

## 野生稲 *Oryza latifolia* Desv. の葉緑体チラコイド膜の耐塩性

仲村一郎<sup>1)</sup>・東江栄<sup>1)</sup>・飛田哲<sup>2)</sup>・柳原誠司<sup>3)</sup>・野瀬昭博<sup>1)</sup>・村山盛一<sup>\*、4)</sup>・本村恵二<sup>4)</sup>

(<sup>1)</sup>佐賀大学, (<sup>2)</sup>国際農林水産業研究センター, (<sup>3)</sup>IRRI, (<sup>4)</sup>琉球大学)

**要旨** : 我々は前報で野生種 *Oryza latifolia* は、水稻の耐塩性品種として育成された SR26B よりも耐塩性が高いことを示した。その要因を明らかにするため、*O. latifolia* 葉身の光合成速度、及びチラコイド膜の酸素放出速度を NaCl 存在下で測定し、感受性品種 *O. rufipogon* と比較した。*O. rufipogon* の光合成速度は、NaCl によって大きく阻害され、300 mM、及び 655 mM NaCl 存在下では、それぞれ処理前の 75 %、及び 30 %であった。一方、*O. latifolia* では、300 mM NaCl 存在下では処理前とほとんど変わらず、655 mM で約 60 %まで低下した。チラコイド膜の耐塩性も *O. latifolia* で高く、*O. latifolia* では酸素放出速度は 655 mM NaCl 存在下で 13 %低下したが、*O. rufipogon* では 300 mM で 10 %、655 mM で 30 %それぞれ低下した。チラコイド膜の耐塩性の要因を解析するために、チラコイド膜のタンパク質組成を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で調べたところ、*O. latifolia* はチラコイド膜に 20.3 kDa、及び 22.4 kDa の本種に特異的なタンパク質を有していた。これらのタンパク質を二次元電気泳動 (2-DE) でさらに調べたところ、分子量 20.3 kDa、及び 22.4 kDa のタンパク質はそれぞれ少なくとも二つ、及び三つのタンパク質を含んでいた。また、スポット番号 28、29 及び 34 の 3 種はまだ報告のない機能未知のタンパク質であった。これらの結果から、*O. latifolia* は、チラコイド膜の耐塩性が高く、高 NaCl 存在下でも光合成能力を維持することができること、またチラコイド膜に本種に特異的なタンパク質を有していることがわかった。

**キーワード** : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動, 光合成, 耐塩性, チラコイド膜タンパク質, 二次元電気泳動, 野生稲

乾燥、半乾燥地域では、塩類集積土壌が広がってきており、全世界面積の約 7 %にも及んでいる (Szabolcs 1994)。塩ストレスは、作物の生長及び収量を制限する重要な環境要因の一つである (Boyer 1982)。塩ストレス条件下では、作物の光合成速度は低下するが (Kaiser and Heber 1981, Seeman and Critchley 1985)、これは、気孔の閉鎖 (Nagy and Galiba 1995, Lakshimi ら 1996)、葉内のタンパク質の減少 (Sibole ら 1998)、クロロフィル含量の低下 (Kolchevskii ら 1995, Sultana ら 1999)、葉内イオンバランスの攪乱 (Khan ら 1997) 等によることが示唆されている。

イネは塩に対して感受性が高く (Greenway and Munns 1980)、NaCl 処理によって光合成速度が著しく低下する。例えば、耐塩性品種と感受性品種を 150 mM NaCl 存在下で 2 日間栽培した場合、光合成速度は前者で 60 %、後者で 85 %低下する (Maegawa ら 1987)。イネの光合成速度の低下は、アポプラストへの塩の蓄積に伴う水ポテンシャルの低下によって引き起こされるという報告はあるが (Yeo ら 1985)、光合成関連酵素、あるいは光合成器官に対する塩の直接的な影響はほとんど調べられていない。

植物の耐塩性機構は、塩分の制御と塩分に対する耐性に大別できる。塩分の制御には、塩類に対する輸送障壁、塩分の除去、及び細胞内での塩の隔離等があり、塩分に対する耐性には、浸透調整や葉緑体チラコイド膜の耐性等が含まれる。イネの場合、耐塩性の程度には品種間差があり、耐塩性の高い品種は、地上部への Na<sup>+</sup>の移行を抑える機構を有していると考えられてきた (Yeo and Flowers 1986, Tsuchiya ら 1994)。しかし、この機構のみでイネに耐塩性

をもたせるには不十分で (Garcia ら 1995)、NaCl 存在下では時間の経過に伴う葉内の NaCl の蓄積は避けられない (Tsuchiya ら 1992)。このような場合には、浸透調節のためプロリンやグリシンベタインといった適合溶質を蓄積することが知られている (Garcia ら 1997)。

我々は前報 (Nakamura ら 2002) で、耐塩性 *Oryza* 属近縁野生種の *O. latifolia*、同感受性の *O. rufipogon*、*O. sativa* 耐塩性品種の SR26B、及び同感受性品種の IR28 に 3 週間 NaCl を与えて水耕栽培し、葉身の Na<sup>+</sup>含量、及び個体の生存率について調べた。その結果、*O. latifolia* では Na<sup>+</sup>が SR26B よりも多く葉内に蓄積したが、生存率は SR26B よりも高いこと、また塩処理後、気孔開度が維持され、プロリンが蓄積されることが明らかとなった。これらの結果から、*O. latifolia* は、これまでイネの一般的な耐塩性機構とされてきた塩の排除よりむしろ、塩分に対する耐性が高いと考えられた。

塩分に対する耐性の高さは、光合成器官自体の耐塩性が高いことを示唆すると考えられるが、光合成器官に対する NaCl の影響を調べた報告は少ない。耐塩性の高いシアノバクテリア突然変異体を用いた報告では、変異株のチラコイド膜の耐塩性が高いこと、また、変異株のチラコイド膜は野生株に比べクロロフィル a やカロチノイド含量が高いことが示されている (Chauhan ら 2000)。

本報では、耐塩性野生稲 *O. latifolia* の光合成器官の耐塩性を評価することを目的とし、まず塩処理していない葉身の光合成速度を液相型酸素電極法で測定し、浸透調整や気孔の影響をなくした光合成能力に及ぼす NaCl の影響を調

べた。ついで葉緑体の耐塩性を調べるために、チラコイド膜を単離し、種々塩濃度下での酸素放出量を測定した。さらにチラコイド膜のタンパク質組成を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE), 及び二次元電気泳動 (2-DE) で調べ、耐塩性に関与するチラコイド膜タンパク質の同定を試みた。

## 材料と方法

### 1. 栽培方法

葉身の光合成速度、及びチラコイド膜の酸素放出速度の測定には、既報 (Nakamura ら 2002) と同様、耐塩性野生稲, *Oryza latifolia* Desv. (IRGC Acc. No. 100965), 及び感受性野生種 *O. rufipogon* Griff. (IRGC Acc. No. 105390) を供試した。また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) には、これらの品種に加え、比較品種として *O. sativa* L. の耐塩性品種 SR26B, 及び同感受性品種 IR28 を供試した。野生稲の種子は、既報 (Nakamura ら 2002) と同様に播種し、佐賀大学ガラスハウス内において吉田氏液 (Yoshida ら 1976) を用いて水耕栽培した。実験には 8~11 葉期の植物体を用いた。SDS-PAGE と二次元電気泳動 (2-DE) には、明期、暗期をそれぞれ 14 時間及び 10 時間、室温を明期 28 °C, 暗期 21 °C に設定したグロースチャンバーで生育させた植物体を用いた。

### 2. 異なる塩濃度下での光合成速度の測定

光合成速度は、葉身の酸素放出速度で評価した。測定は、液相型酸素電極 (Clark-type, Rank Brothers, England) を用いて Ishii ら (1977) の方法で行なった。緩衝液の温度は 25 °C, 光強度は  $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  とした。最上位展開葉の中央部位  $1 \text{ cm}^2$  を、0.5 mM 硫酸カルシウムを含む 50 mM HEPES (pH 7.2) 緩衝液中で  $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$  に細断した。NaCl は、終濃度 100, 300, 及び 655 mM となるよう緩衝液に加えた。光照射後、30 mM  $\text{NaHCO}_3$  を添加し、反応を開始させた。測定後、葉片を集めて  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  に保存し、クロロフィル含量の測定に用いた。測定は、Porra ら (1989) の方法に従った。

### 3. チラコイド膜の単離

チラコイド膜の単離は、Kura-Hotta ら (1987) の方法で行なった。最上位展開葉 1.8g を細断し、冷蔵した緩衝液 [30 ml : 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 400 mM スクロース, 10 mM 塩化ナトリウム, 及び 5 mM 塩化マグネシウム] の入ったホモジナイザー (SM-KM 37, Sanyo) で 30 秒間破碎した。懸濁液をミラクロス (Calbichem, USA) でろ過し、ろ過液約 8 ml を  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $250 \times g$  で 5 分間遠心分離した。さらに上清液を  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5500 \times g$  で 15 分間遠心分離し、得られた沈殿物をチラコイド膜サンプルとして酸素放出速度の測定に用いた。光による分

解を避けるため、これらの作業はすべて弱光下で行なった。

### 4. チラコイド膜の酸素放出速度の測定

単離したチラコイド膜を、400 mM スクロース 10 mM 塩化ナトリウム, 5 mM 塩化マグネシウムを含む 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) 緩衝液に懸濁し、液相型酸素電極 (Clark-type, Rank Brothers, England) を用いて酸素放出速度を測定した。測定は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した 1 mM フェニル-p-ベンゾキノン (PPBQ) をチラコイド膜の懸濁液に添加し反応を開始させ、光強度  $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  で行なった。

### 5. チラコイド膜タンパク質の SDS-PAGE

0.3~0.4 g の葉身から単離したチラコイド膜を、0.06 M トリス (pH 6.8), 5% (w/v)  $\beta$ -メルカプトエタノール, 2% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 及び 5% (w/v) グリセロールを含む SDS-可溶化液 (Henriques ら 1975) に懸濁し、 $90 \text{ }^\circ\text{C}$  で 1 分間熱処理した。SDS-PAGE は Laemmli (1970) の方法に従い、10% (v/v) のスラブゲルで行なった。ゲルの染色には、クマシーブリリアントブルー R-250 を用いた。タンパク質含量は、ブラッドフォード法 (Bradford 1976) で測定した。

### 6. チラコイド膜タンパク質の 2-DE

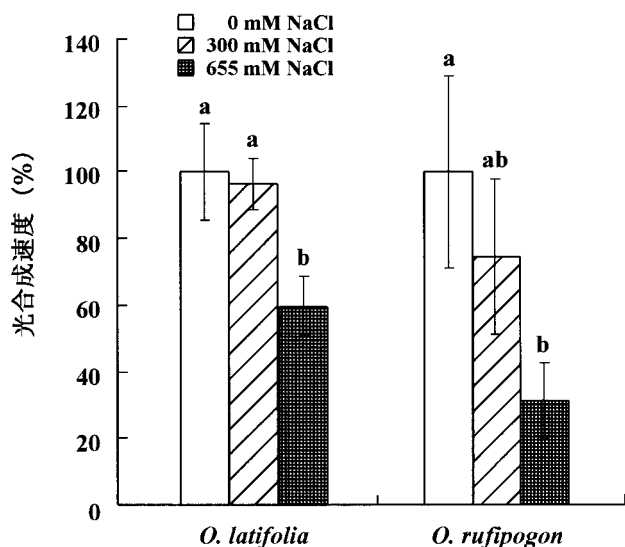
チラコイド膜タンパク質の可溶化は、Rabilloud (1998) の方法を一部改変して行なった。すなわち、7 M 尿素, 2 M チオ尿素, 2 mM トリブチルホスフィン, 4% 3-[(3-コラミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホンサン, 0.5% トリトン X-100, 0.5% IPG buffer (pH 3-pH 10) (Amersham Biosciences) を含む緩衝液にチラコイド膜サンプルを懸濁した。一次元目の等電点電気泳動には、アマシャム バイオサイエンス社製 (Immobiline DryStrips pH 3-10) を用いた。二次元目の SDS-PAGE には、アマシャム バイオサイエンス社製のプレキャストゲル (ExcelGel SDS XL Gradient 12-14) を用いた。泳動に用いたサンプルのタンパク質含量は、 $30 \mu\text{g}$  とした。ゲルは、サイプロルビー (Bio-Rad) で染色し、染色されたタンパク質のスポット検出には、Typhoon 9000 E (Amersham Bioscience Corp., USA) を用いた。スポット解析は、Image Master 2D software (Amersham Pharmacia Biotech) を使用し、タンパク質の等電点 (pI) と分子量 (Mw) を元にした相同性検索には、ExpASY-TagIdent tool (<http://tw.expasy.org/tools/tagident.html>) を利用した。等電点、及び分子量の検索範囲は、等電点  $\pm 0.1$ , 及び分子量  $\pm 10\%$  とした。

