

塩ストレスによって誘導されるイネ培養細胞中のタンパク質

白 田 和 人・高 岸 秀次郎*

(農業生物資源研究所遺伝資源第二部・*農業生物資源研究所機能開発部)

Salt Induced Protein in Cultured Rice Cells

Kazuto SHIRATA and Hidejiro TAKAGISHI*

(Department of Genetic Resources II, National Institute of Agrobiological Resources *)
(*Department of Applied Physiology, National Institute of Agrobiological Resources)

1 はじめに

高塩類条件下で作物栽培を可能にするための方法として、育種による作物への耐塩性の導入が考えられる。そのためには植物の耐塩性機構を解明するの必要があり、特に遺伝子工学的手法による耐塩性作物の育種のためには、耐塩性を支配する遺伝子を明らかにしなければならない。その手がかりとしてタバコ、トマト及びオオムギなどの培養細胞や根端のタンパクの電気泳動によって、いくつかの塩ストレスに関連するタンパクが見いだされている。すなわち、タバコ培養細胞で見いだされたオスモチン³⁾やトマト培養細胞のNP24²⁾などのタンパクについて、そのアミノ酸配列や細胞内での局在性などの特徴が明らかにされている。しかし、イネにおいてはカルス¹⁾や根端⁴⁾についてタンパクの検索がなされてきたが、現在までのところ見いだされていない。そこで本報では、液体培地で選抜された耐塩性イネ培養細胞を用いてこれらのタンパクを検索しようとした。

2 材料及び方法

液体培養に用いた細胞は、イネ種子(日本晴)よりカルスを誘導し、R-2培地を用いて液体培地に導入した。各耐塩性細胞は3, 10, 20 g/l NaClを含む液体培地で順次選抜した。NaCl耐性及び対照細胞の生育量は新しい培地に植え継ぎ後、1, 2, 4, 6, 8日目に収穫し、100mlフラスコ(培地40ml)当りの新鮮重として測定した。細胞は氷冷した乳鉢に移し、Tris-bufferとともに摩砕した後、ナイロクロスでろ過した。抽出液を100,000x gで1時間遠心分離し、その上澄みに等量のSDS-bufferを加えた。電気泳動は12.5%アクリルアミド、1% SDSで行った。タンパク50 µgを含むサンプル液を3分間沸騰させ、遠心して上澄をスラブゲルにのせ、濃縮ゲルは80mv、分離ゲルは160mvで泳動した。泳動終了後、ゲルを0.25% クマシーブルーで染色した。

3 結果と考察

植え継ぎ後の各耐塩性細胞と対照細胞の生育量の変化を図1に示した。3 g/l NaCl 耐性細胞及び対照細胞の誘導期は約1日で2日目までが対数増殖期であったが、20 g/l NaCl 耐性細胞では誘導期が2日目まで

続き、その後8日目までわずかな増加した。10 g/l NaCl 耐性細胞はその中間の生育を示した。それに対して3 g/l NaCl 培地に移植した対照細胞の生育は著しく抑制され、10及び20 g/l NaCl 培地に移植した細胞では8日目までまったく増殖しなかった。

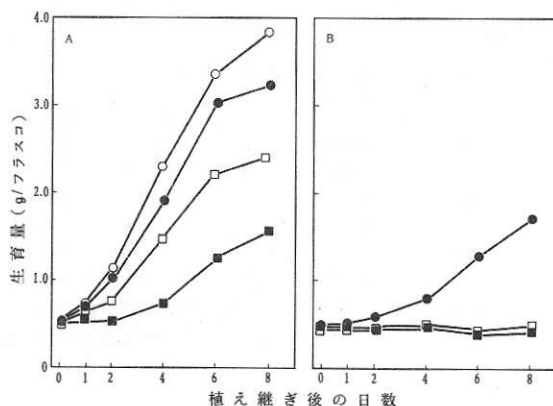


図1 各耐塩性細胞の生育量(A)及び各塩濃度培地における対照細胞の生育量(B)

注. ○—○: 対照 ●—●: 10 g/l NaCl
□—□: 10 g/l NaCl ■—■: 20 g/l NaCl

植え継ぎ4日目の各耐塩性細胞と対照細胞のタンパクの泳動パターンを図2に示した。各細胞のタンパクバンドは極めて類似したが、耐塩性細胞特に10及び20 g/l NaCl 耐性細胞にのみ26kdタンパクのバンドが認められ、20 g/l NaCl 耐性細胞のバンドは10 g/l NaCl 耐性細胞のそれよりも濃く染色された。

図3に20 g/l NaCl 耐性細胞と対照細胞の植え継ぎ後の経時的なタンパクの変化を示した。26kdバンドは20 g/l NaCl 耐性細胞の1, 2, 4日目の細胞にのみ認められ、対照細胞や20 g/l NaCl 耐性細胞の6, 8日目では認められなかった。

