

2009 年京都大会
シンポジウムの概要

植物のミネラルストレス応答*

牧野 周¹・山谷知行¹・鎌田 淳²・落合久美子³・小山博之⁴・信濃卓郎⁵・馬 建鋒⁶・渡部敏裕⁷

キーワード 窒素, リン酸, カリ, ホウ素, アルミニウム, 網羅解析, 元素分析

1. はじめに

第4部門でのシンポジウム企画の目的を述べる前に、当該部門における部会再編の経過を説明する。第4部門では、かねてより、植物栄養学研究の進展と成果を共有したいと言う要望が多く、現在の部会編成が必ずしもその要望に答えるものではない、という意見があった。一方、一つの部会「植物の無機栄養」が極端に肥大化してしまい、一部の年発表総数が部門総発表数の60%を超える事態も生じていた。そんな中、2007年の東京大会では、そのような会員の要望に応じて第4部門の一会場開催も試みた。この試み概ね高い評価を受け、継続の要望も多かったが、諸般の事情により2008年の名古屋大会では継続されなかった。また、今年度の京都大会においては、会場の都合上、第4部門一会場開催は不可能となった。

そこで、緊急に部門長および副部門長の5名で協議した結果、それまでの4部会「9. 植物の無機栄養」「10. 植物の代謝」「11. 植物の栄養生態」「12. 農産物の品質・成分」を、

「9. 植物の多量栄養素」「10. 植物の微量栄養素」「11. 植物の有害元素」「12. 植物の代謝成分・農作物の品質」の4部会に再編する案が決定された。基本的な考え方は、研究内容による部会区分を廃止し、研究対象や材料で部会を区分することにより、第4部門の植物栄養学研究の進展と成果を共有する、と同時に、研究内容に関してはシンポジウムの企画で研究成果や進展議論の共有をはかるというものであった。同時に、京都大会でのシンポジウムは「植物のミネラルストレス応答」に決定した。そして、上記4つの部会からこのテーマに即した話題提供者7名を選出した。次回の札幌大会では、「植物の必須元素の栄養生理・最近の進歩または今昔物語」で行う予定である。

なお、土壤肥料学会の内規では、部会の変更・廃止は部門長会議の決定事項で理事会には報告事項にあたる。部門長会議の決定を待つと、時間的な問題で、今回の京都大会には新部会体制での発表形態では行えないことがわかったので、第4部門の部会再編成案を電子メールにて各部門長に仮承認を頂き、4月の部門長会議で事後承認、正式決定の形とした。(牧野 周)

2. イネの窒素飢餓ストレス

植物は、個体の移動手段を持たないことから、発芽した環境でライフサイクルを完結している。植物の成育に必要な必須元素の中で、窒素は最も不足する栄養素である。従って、多くの植物には、窒素を最大限吸収利用する機構が備わっている。窒素などの必須養分が欠乏すると、植物は根の伸長を促進し、地上部の成育を抑制する応答を示す。また、植物の窒素代謝は、通常は炭素代謝（光合成）やエネルギー代謝と密接にバランスをとっている。本稿では、イネの窒素飢餓ストレスに応答して根の伸長を促進するQTLを見いだしたことから、QTL領域からの原因遺伝子の単離とその遺伝子の特性について紹介する。また、アンモニウムイオン同化に直接関わるサイトゾル型グルタミン合成酵素1:1 (GS1:1) の遺伝子破壊変異体を、窒素飢餓ストレスを模倣したイネとして用い、メタボローム解析による代謝産物のプロファイリングを行い、代謝かく乱状態の解析を行った結果を紹介する。

Amane Makino, Tomoyuki YAMAYA, Atsushi KAMATA, Kumiko OCHIAI, Hiroyuki KOYAMA, Jian Feng MA, Toshihiro WATANABE: Responses of mineral stress in higher plants

*本資料は2009年9月に開催された日本土壤肥料学会京都大会における植物栄養部門（第4部門）主催シンポジウムの趣旨および講演内容を要約した。

¹ 東北大学大学院農学研究科 (981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1)

² 埼玉県農林総合研究センター水田農業研究所 (360-0831 熊谷市久保島1372)

³ 京都大学大学院農学研究科 (606-8502 京都市左京区北白川追分町)

⁴ 岐阜大学応用生物科学部 (501-1193 岐阜市柳戸1-1)

⁵ 農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター (062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘1番地)

⁶ 岡山大学資源生物科学研究所 (710-0046 倉敷市中央2-20-1)

⁷ 北海道大学大学院農学研究科 (060-8589 札幌市北区北9条西9丁目)

2009年12月17日受付・受理

日本土壤肥料学雑誌 第81巻 第2号 p.181~189 (2010)

窒素低栄養条件で根の伸長を促進する原因遺伝子の単離にあたり、コシヒカリを遺伝背景として Kasalath 由来の部分染色体断片を全染色体に連続的に置換された 38 系統 (CSSL) を用いた。両親並びに CSSL を屋外型人工気象室において、1/4 強度の水耕液に 5~1000 μM の NH_4Cl を与えて 25°C で 8 日間栽培し、根の長さを指標に QTL 解析を行った。根の伸長を促進する多数の QTL が検出されたが、 NH_4^+ の供給に伴って検出できた QTL の中から、最も寄与率の高い QTL を第 6 染色体長腕側に見いだした。この QTL における Kasalath の対立遺伝子は、用いた全ての NH_4^+ 濃度で根の伸長を促進するとともに、 NH_4^+ の吸収量の促進と全乾物重の増加をもたらした。この効果は、ガラス室での幼植物期での栽培のみならず、水田圃場を用いて登熟期まで栽培した場合でも確認できた。この領域約 90 cM を、コシヒカリに戻し交配を進め、QTL 領域を段階的に狭め、最終的に一つの原因遺伝子を単離することに成功した。本遺伝子は、転写活性化因子様のタンパク質をコードしており、コシヒカリでは成熟型タンパク質を翻訳されるが、Kasalath 型では途中に変異が入っており、成熟タンパク質は合成されない。つまり、この遺伝子の機能が欠損することで、 NH_4^+ に応答して根の伸長や窒素吸収を促進していることが明らかとなった。この成熟型タンパク質が、転写活性化能を有することは、酵母を用いて確認しており、今後、標的となる遺伝子の探索が必要である。また、多数のイネの品種を用いて NH_4^+ 応答を見た結果、Kasalath 型の遺伝子を持つラインは、いずれも根の伸長促進が認められた。また、コシヒカリで機能している遺伝子は、根の細胞伸長と細胞増殖をともに抑制していることが判明した。将来、Kasalath 型の遺伝子を活用することにより、窒素吸収やバイオマスの増加を促進できるイネを開発できることが期待できる。

