



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

STOP1

転写制御による植物の酸性土壌耐性機構に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2014-12-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 澤木, 宣忠 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/49026

STOP1 転写制御による
植物の酸性土壌耐性機構に関する研究

2013 年

岐阜大学大学院連合農学研究科

澤木 宣忠

STOP1 転写制御による
植物の酸性土壌耐性機構に関する研究

澤木 宣忠

目次

序論	3 頁
第 1 章 シロイヌナズナの Al、低 pH 耐性転写因子 AtSTOP1 が制御する下流遺伝子の探索	9 頁
第 2 章 ユーカリの Al 耐性遺伝子と AtSTOP1 ホモログ遺伝子との関連性	52 頁
結論	93 頁
要約	96 頁
謝辞	99 頁
引用文献	100 頁

序論

今日、世界の人口は 70 億人を超え(2011 年)、2050 年までには 90 億人を超えると見込まれる。しかし一方では飢餓が深刻化し、栄養不足の人は全世界において約 9 億人いると推定されている [FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)]。そのため食糧不足の解消が急務となっているが、世界的に作物の生産能力は限界となっているのが現状である。ひとつの理由としては、これまでの品種改良の結果、生産性や品質が十分に高くなったためにこれ以上の劇的な改良が期待できなくなっていることがある。そしてもうひとつは作物の耕地面積の拡大が困難になっていることである。これはひとえに、作物生産に適さない不良土壌が広く存在しているためである。一般にこのような土壌においては作物生産能力が著しく低下する。もし、このような土壌で作物生産を行い、収穫量を向上させることができれば、食糧不足の解消に向けた第一歩が踏み出せると考えられる。では、不良土壌はどのような種類があり、何が原因となって生育不良を引き起こしているのであろうか。また、不良土壌で作物を生産するためにはどうすればよいのであろうか。

世界の陸地面積は約 130 億ヘクタールと言われているが、農用地として利用されているのは約 15.5 億ヘクタールである (FAO, FAO Statistical Yearbook 2012)。しかし、農用地のうち、酸性土壌やアルカリ性土壌、乾燥地や重金属汚染土壌など約 70 %が不良土壌と言われている。この中で特に注目すべきものは、不良土壌のうち約 50 % (約 5 億ヘクタール)を占めている酸性土壌である。酸性土壌は世界中に広がっているが、特に熱帯や温帯など雨の多い地域に分布している。これは空気中の CO_2 が雨水に溶け、土壌中で弱酸性を示すようになるためである。さらに近年では、産業活動による窒素酸化物や硫黄酸化物が雨水に溶け込む酸性雨の影響、

窒素を多く含む肥料の投与による硝酸態の増加のため、土壌の酸性化は日々進行しているとも言われている。

このような背景から、酸性土壌で作物生産できるようになることは非常に意義が大きいと考えられ、これを実行するためには 2 つの方法がある。ひとつは土壌自体を改良すること、すなわち土壌の中和である。しかし、この方法では多量の中和用石灰や肥料が必要になる上、酸性土壌が発達途上国に多く分布していることから経済的にも現実的ではない。そこでもうひとつの方法として、植物の改良、すなわち植物への酸性土壌耐性の付与が挙げられる。これを行うためには、まず酸性土壌が植物に対しどのような影響を与えているのかを理解する必要がある。酸性土壌についての研究は 1960 年代から現在まで幅広く行われ、これまでにアルミニウム (Al) 毒性、マンガン (Mn) 毒性、鉄 (Fe) 毒性、リン酸欠乏、カルシウム (Ca) 欠乏、マンガン (Mn) 欠乏、カリウム (K) 欠乏が複合的に起きていることが知られている (von Uexküll and Mutert, 1995)。具体的には、低 pH によって可溶化された土壌中の金属イオン (Al^{3+} など)、あるいは水素イオン (H^+) が植物に直接害を与えていることがある。さらに間接的な害として、その可溶化した金属イオンとリン酸が結合し不溶化することで植物はリン酸を吸収できなくなる栄養欠乏、加えて土壌中の Ca や Mg などの塩基が H^+ とイオン交換され流出することで起こる栄養欠乏も同時に存在する。この中でも Al イオンについては特に毒性が強く、酸性土壌における作物生育の制限要因のひとつとなっており、精力的に研究が進められている。

Al は土壌中に最も多く存在している金属元素である。pH が中性の場合、Al は鉱物中のケイ酸と結合して不溶化しているが、pH の低下に伴い Al が可溶化し、交換性陽イオンとして土壌粒子に吸着される。pH 5 以下ではこれが溶出し、毒性の強い Al^{3+} となって植物に害を与える。大部分の Al は根端の表皮に集積し、またある一部は細胞内まで侵入することで障害を引き起こす。このため、Al イオンに

よる障害が顕著に表れるのは主根の伸長阻害であり、根端の分裂域にある細胞の伸長が阻害される。さらに側根の発生、褐色化、根が太くなる等の症状も表れることが知られている。一方、分子生物レベルでのこれらの障害応答機構は未解明の部分が多いが、Al による細胞内の変化についてはいくつか報告がある。

その1つ、Al 毒性に対する Ca イオンの役割についての研究は古くから行われている (Z. Rengel 1992, Z. Rengel and W.-H. Zhang, 2003)。Al が apoplasm に侵入すると細胞内 Ca イオン濃度が上昇することが知られている。さらに、Al 応答とされるカロース (1,3- β -glucan) の誘導や過酸化誘導、細胞骨格の変化は Ca の影響と関係があるとも言われている。カロースは Al によって上昇した細胞内 Ca が引き金となって 1,3- β -glucan synthase が活性化され、集積する (Krauss and Jeblick, 1991)。しかしこのカロースは Al 結合能がなく、どのような目的で合成されているかはよく解っていない。過酸化誘導については植物細胞のみならず、動物細胞でも細胞内 Ca が増加すると過酸化ストレスが起こるとの報告がある (Klyubin et al. 1996, Price et al. 1994)。この原因物質としては超酸化物 (superoxide) や過酸化水素 (hydrogen peroxide) があり、タンパク質の変性、変異、光合成阻害を引き起こすとされている。しかし、細胞内 Ca が引き金かどうかは不明であり、Al ストレスと過酸化ストレスとの関連性についても未解明の部分が多い。また、Al による応答として細胞骨格の変化がある。これらは主に微小管 (microtubule) や微小繊維 (microfilaments) が消失することによるもので、この結果、細胞分裂や細胞壁合成を阻害しているものと考えられている。なお、この応答は Ca シグナルのカスケードによるものとされている。これら Ca 以外の Al 応答として、細胞膜の表面荷電の脱分極や、核内における Al-クロマチン結合体の生成や紡錘体の消失による細胞分裂阻害、リグニンの合成などが知られている。

植物はこのような Al による障害を回避するため、いくつかの Al 耐性機構を持

っている (Kochian et al. 2004)。その 1 つとして、根端から有機酸を放出して Al をキレートし、無毒化する機構がある。放出する有機酸は植物種により異なるが、例えばクエン酸を放出するものとしてダイズ (Pellet, D.M. et al. 1995)、タバコ (Delhaize et al. 2001)、ニンジン (Ojima et al. 1984) などがある。また、コムギ (Delhaize et al. 1993) やシロイヌナズナ (Hoekenga OA et al., 2003) はリンゴ酸を、ソバはシュウ酸を放出することが知られている (Zheng et al. 1998)。有機酸放出の効果はこれだけではない。酸性条件下で Al と結合して不溶化したリン酸 Al は、有機酸が存在すると Al と有機酸でキレートを形成し、リン酸を再び遊離させることができる。これはリン酸欠乏の解消にも役立つ (Ryan et al. 2001)。このような報告から、植物により多くの有機酸を放出させることが Al 耐性付与になると考えられるようになった。このためには、有機酸合成量の増加と有機酸放出トランスポーターの発現増加の 2 つが必要となる。前者については、有機酸合成酵素の過剰発現体を作成したいくつかの報告がある。Fuente (1997) らはクエン酸合成酵素 (Citrate Synthase, CS) をタバコやパパイヤで過剰発現させたところ Al に耐性になったと報告している。また、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (Malate dehydrogenase) を過剰発現したアルファルファでは、有機酸合成が増加しただけではなく、Al にも耐性になった (Tesfaye et al. 2001)。あるいは CS をシロイヌナズナで過剰発現させたところ、リン酸 Al による低リン酸条件での生育が改善したという報告もある (Koyama et al. 2000)。一方、後者について有機酸放出のアニオンチャネルの探索が行われてきた。パッチクランプ法などにより、Al 応答アニオンチャネルの研究が行われてきた (Kochian et al. 2001) が、その働きをする遺伝子はこれまで単離されてこなかった。しかし近年、コムギにおいて Al によって活性化されるリンゴ酸トランスポーター、ALMT1 (Aluminum activated malate transporter) が単離され (Sasaki et al., 2004)、オオムギへの導入で Al 耐性が付与されることが報告さ

れた (Delhaize et al., 2004)。また、シロイヌナズナでもリンゴ酸トランスポーターが見つかり (Hoekenga OA et al., 2006)、さらにクエン酸トランスポーターがツルアズキ (*Vigna umbellata*)から発見された (Jian Li Yang et al., 2006)。今後は有機酸合成、放出の面から Al 耐性の付与が期待される。

また、pH すなわち H^+ の害も同時に存在する。多くの品種が存在するシロイヌナズナにおいて Al と低 pH で低 pH にのみ感受性を示す品種が報告されている (Ikka et al., 2007)。これは Al と pH の害は異なる機構であることを示唆しているが、この差についての詳しい報告はこれまでにない。ところで、低 pH に感受性を示すシロイヌナズナとして選抜されてきた変異体はその後、zinc finger protein 転写因子の変異であることが示され、AtSTOP1 (sensitive to proton rhizotoxicity 1) と名付けられた。この変異体は Al にも感受性であったことが報告されている (Iuchi et al., 2007)。しかし、この転写因子が制御している下流の遺伝子については調べられていない。

本研究では、STOP1 転写因子を中心とした Al、低 pH 耐性機構の解明を目的とした。第 1 章ではこの転写因子によって制御されている下流遺伝子の探索を行った。STOP1 が機能しないことで Al や低 pH に感受性になるということは、STOP1 が制御している遺伝子が働かなくなった (もしくは働いてしまった) 結果、感受性になった、ということである。Al や低 pH の耐性機構は複合的なものであり、そのような遺伝子を探索するためには、ゲノム科学的手法により遺伝子すべてを網羅的に調べる必要がある。これを行うための強力なツールにマイクロアレイがある。マイクロアレイは多くの遺伝子の転写解析を網羅的に行うことができるため、ゲノム全体の解析に非常に有用であり、トランスクリプトーム解析といわれる。近年は菌類、動物、植物と様々な生物種のゲノム配列が解読されてきたことから広く使われる手法となり、遺伝子探索の重要なツールとして使用されている。狂犬病ウ

ウイルスに対する抗ウイルス薬の応答遺伝子の探索にも使用されている (Masatani et al., 2010)。植物において、モデル植物のシロイヌナズナのマイクロアレイでは、ほぼすべての遺伝子が含まれている。Al ストレスのトランスクリプトーム解析により、リンゴ酸合成、およびその周辺の代謝遺伝子の変動を明らかにした (澤木 et al., 2008)。また、Al、塩、Cd、Cu のストレスをマイクロアレイから特異的に応答する遺伝子を明らかにし (Zhao, et al., 2009)、これらストレスの炭素代謝やアミノ酸代謝経路のプロファイルを解析した (Zhao, et al., 2010)。このように、STOP1 転写因子や Al や pH についてのトランスクリプトーム解析から STOP1 下流遺伝子を探索していく。第 2 章では、産業植物であるユーカリを材料に、Al、低 pH 耐性機構がモデル植物であるシロイヌナズナと共通のものなのか、またシロイヌナズナ STOP1 のホモログが存在し、かつその下流に Al 耐性遺伝子が存在するのか調べた。

第1章 シロイヌナズナの Al、低 pH 耐性転写因子 STOP1 が制御する下流遺伝子の探索

1-1 緒言

植物は、乾燥、塩、酸性土壌など、様々な環境ストレスに適応するために耐性メカニズムを働かせている (Seki et al., 2003; Kochian et al., 2004)。このようなシステムを分子生物学の観点で解明することにより、ストレス環境下であっても高生産できる作物を作出するための品種改良を効率的に発展させることが期待できる。このような背景において、酸性土壌で起こる植物根の Al^{3+} 、 H^{+} の毒性 (Kinraide, 2003)、マンガン過剰 (Horst, 1988)、リン酸欠乏 (Neumann et al., 1999)、などのストレスに対する耐性メカニズムは、品種改良における重要なターゲットとなる。それは、酸性土壌が世界の耕作可能な土地の 40% を占めており、生育阻害を起こしているためである。

Al 耐性に応答するいくつかの耐性遺伝子は、様々な種の植物から単離されている。 Al^{3+} を排除するメカニズムの重要な機構として有機酸放出があり、クエン酸やリンゴ酸を放出する。その機能を持つ遺伝子として有機酸トランスポーターがあり、リンゴ酸トランスポーターはコムギ (*Triticum aestivum*; TaALMT1 [Sasaki et al., 2004]) やシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*; AtALMT1 [Hoekenga et al., 2006]) から、クエン酸トランスポーターはモロコシ (*Sorghum bicolor*; Magalhaes et al., 2007) から同定された。他に、変異体研究から単離された ALS3 (Aluminum Sensitive 3) は、half type ATP-binding cassette transporter をコードし、Al 感受性の組織から Al を再配分する経路への関わりが示唆されている (Larsen et al., 2005)。他方、分子生理学の研究で、高親和性リン酸トランスポーターのように、

効率的なリン酸獲得を制御する鍵となる遺伝子が同定された (Mitsukawa et al., 1997)。しかし、 H^+ は様々な植物に対して高い毒性を示すにもかかわらず (Koyama et al., 1995; Yokota and Ojima, 1995; Kinraide, 2003; Watanabe and Okada, 2005)、マンガン毒性など他の酸性土壌のストレスに比較して、その分子生物学的知見はわずかしかない (Delhaize et al., 2003)。

根毒性の実験において、 H^+ と Al で傷害パターンは異なっており (Koyama et al., 1995)、さらに、酸性森林土壌の根伸長のモデリングによって、これら 2 つのストレス要因は区別された (Kinraide, 2003)。これらの報告は、 H^+ と Al の根毒性が、異なるプロセスによって傷害を引き起こしていることを示している。しかし、Al 耐性品種を用いたいくつかの実験では、数種の植物種において、 H^+ 耐性と Al 耐性は遺伝学的に関連していることを示唆していた (Rangel et al., 2005; Yang et al., 2005)。これらの報告は、 H^+ と Al の毒性メカニズムが異なった生物学的プロセスになっているが、いくつかの植物種では、 H^+ と Al のストレス耐性が場合によっては同じ遺伝因子で同時に調節されている可能性を示している。近年、井内らは H^+ 毒性と Al 毒性に超感受性を示すシロイヌナズナ *stop1* 変異体を単離した (Iuchi et al., 2007)。この変異体は分子レベルでの H^+ 耐性メカニズムや、 H^+ と Al の耐性メカニズムの相互関係を解析するためのよいモデルとなる可能性がある。このシロイヌナズナ *stop1* 変異体は、エチルメタンスルホン酸によって突然変異を誘発した集団から、低 pH 寒天培地を選抜指標とした root bending assay の結果、根伸長が阻害された個体として単離された (Iuchi et al., 2007)。興味深いことに、*stop1* 変異体は H^+ 感受性として単離されたにもかかわらず、Al に対しても超感受性を示した。その後のゲノム DNA 配列解析である Chromosome-walking の解析により、*stop1* 変異体は zinc finger protein のもっとも重要な Cys-2-His-2 モチーフの His 残基がミスセンス変異により Tyr 残基に置き換えられたことが判明した。また、

Al 耐性の重要な遺伝子の 1 つであるリンゴ酸トランスポーター、AtALMT1 (Hoekenga et al., 2006)も *stop1* 変異体で転写量が抑制されていた (Iuchi et al., 2007)。この *stop1* 変異体シロイヌナズナでは、重要な Al 耐性メカニズムである Al 応答リンゴ酸放出が停止している (Kobayashi et al., 2007)。しかし、ノックアウト変異体 (T-DNA 挿入ライン)を使用した逆遺伝学の実験では、H⁺には感受性を示さず、AtALMT1 が H⁺耐性メカニズムには含まれないことが示された (Kobayashi et al., 2007)。これらの結果は、STOP1 が H⁺と Al の超感受性に決定的に影響を与える他の遺伝子の発現を調節する機能を持つことを示唆している。近年、Liu et al. (2009)らは、シロイヌナズナの Al 耐性に関わる、multidrug and toxic compound exclusion protein ([AtMATE]; At1g51340)のような遺伝子も STOP1 によって制御されていると報告した。zinc finger protein は様々な機能を持っているが (Englbrecht et al., 2004)、これらの結果は STOP1 が Al や H⁺の耐性メカニズムを制御する、情報伝達経路に深くかかわる重要な因子であることを示し、Al 耐性の AtALMT1 (Iuchi et al., 2007)や、AtMATE (Liu et al., 2009)以外でも様々な耐性遺伝子を制御している可能性がある。

この研究では、*stop1* 変異体における Al と H⁺の超感受性の分子生理学的な特徴づけを行った。DNA マイクロアレイ解析は、AtALMT1 や ALS3 のような Al 耐性に重要な遺伝子や、低 pH に潜在的に貢献する、カリウムのようなイオン恒常性の生理過程に属する遺伝子が、*stop1* 変異体で複数、転写抑制されることを明らかにした。加えて、代謝物や転写物の総合的な解析では、植物の細胞質内 pH 制御とされる代謝経路、biochemical pH stat (Sakano, 1998)や γ -aminobutyric acid [GABA] shunt (Bouche and Fromm, 2004)経路の遺伝子、代謝産物も変異体で抑制されていることを明らかにした。興味深いことに、イオン恒常性と pH 制御代謝は、他の生物種、大腸菌 (Yohannes et al., 2004)や魚類 (Hirata et al., 2003)で低

pH 耐性に重要であることから、高等植物でもその可能性はある (Yan et al., 1992)。これらの結果は、STOP1 が酸性土壌の主なストレス要因の複合的な耐性メカニズムを制御し、*stop1* 変異体で転写抑制された H⁺耐性システムの数種類が他の生物種と類似していることを示している。

1-2 実験材料及び実験方法

シロイヌナズナアクセッション

シロイヌナズナ *stop1* 変異体は、エコタイプ Col-0 を ethyl methanesulfonate 処理で変異誘導させることによって得られた F2 集団である (Iuchi et al., 2007)。*AtALMT1*-KO (SALK_009629)、*STOP1*-KO (SALK_114108)、*ALS3*-KO (SALK_061074) の SALK T-DNA 挿入ノックアウト変異体は、Arabidopsis Biological Resource Center から入手したものである。Col-0 (JA58) and Col-4 (N933) は、それぞれ RIKEN Bio-Resource Center と Nottingham Arabidopsis Stock Center から入手したものである。STOP1 相補組換え体は、*stop1* 変異体に CaMV35S プロモーターを接続した STOP1 ベクター (CaMV35S::STOP1) を導入した組換え体であり、井内らによって作成されたものである (Iuchi et al., 2007)。

水耕栽培および生育試験

水耕生育試験は、井内らの報告と同条件で行った (Iuchi et al., 2007)。幼植物体は改変 MGRL 培地 (1/50 強度、Pi 除去、200 μ M CaCl₂、pH 5.5) を基本に、各ストレスの溶液を処理濃度となるように添加した。溶液は 1 日おきに更新し、根長を測定した。生育は 12 時間明期、光度 250 μ mol m⁻² s⁻¹、25 °C で 7 日間生育した。根長試験は野生型とノックアウト変異体の実生それぞれ 10 個体のうち、上位 3 個

体の根長データを使用した。一方、CaMV35S::AtALMT を *stop1* 変異体に導入した相補組換え体は 20 個体を使用した。

土耕試験法

土耕に使用した土は、東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター（川渡センター）で採取された酸性黒ボク土を使用した。この黒ボク土は、有機物とともに毒性アルミニウムが多く含まれている。対照となる褐色森林土（中性、無毒性アルミニウム）は蔵王で取得した。これらの土壌の特性は調べられており、Al、プロトンの植物への害も調べられている（Ikka et al., 2007）。土耕試験には、それぞれの土壌に多量元素、微量元素を添加し（Kobayashi et al., 2005）、さらに黒ボク土には CaCO₃ (60, 250, and 400 mg per 100 g of dry soil) で段階的に中和した。土壌 pH (Shoji et al., 1964) および 交換性 Al を測定した（Koyama et al., 2000）。

GFP の一過的発現解析

GFP (sGFP) は、植物のシステムに適合したコドンになるように配列を最適化したものを使用した（Chiu et al., 1996）。この GFP を AtSTOP1 配列の N 末端に接続するため、overlap PCR で GFP と AtSTOP1 を接続しつつ増幅した。GFP は pBE2113 (containing sGFP) を 鋳 型 に 、 SfiI-GFP (5'-CATTTGGCCAAATCGGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3'), GFP-NotI (5'-GGATTAGCGGCCGCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGTGAG-3') のプライマーで増幅した。また、AtSTOP1 は、RAFL (the RIKEN full-length cDNA clone [RAFL09-20I22; Seki et al., 2002] を 鋳 型 に 、 NotI-STOP1 (5'-ACAAGGGCGGCCGCATGGAAACTGAAGACGATTTGTGCAAC-3')、STOP1-SfiI

(5'-ACAAGGGCGGCCGCATGGAACTGAAGACGATTTGTGCAAC-3') のプライマーで増幅した。この増幅した DNA 断片をそれぞれ制限酵素 SfiI と NotI で切断し、同様に SfiI で切断した pBI2113SF ベクターに導入した。配列は DNA シーケンサーで確認した。このベクターをタマネギの表皮細胞にパーティクルガン法で導入し、細胞を 22°C で 12 時間インキュベート後、GFP の蛍光を観察した (Fujita et al., 2004)。

stop1 変異体の AtALMT1 相補試験

AtALMT1 の DNA 断片は、シロイヌナズナのゲノム DNA を鋳型に PCR で増幅した。増幅に使用したプライマーは、Forward: 5'-CATTTGGCCAAATCGGCCATGGAGAAAGTGAGAGAGATAGTGAGAGAAG-3'、Reverse: 5'-AGAACGGCCTTATGGCCTTACTGAAGATGCCATTACTTAATG-3' である。AtALMT1 は、バイナリーベクター pBE2113SF (Liu et al., 1998) の CaMV 35S プロモーターの下流に挿入した。このベクターを、stop1 変異体のシロイヌナズナに floral dip 法 (Clough and Bent, 1998) で導入し、得られた組換え体は、T1 植物体を自家受精させ、T2 世代を得た。

RNA およびメタボローム解析サンプル調製

実生を 200 μ M CaCl₂ 入り 1/50 強度 MGRL 水耕液 (pH 5.6) に播種し (Toda et al., 1999)、30 μ mol quanta m⁻² s⁻¹, 12 時間明期, 25°C の環境で、溶液は 1 日おきに更新した。10 日目の幼植物体を Al 溶液 (10 μ M AlCl₃ pH 5.0)、低 pH 溶液 (pH 4.5) に移した (Iuchi et al., 2007)。処理中は連続照明にし、移植 24 時間後に根をはさみで切断し、液体窒素で素早く凍結し、-80°C で保存した。RNA は鈴木らの方法で抽出した (Suzuki et al., 2004)。マイクロアレイに使用する RNA は、

Agilent 2100 Bioanalyzer を使用して分解程度を判定した。GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) と CE-MS (capillary electrophoresis-mass spectrometry) の代謝物測定に使用するサンプルは、50% エタノールと Qiagen Mixer Mill MM300 kit で抽出した。その後、GC-TOF-MS (for GC-time of flight-mass spectrometry)、CE-MS の陽イオン性、陰イオン性分離画分を N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide で前処理した (Urano et al., 2009)。

RT-PCR および定量 RT-PCR

RT-PCR は、小林らの方法で行い (Kobayashi et al., 2007)、定量 RT-PCR はリアルタイム PCR (Applied Biosystems 7300) をプロトコルに従い使用した。遺伝子の転写量は、ユビキチン UBQ1 の転写量をコントロールにして標準化したのち、野生型と比較した。プライマー配列は、Table 1 に示した。

マイクロアレイおよびデータ解析

マイクロアレイは Agilent のマイクロアレイチップ Arabidopsis 3 をプロトコルに従い、Cy3 と Cy5 の 2 色法で行った。ハイブリダイゼーションの組合せは、Col-4 のコントロール (-Al, pH 5.0, 24 h) とストレス処理 (-Al, pH 4.5, 24 h または 10 μ M Al solution, pH 5.0, 24 h)、Al、低 pH ストレス処理の Col-0 と *stop1* 変異体、および Al ストレス処理の Col-0 と *AtALMT1-KO* の 5 種である。それぞれのマイクロアレイ実験は、色素を入れ替えたダイスワップを含め、独立した 3 反復の実験を行っている。なお、野生型の Col-0 と Col-4 の Al と低 pH 耐性程度は非常に似ている (Ikka et al., 2007)。マイクロアレイに関する cDNA 合成、cRNA 合成、Dye ラベル化は Agilent の Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS

Table 1. *Primer sequences used for quantitative RT-PCR of the markedly down-regulated genes of the stop1-mutant.*

Name		Sequence (5'-)	T _m (°C)	Annealing temp. (°C)
At1g08430	F	GGCCGACCGTGCTATACGAG	62.5	53.0
	R	GAGTTGAATTACTTACTGAAG	50.7	
At1g08430-2	F	GGCCGACCGTGCTATACGAG	62.5	53.0
	R	CATGAGTCCTGTGAACCTCC	58.4	
At1g30270	F	CAGTCGACATAAGCTGTTTACTTTT	55.6	53.0
	R	GAATCTCAGCGTCCGACAATATAGAA	58.9	
At1g34370	F	CATCAGCCAGTACATCTACTCAGA	58.8	53.0
	R	ATGGCAATGCCTTAGAGACTAGTA	57.1	
At1g51830	F	ATGTGTATGACCGAAAATGGTACCCGATC	61.9	53.0
	R	CCTCCATTACATTGCTCGGGGCTTAAGT	63.4	
At1g51840	F	TTAATAAACACTGGGAAGACT	50.7	53.0
	R	ACCGCTTTGAGTAGCGTATACA	56.7	
At1g67325	F	AAGACAAGATCCACGAGGACGAC	60.5	53.0
	R	GTCTGAGACATGTTTGGGGTGTG	60.5	
At1g77760	F	GGTTTATAAAGTGAAGCTGTCTTAG	57.2	53.0
	R	CTATAACAAAAGTGCCCAAATAACC	55.6	
At2g18480	F	AAGGCGATCACGACAGGGGCGTG	67.3	53.0
	R	TTATGAGAAACCCCAATAGAGATG	57.2	
At2g19900	F	GTGTTCTGTCCTTACGCGTGTTCCTGT	63.4	53.0
	R	GCAAGTGGCTATTCTGTTAACTTCTGTG	62.0	
At2g19900a	F	CACATACCGTCTCTACCGTTGA	58.6	60.0
	R	GAGAGATCTTGGCATGTGTTGA	56.9	
At2g28270	F	AGAGAGATGGCGATAATACATCAAC	57.2	53.0
	R	ATGGTCTCCCAAGATTCAATTT	57.2	
At2g37330	F	TAGTGATCTCTCTGTCTCCGGTTTT	58.8	53.0
	R	GTTTCAATCTGAGGAGAAGACATGA	57.2	
At2g37330a	F	TATCGATCCTTGCCGGGACTTCA	60.5	60.0
	R	GCTTGTCTTGGCGTTGCTCTA	60.4	
At2g37570	F	AGAGATCCCATTTATCAAACCGAATC	57.2	53.0
	R	CCCATTAACAGTGAAAACGCCTA	57.2	
At2g41380	F	GCGTATCAGACGGCTAAGGAGA	60.4	53.0
	R	CCAGGAATGCTGGAACGACAAAGTT	60.5	
At3g05400	F	TAGCTGGGAGTTTAGTGACCATAGC	60.5	53.0
	R	AATTTATGGATACGATCGAAGCCGA	57.2	
At3g22200a	F	TGTTAGTCCGTGTTGCAGGTGA	58.6	60.0
	R	CACCTCTTGTGCTGAGCCTTGA	58.6	
At3g28345	F	GCTTTGGACAGCCAGTCGGAACGTG	65.4	53.0
	R	TGATTACAAATAATTTCAATAGCGA	50.6	
At4g13420	F	GCGAGAGAGAAAGGGATGGTTTATC	60.5	53.0
	R	TCCCCTAAACATGGAGACACTTTAT	57.2	
At5g02480	F	ACTTTCAAGCTGGTTGATCAGATGG	58.8	53.0
	R	TGGTTAAATACAACCTTGCTCTGAAG	55.6	
At5g06860	F	TAAACCAAGCTTATCTCTAGGATTA	53.9	53.0
	R	CCATCAAATAAAACATTTTGAATGTGC	54.9	
At5g07440a	F	AGGAGTGACAGTGAGTTACTTCG	58.7	60.0
	R	TGGCTCGAGCGACTCGGTTA	60.4	
At5g11670	F	GCACAAGTGACAGAAGAGCATTAC	58.8	53.0
	R	GAGAGTTCAAAACAGCATCATAATG	57.3	
At5g11670a	F	AGCATTACGCCAATGGTCTGATCTA	58.8	60.0
	R	TTGACGCCAATCCGAGGTCATA	60.5	

(Table continues on following page.)

Table 1. (Continued from previous page.)

Name		Sequence (5'-)	T _m (°C)	Annealing temp. (°C)
At5g17330	F	ACAGGAAGAAGACGAGTGGTAT	56.7	53.0
	R	GAAACTTGGTT CAGT AAT AAAGGGA	55.6	
At5g18170	F	GAAGGTGAACGATGAGCTAAAGACT	58.8	53.0
	R	GCGTCTTCTAGTACTTGTAAACACA	57.2	
At5g18170a	F	GTGGCTCAAGCTACCATTCCTCAGA	60.5	60.0
	R	CTGTAACTCAGGATGACCTCTA	56.9	
At5g19600	F	CCTTCTTCTTAGTTATTAGTGGGAA	55.6	53.0
	R	GAAATTTTCATTTATCGCTTCTTGC	53.9	
At5g22890	F	CGTTTCTTTGTTTTGGGCCACGTA	58.8	53.0
	R	TCTATGCATGATACCCATCAGAACCC	58.8	
At5g27920	F	GGGTCAAGACGTTGACTTAGTTC	58.8	53.0
	R	TATGGATCCAAACAAACCGCTACTA	57.3	
At5g47560	F	GCATATAGAGATCAAAGACATGATC	55.6	53.0
	R	GACCTCATCTAAATTTCCCATCCA	57.2	
At5g51980	F	TGTATACAAACACTCACTGATCATT	53.9	53.0
	R	TCTTTGACGATAGCATCAAACCTTC	55.6	
At5g35410	F	GAGGGATTATCTTCGATCAAGGCCG	62.1	53.0
	R	CAAGAAGCAAATCTTCCAATCTCCC	58.8	
At5g38200	F	GTTTCATGTGAATGAATCGCATGCA	57.2	53.0
	R	TCATTGTTGGATCTACATCAGCAAT	55.6	
At5g66650	F	CGGATTAGGCCTAATAATGGCC	58.6	53.0
	R	AAGAATTACGATCAACAACGACCAG	57.2	
At3g52590 (internal std.)	F	TCGTAAGTACAATCAGGATAAGATG	55.6	53.0
	R	CACTGAAACAAGAAAAACAAACCCT	55.6	
At3g52590a (internal std.)	F	AGAGCTGTCAACTGCAGGAAGAA	58.7	60.0
	R	ACAAGAAAAACAAACCCTATCAAAGG	55.8	

T_m indicates melting temperature calculated with GC% method.

At1g08430-2 primer is used for RT-PCR in Fig. 4.

At2g37330a primer is used for Real-time RT-PCR in Fig. 3.

At2g19900a, At3g22200a, At5g07440a, At5g11670a, At5g17330, At5g18170a and At3g52590a primer is used for real time RT-PCR in Fig. 6.

を使用した。Agilent マイクロアレイスキャナー (G2565BA) で得られた画像は、Feature Extraction version 9.5.1 software (Agilent) で数値化した。マイクロアレイのデータマイニングと統計計算は GeneSpring GX version 7.3.1 (Agilent) を用いた。マイクロアレイデータの quality control として、スポットの形状データを GeneSpring により flags (low intensity, not uniform, abnormal in the background; http://www.chem.agilent.com/cag/bsp/products/gsgx/downloads/pdf/FE_Plugin.pdf)としてマークされたスポットデータを除外した。複数の処理区 (wild type in Al and low-pH treatments または comparisons between the stop1 mutant and the wild type) で 2 つ以上のフラグデータが入っていた場合、その遺伝子はデータマイニングから除外した。Al、低 pH 処理において、*stop1* 変異体で野生型と比較した際、Fold Change (FC)で全ての検出された遺伝子データの下位 1%に含まれた遺伝子を、著しく転写抑制された遺伝子と定義した。

メタボローム解析

GC-TOF-MS 分析は、LECO Pegasus III mass spectrometer (Agilent) に接続された Agilent 6890 GC system で行った。一方、CE-MS 分析は Agilent 1100 series MSD mass spectrometer を接続した、Agilent CE system で行った。CE-MS による陰イオンの検出、および GC-TOF-MS による検出は、Urano et al. (2009) の方法に従った。検出されたピークは、既知の化合物(有機酸、アミノ酸)の理論上の M_r 値、または化合物の標品から直接検出した値と照合した。それぞれのピークの強度を fresh weight で標準化した。それぞれの処理区サンプルに対し、独立した 3 回の実験を行い、Excel で統計解析を行った。代謝物の比較値 (例: ratio of normalized peaks of *STOP1-KO* /wild type, pH 4.5) は代謝物のパスウェイマップに統合した。

1-3 実験結果

トランスクリプトームによる代謝関連遺伝子の Al 応答

様々なイオンストレスで 24 時間処理した植物体のリンゴ酸含量を測定したところ、Al で約 3 倍、Al のミミックとして働く La、Er で約 2 倍増加したが、逆に低 pH や Na、重金属処理では半分以下に減少した。また、Al の濃度が増えるに従いリンゴ酸含量も増加していたことから、Al 処理することで特異的にリンゴ酸が合成、蓄積する傾向にあると考えられた。この結果からリンゴ酸合成に関わる遺伝子が、Al 処理によって変動していると予想されたため、Al 処理のマイクロアレイデータを代謝マップにあてはめて代謝系の転写変動を調べた (Fig. 1a)。代謝系全体では二次代謝、硫黄代謝に関わる遺伝子の転写量が増加していた。窒素代謝・アミノ酸代謝では glutamate dehydrogenase をはじめとするグルタミン酸や、セリン、GABA の合成経路で顕著な増加を示していた。リンゴ酸に関わる遺伝子では、TCA サイクル内の遺伝子はやや転写が抑えられているのに対し、Malic enzyme、Malate dehydrogenase、PEP carboxykinase など TCA サイクル周辺の遺伝子が高い転写量を示していた (Fig. 1b)。次に、Al による代謝変動を調べたところ、グルタミン酸が減少し、アスパラギン酸が増加していた。以上から、Al 処理によるリンゴ酸増加はセリン経路やグルタミン酸からアスパラギン酸を経由する経路など、TCA サイクルのバイパスとなる経路が重要な役割をしていることが示唆された。

トランスクリプトームによる stop1 変異体で転写抑制された遺伝子の同定

以前の報告では、Al 耐性に重要な遺伝子の 1 つは AtALMT1 であり、Al 処理の stop1 変異体で AtALMT1 は著しく転写抑制された (Iuchi et al., 2007)。

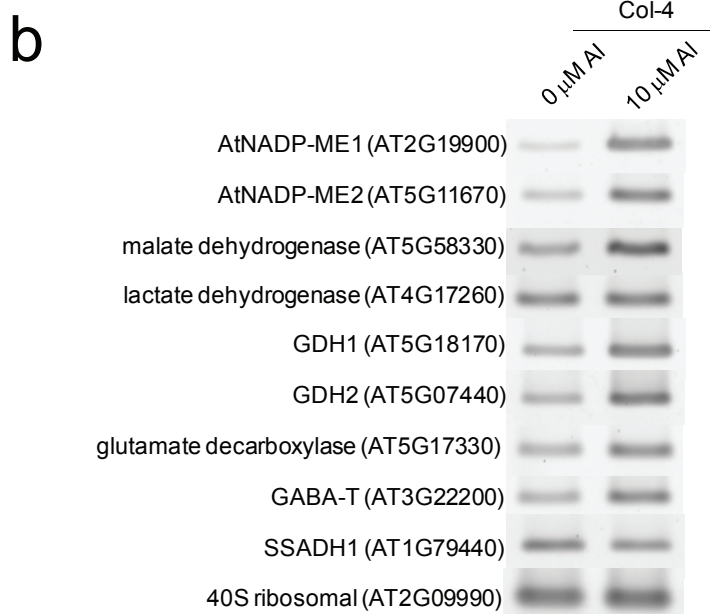
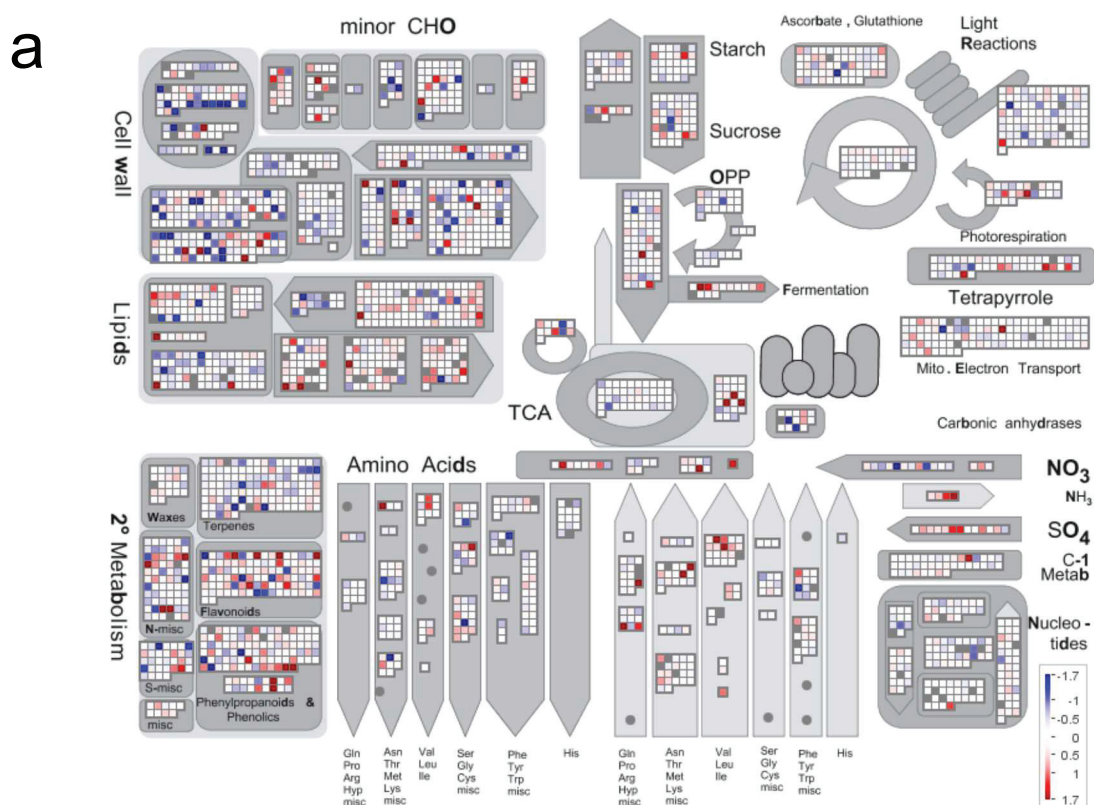


Figure 1. (a) Metabolism overview by transcriptome in *Arabidopsis* roots treated by 10 μ M Al for 24 hours. The color indicated up (red) and down (blue) regulations, or no change (white), compared 10 μ M Al treated sample for 24 hours with control one. The scale is shown in log2. The result is displayed using the MapMan software. (b) Expression of malate, glutamate and GABA pathway genes in the roots of *Arabidopsis thaliana* with aluminum treatment. Each transcript was quantified by quantitative RT-PCR with specific primers. Amplicons were stained by SYBR green I. 40S ribosomal are shown as control.

しかし、AtALMT1 は H⁺耐性には貢献していなかった (Kobayashi et al., 2007)。この結果は、STOP1 が AtALMT1 以外の Al と H⁺耐性遺伝子の転写調節シグナル伝達に関わっていることを示唆している。これを調べるため、またその遺伝子を特定するため、遺伝子の転写量を網羅的に調べる DNA マイクロアレイを行った。最初に、Al、H⁺ストレスを受けた野生型と *stop1* 変異体で転写量を比較し、*stop1* 変異体で、より転写抑制された遺伝子を決定するため、転写量を比較するマイクロアレイを行った。独立した 3 回の実験を行い、Al、H⁺処理それぞれにおいて、*stop1* 変異体で著しく転写抑制された遺伝子を fold change (FC) 値、(*stop1* 変異体 / 野生型) で選抜を行った。3 回の実験すべてにおいて下位 1% に含まれた遺伝子は再現可能な転写抑制遺伝子とし、Al では 101、H⁺では 45 の遺伝子が選抜された (Fig. 2a)。これらの遺伝子のうち、Al と H⁺処理の両方で転写抑制されたのは、32 遺伝子であった。

ここで、*stop1* 変異体で転写抑制された遺伝子の中には、成長が野生型よりも大幅に阻害されたことにより転写抑制された、成長に関連する遺伝子が含まれている可能性がある。このような遺伝子は、Al や H⁺処理によって転写抑制されることで生育が悪くなると考えられる。そこで、Al 処理 / control や H⁺処理 / control の野生型のストレス誘導マイクロアレイを行い、FC 値でそのような遺伝子を選抜した。選抜の効果を最大限にするために、処理区において有意に転写抑制された遺伝子 (FC <1、かつ *t*-test で $P < 0.05$) と、FC が 0.8 以下の遺伝子を除いた。この結果、Al で 64 個、H⁺で 28 個 (重複 19 個を含む) の遺伝子がリストから除かれた (Fig. 2a、Table 2)。このようにして残った遺伝子を、*stop1* 変異体で有意に転写抑制された遺伝子とした。その半分以上は、AtALMT1 の T-DNA 挿入ノックアウトライン (AtALMT1-KO) の Al 処理で転写抑制 (FC [AtALMT1-KO / 野生型] <1、かつ *t*-test で $P < 0.05$ または FC <0.8) されており (Table 2、Table 3)、

Table 2. List of down-regulated genes in the *stop1*-mutant among down-regulated or stable genes in WT under Al and low pH conditions.

AGI code	Fold change (<i>stop1</i> -mutant or <i>At4LMT1</i> -KO/WT)				Fold change in the WT with Al or low pH treatments (treatment/control)				Description		
	Al <i>stop1</i> -mutant		low pH <i>stop1</i> -mutant		Al		low pH				
	FC $\pm$ SD	P-value	FC $\pm$ SD	P-value	FC $\pm$ SD	P-value	FC $\pm$ SD	P-value			
Repressed in <i>stop1</i> -mutant, and down-regulated or stable in WT with Al and low pH treatments; 19 genes											
At1g51830	0.02 $\pm$ 0.00	0.001	0.10 $\pm$ 0.03	0.007	0.98 $\pm$ 0.14	0.830	2.65 $\pm$ 0.75	0.026	0.63 $\pm$ 0.22	0.147	ATP binding / kinase/ protein serine/threonine kinase
At1g51850	0.10 $\pm$ 0.01	0.000	0.43 $\pm$ 0.07	0.014	0.87 $\pm$ 0.12	0.226	0.45 $\pm$ 0.16	0.054	0.38 $\pm$ 0.05	0.005	putative, leucine-rich repeat protein kinase
At1g52070	0.01 $\pm$ 0.00	0.000	0.03 $\pm$ 0.02	0.013	1.04 $\pm$ 0.15	0.668	0.40 $\pm$ 0.21	0.083	0.05 $\pm$ 0.01	0.001	jacalin lectin family protein
At1g56430	0.31 $\pm$ 0.02	0.001	0.37 $\pm$ 0.16	0.053	2.01 $\pm$ 0.32	0.016	0.16 $\pm$ 0.01	0.001	1.07 $\pm$ 0.10	0.338	NAS4 (nicotianamine synthase 4)
At1g67325	0.24 $\pm$ 0.02	0.001	0.25 $\pm$ 0.01	0.001	1.00 $\pm$ 0.14	0.977	0.93 $\pm$ 0.08	0.253	0.80 $\pm$ 0.13	0.140	RanBP2-type zinc finger protein
At1g80240	0.06 $\pm$ 0.01	0.001	0.30 $\pm$ 0.09	0.021	0.95 $\pm$ 0.13	0.569	0.83 $\pm$ 0.09	0.086	0.32 $\pm$ 0.05	0.007	unknown protein
At2g3480	0.31 $\pm$ 0.05	0.007	0.39 $\pm$ 0.09	0.018	1.03 $\pm$ 0.15	0.798	0.72 $\pm$ 0.17	0.139	0.51 $\pm$ 0.18	0.074	PER26 (peroxidase 26 precursor)
At2g44110	0.29 $\pm$ 0.02	0.001	0.38 $\pm$ 0.02	0.001	0.98 $\pm$ 0.34	0.915	0.38 $\pm$ 0.05	0.007	0.35 $\pm$ 0.02	0.001	MLO15 (mildew resistance locus 15)
At3g0380	0.08 $\pm$ 0.04	0.011	0.29 $\pm$ 0.11	0.028	1.23 $\pm$ 0.18	0.129	0.85 $\pm$ 0.09	0.109	0.58 $\pm$ 0.30	0.193	MATH domain-containing protein
At3g28345	0.15 $\pm$ 0.01	0.000	0.26 $\pm$ 0.05	0.006	1.24 $\pm$ 0.18	0.123	0.65 $\pm$ 0.40	0.312	1.29 $\pm$ 0.24	0.139	MDR13 (ABC transporter family protein)
At3g46270	0.12 $\pm$ 0.02	0.001	0.28 $\pm$ 0.04	0.004	0.73 $\pm$ 0.18	0.089	0.35 $\pm$ 0.03	0.002	0.49 $\pm$ 0.19	0.078	receptor protein kinase-related
At3g46280	0.08 $\pm$ 0.02	0.003	0.25 $\pm$ 0.06	0.008	0.79 $\pm$ 0.12	0.111	0.34 $\pm$ 0.07	0.010	0.29 $\pm$ 0.04	0.004	receptor protein kinase-related
At3g50640	0.18 $\pm$ 0.03	0.003	0.41 $\pm$ 0.05	0.006	0.50 $\pm$ 0.08	0.016	0.31 $\pm$ 0.07	0.012	0.15 $\pm$ 0.03	0.005	unknown protein
At3g61940	0.21 $\pm$ 0.05	0.007	0.24 $\pm$ 0.12	0.033	2.90 $\pm$ 0.76	0.002	0.04 $\pm$ 0.00	0.000	0.36 $\pm$ 0.03	0.003	ATMTPA1 (zinc transporter family)
At4g0670	0.11 $\pm$ 0.01	0.001	0.31 $\pm$ 0.07	0.012	1.15 $\pm$ 0.16	0.233	2.20 $\pm$ 0.42	0.019	0.52 $\pm$ 0.04	0.004	unknown protein
At5g03860	0.29 $\pm$ 0.06	0.010	0.42 $\pm$ 0.05	0.005	2.09 $\pm$ 0.52	0.007	0.39 $\pm$ 0.05	0.006	0.69 $\pm$ 0.10	0.046	Malate synthase
At5g5460	0.03 $\pm$ 0.00	0.001	0.22 $\pm$ 0.11	0.030	0.92 $\pm$ 0.13	0.391	2.84 $\pm$ 0.53	0.010	0.30 $\pm$ 0.05	0.006	unknown protein
At5g7920	0.15 $\pm$ 0.02	0.002	0.15 $\pm$ 0.00	0.000	0.99 $\pm$ 0.18	0.950	1.26 $\pm$ 0.23	0.161	0.90 $\pm$ 0.20	0.504	similar to FBL3 (F-box family protein)
At5g8784	0.12 $\pm$ 0.02	0.002	0.29 $\pm$ 0.12	0.032	0.46 $\pm$ 0.08	0.015	0.60 $\pm$ 0.19	0.103	0.39 $\pm$ 0.05	0.007	dehydrodolichyl diphosphate synthase 5
Repressed in <i>stop1</i> -mutant, and down-regulated or stable in WT with Al treatment; 45 genes											
At1g01750	0.15 $\pm$ 0.02	0.001	0.45 $\pm$ 0.21	0.088	0.33 $\pm$ 0.07	0.004	0.29 $\pm$ 0.06	0.010	0.27 $\pm$ 0.06	0.010	ADF10 (actin-depolymerizing factor 10)
At1g05250	0.12 $\pm$ 0.08	0.025	0.53 $\pm$ 0.23	0.114	1.54 $\pm$ 0.23	0.037	0.14 $\pm$ 0.01	0.001	0.08 $\pm$ 0.01	0.001	PER2 (peroxidase 1/2 precursor)
At1g12090	0.28 $\pm$ 0.02	0.001	0.80 $\pm$ 0.10	0.089	0.50 $\pm$ 0.08	0.017	0.33 $\pm$ 0.11	0.026	0.25 $\pm$ 0.05	0.007	ELP (extensin-like protein)
At1g14220	0.20 $\pm$ 0.07	0.014	0.66 $\pm$ 0.21	0.147	0.83 $\pm$ 0.13	0.171	0.39 $\pm$ 0.03	0.002	0.27 $\pm$ 0.03	0.003	similar to RNS3 (ribonuclease 3)
At1g25500	0.15 $\pm$ 0.04	0.006	0.96 $\pm$ 0.18	0.720	0.99 $\pm$ 0.14	0.924	0.33 $\pm$ 0.12	0.034	0.68 $\pm$ 0.29	0.240	ATLIC (RING-H2 finger protein ATL1C precursor)
At1g23750	0.23 $\pm$ 0.03	0.003	0.51 $\pm$ 0.16	0.059	0.51 $\pm$ 0.08	0.018	0.40 $\pm$ 0.13	0.037	0.26 $\pm$ 0.08	0.016	DNA-binding protein-related
At1g27140	0.07 $\pm$ 0.03	0.008	0.49 $\pm$ 0.10	0.024	0.21 $\pm$ 0.07	0.001	0.53 $\pm$ 0.24	0.127	0.24 $\pm$ 0.06	0.011	ATGSTU14 (glutathione S-transferase TAU 14)
At1g30870	0.08 $\pm$ 0.03	0.007	0.68 $\pm$ 0.15	0.088	0.30 $\pm$ 0.07	0.001	0.10 $\pm$ 0.02	0.002	0.10 $\pm$ 0.02	0.003	PER7 (peroxidase 7 precursor)
At1g48930	0.15 $\pm$ 0.01	0.000	0.76 $\pm$ 0.12	0.096	0.42 $\pm$ 0.09	0.003	0.16 $\pm$ 0.03	0.003	0.17 $\pm$ 0.04	0.006	ATGH9C1 (glycosyl hydrolase 9C1)
At1g49030	0.11 $\pm$ 0.04	0.009	0.50 $\pm$ 0.17	0.069	0.24 $\pm$ 0.08	0.002	0.48 $\pm$ 0.04	0.004	0.54 $\pm$ 0.10	0.029	unknown protein
At1g49860	0.29 $\pm$ 0.03	0.002	0.63 $\pm$ 0.26	0.180	1.06 $\pm$ 0.30	0.738	0.29 $\pm$ 0.14	0.041	0.85 $\pm$ 0.24	0.414	ATGSTF14 (glutathione transferase)
At1g64770	0.30 $\pm$ 0.02	0.001	0.83 $\pm$ 0.10	0.117	0.71 $\pm$ 0.10	0.056	0.82 $\pm$ 0.21	0.310	0.55 $\pm$ 0.07	0.013	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
At1g75780	0.30 $\pm$ 0.03	0.002	0.67 $\pm$ 0.06	0.014	0.72 $\pm$ 0.11	0.059	0.49 $\pm$ 0.24	0.118	0.24 $\pm$ 0.06	0.009	TUB1 (Tubulin beta-1 chain)
At2g04160	0.21 $\pm$ 0.03	0.003	0.54 $\pm$ 0.11	0.036	1.30 $\pm$ 0.19	0.087	0.43 $\pm$ 0.21	0.088	0.17 $\pm$ 0.04	0.006	AIR3 (auxin-induced in root cultures 3)
At2g5810	0.13 $\pm$ 0.04	0.006	0.68 $\pm$ 0.15	0.095	0.28 $\pm$ 0.06	0.005	0.51 $\pm$ 0.04	0.005	0.59 $\pm$ 0.15	0.069	TIP4;1 (tonoplast intrinsic protein 4;1)
At2g73770	0.28 $\pm$ 0.07	0.012	0.62 $\pm$ 0.11	0.046	0.75 $\pm$ 0.11	0.072	0.63 $\pm$ 0.00	0.000	0.60 $\pm$ 0.09	0.029	integral membrane family protein
At2g34180	0.25 $\pm$ 0.04	0.004	1.45 $\pm$ 0.45	0.171	1.54 $\pm$ 0.30	0.019	0.60 $\pm$ 0.05	0.009	0.78 $\pm$ 0.31	0.384	CIPK13 (CBL-interacting protein kinase 13)
At2g39430	0.32 $\pm$ 0.04	0.005	0.57 $\pm$ 0.14	0.059	0.79 $\pm$ 0.12	0.085	0.25 $\pm$ 0.08	0.016	0.17 $\pm$ 0.01	0.000	disease resistance-responsive protein-related
At3g10710	0.27 $\pm$ 0.12	0.034	0.75 $\pm$ 0.26	0.275	1.50 $\pm$ 0.24	0.046	0.25 $\pm$ 0.10	0.024	0.29 $\pm$ 0.13	0.036	pectinesterase family protein
At3g43960	0.27 $\pm$ 0.05	0.007	0.60 $\pm$ 0.08	0.021	0.64 $\pm$ 0.09	0.033	0.51 $\pm$ 0.10	0.026	0.34 $\pm$ 0.04	0.004	putative cysteine proteinase
At3g59370	0.17 $\pm$ 0.04	0.006	0.46 $\pm$ 0.09	0.018	0.24 $\pm$ 0.06	0.008	0.48 $\pm$ 0.20	0.085	0.36 $\pm$ 0.11	0.027	unknown protein

(Table continues on following page.)

Table 2. (Continued from previous page.)

AGI code	Fold change (<i>stop1</i> -mutant or <i>AtALMT1</i> -KO/WT)				Fold change in the WT with Al or low pH treatments (treatment/control)				Description
	Al <i>stop1</i> -mutant		low pH <i>stop1</i> -mutant		Al		low pH		
	FC ± SD	P-value	FC ± SD	P-value	FC ± SD	P-value	FC ± SD	P-value	
Repressed in <i>stop1</i> -mutant, and down-regulated or stable in WT with Al treatment; 45 genes (Continued from previous page.)									
At4g00080	0.16 ± 0.03	0.002	0.68 ± 0.18	0.127	0.91 ± 0.13	0.345	0.73 ± 0.04	0.009	UNE11 (unfertilized embryo sac 11)
At4g01950	0.22 ± 0.03	0.002	0.68 ± 0.19	0.139	0.53 ± 0.08	0.019	0.60 ± 0.04	0.006	ATGPA13 (glycerol-3-phosphate acyltransferase 3)
At4g10350	0.32 ± 0.02	0.001	0.49 ± 0.17	0.066	0.89 ± 0.18	0.376	0.37 ± 0.04	0.003	ANAC070 (NAC domain containing protein 70)
At4g19030	0.25 ± 0.05	0.008	0.59 ± 0.03	0.003	0.57 ± 0.09	0.023	0.34 ± 0.10	0.024	NIP1;1 (NOD26-like intrinsic protein 1;1)
At4g25560	0.31 ± 0.03	0.003	0.73 ± 0.09	0.048	0.91 ± 0.13	0.365	0.58 ± 0.08	0.020	ATMYB18 (MYB domain protein 18)
At4g26010	0.10 ± 0.05	0.014	0.86 ± 0.29	0.501	0.79 ± 0.14	0.087	0.14 ± 0.04	0.008	PER44 (peroxidase 44 precursor)
At4g31470	0.18 ± 0.05	0.008	0.59 ± 0.11	0.041	0.41 ± 0.08	0.004	0.20 ± 0.02	0.002	putative pathogenesis-related protein
At4g31940	0.13 ± 0.09	0.032	0.34 ± 0.25	0.105	1.09 ± 0.35	0.654	0.04 ± 0.01	0.005	CYP82C4 (cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 4)
At4g33880	0.13 ± 0.04	0.008	0.51 ± 0.07	0.013	0.56 ± 0.10	0.028	0.18 ± 0.03	0.004	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
At4g34580	0.16 ± 0.04	0.007	0.59 ± 0.14	0.056	0.83 ± 0.13	0.178	0.13 ± 0.02	0.001	similar to SEC14 cytosolic factor family protein
At4g34930	0.34 ± 0.01	0.000	0.67 ± 0.15	0.087	0.71 ± 0.11	0.049	0.72 ± 0.10	0.060	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase-related
At4g37160	0.17 ± 0.02	0.001	0.41 ± 0.13	0.035	0.48 ± 0.08	0.017	0.37 ± 0.21	0.085	SKS15 (SKU5 Similar 15)
At5g05500	0.32 ± 0.03	0.002	0.82 ± 0.11	0.117	0.50 ± 0.08	0.017	0.19 ± 0.04	0.005	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
At5g12940	0.32 ± 0.01	0.000	0.50 ± 0.10	0.027	1.05 ± 0.15	0.619	0.80 ± 0.22	0.285	leucine-rich repeat family protein
At5g15150	0.21 ± 0.05	0.008	0.72 ± 0.08	0.033	0.73 ± 0.19	0.096	0.29 ± 0.08	0.016	ATHB-3 (arabidopsis thaliana homeobox 3)
At5g24070	0.21 ± 0.03	0.002	0.48 ± 0.16	0.061	0.61 ± 0.22	0.096	0.10 ± 0.03	0.004	PER61 (peroxidase 61 precursor)
At5g24100	0.26 ± 0.06	0.011	0.60 ± 0.08	0.022	1.07 ± 0.15	0.517	0.49 ± 0.08	0.015	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
At5g42180	0.28 ± 0.05	0.007	0.62 ± 0.08	0.024	0.90 ± 0.13	0.308	0.27 ± 0.08	0.014	PER64 (peroxidase 64 precursor)
At5g44020	0.31 ± 0.05	0.005	1.04 ± 0.14	0.668	1.07 ± 0.15	0.513	0.22 ± 0.11	0.029	acid phosphatase class B family protein
At5g49270	0.18 ± 0.03	0.004	0.63 ± 0.18	0.107	0.39 ± 0.07	0.010	0.44 ± 0.17	0.060	COBL9 (cobra-like protein 9)
At5g53250	0.26 ± 0.03	0.003	0.63 ± 0.18	0.106	0.79 ± 0.11	0.104	0.28 ± 0.03	0.002	AGP22 (Arabinogalactan peptide 22 precursor)
At5g56320	0.23 ± 0.03	0.002	0.65 ± 0.06	0.104	0.74 ± 0.11	0.071	0.54 ± 0.14	0.056	ATEXA14 (arabidopsis thaliana expansin A14)
At5g57625	0.15 ± 0.07	0.017	0.57 ± 0.11	0.038	0.72 ± 0.13	0.047	0.09 ± 0.01	0.000	allergen V5/Tpx-1-related family protein
At5g60530	0.31 ± 0.02	0.001	0.90 ± 0.08	0.159	0.51 ± 0.10	0.005	0.10 ± 0.06	0.017	late embryogenesis abundant protein-related
Repressed in <i>stop1</i> -mutant, and down-regulated or stable in WT with low pH treatment; 9 genes									
At1g28170	0.26 ± 0.18	0.064	0.41 ± 0.11	0.029	0.88 ± 0.17	0.315	0.67 ± 0.42	0.350	sulfotransferase family protein
At1g29230	0.42 ± 0.08	0.015	0.40 ± 0.06	0.010	0.98 ± 0.16	0.868	0.91 ± 0.06	0.125	galactosyltransferase family protein
At1g49700	0.46 ± 0.06	0.009	0.29 ± 0.09	0.020	0.78 ± 0.37	0.427	0.45 ± 0.21	0.087	unknown protein
At1g60830	0.31 ± 0.09	0.019	0.41 ± 0.14	0.043	1.09 ± 0.16	0.402	0.36 ± 0.14	0.043	NRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein 1)
At2g7820	0.29 ± 0.10	0.023	0.33 ± 0.06	0.009	0.66 ± 0.11	0.048	0.18 ± 0.03	0.004	DC1 domain-containing protein
At3g47360	0.36 ± 0.03	0.003	0.34 ± 0.12	0.030	0.96 ± 0.14	0.693	0.68 ± 0.08	0.029	ATHSE3 (hydroxysteroid dehydrogenase 3)
At5g09570	0.97 ± 0.03	0.153	0.42 ± 0.13	0.037	1.01 ± 0.14	0.947	0.36 ± 0.11	0.029	unknown protein
At5g14740	0.32 ± 0.07	0.010	0.35 ± 0.15	0.048	2.45 ± 0.67	0.006	0.27 ± 0.11	0.028	CA1 (carbonic anhydrase 1)
At5g1980	0.34 ± 0.01	0.000	0.32 ± 0.03	0.002	1.02 ± 0.14	0.866	0.98 ± 0.10	0.734	ZFWD2 (WD-40 repeat family protein)

Biologically independent 3 replication of competitive microarray analyses were carried out as follows: *stop1*-mutant versus wild type (WT) in Al (10 μ M, 24 h) or low pH (pH 4.5, 24 h); *AtALMT1*-KO versus WT in Al (10 μ M, 24 h); Control (pH 5.0 no Al, 24 h) versus Al (10 μ M, pH 5.0, 24 h) or low pH (pH 4.5, 24 h) in WT. Fold change (FC) and whose $\pm$ SD are shown. P-value of t-test for significant difference from fold change 1.00 is shown.

AtALMT1-KO の成長は野生型に比べ阻害されていた。この結果は、前述の選抜方法が、*stop1* 変異体のような感受性個体の成長抑制に由来する偽陽性の除去に有効であることを示唆している。ところで、Al 処理と低 pH 処理の両方に分類された、野生型の Al ストレス誘導マイクロアレイで転写抑制されず、かつ *AtALMT1-KO* で有意に転写抑制された遺伝子が 1 つだけあった。この遺伝子、*At1g53480* は *stop1* 変異体では Al 誘導性のリンゴ酸放出が阻害されたために転写抑制されたが、*STOP1* の変異そのものによる結果ではない可能性がある。最終的に、12 個の Al、低 pH 共通遺伝子を含む、合計 39 個の転写抑制遺伝子を選抜した (Table 3、Fig. 2a)。

stop1 変異体における遺伝子の抑制が、*STOP1* の変異によって起こった可能性をさらに検証するために、共通する 12 個の遺伝子の Al、低 pH 処理の転写レベルを、*STOP1-KO* (*STOP1* への T-DNA 挿入変異体)と、相補ライン (カリフラワーモザイクウイルス (35S CaMV)プロモーターと *STOP1* 遺伝子を接続したベクターを、*stop1* 変異体に導入した組換え体 (Iuchi et al., 2007))で比較した。その結果、*stop1* 変異体と *STOP1-KO* の転写パターンは非常に似ていた (Fig. 2b)。さらに、*STOP1* を *stop1* 変異体に導入した相補ラインでは、これら 12 個の遺伝子の転写量が回復した (Fig. 2b)。以上の結果は、*STOP1* の変異が、これらの選抜遺伝子の転写に影響を与えていることを示している。

***stop1* 変異体における遺伝子抑制の機能**

stop1 変異体において Al と低 pH 処理の両方で転写抑制される共通の遺伝子グループには、過去に単離された Al 耐性に重要な *AtALMT1* (Hoekenga et al., 2006; Table 3)や、zinc finger protein をコードする *STOP1* のホモログ遺伝子 (以下、*STOP2*)が含まれていた。他に、硫酸トランスポーターの *SULTR3;5*、

Table 3. List of repressed genes in the *stop1* mutant among up-regulated or stable genes in the wild type under Al and low-pH conditions

Arabidopsis Genome Initiative Code	FC (stop1 Mutant or AtALMT1-KO/Wild Type)						FC in the Wild Type with Al or Low-pH Treatments (Treatment/Control)				Description
	Al <i>stop1</i> -MT		low pH <i>stop1</i> -MT		Al <i>AtALMT</i> -KO		Al		low pH		
	FC ± SD	P-value	FC ± SD	P-value	FC ± SD	P-value	FC ± SD	P-value	FC ± SD	P-value	
Downregulated in <i>stop1</i> and not downregulated by Al and low pH; 12(+1) genes											
At1g08430	0.01 ± 0.00	0.001	0.01 ± 0.00	0.000	0.01 ± 0.00	0.001	24.40 ± 13.8	0.009	7.41 ± 4.07	0.021	ATALMT1 (Al-activated malate transporter)
At1g30270	0.13 ± 0.03	0.003	0.19 ± 0.02	0.001	1.02 ± 0.14	0.866	1.44 ± 0.09	0.009	1.42 ± 0.25	0.073	ATCIPK23 (CBL-interacting protein kinase 23)
At1g51840	0.25 ± 0.06	0.010	0.40 ± 0.06	0.008	1.03 ± 0.15	0.765	1.31 ± 0.42	0.272	1.21 ± 0.30	0.305	similar to leucine-rich repeat protein kinase, putative
At2g18480	0.06 ± 0.01	0.002	0.12 ± 0.09	0.031	1.08 ± 0.15	0.433	6.97 ± 1.12	0.002	1.89 ± 0.08	0.001	PLT3 (probable polyol transporter 3)
At2g41380	0.04 ± 0.01	0.003	0.14 ± 0.08	0.025	1.11 ± 0.16	0.327	6.98 ± 3.70	0.021	2.28 ± 0.57	0.028	similar to embryo-abundant protein-related
At5g02480	0.19 ± 0.03	0.003	0.31 ± 0.08	0.015	1.07 ± 0.15	0.491	2.02 ± 0.31	0.015	1.18 ± 0.07	0.040	similar to SLT1 (sodium- and lithium-tolerant 1)
At5g06860	0.05 ± 0.00	0.000	0.13 ± 0.06	0.017	1.17 ± 0.17	0.201	1.93 ± 1.46	0.232	1.00 ± 0.74	0.992	PGIP1 (polygalacturonase inhibiting protein 1)
At5g18170	0.08 ± 0.01	0.001	0.27 ± 0.11	0.030	1.26 ± 0.18	0.109	2.91 ± 0.39	0.005	1.19 ± 0.10	0.068	GDH1 (glutamate dehydrogenase 1)
At5g19600	0.01 ± 0.00	0.002	0.29 ± 0.06	0.008	1.33 ± 0.19	0.074	1.50 ± 0.45	0.138	2.08 ± 0.37	0.019	SULTR3;5 (sulfate transporter 3;5)
At5g22890	0.06 ± 0.01	0.001	0.16 ± 0.08	0.023	1.07 ± 0.15	0.520	1.03 ± 0.20	0.809	1.15 ± 0.15	0.200	similar to STOP1 (sensitive to proton rhizotoxicity 1)
At5g38200	0.02 ± 0.00	0.001	0.10 ± 0.04	0.009	1.06 ± 0.15	0.552	4.16 ± 1.79	0.027	1.77 ± 0.19	0.012	similar to hydrolase
At5g66650	0.24 ± 0.03	0.003	0.19 ± 0.13	0.043	1.03 ± 0.15	0.766	9.13 ± 1.11	0.001	2.68 ± 1.17	0.055	similar to unknown protein
At1g53480	0.02 ± 0.01	0.002	0.02 ± 0.01	0.007	0.01 ± 0.00	0.003	1.02 ± 0.02	0.341	1.10 ± 0.05	0.060	similar to unknown protein
Downregulated in <i>stop1</i> and not downregulated by Al; 24 genes											
At1g35670	0.34 ± 0.02	0.001	0.76 ± 0.06	0.030	1.05 ± 0.15	0.598	1.35 ± 0.07	0.011	0.53 ± 0.08	0.020	ATCDPK2 (calcium-dependent protein kinase)
At1g60610	0.26 ± 0.05	0.006	0.54 ± 0.05	0.008	0.95 ± 0.14	0.618	1.68 ± 0.23	0.023	1.16 ± 0.10	0.095	similar to protein binding / zinc ion binding
At1g61560	0.26 ± 0.03	0.003	0.61 ± 0.09	0.029	0.99 ± 0.14	0.955	3.34 ± 0.75	0.011	2.65 ± 1.02	0.045	MLO6 (mildew resistance locus O 6)
At1g72870	0.22 ± 0.09	0.021	0.59 ± 0.15	0.064	0.92 ± 0.13	0.406	1.29 ± 0.32	0.213	0.60 ± 0.05	0.008	putative disease resistance protein (TIR-NBS class)
At1g77760	0.18 ± 0.05	0.008	0.88 ± 0.30	0.574	1.29 ± 0.19	0.088	1.66 ± 0.30	0.038	1.68 ± 0.13	0.007	NIA1 (nitrate reductase 1)
At2g01180	0.31 ± 0.03	0.003	0.59 ± 0.09	0.028	1.03 ± 0.15	0.779	2.13 ± 0.32	0.013	1.04 ± 0.09	0.525	ATPAP1 (phosphatidic acid phosphatase 1)
At2g16660	0.34 ± 0.01	0.001	0.53 ± 0.06	0.009	1.23 ± 0.18	0.126	2.62 ± 0.66	0.021	1.29 ± 0.43	0.310	similar to nodulin family protein
At2g23150	0.31 ± 0.03	0.002	0.61 ± 0.13	0.054	1.04 ± 0.16	0.661	2.80 ± 0.55	0.012	1.27 ± 0.08	0.020	NRAMP3 (manganese-ion transporter)
At2g28270	0.08 ± 0.03	0.006	0.41 ± 0.26	0.114	0.98 ± 0.23	0.873	2.52 ± 0.92	0.046	0.74 ± 0.34	0.357	similar to DC1 domain-containing protein
At2g39380	0.28 ± 0.05	0.005	0.83 ± 0.07	0.064	1.03 ± 0.15	0.753	1.41 ± 0.21	0.054	2.63 ± 0.22	0.003	ATEXO70H2 (exocyst subunit EXO70 family protein H2)
At2g39510	0.27 ± 0.07	0.013	1.32 ± 1.12	0.579	1.35 ± 0.20	0.072	9.60 ± 7.83	0.032	1.97 ± 1.57	0.235	similar to nodulin MtN21 family protein
At2g43590	0.25 ± 0.10	0.025	1.09 ± 0.50	0.754	0.84 ± 0.15	0.157	3.20 ± 0.63	0.009	2.22 ± 2.00	0.214	putative chitinase
At2g45220	0.26 ± 0.04	0.005	0.69 ± 0.02	0.003	1.13 ± 0.29	0.458	1.98 ± 0.26	0.012	0.43 ± 0.11	0.026	similar to pectinesterase family protein
At3g05400	0.19 ± 0.04	0.004	0.63 ± 0.15	0.076	1.20 ± 0.17	0.158	2.98 ± 1.04	0.031	1.07 ± 0.09	0.293	SUGTL5 (sugar transporter ERD6-like 12)
At3g28290	0.13 ± 0.03	0.004	0.46 ± 0.16	0.055	0.87 ± 0.12	0.237	1.51 ± 0.13	0.014	0.93 ± 0.28	0.713	similar to ATI4A
At4g13420	0.03 ± 0.00	0.000	2.21 ± 1.35	0.135	0.84 ± 0.12	0.165	7.54 ± 4.39	0.023	6.86 ± 1.12	0.002	HAK5 (high affinity K ⁺ transporter 5)
At4g16563	0.09 ± 0.07	0.026	0.22 ± 0.27	0.113	1.13 ± 0.28	0.449	1.22 ± 0.31	0.307	0.35 ± 0.04	0.004	similar to aspartyl protease family protein
At4g30270	0.28 ± 0.06	0.010	0.84 ± 0.63	0.693	0.91 ± 0.15	0.407	12.56 ± 5.39	0.009	2.05 ± 0.76	0.074	MER15B (endo xyloglucan transferase)
At4g38470	0.29 ± 0.05	0.007	0.80 ± 0.22	0.297	1.17 ± 0.17	0.200	1.13 ± 0.20	0.343	1.15 ± 0.17	0.245	similar to protein kinase family protein
At5g07440	0.29 ± 0.05	0.005	0.54 ± 0.15	0.060	1.16 ± 0.17	0.208	2.55 ± 0.16	0.001	1.23 ± 0.17	0.123	GDH2 (glutamate dehydrogenase 2)
At5g11670	0.26 ± 0.07	0.012	0.67 ± 0.06	0.017	1.02 ± 0.14	0.834	3.62 ± 0.78	0.009	1.53 ± 0.15	0.018	ATNADP-ME2 (malic enzyme 2)
At5g17860	0.31 ± 0.03	0.003	0.98 ± 0.02	0.208	0.98 ± 0.17	0.837	1.28 ± 0.06	0.012	1.02 ± 0.06	0.681	CAX7 (calcium exchanger 7)
At5g47560	0.12 ± 0.02	0.002	0.75 ± 0.15	0.129	1.09 ± 0.19	0.423	1.05 ± 0.12	0.557	1.06 ± 0.12	0.457	ATIDT (tonoplast malate/fumarate transporter)
At5g66800	0.33 ± 0.03	0.003	0.58 ± 0.06	0.011	0.71 ± 0.11	0.057	1.04 ± 0.05	0.248	0.91 ± 0.06	0.124	similar to unknown protein
Downregulated in <i>stop1</i> and not downregulated by pH; 4 genes											
At1g62280	0.97 ± 0.62	0.936	0.47 ± 0.01	0.001	0.84 ± 0.15	0.161	0.33 ± 0.30	0.133	1.06 ± 0.51	0.858	SLAH1 (SLAC1 homologue 1)
At1g75840	0.58 ± 0.04	0.005	0.47 ± 0.03	0.002	0.99 ± 0.15	0.879	0.94 ± 0.14	0.570	1.03 ± 0.06	0.460	ATROP4 (rho-like gtp binding protein 4)
At3g12750	0.60 ± 0.05	0.010	0.46 ± 0.09	0.020	1.42 ± 0.21	0.053	0.55 ± 0.04	0.004	1.62 ± 0.13	0.009	ZIP1 (zinc transporter 1)
At5g24780	0.65 ± 0.57	0.431	0.43 ± 0.01	0.000	2.21 ± 0.42	0.004	1.06 ± 1.02	0.918	4.00 ± 1.69	0.027	VSP1 (vegetative storage protein1)

Three biologically independent replications of competitive microarray analyses were carried out as follows: *stop1* mutant versus the wild type in Al (10 μ M, 24 h) or low pH (pH 4.5, 24 h); *AtALMT1*-KO versus the wild type in Al (10 μ M, 24 h); control (pH 5.0, no Al, 24 h) versus Al (10 μ M, pH 5.0, 24 h) or low pH (pH 4.5, 24 h) in the wild type. FC $\pm$ SD values are shown, as are *P* values from *t* tests for significant differences from FC = 1.00.

