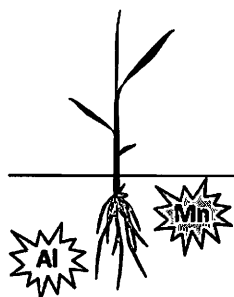


講座

生物情報科学・細胞生物学的手法から見えてきた
植物栄養応答

5. 作物の金属ストレス耐性機構



横正健剛・山地直樹
岡山大学資源植物科学研究所

キーワード 酸性土壌, 有機酸分泌, アルミニウム耐性, マンガン耐性, トランスポーター

1. はじめに

酸性土壌は熱帯や亜熱帯地域を中心に広く分布し、世界の耕地面積の3~4割を占める。酸性土壌は世界で最も広い問題土壌の一つである (von Uexküll and Mutert, 1995)。この講座では酸性土壌で問題となるアルミニウムやマンガンの過剰毒性ストレスについて、イネ科の作物を中心とした耐性機構を解説するとともに、次世代シーケンサーを用いたソバのアルミニウム耐性の研究についても紹介する。

酸性土壌での植物の主な生育阻害因子はアルミニウム毒性ストレスである。アルミニウムは地殻中に普遍的に存在するが、土壌が酸性化すると3価の陽イオン (Al^{3+}) として溶出される。感受性の高い植物であれば数マイクロモル濃度のアルミニウムイオンで根の伸長が阻害され、様々な障害が引き起こされる (Kochian *et al.*, 2004)。しかし、一部の植物は酸性土壌で生存するためのアルミニウムストレス耐性機構を獲得している。植物のアルミニウム耐性機構は根圏でアルミニウムを無毒化する方法と、細胞内に侵入したアルミニウムを無毒化する方法の二つに分類される (Ma *et al.*, 2001)。アルミニウム耐性は植物種間で異なり、イネ科作物ではイネ (*Oryza sativa*) やライムギ (*Secale cereale*) はコムギ (*Triticum aestivum*) やオオムギ (*Hordeum vulgare*) に比べてアルミニウム耐性が高いことが知られている (Ma *et al.*, 2014)。

2. アルミニウムに応答した有機酸分泌と
トランスポーターの同定

植物の最も一般的なアルミニウム耐性機構に根からの有機酸の分泌がある。分泌される有機酸の種類は、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸が知られており、いずれの有機酸も根圏でアルミニウムをキレートすることで無毒化する。この有機酸分泌についてはイネ科の作物を中心に研究が進められ、リンゴ酸とクエン酸は分泌のためのトランスポーターが単離、同定されている。一方でシュウ酸分泌のためのトランスポーターは未だ単離されていない。

世界で初めて単離されたアルミニウム耐性に関与する有機酸トランスポーターはコムギの ALMT1 (Aluminum-activated malate transporter 1) である。この遺伝子はコムギのアルミニウム耐性の品種間差を用いた解析から単離され、耐性品種の根で強く発現していた (Sasaki *et al.*, 2004)。さらにコムギ ALMT1 の単離から数年後にオオムギとソルガムからクエン酸分泌のトランスポーター (HvAACT1, SbMATE) が単離された (Furukawa *et al.*, 2007; Magalhaes *et al.*, 2007)。HvAACT1 (Aluminum-activated citrate transporter 1) と SbMATE (Multidrug and toxic compound extrusion) のアミノ酸配列の相同性は高く、MATE 遺伝子ファミリーに属していた。また、同年には同じ MATE 遺伝子ファミリーである FRD3 (Ferric reductase defective 3) がシロイヌナズナから単離されているが、この遺伝子はアルミニウムの無毒化には関与せず、導管にクエン酸を供給することで鉄-クエン酸錯体を形成し、鉄の根から地上部への移行に関与していた (Durrett *et al.*, 2007)。アルミニウム耐性に関与する ALMT1 や MATE 遺伝子の発見後、その相同遺伝子は单子葉、双子葉に関わらず様々な植物から単離され機能解析が進んでいる (Kochian *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2014)。有機酸トランスポーター遺伝子は植物種によってアルミニウムに対する発現応答が異なる。ライムギの ScALMT1,

Kengo YOKOSHO and Naoki YAMAJI: Plant responses to nutrition revealed by bioinformatics and cell biology. 5. Molecular mechanisms of metal stress tolerance in crops 710-0046 岡山県倉敷市中央2-20-1

Corresponding Author: 横正健剛

2016年12月8日受付・2016年12月9日受理

日本土壌肥科学雑誌 第88巻 第2号 p. 139~146 (2017)

ScFRDL2, イネの *OsFRDL4*, *OsFRDL2* トウモロコシ *ZmMATE1* はアルミニウム処理によって数時間の間に遺伝子の発現量が増加する (Collins *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2010; Yokosho *et al.*, 2010; Yokosho *et al.*, 2011; Yokosho *et al.*, 2016a). 一方, コムギの *TaALMT1* とオオムギの *HvAACT1*, ソルガムの *SbMATE* はアルミニウムによる遺伝子発現の誘導はほとんどなく, アルミニウム処理直後から有機酸の分泌が始まる (Furukawa *et al.*, 2007; Magalhaes *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2004). 後者のような有機酸分泌にはタンパク質レベルでの制御が関与している. *TaALMT1* は N 末端と C 末端それぞれに, リンゴ酸輸送や活性化に重要なドメインがあり, 3 箇所のアミノ酸残基 (E274, D275, E284) がアルミニウムによる活性化に必要であることが報告されている (Furuichi *et al.*, 2010; Ligaba *et al.*, 2013; Sasaki *et al.*, 2014).