## 結果

### 1. 異なる NaCl 存在下での光合成速度

気孔の影響を除いた葉身の光合成能力に及ぼす塩の影響

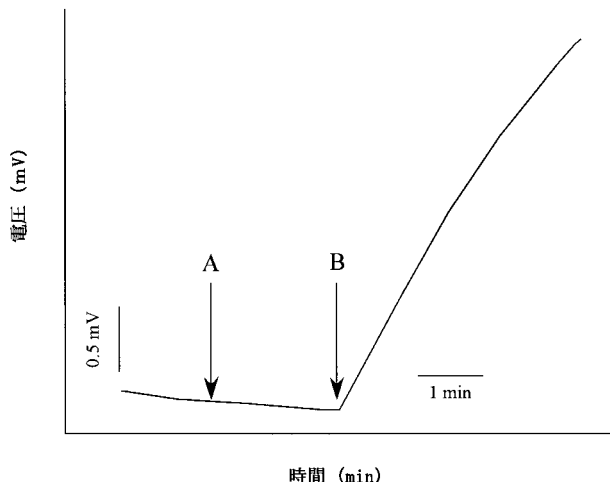
を調べるために、液相型酸素電極を用い、反応液中の NaCl 濃度をかえて酸素放出速度を測定した (第 1 図). その結果、両者の光合成速度には明確な差異が認められた. すなわち、300 mM NaCl 存在下での光合成速度は耐塩性種 *O. latifolia* では、処理前とほぼ同じ値だったのに対し、感受性種の *O. rufipogon* では 25% 低下した. 655 mM NaCl 存在下の酸素放出速度は、*O. latifolia* では処理前の 60%、*O. rufipogon* では 30% まで低下した. NaCl 無処理区と 655 mM NaCl 存在下での光合成速度の差は、Fisher の LSD 法により 5% 水準で統計的に有意だった. また、NaCl 処理を込みにした両品種間で t 検定を適用したところ、両品種間に 5% レベルで有意差が認められた. 以上の結果から、*O. latifolia* の葉身は、浸透調節がおきていない状態でも、光合成を支配する気孔以外の要因、すなわちチラコイド膜の光化学反応系や細胞質の炭酸固定反応系の耐塩性が *O. rufipogon* より高いことが示唆された.



第 1 図 異なる NaCl 環境下での葉身光合成速度. 光合成速度は酸素放出速度で評価した. 0 mM NaCl 区の値を 100 とした場合の相対値で表した. *O. latifolia* と *O. rufipogon* の 0 mM NaCl 区の値は、それぞれ 89、及び 78  $\mu\text{molO}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ hr}^{-1}$  であった. 各品種内で同一英文字のついた値間には Fisher の LSD 法により 5% 水準で有意差が無いことを示す.

## 2. NaCl 存在下でのチラコイド膜の酸素放出速度

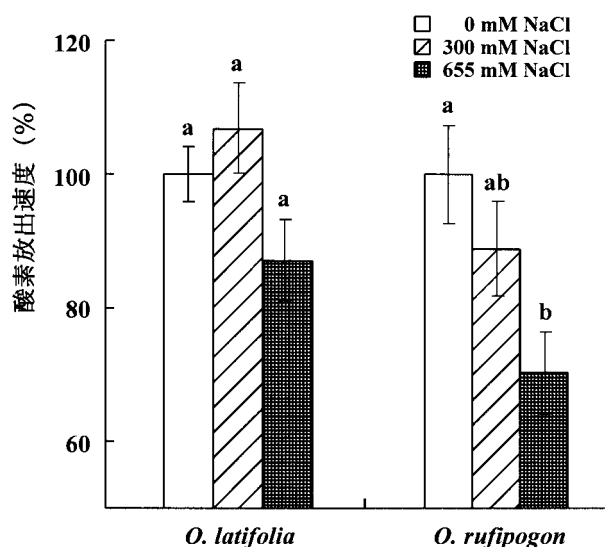
*O. latifolia* の光合成速度が NaCl 存在下で維持される要因を明らかにするため、チラコイド膜を単離してチラコイド膜の酸素放出速度に及ぼす NaCl の影響を調べた. 第 2 図に単離したチラコイド膜の酸素放出の一例を示した. チラコイド膜を暗所に約 15 分置いた後、光を照射しても、酸素の放出は見られなかったが (A)、電子授与体である PPBQ を添加すると酸素の放出が起こった (B). *O. rufipogon* でも同様な結果が得られた (データは示さず). このことは、野生稲から単離したチラコイド膜標品には電



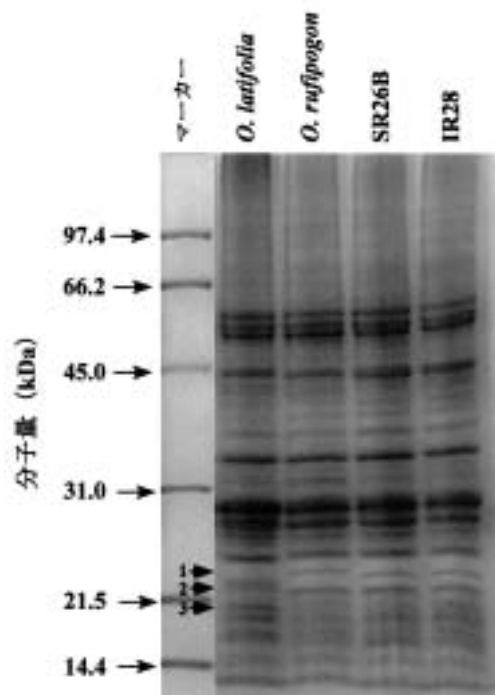
第 2 図 *O. latifolia* におけるチラコイド膜からの酸素の放出. チラコイド膜標品は光を照射する前、暗闇に約 15 分おいた. A, 光照射開始; B, PPBQ 添加.

