

5- アミノレブリン酸が植物の成長および Rubisco をコードする遺伝子の発現に及ぼす影響

室田憲一^{*1}・長谷川瑠美^{*2}

5-アミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic acid, ALA) は、分子量131kDa のケトアミノ酸で、ビタミン B12、クロロフィル、ヘムおよびチトクロームなどのポルフィリン化合物の前駆体であり、植物、動物、藻類や光合成細菌などに広く存在する^{1, 2)}。植物において、ALA は色素体でグルタミル-tRNA とグルタミン酸セミアルデヒドを経由してグルタミン酸から光依存性の C5回路により合成され^{3, 4)}、その ALA の合成段階は、クロロフィル生合成の律速段階である⁵⁾。また、ALA の合成は植物が暴露される気温が高い場合と低い場合に阻害され、ALA 合成は温度感受性であることも示唆されている⁶⁾。さらに被子植物において ALA は暗所でのクロロフィル合成を刺激することから ALA に関連する代謝は環境に影響を受ける⁷⁾。ALA が植物におよぼす影響については多くの報告がなされている。すなわち、高濃度の ALA の施用は植物体内にスーパーオキシドアニオン、過酸化水素やヒドロキシラジカルなどの活性酸素種を合成し、植物の成育を阻害する⁸⁾。その一方で、低濃度の ALA の施用により植物の成長が促進する⁹⁾とともに、塩や温度などの非生物学的ストレスに対する植物の耐性を増強することが明らかになっている^{10, 11)}。このようなことから、ALA は非常に有効な植物の成長調節物質として注目されている。

ALA が植物の成長促進に関わる原因として、光合成活性の向上が挙げられており、ALA がクロロフィルの前駆体であることから、特に植物体内のクロロフィル含有量の増加、すなわち光化学系の代謝促進によるものであると理解されていることが多い¹²⁾。しかしながら、光合成のもう一つのコンポーネントであるカルビン回路を中心とする炭酸固定反応に及ぼす ALA の影響についてはほとんど報告がなく、その作用機序については全くわかっていない。光合成は主に光化学系と炭酸固定反応のバランスにより成り立っており、クロロフィルの含有量増大による光化学系の増強のみでは、光合成全体の活性促進、ならびにそれに起因する植物体の成長促進効果について統括した理解ができない。

本研究では、ALA が植物の成長におよぼす影響とともに、光合成カルビン回路での炭酸固定に関与する重要な酵素タンパク質であるリブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) をコードする遺伝子の発現におよぼす影響について調べたので、その結果を報告する。

提出日2012年9月26日 受理日2012年11月28日

* 1 教養学部人間環境学科自然環境課程教授 * 2 教養学部人間環境学科自然環境課程卒業生

【材料および方法】

供試植物としてアブラナ科のモデル植物であるファストプラント (*Brassica rapa*, ファストプラント日本事務局 (<http://www.fastplants.jp>)) を用いた。250ml のプラスチック製育苗ポットにバーミキュライトを充填し、1ポットに15粒程度播種した。栽培には人工気象器 (日立、CR-20L) を用い、22℃、24時間明所で行った。発芽後10個体になるように成長のいいものを選抜し、その後の試験に用いた。

今回 ALA を含有する肥料としてペンタガーデン PRO (コスモ石油, コスモ誠和アグリカルチャ, 以下 PG) を使用した。PG の製品容器に記載の成分組成 (% (w / w)) は、保証成分として、窒素全量6.0, 水溶性りん酸10.0, 水溶性加里4.0, 水溶性苦土1.5, 水溶性マンガン0.05, 水溶性ほう素0.09であり、材料として、DTPA-鉄 (鉄として) 0.11, 硫酸亜鉛 (亜鉛として) 0.03, 硫酸銅 (銅として) 0.005, モリブデン酸ナトリウム (モリブデンとして) 0.003である。また、コスモ誠和アグリカルチャへの問合せによりペンタガーデン PRO には0.6% (w/w) の ALA が含まれているとの回答をいただいた。ペンタガーデン PRO を植物に施用する場合には1000倍希釈液を用いるので、本実験で植物に施用する ALA 濃度は0.0006% (w/w) とした。