3. イネのアルミニウム耐性機構

イネは他のイネ科作物に比べてアルミニウム耐性が高いにもかかわらず有機酸の分泌量は少なく, 長い間その耐性機構は謎となっていた. しかし, イネのアルミニウム感受性のスクリーニングから単離された変異体の解析を発端に, アルミニウム耐性の分子メカニズムの解明は飛躍的に進展した. アルミニウム感受性変異体の原因遺伝子の一つに C2H2 型 Zn フィンガー転写調節因子をコードする ART1 (Al resistance transcription factor 1) がある (Yamaji *et al.*, 2009). ART1 はシス配列 GGN (T/g/a/C) V (C/a/g) S (C/G) を認識し, その下流にはアルミニウムによって発現が増加する 32 個の遺伝子を正に制御していることが明らかとなった (Tsutsui *et al.*, 2011; Yamaji *et al.*, 2009). 我々は ART1 制御下のトランスポーターを

中心に, 破壊株を用いた生理学的な解析, タンパク質の局在性解析や異種発現系 (酵母やアフリカツメガエル卵母細胞) による輸送活性測定を組み合わせることで個々の遺伝子の役割を明らかにしてきた. 図1にはこれまでに報告した ART1 に制御される遺伝子の機能を示している. STAR1 および STAR2 (Sensitive to Al rhizotoxicity 1, 2) はそれぞれ, 細菌型 ABC トランスポーターを構成するヌクレオチド結合ドメインと膜貫通ドメインをコードしている. この2つのタンパク質は小胞膜上でコンプレックスを形成して UDP-グルコースを輸送する. この UDP-グルコースは細胞壁の修飾に使われると考えられている (Huang *et al.*, 2009). Nrat1 (Nramp aluminum transporter 1) は Nramp 型のトランスポーターをコードするが, 他の Nramp とは輸送基質が異なり三価のアルミニウムイオンを細胞内へ取り込む (Xia *et al.*, 2010). また細胞内に取り込まれたアルミニウムは細胞質に蓄積するのではなく, 液胞膜に局在する OsALS1 によって液胞へ隔離される (Huang *et al.*, 2012). OsMGT1 は細胞膜に局在するマグネシウムトランスポーターをコードする (Chen *et al.*, 2012). その機能はアルミニウムとマグネシウムの競合によって細胞内アルミニウム毒性を緩和することが示されている (Chen *et al.*, 2012). OsCDT3 はシステインに富む短いペプチドをコードする. このペプチドは細胞膜に局在し, アルミニウムと結合する活性がある (Xia *et al.*, 2013). OsFRDL4 は細胞膜に局在するクエン酸トランスポーターであり, この遺伝子の破壊株ではクエン酸の分泌量とアルミニウム耐性が低下する. 一方 OsFRDL2 もクエン酸を輸送するが細胞内局在が異なり, なんらかの小胞に局在する. また, 破壊株においてアルミニウム耐性に違いがないことから, OsFRDL2 のアルミニウム耐性

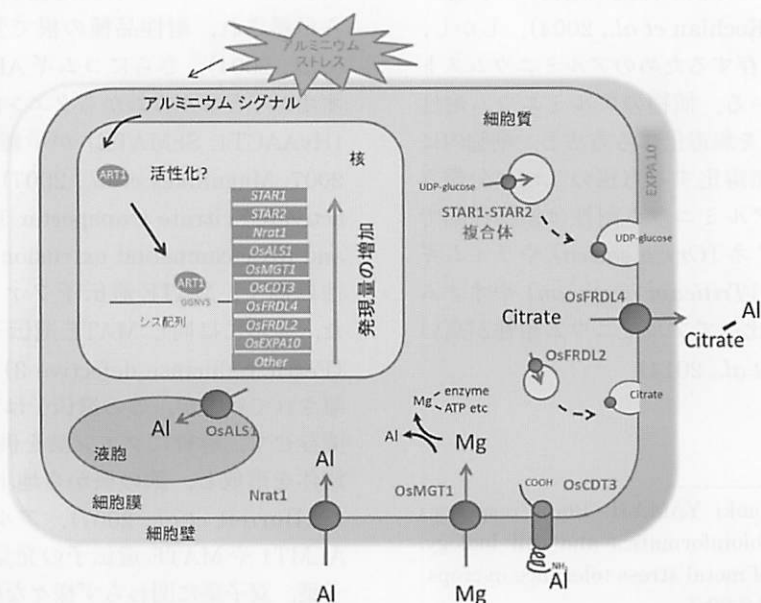


図1 ART1 を介したイネのアルミニウム耐性機構

イネのアルミニウム耐性遺伝子は ART1 によって制御されている. 図にはこれまでに明らかとなった耐性遺伝子の機能を示している. それぞれ細胞壁, 細胞膜, 液胞膜など様々な器官で機能している.

への寄与は小さいことが示唆されている (Yokosho *et al.*, 2016a). OsEXPA10 は細胞伸長に関与しているが, この遺伝子の破壊株でもアルミニウム耐性には大きな変化がないことから, OsEXPA10 のアルミニウム耐性への寄与も小さいと考えられる (Che *et al.*, 2016).

