

氏 名(本籍) 横^{よこ} 田^た 聡^{さとし}

学位の種類 博士 (農 学)

学位記番号 農 第 6 4 7 号

学位授与年月日 平成 14 年 4 月 11 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 アルミニウムイオンストレスによる根の伸長阻害機構の解明—非破壊的分析手法を用いた解析—

論文審査委員 (主 査) 教 授 前 忠 彦

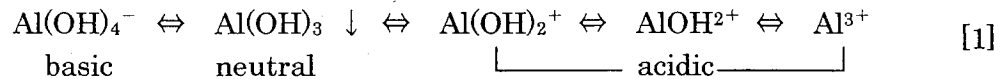
(副 査) 教 授 山 谷 知 行

教 授 三 枝 正 彦

論文内容要旨

序論

酸性土壌は表土の pH (H₂O) が 5.5 未満の土壌と定義され、全世界の耕地として利用可能な土地面積のおよそ 30% 以上を占めるが (von Uexküll and Mutert 1995)、一般に作物の生産性が低い不良土壌とされ利用が進んでいない。酸性土壌では根の伸長・発達の障害が栽培の大きな障害であり、その主な要因は、低 pH すなわちプロトンストレスと低 pH 条件下で可溶化するアルミニウム (Al) イオンストレスである。土壌中の Al の大部分は鉱物の化学構造に取り込まれて存在するが、ごく一部は酸性条件下で可溶性イオンとして存在する ([1])。



これらの酸性 Al イオン種のうち、Al³⁺の根の伸長阻害作用が著しく高い (Kinraide and Parker 1990)。しかし、Al イオンによる根の伸長阻害メカニズムの詳細は未だ明らかではない。世界人口は激増しており、食料増産のためには酸性土壌を積極的に利用せざるを得ず、Al 耐性品種の作出が急務である。そのためには、Al ストレスの基本的な機構を解明しなければならない。

酸性土壌に作物を播種または移植すると、根は Al ストレスに曝露され、感受性の高い植物では直後から伸長阻害が起こる。根の伸長は分裂域での細胞分裂による新しい細胞の伸長域への供給と、伸長域における細胞の吸水成長の、二段階によって進行するが、根全体の長さの増加は後者による。したがって、Al ストレスによるすみやかな伸長阻害は、伸長域の細胞伸長が阻害されるためと考えられ、なかでも表皮細胞は Al イオンと直接接触し、最も影響を受けやすいと考えられる。そこで、短時間で根の表皮細胞に発生する現象をとらえることが Al ストレスのメカニズムを探るにあたり重要である。しかし伸長域・表皮細胞という限られた領域のみを根から摘出することは困難であり、組織化された細胞を分離することによるアーティファクトも解析上大きな問題となる。

そこで本研究では、Al ストレスにより短時間に根の伸長域表皮細胞に発生する現象を非破壊的にあるがままの状態を観察・分析する手法を検討・適用し、Al ストレスによる伸長阻害機構を探ることを目的とした。供試植物としては、重要な飼料作物であるが酸性土壌での生産性が低く、Al 耐性品種の開発が望まれているアルファルファ (*Medicago sativa* L.) の幼植物を用い一次根について解析した。第 1 章では、低 pH ストレスを抑え Al イオンそのもののストレスを付加するための水耕栽培による実験系を確立した。第 2 章では、Al ストレス下での細胞の生死と生理的变化に着目し、非破壊的手法を用いて観察・分析した。

第 1 章 Al イオンストレス付加のための水耕実験系の確立と Al イオンによる根の伸長阻害モデル

Al ストレスを付加する方法としては、酸性土壌による土耕栽培法または系の単純化が可能な水耕栽培法が考えられる。本研究では、Al イオンや他の栄養素の濃度、pH を容易に変化させることができる水耕栽培系を採用し、Al ストレス付加水耕栽培系を設計した。

