

博士論文

イネ科植物の鉄獲得に関わる遺伝子群の3次元発現解析

応用生命化学専攻

平成14年度博士課程 進学

氏名 井上 晴彦

指導教員名 西澤 直子

目次

	頁
略語表	4
第1章 序文	
1-1 研究の背景	5
1-2 植物の鉄獲得機構	7
1-3 ムギネ酸類の生合成経路および関連遺伝子	9
1-4 ムギネ酸類とニコチアナミン	11
1-5 「鉄-ムギネ酸類」錯体トランスポーター	13
1-6 本研究の概要	14
第2章 イネのデオキシムギネ酸生合成に関わる遺伝子群の発現様式	
2-1 要約	15
2-2 実験方法	16
2-3 実験結果	24
2-4 考察	47
第3章 「鉄-デオキシムギネ酸」錯体を輸送する OsYSL15 の解析	
3-1 要約	58
3-2 実験方法	60
3-3 実験結果	63
3-4 考察	72

第4章 「金属－ニコチアナミン」錯体を輸送する OsYSL2 の解析

4-1 要約	75
4-2 実験方法	76
4-3 実験結果	77
4-4 考察	85

第5章 FRD3 に相同性の高いイネの遺伝子 (*OsFRDL*) の単離と解析

5-1 要約	88
5-2 実験方法	89
5-3 実験結果	91
5-4 考察	101

第6章 総合考察

6-1 鉄の輸送経路について	105
6-2 今後の展望	108

謝辞	112
----	-----

参考文献	113
------	-----

略語表

APRT	アデニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (adenine phosphoribosyltransferase)
AVA	アベニン酸 (avenic acid)
DMA	2'-デオキシムギネ酸 (2'-deoxymugineic acid)
epiHDMA	3-エピヒドロキシ-2'-デオキシムギネ酸 (3-epihydroxy-2'-deoxymugineic acid)
(epi)HMA	3-(エピ)ヒドロキシムギネ酸 (3-(epi)hydroxymugineic acid)
GUS	β -glucuronidase
IDS3	<u>I</u> ron <u>d</u> eficiency <u>s</u> pecific clone No. 2
IDS3	<u>I</u> ron <u>d</u> eficiency <u>s</u> pecific clone No. 3
SAM	S-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine)
NA	ニコチアナミン (nicotianamine)
NAS	ニコチアナミン合成酵素 (nicotianamine synthase)
NAAT	ニコチアナミンアミノ基転移酵素 (nicotianamine aminotransferase)
DMAS	デオキシムギネ酸合成酵素
PLP	ピリドキサルリン酸 (pyridoxyl 5-phosphate)

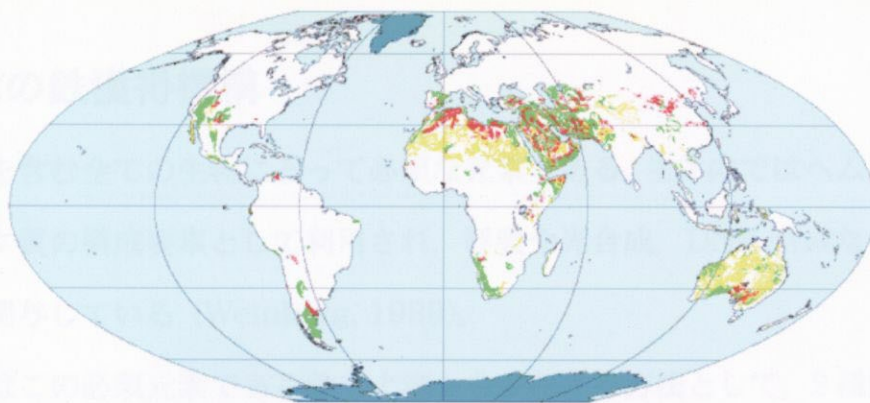
第1章 序章

1-1 研究の背景

現在 64 億人である世界人口は今なお急速に増加しており、年間 7600 万人の割合で増えている（世界人口白書，2004）。そして、国連の推計では現在から 2050 年までに約 25 億人が増加すると見られるが、これは 1950 年の全世界の人口に匹敵する。しかし、現在ですら人口を支えるだけの食糧の生産は十分とは言えず、世界では、8 億人以上が栄養不足に苦しんでいる（The State of Food Insecurity in the World, 2001）。

