

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07697

研究課題名(和文) トマトの器官特異的に発現するリンゴ酸輸送体ALMTファミリーの生理機能の解明

研究課題名(英文) Physiological functions of ALMT-family malate transporters specifically expressed in organs of tomato

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・准教授

研究者番号：60362985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：トマトにおけるALMTファミリーリンゴ酸輸送体(SIALMT)について、果実や葉などの器官特異的に発現する2つのSIALMT遺伝子に着目し生理機能を解析した。本研究課題では、主に果実で発現するSIALMTが、成熟初期の維管束で発現すること、輸送特性としてリンゴ酸と他ジカルボン酸を放出し、硝酸・塩素イオンを取り込むことを明らかにした。この遺伝子の発現抑制システムを作製し、メタボローム解析を行ったが、リンゴ酸含量に変化はみられなかった。葉で発現するSIALMT遺伝子は、気孔を構成する孔辺細胞で発現すること、輸送特性として、リンゴ酸の放出が、外液にリンゴ酸を添加することで活性化されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALMTファミリー輸送体は植物特異的なアニオン輸送体として多くの研究が進められているが、その性質の多くは未解明である。申請者は、アルミニウム耐性遺伝子のTaALMT1、気孔閉口に関わるAtALMT12など、世界に先駆けて研究を進めてきた。本研究課題では、モデル作物のトマトにおいて、果実を含めた器官・組織・細胞で発現するALMTファミリーの輸送機能と、関与する生理機能との関係を明らかにした。この成果は、作物がもつ様々なタイプのALMT輸送体の性質を理解し、活用することで、環境ストレス耐性の付与、農作物の成長制御と品質向上への応用を可能にする。

研究成果の概要(英文)：In this study, two tomato ALMT-family malate transporter genes expressed in fruit and leaf were analyzed. The SIALMT gene in fruit was found to be expressed in the vascular bundles during the early stage of maturation. The SIALMT transporter exhibited the efflux of malate as well as dicarboxylic acids, and the influx of nitrate and chloride. The transgenic suppressor were constructed and examined several metabolites. Malate content in mature green fruit was not different between wild type and the suppressor lines. The SIALMT gene in leaf was found to be expressed in guard cells. The SIALMT transporter exhibited the malate-efflux activated by extracellular malate concentration.

研究分野：植物栄養学

キーワード：リンゴ酸輸送体 トマト ALMTファミリー アルミニウム 電気生理学 果実 孔辺細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ALMT タイプ輸送体は、申請者らにより世界で初めて、コムギの酸性土壌・アルミニウム耐性遺伝子として発見された、アルミニウムで活性化されるリンゴ酸輸送体である。その後、ほとんどの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、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ため、その輸送機能および生理的役割は不明なものが多い。

以前の研究で、申請者らはトマト(品種 Micro-Tom)の果実で発現する *SIALMT* 遺伝子に着目し、果実で発現する2つの *SIALMT4*、*SIALMT5* 遺伝子を同定した。これらは、果実内の種子に繋がる維管束で発現しており、種子へのリンゴ酸輸送が示唆された。さらに、電気生理学的解析結果からリンゴ酸輸送機能を確認した。特にリンゴ酸輸送能の高かった *SIALMT5* 遺伝子については、遺伝子過剰発現トマトを作成し、GC-MS による解析を行った結果、完熟種子のリンゴ酸とクエン酸含量の増大を見出し、*SIALMT5* が種子の有機酸含量の調節に関与する事を明らかにした (Sasaki et al. 2016)。

その後、中国の研究者らがトマトの *SIALMT9* が液胞膜に局在し、トマト品種間でみられるリンゴ酸含量の違いに関与すると報告した (Ye et al. 2017)。それによると、*SIALMT9* の約 400bp 遺伝子上流の3塩基の挿入と欠損 (InDel) が、遺伝子発現を制御することで、リンゴ酸の蓄積の違いがみられる。しかし、*SIALMT9* 遺伝子は、Micro-Tom や Heinz 1706 品種において、果実ではほとんど発現がみられない (Sasaki et al. 2016)。ただし、Micro-Tom 品種でも(成熟過程で変動はするものの)リンゴ酸は果実に蓄積していることから、他の ALMT または、他の輸送体の遺伝子等も果実のリンゴ酸含量に影響していると考えられた。

2. 研究の目的

トマトには16の *SIALMT* 遺伝子が存在する。そのうち、我々が見出した *SIALMT4*、*SIALMT5* 以外に機能解析が行われているのは、*SIALMT9* を含めて3遺伝子である。そこで本研究では、モデル植物のトマトを用いて機能未知の *SIALMT* 輸送体の生理的な役割を解明すること、特に *SIALMT* 遺伝子の発現器官と発現様式の違いに着目して解析することにした。その中でも、花器官および果実の成熟初期に発現する遺伝子、葉で多く発現する遺伝子、根で発現する遺伝子を予備的な知見から、解析する候補遺伝子とした。

本研究課題では、さらにその中から生理機能が特徴的と考えられる遺伝子に焦点を絞り、それら輸送体の機能の詳細を明らかにし、また遺伝子発現を改変した形質転換トマトを作出することで、果実の品質や成長制御、環境ストレス耐性等の形質との関係解明を目的とした。

3. 研究の方法

トマトの Heinz 1706 品種で報告のある *SIALMT* 遺伝子の発現プロファイルを参考に、申請者自身がトマト Micro-Tom 品種を用いて行なった発現解析結果から、特徴的な *SIALMT* 遺伝子を選択し、以下の手法により解析を行った。

- a) PCR 法による、それぞれの遺伝子が発現する器官・時期の解析。
- b) GFP 融合タンパク質の一過的発現によるタンパク質の細胞内局在の解析。
- c) 電気生理学的手法による、輸送基質や活性化の特性の解析。
- d) 生理機能が重要と思われる *SIALMT* 遺伝子について、発現を制御した形質転換トマトの作製と、その形質について野生トマトとの比較解析。

4. 研究成果

本研究では、16あるトマト *SIALMT* 遺伝子の器官別の発現解析を行い、その中から、果実の成熟初期および気孔で発現する2つの *SIALMT* 遺伝子に着目することで、以下に示す成果を得た。

(1) トマト *SIALMT* 遺伝子の網羅的解析

はじめに、Heinz 1706 品種を用いた遺伝子発現プロファイルと、Micro-Tom 品種を用いた PCR 法により、目的とする遺伝子発現の器官、組織、果実における成熟期について調査した。

根で特異的に発現する *SIALMT* 遺伝子についても解析を行い、幼植物体の根のアルミニウム処理や、栄養塩の欠乏処理により発現が変動するいくつかの候補遺伝子を見出した。これらの中で、以下に示す2つの遺伝子[項目(2)および(3)]に特化して解析を進めることが、より研究の発展につながると考えたため、根の遺伝子の解析については初年度以降、保留とした。今後、これらの候補遺伝子についても、あらためて研究を進める予定である。

(2) トマト果実の成熟初期に発現する *SIALMT* 遺伝子の解析

これまでの研究から、トマト *SIALMT* 遺伝子のうち、すでに果実の成熟過程で恒常的に発現していた 2 遺伝子 (*SIALMT4*, *SIALMT5*) について、細胞内膜系で発現し、そのうちの 1 つ、*SIALMT5* が種子のリンゴ酸含量に影響することを明らかにしている。

本研究課題では、果実成熟の初期段階で主に発現している *SIALMT* 遺伝子について解析した。プロモーター::*GUS* の形質転換トマトを作製し、発現組織を調べた結果、この遺伝子が果実の維管束で発現することを明らかにした。また、*GFP* 融合タンパク質の一過的発現による細胞内局在を観た結果、細胞膜に局在することが示唆された。

この果実 *SIALMT* 遺伝子をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、電気生理学的測定により、輸送基質の解析を行った。その結果、この輸送体は、果実で発現する *SIALMT4* と *SIALMT5* よりも高いリンゴ酸輸送活性を示した。さらに、リンゴ酸以外にもジカルボン酸のフマル酸やコハク酸の排出、および硝酸と塩素イオンの流入の輸送活性が明らかとなった。しかし、トリカルボン酸のクエン酸、酸性アミノ酸のアスパラギン酸、グルタミン酸の透過はみられなかった。

次に、果実と種子の有機酸含量の調査のため、この *SIALMT* 遺伝子の過剰発現系統と発現抑制系統の作出を行った。過剰発現系統については、*CaMV35S* プロモーターを用いたが、高い発現を示す系統は得られたものの、*homozygous* 系統を得ることができなかった。その理由として、遺伝子の過剰発現が生育に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。それに対して、遺伝子発現が野生株の 10-20% に抑えられた発現抑制系統については *homozygous* 系統を得ることができた。この発現抑制系統を用いて、果実のメタボローム解析を行った。その結果、果実におけるリンゴ酸およびジカルボン酸の含量は野生株と比較して、変化は認められなかったが、他のアミノ酸含量に違いがみられた。そのアミノ酸変動の原因を解明するため、この果実 *SIALMT* タンパク質の輸送機能について、今後もさらに解析を行う予定である。

(3) トマトの気孔で発現する *SIALMT* 遺伝子の解析

もう一つ詳細に解析したのは、トマトの孔辺細胞で発現する *SIALMT* 遺伝子である。この遺伝子単離については、孔辺細胞を多く含む葉の表皮から RNA を抽出し、RT-PCR により 16 の *SIALMT* 遺伝子について発現解析を行った。その結果、一つの *SIALMT* 遺伝子が葉全体と比較して表皮で高発現していた。その遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、プロモーター::*GFP* を発現させた形質転換トマトを作出した。そして、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて、形質転換トマトの葉の観察を行った結果、この遺伝子が孔辺細胞で発現することを明らかにした。さらに、細胞内局在を *GFP* 融合タンパク質の一過的発現により解析した結果、この *SIALMT* タンパク質は、細胞膜に局在することが示唆された。

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により、孔辺細胞 *SIALMT* の輸送体の特性を解析した。その結果、卵母細胞の外液にリンゴ酸を添加し、さらに測定直前に卵母細胞内にリンゴ酸を注入した際にみられる、リンゴ酸放出にともなう高い「内向き電流」が測定された。

「内向き電流」とは、マイナス側の膜電位固定により生ずるマイナス方向に上昇する電流であり、この場合、リンゴ酸が細胞の外に放出されることを意味する。そしてさらに、このリンゴ酸放出にともなう内向き電流は、植物膜の静止電位 (-100 mV) 付近をピークとする「ベル型」の電流・電圧曲線を示した (図 1)。

細胞外のリンゴ酸は、グルコン酸を含む外液の時よりもベル型を示す内向き電流のピークを負の膜電位側 (過分極側: -100 mV) に移動させる。細胞外のリンゴ酸の存在により、広い膜電位の範囲で (プラス側からピーク値まで) チャンネルが開き、リンゴ酸放出がおこる。そして、膜電位がピーク値よりも過分極になるとチャンネルは閉じ、リンゴ酸の放出は抑えられる (図 1)。

