

1. 研究大課題名 : 植物のアルミニウムストレス耐性機構

研究中課題名 : I. 超微量アルミニウム測定法の開発

2. 研究機関 : 農林水産省九州農業試験場育種工学研究室

E-mail address: cyto1952@knaes.affrc.go.jp

3. 研究者 : 斎藤 彰

4. 研究協力者 : 宮崎 力 ( 科学技術振興事業団派遣研究員 )

正岡 淑邦 ( 農林水産省九州農業試験場生産環境部 )

小林 紘一 ( 東京大学原子力総合研究センター )

5. 研究期間 : 平成7年度~平成11年度

6. 要約

酸性土壌に伴い土壌アルミニウムが可溶化(イオン化)し、その過剰害が深刻な農業問題となっている。しかし、実際のアルミニウムストレスや毒性の作用機構については、環境中に多量に存在するアルミニウムが精密な分析を妨げるため詳細な細胞学的、生化学的研究が発展していない。本研究では植物の葉細胞内のアルミニウムを細胞レベルで分析するために、自然界には存在しない<sup>2,6</sup>アルミニウムをトレーサーとして用いて加速器質量分析法(AMS)による $10^8$ 原子レベルの超微量分析法を開発した。さらにその超微量分析により、アルミニウムストレス条件下においた好アルミニウム植物(ルジグラス)、アルミニウム耐性、感受性大麦品種の葉、葉細胞オルガネラ内のアルミニウム量を測定した。その結果アルミニウムは葉全体、また葉緑体を除いた核、ミトコンドリアでは感受性品種に比べ好アルミニウム、耐性品種に多く取り込まれていた。以上から、葉(細胞)においてアルミニウムストレス耐性機構の一つとしてアルミニウムを高度に解毒化する機構が推定できた。

7. 研究目的

アルミニウムは、地殻の元素としては第一位の酸素(46.4%)、第二位のケイ素(28.2%)に次いで、第三位の8.2%を占めており、地殻(土壌)の主な構成成分である<sup>1)</sup>。一方世界の農業に利用可能な耕地面積の31%(34億ha)は作物の生育を著しく阻害する酸性土壌である。また、酸性土壌の内でもその74%(25億ha)が現在の農耕地である<sup>2)</sup>。酸性土壌に伴い土壌アルミニウムが可溶化(イオン化)し、その過剰害が深刻な農業問題となっている<sup>3)</sup>。これまで土壌中のアルミニウム過剰ストレスに伴う植物の生理的变化を解析した報告は数多くでている。酸性土壌においては、毒性のあるアルミニウムイオン( $Al^{3+}$ )が溶出し、根の伸張反応に著しい障害を与えていること明らかとなっている<sup>4)</sup>。しかしながら、アルミニウムイオンが生体内のどのような反応を阻害することで根の伸張阻害が起きるのか、どのような組織や細胞内器官に集積されるのかなどいまだ明らかになっていないことが多い。一方アルミニウムは地上部(葉)の生長も阻害するが、その研究はほとんど進んでいない。従来のアルミニウム分析には呈色反応(キノール法)<sup>5)</sup>、原子吸光法(フレイム、フレイムレス法)<sup>6)</sup>、誘導結合プラズマ法(ICP<sup>7)</sup>)や、ICP質量分析法(ICPMS)<sup>8)</sup>などが利用されている。それらの中で最も微量分析ができるICPMSはアルミニウムの実際的検出限界が1ppb(1 $\mu$ g/l; 100ng/100ml/測定)である。アルミニウム細胞毒性機作についての細胞レベル、生

化学レベルでの研究には超微量のアルミニウム分析法の開発が不可欠である。

一般に、作物のアルミニウム含量は極めて少ないことが知られている<sup>9)</sup>。一方、植物体内に多量のアルミニウムを含有(数 100  $\mu\text{g/g}$ )するアルミニウム集積植物の存在も知られている<sup>10)</sup>。このような植物体では毒性のあるアルミニウムイオンが何らかの形で不活化されて蓄積されているものと推定される。しかし、生体内でのアルミニウムの動態に関する基本的な知見が欠如しているため、正しい評価をすることが困難であると思われる。このため、アルミニウムに対して感受性の異なる大麦 2 品種<sup>11)</sup>とアルミニウムを集積するような植物(クワ、ルジグラス)<sup>12)</sup>を材料に、組織や細胞内器官別でのアルミニウムの分布や存在様式を詳細に検討することが、アルミニウムの与えるストレスやストレスに対する耐性機構を解明する上で重要である。

以上から本研究では、1) 超微量のアルミニウム検出技術を開発し、2) アルミニウムイオンに感受性の異なる種々の植物において、体内に吸収されたアルミニウムイオンが、いずれの組織の細胞内器官に、どのくらいの濃度で集積するのか解析することを目的にする。

## 8. 材料と方法

1) 南方産野生種シマクワの葉 (*Morus acidose*) の細胞内器官分画法を確立し、アルミニウムの微量分析(8-キノール塩抽出法<sup>5)</sup>、誘導結合プラズマ質量分析法<sup>7)</sup>)をする。

九州農業試験場内圃場(黒ボク土壌, pH5.2)で生育したクワの葉をはさみで主な葉脈を除いた部分(葉 1)と主な葉脈部分(葉 2)とに分け、常法<sup>5)</sup>により葉 1 の一部と葉 2 は硝酸と過酸化水素水を加え 60 で 30 分加熱後、液が透明になるまで 200 で湿式分解し、最終的に 10 ml の硝酸溶液とした。また、葉 1 部分(10 g 生重)から Day らの方法<sup>13)</sup>に従いミトコンドリア分画を調整した(Fig. 1)。

葉については 8-キノール塩抽出法<sup>5)</sup>で、またミトコンドリア分画についてはセイコー社製 SPQ90001 装置を用いた誘導結合プラズマ質量分析法<sup>7)</sup>でアルミニウム量を測定した。

2) 水耕栽培系において、クワの葉柄からおよびルジグラスの切断根からミトコンドリアへ取り込まれたアルミニウムの加速器質量分析(AMS)：

主要栄養要素を含む水耕栽培(4mM  $\text{CaCl}_2$ , 6.5 mM  $\text{KNO}_3$ , 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.4 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 5.0 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )で十分に根を発育させたルジグラス 16 個体の根を切断し、50 dpm(15 ng)の放射線同位元素  $^{26}\text{Al}$  を含む 300 ml のリン酸塩を除き 81 mg  $^{27}\text{Al}$  を含む(10 mM Al ストレス)栄養要素培養液( $^{26}\text{Al}/^{27}\text{Al}=1.9 \times 10^{-7}$ )で 5 時間、24 時間水耕トレーサー実験(Fig. 2)し、上部の葉を採取した。

桑葉 30 枚を 100 dpm(30 ng)の  $^{26}\text{Al}$  を含む 600 ml のリン酸塩を除き 162 mg の  $^{27}\text{Al}$  を含む(10 mM Al ストレス)栄養要素培養液( $^{26}\text{Al}/^{27}\text{Al}=1.9 \times 10^{-7}$ )で 1 時間水耕した。

水耕実験した植物の葉から常法<sup>13)</sup>に従いミトコンドリアを分画後、1/10 容量で蛋白質量を定量し、残りを AMS による動物材料由来  $^{26}\text{Al}$  分析の既法<sup>14)</sup>を以下のように簡便化し、硝酸分解/灰化し加速器質量分析(AMS)に供試した(Fig. 3)。

- ステップ 1 : 50 ml の Buffer A (0.4 M Sucrose, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 5 mM EDTA 1 % BSA, 5 mM 2-mercaptoethanol, 6 % Polyvinylpyrrolidon (PVP))を加え、ワーリングブレンダーで数秒粉碎後、4 枚重ねガーゼ、ミラクロスでろ過し、ろ液を 3,000 rpm、10 分遠心、上清をさらに 10,000 rpm で 20 分遠心、沈殿物を得た。
- ステップ 2 : その沈殿物を 5 ml の Buffer G (0.3 M Sucrose, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.05 % BSA, 6 % PVP) に懸濁した。
- ステップ 3 : さらにその溶液を 3,000 rpm、10 分遠心、上清に 0.01vol.の 1M MgCl<sub>2</sub>、50 μl の 2 mg/ml DNase を加え、室温で 1 時間反応させる。
- ステップ 4 : 反応液を 2 倍量の Shelf Buffer (0.6 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM EDTA, 6 % PVP) クッション上に重層し、9,000 rpm で 20 分遠心しミトコンドリアを沈殿させた。  
再度ステップ 2、4 を行い沈殿物に 1 ml の Buffer G を加え懸濁して、0.2 ml は全蛋白質含量を測定した。
- ステップ 5 : 0.8 ml には 3 ml の硝酸、0.5 ml の過酸化水素水を加え前出と同様にアルミニウム測定用サンプルとした。

Fig. 1 . ミトコンドリア分画法<sup>13)</sup>

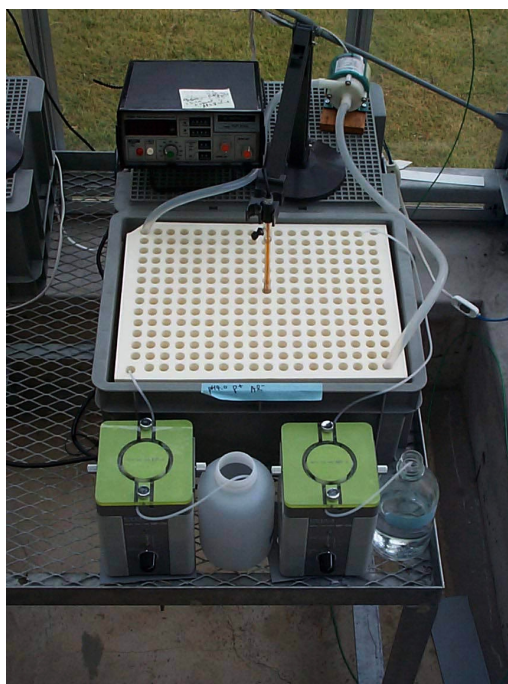
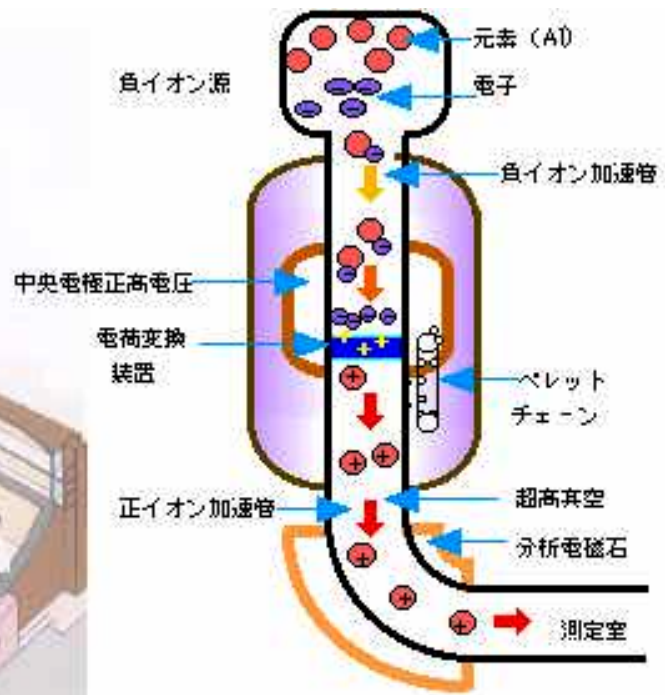