今後も不足が予想される食糧の増産をいかに達成するかは、人類にとって重要な問題である。これまでも第一次、第二次緑の革命により単位面積当たりの収穫量を増加させ、人口の増加に対応してきた。しかし現在、単位面積当たりの収穫量の増加率は既に頭打ちになってきており、これ以上の収穫量の飛躍的な増加は期待できない。この深刻な食糧問題の有力な解決方法のひとつは耕地面積の拡大である。すなわち、今までは耕地として利用されていなかった、もしくは利用されていても高い収量を確保出来なかった不良土壌の活用に問題解決の糸口がある。

不良土壌の中でも特に、石灰質アルカリ土壌は鉄欠乏地帯として世界中に広く存在する（図 1.1）。石灰質アルカリ土壌では鉄は植物には吸収されにくい水酸化第二鉄の形で不溶態として存在しているため、植物は鉄欠乏クロロシスを呈し、症状が重い場合にはやがて枯死してしまう（図 1.2）。このような土壌が世界の耕地土壌のおよそ三分の一をしめている（Wallace and Lunt, 1960）。従って、不溶態として豊富に存在する鉄を石灰質アルカリ土壌から吸収できるような植物、特にイネ科の作物を作出できれば食糧増産、砂漠の緑化などの様々な問題に対応できる。そのような鉄欠乏耐性を備えた植物の作出を最終的な目標とし、植物の鉄獲得および鉄栄養に関する研究を行っている。



■ Dominant
 ■ Associated
 ■ Inclusions
 ■ Miscellaneous lands
 (Inland waterbodies, Glaciers, No data)

Flat Polar Quartic Projection FAO-GIS, February 1998

図1.1 世界におけるアルカリ土壌の分布

WRB, FAO/Unesco Soil MAP of the World 調べによる。



図1.2 鉄欠乏クロロシスを呈したイネ

写真提供：森川クラウジオ健治

1-2 植物の鉄獲得機構

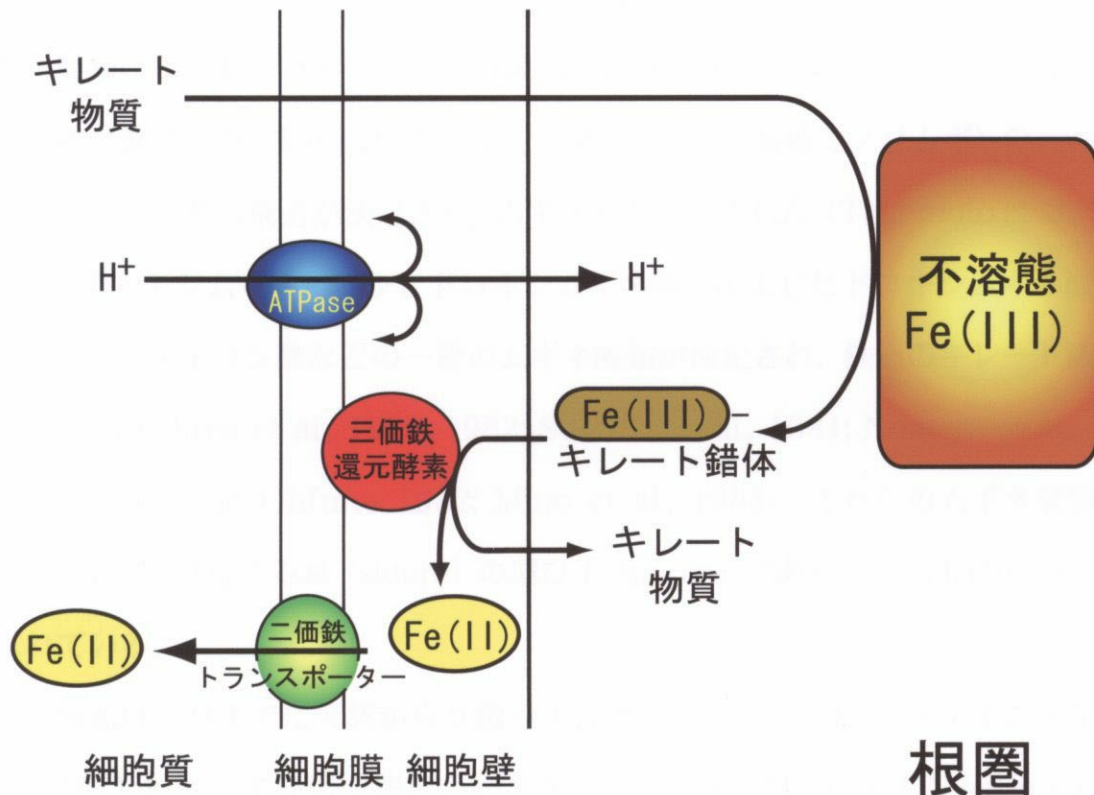
鉄は植物を含む全ての生物にとって必須な元素である。生体内ではヘムタンパク質や非ヘムタンパク質の構成要素として利用され、呼吸や光合成、DNA合成などの多くの生体プロセスに関与している (Weinberg, 1989)。

