

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：35308

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580072

研究課題名（和文） アルミニウム障害を受けている植物根の回復機構の解明

研究課題名（英文） Mechanism of aluminum toxicity recovery in plant root

研究代表者

松本 英明 (MATSUMOTO HIDEAKI)

吉備国際大学・保健福祉研究所・研究員

研究者番号：80026418

研究成果の概要（和文）：Al 連続処理根は回復処理根に比べ根表皮、表層細胞の崩壊が進み、それと連動して酸化ストレスに関連するスーパーオキシドアニオン、過酸化水素、リグニンなどの増加を認めた。一方、脂質過酸化は増加したが両者間で顕著な差異を認めなかった。回復処理過程で中心柱の再伸長を認めた。その要因の一つとして Al 処理過程で主に死細胞からなる帯状の組織が根周辺に生成され、Al 侵入のバリアーとして働き、いわゆるプログラム細胞死様の機能を果たしていることが示唆した。

研究成果の概要（英文）：The continued Al treatment root showed sever rupture formation at root surface and outer cortex region concomitant with higher level of superoxide anion,  $H_2O_2$  and lignin related with the oxidative stress compared to the recovery root. However, lipid peroxidation was induced in both roots without significant difference. Re-elongation of central cylinder was observed during the recovery treatment. The belt-like region consisting of mainly dead cells was formed on the root surface by Al treatment. The belt-like region has a role as barrier inhibiting the entry of toxic Al into the central region. Thus the region seems to have a programmed cell like function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード：植物・ストレス・酸性土壌・アルミニウム・毒性・回復

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 酸性土壌は世界の農耕地の 40～50% を占めると言われ、そこでの作物生産性は低くその有効利用について様々な角度から研究されて来た。酸性土壌における主要な阻害因子は低 pH で溶解する Al イオンであり極めて低濃度で強く根伸長を阻害されるこ

とが知られている。

(2) Al ストレス研究においてこれまで、その毒性や耐性機構について、それぞれ独立的に多くの研究がなされてきた。酸性土壌における作物の生育を改善するため、Al により短時間で障害をうけた根の伸長回復機構についての研究は必要にかかわらず、これまで

極めて限定的で有りしかも殆どの研究において回復過程における根伸長が測定されたものであり、その回復機構についての解析は少なかった。

## 2. 研究の目的

(1) Al 障害と回復過程における根の構造変化に注目しそれに連動する生理、生化学的な新たな解明が必要で有ると考えた。まずエンドウ幼植物根を用い Al 毒性・回復のモデル実験系の構築を目的とした。

(2) これまで Al 障害は酸化ストレスと連動する事が知られているのでモデル系をもちいて Al 毒性・回復過程において酸化ストレスの消長について関連する物質の変動とその代謝活性について調べることを目的とした。

(3) Al 毒性・回復過程における根の構造的変化の解析とその背景に介在する酸化ストレスを基盤とする生理、生化学的な知見を総合的に考慮して Al 毒性・回復過程に関する機構のモデルを提唱する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Al 毒性・回復実験のモデル系の構築：エンドウ幼植物を用い異なった濃度の  $AlCl_3$  (pH 4.5) を用い約 50% 程度の根の伸長抑制が起こる濃度と処理時間を決定した。この Al 前処理根を Al を含まない Ca 溶液 (pH 4.5) に移した (回復処理根)。前処理をさらに同じ濃度の Al で処理を継続した根 (継続処理根) の伸長に比べ明らかに根伸長の回復が認められる処理時間を決定し、モデル系とした。また回復が根のどの部位で起こるかを測定した。

(2) モデル系における根端の構造変化の観察：幼植物根の先端から 5 mm 間隔であらかじめ木樁で標識し、標識を追跡する事により、根のどの部位が回復過程で再伸長に関与しているかを解析した。また細胞死を認識する色素であるエバンスブルー (EB) を用いて処理根を染色することによりモデル系における根端組織の崩壊をとまなう変動について観察した。

(3) モデル系における酸化ストレスの関与：活性酸素類 (reactive oxygen species: ROS) の代表的なものであるスーパーオキシドアニオンはジヒドロエチジウムで染色した根端を蛍光顕微鏡で観察した。またスーパーオキシドアニオンの根からの分泌量はスーパーオキシドアニオンにより還元生成されるフォルマザンを比色定量した。過酸化水素は TMB を用いて顕微鏡観察した。リグニンフルオログルシノールを用いて染色したものを顕微鏡観察した。組織から抽出したリグニンも化学的に比色定量した。脂質過酸化は生成されるマロンチアルデヒドを比色定

量した。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性は粗酵素液を用いて測定した。

## 4. 研究成果

(1) モデル系における根伸長解析：40  $\mu M$   $AlCl_3$  (pH 4.5) でエンドウ幼植物を 12 時間処理 (前処理) した根の伸長をコントロール根 (Al 処理をおこなわない) の伸長との比較値 (relative root growth: RRG) は 45% であった。12 時間前処理した植物を 2 分し、一方は 40  $\mu M$  Al 処理をさらに 12 時間継続した (継続処理根)、他方は良く洗浄したのち、Al を含まない Ca 溶液に移し 12 時間処理した (回復処理根)。継続処理根の RRG は 35% に低下したのに比べ回復処理根の RRG は 75% に増加した (図 1)。

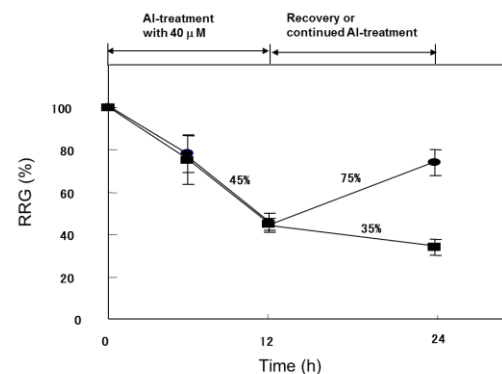


図1 Al毒性・回復実験のモデル系

この結果から回復処理過程において Al 障害から回復する何らかの代謝系が進行しているものと思われた。本研究では回復処理過程において酸素ストレスが関与している様々な項目について検討を加えた。回復過程における根再伸長が根のどの部位で起こるのか、すなわち一端、伸長抑制を受けた部位から起こるのかそれともコントロール根とおなじ先端部位から起こっているのかどうか調べた結果、回復根においてもコントロール根と同じ根端部で起こっていることが示された (発表論文: Plant Soil 2010)。

(2) モデル系における根構造の変化： Al 継続処理根と回復処理根において細胞死が引き起こされている可能性についてエバンスブルー (EB) を用いて染色観察した。両処理根とも伸長領域で強く染色される帯状の部位 (ZR: zonal region) が認められた。その帯状のもの EB による染色の程度は継続処理根と回復処理根で大差は認められなかった。一方、ZR 間の部位は Al で損傷を受け連続処理根では表皮から中心柱近傍まで亀裂、崩壊しているのが観察された (RR: rupture region)。興味深いことに回復根の RR に相当する部位は継続処理根に比べ幅が広がっており、この部位が回復過程に置い

て再伸長して可能性を示唆した (図 2)。(発表論文:Plant Sig Behav 2011)

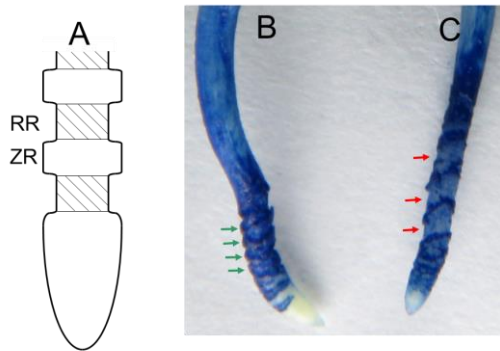


図2 AI 継続処理根 (B)と回復処理根 (C)のEB染色による構造変化

(3) モデル系における酸化ストレスの関与：活性酸素類 (ROS) の代表的なものであるスーパーオキシドアニオンの変動を蛍光色素で染色し顕微鏡観察した結果、コントロール根では殆ど観察されなかったが、連続処理根及び回復処理根ともに明瞭な成生が認められた。染色の割合は連続処理根で最大であった。また AI により根表層で崩壊が進行している部位に特異的に染色が観察された (図 3)。

