

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17078007

研究課題名（和文） アルミニウム活性化型有機酸トランスポーターの分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of aluminum-activated malate transporter

研究代表者

佐々木 孝行 (SASAKI TAKAYUKI)

岡山大学・資源生物科学研究所・助教

研究者番号：60362985

研究成果の概要（和文）：

コムギのアルミニウム活性化型リンゴ酸トランスポーターをコードする *ALMT1* 遺伝子について、遺伝子上流域のクローニングと構造解析を行い、根端で高レベル発現を制御するプロモーター領域を同定した。また、*ALMT1* トランスポーターのアルミニウム活性化に関与するアミノ酸を明らかにした。さらに、シロイヌナズナの *ALMT1* 相同遺伝子の機能解析を行うことで、アルミニウム耐性や気孔閉口に関与することを明らかにし、*ALMT* ファミリータンパク質の機能多様性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The mechanisms for the expression and function of aluminum-activated malate transporter (*ALMT1*) of wheat were analyzed. We demonstrated that the variation of the upstream sequence of *ALMT1* is strongly correlated to the aluminum sensitivity of wheat, and that three acidic amino acids within hydrophilic C-terminal domain of *ALMT1* is required for the activation of transport function by aluminum. Furthermore, we found that the functions of several *ALMT* homologues in *Arabidopsis* are related to aluminum resistance and closing stomata, suggesting that *ALMT* proteins comprise a family of anion transporters, possessing diverse functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	16,500,000	0	16,500,000
2006年度	16,500,000	0	16,500,000
2007年度	16,500,000	0	16,500,000
2008年度	15,500,000	0	15,500,000
2009年度	15,500,000	0	15,500,000
総計	80,500,000	0	80,500,000

研究分野：植物生理学・分子生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：アルミニウム耐性、*ALMT1*、アニオントランスポーター、気孔閉口、リンゴ酸トランスポーター、電気生理学

## 1. 研究開始当初の背景

世界の農耕可能地の 30～40%を占める酸性土壌では、アルミニウムイオンが主な原因とな

って植物の生育が抑制されており、特にアルミニウムイオンに直接さらされる根において顕著な阻害がみられる。このようなアルミ

ニウム毒性に対して多くの植物が多様な耐性機構を進化させ、酸性土壌で生育している。植物が持つアルミニウム耐性機構の一つに、根からの有機酸放出があげられる。有機酸はアルミニウムをキレートし、アルミニウムを無毒化する。1993年にオーストラリアの研究者らが、アルミニウム耐性の異なるコムギ準同質遺伝子系統のET8（アルミニウム耐性）とES8（感受性）における耐性の差が根端特異的なリンゴ酸の放出であることを実験的に証明した。彼らはさらに詳細な解析を行い、リンゴ酸がアニオントランスポーターを介して放出されることを予見していた。しかし、その遺伝子の実体は長い間不明であった。

研究代表者らは2004年に、この準同質遺伝子系統コムギET8とES8の間で発現している遺伝子を比較することにより、ET8で特異的高発現する遺伝子を単離し、報告した。この遺伝子がアルミニウムにより活性化されるリンゴ酸トランスポーターをコードすることから、*ALMT1* (aluminum-activated malate transporter 1)と命名した。また、*ALMT1*を形質転換したオオムギではアルミニウムに応答したリンゴ酸放出がみられ、その結果としてアルミニウム耐性そして酸性土壌耐性を付与できることが示された。

さらに、*ALMT1*遺伝子に相同な遺伝子は動物や微生物には無く、植物に特異的な遺伝子であることから、その機能解明が待たれていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、コムギのアルミニウム耐性遺伝子 *ALMT1* ならびに *ALMT* 相同遺伝子について、機能や発現について解析を行い、*ALMT* 遺伝子ファミリーの生理学的な役割の解明を目指した。

研究目標としては以下のものを考えた。

- (1) コムギ *ALMT1* 遺伝子の上流配列のクローニングと構造解析。*ALMT1* 遺伝子を根端で高レベルに発現制御する転写調節機構を明らかにする。
- (2) コムギ *ALMT1* タンパク質の機能解析。*ALMT1* の膜配向性やアルミニウム活性化に関与する領域を明らかにする。
- (3) 他の植物から単離した *ALMT* 相同遺伝子の機能解析。シロイヌナズナのアルミニウム耐性遺伝子、およびその他の機能をもつ *ALMT* 相同遺伝子の機能と生理的役割を明らかにする。

