

短 報

Short
Communications

エンドウ (*Pisum sativum* L.) における histidine 施用によるニッケル毒性軽減効果

亀田弥生*・伊藤英介**・竹下 絢**・中澤亮二***・武長 宏**

(平成 13 年 11 月 13 日受付/平成 14 年 3 月 14 日受理)

要約 : Histidine が Ni 超集積植物以外の植物における Ni 耐性に関与しているか否かについて明らかにする目的で, histidine が養液栽培のエンドウ (*Pisum sativum* L.) の Ni 耐性に与える影響を検討した。植物体内の histidine 含有率は Ni 施用により増加した。また, Ni 施用によって減少した生育量は外因性の histidine を Ni と同時に施用すると軽減された。予め histidine を植物体に吸収させた後に Ni を施用すると, それらを同時に添加した場合よりも低かったが Ni 毒性軽減効果は認められた。従って, 外因性の histidine は培養液中および植物体内で, ある程度 Ni を無毒化していることが考えられた。

キーワード : ニッケル, ヒスチジン, エンドウ, 解毒

緒 言

土壤中に存在する重金属は植物にとって重要な環境ストレス要因のひとつであり, 重金属ストレスによる毒性の発現は多くの場合, Mg^{2+} や Fe^{3+} など他の必須金属元素の拮抗吸収阻害による代謝阻害を引き起こし, 重要な生理化合物の代謝攪乱を誘発する¹⁾。多くの場合, その症状は視覚的には葉緑体合成阻害からくる Fe 欠クロロシスとなって判断できる²⁾。また, 重金属は多くの細胞構成成分 (ヌクレオチド, アミノ酸, リン脂質など) に直接作用して細胞の生理生化学的応答を阻害する¹⁾。

ニッケル (Ni) はメッキ, 合金, 触媒など各方面で広く用いられている金属である。過剰に Ni が含まれるような土壌では植物の生育を阻害するストレス因子のひとつとなっている^{3,4)}。Ni 耐性をもつ植物については, Ni を多量に含む自然汚染土壌である蛇紋岩風化土壌に生育する Ni 超集積植物 (Ni-hyperaccumulate plants) の存在が知られている⁵⁾。Ni 超集積植物は特に高濃度 (数千~数万 ppm) の Ni を集積する能力があり, 植物における Ni 耐性機構の主な研究材料として利用されている^{6~8)}。現在約 400 種の Ni 超集積植物が同定され, 植物を用いた環境浄化 (phytoremediation) に寄与するものと期待されている⁹⁾。植物の Ni 耐性機構について今までに報告されているのは, Ni 超集積植物についての検討が殆どであり, 導管溢液からのクエン酸-Ni 錯体の分離同定^{10~12)}、近年では Ni 集積植物 (*Alyssum lesbiacum*) において, Ni を水耕液中に施用した際に導管溢液中の遊離 histidine 含有量が顕著にかつ比例的に増加すること, 非 Ni 耐性種 *A. montanum* に histidine を葉面撒布するとその Ni 耐性と

地上部への Ni 移動量が著しく増加することなどから, Ni のキレーターは遊離 histidine であり, Ni 吸収に伴う histidine の蓄積は Ni 超集積の機構であるという報告¹³⁾などが代表的なものである。また植物ではないが, 酵母 (*Sccharomyces cerevisiae*) の細胞内においても histidine が Ni をキレーションし, 空胞 (vacuole; 植物細胞では液胞に相当) に隔離しているとの報告がある¹⁴⁾。これらのことから, 一般作物においても histidine が Ni 耐性に関与していることが予想される。しかし, 一般作物における Ni 耐性と histidine の関係については不明である。本研究では, エンドウ (*Pisum sativum* L.) における histidine の Ni 毒性軽減効果について検討した。

材料および方法

(1) 供試植物および処理条件

エンドウ (*Pisum sativum* L.) は発芽後 7 日の幼植物を, Hoagland 水耕液 (pH 6.0) を基本培養液とした処理液に移植し 7 日間生育させた。栽培はパイオトロン内 (25°C, 照度 6,400 lx, 明期 14 時間暗期 10 時間) にて行った。収穫した植物体は純水にて根部を洗浄し, それぞれの処理区について茎部, 葉部, 根部に分け, それぞれの生体重を測定した後液体窒素にて凍結し保存した。

植物体への Ni 処理または histidine 処理は $NiCl_2$, L-histidine hydrochloride monohydrate の水溶液を基本培養液に添加することで行った。Ni-histidine 処理においては, 試験区は histidine を Ni 処理と同時に添加する区, histidine 処理後に根部を水洗し, Ni を添加した水耕液に移植する区を設けた。水耕液へ添加する histidine の濃度は, 添加 Ni 濃度の 0.5 倍 (100 μM) または, Ni と等倍の濃

