【解説】

植物と微生物の駆動力と膜輸送体 動物との相違点と共通性

浜本 晋, 七谷 圭, 佐藤陽子, 魚住信之

生体膜は生体エネルギーの形成と変換の舞台であり、生命維持の中心的な役割を担っている。植物・微生物と動物のイオン環境は異なっている。 Na^+/K^+ ポンプをもたない植物・微生物は、膜電位形成の主体となる多様な K^+ 取り込み系を発達させた。植物・微生物の K^+ と Na^+ 輸送体は、物質輸送・蓄積および生体エネルギー生産の根底を支えている。

膜輸送に関してしばしば遭遇する誤解の一つは、生化学の教科書に必ず登場する Na^+ , K^+ -ATPaseが、どの生物にも存在すると思われることである。ATPを加水分解して3個の Na^+ と2個の K^+ を交換するこのポンプは動物細胞のみに存在し、微生物や植物細胞には見られないことから、時折混乱をまねくようである。しかし、微生物や植物細胞の呼吸鎖や明反応（光合成電子伝達系）の解説はあっても、細胞内外のイオン環境や電気化学的ポテンシャルの形成に関する説明は生化学の教科書には少ないようである。微生物、植物は、動物と異なる

イオン環境で生育するため、独自の K^+ および Na^+ 輸送システムを発達させた。この輸送システムは駆動系として、養分吸収や重金属の吸収と排出など、生体維持に関わる膜輸送の根底を支えている。両者の環境と生体要求元素の異同を理解して、駆動力形成に中心的な役割を担う陽イオンの Na^+ と K^+ に関する輸送体の構造と機能を比較することで、生物全体の膜輸送を介した駆動力形成と環境適応システムの理解がさらに深まると考えられる。

植物と微生物の水・イオン輸送体

生体膜の物質通過は電気化学的ポテンシャルの勾配、すなわち駆動力に従う。ポンプが細胞外に H^+ や Na^+ を汲み出し、細胞内に K^+ を蓄積して、膜を介した電気化学的なポテンシャル勾配を生み出す。生物の種類を問わず細胞内の主要な陽イオンは K^+ であり、通常 K^+ は濃度勾配に逆らって細胞内に蓄積される。植物や微生物には K^+ を細胞内に吸収する Na^+ , K^+ -ATPaseがない代わりに、独自の K^+ 取り込み系をもつ。この K^+ の蓄積と K^+ 輸送体が、駆動力の成分の1つである膜電位差の主

Membrane Motive Force and Membrane Transport System in Plant Cells and Bacteria
Shin HAMAMOTO, Kei NANATANI, Yoko SATO, Nobuyuki UOZUMI, 東北大学大学院工学研究科

図1 ■ 植物・微生物の乾燥・塩・高浸透圧ストレスへの初期反応

環境ストレスに瞬時に反応する K^+ および Na^+ 輸送体、浸透圧調節分子（オスモプロテクタント）の生合成は、生合成酵素の遺伝子発現を伴うため、急激な浸透圧の変化には適応できない。そこで、緊急の浸透圧適応機構として、 K^+ および Na^+ 輸送体による浸透圧調節が行なわれる。

図2 ■ 駆動力形成に関わるシアノバクテリア・植物の K^+ および Na^+ 輸送体およびアクアポリン

イオン輸送体は、細胞内のイオン恒常性の維持と浸透圧調節やpH調節、二次性輸送体の駆動力形成など、様々な機能を有する。そのため、生物種や生育環境により数や種類に多様性が生まれた。

要部分を担う。この駆動力を利用して、二次輸送体が細胞内に栄養分を取り込み、細胞内に蓄積した老廃物を排出する。駆動力は物質輸送を支える細胞恒常性の維持を担う中心的要素である。

