

第4章 根からのアルミニウム結合性物質の放出

4.1 はじめに

第3章で耐性種 *Melaleuca cajuputi* と感受性種 *M. bracteata* を選抜した。Al によって植物に現れる最も顕著な障害は根の伸長阻害であり、根の伸長阻害は根端に Al が侵入することによって引き起こされる (Delhaize and Ryan 1995)。従って、植物の Al 耐性機構は、Al が根端に集積するのを防ぐ「Al 排除機構」と根端に Al が集積しても耐えられる「根端内 Al 耐性機構」に分けて考えることができる。1 mM の Al に根を 24 時間浸けたところ、*M. cajuputi* の根端の Al 濃度は *M. bracteata* よりも低かったので (図 3-3)、*M. cajuputi* には何らかの Al 排除機構が存在している可能性がある。第4章では、*M. cajuputi* の極めて高い Al 耐性の機構を解明するために、まず *M. cajuputi* の Al 耐性が根から Al 結合性物質を分泌することによる Al 排除機構であるかどうかを明らかにすることを目的とした。

リンゴ酸やクエン酸、シュウ酸などの低分子有機酸は、Al とキレート結合して安定な複合体を形成し、Al が細胞を構成する物質に結合するのを防ぐことができる (Ma 2000)。作物やモデル植物では、根端から有機酸を分泌することが Al 排除機構として解明されつつある (Ma and Furukawa 2003)。例えば、コムギ (*Triticum aestivum*) の Al 耐性系統でリンゴ酸を (Delhaize et al. 1993b)、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) の Al 耐性品種でクエン酸を (Miyasaka et al. 1991)、ソバ (*Fagopyrum esculentum*) の Al 耐性品種でシュウ酸を (Zheng et al. 1998)、Al に応答して根から分泌することが知られている。植物の Al 耐性機構に関する研究の多くは、根端からの有機酸分泌による Al 排除機構に注目しており、実験的証拠のほとんどがこの機構に関するものである (Kochian et al. 2004)。

有機酸のほかにも、リン酸やカテキン、クエルセチンなどのフェノール物質が、根から分泌され根圏で Al と結合し、Al の集積を抑制する物質として提唱されている (Lindberg 1990, Basu et

al. 1999, Kidd et al. 2001)。

本章では、耐性種 *M. cajuputi* の根から放出される Al 結合性物質の量を測定し、第 3 章で選抜した感受性種 *M. bracteata* と比較した。また、第 3 章で Al 誘導性の耐性機構を有する可能性が指摘された *Eucalyptus camaldulensis* についても *M. bracteata* と比較した。Al 結合性物質として、有機酸、リン酸、フェノール物質を測定した。また、根から放出される物質の Al 結合能力を評価した。

4.2 材料と方法

植物材料

「3.2 材料と方法」の「植物材料」(第3章)と同じ方法で、*M. cajuputi*、*E. camaldulensis*、*M. bracteata* の実生を栽培した。

根からの放出物の採取

播種後3~5ヶ月の実生を3Lのプラスチックポットに6本ずつ植え替え、実験1(第3章)と同様の培養液を使って水耕栽培した。30~40日間水耕栽培した実生の根を、脱イオン水でよく洗ったのち、8個体ずつまとめて200 mLの0 mMあるいは1 mMの AlCl_3 を含む0.35 mM CaCl_2 溶液(pH 4.0)に通気しながら24時間浸け、この溶液を根から放出された物質を分析する試料とした。溶液は200 mLに定容したのち、185 mLを有機酸とリン酸の分析に、15 mLを元素(K, Ca, Mg, Fe)と全有機炭素の定量に用いた。根は処理終了後、脱イオン水で洗浄してから、すみやかに -30°C で冷凍させ、凍結乾燥したのち、乾重を測定した。乾重測定後の根は、根の有機酸濃度の測定(第5章)まで -30°C で保存した。また、根から放出物を含む溶液を同様に採取し、Al結合能力の評価とゲル濾過による分析に用いた。試料溶液はすべて0.22 μm のメンブレンフィルターを通したのち、分析まで -30°C で保存した。有機酸とリン酸、全有機炭素、K、Ca、Mg、Feの分析に4反復、フェノール物質の分析とAl結合能力の評価に3反復を設けた。

有機酸、リン酸の測定

Ma et al. (1997b)の方法により、陽イオン交換カラムと陰イオン交換カラムを用いて試料溶液を精製した。陽イオン交換カラム(1.5 cm × 12 cm, Econo-Pac Disposable Chromatography

Columns, バイオラッド)に 5 g の陽イオン交換樹脂(Amberlite IR-120B, H⁺形, オルガノ)、陰イオン交換カラム(0.4 cm × 4 cm, Poly-Prep Chromatography Columns, バイオラッド)に 2 g の陰イオン交換樹脂(AG 1-X8 resin, 100-200 mesh, formate form, バイオラッド)を充填し、脱イオン水で樹脂を洗浄した。キャップ(Poly-Prep Column Stack Caps, バイオラッド)で陽イオン交換カラムと陰イオン交換カラムを接続し、試料溶液を 0.3-1.0 cm min⁻¹ の流速で、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂の順に通過させた。脱イオン水で樹脂を洗浄したのち、陰イオン交換カラムに 3 mL の 2 N 塩酸を 3 回流し、陰イオン交換樹脂に吸着されている有機酸を溶出させた。遠心エバポレーター(CVE-3100, 東京理化器械)を用いて溶出液を完全に乾燥させ(50°C)、200 μL の 10 mM NaOH に溶かし、遠心式フィルター(Ultra free-MC, ミリポア)で濾過したのち、有機酸の定量まで-30°Cで保存した。

