

第四章 イネ幼植物のアミノ酸吸収の解析

第一節 はじめに

第三章で行った実験の結果、窒素源として与えたアミノ酸の種類により植物の生育量には差が生じ、いくつかの種類のアミノ酸では無機態の窒素と同様に窒素源として生育することが十分可能であると考えられた。通常植物は、硝酸やアンモニアなど無機態窒素を吸収し、光合成の同化産物から、アミノ酸を合成する。しかし、これまで考えられている無機態窒素以外の吸収も行われるのであれば、これまでの無機態窒素と異なる利用・代謝経路も考えられる。この植物による無機態窒素と有機態窒素の利用形態の相違は、有機農業における植物の養分吸収の特徴にもつながることが考えられる。

植物は水および窒素など必要な養分を、すべて土壤溶液中から植物体内に吸収する。その役割を担うのが根であり、根は土壤中の有限でかつ生育の律速となるあらゆる養分の存在を感知し、吸収する。この仕組みはきわめて巧妙であることが明らかにされつつあり、その吸収の制御機構を解明することは植物の生長生理を把握する上で最も重要な課題であるといえる。そこで本章では、植物の有機態窒素利用形態解明の第一歩として、アミノ酸の吸収様式について検討を行った。従来無機態窒素の吸収に関しては多くの研究が報告されているが、アミノ酸の吸収様式に関する報告は極めて少ない。

第二節では、水耕液中のアミノ酸がアミノ酸として直接根から吸収される可能性について検討を行った。植物のアミノ酸利用が、植物体の外、すなわち水耕液もしくは土壤溶液中での形態変化(無機化)を伴うかどうかをまず明らかにすることを試みた。

第三節では、アミノ酸の吸収・蓄積部位の検討を行うために、イネ幼植物に ^{14}C -アミノ酸(グルタミン、アラニン、バリン)を吸収させたオートラジオグラフィ像の解析を行った。

第四節では、近年開発されたリアルタイムオートラジオグラフィシステム(Rai et al. 2008)を用いて、溶液から根へのグルタミンの移行動態をリアルタイムで画像化し、吸収・集積部位の検討を行った。

第五節では、アミノ酸の吸収速度について検討を行った。本節では供試植物のイネにおいて根のアミノ酸吸収の特性評価として、 K_m , V_{max} の測定を試みた。

第六節では、前処理条件が異なるイネ幼植物によるアミノ酸の吸収を検討した。植物の生育条件、特にその植物がおかれた窒素環境がアミノ酸吸収にどのような影響を

与えるかを解析することにより、植物の土壌溶液中の有機態窒素(アミノ酸)の探知や積極的な吸収機構の有無を解析した。

第二節 アミノ酸の直接吸収の証明

1) 目的

植物は通常硝酸やアンモニアなど無機態窒素を吸収し、光合成の同化産物を使用してアミノ酸を合成し、これを材料として数多くのタンパク質をつくり生長する。しかし、植物がアミノ酸を直接吸収するのであれば、光合成でつくられた同化産物を必要としない異なる代謝経路が存在している可能性があると考えられた。そこでまず、植物がアミノ酸をアミノ酸として直接吸収できるかを検討した。

アミノ酸の直接吸収に関する研究は、 ^{15}N 、 ^{13}C で二重標識したアミノ酸を供試し、植物が吸収した ^{15}N 、 ^{13}C 化合物を安定同位体比質量分析計 (Isotope Ratio Mass; IR-MS) で分析した結果、 ^{15}N と ^{13}C の両方が植物体内で検出されればアミノ酸が直接吸収したとされてきた (Nasholm et al. 2000)。この方法により、生態系では森林 (Nasholm et al. 1998, Ohlund et al. 2001) や草地 (Nasholm et al. 2000, Weigelt et al. 2005)、作物では茶 (森田ら 2004)、コムギ (Nasholm et al. 2001)、イネ (山室 1999) について同様の検討が行われてきた。しかし、アミノ酸が植物根外で分解され、 ^{15}N 、 ^{13}C 化合物がそれぞれ吸収する可能性も考えられるため、 ^{15}N と ^{13}C の双方の検出だけでは供試したアミノ酸が植物体内に存在するかは不明であり、アミノ酸が直接吸収されたことを証明するには不十分であると考えられた。近年、ガスクロマトグラフ (GC) や液体クロマトグラフ (LC) を質量分析計 (Mass spectrometry, MS) に組み合わせた分析が発達しており、供試した同位体標識のアミノ酸を、通常植物が作成するアミノ酸と分別して測定することが可能である (Nasholm et al. 2001) が、アミノ酸の直接吸収に用いた報告はいまだ少ない (Persson et al. 2001)。

本節では有機態窒素の吸収・利用を検討する第一歩として、イネ幼植物のグルタミンの直接吸収を、高速液体クロマトグラフィーおよびイオントラップ型質量分析計を用いて検討を行った。

2) 材料と方法

供試作物はイネ (*Oryza sativa* L. 日本晴) を用いた。種子サンプルは籾殻を外し、玄米を 5 % 次亜塩素酸ナトリウムと 1 % tritonX の混合液で 15 分振とうし、新しい溶液と交換する操作を 3 回繰り返し行った。この滅菌操作後、滅菌水で完全に溶液が置換できるまで洗浄して寒天に播種し、28℃ で 3 日間保温して発芽させた。窒素成分抜き改変木村氏 B 液を 121℃、20 分のオートクレーブ処理を行い、室温まで放冷後、50 ml ポリプロピレン製遠沈管 (コーニング社) に 25 ml ずつ分注した。遠沈管の水面にポリプロピレン製ネットを浮かせて、正常に発芽した種子を 1 個体ずつ移植した。

この遠沈管 4 本を組織培養用プラントボックス(60 mm x 60 mm x 100 mm)に入れ、同型のプラントボックスを上からかぶせて無菌条件を維持できるように密封し生育させた。播種、移植作業はすべてクリーンベンチ内で行い無菌条件を維持した。通気性維持のため、上部に直径約 8 mm の穴にミリシールを貼った。人工気象器にて、温度 28℃、明期 18 時間/暗期 6 時間で移植後 6 日間栽培した。

生育の揃ったイネ幼植物を供試溶液に交換し、生育時と同じ人工気象器内にて 1 時間明条件の吸収試験を行った。供試溶液は、窒素成分抜き改変木村氏 B 液に (U-)¹⁵N, ¹³C-グルタミン ((¹³CO(¹⁵NH₂)¹³CH₂¹³CH₂¹³CH(¹⁵NH₂)¹³COOH), ¹⁵N・¹³C 98 atom%, 昭光通商, 図 4-2-1)を窒素成分で 1 mM(25 μmol/25 ml)となるように添加して作成した。1 時間後、氷冷した冷水で 30 秒間ずつ 3 回根を洗浄した後、地上部と地下部に分離しそれぞれの新鮮重を測定した。その後、液体窒素で瞬間的に植物体を凍結して、0.5 mm シリカ約 1 g、および 5 mm ビーズ 3 個が入った 2 ml スクリューキャップ付きチューブに入れ、80 %エタノールを 1 ml 添加した。ビーズ式細胞破碎装置(トミー精工 MS-100)で破碎(5000 rpm、1 分×3 回)し、振とうしながら 60℃にて遊離アミノ酸を抽出し、遠心分離(12000 g、10 分)により、上澄み液を抽出アミノ酸溶存液とした。

抽出液のアミノ酸分析は、6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate(AQC、ウォーターズ社)を用い、Orte et.al.(2003)による蛍光誘導体化を一部改変して行った(図 4-2-2)。具体的には、10 μl 抽出液の上澄み液、10 μl ノルロイシン(内部標準)、70 μl 0.2M ほう酸ナトリウム緩衝液(pH=8.8、5 mM・2Na・EDTA 含む)を混合し、AQC 10 μl を添加し、10 秒間振とう後、55℃で 10 分間保持して、誘導体化を行った。

分析は、LC/MS(表 4-2-1)を用いた。移動層 A は 0.1 %ギ酸、移動層 B は 0.1 %/アセトニトリルとし、グラジエントは表 4-2-2 に示した。移動相の流速は 0.1 ml/min、カラム(Inertsil ODS-3 GL Science, 3 μm, 1.5×250 mm)のオープン温度は 40℃の条件で 5 ml をインジェクションし分析を行った。イオン化法は ESI とした。

3) 結果と考察

栽培前の溶液をサンプリングし、AQC で遊離アミノ酸を誘導体化して、LC/MS により分析した。トータルイオンクロマトグラム(TIC)とグルタミンのズームスキャンマススペクトルを図 4-2-3、1 時間吸収後の溶液についてのトータルイオンクロマトグラムとグルタミンのズームスキャンマススペクトルを図 4-2-4 に示した。栽培前の溶液を分析した結果、グルタミンの保持時間は 10.2 分、マススペクトルは二重標識したグルタミン(分子量

153)をAQC(分子量171)で誘導体化するため m/z (m :分子量、 z :電荷)は324であった。栽培後の溶液にはグルタミン以外のアミノ酸は検出されなかった。また、AQCによる分析では、分解によるアンモニアイオンも検出される可能性もあるが、吸収試験後の溶液からはアンモニアイオンも検出されなかった。グルタミンのズームスキャンマスペクトルも同様に m/z が324を中心とした分布を示していた。したがって、試験期間内において微生物や根からの分泌物等によるグルタミンの分解はおこっていないと考えられた。なお、栽培前後の溶液を比較すると、1時間に約8%(2 μmol)減少していた。

無窒素で生育させたイネ幼植物と、そのイネ幼植物に1 mM $(\text{U-})^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -グルタミン溶液を1時間吸収させた地上部と地下部のグルタミンのズームスキャンマスペクトルを図4-2-5に示した。無窒素で生育したイネ幼植物(図4-2-6)では、地上部、地下部にグルタミン分子の317がみられた。これは種子内に貯蔵されていて窒素から合成されたグルタミン(分子量146)のピーク(317=グルタミン分子量146+AQC分子量171)である。これに対し、 $(\text{U-})^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -グルタミン溶液を吸収させたイネ幼植物において、地上部および地下部で、無窒素で生育したイネ幼植物ではみられなかった324にピークがあり、グルタミン分子の質量シフトがみられた。

地下部だけの結果では、抽出前に丹念に洗浄しているとはいえ、根表面へのイオンおよびアポプラスト内へ侵入した二重標識グルタミンの存在が懸念される。しかし、地上部でも二重標識グルタミンが確認されたことから、溶液中のグルタミンは分解されずに直接根に吸収され、そのままの形態で地上部へ輸送されたグルタミンも存在することが示唆された。

なお、地上部の二重標識グルタミンの割合が低いのは、第五章でより詳細に解析するが、地下部で吸収後、代謝されることで、二重標識したグルタミンの ^{15}N や ^{13}C が他のアミノ酸や有機酸に移行し地上部へ移動したためと考えられた。同様に、地下部のグルタミンマスペクトルで318や319のピークが見られるのは、恐らく二重標識グルタミンのうち ^{15}N の一部が体内の ^{14}N と同様に代謝され、他のアミノ酸にアミノ基転移により変化し、代謝されたものと考えられる。

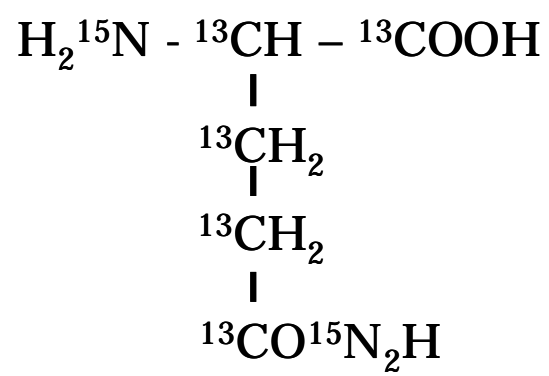


図 4-2-1 (U-) ^{15}N , ^{13}C グルタミン

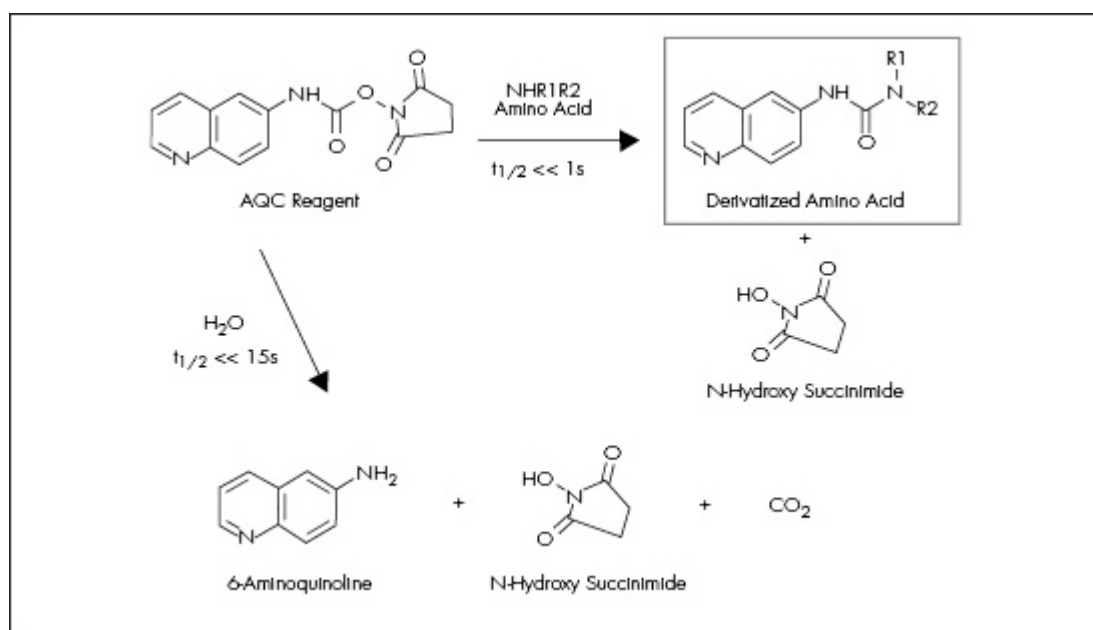


図 4-2-2 AQC によるアミノ酸誘導体化 (waters 社 HP より)

