

平成 21年 3月 31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18780047

研究課題名（和文）土壌環境中の重金属に応答した植物の活性酸素生成とカルシウム情報伝達への影響

研究課題名（英文）Impact of the production of reactive oxygen species induced in response to heavy metals in the soil on the calcium signaling in plants

研究代表者

河野 智謙（KAWANO TOMONORI）

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号：20335699

研究成果の概要：

本研究テーマでは、植物におけるカルシウム情報伝達と活性酸素生成系を介した環境応答に与える金属イオンの影響について研究を行った。その結果、オゾンや紫外線あるいは低温ショックなどの環境要因に対するタバコ細胞および植物体の応答および過敏感細胞死誘導反応においてカルシウムチャンネルと二次的な活性酸素生成が重要な働きをすること、その情報伝達の過程で金属イオンがイオンチャンネル等の特定の分子をターゲットに大きな影響を及ぼすことを示唆するデータを得た。具体的には、環境応答に関与する当該カルシウムチャンネルが、金属カチオン（ $Al^{3+}$ 、 $La^{3+}$ 、 $Gd^{3+}$ など）に対して強い感受性を示し、活性酸素生成は、二価鉄イオン（ $Fe^{2+}$ ）や一価の銅イオン（ $Cu^{+}$ ）の影響を大きく受けることが明らかになった。また、3系統のタバコに由来する培養細胞およびイネの培養細胞の低温応答性カルシウム情報伝達に対する16種類の希土類イオンと $Al^{3+}$ の影響を比較した。希土類16種類に対する感受性のタイピングと $Al^{3+}$ に対する強い感受性から低温応答性カルシウムチャンネルが機械刺激応答性カルシウムチャンネルとも活性酸素応答性カルシウムチャンネルとも異なる新規のチャンネルであることが明らかになった。

上記の研究から得られた知見に基づき、これを応用した研究事例として、金属イオンが直接的に植物の細胞にダメージを与えるメカニズムに着目し、植物細胞を金属ストレスから保護するためのペプチドの開発に成功している。将来的にこのペプチドを分泌する植物を作成することで、効果的な金属汚染土壌での植物の栽培やファイトリメディエーションによる環境改善に道を拓くことが期待できる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	210,000	3,810,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：植物、カルシウムイオン、活性酸素、土壌、金属、イオンチャンネル、環境、細胞内情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

報告者は、植物が病原菌由来分子やサリチル酸などに応答してスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) 等の活性酸素種 (ROS) の生成を誘導し、生じた ROS が  $Ca^{2+}$  流入を誘導することを発見した経緯から、約 10 年間にわたり、ROS と  $Ca^{2+}$  が関与する情報伝達機構の研究に取り組んできた。またフランス国立農学研究所、Frederic Lapeyrie 所長との共同研究で、タバコ培養細胞において塩ストレスに伴う金属カチオンストレスが  $O_2^-$  等の ROS の生成を誘導する現象を見出すなど植物の環境応答に関する独自の知見を多数報告してきた。このタバコ細胞における ROS 生成反応は、高濃度  $Na^+$  や低濃度の希土類イオンあるいは  $Al^{3+}$  などの金属カチオンにより誘導され、浸透圧変化とは無関係に起きる反応である。即ち金属カチオンによる酸化的ダメージは、誘導された ROS によるものである可能性が示された。このように ROS 生成反応を誘導する金属カチオンには、アルカリ金属 ( $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ )、アルカリ土類金属 ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ )、希土類 ( $Y^{3+}$ ,  $Ce^{3+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Pr^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$ ,  $Sm^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Gd^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$ ,  $Ho^{3+}$ ,  $Er^{3+}$ ,  $Tm^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$ ,  $Lu^{3+}$ ) および  $Al^{3+}$  などが含まれる。さらに  $Hg^{2+}$  などの一部の重金属も同様の活性を示す。また、これら金属イオンのなかでは、イオン価と ROS 生成量及び至適濃度の間には有意な関係が認められる。即ち 1 価よりも 2 価、3 価の金属カチオンの方がより強い ROS 誘導活性を示し、更にイオン価の高いカチオンは、より低濃度で最大の反応を誘導する傾向にあった。ここで生じた ROS は細胞内への  $Ca^{2+}$  流入を誘導し、細胞内カルシウム情報伝達を刺激する一方、金属種によっては、ある一定濃度以上になると  $Ca^{2+}$  チャネルをブロックし、情報伝達経路を攪乱する。これに関連して、平成 15 年度特定領域研究 (公募)「サリチル酸シグナルの伝達機構 (武藤尚志、河野智謙)」の成果として、タバコ細胞で発現したシロイヌナズナ *TPC1* チャネルが  $Al^{3+}$  誘導の ROS に応答性を持つ  $Ca^{2+}$  チャネルであると同時に  $Al^{3+}$  感受性チャネルとして振舞うことを示した (下図参照)。ここでは NADPH オキシダーゼ (rboh) が金属カチオン応答性の ROS 生成に関与する。