ポリオールトランスポーターの PLT3、AKT1 活性を調節する CBL-interacting protein kinase 23 (CIPK23)、Na⁺/K⁺トランスポーターを調節する SLT1 (sodium and lithium tolerant 1)のホモログなど、トランスポーターやイオン輸送の調節タンパクなどが選抜遺伝子のグループに見られた。さらに、窒素代謝の重要な遺伝子の 1 つである glutamate dehydrogenase 1 (GDH1)や、生物的なストレスの防御システムに関するといわれている polygalacturonase inhibiting protein 1 (PGIP1) も同じグループに属していた。

その他の Al または低 pH で転写抑制される 2 つのグループでは、前述の遺伝子に関連する機能を持つものがいくつか含まれていた (Table 3)。主要なカリウムトランスポーターの 1 つである HAK5、窒素代謝の主要な酵素である NIA1 (nitrate reductase)や GDH2 が Al 処理のグループに含まれていた。ALMT1 と異なるタイプのリンゴ酸トランスポーター、AtTDT (vacuolar malate/Na⁺ co-transporter)や、SLAC1 (slow anion channel 1)のホモログ、リンゴ酸酵素の ME2 (malic enzyme) が Al 処理 (AtTDT、ME2)や低 pH (SLAC1 ホモログ)処理のグループにそれぞれ含まれていた。これらのデータは STOP1 の変異がイオンの恒常性、リンゴ酸放出、*stop1* 変異体の代謝を変化させたことを示している。

***stop1* 変異体における ALS3 の転写抑制**

低 pH 感受性にする重要な遺伝子はいまだ明らかになっていないが、Al 耐性に応答するいくつかの遺伝子は、シロイヌナズナで明らかになっている。前述のデータ整理では、*stop1* 変異体において、有意に転写抑制された遺伝子、または FC 値が下位 1%の遺伝子のみ選抜した。しかし、もし Al 耐性に重要な遺伝子ならば、比較的転写抑制されない遺伝子が *stop1* 変異体の超感受性の増大に寄与しているかもしれない。これを、同じマイクロアレイの FC (*stop1* 変異体 / 野生型) データ

を使用して、すでに知られている Al 耐性遺伝子について調べた。ALS1 と ALS3 は変異体解析で特定され (Larsen et al., 2005)、WAK1 (cell wall-associated kinase 1 (Sivaguru et al., 2003); At1g21250)、AtBCB (Arabidopsis blue copper-binding protein (Ezaki et al., 2004); At5g20230)、AtCS (Arabidopsis citrate synthase (Koyama et al., 1999))は組換え体の解析によって特定された。これらの遺伝子の中で、Al 感受性の器官から Al を再分配する遺伝子に属する ALS3 (At2g37330)だけが *stop1* 変異体で転写抑制され、FC は 0.33 であった (Fig.3)。ALS3 の転写レベルを定量 RT-PCR で調べたところ、*stop1* 変異体と *STOP1-KO* では転写抑制され、CaMV35S::STOP1 を *stop1* 変異体に相補したラインでは転写レベルは回復していた (Fig. 4a)。この結果は、少なくともシロイヌナズナでは STOP1 が AtALMT1 や ALS3 のような Al 耐性に重要な遺伝子のグループを調節していることを示している。

stop1 変異体の Al 超感受性に関する Al 耐性遺伝子群の転写抑制を評価するために、*KO* 変異体の生育を比較した。以前に報告されたように (Iuchi et al., 2007)、*STOP1-KO* は低 pH に感受性であるが、*AtALMT1-KO* は感受性ではない (Fig. 4b, 4c; Kobayashi et al., 2007)。Al の入っていない pH 5.5 のコントロール溶液では、すべての *KO* 変異体が野生型と同様に成長した。一方、野生型の低 pH ストレス (pH 5.5 との根伸長阻害比較)では、pH 5.0 で 30%程度のわずかな阻害を示し、さらに pH 4.7 では約 50%の阻害を示した。この条件下で、*ALS3-KO* は pH 5.0 と pH 4.7 で野生型よりもわずかに良い成長であったことから、*stop1* 変異体の ALS3 の転写抑制は、低 pH の超感受性とは関連がないことが示された。これらの *KO* 変異体の Al 感受性を評価するため、低 pH の根毒性効果が最小、かつ比較的高い pH 条件で実験を行った。過去に QTL (quantitative trait locus)解析で pH 5.0 を使用したが (Kobayashi et al., 2005; Ikka et al., 2008)、本研究では pH 5.5 で

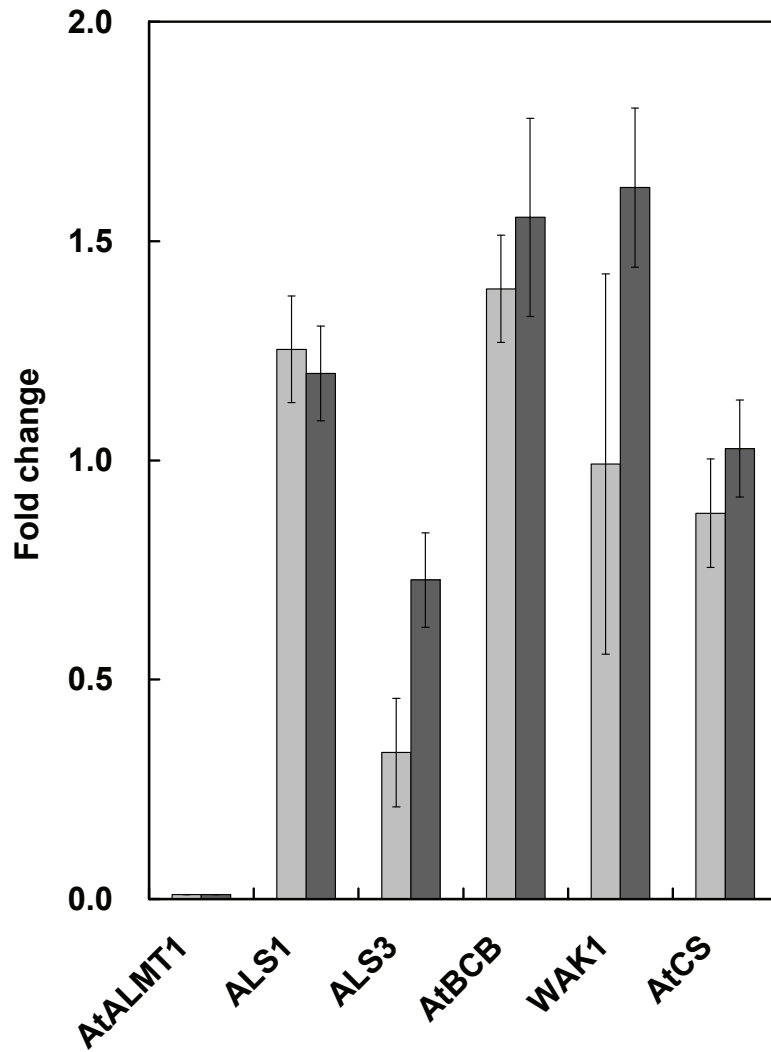


Figure 3. Fold change of gene expression in microarray, whose gene is associated with Al tolerance as follows; *AtALMT1* (Hoekenga et al., 2006), *ALS1* (Larsen et al., 2007), *ALS3* (Larsen et al., 2005), *AtBCB* (Ezaki et al., 2000), *WAK1* (Sivaguru et al., 2003), *AtCS* (Koyama et al., 2000). Biologically independent 3 replication of competitive microarray analyses were carried out as follows; stop1-mutant versus wild type in Al (10 μ M, 24 h; light gray) and low pH (pH 4.5, 24 h; dark gray). Fold change and whose $\pm$ SD are shown.

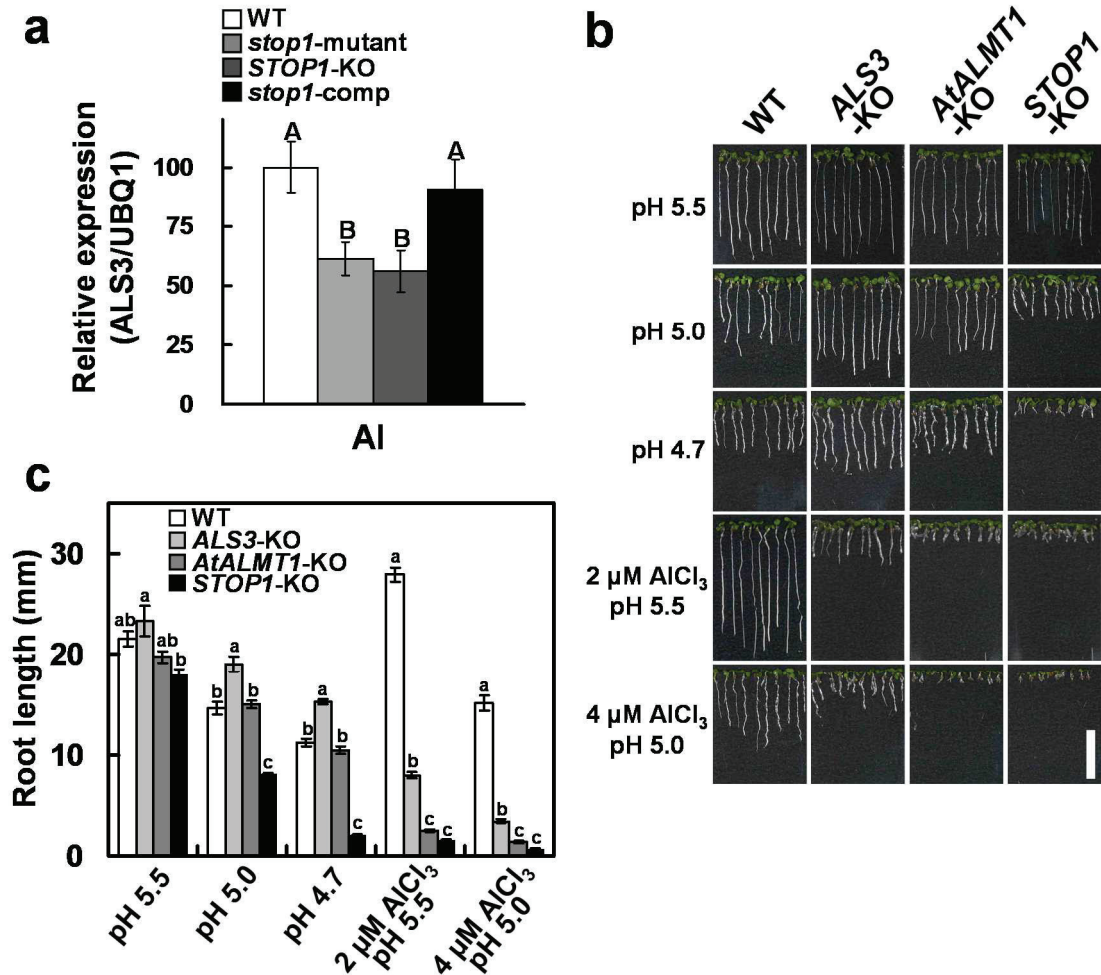


Figure 4. Repression of *ALS3* in the *stop1* mutant and comparison of growth among T-DNA insertion mutants. (a) *ALS3* expression in the wild type (WT), the *stop1* mutant, *STOP1*-KO, and a complemented line of the *stop1* mutant carrying CaMV35S::STOP1 (*stop1*-comp), which were grown for 10 d in normal conditions and exposed to Al (10 μ M, pH 5.0) for 24 h. *ALS3* expression was normalized by *UBQ1* expression and compared with that of the wild type. (b) and (c), Growth response of *ALS3*-KO compared with that of *STOP1*-KO and *AtALMT1*-KO with Al and H⁺ rhizotoxicities. White bar in B = 1 cm. Different letters indicate significant differences by LSD test ($P = 0.05$).

低 pH 根毒性が最小となった。両者の条件下では、*ALS3-KO* は野生型に比べ Al に超感受性を示したが、*STOP1-KO* と *AtALMT1-KO* よりは耐性を示した (Fig. 4b, 4c)。これらの結果は、*stop1* 変異体の Al 超感受性に *ALS3* の転写抑制が寄与していることを示している。このことは、*stop1* 変異体への CaMV35S::AtALMT1 導入による相補実験により立証されている。*stop1* 変異体での AtALMT1 の過剰発現は、Al³⁺の耐性を回復させた。しかし、相補組換え体で AtALMT1 の転写量は野生型よりも大きくなったにもかかわらず、Al 耐性は完全には回復しなかった (Fig. 5)。一方、*STOP1-KO* の pH 5.5 での Al 処理溶液における生育阻害は、*AtALMT1-KO* よりも重度であり、これら 2 つのラインを統計的に比較したところ、 $P = 7.71 \times 10^{-5}$ であった (*t*-test)。以上の結果は、*STOP1-KO* シロイヌナズナの Al 根毒性に対する超感受性が、Al 耐性に重要な複数の遺伝子の転写抑制によって起こっていることを示している。

土耕試験による *STOP1-KO* と Al 感受性 KO 変異体の成長

以前の研究で、シロイヌナズナの低 pH 感受性品種は、酸性土壌試験においても低 pH 耐性品種より弱い成長を示した (Ikka et al., 2007)。同じ条件の土耕試験において、*STOP1-KO* と他の Al 超感受性 KO 変異体の成長を、低 pH 超感受性の点から比較評価した。森林褐色土壌 (pH 6.6) では、*STOP1-KO* と他の Al 超感受性 KO 変異体は野生型と同等の生育をしたことから、*STOP1* の変異は中性の土耕では成長に影響を与えないことを示している (Fig. 6)。一方、*STOP1-KO* と他の Al 超感受性 KO 変異体は、交換性 Al と低 pH の根毒性を持つ酸性土壌において阻害を受けた。石灰添加の最も低い区分において、すべての KO 変異体の成長は、Al 根毒性によってほとんど阻害を受けたが、CaCO₃ 添加による土壌の Al 根毒性の軽減によって回復した。*ALS3-KO* と *AtALMT1-KO* の成長は、

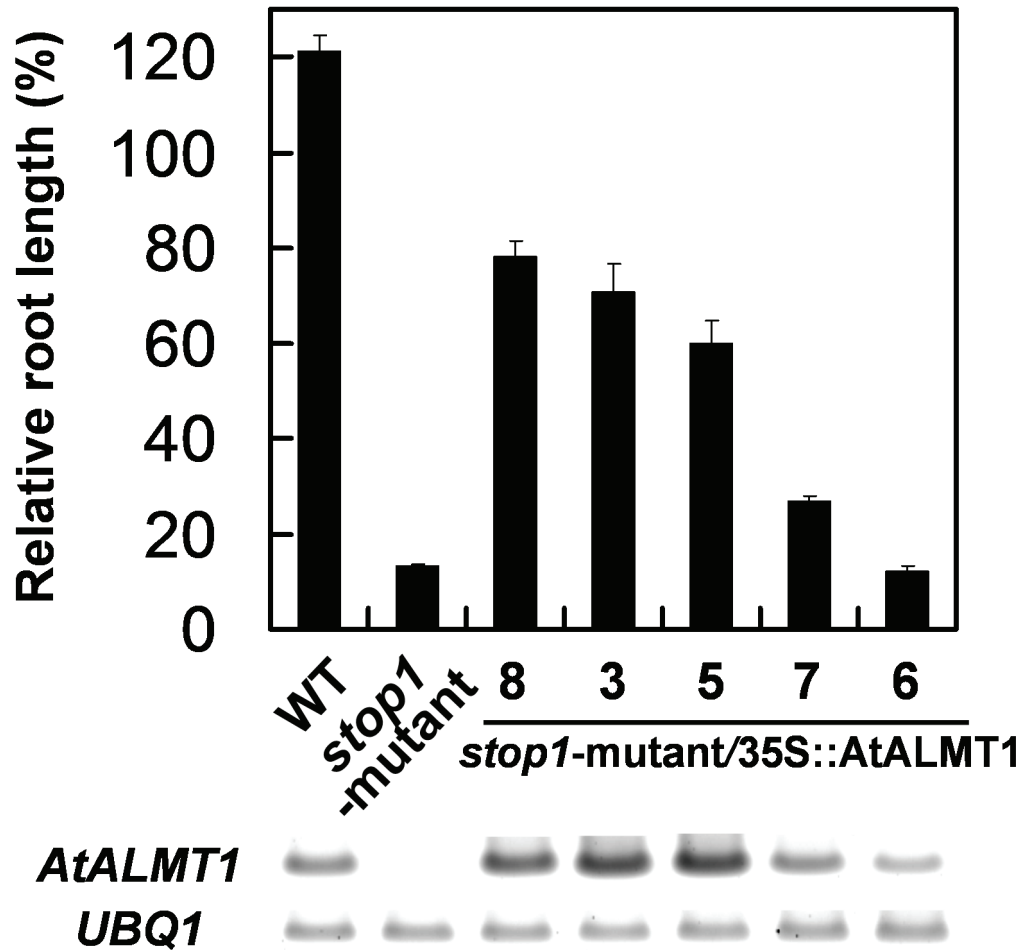


Figure 5. Root growth of the wild type (WT), the *stop1* mutant, and a transgenic *stop1* mutant carrying CaMV35S::AtALMT1. Seedlings were grown hydroponically in Al toxic solution containing 2 μ M Al at pH 5.5. Culture solution was renewed every 2 d, and relative root length (percentage of the root growth in the absence of Al) was determined at 7 d. Gel image of semiquantitative RT-PCR of AtALMT1 and UBQ1 transcripts of each line is shown at the bottom. Means $\pm$ SE are shown (n=3).

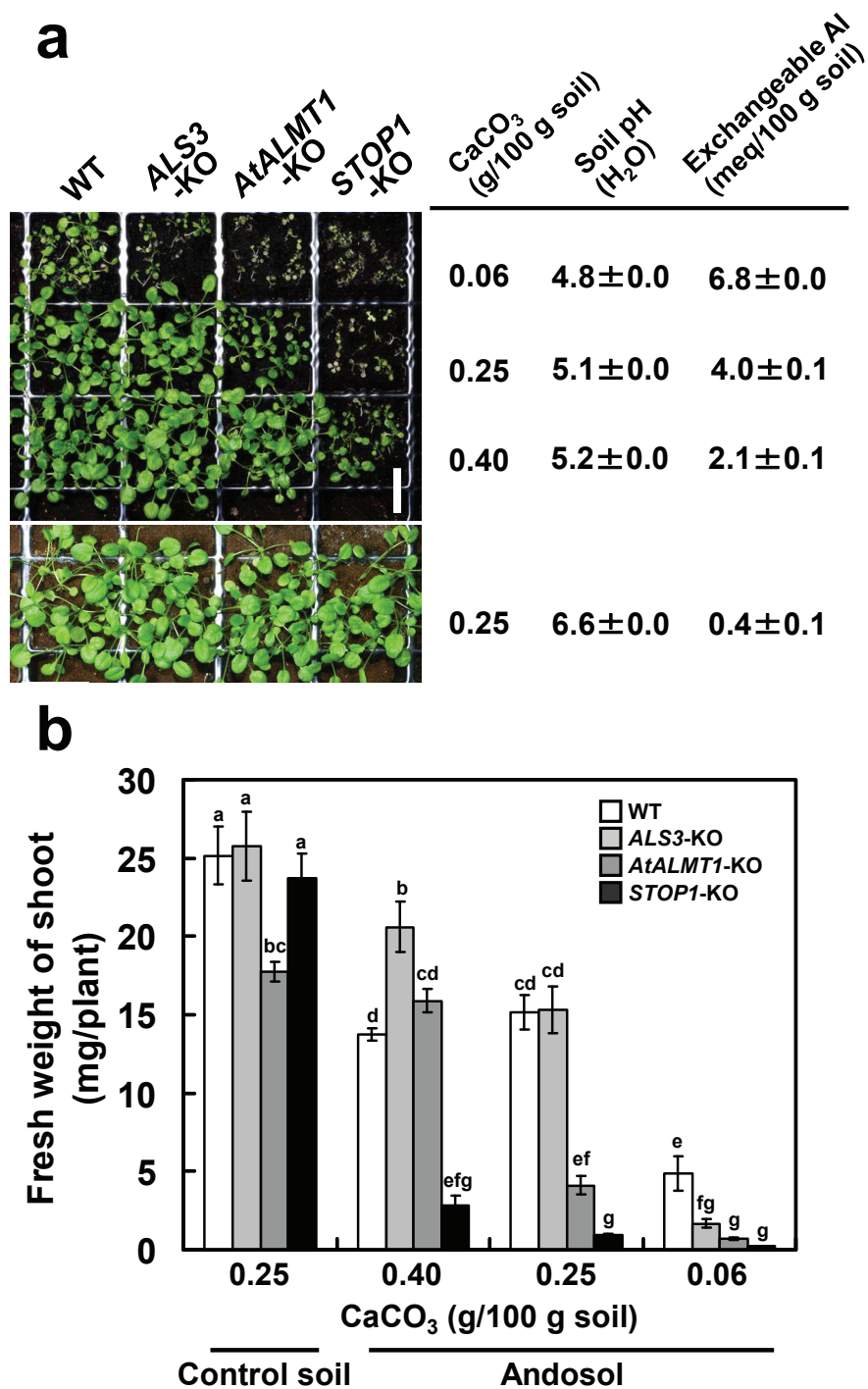


Figure 6. (a) Growth of *ALS3*-KO, *AtALMT1*-KO, and *STOP1*-KO in neutral forest brown soil (bottom) and acidic andosol (top). Seedlings were grown for 4 weeks on both soil types. Acidic andosol was neutralized by adding various amounts of CaCO₃. Soil pH and amount of exchangeable Al were determined. WT, wild type. White bar = 1 cm. (b) Fresh weight of the shoots plotted as means $\pm$ SE (n > 4). Different letters indicate significant differences at P = 0.05 by LSD test.

それぞれ中間 (*ALS3-KO*)、高 (*AtALMT1-KO*)区分の石灰添加で野生型と同等の成長を示した。この結果は水耕栽培の結果と同じように (Fig. 4b, 4c)、*KO* 変異体の *Al* 感受性の違いによって説明でき、*Al* 根毒性は高区分の石灰添加で軽減されていることを示している。しかし、高区分の石灰添加区において、*STOP1-KO* の成長は野生型や他の *Al* 超感受性変異体に比べて著しく阻害された。これは *stop1* 変異体の低 pH 超感受性が、酸性土壌で生育能力に悪影響を及ぼしていることを示している。実際、高区分の石灰添加区土壌 (pH 5.2)での *STOP1-KO* の成長は、野生型よりも著しく阻害され、水耕栽培でも同様であった (Iuchi et al., 2007)。

***stop1* 変異体の pH 調節に関わる代謝パスウェイの影響**

シロイヌナズナで液胞リンゴ酸トランスポーターをコードする *AtTDT* は、pH 調節経路に属しており、*Al* 処理の *stop1* 変異体で著しく転写抑制された遺伝子として選抜された。しかし、この遺伝子は低 pH 処理で大きな転写抑制はなかった。それゆえ、この遺伝子は *stop1* 変異体の低 pH 超感受性に大きく関与する可能性はないとされた。この結果は、変異体の低 pH 超感受性に、他の遺伝子が協調して作用することを示唆している。低 pH 超感受性を説明する、可能性のあるメカニズムの 1 つは、pH 調節の代謝パスウェイのブロックによるものである。それは、GABA shunt の GDH や(Bouche and Fromm, 2004)、biochemical pH stat に関わる malic enzyme (Sakano, 1998) が、*stop1* 変異体の著しく転写抑制された遺伝子のグループに含まれていたためである (Table 3)。

低 pH 処理 (pH 4.5、24 h)の DNA マイクロアレイ比較 (*stop1* 変異体 / 野生型)と、代謝産物の比較 (*STOP1-KO* / 野生型)の両者のデータを、pH 調節経路を含むパスウェイマップに統合した (Fig. 7)。この実験で、代謝へのインパクトが比較的低いと考えられる低強度 (< 1000)の遺伝子を排除した。パスウェイマップ上

(glycolysis pathway、tricarboxylic acid cycle、related organic acid and amino acid metabolic pathways; Table 4)の合計 222 個の遺伝子のうち 11 個の遺伝子は、他の遺伝子に比べ *stop1* 変異体でより転写抑制された (*stop1* 変異体 / 野生型 < 0.8、 $P < 0.05$ in *t* test between the FC and 1)。ここに含まれる 4 つの遺伝子は、pH 調節代謝パスウェイの酵素をコードする遺伝子であった(Fig. 7; Table 4)。GABA shunt 経路の酵素をコードする遺伝子 (GDH1、GAD1; Bouche and Fromm, 2004)や、2 つの biochemical pH stat pathway の遺伝子 (ME1、ME2; Sakano, 1998)は、野生型と比べ、*stop1* 変異体でより転写抑制された。加えて、GABA-T (GABA aminotransferase)と GDH2 は、定量 RT-PCR の結果 *STOP1-KO* で転写抑制の傾向があった (GABA-T, FC = 0.76、*stop1* 変異体 / 野生型 <1 の *t* test $P = 0.06$; GDH2, FC = 0.54, *stop1* 変異体 / 野生型 <1 の *t* test $P = 0.06$)が、マイクロアレイデータの解析では有意な閾値より *P* value がわずかに高いことによって排除された。この傾向は *STOP1-KO* の定量 RT-PCR 解析によって確認されたため (Fig. 7)、*stop1* 変異体での pH 調節経路に属するこれらの遺伝子の転写抑制は、*STOP1* の機能不全によって引き起こされると仮定した (Fig. 7)。このマップ上の 4 つの遺伝子だけが、*stop1* 変異体で有意に転写誘導されており (pH 4.5; *stop1* mutant/wild type > 1.25, $P < 0.05$ in *t* test between the FC and 1)、この 4 つには、pyruvate decarboxylase (PDC2)のアイソザイムや、ホモログが含まれていた (At4g33070; Table 4)。

このような条件下において、パスウェイ上のいくつかの代謝物が *STOP1-KO* 変異体で有意に変化していた。24 の代謝物を検出し分析した結果、*STOP1-KO* で 4 つの代謝物が有意に変化していた(Fig. 7; Table 5)。GABA shunt 経路に含まれる GABA やコハク酸は *KO* 変異体で有意に少なくなっていた。加えて、pH stat 経路のリンゴ酸酵素の生成物も、変異体で少なくなっていた。

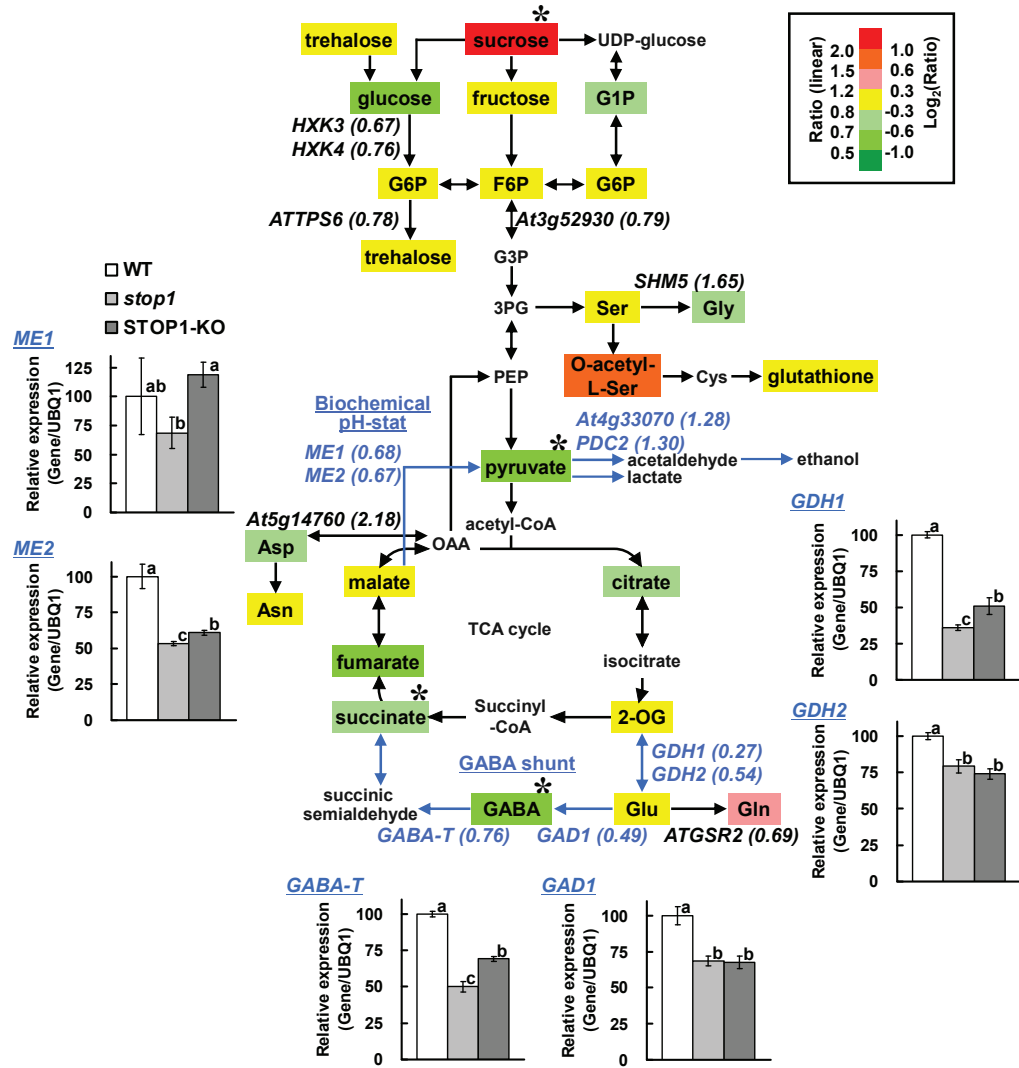


Figure 7. Comparison of metabolites and transcripts in glycolysis, tricarboxylic acid (TCA) cycle, and pH-regulating pathways between the wild type (WT) and the *stop1* mutant. Seedlings of the wild type and the *stop1* mutant were grown for 10 d in stressfree control conditions, then transferred to low-pH (pH 4.5) solution and incubated for 24 h. The transcriptomes of the *stop1* mutant and the wild type on the pathway (222 genes in Table 4) were compared, while the metabolomes were compared between *STOP1-KO* and the wild type. Determined metabolites are shown in colored boxes, and the ratio of *STOP1-KO* to the wild type is indicated by color as shown at top right. Among the genes with intensities greater than 1,000, relatively more down-regulated (*stop1* mutant/wild type < 0.8) or up-regulated (*stop1* mutant/wild type > 1.25) genes than others are indicated in italics with the means of FC in parentheses (Table 4). Asterisks show significant difference from FC = 1 (t test, $P < 0.05$). Transcript levels of selected genes in the wild type, the *stop1* mutant, and *STOP1-KO* at pH 4.5 for 24 h are shown in small panels. Different letters in the small panels indicate significant differences by LSD test ($P = 0.05$). GABA shunt and biochemical pH stat pathways are emphasized by blue color.

Table 4. Relative expression level of genes in the *stop1*-mutant among genes involved in major carbohydrate metabolic pathways (see also Fig. 6).

AGI code	Fold change (<i>stop1</i> -mutant/WT)		Intensity		Description
	FC ± SD	P-value (1)	<i>stop1</i> -mutant	WT	
sucrose to fructose					
At1g12240	0.92 ± 0.12	0.373	10010	10983	ATBETAFRUCT4 (Beta-fructofuranosidase 4)
At1g22650	1.09 ± 0.24	0.572	481	454	similar to beta-fructofuranosidase
At1g35580	1.17 ± 0.22	0.286	43263	38695	CINV1 (Cytosolic Invertase 1)
At1g56560	1.06 ± 0.00	0.000	3663	3453	similar to beta-fructofuranosidase
At1g73370	0.99 ± 0.09	0.865	3980	3940	similar to SUS1 (Sucrose synthase 1)
At3g05820	1.23 ± 0.18	0.133	47	39	similar to beta-fructofuranosidase
At3g06500	0.99 ± 0.04	0.714	4451	4507	similar to beta-fructofuranosidase
At3g43190	1.29 ± 0.23	0.129	1102	819	similar to SUS1 (Sucrose synthase 1)
At4g02280	1.92 ± 0.85	0.117	556	283	similar to SUS1 (Sucrose synthase 1)
At4g09510	0.97 ± 0.05	0.350	1376	1438	similar to beta-fructofuranosidase
At4g34860	0.92 ± 0.06	0.145	7445	7259	similar to beta-fructofuranosidase
At5g20830	1.06 ± 0.11	0.436	4973	4672	SUS1 (Sucrose synthase 1)
At5g22510	0.94 ± 0.06	0.249	2977	3191	similar to beta-fructofuranosidase
At5g37180	0.97 ± 0.05	0.434	1487	1538	similar to SUS1 (Sucrose synthase 1)
At5g49190	1.03 ± 0.10	0.679	119	118	SUS2 (Sucrose synthase 2)
sucrose to glucose 1-P					
At1g73370	0.99 ± 0.09	0.865	3980	3940	similar to SUS1 (Sucrose synthase 1)
At3g43190	1.29 ± 0.23	0.129	1102	819	similar to SUS1 (Sucrose synthase 1)
At4g02280	1.92 ± 0.85	0.117	556	283	similar to SUS1 (Sucrose synthase 1)
At5g17310	1.11 ± 0.05	0.056	4385	3960	UTP-glucose-1-phosphate uridylyl transferase 1
At5g20830	1.06 ± 0.11	0.436	4973	4672	SUS1 (Sucrose synthase 1)
At5g37180	0.97 ± 0.05	0.434	1487	1538	similar to SUS1 (Sucrose synthase 1)
At5g49190	1.03 ± 0.10	0.679	119	118	SUS2 (Sucrose synthase 2)
sucrose to glucose					
At1g12240	0.92 ± 0.12	0.373	10010	10983	ATBETAFRUCT4 (Beta-fructofuranosidase 4)
At1g22650	1.09 ± 0.24	0.572	481	454	similar to beta-fructofuranosidase
At1g35580	1.17 ± 0.22	0.286	43263	38695	CINV1 (Cytosolic Invertase 1)
At1g56560	1.06 ± 0.00	0.000	3663	3453	similar to beta-fructofuranosidase
At3g05820	1.23 ± 0.18	0.133	47	39	similar to beta-fructofuranosidase
At3g06500	0.99 ± 0.04	0.714	4451	4507	similar to beta-fructofuranosidase
At4g09510	0.97 ± 0.05	0.350	1376	1438	similar to beta-fructofuranosidase
At4g34860	0.92 ± 0.06	0.145	29269	29508	similar to beta-fructofuranosidase
At5g22510	0.94 ± 0.06	0.249	2977	3191	similar to beta-fructofuranosidase
fructose to fructose 6-P					
At2g19860	1.00 ± 0.02	0.696	2748	2730	HXK2 (Hexokinase 2)
At4g29130	1.00 ± 0.08	0.941	8306	8434	HXK1 (Hexokinase 1)
glucose 1-P to glucose 6-P					
At1g23190	0.97 ± 0.13	0.712	10718	11361	similar to phosphoglucomutase
At1g70730	0.87 ± 0.07	0.094	8726	10045	similar to phosphoglucomutase
At5g51820	0.86 ± 0.13	0.223	1150	1357	PGM1 (Phosphoglucomutase 1)
glucose to glucose 6-P					
At1g47840	0.67 ± 0.02 ^a	0.003	4588	6768	HXK3 (Hexokinase 3)
At1g50460	0.94 ± 0.03	0.079	3515	3771	HKL1 (Hexokinase like 1)
At2g19860	1.00 ± 0.02	0.696	2748	2730	HXK2 (Hexokinase 2)
At3g20040	0.76 ± 0.02 ^a	0.004	3252	4311	HXK4 (Hexokinase 4)
At4g29130	1.00 ± 0.08	0.941	8306	8434	HXK1 (Hexokinase 1)
At4g37840	0.64 ± 0.15	0.077	71542	48773	HKL3 (Hexokinase like 3)
glucose 6-P to fructose 6-P					
At4g24620	0.94 ± 0.12	0.509	17908	18686	PGI1 (Phosphoglucose Isomerase 1)
At5g42740	1.04 ± 0.15	0.670	4444	4248	PGIC (Glucose-6-phosphate isomerase, cytosolic)
a-D-glucose-6-P to trehalose					
At1g06410	1.03 ± 0.04	0.369	8159	7872	ATTPS7 (Trehalose-6-phosphate synthase 7)
At1g22210	1.29 ± 0.12	0.043	67	52	similar to ATTPPB (Trehalose-6-phosphate phosphatases)
At1g23870	1.01 ± 0.26	0.942	9278	8813	ATTPS9 (Trehalose-6-phosphate synthase 9)
At1g35910	1.19 ± 0.24	0.271	5313	4171	similar to trehalose-6-phosphate phosphatase
At1g60140	1.09 ± 0.25	0.572	15516	13642	ATTPS10 (Trehalose-6-phosphate synthase 10)
At1g68020	0.78 ± 0.07 ^a	0.040	2022	2515	ATTPS6 (Trehalose-6-phosphate synthase 6)
At1g70290	0.99 ± 0.12	0.929	2968	3057	ATTPS8 (Trehalose-6-phosphate synthase 8)
At1g78090	1.49 ± 0.29	0.069	8381	5932	ATTPPB (Trehalose-6-phosphate phosphatases)
At1g78580	0.83 ± 0.13	0.173	3236	3958	ATTPS1 (Trehalose-6-phosphate synthase 1)
At2g18700	1.28 ± 0.15	0.069	2870	2140	ATTPS11 (Trehalose-6-phosphate synthase 11)
At2g22190	1.46 ± 0.31	0.089	6258	4783	similar to trehalose-6-phosphate phosphatase
At4g12430	1.24 ± 0.35	0.307	1907	1640	similar to trehalose-6-phosphate phosphatase
At4g17770	0.80 ± 0.15	0.178	7561	9651	ATTPS5 (Trehalose-6-phosphate synthase 5)
At4g22590	1.22 ± 0.27	0.255	12844	10795	similar to trehalose-6-phosphate phosphatase
At4g27550	0.73 ± 0.29	0.291	21	32	similar to ATTPS2 (Trehalose-6-phosphate synthase 2)
At4g39770	1.22 ± 0.20	0.172	6971	6081	similar to trehalose-6-phosphate phosphatase
At5g51460	1.03 ± 0.04	0.338	3126	3047	ATTPPA (Trehalose-6-phosphate phosphatases)
trehalose to glucose					
At4g24040	1.09 ± 0.26	0.584	849	833	ATTRE1 (Trehalase 1)

Table continues on following page

(Table continues on following page.)

Table 4. (Continued from previous page.)