コントロール区には蒸留水のみ、ALA 区には0.0006% (w/w) の ALA (和光純薬) 水溶液、PG 区には1000倍希釈の PG をそれぞれ30ml ずつ播種から3日毎に施用した。

成育調査および Rubisco をコードする遺伝子発現解析の試料として、播種後9日目の植物体を用いた。成育調査は、草丈、葉長、根長および生体重をそれぞれ2から3反復 (各ポット9から10個体で、2から3ポット) で測定した。また生育調査で得られたデータの分散分析には ANOVA4 on the Mac (<http://www.hju.ac.jp/~kiriki/anova4/>) を用いた。

遺伝子発現解析はディジェネレート PCR 法により行った¹³⁾。植物試料から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) による全 RNA を抽出後、Oligo-dT プライマーを用いて PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit (タカラバイオ) により逆転写反応で cDNA を合成した。

PCR のためのプライマーの設計には、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベース検索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) より、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*)、キュウリ (*Cucumis sativus*)、イネ (*Oryza sativa*)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、およびサツマイモ (*Ipomoea batatas*) の Rubisco のラージサブユニットのアミノ酸配列を収集した。収集したアミノ酸配列は ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>) により多重整列を作製し、相同性が高く、非特異性のできるだけ低い領域をプライマーの候補として選定した (図1)。選定したアミノ酸配列から対応する塩基配列をディジェネレート PCR のプライマーとした (表1)。

内在性コントロール遺伝子としてアクチンを用いた。アクチンのプライマーは既報¹⁴⁾に従い、フォワードプライマーは5' - CTCCGTGTTGCT CCTGAGGAACATC -3', リバースプライマーは5' - ACCTCAGGACAACGGAATCGCTC -3' とした。全てのプライマーの作成はシグマアルドリッチ (<http://www.genosys.jp>) に外注した。

