

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

Plant Journal (2003) 36: 366-381

2-1 要約

イネ科植物がS-アデノシルメチオニンからデオキシムギネ酸を生合成するためには、3つの酵素が必要である。ニコチアナミン合成酵素 (NAS), ニコチアナミンアミノ基転移酵素 (NAAT) とデオキシムギネ酸合成酵素 (DMAS) である。本論文では、デオキシムギネ酸生合成に関わる遺伝子群 (*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAS3*, *OsNAAT1*, *OsDMAS1*) を、イネから単離した。大腸菌で各タンパク質を発現させて *in vitro* で反応を行うと、それぞれが酵素活性を有していた。さらに、*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAS3*, *OsNAAT1*, *OsDMAS1* の各プロモーター領域を、レポーター遺伝子である β -グルクロニダーゼ (*GUS*) 遺伝子に連結したコンストラクトを作製し、イネに導入して発現部位を解析した。*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAAT1* は、鉄欠乏の根の全体で発現しており、これら3つの遺伝子は鉄欠乏によりイネの根から分泌されるデオキシムギネ酸生合成を行っていると考えられた。また、3つの遺伝子が維管束の篩部伴細胞で強く発現したことから、イネにおいてニコチアナミンまたはデオキシムギネ酸が鉄の長距離輸送に関与していると考えられた。

2-2 実験方法

分子生物学的実験方法は、「クローニングとシークエンス」(農村文化社),「バイオ実験イラストイテッド」①~④(秀潤社),「モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ編」(秀潤社)等によった。使用した溶液, 培地等の組成はこれらに記載されている通りである。ここでは本研究を行うにあたって重要な点, 改良した点について詳しく記載する。

2-2-1 ノーザン解析

形質転換体イネおよび非形質転換体イネの根と葉からのトータル RNA の抽出は, SDS-フェノール法で行った。トータル RNA (10 μ g) を 0.66 M ホルムアルデヒドを含む 1.2% (w/v) 変性アガロースゲルで泳動し, Hybond-N+メンブレンに 2 \times SSPE でトランスファーした。

以下の特異的プライマーの組み合わせで, Higuchi et al. (2001) により単離された各 *OsNAS* 遺伝子を鋳型として PCR を行った。

OsNAS1 forward 5'-GTCTAACAGCCGGACGATCGAAAGG-3'

OsNAS1 reverse 5'-TTTCTCACTGTCATACACAGATGGC-3'

OsNAS2 forward 5'-TGAGTGCGTGCATAGTAATCCTGGC-3'

OsNAS2 reverse 5'-CAGACGGTCACAAACACCTCTTGC-3'

OsNAS3 forward 5'-GACTGCTTCCATCGCTTGCTACCTC-3'

OsNAS3 reverse 5'-CGCAACAGAGACAATGGTTGATTGT-3'

増幅された各断片を電気泳動後, ゲルから切り出して精製し, PCR ラベル法によって [α - 32 P]dATP で標識した。

ハイブリダイゼーションは自動ハイブリダイゼーション機で行った。Church and Gilbert (1984) のハイブリダイゼーション液 (250 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ pH 7.2, 7% (w/v) SDS, 1 mM EDTA pH 8.0) を 20 ml, 精製したプローブを 5 μ l 入れて 65 $^\circ\text{C}$ で一晩ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンの洗浄は, 30 ml の 20 mM

NaH₂PO₄-H₃PO₄ pH 7.2, 1% (w/v) SDS を用いて 65°C, 15 分を 2 回行った。検出には BAS-2000 システムとイメージングプレート (Fuji Film) を用いた。

2-2-2 定量的リアルタイム-PCR

ノーザンブロット解析の際に抽出したトータル RNA を用いた。トータル RNA に含まれるゲノム DNA を完全に消化するために DNaseI (RNase-free) (TaKaRa) で処理した。付属の取扱説明書に従った。逆転写反応には SuperScript II (Invitrogen) を用いた。Smart Cyclor (TaKaRa) を用いて定量的リアルタイム (RT)-PCR を行った。Smart Cyclor の付属説明書に従った。既知濃度のプラスミドを用いて同条件で反応させて検量線を作製し、トータル RNA 1μg あたりの *OsNAS* 転写産物量を算出した。