動物は体液中に Na^+ を維持するのに対して、植物にとって Na^+ は必要元素ではなく、むしろ Na^+/K^+ 比を壊す塩害の素である。細胞内イオン環境の恒常性を保ち塩ストレスに適応するには、 Na^+/K^+ 比が重要と考えられている。このため、過剰となった Na^+ の細胞外排出や液胞への閉じ込めが図られる。シロイヌナズナは、 Na^+/H^+ アンチポーター（SOS1など）によって、細胞内の Na^+ を H^+ 駆動力により細胞外に排出する⁽¹⁾。液胞膜の Na^+/H^+ アンチポーター（AtNHX1）は Na^+ を液胞へ閉じ込める機能を有する⁽²⁾。大腸菌には、NhaA, NhaB, ChaAの3つの Na^+/H^+ アンチポーターが存在し、すべて Na^+ の汲み出しに寄与している（図1）。一方、

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803は、6つの Na^+/H^+ アンチポーターホモログ（NhaS1-S6）をもち、NhaS4は意外にも Na^+ の取り込み活性をもつ⁽³⁾。これは、*Synechocystis*の生育に Na^+ が必要なイオンであることを示唆している。また、NhaS3は*Synechocystis*の Na^+/H^+ アンチポーターホモログの中で唯一、完全破壊株が得られない輸送体であり、細胞内の H^+ 、 Na^+ 、 K^+ の恒常性の維持に関与している⁽⁴⁾。このように Na^+/H^+ アンチポーターは、生物個体の特性や細胞内局在性によって、細胞質から Na^+ を排出することによる細胞内のイオン恒常性と浸透圧やpH調節に機能を果たしている（図2）。水チャネル（アクアポリン）は、30以上の遺伝子がシロイヌナズナに存在する。この中には液胞膜に局在するアクアポリンもあり、植物細胞の容積の大半を占める液胞の維持に欠かせない役割を担っている。一方、*Synechocystis*は、水チャネル（AqpZ）を1つしかもた

ず、pH恒常性の維持や細胞分裂、グルコース代謝に関与していることがわかっている⁽⁵⁾ (図2)。AqpZは主に細胞膜に発現しており、チラコイド膜に局在している可能性は低い。

植物とシアノバクテリアの K^+ トランスポーター

K は、 P と N とともに植物の三大栄養素である。形成される K^+ の細胞内外の濃度勾配は、動物で10倍、植物や微生物では $10^3 \sim 10^5$ 倍にも及ぶ⁽⁶⁾。特に、植物と微生物は、環境中の μM レベルの低濃度 K^+ ⁽⁷⁾を細胞内に濃縮する。外部環境の K^+ 濃度が低下すると、植物や真核微生物では細胞膜電位が $-200 \sim -300$ mVにまで達する^(8,9)。この過分極は、 K^+ ユニポーターを介した K^+ の取り込みや H^+/K^+ シンポーター (植物、微生物)、 Na^+/K^+ シンポーター (微生物)、内向き整流性 K^+ チャネルによる K^+ の取り込みを誘導する。植物や微生物は、動物にはみられないKdp, Trk/Ktr/HKT, KUP/HAKの3つの K^+ トランスポーターファミリーを有している。KdpはATPによって低濃度の K^+ を吸収することを可能とする輸送体であり、大腸菌や*Synechocystis*などの細菌に存在する。このKdp遺伝子はシロイヌナズナや出芽酵母には存在しない。KUP/HAKファミリー K^+ トランスポーターは、大腸菌において3番目の K^+ 取り込み系として単離された。*Synechocystis*や出芽酵母にはその遺伝子は存在しないが、シロイヌナズナは12のKUP/HAK遺伝子をもつ。中でも、根で発現するAtHAK5は、低濃度で存在する土壌中の K^+ を取り込む輸送体として報告されている⁽¹⁰⁾。

Ktr/Trk/HKTトランスポーターは、植物や微生物に広く存在する (図2)。出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*から初めて K^+ 取り込み系としてKtr/Trk/HKTファミリートランスポーターScTrk1が見いだされ、他の微生物や植物からもホモログ遺伝子が単離された。出芽酵母ではTRK、植物ではHKT、大腸菌ではTrk、枯草菌や*Synechocystis*ではKtrと名づけられている。植物のKtr/Trk/HKTトランスポーターは、*S. cerevisiae*の K^+ 取り込み変異株を相補する遺伝子(*TaHKT1*)としてコムギ(*Triticum aestivum*)から初めて単離された⁽¹¹⁾。*S. cerevisiae*を用いた機能解析とアフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的解析から、TaHKT1は Na^+ も K^+ も輸送可能な H^+ とのシンポーターと報告されている。しかし、シロイヌナズナに1つのみ存在するAtHKT1は、 Na^+ を選択的に輸送する⁽¹²⁾。

