

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580093

研究課題名(和文)植物特異的リンゴ酸輸送体の機能多様性の解析と作物生産増収への応用

研究課題名(英文) Study of functional diversity of plant specific malate transporter, aiming for an increase in crop productivity.

研究代表者

佐々木 孝行 (SASAKI, TAKAYUKI)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：60362985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴ酸輸送体ALMT1の相同遺伝子を、果実モデル植物・トマトから単離し、果実での生理機能を解析した。その結果、内膜局在型の2つのSIALMT遺伝子を見出し、電気生理学的解析によりリンゴ酸輸送能を示す事、種子に繋がる維管束で発現する事、さらに1つは種子の発根に重要な種皮組織で強く発現する事を明らかにした。過剰発現体を作成した結果、果実では差が無く、種子の有機酸含量に差があった事から、トマト果実熟成過程および種子発芽過程で、種子での陰イオン輸送機能が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Endomembrane localized ALMT-family transporter in tomato were analyzed. SIALMT possessed malate and anion transport function. The overexpression of the gene could not show malate accumulation in fruits, but caused change of organic anion contents in seed, suggesting that SIALMT transporter is involved in organic anion metabolisms in seed.

研究分野：植物栄養学・土壌学

キーワード：リンゴ酸輸送体 ALMT アニオン輸送 アルミニウム 電気生理学

1. 研究開始当初の背景

有機酸の一つであるリンゴ酸は全ての動植物において様々な代謝に関わっている。植物では、CAM 植物における CO₂ 濃縮の蓄積物として、また TCA サイクルの中間代謝産物としてリンゴ酸は重要な物質である。一般に、植物の細胞でリンゴ酸は、細胞質で 1-5 mM、液胞では 5-100 mM であり主に液胞内に蓄積されており、液胞浸透圧調節分子としても機能する。

さらに有機酸は、果実の酸味成分として重要である。果実の酸味は作物の食味に関わるだけでなく、収穫時期の指標となり、また加工品(例えばワインや果実飲料)の品質においても重要である。

液胞への有機酸の輸送に関わる遺伝子の報告例は限られている。シロイヌナズナの *AttDT* は液胞の Na⁺/dicarboxylate transporter として単離され、pH ホメオスタシスに關与するが、リンゴ酸を輸送する液胞チャネルは *AttDT* 以外にも存在すると報告されていた (Emmerlich et al. 2003, Hurth et al. 2005)。その後、液胞のリンゴ酸輸送体として *AtALMT9* が同定された (Kovermann et al. 2007)。しかしながら、この欠損変異体の表現系に変化が見られなかったことから、その時点では *AtALMT9* の生理的役割は不明であった。その後、*AtALMT9* が気孔の孔辺細胞の液胞膜に局在し、気孔開口に關与することが報告されている (De Angeli et al. 2013)。

AtALMT9 は、コムギのアルミニウム (Al) 活性化型リンゴ酸輸送体をコードする遺伝子 *ALMT1* (aluminum-activated malate transporter) の相同遺伝子として報告されたものである。このコムギ *ALMT1* は我々が世界で初めて単離して報告した (Sasaki et al. 2004)。

ALMT タイプ輸送体は、微生物や動物の既知のイオン輸送体とは相同性を示さない植物特有の輸送体である。近年のゲノム解析の進展により、シロイヌナズナ以外にも、イネやポプラなど植物のゲノムデータベース上に *ALMT* 相同遺伝子が存在することが分かってきたが、ほとんどの場合その輸送機能および生理的役割は不明である。

2. 研究の目的

植物の *ALMT* 輸送体の生理的役割は、発現する組織や細胞内局在によって多岐におよぶと予想され、未同定の *ALMT* 相同遺伝子の単離と特徴の解明は、新たな作物科学イノベーションにつながることを期待できた。

本研究課題では、液胞などの細胞内膜に局在する *ALMT* 相同遺伝子に主眼を置き、遺伝子の発現制御機構ならびに遺伝子産物の機能・性質について明らかにした。材料としてナス科のモデル植物で形質転換可能なトマト (cv. Micro-Tom) を選んだ。果実の有機酸は植物種や熟成時期によりその種類や量が変化することが知られている。トマトは果実にリンゴ酸を含むため、果実成熟の過程で代謝制御されていると考えられた。