精製した試料溶液のシュウ酸を逆相イオンペアクロマトグラフィーの分離による高速液体クロマトグラフを用いて定量した。移動相として 31.8 mM KH₂PO₄、5.2 mM K₂HPO₄、5 mM テトラブチルアンモニウム硫酸水素塩、10% (v/v)メタノールを含む水溶液(pH 5.0)を 0.6 mL min⁻¹ で送液し、カラム(Cadenza CD-C18, 4.6 mm × 25 cm, インタクト)を用いて 50°C 下でシュウ酸を分離した。シュウ酸を UV-VIS 検出器(SPD-10A, 島津製作所)によって、210 nm における吸光度を測定することにより検出した。標準物質としてシュウ酸(和光純薬工業)を用いた。

試料溶液中のクエン酸とリンゴ酸、コハク酸、リン酸を Tahara et al. (2005)の方法で高速液体クロマトグラフを用いて定量した。この方法は、イオン排除クロマトグラフィーによって有機酸を分離し、ポストカラム pH 緩衝化電気伝導度法により検出するものである。5 mM *p*-トルエンスルホン酸水溶液を移動相として 0.8 mL min⁻¹ で送液し、ガードカラム(SCR-102H, 6.0 mm × 5 cm, 島津製作所)を取り付けたカラム(Shim-pac SCR-102H, 8.0 mm × 30 cm, 島津製作所)を用いて 45°C 下で有機酸とリン酸を分離した。カラム溶出液に 5 mM *p*-トルエンスルホン酸および 100 μM エチレンジアミン四酢酸を含む 20 mM ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン水溶液を緩衝液として 0.8 mL min⁻¹ で混合したのち、電気伝導度検出器

(CDD-6A, 島津製作所)によって 48°Cで検出した。標準物質としてクエン酸三ナトリウム二水和物、D,L-リンゴ酸、コハク酸二ナトリウム六水和物、リン酸二水素ナトリウム二水和物(和光純薬工業)を用いた。

全有機炭素、元素の測定

試料溶液中の全有機炭素を全有機体炭素計(TOC-5000A, 島津製作所)で、K と Ca、Mg、Fe をフレイム原子吸光光度計(Z-6100, 日立ハイテクノロジーズ)で定量した。

フェノール物質の測定

陽イオン交換樹脂(Amberlite IR-120B, H⁺形, オルガノ)5 g を充填したカラムに試料溶液を通し、Al や Fe を除いた。溶液の pH を 0.1 M NaOH で 7 に合わせたのち、ロータリーエバポレーター(N-1, 東京理化器械)を使って 30°C で濃縮した。濃縮した試料溶液に 0.1 M HCl を加えて pH を 4.0 に合わせたのち、10 mL に定容した。このようにして精製、濃縮した試料溶液をフェノール物質、Al 結合能力の分析に用いた。

試料溶液中のフェノール物質をホーリン-デニス法(Swain and Hillis 1959)で定量した。この定量法は、溶液中の Fe によって干渉されることが予備測定によって明らかになった。根を Al 処理すると、アポプラストに吸着していたと思われる Fe が放出される(図 4-1)。従って、試料溶液から Fe を除去することが必要である。2 g リンモリブデン酸、11.23 g Na₂WO₄·2H₂O、5 mL の 85% (w/w) リン酸を 75 mL の水に加えたのち、2 時間還流させ、100 mL に定容してホーリン-デニス試薬を調製した。850 μL の試料溶液に 50 μL のホーリン-デニス試薬を加え攪拌し、3 分後に 100 μL の飽和 Na₂CO₃ 水溶液を加えた。1 時間後に 725 nm における吸光度を分光光度計(U-2000, 日立ハイテクノロジーズ)で測定した。標準物質としてフェノール(和光純薬工業)を用いた。

アルミニウム結合能力の評価

根からの放出物の Al 結合能力を以下の方法で評価した。精製、濃縮した試料溶液 2.7 mL に 0.3 mL の 0.25 mM $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ を加え、混合液の単量体 Al 濃度をピロカテコールバイオレット比色法 (Menzies et al. 1992) によって測定した。混合液に 0.108% (w/v) 1,10-フェナントロリン一水和物と 0.5% (w/v) アスコルビン酸を含む水溶液 0.5 mL を加え 1 分間反応させたのち、0.2 mL の 0.055% (w/v) ピロカテコールバイオレットと 1.0 mL 1 M イミダゾール緩衝液 (pH 5.6) を加え、60 秒後に 678 nm における吸光度を分光光度計 (U-2000, 日立ハイテクノロジー) で測定した。溶液中の全 Al 濃度をファーンエス原子吸光分析装置 (SIMAA6000, パーキンエルマー) で定量した。混合液の全 Al 量と単量体 Al 量の差から、何らかの物質と結合している Al 量を算出し、これをもって根から放出物の Al 結合能力を評価した。

ゲル濾過クロマトグラフィーによるアルミニウム結合性物質の分離

Sephadex G-10 (排除限界 700 Da, アマシャムバイオサイエンス) を充填したカラム (1.5 × 47 cm) を用いて、根の放出物から Al 結合性物質を分離した。溶出液として、0.1 M HCl で pH 4.0 に調整した脱イオン水を流速 0.43 mL min^{-1} で流した。「フェノール物質の分析」と同じ方法で試料溶液を精製、濃縮したのち、さらに遠心エバポレーター (CVE-3100, 東京理化工械) で完全に乾燥させた。0.3 mL の 10 mM AlCl_3 と 2.7 mL の溶出液を含む溶液 (Al 濃度: 1 mM) に試料を超音波で溶解させ、2 mL をカラムに添加した。溶出液を 1 画分あたり 30 滴 (およそ 1 mL) としてフラクションコレクターで分取し、各画分の Al 濃度をファーンエス原子吸光分析装置 (SIMAA6000, パーキンエルマー) で定量した。分子量既知の有機酸を標準物質として、画分番号に対する分子量の検量線を引き、ピークの画分番号から分離された物質のおよその分子量を求めた。

