

# シダでもサリチル酸は植物ホルモンとなるか

静岡県立下田高等学校  
自然科学部 2年 佐野和雲 渡邊祥

## 1. 背景

### 1-1. 私たちの研究目的

サリチル酸とは最近になって植物ホルモンとして認められた物質である [参考 1] [参考 2]。植物ホルモンとしてのサリチル酸は、病原体に対する抗菌作用や、抵抗性の獲得に関与するとされている。病原体に感染すると、病斑部の周囲の細胞で細胞死を起こし、病原体の感染の拡大を防ぐ過敏感反応、病斑部で抗菌作用を持つサリチル酸を急激に増加させる局部獲得抵抗性、過敏感反応や病原抵抗性に関与する病原特異的たんぱく質合成の誘導、サリチル酸メチルに変換し、植物体全体に広がり、病原体抵抗性の向上などはたらきがある。揮発性のサリチル酸メチルは、空気を介して他の植物の抵抗性も誘導する。

上級生の先行研究 [参考 2] では、被子植物 2 種、シダ植物 1 種、緑藻植物 1 種で実験し、被子植物ではサリチル酸水溶液によって斑点状に変色するが、シダ植物以前では全体に変色することが分かっている。さらに、サリチル酸水溶液に浸された植物は気孔を閉じることが分かっている。しかし、これでは被子植物より前の植物である裸子植物やシダ植物などでは、サリチル酸が植物ホルモンとなるか分からない。そこで、私たちは、被子植物 3 種、裸子植物 1 種、シダ植物 3 種で実験を行うことにした。

植物ホルモンとしてのサリチル酸の働きは、前述したように病原菌の感染が広まらないように、植物ホルモンとして成長を調節することである。しかしながら、これは一部の被子植物を対象とした知見である。一部の被子植物を対象とした知見が、シダ植物や裸子植物などの原始的な植物種に当てはまるとは限らない。サリチル酸の受容体 [参考 3] [参考 4] がヒトや各種の動物に存在しないので、私たちは先祖にはサリチル酸の効かない植物がいるはずだと予想し、この仮説を検証するため実験した。

### 1-2. シダ植物の特徴

植物進化の歴史上、コケ植物の中から維管束を獲得してシダ植物が、シダ植物の中から胚珠を獲得して裸子植物が、裸子植物の中から子房を獲得して被子植物が登場したとされる。したがって、維管束はあるが、胚珠や子房を持たず、種子や果実を作らない植物がシダ植物であり、これらは裸子植物や被子植物といった種子植物よりも原始的な特徴を持つ植物である。このシダ植物は、孢子と前葉体で増殖する。

前葉体の時期に豊富な水を必要とするシダ植物にとって湿潤な日本は好都合な生息地であり、700 種類（諸説あり）以上のシダが自生しているとされる。古くから日本人にとってシダは身近な植物であり、万葉集には柿本人麻呂「わが屋戸の軒のしだ草生ひたれど恋忘草見れど生ひなく」の短歌が集録されている。「しだ草」の言葉がある通り万葉集が編纂された奈良時代にはすでに、家屋の近くに生育する植物として、シダ植物全般が広く認知されていたようである。

また、日本人にとって、シダのうちゼンマイ、ワラビ、そしてスギナ（ツクシ）は、食用の植物としても身近な植物だった。万葉集には志貴皇子「石走る垂水の上のさ蕨（わらび）の萌え出づる春になりにけるかも」の短歌が集録されており、この時代には熱や灰を使った解毒処理の手順が確立し、春に採取できる食材としてワラビが広く認知されていたようである。煮物や天ぷらなど今に伝わる食用シダ植物の食文化はほぼ日本に固有であり、海外（ミズワラビのサラダなど）ではまれである。

現在、ゼンマイ、ワラビ、スギナ（ツクシ）といった食用シダ植物は、山菜として採取されることが通例であり、農作物として栽培されることは少ない。山菜など野生資源が乱獲され、資源量が激減していることから、ゼンマイの優良個体選抜に必要な組織培養技術については研究 [参考 5] [参考 6] されており、オーキシン、サ

