

特 集 6  
研 究 速 報

## イネのフィトキレチン誘導に及ぼす重金属イオンの共存効果

Synergistic Effects of Heavy Metal Ions on the Phytochelatin Induction in Rice Callus

高 寺 喜久雄\*・小 野 由紀人\*・渡 辺 正\*

Kikuo TAKATERA, Yukito ONO and Tadashi WATANABE

## 1. は じ め に

金属イオンは生体機能を発揮するうえで、タンパク質、核酸、脂質および糖質などとともに必須の物質である。しかし、必須金属でも生体にとって適量を越えると毒性を示す。たとえば亜鉛や銅は多くの酵素反応の進行に欠くことのできない必須微量元素であるが、高濃度で生体内に存在すると、酵素の活性サイト周辺を構成するアミノ酸残基と無差別に結合してその働きを阻害し、毒性を発現する。

しかし、生体内にはこれら金属濃度を一定に保つため、過剰に取り込まれた金属を無毒化する働きがあり、高等植物においてその役割を担っている物質をフィトキレチン (phytochelatin, PC: 植物体内にあって金属とキレート結合する物質の意) という。

PC は  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ ,  $n = 2 \sim 11$  で表される構造を持ち、システインのチオール基が金属イオンに配位しており、PC のシステインと金属の割合は、Cd, Zn, Pb 錯体で 2 : 1, Cu (I) 錯体で 1 : 1 である<sup>1)</sup>。

PC 合成量は植物の重金属耐性とも相関しており、PC 合成能力の低い変異体の重金属耐性は低いことが報告されている<sup>2)</sup>。重金属の中には PC 合成酵素と結合することにより PC 合成を阻害するものも存在すると考えられ、このような重金属の共存下においては植物の重金属耐性は低くなると予想される。

そこで本研究では、複数の重金属が混在する環境下において、重金属が植物に及ぼす影響を解明することを目的に、共存金属の PC 誘導に及ぼす影響を検討した。

## 2. 実 験

## 2.1 試料

イネ (*Oryza sativa*) のカルスに各重金属を添加後 10 日

\*東京大学生産技術研究所 第 4 部

間培養し、破碎後の水溶性画分に含まれる誘導物質を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICPMS) を連結した HPLC-ICPMS 法<sup>3)</sup>で測定した (図 2)。

## 2.2 重金属ストレス誘導物質の検出

ゲル濾過-HPLC で組織破碎後の水溶性画分を分子量により分離後、カラム溶出液をオンラインで 5, 5'-dithiobis

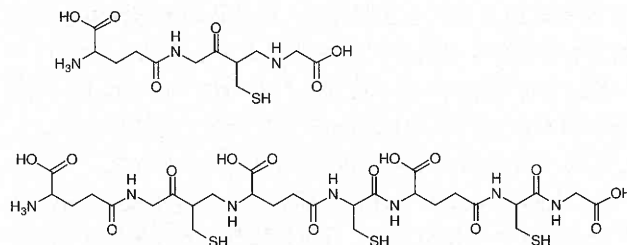


図 1 グルタチオンとフィトキレチン ( $n = 3$ ) ( $\gamma$ -glutamylcysteinyl)<sub>3</sub>-glycine の構造

