界人口の急激な増加やそれに起因する地球温暖化は、人類が直面する危急の問題である。食糧増産や荒漠地の緑化を目的とする遺伝子組換え植物 (GM 植物) の開発が、米国や中国をはじめとする多数の国で進められている。植物の遺伝子組換えに関しては、安全性の評価系が確立していないことなどいくつかの問題があり、全世界的に商業利用が認められているわけではない。しかし、地球規模での食糧難や環境劣化に歯止めをかけるためには、多かれ少なかれ GM 植物に依存せざるを得ない (気候変動枠組条約締約国会議 (COP9))。地球上の陸地の相当部分を占める半乾燥地や乾燥地において、遺伝子組換え技術によって乾燥耐性が向上した作物や樹木を栽培することは、食糧増産および温暖化軽減にとって極めて有望な方法である。

これまで、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) などのモデル草本植物を用いた研究により、乾燥耐性の向上に有効な形質や関連遺伝子が多数発見されている (2)。それらの有用形質のうち、ガラクトチノールおよび RFO の蓄積は、植物の乾燥耐性に大きく貢献する。そのため、ガラクトチノールの生合成を担う酵素であるガラクトチノールシンターゼをコードする遺伝子は、高乾燥耐性 GM 植物のための優良な標的である。実際、ガラクトチノールシンターゼ遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナ組換え体は、高い乾燥耐性を獲得した (3)。ガラクトチノールおよび RFO の産生能の向上は、高乾燥耐性 GM 樹木の開発にも応用できると考えられる。本研究では、乾燥処理時のポプラにおいて、ガラクトチノールと RFO の内生量の上昇を確認した。これは、今後の高乾燥耐性組換えポプラの開発につながる成果として位置付けられる。

V 参考文献

- (1) 篠崎一雄・篠崎和子 (2001) 乾燥ストレス応答の分子機構. (朝倉植物生理学講座 5 環境応答. 寺島一朗編, 212pp, 朝倉書店, 東京). pp. 106-114.
- (2) 楠城時彦・春日美江・篠崎和子・篠崎一雄 (2002) 環境ストレスによる形態変化. 蛋白質 核酸 酵素, 47: pp. 1684-1689.
- (3) 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*. *Plant J.* **29**: 417-426.

