

トランスポーター研究が土壌・肥料・植物栄養学にもたらすインパクト

6. 硫酸イオントランスポーターの機能と制御

吉本尚子^{1,2}・高橋秀樹^{2,3,4}

¹千葉大学大学院薬学研究院, ²理化学研究所植物科学研究センター,

³横浜市立大学木原生物学研究所, ⁴ミシガン州立大学

キーワード 硫黄, 硫酸イオン, トランスポーター, 植物栄養, 制御

1. はじめに

硫黄は自然界に多く存在する多量元素であり、生物においては生命維持に欠かせない必須元素の一つである。植物は土壌溶液に含まれる硫酸イオンを吸収し、システインやメチオニン、ビタミンや補酵素、グルコシノレートやアリイン等に代表される含硫代謝物を生合成するための硫黄源として利用する (Saito, 2004)。このため、植物は硫黄欠乏土壌では含硫代謝物を十分に合成できず生育が阻害される。また、硫黄欠乏植物はアミノ酸代謝バランスが変化しアスパラギンを過剰蓄積するが、これは加熱処理により発がん性物質であるアクリルアミドの蓄積を引き起こす (Muttucumaru *et al.*, 2006)。すなわち、植物の硫酸イオンの利用効率は、質的・量的に優れた作物を生産する上で重要な因子の1つである。近年、様々な植物種から硫酸イオンの輸送に関わるトランスポーターやその制御因子が同定され、植物における硫酸イオンの輸送と調節に関する分子レベルでの理解が進められている。本稿ではシロイヌナズナを中心に、植物の硫酸イオントランスポーター群の機能分担と発現制御について最近の知見を含めて紹介する。

2. 硫酸イオントランスポーター遺伝子の同定

植物は外部環境中に存在する硫酸イオンを細胞内に取り込み、硫黄同化の主要な場であるプラスチドや貯蔵の場である液胞へと輸送する。細胞膜やオルガネラ膜は脂質二

重層で構成されるため、イオンの膜透過には特異的な膜貫通型輸送タンパク質が仲介する輸送メカニズムが必要である。植物の硫酸イオン輸送に関する生理学的研究は古くから行われ、植物の根には硫酸イオンに対する K_m 値が $10 \mu\text{M}$ 台である高親和型の輸送システムと、 K_m 値が数 mM 台である低親和型の輸送システムが共存することや、硫黄欠乏条件では植物の硫酸イオン吸収活性が上昇することが知られていた (Clarkson *et al.*, 1983; Leggett and Epstein 1956)。近年、硫酸イオン吸収機能を欠損する酵母変異株 YSD1 が単離され、この酵母の機能相補を指標として植物の硫酸イオントランスポーターが同定された。YSD1 は硫酸イオンの毒性アナログであるセレン酸およびクロム酸に耐性を示す変異株として単離された (Smith *et al.*, 1995a)。YSD1 は細胞外の硫酸イオンを細胞内に吸収する活性をほとんど持たないことから、変異原因遺伝子 *SUL1* が細胞膜で機能する硫酸イオントランスポーターをコードすることが示された。続いて、熱帯性マメ科植物 *Stylosanthes hamata* から YSD1 の硫酸イオン吸収機能を相補する遺伝子が探索され、互いに配列の似た3つの遺伝子 (*SHST1*, *SHST2*, *SHST3*) が単離された (Smith *et al.*, 1995b)。これら *SHST* 遺伝子を発現させた酵母では、濃度勾配に逆らって細胞外の硫酸イオンを細胞内へ輸送する活性を示し、その輸送活性は細胞外のプロトン濃度に応じて変化することから、*SHST* 遺伝子は細胞膜局在性のプロトン/硫酸イオン共輸送体をコードすると考えられた。その後、*SHST* 遺伝子との配列相同性をもとに、様々な植物種から硫酸イオントランスポーター遺伝子が単離された (Bolchi *et al.*, 1999; Buchner *et al.*, 2004; 2010; Hopkins *et al.*, 2005; Howarth *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 1997; 2000)。これらの遺伝子は配列の類似性に基づき4つのグループに分類される。その後の機能解析の結果、各グループには硫酸イオン輸送機能や局在性に特徴が見られることが判明した。硫酸イオン輸送機能に注目すると、グループ1およびグループ2に属するトランスポーターは、酵母変異株 YSD1 の硫酸イオン吸収機能を回復できることから、細胞膜に局在して細胞外の硫酸イオンを取り込む機能を持

Naoko YOSHIMOTO and Hideki TAKAHASHI: Research on transporters and its impact on the fields of soil science, fertilizers and plant nutrition. 6. Plant sulfate transporters—recent advances in understanding of their functional and regulatory aspects

¹ 263-8522 千葉市稲毛区弥生町1-33

² 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

³ 244-0813 横浜市戸塚区舞岡町641-12

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA
2010年5月7日受付・2010年6月3日受理

日本土壌肥科学雑誌 第82巻 第1号 p.70~75 (2011)

つと考えられる。グループ1およびグループ2による硫酸イオン輸送活性は、硫酸イオン濃度に依存的でありミカエリスメンテン型の曲線に近似されるが、両者の硫酸イオンに対する親和性は大きく異なる。硫酸イオンに対する K_m 値はグループ1では十数 μM 以下であるのに対しグループ2では mM のオーダーを示すことから、グループ1は高親和型に、グループ2は低親和型に分類される (Smith *et al.*, 1995; 1997; Takahashi *et al.*, 2000; Yoshimoto *et al.*, 2002)。細胞内局在性に着目すると、グループ1~3は細胞膜局在を示すのに対し、グループ4は液胞膜に局在する (Kataoka *et al.*, 2004a)。グループ間における輸送活性や細胞内局在性の違いは、硫酸イオンの体内輸送における各グループの役割分担と関連があると考えられる。各グループに属するトランスポーターの生理機能については、後章でシロイヌナズナを例として述べる。

3. 硫酸イオントランスポーターの構造

膜貫通領域予測プログラムを用いたトポロジー予測によると、植物の硫酸イオントランスポーターは12個の膜貫通ヘリックスを持ち、親水性のN末端およびC末端領域は細胞質側に位置すると考えられている (Smith *et al.*, 1995b)。脂質二重層中での膜貫通領域の立体配置は、膜貫通ヘリックス内に存在する極性側鎖間鎖の静電的な相互作用によって安定化しており、1番目、2番目、5番目のヘリックスは蛋白質内部に位置すると予想されている (Leves *et al.*, 2008; Shelden *et al.*, 2003)。1番目と2番目の膜貫通ヘリックスには極性側鎖アミノ酸残基が多く存在するが、これら極性側鎖を非極性側鎖に置換した変異蛋白質では硫酸イオン輸送機能が低下することから、極性側鎖の硫酸イオン輸送機能への関与が示唆されている (Leves *et al.*, 2008)。

C末端親水性領域には枯草菌等のバクテリアが持つ抗シグマ因子のアンタゴニスト (ASA) と高い配列相同性を示す領域が存在し、STAS (sulfate transporters and anti-sigma factor antagonists) ドメインと呼ばれる (Aravind and Koonin, 2000)。哺乳類のSLC26は塩化物イオンや硫酸イオン、重炭酸イオン、ヨウ化物イオン等の一価や二価の陰イオンを対向輸送する輸送体ファミリーであり、植物の硫酸イオントランスポーターと配列相同性を示し、C末端にSTASドメインを持つ (Mount and Romero, 2004)。SLC26はSTASドメインを介して炭酸脱水素酵素や囊胞性線維症膜コンダクタンス制御因子と結合することで、輸送活性の制御を受ける (Ko *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2005)。哺乳類のSLC26やバクテリアのASAでは、STASドメインのリン酸化/脱リン酸化により結合蛋白質との相互作用が制御されている。これらの知見から、植物の硫酸イオントランスポーターについてもSTASドメインのリン酸化/脱リン酸化によって他の蛋白質が相互作用し、硫酸イオン輸送活性が制御される可能性が議論されている。シロイヌナズナのSULTR1;2のSTASドメ

ンについて、ASAのリン酸化部位に相当する582番目のスレオニン残基を、セリン、疑似リン酸化型のアスパラギン酸、疑似脱リン酸化型のアラニン残基に置換すると、どの変異蛋白質も硫酸イオン輸送活性を失う (Rouached *et al.*, 2005)。この結果からはSULTR1;2の582番目のスレオニン残基がリン酸化を受けるか否かは判断できないが、このスレオニン残基の硫酸イオン輸送機能における重要性が示唆される。また、STASの欠損や部分変異によりSULTR1;2の輸送活性や細胞膜移行性、蛋白質発現量が減少することも硫酸イオントランスポーターにおけるSTASドメインの重要性を示唆している (Shibagaki and Grossmann, 2004, 2006)。