2-2-3 ウェスタンブロット解析

タンパク質抽出から二次抗体による検出までの一連の実験方法は Higuchi et al. (1999b) の方法に従った。鉄欠乏条件で育てたイネの根からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動 (2D-PAGE) を行った後、PVDF 膜 (Millipore) に転写した。NAS を検出する一次抗体として、鉄欠乏オオムギ根から精製した NAS タンパク質を抗原とするマウス抗体を用いた (Higuchi et al., 1999b)。二次抗体にはヤギの抗マウス IgG (H+L) 抗体にホースラディッシュのペルオキシダーゼを融合させたタンパク質 (Bio-Rad) を用いた。最後に diaminobenzidine によってスポットを検出した。

2-2-4 マルトース結合タンパク質融合タンパク質の大量発現

pMAL ベクター (New England Biolabs) はマルトース結合タンパク質 (MBP) をコードする *malE* 遺伝子を含み、強力な Ptac プロモーターの下、大腸菌で大量に MBP を発現させる。*malE* 遺伝子の下流に目的のタンパク質をコードする遺伝子を融合させ、そのコンストラクトを用いて大腸菌を形質転換することで、「MBP-目的のタンパク質」の融合タンパク質を大腸菌に大量発現させることができる。大量発現された融合タンパク質は MBP のアフィニティーカラムであるアミロース

レジカラムを用いて精製することができる。純度の高い MBP との融合タンパク質を調製し, *in vitro* での各種酵素の活性測定を行った。

以下のプライマーを用いて, イネの鉄欠乏根から作製した cDNA を鋳型とし各遺伝子の全長を増幅した。

OsNAS2 forward	5'-gagagagaattcATGGAGGCTCAGAACCAAGA-3'
OsNAS2 reverse	5'-gagagaggatccTCAGACGGATAGCCTCTTGG-3'
OsNAS3 forward	5'-gagagagaattcATGACGGTGGAAGTGGAGGC-3'
OsNAS3 reverse	5'-gagagaggatccCTACGAGGAGGGCAGCTTCT-3'
OsNAAT1 forward	5'-gagagaagatctATGGCACCGACGACGGCGGCGGCGG-3'
OsNAAT1 reverse	5'-gagagatctagaCTAGATATAATTTAAAGGGTTTTTC-3'
OsDMAS1 forward	5'-gagagatctagaATGAGCGACGGCGGCGCAGGCGCCA-3'
OsDMAS1 reverse	5'-gagagaaagcttTCATATCTCGCCGTCCCAGAGGTCG-3'

増幅された各 PCR 断片を, pBluescript II (SK-) に組み入れた。組み入れた配列を, Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit (Amersham LIFE SCIENCE) を用いて, DSQ-2000L DNA Sequencer (島津製作所) によって確認した後, 断片を pMAL-c2 (New England Biolabs) ベクターに導入し, 目的のコンストラクトを得た。

2-2-5 NAS 活性の測定

in vitro での NAS 活性測定は Higuchi et al. (1994) と Suzuki et al. (1999) の方法に従った。1 μ g の精製した融合タンパク質を 50 μ l の反応バッファー (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 mM dithiothreitol, 10 μ M (p-amidinophenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ M trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butane, pH 8.7) に混合し, [¹⁴C] S-アデノシルメチオニン (SAM) を終濃度 20 μ M になるように加えた。25°C で 20 分間反応させ, 5 M HCl を終濃度 0.2 M になるように加えて反応を停止した。反応液を TLC LK6 プレート (Whatmann) にスポットし, フェノール:n-ブタノール:ギ酸:水 (12:2:2:3 v/v) の展開溶液で展開した。融合タンパク質によって合成された [¹⁴C]

