

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月17日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580078

研究課題名（和文） アルミニウムのエネルギー代謝への影響に関する研究

研究課題名（英文） Effects of aluminum on energy metabolism

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：アルミニウムイオンは、酸性土壌における主要な作物生育阻害因子である。アルミニウムによる障害機構ならびに植物が持つ耐性機構について、エネルギー代謝（糖代謝）に着目し、主として、タバコ培養細胞株とタバコ植物体を用いて解析した。その結果、エネルギー代謝を呼吸から乳酸発酵に変換することで、アルミニウムが誘発するミトコンドリアの機能不全に基づく活性酸素種（ROS）の生成を抑制する新しい耐性機構を見いだした。

研究成果の概要（英文）：Aluminum ion is a major factor to inhibit plant growth in acidic soils. Mechanisms of aluminum toxicity and tolerance in plants were examined, focusing on energy (sugar) metabolism in mainly cultured tobacco cell lines and tobacco plant. Our results suggest a novel aluminum tolerant mechanism which shifts energy metabolism from respiration to lactate fermentation so that the production of reactive oxygen species (ROS) via dysfunction of mitochondria under aluminum stress could be avoided.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：アルミニウム耐性、ALMT1 遺伝子、インベルターゼ、細胞伸張阻害機構、スクロース輸送体、糖代謝、メタボローム解析、Vacuolar Processing Enzyme (VPE)

1. 研究開始当初の背景

作物の生育を阻害する問題土壌の中でも、酸性土壌は、日本をはじめとし世界中で最も広範囲に分布している。アルミニウム(Al)イオンは、酸性土壌に多く存在し、植物の主要な生育阻害因子と考えられている。Alによる

根の伸張阻害機構についてはすでに多くの研究がなされているものの、いまだその分子機構については不明である。

申請者は、これまで培養細胞の系や根を用いて障害機構の解析を行い、細胞の増殖に直接関わる障害として、ミトコンドリアの機能

阻害とそれに連動したATP含量の低下並びにROSの誘発を見いだした。さらに、最近、培養細胞や根の系においてA1が細胞内の糖含量を減少させることや、根をA1で処理することにより光合成産物である蔗糖（スクロース）の根への転流が促進されることを見いだしていた。これらの結果はすべてA1のエネルギー代謝への影響を示すものであり、A1が光合成から解糖系を経て、ミトコンドリアでのATP合成に至るエネルギーの流れ全体に影響を与えている可能性を示している。

一方、動物の系においても、アルツハイマー病やパーキンソン病との関連から、A1の細胞死誘発機構の解析がなされており、最近の成果として、植物の系と同様に、A1によるミトコンドリアの機能障害や活性酸素の誘発が報告されている。

そこで、本研究では、これまで断片的に得られてきたA1障害機構をエネルギー代謝の面から再評価し、鍵となる分子をエネルギー代謝経路に見だし、そこに関わる酵素や遺伝子を明らかにすることによりA1の障害機構や耐性機構を解明したいと考えた。

2. 研究の目的

A1の障害機構について、エネルギー代謝への影響に焦点を当てて解析することを目的とし、次の解析を行うこととした。

(1) 糖の取り込みや、糖代謝（解糖系や酸化的リン酸化）に対するA1の影響解析

(2) 根におけるA1ストレスに呼応した光合成促進の可能性、ならびに光合成産物（スクロース）の転流促進の機構解析

(3) 発芽時にA1高感受性を示すイネの変異系統を用い、糖代謝について、親系統との比較解析

これらの解析を通して、A1の処理に伴って変動する主要な代謝産物、酵素活

性、遺伝子を明らかにし、A1の根伸長阻害や細胞死の原因となる分子を特定すること、さらにはA1耐性に関わる分子を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料：本研究では、タバコ (*Nicotiana tabacum*) の植物体ならびに培養細胞株を用いた。比較解析に用いた培養細胞株のセットは次の通りである。①野生株 (SL) とSL株を変異原処理してA1で選抜して得られた**A1耐性株 (ALT301)** (Devi et al. 2001, 2003)。両株は互いに同質遺伝子系統。②SL細胞株にコムギ**ALMT1遺伝子**を導入し高発現させた形質転換細胞株とそのベクターコントロール細胞株 (Sasaki et al., 2004)。③野生株 (BY-2) にタバコの**スクロース輸送体遺伝子 *NtSUT1***を導入し過剰発現させた株 (**OX株**) と発現抑制株 [アンチセンス株 (**ANT株**) と**RNAi株**] (未発表)。