Nicotiana asterids_lamiids_Solanales_Con Oryzasativasubsp.japonica_Rice rosids_malvids_Brassicales_Bra rosids_fabids_Cucurbitales_Cuc Caryophyllales_Amaranthaceae_S	MSPQTEKASVGFKAGVKYKLTYYTPEYQTKDIDLAAFRVTPQPGVPP MSPQTEKASVGFKAGVKYKLTYYTPEYQTKDIDLAAFRVTPQPGVPP MSPQTEKASVGFKAGVKYKLTYYTPEYQTKDIDLAAFRVTPQPGVPP MSPQTEKASVGFKAGVKYKLTYYTPEYQTKDIDLAAFRVTPQPGVPP MSPQTEKASVGFKAGVKYKLTYYTPEYQTKDIDLAAFRVTPQPGVPP *****;*****;*****;*****;*****;*****
Nicotiana asterids_lamiids_Solanales_Con Oryzasativasubsp.japonica_Rice rosids_malvids_Brassicales_Bra rosids_fabids_Cucurbitales_Cuc Caryophyllales_Amaranthaceae_S	EEAGAAVAESSTGTTTWTVDGLTSLDRYKGRCYRIERVVEGKDQYIAY EEAGAAVAESSTGTTTWTVDGLTSLDRYKGRCYRIERVVEGKDQYIAY EEAGAAVAESSTGTTTWTVDGLTSLDRYKGRCYRIERVVEGKDQYIAY EEAGAAVAESSTGTTTWTVDGLTSLDRYKGRCYRIERVVEGKDQYIAY EEAGAAVAESSTGTTTWTVDGLTSLDRYKGRCYRIERVVEGKDQYIAY EEAGAAVAESSTGTTTWTVDGLTSLDRYKGRCYRIERVVEGKDQYIAY *****;*****;*****;*****;*****;*****
Nicotiana asterids_lamiids_Solanales_Con Oryzasativasubsp.japonica_Rice rosids_malvids_Brassicales_Bra rosids_fabids_Cucurbitales_Cuc Caryophyllales_Amaranthaceae_S	VAYPLDLFEESVTNMFTSIVGNVFGFKALRALRLIEDLRIPAYVKTFQG VAYPLDLFEESVTNMFTSIVGNVFGFKALRALRLIEDLRIPAYVKTFQG VAYPLDLFEESVTNMFTSIVGNVFGFKALRALRLIEDLRIPAYVKTFQG VAYPLDLFEESVTNMFTSIVGNVFGFKALRALRLIEDLRIPAYVKTFQG VAYPLDLFEESVTNMFTSIVGNVFGFKALRALRLIEDLRIPAYVKTFQG VAYPLDLFEESVTNMFTSIVGNVFGFKALRALRLIEDLRIPAYVKTFQG *****;*****;*****;*****;*****;*****
Nicotiana asterids_lamiids_Solanales_Con Oryzasativasubsp.japonica_Rice rosids_malvids_Brassicales_Bra rosids_fabids_Cucurbitales_Cuc Caryophyllales_Amaranthaceae_S	PPHGIVQERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGRAVYECRLGGIDFT PPHGIVQERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGRAVYECRLGGIDFT PPHGIVQERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGRAVYECRLGGIDFT PPHGIVQERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGRAVYECRLGGIDFT PPHGIVQERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGRAVYECRLGGIDFT PPHGIVQERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGRAVYECRLGGIDFT *****;*****;*****;*****;*****;*****
Nicotiana asterids_lamiids_Solanales_Con Oryzasativasubsp.japonica_Rice rosids_malvids_Brassicales_Bra rosids_fabids_Cucurbitales_Cuc Caryophyllales_Amaranthaceae_S	KDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEALYKQAETGEIKGHVYNATAGTCCEM KDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEALYKQAETGEIKGHVYNATAGTCCEM KDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEALYKQAETGEIKGHVYNATAGTCCEM KDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEALYKQAETGEIKGHVYNATAGTCCEM KDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEALYKQAETGEIKGHVYNATAGTCCEM KDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEALYKQAETGEIKGHVYNATAGTCCEM *****;*****;*****;*****;*****;*****
Nicotiana asterids_lamiids_Solanales_Con Oryzasativasubsp.japonica_Rice rosids_malvids_Brassicales_Bra rosids_fabids_Cucurbitales_Cuc Caryophyllales_Amaranthaceae_S	IKRAVFARELGVPIMVHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLHHIRAMHAV MKRAIFARELGVPIMVHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLHHIRAMHAV IKRAVFARELGVPIMVHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLHHIRAMHAV IKRAVFARELGVPIMVHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLHHIRAMHAV MKRAIFARELGVPIMVHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLHHIRAMHAV MKRAVFARELGVPIMVHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLHHIRAMHAV *****;*****;*****;*****;*****;*****
Nicotiana asterids_lamiids_Solanales_Con Oryzasativasubsp.japonica_Rice rosids_malvids_Brassicales_Bra rosids_fabids_Cucurbitales_Cuc Caryophyllales_Amaranthaceae_S	IDRQKNHGIHFRVLAKALRMSGDDHISGTVVGKLEGERDITLGFVDLLR IDRQKNHGMHFRVLAKALRMSGDDHISGTVVGKLEGERDITLGFVDLLR IDRQKNHGMHFRVLAKALRMSGDDHISGTVVGKLEGERDITLGFVDLLR IDRQKNHGMHFRVLAKALRMSGDDHISGTVVGKLEGERDITLGFVDLLR IDRQKNHGMHFRVLAKALRMSGDDHISGTVVGKLEGERDITLGFVDLLR IDRQKNHGMHFRVLAKALRMSGDDHISGTVVGKLEGERDITLGFVDLLR *****;*****;*****;*****;*****;*****
Nicotiana asterids_lamiids_Solanales_Con Oryzasativasubsp.japonica_Rice rosids_malvids_Brassicales_Bra rosids_fabids_Cucurbitales_Cuc Caryophyllales_Amaranthaceae_S	DDFVEQDRSRGIYFTQDWVSLPGVLPVASC ^{GIHVWHMPALTEIFGDDSVL} DDFVEQDRSRGIYFTQDWVSLPGVLPVASC ^{GIHVWHMPALTEIFGDDSVL} DDFVEQDRSRGIYFTQDWVSLPGVLPVASC ^{GIHVWHMPALTEIFGDDSVL} DDFVEQDRSRGIYFTQDWVSLPGVLPVASC ^{GIHVWHMPALTEIFGDDSVL} DDFVEQDRSRGIYFTQDWVSLPGVLPVASC ^{GIHVWHMPALTEIFGDDSVL} DDFVEQDRSRGIYFTQDWVSLPGVLPVASC ^{GIHVWHMPALTEIFGDDSVL} *****;*****;*****;*****;*****;*****
Nicotiana asterids_lamiids_Solanales_Con Oryzasativasubsp.japonica_Rice rosids_malvids_Brassicales_Bra rosids_fabids_Cucurbitales_Cuc Caryophyllales_Amaranthaceae_S	QFGGGTLGHPWGNAPGAVANRVALEACVQARNEGRDLAREGNEIIREACK QFGGGTLGHPWGNAPGAVANRVALEACVQARNEGRDLAREGNEIIREACK QFGGGTLGHPWGNAPGAVANRVALEACVQARNEGRDLAREGNEIIREACK QFGGGTLGHPWGNAPGAVANRVALEACVQARNEGRDLAREGNEIIREACK QFGGGTLGHPWGNAPGAVANRVALEACVQARNEGRDLAREGNEIIREACK QFGGGTLGHPWGNAPGAVANRVALEACVQARNEGRDLAREGNEIIREACK *****;*****;*****;*****;*****;*****
Nicotiana asterids_lamiids_Solanales_Con Oryzasativasubsp.japonica_Rice rosids_malvids_Brassicales_Bra rosids_fabids_Cucurbitales_Cuc Caryophyllales_Amaranthaceae_S	WSPELAAACEVWKEIVFNFAAVDVLDK--- WSPELAAACEVWKEIVFNFAAVDVLDK--- WSPELAAACEVWKEIVFNFAAVDVLDK--- WSPELAAACEVWKEIVFNFAAVDVLDK--- WSPELAAACEVWKEIVFNFAAVDVLDK--- WSPELAAACEVWKEIVFNFAAVDVLDK--- *****;*****;*****;*****;*****;*****