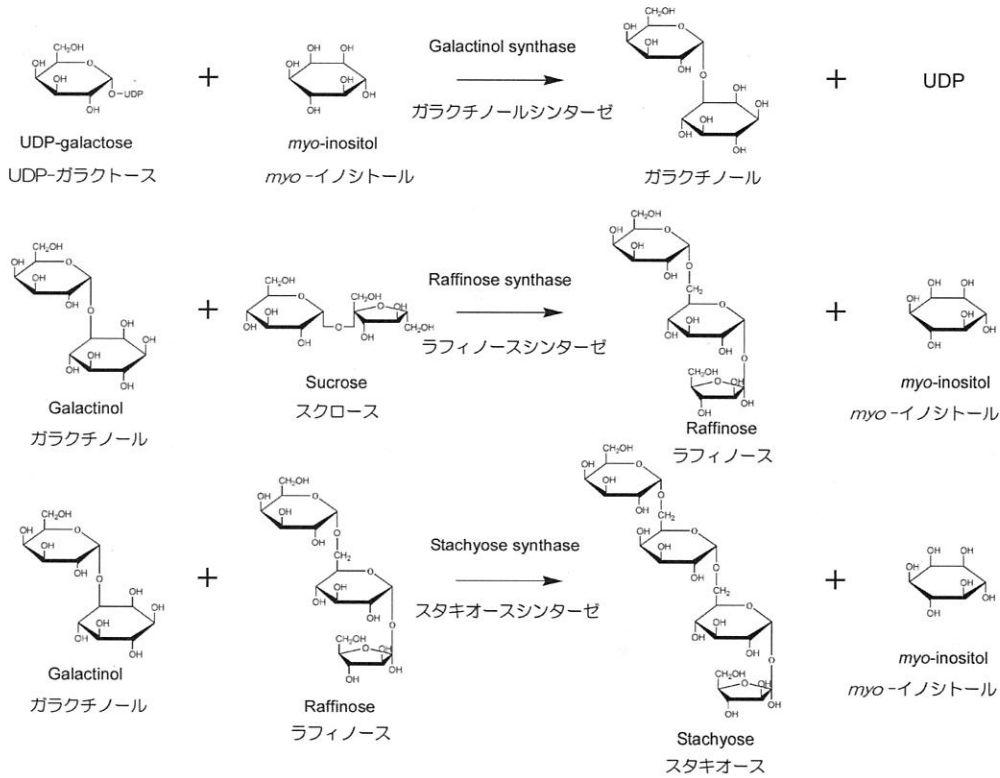


図-1. 植物におけるガラクチノールおよびラフィノースファミリーオリゴ糖 (RFO) の代謝経路

Fig.1 Metabolic pathway of galactinol and RFO in plants

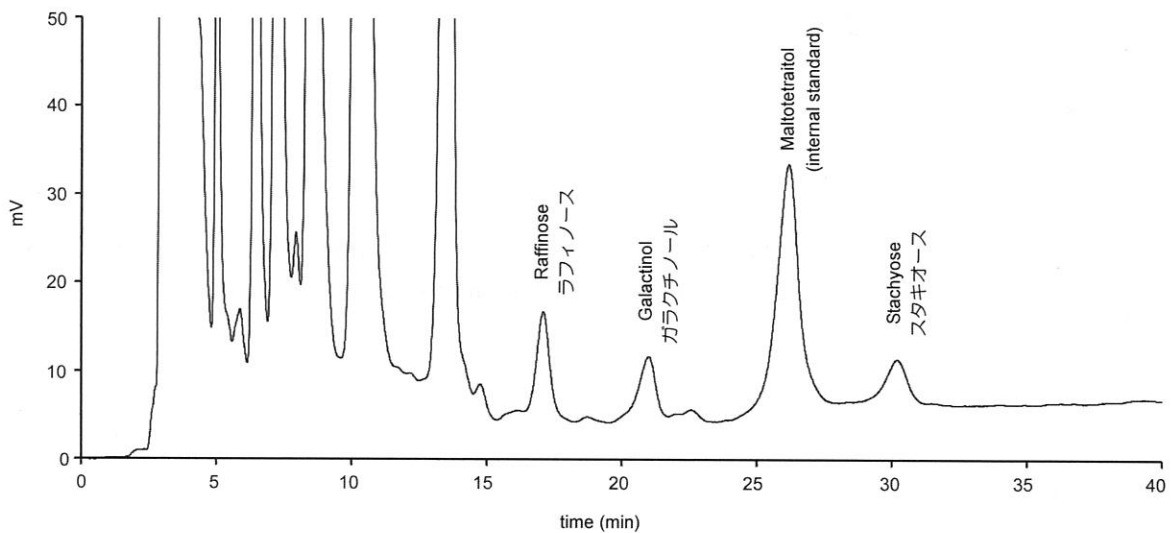


図-2. ポプラのガラクチノールおよびラフィノースファミリーオリゴ糖 (RFO) のクロマトグラム

Fig.2 HPLC profiles of galactinol and RFO in poplar

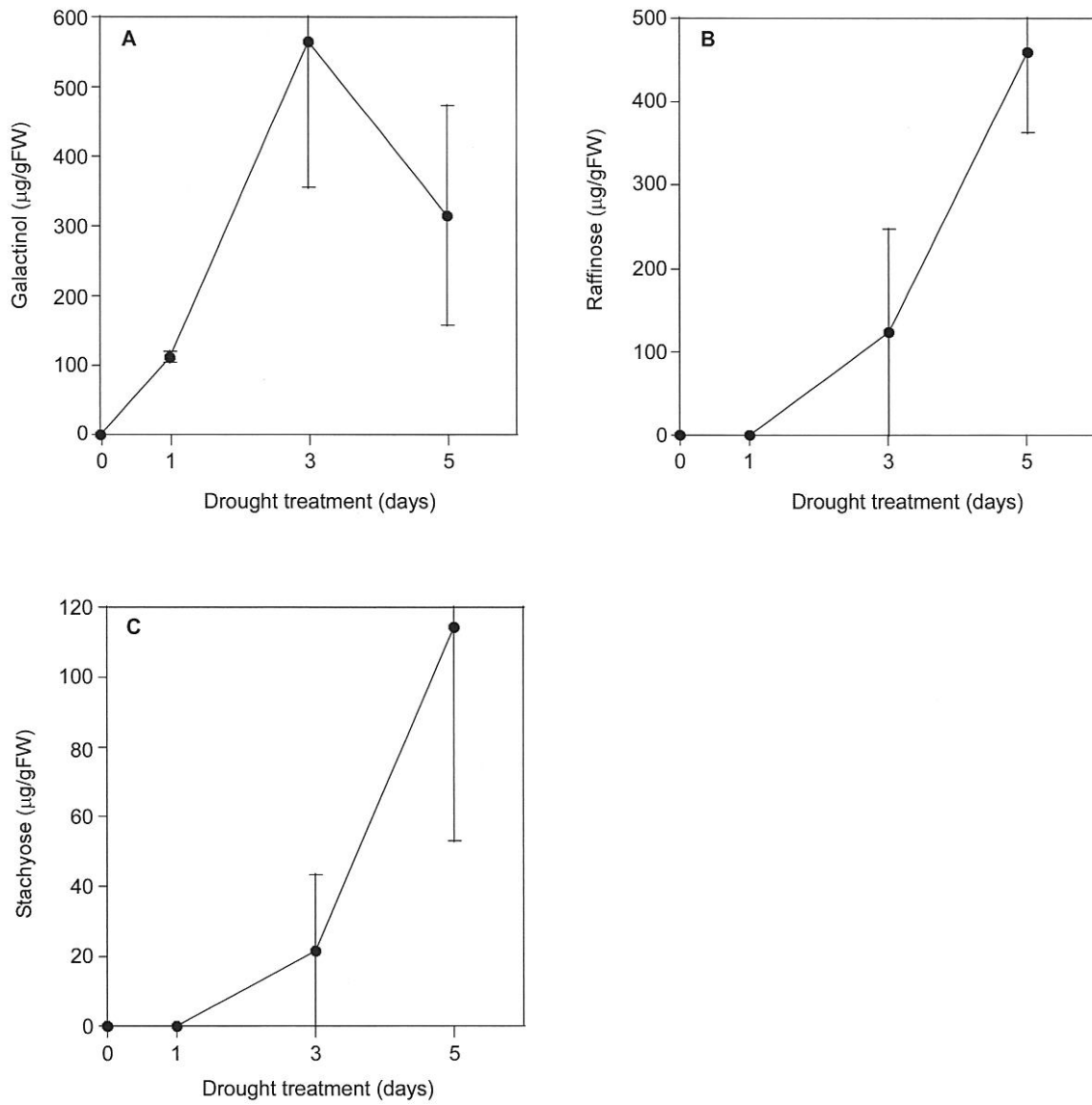


図-3. 乾燥処理によるガラクチノールおよびラフィノースファミリーオリゴ糖 (RFO) の内生量の経時変化 ($n=3$, S.E.)

Fig.3 Effect of drought stress on content of galactinol and RFO in poplar ($n=3$, S.E.)