表 4-2-1 LC/MS の装置構成

装置	使用機種	メーカー
LCポンプ	デュアルポンプ 3201 ナノスペース	資生堂
オートサンブラ	HTSオートサンブラー SI-2 3133 ナノスペース	資生堂
カラムオープン	ナノスペース SI-1	資生堂
分析カラム	Inertsil ODS-3 3 μ m, 1.5 \times 250 mm	GL Science
検出器	Finnigan LTQ イオントラップ型質量分析装置	Thermo Finnigan Japan

表 4-2-2 HPLC 移動相のグラジエント条件

Time (min)	Flow Rate (ml/min)	A (%)	B (%)
0	0.1	99	1
0.5	0.1	95	5
17.5	0.1	85	15
30	0.1	70	30
35	0.1	70	30
37.5	0.1	99	1
45	0.1	99	1

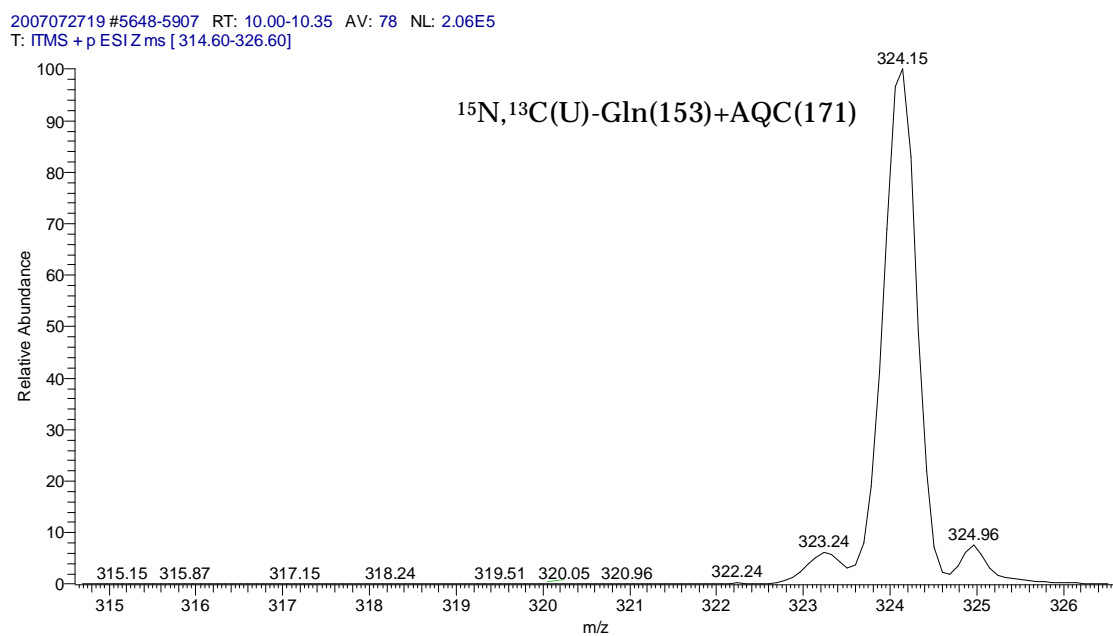
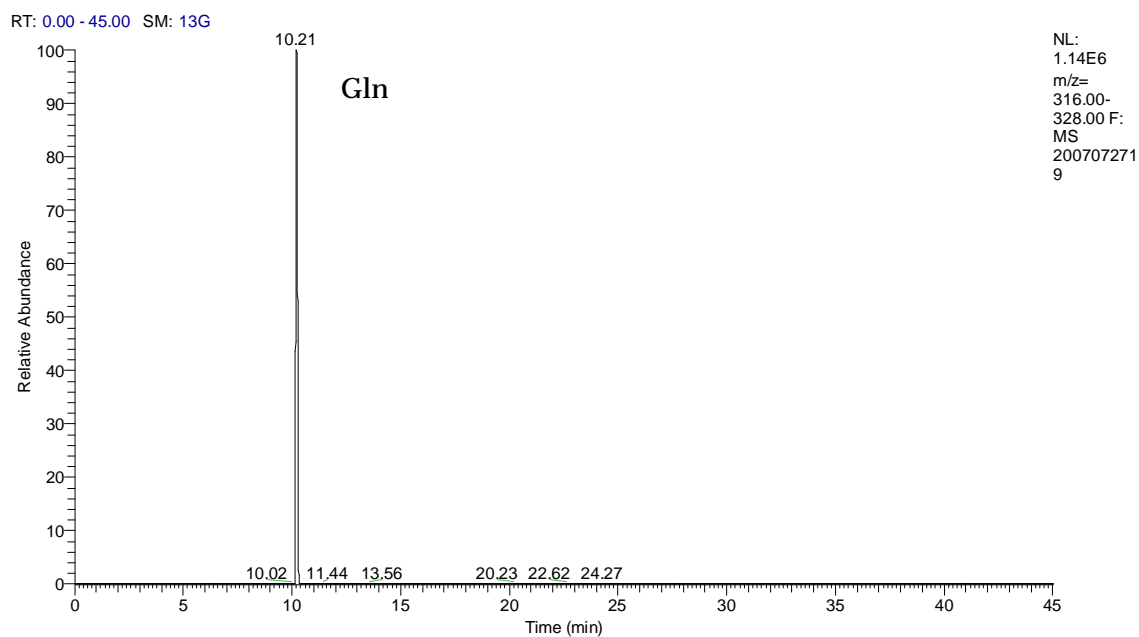


図 4-2-3 水耕液(1mM・(U)- $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -Gln)のトータルイオンクロマトグラム(上段)とグルタミンのズームスキャンマススペクトル(下段)

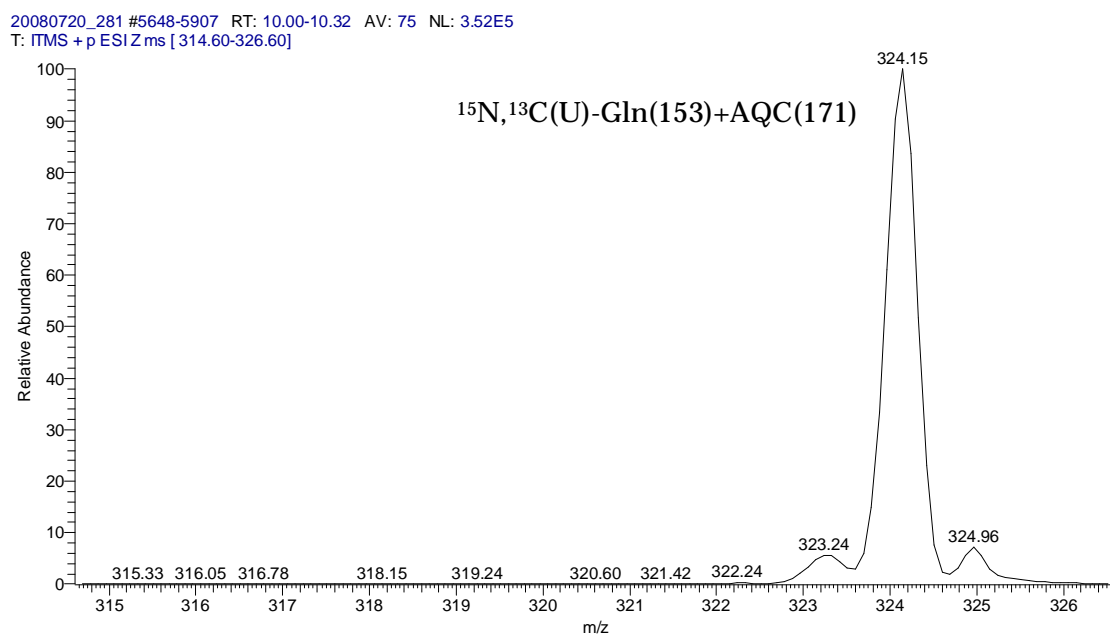
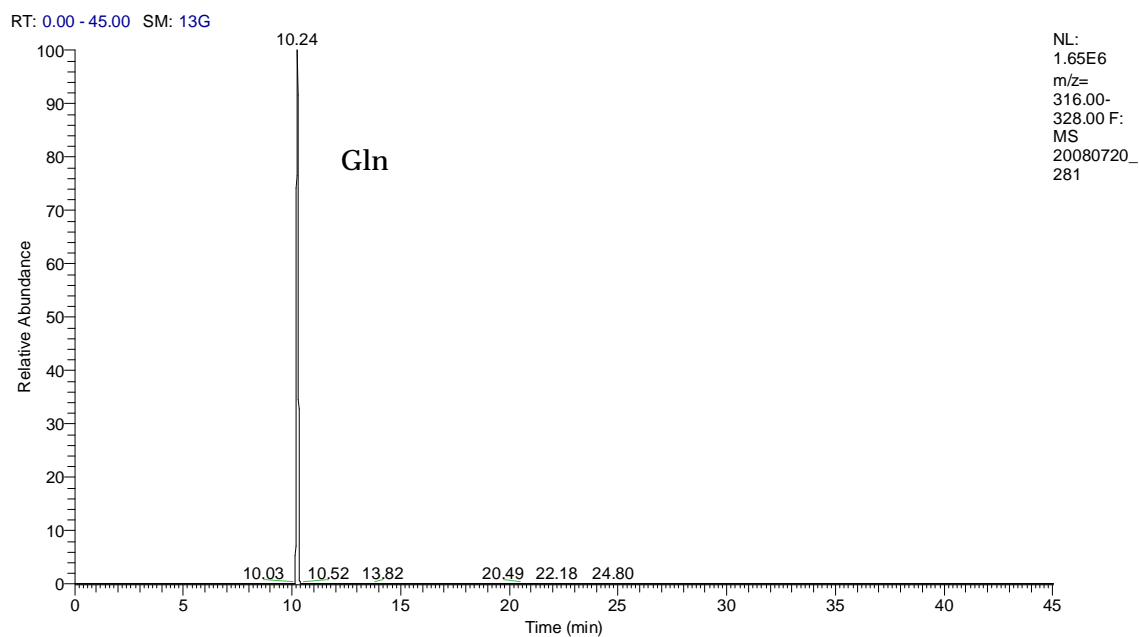
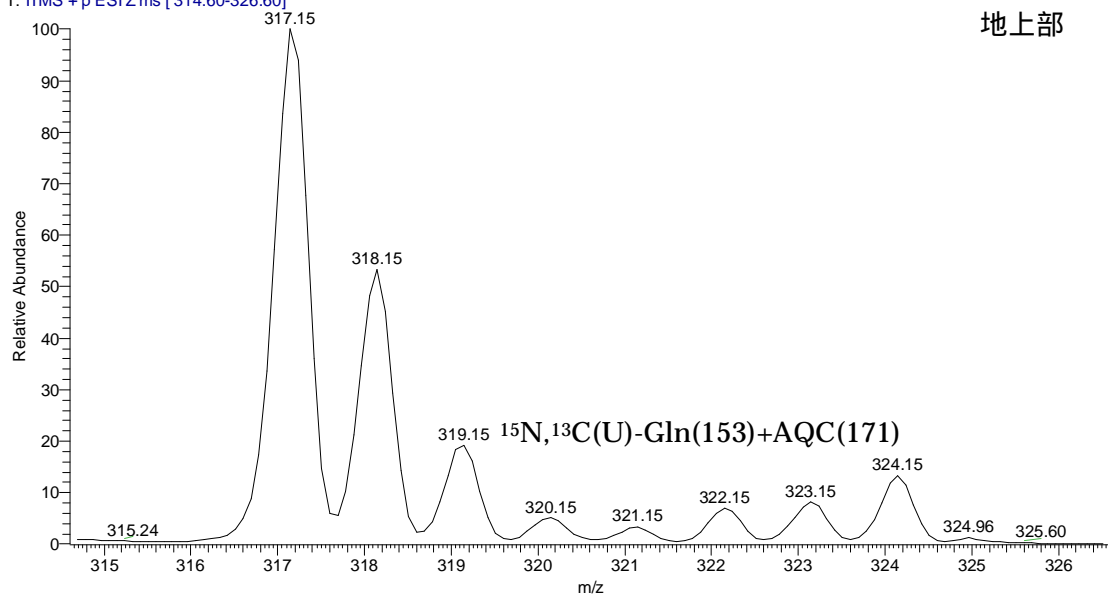


図 4-2-4 1 時間吸収試験後の水耕液 (1mM・(U)- $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -Gln) のクロマトグラム (上段) とグルタミンのマススペクトル (下段)

20080720_250 #5648-5907 RT: 10.01-10.37 AV: 72 NL: 2.60E3
T: ITMS + p ESI Z ms [314.60-326.60]



20080720_269 #5648-5907 RT: 10.01-10.41 AV: 76 NL: 3.34E2
T: ITMS + p ESI Z ms [314.60-326.60]

