

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 5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658021

研究課題名（和文） 植物根におけるカドミウム付着性物質の構造と機能

研究課題名（英文） Structure and function of cadmium adsorbing materials in higher plants.

研究代表者

吉村 悦郎 (YOSHIMURA ETSURO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：10130303

研究成果の概要（和文）：カドミウムを含む水耕液で栽培したタチスベリヒユの粉碎調製物ではカドミウムはほとんどが沈殿画分に存在した。この沈殿をペクチナーゼで処理することでカドミウムを可溶化した。この可溶性画分に含まれるカドミウム結合性物質を各種クロマトグラフィーで単離・精製した。この際に、新たに開発したソフト金属キレーター分析法を適用した。精製した物質はNMR測定からその構造を酸性多糖と決定した。

研究成果の概要（英文）：Majority of cadmium was distributed in precipitated fraction of homogenate of the higher plant *Portulaca oleracea*. Digestion of the precipitate with pectinase released cadmium in the solution. Cadmium-binding substance was purified from the solution using several steps of chromatography, where detection method for soft-metal chelator that was newly developed was applied. The structure of the purified substance was determined to be polysaccharides by NMR spectrometry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養・土壌学

キーワード：植物栄養代謝

1. 研究開始当初の背景

高等植物はCdの進入に対してファイトケラチン(PC)といわれるペプチドを誘導合成する。このPCはCdとの複合体を形成し、液胞へと輸送されることで耐性を発揮すると

考えられていた。一方、高等植物内でのCdの主要な化学形態は必ずしもPCとの複合体ではなく、またシロイヌナズナにおいてPC合成酵素の過剰発現体は逆にCd感受性を示す事実(S. Lee, et al. Plant Physiol.

(2003) 131, 656) は、PC 以外にも Cd 毒性緩和に関係した因子が存在することを示している。

一方、Cd 存在下で栽培した高等植物の Cd 分布を調べると、かなりの部分が根部に不溶体として存在していることが知られている。このことは、Cd の不溶化がその毒性緩和の役割を担っている可能性が高いことを示していた。

2. 研究の目的

本研究では高等植物の根に吸着する Cd の化学形態を解明するものである。Cd 存在下で栽培した高等植物では、かなりの部分が根において不溶性画分に見出される。本研究ではまず、Cd に特異的なキレーター分析法を開発する。次いで、Cd 存在下で栽培した植物の根の Cd 不溶性画分から種々の加水分解酵素を用いて可溶化を図り、開発した Cd キレーター分析法を活用しながら Cd 結合物質の単離・精製を行う。さらに、Cd 結合物質の構造解析を行い、Cd 毒性緩和機構との関連を探るものである。

3. 研究の方法

Cd を根部に蓄積することが知られているタチスベリヒユを用いた。この植物を、Cd を含む水耕液で栽培した後、根、茎、葉の各部位において、不溶化した Cd の可溶化を試みた。可溶化は、植物の不溶性部分を種々の多糖加水分解酵素により可溶化してくる Cd を指標とした。

一方、可溶化してくる物質の中から Cd 結合物質の単離・精製を行った。この際に、開発したソフト金属キレタ分析法を用い、ソフト金属に対するキレート能の高い物質の単離を行った。この物質の構造を、NMR により解析し、不溶体化した Cd の化学構造を推定した。

4. 研究成果

(1) タチスベリヒユの栽培

タチスベリヒユ (*Portulaca oleracea* L. var. *sativa* L.) の種を数粒ずつ OASIS Growing Medium にまき、底をカットした 25 ml チューブ (IWAKI) に収めた。20 L コンテナの蓋に直径 3 cm の穴を 24 個あけてその穴へチューブをはめ込み、アーノン・ホーランド液を用いてエアレーションを行いながら栽培した。

(2) 植物体の Cd 分析

葉、茎、根に分け Cd 濃度の測定を行った。栽培した植物を根、茎、葉の各部位に分け、約 0.3 g をそれぞれをテフロン容器に入れ 80°C で乾燥させた。乾燥した試料を秤量後、500 μ l の濃硝酸を加えて密閉し 150°C、5 時間で硝酸蒸気により分解した。分解物は 0.1 M