(2) **A1処理方法とA1応答反応の解析**：対数増殖期のタバコ細胞を塩化カルシウムとスクロースのみを含みpHを5に調整したA1処理用培地に懸濁し、A1を添加して18時間培養をした。その後、細胞を回収し様々な解析に供した (増殖能力、細胞死の程度、遊離糖含量、 β 1,3-グルカン含量、水含量、活性酸素種の発生程度) (Abdel-Basset et al. 2010)。呼吸量は酸素電極を用いて測定した。

(3) **メタボローム解析**：A1処理後の細胞を凍結乾燥後、ガスクロマト-質量分析法ならびにキャピラリー電気泳動-質量分析法を用いて解析した。

(4) **有機酸の定量ならびに糖代謝関連酵素活性の測定**：有機酸は酵素法で定量し、酵素活性は細胞から粗酵素液を調製し常法に従い測定した。

(5) **光合成の測定**：水耕栽培で育てたタバ

コ植物体（7週程度）の根部をA1で処理し、地上部の光合成活性を光合成蒸散測定システムを用いて測定した。

4. 研究成果

主としてタバコ培養細胞株を用い、A1のエネルギー代謝（糖代謝）への影響を解析し以下の結果を得た。

（1） A1による細胞伸張阻害機構：野生株において、A1は添加直後から細胞の遊離糖含量と水含量の増加を抑制した。¹⁴C-スクロースを用いた実験より、A1はスクロースの吸収を阻害するとともに、細胞内に取り込んだスクロースの消費と細胞外への放出を促進した。一般的に、遊離糖含量の増加による水ポテンシャルの低下は水吸収の駆動力となる。従って、A1は糖吸収の抑制と糖消費の促進により細胞内遊離糖含量を低下させる結果、水吸収を抑制し細胞伸張阻害を引き起こす可能性が示唆された

(Abdel-Basset et al. 2010)。

（2） スクロース輸送体の細胞増殖ならびに A1 応答への関わり

A1が培地からの糖の取り込みを阻害する可能性がみられたことから、タバコのスクロース輸送体 *NtSUT* 遺伝子の発現量を変化させた形質転換タバコ細胞株を作成し、A1応答を解析した。その結果、A1はスクロース輸送体を介した糖の取り込みを強く阻害し、過剰発現株であっても取り込み量の改善や増殖能の改善はみられなかった。一方、抑制株では、A1障害の指標であるβ1,3-グルカンの合成やROS誘発が促進された。一方、A1を添加しない通常の培養条件では、野生株と比較して過剰発現株で増殖速度が増加し、発現抑制株で低下した。以

上の結果より、スクロース輸送体は、通常の生育条件やA1ストレス下の生育において機能していること、しかし過剰発現してもA1耐性を獲得できないことが示された。

（3） 代謝変動の網羅的解析に基づく新規 A1 耐性機構の解析：野生株を用いた代謝物の網羅的解析より、A1は糖代謝全般（解糖系、乳酸発酵、エタノール発酵、TCA回路）を促進させる可能性が示唆された。さらに、野生株と比較してA1耐性株は、構成的にTCA回路が抑制され、解糖系-乳酸発酵系が促進されていることを示唆する結果を得た。これらの結果は、実際に、各経路の鍵となる代謝産物や酵素の定量、さらに酸素消費量（呼吸量）からも示唆された。

本A1耐性株の特徴は、A1処理時のROS生成の抑制である。エネルギー代謝を呼吸から乳酸発酵にシフトすることで、呼吸の電子伝達系を主たる発生源とするROSの誘発を抑制しA1耐性を獲得している可能性が高い。これは新規のA1耐性機構であり、A1耐性機構を考える上で重要な知見である。今後、両株の比較解析を遺伝子発現レベルで行い、エネルギー代謝変換に関わる新しいA1耐性遺伝子を見いだしたい。