4. 耐性品種におけるアルミニウム耐性獲得過程

イネ科作物のアルミニウム耐性は品種間においても大きく異なる. 最近ではこの品種間差の原因やアルミニウム耐性の獲得過程についても研究が進んでいる. オオムギの品種間におけるアルミニウム耐性の違いはクエン酸分泌と *HvAACT1* の発現に由来する (Furukawa *et al.*, 2007). さらに, 耐性品種と感受性品種では *HvAACT1* の発現量だけでなく発現部位も異なる. 感受性品種 (Morex) では *HvAACT1* は主に根の基部側で発現している. さらにレーザーマイクロダイセクションにより根を中心柱と外周に切り分け発現の比較を行うと, 感受性品種の *HvAACT1* は中心柱で発現していた. 一方, 耐性品種 (ムラサキモチ) では根の基部側の発現に加えて根の先端付近の表皮でも強く発現していた (図2; Fujii *et al.*, 2012). この違いの原因を明らかにするため, *HvAACT1* の上流配列について比較を行ったところ, 耐性品種には *HvAACT1* の上流に約1kbのトランスポゾン (CACTA) 様配列が挿入されていた (図2; Fujii *et al.*, 2012). この挿入配列はプロモーターとして機能しており, 挿入配列内に複数の転写開始点が生じていた (図2; Fujii *et al.*, 2012). さらにこの挿入は東アジアの一部の在来品種にのみ確認された. すなわちオオムギでは, 酸性土壌地域である東アジアへの栽培域の拡大に合わせて, *HvAACT1* の上流にトランスポゾンの挿入が起こり, 本来根の中心柱で発現し鉄の転流を担う *HvAACT1* にアルミニウムの無毒化という新たな役割の付加が生じたと考えている (図2; Fujii *et al.*, 2012).

イネも品種によってアルミニウム耐性が大きく異なる. 一般にインディカ品種よりもジャポニカ品種の方が, アルミニウム耐性が高いことが知られている. これまでに品種間差を利用した QTL 解析も行われているが原因遺伝子の単離は成功していない. その原因の一つは上記のような複雑なイネのアルミニウム耐性機構が関与しているためと考えられる. しかし, 最近の研究からいくつかの QTL の近傍にある遺伝子がイネの品種間におけるアルミニウム耐性の違いを決めていることがわかってきた. アルミニウム耐性品種 (日本晴) は感受性品種 (カサラス) に比べて *OsFRDL4* の発現量とクエン酸分泌量が高い. 日本晴とカサラスの *OsFRDL4* のプロモーター領域を比較すると日本晴のプロモーターには1.2kbの挿入がみられた (図3; Yokosho *et al.*, 2016b). この挿入もトランスポゾン様配列であったが, *HvAACT1* の場合とは異なり solo-LTR タイプのトランスポゾンであった. この挿入配列は ART1 のシス配列を多く含んでおり, プロトプラストを用いた一過的な発現解析から日本晴のプロモーターはカサラスに比べて ART1 を介した転写活性が有意に高いことが明らかとなった (図3; Yokosho *et al.*, 2016b). この挿入はジャポニカのほとんどの品種でみられたが, 野生イネと多くのインディカの品種には挿入がない. この結果は, このトランスポゾンの挿入がジャポニカの栽培化の初期に起こったことを示唆している (Yokosho *et al.*, 2016b).

ART1 のシス配列の数による転写活性の違いはイネだけでなく, オオムギの近縁種であるシラゲガヤ (*Holcus lanatus*) でも報告されている (Chen *et al.*, 2013b). イギリスの Rothamsted Research で続けられている長期連用試験において, 硫酸アンモニウムの連用で土壌 pH が3.6まで低下した試験区ではこのシラゲガヤが卓越している. 酸性土壌で生育するシラゲガヤ (酸性型) は, 中性土壌で生育する生態型 (中性型) よりもアルミニウムによるリン

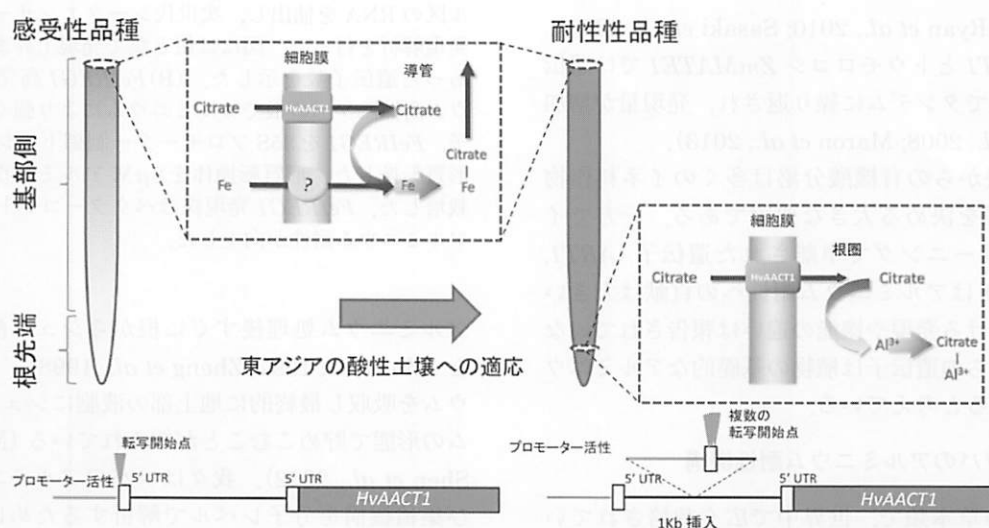


図2 オオムギアルミニウム耐性品種の耐性獲得過程

オオムギは酸性土壌への栽培域の拡大過程において, *HvAACT1* の上流に1kbの挿入が生じた. この挿入により *HvAACT1* は根の中心柱での役割, 鉄-クエン酸錯体の根から地上部への転流に加えて, 根の先端での役割, 根圏へのクエン酸分泌も担うようになった.