AGI code	Fold change (<i>stop1</i> -mutant/WT)		Intensity		Description
	FC ± SD	P-value (1)	<i>stop1</i> -mutant	WT	
fructose 6-P to glyceraldehyde-3-P					
At1g18270	0.96 ± 0.16	0.744	9059	9400	similar to 6-phosphogluconate dehydrogenase
At2g01140	1.10 ± 0.18	0.395	33744	30996	Fructose-bisphosphate aldolase 3
At2g21170	0.88 ± 0.14	0.298	15007	17128	TIM (Triosephosphate isomerase)
At2g21330	2.55 ± 2.15	0.157	249	64	Fructose-bisphosphate aldolase 1
At2g22480	0.91 ± 0.10	0.266	9829	10728	PFK5 (Phosphofructokinase 5)
At2g36460	0.84 ± 0.07	0.073	19427	23249	similar to fructose-bisphosphate aldolase
At3g52930	0.79 ± 0.04 ^a	0.013	90554	114717	similar to fructose-bisphosphate aldolase
At3g55440	0.93 ± 0.02	0.017	88713	95021	ATCTIMC (Cytosolic triose phosphate isomerase)
At4g26270	1.38 ± 0.47	0.231	2820	2139	PFK3 (Phosphofructokinase 3)
At4g26520	1.68 ± 0.88	0.375	18	10	Fructose-bisphosphate aldolase
At4g29220	1.08 ± 0.09	0.264	10584	9652	PFK1 (Phosphofructokinase 1)
At4g32840	0.96 ± 0.06	0.359	879	925	PFK6 (Phosphofructokinase 6)
At4g38970	4.10 ± 2.96	0.063	6971	6081	Fructose-bisphosphate aldolase 2
At5g03690	0.98 ± 0.09	0.691	1498	1549	similar to fructose-bisphosphate aldolase
At5g47810	0.85 ± 0.15	0.263	860	1032	PFK2 (Phosphofructokinase 2)
At5g56630	0.90 ± 0.10	0.230	13698	15457	PFK7 (Phosphofructokinase 7)
At5g61580	0.97 ± 0.09	0.627	4787	4816	PFK4 (Phosphofructokinase 4)
glyceraldehyde-3-P to 3-phosphoglycerate					
At1g12900	3.02 ± 1.53	0.057	350	105	similar to GAPA (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A)
At1g13440	0.82 ± 0.07	0.051	115738	139222	GAPC2 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2)
At1g16300	1.00 ± 0.08	0.980	8787	8849	similar to GAPC1 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1)
At1g32060	4.60 ± 4.32	0.080	84	13	PRK (Phosphoribulokinase)
At1g42970	3.10 ± 2.15	0.089	718	175	GAPB (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B)
At1g56190	0.90 ± 0.17	0.433	590	691	Phosphoglycerate kinase
At1g79530	0.98 ± 0.05	0.509	36346	37385	similar to GAPC2 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2)
At1g79550	0.93 ± 0.20	0.620	27039	29195	PGK (Phosphoglycerate kinase)
At2g24270	2.05 ± 1.87	0.252	219	86	ALDH11A3 (NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
At3g04120	0.77 ± 0.16	0.159	55709	74529	GAPC (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C)
At3g12780	0.99 ± 0.21	0.927	4676	4852	PGK1 (Phosphoglycerate kinase 1)
At3g26650	3.42 ± 2.33	0.075	665	172	GAPA (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A)
At3g62410	1.21 ± 0.19	0.163	39	32	CPI2-2 (CPI2 domain-containing protein 2)
3-phosphoglycerate to PEP					
At1g09780	1.09 ± 0.19	0.475	51145	47522	PGM1 (Phosphoglycerate mutase 1)
At1g22170	1.05 ± 0.14	0.574	4315	4057	similar to phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase
At1g74030	1.00 ± 0.09	0.947	26048	26318	similar to LOS2 (Low expression of osmotically responsive genes 1)
At1g78050	1.08 ± 0.23	0.582	14098	12834	PGM (Phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase)
At2g29560	1.00 ± 0.05	0.907	3345	3335	similar to LOS2 (Low expression of osmotically responsive genes 1)
At2g36530	0.95 ± 0.13	0.582	86862	92448	LOS2 (Low expression of osmotically responsive genes 1)
At3g08590	1.03 ± 0.16	0.785	3668	3626	PGM2 (Phosphoglycerate mutase 2)
At3g50520	0.98 ± 0.02	0.271	5603	5731	similar to phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase
At4g09520	0.84 ± 0.03	0.018	7183	8484	similar to phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase
At5g04120	2.88 ± 2.30	0.121	341	123	similar to phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase
PEP to pyruvate					
At1g32440	0.99 ± 0.09	0.814	6125	6182	PKP3 (Plastidial pyruvate kinase 3)
At2g36580	1.09 ± 0.16	0.415	7256	6881	similar to pyruvate kinase
At3g22960	0.80 ± 0.03	0.010	9925	12404	PKP1 (Plastidial pyruvate kinase 1)
At3g25960	0.99 ± 0.09	0.824	115	119	similar to pyruvate kinase
At3g49160	1.06 ± 0.13	0.513	415	382	similar to pyruvate kinase
At3g52990	1.13 ± 0.34	0.551	6798	6418	similar to pyruvate kinase
At3g55650	1.06 ± 0.15	0.525	144	136	similar to pyruvate kinase
At3g55810	1.01 ± 0.15	0.906	56	55	similar to pyruvate kinase
At4g26390	0.98 ± 0.08	0.705	322	325	similar to pyruvate kinase
At5g08570	0.94 ± 0.05	0.187	11811	12696	similar to pyruvate kinase
At5g52920	0.89 ± 0.01	0.002	19158	21675	PKP2 (Plastidial pyruvate kinase 2)
At5g56350	1.06 ± 0.08	0.362	23173	22060	similar to pyruvate kinase
At5g63680	1.10 ± 0.11	0.227	7771	7173	similar to pyruvate kinase
pyruvate to acetyl-CoA					
At1g01090	0.93 ± 0.11	0.386	40375	44908	PDH-E1 ALPHA (Pyruvate dehydrogenase E1 alpha)
At1g24180	1.11 ± 0.03	0.026	29557	26654	IAR4 (Pyruvate dehydrogenase E1 alpha)
At1g30120	0.89 ± 0.13	0.299	9981	11381	PDH-E1 BETA (Pyruvate dehydrogenase E1 beta)
At1g34430	0.84 ± 0.13	0.182	5861	7078	EMB3003 (Embryo defective 3003)
At1g48030	1.02 ± 0.09	0.732	12188	12059	MTLPD1 (Mitochondrial Liponamide dehydrogenase 1)
At1g54220	1.03 ± 0.01	0.065	2275	2202	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 3 of pyruvate dehydrogenase
At1g59900	0.96 ± 0.01	0.038	5368	5572	AT-E1 ALPHA (E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase)
At3g13930	0.98 ± 0.08	0.746	16956	17195	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 2 of pyruvate dehydrogenase
At3g16950	0.84 ± 0.04	0.028	6900	8286	LPD1 (Liponamide dehydrogenase 1)
At3g17240	1.01 ± 0.03	0.675	22675	22577	LPD2 (Liponamide dehydrogenase 2)
At3g25860	0.88 ± 0.04	0.041	12264	14026	LT A2 (Dihydroliponamide S-acetyltransferase 2)
At3g52200	1.00 ± 0.03	0.890	6639	6634	LT A3 (Dihydroliponamide S-acetyltransferase 3)
At4g16155	0.86 ± 0.12	0.208	390	457	PTLPD2 (Plastidic/liponamide dehydrogenase 2)
At5g17380	1.08 ± 0.07	0.183	4314	3917	similar to CSR1 (Chlorsulfuron/Imidazolinone resistant 1)
At5g50850	1.02 ± 0.05	0.587	22178	21718	MAB1 (Pyruvate dehydrogenase)

(Table continues on following page.)

Table 4. (Continued from previous page.)

AGI code	Fold change (<i>stop1</i> -mutant/WT)		Intensity		Description
	FC ± SD	P-value (1)	<i>stop1</i> -mutant	WT	
pyruvate to acetaldehyde					
At4g33070	1.28 ± 0.15 ^b	0.070	34180	34345	similar to PDC3 (Pyruvate decarboxylase 3)
At5g01320	1.32 ± 0.19	0.077	154	117	similar to PDC3 (Pyruvate decarboxylase 3)
At5g01330	1.10 ± 0.32	0.625	51	49	PDC3 (Pyruvate decarboxylase 3)
At5g54960	1.30 ± 0.12 ^b	0.037	9572	7432	PDC2 (Pyruvate decarboxylase 2)
acetaldehyde to ethanol					
At1g77120	1.25 ± 0.31	0.252	2323	1790	ADH1 (Alcohol dehydrogenase 1)
pyruvate to lactate					
At4g17260	0.88 ± 0.05	0.049	2763	3159	similar to PMDH2 (peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2)
acetyl-CoA to citrate					
At2g11270	0.98 ± 0.23	0.869	54	59	similar to CSY5 (Citrate synthase 5)
At2g44350	1.03 ± 0.10	0.692	27664	27236	ATCS (Citrate synthase 4)
At3g60100	1.06 ± 0.14	0.521	2990	2860	CSY5 (Citrate synthase 5)
citrate to 2-OG					
At1g54340	1.05 ± 0.05	0.215	5484	5215	ICDH (NADP-specific isocitrate dehydrogenase)
At1g65930	0.99 ± 0.08	0.857	71656	72245	similar to ICDH (Isocitrate dehydrogenase)
At2g05710	1.00 ± 0.15	0.988	26157	25342	ACO2 (Aconitate hydratase 2)
At2g17130	1.05 ± 0.08	0.390	14665	13899	IDH2 (NAD ⁺ dependent isocitrate dehydrogenase subunit 2)
At4g26970	0.96 ± 0.18	0.753	37218	36807	ACO3 (Aconitate hydratase 3)
At4g35260	1.03 ± 0.10	0.604	34	38	IDH1 (NAD ⁺ dependent isocitrate dehydrogenase 1)
At4g35650	0.87 ± 0.22	0.441	35372	34632	Isocitrate dehydrogenase NAD regulatory subunit 3 (IDH3)
At4g35830	1.03 ± 0.07	0.520	33	47	ACO1 (Aconitate hydratase 1)
At5g03290	1.04 ± 0.06	0.334	17121	16462	Isocitrate dehydrogenase NAD catalytic subunit 5 (IDH5)
At5g14590	0.98 ± 0.17	0.828	6783	7145	similar to ICDH (Isocitrate dehydrogenase)
At5g54950	1.01 ± 0.22	0.958	93	90	similar to aconitate hydratase
2-OG to succinate					
At2g20420	1.07 ± 0.09	0.315	21576	20448	Succinyl-CoA ligase beta-chain
At3g55410	1.03 ± 0.07	0.563	10245	9949	similar to 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component
At5g08300	1.05 ± 0.16	0.608	20634	19905	Succinyl-CoA ligase subunit alpha-1
At5g23250	0.91 ± 0.09	0.265	6239	6890	Succinyl-CoA ligase subunit alpha-2
At5g55070	1.07 ± 0.07	0.233	12236	11547	similar to 2-oxoacid dehydrogenase family protein
At5g65750	1.05 ± 0.05	0.165	2600	2441	similar to 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component
Glu to Gln					
At1g48470	0.91 ± 0.03	0.048	702	770	GLN1-5 (Cytosolic glutamate synthetase)
At1g66200	0.69 ± 0.06 ^a	0.019	58574	84217	ATGSR2 (Cytosolic glutamate synthetase 2)
At3g17820	0.82 ± 0.18	0.267	6888	8409	ATGSKB6 (Cytosolic glutamate synthetase)
At3g53180	0.86 ± 0.09	0.127	4700	5350	Glutamate-ammonia ligase
At5g16570	1.44 ± 0.37	0.130	6681	4339	GLN1-4 (Cytosolic glutamate synthetase)
At5g35630	0.90 ± 0.04	0.061	12179	13582	GS2 (Glutamine synthetase 2)
At5g37600	0.90 ± 0.13	0.328	12924	13782	ATGSR1 (Cytosolic glutamate synthetase 1)
Glu to 2-OG					
At1g51720	1.01 ± 0.08	0.861	4157	4049	similar to GDH2
At3g03910	1.41 ± 0.23	0.070	4225	2966	GDH3 (Glutamate dehydrogenase 3)
At5g07440	0.54 ± 0.15 ^a	0.060	22572	45606	GDH2 (Glutamate dehydrogenase 2)
At5g18170	0.27 ± 0.11 ^a	0.030	1941	8258	GDH1 (Glutamate dehydrogenase 1)
Glu to GABA					
At1g65960	0.98 ± 0.25	0.896	15676	16607	GAD2 (glutamate decarboxylase 2)
At2g02000	0.87 ± 0.07	0.089	153	176	GAD3 (glutamate decarboxylase 3)
At2g02010	1.76 ± 0.56	0.088	271	141	GAD4 (glutamate decarboxylase 4)
At3g17760	1.17 ± 0.27	0.355	29	25	GAD5 (glutamate decarboxylase 5)
At5g17330	0.49 ± 0.10 ^a	0.025	24520	50641	GAD1 (glutamate decarboxylase 1)
GABA to succinate					
At1g79440	1.14 ± 0.07	0.071	8537	7625	SSADH1 (succinic semialdehyde dehydrogenase1)
At3g22200	0.76 ± 0.09 ^a	0.060	13716	18576	GABA-T (gamma-Aminobutyric acid transaminase)
succinate to fumarate					
At1g08480	0.93 ± 0.12	0.421	17556	18924	Unknown protein
At1g47420	1.00 ± 0.05	0.963	32858	32916	Unknown protein
At2g18450	0.74 ± 0.19	0.175	1044	1337	SDH1-2 (Succinate dehydrogenase)
At2g46390	1.03 ± 0.02	0.114	30984	29934	Unknown protein
At2g46505	0.95 ± 0.05	0.189	4500	4777	SDH4 (Succinate dehydrogenase)
At3g27380	0.98 ± 0.09	0.744	18292	18582	SDH2-1 (Succinate dehydrogenase)
At3g47833	0.92 ± 0.06	0.144	11730	12810	Unknown protein
At5g40650	0.93 ± 0.14	0.501	7858	8581	SDH2-2 (Succinate dehydrogenase)
At5g40650	0.93 ± 0.14	0.501	7858	8581	SDH2-2 (Succinate dehydrogenase)
At5g65165	0.69 ± 0.18	0.128	61	87	SDH2-3 (Succinate dehydrogenase)
At5g66760	1.06 ± 0.15	0.530	18616	17681	SDH1-1 (Succinate dehydrogenase)
fumarate to malate					
At2g47510	0.94 ± 0.24	0.706	2912	3222	FUM1 (Fumarase 1)
malate to OAA					

Table continues on following page

(Table continues on following page.)

Table 4. (Continued from previous page.)

AGI code	Fold change (<i>stop1</i> -mutant/WT)		Intensity		Description
	FC ± SD	P-value (1)	<i>stop1</i> -mutant	WT	
OAA to malate					
At1g04410	0.97 ± 0.05	0.392	80989	83890	MDH1 (Malate dehydrogenase 1, cytosolic)
At1g53240	0.95 ± 0.30	0.815	2856	3055	MDH1 (Malate dehydrogenase 1, mitochondrial)
At3g15020	0.99 ± 0.11	0.885	4353	4428	MDH2 (Malate dehydrogenase 2, mitochondrial)
<i>At3g53910</i>	<i>0.82 ± 0.93</i>	<i>0.739</i>	<i>14</i>	<i>15</i>	<i>similar to MDH (Malate dehydrogenase)</i>
At5g43330	1.19 ± 0.21	0.232	3960	3269	MDH2 (Malate dehydrogenase 2, cytosolic)
At5g56720	1.06 ± 0.06	0.227	1067	1010	similar to malate dehydrogenase, cytosolic
<i>At5g58330</i>	<i>1.50 ± 0.48</i>	<i>0.153</i>	<i>275</i>	<i>185</i>	<i>similar to MDH (Malate dehydrogenase)</i>
malate to pyruvate					
At1g79750	0.96 ± 0.14	0.667	10233	11040	ATNADP-ME4 (Malic enzyme 4)
At2g13560	1.01 ± 0.03	0.650	24116	24026	similar to NAD-dependent malic enzyme
At2g19900	0.68 ± 0.09 ^a	0.038	2565	3735	ATNADP-ME1 (Malic enzyme 1)
At4g00570	0.94 ± 0.05	0.161	8775	9387	similar to NAD-dependent malic enzyme
At5g11670	0.67 ± 0.06 ^a	0.017	26981	39328	ATNADP-ME2 (Malic enzyme 2)
<i>At5g25880</i>	<i>0.87 ± 0.08</i>	<i>0.122</i>	<i>116</i>	<i>133</i>	<i>ATNADP-ME3 (Malic enzyme 3)</i>
OAA to PEP					
At4g37870	1.37 ± 0.24	0.090	3013	3461	PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase)
<i>At5g65690</i>	<i>0.86 ± 0.07</i>	<i>0.080</i>	<i>521</i>	<i>619</i>	<i>PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase)</i>
OAA to Asp					
At1g62800	0.86 ± 0.12	0.198	17354	20720	ASP4 (Aspartate aminotransferase 4)
<i>At2g13810</i>	<i>4.43 ± 0.84</i>	<i>0.005</i>	<i>1113</i>	<i>269</i>	<i>similar to AGD2 (Aberrant growth and death 2)</i>
At2g22250	1.11 ± 0.07	0.118	14565	12942	similar to aminotransferase class I and II family protein
At2g30970	0.89 ± 0.10	0.217	22542	25304	ASP1 (Aspartate aminotransferase 1)
At4g31990	0.85 ± 0.09	0.112	20187	24001	ASP5 (Aspartate aminotransferase 5)
At5g11520	1.11 ± 0.13	0.236	10162	8949	ASP3 (Aspartate aminotransferase 3)
At5g19550	0.89 ± 0.09	0.183	6234	7061	ASP2 (Aspartate aminotransferase 2)
Asp to OAA					
At5g14760	2.18 ± 0.64 ^b	0.042	4944	2203	similar to SDH1-1 (Succinate dehydrogenase 1-1)
Asp to Asn					
<i>At3g47340</i>	<i>2.43 ± 2.03</i>	<i>0.169</i>	<i>921</i>	<i>379</i>	<i>ASN1 (Asparagine synthetase 1)</i>
At5g10240	0.90 ± 0.24	0.557	3505	4041	ASN3 (Asparagine synthetase 3)
At5g65010	1.03 ± 0.18	0.823	2314	2292	ASN2 (Asparagine synthetase 2)
3-phosphoglycerate to Ser					
At1g17745	0.94 ± 0.17	0.609	33485	36862	PGDH (3-Phosphoglycerate dehydrogenase)
At1g18640	0.91 ± 0.06	0.125	4580	5088	PSP (3-Phosphoserine phosphatase)
At2g17630	0.92 ± 0.27	0.676	4056	4517	similar to PSAT (Phosphoserine aminotransferase)
<i>At3g19480</i>	<i>1.06 ± 0.23</i>	<i>0.703</i>	<i>74</i>	<i>72</i>	<i>similar to PGDH (3-Phosphoglycerate dehydrogenase)</i>
At4g34200	1.01 ± 0.15	0.896	2910	3215	similar to PGDH (3-Phosphoglycerate dehydrogenase)
<i>At4g35630</i>	<i>1.01 ± 0.09</i>	<i>0.824</i>	<i>158</i>	<i>170</i>	<i>PSAT (Phosphoserine aminotransferase)</i>
Ser to Gly					
At1g22020	1.02 ± 0.01	0.102	2885	2826	SHM6 (Serine hydroxymethyltransferase 6)
At1g36370	1.10 ± 0.06	0.098	4158	3818	SHM7 (Serine hydroxymethyltransferase 7)
At4g13890	1.65 ± 0.34 ^b	0.049	4682	3030	SHM5 (Serine hydroxymethyltransferase5)
At4g13930	0.96 ± 0.21	0.779	54423	58176	SHM4 (Serine hydroxymethyltransferase 4)
At4g32520	0.93 ± 0.14	0.501	5781	6297	SHM3 (Serine hydroxymethyltransferase 3)
At4g37930	0.88 ± 0.10	0.208	3013	3461	SHM1 (Serine hydroxymethyltransferase 1)
At5g26780	1.07 ± 0.06	0.180	5921	5509	SHM2 (Serine hydroxymethyltransferase 2)
Ser to O-acetyl-L-Ser					
At1g55920	1.12 ± 0.24	0.457	16315	13571	ATSERAT2-1 (Serine acetyltransferase 2-1)
At2g17640	0.98 ± 0.15	0.810	1111	1158	ATSERAT3-1 (Serine acetyltransferase 3-1)
At3g13110	1.10 ± 0.04	0.047	20570	18529	ATSERAT2-2 (Serine acetyltransferase 2-2)
<i>At4g35640</i>	<i>0.90 ± 0.34</i>	<i>0.659</i>	<i>11</i>	<i>13</i>	<i>ATSERAT3-2 (Serine acetyltransferase 3-2)</i>
At5g56760	0.88 ± 0.05	0.069	22131	25210	ATSERAT1-1 (Serine acetyltransferase 1-1)
O-acetyl-L-Ser to Cys					
At1g55880	0.93 ± 0.11	0.404	2774	3094	similar to cysteine synthase
At2g43750	0.90 ± 0.11	0.296	5989	6814	OASB (Cysteine synthase 1)
<i>At3g03630</i>	<i>0.91 ± 0.13</i>	<i>0.367</i>	<i>498</i>	<i>563</i>	<i>CS26 (O-acetylserine lyase)</i>
At3g04940	0.99 ± 0.13	0.912	5834	5966	ATCYSD1 (Cysteine synthase D1)
At3g22460	1.20 ± 0.27	0.291	3457	2900	similar to OASA1 (O-Acetylserine lyase)
At3g61440	1.02 ± 0.03	0.301	44581	43380	ATCYSC1 (Cysteine synthase C1)
At4g14880	1.04 ± 0.10	0.595	52006	50718	OASA1 (Cysteine synthase)
At5g28020	0.74 ± 0.14	0.112	1911	2494	ATCYSD2 (Cysteine synthase D2)
<i>At5g28030</i>	<i>1.00 ± 0.11</i>	<i>0.987</i>	<i>716</i>	<i>731</i>	<i>similar to ATCYSD2 (Cysteine synthase D2)</i>
Cys to glutathione					
At4g23100	0.98 ± 0.08	0.774	32690	33728	GSH1 (Glutathione synthetase 1)
At5g27380	0.92 ± 0.13	0.428	14998	15709	GSH2 (Glutathione synthetase 2)

Biologically independent 3 replication of competitive microarray analyses were carried out as follows; *stop1*-mutant versus wild type (WT) in low pH (pH 4.5, 24 h). Means of fold change (FC) and whose $\pm$ SD are shown. Different letters (a; down-regulation, b; up-regulation) indicates significant difference from FC 1.0 (t-test, $P < 0.05$). Means of intensity were also shown in *stop1* -mutant and WT. Italicized gene showed the intensity <1000.

Table 5. Metabolite profile in major carbohydrate metabolic pathways (see Fig. 6) of the *STOPI*-KO relative to those determined for the WT under low pH conditions.

	method	Ratio of <i>STOPI</i> -KO to WT			
		rep.1	rep.2	rep.3	mean $\pm$ SD
4-aminobutyrate	GC-MS	0.62	0.48	0.60	0.57 $\pm$ 0.07 ^a
2-oxoglutarate	GC-MS	1.19	0.73	1.05	0.99 $\pm$ 0.24
citrate	GC-MS	0.70	0.76	0.93	0.80 $\pm$ 0.12
fructose	GC-MS	1.19	1.05	1.11	1.12 $\pm$ 0.07
fructose 6-phosphate	GC-MS	1.08	1.17	1.25	1.16 $\pm$ 0.08
fumarate	CE-MS	0.50	0.72	0.68	0.63 $\pm$ 0.12
glucose	GC-MS	0.28	0.87	0.87	0.67 $\pm$ 0.34
glucose 1-phosphate	GC-MS	0.58	0.95	0.85	0.79 $\pm$ 0.19
glucose 6-phosphate	GC-MS	1.09	1.39	1.11	1.19 $\pm$ 0.17
glutathione (reduced)	CE-MS	1.32	1.21	0.86	1.13 $\pm$ 0.24
glycine	GC-MS	0.77	0.88	0.69	0.78 $\pm$ 0.09
L-asparagine	GC-MS	1.21	1.02	1.36	1.20 $\pm$ 0.17
L-aspartate	GC-MS	0.78	0.77	0.91	0.82 $\pm$ 0.08
L-glutamate	GC-MS	1.16	1.00	1.12	1.09 $\pm$ 0.08
L-glutamine	GC-MS	1.41	1.30	1.80	1.51 $\pm$ 0.26
L-serine	GC-MS	1.16	1.04	1.11	1.11 $\pm$ 0.06
malate	GC-MS	0.97	0.74	0.90	0.87 $\pm$ 0.12
O-acetyl-L-serine	CE-MS	1.45	1.70	1.86	1.67 $\pm$ 0.21
pyruvate	GC-MS	0.56	-	0.51	0.54 $\pm$ 0.04 ^a
succinate	GC-MS	0.77	0.58	0.67	0.67 $\pm$ 0.09 ^a
sucrose	GC-MS	4.09	5.44	4.38	4.64 $\pm$ 0.71 ^a
trehalose	GC-MS	0.89	1.04	0.97	0.97 $\pm$ 0.07

Letter indicates significant difference between *STOPI* -KO and WT (t-test, $P < 0.05$).

これらの結果は、*stop1* 変異体で pH 調節経路が減少制御されたことを示している。他方、スクロースの濃度は *stop1* 変異体で有意に増加していた。このことは、STOP1 の機能障害が根におけるスクロースの含量にも影響を与えていることを示唆している。これはヘキソキナーゼ (HXK3、HXK4)のいくつかのホモログの転写抑制によって起こっている。

STOP1 タンパク質の細胞内局在

stop1 変異体における様々な遺伝子の転写抑制は、STOP1 が低 pH や Al 応答経路の遺伝子発現に関わっていることを示している。この可能性を探るさらなる実験で、STOP1 に GFP を接続したタンパク質をタマネギ (*Allium cepa*)表皮細胞にトランジェントアッセイすることで STOP1 タンパク質の細胞内局在を決定した。コントロールのコンストラクト (CaMV35S::GFP)をパーティクルガンで表皮細胞に入れたところ、細胞全体が緑色の蛍光を示し、核の蛍光はわずかであった(Fig. 8)。これは典型的な植物細胞の GFP の細胞局在であった。対照的に、CaMV35S::STOP1:GFP を導入したものは、核のみで蛍光を発した(Fig. 8)。これは STOP1 が核に局在することを明らかにし、転写因子としてか、または低 pH や Al シグナル伝達経路にある他のメンバーの転写調節に関与する可能性を示している。

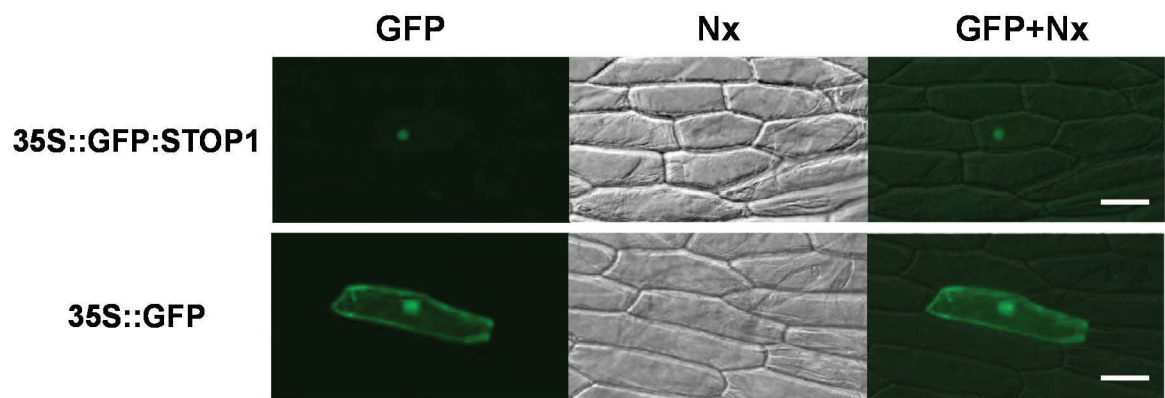


Figure 8. Localization of the GFP::STOP1 protein that was transiently expressed in onion epidermis cells. Vectors containing CaMV35S::GFP:STOP1 (top) or CaMV35S::GFP (bottom) were introduced by particle bombardment. Fluorescence images (left) and brightfield images (middle) are merged at right. Bars = 100 μ m.

1-4 考察

比較マイクロアレイ解析後の定量 RT-PCR は、STOP1 の機能障害が AtALMT1 (Kobayashi et al., 2007) と ALS3 (Larsen et al., 2005) の 2 つの重要な Al 耐性遺伝子の転写抑制によって引き起こされたことを明らかにした (Fig. 3)。加えて、もう 1 つの Al 耐性遺伝子である AtMATE は、STOP1-KO で遺伝子の発現がかなり抑制されていたため STOP1 によって調節されていると同定された (Liu et al., 2009)。本研究では、AtMATE は比較マイクロアレイ解析のクオリティーコントロールによって排除された。これは野生型における低 pH 誘導の 3 連のうち、2 連のデータで異常なスキャンデータであったためであるが、転写レベルは、Al によって大きく抑制されていた (Al 処理における *stop1* 変異体 / 野生型の FC は 0.23 ± 0.07 ; Table 3, Table 6)。まとめると、これらの結果は、Al 耐性の複数の遺伝子が、シロイヌナズナ STOP1 タンパク質を必要とする遺伝子発現経路によって共調節されていることを示している (Fig. 9)。

加えて、STOP1 の機能不全は、低 pH 耐性に影響を与えるイオン恒常性や pH 調節経路に属する遺伝子の転写抑制も引き起こす (Table 3; Fig. 7)。これは、STOP1-KO と、AtALMT1-KO や ALS3-KO の Al 超感受性 KO 変異体の水耕、土耕栽培の生育応答結果と一致する (Fig. 4, Fig. 6)。STOP1-KO は低 pH 感受性であるが、低 pH 感受性ではない他の Al 感受性 KO 変異体と比べ、酸性土壌の生育実験で生育抑制されていた。これらの結果は、Al と低 pH 毒性の両者の耐性システムが、STOP1 を含んだシグナル伝達経路によって共調節されていることを明らかに示している (Fig. 9)。GFP を結合した STOP1 の細胞内局在の結果、STOP1 が核で転写因子か、または転写を調節する別の重要な因子として働くことが示された (Fig. 8)。

Table 6. List of genes rejected during quality control of microarray data analysis, while is likely greatly down-regulated in the *stopI* -mutant under AI and low pH conditions.

AGI code	Fold change in WT (AI/Control)					Repression in the <i>stopI</i> -mutant in AI (pH4.5/Control)					Repression in the <i>stopI</i> -mutant in low pH (stopI -mutant/WT)				
	FC ± SD		FC ± SD		P-value	FC ± SD		FC ± SD		P-value	FC ± SD		FC ± SD		P-value
	Raw	Control	Raw	Control		Raw	Control	Raw	Control		Raw	Control	Raw	Control	
AI	P	19294	16769	24366	P, A	30887	24366	P	1763	P	7602	1251	P	1106	1251
	0.072				0.038			0.013		0.013			0.042		
	1.16 ± 0.08				1.24 ± 0.10			0.23 ± 0.07		0.23 ± 0.07			0.88 ± 0.04		
	A11g51340														
	P	441	27	29	P	40	29	P	158	P	570	10	A	10	
	0.003				0.750			0.020		0.020			no replicates		
	15.73 ± 4.25				1.23 ± 1.62			0.27 ± 0.09		0.27 ± 0.09			1.03		
	A13g21790														
	P	222	132	220	P	198	220	P, A	16	P, A	86	101	P, A	101	168
	0.347				0.206			0.20 ± 0.12		0.037			0.019		
pH	A13g22250														
	P	36	36	54	P	66	54	P	16	P	69	39	P, A	11	39
	0.574				0.357			0.21 ± 0.12		0.035			0.065		
	A15g06870														
	P	295	114	111	P	118	111	P, A	35	P, A	271	28	P, A	23	28
	0.067				0.729			0.12 ± 0.04		0.006			0.312		
	A15g07570														
	P	415	131	127	P	88	127	P	277	P	1044	42	P, A	42	79
	0.005				0.056			0.26 ± 0.02		0.001			0.56 ± 0.11		
	A15g48100														
pH	P	173	99	113	P	116	113	P	39	P	317	25	A	22	25
	0.155				0.425			0.12 ± 0.06		0.014			no replicates		
	A15g60770														
	P	36	24	137	P	126	137	P, A	5	P, A	34	< 10	A	< 10	< 10
	0.488				0.980			0.14 ± 0.07		0.019			low intensity		
	A15g64210														
	P	46	72	56	P	56	56	P	37	P	58	41	P	18	41
	0.040				0.985			0.60 ± 0.09		0.029			0.42 ± 0.06		
	A11g69230														
	P														

Repressed genes in the *stopI* -mutants were identified by comparative microarray analyses as shown in Fig. 2 and Table 3. The genes listed here are rejected during quality control of the spot raw data due to Flags A or M, which indicated problems in the quality of spot data. If the gene carried multiple insufficient flags (i.e. A and/or M), the data was omitted from the datamining even if they had repressed in the *stopI* -mutant comparably to the genes listed in Table 1. Fold change (FC) and whose ± SD are shown. P-value of t-test for significant difference from fold change 1.00 is shown.

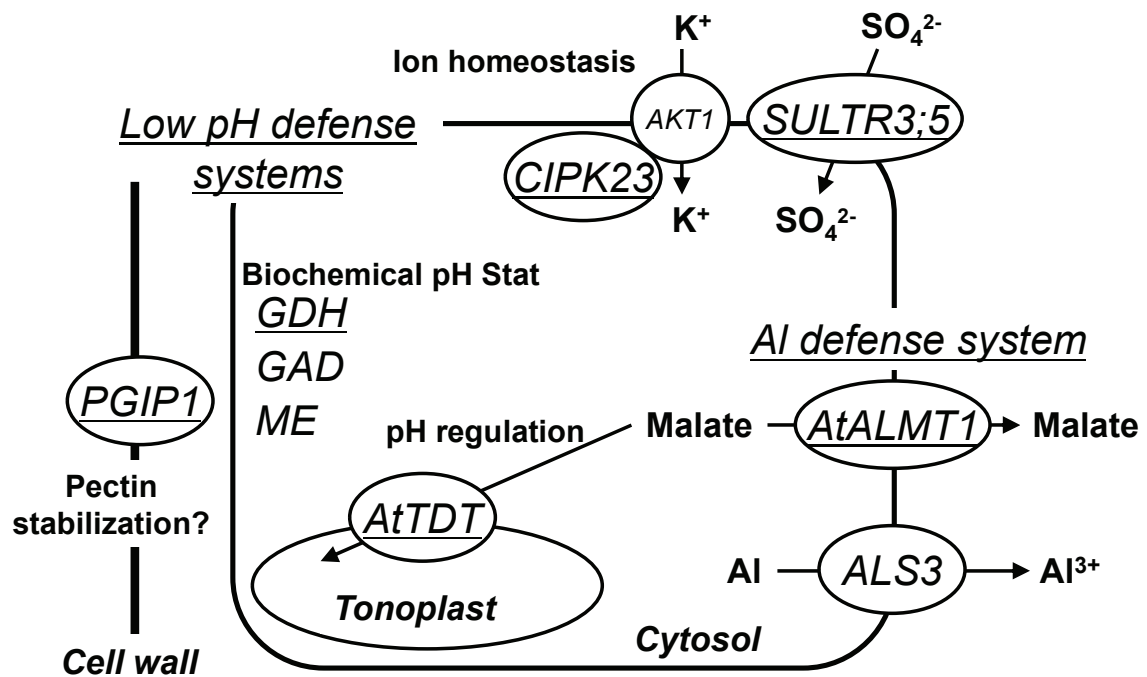


Figure 9. Schematic representation of regulating genes by STOP1 in relation to low pH and Al tolerance. Major genes identified as downregulated in the *stop1* mutant are shown with possible functions in low pH and Al stress tolerance. Except for *AKT1*, other genes were downregulated in the *stop1* mutant. *AtMATE* was reported by Liu et al. (2009). Underlined genes were greatly down-regulated in the *stop1* mutant with both low-pH and Al treatments (Table 3).