次に、イネの窒素飢餓状態を模倣できると考えられる、GS1;1 遺伝子破壊変異体を用いて、代謝の攪乱状態を知る目的で、メタボローム解析を行った。GS1;1 遺伝子破壊変異体は、レトロトランスポゾン Tos17 が同遺伝子のエキソンに挿入されたものであり、ホモ接合体として挿入された変異体を解析に供した。この変異体は、一生を通じて成育が極端に抑制されており、出穂までに長い期間を要するとともに、穂のサイズも小さく、ほとんどの穎果は稔実しない表現型をしめす。また、GS1;2 や NADH-GOGAT1 など、他の窒素同化系に関わる酵素の遺伝子は、野生型と同様の発現を示していた。この表現型が GS1;1 遺伝子欠損でもたらされていることは、この変異体に OsGS1;1 cDNA を OsGS1;1 プロモーターの制御下で発現できるキメラ遺伝子を導入した相補実験で確認している。この変異体とニホンバレを、1 mM の NH_4Cl を含む水耕液で 19 日間栽培後、地上部と地下部に分けて収穫し、解析に供した。成育や登熟に極めて重要な GS1;1 遺伝子を破壊したイネの葉身では、ブドウ糖・果糖・楝リン酸などの代謝物が大幅に増加していたが、一方で、グルタミン

を始めとして、ほとんどのアミノ酸や有機酸は減少していた。変異体の根では、蔗糖やブドウ糖に加えてチラミン・トリプタミン・シキミ酸・キナ酸などの二次代謝物の増加が見られ、アミノ酸類の減少が観察された。このように、窒素と炭素代謝物は大きくバランスを欠いており、同時に新たな代謝物のコリレーションネットワークが生じていた。具体的には、変異体では蔗糖やブドウ糖と糖リン酸のネットワークなどが消失し、新たにグルコン酸とシキミ酸やキナ酸、グリシンとチラミンなどの新規なネットワークの形成が認められた。トランスクリプトーム解析では、変異体におけるトレハロース 6 リン酸合成酵素遺伝子群の発現抑制などが検出された。このように、窒素飢餓を模倣した遺伝子破壊変異体では、炭素と窒素代謝のバランスを大きく崩れることにより、成育の抑制や登熟の抑制に結びついているものと結論できた。

遺伝子破壊変異体は、OsGS1;1 のみならず OsGS1;2 や OsGS1;3、また OsNADH-GOGAT1 や OsNADH-GOGAT2 もスクリーニングできている。今後、これらを用いて同様の研究を進め、代謝間バランスの重要性をより明確にしていく予定である。

なお、QTL 関連の成果は岩手生物工学研究センターの小原実広博士と、また変異体を用いたメタボローム解析は理化学研究所植物科学研究センターの草野都博士ならびに東北大学大学院農学研究科の田淵真由美博士との共同研究によって得られたものである。また、本研究は、科研費の特定領域研究・科研費基盤研究 A や、農水省新農業展開ゲノムプロジェクト (IPT0008) の支援により行われたものであり、ここに感謝する。(山谷知行)

3. 家畜ふん堆肥の連用によるカリ過剰と ブロッコリーの花蕾黒変症について

平成 14 年から埼玉県の花蕾黒変症産地では、花蕾内部が黒変したり、分枝部周辺に薄墨色の斑点を生じる花蕾黒変症が散見された。本症状は品質を著しく低下させるため、産地では大きな問題となった。現時点では品種等の変更によりほとんど発症していないが、類似した事例が他県でも報告され始めたことから、生産現場ではブロッコリー花蕾黒変症に関する発生機作の解明とその対策技術が望まれている (鎌田, 2008)。本症状について、家畜ふん堆肥に由来するカリ過剰蓄積やべと病菌の関与、そしてアントシアニンフリー系品種で発生しやすい等の情報はあが、詳細は明らかでなかった。

そこで、本研究はブロッコリー花蕾黒変症の多発圃場を対象に、土壌調査と花蕾黒変症の発生機作及び窒素成分を主体とするセル内全量基肥法による対策試験を実証した。

1) 現地の土壌調査

土壌調査は、定期的なモニタリング調査及び花蕾黒変症の発生圃場を中心に実施した。1979 年以降、モニタリング調査では、普通畑におけるリン酸及びカリ蓄積圃場が増加しており、花蕾黒変症の多発圃場でも、カリ、カルシウ

ム及びマグネシウム含有量が発病少圃場に比べて約2倍高く、塩基バランスの崩れる傾向も認められた。実態調査の結果、花蕾黒変症の多発圃場では、カリ成分の蓄積しやすい牛ふん堆肥が過剰連用されていた。

2) ブロッコリー花蕾黒変症の発現機作について

家畜ふん堆肥の過剰施用によるリン酸・カリ蓄積と生産現場で指摘されたべと病菌に着目し、再現試験を行った。その結果、カリ増施区にべと病菌の分生胞子を散布すると、生産現場で見られる典型的な花蕾黒変症が再現し、花蕾部周辺の新葉裏面には楕円形の褐変が確認された。

そこで、葉組織の障害程度を観察した結果、カリ増施区では新葉の細胞脂質が酸化しており、カリウムやカルシウム等の陽イオンが漏出し、水分保持率は増加していた。カリ増施区のカルシウム含有率は、上位葉で対照区の1/3、中位葉では1/2に減少しており、典型的な拮抗作用が確認された。

