

環境抵抗性マメ科木本植物 *Acacia mangium* の
低 pH とアルミニウムストレス応答に関する研究

日本大学大学院生物資源科学研究科応用生命科学専攻
博士後期課程

水野 修平

2013

目次

序論	1
材料と方法	8
1. 植物材料と試薬類	8
2. ストレス処理	11
3. 組織化学的方法	13
4. 分子生物学的方法	14
5. 有機酸の分析	20
6. H ⁺ 排出活性の測定	21
結果	33
1. <i>Acacia mangium</i> 実生の低 pH と Al ストレス応答	33
2. <i>A. mangium</i> 培養細胞系の確立およびその低 pH と Al ストレス応答	34
3. <i>A. mangium</i> 培養細胞の低 pH と Al ストレスに対する 転写応答と応答遺伝子の全長 cDNA クローニング	36
4. <i>A. mangium</i> 培養細胞の Al 応答により排出される有機酸	40
5. <i>A. mangium</i> 培養細胞の H ⁺ 排出活性	41
6. 実生を用いたストレス応答遺伝子の器官別転写解析	41
考察	63
1. <i>Acacia mangium</i> のストレス抵抗性とストレス応答 遺伝子の検出	63

2. <i>A. mangium</i> から検出されたストレス応答遺伝子	65
3. <i>A. mangium</i> の既知 Al 抵抗性遺伝子	77
4. <i>A. mangium</i> における低 pH と Al ストレス応答のまとめ . . .	81
5. 課題と展望	82
謝辞	85
引用文献	86

序 論

酸性土壌は世界の耕作地の約 40%にも及ぶ問題土壌である (Von Uexküll and Mutert 1995)。酸性土壌では、高濃度のプロトン (H^+) とアルミニウムイオン (Al^{3+} : 以下 Al と表記) の毒性や、無機栄養塩の不溶化による栄養欠乏が植物の生育を著しく阻害し、作物生産の低下を招いている。また、バイオ燃料植物の生産においても、食用作物との耕作地競合を避ける観点から、問題土壌の利用はきわめて重要な課題である。このように食糧問題、エネルギー問題の解決に向けて、植物の酸性土壌に対する適応機構の解明および有用植物の酸性土壌適性の改良が急務である。

アルミニウムは地殻中に最も多量に含まれる金属元素であり、中性付近の土壌では溶解性は低く無毒性である。しかし、土壌が酸性化することによってアルミニウムは可溶化し、土壌溶液中に有毒な Al が放出される (Kinraide 2003)。Al の植物毒性は酸性土壌における植物の生育を阻害する主要要因とされている。Al 毒性の主な標的は根端の分裂組織であり、植物が Al に曝露されると、根の伸長は速やかに阻害されることが知られている。Al は直接的、あるいは間接的に、多様な機序により細胞の生理機能に干渉することで、根の細胞分裂と細胞伸長の阻害、水や無機栄養塩の吸収阻害、細胞膜の透過性低下、シグナル伝達の阻害、酸化ストレスの誘発などの多様な障害を引き起こすことが報告されている (Kochian et al. 2005; Ma 2007)。

酸性土壌において、土壌溶液中に高濃度で存在するプロトンもまた、植物の生育を阻害することが知られ、プロトン毒性の影響はとりわけ酸性有機質土壌において顕著である (Kidd and Proctor 2001)。シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* において、プロトン毒性は根の伸長領域で細胞を不可逆的に傷害し、根の伸長を著しく阻害することが報告されている (Koyama et al. 2001)。また、プロトン毒性の分子機構の 1 つとして、アポプラストにおいてペクチンネット

ワークを安定化させている Ca^{2+} などの二価陽イオンがプロトンによって置換され、その構造が不安定化されることが考えられている。

今日までに、植物の酸性土壌適応機構に関する研究は主としてシロイヌナズナ、イネ *Oryza sativa*、コムギ *Triticum aestivum* などの草本のモデル植物や穀類で重点的に行われており、特に Al 抵抗性 (Al resistance) に関しては比較的多く研究されている (Ryan et al. 2011; Delhaize et al. 2012)。これらの研究を通して、植物が Al ストレスに適応するために発達させてきた多様な Al 抵抗性機構の存在が提唱されている。さらに、これらの機構は“Al 排除 (Al exclusion)”と“Al 耐性 (Al tolerance)”の2種類に大別される (Ryan and Delhaize 2012)。Al 排除機構は細胞内への Al の侵入および細胞表層への Al の吸着を阻止するための機構と定義されている。Al 排除機構の中でも、Al を無毒化するための有機酸の根圏への排出は最も広く認知されている機構である。根圏へ排出されたリンゴ酸やクエン酸、シュウ酸などの有機酸に由来するアニオンは Al をキレートし、不溶性の複合体を形成する。その結果、植物には有機酸 Al 塩を取り込むトランスポーターがないため、Al の吸収が抑制される。その他にも、細胞膜や細胞壁への Al 吸着を阻止するための機構として、細胞膜内外の電位差の減少や、ペクチンのメチル化促進による Al 吸着阻止などの細胞膜や細胞壁の構造変化などによる Al 排除機構が提唱されている。一方、Al 耐性機構は細胞内での Al の無毒化や液胞への隔離、Al 毒性によって障害を受けた細胞膜や細胞壁の修復、高感受性部位から低感受性部位への Al の輸送などの植物体内に侵入した Al へ対処するための機構と定義されている。

Al 抵抗性の分子機構を解明するために、抵抗性と感受性の品種や変異体を用いた QTL (quantitative trait loci) 解析、マップベースクローニングなどの分子遺伝学的手法や、cDNA サブトラクション、マイクロアレイ解析などの転写解析が用いられ、この 10 年程の間に複数の Al 抵抗性遺伝子が単離、同定されている。

有機酸の排出に関連する遺伝子では、リンゴ酸排出に関わる *ALMT* (*aluminum-activated malate transporter*) とクエン酸排出に関わる *MATE* (*multidrug and toxic compound extrusion*) ファミリーのトランスポーター遺伝子がコムギ (Sasaki et al. 2004)、シロイヌナズナ (Hoekenga et al. 2006; Liu

et al. 2009)、オオムギ *Hordeum vulgare* (Furukawa et al. 2007)、ソルガム *Sorghum bicolor* (Magalhaes et al. 2007)などで同定され、その機能の特徴付けが行われている。有機酸排出以外の Al 抵抗性に関与するトランスポーター遺伝子として、複数の half-size ABC (ATP-binding cassette)トランスポーターをコードしている遺伝子が同定されている。イネにおいて同定された *OsSTAR1* (*sensitive to aluminum rhizotoxicity 1*)および *OsSTAR2* は ATP-binding domain と膜貫通 domain をそれぞれコードし、*OsSTAR1* と *OsSTAR2* は複合体を形成して分泌顆粒膜に局在している。この複合体は、細胞壁の構造改変や修復の際の基質として用いられる UDP-グルコースの分泌顆粒へのソーティングに関与していると考えられている (Huang et al. 2009)。また、それらのシロイヌナズナホモログである *AtSTAR1* と *AtALS3* (*aluminum sensitive 3*)においても、イネと同様に *AtSTAR1* と *AtALS3* の相互作用が示唆されているが、イネとは異なり *AtALS3* は主に細胞膜に局在している (Huang et al. 2010; Larsen et al. 2005)。*AtALS3* の機能として、Al 感受性の部位からより感受性の低い部位への植物体内での Al の輸送、再分配機構への関与が提唱されている。また、*AtSTAR1* の機能の詳細は不明である。その他、イネとシロイヌナズナで Al の液胞内への隔離に関与していると考えられる遺伝子として、*OsALS1* と *AtALS1* が同定されている (Larsen et al. 2007; Huang et al. 2012)。さらに、イネでは、Al の細胞内への取り込みに関与するトランスポーターとして、Nramp (natural resistant-associated macrophage protein)ファミリーに属する *NRAT1* (*Nramp aluminum transporter 1*)も同定されており、Al を細胞内に取り込み、無毒化することで細胞壁への Al の吸着を抑える機構の発達が示唆されている (Xia et al. 2010)。

トランスポーター以外には、Cys₂/His₂-type zinc-finger 転写因子をコードし、シロイヌナズナやタバコ *Nicotiana tabacum* などのプロトンと Al に対する抵抗性を制御している *STOP1* (*sensitive to proton rhizotoxicity 1*)と、イネの Al 抵抗性を制御している *OsART1* (*aluminum resistance transcription factor 1*)が同定されている (Iuchi et al. 2007; Yamaji et al. 2009; Ohyama et al. 2013)。また、多くの植物で Al 毒性に対する網羅的な転写応答解析がマイクロアレイを用いて行われ、多くの候補遺伝子の情報が得られている (Maron et al.

2008; Kumari et al. 2008; Duressa et al. 2010; Tsutsui et al. 2012)。

プロトン耐性に関しては、シロイヌナズナの *stop1* 変異体の研究から、*GDH* (*glutamate dehydrogenase*)、*ME* (*malic enzyme*)、*GAD* (*glutamic acid decarboxylase*) などの代謝酵素遺伝子や、細胞壁関連遺伝子の *PGIP* (*polygalacturonase inhibiting protein*) などの関与が示唆されているが (Sawaki et al. 2009)、植物プロトン耐性の分子機構に関する知見はきわめて限られている。

一方で、ノボタン科の *Melastoma melabathricum*、ツバキ科のチャ *Camellia sinensis*、フトモモ科の *Melaleuca cajuputi*、マメ科の *Acacia mangium* など、ある種の本木植物は酸性土壌に適応して旺盛な成育を示すことが報告されている (Matsumoto et al. 1976; Osaki et al. 1997)。本木植物の Al 抵抗性について、これまでに報告されている機構として、本木モデル植物である *Populus trichocarpa* でのクエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、コハク酸 の排出 (Naik et al. 2009)、*M. cajuputi* でのクエン酸、リンゴ酸、シュウ酸 の排出 (Nguyen et al. 2003; Tahara et al. 2008)、チャでのシュウ酸排出 (Morita et al. 2011) をはじめ、いくつかの種で有機酸排出が報告されている。また、有機酸以外の Al キレート物質として、多糖を主成分とする粘液質であるムシラーゲの分泌が *M. melabathricum* で報告されている他、チャやユーカリ *Eucalyptus camaldulensis*、*M. cajuputi* などではフェノール化合物の排出が報告されている (Nguyen et al. 2003; Watanabe et al. 2008)。Al キレート物質の排出以外の機構としては、クスノキ *Cinnamomum camphora* において、根の表皮組織のプロアントシアニジン蓄積細胞の発達と脱離の重要性が報告されている (Osawa et al. 2011)。また、高い Al 抵抗性を示す本木植物は、高濃度で Al を蓄積する “Al-accumulator” と Al をほとんど蓄積しない “Al-excluder” の 2 種類に大別することが可能であり (Brunner and Sperisen 2013)、原子吸光法による元素分析の結果から、*M. melabathricum* やチャは Al-accumulator であり、*M. cajuputi* や *A. mangium* は Al-excluder であることも報告されている (Osaki et al. 1997)。

このように、酸性土壌においても旺盛な生育が可能な本木植物には、独自のあるいはより高機能な酸性土壌適応機構が発達していることが期待されるが、

その遺伝子レベルでの知見は未だ非常に限られている。いくつかの研究例を挙げると、これまでにマメ科の *Paraserianthus falcataria* から Al 誘導性のミトコンドリア型クエン酸合成酵素遺伝子 (Osawa and Kojima 2006) が、*Populus tremula* とユーカリから *MATE* のホモログ (Grisel et al. 2010; Sawaki et al. 2013) が報告されている。また、チャと *Populus nigra* の *STOP1-like* 遺伝子がシロイヌナズナの *stop1* 変異体のプロトン感受性と Al 感受性の一部を相補可能なことが報告されている (Ohyama et al. 2013)。木本植物では、一般的に環境抵抗性に関する適切な変異体を作成するのが困難であることから、分子遺伝学的な解析が困難であり、これらの研究はストレス処理を加えた植物体を用いて行われている。

前述の酸性土壌適応植物の 1 つである *Acacia mangium* はオーストラリアからインドネシア原産のマメ科ネムノキ亜科の木本植物であり、パルプや用材などとして用いられている。また、マメ科植物に特有な根粒菌共生窒素固定が可能で成長速度が早いことから、荒廃地への植林を行う際のパイオニア植物としても利用されている。このように、*A. mangium* は東南アジアにおいて広く植林されている森林資源として非常に重要な植物である (Norisada et al. 2005; Umezawa et al. 2008)。*A. mangium* の特性として高い環境抵抗性が挙げられ、耐塩性、土壌の低 pH、Al 毒性に対する抵抗性が知られており、酸性土壌や塩類土壌でも旺盛な生育が可能であることから、*A. mangium* にはこれまでに知られていない独自の酸性土壌適応機構が発達している可能性がある。したがって、*A. mangium* のストレス応答に関する研究は、環境抵抗性植物の酸性土壌適応機構の分子レベルでの理解、植物の酸性土壌適性の改良による作物生産や植生回復の促進に利用可能な遺伝子資源の獲得、さらには酸性環境下におけるマメ科植物-根粒菌共生窒素固定の理解という観点から非常に重要と考えられる。しかし、*A. mangium* の Al 抵抗性機構に関連した知見としては、前述の通り Al-excluder としての性質が報告されている他は、Al に応答して微量のクエン酸を根圏に排出することが報告されているのみである (Osawa and Kojima 2006)。その他に得られている知見も、同属の *A. auriculiformis* におけるクエン酸とシュウ酸の排出 (Nguyen et al. 2003) が報告されているだけである。また、*A. mangium* に関連した遺伝子レベルの研究では、花由来の cDNA サブ

トラクションライブラリー (Wang et al. 2005) が報告されている他、近年、*A. mangium* の材としての有用性が注目され、セルロースやリグニン生合成に関連した遺伝子のクローニングや EST (expression sequence tags) 解析などが *A. mangium* や *A. auriculiformis* と *A. mangium* の雑種を用いて行われている (Suzuki et al. 2011; Yong et al. 2011; Wong et al. 2011; Ong and Wickneswari 2012; Sukganah et al. 2013; Yong and Wickneswari 2013)。しかし、その一方で *A. mangium* におけるストレス応答に関連した遺伝子レベルでの解析はほとんど行われておらず、その環境抵抗性に関する分子レベルでの知見もほとんど得られていない。

日本大学大学院では生物資源科学研究科を中心として、2003 (平成 15) ~ 2007 (平成 19) 年度、文部科学省「21 世紀 COE プログラム」に選定された「環境適応生物を活用する環境修復技術の開発」(拠点リーダー・佐々木 恵彦教授) の事業が展開された。このプログラムでは、酸性硫酸塩土壌に適応して生育する生物を用いた環境修復を目標に、自然科学と社会科学を融合させた先駆的な研究が行われ、植物科学分野でも *O*-acetylserine (thiol) lyase (cysteine synthase, CSase) の酸性ストレス適応における役割の解明などの重要な成果が得られている (Hasegawa 2008)。そして *A. mangium* を含む数種類の酸性土壌適応木本植物の実用化への展開とともに、*A. mangium* と耐酸性イネ科植物ハイキビ *Panicum repens* のストレス応答遺伝子の解析なども試みられた (Matoba et al. 2008)。しかし当時は植物の酸性ストレス応答の分子レベルでの知見はきわめて限られており、この解析も萌芽的な段階にとどまるものであった。本学位論文の研究内容は、このプログラムの研究を基盤にしつつ、プログラム終了後に *A. mangium* について新たな展開を図ったものである。

本研究の大目的は、環境抵抗性植物 *A. mangium* の酸性土壌適応機構の分子レベルでの理解と、それに関与する遺伝子の検出、有用リソースとなり得る抵抗性遺伝子候補の獲得である。しかし、*A. mangium* はモデル植物のように実験系統が確立しておらず遺伝的な個体差が大きい木本植物である。このため、分子レベルでの実験系を確立するために、実生における低 pH と Al ストレス応答に関連した成長応答と組織化学的性質の検討を行うとともに、培養細胞系を確立し、これらの実験系の有効性についての検討を行った。そして培養細胞系

を有効に利用し、低 pH と Al ストレスに対する転写応答解析を行い、多数のストレス応答遺伝子を検出した。さらに、遺伝子機能の解析のリソースを獲得するために、検出された遺伝子の全長 cDNA のクローニングに重点を置いた。その結果、酸性土壌適応に関与すると思われる遺伝子が *Acacia* 属植物の EST データベースには未登録だったものを含めて多数クローニングされ、これらの環境抵抗性との関連性についての考察を行った。

本論文の内容の一部は、Mizuno et al. (2014) で発表した。

材料と方法

1. 植物材料と試薬類

1-1. *Acacia mangium* 実生

1-1-1. 種子の発芽処理と前培養

(a) 方法1：寒天固化培地の利用

Acacia mangium の種子は B&T World Seeds (Aigues-Vives, France) より入手した。付着している果肉を取り除いた種子約 1 g を、50 ml ポリプロピレンチューブに入れ約 10 ml の濃硫酸を加えて激しく攪拌し、8 分間放置後、水に色が付かなくなるまで水道水で水洗した。約 40 ml の種子滅菌溶液 (9% (w/v) 次亜塩素酸カルシウム、0.02% (v/v) polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate) を加え 20 分間穏やかに攪拌して種子を滅菌し、滅菌蒸留水で十分洗浄した。滅菌蒸留水 25 ml を加えて穏やかに攪拌し、1 日おきに滅菌蒸留水を交換しながら 3 日間種子を吸水させた。吸水後の種子は、容器の下半分を黒画用紙で遮光したプラスチック容器 (80×110×150 mm) 内の 0.3% (w/v) 寒天 (700 ml; 培地用寒天・BA-10; 伊那食品工業) 上に播種し、人工気象装置 (LPH-350S; 日本医化器械製作所) 内で 30°C、12 時間明期 (27,000 lx) /12 時間暗期の条件下で培養した。

(b) 方法2：液体培地の利用

A. mangium の種子を濃硫酸で 5 分間処理し、水道水で十分に水洗して流水で一晩吸水させた。種子は、園芸用品のプラスチックメッシュ (目開き 1.2×1.2 mm) 上に播種し、それをプラスチック容器 (120×180×60 mm) 内の蒸留水 (300

ml) に浮かべ、人工気象装置 (FLI-301N; 東京理化工機) 内で 30°C、12 時間
明期 (25,000 lx) /12 時間暗期の条件下で発芽させ、引き続き培養した。

1-1-2. 発芽後の実生の培養

(a) 培地組成

以下の基本培地に、目的に応じて pH 調整と AlCl₃ 添加を行った (2-1 項)。

(a-i) 栄養液

Osaki et al. (1997) に基づいて調製した。組成は次の通りである : 374.8 μM
NH₄NO₃、6.41 μM NaH₂PO₄·2H₂O、86.1 μM K₂SO₄、201.2 μM KCl、340.1
μM CaCl₂·2H₂O、81.1 μM MgSO₄·7H₂O、7.2 μM FeSO₄·7H₂O、2.2 μM
MnSO₄·4H₂O、8.1 μM H₃BO₃、0.7 μM ZnSO₄·7H₂O、0.04 μM CuSO₄·5H₂O、
0.004 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O。

(a-ii) 1/5 Hoagland 水耕液

Hoagland's No. 2 Basal Salt Mixture を Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,
USA) より購入し、調製した。

(b) 培養法 1 : 栄養液寒天固化培地

pH を調整した 1.2 倍濃度の栄養液 250 ml と 6% (w/v) 寒天 50 ml を個別に
オートクレーブ滅菌した後、それらをよく混合して、プラスチック容器
(150×200×55 mm) に流し込んで固化させた。これに実生を移植して、蓋を
被せ(実生の上部にあたる一边をサージカルテープ、残りの三辺をビニールテー
プで封をした)、容器の下半分を遮光した。これを人工気象装置 (LPH-350S)
内で斜めに立てた (サージカルテープで封をした辺を上にした) 状態で 30°C、
12 時間明期 (27,000 lx) /12 時間暗期の条件下で培養した。

(c) 培養法 2 : 栄養液液体培地

底部を切除し適当な大きさに整形した PCR プレート (CatNo. 35801;
Sorenson BioScience, Salt Lake City, UT, USA) に、1 プレートあたり 10~
12 個体になるように実生を移植した。これをプラスチック製の pasta ケース

(φ 90×270 mm) 内の pH および AlCl₃ 濃度を調整後の栄養液 1,000 ml に浮かべ、人工気象装置 (LPH-350S) 内で 30°C、12 時間明期 (27,000 lx)/12 時間暗期の条件下で水耕栽培した。

(d) 培養法 3 : 1/5 Hoagland 水耕液

(c) と同様の加工を施した PCR プレートに、1 プレートあたり 35~40 個体になるように実生を移植した。これをプラスチック容器 (180×270×180 mm) 内の 1/5 Hoagland 水耕液 5000 ml に浮かべ、人工気象装置 (FLI-301N) 中で水耕栽培した。栽培期間中は 5 日おきに水耕液の交換を行った。

1-2. *Acacia mangium* 培養細胞

A. mangium の胚軸から誘導されたカルスを 1 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l kinetin, 3% sucrose を含む Murashige-Skoog (MS) 液体培地 (pH 5.8) を用いて 25°C、暗黒下、140 rpm で巡回培養した。継代培養は、3 週間ごとに培養液 50 ml を 200 ml の新しい液体培地に植え継ぐ方法で行った。

1-3. 試薬類

無機および有機化合物と溶媒類は、和光純薬工業から販売されている製品を使用し、原則として生化学用または特級品を用いた。それ以外については製造元をカッコ内に示した。

設計を行ったプライマーは、北海道システム・サイエンスに合成を依頼した。

2. ストレス処理

2-1. 実生のストレス処理

2-1-1. 根の伸長測定のためのストレス処理

実生は 1-1-1 (a)の方法 1 により培養した播種後 7 日目のもの (根長 5 ± 1 cm) を用いた。

低 pH ストレス処理として、寒天固化栄養液の pH を 6.0、4.3、3.5、3.0 に調整し、実生を 1-1-2 (b)の培養法 1 により 10 日間培養した。

Al ストレス処理として、各濃度 (0、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 mM) の AlCl_3 を添加した栄養液 (pH 4.3) を用い、実生を 1-1-2 (c)の培養法 2 により 10 日間または 14 日間水耕栽培した。

2-1-2. 既知 Al 抵抗性遺伝子ホモログの検出と転写応答解析のためのストレス処理

実生は 1-1-1 (b)の方法 2 で 2 週間経過後、1-1-2 (d)の培養法 3 で 3 週間水耕栽培したのを用い、プレートごとに各処理に応じた水耕液の入った容器に移し替えた。水耕液は次の通りである：低 pH 処理、硫酸で pH 3.0 に調整した 1/5 Hoagland 水耕液；Al 処理、硫酸で pH 3.0 に調整し 5.0 mM の AlCl_3 を添加した 1/5 Hoagland 水耕液；コントロール、pH 6.0 の 1/5 Hoagland 水耕液。処理は、明暗の切り替わりによる遺伝子発現の変化をバックグラウンドとして検出しないように、明期開始の 3 時間後に行い、開始から 1 時間と 24 時間後に根を回収した。

2-1-3. DDRT-PCR 法で得られた遺伝子の器官別転写解析のためのストレス処理

1-1-1 (a)の方法 1 により培養した播種後 8 日目の実生 (根長 5 ± 1 cm) を、

1-1-2 (c)の培養法2で栄養液 (pH 5.8) を用いて11日間水耕栽培した。ストレス処理は、実生を植えたプレートにpH 5.8、pH 4.3、pH 3.0、0.1 mM AlCl₃ (pH 4.3)、2.0 mM AlCl₃ (pH 4.3)、5.0 mM AlCl₃ (pH 4.3)の各条件の栄養液の入った容器に移し替える方法で行った。植物体へのストレス処理は、2-1-2と同様の理由から、明期3時間目から開始し、処理から1時間と24時間後に実生を回収し、地上部と根をメスで切り分けて実験に用いた。

2-2. 培養細胞のストレス処理

2-2-1. 細胞増殖測定のためのAlストレス処理

コーヒー *Coffea arabica* の培養細胞系におけるAl毒性の研究 (Martínez-Estévez et al. 2001) で用いられた1/2 MS培地を用いる実験系を用いた。継代から3週間後の細胞培養液30 mlを0、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 mMのAlCl₃を含む1/2 MS培地 (1 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l kinetin, 3% sucrose, pH 4.3) 120 mlに移し、25°C、暗黒条件、140 rpmの条件下で15日間旋回培養した。培養後、細胞を吸引濾過により回収して生重量を測定した。

2-2-2. ストレス応答遺伝子の探索のためのストレス処理

(a) 低pHおよび低pH/低濃度Al処理

継代後13日目の培養細胞を用いた。150 mlの細胞培養液にフィルター (0.22 μm; Millex-GV; Merck Millipore, Billerica, MA, USA) 滅菌した0.5 M硫酸を450 μl添加することでpH 3に調整したものを低pH処理とし、細胞培養液にフィルター滅菌した0.5 M硫酸450 μlと1.0 M AlCl₃水溶液150 μlをそれぞれ添加してpH 3、0.1 mM AlCl₃にしたものを低pH/低濃度Al処理とした。細胞培養液に滅菌超純水600 μlを添加したものをコントロールとした。処理後25°C、暗黒下、140 rpmで旋回培養を行い、1時間と24時間後に細胞を回収した。

(b) 高濃度 Al 処理

継代後 13 日目の細胞培養液 150 ml を吸引濾過して回収した細胞を、終濃度 2.0 mM および 5.0 mM の AlCl_3 を添加した 1/2 MS 培地 (1 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l kinetin, 3% sucrose, pH 4.3) 150 ml に移植した。回収した細胞を AlCl_3 を含まない 1/2 MS 培地 (pH 4.3) に移植したものをコントロールとした。(a) と同様に巡回培養し、24 時間後に細胞を回収した。

2-2-3. 既知 Al 抵抗性遺伝子ホモログの検出と転写応答解析のためのストレス処理

継代後 13 日目の培養細胞を用いた。低 pH 処理は 2-2-2 (a) と同様に、150 ml の細胞培養液にフィルター滅菌した 0.5 M 硫酸または 1.0 M 塩酸を 450 μl 添加して pH 3 に調整し、滅菌超純水 450 μl を添加したものをコントロールとした。Al 処理は 2-2-2 (b) と同様に、吸引濾過により回収した細胞を、0.1、2.0、5.0 mM の AlCl_3 を添加した 1/2 MS 培地 (1 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l kinetin, 3% sucrose, pH 4.3) 150 ml に移植し、 AlCl_3 を添加していない 1/2 MS 培地 (pH 4.3) に細胞を移植したものをコントロールとした。2-2-2 と同様に巡回培養を行い、低 pH 処理では 1 時間と 24 時間後に、Al 処理では 24 時間後に細胞を回収した。

3. 組織化学的方法

2-1-1 で得た 14 日間水耕栽培後の根を用いた。

3-1. ヘマトキシリン染色

Zhao et al. (2009c) に基づく方法で行った。根を滅菌蒸留水で 3 回洗浄し、ヘマトキシリン染色液 (0.2% (w/v) ヘマトキシリン一水和物、0.02% (w/v) KIO_3) に浸漬して 30 分間穏やかに攪拌しながら染色した。滅菌蒸留水で染色

液を軽く洗い流した後に、30 分間穏やかに攪拌しながら洗浄した。システム顕微鏡 (BX60; オリンパス) を用い、明視野像を観察した。

3-2. モリン染色

Larsen et al. (1996) に基づく方法で行った。根を 0.5 M MES (2-morpholinoethanesulfonic acid)-NaOH (pH 5.5) で 10 分間洗浄した後、モリン染色液 (0.1 mM モリン (2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone; Sigma-Aldrich)、0.5 M MES-NaOH (pH 5.5)) に遮光状態で 60 分間浸漬し、0.5 M MES-NaOH (pH 5.5) で数回洗浄した。システム顕微鏡を用いて蛍光像 (励起波長; 420 nm) を観察した。

3-3. エバンスブルー染色

Yamamoto et al. (2001) に基づく方法で行った。根を 0.1 mM CaCl_2 (pH 5.6) で 3 回洗浄し、エバンスブルー染色液 (0.025% (w/v) エバンスブルー、0.1 mM CaCl_2 (pH 5.6)) に浸漬して 10 分間穏やかに攪拌しながら染色し、0.1 mM CaCl_2 (pH 5.6) で 3 回洗浄した。システム顕微鏡を用い、明視野像を観察した。