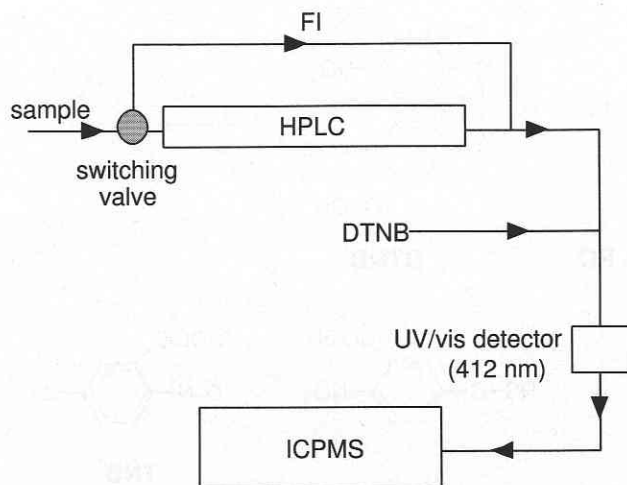


図 2 HPLC-ICPMS の装置構成

## 研究速報

(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, 0.1 mM) 溶液と混合し, 約1分の反応時間経過後, PC中のSH基との反応で生じたTNB<sup>-</sup>(図3)を412 nmの吸光度で検出した. その後, ICPMSで金属成分を検出した. 定量はHPLCからフローインジェクション(FI)に切り替え(図2), 標準試料を同様に測定し, それぞれの検出ピーク面積を比較することにより行った.

ICPMSは大部分の元素でppbレベルの高感度検出ができ, 本法によればHPLCでPC含有成分を分離した後, ポストカラム反応でPC中のSH基を検出・定量できると同時に, ICPMSによりPC中に含まれている重金属を高感度に検出・定量できる.

## 2.3 PCのnの数の違いによる分析

カラムに逆相の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%)により分離を行いPC中のSH基を上記DTNBとの反応で検出した<sup>4)</sup>.

## 3. 結果と考察

## 3.1 単一重金属の効果

CdCl<sub>2</sub> (100 μM), CuCl<sub>2</sub> (100 μM), ZnCl<sub>2</sub> (300 μM), HgCl<sub>2</sub> (100 μM)をそれぞれ単独に加えた培地中でイネのカルスを10日間培養後収穫し, 破碎後の水溶性画分中に含まれる成分をHPLC-ICPMS法により分析した(図4).

Cd, Cuストレス下で培養したものについてはPCの誘導が認められたが, Hg, Znストレス下で培養したものについては金属を取り込んだPCは誘導されなかった.

Cu, HgはPCよりも保持時間の短い(分子量が大きい)位置にピークが検出され, 分子量数万以上のタンパク成分と結合しているのが観測された. このことは, Cu, Hgは