研究目標としては以下のものを考えた。

- 1) トマト (cv. MicroTom) の果実で発現する *ALMT* 相同遺伝子を単離し、発現様式と発現組織を解析する。さらに、タンパク質の細胞内局在を明らかにする。
- 2) *ALMT* 輸送体のリンゴ酸・無機アニオン輸送の特性を電気生理学的手法により解析する。
- 3) *ALMT* 遺伝子発現を制御した形質転換トマトを作製し、果実のリンゴ酸蓄積量や、アニオン輸送による成長制御機構への関与を解析する。

以上の解析により、植物特異的な *ALMT* タイプ輸送体の新たな生理学的機能の解明を目的とした。

3. 研究の方法

材料には、上述の様にトマト MicroTom を用いた。本課題が採択された 2012 年に Sol Genome Network より、トマト品種 Heinz 1706 より大規模なゲノム配列が公開されたが、代表者らが研究を開始した 2011 年には EST と一部のゲノム配列があるのみだった。また品種も異なったことから、MicroTom より、*ALMT1* 遺伝子および上流配列は、EST、ゲノム情報を元に RACE-PCR および PCR によりクローニングした。

SIALMT の電気生理学的解析は、アフリカツメガエル卵母細胞で cRNA を発現させ、二電極膜電位固定法により、そのイオン輸送特性を解析した。

トマト MicroTom への SIALMT 遺伝子の過剰発現および遺伝子抑制系統の作出は、アグロバクテリウム法により行った。用いたバイナリープラスミドはカリフラワー-35S プロモーターを持ち、カナマイシン耐性遺伝子で選抜可能なものを使用した。得られた形質転換体の果実のリンゴ酸は酵素法により定量した。さらに、GC-MS 法により、主な含有有機酸などを解析した。

4. 研究成果

本研究課題の研究期間内の主な成果は以下の通りである。

(1) ALMT 相同遺伝子の単離と発現様式、発現場所の特定

ゲノムデータベースが公開されているトマトを用いた。品種は公開データベースのものとは異なるが、形質転換体を得られ、室内で栽培可能な品種 MicroTom を用いた。データベース上で、16 種類のトマト SIALMT 遺伝子の存在を確認した。特に液胞などの細胞内膜に局在するクレード 2 に着目し、5 つの存在を見出し、それぞれの組織発現を解析した。その結果そのうち 2 つが果実の成熟過程で恒常的に発現している事が明らかとなった。

細胞内局在の解析のため、SIALMT::GFP を作製し、タバコ培養細胞のプロトプラストに一過的に発現させた結果、一つは小胞体に、もう一つは小胞体と他の細胞内膜系に局在する事が明らかとなった。この局在が不明瞭な SIALMT の局在解析をさらに行うべく、抗体を作製したが、残念ながら抗体反応が弱く、イムノプロットなどによる解析は行えなかった。

さらにプロモーター::GUS 形質転換体を作製し、組織における発現解析を行った。その結果、果実では果皮と中軸の特に維管束で発現しており、それが果実内の未熟種子に繋がる事を明らかにした。

そのため、種子における遺伝子発現解析を行った結果、胚と、一つは種皮の一部分に特異的に発現していた。

2) SIALMT 輸送体の電気生理学的手法によるイオン輸送機能の解析

この細胞内膜系の 2 つの SIALMT について、遺伝子のクローニングを行い、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理

学的手法でリンゴ酸輸送活性を測定した。

その結果、共にリンゴ酸輸送活性を示した。一つは、リンゴ酸を入れなくてもアニオン輸送を示し、リンゴ酸を卵母細胞に入るとさらに輸送活性が高まった。しかし、もう一方は、実験により明確な輸送活性が見られない事があった。その SIALMT は、卵母細胞における発現が不安定であるため、リンゴ酸輸送活性にばらつきが見られたと推定している。

安定的にリンゴ酸を輸送する SIALMT について、さらに無機アニオンの輸送活性を調べた結果、高い硝酸イオン輸送活性を示し、それよりは低いが塩素イオンの輸送活性も示した。これらの結果から、この SIALMT はリンゴ酸のみならずいくつかの無機アニオンを輸送する、比較的広い基質特性を示すと考えられた。