Al イオンの形態は溶液の pH に依存し([1])、pH が低いほど毒性の高い Al^{3+} の割合が高くなり、可溶性 Al も激増するため、従来の研究例では pH 4~4.5 の領域がしばしば用いられた。しかし酸性土壌では pH が 5 付近でも Al ストレスが問題となる場合があることから、 H^+ の影響が加味される低 pH 領域は Al イオンそのものの毒性を評価するには不適切である。そこで、pH 4.5 以上で酸性土壌における根の伸長阻害と似通った状況を作り出す pH、Al イオンおよび栄養素濃度の条件を検討した。

栄養素をまったく含まない水溶液中でのアルファルファ根の伸長は、pH 4.5 未満の領域では著しい阻害を受けたことから (Fig. 1)、より高い pH における解析が必要となった。しかし、水溶液中の Al 濃度を高めると必然的に pH が低下するために、pH を調節するためにはアルカリを加える必要があるが、この操作には大きな問題がつかまとう。酸性の水溶液中で存在しうる Al イオンには [1] に示したモノマーイオン種の他に、" Al_{13} " と通称されるポリマーイオン種 (組成: $[AlO_4Al_{12}(OH)_{24}(H_2O)_{12}]^{7+}$) が知られている。 Al_{13} はモノマーイオンを含む水溶液を部分中和することによって人為的に生成し、根に対して伸長阻害作用を及ぼすことが知られている (Parker et al. 1989)。しかし、酸性土壌中での Al ストレスの主体は Al^{3+} であり、ポリマーイオンの混在は実験の再現性の低下や結果の解釈に混乱を招くことから、ポリマーイオンが生成しない条件で行うことが望ましい。そこで、Al イオンを含む水溶液における Al_{13} ポリマーの生成条件について検討した。終濃度 100 または 10 mM $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 水溶液にそれぞれ 1 または 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液を徐々に滴下して pH を 4.5 まで上昇させた水溶液の Al イオン組成を ^{27}Al -NMR によって調べたところ、 Al_{13} に相当する化学シフト + 62.5 ppm のピークが認められ (Fig. 2)、また Al イオン種の組成を分別する ferron 法による分析でも中和操作に伴うポリマーイオンの生成が認められた (Fig. 3)。

したがって、低 pH ストレスを回避しつつモノマー Al イオンストレスを付加するためには、pH 5 付近で中和操作を必要としない Al 濃度で行う必要がある。そこで pH 5.0 で栄養素を含まない試験水溶液中での Al イオン濃度と根の伸長の関係を調べたところ、2.5 μM から阻害がみとめられ、低 pH ストレスを抑えて Al イオンそのもののストレスを評価できることが確認された (Fig. 4)。

次に、一次根の持続的な伸長には外部からの Ca 供給が必要であるという知見 (Marschner and Richter 1974) に基づき、試験水溶液への $CaCl_2$ の添加効果を調べたところ、Al を含まない場合は伸長の促進効果がみとめられたが、同じカチオンである Al イオンとの競合による毒性軽減効果はほとんどみとめられなかった (Fig. 5, 6)。

以上の知見をもとに構成された 20 μM $AlCl_3$ 、1 mM $CaCl_2$ を含む pH 4.8 の水耕液と酸性土壌 (pH (H_2O) = 4.7) における根の生育を比較したところ、いずれの場合も根の伸長は阻害され、低真空 SEM*1 による観察では、両者の根の表面にはきわめて似通った亀裂生成現象がみとめられ (Fig. 7)、用いた水耕栽培実験系は現実に即した妥当なものであることがわかった。

Figure 7 では根表面の亀裂は伸長域に発生し、細胞が上下にひきちぎられたような形態を示した。これは Al ストレスにより表皮細胞の伸長が止まるいっぽう、より内層の細胞群の伸長能力が維持されていたために、その伸長する力によって表皮細胞が破断されて生じたものと考えられる (Fig. 8)。そこで、このモデルをもとに、第 2 章では伸長域表皮細胞に注目し、Al ストレスにより発生する現象を非破壊的に観察・分析し、細胞の伸長阻害機構について検討した。