特筆すべきことに、最近のタバコ培養細胞およびイネの培養細胞を用いた実験により、食用米への蓄積が問題とされる重金属カドミウムも上記の様なメカニズムで活性酸素生成系との相互作用および  $Ca^{2+}$  チャネルとの相互作用をすることを示すデータを得た。また  $Cd^{2+}$  を他の ROS 誘導活性の強弱の異なる金属イオン種を  $Cd^{2+}$  と共存させると競合的に相

互作用することが示されたため、他の金属カチオンと同じターゲット部位に結合し、活性酸素生成および  $Ca^{2+}$  チャネルの活性制御を行うものと推察された。一方で、生体に取り込まれる  $Cd^{2+}$  の主要流入ルートが、 $Ca^{2+}$  透過性カチオンチャネルであること及び  $Cd^{2+}$  取り込みを亜鉛が抑制することなどを支持する細胞レベルでのデータも得られている。また、報告者の所属機関の周辺地域の自治体との共同研究会議において、Cd 高濃度検出米が必ずしも、有意な濃度の Cd を含む土壌や水源のもとで発見されるわけではなく、土壌中の亜鉛濃度の欠乏土壌で Cd 高濃度検出米が生じやすいとする地域農地での報告とも一致するように思える (H4 年度、北九州市環境局報告)。

## 2. 研究の目的

本研究では、平成 18-20 年度の 3 年間に、これまでに細胞レベルで明らかにしてきたカドミウムをはじめとする重金属を含む多種類の金属カチオンに応答した ROS 生成機構およびカルシウム情報伝達系への影響を、あらかじめ多様な金属カチオン種を含む土壌中で生育するタバコ、シロイヌナズナおよびイネの植物体を用いて実証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

ROS の生成分布と挙動をイメージング技術により解析し、カルシウム情報伝達系への影響解析では、 $Ca^{2+}$  感受性発光タンパク質エクスプレッションを発現した組み換え植物体を用いて、リアルタイムで刺激応答性  $Ca^{2+}$  濃度変化に対する金属の影響を解析する。同時に植物体で観察された現象を、培養細胞を用いた実験においても再現・解析し、詳細な解析を行なう。タバコおよびシロイヌナズナでの実験は重金属イオンの吸収の最適化と生体内での毒性の低減にいたる条件を探る。またイネの実験では、重金属イオンの吸収と蓄積を最小限に抑える条件を探る。微量元素の影響解析や金属毒性緩和機構さらには環境応答時の植物の情報伝達における金属イオンの役割の解明についても計画に含める。

## 4. 研究成果

### (1) 平成 18 年度の研究成果

本研究に着手し、植物におけるカルシウム情報伝達と活性酸素生成系を介した環境応答に与える金属イオンの影響を解析した。その結果、オゾンに対するタバコ細胞および植物体の応答および過敏感細胞死誘導反応におい

てカルシウムチャネルと二次的な活性酸素生成が重要な働きをすることを明らかにし、その前者はアルミニウムイオン ( $Al^{3+}$ ) や希土類イオン ( $La^{3+}$ ,  $Gd^{3+}$  など) に対して感受性を示し、後者は二価鉄イオン ( $Fe^{2+}$ ) や一価の銅イオン ( $Cu^+$ ) の影響を大きく受けることが明らかになった (Kadono et al. 2006)。また、3系統のタバコに由来する培養細胞およびイネの培養細胞の低温応答性カルシウム情報伝達に対する16種類の希土類イオンとアルミニウムイオンの影響を比較した。希土類16種類に対する感受性のタイピングとアルミニウムに対する強い感受性から低温応答性カルシウムチャネルが機械刺激応答性カルシウムチャネルとも異なる新規のチャネルであることが明らかになった (Lin et al. 2006)。