4. シロイヌナズナにおける硫酸イオントランスポーターの局在と機能分担

シロイヌナズナのゲノムにはSHST遺伝子と配列が似た遺伝子SULTR (Sulfate transporter) が12個存在しており、各アイソフォームについて発現特異性の解析や遺伝子破壊系統を用いた機能解析が進められている。本項では、シロイヌナズナの硫酸イオン輸送系における各SULTRアイソフォームの役割について、輸送ステップごとに述べてい

1) 土壌溶液からの吸収

シロイヌナズナの根には1列の内皮細胞列が存在するが、隣り合う内皮細胞の間には細胞壁にカスバリー線が存在し、水やイオンのアポプラストを通した自由な透過を阻んでいる。このため、植物が土壌溶液中のイオンを体内へ取り込むためには、内皮細胞かそれより外側に位置する表皮細胞や皮層細胞の細胞膜に局在する輸送蛋白質を利用した膜輸送による細胞内へのイオンの輸送が必要である。細胞内に吸収されたイオン類は、原形質連絡を通じたシン بلاスト輸送によって中心柱に到達する (図1)。

SULTR1;1とSULTR1;2は、根の根毛、表皮及び皮層で発現するグループ1高親和型硫酸イオントランスポーターである (Shibagaki *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2000; Yoshimoto *et al.*, 2002)。これらの遺伝子のmRNA発現量は、植物を低硫酸イオン条件で生育させた場合に顕著に増加する。従って、SULTR1;1およびSULTR1;2は外部環境中の硫酸イオン濃度が低下した場合に機能し硫黄源の獲得に寄与していると考えられる。実際、*sultr1;1 sultr1;2*二重変異体は硫酸イオン濃度が $5\mu\text{M}$ の低硫酸イオン培地から硫酸イオンを吸収することができず、この条件では生育することができない (Yoshimoto *et al.*, 2007)。一方、*sultr1;1*変異体及び*sultr1;2*変異体は低硫酸イオン培地から硫酸イオンを吸収し、生育することができる。これはSULTR1;1とSULTR1;2の硫酸イオン輸送系における機能が重複していることを示唆している。*sultr1;1 sultr1;2*二重変異体は 1.7mM の硫酸イオンを含む通常培地においても野生型植物と比較して硫酸イオン吸収活性が顕著に低く、バイオマスが低下する (図2)。これらの結果から、

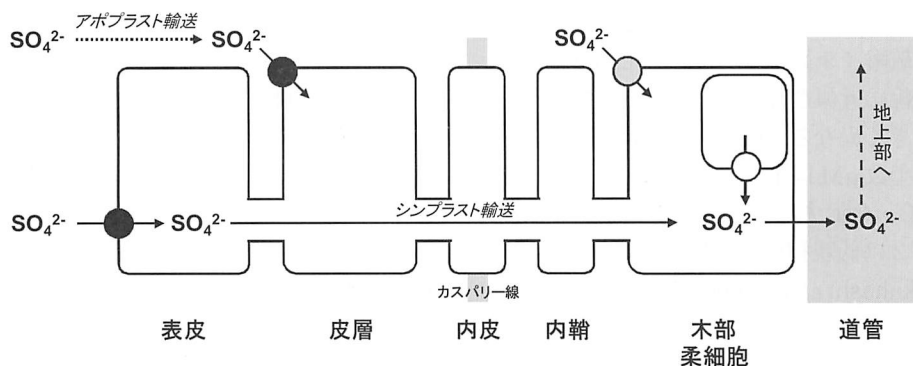


図1 シロイヌナズナの根における硫酸イオン輸送モデル

●SULTR1;1 SULTR1;2, ○SULTR2;1 SULTR3;5, ○SULTR4;1 SULTR4;2

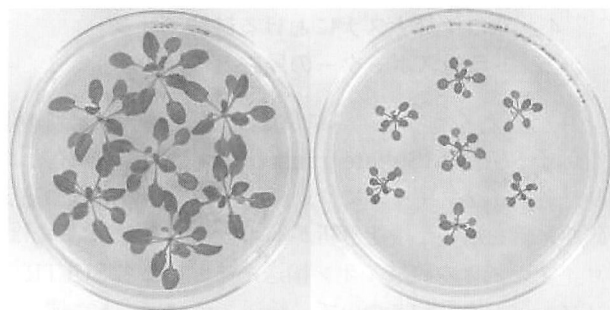


図2 シロイヌナズナ *sultr1;1 sultr1;2* 二重変異体
野生型のシロイヌナズナ (左) と *sultr1;1 sultr1;2* 二重変異体 (右) を 1.7 mM の硫酸イオンを含む通常培地で 16 日間栽培したものの。