さらに、野生株とA1耐性株において**A1による細胞死の機構を比較解析**した。その結果、ROS発生が細胞死の原因と考えられる野生株と異なり、A1耐性株では、液胞のプロテアーゼで細胞死を調節する **Vacuolar processing enzyme (VPE)** の遺伝子発現ならびに酵素活性がA1によって増加することを見出した。従って、野生株ではミトコンドリア経由、A1耐性株では液胞経由の細胞死が誘発され

ている可能性が示唆された。

(4) 代謝変動の網羅的解析に基づくコムギ A1 耐性遺伝子 ALMT の機能解析: ALMT 遺伝子は、A1 で活性化されるリンゴ酸輸送体をコードし、A1 存在下にリンゴ酸を放出し A1 をキレートして無毒化すると考えられている。本研究では、ALMT タンパクの C 末端側に A1 による活性化に関わるアミノ酸を同定するとともに、ALMT 遺伝子を高発現するタバコ細胞株とベクターコントロール細胞株を用いて、代謝物の網羅的解析を行った。その結果、ALMT 遺伝子高発現株では、TCA 回路の有機酸含量に違いがみられたことから、ALMT タンパクの発現は TCA 回路を含む有機酸合成の制御に関わる可能性が示唆された。

(5) A1 のインベルターゼ活性への影響: 培地のスクロースの取り込みは、液胞のインベルターゼ活性によって促進されることが報告されている。A1 の影響を野生株 (SL) で調べたところ、液胞インベルターゼの比活性が増加することが分かった。A1 による細胞内の糖代謝の促進 (上記 (1)) と関連している可能性がある。

(6) 根における A1 ストレスに呼応した光合成促進の可能性、ならびに光合成産物 (糖) の転流促進の機構解析: タバコの根部を A1 で処理した場合、光合成活性は低濃度の A1 でやや促進されるものの、根の生育を阻害する濃度では阻害された。一方、光合成産物の根への転流は促進され、根端の遊離糖含量の増加がみられた。これに伴い、インベルターゼの活性上昇もみられ、インベルターゼが、細胞への糖の取り込みと転流促進に関与している可能性が

示唆された。

(7) 発芽時に A1 高感受性を示すイネの変異系統と親系統を用いた糖代謝の比較解析: A1 高感受性変異系統では、野生系統と比較して、発芽時のデンプンの可溶化が抑制されていた。また、通常の生育条件においても生育抑制がみられ、矮性を示すとともに、一穂当たりの種子数も少なかった。さらに、次世代の解析をした結果、本 A1 高感受性の形質は、ヘテロで優性を示し、ホモで致死になると思われる結果を得た。今後、野生系統と A1 高感受性系統 (ヘテロ接合体) との間で発現遺伝子の違いに着目した解析を行いたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Ryan, P.R., Tyerman, S.D., Sasaki, T., Furuichi, T., Yamamoto, Y., Zhang, W.-H. and Delhaize, E. 2011. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. J. Exp. Bot. 62: 9-20. (査読有り)
- ② Furuichi, T., Sasaki, T., Tsuchiya, Y., Ryan, P.R., Delhaize, E. and Yamamoto, Y. 2010. Extracellular hydrophilic carboxy-terminal domain regulates the activity of TaALMT1, the aluminum-activated malate transport protein of wheat. Plant J. 64: 47-55. (査読有り)
- ③ Abdel-Basset, R., Ozuka, S., Demiral, T., Furuichi, T., Sawatani, I., Baskin, T.I., Matsumoto, H. and Yamamoto, Y. 2010. Aluminium reduces sugar uptake in tobacco cell cultures: A potential cause of inhibited elongation but not of toxicity. J. Exp. Bot. 61:1597-1610. (査読有り)

[学会発表] (計 16 件)

- ① 山本洋子, Tijjen Demiral、佐々木孝行、佐野俊夫、馳澤盛一郎、泉洋平: 植物細胞におけるアルミニウムによる細胞死誘発機構の解析. 日本植物生理学会, 京都, 2012 年 3 月 16-18 日.
- ② Sameeullah, M., Sasaki, T. and Yamamoto, Y.: Roles of sucrose transporter under aluminum stress in tobacco.