また、これらのタンパクの二次元電気泳動によって、対照細胞にはない二つの大きなスポットが耐塩細胞に認められた(図4)。その一つは前述の一次元で電気泳動で認められたタンパクと考えられ、およそ分子量26kd, pI 6.1であった。もう一つは分子量およそ27kd, pI 6.4であり、二次元電気泳動によって分離された。

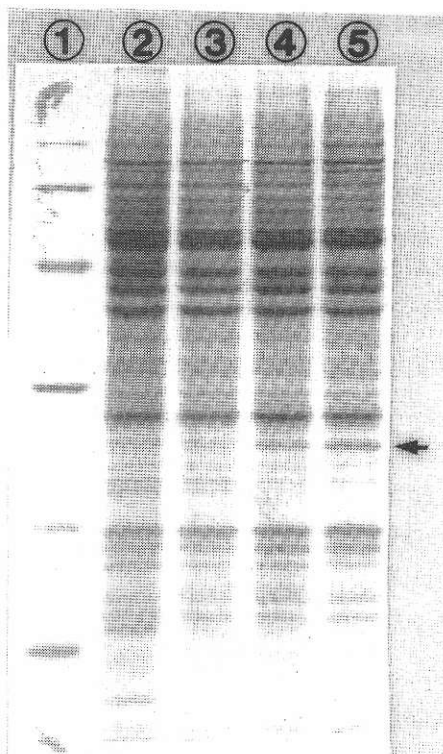


図2 各耐塩性イネ培養細胞(植え継ぎ4日目)の可溶性タンパクのSDS-PAGE

注. ①: 分子量マーカー, 上から94, 67, 43, 30, 20.1, 14.4 kD, ②: 対照細胞, ③~⑤: それぞれ3, 1.0, 2.0 g/l NaCl 耐性細胞, 矢印は26 kD タンパク。

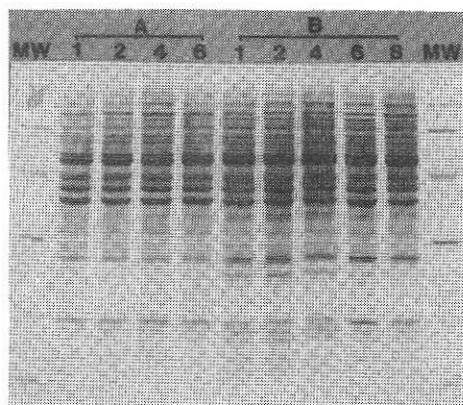


図3 対照細胞(A)及び20 g/l NaCl 耐性細胞(B)の可溶性タンパクの経時の変化

注. MW: 分子量マーカー, 数字は植え継ぎ後の日数

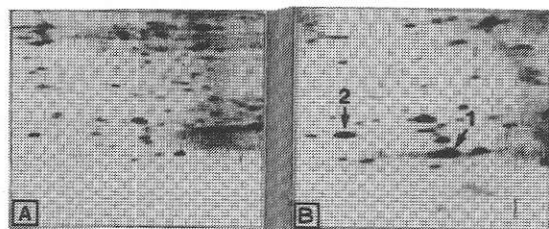


図4 対照細胞(A)及び20 g/l NaCl 耐性細胞(B)タンパクの二次元電気泳動像

注. 1: 分子量26kD, pI 6.1, 2: 分子量27kD, pI 6.4

以上の結果から, 塩ストレスによってイネ培養細胞においてもいくつかのタンパクが誘導されることが認められ, これらのタンパクの増加が細胞の耐塩性や塩適応機能に関連する反応の一つであると考えられた。

4 ま と め

耐塩性のイネ培養細胞を用いて, 塩ストレスに伴う特異的なタンパクを検索した。その結果, 耐性を獲得した細胞では26kD付近に塩濃度に比例して染色されるバンドが認められた。また経時的な調査の結果, このバンドは主として細胞分裂の盛んな植え継ぎ初期にのみ認められ, 耐性細胞の細胞分裂に関連すると考えられた。更に二次元電気泳動によって27kD付近にも耐性細胞に特異的なタンパクが認められた。

引用文献

- 1) 菊池尚志, 高岩文雄, 大野清春. 1985. イネ培養細胞における遺伝子発現の解析. 1. イネカルスにおけるタンパク質合成の二次元電気泳動法による解析. 育種 35 (別1): 74-75.
- 2) King, G. J. ; Turner, V. A. ; Hussey, C. E. ; Wurtele, E. Jr. ; Lee, S. M. 1988. Isolation and characterization of a tomato cDNA clone which codes for a salt-induced protein. Plant Mol. Biol. 10: 401-412.
- 3) Singh, N. K. ; Brecker, C. A. ; Hasegawa, P. M. ; Handa, A. K. ; Buckel, S. ; Hermanson, M. A. ; Pfankoch, E. ; Regnier, F. E. ; Bressan, R. A. 1987. Characterization of Osmotion. Plant Physiol. 85: 529-536.
- 4) 竹林伸夫, 蜂須賀正章, 森 敏. 1987. オオムギ根中のNaCl ストレス関連ペプチド. 土肥誌 58: 696-701.