ニコチアミンの検出には BAS-2000 システムとイメージングプレート (Fuji Film) を用いた。

2-2-6 NAAT 活性の測定

酵素活性の測定は Ohata et al. (1993) と Kanazawa et al. (1994) の方法に従って行った。まず、限外濾過 (Ultrafree MC, Millipore) によって、酵素液を濃縮した。その後、反応液をウルトラフリーの濾過カップ内に加えて反応を開始した。反応液の組成は、50 mM TAPS/KOH (pH 9.0), 5mM MgCl₂, 150 μM ニコチアミン, 10 mM 2-オキソグルタル酸, 10 μM ピリドキサルリン酸 (pyridoxyl 5-phosphate; PLP) とした。タンパク質の量は、反応液 50 μl に対して 5 μg を用いた。反応条件は、25°C, 30 分間で行った。反応の停止は、4°C に冷却すると同時に限外濾過によって、酵素を反応液から除去する事によって行った。限外濾過によって得られた濾液に 4 μl の 0.25 M NaBH₄ を添加し、1 分間室温で還元を行って、濾液中の酵素反応生成物 (ケト体) をデオキシムギネ酸へ変換した。これに、46 μl のムギネ酸類分析 HPLC の第一溶離液を添加して還元反応を停止し、HPLC で分析、定量を行った。

2-2-7 DMAS 活性の測定

模式図を図 2.1 に示す。OsNAAT1 によって生成されたケト体を基質として用い DMAS 活性を測定した。まず、限外濾過によって OsDMAS1 を濃縮した。これに、50 μl のケト体を含む反応生成溶液に、10 μl の NADPH を加えて終濃度を、3.8, 5.0, または 25 μM とした。反応条件は、26°C, 30 分間で行った。反応の停止は、4°C に冷却すると同時に、限外濾過によって酵素を反応液から除去する事によって行った。これに、40 μl のムギネ酸類分析 HPLC の第一溶離液を添加して還元反応を停止し、HPLC で分析、定量を行った。