現在では、多くのHKTは Na^+ を輸送し、一部のHKT

図3 ■ シロイヌナズナに発現する K^+ チャネル・AtHKT1・ Na^+/H^+ アンチポーター

は K^+ も輸送し、また K^+ 選択的なHKTも存在することがわかっている^(13,14)。HKT1は、 K^+ チャネルなどで知られるMPM (membrane-pore-membrane) 構造*が4つ連続した $4 \times$ MPM構造をもち、8個の膜貫通領域の柱に取り囲まれるようにイオン透過孔が形成されている⁽¹⁵⁾。 K^+ に関するイオン選択性の違いは、最初のイオン選択孔 (Pore) のGlyがSerに置き換わっているか否かに依存する⁽¹⁶⁾。また、8番目の膜貫通領域の中央に位置する高く保存された正電荷のアミノ酸と透過孔の負電荷アミノ酸が相互作用して、トランスポーター構造を安定化させている⁽¹⁷⁾。この相互作用は、トランスポーターとチャネルの機能の区別に重要であることが示唆されている。

植物体内で、AtHKT1は各組織の道管に局在し、葉や茎の木部柔組織に多く発現している (図3)⁽¹⁸⁾。AtHKT1遺伝子破壊株は、高濃度 Na^+ 培地で地上部の生育が著しく阻害される。 K^+ 輸送だけではなく植物では道管から Na^+ を除くことで耐塩性に寄与しており、AtHKT1は地上部から根への Na^+ の転流に関与している⁽¹⁹⁾。

*Synechocystis*は、Ktrのサブユニットの一つKtrB (*slr1509*)を有する。KtrB破壊株 (*ktrB*)には K^+ 取り

*2本の膜貫通ドメインにPoreドメインが挟まれた構造

込み能の低下, Na^+ 感受性の上昇が観察されたことから, KtrBは, 制御ドメイン KtrA (*sl* 0493) と KtrE (*slr*1508) から構成され, KtrABEによる K^+ 取り込みは Na^+ で促進され, H^+ 駆動力に依存的である^(20~22). このように, KtrABEは*Synechocystis*の高浸透圧適応において, 初期の膨圧調整機能を担う K^+ 取り込み機構であることが示された(図2).

細胞膜 K^+ チャネル

動物には存在しない K^+ トランスポーターに加えて, 植物やシアノバクテリアにも動物と同様の K^+ チャネルは存在する. シロイヌナズナには, 9つの膜電位依存性 Shaker型 K^+ チャネル (KAT1, KAT2, AKT1, AKT2/3, AKT5, SPIK = AKT6, AtKC1, GORK, SKOR) 遺伝子と2つのイオン選択孔を有するTwo-Pore型TPKチャネル (TPK1~5) とKCO3が存在する⁽²³⁾. これらは, 様々な組織で発現してイオン恒常性維持に関係している(図3).

気孔を構成する2つの孔辺細胞には数々の K^+ チャネルが発現しており, 膨潤と収縮を繰り返して, 気孔の開閉を行なう. 孔辺細胞の細胞膜の H^+ ポンプによる H^+ の排出によって生じた細胞膜電位の過分極によって活性化した内向き整流性 K^+ チャネルのKAT1やKAT2が K^+ を取り込み細胞内の浸透圧を上昇させる. すると, それに伴い水が細胞内へ流入して細胞が膨らむ. 一方, 孔辺細胞内からの K^+ と水の流出により細胞体積が減少して気孔が閉じる. このとき, 内向き K^+ チャネルの抑制と外向き整流性 K^+ チャネルのGORKの活性化が起こる.

KAT1は初めて発見された植物のチャネルであるため, 構造と機能解析は最も進んでおり, 他のチャネルのお手本である. KAT1のチャネル活性については, 膜電位だけでなく生体内因子によって制御されていることが知られている. 気孔の閉口の際に活性化するSnRK2.6リン酸化酵素が K^+ チャネルをリン酸化することが推定されていた. その標的リン酸化アミノ酸はKAT1の306番目のThrである可能性が報告された. このアミノ酸がSnRK2.6のリン酸化修飾を受けるとKAT1のチャネル活性は阻害されることから, リン酸化制御がチャネル活性に関与していることが示唆されている⁽²⁴⁾.

