

# 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成21年 博士課程 進学  
氏名 有賀 智子  
指導教官名 吉村 悦郎

## 論文題目

HPLC ポストカラム法による Fe(III)キレーター分析法の開発とその応用

### 第1章 序論

鉄 (Fe) はカタラーゼやペルオキシダーゼ、シトクローム、Fe 硫黄タンパク質など電子伝達系や呼吸に関わるタンパク質を構成する重要な元素であり、高等植物の必須元素である。Fe は地球の地殻上に多く含まれる元素の一つであるが、耕作地などの酸化的な環境では多くが水に難溶性の  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  または  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  などの形で存在している。そのため、通常の土壌 pH において Fe(III) はほとんど水に溶解せず、土壌中の可溶性 Fe の濃度は植物が正常に生育するには不十分である。そこで、高等植物は土壌中の Fe を効率的に吸収するための Fe 獲得機構を発達させてきた。この Fe 獲得機構には Fe(III)キレーター (Ferric Iron Chelator、FIC) が大きく関与している。イネ科植物は根から FIC の一種であるムギネ酸類を、非イネ科植物はフェノール性の酸を分泌し、土壌中の難溶性 Fe を可溶性に溶解して吸収する。また、高等植物体内において Fe は導管および篩管を通じて輸送されるが、導管内を満たす導管液の pH は 5.5~6.0 の弱酸性、篩管内を満たす篩管液の pH は 8.0 の弱アルカリ性であり、これらの pH における Fe(III) の溶解性は非常に低い。そこで Fe(III) の溶解性を維持するため、根からの Fe(III) の吸収だけでなく高等植物体内における Fe(III) の輸送にも FIC が関わっていると考えられている。

このように、高等植物における Fe の吸収や輸送といった Fe 栄養生理には FIC が大きく関与しており、Fe が関わる多くの生理学的機構の解明には FIC を化学的に分析する手法が必要不可欠である。しかし、従来の FIC 分析法には検出感度の低さや Fe(III) とのキレート能に対する検出の選択性の欠如などの問題点が存在していた。そこで本研究では、操作が簡便な HPLC ポストカラム法を応用して、Fe(III)キレート能を有する化合物を高感度かつ網羅的に分析できる FIC 分析法の開発を行った。また、開発した FIC 分析法を用いて実際に高等植物から採取した導管液中の FIC 分析を行った。

## 第2章 蛍光法による Fe(III)キレーターの HPLC 分析法の開発

本章では蛍光検出による HPLC ポストカラム法を応用して新規の FIC 分析法を開発した。カルセインブルー（4-methylumbelliferone-8-methyleneiminodiacetic acid、Caicein Blue、CB）は pH 4.0~11.0 において  $\lambda_{ex}=330\text{ nm}$  に対して  $\lambda_{em}=440\text{ nm}$  に強い蛍光を呈する蛍光試薬である。本章では CB が Fe(III)と錯体を形成し消光することを確認し、この性質を FIC 検出に応用した。本分析法の検出原理を図 1 に示した。本分析法で使用したポストカラム溶液は Fe(III)と結合し消光した状態の Fe(III)-CB 錯体を含む。カラムによって分離された試料中の FIC はポストカラム溶液中の Fe(III)-CB と反応コイル内で反応する。Fe(III)-CB 錯体中の Fe(III)と FIC が結合することで CB が遊離する。その際の脱消光で生じる蛍光を蛍光検出器で検出することにより FIC を検出した。

検出感度を左右すると考えられる分析条件について最適化を行った結果、実際にいくつかの既知 FIC を検出可能であった。

代表的な FIC であるクエン酸の検出限界は 72 pmol であり良好な検出感度が得られた。本分析法で検出可能だった 6 種類の FIC について Fe(III)との結合定数  $\log K_{ML}$  と、検出感度を示す数値であるピーク高さ濃度 (VM) の間の関係を求めると、両者に直線的な関係が見出された。すなわち、本分析法は Fe(III)とのキレート能に応じて FIC を選択的に検出することが可能であることから、新規な分析法が完成した。