SULTR1;1 と SULTR1;2 は、硫黄条件に関わらず、根における硫酸イオンの獲得に主要な役割を果たしていると考えられる。

外部環境からの硫黄源の獲得を担うという生理的重要性に起因すると考えられるが、SULTR1;1 と SULTR1;2 の発現は環境変化に応じて複雑に制御される。硫黄欠乏条件下では、プロモーターの制御により *SULTR1;1* と *SULTR1;2* の mRNA 発現量が増加するが、両者の発現誘導性には違いが見られる (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004; 2005)。硫黄十分条件では、*SULTR1;2* mRNA が主に発現し、*SULTR1;1* mRNA の発現量は低い。植物が硫黄欠乏にさらされると *SULTR1;1* の mRNA 発現は強く誘導されるのに対し、*SULTR1;2* の mRNA 発現誘導は比較的弱い (Yoshimoto *et al.*, 2002)。最近、様々な環境で育てた植物における *SULTR1;1* および *SULTR1;2* の mRNA 発現量と硫黄化合物蓄積量が測定され、相関解析がなされた (Rouached *et al.*, 2008)。その結果、*SULTR1;1* は局所的な硫黄欠乏に応答して発現が誘導されるのに対し、*SULTR1;2* の mRNA 量は炭素・窒素・硫黄の栄養バランスによる代謝要求の変化や概日リズムによって変動することが示された。また、*SULTR1;1* および *SULTR1;2* の mRNA 発現はサイトカニンにより抑制されるが、この調節は硫黄欠乏応答とは独立しておこる (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004)。一方、恒常的発現プロモーターの制御下で *SULTR1;1* や *SULTR1;2*

を発現させた形質転換植物を解析した結果、*SULTR1;1* と *SULTR1;2* は転写後の発現制御も受けることが明らかになった (Yoshimoto *et al.*, 2007)。形質転換植物の根では、硫黄条件に関わらず *SULTR1;1* および *SULTR1;2* の mRNA が蓄積した。しかし、*SULTR1;1* および *SULTR1;2* 蛋白質は硫黄十分条件の根ではほとんど蓄積せず、硫黄を含まない環境に移すと 8 時間以内に蛋白質が蓄積した。これらの結果は、*SULTR1;1* および *SULTR1;2* の蛋白質の翻訳効率や安定性が硫黄環境変化に応じて調節されていることを示唆している。

2) 道管への積み込み

根の細胞内に取り込まれた硫酸イオンは原形質連絡を通過して木部柔細胞に到達した後、隣接する道管内へ移行する。この細胞間シンプラスト輸送の過程で輸送中の硫酸イオンはアポプラストに漏れ出すことがある。硫酸イオンの細胞外 (アポプラスト) への排出は、プロトンポンプにより細胞膜の外側に向かって形成される正の電位差により起こると考えられる。グループ 2 の *SULTR2;1* とグループ 3 の *SULTR3;5* は根の木部柔細胞の細胞膜に局在し、中心柱のアポプラスト空間に漏れ出した硫酸イオンを木部柔細胞に輸送することで、間接的に道管への積み込み効率をあげていると考えられる (Takahashi *et al.*, 1997; 2000; Kataoka *et al.*, 2004b)。酵母を用いて硫酸イオン輸送機能を解析した結果、*SULTR2;1* は細胞外に存在する硫酸イオンを細胞内へ輸送する低親和型のトランスポーターであることが示された。これに対し *SULTR3;5* は単独では硫酸イオン輸送活性を示さないが、*SULTR2;1* と *SULTR3;5* を共発現させると *SULTR2;1* の活性と比べて約 3 倍高い硫酸イオン輸送活性を示した (Kataoka *et al.*, 2004b)。共発現による硫酸イオン輸送機能の相乗効果が、*SULTR2;1* と *SULTR3;5* の物理的相互作用による蛋白質の構造変化に由来するものか、機能的相互作用による輸送活性の向上によるものかについては、今後の解明が待たれる。*SULTR2;1* と *SULTR3;5* によって木部柔細胞内に濃縮された硫酸イオンは、隣接する道管内へ移行すると考えられる。ここでは *SULTR* とは異なる輸送メカニズムを持つ分子が関与していると予想されるが、現在までに排出型の硫酸イオン

ランスポーターは明らかにされていない。

3) 液胞—細胞質間の輸送

環境中に十分な量の硫酸イオンが存在する場合、植物は硫黄同化に必要とされる量以上の硫酸イオンを細胞内に取り込み、余剰の硫酸イオンを液胞内に貯蔵する (Kaiser *et al.*, 1989). 液胞膜にはプロトンポンプが存在し、細胞質のプロトンを液胞内部にくみ上げている (Martinoia *et al.*, 2000). このため、液胞内部は細胞質と比較してプロトン濃度が高く、正の電位を持つ。細胞質中の硫酸イオンは、液胞膜を挟んだ電位差を駆動力とする輸送体によって液胞内に輸送されると考えられている (Kaiser *et al.*, 1989; Martinoia *et al.*, 2000).