図1 種々の植物種の Rubisco のアミノ酸配列。ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>) により多重
整列解析枠のアミノ酸配列を基にディジェネレートプライマーを作成した。

表1 Rubisco のディジェネレートプライマーおよび Actin のプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列	対応するアミノ酸配列	Tm (℃)
Rubisco F	5'- GAYTTYCANAARGAYGAYGARAAYGTN -3'	DFTKDDENV	51
Rubisco R	5'- GCNGGCATRTGCCANACRTGDATNCC -3'	GIHVWHMPA	60
Actin F	5'- CTCCTGTGTTGCTCCTGAGGAA CATC -3'		63
Actin R	5'- ACCTCAGGACAACGAATCGCTC -3'		62

サーマルサイクラー (PTC-200, Bio-Rad) による PCR の条件は, Rubisco が95℃ : 5 分, (95℃ :30秒, 51℃ :30秒, 72℃ :1 分) ×25サイクル, 72℃ :5 分で, アクチンが95℃ : 5 分, (95℃ :30秒, 62℃ :30秒, 72℃ :1 分) ×25サイクル, 72℃ :5 分で行った。

PCR 産物はアガロースゲル電気泳動法により DNA 断片を解析した。

【結果および考察】

ALA は, 暴露時間および植物種により異なるが, 一般的に低濃度ではクロロフィル生合成, 光合成やそれらの増大に伴う植物の成長増大などの効果をもたらすことが明らかになっている¹⁵⁾。ALA が光合成活性におよぼす影響については, 双子葉植物であるハツカダイコン, ライムポトスおよびハウレンソウ¹²⁾, 単子葉植物であるコウシュンシバおよびベントグラス¹⁶⁾ を用いた試験の結果から, 明条件下での低濃度の ALA 処理により, 植物の光合成の指標としての炭酸ガスの吸収速度が上昇し, 暗呼吸を抑制することがわかっている。また, 果実であるブドウに及ぼす ALA の影響を調べた結果, ALA 施用によって光合成活性が22%, 果実の糖含有量が2.7%, 房の重量が53% も増加した¹⁷⁾。

このように, ALA が植物の光合成におよぼす影響については多くの報告がなされているが, その生理学的な作用機序, 特に光合成の炭酸固定に係る作用機序についての報告はみられない。

