

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18380052  
 研究課題名 (和文) イネ科植物由来のアルミニウム耐性遺伝子の単離と機能解析  
 研究課題名 (英文) Isolation and functional analysis of Al-tolerance genes in gramineous plants  
 研究代表者  
 馬 建鋒 (MA Jian Feng)  
 岡山大学・資源生物科学研究所・教授  
 研究者番号：80260389

## 研究成果の概要：

アルミニウムイオン毒性は世界の耕地面積の3割以上を占める酸性土壌での主な作物生育阻害因子である。しかし、植物の種類あるいは品種によってアルミニウム毒性に対する耐性が大きく異なる。本研究ではオオムギの品種間差を利用して、クエン酸の分泌に関与する遺伝子を同定した。またイネのアルミニウム感受性変異体を用いて、細菌型ABCトランスポーターをコードするアルミニウム耐性遺伝子を同定し、その機能を解析した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：植物栄養学

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、イネ科、クエン酸トランスポーター、ABCトランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

アルミニウムイオン毒性は低濃度で根の伸長や養水分の吸収を素早く阻害することから、世界の耕地面積の3割以上を占める酸性土壌での主な生育阻害因子である。しかし、一部の植物はアルミニウム毒性に対して耐性機構を発達させてきた。これまでに多くの生理学的な研究がなされ、いくつか耐性機構が提唱されてきた。特に多くの植物についてアルミ

ニウムに応答して根から有機酸（クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸）を分泌し、根圏においてアルミニウムを無毒化することが知られている。しかし、アルミニウムによる有機酸の分泌に関与する遺伝子については、コムギから単離されたリンゴ酸トランスポーター遺伝子以外には同定されていなかった。またイネはアルミニウム耐性種として知られているが、その耐性機構や耐性遺伝子については明らか

にされていない。

## 2. 研究の目的

イネ科作物のアルミニウム耐性は、イネ、ライ麦>コムギ>オオムギの順で、イネはアルミニウム耐性が強く、オオムギは弱いとされている。しかし、今まで多くの研究からオオムギ、イネともにアルミニウム耐性の品種間差があることが報告されている。オオムギの場合、我々は世界各国のオオムギ700品種のアルミニウム耐性をスクリーニングし、感受性品種と耐性品種の間にアルミニウム耐性の差が最大4倍あることを明らかにしている。また、イネの場合、一般的に日本型イネ品種のほうがインド型イネ品種より強い。しかし、多くのオオムギやイネ栽培地域において、アルミニウム耐性の弱い品種が栽培されているため、オオムギやイネの生産性に影響が見られ、特に酸性土壌地域の陸稲や硫酸酸性土壌地域の水稲の収量が低い。今後酸性土壌での生産性を向上させるために、アルミニウム耐性の強い作物の作出が望まれているが、オオムギやイネのアルミニウム耐性遺伝子は単離されていない。本研究の目的はアルミニウム耐性の高いオオムギとイネの品種からアルミニウム耐性遺伝子を単離し、その機能を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) オオムギアルミニウム耐性品種(むらさきもち)と感受性品種 (Morex) および両品種の交配集団を用いて、アルミニウム耐性遺伝子のマッピングを行った。また単離された遺伝子の部位別発現量などを定量RT-PCRで測定し、抗体染色で組織局在性を調べた。さらにアフリカツメガエルの卵母細胞に単離した遺伝子を発現させ、クエン酸の輸送活性を測定した。(2) すでに単離したイネアルミニウム感受性突然変異体を用いて、マップベースクローニ

ング法で原因遺伝子を単離した。また単離した遺伝子を変異体に導入して、相補性試験を行った。遺伝子の部位別、時間別発現量、アルミニウム処理による影響を定量的RT-PCRで調べた。またGFPとの融合遺伝子を作成して、タマネギの表皮細胞やイネに形質転換して、細胞内、細胞・組織局在性を調べた。さらに、根から膜画分をショ糖密度分画法で分取し、細胞内局在性をWestern blot法で調べた。

## 4. 研究成果

### (1) オオムギアルミニウム耐性遺伝子の単離と機能解析

我々はこれまでの研究で、根からのクエン酸の分泌がオオムギにおける主要な耐性機構であることを明らかにしている。そこで、アルミニウムによって活性化されるクエン酸の分泌に関与する遺伝子(AACT1, Aluminum-Activated Citrate Transporter) を単離するためにアルミニウム耐性品種「むらさきもち」と感受性品種「Morex」との交配から得たF<sub>3</sub>ヘテロ個体由来のF<sub>4</sub>集団600個体を用いて、新たなマーカーを設計し、ファインマッピングを行った。その結果、AACT1はオオムギ4番染色体上のマーカーHvP1とK06496の間にマップされた。またむらさきもちとMorexを用いてマイクロアレイを行った結果、この領域にむらさきもちで常に高発現している候補遺伝子を見つけた。この遺伝子を含むBACクローンを選抜して配列解析し、遺伝子の全長配列を取得したところ、ORFに「むらさきもち」と「Morex」間で2つのSNPが存在しており、そのうち1つはアミノ酸レベルでの相違を伴っていた。この遺伝子は主に根に発現していて、根の先端より基部のほうの発現量が多かった。また構成的に発現しておりアルミニウムによって誘導されなかった。アルミニウム耐性能が異なるオオムギ8品種においてこの

