

重金属ストレスによるイネカルス破碎物中のフィトキレチン誘導

Phytochelatin Induction in Rice Callus in Response to Heavy-Metal Stress

小 野 由紀人*・吉 田 章一郎*・渡 辺 正*

Yukito ONO, Shoichiro YOSHIDA and Tadashi WATANABE

1. はじめに

産業の発展に伴って重金属の生産と廃棄量は飛躍的に増加し、環境への流出がイタイイタイ病などの公害を引き起こした例もある。重金属の汚染は今後とも増大すると予想され、希薄な汚染が広く拡散するせいで、対処はますますむずかしくなっている。

重金属汚染の対策には、①非汚染土壌による被覆や希釈、②重金属の不溶化 (pH, キレート剤, リン酸塩など)、③洗浄 (酸, キレート剤, 中性塩溶液など)、④電気化学的除去、⑤生物による浄化 (Bio-remediation) などがある。そのうち、広範囲の汚染に有効で低コストな浄化法のひとつとして、植物による浄化 (Phytoremediation) がある。植物が accumulator となるための必要条件是、重金属耐性を有し、蓄積能が高く、バイオマス生産能が大きいことである。

重金属耐性植物はフィトキレチン (phytochelatin, PC) と呼ばれるペプチドの誘導能が一般に高く、このペプチドが重金属耐性と蓄積能に関与すると考えられている。

PCは $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, $n = 2 \sim 11$ というシステインに富む構造を持ち、システインのチオール (SH) 基が金属イオンと配位結合して解毒すると考えられている¹⁾。PCはグルタミン酸の γ 位での結合を有するため、RNAからの転写物ではなく酵素合成物である。この酵素をPC合成酵素 ($\gamma\text{-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase}$: PC synthase)²⁾ という。

従来の研究で、重金属の多くはPC合成酵素を活性化させ、とりわけCdのPC誘導能が大きいと判明している³⁾。しかし、Cd以外の重金属がPC合成酵素に同等の影響を及ぼすかどうか詳しく調べた例はほとんどない。環境中にはCd以外の重金属も共存するため、①さまざまな重金属が単独でPC誘導に与える影響、②複数重金属の共存がPC

誘導に与える影響の評価が望ましい。

そこで本研究ではまず、環境中に比較的高濃度で存在するCuのPC合成酵素活性に与える影響をCdの場合と比べた。また、CdとCuの共存がPC誘導に及ぼす影響についても検討した。

2. 実験方法

2.1 植物試料

MS培地上で前培養 (1週間, 25°C, 700 lx) したイネ (*Oryza sativa*) のカルスをPC合成酵素粗抽出に用いた。

2.2 PC合成酵素の粗抽出とPCの *in vitro* 合成反応

凍結保存したイネカルス0.4gに、破碎液 (pH = 7.7の100 mM Tris-HCl buffer, 10 mM 2-mercaptoethanol) 0.6 mLを加えて破碎し、遠心分離 (11000 rpm, 10分) 後、上清をPC合成酵素粗抽出液とした。

酵素粗抽出液400 μL に十分量の基質GSHとCdCl₂またはCuCl₂を加えて合成反応を開始させた。1 M NaOH (1 mg/mLのNaBH₄を含む)で反応を止めた後、酸処理 (3.6 M HCl) によってPCと金属を分離させた²⁾。遠心分離 (11000 rpm, 10分) 後、上清100 μL を逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析に供した。

2.3 逆相HPLCによるPCの分析

逆相のODSカラムを使用し、水/アセトニトリルのグラジエント溶出 (0 ~ 20%) で分離した。分離後、PC中のSH基を、ポストカラムでDTNBと反応 (Fig. 1) させることにより検出した⁴⁾。

3. 結果と考察

3.1 長さの異なるPCの分離・分析

Fig. 2に典型的なクロマトグラムを示す。DTNBで発色させる本法では、SH基を持つ分子が検出される。まずCysが溶出し (3 ~ 4分)、12分付近からPC₂, PC₃, PC₄, PC₅の順に溶出した。各PCの間に出る小さいピークは、