高等植物はこの必須元素である鉄を土壌から吸収する方法として、2種類の鉄獲得機構を進化させてきた。これらの機構は Strategy I, Strategy II として提唱されている (Marschner et al., 1986; 図 1.3)。

双子葉植物とイネ科以外の単子葉植物は Strategy I を持つ。根から放出するカフェイン酸などのキレート物質により土壌中の Fe(III) を可溶化し (Hether et al., 1984), 根の細胞膜上の三価鉄キレート還元酵素が「Fe(III)-キレート」を Fe(II) に還元し, これを Fe(II)トランスポーターで吸収する (Römheld and Marschner, 1981)。三価鉄還元酵素 (FRO2) および Fe(II)トランスポーター (IRT1) の遺伝子はシロイヌナズナからそれぞれ Robinson et al. (1999), Eide et al. (1996) によって単離された。また, 鉄欠乏条件にさらされると, 根圏へのプロトン分泌により土壌 pH を低下させ, 根圏へのキレート物質の分泌量増加により土壌溶液中の可溶性鉄の濃度を上昇させ, さらに根の細胞膜表面に存在する還元酵素の活性が上昇する (Olsen and Brown, 1980; Marschner et al., 1986; Römheld, 1987)。

一方, イネ科植物は Strategy II を持つ。イネ科植物は鉄の要求性が高まると, イネ科植物特有の三価鉄のキレーターであるムギネ酸類を根で合成し, 分泌する (Takagi, 1976; 高城, 1984)。この分泌はカリウムの放出を伴い, アニオンチャネル阻害剤によって阻害されることから, ムギネ酸類は一価のアニオンとして放出されると考えられる (Sakaguchi et al., 1999)。分泌されたムギネ酸類は土壌中の不溶性鉄をキレートして可溶化し, 「鉄-ムギネ酸類」錯体として特有のトランスポーターにより根で再吸収される。この「鉄-ムギネ酸類」錯体のトランスポーター (YS1) の遺伝子はトウモロコシから単離された (Curie et al., 2001)。