候補遺伝子の発現量とアルミニウムにより誘導されるクエン酸の分泌量との間に強い正の相関 ( $R=0.96$ ) が得られた。抗体染色を行った結果、HvAACT1は根の表皮細胞に局在していた。またGFPとの融合遺伝子をタマネギの表皮細胞に一過的に発現させてHvAACT1が細胞膜に局在していることを明らかにした。さらにアフリカツメガエルの卵母細胞に候補遺伝子のcRNAとクエン酸を注入して、アルミニウムによる膜電流の変化を測定したところ、水を注入した細胞の約2倍の電流が認められ、cRNAとリンゴ酸の注入では電流の変化が見られなかった。 $^{14}\text{C}$ で標識したクエン酸あるいはリンゴ酸を卵母細胞に注入し、輸送活性を調べた結果、同じくクエン酸に対して輸送活性を示したが、リンゴ酸に対しては示さなかった。これらのことはこの輸送体がクエン酸を特異的に輸送する特性を持っていることを示している。

本研究では、世界で初めてアルミニウムによるクエン酸の分泌を司る遺伝子を同定した。今後はこの遺伝子の発現制御機構を明らかにし、アルミニウム耐性作物の作出に応用することが期待されている。

## (2) イネアルミニウム耐性遺伝子の単離と機能解析

これまでに単離したイネアルミニウム感受性突然変異体 *als1* とインド型イネ品種 Kasalath を交配し、マッピングの集団を作成した。マップベースクローニング法で原因遺伝子 (*Als1*) をクローニングした。この遺伝子は染色体6番に座乗し、ABCトランスポーターのATP結合ドメインのみをコードしていた。この遺伝子を変異体に導入した形質転換植物では、アルミニウム耐性が回復した。この遺伝子は主に根で発現し、アルミニウム処理によって2時間以内に発現が誘導された。一方で、

この遺伝子は他の金属 (Cd, La) や低 pH によっては誘導されなかった。

タマネギの表皮細胞に *Als1* と GFP との融合遺伝子を一過的に発現させて細胞内局在性を観察したところ、*Als1* は細胞内に顆粒状に存在していた。しかし、イネの根から膜画分と可溶性画分を抽出して、Western blot を行ったところ、膜画分に存在していた。さらにシヨ糖密度勾配で膜画分を分画したところ、*Als1* は細胞膜や液胞膜ではなく、軽い画分に存在していた。これらの結果は *Als1* が他の膜に結合する因子と相互作用していることを示唆している。最近我々は別の研究から、*Als1* と相互作用し、ABCトランスポーターの膜結合ドメインをコードしている遺伝子を明らかにした。

*Als1* と GFP の融合遺伝子をイネに形質転換した植物を観察した結果、*Als1* は根の先端付近ではすべての細胞に、基部では表皮以外のすべての細胞に局在していた。また抗体染色でも同じ局在性を示した。

*Als1* はイネで初めて同定されたアルミニウム耐性遺伝子であり、今後アルミニウム耐性におけるこの遺伝子の役割をさらに解明していく必要がある。

## 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 9 件)

- (1) Huang, C. F., Yamaji, N., Mitani, N., Yano, M., Nagamura, Y. and Ma, J. F. A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell*, 21: 655-667, 2009, 査読：有
- (2) Dong, X. Y., Shen, R. F., Chen, R. F., Zhu, Z. L. and Ma, J. F. Secretion of malate and citrate from roots is