4. 分子生物学的方法

4-1. Total RNA の抽出と first strand cDNA の合成

Total RNA は CTAB 法 (Chang et al. 1993) により抽出し、得られた total RNA サンプルの精製とサンプル中に混入している genomic DNA の分解は、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) と RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いてマニュアルに準じた手順で行った。

First-strand cDNA 合成は、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて行った。

4-2. ストレス応答遺伝子の検出

低 pH および低 pH/低濃度 Al 処理に応答する遺伝子の検出には 2-2-2 (a)、高濃度 Al 処理に応答する遺伝子の検出には (b) で得られた培養細胞に由来する first-strand cDNA を PCR の鋳型として用いた。

4-2-1. Differential display RT-PCR (DDRT-PCR) 法

DDRT-PCR 法は Yoshida et al. (1994) により報告された簡易 DDRT-PCR 法に若干の変更を加えて行い、任意プライマーには RAPD (random amplified polymorphic DNA) プライマー (OPA01~OPE20, OPERON 10mer kits; Operon Technologies, Alameda, CA, USA) を用いた。遺伝子断片の増幅反応は、100 pmol のシングル RAPD プライマーを用い、12.5 ng の first strand cDNA を鋳型にして GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) により行った。PCR 装置には Thermal Cycler MP (タカラバイオ) または Thermal Cycler Dice Gradient (タカラバイオ) を用い、温度条件は、94°C・5分を 1 サイクル、[94°C・1分、35°C・1分、72°C・2分] を 40~45 サイクル、72°C・5分を 1 サイクルとした。反応後、1.5%アガロースゲル (L03; タカラバイオ) により PCR 産物の電気泳動を行い、エチジウムブロミド染色後、UV 照射下で増幅産物のバンドパターンを視覚化した。

電気泳動により得られたバンドパターンの比較をコントロールとストレス処理を加えたサンプル間で行い、異なる増幅パターンを示したバンドをゲルから切り出した。バンドの切り出しは、高濃度 Al 処理の転写応答解析では発現レベルが上昇した遺伝子に由来すると予測されたバンド、低 pH および低 pH/低濃度 Al 処理では上昇および低下したバンドについて行った。切り出したゲル片から DNA の回収には、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用い、回収された DNA 断片は pGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いてクローニングし、バンドごとに 4 クローンの塩基配列を後述 (4-5) の方法で決定した。

4-2-2. 半定量 RT-PCR による発現パターンの確認

DDRT-PCR 法によって検出された遺伝子断片の塩基配列から、GENETYX-MAC Ver.12 (ゼネティックス) を用いて遺伝子特異的プライマーを設計した (Table 1)。RT-PCR 反応は、フォワードおよびリバースプライマーを 4 pmol ずつ使い、25 ng の first strand cDNA を鋳型にして GoTaq Green Master Mix (Promega) により行った。PCR 条件は、94°C・5分を 1 サイクル、[94°C・30秒、55°C・30秒、72°C・30秒] を 22~40 サイクル、72°C・5分を 1 サイクルとした。内部標準として、*GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) 遺伝子を用いた。増幅には、Zhen et al. (2007) に記述されたサイズの *GAPDH* 特異的プライマーを用いたが、得られた増幅産物の塩基配列を解析し、このプライマーが *A. mangium* の *GAPDH* を増幅することを確認した上で使用した。

4-3. Degenerate PCR 法による既報 Al 抵抗性遺伝子ホモログの検出

モデル植物や穀類などのプロトン耐性および Al 抵抗性関連遺伝子 7 種類 (*ALMT*、*MATE*、*STOP1*、*STAR1*、*ALS1*、*ALS3*、*NRAT1*) について、データベースに登録されている遺伝子情報から degenerate プライマーを設計した。設計した degenerate プライマーの配列は Table 2 に示した。PCR 反応は、フォワードおよびリバースプライマーを 10 pmol ずつ使い、2-1-2 と 2-2-3 に由来する first-strand cDNA の等比混合物 25 ng を鋳型にして GoTaq Green Master Mix により行った。PCR 条件は、94°C・5分を 1 サイクル、[94°C・30秒、40°C・30秒、72°C・1分] を 40 サイクル、72°C・5分を 1 サイクルとした。増幅産物を 4-2-1 と同様の方法でゲルから回収、クローニングし、塩基配列を決定した。

4-4. 全長 cDNA クローニング

DDRT-PCR 法に基づいて検出されたストレス応答遺伝子には 2-2-2 (a) と (b)、既知 AI 抵抗性遺伝子ホモログには 2-1-2 と 2-2-3 に由来する total RNA を用いた。

4-4-1. 3'および 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)

半定量 RT-PCR によりストレスに応答して転写レベルが増大していることが確認された遺伝子と degenerate PCR 法により検出された既報 AI 抵抗性遺伝子ホモログについて、RACE 法による 5'及び 3'未知領域の塩基配列解析を行った。RACE PCR に用いた cDNA は GeneRacer Kit (Life Technologies) により調製した。また、RACE PCR に用いた特異的プライマーは GENETYX-MAC Ver.12 を用いて設計した (Table 3)。First RACE PCR は、30 pmol の GeneRacer Primer と 10 pmol の遺伝子特異的プライマーを用い、50 ng の RACE ready cDNA を鋳型にして Ex Taq DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて行った。PCR 条件は、94°C・5分を1サイクル、[94°C・30秒、65°C・30秒、72°C・1分/1 kbp] を 35 サイクル、72°C・5分を1サイクル行った。続く nested PCR は、10 pmol の first RACE PCR 産物を鋳型にして Ex Taq DNA Polymerase を用いて行った。温度条件は、94°C・5分を1サイクル、[94°C・30秒、65°C・30秒、72°C・1分/1 kbp] を 30 サイクル、72°C・5分を1サイクル行った。得られた増幅産物は 4-2-1 の方法でゲルから回収、クローニングし、塩基配列を決定した。

4-4-2. PCR による全長 cDNA のクローニング

RACE 法により明らかになった塩基配列から目的遺伝子の全長 cDNA を増幅するためのプライマーを設計した (Table 4)。PCR による全長 cDNA の増幅反応は、フォワードおよびリバースプライマーを 10 pmol ずつ用い、25 ng の first strand cDNA を鋳型にして PrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカ

ラバイオ) を用いて行った。PCR 条件は、98°C・5分を1サイクル、[98°C・10秒、65°C・15秒、72°C・1分/1 kbp] を35サイクル、72°C・5分を1サイクルとした。得られた増幅産物は4-2-1の方法でゲルから回収した。

ストレス応答遺伝子の全長 cDNA クローニングには、pENTR/D-TOPO または pCR8/GW/TOPO ベクター (Life Technologies) を用いた。pENTR/D-TOPO にはゲルから精製した増幅産物をそのまま挿入したが、pCR8/GW/TOPO には 3' A overhang の付加反応を行った増幅断片を挿入した。付加反応は、Taq DNA polymerase (タカラバイオ) と dATP を用いて、70°C で2時間行った。TOPO 反応はマニュアルに従って行った。また、既報 AI 抵抗性遺伝子ホモログの全長 cDNA クローニングには、pGEM-T Easy Vector System を用いた。

大腸菌からプラスミドの回収には PureYield Plasmid Miniprep System (Promega) を用いてマニュアルに従って行った。

4-5. シークエンス

シークエンスの解析は Dye Terminator 法により行い、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を用いて行った。反応条件と産物の精製はマニュアルに従って行った。シークエンス反応産物のキャピラリー電気泳動とシークエンスの読み込みは日本大学生物資源科学部総合研究所に依頼した。

4-6. データ解析

得られたシークエンスデータの相同性検索は、NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて行った。機能分類は、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) の BRITe Database (http://www.genome.jp/kegg/brite_ja.html) に基づいて行った。膜タンパク質の予測は、SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) と TMHMM (TransMembrane predicted using Hidden Markov Models;

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) に、ドメイン検索は SMART (Simple Modular Architecture Research Tool; <http://smart.embl-heidelberg.de/>) に、シグナルペプチド予測は SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) に基づいて行った。

4-7. クローニングした遺伝子の転写応答解析

DDRT-PCR 法で検出された 58 遺伝子のうち 37 遺伝子について実生 (2-1-3) 由来の cDNA を用いた器官別転写解析を行った。また、既知 AI 抵抗性遺伝子ホモログの 6 遺伝子については、実生 (2-1-2) と培養細胞 (2-2-3) 由来の cDNA を用いた転写解析を行った。前者の実生 (2-1-3) と後者の培養細胞 (2-2-3) を用いた解析には、獲得された全長 cDNA の塩基配列に基づいて配列の反復箇所などを避けて設計した特異的プライマーを使用した (Table 5)。後者の実生 (2-1-2) を用いた解析には degenerate プライマーを用い (Table 2)、増幅産物の塩基配列を確認した。PCR 反応は、フォワードおよびリバースプライマーを 4 pmol ずつ用い、25 ng の first strand cDNA を鋳型にして GoTaq Green Master Mix を用いて行った。PCR 装置は 3-2-1 に記載した 2 機種または Thermal Cycler Dice *Touch* (タカラバイオ) を用いた。PCR 反応の温度条件は、94°C・5 分を 1 サイクル、[94°C・30 秒、55°C・30 秒、72°C・30 秒] (degenerate プライマーを用いた解析では、[94°C・30 秒、42°C・30 秒、72°C・30 秒]) を 22~40 サイクル、72°C・5 分を 1 サイクルとした。サイクル数は遺伝子ごとに調節した。内部標準には *GAPDH* 遺伝子を用い、2-1-2 を用いた解析には 4-2-2 のプライマーを使用した。2-1-3 と 2-2-3 を用いた解析では内部標準のために *A. mangium* の *GAPDH* 遺伝子の全長 cDNA をクローニングして塩基配列を決定 (DDBJ, DNA Data Bank of Japan 登録番号: AB839225) して、特異的プライマーを設計した (Table 5)。

5. 有機酸の分析

5-1. 有機酸分析サンプルの調製

2-2-3 で述べた方法で 24 時間の Al 処理 (0、0.1、2.0、5.0 mM の各条件) を加えた細胞を用いて有機酸分析サンプルの調製を行った。有機酸分析サンプルの調製は Sasaki et al. (2004) の方法に基づき、若干の変更を加えて行った。すなわち、ストレス処理を加えた細胞を 150 ml の Ca medium (3.0 mM CaCl₂、3% (w/v) sucrose、pH 4.3 (Ikegawa et al. 2000)) を用いて 2 回洗浄し、細胞 2 g を 150 ml の Ca medium に移し変えて 24 時間培養した。

24 時間培養後に、培養液を孔径 40 μm のメッシュ (Falcon 40 μm Cell Strainer; Corning International, Corning, NY, USA) で濾過し、細胞と培地を分離した。培地中の有機酸の抽出は Waters Accell Plus QMA (Waters, Milford, MA, USA) を用いた固相抽出により行った。すなわち、10 ml の超純水に続いて 10 ml の 0.1 M NaOH でコンディショニングを行ったカートリッジに、培地 30 ml を流して有機酸を吸着させた。その後、カートリッジを 10 ml の超純水で 3 回洗浄し、1 ml の 0.1 M HCl を用いて有機酸を溶出させた。

ガスクロマトグラフィー (GC) 分析に用いたサンプルは Millex-LH (Merck Millipore) で、超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) 分析に用いたサンプルは Millex-LG (Merck Millipore) を用いて濾過した。

5-2. 有機酸分析

GC による有機酸分析は、東京化成工業株式会社 大貫裕之博士に依頼した。UPLC による分析は ACQUITY UPLC (Waters) を用いて行った。カラムは ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm; 内径 2.1×長さ 150 mm) (Waters) を用い、移動相は 5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.8)、流速 0.5 ml/min、注入量 5 μl、カラム温度 30°C、検出波長 210 nm の条件で分析を行った。

6. H⁺排出活性の測定

Guo et al. (2013)の方法に若干の変更を加えて行った。2-2-2 (a)の方法で培養細胞の低 pH 処理を 24 時間行い、細胞を吸引濾過により回収した。回収した細胞を 150 ml の test solution (1.0 mM CaSO₄、0.5 mM K₂SO₄、0.5 mM Na₂SO₄、3% sucrose、pH 5.8 (Yan et al. 1998 を改変))で 2 回洗浄し、孔径 40 μm のメッシュで濾過して回収した。回収した細胞 0.5 g を 0.04% (w/v)ブロモクレゾールパープル、1.0 mM CaCl₂を添加した 0.75% (w/v)寒天 (pH 6.0)上にスポット (直径 14 mm) して、ブロモクレゾールパープルの色調の変化を観察した。

Table 1. Primers used for semi-quantitative RT-PCR analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer
A01c-1	CCCTCCAAGTTAGTCTCGTC	CGGAGTTTAAGCAGAAGGTG
A02c-1	AGAACCAGGAGGCCGCCGAGAC	GGCAGTTGCCGGCCTCATGCAC
A04c-1	TCACACGCGCTCCCAGCAGTAG	CCTATGGAGCACCGCCAGGAC
A05c-1	GATTTCCACTCGCCACATGTTACTGTGT	CCAACCAGTGAGTTCCTCAATGGGTT
A05c-2	GAAGGTGTTATTGGCAGCAC	CATATGCAGTTTGGGCGAAG
A06c-1	TGTTAGGGGAGCTCTAAAAGGCAAGACTG	AGTTCCATAGAAGTCTCGTGTGCTGCTAC
A07c-1	TGATACACCCCGTGTGAGAAGG	CCACCAGCGGTCCAGTATCTCTG
A07c-2	CATGTGTACGCCATGGGAAGGATGGAGAA	TAAACGGATCTCTCGCCACATACCTCCACT
A08c-1	GCACACAGAACTCTTCGTTCTGTGTTCCA	CTCTCTGGGTTCCCTTTTCGATAGCCTT
A09c-1	ATAATCCATGCGTCTCGCAGGGCTTCGT	AGGCTCCATTGCCGAGAGAAAAGAAGCGT
B01c-1	CCCAGCAAACAACCGAACCATTCAAGTTGTC	GTGGAGGAAAGTAACAGTTCCTGGGCAGCTT
B03c-1	AATCAGAGAGGGTACTCAAG	GAAGACCTTATGGATGACAC
B04c-1	AGAGGACTCCATTGACATGCT	CAAACAGACCCATCCAATCCC
B05c-1	CATGCCAGAGTTTGTGACCTG	AAGGCCATCTTGACTAGTGCC
B05c-2	CTTGAGGAGAGGTATGGTGTGTC	TGCACTAGCTGAACCATCTC
B06c-1	ATTTGCTCCTTGGGCGGTGA	CGGCTGACTCCTCTTCTGGAC
B06c-2	CTTGGCTGTCACTTGAGAGCTG	CAATCCTGACGCTTTCCCATCC
B06c-3	GATATCCGTTCCACCAGGAG	TTGAAGCCATCGATCCTGAC
B07c-1	ATCACTGGTTCGTGGCTCTG	GACAGTGGCCGAAAGCTAAGG
B08c-1	CTGAACAAGATTGGCCACGTGAA	CGTGGGGTTGGAAAATTCGCTCAA
B09c-1	AGGTGGCTCTGTAGTACGGTC	GTGCAGGTGAATGCTTTTGCTC
B09c-2	CAAACCACATCTCCCTTCATAGCCGAAA	TGTTGATGAGGGCGGACTATGGAAGA
B10c-1	ACCATGTCATTACCTGGAGACGATCCT	GGAACCTGAAGTCAGAGCCCTATATCCCTT
B10c-2	AGTTGAGCTTGATCCTCCAG	GCTGGCAGTGAATATGTGTC
B12c-1	GTTACGCAGACAAGAGTACATTCCATCGT	ACTATCCAAC TAGCTAGTTGGTCCCCTCA
B16c-1	GAGCGCCGATAATGTCGTCATC	TGACCCGGTCTAGGCTAGATTCC
B16c-2	TCCAGCAATAGGCTGGTTCACCTCAAGGT	TGTTGGCCCCATTCTATTGATGACGGAA
B16c-3	CCTCCAAC TAGCCTTAGCAGCA	TGCCTTGGTATGGCACTGTCTC
C01c-1	GCTCTACGTACGATGTAGACTC	AGATAGCCTGATCCGTTCTG
C01c-2	TCTACTGTGGAGACATTGCCAG	AACTGTCCAAGGACTGAGGAA
C01c-3	GCATTGGAAGGGATTCTAGCTG	AGACCTGAGGTCGAAAGCTTAC
C01c-4	GTTGCTGAAGGCAGAGCCAG	AAATCGAGGGCGGTGGAGGAG
C02c-1	CGAGGTTGCACCTTACAAGTCAG	ATACTGCTGAGGACCGAGCATA
C03c-1	TTGGTCATACATCCACCTTG	GAAGCAGTTGCAAAGGAAGAC
C04c-2	AACGAGCAACGTCGTGCCTT	ATGTAGTGCGCCAAGCCTCA
C04c-3	GCTCCAGATCTAAGCAGCTCAC	TCGACTGGCTTCAAGAGAACAC
C04c-4	CAGTTGACGCCAAGAGTGGAAG	TCTGGGTACAGTGATCGACCTC
C06c-1	GGCCCTATTCCTCCACACCTCTG	TACGGCAGCACCGGATATGAGTG
C07c-1	GTGGCACTATTAGGATTCGCGTTGAAGAG	GACAGCAACCATCTTAGCTAGGCCAAA
C08c-1	ACTTGGATCGGCCCTGCACTTC	CCATGACCTGTGGTCTGCCAAC
C08c-2	TTTGGGGTATCTTGTGTCAGTC	TTGTACCTTGGATTGGTGG
C09c-1	GAAACGAAGAGCCGTAGCTTCTG	CAGGTACCACACAATCTTGGCTC
C09c-3	TAAGTAGGTGGTTTGGGCTAGG	AGGCACTTTAGTGCAAACCAAC
C10c-1	GAGCATGAAACTAACAGGGATG	GGTATCAAAGCTCTAGGGTTTC
C11c-1	GGAGGAATCCCATGCTATGCCTACT	AAGAACATCCATACCGCCATCTCTTC
C11c-2	TCATCGGGTCCGATCCTTCTGTG	ATCTCCGCTGCATATCCTCTCTG
C11c-3	AAGATCCGAAAGCCTCCGCTTCC	ATGAAGTCGTCGACCGGAACGTG
C14c-1	AGGAAATCGAGGGAGTGGGTTT	ACGCCGGCTTTTAGATCCTTGT
C14c-2	CGCGATGTTAGTCCGTGCGAC	TGACATTTGCCCTGCGCTCTG
C17c-1	AACTCGAAGCCCTGTCCCAAGTGCAA	ACCATGCACCAAGGCATAGCCAGCAA
C17c-2	TCAAAACAGGAGCTCAATTGCAC	GCATTGAACTTGGCGACTTCAC
C19c-1	ATAGGTCTTTTCGAGGCCTGAAC	GGAAGAGGAGCAGAAGGCTAAC
C21c-1	ATGATGGCACTTCGCTACCTTC	CAGCAGGTTCTCAATCTCGGTG
C21c-2	GTACAGAGTGCTCATGACACAG	TCCTCCATAAATACCACAGCAG

Table 1. Continued

D02c-1	AGAGCATCTTCTCCACGCCGGAA	GATAATTCGCCGCCAGCTCCGAC
D02c-2	CCTCAAACACCCTGAATTGCTG	CGAAGGAGAAGTCGAGGTGATG
D02c-3	CCGTGGCGTCATCGGCGAACAG	TGCGGTGATGCGTCCGACACAG
D03c-1	TTGGAGTCCGTGGACATAGCTG	ATCGGACGGGTGGTATCTGATG
D03c-2	GGTCCCTTATCAGCTGCCTTGAC	GCCTTCTTTTCATCGTCCGGAAG
D04c-1	TCCTTGGTGAGTCTGACAACCTG	GCTTGATGTGACTAACCCTGCT
D05c-1	GGTGACAAGCCTCCAAACCTGA	CCACCAGTGAGCAAGGCCTATG
D07c-2	CCCAGTATTCGTTTCCGTTGTG	CCTATCACCTGACCACTTCCCTG
E02c-1	AACGTTACATGCCTTGACATCAG	ACATTCTGCATTTCCAGGACGA
E05c-1	CCATGTCATATCTAATTTGCCT	TATTCTTTCTCTCGACTTGGA
E05c-3	AACTGTCCCAATTGATCACTAC	CCCATTGGAGGAAGCTGA
E06c-1	ACTGCTGTGAGGTTTCTTCCACCTT	AGCAGAGTACATTCCAGCGGCTCTT
E08c-1	TCCCTTATCTTGCTCCTGCAAC	GGGTAGGGTTTACGACTTCGAC
E08c-2	GTCGCCTTCTCAGAAGCACTC	TTGAATTGCCCAAACAAGCTG
E09c-1	TGCTGAAGGCCAGATAGAGAAG	TCCACAGCAGTATCTTTCCAG
E09c-2	CATCTTCAGAAGCACCCACTAC	CAGTGGAGTATGATGAGCAAGG
E09c-3	TATAGGAACGGTAGCAACCCCT	AGCTTCTGTGGTACCTTGGTTC
E09c-4	CTTAACAGCACCCAAAAGCGAC	AGGAAGGTTAACGGCTCTACAC
E10c-1	TGTTGCAGTGGAGGCTACAGAACCAGA	TTGGTTGCACCACTGGACCTGACACTAC
E12c-1	GGGAGACAGATGGAACGATTGTGCCGTGGA	TGATGCATAGATCGCCCCAGTCCAGTT
E12c-2	TCTATCTCTGCATCGCCCCCTTC	AGAATGTCGCCGCAGATACTCTC
E13c-1	AGGGCTACTGCAATGGAAGGAACAGAGA	GGTTACACGTTTCTTTTGGCCACCTGAGA
E14c-1	GGAGATGATTGTGGGACCTACAAAGACACT	GAGGTGTACAATCTGCTGCAAGCACTTC
E15c-1	GCTTACGGTACGACATAGATCAACGGCAAA	GTTCCCTCATTCCACTTGTGGGAAAGGT
E16c-1	ATCCCGGACGAGAGTGACCCTG	CAGTCCAGGTCGACGGTTGCTG
E18c-1	TGTGTTAGGGGAGCTCTAAAAGGCAAGAC	TCCATAGAAGTCTCGTGTGCTGTACCA
E19c-1	CGGCTGGTACCATTTCGATGT	ATATTTCAAGCCGGCTTCCGT
E19c-2	GGAATGGAGTGATGTCAGGAAGCAAAG	CACTAACTGCATAAGCACGAACCTCTTCAC
E20c-1	GGTTCATACGGGTGATATCGGG	GCCATACTGTGCTCTGGGACTC
E22c-2	CGGAATCTGGTAAGGGTACTC	CTTCACTGTGCTGTTGCTTC
E23c-2	CGTTTGCGTCTTCGATTGGTAG	AATCACCGCGATACAGAACGAG
E23c-3	AGGATCCTGATGAACGAGGCTG	CTGCGAGTAATCGGACTGGGTG
E23c-4	GCTGTTCTGTCACCATGCAC	TGGCTTTCAGAGTGGTCGAG
E24c-1	CATTCACCCTCTTGTACCTC	CAGACACTATGGTTAGGCTG
E24c-4	TTTCTCTGACCTAATGCTCACTCTCA	AAAATCAGAGGCCACTGTGCTCCAA
E25c-2	TGGTTATGCTGCATTCCGAGACGCAA	GAAGAGGGGCTGGCAATAAACCTGGTAAG
E26c-4	CTTCCCTTCACTTTTGCACATTCC	TACCACAGACTATTCGGGAGGTAAG
E27c-1	GCTGAGGAGTTTCGTTTGCTC	GCCCCTCTAATCCTAAACCAC
E27c-3	GAAGGATGAGGGAAATCTCCAA	GTACTTGTGCTTTCAGGTCAG
E28c-2	CAAATACTTGCTAGTGGGAG	GTACAACCTTATGGCCTGATG
E28c-3	TCCCCAAACTCCAATTGCTGAC	GCAAGAGGACGACTCTATGCAC
E28c-4	TCTCGGTTACATCCTCTTGCTC	TCTACTTTCTCGGGAACCCAAC
A101-1	TCACTGTGGCTGAAATAACGTG	AGCGCTGTAAGTGATTCAACTG
A101-2	GAAGAGCGAGATCAGAGAGTAG	CAGTCTGCAAGTATACTGGTGT
A102	TGTGGTGACACGGAATCTGAAG	AATGCCGGCAATTTGACAGAG
A103-1	TCAGCCACCCTCATGTCCATTC	GGTCGACGGTGATGGAGAGTTG
A103-2	AGCAACTCTTGTATCGGCCGTTG	ACCCTGTCCTTACCCAGAGCTTG
A104	ATAAGCCTGCCTCGTAATCCTCC	GCTTATCCCACTAAGTGGGGTCA
A105-1	AAGAAATTCCTCGATAAAGCTG	TGGAGGTAGCATTTTACTGATG
A105-2	CAACCTCAGCCAAAATGTACAC	AACTCTCAAGCCGTATCGTAAG
A106	GCATCCAGCAACACCACGGACTG	CACGATGCGCGAGACGACTGAAC
A108	AGCCAAGAAAACCAGCTGGACAC	GGTCTTCATGGGCTAGGTGCTTC
A110	ACTCTCAGACTAACCTCTTC	ACTATTTACATCGGCAACTG
A111	ACCCTGGCTTGGTGGTCTCATC	TCCGACGTCGTTTCGGAATCGCA
A112	ACGTCAGGAGAGAATGTGTG	AACAGTACACCAGCACCTTG
A113	CTCGGCTGTAATCTATCAAGTC	ACACCTAATTTATCCGTTCTCTG

