

アルミニウムによる根伸長阻害の分子機構

—アルミニウムイオンによる活性酸素誘発とミトコンドリア機能障害について—

山本 洋子

岡山大学資源生物科学研究所

要 旨：酸性土壌では植物の生育が阻害され、その主要な生育阻害因子はアルミニウム (Al) イオンと考えられている。土壌水中の Al イオン濃度は、土壌の酸性化に伴って増加し、根端の分裂・伸長域に特異的に集積して、細胞伸長を直ちに阻害する。このような Al イオンによる根の生育阻害機構を細胞や分子のレベルで明らかにすることを目的に、タバコ培養細胞株を実験材料として導入し、培養細胞と根における Al に対する応答反応を比較検討した結果、Al が活性酸素とミトコンドリアの機能障害を誘発し、活性酸素が決定因子となって細胞増殖（根の場合は細胞伸長）が阻害される新しいタイプの Al 毒性機構を見い出した。

キーワード：Al 毒性機構、活性酸素、脂質過酸化、タバコ培養細胞、ミトコンドリア。

1. はじめに

作物の生育が悪く農耕地に適していない土壌を問題土壌と呼び、中でも酸性土壌は熱帯・亜熱帯地域を中心に広く分布し、世界の農耕可能地面積の約 40% を占めている。日本の土壌において広く見られる黒ボク土も火山灰性の酸性土壌である。このような酸性土壌における作物の生育阻害因子としては、水素イオン (H^+) の害や H^+ の増加により土壌から Ca, Mg, K, NH_4 等の植物の生育に必要な陽イオンが溶脱したり、逆に Al や Mn などの有害イオンが増加すること、さらに Al イオンによるリン酸イオンの不可給態化など複数存在するが、これらの中でも主要な生育阻害因子は毒性の高い Al イオンであると考えられている。Al は地殻の構成元素の中でも O, Si につづいて 3 番目に多い元素である。Al の土壌水への溶解度は、 H^+ 濃度の増加とともに増え、土壌水の pH が 5 以下の酸性土壌で顕著に高まる。Al イオンは、双子葉植物でも単子葉植物でも、根の先端の細胞分裂域から細胞伸長域の主として表皮の若い細胞に結合し、直ちに細胞伸長阻害を引き起こすが、根の基部に存在する細胞への結合は少ない。Al の集積部位は主としてアポプラスト領域であり、細胞壁から原形質膜の細胞壁側にかけての領域に結合することによって様々な細胞応答反応を誘導するものと思われる。しかし、

ごく微量の Al が細胞質内に取り込まれ種々の代謝異常を誘導する可能性も否定できない。Al に対する応答反応は、形態変化から代謝変動まで数多く報告されているが、その中で初期応答反応である根の伸長阻害とそれに伴うカロース (β -1, 3 グルカン) の分泌は Al 障害の指標と考えられている。しかし、これら Al 障害の生成機構はまだ解明されていない。

Al 自身は遷移金属ではないために、酸化還元反応を触媒することは出来ない。しかし、これまでの研究から、Al による障害の中に活性酸素障害が含まれることが示唆されている。Cakmak と Horst (1991) は、ダイズ (*Glycine max*) の水耕栽培において、Al が根において脂質過酸化を誘発し、さらに活性酸素消去系の酵素活性をわずかではあるが誘導することを見出し、Al によって活性酸素種 (ROS) の誘発と ROS による障害が根の生育阻害を引き起こす可能性について初めて報告した。その後、Al 毒性に関する生理・生化学的ならびに遺伝学的解析が進むにつれ、上記の仮説を支持する証拠が多く集積してきている。我々も Al による根の細胞伸長阻害機構の解明を目指し、エンドウ根とタバコ培養細胞の系を用い、両者の系における Al 応答反応を比較検討しながら解析した結果、Al がミトコンドリアの機能障害と ROS を誘発し、ROS の誘発が細胞増殖阻害の決定

2002 年 11 月 20 日受付

*連絡先 〒710-0046 倉敷市中央二丁目 20-1

Fax: 086-434-1210 E-mail: yoko@rib.okayama.ac.jp

因子と考えられる新しい Al 毒性機構を見出した (Yamamoto et al., 2002a; Yamamoto et al., 2002b). このミニレビューでは, Al イオンによる植物の生育阻害機構について, 活性酸素ストレスとの関わりに焦点を絞り我々の研究結果を中心にまとめた. なお, 植物における Al 毒性や Al 耐性機構全般に関する理解のためには, 他の総説を参考にして頂きたい (Kochian and Jones, 1997; Ma, 2001; Matsumoto, 2000; Matsumoto et al., 2001; 山本, 2001).

2. Al による脂質過酸化の促進

生体内で生成する ROS には, O_2 に電子が一つ付加したスーパーオキシドアニオン(O_2^-), O_2^- から酵素的ないしは非酵素的に生じる過酸化水素, O_2^- と過酸化水素の存在下に Fe イオンの触媒によって生成する OH ラジカル, O_2 が光や化学エネルギーにより励起されて生じる一重項酸素等があり, 主として葉緑体やミトコンドリアにおける各々光合成や呼吸に伴って発生する. ROS のうち, OH ラジカルの反応性が最も高く様々な生体内分子に作用して活性酸素障害を引き起こす. 活性酸素障害の中で最も広範囲に見られるのが生体膜における脂質過酸化である (Halliwell and Gutteridge, 1999). ここでは, Al による脂質過酸化の促進について述べる.