以上の解析により、*ALMT1* トランスポーター

に関するアルミニウム耐性の決定要因解明と機能の多様性の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) *ALMT1* 遺伝子の上流配列は、コムギの TAC ライブラリーを用いてクローニングした。この配列データを元に PCR を行い、数十種類のコムギ系統から *ALMT1* 上流配列を同定、分類し、アルミニウム耐性やリンゴ酸放出能との比較解析を行った。
- (2) コムギ *ALMT1* タンパク質の膜配向性の解析は、*ALMT1* を動物培養細胞に発現させ、タンパク質の各領域で作製した抗体反応や His, GFP タグの配向性を確認することで、決定した。
- (3) コムギ *ALMT1* の電気生理学的解析では、タバコ培養細胞でのパッチクランプ法、およびアフリカツメガエル卵母細胞での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。
- (4) シロイヌナズナの *ALMT* 相同遺伝子の解析は、PCR 法により該当遺伝子をクローニングし、電気生理学的に輸送活性の測定を行うと共に、遺伝子欠損変異系統を用いた表現系の解析を行った。

## 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) コムギ *ALMT1* の上流配列の解析により、以下のような成果が得られた。
  - ① コムギのゲノムライブラリーより *ALMT1* の上流配列をクローニングし、解析した。その結果、日本以外の育種系統には、6種のパターンの異なる *ALMT1* 上流配列が存在し、その重複が遺伝子の高発現およびアルミニウム耐性に強く関与することを明らかにした。一方、日本の育種系統でみられた2種類の上流配列では遺伝子発現量やアルミニウム耐性との相関が低いことが示された。しかし、アルミニウムで活性化されるリンゴ酸放出量と、アルミニウム耐性度とは正の相関を示した。従って、日本のコムギ系統においてもリンゴ酸放出量がアルミニウム耐性の第一要因であると考えられるが、日本の系統では *ALMT1* 遺伝子の発現量以外に、転写後の制御が関与する事が示唆された。
  - ② コムギ *ALMT1* の上流の重複配列および遺伝子配列の SNP について、アルミニウム耐性との関連を検討した結果、上流配列はコムギのアルミニウム耐性系統を選抜する分子マーカーとして有効であることを示し

た。

ALMT1 遺伝子上流の重複配列がコムギのアルミニウム耐性を制御するという発見から、この領域を指標にすることで、アルミニウム耐性系統コムギの分子育種への応用という研究にまで発展することができた。また、日本のコムギ系統の解析から、ALMT1 の活性化に関わる転写後調節因子の存在も示唆され、目的遺伝子の同定を試みている。

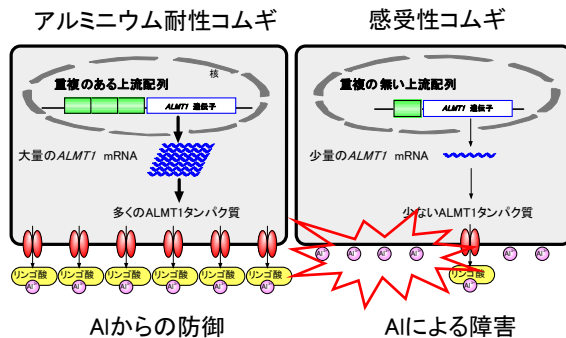


図 1 ALMT1 上流配列とアルミニウム耐性との関係

(2)コムギ ALMT1 タンパク質の解析により、以下のような成果が得られた。

- ①コムギ ALMT1 タンパク質の膜配向性の解析を行い、ALMT1 タンパク質が6つの膜貫通領域をもち、N末端およびC末端は細胞の外側に存在することを明らかにした。
- ②コムギ ALMT1 遺伝子を導入した形質転換タバコ細胞を用いたパッチクランプ法により、ALMT1 タンパク質自身がアルミニウムで活性化されるリンゴ酸チャネルとして機能していることを明らかにした。
- ③コムギ ALMT1 のC末端に存在する3つの酸性アミノ酸が、アルミニウム活性化に重要であることを明らかにした。

ALMT1 タンパク質の解析から、膜配向性、イオンチャネルとしての機能、C末端配列のアルミニウム活性化機構などが明らかになってきた。ALMT は、植物にしかない新奇のトランスポーター・ファミリーであることから、今後、ALMT1 タンパク質の結晶構造解析を行い、立体構造を明らかにすることで、これらの知見を検証する予定である。

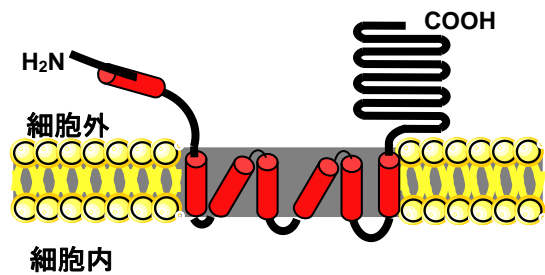


図 2 ALMT1 タンパク質の膜配向性の決定

(3)シロイヌナズナにおける ALMT 相同遺伝子の解析からは、以下の成果が得られた。

- ①シロイヌナズナの 13 ある相同遺伝子の中で、AtALMT1 が、アルミニウムで活性化されるリンゴ酸トランスポーターとして機能し、アルミニウム耐性遺伝子であることを明らかにした。
- ②シロイヌナズナ AtALMT12 が気孔で特異的に発現し、気孔閉口に関与する無機アニオンのトランスポーターであることを明らかにした。