Table 1. Continued

A114	CTTGCAACCTCCGCCCGATGTG	GGGTGCGGCAGGAGATGATGGAG
A115	TGCGCCTGCAAACATGAACAGAC	GCTTCTGGCGGGTACTTCAGCA
A116-1	GCGTCGCAGTTTTCGAATGCAG	TGAACTGGAAGGGTGCACGAAG
A116-2	CACATCCTCCATGCATGTCC	ATATGGCTCCCGAATACGCA
A117-1	TACCAAAGGGGTCCATCATGAG	AATAACGGCAGTCTTGTGGTG
A117-2	CAGCCACTCCATTCTGTTGAG	CTTGGAAGTGACAATGGTCGAG
A118	GACATTCTGGGATGAGCTTGAC	AGTAGGTCTGCTGTTCCCGAAG
A119	AGCTGGTTCTCCAAGCTTCCTC	AGCTCAGCCTGTTGCTGTCAAG
A120	GATCCATCTGTGAAAACAAACC	ATTGTACAGGTAGATGGAAGTG
A121	TCAGGAGATAGACACCCCAAG	CCACAGCAGTAGTCATAGAAGG
A122	TTCATAATCCGCTCAACTTCTC	CATCACTCAGGTACATTTCTG
A123	GGAGTTTGGTCATACATCCAC	CAAGGGAAGCAGTTGCAAAG
A124-1	CCAAATAACACACTTCCTCAAC	CTTTTGGTTGTTACTGTCTC
A124-2	AACTCAGTAATCCCGCATGAG	AGTGCCTCTAACTCAGCACAAC
A125	TACTTGTCTTTGGACACTACTC	CATAGCTCAAAGGATGTGATG
A126	CCCATCAGGAAAGTCGTGAGTG	GACTTGGCAGAGACTGCTACTG
A127-1	CCCCTGGATTCTTGATCATCC	GCCAAATAGTGGTGGGGCTT
A127-2	GGATCACTGACCACAAAAGCTG	TGGCACCATAAAGAAATGGAC
A128	TGCAGCCACAATAGCTGCCTCTG	GTCTCCCACTTCTGTTGCTCGCT
A129	CATGACCATGTCACCAACGCAAG	GTTCCGGATGTCACTGGGTCTAC
A130	TAGTCTCAGTCTCTCCCTAAC	CATTGCCTTCAAGACGGCTATG
A131	TAGTCTCAGTCTCTCCCTAAC	CATTGCCTTCAAGACGGCTATG
A132	GCAGTGGTTCTGATGTGTTCCAG	CATAGTCGCGTACGGACTTCCAC
A133-1	GGCCATCATTATCCCTCTCTTC	GGACATAACCCTTGATGGTACGG
A133-2	CGGCAACAATGATACCATCCTC	CAACACCTTACTTGCTGCGT
A134	TGATTCGTCCAGCCAAAGACAC	GCGGGAACTCAAGAACAAGCAG
A135	CTACTGCTTCAAACAGGAACGA	GTAGTTCAGGAGAGTTGGATG
A136	CAAAGACATCCGCACTCAACAC	ACGAGAACAACCCAGAAACCAG
A137	CTTTTGGCTGCTATGCTCCTC	CCGTTCAAACAGCATCCCAAG
A138	GGCCTGTGGTTAGTCTTGCCATAC	GGATTCTTGGTCTCGATTGCCTG
A139	TTGGAGAGCTGGAATCTGAGTG	AATATTGGACCGGTGCGACTG
A140-1	AAGTCCTGATTATGTGATGG	CAAAGAAAACAACCAGTCTC
A140-2	CAGCCATATCCTTATGAAATGCC	TCTTCTTAGAGAAGGGTAGCGA
A141-1	TGGAATTGTGCCTACCCTTCAG	GCTCACTTTTAGCACCCGTACA
A141-2	CAGCAGCTCGATAACGTGTAG	TCAGAATCCACTTCAGTTCGTG
A142	GCAACGTTGAACGATGGAGATG	GGATTCCAGACATGCTTGCTGA
A143	GCGTCTTCAATCCACATACCTC	CTTGGACTTCATCGGCTGACAAC
A144	ACCAACAGACTAAGCAGCAC	TTTATTGCGTCCCGTCTTCC
A145	GACGAGATACCCATATCCAAGCC	GCTGCTCTAAGGATGACACTCTC
A146	TGACATGCCCAATAGTACCATC	GGAGAAGTCTTCTGTTGCTG
A147	TCTCTCCGTGGATAGTTGGGA	GAGATGCTTCGACTAATGCCCT
A148	TATGAACCTCTTAAGGGTTCAG	TAATCTTCCGGACATGATCAG
A149	TGCAGTTCAAGACTCAACCAAC	TTATCTAACTACCGCTCTCCT
A150	GCTGTGATCTGCTGAAGCAC	TGATATGCCTCGGATTGAGGAC
A151	ACTGGACCAGTATGAAGCTCTC	GTGGAGCAAAGGAACCTGAAG
A152	CCGGTCGATATCACATCCATGA	AATGGAAGGAACAGAGAGCAGT
A153	TTGAGCGCTATATCCGTGTAG	ATTCGCACCAAAATGATGCTTG
A154	CTGACTCAGCTTGGGAATGGTG	TCAAGAAGTGGCAAAGCTACGA
A155-1	CCACGTATCCAGTGGTTCGAAG	AGCGATGGTCATATACCAAGCGG
A155-2	TCCCACGCTTACTAGCTCAAGCA	AAGTTGAAGGCCATGACCCCTCT
A156	GACAGTTGCTGTGTGGTACCTC	CAACTTCAGGGAGTGCAGCATC
A157	GACTTGGTGGAAATGTAAGCTTG	CTCTGAGAACCCTAACACTC
A158	GCTGCACAGGGATCGATTTGGTG	AGGTCCTGGGTTGCAATGTCGT
A159	CCTCAACCAATAGCTCGTAGTG	TTTGAAAATGCCCTAGCAACTC
A160	CAAAGTCCCTTAATGAGGGT	GAGGCATTATACAACAGCGA
A161	GGACGCTTCCGTGAAAGTGGCTG	GTGGTGAAGCACGAAGGGCATGA

Table 1. Continued

A162	CACGCGGTATTTGAGCAAGCAG	GCCAGTTAAACCGAGGCGATGT
A163	AGGCAAAGGCGCAGTGAGTAGTG	CAGAGCTTGCCGGTACTGATGCC
A101'-1	ACATCGTCATTCTCCATCATCC	AAAGTTTCACCCACAACAAGAC
A101'-2	AGCCACAATCACCAATACTCTC	AGCCACTCATTGAAACAGCTAC
A102'	AGCAAGGCGGGATATAAAGGTG	ACAGACTCCGTACACATGCTCTG
A103'	TCACTTGGCAATGCACTGTCCAC	GAGCGTACTTCCAGGGCACTGA
A104'	ATGCCATCTCCTTCCCGAGACA	GTACGCCATGGGAAGGATGGAG
A105'-1	TGGGCATTGAAATACCTCACTC	CTATATGGGGCAGATGGCTATG
A105'-2	GTCATGGTAAGGCAAAGCAC	CAGAGAGTTGATGGGTATGGAG
A106'	GGAAC TTGATGAGTGAGGCAGAG	GGAAGTCAAGCTGTCATCACTGG
A107'	CCGTGGACGTGAAAGAGTGGCAG	GACGTGGCCCTATTCTCCACAC
A108'	TAAGCGCAGAAATCGACCCCAAC	TGGTCCGTCACTTTGATTCCAG
A109'	TGCGTTGGATAGGGTACATGAC	TAACCAAGTTGGCCATTTCCAG
A110'	GAATAAGACCCCTCTAACAGGA	TGCATATTACTTTCCCCACTGA
A111'	TCGGTACTGTTCAAGCCTCGTCA	GGTAACCGATACATCCGCTGCTC
A112'	GATACCAGGTTGGCTCCTCTTC	GCCGATAAGGGAGAGAAGCTTG
A113'	GCATCGCGCTTGCTAATCATGG	GGCAGCAAGGATGTCAGGTCTAC
A115'	CCTGGTGATTCATCGACCCCAAC	TTGCTGAAACGCCATGCCCTTAC
A116'	GTGCGGTTGTAACAGCACCTATG	TCGGCAGTCTCAAAGGATTCGTC
A117'	CCGGCTCCTGAAGGTAACCTTAGG	AAAACCAGCCGGTACTGGAAGAC
A118'	GACGAGATACCCATATCCAAGCC	GCTGCTCTAAGGATGACACTCTC
A119'	TGACATGCCCAATAGTACCATC	GGAGAAGTTCTTCTGGTACCTG
A120'	TGATAGGCTCTGGTACACGTCTC	GGCTCTTCCACAATGACGCTATC
A121'	GGAGAGTTTTGTGGTTGCCTC	AACAAGCTCCTACTCGCTTCTC
A122'	CTTCCATGACAAGGCTCCCTTGA	AGGGAGGAGAATGCGAAGATGAG
A123'	ACGCTTACTAGCTCAAGCACCAC	GCACATGAAAAGGCTCAGGCATC
A124'	AGCTCCGACTTCTCCAACCCAG	GAACGAATGGCTGGACAGGCAAC
GAPDH	TGGACACTGGAAGCATCACG	AACAGTCTTCTGGGTAGCGG

Table 2. Primers used for degenerate PCR analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer
ALMT	GWSTKCMGSAATGTGGGCTGT	RWYKRAAMYKGCCATGWCCTGGT
MATE	AATAGGTCCAGTAGAGCTTG	GTCTTTAAATCCTCGGAAGAC
STOP1	ATATGYGGBAARGGDTTCAAG	GCAGGHGTRTGKCCYTGGAABAGAGC
ALS1	AATGAAAGCTGCWGGNGCHAGYAG	CATYARVGAVTCCATBGCATCCTG
ALS3	ATGWTGGTYGGVAAYKCMATGAC	GTGAAGAADGMWGGCCAACARAG
STAR1	CGCCGWAAVRTYGSSATGCTBTTYCAG	ARBGCACTWGTHGGYTCATC
NRAT1	GSNTGYTTCTTTGSNGAAATGAG	ATTGARTTCTTRTGWGGDCCCA

Table 3. Primers used for RACE PCR

Gene		5' RACE	3' RACE
A07c-2	1st PCR	TCCATCCTTCCCATGGCGTACAC	GGGAAGCGGTGAAGAATCAGAGAAGTG
	Nested PCR	GGCGTACACATGATACGTCACTCTCA	GGAGGTATGTGGCGAGAGATCCGTTT
A08c-1	1st PCR	ACCCAGGACATTTCTTGCCAGACTAC	CTGCAAACCTCAGTGCACACAGAAC
	Nested PCR	CTTGCCAGACTACCCACGACATCAG	CAGTGCACACAGAACTCTTCGTTCTC
A09c-1	1st PCR	CGACGGAGGAATCAACCAAACAGTAG	GTCGTTCTGTTTGGCTGGCTTG
	Nested PCR	CAGCCGTAGGAAAAGAAATCGCCATCAC	GAACCAGCAGGATTGCCACGACT
B01c-1	1st PCR	AAGACTGAACACAAGGGCCTGGAAGA	GCTCTAATCCGCTTGAGCTTCTTTG
	Nested PCR	TTCAGTTGTCTGATGGCGCAGCTATG	TGGCATTGCGCCATTGTGGATCTG
B04c-1	1st PCR	AACAACATCGCAGTCACTGCCAGTTC	CTTCTGGACACTCGCGACAACAG
	Nested PCR	CAGTCACTGCCAGTTCGGAACCTTG	GCCCCGAGATGCTATAGGCGTCACTTC
B04c-1	1st PCR	AACAACATCGCAGTCACTGCCAGTTC	CTTCTGGACACTCGCGACAACAG
	Nested PCR	CAGTCACTGCCAGTTCGGAACCTTG	GCCCCGAGATGCTATAGGCGTCACTTC
B06c-1	1st PCR	CGCAATCTCGGCTGACTCCTCTCTG	TTACCCTTCGTAAGGGTCCAGAAGAG
	Nested PCR	GGCTGACTCCTCTCTGGACCCTTAC	GCCAAGTTTGGCTGGTATAAACCGCTTG
B07c-1	1st PCR	GTTTTGCCCCGCCGTTTACTCTTG	CGCTTCATCAAGAATACGCGGATGT
	Nested PCR	GCCCTGCGCTCTGAAATTAGGATGAC	GCGGGGCAAACTCATTGGGAGGAA
B16c-3	1st PCR	CATGACCCCGCAGCACCAGGAAGAG	TCTGAGAACCCATAACTCTGGAC
	Nested PCR	GCAGCACCAGGAAGCAAGCAACAA	GGGACCGTGTGGGAAAGTACTGGTTC
C01c-4	1st PCR	ACTAACTCCTGTGTAGGTGGCTGCTT	GGACATGTCTAAGCAGCCACTACAC
	Nested PCR	AGGTGGCTGCTTAGACATGTCCAAAG	CACAGGAGTTAGTGGCAAAAGGATCTG
C02c-1	1st PCR	CCAGAACATCAGGATTACTGGCGTAG	CCTGGTTGGTACGAGGAGTTAACTGCAA
	Nested PCR	ACTTGTAAGGTGCAACCTCGGCTTCA	GCACCTTACAAGTCAGGACTCTTCAG
C03c-1	1st PCR	GCATCAAGGGAAGCAGTTGCAAAGG	GGAGTTTGGTCATACATCCACCTTG
	Nested PCR	CTTGACCAACCATTGGTCCAATCC	TGGGATTGGACCAATGGTTGGTCAAG
C07c-1	1st PCR	GGAGATAATGGGCTGTGGTTGATGAC	GTTGCTGTCAAGTGAAGATGAGGGAAG
	Nested PCR	AGAAAGCAGTTTCTGGGGCAA	CAAATGCAAGGCCCTTCATGGCTAC
C11c-3	1st PCR	TTCATGAAGTCGTCGACCGAACGTGAA	TTAGACTCCTCTCTGATCTCCGCCATTC
	Nested PCR	GCCTTGAGCGCGAGCTCTTCTAGAC	CCAGTCTAGAAGAGAGCTCGCGCTCAA
C14c-1	1st PCR	CCGAGAGTGTATGAAGCATGGACGTT	TATAACGTGGCAGTGCCGGAAGT
	Nested PCR	GCCAACACATCGCCGGAGAAACC	CCGGAAGTGCATCCGGCGAACAG
C14c-2	1st PCR	GTTTTGCCCCGCCGTTTACTCTTG	CGCTTCATCAAGAATACGCGGATGT
	Nested PCR	GCCCTGCGCTCTGAAATTAGGATGAC	GCGGGGCAAACTCATTGGGAGGAA
C20c-2	1st PCR	GAATTGGAGCCACTGGGAGATCGT	CATTGTTGGGCGACTCCACCCAAGTC
	Nested PCR	GTGCAATTCAGTGGGAGCCAGACTTG	CTCCCACTGAATTGCACCCTCACCTT
D02c-1	1st PCR	CGCATCAGATCGCTCCTCCAGAGAAC	GCGGCGAATTATCCCAAATGCCAAGA
	Nested PCR	AGAACCCTTGTAGAGTGTGCCACTT	ACCACATCCATCGGGTAAATGGAACAG
D03c-1	1st PCR	CTTCATCAGATACCACCCGTCCGATT	CTATGTCCACGGACTCCAAGGTGATG
	Nested PCR	CCACCCGTCCGATTGGTTCCAGAGA	AGGTGGCTGCCTGTTGTAACACTAC
D04c-1	1st PCR	CTTCGCCGAAACACCAGACTCTGACT	CTGCTAGTGTCCATCCCTTGCAAGT
	Nested PCR	GCTTCAAGGCCCTCTTCTCATCTC	CAGAGTCTGGTGTTCGCGGAAGTG
E06c-1	1st PCR	GGCCCTACTAATATCCCTGTCTTCA	CTTGGATGTGGGAGTCAACTTCAG
	Nested PCR	CTGTCTCATAACCCTGCTGCAC	ATTCCCCACCCAGTACTCACAGTCA
E08c-1	1st PCR	GACTTGGTAGAACGTGTCTCTTCT	TCCCTGTGTTCTGCAAGTGCCTAAC
	Nested PCR	GGTGTAGGAGGGATTGGCGTAAGAGATG	CACCACTCAATTGCAAAACGGCGAGAAC
E09c-4	1st PCR	CGACAAAGGAAGGTTAACGGCTCTACAC	TGCTTAACAGCACCCAAAAGCGACATCC
	Nested PCR	GGTTAACGGCTCTACACGTGCTTCTC	GCTTAACAGCACCCAAAAGCGACATCC
E10c-1	1st PCR	TCGACCACTGGACCTGACACTACTC	CCGCTCTGCTCCTGATCCCAATCC
	Nested PCR	ATTCGCTGGTTGTTCTCGGGATTG	AATCCCGAGGAACAACCAGCGAATG
E14c-3	1st PCR	CAAGACCGGTGATATCTCATCCA	TGGATGAGATATCGACCGGTCTTG
	Nested PCR	GAAGGTGAGGAACCAAGTCCAAG	TCGACCGGTCTTGATAGCTCCAC
E16c-1	1st PCR	GTATCTCTGAGGGTCTGTTGGAAC	CAAGAGGAACAGTGACAGGACTGTA
	Nested PCR	GGGTCATCTCGTCCGGGATTAGTCTTC	TGAGCTGCTTGCTCCTACTCTGAAC
E24c-1	1st PCR	TCGAGCAAGCTCTGGTTTCCACTAC	AATGGAAATCGGTGTCGAGGGCTATG
	Nested PCR	CTCGCATTGCTGAGGGGACACGTAGA	GCAGAGGAACGGCCTGTAAGGTAGTG

Table 3. continued

E24c-4	1st PCR	CGAAGCCACATAGAGACCATCT	CCTAGGACGTGTGTTCCGAGGTTTC
	Nested PCR	GAGAGTGAGCATTAGGGTACGAGGAA	TCCTCGTACCCTAATGCTCACTCTCA
E25c-2	1st PCR	CCAAGCCCAATGGTTGAGTAGGTGAA	GCAGCAGATAGATCCCAGGAAGT
	Nested PCR	GACAGCAGCTAAATGGGAACCATCAC	CCCTGGTCTCCGATCACCCCTACCA
A101-2	1st PCR	AGAGCGAGATCAGAGAGTAGGCCTAGT	GGGTTCTTACCCAATGAACTAGGCCTAC
	Nested PCR	GGGTAAGAACCCAGCTATGTCTCCAA	TAGGCCTACTCTCTGATCTCGCTCTTC
A103-2	1st PCR	TCTCTGGTCCATCAGGTGTCACT	CCCAGAGCTTGTAATGGCCTACGA
	Nested PCR	TCTTGTATCGGCCGTTGCTCTGGAC	AGTCCACACAGATGCAGGAGGTGTT
A105-1	1st PCR	CCCGATAAAGCTGCTAGTACCAGGTGAA	GTGAGCACCATGCCGAATTTCTCTACCA
	Nested PCR	GGTAGAGAAAATTCGGCATGGTGTCTACT	TAGCCACATTAGCAGCGCTTGGGATGA
A111	1st PCR	ACTCTTCAGAACGTCGGTGGCATCA	ATTCAGTGATGCCACCGACGTTCTG
	Nested PCR	CCGCCGCTGTTTGATTACCGAAAG	GGCTGACACTGCGAAGATCGTTGAG
A116-2	1st PCR	CCTCATTCACATCCTCCATGCATGTC	CCTAATGAAAACGCTGCTCGGGTGAGA
	Nested PCR	TGCGTATTCGGGAGCCATATAACCA	CCTTGCTTCTCCAGAAACAGCTGAAC
A119	1st PCR	ACTCTGGAGCAGCATAGCCCTGTGT	GAAGCTTGGAGAACCAGCTCTTCAG
	Nested PCR	GTTTGGCAGTGTAATCGGAGTCCAG	CTGGACTCCGATTACACTGCCAAAC
A121	1st PCR	CCAGCACCAATCTTAGCTCCTTCAC	GCTTCAGGAGATAGACACCCCAAGA
	Nested PCR	CCTGCTCCTATAAGCACTCCATCTC	GGAGATGGAGTGCCTATAGGAGCAG
A122	1st PCR	CATAATCCGCTCAACTTCTCCACC	CTTAGATACTCCAGGACACGCAGAC
	Nested PCR	ATCCGCTCAACTTCTCCACCGAA	TCTTAGATACTCCAGGACACGCAGAC
A124-2	1st PCR	TACGGCAGCACCCGGATATGAGTGA	AAGGAGTGCCTCTAACTCAGCACAA
	Nested PCR	ACGTGAAAAGAGTGGCAGAACGATCA	AGCACAACTTAGCCGCATCGGTTCA
A132	1st PCR	GCACATAGTCGCGTACGGACTTCCA	AAGCTGTTACCGGGTATCCCGTAAG
	Nested PCR	CATCAGAACCCTGCCACAGCATAAC	GTATGCTGGGGCAGTGGTTCTGATG
A133-2	1st PCR	CCCTACCCTGATATTGGGCTTAC	TCCATCTTCGGCTTATCGAAGCTGTTG
	Nested PCR	GGCTTCACGGCAACAATGATACCATCCT	CGGTCGTAATGCTCAACACCAAGAG
A135	1st PCR	TTGAAGCAGTAGCCCCATGCGTAAAG	TACGGACCAGCCGGAAGAGCGATAG
	Nested PCR	GTCTCATGGGAAGTTTGCCAAAGGA	GACCTGGTGGTACTGATCCTGTGA
A146	1st PCR	AGAAGCACCAATCTGTCTCAGGTACAC	CGCAAGAGGTTAACGATCGCAGTT
	Nested PCR	CCAATCTGTCTCAGGTACACCTTGA	GAACACGGTGGACACCGGGAAGAC
A147	1st PCR	CCAGGAATCTTGATAGGCTCTGGTACAC	GCCCTAACGAAGATGGCTCTTCCACAA
	Nested PCR	GGGAAATGAAGGCAAAGGGAGAGGATTG	GATGGCTCTTCCACAATGACGCTATC
A152	1st PCR	TGGAACCTGCCCTGCTTCTACGTATG	CAGGTGGCCAAAAGAAACGTGTAACC
	Nested PCR	GAATTCACGTGTCTCTTCGGCTACTC	TCGACCGGTCTTGATAGCTCCACAAC
A163	1st PCR	GGGGTTTCTCCAACGTCACAGTGATCCT	GATGCCCGGCATGAAGTACCAAAG
	Nested PCR	CTTTGGTACTTCATCGCCGGGCATCA	CCACCCAGGATCACTGTGACGTTGGA
A102'	1st PCR	GCCAGCCAACAGTTTCGTGCCGGTGAA	CATCGTCAGATGATTGGGTGGGAGTT
	Nested PCR	AACCCTTGTCCAGGTAACGGTCTATCTC	GCCTTGCTCAAGGAAAAGTCTTGGGATGA
A105'-1	1st PCR	TTGGCCTGGCAAGCCACAGCGAACT	TCATCCACCCATCGGGCCCTCAG
	Nested PCR	TGCAGATTGTACGCTGCCGAAGA	ATGGCCATGGGGAAGCTGGGTACTC
A106'	1st PCR	TCTGCAGGCCCTGTGTTCTCCAA	GCTGCAACATTATGGGACCCATCGT
	Nested PCR	CCCCTGTGTTTCTCCAACACCGATT	GCGCATGGGAAATGCATCAGGATTG
A108'	1st PCR	AGAGGGAATGTCTCACTGGGGATGA	GCTCCAGTGCTGTTCAACACATTGG
	Nested PCR	TGCTGGAAGATCTGCAAGGCAATGG	GGGAATCAAAGTGACGGACACTCT
A109'	1st PCR	GGCCATTGTCACGGACAACACAGTAG	GTGACAAGACCGGGACACTCACT
	Nested PCR	TGTCACGGACAACACAGTAGGCATAG	ACAAGGACCATGTGCTGCTTCTC
A113'	1st PCR	GCAAGGATGTCAGGTCTACCAGAGA	CCCTTAATGCACCTCAGCTTGGAGAGA
	Nested PCR	GCTGAAGGTGCATTAAGGGTCCATAC	CTCTGGTAGACCTGACATCCTTGCT
A123'	1st PCR	GGCAGGGTCCATATCATCTGGGATT	TGCCGAAATAATGGCAGCTCTGAAG
	Nested PCR	ATCTGGGATTTCAAGTCGGCGATGT	AGCACATGAAAAGGCTCAGGCATCA
A124'	1st PCR	ACTCGTAAACGACCCGTCTCGATCA	GCAGCTGAAGATATTGGCCATGAG
	Nested PCR	CCACTGAGGAACAACCAGAGTGAGA	GCGATCCAGAATGAGAAACCTCTTG
ALMT1	1st PCR	CAAATCCTAGAGCTCTGCCACTACTG	CGAGCTTGCTCATCAAAGGTTCTC
	Nested PCR	CAAATGGTTGCACCTACGGTGAAGTC	TTTGGGCAGGCCGAAGACCTTCAC
MATE2	1st PCR	TCCACAGGTGCACCTTCTCCAAGT	GCTTGTGCAGATGTTACGACTCA
	Nested PCR	GCCGAGAGTATCTTCTCAGCAACA	CACGACTCAGATTCCGGTAGGTGGAA

Table 3. continued

STOP1	1st PCR	AGTCTGAACCGAAGCTCATCAAGAGG	CCCCTGAAGCGCTCGCAAAACCTAAC
	Nested PCR	TACGCTTGCAGCCAGGGTAGGGACAG	AATCCGAGTCTGAACCGAAGCTCATC
ALS1	1st PCR	TACCCACGTTCTCCAACATGTGTCT	CTGGATCGAGTCTCTTCCATGCCTAA
	Nested PCR	CACCATCTTGATCACCCAAAGGACAC	GGTTTGCCTACCCATCACGTCCAAGT
ALS3	1st PCR	GGCGAAGCCCCACCCATAATCATAAC	GACTTCGAGACGACATCCAAGTACAG
	Nested PCR	CATACCAGTCATTGCCCCAGGAAGAG	GGCTCTTGGTGCTACTCCACGACAAG
STAR1	1st PCR	TGTCCTGGCAAGTGCCACACGTTGAG	CTGCCCTCTCGAAGGCACGGTAGCA
	Nested PCR	CACACGTTGAGCTTGACCCACAGAGA	ACGGTAGCAGACAATGTGAGGTATGG
GAPDH	1st PCR	TGAACGGTGGTCATTAGCCCCTCAA	CCATGGGGTGAGACTGGAGCTGAGT
	Nested PCR	GGGTCCTGTGAGCAAACACAGTGA	TTCACAGACAAGGAGAAGGCTACTG

Table 4. Primers used for full-length cDNA cloning

Gene	Forward primer	Reverse primer
A07c-2	CACCCTCTACAAATATGGCCGTCCAATC	AGGTTTAGGCCAAAAGAAATGAATCTTG
A08c-1	GGGGGGCCGACGGTTCATCAATGGCGGATTC	CCCGCGCGCCTTTACGACAAAAGAGTTGAATG
A09c-1	GGGCTGCAGGTTTATCTCATGGATACCGTAGTTC	CCCGGGCGCCCTCACACATACTTGGGAGTTG
B01c-1	GGGCTGCAGGATCCTTACATGACGATTTCACTC	CCCGGGCGCCATCTTGAACAATAGAGATTTG
B04c-1	GGGCTGCAGGTCAAATCCAAATGTGGAAATAC	CCCGGGCGCCATCAGCTCTGAATGGCGACAAC
B06c-1	CACCCATCAACGATGGTAGGACTGGAAC	AGGCCTAAACCTTTCACCTCCAAAACCTC
B07c-1	CACCTCATCAAGCATGCAGAAAATAGTGT	TGTGTTTAATAGGTGATGACGCAGGCCA
B16c-3	GGGCTGCAGGTGGTTAGCTCATCTCCAGGAAC	CCCGGGCGCCACTAATATAATTACACACCCCAATTAG
C01c-4	GGGCTGCAGGAGGAATCCCTGAAGGTATAGGTCTG	CCCGGGCGCCCTCAGTTCAAAATACGACTTCGGTCT
C02c-1	CACCGAATCTGCACCAATGGACTTACT	ATTTGAAATGTTTAGTTGTAAGCTACTC
C03c-1	CACCCACATCTACAGCTTCAAAATGGCT	AGGTCGTCTTGGACCTTGTAGTCTTGT
C07c-1	CACCCCTCACCAATGTTTTTCACAACTGC	GAAAAAGAAATAAATAATAGCCTTATACTAGC
C11c-3	CACCTCCGCCATTCATCATGAATCCCG	ACAATTAGTCGAAGATACTGAAGACGTC
C14c-1	CACCGGGCAATATGAGAACCTCA	TACAAAAAGCTAAAATCTACTTCAATCCA
C14c-2	GGGCTGCAGGAAAGAGGATATGCATCCCG	CCCGGGCGCCATTAATGCAATGGTTTCAATC
C20c-2	CACCGCCATTGATTTAGCAATGGGGCT	AGATGATGATGATTTAGGCATGAATTC
D02c-1	CACCCCTGCAGCCATGGCAGACTCTGT	AAATCAGGGGAATCCTCTGGAACCTCTA
D03c-1	CACCAITATTACAGAATGAGAAAGTTTAT	CAACTGTACATTAATTAATTTGCTGCA
D04c-1	CACCCCTCATCAATGGCAGAAAGCAACA	GATTTAGCTTAAAATGGAATAATTTCACT
E08c-1	GGGCTGCAGGCAGAAAATCATGAGAAAACCTCCATAC	CCCGGGCGCCTTCACTTGGGACACCCAATGGAG
E12c-2	CACCACAAAGGAAAGATGCCTGTTCTAITTC	GATTTCAAAAACATAAGGGGGGTTGCA
A152	GGGCTGCAGGGTAGGCAGCATGGAGGGTAATA	CCCGGGCGCCCTTATCTCACTGGAAGTTTCAAGTGTGTC
E16c-1	CACCGAAGGAAAGATGGTCTCTGGCGAAAAG	TGCTGTGTTTTCAGGTGGACACACTGTGTTG
E24c-1	CACCAGAAATGTGATGGAAACAATGGAC	CTATCTATCTTAGTTGGAAGAATTTCTGCT
E24c-4	CACCAACATCATCAACATGGTTGTCGTTG	ATATTCAAATCTATTCCTTCTTTCACAT
E25c-2	CACCACATAAAGATGGTTGAGACCCGGCA	ATCACTGTGTTGTGTAACCTTAAGGTGA
A101-2	GGGCTGCAGGACAAAAGCAATATGGCTTCGGTTTCA	CCCGGGCGCCCTCATGGATATGGTGGTGTAGTAAT
A105-1	GGGCTGCAGGTGGTCTGGTATGAGAAAGTTATGGGA	CCCGGGCGCCCTCAAGAAGTAAATTTGGCCATGT
A111	GGGCTGCAGGTTTCTGGCCATGCCTCCCATGA	CCCGGGCGCCCTCTATCTATGAGAGAGAGGCTAATC
A119	GGGCTGCAGGTCGGTTCTAGATGACTAAGAAGATTAC	CCCGGGCGCCCTTAGCGCTCTTTTGGTCTTAC
A121	GGGCTGCAGGATCTCTCCAAATGGTGTGTTGAC	CCCGGGCGCCATTAATAACATAGTCAGACCCTC
A124-2	GGGCTGCAGGATCCCAATCATGGAGGCTCCAAAC	CCCGGGCGCCCTCACTTTTGGAAAACGAAATTTTC
A133	GGGCTGCAGGAAACTCAAGATGAGACTATGAACATG	CCCGGGCGCCCTGAAGACAGATATGACGACTAICTTC
A135	GGGCTGCAGGATCGGATGGATAACATGAACAAGCTTTTG	CCCGGGCGCCCTCATGATGATGACGCTCGATGAG