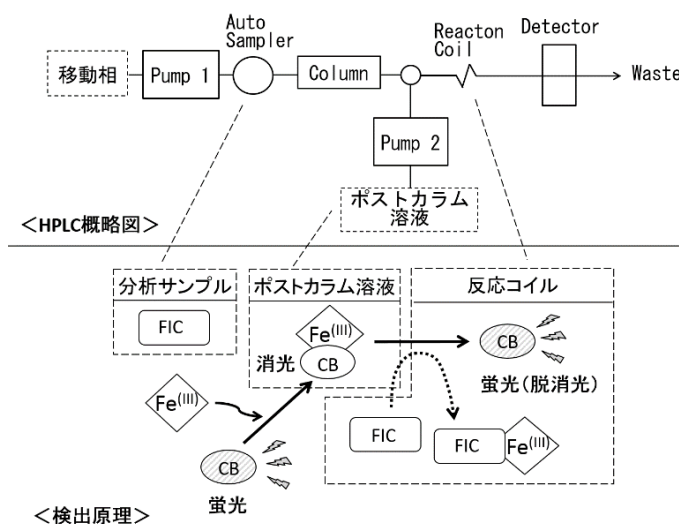


図 1. CB を用いた FIC 分析法の HPLC 概略図および検出原理

## 第3章 化学発光法による Fe(III)キレーターの HPLC 分析法の開発

本章では極高感度の FIC 分析法の開発を目指した。ルミノール（5-amino-2,3-dihydro-phthalazine-1,4-dione）は pH 9~11 のアルカリ条件において過酸化水素（ $\text{H}_2\text{O}_2$ ）等の酸化剤によって酸化され、波長 425 nm に強い化学発光を生じる。ルミノールの酸化反応は、共存する遷移金属イオンやその錯体が酸化補助剤として働くことにより進行する。本章では Fe(III)-FIC 錯体も酸化補助剤となり得ることを確認し、化学発光検出による FIC 分析法を開発した。

本分析法では HPLC ポストカラム法を用いており、ポストカラム溶液にはルミノールと

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が含まれる。分析試料にはあらかじめ Fe(III)を加えてインキュベートし、試料中の FIC を Fe(III)-FIC 錯体としておく。Fe(III)-FIC はゲルろ過カラムで分離され、そののち反応コイル内でポストカラム溶液と反応する。Fe(III)-FIC の共存下でルミノールが酸化されることによって生じる化学発光を化学発光検出器で検出した。本研究では植物由来の生体試料中の FIC 分析を最終的な目的としていたため、分離には植物体内における生理的な pH に近い、pH 5.5 および pH 8.0 の移動相を用いた。

以上の分析システムで Fe(III)-FIC 錯体を分析した結果、Fe(III)-EDTA の検出感度が顕著に高かった。そこで、ポストカラム溶液に EDTA を加えサンプル中の Fe(III)-FIC 錯体のうち FIC を EDTA で配位子交換し (図 2①) Fe(III)-EDTA を検出することで (図 2②)、Fe(III)-FIC を高感度に検出する検出原理を着想した。ポストカラム溶液に EDTA を添加した結果、EDTA を添加しない場合

と比較して Fe(III)-Cit の検出感度 (V/M) は 3 桁向上した。Fe(III)-FIC の検出限界を求めると、Fe(III)-EDTA では 0.25 pmol、Fe(III)-Cit では 2.3 pmol、植物由来の代表的な FIC であるニコチアナミン-Fe(III)錯体では 1.1 pmol であった。従来法の検出限界は EDTA が 1.71 pmol、クエン酸が 210 pmol、ニコチアナミンが 50 pmol であることを踏まえると、検出限界は最大で 2 桁向上しており本分析法は世界一高感度な FIC 分析法である。