以上の結果、家畜ふん堆肥の多投入に起因するカリ過剰が、膜脂質の酸化やカルシウム等の拮抗作用に伴う生理代謝等へ影響し、べと病の発生を助長することが示唆された。

3) 生産現場におけるリン酸・カリ蓄積圃場の対策

家畜ふん堆肥の過剰施用によるリン酸・カリ蓄積圃場では、リン酸、加里の成分をほとんど含まない被覆燐硝安肥料 ($N:P_2O_5:K_2O=24:1:1$, 100日シグモイド) が有効であることを明らかにした。さらに、省力化をめざし慣行施肥窒素の50%相当を全量セル内に施用するセル苗全量基肥法を開発した。本法による苗の濃度障害はみられず、根の活性は約1.6倍に高まった。また、中生から中晩生品種まで、慣行の追肥体系と同等の生育、収量及び品質が得られ、窒素吸収量も対照区と遜色なかった。本栽培法は、リン酸・カリ蓄積圃場に残留する肥料成分を利用するため、減肥栽培や塩基バランスの改善に役立つことが期待される。

4) 地上部(葉)への接触刺激を利用したブロッコリーセル苗全量基肥法

セル苗全量基肥法では、高温時における徒長や根鉢形成の抑制が散見されるため、接触刺激を利用した苗質改善試験を行った。その結果、徒長苗は減少し総根長及び最長根長の増加による根鉢形成の改善が認められた。接触刺激は発根作用に関与する低濃度のエチレンを生成するが、本試験では品種間差が認められ、アントシアニンフリー系品種では、接触刺激による発根作用とエチレン生成量の関係が判然としなかった。

5) まとめ

本研究では、ブロッコリー花蕾黒変症の発現機作に関する基礎的な知見を得るために、現地土壌の調査、花蕾黒変症の再現及び対策試験を行ったものである。

生産現場では、家畜ふん堆肥に含まれる肥料成分を考慮せずに化学肥料を併用する傾向がある。本試験の結果、花蕾黒変症の多発圃場では、牛ふん堆肥の過剰連用に起因するカリ蓄積と花蕾黒変症の発病助長に一定の傾向が認めら

れた。キャベツのべと病菌は、カリウムの多量施用で罹病しやすく、土壌中の肥料成分と作物の病害発生の関係が指摘されている(渡辺, 2009)。近年では、肥料価格の高騰やリン資源の枯渇も懸念されており、圃場に蓄積する肥料成分を有効に利用しながら、土壌の塩基バランスを改善する施肥法の開発が望まれる。

そこで、リン酸やカリ成分をほとんど含まない被覆燐硝安肥料を利用したブロッコリーセル苗全量基肥法と接触刺激の併用処理について検証した。その結果、本栽培法は家畜ふん堆肥の長期的な農地還元を目的に導入すると、土壌環境の改善や施肥投入量の削減に役立つことが明らかになった。なお、今回紹介したブロッコリー花蕾黒変症の発現機作は、家畜ふん堆肥の過剰連用に起因するため、土壌や品種等の栽培環境によって発生程度の異なる場合があるために、今後も詳細な検討が必要である。(鎌田 淳)

4. イネのホウ素過剰耐性遺伝子の単離とその機能

ホウ素(B)は高等植物の必須元素だが、土壌ホウ素の最適濃度範囲は狭い。ホウ素は土壌中では主にホウ酸($B(OH)_3$)として存在し、水とともに移動する。多雨の日本ではホウ素過剰土壌は存在しないが、乾燥気候下にはホウ素濃度の高い灌漑水や土壌が存在し、農作物にホウ素過剰害が発生している。

1) イネのホウ素過剰耐性と耐性の品種間差

イネ(*Oryza sativa* L.)はホウ素過剰に弱いとされ、灌漑水がホウ素に富む乾燥気候下の水田ではホウ素過剰害をうける。また、ホウ酸は工業分野で広く利用されており、工業排水の流入による稲作被害発生例が日本においても見受けられる。コシヒカリをホウ素を過剰に含む灌漑水で登熟まで栽培したところ、 3 mg L^{-1} ホウ素を含む灌漑水までは乾物生産量、初収穫量とも対照区と差はなかったが、 10 mg L^{-1} ホウ素区では分げつ数が低下し、分げつ数の低下が初収量低下の要因であった。同様の栽培試験を熱研1号(ジャポニカ品種)とIR36(インディカ品種)についても行ったところ、コシヒカリと熱研1号に比べてIR36では過剰のホウ素による初収穫量の低下割合が大きかった。

幼苗期のイネのホウ素過剰耐性程度には大きな品種間差が存在する。 60 mg L^{-1} ホウ素を与えて播種後7日間水耕栽培すると、IR36は枯死するが熱研1号は生育を続ける。しかし、両品種間で地上部及び根のホウ素含有率には有意な違いは見られなかった。オオムギやコムギではホウ素過剰耐性にはホウ素排除能力が影響し、耐性品種の体内ホウ素含有率が常に低いと報告されている。イネの場合にはホウ素含有率ではなく細胞代謝の過剰ホウ素に対する耐性が品種間差に影響していると考えた。

2) ホウ素過剰耐性品種間差原因遺伝子の単離

ホウ素過剰耐性のしくみを理解し、ホウ素過剰耐性のイネ品種を育成するため、ホウ素過剰耐性熱研1号とホウ素過剰感受性IR36の交雑に由来するrecombinant inbred line (RIL) 集団を用い、 60 mg L^{-1} ホウ素を与えて栽培し

た7日齢幼苗の地上部長さを対照区の地上部の長さで割って補正した相対地上部長をホウ素過剰耐性の指標として quantitative trait locus (QTL) 解析を行った。4番染色体上に寄与率45%のQTLを検出し (Ochiai *et al.*, 2008), ファインマッピングによってホウ素過剰耐性遺伝子 *BET1* (Boron-excess tolerant 1) の候補領域をさらに49 kbpにまで狭めた。この領域内には8つの遺伝子が存在した。遺伝子の同定を進めるため、この候補領域内の遺伝子型とホウ素過剰下での相対地上部長との連関をジャポニカ品種44品種を用いて解析した。連関が最も大きくなる多型部位 (4カ所) のうちの1つがアミノ酸をコードする配列内における一塩基の挿入欠失変異であった。この候補遺伝子はNAC転写因子をコードすると予測され、耐性品種では一塩基の欠失によって未成熟終止コドンが出現し機能欠失していると推定した。そこで、酵母を用いて試験したところ、感受性品種の遺伝子産物が転写活性化能を持つことが示された。また、候補遺伝子は耐性品種に比べ感受性品種で多く発現していた。