- related to high Al-resistance in *Lespedeza bicolor*. Plant Soil, 306:139-147, 2008, 査読：有
- (3) Furukawa, J., Yamaji, N., Wang, H., Mitani, N., Murata, Y., Sato, K., Katsuhara, M., Takeda, K., and Ma, J. F. An aluminum-activated citrate transporter in barley. Plant Cell Physiol., 48:1081-1091, 2007, 査読：有
- (4) Hiradate, S., Ma, J. F. and Matsumoto, H. Strategies of plants to adapt to mineral stresses in problem soils. Advances in Agronomy, 96: 65-132, 2007, 査読：有
- (5) Ma, J. F. Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. International Review of Cytology, 264: 225-252, 2007, 査読：有
- (6) Shen, R. F., Chen, R. F. and Ma, J. F. Buckwheat accumulates aluminum in leaves but not in seeds. Plant Soil, 284: 265-271, 2006, 査読：有
- (7) Chen, R. F., Shen, R. F., Gu, P., Dong, X. Y., Du, C. W. and Ma, J. F. Response of rice (*Oryza sativa*) with root surface iron plaque under aluminium stress. Ann. Bot. 98: 389-395, 2006, 査読：有
- (8) Xue, Y., Wan, J. M., Jiang, L. Liu, L. L., Su, N., Zhai, H. Q. and Ma, J. F. QTL analysis of aluminum resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Soil, 287: 375-383, 2006, 査読：有
- (9) 古川純、馬建鋒. 講座「植物栄養学研究へのゲノム科学のインパクト」第3回「植物のミネラルストレス研究におけるプロテオミクスの応用」、日本土壤肥料学雑誌、第77巻1号 109-114、2006、査読：有
- [学会発表] (計18件)
- (1) 山地直樹・黄朝鋒・長村吉晃・馬建鋒. イネ転写調節因子 STAR3 によるアルミニウム耐性遺伝子の発現制御. 日本土壤肥料学会年会、2008年9月10日、名古屋
- (2) 黄朝鋒・山地直樹・田島茂行・馬建鋒. 新規アルミニウム感受性突然変異体の単離と原因遺伝子のマッピング. 日本土壤肥料学会年会、2008年9月10日、名古屋
- (3) 馬建鋒. 問題土壌中のミネラルストレスに対する植物の適応戦略. 日本遺伝学会第80回大会、2008年9月4日、名古屋
- (4) 馬建鋒. イネのアルミニウム耐性に関する細菌タイプ ABC トランスポーターの解析. 日本植物生理学会年会、2008年3月21日、札幌
- (5) 馬建鋒. オオムギミネラルストレス耐性遺伝子の同定. ムギ類研究会、2007年11月17日、福山
- (6) Huang, C. F. and Ma, J. F. Isolation and characterization of two Al-tolerant genes in rice. The 5<sup>th</sup> International Symposium of Rice Functional Genomics, Oct. 16, 2007, Tsukuba, Japan
- (7) 黄朝鋒・山地直樹・田島茂行・矢野昌裕・馬建鋒. Functional analyses of two Al-tolerant genes *Als1* and *Als2* in rice. 日本土壤肥料学会年会、2007年8月22日、東京
- (8) 古川純・山地直樹・王華・三谷奈見季・村田佳子・佐藤和広・且原真木・武田和義・馬建鋒. オオムギにおけるアルミニウムによるクエン酸分泌に関する遺伝子の単離と機能解析. 日本土壤肥料学会年会、2007年8月22日、東京
- (9) 馬建鋒. イネのケイ酸吸収欠損変異体、アルミニウム感受性変異体の解析. ガン

- マーフィールドシンポジウム、突然変異による有用遺伝子の創出と解析、2007年7月11日、水戸
- (10) 馬 建鋒・古川純・山地直樹・王華・三谷奈見季・佐藤和広・武田和義. アルミニウムによって活性化されるクエン酸トランスポーターの同定. 第2回トランスポーター研究会、2007年6月10日、東京
- (11) 黄 朝鋒・山地直樹・矢野昌裕・馬建鋒. イネアルミニウム耐性遺伝子 *Als1* の機能解析. 日本植物生理学会年会、2007年3月28日、愛媛
- (12) 古川 純・山地直樹・王 華・且原真木・佐藤和広・武田和義・馬 建鋒. オオムギのアルミニウム活性化型クエン酸輸送体候補遺伝子の発現ならびに機能解析. 日本植物生理学会年会、2007年3月28日、愛媛
- (13) Huang, C. F, Yamaji, N. and Ma, J. F. Cloning and characterization of Al-tolerant genes in rice. International Plant and Animal Genome Conference XV, Jan. 15, 2007, San Diego, USA
- (14) Huang C., Nagao S. and Ma J. F. Isolation and characterization of a novel Al-resistance gene *Als2* in rice (*Oryza sativa* L.). Annual meeting of the Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition, Sept. 7, 2006, Akita
- (15) 古川 純・馬 建鋒・佐藤和広・武田和義. オオムギのアルミニウム耐性に関与する遺伝子の探索. 日本土壌肥料学会年会、2006年9月6日、秋田
- (16) Huang C., Yamaji N. and Ma J. F. Cloning and characterization of a rice

- Al-tolerant gene *Als1*. Annual meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists. March 20, 2006, Tsukuba
- (17) 馬 建鋒. オオムギにおけるミネラルストレス耐性. 植物生理学会年会シンポジウム、オオムギゲノムの機能：遺伝子、個体からビールまで、2006年3月19日、つくば
- (18) 古川 純・馬 建鋒・佐藤和広・武田和義. Al 耐性および感受性オオムギの根端における網羅的遺伝子発現解析. 日本植物生理学会年会、2006年3月19日、つくば

[その他]

2009年3月29日 山陽新聞 イネのアルミニウム耐性関与 2種の遺伝子特定  
イネからアルミニウム耐性に関与する遺伝子二つを世界ではじめて同定し、その機能を解明した。今後酸性土壌でも生育できる作物の作出に寄与することが期待される。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬 建鋒 (MA Jian Feng)

岡山大学・資源生物科学研究所・教授

研究者番号：80260389

### (3) 連携研究者