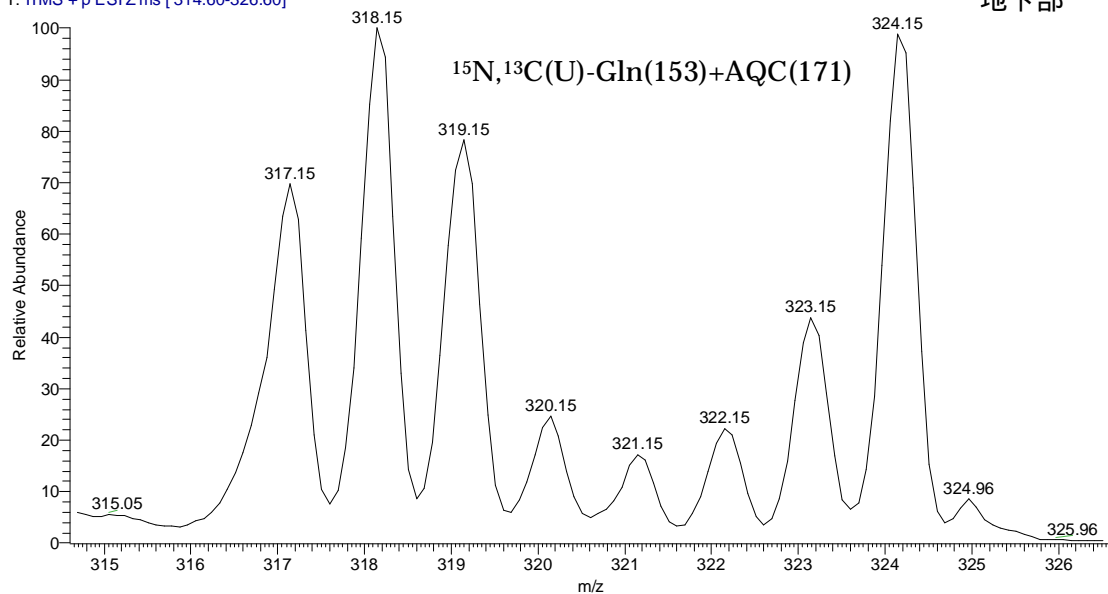
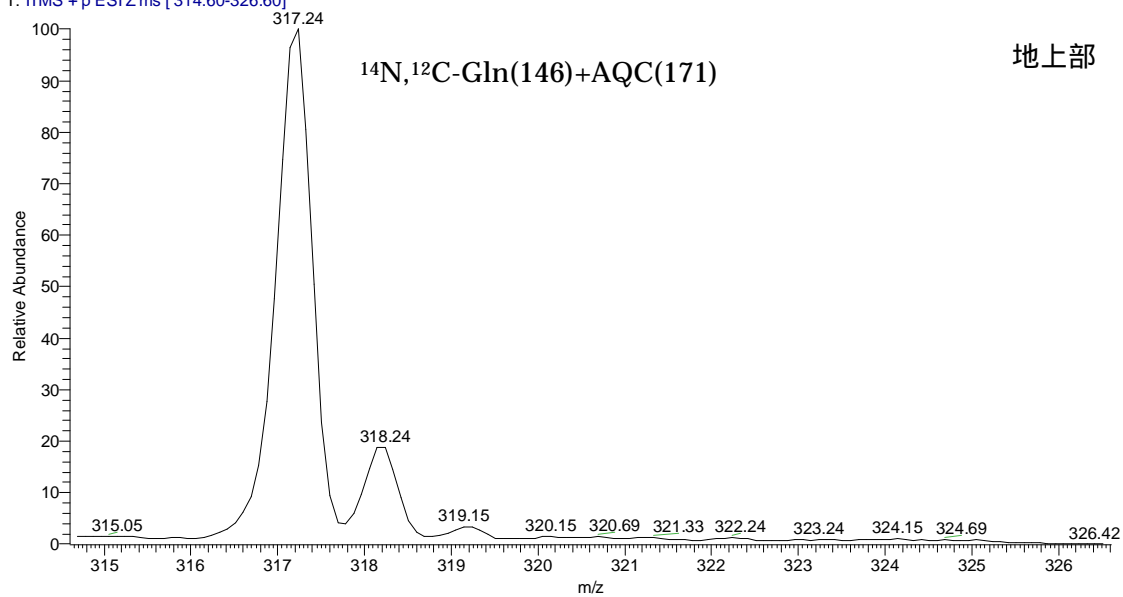


図 4-2-5 無窒素で 6 日間生育後、(U)- ^{15}N , ^{13}C -Gln を 1 時間吸収させたイネ幼植物抽出液のグルタミンのマススペクトル(上段;地上部、下段;地下部)

20080720_261 #5648-5907 RT: 10.01-10.40 AV: 75 NL: 1.27E3
T: ITMS + p ESI Z ms [314.60-326.60]



20080720_280 #5648-5907 RT: 10.01-10.41 AV: 76 NL: 8.20E2
T: ITMS + p ESI Z ms [314.60-326.60]

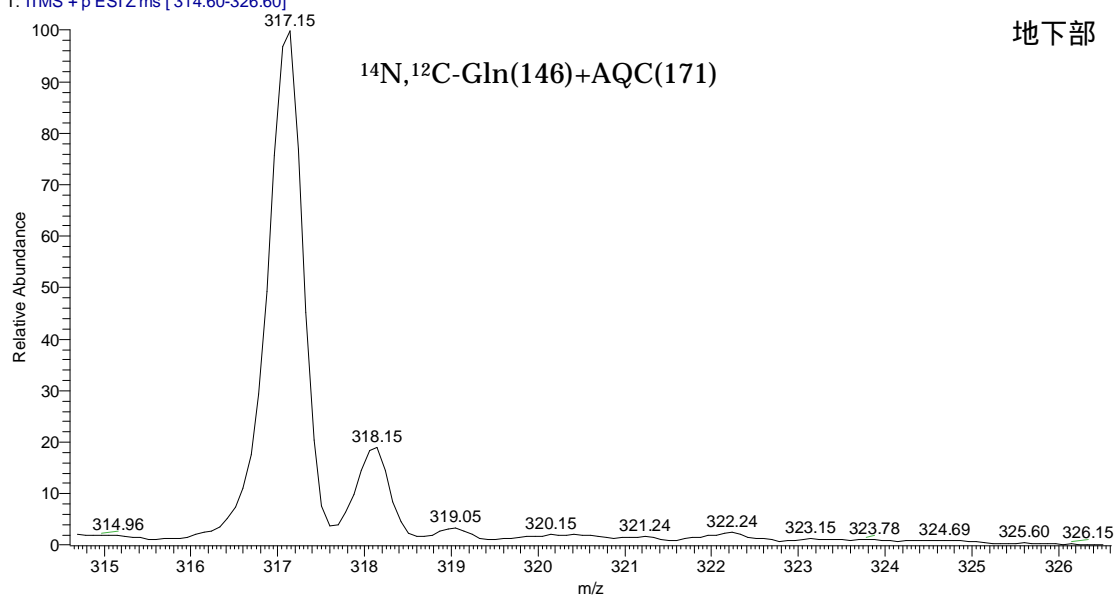


図 4-2-6 無窒素で 6 日間生育したイネ幼植物抽出液のグルタミンのマススペクトル
(上段;地上部、下段;地下部)

第三節 アミノ酸の吸収・蓄積部位

1) 目的

植物根における養水分の吸収部位に関する研究はこれまでも報告がある。オオムギ根において、水やカルシウム、鉄の吸収は根端から数 cm 基部よりの部分で認められるのに対し、リン、カリ、アンモニウムは、水のような明瞭な変異を示さず、根全体から吸収を行う (Clarkson 1978) とされている。一般的に、根表面に存在する水やイオンが、茎葉部へ転流するために木部導管まで移動する経路は、大別して原形質連絡を通じて細胞膜で連絡しているシンプラスト、細胞壁や細胞間隙を連絡しているアポプラストの二種類に分けられる (巽 1998)。根端から数 cm 基部寄りの部位では、これら両者のルートを介した水の移動が最も容易であるために、活発な水の吸収が見られる。一方、基部寄りの部位においては、内皮細胞の細胞壁が肥厚して、水を通し難いスベリンなどの物質が蓄積する。このような部分では、皮層から中心柱へ向かうアポプラスと経路の水の移動が妨げられる。水は内皮細胞でいったんシンプラストを通過してから木部導管へ移動することになり、吸収活性が低下すると考えられている。しかし、トウモロコシやイネにおいて、アンモニウムの吸収は伸長域より根端で速い (Colmer et al. 1998) とされ、トウモロコシにおけるカリ (Sharp et al. 1990) や硝酸塩 (Taylor et al. 1998) は伸長域において最大速度を示すとしている。一方、リンは齢の進行によって吸収部位が変わる (吉田ら 1968) との報告もある。このような報告から、養水分の吸収部位は、植物種や調べた養分に依存して変わる。

しかし、これまでアミノ酸の吸収部位や根の蓄積部位に関する検討はない。吸収・蓄積部位を特定することは、取り込みに関するタンパク質の発現が予測され、分子生物学的解析にも有用な情報となる。そこで本節では、アミノ酸の吸収・蓄積部位の検討を行うために、イネ幼植物に ^{14}C -アミノ酸 (グルタミン、アラニン、バリン) を吸収させたオートラジオグラフィ像の解析を行った。

2) 材料と方法

供試作物はイネ (*Oryza sativa* L. 日本晴) を用いた。第二節と同様に、種子滅菌後、発芽した種子を無窒素条件で 6 日間無菌水耕生育した。7 日目に、無窒素改変木村氏 B 液に、

^{14}C -L-グルタミン (2.5 kBq/ml, $^{14}\text{CO}(\text{NH}_2)^{14}\text{CH}_2^{14}\text{CH}_2^{14}\text{CH}(\text{NH}_2)^{14}\text{COOH}$)

^{14}C -L-アラニン (2.5 kBq/ml, $^{14}\text{CH}_3^{14}\text{CH}(\text{NH}_2)^{14}\text{COOH}$)

^{14}C -L-バリン (2.5 kBq/ml, $^{14}\text{CH}(\text{CH}_3)_2^{14}\text{CH}(\text{NH}_2)^{14}\text{COOH}$)

を含んだ窒素濃度 100 μM の各アミノ酸溶液に入れ替えた。人工気象室にて 28

明条件で試験した。吸収時間は 1 時間と 3 時間とした。また、比較として、 ^{45}Ca と ^{32}P も同様に試験した。さらに、根への吸着を検討するために、同じ人工気象室内で、氷冷した溶液のアミノ酸を同様に 3 時間吸収させた。サンプリングしたイネ幼植物の地下部を 1 M CaCl_2 液で 30 秒ずつ 3 回洗浄した後、イメージングプレート(富士写真フィルム、以下 IP)に添付した。作業は 4 月の部屋で行った。3 日間(^{32}P は 3 時間)冷凍庫内で保管後、スキャナー (FLA-5000、富士写真フィルム)で画像を読み込んだ。

3) 結果と考察

^{14}C -アミノ酸および、 ^{45}Ca と ^{32}P を 1、3 時間吸収したイネ幼植物根のオートラジオグラフィ像を図 4-3-1 に示した。 ^{45}Ca を吸収したイネ幼植物根は根端が明るく光った。 ^{32}P は、根端も明るく光るが、 ^{45}Ca より全体的に明るかった。また、氷冷した溶液からのアミノ酸吸収は、28 °C 条件で行った試験に比べて明るい部分は少なく、根全体が薄く写し出された。これは、溶液を氷冷したため、イネ幼植物の生理活性が低下し、アミノ酸の吸収が少なく、主に根表面に吸着した像となったと思われる。

28 °C の 1 時間吸収では、アラニン、グルタミン、バリンとも種子根の根端が明るく写し出されていた。3 時間吸収では、1 時間吸収の根より根端から基部側へ明るい範囲が広がり、その範囲は特にバリンで大きかった。吸収時間が長くなり、吸収量および根内での移行が見られたためと思われる。また、カルシウムとアミノ酸の根端を比較すると、アミノ酸を吸収した根端は、カルシウムより広い範囲で明るかった。

次節では、アミノ酸の吸収の過程をより詳細に検討するため、リアルタイムオートラジオグラフィシステムを用いた解析を行った。

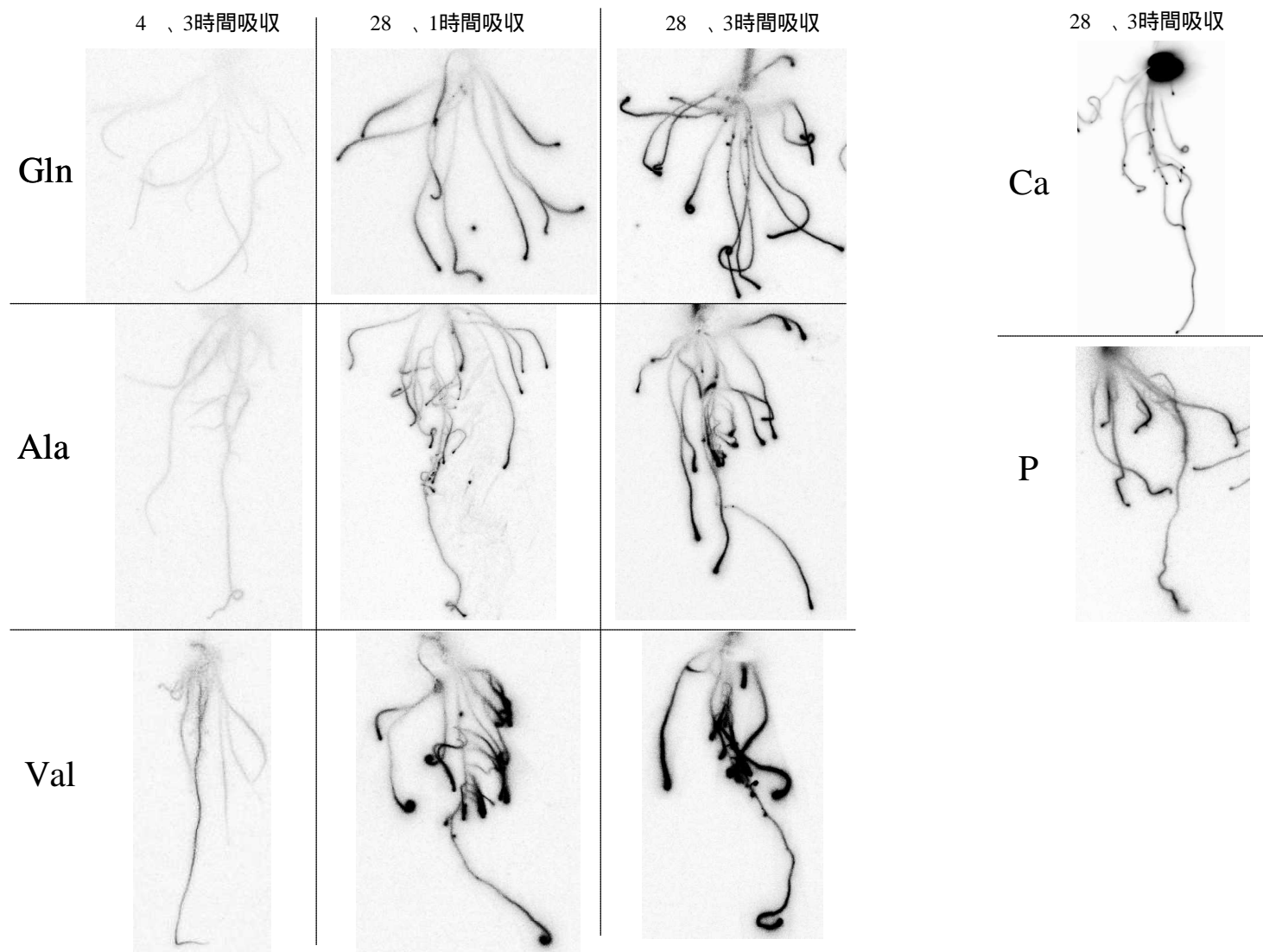


図 4-3-1 ^{14}C -アミノ酸および ^{45}Ca -カルシウム、 ^{32}P -リンの吸収初期(吸収後 1、3 時間)のイネ幼植物根のオートラジオグラフィ