Fig. 2 pHコントローラーによる精密pH水耕栽培システム



東京大学タンデム加速器実験施設

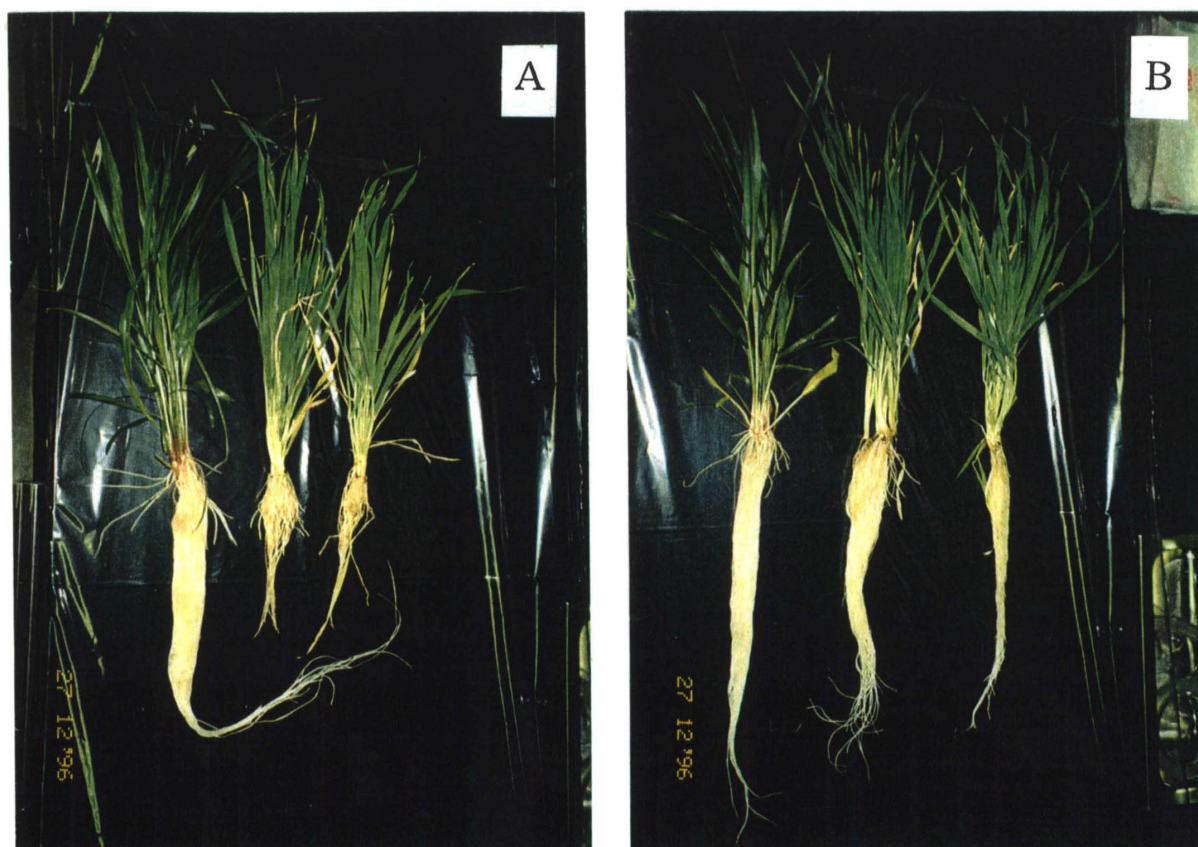


加速器の原理

Fig. 3 東京大学原子力総合研究センター MALT と加速器質量分析 (AMS) 法

3) 水耕栽培系において、大麦およびルジグラスの根からミトコンドリア分画へ取り込まれたアルミニウムの加速器質量分析 (AMS) :

ルジグラス, アルミニウム耐性品種 Dayton と感受性品種 Kearney を 1% 次亜塩素酸で 30 分消毒後 1 晩吸水させ, 水分を浸み込ませたシャーレ内ろ紙上でルジグラスでは約 1 週間, 大麦では約 2 日間 4 本種子根 (主根, 側根 1-3) を発根させた。その後ルジグラスと大麦は完全水耕 (0.6 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3.0 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1.0 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.5 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ , 46  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 4.3  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.07  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 0.8  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 1.82  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 0.3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) で約 3 週間地上部が 4,5 葉で種子根を十分に発育させた。さらに, 10 dpm(3 ng)の放射線同位元素  $^{26}\text{Al}$ (7.4 kBq/ $\mu\text{mole}$ )と 48.6  $\mu\text{g}^{27}\text{Al}$  を含むリン酸塩を除いた 90 ml 栄養要素培養液 (20  $\mu\text{M}$  Al:  $^{26}\text{Al} / ^{27}\text{Al} = 6.2 \times 10^{-5}$ ) あるいは 50dpm(15ng)の放射線同位元素  $^{26}\text{Al}$ (7.4 kBq/ $\mu\text{mole}$ )と 243  $\mu\text{g}^{27}\text{Al}$  を含むリン酸塩を除いた 90ml 栄養要素培養液 (100  $\mu\text{M}$  Al:  $^{26}\text{Al} / ^{27}\text{Al} = 6.2 \times 10^{-5}$ ) で 5 時間水耕トレーサー実験した (Fig. 2) 地上部の葉身, 葉鞘と根に分け, それらに集積したアルミニウム量を ICPMS で測定し, さらに葉身からは常法<sup>13)</sup>に従いミトコンドリア分画を得た。ミトコンドリア分画は 2) と同様にその 1/10 量を蛋白質定量し, 9/10 を硝酸分解・灰化し, AMS 分析に供した (Fig. 3)



(A)pH4.0, 1mM Al 水耕栽培：左,ルジグラス；中央,Dayton；右,Kearney  
 (B)pH4.0, 0mM Al 水耕栽培：左,ルジグラス；中央,Dayton；右,Kearney

Fig. 4 水耕栽培したルジグラス，大麦

4) 水耕栽培系において、大麦およびルジグラスの根から、核、葉緑体、ミトコンドリア分画へ取り込まれたアルミニウムの加速器質量分析 (AMS) :

ルジグラス，アルミニウム耐性品種 Dayton と感受性品種 Kearney を 1% 次亜塩素酸で 30 分消毒後 1 晩吸水させ，水分を浸み込ませたシャーレ内ろ紙上でルジグラスでは約 1 週間，大麦では約 2 日間 4 本種子根（主根，側根 1-3）を発根させた．その後ルジグラスと大麦は完全水耕（0.6 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ，3.0 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ，1.0 mM  $\text{MgSO}_4$ ，0.5 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ，50  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ ，46  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_4$ ，4.3  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ，0.07  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ，0.8  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ，1.82  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ ，0.3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ）で約 3 週間地上部が 4，5 葉で種子根を十分に発育させた．さらに，50 dpm(15 ng)の放射線同位元素  $^{26}\text{Al}$ (7.4 kBq/ $\mu\text{mole}$ )と 243  $\mu\text{g}^{27}\text{Al}$  を含むリン酸塩を除いた 90 ml 栄養要素培養液（100 $\mu\text{M}$  Al:  $^{26}\text{Al} / ^{27}\text{Al} = 6.2 \times 10^{-5}$ ）で 5 時間水耕トレーサー実験し、上部の葉を採取し常法に従い核<sup>16)</sup>，葉緑体<sup>15)</sup>，ミトコンドリア分画<sup>13)</sup>を得た．それら分画は 3) と同様にその 1/10 量を蛋白質定量し，9/10 を硝酸分解・灰化し AMS 分析に供した．

## 9. 結果

1) 従来法 (キノール法、誘導結合プラズマ質量分析法 Induced Coupled Plasma Mass Spectrometry; [IPC-MS]) による、アルミニウム集積植物 (クワ) の葉内アルミニウム含量分析:

数  $10 \mu\text{g}$  の量のアルミニウム ( $10^{17}$  アルミニウム原子) を検出できる 8-キノール塩抽出法、および  $10^{15}$  アルミニウム原子を検出できる ICPMS 法を用いて、クワの葉内アルミニウムを解析に供した。8-キノール分析により、クワ及びルジグラスの葉には生重量  $1\text{g}$  あたり  $20.26 \mu\text{g}$  のアルミニウムが存在していることが明らかになった。また、主な葉脈を除いたクワ葉細胞にはその内の  $8.2\mu\text{g}$  (40.6%) が存在していた。さらに、ICPMS 分析により葉細胞のミトコンドリア分画にはミトコンドリア内の蛋白質  $\text{mg}$  あたり  $0.68 \mu\text{g}$  ( $4.25 \mu\text{gAl}/5.38 \text{mg protein/total Mt fraction}/30 \text{g leaves}$ ) と多量のアルミニウムが測定できた。

2) 水耕栽培系において、アルミニウム集積植物のクワおよび (好) アルミニウム耐性ルジグラスの切断根からミトコンドリアへ取り込まれたアルミニウムの加速器質量分析 (AMS):

ルジグラスの水耕トレーサー実験では5時間アルミニウムストレスをかけ、その後ストレスをかけない (チェイス) 水耕を行ったが、チェイス開始後 24 時間アルミニウムは葉身に取り込まれた。その後減少したが 168 時間後にはほぼチェイス開始時のレベルに達した。このことから、5時間の取り込み量を5時間のアルミニウムストレスによって集積した量と考えた。ICPMS 分析の結果、5時間で約  $17 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ 、24時間で約  $25 \mu\text{g}/\text{mg protein}$  のアルミニウムがルジグラスの葉身に集積した (Fig. 5A)。クワ葉については葉がしおれてしまうため、葉柄からアルミニウムを取り込ませる方法で1時間水耕することが限界であった。なお両者の葉約  $10\text{g}$  の葉からは約  $1\text{mg}$  蛋白質相当のミトコンドリアが得られた。

AMS 分析の結果ルジグラスでは 24 時間アルミニウムのミトコンドリアへの取り込み量は増加し、5時間で  $^{26}\text{Al}$  は  $1.121 \times 10^8 \text{ atom}$  ( $=5.027\text{fg}$ )、すなわち  $^{26}\text{Al} + ^{27}\text{Al}$  は5時間で  $60.76 \text{ ng}/\text{mg protein}$ 、24 時間で  $197.7 \text{ ng}/\text{mg protein}$  であった (Fig. 5B)。一方クワ葉では  $^{26}\text{Al} + ^{27}\text{Al}$  は1時間で  $62.81 \text{ pg}/\text{mg protein}$  であった。すなわち、根のないルジグラスの地上部 (葉) ミトコンドリアに集積したアルミニウム (約  $200 \text{ ng}/1\text{mg protein/isolated mitochondria}/10 \text{ g leaf}/24\text{hr}$ ) は ICPMS の検出限界 ( $100 \text{ ng}/100 \text{ ml}$  サンプル溶液) に近い値であった。集積植物のクワのアルミニウム取り込み能は、葉柄から取り込ませる方法で最も取り込み効率の良い方法と考えられたが、約  $0.06\text{ng}/1\text{-}2\text{mg protein}/1\text{hr incorporation}/10\text{g leaves}/\text{sample}$  であり、1時間ミトコンドリアに取り込ませたアルミニウム集積量は ICPMS の検出限界 ( $100 \text{ ng}/100 \text{ ml}$  サンプル溶液) の  $1/1000$  以下だった。