イトカイニン、ジベレリンといった植物ホルモンを培地に添加するとどうなるか、1990年代に記載がある。サリチル酸の受容体が発覚 [参考3] し、サリチル酸の植物ホルモンとしての位置づけが疑いようのない状態になったのは2010年代であり、受容体となるタンパク質の結晶構造解析が達成されたのは2020年 [参考4] であるから、シダ植物に対するサリチル酸の作用は、未開の研究テーマである。育苗された優良系統のゼンマイ [参考7] やワラビ [参考8] の苗が通販で購入できるようになった現代においても、食用シダ植物の栽培に関係した植物ホルモンの活性作用をより深く理解する意義は高まっている。

### 1-3. 植物分野全体の研究意義

植物は自由に動くことができず、芽生えた場所で生涯を過ごさなければならない。寒い冬を耐え抜き、花を咲かせ、実を結び次世代を残していく。地球上の生命を支えているのは植物であり、生態系の生産者として、光合成で太陽エネルギーを有機物に変えたり、食物として他の生物に栄養分を与えたりしている。

植物は地球温暖化の防止策にもなっている。産業革命以降、化石燃料を沢山使用してきたことで、地球上の二酸化炭素濃度が高くなり、地球温暖化が促進している。植物は光合成によって、この温室効果ガスである二酸化炭素を消費し、酸素を生産している。つまり地球温暖化を防ぐには、植物が必要不可欠である。

私たち人間も植物によって養われている。今世界では食糧の需要と供給の地域的な偏りが問題になっていて、発展途上国では多くの人が栄養不足や飢餓に苦しんでいる。一方日本では農業就業人口が減少し、主業農家も少なくなっているため、農業の省労力化が克服すべき課題になっている。こうした地球規模の環境問題や、食糧問題を解決するためには植物の存在が必須であるため、植物分野の研究には意味がある。

## 2. 方法

### 2-1. 試料の調整

植物ホルモン活性を調べる実験では、下田高校化学室にあったサリチル酸  $C_7H_6O_3$  (国産化学株式会社) を使った。水溶液の作成にあたっては、比較対照群には純水製造装置ピュアライン Water Purifier W1,200 (ヤマト科学株式会社) のイオン交換水を使用した。水溶液の作成にあたっては電子天秤 UX4200H (島津製作所) でサリチル酸の質量を測定し、希釈にあたってはメスフラスコを使用した。サリチル酸の異性体 (*m*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸) でも同様の作業を行ない、水溶液を作成した。

### 2-2. 植物材料の調達

シダ植物のゼンマイ (*Osmunda japonica*)、ワラビ (*Pteridium aquilinum*)、マツザカシダ (*Pteris nipponica*)、と裸子植物のイチョウ (*Ginkgo bioba*)、被子植物のミズタマソウ (*Circaea mollis*)、クズ (*Pueria montana*)、クスノキ (*Cinnamomun camphora*) を下田高校敷地内で採取した。裸子植物であるマツ (*Pinus sp.*) やスギ (*Cryptomeria japonica sp.*) は葉が細く変色を観察しにくいと考え、イチョウのみで実験をおこなった。

### 2-3. 変色の観察と数値化

サリチル酸水溶液に浸された葉は、茶色く変色することが分かっている [参考2] ので、まず採取した葉をシャーレに入れ、作成したサリチル酸水溶液 ( $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ) に浸し、蓋をしてパラフィルム (三和産業株式会社) を貼った。次にサリチル酸水溶液に浸した葉を1週間放置し、1週間後の葉の状態をスマホで撮影した。数値化にあたっては、撮影した写真を印刷し、一辺が0.5 cmの方眼用紙を用いて変色した面積を数値化した。

また、サリチル酸による葉の変色は濃度依存であるかどうかを調べるために、羽状複葉が発達していて観察しやすいシダ植物のゼンマイと進化の過程で気になる裸子植物のイチョウで、試葉をサリチル酸の異性体 (*m*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸) に変え、同じように実験をした。

### 3. 結果

#### 3-1. サリチル酸による変色の観察

原始的な植物種であるシダ植物のゼンマイ、ワラビ、マツザカシダ、新しい植物種である被子植物のミズタマソウ、クズ、クスノキ、シダ植物と被子植物の間である裸子植物のイチョウが手に入ったので、これらの植物試料を使って、植物の進化の観点で、サリチル酸の効き目を調べる実験をした。