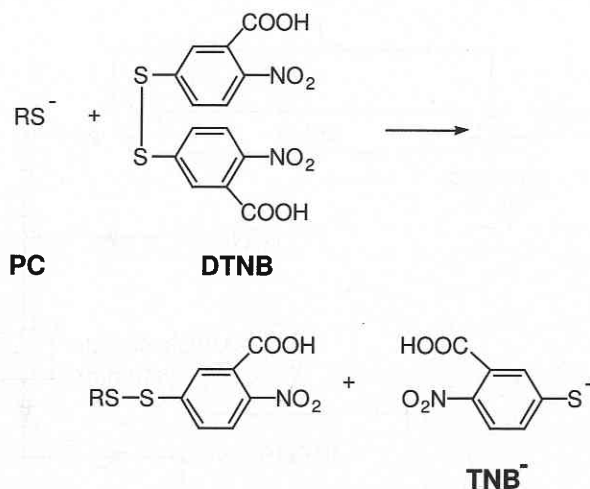


図3 PCとDTNBとの反応

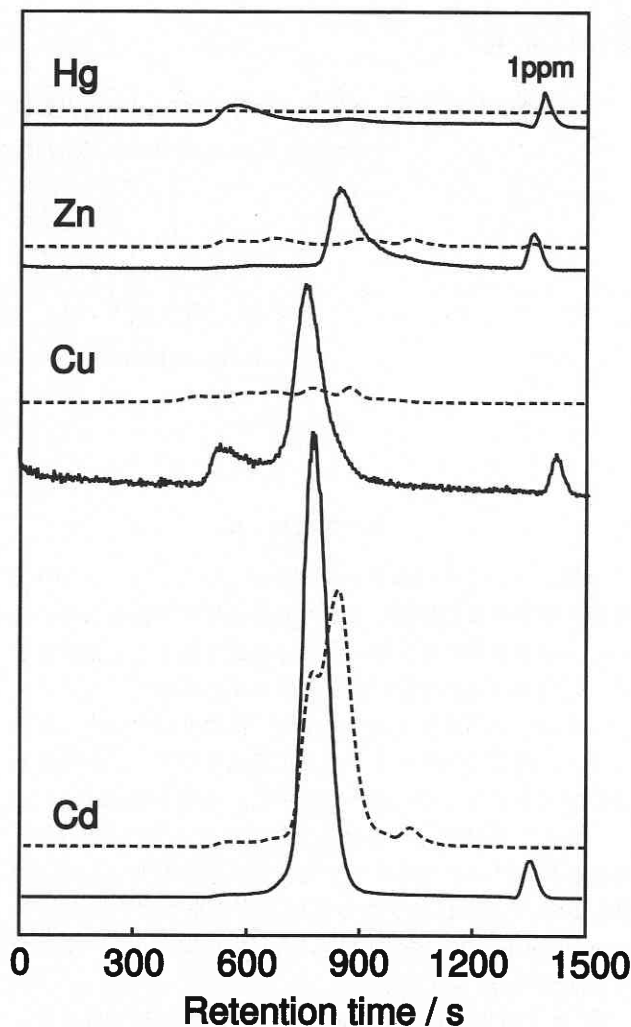


図4 各金属を単独で添加した培地中で培養したイネカルスのHPLC-ICPMSクロマトグラム. 実線は各金属のICPMS検出クロマトグラム, 点線はSH基検出クロマトグラム. 1300~1400sにICPMSで検出されるピークは1ppmの標準試料.

生体中に存在する酵素タンパクと強く結合し, 酵素の機能を失活させる働きが強く, 生体中で高い毒性を発現することを示唆している.

CdのSH基検出クロマトグラムにおいて, 2つのPCに由来するピーク(PC1, PC2)が検出され, 保持時間の短いピーク(PC1)にCdが検出された. PCと重金属との結合は, PC((γ-Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly)のnの値が大きいほど強くなることから, Cdと結合していない保持時間の長いピークはnのより小さいPCに由来すると考えられる.

CdとCuを比較すれば, PC中に取り込まれている金属量はCdがCuの約2倍であるにもかかわらず, SH基含有量はCdの方が約20倍高くなった. この理由として, Cu

の方が Cd よりも PC との結合が強く一旦 PC と結合した Cu は再び遊離しないために再び PC 合成に関与する可能性が低いこと, Cu(I) は 2 座配位であるのに対し, Cd (II) は 4 座配位であるため PC との結合に要するシステインのチオール基数が少なくすむことによると考えられる。

Zn は, Cd-PC, Cu-PC よりも分子量の小さい位置にピークが検出されたが, これには SH 基は検出されなかったことから, Zn は PC をほとんど誘導せず, 低分子量の有機酸などと結合していると推定される。

### 3.2 PC の n の数の違いによる分析

Cd および Cu ストレス下で培養したイネカサの破碎物を  $\text{NaBH}_4$  で還元後, 酸で PC 中の金属を外し, 逆相 HPLC により PC ( $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ) を n の数の違いに応じて分離検出した (図 5)。

Cd ストレス下で誘導された PC の n = 2 ~ 5 の各ピーク間にみられる小さいピークは, C 末端の Gly が欠けた PC,  $\beta\text{-Ala}$  (homo-PC), Ser (hydroxymethyl-PC) に置き換わった PC に由来すると推定される<sup>4)</sup>。

