

酸性土壌とアルミニウムストレス

松 本 英 明

岡山大学資源生物科学研究所

要　旨：人類の歴史は食糧を安全に確保するための戦いの歴史であったといえる。著しい人口増と環境ストレスの増大などから、作物が良好に育つ土壌は殆ど利用しつくされ、残されているのは作物が生育しにくい問題土壌と呼ばれるものである。その一つに酸性土壌があり、世界の農耕地の30~40%を占める。酸性土壌ではアルミニウム(A1)が土の酸性化に伴ってイオンとして溶け出し、植物根の生育を著しく阻害する。従って、酸性土壌における作物生産性を高めるため、A1ストレスに打ち克つ作物等の耐性機構の解明が進められ、最近の研究で重要なA1耐性遺伝子が見つけられ、その解析が進められている。

キーワード：酸性土壌、アルミニウムストレス、根伸長阻害、耐性機構、耐性遺伝子。

Acid soils and aluminum stress in plant roots : Hideaki MATSUMOTO (*Research Institute for Bioresources, Okayama University*)

Abstract: Due to burst of world population and increasing environmental stresses, it is thought that good arable lands have been almost used up and unused problem soils are remained in the world. Acid soils which are one of the typical problem soils occupy 30~40% of world's ice-free land. Aluminum (Al) ion is solubilized in the soil water according to the acidification of soil and inhibits the root growth remarkably. Under such situation, attention has been paid to improve the agricultural production in acid soils. The Al tolerant mechanism in higher plants has been intensively investigated and very important Al tolerant gene encoding Al dependent malate transporter in Al tolerant wheat root was discovered recently and its molecular analysis and transformation in Al sensitive plants are now actively carried out.

Keyword: acid soils, Al stress, inhibition of root growth, tolerant gene, tolerant mechanism

I. 酸性土壌における植物の生育障害

1. 酸性土壌

生物生産に利用される土壌の約70%はいわゆる問題土壌である。そのうち酸性土壌は熱帯、温帯の農耕地の30~40%を占め、その面積は3.95億ヘクタールといわれている(Baligar and Ahlrichs, 1998)。酸性土壌の67%は森林地帯、18%がサバンナ、草原、ステップ地帯に存在し、酸性土壌のわずか4.5%程度が農耕地として使われているにすぎない。このような酸性土壌は世界中に広く分布するが(第1表)，特にアジア、アフリカ等の発展途上国に多く存在する。

このような地域は人口増が著しいので発展途上国においてこそ食糧生産のための酸性土壌の利用が必要である。

一般的な酸性土壌の生成の要因には雨水、土壤を構成している元素、気温などが関与している。即ち、酸性土壌は何千~何万年という長時間をかけて雨水に土壤がさらされた風化作用の結果、生成したと考えられている。雨水にはプロトンが含まれ、土壤中の可溶性の栄養塩類(塩基)がH⁺との交換反応で溶脱される。その結果、土壤が酸性化していくと考えられている(Baligar and Ahlrichs, 1998)。従って、一般

第1表 世界全体および各地域における酸性土壌の分布 (Baligar and Ahlrichs, 1998より)

分 布 全 体	地 域						
	中央アメリカ	南アメリカ	アフリカ	アジア	オーストラリア/ ニュージーランド	北アメリカ	ヨーロッパ
面積(×10 ⁴ ヘクタール)	3,950	37	917	659	532	239	662
割 合 (%)	30	35	14	22	76	30	37

2003年9月29日受付 2003年11月6日受理

*連絡先 〒710-0046 岡山市中央2-20-1 岡山大学資源生物科学研究所
Fax:086-434-1210 E-mail:hmatsumo@rib.okayama-u.ac.jp

的に酸性土壌は雨量の多い、気温の高い地域で生成されやすい。このような風化の結果、土壌は最終的に鉄やアルミニウムといった元素の酸化物や水酸化物が主要な成分となり酸性を示すことになる。

これら風化に関わる自然条件の他、硫安など無機肥料の過剰投与による土壌管理の影響、収穫による陽イオンの除去などの他、近年、酸性降下物も土壌の酸性化に関与している。

2. アルミニウム毒性

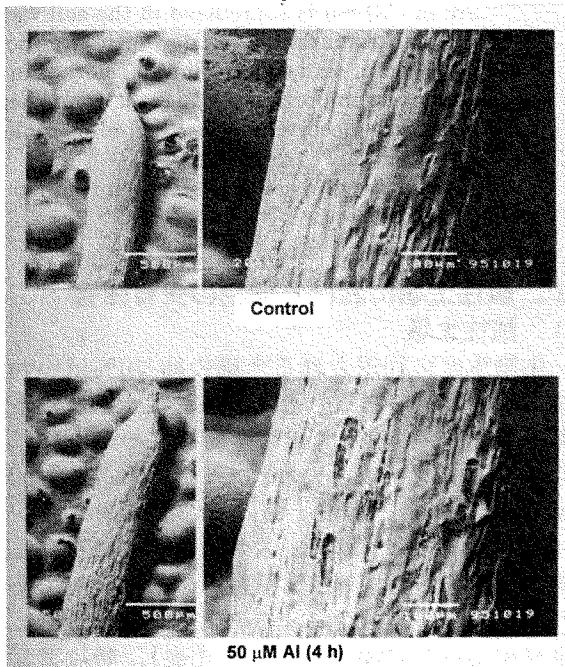
上に述べたように、酸性土壌は植物に利用される塩基（栄養塩類）が少なくやせた土壌である。しかし酸性土壌中の植物の生育阻害となる最も大きな因子は、酸性化に伴って溶解するアルミニウムである。Alは土壌を構成する金属元素として最も多く、約7%を占めている。中性ないし弱酸性の土壌ではAlは不溶性の珪酸アルミニウムや酸化物として存在する。しかし土壌が酸性になるに従い、毒性の強いイオンとして溶け出す。Alイオンの形態はpHによって異なり、pHが4.5以下では大部分が Al^{3+} として存在し最も毒性が強い。pHの上昇につれて Al(OH)_2^+ 、 Al(OH)_2^+ に変化し、中性附近では不溶性の Al(OH)_3 、即ちギップサイトとして存在し毒性を示すことはない。アルカリ側になると再びアルミネートアニオン Al(OH)_4^- になる。このようにAlの化学的形態はpHによって複雑に変化し、またそれにつれて毒性も変化する。従ってAlストレスの研究ではpHや共存する塩類を厳密に制御することが極めて重要である。また Al^{3+} は水酸基のみならずリン酸、 F^- 、 SO_4^{2-} 、ケイ酸の他、多くの有機リガンドとよく結合する。特殊なOH/Alの条件下で、いわゆる Al_{13} 重合体 $[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{7+}$ が生成し、最も毒性が強いと考えられているが、自然界の条件では Al_{13} 重合体は生成しないと考えられている(Funakawa et al., 1993)。Al毒性により第一義的に根の伸長が阻害されるので植物の水分、養分の吸収が抑制され収量の低下につながる。

酸性土壌は広く分布し、環境問題や急激な人口増加の問題などが背景にあり、ここ10~20年間でAlストレスに関する研究は大きく進展した。この総説では、これまでのAlストレスに関する重要な知見を概説するとともに(Kochian, 1995; Matsumoto, 2000, 2002a, 2002b; Matsumoto et al., 2001)，最近の研究成果についてもAl障害と耐性の面から説明を加えたい。

3. 植物のアルミニウムによる障害

1) 根の伸長阻害と障害を受ける部位

Al感受性のコムギやアラスカエンドウを5~10 μM 程度の Al^{3+} (pH 4.5)で処理すると、短時間で根の伸長が抑制される。Alにより障害を受けるのは根端に限られる。根冠、分裂域、分裂域から伸長域にいたる中間域(distal part of the transition zone: DTZ)(Sivaguru and Horst, 1998)および伸長域にAlが集積し、根端の細胞でAlによって引き起こされる機能障害により根の伸長は停止する。Alは根端の表層に近い細胞に大量に集積し、伸長域の細胞の縦方向への伸長が阻害され細胞の長さは短く、逆に横方向に肥大した細胞になる。その結果、根の外側に向かって内側の細胞から圧力が加わり、根の表皮細胞に亀裂が生じる(Sasaki, 1996; Sasaki et al., 1996; Matsumoto, 2002a)（第1図）。伸長域の細胞の構造変化に伴いリグニンの蓄積、カロースの蓄積などが認められ、細胞死が観察される。