この他に「土壌環境中の重金属に応答した植物の活性酸素生成とカルシウム情報伝達系への影響」に関連したテーマで、6件の海外研究機関における招聘講演 (英・クランフィールド大学、独・ボン大学、仏・パリ第6大学、仏・パリ第7大学、中国林業科学研究院など)、3件の国内外シンポジウム招聘講演 (北京市、九州大学など)、7件の国際会議発表、および8件の国際学会発表を行った。また現時点で成果発表には至っていないが、北九州市におけるカドミウム高含有米発生のフィールドにおける実態調査およびその発生メカニズムの検証を北九州市経済文化局農林水産部および北九州市市環境科学研究所との共同研究を通じて実施した。

### (2) 平成 19 年度の研究成果

平成19年度は、前年度に引き続き、植物培養細胞および植物体 (タバコ、イネ、シロイヌナズナ) および藻類におけるカルシウム情報伝達と活性酸素生成系を介した環境応答に与える金属イオンの影響について研究を行った。以下に成果を列記する。(1) 本研究の成果として得た知見を、活性酸素生成とイオンチャネルに関する複数の著書と総説の中で公表した。(2) すでに  $Al^{3+}$  や  $Cu^{2+}$  をはじめとする金属イオンが活性酸素生成およびカルシウム情報伝達の制御因子として重要な役割を演じることを既に報告しているオゾンに対するタバコ細胞の応答反応を、実験室レベルではなく実際に光化学オキシダント発生時の大気に曝露した植物を用いて詳細な解析を行った (国内外の学会において成果発表済み)。(3) タバコ培養細胞の低温応答性カルシウム情報伝達に対する16種類の希土類イオンとアルミニウムイオンの影響を既報に続いて詳細に

解析した (林他)。この他に「土壌環境中の重金属に応答した植物の活性酸素生成とカルシウム情報伝達系への影響」に関連したテーマで、22件の学会発表、招聘講演等を行った。

また現在、研究を継続中であるが、北九州市におけるカドミウム高含有米発生のフィールドにおける実態調査およびその発生メカニズムの検証を北九州市経済文化局農林水産部および北九州市市環境科学研究所との共同研究を通じて実施している。さらに19年3月より、カドミウムが活性酸素生成および一酸化窒素の生成に与える影響に関してフランスのブルゴーニュ大学との共同研究に着手した。

### (3) 平成 20 年度の研究成果

土壌環境中の重金属に応答した植物の活性酸素生成とカルシウム情報伝達への影響を解明するため、シロイヌナズナ、タバコ、トマト、イネなど様々な植物材料を用いて研究を行ってきたが、特にタバコ培養細胞を利用した研究において進展があったので以下に記載する。重金属に対する植物細胞の応答過程で細胞内でのカルシウム情報伝達が重要な役割を果たすことに着目し、銅処理を行ったタバコ培養細胞における細胞内カルシウム濃度変化 (細胞質のみで発現させたエクオリン発光によりリアルタイムに観測) と細胞死 (エバンスブルー染色により定量化) の誘導の間に相関があること実験により示した。次に、分子レベルでの植物細胞保護の観点から、生体毒性を示す金属を取り込み無毒化することにより植物細胞を保護する活性を有するペプチド配列を設計し合成した (将来は遺伝子組み換えによる導入を検討)。本オリゴペプチドはヒトプリオンタンパク質の銅結合領域のアミノ酸配列を参考にしたものである。銅により誘導される細胞へのカルシウムイオンの取り込みを阻害するため、新規に開発したペプチド性の植物細胞保護試薬を植物に添加し、効果を検証した。実際に、ペプチド添加により銅イオンにより誘導される細胞内カルシウム濃度上昇の阻害に成功した。細胞死誘導過程において重要な役割を担うカルシウム情報伝達経路が阻害されたことで細胞死の抑制が予想された。予想の通り、ペプチドを添加した処理区では、銅による細胞死が有意に阻害された。これらの知見は、将来、重金属の毒性から植物を保護する目的で、土壌改良あるいは耐性植物の創出に向けた有用な知見であるといえる。この成果は、国内外の学会での発表後、論文として *Zeitschrift fuer Naturforschung* 誌に受理されており、年内に

出版予定。一方、アルミニウムによる細胞毒性に活性酸素とカルシウム情報伝達の下流で機能するサリチル酸情報伝達系が関与することがシロイヌナズナのさまざまな変異体を用いて明らかにした（複数の論文投稿を準備中）。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計7件）

