

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660116

研究課題名(和文)重合性フラボノイドの細胞局在機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of subcellular localization of polymeric proanthocyanidins

研究代表者

大澤 裕樹 (Osawa, Hiroki)

東京大学・農学生命科学研究科・研究員

研究者番号：90401182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物根に集積するフラボノイドの機能と役割について細胞内での存在部位と動態が追跡困難なため不明な点が多い。本研究では、アカシアマンギウム単離細胞組織を用いて木本種の根に特徴的なフラボノイドの一種のプロアントシアニン(PA)の細細胞内局在と動態、金属イオンとの対応関係を調べた。組織細胞学的観察からPAが前駆液胞やアミロプラスとは異なるより小さい小胞体に含まれるより強固な証拠を提供した。細胞毒であるアルミニウム(Al)とPA細胞内の空間分布が異なったことは、この種の強いAl耐性は細胞内でのAlとPAの直接的な結合にほぼ依存しないことを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Roles and functions of flavonoids in plant roots remains largely unclear, partly because detailed localization and dynamics of flavonoids at subcellular level are challenging to detect. In the present study, by using isolated root-cells and -tissues from *Acacia mangium*, we examined the subcellular localization and metal-ion responses of proanthocyanidins (PAs), one group of flavonoids and characteristic in woody plant roots. Our cytological observation provided direct evidence that PAs were localized to small vesicles that were apparently different from prevacuoles and amyloplasts. We found clear differences in spatial distribution between cytotoxic aluminum (Al) and PAs in the cells, suggesting that strong Al tolerance in *A. mangium* may hardly rely on the direct binding of Al and PAs inside the cells.

研究分野：樹木生理学

キーワード：プロアントシアニン アルミニウム 根 樹木 液胞 根冠

1. 研究開始当初の背景

プロアントシアニジンは重合性フラボノイドの1種であり、主に種皮、果皮、樹皮、および木部に集積する。強い抗酸化性を示す一方、タンパク質や金属イオンと強く結合するため、これらの器官においてプロアントシアニジンは抗菌物質や光や水の移動調節因子として関与する。また、これらの特性に基づき、特定樹木や果実から抽出されるプロアントシアニジン成分が皮革なめしや機能性食品物質として産業利用されている。プロアントシアニジン機能の解明と高度利用にとって重要となるプロアントシアニジン生成経路の理解が草本モデル植物の変異株を用いた分子機構の解析から進んでいる。しかし、変異株の解析が飛躍的に進みほぼ完了した最近20年余りの研究進捗においても、最も注目されるはずのプロアントシアニジンの最終重合ステップや生成経路の有力候補である液胞前駆胞体でのプロアントシアニジン輸送についての実質的な理解はほぼ停滞している。変異株の機能解析からプロアントシアニジン重合プロセスの同定を困難にした理由の1つとして、重合の最終ステップと関連したプロアントシアニジンの細胞内輸送や局在が致死性の細胞機能と恐らく関連することが考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、我々の研究グループが最近木本植物の根で発見した特徴的な細胞組織を用いてプロアントシアニジンの細胞内局在解析を実施することにより、既存の成熟組織を用いた研究では困難だった細胞内のプロアントシアニジン局在ならびにプロアントシアニジン重合プロセスを詳細に照査することを目標とした。本研究は、単層の細胞シートでかつ生活性を有するプロアントシアニジン集積性の根脱落細胞の特性を最大限利用して組織化学細胞学的解析を試みる過程において、最先端の革新技術の確立と学問的ブレークスルーへの課題挑戦に対する責務を負う。本研究課題の実施により、プロアントシアニジンの機能改変や増強に向けたプロアントシアニジンの輸送重合機構の鍵因子に関する先行情報を世界に先駆けて取得するとともに、高分子機能物質の輸送機構の解明に必要な生理基盤を同定する。

3. 研究の方法

私たちが発見したアカシヤマンギウム根の教会用細胞 (BLC, ボーダーライクセル) (Endo et al., 2011) をプロアントシアニジン局在性解析に用いた。アカシヤマンギウム根由来のボーダーライクセルは薄い組織シートを常時提供することができ、構造的に単層シート細胞モデルとしての特徴を有するため、組織細胞レベルの解析手法を応用することを可能にする。これらの材料と、我々が開発しつつある新規の細胞固定法と蛍光物

質の同時染色の組み合わせにより、組織化学的にプロアントシアニジンの細胞内局在と細胞内移動を蛍光顕微鏡により観察した。また、生きた細胞の経時観察により、プロアントシアニジンの細胞内動態を追跡して胞体輸送に関連する細胞外放出を評価した。

4. 研究成果

(1) 我々のグループは現在までに、重合性フラボノイドの1つであるプロアントシアニジンがアカシヤマンギウムの根端の境界様細胞に含まれることを見出しており、興味深いことに、これらのプロアントシアニジン局在が、中央液胞よりも小さい小胞に隔離される予備知見を得ている。これらの知見はプロアントシアニジンが液胞内に隔離されるとされる既存の推定に挑むことから、本研究においてまず第一に、アカシヤマンギウム境界様細胞の重合性フラボノイドの細胞学的特性および局在性の解析を行った。細胞サイズと集合状態の異なる境界様細胞のプロアントシアニジン集積割合をDMACA染色法を用いて調べたところ、プロアントシアニジンは伸長しかつ集合状態にある境界様細胞の大部分に集積することを明らかにした。細胞固定条件の改良により、細胞内プロアントシアニジンを明視野顕微鏡下で可視化したところ、プロアントシアニジンは細胞壁周縁に隣接した細胞質小胞に局在することがわかった。核と細胞質マーカーを用いた二重染色法によりプロアントシアニジン局在とオルガネラ局在を比較したところ、このプロアントシアニジンの細胞質小胞局在は、核やアミロプラスト、中央液胞とは異なる領域に位置することがわかった。アカシヤマンギウムの境界様細胞の構造をプロアントシアニジン非集積性のダイズ根境界細胞と比較したところ、境界様細胞はアミロプラストを含む割合がより低く、中央液胞以外の細胞膜をより多くなる傾向を認めた。一方、DPBAを用いた観察により、クエルセチンなどのプロアントシアニジン前駆体フラボノイドはマンギウム境界様細胞の細胞質全般に分布することがわかった。

(2) プロアントシアニジンは、主として種皮および果皮に蓄積する高分子フラボノイドのグループの1種であり、昆虫食害または病原性微生物の攻撃に防御の役割を果たしていると考えられている。さらに、様々な木本植物の根端における多様なプロアントシアニジン蓄積に関する我々の最近の知見は、プロアントシアニジンは根において強いアルミストレス耐性に関与することを含む複数の防御役割を果たしていることを見出している。しかし、細胞内の正確なプロアントシアニジン分布、特に原形質膜近傍におけるプロアントシアニジンと、アポプラストとの区分はそれぞれの植物種において依然として不明のままである。そのため、アルミスト

レス耐性植物種の一つであるアカシアマンギウムの根の境界細胞様細胞 (BLC) を用いて、原形質分離状態または調製したプロトプラストを用いて、プロアントシアニジンの細胞内動態を検討した。境界細胞様細胞を 0.1 M マンニトール溶液で処理したところ、トルイジンブルー-0 で染色される反応性物質は、細胞壁から原形質分離を生じた細胞質内のみ局在することがわかった。さらに、境界細胞様細胞から調製したプロトプラストの顕微鏡観察は、トルイジンブルー-0 反応性物質が中央液胞以外の小さい小胞に限定されて存在することを明らかにした。対照的に、マンギウム葉のプロトプラストにおけるトルイジンブルー-0 反応性物質は、主に中央液胞に局在していた。根の生細胞観察による現在の結果は、以前の知見となるエタノール固定細胞におけるプロアントシアニジン分布と一致するとともに、さらに細胞内プロアントシアニジン分布は時間変化と細胞構造変化によらず安定的に保持することを示している。

(3) プロアントシアニジンはアルミニウム結合能を有する多量体フラボノイドの一種でもあり、アカシアマンギウムを木本植物種根のアルミニウム耐性において保護的役割を果たす可能性が考えられる。一方、アルミニウムは根端細胞アポプラストに主に集積するのに対し、プロアントシアニジンはシンプラストに主に集積してアポプラストへの放出が少ない。アルミニウム耐性における細胞内プロアントシアニジン局在とその動態の役割を理解するため、アカシアマンギウム根境界様細胞と木本植物各種の根単離プロトプラストを用いて、プロアントシアニジンとアルミニウムの細胞内関係を調べた。

<アルミニウム処理による局在化変化> : アカシアマンギウム根細胞をアルミニウム処理した場合、死細胞のみシンプラストへアルミニウムが侵入する一方、生細胞ではアポプラストにアルミニウムが限定された。細胞壁を除去したプロトプラストにおいてもアルミニウムは原形質膜外側に限られ、プロアントシアニジン小胞のシンプラスト局在は不変だった。両者の空間的差異は膜損傷を受けた後でも健全な場合と比べて大きく変化しなかった。

<シンプラストのベシクル輸送評価> : エンドサイトシスを指標する蛍光物質はおもに中央液胞に取り込まれ、プロアントシアニジン分布と異なった。アカシアマンギウム根端細胞の蛍光物質の取り込み活性はアルミニウム処理の有無によらず不変であることが判明し、アルミストレス侵入させずにエンドサイトシスが機能することが示唆された。アカシアマンギウム以外の木本植物種数種の蛍光物質の細胞内集積部位とプロアントシアニジン分布部位はすべて異なったことから、プロアントシアニジンは原形質膜輸

送に直接関与しない可能性が示唆された。これらの結果から、アカシアマンギウムの強いアルミニウム耐性は細胞内でのアルミニウムとプロアントシアニジンの直接的な結合にほとんど依存しないことが示唆された。

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 1 件)

Hiroki Osawa, Shinsuke Ikeda, Takeshi Tange, The rapid accumulation of aluminum is ubiquitous in both the evergreen and deciduous leaves of Theaceae and Ternstroemiaceae plants over a wide pH range in acidic soils, 査読有、Plant and Soil 363:49-59, DOI: 10.1007/s11104-012-1285-5

[学会発表](計 4 件)

Zhang M, Osawa H, Tange T, Effect of aluminum on endocytosis and intracellular dynamics of proanthocyanidins in root-tip cells of woody plants, 第 126 回 日本森林学会大会, 2015 年 3 月 25-29 日, 北海道札幌市

Osawa H, Matsushima Y, Ikeda S, Tange T, Comprehensive analysis of proanthocyanidin accumulation in woody plant roots, 6th International Symposium on Physiological Processes in Roots of Woody Plants, 2014 年 9 月 8-13 日, 愛知県名古屋市

Zhang M, Osawa H, Tange T, Subcellular localization of polymeric flavonoids in border-like cells of Al-tolerant woody plant *Acacia mangium*, 6th International Symposium on Physiological Processes in Roots of Woody Plants, 2014 年 9 月 8-13 日, 愛知県名古屋市

張萌、大澤裕樹、丹下健、アカシアマンギウム根プロトプラストを用いた重合性フラボノイドの細胞内局在の確定、第 125 回日本森林学会大会、2014 年 3 月 27-29 日、埼玉県大宮市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大澤 裕樹 (OSAWA, Hiroki)

東京大学・農学生命科学研究科・研究員

研究者番号： 90401182