

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19880034
 研究課題名（和文） ユーカリのアルミニウム耐性を決定する根分泌物の構造と分泌特性に関する研究
 研究課題名（英文） Structure and secretion characteristics of root exudates conferring resistance of *Eucalyptus* to aluminum
 研究代表者
 田原 恒 (TAHARA KO)
 独立行政法人森林総合研究所・生物工学研究領域・研究員
 研究者番号：70445740

研究成果の概要：フトモモ科の樹木 *Eucalyptus camaldulensis*（ユーカリ）は、酸性土壌で問題となるアルミニウム過剰害に対して強い耐性を持つ。ユーカリのアルミニウム耐性機構を解明するために、根分泌物および根含有物からアルミニウム結合性の物質の分離を試みた。その結果、ユーカリの根に、アルミニウムと結合して可溶性のままの物質と不溶化する物質が含まれていることを明かにした。これらの物質がユーカリのアルミニウム耐性に寄与している可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：樹木生理学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：酸性土壌、アルミニウム耐性機構、フトモモ科樹木、*Eucalyptus camaldulensis*、根分泌物、アルミニウム結合物質、構造解析、ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

永久凍土等を除いた世界の陸地面積のうち 30.7%は、強酸性土壌が占めている。ここでは、土壌鉱物から溶出したアルミニウム (Al) が植物の生育を阻害する主要因となっている。植物の Al 耐性を強化できれば、強酸性土壌において、造林によって炭素蓄積量を増大させる、あるいは作物生産を向上させることが可能になり、地球温暖化や食料不足の緩和に寄与できる。

Al によって引き起こされる最も顕著な障害は根の伸長阻害であり、それは根に Al が

侵入することによって引き起こされる。Al 耐性機構に関する既存研究は、そのほとんどがコムギなど草本作物を対象としてきた。これら草本作物は数 μM ～数 $10 \mu\text{M}$ の Al で根の伸長が阻害される。しかし、実際の強酸性土壌の土壌溶液では数 $100 \mu\text{M}$ ～数 $1000 \mu\text{M}$ の Al が含まれる場合が多々ある。したがって、このような強酸性土壌において生物生産を高めるには、現在酸性に強いとされている作物が保持している以上の Al 耐性を植物に発揮させなければならない。フトモモ科樹木は、酸性土壌の中でも特に酸性度の強い酸性硫

酸塩土壌で生育できることから、高い Al 耐性を持つことが予想された。そこで、ユーカリ属を含む複数のフトモモ科樹種の Al 耐性を評価したところ、*Eucalyptus camaldulensis* (ユーカリ) が 1000 μM という極めて高濃度の Al に耐性を持つことを見いだした。

一般に、作物では根から Al に応答して有機酸を分泌することが Al 耐性の発揮に貢献している。リンゴ酸、シュウ酸、クエン酸などの有機酸は Al と結合することによって、Al が根に集積するのを防ぐことができる。しかし、近年、植物の Al 耐性は、根からの有機酸分泌のみによっては説明できないとの報告が増加している。有機酸分泌以外による Al 耐性機構は、現在までのところ未解明のままである。ユーカリの Al 耐性が有機酸分泌によるものか調べたが、根から分泌される有機酸の量は有機酸分泌型の耐性植物の数 100 分の 1 程度であった。この結果は、ユーカリの Al 耐性機構は有機酸の分泌によっては説明できないことを示している。そこで、ユーカリでは、有機酸以外の Al 結合物質が Al 耐性の獲得に貢献しているのではないかと考えた。Al 結合物質は、根から分泌されれば Al が根に集積するのを防ぎ、体内では侵入した Al を無害化し、植物に Al 耐性を付与できると考えられる。

2. 研究の目的

ユーカリは、強酸性土壌で問題となる Al 過剰害に対して極めて高い耐性を有する。ユーカリの持つ強力な Al 耐性機構を解明し、その機構を応用することによって強酸性土壌で生育可能な高 Al 耐性植物を作出することが可能になる。本研究では、その第一歩としてユーカリの Al 耐性機構を担っている可能性がある Al 結合性の物質を、ユーカリの根分泌物および根含有物の中から探索し、分離することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ユーカリの栽培と試料の採取