一方、植物が硫黄欠乏にさらされると、液胞内に蓄えられた硫酸イオンは細胞質へと排出され、硫黄同化に利用される。グループ4に属する *SULTR4;1* と *SULTR4;2* は液胞膜に局在する硫酸イオントランスポーターである。 *sultr4;1 sultr4;2* 二重変異体では、野生型植物と比較して液胞内部の硫酸イオン濃度が顕著に高く、液胞内部の硫酸イオンを細胞質に排出する機能が低下していることが予想された。すなわち、*SULTR4;1* と *SULTR4;2* は液胞膜を挟んだプロトン濃度勾配を利用して、液胞内に貯蔵された硫酸イオンをプロトンと共に細胞質へと排出する役割を持つと考えられる (Kataoka *et al.*, 2004a). 細胞レベルでは、*SULTR4;1* および *SULTR4;2* は根の内鞘および木部柔細胞で発現し、*sultr4;1 sultr4;2* 二重変異体では硫酸イオンの根から地上部への移行効率が低下する。この結果は、*SULTR4;1* および *SULTR4;2* が道管に接した細胞のシンプラストにおける硫酸イオン濃度を調節することで、道管へ積み込まれる硫酸イオンの量を制御することを示唆している (Kataoka *et al.*, 2004a).

4) 篩管転流

体内で不要になった硫黄は主に篩管を通して硫黄要求性の高い器官に再分配される。植物の篩管液にはグルタチオン、S-メチルメチオニン及び硫酸イオン等の硫黄化合物が含まれることから、硫黄は主にこれらの化合物として転流されると考えられる (Bourgis *et al.*, 1999; Kuzuhara *et al.*, 2000; Tabe *et al.*, 2001). シロイヌナズナでは篩管と篩部伴細胞は多数の原形質連絡で密につながっていることから (Haritatos *et al.*, 2000), 篩管または篩部伴細胞に局在するトランスポーターが硫黄転流に関与すると考えられる。GFP 融合蛋白質の発現解析の結果、グループ1高親和型硫酸イオントランスポーター *SULTR1;3* は篩部伴細胞で発現することが示された。また、*sultr1;3* 変異体では、子葉から成長中の葉や根への硫酸イオンの器官間輸送活性が野生型植物と比べて低いことから、*SULTR1;3* が硫酸イオンの転流の効率化に寄与することが示唆された (Yoshimoto *et al.*, 2003). ソース器官の細葉脈で篩部に積み込まれた硫酸イオンは篩管を通して器官間を移動しシンク器官のアポプラスト空間に放出されるが、この器官間輸送の過程で篩管から輸送物質が漏れることがある。

SULTR1;3 はソース器官とシンク器官をつなぐ維管束の篩部伴細胞で主に発現する。このことから、器官間輸送中にアポプラストに漏れ出した硫酸イオンが篩部伴細胞に再吸収されて原形質連絡を通じて篩管に戻る過程において、*SULTR1;3* は伴細胞への硫酸イオンの吸収を担い、硫酸イオンの転流を効率化していると考えられる。

前述の様に、*SULTR2;1* は根では木部柔細胞で発現し道管への硫酸イオン輸送に関わるが、地上部では篩部でも発現しており篩管を介した器官間輸送に関与する可能性が指摘されている (Takahashi *et al.*, 2000). 登熟中の種子は硫黄源の要求性が高く、硫黄転流のシンクであると考えられる。局在解析の結果、*SULTR2;1* が成熟中の鞘の基部と維管束、および鞘と種子をつなぐ珠柄で強く発現することが示された (Awazuhara *et al.*, 2005). *SULTR2;1* の発現が抑制されたアンチセンス植物では種子中の硫酸イオンおよびチオール含量が低下することから、*SULTR2;1* が種子への硫酸イオンの転流に関与することが示唆される (Awazuhara *et al.*, 2005).

