

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 12 年度博士課程進学
氏名 古川 純
指導教官 中西友子

論文題目 アポプラスト蛋白を対象としたダイズ根における Al 毒性の解析

アルミニウム(Al)は酸素、ケイ素に次いで地殻中三番目に存在量の多い構成元素であり、金属元素では最も多く存在する元素である。Al は通常不溶性の化学形態をとっているが、世界の農耕地の 30~40%を占める酸性土壌では土壌溶液中へ Al イオンとして溶出している。特に pH4.5 以下の低 pH 条件下では大部分が Al^{3+} として存在し、植物に対して強い毒性を示すことから、酸性土壌における作物生産上の重大な問題となっている。多くの植物種で Al による生育阻害が報告されているが、それらに共通する現象として根の伸長阻害が挙げられる。Al による根伸長阻害は極めて短時間に生じることが特徴であり、Al 処理開始後 2 時間以内に観察される現象である。これまで伸長阻害とそれに伴う根形態の変化や Al 処理による細胞壁の強度変化などが報告されているが、伸長阻害の具体的な作用機構に対する知見は乏しい。本研究は Al 障害の研究に用いられる植物種の一つであるダイズ(*Glycine max.* (L.). Merr. cv. Tsurunoko)を対象として、Al による根伸長阻害機構の解明を目的としたものである。

①根伸長に対する Al の影響

播種後 2 日のダイズ幼植物を $20\mu M AlCl_3$ を添加した $0.2mM CaCl_2$ 溶液(pH4.5)で育成すると、Al は短時間のうちに根組織に取り込まれ、根伸長を阻害していた。主根の伸長速度は Al 処理開始後 2 時間で対照区の 65%まで低下しており、4 時間で約 50%、

その後 24 時間まで 30-40%での推移を示した。以下 AI 処理濃度はすべて 20 μ M である。AI 障害の指標に用いられる根端での Callose(β -1,3-グルカン)合成と細胞膜損傷を AI 処理 0-8 時間で検証したところ、Callose 合成量の急激な増加は 2 時間以降であり、細胞膜の損傷が検出されたのは 3-4 時間後であった。Callose 合成は細胞膜が障害を感知した際に促進されることから、それよりも早い段階で生じる伸長阻害はアポプラストを対象とした AI 障害であると考えられた。また、処理開始から 2 時間で影響が現れていることから、この伸長阻害機構に対する細胞分裂ならびに遺伝子発現の寄与は小さく、個々の細胞伸長に直接作用する障害であることが示唆された。

②アポプラスト蛋白に対する AI の影響

植物根における細胞伸長は伸長帯と呼ばれる根端 2-6mm で活発である。ここでは細胞壁成分の物性変化により細胞の膨圧に対する応力が緩和されている。細胞壁の応力緩和とそれに伴う細胞伸長はセルロース微繊維とキシログルカンのような多糖成分の分解・繋ぎ変えによる網状構造の再編によると考えられており、その再編過程を担うのがアポプラストに存在する蛋白である。本研究ではアポプラスト蛋白の機能に対する AI の影響に着目した。アポプラストにおける酵素活性を検討するために、細胞壁成分の自己消化ならびにアポプラストからの抽出蛋白を用いた 2 次元電気泳動による解析を行ったところ、AI 処理により消失する蛋白が 3 種確認された。これら蛋白のうち分子量 27kDa の蛋白(SAP27; soybean apoplast protein of 27kDa)は AI 処理後 30 分から 1 時間の間に消失しており、AI による短時間での伸長阻害に関与している可能性が考えられた。アポプラストから抽出される蛋白量は極めて微量であり、電気泳動により単離した SAP27 を用いた N 末端アミノ酸配列で決定できた配列は 6 残基であった。この配列を用いたアミノ酸配列データベースによる解析から、ダイズ α -ガラクトシダーゼ中に同様の配列が認められたものの、N 末端の配列に相同性はなく別個の蛋白であると考えられた。

③AI によるアポプラスト蛋白不溶化機構の解析

SAP27 は 1 時間の AI 処理後であっても高濃度の抽出液を用いると抽出されることから、AI により不溶化していると考えられた。この不溶化機構を明らかにするため AI と同じ 3 価カチオンである La による検討を加えた。La による伸長阻害は AI と様式が異なっており、伸長速度が対照区の 50%以下になるのは 8 時間後であった。この時点でアポプラストから蛋白を抽出したところ SAP27 の不溶化は生じておらず、電荷による金属元素と蛋白との相互作用は不溶化の主な原因ではないと考えられた。次にアポプラストにおける蛋白不溶化機構として既知である、ペルオキシダーゼによる H₂O₂ 無毒化機構に関わる解析を行った。これはペルオキシダーゼが H₂O₂ を還元する際にペプチド間に共有結合を生成するためであり、近年着目されている AI によ