* 東京農業大学大学院農芸化学専攻

** 東京農業大学応用生物科学部生物化学科

*** 筑波大学応用生物化学系

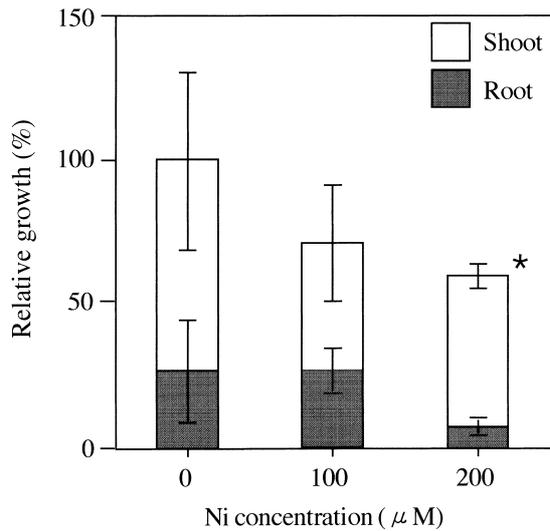


図1 Ni 処理がエンドウの生育に及ぼす影響
*: Ni 無添加区に対する有意差 (p<0.05)

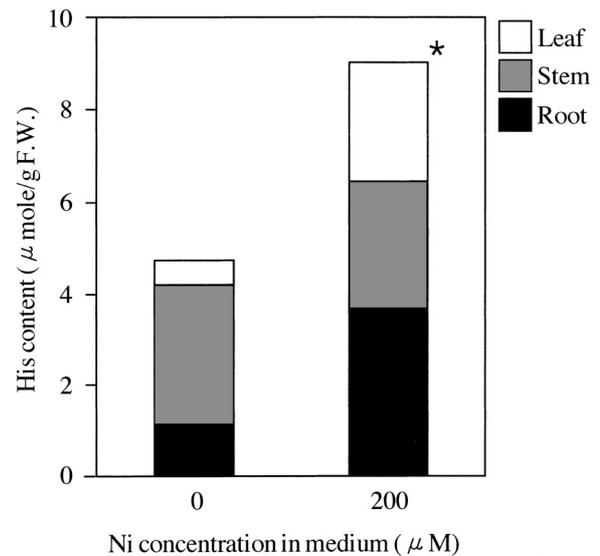


図2 Ni 処理によるエンドウの histidine 含有率の増加
*: Ni 無添加区に対する有意差 (p<0.05)



Ni	-	+	+	+
His	-	-	+	+
			A	B

写真1 Histidine 処理による Ni 障害の軽減
histidine を Ni と同時に水耕液に添加した場合
A...Ni : His = 1 : 0.5, B...Ni : His = 1 : 1, Bar = 10 cm

度 (200 μM) を用いた。なお, histidine 処理区は histidine 溶液添加後に 1N NaOH で pH を調整した。

(2) エンドウの histidine 含有率の測定

収穫した植物体は液体窒素で凍結磨砕し, 80% ethanol を加えて約 70°C で 10 分間熱抽出し, その後遠心分離 (10,000 × g, 10 min, 4°C) し上清を得た。抽出から分離までの作業は 3 回繰り返し, それらの上清を合わせてロータリーエバポレーターで蒸発乾固し, アミノ酸分析用試料希釈液 (組成: 0.2N tri-sodium citrate dihydrate, 1.6% (v/v) HClO₄, 0.01% (v/v) n-caprylic acid, pH 2.20) に

溶解, 0.45 μm membrane filter にて濾過したものをアミノ酸自動分析機 (Shimadzu LC-6A, Na-type) にて遊離 histidine 量を測定した。

結果および考察

エンドウの Ni 処理による生体重の変化を図 1 に示した。control 区を 100% とすると, Ni 200 μM 区では, 生体重が 62% に低下した。形態的には Ni 処理により主根の伸長抑制が認められた (写真 1 左から 2 番目)。このことから, エンドウの生育が Ni により阻害されていることが示された。

次に Ni 処理時における遊離 histidine 含有量を測定したところ, Ni 処理によりその含有量は増加することが示された (図 2)。先に述べたように Ni 超集積植物 (*A. lesbiacum*) では Ni 投与により導管分泌液中の遊離 histidine 含有量が増大し, 同属の非集積種 (*A. montanum*) に histidine を葉面散布すると Ni による生育阻害が緩和され, Ni の導管内移動速度が高まっている¹³⁾。また, 酵母 (*Sccharomyces cerevisiae*) の細胞内においても histidine が Ni をキレーションし, 空胞に隔離することで Ni 耐性に関与していることが示されている¹⁴⁾。植物における histidine の Ni 耐性機構への関与は Ni 超集積植物以外には報告例がなく, histidine の蓄積は Ni 超集積のための特殊な機構であると考えられている¹³⁾ が, 一般作物であるエンドウにおいても histidine 含有量の増加が Ni 耐性機構に関与している可能性が考えられた。