Table 4. continued

A146	CACCTGGTTGTGATGGAAGGTGGTAAC	AGTCAAAACTCTTATCGCCTCTGGAAAGT
A147	GGGCTGCAGGCAAAATTTCCATGGGAAAACAACACAC	CCCGCGGCCAATTCACAGAAATCTCCGTGGATAG
A152	GGGCTGCAGGGTAGGCGACGATGGAGGGTAATA	CCCGCGGCCCTTATCTCATCTGGAAGTTCCAGTGC
A163	GGGCTGCAGGACAAATGAATGGAAAATGAGGATCTAC	CCCGCGGCCCTTAAATAATCTAAGGCAAAAGCGCAGTG
A102'	GGGCTGCAGGAATAAGTATGGAAACCATCCTCCTC	CCCGCGGCCAATTAATCAGCTAAGGTGGTAGGTTT
A105'-1	GGGCTGCAGGTTAAAGCTTATGTGTTTACTTTGTTAT	CCCGCGGCCCTTATGAACAATAACTCGGATGGGCAT
A106'	GGGCTGCAGGACAGCCCTCATGGATCTGGAGTCTC	CCCGCGGCCCTCAGACATATAAGATCATGCCAC
A108'	GGGCTGCAGGTGAGGCAGCCATGGCTGGCGGAGT	CCCGCGGCCCTTACAACCTGGGAAGAGGGATTTGAAC
A109'	CACCTGATCACCCATGGCTGGAGACAAG	TAGTGTCTTCTTACACACAGTATAGTGCT
A113'	GGGCTGCAGGAACACTCATATGAGCATCGCGCTTG	CCCGCGGCCACTAGGGTTGATAACTGATTTGGGAT
A123'	GGGCTGCAGGACGGCTGAGGATGGCCCTAGATAC	CCCGCGGCCCTTATCCAGCTGGGTTTTGTGCAAT
A124'	GGGCTGCAGGAGCTCAAAAACATGGCAGGAGACA	CCCGCGGCCATCACCTTCGCAAGGTCCTGATC
ALMT1	CACCTTAGAGTCAATGGAAATGAGTCA	ATCAAACTATTTACAAGATGCACACTTTG
MAIE2	CACCTTTGGAGATGGCTGAGAAGGATA	ATGATGATGGAACCATCAGCTCCTAAAG
STOPI	TCCCCCAGAAATCAATGATGCAAGGCG	CGTCAITCATATFAGATTAITCACAAGATTTC
ALS1	GTTGGTTGAGCCGAGGATGCCGAGATCAAGA	CAATTGGGTGTAGAAATGAAATTAATCTAAAT
ALS3	CGTGACGCTACGATGATCGGGAAC	GAGGAGGGTTACAATGCAACTTGCAAG
STAR1	CGCGGTACACTATGCCCTTCAGATTG	CTATAGAAAATTAATTGACAAGAAAGTCCGA

Table 5. Primers used for organ-specific gene expression analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer
A07c-2	CGTCGAACAGGTTGTGGACAACGAG	CTCTGCCCCAGTGATGGTGACAAG
A08c-1	ATCGGGCAATCATACTGACCAC	TGCCTTGGTAGCATTTGGAGAC
A09c-1	GGTAAGCTCAACTTGGTCACAG	CACATACTTGGGAGTTGGAGAG
B01c-1	TGGCGTATACCGCAACGTACTG	ACTGGAGATGCTGCCATGACTAC
B04c-1	CTTACCGTTCCTGGAGGAGCTAGTG	CTGCAGCTTCGGTAGGAACAGAGT
B07c-1	ATTGTGTCGGTGGGACCCAAAG	TTAGGTGATGACGCAGCCAACAG
B16c-3	CTCACGACGAGACCTCAGTGAGAAG	GGACAGGGTGATCTGAACAATGCC
C02c-1	TATCTGCTGGCTTGCCACCTTC	CCACCTGGCCTAAGCACTCTCT
C03c-1	CCGACGATCAATTTATCCGCGTCTAC	CAAGGTGGGATGTATGACCAAACCTCC
C07c-1	AGGGAGAGGTGGATTGGACAAG	TTCTGTGCTGGAGTCTGGCTATC
C14c-1	CGACGCATGCCAGATGGAATGGTC	CACCCAATGTGCGCGCATAGTCTC
C14c-2	CAATCCGGGCAACTGTGAGATCC	TACCAGGGGCAGTGATCATTCCAG
D03c-1	GGCTACCAATGACATGGTATCCAC	GGTGAATCTCGTGTAGCTAAGCC
D04c-1	GGAAACAAAGGGATGGGTTCCAG	ATTAGCAGTGGGGTCAGTCACATC
E10c-1	CGAATGTTGCAAGTGGAGGCTACAG	GCCCATACCCAGTAACTCTTGAC
E12c-1	TGTTGCACTGACTCAGCCCATC	CCCTGTTTCCAGACCCTAGCCCTC
E16c-1	CCAAGTCCCGGTCAAAACGTG	ATGCACGCATGTGTTTCGTAACC
E24c-1	CTCTCCGGCAACAATGTTCTCAC	CCTGCCACCATTGACCTTC
E24c-4	TTCTCTGCTACCCTAATGCTCAC	TACAACCCTATTGGGCTAGCAG
E25c-2	CCCTGGTCTCCGATCACCTAC	ACCCATTTGGTGCTCCACCTTG
A103-2	GTGAATGGCCTACGAGCTCACAC	CAACTCTGTATCGGCCGTTGCTC
A105-1	CACATTAGCAGCGCTTGGGATGA	CATGCAGTCCAGGAACACTTTGGG
A116-2	CACTTTGTGGCTGTCGTGATG	CTGCCATCAAGGTTTGTAGCTC
A119	GGCCTATGTTGAGGGATCCAA	TCGTGCAATCCCTGAAGTGTCTC
A121	GGAGCAGGGACTTGATTCTGG	CTGGGTTTCCAACAGCAGTACTC
A124-2	GGGAGAGATCCAGAAGGCTGAAG	GAGCTCCTTAATTCGTTCCAACCAG
A133-2	GAGCCTGTTGTCTCTGGGCTAGTC	GCCTTGTGATGTCCTCGTTTCTTG
A135	TATGGCCGTGGACCCATCCAATC	ACCCAGAACCACAGCGCTGTCTTG
A147	CCAAACGATGCCAACACAGCAATC	GCACCTCAGAAGCAAAGGGTCTAC
A146	CCACTCGCCACATGTTACTGTC	AACCTCTGCGTTGTTTCGGTTG
A152	CTCCATAGCAGTCGAAGTTCGT	ATTGTCCCCACCATTAGACCAG
A102'	CACCTTATCCTGGACAGAACTCTC	GATAAGCTGGTCAGTGGTGTG
A106'	CCTGAGAAAGTCAGGAAGCGAG	TCTAGGGTAGATGCATGAGGGA
A108'	CTGGATGGGTGTTGATCATGTC	CTACAACGGGAAGAGGGATTG
A109'	CTGGCTCTACAGCATTGTCTTC	CTTTCAGCTTCACTACTGACTC
A113'	GTTTCATCGCTGGAACGGAGACAAC	TAGAAACACCCAGGTGGGTGAAG
A124'	CTGGCATTACTAGCAGACCAAG	CCTTCTTCCACCACAACCATC
ALMT1	CGCACTGAGAGCATTATCTCTGTC	CGGTGAAGTAAGTGTGGCTTCTC
MATE2	CAGGTTTGGTTGGCAACATCTC	ACCAAGCCCATCTGTAGTACTC
STOP1	GGTCATGGCGGACCTTAAAACCTCAC	GGTGTATGGCCTTGAACAGAGCA
ALS1	TGAAAGGGTCGTTGCACGGTTGAG	CGCAAGAACCGGCCAAATTTACGAAC
ALS3	CTTCTGGGGCAATGACTGGTATG	GGTACGCCTTGGTGAAGAACGTAG
STAR1	CTGAACCTCTGTGGGTCAAGCTC	AGGCAAACCAAGTCAGCTATCCTC
GAPDH	CGAGATGGGTTACAGCACAC	GGAGGGTAGACTGCAACCAG

結 果

1. *Acacia mangium* 実生の低 pH と Al ストレス応答

1-1. 低 pH と Al ストレス条件下での根の伸長応答

Acacia mangium は酸性土壌適応植物であるが、非モデル木本植物であるため、実験室内で定量的に取り扱うことのできる実験系は確立されていない。本研究では、ストレス応答の分子生物学的解析に先立って、最適な実験系を選択するため、まず実生の根のストレス抵抗性を検討した。

実生の成長速度には、個体ごとにかかなりのばらつきがあり、寒天固化培地(「材料と方法」1-1-1 (a)) で育成した播種 10 日後の根の長さには約 1 cm から 7 cm 程度の幅が見られた (Fig. 1)。このため以降の実験では播種後 7 日目の時点で根長が 5 ± 1 cm の実生を用いた。

まず低 pH に対する応答を見るため、この 7 日目の実生を、pH 6.0、4.3、3.5、3.0 に調整した栄養液寒天固化培地で 10 日間培養した後の根長を、コントロール (pH 6.0) と比較した。その結果、pH 4.3 では約 15%の伸長促進が、pH 3.5 と pH 3.0 でそれぞれ約 20%と約 25%の伸長阻害がみられたが、有意な差とは認められなかった (Fig. 2)。

また Al ストレスに対する応答は、播種後 7 日目の実生を、各濃度 (0、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 mM) で AlCl_3 を添加した栄養液 (pH 4.3) を用いて 10 日間水耕栽培し、根の伸長をコントロール (0 mM AlCl_3 、pH 4.3) と比較した。その結果、5.0 mM AlCl_3 において約 80%の根の伸長阻害が認められたが、2.0 mM 以下の AlCl_3 濃度では根の伸長阻害は認められなかった (Fig. 3)。

1-2. Al ストレス条件下での根の組織化学的变化

Al と結合して赤紫色の複合体を形成するヘマトキシリン、Al と錯体を形成し励起波長 420 nm で 515 nm の蛍光を発するモリン、傷害により細胞膜の選択透過性を喪失した細胞を染色するエバンスブルーの 3 種類の染色剤を用い、実生の根への Al の侵入や、組織の損傷を検討した。

まず、播種後 7 日目の実生を、前項と同じ濃度で AlCl_3 を添加した栄養液 (pH 4.3) を用いて 14 日間水耕栽培し、根端における Al の分布をヘマトキシリンおよびモリン染色により調べた。顕微鏡観察の結果、両染色剤により、5.0 mM AlCl_3 添加水耕液での栽培後に根全体が濃く染色され、根への Al の吸着が示唆された (Figs. 4, 5)。しかし AlCl_3 濃度 1.0 mM (ヘマトキシリン、Fig. 4) ないし 0.5 mM (モリン、Fig. 5) 以下の水耕液では、根冠部以外はほとんど染色されなかった。

また根の横断切片を作製し、モリン染色により根の内部への Al の蓄積を観察した結果、5.0 mM AlCl_3 では根の内部も染色され、Al の蓄積が示唆されたが、0.1 mM ではほとんど染色されなかった (Fig. 6)。

さらに細胞膜が損傷した細胞を青く染めるエバンスブルー染色により、Al ストレスによる細胞膜の傷害の程度を観察した結果、Al 濃度が 5.0 mM では根全体が濃く染色され、Al ストレスにより細胞膜が著しく傷害を受けていることが示唆されたが、1.0 mM ないしそれより低濃度の Al 処理では根冠を除いてわずかに染色された程度だった (Fig. 7)。

以上のように、2 週間の Al ストレスに曝された *A. mangium* 実生の根は、栄養液中の Al 濃度が数十~数百 μM 程度のとき、Al をほとんど組織内に取り込んでいないことが示された。

2. *A. mangium* 培養細胞系の確立およびその低 pH と Al ストレス応答

根の伸長測定と組織化学的観察を通じて *A. mangium* 実生の根は、少なくとも

も実験を行った播種後 17 日目～3 週間目の範囲で、低 pH および Al ストレスに対する高度の抵抗性を持つことが明らかになった。しかし、分子生物学的な実験のためには、植物体を用いるよりも、実験系を単純化でき、細胞に対して直接ストレスが加えられる培養細胞系が有利と考えられた。そこで、*A. mangium* の胚軸より培養細胞を誘導し、そのストレス応答を検討した。

培養細胞は「材料と方法」1-2 項に示した条件で継代培養され、3 週間のうちに 5 倍程度の増殖を示した。通常の pH 5.8 の MS 培地に加えて、低 pH に調整した MS 培地への移植を繰り返すことにより、pH 3 程度では pH 5.8 に較べて全く遜色ない成長を示し、また pH 2.5 でも僅かに増殖が劣るが継代培養可能な培養系が得られた (Fig. 8)。また Al 添加培地でも増殖し、徐々に培地の Al 濃度を高めることで、最終的に 3.0 mM の AlCl₃ を含む培地でも継代培養可能であった (Fig. 8)。

Al の細胞増殖に及ぼす影響を定量的に測定するため、通常の MS 培地 (培養開始時に pH 5.8) で継代 3 週間後の培養細胞を、各種濃度の AlCl₃ を含む 1/2 MS 培地 (pH 4.3) に移し、15 日後の細胞の生長量を測定した。その結果、細胞の増殖は、コントロール (0 mM AlCl₃) と比較して 0.5 mM で約 5%、1.0 mM と 2.0 mM で約 10%、5.0 mM で約 60% の増殖阻害が認められた (Fig. 9)。また、0.05 mM、0.1 mM では増殖阻害はほとんど認められなかった。このように、*A. mangium* 培養細胞は 2.0 mM 程度までの Al によってはほとんど成長に影響を受けず、2.0 mM と 5.0 mM の間で急激に増殖が阻害される閾値が存在することが示唆された。

これまでの実験で、この植物の分子生物学的な解析には培養細胞が最も有効であると考えられたので、以下ストレス応答に関わる可能性のある遺伝子の検出に利用することにした。

3. *A. mangium* 培養細胞の低 pH と Al ストレスに対する転写応答と応答遺伝子の全長 cDNA クローニング

3-1. DDRT-PCR 法に基づくストレス応答遺伝子の検出とクローニング

A. mangium の培養細胞において、低 pH と Al ストレスに応答する遺伝子を明らかにするために DDRT-PCR 法による転写解析を行った。解析には、細胞の増殖にはあまり影響のない低 pH および低濃度の Al に対する転写応答と、増殖阻害が認められた高濃度の Al に対する転写応答を解析するための、2 つの実験系を設定した。

1 つ目の実験系では、細胞培養液に硫酸を添加することで培地の pH を 3 にした低 pH 処理と、pH を 3 にした上で終濃度 0.1 mM の AlCl₃ を添加した低 pH/低濃度 Al 処理に対する、1 時間と 24 時間後の転写応答を解析した。2 つ目の高濃度 Al 実験系では、細胞を 2.0 mM と 5.0 mM の AlCl₃ を含む培地に移植し、24 時間後の転写応答を解析した。

3-1-1. DDRT-PCR 法に基づくストレス応答遺伝子の探索

両実験系とも、100 種類の RAPD プライマーを用いて転写解析を行った結果、鎖長約 150~2500 bp の範囲で、約 300 のバンドが検出された。低 pH および低 pH/低濃度 Al 処理を加えた培養細胞を用いた転写解析では、40 種類のプライマーから、ストレス処理による発現の変化を示唆する増幅パターンが認められた。すなわち、コントロールと比較して、発現レベルが上昇した 66 バンドと、発現レベルが低下した 15 バンドの合計 81 バンドが検出された。これらのバンドを切り出してクローニングし、4 クローンずつ塩基配列を解析した結果、発現レベルが上昇した 66 バンドには 108 種類の遺伝子断片が含まれ、発現レベルが低下した 15 バンドには 21 種類の遺伝子断片が含まれていた。また、高濃度 Al 処理では 48 種類のプライマーから、発現レベルが上昇した 87 バンドの増幅が検出され、これらには 100 種類の遺伝子断片が含まれていた。

3-1-2. 半定量 RT-PCR による発現パターンの確認

低 pH および低 pH/低濃度 Al 処理を加えた細胞から得られた合計 129 種類の遺伝子断片のうち、トランスポゾンや rRNA 由来と思われるものなどを除いた 106 種類の遺伝子断片について特異的プライマーを設計し、半定量 RT-PCR による転写解析を行ったところ、34 遺伝子の転写レベルがストレスにตอบสนองして上昇していることが確かめられた。これら 34 遺伝子のうち、31 遺伝子は低 pH と低 pH/低濃度 Al 処理の両方にตอบสนองし、2 遺伝子は低 pH 処理のみに、1 遺伝子は低 pH/低濃度 Al 処理のみにตอบสนองしていた (Fig. 10; Analysis I)。また、これらの 34 遺伝子の発現上昇のパターンとストレス処理後の時間に着目すると、19 遺伝子は処理後 1 時間のみで発現上昇が認められ、5 遺伝子では処理後 24 時間のみで発現が上昇していた。さらに、10 遺伝子は処理後 1 時間、24 時間の両方で発現上昇が認められた (Table 6)。

同様に、高濃度 Al 処理により検出された 100 種類の遺伝子断片では、97 種類の遺伝子断片について特異的プライマーを設計し、半定量 RT-PCR による転写解析を行った。その結果、31 遺伝子の転写レベルがストレスにตอบสนองして上昇していた。これら 31 遺伝子のうち、25 遺伝子は 2.0 mM と 5.0 mM の両方の濃度の AlCl₃ 処理にตอบสนองし、6 遺伝子は 5.0 mM AlCl₃ 処理のみにตอบสนองしていた。2.0 mM AlCl₃ 処理のみにตอบสนองした遺伝子は検出されなかった (Fig. 10; Analysis II)。

また、低 pH と低 pH/低濃度 Al 処理に対する転写応答解析と、高濃度 Al 処理に対する転写応答解析の 2 つの実験系は、それぞれ独立に行った解析であるにもかかわらず、7 遺伝子が 2 つの実験系で共通に検出された (Fig. 10)。したがって、本研究により合計 58 種類のストレス応答遺伝子が *A. mangium* の培養細胞から検出されたことになった。

3-1-3. ストレス応答遺伝子の全長 cDNA クローニングとその機能分類

検出された 58 種類の遺伝子断片の 5' および 3' 未知領域の解析を RACE 法により試みた結果、3 遺伝子は偽遺伝子と予測され、10 遺伝子では RACE PCR

により期待される増幅産物が検出されなかったが、それ以外の 45 遺伝子の全長 cDNA 配列が決定された (Table 6)。全長配列が決定された 45 遺伝子では、全長 cDNA をクローニングし、その塩基配列をデータベースに登録した。これらの遺伝子の配列から予想されるタンパク質のアノテーションは、NCBI BLAST プログラムを利用した相同性検索の結果 ($E\text{-values} \leq 2.0e-10$) に基づいて決定し、その機能分類を KEGG BRITE データベースによって行ったところ、検出された 58 遺伝子は、10 種の“トランスポーター遺伝子”、18 種の“代謝酵素”、3 種の“転写因子”、9 種の“シグナル伝達”、10 種の“その他の機能”、8 種の“機能不明”の 6 つのカテゴリに分類することができた。これらの 58 遺伝子の配列から予想されるタンパク質のアノテーションやその分類は Table 6 に示してある。またこの Table 6 には、DDBJ への登録番号、半定量 RT-PCR の結果、相同性を示した遺伝子の生物種、相同性検索結果の信頼性、後述する *Acacia* 属の EST データベースへの照合結果の情報も含めてある。

カテゴリごとの検出された遺伝子の概略は次の通りである (以下、遺伝子の名の略称は Table 6 を参照)。トランスポーター遺伝子には、MATE ファミリートランスポーター (*AmMATE1* [E12c-2]) や、細胞膜型 H⁺-ATPase (HA [C11c-1])、3 種類の ABC トランスポーター (ABCA [A08c-1]; PDR1 [A146]; PDR2 [A152]) などが含まれていた。代謝酵素には、炭素や窒素代謝に関わる酵素遺伝子の他にも、ホルモン生合成や、二次代謝関連などの多様な遺伝子が含まれていた。転写因子には、MYB ドメインをもつ SHOOT2 (E24c-1) などが含まれていた。シグナル伝達関連遺伝子には、複数の膜結合型プロテインキナーゼが含まれていた。低 pH および低 pH/低濃度 Al 処理に対する転写解析により検出された全ての転写因子とシグナル伝達関連遺伝子は、処理 1 時間後のみで一過的に発現上昇する遺伝子だった。また、ubiquitin-proteasome 系による細胞内でのタンパク質分解に関わる E3 ubiquitin ligase (E3UL [B06c-1]) や細胞壁構造タンパク質の expansin (EXP [C20c-2])、extensin (EXT [A101-2]) などの遺伝子はその他の機能に分類された。さらに、相同性検索またはドメイン検索からは、機能推定に関わる情報が得られなかった遺伝子は、機能不明に分類された。

これらの遺伝子の低 pH と Al ストレス適応における機能は「考察」で議論す

る。

3-1-4. EST データベース検索

検出された 58 遺伝子の塩基配列を *Acacia* 属の EST データベースに照合したところ、8 遺伝子が *A. mangium* の発達中の二次木部や地上部由来の EST データベース (Suzuki et al. 2011) から、2 遺伝子が *A. auriculiformis* x *A. mangium* 雑種の師部由来の EST データベース (Yong et al. 2011) から見出されたが、他の 48 遺伝子は *Acacia* 属の EST データベースには登録されていないものだった (Table 6)。

3-2. 既知 AI 抵抗性遺伝子ホモログの解析

3-2-1. Degenerate PCR 法による既知 AI 抵抗性遺伝子ホモログの検出

モデル植物や穀類などを用いた研究により、最近 10 年の間に同定されたプロトン耐性および AI 抵抗性関連遺伝子 7 種類 (*ALMT*、*MATE*、*STOP1*、*STAR1*、*ALS1*、*ALS3*、*NRAT1*) について、その *A. mangium* ホモログの検出を試みた。すなわち、データベースに登録されている遺伝子情報からプライマーを設計し、degenerate PCR 法を適用した。

Degenerate PCR の結果、*A. mangium* の根と培養細胞から *NRAT1* を除く 6 遺伝子のホモログが単離され、これらの全長 cDNA をクローニングした。Table 7 には、それらの転写応答解析の結果 (次項 3-2-2 で後述) と、BLAST による相同性検索の結果、シロイヌナズナホモログとの相同性、*Acacia* 属の EST データベースへの照合結果の情報を示してある。このうち *MATE* は、DDRT-PCR 法による解析でも検出されたが (*AmMATE1*; Table 6)、degenerate PCR 法による解析からは *AmMATE1* とは異なる塩基配列をもった遺伝子 (*AmMATE2*) が検出された。このため、本研究では 2 種類の *MATE* 遺伝子が検出されたことになった。*A. mangium* からクローニングされた *AmALMT1*、*AmMATE2*、*AmSTOP1*、*AmSTAR1*、*AmALS1*、*AmALS3* 遺

伝子の推定アミノ酸配列を既に機能解析が行われているシロイヌナズナホモログと比較すると、それぞれ、*AtALMT1* (At1g08430) と 42%、*AtMATE1* (At1g51340) と 69%、*AtSTOP1* (At1g34370) と 58%、*AtSTAR1* (At1g67940) と 70%、*AtALS1* (At5g39040) と 74%、*AtALS3* (At2g37330) と 76%の相同性を示した。また、単離されたホモログの塩基配列を用いて前述の *Acacia* 属の EST データベースを検索した結果、*AmSTOP1* と *AmSTAR1* の 2 遺伝子は、*A. mangium* の EST データベースからも見出されたが、他の遺伝子は見出されなかった (Table 7)。

3-2-2. 既知 Al 抵抗性遺伝子ホモログの転写応答解析

これらの 6 遺伝子について、「材料と方法」2-1-2 項と 2-2-3 項に記載した 5 週間目の水耕栽培実生の根と地上部および 3 週間目の培養細胞を用いて、転写応答解析を行った (Fig. 11)。*AmALMT1* は、培養細胞の転写物からは検出されず、24 時間の Al 処理を加えた根でのみ応答していた。*AmMATE2* と *AmSTOP1* の転写は、ストレス処理にはほとんど応答していなかった。また、*AmSTAR1* と *AmALS3* は、1 時間および 24 時間の Al 処理を加えた根において発現が上昇していた他、Al 処理を加えた培養細胞においても 0.1、2.0、5.0 mM の全ての処理条件で明確な発現上昇が認められた。*AmALS1* の発現は 24 時間の Al 処理を加えた根と培養細胞で上昇した。

4. *A. mangium* 培養細胞の Al 応答により排出される有機酸

有機酸排出による Al 抵抗性はもっとも広く研究が行われている機構であり、植物種により排出される有機酸の種類が異なることが知られている。そのため、まず GC 分析により *A. mangium* 培養細胞によって排出される有機酸の同定を行った (Fig. 12)。その結果、Al 処理を加えた *A. mangium* 培養細胞の培養液から、クエン酸とリンゴ酸とともに、微量のシュウ酸、フマル酸、コハク酸が検出された。また、Al 未処理の細胞では、これらの有機酸は検出されなかった。

次に、UPLC 分析により、クエン酸の定量を行った結果、培養液から検出されたクエン酸量は、Al 未処理のコントロールで細胞 1g 当たり約 1 μ g、0.1 mM Al 処理で約 3 μ g、2.0 mM Al 処理で約 18 μ g、5.0 mM Al 処理で約 15 μ g だった (Fig. 13)。

5. *A. mangium* 培養細胞の H⁺排出活性

24 時間の低 pH 処理を加えた培養細胞と未処理の細胞を、pH 指示薬を添加した寒天上にスポットし、細胞スポット周囲の色調変化を観察した。その結果、低 pH 処理を加えた細胞では、スポットの周囲が未処理の細胞よりも広範囲に色調が黄色に変化して、酸性化が起こったことを示した。なお、細胞の洗浄に用いたろ液をスポットしても寒天の色調変化は観察されなかった (Fig. 14)。

6. 実生を用いたストレス応答遺伝子の器官別転写解析

DDRT-PCR 法で単離された 58 種類のストレス応答遺伝子のうち 37 種類について、水耕栽培実生に「材料と方法」2-1-3 記載の方法により各種 pH および Al 処理を行った後、根と地上部における転写を解析した (Fig. 15)。転写解析は半定量 RT-PCR により行い、遺伝子の発現量の差は PCR 産物の電気泳動像から、内部標準 *GAPDH* 遺伝子の発現量を考慮しつつ、目視にて判断した。

転写解析の結果、解析を行った全ての遺伝子は根において発現していることが認められた。これらのうち、19 遺伝子は低 pH と Al 処理の両方またはいずれか一方の処理に応答して発現上昇した。19 遺伝子のうち、7 遺伝子 (*MATE* ファミリートランスポーター (*AmMATE1* [E12c-2])、PDR (pleiotropic drug resistance) タイプ ABC トランスポーター (PDR2 [A152])、CYP94A1 (A07c-2)、serine acetyltransferase (SAT [A121])、4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase (4-CL [A124-2])、glycosyltransferase (GT1 [A147])、heavy metal associated domain containing protein (HMA [B07c-1])) は 1 時間と 24 時間