統計分析

ソフトウェアMac 統計解析(エスミ)を使って、チューキーの方法により各処理の平均を比較した。

4.3 結果

根からのカリウム、カルシウム、マグネシウム、鉄の放出

M. cajuputi, *E. camaldulensis*, *M. bracteata* の根から放出された K、Ca、Mg、Fe の量を図 4-1 に示す。根からの K の放出は、*M. cajuputi* では検出されなかったが、*E. camaldulensis* と *M. bracteata* では認められ、*E. camaldulensis* では Al によって減少した (t 検定, $P < 0.05$)。根からの Ca の放出は、*M. cajuputi* と *E. camaldulensis* の 0 mM Al 区では認められなかった。Ca の放出における負の値は、処理液である Ca 溶液から根に Ca が吸収されたことを意味する。*E. camaldulensis* の 1 mM Al 区と *M. bracteata* の根からは Ca の放出が認められた。根からの Mg の放出量は、*M. cajuputi* と *E. camaldulensis* で Al によって増加し (t 検定, $P < 0.05$)、*M. bracteata* では Al の影響を受けなかった (t 検定, $P > 0.05$)。根からの Fe の放出量は、3 樹種とも Al によって大きく増加した (t 検定, $P < 0.05$)。根を Al 処理すると、根の表面に付着していた陽イオンが Al とのイオン交換によって処理溶液中に放出されることが報告されている (Heim et al. 1999)。Al によって増加した根からの Mg と Fe の放出は、Al イオンとのイオン交換によって根の表面から放出された Mg イオンと Fe イオンであると考えられる。

根からの有機酸の放出

M. cajuputi, *E. camaldulensis*, *M. bracteata* の根から放出された有機酸の量を図 4-2 に示す。シュウ酸の根からの放出は、*E. camaldulensis* のみで検出され、*M. cajuputi* と *M. bracteata* では認められなかった。*E. camaldulensis* の根からのシュウ酸放出は 1 mM Al 区のほうが 0 mM Al 区よりも多い傾向にあった。クエン酸の根からの放出は、0 mM Al 区では 3 樹種とも認められなかったが、1 mM Al 区では 3 樹種とも放出していた。*M. cajuputi* と *E. camaldulensis* のクエン酸放出は、*M. bracteata* よりも少ない傾向にあった。リンゴ酸の根からの放出は、0 mM Al

区では3樹種とも検出されなかったが、1 mM Al 区では3樹種とも認められた。1 mM Al 区における *M. cajuputi* と *E. camaldulensis* のリンゴ酸の放出量は、*M. bracteata* よりも少ない傾向にあった。*E. camaldulensis* と *M. bracteata* では、0 mM Al 区でコハク酸の根からの放出が認められたが、1 mM Al 区では検出されなかった。*M. cajuputi* では、Al の有無に関わらずコハク酸の放出が認められなかった。それぞれの有機酸で、放出量の間には有意な差はなかった(チューキーの方法, $P > 0.05$)。

根からのリン酸、フェノール物質の放出と放出物の全有機炭素

M. cajuputi の根からのリン酸の放出量は、Al 処理によって影響を受けなかったが、*E. camaldulensis* と *M. bracteata* では、1 mM Al 区のほうが0 mM Al より放出量が少なかった(チューキーの方法, $P < 0.05$; 図 4-3)。1 mM Al 区のリン酸の放出量は、3樹種で違いがなかった(チューキーの方法, $P > 0.05$; 図 4-3)。

根からのフェノール物質の放出は、3樹種ともAlによって放出量が減少した(チューキーの方法, $P < 0.05$; 図 4-3)。1 mM Al 区におけるフェノール物質の放出量は、*M. cajuputi* は *M. bracteata* より少なく、*E. camaldulensis* は *M. bracteata* よりも多かった(チューキーの方法, $P < 0.05$; 図 4-3)。

根からの放出された全有機炭素量は、3樹種ともAlによって影響を受けなかった(チューキーの方法, $P > 0.05$; 図 4-3)。1 mM Al 区での放出量に樹種による違いはなかった(チューキーの方法, $P > 0.05$; 図 4-3)。

根からの放出物のアルミニウム結合能力

根からの放出物のAl結合能力を評価した(図 4-4)。3樹種とも0 mM Al 区と1 mM Al 区に有意な差はなかったが(チューキーの方法, $P > 0.05$)、*E. camaldulensis* はAlによって放出物のAl結合能力が高まる傾向にあった。1 mM Al 区における *M. cajuputi* の根からの放出物の

Al 結合能力は、*M. bracteata* と比べて 0.51 倍と低かった(チューキーの方法, $P < 0.05$)。一方、*E. camaldulensis* では、1 mM Al 区における根からの放出物の Al 結合能力が *M. bracteata* の 1.8 倍と高かった(チューキーの方法, $P < 0.05$)。