第四節 リアルタイムオートラジオグラフィシステムを用いたアミノ酸の吸収解析

1) 目的

前説では、アミノ酸の吸収・蓄積が、主に根端でみられることを明らかにした。しかし、これはイネ幼植物を IP に貼り付けカセット内に長時間コンタクトした結果であり、同一の個体を用いて経時的な変化を解析したものではない。植物体内の物質動態や生理応答はかなり早いものであり刻一刻と変化する。例えば無機態窒素を用いた試験では、根に与えた窒素がわずかに数分後に地上部で検出(Nakanishi et al. 1999)されている。低分子であるアミノ酸の動態や吸収特性を検討するためには、アミノ酸の物性を変化させることなく標識し、植物の生理状態を維持したまま根からの吸収動態をリアルタイムで解析できるシステムが必要である。これまでに、植物体内の物質動態を生きたままの状態で解析する方法として、PETIS(Positron Emitting Tracer Imaging System)が報告されているが、この方法で使用するポジトロン核種の調整には大規模な施設を要すること、ポジトロン放出各種は一般に半減期が短く使用時間が限られていること、そして 線を主に検出するため解像度の限界があること、ポジトロンの抜けという現象のため画像に定量性がないことなどの問題点がある。

近年 Rai et al.(2008)は、崩壊核種のラジオアイソトープ ^{14}C 、 ^{45}Ca 、 ^{32}P などを用いて、植物体中の物質動態を非破壊かつリアルタイムで画像化するシステムを開発した。このリアルタイムオートラジオグラフィシステム(以下リアルタイムシステム)は、放射性同位体トレーサーが崩壊して生じる 線を、CsI シンチレータによって可視光へと変換し、その可視光をフォトンカウンティングに用いられる GaAsP イメージングインテンシファイアで増幅し CCD カメラ(浜松ホトニクス)で検出するものである(図 4-4-1)。CsI シンチレータによって変換される光はきわめて微弱でありこの光をインテンシファイア光電面において電子に変換し、変換された電子を同じくインテンシファイアに内蔵されたマイクロチャネルプレートにおいて増幅している。増幅した電子は蛍光面で再び蛍光像に変換され CCD カメラで画像化され、ソフトウェアの AQUACOSMOS(浜松ホトニクス)を使用して画像構築および解析が行われる。これまでは、 ^{32}P や ^{45}Ca を根から吸収させて、葉や莢など地上部に移行してくる植物体地上部を対象とする解析が主に行われている。

本研究では、このリアルタイムシステムを用いて、イネ幼植物根がグルタミンを吸収する過程を撮影した。本研究では、従来とは撮影対象が異なり、溶液から根へのグルタミンの吸収過程を検討課題としたため、一部リアルタイムシステムを改良して試験を行った。

2) 材料と方法

供試作物はイネ (*Oryza sativa* L. 日本晴) を用いた。第一節と同様に、種子滅菌を行った後、発芽した種子を無窒素条件で2日間無菌的に水耕栽培を行った。測定は、リアルタイムシステムを用いたが、溶液中のアミノ酸を根が吸収する様子を撮影するために、イネ幼植物(地上部・地下部全体)を、ポリスチレン(4 μ m)薄膜を介して、Csl シンチレーター上に固定し、ポリエチレンメッシュ(20 μ m)シートで覆ったスポンジで根を抑え、Csl シンチレーターに密着させた。上部を一部空けたプラスチックシャーレをスポンジの上から覆い、溶液が漏れないように周囲をシリコングリースで止めて、 1 C-アラニン、 1 C-グルタミン溶液(18.5 kB/ml、窒素濃度 250 μ M、約 20 ml)を添加し吸収実験を行った(図 4-4-2)。アラニンは5分積算した画像を1コマとして500枚(41時間)、グルタミンは10分積算した画像を1コマとして258枚(43時間)撮影した。グルタミン撮影時には、吸収部位を明らかにするために、イネ幼植物の葉にワセリンを塗布し、蒸散を抑えて導管の蒸散流を止めたサンプルも撮影した。

3) 結果と考察

アミノ酸吸収のリアルタイム解析

リアルタイムシステムを用いてイネ幼植物が根から 14 C-グルタミンを吸収する過程の、試験開始後3~6時間における10分ごとの吸収動態を図 4-4-3 に示した。バックグラウンドとして撮影される水溶液から根が 14 C-グルタミンを吸収・蓄積して、 14 C-グルタミン濃度が濃くなり根が画像として浮かびあがってくる様子が観察された。吸収初期では、根全体で吸収が見られた。

試験開始後7~43時間の2時間ごとのイネ幼植物の吸収動態を図 4-4-4、ワセリン塗布を行ったイネ幼植物の吸収動態を図 4-4-5、それぞれの輝度値の上昇から根端と根中央部におけるグルタミンの濃度変化を数値化し図 4-4-6 に示した。ワセリン塗布が無いイネでは、吸収された 14 C-グルタミンは根端に蓄積がみられた。なお、12時間後には、輝度値の低下がみられるが、これは溶液中の 14 C-グルタミンが吸収されてなくなり、吸収された 14 C-グルタミンが地上部へ移行したものと考えられる。

一方、ワセリン塗布のイネでも、根端への蓄積が見られるが、全体的な吸収はワセリン無塗布と比べると低く、時間が経過しても根の 14 C-グルタミン濃度の低下はなかった。水輸送の原動力となるのは気孔の蒸散であり、根から吸収された養水分は、水ポテンシャルの勾配にしたがって地上部へ輸送される。したがって、葉へのワセリン塗布により蒸散が抑制されたため、地上部への移行が低下したためと考えられる。

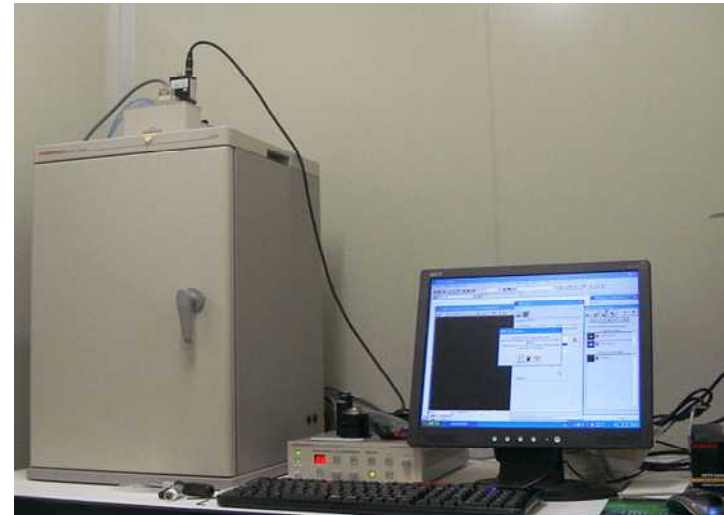
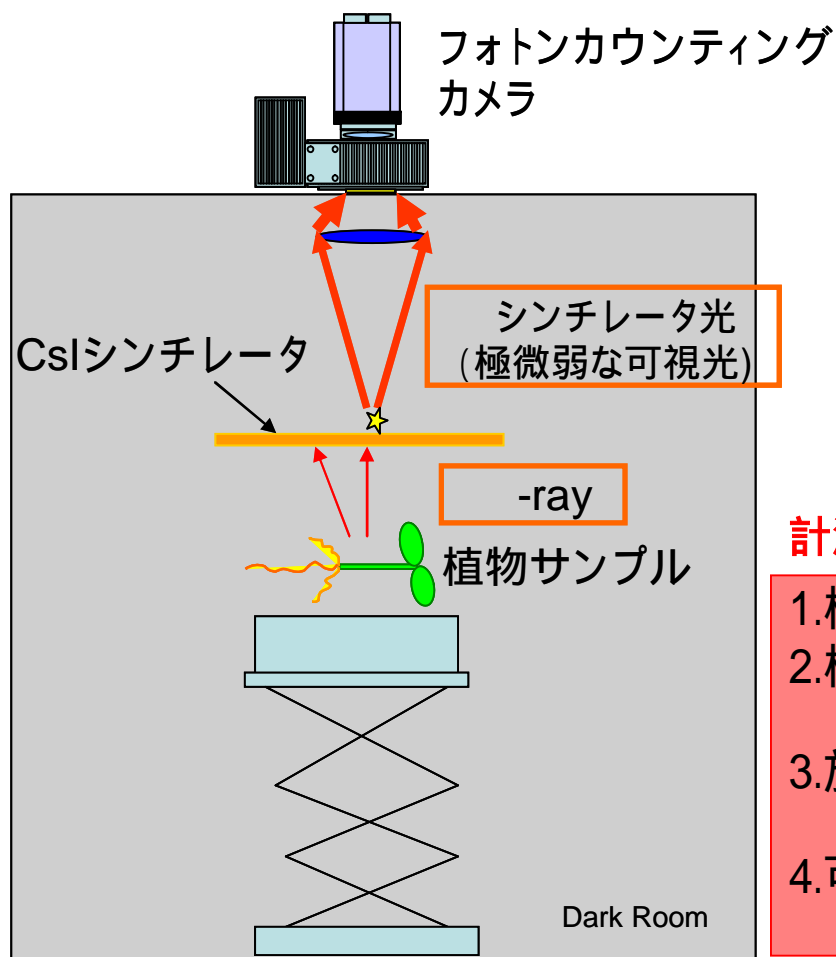
図 4-4-7 に試験開始後 7 ~ 43 時間の 2 時間おきの ^{14}C -アラニンの吸収過程を示した。グルタミンと同様、アラニンの吸収も根端で高くなることが観察された。

考察

根端には、根冠に守られた根端分裂組織があり、細胞分裂と細胞伸長が繰り返されて根は伸長する。根の伸長にあたっては葉で同化された炭水化物が篩管を通して供給されている。また、Oaks (1966) は、トウモロコシの根端部ではある種のアミノ酸の生合成がほとんど行われておらず、タンパク質合成に必要なアミノ酸は根の他の部分から輸送されることを指摘している。また、アンモニア態窒素を ^{15}N で標識した実験で吸収されたアンモニア態窒素の根端への移動があることも報告 (Yoneyama et al. 1977) されている。

本試験および前節の結果、イネ幼植物の根では、 ^{14}C -アミノ酸の吸収・蓄積は特に根端で多くみられた。Oaks (1966) らの報告より、根内でアミノ酸が移行することも考えられるため、根端の吸収量が多いのか、根端以外から吸収したアミノ酸の蓄積が多いのか、判然としない。リアルタイムシステムを用いた映像では、最初に根全体が浮き上がる画像がみられたが、これは根全体で吸収が同一速度で行われているのではなく、前節でも指摘したように、アミノ酸が根表面へ吸着したことが要因であると推測している。

根端部でアミノ酸の吸収量が多いのか、蓄積が多いのかについては、今後、根の部位別の吸収量や、根端以外の部分で吸収したアミノ酸の根端への移行量、またパルス的に ^{14}C -アミノ酸を与えた植物根をリアルタイムシステムで解析するなどの検討が必要である。



計測原理

1. 植物サンプルにRI標識化合物を与える
2. 植物に吸収された標識化合物から 線が放出される
3. 放出された 線をシンチレータで可視光に変換する
4. 可視光を光子カウンティングカメラで画像として検出する

RI標識化合物 → 線 → シンチレータ → 微弱光 → 2Dでリアルタイム検出

図 4-4-1 リアルタイムオートラジオグラフィシステム (Rai et al. 2008 より一部改変)