実験に使用した植物すべてで  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L の濃度のサリチル酸水溶液によって葉が茶色く変色したことを確認できた [図2]。シダ植物であるワラビ、ゼンマイ、マツザカシダ、裸子植物であるイチョウでは  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L の濃度のサリチル酸水溶液によって葉のほとんどが茶色く変色した。被子植物であるミズタマソウ、クズ、クスノキでは  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L の濃度のサリチル酸水溶液によって斑点状に変色した。水、 $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L の濃度のサリチル酸水溶液ではどの植物でも茶色の変色がほとんど見られなかった。また変色した面積を数値化しグラフ化した [図2]。グラフでは、シダ植物や裸子植物は変色面積が 50%以上で、被子植物では変色面積が 50%未満であることから、当初に立てた仮説に反して被子植物よりもシダ植物や裸子植物の方が、ものすごくよくサリチル酸が効くということがわかった。

また、サリチル酸による葉の変色は濃度依存であるかどうかを調べるために、羽状複葉が発達していて観察しやすいシダ植物であるゼンマイと、進化の過程で気になる裸子植物のイチョウで実験を繰り返し、用量反応曲線を得た [図3]。用量反応曲線とは、サリチル酸の濃度が濃ければ変色 100%、薄ければ変色 0%としてグラフにしたものである。用量反応曲線からサリチル酸による葉の変色はサリチル酸水溶液の濃度依存であることがわかった。

#### 3-2. サリチル酸の異性体による変色の観察

サリチル酸の異性体 (*m*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸) による変色の観察は、サリチル酸に浸した時に観察しやすかったシダ植物のゼンマイ、裸子植物のイチョウを用いて行った。実験に使用した植物すべてで、サリチル酸の異性体による変色はほとんど確認できなかった [図4]。サリチル酸水溶液に浸されたゼンマイ、イチョウと比較するため、変色した面積を数値化し、グラフ化した [図5]。グラフからサリチル酸の異性体ではサリチル酸水溶液に浸されたゼンマイイチョウより、変色していないことが分かる。

### 4. 考察

#### 4-1. 主な成果

今年度の実験では、サリチル酸の一部の被子植物を対象とした知見が、原始的な植物種であるシダ植物と裸子植物ではどうなるのかを示すことができた。実験に使用したどの植物でも変色を確認することができたが、シダ植物と裸子植物では変色が葉の全体に広がるが、被子植物では変色が全体に広がることはなく斑点状に変色することがわかった。また、サリチル酸の異性体での実験では、植物がサリチル酸を認識して変色できているのかを示すことができた。サリチル酸によって全体が変色したシダ植物のゼンマイと裸子植物のイチョウでも、変色が見られないことがわかった。

#### 4-2. 原始的な植物と被子植物で変色に違いがあるのはなぜか

植物は進化段階ごとに、複雑さを増大させていった。緑藻などの藻類から始まって、コケやシダの仲間を経て、現代の複雑な種子植物に至る。

陸上植物は、約4億7千万年前ごろに、緑藻類から進化したと考えられている。陸上植物の起源は、棲息場所が浅い淡水の下で、季節的に乾燥する小さな池の縁であったと考えられている。また、菌類との共生が、初期植物の陸上進出を助けた可能性があるともされている。緑藻類は、乾燥から身を守るために、水分を通さない表皮を発達させ、茎の中に水分や養分を運ぶ管を作り、陸上に進出していったとされる。シダ植物は維管束の形成で乾燥に耐え、体を支えられるようになった。

シダ植物から種子植物への進化は2~3億年前に起きたと考えられている。シダ植物から種子植物へ進化する

際には、外界からの水を必要としない受精様式を獲得し、乾燥に耐えうる種子を形成することができるようになった。水がなくても子孫を残すことができる種子植物から裸子植物や被子植物の祖先が出現した。裸子植物は、寒冷化している時期から始まる古生代のペルム紀前期に出現した。ペルム紀前期では寒冷化により、シダ植物が衰退し、後期ではシダ種子類が絶滅している。被子植物は中生代の白亜紀前期に出現した。白亜紀前期は、シダ植物や裸子植物が生い茂っていたが、約1億3000万年前に現れた被子植物がどんどん多様化して広がっていき、白亜紀後期には被子植物が大部分を占めるようになった。