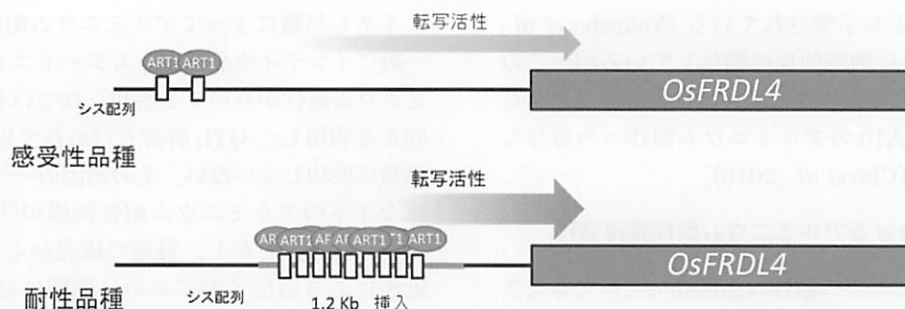


図3 イネの品種間におけるクエン酸トランスポーター *OsFRDL4* の発現調節機構

イネのアルミニウム耐性品種では *OsFRDL4* のプロモーター領域に1.2kbの挿入があり、この挿入配列内にはART1のシス配列が多数存在する。このシス配列の数の違いによって品種間における *OsFRDL4* の発現が異なる。

ゴ酸分泌量が多い。 *HALMT1* のプロモーター領域を比較したところ両者の間には多くの多型が存在し、ART1のシス配列が酸性型には5カ所、中性型には3カ所あった。この違いはトランスポゾンの挿入によるものではなく、自然変異の蓄積によるものである。低pH試験区ではこの酸性型のシラケガヤが生き残ったものと推測される。

イネのもう一つの品種間差の原因の例としては *Nrat1* の発現の違いがある。 *Nrat1* のプロモーター領域には耐性品種と感受性品種の間に多くの多型が存在する。しかしこの違いはART1のシス配列を含まないことから、品種間における *Nrat1* の発現増加にはART1とは別のファクターが関与していることが予想される (Li *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2014)。

その他、品種間におけるアルミニウム耐性遺伝子の発現の変化については南米の一部のコムギ品種などで *TaMATE1* 上流に新たなプロモーター活性をもつ配列が挿入されたことによってクエン酸分泌能を獲得した例がある (Garcia-Oliveira *et al.*, 2014; Tovkach *et al.*, 2013)。また、コムギとソルガムの耐性品種では、 *TaALMT1* および *SbMATE* 遺伝子プロモーター内の繰り返し配列のコピー数の増加によって発現レベルが上昇している (Magalhaes *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 2006)。ライムギ *ScALMT1* とトウモロコシ *ZmMATE1* では遺伝子全体がゲノム上でタンデムに繰り返され、発現量が増加した (Collins *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2013)。

このように、根からの有機酸分泌は多くのイネ科作物において品種間差を決める大きな要因である。一方でイネの感受性スクリーニングで単離された遺伝子 (*ART1*, *STAR1*, *OsALSI*) はアルミニウム耐性への貢献は大きいものの品種間における発現や機能の違いは報告されていない。それゆえこれらの遺伝子は植物の基礎的なアルミニウム耐性を担っていると考えている。

5. ソバのアルミニウム耐性機構

ソバはタデ科の草本類で、世界中で広く栽培されている。また、最近になって全ゲノム情報が解読され公開された (Yasui *et al.*, 2016)。ソバは、イネと同様アルミニウムに強い植物に分類され、これまでの生理学的な研究から

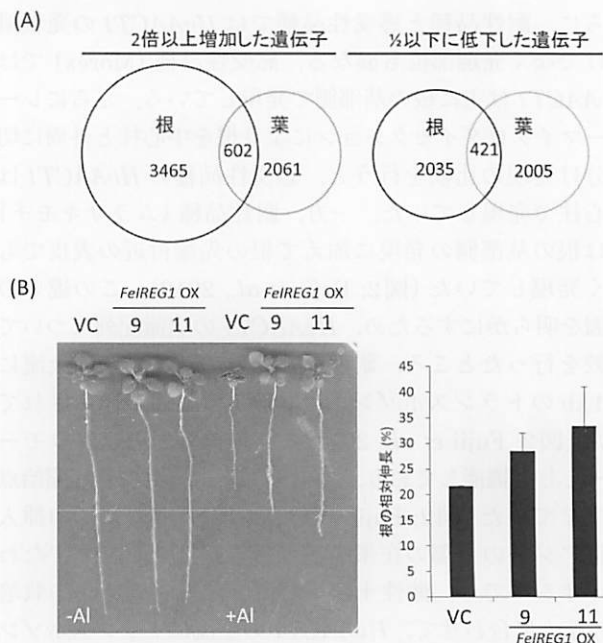


図4 RNA-Seqによるソバのアルミニウム耐性機構の解析 (A) ソバのアルミニウムによる発現変化のプロファイリング。アルミニウム処理したソバの根 (20 μ M アルミニウム6時間) と葉 (20 μ M アルミニウム24時間) とそれぞれのコントロール区のRNAを抽出し、次世代シーケンサーによる網羅的な発現解析を行った。図には根と葉で発現上昇または低下変動のあった遺伝子数を示した。 (B) *FeIREG1* 高発現株のアルミニウム耐性。ソバの根でアルミニウムにより強く誘導される遺伝子、 *FeIREG1* を35Sプロモーター制御下でシロイヌナズナに形質転換した。形質転換体を8 μ M アルミニウムで7日間水耕栽培した。 *FeIREG1* 発現株はベクターコントロールに比べてアルミニウム耐性が向上した。