5. 硫酸イオントランスポーターの制御因子

シロイヌナズナの *SULTR* 遺伝子群のうち、*SULTR1;1* は硫黄欠乏によって最も強く mRNA 発現が誘導されるアイソフォームの1つである。*SULTR1;1* のプロモーター領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を発現する植物を用いた解析により、硫黄欠乏による *SULTR1;1* 転写活性化に関わるシス配列 SURE (sulfur-responsive element) が同定されている (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2005). SURE は内部にオーキシン応答性配列を含む16塩基から成る配列であるが、オーキシン応答性を示さない。SURE は硫黄環境条件の変化に対する応答に特異的に関わるシス配列であるといえる。SURE 様配列は、硫黄欠乏時に mRNA 発現が誘導されることが知られている *SULTR2;1* や *SULTR4;2* のプロモーター領域にも含まれており、このシス配列が硫黄欠乏による遺伝子発現誘導に広く関わっていることが示唆される。

一方、*SULTR1;2* のプロモーター領域の下流に GFP コード領域をつないだ融合遺伝子を発現するシロイヌナズナを利用して、*SULTR1;2* 遺伝子の硫黄欠乏応答に関わる転写因子の探索が試みられた (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2006). 親植物をエチルメタンスルホン酸処理して得られた変異植物から、硫黄欠乏条件下でも GFP の発現が誘導されない変異体 *slim1* (sulfur limitation 1) を選抜したところ、その表現型は劣性の一遺伝子変異によるものであった。*SLIM1* 遺伝子は、EIL ファミリーに属する転写因子をコードしていた。*slim1* 変異体のマイクロアレイ解析の結果、*SLIM1* は *SULTR1;2* 以外にも、*SULTR1;1*, *SULTR3;5*, *SULTR4;2* 等の他の *SULTR* アイソフォームや、硫黄の一次代謝および二次代謝に関わる酵素遺伝子群の硫黄欠乏時の mRNA 発現制御にも関わる事が明らかにされた。*SLIM1* は硫黄条件の変化に応じて硫黄代謝系

全体を調節するマスター転写因子であるといえる。

硫酸イオントランスポーターの発現はマイクロ RNA によっても制御される。最近、シロイヌナズナとイネのゲノム配列の比較解析が行われ、多数のマイクロ RNA が同定された (Jones-Rhoades and Bartel, 2004)。これらのうち miR395 は *SULTR2;1* および硫黄同化系酵素 ATP スルフラゼをコードする遺伝子と相補的な配列を持つマイクロ RNA であり、その発現量は硫黄欠乏にตอบสนองして増加する (Jones-Rhoades and Bartel, 2004)。このことから、植物が硫黄欠乏にさらされると *SULTR2;1* mRNA は miR395 の蓄積に伴い分解されると予想されるが、実際には硫黄欠乏により *SULTR2;1* mRNA 量は葉では減少するが根では増加する。その原因は、miR395 が主に節部で発現し葉では *SULTR2;1* mRNA の発現場所と重複が見られるのに対し、根では miR395 の発現が見られない木部柔細胞で *SULTR2;1* mRNA が発現することによると推測されているが、器官間で多様化した制御メカニズムの詳細は明らかではない。miR395 の硫黄欠乏にตอบสนองした発現誘導は、前述の SLIM1 転写因子の制御下にあることが明らかにされている。硫黄欠乏時の葉において、野生型株では *SULTR2;1* mRNA が減少するが *slim1* 変異体では逆に増加する。これらの結果は、*SULTR2;1* mRNA の安定性が miR395 により制御されていることを示唆している (Kawashima *et al.*, 2009)。

6. お わ り に

シロイヌナズナを中心に硫酸イオントランスポーター群の機能解析やその制御機構の解析が進められ、硫酸イオンの植物体内輸送の全体像が明らかにされ始めた。一方、道管への硫酸イオンの積み込みや、液胞や葉緑体への硫酸イオン輸送に関わる輸送体の実体は解明されておらず、硫酸イオントランスポーターの発現を制御する硫黄のセンシング機構についても未知の部分が多い。今後これらの点が解明され、得られた知見をもとに硫黄の輸送ステップや同化機能を調節した農作物の分子エンジニアリングが成されることが期待される。