AtALMT1-KO や *ALS3*-KO は低 pH 毒性に感受性ではない。それゆえ、*stop1* 変異体で転写抑制されたこれ以外の遺伝子が、低 pH 毒性の耐性システムとして機能しているかもしれない。DNA マイクロアレイ解析 (e.g. *stop1* 変異体と野生型の比較マイクロアレイ)の次に行う半定量 RT-PCR は、*STOP1*-KO や相補組換え体 (i.e. CaMV 35S:: *STOP1* 導入 *stop1* 変異体)において、イオン恒常性や pH 調節の遺伝子が *STOP1* によって共調節されていることを明らかにした (Fig. 9)。例えば、液胞膜ジカルボキシトランスポーターである *AtTDT* (リンゴ酸トランスポーターの一種)は、*stop1* 変異体で転写抑制された遺伝子の 1 つとして選ばれた。この遺伝子の T-DNA 挿入変異体は細胞質の pH 恒常性が機能しなくなったため、シロイヌナズナの pH 調節の遺伝子として報告された (Hurth et al., 2005)。この遺伝子は *stop1* 変異体の低 pH 処理で大きく転写抑制されてはいなかったが (FC = 0.75)、その低 pH 超感受性の一部は説明できる。他の植物種の低 pH 耐性に重要な遺伝子のいくつかも、*stop1* 変異体で転写抑制されていた。例えば、様々な生物種で K⁺ の輸送やその恒常性は主な pH 調節機構として知られている (Zhang and Kone, 2002)。主要な K⁺トランスポーターの *AKT1* (Lee et al., 2007)を調節するキナーゼをコードする *CIPK23* の転写抑制は、*AKT1* 活性の減少を引き起こすことで *stop1* 変異体の pH 調節に影響を与えているかもしれない。SO₄ や NO₃ に関する他のトランスポーターも、植物の pH 調節に寄与しているかもしれない。トウモロコシでは、低 pH 培地の根の生育が、K₂SO₄ の添加で改善される (Yan et al., 1992)。そのうえ、高濃度の K⁺ は Al 処理したコムギの細胞内の酸性化を防いでいる (Lindberg and Strid, 1997)。一方、NO₃ の追加は、酸素欠乏下のトウモロコシのアシドーシスを緩和している (Libourel et al., 2006)。まとめると、これらのデータは、イオン恒常性やイオン輸送に関わる遺伝子の転写抑制が、*stop1* 変異体の H⁺ 感受性を引き起こすことを示唆している。この可能性は、シロイヌナズナの K⁺ト

ランスポーターの最近の研究で立証されている。cation-proton アンチポーターである CHX13 の過剰発現は、K⁺制限条件において、低 pH (pH 4.3 and 5.6; Zhao et al., 2008)での生育はわずかに改善したことから、シロイヌナズナの K⁺恒常性は H⁺感受性に関連があることを示している。

STOP1 の機能障害は、pH 調節の代謝パスウェイとした、植物細胞内の pH 恒常性プロセスと予想されるメカニズムにも影響を与えている。pH stat 経路の一部は、リンゴ酸酵素 (malic enzyme)やピルビン酸カルボキシラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、または乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase)によって構成され、H⁺を消費できる (Roberts et al., 1992; Sakano, 1998)。他の pH stat 経路で、GABA shunt は GDH、GAD、GABA-T で構成され、細胞質の H⁺調節に関与している (Bown and Shelp, 1997)。GABA shunt 経路は、細胞質のアシドーシスを引き起こす低酸素状態や他のストレスによって高まる (Crawford et al., 1994)。今回の結果は、これらの pH 調節パスウェイが *stop1* 変異体で抑制されていることを示している (Fig. 7)。これらの経路の主なアイソフォームである GDH1、GDH2、GAD1、GABA-T、ME1、ME2 は *stop1* 変異体で転写抑制されていた (Table 3; Fig. 7)。GAD アイソフォームの 1 つである GAD4 は、*stop1* 変異体で転写促進されていたが (Table 4)、GAD4 発現による貢献は、GAD1 よりも小さく、トータルの GAD 活性の評価が最近の研究で行われている (Miyashita and Good, 2008)。一方で、他の転写抑制された遺伝子の発現レベルは、野生型と *stop1* 変異体でかなり似ていたことから、これらの経路は *stop1* 変異体で抑制制御されていることを示している。これは *stop1* 変異体の H⁺感受性に影響を与えている可能性がある。興味深いことに、これらの遺伝子のオーソログは、他の生物種で酸性環境の適応に重要であるとして同定されている (Castanie-Cornet et al., 1999)。大腸菌では、GAD は低 pH 培地での生き残りに必須なものである (Yohannes et al., 2004)。*stop1* 変異

体で転写抑制されたこれらの遺伝子は、シロイヌナズナの低 pH 耐性メカニズムに関与しているかもしれない。

STOP1 によって調節された他の遺伝子は、過去に H⁺耐性遺伝子としてではなく、他の生物学的現象によって同定されたとしても、低 pH 耐性の機能を持っている可能性がある。例えば、*stop1* 変異体で転写抑制された遺伝子の 1 つである PGIP1 は、病原体感染の防御システムに関わるタンパク質としてよく知られている。Rudrappa らは、葉への病原菌による感染が AtALMT1 の発現を誘導し、根圏の有用菌を強化したことを報告した (Rudrappa et al., 2008)。これは、STOP1 が生物的、非生物的有害因子の両方の防御システムに属する多面性遺伝子であることを示していることから、STOP1 は PGIP 発現を調節していると考えられる。一方で、PGIP1 も根の細胞壁における機能により、H⁺耐性の潜在的な役割を持っている。ペクチン領域のポリガラクトuron酸 (polygalacturonic acid) に結合するこのタンパク質は、“egg box”といわれる構造物を構築する (Spadoni et al., 2006)。この構造物は、共有結合によるペクチン鎖の結合に必須であり (O'Neill et al., 2004)、低 pH 条件によるその弱体化は、シロイヌナズナ根の H⁺毒性の一つとされている (Koyama et al., 2001)。H⁺耐性における PGIP1 の役割は未だ明らかになっていないが、酵母において細胞壁の安定を保つ、類似の機能をもつタンパク質が低 pH 耐性メカニズムの 1 つとして同定されている。マンノース部分を輸送するタンパク質である CWP2 (for cell wall 2) は、酵母において低 pH 条件で細胞壁を安定させることができるため、H⁺耐性に必須である (Skrzypek et al., 1997)。興味深いことに、PGIP1 は中性条件でペクチンなどの基質を安定させるため、病原体のポリガラクトナーゼ (polygalacturonase) を阻害する一方で、ペクチンの合成は低 pH 条件で増加する (Spadoni et al., 2006)。加えて、PGIP1 のホモログである PGIP2 も *stop1* 変異体で有意に転写抑制されていたが、マイクロアレイのスクランデータ

のクオリティーコントロールの段階で排除されていた (Table 6)。シロイヌナズナ根の H⁺耐性に関するこれら PGIP タンパク質の貢献について、さらなる研究により、評価することが必要である。全体的に、*stop1* 変異体で転写抑制されていた遺伝子は、植物や他の生物種の低 pH 耐性や pH 恒常性に関する遺伝子として決定された、様々な遺伝子で構成されている。植物の研究における実験的な証拠は限定的であるが、イオン輸送と炭素、窒素 (CN) 代謝の変動による連携は、低 pH 環境に適応するためであり、他の生物種でも共通である。例えば、魚類の低 pH 適応はカリウム、ナトリウム、水素輸送や CN 代謝の変化であることが明らかとされ (Hirata et al., 2003)、さらに pH 0 付近で生息するバクテリアは、他の中性付近で生息するバクテリアに比べ、イオントランスポーターや CN 代謝の酵素のコピー数が多かった (Fütterer et al., 2004)。STOP1 制御遺伝子のさらなる研究で、高等植物の複雑な pH 耐性システムが明らかになるかもしれない。

制御タンパク質の一群 (e.g. protein kinases、transcriptional regulators)は、*stop1* 変異体で転写抑制された。そこにはシロイヌナズナ STOP1 の 2 つあるホモログのうちの 1 つが含まれており、これを STOP2 と名付けた。STOP2 は STOP1 と非常によく似た Cys-2-Hys-2 zinc finger domain を持っていた (Iuchi et al., 2007)。STOP2 の機能はまだ明らかになっていないが、他の zinc finger transcription factor と同様、STOP1 とともにいくつかの遺伝子の転写を共制御しているかもしれない。例えば、zinc finger transcription factor protein の DOF1 (At1g51700)は、そのホモログの DOF2 と共同で、根でアミノ酸と炭化水素の代謝の酵素をコードする遺伝子 (e.g. PEP and PPK; Yanagisawa et al., 2004)の転写を制御している (Yanagisawa, 2000)。STOP2 の役割の決定は、STOP1 によって調節される遺伝子の転写パスウェイを理解するうえで重要な課題である。一方で、H⁺による *stop1* 変異体の遺伝子転写制御は Al 処理でも起こった。これは、両者の

ストレスが同じシグナルを誘導することで、遺伝子発現を引き起こすことを示している。H⁺や Al による細胞質の酸性化の誘導で、pH を感知する GFP を用いたシロイヌナズナで確認された。Al 処理は、低 pH 処理下でのシロイヌナズナ根の細胞質に追加的な酸性化をもたらす(Moseyko and Feldman, 2001)。Al による細胞膜 H⁺-ATPase の阻害は、いくつかの植物種で報告されているが(Ahn et al., 2001)、それらも細胞質の酸性化によるものかもしれない。さらなる研究で、Al 処理における、STOP1 によって制御される遺伝子の活性化プロセスに関する分子メカニズムを明らかにすることができる。

stop1 変異体は、*AtALMT1-KO* に比べ、酸性土壌における生育が良くない。一方、Al 耐性レベルを水耕栽培で測定したところ、その結果は非常によく似ていた (Fig. 4b, 4c; Figure 6A in Iuchi et al., 2007)。これは、H⁺の感受性が、酸性土壌における *stop1* 変異体の生育に影響を与えていることを示す。このことは、シロイヌナズナの品種を用いた過去の生育実験によっても支持されるかもしれない。シロイヌナズナの各品種を同じ酸性土壌で生育させると、Al 耐性程度が似ている場合、その生育は H⁺耐性と相関がある(Ikka et al., 2007)。これは H⁺耐性が、酸性土壌におけるシロイヌナズナの生育を決定するのに重要な要因の 1 つとなっていることを示している。STOP1 によって制御される H⁺耐性の遺伝子 (Fig. 9) のさらなる研究は、他種の作物の H⁺耐性を、遺伝子組換えや比較ゲノムのマーカーセレクションによって改良することに貢献するかもしれない(Iuchi et al., 2007)。

第2章 ユーカリのAl耐性遺伝子とAtSTOP1ホモログ遺伝子との関連性

2-1 緒言

ユーカリは樹木の中でも成長の速い種の1つであり、パルプ生産の主原料となる (e.g., Greaves et al. 1997; Campinhos 1999)。ユーカリの植林地だけで世界中で1700万 ha 以上のプランテーションが稼働している (FAO 2001)。ユーカリは、その地域の自然環境条件に適応した品種が生育しているが、繊維長が長い、あるいはパルプ生産性が高いというような、工業的に適した特性を持っているとして選抜されたエリートクローンは、他の生育地域で成長が悪くなることもある。マーカー選抜や遺伝子導入による分子育種は、プランテーションの環境ストレスに対する抵抗性を与える合理的な手法の1つである (Raymond and Apiolaza 2004)。実際、分子マーカーの確立のためのゲノム配列が国際共同事業として進行しており (DOE Joint Genome Institute and the Eucalyptus Genome Network, EUCAGEN)、遺伝子形質転換の方法はいくつかの種で確立されている (Ito et al. 1996)。ある特定の形質を調節する遺伝子の同定は重要であり、効果的な育種戦略を実行するための残された問題点である。

塩ストレスや酸性ストレスのような土壌ストレスは、ユーカリのプランテーションにおける成長の低下の主要な原因である (White et al. 2009; Feikema and Baker 2011)。酸性土壌は亜熱帯地域に広く分布しているため、Al ストレスのような酸性土壌ストレス耐性に重要な遺伝子の同定は、育種における分子マーカーの進歩に重要である。UDP-glucose を利用する耐性や (Fukuda et al. 2007)、細胞膜表面の低負電荷のような (Wagatsuma et al. 1995)、様々な耐性メカニズムが多種の

植物で発見されてきたが、有機酸放出は多くの植物種に共通の Al 耐性メカニズムとして認知されてきた (Ma et al. 2001; Kochian et al. 2004)。根からの有機酸放出は、根端の Al 感受性組織をその毒性から保護している (Delhaize et al. 1993)。リン酸による Al 毒性の不活性化は、ソバ (buckwheat) で認められたが (Zheng et al. 2005)、有機酸、すなわちリンゴ酸、クエン酸、シュウ酸の根からの放出はソバのもっとも重要な Al 耐性メカニズムであるかもしれないとされた (e.g. Ma et al. 1998; Zheng et al. 1998)。いくつかの研究で、有機酸代謝の改変は Al 耐性の有機酸放出の増強に役立つとされ (e.g., canola, Anoop et al. 2003; alfalfa, Tesfaye et al. 2001)、さらに細胞膜の輸送能力も有機酸放出の促進要因と報告された (Furukawa et al. 2007; Magalhaes et al. 2007)。これに似たメカニズムとして、ホワイトルーピン (white lupin) や (Neumann et al. 1999; Kihara et al. 2003)、ニンジン細胞の変異体では (Takita et al. 1999; Ohno et al. 2003)、リン酸欠乏によって有機酸放出が高められることが判明した。これらのプロセスに関連する重要な遺伝子は、マーカー選抜の際に酸性土壌耐性を高める分子マーカー候補となる可能性がある。

Al 応答性リンゴ酸トランスポーター、ALMT1 (Aluminum activated malate transporter 1) は、コムギで同定され (Sasaki et al. 2004)、その後シロイヌナズナでも同定された (Hoekenga et al. 2006)。一方、ALMT1 と異なり、multidrug and toxic compound extrusion (MATE) トランスポーターファミリーに属するクエン酸トランスポーターは、様々な植物種で単離されている (Rogers and Guerinot 2002)。クエン酸を輸送する MATE のいくつかは、Al 応答性であり、モロコシ (sorghum) や (Magalhaes et al. 2007; Maron et al. 2010)、オオムギ (barley) では (HvAACT1: *Hordeum vulgare* aluminum-activated citrate transporter 1, Furukawa et al. 2007)、Al 耐性に関与すると特定された。遺伝子

解析では、いくつかの品種の有機酸放出による Al 耐性の違いが、有機酸トランスポーターの転写レベルの違い (Sasaki et al. 2006; Furukawa et al. 2007)であり、MATE タンパク質の有機酸輸送能力 (Raman et al. 2008)によって説明できることを明らかにした。これに加え、シロイヌナズナで単離された AtSTOP1 は転写因子として働き、この下流には Al 耐性、低 pH 耐性に寄与すると考えられる遺伝子が多く含まれていた。これは、MATE トランスポーターや、STOP1 の下流にある遺伝子が、酸性土壌耐性を向上させるマーカー選抜のための合理的なターゲットとなることを示唆している。

この章では、ユーカリの根からの有機酸放出や、クローニングによるクエン酸輸送の MATE トランスポーターホモログをコードする遺伝子の研究について報告する。また、ユーカリの STOP1 ホモログ遺伝子を単離し、それが Al、低 pH 耐性に働いているのか、また、転写因子として働き、既知の MATE をはじめとする Al 耐性遺伝子を制御しているのか調べた結果を報告する。

2-2 実験材料及び実験方法

植物材料および菌体系統

ユーカリカマルドレンシス (*Eucalyptus camaldulensis* var. obtuse, Location: EMU CREEK PETFORD)は Australian Tree Seed Center から取得した。また、ユーカリ GUT5 は、グランディス (*Eucalyptus grandis*) とユーロフィラ (*E. urophylla*) を交配して選抜されたクローン品種である。このクローンは *in vitro* で組織培養、継代されている (Kawazu et al., 1996)。シロイヌナズナは野生型として Colombia-0 (Col-0)を、T-DNA 挿入変異体として *ALS3-KO* (SALK_061074)を使用した。他に、タバコ BY-2 (*Nicotiana tabacum*, Bright-Yellow 2)、ユーカリ毛状根

の誘導のため、Ri プラスミドを持つ hyper-virulent *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC15834 (American type culture collection, VA, USA)を使用した。シロイヌナズナの組換え体作成には、*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 を使用した。

ユーカリカマルドレンシス実生の生育条件及びストレス処理条件

ユーカリ種子を次亜塩素酸で種子滅菌し (1% available chlorine; 10°Cで 20 分)、前培養はシロイヌナズナで *in vitro* 生育した Kobayashi et al. (2007)の方法をもとに、少しの変更をしたうえで、無菌的な条件で行った。4 つのナイロンのメッシュシート(1.3 cm square of 50 mesh per inch; 20 seedlings per sheet)を、プラスチックのメッシュシート (5 cm square)に置き、150 ml の前培養溶液の入ったプラスチックポットに浮かべ、播種した。前培養溶液の組成は、改変 Hoagland-Arnon 溶液 (0.4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.1 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.2 mM MgSO_4 , 40 μM KCl, 5.4 μM EDTA-Fe, 1 μM MnCl_2 , 4.6 μM H_3BO_3 , 0.076 μM ZnSO_4 , 0.032 μM CuSO_4 , 0.001 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$)に、1 %となるよう sucrose を加え、pH を 5.6 に調整したものである。このポットは 23°C、16 時間明期 (20 $\mu\text{mol E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で維持した。

前培養 6 日後、幼植物体を支持しているメッシュシートをコントロール溶液の入った新しいプラスチックポットに移し替え、1 時間前処理を行った。コントロール溶液は、前培養溶液からリン酸を除き、pH を 4.8 に調整したものである。前処理した幼植物体は、続けてストレス処理溶液のポットに移し替えた。RNA 抽出のためのストレス処理溶液は、コントロール、Cu (コントロール溶液+1 μM CuSO_4 , pH 4.8)、NaCl (コントロール溶液+30 mM NaCl, pH 4.8)、Al (コントロール溶液+50 μM AlCl_3 , pH 4.6)、低 pH (コントロール溶液, pH 4.0)である。根から放出された有機酸を回収するため、前処理した幼植物体のメッシュシートは 3 ml のスト

レス処理溶液またはコントロール溶液の入った 6 ウェルプレートに移し替え、処理を行った。タンパク質のリン酸化、脱リン酸化の阻害剤の効果を調べるため、カリクリン (calyculin)、K-252a、スタウロスポリン (staurosporin)、シクロスポリン (cyclosporine) を終濃度 $5\text{ }\mu\text{M}$ になるよう加えて処理した。すべての処理中は、 25°C 、連続明期 ($20\text{ }\mu\text{mol E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) に維持した。

ユーカリ GUT5 の生育条件及びストレス処理条件

無菌的に生育した GUT5 を、4 から 5 枚の葉と 2 cm の根を残して切断し、1% のスクロースを加えた 1/5 濃度改変 Hoagland-Arnon 溶液 (pH 5.6) 150 ml の入ったプラスチックのポットに、プラスチックメッシュのフロート上で生育した。温度条件は 23°C 、照度 $20\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 、16 時間明期である。これらは RNA 抽出や、クエン酸放出測定に使用した。組換え GUT5 毛状根は、1% スクロースを加え、リン酸を除いた 1/4 濃度の B5 寒天 (1%) 培地 (pH 4.6) をコントロールとし、Al 処理区は $50\text{ }\mu\text{M AlCl}_3$ (pH 4.6)、低 pH 処理区は pH 4.0 に調整した培地を使用し、3 日間処理した。温度条件は 22°C 、照度 $20\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 、16 時間明期である。シロイヌナズナは水耕栽培で第 1 章と同じ条件で行った。コントロールは 1/50 濃度の MGRL 培地に $200\text{ }\mu\text{M}$ になるよう CaCl_2 を加え、リン酸を除き、pH 5.0 に調整したものである。Al 処理区はコントロール溶液に $2\text{ }\mu\text{M}$ になるよう Al を添加した。幼植物体は 25°C 、照度 $35\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 、12 時間明期で 7 日間栽培した。溶液は 2 日ごとに更新した。

RNA 抽出、逆転写、DNA シークエンス、配列解析

Total RNA は Suzuki らの方法によって抽出した (Suzuki et al., 2004)。Total RNA は Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit (Roche Applied Science, Tokyo, Japan) によって逆転写した。遺伝子配列は ABI PRISM 3130xl DNA

sequencer と ABI BigDye terminator system (ver3.1)を使用して解析した。配列解析、アミノ酸アラインメント、系統樹は CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)で行い、膜タンパクの貫通領域予測は HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>)で行った。

クエン酸輸送 MATE ファミリー遺伝子のユーカリホモログの単離

クエン酸輸送 MATE の cDNA 断片は、degenerate primer を用いて AI 処理した根から抽出した cDNA を鋳型に nested PCR によって得た。degenerate primer は、シロイヌナズナ (At3g08040)、イネ (Os03g11734.1)、Lupinus albus (Q3T7F5) のクエン酸輸送 MATE の保存領域をもとに設計した。1st PCR は、forward, 5'-GCIGCIGAYCCIIYTIGCI, reverse, 5'-RCARAAIGTIACIGCIACIAC、2nd PCR forward, 5'-GAYACIGCITTYATHGGI, reverse, 5'-RTCYTTRAACICICKRAA である。増幅産物をサブクローニングし、ABI PRISM 3130xl DNA sequencer と ABI BigDye terminator system (ver 3.1) で配列を決定した。その後、SMART RACE cDNA Amplification Kit (Takara-bio, Ohtsu, Japan)で各遺伝子 30 から 50 の断片が得られ、配列を決定し、全長を得た。単離したクローンの配列は Genbank のデータベースに登録した (Accession numbers: EcMATE1, AB725912; EcMATE2, AB725913; EcMATE3, AB725914; EcMATE4, AB725915)。GUT5 の ALS3、MATE1、STOP1 は Ohyama ら (Ohyama et al., 2013)の方法で単離した。完全長 cDNA は Kihara ら (Kihara et al., 2003) の方法で 3'、5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により単離した。根から total RNA を抽出し、Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit (Roche Applied Science, Tokyo, Japan)を用いて oligo dT プライマーで逆転写した産物を degenerate PCR と RACE に使用した。配列は ABI PRISM 3130xl DNA sequencer で決定した。アミノ酸配列のアラインメントと系統樹は GENETYX

software version 11.01 (Genetyx, Tokyo, Japan) と ClustalW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>) で作成し、膜貫通領域予測は HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) を使用した。これらのオーソログ遺伝子配列は GenBank に登録した。Accession number は AB826006 (*EguSTOP1*)、AB826007 (*EguMATE1*)、AB826008 (*EguALS3*)である。

遺伝子の転写量解析

各遺伝子の転写レベルは、LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche) とリアルタイム PCR (LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche))で解析した。使用したプライマーは以下のとおりである。なお、内部標準とし Actin を使用している。

EcMATE1: forward 5'-AGTCTCCCTTATCAGCATTGCTTCA,
reverse 5'-TAAACGTTGTGGAAGAAGTCCTTCTCTAAT,

EcMATE2: forward 5'-ATGCCAGAGGACAGTGTTTCAGCATCT,
reverse 5'-TGCAGTGTCAATTAGGGAAGCAACAGGATC,

EcMATE3: forward 5'-GCGTTGAATCTTTCTTGATTTTG,
reverse 5'-CAGTCTCCCCACTTCAAGAATTA,

EcMATE4: forward: 5'-CACAGGCGGCTTTGCTGCAA,
reverse 5'-AGGCTGATAACTATTGGCGCTG,

EcActin: forward 5'-GTTGCACCTCCTGAGAGAAAGT,
reverse 5'-TAGCTCACCAACAAAGACCTTGC,

EguSTOP1: forward 5'- GTTTAATGAGTTCACGCGATCTGCT,
reverse 5'- CACTAAAATCAGGCCACCTCGTTC,

EguALS3: forward 5'- AACCTAGCACAACTCGAATCC,

reverse 5'- CTCAACATGGTGCAAGAAAATG,

EguMATE1: forward 5'- AGTCTCCCTTATCAGCATTGCTTCA,

reverse 5'- TAAACGTTGTGGAAGAAGTCCTTCTCTAAT,

EguActin: forward: 5'- GTTGCACCTCCTGAGAGAAAGT,

reverse 5'- TAGCTCACCAACAAAGACCTTGC.

ベクター構築およびアグロバクテリウムによる形質転換

EcMATE1-4 を Mini-Ti に接続したプラスミドベクターは、植物体への形質転換に構成された Gateway ベクターである pGWA2 を使用して構築した (Nakagawa et al. 2009)。pGWA2 は pBI121 をもとに、cauliflower mosaic virus 35S プロモーターと *Agrobacterium* nopaline synthase terminator (NOS-T) の間に遺伝子を導入する Gateway クローニングサイトを持っている。このカセットは、T-DNA 領域にあり、その隣にはハイグロマイシン耐性とカナマイシン耐性のカセットがある。EcMATE1-4 は Gateway クロナーゼの認識配列を接続したプライマーで PCR 増幅し、T-DNA の Gateway クローニングサイトに導入した。これにより、毛状根で MATE を過剰発現させる pGWA2-EcMATE1-4 を作成した。すべてのクローニングベクターは、Gateway system (Invitrogen) の標準プロトコルに従い、TOPO クローニングのための PCR プライマーは以下のとおりである。

EcMATE1: forward 5'-CACCATGGCCGAGGACTCTGATGTTCTGTG,

reverse 5'-TCATAAACGTTGTGGAAGAAGTCCTTCTCTAAT,

EcMATE2: forward 5'-CACCATGCCAGAGGACAGTGTTTCAGCATCT,

reverse 5'-TTATGAAGCCTGTGGTGTACGTTGACCC,

EcMATE3: forward 5'-CACCATGCCTCTGTCTATGTTCTTCAAGGA,

reverse 5'-TTAGTTATTTAGAAATCCCCAAGGTCCCATGCC,

EcMATE4: forward: 5'-CACCATGGAGCCTCTGGAGGGTTCG,
reverse 5'-TCAGCCCCAGAGAAAATTCCAAGGACCC.

pGWA2-EcMATE1 は Diaz の方法に従い (Diaz et al. 1989)、*Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 にエレクトロポレーションで導入し、組換え毛状根を誘導するため、無菌的に生育させたタバコ BY-2 の葉に感染させた。感染させたタバコ葉 (1 cm square) は、1 % (w/v) galactose と acetosyringone (20 µg/ml) を含んだ 1/4 濃度の B5 寒天培地 (1%) で 2 日間培養し、6.25 mg/l meropenem (Sumitomo pharmaceutical Co., Japan, Tokyo) で洗浄した。洗浄した葉は、さらに sucrose (1 % w/v)、meropenem (6.25 mg/l) と 1 ppm の naphthylacetic acid (NAA) を含んだ 1/4 濃度の B5 寒天培地 (1%) で培養した。培地は毛状根が誘導されるまで 2 週間ごとに更新した。誘導された組換え毛状根は meropenem の代わりに 50 µg/ml of hygromycin を含んだ同じ寒天培地で選抜した。培養は 22°C、16 時間明期 (20 µmol E m⁻² s⁻¹) で維持した。

EguSTOP1-RNAi (RNA interference) (pGWB80-*EguSTOP1*-RNAi) のベクター作成も同様に行った。*EguSTOP1* の配列 250 bp を GATEWAY binary vector pGWB80 (Nakagawa et al. 2009) に導入した。pGWB80 はシロイヌナズナ isocitrate dehydrogenase (At1g65930) のイントロンの両端に GATEWAY により相補、逆相補になるよう断片を導入することで RNAi を構築できるようにしたベクターである。pGWB80-*EguSTOP1*-RNAi は上記と同様にエレクトロポレーションで *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 に導入し、GUT5 の葉に感染させることで組換え毛状根を得た。また、pBI121 (with a GUS cassette in the T-DNA) を同様に組み換えた毛状根をコントロールとした。

シロイヌナズナ相補試験のベクターは、*EguALS3* と *AtALS3* (At2g37330) のプロモーター (ATG の上流約 -700 bp)、3' 端領域 (stop コドンから 400 bp) を接続するた

め overlap extension PCR (Horton et al., 1989) を行って作成した。この DNA は pBIG-HYG の T-DNA 領域の GUS の部分に導入し、*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 でシロイヌナズナ *ALS3-KO* ラインに floral dip 法 (Clough et al., 1998) で感染させた。T₂ 種子を生育試験、転写解析に用いた。

アグロバクテリウムを用いた一過的発現による EcMATE1、EguSTOP1 の細胞内局在

EcMATE1 および EguSTOP1 の細胞内局在は Sparkes (2006) の方法をもとに、タバコ根のアグロバクテリウムを使用した一過的発現で解析した。green fluorescent protein (sGFP; see Sawaki et al. 2009) をコードした cDNA を各遺伝子の C 末端に PCR で接続した。それぞれの遺伝子は、個別に PCR 増幅したが、そのときに使用したプライマーを以下に示す。

EcMATE1: forward 5'-TTAACCCGGGATGGCCGAGGACTCTGATGT-3',

reverse 5'-TCGCCCTTGCTCACCATTAAACGTTGTGGAAGAAGT-3'

sGFP: forward 5'-ACTTCTTCCACAACGTTTAATGGTGAGCAAGGGCGA-3'

reverse 5'-CGAAGAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'

EcMATE1-sGFP、EguSTOP1-sGFP は EcMATE1 または EguSTOP1 の forward と sGFP の reverse プライマーで PCR によって結合した。この DNA は pBI121 の β -glucuronidase と置き換え、hypervirulence *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 に導入した。寒天培地 (1 % (w/v) sucrose を含む 1/2 濃度 MS 培地 (Murashige and Skoog 1962) containing) でタバコ根を 4 週間生育し、蒸留水で洗浄した。その後、150 μ M の acetosyringone を含む *Agrobacterium* buffer (pH 5.6 of 10 mM MES/KOH, 10 mM of MgCl₂, OD₆₆₀ = 0.2) に浸した。この幼植物体を湿らせたフィルターペーパー上で 2 日間維持し、根細胞の GFP を蛍光顕微鏡 (Axio,

Zeiss-Japan, Tokyo)で観察した。

根から放出されたリンゴ酸とクエン酸の定量

GUT5 のクエン酸放出実験では、順化 3 週間の植物体を使用した。

溶液中のクエン酸とリンゴ酸は、Kihara (2003)の方法で、NAD⁺/NADH cycling method (Hampp et al. 1984)による酵素反応で測定した。リンゴ酸とクエン酸は化学量的に malate dehydrogenase や citrate lyase によって NADH に変換され、その後 NADH を cycling method で定量化した。

組換えタバコ毛状根の有機酸放出

組換えタバコ毛状根は、2 % sucrose を含む 1/4 濃度 MS solution (pH 5.6)で 1 週間前培養した。切り取られた根端 (3 cm; 100 root tips)は、30 ml のコントロール溶液 (1 % (w/v) sucrose を含む 1/20 濃度 MS solution (-Pi), pH 4.8)の入った 100 ml フラスコ中で 2 時間前処理を行った。前処理後、根は 30 ml のコントロール溶液または Al ストレス溶液 (前処理溶液 + 25 μ M AlCl₃)に移し替えた。この培地は、24 時間で更新し、48 時間まで処理した。すべてのフラスコは暗所、25°Cで回転培養 (50 rpm)した。24 時間処理した培地は有機酸解析に使用した。組換え毛状根の成長は有機酸放出試験に使用したコントロールと Al ストレス溶液で 3 日間の根伸長によって試験した。

統計解析

すべての実験は少なくとも 2 回反復で行われ、再現性を確認している。統計解析はマイクロソフトのエクセルを使用し、student の t-test を行った。

2-3 実験結果

ユーカリの有機酸放出

様々な植物は Al に応答して有機酸を放出しているが、放出する有機酸の種類や誘導時間に関する放出パターンの違いがある。予備実験で、ユーカリカマルドレンシスの根から放出される主な有機酸を測定した結果、リンゴ酸とクエン酸の両方を検出したが、シュウ酸は検出されなかった。従って、培地中のリンゴ酸とクエン酸を定量することにした。

リンゴ酸とクエン酸のどちらが根から放出される主な有機酸か調べるために、播種 1 週間のユーカリカマルドレンシス幼植物体（根長 5-10 mm）を Al 溶液で処理した。クエン酸放出は、Al 濃度が 25 μM 以上で増加するが、一方でリンゴ酸放出は Al による応答はなかった (Fig. 10a)。Al 溶液中のクエン酸放出はその時間に依存した (Fig. 10b)。放出量を 3 時間ごとに調べたところ、少なくとも 12 時間まで増加した。これらの結果は、ユーカリカマルドレンシスが Al 誘導性クエン酸放出の能力を持っていることを示している。

さらなる根からのクエン酸とリンゴ酸放出を比較するため、他のストレスで処理した時の、両者の有機酸放出量を調べた。それぞれの処理濃度は、50 μM Al、低 pH (pH4.0)、1.0 μM Cu、30 mM NaCl で、コントロール溶液の時と比較して 50%の根伸長阻害を示す濃度である (Fig. 10c)。すべての処理において、リンゴ酸の放出レベルは似たようなものであったが、クエン酸放出は Al のみにおいて検出された (Fig. 10d)。これらの結果はクエン酸が Al ストレスに対して特異的に放出されることを示している。

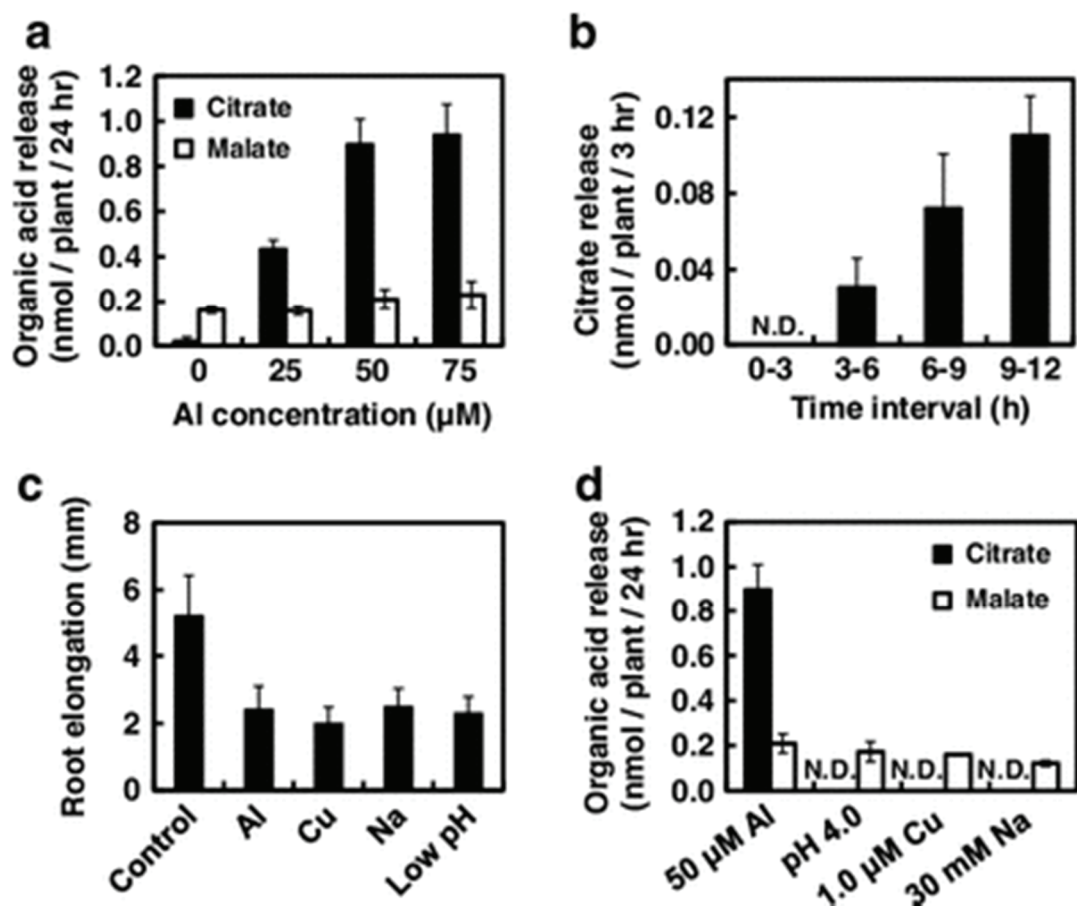


Figure 10. Citrate and malate release profile in *Eucalyptus camaldulensis*. a Response to Al concentration. b Time-course response to Al (50 μM) stress. c Growth of roots with various stressors (50 μM AlCl₃, low pH (pH 4.0), 1.0 μM CuSO₄ and 30 mM NaCl) for 3 days. d Citrate release with various stressors (identical to conditions used for c). Each solution was adjusted to pH 4.6 except the low pH treatment. Each experiment was replicated three times and mean ± SD are shown.

PCR 法を利用した EcMATE の単離

すでに報告されたクエン酸輸送 MATE 遺伝子のアミノ酸配列の保存領域から作成した degenerate primer を使用したところ、EcMATE ファミリー遺伝子をコードする cDNA 断片が約 40 個得られた。この断片から作成されたプライマーを用いて 3'RACE、5'RACE を行い、4 つの異なる EcMATE タンパク質をコードする遺伝子を単離した。これらの cDNA クローンは degenerate primer の位置に保存されたアミノ酸配列を持っており、502 から 579 のアミノ酸をコードしているタンパク質であり (Table 7)、これらの遺伝子は 5' と 3' の UTR 領域を持っていた。

EcMATE のアミノ酸配列は他の植物種のクエン酸輸送 MATE の典型的な特徴を持っていた (Fig. 11a)。すべての EcMATE タンパク質は 12 の膜貫通領域を持っており、他のクエン酸輸送 MATE タンパク質でも同定されている。系統樹による解析では、EcMATE1 と他の 2 つのタンパク質が同じグループに入ったが、一方で、EcMATE3 と EcMATE4 は別のグループに分類された (Fig. 11b)。これらのすべてのタンパク質は、単子葉植物のホモログよりも、シロイヌナズナ、ホワイトルーパーピンのような双子葉植物に近かった。AtFRD3 (*Arabidopsis thaliana* ferric reductase defective 3) は鉄取得に関係するクエン酸トランスポーターであるが、EcMATE1、EcMATE2 に最も近く、一方で、AtMATE はシロイヌナズナの Al 応答クエン酸輸送 MATE であるが、EcMATE4 に最も近かった。

根毒性処理に応答する EcMATE 遺伝子の転写プロファイル

EcMATE 遺伝子の発現を調べるため、様々なストレス処理における根と地上部の転写レベルを調べた。*EcMATE4* の転写は根と地上部の両方で転写されていたが、一方で *EcMATE1*、2、3 は様々なストレスで地上部よりも根で高い転写量であった (Fig. 12)。根で高転写する EcMATE ホモログのうちで、

Table 7. Basal information of MATE family genes in *E. camaldulensis*.

gene name	ORF (bp)	amino acid (AA)	transmembrane helices
<i>EcMATE1</i>	1740	579	12
<i>EcMATE2</i>	1641	546	12
<i>EcMATE3</i>	1509	502	12
<i>EcMATE4</i>	1608	534	12

The transmembrane helices were predicted by the HMMTOP program.

