

国内ミヤコグサ系統間のアルミニウムイオン応答解析

下村 憲司朗*， 堅田 夏輝**， 松野 光樹**， 藤岡 睦未**

Aluminum Ion Response Comparison between Domestic *Lotus japonicus* Lines

Kenshiro SHIMOMURA*, Natsuki KATADA**, Kouki MATSUNO**, Mutumi FUJIOKA**

ABSTRACT

Aluminum cation (Al^{3+}) toxicity due to soil acidity inhibits root growth and function. Organic acid (OA) released from roots has been identified in several crop plants as a major component of Al tolerance. But OA secretion mechanism in a leguminous plant is not understood well. We tried acquisition of Al sensitive lines and Al resistant lines that facilitated Al resistant mechanical analysis by using *Lotus japonicus* as the leguminous model plant. Fourteen Al resistant lines, four Al sensitive lines, and a promotion line were obtained by the extension comparisons of roots under the Al^{3+} existence. As quantitative-PCR analysis of orthologs of already-known genes related to aluminum tolerance, LjALMT1 gene showed Al^{3+} inductivity. In addition, the expression of ortholog of STOP1 gene that took part in the transcript of ALMT1 was confirmed. These results suggest *L. japonicus* have the malate secretion mechanism.

Keywords: acid soil, Al stress, Al tolerant mechanism, legume, symbiosis

1. 緒言

作物の生育が悪く農耕地に適していない土壌は問題土壌と呼ばれる。中でも酸性土壌は熱帯、温帯の農耕地の 30-40%を占め、その面積は 3.95 億ヘクタールといわれている⁽¹⁾。酸性土壌は特にアジア、アフリカ等の発展途上国に多く存在するが、このような地域は人口増加が著しいため、食糧生産のための酸性土壌利用が必要となっている。

酸性土壌はプロトンとの交換溶脱のために、栄養塩類に乏しいやせた土壌であるが、酸性土壌中において植物の生育阻害となる最も大きな因子は酸性化に伴って溶出するアルミニウムイオン (Al イオン) である。一般に Al イオンは根の根端に集積することで縦方向への伸長を阻害し、横方向へと肥大化させてしまう⁽²⁾。結果として、根の正常な形態形成が阻害され、作物の生育に影響が及ぶ。そのため、マメ科植物等の根圏で根粒菌と共生窒素固定を行う作物は特に影響を受けると予想される。実際にマメ科作物の栽培前には石灰による土壌の中和が行われている。一方、マメ科植物の中でもシロツメクサ (*Trifolium repens* L.) は酸性条件下で、根の伸長と根粒の着生が促進されることが知られている⁽³⁾。酸性条件下による根の伸長・根粒着生の

増大の分子メカニズムはシロツメクサの遺伝子リソースや形質転換法の整備が不十分であることから、解明に至っていない。

植物の Al イオン耐性機構には大別して、 Al イオン排除機構と細胞内抵抗性機構の二つの方法があるが、有機酸分泌による Al イオン排除機構が主要なものと考えられている。植物は一般的に、 Al イオンに対し根圏でリンゴ酸やクエン酸等の有機酸を分泌する事で無毒化する事が知られている。シロイヌナズナやコムギの場合、 Al ストレスシグナルを感知すると、ALMT1 (アルミニウム誘導性リンゴ酸トランスポーター) が誘導され、根からリンゴ酸を分泌し、 Al イオンとキレート結合を形成させることで根内への Al イオンの取り込みを抑制する事が報告されている⁽⁴⁾。また、ALMT1 遺伝子の発現にはプロトン感受性転写因子、STOP1 が関与する⁽⁵⁾。一方、オオムギは AACT (アルミニウム活性型クエン酸トランスポーター) が関与し、クエン酸を分泌することが報告されている⁽⁶⁾。マメ科植物についてもエンドウ、ダイズを中心に Al イオン耐性機構の解析が行われてきたが、遺伝子資源や形質転換法の整備が不十分であることから、解明に至っていない。マメ科のモデル植物であるミヤコグサは Al イオン耐性機構の分子レベルの解析を可能にする遺伝子資源が整っているが、ミヤコグサによる解析例は報告されて

*神戸高専応用化学科 講師

**神戸高専応用化学科

いない。ミヤコグサの Al イオン耐性および感受性系統を得ることができれば、マメ科植物の Al イオン耐性機構の解析を行う上で、有用なツールとなると考えられる。

本研究では、マメ科モデル植物のミヤコグサの国内自生系統の Al イオン存在下における根の伸長を評価し、Al イオン耐性系統および感受性系統を得ることを目的とした。更に、ミヤコグサ Al イオン耐性に関する遺伝子の検索を試みた。