候補遺伝子が *BET1* であるならば、機能型の配列をもつ感受性品種において候補遺伝子の発現を抑制すればホウ素過剰に耐性になるであろうと考え、感受性系統SL18を用いてRNAi形質転換体を作成し遺伝子の発現を抑制したところ、T₁種子はホウ素過剰への耐性を発揮した。

これらの結果から、ホウ素過剰耐性品種間差に関与する *BET1* を転写因子遺伝子として同定した。コシヒカリ由来の *BET1* 領域を感受性品種のIR36とIR64に導入し、これらの品種のホウ素過剰耐性を強化するためのマーカー育種をすすめている。

3) 実験手法の応用

BET1 の単離に用いた実験手法を施肥量低減可能なイネを作るために応用しようとしている。

窒素、リン、カリウムそれぞれについて検討を進めているが、窒素についてはまず、近代品種、在来品種について化学肥料区と堆肥区での窒素吸収量を比較した。窒素吸収量には品種間差が見られ、化学肥料区で窒素吸収量の大きい品種は堆肥区においても窒素吸収量が大きかった。

また、コシヒカリとハバタキの交雑に由来する染色体部分置換系統群を京都、滋賀の3カ所の圃場で栽培し登熟期の葉身窒素含有率を測定したところ、3圃場ともで窒素の含有率が高い系統、低い系統が存在した。葉身窒素含有率の高かった系統及び低かった系統を施肥窒素レベルを変えてポット栽培試験した。窒素無施肥区において登熟期の乾物生産量がコシヒカリよりも大きな系統は存在しなかったが、圃場試験での葉身含有率が低かった系統では10 kg-N 10 a⁻¹ 区での乾物生産量が遺伝的背景であるコシヒカリに比べて20%増加していた。

リンについても同様の栽培試験を行っている。また、難溶性リン酸吸収能力の品種間差についての検討を行い、アバタイト型リン酸の利用能に品種間差を見いだした。

カリウムに関しては、低カリウム供給下でのイネにおけ

るナトリウムの代替効果について検討している。培養液のカリウム濃度を1/10に低下させてイネを栽培すると生育は低下したが、ナトリウムを培養液に添加した場合には生育の部分的な改善が見られた。幼苗を用いた検討から、イネのナトリウム吸収には大きな品種間差が存在し、この品種間差の効果の大きな原因遺伝子が6番染色体に座乗していることが示された。ナトリウムが代替効果を発揮するためにはまずイネに吸収される必要が有ると考え、ナトリウム吸収の品種間差とカリウム欠乏耐性の関係についての検討を行っている。

肥料は農業生産に必須の資材であるが、耕地の養分循環を無視した多量の施肥はしばしば偏った養分蓄積や環境の富栄養化を引き起こしてきた。これらの研究を通じて、自然環境での養分循環になるべく影響を与えないイネを作出する手がかりを得たいと考えている。 (落合久美子)

5. トランスクリプトーム解析から見える 根のイオンストレス

根は様々な障害を受けながらも養分・水分の吸収を維持するように適応している。これには形態的な変化とともに、いわゆる耐性機構に関わる変化、すなわち機能面での変化も起きる。この変化・応答は、遺伝子一つが対応しているわけではない。これまでの生理学的な研究で明らかのように、複数の遺伝子が制御する仕組みが存在すると考えるほうが妥当である。この全体像をとらえるためには、ゲノムワイドな解析を行うことが有効であるが、その解析には問題も残されている。ここでは、単純な方法により根のイオンストレスのトランスクリプトームデータを解析した結果をもとに、イオンストレス下で根が示す応答に関して話題を提供する。

1) トランスクリプトームの現状

様々な植物種でゲノムDNA配列が解読され、それに呼応してマイクロアレイに用いるオリゴDNAチップも整備されている。現在用いられているチップは、Affimetric社とAgilent社のものが主流であるが、ともに様々なチップが市販されている。現在、1枚のスライドで4つのサンプルが解析 (44K) できるものがAgilent社では10万円ほどで市販されている。1つのサンプルの解析にかかるコストは4万円強まで低下している。シロイヌナズナに加え、ここ数年でイネ、トウモロコシ、コムギ、トマト、タバコとマメ科モデル植物などが追加設定されている。ハードウェアの面からは、ほとんど全ての材料で解析が可能になっているのが現状である。解析とそれに引き続く実験では、Gene Ontology (GO) などの情報とバイオリソースが整備されていることが望まれるが、シロイヌナズナとイネに比べて他の植物ではまだ制約も多い。しかし、いずれにしてもここ数年で状況が一変した感はある。

2) データ解析に関わる問題と現状

マイクロアレイ解析では、データの統計処理が常に問題となる。例えば、一般的な優位差検定を行うと3回のデー

タが2倍, 2.1倍, 2.3倍は優位に増加(1よりも大きい)すると判定されるが, 3倍, 5倍, 10倍と示すものは優位差が認められず(1と優位差がない), 解析から除かれてしまう。実際, 初期のマイクロアレイ解析では重要な遺伝子は統計の時点で解析から除かれていた。最近では, 変動量そのものよりも相対的な変動量を用いてデータを整理し, 引き続き解析する方法が受け入れられつつある。例えば, ランキングやパーセンタイルを用いて遺伝子を特定してGOなどの情報を調べるとともに, 共発現ネットワーク解析などを行うことの利点も認められつつある。

3) イオンストレス下でのシロイヌナズナ根のトランスクリプトーム

ストレス応答研究で頻繁に問題となるのは、「特異的」と「一般的」な応答の区別である。これは, 単純に比較することで区別できる可能性が高い。最近報告した論文(Zhao *et al.*, 2009)では, シロイヌナズナの根を同じ程度のストレス(Al, Cd, Cu, NaCl)で処理し(ほぼ完全に生育を阻害する濃度), 上位2.5%で再現性を持つ遺伝子を比較解析した。その結果, 当たり前のことであるが全てのイオンで共通する応答と, 個々のイオンに特徴的な応答が存在することを明確に示すことができた。例えば, イオン処理に共通する遺伝子にはROSの除去に関わる遺伝子やCaシグナルに関わる遺伝子が濃縮されていた。一方, アルミニウムでは既知のAl応答遺伝子(例えば, リンゴ酸トランスポーター; AtALMT1)が, NaCl処理ではDREB転写因子などが多く含まれていた。一方, Cdではこれまでに認識されていないHSPタンパク群の誘導が確認されるなど, トランスクリプトームならではの, 想定外のものを把握することも可能であると考えている。