Strategy I



Strategy II

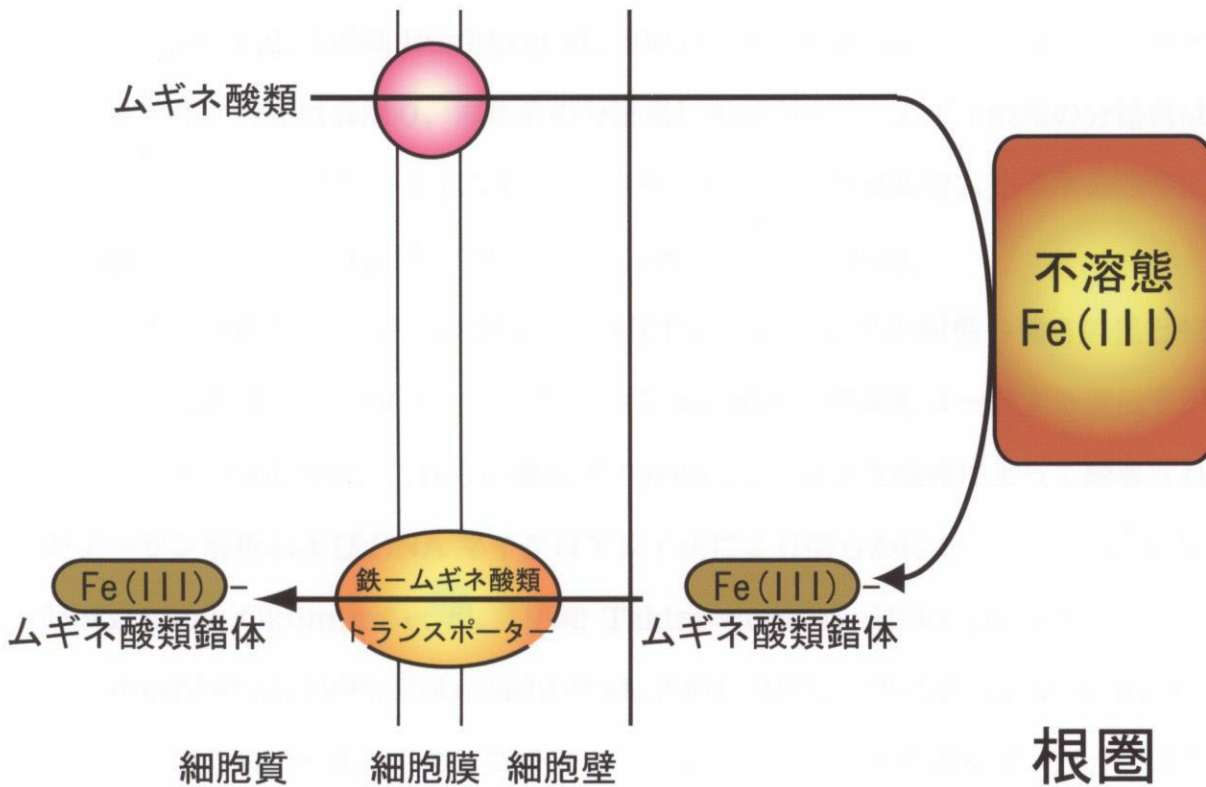


図1.3 高等植物の鉄獲得機構：Strategy I と Strategy II

1-3 ムギネ酸類の生合成経路および関連遺伝子

ムギネ酸類はイネおよびカラスムギの根の root wash から鉄溶解力活性を有する物質として最初に発見され (Takagi, 1976), その後オオムギ (品種ミノリムギ) の root wash から精製された物質の構造が決定され, ムギネ酸と命名された (Takemoto et al., 1978)。さらに 2'-デオキシムギネ酸, 3-ヒドロキシムギネ酸, 3-エピヒドロキシムギネ酸, アベニン酸, ディステイコン酸などの一連のムギネ酸類が同定され, 鉄とのキレート活性が確かめられた (Fushiya et al., 1980, 1982; Sugiura et al., 1981; Nomoto et al., 1981a, 1981b; Nomoto and Ohfuné 1982; Mino et al., 1983)。これらのムギネ酸類は植物 (phyto) が合成, 分泌する鉄 (sidero) の運び手 (phore) であるため, phytosiderophore と呼ばれている。

ムギネ酸類はこれまでに天然から 9 種の化合物が見つかり, メチオニンを前駆体として, 図 1.4 に示す経路で根において生合成される (Mori and Nishizawa, 1987; Kawai et al., 1988; Shojima et al., 1990; Ma and Nomoto, 1993; Ma et al., 1999; Ueno et al., 2004)。基質となるメチオニンは地上部からではなく根で供給されている (Nakanishi et al., 1999; Bughio et al., 2001)。イネ科植物の中でも種により分泌されるムギネ酸類の種類は異なり, またその分泌量にも差がある。ムギネ酸類の分泌量はオオムギ > コムギ > エンバク > ライムギ >> トウモロコシ >> ソルガム > イネの順番に多いことが報告されている (高城, 1984; Lytle and Jolley, 1991)。

