

植物必須微量元素ホウ素の植物体内化学形態と  
動態・機能に関する分析化学的研究

櫻 永 俊 樹

①

植物必須微量元素ホウ素の  
植物体内化学形態と動態・機能に関する  
分析化学的研究

松永 俊朗

## 目次

第1章 序論	1
第2章 植物体中の水溶性ホウ素	
第1節 植物組織の <i>in vivo</i> $^{11}\text{B}$ NMR	7
第2節 ダイコン根ジュースのHPLC/ICP-MS	19
第3節 コマツナ組織の <i>in vivo</i> $^{11}\text{B}$ NMR	27
第3章 植物細胞壁中の水不溶性ホウ素	
第1節 植物細胞壁からのホウ素-多糖複合体の単離	35
第2節 ホウ素-多糖複合体の構造	40
第3節 dRGII-Bと金属	50
第4節 HPLC/ICP-AESによるdRGII-B中BとCaの定量	57
第5節 dRGII-Bと結合している金属の特性	66
第6節 HPLC/ICP-MSによる植物細胞壁中dRGII-Bの検出	71
第4章 総合考察	85
第5章 要約	105
謝辞	109
文献	110

## 第1章 序論

本章では、序論として以下の事項について述べる。

- ・ホウ素の植物必須性
- ・元素の化学形態と動態・機能
- ・ホウ酸の化学
- ・状態分析法
- ・本研究の目的

### 1. ホウ素の植物必須性

現在、植物の必須微量元素(植物の乾物中およそ0.01%以下のもの)として、鉄・マンガン・亜鉛・銅・ホウ素・モリブデン・塩素の7元素が認められている。その中で、ホウ素が高等植物の必須微量元素であることは、70年以上前の1923年に明らかにされた。ホウ素の必須性は、被子植物(単子葉植物と双子葉植物)、裸子植物、シダ植物という維管束植物と一部の珪藻で認められているが、細菌、糸状菌、藻類では認められていない(Loomis and Durst, 1992; Shelp, 1993)。動物については、ホウ素が生育に有用であることを示す証拠は得られているものの、必須性までは認められていない(Nielsen, 1997)。

必須微量元素の中で、作物生産場面で養分欠乏が最もよく起きるのがホウ素である(Gupta, 1979)。そのため肥料として施用されることも多く、我が国の肥料取締法で、公定規格が定められている必須微量元素肥料は、「ほう素質肥料」と「マンガン質肥料」の二つしかない。ホウ素が欠乏すると、根や葉の伸長部位の生育が阻害される(図1-1)。では、ホウ素は植物体内でどのような機構で動いたり、働いたりしているのだろうか。ホウ素の動態や機能が明らかになれば、

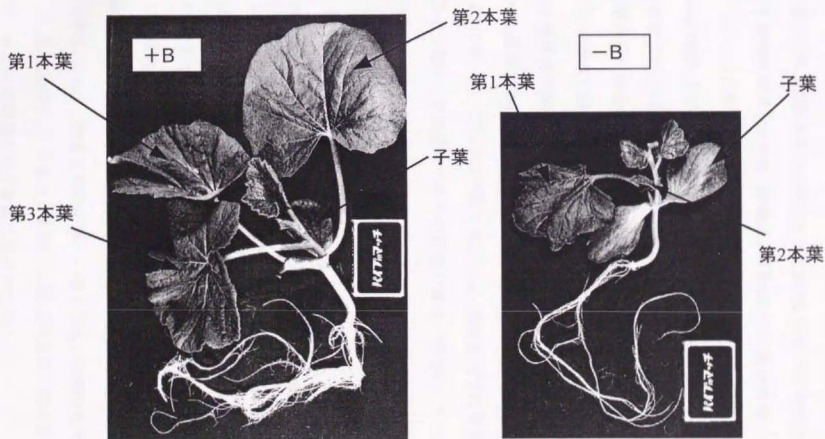


図1-1 カボチャのホウ素欠乏症状

発芽後、ホウ素50mMを含むHoagland培地で2週間水耕栽培後、さらに、+Bはホウ素50mMを含むHoagland培地で、-Bはホウ素無添加のHoagland培地で1週間水耕栽培した。

より確実な施肥法、栄養診断法などの農業技術開発に結びつくはずである。しかしながら、これまで植物におけるホウ素の動態や機能については、不明な点が多かった。植物体内でのホウ素の役割としては、ホウ素欠乏植物の症状観察や成分分析結果などから、糖輸送、細胞壁合成・構造維持、炭水化物・RNA・フェノール代謝、および膜機能への関与などが提案されてきた(Loomis and Durst, 1992)。しかし、これらがホウ素の植物体内での真の一次的な(primary)役割なのか、あるいは、ホウ素の一次的役割が阻害されたことから起きた二次的現象を一次的役割と見誤っているのかは判然としなかった。すなわち、これまで、ホウ素の機能を直接的に示す証拠は提出されてこなかったと言える。他の必須微量元素については、例えば亜鉛や銅では、それらが活性中心に配位した金属酵素の存在が見出されたことで、それら金属の生体内機能が理解されるようになった。ところがホウ素に関しては、植物体内での化学形態が知られておらず、そのため分子レベルでの動態や機能が明らかにされていなかったのである。

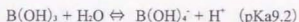
## 2. 元素の化学形態と動態・機能

多くの必須微量元素は、生体内で有機化合物との結合体として存在し機能していることが知られている。例えば、亜鉛や銅は動植物中の多くの金属酵素の活性中心に配位し、酵素活性を賦与している。動物の必須微量元素であるコバルトはビタミン B<sub>12</sub> の構成元素である。また、毒性を示す微量元素では、その存在化学種によって毒性に大きな違いがある。例えば、ヒ素の毒性は、亜ヒ酸 > ヒ酸 > モノメチルアルソン酸 > ジメチルアルシン酸 > アルセノベタインの順である。さらに、微量元素の生体への吸収性も、元素の化学形態により異なっている。このように、元素の生体内での動態や機能を考える上で、その存在状態、特に化学形態を知る意義は極めて大きい。

元素の存在状態を知るための分析を特に状態分析 (elemental speciation) という。微量元素の研究では、試料中の元素の全量を求める全分析が依然として良く行われてはいるものの、その一方で、状態分析の重要性は一層増加しつつある (Cornelis and Kimpe, 1994)。

### 3. ホウ酸の化学

自然界に存在するホウ素は、ほとんどがホウ酸塩鉱物である。水溶液中ではホウ酸  $B(OH)_3$  とホウ酸陰イオン  $B(OH)_4^-$  との間で、



という平衡関係がある。 $B(OH)_3$  は平面三角形構造、 $B(OH)_4^-$  は正四面体構造をとる。土壌溶液や植物体内の pH は通常は中性から弱酸性であるから、そこでは上の平衡は左に片寄り、遊離のホウ酸は、ほとんどが電気的に中性なホウ酸として存在している。ホウ素以外の必須微量元素は、中性から弱酸性では正または負のイオンとして存在するのに対して、ホウ素がイオン化していないホウ酸として存在することは、ホウ素の特徴の一つである。



図 1-2 ホウ酸とジヒドロキシ化合物との反応

また、図 1-2 に示すように、ホウ酸は、向きが同じで隣り合う二つの水酸基、すなわちシスジオール基を持つ化合物など (ジヒドロキシ化合物) と安定なモノ

エステル錯体(1:1)およびジエステル錯体(1:2)を形成することが知られている。これらのエステルは、マイナス1価の電荷を持つ。生体関連化合物の中では、ジヒドロキシ化合物としては、糖、糖アルコール、フェノール類、有機酸やそれらを含む多糖、核酸等がある。ホウ酸の有する、ジヒドロキシ化合物とのエステル錯体生成能は、ホウ素の生体内での動態・役割を考えるときに極めて重要な性質であると考えられる。

#### 4. 状態分析法

元素の状態分析法には色々な方法があるが、その中で有力と考えられる機器分析法に、核磁気共鳴吸収分析法(NMR)と高速液体クロマトグラフィー／誘導結合プラズマ質量分析法(HPLC/ICP-MS)がある。

##### 1)核磁気共鳴吸収分析法

NMR法は、 $^1\text{H}$ または $^{13}\text{C}$  NMRが有機化合物の構造決定に広く用いられているが、 $^1\text{H}$ または $^{13}\text{C}$ 以外の核磁気モーメントを持つ核種もNMR測定が可能であり、その場合を多核NMRという。NMR法は感度が低いという欠点があるものの、試料を非破壊で状態分析できるという特長がある。それを生かして生体を直接NMR測定することにより、生体試料中の元素の状態分析を行うのが *in vivo* NMRである。植物体の *in vivo* NMR測定は、 $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{39}\text{K}$ といった多量必須元素については応用例が多く、Lee & Ratcliffeの総説(1993)が出ている。微量元素については感度不足もあり報告がほとんどなかったが、Nagataらは、茶葉中のAlの存在形態を *in vivo*  $^{27}\text{Al}$  NMRを用いて報告している(Nagata *et al.*, 1991, 1992)。しかしながら、植物体を *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR測定して、植物中のホウ素を状態分析した報告は見あたらない。

2)高速液体クロマトグラフィー／誘導結合プラズマ質量分析法(Hill *et al.*, 1993; Vela *et al.*, 1993)



元素の存在化学形態ごとにクロマトグラフィーにより分離し、検出に、元素特異的な検出器を用いる方法は、広く用いられている状態分析法である。クロマトグラフィーには、ガスクロマトグラフィー(GC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などがあるが、生体に多くみられる液体試料にはHPLCが適している。HPLCの分離モードとしては、逆相分配、サイズ排除、イオン交換などがよく用いられる。一方、元素特異的な検出器には、元素分析装置の発展の歴史に従って、原子吸光分光分析(AAS)、誘導結合プラズマ発光分光分析(ICP-AES)、そして最近では誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)が用いられるようになってきた。したがって、生体試料中の微量元素の状態分析において現在の主流といえる組み合わせは、HPLC/ICP-MSである。ただHPLC/ICP-MSといっても、GC/MSやLC/MSのように市販品があるわけではない。そこで、HPLCの出口とICP-MSのネブライザーの入り口との適当なチューブを用いた接続、ICP-MS装置によるクロマトグラムデータ処理など、実験者が多少の工夫を要する場合がある。

## 5. 本研究の目的

以上述べてきたように、ホウ素は、高等植物の生育に必須な微量元素であり、ホウ素が欠乏すると、根や葉の伸長部位の生育が阻害される。しかしながら、これまでホウ素の植物における動態や機能については、不明点が多かった。筆者は、その理由の一つは、ホウ素の植物体内での化学形態が分子レベルで明らかにされていないことにあると考えた。一方、有力な元素状態分析法として、最近では *in vivo* NMR や HPLC/ICP-MS が開発されてきている。そこで、本研究は、植物の必須微量元素であるホウ素の植物体内における化学形態をこれら最新の状態分析法で調べて、ホウ素の植物体内での動態・機能を明らかにすることを目的とした。

## 第2章 植物体中の水溶性ホウ素

本章では、植物体中の水溶性のホウ素について、以下の3節に分けて述べる。

- ・植物組織の *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR
- ・ダイコン根ジュースの HPLC/ICP-MS
- ・コマツナ組織の *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR

### 第1節 植物組織の *in vivo* $^{11}\text{B}$ NMR

第1章で述べたように、*in vivo* NMR は、有力な元素の生体内存在化学形態の分析法である。表 2-1 に示すように、ホウ素の安定同位体には、 $^{10}\text{B}$  と  $^{11}\text{B}$  とがあり、それぞれ核スピンの持つので、どちらも NMR 測定が可能な核種である。したがって、ホウ素についても、植物体の *in vivo* B NMR 測定が可能であれば、植物体内でのホウ素の存在形態について多くの情報が得られるはずである。しかしながら、これまで植物体内のホウ素の存在状態を *in vivo* B NMR により測定した報告はなかった。

$^{10}\text{B}$  と  $^{11}\text{B}$  の核スピンは  $1/2$  ではないので、どちらも四重極モーメントを持ち、核スピンの  $1/2$  の  $^1\text{H}$  や  $^{13}\text{C}$  に比べて縦緩和時間が小さくなり線幅が広い。 $^{10}\text{B}$  と  $^{11}\text{B}$  を比べると、 $^{11}\text{B}$  のほうが共鳴周波数が大きくかつ天然存在比も大きいので、総合相対感度が高い。 $^{10}\text{B}$  と  $^{11}\text{B}$  の四重極モーメントによる線幅の広がり程度(線幅因子)は両者それほど違わないので、ホウ素核の NMR 測定では、 $^{11}\text{B}$  を測定対象核種としたほうが  $^{10}\text{B}$  に比べて感度的に有利である。 $^{11}\text{B}$  の測定感度は、 $^1\text{H}$  の  $1/10$ 、 $^{13}\text{C}$  の  $750$  倍と比較的高いほうであり、 $^{11}\text{B}$  は

NMR 測定しやすい核種と言えよう。そこで、 $^{11}\text{B}$  NMR は、様々な化学研究で利用されてきており、データも蓄積されている(宗像ら, 1991)。

そこで、 $^{11}\text{B}$  核を測定対象核種として選び、植物組織への *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR の適用を試みることにした。実験材料としては、初めは比較的水分の多い植物組織であるダイコン根とリンゴ果実を用いた。

表 2-1 代表的な核種の諸定数

核種	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{10}\text{B}$	$^{11}\text{B}$
核スピン	1/2	1/2	3	3/2
共鳴周波数*	100.0	25.1	10.7	32.0
天然存在比(%)	99.985	1.08	19.58	80.42
総合相対感度	5700	1	22	750
線幅因子**	-	-	36	56

\*  $^1\text{H}$  が 100.0MHz のとき

\*\*  $^2\text{H}=1$  としたとき

## 実験方法

### 1) 植物材料

ダイコン (*Raphanus sativus* L. cv Aokubi-daikon) 根とリンゴ (*Malus pumila* Mill. cv Fuji) 果実は、茨城県内の店で購入した。

### 2) *in vivo* $^{11}\text{B}$ NMR 試料調製

リンゴ果実とダイコン根を、内径 8mm のコルクボーラーでくり抜いた。このくり抜いた組織を、直径 10mm のテフロン製 NMR 試料管に高さ約 5cm に詰めて、直ちに  $^{11}\text{B}$  NMR 測定に供した。

### 3) ジュースと残さ試料調製

コルクボーラーでくり抜いた残りのリンゴ果実とダイコン根については、ダイコンおろしですりおろした後、遠心分離した(15min, 10000g)。上清(3ml)および脱イオン水で1回遠心洗浄した残さを、それぞれテフロン製NMR試料管に入れ、ジュースと残さ試料とした。

#### 4)<sup>11</sup>B NMR 測定

NMR 装置は、日本電子 JNM-A600 を使い、<sup>11</sup>B NMR 測定は共鳴周波数 192.6MHz、25℃、試料管のスピンングと周波数ロック無しで行った。ケミカルシフトは、外部基準の 0.1M ホウ酸水溶液を 0.0ppm として求めた。NMR 測定条件は、データポイント数: 1024、観測周波数範囲: 28900Hz、パルス幅: 40 $\mu$ s(90 度)、パルスの繰り返し時間: 0.075s とした。

このデータポイント数やパルスの繰り返し時間は、通常の <sup>1</sup>H や <sup>13</sup>C NMR 測定に比べて、データポイント数で 1 桁、パルスの繰り返し時間で 2 桁小さい値である。<sup>11</sup>B は四重極モーメントを持つ核種であるので、例えば 0.1M ホウ酸水溶液の縦緩和時間は 4.8ms と、s のオーダーである <sup>1</sup>H や <sup>13</sup>C の縦緩和時間に比べて、3 桁小さい。その一方で、<sup>11</sup>B の NMR ピークの線幅は広い。そのことを利用して、時間効率が良い積算測定を行うために、データポイント数を 1024 と小さくすることで、パルスの繰り返し時間を 0.075s と小さな値に設定した。

#### 5)<sup>11</sup>B NMR 測定試料のホウ素含量測定

<sup>11</sup>B NMR 測定後、ジュース以外の試料は、乾燥・秤量し、マイクロウェーブ分解装置 MILESTONE MLS-1200MEGA を用いて、硝酸 3ml と過酸化水素水 1ml で湿式灰化した。そして、分解液中のホウ素濃度を、ICP-MS 装置(SII SPQ8000A)を用いて、検量線法により定量した。ジュース試料については、分解操作を行わずに、インジェクタ(Rheodyne 9125)を装備した高速液体クロマトグラフ用ポンプ(JASCO PU-980i)を ICP-MS 装置に直結して、フローインジェク

ション(FI)/ICP-MS 測定を行った。その条件は、キャリアー:脱イオン水、流速: 1.0ml/min、試料注入量: 20 $\mu$ lとした。

#### 6)ホウ酸—ジヒドロキシ化合物標品の $^{11}\text{B}$ NMR 測定

市販試薬のフルクトース、リンゴ酸およびソルビトールをそのまま用いた。これら試薬の 200mM/10.0ml 相当量を 9.8ml の水に溶かした水溶液に、100mM ホウ酸水溶液を 200 $\mu$ l 加え、試料溶液とした。ホウ酸とジヒドロキシ化合物標品のモル比は 1:100 である。試料の pH 測定後、直径 10mm のテフロン製 NMR 試料管に試料 3.0ml を入れ、 $^{11}\text{B}$  NMR 測定を行った。試料溶液の pH は、1M または 5M NaOH を添加して調製した。NMR 測定条件は、以下の点を除いて、植物組織の *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR 測定と同じとした。データポイント数: 4096、パルスの繰り返し時間: 0.18s、積算回数: 800。

### 結果および考察

#### 1)植物組織の $^{11}\text{B}$ NMR スペクトル

図 2-1 にダイコン根、図 2-2 にリンゴ果実の a.植物体、b.ジュース、c.残さの  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを示す。また、表 2-2 に、 $^{11}\text{B}$  NMR 測定試料のホウ素含量測定結果を示す。

図 2-1a および図 2-2a に示すように、ダイコン根とリンゴ果実という植物組織の明瞭な *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを、比較的短時間で得ることができた。ダイコン根の場合、試料管中の全ホウ素量は 3.13 $\mu$ g で測定時間は 119 分、リンゴ果実の場合、試料管中の全ホウ素量は 8.57 $\mu$ g で測定時間は 56 分であった。この成功の理由は、以下の二つの要因に依っていると考えられる。一つは、プロトン共鳴周波数 600MHz という強力な超伝導磁石を有する NMR 装置を用いたことにより、感度および分解能が高かったことである。今一つは、現在の NMR 測定では 5mm  $\phi$  試料管用プローブが汎用されるが、本実験では

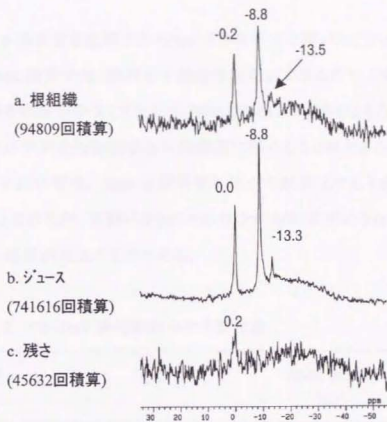


図2-1 ダイコン根の $^{11}\text{B}$  NMR スペクトル(数字はケミカルシフト)

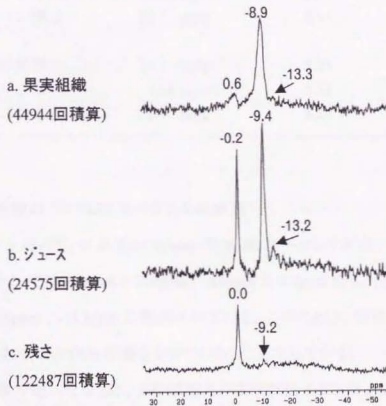


図2-2 リンゴ果実の $^{11}\text{B}$  NMR スペクトル(数字はケミカルシフト)

10mm φ 試料管を使用する 10mm φ プローブを用いたことによる。特に、*in vivo* NMR 測定では、試料が不定形な固体状であるので、5mm φ 試料管では試料を空隙が少なくなるように詰めることに困難さがともなうが、10mm φ 試料管では試料を比較的容易に高密度に詰めることができる。そのため、10mm φ 試料管は、5mm φ 試料管に比べて計算上でも 4 倍の試料を詰められることになるが、実際はさらにそれ以上の試料が詰められるので、結果的に大幅に感度が向上するのである。

表 2-2  $^{11}\text{B}$  NMR 測定試料のホウ素含量

試料	B 含量	NMR 試料管中全 B 量 ( $\mu\text{g}$ )
ダイコン根	18.3 $\mu\text{g/g}$	3.13
ダイコンジュース	0.40 $\mu\text{g/ml}$	1.21
ダイコン残さ	36.7 $\mu\text{g/g}$	8.03
リンゴ果実	14.3 $\mu\text{g/g}$	8.57
リンゴジュース	1.84 $\mu\text{g/ml}$	5.51
リンゴ残さ	22.8 $\mu\text{g/g}$	6.12

## 2) 植物組織の $^{11}\text{B}$ NMR スペクトルの帰属

ダイコン根とリンゴ果実の *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルには、2 つの大きなピークがそれぞれ -0.2ppm と -8.8ppm、0.6ppm と -8.9ppm に、小さなピークがそれぞれ -13.5ppm、-13.3ppm に観測されている。このことは、植物体中のホウ素は、少なくとも 3 つの存在形態をとっていることを示している。

第 1 章で述べたように、ホウ酸およびホウ酸陰イオンは、ジヒドロキシ化合物と反応して、ホウ酸モノエステルとホウ酸ジエステルを生成することは、良く知

られている。そして、ホウ酸モノエステルの  $^{11}\text{B}$  NMR ケミカルシフトは -11.5 ~ -14.5ppm、ホウ酸ジエステルの  $^{11}\text{B}$  NMR ケミカルシフトは -8 ~ -10.5ppm であることが報告されている(van Duin *et al.*, 1984)。また、ホウ酸は、ホウ酸-ホウ酸陰イオンの平衡関係にあり、ホウ酸の  $^{11}\text{B}$  NMR ケミカルシフトは 0ppm、ホウ酸陰イオンの  $^{11}\text{B}$  NMR ケミカルシフトは -17.6ppm である。その pKa は 9.2 であるから、植物体内の生理的 pH の中性から弱酸性では、ホウ酸-ホウ酸陰イオン系では大部分がホウ酸である(Balz *et al.*, 1986)。これらのことから、ダイコン根とリンゴ果実の *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルで見られた 0ppm、-9ppm、-13ppm のピークは、それぞれホウ酸、ホウ酸ジエステル、ホウ酸モノエステルに帰属される。これらの存在割合は、ホウ酸とジヒドロキシ化合物の量比と pH に依存する(Makkee *et al.*, 1985)。ダイコン根とリンゴ果実の *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルで、ホウ酸ジエステルのピークが、ホウ酸モノエステルのピークに対して大きいことは、これら植物組織中では、ホウ酸濃度がジヒドロキシ化合物濃度に比べてかなり低いことを意味している。

