

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 : II. 超微量アルミニウム測定法による好アルミニウム植物、ルジグラス培養細胞内のアルミニウム / 蛋白質複合体の検出
2. 研究機関 : 農林水産省九州農業試験場育種工学研究室
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 1 1 年度
6. 要約

土壌の酸性度が pH5.5 以下では、アルミニウム(Al)は大部分の植物の生育を阻害する。一方亜熱帯地域の酸性土壌に栽培される牧草ルジグラス,*Brachiaria ruziziensis* は中性土壌にくらべ生育が良い。本研究では、Al がルジグラスの生育を促進する機構解明するために、その細胞培養系を確立した。種々の pH 条件下における培養により、その細胞増殖は酸性条件 ( pH3.5 ~ 4.5 ) で一般的な植物細胞培養で適切な条件である pH5.8 と比べ促進された。pH4.0 の培養条件で  $^{26}\text{Al}$  を添加し、細胞内に取り込まれた  $^{26}\text{Al}$  を加速器質量(AMS)分析すると、 $^{26}\text{Al}$  は添加後 24 時間直線的に取り込まれていた。さらに、 $^{26}\text{Al}$  が取り込まれた細胞の水溶性分画を未変性 PAGE 電気泳動分析し、またそのゲル切断片中の  $^{26}\text{Al}$  を AMS 分析した。その結果いくつかの蛋白質が超微量の  $^{26}\text{Al}$  ( $10^{-15}\text{g/gel slice}$ ) と相互作用していることが示された。このように AMS によりルジグラス細胞内の超微量  $^{26}\text{Al}$  を検出したことは、今後さらに植物内の Al の生物学的機能研究を可能にする。

## 7. 研究目的

アルミニウムは地殻構成原子の中ではケイ素と酸素に次いで非常に多量である<sup>1)</sup>。一方、世界の耕作可能な土壌の 42%が酸性土壌であり、そこではアルミニウムはその pH 値に従って様々にイオン化している<sup>2)</sup>。一般にイオン化したアルミニウムは人類やその他の生物を支える主要作物の生長に甚大な被害を与える。すなわち、アルミニウムな生物にとって非必須元素の一つと言うよりむしろ金属毒の一種として研究されている。しかし、動物、植物生体内におけるアルミニウムの作用機作はまだ知られていない。ただ 動物ではクエン酸や、鉄輸送する Transferrin や ferritin などがアルミニウム輸送に関与すると考えられている。一方下等植物である酵母やコケなどはその細胞内に多量のアルミニウムを蓄積することが知られている<sup>3)</sup>。さらに、亜熱帯原産の高等植物のいくつか、例えばチャヤクワや牧草などの生育はアルミニウムイオンが多く含まれる土壌で促進されることが報告されている<sup>4)</sup>。これらの植物で見られる現象は動物では見られず、またそれら好アルミニウム植物におけるアルミニウムの生物学的機能についてはまだ研究されていない。

本研究ではアルミニウムイオン存在下でその生育が促進される亜熱帯牧草ルジグラス,*Brachiaria ruziziensis* の細胞培養系を確立する。また現在、超微量なアルミニウムは ICP,

ICPMS では測定できない。しかし最新の加速器質量分析装置による超微量アルミニウム分析では、動物と同様に植物内の取り込み  $^{26}\text{Al}$  を高精度で計ることができる<sup>5, 6)</sup>。そこで、植物細胞内の  $^{26}\text{Al}$  の生体内存在状態を明かにする目的で、細胞内の未変性な  $^{26}\text{Al}$  複合体の存在を検証する。

## 8. 材料と方法

### 細胞培養：

ルジグラス種子はタイ国の Phaikaew 博士から分譲された。カルスは完熟種子から田中の方法 (personal comm.) で誘導形成した。カルスは pH5.8 の 1/2MS 培養寒天培地上<sup>7)</sup> で増殖し、さらに 14 日間 15ml の同培養液でサスペンションカルチャーにした。14 日間毎に増殖したカルスは 2mm 直径のステンレスメッシュで裏ごしして小片化され新しい培養液で培養した。

### 細胞増殖測定：

実験処理前に、前述のカルスは異なる pH に順応させるために 7 日間その pH の培養液で培養した。順応後、約 0.3g 生重のカルス培養を 10 セット作成し、最大 30 日間培養した。培養開始から経時的にサンプリングし、カルスの生重を計量し、相対的重量を (生重 / 培養初期生重 × 100) で表した。

### ルジグラスカルス細胞内への $^{26}\text{Al}$ 取り込み：

14 日間 pH5.8, 1/2MS 培養液で培養したカルス (約 1.0g) を用いて、リン酸欠乏と酸性条件に適応させるために 1 日リン酸を含まない pH4.0 の培養液で前培養した。その後、0.1ml (50.5 dpm/ml;  $154.53 \times 10^{-10}$  g  $^{26}\text{Al}$ /ml) を培養液に添加した。 $^{26}\text{Al}$  を 3, 6, 24 時間取り込ませた後、カルスはカルスに取り込まれずに吸着しているアルミニウムを 10ml の 0.1M のクエン酸で 5 回洗浄後採取して、生重を秤量し -80 °C で保存した。

### $^{26}\text{Al}$ を取り込んだカルスの硝酸分解：

前述の方法<sup>8)</sup> で硝酸分解され、1/2MS 培養液の 0.5ml を化学的ブランクとして  $^{26}\text{Al}$  を測定した。

### 未変性ポリアクリルアミドゲル (PAGE) とそのゲルスライス内 $^{26}\text{Al}$ 測定：

24 時間  $^{26}\text{Al}$  を取り込ませたカルス約 0.5 g を冷えた乳鉢で 1 ml の破碎液 (50mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM EDGA, 0.4 mg/ml Pefablock, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  chymostain) で破碎した。破碎液は 500 g で 10 分遠心し上澄みを水溶性分画とした。その分画のうち 30  $\mu\text{l}$  をサイズマーカーと共に 7.5% の未変成ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native PAGE) に供した。電気泳動後、ゲルは固定し、Commassie Brilliant Blue で染色し、さらに脱色後ゲルスライサーで 2.6mm 幅に切った。その切片ゲルを硝酸分解し、さらに前述と同様に  $^{26}\text{Al}$  量を AMS で測定した。Native PAGE では  $^{26}\text{Al}$  サンプルを供さないゲルスリップをゲルブランクとした。

## 9. 結果

様々な pH の 1/2MS 培養液でルジグラス細胞を増殖させると、pH3.5-4.0 における細胞増殖が pH3.0, 4.5, 5.0, 5.8 より速かった (Fig. 1). pH4.0 における細胞分裂速度 (cell doubling time) は約 6-7 日であり、その他の pH では約 12-15 日であった。さらに、pH4.0 における培養では細胞生重量の最大値は他の約 1.5 倍と高かった。

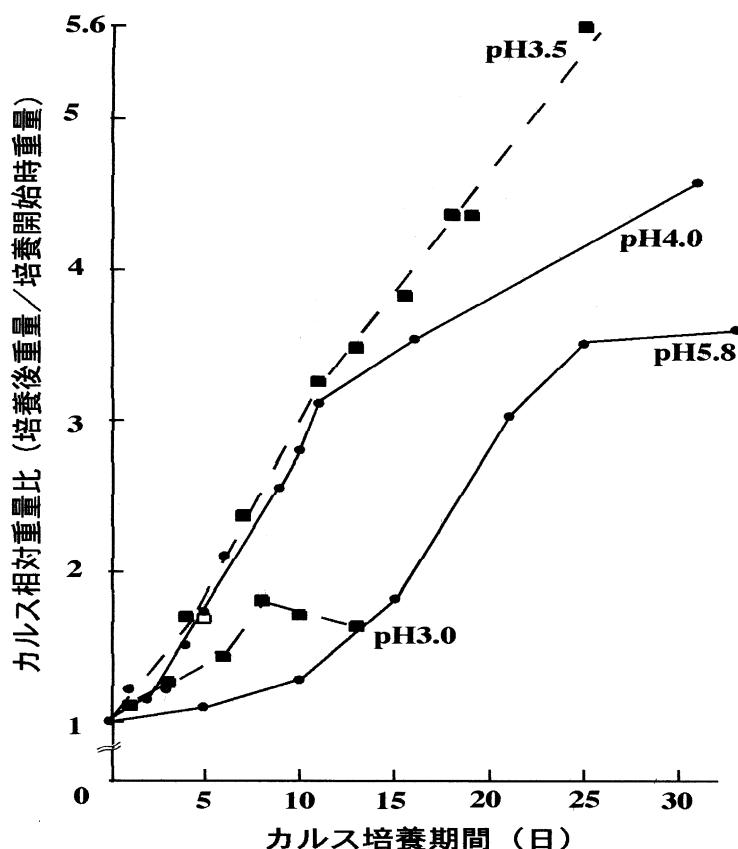


Fig. 1 Cell proliferation of Al-preferable plant, ruzi grass under different pH condition

そこで、酸性 / アルミニウムストレス下の細胞培養系におけるアルミニウムの取り込みを明らかにするために、酸性 / リン酸欠乏条件の順応のための前培養後  $^{26}\text{Al}$  を加えた。24 時間の取り込み後、細胞は pH4.0 の完全培養液と同様に増殖した。細胞 (約 1g) に取り込まれるアルミニウムは 24 時間直線的に増加し、添加した  $^{26}\text{Al}$  アルミニウム (30pg) の約 2%であった。この高い取り込み率は ICPMS による分子レベルでの細胞内アルミニウム分析を可能にしないが、 $^{26}\text{Al}$  の AMS による分析には十分であった (Fig. 2)。

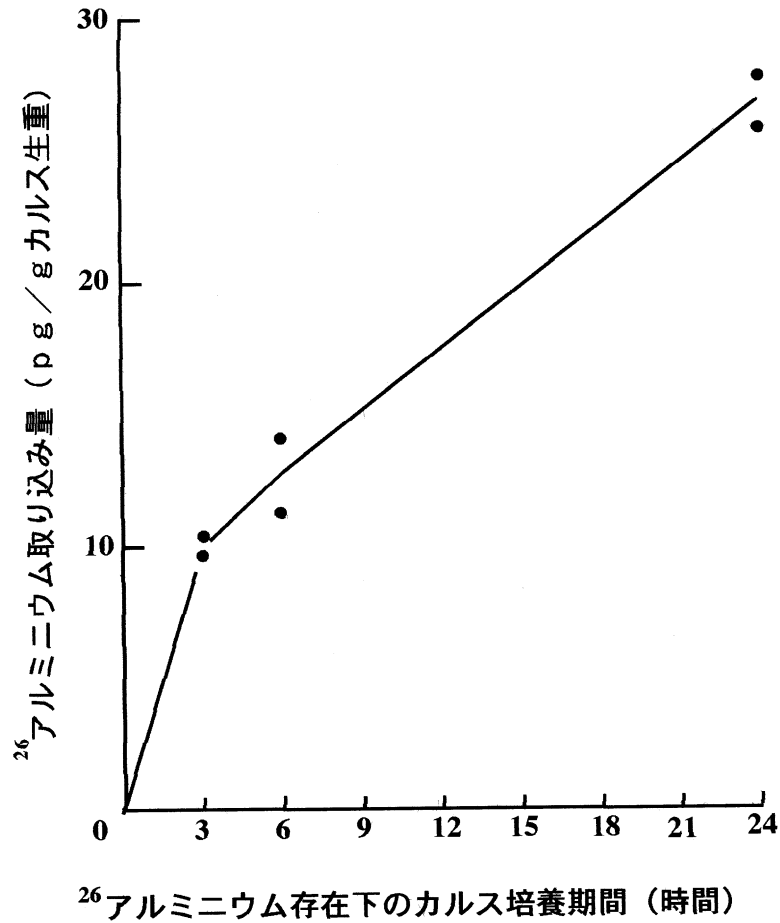


Fig. 2 Incorporation of  $^{26}\text{Al}$  into the ruzi grass calli cultured at pH4.0

このことから、 $^{26}\text{Al}$  が取り込まれた細胞の水溶性分画の 1/10 量を未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native PAGE) 分析し、さらにそのゲルをスライスした小片中の  $^{26}\text{Al}$  を AMS で測定した。その結果、いくつかの小片に含まれる  $^{26}\text{Al}$  量は泳動したゲル全体から見ていくつかのピークを示した (Fig. 2)。細胞内にある既存の蛋白質分解酵素で自己消化したサンプルを Native PAGE 分析すると、ゲルに含まれる  $^{26}\text{Al}$  量はゲルバックグラウンドとほぼ同等であった (data not shown)。ピークを示す  $^{26}\text{Al}$  量はゲルバックグラウンドより高い値を示し、このことは  $^{26}\text{Al}$  を取り込ませた細胞から得られた水溶性分画には蛋白質とアルミニウムの複合体がいくつかあることを示唆した。

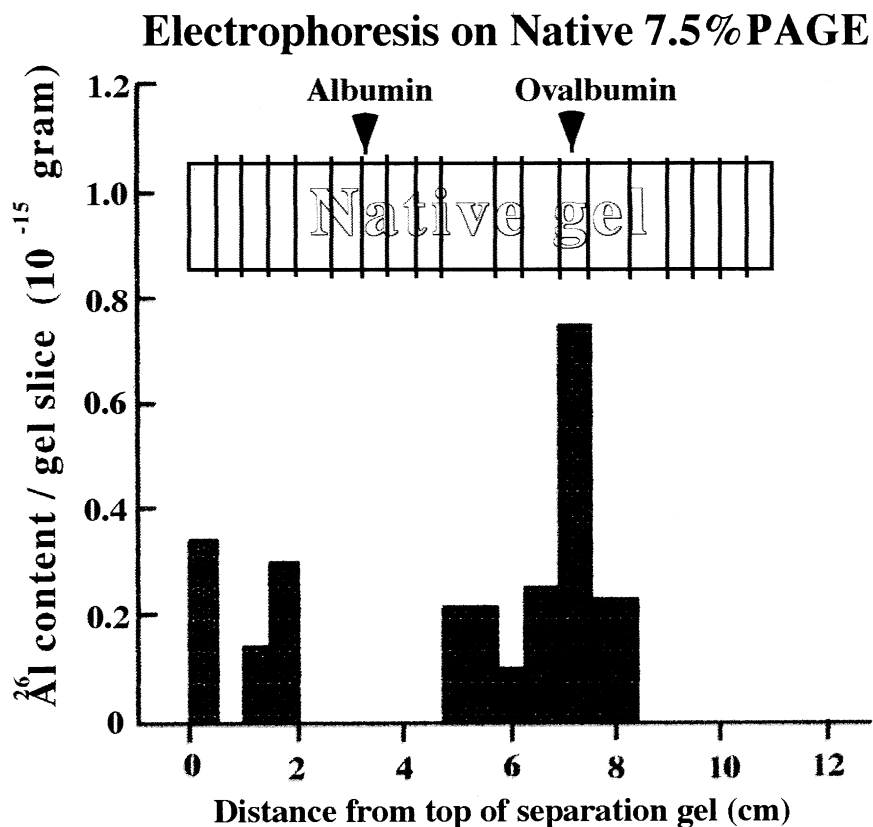


Fig. 3 AMS analysis for <sup>26</sup>Al in gel slices after Native PAGE of water soluble fraction of <sup>26</sup>Al incorporated ruzi grass calli

#### 10. 考察

一般にイオン化したアルミニウムは人類や他の生物を支える主要穀物の成長に重大な被害を与える。そこで、そのアルミニウムは生物に非必須物質の一つと言うより、むしろ動物や植物に対する一種の毒として研究されてきた<sup>9)</sup>。特に食品，飲料水，空中など環境からアルミニウムがクエン酸，トランスフェリン，フェリチンで輸送され脳内のアルツハイマー病に関連する beta-amyloid 蛋白質と結合することから，ダスト微量のアルミニウムでさえヒトのアルツハイマー病との関連が議論されている<sup>10)</sup>。しかし，植物ではクエン酸がアルミニウム輸送に関与する可能性があるものの，植物生体内におけるアルミニウムの輸送や毒性機構についてはいまだ知られていない<sup>11)</sup>。本研究では好アルミニウム植物ルジグラスの培養細胞に対する酸性度 pH とリン酸欠乏の影響について検討し，ルジグラス培養細胞の最適 pH は pH4.0 であり，またリン酸欠乏にも耐性であることが明らかになり，それらはアルミニウムの生育亢進性機構に関与することが示唆された。また，酸性条件 <sup>26</sup>Al を添加した際に，培養細胞に取り込まれる効率(2%)は水耕栽培に比べ非常に高かった (data not shown)。このことから，ルジグラス培養細胞は細胞内のアルミニウムの分子作用を理解するために適した実験系であると言えた。前述したように (I) 水耕栽培において葉細胞オルガネラに取り込まれた <sup>26</sup>Al を AMS で測定した<sup>6)</sup>。さらに本研究ではいくつかのアルミニウムと蛋白質の複合体を

検出した。それら複合体の分析ができていないが、酸性/アルミニウムストレス下の植物細胞にアルミニウム蛋白質が存在する報告としてはこれが初めてである。

### 1 1 . 今後の展開

アルミニウムストレス下における植物応答研究に、新しく  $^{26}\text{Al}$  を利用することができ、またそれは超高感度 ( $10^8$  原子レベル) で AMS 分析できる。さらには、細胞内オルガネラや分子レベルでの分析できることが示されたこと、アルミニウム毒性の生体内機作や、アルミニウム耐性機構が生化学的に発展すると考えられる。しかし、現在のところわが国では AMS 分析は東京大学原子力総合研究センターの大型装置でのみ可能である。現在開発中の小型 AMS の普及によりその利便性が高まることが本研究にとって不可欠である。今後はアルミニウムと複合体を形成する蛋白質の分析を進める予定である。一方、これまでのアルミニウムストレス応答研究はアルミニウム毒性応答を対象としていたが、本研究では好アルミニウム植物、ルジグラスを用いて、これまでに類のない植物の生育を亢進するアルミニウムストレス応答研究の基礎的知見を得ることができた。このことは、動物では見られず、また植物では分子進化に関連することが予想されることから、新しい研究分野としての発展が期待できる。

### 1 2 . 参考文献

1. Haug A: in Molecular aspects of aluminium toxicity, Crit Rev. Plant Sci. 1, CRC 345-373, 1984
2. FAO/Unesco: in Soil map of the world, 1:5,000,000, 2. Legend, Unesco Paris 1974
3. Baker J, et al., Nucl. Instr. and Metho., B68, 319-322, 1992
4. Foy C.D, Chaney R.L, White M.C. Ann. Rev. Plant Physio., 29 511-566, 1978
5. Kobayashi K, et al., Proc. Japan Acad., 66, Ser. B 189-192, 1990
6. Masaoka Y. et al., Nucl. Instr. and Metho., 1999 in press
7. Murashige T and Skoog F., Physiol Plant. 15 473-483
8. Arakawa Y. et al., Nucl. Instr. and Metho., 1999 in press
9. Foy C.D, Chaney R.L, White M.C., Ann. Rev. Plant Physio., 29 511-566, 1978
10. Kawahara M. et al., Biochem Biophys. Res. Commu 198 531-535, 1994
11. Kovhisn L.V., Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46 237-260, 1995

### 1 3 . 研究業績

#### 1 3 1 . 原著論文

1. A. Saito, Y. Masaoka, H. Matsuzaki, H. Nagai and K. Kobayashi Nucl. Instr. and Metho., 1999 in press

#### 1 3 2 . 総説 なし

#### 1 3 3 . 国際学会発表

1. A. Saito, Y. Masaoka, H. Matsuzaki, H. Nagai and K. Kobayashi  
The 8th Accelerator of Mass Spectrometer (AMS) conference, Viena 245-246 1999

2. A. Saito, Y. Masaoka, H. Matsuzaki, H. Nagai and K. Kobayashi  
Plant and Animal Genome VIII, SanDiego 2000

1 3 4. 国内学会発表

1 . 斎藤彰, 正岡淑邦, 小林紘一, 永井尚生, 荒川祐介, 宮崎力: 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 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 : II.Detection of molecular complexes with Al and protein in the cultured cell of an Al-preferable plant, *Brachiaria ruziziensis* using an accelerator of mass spectrometer
- (2) Research organization : Labo. of Plant Biotech. Kyushu National Agricultural Experiment Station (KNAES)
- (3) Reseacher : Akira Saito
- (4) Co-reseachers : Chikara Miyazaki ( JICST )  
Yoshikuni. Masaoka (KNAES)  
Koichi Kobayashi (University of Tokyo, MALT)

(5) 期間 Research periods : 1995-1999

(6) Abstract

In the acid soil (<pH5.5), aluminium (Al) stress inhibits the growth of most plants. As compared the relative degree of the inhibition in a cereal plant, the varieties can be characterized as either Al-tolerant or Al-sensitive ones. On the other hand, a pasture of ruzigrass cultivated in acid soil around sub-tropical areas, *Brachiaria ruziziensis*, can grow much better than in neutral soil. In this study, we established a suspension cell culture of the Al-preferable plant of ruzigrass to understand the mechanism of Al to promote the growth. The culture under various pH conditions revealed that the cell proliferation was enhanced by acid condition (pH 3.5-4.5) rather than by pH 5.8 suitable for general plant cell cultures. When <sup>26</sup>Al was added *in vitro* under acid condition (pH 4.0), and amount of <sup>26</sup>Al in the cell was measured by an accelerator of mass spectrometer (AMS), <sup>26</sup>Al ion was incorporated into the cell linearly up to 24 hours just after the addition of <sup>26</sup>Al. Additionally, we performed electrophoresis in native polyacrylamide gel (PAGE) for the water soluble protein fraction from the <sup>26</sup>Al incorporated cell and AMS-analysis of <sup>26</sup>Al for the thin slice of the gel. It showed that some proteins were associated with ultra trace of <sup>26</sup>Al (at level of 10<sup>-15</sup>g/gel slice). AMS for detection of an ultra trace of <sup>26</sup>Al in the ruzi grass cell should allow further study on mechanism of the biological function of Al in the plant.