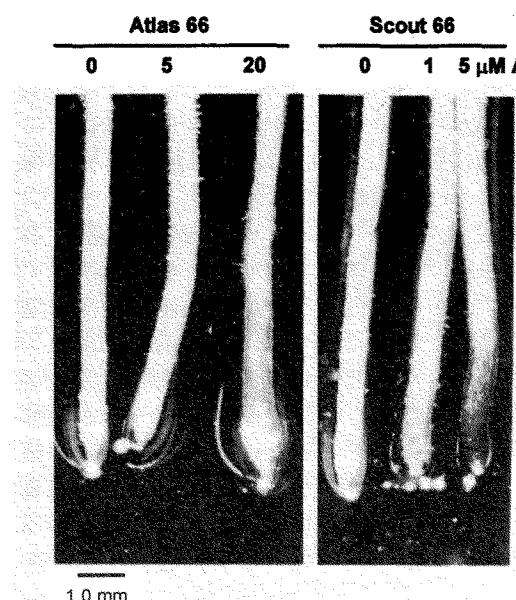
第1図 Al耐性コムギ(Atlas 66)を50 μM Alを含む0.1 mM CaCl_2 溶液(pH 4.5)で4時間処理したものの走査電顕写真(Sasaki, 1996より)

エンドウ、ダイズなどでは、細胞膜の脂質の過酸化もこれらの現象と平行して認められる(Cakmak and Horst, 1991; Yamamoto et al., 1997, 2001)。しかしながら抗酸化剤によりAlの脂質過酸化を抑制しても伸長阻害は回復しないので、脂質過酸化そのものは直接伸長阻害の

原因にならない。最近の研究成果によると、Al により伸長域の細胞のミトコンドリアにおいて活性酸素の誘発が起こり、それに伴って引き起こされる代謝変動が Al 障害の初期反応に重要なものの一つとして考えられている。これらの点に関して、共同研究者の山本博士が本誌に記載しているので参考されたい（山本洋子, 2002）。

2) Al の集積部位と細胞内分布

Al は根端に集積するが、キレート試薬で染色すると、Al 耐性コムギ (Atlas 66) は Al 感受性コムギ (Scout 66) に比べて明らかに染色の程度が小さい（第2図）。このことは①根端の Al 集積の違いは Al に対する感受性に関係する、②根の伸長阻害は根端に集積する Al の含量に関係する、③耐性種は根端に Al を集積しない機構を持つことを示唆している。一方、細胞内の分布に関しては主に Al の毒性が細胞内原形質で発現するか、細胞外アポプラストで発現するかという立場から論じられてきた。吸収された Al の大部分はアポプラストに集積する (Horst, 1995; Tice et al., 1992; Rengel, 1996)。しかしシャジクモにおいて²⁶Al を利用した最近の研究によると、30 分間の Al 処理で 71~318 μg m⁻² min⁻¹ の Al がアポプラストに集積する一方、71~540 ng m⁻² min⁻¹ の Al が原形質にも侵入することが明らかにされた (Taylor et al., 2000)。このことは従来、Al は殆ど原形質には取り込まれないと考えていたが、それを否



第2図 Al 耐性 (Atlas), 感受性 (Scout) コムギを異なる濃度の Al で 1 日間処理した根に吸収された Al をヘマトキシレンで染色 (Sasaki et al., 1997 より)

定するもので原形質内でも Al 毒性が作用する部位があることを示唆している。このことは、エンドウ根、タバコ培養細胞等の核内に Al が集積することによっても支持される (Matsumoto et al., 1976a; Silva et al., 2000; Yamamoto et al., 1994)。

3) 原形質膜

Al の細胞内の集積する部位として原形質膜がある。原形質膜は細胞の最も外側に位置し、その主たる構成成分であるリン脂質には大量のリン酸が含まれ、Al との結合の大きさから、原形質膜は Al の標的部位と考えられている (Haug, 1984; Wagatsuma et al., 1995; Haug and Caldwell, 1985; Jones and Kochian, 1997)。

リポソームを用いた Al の結合実験によると、膜の構造と機能に欠くことの出来ないカルシウム (Ca) に比べて、Al は 500 倍もの結合親和性が高い (Akeson et al., 1989)。原形質膜と Al の結合により、Ca が置換することや膜の物理化学的性質、例えば流動性などが変化し、Al 毒性の原因になると考えられている (Viestra and Haug, 1978; Matsumoto et al., 1992; Zhao et al., 1987; Olivetti et al., 1995; Ahn et al., 2002)。Al の原形質膜機能に阻害を及ぼす例として、チャンネルの阻害や表面荷電の変化による膜機能の障害が知られている。Ahn ら (2001) はカボチャの根を用い、原形質膜の表面荷電 (ゼータ電位) が脱分極することを認めた。その変化は根端の細胞膜でのみ認められた。in vivo で Al との結合により、不可逆的な原形質膜の構造変化が誘導され、H⁺-ATPase の抗体を用いて調べた結果、H⁺-ATPase の含量が減少していることが分かった。さらに準同質遺伝系統の Al 耐性コムギ ET8 と感受性コムギ ES8 を用いた実験で、Al 処理した ES8 根の原形質膜ベシクルの表面荷電の脱分極が認められたが、ET8 では認められなかった。一方、4 時間の Al 処理で耐性の ET8 根の原形質膜ベシクルの H⁺-ATPase と H⁺輸送活性は増加したが、ES8 では逆に減少した。さらに興味深いことに ET8 の根端から調製した膜ベシクルを 10 μM の Al で in vitro で処理すると、膜ベシクルの H⁺-ATPase 活性の阻害は ES8 から調製した膜ベシクルに比べて小さかった (Ahn ら, 印刷中)。さらに ES8 に対して in vivo で Al 処理を行うときにリンゴ酸を共存させると、表面荷電の変化や H⁺-ATPase の活性低下が起らなかったので、分泌したリンゴ酸の Al 耐性機構の一端として膜機能の変動が関わっていることを示唆している。これらの結果は、Al 耐性コムギの耐

性機構として分泌されたリンゴ酸が Al とキレートして Al の細胞内への取り込みを抑制したということだけでは説明出来ない。この推察の根拠の一つとして ET8 と ES8 の根伸長が同程度阻害される場合、即ち ET8 に対しては 50 μM の、ES8 に対しては 5 μM Al で根を処理した時に根伸長時は 50% 阻害されるが、その時の根内の Al 含量は ET8 の方が明らかに多いことがあげられる (Kikui ら, 投稿中)。

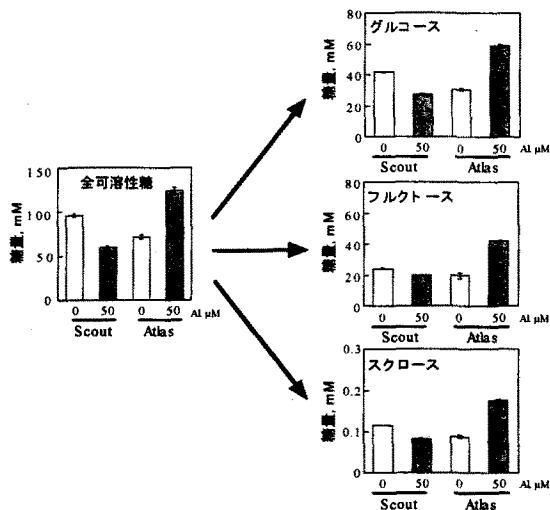
4) アポプラスト

吸収した大部分の Al (40~90%) はアポプラストに蓄積すると言われているが、その作用はよく分かっていない。Al の細胞壁との結合部位はペクチンと一般に考えられており、ペクチンを介した細胞壁ネットワークの変動から Al のアポプラストでの作用が論じられることが多い (Blamey et al., 1983; Horst, 1995; Chang et al., 1999)。

Al 耐性コムギ (Atlas 66) と Al 感受性コムギ (Scout 66) を 10 μM Al で処理すると、Scout では細胞壁の進展性の顕著な低下が認められたのに対し、Atlas 66 ではその低下はわずかであり、根の伸長阻害は認められなかった。また Scout では根端のヘミセルロース画分の増加と分子サイズの増加が認められた。さらに細胞壁に結合したフェルラ酸、ジフェルラ酸の増大を認めた。これらの事実は Al 感受性種では細胞壁の肥大と堅さの増大 (伸展生の低下) が起こっていることを示している (Tabuchi and Matsumoto, 2001)。