子を授与する夾雑物の混在が少ないことを示している.

第 3 図に単離したチラコイド膜の酸素放出速度を示した. *O. latifolia* の酸素放出速度は、300 mM NaCl 存在下でも無処理区とほとんど変わらず、655 mM NaCl 存在下でも 87% までしか低下しなかった. NaCl 処理区間には統計的な有意差は無く、NaCl の影響をほとんど受けていなかった. 一方、*O. rufipogon* では、300 mM、及び 655 mM NaCl 存在下の酸素放出速度は、それぞれ、処理前の値の 90%、及び 70% であった. *O. rufipogon* では、NaCl 無処



第 3 図 異なる NaCl 環境下でのチラコイド膜からの酸素放出速度. 0 mM NaCl 区の値を 100 とした場合の相対値で表した. *O. latifolia* と *O. rufipogon* の 0 mM NaCl 区の値は、それぞれ 33、及び 58  $\mu\text{molO}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ hr}^{-1}$  であった. 各品種内で同一英文字のついた値間には Fisher の LSD 法により 5% 水準で有意差が無いことを示す.



第4図 単離チラコイド膜のポリペプチド組成。  
泳動に用いたサンプルのタンパク質量は1  $\mu$ gとした。  
図中の矢印1, 2は、それぞれ22.4 kDa, 及び20.3 kDa  
を示す。

理区と655 mM NaCl存在下での光合成速度の差は、いずれの品種でもFisherのLSD法により5%水準で統計的に有意だった。また、NaCl処理を込みにした両品種間でt検定を適用したところ、両品種間に5%レベルで有意差が認められた。これらの結果は、*O. latifolia*のチラコイド膜自体の耐塩性が、*O. rufipogon*のそれよりも高いことを示している。

### 3. SDS-PAGEによるチラコイド膜タンパク質の解析

*O. latifolia*の塩ストレス下におけるチラコイド膜の酸素放出速度がほとんど変化しなかった要因を、チラコイド膜のタンパク質組成から検討した(第4図)。まず、SDS-PAGEを用いて、チラコイド膜構成タンパク質の分子量の違いを調べた。ここでは前報で比較品種として用いた耐塩性品種SR26B、及び感受性品種IR28も合わせて検討した。その結果、*O. latifolia*のチラコイド膜には、20.3及び22.4 kDaの分子量をもつ本種に特異的なタンパク質があることがわかった。また、*O. rufipogon*、SR26B、及びIR28のバンドパターンは互いによく似ており、これらのチラコイド膜には*O. latifolia*には無い分子量24 kDaのタンパク質が存在していた。

### 4. 2-DEを用いたチラコイド膜タンパク質の解析

SDS-PAGEでみられた*O. latifolia*に特異的なタンパク質をさらに詳細に解析するために、2-DEを用いて*O. latifolia*と*O. rufipogon*のタンパク質組成を比較した(第5図)。その結果、*O. latifolia*では約200個の、*O. rufipogon*

では約180個のタンパク質が検出された。またSDS-PAGEでは検出できなかった低分子のタンパク質、特に等電点約9.0のタンパク質にも両方で顕著な違いがあることがわかった。

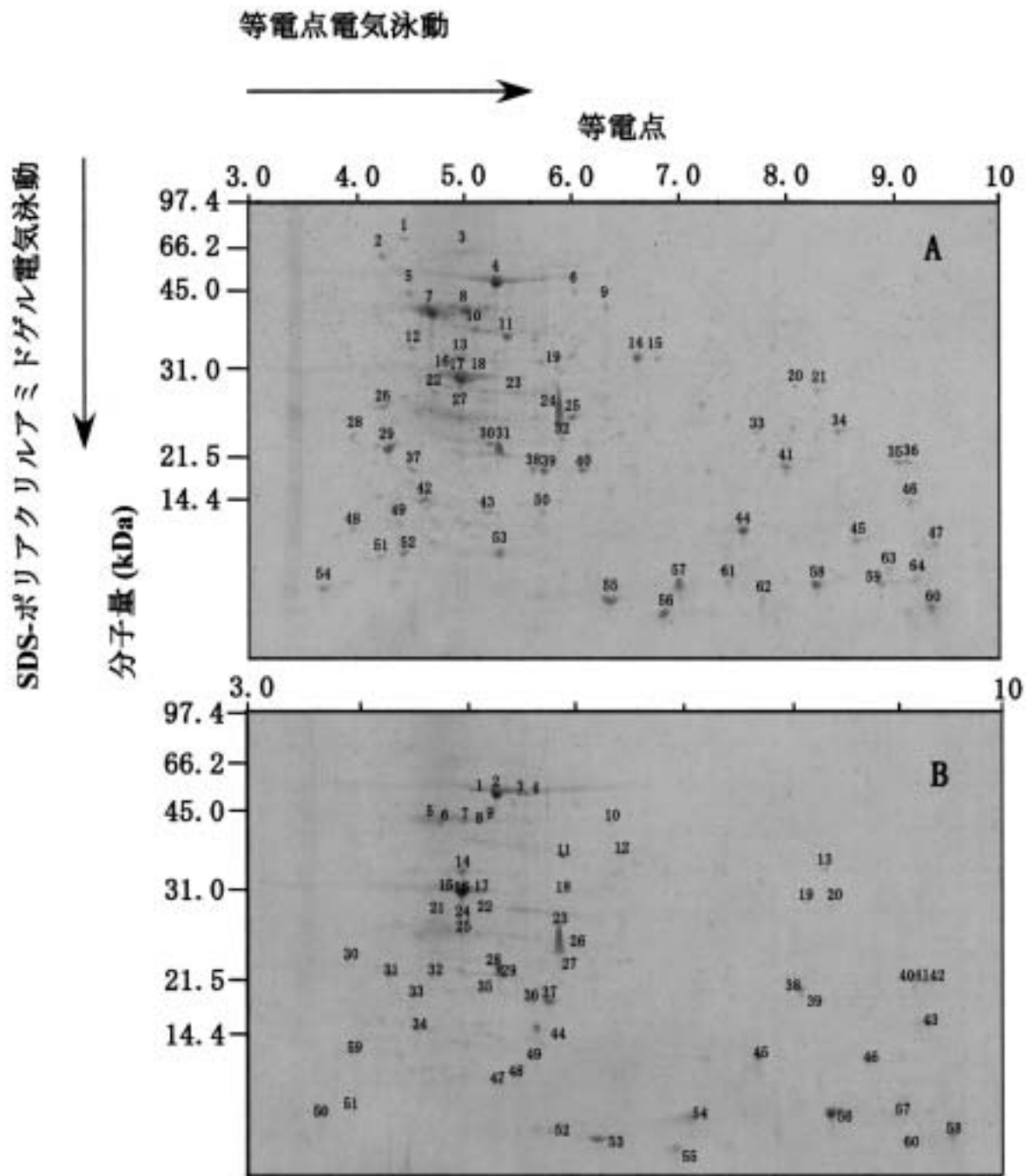
SDS-PAGEによる解析で、*O. latifolia*にみられた分子量20.3及び22.4 kDaの特異的なタンパク質は、2-DEの結果、それぞれ二つ(29, 31)及び三つ(28, 32, 34)の等電点の異なるタンパク質を含むことがわかった。また、*O. rufipogon*のSDS-PAGEにおける24 kDaのバンドは、2-DEの結果から一つのタンパク質(25)であることがわかった。

