

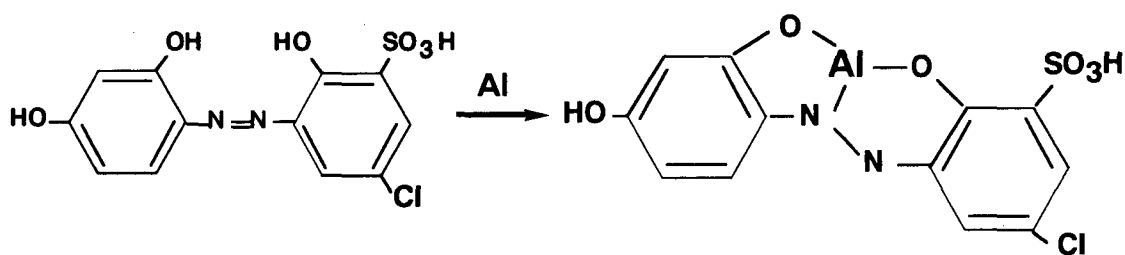
植物根組織における微量 Al の動態解析

片岡 達彦 ・ 中西 友子 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

酸性土壌は、世界の農耕可能地の約40%を占めるといわれ、将来の食糧増産を考える上で非常に重要な問題とされている。酸性土壌における作物の生育阻害の要因として、 H^+ やMn, Alなどの有害物質の蓄積、PやCa, Mg, Cuなどの栄養成分の不足があげられるが、このうち最も深刻な問題と考えられているのがAl過剰障害である。土壌の構成成分であるはずのAlは、土壌のpHの低下(酸性化)に伴い、イオン化した化学形態を有して土壌溶液中に溶出される。土壌溶液に存在する活性化したAlは、主に植物根の根端部に吸収され、根の伸長阻害を引き起こすことが広く知られている。Al過剰害の問題については、これまでに数多くの報告が行われてきたが、Alの持つ化学形態の複雑性(Martin, 1988; Kinraide, 1991)、Alの高感度検出法の欠如、Alにトレーサーとして用いることのできる放射性同位元素が存在しないなどの理由から、Alの植物に対する生育阻害のメカニズムの解明に関しては、未だ不明な点が数多く残されている。そこで、これまでAlの研究の発展の最大の障壁のひとつと考えられているAlを高感度に検出する染色方法の確立(Kataoka *et al.*, 1997b)を行い、植物根内Al動態の解析(Kataoka *et al.*, 1997a)を試みたので、これまでに得られた成果について報告する。

(ルモガリオン染色法の確立および植物根内Al動態の解析)

生体に対するAl毒性に関する研究は、実験対象の動植物を問わず、急速に増えている。しかしながら、上記の理由から特に、植物組織におけるAl動態についての報告は、想像以上に少ない。現在まで報告されているなかで、最も高感度なAl検出として、secondary ion mass spectrometry (SIMS) を用いた研究(Lazof *et al.*, 1994; 1996)が知られているが、装置が非常に高価であり汎用性は期待できない。そのため、生体組織中のAlの局在を検討するにはZ軸方向(深さ方向)への高い分解能を有し、試料の任意の断面像を得ることのできる共焦点レーザー顕微鏡を用いることが、非常に重要であると考えられた。そこで、本装置に適切な染色色素の検索を行ったところ、蛍光色素ルモガリオン (lumogallion ; [5-chloro-3-(2,4--2-hydroxybenzene-

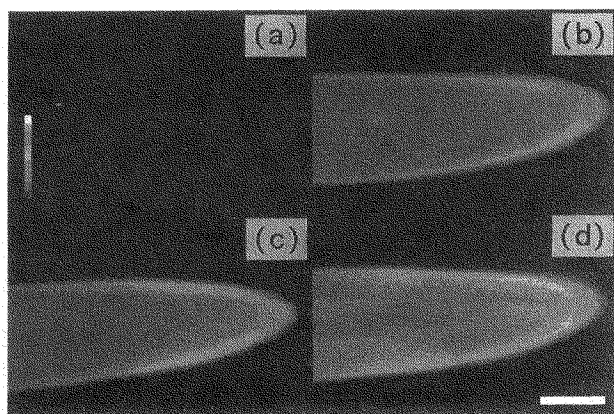


(第1図) ルモガリオンおよびAl-ルモガリオン錯体の化学構造式

1-sulphonic acid]) (第1図)が、pH2.0-5.7の広範囲にわたり、微量の無機態Alと特異的に結合し、Alと形成した錯体は安定度定数が 5.62×10^7 と非常に高い(Suman, 1992)ことから、組織内Alの検出に適切な染色試薬である可能性が考えられた。また、ルモガリオンの検出感度についてはHPLCを用いた定量分析において、人血清中Alを $\mu\text{g L}^{-1}$ レベルの高感度に微量検出が可能であることを示す報告が行われており(Suzuki, 1989; Wu et al., 1995)、染色法の確立について検討を行うこととした。これまで、共焦点レーザー顕微鏡を用いた植物体内中Alの検出には蛍光色素モリンが用いられているため(Tice et al., 1992; Larsen et al. 1996)、ルモガリオンの植物根組織内微量Alの検出に対する有効性に関しても、モリンとの比較検討を試みた。

(実験方法および結果)

ダイズ(*Glycine max* cv. Tsurunoko) 幼植物を0.2mM CaCl_2 を含む100 μM AlCl_3 水耕液(pH4.5)中、0, 2, 4, 6時間処理後、根端約6mmを切断、4%パラホルムアルデヒド-0.2MMOPS緩衝液(pH7.0)内で2時間固定処理を行った。固定した試料は、マイクロスライサーを用いて伸長方向に平行にスライスし、厚さ100 μm の切片を作製した。切片は10 μM ルモガリオン染色液-0.1M酢酸緩衝液(pH5.2)で、50 $^\circ\text{C}$ 湯浴により60分間染色を行い、染色後、試料切片は緩衝液で軽く洗浄した。解析には、共焦点レーザー顕微鏡MRC-1000(Bio-Rad社製)を用いた。励起および蛍光波長には、それぞれ488nm, 520nmEFLPのフィルターを使用し、得られた蛍光画像は、デジタル画像として取り込んだ後、疑似カラー化した(本稿では白黒写真ですが)。モリン染色では、ルモガリオン染色と同じ光源の強さでは、全く蛍光が現れなかったため、モリン染色法は短時間のAl処理による根内Al動態の解析には、不適当であると判断された。第2図には、ルモガリオン染色による、根内Al動態を示した。それぞれ、0.2mM CaCl_2 を含む100 μM AlCl_3 (pH4.5)水耕液で2(b), 4(c), 6(d)時間処理を行った。第2図内の蛍光強度は、黒色の部位では、Alの検出はされず、白色部は非常に高濃度のAlが蓄積していると考えられる。根内Alの集積を経時的に検討した結果、2時間後には、Alは表皮と根冠に集積し、根端2mm



(第2図) ルモガリオン染色による100 μM AlCl_3 水耕液(pH4.5)処理根端内Al分布 (a)対照区、(b)2時間、(c)4時間、(d)6時間処理 Bar: 1.5mm

以内の外側皮層部においても、少量のAlの蓄積が認められた。4時間処理根では、根端1-3mmの根冠および皮層部へのAlの集積が顕著であった。さらに、6時間後には皮層部全体に拡大することが示された。(d)に示されるようにAlの集積が、特に根端3-5mm部の特にAl処理による組織の障害の現れる伸長帯で認められた。また、6時間処理根では、根端0.5-2mmの根冠部に高濃度のAl蓄積が認められ、さらに、根冠や分裂組織に近い皮層部においても、蛍光が認められたことから組織内部にまでAlが吸収されることが明らかとなった。以上の結果から、従来法のモリン染色に比較して、ルモガリオン染色法が組織内の微量Alを高感度に検出可能であることが明らかとなった。

次に、ルモガリオン染色の各過程で試料中より流出するAlについて検討を行った。固定液・切片化に用いた緩衝液・染色液の各処理液は、濾過後の溶出液中Al濃度について定量を行ったところ、固定液およびスライス時の緩衝液のAl量は、検出限界以下であり、染色操作においてのみ試料中Alの約10%の流出が確認され、主として表皮細胞由来のAlであることが示唆された。また、共焦点レーザー顕微鏡観察で得られる蛍光強度と試料中Al濃度との相関性について検討を行ったところ、非常に高い相関性を有していることが明らかとなった。

また、Al濃度を200 μ Mに設定して育成させたところ、2時間処理根では高く維持されているバイアビリティが、4時間後には低下し始めたが、根内Al動態は、2時間処理試料において根冠・表皮・外側皮層部へのAlの集積、4時間後には根端3-5mmの伸長部への吸収が確かめられた。そして、Al処理4時間試料における生長回復の抑制と、組織内Al分布との相関性をさらに詳細に検討するために、Al2時間処理試料をクエン酸で洗浄しAlを十分に洗い流した後、ルモガリオン染色を行い、両試料間の組織内Al分布について検討を行ったところ、ほとんどのAlが洗い流された。しかし、両試料間のAl分布を詳細に比較検討したところ、伸長帯においてのみ差が認められたため、伸長帯をさらに拡大して詳細な検討を行い、4時間処理根の伸長帯において表皮直下の皮層細胞の原形質内へのAl蓄積が認められた。また、表皮の内側2-4層の外側皮層部の細胞において細胞内のみならず、アポプラストにクエン酸洗浄では洗い流されず組織と非常に強い結合をしたAlの存在が確かめられた。以上の結果から、伸長帯に強い結合を有して存在するAlが周囲の細胞の伸長を阻害し、さらに根の内部に位置する中心柱周辺の細胞との伸長速度のギャップにより組織の破壊が誘発され、バイアビリティの低下に至るメカニズムが考えられた。バイアビリティの低下は、根全体のうち分裂組織や基部側の組織に先立って、伸長帯で最も現れやすいことから以上の機構が支持される。またAl4時間処理根の伸長帯のAlが、生長回復の抑制においても大きく関与する可能性が示唆された(Kataoka *et al.*, 1997 a)。

蛍光色素ルモガリオンを用いて、初めて根の短時間Al処理におけるAl動態を明らかにした。本方法は、従来の方法と比較して、非常に高感度であり、かつAl錯体の安定度定数が高く、共焦点レーザー顕微鏡観察中における蛍光色素の退色もほとんど認められないことから、根内の微量Alの動態解析に適していると考えられる。さらに、当研究室では、これまでに本方法を用いて得られた画像をもとに、根細胞組織内Al分布の三次元化像の構築が可能であることを確かめ

ている。今後は、さらに詳細な検討を行うことにより、Al過剰障害メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

引用文献

- Martin, RB. (1988) Bioinorganic chemistry of aluminum. *In* H Siegel, A Sigel, eds, *Metal Ions in Biological Systems*, Vol 24; Aluminum and Its Role in Biology. Marcel Dekker, New York, pp2-57.
- Kataoka, T., Iikura, H. and Nakanishi, TM. (1997a) Aluminum distribution and viability of plant root and cultured cells. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 43: 1003-1007.
- Kataoka, T., Mori, M., Nakanishi, TM., Matsumoto, S. and Uchiumi, A. (1997b) Highly sensitive analytical method for aluminum movement in soybean root through lumogallion staining. *J. Plant Res.* 110: 305-309.
- Kinraide, TB. (1991) Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant and Soil* 134: 167-178.
- Lazof, DB., Goldsmith, JG., Ruffy, TW. and Linton, RW. (1994) Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. A microanalytical study using secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiol.* 106: 1107-1114.
- Lazof, DB., Goldsmith, JG., Ruffy, TW. and Linton, RW. (1996) The early entry of Al into cells of intact soybean roots. A comparison of three developmental root regions using secondary ion mass spectrometry imaging. *Plant Physiol.* 112: 1289-1300.
- Suzuki, Y. (1989) Fluorimetric determination of aluminium in serum. *Analyst* 114: 839-842.
- Tice, KR., Parker, DR. and DeMason, DA. (1992) Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fraction in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol.* 100: 309-318.
- Larsen, PB., Tin, CY., Kochian, LV. and Howell, SH. (1996) Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminum. *Plant Physiol.* 110: 743-751.
- Wu, J., Zhou, C.Y., Chi, H., Wong, M.K., Lee, H.K., Ong, H.Y. and Ong, C.N. (1995) Determination of serum aluminium using an ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatographic-fluorimetric system with lumogallion. *J. Chromatogr.* 663: 247-253.
- Shuman, M.S. (1992) Dissociation pathways and species distribution of aluminum bound to an aquatic fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* 26: 593-598.

Analysis of trace amount of aluminum movement in plant root.

Tatsuhiko KATAOKA / Tomoko M. NAKANISHI