これまで、植物体中にはホウ酸モノエステルやホウ酸ジエステルが存在しており、それらがホウ素の植物における役割の鍵となるだろうと、想像はされていた(Shelp, 1993)。しかしながら、これまで植物体内でホウ酸とジヒドロキシ化合物とのエステル生成を直接的に示す証拠は何一つ得られていなかった。それは一つには、植物体からの抽出液を分析する従来の方法では、たとえエステル体のホウ酸を検出したとしても、それが抽出にともなうアーティファクトである可能性を否定することが困難であったからであると思われる。例えば、仮に、植物体抽出液の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルにホウ酸エステルのピークが観測されたとしても、しかしその場合でも、植物体内で、本来は別々の場所にあった、ホウ酸とジヒドロキシ化合物が、抽出という破壊操作の過程で混合され結合した可能性を否定できない。また、もしホウ酸とジヒドロキシ化合物が植物体内で共存し



ていたとしても、エステル生成は pH 依存性だから、その環境の pH によってはエステル生成が起きていないということもありうる。ところが、植物体の *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルでホウ酸エステルのピークが観測されれば、植物体内でのホウ酸エステルの存在は確かなのである。従って、ここでの植物体の *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR 測定結果は、植物体中にホウ酸エステルが存在していることを直接的に示す初めての証拠と言えよう。ホウ酸エステルが生成することで、より強い酸性と負に荷電したホウ酸化合物をもたらすが、このことが植物におけるホウ酸エステル生成の生理学的意義と関連していると思われる。

なお、約 -20ppm を中心に見られるブロードな (半値幅 5kHz) シグナルは、NMR プローブに含まれるホウ素に由来するバックグラウンドである。

### 3) ジュースと残さの $^{11}\text{B}$ NMR スペクトル

ダイコン根とリンゴ果実中では、ホウ素は、ホウ酸、ホウ酸モノエステル、及びホウ酸ジエステルの 3 つの化学形態をとっていることが明らかになった。そこで、次の興味は、ホウ酸とエステル結合している化合物の同定である。その手がかりを得るために、ダイコン根とリンゴ果実からジュースおよび残さ画分を調製して、それらの  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを測定した。得られたスペクトルを、図 2-1b,c および図 2-2b,c に示す。

ジュースのスペクトルにはホウ酸、ホウ酸モノエステル、ホウ酸ジエステルのピークが観測されている。リンゴ果実ジュースのスペクトルで、ホウ酸のピーク強度が相対的に大きいものの、ジュースのスペクトルは、植物組織のスペクトルと、ピークのケミカルシフトや強度が良く似ている。残さのスペクトルには、比較的小さなホウ酸のピークのみが見られる。これらの結果は、ダイコン根とリンゴ果実の *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルに見られたシグナルは、特にホウ酸エステルについては、植物組織の水溶性画分に由来することを示している。

van Duinら(1984)は、ホウ酸がエステル結合しうる低分子ジヒドロキシ化合物には、ジオール、ヒドロキシカルボン酸、ジカルボン酸があること、およびホウ酸エステル生成は、酸性ではヒドロキシカルボン酸、中性からアルカリ性ではジオールが優位であることを報告している。ダイコン根およびリンゴ果実ジュースのpHは、それぞれ6.2と4.0であったから、ホウ酸は、ダイコン根ジュースではジオールと、リンゴ果実ジュースではヒドロキシカルボン酸と、結合していると推定することができる。Lutzら(1991)も、ワインやブドウの生ジュースの<sup>11</sup>B NMRスペクトルで観測されるピークは、リンゴ酸、乳酸、酒石酸、クエン酸のようなヒドロキシカルボン酸由来のピークが重なっていると考えられると報告している。

#### 4) ホウ酸-ジヒドロキシ化合物標品の<sup>11</sup>B NMRスペクトル

安定なホウ酸エステルを生成することが知られている化合物(van Duin *et al.*, 1984; Makkee *et al.*, 1985)の中で、フラクトースは、一般に野菜に多く含まれる(Morvai *et al.*, 1991)。また、フラクトースに加えて、ソルビトール、リンゴ酸はリンゴ果実に多く含まれる(Lee and Wrolstad, 1988)。そこで、ホウ酸とこれらジヒドロキシ化合物標品のモル比を1:100とした水溶液の<sup>11</sup>B NMRスペクトルをpHを変えながら測定した。フラクトースとリンゴ酸についての結果を図2-3に示す。なおソルビトールは、フラクトースと同様な結果であった。

ダイコン根のジュース(pH6.2)のスペクトル(図2-1b)と良く似ているのは、ホウ酸2mM+フラクトース200mM水溶液のpH6前後のスペクトルである。また、リンゴ果実のジュース(pH4.0)のスペクトル(図2-2b)と良く似ているのは、ホウ酸2mM+リンゴ酸200mM水溶液のスペクトルである。これらのことから、ダイコン根とリンゴ果実で、ホウ酸がエステル結合しているジヒドロキシ化合物の候補としては、それぞれフラクトースとリンゴ酸が一応は考えられる。しかしながら、上

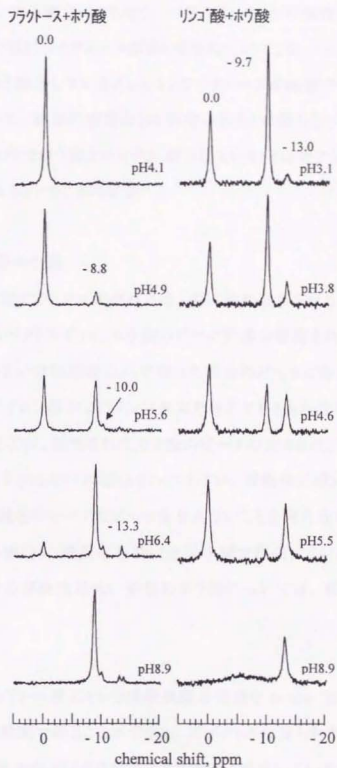


図2-3 200mMフラクトース+2mMホウ酸(左)と200mMリンゴ酸+2mMホウ酸(右)の $^{11}\text{B}$  NMRスペクトル

述したように、抽出操作にともなうアーティファクトの可能性は否定できない。たとえ、ダイコン根にフラクトースが多く含まれていて、かつジュース中でフラクトースがホウ酸と結合しているとしても、フラクトースが組織中でホウ酸と同じ場所に存在していて、結合に適当な pH 環境にあるとは限らないからである。従って、植物組織内でホウ酸とエステル結合している化合物の同定には、さらなる検討が必要であるということになる。

### 5) 細胞壁中のホウ素

ダイコン根およびリンゴ果実残さは、主に細胞壁からなると考えられる。残さの  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルには、ホウ酸のピークが多少観測されたが、そのホウ酸が細胞壁、あるいは細胞壁以外で残った部分のどちらに存在するのかははっきりとしない。ダイコン根およびリンゴ果実残さのどちらもかなりの量のホウ素を含んでいる(表 2-2)が、観測されたホウ酸のピークの大きさは、ホウ素含量から予想される大きさに比べればはるかに小さい。運動性が低い分子は、高分解能 NMR 検出可能なシャープなピークを与えないことを考え合わせると、細胞壁中のホウ素の多くは、運動性が低い化学形態で存在していることが示唆される。この細胞壁中の運動性が低い形態のホウ素については、第 3 章で詳述する。

### 要約

- 1) ダイコン根とリンゴ果実という植物組織の明瞭な *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを、比較的短時間で得ることができた。スペクトルに見られたピークは、ホウ酸、ホウ酸ジエステルおよびホウ酸モノエステルに由来していた。この結果は、植物体中にホウ酸エステルが存在していることを直接的に示す初めての証拠である。
- 2) ダイコン根とリンゴ果実のジュースの  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを測定した結果、ダイコン根とリンゴ果実の *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルに見られたシグナルは、

特にホウ酸エステルについては、植物組織の水溶性画分に由来していた。ホウ酸-ジヒドロキシ化合物標品の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルなどから、ダイコン根とリンゴ果実で、ホウ酸がエステル結合しているジヒドロキシ化合物の候補としては、それぞれフラクトースとリンゴ酸が一応は考えられた。

3)ダイコン根とリンゴ果実の残さの  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを測定した結果、細胞壁中のホウ素の多くは、運動性が低い化学形態で存在していることが示唆された。

## 第2節 ダイコン根ジュースの HPLC/ICP-MS

前節で、*in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR により植物体中に水溶性ホウ酸エステルが存在していることを明らかにした。しかしながら、ホウ酸がエステル結合しているジヒドロキシン化合物については不明であった。第1章で述べたように液体試料中の元素の状態分析には、HPLC/ICP-MS は有力な手法である。そこで、植物体中水溶性ホウ素化合物の存在状態を知ることを目的に、ダイコン根のジュース画分を対象試料として、サイズ排除分離モードによる HPLC/ICP-MS 測定を行った。

### 実験方法

#### 1) 実験材料

ダイコン (*Raphanus sativus* L. cv Aokubi-daikon) 根は、茨城県内の店で購入した。

#### 2) HPLC/ICP-MS 試料調製

冷蔵したダイコン根をダイコンおろしですりおろした後、遠心分離 (15min, 10000g) して得た上清をジュース試料とした。ジュース画分 10.0ml を透析チューブに入れ、大量の脱イオン水に対して 4℃ で透析した。透析したジュース画分を凍結乾燥し、1.0ml の脱イオン水を加え溶解させた後、遠心分離 (15min, 10000g) して得た上清を、0.45 $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターでろ過して、濃縮ジュース試料とした。

#### 3) HPLC/ICP-MS 測定

HPLC 装置は、JASCO PU-980i ポンプ (JASCO Co., Tokyo, Japan)、Rheodyne 9125 インジェクター (インジェクションループ 200 $\mu\text{l}$ )、JASCO UV-970 UV/VIS

検出器から成り、接液部に金属を用いないメタルフリーシステムを用いた。サイズ排除カラムは、YMC-Pack Diol-120(8 x 300mm)(YMC Co., Kyoto, Japan)を用いた。HPLCの測定条件は、溶離液: 0.2M  $\text{HCO}_2\text{NH}_4$ (pH6.5)、流速: 1.0 ml/min、試料注入量: 100 $\mu\text{l}$ とした。溶離液には、通常のサイズ排除 HPLC 測定では、塩として NaCl や  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  がよく用いられるが、これらは ICP-MS のサンプリングコーン部に析出して詰まらせるので、ここでは揮散して析出しない  $\text{HCO}_2\text{NH}_4$  を用いた。カラムは、ブルラン標準(Shodex STANDARD P-82(P-5, Mw=5,800; P-10, Mw=12,200; P-20, Mw=23,700; P-100, Mw=10.0 $\times 10^4$ ; P-1600, Mw=160 $\times 10^4$ ); Showa Denko K.K., Tokyo, Japan)を JASCO 830-RI 示差屈折計を用いて検出して分子量校正した。

ICP-MS 装置は、SII SPQ8000A(Seiko Instruments Inc., Chiba, Japan)を用いた。HPLC 装置の UV/VIS 検出器の出口を ICP-MS のネプライザー入り口に、長さ 1m の PEEK(poly ether ether ketone)製チュービングにより直結した。ICP-MS の測定条件は、プラズマガス流量: 16 l/min、外部ガス流量: 0.5 l/min、ネプライザーガス流量: 0.8 l/min、Rf 出力: 1.1kW とした。記録は、NEC PC-9801 パーソナルコンピュータ上で稼働する SII 製ソフトウェア"ION"(version 1.5)を用いて、質量数 10 と 11 のイオンカウントを 5 秒毎に記録し、測定終了後、結果をテキストファイルに保存した。そのファイルを、市販の表計算ソフトウェアで読み込んで、クロマトグラムを得た。

#### 4)FI/ICP-MS 測定

HPLC/ICP-MS 測定に供した試料中の全ホウ素濃度測定は、上述の HPLC/ICP-MS 装置を、カラムをはずしてフローインジェクション(FI)/ICP-MS モードに変えて行った。FI 条件は、キャリアー: 脱イオン水、流速: 1.0ml/min、試料注入量: 20 $\mu\text{l}$ とした。

## 結果および考察

### 1)<sup>10</sup>Bと<sup>11</sup>B

本実験で用いた HPLC/ICP-MS システムは、最大 15 の質量数を同時測定できる。ホウ素の安定同位体には、<sup>10</sup>B と <sup>11</sup>B の 2 つがあり、天然存在比は、それぞれ 19.7% と 80.3% である。そこで質量数 10 と 11 を同時測定した。質量数 11 は質量数 12 の隣であり、質量数 12 の元素には <sup>12</sup>C がある。そのため、生物試料を灰化した場合など、有機炭素が高濃度含まれている試料溶液の ICP-MS 測定では、<sup>11</sup>B に <sup>12</sup>C のスペクトル干渉が起きる可能性が指摘されている (Evans and Krahenbuhl, 1994)。そこで本実験で得られたクロマトグラムについて、<sup>11</sup>B/<sup>10</sup>B を計算した結果、その値は 80.3/19.7=4.07 前後で一定であり、<sup>11</sup>B への <sup>12</sup>C のスペクトル干渉は見られなかった。<sup>11</sup>B のイオンカウントは <sup>10</sup>B の約 4 倍あり、<sup>11</sup>B は <sup>10</sup>B よりノイズが少ないクロマトグラムが得られるので、ここでは <sup>11</sup>B の結果を示した。

なお、ホウ素に <sup>10</sup>B と <sup>11</sup>B の 2 つの安定同位体があることと、ICP-MS が同位体同時測定可能であることを利用して、<sup>10</sup>B ラベルを用いたホウ素の動態研究などが可能である。

### 2) ダイコン根ジュースの ICP-MS クロマトグラム

図 2-4 にダイコン根ジュース試料の ICP-MS (下) と UV (上) クロマトグラムを示す。また、図 2-5 に用いたサイズ排除カラムの分子量校正曲線を示す。

UV (220nm) クロマトグラムを見ると、保持時間約 5 分で、カラムのボイド部分が終わり、高分子化合物が流出し始め、約 11 分で低分子化合物が流出し始めている。ICP-MS (<sup>11</sup>B) クロマトグラムでは、15.3 分に大きく幅広いホウ酸由来のピークが見られる。また、高分子領域では 6.2 分 (ピーク 1) と 8.6 分 (ピーク 2) に、低分子領域では 10-12 分に、ホウ酸のピークに比べれば極めて小さくノイズが多いものの、いくつかのピークが見られる。



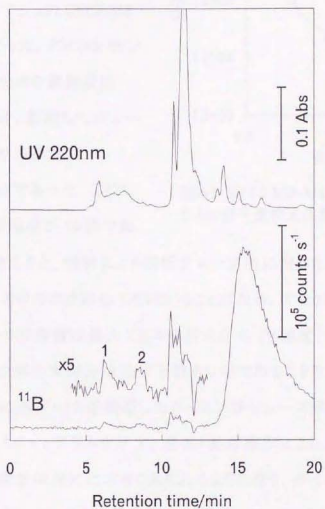


図2.4 ダイコン根ジュースのサイズ排除HPLC/ICP-MS(下)とUVスペクトル(上)

高分子領域のピーク1および2の存在を確認するために、ダイコン根ジュースを透析後、凍結乾燥して10倍に濃縮して、HPLC/ICP-MS測定を行った。ダイコン根ジュースの全ホウ素濃度は $0.333\mu\text{g/ml}$ 、濃縮したジュースの全ホウ素濃度は $0.047\mu\text{g/ml}$ であった。このことから、濃縮率が10倍であ

ることを考えると、透析により透析チューブ内に残った高分子態ホウ素は、透析前ジュース中のホウ素の1.4%ということになる。すなわちダイコンジュース中の高分子ホウ素量は最大でもホウ素全体の1%程度と少なく、ダイコンジュース中のホウ素の大部分は低分子態ホウ素であることを示している。

図2-6に透析・10倍濃縮したダイコン根ジュース試料のICP-MS(下)とUV(上)クロマトグラムを示す。透析・濃縮操作により、高分子領域のピーク1と2の強度が相対的に大きく見られるようになり、ダイコン根ジュースには、高分子と結合しているホウ素が確かに存在していることを示している。これは、植物ジュース中でのホウ素を含む水溶性高分子の存在を初めて示した結果であり、そのことは高性能分離・高感度検出機能を有するサイズ排除HPLC/ICP-MSを用いることによりもたらされたものであると言えよう。ピーク1がボイド直後に出現してテーリングしているのに対して、ピーク2はシャープで対称であるから、ピーク2のホウ素を含む高分子は、ピーク1より均一な化合物と思われる。また、この実験では、3本のダイコン根について試料調製と

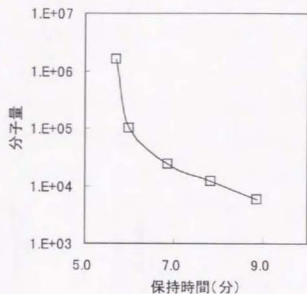


図2-5 HPLC/ICP-MSに用いたサイズ排除カラムの分子量校正曲線

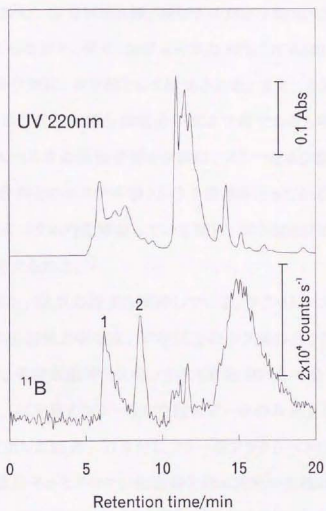


図2-6 透析・10倍濃縮したダイコン根ジュースのサイズ排除  
HPLC/ICP-MS(下)とUVスペクトル(上)

HPLC/ICP-MS 測定を行ったが、ピーク 2 は 3 本のダイコン試料すべてで観測されたが、ピーク 1 は 1 本のダイコン試料では観測されなかった。

### 3) ホウ素と結合した低分子

前節の図 2-1b のダイコンジュースの  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを見ると、ジュース中のホウ素は、半分がホウ酸、残り半分がホウ酸エステルという形態で存在している。しかしながら、ダイコンジュースの HPLC/ICP-MS クロマトグラムでは、ほとんどのホウ素は、ホウ酸として検出された。また、上述したように、ダイコンジュース中のホウ素の大部分は低分子態ホウ素であると考えられる。したがって、ダイコンジュース中の低分子態ホウ素は、フリーなホウ酸と、ホウ酸と低分子ジヒドロキシ化合物とのエステル態という 2 形態をとっているが、エステル態のホウ酸は HPLC カラム内を移動している間に、ホウ酸とジヒドロキシ化合物とに遊離したと考えられる。

このことを、以下の結果も支持している。フラクトース 0.2M とホウ酸 2mM を含む水溶液 (pH6.2) 中では、半分以上のホウ素はホウ酸エステルの形態である (図 2-3)。その水溶液 2 $\mu\text{l}$  を、サイズ排除 HPLC で分離して ICP-MS で検出した結果、16.3 分のフリーなホウ酸のピークのみが見られた。一方、示差屈折計で検出した結果、11.9 分にフリーなフラクトースのピークのみが見られた。ホウ酸と低分子ジヒドロキシ化合物とのエステル生成は、ホウ酸、ホウ酸モノエステルおよびホウ酸ジエステル間の速い平衡関係にある。ここで用いたサイズ排除カラム Diol-120 では、ホウ酸はカラムと相互作用して  $\text{Mg}^{2+}$  などフリーな金属イオンより遅く、ブロードなピークとして溶出する。したがって、エステル態のホウ酸は、カラム内でホウ酸が遅く移動するのでエステル態の解離方向へ平衡が進み、直ちにホウ酸と低分子ジヒドロキシ化合物とに分離したと考えられる。

また、ダイコンジュースの HPLC/ICP-MS クロマトグラムで保持時間 10 ~ 12 分に見られたピークは、比較的分子量の小さい、ホウ素を含む化合物群と考え

られる。これらの化合物では、ホウ酸と低分子ジヒドロキシ化合物の結合が、フラクトースとホウ酸の場合より強いかもしれない。

#### 4)ホウ素と結合した高分子

ダイコンジュースの HPLC/ICP-MS クロマトグラムに見られたピーク 1 と 2 は、ホウ素と結合した高分子由来である。では、これらホウ素-高分子の高分子とは何であろうか。ピーク 1 の保持時間は 6.2 分であるから、その分子量は  $10^4$  程度、ピーク 2 の保持時間は 8.6 分であるから、その分子量は  $10^5$  程度であると考えられる。

第 3 章で詳述するが、植物細胞壁のペクチン分解酵素可溶化物中から、ホウ酸-ラムノガラクトuronan II 複合体というホウ素と結合した高分子が単離される。このホウ酸-ラムノガラクトuronan II 複合体を、同じ条件でサイズ排除 HPLC/ICP-MS 測定したときの保持時間は、ピーク 2 の保持時間と一致する。このことから、ピーク 2 を与えるホウ素と結合した高分子は、ホウ酸-ラムノガラクトuronan II 複合体である可能性がある。そのことを確かめるためには、ピーク 2 を与えるホウ素と結合した高分子を単離同定する必要がある。

#### 要約

- 1)ダイコン根ジュース中の高分子ホウ素量は最大でもホウ素全体の 1%程度と少なく、ジュース中のホウ素の大部分は低分子態ホウ素であった。
- 2)サイズ排除 HPLC/ICP-MS 測定したとき、ダイコン根ジュース中のエステル態のホウ酸はカラム内を移動している間に、ホウ酸とジヒドロキシ化合物とに遊離した。
- 3)ダイコン根ジュースとその透析・濃縮物をサイズ排除 HPLC/ICP-MS 測定した結果、ジュース中には高分子と結合しているホウ素が存在していた。

### 第3節 コマツナ組織の *in vivo* $^{11}\text{B}$ NMR

第1節と第2節とで、植物体中の水溶性ホウ素は、フリーなホウ酸と、ホウ酸と低分子ジヒドロキシ化合物とのモノエステル・ジエステルの形態であることを示した。

ここでは、コマツナを対象植物として、植物部位別のホウ素存在状態を *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR により調べた。コマツナの生育段階は、生育初期と開花期とした。

#### 実験方法

##### 1) 植物材料

生育初期コマツナ (*Brassica campestris* L.) は、ホーグランド&アーノン培地 (Hoagland and Arnon, 1938、ホウ素濃度は  $0.5\text{mg/l}$ ) を用いてガラス室で17日間水耕栽培した。

開花期コマツナは、農業研究センター圃場(つくば市、黒ボク土)で栽培された。播種は1996年10月、施肥は8-8-8化成肥料  $700\text{kg ha}^{-1}$  であった。開花期の1997年4月3日に下位茎葉、上位茎葉、花茎、蕾を、4月21日に花、莢(未熟)を各2個体から採取した。

