

## 論文の内容の要旨

氏 名 田野井 慶太郎

指導教員 中西 友子

### 論文題目

イネにおけるマグネシウム吸収機構解析  
— 放射性同位体の製造とトレーサー利用 —

マグネシウム (Mg) は植物にとって必要不可欠な多量必須元素の 1 つであり、様々な酵素活性への寄与やクロロフィルの構成元素であることなど、その機能の重要性は古くから知られている。一方で、特に Mg の輸送に関する知見は非常に少ない。その要因の 1 つとして、Mg の放射性、あるいは安定同位体は、半減期、あるいは存在比率の問題から、トレーサーとしての利用が難しいことが挙げられる。すなわち、Mg の安定同位体は 3 つ存在し、その比は  $^{24}\text{Mg}:^{25}\text{Mg}:^{26}\text{Mg} = 78.99:10.00:11.01$  である。比較的وجود比が少ない  $^{25}\text{Mg}$  を濃縮して実験に用いたとしても、試料には既に相当量の  $^{25}\text{Mg}$  が含まれていることから、その検出感度は著しく低くなる。一方、Mg の放射性同位体は 2 つ存在する。このうち  $^{27}\text{Mg}$  は中性子線照射により  $^{26}\text{Mg} (n, \gamma) ^{27}\text{Mg}$  の核反応で製造することができるが、中性子と核反応をしなかった多量の  $^{26}\text{Mg}$  と、生成した放射性同位体の  $^{27}\text{Mg}$  が混合された状態で回収されるため、実験に用いる場合、試料中の Mg 濃度の調整が困難になる。さらに、 $^{27}\text{Mg}$  の半減期が 9.46 分と非常に短いことも、生命科学実験に用いるには障害となる。もうひとつの放射性同位体は  $^{28}\text{Mg}$  である。 $^{28}\text{Mg}$  の半減期も約 21 時間と短く、市販されていない。しかしながら、 $^{28}\text{Mg}$  は製造後直ちに実験に供すれば生命科学のトレーサー実験が可能と考えられた。 $^{28}\text{Mg}$  は加速器を用いて  $^{27}\text{Al} (\alpha, 3p) ^{28}\text{Mg}$  の核反応で製造する。照射するターゲットは Al なので、キャリア・フリー $^{28}\text{Mg}$  の作成が可能であることから、Mg のトレーサー実験には  $^{28}\text{Mg}$  を用いることが最適であると考えられた。そこで本研究では、トレーサー実験に  $^{28}\text{Mg}$  を用い、イネの根による Mg 吸収・移行の解析を行った。

現在、Mg 環境に応じた Mg の吸収・移行に関する知見が非常に少ない。Mg 輸送機構を解明するためには、アポプラスト経路を主とした受動拡散や、膜電位を駆動力としチャンネルを介する受動輸送 (secondary active transport) など、Mg 輸送への関与が予想される各種輸送システムが、どういう Mg 環境下で役割を果たすかについての基礎的知見の蓄積が必要である。