一方、Al 耐性の Atlas では細胞の進展性の減少に打ち克つ浸透圧の増加が起こっており (第 3 図)、それを支持する証拠として Al により細胞質内の可溶性の糖類が増加した (第 4 図) (Tabuchi et al., 印刷中)。このことはコムギの

Al 耐性機構として第一義的に重要なものはリンゴ酸の分泌であるが、さらに細胞内 Al 抵抗性機構として細胞内の浸透圧の増加を挙げることができる。即ち、特に Al 耐性コムギでは Al ストレスにより、その機構は不明であるが細胞質に遊離の糖類を蓄積することにより吸水量を増加させ浸透圧が高まる。その結果として、Al による細胞伸長阻害に打ちかって細胞伸長を促進させることになる。

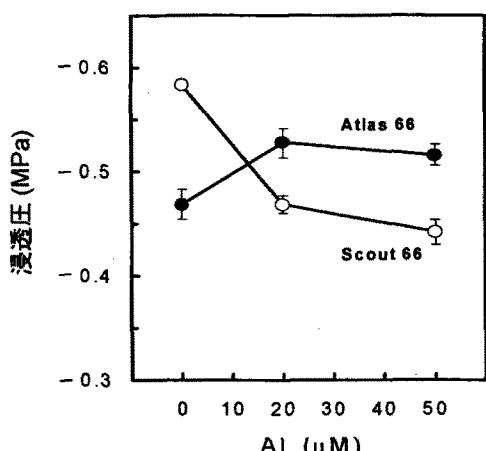


第 4 図 Al の根端細胞質中の各種糖濃度に対する影響

5) カロースの蓄積

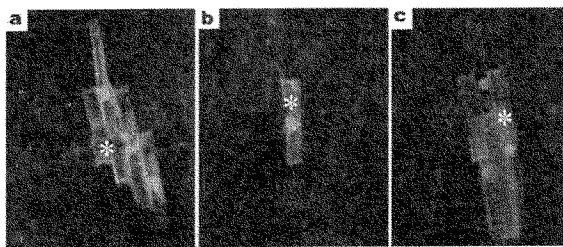
Al 障害の発現と連動してカロースの蓄積が起こることが知られているが、その役割は不明であった。一方、Al ストレスにより根のイオン吸収が抑制されることが知られており、この点に注目して Sivaguru (2000) らは新たな発見をした。即ち、カロースが導管など輸送器官に多いことに注目し、Al による原形質連絡の機能障害について検討した。

Al 感受性コムギ (Scout 66) を Al 処理すると、根端にカロースが蓄積する。その部位をアニリンブルーで染色すると原形質連絡近傍に蓄積していた。さらにカロースの β -1,3 グルカンを抗体にして、金粒子免疫沈降によってこの事実は確認された。このことからカロースが原形質連絡近傍に蓄積することによって原形質連絡の管の部位に圧力がかかることになり、原形質連絡を介した細胞間物質輸送が阻害されているのではないかと予想した。事実、蛍光色素であるルシファイエロー (LYCH) をマイクロインジェクション法で根の特定の細胞に注入し、そこから周辺細胞への原形質連絡を介した LYCH の移動をレーザー顕微鏡を用いて測定した。その結果、明らかに Al 処理した根では LYCH の



第 3 図 Al の浸透圧に対する影響 (Tabuchi et al., 2003 より)

原形質連絡を介した拡散輸送が抑制されていた。さらに Al 处理時にカロース合成の阻害剤であるデオキシグルコースを与えると、カロースの生成の抑制とともに LYCH の細胞間輸送の阻害も認められなかった(第5図)。これらの結果は、Al ストレスによるカロースの合成が原形質連絡を介した植物根における物質輸送を阻害することを意味している。



第5図 LYCH を*印の細胞中にマイクロインジェクションした後、原形質連絡を介して近傍細胞への移動を調べた。
a: コントロール、b: Al 处理根、c: DDG で前処理した根を Al 处理
(Sivaguru et al., 2000 より)

6) 細胞分裂阻害

Al による根の伸長阻害は短時間で認められる。一方、Al による細胞分裂の阻害は数時間を要す。さらに、細胞分裂が根の伸長に占める割合は 1~2%と考えられており、細胞分裂阻害は Al による根の伸長阻害の第一義的原因とは考えられていない。しかし、根の伸長阻害は伸長域の細胞伸長の阻害によるので、分裂域で生成した新たな細胞が伸長域へ供給される限り、根は Al 毒性によって完全に死に至ることはない。このように考えると、不可逆的な伸長阻害の原因になる Al 毒性は細胞分裂の阻害に帰結される(Matsumoto, 2000; Morimura et al., 1978b; Matsumoto and Morimura, 1980)。エンドウ根を Al 处理すると、Al は細胞分裂の高い伸長しつつある側根に多く取り込まれ、核内への集積が認められる(Matsumoto et al., 1976a; Matsumoto, 1991)。Al 处理したエンドウ根から核を調製し核内に侵入した Al を分画すると、大部分がクロマチンに結合しており、特に DNA のリン酸基に結合していた(Matsumoto et al., 1997)。その結果、クロマチン構造が凝集し、転写活性の低下が起こっていることが認められた(Morimura and Matsumoto, 1978a)。このことは Al による細胞分裂阻害が核内 DNA との結合によると考えられる(Morimura et al., 1978a)。

ダイズにおいても低濃度 1.45 μ M Al (pH

4.2) で処理すると、Al は細胞分裂域の核内に集積し、Al 感受性のダイズほど多くの Al が根に集積することが明らかにされた(Silva et al., 2000)。

タバコ培養細胞の対数増殖期の細胞は Al による増殖阻害を受けるが、定常期の細胞は殆ど受けない(Yamamoto et al., 1994)。対数期の細胞を Al 処理すると、6 時間の処理で隔膜形成体(フラグモプラスト)を構成している微小管の減少を認めた。さらに Al 処理 24 時間で分裂中期の細胞において紡錘体が消失した。Al による微小管の崩壊は、Al が直接細胞分裂を阻害することを示唆している(Sivaguru et al., 1999)。

7) ボーダー細胞

根冠のボーダー細胞の Al ストレスによる挙動について調べられた。Al 耐性コムギ(Atlas 66)と感受性コムギ(Scout 66)とともに、Al はボーダー細胞の生成と根根幹からの分離を抑制した。その結果、ボーダー細胞の凝集(集合化)が引き起こされ、その程度は Atlas 66 の方が小さかった。根冠から遊離するボーダー細胞の数は、Al 処理によって著しく減少した。Al は分離したボーダー細胞の死を誘導し、25 μ M Al で 20 時間処理すると分離したボーダー細胞の細胞死が引き起こされた。Atlas 66, Scout 66 ともに根冠からボーダー細胞を取り除くと、根内への Al の集積が増加するとともに根伸長阻害が引き起こされた。これらの結果は、根冠にボーダー細胞が付着していることが Al 耐性の一部を付与していることを示唆している(Zhu et al., 2003)。

II. Al ストレス耐性

植物は動物と異なり、根により土中に固定されているので移動によってストレスを避けることは出来ない。そのため自らストレスを抑制する方法を獲得してきたと言える。Al 抵抗性機構には大別して 2 つの方法がある。①Al 排除機構(Al exclusion mechanism)と②細胞内抵抗性機構(internal detoxification)である。植物により①あるいは②のどちらかしか機能していないというわけでなく、種によっては両方の機構を働かせている場合もある(Li et al., 2000a, 2002)。これまで機構の単純明快さや多くの事実から Al 排除機構が主要なものと考えられている。

1. Al 排除機構

この機構は根圏に存在する毒性 Al (Al^{3+}) が

根内に取り込まれるのを排除しようという機構で、いくつかの戦略が考えられている。

1) 根圏 pH の制御

Al の溶解度は pH に強く依存し、毒性の最も強い Al³⁺の大部分は pH 4.5 以下の条件で存在する。従って、根圏の pH を高めて溶解している Al³⁺を不溶化し、沈殿させることによって耐性を獲得しようというものである。アラビドブシスの Al 耐性変異株 (*Alt-107*) は、この戦略を持っている。微小電極を用いて根近傍の pH を測定すると Al が存在する時のみ pH の上昇を認めたが、野生株では pH の上昇が認められなかった。*Alt-107* は H⁺の吸収量が、野生株に比べて 2 倍高く、根圏の pH は Al により 0.15 単位上昇し Al の吸収を抑制した (Degenhardt et al., 1998)。