4) 終わりに

トランスクリプトーム解析はこれまでの生理的な研究の理解を飛躍的に深めるとともに, 見落とししていた生理現象を把握することに威力を発揮する。今後は, トランスクリプトームデータの種間比較や, 他のオミクス手法との統合や変異体の利用など, 本来土壌肥科学が対象にしていた, 植物種間差や栄養生理に関わる現象に対応した研究を進めるための工夫が必要な段階になっている。(小山博之)

6. 網羅的元素分析による非必須元素吸収解析手法の開発

網羅的元素分析手法はイオノーム, イオノミクスあるいはエレメントームと呼ばれ, 2003年に米国Purdue大学のDavid Saltらのグループが中心となって提唱した概念であり(Lahner *et al.*, 2003), 約6000のシロイヌナズナの変異体に関して地上部の18元素の存在割合を比較し, 遺伝情報と統合することで新たな元素2吸収などに関わる遺伝子の発見が可能であることを指摘した。従来の手法では種々の機器分析法を組み合わせ, 興味のある元素の含有率を決定する事がほとんどであったが, イオノーム手法では網羅的に且つハイスルーブットに多数の試料を一斉分析することを目的として行なわれる。主にICP-MSを活用

することにより幅広いダイナミックレンジで様々な元素を定量することが可能である。研究は遺伝的な背景が明瞭であるいわゆるモデル植物を中心にして進められており, これまでにシロイヌナズナに関しての研究がSaltラボを中心に精力的に行われている(Baxter *et al.*, 2007)。さらに変異体に関して得られた大量のデータをデータベース化して公開を進め, 変異体の情報と元素吸収の情報の統合を進めている(PurdueIonomics, <http://www.ionomicshub.org/home/PiiMS>)。またイネに関しても現在Saltラボでデータベースの公開準備が進められている。また酵母に関してはEideらが積極的に進めており(Eide *et al.*, 2005), 酵母のイオノーム研究は遺伝的な変異との関連付けまで進められた。さらにこの酵母のデータベースはSaltラボが中心となって進めている前出のイオノミクスのデータベースに統合されている。本手法を用いることにより明瞭な表現系に違いが生じなくても養分吸収に関わる新しい変異体の取得等を目指すことが可能になる。我々は本手法をマメ科のモデル植物であるミヤコグサに活用することを目指した。宮崎大学に設置されているNational BioResource Projectミヤコグサ・ダイズ中核機関(<http://www.legumebase.agr.miyazaki-u.ac.jp/index.jsp>)で整備されたミヤコグサ野生株45種類およびEMS処理T2世代のミヤコグサ種子(約7000)を入手し, これを200個体ごとに解析を行った。多数の検体を効率的に解析することに変異体を活用したイオノーム解析の特徴があるため, 研究ではまず栽培法と分析法の検討を行なった。分析の主力となる機器はICP-MSである。ICP-MSの特徴は幅広いダイナミックレンジを持っていることであり, 様々な元素が大きな濃度差で存在している植物体の分析には重要な点である。さらに, 微量の重金属を高感度に測定可能なことは, 非必須元素の取り込みに関しても大きな威力を発揮することができる。その一方で, バックグラウンドとしての元素の混入を極力避ける必要があり, 実験ではセラミック製のハサミ, ピンセットの利用, 分解においては金属部分が露出していないドラフトや分解装置, 分解試薬においても分析対象となる元素の含有率が特に低い製品を予め明らかにした上で用いる必要があった。もちろん同様の研究を他の分析機器で行なうことは可能である。原子吸光度計, ICP-AES, XRF, PIXEなどを利用した研究も進められている。また, 必須元素全てを網羅的に解析することを考えるとCHNOS元素分析機や他の測定器を併用して測定するか, ハイスルーブットではないが放射化分析などの手法での解析も可能である。

実験では必須養分の他に, 非必須元素としてNa, Ni, Sr, Cd, Cs, Pbを培養液に添加し, その吸収に関する変動を解析した。このような非必須元素に関しては興味の対象を広げることにより, さらに多くの元素を解析することが可能となる。例えばBaxter *et al.* (2007)はSeの解析も一斉分析に含めてシロイヌナズナの研究を進めている。このとき, 植物体の生長には有意な影響を及ぼさず, なお

かつ ICP-MS によって十分な感度となる培養液への添加条件をミヤコグサ野生株の MG-20 を標準株として検討を行なった。なお、ICP-MS の一斉分析の対象とした元素はこれらの非必須元素の他に B, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo である。自生してきた生育環境に適応した元素の集積パターンが見られることを期待した野生株 45 種類の中から対象とした元素に特異的な吸収傾向を示す系統は見出せなかったが、その各元素の吸収傾向からは従来考えられていた同族元素での競合的な吸収の関係（例えば、K-Na, K-Cs, Ca-Mg など）は認められなかった。その一方で、Fe, As, Na, Zn, Mo および、Mn, Ca, さらには Mg, Ni といった元素グループの吸収パターンが類似していることが示された。

