

(研究題目) 植物の酸性土壌ストレスに対する耐性の獲得機構に関する研究
Study on the tolerant mechanism of plant against acid soil stress

(研究者) 代表研究者: 松本英明・岡山大学資源生物科学研究所・教授
Hideaki Matsumoto; Res. Inst. for Bioresources, Okayama
Univ.; Professor
協同研究者: 山本洋子・同上・助教授 Yoko Yamamoto; Assoc. Prof.
江崎文一・同上・助手 Bunichi Ezaki; Res. Assoc.

Summary

Mechanism of Al toxicity and tolerant in plant have been studied. Characteristic difference of plasmalemma was found between Al tolerant and sensitive wheat. Levels of abscisic acid (ABA) increased by Al treatment. $AlCl_3$ and ABA increased two H^+ -pumps in tonoplast of barley roots. Al tolerance was induced by phosphate starvation concomitant with the increased expression of genes.

研究目的

地球上の生物生産に利用される土壌の約30%が酸性土壌と考えられており、作物の生育にとって好ましくない不良土壌の代表的なものと考えられている。土壌環境の酸性化は近年、酸性雨や先進国における無機肥料の過剰施与などにより、地球的規模で徐々に進行していると考えられている。一方、地球上の人口は来世紀の前半まで急激に増え続け、深刻な食糧不足に見舞われると予想されており、今後、飛躍的な食糧増産のためには不良土壌の積極的な利用を進める必要がある。酸性土壌の利用に関しては、植物側の問題として酸性障害の機構を解明し、耐性種を積極的に利用することである。酸性土壌の障害の主たる原因は、通常の土壌pHでは他の元素に固定されている大量のアルミニウム (Al) がpHの低下に伴い可溶化され植物に吸収され、様々な障害をもたらすと考えられている。これまで主として農学を中心とする研究者によりAlの障害機構や耐性機構について研究されてきたが、多くの問題が未解決のまま残されており、障害や耐性の機構を分子レベルで理解するに至っていないのが現状である。研究の飛躍的な進展のためには、農学的な問題意識の上に立って植物生理学、分子生物学、分子遺伝学等の研究の導入が不可欠である。本研究においては、植物個体、細胞及び遺伝子レベルにおけるAlによる障害とその耐性機構について解明することを目的とした。

研究経過および成果

1. 個体レベルでのAlストレスに対する応答反応

a. オオムギ根の応答反応 — 申請代表者は、すでにオオムギ根にAlストレスを加えると、液胞膜のATP及びPPi依存のH⁺ポンプの活性が増加することを報告し、この点について更に検討を加えた。即ちAl処理によりオオムギ根のアブサイシン酸 (ABA) の含量が増加すること、一方ABA処理によってもH⁺ポンプの活性が増加するので、Alシグナル→ABAの増加→液胞膜H⁺ポンプの活性増加というシグナル応答経路の存在が推察された。また、H⁺ポンプ活性の増大にはH⁺-ATPase、PPiase活性の増加をともなっていた。そこで、H⁺-ATPase、PPiaseの抗体を用いることにより、これらH⁺ポンプ活性の増大がH⁺-ATPaseおよびPPiaseの増加によることを明らかにした。

b. Al耐性を異にするコムギ根の応答反応 — Al耐性種コムギ (Atlas) と、感受性種 (Scout) を用い、原形質膜機能について比較した。Alは原形質膜に結合し、そのH⁺ポンプ活性を阻害することをすでに報告した。本研究では、あらかじめK⁺を負荷した根の様々な条件下におけるK⁺の排出について検討した。すなわちK⁺を負荷した根をAlストレスが発現するような低pH溶液に移すと、K⁺の排出が促進され、K⁺の排出はScoutの方が明らかに多かった。この現象は、根の内外の濃度勾配により根内に流入したH⁺による脱分極を解消するためと考えられた。このことはH⁺ポンプの阻害剤であるバナジン酸によってK⁺の排出が増大することから支持された。負荷したK⁺の量はほぼ同じなので、Scoutの方がH⁺の流入量が大きいのか、H⁺の排出量に差があると考えられるが、原形質膜のH⁺ポンプ活性には殆ど差がなかったため、流入量の差であると思われた。

次にK⁺排出に対するAlの影響を見ると、AlはK⁺排出を強く抑制した。その程度はScoutの方が大きかった。Alはバナジン酸によるK⁺放出の促進をも完全に抑制したので、AlはK⁺排出の機構 (K⁺チャンネル?) を直接阻害していると考えられた。一方、様々なレベルでAl障害に対して改善的に働くCa²⁺の影響を調べた結果、Alに比べてその作用は弱い、K⁺の排出を抑制した。この結果からCa²⁺の取り込み能力が、Al耐性に関わっていると考えられたので、原形質膜ベシクルを用いて⁴⁵Caの取り込み活性を測定した。しかし、in vitroの系では差が認められなかった。以上の結果より原形質膜の機能からみた低pHにおけるAl耐性の差は、細胞内へのH⁺の流入量の差、及びその結果、引き起こされる膜の脱分極を補償する機能の違いによると考えられた。

2. 細胞レベルでのAlストレスに対する応答反応

タバコ培養細胞を、EDTA、リン酸を含まない、100 μM AlCl₃を加えた培地 (pH 4.0) で

処理した後、リン酸を含む Murashige & Skoogの改変培地 (pH 5.0) に移し6日間生育させた後、Al処理を行わないコントロール細胞と比較した。Al処理時間が10時間以内では、細胞へのAlの取り込みは認められず、また生育阻害も起こらなかった。処理時間を10時間以上にすると急激にAlの取り込みと生育阻害が起こり、処理時間18時間で両パラメーターは最大に達した。一方、生育定常期の細胞では160 μ MのAlで処理しても、細胞内への取り込みと生育阻害は全く起こらなかった。Alの阻害はいわゆる“一打キネティクス”の特性を示し、生育阻害を起こすのに必要なAlは細胞1ヶ当たり 1×10^{11} 原子と計算された。

一方、Alイオンはリン酸イオンと難溶性のリン酸アルミニウム塩を形成する。従って、Al毒性はリン酸欠乏と類似の症状を示す場合がある。そこで、あらかじめリン酸欠乏の前処理をすることによってAl耐性を付与できるかどうかを検討した。即ちタバコ培養細胞を2日間、リン酸欠乏培地で前培養すると細胞内リン酸含量は、リン酸を与えたコントロール細胞の60%程度に低下したが、Alストレスに対する生存率は3~7倍増加した。Al耐性を獲得した細胞は、吸収したAlを細胞外へ排出する能力が高まっている。また細胞外へ分泌するタンパク質について調べた。コントロール細胞及びリン酸欠乏細胞に0~100 μ MのAlで18時間処理を行い、16~18時間目に 35 Sメチオニンで標識した。この間に分泌されたタンパク質をSDS-PAGEで分離し、オートラジオグラフィーにより発現パターンを解析した。その結果、少なくとも102K、59K、57K、43K、41Kのペプチドがリン酸欠乏及びAl処理により強くラベルされていた。

3. Al耐性の誘導と遺伝子

Al耐性遺伝子を得ることを最終的な目標として以下の実験を行った。リン酸欠乏処理とAl処理を行ったタバコ培養細胞からmRNAを調製してcDNAライブラリーを構築した。コントロール細胞より得たcDNAとの間でディファレンシャルスクリーニングを行い、4種のcDNAクローン (pAL 111、139、141 および142) を得た。ノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果から、これらのクローンはリン酸欠乏処理で発現が増加していることが分かった。さらにpAL 111とpAL 142はリン酸欠乏処理を行わないで、直接Al処理 (10時間) で強く発現が増加した。これら4種のクローンのcDNAの全塩基配列を決定した。その結果、pAL 111はタバコ細胞でオーキシンによりその発現が制御されるpar A 遺伝子と完全に一致しpAL 142はタバコのグルタチオンS-トランスフェラーゼをコードしていると考えられるpar B 遺伝子と高い相同性を示した。現在、これらの遺伝子を組み込んだタバコの形質転換細胞を作製し、Alに対する耐性を示すかどうかを検討中である。

発表論文

- Kasai, M., Y. Yamamoto and H. Matsumoto (1994) In vivo treatment of barley roots with vanadate increases vacuolar H⁺-translocating ATPase activity of the tonoplast-enriched membrane vesicles and the level of endogenous ABA, *Plant Cell Physiol.*, 35, 291-295
- Sasaki, M., M. Kasai., Y. Yamamoto and H. Matsumoto (1994) Comparison of the early response to aluminum stress between tolerant and sensitive wheat cultivars: Root growth, aluminum content and efflux of K⁺, *J. Plant Nutr.*, 17, 1275-1288
- Yamamoto, Y., S. Rikiishi., Y-C. Chang., K. Ono., M. Kasai and H. Matsumoto (1994) Quantitative estimation of aluminium toxicity in cultured tobacco cells: correlation between aluminium uptake and growth inhibition, *Plant Cell Physiol.*, 35, 575-583
- Yamashita, K., M. Kasai., Y. Yamamoto and H. Matsumoto (1994) Stimulation of plasma membrane H⁺-transport activity in barley roots by salt stress. Possible role of the increase in chloride permeability, *Soil Sci. Plant Nutr.*, in press
- 松本英明 (1994) 植物におけるアルミニウム耐性の生理生化学、「低pH土壌と作物」日本土壤肥料学会(編)、博友社、印刷中
- Sasaki, M., Y. Yamamoto and H. Matsumoto (1994) Putative Ca²⁺ channels of plasma membrane vesicles are not involved in tolerance mechanism of aluminum in aluminum tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar., *Soil Sci. Plant Nutr.*, in press