

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780113

研究課題名（和文）イネ科植物における珪酸ガラス形成機構の解明

研究課題名（英文）

Study on molecular mechanisms of biosilicification in rice leaves

研究代表者

尾崎 紀昭（OZAKI NORIAKI）

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：50468120

研究成果の概要（和文）：

イネ科植物は葉身に珪酸ガラス（非晶質シリカ）を沈着するが、その形成には有機物の関与はないと考えられてきた。本研究ではイネ（あきたこまち）の扇形珪酸体（ガラス）中に有機物が存在することを初めて明らかにした。この有機物は試験管内において可溶性の珪酸分子を重合して沈殿（不溶化）させる活性を有していたことから、イネのガラス形成にも珪藻や海綿動物と同様に有機物が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It has been hypothesized that silica bodies (amorphous silica) in rice leaves, are formed without participation of organic compounds. However, HF-soluble organic compounds extracted from fan-shaped silica bodies of rice showed silica precipitation activity. These results suggest that organic compounds serve as a regulator in the biosilicification of the rice leaves like other organisms (diatom and marine sponge).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、生物生産化学・生物有機化学

キーワード：イネ、珪酸、電子顕微鏡、バイオミネラル、有機基質

## 1. 研究開始当初の背景

生物がつくる鉱物をバイオミネラルと呼ぶが、無機物と有機物の複合材料ともいえる。これまでに研究されたほぼ全てのバイオミネラル形成には有機物（有機基質）の関与があることが示唆されてきた。生物は有機物を利用することによって常温常圧下での速やかな鉱物形成を助けていると考えられている。近年、本研究者は円石藻、甲殻類などバ

イオミネラリゼーションを行う多様な生物材料を用いて研究を行ってきた。それぞれの生物が形成するバイオミネラル中から鉱物形成に及ぼす効果（生物活性）を指標にして有機物を探索した。その結果、これまでにバイオミネラル中から単離・同定した有機物には無機イオンを結合あるいは濃縮をする際に必須と思われる特徴的な部位をその構造中に持っていることが明らかとなってきた。代表的なバイオミネラルの例である珪酸

ガラス（非晶質シリカ）は珪藻、海綿動物、イネ科植物などによって形成される。イネにとって珪酸の沈着は植物体の成長を助長し、機械的な強度や硬度を与えることで、害虫や病原菌からの防御に役立つと考えられている。また、葉の受光体勢を整えることによって光合成戦略として役立っているという仮説も提唱されている。このような重要性にも関わらずイネのシリカ形成に関する研究例は少なく、特に珪酸が重合する分子機構に関してはほとんど分かっていないのが現状である。

一方、同じく珪酸ガラスを形成する珪藻と海綿動物では研究の進展が見られ、どちらの生物においても珪酸重合に関与する特殊な有機物がそれぞれのガラス骨格中から単離、構造決定された。そのうち、長鎖ポリアミンは珪藻だけに存在すると当初は考えられていたが、近年になって海綿動物にもその存在が報告され、生物種を超えたガラス形成に必須の共通因子であることが提唱されている。

イネの珪酸取り込みに関する研究は岡山大学の研究グループで精力的に行われており、新規の珪酸輸送体が次々と発見され、イネが能動的に珪酸を取り込んでいる事実が確認された。しかしながら、イネの珪酸ガラス中から有機物が得られたという証拠はほとんどなく、珪酸が葉身に運ばれて重合する際、有機物の関与はないとする考え方が現在も支配的である。そこで、これまでの経験をもとにイネの珪酸ガラス中に有機物が含まれていると仮定し、珪酸重合活性を指標にして有機物の探索を行うと共に、イネのガラス形成機構を解明するべく研究を開始した。

## 2. 研究の目的

イネの珪酸ガラス（以下、シリカと略記）形成機構の一端を明らかにするため、以下の5つを目的とした。

- (1) イネ（あきたこまち）の葉に存在するシリカの形態・種類を光学、電子顕微鏡により分析する
- (2) シリカの形成時期を特定する
- (3) 葉からのシリカ単離方法を確立する
- (4) シリカから有機物を単離する
- (5) 単離した有機物の構造決定をめざす

## 3. 研究の方法

(1) あきたこまちの葉に存在するシリカの形態・種類を光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡によって観察するため、圃場にて育成したイネの葉を採取した。葉の表面に存在するシリカを観察するために葉をエタノールで脱水後、金蒸着を行った。葉の内部に存在するシリカの観察には結果の欄で後述するよ