2. 材料

Al イオン耐性能評価には、ゲノム解析や EST 解析が完了している系統 "gifu" とナショナルバイオリソースプロジェクト (<http://www.legumebase.agr.miyazaki-u.ac.jp/>) より配布されている 18 系統のミヤコグサを使用した(表 1)。

表 1. Al イオン耐性能評価に用いたミヤコグサ系統

系統名	採取地		系統名	採取地	
MG-3	神奈川県	横浜市	MG-70	和歌山県	印南町
MG-8	京都府	亀岡市	MG-71	熊本県	阿蘇町
MG-27	沖縄県	読谷村	MG-73	大分県	久住町
MG-42	秋田県	田沢湖	MG-74	愛媛県	宇和町
MG-44	宮城県	石巻市	MG-109	岩手県	盛岡市
MG-49	兵庫県	香住町	MG-117	福井県	九頭竜
MG-52	高知県	斐川町	MG-119	新潟県	信濃川
MG-56	宮崎県	日南市	MG-122	長野県	真田町
MG-60	鹿児島県	枕崎市	MG-131	大阪府	大和川

3.1 Al イオン耐性能評価

各ミヤコグサ系統の種子をサンドペーパーで硬実打破し、22℃で一晩吸水させた。十分に吸水した種子のみを 1/5 濃度の Nifal 水耕液に 0.8% アガロースを加え、オートクレーブ滅菌後の培地に播種し、24℃、16/8 時間の明暗条件下で 3 週間培養した。培地の Al イオンと pH 条件は AlCl₃ 0 μM, pH5.5 と AlCl₃ 50 μM, pH4.5 とした。培養には 200ml のプラントボックスを使用した。3 週間の栽培後の根長を測定し、Al イオンの影響を評価した。その際、根長 3mm 以下の個体は種子自体の発芽不良と判断をし、根長測定から排除した。

3.2 Al イオン耐性候補遺伝子の検索

シロイヌナズナで既に報告されている AtALMT1 (EU181365) と AtSTOP1 (AB300237) のアミノ酸配列を基にさ DNA 研究所 (<http://www.kazusa.or.jp/>) のミヤコグサ EST およびゲノムデータベースで検索を行った。同様に、オオムギの HvAACT (AB302223) のアミノ酸配列を用いて候補遺伝子の検索を行った。

3.3 定量的 PCR 解析

ガラスビーズ(粒径 0.71-1.40mm)を疑似土壌として用い、ミヤコグサの gifu を 1/5 濃度の Nifal 水耕液で 3 週間栽培した。水耕液の Al イオン濃度と pH 条件は AlCl₃ 0 μM, pH5.5 と AlCl₃ 50 μM, pH4.5 とした。各条件下で栽培した個体の根の先端約 5mm をサンプリングし、ISOGEN (ニッポンジーン社)を用いて、トータル RNA を抽出した。トータル RNA 1 μg を鋳型とし、PrimeScript RT-PCR Kit (タカラバイオ社)、オリゴ dT プライマー (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTNN-3') を用いて逆転写反応を行った。定量的 PCR の内部標準には恒常的に発現していることが知られている Ubiquitin を用いた。各候補遺伝子(LjALMT1, LjSTOP1, LjAACT) の解析には逆転写後の反応液から 1 μl を鋳型とし、Ubiquitin の解析には 30 倍希釈した反応液から 1 μl を用いた。PCR に使用したプライマーセットを表 2 にまとめた。PCR の増幅サイクルは 94℃ -15sec, 50℃ -15sec, 72℃ -30sec, 24 サイクルとした。PCR 反応産物をアガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロミドで染色した。

表 2. 定量的 PCR プライマー配列

primer name	sequence
ALMT1 forward	TGTGATAAGAGTTACATTTGCAGC
ALMT1 reverse	CTACAGATTGTCAGAACATGGTTC
STOP1 forward	TCAATACCTACCTCTATCATCCCTC
STOP1 reverse	CACACTTGGATCCCAATCTTGGAG
AACT forward	GTAGCAGTAACATTTTGTGTGACC
AACT reverse	GGTCTGAACATGTTCCCATCCTG
Ubiquitin forward	AGAGGTTGATTTTTGCTGGTAAGC
Ubiquitin reverse	TATTCACAGCCAGAAGAGGCCAC

4. 結果

4.1 Al イオン耐性能評価

ナショナルバイオリソースプロジェクトより提供を受けたミヤコグサ国内野生系統 18 種と実験系統として最も用いられている gifu の計 19 系統について、酸性条件・Al イオン耐性能を根長測定によって評価した。シロイヌナズナやコムギ、オオムギの Al イオン感受性品種では AlCl₃ 濃度 10-50 μM で明らかな根の伸長阻害が確認されている。ミヤコグサの Al イオン耐性能評価では 50 μM AlCl₃ とした。発芽不良を除く個体の根長を測定し、平均長、標準偏差を求めた。t 検定(p<0.05)の結果、MG-8, MG-27, MG-42, MG-44, MG-52, MG-56, MG-60, MG-70, MG-71, MG-73, MG-74, MG-109, MG-122, MG-131 系統では Al イオンによる根の生育抑制は確認されなかった(表 3)。一方、gifu, MG-49, MG-117, MG-119 系統では有意に Al イオンによる根の

伸長抑制が観察された(図1). MG-3 系統は 50 μM の Al イオン添加によって 根の伸長促進が観察された(図1).