アルミニウム処理後すぐに根からシュウ酸を分泌すること (Ma *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1998)、一方でアルミニウムを吸収し最終的に地上部の液胞にシュウ酸アルミニウムの形態で貯めこむことが知られている (Ma *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2002)。我々はソバのアルミニウム耐性および集積機構を分子レベルで解析するために、アルミニウムで処理したソバの根と葉からRNAを抽出し次世代シーケンサーを用いてRNA-Seq解析を行った (Yokosho *et al.*, 2014)。その結果、約15万のコンティグと約8万の

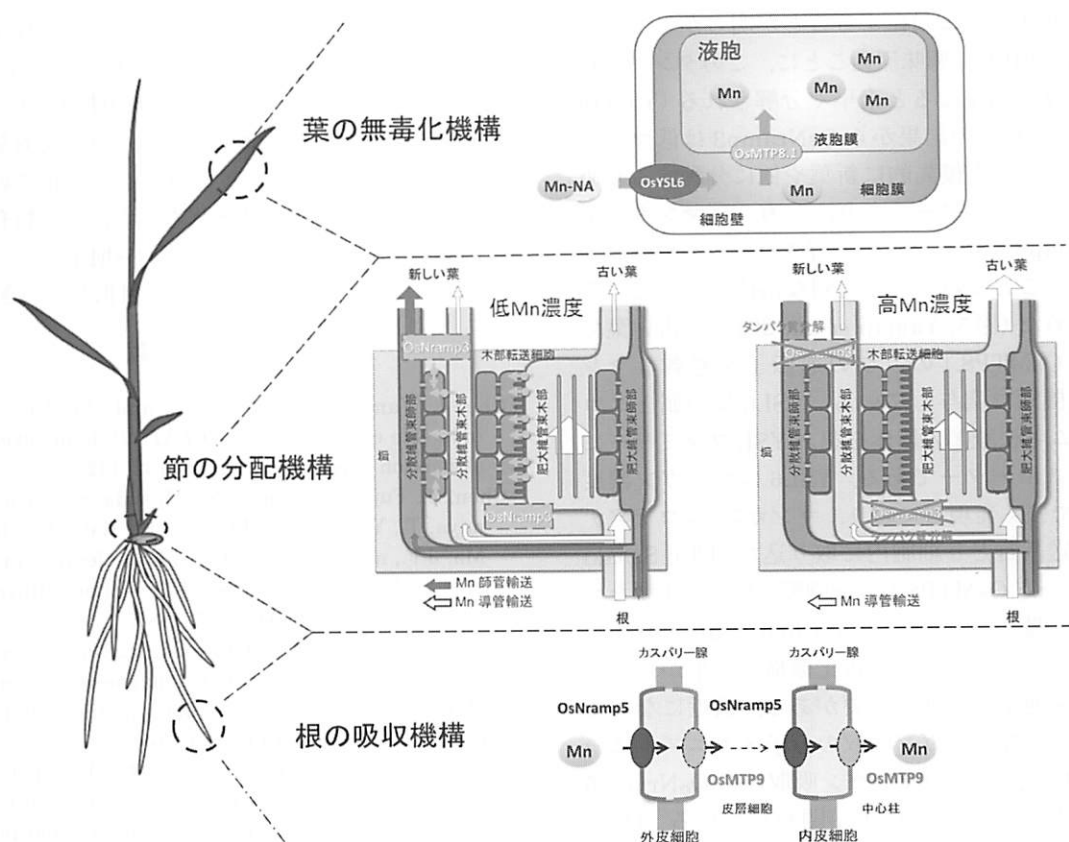


図5 イネのマンガン吸収、集積および耐性機構

土壌中のマンガンは OsNramp5, OsMTP9 によって吸収され速やかに地上部へ輸送される。マンガン濃度が高い場合、節で機能する OsNramp3 タンパク質が分解されることで新葉のマンガン過剰を防ぎ、古い葉へのマンガン輸送を促す。古い葉では過剰なマンガンは OsYSL6 により細胞内に取り込まれ、OsMTP8.1 により液胞内に隔離される。

アノテーション付きの遺伝子配列を取得した。アルミニウムによって誘導される遺伝子の発現プロファイルを解析した結果、根で発現が2倍以上に増加した遺伝子は4,067、葉では2,663個存在した(図4A; Yokosho *et al.*, 2014)。この中にはABCトランスポーターやMATEトランスポーターなどの既知のアルミニウム耐性遺伝子の相同遺伝子が含まれていた(Yokosho *et al.*, 2014)。一方でソバ特異的な発現パターンの輸送体も見つけることができた。*FeIREG1*はソバの根で発現しており、そのコードするアミノ酸はシロイヌナズナの金属イオン(Fe, Co, Ni)トランスポーター、*AtIREG2*と約60%の相同性を示した(Yokosho *et al.*, 2016c)。シロイヌナズナ*AtIREG2*は鉄欠乏に応答し発現が上昇する(Morrissey *et al.*, 2009; Schaaf *et al.*, 2006)。それに対して、*FeIREG1*は鉄欠乏には応答せず、アルミニウム特異的に発現が応答し、そのタンパク質は液胞膜に局在した(Yokosho *et al.*, 2016c)。さらにシロイヌナズナで*FeIREG1*を高発現させたところ、コントロール株に比べてアルミニウム耐性が向上した(図4B; Yokosho *et al.*, 2016c)。これらの結果から*FeIREG1*の機能は根でのアルミニウム無毒化機構に関与していることを明らかにした(Yokosho *et al.*, 2016c)。しかし、*FeIREG1*は根の先端の液胞膜に局在することから、ソバのアルミニウムの吸収、移行、地上部での無毒化には