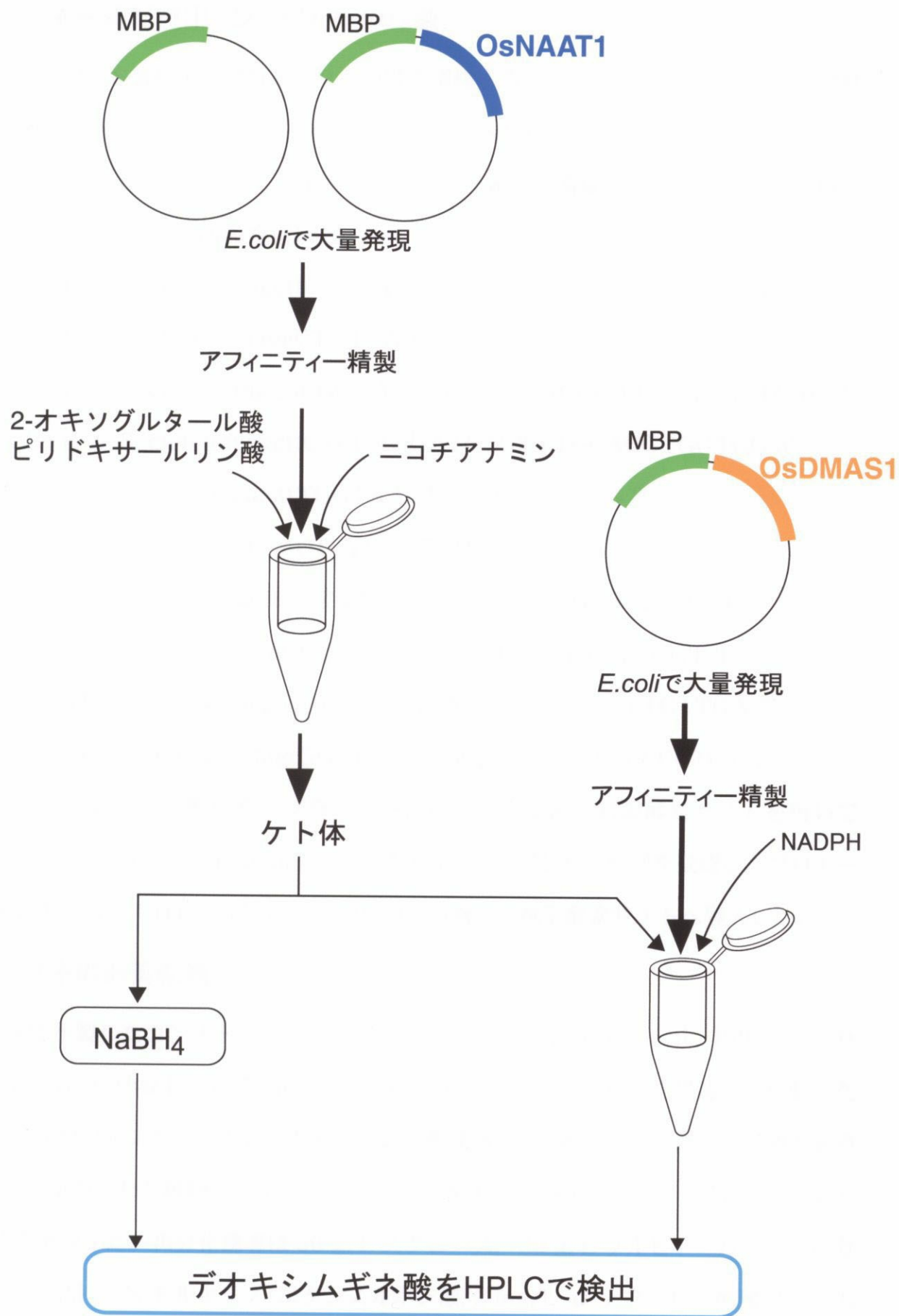


図2.1 OsNAAT1, OsDMAS1酵素活性の測定方法

2-2-8 イネ形質転換用コンストラクトの作製

3つの *OsNAS* 遺伝子のプロモーター領域を増幅するために、以下のプライマーを設計した。翻訳開始点を起点として、*OsNAS1*, *2*, *3*, *OsNAAT1*, *OsDMAS1* について、それぞれ上流 1.6, 1.8, 1.0, 1.7, 1.3 kb のプロモーター領域を増幅した。PCR の鋳型には、抽出したイネのゲノム DNA を用いた。

OsNAS1p F 5'-ctctctctaagcttCTCGAGGATCTGTTTGCACGTGGTGG-3'
OsNAS1p R 5'-ctctctctctagaCTGTGAAGCTATGTCGCGGTTGGGAAC-3'
OsNAS2p F 5'-ctctcttctagaGCGGTAGTAGTAAAACCGATTCAGATTCAG-3'
OsNAS2p R 5'-ctctctctaagcttCTCGAGGATCTGTTTGCACGTGGTGG-3'
OsNAS3p F 5'- tgtgtgaagcttTGGTAACTACAGCGTAGG-3'
OsNAS3p R 5'- tgtgtgtctagaCTCTCTCTCTCGATCGATT-3'
OsNAAT1p F 5'-ctctctaagcttCTTAATGGCACAGAGGGAAAAACCT-3'
OsNAAT1p R 5'-ctctcttctagaGGCCGTGCTCTGTTTTTTTGTGGT-3'
OsDMAS1p F 5'-gagagactcgagACCCCTAGACATTTTACGTTGTTGA-3'
OsDMAS1p R 5'-gagagaactagtGGCTGGAGGCAGAGTGTTCCCCTCT-3'

増幅された各 PCR 断片を、プライマーに組み込んである制限酵素サイトを用いて pBluescriptII SK+ (Stratagene) にサブクローニングした。配列を確認したプロモーター配列を、pIG121Hm (Hiei et al., 1994) の適切な制限酵素サイトへ導入した。