文 献

- Alvarez, B. V., Vilas, G. L., and Casey, J. R. 2005. Metabolon disruption: a mechanism that regulates bicarbonate transport. *EMBO J.*, **24**, 2499–2511.
- Aravind, L., and Koonin, E. V. 2000. The STAS domain – a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Curr. Biol.*, **10**, R53–R55.
- Awazuhara, M., Fujiwara, T., Hayashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Takahashi, H., and Saito, K. 2005. The function of *SULTR2;1* sulfate transporter during seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plantarum*, **125**, 95–105.
- Bolchi, A., Petrucco, S., Tenca, P. L., Foroni, C., and Ottonello, S. 1999. Coordinate modulation of maize sulfate permease and ATP sulfurylase mRNAs in response to variations in sulfur nutritional stress: stereospecific down-regulation by L-cysteine. *Plant Mol. Biol.*, **39**, 527–537.
- Bourgis, F., Roje, S., Nuccio, M. L., Fisher, D. B., Tarczynski, M. C., Li, C., Herschbach, C., Rennenberg, H., Pimenta, M. J., Shen, T., Gage, D. A., and Hanson, A. D. 1999. S-methylmethionine plays a role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *Plant Cell*, **11**, 1485–1497.
- Buchner, P., Parmar, S., Kriegel, A., Carpentier, M., and Hawkesford, M. J. 2010. The sulfate transporter family in wheat: tissue-specific gene expression in relation to nutrition. *Mol. Plant*, **3**, 374–389.
- Buchner, P., Stuiver, C. E. E., Westerman, S., Wirtz, M., Hell, R., Hawkesford, M. J., and De Kok, L. J. 2004. Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulfate nutrition. *Plant Physiol.*, **136**, 3396–3408.
- Clarkson, D. T., Smith, F. W., and Vanden Berg, P. J. 1983. Regulation of sulphate transport in a tropical legume, *Macroptilium atropurpureum*, cv. Siratro. *J. Exp. Bot.*, **34**, 1463–1483.
- Haritatos, E., Medville, R., and Turgeon, R. 2000. Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **211**, 105–111.
- Hopkins, L., Parmar, S., Blaszczyk, A., Hesse, H., Hoefgen, R., and Hawkesford, M. J. 2005. O-acetylserine and the regulation of expression of genes encoding components for sulfate uptake and assimilation in potato. *Plant Physiol.*, **138**, 433–440.
- Howarth, J. R., Fourcroy, P., Davidian, J. –C., Smith, F. W., Hawkesford, M. J. 2003. Cloning of two contrasting high-affinity sulfate transporters from tomato induced by low sulfate and infection by the vascular pathogen *Verticillium dahliae*. *Planta*, **218**, 58–64.
- Jones-Rhoades, M. W., and Bartel, D. P. 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell*, **14**, 787–799.
- Kaiser, G., Martinoia, E., Schroppelmeier, G., and Heber, U. 1989. Active-transport of sulfate into the vacuole of plant cells provides halotolerance and can detoxify SO₂. *J. Plant Physiol.*, **133**, 756–763.
- Kataoka, T., Hayashi, N., Yamaya, T., and Takahashi, H. 2004b. Root-to-shoot transport of sulfate in *Arabidopsis*. Evidence for the role of *SULTR3;5* as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant Physiol.*, **136**, 4198–4204.
- Kataoka, T., Watanabe-Takahashi, A., Hayashi, N., Ohnishi, M., Mimura, T., Buchner, P., Hawkesford, M. J., Yamaya, T., and Takahashi, H. 2004a. Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2693–2704.
- Kawashima, C. G., Yoshimoto, N., Maruyama-Nakashita, A., Tsuchiya, Y. N., Saito, K., Takahashi, H., and Dalmay, T. 2009. Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *Plant J.*, **57**, 313–321.
- Ko, S. B. H., Zeng, W., Dorwart, M. R., Luo, X., Kim, K. H., Millen, L., Goto, H., Naruse, S., Soyombo, A., Thomas, P. J., Muallem, S. 2004. Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nature Cell Biol.*, **6**, 343–350.
- Kuzuhara, Y., Isobe, A., Awazuhara, M., Fujiwara, T., Hayashi, H. 2000. Glutathione levels in phloem sap of rice plants under sulfur deficient conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **46**, 265–270.