上記のタンパク質について等電点と分子量をもとにExPASy-TagIdent toolによる相同性検索を行なった(第1表)。その結果、*O. latifolia*のタンパク質31は、トマトのクロロフィルa-b結合タンパク質6A、トマトやシロガラシ等の葉緑体前駆物質、ジャガイモやシロガラシ等の酸素放出エンハンサータンパク質2、シロイヌナズナのチラコイドルーメン21.5 kDaタンパク質、及びトウモロコシやミヤコグサ等の光化学系I集合タンパク質ycf3等と同様な等電点と分子量を有していた。また、タンパク質32の等電点と分子量は、キュウリ等の酸素放出エンハンサータンパク質2と同等であった。28, 29, 及び34については、未だ報告が無く、未知のタンパク質である可能性が高い。*O. rufipogon*に特異的なタンパク質(25)は、緑藻やシロイヌナズナの酸素放出エンハンサータンパク質1-1、キュウリやトウモロコシ等の葉緑体前駆物質、及びトウモロコシ等のクロロフィルa-b結合タンパク質151と同様な等電点と分子量をもっていた。

## 考 察

### 1. 葉身の光合成、及びチラコイド膜の酸素放出における耐塩性

本研究では、液相型酸素電極を用いて、緩衝液のNaCl濃度を種々かえて光合成速度を測定し、野生稲2種の光合成能力に及ぼす塩の影響を調べた。耐塩性野生稲*O. latifolia*の光合成反応に対する塩の影響は、感受性野生種*O. rufipogon*よりも少なかった(第1図)。イネの塩ストレスにともなう光合成速度の低下の要因については、多くの報告があるが(Maegawaら1987, Kawasakiら2001)、以下の3つに大別できる。すなわち、1)塩の吸収による水ポテンシャルの低下が引き起こす気孔の閉鎖、2)炭酸固定過程に関わる酵素の失活、及び3)葉内の炭酸ガス拡散抵抗の増大である(Delifineら1998)。今回実験に供試した葉身は、塩ストレスをうけていない個体から採取した。また、NaClは葉片と共に緩衝液へ添加したことから、適合溶質の蓄積や、液胞内への塩の隔離といった塩ストレスに対する適応反応は起きていないと考えられる。よって、ここで測定された光合成速度の変化は、葉緑体へのNaClの直接的な影響を反映している。また、測定には葉片を細断



第5図 *O. latifolia* (A) および *O. rufipogon* (B) におけるチラコイド膜タンパク質の二次元電気泳動. ゲル染色には Sypro ruby を用いた.

し  $\text{NaHCO}_3$  を高濃度 (30 mM) にしているため, 葉片内外の基質の濃度勾配は大きく, 葉組織内への炭酸ガス拡散抵抗は低いと考えられる. したがって  $\text{NaCl}$  存在下での酸素放出速度の低下程度が *O. latifolia* で低かったのは, 葉身の光合成関連酵素あるいは, チラコイド膜が塩に対して高い耐性を持つためと考えられた.

一般に, 細胞質にある光合成関連酵素群の耐塩性は低く, 耐塩性の高い塩生植物でも酵素の耐塩性は中生植物と同程度である (Flowers ら 1977). また, シアノバクテリアで

は光合成能力の耐塩性とチラコイド膜の特性との間に関連性が見出されている (Chauhan ら 2000). このようなことから本研究では, 光合成速度に違いを生じさせる要因としてチラコイド膜に着目し, チラコイド膜の耐塩性を両種で比較することにした.

一般に, イネのチラコイド膜の単離は難しいと考えられており, 野生稲で単離した例はほとんど無い. 他の植物では葉組織からまずプロトプラストを単離し, ついでプロトプラストを破壊してチラコイド膜を得る方法が一般的であ

第1表 2-DE から得られた野生稲2種に特異的なチラコイド膜タンパク質の特性.