実験に使用した植物を原始的なものから順に並べると、シダ植物、裸子植物、被子植物となる。実験では原始的な植物種の方が被子植物よりサリチル酸によって変色しやすいことが分かっている。このことから、サリチル酸の働きを抑制する何らかの因子が被子植物では働いているが、シダ植物と裸子植物では働いていないと考えることができる。抑制因子の抑制がなくなった例としては、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、転写因子の遺伝子 (*LSD1*) に機能喪失変異があると、サリチル酸で誘導される細胞死の暴走が起こるという報告がある [参考9]。したがって、被子植物は様々な病原菌に感染する陸上の環境で生息域を拡大する中、裸子植物から進化していく過程で、病害応答を調節する高度な仕組みを手に入れたと考えると説明がつく [図6]。

#### 4-3. シダ植物はサリチル酸を異性体と区別して認識している

#### 4-4. スギナ選択的除草剤としての応用

[紙面の都合で省略]

#### 4-5. 反省と課題

今年度の実験では、原始的な植物であるシダ植物と裸子植物の方が、新しい植物種である被子植物よりサリチル酸によって変色することが示せたが、これは投与したサリチル酸の効き方を調べただけであって、植物が作り出すサリチル酸の効き方が調べられたわけではない。植物本来が作り出すサリチル酸にどのような役割があるのか分かっていないので、サリチル酸の濃度が調べられるようになってからシダ植物や裸子植物の葉に含まれるサリチル酸の量を測定して比較したい。

### 5. 謝辞

この研究は、下田高校自然科学部（顧問：吉田亮祐教諭）の中で行われました。試薬や備品を購入するため、下田高校生徒会から支給される部費に加えて、昨年度の山崎賞賞金を使用しました。

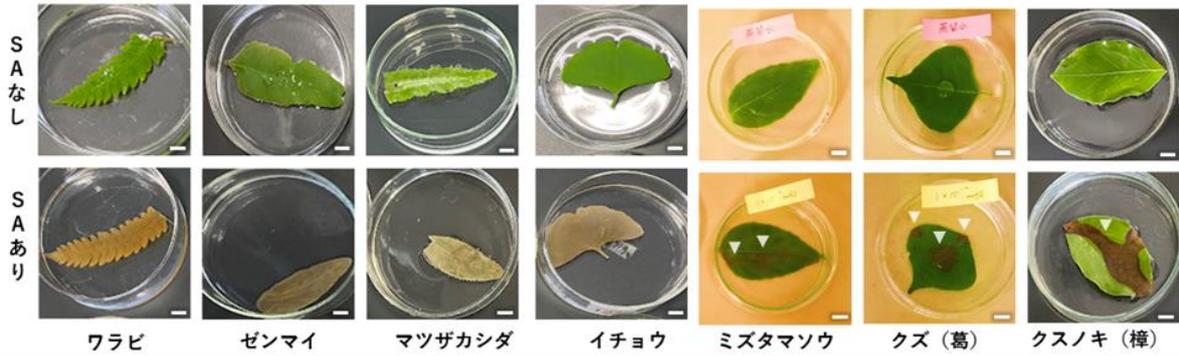
また、この研究は、今年度（2022年10～11月）の高文連自然科学専門部の生徒理科研究発表会で、口頭発表とポスター展示をしたものにデータを加え、まとめ直したものです。生徒理科研究発表会では、静岡県東部地区大会で最優秀賞をいただき、県大会まで進みました。