#### 1. 導管液採取による Mg 輸送様式の解析

Mg が根から吸収された後、地上部へ輸送されるまでの Mg 輸送様式を解析するため、まず、導管液内の Mg 濃度変化に注目した。

播種後 1 カ月のイネに、異なる濃度の Mg を与え、根の上部の茎部を切断して溢泌する導管液を解析した。その結果、根から供する外溶液中の Mg 濃度が 3mM 以下の場合には導管溢泌液の Mg 濃度の方が外溶液中のそれよりも高くなり、反対に、外溶液中の Mg 濃度が 5mM 以上の場合には、導管溢泌液の Mg 濃度のほうが外溶液よりも低くなること示された。この結果は、外溶液の Mg 濃度が低い場合には根による導管への積極的な輸送が、逆に高い場合には根による Mg の希釈作用があることを示唆するものと考えられた。外溶液 Mg 濃度と導管溢泌液 Mg 濃度の相関を解析したところ、得られた曲線は Michaelis-Menten 式と線形式、つまり飽和性成分と直線性成分からなる式によって説明されたことから、根による吸収から導管による地上部への移行までの Mg 輸送システムには、少なくとも 2 種類が存在することが明らかになった。Mg 濃度が低い条件下での寄与が多くなる飽和性成分において、輸送の親和性を表す  $K_m$  値はおよそ 20  $\mu\text{M}$  であった。また高濃度域で寄与が多くなる直線性成分の傾きは 0.6 であった。続いて、マルチコンパートメント・トランスポート・ボックスを利用し、根からの導管滲出液を解析することで、Mg 吸収に対する阻害剤の影響を調べた。阻害剤としては、脱共役剤の 2,4-dinitrophenol (DNP) と、水和した  $\text{Mg}^{2+}$  のアナログである hexaaminecobalt(III) (Co-Hex) を用いた。その結果、Co-Hex 処理により、外溶液から導管までの Mg 輸送速度が減少することが判明した。同時に、対照実験としてリン酸の輸送についても調べたところ、Co-Hex の存在下でもリン酸の輸送速度は変化しなかったことから、Co-Hex は Mg の輸送を特異的に阻害している可能性が示された。Co-Hex は P-type ATPase の Mg 輸送体は阻害しないことが報告されていることから、イネの根が Mg を輸送する際の Mg は水和した形態であること、すなわち根にはチャンネルを介した Mg 輸送システムが存在することが示唆された。

しかし、導管液を解析する手法では、外溶液から導管までの多岐にわたる輸送経路をまとめて評価することとなり、個別のメカニズムを議論することができない。そこで、次に、外溶液から根への吸収を評価するため、放射性同位体  $^{28}\text{Mg}$  を製造してトレーサー実験を行った。

## 2. $^{28}\text{Mg}$ の製造・精製とその植物実験への応用

根における Mg 吸収動態を解析するためには、もともと根に存在する Mg と、トレーサーとして新たに吸収される Mg との区別が必要なため、同位体の利用が必須である。しかし現在、トレーサーとして有効な Mg 同位体が入手できない状態であるため、 $^{28}\text{Mg}$  を製造した上でトレーサー実験を行う必要がある。さらに、特に低濃度の Mg 条件下で吸収動態を解析するためには、 $^{28}\text{Mg}$  をキャリア・フリーで得ることが肝要である。そこで、ターゲットを Al とし、製造された  $^{28}\text{Mg}$  を回収・精製することにより、 $^{28}\text{Mg}$  のみが存在する溶液を得ることができた。 $^{28}\text{Mg}$  の製造は東北大学 AVF サイクロトロンで行い、50MeV で加速した He 粒子を 6 時間照射した。精製過程では、まず Al 箔を塩酸で溶解した後、固相抽出で Be を除外し、次にイオン交換樹脂に  $^{28}\text{Mg}$  を含む陽イオンを吸着させた。ここにシュウ酸溶液を流し、大量に存在する Al を洗い出し、最後に塩酸にて  $^{28}\text{Mg}$  のみを回収した。得られた  $^{28}\text{Mg}$  を Ge 半導体検出器で測定したところ、照射により生成すると予想された副産物は検出されなかった。最終的に得られた  $^{28}\text{Mg}$  は約 1MBq であった。この製造・精製した  $^{28}\text{Mg}$  を直ちにイネの吸収実験に用いた。イネ中の  $^{28}\text{Mg}$  の検出方法として、イメージング・プレートで可視化する方法と、ガンマー線を測定するオートウエルガンマーカウンターで測定する方法を検討し、定量解析方法を確立することができた。これらの実験系を用い、イネの根における Mg 輸送活性評価を行った。