硝酸を用いて 3 ml に希釈し、金属測定用サンプルとした。

分析結果を図 1 に示した。植物の培養条件

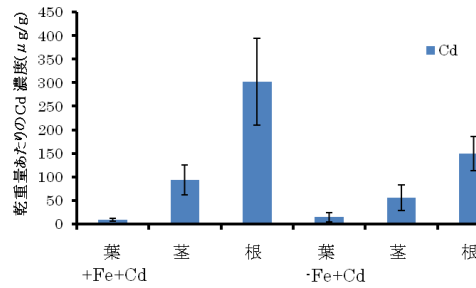


図 1 Cd を含む水耕液で栽培したタチスベリヒユの Cd 濃度分析

として鉄欠乏処理 (右) と非処理 (左) を行った結果を示した。鉄欠乏非処理 (左) では Cd は乾重量あたり葉に 8.9 μ g/g、茎に 93 μ g/g、根に 302 μ g/g 蓄積していた。それぞれの分布は、葉に 2%、茎に 23%、根が 74% で根に集中して蓄積していた。鉄欠乏処理 (右) では Cd は乾重量あたり葉に 15 μ g/g、茎に 56 μ g/g、根に 150 μ g/g であった。分布は根、茎、葉でそれぞれ 7%、25%、68% であり、根での蓄積が依然として多いが、鉄欠乏処理により Cd は地上部への輸送が促進されることが分かった。

(3) タチスベリヒユに含まれる Cd の可溶性

Cd を含む水耕液で栽培したタチスベリヒユを葉、茎、根の各部位に分けた。それぞれを乳鉢と乳房で破碎し、遠心で上清と沈殿画分とに分離した。沈殿は同様の操作を繰り返した。それぞれの画分に含まれる Cd は図 2 に示したように、第一回目の破碎で大部分の Cd は抽出されること、また茎と葉ではほとんどの Cd が不溶体として存在することが明らかとなった。根では根の全 Cd の 40% 程度が可溶性画分に、残りの 60% 程度が不溶性画分に存在していた。

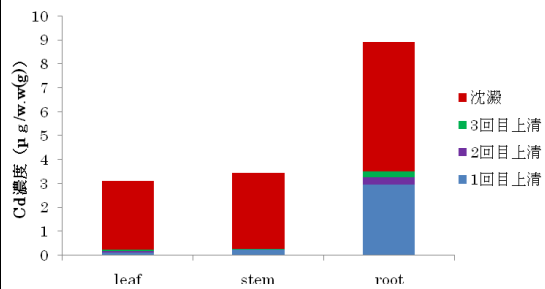


図 2 タチスベリヒユ各部位における Cd の沈澱と上清への分布

(4) 沈殿画分に存在する Cd のペクチナーゼ処理による可溶化

沈殿画分に存在する Cd の形態解析を行うためにペクチナーゼ(pectinex)により Cd の可溶化を試みた。まず、沈殿部分を可溶化する酵素の濃度の検討を行った。ペクチナーゼの濃度を 0.1 ~1%と変化させて Cd 濃度を測定したところ、根、茎では濃度に依存して Cd が遊離した(図 3)。また酵素濃度が 0.5% と 1%ではほとんど Cd 濃度に変化が見られなかった。

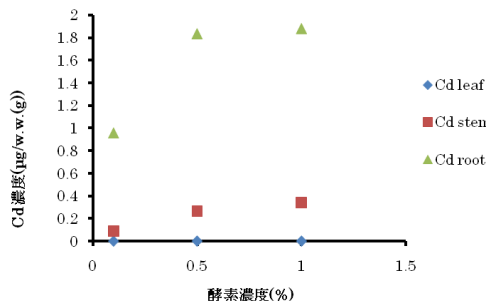


図 3 ペクチナーゼ処理により遊離してくる Cd 濃度の酵素濃度依存性

また、遊離してくる Cd は根において顕著であった。

次に、酵素の反応時間の検討を行った。測定条件は酵素濃度 1%にし、6 時間ごとに 36 時間まで 30°C で振とうし、Cd 濃度の測定を行った。その結果 24 時間までは時間に伴って Cd 濃度が増加し、その後ほぼ一定となった(図 4)。