スギナの生育と駆除に関係して、静岡県立農林技術研究所伊豆農業研究センターに所属の馬場富二夫様からアドバイスをいただきました。ここにお礼、申し上げます。

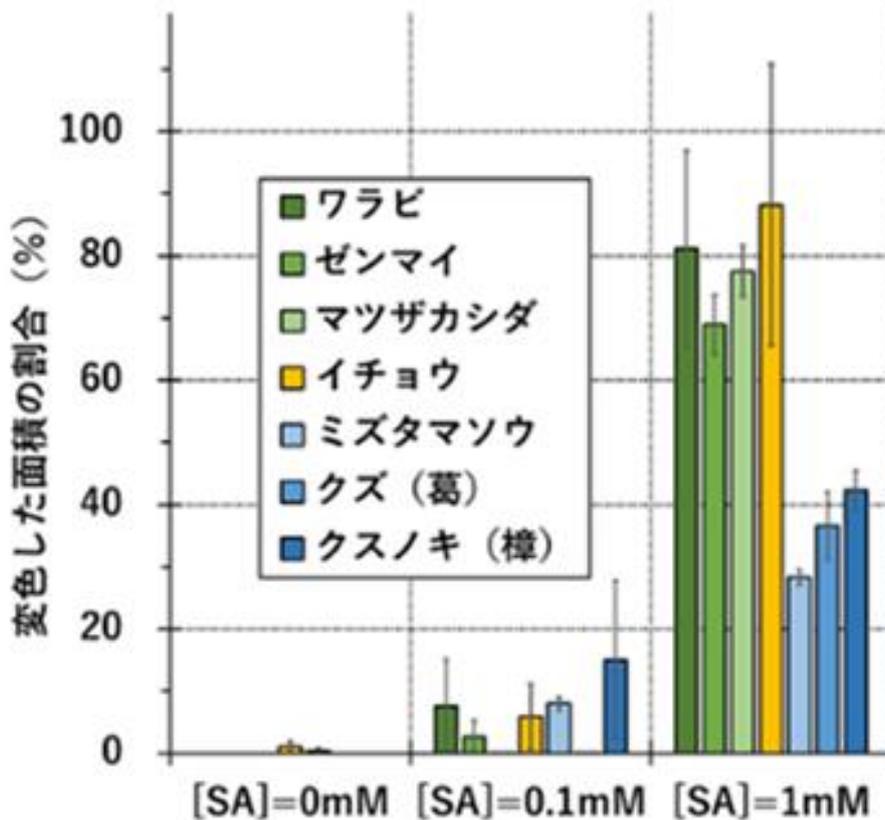
## 6. 参考文献

- [参考 1] 数研出版『フォトサイエンス生物図録』P.201 (三訂版)
- [参考 2] 下田高校自然科学部『サリチル酸の効きめは植物の進化でどう変わったか』第 37 回山崎賞受賞論文 (2021)  
<https://gakusyuu.shizuoka-c.ed.jp/science/sonota/ronnbunshu/R2/203080.pdf>
- [参考 3] Zheng Qing Fu ら "NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants." *Nature* (2012) P.228–232  
<https://doi.org/10.1038/nature11162>
- [参考 4] Wei Wang ら "Structural basis of salicylic acid perception by Arabidopsis NPR proteins." *Nature* (2020) P.311-316  
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2596-y>
- [参考 5] 原田牧人ら『組織培養によるゼンマイの大量増殖』宮城県農業センター研究報告 (1993) P.12-19  
<https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010491234>
- [参考 6] 青野茂ら『組織培養による山菜の大量増殖試験』福島県林業試験場研究報告 (1995-1999)  
<https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010530883> および <https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010600791>
- [参考 7] ゼンマイの苗 | タキイネット通販  
<https://shop.takii.co.jp/category/00004926>
- [参考 8] ワラビの苗 | タキイネット通販  
<https://shop.takii.co.jp/category/00006194>
- [参考 9] Daniel H. Aviv ら "Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *lsd1* is SA- and *NPR1*-dependent." *Plant Journal* (2002) P.381-391  
<https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01225.x>