一方、変異剤 (EMS) 処理した系統においては 200 個体を同時に栽培を行い、その全体を母集団として扱い、この母集団に対して一定の閾値で元素含有率が高い、あるいは低いという観点から選抜を行なった。自分たちの研究では母平均に対して三倍以上あるいは半分以下を閾値として設定した。この際、植物体の地上部（子葉のすぐ下で切断）のみを解析対象とすることにより、その後のスクリーニング対象に選抜された個体に関しては栽培を継続して個体を再生した上で、種子を採取することを可能とした。200 個体のスクリーニングを播種、栽培、処理、サンプリング、分解、分析、解析の一連の作業を 3 週間で行うシステムを構築した。この分析において対象とする 15 元素を同時に評価することが可能であることから三週間で 200 系統 $\times$ 15 元素 = 3000 の形質のスクリーニングが可能になったと言える。これまでの研究から実際に Mo の吸収変異体（有意に抑制される）が獲得され、これに関してはモリブデントランスポーターに変異が生じていることが共同研究者によって確認されており、本手法の有用性が認められる。一方、これまでの約 2000 系統の解析の結果からは、約 30 系統に関してはさらに 2 世代経代を続けた場合でも元素含有率の増減が生じていることから、これらの系統に関しては養分吸収あるいは吸収後の分配に関与することが想定される一つあるいは複数の遺伝子に変異が生じていることが期待される。また得られた変異系統の特徴としては、形態や生育に大きな影響が出ない場合でも元素吸収パターンに変動が生じている場合が認められている。スクリーニングがある意味では力任せのハイスループットの解析である利点として、みかけの特徴に依存しないでも変異体を獲得できるという特色を示していると考えられる。また、特定の元素のみが変動した変異体はむしろ少なく、2~9 元素、多くは 2~5 元素が同時に変動していることが明らかとなった。このことはシロイヌナズナを用いた Lahner *et al.* (2003) の研究で、元素吸収に変異を持っている変異体の中で 1 元素のみが変動を示した割合がわずか 11% であったという結果と一致するものである。また、元素ごとに変異体が得られる個体数には大きな違いが存在し、Cu, Zn などでは 2 系統しか得られなかったのに対して、Mg,

Sr, Mo, Cs では 10 系統以上が候補として獲得された。このような複数の元素に対しての同調的な応答はシロイヌナズナのみならずミヤコグサにおいても植物体内にイオンのホメオスタシスが存在していることを示唆する。

酵母を用いたイオノーム研究からは Mg, Ni, P, Co というこれまでの元素の吸収に関しての概念からは説明が付きにくい、異なる性質の元素が協動的に吸収される結果、体内で定常的な状態を作っていること（イオンのホメオスタシス）が報告されている (Eide *et al.*, 2005)。Mg, Ni の吸収に何らかの関係があることは微生物 (Maguire, 2006)、植物 (Li *et al.*, 2001) でも報告されていたが、P, Co も含めた関係は酵母で示されているのみであった。先に示したように野生株 45 系統の解析からは Mg, Ni の間に同調的な吸収傾向が観察されていた。そこで、Mg, Ni の吸収に変異が誘導されたミヤコグサ EMS 処理系統を利用してこれら 4 元素の吸収傾向を比較したところ、同様の吸収パターンが観察され、酵母と同様にこれらの元素の協調的な吸収機構が存在することが明らかとなった。Co と Ni は同族元素であり、菌類や原核生物においては共輸送の現象が報告されている (Eitinger *et al.*, 2005)。またシロイヌナズナにおいては Co と P の関係が示唆されているがその詳細な機構については明らかではない (Baxter *et al.*, 2008)。このようなイオンのホメオスタシスは植物体を個体として扱った時に始めて具象化してくる現象として考えられており、また網羅的な元素吸収の解析によって見出される新たな知見である。

このように本手法は、特定の元素の吸収変異体の獲得に活用が可能となる他にも、異なる元素間の相互関係に関わる因子の解析が可能であり、今後はそのような因子の制御に関わっているような遺伝子の獲得にまで道を開く技術となることが期待される。また、低濃度汚染土壌からの効率的かつ選択的な有害元素の集積能が高い植物を選抜、あるいは育成する場合にイオンホメオスタシスの概念を導入することも可能になると思われる。集積能を考えた場合には吸収する段階での能力のみならず、体内での分配等の機能が重要であるためである。

なお、これらの研究成果の一部は Cheng *et al.*, 2009a, b として報告をした。

本研究の一部は科学研究費補助金 特定領域研究「植物の養分吸収と循環系一膜輸送を担う分子の同定と制御」の公募研究として H18-19 年度（体内イオンバランスの調整に関与する遺伝子のイオノームによる解析手法の開発）、H20-21 年度（イオノームによるミヤコグサ養分動態変異体の獲得と解析）に渡り援助を受けた成果となります。また研究の遂行にあたり北海道大学大学院農学研究院渡部敏裕助教には共同研究を通して多大なるサポートを頂いていることをこの場を借りてお礼申し上げます。（信濃卓郎）

7. アルミニウムストレス耐性の分子機構

アルミニウムイオン (Al^{3+}) 毒性は低濃度で根の伸長や

養水分の吸収を素早く阻害し、世界の耕地面積の3割以上を占める酸性土壌での主な生育阻害因子とされている。しかし、一部の植物はアルミニウム毒性に対して耐性機構を発達させてきた。これまでに多くの生理学的な研究がなされ、いくつか耐性機構が提唱されてきた。中でも多くの植物はアルミニウムに応答して根から有機酸（クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸）を分泌し、根圏においてアルミニウムを無毒化することが知られている（Ma, 2007）。近年、有機酸の分泌に関与する遺伝子の同定や他のアルミニウム耐性遺伝子の単離など、アルミニウム耐性の分子機構の解明に大きな進展があった。本シンポジウムでは、主に我々が行っている研究について紹介する。

1) オオムギアルミニウム耐性遺伝子

オオムギはイネ科植物の中でアルミニウム耐性が弱い種とされている。しかし、我々は十数年前に世界各国のオオムギ700品種のアルミニウム耐性をスクリーニングした結果、アルミニウム耐性に大きな品種間差があることを明らかにしている。またその後の生理学的及び遺伝学的な解析から、根からのクエン酸の分泌がオオムギにおける主要な耐性機構であることも明らかにしている（Zhao *et al.*, 2003）。近年さらにこのクエン酸の分泌を司る遺伝子（AACT1, Aluminum-Activated Citrate Transporter）を同定した（Furukawa *et al.*, 2007）。この遺伝子はMATE（multidrug and toxic compound extrusion）ファミリーに属し、この遺伝子によってコードされるタンパク質はアフリカツメガエルの卵母細胞のアッセイ系においてクエン酸の排出輸送活性を示した。またこの遺伝子をタバコに過剰発現すると、クエン酸の分泌量並びにアルミニウム耐性が高まった。この遺伝子は主に根で発現し、アルミニウムによって誘導されない。さらにこの遺伝子の発現量とアルミニウムにより誘導されるクエン酸の分泌量との間に強い正の相関（ $R=0.96$ ）が認められた。このことはこの遺伝子の発現量の多少がアルミニウムによるクエン酸の分泌量を規定していることを示している。ごく最近、この遺伝子の発現量が5'-UTR領域に挿入された特異的配列によって制御されている可能性を突き止めた。HvAACT1は根端付近の表皮細胞の細胞膜に局在していた。これらの結果からHvAACT1がアルミニウム活性化型のクエン酸排出トランスポーターであることを示している。オオムギ以外に、ソルガムやアラビドプシスからHvAAVT1の相同遺伝子SbMATEとAtMATEが同定されている（Liu *et al.*, 2009; Magalhaes *et al.*, 2007）。