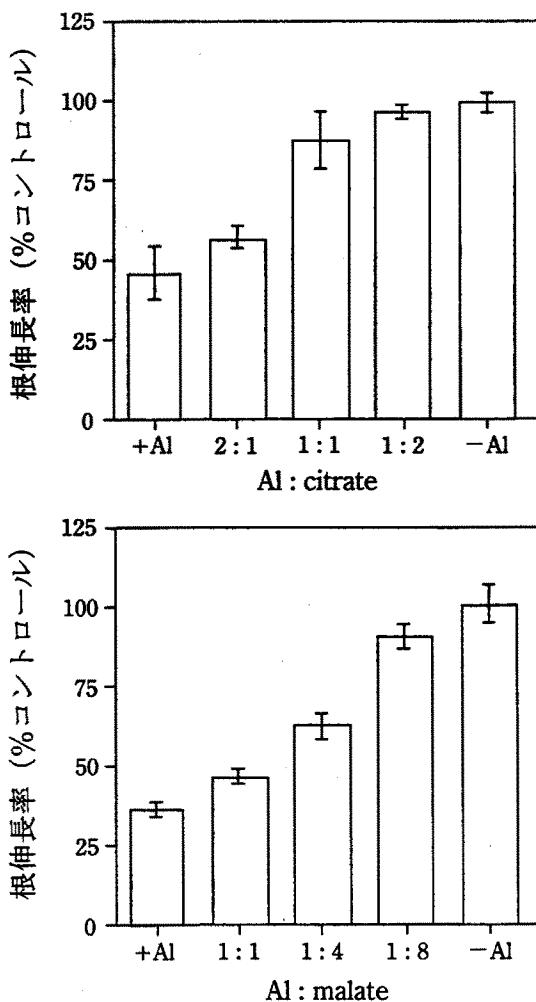
2) 有機酸分泌

この戦略は植物根が Al ストレスシグナルを感じると、根より Al キレート物質として有機酸を分泌して根圏で Al³⁺とキレート結合を形成し、根内への Al の取り込みを抑制する。毒性 Al³⁺を根内へ取り込まないようにするこの戦略は、極めて合理的な戦略といえる (Kochian, 1995; Delhaize and Ryan, 1995; Matsumoto, 2000)。植物により同じ Al ストレスシグナルによって分泌する有機酸の種類は異なる。トウモロコシ、タバコ、エビスグサ、ダイズ、インゲン、オオムギ、ヒマワリ等はクエン酸を、タロイモ、ソバはシュウ酸を、コムギはリンゴ酸を分泌する。またライムギは同時にクエン酸とリンゴ酸を分泌する。また分泌パターンにも違いが見られ、リンゴ酸は Al ストレスにより数分以内で分泌されるが、クエン酸の分泌は 1~数時間単位の誘導期が必要である (Yang et al., 2000)。しかし、その違いの詳細は分かっていない。一方、分泌される有機酸の Al に対するキレート安定定数は異なり、クエン酸は 12.3 (*K_{eq} Al*) で最も高く、シュウ酸は 6.53、リンゴ酸は 6.0 である。従って Al 感受性コムギの Scout 66 を 50 μM Al (pH 4.5) で処理する際、Al による根伸長阻害を完全に抑制するのに必要なクエン酸は Al と同量 (1 : 1 モル比) で充分であるが、リンゴ酸の場合は Al の 5~8 倍必要であり、効率からいえばリンゴ酸の分泌よりクエン酸の分泌の方がはるかに高いといえる (第 6 図)。

有機酸分泌による Al 耐性の研究は多い (Koyama et al., 1999)。インゲンを用いて Al によるクエン酸分泌が初めて報告された (Miyasaka et al., 1991)。その後、多くの研究

により有機酸による Al 排除機構の意義が確認されている。以下にその根拠になった事実を示す。

a) Al 耐性種では Al 濃度に比例してクエン酸やリンゴ酸を分泌するが、感受性種では分泌が認められないか、非常に少ない。b) Al 耐性のインゲンでは Al が存在すると、しない場合の 70 倍ものクエン酸を分泌する。しかも Al 耐性種の方が感受性種に比べ 10 倍多くクエン酸を分泌する。c) コムギの Al 耐性が異なる 36 種について調べた結果、耐性とリンゴ酸分泌量との間に正の相関が認められた (Ryan et al., 1995a)。d) ライムギを Al 処理する際に有機酸を共存させると、Al による根の伸長阻害が抑制され細胞死も著しく減少した (Li et al., 2002, 2000b)。e) 有機酸の分泌は多くの植物種において Al に特異的であり、他の 3 個のカ



第 6 図 Al 感受性コムギ Scout 66 の根伸長の Al による阻害とクエン酸及びリンゴ酸の共存による阻害の軽減。50 μM Al と有機酸を様々なモル比で含む溶液 (pH 4.5) で 9 時間処理 (Li, 2000 より)

チオンでは認められない (Ma et al., 1997c). f) Al による有機酸の分泌は Al の集積により阻害を受ける根端で特異的に認められる (Zheng et al., 1998; Ryan et al., 1995b). g) トウモロコシを Al 处理する際、シュウ酸を共存させると、その量に従って根内への Al の集積が減少した (Ma et al., 1998).

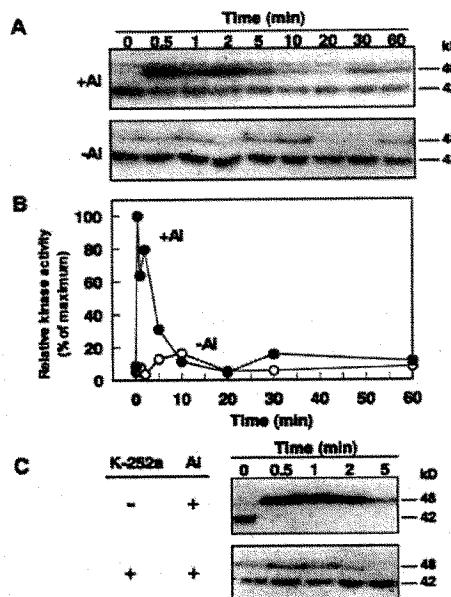
これらの事実から、有機酸分泌は強力な Al 耐性機構と考えられ、これまで多くの研究がなされてきた (Ryan et al., 1997). その耐性機構の解明と分泌を制御する遺伝子の発見に熾烈な競争が繰り返されてきた。分泌の機構は阻害剤を用いた実験から有機酸チャンネルの存在が考えられていたが、最近プロトプラストや単離膜を用い、パッチクランプの手法により Al により制御される有機酸チャンネルの存在が報告された。即ち、同質遺伝子系統の ET8 と ES8 を用いホールセルパッチクランプ法で調べた結果、Al によりアニオノンの透過が起こり、それに連動して電流が発生するチャンネルが発見された。このチャンネルではリンゴ酸の方が Cl^- より 2.6 倍多く通過し、アニオノンチャンネル阻害剤で阻害を受けた。また ET8 のチャンネルをリンゴ酸が透過する際に発生する内向き電流は $-68 \pm 8 \text{ mA m}^{-2}$ であるのに対し、ES8 の場合は $-27 \pm 6 \text{ mA m}^{-2}$ で明らかに弱かった (Zhang et al., 2001)。またトウモロコシの単離膜パッチにより Al 依存のチャンネルの存在が明らかにされ、このチャンネルはカチオンよりもアニオノンに対してより選択性に機能した (Piñeros and Kochian, 2001)。