このムギネ酸類の分泌量の差はイネ科植物における鉄欠乏耐性の強さの差と強い相関がある。これまでに, 図 1.4 に示した生合成経路上の酵素をコードする遺伝子がオオムギから単離, 同定され, これらの遺伝子の発現は全て鉄欠乏処理によって誘導されることがノーザン解析および DNA マイクロアレイ法により明らかになった (Nakanishi et al., 1993, 2000; Okumura et al., 1994; Takizawa et al., 1996; Higuchi et al., 1999a; Takahashi et al., 1999; Kobayashi et al., 2001; 根岸, 2002; Negishi et al., 2002)。またこれらのうち, オオムギのニコチアミンアミノ基転移酵素遺伝子 (*HvNAAT*) を含むゲノム断片を導入したイネは野生型のイネと比べ, 鉄欠乏条件下でムギネ酸類の分泌量が

ムギネ酸類

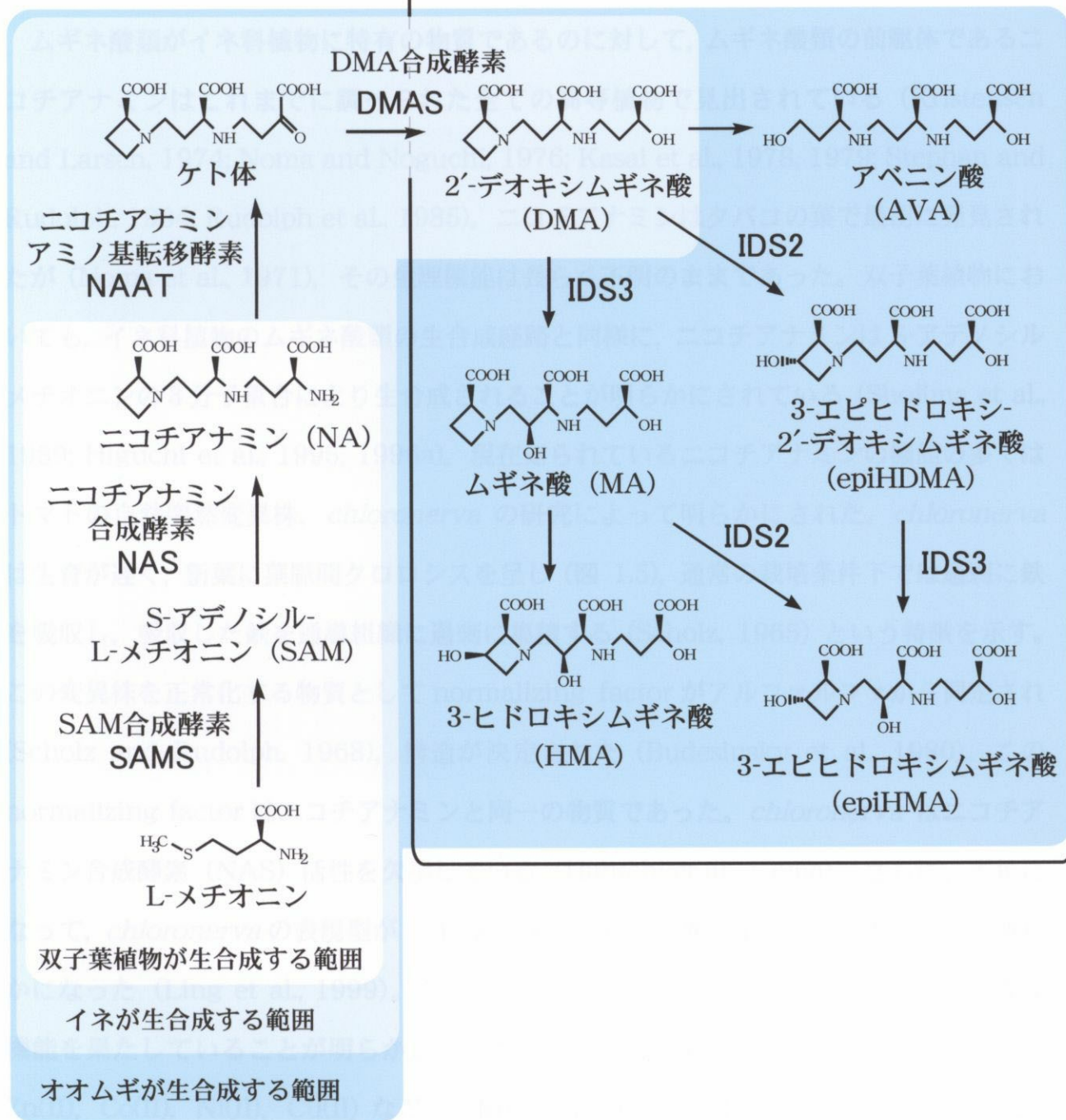


図1.4 ムギネ酸類の生合成経路

双子葉植物はニコチアナミンまでを生合成する。イネはデオキシムギネ酸までを生合成する。オオムギは、デオキシムギネ酸および他のムギネ酸類を生合成する。

増加し、鉄欠乏耐性を示した (Takahashi et al., 2001)。

1-4 ムギネ酸類とニコチアナミン

ムギネ酸類がイネ科植物に特有の物質であるのに対して、ムギネ酸類の前駆体であるニコチアナミンはこれまでに調べられた全ての高等植物で見出されている (Kristensen and Larsen, 1974; Noma and Noguchi, 1976; Kasai et al., 1978, 1979; Stephan and Rudolph, 1984; Rudolph et al., 1985)。ニコチアナミンはタバコの葉で最初に発見されたが (Noma et al., 1971), その生理機能は長らく不明のままであった。