##### 2) *in vivo* $^{11}\text{B}$ NMR 測定

採取後直ちに、試料をそれぞれ直径10mmのテフロン製試料管に約5cm高さに入れ、 $^{11}\text{B}$  NMR 測定した。葉身と根については、ハサミで適当な大きさに切った。茎葉は、ハサミで約1cm角に切った十数片、蕾、花は果梗部分で切り取った約20個を試料管に詰めた。花茎は、上位部の直径約8mmの部分の上下を、カッターで高さ5cmに切り出した1本、莢は果梗部分で切り取った1個を試料管に入れた。 $^{11}\text{B}$  NMR 測定は、日本電子製 JNM-A600 を用

いて、共鳴周波数 192.6MHz で行った。

### 3) ホウ素含量及び糖組成分析

NMR 測定後、試料を凍結乾燥した。試料 10mg を、全ホウ素定量の場合、硝酸分解、水溶性ホウ素定量の場合(開花期コマツナ)、水 5mL で 25℃、1 時間振とう抽出後、ホウ素濃度を ICP-MS (SII SPQ8000A) で測定した。開花期コマツナの糖組成は、試料 10mg を 80% エタノールで沸騰湯浴中 10 分抽出後、トリメチルシリル化しガスクロマトグラフィーで分析 (York *et al.*, 1985a) した。

## 結果および考察

### 1) 生育初期コマツナの *in vivo* $^{11}\text{B}$ NMR スペクトル

図 2-7 に、生育初期コマツナの部位別 *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを示す。ホウ素含量は、古い葉 72.4 $\mu\text{g/g}$ 、成熟葉 35.6 $\mu\text{g/g}$ 、若い葉 30.0 $\mu\text{g/g}$ 、そして根 24.2 $\mu\text{g/g}$  であった。スペクトルには、1.3 ~ 2.0ppm にホウ酸、-12.5ppm にホウ酸モノエステル、そして -7.5 ~ -8.2ppm にホウ酸ジエステルのピークが見られる。より初期に展開した古い葉と後期に添加した若い葉とを比べると、古い葉ではホウ酸のピークが大きく、若い葉や根では、ホウ酸ジエステルのピークが大きい。Brown と Shelp は、光合成産物の転流に糖アルコールを用いない一般の植物では、ホウ素の吸収と移動は水の蒸散流によるので、ホウ素含量は古い組織ほど多くなることを示している (Brown and Shelp, 1997)。本実験では、水耕培地から十分に供給されたホウ酸は、古い葉に蓄積して、ジエステル結合を作る相手の低分子ジヒドロキシ化合物量に比べて当量比が大きくなり、その結果、ホウ酸のピークが大きく観測されたと考えられる。

また、植物体の *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルのホウ酸やホウ酸ジエステルのケミカルシフトは、例えばホウ酸で 1.3 ~ 2.0ppm と、水溶液中のそれらのケミ

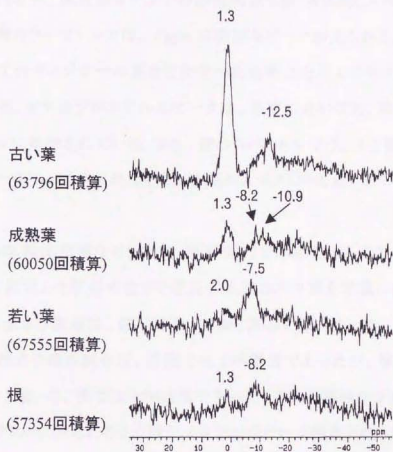


図2-7 生育初期コマツナの *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトル (数字はケミカルシフト)



カルシウムに比べて、1～2ppm、低磁場側であった。この原因は不明であり、今後の検討課題である。

## 2) 開花期コマツナの *in vivo* $^{11}\text{B}$ NMR スペクトル

図 2-8 に、開花期コマツナの部位別 *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを示す。蕾、花、莢のスペクトルでは、-7ppm に明瞭なピークが見られる。そのピークは、ホウ酸 1 分子とジオール基などを持つ化合物 2 分子とのホウ酸ジエステルに由来する。ホウ酸ジエステルのピークは、花茎においても、強度の小さいピークが -9ppm に観測されている。また、蕾のスペクトルでは、ホウ酸に由来する小さなピーク(2ppm)が現れている。茎葉のスペクトルには、ピークは見られなかった。

NMR 検出可能なホウ素は、植物体内で水溶性のものである。そこで、NMR 測定した試料の全ホウ素及び水溶性ホウ素を定量した。その結果(図 2-9)、全ホウ素量は、蕾>花>莢、茎葉、花茎の順であった。全ホウ素に対する水溶性ホウ素の割合は、茎葉では 10%程度であったが、植物の上位部で高くなり、蕾、花、莢では 80%程度であった。また水溶性ホウ素量と、 $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルに見られるホウ酸ジエステルのピーク強度とは、良い一致を示した。

以上のことから、蕾、花、莢中には水溶性ホウ素が多く、その化学形態はホウ酸ジエステルであることが明らかとなった。また、茎葉中のホウ素は、大部分が水不溶性であった。これら水不溶性ホウ素は、第 3 章で述べる細胞壁中のペクチンをラムノガラクトuronan II 部分で架橋しているホウ酸であると考えられる。

4 月 3 日採取個体の蕾のホウ素含量は、茎葉や花茎に比べて 5 倍程度高かった。また、跡地作土の熱水抽出ホウ素量は  $0.20\text{mg kg}^{-1}$  とやや少なかった (Johnson, 1990)。このようにホウ素供給が潤沢でない場合に、頂部のホウ素含量が高くなっているということから、ホウ素の師管を通じた再移動が起きていることが示唆される (Liu *et al.*, 1993)。そしてコマツナと同属のプロコクリーで、

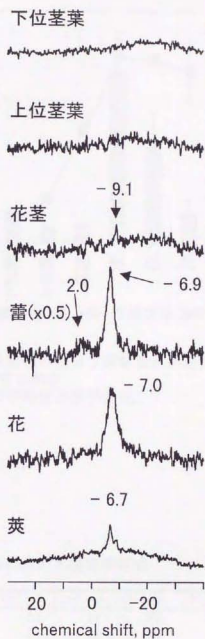


図2-8 開花期コマツナの部位別 *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトル

積算回数は、下位茎葉135,391、上位茎葉41,469、花茎41,279、蕾6,943、花31,209、莢236,360。0.1M  $\text{H}_3\text{BO}_3$ を基準とした。蕾のスペクトルは縦軸を0.5倍に縮小してある。

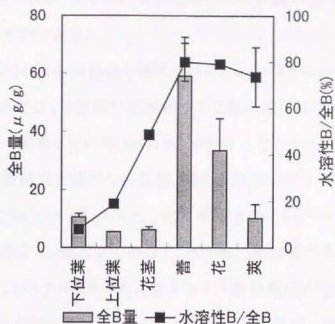


図2-9 コマツナ各部位の全フラボノイド含量と水溶性フラボノイド含量の全フラボノイド含量に対する割合  
データは、2個体の平均値と標準偏差。

表2-3 コマツナ各部位の水溶性糖組成

	(mg/g乾重)						
	グルコース	フラクトース	シュクロース	ソルビトール	マンノール	イソシトルA	イソシトルB
莖葉1	51	61	tr	ND	ND	1.4	2.2
莖葉2	46	61	tr	ND	ND	tr	2.0
蕾1	32	37	tr	tr	tr	3.6	2.0
蕾2	21	24	1.1	0.45	0.35	6.0	3.0
莢1	275	217	4.3	ND	ND	tr	3.6
莢2	242	204	11.6	ND	ND	tr	4.3

\*tr:trace, ND:not detected

\*\*イソシトルA, Bは、αイソシトルの立体異性体のいずれか一つ

同様な結果が報告されている(Liu *et al.*, 1993)。しかしながら、蕾、花、莢中のホウ酸ジエステルが、ホウ素の再移動あるいは貯蔵形態であるのかなど、その存在意義は不明である。

最近、Huらは、光合成産物を糖アルコール(ソルビトール等)で転流させるバラ科等の植物では、ホウ素の再移動がホウ酸-糖アルコールジエステルの形態で起きることを報告している(Hu *et al.*, 1997b)。そこでコマツナ茎葉、蕾、及び莢の水溶性糖組成を調べてみた結果(表 2-3)、ソルビトール、マニトールは蕾でしか検出されなかった。しかも、例えば蕾2のソルビトールとマニトールを合わせた含量は  $4.4\mu\text{mol g}^{-1}$  しかなく、ホウ酸の結合相手を糖アルコールだけで説明することはできなかった。蕾2のホウ素含量は  $4.7\mu\text{mol g}^{-1}$  であり、そのホウ素がすべてホウ酸ジエステルを生成するとすれば、倍の  $9.4\mu\text{mol g}^{-1}$  以上のジヒドロキシ化合物と共存している必要があるからである。ホウ酸とエステル結合しやすいジヒドロキシ化合物としては、糖アルコール以外にフラクトースが、すべての試料で比較的多量に含まれていたが、フラクトースがホウ酸とエステル結合をしているのかもしれない。

今後、開花期コマツナ蕾、花、莢中の水溶性ホウ酸ジエステルの存在意義を明らかにしていくためには、ホウ酸とエステル結合しているジヒドロキシ化合物の同定とともに、ホウ酸ジエステルの生育時期別の消長や組織・細胞内での存在位置の解明等を行う必要がある。

## 要約

1) 水耕栽培した生育初期コマツナを部位別に *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR 測定した結果、古い葉ではホウ酸のピークが大きく、若い葉や根では、ホウ酸ジエステルのピークが大きかった。水耕培地から十分に供給されたホウ酸は、古い葉に蓄積して、ジエステル結合を作る相手の低分子ジヒドロキシ化合物量に比べて当量比が大

きくなったと考えられた。

2)ホウ素供給量が低い圃場で栽培した開花期コマツナを部位別に *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR 測定し、また水溶性ホウ素量を分析した結果、蕾、花、莢中には水溶性ホウ素が多く、その化学形態はホウ酸ジエステルであった。また、茎葉中のホウ素は、大部分が水不溶性であった。

### 第3章 植物細胞壁中の水不溶性ホウ素

本章では、植物細胞壁中の水不溶性のホウ素について、以下の節に分けて述べる。

- ・植物細胞壁からのホウ素-多糖複合体の単離
- ・ホウ素-多糖複合体の構造
- ・ラムノガラクトuronan II-ホウ酸ダイマー(dRGII-B)と金属
- ・HPLC/ICP-AESによるdRGII-B中BとCaの定量
- ・dRGII-Bと結合している金属の特性
- ・HPLC/ICP-MSによる植物細胞壁中dRGII-Bの検出

#### 第1節 植物細胞壁からのホウ素-多糖複合体の単離

前章第1節で述べたように、細胞壁中のホウ素の多くは、運動性が低い化学形態で存在している。この細胞壁中のホウ素は、どういう構造をとっているのだろうか。1993年に、間藤らはダイコン根細胞壁の酵素可溶化物の中からホウ素と結合した多糖を得たことを報告していた(Matoh *et al.*, 1993)。そこで、細胞壁中に含まれるホウ素-多糖複合体の構造を調べるために、植物の細胞壁を酵素可溶化してホウ素-多糖複合体を単離することを試みた。クロマトグラフィーは、間藤らの報告を参考にして、陰イオン交換とサイズ排除モードを用いた。植物材料としては、双子葉植物であるシュガービートと単子葉植物イネ科のタケ(タケノコ)を用いた。

#### 実験方法

### 1) 実験材料

シュガービート(*Beta vulgaris* L.)のバルブは、北海道立根釧農業試験場から、供与していただいた。バルブを、メタノールで 16 時間還流し、残さを細胞壁画分とした。

タケノコ(*Phyllostachys edulis* A. and C. Riv.)は、野原農場(茨城県)から購入した。細胞壁画分は既報(Matoh *et al.*, 1993)に従い調製した。

### 2) 弱陰イオン交換クロマトグラフィー

細胞壁をドリセラーゼ(協和発酵)で分解し、可溶化物を脱イオン水に対して透析した。透析チューブ内に残った画分を、ギ酸アンモニウム緩衝液 50mM (pH7.0)で平衡にしておいた DEAE-Sepharose Fast Flow カラム(2.5 x 43 cm)を通して、ギ酸アンモニウム緩衝液 50mM(pH7.0)500ml を流し、カラムに吸着されない中性成分を流去した。次に、ギ酸アンモニウム緩衝液(pH7.0)濃度を 50mM から 1M へ直線的に上げながら全量 1l を流し、カラムに吸着された酸性画分をグラジエント溶出した。溶離液を 5ml ずつ分取し、ホウ素を含むフラクション I を集めて、凍結乾燥した。

### 3) サイズ排除クロマトグラフィー

フラクション I を Bio Gel P-10 カラム(1.5 x 90 cm)に載せ、ギ酸アンモニウム緩衝液 200mM(pH7.0)で溶出した。溶離液を 2ml ずつ分取した。ホウ素を含むフラクション II を集めて、脱イオン水に対して透析後、凍結乾燥した。

### 4) 陰イオン交換クロマトグラフィー

フラクション II を Q-Sepharose Fast Flow カラム(1.5 x 25 cm)に載せ、炭酸水素アンモニウム緩衝液 100mM(pH7.8)250ml でカラムに吸着されない成分を流去した。次に、炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH7.8)濃度を 100mM から 500mM へ直線的に上げながら全量 500ml を流し、グラジエント溶出した。溶離液を 5ml ずつ分取し、ホウ素を含むフラクション III を集めて、脱イオン水に

対して透析後、凍結乾燥した。

#### 5) フラクシオンの分析

各フラクシオン中のホウ素や糖の含量を分析した。

ホウ素は、インジェクタ(Rheodyne 9125)を装備した高速液体クロマトグラフ用ポンプ(JASCO PU-980i)を ICP-MS 装置(SII SPQ8000A)に直結して、フローインジェクション(FI)/ICP-MS 測定を行った。その条件は、キャリアー: 脱イオン水、流速: 1.0ml/min、試料注入量: 20 $\mu$ l とした。

中性糖はアンスロン法(Dische, 1962)、ウロン酸は m-ヒドロキシビフェニル法(Blumenkrantz, 1973)により測定した。Kdo(3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid)または Dha(3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid)はチオバルビツール酸アッセイ変法(York, 1985b) により求めた。

#### 結果および考察

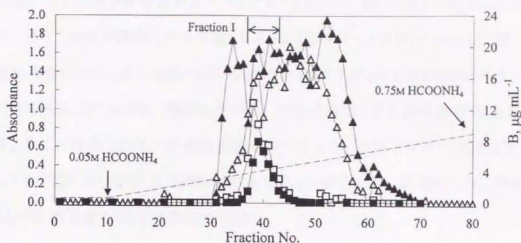
シュガービート細胞壁画分のホウ素含量は、43.4 $\mu$ g B/g、タケノコ細胞壁画分のホウ素含量は、5.42 $\mu$ g B/g であった。一般に、双子葉植物と単子葉植物では、双子葉植物のホウ素含量が高く、またホウ素要求量も多いことが知られている(Kabata-Pendias and Pendias, 1992)。そのホウ素含量の違いが、細胞壁においてもあらわれていると考えられる。

細胞壁をペクチナーゼ、セルラーゼ等植物細胞壁分解活性を持つドリセラナーゼで可溶化した。細胞壁画分のドリセラナーゼ可溶化液に含まれるホウ素の大部分は、透析チューブ内に残ったことから、ドリセラナーゼ可溶化液中のホウ素は、高分子と結合していると考えられた。

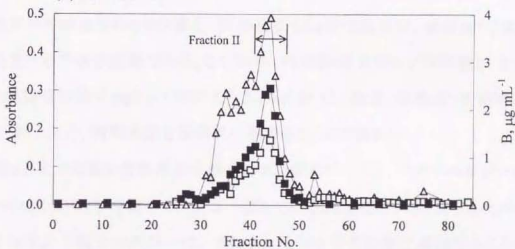
図 3-1 にシュガービートの場合の精製過程のクロマトグラムを示す。透析チューブ内に残った高分子画分を、陰イオン交換クロマトグラフィーにより、カラムに保持されない中性画分と保持される酸性画分とに分け、さらに溶離液の塩濃



(A) DEAE-Sephrose Fast Flow



(B) Bio Gel P-10



(C) Q-Sephrose Fast

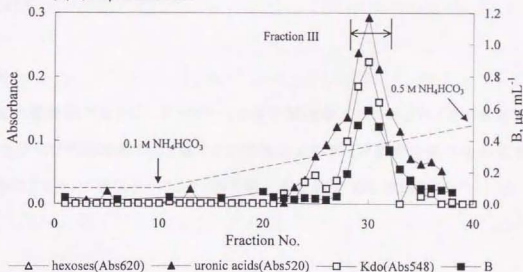


図3-1 シュガービート細胞壁酵素可溶化物からのホウ素-多糖複体の精製過程

度を上げていきホウ素を含むピーク(フラクション I、図 3-1A の No.37-43)を得た。次に、サイズ排除(ゲルろ過)クロマトグラフィー(フラクション II、図 3-1B の No.41-47)、さらに陰イオン交換クロマトグラフィー(フラクション III、図 3-1C の No.28-32)により、精製を行った。この段階で、ホウ素を含む高分子画分は、サイズ排除 HPLC (示差屈折計検出)により、対象でシャープな 1 ピークしか与えなくなったので、精製は完全であると判断した。同様に、タケノコからもホウ素を含む高分子画分を得た。

ホウ素を含む物質をクロマトグラフィーにより精製していくためには、溶離液の各画分中に含まれるホウ素を、試料液量の消費は微量で、感度良く、効率的に検出する方法が必要である。ここでは、FI/ICP-MS を用い、試料量は 20 $\mu$ l、ホウ素濃度は数百  $\mu$ g/l、1 時間当たり 60 点という、微量・高感度・高能率検出を行うことで、精製作業を効率的に進めることができた。

得られたホウ素を含む高分子画分のホウ素のピークと、チオバルビツール酸アッセイポジティブな糖のピークは一致している。このことから、得られたホウ素を含む高分子画分の高分子は、Kdo または Dha を含む酸性多糖であると考えられる。

## 要約

双子葉植物であるシュガービートと単子葉植物イネ科のタケノコの細胞壁のドリセラゼ可溶化物から、陰イオン交換およびサイズ排除を組み合わせた 3 段階のクロマトグラフィーにより、ホウ素-多糖複合体を単離した。

## 第2節 ホウ素-多糖複合体の構造

前節で述べたように、植物細胞壁から、ホウ素-多糖複合体を単離することができた。この複合体の構造を知るために、複合体およびその酸処理物について、FI/ICP-MSによるホウ素含量測定、 $^{11}\text{B}$  NMRによるホウ素の存在状態分析、サイズ排除 HPLC およびマトリクス支援レーザー脱離イオン化時間飛行型質量分析装置(MALDI/TOF-MS)測定による分子量測定を行った。

MALDI/TOF-MS は、1990年代に実用化された質量分析法である(田中、1996)。生体高分子など水溶性で従来の方法ではイオン化しにくい目的化合物を、マトリクス化合物と混ぜてレーザー光を照射してソフトイオン化し、時間飛行型質量分析装置で検出する方法である。最近では、タンパク質の分子量測定やペプチドの構造決定などに広く用いられるようになってきている。

### 実験方法

#### 1) 試料

ホウ素-多糖複合体は、シュガービートおよびタケノコから単離したものをを用いた。また、同複合体を、0.5M 塩酸中で 25℃、30分処理後、1M 水酸化ナトリウムで中和し、水に対して透析し、最後に凍結乾燥して、酸処理物を調製した。

#### 2) FI/ICP-MS 測定

試料中のホウ素含量測定は、第2章第1節で述べたフローインジェクション(FI)/ICP-MS 測定により行った。FI 条件は、キャリアー: 脱イオン水、流速: 1.0ml/min、試料注入量: 20 $\mu$ l とした。

#### 3) $^{11}\text{B}$ NMR

試料の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトル測定は、日本電子 JNM-A600 を用い、共鳴周波数 192.6MHz、25 °C、試料管のスピンングと周波数ロック無しで行った。試料管は、石英製の直径 5mm のものを用いた。ケミカルシフトは、外部基準の 0.1M ホウ酸水溶液を 0.0ppm として求めた。NMR 測定条件は、データポイント数: 2048、観測周波数範囲: 28900Hz、パルス幅: 15 $\mu\text{s}$ (90 度)、パルスの繰り返し時間: 0.11s とした。

#### 4) サイズ排除 HPLC

試料のサイズ排除 HPLC 測定は、示差屈折計 (Shimadzu RID06A) を検出器とした Shimadzu LC6A システムを用いて行った。サイズ排除カラムは、YMC-Pack Diol-120(8 x 300mm)(YMC Co., Kyoto, Japan) を用いた。HPLC の測定条件は、溶離液: 0.2M  $\text{HCO}_2\text{NH}_4$ (pH7.0)、流速: 0.8 ml/min とした。カラムは、プルラン標準(Shodex STANDARD P-82(P-5, Mw=5,800; P-10, Mw=12,200; P-20, Mw=23,700; P-100, Mw=10.0 $\times 10^4$ ; P-1600, Mw=160 $\times 10^4$ ); Showa Denko K.K., Tokyo, Japan) を用いて分子量校正した。

#### 5) MALDI/TOF-MS

試料の酸加水分解物の MALDI/TOF-MS 測定は、窒素レーザー(337nm)を装備した TofSpec-SE(Micromass Ltd, Manchester, U.K.) を用いて行った。2,5-ジヒドロキシベンゾイックアシッド 20mg をアセトニトリル:水(1:1) 1ml に溶かし、マトリクス溶液とした。濃度約 1mg/ml の試料水溶液 1.5 $\mu\text{l}$  とマトリクス溶液 1.5 $\mu\text{l}$  を混ぜ合わせて、1.5 $\mu\text{l}$  をターゲット上に置いて風乾後、測定した。

#### 5) 糖組成および糖結合組成の分析

糖組成分析は、誘導体化し GLC(ガスクロマトグラフィー)(Ishii, 1995)、そして糖結合組成分析は、誘導体化し GLC-MS(York *et al.*, 1985a) により行った。

#### 結果および考察

### 1) ホウ素-多糖複合体のホウ素含量と分子量

ホウ素-多糖複合体のホウ素含量は、シュガービートの場合、1.2mg/g、タケノコの場合、1.5mg/gという値が得られた。この値は、ホウ素-多糖複合体は数mgしか得られないために、1mg程度の複合体を精秤して1mlの水に溶かして、その内の20 $\mu$ lをFI/ICP-MS測定することにより求めたものである。従って、数十から数百mgのホウ素-多糖複合体を酸分解して分析しているわけではないので、試料重の測定誤差や試料中のフリーなホウ酸のコンタミによる誤差を含んでいると考えられる。

ホウ素-多糖複合体の分子量は、シュガービートの場合、サイズ排除HPLCでは10500、MALDI/TOF-MSでは8900(図3-2)、そしてタケノコの場合、サイズ排除HPLCでは8200、MALDI/TOF-MSでは9200(図3-3)という結果が得られた。サイズ排除HPLCによる分子量測定は、ブルラン標準で作成した校正曲線から分子量を求めるのであるから、未知試料の特性がブルランと異なる程度が大きいほど、得られる分子量の誤差は大きくなる。それに対して、MALDI/TOF-MSによる分子量測定は、校正は分子量既知のタンパク質で行い、測定原理は質量分析法であるから得られる分子量は正確である。しかし、図3-2,3-3に示すように、ホウ素-多糖複合体のMALDI/TOF-MSスペクトルの分子ピークは極めてブロードである。このことから、この複合体の分子量は一定ではなく、その化学構造は不均一であると考えられる。

ホウ素-多糖複合体のホウ素含量と分子量から、複合体1分子に含まれるホウ素の数を計算することができる。シュガービートの場合、分子量8900で、ホウ素含量1.2mg/gであったから、ホウ素の原子量を10.8とすると、ホウ素数 $= (0.0012/10.8)/(1/8900) = 0.99$ となる。同様に、タケノコの場合、ホウ素数は $(0.0015/10.8)/(1/9200) = 1.28$ となる。すなわち、ホウ素-多糖複合体1分子に含まれるホウ素は約1個であるということになる。

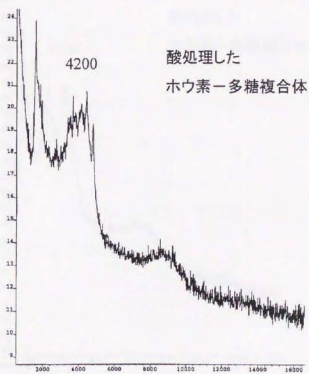
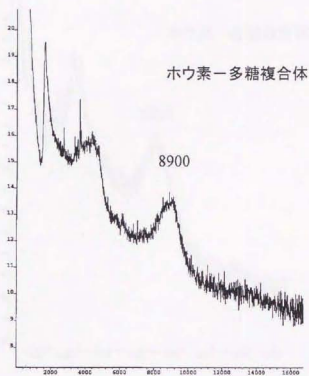


図3-2 シュガービートから単離したホウ素-多糖複合体のMALDI/TOF-MSスペクトル

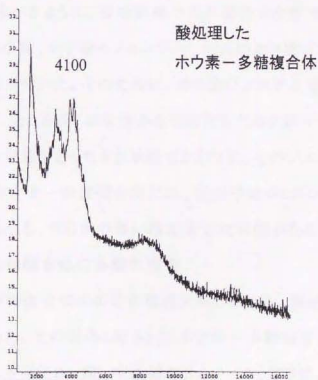
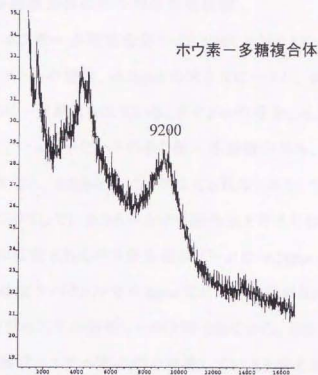


図3-3 タケノコから単離したホウ素-多糖複合体のMALDI/TOF-MSスペクトル

## 2) ホウ素-多糖複合体のホウ素の存在状態

図 3-4 に、ホウ素-多糖複合体の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを示す。スペクトルには、シュガービートの場合、 $-9.5\text{ppm}$  の大きなピークと、 $0.0\text{ppm}$  にその  $1/10$  程度の大きさのピークが見られている。タケノコの場合、 $-9.5\text{ppm}$  のみにピークが見られている。シュガービートのホウ素-多糖複合体も、透析して低分子を徹底的に除去すると、 $0.0\text{ppm}$  のピークは見られなくなる。すなわち、 $0.0\text{ppm}$  のピークは、コンタミしているフリーなホウ酸由来と考えられる。したがって、ホウ素-多糖複合体に含まれるホウ素由来のピークは $-9.5\text{ppm}$  のピーク、ただ一つである。 $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルで $-9.5\text{ppm}$  にピークを与えるのは、2つのジヒドロキシ化合物とジエステル結合したホウ酸であるから、ホウ素-多糖複合体のホウ素は、ホウ酸ジエステル態の形で存在していると言える。

第 2 章で述べたように、植物組織中の水溶性ホウ素は、相互に速い平衡関係にあるホウ酸、ホウ酸モノエステル、およびホウ酸ジエステルという3つの化学形態からなっていた。そのために、ホウ酸ジエステル態だけを単離することはできなかった。ところが、細胞壁から可溶化したホウ素-多糖複合体は、ホウ酸ジエステルの形態をとったまま単離できるほど、そのジエステル構造は安定であった。このホウ素-多糖複合体には、低分子のジヒドロキシ化合物とホウ酸の平衡系とは異なる、何らかの強い構造安定化要因があると考えられる。

## 3) ホウ素-多糖複合体の多糖の構造

ホウ素-多糖複合体の多糖の構造を知るために、糖組成および糖結合組成の分析を行った。その結果(表 3-1)、ホウ素-多糖複合体には、酸性糖のガラクトuron酸、グルクロン酸、中性糖のラムノース、アラビノース、ガラクトースなどが多く含まれていた。さらに、これら良く知られた糖に加えて、アピオース、アセリン酸、Kdo、Dhaなども含まれていた。また、特徴的な結合として、3位や2,3,4位に結合を持つラムノース残基、3,4位に結合を持つフコース残基、



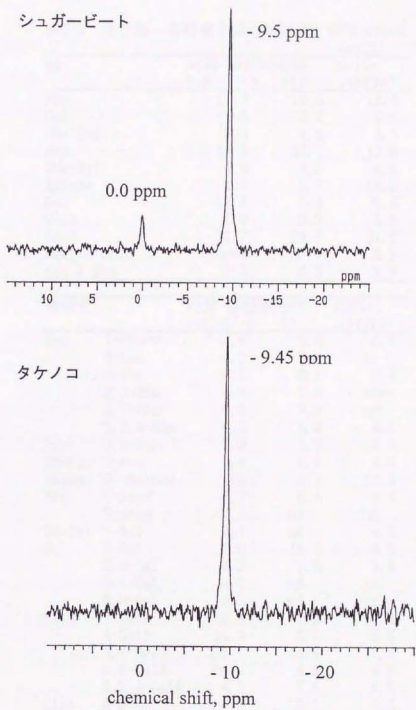


図3-4 単離したホウ素-多糖複合体の $^{11}\text{B}$  NMRスペクトル  
上:シュガービート、下:タケノコ

表3-1 ホウ素-多糖複合体の糖組成と糖結合組成

糖	(mol%)		
	ホウ素-多糖複合体 シュカ <sup>a</sup> -ビ <sup>a</sup> -ト	タケノコ	RGII* シカモアカエデ <sup>b</sup>
Rha	11.3	18.6	12.4
Fuc	1.6	3.2	2.8
2Me-Fuc	3.3	4.6	3.5
Ara	10.9	12.1	10.8
2Me-Xyl	4.9	4.5	4.8
Apiose	4.5	6.7	12.2
Gal	12.4	8.3	9.0
GlcA	7.0	3.2	3.2
GalA	37.7	28.7	31.2
Aceric acid	tr**	tr**	3.5
Kdo & Dha	5.3	8.3	3.5

糖結合	ホウ素-多糖複合体			
	シュカ <sup>a</sup> -ビ <sup>a</sup> -ト	タケノコ	RGII* シカモアカエデ <sup>b</sup>	
Rha	T-Rha**	4.5	4.6	6.6
	2-Rha	4.3	2.3	tr
	3-Rha	5.3	5.1	5.7
	2,3-Rha	0.8	1.6	nd**
	2,4-Rha	0.9	0.8	nd
	2,3,4-Rha	6.5	5.2	4.5
Fuc	3,4-Fuc	3.3	5.8	4.5
	2MeFuc	T-Fuc	5.6	6.7
Apiose	3'-Apiose	5.0	5.2	10.9
Ara	T-Ara <sup>f</sup>	6.3	6.4	6.1
	T-Ara <sup>p</sup>	2.5	nd	nd
2MeXyl	T-Xyl	4.1	nd	4.5
Gal	T-Gal	5.0	11.0	4.9
	2,4-Gal	5.2	7.6	5.6
	3,4-Gal	4.3	nd	nd
	3,6-Gal	0.3	nd	nd
	GalA	T-GalA	10.0	7.2
GalA	4-GalA	14.3	5.6	8.8
	3,4-GalA	nd	10.7	7.3
	2,4-GalA	nd	4.8	4.6
	2,3,4-GalA <sup>h</sup>	4.7	7.8	1.5
GlcA	2-GlcA	7.1	3.1	6.3

\* Stevenson *et al.* (1988)\*\*T, non-reducing terminal rhamnosyl, etc. ;  
tr, trace; nd, not determined.

そして2位に結合を持つグルクロン酸残基などが存在することが明らかとなった。

これら糖組成と糖結合組成を持つオリゴ糖として、ラムノガラクトシロナンII (RGII)が知られている(O'Neill *et al.*, 1990)。これまで報告されているシカモアカエデから単離されたRGIIの糖組成と糖結合組成と、今回、シュガービートとタケノコから単離したホウ素-多糖複合体の多糖部分とを比較すると、両者は良く一致していた。このことから、シュガービートとタケノコから単離したホウ素-多糖複合体の多糖部分は、RGIIであることが明らかとなった。RGIIは、植物細胞壁マトリクス多糖の一つであるペクチンの構成多糖の一つとして知られている(O'Neill *et al.*, 1990)。 $\alpha$ -1,4結合したガラクトシロニン直鎖にラムノース、アピオース、アラビノース等多種多様な糖からなる側鎖が結合しており、分子量は約5000である。

#### 4)ホウ素-多糖複合体の酸処理

ホウ素-多糖複合体の酸処理物のホウ素含量は、検出限界以下であった。また、その分子量は、MALDI/TOF-MSで測定した結果、シュガービートで4200、タケノコで4100であった(図3-2,3-3)。酸処理前の分子量が、シュガービートで8900、タケノコで9200であったから、ホウ素-多糖複合体の分子量は、酸処理でホウ素がはずれるとともに、約半分に減少したことになる。ところが、酸処理物の糖組成と糖結合組成は、酸処理前のそれらと同様であった。このことは、ホウ素-多糖複合体が2量体であることを示している。

1)-4)の結果を総合すると、シュガービートとタケノコから単離したホウ素-多糖複合体は、1分子のホウ酸が、2分子のラムノガラクトシロナンIIを、ホウ酸ジエステル結合で架橋している構造をとっていると結論される。1分子のRGIIの分子量が約5000であるから、2分子で分子量は約10000となり、ホウ素-多糖複合体の分子量と一致すること、塩酸処理でホウ素-多糖複合体の

分子量が半分の約 5000 となったとき糖組成や糖結合組成が変わらないことも矛盾なく説明できる。以後、このホウ素-多糖複合体を、ラムノガラクトシロナン II-ホウ酸ダイマー(dRGII-B)と記述する。酸処理物は、ラムノガラクトシロナン II モノマー(mRGII)ということになる。

筆者らが、シュガービートとタケノコから単離したホウ素-多糖複合体の構造決定を進めている間に、小林らは、ダイコン根から単離したホウ素-多糖複合体の構造が、ラムノガラクトシロナン II-ホウ酸ダイマーであることを報告した(Kobayashi *et al.*, 1996)。上述したシュガービートとタケノコから単離したラムノガラクトシロナン II-ホウ酸ダイマーの構造は、ホウ素の含量以外は、小林らの結果とほぼ同様であった。小林らは、彼らがダイコン根から単離した dRGII-B について、分子量 9894、ホウ素含量 0.30%(3.0mg/g)という測定結果を得て、複合体 1mol は 2.1mol のホウ素を含むと報告している。それに対しシュガービートとタケノコ dRGII-B の場合、複合体 1mol に含まれるホウ素は 1mol という結果であったから、複合体に含まれるホウ素の個数は、小林らの結果の半分ということになる。

## 要約

ホウ素-多糖複合体の分子量は MALDI/TOF-MS 測定を行った結果、約 9000 であり、複合体 1 分子に含まれるホウ素は FI/ICP-MS 測定を行った結果、約 1 個であり、さらに  $^{11}\text{B}$  NMR 測定を行った結果、ホウ酸ジエステル形態で存在していた。また複合体の多糖部分は、ラムノガラクトシロナン II であった。さらに、複合体を酸処理した結果、複合体は 2 量体であった。これらのことから、シュガービートとタケノコから単離したホウ素-多糖複合体は、1 分子のホウ酸が、2 分子のラムノガラクトシロナン II を、ホウ酸ジエステル結合で架橋している構造であると結論された。

### 第3節 dRGII-Bと金属

前節で述べたように、植物細胞壁から単離したホウ素-多糖複合体の構造は、ラムノガラクトソナンII-ホウ酸ダイマー(dRGII-B)であった。O'Neillら(1996)は、dRGII-B水溶液をICP発光分析法で全分析した結果から、dRGII-BはSr, Ba, Pbなど金属を含むことを報告した。しかし、検出されたSr, Ba, Pbなど金属が、確かにdRGII-Bと結合しているのか、あるいは一部、または全部が試料溶液にコンタミしているのか、その点は明瞭ではなかった。そこで、dRGII-B複合体およびその酸処理物について、サイズ排除HPLC/ICP-MS測定を行った。

#### 実験方法

##### 1) dRGII-B複合体の酸処理

dRGII-B複合体は、シュガービートとタケノコから調製した。dRGII-B水溶液0.5ml (dRGII-B濃度:シュガービート1.6mg/ml、タケノコ0.8mg/ml)を0.25mlずつ、二つに分けた。一方には、水0.75mlを加え、dRGII-B複合体試料とした。もう一方には、0.5M塩酸0.5mlを加え、30℃、30分間インキュベートした後、1M水酸化ナトリウム0.25mlで中和し、酸処理物試料とした。

##### 2) HPLC/ICP-MS測定

第2章第2節と同様な方法で行った。試料注入量は100 $\mu$ lとした。

#### 結果および考察

##### 1) dRGII-B複合体のHPLC/ICP-MSクロマトグラム

dRGII-B水溶液を試料として、質量数5から240の範囲でICP-MSスペクト

ルを測定した。そのスペクトルを水ブランクのスペクトルと比較した結果(図 3-5)、dRGII-B 水溶液は、ホウ素以外に Mg, Ca, Zn, Sr, Ba, そして Pb を含んでいることが分かった。そこで、サイズ排除 HPLC/ICP-MS 測定では、ホウ素とともに、これらの金属を同時測定した。

図 3-6 左にタケノコ、図 3-7 左にシュガービートの dRGII-B 水溶液の HPLC/ICP-MS クロマトグラムを示す。元素によって、濃度以外にも、イオン化効率や測定質量数の天然存在比が異なることから、イオンカウントが大きく異なるので、見やすくするために、 $^{40}\text{Ca}$ 、 $^{66}\text{Zn}$ などは、縦軸を拡大して表示してある。

$^{11}\text{B}$ のクロマトグラムを見ると、高分子領域の保持時間 525-530 秒にピークが一つ観測されている。このピークが、分子量約 9000 の dRGII-B 中のホウ素に由来している。そして、 $^{40}\text{Ca}$ 、 $^{66}\text{Zn}$ 、 $^{88}\text{Sr}$ 、 $^{138}\text{Ba}$ 、 $^{208}\text{Pb}$ のピークが、このホウ素のピークと同じ保持時間に現れている。それに対して、 $^{24}\text{Mg}$ のピークは、保持時間 530 秒には見られず、720 秒に現れている。これは、フリーな  $\text{Mg}^{2+}$ イオンに由来している。これらのことから、dRGII-B はホウ素以外に Ca, Zn, Sr, Ba, そして Pb と結合していることが直接的に証明された。

図 3-8 に、dRGII-B 水溶液を FI/ICP-MS 測定して求めた dRGII-B の元素含量を示す。dRGII-B 複合体 1 分子は、約 1 個のホウ素を含むが、Ca も約 1 個含んでいた。Zn, Sr, Ba, Pb の含量は、シュガービートとタケノコで多少異なるが、多くても dRGII-B 複合体 1 分子当たり 0.2 個であった。

## 2) dRGII-B 複合体酸処理物の HPLC/ICP-MS クロマトグラム

図 3-6 右にタケノコ、図 3-7 右にシュガービートの dRGII-B 酸処理物水溶液の HPLC/ICP-MS クロマトグラムを示す。 $^{11}\text{B}$ のクロマトグラムを見ると、酸処理前の dRGII-B で観測されていた保持時間 525-530 秒のピークが失われ、新たに 895 秒にブロードなピークが現れている。これは、フリーなホウ酸のピーク

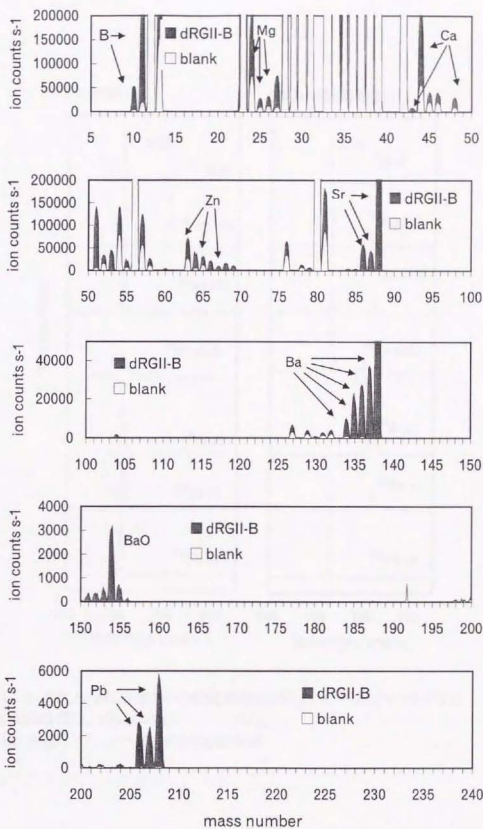


図3-5 シュガービートdRGII-B水溶液のICP-MSスペクトル  
dRGII-B: 6 $\mu$ g/ml

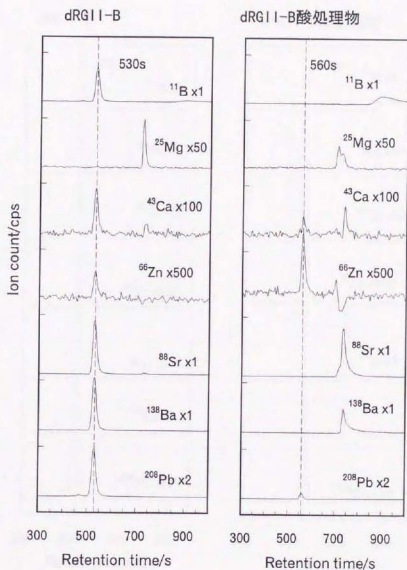


図3-6 タケノコdRGII-Bとその酸処理物のHPLC/ICP-MSクロマトグラム  
 注入試料量は、 $19\mu\text{g}/100\mu\text{l}$   
 Y軸1目盛は $10^6$  cpsで、倍率はY軸拡大率



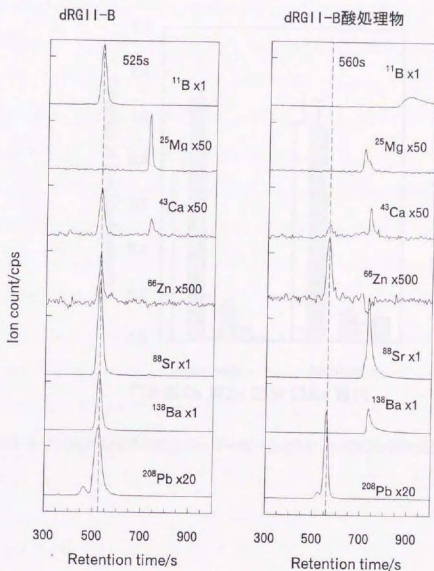


図3-7 シュガービートdRGII-Bとその酸処理物のLC/ICP-MSクロマトグラム

注入試料量は、39 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$

Y軸1目盛は $10^6$  cpsで、倍率はY軸拡大率

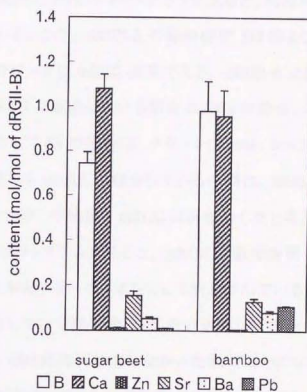


図3-8 FI/ICP-MSで求めたシュガービートとタケノコdRGII-Bの元素含量

クである。すなわち、酸処理により、dRGII-B からホウ素が除かれ、それとともに RGII-B ダイマーは 2 個の RGII モノマーに変わったのである。

そのとき、Ca、Zn と Pb のクロマトグラムを見ると、保持時間 560 秒にピークが観測されている。この、dRGII-B の保持時間 530 秒より 30 秒後に現れた、より低分子量のピークは mRGII 由来である。dRGII-B に結合していた金属が、酸処理後も mRGII に結合している割合は、Ca の場合、1/3 から 1/4、Zn の場合は全部、そして Pb の場合は、タケノコで 10%、シュガービートで 70% であった。酸処理後も mRGII に結合している金属は、酸処理により dRGII-B から遊離したイオンが、中和後、mRGII に再結合したと考えられる。

Sr と Ba のクロマトグラムを見ると、mRGII の保持時間 560 秒にはピークが見られず、720 秒にフリーなイオンとして検出されている。したがって、dRGII-B に結合していて酸処理にともない遊離した Sr と Ba イオンは、その全てが、中和後、mRGII に再結合しなかったということになる。

酸処理により dRGII-B から生成した mRGII に再結合しなかったイオンは、その結合サイトが dRGII-B にしかなく、mRGII には結合サイトがないため再結合できなかったと考えられる。したがって以上の結果から、dRGII-B 複合体に結合している全ての Sr、Ba と、多くの Ca、Pb が、複合体に特異的に結合していると言えよう。

## 要約

dRGII-B 水溶液と、その酸処理物の HPLC/ICP-MS 測定を行った結果、RGII-B 複合体に結合している全ての Sr、Ba と、多くの Ca、Pb が、複合体に特異的に結合していた。

#### 第4節 HPLC/ICP-AESによるdRGII-B中BとCaの定量

第2,3節で述べたように、全分析の結果から、ラムノガラクトソナンII-ホウ酸ダイマー(dRGII-B)は、1分子当たり、約1個のホウ素とカルシウムを含んでいた。一方、小林らは、dRGII-Bは1分子当たり2.1個のホウ素を含んでいると報告している(Kobayashi *et al.*, 1996)。dRGII-Bは貴重な試料であるので、全分析測定には数mgしか用いることができないため、全分析測定結果には、試料溶液にコンタミしているホウ素やカルシウム由来の誤差がないとは言いきれない。

dRGII-Bと結合している元素を定量するためには、サイズ排除HPLCを用いてdRGII-Bとコンタミしているフリーなホウ酸やカルシウムイオンを分離して、ICP-AESやICP-MSで元素特異的に定量する方法が適当と考えられる。しかし、元素含量既知のdRGII-B標品はないので、定量にdRGII-B標品を用いた検量線法は使えない。そういう場合の定量法として、二つの方法が報告されている。一つは、溶離液をカラムに流して未知試料をHPLC分離測定した後に、インジェクターの後のスイッチングバルブを切り換えて溶離液をカラムに流さないようにして、元素の無機標準溶液をFI測定し検量線を作成し定量する方法である(Takatera and Watanabe, 1992)。今一つは、カラム(接続されている場合は紫外可視検出器)の出口とICP-MSなど元素検出装置の間に、2つ目のインジェクターを取り付けて、通常の1つ目のインジェクター1(カラムの前)で未知試料を注入して分離検出後、2つ目のインジェクター2で元素の無機標準溶液を注入しFI測定する方法である(Leopold and Fricke, 1997)。

ここでは、装置が簡単であること、常にカラムに溶離液を流す方が安定であると思われることから、後者の方法で、dRGII-B複合体およびその酸処理物

中のホウ素とカルシウムを定量するために、サイズ排除 HPLC/ICP-AES 測定を行った。ICP-MS ではなく ICP-AES を用いたのは、一般に多くの元素については ICP-MS の感度が ICP-AES のそれより高いが、カルシウムについては逆に ICP-AES のほうが ICP-MS に比べて感度が良い場合があるからである(伊藤, 1988)。それは、Ar プラズマを用いる ICP-MS では、カルシウムに関しては、天然存在比 96.97% の  $^{40}\text{Ca}$  は  $^{40}\text{Ar}$  の妨害を大きく受けて測定できず、また 2.06% の  $^{44}\text{Ca}$  は  $\text{CO}_2$ 、0.64% の  $^{42}\text{Ca}$  は  $\text{ArH}_2$  の妨害を大きく受けてしまうので、天然存在比 0.145% しかない  $^{43}\text{Ca}$  を測定に使わざるをえないことが大きな理由である(河口, 1994)。

## 実験方法

### 1) dRGII-B 複合体の酸処理

dRGII-B 複合体は、シュガービートとタケノコから調製した。dRGII-B 水溶液 (dRGII-B 濃度: シュガービート 1.7mg/ml、タケノコ 1.6mg/ml) を調製した。この水溶液を水で 4 倍に希釈して、dRGII-B 複合体試料とした。また、この水溶液 100 $\mu\text{l}$  に 0.5M 塩酸 200 $\mu\text{l}$  を加え、30 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間インキュベートした後、1M 水酸化ナトリウム 100 $\mu\text{l}$  で中和し、酸処理物試料とした。

### 2) HPLC/ICP-AES 測定

HPLC 装置は、JASCO PU-980 ポンプ(JASCO Co., Tokyo, Japan)を用い、カラムの前後に Rheodyne 9125 インジェクターを 2 個取り付け付けた(インジェクションループ各 20 $\mu\text{l}$ )。サイズ排除カラムは、YMC-Pack Diol-120(8 x 300mm) (YMC Co., Kyoto, Japan)を用いた。HPLC の測定条件は、溶離液: 0.2M  $\text{HCO}_3\text{NH}_4$ (pH6.5)、流速: 1.0 ml/min、試料・標準溶液注入量: 20 $\mu\text{l}$ とした。

ICP-AES 装置は、SII SPQ4000(Seiko Instruments Inc., Chiba, Japan)を用いた。HPLC 装置の 2 つ目のインジェクター 2 の出口を ICP-AES のネブライザー入り

口に、PEEK(poly ether ether ketone)製チュービングにより直結した。ICP-AESの測定条件は、プラズマガス流量：16L min<sup>-1</sup>、外部ガス流量：0.5L min<sup>-1</sup>、ネブライザーガス流量：0.9L min<sup>-1</sup>、Rf出力：1.3kWとした。検出は、NEC PC-9801 パーソナルコンピュータ上で稼働するSII製SPS4000測定ソフトウェア(version 2.80)の過渡測定モードを用いた。Bは分光器Bで波長249.773nm、Caは分光器Aで波長393.366nmで、1秒毎に記録し、測定終了後、結果をテキストファイルに保存した。そのファイルを、市販の表計算ソフトウェアで読み込んで、クロマトグラムを得た。

インジェクター1と2は20 $\mu$ lのサンプルループを用いたが、その容量は正確ではないため、両者の容量は等しくない。そこで、カラムをはずしてFI/ICP-AESモードにして、インジェクター1と2から交互に同じBとCa標準溶液を注入して、インジェクター1から注入した場合と2から注入した場合とのピーク面積比を求め、両者のサンプルループの容量比とし、検量線を補正した。

### 結果および考察

図3-9に、シュガービートのdRGII-B水溶液(左)とその酸処理物(右)のHPLC/ICP-AESクロマトグラムを示す。dRGII-B水溶液のクロマトグラムには、保持時間548sにdRGII-B由来のピークがBとCa両方で見られている。保持時間752sのCaのピークはフリーのCaイオンである。また、1100s以後のシャープな2つのピークは、定量のためにインジェクター2から注入した標準溶液B0.4ppm, Ca1.6ppmのピークである。酸処理物のクロマトグラムには、905sにフリーのホウ酸、591sにmRGIIに結合しているCa、そして754sにフリーのCaイオンのピークが見られている。

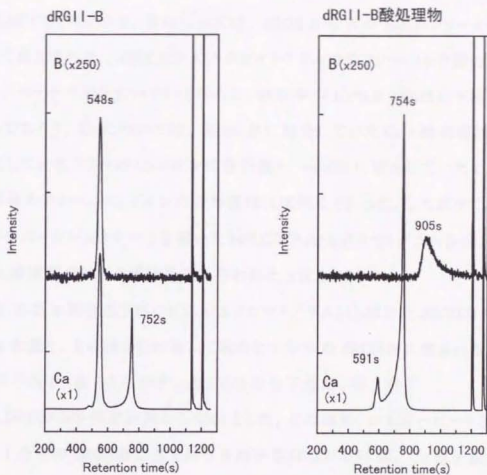


図3-9 シュガービートdRGII-Bとその酸処理物のLC/ICP-AESクロマトグラム

Y軸1目盛は $5 \times 10^5$ で、倍率はY軸拡大率

図 3-10 に、シュガービートとタケノコの dRGII-B 水溶液とその酸処理物の HPLC/ICP-AES クロマトグラムから求めた各成分の B と Ca 濃度を示す。塩酸処理(HCl+)により、dRGII-B からフリーのホウ酸と Ca イオンが遊離し、mRGII が生成する。そのとき、B については、dRGII-B の B の 80%がフリーのホウ酸として検出された。HPLC/ICP-AES クロマトグラムでのフリーのホウ酸のピークは、ブロードで裾を引いているために、回収率が 100%を 20%ほど下回っているであろう。Ca については、dRGII-B に結合していた Ca と酸処理前から存在していたフリーの Ca イオンの合計量と、mRGII に結合していた Ca と酸処理後のフリーの Ca イオンの合計量はほぼ同じであった。したがって、カラムの後のインジェクター 2 を用いた HPLC/ICP-AES クロマトグラム各成分の B と Ca 濃度測定は、ほぼ定量的に行われたと言える。

dRGII-B 水溶液の HPLC/ICP-AES クロマトグラムから求めた dRGII-B 中の B と Ca 含量と、その値から計算して求めた 1 分子の dRGII-B に含まれる B と Ca 原子数を、表 3-2 に示す。dRGII-B の分子量は、第 2 節の MALDI/TOF-MS 測定結果から 9000 とした。その結果、シュガービートとタケノコの 1 分子の dRGII-B に含まれる B 原子数は 0.87-0.93 個、Ca 原子数は 0.81-0.86 個と計算された。dRGII-B 試料重量は、それに含まれる微量の水分や不純物により正の誤差を含む可能性があることも考慮すると、この結果から、1 分子の dRGII-B に含まれる B 原子数は 1 個であり、2 個ではないことは間違いない。また、1 分子の dRGII-B に含まれる Ca 原子数もほぼ 1 個であると言える。図 3-9 左の dRGII-B 水溶液の HPLC/ICP-AES クロマトグラムを見ても分かるように、試料溶液中には dRGII-B に結合している Ca 以外に、フリーの Ca イオンが無視できない量、含まれている。この場合、試料溶液を全分析して Ca 濃度を求めて dRGII-B に結合している Ca 濃度としたら、過大評価する危険性がある。その点で、HPLC/ICP-AES による分離定量の有用性は極めて



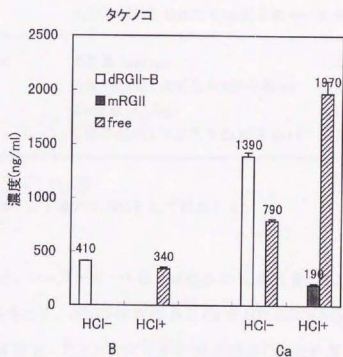
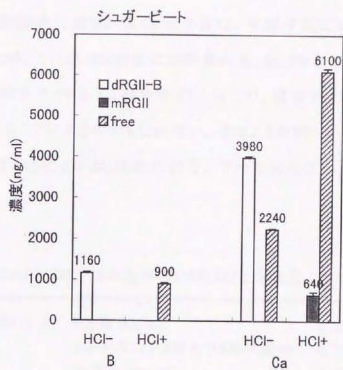


図3-10 dRGII-Bとその酸処理物のLC/ICP-AESクロマトグラムから求めた各成分の濃度  
 HCl-: 塩酸未処理(水溶液)、HCl+: 塩酸処理

大きいと言える。

1分子のdRGII-Bに含まれるCa原子数は、B原子数に比べて少し小さな値が得られたが、これはdRGII-Bには微量のSr, Ba, Pbなどが結合しているが、それらの結合サイトがCa結合サイトと同じで、結合サイトがSrなどにより置換されていることによるのかもしれない。そのことを明らかにするためには、今後、HPLC/ICP-MSによりdRGII-Bに結合しているSrなどの金属の定量を行う必要がある。

表3-2 HPLC/ICP-AESで求めたdRGII-B中のBとCa含量

シュガービートdRGII-B	B含量(mg/mg)	1.12 ± 0.03
	1分子dRGII-B当たりB原子数**	0.93
	Ca含量(mg/mg)	3.83 ± 0.04
	1分子dRGII-B当たりCa原子数**	0.86
ケノコdRGII-B	B含量(mg/mg)	1.05 ± 0.00
	1分子dRGII-B当たりB原子数**	0.87
	Ca含量(mg/mg)	3.57 ± 0.09
	1分子dRGII-B当たりCa原子数**	0.81

\* 測定繰り返しは2回

\*\* dRGII-Bの分子量は9,000として計算した。

ここで求めた、シュガービートのdRGII-Bの元素含量、1.12 $\mu$ gB/mg、3.83 $\mu$ gCa/mgをもとに、dRGII-B中のBとCaをHPLC/ICP-MSとHPLC/ICP-AES測定したときの両元素の検出限界(3 $\sigma$ )を計算した。その結果を表3-3に示す。Bについては、ICP-MSはICP-AESより一桁検出限界が小さく、Caについては、ICP-MSはICP-AESより二桁検出限界が大きかった。このように、ICP-MSやICP-AESはそれぞれの特長があり、またそれに市販装

置の特性が加わるので、それらを考慮して目的に応じた装置の選択をしなければならない。

表 3-3 dRGII-B 中の B と Ca の HPLC/ICP-MS と HPLC/ICP-AES 測定における検出限界(3 $\sigma$ )

	B		Ca	
	絶対量(ng)	濃度( $\mu$ g/l)	絶対量(ng)	濃度( $\mu$ g/l)
ICP-AES(SPS4000)	0.96	48.1	0.06	2.8
ICP-MS(SPQ8000A)	0.06	3.1	7.96	397.9

\* シュガービートの dRGII-B の元素含量は、1.12 $\mu$ gB/mg、3.83 $\mu$ gCa/mg として計算

\*\* ICP-AES は図 3-9、ICP-MS は図 3-7 のデータから計算

\*\*\* サンプルループは、20 $\mu$ l

図 3-9 右の dRGII-B 酸処理物の HPLC/ICP-AES クロマトグラムに見られたように、mRGII にも Ca が結合していた。この Ca 量は、シュガービート dRGII-B で 0.62 $\mu$ g/mg、タケノコ dRGII-B で 0.50 $\mu$ g/mg であった。mRGII の分子量を 4500 として、1 分子の mRGII に結合している Ca 原子数を計算すると、シュガービート mRGII で 0.07 個、タケノコ mRGII で 0.06 個となった。すなわち、1 分子の dRGII-B に 1 個結合していた Ca は、酸処理により dRGII-B が 2 分子の mRGII に解離したとき、ほとんどはフリーの Ca イオンになり、中和後の mRGII に結合していた Ca は 5% 以下ということになる。

第 3 節では、dRGII-B 水溶液とその酸処理物の HPLC/ICP-MS 測定により、dRGII-B に結合している Ca は、酸処理後もその 1/3 から 1/4 が mRGII に結合していたことから、dRGII-B 複合体に結合している多くの Ca が、複合体に特異的に結合していると結論した。本節の HPLC/ICP-AES 測定結果は、その結論を裏付けるとともに、Ca に関しては、ICP-MS に比べて検出限界が小さい

ICP-AESを用いることで、dRGII-B複合体に結合している95%以上のCaが、複合体に特異的に結合していることを示したといえる。

#### 要約

カラムと元素検出器の間に定量用インジェクタを付けて、dRGII-B水溶液のHPLC/ICP-AES測定を行った結果、1分子のdRGII-Bに含まれるB原子数は0.87-0.93個、Ca原子数は0.81-0.86個であった。また、dRGII-B水溶液とその酸処理物のHPLC/ICP-AES測定を行った結果、dRGII-B複合体に結合している95%以上のCaが、複合体に特異的に結合していた。

## 第5節 dRGII-Bと結合している金属の特性

第3, 4節で述べたように、ラムノガラクトツロナンII-ホウ酸ダイマー(dRGII-B)は、1分子当たり、1個のホウ素を含むとともに、1個のカルシウムと、多くても0.2個以下と少ないものの、Sr, Ba, Pbと結合していた。これら金属がdRGII-Bと結合している意味を調べるために、dRGII-BをEDTA処理して、結合金属を除いたときのdRGII-Bの安定性、およびdRGII-Bを金属塩処理したときの結合金属の置換特性を、サイズ排除HPLC/ICP-AESまたはHPLC/ICP-MS測定を行って調べた。

### 実験方法

#### 1) dRGII-B複合体のEDTA処理

溶離液を通常の0.2Mギ酸アンモニウムではなく、0.5mMのEDTAを含む0.2Mギ酸アンモニウムに変えて、dRGII-B複合体試料をサイズ排除HPLC/ICP-MSとHPLC/ICP-AES測定した。HPLC/ICP-MSでは、 $^{11}\text{B}$ ,  $^{88}\text{Sr}$ ,  $^{137}\text{Ba}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ を、HPLC/ICP-AESでは、BとCaを同時測定した。

#### 2) dRGII-B複合体の金属塩処理

31mM酢酸緩衝液(pH5.0)中の0.03mMのdRGII-B溶液80 $\mu\text{l}$ に、1.0mMのCaCl<sub>2</sub>, SrCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, またはPbCl<sub>2</sub>水溶液20 $\mu\text{l}$ を加えて、混合して、直ちにサイズ排除HPLC/ICP-MS測定を行った。

#### 3) HPLC/ICP-MS測定とHPLC/ICP-AES測定

HPLC/ICP-MS測定は、第2章第2節と同様な方法で行った。  
HPLC/ICP-AES測定は、第3章第4節と同様な方法で行った。

## 結果および考察

### 1) dRGII-B 複合体の EDTA 処理

通常の溶離液 0.2M 硝酸アンモニウムに 0.5mM の EDTA を加えたとき、ICP-MS の  $^{40}\text{Ca}$  のバックグラウンドが高く測定が困難であったので、Ca は HPLC/ICP-AES で、Ca を除いた金属は HPLC/ICP-MS で測定した。図 3-11 に、HPLC/ICP-AES 測定により求めた、溶離液に EDTA を加えたときのシュガービートとタケノコ dRGII-B の元素濃度を示す。また、図 3-12 に、HPLC/ICP-MS 測定により求めた、溶離液に EDTA を加えたときのシュガービートとタケノコ dRGII-B の元素イオン強度を、 $^{11}\text{B}$  の強度を 1 としてそれに対する比で示す。図 3-12 で示されている強度は ICP-MS のイオンカウント比であり、実際の濃度とは異なることに注意する必要がある。

図 3-11 と 3-12 を見ると、EDTA の有無により、シュガービートとタケノコのどちらの dRGII-B でも B 濃度に違いがないから、溶離液への EDTA 添加による dRGII-B の mRGII への分解は起きていないことが分かる。dRGII-B に結合している金属については、EDTA 添加により、Pb は dRGII-B から 100% 除かれ、Ca も 98% 除かれた。それに対して、Sr は 20 ~ 30%、Ba は 70 ~ 80% 残存した。EDTA とこれら金属イオンとの生成定数は、Ba 7.8, Sr 8.8, Ca 11, Pb 18.3 であるから、この dRGII-B からの金属イオンの除去割合の違いは、この生成定数の差を反映していると思われる。

以上の結果から、dRGII-B に結合している金属の中で、EDTA 処理により、分子当たり結合数が多い Ca が dRGII-B から除かれても、dRGII-B は直ちに mRGII へ分解はしないことが示された。このことは、Ca は dRGII-B の構造に不可欠な要素ではないことを示唆している。

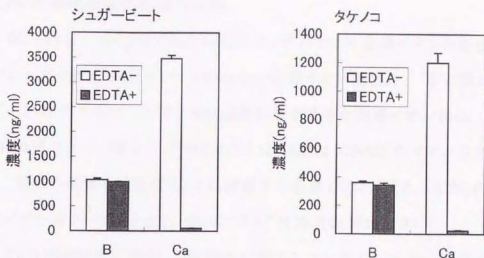


図3-11 HPLC/ICP-AES測定により求めた溶離液にEDTAを加えたときのシュガービートとタケノコdRGII-Bの元素濃度

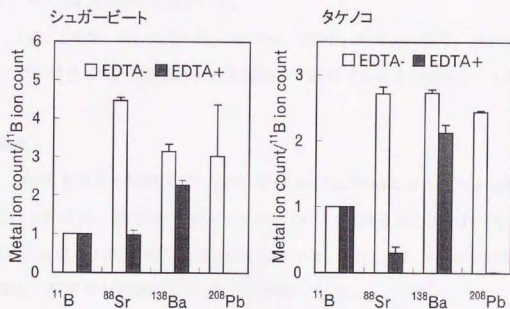


図3-12 HPLC/ICP-MS測定により求めた溶離液にEDTAを加えたときのシュガービートとタケノコdRGII-Bの元素イオン強度

## 2) dRGII-B複合体の金属塩処理

図 3-13 に、HPLC/ICP-MS 測定により求めた、各金属イオンと混合したときのシュガービートとタケノコ dRGII-B の金属イオン強度を、<sup>109</sup>B の強度を 1 とし、それぞれに対する比で示す。dRGII-B に接触させた金属イオン量は、モル数で約 10 倍である。図 3-13 で示されている強度は ICP-MS のイオンカウントであり、実際の濃度とは異なることに注意する必要がある。また、ICP-MS の <sup>40</sup>Ca のイオンカウントは小さく、Ca については測定誤差が大きい。

Ca を接触させた場合、dRGII-B に結合している Ca, Sr, Ba, Pb 量は変わらなかった。Sr を接触させた場合、dRGII-B に結合している Sr 量が 1.5 倍に増加し、Ba と Pb 量は減少した。Ba を接触させた場合、dRGII-B に結合している Ba 量が 2 から 2.5 倍に増加し、Sr と Pb 量は減少した。Pb を接触させた場合、dRGII-B に結合している Pb 量が 3 から 5 倍に増加し、Ca 量が若干減少し、Sr と Ba 量は著しく減少した。

このことから、Ca, Sr, Ba, Pb の中では、Pb>Ba>Sr>Ca の順で、dRGII-B にすでに結合している金属イオンを置換して結合する能力が大きいことが分かる。

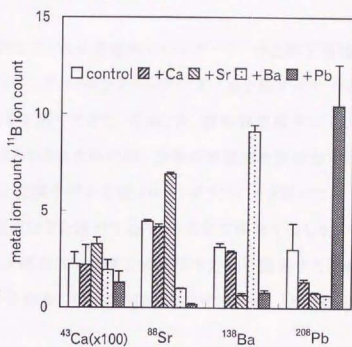
## 要約

EDTA を加えた溶離液で、dRGII-B の HPLC/ICP-AES および ICP-MS 測定を行った結果、dRGII-B に結合している Ca が dRGII-B から除かれても、dRGII-B は mRGII へ直ちには分解しなかった。このことは、Ca は dRGII-B の構造に不可欠な要素ではないことを示唆している。

モル数で約 10 倍の Ca, Sr, Ba, Pb イオンに接触させた dRGII-B の HPLC/ICP-MS 測定を行った結果、Ca, Sr, Ba, Pb の中では、Pb>Ba>Sr>Ca の順で、dRGII-B にすでに結合している金属イオンを置換して結合する能力が大きかった。



A. sugar beet



B. bamboo

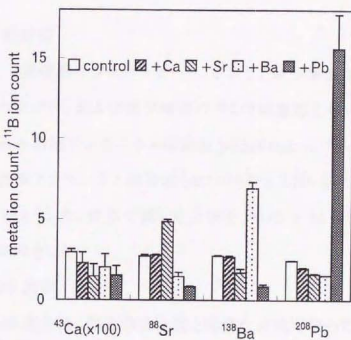


図3-13 HPLC/ICP-MS測定により求めた各金属イオンと混合したときのシュガービートとタケノコdRGII-Bの金属イオン強度

## 第6節 HPLC/ICP-MSによる植物細胞壁中 dRGII-Bの検出

第1～5節まで、双子葉植物のシュガービートと単子葉植物イネ科のタケノコの細胞壁から、ラムノガラクトuronan II-ホウ酸ダイマー(dRGII-B)を単離してその構造等を調べてきた。そのとき、植物細胞壁中にdRGII-B複合体が存在していることを知るためには、多量の細胞壁を酵素分解して複合体を可溶化後、陰イオン交換やゲルろ過クロマトグラフィーを用いて単離し、ホウ素含量・分子量・糖組成などを測定するという大変な作業を要した。そこで、植物細胞壁中のdRGII-B複合体を簡便に検出する方法を開発するために、微量の細胞壁を酵素で分解後、サイズ排除HPLC/ICP-MSにより分離分析する方法を検討した。

### 実験方法

#### 1)植物試料と前処理

試料は、双子葉植物のシュガービート、ポプラ、単子葉植物のタケノコ、イネ、トウモロコシ、ウキクサ、および裸子植物のモミの細胞壁を用いた。細胞壁試料10-20mgを10mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH5.0)1mLにけんできし、酵素液(50mg/50mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH5.0)100  $\mu$  L)10  $\mu$  Lを加え、30°Cで、18時間、振とうした。遠心分離した上清を、0.45  $\mu$  Mのフィルターでろ過して、分析試料とした。

#### 2)HPLC/ICP-MS測定

HPLC/ICP-MS測定は、第2章第2節と同様な方法で行った。

### 結果および考察

## 1) シュガービートとタケノコ細胞壁のHPLC/ICP-MSクロマトグラム

細胞壁分解酵素として市販されているドリセラゼとペクチナーゼ SS の細胞壁分解特性を比較検討した。その結果(図 3-14)、ドリセラゼのほうがペクチナーゼ SS より低分子化が進んだので、以後、ドリセラゼを用いた。

シュガービートとタケノコ細胞壁について、ドリセラゼ処理前の元素全含量と可溶化した元素量を測定し、表 3-4 にその結果と、後者の前者に対する割合を示した。細胞壁のホウ素含有率は、双子葉植物であるシュガービートが単子葉植物であるタケノコに比べて一桁大きかった。細胞壁のドリセラゼ処理により、シュガービートとタケノコの細胞壁中のホウ素の 75% が可溶化された。

図 3-15 と 3-16 に、それぞれシュガービートとタケノコ細胞壁のドリセラゼ可溶化物の HPLC/ICP-MS クロマトグラムを示す。シュガービートやタケノコの dRGII-B 複合体標品と同じ保持時間に、B のピークと Ca, Sr, Ba, Pb のピークが観測された。このことから、酵素分解・サイズ排除 HPLC/ICP-MS は、植物細胞壁中の dRGII-B 複合体の簡便な検出に有効な方法と結論した。

## 2) 各種植物細胞壁のHPLC/ICP-MSクロマトグラム

図 3-17 ~ 3-21 に、各種植物細胞壁のドリセラゼ可溶化物の HPLC/ICP-MS クロマトグラムを示す。すべての植物細胞壁のドリセラゼ処理液のクロマトグラムで、タケノコの dRGII-B 複合体標品と同じ保持時間に、B のピークと Ca, Sr, Ba, Pb のピークが観測された。このことから、供試した双子葉植物のポプラ、シカモアカエデ、単子葉植物のイネ、トウモロコシ、ウキクサ、および裸子植物のモミの細胞壁において dRGII-B 複合体が存在することが確認された。間藤ら(Matoh *et al.*, 1996)は、植物細胞壁のドリセラゼ可溶化物をサイズ排除カラムに通して高分子画分と低分子画分とに分け、高分子画分のホウ素全含量を分析した。そして、供試した双子葉植物 17 種と単子葉植

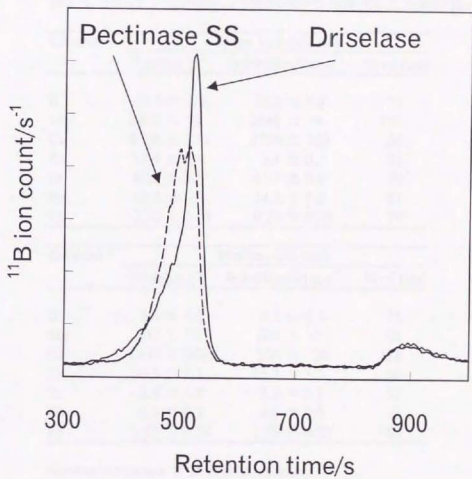


図3-14 シュガービート細胞壁のドリセラゼまたはペクチナーゼSS分解物のHPLC/ICP-MSクロマトグラム

表3-4 ドリセラーゼ処理により細胞壁から可溶化した元素の量と割合

Element	sugar beet cell wall		
	Total/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Solubilized/ $\mu\text{g g}^{-1}$	% of total
B	43.4 $\pm$ 0.6	32.4 $\pm$ 5.8	75
Mg	2430 $\pm$ 10	2440 $\pm$ 70	101
Ca	8500 $\pm$ 370	4770 $\pm$ 360	56
Zn	10.9 $\pm$ 1.4	3.4 $\pm$ 0.2	31
Sr	87.7 $\pm$ 3.6	61.7 $\pm$ 0.4	70
Ba	66.2 $\pm$ 6.3	34.1 $\pm$ 0.3	51
Pb	0.30 $\pm$ 0.07	0.24 $\pm$ 0.00	79

Element	bamboo cell wall		
	Total/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Solubilized/ $\mu\text{g g}^{-1}$	% of total
B	5.4 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.4	75
Mg	330 $\pm$ 70	200 $\pm$ 0	61
Ca	1260 $\pm$ 240	350 $\pm$ 20	28
Zn	26.3 $\pm$ 1.1	15.8 $\pm$ 1.5	60
Sr	8.9 $\pm$ 1.7	5.1 $\pm$ 0.1	57
Ba	6.5 $\pm$ 0.3	4.0 $\pm$ 0.0	62
Pb	2.57 $\pm$ 0.24	1.76 $\pm$ 0.03	69

Shows are means  $\pm$  se of two replicates.

物 7 種すべてで高分子画分にホウ素が含まれ、しかも 15 種では細胞壁に含まれていたホウ素の多くが可溶性高分子画分に回収されたことから、dRGII-B 複合体が高等植物に広く分布していると報告している。間藤らの方法に比べて、HPLC/ICP-MS 法は、dRGII-B 複合体の分子量との一致を確認していること、Ca, Sr, Ba, Pb の共存を確認していることの 2 点で、より確実な dRGII-B 複合体の検出方法である。さらに、筆者の結果は、被子植物(双子葉植物と単子葉植物)だけではなく、裸子植物においても dRGII-B 複合体が存在することを、初めて示した。

また、トウモロコシ、ポプラ、ウキクサでは、ボイド直後の高分子領域にホウ素のピークが見られ、しかもこのピークと同じ保持時間に、Ca, Sr, Ba, Pb のピークが見られた。したがって、この dRGII-B 複合体より分子量が大きいピーク成分は、その一部に dRGII-B 複合体を含んでいると考えられる。RGII のガラクトロン酸直鎖は、側鎖のないガラクトロン直鎖、すなわちホモガラクトロン(HG)と共有結合していると予想されているが、この dRGII-B 複合体を含んだ高分子は、HG と結合した dRGII-B 複合体かもしれない。

図 3-22 に、植物細胞壁のドリセラーゼ処理液のサイズ排除 HPLC/ICP-MS クロマトグラムにおける、可溶性された dRGII-B 複合体ピークの金属イオン強度を、ホウ素のピークに対する比で示した。Ca については、すべての植物試料でホウ素に対する比がほぼ一定である。シュガービートとタケノコの dRGII-B 複合体では、Ca/ホウ素は約 1 であるが、このことが多くの植物で一般的であることを示唆している。Sr, Ba, Pb については、植物試料によりホウ素に対する比が大きく異なっている。それぞれの植物が生育した環境中の各元素量を反映しているものと考えられる。

シュガービート(双子葉植物)

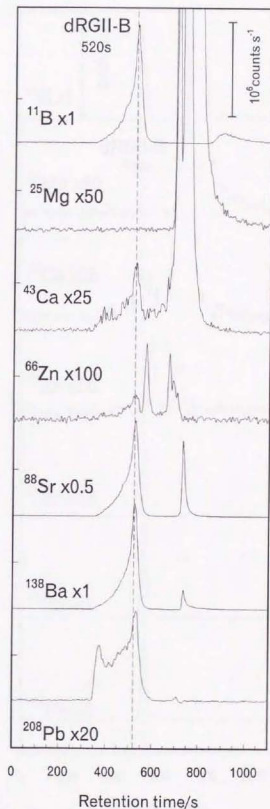


図3-15 シュガービート細胞壁のドリセラーゼ可溶化物の HPLC/ICP-MSクロマトグラム (x数字は縦軸の拡大率)

タケノコ(単子葉植物イネ科)

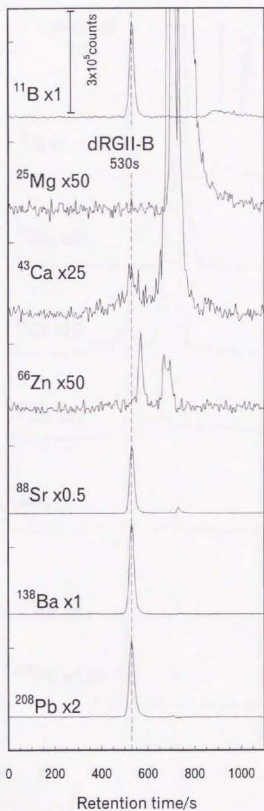


図3-16 タケノコ細胞壁のドリセラーゼ可溶化物のHPLC/ICP-MS  
クロマトグラム(x数字は縦軸の拡大率)



ポプラ(双子葉植物)

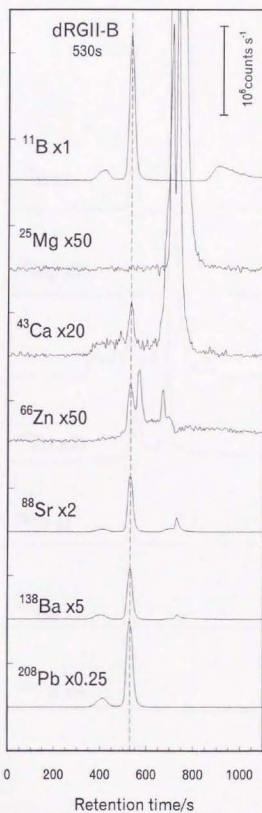


図3-17 ポプラ細胞壁のドリセラーゼ可溶化物のHPLC/ICP-MSクロマトグラム(x数字は縦軸の拡大率)

イネ(単子葉植物イネ科)

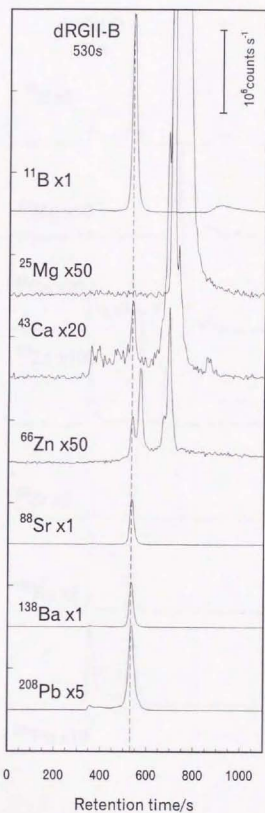


図3-18 イネ細胞壁のドリセラゼ可溶化物のHPLC/ICP-MSクロマトグラム(x数字は縦軸の拡大率)

トウモロコシ(单子葉植物イネ科)

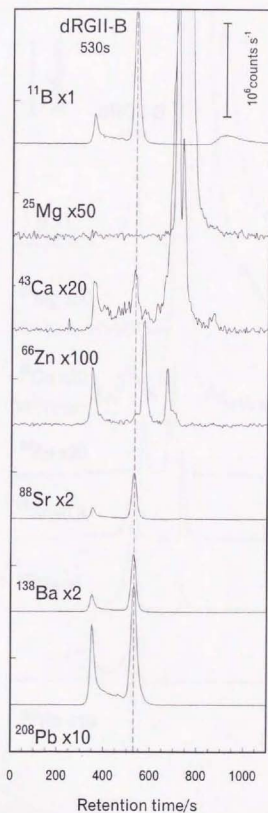


図3-19 トウモロコシ細胞壁のドリセラゼ可溶化物のHPLC/ICP-MSクロマトグラム(x数字は縦軸の拡大率)

ウキクサ(単子葉植物)

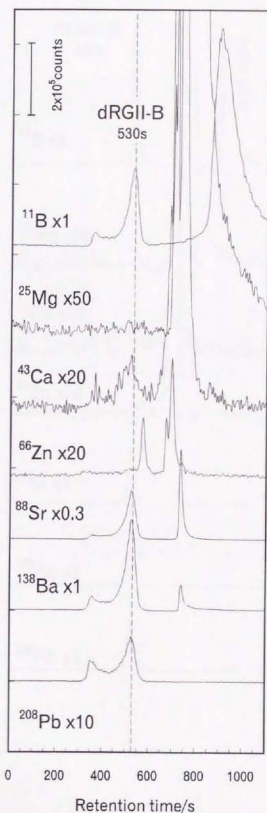


図3-20 ウキクサ細胞壁のドリセラーゼ可溶化物のHPLC/ICP-MSクロマトグラム(x数字は縦軸の拡大率)

モミ(裸子植物)

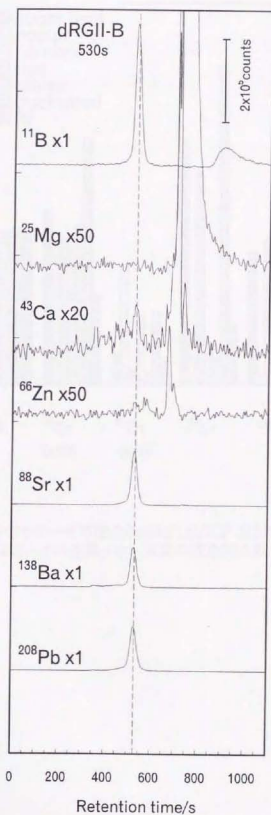


図3-21 モミ細胞壁のドリセラゼ可溶化物のHPLC/ICP-MSクロマトグラム(x数字は縦軸の拡大率)

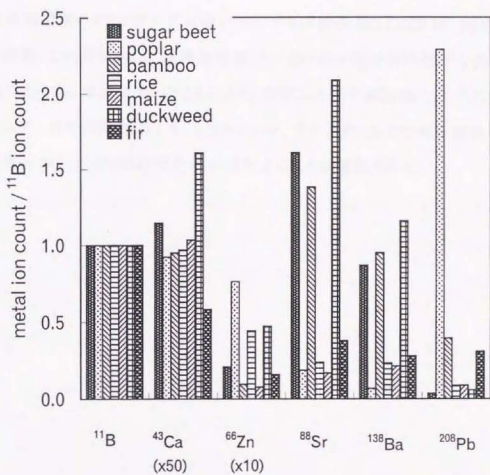


図3-22 細胞壁ドリセラーゼ可溶化物のHPLC/ICP-MSクロマトグラムにおけるRGII-Bピークの金属イオン強度の植物間比較

## 要約

植物細胞壁のドリセラゼ可溶化物のサイズ排除 HPLC/ICP-MS 測定を行った結果、この測定法は、植物細胞壁中の dRGII-B 複合体の簡便な検出に有効であった。本法を用いることにより、供試した双子葉植物のポプラ、シカモアカエデ、単子葉植物のイネ、トウモロコシ、ウキクサ、および裸子植物のモミの細胞壁において dRGII-B 複合体が存在することが確認された。

## 第4章 総合考察

本研究では、*in vivo* NMR や HPLC/ICP-MS など最新の状態分析法を用いて、植物の必須微量元素であるホウ素の植物体内における化学形態を分子レベルで調べた。そして、図 4-1 に示すように、植物体内には、水溶性ホウ素と水不溶性ホウ素があり、前者については、ホウ酸と低分子ジヒドロキシ化合物と水溶性エステルが存在、および後者については細胞壁中でのホウ酸とラムノガラクトシロナン II という多糖との複合体の存在を明らかにした(Matsunaga and Nagata, 1995; Matsunaga *et al.*, 1996, 1997; Ishii and Matsunaga, 1996; Kaneko *et al.*, 1997; 松永&石井, 1999)。

本章では、これら本研究で得られた結果やそれらから言えることについて、これまでの知見を引用しながら考察を加えるとともに、今後の研究方向について展望する。

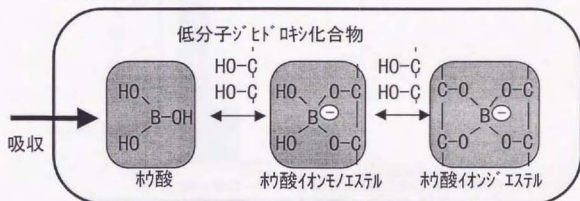
### 1. 植物体内の水溶性と水不溶性のホウ素

植物体内には、組織を *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR 測定したときに NMR 吸収を与える水溶性のホウ素と、NMR 吸収を与えない細胞壁中の水不溶性のホウ素が存在していた。このように、植物体内のホウ素は、大きく分けると、水溶性ホウ素と細胞壁中の水不溶性ホウ素とがある(図 4-1)。

Hu and Brown(1994)は、カボチャを  $50\mu\text{M}$  のホウ素を含むホーランド水耕液で 2 週間栽培後、半数をそのまま  $50\mu\text{M}$  のホウ素を含む水耕液、残り半数をホウ素を含まない水耕液で、さらに 1 週間栽培したときの、最新葉(第 5 葉)の全ホウ素量と細胞壁(水不溶性)ホウ素量を分析した(図 4-2)。全ホウ素量と細胞壁ホウ素量との差が、水溶性ホウ素量ということになる。葉の生育は、



水溶性ホウ素



水不溶性ホウ素：細胞壁

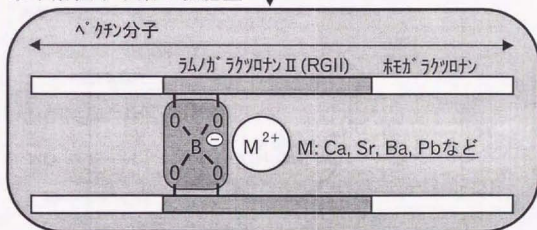


図4-1 ホウ素の植物体内での化学形態

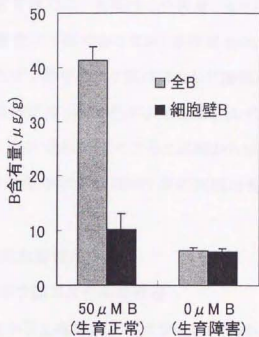


図4-2 カボチャ最新葉(第5葉)の全ホウ素と細胞壁中ホウ素含量  
Hu and Brown(1994)より筆者作成。ホウ素を50μM含む水耕液で  
14日間栽培後、半数をホウ素を含まない水耕液に移してさらに7日  
間栽培した。

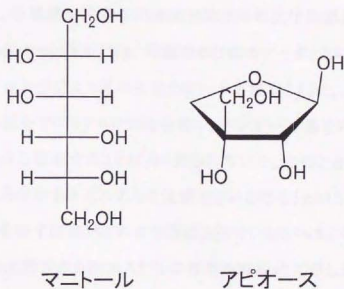


図4-3 ホウ酸とエステル結合しやすいシスジオール基を持つ  
化合物の例

ホウ素 50 $\mu$ M では正常だったが、0 $\mu$ M では障害が発生した。そのとき、ホウ素 50 $\mu$ M の正常葉では、水溶性ホウ素量(全ホウ素量-細胞壁ホウ素量)は細胞壁ホウ素量の3倍であったが、ホウ素 0 $\mu$ M の障害葉では、水溶性ホウ素量は見られず、葉中のホウ素はほとんど細胞壁ホウ素量であった。すなわち、ホウ素欠乏組織には、水溶性ホウ素は見られず、細胞壁中の水不溶性ホウ素のみが存在したのである。このことは以前から知られているが、植物体内の水溶性ホウ素と細胞壁中水不溶性ホウ素の実態は良く分かっていなかった。

## 2. 植物体内の水溶性ホウ素

### 2-1. 水溶性ホウ酸エステルの存在

植物は、根から土壌溶液中のホウ素をホウ酸の形で吸収する(Hu and Brown, 1997a)。植物に吸収されたホウ酸は、体内を移動し、機能していくことになる。

筆者は、植物体を NMR 試料管に入れてそのまま測定する *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR 法により、各種植物組織中の水溶性ホウ素の化学形態測定を行った。植物体の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルには、遊離のホウ酸のピークとともに、ホウ酸イオンモノエステルおよびジエステル由来のピークが観測された。以前から、試験管内で、ホウ酸が低分子ジヒドロキシ化合物(シスジオール基を持つ化合物など)と安定なエステルを形成することは良く知られていた。そのことから、ホウ酸は植物体内でこれら化合物とエステルを生成しているだろうという予想はされていたものの、それを示す証拠はこれまで提出されていなかった。本研究の結果は、植物体内での水溶性ホウ酸エステルの存在を直接的に示した初めての証拠と言えよう。

## 2-2. 花の水溶性ホウ酸エステル

開花期コマツナを部位別に *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR 測定し、また水溶性ホウ素量を分析した結果、蕾、花、莢中には水溶性ホウ素が多く、その化学形態はホウ酸ジエステルであった。これまでも、花のホウ素含量が高いことは知られていた (Vasil, 1987) が、その理由は十分には解明されていなかった。また、花粉管の伸長に、多くのホウ素を必要とすることも良く知られている (Loomis and Durst, 1992)。したがって、花粉管に供給するために花には多くのホウ素が含まれているのかもしれない。もしそうだとすると、その形態がホウ酸ジエステルであることの意味は良く分からない。次に述べるホウ素の再移動形態なのかも知れない。それを知るためには、ホウ酸とエステル結合しているジヒドロキシ化合物の同定とともに、ホウ酸ジエステルの生育時期別の消長や組織・細胞内での存在位置の解明を行っていく必要があるだろう。

## 2-3. ホウ酸ジエステルとホウ素の再移動

これまでの植物栄養学の常識では、ホウ素はカルシウムと同様に、古い組織から新しい組織へ再移動しにくい元素とされてきた。しかしながら、Brownらのグループはここ数年間で、バラ科等の光合成産物が糖アルコールで転流する植物では、ホウ素の再移動が起きていることを明らかにしてきた (Brown and Shelp, 1997)。彼らは、これら植物ではホウ酸がソルビトールやマニトール (図 4-3, p85) とエステル結合して、師管液中を再移動すると考えた。そして最近、セロリ師管液中のホウ酸-マニトールジエステルの存在を証明することに成功した (Hu *et al.*, 1997b)。採取した数  $\mu\text{l}$  の師管液をマトリクス支援レーザー脱離-フーリエ変換質量分析法で超高感度分析し、ホウ酸-マニトールジエステルの分子ピークを検出したのである。彼らの仕事のポイントは、師管液のみを採取したことにあり、そのことで検出されたホウ酸-マニトールジエステルが、試料調