処理の両方で発現上昇したが、3 遺伝子 (neomenthol dehydrogenase (NMD [D04c-1])、purple acid phosphatase (PAP [A102'])、serine/threonine protein kinase (STK3 [A119])) は 1 時間処理のみ、5 遺伝子 (A サブファミリー (ABCA [A08c-1]) および PDR タイプ (PDR1 [A146]) ABC トランスポーター、asparagine synthetase (AS [B04c-1])、methyltransferase-like (MT [C02c-1])、SHOOT2 (E24c-1)) は 24 時間処理のみ、coatmer subunit β' (β' -COP [C03c-1]) は低 pH・1 時間処理と低 pH/Al・24 時間処理に応答していた。Cation/calcium exchanger (CAX [A09c-1]) と細胞膜型 H⁺-ATPase (HA [A109']) の 2 遺伝子は、低 pH・24 時間処理のみ、 β -D-xylosidase (β -XYL [D03c-1]) は 5.0 mM Al・24 時間処理にのみ応答して発現上昇した。

上述の 19 遺伝子のうち 5 遺伝子 (*AmMATE1*、PDR2、GT1、SHOOT2、 β' -COP) は、地上部でも高濃度の Al 処理 (2.0 および 5.0、または 5.0 mM のみ) に応答して発現が上昇し、4-CL も低 pH・1 時間処理と低 pH/Al・24 時間処理で地上部において発現上昇したが、他の遺伝子は地上部でのストレス応答は認められなかった。

一方、上述の 19 遺伝子を除く他の 18 遺伝子では、class I chitinase (CHIT [A135]) が地上部でのみ低 pH/Al・24 時間処理に応答して発現上昇したが、その他の遺伝子は、根と地上部のいずれにおいてもストレス処理に応答した明確な転写レベルの変化が認められなかった (Fig. 15)。

Table 6. Genes up-regulated by low-pH and/or aluminum treatments detected in cultured cells of *Acacia mangium* in this study

Gene	Length ^{a)} (bp)	Accession number	Detection condition ^{b)}	Expression ^{c)} $\frac{\text{h}^*}{\text{mM}^{**}}$					Functional category and homology	Abbreviation	Organism	E-value	Identity to EST ^{d)}
				1	24	2	5	5					
Transporter													
E12c-2	1518	AB839199	LAL	+	+				MATE family transporter	AmMATE1	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	0.0	
A09c-1	1713	AB839182	PH	-	+				Cation/calcium exchanger	CAX	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	
A08c-1	2838	AB839181	LpA	+	-				ABC transporter A subfamily	ABCA	<i>Vitis vinifera</i>	0.0	
E24c-4	1362	AB839202	LpA	+	+				Nitrate and chloride transporter	NiCIT	<i>M. truncatula</i>	0.0	
E25c-2	1461	AB839203	LpA	+	+				Amino acid permease	AAP	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	FSS84846
A146	4302	AB839212	LH	+	+	-	+		Pleiotropic drug resistance protein	PDR1	<i>Glycine max</i>	0.0	
A152	4446	AB839214	LH	+	-	+	+		Pleiotropic drug resistance protein	PDR2	<i>M. truncatula</i>	0.0	
A109'	2865	AB839220	LH	+	+	+	+		Plasma membrane H ⁺ -ATPase	HA	<i>Sesbania rostrata</i>	0.0	
A106'	2328	AB839218	HAL			+	+		Potassium transporter	KT	<i>Gossypium hirsutum</i>	0.0	
A108'	1575	AB839219	HAL			-	+		Hexose transporter	HT	<i>M. truncatula</i>	0.0	
Metabolic enzyme													
D03c-1	2292	AB839196	PH	-	+				β -D-Xylosidase	β -XYL	<i>G. max</i>	0.0	FSS90492 GR480913
B04c-1	1767	AB839184	LpA	-	+				Asparagine synthetase	AS	<i>G. max</i>	0.0	
C02c-1	732	AB839189	LpA	+	+				Methyltransferase-like	MT	<i>G. max</i>	3.0e-117	
C14c-2	858	AB839194	LpA	+	-				Phosphoglycerate mutase-like	PGM	<i>G. max</i>	2.0e-162	
D04c-1	918	AB839197	LpA	+	+				Neomenthol dehydrogenase	NMD	<i>G. max</i>	9.0e-133	
E16c-1	2778	AB839200	LpA	+	-				Lipoxygenase	LOX	<i>S. rostrata</i>	0.0	GR480838
A07c-2	1524	AB839180	LH	+	-	+	+		Cytochrome P450 94A1	CYP94A1	<i>V. vinifera</i>	0.0	FSS85227
B16c-3	2079	AB839187	LH	+	+	+	+		Rhamnogalacturonate lyase	RGL	<i>M. truncatula</i>	0.0	
A103-2	964*		HAL			+	+		1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like	ACCO	<i>G. max</i>	9.0e-170	

Table 6. continued

A105-1	1158	AB839205	HAL							NADH dehydrogenase subunit 4	NAD	<i>Silene latifolia</i>	0.0	F587598
A121	975	AB839208	HAL	+	+					Serine acetyltransferase	SAT	<i>Nicotiana tabacum</i>	2.0e-125	
A124-2	1542	AB839209	HAL	+	+					4-Hydroxycinnamoyl-CoA ligase	4-CL	<i>Coffea arabica</i>	0.0	
A133-2	1620	AB839210	HAL	+	+					Dihydropyrimidinase	DHP	<i>M. truncatula</i>	0.0	F588531
A135	972	AB839211	HAL	+	+					Class I chitinase	CHIT	<i>Acacia koa</i>	0.0	
A147	1410	AB839213	HAL	+	+					Glycosyltransferase	GT1	<i>Pueraria montana</i>	0.0	
A102'	1869	AB839216	HAL	+	+					Purple acid phosphatase	PAP	<i>G. max</i>	0.0	
A113'	1512	AB839221	HAL	+	+					Cytochrome P450 71D	CYP71D	<i>G. max</i>	5.0e-175	
A124'	1407	AB839223	HAL	+	+					UDP-glycosyltransferase	GT2	<i>G. max</i>	0.0	
										Transcription factor				
C01c-4	2562	AB839188	LpA	+	-					Auxin response factor-like	ARF	<i>G. max</i>	0.0	F592678
E24c-1	1362	AB839201	LpA	+	-					SHOOT2 protein	SHOOT2	<i>G. max</i>	7.0e-158	
A105'-1	1353	AB839217	HAL	+	+					Basic leucine zipper protein	bZIP	<i>Phaseolus vulgaris</i>	0.0	F586684
										Signal transduction				
B01c-1	2400	AB839183	LpA	+	-					Serine/threonine protein kinase-like	STK1	<i>G. max</i>	0.0	
B03c-1	1221*		LpA	+	-					Calcium-dependent protein kinase-like	CDPK	<i>G. max</i>	2.0e-11	
C07c-1	1935	AB839191	LpA	+	-					Cysteine-rich receptor-like protein kinase	CRK	<i>G. max</i>	0.0	
C11c-3	624	AB839192	LpA	+	-					Protein MKS1-like	MKS	<i>G. max</i>	8.0e-71	
E08c-1	1926	AB839198	LpA	+	-					Receptor-like protein kinase	RLK	<i>G. max</i>	0.0	
A116-2	1423*		HAL	+	+					Serine/threonine protein kinase	STK2	<i>G. max</i>	1.0e-145	
A119	1149	AB839207	HAL	+	+					Serine/threonine protein kinase	STK3	<i>G. max</i>	0.0	
A122	538*		HAL	-	+					GTP-binding protein	GBP	<i>V. vinifera</i>	2.0e-30	
A123'	558	AB839222	HAL	+	+					Protein kinase	PK	<i>G. max</i>	1.0e-115	

Table 6. continued

Other									
B05c-2	682*	LpA	+	+	DNA-directed RNA polymerase	DDRP	<i>M. truncatula</i>	2.0e-10	
B06c-1	3048	LpA	+	-	Putative E3 ubiquitin ligase	E3UL	<i>P. trichocarpa</i>	0.0	
B07c-1	363	LpA	+	-	Heavy metal associated domain containing protein	HMA	<i>G. max</i>	2.0e-29	
C20c-2	744	LpA	-	+	Expansin-like	EXP	<i>G. max</i>	8.00E-93	
D02c-1	1986	LpA	+	-	Armadillo repeat-containing protein	ARP	<i>M. truncatula</i>	0.0	
E10c-1	297*	LpA	+	-	Proton pump-interactor 1-like	PPI	<i>G. max</i>	2.0e-11	
C03c-1	939	LH	-	+	Coatmer subunit β '-2-like	β '-COP	<i>G. max</i>	2.0e-179	
C14c-1	1098	LH	+	+	MYND-type zinc finger protein	MYND	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4.0e-149	FS587256
A101-2	1257	HAL	+	+	Extensin-like protein	EXT	<i>G. max</i>	0.0	
A132	788**	HAL	+	+	60S Ribosomal protein-like	60S	<i>G. max</i>	1.0e-46	
Unknown									
A111	1230	HAL	+	+	Uncharacterized protein		<i>G. max</i>	3.0e-155	
A163	366	HAL	+	+	Uncharacterized protein		<i>G. max</i>	2.0e-42	
A01c-1	1290*	LpA	+	-	No hits				
C19c-1	1131**	LpA	+	-	No hits				
E09c-4	811*	LpA	+	-	No hits				
AI24-1	1241**	HAL	+	+	No hits				
AI17'	932*	HAL	+	+	No hits				
AI21'	1377*	HAL	-	+	No hits				

a) * : partial sequence and not cloned. ** : estimated pseudogene and not cloned.

b) PH: low-pH (pH 3.0) treatment. LAL: low-pH/Al (pH 3.0, 0.1 mM) treatment. HAL: high-Al (pH 4.3, 2 and/or 5 mM) treatment. LpA: low-pH and low-pH/Al treatments. LH: low-pH, low-pH/Al and high-Al treatments.

c) * : time for low-pH and/or low-pH/Al treatments. ** : Al concentration of high-Al treatment. + and - : up-regulated and similar level compared with control, respectively.

d) >98% identity to EST databases (FS: Suzuki et al., 2012; GR: Yong et al., 2011).

Table 7. Al-resistance gene homologs detected in *Acacia mangium* in this study

Gene	Length (bp)	Gene expression ^{a)}										Result of Blast search			Identity to <i>Arabidopsis</i> Al resistance gene		Identity to EST ^{d)}	
		Cell		Low-pH		24h Al (mM)		Low-pH		Root		Homology	Organism and accession no.	Identity (%) ^{b)}	Gene	Identity (%) ^{c)}		
		Low-pH	24h	1h	24h	1h	24h	1h	24h	1h	24h							
		1h	24h	0.1	2	5	1h	24h	1h	24h	5 mM Al							
AmALMT1	1443	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	+	Aluminum-activated malate transporter	<i>Glycine max</i> NP_001237989	67	At1g08430	42	
AmMATE2	1545	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Aluminum-activated citrate transporter	<i>Glycine max</i> NP_001238722	83	At1g51340	69	
AmSTOP1	1278	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sensitive to proton rhizotoxicity 1-like	<i>Glycine max</i> XP_003556206	74	At1g34370	58	FS585053
AmSTAR1	873	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	ABC transporter I family member 17	<i>Glycine max</i> XP_006584910	79	At1g67940	70	FS588102
AmALS1	1890	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ABC transporter B family member 25-like	<i>Cicer arietinum</i> XP_004508658	86	At5g39040	74	
AmALS3	840	-	-	+	+	+	N.D.	-	+	+	+	+	Aluminum sensitive 3-like	<i>Glycine max</i> XP_003536972	84	At2g37330	76	

a) N.D.: not detected. + and -: up-regulated and similar level compared with control, respectively.

b and c) At the amino acid level.

d) >98% identity to EST databases (Suzuki et al., 2012).

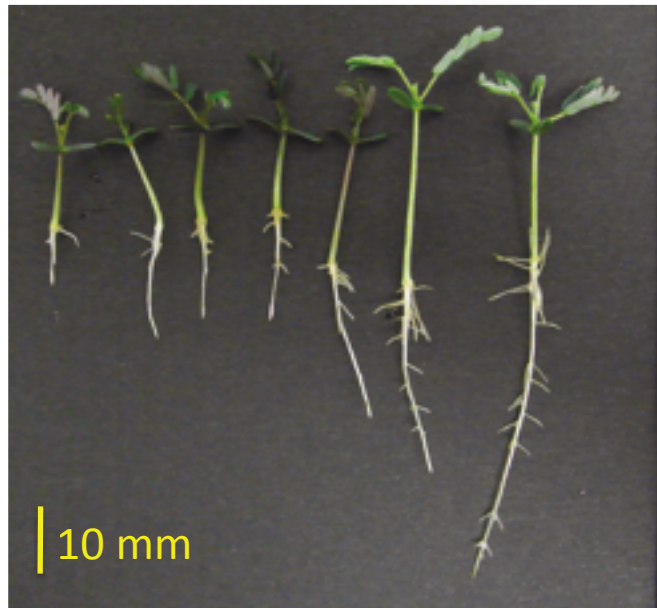


Fig. 1. *A. mangium* seedlings at 10 days after sowing on an agar medium showing various growth rates.

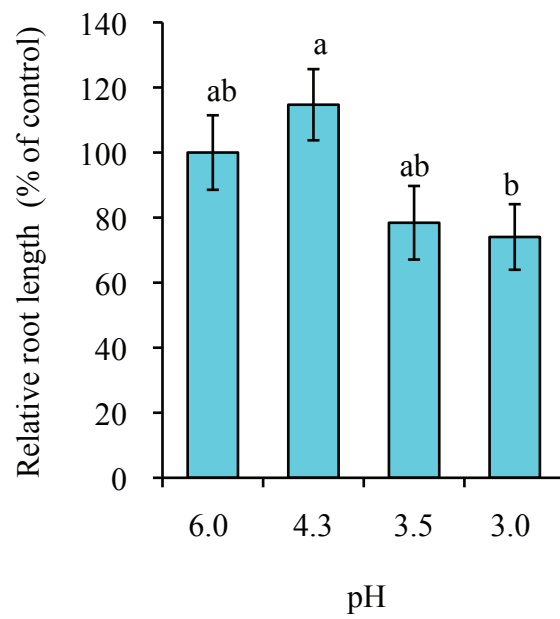


Fig. 2. Effect of pH on the root growth of *A. mangium* seedlings. Bars indicate SE (n = 9). Same alphabets show no significant difference at $p = 0.05$ by Tukey test.

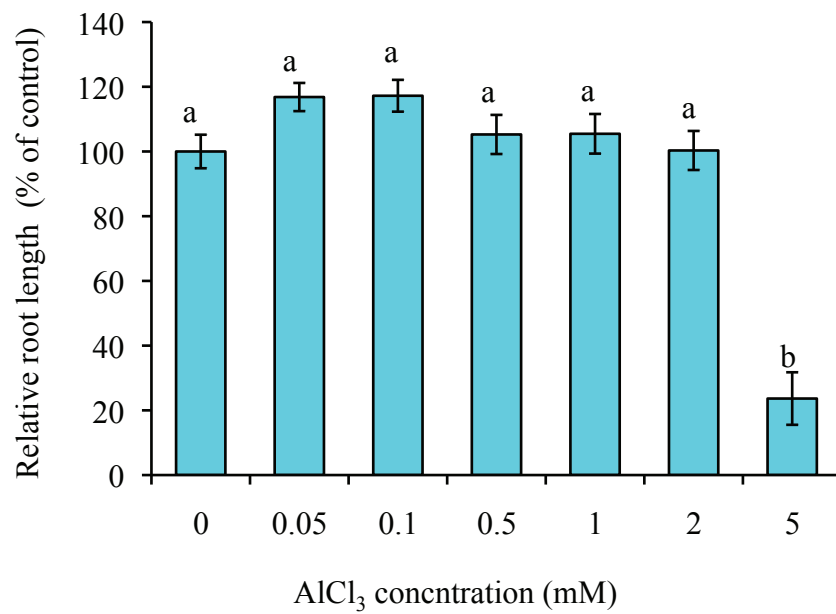


Fig. 3. Effect of Al concentration on root growth of *A. mangium* seedlings. Bars indicate SE (n = 44 -66). Same alphabets show no significant difference at $p = 0.05$ by Tukey test.

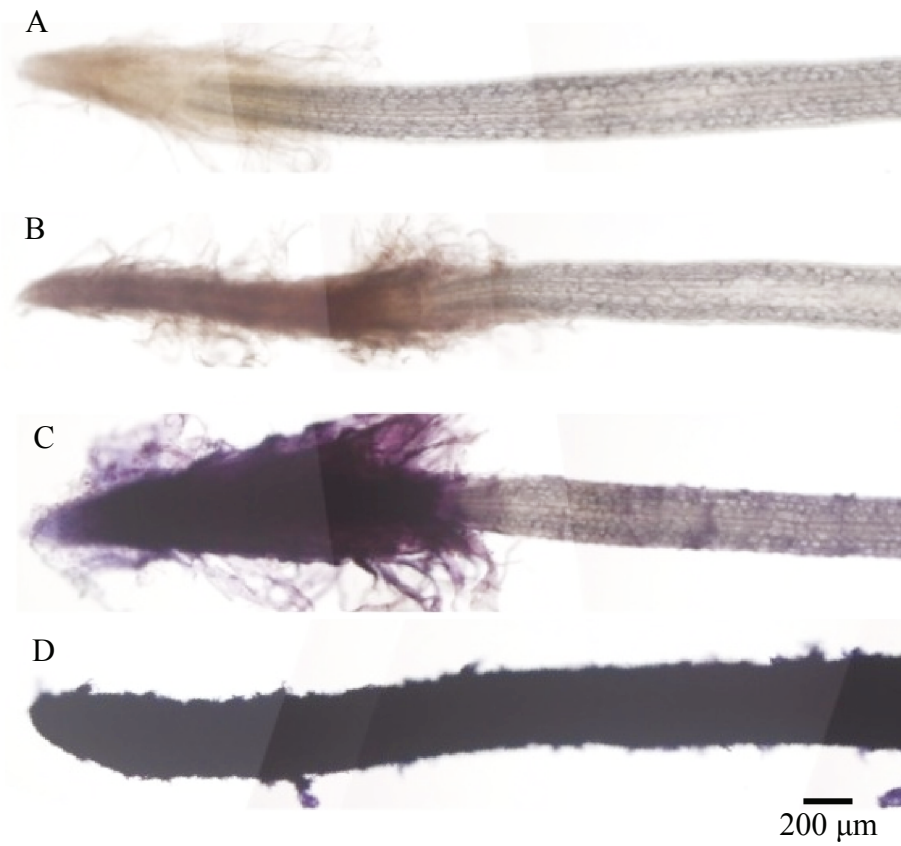


Fig. 4. Hematoxylin staining of Al-treated *A. mangium* roots. A, control (0.0 mM AlCl₃); B, 0.05 mM AlCl₃; C, 1.0 mM AlCl₃; D, 5.0 mM AlCl₃.

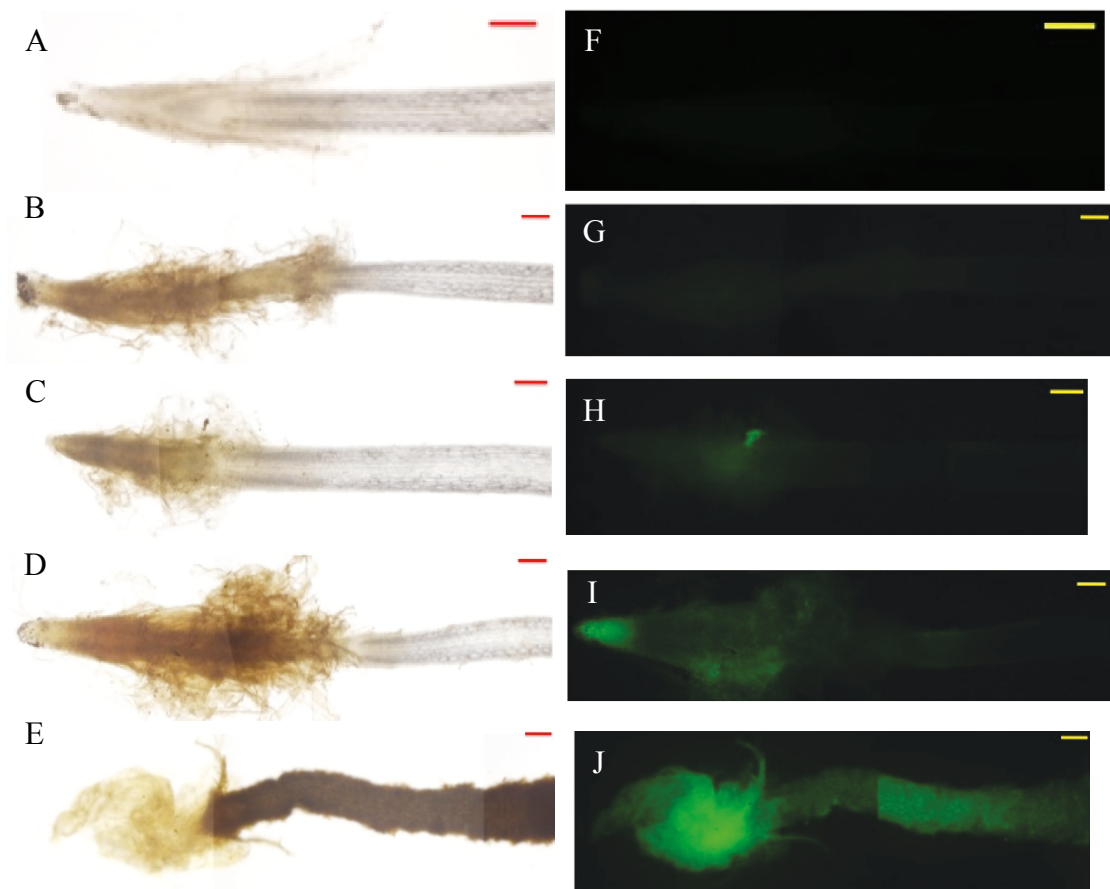


Fig. 5. Morin staining of Al-treated *A. mangium* roots. A and F, control (0.0 mM AlCl₃); B and G, 0.05 mM AlCl₃; C and H, 0.1 mM AlCl₃; D and I, 0.5 mM AlCl₃; E and J, 5.0 mM AlCl₃. A – E, light microscope. F – J, fluorescence microscope.

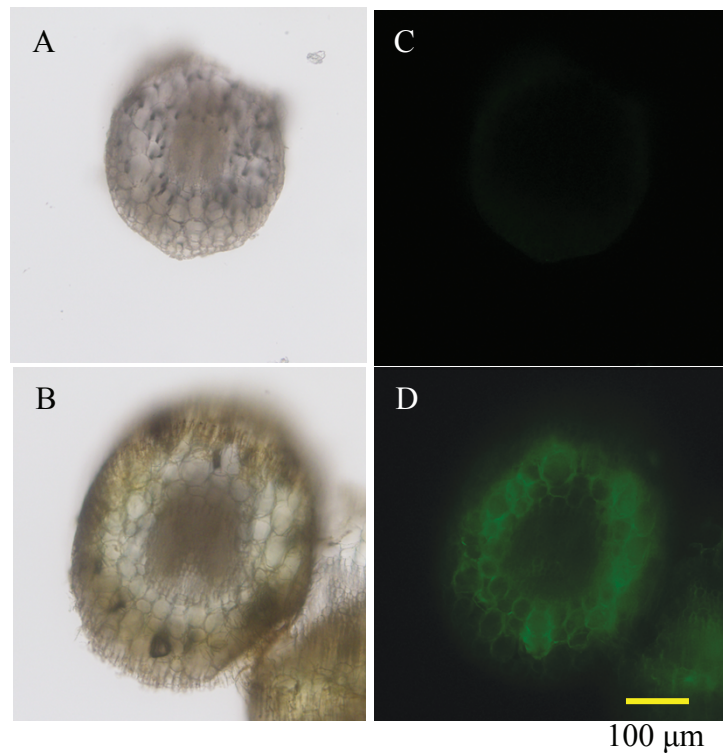


Fig. 6. Cross section of Al-treated *A. mangium* roots with morin staining. A and C, 0.1 mM AlCl₃; B and D, 5.0 mM AlCl₃; A and B, light microscope; C and D, fluorescence microscope.

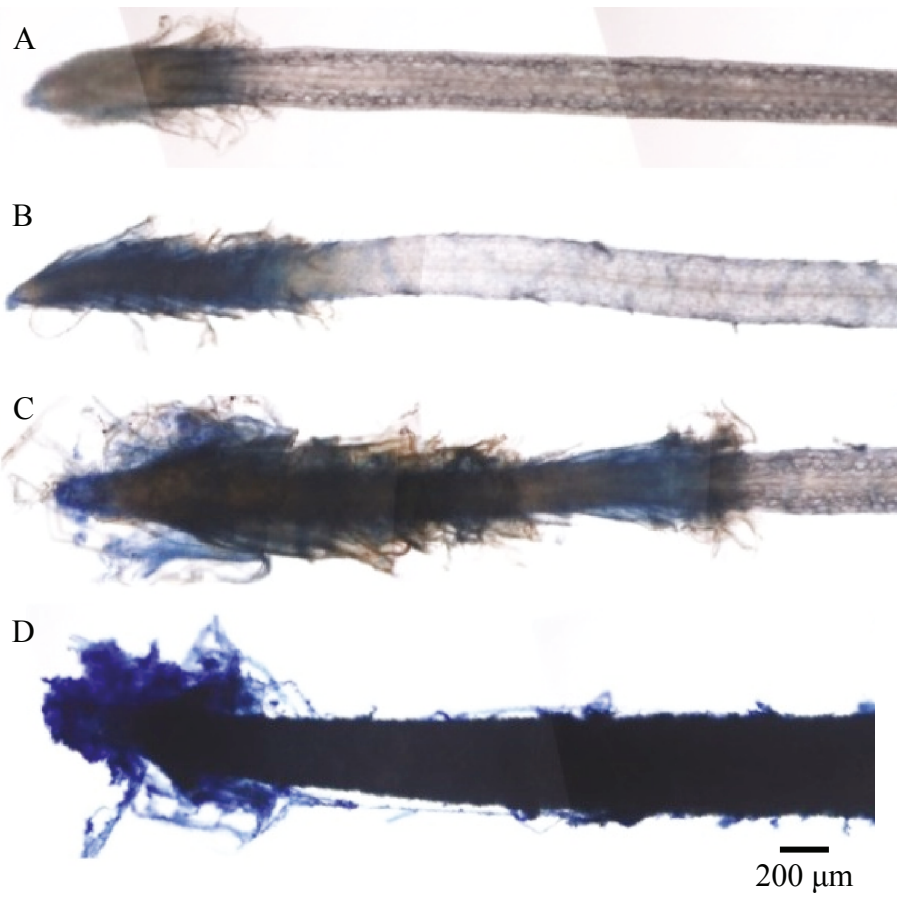


Fig. 7. Evans blue staining of Al-treated *A. mangium* roots. A, control (0.0 mM AlCl₃, pH 4.3); B, 0.5 mM AlCl₃; C, 1.0 mM AlCl₃; D, 5.0 mM AlCl₃.

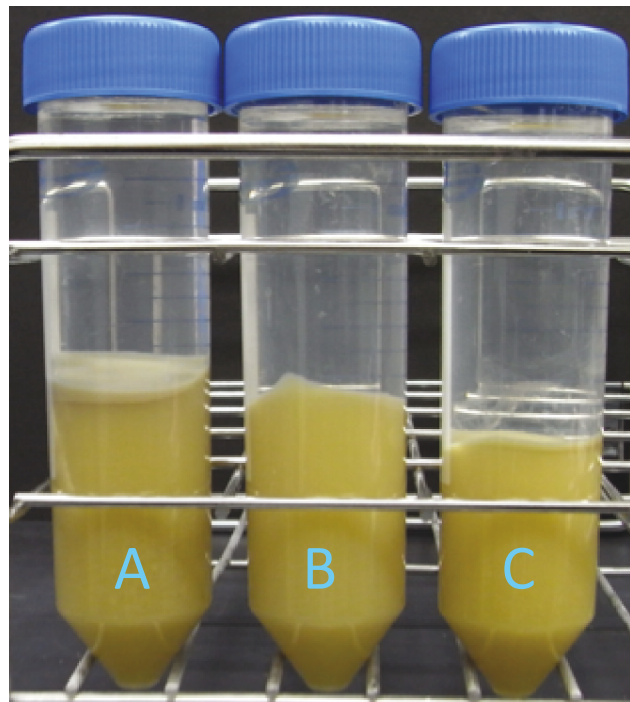


Fig. 8. Suspension-cultured *A. mangium* cells in low-pH and high Al media.
A, pH 5.8; B, pH 2.5; C, 3.0 mM AlCl₃ (pH 3.0).

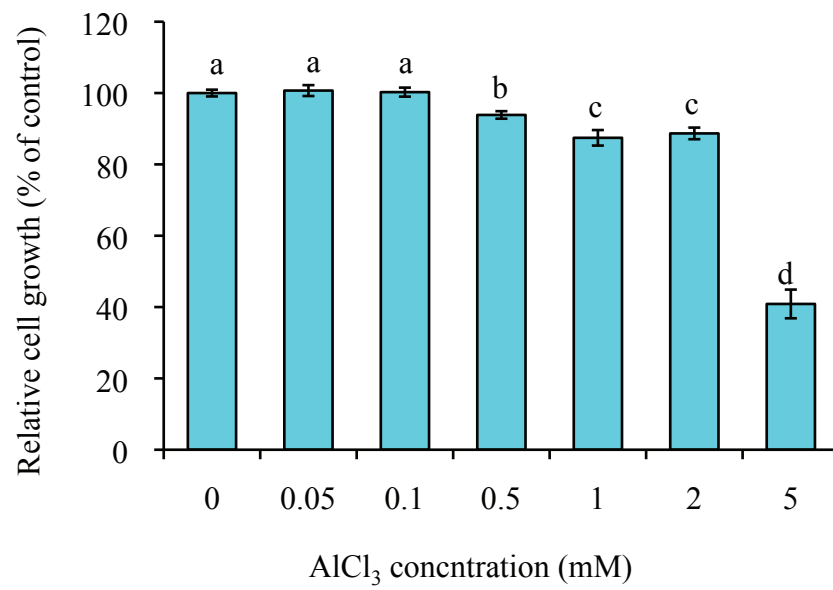


Fig. 9. Effect of Al on cell growth of *A. mangium* cultures . Bars indicate SE (n = 16). Same alphabets show no significant difference at $p = 0.05$ by Tukey test.

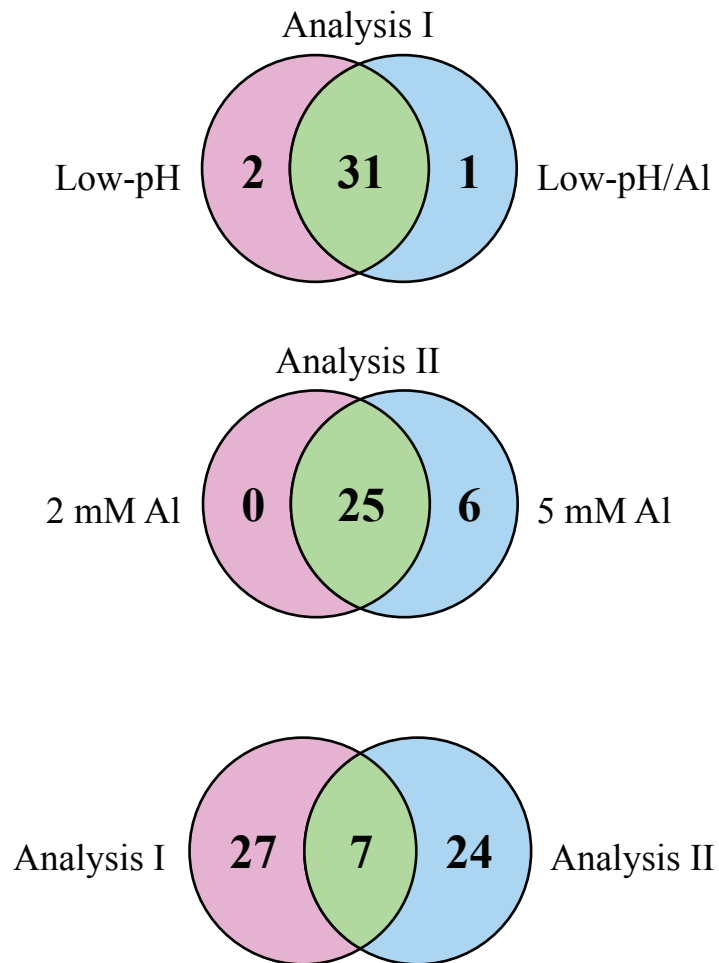


Fig. 10. Numbers of stress-responsive genes detected in two analyses using cultured *A. mangium* cells. Analysis I, low-pH and low-pH/Al conditions; analysis II, high-Al conditions.

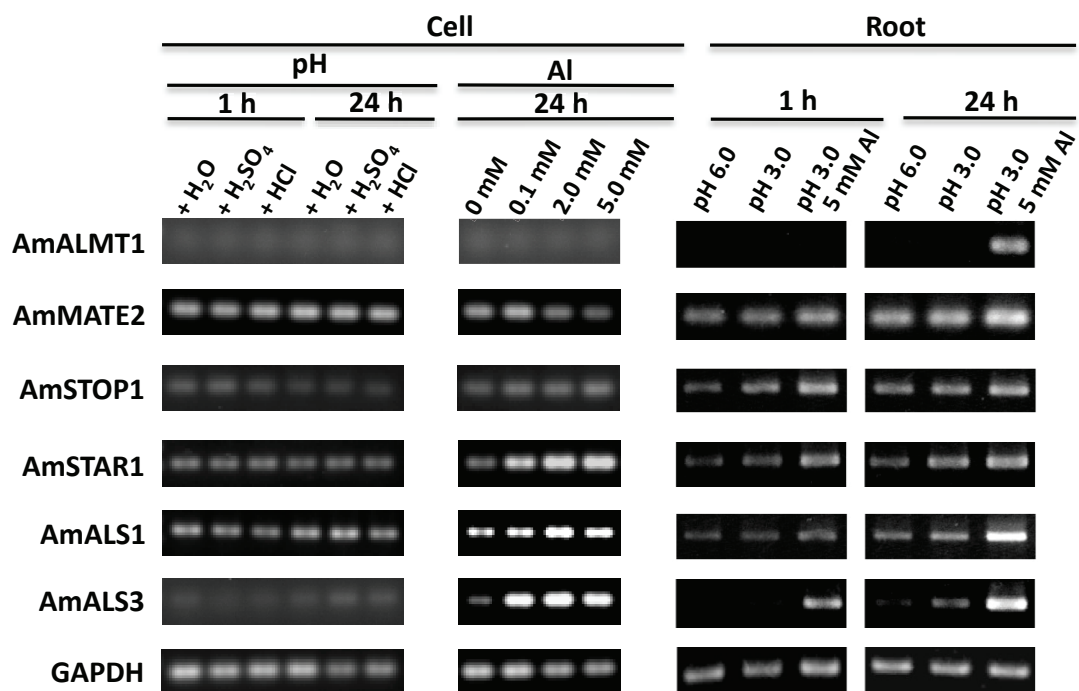


Fig. 11. Expression analysis of genes involved in stress resistance in *A. mangium* detected through degenerate PCR.

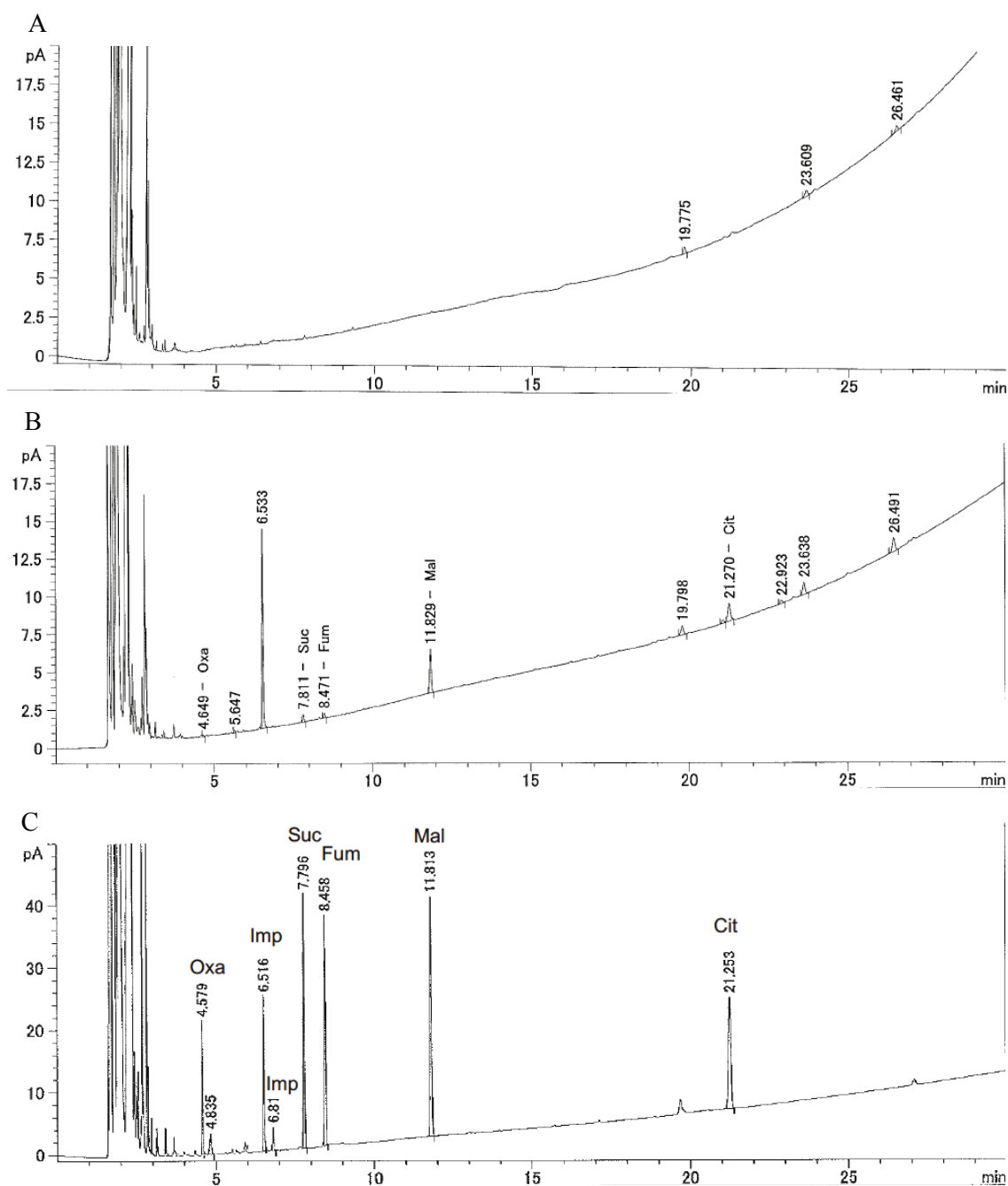


Fig. 12. Al-induced efflux of organic acids from cultured *A. mangium* cells determined by GC analysis. A, secretions from control cells; B, secretions from cells treated with 2.0 mM AlCl₃; C, standard samples. Cit, citric acid; Fum, fumaric acid; Mal, malic acid; Oxa, oxalic acid; Suc, succinic acid.

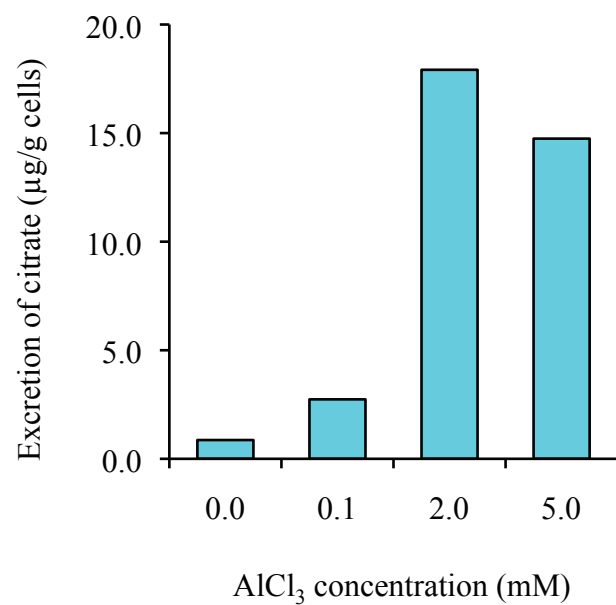


Fig. 13. Al-induced efflux of citrate from cultured *A. mangium* cells measured by UPLC analysis.

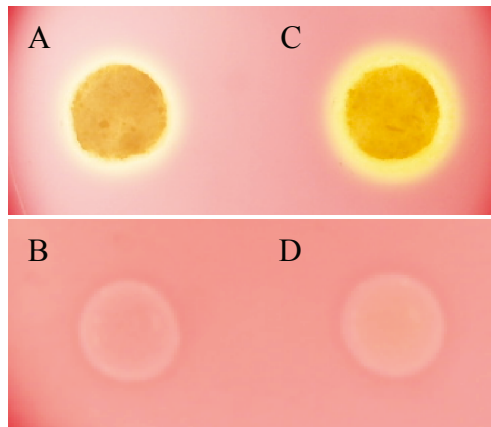


Fig. 14. Low-pH-induced efflux of proton from cultured *A. mangium* cells. A and B, control (pH 5.8); C and D, pH 3.0. A and C, cells; B and D, wash solution.

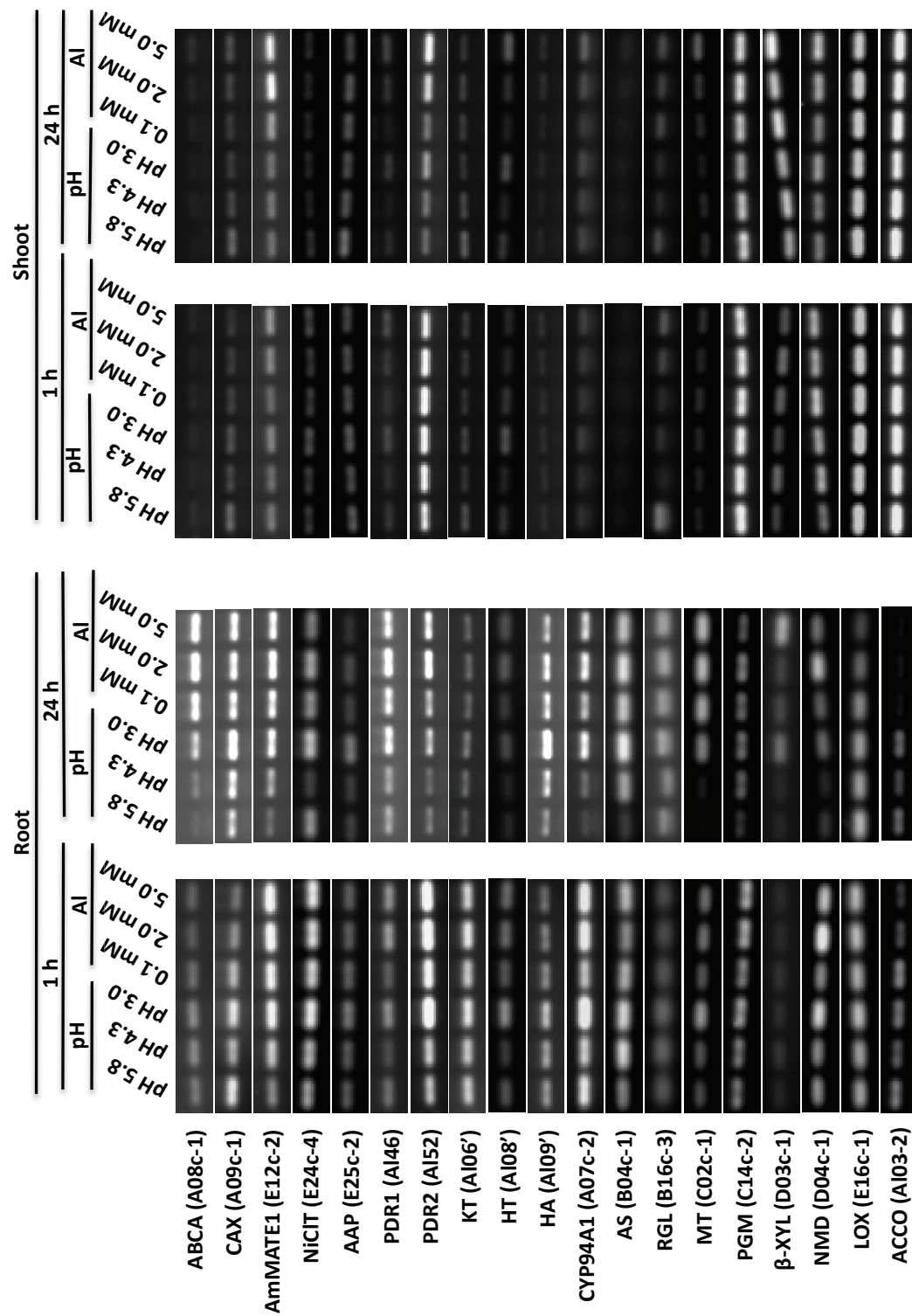


Fig. 15. Organ-specific expression of selected genes in *Acacia mangium* seedlings.

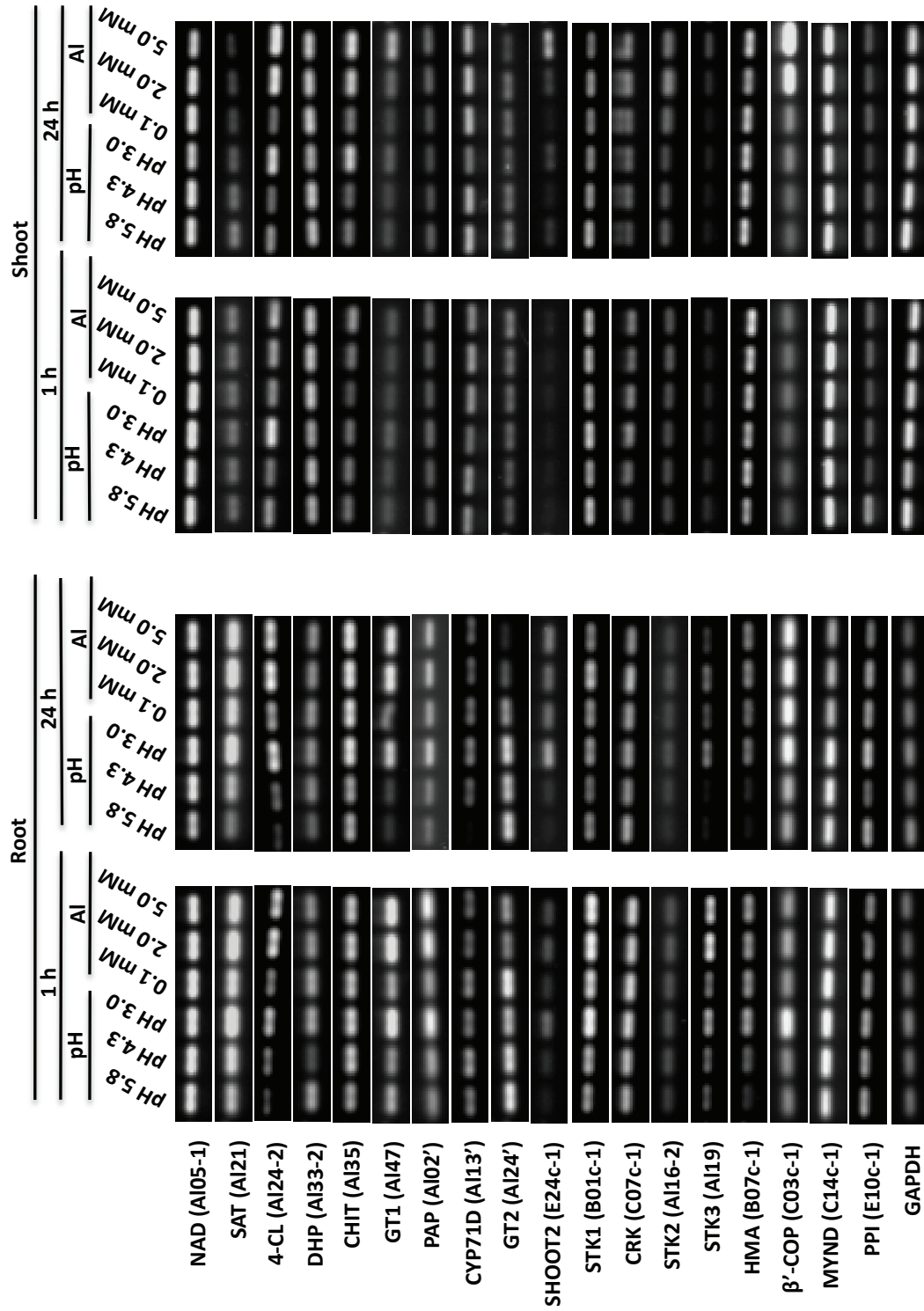


Fig. 15. continued

考 察

本研究は、環境抵抗性木本植物の実生と培養細胞系を用いて低 pH や Al ストレスに対する応答を解析したものであり、特に培養細胞を活用した応答遺伝子の全長 cDNA クローニングは我々の知る限り初の試みである。以下に、*Acacia mangium* の低 pH/Al ストレス抵抗性と検出された遺伝子の機能に関する考察を行い、今後の課題と展望を述べる。

1. *Acacia mangium* のストレス抵抗性とストレス応答遺伝子の検出

序論で述べたように、これまでの植物の酸性土壌適応に関する分子レベルでの研究は、2004 年のコムギの *ALMT* 遺伝子の同定 (Sasaki et al. 2004) を皮切りに、草本のモデル植物や穀物を中心に行われている。木本の環境抵抗性植物についても、生理学的な研究が進展し、また一部分子生物学的研究が行われている。たとえば最近、クスノキの Al 抵抗性に関連して、根の表皮のプロアントシアニン蓄積細胞の発達と脱離の重要性が示された (Osawa et al. 2011)。またユーカリや *Populus tremula* で Al 抵抗性に関与する既知の遺伝子が報告されている (Grisel et al. 2010; Sawaki et al. 2013)。しかし、実用化されている酸性土壌適応植物である *A. mangium* については、材としての有用性からその部分の EST が報告されているものの (Suzuki et al. 2011)、ストレス抵抗性に関する分子生物学的解析は行われていない。本研究では、*A. mangium* の実生と培養細胞を用いてストレス応答を検討し、分子レベルでの実験系の確立を目指した。

実生の低 pH に対する成長応答を測定したところ、pH 4.3 の培地では pH 6.0

と較べて根の伸長が促進される傾向にあり、この植物が弱酸性の環境を好むことが示された。一方、pH 3.5 以下では根の伸長が阻害される傾向が見られた (Fig. 2)。また、Al ストレスに対する成長応答を検討した結果、根の伸長は 5.0 mM の AlCl₃ を添加した培地において約 80% 阻害されたが、2.0 mM よりも低い AlCl₃ 濃度ではほとんど影響を受けなかった (Fig. 3)。これまでに調べられた他の多くの植物では、pH 4.7 程度の酸性や、数 μM ~ 数 100 μM のオーダーの Al 濃度により根の伸長阻害が起こることが知られている。これらのことから *A. mangium* が低 pH と高濃度の Al に対する抵抗性を有していることが改めて確認された。

根端の Al の分布をヘマトキシリンおよびモリン染色により調べた結果、ヘマトキシリン染色では、周囲の AlCl₃ 濃度が 5.0 mM のとき根全体が濃く染色されたが、1.0 mM 以下では根冠を除いてほとんど染色されなかった (Fig. 4)。モリン染色によっても同様の結果が得られ、また、高濃度の Al 処理では根の内部も染色されたが低濃度の処理では染色されなかった (Figs. 5, 6)。さらに、エバンスブルー染色により、AlCl₃ 濃度が 5.0 mM では根全体が細胞膜の傷害により濃く染色されたが、低濃度の Al 処理では根冠を除いてわずかに染色された程度だった (Fig. 7)。他の植物では低濃度の Al 処理でヘマトキシリン染色やモリン染色により根全体が染色されるのに対し、*A. mangium* ではこのように低濃度の Al 処理では根の表面や内部に Al の蓄積が見られず、細胞の損傷も少ないことから、Al に対する高い抵抗性の 1 つの要因は Al 排除機構の発達によるものであることが示唆された。

A. mangium の懸濁培養細胞を AlCl₃ を添加した 1/2 MS 培地 (pH 4.3) を用いて 15 日間培養し、培養後の湿重量を測定した結果、コントロールと比較してそれぞれ 1.0 mM と 2.0 mM の AlCl₃ 添加では約 10%、5.0 mM の AlCl₃ 添加では約 60% の細胞増殖阻害が認められた (Fig. 9)。一方、これまでに、コーヒの培養細胞では、0.025 mM の AlCl₃ による細胞増殖阻害も報告されていることから (Martínez-Estévez et al. 2001)、*A. mangium* は実生のみならず培養細胞においても高い Al 耐性を有していることが明らかになった。

これらのことから、実験系統が確立されていない木本植物である *A. mangium* では、植物体を用いるよりも、実験系を単純化でき、細胞に対して

直接ストレスが加えられる培養細胞系を用いてストレス応答に関わる遺伝子解析を行うことが効率的であると考えられた。ストレス応答遺伝子の探索には、遺伝子情報が未整備な非モデル植物においても、比較的簡便に安価で広範な遺伝子発現応答の解析が可能である DDRT-PCR 法をまず利用した。その後、より精密な手法により候補遺伝子を絞り込むとともに、その全長 cDNA をクローニングした。一方、他植物で既知の低 pH および Al 抵抗性に関わる遺伝子由来の cDNA も、degenerate PCR 法を活用して単離した。これらの推定機能については次項で記述する。

A. mangium 培養細胞を用いたストレス応答遺伝子の同定に引き続き、実生を用いた器官別転写解析を行った。その結果、検出された遺伝子の多くで実生においてもストレス応答性が認められたと同時に、発現応答は地上部よりも根において顕著であることが明らかになった。この結果は、細胞レベルの解析が組織・器官レベルの解析に適用できることを示すもので、植物体としての取り扱いが困難な場合の、培養細胞系を用いた解析の有効性を示すものと考えられる。

2. *A. mangium* から検出されたストレス応答遺伝子

2-1. トランスポーター

培養細胞から検出されたトランスポーター遺伝子には、MATE ファミリートランスポーター や細胞膜型 H⁺-ATPase、3 種類の ABC トランスポーターなど、10 種類が含まれていた。

2-1-1. MATE ファミリートランスポーター

MATE ファミリートランスポーター遺伝子 (*AmMATE1* [E12c-2]) は唯一、*A. mangium* 培養細胞において低 pH 処理のみには応答せず、低 pH/低濃度 Al

処理で発現が上昇した遺伝子だった。この発現上昇は処理 1 時間後で既に見られ、24 時間後まで持続していた (Table 6)。一方、実生の根では、培養細胞とは異なり低 pH 処理のみにも応答して発現が上昇していた (Fig. 15)。このトランスポーターの機能との関連で、*A. mangium* 培養細胞のクエン酸排出と、それが Al 処理によって増加することが確認されている (Figs. 12, 13)。

シロイヌナズナの MATE ファミリーメンバーのうち、*AmMATE1* に最も相同なホモログは、Al 活性型クエン酸トランスポーターをコードしている *AtMATE1* (At1g51340) だった (Liu et al. 2009)。以前の研究で、Al による *A. mangium* の根からのクエン酸排出が微量であることから、この植物の Al 抵抗性におけるクエン酸の役割は細胞内での Al の解毒であるとされている (Osawa and Kojima 2006)。しかし最近、木本植物の *Populus tremula* とユーカリにおいて Al 誘導性の MATE 遺伝子が報告され、これらのうちユーカリの *EcMATE1* は Al 活性型クエン酸トランスポーターをコードしていた (Grisel et al. 2010; Sawaki et al. 2013)。従って木本植物においても、Al 抵抗性にクエン酸排出が一定の役割を持つことが十分推察され、*AmMATE1* が *A. mangium* の Al 活性型クエン酸トランスポーターをコードしている可能性がある。

