

ミヤコグサ ALMT1 遺伝子の性状解析

下村 憲司朗*, 米田 裕基**

Characterization of *Lotus japonicus* ALMT1 gene

Kenshiro SHIMOMURA*, Yuki YONEDA**

ABSTRACT

Aluminum activated malate transporter (ALMT1) was identified from some plant kinds as the protein which participates in secretion of malate in Al-tolerance mechanism. But character of ALMT1 in a leguminous plant is not understood well. Here, we further characterize *LjALMT1*, an *Lotus japonicus* aluminum-activated malate transporter gene, to clarify its specific role in Al stress responses. To investigate Al-inducible changes in gene expression and location, an *LjALMT1* promoter::GUS reporter construct was generated and used to transform wild-type *L. japonicus*. With Al treatment, *LjALMT1* was expressed more strongly and widely within root apices and in the central core in mature portions of the root. Although *LjALMT1* showed similarity to *AtALMT1* in gene expression conditions, the clear difference was shown in comparison of an amino acid sequence. The ALMT1 in a leguminous plant may play roles also not only to Al-tolerance mechanism but to symbiosis with rhizobium.

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

1. 緒言

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⁾。酸性土壌中の植物の生育阻害となる最も大きな要因は、酸性化に伴って溶解するAlイオンである。土壌を構成する金属元素の中でAlが最も多く存在し、約7%を占めている。Alは土壌が酸性になるに従い、毒性の強いイオンとして溶出し、pHが4.5以下の土壌では最も毒性が強いAl³⁺として存在する。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。

植物は動物と異なり、土壌からのストレスを移動によって回避することができないため、自らストレスを抑制する方法を持つ。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

*神戸高専応用化学科 准教授

**神戸高専 応用化学専攻

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⁽³⁾。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⁽⁴⁾。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⁽⁵⁾。

主要作物の一つである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。一方、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。我々はシロイヌナズナ *AtALMT1* (EU181365) と *AtSTOP1* (AB300237) の塩基配列を用いたミヤコグサ EST およびゲノムデータベース検索により、塩基配列上類似した遺伝子を発見し、ミヤコグサ *ALMT1* 遺伝子と *STOP1* 遺伝子（以下 *LjALMT1*, *LjSTOP1*）が根で発現している事を報告している⁽⁶⁾。

本研究では、*LjALMT1* のアミノ酸配列、発現部位、Alイオン誘導性について *AtALMT1* との比較を行った。

2. 材料および方法

2.1 大腸菌とアグロバクテリウムの培養 コンストラクト作成のための大腸菌は *E.coli* DH5α, ミヤコグサ形質転換のためのアグロバクテリウムは

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 を用いた. 大腸菌の培養には LB 培地, アグロバクテリウムの培養には YEM 培地を使用した.

2.2 LjALMT1 プロモーターのクローニング

LjALMT1 遺伝子領域を含むゲノムクローン (CM000361) を鋳型とし, 転写開始点の上流約 3 kbp を PCR により増幅した. 反応には Promega 社の Gene taq NT, Forward primer (5'-CTTCTGTAGAATCTCGGAC TAAACC-3'), Reverse primer (5'-GATTTGATATAGAG GAGAAAAAACC-3') を用い, 反応条件は 94℃を 15 sec, 55℃を 15 sec, 72℃を 2 min, 30 サイクルとした.

PCR 産物を電気泳動で確認後, Promega 社の pGEM easy vector system で TA クローニングした.

2.3 ミヤコグサ形質転換体作出 クローニングした *LjALMT1* プロモーター領域を pCAMBIA1301 ベクターの GUS の上流に導入し, *A. tumefaciens* LBA4404 に形質転換した.

作成したアグロバクテリウムを使用し, アグロバクテリウム法によりミヤコグサの形質転換体を作出した. 遺伝子組換え個体の作出は以前に使用した手法を用いた⁽⁷⁾. 形質転換個体の選抜は再生個体から抽出したゲノム DNA を鋳型とし, GUS 遺伝子に対するプライマー (GUS Forward primer 5'-TATCACCGTGGTGAC GCATGT-3', GUS Reverse primer 5'-TTACATTGAC GCAGGTGATCG-3') を用いた PCR により実施した.