製過程でのアーティファクトである可能性を消している。

ホウ酸は、電気的に中性で小さな分子であることから生体膜透過能が高いので、ある組織から師管内を移動し始めたとしても隣り合う導管内に漏れ出て元の組織に戻ってしまい、その結果、再移動が起こらない。それに対して、ホウ酸エステルはマイナス1価の電荷と、ある程度の大きさを持つ分子であるので膜透過能は低く、師管内を再移動することができるのだらうと考えられている(Hu *et al.*, 1997b)。

作物栽培や育種といった農業技術の場面でホウ素栄養を考えるときも、対象とする作物が糖アルコールを転流に使う作物かどうかでホウ素の再移動が大きく異なることを考慮に入れる必要がある。Brown and Shelp(1997)は、植物組織のホウ素含量分析による栄養診断を行うとき、糖アルコールを転流に使う作物かどうかで診断に適切な分析部位が異なること、ホウ酸が糖アルコールと結合してホウ素再移動が起きる植物では、ホウ素葉面散布が果実生産に効果的であることを述べている。また、彼らは、糖アルコール生産能が高い品種の選抜や糖アルコール生産遺伝子組み換え体の作出による、ホウ素利用効率が高い作物の育種を提案している。

#### 2-4. 水溶性ホウ素の組織・細胞内存在位置

ホウ素は、根からホウ酸の形で吸収され、ホウ酸やホウ酸エステルの形で体内を移動し、最後にペクチンの RGII 部分を架橋する形で細胞壁に取り込まれると考えられる。本研究で存在が明らかにされたホウ酸やホウ酸エステルの形をとる水溶性低分子ホウ素は、では植物組織または細胞のどこに存在するのだろうか。水溶性ホウ素が観測されたダイコン根やリンゴ果実では、柔組織が発達しており、それを構成する柔細胞は、薄い細胞壁(一次壁のみ)と、大きな液胞を持つ。細胞レベルで水溶性ホウ素の存在場所を考えると、可能性がある

のは、細胞内では原形質と液胞、細胞外では細胞壁と細胞間隙である。また、ホウ酸とジヒドロキシ化合物とのエステル生成を考えると、その存在場所の pH も重要である。一般に、液胞は有機酸の存在のために pH は 5 以下と低く、原形質の pH は 7 前後、そしてアポプラストの pH は 5 ~ 6.5 である (Smith, 1979; Grignon and Sentenac, 1991)。

水溶性ホウ素が原形質に多量に存在することは考えにくい。なぜなら、ホウ素は、植物生育の適正濃度範囲が狭く、過剰害もよく知られているが、その過剰害は、原形質に侵入したホウ酸が、核酸のリボース残基などが持つジオール基と無秩序にエステル結合して、代謝を阻害することに起因すると考えられるからである。リンゴは、バラ科であり、光合成産物をソルビトールの形で果実に転流させるから、ホウ素はホウ酸-ソルビトールジエステルの形で移動すると考えられる。Yamaki (1984) は、リンゴ果実細胞では、プロトプラスト調製法により、ソルビトールはフリースペース (細胞間隙と細胞壁) と液胞、フラクトース、グルコース、リンゴ酸は液胞に、そしてシュクロースはフリースペースと原形質に存在していると報告した。その後、同じ著者らは、よりよい方法とするコンパートメント法では、ソルビトール、フラクトース、グルコース、シュクロースは、ほとんど液胞に存在すると報告している (Yamaki and Ino, 1992)。したがって、ホウ酸-ソルビトールジエステルの形で移動してきたホウ酸は、リンゴ果実柔細胞では、細胞間隙であればホウ酸-ソルビトールジエステル、また液胞であればホウ酸-リンゴ酸の形で存在しているのかもしれない。リンゴの液胞の pH はリンゴ酸などの有機酸により低いので、共存していたとしてもホウ酸-フラクトースは生成しないと考えられる。これらのことを調べる手段としては、ダイコン根やリンゴ果実などの植物組織からプロトプラストを調製して、その *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR 測定を行うことが考えられよう。

### 3. 植物体内の水不溶性ホウ素

#### 3-1. ラムノガラクトツロナン II - ホウ酸複合体(dRGII-B)

本研究では、双子葉植物であるシュガービートと単子葉植物イネ科のタケノコの細胞壁のドリセラゼ可溶化物から、ホウ素-多糖複合体を単離した。そして、その構造は、1分子のホウ酸が、2分子のラムノガラクトツロナン II を、ホウ酸ジエステル結合で架橋しているラムノガラクトツロナン II - ホウ酸ダイマー(dRGII-B)であることを示した(図 4-4)。

これまで、ホウ素が植物細胞壁に含まれていて、しかも細胞壁中のホウ素はペクチンと共存していることが報告されていた(Hu and Brown, 1994)。また、間藤らはダイコン根細胞壁の酵素可溶化物の中からホウ素と結合した多糖を得たことを報告していた(Matoh *et al.*, 1993)。さらに筆者らが、シュガービートとタケノコから単離したホウ素-多糖複合体の構造決定を進めている間に、小林らは、ダイコン根から単離したホウ素-多糖複合体の構造が、ラムノガラクトツロナン II - ホウ酸ダイマーであることを報告した(Kobayashi *et al.*, 1996)。間藤・小林らのグループの dRGII-B 複合体の発見は、ホウ素の植物栄養研究において画期的であったと言える。

ラムノガラクトツロナン II (RGI) は、植物細胞壁マトリクス多糖の一つであるペクチンの構成多糖の一つとして知られていた(O'Neill *et al.*, 1990)。ペクチンには、 $\alpha$ -1,4 結合したガラクトツロン酸直鎖からなるホモガラクトツロナン(HG)の他に、ラムノガラクトツロナン I (RGI) と RGII とを合わせて 3 種類があることが知られている。RGII は、 $\alpha$ -1,4 結合したガラクトツロン酸直鎖にラムノース、アピオース、アラビノース等多種多様な糖からなる側鎖が結合した多糖で、分子量は約 5000 である(図 4-5)。RGII の機能についてはこれまで不明であったが、その複雑な構造から何らかの機能が予想されていた。dRGII-B 複合体の発見は、植物栄養分野のホウ素研究と細胞壁多糖分野の RGII 研究とを結びつ

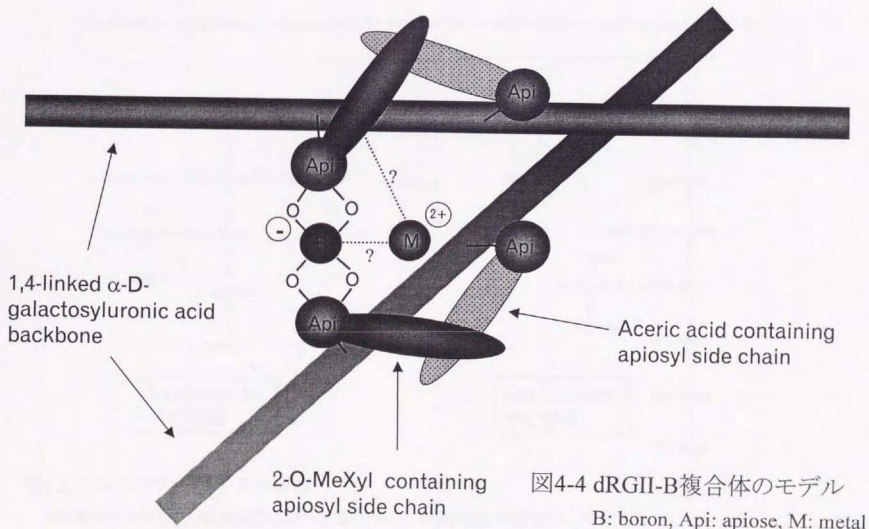


図4-4 dRGII-B複合体のモデル

B: boron, Api: apiose, M: metal



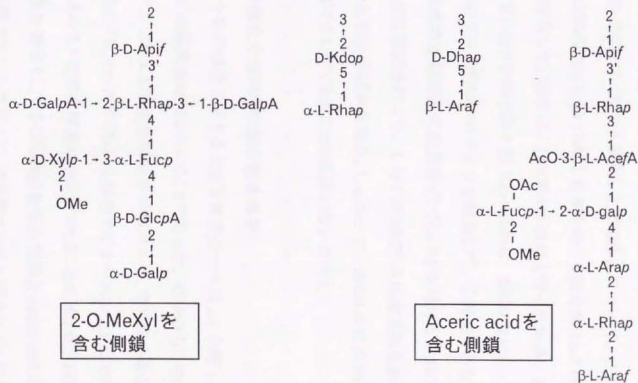
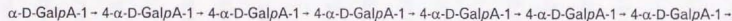


図4-5 ラムノガラクトツロナンIIの構造

直鎖のガラクトツロン酸残基数は7~15個である。側鎖の結合位置は、特定されていない。

けた形となり、細胞壁多糖分野に新たな研究展開を引き起こしている。

### 3-2. dRGII-B 複合体に含まれるホウ素の個数

筆者らがシュガービートとタケノコから単離したラムノガラクトuronan II - ホウ酸ダイマーの構造は、ホウ素の含量以外は、小林らの結果とほぼ同様であった。小林らは、彼らがダイコン根から単離した dRGII-B について、分子量 9894、ホウ素含量 0.30%(3.0mg/g)という測定結果を得て、複合体 1mol は 2.1mol のホウ素を含むと報告した。筆者は、FI/ICP-MS 測定を行った結果、1分子の dRGII-B に含まれるホウ素は約 1個であったから、dRGII-B は、1分子のホウ酸が、2分子のラムノガラクトuronan II を架橋している構造であるとした。さらに、カラムと元素検出器の間に定量用インジェクタを付けて、dRGII-B 水溶液の HPLC/ICP-AES 測定を行って、1分子の dRGII-B に含まれる B 原子数は 0.87-0.93 個であるという結果を得た。したがって、dRGII-B に含まれる B 原子数は 2 個ではなく 1 個であることは間違いないだろう。

### 3-3. dRGII-B 複合体中のホウ酸の結合相手

dRGII-B 複合体の構造に関する大きな興味の一つは、ホウ酸 1 分子がエステル結合している糖残基は何かということであった。O'Neill ら(1996)は、dRGII-B のメチル化による糖結合組成分析結果から、ホウ酸の結合位置は RGII 中の 2 個のアピオースのうちの 1 個のアピオースの 2,3 位であり、もう 1 個のアピオースの 2,3 位の水酸基はフリーであることを示した。RGII 中には、アピオースを含む側鎖として 2-O-MeXyl を含む側鎖と Aceric acid を含む側鎖の 2 つがある(図 4-5)。したがって、ホウ酸エステル結合による架橋の組み合わせは、2-O-MeXyl を含む側鎖同士、Aceric acid を含む側鎖同士、そして 2-O-MeXyl を含む側鎖と Aceric acid を含む側鎖の 3 通りが考えられる。つい

最近、我々のグループは、dRGII-Bを数段階修飾し、部分加水分解後、GC/MS測定するという巧妙な方法により、2-O-MeXylを含む側鎖中のアピオース同士が、ホウ酸ジエステル結合していることを明らかにした(Ishii *et al.*, 1999)。すなわち、dRGII-B中では、1分子のホウ酸が2-O-MeXylを含む側鎖中のアピオース同士とエステル結合することで2分子のRGIIを架橋していたのである(図4-4)。

アピオース(図4-3, p87)は、シスジオール基を持つフラノース環構造の単糖であり、安定なホウ酸陰イオンジエステルを作ることが知られていた(Loomis and Durst, 1992)。そのアピオースが、RGIIの2つの大きな側鎖の中で、直鎖と結合する部分の糖残基として存在し、しかもその一方のみが、ホウ酸とエステル結合して架橋にあずかっているのである。通常、ホウ酸と低分子ジヒドロキシ化合物から生成するホウ酸イオンジエステルは、ホウ酸やホウ酸イオンモノエステルと速やかな平衡関係にある(図1-2, p4)。それに対して、dRGII-B複合体中のホウ酸とアピオースのジエステル結合は、複合体が単離されることから分かるように極めて安定であり、その安定化機構の解明は、今後の大きな研究課題である。そのためには、ホウ酸が2-O-MeXylを含む側鎖中のアピオースと選択的に結合する理由や、その一方でAcetic acidを含む側鎖の存在意義を明らかにしていく必要がある。

#### 3-4. dRGII-B中の金属元素

dRGII-B水溶液と、その酸処理物のHPLC/ICP-MSやHPLC/ICP-AES測定を行った結果、興味深いことに、dRGII-B複合体には、Ca, Sr, BaとPbが、特異的に結合していた(図4-4)。dRGII-Bに結合している金属元素量は、CaはBとほぼ等モルで、複合体1分子あたり1個であり、Sr, Ba, Pb等はBに対して多くても0.2モルをこえないモル比でしかなかった。

これまで、ポリヒドロキシカルボン酸とのホウ酸ジエステルに、Ca イオンが配位することが知られている(van Duin *et al.*, 1987a)。例えば、グルカル酸(COOH(CHOH)<sub>4</sub>COOH)とのホウ酸ジエステルでは、Ca イオン 2 個が、カルボキシル基やホウ酸エステルの酸素と配位する(van Duin *et al.*, 1987b)。dRGII-B 複合体中の B と Ca の量比が 1:1 と量論的であること、1 分子の mRGII に結合している Ca 量は 0.1 個以下とかなり少ないことから、dRGII-B に結合している Ca は、dRGII-B のホウ酸陰イオンや解離したカルボキシル基の負電荷と結合しているのだろうと想像される。しかし、それを示す証拠は得られていない。逆に、O'Neill ら(1996)は、Pr<sup>3+</sup>を配位させた dRGII-B の <sup>13</sup>B NMR スペクトルを測定し、ホウ酸ジエステルのケミカルシフトがシフトしないことから、dRGII-B 中の金属はホウ酸ジエステルとは直接には配位していないだろうと述べている。いずれにせよ、dRGII-B 中の金属結合部位の特定は、重要な問題点として残されている。

また、dRGII-B に特異的に結合している Ca, Sr, Ba, Pb 等金属元素は、+2 価のイオンの中で、イオン半径が 1 Å 以上という特徴を持つ(O'Neill *et al.*, 1996)。例えば、Mg<sup>2+</sup>は 0.66 Å、Zn<sup>2+</sup>は 0.74 Å、Ca<sup>2+</sup>は 0.99 Å、Sr<sup>2+</sup>は 1.12 Å、Ba<sup>2+</sup>は 1.20 Å、Pb<sup>2+</sup>は 1.34 Å である。すなわち、dRGII-B は、イオン半径の大きな二価金属陽イオンを選択的に結合していると考えられる。この選択性が発現する dRGII-B 分子構造説明も今後の問題点として残されている。それが説明されれば、イオン半径の大きな金属陽イオンを選択的に吸着する化合物が設計できるかもしれない。また、dRGII-B の金属結合に関する、安定度定数や結合容量を調べていくことも重要である。これらの結果が、dRGII-B、ペクチンあるいは植物細胞壁そのものを利用した環境からの金属吸着捕集に道を開くかもしれない。

本章 3-3 で述べた dRGII-B のホウ酸ジエステル結合の驚くべき安定性の理

由解明や、金属結合部位の特定などを進めていくためには、dRGII-Bの立体構造を明らかにしていく必要がある。近年の構造生物学では、結晶X線回折法やNMR法により分子量数万のタンパク質の立体構造が解明されている。しかし、dRGII-Bの場合、多糖であるため、結晶を得ることは困難であること、ペクチンを酵素分解した断片であり、ガラクトuron酸の直鎖数や、カルボキシル基のメチルエステル化割合が一定でなく、分子量が一つに定まらないこと、主鎖に側鎖が付いていて構造が複雑であることなどから、立体構造解明はかなり難しい。最近では、dRGII-Bの側鎖構造を計算化学手法で求める動きもあり(Mazeau and Perez, 1998)、今後の発展が期待される。

### 3-5. dRGII-B中の金属元素結合の意義

Caなど金属のdRGII-Bへの結合は、何らかの生理的意義を有するのであろうか。本研究では、dRGII-Bに結合しているCaをEDTAによりdRGII-Bから除いても、dRGII-BのmRGIIへの分解は直ちには起きなかった。ホウ素の場合はそれを除くとdRGII-Bは直ちにmRGIIに分解してしまうから、その意味では、CaはdRGII-Bの構造に不可欠な要素ではないということになる。

試験管内でmRGIIとホウ酸を混ぜておくとdRGII-Bが徐々に生成するが、Sr, Ba, Pbなどの2価正イオンを共存させると、dRGII-B生成が著しく促進され、しかも生成したdRGII-B分子1モルには、各金属が約1モル結合していた(O'Neill *et al.*, 1996)。しかし、Sr, Ba, Pbなどに比べて、CaのdRGII-B生成促進効果は小さかった(Ishii *et al.*, 1999)。それに対して、Kobayashiら(1999)は、CaもSr, Baほどではないが、dRGII-B生成をかなり促進すること、およびdRGII-BをCDTA処理するとdRGII-Bは徐々に分解することを報告している。そしてこれらのことから、植物必須元素Caの必須元素としての機能の一つは、dRGII-Bへの結合によるその構造安定化であると考えている。

一方、本研究では、Ca, Sr, Ba, Pb の中では、Pb>Ba>Sr>Ca の順で、dRGII-B にすでに結合している金属イオンを置換して結合する能力が大きいという結果が得られた。dRGII-B の金属結合部位は、通常は Ca が結合していて、植物に有害な Sr, Ba, Pb などが細胞壁に来ると、それら金属は dRGII-B の Ca と置換してトラップされるのかもしれない。また、シュガービートなどのペクチンは 2 価の金属イオンと結合することが知られているが (Dronnet *et al.*, 1996)、そのときの金属イオン結合への dRGII-B の寄与割合にも興味を持たれる。

このように dRGII-B に結合している Ca など金属イオンの意義については議論が多く、これも今後の検討課題の一つであろう。そのとき、留意しておく必要があるのは、dRGII-B は、細胞壁をペクチン分解酵素で分解し可溶化したときに得られる断片であるということである。dRGII-B はホモガラクトソナンと共有結合していると予想されているが、その形でペクチンの一部として細胞壁中で存在しているときの dRGII-B と、可溶化された dRGII-B は、異なる立体構造をとっている可能性があるからである。

### 3-6. dRGII-B の細胞壁での生合成と機能

dRGII-B は、細胞壁をペクチン分解酵素で分解し可溶化したときに得られる断片である。RGII は、ペクチンの主体である  $\alpha$  1,4 結合したガラクトソンの直鎖状ポリマーであるホモガラクトソナンと、共有結合していると予想されている。従って、ハウ素は、細胞壁中で、ペクチン分子を RGII 部分でハウ酸ジエステル結合により架橋し、細胞壁を構造安定化していると考えられる。しかしながら、細胞壁から dRGII-B 複合体が得られたとは言っても、dRGII-B 複合体の生合成機構や、細胞壁構造安定化への寄与を直接的に示す証拠は、今後の課題として残されている。

では、ホウ酸によるペクチンの RGII 部分同士の架橋は、どのように生成されるのであろうか。ペクチンの生成については、ホモガラクトuronanでは次のように考えられている(西谷, 1995)。ペクチンは、ゴルジ体で、転移酵素により UDP ガラクトuron酸が重合して生成され、カルボキシル基がメチルエステル化された後、細胞壁に分泌される。そして、一部、脱メチルエステル化され、 $Ca^{2+}$ により架橋され、ペクチン分子が形成される。RGII の生成については、明確な証拠はないが、ホモガラクトuronanと同様と考えられている。本章 2-4 で述べたように、細胞へ運ばれてきたホウ素は、水溶性のホウ酸またはホウ酸エステルとして、細胞壁あるいは液胞に存在すると思われる。したがって、ホウ素がペクチンの RGII 部分同士と架橋反応を起こすのは、おそらく RGII が細胞壁に分泌された後であろう。

このホウ素によるペクチン分子の架橋と構造安定化に関して、最近、極めて興味深い報告がなされた。アカザ培養細胞は、ホウ素無添加培地では、対数増殖期には、細胞壁孔隙と細胞のサイズが増大したものの生育は続いたが、定常期に入ると細胞サイズの増大が止まらず細胞壁が破裂して死んでしまった(Fleischer *et al.*, 1998)。ところが定常期への移行時に、ホウ素を培地に添加すると、細胞壁孔隙サイズが正常値まで減少し、細胞壁の破裂は起きなかった。さらに、アカザ培養細胞は、ホウ素欠如培地では RGII モノマーしか含まないが、ホウ素を添加すると、ホウ素は 10 分以内に細胞壁に取り込まれ dRGII-B が生成するとともに、細胞壁孔隙サイズの減少が起きることが明らかにされた(O'Neill, 1998)。これらのことから、外から与えられたホウ素により細胞壁ペクチンの RGII 架橋生成は速やかに起こり、生成した架橋構造により孔隙サイズの小さなペクチンネットワークが作られ、細胞壁の機械的強度が増大すると考えられる。

この結果は、dRGII-B の生成と細胞壁孔隙サイズとを関連づけた最初の報

告である。細胞壁での dRGII-B 生成時に、何らかの生合成酵素が存在するの  
か、あるいは Ca などの金属が必要なかは不明である。今後さらに、ホウ素  
の dRGII-B への取り込みと細胞壁孔隙サイズ減少の機構や、細胞壁孔隙サ  
イズと細胞壁の機械的強度との関連の解明が必要であろう。また、植物個体で  
も同様な結果が得られるのかを確認していく必要もあろう。また RGII モノマー  
を検出する簡便な手段が開発されれば、ホウ素欠乏の良い診断指標になるか  
も知れない。

### 3-7. dRGII-B 存在の普遍性

植物細胞壁のドリセラゼ可溶化物のサイズ排除 HPLC/ICP-MS 測定は、  
植物細胞壁中の dRGII-B 複合体の簡便な検出に有効であった。本法を用い  
ることにより、供試した双子葉植物のポプラ、シカモアカエデ、単子葉植物のイ  
ネ、トウモロコシ、ウキクサ、および裸子植物のモミの細胞壁において dRGII-B  
複合体が存在することが確認された。

これまで、dRGII-B の植物細胞壁からの単離同定は、筆者らの双子葉植  
物のシュガービート、単子葉植物イネ科のタケノコ以外に、双子葉植物のダイ  
コン、シカモアカエデ、エンドウから行われている。つい最近、筆者らのグルー  
プは裸子植物のアカマツから dRGII-B を単離同定し、HPLC/ICP-MS 測定に  
よる植物細胞壁中の dRGII-B 複合体の簡易検出の結果を裏付けた  
(Shimokawa *et al.*, 1999)。このように、dRGII-B の存在は、裸子植物、被子植物  
という高等植物の細胞壁には普遍的であると考えられる。