根に発現する K^+ チャネルとしてAKT1が報告されている. 根の表皮細胞に発現するAKT1は, アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理学的な実験により, 土壌中の K^+ を細胞内に取り込む内向き整流性チャ

ネルであることが判明している. NH_4^+ 存在下では, AKT1変異株は野生株と比較して K^+ の取り込み量が減少し, 発芽率が低下することが知られている. AKT1によって根に取り込まれた K^+ は, 木部柔組織に発現するSKORによって道管に運搬されて地上部へ長距離輸送される.

細胞内の膨圧は, 細胞の伸長や花粉からの花粉管の伸長に重要な役割を担っている. SPIK変異株は野生株と比較して花粉管伸長の速度が遅い. SPIKは内向き整流性チャネルとして機能し, 花粉管の伸長時に K^+ の流入によって生じる細胞内の膨圧に関わると考えられている. 最近, CHX21とCHX23も花粉管の伸長に必須であることが報告された⁽²⁵⁾. このCation/ H^+ アンチポーターのCHX16~20, 23は K^+ と H^+ の対向輸送体であり, 細胞膜やオルガネラ膜に局在する.

K^+ チャネルの膜構造形成様式

K^+ チャネルは四量体で構成される. 1998年に微生物の K^+ チャネルについて初めてのX線結晶構造が報告され, イオン透過孔(Pore)を構成する2本の膜貫通部位とその間の膜内ループ構造の詳細が明らかになった. Poreにおいては, 4つのアミノ酸(TVGY)の主鎖カルボニル基が4列平行に内側を向き, 4個所のイオン結合部位を形成している(図4) この4個所のイオン結合部位の内径は1.5 Åと狭いため, 脱水和した半径1.3 Åの

図4 ■ K^+ チャネルの四量体形成とイオン選択孔の構造

(A) K^+ チャネル四量体の立体構造. 中心のピンク色の球が K^+ イオンである (PDB ID: 1BL8). (B) K^+ 選択孔として機能するTVGY配列. Aにおける黄色と黄緑色のサブユニットのみを示した. Pore領域において K^+ イオン結合部位を形成する原子をスティックモデルで示した. 赤色で示した原子は, 一番下がThrの側鎖酸素原子であり, その次からは順にThr, Val, Gly, Tyrの各残基の主鎖の酸素原子である. ピンク色の球は, 一番下に少し離れて位置するものが水和状態で存在する K^+ イオンを示し, 上4つの球がTVGY配列によって形成された4個所の K^+ イオン結合部位を示す (PDB ID: 1R3J).

図5 ■ Shaker型膜電位依存性K⁺チャネルの膜電位センサーの膜組み込み機構

(A) 膜電位依存性K⁺チャネルのトポロジーモデルと保存された電荷残基および膜貫通部位間の相互作用。(B) KAT1とShaker BのS1～S4の疎水性。膜電位センサーを構成するS3とS4の疎水度が低いKAT1に比べて、Shaker BのS3は比較的高い。(C) KAT1およびShaker Bの膜組み込み機構。KAT1のS3とS4は相互作用をしながら同時に組み込まれるのに対して、Shaker BではS3から単独で膜貫通する機能がある。

K⁺イオンが入るとペプチド鎖の酸素が水和状態を引き継いでK⁺イオンと結合する。K⁺イオンは4個所の結合サイトを次々と移動して、再び水和状態に戻り膜透過を完了する。この高速K⁺イオン選択フィルターによって、1秒間に1億個のK⁺イオンを選択的に透過することができる。