うに灰化処理を行い、光学顕微鏡を使用した。

### (2) シリカの形成時期を特定する

6月から9月にかけて2週間ごとにイネの葉を採取し、形成されたシリカを観察した。内部に形成される扇形シリカは灰化した試料を光学顕微鏡-CCDカメラを用いて撮影し、数量を測定した。

### (3) 葉からのシリカ単離方法を確立する

以前は混酸（硫酸+硝酸）や過酸化水素処理によってシリカを単離する方法が主であったが、有機物の分解を抑えるため、今回新たに化学処理を行わずに単離する方法を考案した。葉をミルミキサーによって破碎し、ナイロンメッシュを通過させることでシリカとセルロース片を含む溶液を得た。さらに時計皿を用いて遠心力を加えると、扇形シリカのみを皿の中心部に集めることが可能となった。

### (4) シリカから有機物を単離する

上記(3)の方法で得た扇形シリカをフッ化水素酸で処理し、ガラス成分を溶解させた。可溶性区を集め、限外分子量500-1000の透析膜を用いてフッ素を除去した後、凍結乾燥を行った。

### (5) 単離した有機物の構造決定をめざす

凍結乾燥物をSDS/DTT溶液に溶かし、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供し、各種染色を行った。また、シリカ沈殿活性を調べるために透析乾燥物を蒸留水で溶かし、準安定な珪酸過飽和溶液に添加した。シリカ沈殿量はモリブデンブルー法により測定した。以上、(3)から(5)の手順を以下に示す(図1)。

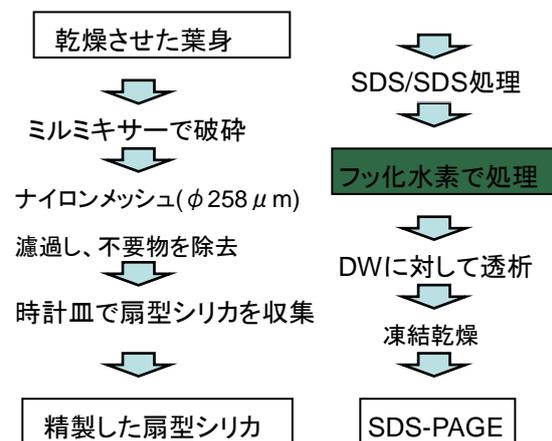


図1 イネの葉からの扇形シリカ単離と有機物抽出の手順

## 4. 研究成果

- (1) あきたこまちの葉に存在するシリカ  
9月以降に収穫したあきたこまちの葉に

は図2に示すように4種類の主要なシリカが含まれていた。そのうち、扇形シリカだけは従来の文献にも示されているように葉の内部に存在していた。したがって葉身における扇形シリカの存在は通常SEMでは観察できず、灰化処理した葉身を光学顕微鏡で光を透過することで確認できた(図3)。6月から9月までの葉身をサンプリングし、灰化させた試料のプレパラートを作成し、シリカの形成時期を調べた結果、扇形シリカのみが出穂期(穂が出る8月上旬)を境に急激に増加することが初めて明らかとなった。これは穂が成長するために光合成活性を上昇させる戦略として扇形シリカが何らかの生理的役割を果たしていることを示唆している。一方、残りの3種類のシリカはサンプリング開始時期以前から葉身表面に常在していた。

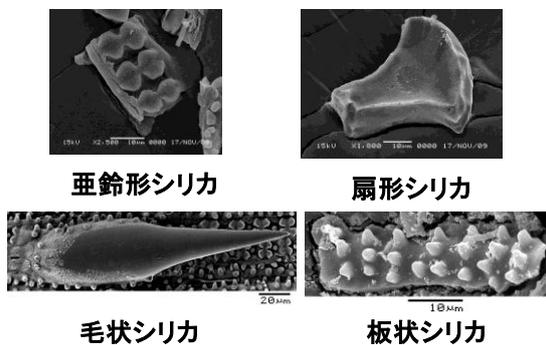


図2 イネの葉から単離したシリカのSEM像

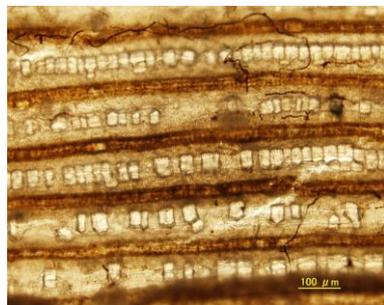


図3 灰化したイネの葉身・光学顕微鏡像 (内部に扇形シリカが形成されている様子)