a	EcMATE1	1	-----MAEDSDVRVTDVIEESDLNTPAMPEGPDPQHDVPPVVIENDQHPL	46
	EcMATE2	1	-----MPEDSVQHLS	10
	EcMATE3	0	-----	0
	EcMATE4	1	-----MEPLEGSFVGTTSSEDDPPFS	22
	AtMATE	1	-----MA	2
	ZmMATE1	1	-----MHPPTHMRARAPIGNSGPDSLSYFIPLHPLLVWTHMGRERERESLFLPDPSAGAMEG	60
	AtFRD3	1	-----MTETGDDLA	9
	SbMATE	1	MEEHRSFAHAKPEAEQPPQOVPAAMAVAVVDVAAPALQNSTAAPAENGDVAAAGAAENG--AASAANGDGGGSELL	78
	LaMATE	1	-----MAENGTVHAPI	11
	HvAACT1	1	-----MEEGAAASMTGDKKVVAVVDVPADADAATAANGHGPEEKAEDLPAALS	50
	OsFRDL1	1	-----MAGLKKMEVTAASAAVASTAEKAAAVVPPDAALTMGAAGAEKTAASAAAPEDLPA--PAALS	66
			TM1 TM2	
	EcMATE1	47	RSKWNIFISVLEFRDARHVFVKDELGRHICAFPAADALADFIASLIDTAFHGRIGPVEIAAVGVSIAPFNCAKVTIF	126
	EcMATE2	11	SKWNMPFIVFRDTRLVFKMPCALGLEIFRIAPPAALADFIASLIDTAFHGRIGPVEIAAVGVSIAPFNCAKVTIF	90
	EcMATE3	1	-----MPLSMFFKDNVFEKDELGIETALPAALADFIASLIDTAFHGRIGPVEIAAVGVSIAPFNCAKVTIF	75
	EcMATE4	23	VKERRIFICIFERNARILKFDDELGRHICAFPAADALADFIASLIDTAFHGRIGPVEIAAVGVSIAPFNCAKVTIF	102
	AtMATE	3	TTQIFQETLYTESLVISVLFKDELGLHICAFPAADALADFIASLIDTAFHGRIGPVEIAAVGVSIAPFNCAKVTIF	82
	ZmMATE1	61	GGEHHHPLSVLEFRDARHVFVKDELGRHICAFPAADALADFIASLIDTAFHGRIGPVEIAAVGVSIAPFNCAKVTIF	140
	AtFRD3	10	TVKKPIFPLVIFKDLRHVFSRGTGRELICAFPAADALADFIASLIDTAFHGRIGPVEIAAVGVSIAPFNCAKVTIF	89
	SbMATE	79	GGPRWTGLHLFVMNIRSVFKDELGRHICAFPAADALADFIASLIDTAFHGRIGPVEIAAVGVSIAPFNCAKVTIF	158
	LaMATE	12	KSSWMRPLIFKDLARLAFKIDSLTKELVIGIPAAIAVADFIASLIDTAFHGRIGPVEIAAVGVSIAPFNCAKVTIF	91
	HvAACT1	51	GCPRTTGLYLFVMNIRSVFKDELGRHICAFPAADALADFIASLIDTAFHGRIGPVEIAAVGVSIAPFNCAKVTIF	130
	OsFRDL1	67	GWPRRVGLYLFVMNIRSVFKDELGRHICAFPAADALADFIASLIDTAFHGRIGPVEIAAVGVSIAPFNCAKVTIF	146
			TM3	
	EcMATE1	127	PLVSTTSFVAEE-----TIGKTCASLEEDNPKKSPKNIEMKELMPDDEMLEKLERGSTN	184
	EcMATE2	91	PLVSTTSFVAEE-----TVGRVGNESATGEEPEKSGIKSEMKEVIAEDVALENLEKGSAT	148
	EcMATE3	76	PLVSTTSFVAEE-----TKERLHIEAQKDENGDKWPFVSKKEK	114
	EcMATE4	103	PLVSTTSFVAEE-----TIRSVSSEAQESCELEACSIE	137
	AtMATE	83	PLVSTTSFVAEE-----ACSSQDQTVRDHKECIEIGINN	119
	ZmMATE1	141	PLVSTTSFVAEE-----AMSGRDNNDKIHQQNECNVS	174
	AtFRD3	90	PLVSTTSFVAEE-----TMEKMKKEANKANLVHAETILVQDSLEKGISSPTSDNTNQPPAPDTKSNNGKNSK--	162
	SbMATE	159	PLVSTTSFVAEE-----AVLSKGGAKVIDNGEEEELEAGQVGPPEKHTAAAGADPEKQKQPA	217
	LaMATE	92	PLVSTTSFVAEE-----TKEKINALAAEKLAELIKADELEKGVTKENNENETPKESLAVNGEIKVLVDGTSKNVKNAGN--	169
	HvAACT1	131	PLVSTTSFVAEE-----AISKYLEENSSQDLEKASH	164
	OsFRDL1	147	PLVSTTSFVAEE-----AISKYLEENSSQDLEKASP	180
			TM4 TM5 TM6	
	EcMATE1	185	NREVTDLVETEDFSATTCKSTPIFFSKPKKAKLS--KERRHIPSASTALVIGLGLQTLILFGKPLISLMGKIS--DS	262
	EcMATE2	149	KSENKELMQEKDIPSTCESPSGTDSDADKFKSC--KERRHIPSASTALVIGLGLQTLILFGKPLISLMGKIS--NS	226
	EcMATE3	115	DVEEELPQSDSTSKSSFTDTSFGKMAIDL--NKRRYIPASSALVIGLGLQTLILFGKPLISLMGKIS--DS	189
	EcMATE4	138	NAENKELIPRNESSDHLSESIQISSIFKVSFKDQM--PRRRHIPSASSALVIGLGLQTLILFGKPLISLMGKIS--DS	216
	AtMATE	120	TEETIELPEKHKDSLSDEFKTSISFISKPP--AKRRNIPSASSALVIGLGLQTLILFGKPLISLMGKIS--DS	196
	ZmMATE1	175	VSEMDLIPPEGASASTSISSFETDSCEVSVE--QKRKNIPSVSTALLGLGLQTLILFGKPLISLMGKIS--DS	250
	AtFRD3	163	-----KEKRTIRTASTAMILGLGLQTLILFGKPLISLMGKIS--DS	206
	SbMATE	218	DEBAKNGGEGCAPAVVAGRSSGKKS--GNRRFVSPTSALVIGLGLQTLILFGKPLISLMGKIS--DS	287
	LaMATE	170	-----KKRRLASASTALLGLGLQTLILFGKPLISLMGKIS--DS	213
	HvAACT1	165	VHSDACNVFASGPDTPVCANSCIPTECTDLNSQGC--KKRYIPSVTSALVIGLGLQTLILFGKPLISLMGKIS--DS	242
	OsFRDL1	181	VDSETNLNVSGPQKVCENSCIPTECTNPSDQGC--KKRYIPSVTSALVIGLGLQTLILFGKPLISLMGKIS--DS	258
			TM7 TM8	
	EcMATE1	263	PLMFAQKYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTTPLYATVAGDNLNVLDPILIFGCGIGVSGAIAHVISOYLIS	342
	EcMATE2	227	PLMFAQKYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTTPLYATVAGDNLNVLDPILIFGCGIGVSGAIAHVISOYLIS	306
	EcMATE3	190	PLMFAQKYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTTPLYATVAGDNLNVLDPILIFGCGIGVSGAIAHVISOYLIS	269
	EcMATE4	217	PLMFAQKYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTTPLYATVAGDNLNVLDPILIFGCGIGVSGAIAHVISOYLIS	296
	AtMATE	197	PLMFAQKYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTTPLYATVAGDNLNVLDPILIFGCGIGVSGAIAHVISOYLIS	276
	ZmMATE1	251	PLMFAQKYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTTPLYATVAGDNLNVLDPILIFGCGIGVSGAIAHVISOYLIS	330
	AtFRD3	207	PLMFAQKYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTTPLYATVAGDNLNVLDPILIFGCGIGVSGAIAHVISOYLIS	286
	SbMATE	288	PLMFAQKYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTTPLYATVAGDNLNVLDPILIFGCGIGVSGAIAHVISOYLIS	367
	LaMATE	214	PLMFAQKYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTTPLYATVAGDNLNVLDPILIFGCGIGVSGAIAHVISOYLIS	293
	HvAACT1	243	PLMFAQKYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTTPLYATVAGDNLNVLDPILIFGCGIGVSGAIAHVISOYLIS	322
	OsFRDL1	259	PLMFAQKYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTTPLYATVAGDNLNVLDPILIFGCGIGVSGAIAHVISOYLIS	338
			TM9 TM10	
	EcMATE1	343	LILLWRKMQVNDLLPPSIKELQFRFLKNGILLARVIAATTCVTLAASMAARIGSTMAAFQCHQCHMMTSLIADGIA	422
	EcMATE2	307	LILLWRKMQVNDLLPPSIKELQFRFLKNGILLARVIAATTCVTLAASMAARIGSTMAAFQCHQCHMMTSLIADGIA	386
	EcMATE3	270	LILLWRKMQVNDLLPPSIKELQFRFLKNGILLARVIAATTCVTLAASMAARIGSTMAAFQCHQCHMMTSLIADGIA	349
	EcMATE4	297	LILLWRKMQVNDLLPPSIKELQFRFLKNGILLARVIAATTCVTLAASMAARIGSTMAAFQCHQCHMMTSLIADGIA	376
	AtMATE	277	LILLWRKMQVNDLLPPSIKELQFRFLKNGILLARVIAATTCVTLAASMAARIGSTMAAFQCHQCHMMTSLIADGIA	356
	ZmMATE1	331	LILLWRKMQVNDLLPPSIKELQFRFLKNGILLARVIAATTCVTLAASMAARIGSTMAAFQCHQCHMMTSLIADGIA	410
	AtFRD3	287	LILLWRKMQVNDLLPPSIKELQFRFLKNGILLARVIAATTCVTLAASMAARIGSTMAAFQCHQCHMMTSLIADGIA	366
	SbMATE	368	LILLWRKMQVNDLLPPSIKELQFRFLKNGILLARVIAATTCVTLAASMAARIGSTMAAFQCHQCHMMTSLIADGIA	447
	LaMATE	294	LILLWRKMQVNDLLPPSIKELQFRFLKNGILLARVIAATTCVTLAASMAARIGSTMAAFQCHQCHMMTSLIADGIA	373
	HvAACT1	323	LILLWRKMQVNDLLPPSIKELQFRFLKNGILLARVIAATTCVTLAASMAARIGSTMAAFQCHQCHMMTSLIADGIA	402
	OsFRDL1	339	LILLWRKMQVNDLLPPSIKELQFRFLKNGILLARVIAATTCVTLAASMAARIGSTMAAFQCHQCHMMTSLIADGIA	418
			TM11 TM12	
	EcMATE1	423	VAGQAILASAFKEDYDRAITAGVRYLGMGFLVGLGAVLVGVRFGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	502
	EcMATE2	387	VAGQAILASAFKEDYDRAITAGVRYLGMGFLVGLGAVLVGVRFGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	466
	EcMATE3	350	VAGQAILASAFKEDYDRAITAGVRYLGMGFLVGLGAVLVGVRFGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	429
	EcMATE4	377	VAGQAILASAFKEDYDRAITAGVRYLGMGFLVGLGAVLVGVRFGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	456
	AtMATE	357	VAGQAILASAFKEDYDRAITAGVRYLGMGFLVGLGAVLVGVRFGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	436
	ZmMATE1	411	VAGQAILASAFKEDYDRAITAGVRYLGMGFLVGLGAVLVGVRFGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	490
	AtFRD3	367	VAGQAILASAFKEDYDRAITAGVRYLGMGFLVGLGAVLVGVRFGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	446
	SbMATE	448	VAGQAILASAFKEDYDRAITAGVRYLGMGFLVGLGAVLVGVRFGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	527
	LaMATE	374	VAGQAILASAFKEDYDRAITAGVRYLGMGFLVGLGAVLVGVRFGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	453
	HvAACT1	403	VAGQAILASAFKEDYDRAITAGVRYLGMGFLVGLGAVLVGVRFGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	482
	OsFRDL1	419	VAGQAILASAFKEDYDRAITAGVRYLGMGFLVGLGAVLVGVRFGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	498
			TM13	
	EcMATE1	503	VDCVNFQASDE--ASMTVSLTSLASIFLLSKSTGVGHVVALTHVVALVGLGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	579
	EcMATE2	467	VDCVNFQASDE--ASMTVSLTSLASIFLLSKSTGVGHVVALTHVVALVGLGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	546
	EcMATE3	430	VDCVNFQASDE--ASMTVSLTSLASIFLLSKSTGVGHVVALTHVVALVGLGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	502
	EcMATE4	457	VDCVNFQASDE--ASMTVSLTSLASIFLLSKSTGVGHVVALTHVVALVGLGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	529
	AtMATE	437	VDCVNFQASDE--ASMTVSLTSLASIFLLSKSTGVGHVVALTHVVALVGLGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	509
	ZmMATE1	491	VDCVNFQASDE--ASMTVSLTSLASIFLLSKSTGVGHVVALTHVVALVGLGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	563
	AtFRD3	447	VDCVNFQASDE--ASMTVSLTSLASIFLLSKSTGVGHVVALTHVVALVGLGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	526
	SbMATE	528	VDCVNFQASDE--ASMTVSLTSLASIFLLSKSTGVGHVVALTHVVALVGLGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	600
	LaMATE	454	VDCVNFQASDE--ASMTVSLTSLASIFLLSKSTGVGHVVALTHVVALVGLGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	531
	HvAACT1	483	VDCVNFQASDE--ASMTVSLTSLASIFLLSKSTGVGHVVALTHVVALVGLGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	555
	OsFRDL1	499	VDCVNFQASDE--ASMTVSLTSLASIFLLSKSTGVGHVVALTHVVALVGLGAGVPSKDIHQHILFVGHFFIAATCPINCLAF	571

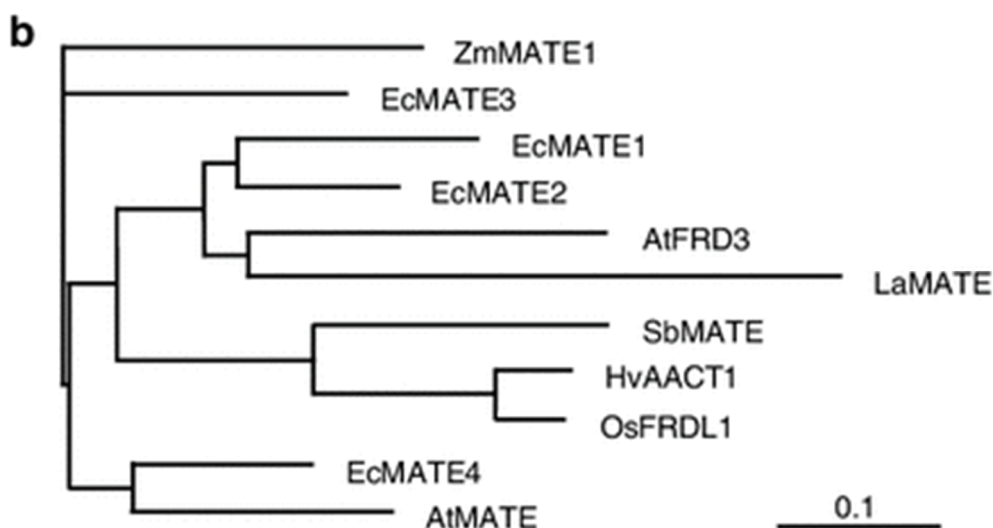


Figure 11. Amino acid alignment (a) and phylogenetic tree (b) of citrate-transporting MATE proteins from *Eucalyptus* and other plant species. EcMATE1–4, *Eucalyptus camaldulensis*; AtMATE (At1g51340) and AtFRD3 (At3g08040), *Arabidopsis thaliana*; OsFRDL1 (Os03g0216700), *Oryza sativa*; HvAACT1 (BAF75822), *Hordeum vulgare*; SbMATE (ABS89149), *Sorghum bicolor*; LaMATE (AAW30733), *Lupinus albus*; ZmMATE1 (FJ015156.1), *Zea mays*. TM1–12 in a indicates transmembrane regions predicted by HMMTOP, and the box indicates the highly conserved region. The scale bar in b indicates amino acid substitutions per site. The actual value depends on the branch lengths in the tree.

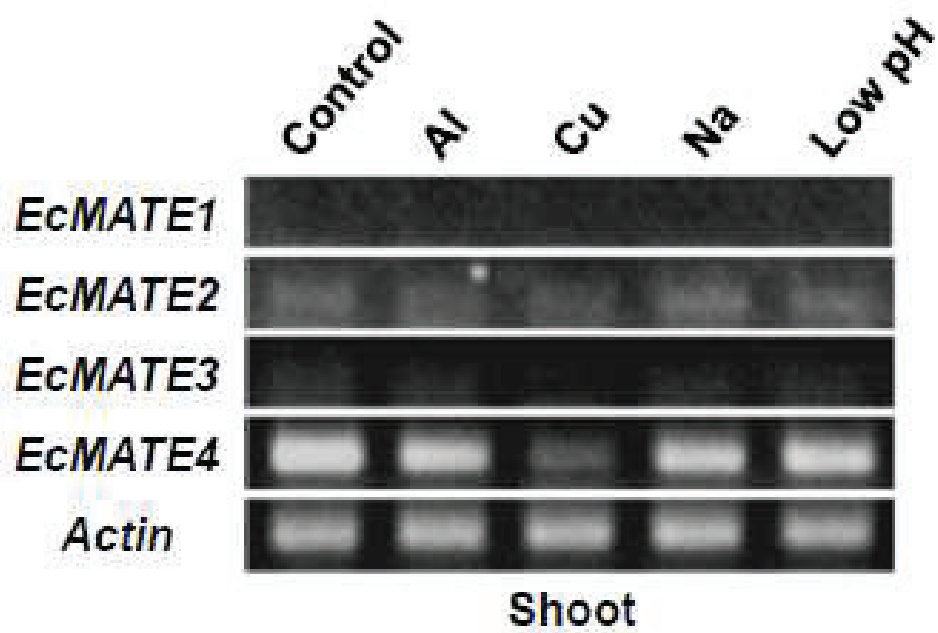


Figure 12. Comparison of expression level of *EcMATE* genes in the shoots with various rhizotoxic treatment. Amplicons for *EcMATE1-4* genes in semi-quantitative RT-PCR were analyzed by gel electrophoresis. The Actin gene was used as an internal control.

EcMATE1 の転写は 50 %成長阻害を起こすストレス処理の中で Al と低 pH に応答した (Fig. 10c)。*EcMATE1* の転写は Al と低 pH によって誘導され、NaCl (30 mM) と銅 (1.0 μ M) では誘導されなかった (Fig. 13a)。*EcMATE1* の最も高い fold change (i.e., Al/control) は、Al 処理 4 時間後で 6.4 だったが、このときクエン酸放出が始まった (Figs. 10b, 13b)。*EcMATE1* の転写は Al と低 pH でストレス強度に比例して誘導されていた (Fig. 13c, d)。加えて、*EcMATE1* の転写は根元よりも、有機酸が放出される根端で高かった (Figs. 13e, 14)。これらの結果は、*EcMATE1* はユーカリカマルドレンシスで Al 誘導クエン酸放出に重要な役割をしていることを示している。

EcMATE1 の細胞内局在

EcMATE1 の細胞内局在を可視化するため、アグロバクテリウムを使用した一過的発現により *EcMATE1*:sGFP の局在を解析した。細胞質内 sGFP がタバコ根に導入された時、細胞の全体が蛍光で明るく光っていた (Fig. 15a, c)。一方、*EcMATE1*:sGFP の発現は、細胞の端で緑の蛍光が多く観察された (Fig. 15b, d)。これは *EcMATE1* タンパク質が細胞膜に局在していることを示している。

タバコ毛状根での EcMATE1 の発現

EcMATE1 の Al 応答クエン酸放出機能を調べるため、Ri プラスミドと、*EcMATE* と Km 耐性遺伝子を T-DNA 領域に組み込んだ Ti プラスミドを作成し、hyper-virulen *A. rhizogenes* を使い組換えタバコ毛状根を作成した。CaMV35s::*EcMATE1* を組み換えたタバコ毛状根は、Al 培地で GUS (β -glucuronidase) を組み換えたコントロールと比べ、クエン酸をより多く放出した。*EcMATE1* 組換え体は Al の含まない培地でのクエン酸放出が

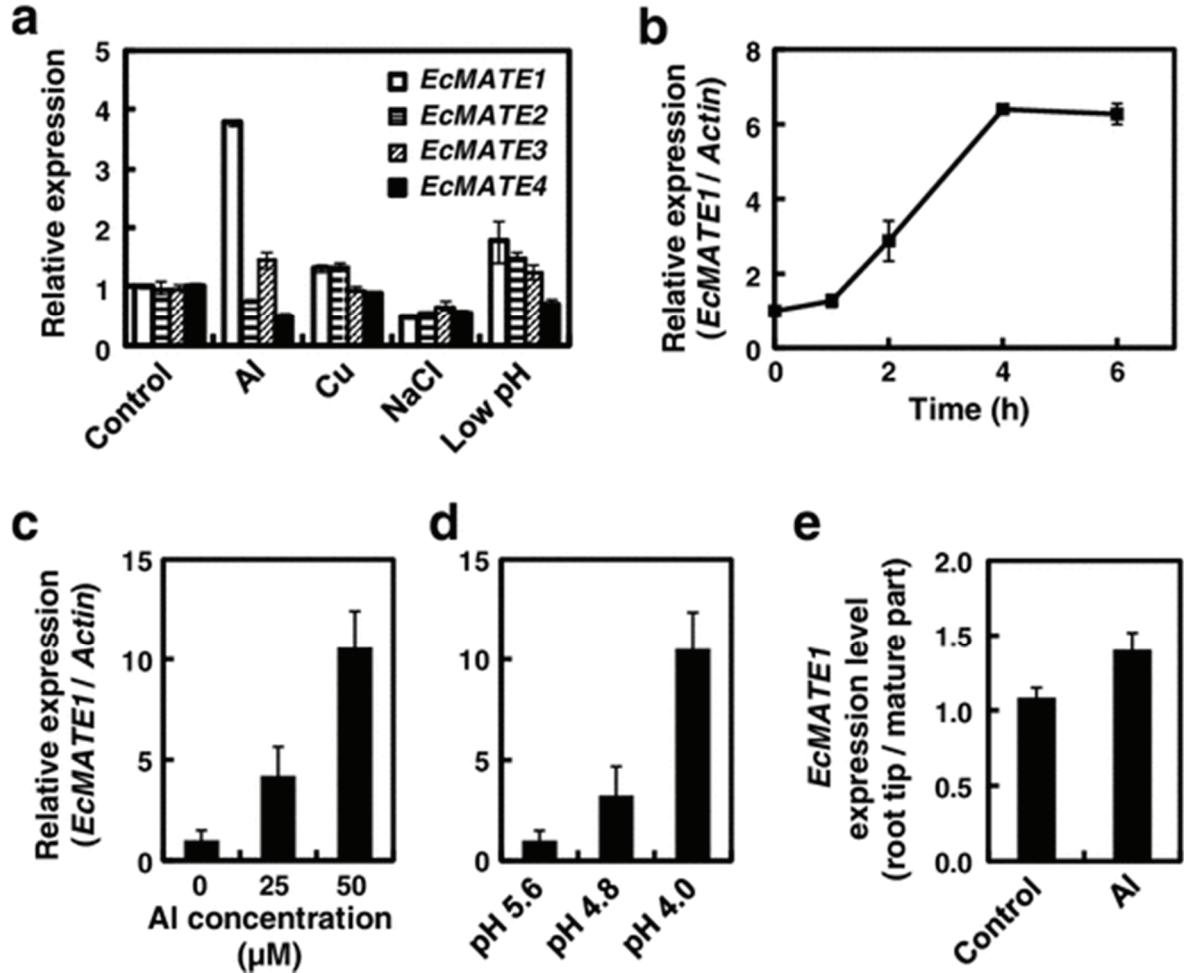


Figure 13. MATE gene expression analysis of *E. camaldulensis* roots treated with ion stress. a Expression of *MATE1-4* to various stressors for 24 h (see conditions in Fig. 10d), b Timecourse analysis of *EcMATE1* expression treated with 50 μM Al by real-time PCR. Dose response analysis of Al (c) and low pH (d). e Relative expression of *EcMATE1* in root tip (0-5 mm) and mature part of roots (>5 mm) with or without 50 μM Al for 24 h. Expression level was quantified by realtime PCR. Means of three replicates and the error bar $\pm$ SD are indicated.

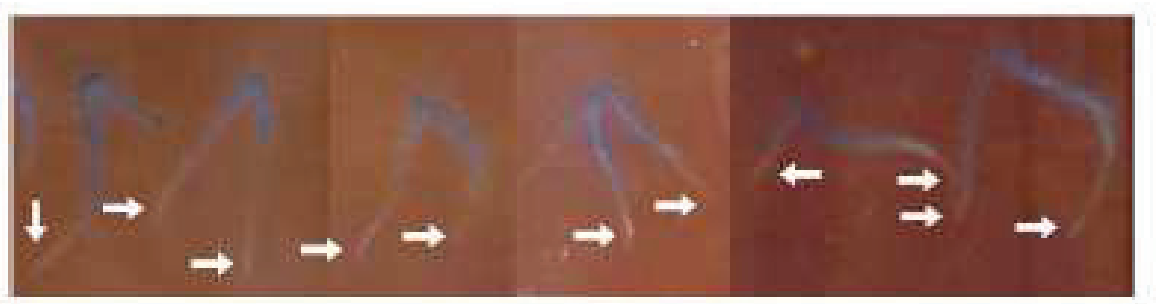


Figure 14. Position of the organic acid efflux in the roots was visualized by the method of Takahashi et al. (1999, Simple visual detection of Al-tolerance level in plant root by decoloring the filter paper stained by hematoxylin : Study using the root of carrot seedling. Jap J Soil Sci Plant Nutr, in Japanese 70:554 - 557). Briefly, primary roots of seedlings were placed on a filter paper, which was pre-stained in 0.2% hematoxiline and 5 μ M of AlCl_3 at pH 4.5 for 1 hour and supported on a grass plate. After 12 hours of incubation, distained position of the hematoxiline-stained-paper was photographed.

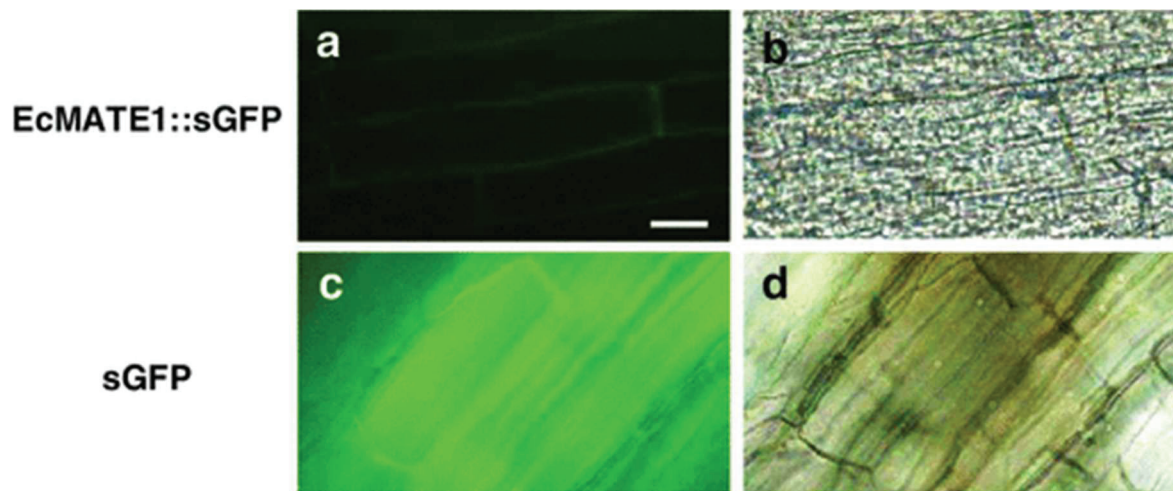


Figure 15. Subcellular localization of EcMATE1::sGFP fusion protein in tobacco root cells. Genes for fusion protein of EcMATE1::sGFP (a, b) and cytosol-localizing sGFP (c, d) were introduced to tobacco by *Agrobacterium* transformation then visualized by a fluorescent microscope at 3 days after infection (a, c). *Bright field images* (b, d) are also shown. Bar indicates 50 μ m.

増加しなかった (Fig. 16a)。加えて、EcMATE1 組換タバコ毛状根の成長は、GUS 組換コントロールよりも良くなった (Fig. 16b)。他のホモログでは、EcMATE3 は Al 応答クエン酸放出を示したが (Fig. 17)、一方で Al による転写誘導はなかった (Fig. 13a)。これらの結果は、EcMATE1 はユーカリカマルドレンシスにおける Al 応答クエン酸輸送 MATE をコードしていることを示している。

protein kinase と phosphatase の阻害剤に対する EcMATE1 転写応答

ユーカリのクエン酸放出がタンパク質のリン酸化、脱リン酸化のプロセスによって調節されているかどうかを調べるため、Al 応答クエン酸放出が様々な protein kinase inhibitor や phosphatase inhibitor の存在でどのように変化するのか調べた (Fig. 18)。Al 応答クエン酸放出は protein kinase inhibitor (K-252a、staurosporine) と phosphatase inhibitor (calyculin A、cyclosporine A) の両方に影響を受ける。Cyclosporin A は放出を 40% 阻害し、一方で他の阻害剤は放出を 70% 以上阻害した (Fig. 18a)。K-252a、staurosporine、calyculin の阻害剤は *EcMATE1* の転写を阻害したが (Fig. 18b)、*EcMATE2* の転写は変化しなかった (Fig. 19)。これらの結果は、EcMATE1 を通じた Al 応答クエン酸放出が、その誘導プロセスにあるタンパク質のリン酸化、脱リン酸化に関係していることを示している。

ユーカリ STOP1 相同遺伝子の単離

AtSTOP1 遺伝子のオーソログは degenerate PCR、RACE によってユーカリ GUT5 から単離された。1959 bp の単一クローンが単離され、217 bp の 3' 端と 158 bp の 5' 端、ORF は 528 のアミノ酸で構成されていた (Fig. 20)。アミノ酸配列には zinc-finger domain の配列が含まれ、他の植物種の STOP1 (*AtSTOP1*, *ART1*, *NtSTOP1*, *AtSTOP2*, *PpSTOP1*) と高い相同性を示した (zinc-finger domain の配列で

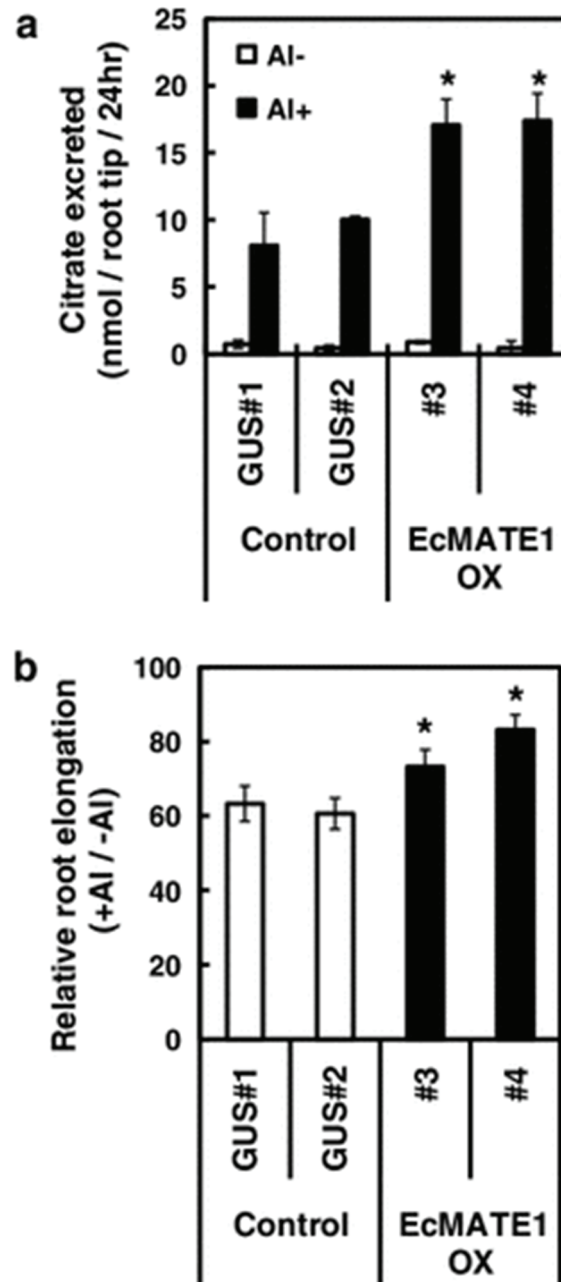


Figure 16. Citrate release and growth of transgenic tobacco hairy roots carrying *EcMATE1*. a Citrate release at 24 h in Al (25 μ M at pH 4.8) and control (pH 4.8) media. b Relative root elongation (25 μ M Al at pH 4.8-0 Al control at pH 4.8). GUS transgenic lines were used as a control experiment. Mean $\pm$ SD are shown ($n = 3$). Asterisks indicate significant difference compared with each control (GUS) line by student t test ($P < 0.05$)

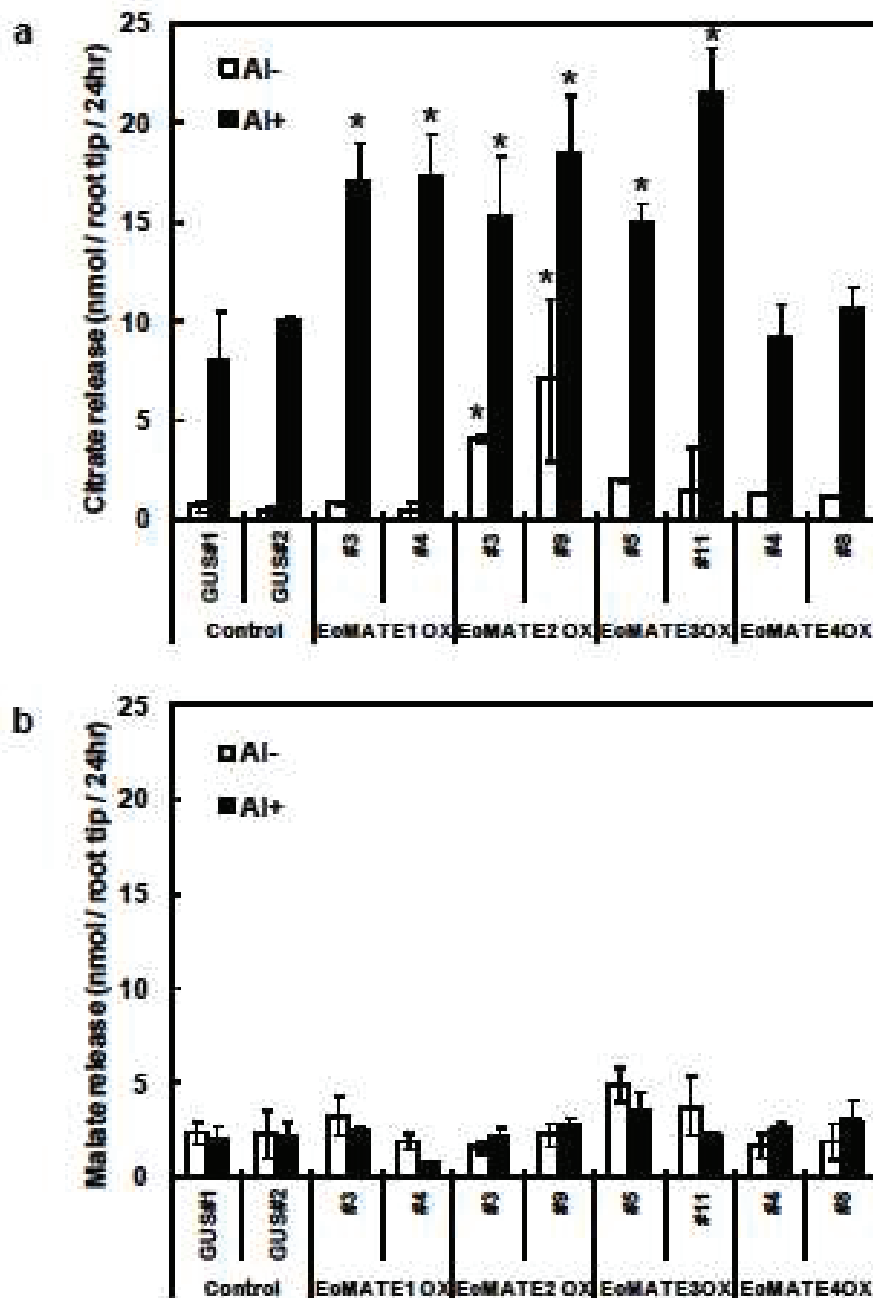


Figure 17. Citrate and malate excretion from the transgenic tobacco hairy roots carrying *EcMATE1-4*. Citrate (a) and malate (b) excretion at 24 h in Al (25 μ M at pH 4.8) and control (pH 4.8) media are shown (Means $\pm$ SD, $n=3$). GUS transgenic lines were used as a control experiment. Asterisks indicate significant difference compared with each control (GUS) line by student t -test ($P < 0.05$).

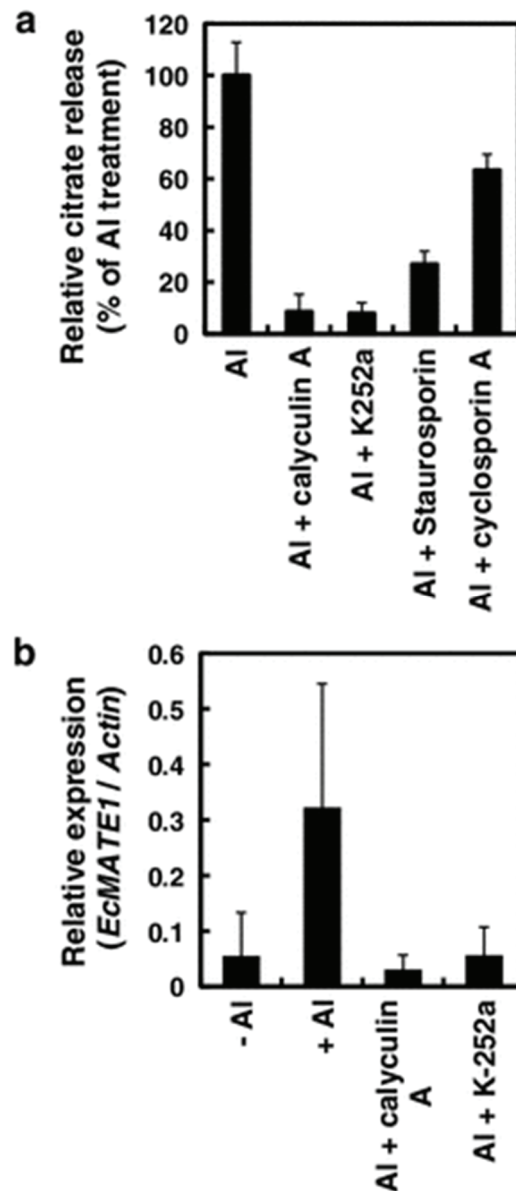


Figure 18. Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on citrate release and *EcMATE1* expression. a Citrate release to Al solution (50 μ M, pH 4.6) from *E. camaldulensis* roots in the presence of protein kinase inhibitors (K-252a and staurosporin A) and protein phosphatase inhibitors (calyculin A and cyclosporin A) or the absence of protein phosphorylation/dephosphorylation inhibitors. b Transcripts of *EcMATE1* in roots treated with Al solution (50 μ M, pH 4.6) alone or supplemented with calyculin A or K-252a. Citrate released into the medium and the transcript levels of *EcMATE1* were analyzed after 24-h treatment. Each experiment was replicated three times and mean $\pm$ SD are shown. Calyculin A and K-252a greatly repressed Al responsive citrate release from the roots

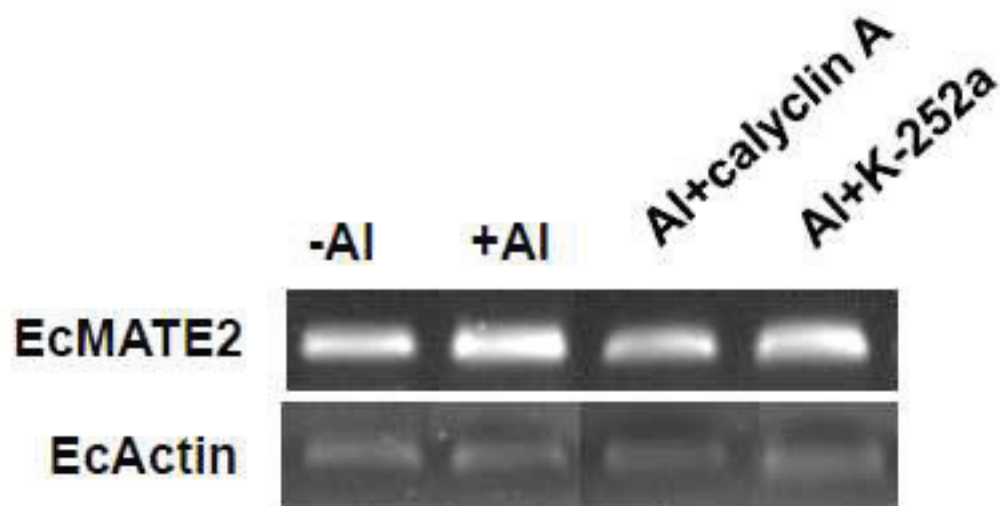


Figure 19. Expression level of actin and *EcMATE2*, a constitutively expressing homologue, under Al treatment in the presence or absence of various kind of inhibitors for protein phosphorylation and de phosphorylation (see detail in Fig. 17 legend).