3) コムギ ET8 と ES8 を用いたリンゴ酸分泌の制御機構

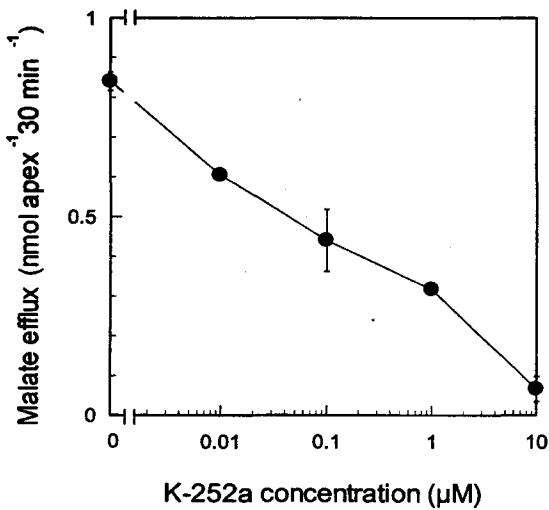
植物根が Al ストレスを感じて有機酸を分泌する過程はよく分かっていない。①Al シグナルが直接、原形質膜上のチャンネルに働きかけてゲートを開く、②Al が原形質膜上の Al シグナル受容体に結合して細胞質の二次情報を介してチャンネルに働く場合、③Al が細胞質内に取り込まれ、直接、膜の内側からチャンネルに働くか、あるいはシグナル変換を介してチャンネルを制御する。Al は異なったイオン形態をとり、他の生体成分との反応性が高いため Al シグナルの伝達については不明な点が多い。

コムギの Al によるリンゴ酸分泌にタンパク質のリン酸化が関与していることが明らかにされた (Osawa and Matsumoto, 2001)。即ち、Al 耐性の Atlas 66 を Al 处理すると、48kD のタンパクキナーゼが 0.1~1 分以内に強く発現し、その発現はリン酸阻害剤の K252a で強く抑制

された。リンゴ酸分泌は Al 处理後、数分で起こるのでこのキナーゼがリンゴ酸分泌に関与している可能性が強い (第 7 図)。同時に K252a によりリンゴ酸の分泌は抑制され (第 8 図)、逆に根内の Al の集積が増加した。一方、リンゴ酸放出は K^+ の放出を伴うことが知られていた。その生理的意味は細胞内の pH のホメオスタシスの維持と電気的バランスの調製にあると考えられるが、阻害剤の実験から K^+ 放出を止



第 7 図 Al に応答した 48kD キナーゼの活性化
A. Al 耐性コムギ品種 (cv. Atlas) 根端から調製した粗タンパク質を用いた in-gel-kinase 活性
B. 48kD キナーゼ活性の定量化
C. K-252a は Al による 48kD キナーゼの活性化を阻害
(Osawa and Matsumoto, 2001 より)



第 8 図 コムギ根の Al 誘導性のリンゴ酸放出に対するタンパク質リン酸化阻害剤 K-252a の影響
(Osawa and Matsumoto, 2001 より)

めても Al によるリンゴ酸の放出が阻害されなかつたので、Al による K⁺放出がリンゴ酸の放出にとって必須ではない (Osawa and Matsu-moto, 2002)。現段階では、Al 耐性機構の発現のために根が受容した Al シグナルが、どのような経路を経て発現に至っているのか殆ど分かっていない。今後の解明されるべき重要な課題である。

吸収された大部分の Al はアポプラストに保持されるので、細胞外（アポプラスト）から原形質への Al シグナルが伝達される機構として微小管ネットワークの関与が考えられている (Horst et al., 1999)。事実、微小管（チューブリン）やアクチンは Al によりその構造変化が引き起こされる (Sasaki et al., 1997; Sivaguru et al., 1999; Grabski and Schindler, 1995; Frantzios et al., 2001)。

植物の WAKs (cell wall associated receptor kinase) は原形質膜と細胞壁の接着に重要な役割を果たしていると考えられる (Sivaguru et al., 2003)。WAK の細胞壁内ドメインはグリシンリッチタンパクと結合すると推測されている。WAK が外部シグナルとの接触により、WAK の細胞質内キナーゼ活性が制御を受け、外部シグナルが WAK に依存したリン酸化を介して伝達される。WAK は細胞伸長や細胞形態の制御に関与しており、傷害などにより WAK1 遺伝子の発現が高まり、細胞外のストレスがキナーゼ活性の変化を通じて細胞内に伝えられることによって、様々な細胞の機能が制御されたり細胞の防御機構が作動する。Sivaguru ら (2003) は、Al ストレスによりアラビドブシスの WAK1 遺伝子の発現が制御されることを明らかにした。即ち、アラビドブシスの根において Al 处理 6 時間で WAK タンパクの増加が認められた。またその分布は、根端伸長域の内皮細胞の周辺に多いことを認めた。さらに WAK1 の発現を高めた形質転換アラビドブシスは Al 存在下でも根伸長を促進し、Al 耐性の要因になっていることが分かった。

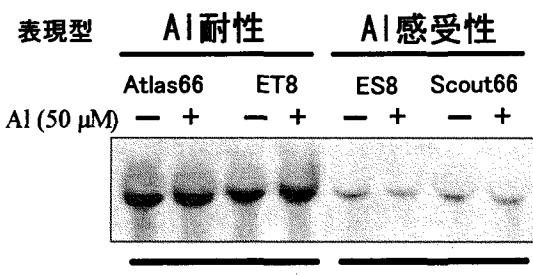
4) コムギの新規リンゴ酸トランスポーター遺伝子 *ALMT1* の発見

前述したように、Al 耐性機構で最も研究の進んでいるのはコムギである。準同質遺伝子系統 ET8 と ES8 がオーストラリアで作られ、その違いとして ET8 は Al により直ちに根からリンゴ酸を分泌出来るが、ES8 は出来ないという点であり、それ以外の遺伝的背景は揃っていると考えられている。このリンゴ酸放出に関わる遺伝子は *Alt1* と名付けられ、その実態は Al で

制御される原形質膜上のリンゴ酸チャンネルであると考えられ、その機能の重要さから世界中の *Alt1* 耐性に関わっている研究者が解明を試みていた。我々の研究グループは最近 *Alt1* 遺伝子に相当するものを発見したので、その概要を述べる (Sasaki et al., 印刷中；松本、佐々木, 2003)。

a) ET8 で特異的に発現している遺伝子の単離

ET8 と ES8 を用い、サブトラクション法により ET8 根端で ES8 根端よりも高い発現を示す cDNA を単離した。この遺伝子の発現は根端で特異的に見られ、Al 処理とは無関係に構成的に起こっていることが分かった。この遺伝子は後述するように種々の性質から Al によってその機能が発現する新規のリンゴ酸トランスポーターであることから、*ALMT1* (aluminum-activated malate transporter) と名付けられた。この *ALMT1* は ET8 で強く、ES8 では弱く発現していることの他、アミノ酸コード領域内で核酸で 6 塩基、アミノ酸で 2 塩基の違いを認め、Al 耐性のものを *ALMT1-1*、感受性のものを *ALMT1-2* とした。またアミノ酸配列から、この遺伝子のコードするタンパクは膜貫通性のタンパクであった。*ALMT1-1* と *ALMT1-2* はいわゆるアレルの関係にある (第 9 図)。



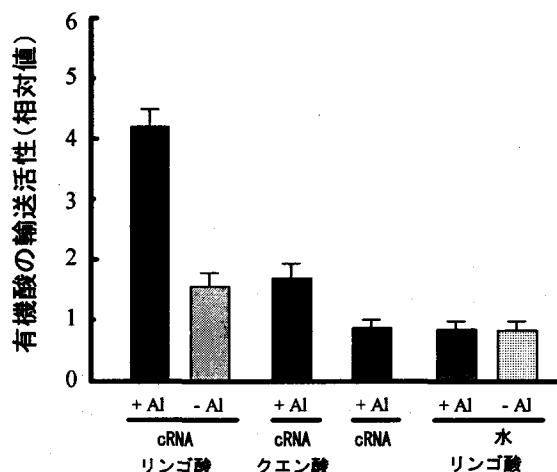
第 9 図 AI 耐性度の異なるコムギ品種間における *ALMT1* 発現と遺伝子型の相違

ノーザン解析から AI 感受性コムギ (ES8 と Scout 66) では *ALMT1-2* の発現量は小さく、AI 耐性コムギ (ET8 と Atlas 66) では *ALMT1-1* が大量に発現していることが分かった。また Al 耐性（根の伸長）やリンゴ酸分泌量が、耐性種と感受性の中間を示すコムギ chinese spring では *ALMT1-2* が発現しており、その量は耐性と感受性種の中間の値を示した。

b) *ALMT1* の生理機能

ALMT1 のコードする ALMT1 タンパク質の機能を解明するため、アフリカツメガエルの卵母細胞に *ALMT1* の cRNA を注入してタンパク

合成を2日間行った。さらにリンゴ酸を卵内に注入した後、細胞外液にAlを添加して二電極膜電位固定法により、リンゴ酸の放出に従って発生する内向き電流の発生から有機酸の輸送活性を調べた（第10図）。内向き電流の発生はcRNA、リンゴ酸を注入し、Alストレスを加えた場合のみに認められた。これらの一つを欠いたものでは電流の発生は認められなかった。またALMT1-1とALMT1-2を比較した結果、内向き電流はALMT1-2の方が小さく、ALMT1-2タンパクのリンゴ酸輸送活性はALMT1-1タンパクよりも小さいことが分かった。即ちAl感受性コムギのリンゴ酸分泌の小さい原因としてALMT1-2の発現量が小さく、かつその活性の低さの両方に支配されていることが分かった。アフリカツメガエルの系では、AlのかわりにLaや、リンゴ酸のかわりにクエン酸を注入しても内向き電流の発生は認められなかった。



第10図 ALMT1タンパク質の有機酸輸送活性へのAlの有無および有機酸種の影響。

アフリカツメガエル卵母細胞にALMT1のcRNAを注入してタンパクを発現させ、さらにリンゴ酸又はクエン酸を注入した後、細胞外液(pH 4.5)に0.1 mM Alを添加して二電極膜電位固定法により測定を行った。（松本英明・佐々木孝行、2003より）

これらの結果は、ALMT1のタンパクがAlで活性化を受けるリンゴ酸トランスポーターの特質をよく示しており、根端で起こるAlストレスによるリンゴ酸放出の実態を示唆している。

c) ALMT1の他の植物における発現

ALMT1遺伝子を導入した形質転換体イネにおける遺伝子発現を調べた。いくつかの独立した形質転換系統においてコムギよりも高い遺伝子発現を確認した。形質転換体におけるAl存在下の培地中におけるリンゴ酸放出を調べた結果、形質転換体の遺伝子発現量に応じたリンゴ

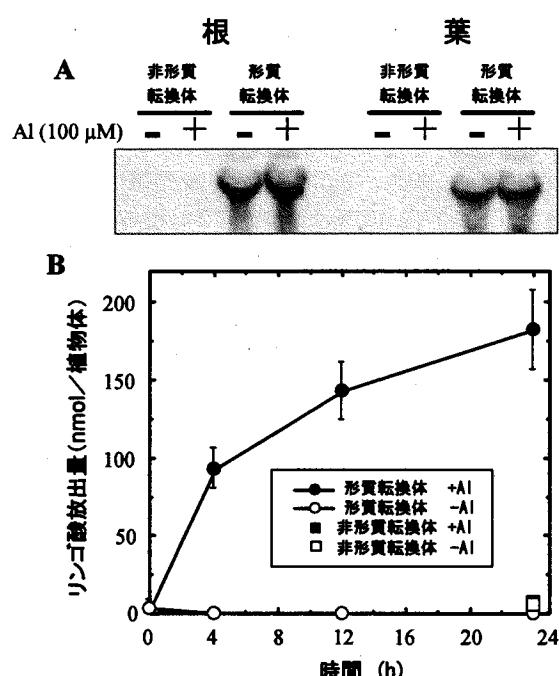
酸の放出を認めた（第11図）。イネ形質転換体をAlのかわりにLa³⁺やFe³⁺で処理してもリンゴ酸の放出は認められず、Alによって放出されるのはリンゴ酸のみでクエン酸の放出は認められなかつた。これらの結果から、ALMT1はAlストレス下でリンゴ酸を放出するトランスポーターの可能性が強く示唆された（Sasaki et al., 印刷中）。一方、タバコ培養細胞にALMT1遺伝子を導入した形質転換細胞においても、発現の高いセルラインからAlによってリンゴ酸を分泌し、Alの集積量が小さく、野生株に比べAl耐性を示した。次に、ALMT1遺伝子がコムギのAl耐性遺伝子である可能性を検討するため、準同質遺伝子系統のETとESの掛け合わせで得られたF2およびF3世代植物において、ALMT1遺伝子とAl耐性遺伝子(*Alt1*)との連鎖分析を行った結果、両者が同一である結果を得た。即ち、ET7とES7の交雑によるF2植物においてAlストレス下でも根伸長を示すAl耐性の個体は、全てALMT1-1のホモおよびヘテロの遺伝子型を持ち、かつALMT1遺伝子の高い発現を示したが、Al感受性の個体は全てALMT1-2のホモの状態を示し、しかも極めて低い発現量であった（Sasaki et al., 印刷中）。さらにET8とES8の交雑により得られたF3植物において、Al耐性の程度と遺伝子の多型パターンをゲノムサザン解析およびゲノムPCRで検討した結果、いずれもAl耐性の個体は全てALMT1-1のホモおよびヘテロの遺伝子型であり、Al感受性の個体は全てALMT1-2をホモとして持っていることが明らかになった。これらの結果から総合的に判断すると、新規にAl耐性コムギで発見したALMT1遺伝子は少なくともコムギのAl排出機構の根幹をなすリンゴ酸輸送トランスポーターであり、現在、この遺伝子のプロモーター領域の解析や染色体上の位置などの解析を進めており、この遺伝子の重要性は酸性土壌における分子育種技術にもとづく作物生産の向上にとって、欠くことの出来ない分子遺伝学的情報と実用的な面においても大きな意義を持つものになるであろう。

d) 個体レベルでみたAl排除機構の制御

有機酸分泌によるAl排除機構のAl耐性に占める重要な重要性は明らかである。しかし、分泌される有機酸の供給機構やAlシグナルの受容、伝達など今後、解明すべき点も多い。ここではAl耐性ダイズであるスズナリを用いたAlによるクエン酸放出について行った結果を概説する。

地上部を暗黒下に24時間おいたものは、クエン酸の分泌は殆ど見られなかった。また地上

部を切断すると、Al によるクエン酸の分泌は認められなかった。これらの結果は、光合成による炭素源の供給あるいはエネルギーの供給が Al によるクエン酸放出に不可欠であることを示唆している (Yang et al., 2001)。また根分け法により 1 本の個体の根の半分に Al 处理を行い、他の半分には Al 处理を加えないと、Al 处理を受けた根のみがクエン酸を分泌した。このことは、根が受容した Al シグナルが Al シグナルを受けていない根に伝達されないことを示唆しており、クエン酸の分泌には根が Al と直接接触することが必要であることを示している。



第11図 *ALMT1-1* 形質転換イネにおける遺伝子発現 (A) とリンゴ酸放出活性 (B) の比較。

形質転換体と非形質転換体 (日本晴品種) との比較を示した。リンゴ酸放出測定時にイネを $100 \mu\text{M}$ AlCl_3 处理した。(松本英明・佐々木孝行, 2003 より)

2. 細胞内 Al 抵抗性機構

この機構は Al 排除機構と異なり、細胞内に侵入した Al に対して直接作用したり、あるいは Al 毒性によって引き起こされた代謝異常や障害を除去ないし修復しようとするものである。前者の場合としては、植物体内での有機酸と Al のキレート結合による無毒化がある。一例として Al 含量の高いアジサイは酸性土壌でも障害を受けず、むしろアジサイが青色の美しい花色を示す場合は Al の存在が必要である。

一方、葉の細胞質中には可溶性の Al を大量に含んでいるが、クエン酸とモル比で 1 : 1 の割合で結合して存在していることが分かった。

このキレート結合の結果、Al は無毒化される (Ma et al., 1997a, b)。ソバも Al に対して強い抵抗性を示すが、ソバは Al によって短時間の内にシュウ酸を分泌する他、Al の存否に関わらず大量のシュウ酸を植物体内に持つており、侵入してきた Al とシュウ酸 : Al (3 : 1) のモル比で結合することが NMR で示された (Ma et al., 1997b)。シュウ酸は Al と 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1 のモル比で結合するが、3 : 1 の結合物が最も安定なものである。ソバはシュウ酸の分泌によって Al 排除機構を働かせる以外に体内においても同様の機構で細胞内抵抗性機構を働かせており、いわば二重の防御機構によって耐性を獲得しているといえる。