そこで本研究では, ALA がモデル植物であるファストプラントの成長に及ぼす影響を調べるとともに, 光合成の炭酸固定反応の重要な段階に関わる酵素タンパク質である Rubisco をコードする遺伝子の発現におよぼす影響について調べた。

〈成育調査〉

ALA および PG の施用が植物の成長に及ぼす影響について, 生体重, 草丈, 葉長および根長の4つの項目を調べた。

生体重では, コントロール区に比べて ALA 区で約30%, PG 区で約130%の増大を示した。また, ALA 区に比べて PG 区でも約75%の増大を示した。分散分析の結果, コントロール区と ALA 区では有意な差は認められなかったが, コントロール区および ALA 区と PG 区では有意な差が認められた (図2)。

これまでに報告されている ALA が植物に及ぼす影響として, クロロフィルの生合成については, 水耕栽培したライムポトスに0.01ppm の ALA を添加することで, 無添加区に比べてクロロフィル含有量が約15%増加した¹⁸⁾。ALA 処理によるクロロフィル含有量の増加については, イネやシバなどについても確認されている。また, タバコの白色カルス培養において, 培地に0.01から0.1ppm の ALA を添加したところ, カルスの緑化が進むことが確認された¹⁹⁾。

さらに, ALA がイネ幼苗の成長におよぼす影響を調べたところ, 根部浸漬処理では0.01から10ppm の濃度で乾物中を指標とした成育促進効果が観察され, 特に0.1ppm で最も成育が促進し, 無処理区の114%の成長を示したが, 100ppm の高濃度では強い成育抑制が認められたことが報告されている。また, その他にもハツカダイコン, ポトス, トウモロコシ, インゲンマメ

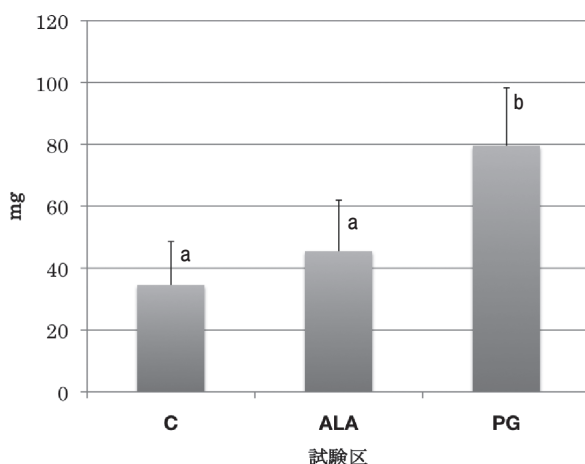


図2 コントロール区 (C), ALA 単独施用区 (ALA) およびペンタガーデン施用区 (PG) の生体重
図中のエラーバーは標準誤差を示し、異なる英小文字間には5%水準の有意差があることを示す

についても低濃度の ALA 処理がそれぞれの植物の成育を促進することが明らかになっている²⁰⁾。これらの報告については、ALA 単独処理による植物の成育促進が認められているものが多いが、今回の結果では、ALA を含む肥料である PG 区でのみ有意に成長促進効果が認められた。また、ALA を植物の根に施用する場合、60 μM 以下の濃度でその成長促進効果が認められている¹²⁾。今回の試験では、約46 μM の ALA を根に施用したが、ALA 単独施用区では植物の生体重を指標とした成長促進効果は認められなかった。ALA の成育促進効果は、ALA の施用濃度、施用時間および植物種により異なる¹⁵⁾ ことから、今回使用した ALA の施用方法ではファストプラントの成長には大きな影響が見られなかったことが考えられる。

草丈の平均値を比較すると、ALA 区と PG 区では大きな差がなかった。ALA 区でコントロール区に比べて約11%、PG 区では約15% 長くなっていることがわかったが、分散分析の結果すべての試験区で有意な差が認められなかった (図3)。

次に、葉長について調べたところ、その平均値では、コントロール区に比べて ALA 区では約10% 長くなったが、PG 区では ALA 区に比べて約33%、コントロール区に比べて約45% もの伸長が認められ、これらの結果は分散分析においても有意な差が認められた (図4)。