- ① Kagenishi, T., Yokawa, K., Kuse, M. Isobe, M. Bouteau, F. and Kawano, T. (2009) Prevention of copper-induced calcium influx and cell death by prion-derived peptide in suspension-cultured tobacco cells. *Zeitschrift für Naturforschung C* (印刷中)
- ② Umemura, K., Satoh, J., Iwata, M., Uiozumi, N., Koga, J., Kawano, T., Koshihara, T., Anzai, H., Mitomi, M. (2009) Contribution of salicylic acid glucosyltransferase, OsSGT1, to chemically induced disease resistance in rice plants. *The Plant Journal* 57(3): 463-472.
- ③ Yoshioka, H., Bouteau, F. and Kawano, T. (2008) Discovery of oxidative burst in the field of plant immunity: Looking back at the early pioneering works and towards the future development. *Plant Signaling and Behaviors* 3(3): 153-155. (総説)
- ④ 林村, 吉塚和治, 河野智謙 (2007) タバコ培養細胞における低温応答性カルシウム情報伝達に対する希土類の影響. *低温生物工学会誌* 53(1): 7-11.
- ⑤ (60) Lin, C. and Kawano, T. (2007) Effect of rare earth elements on cold-responsive calcium signaling in tobacco cells - A mini review. *ITE Letters* 8(4): 414-420.
- ⑥ Lin, C., Kadono, T., Suzuki, T., Yoshizuka, K., Furuichi, T., Yokawa, K. and Kawano, T. (2006) Mechanism for temperature-shift-responsive acute  $Ca^{2+}$  uptake in suspension-cultured tobacco and rice cells. *Cryobiology and Cryotechnology* 52(2): 83-89.
- ⑦ Kadono, T., Yamaguchi, Y., Furuichi, T., Hirono, M., Garrec, J.-P. and Kawano, T. (2006) Ozone-induced cell death mediated with oxidative and calcium signaling pathways in tobacco Bel-W3 and Bel-B cell suspension cultures. *Plant Signaling and Behavior* 1(6): 312-322.

〔学会発表〕（計48件）

以下は代表的な発表3件

- ① 河野智謙 (2008) 「 $Ca^{2+}$ シグナル伝達の初発反応」(招待講演). 日本植物学会第72回大会シンポジウム「 $Ca^{2+}$ シグナルか

ら見た植物細胞の新しい姿」(高知大学)

- ② Hiramatsu, T., Yukihiro, M., Kadono, T. and Kawano, T. (2008) Role of trace elements during environmental oxidative stress responses in plant cells. *Proceedings of 3rd Japan-Taiwan Joint International Symposium on Environmental Science and Technology 2008*, pp. 211-213.
- ③ Kagenishi, T. and Kawano, T. (2008) Metal toxicity in plants: Proposal of plant cell protection protocols based on the molecular mechanism. *Proceedings of 3rd Japan-Taiwan Joint International Symposium on Environmental Science and Technology 2008*, pp. 208-210.

〔図書〕（計3件）

- ① Kadono, T., Kawano, T., Yuasa, T. and Iwaya-Inoue, M. (2009) Effect of sugars on aluminum-induced oxidative burst and cell death in tomato suspension cells. In: *Bioluminescence & Chemiluminescence, 2008* (Eds, Kricka, L.J., Stanley, P.E.) World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore. pp. 201-204. (分担執筆、査読あり)
- ② Furuichi, T., Kawano, T., Tatsumi, H. and Sokabe, M. (2007) Roles of ion channels in environmental responses of plants. In: *Sensing with Ion Channels*. Springer Series in Biophysics, Vol. 11 (Ed., Martinac, B.) Springer-Verlag, Berlin. pp. 47-62. (執筆依頼に基づき分担執筆、査読あり)
- ③ Kawano, T. and Furuichi, T. (2007) Salicylic acid as a defense-related plant hormone: Roles of oxidative and calcium signaling paths in salicylic acid biology. In: *Salicylic Acid - A Plant Hormone* (Eds, Hayat, S. and Ahmad A.) Springer, Dordrecht, Netherland pp. 277-321. (執筆依頼に基づき分担執筆、査読あり)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://chempro.env.kitakyu-u.ac.jp/~tkawano/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 智謙 (KAWANO TOMONORI)  
北九州市立大学・国際環境工学部・准教授  
研究者番号：20335699

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