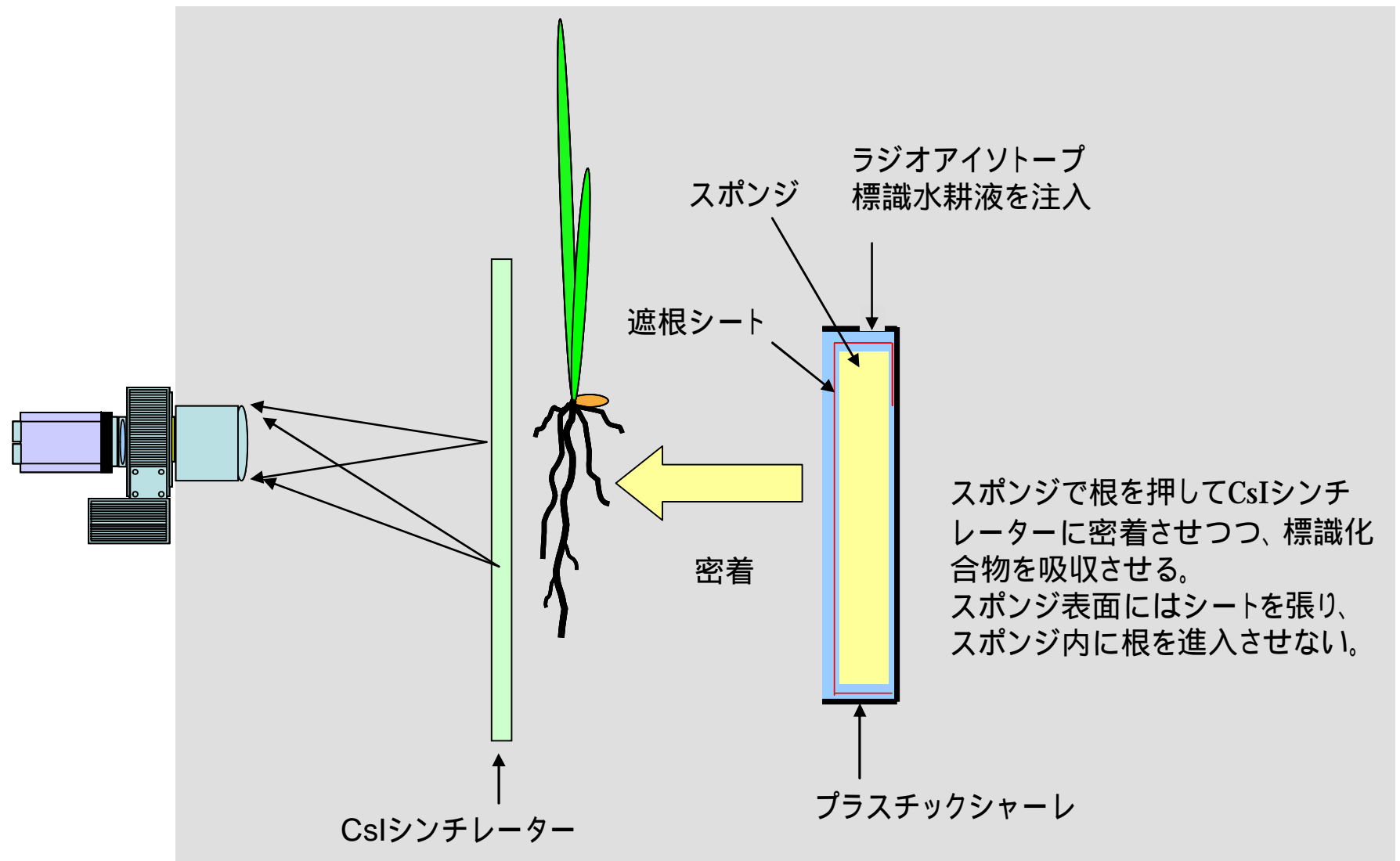


図 4-4-2 溶液から根へ ^{14}C -アミノ酸吸収を撮影するためのリアルタイムオートラジオグラフィシステム

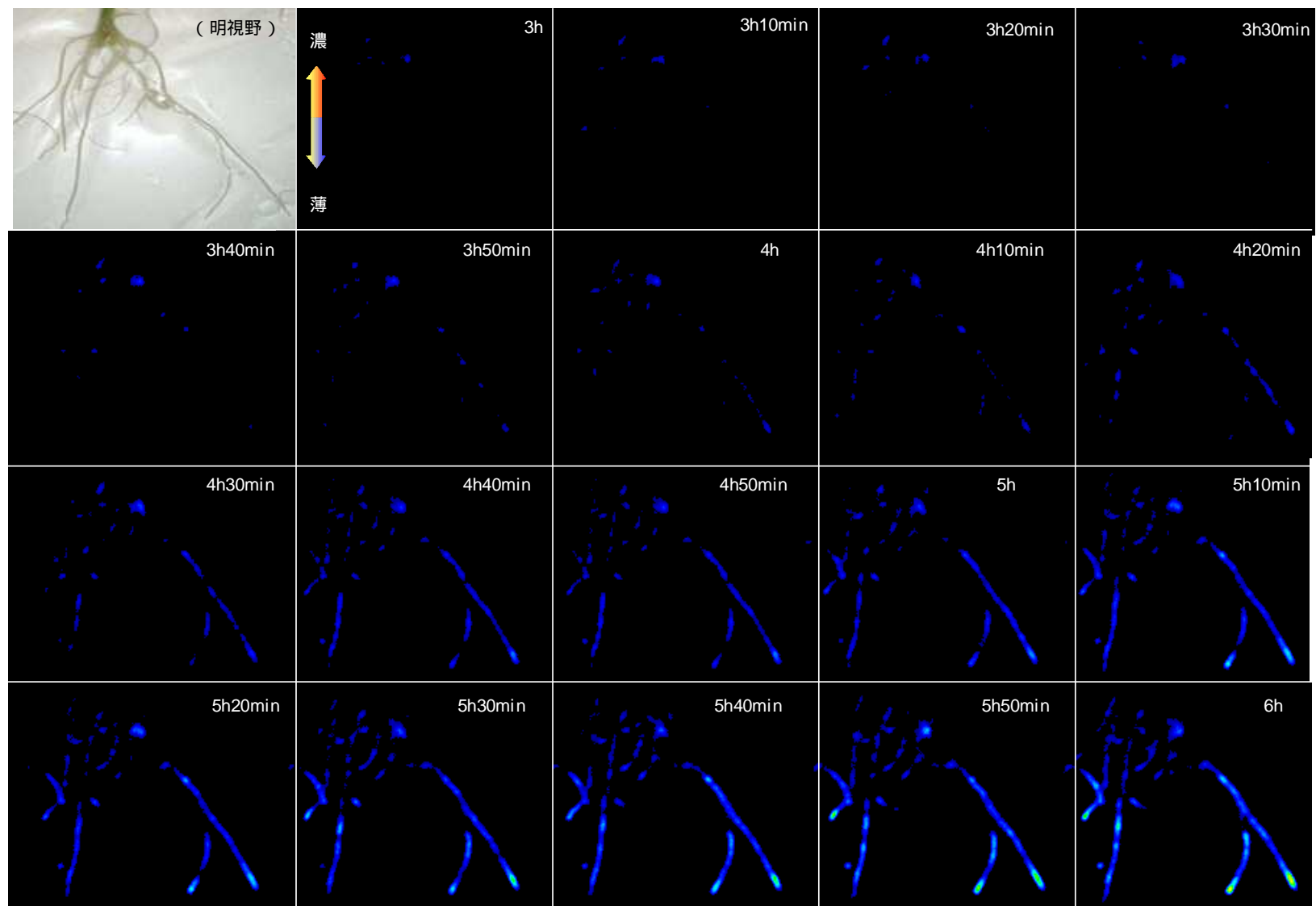


図 4-4-3 吸収後 3～6 時間のイネ幼植物(ワセリン塗布無)の ^{14}C -グルタミンのリアルタイム画像(10 分ごとの画像を掲載)

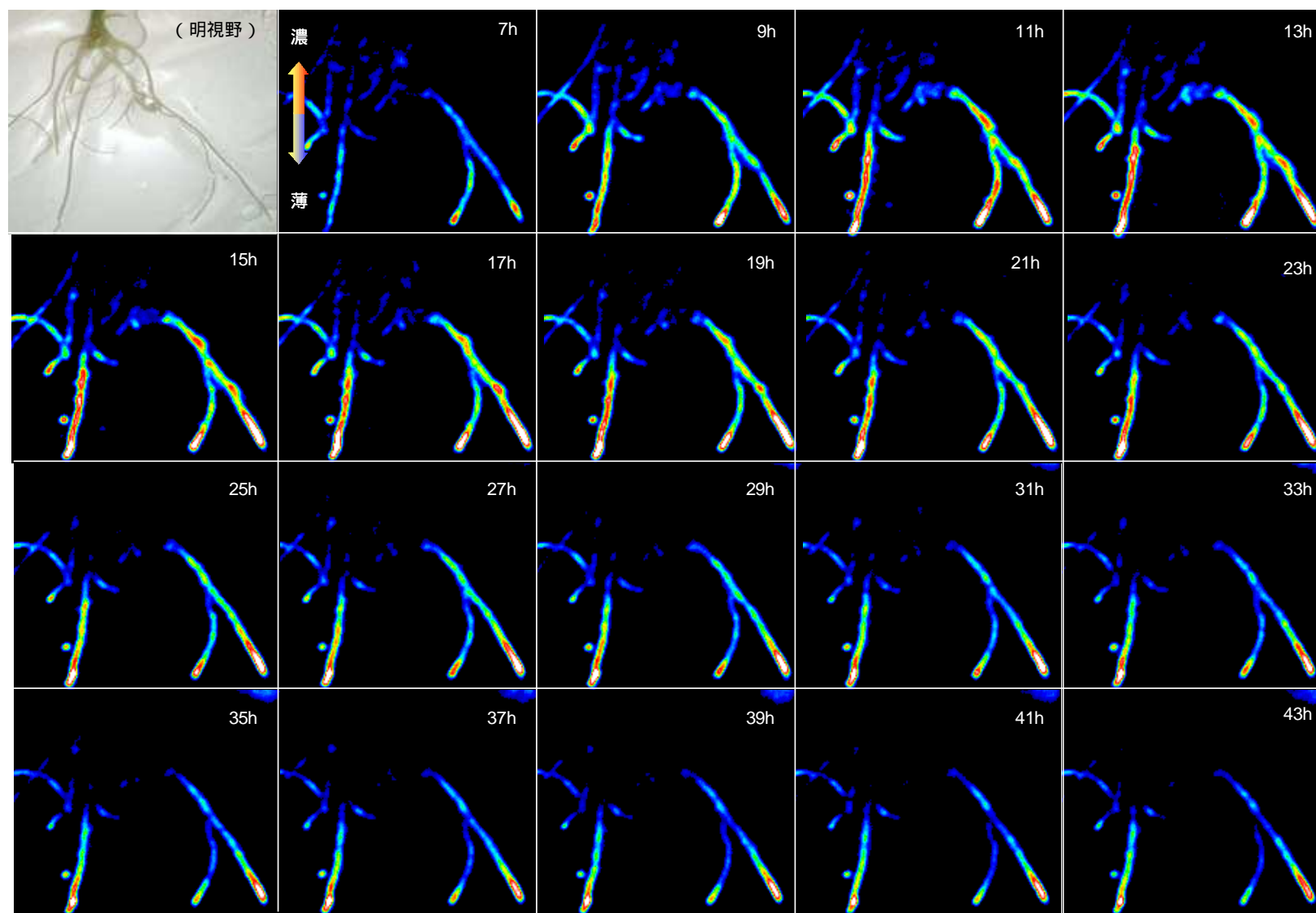


図 4-4-4 吸収後 7～43 時間のイネ幼植物(ワセリン塗布無)の ^{14}C -グルタミンのリアルタイム画像(2 時間ごとの画像を掲載)