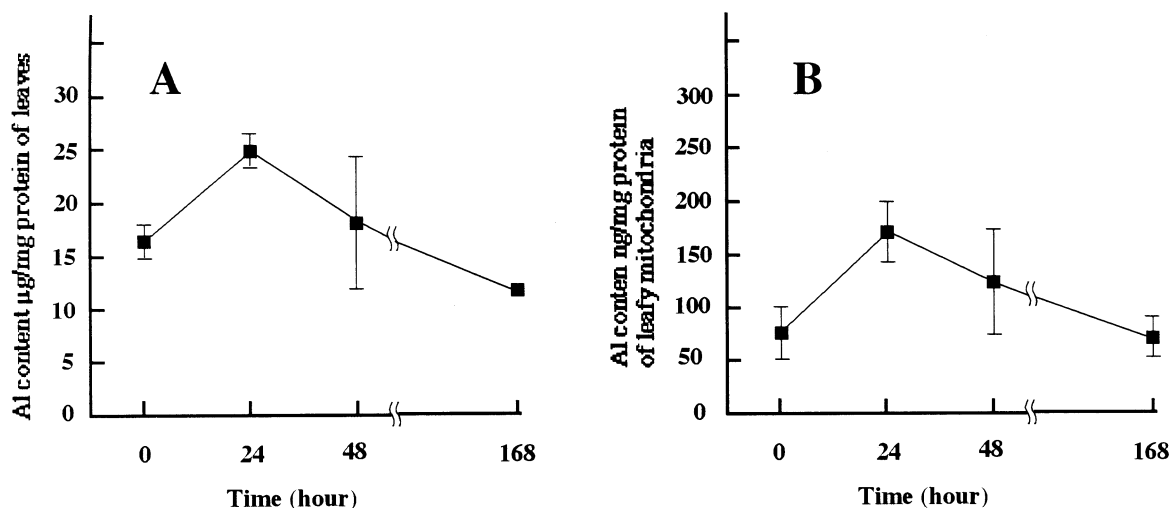


Fig. 5 Changes in accumulated Al in the leaves (A) and the mitochondria (B)

3) 水耕栽培系において、大麦およびルジグラスの根からミトコンドリア分画へ取り込まれたアルミニウムの加速器質量分析 (AMS) :

アルミニウムを取り込む際の大麦及びルジグラスは完全水耕溶液中で正常に十分生育した種子根と次に発根しはじめた冠根を持つ。9日間 100  $\mu\text{M}$  Al ストレス下におかれた大麦及びルジグラスの植物体当たりの葉身，葉鞘に蓄積したアルミニウムはルジグラス >Dayton>Kearney の順に高く，一方根では3者に差がなかった (Fig. 6A,B) .また，5時間 20, 100  $\mu\text{M}$  Al ストレス下で  $^{26}\text{Al}$  を葉身ミトコンドリアに取り込ませた場合は，水耕溶液中のアルミニウム濃度にほぼ比例してその取り込み量は増加し，その量はルジグラス >Dayton>Kearney の順に高かった (Fig. 6C) .すなわち，ルジグラスのそれは 20  $\mu\text{M}$  Al ストレスで大麦の約 10 倍，100  $\mu\text{M}$  Al ストレスで約 2.5 倍であった。またアルミニウム耐性品種 Dayton は感受性品種 Kearney に比べ約 50%高い値を示した (Fig. 6B) 。またそれら3者の相対比は前述 (Fig. 6A; 葉身) とほぼ同等であった。