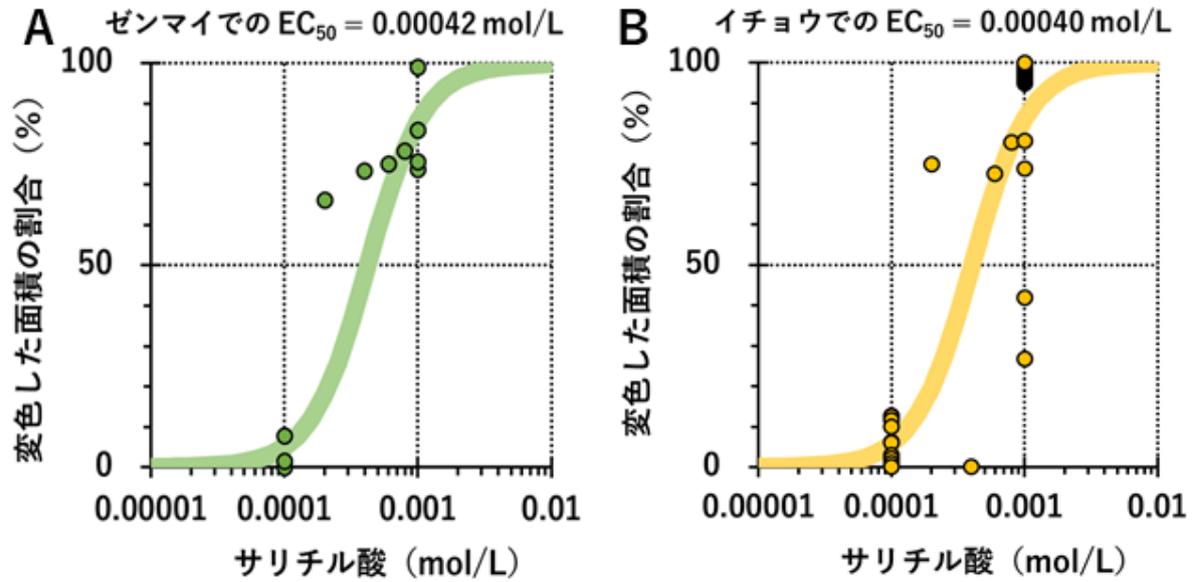
7. 図表



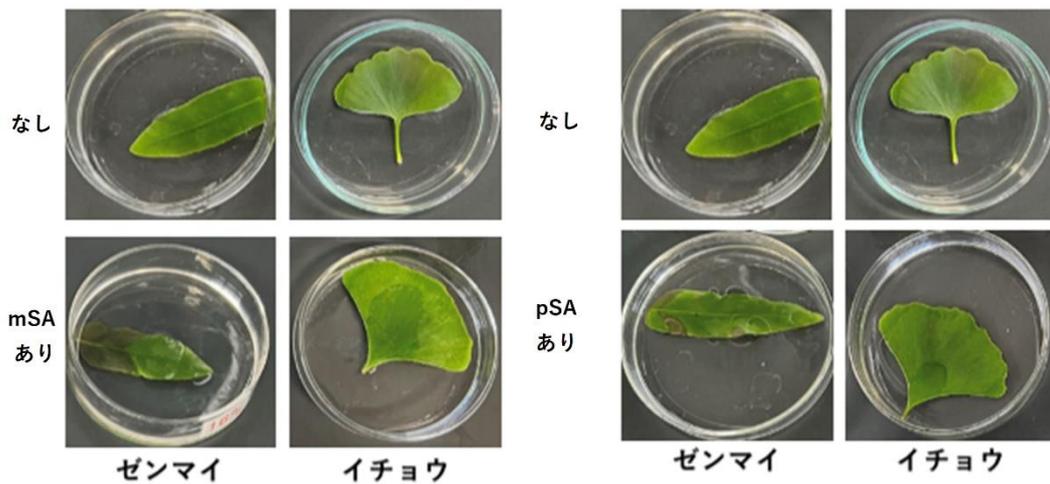
[図1] シダ植物、裸子植物、被子植物をサリチル酸水溶液に浸した実験結果。シャーレに入れ、パラフィルムを貼り、1週間放置して撮影した。シダ植物や裸子植物は変色がほぼ全体に広がっているが、被子植物は斑点状に変色している。三角印(▽)は強調、縮尺棒は1cm、SAはサリチル酸で、ありの濃度は $1.0 \times 10^{-3}$  mol/Lである。