第2章 Al イオンに対する根の応答と Al イオンによる細胞伸長の阻害機構 — 非破壊的分析手法を用いた解析 —

Al イオンにより細胞伸長が阻害される機構には (1) Al イオンの毒性によって生存能力を失い死に至る、(2) 生存能力は維持しているが、細胞壁の合成や伸長が Al との直接の接触によって阻害される、(3) Al ストレスを感知した他の部位、例えば根冠などからのシグナルを受けて、間接的に伸長が止められる、などが考えられる。したがって、Al ストレス下での細胞の生死、生理的活性を調べるのがまず重要である。そこで、蛍光プローブを用いて伸長域表皮細胞の生死および呼吸にともなうミトコンドリア膜ポテンシャル ($\Delta\Psi_m$) の可視化を試みた。細胞膜のバリア機能と細胞内エステラーゼ活性が保たれていることを指標に細胞の生死を判定する FDA*² 染色法により、伸長が阻害されている 2~4 時間後でも、細胞の生存を示す緑色の蛍光が観察され、DAPI*³ 染色によっても原形質膜がバリア機能を持つことが確認された (Fig. 9)。また、JC-1*⁴ 蛍光プローブを用いた $\Delta\Psi_m$ の可視化により、伸長域の細胞は亀裂生成にともない破損した細胞以外は呼吸によるエネルギー生産が可能な状態であることが赤色粒子の存在によって証明され、低 pH ストレスに対する応答は全く異なっていた (Fig. 10)。また、同じく細胞伸長を伴う根毛の伸長も、細胞の著しい破壊を伴わず阻害されることがわかった (Fig. 11)。これらのことから、Al ストレスによる細胞の伸長阻害は細胞の生存能力の喪失によるものではなく、細胞壁伸長にかかわる機構の阻害による可能性が提起された。

双子葉植物の細胞壁には Ca^{2+} 結合部位を持つペクチンが多く、Al イオンが Ca^{2+} を置換・排除することによって細胞壁の伸長が阻害されることが考えられる。そこで、伸長域表皮細胞の元素組成を低真空 SEM と組み合わせられた EDXMA*⁵ による X 線元素分析法により、非破壊的に分析した。溶液中に Al よりも 100 倍高濃度の Ca^{2+} が加えられても 4 時間の Al 処理では、Al/Ca の上昇が認められた (Fig. 12)。しかし、高濃度あるいは長時間の Al 処理によっても Ca が完全に排除されることはなく、 Ca^{2+} と競合しない Al 結合サイトの存在が示唆された。

総合論議

Al イオンそのもののストレスによる根の伸長阻害は、伸長域表皮細胞の伸長阻害によってひきおこされ、細胞の生存能力には大きなダメージを与えないことや Ca^{2+} による軽減がみとめられないという点で低 pH ストレスと阻害様式が異なることがわかった。このことは、実際の酸性土壌でもその pH や可溶性 Al イオンの濃度などの特性の違いによって植物の受けるストレスが大きく異なる可能性を示唆している。

Al ストレス下、伸長域では表皮細胞の伸長が内層の細胞に比べて強く阻害されることから、Al による伸長阻害は Al イオンが細胞に直接接触することによってひきおこされると考えられる。

Al ストレス下で伸長が全く停止している細胞でも呼吸の原動力となる $\Delta\Psi_m$ は保たれており、また根毛の伸長も阻害されることから、Al は細胞壁など伸長に直接関わる部位に阻害作用を及ぼすことが示唆された。このような Al イオンの細胞壁伸長への影響を調べることを通じて細胞壁の伸長メカニズムのさらなる解明が期待できる。また Al ストレス下でも細胞の

呼吸活性が保たれることは、Al イオンと結合して解毒する働きを持つ有機酸を合成・分泌するポテンシャルを有することを意味し、この能力を引き出す方向での品種改良が可能であることが示唆された。

結論

本研究では酸性土壌における根の伸長阻害要因である Al イオンそのもののストレスを付加するための実験系を確立し、伸長域表皮細胞に引き起こされる現象を非破壊的分析手法により解析し、以下の結論を得た。

1. モノマー Al イオンそのもののストレスをアルファルファ根に付加することができる水耕栽培モデル実験系を確立した。
2. Al イオンそのもののストレスによる根の伸長阻害は短時間で伸長域の表皮細胞に発生し、内層の細胞の伸長能力は維持されていた。
3. Al ストレスにより伸長域の表皮細胞は生存能力・呼吸能力を保ったまま伸長が阻害され、低 pH ストレスとの本質的な違いが明らかとなった。
4. Al イオンによる細胞伸長の阻害は溶液中での Ca^{2+} との競合のみによるものではなかった。

参考文献

Kinraide TB, Parker DR (1990), *Plant Physiol* 79: 283-288.

