

平成23年 3 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580363

研究課題名 (和文) 有害重金属を高濃度で集積できる特異なコケ・シダ植物の機能評価

研究課題名 (英文) Characterization of moss and fern accumulated heavy metals

研究代表者

今野 晴義 (KONNO HARUYOSHI)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：10108178

研究成果の概要 (和文) : ホンモンジゴケ原糸体の生育は正常培地および銅や亜鉛含有培地ではほとんど変化しなかったが、アオネカズラ前葉体の場合は減少した。銅処理した両細胞は生育過程で銅を生体内に蓄積した。ホンモンジゴケ原糸体に蓄積された銅は細胞壁ペクチンと結合していた。両植物の正常細胞と銅処理細胞から調製した可溶性画分には多数の糖質加水分解酵素が検出された。両植物の銅処理細胞の細胞壁マトリックス多糖中のウロン酸含量は正常細胞とほぼ同じであったが、数種の中性糖含量が減少した。

研究成果の概要 (英文) : The cell mass of *Scopelophila* protonema appeared to be present in similar amounts under normal and copper- or zinc-enriched conditions, whereas the cell mass of *Polypodium* prothallium was reduced. The copper-treated cells showed the accumulation of copper during growth. The copper accumulated in *Scopelophila* protonema was bound to the cell wall pectin. Many glycoside hydrolase activities were detected in the soluble fractions from control and copper-treated cells. Uronic acids were found in similar amounts in cell walls of control and copper-treated cells, whereas the amount of some neutral sugars decreased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：コケ原糸体、シダ前葉体、植物細胞壁

1. 研究開始当初の背景

産業発展に伴う酸性雨は、鉱山廃鉱や金属

建造物などから少しずつ重金属を流出させている。銅や亜鉛のような重金属は植物のタン

パク質構造や機能に欠くことができない微量元素である。しかし、多くの重金属は機能タンパク質の活性部位と容易に結合するので、高濃度の重金属が植物体内に吸収されると正常な生育や分化などが阻害される。そのため、重金属による土壤汚染は、植物の生態系を破壊し作物生産を低下させるなどの環境破壊を引き起こす。汚染土壤の環境改善は積極的に進められているが、広範な地域の修復は難しい。近年、このような環境修復に植物を利用することが提案されている。そのために、重金属が検出される地域でも生育できる植物種の検索や耐性機構に関する研究が活発に行われている。しかし、植物の耐性機構は非常に複雑で未解決の部分が多く、十分に理解されていない。

2. 研究の目的

重金属を含む地域に生育できる植物の検索が進められているが、コケやシダ植物は様々な環境下に自生し、環境の指標となる優れた植物と考えられている。これまで、いくつかのコケ・シダ植物は銅や亜鉛などの重金属を含む土壤にも特異的に生育し、生体内に重金属を取り込み、蓄積していることが知られている。従って、これらのコケ・シダ植物の特性を利用して、重金属含有地域の環境浄化が可能である。植物の重金属耐性機構は様々な分野から研究され、細胞壁は重金属を蓄積できる重要な機能を有していると考えられている。近年、カニクサ(シダ植物)前葉体を銅含有培地で培養すると、細胞壁に銅を蓄積しながら生育することや細胞壁の構造変化について報告した。しかし、これまで植物細胞壁の研究は主に種子植物において進められてきたため、コケ・シダなどの孢子植物における細胞壁に関する研究例は非常に少ない。そこで、本研究では、強い銅耐性を有することが知ら

れているホンモンジゴケ(コケ植物)の原糸体および銅含有培地でも生育できるアオネカズラ(シダ植物)の前葉体を研究試料として、硫酸銅含有培地における生育、生体内への経時的な銅の取り込み、蓄積に関わる細胞壁の性状などを生化学的手法によって明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

ホンモンジゴケの無菌胞子を1% (w/v) 寒天を加えた1/10濃度のムラシゲ-スクーグ基本塩混合培地で発芽させ(原糸体)、同培地で光量子密度 $98 \mu \text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$ 、 22°C の環境制御下で2ヵ月毎に継代培養した。アオネカズラの無菌胞子も同様に発芽させ(前葉体)、ムラシゲ-スクーグ改変培地に3% (w/v) ショ糖と1% 寒天を加えた培地で、同様に継代培養した。両植物を上記培地(正常培地)と正常培地に0.2 mMまたは0.4 mMの硫酸銅を加えた銅培地で培養し、細胞乾燥重と生体内に蓄積された銅量を経時的に測定した。試料中の銅含量は原子吸光法で定量した。また、ホンモンジゴケ原糸体とアオネカズラ前葉体を亜鉛含有培地でも培養し、それらの細胞乾燥重の経時変化を検討した。両植物の正常細胞と銅処理細胞を破碎し、可溶性画分と沈澱画分に分画した。可溶性画分に含まれるタンパク質は硫酸沈澱として集め酵素液とし、糖質加水分解酵素活性を測定した。一方、沈澱画分に混在する澱粉とタンパク質は α -アミラーゼとプロテアーゼを作用させて除去し、蒸留水とエタノールで洗浄し風乾後、細胞壁標品とした。細胞壁に蓄積された銅の結合部位(局在性)は、マトリックス多糖を特異的に分解する数種の酵素を作用させ、可溶化される画分に含まれる銅量から決定した。細胞壁からシクロヘキサンジアミン四酢酸と炭酸ナトリウムでペクチンを、1 Mと4 M水酸化カリウムでヘミセル

