

シロイヌナズナの根部酸性
ストレス障害機構の解明

1999年

岐阜大学大学院
総合農学研究所
生産物資源科学専攻
(岐阜大学)

戸 田 智 美

①

シロイヌナズナの根部酸性 ストレス障害機構の解明

戸 田 智 美

目次

序論	1 頁
第1章 水耕栽培法によるシロイヌナズナ幼植物の酸性ストレス 応答の解析	
1-1 緒言	8 頁
1-2 材料及び方法	10 頁
1-3 結果	16 頁
1-4 考察	27 頁
第2章 酸性土壌ストレスに対する耐性能の系統間差	
1-1 緒言	32 頁
1-2 材料及び方法	35 頁
1-3 結果	39 頁
1-4 考察	48 頁
第3章 シロイヌナズナ幼植物の根部酸性ストレス障害機構の解明	
3-1 緒言	54 頁
3-2 材料及び方法	56 頁
3-3 結果	58 頁
3-4 考察	68 頁
第4章 総合考察	75 頁
要約	81 頁
謝辞	82 頁
引用文献	83 頁

序論

急速な人口増加と、世界的規模での生活レベルの向上に伴う食糧供給の拡大により、近い将来深刻な食糧不足に見舞われることが予測される。しかしながら、食糧生産に有効な良質土壌は既に農耕地として利用しつくされており、今後、飛躍的な食糧増産のためには、耕作不適地とされている不良土壌を積極的に利用することが求められる。一般に、植物の生育が不良となる代表的な土壌として酸性土壌が挙げられる。酸性土壌は多雨地域を中心として全世界に広く分布しており、わが国をはじめとする東アジアの土壌も、その多くが酸性土壌に分類される。この酸性土壌は、現在、程度の差はあるものの利用可能な耕地面積の少なくとも30%に相当するといわれている（Foy 1983）。従って、このような酸性土壌を農耕地として有効に利用し、作物生産の効率をあげることができれば、今後の食糧生産に大きく貢献するであろうことは疑う余地がない（Sanchez et al. 1982）。

一方、産業活動の活発化に起因する酸性降下物の増加や、先進国が遂行する化学肥料の大量投与などによる、土壌生態系への影響が懸念されている。ここで深刻なのは、土壌が本来もっている緩衝能力を超えた酸性化が地球的規模で進行していることである。そのため、このような土壌を農耕地として利用するためには、植物の生産性の向上をはかると共に、環境改善に関わる何らかの対策を施す必要がある。

土壌の酸性化が進行すると、土壌中の交換性カチオンであるカルシウム（Ca）やマグネシウム（Mg）、カリウム（K）等が減少し、これに対し、本来溶解度が低いとされているアルミニウム（Al）やマンガン等の金属

イオンの可溶化が起こる。なかでも、元来土壌中に大量に存在し、固定されている Al が、土壌 pH の低下により可溶化すると、毒性をもった Al イオンが必然的に増加する。この Al イオンは、それ自体が強い毒性を示すと同時に (Foy et al. 1978)、特に土壌中のリン酸と結合して、土壌中の可溶性リン酸量を減少させ、植物をいわゆるリン酸欠乏状態に陥らせる (Hewitt and Smith 1975, Leaver and Russele 1957)。このようなことから、酸性土壌における作物の収量低下は、酸性条件下で可溶化される Al が最大の要因であると考えられる (Foy et al. 1978)。

Al 毒性を軽減するための解決策として、土壌中和を目的とした多量の石灰投与による大規模な土壌改良が挙げられる。しかしながら、現実的には、経済的な理由から困難であったり、塩類集積などの新たな土壌問題を引き起こす可能性があるなど、全面的な土壌ストレス問題の解決には至っていない。むしろ、安定で持続可能な農業の実施には、ストレス条件下での生育が可能な耐性種の選抜や作出、更には、導入する植物種の酸性土壌ストレスに対する抵抗性を強化していくことが望ましいと考えられる。このような背景から、酸性土壌を耕地として有効に利用するためには、酸性土壌における主要なストレス因子である Al イオンに対して抵抗性を有する植物の投入が期待され、これまでに Al イオンストレス耐性品種の選抜が各種作物で試みられてきた (Rhue and Grogan 1977, Foy 1983, Conner and Meredith 1985a)。

Al イオン耐性系統の一般的な選抜法としては、従来の育種的手法が適用されてきた。その方法は、選抜に供試する母集団を、Al 毒性が問題となる土壌でスクリーニングし、良好な生育を示した個体を、耐性系統の候補として選抜し、これより後代系統を獲得する。さらに、これらを水耕

法などにより A 1 イオンに対する耐性検定を行い、耐性が認められた系統については 純系を獲得する方法である。しかしながら、このような特定の土壌を用いた方法で選抜を行い、実際に有効な A 1 耐性品種が得られた例は際めて少ない。その原因として次のようなことが考えられる。まず、特定の圃場を用いるために、その土壌に固有のストレスや大きく変動する外的要因が植物の生育に影響を及ぼし、真の A 1 耐性植物が選抜される可能性が引き下げられる (Taylor 1991)。また、栽培に広大な敷地を必要とし、処理可能な作物種並びに個体数が限られることも、有効な耐性品種の選抜を困難にしている原因であると考えられる (Conner and Meredith 1985a)。従って、個体レベルで一応の結果は得られるものの、正当な A 1 耐性系統の作出は困難であり、これに変わる有効な選抜法の確立が強く望まれている。

そこで導入されたのが、培養細胞を用いた実験室レベルでの選抜である。この手法では、上記のような個体レベルの選抜にともなう問題を概ね解決した。なかでも、1) 培養細胞を用いるため、多量の母集団を選抜に供試でき (Widholm 1976)、2) 簡便に変異誘発処理が行えるため、効率的に強い耐性を示す変異体を獲得しやすく (Flashman and Filner 1978)、3) 化学組成の明確な培地を用いるため、目的とするストレスのみを厳密に設定することが可能である、等の利点があり、効果的な選抜系を組む際に有効であると考えられる。実際、培養細胞系では酸性土壌における A 1 イオン毒性を想定した選抜条件の設定が可能となった (Ojima and Ohira 1983, Conner and Meredith 1984)。

このような培養細胞を用いた A 1 イオンに対する選抜では、まず、選抜培地の組成と A 1 イオン毒性の関係について十分に吟味し、栽培期間中

の Al イオンストレスを維持することが重要であった (Conner and Meredith 1985a). Conner and Meredith (1985b) は、培地中のリン酸及び Ca 濃度をできるだけ下げ、pH を低く設定し、培地中に添加されたすべての Al が可溶化した Al イオンストレス培地を確立した。さらに、Conner and Meredith (1984) は培地を十分に吸湿させたポリウレタン上で培養細胞を培養することにより、簡便に培地を更新する方法も考案した。その後、このような手法がニンジン並びにタバコ培養細胞に適用され、両植物種から Al 耐性培養細胞が選抜され、さらに Al 耐性を示す再分化個体が作出された (Conner and Meredith 1985c, Arihara et al. 1991). 獲得された再分化個体の交配実験の結果からは、Al イオン耐性が単一の遺伝子に支配されている形質であることが報告された (Arihara et al. 1991). 従って、同様な手法を、農業上有用な作物種に適応すれば、実用的な酸性土壌ストレス耐性植物の作出が可能であると考えられる。しかしながら、実際のところ、1) 主要な穀物種であるイネ科植物では、ストレス選抜に適した培養細胞が得にくい、2) 培養細胞の選抜では長期的な培養による淘汰が起因する選抜法であるため、栽培期間中に植物細胞が再分化能力を喪失する、などの問題もあり、現状ではそのまま応用することは難しい (Juretic and Jelaska 1991). しかし、Al 耐性は何らかの変異をともなう遺伝形質であり、単一の遺伝子にコードされている可能性が高い。従って、Al 耐性に関与する遺伝子を単離し、遺伝子導入を行う、いわゆる分子育種的手法が適用可能であると考えられる。

近年になって、遺伝子の単離や導入に関する諸技術が飛躍的に進歩し、植物の抵抗性を強化する手段として、分子育種が実現可能な段階に入った。この手法では、耐性を支配する遺伝子を特定・単離し、遺伝子導入などに

よる遺伝子の発現制御および耐性形質の付与を行い、植物の耐性を強化することが理論的に可能である。このような分子育種によるアプローチでは、耐性を支配する遺伝子の特定・単離は勿論のこと、導入した遺伝子により目的とする形質のみに変異を持たせることが極めて有効となる。今後は、単離された遺伝子が実際に A1 耐性を支配するか否かを、形質転換システムを用いて解析する段階に入ることが予想される。その際、あらかじめ遺伝子を導入する宿主植物の A1 に対する感受性を評価しておくことが重要となる。しかしながら、分子生物学上の有力な宿主となる植物種で、A1 ストレスに対する応答を正しく評価した報告はそれほど多くはない (Koyama et al. 1995, Larsen et al. 1996)。そこで本研究では、変異体の単離や遺伝子の解析が容易であることから、高等植物の分子生物学で最も広く用いられているシロイヌナズナ植物に着目し、本植物種の A1 に対する応答を調べると同時に、A1 耐性変異体の作出を試みた。

現代の植物研究において、シロイヌナズナが注目されるようになった背景には、本植物が次のような、モデル植物に有利な特徴を持つことが挙げられる。1) ゲノムサイズが小さく、反復配列も少ないことから染色体の遺伝子マップが完成している、2) 突然変異体の作出が簡便で、多様な変異をもつ系統が獲得できる、3) 形質転換法が確立しており、導入遺伝子の解析が比較的容易かつ迅速に行える、4) 植物体が小さく、栽培が実験室レベルで行えるため、選抜に多量の母集団を供試できる、5) 世代時間が短いため、望みの変異体を比較的短時間で獲得することができるなど、いわゆる分子生物学的アプローチに適した多くの特性を持つ。しかしながらその反面、種子並びに幼植物体が極めて小さく、植物の栄養生理の研究に必要な水耕栽培による実験が困難であるという、マイナスの性質も併せ

持つ。本研究に着手した時点では、シロイヌナズナを水耕で栽培した報告は皆無であり、その後、いくつかの研究グループにより水耕栽培法が報告されたが、いずれも完熟植物を対象にした栽培法であった(Ernst et al. 1991, Hirai et al. 1993, Gibeaut et al. 1997)。従って、本植物種のA1耐性応答を評価する前提として、A1耐性評価に有効な幼植物のための水耕栽培法を考案することが望ましいと考えられた。

本研究では、シロイヌナズナの酸性土壌ストレスに対する感受性を調べ、モデル実験系の構築を目指すために、以下の項目について検討した。

1) A1耐性に関する研究で必須の水耕栽培法を独自に開発し、シロイヌナズナ幼植物の根長を指標とした酸性ストレスに対する感受性の評価を行った。その際、通常のA1ストレス応答に関する研究ではあまり考慮されない、水素イオン毒性についても調査し、両ストレスに対する感受性を個別に解析した。

2) 上述の水耕栽培法を駆使し、A1耐性シロイヌナズナの作出を試みた。選抜した系統のA1イオンに対する耐性を種子後代で調査し、選抜した系統が持つ耐性特性の解明を目指した。一連のストレス選抜技術の農業への貢献を考慮した場合、これまでに実験室レベルでA1耐性植物を選抜し、獲得した耐性系統が実際の土壌で有意なストレス耐性を示すことを実証した報告が見当たらないことは、重要な問題であると考えられる。そこで水耕栽培における耐性形質の発現が、実際の酸性土壌で再現されるか否かを調査し、水耕栽培系による選抜法の有効性について吟味した。

3) 酸性土壌においては、A1イオンと水素イオン毒性が植物の根伸長を直接的に阻害する可能性が考えられることから、両ストレスによる根部障害機構のモデル化を目的とした、根伸長阻害メカニズムの解明を試みた。尚、本論文では酸性土壌で推定される植物毒性のうち、A1イオン

並びに水素イオン（低 pH）毒の両者を，酸性ストレスと定義した。

第1章 シロイヌナズナ幼植物の酸性ストレス応答の解析

1-1. 緒言

シロイヌナズナのA1耐性を評価することは、本植物種がA1耐性遺伝子を導入する宿主として、適当であるか否かを決定する際の有力な判断材料となる。一般に、A1イオンに対する耐性評価は、A1障害が主に植物の根端で顕著に現れることから、細胞分裂や細胞伸長を反映した根伸長を指標とした方法が採用されている。一方、シロイヌナズナは突然変異体が容易に単離でき、遺伝解析に有利であるという特性から、栄養要求性(Cao et al 1993, Masucci and Schiefelbein 1994)や根部形態に関する多数の変異体が単離され(Okada and Shimura 1990, Schiefelbein and Somerville 1990, Baskin et al. 1992)、根部の生育や形態を指標とした解析が盛んに行われている。従って、シロイヌナズナにおいても、根部の生育を指標としてA1耐性を評価することが可能であると考えられる。これまでのところ、シロイヌナズナの根部に関する研究では、植物体の小ささと根部の繊細さのために一般に固形培地が用いられている(Okada and Shimura 1990, Simmons et al. 1995)。しかしながら、固形培地では、pHや栄養塩濃度などの制御が困難であると考えられる。特にA1イオンの場合、固形培地による栽培系では、ストレス因子が栽培過程で変化するため、不適当であることが報告されている(Conner and Meredith 1984, 1985b)。例えば、溶液中のA1イオンの形態は、溶液中の水素イオンの濃度によって容易に変

化するだけでなく (Foy 1983, Kinraide et al. 1992), 同じ pH でも塩基の共存により, 重合度が異なる様々なポリマー状 A1 を形成し (Wagatsuma and Ezoe 1985, Tanaka et al. 1987), 共存する他の元素と反応して様々な錯体を形成する (Hue et al. 1986). このような A1 の化学的形態変化の起こりやすさを考慮し, A1 イオンストレスに対する植物の生育応答を調べる際には, A1 の形態や濃度を正確に把握することが可能な, 水耕栽培による実験系を用いることが望ましい. 従って, 本章で用いる水耕栽培では, 上記のような A1 の溶液化学に配慮し, 1) 一次根の生育に必要な CaCl_2 のみを添加した単純な水耕液を用い, 2) A1 の化学的形態に影響しない実験材料を使用し, 3) 植物に影響のない pH 領域で, 水耕液を毎日更新することにより培地 pH の維持に努めた.

ところで, これまでに A1 耐性に関する研究は, 農業上価値の高い, イネ, コムギ, トウモロコシなどで多数報告があるものの, A1 耐性機構について統一的な見解が得られるまでには至っていない (Aniol 1984). その理由として, 用いる植物種や品種によってその耐性程度や耐性機構が著しく異なることや, A1 毒性が他の元素による影響を受けて容易に変化することなどが挙げられる. また, 研究者によって異なる実験条件が, 結果から推定される諸仮説の統一化を妨げる一因となっている可能性も否定できない. 従って, 既報の A1 ストレス応答に関する現象を実証するためには, まずモデル植物による統括的な実験系の組み立てが必要であると考えられる.

本研究で用いるシロイヌナズナは, 分子生物学的なアプローチをとりやすいことから, 現代の植物研究において最も注目を集めている高等植物のモデル植物のひとつである. しかしながら, シロイヌナズナは植物体自

身と種子の小ささのために取り扱いが困難であり、A1実験で有効な幼植物のための水耕栽培法が確立されていない。これまでのところ、シロイヌナズナを水耕栽培する方法が Ernst et al. (1991), Hirai et al. (1993) 及び Gibeaut et al. (1997) など、複数の研究グループにより考案されている。しかしながら、これらの方法は、成熟植物の生育には適しているものの、植物体をロックウールなどで支持するため、A1耐性を評価するために有力であると考えられる、幼植物体根部の直接的な観察には不向きである。そこで、本章では、シロイヌナズナ幼植物体の栽培に適した2つの水耕栽培法を考案し、それぞれの栽培法の長所並びに短所を考慮した実験系の確立を第1の目的とした。さらに、これらの水耕栽培法を駆使し、酸性土壌ストレス因子であるA1イオンと水素イオンに対する、シロイヌナズナの応答を明らかにすることを第2の目的とした。

1-2. 材料および方法

水耕栽培装置の概要並びに根長の測定法

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の代表的な系統である Landsberg (Ler) の種子は、あらかじめ蒸留水に浸漬し、浮遊した種子を未熟種子として排除した。種子は栽培中の微生物繁殖を抑制するために、0.5% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液で5分間滅菌し、蒸留水で十分に洗浄した。尚、すべての栽培において、幼植物の発芽勢を揃えるために、種子滅菌後2日間、4℃にて吸水処理を行った。

発芽処理を行った種子は、カバーガラス[18×18 (mm) : Matsunami

Glass, Japan]を接着して段差をつけたスライドグラス[76×26 (mm): Matsunami Glass, Japan]上に播種し、ナイロンメッシュ(100 mesh)で覆い固定した(Figure 1A)。この水耕栽培装置を2枚ずつ培養ポット[8.3cm(φ)×3cm(H)]中に垂直に固定し、水耕液 130ml に対し種子を約 30 粒播種した(Figure 1B)。特に示さない限り、幼植物の生育は一次根の根長を指標とし、後述の栽培条件下で一定期間栽培後、顕微鏡下(Model BH-2, Olympus, Japan)でメッシュの数を数えることにより直接測定した(Figure 1A)。尚、使用したナイロンメッシュは、顕微鏡下で対物ミクロメーターを使用して測定したところ、目幅 230 μm であり、根長は必要に応じて mm 単位に換算した。また、栽培は 25℃ に設定した培養室内で行い、植物用の蛍光灯下(2000lux)で 12 時間照射した。

初期生育における Ca の影響

まず、根生長に重要な役割を果たす Ca イオンの影響を水耕条件下で検討した。溶液は CaCl₂ を終濃度が 0~400 μM となるように蒸留水に添加し、pH を HCl で 5.0 に調整した。

A1 イオンストレス及び水素イオンストレス条件の設定

幼植物の根伸長を指標として、水素イオンと A1 イオンの毒性を個別に評価することに重点をおいた。そのため溶液には、A1 イオンとの反応や pH 変動に大きく関与するような栄養塩を加えず、CaCl₂、AlCl₃ 及び pH 調節のための HCl のみを添加した極めて単純な組成のものをを用いた。

まず、A1 ストレスに対する根の生育応答を調べるために、固形培地を用いた栽培法と前述の水耕栽培法による A1 イオンストレス試験を行っ

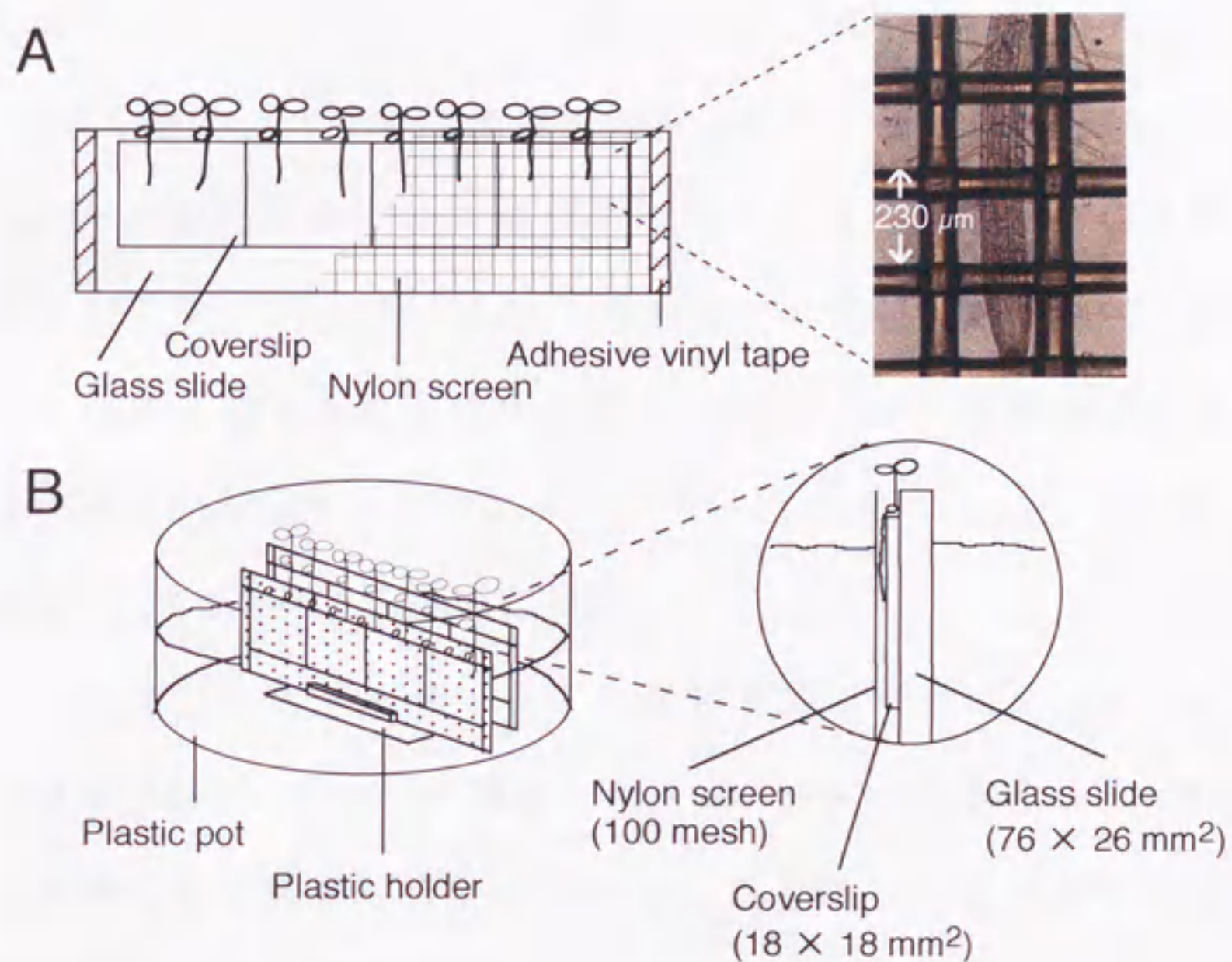


Figure 1. Culture apparatus for culturing young seedling of *A. thaliana* in hydroponic culture. About 15 seeds were put on the top edge of cover glasses and root length was measured with a microscope (A). Two slide glasses were placed vertically in a plastic pot (B).