Marschner H, Richter C (1974), *Plant Soil* 134: 1-20.

Parker DR, Kinraide TB, Zelazny LW (1989), *Soil Sci Soc Am J* 53: 789-796.

von Uexküll HR, Mutert E (1995), R. A. Date et al. (eds.), *Plant Soil Interactions at Low pH*, 5-19

*1 scanning electron microscope

*2 fluorescein diacetate

*3 4',6'-diamidino-2-phenylindole

*4 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide

*5 energy dispersive X-ray microanalyzer

图表

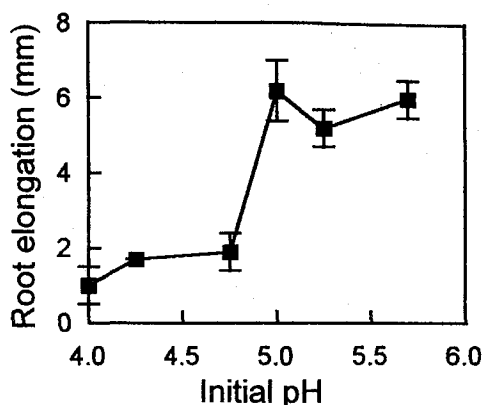


Figure 1. Root elongation of alfalfa as a function of initial pH of culture solution. Alfalfa seedlings were grown for 20 h in a culture solution at various pH values. The elongation was defined as an increment in root length within 20 h. Bars = S.D. (n = 5).

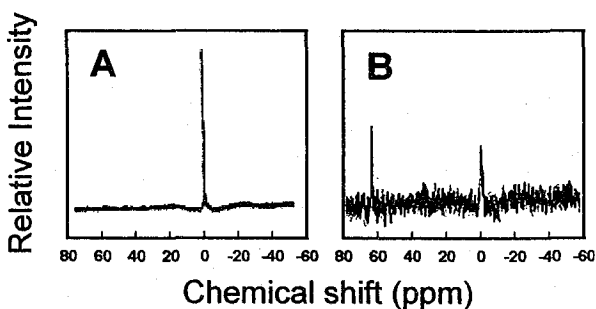


Figure 2. Speciation of Al in the partially neutralized AlCl_3 solution by ^{27}Al -NMR. The 100 mM AlCl_3 solution (panel A) was partially neutralized by the stepwise addition of 1 mol l^{-1} NaOH solution up to the pH value of 4.5 (panel B).

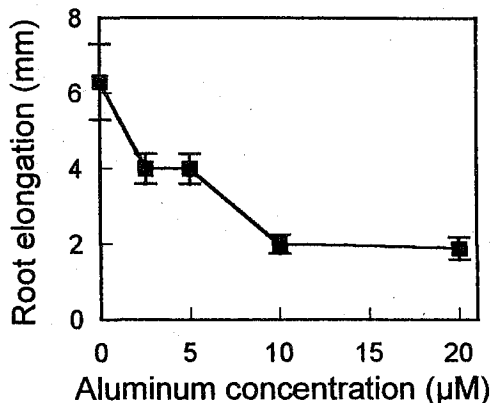


Figure 4. Root elongation of alfalfa as a function of aluminum concentration. The elongation was defined as an increment in root length within 20 h. Bars = S.D. (n = 5).

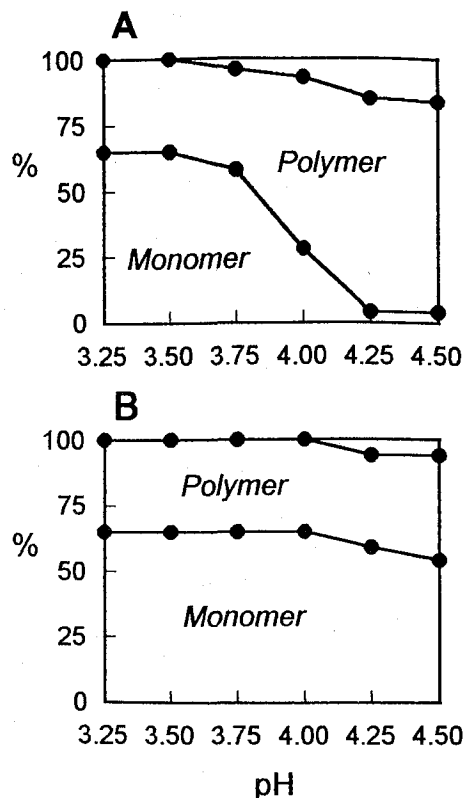


Figure 3. Changes in the composition of Al species by partial neutralization of AlCl_3 solutions estimated by ferron method. The solutions of 100 and 10 mM AlCl_3 were partially neutralized by the stepwise addition of 1 (panel A) and 0.1 mol l^{-1} (panel B) NaOH solutions, respectively.

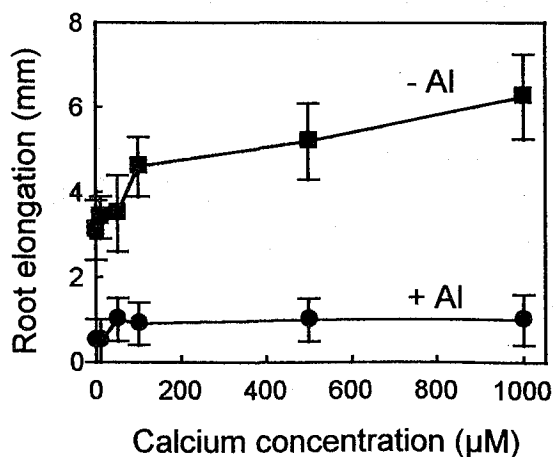


Figure 6. Effect of calcium concentration on the root elongation of alfalfa. Alfalfa seedlings were grown without (\blacksquare) or with 20 μM AlCl_3 (\bullet) at the indicated concentrations of CaCl_2 . Root elongation was defined as the increment of root length within 12 h from time zero. Bars = S.D. (n=6).

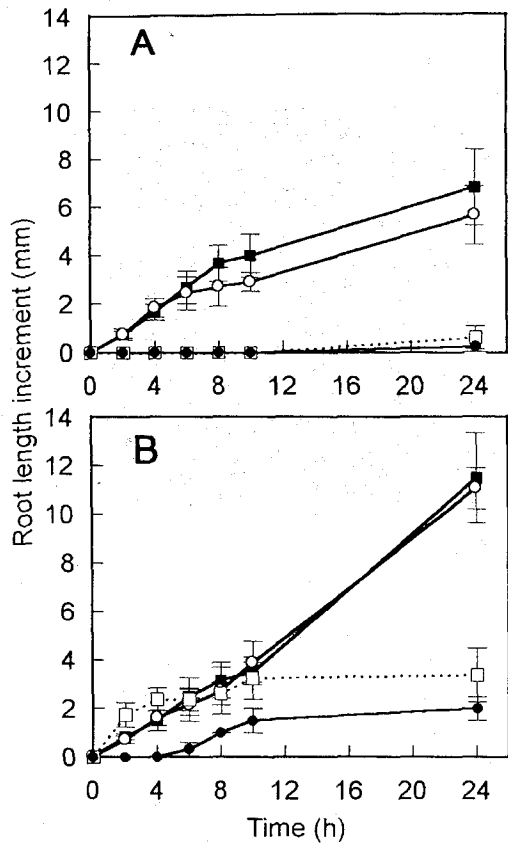


Figure 6. Time course of root elongation of alfalfa under low pH or aluminum stress in the absence (panel A) or presence (Panel B) of 1 mM CaCl_2 . Roots were exposed to the solutions without Al at pH 5.5 (■), pH 4.8 (○), pH 4.2 (□), or with 20 μM Al at pH 4.8 (●), respectively. Roots were digitally photographed at indicated times for measuring their root length using a graphical software on a computer. Root length increment means elongation from time-zero. Data are mean \pm S.D. (n = 5).

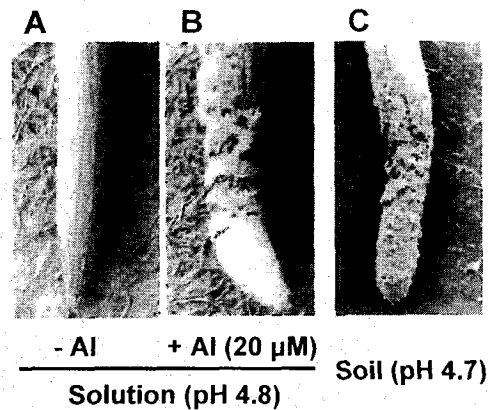


Figure 7. Natural scanning electron micrograph of alfalfa roots grown in Al-stressed solution or acid volcanic soil. Seedlings were transplanted onto the solution without (panel A) or with 20 μM Al (panel B) or onto acid soil (panel C). Plants were grown for 24 h, followed by natural SEM. Bar = 1 mm.

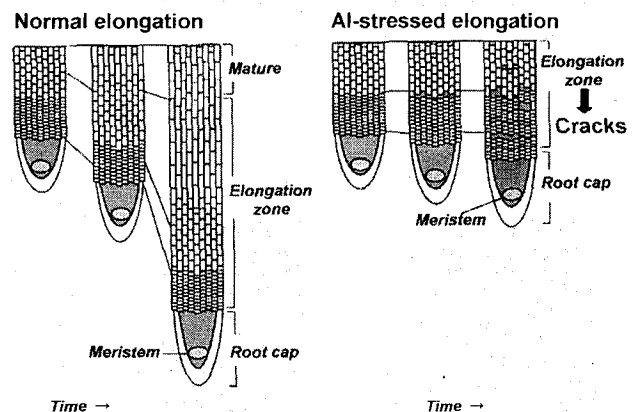


Figure 8. A working model for the inhibition of root elongation of alfalfa by Al.

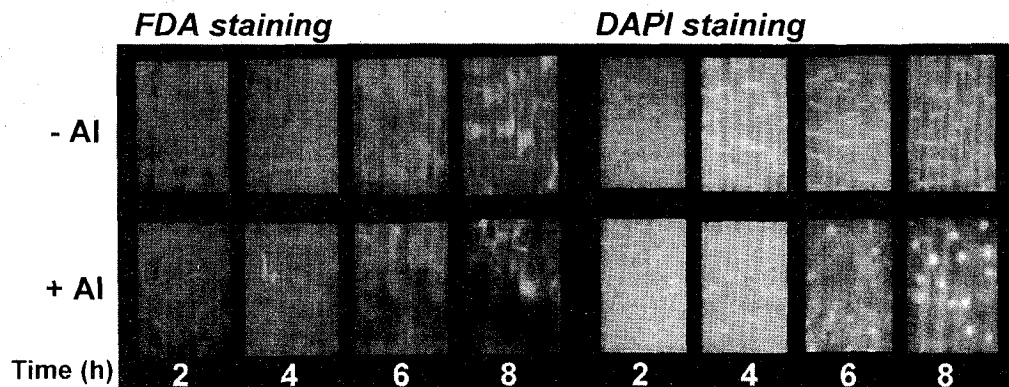


Figure 9. Cellular viability and permeability of plasma membrane under Al stress. Alfalfa roots were exposed to 20 μM Al for 2, 4, 6 or 8 h, followed by FDA or DAPI staining. In FDA staining, viable cells fluoresce green. In DAPI staining, bright particles (nuclei) indicate non-selective diffusion of DAPI molecules through plasma membrane without barrier functions. Bar = 100 μm .