ユーカリの種子を滅菌した砂上で発芽させ、人工気象室内(16 時間明期/8 時間暗期、28/25 $^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 75%) で培養液を与えて砂耕栽培した。3~4 ヶ月生の実生を 5 日間水耕栽培した後、0 あるいは 1 mM AlCl_3 を含む 0.35 mM CaCl_2 溶液 (pH 4) に根を浸けた。24 時間後、根からの分泌物を含む処理溶液を回収し、根の先端 5 mm を採取した。

(2) 試料の調整

根分泌物を含む溶液は、陽イオン交換樹脂 (アンバーライト IR120B, H^+ form; オルガノ) を通して Al を除去した。1 N NaOH を加えて pH を 7 に調整した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮した溶液に、1 mM Al になるように AlCl_3 を加え、pH を 4 に

調整した。調整した試料から、Al と結合しても可溶性の Al 結合物質を、後述のゲル濾過クロマトグラフィー (ゲル濾過) によって分離した。

根の先端は、凍結融解後、分画分子量 1 万の限外濾過膜 (マイクロコン 10; ミリポア) の上で遠心して細胞内の溶液を採取した。細胞内溶液に 1 mM になるように AlCl_3 を加えた後、pH を 4 に調整した。細胞内溶液から、Al と結合しても可溶性の Al 結合物質をゲル濾過によって分離し、Al と結合して不溶化する物質を後述の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分離した。

(3) ゲル濾過による可溶性 Al 結合物質の分離法

Al と結合しても可溶性の Al 結合物質の分離をゲル濾過 (Sephadex G-10 あるいは G-25; GE ヘルスケアバイオサイエンス) によって行った。溶出液として 20 mM NaCl を含む 2.5 mM Homopipes (pH 4) を流し、2 ml の試料をゲルに添加し分取した。各画分の Al 濃度を ICP 発光分析装置 (ICP-AES; Optima 4300DV; パーキンエルマー) によって測定し、Al 単独あるいは Al 結合物質-Al 複合体の溶出パターンを調べた。試料を流した後は、毎回 10 mM クエン酸を流し、ゲルに吸着した Al を洗浄した。基準物質として Al のみ、Al+クエン酸、Al+シュウ酸を添加し分取した。試料溶液の pH は、すべて HCl または NaOH で pH 4 に合わせた。210 nm における吸光度を測定し、クエン酸とシュウ酸の溶出パターンを解析した。また、細胞内溶液の分取画分については、HPLC 有機酸分析システム (島津) により、クエン酸の濃度を測定した。

(4) HPLC による不溶化 Al 結合物質の分離法

Al と結合して不溶化する物質の分離を HPLC (LC-VP シリーズ; 島津) によって行った。逆相カラムによって細胞内溶液に含まれる物質を分離し、280 nm の吸光を測定し、クロマトグラムを得た。Al を添加しない細胞内溶液と Al を添加した細胞内溶液のクロマトグラムを比較し、Al の添加によって小さくなったピークを Al 結合物質のピークと判断した。

分離した物質の Al 結合能をピロカテコールバイオレット法によって確認した。ピロカテコールバイオレット法は、他の物質と結合していないフリーの Al を定量する手法である。物質の添加によってフリーの Al が減少すれば、その物質が Al と結合していると判断した。

4. 研究成果

(1) ゲル濾過による Al 結合物質の分離法の確立

ゲル濾過は、物質の分子量の違いによって、物質を分離する手法である。ゲル濾過による

Al 結合物質の分離は、フリーの Al と何らかの物質と結合した Al の分子量が異なることを利用して、Al 結合物質を分離しようというものである。

まず、ゲル濾過の溶出液の検討を行った。Al と物質の結合は、pH によって影響を受けることが予想されるため、溶出液の pH を、処理時に根が浸っている溶液と同じ pH 4 に調整することにした。当初、超純水の pH を希 HCl で 4 に合わせた溶液を溶出液として用いた。しかし、ゲルを通過しているうちに、溶出液の pH が上昇してしまうことが明らかになった。そこで、Al との相互作用が小さいとされている Homopipes を用いた緩衝液を溶出液に加えることで、溶出液の pH を安定させ、この問題を解決した。さらに、試料分子とゲルの間のイオンの相互作用を避けるために、20 mM の NaCl を、溶出液に加えることにした。