チャは極めて酸性の強い茶園で生育するが、水耕栽培液中に Al を添加するとむしろ新根の生成をともなった生育促進を示す (Matsumoto et al., 1976b)。その促進の機構は不明であるが、カテキン、フラボノイドなど茶に多い成分と Al との結合が報告されている (Nagata et al., 1992)。細胞内抵抗性機構に関してなされた多くの遺伝子レベルの研究は、Al 誘導性遺伝子に関するものである。これまで多くの Al 誘導性遺伝子が単離されているが、それらが耐性に関するものかどうか不明なものが多い (Sasaki et al., 2002; Snowden and Gardner, 1993)。

江崎ら (2001) はタバコ、アラビドブシスから得られた Al 誘導性遺伝子のうち、アラビドブシス blue copper binding protein, タバコ GDP dissociation inhibitor protein, タバコ peroxidase, タバコ parB 遺伝子などをアラビドブシスに導入した結果、Al 濃度が $200 \mu\text{M}$ という限定された濃度範囲であるが、弱いながら Al 耐性を示した。

Al ストレスによって酸素ストレスが引き起こされるが (Devi et al., 2003; Ezaki et al., 2000; Yamamoto et al., 2001, 2003), その主たるものはミトコンドリアで発生する活性酸素ラジカル O_2^- であると考えられている (Yamamoto et al., 2002)。この点に関して Basu ら (2001) は、ミトコンドリアに存在し O_2^- の除去に関す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からクローニングしたものを形質転換ナタネで発現させると、Al による根の伸長阻害が抑制されることを見い出した。細胞内抵抗性機構は、今後、有機酸分泌を伴わないで Al 耐性の強い植物種、例えばイネや signalgrass の耐性機構の解明などに期待される (Wenzel et al., 2001; Nguyen et al., 2002)。

おわりに

Al ストレスが最初に報告されたのは今から90年も前のことである。ヨーロッパの酸性土壤でムギ類の生産が劣ることに端を発しており、農業生産の現場で指摘されたものである。その後、その機構に関する研究は、長年殆ど進んでいなかった。近年、地球をとりまく人口増、環境の悪化、資源の有限性などの諸問題から関心が高まり、かつ植物科学における遺伝子解析技術の導入など、近年のバイオサイエンスの著しい進展とともにアルミニウムストレスに関する研究も急速に進展した。

特に Al 排除機構は植物の持つ独特の仕組みであり、特に有機酸分泌は Al 排除のみならず、逆に鉄やリン酸などの利用の面でも大きな役割を果たしている。従ってこの機構のより一層の解明が強く望まれ、植物根の持つ役割に新たな知見が提供され、それを基盤として今後の食糧の増産という面で貢献出来ることが強く期待される。

謝 辞

本総説で紹介した研究成果の多くは、平成10年度生研機構「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の援助を受けて行ったものである。また共同研究者の山本洋子、佐々木孝行、江崎文一、馬 建鋒、且原真木、大沢裕樹、田渕 彰、S.R. Devi, S.J. Ahn, M. Sivaguru, Z.M. Yang, P. Ryan, E. Delhaize, M.Y. Zhu, S.J. Zheng, H. Nian, 守村清一郎、平沢栄次の諸氏に感謝する。また原稿作成に協力いただいた力石早苗氏に感謝する。

形質転換イネの作出に用いたベクターは、中村研三、佐野 浩両博士から供与を受けた。

引用文献

- Ahn, S.J., Rengel, Z., Matsumoto, H. 2004. Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H⁺-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytologist* (in press).
- Ahn, S.J., Sivaguru, M., Osawa, H., Chung, G.C., Matsumoto, H. 2001. Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiol.* 126: 1381-1390.
- Ahn, S.J., Sivaguru, M., Chung, G.C., Rengel, Z., Matsumoto, H. 2002. Aluminum-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx or H⁺ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *J. Exp. Bot.* 53: 1959-1966.
- Akeson, M.A., Munns, D.N., Bureau, R.G. 1989. Adsorption of Al³⁺ to phosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 986: 33-40.
- Baligar, V.C., Ahlrichs, J.L. 1998. Nature and distribution of acid soils in the world. In Schaffert RE. ed., Proceeding of the Workshop to Develop a Strategy for Collaborative Research and Dissemination of Technology in Sustainable Crop Production in Acid Savannas and other Problem Soils of the World. Purdue University pp1-11.
- 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.
- Blamey, F.P.C., Edwards, D.G., Asher, C.J. 1983. Effects of aluminum, OH : Al and P : Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. *Soil Sci.* 136: 197-207.
- Cakmak, I., Horst, W.J. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83: 463-468.
- Chang, Y-C., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. 1999. Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminium and iron. *Plant Cell Environ.* 22: 1009-1017.
- Degenhardt, J., Larsen, P.B., Howell, S.H., Kochian, L.V. 1998. Aluminum resistance in the arabidopsis mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol.* 117: 19-27.
- Devi, S.R., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. 2003. An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. *J. Inorganic Biochemistry* 97: 59-68.
- Delhaize, E., Ryan, P.R. 1995. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107: 315-321.
- 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.
- Ezaki, B., Katsuhara, M., Kawamura, M., Matsumoto, H. 2001. Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 127: 918-927.
- Frantzios, G., Galatis, B., Apostolakos, P. 2001. Aluminum effects on microtubule organization in dividing root tip cells of *Triticum turgidum*. II. Cytokinetic

- cells. *J. Plant Res.* 114: 157-170.
- Funakawa, S., Hirai, H., Kyuma, K. 1993. Speciation of aluminum in soils solution from forest soils in northern Kyoto with special reference to there pedogenic process. *Soil Sci. Plant Nutr.* 39: 281-290.
- Grabski, S., Schindler, M. 1995. Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. *Plant Physiol.* 108: 897-901.
- Haug, A. 1984. Molecular aspects of aluminum toxicity. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 1: 345-373.
- Haug, A., Caldwell, C.R. 1985. Aluminum toxicity in plant: The role of the root plasma membrane and calmodulin. In John, J.B.St., Berlin, E., Jackson, P.C. eds., "Frontiers of Membrane Research in Agriculture" Beltsville Symposium 9, Rowman & Allanheld, Totowa. pp359-381.
- Horst, W.J. 1995. The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: A review. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 158: 419-428.
- Horst, W.J. Schmohl, A., Baluška, F., Sivaguru, M. 1999. Does aluminium effect root growth of maize through interaction with the cell wall - plasma membrane - cytoskeleton continuum? *Plant Soil* 215: 163-174.
- Jones, D.L., Kochian, L.V. 1997. Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *FEBS Lett.* 400: 51-57.
- Kochian, L.V. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 237-260.
- Koyama, H., Takita, E., Kawamura, A., Hara, T., Shibusawa, D. 1999. Over expression of mitochondrial citrate synthase gene improves the growth of carrot cells in Al-phosphate medium. *Plant Cell Physiol.* 40: 482-488.
- Li, X.F., Ma, J.F., Matsumoto, H. 2000a. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol.* 123: 1537-1543.
- Li, X.F. 2000b. Aluminum detoxification mechanism by organic acids and mucilage in higher plants. PhD dissertation, Okayama University.
- Li, X.F., Ma, J.F., Matsumoto, H. 2002. Aluminum-induced secretion of both citrate and malate in rye. *Plant Soil* 242: 235-243.
- Ma, J.F., Hiradate, S., Nomoto, K., Iwashita, T., Matsumoto, H. 1997a. Internal detoxification mechanism of Al in *Hydrangea*: Identification of Al form in the leaves. *Plant Physiol.* 113: 1033-1039.
- Ma, J.F., Zheng, S.J., Matsumoto, H., Hiradate, S. 1997b. Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* 390: 569-570.
- Ma, J.F., Zheng, S.J., Matsumoto, H. 1997c. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.* 38: 1019-1025.
- Ma, J.F., Hiradate, S., Matsumoto, H. 1998. High Al resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminium internally. *Plant Physiol.* 117: 753-759.
- Matsumoto, H., Hirasawa, E., Torikai, H., Takahashi, E. 1976a. Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nucleic acids. *Plant Cell Physiol.* 17: 127-137.
- Matsumoto, H., Hirasawa, E., Morimura, S., Takahashi, E. 1976b. Localization of aluminium forms in tea leaves. *Plant Cell Physiol.* 17: 627-631.
- Matsumoto, H., Morimura, S., Takahashi, E. 1977. Binding of aluminium to DNA of DNP in pea root nuclei. *Plant Cell Physiol.* 18: 987-993.
- Matsumoto, H., Morimura, S. 1980. Repressed template activity of chromatin of pea roots treated by aluminium. *Plant Cell Physiol.* 21: 951-959.
- Matsumoto, H. 1991. Biochemical mechanism of the toxicity of aluminum and the sequestration of aluminum in plant cells. In Wright, R.J., Baligar, V.C., Murrmann, R.P. eds., *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 825-838.
- Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Kasai, M. 1992. Changes of some properties of the plasma membrane-enriched fraction of barley roots related to aluminum stress: Membrane-associated ATPase, aluminum and calcium. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38: 411-419.
- Matsumoto, H. 2000. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* Academic Press 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*, Marcel Dekker, Inc. pp289-319.
- Matsumoto, H. 2002a. Plant roots under aluminum stress: Toxicity and tolerance. In Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. eds., *Plant Roots: The Hidden Half*. Third Edition, Marcel Dekker, Inc. pp821-837.
- Matsumoto, H. 2002b. Metabolism of organic acids and metal tolerance in plants exposed to aluminum. In Prasad, M.N.V., Strzalka, K. eds., *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Kluwer Academic Publishers pp95-109.