## 3. $^{28}\text{Mg}$ を用いた Mg 吸収様式の解析

濃度を 9 段階に変化させ Mg 吸収実験を行ったところ、導管液採取実験と同様に低濃度域では飽和に、高濃度域では直線の吸収様式になることが判明した。その  $K_m$  値は、対照区が約 250  $\mu\text{M}$  である一方で、Mg 欠乏処理区では約 110  $\mu\text{M}$  へと減少した。これは、Mg 欠乏処理により、根による Mg 吸収の親和性が高まったことを示している。次に Mg 吸収に対する阻害剤の効果を調べたところ、脱共役剤である DNP や carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)、水和した  $\text{Mg}^{2+}$  のアナログである Co-Hex の処理による Mg 吸収阻害効果が認められた。また、これらの阻害剤は、Mg 欠乏処理を施した根に対して、より大きな阻害度を示した。これは、Mg 欠乏処理により、代謝エネルギーを駆動力とした Mg 輸送能が高まったことを示唆するものと考えられた。さらに  $^{28}\text{Mg}$  を 15 分間吸収させた後、通常水耕液へ移して  $^{28}\text{Mg}$  の植物体内動態を追跡したところ、地下部と地上部の  $^{28}\text{Mg}$  の分配比に Mg 欠乏処理の影響は見られなかったものの、葉位毎の  $^{28}\text{Mg}$  分布に変化が見られた。すなわち、対照区では最大展開葉に最も多くの  $^{28}\text{Mg}$  が分布したが、欠乏処理により  $^{28}\text{Mg}$  は最も新しい葉に集積する傾向が強まった。これらのことから、Mg 欠乏により各葉位への Mg 分配

機構が影響を受ける可能性が示された。

#### 4. Al 処理が Mg、K の吸収に与える影響

Al 障害は酸性土壌において作物生産を制限する主要因であり、その初期症状として根の伸長阻害が挙げられる。また、Al 毒性の一つとして根における陽イオン吸収が阻害されることが報告されている。細胞伸長には、K などの陽イオンが細胞内に集積することによる細胞容積の増加が重要であることから、陽イオン吸収阻害は、細胞伸長阻害の原因となる。本研究では、Al 処理の、K と Mg の吸収活性への影響を調べるため、放射性同位体  $^{38}\text{K}$  と  $^{28}\text{Mg}$  を用い、根の各部位における吸収活性をイメージングにより解析した。 $^{38}\text{K}$  は半減期が 7.6 分と極端に短いことから、製造から実験完了までを直ちに遂行する必要があった。 $^{38}\text{K}$  は  $^{40}\text{Ar}$  ガスをターゲットにして  $^{40}\text{Ar}(p, 3n)^{38}\text{K}$  の核反応により製造し、純水により  $^{38}\text{K}$  を回収し直ちにイオン交換樹脂で精製した。

24 時間  $10\mu\text{MAl}$  処理を行った後に K、Mg 吸収活性を解析したところ、K は根端 2-20 mm 部分で、Mg は根端より 2-30 mm 部位でともに吸収活性が増加した。すなわち Al に応答して K や Mg の吸収能を上げる機構がイネに存在することが示唆された。

また、Mg 吸収活性に対する Co-Hex の阻害率は根端ほど高く、根端から 4 cm の基部側の根への阻害効果は低かった。このことから、新しい組織ほど、Mg 輸送形態が Co-Hex 感受性である、すなわち水和した  $\text{Mg}^{2+}$  を通すチャネルでの輸送が多いことが示唆された。

本研究は  $^{28}\text{Mg}$  を用いて、イネにおける吸収動態を調べた初めての研究である。その結果、イネの根が受動的な拡散と代謝依存性の輸送の 2 種類を使い分けて Mg 吸収をしていることが示され、また根における Mg 吸収への Co-Hex 感受性チャネルの関与が強く示唆された。本研究結果は、未だ特定されていない根での Mg 輸送分子メカニズムを解く重要な情報を提供するものと考えられる。

#### 発表論文

1. Tanoi, K., Saito T., Iwata, N., Kobayashi I. N., Nakanishi, T.M., (2011). The analysis of magnesium transport system from external solution to xylem in rice root. *Soil Science and Plant Nutrition, in press.*
2. 田野井慶太郎、斉藤貴之、岩田直子、大前芳美、広瀬農、小林奈通子、岩田錬、中西友子、 $^{28}\text{Mg}$  の製造とイネにおける Mg 吸収解析への利用、RADIOISOTOPES、*in press.*
3. Tanoi, K., Hojo, J., Suzuki, K., Hayashi, Y., Nishiyama, H., Nakanishi, T. M., (2005). Analysis of potassium uptake by rice roots treated with aluminum using a positron emitting nuclide, K-38. *Soil Science and Plant Nutrition*, 51(5), 715-717.