膜輸送体は複数の膜貫通部位から構成されるマルチスパン型膜タンパク質である。リボソームによってタンパク質合成が開始されるとほぼ同時に、小胞体膜上のトラ

ンスロコンに移動して、ポリペプチド鎖の合成が再び開始して膜タンパク質がつくられる。K⁺チャネルには2つの特徴的な膜貫通構造がみられる。1つ目の特徴は、Poreは高い疎水性を有するにもかかわらず、ループ構造をしており膜貫通しない領域が存在することである。この膜形成が、無細胞翻訳・膜組み込み系を用いて、KAT1、KcsA（細菌由来）やKir2.1（哺乳類由来）を材料に検討された⁽²⁶⁾。ループを支える2つの膜貫通領域の性質はそれぞれのK⁺チャネルで異なるものであったが、Pore領域は合成直後に小胞体内腔へ一度露出することが予測された。そして、K⁺チャネルが四量体を形成する際にPore領域が膜内に組み込まれる可能性が示唆された。これとは異なり、ヒトNa⁺/H⁺交換輸送体(NHE1)の類似の膜内ループ構造は小胞体内腔へ露出することなく膜へ組み込まれる⁽²⁷⁾。

2つ目は、膜電位センサー領域に関する特徴である。膜電位依存性K⁺チャネルの膜電位は膜貫通領域に存在する電荷アミノ酸が感知する。図5に示すように、その膜貫通領域のS2に2個とS3に1個の負電荷アミノ酸、そしてS4には数個の正電荷アミノ酸が存在し、その膜貫通領域の疎水性は比較的低い。このようなS2～S4の電荷アミノ酸は、通常は疎水環境の生体膜への組み込みには障害となる。KAT1とShaker B（ショウジョウバエ）の膜電位センサーの膜組み込みが詳細に解析された結果⁽²⁸⁻³⁰⁾、S3単独では膜挿入できないため、S4がリボソームから露出して合成が完了した後にS3とS4内の電荷残基どうしが相互作用して、S3とS4が一体となって膜へ組み込まれることがわかった。これは、2つの膜貫通領域が1セットで組み込まれるという珍しい形式である。Shakerにおいては、上記の組み込み様式にはS3の高い疎水性も膜組み込みに寄与すると考えられた。

植物オルガネラK⁺チャネル

植物細胞の90%を占める液胞の膜にもイオンチャネルが存在している。slow-activating vacuolar channel (SV), fast-activating vacuolar channel (FV), vacuolar K⁺ channel (VK)といった3種類のチャネル電流の名称が付けられている(図6)。FVチャネルはK⁺選択性が高く、Ca²⁺による抑制と膜電位非依存的な制御機構が報告されているが、チャネルの実体は未同定のままである。一方、21世紀に入ってから、SVとVKチャネルの実体が明らかとなった。SVチャネルは植物に広範に発現しており、膜電位とCa²⁺による活性化によって1価と2価の陽イオンを輸送する。液胞膜に発現する

植物液胞膜には様々な陽イオンチャネル (FV, SV, VK) が発現しているため、それらがバックグラウンド電流として外来輸送体のNtTPK1の輸送活性測定を妨害した。酵母の液胞膜チャネル $yvc1$ 変異株のバックグラウンド電流はほとんど消滅したことから、NtTPK1の電流特性評価が可能となった。

図6 ■ 植物液胞膜新規 K^+ チャネルの酵母発現系パッチクランプ測定

Shakerチャネルがタンデムに連結した構造のTPC1がSVチャネルの本体であることが報告された。一方、AtTPC1は K^+ を優先的に透過する性質をもち、SVチャネルの本体ではないとする報告もある。VKチャネルの実体はAtTPK1と報告されて、 Ca^{2+} による活性化と膜電位依存的な特性を示した。 Ca^{2+} による活性化は、TPKファミリーに広く保存されているC末端領域のEF-handに結合する Ca^{2+} によることが考えられている。TPKチャネルは、液胞膜やその他のオルガネラ膜に局在しているが、チャネルの分子構造や生理的役割などはまだ解明に至っていない。