*東京大学生産技術研究所 第4部

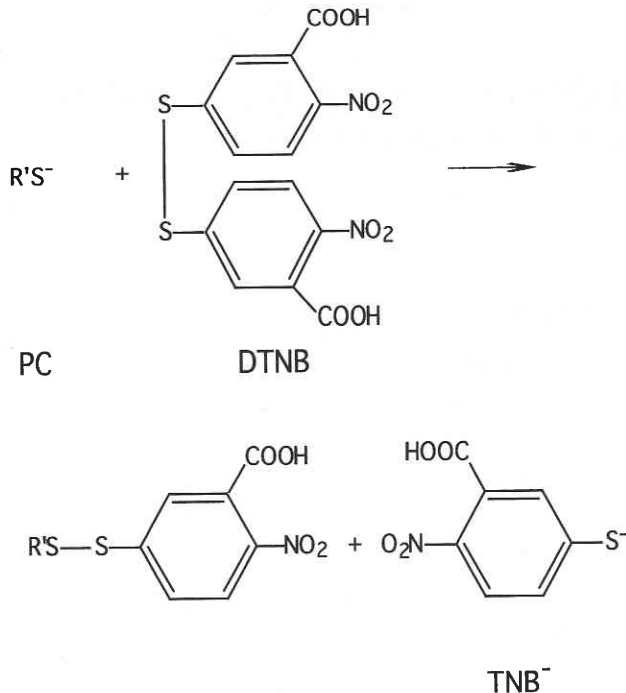


Fig. 1 PC と DTNB の反応

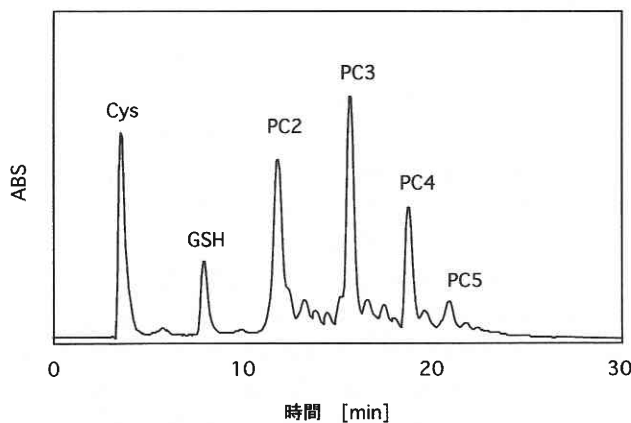


Fig. 2 n 値の異なる PC を分離検出したクロマトグラム

末端の Gly が Ala などに置き換わった PC 類である⁴⁾。

3.2 単独ストレス下での PC 合成 (Cd と Cu の比較)

PC 合成酵素のアクチベーターとして、Cd (500 μM) と Cu (25 μM) をそれぞれ単独で添加した場合の PC 量の経時変化を Fig. 3 に示す。PC 合成は、Cd ストレス下では 120 分、Cu の場合では 60 分で飽和した。データは示していないが、より低い Cd 濃度でも PC 合成が飽和するには約 120 分かかった。

Cu を用いた場合、PC 合成は Cd より短時間で飽和に達した。原因のひとつとして、Cu の PC 合成酵素に対する反応速度が Cd より大きいことが考えられる。より厳密な議