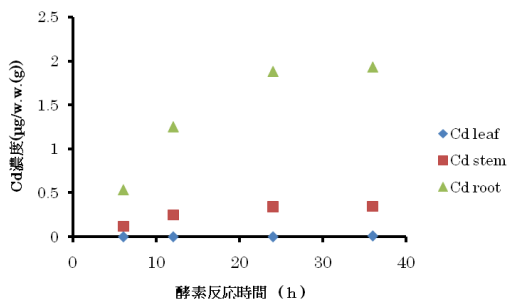


図 4 ペクチナーゼ処理により遊離してくる Cd の時間変化

(5) ソフト金属キレーター分析法の最適化

ソフト金属キレーター分析法はソフト金属に対して高い親和性を有する物質を特異的に分析する手法である。これは、蛍光物 bathocuproine disulfonate(BCS) が Cu(I) とキレートを形成することで消光することを利用したものである。つまり、HPLC でソフト金属キレーターを分離し、Cu(I)-BCS 錯体をポストカラム溶液と反応させ脱消光で生じた蛍光を観測するものである。分析の最適条件を表 1 と表 2 に示した。

表 1 ポストカラム溶液の最適条件

	濃度
BCS	1.1 µM
Cu(I)	0.5 µM
アスコルビン酸	10 µM
CHES-NaOH (pH 10.0)	50 mM

表 2 HPLC 測定の最適条件

カラム	分析用カラム(ODS-80T _M 7.8 mm × 15 mm)
溶離液	A:5% アセトニトリル with 0.1% TFA B:40% アセトニトリル with 0.1% TFA A→B linear gradient (25 分間、アセトニトリル濃度 0%→20%)
流速	1.0 ml/min
カラム温度	35°C
検出	蛍光 Ex:580 nm, Em:770 nm

(6) ペクチナーゼ処理で可溶化する Cd の化学形態解析

(i) 可溶化物の単離精製

根の沈殿画分の酵素処理で得られた可溶化画分のソフト金属キレーター分析を行った。まず、酵素自身に含まれるキレーターと蛍光物質の確認を行った。酵素だけを 24h 30°C で振とうし、分析を行った。その結果を図 5 に示した。クロマトグラムには①~④にピークが検出され、この酵素には不純物としてキレーターもしくは蛍光物質が含まれていることが判明した。

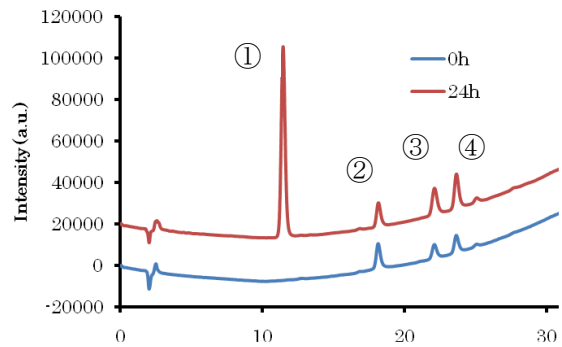


図 5 ペクチナーゼを 24 時間 30°C で振とう後と振とう前のキレーター分析

このため分子量 30,000 以下の成分を限外濾過し酵素に含まれる不純物を除去した。精製後の酵素の分析を行った結果、標品に含まれていた不純物①、④は完全に除去することができたことが確認された。また②、③のピークも減少したことから、酵素に含まれる大部

分の不純物を除去することができたと考えられた。

(ii) ペクチナーゼ処置により茎から可溶化される Cd 結合物質の単離・精製

Cd を含む水耕液で栽培したタチスベリヒユの茎の沈殿画分をペクチナーゼ処理し、得られた可溶性画分に対してソフト金属キレーター分析を行った。図 6 に示すように酵素処理により遊離したキレーター①～④が得られた。これらのピーク成分のうち最も大きい信号を与えるピーク①を分取した。

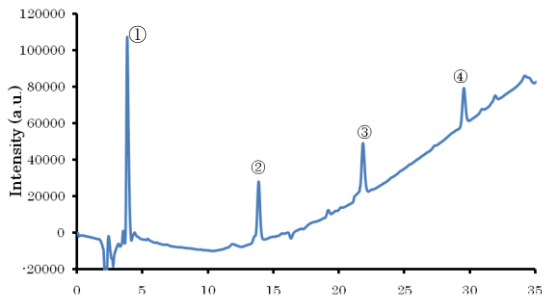
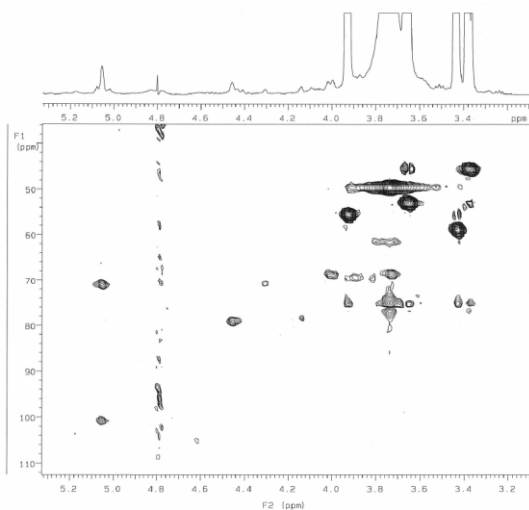


図 6 タチスベリヒユ茎の 24h 酵素処理後のソフトキレーター分析

(iii) NMR による構造解析

図 7 は分取したピーク成分①の HSQC スペクトルを示した。¹H NMR で 0.64~0.69、1.09~1.24、1.51~1.90、2.69~2.73 ppm 付近、¹³C NMR で 20~30、50 ppm に現われたシグナルは有機酸と考えられる。なお、¹H NMR で 3.20~3.26、3.28~3.76、3.77~3.78 ppm 付近、¹³C NMR で 40~60 ppm に現われたシグナルは破碎バッファーとして使用した HEPES である。

また、¹H NMR で 4.19~4.30、4.62~4.65、4.89、5.08 ppm、¹³C NMR で 100 ppm に現われたシグナルが糖に由来するものと考えられた。



(6) まとめ

Cd を含む水耕液で栽培したタチスベリヒユに含まれる不溶性の Cd 結合物質の構造解析を試みた。植物の沈殿画分をペクチナーゼ処理により Cd を可溶化し、そこで Cd と結合しているキレート分子を、ソフト金属との親和性を指標とした分析法を用いて単離・精製した。この画分の NMR による構造解析から、Cd 結合物質として、糖にカルボキシル基の配位した糖酸が浮かび上がった。また、DOSY スペクトルにより、これらの糖酸に由来すると思われるピークは、拡散速度が速く、これはこの糖が糖鎖構造が連なった糖鎖として存在していることを示唆していた。

糖酸はカルボキシル基によりキレート能をもつ。植物体内に存在する糖酸の主なものは細胞壁成分のポリガラクトuron酸(ペクチン酸)である。細胞壁のポリガラクトuron酸(ペクチン酸)の -COO⁻には Ca がイオン交換吸着され、結合して存在することが知られている。以上の結果は、Cd が細胞壁のポリガラクトuron酸などの糖酸に結合して存在していることが示すものである。Cd に対する耐性機構は細胞壁への吸着と固定、細胞内で PCs などのキレーターを合成し、配位結合することで無毒化する機構が知られているが、その割合は植物によって異なる。本研究からタチスベリヒユのように、厳しい環境ストレス下に適応できる植物は、細胞内部への Cd の侵入を妨げるために細胞壁への吸着を優先しているのではないかと考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

陳嘉上、井村祐己、小川進也、吉村悦郎 HPLC ポストカラム法を利用したカドミウムキレーターの高感度分析システムの開発とウマ血漿中グルタチオン分析への応用、第 72 回分析化学討論会 2012 年 5 月 19 日~20 日(鹿児島大学郡元キャンパス・工学部)

〔図書〕(計 0 件)

〔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://park.itc.u-tokyo.ac.jp/analchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村悦郎 (YOSHIMURA ETSURO)
東京大学大学院・農学生命科学研究科・教授
研究者番号：10130303

(2) 研究分担者

(0)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号：