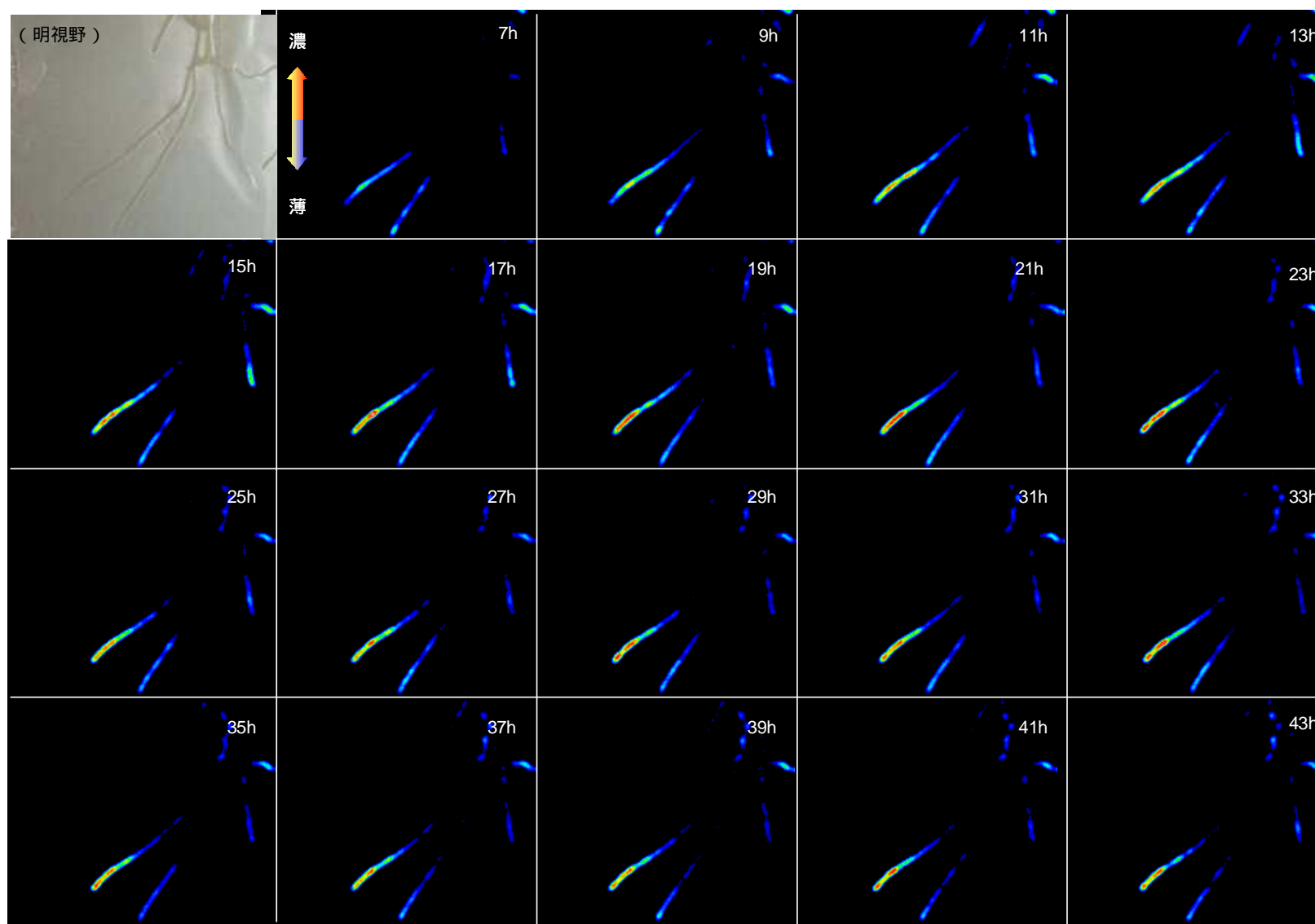
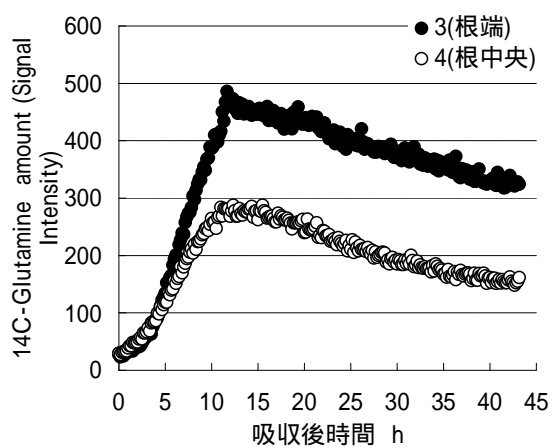
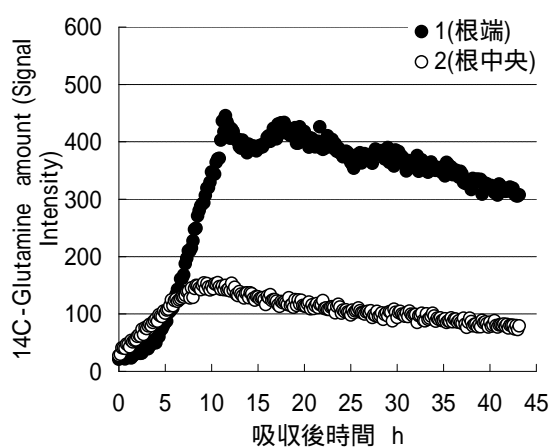
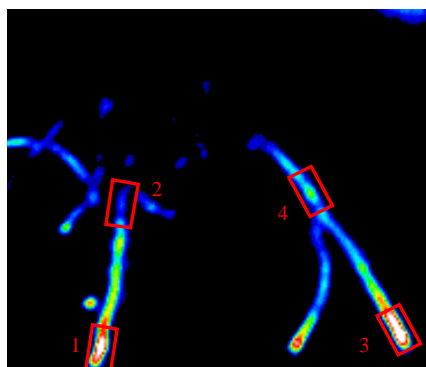


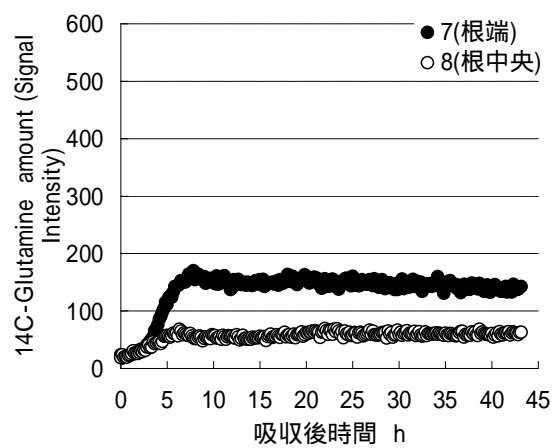
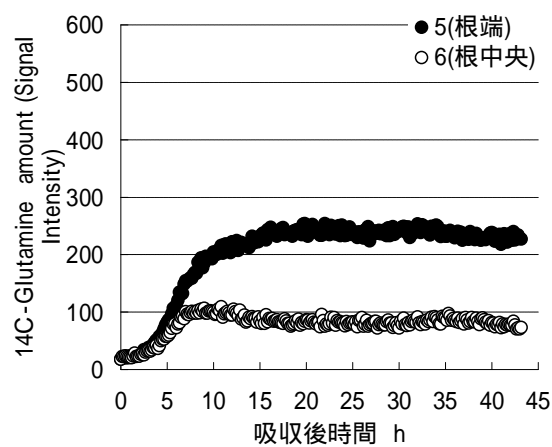
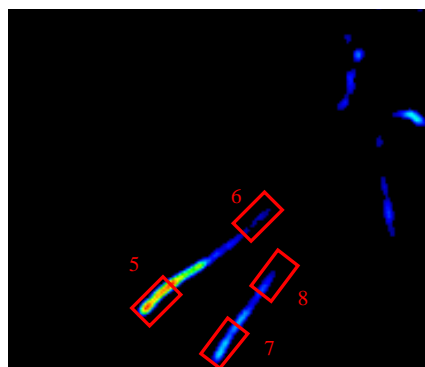
図 4-4-5 吸収後 7～43 時間のイネ幼植物(ワセリン塗布有)の ^{14}C -グルタミンのリアルタイム画像(2 時間ごとの画像を掲載)

ワセリン塗布無イネ幼植物根



ワセリン塗布無

ワセリン塗布有・イネ幼植物根



ワセリン塗布有

図 4-4-6 ^{14}C -グルタミンを吸収させたワセリン塗布有無イネ幼植物の根端と根中央部の輝度値

(1,3;ワセリン無・根端、2,4;ワセリン無・根中央、5,7;ワセリン有・根端、6,8;ワセリン有・根中央)

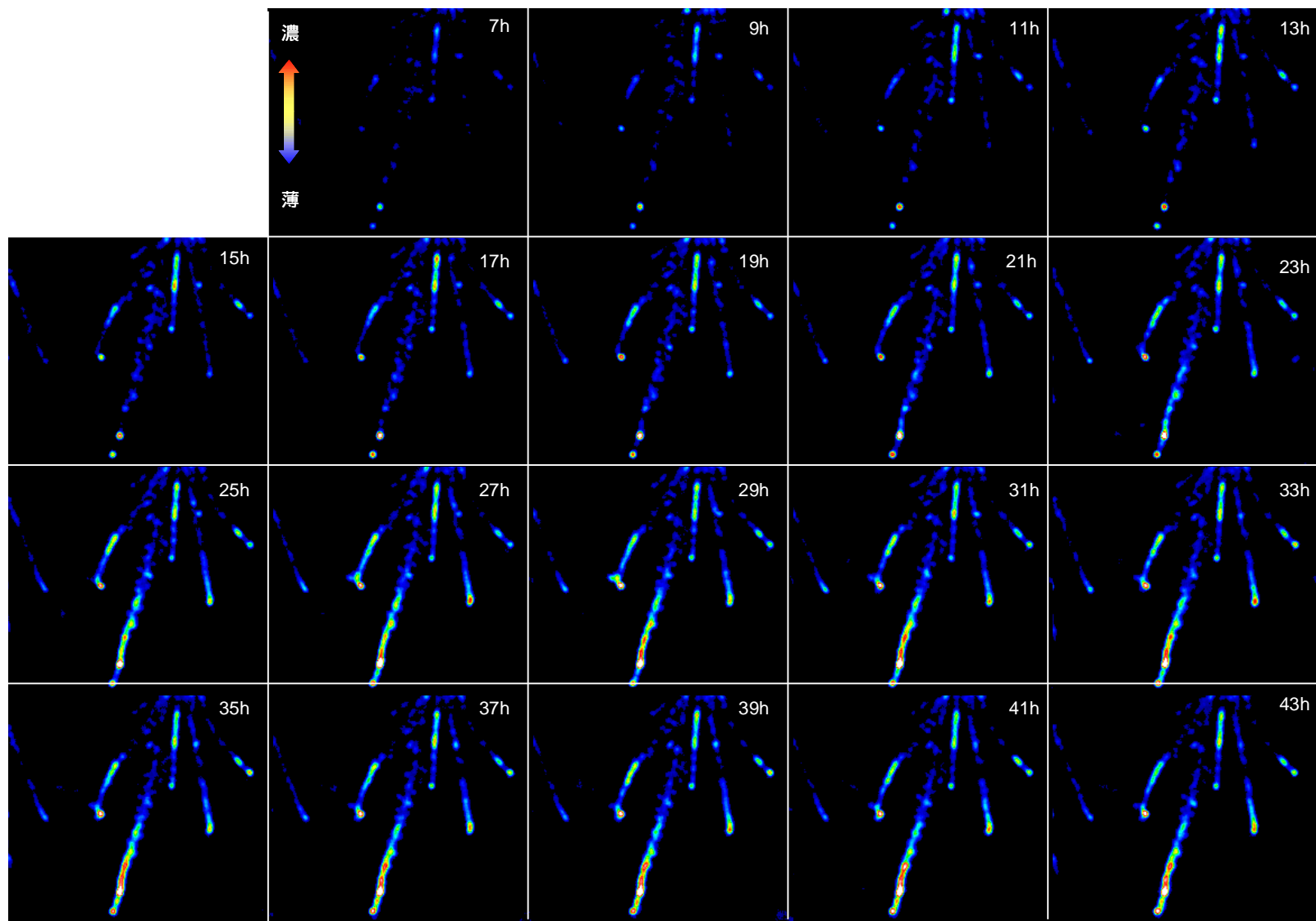


図 4-4-7 吸収後 7 ～ 43 時間のイネ幼植物の ^{14}C -アラニンのリアルタイム画像 (2 時間ごとの画像を掲載)

第五節 アミノ酸の吸収速度

1) 目的

植物の生育に必要な必須元素は 17 種類であるが、炭素と酸素を除きそのほとんどが根から吸収される。窒素は植物が根から吸収する養分の中でも最も重要な栄養素の一つであり、これまでに、硝酸やアンモニアの吸収に関しては数多くの研究がなされてきた。その結果、硝酸イオンとアンモニアイオンには、低濃度な環境からでも積極的に吸収できるそれぞれ独立したトランスポーターが存在していることが明らかとなっている (Crawford et al. 1998, von Wiren et al. 2000)。硝酸トランスポーター (NRT) には、低濃度 (<0.5 mM) の硝酸イオンを取り込む高親和性輸送系と、高濃度 (>0.5 mM) の取り込みに働く低親和性輸送系が存在している (池田ら 2000)。アンモニウムイオンの吸収も硝酸イオンと同じようにアンモニウムトランスポーターの存在が知られている (斎木 2002)。アンモニウムイオンの培地濃度が 1 mM 以下では高親和性輸送系に基づいたミカエリス・メンテン型の吸収曲線を示し、1 mM 以上では、濃度に依存して直線的に吸収量が上昇する (末吉 2003) ことが明らかにされている。

また、アミノ酸については、根や葉で合成されたアミノ酸が維管束を通して輸送され、窒素同化を行わない他の器官はアミノ酸を積極的に取り込むことが明らかにされている。それぞれの器官、組織にはアミノ酸の運搬に関わるトランスポーターが存在し、基質特異性や組織分布が明らかとなっている (Fischer 1998, 柿沼 2003)。近年、*Arabidopsis* の根において溶液からのアミノ酸吸収に関わっていると思われるトランスポーター (Lysine Histidine Transporter : LHT1) についての報告もあった (Hirner et al. 2006, Svennerstam et al. 2007)。

アミノ酸吸収にトランスポーターが関与していることを示す重要な証拠の一つが基質のアミノ酸濃度と吸収速度との関係がミカエリス・メンテン式の酵素反応式で示されることである。同式の定数 K_m (ミカエリス定数) および V_{max} (最大吸収速度) は植物根の細胞膜の最適濃度および最大吸収速度というアミノ酸吸収能を表現しており、これらをパラメーターとして植物のアミノ酸吸収能を評価することができる。これまでに、アミノ酸吸収に関する K_m 値は、牧草 (Kielland 1994)、オオムギ (Soldal 1978, Jamtgard et al. 2008) で測定が行われている。

イネ幼植物根のアミノ酸吸収もトランスポーターを含めた吸収システムが介していると考えられ、本節にはイネ幼植物のアミノ酸吸収特性としてグルタミンの K_m 、 V_{max} の測定を試みた。