2) イネアルミニウム耐性遺伝子

イネはイネ科作物の中で一番アルミニウム耐性が強い種として知られている。しかし、その耐性機構も耐性遺伝子もまだ明らかにされていない。我々はアルミニウム感受性突然変異体を単離して、アルミニウム耐性遺伝子をクローニングするアプローチを取ってきた。これまでに幾つかのアルミニウム感受性突然変異体を取得している。これまでにこれらの変異体を用いて耐性遺伝子三つ（STAR1,

STAR2とART1）を同定した。STAR1（sensitive to Al rhizotoxicity）はABCトランスポーターのATP結合ドメインのみをコードしている（Huang *et al.*, 2009）。一方、STAR2はABCトランスポーターの膜結合ドメインのみをコードしている。Yeast two hybridやタマネギ表皮細胞での共発現などからSTAR1とSTAR2は複合体を形成して、ABCトランスポーターとして機能していることを明らかにした。STAR1と2はともに主に根で発現し、アルミニウム処理によって2時間以内に発現が誘導される。またこの遺伝子は他の金属（Cd, La）や低pHによっては誘導されない。

STAR1/2は根の先端ではすべての細胞、基部では表皮細胞以外のすべての細胞に局在していた。また細胞膜ではなく、小胞様膜に局在している。輸送基質を調べたところ、UDP-Glucoseを特異的に輸送することを明らかにした。STAR1/2の役割はおそらく小胞へUDP-Gluを輸送し、exocytosisによって細胞外に放出されたUDP-Gluまたはその代謝産物が細胞壁の修飾に使われ、その結果、アルミニウムとの結合様式が変わると推測される。

一方、ART1（Aluminum resistant transcription factor1）はアルミニウム耐性転写因子をコードしている（Yamaji *et al.*, 2009）。ART1はC2H2型 zinc finger の転写因子で、根において構成的に発現し、Al処理によって誘導されない。ART1は根のすべての細胞の核に局在していて、転写活性を有する。ART1はSTAR1と2を含む30個近くの遺伝子を制御している。これらの遺伝子群はシロイヌナズナで同定されたSTOP1の下流遺伝子と大きく異なる（Sawaki *et al.*, 2009）。これらのことはシロイヌナズナとイネとではアルミニウム耐性の分子機構が大きく異なることを示している。（馬 建鋒）

8. 好酸性植物とアルミニウム

1) 好酸性植物とは

一般に、植物は酸性土壌で生育を抑制されるが、一部の植物は酸性土壌でより旺盛に生育する。このような植物を好酸性植物と呼んでいる。酸性土壌には植物の生育に対する様々なストレスが存在し、それらの中で多くの酸性土壌において植物の生育を制限する主要因となるのは土壌酸性化によって溶解度の高まるアルミニウム（Al）イオンによる障害である。しかしながら、好酸性植物の多くはAlイオンに対する耐性が強いだけでなく、Alイオンの存在によってむしろ生育が良好になることが古くから知られている。そのため、教科書ではAlは有害元素としてだけでなく、有益元素としても紹介されている。これらのAlの有益な効果を説明する要因として、AlイオンによるH⁺毒性やリン酸過剰の軽減が提案されている。

2) 好酸性植物とアルミニウム集積植物

障害を受けることなく地上部のAl含有率が1,000 mg kg⁻¹ DW以上に達する植物種をAl集積植物と呼んでいる。これらAl集積植物にはチャやアジサイ等しばしば好酸性

植物が認められている。Al集積植物は極めてAl耐性が強く、酸性硫酸塩土壌のような強酸性土壌ではAl集積植物が優占種となっている場合も多い。これらの植物種は、Alイオンを含まない培地で栽培した場合、葉では萎縮や斑点などの障害が、根では褐変、細根減少や脂質過酸化などが引き起こされ、生育不良となることがある。これらの植物種がAlを多く吸収することから、Alが体内で何らかの生理的役割を持ち、Alが培地に無い場合は「Al欠乏症状」が起こることも考えられているが、詳細についてはほとんど研究されていない。ここでは筆者らの研究で明らかになったメラストーマの生育におけるAlの役割について述べる。メラストーマ (*Melastoma malabathricum* L.) は熱帯・亜熱帯アジア地域に分布し、酸性硫酸塩土壌の優占種の一つであり、葉に10,000 mg kg⁻¹以上のAlを集積する。この植物もAlによる生育促進が認められるが、その現象はAlによるH⁺毒性やリン酸過剰の軽減では説明できない。

3) メラストーマではアルミニウムイオンが鉄イオンによる障害を軽減

筆者らはまず、この植物が生育する酸性硫酸塩土壌のような強酸性土壌では、Alだけではなく鉄(Fe)イオンの溶解度も上昇することに注目し、メラストーマの生育におけるAlとFeの相互作用について検討した。植物に対するFe過剰害の発生は水田などの還元状態下でFe²⁺イオンの溶解度が高まり引き起こされることがあるが、好気的条件下ではほとんど問題になることはない。水耕栽培では、イネの場合、養分状態によりmMオーダーでFe過剰害が発生することがあるが、メラストーマの場合、40~100 μMという標準培養液中のFe濃度と大差ない濃度で根の変色や脂質過酸化の増大など障害が発生し、その症状はAl欠乏時のものと一致する。これらの障害は培地中Fe濃度を低下させることにより解消されるが、培地にAlを添加することによってもFe吸収が大幅に減少し、障害は改善される。メラストーマでしばしば観察されるAlによる養分吸収の促進は、Fe害によって障害を受けた根のAlによる機能改善に起因すると考えられる。また、メラストーマと同じフトモモ目に属し、系統学的にも近いAl非集積植物であるメラルーカ (*Melaleuca cajuputi* Powell) も100 μM Feによって同様の障害を受けるが、Alの添加によってFe吸収が減少することではなく、その障害も改善されない。以上により、Fe耐性が極めて弱いメラストーマは、溶存Feイオンをある程度含む土壌に適応するためにAlを多く吸収することによりFe吸収を抑制する機構を獲得したと考えられる。