種名	スポット番号	分子量 (kDa)	等電点	相同性の高いタンパク質
<i>O. latifolia</i>	2	60.4	4.2	
	10	38.0	5.1	光化学系Q (B) タンパク質, 光化学系IIタンパク質D1
	15	32.3	6.8	アポシトクロム f 前駆物質
	26	25.6	4.2	
	28	21.8	3.9	
	29	20.6	4.3	
	31	20.6	5.3	クロロフィルa-b結合タンパク6A, 葉緑体前駆物質 (LHC I タイプ I CAB-6A), 酸素放出エンハンサータンパク質 2, チラコイドルーメン21.5 kDaタンパク質 光化学系I集光タンパク質ycf3
	32	21.8	5.9	酸素放出エンハンサータンパク質2, 葉緑体前駆物質 (OEE2), (光化学系II酸素放出システム 23 kDa サブユニット) (23 kDa チラコイド膜タンパク) (OEC23)
	34	23.2	8.5	
	40	18.3	6.1	
	47	12.3	9.5	
	52	10.9	4.4	プラストシアニン, 葉緑体前駆物質
	53	10.9	5.4	
61	8.9	7.4	光化学系I鉄-硫黄センター (光化学系IサブユニットVII) (9 kDaポリペプチド)	
<i>O. rufipogon</i>	11	35.0	5.9	ATP合成ガンマ鎖, 葉緑体前駆物質 (EC3.6.3.14)
	25	24.6	4.9	酸素放出エンハンサータンパク1-1, 葉緑体前駆物質 (OEE1), クロロフィルa-b結合タンパク質151
	42	19.6	9.4	光化学系I反応センターサブユニットII, 葉緑体前駆物質 (光化学系I20 kDaサブユニット)

相同性検索は, ExPASy-TagIdent tool (<http://tw.expasy.org/tools/tagident.html>) によって行なった. 検索範囲は, 等電点 $\pm 0.1$ , 及び分子量 $\pm 10\%$ とした.

る. 我々も野生稲からプロトプラストの単離を試みたが, 回収率が著しく低く, チラコイドを単離するまでには到らなかった. そこで本研究では, イネ葉からチラコイド膜を単離している Kura-Hottaら (1987) の方法に準じ機械的単離法でチラコイド膜を単離することにした. 本法は, イネチラコイド膜単離法として広く用いられており, 例えば明反応系 (Yamazakiら 1999), 及びポリペプチド組成 (Yamazakiら 2000) 等が調べられている. 本研究で野生稲から単離したチラコイド膜には, 電子授与体の夾雑物が少なく (第2図), 本法が野生稲のチラコイド膜の単離にも有効であると考えられた. また本研究では, 光合成速度の測定と同様, 浸透調整の影響をなくすために塩処理を行っていない個体からチラコイド膜を採取し, 測定に際してチラコイド膜を懸濁した緩衝液にNaClを添加した. 適合溶質生成の場を含む細胞内容物はチラコイド膜の単離の過程でほとんど除去されていると考えられる. したがって, ここで測定された酸素放出速度の変化は, 野生種の葉身から単離されたチラコイド膜へのNaClの作用, しかも浸透調整の影響の無い直接的な作用を示しているといえる.

NaCl存在下でのチラコイド膜の酸素放出速度を測定したところ (第3図), 塩ストレスによる低下は*O. latifolia*でほとんどなく, *O. latifolia*ではチラコイド膜の耐塩性が

高いことが示唆された. また葉身の光合成速度と比較すると, *O. latifolia*の葉身の光合成速度はNaCl処理により40%低下したのに対し, チラコイド膜の酸素放出速度は13%しか低下しなかった. これは, *O. latifolia*のチラコイド膜の耐塩性の高さを示している.

光化学系に及ぼす塩の影響を調べた報告は少ないが, イネ (Hoshidaら 2000) では150 mM NaCl存在下で14日間, シアノバクテリア (Allakhverdievら 2001) では500 mM NaCl存在下で4時間処理すると, 光化学系IIの活性がほとんどみられなくなる. イネでは, 光化学系IIが酸化されて損傷をうけ, シアノバクテリアでは, 光化学系II複合体の酸素放出部位が損傷をうけることが示されている. チラコイド膜からの酸素の放出は光化学系IIで生じる. よって, *O. latifolia*が*O. rufipogon*に比べチラコイド膜の酸素放出速度にNaClの影響がみられなかったことは, 本種の光化学系IIの耐塩性が高いことを示している. このことについては今後さらに検討したい.

## 2. 耐塩性に関わるチラコイド膜タンパク質

上述のようにNaCl存在下における酸素放出速度の測定から, *O. latifolia*では, チラコイド膜が高いNaCl耐性を持つことが示唆された. 耐塩性の違いをチラコイド膜タンパク質の組成から検討するため, 両野生種の葉身からチラ

コイド膜を単離し、膜タンパク質組成を SDS-PAGE で調べた。ここでは、前報で用いた耐塩性品種の SR26B 及び感受性品種の IR28 も比較品種として供試した。 *O. latifolia* のバンドパターンは他の 3 種と大きく異なり、20.3 kDa、及び 22.4 kDa 付近にこの種に特異的なバンドが見出された。 *O. latifolia* 以外の 3 種、すなわち *O. rufipogon*, SR26B, 及び IR28 のバンドパターンはお互いに良く似ていた。これはこれら 3 種のゲノムタイプが AA と同じであるのに対し、 *O. latifolia* のそれは CCDD ゲノムであることに起因しているのかもしれない。イネのゲノムタイプとチラコイド膜タンパク質の組成との関係を論じた報告はほとんど無く、この結果はイネの進化の観点からみて興味深い。

イネの茎葉のタンパク質組成に及ぼす塩の影響を SDS-PAGE で調べた例 (Ramani and Apte 1997) によると、100 mM NaCl を処理して 3 日目には分子量 14 kDa から 90 kDa のタンパク質 18 個の発現が誘導され、7 個のタンパク質の発現が抑制された。同様に、NaCl 処理後 6 日目には 5 個のタンパク質が発現し、逆に 11 個のタンパク質の発現が抑制された。これら発現が誘導されたタンパク質の中には、 *O. latifolia* で特異的だったタンパク質 (20.3 kDa、及び 22.4 kDa) と同じ大きさのタンパク質が含まれていた。22.4 kDa のタンパク質の機能は不明であるが、20.3 kDa のタンパク質は、RAB21 にコードされるグリシンに富むタンパク質であり、乾燥、NaCl、及びアブシジン酸処理でイネの葉に誘導されることから、耐乾性に関与していることが示唆されている (Mundy and Chua 1988)。 *O. latifolia* で見出されたタンパク質も同様な機能を有している可能性がある。