2) 材料と方法

供試作物はイネ (*Oryza sativa* L. 日本晴) を用いた。第一節と同様に、種子滅菌後、発芽した種子を無窒素条件で 6 日間無菌的に水耕栽培した。7 日目に、無窒素改変木村氏 B 25 ml に U- ^{14}C -グルタミン (2.5 kBq/ml , $^{14}\text{CO}(\text{NH}_2)^{14}\text{CH}_2^{14}\text{CH}_2^{14}\text{CH}(\text{NH}_2)^{14}\text{COOH}$) で標識した窒素濃度 0.15、10、25、50、100、250、500 μM (アミノ酸濃度 0.075、5、12.5、25、50、125、250 μM) のグルタミン溶液に入れ替えた。数時間 (試験開始初期は 30 分) 毎に 24 時間後まで溶液を 50 μl 採取し、シンチレーションカクテル (MicroScint-40TM, パーキンエルマー) を 150 μl 添加後よく攪拌して、マイクロプレートシンチレーションカウンタ (1450 MicroBeta Trilux, パーキンエルマー) で溶液中の ^{14}C を測定した。実験は 4 連で測定は 2 連で行った。試験期間中の蒸散による溶液減少に伴う濃縮を計算により補正し、溶液中のグルタミンの正確な減少量を算出した。吸収試験終了 (24 時間) 後、イネ幼植物を洗浄して新鮮重を測定し、植物当たりの吸収量 ($\mu\text{mol/g}$) を算出した。吸収時間と吸収量の関係から吸収速度 ($\mu\text{mol/g/h}$) を求め、それと初期溶液濃度との関係をミカエリス・メンテン式、

$$v/V_{\text{max}} = [S] / ([S] + K_m)$$

により解析するため、Hanes-Woolf 式、

$$[S] / V = [S] / V_{\text{max}} + K_m / V_{\text{max}}$$

を用いて、 K_m と V_{max} を算出した。なお、 v は吸収速度 ($\mu\text{mol/g/h}$)、 $[S]$ は初期溶液濃度 (μM)、 V_{max} は最大吸収速度 ($\mu\text{mol/g/h}$)、 K_m はミカエリス定数 (μM)、 V_{max} に達する半分の濃度) である。

3) 結果と考察

K_m 、 V_{max} 値

溶液中の ^{14}C を測定してグルタミンの減少率を図 4-5-1 に示した。 ^{14}C -グルタミンの量は濃度によらず一定としたため、窒素濃度が薄いほど ^{14}C -グルタミンの減少率は早かった。

減少した ^{14}C -グルタミン量を植物の吸収量とし、吸収時間と植物個体当たりの吸収量を図 4-5-2 に示した。吸収時間の経過に伴い直線的に吸収量は増加し等速となった。直線の傾きから吸収速度を求めた。

図 4-5-3 に溶液濃度と吸収速度の関係を示した。溶液濃度が高くなると吸収速度は直線的には増加せず、飽和傾向がみられた。溶液濃度と吸収速度から Hanes-Woolf 式を用いて、 K_m と V_{max} を算出した。その結果、グルタミンの K_m は $199.7 \mu\text{mol}$ 、 V_{max} は $2.9 \mu\text{mol/g/h}$ であった。

グルタミンと同様に、アラニンの K_m と V_{max} を求めた (図 4-5-4)。その結果、 K_m は

54.0 μmol 、 V_{max} は 1.2 $\mu\text{mol/g/h}$ であった。

考察

通常、土壌中のアミノ酸濃度は、数十 μM (Kielland 1994, Jamtgard et al. 2008)であり、有機質肥料を施用した場合にはさらにアミノ酸濃度が上がるものと考えられる。堆肥や稲わら連用圃場では、化学肥料のみの圃場より 1.3～1.6 倍多くの遊離アミノ酸が存在するとする報告(佐藤 1985)もある。本試験で、10 μM 以下の濃度においてもグルタミンを吸収していることから、実際に土壌中のアミノ酸も吸収していることが推察される。

イネのアンモニウムイオン吸収に関するこれまでの報告では、本試験と同様な条件ではないが、窒素条件を変えて 3 週間生育した場合、 K_m は 32.2～188.1 μmol 、 V_{max} は 3.4～12.8 $\mu\text{mol/g/h}$ (Wang et al. 1993)であり、窒素濃度 200 μM で 4 週間生育した $K_m=75 \mu\text{M}$ 、 $V_{\text{max}}=216 \mu\text{mol/g root /h}$ (Youngdahl et al. 1982)などがある。また、アミノ酸吸収に関しては、生きた植物のインタクトな根では、1 mM の窒素条件で 20 日間生育したオオムギ K_m が 33.2 μM 、 V_{max} が 10.2 $\mu\text{mol/g root /h}$ (Jamtgard et al. 2008)であることを報告している。酵母での試験では、プロリンの K_m が 10 μM 、グルタミン酸は 13 μM 、ヒスチジンは 362.3 μM である(Hirner et al. 2006)。今回の試験とこれまでの報告から、生育条件によって吸収特性は変わるものと考えられるが、イネ根のグルタミンの吸収はアンモニアイオンやアラニンより K_m がやや高め、 V_{max} がやや低めであることが予想された。

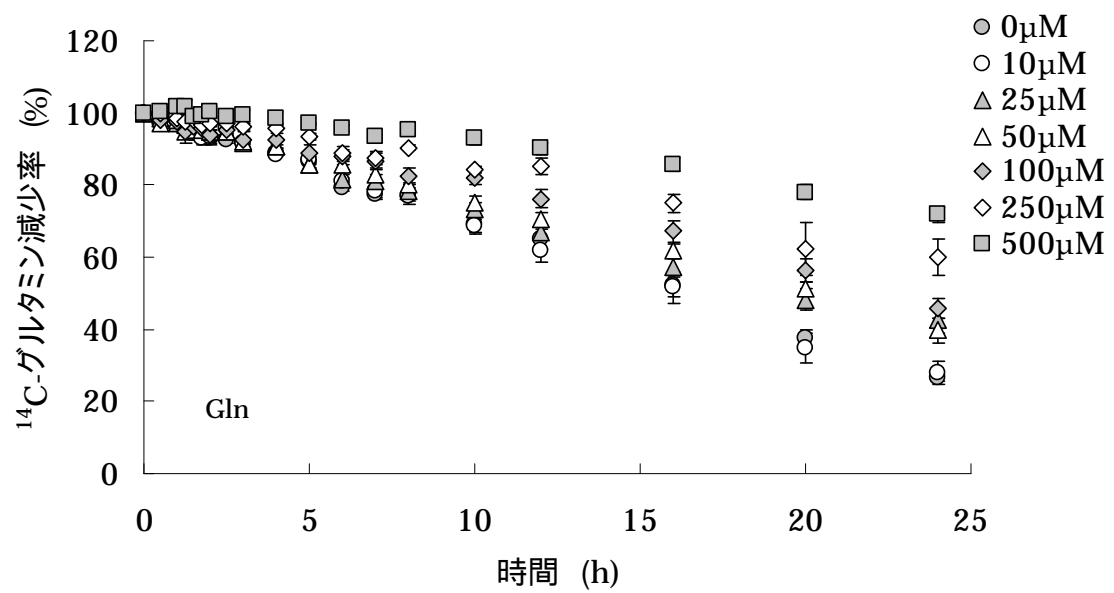


図 4-5-1 イネ幼植物の濃度別グルタミン溶液の ^{14}C -グルタミン減少率
(試験開始時を 100 とする)

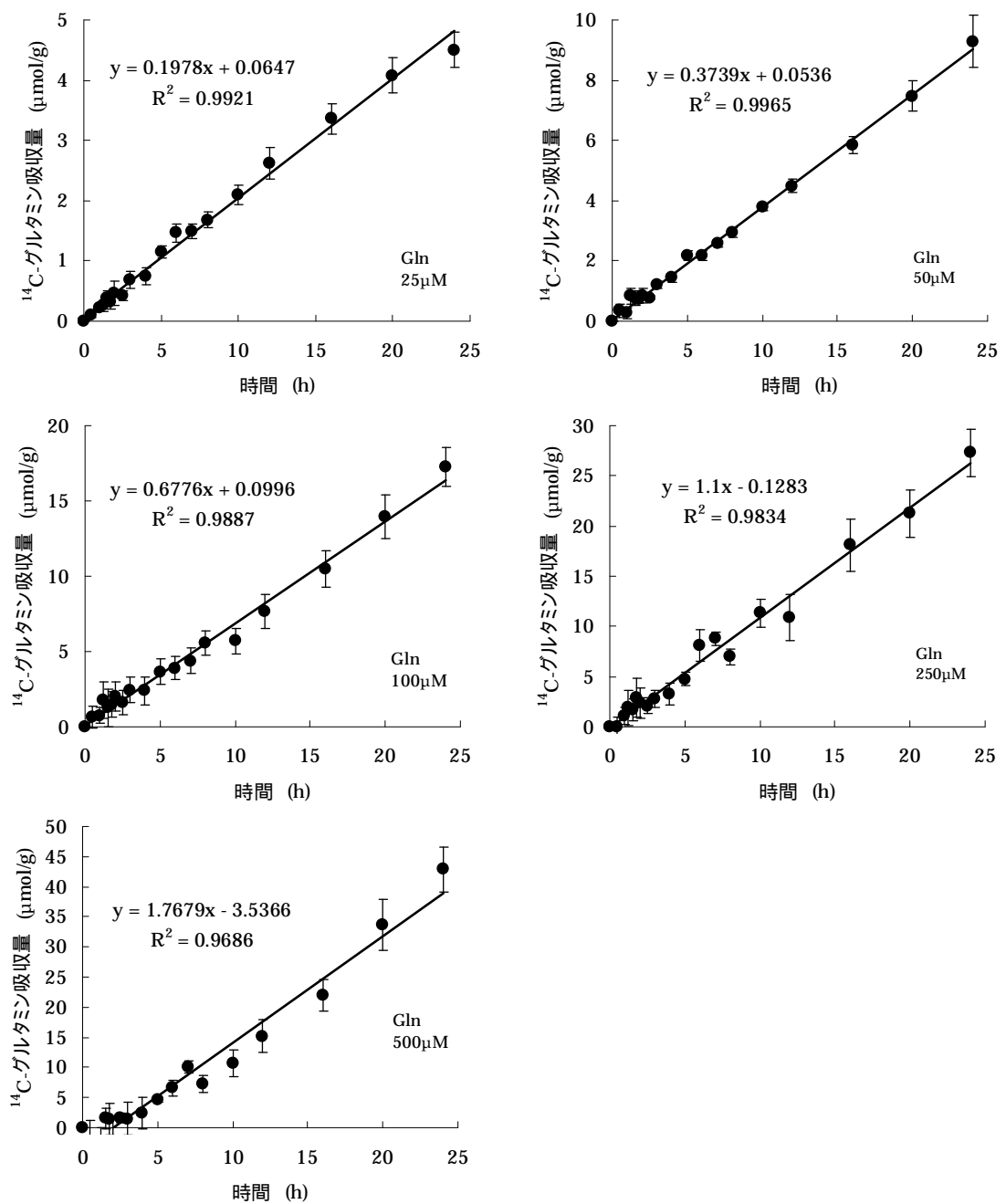


図 4-5-2 イネ幼植物のグルタミン溶液濃度別の吸収量

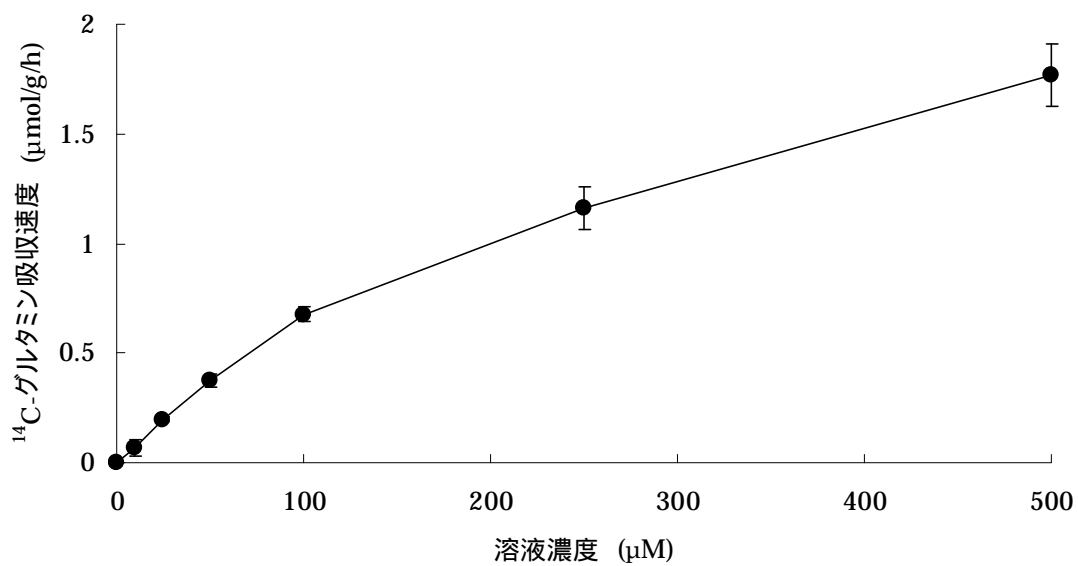


図 4-5-3 イネ幼植物のグルタミン溶液濃度と吸収速度

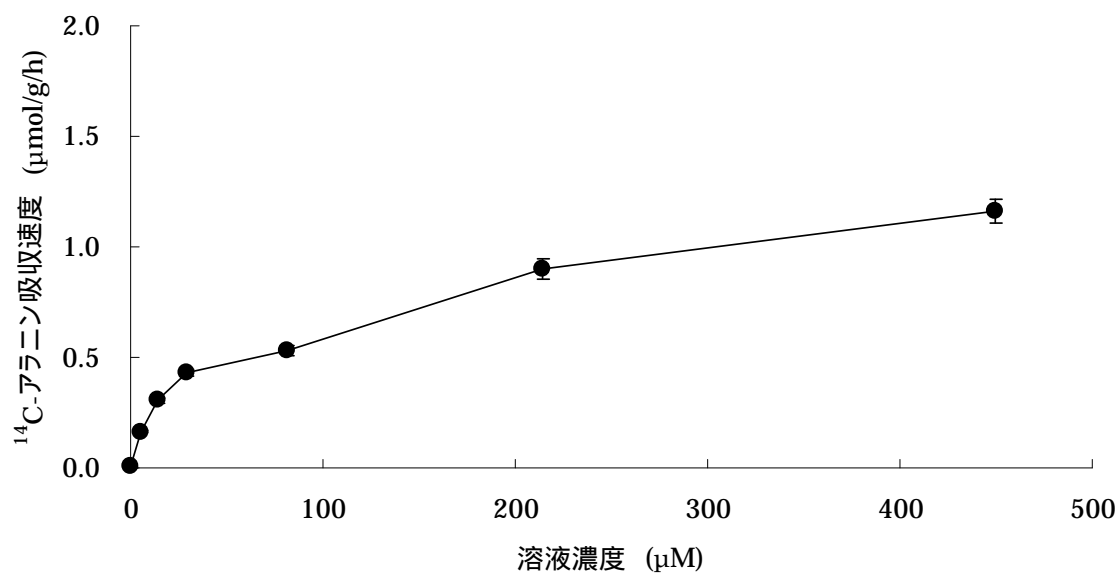


図 4-5-4 イネ幼植物のアラニン溶液濃度と吸収速度

第六節 窒素環境の違いがアミノ酸吸収に及ぼす影響

1) 目的

植物は養分を獲得するために様々な機構を働かせている。生育環境の違いで、トランスポーターの発現が変わることも、植物の重要な生き残りの戦略である。硝酸の高親和性輸送系は、植物根の初期吸収速度はミカエリス・メンテン型の曲線を示す。その中でも、恒常的に発現しているか、もしくは硝酸イオンの濃度によって発現が誘導されるかなど、さらにいくつかのタイプに分類され、それぞれの発現が環境条件に合わせて制御されている(末吉 2003)。一般に同じ高親和型でも、誘導的に発現するものの方が、硝酸イオンの輸送速度が速く(榊原ら 2002)、イネのアンモニウムトランスポーターと考えられる *OsAMT1;2* は、硫酸アンモニウム添加後 30 分後に発現し始め、60 分から 120 分後でさらに発現量の増加が認められたとの報告(斎木ら 2002)もある。