他の遺伝子が関与していると考えられる。

6. イネのマンガン吸収集積耐性機構

マンガンは植物の必須元素であるが酸性土壌において過剰害が報告されており、マンガン毒性はアルミニウムに次ぐ酸性土壌での主要な生育阻害因子である(Kochian *et al.*, 2004)。イネは酸性土壌に強い作物でありアルミニウム毒性だけでなくマンガン毒性にも高い耐性をもっている。また水田環境ではマンガンの溶解度は大きく変化することから、イネは幅広いマンガンの変化に対応する機構も備えている。

我々はイネのマンガン耐性機構に関わる遺伝子を三つ同定している。一つ目はOsNramp3でこの遺伝子はNramp1と同じNrampファミリーに属しているが、コードするタンパク質はアルミニウムではなくマンガンを細胞内に取り込む(Yamaji *et al.*, 2013)。OsNramp3の遺伝子発現について調べたところ、節で恒常的に強く発現していた(Yamaji *et al.*, 2013)。イネの節はミネラルの選択的分配に重要な役割を果たしている。近年、我々は節で働く様々な輸送体の機能について研究を進めている。節の詳しい構造や機能については総説を参考にされたい(Yamaji and Ma, 2014)。OsNramp3に特異的な抗体を用いて組織内局在を調べたところ、OsNramp3は主に節の肥大維管束

周辺部の本部転送細胞に局在することが明らかとなった (Yamaji *et al.*, 2013). 興味深いことに、このタンパク質はマンガン濃度が高くなると素早く分解される (Yamaji *et al.*, 2013). これらの結果から OsNramp3 は低マンガン条件下ではマンガンを優先的に新葉や穂に分配するために必要なトランスポーターであり、一方、高マンガン条件下では OsNramp3 タンパク質が分解され、古い葉へマンガンを分配することで新葉への過剰な蓄積を防いでいることを突き止めた (図5; Yamaji *et al.*, 2013). 古い葉では OsYSL6 と OsMTP8.1 の二つの遺伝子が過剰なマンガンの無毒化機構に関与している。YSL6 は金属とニコチアミンやムギ根酸類の錯体運搬 YSL ファミリーに属するトランスポーターである。YSL6 はマンガン濃度の高い古い葉で強く発現しており、マンガン-ニコチアミン錯体を輸送基質とし細胞内に取り込む (図5; Sasaki *et al.*, 2011). 一方 OsMTP8.1 は液胞膜に局在し不要なマンガンの隔離に関与していた (図5; Chen *et al.*, 2013a). イネの地上部でのマンガンの無毒化機構には根から吸収したマンガンを地上部に運ぶ必要がある。最近になってこのイネの速やかなマンガン吸収の分子メカニズムについても解明された。イネのマンガン吸収には OsNramp5 と OsMTP9 という二つの遺伝子が関わっている。OsNramp5 はマンガンを土壤中から根の細胞内に取り込むトランスポーターで、根の外皮細胞と内皮細胞の遠心側に極性をもって局在していた (図5; Sasaki *et al.*, 2012). 一方 OsMTP9 は細胞膜に局在しマンガンを排出する活性がある (Ueno *et al.*, 2015). OsMTP9 も根の外皮細胞と内皮細胞に存在するが、OsNramp5 とは反対の向心側に局在する (図5; Ueno *et al.*, 2015). このようにイネではマンガン吸収、耐性、集積に関わる主要な遺伝子が単離、同定されてきたが (図5)、一方で他の植物の分子機構はほとんど解明されていない。

7. おわりに

最近の細胞生物学的手法の発展により、イネを中心にアルミニウムやマンガンの耐性に関わる個々の遺伝子の役割については多くのことがわかってきた (図1; 図5). 一方このようなストレスシグナルを植物がどのように認識するのかについては明らかでない。例えば、イネはアルミニウム処理時に転写因子 ART1 が活性化され下流の耐性遺伝子の発現を増加させるが、活性化の機構は不明である。OsNramp3 のマンガン濃度によるタンパク質分解についてもどのようにマンガンの濃度を感知しているかはわかっていない。今後は、このようなアルミニウムやマンガンストレスの感知機構の研究が必要である。この講座ではイネ科作物の品種間におけるアルミニウム耐性の獲得過程についても紹介した (図2; 図3). その多くは有機酸トランスポーターの発現の違いが品種間の耐性を決める要因になっていた。一方で植物種間の耐性差を決定づける遺伝的要因については解明されておらず今後の研究の課題である。

また次世代シーケンサーの発展により様々な植物からゲノム配列や遺伝子発現の情報が得られるようになった。これにより近年、モデル植物以外の植物の研究が着目されている。我々もアルミニウムに強いソバを対象に網羅的な遺伝子発現解析を行っている (図4). 今後この情報をもとにイネやシロイヌナズナと異なった、ソバ特有のアルミニウム耐性 (根からのシュウ酸分泌や地上部へのアルミニウム集積) に関わる遺伝子の単離を目指していきたい。