シロイヌナズナの ALMT 相同遺伝子については、アルミニウム耐性に関わるもの以外にも、気孔閉口に関与する機能を新たに見出すことができた。近年、海外の研究者によりトウモロコシやオオムギから ALMT 相同遺伝子が単離され、研究が進められているが、ALMT 相同遺伝子の機能と植物の生理現象とを明確に証明したのは、我々の研究のみである。これらの研究により、ALMT タイプトランスポーターの多様性が明らかになってきた。今後さらに研究を進め、ALMT の新たな生理機能の解明を目指している。

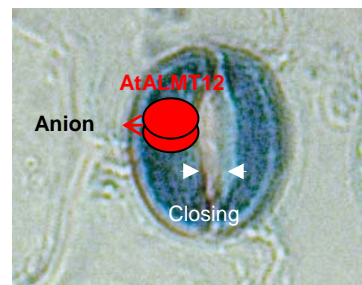


図 3 気孔で発現する AtALMT12 は気孔の閉口に関与する無機アニオントランスポーターである。

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 15 件)

- ① Sasaki T, Mori IC, Furuichi T, Munemasa S, Toyooka K, Matsuoka K, Murata Y, Yamamoto Y (2010) Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. *Plant Cell Physiol.* 51, 354-365, 査読有
- ② Zhang W-H, Ryan PR, Sasaki T, Yamamoto Y, Sullivan, W, Tyerman SD (2008) Characterisation of the TaALMT1 protein as an Al<sup>3+</sup>-activated anion channel in transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells. *Plant Cell Physiol.* 49, 2008, 1316-1330, 査読有
- ③ Raman H, Ryan PR, Raman R, Stodart BJ, Zhang K, Martin P, Wood R, Sasaki T, Yamamoto Y, Mackay M, Hebb DM, Delhaize E (2008) Analysis of *TaALMT1* traces the transmission of aluminum resistance in cultivated common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 116, 343-354, 査読有
- ④ Motoda H, Sasaki T, Kano Y, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H, Yamamoto Y (2007) The membrane topology of ALMT1, an aluminum-activated malate transport protein in wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Signaling Behavior* 2, 467-472, 査読有
- ⑤ Kikui S, Sasaki T, Matsumoto H, Osawa H, Yamamoto Y (2007) Malate enhances recovery from Al-caused inhibition of root elongation in wheat. *Plant Soil* 290, 1-15, 査読有
- ⑥ Sasaki T, Ryan PR, Delhaize E, Hebb DM, Ogiwara Y, Kawaura K, Noda K, Kojima T, Toyoda A, Matsumoto H, Yamamoto Y (2006) Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) *ALMT1* gene and its relationship to aluminum resistance. *Plant Cell Physiol.* 47, 1343-1354, 査読有
- ⑦ Hoekenga OA, Maron LG, Piner MA, Cancado GM, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, Kochian LV (2006) AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 9738-9743, 査読有

- ⑧ Yamaguchi M, Sasaki T, Sivaguru M, Yamamoto Y, Osawa H, Ahn SJ, Matsumoto H (2005) Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter (ALMT1). *Plant Cell Physiol.* 46, 812-816, 査読有
- ⑨ Shen H, He LF, Sasaki T, Yamamoto Y, Zheng SJ, Ligaba A, Yan XL, Ahn SJ, Yamaguchi M, Sasakawa H, Matsumoto H (2005) Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress: Up-regulation of transcription, translation and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* 138, 287-296, 査読有
- ⑩ Kikui S, Sasaki T, Maekawa M, Miyao A, Hirochika H, Matsumoto H, Yamamoto Y (2005) Physiological and genetic analyses of aluminium tolerance in rice, focusing on root growth during germination. *J. Inorganic Biochem.* 99, 1837-1844, 査読有
- ⑪ Raman H, Zhang K, Cakir M, Appels R, Garvin DF, Maron LG, Kochian LV, Moroni JS, Raman R, Imtiaz M, Drake-Brockman F, Waters I, Martin P, Sasaki T, Yamamoto Y, Matsumoto H, Hebb DM, Delhaize E, Ryan PR. (2005) Molecular characterization and mapping of *ALMT1*, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 48, 781-791, 査読有
- ⑫ 佐々木孝行, 山本洋子 (2005) アルミニウム毒性の多様性と作物にみられる耐性の分子メカニズム 化学と生物 Vol. 43, 569-578, 査読無