(3) SIALMT 遺伝子の過剰発現体と欠損変異体の作出と生理機能解析

輸送活性を明確に示した SIALMT 遺伝子について 2 つの過剰発現系統を作製した。一方で、発現抑制系統は得ることができなかったが、後に述べるように発現抑制は致死に至るため作製困難だった可能性もある。

得られた SIALMT 過剰発現系統の果実および葉などの組織におけるリンゴ酸含量の測定を行った結果、果実におけるリンゴ酸含量には大きな差はみられなかった。

果実の GC-MS 解析の結果も同様に、ほとんどの有機酸に差はなかった。しかし、種子中の有機酸含量を調べたところ、リンゴ酸ではないが、SIALMT 過剰発現系統で高い傾向がみられ、SIALMT の機能として有機酸の蓄積量に影響することが示唆された。

以上の結果から、トマト果実の細胞内膜に局在する ALMT は、果実の維管束を通じてのアニオン輸送に関与し種子の熟成や発根の過程に関与する事が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Sasaki T, Tsuchiya Y, Ariyoshi M, Ryan PR, Furuichi T, Yamamoto Y. A Domain-Based Approach for Analyzing the Function of Aluminum-Activated Malate

Transporters from Wheat (*Triticum aestivum*) and *Arabidopsis thaliana* in *Xenopus* oocytes. *Plant Cell Physiol.* 55, 2126-2138. 2014. 査読有 DOI: 10.1093/pcp/pcu143

Kariya, K., Demiral, T., Sasaki, T., Tsuchiya, Y., Turkan, I., Sano, T., Hasezawa, S., Yamamoto, Y. A novel mechanism of aluminium-induced cell death involving vacuolar processing enzyme and vacuolar collapse in tobacco cell line BY-2. *J. Inorg. Biochem.* 128, 196-201. 2013. 査読有 DOI: 10.1016/j.jiorgbio.2013.07.001

Sameeullah, H., Sasaki, T., Yamamoto, Y. Sucrose transporter NtSUT1 confers aluminum tolerance on cultured cells of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Soil Sci. Plant Nutri.* 59, 756-770. 2013 査読有 DOI: 10.1080/00380768.2013.830230

Wu, D., Zhao, M., Shen, S., Fu, Y., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Wei, W., Shen, H. Al-induced secretion of organic acid, gene expression and root elongation in soybean roots. *Acta Physiol. Plant.* 35, 223-232. 2013. 査読有 DOI: 10.1007/s11738-012-1067-y

Hoque, T.S., Okuma, E., Uraji, M., Furuichi, T., Sasaki, T., Hoque, M.A., Nakamura, Y., Murata, Y. Inhibitory effects of methylglyoxal on light-induced stomatal opening and inward K⁺ channel activity in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 617-619. 2012. 査読有 DOI:10.1271/bbb.110885

〔学会発表〕(計 22 件)

土屋善幸、苅谷耕輝、佐々木孝行、山本洋子 アルミニウム耐性タバコ培養細胞株と野生株に発現する遺伝子群の比較解析 日本植物生理学会 2015年3月16-18日 東京

苅谷耕輝、土屋善幸、佐々木孝行、山本洋子 タバコの培養細胞ならびに根におけるアルミニウムによる細胞死に伴う VPE 遺伝子の発現誘導 日本植物生理学会 2015年3月16-18日 東京

山本洋子、苅谷耕輝、土屋善幸、佐々木孝行 アルミニウムによる細胞死のメカニズム - 液胞に局在するプロテアーゼ VPE の関わり - 「低炭素社会と食の安全・安心を統合した環境生命学的研究」研究発表会・食料生産の持続性を担保する循環的な環境管理システムの構築 2014年12月8日 岡山

苅谷耕輝、土屋善幸、佐々木孝行、山本洋子 タバコのアルミニウムによる根生育阻害における液胞の関わり 日本土壌肥料学会 2014年9月9-11日 東京

土屋善幸、苅谷耕輝、佐々木孝行、山本洋子 タバコ培養細胞におけるアルミニウム耐性とスクロースシンターゼとの関係 日本土壌肥料学会 2014年9月9-11日 東京

高梨功次郎、佐々木孝行、管智弘、齊田有桂、杉山暁史、山本洋子、矢崎一史 ミヤコグサ根粒で発現する ALMT の機能解析 日本植物細胞分子生物学会 2014年8月21-22日 盛岡