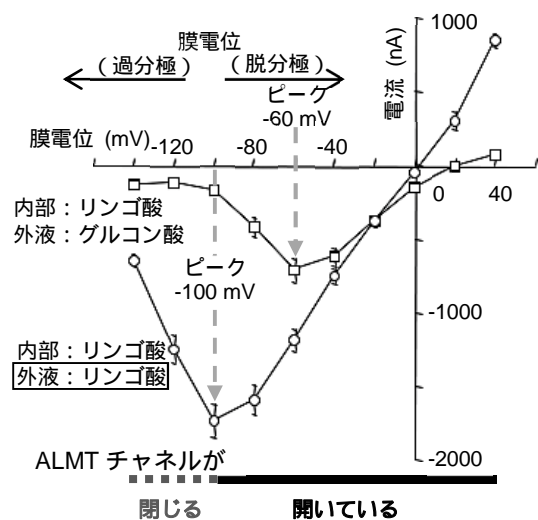


図 1 孔辺細胞の *SIALMT* が示す典型的な電流・電圧曲線

これは、以前報告されたシロイヌナズナの *AtALMT12* の結果と共通する輸送特性である。

気孔が開くときは、孔辺細胞の細胞膜プロトン ATPase の活性化により水素イオンが放出され、膜の脱分極が起こる。そして、膜が脱分極の状態では孔辺細胞の *ALMT* を介したリンゴ酸放出活性が抑えられる。このようなメカニズムが植物の気孔の開閉時におきていると推測される。

さらに、孔辺細胞 SIALMT タンパク質の C 末端に GFP 等のペプチド・タグを付加することで、「ベル型」を示さず、直線的な電流・電圧曲線へと電位依存性が変化することを見出した。そのため、これら孔辺細胞の ALMT の C 末端側には、共通した膜電位または外液リンゴ酸に対する感受センサー部位が存在すると考えられた。

加えて、電気生理学的解析から、孔辺細胞 SIALMT がリンゴ酸以外にもフマル酸とコハク酸を輸送し、クエン酸は輸送しないという基質特異性も明らかにした。

以上の結果から、トマトの孔辺細胞で発現する *SIALMT* 遺伝子の、気孔閉口への関与が示唆された。そして、アポプラスト側のリンゴ酸により孔辺細胞の ALMT が活性化され、細胞内のジカルボン酸(リンゴ酸)を放出することで起こる気孔閉口のメカニズムが、様々な植物で共通することが考えられた。

現在、孔辺細胞の *SIALMT* が関与する生理機能を証明するため、この遺伝子を発現抑制する形質転換トマトの作出と、生理的な形質の解析を進めている。

参考文献

Sasaki, T., Tsuchiya, Y., Ariyoshi, M., Nakano, R., Ushijima, K., Kubo, Y., Mori, I.C., Higashiizumi, E., Galis, I., Yamamoto, Y. Two members of the aluminum-activated malate transporter family, *SIALMT4* and *SIALMT5*, are expressed during fruit development and the overexpression of *SIALMT5* alters organic acid contents in seeds in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Physiol.* 37, 2367-2379 (2016)