- Leggett, J. E., and Epstein, E. 1956. Kinetics of sulfate absorption by barley roots. *Plant Physiol.*, **31**, 222–226.
- Leves, F. P., Tierney, M. L., and Howitt, S. M. 2008. Polar residues in a conserved motif spanning helices 1 and 2 are functionally important in the SulP transporter family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **40**, 2596–2605.
- Martinoia, E., Massonneau, A., and Frangne, N. 2000. Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1175–1186.
- Maruyama–Nakashita, A., Nakamura, Y., Tohge, T., Saito, K., and Takahashi, H. 2006. Arabidopsis SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *Plant Cell*, **18**, 3235–3251.
- Maruyama–Nakashita, A., Nakamura, Y., Watanabe–Takahashi, A., Inoue, E., Yamaya, T., and Takahashi, H. 2005. Identification of a novel *cis*-acting element conferring sulfur deficiency response in Arabidopsis roots. *Plant J.*, **42**, 305–314.
- Maruyama–Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T., and Takahashi, H. 2004. A novel regulatory pathway of sulfate uptake in *Arabidopsis* roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *Plant J.*, **38**, 779–789.
- Mount, D. B., and Romero, M. F. 2004. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch.*, **447**, 710–721.
- Muttucumaru, N., Halford, N. G., Elmore, J. S., Dodson, A. T., Parry, M., Shewry, P. R., and Mottram, D. S. 2006. Formation of high levels of acrylamide during the processing of flour derived from sulfate-deprived wheat. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8951–8955.
- Rouached, H., Berthomieu, P., El Kassis, E., Cathala, N., Catherinot, V., Labesse, G., Davidian, J. –C., and Fourcroy, P. 2005. Structural and functional analysis of the C-terminal STAS (sulfate transporter and anti-sigma antagonist) domain of the *Arabidopsis thaliana* sulfate transporter SULTR1. 2. *J. Biol. Chem.*, **280**, 15976–15983.
- Rouached, H., Wirtz, M., Alary, R., Hell, R., Arpat, A. B., Davidian, J. –C., Fourcroy, P., and Berthomieu, P. 2008. Differential regulation of the expression of two high-affinity sulfate transporters, SULTR1. 1 and SULTR1. 2, in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **147**, 897–911.
- Saito, K. 2004. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelly road. *Plant Physiol.*, **136**, 2443–2450.
- Shelden, M. C., Loughlin, P., Tierney, M. L., and Howitt, S. M. 2003. Interactions between charged amino acid residues within transmembrane helices in the sulfate transporter SHST1. *Biochemistry*, **42**, 12941–12949.
- Shibagaki, N., and Grossmann, A. R. 2004. Probing the function of STAS domains of the Arabidopsis sulfate transporters. *J. Biol. Chem.*, **279**, 30791–30799.
- Shibagaki, N., and Grossmann, A. R. 2006. The role of the STAS domain in the function and biogenesis of a sulfate transporter as probed by random mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **281**, 22964–22973.
- Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J. P., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Davies, J. P. 2002. Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify *Sultr1;2*, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant J.*, **29**, 475–486.
- Smith, F. W., Ealing, P. M., Hawkesford, M. J., and Clarkson, D. T. 1995b. Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9373–9377.
- Smith, F. W., Hawkesford, M. J., Prosser, I. M., and Clarkson, D. T. 1995a. Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulphate transporter at the plasma membrane. *Mol. Gen. Genet.*, **247**, 709–715.
- Smith, F. W., Hawkesford, M. J., Ealing, P. M., Clarkson, D. T., Vanden, Berg, P. J., Belcher, A. R., and Warrilow, A. G. S. 1997. Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *Plant J.*, **12**, 875–884.
- Tabe, L. M., and Droux, M. 2001. Sulfur assimilation in developing lupin cotyledons could contribute significantly to the accumulation of organic sulfur reserves in the seed. *Plant Physiol.*, **126**, 176–187.
- Takahashi, H., Watanabe–Takahashi, A., Smith, F. W., Blake–Kalf, M., Hawkesford, M. J., and Saito, K. 2000. The roles of three functional sulfate transporters involved in uptake and translocation of sulfate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **23**, 171–182.
- Takahashi, H., Yamazaki, M., Sasakura, N., Watanabe, A., Leustek, T., de Almeida Engler, J., Engler, G., Van Montagu, M., and Saito, K. 1997. Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11102–11107.
- Yoshimoto, N., Inoue, E., Saito, K., Yamaya, T., and Takahashi, H. 2003. Phloem-localizing sulfate transporter, *Sultr1;3*, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **131**, 1511–1517.
- Yoshimoto, N., Inoue, E., Watanabe–Takahashi, A., Saito, K., and Takahashi, H. 2007. Posttranscriptional regulation of high-affinity sulfate transporters in Arabidopsis by sulfur nutrition. *Plant Physiol.*, **145**, 378–388.
- Yoshimoto, N., Takahashi, H., Smith, F. W., Yamaya, T., and Saito, K. 2002. Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *Plant J.*, **29**, 465–473.