EguSTOP1 0 ----- 0
AtSTOP1 0 ----- 0
OsART1 0 ----- 0
Zea mays 0 ----- 0
NtSTOP1 0 ----- 0
PpSTOP1 1 MQGGNQPPAPSPNTNDSLSTLAFLLHQLTQQFSTSNLPTPLSSSLGFSMSGNAQDQSHTHQNIQQQIQ 70
AtSTOP2 0 ----- 0

EguSTOP1 1 -----MDSKMDLEERLRAETWGFSSVNDLPQRVPPD 32
AtSTOP1 1 -----MET 3
OsART1 0 ----- 0
Zea mays 1 -----MEGRMTSLEATMKVS 15
NtSTOP1 1 -----MDPDDSLSEDPWTKPSSSGNELLKIVPS 28
PpSTOP1 71 SMISGGGSRGHAQVGSRSGESPGGLFQHLQHGNRDSNLDQHGFYNETTNQLFSENVLNQASLVEQVRVSI 140
AtSTOP2 0 ----- 0

EguSTOP1 33 RQTPTFPNFASHKNLQKREDQDPSISNYGMRIEPSFSEFNRPSECQPLPSNPISQDRGVQMNDILQLGKT 102
AtSTOP1 4 EDDLNTNWGSSSSKSREPSSDCGNSTFAGFTSQQKWEDASILDYEMGVPEGLQESIQANVDFLQGVRA 73
OsART1 1 -----MDRDQMTNTMRDQAANLTSMNPLFYPFMADDALLGMAPPPPQQLLPVSQIH 52
Zea mays 16 SLMASSMSRNADPDQTLRPNSEVQFYFPRPGQSLPGIPFFGPPSSSLYLPNDNEAKFGNPFESNPQN 85
NtSTOP1 29 DNHSFTNPNLH--AQKWE--SSYLQDQTRIEQQFSGF-----TQPKHTYQMDQ-HGNQMNNHDSST 87
PpSTOP1 141 TEHLSMLQDRIQQQLALVPLISQLSHFQNEGNVLAQQQVAAVVSITSQLAMAVDVLQLQSGVNTGTQP 210
AtSTOP2 1 -----MHIMMNRDEHIAKKEVSGI 20

EguSTOP1 103 QEWDPKAMLNLSLEQKIHLQELVHAIVGRRGVPVLRPDELVAQQQQLITADLTSTIIQLISTAGSLL 172
AtSTOP1 74 QAWDPRTMLSNLSFMEQKIHQLQDLVHLLVGRGGQLQGRQDELAQQQQLITADLTSTIIQLISTAGSLL 143
OsART1 53 MDWSPDTMLDNLTFIEEKIRQVKDVIRSMACRRASSSSAATP---EQQLVNADLTCLIVQLISTAGSLL 118
Zea mays 86 TDWDFQAIVSNLTFLEQKIKQVKDIVQSMNRENQVAGGSSELAQKH-LVTADLTSTIIQLISTAGSLL 154
NtSTOP1 88 KDWDPSNLLNLSLEQKIHLQELVHLLVGRGGQLQGRQDELAQQQQLITADLTSTIIQLISTAGSLL 157
PpSTOP1 211 NKSKEMLSLQLQANPNFSCQNAPRHDLRAHPMSHWMEKLLGGSFAASEGVNAATISGNGGIRFSGGG 280
AtSTOP2 21 SSFSGETSTSSKQIYVNPVTTTGTKSMEDDDVSLSLYLNLSLHEKVHQIQLSVFSYMVSTNNINQSSGS 90

EguSTOP1 173 PSVKNS--LSSASTPIRQLGQLGILNNSGSGIGLDSNLVLPSSQ--GGSKVPDQSNQVDPMDQSAID-- 236
AtSTOP1 144 PSVKHN--MSTAPGPF--TGQPGSAVFYVYREAN--NVAQSQ--NNNCGAREFDLPKPVLDVREG 203
OsART1 119 PSLKNSSFLSRTTPPPAAAAGAAQAVSLAAGESSSSARNNETNREDEEEQMGSPDYDELFPVNTGGGAD 188
Zea mays 155 PSKKNP--LLSSNPAV-RQLGNTLGSMPGLGMNANRQPSVDSKTDIPDTGKTSYDELMSNLNPTQDERD 221
NtSTOP1 158 PTMKHS--LSSVSHAA-SQLVQFGGVTVPSTCTN-GGGLPCNDG--GVTKVEDQSNHVDQLRDCGIEQS 221
PpSTOP1 281 GNFPVLIDDVENSQQQSLSGAQVGGNGSAGSMIHYFMSNMIGKDFGSLDGKDRKPSDVLGSSSREGDS 350
AtSTOP2 91 TSLAVANIGSLVQEIIITAASSMLYTCQQLQIGSNNNNNDINDQTVDMAMLEFVSQETDPGHDFVQESTN 160

C2H2 domain 1

EguSTOP1 237 -NL-----EDHESKDEDEGDEGENLPFGSFEILQLEKEEILAPHTHEFCICGKGFKRDA 289
AtSTOP1 204 HVV-----EEHEMKDEDDVEEENLPFGSYEILQLEKEEILAPHTHEFCICGKGFKRDA 257
OsART1 189 ECV-----GAAGDEQDARENFAAAEE-----KYEVLOLEDEILAPHTHEFCICGKGFKRDA 242
Zea mays 222 EMIKCPNFCDEGSELTPEMDHDKESDDGCEGENLPFGSYVVLQLEKEEILAPHTHEFCICGKGFKRDA 291
NtSTOP1 222 HAV-----DGHEKDEDEAEENLPFGSYEILQLEKEEILAPHTHEFCICGKGFKRDA 275
PpSTOP1 351 GANEFISVELRGVNAGLEDLDNDSRVDDGSDSDNISPGSFDLVEMDATEILAEHTHEFCICGKGFKRDA 420
AtSTOP2 161 LFGVQERGQISFPDQNLWDYNTETINPKDKHRSKPSSGSYDILELDVADLLAKYTHYFCICGKGFKRDA 230

C2H2 domain 1 C2H2 domain 2

EguSTOP1 290 NLRMHMRGHGDEYKTPAALAKPHKE--AGSEMILI-KRYSCEPYAGCKRNKDKHKKFQPLKTIICVKNHYKR 356
AtSTOP1 258 NLRMHMRGHGDEYKTAALAKPNKESVPGSEPMILI-KRYSCEPLGCKRNKDKHKKFQPLKTIICVKNHYKR 326
OsART1 243 NLRMHMRGHGDEYKSAALAKPEPPPEGEEQPPQPERRYSCPEAGCKRNRMHASFQPLKTIICVKNHYKR 312
Zea mays 292 NLRMHMRGHGDEYKTPAALAKPTKD--SGADHAPV-TRYSCPEVGCCKRNKDKHKKFQPLKTIICVKNHYKR 358
NtSTOP1 276 NLRMHMRGHGDEYKTPAALAKPHKE--PSSEPTILI-KRYSCEPNVGCCKRNKDKHKKFQPLKTIICVKNHYKR 342
PpSTOP1 421 NLRMHMRGHGDEYKTAALAKPDG--TQIPTSNASRRYSCPYVGCCKRNKDKHKKFQPLKTIICVKNHYKR 488
AtSTOP2 231 NLRMHMRGHGDEYKTREALISPTSQ-DKKGYSILKKHYISCPQHGCRRMNRHEMFQPLKSVICAKKNHYKR 299

C2H2 domain 3 C2H2 domain 4

EguSTOP1 357 THCDKSYTCSRCKNTKRFVSLADLKTHEKHCCGDKMMLCSCGTTFSRKDKLFGHILFQGHAPALPFDENKG 426
AtSTOP1 327 THCDKSYTCSRCKNTKRFVSLADLKTHEKHCCGDKMMLCSCGTTFSRKDKLFGHILFQGHAPALPFDENKG 396
OsART1 313 SHCDKSYTCSRCKNTKRFVSLADLKTHEKHCCGDKMMLCSCGTTFSRKDKLFGHILFQGHAPALPFDENKG 382
Zea mays 359 SHCDKSYTCSRCKNTKRFVSLADLKTHEKHCCGDKMMLCSCGTTFSRKDKLFGHILFQGHAPALPFDENKG 428
NtSTOP1 343 THCDKSYTCSRCKNTKRFVSLADLKTHEKHCCGDKMMLCSCGTTFSRKDKLFGHILFQGHAPALPFDENKG 412
PpSTOP1 489 SHCDKSYTCSRCKNTKRFVSLADLKTHEKHCCGDKMMLCSCGTTFSRKDKLFGHILFQGHAPALPFDENKG 558
AtSTOP2 300 SHCDKSYTCSRCKNTKRFVSLADLKTHEKHCCGDKMMLCSCGTTFSRKDKLFGHILFQGHAPALPFDENKG 369

EguSTOP1 427 GLSLQGEHNEDTNKVGNSVF-SFGSSTPSSGGVQNMEDVKGNDVDDPTSFSPSLSEASNFGGFNEFTRS 495
AtSTOP1 397 SASTSQRGSSSEGNNNQGMVGNLGSASNAQETTPGMTDGRICFEESFSPMNFDTNFGGFEHFPRL 466
OsART1 383 TSGRRRHQKEEPEFTWGGGGNEFLDVKGITAGVSGSGGGDEFFSAGSFGAMDFFGQLDASLMLPSE 452
Zea mays 429 SEASEQPQDEPMNEMARSN-VYSFPCSSSDGISNLD--MKMADDVRGYFSPNFDPC-FGALDDFTNP 493
NtSTOP1 413 SAGTSDRGQTSVETMKARQE-DFKVNASHGNEFQDPR-DIKSAADDPGSYFSPNFDTSNLNGFQGFPRP 480
PpSTOP1 559 GVGSNLIVDHHQSPAEAFGLGSKSPMAFWE----- 588
AtSTOP2 370 ITLK----- 373

EguSTOP1 496 AFDDSEGAFFSLLQASCNYPQKNGGQSSSNLE- 528
AtSTOP1 467 MFDDSESEFQMLIANACGFSPRNVGESVSDTSL- 499
OsART1 453 QFAGDHQENGDK----- 465
Zea mays 494 GFDISENPFSSFLPSGSCSYGQQNGDS----- 519
NtSTOP1 481 PFDESSESSSFLLSGSCSEYPHPKAAKYSFTELE 514
PpSTOP1 588 ----- 588
AtSTOP2 373 ----- 373

Figure 20. Deduced amino acid sequence of *EguSTOP1* and orthologous genes in other plant species. Letters highlighted with black are strictly conserved among orthologues and those with gray belong to the same amino acid group.

72～94%の相同性、Fig. 21a, 21b)。このユーカリ STOP1 タンパク質 (以下、EguSTOP1) は、細胞質に局在している sGFP と全く異なる局在を示し、EguSTOP1 は一過的発現解析により核で蛍光が観察された (Fig. 22)。この結果から、EucSTOP1 は保存された zinc-finger domain を持ち、他の植物種の STOP1 と共通していることが示された。

Ohyama らはシロイヌナズナの *stop1* 変異体に他種の STOP1 類似タンパク質を相補したところ、H⁺感受性が回復した (Ohyama et al., 2013)。同じ実験条件で、AtSTOP1 プロモーターに EguSTOP1 の完全長 cDNA を接続したベクターをシロイヌナズナの *stop1* 変異体に導入した相補組換え体を作成したところ、pH 5.5 では *stop1* 変異体と 5 系統の相補組換え体は野生型の Col-0 と同じ生育を示した。一方、pH 4.7 では、*stop1* 変異体は低 pH 超感受性のため根の成長はなく、相補組換え体は *stop1* 変異体の低 pH 超感受性の一部を回復し、根の成長は野生型の約 50%の生育であった (Fig. 23)。これは EguSTOP1 が、*stop1* 変異体によって抑制されたシロイヌナズナのいくつかの H⁺耐性遺伝子を活性化させることを示し、EguSTOP1 の機能は転写因子であると評価した。

RNAi によるユーカリ STOP1 ノックダウン毛状根の解析

GUT5 は *Agrobacterium rhizogenes* による組換え毛状根を作成できる。EguSTOP1 の Al³⁺と H⁺調節を評価するため、EguSTOP1 の RNAi コンストラクト (Fig. 24a)を導入した組換え毛状根の生育応答を、EguSTOP1 RNAi の入っていないラインをコントロールとして比較した。EguSTOP1 の RNAi ノックダウンライン (EguSTOP1-KD; knock-down)の EguSTOP1 転写量はコントロールの 10%であった (Fig. 24b)。EguSTOP1-KD は低 pH 培地 (pH4.0)で生育した時、野生型に比べ、40%の生育阻害を受けた (Fig. 24c)。

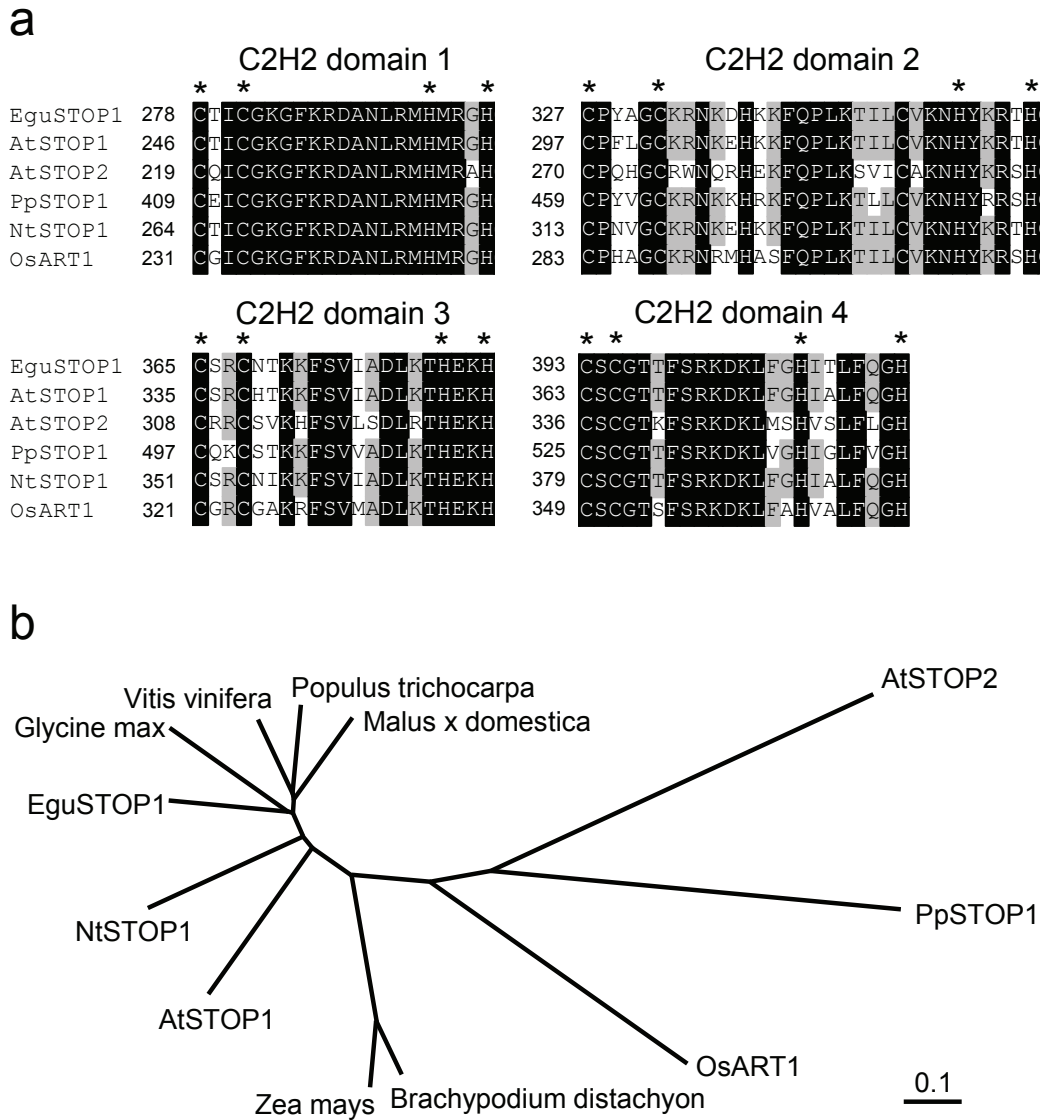


Figure 21. Amino acid alignment and phylogenetic tree of *EguSTOP1* and orthologous genes in other plant species. Predicted C2H2 zinc finger domains (a) and phylogenetic tree of overall proteins (b) were shown. Strictly conserved amino acids are highlighted with black, while the amino acids belong to the same amino acid group were shown with gray (a). The overall similarity of proteins was analyzed with Clustal W, and then visualized in the phylogenetic tree (b). The bar indicates nucleotide substitutions per site. The orthologous genes are *AtSTOP1* (TAIR: At1g34370), *AtSTOP2* (TAIR: At5g22890), *PpSTOP1* (GenBank: AB811779), *NtSTOP1* (GenBank: AB811781), *OsART1* (GenBank: AB379846), *Brachypodium distachyon* (GenBank: XP_003564719), *Glycine max* (GenBank: XP_003556206), *Malus x domestica* (GenBank: ADL36633), *Populus trichocarpa* (GenBank: XP_002327330), *Vitis vinifera* (GenBank: XP_002270196), *Zea mays* (GenBank: NP_001149728).

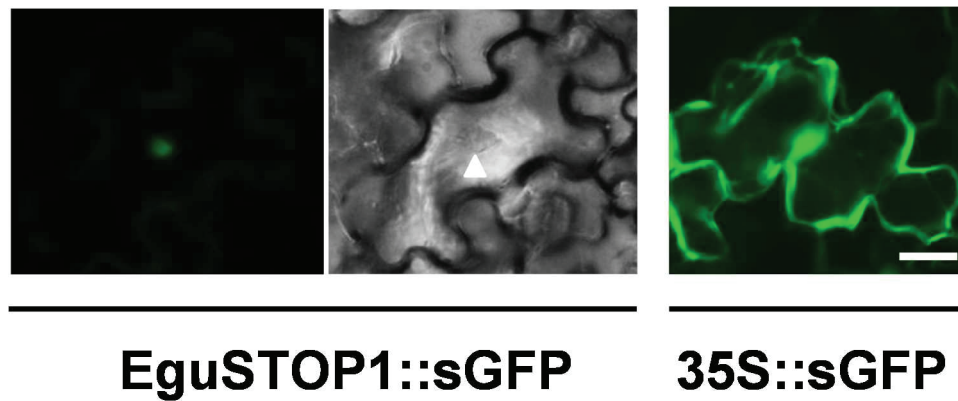


Figure 22. Fluorescence microscopy image of EguSTOP1::sGFP by *Agrobacterium*-mediated transient assay in tobacco leaf cells. Fluorescent images (left) and bright field images (right) of EguSTOP1::sGFP and sGFP are shown. The bar indicates 50 μm .

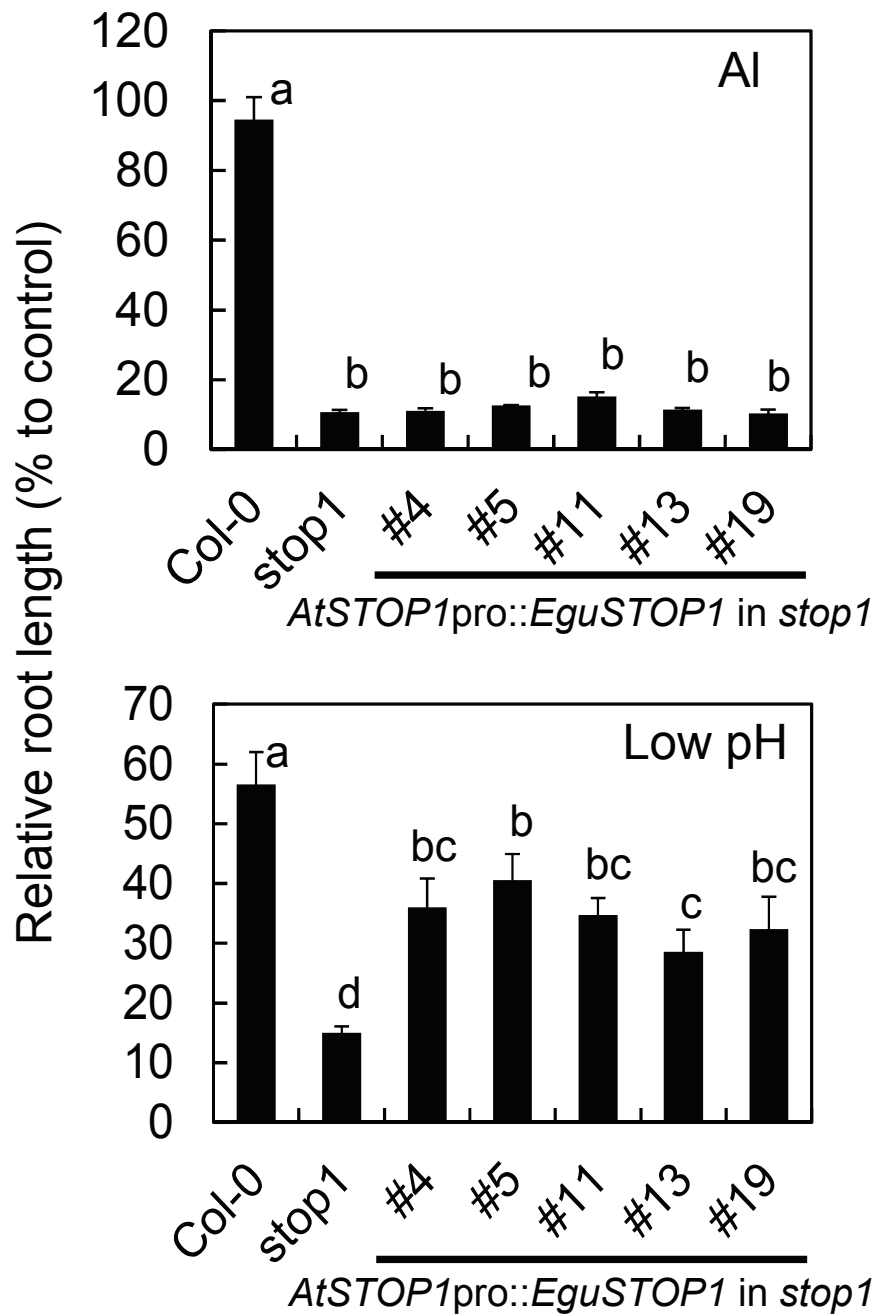


Figure 23. Root growth inhibition of *Arabidopsis stop1* mutants expressing *AtSTOP1* promoter-driven EguSTOP1 in Al and low pH stress treatments. Seedlings were grown in Al-toxic (pH5.5, Al 2 μ M), low pH-toxic (pH 4.7) and control solutions for 5 days. Mean $\pm$ SD relative root lengths (% to Control) are shown ($n = 5$). Different letters indicate significant difference from Col-0 (Tukey's test, $P < 0.05$).

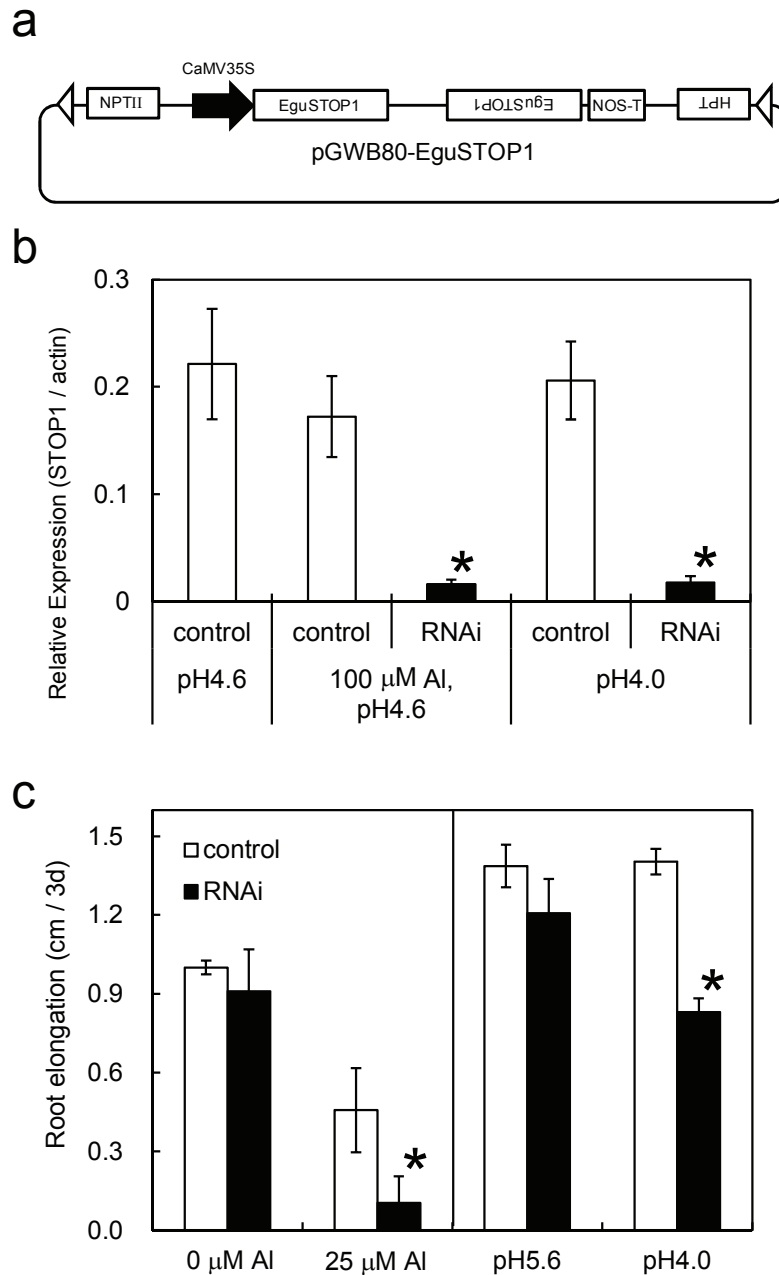


Figure 24. Vector construct for RNAi suppression of *EguSTOP1* (a), suppression of *EguSTOP1* transcript levels (b) and growth assay of transgenic hairy roots in low pH and Al treatments (c). Control transgenic hairy roots were not carrying *EguSTOP1* (white bar) and in *EguSTOP1*-KD plants (black bar) the STOP1-orthologue was suppressed. Transcript levels were compared after exposure to Al toxic solution. Means and SE are shown ($n = 3$). (b) For each line, three independent transgenic hairy roots were grown for 3 days on control (pH 5.6), low pH (4.0) or Al (pH 4.0, Al 100 μ M) medium. Means and SE are shown ($n = 3$). An asterisk indicates significant difference from control (student's t -test, $P < 0.05$).

加えて、Al ストレス処理 (25 μ M Al)での生育はコントロールよりも重い阻害を受けた。コントロールは 0 μ M Al に比べ 50 %の阻害を受けたが、*EguSTOP1*-KD の根長は 15 %になっていた (Fig. 24c)。これは *EguSTOP1* が毛状根の Al と低 pH 耐性の調節していることを示している。

EguSTOP1 ノックダウン毛状根の Al 耐性遺伝子オーソログの転写変動

先述のとおり、ユーカリカマルドレンシスにおいて Al 応答クエン酸放出が Al 耐性メカニズムに含まれており、Al 誘導で発現する *EcMATE1* によって放出が起ることが明らかとなった。また、bacterial-type ABC transporter をコードする *ALS3* / *STAR2* (sensitive to Al rhizotoxicity 2)は *AtSTOP1* / *ART1* 転写因子によって調節される遺伝子として特定された (Yamaji et al., 2009)。この結果から、これら 2 つの遺伝子が *EguSTOP1*-KD で転写抑制されるか調べた。

Al 応答の *MATE* transporter や *ALS3* をコードする遺伝子は、*GUT5* から degenerate PCR、RACE によって単離した。ユーカリ *GUT5* から 4 個のクエン酸輸送 *MATE* を単離した。その 1 つ (*EguMATE1*)は、582 のアミノ酸をコードし、ユーカリカマルドレンシスの *EcMATE1* と 96%の相同性であった。これらのユーカリ *MATE* は、既知のクエン酸輸送 *MATE* による系統樹で *AtFRD3* や *LaMATE* と同じグループに属していた (Fig. 25a)。シロイヌナズナ *AtALS3* のユーカリ *GUT5* ホモログ(以下、*EguALS3*)は、*AtALS3* (78%)と *STAR2* (rice *ALS3*; 71%)をもとに単離した。*EguALS3* は、285 のアミノ酸で構成され、他植物種と共通の 7 つの膜貫通ドメインを持っていた (Fig. 25b)。*EguALS3* の Al 耐性への貢献を評価するため、シロイヌナズナの T-DNA 挿入ノックアウトライン (*ALS3*-KO)の相補試験を行った。その結果、*EguALS3* は *ALS3*-KO の Al 感受性を劇的に回復させ (Fig. 26)、ユーカリの Al 耐性の機能を持っていることが示された。

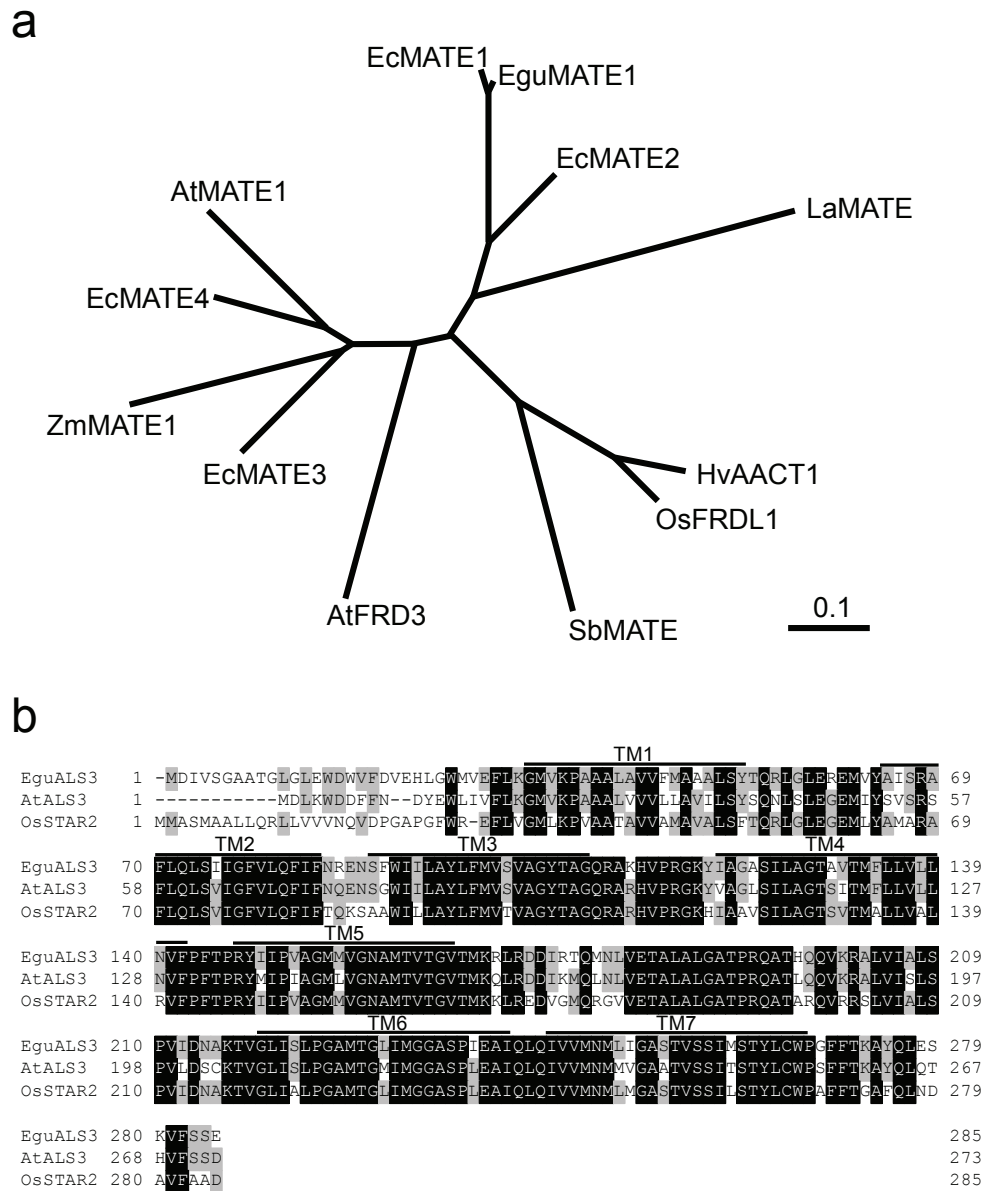


Figure 25. Comparison of the deduced amino acid sequences of orthologous genes for citrate transporting MATE and ALS3/STAR2 transporters. Phylogenetic tree analysis of EguMATE1 and previously identified citrate transporting MATE proteins in various plants (a). The orthologous genes are *EcMATE1* (GenBank: AB725912), *EcMATE2* (GenBank: AB725913), *EcMATE3* (GenBank: AB725914), *EcMATE4* (GenBank: AB725915), *AtMATE* (TAIR: At1g51340), *AtFRD3* (TAIR: At3g08040), *OsFRDL1* (RAP-DB: Os03g0216700), *HvAACT1* (GenBank: BAF75822), *SbMATE* (GenBank: ABS89149), *LaMATE* (GenBank: AAW30733) and *ZmMATE1* (GenBank: FJ015156.1). The bar indicates nucleotide substitutions per site. Amino acid alignment of *AtALS3* (TAIR: At2g37330), *STAR2* (rice homologue of ALS3; GenBank: AB379845) and *EguALS3* (b). Black boxed residues are identical and gray boxes indicate similar amino acids. Putative transmembrane domains are indicated with bars above the letters.

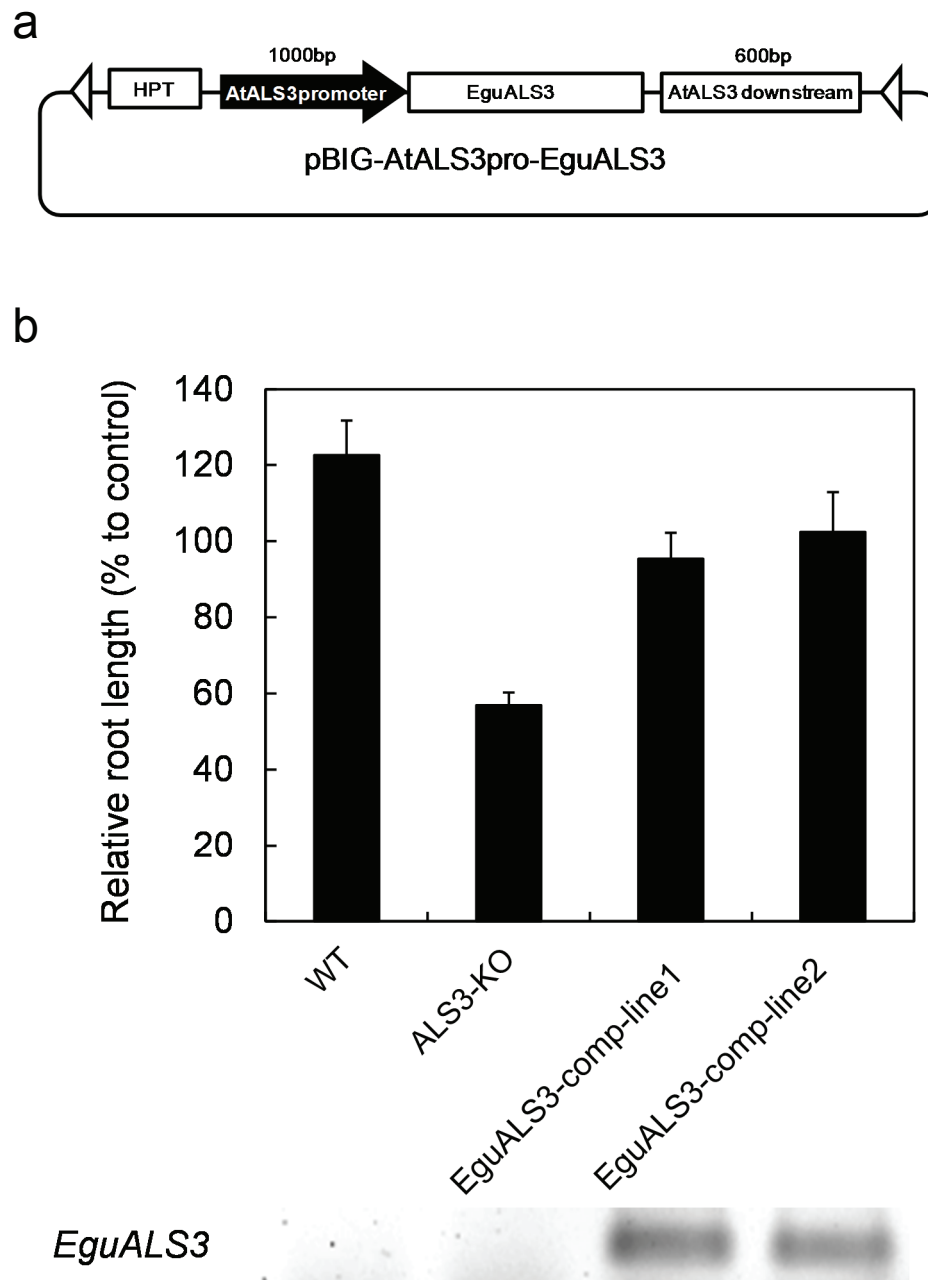


Figure 26. *In planta* complementation assay of *EguALS3* in a T-DNA insertion mutant of *Arabidopsis thaliana*. Vector construct for *in planta* complemented assay (a). The complemented lines were obtained by introducing *EguALS3* into the T-DNA insertion mutant of *ALS3* in *Arabidopsis*. All lines were grown in solution in the presence or absence of Al (pH 5.0, Al 2 μ M), and then relative root length was calculated (b). Means and SE ($n = 5$) were shown. Expression of *EguALS3* in the complemented lines was compared by RT-PCR.

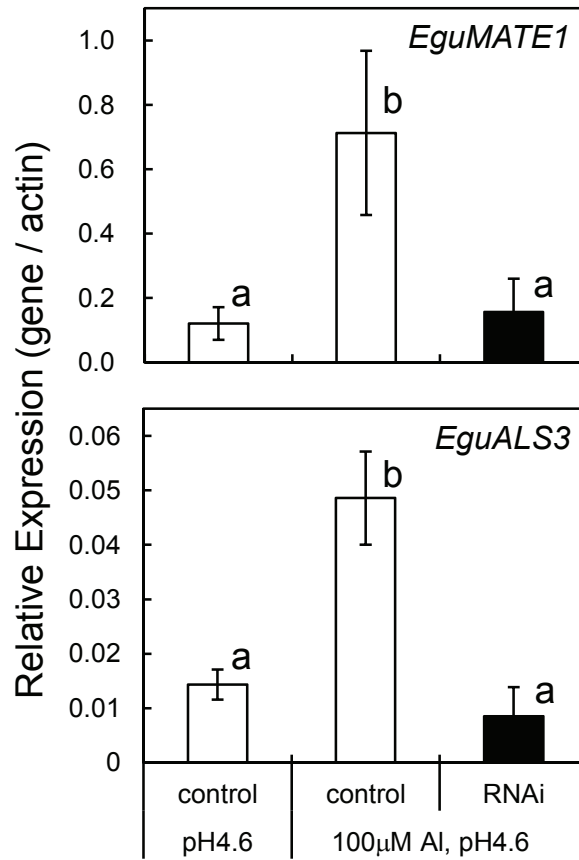


Figure 27. Transcripts levels of *EguMATE1* and *EguALS3* in control transgenic and *EguSTOP1*-suppressed hairy roots. For each line, three independent transgenic hairy roots were grown for 3 days on control (pH 5.6), low pH (pH 4.0) and Al (pH 4.0, Al 100 μ M) medium. Means and SE are shown ($n = 3$). Transcript levels for *EguMATE1* and *EguALS3* were quantified by real-time PCR in the control and *EguSTOP1*-KD hairy roots. Means and SE of three replications are shown. Different letters indicate significant difference (Tukey's test, $P < 0.05$).