2.4 GUS 染色 各ミヤコグサ形質転換体を AI イオン (200 μM) 存在下・非存在下で 1 週間栽培した. この各ミヤコグサ形質転換体から切り取った根を GUS 染色液 (X-glucuronide 1.9 mM, フェリシアン酸カリウム 0.5 mM, フェロシアン酸カリウム 0.5 mM, TritonX-100 0.3%, メタノール 20%, リン酸ナトリウム 100 mM, pH 7.0) に浸し, 真空下で 2~3 分静置した後, 37℃の暗所で 1 時間インキュベートした. 染色後, 試料を 100%エタノールに一晩浸し, 漂白を行った.

3. 結果

3.1 LjALMT1 アミノ酸配列比較 ミヤコグサゲノムクローン (CM000361) より見出された *LjALMT1* 遺伝子配列より予測したアミノ酸配列とシロイヌナズナ, ダイズより報告されている ALMT1 アミノ酸配列を用い, Multiple alignment 解析 (NCBI COBALT program) を行った (Fig. 1). Multiple alignment 解析の結果, LjALMT1 と GmALMT1 のアミノ酸配列の相同性は 75.4%, LjALMT1 と AtALMT1 のアミノ酸配列の相同性は 41.7% であり, 高い相同性を示した.

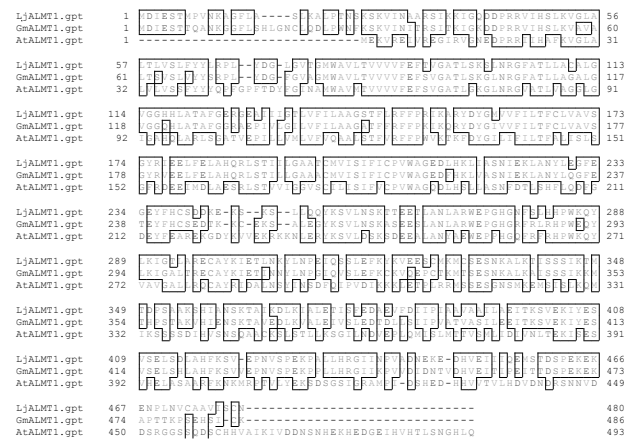


Fig. 1 ミヤコグサ (Lj), ダイズ (Gm), シロイヌナズナ (At) ALMT1 アミノ酸配列の Multiple alignment 解析. 四角はミヤコグサ ALMT1 と一致したアミノ酸を示す.

また, ミヤコグサゲノムから予測されるアミノ酸配列と既に報告されている ALMT1 アミノ酸配列から作成した系統樹では, 双子葉植物の ALMT1 と単子葉植物の ALMT1 は別のグループを形成し, さらにマメ科植物の ALMT1 は独自のグループを形成することが明らかとなった (Fig. 2).

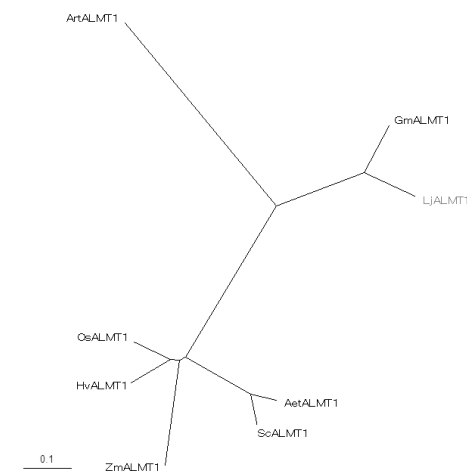


Fig. 2 ALMT1 系統樹. *Lotus japonicus* (Lj), *Glycine max* (Gm), *Arabidopsis thaliana* (Art), *Oryza sativa* (Os), *Hordeum vulgare* (Hv), *Aegilops tauschii* (Aet), *Secale cereale* (Sc), *Zea mays* (Zm) の ALMT1 アミノ酸配列に対し, ClustalW 解析を行い, TreeView32 プログラムにより系統樹を作成した.

コムギの ALMT1 は細胞の原形質膜に局在していることが報告されていることから, TMHMM プログラムによる, 膜貫通ドメイン予測を行った (Fig. 3)⁽⁸⁾.