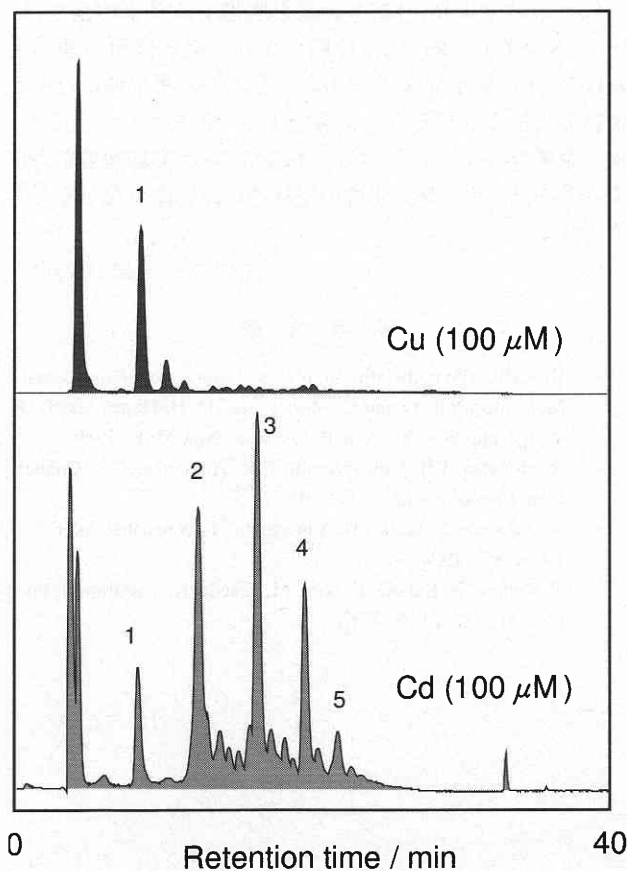


図 5 PC ( $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ) を n の数の違いにより分離検出したクロマトグラム. 図中の数字は n の値.

Cd ストレス下で培養したものは n = 1 ~ 5 の PC が検出されたが, Cu では n が 2 以上のものはごくわずしか検出されなかった. これは, 先に述べたように, Cd が 4 座配位なので PC と強く結合するためには n = 4 以上の長鎖の PC が必要とされるのに対し, Cu(I) は 2 座配位なので短鎖の PC でも強く分子内に固定されるためと考えられる。

### 3.3 Cd と他の金属の共存効果

Cd ( $100\ \mu\text{M}$ ) と他の金属 (Zn, Cu, Pb, Hg, Ni) が共存するときの PC 合成量の変化をゲル濾過 HPLC で測定した. 検出は DTNB による SH 基検出により行った。

Cu は Cd と同様に PC を誘導する金属であるが, Cd と Cu とが共存すると,  $50\ \mu\text{M}$  以上の Cu 濃度で PC 合成量が減少した (図 7). これは, Cu が PC を誘導するとともに高濃度では PC の誘導を阻害する働きをもつためと推察される. 従って, Cd と Cu がある濃度以上で共存すると PC 合成により重金属を無毒化する能力が落ち, イネの重金属耐性は弱まるものと考えられる。

Cu のほか, Ni, Zn, Hg, Pb についても同様に測定を行ったときの PC 合成量を表 1 に示した. 表中の数値は, Cd ( $100\ \mu\text{M}$ ) 単独の存在下で合成された PC 量を 100 としたときの相対値である。

Pb は PC を誘導しないが,  $100\ \mu\text{M}$  では Cd による PC 誘導を阻害した (表 1). HPLC-ICPMS 測定において Pb はカサ破碎後の水溶性画分にほとんど検出されなかったこと