根から放出されたアルミニウム結合性物質の分離

根からの放出物を含む溶液に 1 mM になるように AlCl_3 を加え、ゲル濾過クロマトグラフィーにより Al 結合性物質を分離した結果を図 4-5 に示す。0.1%(w/v) NaCl 中の 0.02%(w/v) ブルーデキストラン 2000 を用いて調べた空隙体積のピークは、33 番画分に現れた。1 mM AlCl_3 のみを流した場合は、49 番画分に Al のピークが現れた(データ非表示)。したがって、図中の 49 番画分付近の大きいピークは、単量体 Al のピークあるいはそれと分離できない低分子の物質と結合した Al のピーク、またはその両方が重なったピークである。3 樹種とも 0 mM Al で根を処理した場合は、33 番画分付近にピークが現れた。これらのピークは、Al が試料溶液中の何らかの物質と結合して単量体 Al よりも分子量が大きくなったことを示している。つまり、根から Al 結合性の物質が放出されていると言える。根を 1 mM Al で処理した場合、*M. cajuputi* と *M. bracteata* では、33 番画分のピークが 0 mM Al の場合よりも小さくなった。*E. camaldulensis* の 1 mM Al 区では、0 mM Al 区では見られなかった大きなピークが 36 番画分に現れた。Al に反応して何らかの Al 結合性の物質が *E. camaldulensis* の根から放出されたと言える。この 36 番画分のピークに含まれる物質の分子量はおよそ 500 であると推定された。このことから、Al に反応して *E. camaldulensis* の根から放出された Al 結合性物質が Al と結合して分子量がおよそ 500 の複合体を形成していたと考えられる。

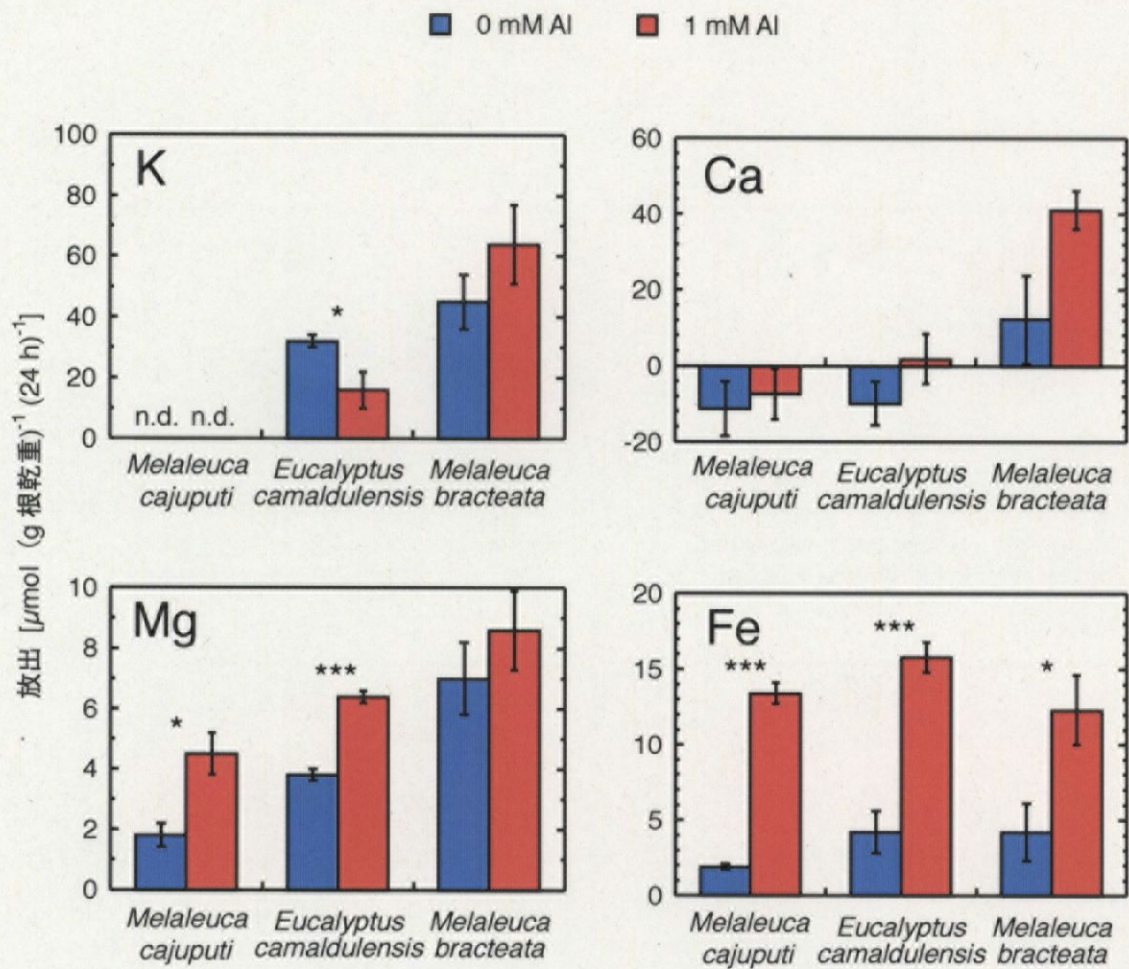


図 4-1. *Melaleuca cajuputi*、*Eucalyptus camaldulensis*、*M. bracteata*の根からのカリウム、カルシウム、マグネシウム、鉄の放出

値は平均±標準誤差である (n=4)。n. d. は検出されなかったことを示す。*、***はそれぞれP<0.05、P<0.001で0 mM Al区と1 mM Al区に有意差があることを示す (t検定)。

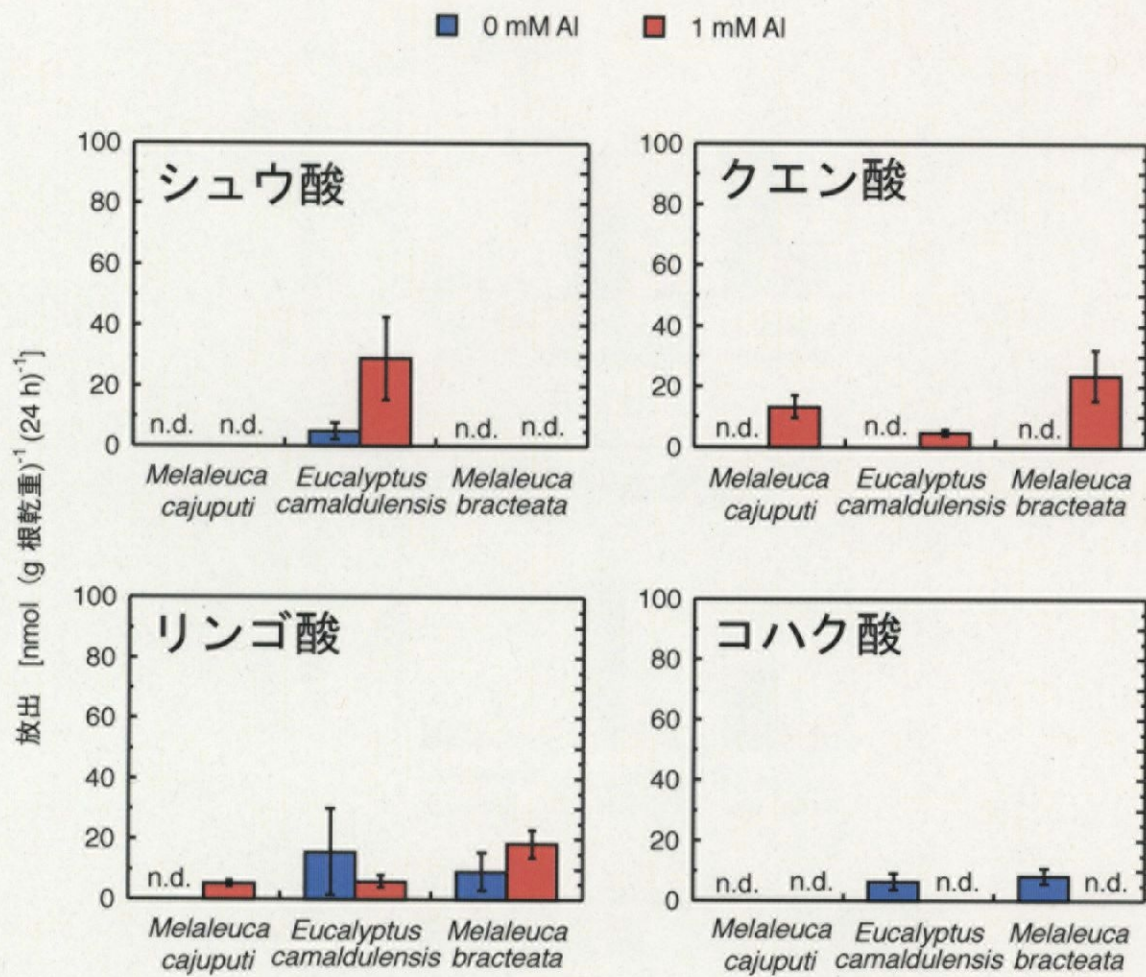


図 4-2. *Melaleuca cajuputi*、*Eucalyptus camaldulensis*、*M. bracteata*の根からの有機酸放出

値は平均±標準誤差である (n = 4)。n. d. は検出されなかったことを示す。

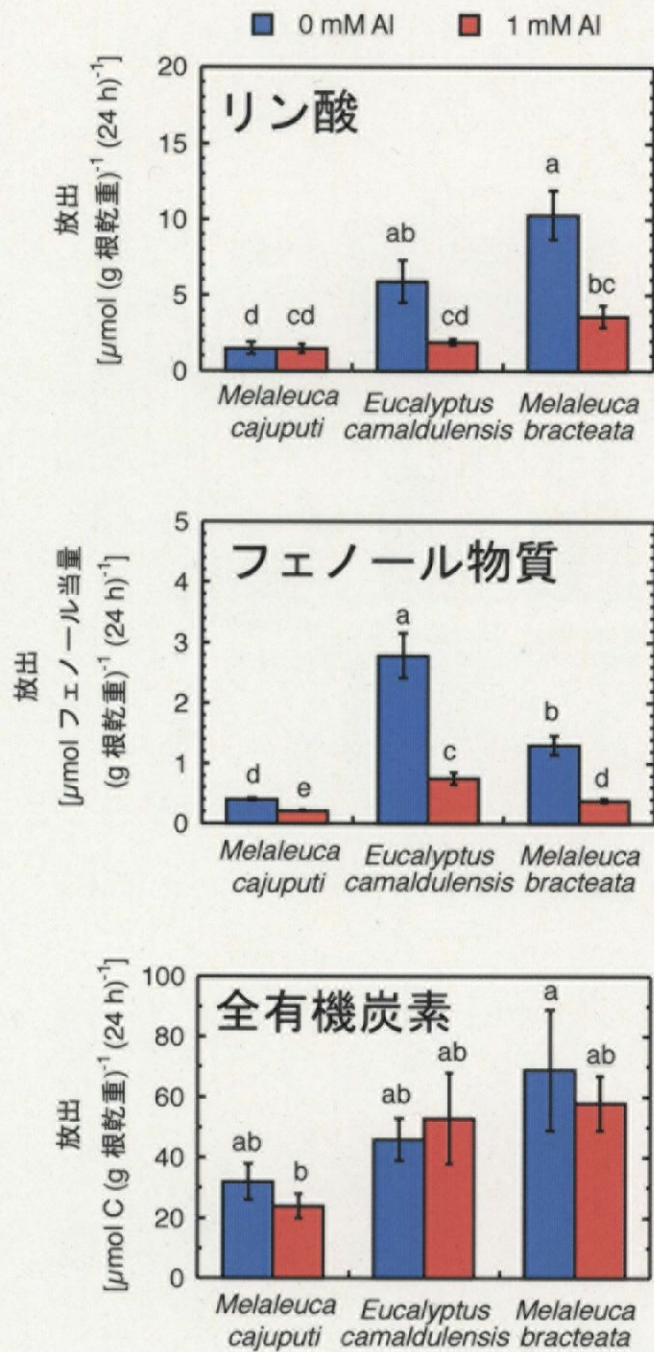


図 4-3. *Melaleuca cajuputi*、*Eucalyptus