TMHMM 解析の結果, AtALMT1 の膜貫通ドメインは 5

個, 同じマメ科植物の GmALMT1 と LjALMT1 の膜貫通ドメインは 6 個であることが予想された。

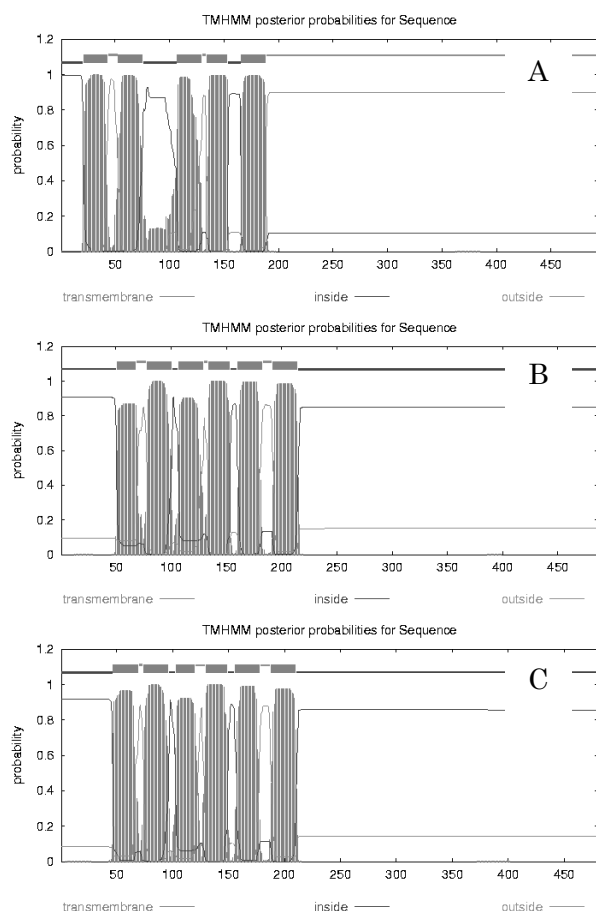


Fig. 3 TMHMM Server v. 2.0 プログラムを用いた ALMT1 膜貫通ドメインの予測. A は AtALMT1, B は GmALMT1, C は LjALMT1 を示す.

3.2 形質転換個体の導入遺伝子の確認 *LjALMT1* は根で発現することが定量的PCR解析で確認されている⁽⁶⁾. *LjALMT1* の詳細な発現解析をプロモーター-GUS法によって実施するために, *LjALMT1* のプロモーター領域に GUS 遺伝子を連結したコンストラクト (LjALMT1 pro::GUS) をアグロバクテリウム法でミヤコグサに導入した (Fig. 4).

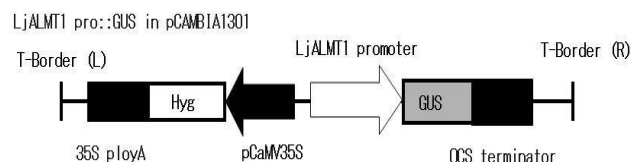


Fig. 4 LjALMT1 pro::GUS コンストラクト.

各形質転換体 (APG-1-17) の葉から抽出したゲノム DNA を鋳型とし, GUS 遺伝子断片 (約 500 bp) が増幅するように設計されたプライマーを用いて PCR 反応

を行った. 反応後に電気泳動により, GUS 断片の増幅の確認を行った (Fig. 5). 独立した形質転換体として得られた APG-1-17 の全てで, GUS 遺伝子断片が増幅されたことより, 全ての形質転換個体中に *LjALMT1* promoter::GUS コンストラクトが導入されていることを確認した.

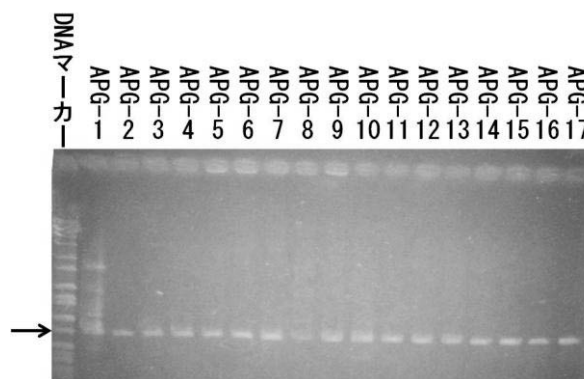


Fig. 5 形質転換中の導入遺伝子の確認. APG-1-17 から抽出したゲノム DNA を鋳型とし, 500 bp のサイズで増幅するように設計された GUS プライマーを用いた PCR 反応液の電気泳動結果. 矢印は 500 bp の位置を示す.