た、 AlCl_3 を添加した固形培地は、 $100\ \mu\text{M}$ の CaCl_2 を含む 0.4% アガロース培地を pH 5.0 に調整後、オートクレーブ滅菌し (121°C , 20 分), 別に濾過滅菌した A 1 ストック溶液 ($1\text{mM}\ \text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) を所定濃度添加して調製した。固形培地による栽培は、概ね Okada 等の栽培法を適用し (Okada and Shimura, 1990), 角型シャーレ [FALCON, 1012, $10 \times 10\ (\text{cm})$] に培地 15 ml を流し込み、十分にゲル化した後、根が培地の表面をはって生育するようにシャーレを垂直に立てかけた。根長は固形培地上に蒸留水で湿らせたナイロンメッシュ (100 mesh) を被せ、水耕栽培装置同様、顕微鏡下でメッシュの数を数えることにより算出した。一方、水耕栽培法に用いる A 1 水溶液は、 CaCl_2 を添加後、A 1 ストック溶液 ($1\text{mM}\ \text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) を適宜加え、pH を HCl で 5.0 に調整した。

また根伸長に及ぼす水素イオンの影響を調べるため、 $100\ \mu\text{M}\ \text{CaCl}_2$ 溶液を作製し、HCl で pH を調整した。尚、pH の上昇やそれに伴う A 1 イオンの形態変化に配慮して、水耕液は毎日更新し、根長は 4 日目の幼植物を用いて顕微鏡下で測定した。

新規水耕栽培システムによる植物の生育並びに根長測定法

A 1 イオン並びに水素イオンによる毒性を、短時間の根伸長並びに形態観察により評価するため、前述の根部を固定した栽培法に変わる新たな栽培法の開発が必要であった。本法は、根部に栽培中の物理的負荷が掛かりにくく、より長期にわたって健全な植物体を維持できる点にポイントがある。

新規に考案した水耕栽培法は、A 1 や溶液の組成に影響を与えないプラスチック製のスライド用マウント [富士フィルム, $50 \times 50\ (\text{mm})$] とナイロ

ンメッシュ (50mesh) のみを用い、植物体の固定のために、ナイロンメッシュをスライドマウントに挿入したものを作成した。前述の手順に従って、滅菌並びに低温吸水処理を行った種子は、蒸留水で懸濁しながらパスツールピペットで約 40 粒ずつナイロンメッシュ上に播種した。メッシュ上の種子を爪楊枝で適当な間隔に広げた後、スライドマウントごと水耕液中に静かに浮かべた (Figure 2)。前培養は、培地 100ml を分注した培養ポット [8.8cm(φ)×3.9cm(H)] 中で行い、特に明記しない限り、Fujiwara et al. が考案した MGRL 培地 (Fujiwara et al. 1992) を 1/10 強度で、pH を 5.5 に調整して用いた。根長測定は植物体をメッシュから静かに引き抜き、根の観察が直接可能な計測ユニット (MC-300, Kenis, Tokyo) 並びに顕微鏡 (PICO-ZOOM, Kenis) を用いて行った。尚、メッシュによって根表面が損傷を受けないように、使用するメッシュの目幅が種子粒径よりも若干小さく、根径より大きくなるように配慮した。栽培装置に用いた材料はすべてオートクレーブ滅菌が可能であり、長期的栽培を行う際には、微生物の繁殖を抑えるために予め滅菌した装置を用いた。

根部の形態観察並びに伸長速度の測定

あらかじめ上述の栽培法で生育させた植物体は、根を傷つけないように A1 溶液あるいは低 pH 溶液に移し、所定時間、25℃で培養した。処理開始後、数時間の幼植物を Jones and Senft (1985) の手法に従って、FDA-PI により染色した。ただし、FDA (Fluorescein diacetate: 5 μg/ml) と PI (Propidium iodide: 35 μg/ml) の染色時間をそれぞれ 3 分から 5 秒、10 分から 1 分に改変し、染色した植物体は、蛍光顕微鏡 (Model: IMT-2-21-RFL, IMT-2-DMB for dichroic mirror, Olympus, Japan) で観察した。

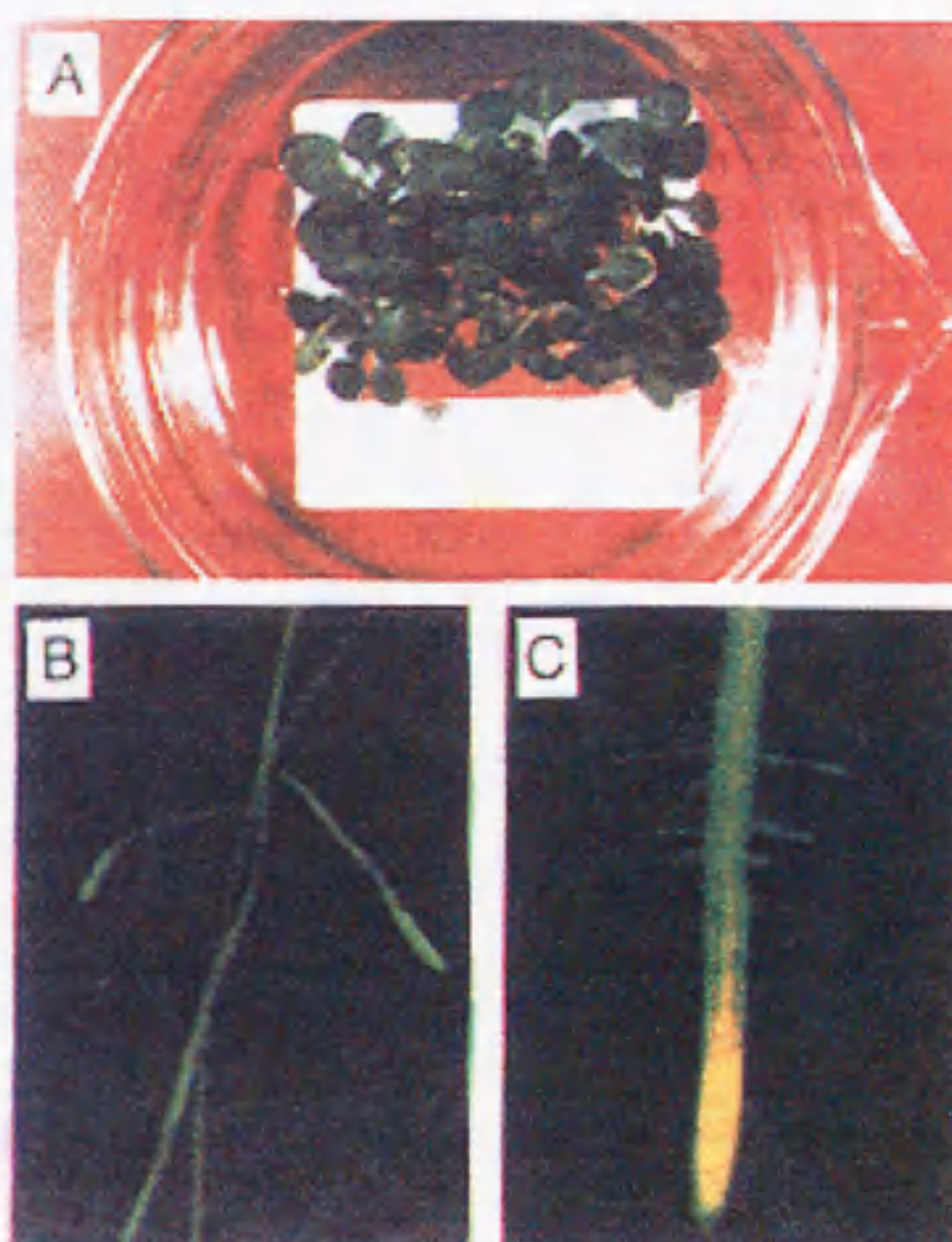


Figure 2. A new hydroponic culture system for seedlings of *A. thaliana* with highly viable roots. (A) Six-weeks-old plants grown in the solution containing 1/10 strength of MGRL nutrient. The roots well-developed (B) and primary root tip with root hairs(C)were stained with FDA-PI. The viable cells showed green fluorescence due to FDA.

一方、ストレスによる根の伸長阻害を調べるため、4日間前培養した植物体を6穴のマイクロプレート(Sumilon MS-80060, Sumitomo Bakelite, Tokyo)に一個体ずつ移植し、3時間ストレス処理を行った。A1並びに低pH溶液を1ウェルあたり5mlずつ分注し、根長を測定する際は、植物体をカバーガラス(21×21mm)で覆い、溶液中に沈めて固定した。植物体はマイクロプレートごと顕微鏡ビデオカメラ下(PICO-ZOOM, Kenis, Tokyo)にセットし、根長は計測メジャーユニット(MC-300, Kenis, Tokyo)を用いて直接測定した。

1-3. 結果

水耕栽培法による幼植物の初期生育

ここで用いた栽培法では、植物体をスライドガラス(水耕栽培装置)に固定したまま根長を測定することが可能であり、同一個体の伸長を経時的に測定することができた(Figure 3)。また、根長は通常の光学顕微鏡下で直接測定することができるため、特別な器具を必要とせず、根長測定は非常に簡便に行うことが可能である。あらかじめ低温吸水処理を施したシロイヌナズナ種子を、 CaCl_2 のみを含む単純な水耕液中に移植し、生育を経時的に観察したところ、播種後約2日で同調的に発芽し、4日目まではほぼ一定速度で順調に伸長を続けた。このことから、シロイヌナズナは少なくとも4日間は種子栄養のみで生育が可能であることがわかった。また、一次根の伸長速度が低下する4日目以降は、次第に一次根の伸長差が顕著になり、二次根の発育も確認された。従って本植物種の場合、A1耐性を

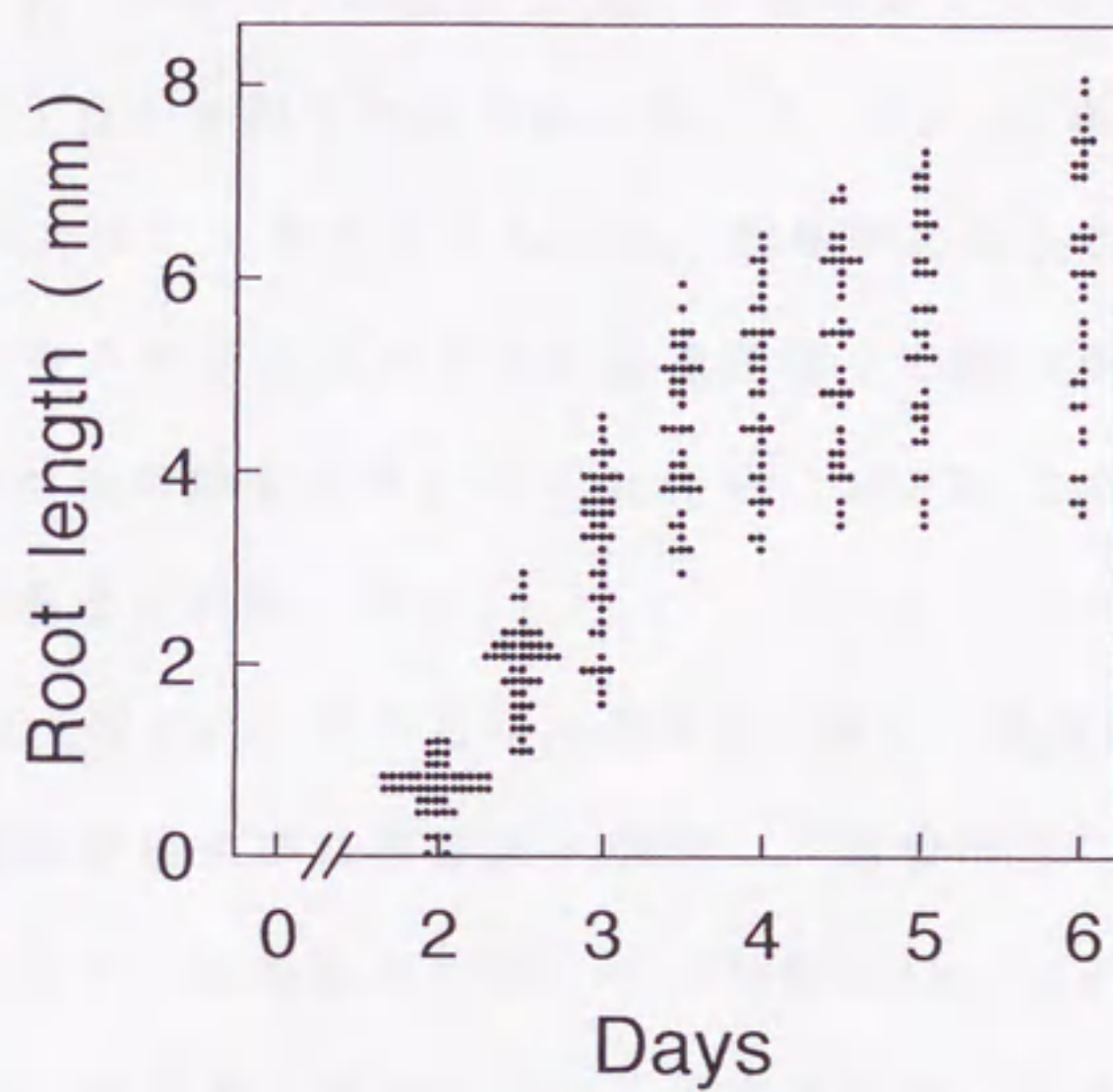


Figure 3. Root elongation of *A. thaliana* grown in hydroponic culture. The seeds were grown in the solution containing 100 μM CaCl_2 at pH 5.0. Each dot corresponds to individual seedling.

評価する場合のように，一次根の伸長を指標とする実験系では，4日をめどに評価を行うことが望ましいと判断した．

まず，酸性ストレス（本論文では， Al^{3+} イオンストレス並びに水素イオンストレスの両者を指すことにする）実験に先立ち，植物の生育に重要な役割を果たす Ca の影響を調べた（Figure 4）．その結果，一次根は比較的低濃度の Ca 存在下（ $50\ \mu\text{M}$ 添加）で最も良く生育し， $400\ \mu\text{M}$ 添加区ではかえって生育が抑制される傾向にあった． $100\ \mu\text{M}$ 添加区の根伸長は $50\ \mu\text{M}$ のそれに比較して若干劣るものの，個体間の伸長差が最も小さく，このことは後述のストレスに対する応答を評価する際の重要なポイントであると考え，幼植物の伸長試験には CaCl_2 を $100\ \mu\text{M}$ となるように添加することが妥当であると判断した．

次に， $100\ \mu\text{M}$ CaCl_2 を含む基本溶液に，様々な濃度になるように AlCl_3 を添加した固形培地並びに水耕液を調製し，両栽培法における幼植物の Al ストレスに対する応答性を比較した（Table 1）．いずれの栽培法でも，根伸長は AlCl_3 添加量の増加に伴って阻害された．しかしながら，その阻害程度は著しく異なり，水耕栽培における根の伸長は，僅か $2.5\ \mu\text{M}$ Al 存在下で 80% 以上， $10\ \mu\text{M}$ 添加区では完全に阻害された．これに対し固形培地では， $10\ \mu\text{M}$ 存在下でも 75% の根伸長を維持していた．このことから，水耕栽培法では，従来の固形培地を用いる場合に比較して， Al ストレスによる生育応答が顕著に現れることが分かった．

酸性ストレス条件下での生育レスポンス

シロイヌナズナ幼植物の pH に対する応答は，pH4.5～5.5 の範囲で4日目の根伸長を指標として評価した（Figure 5）．その結果，pH5.0 並びに

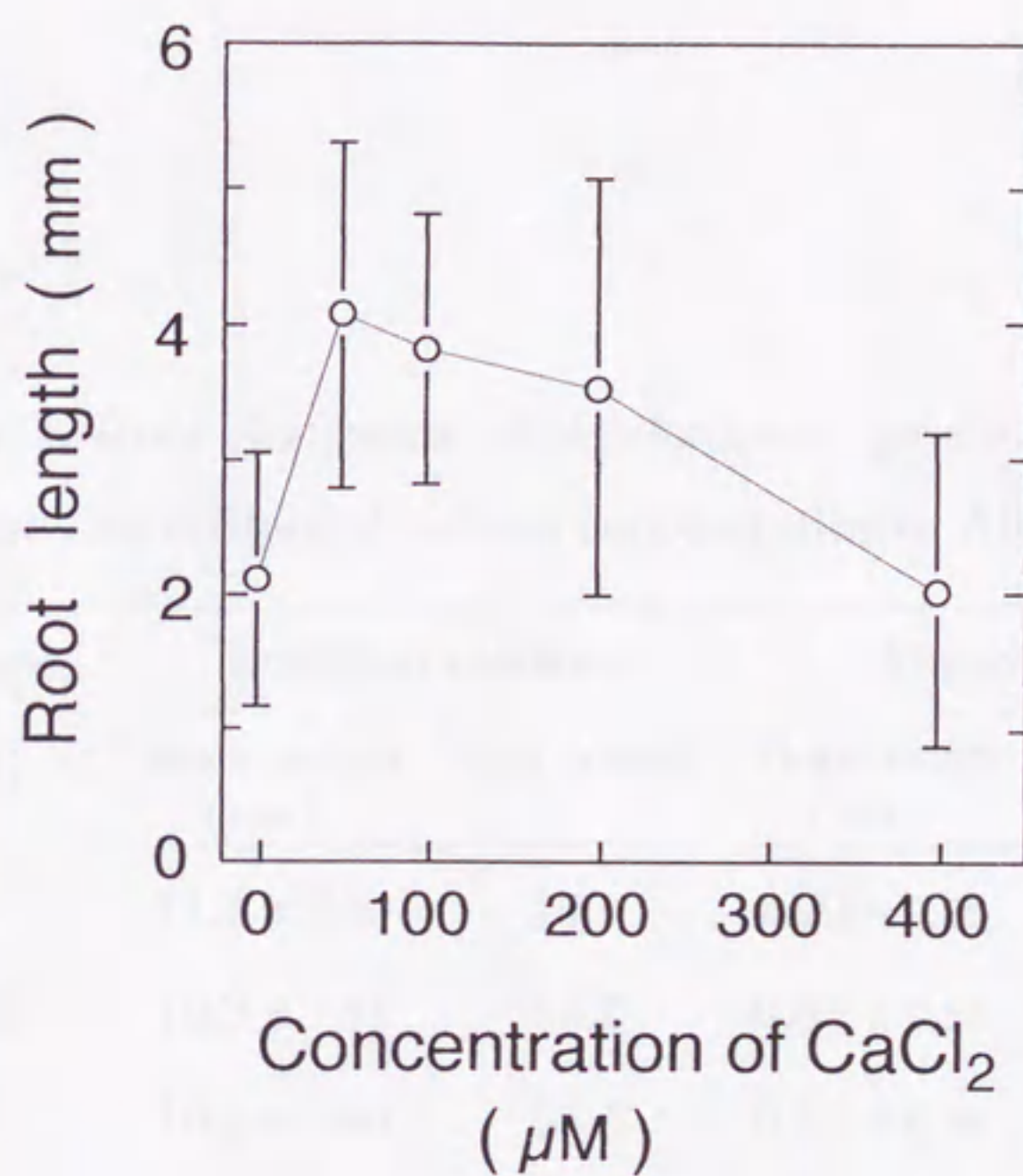


Figure 4. Effect of the increasing concentration of Ca on root elongation of *A. thaliana*. Seedlings were cultured for 4 days in solution containing various concentration of CaCl_2 at pH 5.0. Means \pm SD are indicated. (n=30)

Table 1. Root-elongation of *A. thaliana* grown in different medium that contained various concentration of AlCl_3 .

Al conc. (μM)	Solidified medium		Liquid medium	
	Root length (mm)	% of control	Root length (mm)	% of control
0	11.7 ± 2.20	100	4.90 ± 0.85	100
2.5	10.3 ± 1.51	88.0	0.85 ± 0.35	17.3
5	10.0 ± 1.40	85.5	0.59 ± 0.18	12.0
10	8.6 ± 2.07	73.5	0.35 ± 0.09	7.1

Means \pm SD are indicated. (n > 30)

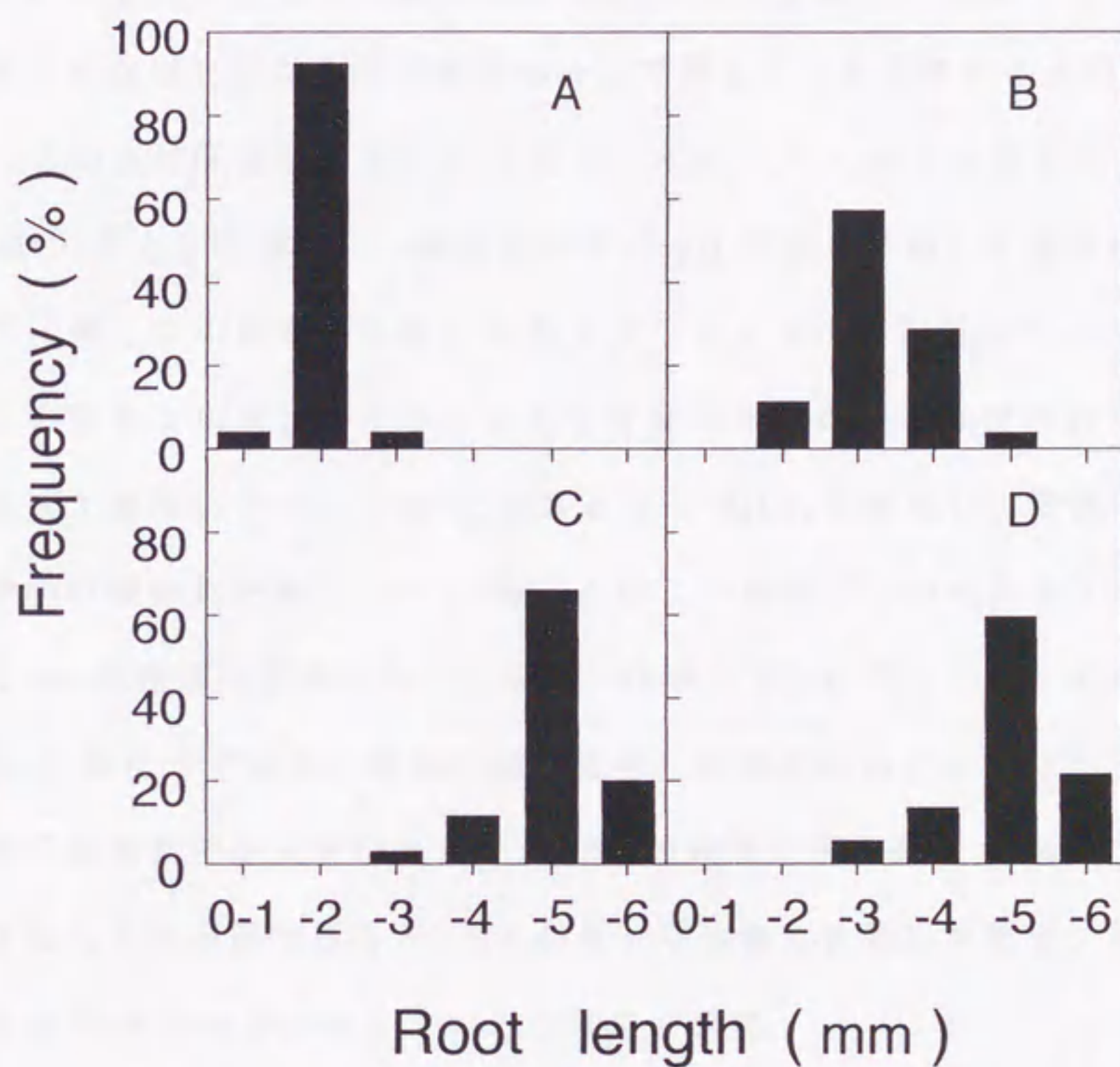


Figure 5. Frequency distribution of root elongation of *A. thaliana* grown in the solution containing $100\mu\text{M}$ CaCl_2 at various pHs. The value of pH was as follows: A 4.5, B 4.8, C 5.0, D 5.5.

5.5 では 4 mm 以上伸長した個体が全体の 90% 以上を占めたが、pH4.8 では 10% 未満に限定され、さらに低い pH4.5 に至っては 2 mm 以下の個体が 95% 以上を占めた。このような低 pH による著しい根伸長阻害は、Al³⁺ イオンストレスを評価する際の溶液 pH の設定が際めて重要であり、最も注意を払わなければならない事項の一つであることを示唆するものである。

この点に配慮し、次に行った Al³⁺ イオンストレス実験では、初期 pH を HCl で 5.0 に調整し、栽培期間中の pH 変動を考慮して溶液は毎日更新した。尚、この設定条件は、水素イオンによる生育阻害がなく、添加した Al³⁺ の殆どが単量体のイオンとして存在しうる範囲と推定される。基本溶液に Al³⁺ 濃度が 0 ~ 2.5 μ M となるように AlCl₃ を添加し、播種後 4 日目の幼植物の根伸長を測定した (Figure 6)。一植株ずつの根長をプロットしたところ、根伸長は溶液中の Al³⁺ イオンが増加するに従って著しく阻害され、2.5 μ M 存在下では根の伸長はほぼ完全に阻害されることが分かった。供試植物の個体間差が大きいために、50% の阻害を引き起こす AlCl₃ 濃度を特定することは困難であるが、30 個体の平均値で比較した場合、1 μ M 存在下で約 50% の阻害が生じていると推定された。

新規水耕栽培法における根伸長の特徴

本研究で新たに考案した水耕栽培法 (Figure 2) を用いて栽培した幼植物は、蛍光灯下で 3 週間以上良好に生育した。さらに、この植物体をネットから静かに引き抜き、根部を FDA-PI で染色したところ、一次根並びに側根はすべて鮮やかな緑色を呈し、ナイロンネットなどとの接触による根表面細胞の損傷がないことが示された (Figure 2B, C)。

またシロイヌナズナ植物を、本栽培法と前述の水耕栽培法並びに固形

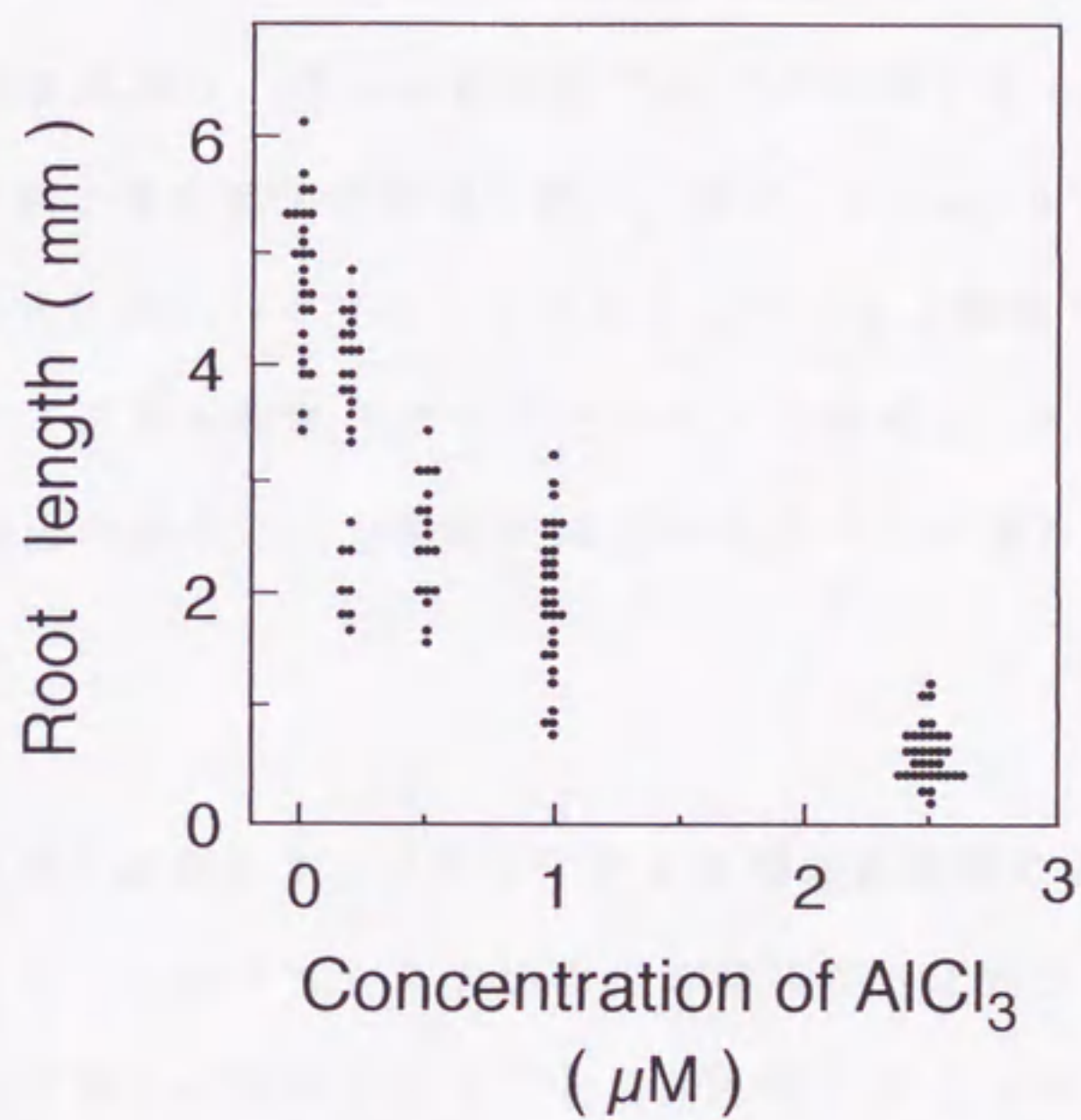


Figure 6. Root elongation of *A. thaliana* grown in the solution containing various concentration of AlCl₃. About 30 seedls were cultured for 4 days under hydroponic culture conditions. Each dot corresponds to individual seedling.

培地を用いて長期的に栽培し、根の生育を一次根の伸長量並びに一個体当たりの側根形成率を基準に比較した (Table 2)。一次根の伸長は、10 日目までは栽培法による差異がほとんど生じなかったが、15 日目には新規水耕栽培法で栽培した植物の根の伸長量が、他の栽培法のそれらと比較して2倍以上におよび、根伸長は栽培期間を通して高い同調率を示した。一個体当たりの側根形成率は、従来の栽培法では1本未満であったのに対し、新規栽培法では約7本の側根が形成された。また、Figure 2で示したように、これら側根は常に高いバイアビリティを有していると推測される。従って、植物のストレス応答を根部のバイアビリティを指標として評価する場合、新規水耕栽培法の適用により根部形成過程のすべての根が対象になりうると考えられる。

A1イオン並びに水素イオンストレスによる根伸長阻害における差異

前項までに、シロイヌナズナ植物根の伸長がA1並びに水素イオンストレスによって著しく阻害されることを示した。そこで両ストレスによる伸長阻害過程に差異があるのか否か、短時間のストレス応答を指標として調べた。幼植物は、あらかじめ障害が起きない水耕条件下で3日間栽培し、A1イオン或いは低pH溶液で処理し、処理開始後3時間の根の伸長をモニターした (Figure 7)。pH5.2のコントロール区の幼植物根は一定速度で伸長し、pH4.8の低pH溶液で処理した根は、はじめの3時間まではコントロールと同程度かそれ以上に伸長した。これに対し、 AlCl_3 1 μM 存在下での根の伸長阻害はわずか2時間で引き起こされ、それ以降はほとんど完全に伸長が停止した。

一方、両ストレスによる障害の差異は、健全な幼植物をストレス処理

Table 2. Root elongation and development of lateral roots in *A. thaliana* seedlings. Seedlings were grown for 10 days and 15 days. Number of the lateral roots were counted at 15 days-culture. Means \pm SD of 20 seedlings are shown.

Culture methods	Length of the primary roots (mm)		Number of lateral roots (number / plant)
	10d	15d	
Hydroponics ¹⁾	12.1 \pm 3.6	11.3 \pm 6.0	0.8 \pm 2.0
Hydroponics ²⁾	13.9 \pm 2.2	27.4 \pm 6.2	7.1 \pm 1.7
Solidified agar ³⁾	12.1 \pm 5.1	14.3 \pm 10.0	0.2 \pm 0.7

1) Hydroponic culture used in our previous report (Koyama et al., 1995) and 2) newly developed method were used. 3) The method reported by Okada and Shimura (1990).

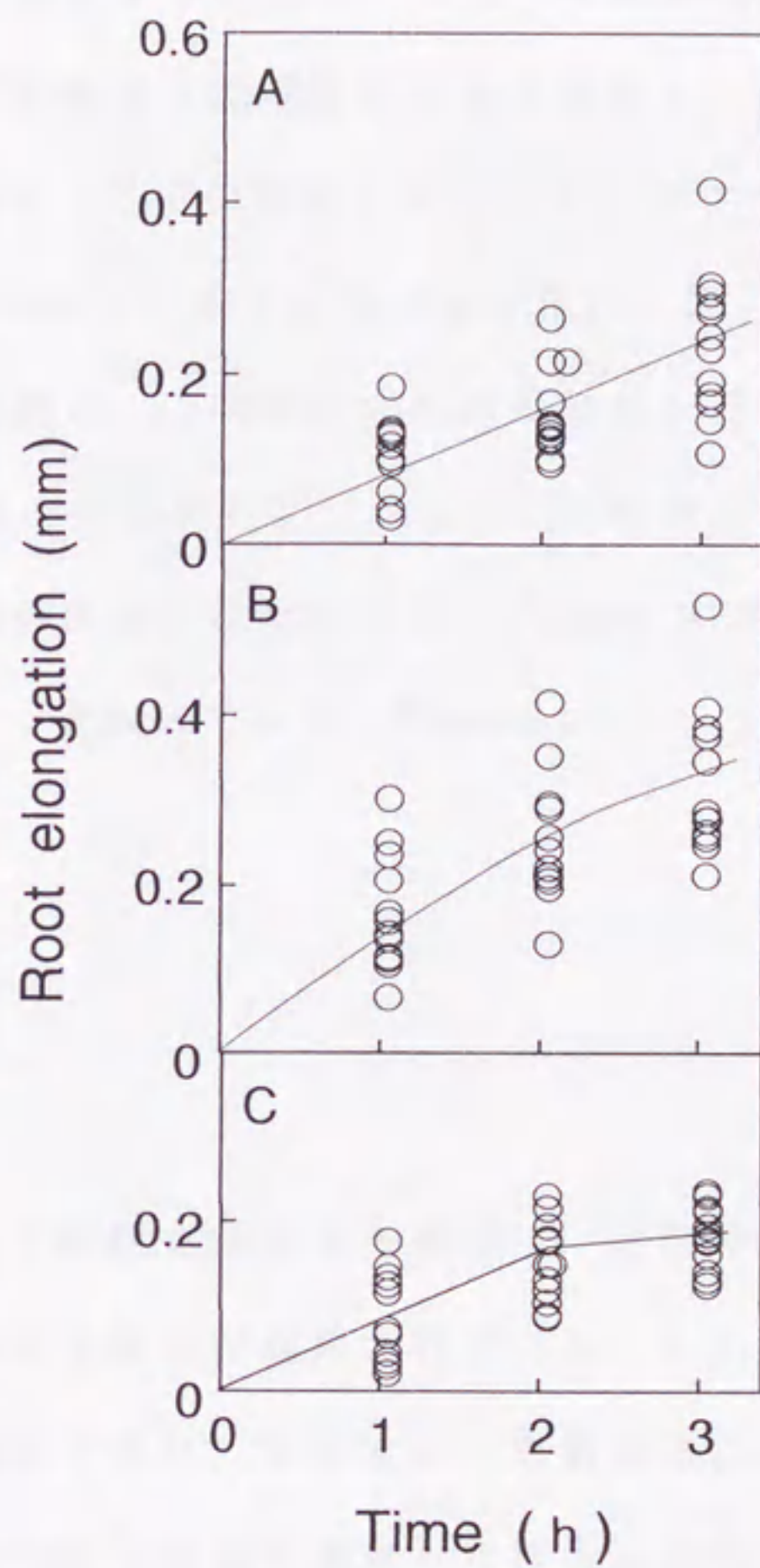


Figure 7. Time course of primary root elongation under different treatments. The seedlings were treated in the solution at pH 5.2 (control: A), at pH 4.8 (low pH: B) and with 1 μ M AlCl_3 at pH 5.0 (Al stress: C) contained 100 μ M CaCl_2 .

し、FDA-PI で染色した場合にも顕著に現れた。この方法は、細胞のバイアピリティを検定する手法の一つで、生細胞は明るい緑色の蛍光を示し、一方、不活性細胞及び死細胞は赤色を呈する。pH5.0 で処理したところ、12時間以内はすべての個体が高いバイアピリティを維持していた (Figure 8A)。しかしながら、低 pH 処理した根は、ほとんどの根が FDA による蛍光を喪失しており、1時間以内に伸長領域が赤く染色された (Figure 8B, C)。この結果とは対照的に、 $5\text{ }\mu\text{M}$ AlCl_3 存在下で処理した幼植物は、表皮細胞に膨潤が確認されたものの (Figure 8E)、少なくとも6時間は高いバイアピリティを保っていた (Figure 8D)。

1-4. 考察

一般に Al 耐性を評価する場合、一次根の伸長を指標とする実験では水耕栽培による実験法が適用されている。しかしながら、シロイヌナズナ幼植物体は微細であり、本章で示した栽培法以外に、幼植物を水耕条件下で栽培し、経時的に根長を測定した報告は見当たらない。また、Al イオン並びに水素イオンストレスに対する、シロイヌナズナ植物の生育応答を解析した報告も極めて少なく、本研究に着手した時点では、シロイヌナズナの Al ストレスに関連した報告は勿論のこと、両ストレスに対する応答を厳密に評価した報告は皆無であった。

Al 感受性を固形培地と水耕栽培で比較したところ、両者による阻害程度は著しく異なり、水耕栽培を用いた場合、Al による阻害がシャープに現れた。このような違いが生じた原因として、培地中の Al の局在と根

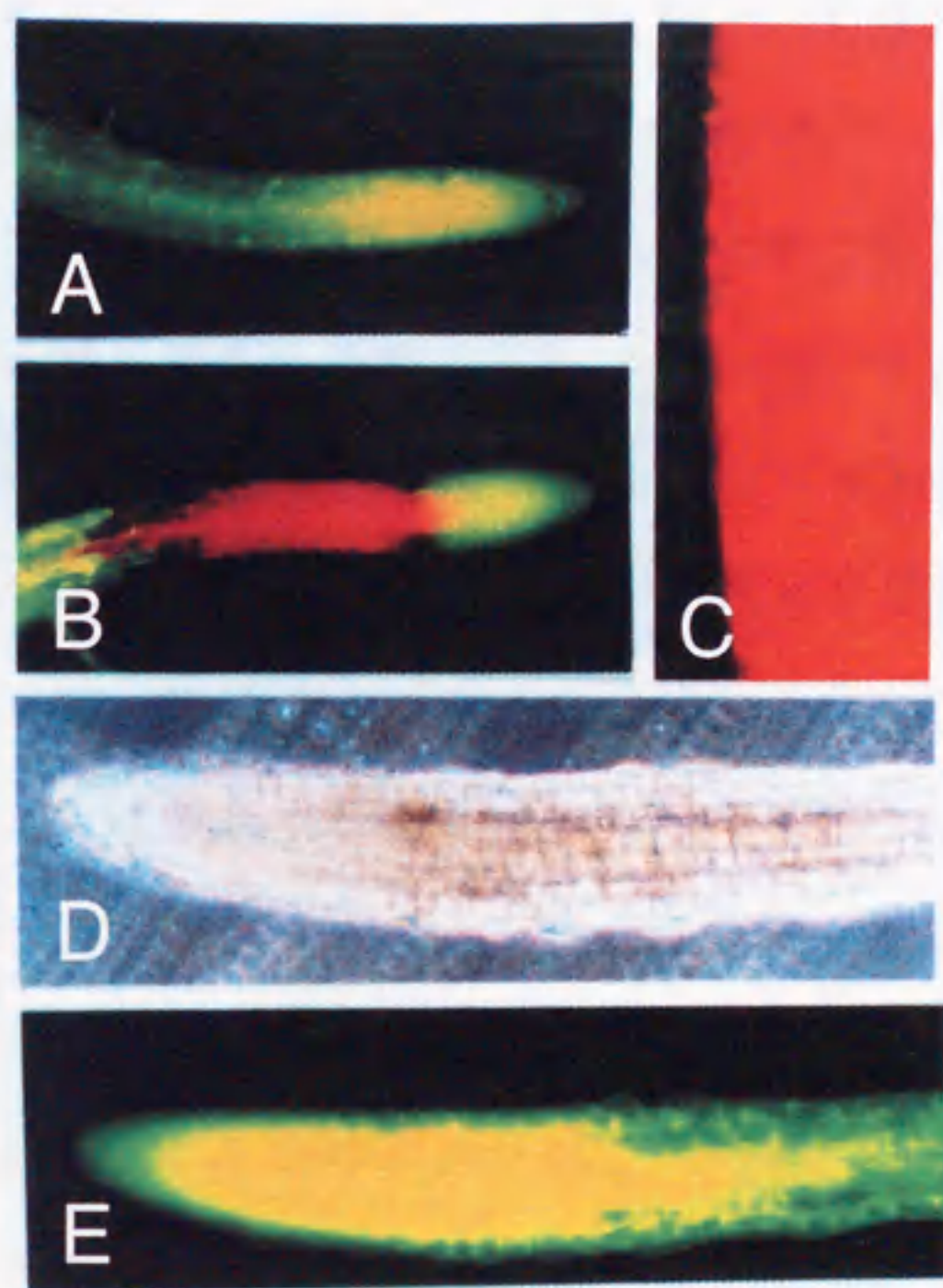


Figure 8. Fluorescence microscope observation of root of *A. thaliana*. The FDA-PI staining was carried out according to the method of Jones and Senft (1985). The roots of seedlings were incubated in the basal solution for 20 h at pH 5.0 (A). Seedlings were incubated in the solution for 2 h at pH 4.5 (B,C). Optical microscopical (D) and fluorescent-microscopic (E) images of seedlings that were incubated in the solution contained $2.5\mu\text{M}$ AlCl_3 for 5 h.

と Al との接触面積に問題があると考えられる。水耕栽培では根表面全体に均一に Al ストレスを付与することが可能であるのに対し、固形培地では Al の形態は変化し、Al が培地中に不均一に存在すると推測される。例えば、Al 添加培地を作製する際に、 CaCl_2 アガロース溶液に AlCl_3 を添加すると、培地内に沈殿性の生成物が速やかに生じた。このことは培地中における Al の不均一性を示唆している。一般に、Al 害は根端で強く現れ (Bennet and Breen 1991)、特に根冠及び分裂組織に直接作用した場合に顕著に現れるため (Ryan et al. 1993)、固形培地のように培地中の Al の局在が不均一で、培地内で化学反応が起きた場合には、見かけ上 Al 毒性は低下したように振舞うと考えられる。これに対し、本研究で用いた水耕栽培法では、Al と供試材料との化学的反応は起きず、添加した Al のほとんどすべてが安定な状態で根端に直接作用し、その結果 Al 害が顕著に現れたと考えられる。

溶液中の水素イオン濃度や共存するイオン種及びその濃度が Al イオンの形態に大きく関与していることが明らかにされている (Kinraide et al. 1994)。本研究で用いた Al 溶液は、 CaCl_2 と HCl のみを含む単純な溶液を基本溶液としているため、ほとんどの Al が溶液中で可溶性 Al イオンとして存在すると考えられる。例えば、終濃度が $2.5 \mu\text{M}$ となるように AlCl_3 を添加した $100 \mu\text{M}$ CaCl_2 溶液を HCl で pH5 に調整した場合、GEOCHEM-PC を用いて計算すると、溶液中の Al^{3+} 、 $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ 、 $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ のイオン活動度はそれぞれ 0.80、0.80、 $0.64 \mu\text{M}$ となり、添加したほとんどの Al は陽イオンとして存在すると推測される。ところが、pH が上昇した場合、次第に Al^{3+} 活動度は減少し、それとは逆に $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ や $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ の活動度が増加し、中性付近では不溶性の Al が形成される (Peterson et al.

1988). しかしながらこのようなイオン種の差異は、植物が受ける障害程度を変化させるものの、いずれのイオン種が植物の生育を最も阻害するかについては、未だ統一的な報告はなされていない (Dommes and Walle 1990).

このように、 Al^{3+} イオンに関する研究が、多岐にわたって多くの研究者によって報告されているのに対し、その重要性にもかかわらず、水素イオンの影響についての報告は際めて少ない。これに対し、本研究で確立した水耕栽培法は、溶液の更新が容易に行え、pH の制御も可能であるという利点を併せ持っており、シロイヌナズナの Al^{3+} イオンと水素イオンストレスに対する応答を個別に調査することができた。 Al^{3+} ストレスの場合、わずか $1 \mu M$ の $AlCl_3$ 存在下でシロイヌナズナの根伸長が約 50% の阻害を受けたが、これは Al^{3+} 感受性の高いコムギやアルファルファの根が、それぞれ $2 \mu M$ 及び $5 \mu M$ の可溶性 Al^{3+} によって 50% の伸長阻害を受けることと比較しても (Kinraide and Parker 1987, Yokota and Ojima 1995)、本植物種の Al^{3+} に対する感受性が十分に高いことを示している。一方、シロイヌナズナ幼植物は低 pH によっても顕著な生育抑制を受け、通常あまり問題とされない pH4.8 でも著しい伸長阻害を受けることが明らかとなった。このような低 pH による伸長阻害は、他の植物でも確認されており、アルファルファの場合、根の伸長は pH 5 未満で抑制され、pH4.3 ではほぼ完全に阻害されたと報告されている (Yokota and Ojima 1995).

Al^{3+} イオンと水素イオンストレス処理根では、生育スピードに明らかな差が生じ、特に低 pH ストレス処理根は、見かけ上は正常に伸長しているにもかかわらず、根端伸長領域の細胞活性を喪失していた。この伸長領域に発現する障害は、膜の破壊を伴う損傷であり、伸長が完全に停止する

よりも早い時期に起こった。一方、これとは対照的に、A1処理根は処理後速やかに伸長が停止したにもかかわらず、根表面の細胞活性は伸長停止後も維持されていた。このことから、水素イオンとA1イオンストレスによる根伸長阻害は明確に区別できる可能性が示唆された。従って、シロイヌナズナでは両ストレスによる根部障害について詳細に調査し、それぞれのストレスに対する耐性形質を調べる事が可能であると考えられる。また、FDA-PI染色で評価した根端の低pH特異的破壊は多くの発達した根系でも確認され、ストレスが根部全体を対象として作用することが示唆された。酸性ストレスに関する研究では、一次根のストレス応答が全根の応答を反映しており、従って一次根のレスポンスを評価することにより、一連のストレス応答メカニズムを推定することが十分に可能であると考えられる。

このような点から、水耕栽培を用いた本実験系が、シロイヌナズナの酸性ストレス障害機構を解明するモデル実験系として有用であると推察された。

第2章 酸性土壌ストレスに対する耐性能の系統間差

2-1. 緒言

前章では、水耕栽培したシロイヌナズナ幼植物を用いて、酸性土壌ストレスに対する生育応答を調べ、本栽培法がシロイヌナズナで酸性ストレス耐性を評価する際に有効であると結論した。さらに、その際に問題となる pH の影響に着目し、 Al^{3+} イオンと水素イオンストレスを厳密に区別した、水耕栽培による実験系を確立することができた。このことから、シロイヌナズナが酸性ストレス耐性に関与する遺伝子を導入する宿主植物として有利であり、耐性メカニズムを解明するためのモデル植物として十分適用しうると考えられた。

本章では、化学的変異誘発処理を行った M_2 種子から、水耕栽培により Al^{3+} 耐性個体を選抜し、これらの Al^{3+} 耐性形質が後代の植物に受け継がれているかを、水耕法により検定することを第一の目的とした。

ところで、農業上実用的な植物の作出を考慮した場合、植物の生育に関する諸条件を完全に制御したアプローチだけでなく、獲得した耐性系統が実際のストレス環境下で耐性を示すことを実験的に証明することも不可欠である。これまでのところ、酸性ストレス土壌を想定した Al^{3+} ストレス条件下で選抜を行い、獲得した Al^{3+} 耐性系統が実際に酸性土壌でストレス耐性を示したと実証した報告は見当たらない。本研究で適用した、水耕栽培による幼植物の伸長を指標とした Al^{3+} 耐性評価法が、実際に Al^{3+} ストレ

ス土壌での植物の生育を反映し、ストレス耐性植物の選抜に有効であるのか否か興味を持たれた。

一般に、酸性土壌の改善には多量の石灰やリン酸化合物が投与されるが、黒ボク土は石灰投与の効果が少ないことから、黒ボク土における酸性障害はほとんど問題視されていなかった。ところが我が国では、アロフェンを主体としない非アロフェン質の黒ボク土が存在し、このタイプの黒ボク土は強い酸性を示すとともに、酸性障害をもたらす主要な要因として過剰のA1を含むことが明らかとなった (Shoji et al. 1985)。このようなことから本章では、既に土壌の化学的特性や他の植物種の生育応答が詳細に研究されている (Nanzyo et al. 1997, Toma and Saigusa 1997)、典型的な非アロフェン型黒ボク土を用い、土耕栽培法によるシロイヌナズナのA1ストレス耐性評価を試みた。実験に用いた非アロフェン型黒ボク土は、土壌 pH が5以下の強酸性を示し、多量の交換性A1を含むだけでなく、植物生育に必須の栄養素の一つである可溶性リン酸が不足した、植物の生育にとって極めて過酷な不良土壌であると考えられる。従って、このような土壌でシロイヌナズナを栽培するためには、土壌に若干の改良を加え、比較的穏やかな条件を設定することが必要である。例えば、黒ボク土壌に炭酸カルシウム(CaCO_3)を投与すると、土壌 pH は6付近まで上昇し (Figure 9)、これに伴う交換性A1の減少が期待できる。そこでまず、 CaCO_3 並びにリン酸ナトリウム (NaH_2PO_4) 投与による黒ボク土壌を母体とした試験土壌を調製し、土壌診断を行うとともに、選抜したA1耐性系統の酸性土壌での生育応答を複数の野生型と比較調査し、A1耐性を評価するための土壌実験系を構築することを第二の目的とした。

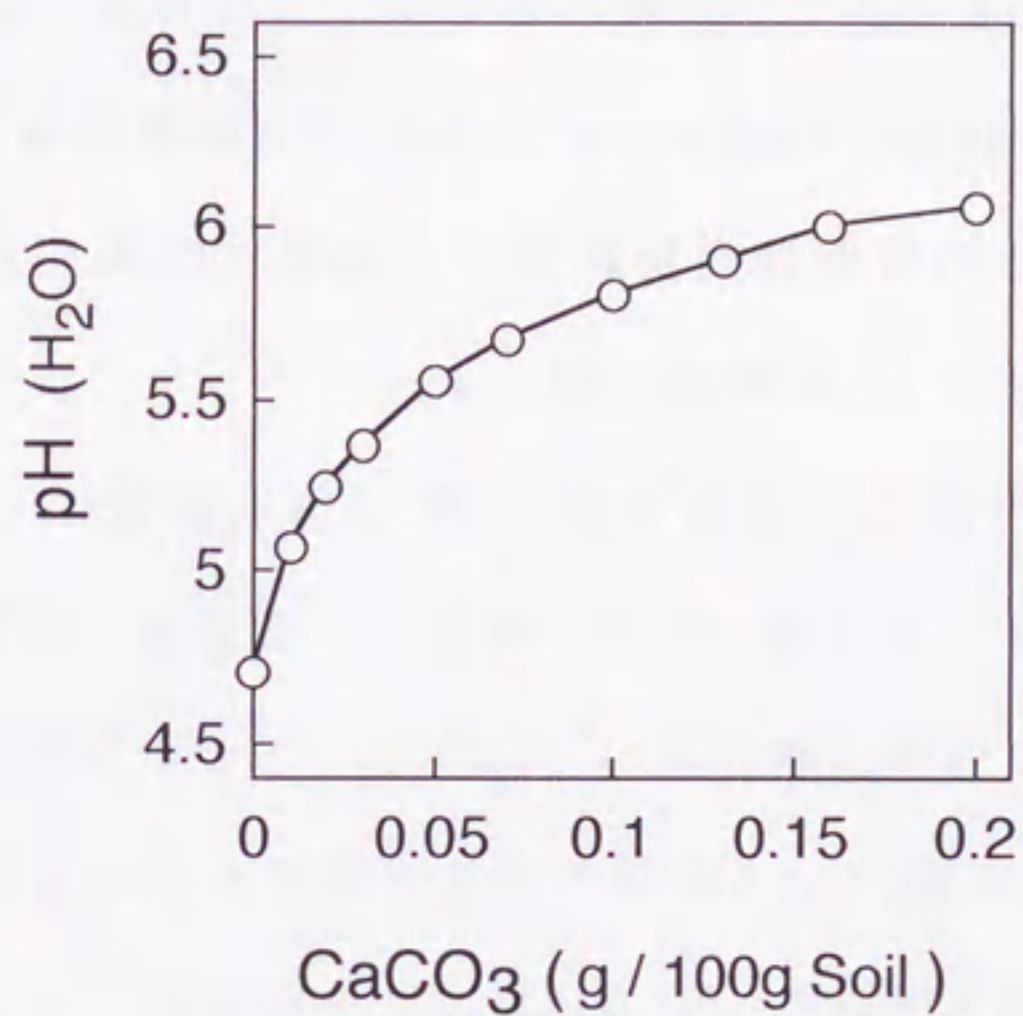


Figure 9. Effect of CaCO₃ on soil pH of a highly acidic nonallophanic andosol (Kawatabi Kuroboku). Appropriate amounts of CaCO₃ was supplied to 100 g of soil as ameliorant. The soil pH (H₂O) value was measured by the method of Toma and Saigusa (1997).

2-2. 材料及び方法

A 1 耐性植物の選抜及び分離

有効な個体を効率的に分離するために、A 1 耐性系統の選抜には、あらかじめ変異誘発処理によって変異の増幅した M_2 選抜母集団を供試した。種子は、突然変異誘発剤として 0.3% (v/v) EMS (Ethyl Methane Sulfonate) 溶液を用い、16 時間、室温にて変異誘発処理を行った。蒸留水で繰り返し洗浄した種子は、ロックウール上に直接播種し、ガラス室で栽培した後、多量の M_2 種子を獲得した。第 1 章で示した幼植物のための水耕栽培法 (Figure 1 参照) を適用し、完熟した M_2 種子を A 1 存在下で栽培した。選抜には約 2 万粒の M_2 種子を供試し、野生型と比較して A 1 存在下での根伸長が極めて良好な個体を耐性系統の候補として選抜した (Figure 10A)。A 1 イオンストレス選抜培地は、低 pH による根伸長阻害を考慮し (Figure 4)、 $100 \mu\text{M}$ の CaCl_2 を含む基本溶液に、 1 mM の $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるように添加した後、pH を水素イオンによる影響が問題とならない pH5.0 に調整した。栽培は 1.3 L 容のプラスチック製のバットを用いて行い、1 日毎に溶液を更新した。選抜した個体は、そのまま MGRL 培地に移して約 1 週間培養室にて栽培した後、一個体ずつロックウール上に移植してガラス室で生育させた。尚、他系統との交配を避けるため、抽だい後は速やかに市販のセロハン紙で一個体ずつ隔離し、後代種子は一系統ずつ個別に採種した (Figure 10B)。

A 1 イオンストレス耐性の検定

選抜した約 50 個体の後代種子のうち、発芽率が良く、比較的安定し

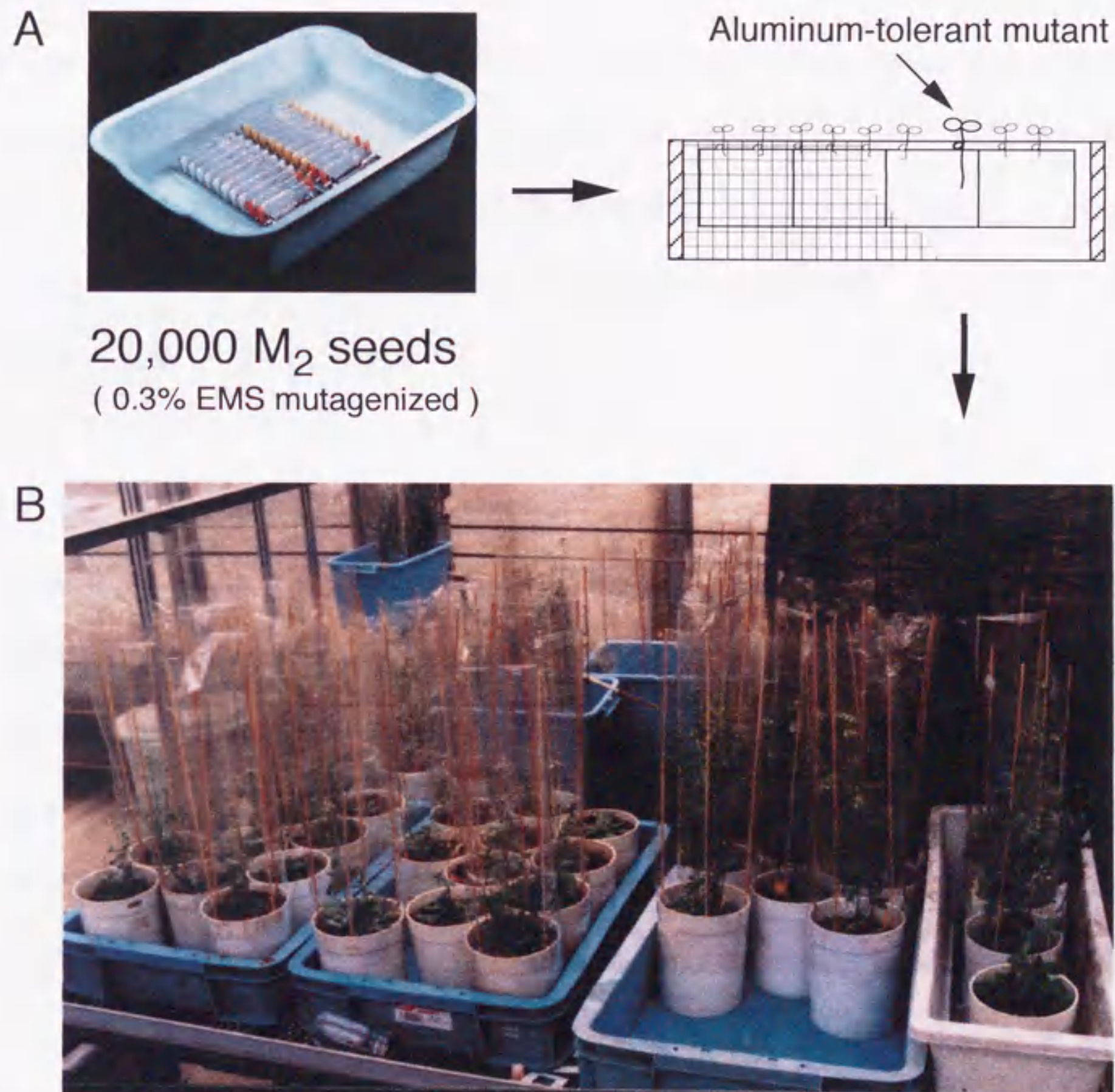


Figure 10. Scheme for screening of Al-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. Seedlings were cultured with CaCl_2 solution containing $5\mu\text{M}$ AlCl_3 for 5 days (A). Aluminum-tolerant mutants were grown in the green house (B).

た生育を示す耐性系統（以下 Al-t）の低 pH 並びに Al イオンストレスに
対す

る応答を調べ、親株である Ler を含む代表的な系統[Col-0umbia (Col-0-0),
Wassilewskija (Ws)]の野生型と比較した。水耕栽培による幼植物体の耐
性検定では、Figure 1 に示した栽培法を適用し、 $100\mu\text{M}$ CaCl_2 および 0
 $\sim 2.5\mu\text{M}$ AlCl_3 を含む pH5.0 の Al 溶液中で生育させ、4 日後の一次根
の根長を測定した。

酸性ストレス土壌の調製並びに栽培法

東北大学川渡実験農場（宮城県，鳴子）より採取した黒ボク土壌は、
多量の交換性 Al を含む典型的な非アロフェン型黒ボク土壌であった。他
の植物根の混入や化学的成分の偏りを避けるため、乾燥土壌はあらかじめ
ふるい（孔サイズ：2mm）にかけて分別し、均一になるように十分に攪拌
した後に供試した。試験土壌は、植物生育に必須の栄養素として、土壌 100g
あたりに硫酸アンモニウム $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 、塩化カリウム（KCl）、硫酸マンガ
ン（ MgSO_4 ）をそれぞれ 132, 48, 36mg 添加した基本土壌に、土壌 pH、
交換性 Al 並びに可給態リン酸量の調整のために適当量（ $0\sim 0.25\text{g}/100\text{g}$
乾燥土）の CaCO_3 及び NaH_2PO_4 を加えて作成した。この実験土壌を育苗
用のプラスチックポット [2W×2L×4.5D(cm)] に 6 g ずつ分注し、一週間毎
に、MGRL 培地に含まれる微量元素を 1/10 濃度で添加した。第 1 章で述べ
た低温処理を行った種子を各ポットに 5 粒ずつ播種し、栽培条件が制御可
能なグロースキャビネット（Koitotron, KG50-HLA, Koito）を用い、
20,000lux, 12 時間照射下（明所下 22℃, 暗所下 18℃）で 4 週間栽培した。
酸性土壌耐性は植物体のロゼット葉の直径を指標として比較した。

土壌分析

本章で用いた試験土壌は以下の方法で測定し、各土壌のストレス因子を推定した。

(1) 土壌 pH の測定

土壌 2 g に対して 10ml の蒸留水を加え、ガラス電極 pH メーター (Φ 34 pH Meter, Beckman-Japan, Tokyo) で攪拌しながら測定した。

(2) 可給態リン酸の測定

可給態リン酸はブレイ第二法 (Shoji et al., 1964) に若干の改良を加えて抽出し、アスコルビン酸還元法 (東海林, 1992) により測定した。土壌 1 g に対し抽出液 [0.03N NH_4F -0.1N HCl] を 20ml 加え 5 分間振とう後、14,000rpm で 5 分間遠心し、上清を得た。上清 1.1ml に 3.5% H_3BO_3 1.0ml, 発色液 [2.5N H_2SO_4 , 0.6% Ammonium Molybdate, 30 mM L-Ascorbic Acid, 0.014% Antimonyl Potassium Tartrate] 0.4ml を添加し、2.5ml に定容後、分光光度計 (U-2000, 日立製作所) を用いて 710nm の吸光度を測定した。尚、本法では土壌中に含まれる、酸に可溶のリン酸カルシウム、リン酸アルミニウム並びにリン酸鉄の一部を可給態リン酸として算出した。

(3) 交換性 A 1 の測定

交換性 A 1 は Yuan (1959) の方法に若干の修正を加えて測定した。土壌 2 g に 1 N KCl 5 ml を加え 2 分間よく攪拌し、室温で 30 分間放置した後、遠心 (14,000rpm, 3 分) 上清を回収した。上清回収後の土壌に、更に KCl 5 ml を添加し、攪拌後ただちに遠心分離して上清を得る操作を 3 回繰り返す、30ml 容三角フラスコに約 20ml の抽出液を回収した。この

うちの 10ml を別の三角フラスコに分注し、pH 指示薬として数滴のフェノールフタレインを滴下し、0.1N NaOH で中和滴定を行った。尚、これに要した NaOH 当量は交換性 H 及び A 1 に相当する。続いて、F-A 1 複合体の形成により水酸化物イオンを遊離させるために、4 % NaF 1 ml を加えて 30 秒間攪拌し、濃い紅色を呈したサンプルを 0.1N HCl で無色になるまで滴定を行った。この時に要した HCl 当量は交換性 A 1 に相当する。尚、本章では、上記の一連の操作を 3 回繰り返して、算出値の合計を交換性 A 1 量として求めた。

2-3. 結果

A 1 イオン耐性系統の作出並びに A 1 耐性試験

水耕栽培では、Ler の生育が他の系統に比べて若干劣るものの、pH4.8 の低 pH 処理区における相対生育量を比較した場合 (Table 3)、いずれの系統も約 50% の生育抑制を受けたことから、低 pH に対する耐性は系統間で大きな差異はないと判断した。一方、A 1 イオンに対する生育応答の評価では、溶液 pH を 5.2 に調整して行った。この pH 領域では、シロイヌナズナが良好な生育を示すことを確認済みである。その結果、Ler が Col-0 並びに Ws に比較して A 1 に対して感受性が強く、Ler が 1 μ M の AlCl₃ 存在下で 50% の生育阻害を受けたのに対し、Al-t を含む他の 3 系統は 70% 以上の生育を示した (Figure 11)。また、2.5 μ M AlCl₃ 存在下での Ws, Col-0 並びに Ler の生育量は、順に 60, 40, 25% を示し、Ler から単離された Al-t の A 1 耐性能は、Ws のそれに比較すると若干劣るものの、Col-0 と同程度、

Table 3. Root elongation of *A. thaliana* grown in the solution containinig 100 μ M CaCl₂ at different pHs. Three ecotypes and Aluminum-tolerant (Al-t) line were grown for 5 days at 25 °C.

Ecotype	Primary root length (mm), (%)	
	pH5.2	pH 4.8
Col-0	5.79 \pm 1.33 (100)	3.03 \pm 0.80 (51.4)
Ws	6.00 \pm 1.12 (100)	2.87 \pm 0.66 (47.8)
Ler	5.01 \pm 1.85 (100)	2.62 \pm 0.93 (52.3)
Al-t	5.90 \pm 1.21 (100)	3.03 \pm 0.62 (51.3)

Means \pm SD of 30 seedlings are shown.

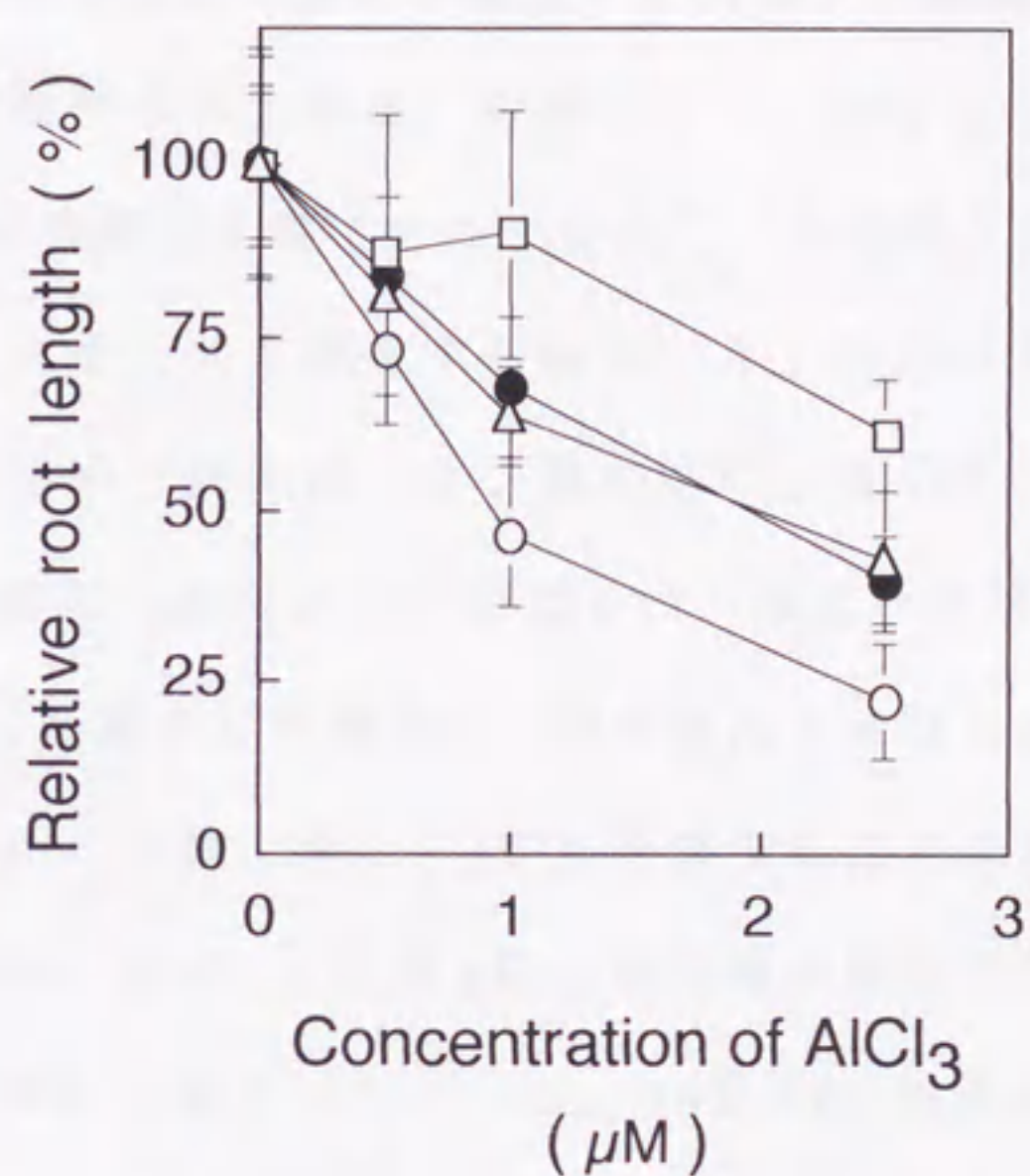


Figure 11. Relative root elongation of *A. thaliana* in Al test solution. Seedlings of four lines [Col-0(Δ), Ws (\square), Ler (wild-type: \circ) and Al-t (an Al-tolerant line selected from Ler : \bullet)] were grown in the Al test solution that contained various concentrations of Al and CaCl_2 ($100 \mu\text{M}$) for 5 days. The pH of the medium was adjusted to 5.2. Means \pm SD of 20 seedlings are shown.

親系統である Ler と比較した場合には、Al-t の生育量はすべての処理区で優っていた。

石灰及びリン酸投与による酸性土壌ストレス因子の変動

供試した川渡黒ボク土壌は、可溶性のリン酸をほとんど含まない、土壌 pH が 4.6 の強酸性土壌である。従って、本酸性ストレス土壌中における植物の生育レスポンスを調査する場合、A 1 量だけでなく、植物の生育を制限する他の要因（例えば、リン酸欠乏や水素イオン毒性）の変化についても正確に把握しておくことが望ましい。黒ボク土壌に適当量の CaCO_3 並びに NaH_2PO_4 を投与した場合の、交換性 A 1 並びに土壌 pH の変化を調べた (Figure 12)。試験土壌に CaCO_3 を添加したところ、土壌 pH 並びに交換性 A 1 量は共に変化し、土壌 pH は添加量の増加にしたがって上昇し、交換性 A 1 量は劇的に減少した。一方、 NaH_2PO_4 の添加量を変化させたところ、土壌 pH はわずかに変化するにとどまり、交換性 A 1 量は緩やかに減少した。また、可溶性リン酸量は添加した NaH_2PO_4 量にほぼ依存した結果を示した（結果は示していない）。このような土壌コンディションに及ぼす CaCO_3 と NaH_2PO_4 の影響の差異は、両試薬の添加量の調節により、ストレス条件が微妙に異なる複数の試験土壌の調製が可能であることを示している。

酸性ストレス土壌での生育レスポンスとその系統間差

一般に A 1 耐性を評価する有力な手段として、ストレス因子が直接作用する、根部の生育が測定される。しかしながら、シロイヌナズナの根部は極めて微細であり、根は土壌中のいたる方向に複雑に伸長するため、土

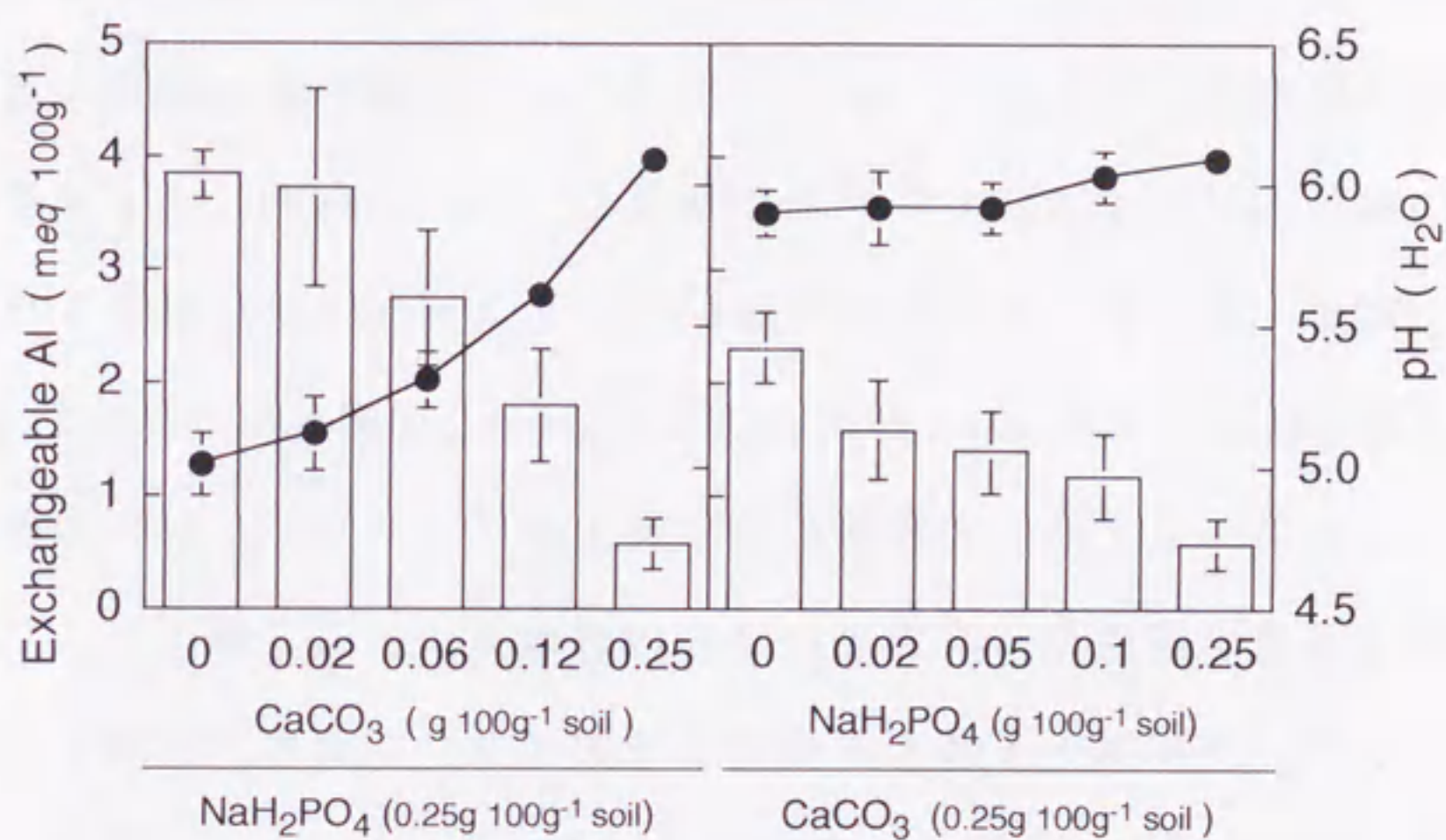


Figure 12. Effects of CaCO_3 and NaH_2PO_4 on the amount of exchangeable Al and soil pH of a typical highly acidic nonallophanic andosol. CaCO_3 was added to 100 g soil samples that contained 0.25 g of NaH_2PO_4 (left) or NaH_2PO_4 was added to 100 g soil that contained 0.25 g of CaCO_3 (right). Means \pm SD of exchangeable Al (bar) and pH (H_2O : ●) are indicated (n=5).

壤から植物体を引き抜き、土壌中の根部の発達を観察することは大変な困難を伴う。4週間土耕栽培したシロイヌナズナの、地上部並びに根部の生育を調べたところ、地上部と根部の生育程度は概ね一致しており (Figure 13)、土耕栽培における A1 ストレス耐性の評価の指標として、地上部 (ロゼット葉) の生育が有効であると考えられた。

CaCO_3 並びに NaH_2PO_4 添加量の調節により、酸性ストレス条件が異なる複数の試験土壌を調製し、そこでのシロイヌナズナの典型的な生育パターンを示した (Figure 14)。土耕栽培試験は3回以上行い、植物の生育はいずれも同様の傾向を示していた (結果は示していない)。 CaCO_3 を土壌 100g 当たり 0.25g 添加し、 NaH_2PO_4 を土壌 100g 当たり 0.05g 以上添加した処理区では、ロゼット葉の生育はほぼ同程度であった。従って、この範囲では、リン酸欠乏による植物の著しい生育抑制は無視できるものと判断し、A1 耐性の評価は、リン酸欠乏の影響を最小限に抑えるためにこの範囲内で比較した。また、低 pH による影響を考慮し、土壌 pH が 5.3 以上を示す範囲の生育レスポンスを比較対象とした。Figure 15 に、各系統のストレス試験区における典型的な生育を示した。例えば、 CaCO_3 並びに NaH_2PO_4 を土壌 100g あたり 0.25g ずつ添加した、交換性 A1 が 0.58 meq/100g 土壌、土壌 pH が 6.0 の区を対照区 (Figure 12 参照)、交換性 A1 が 2.4 meq/100g 土壌、pH が 5.7 の区をストレス処理区としてロゼット葉の生育を比較したところ、両試験区における Col-0, Ws 及び Al-t の生育はほとんど差異がなかった。これに対し、Ler の生育はストレス区で著しく阻害を受けた。このような系統間の酸性土壌ストレス耐性能を、交換性 A1 に対する関数で示したところ、交換性 A1 が 2 meq/100g 土壌以上で生育差が顕著になり、A1 ストレスに対して Ler が最も感受性が強いことが明

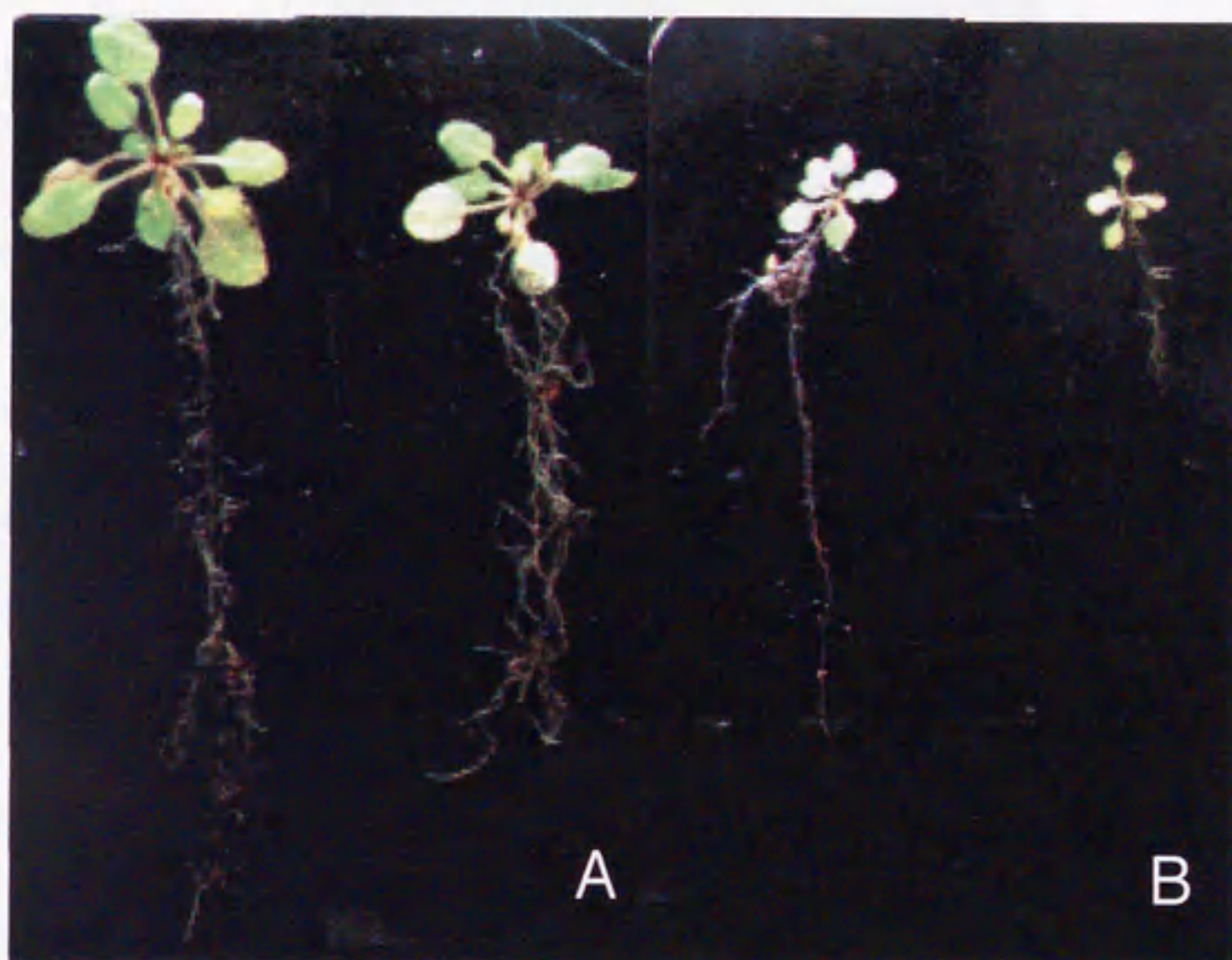


Figure 13. Relationship between rosette leaves and root growth of seedlings grown on typical acidic nonallophanic andosol. The seedlings were grown on low (A) or highly (B) acidic soils for 4 weeks.

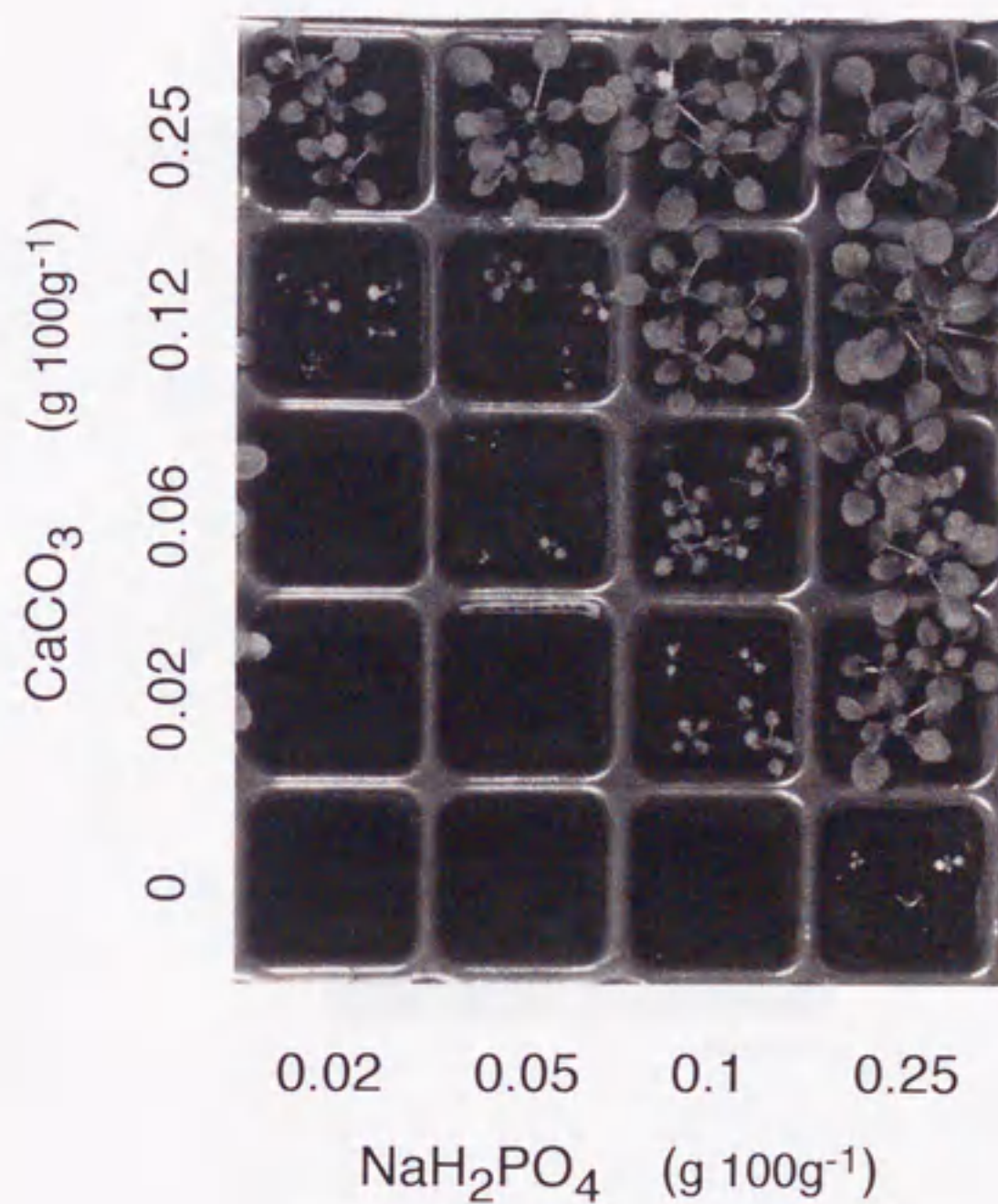


Figure 14. Growth of *A. thaliana* ecotype Col-0 plants on highly acidic nonallophanic andosol. Plants were grown on acidic nonallophanic andosol (Kawatabi Kuroboku) with different amounts of CaCO_3 and NaH_2PO_4 for 4 weeks.

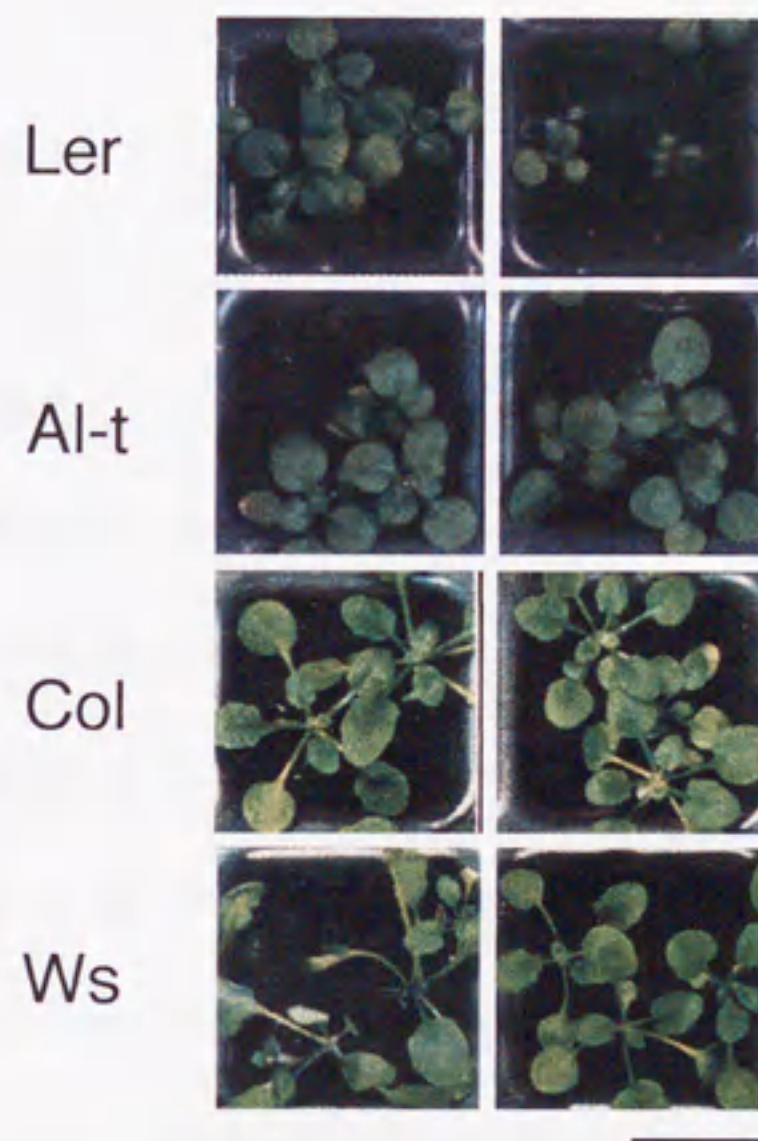


Figure 15. Growth of three ecotypes and Al-t line of *A. thaliana* on acid soils. Plants were grown on soils which 0.25 g of CaCl_3 and NaH_2PO_4 (left) and 0.1 g of CaCl_3 and 0.1 g NaH_2PO_4 (right) were added to 100 g of soil. Bar indicate 1 cm.

らかとなった (Figure 16).

2-4. 考察

これまで、コムギ、イネをはじめとする複数の栽培種で A1 耐性系統の選抜が行われているが、いずれの場合も pH が 4.5 を下回る極めて過酷な pH 条件で行われていた (Baligar et al. 1993). しかしながら、低 pH による植物の根生育阻害は、A1 イオンストレスと比較しても決して無視することのできない深刻な問題であると考えられる. 実際、前章の結果から、シロイヌナズナ幼植物は、A1 イオンだけでなく水素イオンによっても著しい根生育阻害を受けることが判明した. 従って、真の A1 耐性系統の作出には、両ストレスによる生育阻害を厳密に区別し、低 pH ストレスを受けない比較的穏和な実験条件を設定することが重要であると考えられた. この点において、本実験のように A1 ストレス条件を個別に設けた選抜法は、以下の利点を持つと考えられる. つまり、1) 変異を持つ母集団から多量の種子を供試するため、A1 耐性が質的に異なる複数の系統を選抜できる可能性が高い、2) 水耕法では、幼植物根の生育が極めて低濃度の A1 イオンにシャープにレスポンスするため、pH が問題とならない穏和な条件での選抜を行うことができる、3) A1 ストレスのみに耐性を示す、真の A1 イオンストレス耐性純系を獲得できるなどが挙げられる.

一方、シロイヌナズナの金属毒性に対する耐性については、既にいくつかの報告があり (Howden and Cobbett 1992, Koyama et al. 1995, Larsen et al. 1998), 近年、シロイヌナズナ幼植物の根伸長を指標とした A1 耐性

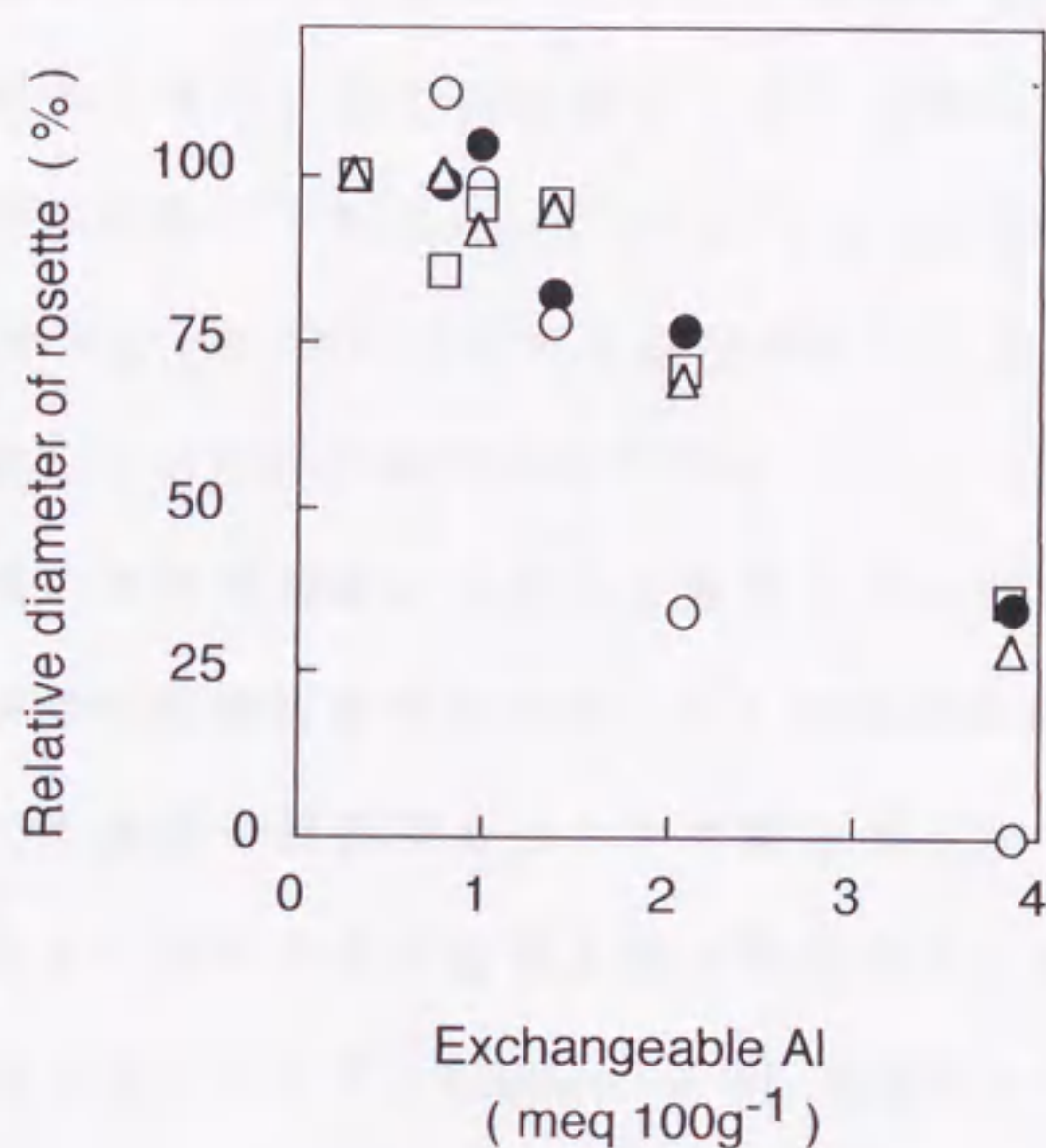


Figure 16. Inhibition of growth as a function of the amount of exchangeable Al in the soil. Plants of four lines [Col-0(△), Ws (□) , Ler (wild-type:○) and Al-t (an Al-tolerant line selected from Ler :●)] were grown for 4 weeks on a typical highly acidic nonallophanic andosol containing various amounts of CaCO_3 and NaH_2PO_4 . Relative values are expressed as percentages of the rosette growth on soil in which 0.25 g of CaCO_3 and NaH_2PO_4 were added to 100 g of soil. Means \pm SD are indicated (n=5).

あるいは感受性変異体の作出が盛んに行われている (Larsen et al. 1996, Toda et al. 1997). しかしながら, Larsen et al. (1996) の固形培地による選抜系では過剰の AlCl_3 を添加するため, 極端な pH の低下は避けられないと予想される. また, 同じ研究者らにより行われた水耕栽培法による A1 耐性評価方法においても (Larsen et al. 1998), 初期 pH は 4.2 と極めて低く, このような pH 領域での A1 耐性評価が, A1 イオンに対する正当な応答を評価しているのか疑問が持たれる.

本研究で用いた水耕栽培による A1 耐性評価法では, 極めて微量の A1 が一次根の伸長に直接影響するため, A1 添加による pH 低下が問題とならない領域で水耕液を調製することが可能であった. シロイヌナズナ系統間の A1 イオンに対する生育応答を調べたところ, 系統間の A1 耐性順位は $\text{Ler} < \text{Col-0-0} < \text{Ws}$ となり, Larsen et al. (1996) の報告とほぼ一致した. これらの結果から, 根伸長を指標とした Ler の A1 イオンに対する感受性は Ws や Col-0-0 よりも強く, 系統間で明確な耐性差があると結論した. また, 獲得した Ler 由来の Al-t 変異体の A1 耐性程度は, Ws のそれには達しなかったものの Col-0-0 と同程度にまで強化されていたことから, A1 耐性形質は遺伝形質であり, 系統間の遺伝子情報を解析することにより特定可能な形質である可能性が示唆された.

近年, シロイヌナズナを用いて, A1 イオンに対する感受性が高い変異体が選抜され, A1 が根部だけでなく地上部の生育にも影響することが示された (Larsen et al. 1997). このような感受性の植物では, Al イオンの過剰障害によって土壌中での根張りが制限されるため, 酸性ストレス条件での植物の生産性は, 根部の酸性土壌ストレスに対する耐性の強弱や戦略に大きく左右されると考えられる. 実際, Figure 13 で示したように,

シロイヌナズナの地上部の生育傾向は、土壌中の根の発達程度と一致していた。従って、根部の生育を指標とした選抜系はA1耐性植物の選抜に有効であると考えられる。

本章では、植物に毒性を示す土壌中のA1の指標として、1N KClで交換抽出される交換性A1量を用いた。この交換性A1は、強酸性を示す非アロフェン型黒ボク土壌中に存在するA1のうちの、ほんの数%にすぎないが、植物にとっての有害なA1であり、植物生育との関係を考える上で、最も有効であるとされている (Saigusa et al. 1980)。さらに本実験に先立ち、調製土壌の安定性を調べたところ、調製後2週間以上経過した土壌は交換性A1が比較的安定していることが分かった (Figure 17)。本土壌栽培法の特徴は、複数のストレスが共存する強酸性の土壌に適量の土壌改良材を添加することにより、例えば、pH条件がほぼ同じでA1ストレスが異なる2つ以上の処理区を設定できることである。このような戦略は、A1ストレスだけでなく、低pHストレス並びにリン酸欠乏ストレスのみが問題となる土壌を作出することも可能にすると考えられる。従って、本栽培法を適用することにより、一般作物の酸性土壌耐性だけでなく、突然変異植物や遺伝子組替え植物が示す耐性形質を土壌条件で評価することが容易になると推測された。

本章で獲得したA1耐性系統は、後代でも酸性土壌抵抗性を示したことから、本系統がA1イオンに対して何らかの耐性を示す遺伝形質を獲得したと推測される。また、黒ボク土壌における野生型系統間の耐性順位が、水耕栽培による結果と概ね一致したことから、A1耐性を評価するための、有用な土耕モデル実験系の構築に成功したと判断される。また、比較的短時間の根伸長阻害に基づいたスクリーニング法により獲得した耐性系統が、

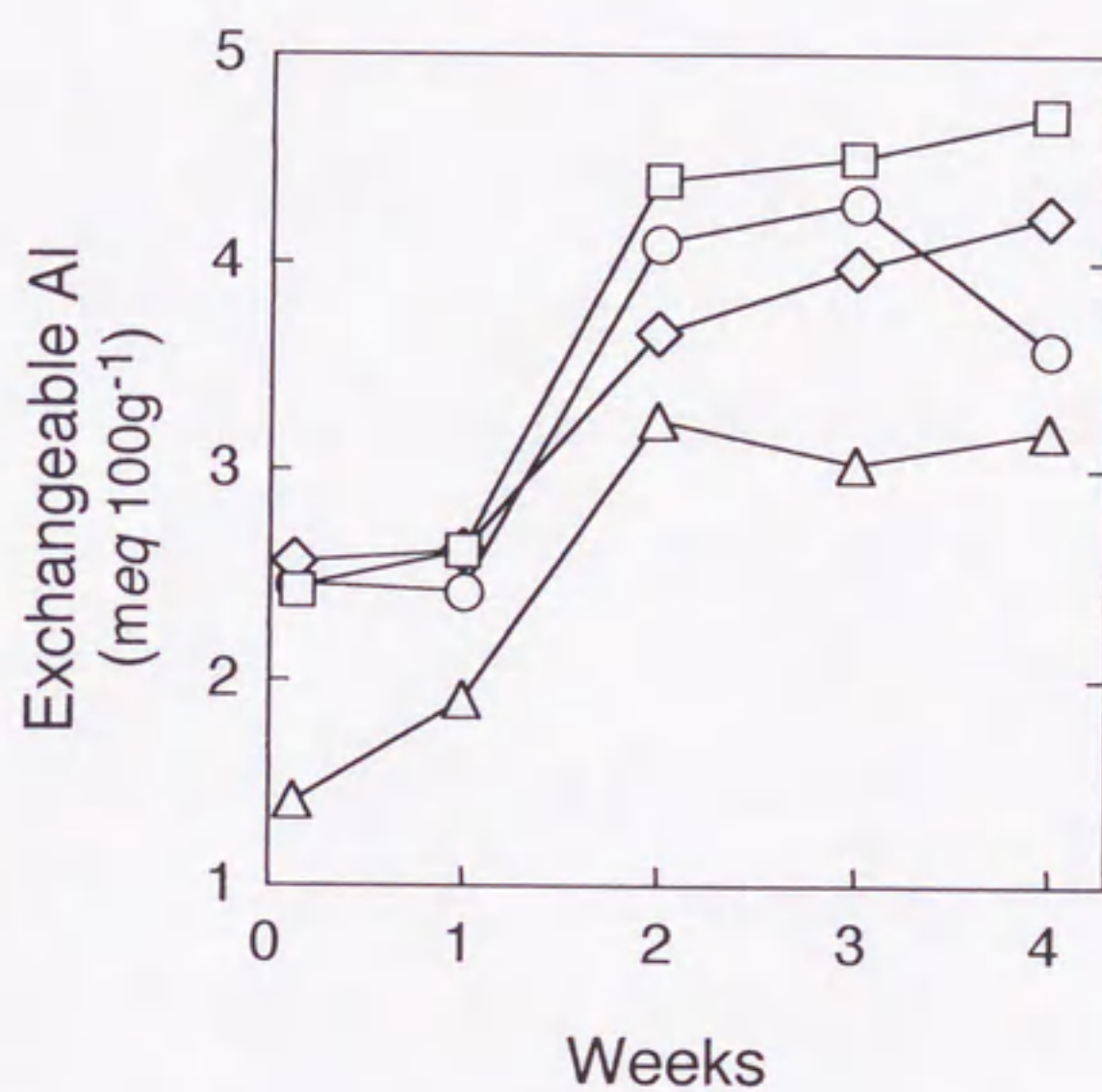


Figure 17. Change of exchangeable Al in andosol samples. Various amounts of NaH_2PO_4 (0.25 g (\triangle), 0.1 g (\circ), 0.05 g (\diamond) and 0.02 g (\square) were added to 100 g soil samples that contained 0.12 g of CaCO_3 .

実際の酸性土壌において、長期的に、かつ地上部でも良好な生育を示したことは、植物の A 1 耐性研究分野において注目すべき知見を提供したものと考えられる。

第3章 シロイヌナズナ幼植物の根部酸性ストレス障害機構の解明

3-1. 緒言

前章までに述べたように、A1障害に関する研究成果が、国内外を問わず多くの研究者によって報告されており、A1による障害機構や (Delhaize and Ryan 1995, Kochian 1995, Taylor 1991)、植物のA1耐性機構 (Pellet et al. 1995, Ma et al. 1997) に関する知見がさまざまな観点から議論されている。これに対し、多数の研究者が水素イオン毒性の存在を認めているにもかかわらず、通常、その毒性についてはA1ストレスの発現に関連した、いわゆるA1ストレス条件の検討やA1耐性メカニズムの解析過程で議論されているに過ぎない。しかしながら、低pHストレスは、少なくとも酸性ストレスに対して感受性が強いとされるシロイヌナズナやアルファルファでは、短時間のうちに根端破壊を伴うシビアな生育障害を引き起こす (Koyama et al. 1995, Yokota and Ojima 1995)。つまり、水素イオン毒性は、A1ストレスに優るとも劣らない極めて深刻な環境ストレス因子であると考えられる。

いくつかの植物種で、水素イオン毒による根の伸長阻害が確認され (Kinraide and Parker 1990, Yokota and Ojima 1995)、最近の研究で、根伸長阻害を引き起こすA1イオン、水素イオンあるいはナトリウム (Na) イオンの毒性が、高濃度のCaを同時に添加することにより軽減されることが報告されている (Kinraide and Parker 1987, Yan et al. 1992,

Yermiyahu et al. 1997). そのなかで Kinraide et al. (1994) や Kinraide (1998) は、コムギの根伸長阻害が水素イオンによる Ca^{2+} 置換によって引き起こされ、それが水素イオン毒性の作用の一つであると提唱した。本研究の第1章で示したように、シロイヌナズナ幼植物は、pH 5 以下で著しい根伸長阻害を受ける。さらに、同じ条件で短時間のストレス処理を行った幼植物の一次根では、伸長阻害の引き金とも考えられる根端細胞の破壊が FDA-PI 染色により確認された (Figure 8B, C)。通常、根の伸長は、根端における活発な細胞分裂と伸長領域の細胞伸長に由来する。この低 pH 障害は、根端の伸長領域に限定される部位特異的障害であったことから、水素イオン毒は直接細胞の伸長に関与しているのではないかという疑問が持たれた。しかしながら、酸性土壌所ストレスに関する多数の報告にも関わらず、水素イオンによる植物の生育阻害がどのように引き起こされるのか、現時点ではあまりよく知られていない。

一方、植物細胞の生育にとって Ca が必須であることがよく知られている (Hanson 1984, Schiefelven et al. 1992)。一般に、植物中に吸収された Ca は、半分以上がアポプラスト中に存在するといわれており、主に細胞壁中のペクチンネットワークの形成に関与している可能性が高い (Matoh and Kobayashi 1998)。さらに、アポプラスト中の Ca のほとんどはペクチン多糖に結合した状態で、細胞壁の安定化あるいは弾性維持などの細胞壁構造構築の上で重要な役割を担っていると考えられている (Carpita and Gibeaut 1993)。現時点では、ペクチン多糖に会合する Ca の生理的機能については不明な点も多いが、Kobayashi et al. (1996) によって、ラムノガラクトツロナン-II (RG-II) 部分での Ca-ホウ素架橋がペクチン質多糖を細胞壁にとどめていることや、ポリガラクトツロン酸 (PGA)

領域で結合する Ca が2本のペクチン鎖を架橋することにより、ペクチンが強く安定していることなどが提案されている (O'Neile et al. 1996, Williams et al. 1996). 逆に Ca の供給が円滑に行われない場合、つまり、アポプラスト中の Ca が不足したり、結合部分で Ca 以外の元素に置換された場合、細胞壁構造は不安定かつ異常を引き起こすと考えられる。

本章では、短時間のうちに起こる低 pH 特異的根端破壊が、細胞壁合成が盛んな根端伸長領域で発現していることから、細胞伸長と Ca の生理的役割との関係に着目した。根伸長と細胞活性を指標とした調査をもとに、低 pH ストレスによる根伸長阻害メカニズムの一端を明らかにすることを目指す。

3-2. 材料及び方法

幼植物根の根長並びに根伸長速度の測定

シロイヌナズナ幼植物の長期的水耕栽培には、第1章で記述済みのスライド用マウントを用いた栽培法を適用し、栽培装置は予めオートクレーブ滅菌を行った。幼植物は、 $100\mu\text{M}$ CaCl_2 溶液あるいは 1/10 濃度の MGRL 培地で前培養し、根長測定は、所定の日時に無差別に引き抜いた約 20 個体を対象に行った。測定は、前述の手順に従い、顕微鏡ビデオカメラ (PICO-ZOOM, Kenis, Tokyo) 並びに計測メジャーユニット (MC-300, Kenis, Tokyo) を用いて行った。伸長速度は、処理開始時と一定期間培養した後の伸長差から算出した。尚、測定誤差を小さくするために測定は一個体につき 3 回ずつ行い、平均値を測定値として記した。

低 pH ストレス条件の設定

厳密な pH 調整並びに処理中の pH 変化抑制（防止）のため，酸性領域で強い緩衝作用を示す MES[2-(*N*-Morpholino)ethanesulfonic Acid·H₂O] を終濃度が 5 μ M となるように添加し，0.01N HCl を用いて pH4.5～5.5 の溶液を調製した．低 pH 処理溶液は，特に示さない限り 100 μ M CaCl₂ 溶液を基本溶液とし，pH 調整は，低イオン強度の pH 測定に定評のあるベックマン社製 pH メーター（ Φ 34 pH Meter, Beckman, Germany）を用いて，一定温度（25℃）下で行った．

ストレス処理根の細胞活性

あらかじめ 1/10 濃度の MGRL 培地で前培養した幼植物体は，100ml の処理溶液中に移植した．一定期間インキュベートした後，前述のように Jones and Senft の手法に若干の修正を加え FDA-PI 染色を行った．染色した幼植物は，基本的にはダイクロイックミラー（Model: IMT-2-DMB, Olympus, Japan）を装備した蛍光顕微鏡（Model: IMT-2-21-RFL, Olympus, Japan）で観察し，コンフォーカル顕微鏡観察は，アルゴン－ヘリウムガスを用いてレーザー顕微鏡（LSM510, Carl-zeiss, Germany）下で行った．尚，FDA 観察における励起波長は 488nm，PI 観察には 543nm の波長をそれぞれ選択した．

低 pH 処理に及ぼすカチオン並びに Ca イオンの影響

共存するイオン種あるいはイオン濃度の影響を調べるために，イオン強度が異なる完全栄養塩溶液（MGRL 培地）から，Ca，Mg 及び K 元素をそれぞれ削除した低 pH 溶液を調製し，根端における障害に差異が生じる

か否かを FDA-PI 蛍光染色法により調査した。

一方、金属イオン添加による水素イオン毒性に対する軽減効果を調査するため、 CaCl_2 基本溶液に金属塩化物を補足し、根端における細胞の活性を調べた。また、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 SrCl_2 並びに BaCl_2 のみを添加した低 pH 処理溶液を調製し、幼植物根の生育並びに低 pH 障害における二価カチオンの直接的な影響を調べた。

低 pH 条件下にある幼植物の根生育に及ぼす Ca の影響を調べるために、 $5\ \mu\text{M}$ MES 溶液に CaCl_2 を $0\sim 1\ \text{mM}$ となるように添加した pH が異なる溶液を調製し、6 時間あたりの伸長量を測定算出した。

3-3. 結果

短時間ストレス処理による幼植物根の伸長阻害と細胞の生存活性の低下

水耕栽培によって得られた様々な生育過程の幼植物根を用い、水素イオンに対する根端の感受性を調べた。まず、 CaCl_2 のみで栽培した場合、シロイヌナズナ幼植物の一次根の伸長は、播種後 6 日目には完全に停止した (Figure 18)。これに対し、シロイヌナズナ栽培用培地である MGRL 栄養液を 1/10 強度で用いた場合には、少なくとも 9 日目までは一定速度で順調に生育を続けた。このような生育過程の異なる幼植物を CaCl_2 溶液で軽く洗浄後、pH4.5 の CaCl_2 溶液で 2 時間処理し、続いて FDA-PI 染色を行った。その結果、3 日目の幼植物及び栄養塩溶液で栽培した幼植物の根は、伸長領域に典型的な低 pH 障害を示したのに対し (Figure 19C)、 CaCl_2 溶液で 6 日間以上栽培した伸長の停止した幼植物根では、可視的な障害は

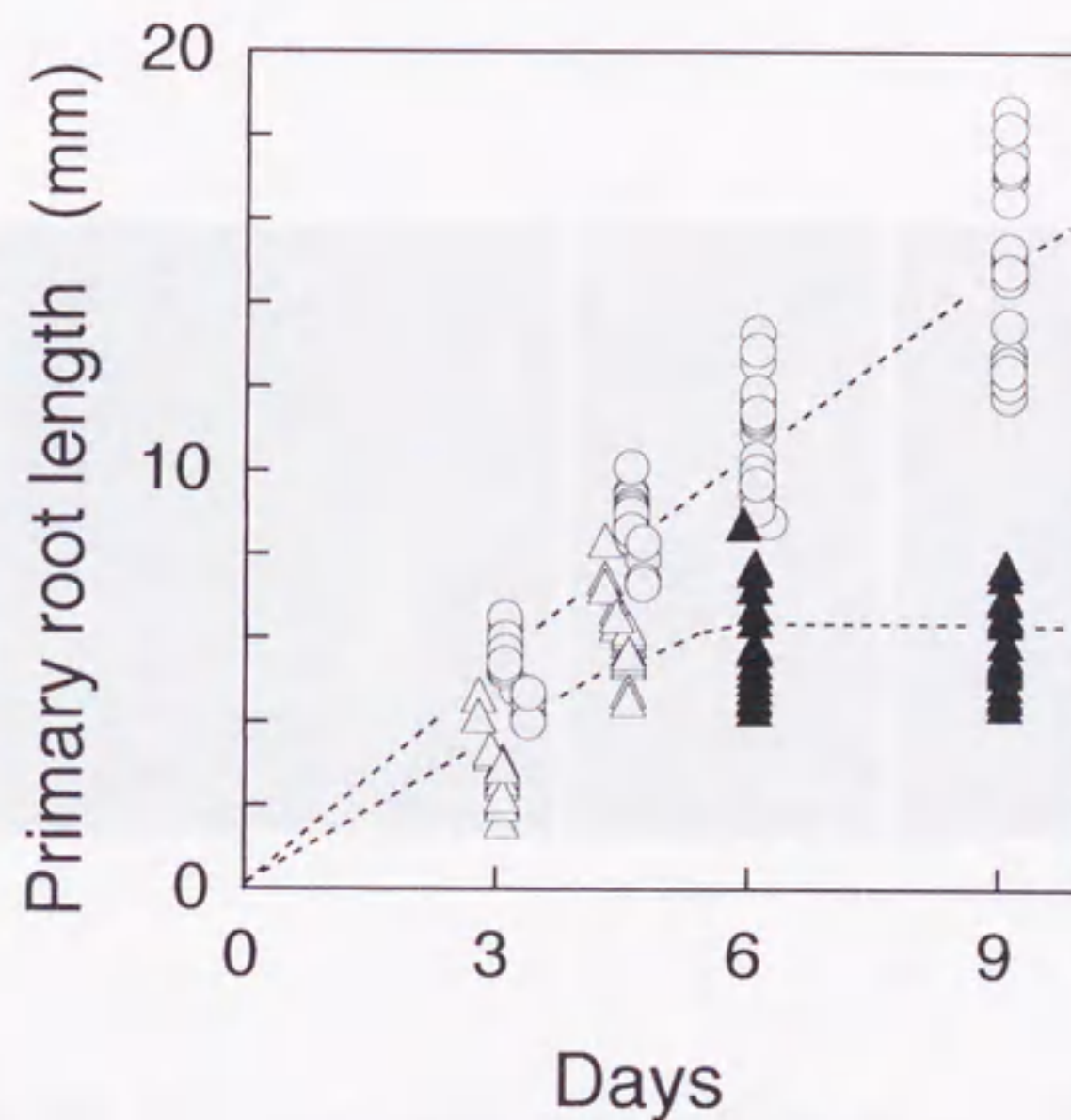


Figure 18. Growth of the primary roots of *A. thaliana* in the basal culture solution containing 100 μM CaCl_2 in the presence (\circ) or absence (\triangle) of 1/10 strength MGRL nutrients added, and their sensitivity to low pH. Initial pH of the solution was adjusted to 5.6, and the primary root at various developmental stages was immersed in a low pH solution (pH 4.5, 100 μM CaCl_2) for 2 h. Open symbols show low-pH damage and closed symbols the absence of damage.

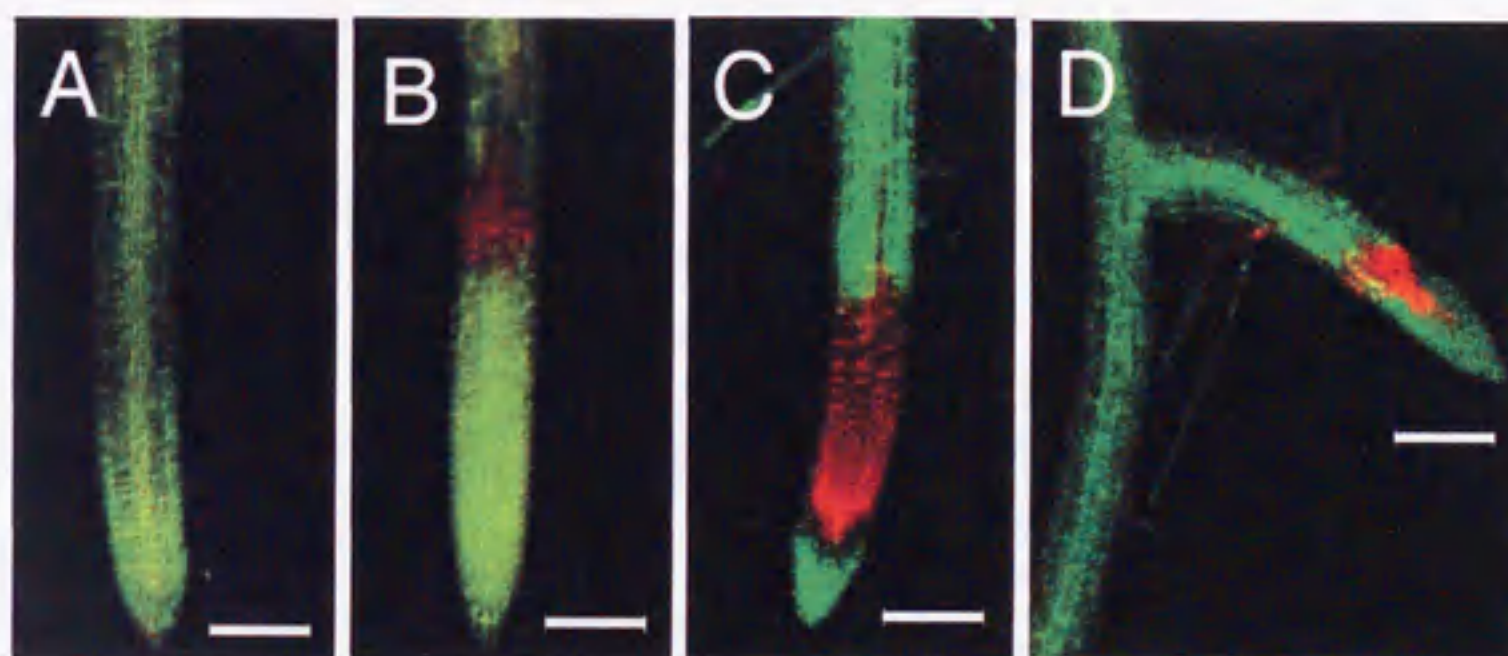


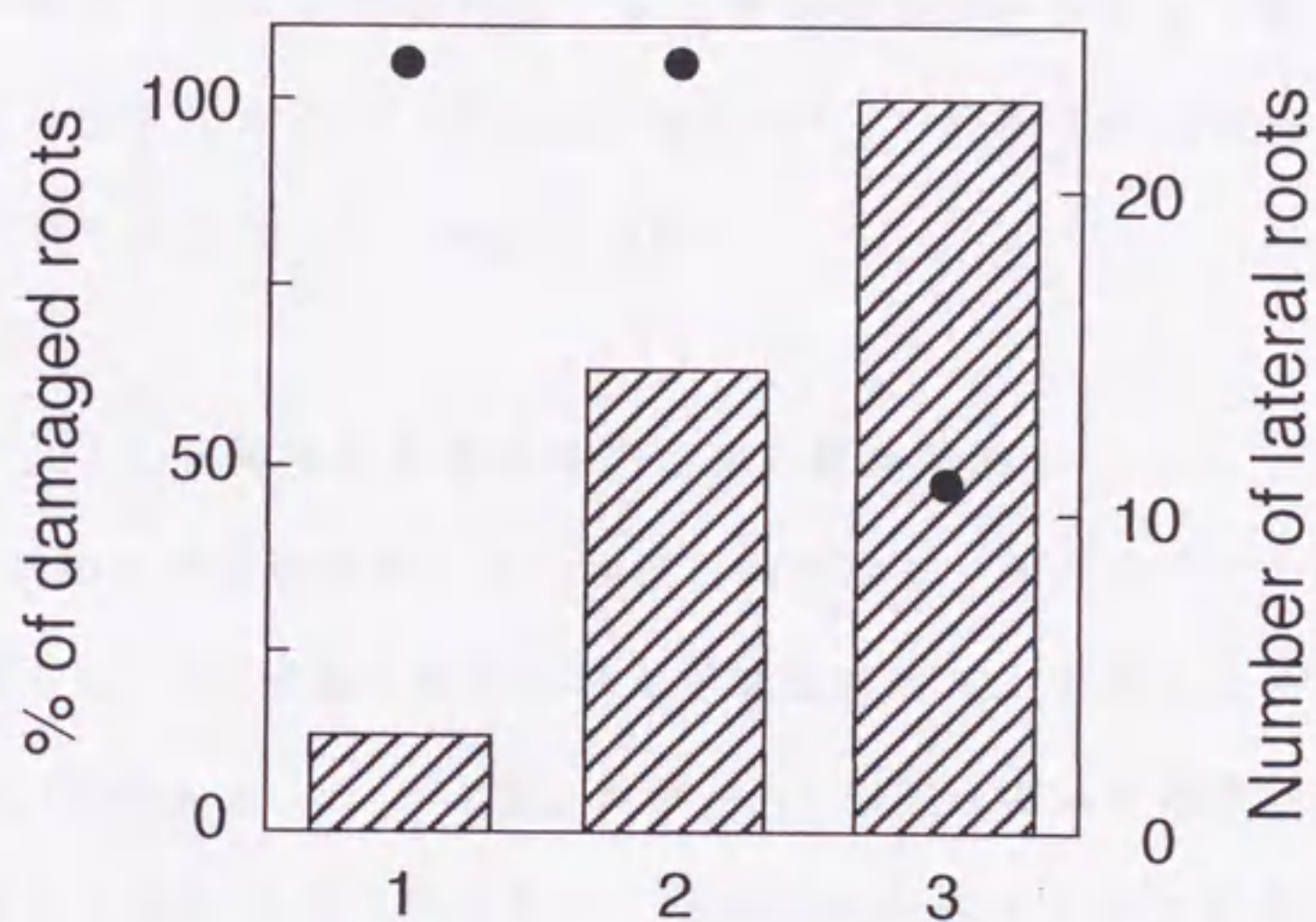
Figure 19. Confocal microscopic observation of the roots of *A. thaliana* exposed to low-pH stress solution. The primary roots of the seedlings grown in the basal culture solution for 3 or 6 days were immersed in a low-pH solution (pH 4.5) for 30 min or 2 h, and then stained with FDA-PI. A: Primary root at day 6 was exposed to a low pH for 2 h. B: Primary root on day 3, low pH treatment for 30 min. C: Primary root on day 3, low pH treatment for 2 h. D: Lateral root on day 15, low pH treatment for 2 h. A: 3-D image. B,C,D: confocal image. Bars indicate 1 μ m

認められず、根部全体が対照区と同様の明るい緑色を呈した (Figure 19A). 低 pH 特異的障害は伸長過程にある一次根の約 90% (410 個体/460 個体) に認められ、伸長が停止した一次根では全く認められなかった (0 個体/138 個体). 同様の障害は、栄養条件下で栽培して獲得した側根をストレス処理した場合にも多数確認されたことから (Figure 19D), 低 pH 特異的ストレス障害はシロイヌナズナのすべての根において起こりうる現象であることが推定された.

そこで、同一個体から多数形成され、様々な生育過程にある側根に着目し、根の伸長と低 pH ストレス障害の関係を調査した. 本実験では、根の生育状況を確認する指標として、ストレス処理開始前 12 時間の根の伸長量を測定した. その結果、生育が活発な側根の根端では、高い確率で低 pH 障害が現れたのに対し、生育速度の低下した側根では、24 個体中 3 個体のみにわずかな障害が確認された (Figure 20). 以上の結果から、低 pH ストレス障害は、伸長している根の根端のみに観察される時期特異的障害であると推定された.

低 pH ストレス処理根の再伸長量の決定

pH4.5 で 30 分間処理した根は、FDA-PI 染色の結果、根端の表皮細胞にわずかな障害を受け (Figure 19B), 2 時間後、この障害は伸長領域全体に広がっていた (Figure 19C, D). この根端障害が、根の生育障害を引き起こす直接的な要因となっているのか興味を持たれたので、低 pH 溶液に浸漬した後の根の再伸長を調べた. 低 pH 溶液で所定時間処理した幼植物体は、その後、1/10 強度の MGRL 培地に移植し、12 時間の伸長量を測定した. その結果、低 pH 処理時間が増すにつれて、根の再伸長量は低下し、



Developmental stage of lateral root

Figure 20. Damage of lateral root exposed to pH 4.5 for 2 h at various developmental stages. Ordinate shows the percentage of damaged lateral roots. Developmental stage of lateral roots was categorized into 3 classes by the root elongation during the preceding 12 h. 1: 0 - 50 μm . 2: 50 - 150 μm . 3: >150 μm . Closed circle shows number of lateral roots. Each 20 seedling was observed.

pH4.5 の $100\mu\text{M}$ CaCl_2 溶液に 1 時間浸漬すると、その後の根生育は全く起こらなかった (Figure 21). また、pH4.7 の溶液に 2 時間浸漬した場合にも、その後の根伸長はほとんど起こらなかった。つまり、数時間のうちに発現する水素イオン毒性障害は、その後幼植物個体が生育可能な環境へ移植されても生育できない (Figure 19B, C), いわゆる不可逆的な障害であることが明らかとなった (Figure 21)。

水素イオンストレス障害に対するカチオンの軽減効果

Ca 非添加区では溶液のイオン強度に関係なく、殆どすべての根端で細胞活性が低下し、PI 染色で確認される根端破壊は Ca 欠如による可能性が示唆された (Table 4)。一方、Mg 及び K 非添加区では培地強度が 1 の場合、障害は全く確認されなかったが、培地強度が低下すると数個体にわずかな障害が現れた。同様の障害が低イオン強度の完全培地でも確認されたことから、イオン強度の低い Mg 並びに K 非添加区での障害は、両イオンの欠乏によるのではなく、Ca イオン不足 ($1/50$ 強度で $40\mu\text{M}$) に起因するのではないかと考えられる。

一方、4 日目の幼植物を CaCl_2 濃度の異なる pH4.7 の低 pH 溶液でインキュベートしたところ、 $100\mu\text{M}$ 存在下では 3 時間以内にすべての幼植物の根端が障害を受けたのに対し、高濃度の Ca 存在下では明らかに障害が軽減された (Table 5)。

pH 条件と Ca 要求性の関係を調査するため、根がよく伸長している 4 日目の幼植物体を、pH 及び Ca 濃度が異なる溶液中に浸漬し、処理開始から 6 時間の根伸長量を測定した (Figure 22)。pH5.3 及び 5.0 の溶液中では、Ca 添加量が $25\mu\text{M}$ の時に最大の伸長量を示し、それ以上の Ca 存在

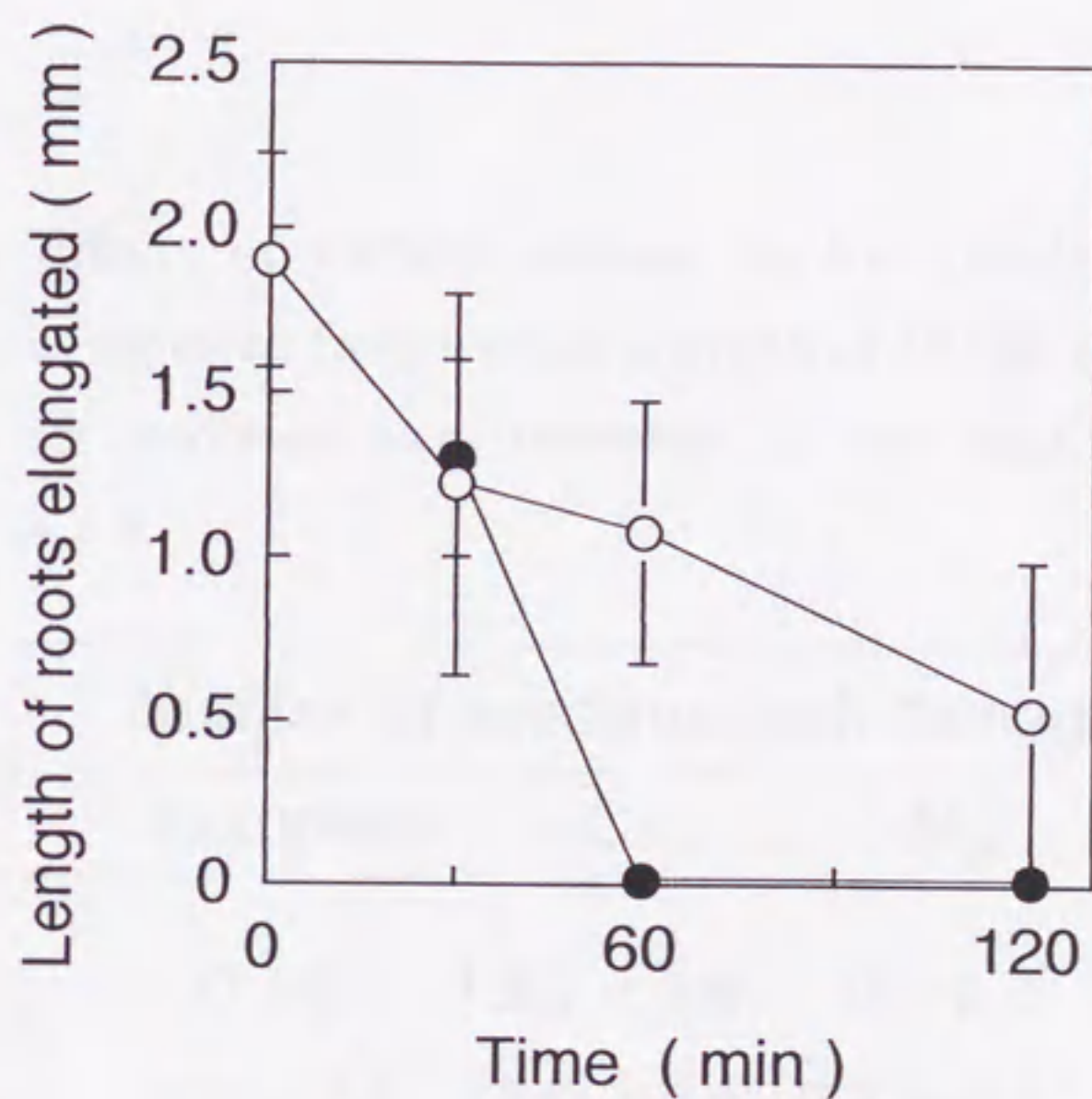


Figure 21. Growth of primary roots after exposing to low-pH stress solution. The roots of the seedlings cultured for 3days in the basal culture solution were exposed to pH 4.5(●) or 4.7(○) for 30, 60, or 120 min, and then the seedlings were cultured in the 1/10 strength MGRL solution at pH 5.6 for 24 h. Ordinate shows the elongation of roots after the low-pH stress treatment. Means \pm SD are indicated (n=20).

Table 4. Effects of nutrient element on low pH-damage. Each element was removed from various strength of MGRL nutrient. The roots of 15 seedlings were immersed in the modified MGRL medium for 2 h.

Strength	Number of seedlings with damaged roots			
	Complete	- Ca	- Mg	- K
1	0 \pm 0.0	19.0 \pm 0.8	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
1 / 25	0.3 \pm 0.5	17.0 \pm 0.8	0.7 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5
1 / 50	6.7 \pm 1.2	18.3 \pm 1.7	5.0 \pm 2.5	1.7 \pm 1.2

Means \pm SD from 3 replications are shown.

Table 5. Ameriolation of low-pH damage in root increasing the concentration of Ca. About 45 seedlings were immersed in the solution containing various concentration of CaCl_2 at pH 4.7.

Incubation time (h)	% of damaged roots			
	Concentration of CaCl_2 (mM)			
	0.1	0.4	1.0	2.0
3	100	13	0	0
6	100	20	15	14

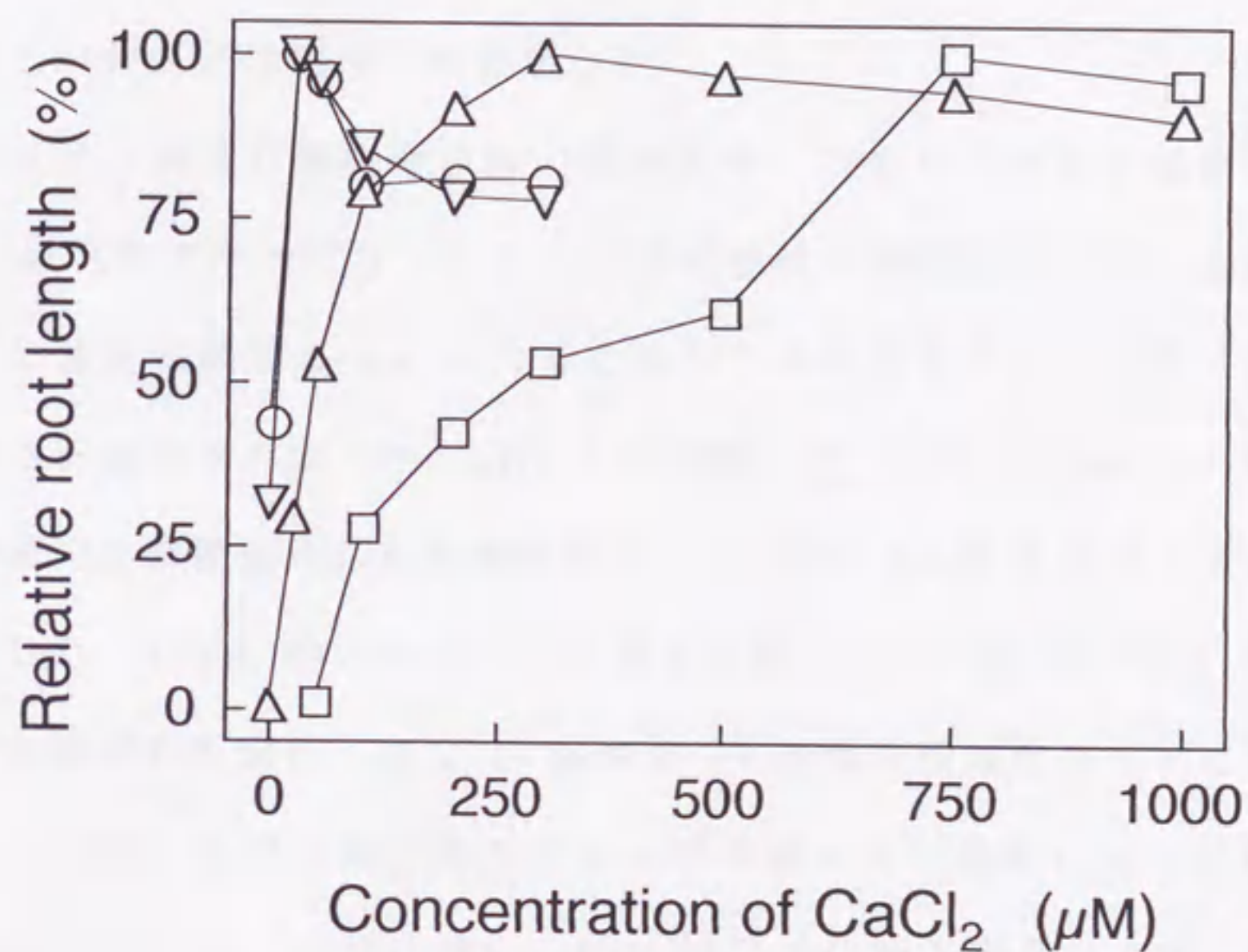


Figure 22. Elongation of the primary root of *A. thaliana* in CaCl_2 solutions at different pHs. The seedlings cultured for 3 days in 1/10 strength MGRL solution were immersed in CaCl_2 solutions at various concentrations at pH 5.3 (○), 5.0(▽), 4.8 (△) or 4.5(□) for 6 h. Root elongation was determined 5 seedlings that showed the highest value among 12 plants. Means of relative values are indicated.

下では伸長量はわずかに減少した。これに対し、pH4.8 及び 4.5 の低 pH 溶液では、Ca 濃度が低濃度から高濃度になるにしたがって伸長増加を示したが、最大伸長を示す明確な濃度は得られなかった。各 pH 条件での最大平均伸長は高 pH から順に、0.30, 0.33, 0.39 及び 0.33mm で、pH の違いによる著しい伸長差は認められなかった。

水素イオン毒性が細胞壁多糖の構成部分、つまりペクチン架橋における Ca の結合性をターゲットにしている可能性に興味を持たれ、細胞壁中ペクチン架橋を形成する Ca の代替となりうる金属イオンの水素イオン毒性に対する軽減効果を調べた。pH4.7 に調整した $100\mu\text{M}$ CaCl_2 のみを含む基本溶液で 2 時間処理した幼植物根は、15 体中 14 個体がバイアピリティを喪失した (Table 6)。一方、この基本溶液に $200\mu\text{M}$ の CaCl_2 あるいは SrCl_2 を補足した場合、逆に 15 個体中 14 個体の根端がバイアピリティを保持しており、これらの二価カチオンは水素イオン毒性に対して効果的な軽減作用を示した。これに対し、 KCl は全く軽減効果を示さず、 MgCl_2 もそれほど効果的な軽減効果は示さなかった。また、二価カチオンを単独で添加した低 pH 処理溶液を調製し、幼植物体を浸漬したところ、Ca, Sr 及び Ba は添加量の増加に伴って水素イオン毒を明らかに軽減したが、Mg の効果はほとんど認められなかった (Figure 23)。

3-4. 考察

シロイヌナズナは一般作物と比較した場合、比較的低栄養条件下での生育が可能な植物であると考えられる。しかしながら、低 pH 溶液中で根

Table 6. Amelioration of low-pH damage in the elongation zone of the primary root by the simultaneous application of various metals. The roots of 15 seedlings were immersed in the basal test solution containing 100 μM of CaCl_2 (control) with 200 μM of various metals added at pH 4.7.

Period of low-pH treatment (min)	Number of seedlings with damaged roots				
	Control	Ca	K	Mg	Sr
60	9.3 \pm 0.3	0.3 \pm 0.5	11.3 \pm 0.9	3.3 \pm 2.1	0.0 \pm 0.0
120	14.3 \pm 0.5	1.0 \pm 0.0	14.7 \pm 0.5	9.3 \pm 2.4	1.0 \pm 0.0

Means \pm SD from 3 replications are shown.

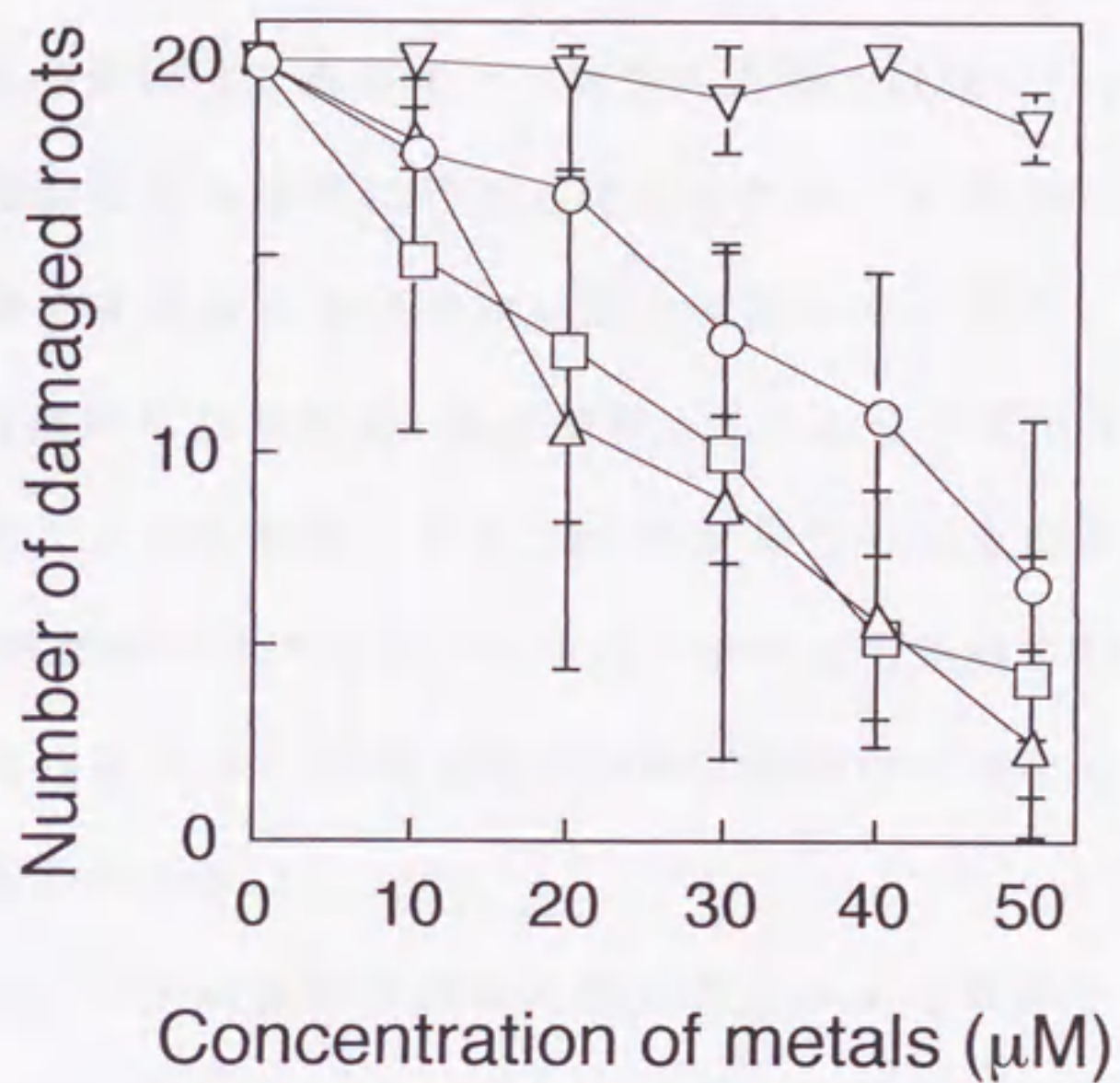


Figure 23. Ameliorative effects of divalent cations for the short-term proton rhizotoxicity. Each 20 seedling was soaked in water solutions that contained CaCl_2 (○), MgCl_2 (▽), SrCl_2 (△) and BaCl_2 (□) at various concentrations at pH 4.8 for 1 h, and then stained with PI. Ordinate shows the seedlings showing damaged cells in the elongation zone of the root. Means \pm SD of 3 replications are shown.

端のバイアビリティを保持するためには、溶液中に高濃度の Ca を必要とし (Table 5), 根伸長維持のためにも適当量の Ca が必須であった (Figure 22). 一方, 根端のバイアビリティ維持に必要な Ca 要求量は, 共存する他の 2 価のカチオン濃度によっても影響をうけた. このようなことから, 水素イオンによる障害は, 水素イオン単独の影響ではなく, pH によって細胞壁の形成や細胞活性の維持に必要と考えられる Ca 供給, あるいは供給プロセスが影響を受けるためではないかと仮定した. また, 細胞壁やアポプラストの構造維持に必要な Ca 要求量は pH によって変化することが予想される. 植物種によって必要とする Ca 量が異なることが予測されるが, 同様の低 pH 障害がアルファルファやユーカリでも観察されたことから, この仮説は, 低 pH ストレス感受性の強弱に関係なくほとんどの植物で成り立つものと考えられる.

シロイヌナズナ幼植物の根は, 低 pH ストレス条件下では, 短時間のうちに根の根端伸長領域に不可逆的なダメージを受け (Figure 19, 21), この現象は主根, 側根に関わらず, すべての伸長過程にある根端で確認された (Figure 19, 20). 従って, 水素イオン毒性のターゲットは根の“伸長”と密接に関連している可能性が高い. 低 pH 処理を行ったシロイヌナズナ幼植物根を FDA-PI で染色したところ, 伸長領域のバイアビリティが処理開始後わずか 30 分で低下した (Figure 19). 一方, Ca 補充による低 pH 障害軽減効果は 60 分以内に観察された (Table 6). このような短時間の応答は, 水素イオンの障害ターゲットがシンプラストではなく, アポプラストである可能性を示している. さらに, 伸長過程にある幼植物根を, Ca チャンネル阻害剤である Verapamil を添加した Ca 溶液で処理したところ, 根伸長は約 30% 抑制されたものの, 根端細胞のバイアビリティは少なくと

も3時間は保持され、低 pH 処理による初期障害がシンプラスト内の Ca 欠乏に起因する障害ではないことが示唆された。また、Sr 単独添加の溶液に浸漬した幼植物根は、多少の根伸長抑制がみられたものの、少なくとも数時間は伸長、細胞バイアビリティともに良好であった。このような結果から、根端の伸長領域に現れる低 pH 初期障害は、アポプラスト内の細胞壁に結合するカチオンの不足、あるいはそれらカチオンが正常に結合しないために起きる障害であると推測された。

一般に Al 障害は、カチオンの共存によって軽減されることが知られており、最近の研究で、Al イオンを始めとするいくつかのイオン毒性に対する Ca^{2+} の軽減効果が調べられている。例えば、Al 毒のターゲットの一つとして、 Al^{3+} による細胞表面や輸送チャネルからの Ca^{2+} 置換説が提唱された (Hanson 1984, Reid et al. 1995, Kinraide 1998)。また Kinraide et al (1994) は、水素イオン毒性を軽減する Ca^{2+} の効果についても調査し、多量の Ca^{2+} が水素イオン毒性を軽減することを示した。本研究においても、溶液中の Ca^{2+} 量の増加が水素イオン毒性を軽減することを示したが、根の伸長と細胞活性を指標とした場合、同様の軽減効果は Ca^{2+} と化学的性質が類似した Sr^{2+} 及び Ba^{2+} でも認められた。このことから、水素イオン毒性軽減効果は、主に細胞壁の形成と伸長における Ca^{2+} の補償効果であると推察した。

しかしながら水素イオン毒性に関する仮説を証明するためには、さらなる実験的根拠が必要であると考えられる。本章では、いくつかの金属イオンの軽減効果から、水素イオン毒の標的の一つが陰イオン高分子であるペクチンであると推測した。現在のところ、 Ca^{2+} の細胞内機能については不明な点も多く残されているが、細胞壁においては、 Ca^{2+} は主に細胞壁構

成分として細胞壁の構造維持と強化に関与している。その一つに、ペクチン鎖の PGA 領域での架橋構造への貢献が挙げられる (Kobayashi et al. 1996, Figure 24 参照)。Egg-box といわれるこの結合領域では、2本のペクチン鎖間に Ca^{2+} が配位結合すると提唱されており (Grant et al. 1973)、理論的には結合部位において2価の金属元素が配位結合を形成することによって Ca^{2+} の代替が可能となる。しかしながら、イオン半径の小さい2価カチオンや1価のカチオンでは架橋構造を形成することはできず、イオン半径の大きい2価カチオンがより安定した配位結合を形成するといわれている (Haug and Smidsrød 1970)。本研究で用いた低 pH 障害に対するカチオンの効果は、このモデルに完全に一致した (Table 6, Figure 23)。つまり、一価カチオンの K^+ は Ca^{2+} 置換効果を全く示さず、 Mg^{2+} は Ca^{2+} よりやや小さい軽減効果、イオン半径の大きい Sr^{2+} 、 Ba^{2+} はともに強い軽減効果を示していた。また、合成ペクチンにこれらのカチオンをそれぞれ単独で添加し、ペクチンの粘性を測定したところ、ペクチンゲルは $\text{Na}^+, \text{K}^+ \leq \text{Mg}^{2+} \leq \text{Ca}^{2+}, \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$ の順に硬化した (結果は示していない)。実際には、これら金属イオンの植物細胞内への影響が懸念されるが、本研究の結果は、少なくとも低 pH による初期障害が、ペクチンの架橋構造の崩壊に起因していることを示唆するものである。現時点では、根伸長阻害におけるペクチンネットワークの重要性を示した報告は見当たらず、上記仮説を実証するための更なる解析が必要であると考えられる。

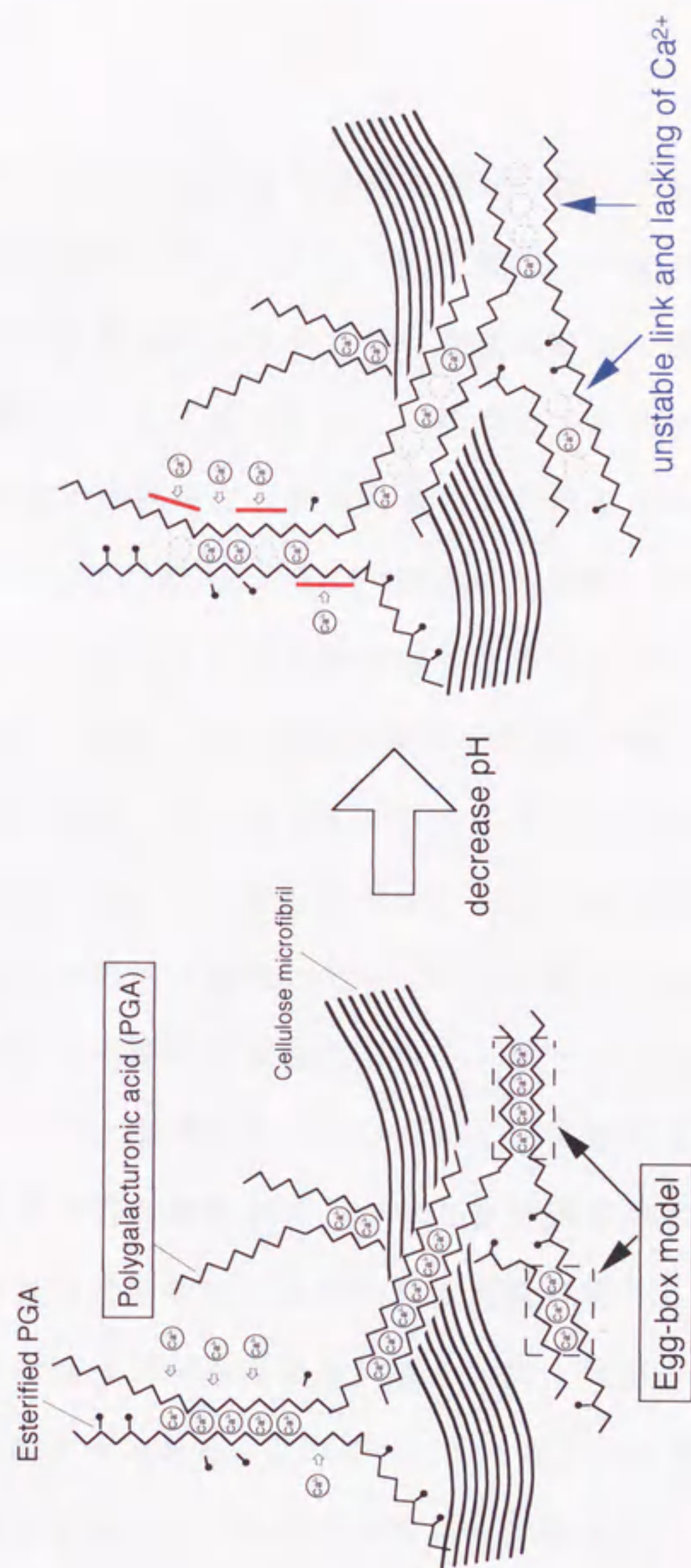


Figure 24. Diagram showing calcium cross-links between pectic polysaccharide in cell wall.

総合考察

一般に酸性土壌での植物の生育障害は、地上部の損傷のみならず、著しい根部の生育障害を伴う。この生育障害は、土壌 pH の低下に伴って可溶化する Al の過剰障害と水素イオンの過剰障害が相乗的に作用する複雑なストレス障害である。従って、この現象を実験的に証明するためには、溶液化学に配慮した単純な水耕液を用いて、植物を栽培することが望ましいと考えられている (Conner and Meredith 1995b)。本研究では、これまで困難であったシロイヌナズナ幼植物を独自の手法で水耕栽培し、根部に及ぼす Al 並びに水素イオン毒性の特性を厳密に評価することに成功した。ストレス評価の実験には、スライドガラスを支持体とした栽培法 (Figure 1) とスライドマウントに挟んだナイロンネットを支持体とする (figure 2) 2つの水耕栽培法を適用した。これらの栽培法はそれぞれに異なる特性を持ち、前者は短期的な栽培において、個々の幼植物体を顕微鏡下で経時的に観察することが可能であるのに対し、後者は根部細胞のバイアビリティが高く維持された植物体を、一度に数百個体供試することを可能にした。さらに後者の栽培法は、長期的な栽培を可能とし、栽培期間中の微生物の繁殖と植物体地上部の浸漬に注意すれば、無傷の側根を多数形成した植物体を得ることができる。このようにして得られた植物根では、例えば、異なる重金属イオンストレスが及ぼす、根部障害のわずかな差異を区別することが可能であった (Toda et al. 1999)。従って、本研究で考案したシロイヌナズナ幼植物を水耕栽培する両手法は、シロイヌナズナのストレス応答に関する研究だけにとどまらず、今後益々活発化するであろう栄養生

理に関する研究においても、分子生物学的研究の端緒となることが期待される。

本研究では、上記の水耕栽培法を適用し、シロイヌナズナ幼植物根の A1 並びに水素イオンストレスに対する感受性が極めて高いことを明らかにし、さらに、両ストレスによる根伸長阻害パターンが異なることを見いだした。これらのことは、酸性ストレス耐性機構の解明に関する分子生物学的研究において、シロイヌナズナが適した植物種であることを示唆している。つまり、有効なストレス耐性系統の選抜や、酸性ストレス耐性関連遺伝子を単離し、その遺伝子の耐性の有無を評価する際の宿主植物として、本植物が適していると考えられる。

一般に耐性機構を研究する場合、ある形質以外の遺伝的背景がほぼ同じ近郊系 (RI ライン) から耐性系統を獲得することができれば、耐性戦略並びに耐性機構を解明する上で、極めて有効であると考えられる (Taylor 1991)。実際、Riede and Anderson (1996) は、A1 に対する感受性が異なる 2 つのコムギを交配して獲得した RI ラインを用い、A1 耐性に関与する遺伝子の染色体上の位置を決定している。しかしながら、多くの場合、栽培種で明確な耐性変異体を獲得することは困難であるため、耐性機構の解明は、植物種間あるいは品種間の耐性差を基準として行っているのが現状である (Pellet et al. 1995, Huang et al. 1993)。これに対して、シロイヌナズナ植物は変異誘発処理が簡便に行え、多数の変異が増幅した母集団を選抜に供試できるため、遺伝的にほぼ同等で目的の形質のみが明確に異なる耐性系統を、効率よく獲得することができると考えられる。

本研究では、A1 耐性系統の選抜のために $100\ \mu\text{M}$ CaCl_2 を含む $5\ \mu\text{M}$ AlCl_3 溶液を調製し、HCl で初発 pH が 5.0 となるように設定した。これは

A1に関する研究を行っている、他の研究者らの報告では類を見ない極めて穏和な条件であり、正にこの点がポイントである。シロイヌナズナは他の一般作物と比較しても、A1イオン並びに水素イオン両ストレスに対して極めて感受性が高いため、低いpH条件での選抜は不当なA1ストレス耐性系統の作出を招きかねない。例えば、コムギの幼植物（品種：Tyler）は、 $18\mu\text{M}$ の AlCl_3 溶液で処理した場合、根伸長が50%阻害を受け、根伸長阻害程度は培地中のA1含量が増加するに従って著しくなった（Tice et al. 1992）。ところが極めて低濃度のA1で処理した場合、低pHではむしろ根の生育は促進された（Kinraide 1993）。これは、極めて低濃度のA1存在下では、培地中に高濃度に存在する水素イオンと低濃度のA1イオンが競合し合い、A1イオンが水素イオンの毒性を軽減するためであると考えられる。従って、A1耐性植物の選抜条件で、pHを低く設定した場合、選抜培地中のストレスはより複雑になり、獲得した変異体の耐性形質が不透明になる可能性が生じる。この点に関して、本研究で採用したA1ストレス選抜条件は、pHを水素イオンによる生育阻害が認められない範囲（pH5.0）に調整したため、A1イオン自体による毒性を反映した系であると考えられる。実際、獲得した耐性系統は、種子後代でA1ストレスに対して耐性を示した。これにより、幼植物の根伸長を指標とした、比較的穏和な条件での選抜法が、A1耐性植物の獲得に有効であることが証明された。後代植物のA1耐性に関しては、主に生育面からの解析にとどまったが、獲得した耐性系統が、既報のA1耐性メカニズムを獲得したものなのか、あるいは全く異なるメカニズムにより耐性を発現したのか興味を持たれる。

これまでのところ、A1耐性に関する一連の研究により、A1耐性メ

カニズムとして大きく分けて2つの戦略が提唱されている。ひとつはシン
プラスト内でのAlの無毒化、他方は根端からのAlイオン吸収防止機構
である (Taylor 1991, Delhaize and Ryan 1995, Kochian 1995)。前者に
関しては、シンプラスト内での耐性メカニズムが未だ明確にされていない
が (Aniol 1984)、後者は、細胞外に放出されるリンゴ酸やクエン酸が細胞
外でAl-有機酸錯体を形成し、植物体内へのAlの吸収を抑制する戦略
であると報告されている (Ryan et al. 1995, Pellet et al. 1994)。Delhaize
and Ryan (1995) は、コムギの近郊系を用いて、Alストレスに特異的な
誘導機構として、Al耐性系統が培地中へ多量のリンゴ酸を分泌すること
を報告した。しかしながら、リンゴ酸の放出量がAlの無毒化に十分量で
あるか否かについて不明な点もあり、他の植物種でのAl解毒に対するリ
ンゴ酸の貢献度を考慮すると、これが正当なAl耐性機構であるか否か疑
問が残る。シンプラスト内でのAlの無毒化機構および細胞外でのAlの
無毒化機構を想定し、今回獲得したAl-t系統の植物体内へのAl吸収量お
よび有機酸放出量をそれぞれ測定した。黒ボク土壌で栽培した時の生育が
同程度であった2処理区では、Al-tの植物体中のAl含量が、Ler野生型
のそれより多いことが分かった。一方、シロイヌナズナを長期的に水耕栽
培し、培地中に放出されたクエン酸及びリンゴ酸量を測定したところ、ク
エン酸は処理区に関係なくAl-tが野生型の約1.4倍多く放出していたもの
の、リンゴ酸は両系統間で全く差は認められず、選抜したAl-t系統におい
ては有機酸放出が直接Al耐性の強化につながったとは考えにくい。いず
れも予備的な結果ではあるが、Al-t系統は、植物体内での高Al量に対し
て耐性を獲得した変異体である可能性が推測された。しかしながら、繰り
返し記述したようにシロイヌナズナ植物体は微細であるため、必ずしもこ

のような微量化学分析に適した材料を提供する訳ではない。むしろ、A 1 ストレス研究における本論文の貢献は、A 1 耐性植物の選抜に関して、以下の3点を明らかにしたことである。つまり、1) A 1 耐性形質は種子後代でも発現し、2) その形質は水耕栽培における根部の生育だけでなく、実際の酸性ストレス土壌での地上部の生育回復にもつながる、3) さらにこれらの結果から、幼植物の一次根を指標としたスクリーニング法が、A 1 耐性系統の獲得に有効であることを明確に示した点である。このことは、今後のA 1 並びに水素イオンストレス耐性を研究する上で、より多くの好適な材料を供試できることを強く示唆している。

根端におけるパイアピリティを指標とした酸性ストレス耐性評価では、特に、水素イオンによる根端破壊が部位特異的かつ時期特異的に現れ、低pH ストレス障害が何らかの規則的なパターンにしたがって起こる障害であると推測された (Figure 7, 8)。ここで興味深いのは、水素イオンによる障害は伸長過程の根部伸長領域のみをターゲットとしており、さらにこの障害が不可逆的であることである。従って、この障害機構をモデル化するにあたっては、根端伸長と部位特異的細胞不活性化に関するデータを集積し、相互の現象を比較統合する必要があると考えられる。現時点では、水素イオン毒性についてそのメカニズムを明確に示した報告はほとんどなく、Kinraide et al. (1994) により Ca^{2+} イオン置換説が提唱されているに過ぎない。水素イオン障害の初期段階では、水素イオンはアポプラストにおいて何らかの根伸長阻害作用を及ぼしている可能性が示唆された。また、根伸長における Ca^{2+} の必要量が pH によって異なることから、細胞壁での Ca^{2+} の役割に対して、水素イオンが密接に関係していると予想される。本論文では、得られた一連の結果を基に、水素イオン障害に関する一つの仮説を

立てた。つまり、水素イオン障害は活発に伸長する細胞において、細胞壁ペクチン中の Ca^{2+} 架橋作用を阻害し、このために Ca^{2+} 依存の架橋構造部位が不安定になる (Figure 24 参照)。このような細胞壁はもろくルーズになり、続いて細胞間隙の亀裂や原形質膜損傷といった細胞破壊が起こり、その結果、回復不能な不可逆的伸長阻害に至ると考えられる。

以上のように、本研究では酸性土壌ストレス因子を実験室レベルで厳密に評価し、選抜を実施すると共に、耐性系統の生育応答を実際の酸性土壌ストレス条件下で評価する実験系を確立した。これにより、水耕栽培による根伸長を指標とした A1 耐性変異体の作出が有効であることが実証された。さらに、根端部における A1 並びに水素イオンストレスによる初期障害が異なることを見だし、特に細胞活性の低下を伴う低 pH 特異的障害については、水素イオン毒性のターゲットが Ca^{2+} を介した細胞壁のペクチンネットワークの崩壊に関与している可能性を予測した。現状では、現象の呈示にとどまったが、今後は酸性ストレス障害について、A1 と水素イオンストレスに対する耐性機構を個別に解明することが望まれる。その際、両ストレスに対する耐性系統を作出するための手法として、本論文で示した水耕栽培による実験系は十分に適応可能であると考えられる。

要約

植物の酸性土壌ストレスに対する耐性機構の解明は、今なお、土壌・肥料学分野での最重要課題となっている。本研究では、これまで困難であったシロイヌナズナ幼植物を独自の手法で水耕栽培し、根部酸性障害因子である Al^{3+} イオン並びに水素イオン毒性を明確に区別することにより、両ストレスに対するシロイヌナズナの生理的応答を明らかにした。

1) シロイヌナズナ幼植物は、 $1\ \mu\text{M}$ の AlCl_3 存在下で約 50 % の根伸長阻害を受け、 $\text{pH} 5$ 以下の低 pH 溶液中でも著しい伸長阻害を受けた。このことから、本植物種が、酸性土壌ストレスに対して、一般の作物種と同等かそれ以上の感受性を有することが明らかとなった。また、FDA-PI 染色により根端の細胞活性を調べたところ、 Al^{3+} イオン処理根は高い活性を維持し続けたのに対し、低 pH 処理根は短時間のうちに伸長領域に細胞破壊を起こしたことから、両ストレスによる根伸長阻害プロセスが異なることが明らかとなった。2) シロイヌナズナ系統間には、 Al^{3+} イオンに対する耐性能に明確な差異が認められた。選抜した Al^{3+} 耐性系統の Al^{3+} イオンストレス耐性形質は、水耕栽培・土耕栽培を通じて発現され、両栽培法における系統間の耐性差には相関が認められた。従って、 Al^{3+} 耐性能は遺伝可能な形質であり、一次根を指標とした Al^{3+} 耐性系統の選抜が有効であると結論した。3) 水素イオン毒による初期障害は、根端伸長領域に限定される不可逆的な細胞損傷であることが明らかとなった。また、この障害は、植物体中における Ca^{2+} の作用を部分的に代替できる Sr^{2+} や Ba^{2+} によって軽減されたことから、水素イオン毒の初期特性は、細胞壁ペクチン多糖における Ca^{2+} 架橋構造の不安定化を引き起こすと推察された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始有益な御助言・御指導を賜り、また本論文の取りまとめに際しても多大なる御尽力を頂きました岐阜大学農学部原徹夫教授に心から感謝致します。

また、本研究遂行にあたり、日常的に討論を行い、常に親身に御指導いただきました岐阜大学農学部小山博之講師に深く感謝致します。

本論文の御校閲と御助言を賜りました岐阜大学農学部河合啓一教授、静岡大学農学部久保井徹教授並びに信州大学農学部柴田久夫教授に感謝いたします。

共に研究し、日頃の討論において有益な助言をくださった同輩瀧田英司君をはじめとする、植物細胞工学研究室の院生、学部生並びに卒業生の皆様と常に暖かい励ましの言葉をかけてくださった学外の皆様、特に田辺草平氏に感謝致します。

また、本論文取りまとめに際し、御配慮を賜りました通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所町田雅之博士にお礼申し上げます。

最後に、大学院進学を快諾し、最後まで暖かく見守り続けてくれた家族に心から感謝します。

平成 11 年 9 月 15 日

戸田 智美

引用文献

Aniol A (1984) Induction of aluminum tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminum in the nutrient solution. *Plant Physiol.* 75, 551-555

Arihara A, Kumagai R, Koyama H and Ojima K (1991) Aluminum-tolerant of carrot (*Daucus carota* L.) plants regenerated from selected cell cultures. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 37, 699-705

Baligar VC, Campbell TA and Wright RJ (1993) Differential responses of alfalfa clones to aluminum-toxic acid soil. *J. Plant Nutr.* 16, 219-233

Baskin TI, Betzner AS, Hoggart R, Cork A and Williamson RE (1992) Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J. Plant Physiol.* 19, 427-438

Bennet RJ and Breen CM (1991) The aluminium signal: new dimensions of mechanisms of aluminium tolerance. *Plant and Soil* 134, 153-166

Cao Y, Glass ADM and Crawford NM (1993) Ammonium inhibition of *Arabidopsis* root growth can be reversed by potassium and by auxin resistance mutations *aux1*, *axr1*, and *axr2*. *Plant Physiol.* 102: 983-989

Carpita NC and Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1-30

Conner AJ and Meredith CP (1984) An improved polyurethane support system for monitoring growth in plant cell cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 3, 59-68

Conner AJ and Meredith CP (1985a) Strategies for the selection and characterization of aluminium-resistant variants from cell cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta*. 166, 466-473

Conner AJ and Meredith CP (1985b) Simulating the mineral environment of aluminum-toxic soils in plant cell culture. *J. Exp. Bot.* 36, 870-880

Conner AJ and Meredith CP (1985c) Large scale selection of aluminum-resistant mutants from plant cell culture: expression and inheritance in seedlings. *Theor. Appl. Genet.* 166, 466-473

Delhaize E and Ryan PR (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107, 315-321

Dommes J and Walle CV (1990) Polysome formation and incorporation of new ribosomes into polysomes during germination of the embryonic axis of maize. *Physiol. Plant* 79, 289-296

Ernst PJ, Rodecap KD and Tingey DT (1991) *Arabidopsis Information Service*. 18: 1

Flashman SM and Filner P (1978) Selection of tobacco cell lines resistant to selenoamino acid. *Plant Sci. Lett.* 12, 219-229

Foy CD, Chaney RL and White MC (1978) The physiology of metal toxicity plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 511-566

Foy CD (1983) Plant adaptation to mineral stress in problem soils. *Iowa J. Res.* 57, 339-354

Fujiwara T, Hirai MY, Chino M, Komeda Y and Naito S (1992) Effects of sulfur nutrition on expression of the soybean seed storage protein genes in transgenic petunia. *Plant Physiol.* 99, 263-268

Gibeaut DM, Hulett J, Cramer GR and Seemann JR (1997) Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol.* 115, 317-319

Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC and Thom D (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS lett.* 32, 195-198

Hanson JB (1984) The functions of calcium in plant nutrition. In PB Tinker, A Lauchli, eds, *Advances in Plant Nutrition*, Vol. 1, pp149-208 Praeger Scientific, New York

Haug A and Smidsrød O (1970) Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions. *Acta. Chem. Scand.* 24, 843-854

Hewitt EJ and Smith TA (1975) Soil problems and diagnostic aspects of mineral

nutrition. *In Plant Mineral Nutrition.*, English University Press, London, pp105-145

Hirai MY, Naito S and Chino M (1993) Method for hydroponic culture of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Technology*. (in Japanese) 5, 484-487

Howden R and Cobbett CS (1992) Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 99, 100-107

Hue NV, Craddock GR and Adams F (1986) Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Soc.Am. J.* 50, 28-34

Huang JW, Grunes DL and Kochian LV (1993) Aluminum effects on calcium ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) translocation in aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars: Differential responses of the root apex versus mature root regions. *Plant Physiol.* 102, 85-93

Jones KH and Senft JA (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J.Histochem.Cytochem.* 33, 77-79

Juretic B and Jelaska S (1991) Plant development in long-term embryogenic callus lines of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell Reports* 9, 623-626

Kinraide TB and Parker DR (1987) Cation amelioration of aluminum toxicity in wheat. *Plant Physiol.* 83, 546-551

Kinraide TB and Parker DR (1990) Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum to four dicotyledonous species. *Physiol. Plant.* 79, 283-288

Kinraide TB, Ryan PR and Kochian LV (1994) Al^{3+} - Ca^{2+} interactions in aluminum rhizotoxicity. II Evaluating the Ca^{2+} -displacement hypothesis. *Planta* 192, 104-109

Kinraide TB (1998) Three mechanisms for calcium alleviation of mineral toxicities. *Plant Physiol.* 118, 513-520

Kobayashi M, Matoh T and Azuma J (1996) Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.* 110, 1017-1020

Kochian LV (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plant. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 237-260

Koyama H, Toda T, Yokota S, Dawair Z and Hara T (1995) Effects of aluminum and pH on root growth and cell viability in *Arabidopsis thaliana* strain Landsberg in hydroponic culture. *Plant Cell Physiol.* 36, 201-205

Larsen PB, Tai C-Y, Kochian LV and Howell SH (1996) Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminum. *Plant Physiol.* 110, 743-751

Larsen PB, Kochian LV and Howell SH (1997) Al inhibits both shoot development and root growth in als3, an Al-sensitive Arabidopsis mutants. *Plant Physiol.* 114, 1207-1214

Larsen PB, Degenhardt J, Tai C-Y, Stenzler LM, Howell SH and Kochian LV (1998) Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol.* 117, 9-18

Leaver JP and Russele EW (1957) The reaction between phosphate and phosphate-fixing soils. *J. Soil Sci.* 8, 113-126

Ma JF, Zheng SJ, Hiradate S and Matsumoto H (1997) Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* 390, 569-570

Masucci JD and Schiefelbein JW (1994) The *rh6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant Physiol.* 106, 1335-1346

Matoh T and Kobayashi M (1998) Boron, calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell wall. *J. Plant Res.* 111, 179-190

Nanzyo M, Takahashi T, Sato A, Shoji S and Yamada I (1997) Dilute acid-soluble phosphorus in fresh air-borne tephros and fixation with an increase in active aluminum and iron. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43, 839-848

Ojima K and Ohira K (1983) Characterization of aluminum and manganese tolerant cell lines selected from carrot cell cultures. *Plant Cell Physiol.* 24, 789-797

Okada K and Shimura Y (1990) Reversible root tip rotation in *Arabidopsis*

seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* 250, 274-276

O'Neill MA, Warrenfeltz D, Kates K, Pellerin P, Doco T, Darvill AG and Albersheim P (1996) Rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *J. Biol. Chem.* 271, 22923-22930

Pellet DM, Grunes DL and Kochian LV (1995) Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 196, 788-795

Pettersson A, Hallbon L and Bergman B (1988) Aluminium effects on uptake metabolism of phosphorus by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Plant Physiol.* 86, 112-116

Riede CR and Anderson JA (1996) Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Science* 36, 905-909

Reid RJ, Tester MA and Smith FA (1995) Calcium/aluminium interactions in the cell wall and plasma membrane of *Chara*. *Planta* 195, 362-368

Rhue RD and Grogan CO (1977) Screening corn for aluminum tolerance using different Ca and Mg concentrations. *Agron. J.* 69, 755-760

Ryan PR, Ditomaso JM and Kochian LV (1993) Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal of Exp. Botany* 44, 437-446

Saigusa M, Shoji M and Takahashi T (1980) Plant root growth in acid Andosols from northeastern Japan, 2 Exchange acidity y_1 as realistic measure of aluminum toxicity potential. *Soil Sci.* 130, 242-250

Sanchez PA, Bandy DE, Villachica JH and Nicholaides JJ (1982) Amazon basin soils: management for continuous crop production. *Science* 216, 821-827

Schiefelbein JW and Somerville C (1990) Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2, 235-243

Schiefelbein JW, Shipley A and Rowse P (1992) Calcium influx at the tip of growing root-hair cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 187, 455-459

Shoji S, Miyake M and Takeuchi Y (1964) Comparison of methods of available soil phosphorus determination II. Correlation between soil tests and "A" values. *Res. Bull. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn.* 84, 32-39

Shoji S, Ito T, Saigusa M and Yamada I (1985) Properties of nonallophanic andosols from Japan. *Soil Sci.* 140, 264-277

Simmons C, Migliaccio F, Masson P, Caspar T and Söll D (1995) A novel root gravitropism mutant of *Arabidopsis thaliana* exhibiting altered auxin physiology. *Physiol. Plant.* 93, 790-798

東海林覚 (1992) 山形県の水田土壌におけるリン酸蓄積の実体とその有効活用. 山形農試特別報 21, 1-48

Tanaka A, Tadano T, Yamamoto K and Kanamura N (1987) Comparison of toxicity to among Al^{3+} , AlSO_4^{4+} , and Al-F complex ions. *Soil.Sci.Plant Nutr.* 33, 43-55

Taylor GJ (1991) Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. *In* Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology, vol. 10: pp57-93, Interdisciplinary Plant Group ed., University of Missouri

Tice KR, Parker DR and Demason DA (1992) Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol.* 100, 309-318

Toda T, Koyama H and Hara T (1997) Selection of aluminium-tolerant variants in *Arabidopsis thaliana* in solution culture. *In* Plant nutrition - for sustainable food production and environment, Eds. T Ando, K Fujita, T Mae, H Matsumoto, S Mori and J Sekiya p. 465-466, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Toda T, Koyama H and Hara T (1999) A simple hydroponic culture method for the development of a highly viable root system in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 210-212

Toma M and Saigusa M (1997) Effects of phosphogypsum on alteration of strongly acid nonallophanic andosols. *Plant and Soil* 192, 49-55

Widholm MJ (1976) Selection and characterization of cultured carrot and tobacco cells resistant to lysine, methionine and proline analogs. *Can. J. Bot.* 54, 1523-1529

Williams MNV, Freshour G, Darvill AG, Albersheim P and Hahn MG (1996) An antibody fab selected from a recombinant phase deesterified pectic polysaccharide rhamunogalacturonan II in plant cells. *Plant Cell* 8, 673-685

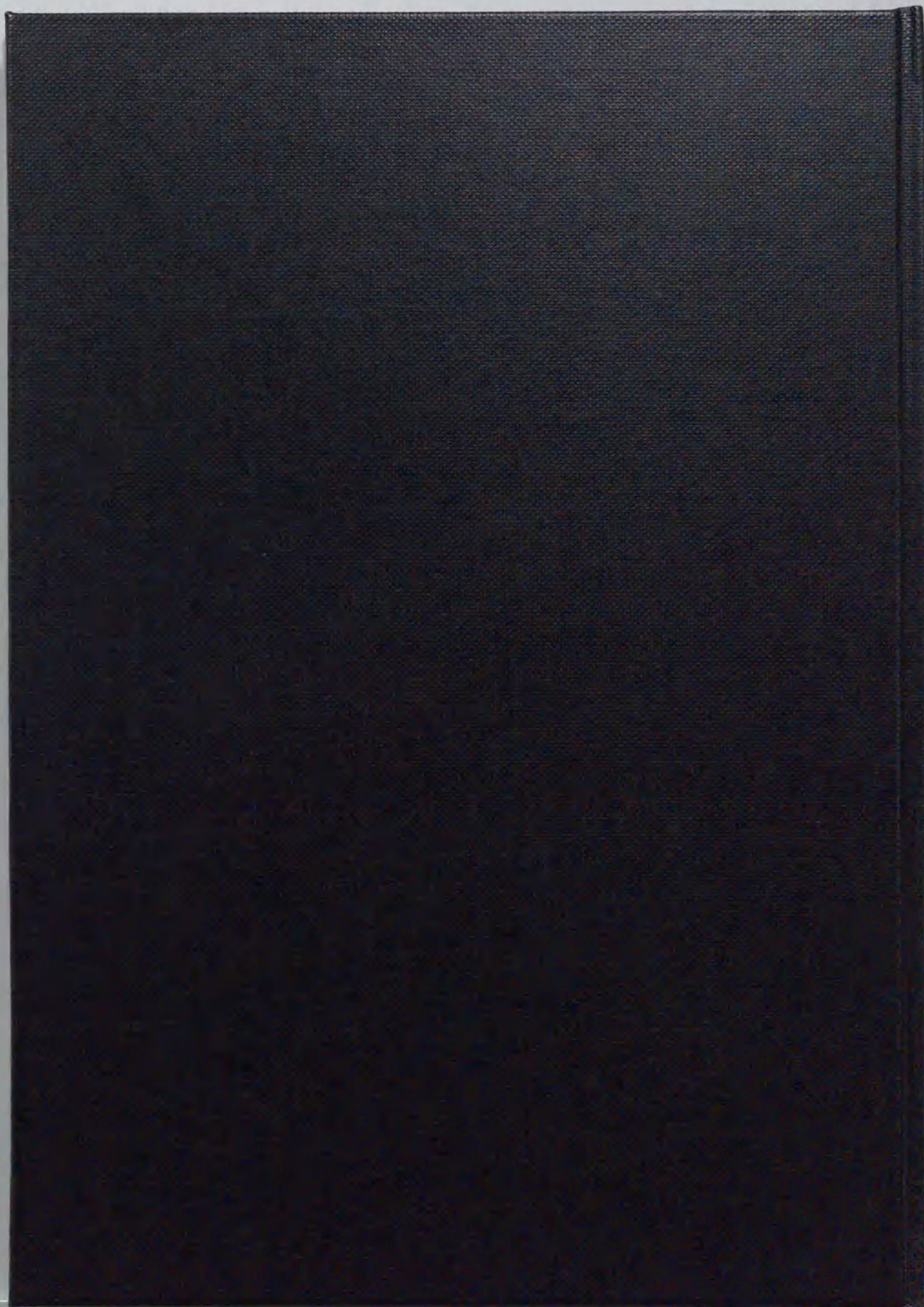
Wagatsuma T and Ezoe Y (1985) Effect of pH on ionic species of aluminium in medium and on aluminium toxicity under solution culture. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 31, 547-561

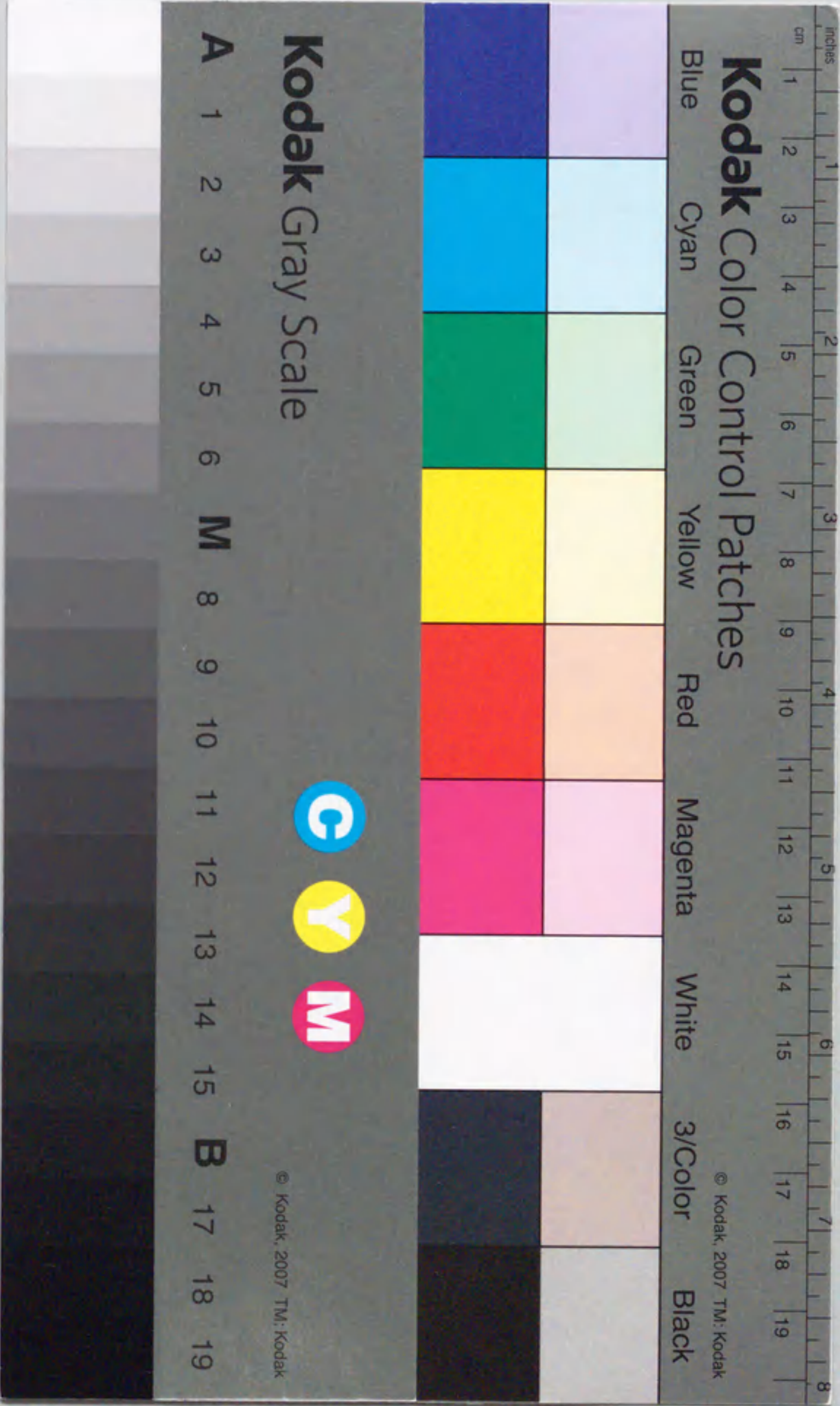
Yan F, Schubert S and Mengel K (1992) Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and root growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol.* 99, 415-421

Yermiyahu U, Nir S, Ben-Hayyim G, Kafkafi U and Kinraide TB (1997) Root elongation in saline solution related to calcium binding to root cell plasma membranes. *Plant and Soil* 191, 67-76

Yokota S and Ojima K (1995) Physiological responses of root tips of alfalfa to low pH and aluminum stress in water culture. *Plant and Soil* 171, 163-165

Yuan TL (1959) Determination of exchangeable hydrogen in soils by a titration method. *Soil Sci.* 88, 164-167





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19