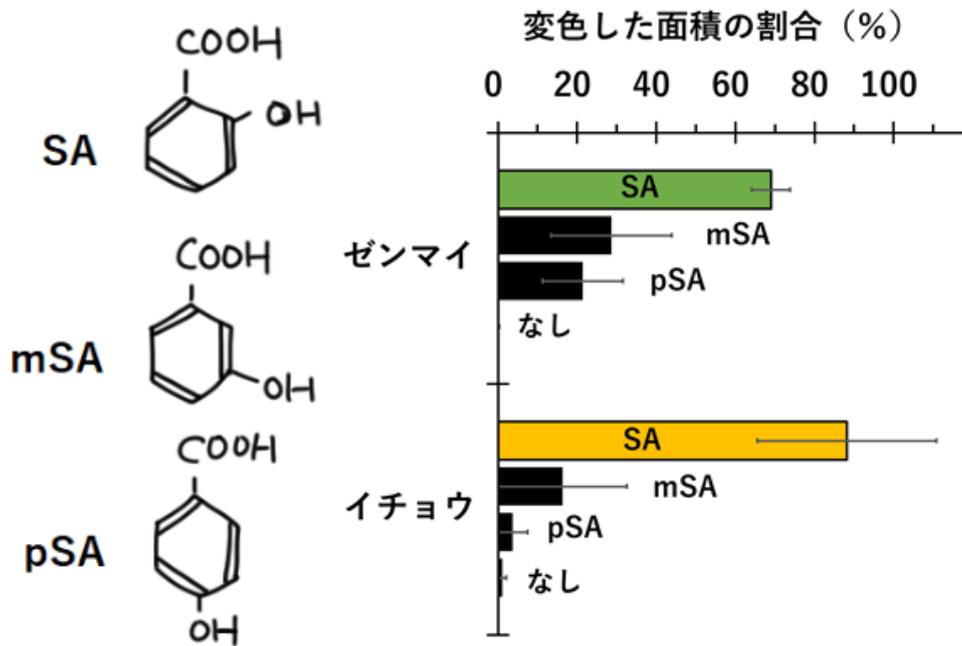
[図2] サリチル酸を投与したとき変色した面積の割合をグラフ化したもの。このグラフから、被子植物やよりもシダ植物や裸子植物の方がサリチル酸水溶液によって変色しやすいことが分かる。縦軸は変色した面積の割合、横軸はサリチル酸のモル濃度、誤差棒は標準偏差である。



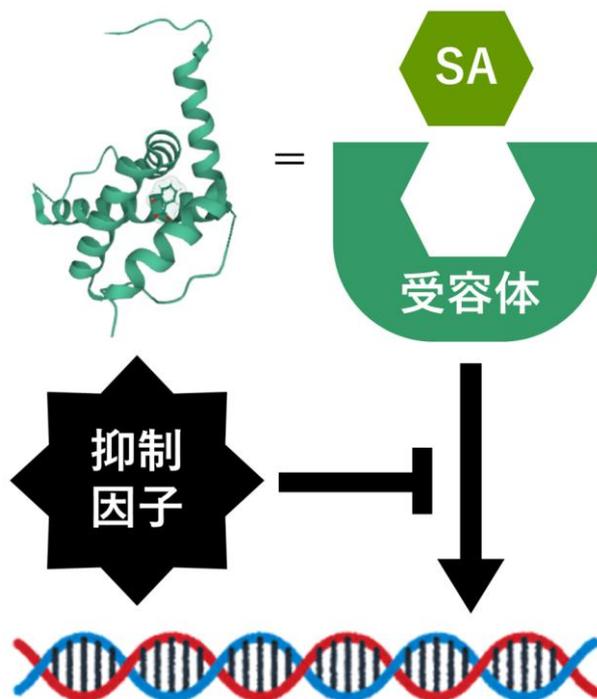
[図3] ゼンマイとイチヨウでの用量反応曲線。観察しやすいシダ植物のゼンマイと、進化上気になる裸子植物のイチヨウで実験を繰り返し、サリチル酸の濃度が濃ければ変色 100%、薄ければ変色 0%とした用量反応曲線を得た。EC<sub>50</sub>は半数の効果濃度、縦軸は変色した面積の割合、横軸はサリチル酸のモル濃度、丸 (○) は実験値である。



[図4] ゼンマイとイチヨウをサリチル酸の異性体 (*m*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸) に浸した実験結果。ゼンマイとイチヨウどちらでも、ほとんど変色が見られなかった。mSA はメタ異性体、pSA はパラ異性体でありの濃度は  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  である。



[図5] サリチル酸水溶液に浸されたゼンマイ、イチョウと異性体に浸されたゼンマイ、イチョウを比較したグラフ。このグラフからサリチル酸に浸されたゼンマイ、イチョウよりも変色した面積の割合が低いことが分かる。このことからゼンマイとイチョウはサリチル酸を認識して変色していると考えられる。横軸は変色した面積の割合、誤差棒は標準偏差で、左の図は上から順にサリチル酸、*m*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸の構造式である。



[図6] 植物がサリチル酸の働きを抑制するときどのような仕組みで抑制しているのかを考察した模式図。病原菌が植物に侵入し、サリチル酸が分泌され、サリチル酸の受容体がサリチル酸を認識し、遺伝子に作用を及ぼす際に、サリチル酸の働きを抑制する因子が被子植物には働きかけると考察した。そのため、被子植物は斑点状に変色し、シダ植物や裸子植物は抑制因子がないため、変色が全体に広がってしまったと考えた。