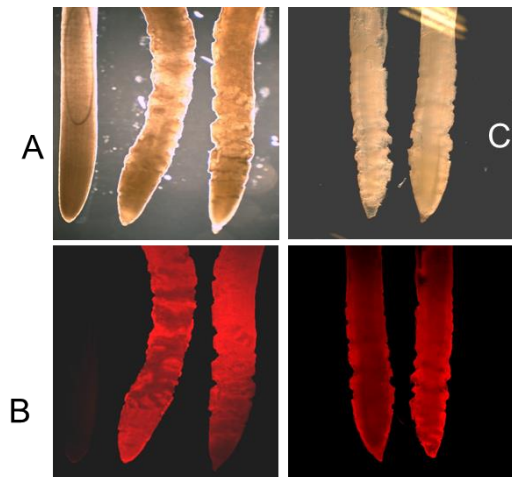


図3 AI継続処理根と回復処理根におけるスーパーオキシドアニオンの挙動

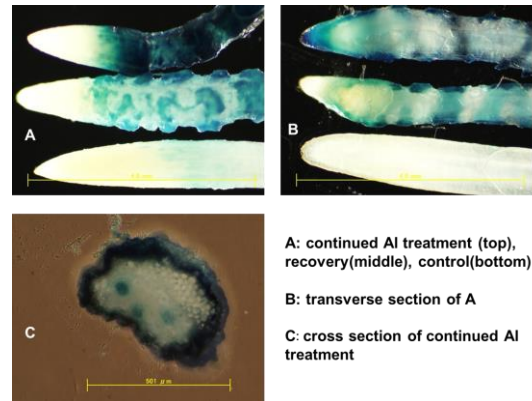
A,C: light microscope

B,D : fluorescent microscope

C: transverse section of continued AI treatment

D: fluorescent image of superoxide anion was observed at the region where rupture formation progressed intensively

さらに ROS の主要なものの一つである  $H_2O_2$  もスーパーオキシドアニオンと同様な挙動を示した (図 4)。



A: continued AI treatment (top), recovery(middle), control(bottom)

B: transverse section of A

C: cross section of continued AI treatment

一方、根から分泌されるスーパーオキシドアニオンを NADPH の存在下で還元生成されるフォルマザン量を基準に比色定量した結果、連続処理根では約 30 分以上にわたりほぼ連続的に分泌が認められたが、NADPH 非存在下で測定すると分泌量は約 3 分の 1 以下に低下し、しかも分泌は約 15 分後に平衡に達した。スーパーオキシドアニオンの分泌量は連続処理根で最大の値を示し、コントロール根では最小で連続処理根の 30% 程度であった。回復処理根は両者の中間の値を示した。NADPH の存在下で分泌量が増加したのでスーパーオキシドアニオンの生成が原形質膜依存 NADPH オキシダーゼによる可能性について調べたが、顕著な活性変動は認めなかった。SOD 活性は連続処理根で最大活性を示し回復処理根では低かった。 $H_2O_2$  を測定した結果、連続処理根で顕著に増加したが回復根では減少した。大部分は細胞壁に存在した (発表論文:Plant Science 2012)。これらの結果は AI により連続処理根では ROS が増加し酸化ストレスの誘導を認めたが回復処理根では減少していることを示唆した。AI ストレスによる細胞の崩壊はリグニンによる細胞壁伸展の抑制であると考えリグニン量を測定した。リグニンは連続処理根で最も多く誘導され、回復処理根では少なかった。またリグニン生成部位は組織の崩壊が見られる部位の細胞壁で起こった (発表論文:Plant Soil 2013)。これまでの研究により AI ストレス下で膜脂質過酸化が起こることが知られている。モデル系で調べた結果、両処理根で増加したが、両者で大差は認められなかった。本課題で得た結果を総合的に考察すると (2) に記載したごとく AI による根組織の崩壊は誘導される酸化ストレスに起因する (表 1)。

表1 Al 継続処理根・回復処理根における根端の構造変化をともなった根の伸長制御と酸化ストレスとの相関

The network of oxidative stress is associated with the process of Al toxicity recovery. Lignin content associated with changes in reactive oxygen species (ROS) may induce the stiffening of cell wall causing the formation of rupture. However, lipid peroxidation might not be associated with the recovery process.