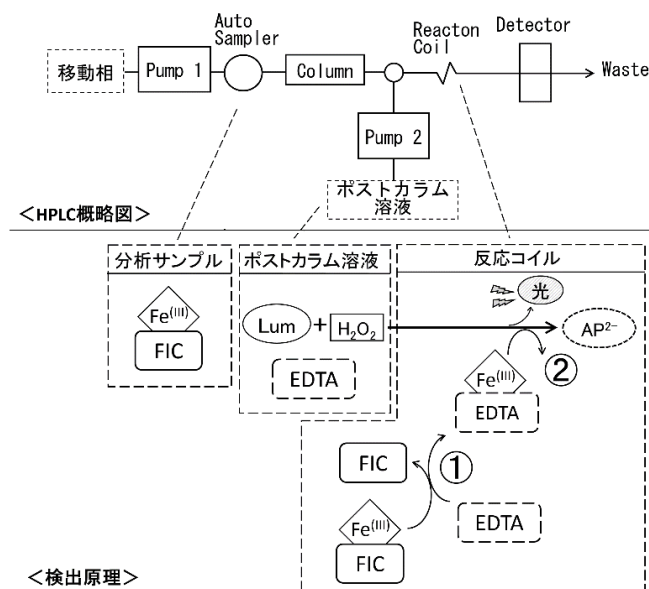


図 2. ルミノールを用いた FIC 分析法の HPLC 概略図および検出原理

#### 第 4 章 植物サンプル中の Fe(III)キレーター分析

本章では高等植物の Fe 獲得機構の違いに着目して、Strategy-II で Fe を吸収するイネ科植物 (オオムギ、ヒエ) と Strategy-I で吸収する非イネ科植物 (アマランサス、ハウレンソウ) のそれぞれから導管液を採取し、第 3 章で開発した FIC 分析法を用いて導管液中の FIC 分析を行った。クロマトグラム上にはいくつかの Fe(III)-FIC 由来のピークを検出した。これらのピークのうち全ての植物種で共通していたピーク (P<sub>25</sub>) に相当する画分を分取し、ESI-TOF-MS 分析に供した。その結果、オオムギおよびアマランサス導管液の画分から Fe<sub>3</sub>-Cit<sub>3</sub> 錯体 (*m/z* 366.46) を検出した。P<sub>25</sub> はイネ科植物導管液では主要なピークではなかった一方で、非イネ科植物では主要なピークであったことから、Fe<sub>3</sub>-Cit<sub>3</sub> は非イネ科植物導管液中の主要な Fe の化学形態であることが明らかになった。また、オオムギ導

管液にのみ現れたピーク (P<sub>32</sub>) のフラクションを分取して ESI-TOF-MS 分析を行ったところ、デオキシムギネ酸 (DMA、*m/z* 305.13) を検出した。P<sub>32</sub> は Fe 充足オオムギから採取した導管液においては主要なピークではなかったが、Fe 欠乏オオムギから採取した導管液では全体の 18% を占める主要なピークであったことから、DMA は特に Fe 欠乏状態においてオオムギ導管液中の主要な FIC として機能していることを明らかにした。また、P<sub>25</sub> 以外の 2 つのピーク P<sub>27</sub>、P<sub>30</sub> も Fe-Cit 錯体のピークではないかと推測され、P<sub>25</sub>、P<sub>27</sub>、P<sub>30</sub> に溶出する Fe は全てが結合比率の異なる Fe-Cit であると考えられた。これら 3 つのピークのピーク強度の合計が全体に占める割合を求めると、今回分析した全ての植物種で 80~98% に達したことから、イネ科、非イネ科を問わず Fe-Cit が導管液中の主な Fe の化学形態であることが示唆された。

## 第 5 章 総合考察

本研究では FIC の機能の側面に着目して、新規の検出原理に基づき Fe(III)キレート能に応じた高感度な FIC 分析法を開発した。本分析法では対象物質の分離と、検出器による検出を一度に行うことのできる HPLC ポストカラム法を用いており、これまで一斉分析が難しかった試料中の FIC の分析を可能にした。この分析法を高等植物由来の生体試料に応用することにより、根からの Fe の吸収、導管・篩管を通した Fe の輸送、器官・組織間での Fe の再分配など、高等植物の Fe 栄養生理の各側面に関わる FIC の包括的な分析が可能になる。今後このような分析が進み Fe 栄養生理の仕組みが詳細に解明されれば、将来的には Fe 欠乏耐性の高い植物の開発や、ひいては不良土壌における農業の安定化につながることを期待される。

さらに、第 4 章では第 3 章で開発した FIC 分析法を用いて高等植物導管液の分析を行い、非イネ科植物導管液中の主要な Fe の化学形態は Fe<sub>3</sub>-Cit<sub>3</sub> 錯体であることを示した。また、DMA は Fe 欠乏オオムギ導管液中の主要な FIC として機能しており、Fe 欠乏状態において Fe の効率的な輸送に DMA が寄与していることを示唆した。

以上の成果は、植物栄養や植物生理の分野の今後の研究の進展にも繋がる重要な成果である。

## 発表論文

- 1) Ariga, T., Hazama, K., Yanagisawa, S., Yoneyama, T. (2014) Chemical forms of iron in xylem sap from graminaceous and non-graminaceous plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* **60**: 460-469.
- 2) Ariga, T., Ito, K., Imura, Y., Yoshimura, E. (2015) High-performance liquid chromatography method for ferric iron chelators using a post-column reaction with Calcein Blue. *J. Chromatogr. B* **985**: 48-53.