近年のゲノム研究の進展により、様々な植物種、組織あるいは環境条件の下で発現する遺伝子、タンパク質の挙動を調べる研究が行われるようになった。多くのタンパク質の挙動を 2-DE で網羅的に調べるプロテオーム解析はこのような機能ゲノム研究にとって有効な手法である。しかし、チラコイド膜タンパク質についての解析例はまだ少ない。Peltier ら (2000) は、エンドウのチラコイド膜を 2-DE で調べ、ルーメンとチラコイド膜には少なくとも 200 から 230 個のタンパク質が存在することを明らかにし、さらにそれらのうち 61 個のタンパク質のアミノ酸配列の一部をペプチドマスフィンガープリント法、シーケンスタグ法、及びエドマン分解法によって決定している。また、Ramani and Apte (1997) は、イネを 3 日間 100 mM NaCl 存在下で栽培し、茎葉に誘導されるタンパク質を 2-DE で調べ、塩処理によって 35 個のタンパク質が発現し、17 個のタンパク質の発現が抑制されることを明らかにした。本研究では、 *O. latifolia*、及び *O. rufipogon* のチラコイド膜でそれぞれ約 200 個、及び約 180 個のタンパク質を分離し、両野生種に特異的なタンパク質を検出することができた (第 1 表)。 *O. latifolia* に特異的に見られたタンパク質は、クロロフィル a-b 結合タンパク質 6 A、葉緑体前駆物質、

酸素放出エンハンサータンパク質 2、チラコイドルーメンタンパク質、及び光化学系 I 集合タンパク質 ycf 3 等と類似した等電点、分子量を有していた。このように光化学系に関連したタンパク質が *O. latifolia* で多く発現していることは、チラコイド膜の耐塩性の高さとの関連性を示唆するもので興味深い。しかし、 *O. latifolia* でみられたこれらのタンパク質と Ramani ら (1997) の報告している塩誘導性タンパク質との間には分子量、等電点いずれも類似性は低かった。これは、彼らの 2-DE が等電点 6-8 の狭い範囲で行なわれたためと考えられる。今後、 *O. latifolia* 特有のタンパク質についてアミノ酸配列を決定し、さらに詳細に検討したい。

以上をまとめると、 *O. latifolia* が高 NaCl 存在下でも光合成速度を維持できたのは、チラコイド膜の耐塩性が高いことによること、また、本種のチラコイド膜には光化学系に関連したタンパク質と相同性の高いタンパク質が *O. latifolia* で多く発現していること、また、感受性野生種にはない新規のタンパク質が存在することが示唆された。

**謝辞:** 本研究の遂行に当たり、協力を頂いた佐賀大学農学部有馬進教授に感謝します。

## 引用文献

- Allakhverdiev, S.I., M. Kinoshita, M. Inaba, I. Suzuki and N. Murata 2001. Unsaturated fatty acids in membrane lipids protect the photosynthetic machinery against salt-induced damage in *Synechococcus*. *Plant Physiol.* 125 : 1842-1853.
- Boyer, J.S. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218 : 443-448.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Chauhan, V.S., B. Singh, S. Singh, R.K. Gour and P.S. Bisen 2000. Isolation and characterization of the thylakoid membranes from the NaCl-Resistant (NaClr) mutant strain of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Curr. Microbiol.* 41 : 321-327.
- Delifine, S., A. Alivino, M. Zacchini and F. Loreto 1998. Consequence of salt stress on conductance to CO<sub>2</sub> diffusion, Rubisco characteristics and anatomy of spinach leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 25 : 395-402.
- Flowers, T.J., P.F. Troke and A.R. Yeo 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28 : 89-121.
- Garcia, A., D. Senadhira, T.J. Flowers and A.R. Yeo 1995. The effects of selection for sodium transport and of selection for agronomic characteristics upon salt resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Teor. Appl. Genet.* 90 : 1106-1111.
- Garcia, A.B., J.de A. Engler, S. Iyer, T. Gerats, M.V. Montagu and A.B. Caplan 1997. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiol.* 115 : 159-169.
- Greenway, H. and R. Munns 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31 : 149-190.
- Henriques, F., W. Vaughan and R. Park 1975. High resolution gel