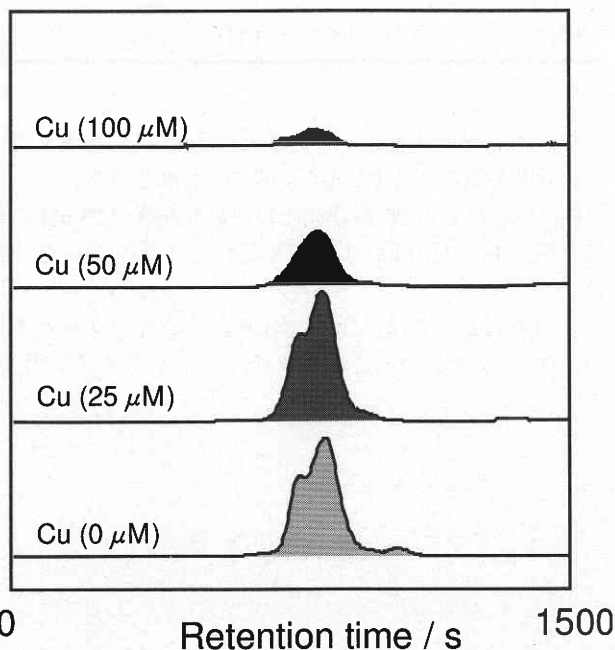


図 6 Cd ( $100\ \mu\text{M}$ ) と Cu との共存効果

## 研究速報

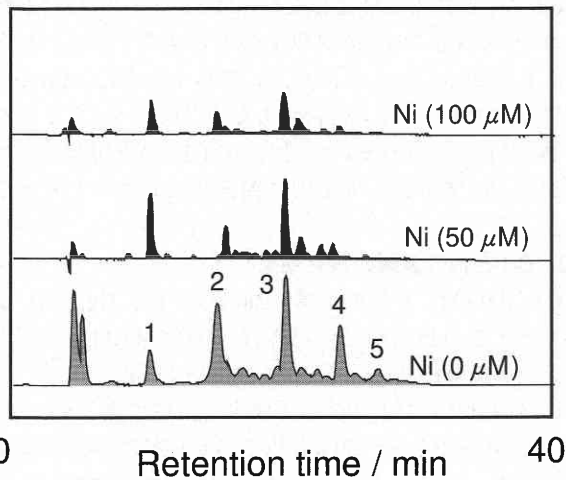


図7 PC (( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly) を n の数の違いにより分離検出したクロマトグラム. 図中の数字は n の値.

表1 Cd (100  $\mu$ M) と各金属共存下における PC 合成量の変化 (Cd (100  $\mu$ M) 単独の存在下で合成された PC 量を 100 としたときの相対値). 空白部は未測定.

濃度( $\mu$ M)	Ni	Cu	Zn	Hg	Pb
25		92		0.3	110
50	22	37		0.04	120
100	8	11			42
150			78		
300			110		

から, Pb は細胞内部に取り込まれにくく, PC 合成を阻害する効果が他の金属より小さいものと推察される.

Hg は Cd による PC の合成阻害が最も顕著で 25  $\mu$ M の濃度で既に PC の誘導がほとんど認められなくなった (表 1).

この原因としては, Hg は SH 基との結合がきわめて強く, PC 合成原料であるグルタチオンのシステインの SH

基と結合することにより PC の合成を阻害すること, Hg は前述のように酵素タンパクとも強く結合することから, PC 合成酵素の活性中心と結合し, PC の合成を阻害することなどが考えられる.

Ni も Pb 同様に PC を誘導しないが, 50  $\mu$ M 以上の濃度で Cd による PC の合成を阻害した (表 1).

一方, Zn は, 300  $\mu$ M の Zn 共存下においても PC 量にほとんど変化はなかったことから (表 1), Zn は PC の誘導にあまり影響を及ぼさないと考えられる.

Cd と Ni の共存ストレス下で培養した試料について, PC の n の数の分析を行った (図 8). n が 4 以上の PC の合成量は, Ni ストレスを加えたものは加えていないものより少なく, Ni ストレスで長鎖の PC の合成が抑えられた. 一方, PC 合成の原料となるグルタチオン (n = 1) の量にほとんど変化はないことから, グルタチオンから PC を合成する PC 合成酵素の機能が Ni により阻害されたために, PC 合成量が減少したと考えられる.

## 4. ま と め

以上の結果より, PC の合成を阻害する効果の強さは, Hg > Ni > Cu > Pb > Zn の順になり, 阻害作用の強い金属ほど, Cd などの PC により無毒化される重金属に対する植物の耐性を弱める方向に機能すると推察される. また, 他の金属の共存による, Cd の PC 誘導量の抑制効果を測定する手法は, 重金属の毒性の定量的に評価につながると考えられる.

(1997年12月25日受理)

## 参 考 文 献

- 1) E. Grill, Phytochelatin in plants. "Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry", ed. D. H. Hamer and D. R. Winge, pp. 283-300. Alan R. Liss, Inc., New York (1989).
- 2) R. Howden, P.B. Goldsbrough, C.R. Andersen, C.S. Cobbett, Plant Physiology 107, 1059 (1995).
- 3) K. Takatera, N. Osaki, H. Yamaguchi, T. Watanabe, Anal. Sci., 10, 6, 907 (1994).
- 4) T. Maitani, H. Kubota, K. Sato, M. Takeda, K. Yoshihira, J. Plant Physiol., 147, 743 (1996).