また、根長の平均値を比較すると、他の調査項目とは異なり、コントロール区で最も大きな伸長が認められ、ALA 区に比べて約60%、PG 区に比べて約45% の伸長促進が認められたが、分散分析の結果では全ての試験区間で有意な差は認められなかった。また、ALA および PG 区に比べてコントロール区で標準偏差が非常に大きく、根の伸長度合いに大きなばらつきが認められた (図5)。鯨は水稻栽培において施肥法を変えると、根茎の形態や機能に変化することを示した。すなわち深層、全層、表層等の施肥位置を変えたところ、肥料が分布する土壌域において側根や根毛がよく発達し、肥料が存在しない土壌域においては根の成育が劣ることを明らかにした²¹⁾。このように肥料成分が存在することで根がよく発達することが一般的にも知ら

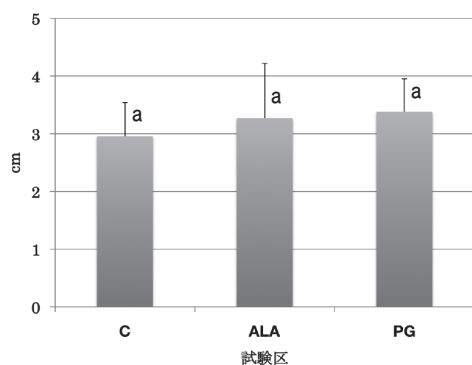


図3 コントロール区 (C), ALA 単独施用区 (ALA) およびペンタガーデン施用区 (PG) の草丈
図中のエラーバーは標準誤差を示し, 異なる英小文字間には5%水準の有意差があることを示す

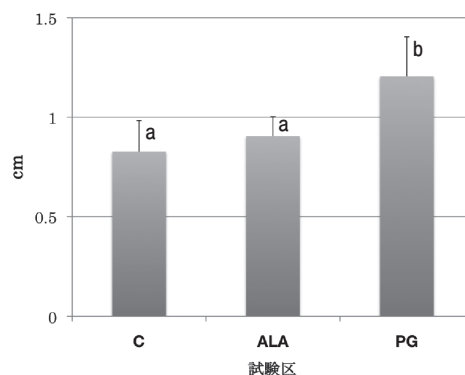


図4 コントロール区 (C), ALA 単独施用区 (ALA) およびペンタガーデン施用区 (PG) の葉長
図中のエラーバーは標準誤差を示し, 異なる英小文字間には5%水準の有意差があることを示す

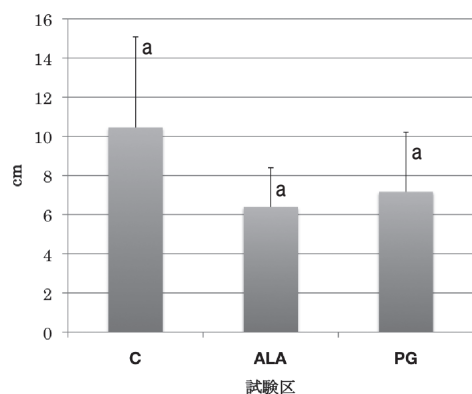


図5 コントロール区 (C), ALA 単独施用区 (ALA) およびペンタガーデン施用区 (PG) の根長
図中のエラーバーは標準誤差を示し, 異なる英小文字間には5%水準の有意差があることを示す

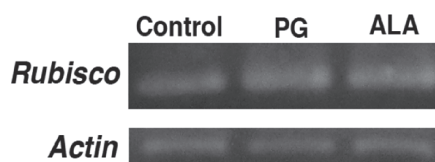


図6 コントロール区 (Control), ペンタガーデン施用区 (PG) および ALA 単独施用区 (ALA) の Rubisco および Actin の電気泳動像

れている。また ALA 処理によりハツカダイコンの根の生体重が増加することも報告されている¹⁹⁾。今回の結果から、分散分析では有意な差は見られなかったものの、肥料を施肥した区に比べて無施肥のコントロール区で根長が長く、ALA および PG は植物の根の伸長を抑制する可能性が示された。また、コントロール区では根の成長に係る標準偏差が非常に大きかったのに対し、ALA および PG 区ではコントロール区に比べて根の成長に係る標準偏差が小さく、根長が比較的揃っていることから、ALA および PG は根の細胞の分裂や伸長を調整して根の形態を決定する機構に何らかの作用を及ぼしていることが示唆された。