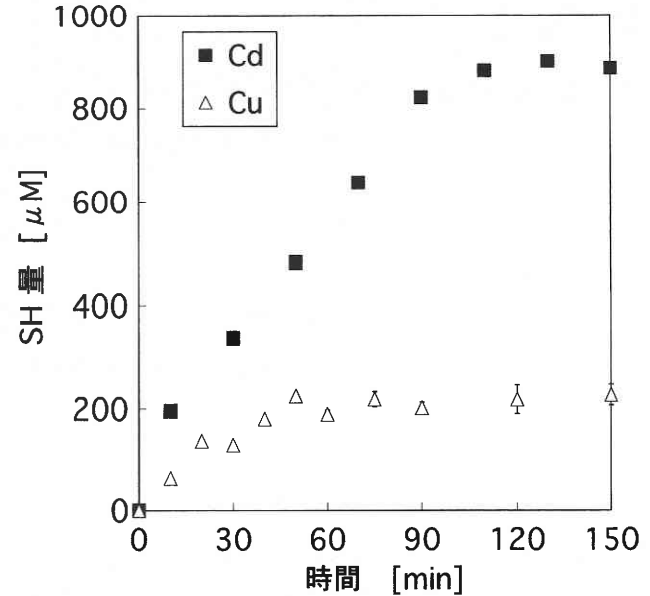


Fig. 3 Cd および Cu 単独ストレス下の PC 合成経時変化

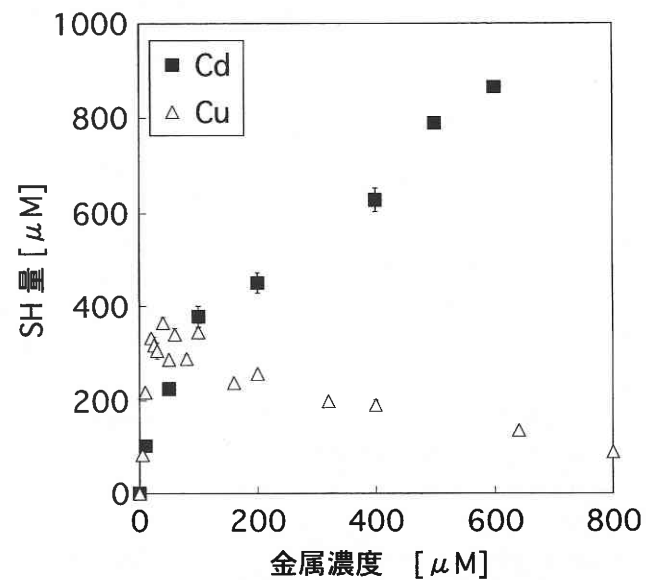


Fig. 4 Cd および Cu 濃度と PC 合成量

論のためには、さまざまな Cd, Cu 濃度で PC 合成経時変化を調べる必要がある。

3.3 金属濃度と PC 合成量 (Cd と Cu の比較)

Cd と Cu それぞれの単独ストレス濃度を変えたとき PC の誘導量に差があるかを調べた。Fig. 4 に示すように、Cd の添加濃度を増すと PC 合成が促進された。

一方、Cu ストレス下では 25 μM 付近の低濃度で PC 合成が極大となり、高濃度側で合成は抑制された。

今まで、PC 合成酵素を最も活性化する重金属は Cd であるとされてきたが、低濃度ではむしろ Cu のほうが活性化

効果が大きいとわかった。

3.4 Cd, Cu 共存による PC 合成への影響

単独ストレスでは PC 誘導挙動に差のある Cd と Cu の共存下で PC 合成量を測定した。Cu を共存させないときの PC 量を 1 とし, Cd (500 μM) にさまざまな濃度 (0 ~ 800 μM) で Cu を共存させたときの PC 相対量を Fig. 5 に示す。共存させる Cu 濃度が高いほど PC 合成は抑制された。

次に, Cd 濃度を 100 μM, 250 μM として Cu を共存させたときの PC 合成量を Fig. 6 に示す。Cd (250 μM) に Cu を共存させると, Cd (500 μM) と同様, 共存 Cu 濃度が大