る活性酸素種の発生と併せて検討したが SAP27 の不溶化は見られなかった。その他に低 pH 処理での検討も行ったが SAP27 の不溶化は見られず、Al 処理によってのみ生じる現象である可能性が示唆されたため、多くの植物種で Al 害を緩和している有機酸放出と SAP27 の不溶化との間に関連があるかどうかについて検討した。植物の有機酸放出は Al により誘導され、Al とキレート化合物を形成することにより根端周辺の根圏を無毒化する効果を示す作用である。SAP27 が不溶化する 4 時間の Al 処理後に Al を含まない 1mM クエン酸溶液(含 0.2mM CaCl₂, pH4.5)で 2 時間育成したところ、根伸長速度において一時的な回復が見られ、また SAP27 が可溶化していた。また Al 処理根から蛋白抽出をする直前に 10mM クエン酸溶液(含 0.2mM CaCl₂, pH4.5, 4℃)で 30 分洗浄して Al を除いた場合も SAP27 が可溶化したことから、根組織からの Al 除去が蛋白不溶化を改善していると考えられた。有機酸放出による Al 毒性の緩和は主に根圏における作用であると考えられているが、アポプラストにおける蛋白の機能回復に対しても有効であることが示唆された。

④アポプラスト蛋白と Al の親和性解析

有機酸による Al 除去が蛋白不溶化を回復したことから、SAP27 と Al の間に高い親和性があり、Al を介した壁成分との結合による不溶化機構があるのではないかと考えた。一般に金属結合蛋白の研究にはラジオアイソトープの利用が効果的であるが、Al のアイソトープは入手が困難であることから、蛍光試薬を用いた蛋白検出法を応用した親和性解析手法を開発した。2 次元電気泳動により分離したアポプラスト蛋白をゲル中で Al とインキュベートし、その後に Al 検出試薬である Morin により蛍光染色したところ、Al と高い親和性を持つ蛋白を検出することが可能となった。しかし SAP27 に高い Al 親和性は認められず、また他の Al と高い親和性を有していた蛋白においても Al 処理による不溶化は生じていないことから、Al 親和性と不溶化機構の関連性は低いことが示唆された。Al 親和性を持つ蛋白がどのような機能を持つ蛋白であるか明らかにするために、アミノ酸配列の解析を行ったが、SAP27 同様配列決定が可能であった残基数が少なく、蛋白の機能を明らかにすることはできなかった。

細胞壁環境に対する Al の影響として、Ca-ペクチン人工膜に Al を結合させると、膜のポアサイズが減少し水透過性が抑制されることが示されている。SAP27 の不溶化がこのポアサイズ減少に起因している可能性もあるが、SAP27 は細胞壁から抽出される蛋白の中では平均的な分子量を持っており、また SAP27 より分子量の大きな蛋白の抽出が Al による影響を受けないことが 2 次元電気泳動の結果から明らかとなっている。従ってペクチン会合体への Al 結合が SAP27 不溶化の原因とは考えにくく、SAP27 と Al の特異的な反応に焦点を当てた研究の進展が望まれる。

⑤Al 耐性・感受性ダイズのアポプラスト蛋白に対する Al の影響

SAP27 の不溶化と Al 障害に相関が高いことから、ダイズの他の品種である福獅子 (Al 耐性) / ピアフレンド (Al 感受性) を用いて Al 耐性能との関連を検討した。これらのダイズは Al 処理 24 時間後の伸長阻害率から選抜された種である。ダイズにおける耐性 / 感受性能の多くはクエン酸放出量に起因するため、Al により誘導される有機酸放出量をキャピラリー電気泳動により測定した。両種とも Al 処理後 4-6 時間からクエン酸放出が促進されていたが、耐性種である福獅子の放出量が感受性種よりも多く、Al 耐性能の主要因と考えられた。これまでの解析からクエン酸洗浄による Al 除去が SAP27 の可溶化に効果的であることが示されており、クエン酸放出による不溶化緩和と耐性能の間に相関が見られるかどうかについて検討した。両種の伸長阻害率の差が最も顕著であった 20 μ M AlCl₃ (0.5mM CaCl₂ 溶液, pH4.5) 条件で育成したところ、両種とも短時間の Al 処理で SAP27 の不溶化が生じ、その後クエン酸放出量の増加に従って回復することが明らかとなった。不溶化緩和が両種で生じていたことから、クエン酸による SAP27 の可溶化は放出されるクエン酸の量ではなく、放出自体との関連性が高いことが示唆された。

Al 障害の研究に用いられる植物種の中で、ダイズは有機酸放出能を持つことから Al 耐性に分類されている。本研究は Al により誘導されるクエン酸放出が根圏のみならずアポプラストにおける障害緩和にも蛋白機能の回復という作用で関与していることを示唆しており、Al 障害緩和機能の研究に新たな解析結果を加えるものである。