Al イオンは Mg^{2+} や Ca^{2+} に比べ, はるかに生体膜への親和性が高く (Akeson et al., 1989), さらに膜に結合することによって膜を固くすると言われている (Deleers et al., 1986). 一方, 遷移金属である Fe イオンは酸化還元反応を触媒し, 生体膜中に脂質過酸化物が存在すると脂質ラジカルの形成を連鎖的に触媒して脂質過酸化が拡大する (Halliwell and Gutteridge, 1999). このような Fe イオンの触媒する脂質過酸化が Al の結合した膜ではさらに著しく促進されることが人工膜の系で示されている (Oteiza, 1994). 同様の現象を, 生きたタバコ培養細胞においても見ることが出来る (図 1). タバコ培養細胞を単純なカルシウム溶液 (3 mM $CaCl_2$ - 3% 蔗糖, pH 4.5; 以下 Ca 培地と表記する) に懸濁し Al を添加すると, Al はすみやかにタバコ細胞に結合するが, Al が結合しただけでは, 原形質膜の脂質過酸化の程度は Al が結合していないコントロール細胞と変わらない. また, 原形質膜の透過性をエバンスブルー (正常な原形質膜は透過しない色素) の透過性で見ると, Al が結合した細胞の原形質膜の透過性はコントロール細胞と変わらない. しかし, Al が結合した細胞に, コントロールの細

胞では脂質過酸化反応をほとんど触媒しない程度の微量の 2 価鉄を添加すると, 直ちに脂質過酸化の著しい増加が見られ (図 1 A), ついでエバンスブルーの透過性も高まることから (図 1 B), Al と 2 価鉄が相乗的に作用して脂質過酸化を促進し, その結果, 膜の機能が損なわれていることが分かる (Ikegawa et al., 2000). このような Al を結合した生体膜において Fe イオンの触媒する脂質過酸化反応が強く促進される現象は, 非酵素的な反応によるものであり, 動物細胞でも報告されている. 以上, Al イオンの細胞膜への結合は, それ自体は膜の機能を損なうものではないが, Fe イオン依存性の脂質過酸化反応を促進する反応は Al 障害機構の一つと考えて良いであろう.

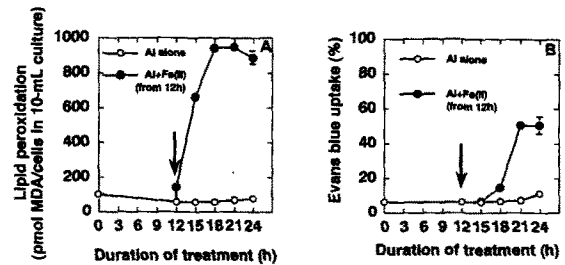


図 1 タバコ培養細胞に見られる Al の結合による Fe-依存性脂質過酸化反応の促進. Ca 培地に懸濁したタバコ培養細胞 (SL 株) に Al (50 μ M) を添加し 12 時間の培養後, 細胞を回収し洗浄した後 2 つに分け, $FeSO_4$ (5 μ M) を含む Ca 培地 (●) もしくは含まない Ca 培地 (○) に各々再懸濁し, さらに 12 時間の培養をして, 脂質過酸化 (A) と原形質膜損傷 (B, エバンスブルーの取り込み) の有無を定量化した. Al の細胞への結合のみでは, 脂質過酸化の促進も原形質膜損傷もほとんど見られないが, そこに微量の 2 価鉄を添加することにより, 直ちに脂質過酸化反応が誘発され, その後原形質膜の透過性にも異常を生じている (Ikegawa et al., 2000).

一方, エンドウ (*Pisum sativum* L. cv Alaska) の幼植物では, その根を単純なカルシウム溶液 (100 μ M $CaCl_2$, pH 4.75) に浸し, Al を添加すると, タバコ培養細胞の時と同様に Al は直ちに根端領域に結合するものの, タバコ培養細胞とは異なり, Fe イオンを添加せずとも, Al の結合と同時に脂質過酸化の促進が Al 結合部位に特異的に生じる (図 2 A, B). 抗酸化剤の Butylated hydroxyanisole (BHA) は, この Al の結合によって促進される脂質過酸化の大部分を抑制することが出来るが, Al による根の伸長阻害を抑制することは出来ない. さらに, 原形質膜の透過性の変動をエバンスブルーの取り込みで調べたが, Al が結合し脂質

過酸化を生じている根端の表皮においても透過性の変動は見られず、表皮の亀裂部位においてのみ見られる(図2D)。従って、Al が根の表皮細胞に結合することによって誘発する脂質過酸化は、原形質膜の機能に影響をおよぼすものではなく、また根の伸長阻害の原因でもないと思われる。前述のように、Al の結合のみで脂質過酸化が促進されることはないことから、エンドウ幼植物の場合は、子葉等から内在性の鉄イオンが Al 結合部位に供給されることによって脂質過酸化が促進される可能性や、次に述べるような Al の原形質膜への結合による細胞内における活性酸素の誘発を経て2次的に脂質過酸化の促進を招く可能性を考えている。いずれにしても、根において Al イオン単独で誘発される脂質過酸化は、Al の結合によって特異的に誘発される初期応答反応の一つであるが、原形質膜の機能低下を引き起こすものではなく、また根伸長阻害の原因でもないことから、Al 毒性機構を考える上では無視できる現象である(Yamamoto et al., 2001)。

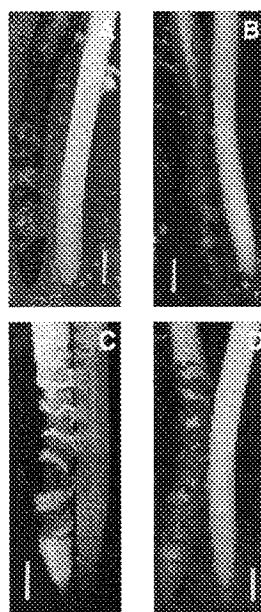


図2 エンドウ根における Al に対する応答反応(組織化学的染色法による解析)。エンドウ幼植物を Ca 溶液中で水耕栽培し、Al (10 μ M) を添加し 24 時間後の Al に対する応答反応を観察した。左側が Al 処理根、右側がコントロール根。バーは 1mm を表す。Al イオンは、主として根端の分裂・伸長域の表皮に結合し(A, ヘマトキシリン染色)、Al 結合部位に脂質過酸化(B, Schiff 染色)やカロースの分泌(C, アニリンブルー染色)を誘発する。一方、原形質膜損傷(D, エバンスブルー染色)は、Al の結合している表皮には見られず、表皮の亀裂部位においてのみ見られることから、Al が結合しても原形質膜の機能はほぼ正常に保たれていると思われる(Yamamoto et al., 2001)。

ところで、カロースの分泌もまた、エンドウの根端に Al が結合することによって引き起こされる初期応答反応であり(図2C)、Al 障害の指標と考えられている。そこで、カロース分泌に対する脂質過酸化の関わりについて、BHA による脂質過酸化抑制効果を利用して検討したところ、カロース分泌の 40%が脂質過酸化の促進によって引き起こされることが分かった(Yamamoto et al., 2001)。

3. Al による活性酸素の誘発とミトコンドリアの機能障害

(1) エンドウ根の場合

Al イオンが根に結合することにより ROS を生成するかどうかを、ROS と特異的に反応する蛍光試薬を用いて検討した(Yamamoto et al., 2002a)。Dihydroethidium (DHE) は、ROSの中でも O_2^- をより特異的に検出すると言われている(Costa-Pereira and Cotter, 1999)。DHE は、細胞内に取り込まれ、細胞内に O_2^- が存在すると、 O_2^- によって酸化されて ethidium が遊離する。ethidium は DNA に結合することにより 488nm の励起光を照射すると 605nm の蛍光を発するため、 O_2^- を生成している細胞を蛍光顕微鏡下で観察すると核やミトコンドリアが赤く染色されている。カルシウム溶液(pH 4.75)中でエンドウ根の Al 処理を行い、DHE で染色すると、 O_2^- の生成が根端の伸長域に特異的に生じていることが分かる(図3)。10 μ M の Al を添加した場合、根の伸長阻害は処理開始後 4 時間目から観察されたが(図5D)、 O_2^- の生成は 2 時間目から観察された(図3)。従って O_2^- の生成は Al に対する初期応答反応であり、かつ細胞伸長阻害との間に強い相関を示している。

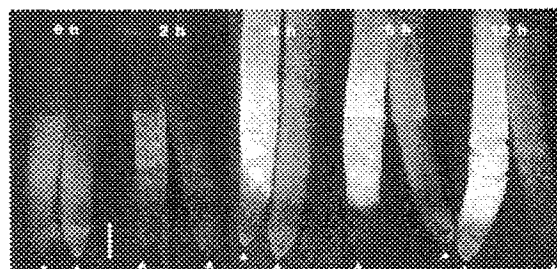


図3 エンドウ根における Al による活性酸素の誘発。エンドウ幼植物を Ca 培養液で水耕栽培し、Al (10 μ M) を添加後、経時的に活性酸素の誘発を DHE 染色で観察した。左側が Al 処理根、右側がコントロール根、三角は根の先端を、バーは 1mm を示している。Al 添加後約 2 時間目から伸長域に特異的な活性酸素の誘発が見られ、処理時間が長くなるにつれて増加している。Al は根端の分裂域にも結合しているが、そこでは活性酸素の誘発は見られない(Yamamoto et al., 2002b)。

光合成を行わない根の細胞における ROS の生成は、その大部分がミトコンドリアにおける呼吸に伴うものである (Møller, 2001). ミトコンドリアではマトリックスに存在する TCA 回路で生成した NADH から電子と H^+ を取り出し、電子は内膜に存在する電子伝達複合体を通して輸送され最終的には O_2 に渡され安全な H_2O になり (呼吸), 同時に H^+ がマトリックスから内膜と外膜の間隙に移動し内膜の内外に形成された H^+ の濃度勾配による膜電位 ($\Delta \Psi_m$) を形成する. 膜間隙の H^+ が内膜内のプロトンポンプを通して再びマトリックスに流れ込む際に ATP が合成される (図 4). しかし, ミトコンドリア内膜における電子の流れが阻害されるような状況が生じると, 電子は流れの途中で O_2 に渡され O_2^- を生じる. さらに O_2^- は過酸化水素から OH ラジカルへ変換されミトコンドリアの機能障害を引き起こし細胞死の引き金となる.

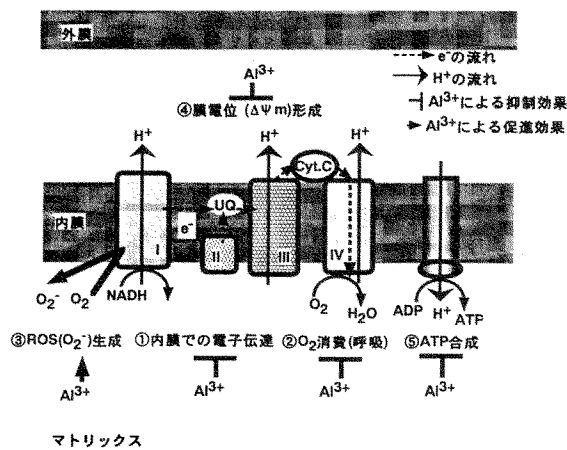


図 4 ミトコンドリア内膜の機能と Al による阻害効果. ミトコンドリア内膜では, マトリックスで生成された NADH から電子と H^+ を取り出し, 電子は電子伝達複合体 (I, II, III, IV) を通って移動し (①内膜内の電子伝達), 最終的には酸素に渡され (②呼吸), H^+ とともに水になる. ここで, 電子が内膜内を移動する際に電子の流れが阻害されると, 電子が酸素に渡されて活性酸素の O_2^- を生じる (③ O_2^- 生成). 一方, H^+ はマトリックスから内膜と外膜の間隙に移動して H^+ の濃度勾配をつくり膜電位 ($\Delta \Psi_m$) を形成する (④ $\Delta \Psi_m$ の形成). 膜間隙に蓄積した H^+ は, 内膜にあるプロトンポンプを通してマトリックスに戻る際に ATP が合成される (⑤ATP 合成). タバコ培養細胞では, Al 添加後, 初期応答反応としてミトコンドリア内膜の電子伝達と $\Delta \Psi_m$ 形成の抑制が見られる. さらに, 12 時間程度ののちに, 増殖能の低下が開始するのに伴って活性酸素の誘発, 呼吸阻害, 細胞内 ATP 含量の低下が見られるが, これらの現象は全てミトコンドリア内膜の機能が Al によって阻害された結果である可能性が高い (図 6, 参照).

これらの情報に基づき, Al の結合によって根の伸長域に誘発される O_2^- もミトコンドリア内膜の近傍で発生しミトコンドリアの機能障害を引き起こしている可能性を考え, Al 処理に伴うミトコンドリアの機能変動を呼吸量と ATP 含量を測定することによって推定した (図 5). その結果, エンドウ根端における細胞伸長ならびに呼吸量と ATP 含量が, Al 濃度依存的に (図 5 A, B, C) かつ伸長阻害の開始と同時に (図 5 D, E, F) 低下することが分かった. Al による O_2^- の生成が伸長阻害の原因であるかどうかについての解答は, エンドウ根において Al による O_2^- 生成を抑制する抗酸化剤が見つからないために, まだ得られていない. そこで, 次に, この点を明らかにすることを目的に, タバコ培養細胞を用いて Al 処理に伴う ROS の生成と細胞増殖阻害との関係を検討した. なお, Al が ROS の生成を促進する現象は, オオムギ (*Hordeum vulgare*) の根端でも報告されている (Pan et al., 2001).

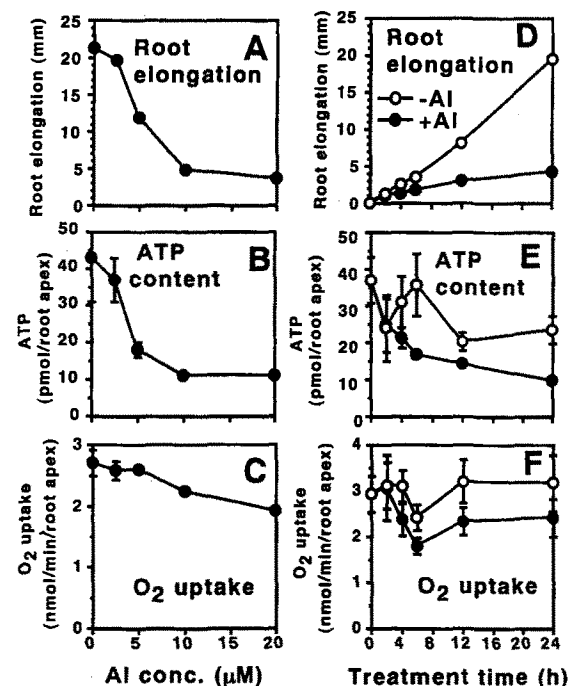


図 5 エンドウ根における Al に対する応答反応 (伸長阻害, ATP 含量の低下, 呼吸阻害) の Al 濃度依存性と経時変化. 図 2 と同様の条件でエンドウ根の Al 処理を行うと, 根端に見られる伸長阻害, ATP 含量の低下, 呼吸阻害の 3 つの応答反応は, 類似の Al 濃度依存性 (A, B, C: 20 μM までの Al を用い 24 時間処理) と経時変化 (D, E, F: 10 μM Al で 24 時間までの処理) を示す. このことは, 根の伸長阻害がミトコンドリアの機能障害によって引き起こされる可能性を示唆している (Yamamoto et al., 2002a).

(2) 実験材料としてのタバコ培養細胞株

ここで培養細胞株を用いた実験系について簡単に述べてみたい。植物体の一部を切り出し、適当な濃度のオーキシンを含む寒天培地上で培養をすると、脱分化してカルスを形成する。カルスを Murashige-Skoog 培養液等に懸濁し、振とう培養することによって細胞はある程度の集塊を形成するものの、培養液の中で増殖しつづける。これら懸濁培養細胞を寒天上に移せば、再びカルスを形成し寒天上で増殖する。カルス化した初期の細胞は個体にまで再生する能力を維持しているが、これらの細胞で発現している遺伝子は一律ではなくヘテロな細胞集団である。一方、培養細胞の継代を繰り返すうちに、個体再生能を失うかわりに遺伝的に均一な安定した細胞集団を得る場合があり、それらは細胞株と呼ばれる。タバコ培養細胞株の BY-2 や筆者らが用いている SL はともに細胞株である。これらの細胞株は、植物細胞の持つ基本的な構造や機能の解析に適している (Matsumoto et al., 2001)。

根における Al の障害は、Al が細胞表層に結合し細胞伸長を阻害する現象であることから、基本的には細胞レベルで解析できる現象である。さらに、根における Al の作用部位が根端の表皮に限定されていることから、根を材料とした細胞レベルの解析は容易ではない。一方、培養細胞株では、特に懸濁培養の場合、活発に増殖している細胞集団を容易に調製することが出来、Al の処理を行っても全ての細胞がほぼ均一に Al の攻撃を受けるため、Al に対する応答反応を細胞や分子のレベルで解析することが容易である。さらに、遺伝的に安定で均一な細胞株であれば、細胞株を突然変異原で処理し適当な選抜をかけることにより、突然変異細胞株を得ることが出来る。筆者らは、SL 株を化学変異原の Ethylmethane sulfonate で処理後、致死量の Al による選抜を繰り返す中から Al 耐性細胞株 (ALT301) を分離した (Devi, S.R. et al., 2001)。親株の SL 株 (Al 感受性) と Al 耐性株 ALT301 における Al に対する応答反応を比較検討することにより、Al による細胞増殖阻害に直結する代謝変動を特定し、Al 耐性に関わる分子を同定することも可能となる。以下、SL 株とともに ALT301 株を用いた Al 応答反応の解析結果について述べる。

(3) タバコ培養細胞の場合

SL 細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv Samsun 由来の葉緑体を持たない細胞株) (Nakamura et

al., 1988) の Al 処理をエンドウ根のそれと出来るだけ類似の条件で行うために Al 処理液を検討し、現在では 3 mM CaCl_2 と 30%の蔗糖を含む単純な Ca 培地を用いて Al に対する応答反応を解析している (Ikegawa et al., 2000)。なお、Ca 培地では増殖に必要な無機塩やオーキシンのないために細胞は増殖しない。そこで、Al の増殖能への影響を評価するためには、Al で処理した細胞と Al 無添加の条件下で同様に処理したコントロール細胞とを増殖用の培養液に再懸濁し、一定期間培養したのち、コントロール細胞の湿重量に対する Al 処理細胞の湿重量の割合で増殖能を定量化している。さて、SL 細胞を Ca 培地に懸濁し Al (50 μM) を添加すると、直ちに Al は細胞に吸着しはじめ添加後 12 時間前後で最大値に達した (図 6A)。一方、Al 添加後 12 時間前後から増殖能が低下し始め、24 時間目にはコントロール細胞の 20%程度まで低下した。さらに、増殖阻害の経時変化と全く同様にカロースの分泌と O_2^- の生成 (DHE 染色で検出) が開始し、ともに 24 時間目まで増加しつづけた。さらに、呼吸量や ATP 含量の低下も Al 濃度依存的にかつ増殖の低下に伴って観察された (図 6B, E, F)。このように、タバコ培養細胞においてもエンドウ根と同様に、Al による細胞の増殖阻害 (根の場合は伸長阻害) と同調して、カロース分泌のみならず O_2^- の生成とミトコンドリアの機能障害が生じている (Yamamoto et al., 2002a; Yamamoto et al., 2002b)。

SL 細胞を用いて、ミトコンドリア機能への Al の影響をさらに検討した (Yamamoto et al., 2002a)。図 4 に示したように、ミトコンドリアでの呼吸や ATP 生成は、内膜における電子の流れと H^+ の濃度勾配に依存している。3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) は、原形質膜を容易に透過し細胞内にはいるとミトコンドリア内膜の電子伝達複合体において電子の還元力によりホルマザンに開裂すると言われており、ホルマザンの生成量から内膜における電子の流れを推定することが出来る。一方、Rhodamine 123 は、細胞内に入るとミトコンドリアの外膜は自由に透過するが、内膜を透過するためには $\Delta \Psi_m$ が必要であり、 $\Delta \Psi_m$ が大きいほど Rhodamine 123 はマトリックスに多く集積することになる。このように、MTT 還元能と Rhodamine 123 の取り込み量はともにミトコンドリア活性の指標として用いられている。ただし、Rhodamine 123 の細胞内への取り込みもまた、原形質膜の電位差

($\Delta \Psi_p$) に依存していることを忘れてはならない。さて、SL 細胞を Al で処理して、MTT 還元能と Rhodamine 123 の取り込みをみると、ともに Al 濃度依存的に低下するとともに、さらに興味深いことには Al 添加直後から低下が見られた (図 6 C, D)。従って、Al の吸着は直ちにミトコンドリア内膜における電子の流れと

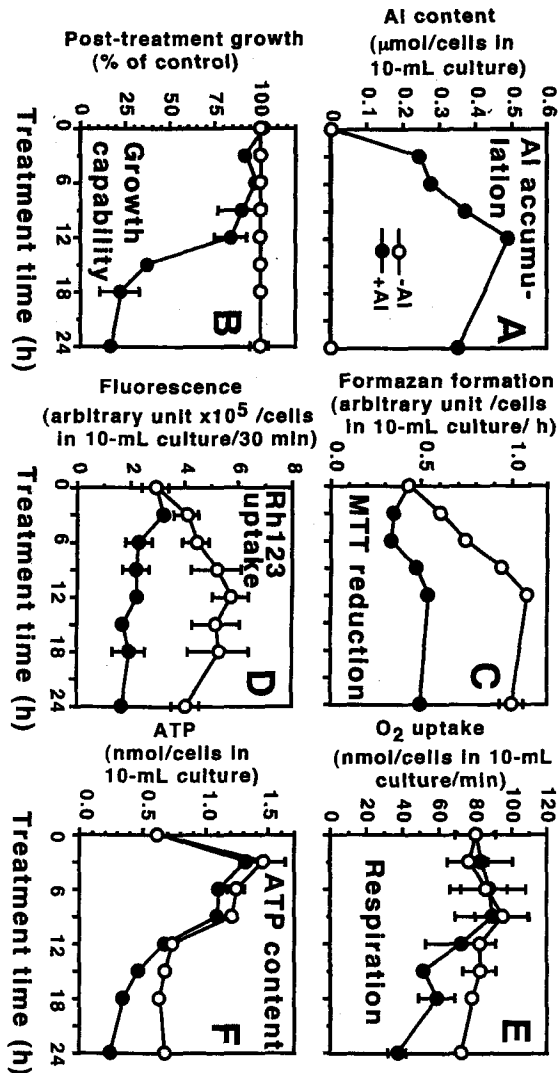


図6 タバコ培養細胞におけるAlに対する応答反応の経時変化。Alのミトコンドリアの機能に対する影響を調べるために、タバコ培養細胞 (SL株) をCa培地に懸濁し、Al (100 μ M) 存在下 (●) と非存在下 (○) におけるAl集積 (A)、増殖能 (B)、MTT還元能 (C)、Rhodamine 123の取り込み (D)、呼吸 (E)、細胞内ATP含量 (F) の変動について経時的に調べた。Al処理開始直後からAlによるMTT還元能やRhodamine 123の取り込みの抑制が見られ、さらに12時間後には、増殖能の低下とともに呼吸阻害やATP含量の低下が見られる。このことは、Alがミトコンドリアの機能を抑制していることを強く示唆している (Yamamoto et al., 2002a)。

$\Delta \Psi_m$ の形成を阻害し、その状態が継続している可能性が高い。一方、増殖能の低下や活性酸素の誘発は12時間程度の遅延期を経て開始することから、ミトコンドリア内膜の電子の流れや $\Delta \Psi_m$ の低下だけでは活性酸素の誘発を起こすわけではないし致命的でもない。では、どのような代謝変動が12時間の遅延ののちに、活性酸素の誘発や致死を引き起こすかについては目下不明であり、これからの研究課題である。

次に、活性酸素の誘発が増殖阻害の原因であるかどうかについて検討した。Maxwellら (1999) は、タバコ培養細胞を antimycin A で処理し、ミトコンドリア内膜における電子の流れを阻害することにより発生する O_2^- が抗酸化剤 BHA の添加により消去されることを報告している。この antimycin A の場合と同様に、BHA は Al の結合によって発生する O_2^- もほぼ完全に消去した (図7)。さらに、BHA で O_2^- を消去した SL 細胞は、Al 処理後も高い ATP 含量を示し高い増殖能を維持していた。なお、BHA で O_2^- を消去した SL 細胞でも、消去しない時と同程度の Al の結合とカロースの合成を示したことから、BHA は Al の結合量に影響を与えるものではなく、さらに、Al の結合により誘発されるカロース合成は活性酸素の誘発とは独立の経路で生じていると思われる。

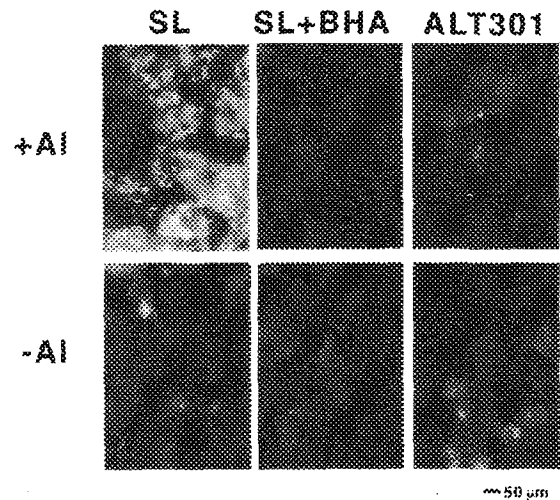


図7 タバコ培養細胞におけるAlによる活性酸素の誘発。Ca培地に懸濁したタバコ培養細胞 (SL株、ALT301株) をAl (100 μ M) で24時間処理したのちにDHEで染色し、蛍光顕微鏡下に観察した。Al処理により、SL株 (Al感受性) はDHEで強く染色されることから細胞内に活性酸素が誘発されており、一方、SL株を抗酸化剤のBHA共存下にAl処理を行ったり、Al耐性のALT301株をAlで処理した場合には、DHEの染色が弱いことから、活性酸素の誘発が抑制されていることが分かる (Yamamoto et al., 2002a)。

SL 細胞株から選抜した Al 耐性細胞株 ALT301 の Al に対する応答反応を解析すると、Al の結合量やカロースの分泌量は SL 細胞と同程度であるにもかかわらず、SL 細胞を BHA で処理した時と同様に O_2^- の発生量が少なく (図 7)、かつ高い ATP 含量と増殖能を維持していた。従って、ALT301 株は、BHA と類似の機能を獲得した結果、Al 耐性を獲得していると思われる。

4. おわりに

これまで紹介してきたように、エンドウ根とタバコ培養細胞の Ca 溶液における Al に対する応答反応は互いに極めて良く似ていることが分かる。それは、Al イオンの標的が分裂や伸長をしている若い細胞であることによると思われる。タバコ培養細胞における応答反応を Al による増殖阻害経路としてまとめると、図 8 のようになる。Al の細胞表層への結合は、まず、ミトコンドリア内膜における電子伝達の低下と $\Delta \Psi_m$ の低下を引き起こし、12 時間程度の遅延時間ののちに、カロース分泌、活性酸素の誘発、呼吸量の低下、ATP 含量の低下、増殖阻害を同時に誘発するが、カロース分泌は、それ以外の応答反応とは独立もしくは上流で生じている反応と思われる。さらに、活性酸素を消去さえすれば増殖阻害を回避できることから、Al による活性酸素の誘発は、増殖阻害の

直接的な原因になっていると思われる。エンドウの根においても、Al による細胞伸長阻害は、おそらくミトコンドリアにおける O_2^- の発生が引き金となっているのであろう。

Al 応答反応に関する分子遺伝学的解析が、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) やコムギ (*Triticum aestivum*) の幼植物やタバコ培養細胞株 SL を用いて行われている。これらは Al に応答して発現量の高まる遺伝子の同定をめざしたものであるが、その中にはペルオキシダーゼ、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ等の抗酸化酵素が多く含まれ (Richards et al., 1998; および左記論文の中に引用)、さらに、これらの遺伝子の中には過剰発現させることによって Al 耐性の改善が見られるものもある (Ezaki et al., 2000)。さらに、Basu ら (2001) は、ミトコンドリアに局在し O_2^- の消去に関わるマンガン型スーパーオキシドジスムターゼの遺伝子をコムギ (*Triticum aestivum*) からクローニングし、ナタネ (*Brassica napus*) で過剰発現させることにより Al による根伸長阻害が抑制されたことを報告している。この結果からも、Al によるミトコンドリアにおける活性酸素の誘発が細胞増殖 (細胞伸長) を引き起こす直接的な原因であることが示唆されている。

Al 耐性タバコ培養細胞株の ALT301 は抗酸化剤の BHA と類似の機能を獲得していると思われる。そこで ALT301 に発現している抗酸化因子の同定を目指し、Al 耐性細胞株において親株の SL 細胞株よりも高く発現している遺伝子をサブトラクション方を用いてクローニングした結果、その中に酸性ペルオキシダーゼの遺伝子が存在した。これらの遺伝子と Al 耐性との関わりについて、今後明らかにしたいと考えている。

謝辞：本研究は、池側広志、小林由樹子、S. Rama Devi、力石早苗、松本英明 の方々との共同研究によりなされたものである。本ミニレビューは 2001 年 11 月に名古屋で開催された The 6th Symposium of the International Society of Root Research での発表内容 (Yamamoto et al., 2002b) をもとに執筆した。執筆の機会を与えて頂きました東京大学大学院の安部 淳博士、「根の研究」の山内 章編集委員長に感謝申し上げます。

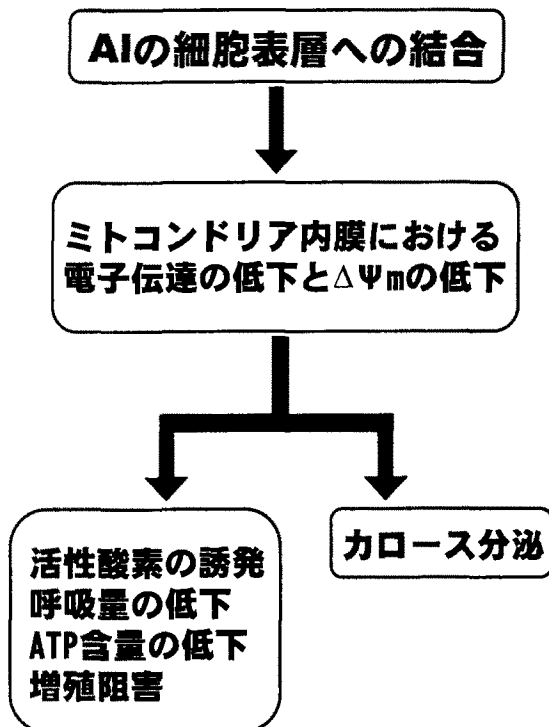


図 8 タバコ培養細胞における Al による増殖阻害経路のモデル図。

引用文献

- Akeson, M.A., Munns, D.N., Burau, R.G. 1989. Adsorption of Al^{3+} to phosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 986: 33-40.
- Basu, U., Good, A.G., Taylor, G.J. 2001. Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminum-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminum. *Plant Cell Environ.* 24: 1269-1278.
- Cakmak, I., Horst, W.J. 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83: 463-468.
- Costa-Pereira, A.P., Cotter, T.G. 1999. Metabolic alterations associated with apoptosis. *In* Studzinski, G. P. ed., *Apoptosis: A practical approach*. pp141-156. Oxford Univ. Press Inc., New York.
- Deleers, M., Servais, J.P., Wulfert, E. 1986. Neurotoxications induce membrane rigidification and membrane fusion at micromolar concentrations. *Biochim. Biophys. Acta* 855: 271-276.
- Devi, S.R., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. 2001. Isolation of aluminum tolerant cell lines of tobacco in a simple calcium medium and their responses to aluminum. *Physiol. Plant.* 112: 397-402.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Matsumoto, H. 2000. Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* 122: 657-665.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 3, Oxford University Press, New York.
- Ikegawa, H., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. 2000. Responses to aluminum of suspension-cultured tobacco cells in a simple calcium solution. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46: 503-514.
- Kochian, L.V., Jones, D.L. 1997. Aluminum toxicity and resistance in plants. *In* Yokel, R.A., Golub, M.S. eds., *Research Issues in Aluminum Toxicity*. pp69-89. Taylor & Francis Ltd, Washington.
- Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E. 2001. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6: 273-278.
- Matsumoto, H. 2000. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 200: 1-46.
- Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Devi, S.R. 2001. Aluminum toxicity in acid soils: Plant response to aluminum. *In* Prasad, M.N.V. ed., *Metals in the Environment: Analysis by Biodiversity*. pp 289-320. Marcel Dekker Inc, New York.
- Maxwell, D.P., Wanig, P., McIntosh, L. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 8271-8276.
- Møller, I.M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turn over, and metabolism of reactive oxygen species. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 561-591.
- Nakamura, C., Telgen, H.V., Mennes, A.M., Ono, H., Libbenga, K.R. 1988. Correlation between auxin resistance and the lack of a membrane-bound auxin resistance and the root-specific peroxidase in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* 88:845-849.
- Oteiza, P.I. 1994. A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 374-379.
- Pan, J., Zhu, M., Chen, H. 2001. Aluminum-induced cell death in root tip cells of barley. *Environ. Exp. Bot.* 46: 71-79.
- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Devis, K.R., Gardner, R.C. 1998. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116: 409-418.
- 山本洋子 2001. 現代土壌肥料学の断面[7]—酸性土壌におけるアルミニウムイオンによる植物生育阻害機構— *農業および園芸* 76: 819-828.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. 2001. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but is not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.* 125: 199-208.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. 2002a. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 128: 63-72.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. 2002b. Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil* (in press)

Title: Molecular mechanism of aluminum-induced root elongation inhibition :

Aluminum ion triggers active oxygen species production and mitochondrial dysfunction.

Author: Yoko Yamamoto