3.3 GUS 染色 *LjALMT1* promoter::GUS コンストラクトの導入が確認された形質転換体を挿し木で増やし, 200 μ M AlCl₃ 添加と非添加で栽培後に GUS 染色を行った. 代表的な染色結果 (APG-15) を Fig. 6 に示した. Al イオンを添加した水耕液で栽培された APG-15 では根の先端が染色された. 一方, Al イオン非添加時には染色は確認されなかった. APG5, 10, 11 は APG-15 と同様の染色パターンを示した (Table 1).

Table 1 APG 形質転換体の GUS 染色結果.

APG	2	4	5	6	7	8	10	11	14	15
Alイオン存在下	○	○	○	×	○	×	○	○	×	○
Alイオン非存在下	○	○	×	×	○	×	×	×	×	×

○は GUS 染色ポジティブ, ×は GUS 染色ネガティブを表す.



Fig. 6 形質転換体 (APG-15) の根の GUS 染色結果. A は AlCl_3 添加条件で栽培した根端. B は AlCl_3 非添加条件で栽培した根端. 青線は 1 mm を表す.

4. 考察

これまで、植物の Al イオン耐性機構はシロイヌナズナやコムギを中心に解析され、リンゴ酸分泌型の耐性機構に関わる ALMT1 や STOP1 が報告されている. 一方、主要作物の一つであるマメ科植物の Al イオン耐性機構は未知の部分が多い.

本研究では、*LjALMT1* 遺伝子の詳細な発現解析を実施し、*LjALMT1* 遺伝子はリンゴ酸分泌型の Al イオン耐性機構を有するシロイヌナズナの *AtALMT1* と同様に、Al イオン存在下、および根の先端で発現することを明らかにした. この結果から *LjALMT1* が Al イオン誘導性のリンゴ酸トランスポーターであり、Al イオン耐性機構に関与することが示唆された.

LjALMT1 遺伝子の発現パターンは *AtALMT1* 遺伝子と高い類似性を示したが、アミノ酸配列比較においては *AtALMT1* よりもダイズの *GmALMT1* と高い相同性 (75.4%) を示した. また、系統樹解析では *LjALMT1* は *GmALMT1* と独自のグループを形成していることに加え、膜貫通ドメイン予測結果でも *AtALMT1* とは異なり、6 個の膜貫通ドメインを有する点で一致していた. *GmALMT1* がリンゴ酸分泌型の Al イオン耐性機構に関わることは証明されていないが、高い類似性を示す *LjALMT1* が Al イオン誘導性であったことから、ダイズもリンゴ酸分泌型の Al イオン耐性機構を有することが予想される.

ダイズやミヤコグサに代表されるマメ科植物にとって、リンゴ酸は共生窒素固定のパートナーである根粒

菌に供給する炭素源でもある. また、根粒形成時にミヤコグサ ALMT1 の発現が誘導されることが報告されている⁽⁹⁾. そのため、ALMT1 は Al イオン耐性機構だけでなく、共生窒素固定においても重要な役割を有するのかもしれない.

謝辞

本研究で利用したミヤコグサゲノムクローン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) Sasaki M., Yamamoto Y. et al. : "A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter", *The Plant Journal.* 37: 645-653, 2004.
- (4) 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
- (5) Furukawa J., Yamaji N. et al. : "An aluminum-activated citrate transporter in Barley", *Plant Cell Physiol.* 48(8):1081-1091, 2007.
- (6) Shimomura K., Katada N., et al. : "Aluminum Ion Response Comparison between Domestic Lotus japonicus Lines", 神戸高専紀要, 48: 101-104, 2010.
- (7) Shimomura K. Nomura M. et al., : "Novel RING Finger Protein, is Required for Symbiotic Interactions Between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*", *Plant Cell Physiol.* 47, 1572-1581, 2006.
- (8) Yamaguchi M., Sasaki T. et al., : "Evidence for the Plasma Membrane Localization of Al-activated Malate Transporter (ALMT1) ", *Plant Cell Physiol.* 46, 812-816, 2006.
- (9) Kan T., Takanashi K. . et al., : "Expression and functional analysis of ALMT in *Lotus japonicas*", 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation