

氏名	雷 貴傑		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	農 学		
学位授与番号	博甲第	5 6 2 6	号
学位授与の日付	平成29年 9月29日		
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Functional characterization of transporter genes involved in aluminum tolerance in buckwheat (ソバのアルミニウム耐性に関与する輸送体遺伝子の機能解析)		
論文審査委員	教授 馬 建鋒	教授 前川 雅彦	准教授 山地 直樹
学位論文の概要			
<p>Buckwheat (<i>Fagopyrum esculentum</i>) is known as an aluminum (Al)-tolerant and accumulating species, however, the molecular mechanisms underlying the high Al tolerance and accumulation are poorly understood. In this study, I functionally characterized four genes including two MATE transporters genes (<i>FeMATE1</i> and <i>FeMATE2</i>) and two half-size ABC transporters genes (<i>FeALS1.1</i> and <i>FeALS1.2</i>) in terms of their expression patterns, subcellular localization and Al tolerance.</p> <p>Both <i>FeMATE1</i> and <i>FeMATE2</i> showed efflux transport activity for citrate when expressed in <i>Xenopus</i> oocytes. The expression of <i>FeMATE1</i> was induced by Al only in the roots, but that of <i>FeMATE2</i> was up-regulated in both the roots and leaves. A transient assay with buckwheat leaf protoplasts using GFP fusion showed that <i>FeMATE1</i> was mainly localized to the plasma membrane, whereas <i>FeMATE2</i> was localized to the trans-Golgi and Golgi. Heterologous expression of <i>FeMATE1</i> or <i>FeMATE2</i> in Arabidopsis mutant <i>atmate</i> partially rescued its Al tolerance. Expression of <i>FeMATE1</i> also partially recovered the Al-induced secretion of citrate in the transgenic lines, whereas expression of <i>FeMATE2</i> did not complement the citrate secretion. Further physiological analysis showed that buckwheat roots also secreted citrate in addition to oxalate in response to Al. Taken together, these results indicate that <i>FeMATE1</i> is involved in the Al-activated citrate secretion in the roots for external Al detoxification, while <i>FeMATE2</i> is probably responsible for the internal detoxification of Al by transporting citrate into Golgi system in the roots and leaves of buckwheat.</p> <p>Proteomic analysis with purified tonoplast fraction led to identification of two half-size ABC transporters; <i>FeALS1.1</i> and <i>FeALS1.2</i>. <i>FeALS1.1</i>-GFP and <i>FeALS1.2</i>-GFP fusion were localized to the tonoplast when transiently expressed in the buckwheat leaf protoplast. In the presence of Al, <i>FeALS1.1</i> was mainly expressed in the roots and its expression level was six times higher than its homologous gene (<i>AtALS1</i>) of Arabidopsis, but <i>FeALS1.2</i> was constitutively highly expressed in the leaves and showed 39 times higher expression level than <i>AtALS1</i>. When <i>FeALS1.1</i> or <i>FeALS1.2</i> was expressed in Arabidopsis <i>atals1</i> mutant under the control of <i>AtALS1</i> promoter, both of them recovered its Al tolerance. There was no difference in Al concentration of whole roots or root cell sap among WT, <i>atals1</i> and complementation lines of <i>FeALS1.1</i> or <i>FeALS1.2</i>. However, the Al signal intensity in the cytosol in the complementation lines was much weaker than the <i>atals1</i> mutant. Taking together, these results indicate that <i>FeALS1.1</i> and <i>FeALS1.2</i> are involved in the internal detoxification of Al in the roots and leaves, respectively, by sequestering Al into the vacuoles. Their high expression is probably required for high Al tolerance in buckwheat.</p>			

論文審査結果の要旨

ソバはアルミニウム耐性・集積植物として知られているが、その耐性と集積に関する分子機構についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、ソバの根及び葉のRNA-seqなどの発現データに基づいて、アルミニウムによって発現が誘導される4つの遺伝子（FeMATE 1 とFeMATE2, FeALS1.1とFeALS1.2）についてその機能解析を行った。

FeMATE1とFeMATE2はmultidrug and toxic compound extrusion (MATE)ファミリーに属し、クエン酸を輸送する。*FeMATE1*の発現がアルミニウムによって根で誘導されたのに対して、*FeMATE2*は根と葉の両方で誘導された。またFeMATE1は主に細胞膜に局在していたが、FeMATE2はゴルジに局在していた。FeMATE1とFeMATE2をシロイヌナズナの変異体*atmate*に導入すると、そのアルミニウム耐性が回復された。しかし、*FeMATE1*が*atmate*のクエン酸分泌を部分的に相補したのに対して、FeMATE2はクエン酸の分泌を相補できなかった。これらの結果は、FeMATE1は根からクエン酸の分泌に関与し、FeMATE2はゴルジでのアルミニウム無毒化に関与している可能性を示している。一方、*FeALS1.1*と*FeALS1.2*はいずれもハーフサイズのABCトランスポーターをコードし、いずれも液胞膜に局在していた。*FeALS1.1*は主に根で発現し、その発現はアルミニウムによって誘導された。またその発現量はシロイヌナズナでの相同遺伝子*AtALS1*の6倍であった。一方、*FeALS1.2*は主に葉で発現し、その発現はアルミニウムによって誘導されなかった。しかし、その発現量は*AtALS1*の39倍であった。*FeALS1.1*と*FeALS1.2*をシロイヌナズナの変異体*atalsl1*に導入すると、いずれの遺伝子も変異体のアルミニウム耐性を相補できた。これらの結果は、FeALS1.1とFeALS1.2はそれぞれ根と葉においてアルミニウムを液胞に隔離するために機能し、その高発現が体内のアルミニウム無毒化に寄与していることを示している。

これらの成果の一部はすでに国際誌に論文として公表されており、博士学位論文として十分に値すると判定した。