佐々木孝行、土屋善幸、有吉美智代、古市卓也、山本洋子 ALMT1 輸送体のアルミニウムによる活性化における N 末端側と C 末端側領域の機能解析 日本植物生理学会 2014年3月18-20日 富山

苅谷耕輝、土屋善幸、佐々木孝行、山本洋子 タバコ BY-2 細胞におけるアルミニウムによる VPE 遺伝子の発現

誘導と細胞死 日本植物生理学会 2014年3月18-20日 富山

Takayuki Sasaki, Takuya Furuichi, Yoko Yamamoto. Analyses of Aluminum-Activation for ALMT Transporters. XVII. International Plant Nutrition Colloquium, 19-22 August, 2013 Istanbul, Turkey.

Muhammad Sameeullah, Takayuki Sasaki and Yoko Yamamoto. Auxin inducible sucrose transporter NtSUT1 is involved in aluminum tolerance in tobacco cells. XVII. International Plant Nutrition Colloquium, 19-22 August, 2013. Istanbul, Turkey.

Takayuki Sasaki, Takuya Furuichi, Yoko Yamamoto Analyses of aluminum-activation domain of ALMT transporters. 16th International Workshop on Plant Membrane Biology 2013年3月26日~3月31日 Kurashiki, Japan

Muhammad Sameeullah, Takayuki Sasaki, Yoko Yamamoto Effects of major sucrose transporter gene (NtSUT1-1) in normal growth and under aluminum stress in tobacco cells. 16th International Workshop on Plant Membrane Biology 2013年3月26日~3月31日 Kurashiki, Japan

Hayato Maruyama, Takayuki Sasaki, Jun Wasaki AtALMT3 is a malate transporter induced in roots of phosphorus deficient *Arabidopsis thaliana*. 16th International Workshop on Plant Membrane Biology 2013年3月26日~3月31日 Kurashiki, Japan

佐々木孝行、古市卓也、山本洋子 アルミニウム活性化型 ALMT1 輸送体の機能向上を目指した遺伝子改変 日本植物生理学会 2013年3月21日~3月23日 岡山市

Muhammad Sameeullah, Takayuki Sasaki, Yoko Yamamoto. Role of plasma membrane sucrose transporter in growth in tobacco cells. 日本植物生理学会 2013年3月21日~3月23日 岡山市

苅谷耕輝、佐々木孝行、山本洋子 BY-2 タバコ培養細胞株においてアルミニウムが誘発する細胞死における液胞の関わり 日本植物生理学会 2013年3月21日~3月23日 岡山市

苅谷耕輝、佐々木孝行、山本洋子 タバコ培養細胞 BY-2 を用いたアルミニウムによる細胞死の解析 日本土壌肥料学会 関西支部会 2012年12月6日~12月7日 倉敷市

佐々木孝行、有吉美智代、山本洋子 植物 ALMT 輸送体機能の比較解析 日本土壌肥料学会 2012年9月4日~9月6日 鳥取

Muhammad Sameeullah, Takayuki Sasaki, Yoko Yamamoto. Role of sucrose transporter (NtSUT1) under normal growth and Al stress conditions in cultured tobacco cells 日本土壌肥料学会 2012年9月4日~9月6日 鳥取

山本洋子、泉洋平、信濃卓郎、中村卓司、岡崎圭毅、佐々木孝行 アルミニウム応答におけるエネルギー代謝の関わり アルミニウム耐性の異なるタバコ培養細胞株の比較解析 日本土壌肥料学会 2012年9月4日~9月6日 鳥取

①矢倉興士、丸山隼人、佐々木孝行、和崎淳 シロバナルーパーピンのクラスター根から単離した ALMT ホモログの解析 日本土壌肥料学会 2012年9月4日~9月6日 鳥取

②佐々木孝行 植物特異的アニオン輸送体の機能多様

性と作物生産性向上への応用 平成 24 年度日本農芸化学会東北支部シンポジウム「遺伝子解析による実用研究の新展開」(招待講演)2012年6月30日 秋田

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/plant.growth/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 孝行 (SASAKI TAKAYUKI)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：60362985

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

山本 洋子 (YAMAMOTO YOKO)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：50166831