2-1-2. 細胞膜型 H⁺-ATPase

細胞膜型 H⁺-ATPase 遺伝子は、塩ストレスや乾燥、低温、重金属といった多様なストレスで誘導されることがこれまでも知られている (Janicka-Russak 2011)。この遺伝子のシロイヌナズナホモログである *AHA2* は、細胞膜型 H⁺-ATPase をコードし、細胞内のイオンの恒常性維持に関わっている (Gaxiola et al. 2007)。低 pH 条件で馴化されたトウモロコシ *Zea mays* の根で認められた細胞膜型 H⁺-ATPase 活性の上昇は、細胞膜型 H⁺-ATPase が植物の低 pH ストレス適応において重要な役割を果たしていることを示唆した (Yan et al. 1998)。一方、Al 抵抗性においても、細胞膜型 H⁺-ATPase によって形成される膜を隔てたプロトン濃度勾配が、Al によって誘導される有機酸排出を制御している可能性が指摘され、実際に Al 抵抗性のダイズ *Glycine max* 品種では細胞膜型 H⁺-ATPase の発現上昇と根からのクエン酸排出量に相関が

あった (Shen et al. 2005)。

A. mangium の細胞膜型 H⁺-ATPase (HA [Al09']) は、培養細胞の低 pH と高濃度 Al 処理の両方に応答して発現上昇していた (Table 6)。また、実生の根では 24 時間の低 pH 処理で明らかに発現が上昇した (Fig. 15)。関連して、24 時間の低 pH 処理を加えた培養細胞を pH 指示薬を含む寒天上にスポットすると、低 pH 処理を加えた細胞では、未処理の細胞よりも広い範囲でスポット周囲が酸性化していたことから、プロトン排出活性が増加していることが示された (Fig. 14)。一方、proton pump interactor (PPI) は細胞膜型 H⁺-ATPase と相互作用してこれを高活性化する相互作用因子であるが (Janicka-Russak 2011)、本研究でも *PPI* (E10c-1) の部分配列が低 pH 処理を加えた *A. mangium* 培養細胞から検出されている (Table 6)。これらのことから、*A. mangium* の低 pH および Al ストレス適応において、細胞膜型 H⁺-ATPase が重要な役割を果たしていることが想定される。

2-1-3. ABC トランスポーター

ABC トランスポーターは、巨大なスーパーファミリーを形成し、生物界に普遍的に存在している (Verrier et al. 2008)。本研究では、ABCG サブファミリーに属する 2 種類の PDR タイプ ABC トランスポーター遺伝子 (*PDR1* [Al46]; *PDR2* [Al52]) が低 pH と Al 処理に応答して *A. mangium* 培養細胞から検出された (Table 6)。また、実生の根でも *PDR1* は 24 時間の低 pH と低 pH/低濃度 Al および高濃度 Al 処理に、*PDR2* は 1 時間と 24 時間の同じ処理に応答して発現上昇していた (Fig. 15)。PDR タイプ ABC トランスポーターが低 pH によっても誘導されることが本研究において初めて明らかになった。

PDR タイプ ABC トランスポーターは多くの植物種において様々な刺激に応答して発現上昇することがしばしば報告され (Rea 2007)、*AmPDR1* と *AmPDR2* のシロイヌナズナホモログは、それぞれ鉛耐性に関与する *AtPDR12* (At1g15520; Lee et al. 2005) とカドミウム耐性に関与する *AtPDR8* (At1g59870; Kim et al. 2007) だった。また、Al 抵抗性のトウモロコシ品種で *AmPDR1* のホモログの発現上昇も報告されている (Maron et al. 2008)。

また、PDR タイプ以外にも、その機能の詳細は不明ながら、ABCA サブファミリーに属する ABC トランスポーター (ABCA [A08c-1]) が検出された。ABCA は培養細胞で低 pH/低濃度 Al 処理に応答して発現上昇していたが (Table 6)、実生を用いた器官別転写解析でも根において 24 時間の高濃度 Al 処理に応答して発現上昇が認められた (Fig. 15)。これらのことから、*A. mangium* の低 pH/Al ストレス適応において多様な ABC トランスポーターが関与している可能性が示唆された。

2-1-4. Cation/calcium exchanger

A. mangium 培養細胞から、cation exchanger (CAX) ファミリーに属する cation/calcium exchanger (CAX [A09c-1]) が低 pH 処理のみに応答して検出され (Table 6)、実生においても 24 時間の低 pH 処理により発現した (Fig. 15)。

Ca²⁺は植物の生長や発達において重要な無機イオンであり、その恒常性は細胞壁や細胞膜の構造維持や各種タンパク質の機能においても重要な役割を果たしている。また、Ca²⁺によって仲介されるシグナル伝達は、塩や乾燥などによる非生物ストレスや、病原体感染による生物ストレスへの応答において重要である (Bose et al. 2011)。シロイヌナズナにおいて、液胞膜に局在している H⁺/Ca²⁺exchanger をコードしている *CAX3* の変異体は、低 pH や塩ストレスに対して感受性を示すことが報告されている (Zhao et al. 2008)。また、機能の詳細は不明ながら、*CAX7* の転写は STOP1 によって制御されている (Sawaki et al. 2009)。これらのことから、本研究で検出された CAX もまた、酸性土壌適応に関連した Ca²⁺の恒常性維持や、ストレス抵抗性に関連したシグナル伝達において何らかの役割を果たしている可能性が推察される。

2-2. 代謝関連酵素

A. mangium 培養細胞の低 pH と低 pH/低濃度 Al 処理、および高濃度 Al 処理により 18 種類の代謝酵素遺伝子が検出された。このカテゴリーには、炭素や窒素代謝に関わる酵素遺伝子の他にも、ホルモン生合成や、二次代謝関連な

どの多様な遺伝子が含まれていた。以下それらに想定される生理機能ごとに、この植物のストレス抵抗性との関連について考察する。

2-2-1. 防御応答関連

ジャスモン酸生合成に関わる lipoxygenase 遺伝子 (LOX [E16c-1]) は、1 時間の低 pH と低 pH/低濃度 Al 処理により発現が上昇し、エチレン生合成に関わる 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACCO [A103-2]) は高濃度 Al 処理によって発現上昇した (Table 6)。実生ではこれらの遺伝子の発現上昇は、処理 1 時間、24 時間ともに認められなかった (Fig. 15)。ジャスモン酸とエチレンは、生物的、非生物的な幅広いストレス応答に関連したシグナル伝達に関与していることが知られている (Porta and Rocha-Sosa 2002; Bari et al. 2009)。LOX 遺伝子の発現上昇は、8 時間の低 pH 処理を加えたシロイヌナズナの根や (Larger et al. 2010)、12 時間の Al 処理を加えたエビスグサ *Cassia tora* の根で認められている (Xue et al. 2008)。その他にも、銅や塩ストレスによっても発現上昇していた (Zhao et al. 2009a)。また、ACCO 遺伝子に関しては、16 時間の Al 処理を加えたシロイヌナズナの根において発現上昇が認められている (Goodwin and Sutter 2009)。しかし、エチレンに関しては Al による根の伸長阻害との関連性も議論されていることから (Massot et al. 2002)、ACCO の発現上昇は Al 毒性に関連したものである可能性もある。

Class I chitinase (CHIT [A135]) は、培養細胞の高濃度 Al 処理によって発現上昇し (Table 6)、実生では地上部で低 pH と高濃度 Al 処理に応答して発現上昇していた (Fig. 15)。CHIT 遺伝子は一般的な防御応答遺伝子として知られ、病原体感染、重金属や塩ストレスなどの多様なストレスによって誘導される (Sharma et al. 2011)。*A. mangium* でも、CHIT 遺伝子の誘導は一般的なストレス応答であると考えられる。

グルタチオンやフィトケラチンの生合成へと繋がるシステイン経路で機能する serine acetyltransferase (SAT [A121]) は、培養細胞の高濃度 Al 処理で発現が上昇し (Table 6)、実生の根では低 pH と高濃度 Al の両方での処理後、1 時間、24 時間でともに発現上昇していた (Fig. 15)。この代謝経路で機能する

CSase の、酸性土壌適応性との関連についての知見がこれまでも得られている。すなわち、Al 抵抗性の植物種では感受性種よりも高い CSase 活性が認められ (Hasegawa 2008)、またプロテオーム解析から CSase のタンパク質レベルでの発現上昇が、イネ (Yang et al. 2007) とダイズ (Duressa et al. 2011) の Al 耐性品種からそれぞれ報告されている。*A. mangium* の SAT も、グルタチオンによる活性酸素種 (ROS, reactive oxygen species) の除去や、フィトケラチンによる細胞内での Al の解毒などに間接的に寄与している可能性が推察される。

生物的、非生物的ストレスに対する植物による応答の代表的なものとして ROS の生成が広く知られ、これまでに行われてきた多数のストレス応答遺伝子の転写解析で glutathione-S-transferase (GST)、peroxidase (POX)、superoxide dismutase (SOD) などの ROS の除去酵素が検出されている (Kumari et al. 2008; Goodwin and Sutter 2009; Zhao et al. 2009a)。しかし、本研究では ROS の除去に直接的に関与する酵素遺伝子は検出されなかった。これは、本研究で行った DDRT-PCR 条件によるものと考えられ、ストレス条件下の *A. mangium* での ROS 除去関連遺伝子の転写応答に関する知見を得るためには、既知遺伝子との相同性に基づいた degenerate PCR 法や、EST 検索などによるホモログの単離が必要であると思われる。

2-2-2. 細胞壁関連酵素

実生では明確な発現上昇を検出することはできなかったが (Fig. 15)、培養細胞において rhamnogalacturonate lyase (RGL [B16c-3]) が低 pH および低 pH/低濃度 Al 処理、高濃度 Al 処理の両方により発現上昇した。また、 β -D-xylosidase (β -XYL [D03c-1]) は、培養細胞では低 pH 処理にのみ応答して発現上昇し、実生の根では 5.0 mM の Al 処理により発現上昇した (Table 6)。これらは細胞壁関連多糖の分解酵素であり、RGL はペクチンの、 β -XYL はヘミセルロースの主成分であるキシランの分解酵素である。RGL については、これまでに他植物の低 pH や Al ストレス応答遺伝子の転写解析での検出例がない新規のものである。

また、細胞壁構造タンパク質の expansin-like protein (EXP [C20c-2])や extensin-like protein (EXT [A101-2])が検出された (Table 6)。これらの遺伝子は、ストレス条件下での細胞壁の構造改変による低 pH や Al に対する抵抗性機構に関与している可能性が推察される。

2-2-3. 酸性フォスファターゼ

Purple acid phosphatase (PAP [A102'])は培養細胞の高濃度 Al 処理で発現が上昇し (Table 6)、実生の根では低 pH と高濃度 Al の両方で発現上昇していた (Fig. 15)。この遺伝子は、細胞外に分泌されることが推定されるフォスファターゼをコードするシロイヌナズナの *AtPAP27* に相同性を示し、推定アミノ酸配列からは N 末端にシグナルペプチドの存在が示唆された。酸性フォスファターゼの根圏への分泌は、リン欠乏条件下での植物のリン栄養獲得戦略の1つと考えられている (Hiradate et al. 2007)。これまでに、シロバナナルピナス *Lupinus albus* やタルマゴヤシ *Medicago truncatula* 由来の分泌型酸性フォスファターゼを導入した植物における、リン栄養吸収や成長の促進が報告されている (Ma et al. 2009; Wasaki et al. 2012)。酸性土壌では、Al がリン酸と不溶性塩を形成してリン酸の溶解性が低下し、リン栄養の欠乏が引き起こされる。このことから、本研究で *A. mangium* から検出された *PAP* もまた、酸性土壌でのリン栄養の獲得に関連している可能性がある。

2-2-4. 窒素代謝関連

Asparagine synthetase (AS [B04c-1])は低 pH および低 pH/低濃度 Al 処理 24 時間後の培養細胞で発現上昇が観察され (Table 6)、実生の根でも低 pH と低濃度および高濃度 Al 処理によって発現が上昇した (Fig. 15)。今回検出された *AS* のシロイヌナズナホモログは、シロイヌナズナの根において低 pH 処理後期 (8 時間後) に発現上昇することが報告されており (Lager et al. 2010)、本研究の結果もこれと一致した。アスパラギンは窒素の貯蔵型と考えられ、*AS* は植物にとって有毒な過剰のアンモニウムの解毒や貯蔵、輸送において重要な

役割を果たしている」と推定されている (Møller et al. 2003)。また、一般的に酸性土壌では硝化細菌の活動が低下し、アンモニウムが優位な窒素源となることが知られ、根における窒素代謝と根圏の pH は密接に関連していると考えられている (Britto et al. 2002)。

詳細な機能解析はなされていないが、Al 感受性のコムギ品種の根から単離された *wali-7* (*wheat aluminum induced gene 7*) は、AS の N 末端領域をコードしていると推定されている (Richards et al. 1994)。アワ *Setaria italica* の種子由来 cDNA ライブラリーから単離された *Si69* では、*wali-7* と類似したドメインが見出され、*Si69* を過剰発現させたシロイヌナズナに Al 抵抗性が付与されたことも報告されている (Zhao et al. 2009b)。これらのことから、*A. mangium* から検出された AS 遺伝子もまた、低 pH や Al ストレス抵抗性において過剰なアンモニウムの解毒などの役割を果たしている可能性が考えられる。

2-2-5. シトクロム P450

シトクロム P450 (P450) は、真核生物において広範に分布する酸化酵素のスーパーファミリーをなしている。本研究では、*CYP94A1* (A07c-2) と *CYP71D* (Al13') の 2 種類の P450 遺伝子が検出され、培養細胞では、*CYP94A1* は低 pH と低 pH/低濃度 Al 処理に、*CYP71D* は高濃度 Al 処理によって発現上昇した (Table 6)。*CYP94A1* は実生の根でも低 pH と高濃度 Al 処理に応答して発現上昇したが、*CYP71D* は実生において転写パターンに明確な変化は見られなかった (Fig. 15)。

シロイヌナズナの *CYP94A1* は脂肪酸の炭素鎖の内部や末端 (ω 位) のヒドロキシル化反応を触媒し、 ω -ヒドロキシ脂肪酸は防御応答を誘発するシグナル物質としての役割や、植物の保護壁であるクチンやスベリンの合成に関連していることが知られている (Pinot and Beission 2011)。クチンは物質の細胞外への拡散を防ぐ疎水的なバリアや環境ストレス応答のためのバリアとして機能する。ダイズにおいても 48 時間の Al 処理で *CYP94A1* 遺伝子の発現上昇が報告されている (Duressa et al. 2010)。*A. mangium* の *CYP94A1* の機能については今後の解析が必要であるが、本研究では、この遺伝子が低 pH 処理にも応答

していることが初めて明らかになった。

CYP71D サブファミリーは典型的な二次代謝酵素群で、アルカロイドやモノテルペン、フラバノンのヒドロキシラーゼなど非常に多様なメンバーが含まれている。*A. mangium* におけるこの遺伝子の機能についても *CYP94A1* 遺伝子と同様さらなる解析が必要である。

2-2-6. 糖転移酵素

2種類の糖転移酵素遺伝子 (GT1 [Al47]; GT2 [Al24']) が培養細胞の高濃度 Al 処理によって検出され (Table 6)、GT2 の実生におけるストレス応答は認められなかったが、GT1 は実生の根において低 pH と高濃度 Al により発現上昇した (Fig. 15)。細胞壁多糖の合成は、UDP-グルコースのような糖ヌクレオチドを基質として、糖転移酵素のはたらきにより行われる。イネの Al 抵抗性に関与する OsSTAR1-OsSTAR2 複合体は、Al ストレス条件下での細胞壁の構造改変に必要となる UDP-グルコースの分泌顆粒への輸送に関わると考えられ (Huang et al. 2009)、Al 感受性の *star1* 変異体は、Al 処理時に UDP-グルコースを同時添加することにより Al 感受性が減少した。本研究で検出された糖転移酵素の機能に興味をもたれる。

2-2-7. Phosphoglycerate mutase

実生では明確な転写応答は認められなかったが (Fig. 15)、培養細胞では解糖系酵素の phosphoglycerate mutase (PGM [C14c-2]) は低 pH および低 pH/低濃度 Al 処理で発現上昇した (Table 6)。8時間の低 pH 処理を加えたシロイヌナズナの根でも PGM の発現上昇が認められている (Larger et al. 2010)。植物細胞内の pH 調節において解糖系の役割が提唱されており (Sakano 1998)、*A. mangium* での PGM の発現上昇は、この機構と何らかの関連があるかもしれない。

2-2-8. Dihydropyrimidinase

Dihydropyrimidinase (DHP [Al33-2]) もまた、実生での明確な転写応答は認められなかったが (Fig. 15)、培養細胞では高濃度 Al 処理によって発現上昇していた (Table 6)。DHP はウラシルの分解系ではたらく酵素で、この経路で生成される代謝産物のβ-アラニン (Zrenner et al. 2009) よりβ-アラニンベタインがつくられる。ベタイン類は浸透圧調節物質として塩や乾燥ストレス耐性に関与しているが、その他にも ROS の除去や細胞膜の維持などによるストレス耐性にも関与している (Oztetik 2011)。これまでに他植物の低 pH や Al ストレス応答遺伝子の転写解析では、*DHP* 遺伝子の検出例はなく、本研究が初めての報告である。*A. mangium* の高い環境抵抗性と、この遺伝子の関わりに興味を持たれる。

2-2-9. 二次代謝系

前述の CYP71D に加えて、neomenthol dehydrogenase (NMD [D04c-1]) と 4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase (4-CL [Al24-2]) は植物の二次代謝系の酵素である。当解析で NMD とアノテートされたタンパク質は、short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) と呼ばれる酸化還元酵素ファミリーのひとつで、SDR 酵素群はテルペノイドばかりでなくフラボノイドやアルカロイドなど非常に多様な二次代謝産物の生合成系で機能する。また 4-CL もフェニルプロパノイド系の鍵酵素のひとつで、すべての維管束植物のリグニン合成系に関わる他、フラボノイドなどの生合成にも関与する。これらが *A. mangium* の根で Al ストレスに対応して発現している (Fig. 15) ことは、よく知られた生物学的ストレスに対する植物の防御物質などの二次代謝系の変動とともに、物理化学的ストレスに対しても二次代謝系の亢進が起きていることを示している。今後 P450 とともにこれらの酵素が関わる代謝系が明らかになれば、*A. mangium* の特異的代謝物の対ストレス機能の研究への発展が期待される。

2-3. 転写因子

低 pH および低 pH/低濃度 Al 処理により 2 種類、高濃度 Al 処理により 1 種類の転写因子と推定される遺伝子が、*A. mangium* 培養細胞から検出された (Table 6)。これらのうち MYB ドメインを持つ SHOOT2 (E24c-1) は、実生の根でも低 pH に応答して発現が上昇した (Fig. 15)。SHOOT2 のシロイヌナズナホモログ (At3g10040) は 8 時間の低 pH 処理を加えたシロイヌナズナの根で発現上昇していた (Larger et al. 2010)。

低 pH や Al 抵抗性に関わる転写因子としては、シロイヌナズナの STOP1 とイネの Al 抵抗性遺伝子を制御している ART1 が知られ、これらはともに Cys₂/His₂-type zinc finger 転写因子をコードしている。1 時間の低 pH 処理を加えたシロイヌナズナの根では、複数の WRKY 転写因子などの多様な転写因子が発現上昇していた (Larger et al. 2010)。本研究で行った DDRT-PCR 法による転写解析からはこれまでに報告されていた WRKY や Cys₂/His₂-type zinc finger protein をコードする遺伝子は検出されず、degenerate PCR 法により STOP1 ホモログが得られている。上記 *A. mangium* 培養細胞から検出された SHOOT2 および他の 2 種の転写因子の機能は不明であり、今後ゲルシフト法によるゲノム中の結合配列の解析や、過剰発現体と野生型との比較トランスクリプトーム解析による被制御遺伝子の解析などが待たれる。

2-4. シグナル伝達系

本研究で *A. mangium* から検出された 9 種類のシグナル伝達関連遺伝子のうち、7 種類はプロテインキナーゼをコードしていると推定される遺伝子だった (Table 6)。さらに、これらのプロテインキナーゼのうち 4 種類 (STK1 [B01c-1]; STK2 [A116-2]; CRK [C07c-1]; RLK [E08c-1]) は膜結合ドメインをもつレセプター様キナーゼ、他 (CDPK [B03c-1]; STK3 [A119]; PK [A123']) は可溶性のキナーゼと推定された。レセプター様キナーゼのうち、低 pH および低 pH/低濃度 Al 処理によって発現上昇した STK1、CRK と、高濃度 Al 処理で発現上昇した STK2 の 3 種は、実生では明確な転写応答が検出されなかった。

一方で、高濃度 Al 処理で発現上昇した可溶性キナーゼの *STK3* は、根において 1 時間の低 pH 処理と高濃度 Al 処理に応答していた (Fig. 15)。

これまでに、植物によって低 pH や Al ストレスが受容される機構についての知見は得られていない。一方で、プロテインキナーゼの阻害剤である K-252a で処理されたシロイヌナズナとダイズの根では、Al ストレスに応答したリンゴ酸やクエン酸の排出が阻害され、これらの応答にはタンパク質リン酸化によるシグナル伝達系が関与していることが推察されている (Kobayashi et al. 2007; Shen et al. 2004)。また、Al 応答性のレセプターキナーゼである *WAK1* (*cell wall-associated receptor kinase 1*) の過剰発現によるシロイヌナズナへの Al 抵抗性付与が報告されている (Sivaguru et al. 2003)。WAK は植物が病原体感染や昆虫による食害を受けた際に生じたペクチン断片などに結合し、細胞壁障害センサーとして防御応答に関与することが推察されている (Kohorn and Kohorn 2012)。また酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、細胞壁障害センサーの MID2 (mating pheromone-induced death protein 2)、WSC1 (cell wall integrity and stress response component 1) 受容体とその下流シグナルが低 pH 環境での生存に関与している (Claret et al. 2005)。

本研究でも、低 pH や Al ストレスによる防御応答関連遺伝子の発現上昇が検出されたが、これらの遺伝子は細胞壁の障害によって誘導された可能性がある。*A. mangium* から検出されたレセプター様キナーゼに結合するリガンドや下流のシグナル、さらに低 pH や Al ストレスの受容機構との関連性に興味もたれる。

2-5. その他の遺伝子

Coatmer subunit β' (β' -COP [C03c-1]) と MYND-type zinc finger protein (MYND [C14c-1]) 遺伝子は *A. mangium* 培養細胞において、低 pH と高濃度 Al の両方に応答していた (Table 6)。また、*MYND* の器官別転写解析では明確な転写レベルの変化は認められなかったが、 β' -COP は実生の根で 1 時間の低 pH 処理と 24 時間の低 pH 処理、低濃度および高濃度 Al 処理に応答して発現上昇し、地上部でも 24 時間の 2.0 mM および 5.0 mM Al 処理で発現上昇が

認められた (Fig. 15)。

β' -COP はゴルジ体内でのタンパク質輸送に関わる COP I coat protein 複合体の構成要素の 1 つである (Hwang and Robinson 2009)。この遺伝子のダイズホモログは 48 時間の Al 処理によって発現上昇することが以前に報告されている (Duressa et al. 2010)。

MYND 遺伝子の低 pH と高濃度 Al に応答した発現上昇は、これまで他植物の類似の転写解析では報告されておらず、*A. mangium* 培養細胞でユニークなものであった。植物における *MYND* の機能は全く不明であるが、その特徴的な *MYND* ドメインはタンパク質間の相互作用に関与していることが知られている (Gamsjaeger et al. 2007)。このタンパク質が植物のストレス適応に関連したタンパク質ネットワークで何らかの役割を果たしている可能性があり、免疫沈降法や yeast two-hybrid system を利用した相互作用因子の探索などの研究が期待される。

ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質の turnover に関わる E3 ubiquitin ligase (E3UL [B06c-1]) 遺伝子もまた、1 時間の低 pH 処理に応答していた (Table 6)。これは *A. mangium* 培養細胞のストレス適応に関連して、迅速なタンパク質の turnover が起こっていることを反映したのものとも考えられる。

3. *A. mangium* の既知 Al 抵抗性遺伝子

Degenerate PCR 法により、*A. mangium* の根と培養細胞から *NRAT1* を除く 6 種類の既知 Al 抵抗性関連遺伝子ホモログが単離され、これらの全長 cDNA がクローニングされた。これらの遺伝子と、機能が同定されているシロイヌナズナホモログとの相同性は低いものであったが (Table 7)、他植物で機能解析が行われているホモログ間の相同性も概して低いものであった [ダイズの *ALMT1* (Liang et al. 2013) と *AtALMT1* では 46%、ユーカリの *MATE1* (Sawaki et al. 2013) と *AtMATE1* では 51%、タバコの *STOP1* (Ohya et al. 2013) と *AtSTOP1* では 51%、機能解析は行われていない *Populus tremula* の

ALS3 (Grisel et al. 2010)と AtALS3 では 76%]。従って、活性に関わるドメインのアミノ酸配列などの確認を要するものの、本研究で単離された遺伝子が Al 抵抗性遺伝子として機能している可能性は議論することができると考えられた。

3-1. ALMT

転写解析の結果、*AmALMT1* は 24 時間の Al 処理を加えた *A. mangium* 実生の根で発現し、培養細胞の転写物からは検出されなかった (Fig. 11)。一方培養細胞を用いて有機酸分析を行ったところ、Al 処理を加えた後に培地中へのリンゴ酸排出が示された (Fig. 12)。これまでに知られている *ALMT* の転写パターンは種によって異なり、コムギの根では Al 応答性を示さず (Sasaki et al. 2004)、シロイヌナズナやダイズの根では Al 処理によって誘導された (Kobayashi et al. 2007; Liang et al. 2013)。シロイヌナズナでは十数種の *ALMT* ファミリートランスポーターの存在が知られ、これらの中には、葉での孔辺細胞の開閉に関わるものなど、Al ストレス抵抗性以外の役割を果たしているものも知られている (Meyer et al. 2010; Koverman et al. 2007)。これらのことから、本研究で同定された *AmALMT* は Al 活性型リンゴ酸トランスポーターとは異なる機能に関与し、*A. mangium* 培養細胞のリンゴ酸排出には別のトランスポーターが関与している可能性も考えられる。

3-2. MATE

MATE は DDRT-PCR 法による解析でも検出されたが (*AmMATE1*; Table 6)、degenerate PCR 法による解析では *AmMATE1* とは異なる塩基配列をもつ遺伝子が検出され (*AmMATE2*; Table 7)、2 種類の *MATE* 遺伝子が検出されたことになった。*AmMATE1* は根や地上部で低 pH と Al 処理に応答した発現上昇が認められたのに対し (Fig. 15)、*AmMATE2* は培養細胞と根の両方で明確な転写応答は認められなかった (Fig. 11)。これまでに知られている Al 活性型クエン酸トランスポーターをコードする *MATE* 遺伝子の根での転写パターン

には、オオムギで認められた Al 処理には応答しないパターンを示すものと (Furukawa et al. 2007)、シロイヌナズナやイネの根で認められた Al 誘導性のものがある (Liu et al. 2009; Yokosho et al. 2011)。

トウモロコシでは、Al 抵抗性に関わる QTL 解析から、Al 応答性でクエン酸排出活性を示し Al 抵抗性に関与する *ZmMATE1* と、Al 処理に対する応答性を示さずクエン酸輸送活性を示さないが Al 抵抗性への関与が推察される *ZmMATE2* の 2 種類の *MATE* 遺伝子が報告されている (Maron et al. 2010)。一方、他の *MATE* ファミリートランスポーターには植物体内での鉄輸送に関わるものも報告されている (Durett et al. 2007)。これらのことから、Al 応答性ではない発現パターンを示した *AmMATE2* もまた、Al ストレス応答性の *AmMATE1* とともに Al ストレス抵抗性に関与している可能性とともに、他の機能に関与している可能性が推察される。

3-3. STAR1 と ALS3

AmSTAR1 と *AmALS3* は、根と培養細胞の両方で Al 処理に応答した発現上昇が認められた (Fig. 11)。シロイヌナズナの根で *AtALS3* の発現パターンは Al 応答性であったが (Larsen et al. 2005)、*AtSTAR1* では Al 応答性は認められなかった (Huang et al. 2010)。シロイヌナズナにおいて *AtALS3* は主に細胞膜に局在し、Al の植物体内での輸送に関与すると考えられている。また、*AtSTAR1* と相互作用することが示唆されているが、*AtSTAR1* の機能は不明である。一方イネでは *OsSTAR1* と *ALS3* ホモログの *OsSTAR2* とが複合体を形成し、分泌顆粒膜上に局在して細胞外への UDP-グルコースの分泌に関与するとされ、それらの遺伝子は根で Al に応答して発現上昇したことが報告されている (Huang et al. 2009)。本研究で *A. mangium* から単離された *AmSTAR1* と *AmALS3* はともに Al によって発現上昇しているので、両遺伝子の産物は相互作用して機能しているかもしれない。イネとシロイヌナズナで機能が異なっている遺伝子が、*A. mangium* においてどのような役割を果たしているのか興味もたれる。

3-4. ALS1

AmALS1 は 24 時間の Al 処理を加えた根と培養細胞において発現上昇が認められた (Fig. 11)。イネとシロイヌナズナから単離された ALS1 はともに液胞膜に局在し、Al の細胞内への隔離による耐性機構に関わっていると考えられている (Larsen et al. 2007; Huang et al. 2012)。また、*ALS1* の根での転写パターンは、シロイヌナズナでは Al 処理には応答せず、イネでは Al 応答性であった。*A. mangium* が Al を蓄積しない excluder であることから、*A. mangium* の Al 抵抗性の大部分は Al 排除機構によるものであると考えられるが、ALS1 による Al 耐性もまた機能しているのかもしれない。

3-5. STOP1

AmSTOP1 は、培養細胞と根のどちらにおいても、低 pH や Al 処理に対する明確な転写応答は認められなかった (Fig. 11)。シロイヌナズナの *STOP1* やイネの *ART1* の転写レベルも低 pH や Al に応答性を示さないことが知られている (Iuchi et al. 2007; Yamaji et al. 2009)。タバコやミヤコグサ *Lotus japonicus* などの *STOP1* ホモログを用いた *Atstop1* 変異体の相補性検定では、植物種により表現型の回復に相違が認められ、これは種間におけるタンパク質の構造や機能の相違に起因するものと推察されている (Ohyama et al. 2013)。Al-excluder としての特性を持つ *A. mangium* における *AmSTOP1* の機能に関心が持たれる。さらに、木本植物では、Al-accumulator と Al-excluder が存在することと関連して、種ごとの Al 抵抗性機構の違いと *STOP1* ホモログの機能の違いも興味深い。

4. *A. mangium* における低 pH と Al ストレス応答のまとめ

これまでの考察から、*A. mangium* の低 pH と Al ストレス応答に関わる遺伝子群と、推察されたストレス抵抗性への関与をまとめると Fig. 16 のように模式化することができる。それらのうち、そのホモログについて既に草本モデル植物などで低 pH や Al ストレス抵抗性における機能が議論され確立している遺伝子は赤で、また議論はされていないが知られている機能から抵抗性への関与が推察される遺伝子は紫で示した。

MATE のような有機酸排出に関わる遺伝子が検出されたことにより、*A. mangium* が有機酸排出による Al 排除機構をもっていることが示唆された。そして、*STAR1* や *ALS3* などの草本植物で知られている Al 抵抗性遺伝子ホモログも検出され、これらの遺伝子が関与する抵抗性機構が木本植物である *A. mangium* においても機能していると考えられる。

また、細胞膜型 H⁺-ATPase とその相互作用因子の *PPI* 遺伝子が検出され、これらが特にプロトン耐性に関与していることが想定された。一方、低 pH と Al ストレスに応答する排出型の PDR タイプ ABC トランスポーターが存在し、*A. mangium* の酸性土壌適応における役割が示唆される。また、この植物が Al excluder であることを示す実生の組織化学的観察と併せて考察すると、細胞壁や保護壁の形成などに関わると推察された遺伝子は、Al 耐性としてのダメージ修復よりも、Al 排除に関係する構造変化に関与している可能性が考えられる。PAP はリンの欠乏する酸性土壌において効率的なリン栄養の獲得に関わることで、*A. mangium* の酸性土壌での旺盛な生育と早い成長を可能にしているのかもしれない。

MYND のようなタンパク質間相互作用に関わる遺伝子がストレス応答遺伝子として初めて見つかったことは、新たな抵抗性または耐性機構を考える上で大変興味深い。さらに、P450 や二次代謝系酵素などストレス抵抗性と関係する可能性のある代謝関連、および細胞内タンパク質輸送などに関わるその他の機能の遺伝子が多数検出されている。

今回、*A. mangium* の培養細胞から検出された遺伝子の多くが *Acacia* 属の EST データベースには登録されていないものだったことは、培養細胞と植物体

の組織・器官での遺伝子発現パターンの違いに起因していると解釈される。一方で、低 pH/Al ストレス応答遺伝子としては *A. mangium* から初めて検出された *DHP* と *MYND* の 2 遺伝子が材由来の EST データベースに登録されていたことより、これらが木本植物に特異的なストレス応答遺伝子であるのかもしれない。

5. 課題と展望

DDRT-PCR 法による転写解析では、転写パターンの変化に着目した候補遺伝子のスクリーニングは可能であるが、ストレス応答性を示さない抵抗性遺伝子が候補から漏れるという弱点がある。これは、DDRT-PCR 法以外のサブトラクション法などでも同様である。これまでに、*AtSTOP1* や *AtALS1* のように、ストレス応答性を示さない低 pH や Al 抵抗性関連遺伝子が報告されているが、これらはストレス感受性の変異体を用いた分子遺伝学的解析により同定されてきた。本研究で用いた *A. mangium* は大型の木本植物であり、変異体を用いた解析には不向きである。さらに、培養細胞系を用いたとしても、ゲノム情報未整備な非モデル植物では、マップベースクローニングなどによる変異遺伝子の同定は非常に困難であると思われる。

また本研究では、ストレスに応答して発現上昇した遺伝子にのみ着目したが、ストレスにより転写レベルが低下した遺伝子の中にもストレス抵抗性に関わる遺伝子が含まれている可能性は否定できず、これらの解析は今後の課題である。

序論でも述べた通り、*A. mangium* は根粒菌共生窒素固定が可能であり、共生状態では非共生状態よりもストレス条件下においてより旺盛な成育を示す (Diouf et al. 2005)。このことから、*A. mangium* の低 pH/Al ストレス応答と根粒菌共生窒素固定の関係にも興味をもたれたが、本研究で検出された遺伝子には根粒菌共生窒素固定に関わると推定されるものは存在しなかった。根粒菌共生と宿主植物のストレス応答の関係を理解するには、根粒菌との共生系を用いる解析などのアプローチが必要であろう。

本研究では、遺伝子リソースの獲得という観点から、検出された遺伝子の全

長 cDNA クローニングに重点を置いた。このリソースを有効に利用して、全長 cDNA が得られた遺伝子の機能を解析することにより、酸性土壌適応において働く新規抵抗性遺伝子が同定され、適応の分子機構がさらに明らかになることが期待される。そして、*A. mangium* から検出された低 pH/Al ストレス応答遺伝子の機能解析のために、酵母やシロイヌナズナの形質転換実験に着手している。

応用面での展開として、作物などの有用植物の耐酸性能を改良する際に、組換え作物の作出という直接的な応用のみならず、ダイズをはじめとするマメ科の重要作物や樹木において酸性土壌適性の高い品種や系統を選抜する上で有用なマーカーの開発といった間接的な分子育種への応用も期待される。そして究極的には、得られたリソースが酸性土壌適応植物の育成を通じた環境修復や食料、燃料の生産を通じて持続可能な社会の実現のための一助となることが望まれる。

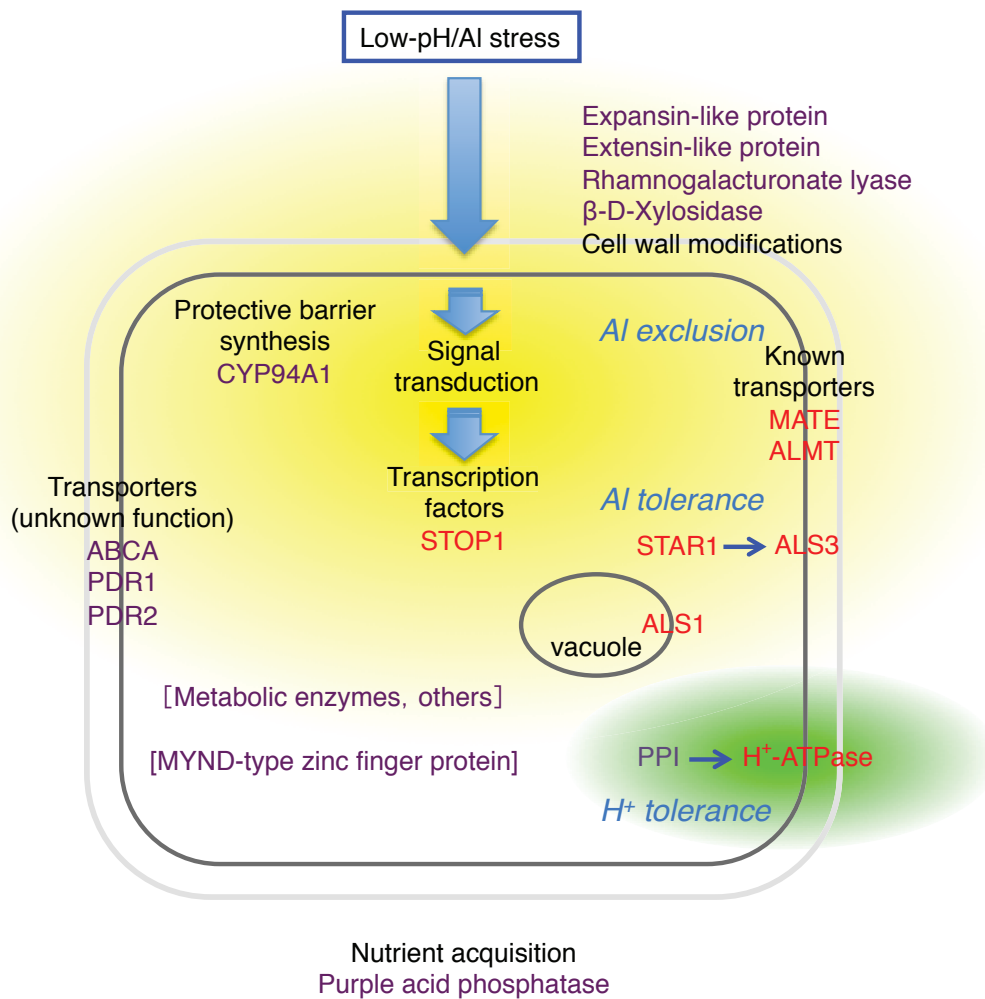


Fig. 16. Gene products putatively involved in the resistance against low-pH and Al stresses in an *A. mangium* cell. The genes have been detected through DDRT-PCR or degenerate PCR analysis. The proteins displayed with red letters have already been proven to function in the resistance in herbaceous model plants, and those with purple letters are suggested in the present study to have roles in the stress adaptation of this plant species based on their biochemical functions. The terms with light blue letters indicate physiological functions. For the abbreviations of the protein names, see Table 6.

謝 辞

本研究の遂行に当たり、数多くの御助言と終始懇切な御指導を賜りました、日本大学大学院生物資源科学研究科 応用生命科学専攻 綾部真一教授、内山寛准教授に心より厚く御礼申し上げます。

本論文の作成に当たり、御校閲の上、数々の御助言を頂きました同生物環境科学専攻 長谷川功教授、同応用生命科学専攻 青木俊夫教授に厚く御礼申し上げます。

有機酸分析でお世話になった東京化成株式会社 大貫裕之博士、本学部食品生命学科 松藤寛准教授に御礼申し上げます。

また、ご配慮とご協力を頂きました植物細胞学研究室の大学院生、学部生の皆様には大変お世話になりました。この場を借りて御礼申し上げます。

引用文献

- Bari R, Jones JDG (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69: 437-488
- Bose J, Pottosin II, Shabala SS, Palmgren MG, Shabala S (2011) Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants. *Front Plant Sci* 2: 85
- Britto DT, Kronzucker HJ (2002) NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* 159: 567-584
- Brunner I, Sperisen C (2013) Aluminum exudation and aluminum tolerance in woody plants. *Front Plant Sci* 4: 172
- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11: 113-116
- Claret S, Gatti X, Doignon F, Thoraval D, Crouzet M (2005) The Rgd1p Rho GTPase-activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4: 1375-1386
- Delhaize E, Ma JF, Ryan PR (2012) Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. *Trends Plant Sci* 17: 341-348
- Diouf D, Duponnois R, Ba AT, Neyra M, Lesueur D (2005) Symbiosis of *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* with mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium* spp. improves salt tolerance in greenhouse conditions. *Funct Plant Biol* 32: 1143-1152
- Duressa D, Soliman K, Chen D (2010) Identification of aluminum responsive genes in Al-tolerant soybean line PI 416937. *Int J Plant Genomics* 2010: Article ID 164862

- Duressa D, Soliman K, Taylor R, Senwo Z (2011) Proteomic analysis of soybean roots under aluminum stress. *Int J Plant Genomics* 2011: Article ID 282531
- Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol* 144: 197-205
- 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
- Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP (2007) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci* 32: 63-70
- Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K (2007) Plant proton pumps. *FEBS Lett* 581: 2204-2214
- Goodwin SB, Sutter TR (2009) Microarray analysis of *Arabidopsis* genome response to aluminum stress. *Biol Plant* 53: 85-99
- Grisel N, Zoller S, Künzli-Gontarczyk M, Lampart T, Münsterkötter M, Brunner I, Bovet L, Métraux JP, Sperisen C (2010) Transcriptome responses to aluminum stress in roots of aspen (*Populus tremula*). *BMC Plant Biol* 10: 185
- Guo CL, Chen Q, Zhao XL, Chen XQ, Zhao Y, Wang L, Li KZ, Yu YX, Chen LM (2013) Al-enhanced expression and interaction of 14-3-3 protein and plasma membrane H⁺-ATPase is Related to Al-induced citrate secretion in an Al-resistant black soybean. *Plant Mol Biol Rep* 31: 1012-1024
- Hasegawa I (2008) Overview and major outcomes in the plant science field. In: Sasaki S (ed) *Development of New Bioremediation Systems of Acid Sulfate Soil for Agriculture and Forestry*. Shoukadoh Book Sellers, Kyoto, Japan, pp 31-36
- Hiradate S, Ma JF, Matsumoto H (2007) Strategies of plants to adapt to

- mineral stresses in problem soils. *Adv Agron* 96: 65-131
- Hoekenga OA, Maron LG, Pineros MA, Cancado GMA, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, Kochian LV (2006) Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9738-9743
- Huang CF, Yamaji N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y, Ma JF (2009) A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* 21: 655-667
- Huang CF, Yamaji N, Ma JF (2010) Knockout of a bacterial-type ATP-binding cassette transporter gene, *AtSTAR1*, results in increased aluminum sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 153: 1669-1677
- Huang CF, Yamaji N, Chen Z, Ma JF (2012) A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *Plant J* 69: 857-867
- Hwang I, Robinson DG (2009) Transport vesicle formation in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* 12: 660-669
- Ikegawa H, Yamamoto Y, Matsumoto H (2000) Response to aluminum of suspension-cultured tobacco cell in a simple calcium solution. *Soil Sci Plant Nutr* 46: 503-514
- Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kobayashi S, Ikka T, Hirayama T, Shinozaki K, Kobayashi M (2007) Zinc finger STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 9900-9905
- Janicka-Russak M (2011) Plant plasma membrane H⁺-ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses. In: Shanker AK, Venkateswarlu B (eds) *Abiotic Stress Response in Plants – Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. InTech, Rijeka, Croatia, pp 197-218
- Kidd PS, Proctor J (2001) Why plants grow poorly on very acid soils: are ecologists missing the obvious? *J Exp Bot* 52: 791-799

- Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y (2007) The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J* 50: 207-18
- Kinraide TB (2003) Toxicity factors in acidic forest soils: attempts to evaluate separately the toxic effects of excessive Al³⁺ and H⁺ and insufficient Ca²⁺ and Mg²⁺ upon root elongation. *Eur J Soil Sci* 54: 323-333
- Kobayashi Y, Hoekenga OA, Itoh H, Nakashima M, Saito S, Shaff JE, Maron LG, Piñeros 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, Piñeros MA, Hoekenga OA (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* 274: 175-195
- Kohorn BD, Kohorn SL (2012) The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Front Plant Sci* 3: 88
- 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
- Kovermann P, Meyer S, Hörtensteiner S, Picco C, Scholz-Starke J, Ravera S, Lee Y, Martinoia E (2007) The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant J* 52: 1169-1180
- Kumari M, Taylor GJ, Deyholos MK (2008) Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* 279: 339-357
- Lager I, Andréasson O, Dunbar TL, Andreasson E, Escobar MA, Rasmusson AG (2010) Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. *Plant Cell*

Environ 33: 1513-1528

- Larsen PB, Tai CY, Kochian LV, Howell SH (1996) Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminum. *Plant Physiol* 110: 743-751
- Larsen PB, Geisler MJB, 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
- Larsen PB, Cancel J, Rounds M, Ochoa V (2007) *Arabidopsis ALS1* encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta* 225: 1447-1458
- Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y (2005) AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138: 827-836
- Liang C, Piñeros MA, Tian J, Yao Z, Sun L, Liu J, Shaff J, Coluccio A, Kochian LV, Liao H (2013) Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through *GmALMT1* to improve soybean adaptation to acid soils. *Plant Physiol* 161: 1347-1361
- 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 J* 57: 389-399
- Ma JF (2007) Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *Int Rev Cytol* 264: 225-252
- Ma XF, Wright E, Ge Y, Bell J, Xi Y, Bouton JH, Wang ZY (2009) Improving phosphorus acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.) by transgenic expression of plant-derived phytase and acid phosphatase genes. *Plant Sci* 176: 479-488
- Magalhaes JV, Liu J, Guimaraes CT, Lana UGP, Alves VMC, Wang YH, Schaffert RE, Hoekenga OA, Pineros, MA, Shaff JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN, Kochian LV (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat Genet* 39: 1156-1161

- Maron LG, Kirst M, Mao C, Milner MJ, Menossi M, Kochian LV (2008) Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. *New Phytol* 179: 116-128
- 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. *Plant J* 61: 728-740
- Martínez-Estévez M, Muñoz-Sánchez J, Loyola-Vargas V, Hernández-Sotomayor S (2001) Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity in cell suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Rep* 20: 469-474
- Massot N, Nicander B, Barceló J, Poschenrieder C, Tillberg E (2002) A rapid increase in cytokinin levels and enhanced ethylene evolution precede Al³⁺-induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Growth Regul* 37: 105-112
- Matoba H, Sasaki N, Mizuno S, Ayabe S, Uchiyama H (2008) Comprehensive analysis of acidic stress-responsive genes of *Panicum repens* and *Acacia mangium* by means of differential display approach. In: Sasaki S (ed) *Development of New Bioremediation Systems of Acid Sulfate Soil for Agriculture and Forestry*. Shoukadoh Book Sellers, Kyoto, Japan, pp 101-104
- Matsumoto H, Hirasawa E, Morimura S, Takahashi E (1976) Localization of aluminium in tea leaves. *Plant Cell Physiol* 17: 627-631
- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KAS, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R (2010) AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *Plant J* 63: 1054-1062
- Mizuno S, Ayabe S, Uchiyama H (2014) Expression of genes encoding transporters and enzyme proteins in response to low-pH and

- high-aluminum treatments in *Acacia mangium*, a stress-tolerant leguminous tree. *Plant Biotechnol* 31: in press
- Møller MG, Taylor C, Holm PB (2003) Molecular cloning and characterisation of two genes encoding asparagine synthetase in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biochim Biophys Acta* 1628: 123-132
- Morita A, Yanagisawa O, Maeda S, Takatsu S, Ikka T (2011) Tea plant (*Camellia sinensis* L.) root secrete oxalic acid and caffeine into medium containing aluminum. *Soil Sci Plant Nutr* 57: 796-802
- Naik D, Smith E, Cumming JR (2009) Rhizosphere carbon deposition, oxidative stress and nutritional changes in two poplar species exposed to aluminum. *Tree Physiol* 29: 423-436
- Nguyen NT, Nakabayashi K, Thompson J, Fujita K (2003) Role of exudation of organic acids and phosphate in aluminum tolerance of four tropical woody species. *Tree Physiol* 23: 1041-1050
- Norisada M, Hitsuma G, Kuroda K, Yamanoshita T, Masumori M, Tange T, Yagi H, Nuyim T, Sasaki S, Kojima K (2005) *Acacia mangium*, a nurse tree candidate for reforestation on degraded sandy soils in the Malay Peninsula. *Forest Sci* 51: 498-510
- Ohyama Y, Ito H, Kobayashi Y, Ikka T, Morita A, Kobayashi M, Imaizumi R, Aoki T, Komatsu K, Sakata Y, Iuchi S, Koyama H (2013) Characterization of *AtSTOP1* orthologous genes in tobacco and other plant species. *Plant Physiol* 162: 1937-1946
- Ong SS, Wickneswari R (2012) Characterization of microRNAs expressed during secondary wall biosynthesis in *Acacia mangium*. *PLoS ONE* 7: e49662
- Osaki M, Watanabe T, Tadano T (1997) Beneficial effect of aluminum on growth of plants adapted to low pH soils. *Soil Sci Plant Nutr* 43: 551-563
- Osawa H, Kojima K (2006) Citrate-release-mediated aluminum resistance is coupled to the inducible expression of mitochondrial citrate synthase

- gene in *Paraserianthes falcataria*. *Tree Physiol* 26: 565-574
- Osawa H, Endo I, Hara Y, Matsushima Y, Tange T (2011) Transient proliferation of proanthocyanidin-accumulating cells on the epidermal apex contributes to highly aluminum-resistant root elongation in camphor tree. *Plant Physiol* 155: 433-446
- Oztetik E (2011) An introduction to oxidative stress in plants and the role of non-enzymatic antioxidants. In: Anjum NA, Umar S, Ahmad A (eds) Oxidative stress in plants causes, consequences and tolerance. I.K. International Publishing House, New Delhi, India, pp 1-50
- Pinot F, Beisson F (2011) Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles. *FEBS J* 278: 195-205
- Porta H, Rocha-Sosa M (2002) Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiol* 130: 15-21
- Rea PA (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol* 58: 347-375
- Richards KD, Snowden KC, Cander RC (1994) *Wali6* and *wali7*. Genes induced by aluminum in Wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol* 105: 1455-1456
- 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. *J Exp Bot* 62: 9-20
- Ryan PR, Delhaize E (2012) Adaptations to aluminum toxicity. In: Shabala (ed) *Plant Stress Physiology*. CAB International, Boston, MA, USA, pp171-193
- Sakano K (1998) Revision of biochemical pH-stat: involvement of alternative pathway metabolisms. *PlantCell Physiol* 39: 467-473
- 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, 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
- 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
- Sharma N, Sharma KP, Gaur RK, Gupta VK (2011) Role of chitinase in plant defence. *Asian J Biochem* 6: 29-37
- Shen H, Ligba A, Yamaguchi M, Osawa H, Shibata K, Yan X, Matsumoto H (2004) Effect of K-252a and abscisic acid on the efflux of citrate from soybean roots. *J Exp Bot* 55: 663-671
- Shen H, He LF, Sasaki T, Yamamoto Y, Zheng SJ, Ligba A, Yan XL, Ahn SJ, Yamaguchi M, Sasakawa H, Matsumoto H (2005) Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 138: 287-296
- Sivaguru M, Ezaki B, He ZH, Tong H, Osawa H, Baluška 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
- Sukganah A, Choong CY, Russell J, Neale D, Wickneswari R (2013) Nucleotide sequence analysis of two lignin genes in *Acacia auriculiformis* x *Acacia mangium* hybrid for enhancement of wood pulp quality. *Tree Genet Genomics* 9: 1369-1381
- Suzuki S, Suda K, Sakurai N, Ogata Y, Hattori T, Suzuki H, Shibata D, Umezawa T (2011) Analysis of expressed sequence tags in developing secondary xylem and shoot of *Acacia mangium*. *J Wood Sci* 57: 40-46

- Tahara K, Norisada M, Yamanoshita T, Kojima K (2008) Role of aluminum-binding ligands in aluminum resistance of *Eucalyptus camaldulensis* and *Melaleuca cajuputi*. *Plant Soil* 302: 175-187
- Tsutsui T, Yamaji N, Huang CF, Motoyama R, Nagamura Y (2012) Comparative genome-wide transcriptional analysis of Al-responsive genes reveals novel Al tolerance mechanisms in rice. *PLoS ONE* 7: e48197
- Umezawa T, Suzuki S, Shibata D (2008) Tree biotechnology of tropical *Acacia*. *Plant Biotechnol* 25: 309-313
- Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu Ü, Lee Y, Martinoia E, Murphy A, Rea PA, Samuels L, Schulz B, Spalding EP, Yazaki K, Theodoulou FL (2008) Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* 13: 151-159
- Von Uexküll HR, Mutert E (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* 171: 1-15
- Wang XJ, Cao XL, Hong Y (2005) Isolation and characterization of flower-specific transcripts in *Acacia mangium*. *Tree Physiol* 25: 167-178
- Wasaki J, Maruyama H, Tanaka M, Yamamura T, Dateki H, Shinano T, Ito S, Osaki M (2012) Overexpression of the *LASAP2* gene for secretory acid phosphatase in white lupin improves the phosphorus uptake and growth of tobacco plants. *Siol Sci Plant Nutr* 55: 107-113
- Watanabe T, Misawa S, Hiradate S, Osaki M (2008) Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *New Phytol* 178: 581-589
- Wong MML, Cannon CH, Wickneswari R (2011) Identification of lignin genes and regulatory sequences involved in secondary cell wall formation in *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* via *de novo* transcriptome ssequencing. *BMC Genomics* 12: 342
- Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma JF (2010) Plasma membrane-localized

- transporter for aluminum in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 18381-18385
- Xue YJ, Tao L, Yang ZM (2008) Aluminum-induced cell wall peroxidase activity and lignin synthesis are differentially regulated by jasmonate and nitric oxide. *J Agric Food Chem* 56: 9676-9684
- Yan F, Feuerle R, Schäffer S, Fortmeier H, Schubert S (1998) Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. *Plant Physiol* 117: 311-319
- 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. *Plant Cell* 21: 3339-3349
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto, H (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol* 125: 199-208
- Yang Q, Wang Y, Zhang J, Shi W, Qian C, Peng X (2007) Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. *Proteomics* 7: 737-749
- Yokosho K, Yamaji N, Ma JF (2011) An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J* 68: 1061–1069
- Yong SYC, Choong CY, Cheong PL, Pang SL, Nor Amalina R, Harikrishna JA, Mat-Isa MN, Hedley PE, Milne L, Vaillancourt RE, Wickneswari R (2011) Analysis of ESTs generated from inner bark tissue of an *Acacia auriculiformis* x *Acacia mangium* hybrid. *Tree Genet Genomes* 7: 143-152
- Yong SYC, Wickneswari R (2013) Molecular characterization of a cellulose synthase gene (AaxmCesA1) isolated from an *Acacia auriculiformis* x *Acacia mangium* hybrid. *Plant Mol Biol Rep* 31: 301-313
- Yoshida KT, Naito S, Takeda G (1994) cDNA cloning of regeneration-specific genes in rice by differential screening of randomly amplified cDNAs using RAPD primers. *Plant Cell Physiol* 35:

1003-1009

- Zhao CR, Ikka T, Sawaki Y, Kobayashi Y, Suzuki Y, Hibino T, Sato S, Sakurai N, Shibata D, Koyama H (2009a) Comparative transcriptomic characterization of aluminum, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 9: 32
- Zhao J, Barkla BJ, Marshall J, Pittman JK, Hirschi KD (2008) The *Arabidopsis cax3* mutants display altered salt tolerance, pH sensitivity and reduced plasma membrane H⁺-ATPase activity. *Planta* 227: 659-669
- Zhao LN, Zhao Q, Ao GM, Yu JJ (2009b) The foxtail millet *Si69* gene is a wali7 (wheat aluminum-induced protein 7) homologue and may function in aluminum tolerance. *Chinese Sci Bull* 54: 1697-1706
- Zhao XQ, Shen RF, Sun QB (2009c) Ammonium under solution culture alleviates aluminum toxicity in rice and reduces aluminum accumulation in roots compared with nitrate. *Plant Soil* 315:107–121
- Zhen Y, Qi JL, Wang SS, Su J, Xu GH, Zhang MS, Miao L, Peng XX, Tian D, Yang YH (2007) Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Physiol Plant* 131: 542-554
- Zrenner R, Riegler H, Marquard CR, Lange PR, Geserick C, Bartoze CE, Chen CT, Slocum RD (2009) A functional analysis of the pyrimidine catabolic pathway in *Arabidopsis*. *New Phytol* 183: 117-132