*EguMATE1*と*EguALS3*はAlによってコントロールラインで転写量が高くなり、*EguSTOP1-KD*では転写量は抑制されていた (Fig. 27)。これはユーカリの主なAl耐性遺伝子が、*EguSTOP1*によって調節されていることを示している。

2-4 考察

多くの植物種は、根から有機酸を放出することで根端のAl感受性細胞を保護する (Ma et al. 2001; Kochian et al. 2004)。この戦略は、単子葉と双子葉の両方の草本植物で共通である。この研究では、ユーカリがAlに応答してクエン酸を放出することを見出した (Fig. 10a)。これは木本植物の根からの有機酸放出も、Al耐性の役割を持つことを示している。ユーカリはAlストレスフリーの状況で根圏にリンゴ酸とクエン酸を放出しているが、Al毒性でクエン酸放出のみが増加した (Fig. 10d)。これは、植物のクエン酸放出MATEタンパク質として知られるホモログに近い*EcMATE*トランスポーターのAl転写誘導によって説明できる。

MATEは12の膜貫通領域を持っており、1つの保存領域はクエン酸放出能力と結び付けられている (Yang et al. 2011)。ユーカリカマルドレンシスから4つのMATEホモログを単離し、すべての遺伝子はクエン酸輸送MATEに共通の特徴、すなわち12の膜貫通領域と既知のクエン酸輸送MATEの保存領域を持っていた (Fig. 11a)。MATEホモログの間で、*EcMATE1*は、唯一Al処理で転写誘導され、Alと低pHの特異性はAl応答有機酸トランスポーターの発現パターンに似ていた (Fig. 13)。例えば、シロイヌナズナでAl応答リンゴ酸放出を調節する*AtALMT1*は、ストレス特異性を調べる実験でAlによって誘導されていた (Kobayashi et al. 2007)。また、シロイヌナズナのクエン酸輸送MATE (*AtMATE*) は、Al耐性への貢献が*AtALMT1*ほどではないが、似たAl誘導パターンを示した (Liu et al. 2009)。

Agrobacterium rhizogenes によるタバコ毛状根での *EcMATE1* 発現で、Al 応答クエン酸放出が増加した (Fig. 16)。これは *EcMATE1* のクエン酸輸送がタバコの細胞で機能することを示している。この結果は、シロイヌナズナ組換え体で *SbMATE* を発現し、クエン酸放出を増加させることで Al 耐性を示した結果と似ている (Magalhaes et al. 2007)。これら MATE タンパク質の発現によるクエン酸輸送は、Al による活性化で説明できる。酵母細胞の研究では、MATE タンパク質が Al と直接相互作用することによって活性化される可能性を示した (e.g., Magalhaes et al. 2007)。この Al 活性化のプロセスにおける、タンパク質のリン酸化は、シロイヌナズナの ALMT1-type リンゴ酸トランスポーターの Al 応答リンゴ酸放出実験をもとに行った (Kobayashi et al. 2007)。類似のタンパク質のリン酸化プロセスが、ユーカリの *EcMATE1* を活性化した可能性があり、実際、タンパク質のリン酸化、脱リン酸化の阻害剤添加は、Al 応答クエン酸放出に影響を及ぼした。

有機酸放出は、様々な植物でストレス耐性に役割を果たしている。例えば Al 耐性や可給態リン酸 (Neumann et al. 1999)、鉄獲得 (Miethke and Marahiel 2007)、根圏病原菌に対する抵抗性 (e.g., Rudrappa et al. 2008) などである。分子生物学研究により、有機酸放出のトランスポーターとその調節が、有機酸の種類とストレス応答の決定に重要な要素であることが示された。近年、オオムギの Al 応答 HvAACT1 クエン酸放出のメカニズムは、プロモーターの進化がきっかけになったと提案された。HvAACT1 のプロモーター解析で、鉄獲得のためのクエン酸放出 MATE のプロモーターの変化が、結果として Al 毒性から根端を保護するための遺伝子の発現パターンも変えたことを示している (Fujii et al. 2012)。*EcMATE* 発現は、根元よりも根端で少し高くなり (Fig. 13e)、膜局在であったが (Fig. 15)、これは HvAACT1 と似ていた。*EcMATE1* と Al 耐性の遺伝的関連性は未だ明らかに

なっていないが、*EcMATE1* のさらなる研究は、木本植物種における Al 応答クエン酸放出の進化の理解という意味で興味深い。

以前報告されたように、*STOP1* 相同遺伝子は様々な植物種で Al 耐性遺伝子を調節している。シロイヌナズナで *stop1* 変異体は *AtALMT1* (Iuchi, et al., 2007) と *ALS3* (Sawaki, et al., 2009)の転写量を抑制し、一方で、イネの *ART1* (rice *STOP1*-like protein) (Yamaji, et al., 2009)を切断した変異体では、*STAR2* (the rice orthologue of *ALS3*)を転写抑制した。加えて、逆遺伝学を使った、タバコでの *STOP1*-like protein (*NtSTOP1*)遺伝子の RNAi ノックダウンでは、*NtMATE* と *NtALS3* の転写量が抑制され、Al 感受性となった (Ohyama, et al., 2013)。以上の結果から、*STOP1*-like protein の逆遺伝学は、他の植物種で Al 耐性遺伝子を決定することが可能であることが示された。期待通り、*EguSTOP1* の RNAi ノックダウンは、クエン酸放出 *MATE* と *ALS3* のオーソログ遺伝子の転写量を抑制し、同時に Al 耐性程度も減少した (Fig.27)。これは、*STOP1*-like proteins の RNAi 転写抑制が、他の植物種でも Al 耐性遺伝子の特定に有用なアプローチであることを示している。

先述のとおり、*Eucalyptus camaludrensis* は Al に応答してクエン酸を放出し、クエン酸放出 *MATE* (*EcMATE1*)の転写レベルによって調節されている。*GUT5* もまた Al によって *EguMATE* の転写量が上がり、根から有機酸を放出する。これは、Al 誘導クエン酸放出がいくつかのユーカリ種で Al 耐性メカニズムの 1 つとなっていることを示している。*EguSTOP1*-KD 毛状根において、*EcMATE1* 転写量は *ALS3*-like protein (*EguALS3*)とともに抑制されていた (Fig. 27)。これは、組換え毛状根において Al 感受性が高まることで説明できる可能性がある。これらの知見は、*STOP1*-like protein と Al 耐性遺伝子の両遺伝子による調節が、ユーカリでも保存されていることを示した。*MATE* や *ALS3* の転写抑制はタバコでも同様に観察さ

れ (Ohyama, et al., 2013)、シロイヌナズナ ((Sawaki, et al., 2009); ALS3, (Liu, et al., 2009); MATE)、イネ (rice ALS3-like protein, (Yamaji, et al., 2009))でも報告されている。これは **STOP1-like proteins** とそれが制御する遺伝子群が多くの植物種で存在することを示している。加えて、シロイヌナズナの *EguSTOP1* 相補組換え体では、 H^+ 感受性は部分的に回復していることから、シロイヌナズナの H^+ 耐性を担ういくつかの遺伝子の転写量が、ユーカリの **STOP1** によって活性化されたことを示している。これは、制御する遺伝子のターゲットとなる *cis*-エレメントがシロイヌナズナとユーカリで保存され、さらに保存された **STOP1-like proteins** の構造によって相互作用できた結果であると示唆された。**STOP1-like protein** による転写調節のさらなる研究が、この可能性の検証に必要である。

結論

本研究では、STOP1 転写因子による Al、低 pH 耐性機構の解明を目的とした。シロイヌナズナ STOP1 タンパク質は、Cys2–His2 zinc finger protein と高いホモロジーを持っており、Al 耐性をコントロールする複数の遺伝子を調節している。シロイヌナズナ STOP1 の下流遺伝子をマイクロアレイから選抜することを目的とした第 1 章では、選抜したリストの中に既知の Al 耐性遺伝子、イオン恒常性や低 pH 調節に関わる遺伝子が含まれていた。RT-PCR の結果から、選抜された遺伝子群は確かにマイクロアレイの結果と一致し、Al または低 pH、あるいは共通で働く遺伝子が含まれている可能性が高まった。Al 耐性は複数の遺伝子の耐性経路によって総合的に耐性形質が得られ、また低 pH 耐性はメカニズムの知見自体が少ないため、これらのリストから更なる Al、低 pH 耐性遺伝子が特定されることが期待される。

第 1 章ではモデル植物のシロイヌナズナを材料に研究を行ったが、産業植物での研究は、効率的で生産性の高い品種の開発につながる。酸性土壌が広く分布する東南アジアでプランテーションを展開するユーカリでは特に Al と低 pH 耐性の強化が高生産性につながる。*EcMATE1* のような Al 耐性遺伝子の過剰発現は一つのアプローチであり、今回のケースでは、*EcMATE1* の過剰発現と有機酸代謝の変化 (e.g., citrate synthase の過剰発現; セイヨウアブラナ、Anoop et al. 2003, *Nicotiana benthamiana*, Deng et al. 2009) のコンビネーションは、クエン酸放出による効果的な Al 耐性の強化に有用である。ユーカリの STOP1 ホモログによる *EcMATE1* の調節については調べられていないが、第 1 章で明らかにしたように、*AtMATE* などの複数の Al 耐性遺伝子の共制御は、シロイヌナズナ STOP1 (Sawaki et al. 2009)、イネ ART1 (Yamaji et al. 2009) と関連がある。STOP1 ホモ

ログによって調節される遺伝子の特定に関するさらなる研究は、ユーカリの Al 耐性遺伝子の共調節を特定する興味深いアプローチになると考えられ、ユーカリの Al 耐性に効果的な分子育種のマーカーの発展に利用できる。

本研究では、ユーカリの STOP1 制御システムに属する 2 つの Al 耐性遺伝子を特定した。この知見は、ユーカリの分子育種に有用であるかもしれない。例えば、樹木のバイオテクノロジーの進歩 (e.g., gene transformation; (Ho, et al., 1998; Kawazu, et al., 2003))により、ユーカリの組換え育種の利用が可能になった (Kirch, et al., 2011)。実際、塩耐性組換え *Eucalyptus globulus* は菌の酵素を過剰発現させることで開発された (Matsunaga, et al., 2012)。アクアポリンの過剰発現は、ユーカリの水利用効率が高まった (Tsuchihira, et al., 2010)。ここで、近年のユーカリゲノミクスや SNP 同定の進歩は(e.g., genome-wide cDNA、SNP identification (Novaes, et al., 2008))、機能ゲノミクスや、効率的な育種の基盤を提供した (e.g., genomic selection, (Grattapaglia and Kirst, 2008; Grattapaglia and Resende, 2011))。このような樹木のバイオテクノロジーによる MATE や ALS3 の過剰発現、両遺伝子の耐性効果に基づくマーカー利用選抜は (e.g., *EguMATE* や *EguALS3* の高発現個体のセレクション)、ユーカリ Al 耐性の向上に効果的な方法である。

これまでの報告では、STOP1-like protein の機能不全は、単子葉植物 (イネの *ART1* 変異体 (Yamaji, et al., 2009))、双子葉植物 (シロイヌナズナ変異体 (Iuchi, et al., 2007); タバコノックダウン (Ohya, et al., 2013))で Al 感受性を引き起こした。本研究では、広葉樹のユーカリ STOP1 オースログ遺伝子のノックダウンによる Al 耐性度の低下を示した。近年、シロイヌナズナ *stop1*-mutant をホストとした他の広葉樹 (i.e., tea, black poplar)の STOP1 オースログ遺伝子を相補試験により特定した (Ohya, et al., 2013)。このタンパクの活性がまだ評価されていなかった間に、データベースによる探索で針葉樹がオースログを持っていることを示

した。これは STOP1 制御システム (STOP1 タンパクとその制御遺伝子)が、進化として古く、樹木を含む陸上植物に広く共通していることを示している。クエン酸輸送 MATE や、ALS3 のような転写調節された遺伝子のいくつかは、様々な植物で主な Al 耐性遺伝子として見つかった。MATE は sorghum (Magalhaes, et al., 2007)、barley (Furukawa, et al., 2007)、corn (Tan and Binger, 1986)で見つかり、これらのタンパク質は、原核生物タイプのトランスポーターと特徴が共通であった (Ryan, et al., 2011)。これは陸上植物の STOP1 システムが細菌と起源が同じであることを示唆している。生物種間の STOP1 の相同性検索では、非常によく似た酸耐性メカニズム (i.e., transcriptional regulation of some shared genes)が酵母 (Gregori, et al., 2008)や哺乳類 (Gunshin, et al., 1997)で報告されたが、藻類と他の生物では相同性が無かった。さらなる酸耐性システムの生物種間の比較研究は、それぞれのシステムが異なる生物種で独立に進化したかどうかの答えとなるかもしれない。

要約

酸性土壌で問題となる Al 及び H⁺は根伸長阻害を引き起こし、リン酸を不可給態にするため、植物の成長を抑制する。これに対処するため、植物は根からの有機酸放出をはじめとする様々な対応策を持っている。モデル植物であるシロイヌナズナでは両ストレスに耐性の機能を与える遺伝子が発見され、STOP1 (sensitive to proton rhizotoxicity 1)と名付けられた。本研究では、網羅的に転写量を測定できるマイクロアレイを用いてシロイヌナズナ STOP1 が制御している下流遺伝子、すなわち Al、および低 pH 耐性に実際に関わる遺伝子を探索することを目的とした。さらに、実用植物としてパルプに使用されるユーカリの有機酸放出による Al 耐性機構を調べた。

シロイヌナズナでは、Al ストレスでリンゴ酸が放出されるとともに、リンゴ酸含量が増加することが知られている。この時のリンゴ酸代謝に関わる遺伝子の転写変動を調べたところ、TCA サイクル内の遺伝子はやや転写が抑えられているのに対し、Malic enzyme、Malate dehydrogenase、PEP carboxykinase など TCA サイクルの周辺で働く遺伝子が高い転写量を示していた。また、Al による代謝変動を調べた結果、グルタミン酸が減少し、アスパラギン酸が増加していた。以上から、Al 処理によるリンゴ酸増加はセリン経路や、グルタミン酸からアスパラギン酸を経由する経路など、TCA サイクルのバイパスとなる経路が重要な役割をしていることが示唆された。さらに、STOP1 ノックアウト変異体と野生型を比較したマイクロアレイの結果から、Al 耐性遺伝子として知られるリンゴ酸放出トランスポーターの AtALMT1 や half type ATP-binding cassette transporter の ALS3 (Aluminum Sensitive 3) が STOP1 変異体で転写抑制されていた。そのほかにトランスポーターやイオン輸送を調節するタンパク質、pH 調節代謝の遺伝子が転写

抑制されたことから、STOP1 が Al と H⁺応答の転写制御のシグナル伝達に関わることが示唆された。低 pH 処理における STOP1 変異体の代謝物の解析でも GABA shunt や pH stat の pH 調節経路が変異体で減少した。また、GFP を用いた STOP1 の局在解析では、STOP1 が核に局在していたこと、さらに Al、H⁺の毒性を防御する様々な遺伝子の発現調節をしていることから、STOP1 が転写因子である可能性を示唆している。

ユーカリは世界中で工業用に植林されているが、酸性土壌をはじめとする不良土壌のため、高成長、高収量の個体選抜、育種が課題となっている。このことから、Al 耐性を付与する有機酸放出は選抜のマーカーとなり得るため、代表的な品種であるユーカリカマルドレンシスの有機酸放出特性を調べた。重金属、低 pH など、様々なストレスで根伸長の阻害が見られたが、有機酸放出は Al のみに応答してクエン酸を放出した。次に、ユーカリではクエン酸輸送に関わるクエン酸トランスポーターは未単離であったため、単離したうえでその機能について解析した。Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) トランスポーターファミリーに属するクエン酸トランスポーターを、他の植物種の配列をもとに、ユーカリカマルドレンシスから 4 つの EcMATE ホモログを単離した。この中で Al に応答して転写量が増加しているホモログは EcMATE1 のみであった。GFP による局在解析では EcMATE1 が細胞膜に存在し、タバコ毛状根での EcMATE1 過剰発現体では Al によりクエン酸放出が増加し、根伸長阻害も改善された。また、タンパク質のリン酸化、脱リン酸化阻害剤により、有機酸放出と EcMATE1 転写量は減少した。以上から、EcMATE1 は Al 耐性に貢献していると考えられた。続いて、ユーカリの STOP1 遺伝子を単離し、アグロバクテリウムリゾゲネスによる毛状根誘導とともに RNAi の導入によって STOP1 の転写を抑えたところ、MATE や ALS3 オーソログ遺伝子の転写は抑制された。ユーカリ STOP1 をシロイヌナズナの stop1 変

異体に導入した相補実験では、低 pH 耐性が回復した。タバコ葉への GFP 融合タンパクの導入では、STOP1 は核に局在していた。以上から、ユーカリの STOP1 と Al 耐性遺伝子を含む Al 耐性遺伝子のシリーズを特定した。これらの遺伝子は酸性土壌耐性に関する分子育種やゲノミックセレクションに有用である可能性を示唆した。

謝辞

今回の研究に関し、組換え体の作成と解析を行ってくださった理化学研究所の篠崎一雄先生、藤田美紀先生、理化学研究所バイオリソースセンターの小林正智先生、井内聖先生、ベクターを提供してくださった島根大学の中川強先生、また、マイクロアレイ、代謝物測定を担当してくださった、かずさDNA研究所の柴田大輔先生、櫻井望先生に感謝いたします。

ユーカリの研究に関し、指導してくださった佐藤茂様、西窪伸之様、土居智仁様、土肥敬悟様、伊藤一弥所長、実験の補助をしてくださった北村智様をはじめ、王子製紙森林資源研究所の皆様に感謝いたします。なお、ユーカリの研究はMETIプロジェクトの補助によって行われました。

最後に、本研究の総合的な指導をしていただきました、岐阜大学応用生物科学部の小山博之先生、小林佑理子先生に感謝いたします。

引用文献

- Ahn SJ, Sivaguru M, Osawa H, Chung GC, Matsumoto H** (2001) Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiol* **126**: 1381-1390
- Anoop VM, Basu U, McCammon MT, McAlister-Henn L, Taylor GJ** (2003) Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol* **132**: 2205-2217
- Bouche N, Fromm H** (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci* **9**: 110-115
- Bown AW, Shelp BJ** (1997) The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiol* **115**: 1-5
- Campinhos Jr E** (1999) Sustainable plantations of high-yield shape *Eucalyptus* trees for production of fiber: the Aracruz case. *New Forests* **17**: 129-143
- Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW** (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 3525-3535
- Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J** (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* **6**: 325-330
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743

- Crawford LA, Bown AW, Breitzkreuz KE, Guinel FC** (1994) The synthesis of γ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant Physiol* **104**: 865-871
- de la Fuente JM, Ramirez-Rodriguez V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L** (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* **276**: 1566-1568
- Delhaize E, Kataoka T, Hebb DM, White RG, Ryan PR** (2003) Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell* **15**: 1131-1142
- Delhaize E, Ryan PR, Hebb DM, Yamamoto Y, Sasaki T, Matsumoto H** (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15249-15254
- Delhaize E, Hebb DM, Ryan PR** (2001) Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol* **125**: 2059-2067
- Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ** (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant physiology* JID - 0401224 PMC - PMC159038 EDAT- 1993/11/01 00:00 MHDA- 2002/09/17 10:00 CRDT- 1993/11/01 00:00 AID - 103/3/695 pii] PST - ppublish
- Deng W, Luo K, Li Z, Yang Y, Hu N, Wu Y** (2009) Overexpression of *Citrus junos* mitochondrial citrate synthase gene in *Nicotiana benthamiana* confers aluminum tolerance. *Planta* **230**: 355-365

- Díaz CL, Melchers LS, Hooykaas PJ, Lugtenberg BJ, Kijne JW** (1989) Root lectin as a determinant of host–plant specificity in the *Rhizobium*–legume symbiosis. *Nature* **338**: 579 - 581
- Englbrecht CC, Schoof H, Bohm S** (2004) Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics* **5**: 39
- Ezaki B, Suzuki M, Motoda H, Kawamura M, Nakashima S, Matsumoto H** (2004) Mechanism of gene expression of arabidopsis glutathione S-transferase, *AtGST1*, and *AtGST11* in response to aluminum stress. *Plant Physiol* **134**: 1672-1682
- FAO** (2001) Forest Genetic Resources No.29. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. ,
<http://www.fao.org/docrep/004/y2316e/y2316e00.htm>.
- Feikema P, Baker T** (2011) Effect of soil salinity on growth of irrigated plantation *Eucalyptus* in south-eastern Australia. *Agric Water Manage* **98**: 1180-1188
- Fujii M, Yokosho K, Yamaji N, Saisho D, Yamane M, Takahashi H, Sato K, Nakazono M, Ma JF** (2012) Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. *Nature Communications* **3**: 713
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran LP, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal* **39**: 863-876

- Fukuda T, Saito A, Wasaki J, Shinano T, Osaki M** (2007) Metabolic alterations proposed by proteome in rice roots grown under low P and high Al concentration under low pH. *Plant Science* **172**: 1157-1165
- Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y, Sato K, Katsuhara M, Takeda K, Ma JF** (2007) An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol* **48**: 1081-1091
- Fütterer O, Angelov A, Liesegang H, Gottschalk G, Schleper C, Schepers B, Dock C, Antranikian G, Liebl W** (2004) Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9091-9096
- Grattapaglia D, Kirst M** (2008) *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytol* **179**: 911-929
- Grattapaglia D, Resende MD** (2011) Genomic selection in forest tree breeding. *Tree Genetics & Genomes* **7**: 241-255
- Greaves BL, Borralho NMG, Raymond CA** (1997) Breeding objective for plantation eucalypts grown for production of kraft pulp. *For Sci* **43**: 465-472
- Gregori C, Schüller C, Frohner IE, Ammerer G, Kuchler K** (2008) Weak organic acids trigger conformational changes of the yeast transcription factor War1 in vivo to elicit stress adaptation. *J Biol Chem* **283**: 25752-25764
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA** (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**: 482-488

- Hampp R, Goller M, Fullgraf H (1984)** Determination of compartmented metabolite pools by a combination of rapid fractionation of oat mesophyll protoplasts and enzymic cycling. *Plant Physiol* **75**: 1017-1021
- Hirata T, Kaneko T, Ono T, Nakazato T, Furukawa N, Hasegawa S, Wakabayashi S, Shigekawa M, Chang MH, Romero MF, Hirose S (2003)** Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**: 1199-1212
- Ho C, Chang S, Tsay J, Tsai C, Chiang V, Chen Z (1998)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Rep* **17**: 675-680
- Hoekenga OA, Maron LG, Pineros 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 U S A* **103**: 9738-9743
- Hoekenga OA, Vision TJ, Shaff JE, Monforte AJ, Lee GP, Howell SH, Kochian LV (2003)** Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (Landsberg erecta x Columbia) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiol* **132**: 936-948
- Horst WJ (1988)** The physiology of manganese toxicity. *Dev Plant Soil Sci* **33**: 175-188

- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR** (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**: 61-68
- Hurth MA, Suh SJ, Kretzschmar T, Geis T, Bregante M, Gambale F, Martinoia E, Neuhaus HE** (2005) Impaired pH homeostasis in *Arabidopsis* lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. *Plant Physiol* **137**: 901-910
- Ikka T, Kobayashi Y, Tazib T, Koyama H** (2008) Aluminum-tolerance QTL in Columbia/Kashmir inbred population of *Arabidopsis thaliana* is not associated with aluminum-responsive malate excretion. *Plant Sci* **175**: 533-538
- Ikka T, Kobayashi Y, Iuchi S, Sakurai N, Shibata D, Kobayashi M, Koyama H** (2007) Natural variation of *Arabidopsis thaliana* reveals that aluminum resistance and proton resistance are controlled by different genetic factors. *Theor Appl Genet* **115**: 709-719
- Ito K, Doi K, Tatemichi Y, Shibata M** (1996) Plant regeneration of eucalypts from rotating nodule cultures. *Plant Cell Rep* **16**: 42-45
- Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, Kobayashi Y, Ikka T, Hirayama T, Shinozaki K, Kobayashi M** (2007) Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 9900-9905
- Kawazu T, Doi K, Kondo K** (2003) Process for transformation of mature trees of *Eucalyptus* plants US Patent 6,563,024

- Kawazu T, Dol K, Tatemichi Y, Ito K, Shibata M** (1996) Regeneration of transgenic plants by nodule culture system in *Eucalyptus camaldulensis*. In: *Proc IUFRO Conf*. Tree improvement for sustainable tropical forestry. 492-497
- Kihara T, Ohno T, Koyama H, Sawafuji T, Hara T** (2003a) Characterization of NADP-isocitrate dehydrogenase expression in a carrot mutant cell line with enhanced citrate excretion. *Plant Soil* **248**: 145-153
- Kihara T, Wada T, Suzuki Y, Hara T, Koyama H** (2003b) Alteration of citrate metabolism in cluster roots of white lupin. *Plant Cell Physiol* **44**: 901-908
- Kinraide TB** (2003) Toxicity factors in acidic forest soils: attempts to evaluate separately the toxic effects of excessive Al^{3+} and H^+ and insufficient Ca^{2+} and Mg^{2+} upon root elongation. *Eur J Soil Sci* **54**: 323-333
- Kirch R, Astarita L, Santarém E, Pasquali G** (2011) *Eucalyptus* transgenic plants: from genetic transformation protocols to biosafety analysis. **5**: P179
- Klyubin IV, Kirpichnikova KM, Gamaley IA** (1996) Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. *Eur J Cell Biol* **70**: 347-351
- Kobayashi Y, Furuta Y, Ohno T, Hara T, Koyama H** (2005) Quantitative trait loci controlling aluminium tolerance in two accessions of *Arabidopsis thaliana* (Landsberg *erecta* and Cape Verde Islands). *Plant Cell Environ* **28**: 1516-1524
- Kobayashi Y, Hoekenga OA, Itoh H, Nakashima M, Saito S, Shaff JE, Maron LG, Pineros MA, Kochian LV, Koyama H** (2007) Characterization of *AtALMT1* expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **145**: 843-852

- Kochian LV** (2001) A Patch-Clamp Study on the Physiology of Aluminum Toxicity and Aluminum Tolerance in Maize. Identification and Characterization of Al³⁺-Induced Anion Channels. *Plant Physiol* **125**: 292-305
- Kochian LV, Hoekenga OA, Pineros MA** (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 459-493
- Koyama H, Toda T, Yotoka S, Dawair Z, Hara T** (1995) Effects of aluminum and pH on root growth and cell viability in *Arabidopsis thaliana* strain Landsberg in hydroponic culture. *Plant Cell Physiol* **36**: 201-205
- Koyama H, Kawamura A, Kihara T, Hara T, Takita E, Shibata D** (2000) Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant Cell Physiol* **41**: 1030-1037
- Koyama H, Takita E, Kawamura A, Hara T, Shibata D** (1999) Over expression of mitochondrial citrate synthase gene improves the growth of carrot cells in Al-phosphate medium. *Plant Cell Physiol* **40**: 482-488
- Koyama H, Toda T, Hara T** (2001) Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: pectin-Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity. *J Exp Bot* **52**: 361-368
- Krauss H, Jeblick W** (1991) Induced Ca²⁺-uptake and callose synthesis in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* are decreased by the protein phosphatase inhibitor okadaic acid. *Plant Physiol* **81**: 309-312

- Larsen PB, Geisler MJ, Jones CA, Williams KM, Cancel JD (2005)** *ALS3* encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* **41**: 353-363
- Lee SC, Lan WZ, Kim BG, Li L, Cheong YH, Pandey GK, Lu G, Buchanan BB, Luan S (2007)** A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15959-15964
- Libourel I, Van Bodegom P, Fricker M, Ratcliffe R (2006)** Nitrite reduces cytoplasmic acidosis under anoxia. *Plant Physiol* **142**: 1710-1717
- LINDBERG S, STRID H (1997)** Aluminium induces rapid changes in cytosolic pH and free calcium and potassium concentrations in root protoplasts of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol Plant* **99**: 405-414
- Liu J, Magalhaes JV, Shaff J, Kochian LV (2009)** Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. *Plant Journal* **57**: 389-399
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998)** Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1391-1406
- Ma JF, Hiradate S, Matsumoto H (1998)** High aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiol* **117**: 753-759

- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E** (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci* **6**: 273-278
- Magalhaes JV, Liu J, Guimaraes CT, Lana UG, Alves VM, Wang YH, Schaffert RE, Hoekenga OA, Pineros MA, Shaff JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN, Kochian LV** (2007a) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat Genet* **39**: 1156-1161
- Magalhaes JV, Liu J, Guimaraes CT, Lana UG, Alves VM, Wang YH, Schaffert RE, Hoekenga OA, Pineros MA, Shaff JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN, Kochian LV** (2007b) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat Genet* **39**: 1156-1161
- Maron LG, Piñeros MA, Guimarães CT, Magalhaes JV, Pleiman JK, Mao C, Shaff J, Belicuas SNJ, Kochian LV** (2010) Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The Plant Journal* **61**: 728-740
- Masatani T, Ito N, Shimizu K, Ito Y, Nakagawa K, Sawaki Y, Koyama H, Sugiyama M** (2010) Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response. *J Virol* **84**: 4002-4012
- Matsunaga E, Nanto K, Oishi M, Ebinuma H, Morishita Y, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Shimada T** (2012) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* using explants with shoot apex with introduction of

- bacterial choline oxidase gene to enhance salt tolerance. *Plant Cell Rep* **31**: 225-235
- Miethke M, Marahiel MA** (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**: 413-451
- Mitsukawa N, Okumura S, Shirano Y, Sato S, Kato T, Harashima S, Shibata D** (1997) Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7098-7102
- Miyashita Y, Good AG** (2008) Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **49**: 92-102
- Moseyko N, Feldman LJ** (2001) Expression of pH-sensitive green fluorescent protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **24**: 557-563
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* **15**: 473-497
- Nakagawa T, Ishiguro S, Kimura T** (2009) Gateway vectors for plant transformation. *Plant biotechnology* **26**: 275-284
- Neumann G, Massonneau A, Martinoia E, Römheld V** (1999) Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* **208**: 373-382
- Novaes E, Drost DR, Farmerie WG, Pappas GJ, Grattapaglia D, Sederoff RR, Kirst M** (2008) High-throughput gene and SNP discovery in *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome. *BMC Genomics* **9**: 312

- Ohno T, Koyama H, Hara T** (2003) Characterization of citrate transport through the plasma membrane in a carrot mutant cell line with enhanced citrate excretion. *Plant Cell Physiol* **44**: 156-162
- Ohyama Y, Ito H, Kobayashi Y, Ikka T, Morita A, Kobayashi M, Imaizumi R, Aoki T, Komatsu K, Sakata Y, Satoshi I, Koyama H** (2013) Characterization of AtSTOP1 orthologous genes in tobacco and other plant species. *Plant Physiol* **162**: 1937-1946
- Ojima K, Abe H, Ohira K** (1984) Release of citric acid into the medium by aluminum-tolerant carrot cells. *Plant and cell physiology* **25**: 855-858
- O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG** (2004) RHAMNOGALACTURONAN II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 109-139
- Pellet DM, Grunes DL, Kochian LV** (1995) Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* **196**: 788-795
- Raman H, Ryan PR, Raman R, Stodart BJ, Zhang K, Martin P, Wood R, Sasaki T, Yamamoto Y, Mackay M** (2008) Analysis of TaALMT1 traces the transmission of aluminum resistance in cultivated common wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* **116**: 343-354
- Rangel AF, Mobin M, Rao IM, Horst WJ** (2005) Proton toxicity interferes with the screening of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for aluminium resistance in nutrient solution. *J Plant Nutr Soil Sci* **168**: 607-616

- Raymond CA, Apiolaza LA** (2004) Incorporating wood quality and deployment traits in *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. Plantation forest biotechnology for the 21st century 87-99
- Rengel Z** (1992) Role of calcium in aluminium toxicity. New Phytol **121**: 499-513
- Rengel Z, Zhang WH** (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. New Phytol **159**: 295-314
- Roberts JK, Hooks MA, Miaullis AP, Edwards S, Webster C** (1992) Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. Plant Physiol **98**: 480-487
- Rogers EE, Guerinot ML** (2002) FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. Plant Cell **14**: 1787-1799
- Rudrappa T, Czymmek KJ, Pare PW, Bais HP** (2008) Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. Plant Physiol **148**: 1547-1556
- Ryan PR, Delhaize E, Jones DL** (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. Annual Review of Plant Biology **52**: 527-560
- Ryan PR, Tyerman SD, Sasaki T, Furuichi T, Yamamoto Y, Zhang WH, Delhaize E** (2011) The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. Journal of Experimental Botany **62**: 9-20
- Sakano K** (1998) Revision of biochemical pH-stat: involvement of alternative pathway metabolisms. Plant Cell Physiol **39**: 467-473

- Sasaki T, Ryan PR, Delhaize E, Hebb DM, Ogihara Y, Kawaura K, Noda K, Kojima T, Toyoda A, Matsumoto H (2006) Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) ALMT1 gene and its relationship to aluminum resistance. *Plant and Cell Physiology* **47**: 1343-1354
- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J* **37**: 645-653
- Sawaki Y, Kihara-Doi T, Kobayashi Y, Nishikubo N, Kawazu T, Kobayashi Y, Koyama H, Sato S (2013) Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*. *Planta* **237**: 979-989
- Sawaki Y, Iuchi S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Ikka T, Sakurai N, Fujita M, Shinozaki K, Shibata D, Kobayashi M, Koyama H (2009) STOP1 regulates multiple genes that protect *Arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol* **150**: 281-294
- Seki M, Narusaka M, Kamiya A, Ishida J, Satou M, Sakurai T, Nakajima M, Enju A, Akiyama K, Oono Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y, Kawai J, Carninci P, Itoh M, Ishii Y, Arakawa T, Shibata K, Shinagawa A, Shinozaki K (2002) Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* **296**: 141-145
- Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 194-199

- Shoji S, Miyake M, Takeuchi Y** (1964) Comparison of methods of available soil phosphorus determination. II. Correlation between soil tests and "A" values. Res Bull Hokkaido Natl Agric Exp Stn **84**: 32-39
- Sivaguru M, Ezaki B, He ZH, Tong H, Osawa H, Baluska F, Volkmann D, Matsumoto H** (2003) Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. Plant Physiol **132**: 2256-2266
- Skrzypek M, Lester RL, Dickson RC** (1997) Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol **179**: 1513-1520
- Spadoni S, Zabotina O, Di Matteo A, Mikkelsen JD, Cervone F, De Lorenzo G, Mattei B, Bellincampi D** (2006) Polygalacturonase-inhibiting protein interacts with pectin through a binding site formed by four clustered residues of arginine and lysine. Plant Physiol **141**: 557-564
- Sparkes IA, Runions J, Kearns A, Hawes C** (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. Nature protocols **1**: 2019-2025
- Suzuki Y, Kawazu T, Koyama H** (2004) RNA isolation from siliques, dry seeds, and other tissues of *Arabidopsis thaliana*. BioTechniques **37**: 542-544
- Takita E, Koyama H, Hara T** (1999) Organic acid metabolism in aluminum-phosphate utilizing cells of carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell Physiol **40**: 489-495

- Tan KH, Binger A** (1986) Effect of humic acid on aluminum toxicity in corn plants. *Soil Sci* **141**: (1):20-25
- Tesfaye M, Temple SJ, Allan DL, Vance CP, Samac DA** (2001a) Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiol* **127**: 1836-1844
- Tesfaye M, Temple SJ, Allan DL, Vance CP, Samac DA** (2001b) Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiol* **127**: 1836-1844
- Toda T, Koyama H, Hori T, Hara T** (1999) Aluminum tolerance of *Arabidopsis thaliana* under hydroponic and soil culture conditions. *Soil Sci Plant Nutr* **45**: 19-425
- Tsuchihira A, Hanba YT, Kato N, Doi T, Kawazu T, Maeshima M** (2010) Effect of overexpression of radish plasma membrane aquaporins on water-use efficiency, photosynthesis and growth of Eucalyptus trees. *Tree Physiol* **30**: 417-430
- Urano K, Maruyama K, Ogata Y, Morishita Y, Takeda M, Sakurai N, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Kobayashi M** (2009) Characterization of the ABA - regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *The Plant Journal* **57**: 1065-1078
- Wagatsuma T, Jujo K, Ishikawa S, Nakashima T** (1995) Aluminum-tolerant protoplasts from roots can be collected with positively charged silica microbeads: A method based on differences in surface negativity. *Plant and cell physiology* **36**: 1493-1502

- Watanabe T, Okada K** (2005) Interactive effects of Al, Ca and other cations on root elongation of rice cultivars under low pH. *Ann Bot* **95**: 379-385
- White DA, Crombie DS, Kinal J, Battaglia M, McGrath JF, Mendham DS, Walker SN** (2009) Managing productivity and drought risk in *Eucalyptus globulus* plantations in south-western Australia. *For Ecol Manage* **259**: 33-44
- Yamaji N, Huang CF, Nagao S, Yano M, Sato Y, Nagamura Y, Ma JF** (2009) A zinc finger transcription factor *ART1* regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in Rice. *The Plant Cell Online* **21**: 3339-3349
- Yan F, Schubert S, Mengel K** (1992) Effect of Low root medium pH on net proton release, root respiration, and root growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol* **99**: 415-421
- Yanagisawa S** (2000) Dof 1 and Dof 2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J* **21**: 281-288
- Yanagisawa S, Akiyama A, Kisaka H, Uchimiya H, Miwa T** (2004) Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7833-7838
- Yang JL, Zheng SJ, He YF, Matsumoto H** (2005) Aluminium resistance requires resistance to acid stress: a case study with spinach that exudes oxalate rapidly when exposed to Al stress. *J Exp Bot* **56**: 1197-1203

- Yang JL, ZHANG L, LI YY, YOU JF, WU P, ZHENG SJ** (2006) Citrate transporters play a critical role in aluminium-stimulated citrate efflux in rice bean (*Vigna umbellata*) roots. *Annals of botany* **97**: 579-584
- Yang XY, Yang JL, Zhou Y, Pineros MA, Kochian LV, Li GX, Zheng SJ** (2011) A de novo synthesis citrate transporter, *Vigna umbellata* multidrug and toxic compound extrusion, implicates in Al-activated citrate efflux in rice bean (*Vigna umbellata*) root apex. *Plant Cell Environ* **34**: 2138-2148
- Yohannes E, Barnhart DM, Slonczewski JL** (2004) pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **186**: 192-199
- Yokota S, Ojima K** (1995) Physiological response of root tip of alfalfa to low pH and aluminium stress in water culture. *Plant Soil* **171**: 163-165
- Zhang W, Kone BC** (2002) NF-kappaB inhibits transcription of the H⁺-K⁺-ATPase alpha₂-subunit gene: role of histone deacetylases. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**: F904-F911
- Zhao CR, Ikka T, Sawaki Y, Kobayashi Y, Suzuki Y, Hibino T, Sato S, Sakurai N, Shibata D, Koyama H** (2009) Comparative transcriptomic characterization of aluminum, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* **9**: 32
- Zhao CR, Sawaki Y, Sakurai N, Shibata D, Koyama H** (2010) Transcriptomic profiling of major carbon and amino acid metabolism in the roots of *Arabidopsis thaliana* treated with various rhizotoxic ions. *Soil Science and Plant Nutrition* **56**: 150-162

- Zhao J, Cheng NH, Motes CM, Blancaflor EB, Moore M, Gonzales N, Padmanaban S, Sze H, Ward JM, Hirschi KD (2008) AtCHX13 is a plasma membrane K⁺ transporter. *Plant Physiol* **148**: 796-807
- Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H (1998) High aluminum resistance in Buckwheat: I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiology* **117**: 745-751
- 小林安文, 小林佑理子, 澤木宣忠, 小山博之 (2009) シロイヌナズナリンゴ酸トランスporter (AtALMT1)遺伝子の発現様式の解析 日本無菌生物ノートバイオロジー学会= Japanese journal of germfree life and gnotobiology **39**: 57-60
- 澤木宣忠, 中島みどり, 小山博之 (2008) シロイヌナズナの Al によるリンゴ酸含量とその代謝遺伝子の変動. 日本無菌生物ノートバイオロジー学会= Japanese journal of germfree life and gnotobiology **38**: 100-103