アミノ酸吸収に関しても、生育させる環境条件の違いがアミノ酸の吸収機構の発現に影響を及ぼすことが考えられる。本節では、生育条件として、窒素形態(アンモニアとグルタミンと無窒素)を変えて生育したイネ幼植物の、グルタミン吸収能力の違いについて実験を行った。

2) 材料と方法

供試作物はイネ(*Oryza sativa* L. 日本晴)を用いた。第一節と同様に、種子滅菌後、発芽した種子を異なる窒素環境で生育して、グルタミン吸収試験に用いた(表 4-6-1)。具体的には、窒素濃度 100 μ M のアンモニアとグルタミン、および対照区として、無窒素条件で 6 日間無菌水耕生育した。7 日目に、無窒素改変木村氏 B 液 25 ml に U- 14 C-グルタミン(2.5 kBq/ml, $^{14}\text{CO}(\text{NH}_2)^{14}\text{CH}_2^{14}\text{CH}_2^{14}\text{CH}(\text{NH}_2)^{14}\text{COOH}$)を含んだ窒素濃度 0.15、25、50、100、250 μ M(アミノ酸濃度 0.075、12.5、25、50、125 μ M)のグルタミン各溶液への交換を行った。無窒素で生育したイネに関しては 25、100 μ M のみの試験とした。数時間(試験開始初期は 30 分)毎に 16 時間後まで溶液を 50 μ l 採取し、シンチレーションカクテル(MicroScint-40TM, パーキンエルマー)を 150 μ l 添加後、マイクロプレートシンチレーションカウンタ(1450 MicroBeta Trilux, パーキンエルマー)で溶液中の 14 C を測定してアミノ酸の減少率を算出した。なお、試験期間中の蒸散による溶液減少に伴う濃縮は計算により補正した。吸収試験終了(24 時間)後、イネ幼植物の根を水で洗浄して、地上部と地下部の新鮮重を測定した。 14 C の減少量から植物当たりの吸収量を算出した。

3) 結果と考察

溶液中の ^{14}C を測定してグルタミンの減少率を図 4-6-1 に示した。また、減少した ^{14}C -グルタミン量を植物の吸収量とし、吸収時間と植物個体当たりの吸収量を図 4-6-2 に示した。減少率、吸収量とも、生育時の窒素環境の違いによる差は見られなかった。よって、本試験で供試した濃度でグルタミン吸収を行っている吸収システムは、窒素欠乏あるいはグルタミン存在下で発現するタイプではなく、常時発現していることが推察された。

表 4-6-1 第四節の試験区設定

生育時窒素環境		吸収試験	
窒素形態	窒素濃度 (μM)	窒素形態	窒素濃度 (μM)
Gln	100	Gln	0.15
			25
			50
			100
			250
NH ₄ ⁺	100	Gln	0.15
			25
			50
			100
			250
無N		Gln	25
			100

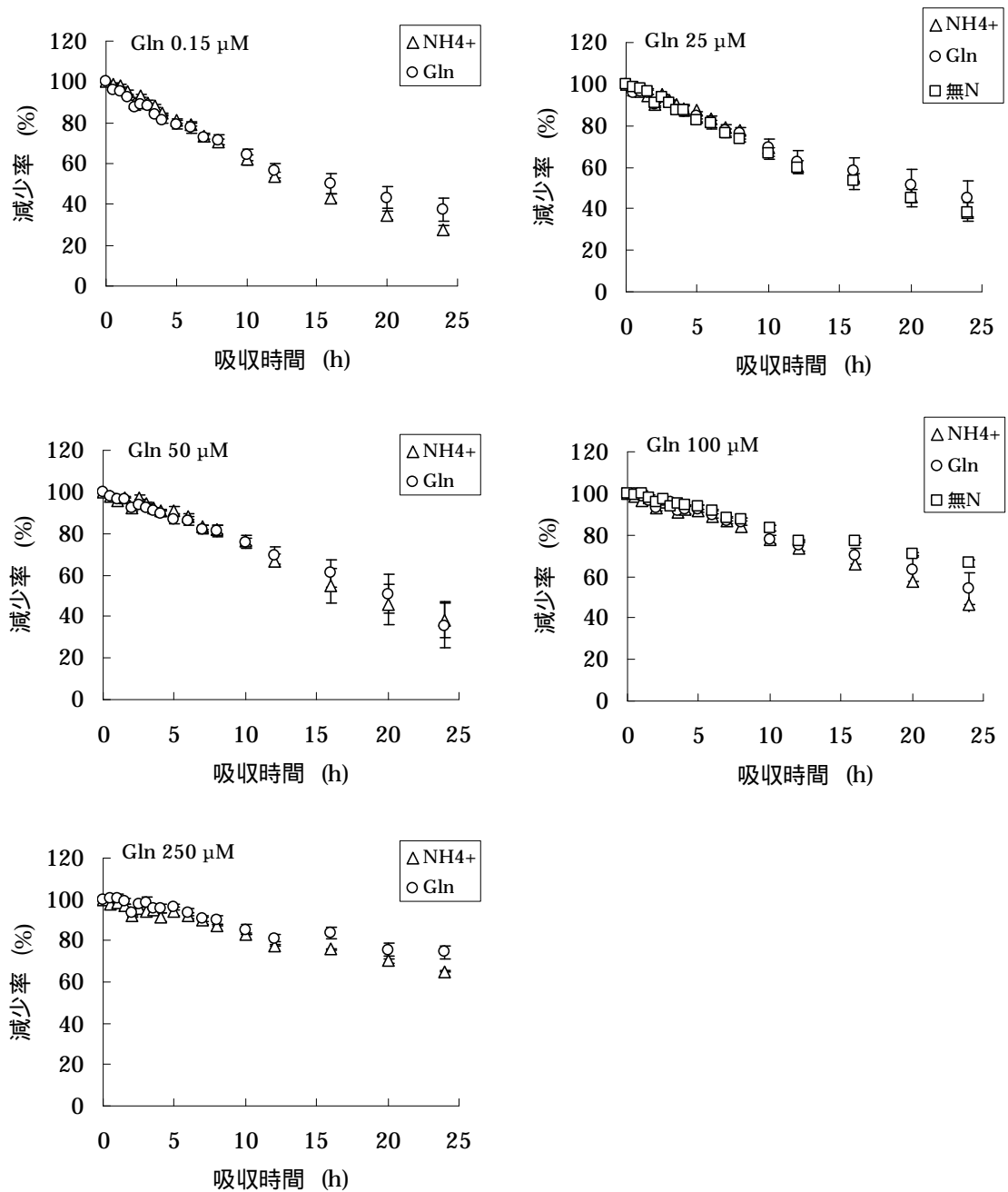


図 4-6-1 異なる窒素環境で生育したイネ幼植物の濃度別グルタミン溶液の ^{14}C -グルタミン減少率
(試験開始時を 100 とする)

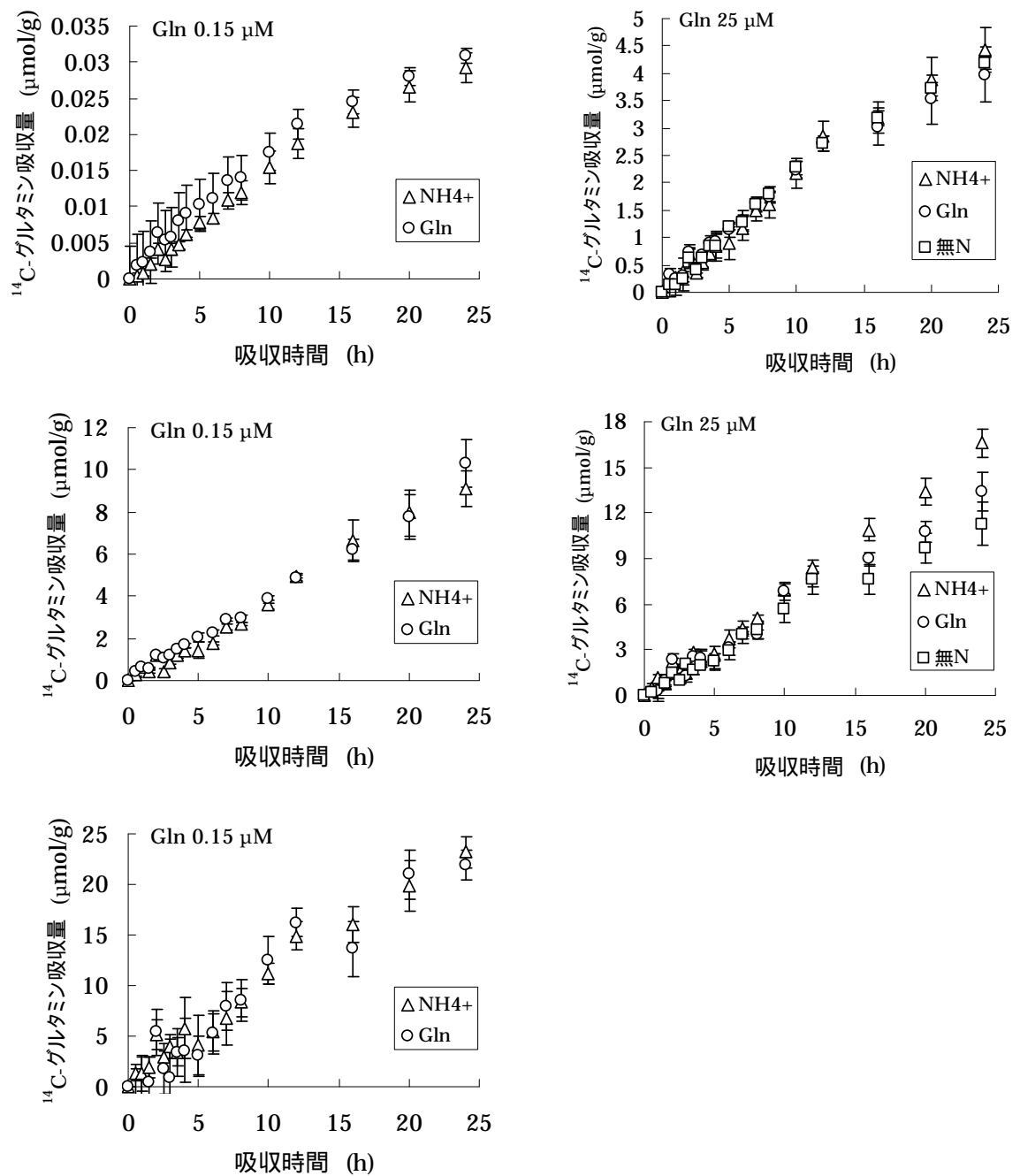


図 4-6-2 濃度別グルタミン溶液の異なる窒素環境で生育したイネ幼植物の ¹⁴C-グルタミン吸収量

第七節 まとめ

第二節では、グルタミンの直接吸収について、二重標識グルタミンを吸収させて、LC/MS により地下部と地上部の遊離アミノ酸を分析した。その結果、根および地上部から抽出した遊離アミノ酸の中に、投与した二重標識グルタミンが検出され、直接吸収が確認された。

第三、四節では、グルタミンの吸収過程をリアルタイムオートラジオグラフィシステムを用いて解析した。溶液から根へのグルタミンの移行動態をリアルタイムで画像化することに成功し、根端部分で吸収・集積が高いことを解明した。

第五節では、グルタミンの吸収速度について検討した。溶液濃度を変えて、吸収速度を測定したところ、ミカエリス・メンテン式に従う曲線となり、グルタミンの K_m は $199.7 \mu\text{mol}$ 、 V_{max} は $2.9 \mu\text{mol/g/h}$ と算出され、能動輸送であることが示唆された。

第六節では、前処理条件を異なるグルタミンの吸収を検討した。異なる窒素環境で生育したイネのグルタミン吸収には差は見られなかった。このことから、グルタミン吸収に関与する吸収システムは、窒素欠乏時に発現するタイプではなく、常時発現しているものと推察された。