- electrophoresis of chloroplast membrane polypeptides. *Plant Physiol.* 55 : 338—339.
- Hoshida, H., Y. Tanaka, T. Hibino, Y. Hayashi, A. Tanaka, T. Takabe and T. Takabe 2000. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol. Biol.* 43 : 103—111.
- Ishii, R., T. Yamagishi and Y. Murata 1977. On a method for measuring photosynthesis and respiration of leaf slices with an oxygen electrode. *Jpn. J. Crop Sci.* 46 : 53—57.
- Kaiser, W.M. and U. Heber 1981. Photosynthesis under osmotic stress : Effect of high solute concentrations on the permeability properties of the chloroplast envelope and on activity of stroma enzymes. *Planta* 153 : 423—429.
- Kawasaki, S., C. Borchert, M. Deyholos, H. Wang, S. Brazille, K. Kawai, D. Galbraith and H.J. Bohnert 2001. Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice. *The Plant Cell*. 13 : 889—905.
- Khan, M.S.A., A. Hamid, A.B.M. Salajuddin, A. Quasem and M.A. Karim 1997. Effect of sodium chloride on growth, photosynthesis and mineral ions accumulation of different types of rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agron. Crop Sci.* 179 : 149—161.
- Kolchevskii, K.G., N.I. Kocharyan and O.Y. Koroleva 1995. Effect of salinity on photosynthetic characteristics and ion accumulation in C3 and C4 plants of Ararat plain. *Photosynthetica* 31 : 277—282.
- Kura-Hotta, M., K. Satoh and S. Katoh 1987. Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* 28 : 1321—1329.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680—685.
- Lakshmi, A., S. Ramanjulu, K. Veeranjanyulu and C. Sudhakar 1996. Effect of NaCl on photosynthesis parameters in two cultivars of mulberry. *Photosynthetica* 32 : 285—289.
- Maegawa, H., E. Usui, N. Uchida, T. Yasuda and T. Yamaguchi 1987. Studies on the mechanism of salt tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) : Relation between salt content and photosynthesis. *Japan J. Trop. Agr.* 31 : 92—98.
- Mundy, J. and N.H. Chua 1988. Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7 : 2279—2286.
- Nagy, Z. and G. Galiba 1995. Drought and salt tolerance are not necessarily linked : A study on wheat varieties differing in drought tolerance under consecutive water and salinity stresses. *J. Plant Physiol.* 145 : 168—174.
- Nakamura, I., S. Murayama, S. Tobita, B.B. Bong, S. Yanagihara, Y. Idhimine and Y. Kawamitsu 2002. Effect of NaCl on the photosynthesis, water relation and free proline accumulation in the wild *Oryza* species. *Plant Prod. Sci.* 5 : 305—310.
- Peltier, J.B., G. Friso, D.E. Kalume, P. Roepstorff, F. Nilsson, I. Adamska and K. J. van Wijk 2000. Proteomics of the chloroplast : systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell*. 12 : 319—341.
- Porra, R.J., W.A. Thompson, P.E. Kriedemann 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents : Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975 : 384—394.
- Rabilloud, T. 1998. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19 : 758—760.
- Ramani, S. and S.K. Apte 1997. Transient expression of multiple genes in salinity-stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Bura Rata. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233 : 663—667.
- Seemann, J.R. and C. Critchley 1985. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behavior and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 164 : 151—162.
- Sibole, J.V., E. Montero, C. Cabot, C. Poschenrieder and J. Barcelo 1998. Role of sodium in the ABA-mediated long-term growth response of bean to salt stress. *Physiol. Plant.* 104 : 299—305.
- Sultana, N., T. Ikeda and R. Itoh 1999. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environ. Exp. Bot.* 42 : 211—220.
- Szabolcs, I. 1994. Soils and salinization. In Pessarakli, M. ed., *Handbook of plant and crop stress*. Marcel Dekker, New York. 3—11.
- Tsuchiya, M., H. Naito, H. Ehara and T. Ogo 1992. Physiological response to salinity in rice plant. I. Relationship between Na<sup>+</sup> uptake and respiration under different humidity and salinity conditions. *Jpn. J. Crop Sci.* 61 : 16—21.
- Tsuchiya, M., M. Miyake and H. Naito 1994. Physiological response to salinity in rice plant. III. A possible mechanism for Na<sup>+</sup> exclusion in rice root under NaCl-stress conditions. *Jpn. J. Crop Sci.* 63 : 326—332.
- Yamazaki, J., Y. Kamimura, M. Okada and Y. Sugimura 1999. Changes in photosynthetic characteristics and photosystem stoichiometries in the lower leaves in rice seedlings. *Plant Sci.* 148 : 155—163.
- Yamazaki, J., Y. Kamimura, K. Nakayama, M. Okada and Y. Sugimura 2000. Effects of light on the photosynthetic apparatus and a novel type of degradation of the photosystem I peripheral antenna complexes under darkness. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 55 : 37—42.
- Yeo, A.R., S.J.M. Capron and T.J. Flowers 1985. The effect of salinity upon photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) : Gas exchange by individual leaves relation to their salt content. *J. Exp. Bot.* 36 : 1240—1248.
- Yeo, A.R. and T.J. Flowers 1986. Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Aust. J. Plant Physiol.* 13 : 161—173.
- Yoshida, S., D.A. Fornal, J.A. Cock and K.A. Gomez. 1976. *Laboratory manual for physiological studies of rice*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. : 62.



**Salt Tolerance of the Chloroplast Thylakoid Membrane in Wild *Oryza* Species, *Oryza latifolia* Desv. :** IchiRO NAKAMURA<sup>1)</sup>, Sakae AGARIE<sup>1)</sup>, Satoshi TOBITA<sup>2)</sup>, Seiji YANAGIHARA<sup>3)</sup>, Akihiro NOSE<sup>1)</sup>, Seiichi MURAYAMA\*<sup>4)</sup>, and Keiji MOTOMURA<sup>4)</sup> (<sup>1)</sup> *Fac. Agri. Saga Univ., Saga* ; <sup>2)</sup> *JIRCAS, Japan* ; <sup>3)</sup> *IRRI, Philippines* ; <sup>4)</sup> *Fac. of Agriculture, Univ. of the Ryukyus, Okinawa 903-0213, Japan*)

**Abstract :** In our previous report, the wild *Oryza* species *O. latifolia* showed higher salt-tolerance than the standard salt tolerant rice species, SR26B. To elucidate the mechanism of salt tolerance in *O. latifolia*, we compared the activity of photosynthetic machinery in thylakoid membrane in *O. latifolia* with that in a salt-susceptible wild *Oryza* species, *O. rufipogon* under high salinity condition. In *O. rufipogon* photosynthetic rate declined by 75 % and 30 % of that in non-stress leaves under 300 mM and 655 mM NaCl, respectively. Whereas in *O. latifolia* it was unchanged under 300 mM NaCl, and decreased under 655 mM NaCl by 60 % of that in non-stress leaves. Thylakoid membrane of *O. latifolia* also showed salt tolerance. The oxygen evolution rate from isolated thylakoid membrane in *O. latifolia* decreased only 13 % under 655 mM NaCl. On the other hand, in *O. rufipogon*, it decreased 10 % and 30 % under 300 mM and 655 mM NaCl, respectively. The peptide compositions of thylakoid membranes examined by SDS-PAGE showed that *O. latifolia* has species-specific proteins with 20.3 kDa and 22.4 kDa of molecular weight. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) of thylakoid membrane proteins showed that the 20.3 kDa and 22.4 kDa proteins contained at least two or three proteins with different isoelectric points. Some of them were novel proteins that had not been published in the database. These results suggest that thylakoid membrane of *O. latifolia* has high salt tolerance and this plant can maintain photosynthetic activity under high NaCl condition. The results of SDS-PAGE and 2-DE showed that the thylakoid membrane of *O. latifolia* had specific proteins which may be partially responsible for the salt-tolerance.

**Key words :** Photosynthesis, Salt tolerance, SDS-PAGE, Thylakoid membrane protein, 2-DE, Wild *Oryza* species.

---