ロースを順次抽出し、それらの構成糖組成を求めた。次に、抽出された多糖類をDEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーにより分画・精製し、主要画分の構成糖組成を求めた。細胞壁や多糖画分中に含まれるウロン酸はヒドロキシジフェニル法で比色定量し、中性糖はガスクロマトグラフで分別定量した。

4. 研究成果

ホンモンジゴケ原糸体の90日間の生育は正常培地および銅や亜鉛含有培地でほとんど変化しなかったが、アオネカズラ前葉体の生育は銅や亜鉛含有培地で60~70%に減少した。両植物とも生育過程で経時的に銅を細胞内に蓄積し、取り込みは培養30~60日目にホンモンジゴケで[65 μ mol/g 乾燥細胞重]、アオネカズラで[16 μ mol/g 乾燥細胞重]を示した。これらのことから、ホンモンジゴケ原糸体は高濃度の銅を細胞内に蓄積できることが示された。両細胞から調製した可溶性画分には多数の糖質加水分解酵素が検出され、ホンモンジゴケにおいては β -グルコシダーゼ、 α -と β -ガラクトシダーゼ、アオネカズラにおいては α -ガラクトシダーゼ、ポリガラクトツロナーゼなどの活性が高かった。ホンモンジゴケとアオネカズラにおけるこれらの糖質加水分解酵素について解析した報告はこれまでない。今後、これらの酵素がどのように細胞壁糖質の代謝に関与しているのかを明らかにすることが重要であると考えられる。銅を蓄積したホンモンジゴケ細胞壁からペクチンを薬剤で抽出すると全銅量の約70%が、またホモガラクトツロナンを特異的に分解する酵素を作用させると全銅量の約43%が、各々可溶化された。従って、ホンモンジゴケ細胞壁に蓄積された銅の大部分がペクチンに結合していることが明らかになった。一方、銅処理によって、ホンモンジゴケ細胞壁中のアラビノースとガラ

クトース含量が約60%に減少し、アオネカズラ細胞壁ではラムノース、アラビノース、キシロース、ウロン酸などの含量が30~65%に減少した。アラビノースとガラクトースは、ペクチンを構成する主要骨格であるラムノガラクトツロナンIの側鎖であるアラビナンやガラクトタンを構成している。アラビナンやガラクトタンは植物細胞の生育と深い関わりをもっていることが示唆されている。従って、銅処理されたホンモンジゴケやアオネカズラの細胞壁において、これらの糖組成が変化していることは非常に興味深い。キシロースはヘミセルロース性多糖であるキシログルカンの主要構成糖である。キシログルカンは陸上植物に広く存在し、種子植物における化学構造は詳細に研究されている。孢子植物におけるキシログルカンの構造解析に関する研究は少ないが、近年、種子植物との構造的差異が報告された。しかし、アオネカズラの細胞壁に関する研究報告はないので、銅処理による細胞壁中のキシロースの減少は、キシログルカンの構造変化に起因しているのかまだわからない。また、銅処理によって、ホンモンジゴケ細胞壁からシクロヘキサンジアミン四酢酸と炭酸ナトリウムで抽出されたペクチン含量およびアオネカズラ細胞壁から4 M 水酸化カリウムで抽出されたヘミセルロース含量が、共に、約1/2に減少した。これらの抽出されたマトリックス多糖はDEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーで5種の画分に分画されたので、主要画分(P-1、P-2)の構成糖組成について解析した。ホンモンジゴケにおいては、シクロヘキサンジアミン四酢酸と1 M 水酸化カリウム抽出多糖のP-1画分とP-2画分のラムノース含量が2~3倍に増加し、4 M 水酸化カリウム抽出多糖のP-1画分のキシロース含量が1/2に減少しウロン酸含量が約2倍に増加した。アオネカズラにおいては、1 M 水酸化

カリウム抽出多糖のP-1画分のアラビノースとマンノース含量が約2倍に増加した。以上のように、細胞壁マトリックス多糖の構成糖組成が銅処理によって、変化することが明らかになった。今後、ホンモンジゴケやアオネカズラなどの孢子植物の細胞壁全体に関する詳細な研究が必要であると考えられる。

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1件)

- ① Konno, H., Nakashima, S., Katoh, K.
Metal-tolerant moss *Scopelophila cataractae* accumulates copper in the cell wall pectin of the protonema.
Journal of Plant Physiology、査読有、
Vol. 167、2010、pp. 358-364

[学会発表] (計1件)

- ① 今野晴義、コケ・シダ植物細胞壁における銅応答の分子機構、分取クロマトグラフィー研究会、2009年11月14日、倉敷芸文館(岡山県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今野 晴義 (KONNO HARUYOSHI)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授
研究者番号：10108178

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし