

## イネを用いた細胞壁への蓄積によるアルミニウム毒性作用機序機構の解明

齋藤 大夢 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古川 純 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景と目的】

アルミニウム(Al)は土壌のおよそ7%を占める元素であり、pHがおよそ5を下回る酸性土壌下では $Al^{3+}$ という水溶性の状態になり植物体内に取り込まれ、根の伸長を阻害することが分かっている。世界の農耕地の30~40%は酸性土壌と言われ、Alによる成長阻害は世界の農作物の収量低下の大きな要因と考えられている。こういった毒性を持つAlへの耐性を持つために根から有機酸を分泌し、土壌中のAlが有機酸と化合物を形成することで根に吸収されにくくするというものが代表的なものとして知られている。しかしながら、イネは有機酸の分泌とAl耐性の相関が確認されないにも関わらず、高いアルミニウム耐性を持つことが知られている。当研究室の結果により、Al濃度が高くなるほど根の分泌性ペクチン(メチル化ペクチン)が多くなることでAlに対して障壁として働き、根本体へのAl吸着を防いでいることが高いAl耐性の鍵であることが見出されている。一方、Al耐性が弱く、Al存在下で根の伸長が抑えられる*star1*変異体では、Al濃度が高い条件でも分泌性ペクチンは増加せず、根へのAlの吸着が多く領域で観察された。

根に吸着したAlは細胞壁領域で存在することから、根の細胞壁成分とAlが結合することで細胞壁特性が変化し、根の伸長が阻害されたと考えられている。しかし、どの細胞壁成分と結合したことで細胞の伸長が阻害されたかについての実験的な検証が現在まで明らかになっていない。そこで本研究では、アルミニウムの結合及び吸着が、どの細胞壁成分で起きているのかを明らかにし、Al毒性に関与する伸長阻害現象に関わる細胞壁成分が何かを明らかにすることを目的としている。

## 【方法】

WT(品種:コシヒカリ)、Al感受性変異体*star1*について、Al処理を施し、根細胞壁を抽出、ペクチン性画分、ヘミセルロース画分、セルロース画分に分け、Al及びCa量をICP-AESを用いて定量した。

WT、*star1*の種子を三日間吸水させた後、1.0 mMの $CaCl_2$ (pH4.5)水耕液で三日間生育、その後異なる濃度(0/100  $\mu$ M)の $AlCl_3$ を含んだ1.0 mMの $CaCl_2$ 水耕液で一日処理した。根の先端1 cmをサンプリングし、凍結乾燥にかけた。

サンプリングした根を破碎し、80%エタノール、1:1 クロロホルム:メタノールで処理を行い、AIR(細胞壁)を抽出した。AIR抽出過程において、根から分泌されたペクチンは除去される。AIRに対し、EPG(エンドポリガラクトナーゼ)による処理を行い、ペクチン性画分を抽出した。その後、2 MのTFA(トリフルオロ酢酸)による処理を行い、ヘミセルロース性画分を抽出、残りをセルロース性画分とした。抽出した細胞壁成分に硝酸分解を施したのち、ICP-AESにて各細胞壁成分に含まれるAl及びCa量の定量を行った。

## 【結果】

## ・Al量

WT (Al耐性)、*star1* (Al感受性)ともにヘミセルロース性画分において、Alが検出された。

WTでは、-Alでも+Al条件でも、Al量に違いはなかった。一方、*star1*では、+Al条件において-Al条件と比較して、12.3% (乾燥細胞壁1mg中5.0  $\mu$ g)多いAlが検出された。

## ・Ca量

WT (Al耐性)、*star1* (Al感受性)ともにヘミセルロース性ペクチン成分において、Alが検出された。

WTでは、-Al条件のヘミセルロース性画分において、最も高いレベルのCa量が検出されたが、+Al条件において-Al条件と比較して、83.3%少ないCaが検出された。

一方、*star1*では、-Alでも+Al条件でも、Ca量に違いはなく、WTと比較して約85%少ない量であった。

## 【考察と今後の展望】

*star1*の細胞壁に含まれるAl量がWTに比べ多かったことは、*star1*の根がAlを吸着しやすいという結果と一致していた。イネはAlに応答して根端周囲の分泌性ペクチン量を増加させ、これらが根内部へのAlの吸着を防ぎ、Alに抵抗していると考えられているが本結果はそれを支持するものである。

*star1*変異体では、Al濃度が高い条件でも分泌性ペクチンは増加せず、根へ多くのAlが吸着し、根の伸長阻害が観察された。本研究結果により、吸着していた細胞壁成分は、ヘミセルロースであることが明らかとなった。ヘミセルロースは、細胞壁の緩みを促進するXTHやエクспанシンのターゲットとなる成分である。Alはヘミセルロースと結合することにより、こういった酵素の働きにくくすることで細胞伸長を阻害しているのではないかと考えられる。

Alは分泌性ペクチンとも結合できるが、Caは細胞壁において分泌性ではないペクチン(脱メチル化ペクチン)のみと結合する。本研究において用いた細胞壁は、分泌性ペクチンを洗浄している。そのため、検出された細胞壁中のCaは、脱メチル化ペクチンと結合しているCaを示している。WTの-Al条件においてCaが多く、Al感受性の*star1*では極めて少なかった。このことは、*star1*ではペクチン合成が盛んではなく、通常状態である-AlでもCaを多く含んでいないことを示している。また、WTでは、+Al条件でCaが著しく減少した。Al量が+Al条件でも増加しなかったことから、Alが直接細胞壁に作用した可能性は低い。そのため、+Al条件ではCa結合し得るペクチンは、Alにより誘導された分解酵素により分解されたと考えられる。Al応答で合成されたペクチンも含めて全て分泌性ペクチンとして、Alの毒性緩和に貢献したのではないかと考えている。

今後はペクチン分解酵素発現株PG2-FOXとその野性型として日本晴を用い、同様の実験を行うことで各細胞壁成分におけるAl量及びCa量の変化を調べる予定である。