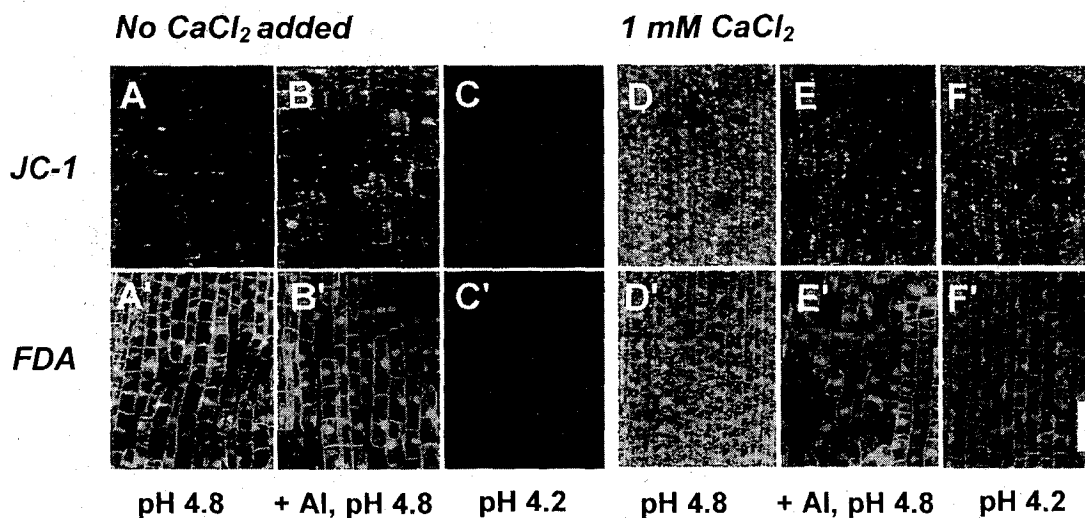


Figure 10. Confocal laser scanning microscopy of JC-1 and FDA staining of elongation zone of alfalfa root-tips after 8 h exposure to Al or low pH stress with or without added CaCl_2 . Seedlings pre-stained with JC-1 were grown for 8 h in the solution without Al at pH 4.8 (A, A', D, D') or pH 4.2 (C, C', F, F'), with Al at pH 4.8 (B, B', E, E'), in the absence (A-C, A'-C') or presence (D-F, D'-F') of 1 mM CaCl_2 . Bar = 100 μm .

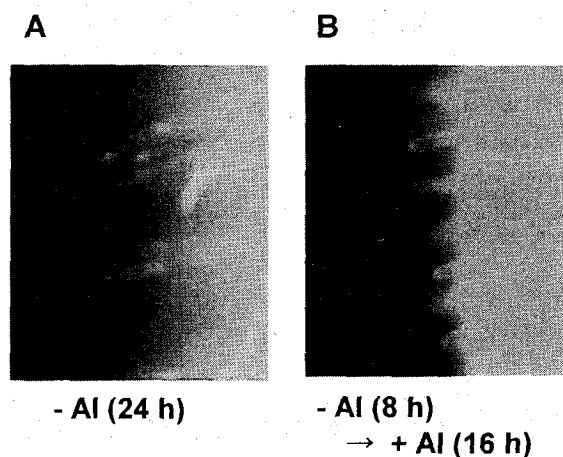


Figure 11. Effect of Al on the elongation and viability of root hair of alfalfa. The seedling were grown without Al for 24 h (panel A); without Al for the first 8 h period, with 20 μM Al for the successive 16 h (panel B), respectively. Roots were stained with FDA, followed by conventional fluorescence microscopy. Bar = 100 μm .