しかしながら, histidine 含有量の増加が Ni 耐性に直接関与しているかどうかまで明らかではない。これを検証する目的で, 培地に histidine を Ni と共に添加して栽培することにより, histidine がエンドウの Ni 障害を軽減する効果を有するか否かを検討した。結果, Ni 単独施用時 (200 μM) におけるエンドウの生体重は Ni 無添加時の約 62%

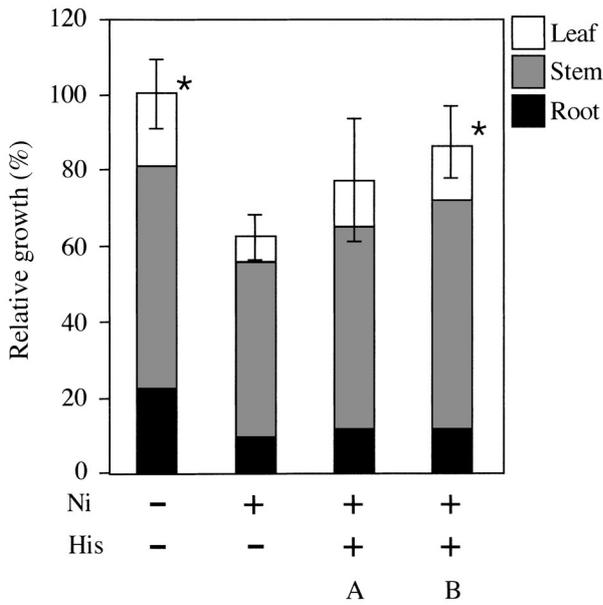


図 3 Histidine 処理による Ni 障害の軽減 1
histidine を Ni と同時に水耕液に添加した場合
A...Ni : His=1 : 0.5, B...Ni : His=1 : 1
* : Ni 単独施用区に対する有意差 (p<0.05)

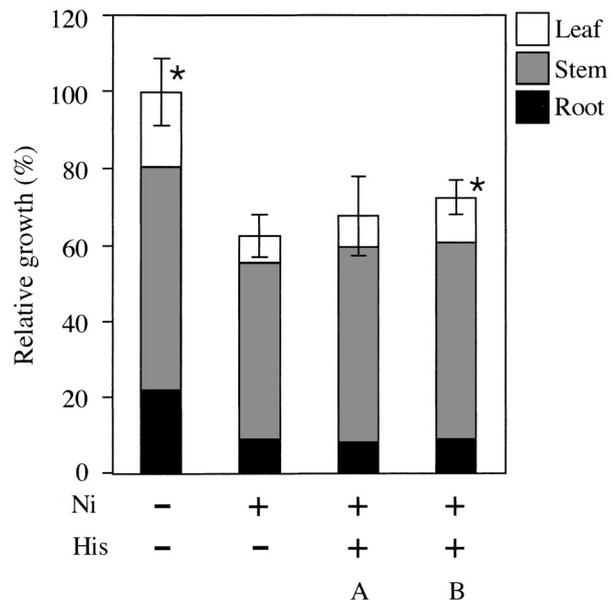


図 4 Histidine 処理による Ni 障害の軽減 2
A. Ni 処理 1 日前に histidine を投与
B. Ni 処理 1 週間前に histidine を投与
* : Ni 単独施用区に対する有意差 (p<0.05)

にまで低下したが、histidine : Ni=1 : 1 の場合において、Ni 毒性の軽減効果 (約 86%) が認められた (図 3, 写真 1)。Histidine 単独処理区では植物の生育に影響を及ぼさなかった。Ni 毒性軽減効果のプロセスとして、(1) 植物体に吸収された histidine が体内で Ni の解毒を行っている、(2) 培地中で Ni が histidine とキレーションすることにより植物体に無毒な形態になっている、の 2 つの可能性が考えられる。特に後者については、キレート化された Ni はほとんどその毒性を失い植物には全く吸収されないという報告¹⁵⁾がある。しかしながら、Ni 超集積種における histidine 葉面撒布により Ni 吸収量が上昇するという報告¹³⁾もあり、また本実験において Ni 施用により体内の histidine 含有率が増加していたことから植物体内で histidine が Ni 耐性ないし Ni 毒性軽減に関与している前者の可能性も考えられる。従って、次に予め histidine を植物に吸収させ、培地中から histidine を除去した後に Ni 処理を行い、Ni 障害によるエンドウの生育ダメージが緩和されるか否かを検討した。図 4 に示すように、histidine と Ni を同時に添加・吸収させた場合 (図 3) ほどの効果は認められなかったが、histidine 1 週間処理区において若干軽減効果が見られた。よって、植物体内においても histidine は Ni 毒性軽減効果を有していることが考えられ、Ni と histidine を同時に添加した方が毒性軽減効果は高かったことから、培地中においても Ni の毒性が histidine によって緩和されていることが考えられた。これらのことから histidine の Ni 耐性ないし Ni 毒性軽減への関与は、Ni 超集積植物の Ni 超集積のための特殊な機構ではなく、一般の植物においてもみられる事象であることが示唆された。

参考文献

- JOHO, M., INOUE, M., TOHOYAMA, H. and MURAYAMA, T., 1995. Nickel resistance mechanisms in yeast and other funge. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 164-168.
- 飯塚隆治, 1976. 葉の葉脈間ネクロシス症状の発現における Ni と Mg および Mn との相互作用. *日本土壌肥科学雑誌*, 47 (3), 69-74.
- PROCTOR, J. and BAKER, A.J.M., 1994. The importance of nickel for plant growth in ultramafic (serpentine) soils, in *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*, ed ; Ross, S.M., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 417-432.
- 直原 毅, 1991. ニッケルによる土壌汚染とその対応, *土壌の有害金属汚染*, 日本土壌肥科学会, 博友社, 84-88.
- 高橋英一, 1974. 蛇紋岩土壌における植物の栄養生理. *比較植物栄養学*, 養賢堂, 205-219.
- GABBRIELLI, R., PANDOLFINI, T., VERGNANO, O. and PALANDRI, M.R., 1990. Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. *Plant and Soil*, 122, 271-277.
- HOMER, F.A., REEVES, R.D., BROOKS, R.R. and BAKER, A.J. M., 1991. Characterization of the nickel-rich extract from the nickel hyperaccumulator *Dichapetalum gelonioides*. *Phytochemistry*, 30 (7), 2141-2145.
- KERSTEN, W.J., BROOKS, R.R., REEVES, R.D. and JAFFRÉ, T., 1980. Nature of nickel complexes in *Psychotria douarrei* and other nickel-accumulating plants. *Phytochemistry*, 19, 1963-1965.
- KRÄMER, U., SMITH, R.D., WENZEL, W.W., RASKIN, I. and SALT, D.E., 1997. The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Hálácsy. *Plant Physiology*, 115, 1641-1650.
- TIFFIN, L.O., 1971. Translocation of nickel in xylem exudate of plants. *Plant Physiology*, 48, 273-277.
- WHITE, M.C., CHANEY, R.L. and DECKER, A.M., 1981. Metal complexation in xylem fluid. *Plant Physiology*, 67, 311-315.

- 12) LEE, J., REEVES, R.D., BROOKS, R.R. and JAFFRÉ, T., 1977. Isolation and identification of a citrato-complex of nickel from nickel-accumulating plants. *Phytochemistry*, **16**, 1503-1505.
- 13) KRÄMER, U., COTTER-HOWELLS, J.D., CHARNOCK, J.M., BAKER, A.J.M. and SMITH, J.A.C., 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, **379**, 635-638.
- 14) JOHO, M., ISHIKAWA, Y., KUNIKANE, M., INOUE, M., TOHOYAMA, H. and MURAYAMA, T., 1992. The subcellular distribution of nickel in Ni-sensitive and Ni-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbios.*, **71**, 149-159.
- 15) VANSELOW, A.P., 1965. Chapter 21/Nickel. in *Diagnostic Criteria for Plants and Soils*, ed ; CHAPMAN, H.D., Riverside, 302-309.

Detoxicational Effect of the Exogenous Histidine on the Growth of Pea (*Pisum sativum* L.) Treated with Nickel

By

Yayoi KAMEDA*, Eisuke ITO**, Aya TAKESHITA**, Ryoji NAKAZAWA***
and Hiroshi TAKENAGA**

(Received November 13, 2001/Accepted March 14, 2002)

Summary : Effects of histidine on nickel tolerance of pea (*Pisum sativa* L.) were investigated, to determine whether histidine participates in Ni tolerance in plants other than Ni hyperaccumulation plants. Histidine content in pea increased by the treatment with Ni. In addition, exogenous histidine reduced the inhibitory effects of Ni on the growth of pea. When adding nickel after histidine (and then histidine was removed from culture medium), the effect of histidine was lower than in the case in which it was added simultaneously. Therefore, it is suggested that exogenous histidine detoxifies Ni to some extent in the culture medium and in the plant.

Key Words : Ni, histidine, *Pisum sativa* L., detoxification

* Division of Agricultural Chemistry, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture

*** Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba