

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 17 年度 博士課程 進学

氏 名 西山 宏樹

指導教員 中西 友子

論文題目

イネのアルミニウム耐性機構の解析

1 背景・目的

世界人口の急増、途上国の経済成長による一人あたりの食料需要の増加、バイオ燃料の需要増などによる穀物需要の急増に加え、気候変動の増大化などの穀物生産阻害要因などもあり、世界では穀物収量の安定確保が喫急の課題である。一方、世界の耕作可能な平地の 4 割を占める酸性土壌には、作物生産に不適のため使用されていない土地も多い(Baligar et al. 1998)。そのため、酸性土壌でも生育可能な作物を創出することができれば、世界の穀物供給を大幅に改善することが可能になると考えられる。

酸性条件下の土壌では、土壌からアルミニウムイオンが溶出し、根に傷害を与える。これまでのアルミニウム耐性植物の研究から、アルミニウムに耐性の強い植物は、根から有機酸を放出し、アルミニウムイオンとキレート化合物を作り、無毒化することによりアルミニウム耐性を得ていることが明らかになっている(Matsumoto 2000, Kochian et al., 2004)。しかしイネは、これらの植物と異なり、アルミニウム存在下で有機酸放出が認められないにもかかわらず一般に知られている有機酸放出に依存する耐性植物よりも強い耐性を示す(Ma et al. 2002)。このイネのアルミニウム耐性機構については、未だ不明な点が多い(Yang et al. 2008, Hueng et al. 2009)。イネのアルミニウム耐性を明らかにできれば、イネが重要な穀物であることから、新しい作物の育種や改良にその知見を適用できることになる。本研究では、イネのアルミニウム感受性種(IR72)と耐性種(日本晴)、さらに小麦(Scout)を用いて、イネの Al 耐性機構について解析を行った。概要は以下の通りである。

- ① 根のアルミニウム生育障害とアルミニウム蓄積に関する解析
- ② 根表面アポプラスト部位の pH 測定手法の開発ならびにイネ根のアポプラスト pH 測定

③ 根細胞壁のペクチンの化学組成とアルミニウム蓄積の関係の解析

以上の実験により、イネの根組織や元素蓄積とアルミニウム耐性について考察した。

2 研究内容

① 根のアルミニウム生育障害とアルミニウム蓄積に関する解析

日本晴と IR72 をアルミニウム濃度 200 μ M、pH4.5 に調整した水耕液中で処理し、根の伸長阻害について調べた。日本晴は IR72 よりも根の伸長阻害度が小さく、IR72 よりもアルミニウム耐性が高かった。またこの結果は、A1 濃度、A1 処理時間を変えても同じであった。

次に、イネの根にアルミニウム処理を行い、アルミニウムの蓄積量の変化を測定した。また、アルミニウムと競合すると考えられるカルシウム、マグネシウムの元素量の変化を、アルミニウム 200 μ M 処理後 30 分から 24 時間後まで ICP-AES、Furness 原子吸光分析を用いて測定した。全体的に、日本晴よりも IR72 で A1 蓄積量が多かった。また、A1 蓄積量が、A1 処理後から経時的に増加していくのに対し、Mg、Ca の量は減少したことから、A1 処理前に根に蓄積していた Mg、Ca がアルミニウムと交換し拡散した可能性がある。また、日本晴は根端での A1 濃度比は変わらなかったが、IR72 では根端 5mm での A1 量が 4cm 部位の中では濃いという結果が得られた。以上から、A1 耐性種の日本晴は、感受性種の IR72 と比較して根に A1 が蓄積しにくい傾向が見られた。

さらに、A1 が根のどの部分にどの程度蓄積するのかを確認するため、アルミニウムを選択的に染色できるヘマトキシリンを用い、根のアルミニウムの存在部位を可視化し、経時的なアルミニウム存在部位の変化を調べた。その結果、アルミニウム処理直後では根端から 0.5cm までの細胞伸長部位にアルミニウムが多く見られ、根が成長するとアルミニウム染色部位も根の後方へ移動していく様子が見られた。日本晴は IR72 よりも染色が薄く、特に根端のアルミニウム蓄積が少ないことが示唆され、元素分析の結果を裏付けられた。

これらのことから、イネのアルミニウム耐性を考える上で、根、特に根端にアルミニウムが蓄積しにくいことが重要であることが示唆された。

② 根表面アポプラスト部位のpH測定手法の開発ならびにイネ根のアポプラストpH測定

アルミニウムイオンの水溶液中での化学形態については、pH4.5 付近から pH 値 0.1 が下降するごとに、A1³⁺イオンの存在比が 8%程度増加し、この A1³⁺イオンが植物根伸長の主要な阻害要因とされている。従って、イネは根近傍の pH を上昇させ A1³⁺イオンの量を減らすことによりアルミニウム耐性を得ているのではないかと仮説を立てた。しかし、水耕栽培のイネに A1 処理を与えた際の溶液中のマクロな pH 変化は観測されなかったことから、根の極表面のアポプラスト pH の微小変化を測定することとした。そのため、蛍光レシオ計測法を適用し、根表面のアポプラスト部位の pH をリアルタイムで測定することを試みた。

水耕液の pH4.5 付近での pH 指示薬には Oregon Green488 を用い、5 μ M の蛍光試薬溶液で

根表面を 3 分染色し、水耕液で 5 分表面を洗浄することにより、根表面細胞間のアポプラストのみを選択的に染色した。測定の結果、日本晴では A1 処理直後から 2 時間かけて、pH がわずかに上昇するのに対し、IR72 では pH が変化しないことが明らかになった。A1 添加後は、pH が約 0.1 上昇するという結果が得られた。このことは、日本晴は A1 に対し、pH をわずかに上昇させ、 Al^{3+} イオン濃度を減らすことにより A1 耐性を得ている可能性を示唆した。

③ 根細胞壁のペクチンの化学組成とアルミニウム蓄積の関係の解析

第一章で、アルミニウム耐性が高い日本晴の方が IR72、小麦の Scout よりも根へのアルミニウム蓄積量が少ない傾向が示された。また、第二章では、日本晴が A1 に応答して根表面のアポプラスト pH をわずかではあるものの上昇させ、 Al^{3+} イオン濃度を軽減させていることが示された。そこで次に、アルミニウムが主に蓄積するとされている根の細胞壁、特にその化学組成に着目し、各作物種のアルミニウム耐性との相関について解析を行った。

根端の細胞壁成分を抽出し、溶液に 24 時間浸し、細胞壁へのアルミニウム蓄積量を測定したところ、アルミニウム耐性の高い作物種ほど、抽出細胞壁成分へのアルミニウム蓄積量が少なかった。また、メチル化度の異なるガラクトuron酸の試薬をアルミニウム溶液に 24 時間浸し、ガラクトuron酸へのアルミニウム蓄積量を測定したところ、メチル化度の高いガラクトuron酸ほどアルミニウムを蓄積しにくい、という結果が得られた。この結果は、カルボキシル基がメチル化されているガラクトuron酸ほど、イオンが蓄積できる状態のフリーのカルボキシル基が少ないために A1 が蓄積しにくいことを示唆した。

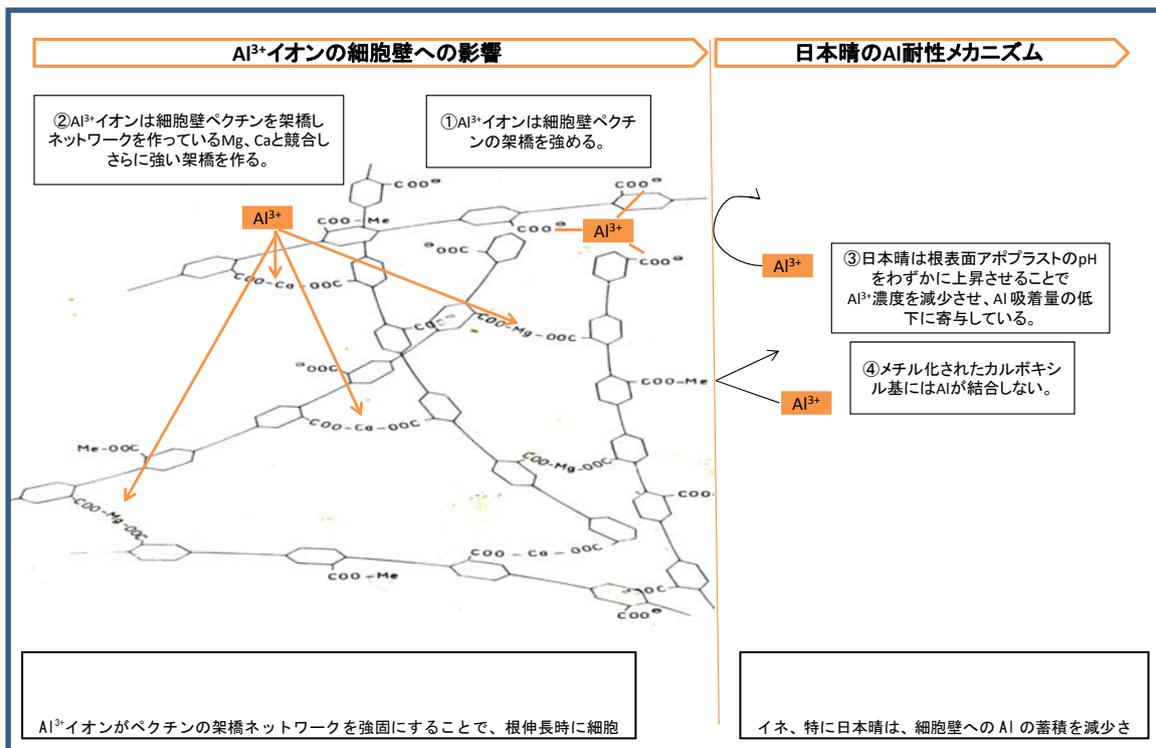
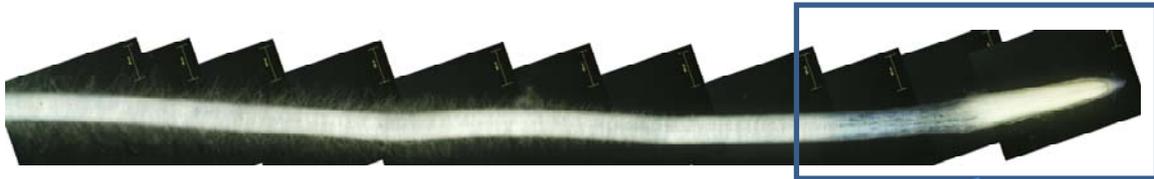
そこで、植物細胞壁中のフリーのガラクトuron酸量を測定すれば、A1 耐性との相関を見いだせると考えた。根端細胞壁から、ガラクトuron酸を含む多糖類であるペクチンを抽出し、(1)単糖に分解し、誘導体化後 GC/MS で糖組成比からガラクトuron酸量を算出するとともに、(2)細胞壁をけん化しメチル化されているカルボニル基を加水分解し、遊離したメタノールを GC で測定した。(1)、(2)から、カルボキシル基がメチル化されていないフリーのカルボキシル基を持つガラクトuron酸量を算出した。その結果、フリーのカルボキシル基が少ない作物種ほど、アルミニウム蓄積量が少なかった。

以上の実験から、イネの根のアルミニウムの蓄積部位は、主に細胞壁中のペクチンを構成するガラクトuron酸の持つフリーのカルボキシル基であり、これが少ないほどアルミニウムが細胞壁に蓄積しにくいというメカニズムが初めて示された。

3. 結論

以上の実験結果により、(1)A1耐性なイネほど根へのA1蓄積量が少ないこと、(2)A1耐性の高い日本晴は、根表面アポプラストのpHをわずかに上昇させることにより根表面の Al^{3+} 濃度を減少させ、耐性を得ている可能性があること、(3)植物の根のアルミニウムの蓄積部

位は、主に細胞壁中のペクチンを構成するガラクトツロン酸の持つフリーのカルボキシル基であり、これが少ないほどアルミニウムが細胞壁に蓄積しにくいことが示された。



発表論文

• Nishiyama H., Oyha T., Tanoi K., and Nakanishi T.M. A Simple measurement of the pH of root apoplast by the fluorescence ratio method. *Plant Root* 2 : 3-6, 2008