(2) シリカの単離と有機物の抽出

十分に扇形シリカを形成している9月以降の葉を乾燥させ、必要に応じてミルミキサーを用いて葉を破碎し、時計皿を用いて遠心力を利用することで扇形シリカを得た。乾燥した葉1gあたり少なくとも3mgの扇形シリカが得られた。扇形シリカをフッ化水素酸(HF)で処理したところ、ガラス成分が溶解し、扇形の形状をした膜状物質(鑄型のような構造)が残存している様子が観察された(図4)。次に処理溶液中からフッ化水素を除くため

に蒸留水に対して透析を行った。透析終了後、凍結乾燥を行ったところ、白色の綿状物質が得られた。

この綿状物質を電気泳動用試料溶液(SDS/DTT)に溶かし、SDS-PAGEに供したところ、珪藻や海綿動物で見られるような高分子のタンパク質成分は含まれていないことが分かった。そこでTris-Tricine SDS-PAGEを行ったところ、比較的low molecular weightの領域(分子量2500以下)において、クマシーブリリアントブルー(CBB)によって染色される幅の広いバンドが検出された(図5)。さらに酸性糖の検出に用いられるアルシアンブルーで染色したところ、CBBで染色された位置よりもさらに低分子の位置にバンドが検出された。以上の結果から、あきたこまちの扇形シリカ由来の分画にはアミノ基を含む成分と、酸性の官能基を有する多糖類と予想される成分の少なくとも2種類の有機物が存在することが示唆された。便宜上、これらをまとめてシリカ関連有機基質(SAM: Silica Associated organic matrices)と呼ぶことにする。現在、SAMの構成成分の構造解析に向け、各種カラムクロマトグラフィーを用いた分離を試みている最中である。

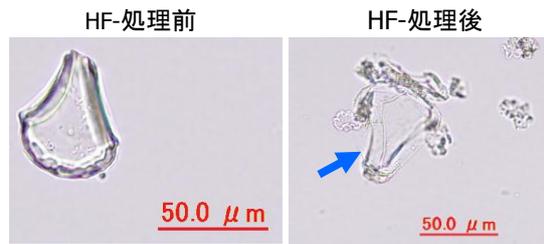


図4 HF処理による扇形シリカの変化

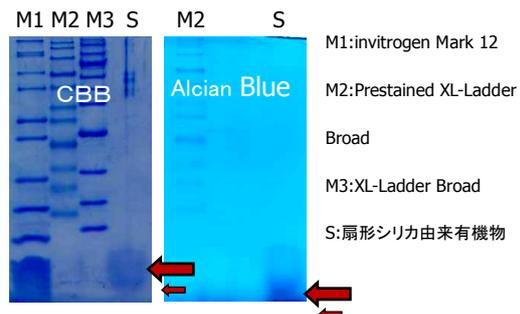


図5 扇形シリカ由来有機物のSDS-PAGE

(3) 有機物の珪酸重合活性

珪藻から単離された長鎖ポリアミンおよびシラフィタンパク質は試験管内においてオルトケイ酸(単量体の珪酸)を重合しシリカの沈殿を形成する活性を有することが分かっている。そこで、あきたこまち由来SAMにもそのような重合活性があるかどうかを

調べた。その結果、対照区と比較してSAMは珪酸を重合する活性をもつことが明らかとなった。今後、本活性がアミノ基を有する成分に由来するのか、または酸性糖に由来するのかを明らかにする必要がある。

#### 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)

[学会発表] (計2件)

(1) 尾崎 紀昭・佐藤 裕弥・小玉 郁子・岡野 桂樹

「イネ(あきたこまち)の葉身に存在するバイオシリカの性状」

第4回バイオミネラルリゼーションワークショップ

(2) 尾崎 紀昭・大澤 章良・岡野 桂樹

「イネ(あきたこまち)の葉身由来ファン型ケイ酸体に含まれる有機物の探索」

第6回バイオミネラルリゼーションワークショップ

[その他]

ホームページ等

<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/scholar/detail.php?id=24>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 紀昭 (OZAKI NORIAKI)

研究者番号: 50468120