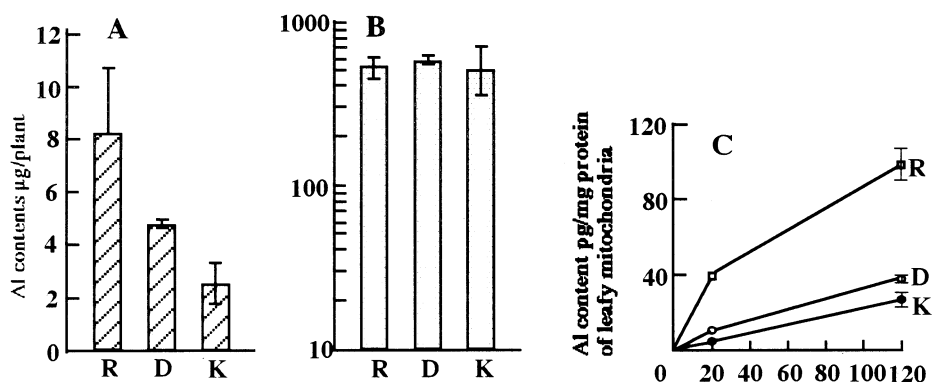
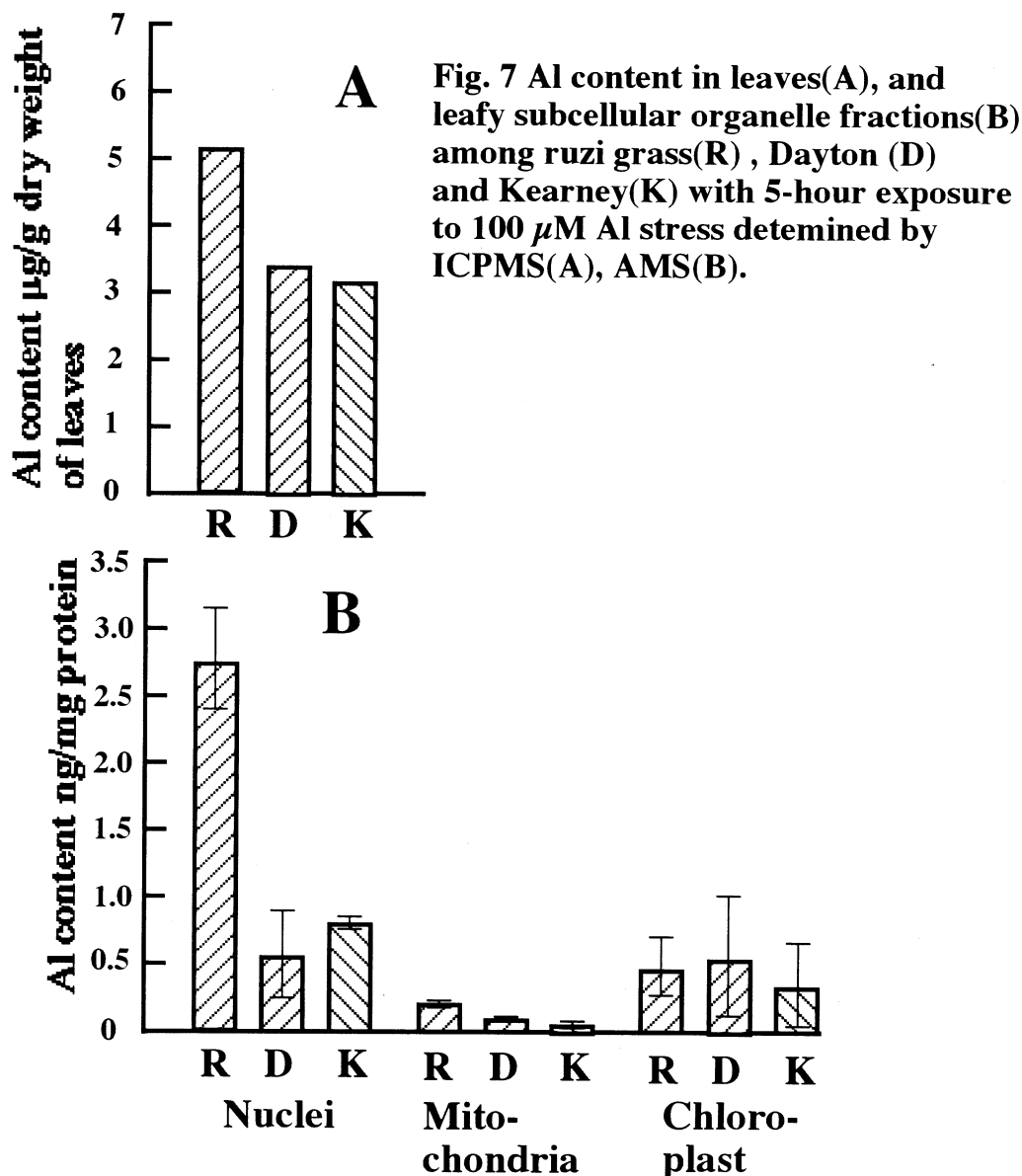


Fig. 6 Al content in leaves(A),roots(B), and leafy mitochondria among ruzi grass(R), Dayton(D) and Kearney(K)

4) 水耕栽培系において、大麦およびルジグラスの根から核，葉緑体，ミトコンドリア分画へ取り込まれたアルミニウムの加速器質量分析 (AMS) :

5 時間 100  $\mu\text{M}$  Al ストレスをかけた大麦アルミニウム耐性品種 Dayton, 感受性品種 Kearney, 及び (好) アルミニウム植物ルジグラスの葉身に取り込まれたアルミニウムを ICPMS で測定した結果, 乾燥重 g 当たりそれぞれ約 5.1  $\mu\text{g}$ , 3.4  $\mu\text{g}$ , 3.2  $\mu\text{g}$  のアルミニウムが集積した (Fig. 7A)。3 者の相対的關係は前述 3) の (Fig. 6A) と同様であった。さらに核, 葉緑体, ミトコンドリアに取り込まれるアルミニウム量は大麦アルミニウム耐性品種 Dayton, 感受性品種 Kearney, 及び (好) アルミニウム植物ルジグラスの葉緑体では 0.5, 0.3, 0.4 ng/mg protein と大きな差はなかった。しかし, 核について大麦では有意な差はないが, ルジグラスの核には大麦の約 4 倍量のアルミニウムが集積した (Fig. 7B)。





## 9. 考察

### 1) 誘導結合プラズマ質量分析法 (Induced Coupled Plasma Mass Spectrometry; ICPMS) によるクワの葉のアルミニウム分析

アルミニウムを集積している植物の細胞内におけるアルミニウムの存在様式や、致死量よりは低濃度のアルミニウムを絶えず供給して生育させた酸性土壌感受性植物の生体内でのアルミニウムの分布を調べることは、アルミニウム耐性機構を考える上で興味深い。このために、アルミニウムを常時微量分析できる実験植物系を確立する必要があると考えた。本研究では、8-キノリノール塩抽出法と ICPMS 分析により、クワの葉およびそのミトコンドリア内のアルミニウムを検出できた。供試した葉内のアルミニウム含量は生重量 1g あたり約 20  $\mu\text{g}$  程度であった。一方、オルガネラの一つミトコンドリア内のアルミニウム含量はミトコンドリア画分の全有機体窒素含量 mg あたり約 4  $\mu\text{g}$  と高い値を示し、ICPMS 分析の検出限界の 1,000 倍以上であった。このことはアルミニウム耐性機構解明のために、アルミニウム集積植物であるクワ葉の細胞レベル、生化学的レベルでのアルミニウム分析は ICPMS で分析できることを示していた。しかし、クワの葉が水耕栽培に適さないことから、以後本研究では供試しなかった。そこで、亜熱帯の酸性土壌で栽培されている牧草のルジグラスに注目し、以後の供試材料とした。本研究では細胞レベル、分子レベルでアルミニウムの存在様式を分析することを目的とすることから、これまで最高の分析感度を持つ ICPMS 以上の超高感度アルミニウム分析技術の確立を目指した。

### 2) アルミニウム耐性ルジグラスの切断根からミトコンドリアへ取り込まれたアルミニウムの加速器質量分析:

近年、東京大学タンデム加速器実験施設 (Fig. 3) の小林らにより、放射性同位元素  $^{26}\text{Al}$  をトレーサーとして、 $10^8$  原子程度の  $^{26}\text{Al}$  を検出できる加速器質量分析法 (Accelerator Mass Spectrometry; AMS) が開発途上であった。 $^{26}\text{Al}$  を用いた AMS 生体トレーサー実験はラットの脳におけるアルミニウム測定<sup>14)</sup>が初めてであり、植物細胞では例がなかった。本研究では5時間の取り込み実験により、葉全体ではクワに比べてルジグラスは高アルミニウム集積植物であることが示された (Fig. 5A)。さらに加速器質量分析法 (AMS) により超微量のアルミニウムが精密に測定でき、アルミニウムストレス耐性機構解明研究の基盤技術となる ICPMS 分析感度の 1/1000 の超高感度アルミニウム分析が確立できた。

### 3) 水耕栽培した大麦, ルジグラスの根から葉, ミトコンドリア分画に取り込まれたアルミニウムの ICPMS 分析, 加速器質量分析 (AMS):

これまでアルミニウム耐性機構の一つとして、コムギ, 大麦, ソバでは根からコハク酸, クエン酸, シュウ酸などの有機酸が分泌され, それがアルミニウムと結合し根から取り込まれない機構が報告されている<sup>17)</sup>。本研究では好アルミニウム植物ルジグラスやアルミニウム耐性大麦品種は感受性大麦品種に比べ, 根では大きな差がなく (Fig. 6B), しかし多量のアルミニウムが葉に蓄積し (Fig. 6A) またそのオルガネラ (ミトコンドリア) にも同様に蓄積することを示した (Fig. 6C)。

以上から葉におけるアルミニウムストレス耐性機構の一つとして、葉やオルガネラ内におけるアルミニウム解毒機構を推定した。

4) 核, 葉緑体, ミトコンドリア分画のアルミニウムの加速器質量分析法 (AMS):

9 日間 100  $\mu\text{M}$  のアルミニウムストレス下に晒された前述 3) の結果と同様に, 5 時間 100  $\mu\text{M}$  のアルミニウムストレス下で葉全体に  $^{26}\text{Al}$  を取り込ませたアルミニウムの蓄積結果はほぼ同様であった。すなわち葉におけるアルミニウム解毒機構が考えられた (Fig. 7A)。さらに各オルガネラの蓄積測定結果では, ルジグラスは葉緑体を除いて核, ミトコンドリアで大麦より多くのアルミニウムが蓄積されていた (Fig. 7B)。これまでも核にアルミニウムが蓄積することから, アルミニウム毒の機作の一つとしてアルミニウムのクロマチン結合, DNA のリン酸基への結合による複製や転写阻害が議論されてきた<sup>18)</sup>。本研究では大麦のアルミニウム耐性品種の核内蓄積アルミニウムは感受性品種より低い量であるが大きな差でなく, ルジグラス核内が特徴的に高い値を示した。このことから前議論には普遍性がないか, あるいはルジグラスでは特別に核内に (積極的に) アルミニウムが取り込まれ機能しているか, または高度に解毒されていると考えられた。アルミニウム障害を受けた葉の症状として葉色のモザイク化が見られる。このことから葉緑体に蓄積するアルミニウムが考えられ, その量は感受性品種が耐性品種やルジグラスより多量であると予想したが, 3 者で差が見られなかった。一方ミトコンドリアにおいてもルジグラスと耐性品種が感受性品種よりアルミニウム蓄積量が多い傾向であり, また Fig. 6C の結果と同様にアルミニウムが取り込まれ機能しているか, または高度に解毒されていると考えられた。

## 1.1. 今後の展開

本研究の III, IV から根端の伸長や根の出根, 葉の出芽にアルミニウムストレスが影響を及ぼすことが明らかになり, それら生物活性のエネルギー供給源であるミトコンドリアにおけるアルミニウム解析がアルミニウムストレス耐性機構解明に重要であると思われた。水耕栽培実験系において取り込まれた超微量  $^{26}\text{Al}$  を超高感度の加速器質量分析法で解析したが, 大規模な施設を必要としアルミニウム専用施設でないために更なる詳細な分析は困難である。しかし現在小型加速器質量分析法が開発中であり, 分析は簡便になることが期待できる。また本研究 II では取り込み効率のよりルジグラス細胞培養系が確立されたことから, 今後さらに細胞, 分子レベルでアルミニウム耐性機構が解析できる。

## 1.2. 参考文献

- 1) Haug A., Molecular aspects of aluminium toxicity CRC Crit Rev Plant Sci 1; 345-373 (1984)
- 2) FAO/Unesco: Soil map of the world, 1:5,000,000, vol. I. Legend, Unesco, Paris. (1974)
- 3) Neenan, M., Plant and Soil XII: 324-338 (1960)
- 4) MacLeod, L.B., and L. P. Jackson, Can J. Soil Sci. 45: 221-237(1978)

- 5) Wada, S.I, and Wada K Soil Sci., 132, 267-273 (1981)
- 6) T. Ito, J Mass Spectrom Soc. Jpn 36 263 (1988)
- 7) Bloom, P.R., R. M. Weaver, M. B. McBride, Soil Sci. Soc. Am J. 42, 713-716 (1978)
- 8) 河口広司、中原武利編：プラスマイオン源質量分析、日本分光学会、1982
- 9) 吉井義次，神保忠男．生態学研究，3, 147-156 (1937)
- 10) 高橋英一，三宅靖人．日土肥誌 47, 296-337 (1976)
- 11) D. A. Reid, A.L. Fleming and C.D. Foy. Agronomy J., 63 600-603 (1971)
- 12) M. Osaki, t. Watanabe and T. Tadano. Soil Sci. Plant Nutri., 43, 551-563 (1977)
- 13) D.A. Day, M. Newburger and R. Douce, Aust. J. Plant Physiol. 12 219-228(1985)
- 14) K. Kobayashi et al., Proc. Jap. Acad., 66, Ser. B 189-192 (1990)
- 15) G.B. Bookjans et al., Anal. Biochem. 141, 244-247 (1984)
- 16) H.B. Zhang et al., Plant J., 7, 175-184 (1995)
- 17) E. Delhaize, P.R. Ryan and P.J. Randall, Plant Physio., 103, 695-702 (1993)
- 18) H. Matsumoto, R.J. Wright et al. (Eds.), Plant-soil inter-reaction at low pH, 825-838 (1991)

### 1 3 . 研究業績

#### 1 3 1 . 原著論文

1. Y. Arakawa, Y. Masaoka, A. Saito, C. Miyazaki, H. Matsuzaki and K. Kobayashi: Establishment of trace aluminium measurement in plant mitochondria. Nucl. Instr. and Metho. in Physics Res. in press 1999
2. Y. Masaoka, K. Kobayashi, A. Saito, Y. Arakawa, C. Miyazaki, H. Nagai and H. Matsuzaki: Accumulation in the Leaf Cell Organelles of Ruzi grass (*Brachiaria ruziziensis*) Analyzed by Accelerator Mass Spectrometry. Nucl. Instr. and Metho. in Physics Res. in press 1999
3. Y. Masaoka, A. Saito, Y. Arakawa, C. Miyazaki, K. Kobayashi, S. Hatori and H. Nagai: Quick Accumulation of  $^{26}\text{Al}$  in the Leaf Mitochondria of *Brachiaria ruziziensis* Analyzed by accelerator Mass Spectrometry (AMS) submitted

#### 1 3 2 . 総説 なし

#### 1 3 3 . 国際学会発表

1. Y. Arakawa, Y. Masaoka, A. Saito, C. Miyazaki, H. Matsuzaki and K. Kobayashi: Establishment of trace aluminium measurement in plant mitochondria. 8th International Conference on Accelerator Mass Spectrometry, Vienna Austria, 1999
2. Y. Masaoka, K. Kobayashi, A. Saito, Y. Arakawa, C. Miyazaki, H. Nagai and H. Matsuzaki: Accumulation in the Leaf Cell Organelles of Ruzi grass (*Brachiaria ruziziensis*) Analyzed by Accelerator Mass Spectrometry. 8th International Conference on Accelerator Mass Spectrometry, Vienna Austria, 1999

#### 1 3 4 . 国内学会発表

1. 正岡淑邦，小林紘一，荒川裕介，斎藤彰，宮崎力，羽鳥聡，春原陽子，

- 中野忠一郎：アルミニウム耐性植物のミトコンドリアに集積するアルミニウム．  
第5回東京大学原子力研究総合センターシンポジウム 1996
2. 正岡淑邦，斎藤彰，荒川裕介，宮崎力，小林紘一，羽鳥聡，  
永井尚正：葉ミトコンドリアに集積するアルミニウムの植物種間差．  
第6回東京大学原子力研究総合センターシンポジウム 23-28, 1997
3. 斎藤彰，正岡淑邦，小林紘一，永井尚正，荒川裕介，宮崎力，  
羽鳥聡：植物細胞におけるアルミニウムの作用・機能解明．  
第7回東京大学原子力研究総合センターシンポジウム 157-160, 1998

1 3 5. 新聞など なし

1 3 6. 特許 なし

#### 1 4 . 英訳

- (1) Research title : Tolerance Mechanisms for Aluminium stress in plant  
Research sub-title : I. Development of ultra-micro measurement of Al
- (2) Research organization : Labo. of plant Biotech, Kyushu National Agricultural Experiment Station (KNAES)
- (3) Researchers : Akira Saito
- (4) Co-researchers : Chikara Miyazaki  
Yoshikuni Masaoka (KNAES)  
Koichi Kobayashi (Univ. of Tokyo)
- (5) Reseach periods : 1995-1999

#### (6) Abstract

In acid soil, aluminium is solublized to damage severely crop growth, causing serious agricultural problems. However, mechanisms of actual aluminum stress and toxicity are unclear, because the highly abundant aluminium in the environments prohibit the accurate analyses at cytological and biochemical research. In this study to reveal the presence of aluminium in plant leaves at cytological level which has been unknown by now, we used a tracer of  $^{26}\text{Al}$  that is not existed in nature for accelerate mass spectrometry detectable at ultra micro level of 108 atoms. According the analyses, we measured the aluminium amounts in leaves and the leafy organella among Al-preferable plant ruzi grass, Al-tolerant barley var. Dayton and Al-sensitive barley var. Kearney. Resultantly, aluminium in total leaves and the organella except the chloroplast of Al-preferable ruzigrass and Al-tolerant Dayton accumulated more than those of Al-sensitive Kearney. Therefore, we proposed one possibility of high detoxification in the leaves as a aluminium tolerant mechanism.