Changes in event	Continued Al treatment	Recovery treatment
Superoxide anion production	↗ a)	↘ b)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> production	↗ 1)	↘ 1)
SOD activity	↗	↘
PAL activity	↗	↘
Lignin content	↗	↘
Stiffening of cell wall	↗ 2)	ND
Lipid peroxidation	↗	↘ c)
Rupture formation	↗ 3)	↘
Elongation of central cylinder	NO	↗

回復機構は Al 前処理過程において形成される死細胞からなる ZR がバリアーになり毒性 Al の侵入を抑制した結果、中心柱近傍の細胞は伸長機能を保持しており回復処理により伸長を開始したと考えられた。これは ZR がプログラム細胞死様の働きをしているという新規の仮説を提唱し（発表論文 Plant Science 2012）ネットで公開されている BioMedLib : “Who is publishing in my domain” にアクセスされた関連研究 20 論文の内 2012 年度の最上位に位置づけられた。

#### 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 4 件）

- ① Motoda H, Kano Y, Hiragami K, Kawamura F, Matsumoto H, Morphological changes in the apex of pea roots during and after recovery from aluminum treatment. Plant Soil, 査読有, Vol. 33, 2010, pp. 49-58  
DOI 10.1007/s11104-010-0318-1
- ② Motoda H, Kano Y, Hiragami K, Kawamura F, Matsumoto H, Changes in rupture formation and zonation stained with Evans blue during the recovery process from aluminum toxicity in the pea root apex. Plant Sig Behav, 査読有, Vol. 6, 2011, pp.98-100  
DOI 10.416/psb-141448
- ③ Matsumoto H, Motoda H, Review Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress  
Plant Science 査読有、Vol.185-186, 2012, 1-8  
doi:10.1016/j.plantsci.2011.07.019
- ④ Matsumoto H, Motoda H, Oxidative

stress is associated with aluminum toxicity recovery in apex of pea root  
Plant Soil 査読有、Vol.363,2013,  
pp.339-410  
DOI 10.1007/s11104-012-1396-z

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 元田弘敏、松本英明、アルミニウム障害を受けている植物根の回復機構の解明：II 根端形態観察と酸化的ストレス  
日本土壌肥料学会 2010 度 北海道大会  
2010 年 9 月 7 日 北海道大学
- ② 元田弘敏、松本英明、アルミニウム障害を受けている植物根の回復機構：III  
日本土壌肥料学会 2011 度 つくば大会  
2011 年 8 月 9 日 つくば国際会議場
- ③ 松本英明、元田弘敏、Al 障害を受けているエンドウ根の回復機構  
日本土壌肥料学会 2012 度鳥取大会  
2012 年 9 月 4 日 鳥取大学
- ④ Matsumoto H, Motoda H, Association of oxidative stress with aluminum toxicity recovery in pea root apex. International Symposium on 6th Bio-energy 2012.11.23 Chonnam National University, Gwangju Korea

〔図書〕（計 1 件）

- ① Matsumoto H, Yamamoto Y CRC Press  
Plant Roots: The Hidden Half, 4th Edition (eds. A.Eshel, T.Beeckman)  
2013、24

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
松本 英明 (MATSUMOTO HIDEAKI)  
吉備国際大・保健福祉研究所・研究員  
研究者番号：80026418
- (2) 研究分担者  
元田 弘敏 (MOTODA HIROTOSHI)  
吉備国際大学・保健福祉研究所・講師  
研究者番号：30278999