双子葉植物においても、イネ科植物のムギネ酸類の生合成経路と同様に、ニコチアナミンは S-アデノシルメチオニンの 3 分子重合により生合成されることが明らかにされている (Shojima et al., 1989; Higuchi et al., 1995, 1996a)。現在知られているニコチアナミンの機能の多くはトマトの自然突然変異株, *chloronerva* の研究によって明らかにされた。*chloronerva* は生育が遅く、新葉に葉脈間クロロシスを呈し (図 1.5), 通常の栽培条件下では過剰に鉄を吸収し、吸収した鉄を通導組織に過剰に集積する (Scholz, 1965) という特徴を示す。この変異株を正常化する物質として normalizing factor がアルファルファから同定され (Scholz and Rudolph, 1968), 構造が決定された (Budesinsky et al., 1980)。この normalizing factor はニコチアナミンと同一の物質であった。*chloronerva* はニコチアナミン合成酵素 (NAS) 活性を欠損している (Higuchi et al., 1996a)。さらに、近年になって、*chloronerva* の表現型が NAS 遺伝子の一塩基変異によるものであることが明らかになった (Ling et al., 1999)。こうしてニコチアナミンは高等植物の鉄栄養に重要な機能を果たしていることが明らかとなった。その後ニコチアナミンは Fe(II), Mn(II), Zn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) などの二価重金属とキレートする (Benes et al., 1983)。これに対して、ムギネ酸類は特に Fe(III) と強くキレートし、その他に, Ca(II), Fe(II), Mn(II), Zn(II), Ni(II), Cu(II) ともキレートする (Murakami et al., 1989)。表 1.1 にムギネ酸およびニコチアナミンの各金属との錯体の安定度定数を示す。



