

原著論文

二次元画像解析法を用いた傷害処理時における黄化実生根端細胞内カルシウムイオン濃度の測定

新技術事業団 水谷植物情報物質プロジェクト
星野 保¹⁾, 川井 悟²⁾, 水谷純也

1. はじめに

細胞内における遊離カルシウムイオンは、高等植物を含む多くの真核生物においてセカンドメッセンジャーとしての重要な役割を持つことが知られており、細胞内カルシウムイオン濃度（以下 $[Ca^{2+}]_i$ と略）の変化は多くの生化学的応答を引き起こすことが知られている。従って $[Ca^{2+}]_i$ を測定することは、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化によって制御を受ける生化学的機構を解明する上で重要な情報を提供することとなる。一般に傷害を受けた植物体において、細胞内 Ca^{2+} がファイトアレキシンの生成など、種々の生化学的反応を誘導することが報告されている¹⁻³⁾。しかし、植物体における $[Ca^{2+}]_i$ の測定は fura-2^{*} を始めとする各種細胞内 Ca^{2+} 指示薬の透過が困難なことから、一部の遺伝子組換え体などを除きその研究例は少ない⁴⁻⁶⁾。このため、傷害時における植物体の細胞内 Ca^{2+} 動態について十分な知見が得られていないのが現状である。

本研究では、比較的自家蛍光の低い黄化実生根端に fura-2 を負荷させ、傷害時における Ca^{2+} 動態について検討を行った。

2. 材料と方法

植物体への細胞内 Ca^{2+} 指示薬の導入 植物試料としては表 1 に示したものを使用した。Eppendorf チューブ中に 50 μ M fura-2 水溶液を含む脱脂綿上にて種子 2-3 粒を暗所、室温で発芽させ（通常 2-3 日）、蛍光顕微鏡によって fura-2 の導入を確認した。

黄化実生根端部へのエリシター処理および画像解析法による $[Ca^{2+}]_i$ の測定 fura-2 を負荷させた植物体をスライドガラスの上に置いた後、蒸留水で湿らせた脱脂綿を入れたシャーレをかぶせ 45 分間室温で放置し、黄化実生の水分量とシャーレ内の湿度を一定にした。黄化実生を取り出し、種々のエリシター溶液で湿らせた濾紙片に根端部を接触させ、すばやくシャーレ内に戻し画像解析を始めた。

$[Ca^{2+}]_i$ 測定に用いた画像解析装置は倒立顕微鏡（オリンパス, IMT-2），2 波長励起装置（オリンパス, 励起波長 340 nm および 380 nm; 10 nm bandpass filter），S I T ビデオカメラ（浜松ホトニクス, C2400-08）および画像処理装置（浜松ホトニクス）からなり、これらはすべて画像処理装置によってタイミング調整がなされている。一対の 340 nm と 380 nm の画像を得るための最短時間は約

1. 現所属；北海道農業試験場 地域基盤研究部 品質生理研究室

2. 現所属；新技術事業団 伏谷着生機構プロジェクト

*; fura-2 代表的細胞内 Ca^{2+} 測定用蛍光色素。 Ca^{2+} との反応によって励起波長が変化する。

1.5 秒である。蛍光像は通常、256 pixels X 241 line、各pixel毎に8-bit 深さのデジタル画像に変換された後、各 pixel毎にR340/380を求め、黄化実生根端における $[Ca^{2+}]_i$ の変化を観察した。

エリシターとしては以下のものを用いた。細胞壁分解酵素；ペクチナーゼ (*Aspergillus niger* 由来, Sigma 製), セルラーゼ (*Penicillium fucosum* 由来, Sigma 製), セルラーゼ (*Asp. niger*由来, Sigma 製)。重金属溶液； $CuCl_2$ (3mM), $AgCl$ (3 mM)。菌類細胞壁成分；nigeran (*Asp. japonicus*由来, Sigma製), chitin (和光純薬製)

3. 結果および考察

黄化実生へのfura-2の導入 一般に $[Ca^{2+}]_i$ の測定において組織中に指示薬が均一に分布していることは、重要な因子の一つである。植物組織においては、これまで指示薬の細胞壁への吸着あるいは細胞に取り込まれにくいなどの障害のため、遺伝子組換え体を^{5,6)} 除き植物体での研究例はほとんどなく、その多くは培養細胞を使用している⁶⁾。

表1に示すように黄化実生へのfura-2の負荷は、その程度の差により3種に大別される。これらの内、アスパラガス、タマネギ、キュウリ、ハツカダイコンでは、黄化実生より調整した細胞質画分よりfura-2に基づく蛍光が確認されたため、 $[Ca^{2+}]_i$ の測定が可能であることが確認された。特にアスパラガスでは、この性質がより明確に認められ、これ以降の検討はアスパラガス黄化実生を使用した。

また、多くの黄化実生ではNADHまたはNADPHなどの自家蛍光物質の存在により、指示薬の負荷が確認できないものが多く、今後さらなる改良が必要である。しかし、本法では発芽による水分吸収に基づいて指示薬を黄化実生に均一に取り込ませるといった簡便な方法によって $[Ca^{2+}]_i$ の測定が可能であることを示した初めての例である。

表1 細胞内fura-2導入を指標とした黄化実生の分類

-
- | |
|---|
| 1. fura-2の細胞内導入が認められるもの
アスパラガス, タマネギ, キュウリ, ハツカダイコン |
| 2. fura-2の細胞内導入があまり認められないもの
レタス, タバコ, シロイヌナズナ, タイム |
| 3. 自家蛍光が強く細胞内fura-2の存在を確認できないもの
カイワレ, トマト, トウガラシ, トウモロコシ, イネ, エンバク |
-

エリシター処理による $[Ca^{2+}]_i$ の変化 植物病原性微生物は宿主への感染の際にセルラーゼ、ペクチナーゼの様な細胞壁分解酵素を分泌する。fura-2を負荷させたアスパラガス根端にペクチナーゼを塗布すると、根端部での $[Ca^{2+}]_i$ の緩やかな上昇が確認された (図1)。また、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は時間の経過とともに処理部から周辺部へと拡大することが確認された。既に、Knightらによってaequorin (Ca^{2+} との結合によって蛍光を発する蛋白質) 遺伝子を持つタバコ黄化実生において、エリシター処理による $[Ca^{2+}]_i$ の変化は物理的刺激によるものと比較して緩慢な変化であることを報告している⁵⁾。今回の画像解析法により、ペクチナーゼ処理による刺激、傷害処理が $[Ca^{2+}]_i$ の変化として他の細胞に伝達さ

れていることが推定された。同様の結果はセルラーゼ、ヘミセルラーゼ処理によっても観察された（結果省略）。

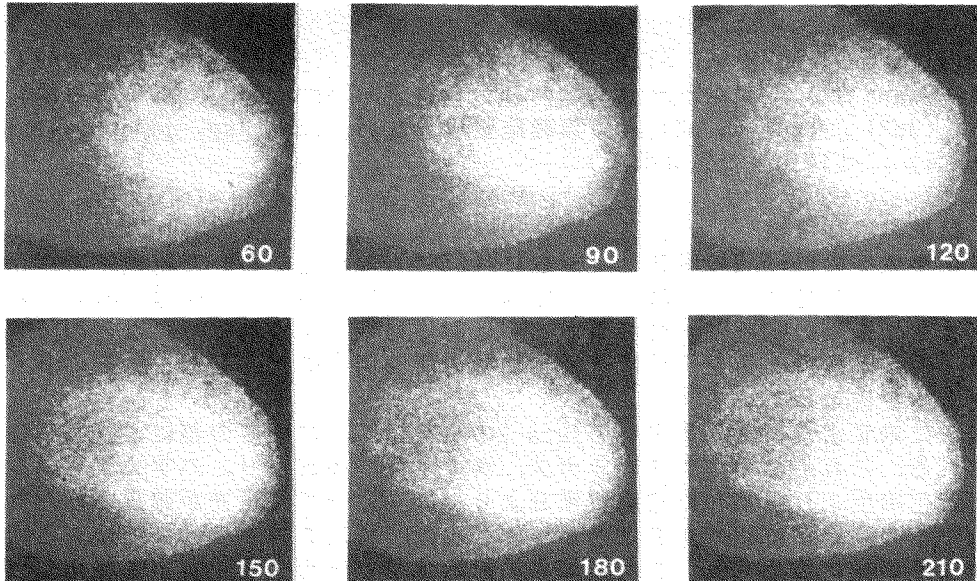


図1. ペクチナーゼ処理によるアスパラガス根端における $[Ca^{2+}]_i$ の変化
各パネル右下の数値はペクチナーゼ処理後の時間 (sec) を示す。

また、他に菌類細胞壁成分もエリシター効果を持つことが知られているが、今回供試したものでは $[Ca^{2+}]_i$ の変化を引き起こすものは認められなかった。

図2に示すように $CuCl_2$ 処理によってアスパラガス黄化実生根端細胞における $[Ca^{2+}]_i$ は、処理部と推定される部位を中心に急激に増加した。同様の結果は $AgCl$ 処理によっても得られた（結果省略）。本測定条件においては、 $[Ca^{2+}]_i$ max を観察することができず、 $CuCl_2$ 処理の極めて早い時期に $[Ca^{2+}]_i$ max を迎えることが推定された。これら $CuCl_2$ 処理によって起こる応答は物理的的刺激に対する応答と類似している^{5,6)}。また、ペクチナーゼ処理とは異なり、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化は処理部付近に限定されていた。

4. おわりに

本研究では画像解析処理法を用いることにより、一部のストレス化合物が植物組織において $[Ca^{2+}]_i$ の変化として認識されることを示すとともに、ストレス化合物の種類によって $[Ca^{2+}]_i$ の変化に差があることを示した。これらの結果より、植物組織における傷害あるいは病原菌感染の初期応答は、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化として伝達されることが推定された。

しかし、酵素処理による細胞壁の構造破壊、あるいは重金属イオンとの置換等によって遊離した Ca^{2+} がアポプラスト中の *fura-2* と反応することも推定される。エリシター処理による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が、細胞壁の物理的・化学的变化に起因するものではなく、エリシター特異的な生化学的反應に基づくことを明らかにすることが、今後の課題である。

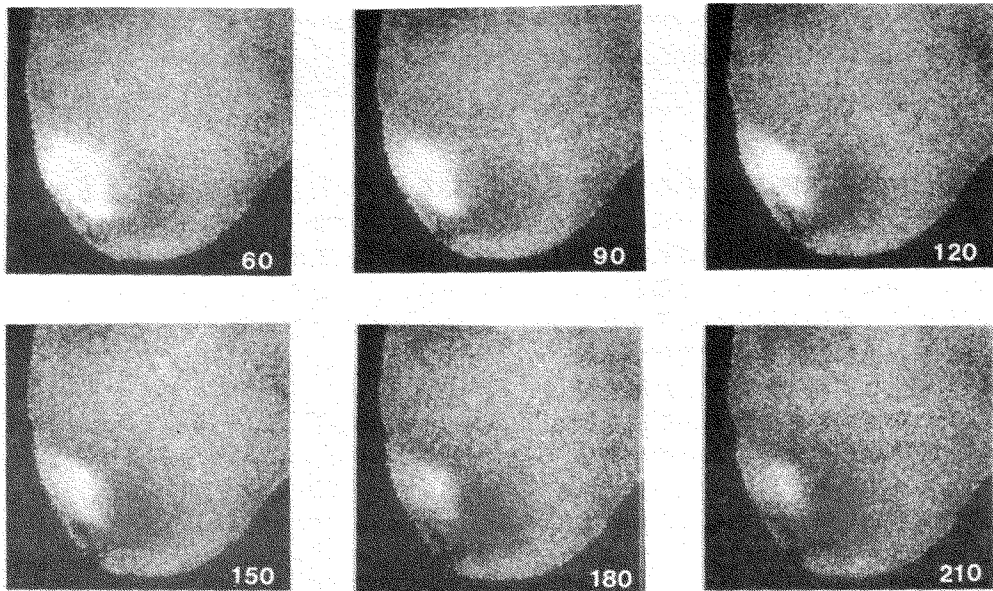


図2. CuCl_2 処理によるアスパラガス根端における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化
説明は図1と同じ。

引用文献

- 1) H. Kohle et. al. (1985) *Plant Physiol.*, 77: 544-551.
- 2) F. Kurosaki et. al. (1987) *Phytochemistry*, 26: 1919-1923.
- 3) M.R. Stab and J. Eble (1987) *Arch. Biochem. Biophys.*, 257: 416-423.
- 4) S. Gilroy et. al. (1991) *Plant Cell*, 3: 333-344.
- 5) M.R. Knight et. al. (1992) *Nature*, 352: 524-526
- 6) N.D. Read et. al. (1992) *J. Micros.*, 166: 57-86.
- 7) D.M. Callaham and P.K. Hepper (1991) *In Cellular Calcium*. eds by J.G. McCormack and P.H. Cobbold, pp. 381-410, IRL press, Oxford.

Two dimensional analysis of intracellular localization of calcium ions in root tip cells of some etiolated plant seedlings by fura-2 during the elicitation.

Tamotsu HOSHINO, Sateru KAWAII and Junya MIZUTANI
(Research and Development Corporation of Japan)

受理日：1994年2月22日