- 松本英明, 佐々木孝行. 2003. アルミニウム耐性と有機酸放出 - リンゴ酸トランスポーターの発見 - 植物の膜輸送システム. 植物細胞工学シリーズ 18: 142-145. 秀潤社
- Miyasaka, S., Buta, J.G., Howell, R.K., Foy, C.D. 1991. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. Plant Physiol. 96: 737-743.
- Morimura, S., Matsumoto, H. 1978a. Effect of aluminum on some properties and template activity of purified pea DNA. Plant Cell Physiol. 19: 429-436.
- Morimura, S., Takahashi, E., Matsumoto, H. 1978b. Association of aluminium with nuclei and inhibition of cell division in onion (*Allium cepa*) roots. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 88: 395-401.
- Nagata, T., Hayatsu, M., Kosuge, N. 1992. Identification of aluminum forms in tea leaves by ²⁷Al NMR. Phytochemistry 31: 1215-1218.
- Nguyen, V., Nguyen, B., Sarkar, S., Martinez, C., Paterson, A., Nguyen, H. 2002. Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic backgrounds. Mol. Genet. Genomics. 26: 772-780.
- Olivetti, G.P., Cumming, J.R., Etherton, B. 1995. Membrane potential depolarization of root cap cells precedes aluminum tolerance in snapbean. Plant Physiol. 107: 123-129.
- Osawa, H., Matsumoto, H. 2001. Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root apex. Plant Physiol. 126: 411-420.
- Osawa, H., Matsumoto, H. 2002. Aluminium triggers malate-independent potassium release via ion channels from the root apex in wheat. Planta 215: 405-412.
- Piñeros, M.A., Kochian, L.V. 2001. A patch clamp study on the physiology of aluminum toxicity and tolerance in *Zea mays*: Identification and characterization of Al³⁺-induced anion channel. Plant Physiol. 125: 292-305.
- Rengel, Z. 1996. Uptake of aluminium by plant cells. New Phytol. 134: 389-406.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., Randall, P.J. 1995a. Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat. Aust. J. Plant Physiol. 22: 531-536.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., Randall, P.J. 1995b. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. Planta 196: 103-110.
- Ryan, P.R., Skerrett, M., Findlay, G.P., Delhaize, E., Tyerman, S.D. 1997. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9547-9552.
- Sasaki, M. 1996. Study of aluminum toxicity on root growth in wheat (*Triticum aestivum* L.). Ph.D dissertation, Okayama University, Kurashiki Okayama, Japan
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. 1996. Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. Physiol. Plant. 96: 193-198.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. 1997. Aluminum inhibits growth and stability of cortical microtubules in wheat (*Triticum aestivum*) roots. Soil Sci. Plant Nutr. 43: 469-472.
- Sasaki, T., Ezaki, B., Matsumoto, H. 2002. A gene encoding multidrug resistance (MDR)-like protein is induced by aluminum and inhibitors of calcium flux in wheat. Plant Cell Physiol. 43: 177-185.
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn Sung Ju, Ryan, P., Delhaize, E., Matsumoto, H. A wheat gene encoding an aluminium-activated malate transporter. Plant J. (in press)
- Silva, I.R., Smyth, J., Moxley, D.F., Carter, T.E., Allen, N.S., Rufty, T.W. 2000. Aluminum accumulation at nuclei of cells in root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. Plant Physiol. 123: 543-552.
- Sivaguru, M., Ezaki, B., He, Z-H., Tong, H., Osawa, H., Baluška, F., Volkmann, D., Matsumoto, H. 2003. Aluminum induced gene-expression and protein localization of a cell wall-associated receptor protein kinase in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 132: 2256-2266.
- Sivaguru, M., Horst, W.J. 1998. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. Plant Physiol. 116: 155-163.
- Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. 1999. Differential impacts of aluminium on microtubule organization depends on growth phase in suspension-cultured tobacco cells. Physiol. Plant. 107: 110-119.
- Sivaguru, M., Fujiwara, T., Šamaj, J., Baluška, F., Yang, Z.M., Osawa, H., Maeda, T., Mori, T., Volkmann, D., Matsumoto, H. 2000. Aluminum-induced 1-3-β-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata: A new mechanism of aluminum toxicity in plants. Plant Physiol. 124: 991-1005.
- Snowden, K.C., Gardner, R.C. 1993. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. Plant Physiol. 103: 855-861.
- Tabuchi, A., Matsumoto, H. 2001. Changes in cell-wall

- properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition. *Physiol. Plant.* 112: 353-358.
- Tabuchi, A., Kikui, S., Matsumoto, H. 2003. Differential effects of aluminum on osmotic potential and sugar accumulation in the root cells of Al-resistant and Al-sensitive wheat. *Physiol. Plant.* (in press)
- Taylor, G.J., McDonald-Stephens, J.L., Hunter, D.B., Bertsch P.M., Elmore, D., Rengel, Z., Reid, R.J. 2000. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of Chara corallinae. *Plant Physiol.* 123: 987-996.
- Tice, K.R., Parker, D.R., DcMason, D.A. 1992. Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol.* 100: 309-318.
- Vierstra, R., Haug, A. 1978. The effect of Al^{3+} on the physical properties of membrane lipids in *Thermoplasma acidophilum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84: 138-143.
- Wagatsuma, T., Jujo, K., Ishikawa, S., Nakashima, T. 1995. Aluminum-tolerant protoplasts from roots can be collected with positively charged silica microbeads: A method based on differences in surface negativity. *Plant Cell Physiol.* 36: 1493-1502.
- Wenzel, P., Patiño, G.M., Chaves, A.L., Mayer, J.E., Rao, I.M. 2001. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. *Plant Physiol.* 125: 1473-1484.
- 山本洋子 2002. 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—. *根の研究*. 11: 147-154.
- Yamamoto, Y., Hachiya, A. and Matsumoto, H. 1997. Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 38: 1333-1339.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. 2001. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but 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. 2002. 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. 2003. Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant Soil* (in press)
- Yamamoto, Y., Rikiishi, S., Chang, Y-C., Ono, K., Kasai, M. and Matsumoto, H. 1994. Quantitative estimation of aluminium toxicity in cultured tobacco cells: correlation between aluminium uptake and growth inhibition. *Plant Cell Physiol.* 35: 575-583
- Yang, Z.M., Nian, H., Sivaguru, M., Tanakamaru, S. and Matsumoto, H. 2001. Characterization of the aluminium-induced citrate secretion in the aluminium-tolerant soybean (*Glycine max*. L.) plants. *Physiol. Plant.* 113: 64-71.
- Yang, Z.M., Sivaguru, M., Horst, W.J., Matsumoto, H. 2000. Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 110: 72-77.
- Zhao, X-J., Sucoff, E., Stadelmann, E.J. 1987. Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. *Plant Physiol.* 83: 159-162.
- Zhang, W.H., Ryan, P.R., Tyerman, S.D. 2001. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. *Plant Physiol.* 125: 1459-1472.
- Zheng, S.J., Ma, J.F., Matsumoto, H. 1998. High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.* 117: 745-751.
- Zhu, M.Y., Ahn, S.J., Matsumoto, H. 2003. Inhibition of growth and development of root border cells in wheat by Al. *Physiol. Plant.* 117: 359-367