液胞膜には上記3つ以外のイオンチャネルも発現している。タバコ液胞膜のNtTPK1はチャネルの一つである。はじめに、NtTPK1の輸送活性の解析をタバコ液胞膜のパッチクランプ測定によって試みたが、タバコ液胞膜に内在する陽イオン輸送バックグラウンド活性が妨げとなり解析は困難であった。また、異種発現系としてアフリカツメガエルの卵母細胞を用いたイオンチャネルの発現解析でも、NtTPK1のチャネル活性は認められなかった。しかし、大腸菌 K^+ 輸送系変異株においては、有意な K^+ 輸送体遺伝子変異を相補する活性が認められたことより、NtTPK1は機能をもつチャネルであることが明らかとなった。しかし、詳細な機能活性が解明されない限りどのようなチャネルかはっきりしないため、電気生理解析が求められた。1999年に矢部らは、大腸菌や出芽酵母の細胞をパッチクランプ法が適用可能な大きさ (10 ~ 20 μm) に巨大化させる方法を開発した。通常、パッチクランプ法で使用する微小電極 (パッチ電極) の先端口径は約1 μm であり、この先端口径よりも小さい細胞内小器官、酵母や大腸菌や脆弱な生体膜のイオン電流計測は難しい。この方法は、細胞壁を除去した細胞 (スフェロプラスト) を培養して巨大化させることからSpheroplast Incubation method (SI法) と名付け

られた⁽³¹⁾。さらに、パッチクランプ装置に改良を施すことによって、脆弱な巨大化大腸菌や巨大化酵母液胞膜のパッチクランプ測定を可能にした。その結果、本手法を用いて、大腸菌のF型ATPase⁽³¹⁾、出芽酵母V型ATPase⁽³²⁾および植物液胞膜局在性H-ポンプV型ピロホスファターゼ⁽³³⁾の機能解析が報告されている。

これまでのSI法を用いた解析と植物液胞膜の輸送体が酵母液胞膜に発現する可能性を踏まえて、NtTPK1の測定が検討された⁽³⁴⁾。酵母液胞膜にはバックグラウンドとなる Ca^{2+} によって活性化される液胞膜内在性の陽イオンチャネルの存在が確認された。酵母ゲノムデータベースを調べたところ、哺乳類TRPチャネルの相同遺伝子 $yvc1$ がその実体であると推測された。酵母 $yvc1$ 変異株を作製してパッチクランプ測定を行なったところ、 Ca^{2+} によって活性化されるイオン電流が消失した。次に、このバックグラウンドイオン電流を低減化した酵母 $yvc1$ 変異株にNtTPK1を発現させてそのチャネル活性を検討した結果、NtTPK1の K^+ 選択性は高く、細胞質の酸性化によってチャネル活性が上昇することがわかった。また、細胞質の Ca^{2+} によって若干活性化され、ポリアミンによってわずかに不活化されることも示された。NtTPK1は高浸透圧によって発現が上昇する。

*

植物の K^+ 輸送体遺伝子が単離され、 Na^+ 輸送体遺伝子の解明も進んでいる。駆動力形成に重要となる輸送体の解明が進められている。また、様々な重金属の輸送体遺伝子も近年次々とクローン化されている。植物・微生物と、動物とを比較することは、生物全体の膜輸送の本質に迫る一助となる。本文に記載のとおり、名称が違っても構造や機能には共通性が多くみられる。はじめに述べたように、イオン環境は動物と微生物・植物とでは大きく異なるが、それを理解して進めれば、個々の研究を

他の生物への転換と発展に利用できる。Na⁺チャネルはなく、Na⁺, K⁺-ATPaseもない植物や微生物は、動物とは異なるK⁺輸送系を発達させて、膜電位の維持を図っている。光合成に必要な強光と酸化ストレスをもたらす激しい環境に適応するために、植物やシアノバクテリアのイオン輸送体は必須の基本装置となっている。植物・シアノバクテリアのイオン輸送体についての研究が進展し、分子の膜輸送をコントロールする駆動力形成の実体が次第に明らかとなることで、恒常性維持と環境ストレスへの適応機構に加えて、光合成機構に影響を与える駆動力の本質に迫ることが可能になると考えられる。