camaldulensis*、*M. bracteata*の根からのリン酸、フェノール物質、全有機炭素の放出

値は平均±標準誤差である（リン酸、全有機炭素 $n=4$ ；フェノール物質 $n=3$ ）。異なるアルファベットは $P < 0.05$ で有意差を示す（チューキーの方法）。

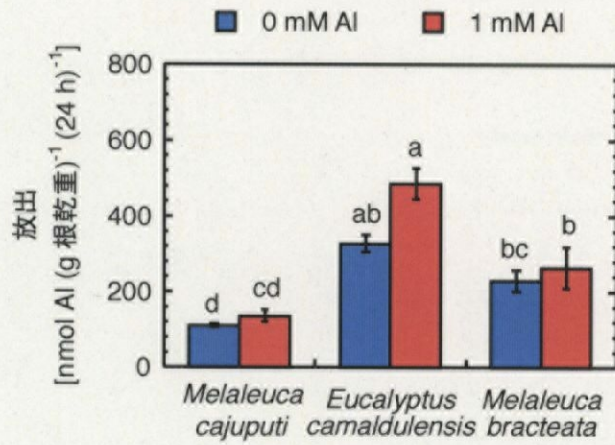


図 4-4. *Melaleuca cajuputi*, *Eucalyptus camaldulensis*, *M. bracteata*の根から放出物のアルミニウム結合能力

値は平均±標準誤差である ($n=3$)。異なるアルファベットは $P < 0.05$ で有意差があることを示す (チューキーの方法)。

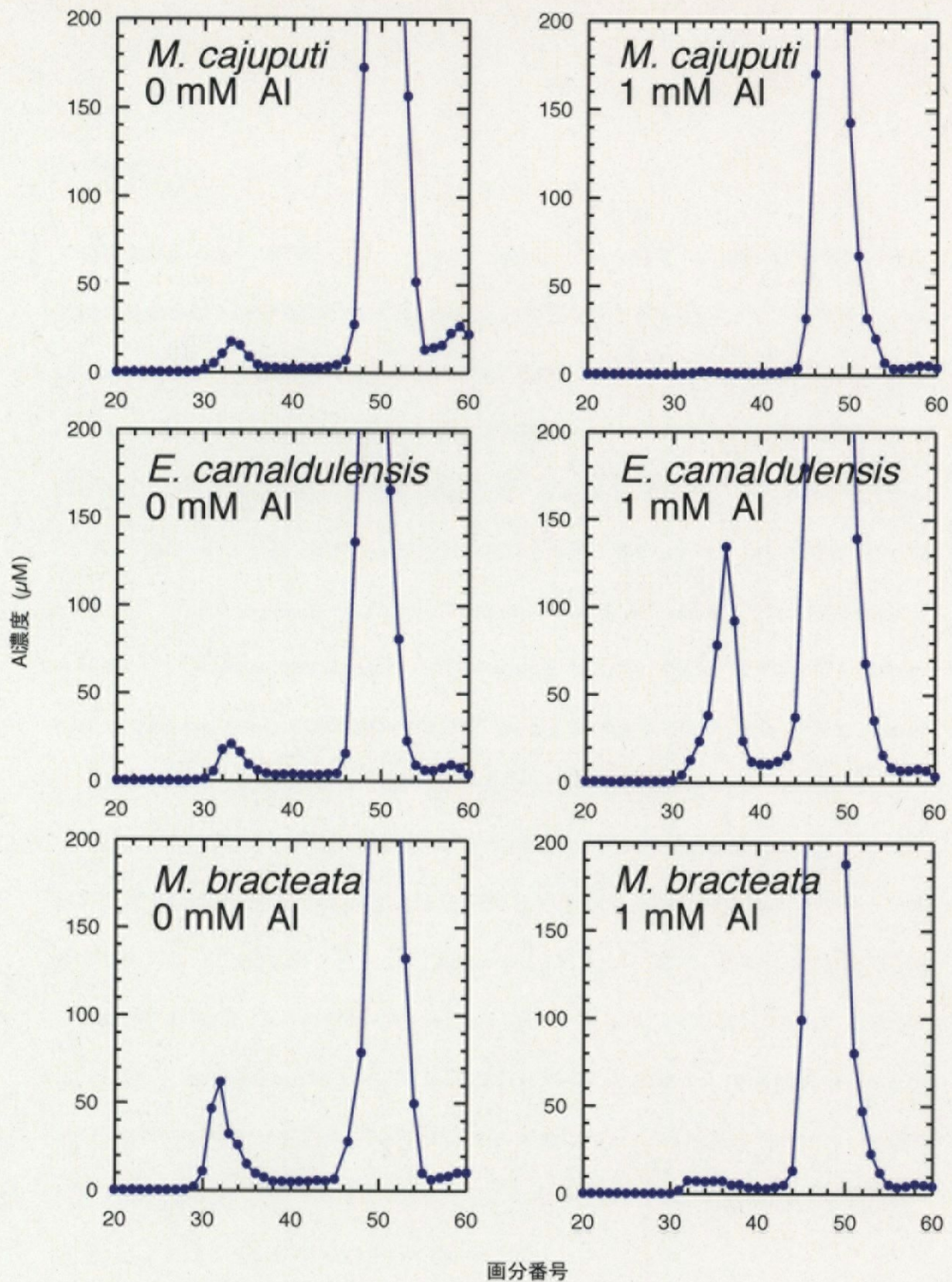


図 4-5. ゲル濾過クロマトグラフィーによって分離した根からの放出物とアルミニウムの複合体

値は各画分のAl濃度である。*Melaleuca cajuputi*、*Eucalyptus camaldulensis*、*M. bracteata* の0 mM Al区と1 mM Al区における根の乾重は、それぞれ、1.55、1.48、0.99、1.05、1.10、1.44 gだった。

4.4 考察

作物を中心に多くの植物で、Al に応答した根からのシュウ酸やクエン酸、リンゴ酸などの有機酸の分泌が報告されており、Al 耐性機構として重要な役割を果たしていると考えられている (Ma et al. 2001)。しかし、*M. cajuputi* や *E. camaldulensis* において、これらの有機酸の根からの分泌は、以下に挙げる 3 つの理由から Al 耐性機構として中心的な役割を果たしていないと考えられる。(1) 有機酸分泌により耐性を得ていると言われている植物よりも放出量が少なかった。本章で用いた 3 樹種の根からの有機酸放出は、処理に関わらず $30 \text{ nmol (g 根乾重)}^{-1} (24 \text{ h})^{-1}$ 以下だった (図 4-2)。ソバはおよそ $24\,000 \text{ nmol (g 根乾重)}^{-1} (24 \text{ h})^{-1}$ でシュウ酸を (Zheng et al. 1998)、*Paraserianthes falcataria* は $9\,000 \text{ nmol (g 根乾重)}^{-1} (24 \text{ h})^{-1}$ でクエン酸を (Tahara et al. unpublished data)、Al 耐性コムギは $2\,000 \text{ nmol (g 根乾重)}^{-1} (24 \text{ h})^{-1}$ でリンゴ酸を (Basu et al. 1994)、それぞれ Al 処理をした根から放出した。これらの植物と比べると *M. cajuputi* と *E. camaldulensis* の根からの有機酸放出量は非常に少ない。(2) 根から放出される物質の Al 結合能力に対する有機酸の寄与度が低い。シュウ酸、クエン酸、リンゴ酸がそれぞれ Al と 1:1 で結合するとしても、*M. cajuputi* と *E. camaldulensis* の 1 mM Al 区において根から放出された有機酸が結合する Al 量は、それぞれ 19 と $40 \text{ nmol Al (g 根乾重)}^{-1} (24 \text{ h})^{-1}$ である。これは、*M. cajuputi* と *E. camaldulensis* の 1 mM Al 区における根からの放出物の Al 結合能力のそれぞれ 14% と 8% を占めるにすぎない。(3) クエン酸とリンゴ酸については、Al 耐性が高い *M. cajuputi* と *E. camaldulensis* の 1 mM Al 区における根からの放出量が、その 2 樹種よりも耐性の低い *M. bracteata* より少ないか同程度だった (図 4-2)。

Al と結合能力を持つリン酸を根から分泌することが Al 排除機構の一つとして提唱されている (Lindberg 1990, Pellet et al. 1997)。しかし、1 mM Al 処理をした *M. cajuputi* と *E. camaldulensis* の根からのリン酸放出量は、*M. bracteata* と同程度だった (図 4-3)。従って、根

からのリン酸の分泌は、*M. cajuputi*と*E. camaldulensis*のAl耐性において重要な位置を占めているとは考えられない。本研究で用いたAl処理溶液はpH 4.0であるが、pH 4.0程度の低pHでは1 mM Al中の0.1 mMの PO_4^{3-} は、ほとんど難溶性の AlPO_4 を形成しない(大沢1999)。従って、根から放出されたリン酸は溶液中でほとんどAlの結合に寄与していないと考えられる。根からのリン酸の放出量は、*E. camaldulensis*と*M. bracteata*でAlによって少なくなった(図4-3)。*Picea abies*の根からのリン酸の放出量もAlによって少なくなることが報告されている(Heim et al. 2001)。彼らは、根のリン濃度がAlによって高まる傾向にあったことから、リン酸が根においてAlと結合して沈殿しているのではないかと推論している。*E. camaldulensis*と*M. bracteata*においてもpHが高い根の内部でリン酸とAlが結合して沈殿した可能性がある。

1 mM Al処理をした*M. cajuputi*の根からのフェノール物質の放出量は、*M. bracteata*よりも少なかった(図4-3)、*M. cajuputi*においてフェノール物質の放出量がAl耐性を決定しているとは考えられない。ただし、フェノール物質はその種類によってAl結合能力が異なっている(Ofei-Manu et al. 2001)、*M. cajuputi*と*M. bracteata*で根から分泌されるフェノール物質の組成が違い、根から分泌されたフェノール物質のAl結合能力が*M. cajuputi*で*M. bracteata*よりも高い可能性はある。一方、1 mM Al処理をした*E. camaldulensis*の根からのフェノール物質の放出量は、*M. bracteata*よりも多い(図4-3)、*E. camaldulensis*ではフェノール物質の放出がAl耐性に寄与している可能性がある。本研究で用いた3樹種とも根からのフェノール物質の放出がAlによって減少した(図4-3)。Alによる根からのフェノール物質放出の減少は*Picea abies*においても報告されている(Heim et al. 1999)。カテキン、クエルセチンなどのフェノール物質は、中性の溶液中(pH 7.0)のほうが酸性の溶液中(pH 4.5)よりもAl結合能力が高い(Ofei-Manu et al. 2001)、Alによってフェノール物質の放出が減少したのは、pHが高い根の中でAlとフェノール物質が結合したためである可能性がある。

*M. cajuputi*はシュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、リン酸の分泌によるAl排除機構を有していないと考えられた。高いAl耐性を持つイネ科牧草*Brachiaria decumbens*もこれらの物質の分泌に

よる Al 排除機構を持っていないと報告されている (Wenzl et al. 2001)。本研究で定量したシュウ酸、クエン酸、リンゴ酸には、1 分子当たり C がそれぞれ 2、6、4 個含まれている。また、フェノール物質 1 mol フェノール当量あたりに 6 mol の C が含まれていると仮定すると、本研究で定量した有機酸とフェノール物質の C の合計は、*M. cajuputi*、*E. camaldulensis*、*M. bracteata* で、それぞれ 1.4、4.6、2.5 $\mu\text{mol C (g 根乾重)}^{-1} (24 \text{ h})^{-1}$ であり、根から放出された全有機炭素のそれぞれ、5.7、8.6、4.3% にすぎない。根から放出された全有機炭素の残りは、本研究で定量した以外の有機酸、糖、アミノ酸、タンパク質などにより構成されていると考えられる。これらの物質の中に Al 結合性物質が含まれている可能性がある。例えば、Al 結合能力を持つポリペプチドが根から分泌されることがコムギで報告されている (Basu et al. 1999)。そこで、シュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、リン酸などの Al 排除機構に関わっていると言われている特定の物質の測定に加え、根からの放出物の Al 結合能力を評価した。本研究は、特定の物質を仮定せず、根からの放出物の Al 結合能力を評価した初めての例である。Al 処理をした耐性種 *M. cajuputi* の根から放出物の Al 結合能力は、感受性種 *M. bracteata* よりも小さかった (図 4-4)。このことから、*M. cajuputi* では根からの Al 結合性物質の分泌が主要な Al 耐性機構ではないと考えられる。*E. camaldulensis* では、Al 処理をした根からの放出物の Al 結合能力が *M. bracteata* よりも大きく (図 4-4)、Al 結合性物質の分泌による Al 排除機構を有している可能性がある。

E. camaldulensis では、Al に応答して Al 結合性の物質が根から放出されることがゲル濾過クロマトグラフィーによって明らかになった (図 4-4)。また、この Al 結合性物質は Al と結合すると分子量が 500 程度の複合体を形成する。3 mM シュウ酸を含む 1 mM Al を流すと、42 番画分にピークが現れた (データ非表示)。従って、Al によって現れた 36 番画分のピークは、Al によって放出が増加したシュウ酸と Al が結合した複合体によるものではない。このピークの画分 (30 番~40 番) に含まれている Al の量 (430 nmol) から、この Al 結合性物質による Al 結合能力を算出すると約 600 nmol Al (g 根乾重)⁻¹ (24 h)⁻¹ だった。これは、1 mM Al 区における *E.*

camaldulensis の根からの放出物の Al 結合能力 $486 \text{ nmol Al (g 根乾重)}^{-1} (24 \text{ h})^{-1}$ (図 4-4)を十分説明できる量である。従って、この Al と結合して分子量 500 程度の複合体を形成する物質は、Al 存在下で *E. camaldulensis* の根から放出される主だった Al 結合性物質であると考えられる。

極めて高い Al 耐性を持つ *M. cajuputi* の Al 耐性は、近縁の感受性種 *M. bracteata* との比較によって、従来から他の植物で提唱されているシュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、リン酸の根からの分泌による Al 排除機構によるものではないことが明らかになった。さらに、本研究で初めて試みられた特定の物質を仮定しない根からの放出物の Al 結合能力評価によって、シュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、リン酸以外の未知の Al 結合性物質の分泌によるものでもないことが明らかになった。*M. cajuputi* の Al 耐性は、Al 結合性物質の根からの分泌以外の Al 排除機構あるいは根端内 Al 耐性機構によるものであると考えられる。Al 結合性物質の根からの分泌以外の Al 排除機構としては、根圏の pH 上昇による Al の不溶化(Degenhardt et al. 1998)、細胞壁や細胞膜の低い Al 親和性(Wagatsuma and Akiba 1989, Schmohl and Horst 2000)、細胞膜の低い Al 透過性、トランスポーターなどによる積極的な Al 排出などが考えられる。

本章の研究によって、*M. cajuputi* の極めて高い Al 耐性は Al 結合性物質の分泌による Al 排除機構ではないことが明らかになった。*M. cajuputi* の Al 耐性機構は、Al 結合性物質の分泌以外の Al 排除機構または根端内 Al 排除機構によるものであると考えられ、そのいずれであるかを次章で明らかにする。また、*E. camaldulensis* は Al に反応して未知の Al 結合性物質を放出し、その物質は Al と結合して分子量 500 程度の複合体を形成することがわかった。この Al 結合性物質の根からの分泌が *E. camaldulensis* の Al 耐性に寄与している可能性がある。