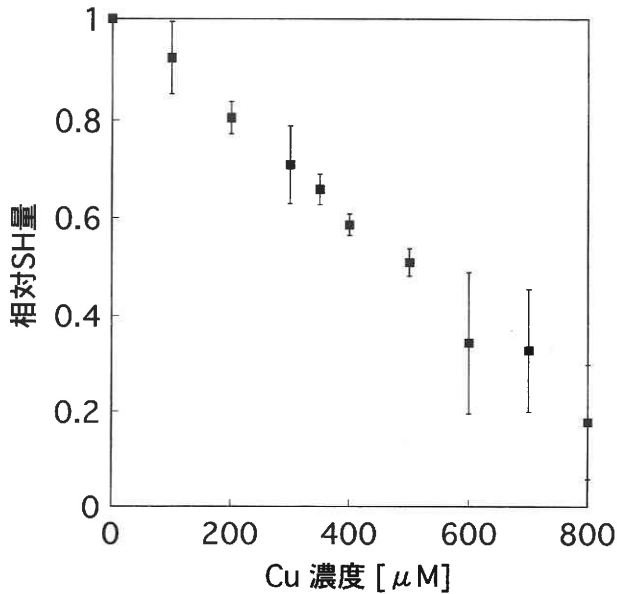


Fig. 5 Cd (500μM) の PC 誘導に対する Cu の共存効果

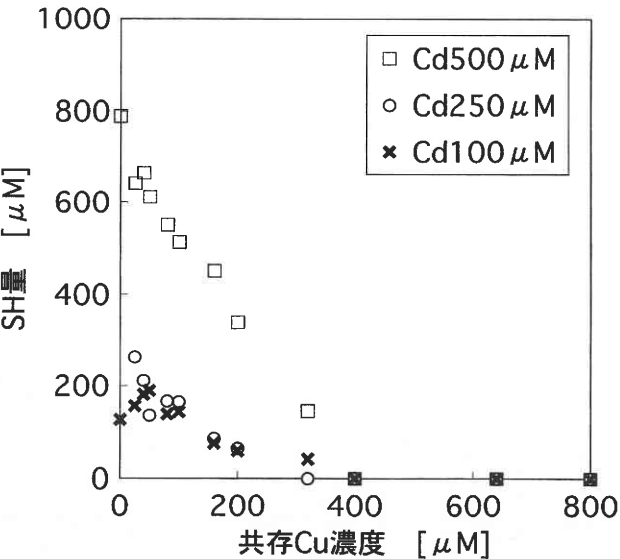


Fig. 6 Cd の PC 誘導に対する Cu の共存効果

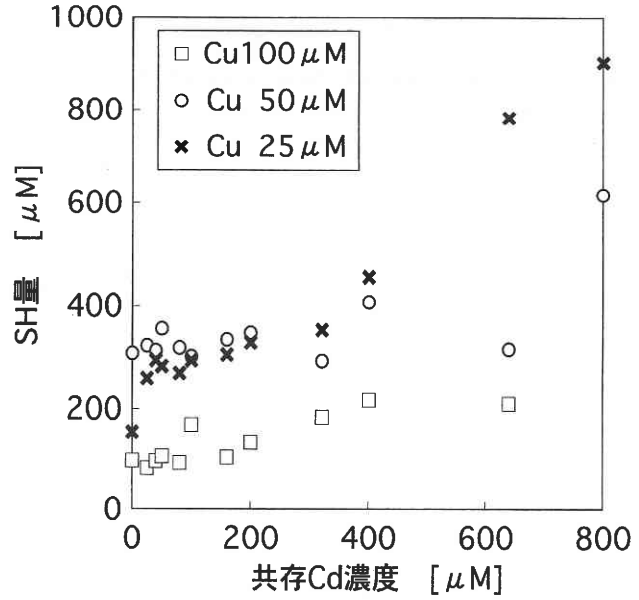


Fig. 7 Cu の PC 誘導に対する Cd の共存効果

きいほど PC 合成は抑制された。Cd (100 μM) の場合, PC 合成量の変化は, Cu 単独ストレス下での PC 合成 (Fig. 4) と似た傾向を示した。

逆に, Cu (25 μM, 50 μM, 100 μM) に Cd (0 ~ 800 μM) を共存させたときの PC 合成量を Fig. 7 に示す。Cd 単独ストレス下では, Cd の添加量を増すほど PC 合成は促進されたが (Fig. 4), 共存 Cd 濃度が低い領域 (0 ~ 400 μM) では, PC 合成はほとんど促進されずほぼ一定であった。

PC 合成酵素に Cd と Cu が独立に働けば, 共存下の PC 合成量は単独ストレス下での合成量の和になる。しかし, 今回の実験では, 共存により PC 合成量はむしろ抑制された。Cu 単独ストレス下で PC 合成が Cd より早く飽和したこと, Cu 濃度を増すほど PC 合成が抑制されたことを考えると, PC 合成酵素の活性化能力は Cu > Cd ではないかと思われる。

4. ま と め

以上の結果より, まず Cd と Cu は PC 誘導挙動に差があるとわかった。また, Cd と Cu の共存が PC 合成に抑制的な影響を及ぼすことが明らかになった。より厳密な議論には, 他の重金属と組み合わせた実験や, 精製した PC 合成酵素を用いる実験を要する。

環境中には複数の重金属が共存していることを考えると, 重金属の共存による PC 合成への影響という観点からの研究も今後必要となるであろう。

(1999年3月23日受理)

研 究 速 報

参 考 文 献

- 1) Strasdeit, H., Duhme, A-K., Kneer, R., Zenk M. H., Hermes, C., Nolting, H-F, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1129-1130 (1991).
- 2) Grill, E., Loffler, S., Winnacker, E-L., Zenk, M. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 6838-6842 (1989).
- 3) Grill, E., Winnacker, E-L., Zenk, M. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 439-443 (1987).
- 4) Maitani, T., Kubota, H., Sato, K., Takeda, M., Yoshihara, K., J. Plant Physiol., **147**, 743 (1996).