図1.5 葉脈間クロロシスを呈する
トマトの変異株*chloronerva*

トマト変異株の遺伝子組換えの遺伝子については、当研究室において Okamoto et al. (1994) が1982年オム平から単離して以来、次々と発表されてきた。しかし、「オム平変異株」発祥地オム平から採取するトランスジェニックに代しては、当研究室のオム平がその遺伝子の単離を冒険し、研究を行ったのはおしなから、実際に遺伝子的手法からその遺伝子 (Y5I) が単離されたのは21世紀を過ぎてからであった (Crisis et al. 2001)。オム平変異株はイネ科植物に特有の物質であり、Soybean1 遺伝子にオム平変異株を採取しない (Graham et al. 1987) ことから、Y5I もイネ科植物特有の遺伝子と推定される。しかし、Soybean-1 遺伝子変異するトランスジェニックのオム平には、Y5I 近縁M10の近い遺伝子 (4c1521と4c1731) が5個も発見された (Crisis et al. 2001)。オム平変異株を合成も利

表 1.1 ムギネ酸 (MA) とニコチアナミン (NA) の各金属との錯体の安定度定数

(Benes et al., 1983; Murakami et al., 1989)

	Ca(II)	Fe(II)	Fe(III)	Mn(II)	Zn(II)	Co(II)	Ni(II)	Cu(II)
MA	3.34	10.00	32.5	8.03	12.4	n.r. ^a	14.4	17.9
NA	n.r. ^a	12.1	20.6 ^b	8.8	14.7	14.8	16.1	18.6

a) n.r. は報告されていないことを意味する。

b) von Wirén et al., 1999 による値

このように、ムギネ酸類とニコチアナミンとは金属のキレーターとしての化学的性質がよく似ており、Fe(III) をキレートした時の錯体のモデル図もよく似ている (von Wirén et al., 1999)。ムギネ酸類とニコチアナミンの大きな違いは、ムギネ酸類がイネ科植物によって植物体外に分泌され、鉄の獲得に機能しているのに対し、ニコチアナミンは体外に分泌されないという点である (Fushiya et al., 1982)。そのため、「植物によって合成、分泌され、鉄と可溶性複合体を形成した後、植物によって再吸収される物質」という phytosiderophore の定義にはニコチアナミンはあてはまらない。

1-5 「鉄—ムギネ酸類」錯体トランスポーター

ムギネ酸類の生合成経路上の遺伝子については、当研究室において Okumura et al. (1994) が *Ids2* をオオムギから単離して以来、次々と単離されてきた。しかし、「鉄—ムギネ酸類」錯体を土壌から吸収するトランスポーターに関しては、当研究室の三橋らがそのタンパク質の単離を目指し、研究を行ったが成功しなかった。実際に遺伝学的手法からその遺伝子 (*YSI*) が単離されたのは 21 世紀を迎えてからであった (Curie et al., 2001)。ムギネ酸類はイネ科植物に特有の物質であり、Strategy I 植物はムギネ酸類を吸収しない (Römheld, 1987) ことから、*YSI* もイネ科植物特有の遺伝子と推測される。しかし、Strategy I 植物に属するシロイヌナズナのゲノムには *YSI* に相同性の高い遺伝子 (*AtYSI-Like: AtYSL*) が 8 個も見出された (Curie et al., 2001)。ムギネ酸類を合成も利

用もしないシロイヌナズナが *AtYSL* を持つことは、シロイヌナズナに存在するニコチアナミンが植物体内においてムギネ酸類と同様の役割を果たしていることを示唆している。つまり、*AtYSL* タンパク質は植物体内で「鉄-ニコチアナミン」錯体のトランスポーターとして機能していると考えられる (Walker, 2002)。

1-6 本研究の概要

当研究室では、ムギネ酸類生合成に関わる遺伝子群を単離してきた。しかし、植物体内におけるムギネ酸類やその前駆体であるニコチアナミンの機能は詳細には明らかになっていない。これを明らかにするために本研究では、ニコチアナミンおよびムギネ酸類の生合成に関与する遺伝子 (第2章)、「Fe-ムギネ酸類」錯体を輸送するトランスポーター遺伝子 (第3章)、「Fe-ニコチアナミン」錯体を輸送するトランスポーター遺伝子 (第4章)、さらにニコチアナミンを輸送する可能性のあるトランスポーター遺伝子 (第5章)が、鉄欠乏条件および鉄十分条件のイネにおいてどの組織で発現するかを三次元的に解析した。