4) メラストーマでは体内のアルミニウム無毒化機構が負に働くことがある

もう一点、メラストーマがAlを必要とする理由を述べる。メラストーマの体内に集積した高濃度のAlイオンは、シュウ酸とキレート化し無毒化される。しかし、メラストーマの場合、このシュウ酸の合成はAl誘導性ではなく、恒

常的に体内のシュウ酸濃度が高い。シュウ酸はアルカリ土類金属をはじめとして多くのカチオンと難溶性塩を形成する。筆者らが調べたところ、+Al処理と比較して-Al処理を施したメラストーマ植物体では水可溶性のカルシウムおよびマグネシウム量が大幅に減少することが示された。すなわち、Alを吸収できない状況では、シュウ酸はカルシウムやマグネシウム等と体内で難溶性塩を形成してしまい、これらの欠乏を引き起こしうることが明らかとなった。このようにAl不在下ではAl無毒化機構が負に働くことにより生育が阻害される可能性がある。(渡部敏裕)

文 献

- Baxter, I., Ouzzani, M., Orcun, S., Kennedy, B., Jandhyala, S. S., and Salt, D. E. 2007. Purdue ionomics information management system: an integrated functional genomics platform. *Plant Physiol.*, 143, 600–611.
- Baxter, I., Vitek, O., Lahner, B., Muthukumar, B., Borghi, M., Morrissey, J., Guerinot, M. L., and Salt, D. E. 2008. The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 105 12081–12086.
- Cheng, Z., Watanabe, T., Shinano, T., Ezawa, T., Wasaki, J., Kimura, K., and Osaki, M. 2009a. Element interconnections in *Lotus japonicus*: a systematic study of the effects of elements additions on different natural variants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 55, 91–101.
- Cheng, Z., Watanabe, T., Shinano, T., Okazaki, K., and Osaki, M. 2009b. Rapid characterization of plant mutants with altered ion-profile: a case study using *Lotus japonicus*. *New Phytol.*, 181, 795–801.
- Eide, D. J., Clark, S., Nair, T. M., Gehl, M., Gribskov, M., Guerinot, M. L., and Harper, J. F. 2005. Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol.*, 6, R77.
- Eitinger, T., Suhr, J., Moore, L., and Smith J. A. C. 2005. Secondary transporters for nickel and cobalt ions: Theme and variations. *BioMetals*, 18, 399–405.
- 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.
- 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.
- 鎌田 淳 2008. ブロッコリー花蕾黒変症の発生機作について. 農業技術, 63, 353–357.
- Lahner, B., Gong, J., Mahmoudian, M., Smith, E. L., Abid, K. B., Rogers, E. E., Guerinot, M. L., Harper, J. F., Ward, J. M., McIntyre, L., Schroeder, J. I., and Salt, D. E. 2003. Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21, 1215–1221.
- Li, L., Tutone, A. F., Drummond, S. M., Gardner, R. C., and Luan, S. 2001. A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13, 2761–2775.
- Liu, J., Magalhaes, J. V., Shaff, J., and Kochian, L. V. 2009. Aluminum-activated citrate and malate transporter from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. *Plant J.*, 57, 389–399.
- Ma, J. F. Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum

- resistance in higher plants. 2007. *Inter. Rev. Cytology*, **264**, 225–252.
- Magalhaes, J. V., Liu, J., Guimarães, C. T., Lana U. G. P., Alves, V. M. C., Wang, Y. H., Schavert, R. E., Hoekenga, O. A., Shaff, J. E., Pinerós, M. A., Klein, P. E., Coelho, C. M., and Kochian, L. V. 2007. A member of the multidrug and toxic compound extrusion 'MATE' family is a major gene that confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genet.*, **39**, 1156–1161.
- Maguire, M. E. 2006. Magnesium transporters: properties, regulation and structure. *Frontiers in Bioscience*, **11**, 3149–3163.
- Ochiai, K., Uemura, S., Shimizu, A., Okumoto, Y., and Matoh, T. 2008. Boron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). I. Quantitative trait locus (QTL) analysis of tolerance to boron toxicity. *Theor. Appl. Genet.*, **117**, 125–133.
- Sawaki, Y., Iuchi, S., Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Ikka, T., Sakurai, N., Fujita, M., Shinozaki, K., Shibata, D., Kobayashi, M., and Koyama, H. 2009. STOP1 regulates multiple genes which protect *Arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol.* **150**, 281–294.
- 渡辺和彦 2009. ミネラルの働きと作物の健康. 農文協.
- 渡部敏裕 2006. 酸性土壌に生育する植物たち—アルミニウム集積植物に見る多彩な適応のメカニズム—. 化学と生物, **44**, 496–499.
- Watanabe, T., Misawa, S., Hiradate, S., and Osaki, M. 2008. Root mucilage enhances aluminum accumulation in *Melastoma malabathricum*, an aluminum accumulator. *Plant Signal. Behav.*, **3**, 603–605.
- Watanabe, T., Jansen, S., and Osaki, M. 2006. Aluminium-iron interactions and growth enhancement in *Melastoma malabathricum* and *Miscanthus sinensis* dominating acid sulphate soils. *Plant Cell Environ.*, **29**, 2124–2132.
- Watanabe, T., Jansen, S., and Osaki, M. 2005. The beneficial effect of Al and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum* L., *New Phytol.*, **165**, 773–780.
- Yamaji, N., Huang, C. F., Nagao, S., Yano, M., Sato, Y., Nagamura, Y., and Ma, J. F. 2009. A Zn-finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell*, in press
- Zhao, C.-R., Ikka, T., Sawaki, Y., Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Hibino, T., Sato, S., Sakurai, N., Shibata, D., and Koyama, H. 2009. Comparative transcriptomic characterization of aluminum, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana* BMC, *Plant Biol.*, **9**, 31.
- Zhao, Z., Ma, J. F., Sato, K., and Takeda, K. 2003. Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hodeum vulgare* L.). *Planta*, **217**, 794–800.