- International Symposium “Strategies of Plants against Global Environmental Changes” Kurashiki, Japan, December 8-10, 2011.
- ③ 泉洋平、佐々木孝行、山本洋子：アルミニウム耐性ならびに感受性タバコ培養細胞における糖代謝の比較解析. 日本土壤肥料学会, つくば市, 2011年8月8-10日.
- ④ 山本洋子、信濃卓郎、中村卓司、岡崎圭毅、泉洋平、佐々木孝行. タバコ培養細胞を用いたアルミニウムに反応した有機酸放出に伴う代謝変動の網羅的解析. 日本土壤肥料学会, つくば, 2011年8月8-10日.
- ⑤ Sameullah, M., Sasaki, T., Yamamoto, Y.: Role of sucrose transporter (NtSUT1) in aluminum toxicity and tolerance mechanisms in tobacco cells. Annual Meeting of the Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition. 日本土壤肥料学会, つくば, 2011年8月8-10日.
- ⑥ 斉格奇白、佐々木孝行、山本洋子：タバコにおけるアルミニウムによる液胞インペルターゼ活性の促進. 日本植物生理学会, 仙台, 2011年3月20-22日.
- ⑦ Yamamoto, Y., Shinano, T., Nakamura, T., Okazaki, K., Izumi, I. and Sasaki, T. A novel mechanism to overcome aluminum toxicity in plants: Repression of ROS production by an enhancement of glycolysis. Ninth Keele Meeting on Aluminium. Aluminium and Life: Living in the aluminium age. Niagara-on-the-lake, Ontario, Canada, February 19-23, 2011.
- ⑧ Yamamoto, Y. and Sasaki, T.: Novel mechanisms of aluminum toxicity and tolerance in plants. The fifth JKUAT Scientific, Technological and Industrialization Conference, Nairobi, Kenya, November 17-19, 2010
- ⑨ 山本洋子、信濃卓郎、中村卓司、岡崎圭毅、泉洋平、佐々木孝行：アルミニウムが糖代謝におよぼす影響：タバコ細胞における代謝変動の網羅的解析. 日本土壤肥料学会年会, 札幌, 2010年9月7-9日.
- ⑩ 山本洋子、藤川雅子、小松和枝、斉格奇白、古市卓也、佐々木孝行：アルミニウムストレス下の植物細胞における有機酸放出が糖代謝へ与える影響. 日本植物生理学会年会, 熊本, 2010年3月18-21日.
- ⑪ 山本洋子、斉格奇白、藤川雅子、小松和枝、古市卓也、佐々木孝行：植物におけるアルミニウムの糖代謝への影響（1）糖の取り込みと消費への影響. 日本土壤肥料学会年会, 京都, 9月15日-18日, 2009.
- ⑫ 斉格奇白、佐々木孝行、山本洋子：植物におけるアルミニウムの糖代謝への影響（2）インペルターゼ活性への影響. 日本土壤肥料学会年会, 京都, 9月15日-18日, 2009.
- ⑬ Yamamoto, Y., Abdel-Basset, R., Rikiishi, S., Ozuka, S., Demiral, T., Furuichi, T., Sawatani, I., Baskin, T.

I., Matsumoto, H. and Sasaki, T. Aluminum reduces sugar uptake in tobacco: a potential cause of cell elongation inhibition but not of cell death. The 7th International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, Guangzhou, China. May, 17-21, 2009.

〔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〕

ホームページ等

http://www.rib.okayama-u.ac.jp/plant_growth/index-j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

泉 洋平 (IZUMI YOHEI)
岡山大学・資源植物科学研究所・技術職員
研究者番号：10457210

山本 泰 (YAMAMOTO YASUSI)
岡山大学・理学部・教授
研究者番号：40091251

信濃 卓郎 (SHINANO TAKURO)
農研機構・北海道農業研究センター
研究者番号：20235542

中村 卓治 (NAKAMURA TAKUJI)
農研機構・作物研究所
研究者番号：60399425

岡崎 圭毅 (OKAZAKI KEIKI)
農研機構・北海道農業研究センター
研究者番号：40414750