文 献

- Che, J., Yamaji, N., Shen, R.F., and Ma, J.F. 2016. An Al-inducible expansin gene, *OsEXPA10* is involved in root cell elongation of rice. *Plant J.*, **88**, 132–142.
- Chen, Z., Fujii, Y., Yamaji, N., Masuda, S., Takemoto, Y., Kamiya, T., Yusuyin, Y., Iwasaki, K., Kato, S., Maeshima, M., Ma, J.F., and Ueno, D. 2013a. Mn tolerance in rice is mediated by MTP8.1, a member of the cation diffusion facilitator family. *J. Exp. Bot.*, **64**, 4375–4387.
- Chen, Z.C., Yamaji, N., Motoyama, R., Nagamura, Y., and Ma, J.F. 2012. Up-regulation of a magnesium transporter gene *OsMGT1* is required for conferring aluminum tolerance in rice. *Plant Physiol.*, **159**, 1624–1633.
- Chen, Z.C., Yokosho, K., Kashino, M., Zhao, F.J., Yamaji, N., and Ma, J.F. 2013b. Adaptation to acidic soil is achieved by increased *cis*-acting element numbers regulating *ALMT1* expression in *Holcus lanatus*. *Plant J.*, **76**, 10–23.
- Collins, N.C., Shirley, N.J., Saeed, M., Pallotta, M., and Gustafson, J.P. 2008. An *ALMT1* gene cluster controlling aluminum tolerance at the *Alt4* locus of rye (*Secale cereale* L.). *Genetics*, **179**, 669–682.
- Durrett, T.P., Gassmann, W., and Rogers, E.E. 2007. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol.*, **144**, 197–205.
- Fujii, M., Yokosho, K., Yamaji, N., Saisho, D., Yamane, M., Takahashi, H., Sato, K., Nakazono, M., and Ma, J.F. 2012. Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. *Nat. Commun.*, **3**, 713.
- Furuichi, T., Sasaki, T., Tuchiya, Y., Ryan, P.R., Delhaize, E., and Yamamoto, Y. 2010. An extracellular hydrophilic carboxy-terminal domain regulated the activity of TaALMT1, the aluminum-activated malate transport protein of wheat. *Plant J.*, **64**, 47–55.
- Furukawa, J., Yamaji, N., Wang, H., Mitani, N., Murata, Y., Sato, K., Katsuhara, M., Takeda, K., and Ma, J.F. 2007. An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol.*, **48**, 1081–1091.
- Garcia-Oliveira, A.L., Martins-Lopes, P., Tolrá, R., Poschenrieder, C., Tarquis, M., Guedes-Pinto, H., and Benito, C. 2014. Molecular characterization of the citrate transporter gene *TaMATE1* and expression analysis of upstream genes involved in organic acid transport under Al stress in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.*, **152**, 441–452.
- Huang, C.F., Yamaji, N., Chen, Z.C., and Ma, J.F. 2012. A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *Plant J.*, **69**, 857–867.
- Huang, C.F., Yamaji, N., Mitani, N., Yano, M., Nagamura, Y., and Ma, J.F. 2009. A bacterial-type ABC transporter is

- involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell*, **21**, 655–667.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., and Pineros, M.A. 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 459–493.
- Kochian, L.V., Piñeros, M.A., Liu, J., and Magalhaes, J.V. 2015. Plant adaptation to acid soils: The molecular basis for crop aluminum resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **66**, 571–598.
- Li, J.Y., Liu, J., Dong, D., Jia, X., McCouch, S.R., and Kochian, L.V. 2014. Natural variation underlies alterations in Nramp aluminum transporter (*Nrat1*) expression and function that play a key role in rice aluminum tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 6503–6508.
- Ligaba, A., Dreyer, I., Margaryan, A., Schneider, D.J., Kochian, L., and Piñeros, M. 2013. Functional, structural and phylogenetic analysis of domains underlying the Al sensitivity of the aluminum-activated malate/anion transporter, TaALMT1. *Plant J.*, **76**, 766–780.
- Ma, J.F., Chen, Z.F., and Shen, R.F. 2014. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. *Plant Soil*, **381**, 1–12.
- Ma, J.F., Hiradate, S., and Matsumoto, H. 1998. High aluminum resistance in buckwheat II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol.*, **117**, 753–759.
- Ma, J.F., Hiradate, S., Zheng, S.J., and Matsumoto, H. 1997. Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature*, **390**, 569–570.
- Ma, J.F., Ryan, P.R., and Delhaize, M. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.*, **6**, 273–278.
- Magalhaes, J.V., Liu, J., Guimarães, C.T., Lana, U.G., Alves, V.M., Wang, Y.H., Schaffert, R.E., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., Shaff, J.E., Klein, P.E., Carneiro, N.P., Coelho, C.M., Trick, H.N., and Kochian, L.V. 2007. A gene in the multi-drug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat. Genet.*, **39**, 1156–1161.
- Maron, L.G., Guimarães, C.T., Kirst, M., Albert, P.S., Birchler, J.A., Bradbury, P.J., Buckler, E.S., Coluccio, A.E., Danilova, T.V., Kudrna, D., Magalhaes, J.V., Piñeros, M.A., Schatz, M.C., Wing, R.A., and Kochian, L.V. 2013. Aluminum tolerance in maize is associated with higher *MATE1* gene copy number. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5241–5246.
- Maron, L.G., Piñeros, M.A., Guimarães, C.T., Magalhaes, J.V., Pleiman, J.K., Mao, C., Shaff, J., Belicuas, S.N., and Kochian, L.V. 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. *Plant J.*, **61**, 728–740.
- Morrissey, J., Baxter, I.R., Lee, J., Li, L., Lahner, B., Grotz, N., Kaplan, J., Salt, D.E., and Guerinot, M.L. 2009. The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**, 3326–3338.
- Ryan, P.R., Raman, H., Gupta, S., Sasaki, T., Yamamoto, Y., and Delhaize, E. 2010. The multiple origins of aluminium resistance in hexaploid wheat include *Aegilops tauschii* and more recent *cis* mutations to *TaALMT1*. *Plant J.*, **64**, 446–455.
- Sasaki, A., Yamaji, N., Xia, J., and Ma, J.F. 2011. OsYSL6 is involved in the detoxification of excess manganese in rice. *Plant Physiol.*, **157**, 1832–1840.
- Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K., and Ma, J.F. 2012. Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *Plant Cell*, **24**, 2155–2167.
- Sasaki, T., Ryan, P.R., Delhaize, E., Hebb, D.M., Ogiwara, Y., Kawaura, K., Noda, K., Kojima, T., Toyoda, A., Matsumoto, H., and Yamamoto, Y. 2006. Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) *ALMT1* gene and its relationship to aluminum resistance. *Plant Cell Physiol.*, **47**, 1343–1354.
- Sasaki, T., Tsuchiya, Y., Ariyoshi, M., Ryan, P.R., Furuichi, T., and Yamamoto, Y. 2014. A domain-based approach for analyzing the function of aluminum-activated malate transporters from wheat (*Triticum aestivum*) and *Arabidopsis thaliana* in *Xenopus* oocytes. *Plant Cell Physiol.*, **55**, 2126–2138.
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S.J., Ryan, P.R., Delhaize, E., and Matsumoto, H. 2004. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.*, **37**, 645–653.
- Schaaf, G., Honsbein, A., Meda, A.R., Kirchner, S., Wipf, D., and von Wiren, N. 2006. *AtIREG2* encodes a tonoplast transport protein involved in iron-dependent nickel detoxification in *Arabidopsis thaliana* roots. *J. Biol. Chem.*, **281**, 25532–25540.
- Shen, R., Ma, J.F., Kyo, M., and Iwashita, T. 2002. Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Planta*, **215**, 394–398.
- Tovkach, A., Ryan, P.R., Richardson, A.E., Lewis, D.C., Rathjen, T.M., Ramesh, S., Tyerman, S.D., and Delhaize, E. 2013. Transposon-mediated alteration of *TaMATE1B* expression in wheat confers constitutive citrate efflux from root apices. *Plant Physiol.*, **161**, 880–892.
- Tsutsui, T., Yamaji, N., and Ma, J.F. 2011. Identification of a *cis*-acting element of ART1, a C2H2-type zinc-finger transcription factor for aluminum tolerance in rice. *Plant Physiol.*, **156**, 925–931.
- Ueno, D., Sasaki, A., Yamaji, N., Miyaji, T., Fujii, Y., Takemoto, Y., Moriyama, S., Che, J., Moriyama, Y., Iwasaki, K., and Ma, J.F. 2015. A polarly localized transporter for efficient manganese uptake in rice. *Nat. Plants*, **1**, 15170.
- von Uexküll, H.R., and Mutert, E. 1995. Global extent development and economic impact of acid soils. *Plant Soil*, **171**, 1–15.
- Xia, J.X., Yamaji, N., Che, J., Shen, R.F., and Ma, J.F. 2014. Differential expression of *Nrat1* is responsible for Al-tolerance QTL on chromosome 2 in rice. *J. Exp. Bot.*, **65**, 4297–4304.
- Xia, J.X., Yamaji, N., Kasai, T., and Ma, J.F. 2010. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 18381–18385.
- Xia, J.X., Yamaji, N., and Ma, J.F. 2013. A plasma membrane-localized small peptide is involved in rice aluminum tolerance. *Plant J.*, **76**, 345–355.
- Yamaji, N., and Ma, J.F. 2014. The node, a hub for mineral nutrient distribution in graminaceous plants. *Trends Plant Sci.*, **19**, 556–563.
- Yamaji, N., Huang, C.F., Nagao, S., Yano, M., Sato, Y., Nagamura, Y., and Ma, J.F. 2009. A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell*, **21**, 3339–3349.
- Yamaji, N., Sasaki, A., Xia, J.X., Yokosho, K., and Ma, J.F. 2013. A node-based switch for preferential distribution of manganese in rice. *Nat. Commun.*, **4**, 2442.
- Yasui, Y., Hirakawa, H., Ueno, M., Matsui, K., Katsube-

- Tanaka, T., Yang, S.J., Aii, J., Sato, S., and Mori, M. 2016. Assembly of the draft genome of buckwheat and its applications in identifying agronomically useful genes. *DNA Res.*, **23**, 215–224.
- Yokosho, K., Yamaji, N., and Ma, J.F. 2010. Isolation and characterization of two MATE genes in rye. *Funct. Plant Biol.*, **37**, 296–303.
- Yokosho, K., Yamaji, N., and Ma, J.F. 2011. An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J.*, **69**, 1061–1069.
- Yokosho, K., Yamaji, N., and Ma, J.F. 2014. Global transcriptome analysis of Al-induced genes in an Al-accumulating species, common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Plant Cell Physiol.*, **55**, 2077–2091.
- Yokosho, K., Yamaji, N., Fujii-Kashino, M., and Ma, J.F. 2016a. Functional analysis of a MATE gene *OsFRDL2* revealed its involvement in Al-induced secretion of citrate, but a lower contribution to Al tolerance in rice. *Plant Cell Physiol.*, **57**, 976–985.
- Yokosho, K., Yamaji, N., Fujii-Kashino, M., and Ma, J.F. 2016b. Retrotransposon-mediated aluminum tolerance through enhanced expression of the citrate transporter *OsFRDL4*. *Plant Physiol.*, **172**, 2327–2336.
- Yokosho, K., Yamaji, N., Mitani-Ueno, N., Shen, R.F., and Ma, J.F. 2016c. Aluminum-Inducible IREG gene is required for Internal detoxification of Aluminum in buckwheat. *Plant Cell Physiol.*, **57**, 1169–1178.
- Zheng, S.J., Ma, J.F., and Matsumoto, H. 1998. High aluminum resistance in buckwheat I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.*, **117**, 745–751.
-