Ye, J., Wang, X., Hu, T., Zhang, F., Wang, B., Li, C., Yang, T., Li, H., Lu, Y., Giovannoni, J.J., Zhang, Y., Ye, Z. An InDel in the promoter of *AI-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER9* selected during tomato domestication determines fruit malate contents and aluminum tolerance. *Plant Cell* 29, 2249-2268 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maruyama Hayato, Sasaki Takayuki, Yamamoto Yoko, Wasaki Jun	4. 巻 60
2. 論文標題 AtALMT3 is Involved in Malate Efflux Induced by Phosphorus Deficiency in Arabidopsis thaliana Root Hairs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 107-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kariya Koki, Tsuchiya Yoshiyuki, Sasaki Takayuki, Yamamoto Yoko	4. 巻 181
2. 論文標題 Aluminium-induced cell death requires upregulation of NtVPE1 gene coding vacuolar processing enzyme in tobacco (Nicotiana tabacum L.).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 152-161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinorgbio.2017.09.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koki Kariya, Muhammad Sameeullah, Takayuki Sasaki and Yoko Yamamoto	4. 巻 63
2. 論文標題 Overexpression of the sucrose transporter gene NtSUT1 alleviates aluminum-induced inhibition of root elongation in tobacco (Nicotiana tabacum L.).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 45-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2017.1283646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kojiro Takanashi, Yasuyuki Yamada, Takayuki Sasaki, Yoko Yamamoto, Fumihiko Sato, Kazufumi Yazaki	4. 巻 138
2. 論文標題 A multidrug and toxic compound extrusion transporter mediates berberine accumulation into vacuoles in Coptis japonica.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 76-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2017.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takayuki Sasaki, Izumi C. Mori, Michiyo Ariyoshi, Yoko Yamamoto
2. 発表標題 Functional analyses of ALMT malate transporters expressed in guard cells
3. 学会等名 日本植物生理学会・大阪
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木孝行
2. 発表標題 植物のALMT輸送体研究から解ってきたこと
3. 学会等名 植物の栄養研究会 第5回研究交流会・広島
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木孝行, 有吉美智代, 山本洋子, 森泉
2. 発表標題 トマトの気孔で発現するALMT 輸送体の機能解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会・静岡
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木孝行, 森泉, 有吉美智代, 山本洋子
2. 発表標題 植物ALMTファミリーの輸送機能の特性
3. 学会等名 日本植物学会・仙台
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Sasaki, Michiyo Ariyoshi, Toshihiro Obata, Izumi C. Mori, Yoko Yamamoto
2. 発表標題 Functional analyses of ALMT-family malate transporters in tomato
3. 学会等名 日本植物生理学会・名古屋
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Furutani, Kiyotoshi Hanashiro, Yumi Fujii, Hayato Maruyama, Takayuki Sasaki, Jun Wasaki
2. 発表標題 Characterization of LaMATE-PI1, a candidate of citrate transporter isolated from cluster roots of white lupin.
3. 学会等名 Symposium on Phosphorus in Soils and Plants (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古谷浩章, 花城清俊, 藤井友美, 西田翔, 佐々木孝行, 和崎淳
2. 発表標題 シロバナルーピンのクラスター根で発現するMATEファミリートランスポーターの解析
3. 学会等名 植物の栄養研究会 第4回研究交流会・京都
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木孝行, 有吉美智代, 森泉, 山本洋子
2. 発表標題 植物のALMTリンゴ酸輸送体の多様性
3. 学会等名 日本植物学会・広島
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木孝行, 有吉美智代, 森泉, 山本洋子
2. 発表標題 トマトにおけるリンゴ酸輸送体ALMTファミリーの多様性
3. 学会等名 日本土壌肥料学会・神奈川
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Furutani, Kiyotoshi Hanashiro, Yumi Fujii, Hayato Maruyama, Takayuki Sasaki, Jun Wasaki
2. 発表標題 Organic-Acid Transporters in Cluster Roots of White Lupin Induced under Phosphorus Deficiency.
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 苅谷耕輝、土屋善幸、佐々木孝行、山本洋子
2. 発表標題 アルミニウムによるタバコの根伸長阻害におけるスクロース輸送体遺伝子の関わり
3. 学会等名 日本土壌肥料学会・仙台
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 土屋善幸、苅谷耕輝、佐々木孝行、山本洋子
2. 発表標題 タバコ培養細胞におけるアルミニウム耐性とERF (エチレン応答因子) ファミリー転写調節因子との関係
3. 学会等名 日本土壌肥料学会・仙台
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本洋子, 苅谷耕輝, 土屋善幸, 佐々木孝行
2. 発表標題 アルミニウムの毒性ならびに耐性機構 - 植物培養細胞を用いたアプローチ -
3. 学会等名 第28回日本微量元素学会学術集会・仙台
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>岡山大学 資源植物科学研究所 植物分子生理学グループ ホームページ http://www.rib.okayama-u.ac.jp/Plant_Mol_Physiol/index-j.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山本 洋子 (Yamamoto Yoko)		
連携研究者	森 泉 (Mori Izumi) (40379805)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授 (15301)	
連携研究者	和崎 淳 (Wasaki Jun) (00374728)	広島大学・統合生命科学研究科・教授 (15401)	