文献

- 1) S. J. Wu, L. Ding & J. K. Zhu: *Plant Cell*, **8**, 617 (1996).
- 2) M. P. Apse, G. S. Aharon, W. A. Snedden & E. Blumwald: *Science*, **285**, 1256 (1999).
- 3) S. Mikkat, C. Milkowski & M. Hagemann: *Plant Cell Environ.*, **23**, 549 (2000).
- 4) K. Tsunekawa *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **284**, 16513 (2009).
- 5) M. Akai *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **286**, 25224 (2011).
- 6) S. G. Schultz & A. K. Solomon: *J. Gen. Physiol.*, **45**, 355 (1961).
- 7) M. K. Ashley, M. Grant & A. Grabov: *J. Exp. Bot.*, **57**, 425 (2006).
- 8) M. R. Blatt & C. L. Slayman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2737 (1987).
- 9) R. E. Hirsch, B. D. Lewis, E. P. Spalding & M. R. Sussman: *Science*, **280**, 918 (1998).
- 10) F. Aleman, M. Nieves-Cordones, V. Martinez & F. Rubio: *Plant Cell Physiol.*, **52**, 1603 (2011).
- 11) D. P. Schachtman & J. I. Schroeder: *Nature*, **370**, 655 (1994).
- 12) N. Uozumi, E. J. Kim, F. Rubio, T. Yamaguchi, S. Muto, A. Tsuboi, E. P. Bakker, T. Nakamura & J. I. Schroeder: *Plant Physiol.*, **122**, 1249 (2000).
- 13) M. Mosimann, S. Goshima, T. Wenzler, A. Luscher, N. Uozumi & P. Maser: *Eukaryot. Cell.*, **9**, 539 (2010).
- 14) 魚住信之: 日本土壤肥科学雑誌, **82**, 65 (2011).
- 15) Y. Kato, M. Sakaguchi, Y. Mori, K. Saito, T. Nakamura, E. P. Bakker, Y. Sato, S. Goshima & N. Uozumi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6488 (2001).
- 16) P. Mäser *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6428 (2002).
- 17) N. Kato, M. Akai, L. Zulkifli, N. Matsuda, Y. Kato, S. Goshima, A. Hazama, M. Yamagami, H. R. Guy & N. Uozumi: *Channels (Austin)*, **1**, 161 (2007).
- 18) Sunarpi *et al.*: *Plant J.*, **44**, 928 (2005).
- 19) P. Berthomieu *et al.*: *EMBO J.*, **22**, 2004 (2003).
- 20) N. Matsuda, H. Kobayashi, H. Katoh, T. Ogawa, L. Futatsugi, T. Nakamura, E. P. Bakker & N. Uozumi: *J. Biol. Chem.*, **279**, 54952 (2004).
- 21) L. Zulkifli & N. Uozumi: *J. Bacteriol.*, **188**, 7985 (2006).
- 22) L. Zulkifli, M. Akai, A. Yoshikawa, M. Shimojima, H. Ohta, H. R. Guy & N. Uozumi: *J. Bacteriol.*, **192**, 5063 (2010).
- 23) A. Lebaudy, A. A. Very & H. Sentenac: *FEBS Lett.*, **581**, 2357 (2007).
- 24) A. Sato *et al.*: *Biochem. J.*, **424**, 439 (2009).
- 25) Y. Lu, S. Chanroj, L. Zulkifli, M. A. Johnson, N. Uozumi, A. Cheung & H. Sze: *Plant Cell*, **23**, 81 (2011).
- 26) N. Umigai, Y. Sato, A. Mizutani, T. Utsumi, M. Sakaguchi & N. Uozumi: *J. Biol. Chem.*, **278**, 40373 (2003).
- 27) Y. Sato, N. Ariyoshi, K. Mihara & M. Sakaguchi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 281 (2004).
- 28) Y. Sato, M. Sakaguchi, S. Goshima, T. Nakamura & N. Uozumi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 60 (2002).
- 29) Y. Sato, M. Sakaguchi, S. Goshima, T. Nakamura & N. Uozumi: *J. Biol. Chem.*, **278**, 13227 (2003).
- 30) L. Zhang, Y. Sato, T. Hessa, G. von Heijne, J. K. Lee, I. Kodama, M. Sakaguchi & N. Uozumi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 8263 (2007).
- 31) T. Kuroda *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **273**, 16897 (1998).
- 32) I. Yabe *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **274**, 34903 (1999).
- 33) Y. Nakanishi, I. Yabe & M. Maeshima: *J. Biochem.*, **134**, 615 (2003).
- 34) S. Hamamoto *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **283**, 1911 (2008).