では、シダ植物、コケ植物など比較的下等とされる植物には、dRGII-B は  
存在するのであろうか。シダ植物では、ホウ素は必須元素であると考えられてい  
るが、コケ植物での必須性ははっきりしていない。dRGII-B がペクチンの架  
橋による細胞壁構造の強化に寄与しているとすれば、シダ植物を含む、維管束



系を持ち体が鉛直方向に大きく成長する高等植物は、進化の過程で、ホウ素を dRGII-B という形で利用することができるようになったことによりその形質を獲得したのかも知れない。下等植物における dRGII-B の存在については、今後、シダ植物、コケ植物などの細胞壁のドリセラゼ可溶化物をサイズ排除 HPLC/ICP-MS 測定して、dRGII-B 検出を試みることにより、明らかにしていきたいと考えている。

### 3-8. 水溶性 dRGII-B

本研究で、ダイコン根ジュース中には高分子と結合しているホウ素が存在していて、それは dRGII-B 様物質であることを示した。その後、我々のグループは、その物質が dRGII-B であることを確認している。ジュース中に存在している水溶性 dRGII-B が、ダイコン根でもともと存在しているのか、すりおろした時に細胞壁分解酵素が働き生成したのかは分からない。

最近、ワインやフルーツジュースに溶存している鉛の大部分は、dRGII-B と結合した形態であることが明らかにされた (Pellerin and O'Neill, 1998)。dRGII-B と結合した金属のヒトへの可給性、すなわち胃腸での吸収が減少するのかどうか、という栄養学的研究が必要であると考えられている。このように dRGII-B に結合している金属については、ヒトの食品からの金属摂取の観点からも関心を持たれている。

また、Shinら(1997)は、朝鮮ニンジン葉の熱水抽出物からの、マクロファージのインターロイキン 6 生産増強活性物質の単離同定を進めて、その物質がラムノガラクトツロナン II であることを報告した。そして最近、我々のグループも協力した結果、ホウ酸ジエステルにより架橋された dRGII-B が、インターロイキン 6 生産増強活性の主体であることが明らかになった (Shin *et al.*, 1998)。今後、朝鮮ニンジン葉 dRGII-B の持つ、インターロイキン 6 生産増強活性発現メカ

ニズムの解明が期待される。

#### 4. 終わりに

本研究では、図 4-1 に示したように、ホウ素の植物体内化学形態と動態・機能の基本スキームを明らかにした。ホウ素は、植物体中で、①水溶性の形で、ホウ酸の形態以外に、ジヒドロキシ基を持つ低分子化合物とのホウ酸エステル  
の形態で存在している、そして②細胞壁では水不溶性の形で、ペクチンの一部のラムノガラクトuronan II とホウ酸ジエステル結合し、ペクチンを架橋している  
のである。

本章1で述べたように、ホウ素欠乏植物中では、水溶性ホウ素は見られず、ほとんどが細胞壁中水不溶性ホウ素である。これは、ホウ素は植物体内で、細胞壁中の dRGII-B 複合体に取り込まれて機能を果たしていて、余剰なホウ素があれば水溶性の形で蓄積されるということなのだろう。このようにホウ素が植物の細胞壁で機能していることが明らかになったことで、ホウ素の必要性が動物では認められていないことも、動物細胞は細胞壁を持たないことを考えると理解できる。

また、植物がホウ素欠乏になると体内水溶性ホウ素量が減少すると考えられるから、植物体中のホウ素栄養状態を診断する場合は、植物体の全ホウ素量よりは水溶性ホウ素量のほうがより良い指標となると思われる。一方、ホウ素は植物への過剰害も起こしやすいことが知られているが、水溶性ホウ素の動態・化学形態と過剰害発生機構は、密接に関わっているだろう。さらに、量的には細胞壁 dRGII-B として機能しているホウ素が多いのだろうが、それに比べて微量な水溶性ホウ素が、細胞膜内で何らかの役割を果たしている可能性もないとは言えない。

ホウ素の植物における動態・機能の研究については、ホウ素の植物体内化

学形態が分子レベルで知られるようになったことにもない、本章で述べたように新たな事実が次々と明らかにされ始めている。このことは、ホウ素の体内化学形態を知ることが、その動態・機能解明への第一ステップであるという考え方の妥当性を裏付けているものであると言えよう。そして今後は、本論文で述べたような分析化学的アプローチに、構造化学、植物生理学など様々な分野のアプローチを加えていくことで、植物におけるホウ素の働きの全体像が構築されていくことだろう。また、ラムノガラクトソナン II - ホウ酸ダイマーと特異的に結合している金属元素の存在が明らかにされたことから、細胞壁での必須元素カルシウムの役割や、細胞壁ペクチンの金属結合能などについて新たな研究が展開されようとしている。このように細胞壁成分と金属元素の相互作用が分子レベルで解明されることも、今後に期待されよう。

## 第5章 要約

ホウ素は、高等植物の生育に必須な微量元素であり、ホウ素が欠乏すると、根や葉の伸長部位の生育が阻害される。しかしながら、これまでホウ素の植物における動態や機能については、不明な点が多かった。筆者は、その理由の一つは、ホウ素の植物体内での化学形態が分子レベルで明らかにされていないことにあると考えた。一方、有力な元素状態分析法として、最近では *in vivo* NMR や HPLC/ICP-MS が開発されてきている。そこで、本研究は、植物の必須微量元素であるホウ素の植物体内における化学形態をこれら最新の状態分析法で調べて、ホウ素の植物体内での動態・機能を明らかにすることを目的とした。

### 1. 植物体内の水溶性ホウ素

- 1)ダイコン根とリンゴ果実という植物組織の明瞭な *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを、比較的短時間で得ることができた。スペクトルに見られたピークは、ホウ酸、ホウ酸ジエステルおよびホウ酸モノエステルに由来していた。この結果は、植物体中にホウ酸エステルが存在していることを直接的に示す初めての証拠である。
- 2) ダイコン根とリンゴ果実のジュースの  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを測定した結果、ダイコン根とリンゴ果実の *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルに見られたシグナルは、特にホウ酸エステルについては、植物組織の水溶性画分に由来していた。
- 3)ダイコン根とリンゴ果実の残さの  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを測定した結果、細胞壁中のホウ素の多くは、運動性が低い化学形態で存在していることが示唆された。
- 4)ダイコン根ジュース中の高分子ホウ素量は最大でもホウ素全体の1%程度と少なく、ジュース中のホウ素の大部分は低分子態ホウ素であった。サイズ排除

HPLC/ICP-MS 測定したとき、ダイコン根ジュース中のエステル態のホウ酸はラム内を移動している間に、ホウ酸とジヒドロキシ化合物とに遊離した。

5)ダイコン根ジュースとその透析・濃縮物をサイズ排除 HPLC/ICP-MS 測定した結果、ジュース中には高分子と結合しているホウ素が存在していた。

6)水耕栽培した生育初期コマツナを部位別に *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR 測定した結果、古い葉ではホウ酸のピークが大きく、若い葉や根では、ホウ酸ジエステルのピークが大きかった。水耕増地から十分に供給されたホウ酸は、古い葉に蓄積して、ジエステル結合を作る相手の低分子ジヒドロキシ化合物量に比べて当量比が大きくなったと考えられた。

7)ホウ素供給量が低い圃場で栽培した開花期コマツナを部位別に *in vivo*  $^{11}\text{B}$  NMR 測定し、また水溶性ホウ素量を分析した結果、蕾、花、莢中には水溶性ホウ素が多く、その化学形態はホウ酸ジエステルであった。また、莖葉中のホウ素は、大部分が水不溶性であった。

## 2. 植物体内の水不溶性ホウ素

1)双子葉植物であるシュガービートと単子葉植物イネ科のタケノコの細胞壁のドリセラーゼ可溶化物から、陰イオン交換およびサイズ排除を組み合わせた3段階のクロマトグラフィーにより、ホウ素-多糖複合体を単離した。

2)ホウ素-多糖複合体の分子量は MALDI/TOF-MS 測定を行った結果、約 9000 であり、複合体 1 分子に含まれるホウ素は FI/ICP-MS 測定を行った結果、約 1 個であり、さらに  $^{11}\text{B}$  NMR 測定を行った結果、ホウ酸ジエステルの形態で存在していた。また複合体の多糖部分は、ラムノガラクトナン II であった。さらに、複合体を酸処理した結果、複合体は 2 量体であった。これらのことから、シュガービートとタケノコから単離したホウ素-多糖複合体は、1 分子のホウ酸が、2 分子のラムノガラクトナン II を、ホウ酸ジエステル結合で架橋

しているラムノガラクトナン II - ホウ酸ダイマー (dRGII-B) であると考えられた。

3) dRGII-B 水溶液と、その酸処理物の HPLC/ICP-MS 測定を行った結果、RGII-B 複合体に結合している全ての Sr, Ba と、多くの Ca, Pb が、複合体に特異的に結合していた。

4) カラムと元素検出器の間に定量用インジェクタを付けて、dRGII-B 水溶液の HPLC/ICP-AES 測定を行った結果、1 分子の dRGII-B に含まれる B 原子数は 0.87-0.93 個、Ca 原子数は 0.81-0.86 個であった。また、dRGII-B 水溶液とその酸処理物の HPLC/ICP-AES 測定を行った結果、dRGII-B 複合体に結合している 95% 以上の Ca が、複合体に特異的に結合していた。

5) EDTA を加えた溶離液で、dRGII-B の HPLC/ICP-AES および ICP-MS 測定を行った結果、dRGII-B に結合している Ca が dRGII-B から除かれても、dRGII-B は mRGII へ直ちには分解しなかった。このことは、Ca は dRGII-B の構造に不可欠な要素ではないことを示唆している。また、モル数で約 10 倍の Ca, Sr, Ba, Pb 各イオンに接触させた dRGII-B の HPLC/ICP-MS 測定を行った結果、Ca, Sr, Ba, Pb の中では、Pb > Ba > Sr > Ca の順で、dRGII-B にすでに結合している金属イオンを置換して結合する能力が大きかった。

6) 植物細胞壁のドリセラーゼ可溶化物のサイズ排除 HPLC/ICP-MS 測定を行った結果、この測定法は、植物細胞壁中の dRGII-B 複合体の簡便な検出に有効であった。本法を用いることにより、供試した双子葉植物のポプラ、シカモアアカエド、単子葉植物のイネ、トウモロコシ、ウキクサ、および裸子植物のモミの細胞壁において dRGII-B 複合体が存在することが確認された。

以上のように、植物体内のホウ素は、水溶性と水不溶性ホウ素に大別された。水溶性ホウ素の化学形態は、ホウ酸とジヒドロキシ化合物との水溶性エステル

であり、ホウ素の移動や貯蔵に関与していると考えられた。水不溶性ホウ素の化学形態は、細胞壁中でのホウ酸 1 分子とラムノガラクトuronan II という多糖 2 分子との複合体であり、細胞壁の安定性に関与していると考えられた。

## 謝辞

本研究をとりまとめるに当たりご指導いただいた、東京大学農学生命科学研究科山崎素直教授および大久保明助教授に、感謝いたします。

本研究を行うに当たり協力していただいた、森林総合研究所石井忠博士に感謝いたします。また、植物組織の *in vivo*  $^{13}\text{C}$  NMR 測定について協力していただいた食品総合研究所(現、畜産試験場)永田忠博博士、およびタケノコ細胞壁からのホウ素-多糖複合体の単離・構造決定に協力していただいた森林総合研究所(現、食品総合研究所)金子哲博士に感謝いたします。

本研究を行うに当たり研究に便宜をはかっていただいた、農業環境技術研究所織田久男博士に感謝いたします。

最後に、筆者が在籍していた農林水産省農業研究センターと農業環境技術研究所の当時の、および在籍している九州農業試験場の現在の同僚の皆様に感謝いたします。



## 文献

- Balz, R., Brandle, U., Kammerer, E., Kohnlein, D., Lutz, O., Nolle, A., Schafitel, R. and Veil, E. (1986)  $^{11}\text{B}$  and  $^{10}\text{B}$  NMR investigation in aqueous solutions. *Z. Naturforsch.*, 41a, 737-742.
- Blumenkrantz, N. and Asboe-hansen, G. (1973) *Anal. Biochem.*, 54, 484-489.
- Brown, P. H. and Shelp, B. J. (1997) Boron mobility in plants, *Plant and soil*, 193, 85-101.
- Cornelis, R. and Kimpe, J. D. (1994) Elemental speciation in biological fluids, *J. Anal. Atomic Spectrometry*, 9, 945-950.
- Dische, Z. (1962) *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 1, ed. Whistler, R. and Wolfrom, M., Academic Press, New York, p.478-512.
- Dronnet, V. M., Renard, C. M. G. C., Axelos, M. A. V., and Thibault, J. -F. (1996) Characterization and selectivity of divalent metal ions binding by citrus and sugar-beet pectins. *Carbohydr. Polymers*, 30, 253-263.
- van Duin, M., Peters, J. A., Kieboom, A. P. G. and van Bekkum, H. (1984) Studies on borate esters I, *Tetrahedron*, 40, 2901-2911.
- van Duin, M., Peters, J. A., Kieboom, A. P. G. and van Bekkum, H. (1987a) Synergic coordination of calcium in borate-polyhydroxycarboxylate systems., *Carbohydr. Res.*, 162, 65-78.
- van Duin, M., Peters, J. A., Kieboom, A. P. G. and van Bekkum, H. (1987b) Studies on borate esters. Part 5. The system glucarate-borate-calcium (II) as studied by  $^1\text{H}$ ,  $^{11}\text{B}$ , and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy., *Carbohydr. Res. J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 473-478.
- Evans, S. and Krahenbuhl, U. (1994) Improved boron determination in biological materials by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. Atomic Spectrometry*, 9, 1249-1253.
- Fleischer, A., Titel, C. and Ehwald, R. (1998) The boron requirement and cell wall properties of growing and stationary suspension-cultured *Chenopodium album* L. Cells, *Plant Physiol.*, 117, 1401-1410.

- Grignon, C., and Sentenac, H. (1991) pH and ionic conditions in the apoplast. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 42, 103-128.
- Gupta, U. C. (1979) Boron nutrition of crops. *Adv. Agron.*, 31, 273-307.
- Hill, S.J., Bloxham, M.J. and Worsfold, P.J. (1993) Chromatography coupled with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 8, 499-515.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. T. (1938) *Calif. Agr. Exp. Sta. Cir.*, 347, 1.
- Hu, H. and Brown, P. H. (1994) Localization of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin. *Plant Physiol.*, 105, 681-689.
- Hu, H. and Brown, P. H. (1997a) Absorption of boron by plant roots. *Plant and Soil*, 193, 49-58.
- Hu, H., Penn, S. G., Lebrilla, C. B., and Brown, P. H. (1997b) Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants. The mechanism of phloem mobility of boron. *Plant Physiol.*, 113, 649-655.
- Ishii, T., (1995) *Mokuzai Gakkaishi*, 41, 669-676.
- Ishii, T., and Matsunaga, T. (1996) Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydr. Res.*, 284, 1-9.
- Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M., Darvill, A. and Albersheim, P. (1999) The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *J. Biol. Chem.*, 274, 13098-13104.
- 伊藤哲雄 (1988) 感度 : ICP-AES か ICP-MS か、質量分析、36, 263-272.
- Johnson, G. V. (1990) Testing soils for sulfur, boron, molybdenum, and chlorine; in *Soil Testing and Plant Analysis*, 3rd ed., ed. R. L. Westerman, p.265-273, Soil Science Society of America, Inc., Madison, USA.
- Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (1992) *Trace Elements in Soils and Plants*, 2nd ed. p.153-161, CRC Press, Boca Raton,
- Kaneko, S., Ishii, T., and Matsunaga, T. (1997) A boron-rhamnogalacturonan-II complex from bamboo shoot cell walls. *Phytochemistry*, 44, 243-248.
- 河口広司 (1994) ICP 質量分析の最適化 ; プラズマイオン源質量分析、河口広司・

中原武利編、p45-62、学会出版センター

- Kobayashi, M., Matoh, T., and Azuma, J. (1996) Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.*, 110, 1017-1020.
- Kobayashi, M., Nakagawa, H., Asaka, T., and Matoh, T. (1999) Borate-rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca<sup>2+</sup> retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. *Plant Physiol.*, 119, 199-203.
- Lee, H.S. and Wrolstad, R.E. (1988) Apple juice composition: sugar, nonvolatile acid, and phenolic profiles. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 789-794.
- Lee, R.B. and Ratcliffe, R.G. (1993) Nuclear magnetic resonance studies of the location and function of plant nutrients in vivo, *Plant and Soil*, 155/156, 45-55.
- Leopold, I. and Fricke, B. (1997) Inhibition, reactivation, and determination of metal ions in membrane metalloproteases of bacterial origin using high-performance liquid chromatography coupled on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 252, 277-285.
- Liu, L., Shelp, B. J., and Spiers, G. A. (1993) Boron distribution and retranslocation in field-grown broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Can. J. Plant Sci.*, 73, 587-600.
- Loomis, W.D. and Durst, R.W. (1992) Chemistry and biology of boron. *BioFactors*, 3, 229-239.
- Lutz, O., Humpfer, E. and Spraul, M. (1991) Ascertainment of boric acid esters in wine by <sup>11</sup>B NMR. *Naturwissenschaften*, 78, 67-69.
- Makkee, M., Kieboom, A.P.G. and van Bekkum, H. (1985) Studies of borate esters III. Borate esters of D-mannitol, D-glucitol, D-fructose and D-glucose in water. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 104, 230-235.
- Matoh, T., Ishigaki, K., Ohno, K. and Azuma, J. (1993) Isolation and characterization of a boron-polysaccharide complex from radish roots, *Plant Cell Physiol.*, 34, 639-642.
- Matoh, T., Kawaguchi, S., and Kobayashi, M. (1996) Ubiquity of a borate-rhamnogalacturonan II complex in the cell walls of higher plants, *Plant Cell Physiol.*, 37, 636-640.
- Matsunaga, T. and Nagata, T. (1995) *In vivo* <sup>11</sup>B NMR observation of plant tissue. *Anal.*

*Sci.*, 11, 889-892.

Matsunaga, T., Ishii, T. and Watanabe, H. (1996) Speciation of water-soluble boron compounds in radish roots by size exclusion HPLC/ICP-MS. *Anal. Sci.*, 12, 673-675.

Matsunaga, T., Ishii, T. and Watanabe-Oda, H. (1997) HPLC/ICP-MS study of metals bound to borate-rhamnolacturonan-II from plant cell walls; in *Plant nutrition-for sustainable food production and environment*, ed. T. Ando et al., p.81-82, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (1997)

松永俊朗、石井忠 (1999) 開花期コマツナ体内の水溶性ホウ素の化学形態、*日本土壌肥科学雑誌*, 70, 70-72.

Mazeau, K., and Perez, S. (1998) The preferred conformations of four oligomeric fragments of rhamnolacturonan II, *Carbohydr. Res.*, 311, 201-217.

Morvai, M., Molnar-Perl, I. and Knausz, D. (1991) Simultaneous gas-liquid chromatographic determination of sugars and organic acids as trimethylsilyl derivatives in vegetables and strawberries. *J. Chromatogr.*, 552, 337-344.

宗像恵、北川進、柴田進 (1991) "多核 NMR 入門-状態分析へのアプローチ"、講談社サイエンティフィック。

Nagata, T., Hayatsu, M. and Kosuge, N. (1991) Direct observation of aluminum in plants by nuclear magnetic resonance, *Anal. Sci.*, 7, 213-215.

Nagata, T., Hayatsu, M. and Kosuge, N. (1992) Identification of aluminum forms in tea leaves by <sup>27</sup>Al NMR, *Phytochemistry*, 31, 1215-1218.

Nielsen, F.H. (1997) Boron in human and animal nutrition. *Plant and Soil*, 193, 199-208.

西谷和彦 (1995) 細胞壁の構築と植物の成長、細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 3, "植物の分子細胞生物学", p.50-61、秀潤社。

O'Neill, M., Albersheim, P. and Darvill, A. (1990) The pectic polysaccharides of primary cell walls, *Methods in Plant Biochem.*, 2, 415-441.

O'Neill, M. A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A. G., and Albersheim, P. (1996) Rhamnolacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *J. Biol. Chem.*, 271, 22923-22930.

O'Neill, M. (1998) A role for borate-ester cross-linking of rhamnolacturonan II in

- Chenopodium album* cell walls, 8th International Cell Wall Meeting, 7.08.
- Pellerin, P. and O'Neill, M.A. (1998) The interaction of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II with heavy metals and lanthanides in wines and fruit juices. *Analisis Magazine*, 26, M32-36.
- Shelp, B.J. (1993) Physiology and biochemistry of boron in plants, in *Boron and Its Role in Crop Production*, ed. U.C.Gupta, p.53-85, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- Shimokawa, T., Ishii, T. and Matsunaga, T. (1999) Isolation and structural characterization of rhamnogalacturonan II-borate complex from *Pinus densiflora*. *J. Wood Sci.*, 45, 435-439.
- Shin, K-S., Kiyohara, H., Matsumoto, T., and Yamada, H. (1997) Rhamnogalacturonan II from the leaves of *Panax ginseng* C.A.Meyer as a macrophage Fc receptor expression-enhancing polysaccharide. *Carbohydr. Res.*, 300, 239-249.
- Shin, K-S., Kiyohara, H., Matsumoto, T., and Yamada, H. (1998) Rhamnogalacturonan II dimers cross-linked by borate diesters from the leaves of *Panax ginseng* C.A.Meyer are responsible for expression of their IL-6 production enhancing activities. *Carbohydr. Res.*, 307, 97-106.
- Smith, F. A. (1979) Intracellular pH and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30, 289-311.
- Stevenson, T. T., Darvill, A. G., and Albersheim, P. (1988) *Carbohydr. Res.*, 182, 207-226.
- Takatera, K. and Watanabe, T. (1992) Application of high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry to the speciation of cadmium-binding metallothionein-like protein in a cyanobacterium. *Anal. Sci.*, 8, 469-474.
- 田中耕一 (1996) マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法、*ぶんせき*、253-261.
- Vasil, I. K. (1987) Physiology and culture of pollen. *Int. Rev. Cytology*, 107, 127-174.
- Vela, N.P., Olson, L.K. and Caruso, J.A. (1993) Elemental speciation with plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 65, 585A-597A.
- Yamaki, S. (1984) Isolation of vacuoles from immature apple fruit flesh and compartmentation of sugars, organic acids, phenolic compounds and amino acids. *Plant*

*Cell Physiol.*, 25, 151-166.

Yamaki, S., and Ino, M. (1992) Alteration of cellular compartmentation and membrane permeability to sugars in immature and mature apple fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117, 951-954.

York, W. S., Darvill, A. G., McNeil, M., Stevenson, T. T., and Albersheim, P. (1985a) Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods. Enzymol.*, 118, 3-40.

York, W. S., Darvill, A. G., McNeil, M., and Albersheim, P. (1985b) *Carbohydr. Res.*, 138, 109-126.