この条件の下、Al を単独でゲルに添加したところ、いずれの画分にも Al は検出されなかった。一方、Al 結合物質であるクエン酸やシュウ酸とともに Al をゲルに添加すると、Al のピークがクエン酸やシュウ酸のピークとそれぞれ重なって出現した。これら結果から、Al 単独ではゲルに吸着してしまうが、クエン酸やシュウ酸などの Al 結合物質と結合した形態の Al はゲルを通過すると考えられた。また、Al が吸着したゲルを用いてゲル濾過すると、クエン酸-Al 複合体やシュウ酸-Al 複合体のピーク位置が移動したことから、ゲルへの Al の吸着が溶出パターンに影響することが明らかになった。そのため、試料を添加するごとに、ゲルに吸着した Al を除くために、10 mM クエン酸でゲルを洗浄することにした。このようにして、ゲル濾過を用いた Al 結合物質の分離法を確立した。Al 単独ではゲルに吸着してしまうため、ゲルを通過して検出される Al は、何らかの物質と結合した Al であると考えられる。最終的な分離条件は、研究の方法の項に記したとおりである。

(2) 根分泌物からの Al 結合物質の分離

根の分泌物を Al と混合してゲル濾過 (Sephadex G-10) を行ったところ、排除限界領域に Al のピークが現れた。このことから、ユーカリの根は、何らかの可溶性 Al 結合物質を放出していることが明らかになった。Al 処理下で採取した根分泌物のピークは、対照区のピークより小さかった。この結果から、Al 処理によって、根からの Al 結合物質の分泌が少なくなることが分かった。Al 処理によって分泌量が少なくなることから、Al と結合しても可溶性の物質の根からの分泌は、ユーカリの Al 耐性にとって重要ではないと考えられた。

(3) 根含有物からの Al 結合物質の分離

根の細胞内溶液を Al と混合してゲル濾過

(Sephadex G-25) を行ったところ、Al のピークが現れた。Al 処理をした根から採取した細胞内溶液では、排除限界領域と低分子領域にピークが二つ現れたのに対し、対照区から採取した細胞内溶液では、低分子領域にのみピークが現れた。この結果は、Al によって含有量が増加する可溶性の Al 結合物質がユーカリの根に存在することを示している。他の植物種で Al 応答的に根のクエン酸が増える現象が報告されていることから、ゲル濾過で分離された可溶性の Al 結合物質がクエン酸である可能性が考えられた。そこで、各画分のクエン酸濃度を測定したところ、Al 処理によって現れる排除限界領域の Al ピークと重なってクエン酸のピークが存在することが分かった。このピークの Al 濃度とクエン酸濃度は同程度であり、この排除限界領域に現れた Al 結合物質-Al 複合体は、クエン酸-Al 複合体であると考えられた。また、基準物質としてゲル濾過したクエン酸-Al 複合体のピーク位置も排除限界領域に現れることを確認した。

Al と結合していない状態では水に可溶性であるが、Al と結合すると不溶化する Al 結合物質の存在も見出した。クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸などの有機酸は Al と結合しても可溶性であるため、見出された Al 結合物質はこれらの有機酸ではないと考えられる。HPLC を用いて、この不溶化 Al 結合物質の分離・精製を試みた。細胞内溶液をそのまま HPLC に流した場合と、細胞内溶液に Al を加えて流した場合のクロマトグラムを比較すると、Al の添加によって、小さくなるピークがあった。また、細胞内溶液に Al を添加すると生じる沈殿にキレート剤である EDTA を添加すると、沈殿が溶解した。溶解後の溶液を HPLC で分析すると、Al の添加によって小さくなったピークと同じ位置にピークが現れた。これらの結果から、このピークに含まれる物質が Al と結合して不溶化する Al 結合物質であると考えられた。このピークに含まれる物質に Al 結合能があることをピロカテコールバイオレット法によって確認した。Al 感受性の樹木である *Melaleuca bracteata* と *Populus nigra* からユーカリと同様に細胞内溶液を採取し、HPLC で分析したところ、感受性の 2 樹種では、ユーカリで分離された不溶化 Al 結合物質のピークが見られないか、あっても小さいという結果を得た。このことは、この不溶化 Al 結合物質の含有量が樹種によって異なることを示している。

5. まとめ

ユーカリの根には、Al と結合して可溶性のままの物質と不溶化する物質が含まれていることが明らかになった。これらの Al 結合物質が Al を無害化し、ユーカリの高い Al 耐

性に寄与している可能性がある。可溶性 Al 結合物質の少なくとも一部は、クエン酸であることが明らかになった。植物の Al 耐性を担う Al 結合物質として詳細に報告されているのは、有機酸のリンゴ酸、クエン酸、シュウ酸のみである。ユーカリの根から分離された不溶化 Al 結合物質は、上記の有機酸ではないと考えられる。今後、この不溶化 Al 結合物質の構造を決定し、その Al 耐性における役割の詳細を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Tahara K, Yamanoshita T, Norisada M, Hasegawa I, Kashima H, Sasaki S, Kojima K (2008) Aluminum distribution and reactive oxygen species accumulation in root tips of two *Melaleuca* trees differing in aluminum resistance. *Plant and Soil* 307: 167-178 査読あり
- ② 田原恒 (2008) 熱帯の酸性硫酸塩土壌に適応する樹種の選抜とその生理特性. 海外の森林と林業 74: 31-35 査読なし
- ③ Tahara K, Norisada M, Yamanoshita T, Kojima K (2008) Role of aluminum-binding ligands in aluminum resistance of *Eucalyptus camaldulensis* and *Melaleuca cajuputi*. *Plant and Soil* 302: 175-187 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

- ① 田原恒, 橋田光, 大原誠資, 小島克己, 篠原健司 (2009) ユーカリの根に含まれるアルミニウム無害化物質の解析. 第 120 回日本森林学会大会, 2009 年 3 月 28 日, 京都市・京都大学
- ② 宝満佳文, 加島洋亨, 田原恒, 新町文絵, 野口章, 佐々木恵彦, 長谷川功 (2008) 強酸性耐性植物のアルミニウム応答特性について. 日本土壌肥料学会 2008 年度愛知大会, 2008 年 9 月 9 日, 名古屋市・名古屋市立大学
- ③ 田原恒, 今雪将司, 則定真利子, 小島克己, 長谷川功, 佐々木恵彦 (2008) *Eucalyptus camaldulensis* の根から放出されるアルミニウム結合物質の解析. 第 119 回日本森林学会大会, 2008 年 3 月 28 日, 府中市・東京農工大学
- ④ 田原恒, 小島克己, 篠原健司 (2007) フタバガキ科 4 種の低 pH と過剰アルミニウムに対する応答. 第 118 回日本森林学会大会, 2007 年 4 月 3 日, 福岡市・九州大学

[図書] (計 1 件)

- ① Tahara K, Imayuki M, Norisada M,

Yamanoshita T, Kojima K, Nuyim T, Kang DJ, Vijarnsorn P, Hasegawa I, Sasaki S (2008) Planting performance of tropical trees on acid sulfate soil and their responses to aluminum and low pH stresses. *In: Development of New Bioremediation Systems of Acid Sulfate Soil for Agriculture and Forestry* (Sasaki S (Ed.)) Shokadoh Book Sellers 37-40

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 恒 (TAHARA KO)

独立行政法人森林総合研究所・生物工学研究領域・研究員

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者