表 3. Al イオン添加条件下の国内ミヤコグサ自生系統の根長測定 各条件下で 3 週間の栽培後の根長を測定した. 括弧内は標準偏差を表す.

	平均根長 (cm)		num ber	平均根長 (cm)		num ber
	Al イオン 0 μM			Al イオン 50 μM		
MG-8	0.92 (0.34)		16	0.89 (0.29)		15
MG-27	1.16 (0.41)		17	1.36 (0.56)		15
MG-42	1.08 (0.48)		19	0.96 (0.36)		13
MG-44	0.98 (0.31)		12	0.87 (0.40)		14
MG-52	1.12 (0.56)		12	1.05 (0.33)		8
MG-56	1.84 (0.60)		20	1.95 (0.76)		16
MG-60	0.92 (0.48)		14	1.11 (0.62)		19
MG-70	0.85 (0.27)		15	0.89 (0.41)		12
MG-71	1.00 (0.58)		8	1.09 (0.45)		14
MG-73	1.00 (0.39)		14	1.23 (0.34)		20
MG-74	1.33 (0.46)		19	1.17 (0.32)		19
MG-109	1.08 (0.37)		13	1.61 (1.09)		9
MG-122	1.63 (0.59)		24	1.41 (0.66)		20
MG-131	0.98 (0.33)		19	1.02 (0.55)		17

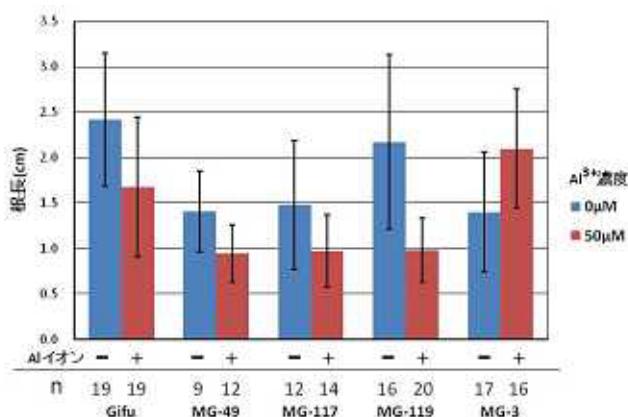


図 1. Al イオンによる根の伸長抑制系統と伸長促進系統の根長測定 AlCl₃の添加は 50 μM とし, 3 週間の栽培後の根長を測定した. n は根長測定個体数を示す.

4.2 Al イオン耐性関連遺伝子候補の検索

植物根が Al イオンを感知して有機酸を分泌する分子メカニズムはよく分かっていない. しかし, 双子葉植物のモデル植物であるシロイヌナズナや単子葉植物のオオムギ, コムギを用いた研究によって, リンゴ酸の分泌には ALMT1, クエン酸の分泌には AACT, ALMT1 遺伝子の発現誘導には STOP1 が関与することが報告されている⁽⁴⁾⁻⁽⁶⁾. 一方, ミヤコグサの Al 耐性機構は全く未知である. ミヤコグサが ALMT1, AACT, STOP1 オルソログを有するのかを確認するために, シロイヌナズナの AtALMT1 と AtSTOP1, オオムギの HvAACT のアミノ酸配列を基に, かずさ DNA 研究所

のミヤコグサ EST (Expressed Sequence Tags) データベースとゲノムデータベースで相同性検索(BLAST 検索)を試みた. その結果, AtALMT1 とアミノ酸レベルで 45.8%の相同性を持つ ALMT1 候補遺伝子 (LjALMT1 遺伝子, TAC/BAC クローン CM0361), AtSTOP1 と 62.7%の相同性をもつ STOP1 候補遺伝子 (LjSTOP1 遺伝子, TM1667), HvAACT と 53.0%の相同性を持つ AACT 候補遺伝子 (LjAACT 遺伝子, LjT09I09) が得られた.

4.3 定量的 PCR 解析

Al イオン耐性関連候補遺伝子 (LjALMT1 遺伝子, LjSTOP1 遺伝子, LjAACT 遺伝子) の塩基配列を基に特異的プライマーを設計した. Al イオン存在下と非存在下で栽培した gifu の根から得た RNA の逆転写によって得られた cDNA を鋳型として定量的 PCR を行った (図 2). LjSTOP1 遺伝子は AtSTOP1 遺伝子と同様に Al イオンの添加に関連なく, 一定で発現していた. また, LjALMT1 遺伝子は AtALMT1 遺伝子と同様に Al イオンの添加によって発現が誘導されていた. 一方, LjAACT 遺伝子の発現は検出されなかった.