[学会発表] (計 40 件)

- ① Takayuki Sasaki Functional diversity of plant specific ALMT-type anion transporter. International symposium on plant membrane transport, March 12-13, 2010, The University of Tokyo
- ② 氷見英子, 佐々木孝行, 土屋善幸, 山本洋子 コムギのALMT1 活性調節に関与する新奇遺伝子の探索 日本植物生理学会 2010年3月18-21日 熊本
- ③ 古市卓也, 佐々木孝行, 土屋善幸, 山本洋子 アルミニウムによるコムギALMT1の活性制御機構 日本植物生理学会 2010年3月18-21日 熊本
- ④ 佐々木孝行, 古市卓也, 源治尚久, 戸澤謙, 山本洋子 異種発現系を用いたコムギALMT1 タンパク質の精製 日本植物生理学会 2009年3月21-24日 名古屋

- ⑤ 古市卓也、佐々木孝行、土屋善幸、山本洋子 コムギALMT1の電気生理学的機能解析 日本植物生理学会 2009年3月21-24日 名古屋
- ⑥ 菊井聖士、佐々木孝行、土屋善幸、山本洋子 コムギにおけるアルミニウム活性化型リンゴ酸トランスポーター (ALMT1) の転写後発現調節の解析 日本植物生理学会 2008年3月20-22日 札幌
- ⑦ 佐々木孝行、Peter R. Ryan、Emmanuel Delhaize、松本英明、山本洋子 コムギALMT1上流配列とアルミニウム耐性 日本植物生理学会 2007年3月28日-30日 愛媛
- ⑧ 佐々木孝行、元田弘敏、山本洋子 コムギALMT1タンパク質の構造解析 日本土壤肥料学会 2007年8月22-25日 東京農業大学
- ⑨ Takayuki Sasaki, Yamamoto Yamamoto. Aluminum-activated malate transporter in plants. Joint International Symposium 'Membrane Transport as a Universal Biological Mechanism' January 13-14 (2007) Kyoto University
- ⑩ 佐々木孝行、菊井聖士、松本英明、山本洋子 コムギにおけるアルミニウム耐性形質とALMT1上流配列の解析 日本土壤肥料学会 秋田県立大学 2006年
- ⑪ 佐々木孝行、山本洋子、Emmanuel Delhaize、Peter R. Ryan、有吉美智代、松本英明 コムギALMT1形質転換植物のアルミニウム耐性 日本植物生理学会 2005年3月24-26日 新潟

[図書] (計1件)

佐々木孝行、山本洋子 共立出版 蛋白質核酸酵素 2007年5月号増刊 植物における環境と生物ストレスに対する応答(2007) Vol. 52, 619-624 「アルミニウム耐性の分子機構：有機酸トランスポーターによる制御」

[産業財産権]

○取得状況 (計3件)

名称：植物のアルミニウム応答性リンゴ酸輸送体の遺伝子及び当該遺伝子がコードする蛋白質  
 発明者：松本英明、佐々木孝行、山本洋子、江崎文一、且原真木  
 権利者：岡山大学長 河野 伊一郎  
 種類：特許  
 番号：特許大 3849022 号  
 取得年月日：2006年9月8日  
 国内外の別：国内

名称：GENE OF ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER OF A PLANT AND A PROTEIN ENCODED BY THE GENE

発明者：松本英明、佐々木孝行、山本洋子、江崎文一、且原真木

権利者：岡山大学長 河野 伊一郎

種類：特許

番号：US7,138,563 B2

取得年月日：2006/11/21

国内外の別：米国

名称：GENE OF ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER OF A PLANT AND A PROTEIN ENCODED BY THE GENE

発明者：松本英明、佐々木孝行、山本洋子、江崎文一、且原真木

権利者：岡山大学長 河野 伊一郎

種類：特許

番号：2,422,295

取得年月日：(2010年3月に取得の連絡あり)

国内外の別：カナダ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 孝行 (SASAKI TAKAYUKI)

岡山大学・資源生物科学研究所・助教

研究者番号：60362985

### (2) 研究分担者

山本 洋子 (YAMAMOTO YOKO)

岡山大学・資源生物科学研究所・教授

研究者番号：50166831

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

古市 卓也 (FURUICHI TAKUYA)

名古屋大学・医学部・博士研究員

(2008年8月～2010年1月まで、特定領域研究費により、岡山大学資源生物科学研究所にて特別契約職員助教)

PETER R. RYAN

CSIRO Plant Industry, Australia

Principal Research Scientist

EMMANUEL DELHAIZE

CSIRO Plant Industry, Australia

Senior Principal Research Scientist