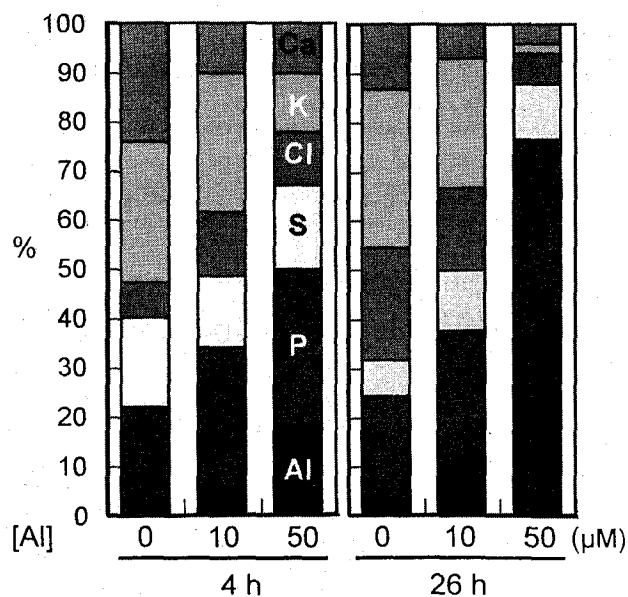


Figure 12. Elemental composition of elongation zone of alfalfa root grown under Al stress. Seedlings were grown without or with 10 or 50 μM AlCl_3 for 4 or 26 h. Elemental analysis was carried out by EDXMA under low-vacuum condition (20 Pa).

論文審査結果要旨

酸性土壌は全世界に広く分布するが、多くは作物生産性の低い不良土壌として利用が進んでいない。酸性土壌における作物生育阻害の主要な要因は、酸性条件下で可溶化して存在するアルミニウムイオンの毒性による茎根の著しい伸長阻害であるとされているが、そのメカニズムはいまだ明らかにされていない。本研究は、植物の初期成育時のアルミニウムイオンによる根の短時間での伸長阻害機構を解明することを目的とし、そのために酸性土壌でのアルミニウムストレスの状況を反映することのできる水耕栽培実験系を確立し、非破壊的分析手法を応用して根の伸長域における細胞伸長阻害機構について解析を行ったものである。

植物材料としては重要な飼料作物であるが酸性土壌における生育が悪いアルファルファを用いた。従来の水耕栽培実験系では、アルミニウムイオン種のうち最も毒性の高いとされる Al^{3+} の割合を高めるために、水耕栽培におけるモデル実験系では pH 4 ~ 4.5 というきわめて低い pH が用いられてきたが、低 pH すなわちプロトン過剰によっても根の伸長は阻害され、アルミニウムイオンそのものの毒性を評価するには不適切と考えられた。そこで、本研究では、pH 5 付近の比較的高い pH におけるアルミニウムイオンそのものの毒性を付加・評価するための実験系の確立を試みた。特に比較的高い pH のアルミニウムイオン水溶液を調製する際に人為的に生成しやすい“ Al^{3+} ”ポリマーイオン種の生成条件を詳細に検討し、“ Al^{3+} ”の生成を回避し、モノマーアルミニウムイオンそのもののストレスを定量的に付加・評価することができる、再現性の高い実験系の確立に成功した。

この実験系におけるアルファルファ根の伸長阻害は、東北大学付属農場（鳴子町川渡）より採取した pH (H₂O) = 4.7 の土壌における状況ときわめて類似しており、確立された水耕栽培モデル実験系は土壌におけるアルミニウムイオンストレスをよく反映するものであることが証明された。これらの土耕・水耕栽培系において伸長を阻害された根には、伸長域の表面に特徴的な亀裂の発生が認められた。この現象より、表皮細胞が内層の細胞に先立ってアルミニウムイオンの毒性により伸長を阻害されるために、内層細胞の伸長する力に耐えられない表皮細胞が破壊されて生じるというモデルを提唱した。

つぎに、伸長域表皮細胞におけるアルミニウムイオンストレスによる伸長阻害の経過を詳細に観察した。細胞をあるがままの状態、すなわち非破壊で観察・分析することができる手法を応用した。アルミニウムイオンストレスにより、表皮細胞の伸長は 2 時間以内にすみやかに停止したが、この伸長停止は原形質膜の選択透過性やミトコンドリア膜ポテンシャルで評価される呼吸活性など細胞の生存の根幹にかかわる機能の喪失によるものではないことを、蛍光プローブを用いた顕微鏡観察により可視化し証明することに初めて成功した。

以上のように、本研究は、アルミニウムイオンによる根の伸長阻害が、細胞壁など細胞伸長そのものにかかわる機構に阻害作用を及ぼすことにより引き起こされることを示し、今後の研究に大きな影響を与えるものである。

よって、審査員一同は、本論文は博士（農学）の学位を授与するに値するものと判断した。