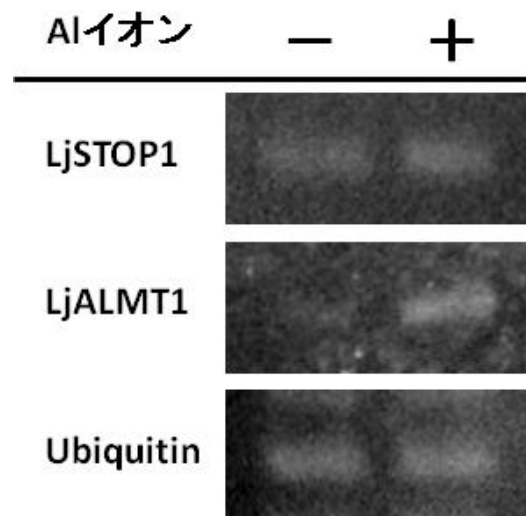


図 2. Al イオン耐性関連候補遺伝子の定量的 PCR 解析

5. 考察

酸性土壌の利用は食料の増産, 持続的農業生産の確立を目指すためには必要不可欠である. それゆえ, 植物の Al ストレスに対する応答機構の解明が望まれている. 近年の研究によって, Al イオンを無毒化する機構の有機酸分泌に関わる遺伝子 (ALMT1, AACT) や ALMT1 の遺伝子発現を誘導するプロトン感受性転写因子, STOP1 が同定された. 加えて, コムギの研究によって Al イオンによるリンゴ酸分泌に 48kDa のタンパクキナーゼが関与していることが示唆されている⁽⁷⁾.

これらの研究には Al ストレス耐性品種と感受性品種や感受性変異体が用いられている。

マメ科作物は根粒菌との共生により、大気窒素を生育に利用しうる重要な農業形質を持つことから、古くから共生機構や生理学的な研究が進められてきた。しかしながら、マメ科植物の Al ストレス耐性に関する分子レベルの研究例は極めて少ない。本研究ではマメ科モデル植物のミヤコグサを研究材料とし、栽培実験から 14 系統の Al イオン耐性系統と 4 系統の Al イオン感受性系統を得た。これらの系統の比較解析は、マメ科植物の Al ストレス耐性機構の解明に有用である。興味深いことに、低 pH、Al イオン存在下で根の伸長が促進した系統 (MG-3) も得ることができた。低 pH 条件下での根の伸長促進は、同じマメ科植物であるシロツメクサで観察されているが分子機構は不明である。MG-3 系統は根の伸長促進メカニズムの解明に重要な役割を持つかもしれない。

gifu 系統を用いた定量的 PCR 解析では LjALMT1 遺伝子は既知の ALMT1 遺伝子と同様に Al イオン誘導性を示した。更に、ALMT1 の発現誘導に参与する転写因子、STOP1 の発現も確認されたことから、ミヤコグサはリンゴ酸分泌型の Al 耐性機構を有していることが示唆された。今後、LjALMT1 遺伝子を指標として発現量と耐性能の相関を解析すれば、LjALMT1 の役割がより明らかとなるだろう。

謝辞

本研究で使用した国内ミヤコグサ系統種子はナショナルバイオリソースプロジェクトより提供を受けた。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- (1) Baligar C., Ahlrichs L. : "Nature and distribution of acid soils in the world. ", In Schaffert RE. ed., Proceeding of the Workshop to Develop a Strategy for Collaborative Research and Dissemination of Technology in Sustainable Crop Production in Acid Savannas and other Problem Soils of the World. Purdue University 1-11, 1998.
- (2) Sasaki M., Yamamoto Y. et al. : "Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots", *Physiol. Plant.* 96: 193-198, 1996.
- (3) Sugawara K. and Stanley D. : "The effects of low pH Growth Medium on nodulation and N₂ fixation of alfalfa(*Medicago sativa* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.)", *J. Japan. Grassl. Sci.* 38 : 53-62. 1992.
- (4) Sasaki M., Yamamoto Y. et al. : "A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter", *The Plant Journal.* 37: 645-653, 2004.

- (5) Iuchi S., Koyama H et al. : " Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance", *Proceedings of National Academy of Science*, 104(23): 9900-9901, 2007
- (6) Furukawa J., Yamaji N. et al. : " An aluminum-activated citrate transporter in Barley", *Plant Cell Physiol.* 48(8):1081-1091, 2007.
- (7) Osawa H., Matsumoto H. : " Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root apex", *Plant Physiol.*, 126: 411-420, 2001.