〈Rubisco をコードする遺伝子の発現解析〉

Rubisco は、植物をはじめとした光独立栄養生物において、大気中から二酸化炭素を吸収するために必要な極めて重要な酵素タンパク質である。カルビン回路に存在し、リブロース1,5-ビスリン酸に二酸化炭素を反応させ、2分子の3-ホスホグリセリン酸を生成する反応を触媒している。また、C3植物の場合には光合成の律速段階となっている²²⁾。

コントロール、ALA および PG 区それぞれの試験区で9日間栽培した植物体の葉を採取して RNA を抽出後、逆転写により合成した cDNA を鋳型として、ディジェネレート PCR により Rubisco をコードする遺伝子の発現量を比較した。その結果、コントロール区に比べて PG 区および ALA 区で Rubisco をコードする遺伝子の発現量の増大が認められた (図6)。

Hotta らは、ポトスの葉身の付いた葉柄を切り取り、Murashige-Skoog 培地と0.06 μ M の ALA を含む培養液に浸けて培養したところ、処理後42時間でクロロフィル含有量は、蒸留水のみコントロール区に比べて約2倍に増加した一方で、最大光合成速度は7.5倍に増加した¹²⁾。このことから、ALA 添加による光合成能増大、およびそれに起因する成長促進作用はクロロフィル含有量の増加による光補足量の増大や光化学系の活性促進だけではなく、その他の光合成のコンパートメントが関与していると考えられる。

本研究の結果から、ALA による植物の光合成能力の増強および成長促進作用には Rubisco をはじめとする炭酸固定に係る代謝の関与が示唆された。一方、これまで ALA が植物におよぼす影響については多くの知見が得られているが、ALA の作用発現には微量必須元素が関与していることがわかっており^{23, 24)}、それらの関係についても調べるのが、植物体内での ALA の作用機序をより理解するのに重要である。

【まとめ】

モデル植物であるファストプラント (*Brassica rapa*) を用いて、ALA が植物の育成および光合成の炭酸固定における重要な酵素である Rubisco をコードする遺伝子の発現におよぼす影響を調べた。その結果、成長については生体重および根長で ALA を含有する肥料である PG の施用により有意な成長促進効果が認められたが、ALA 単独の使用ではコントロール区と有意な差は認められなかった。また、Rubisco をコードする遺伝子の発現について調べた結果、コントロール区に比べて ALA および PG 区でその発現量が増大したことから、ALA は光合成のカルビン回路を中心とする炭酸固定反応にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。

文献

- 1) Wang, L. J., et al. Promotion by 5-aminolevulinic acid of germination of pakchoi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* Tsen et Lee) seed under salt stress. J Integr Plant Biol. 47, 1084-1091 (2005)
- 2) Tabuchi, K., Mizuta, H. and Yasui, H. Promotion of callus propagation by 5-aminolevulinic acid in a *Laminaria japonica* sporophyte. Aquacult Res. 41. 1-10 (2009)
- 3) Beale, S. I. Biosynthesis of tetrapyrrole pigment precursor, *d*-aminolevulinic acid, from glutamate.

- Plant Physiol. 93. 1273-1279 (1990)
- 4) Reinbothe, S. and Reinbothe, C. Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. Plant Physiol. 111. 1-7 (1996)
 - 5) Pavlovic, A., et al. Feeding with aminolevulinic acid increased chlorophyll content in Norway spruce (*Picea avies*) in the dark. Photosynthetica. 47. 621-634 (2009)
 - 6) Tewari, A. K. and Tripathy, B. C. Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat. Plant Physiol. 117. 851-858 (1998)
 - 7) Yang, C. M., Tsai, H. M. and Yang, J. H. Glucose and delta-aminolevulinic acid stimulate the dark chlorophyll synthesis of rice seedlings. Acta Botanica Sinica. 45. 422-426 (2003)
 - 8) Balestrasse, K. B., et al., The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants. Phytochemistry. 71, 2038-2045 (2010)
 - 9) Watanabe, K. et al. Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid. Plant Growth Regul. 32. 97-101 (2000)
 - 10) Lorkmaz, A., Korkmaz, Y. and Demirkiran, A. R. Enhancing chilling stress tolerance of pepper seedlings by exogenous application of 5-aminolevulinic acid. Environ Exp Bot. 67. 495-501 (2010)
 - 11) Naeem, M. S., et al. 5-Aminolevulinic acid improves photosynthetic gas exchange capacity and ion uptake under salinity stress in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Soil. 332. 405-415 (2010)
 - 12) Hotta, Y., et al. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: The increase of photosynthesis, chlorophyll content, and plant growth. Biosci Biotech Biochem. 61. 2025-2028 (1997)
 - 13) McPherson, M. J., Jones, K. M., and Gurr, S. J. PCR with highly degenerate primers in The Polymerase Chain Reactions. K. B. Mullis, F. Ferre and R. A. Gibbs, eds. Birkhauser (1994)
 - 14) Kim, J. Y., et al. MicroRNA402 Affects seed Germination of Arabidopsis thaliana Under Stress Conditions via Targeting DEMETER-LIKE Protein3 mRNA. Plant Cell Physiol. 52 (6) , 1079-1083 (1994)
 - 15) Kantha, T., et al. Selection of photosynthetic bacteria producing 5-aminolevulinic acid from soil of organic saline paddy fields from the Northeast region of Thailand. Afr J Microbiol Res. 4. 1848-1855 (2010)
 - 16) 堀田康司ら, 5-アミノレブリン酸のコウシュンシバ (*Zoysia matrella* Merr.) とベントグラス (*Agrostis palustris* Huds. cv. Penncross) の育成におよぼす影響, 芝草研究, 28 (2), 97-102 (2000)
 - 17) Watanabe, K., et al. Enhancement of growth and fruit maturity in 2-year-old grapevines cv. Delaware by 5-aminolevulinic acid. Plant Growth Regul. 49, 35-42 (2006)
 - 18) 吉田達ら, 5-アミノレブリン酸の植調作用発現要因, 植物化学調節学会第29回大会研究発表記録集, pp. 153-154 (1994)
 - 19) 堀田康司ら, 5-アミノレブリン酸が幼植物の育成に及ぼす影響, 日本農薬学会誌, 22, 102-107 (1997)
 - 20) Korkmaz, A. Effects of exogenous application of 5-aminolevulinic acid in crop plants. Ahmad, P. and Prasad, M. N. V. (eds.) Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. pp. 215-234
 - 21) 鯨幸夫, 施肥法の違いが水稻根の形態に及ぼす影響. 日本作物学会記事 58 (別 1), 24-25 (1989)
 - 22) Andersson, I. and Backlund, A., Structure and function of Rubisco. 46, 275-291 (2008)
 - 23) 葭田隆治ら, 5-アミノレブリン酸と微量元素との組合せの葉面散布がコマツナの収量に及ぼす影響, 北陸作物学会報, 39, 66-68 (2004)
 - 24) 岩井一弥, 倉持仁志, 竹内安智, クリーピンググラス (*Agrostis palustris* Huds.) の生育に及ぼす5-アミノレブリン酸と微量元素入り液状窒素肥料の組み合わせの影響, 芝草研究, 35 (2), 99-104 (2007)

Abstract**Effect of 5-Aminolevulinic Acid on the Growth and Expression of the Gene Coding Rubisco in *Brassica rapa*.**

Ken-ichi MUROTA, Tamami HASEGAWA

5-Aminolevulinic acid (ALA) is a precursor in the biosynthesis of porphyrins such as chlorophyll, and ALA formation is the rate-limiting step in chlorophyll biosynthesis in plants. High concentrations of ALA in tissues enhance reactive oxygen species production leading to oxidative stress, acting as a herbicide, while low ALA concentrations appear to promote growth of several crops and vegetables.

In this paper, we investigated that effect of the ALA and the fertilizer containing ALA (PG) treatment on the growth of Fast Plants (*Brassica rapa*) and on the expression of the gene coding for Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) .

There are significant difference between control/ALA treatment and PG treatment in fresh weight and leaf length. Higher level of expression of the gene coding for Rubisco in PG and ALA treatment was observed, than those in control.

These results suggest that low concentration of ALA also promote the reaction of carbon dioxide fixation in plants.