2-2-9 イネの形質転換

2-2-8 で作製したコンストラクトをアグロバクテリウム法 (Hiei et al., 1994) によりイネ (*Oryza sativa* L. cv. Tsukinohikari) に導入した。完熟種子を播種して作製した4週目の胚盤カルスを、アグロバクテリウムの懸濁液に30秒間浸漬した。3日間の感染の後、形質転換された細胞をハイグロマイシン B を用いて、30 mg/L で2週間、50 mg/L で2週間選抜した。再分化誘導は30 g/L スクロース、30 g/L ソルビトール、2 g/L カゼイン、5 mM 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、2 mg/L α -ナフタレン酢酸、1 mg/L カイネチン、250 mg/L クラフォラン、50 mg/L ハイグロマイシン B を含む MS 培地

で2週間行った。その後の再分化は30 g/L スクロース, 250 mg/L クラフォラン, 50 mg/L ハイグロマイシン B を含む MS 培地で 28°C, 16 時間明期, 8 時間暗期で行った。再分化植物を土壌を用いて温室で栽培し, T₁ 種子を得た。

2-2-10 イネの栽培

形質転換体イネおよび非形質転換体イネの栽培は, 30°C, 14 時間明期, 10 時間暗期の条件に制御された天然光気象室で行った。T₁ 種子は, 2% の次亜塩素酸で殺菌した後, 50 mg/L のハイグロマイシン B を 50 mg/L 含む MS 培地上で発芽させた。播種4週間後に, 水耕栽培を開始した。水耕液の組成は以下の通りである。2 mM Ca (NO₃)₂ · 4H₂O, 500 μM MgSO₄ · 7H₂O, 100 μM Fe(III)-EDTA, 700 μM K₂SO₄, 100 μM KCl, 100 μM KH₂PO₄, 10 μM H₃BO₃, 0.5 μM MnSO₄ · 5H₂O, 0.5 μM ZnSO₄ · 7H₂O, 0.2 μM CuSO₄ · 5H₂O, 0.01 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O。水耕液は毎週取り替え, pH は毎日 1M HCl で 5.3 に調整した。鉄欠乏処理は, 第5葉が展開したときに Fe(III)-EDTA を水耕液から完全に取り除くことにより行った。鉄欠乏処理 14 日後に, 各種実験のサンプリングを行った。

2-2-11 形質転換イネの GUS 活性の組織化学的観察

2-2-10 の方法で栽培した T₁ 形質転換イネをサンプリングし, 観察を行う部位をカミソリで 0.5 ~ 1.0 cm に切り分けた。切断した組織塊は乾燥と GUS の失活を防ぐため, 氷冷した滅菌水に入れた。

オートクレーブで融解した 4% の寒天をペトリ皿に流しこみ, 楊枝で攪拌しながら温度を下げていき, 表面に寒天の薄膜ができはじめた頃 (40°C 以下) に用意した組織塊を包埋した。組織塊を埋め込む際, 後の切片化が簡便となるように, 組織塊が水平になるようにした。室温で 10 分間, 4°C で 10 分間冷却した。

切片の作製法は, 村上ら (1992) の方法に従った。切片の作製には DTK-1000 microslicer (Dosaka EM Co. Ltd., Kyoto, Japan) を使用した。包埋試料をペトリ皿から寒天ごと大きく切

り出して、寒天の底面と試料を切る面と平行になるようトリミングした。包埋した試料の周りの余分な寒天を、試料が露出しないよう切り落とした。DTK-1000 microslicer に固定させた試料トレイの中央にアロンアルファで寒天試料塊を接着した。切片の厚さは、縦断切片の場合は 80 μm , 横断切片の場合は地上部で 100 μm , 根で 130 μm とした。刃の振動数は 6~7, 刃の前進速度は 4~6 で行った。得られた切片を氷冷した滅菌水中に保存した。

GUS の酵素反応液は Jefferson et al.(1987)の方法に準拠し, Kosugi et al.(1991)の改良法で行った。上記で得られた切片を 1000 rpm で遠心して落とし, 滅菌水を除去した。これに GUS 染色液を 500 μL 加え, 氷冷しながら 30 分間減圧脱気した。GUS 染色液の組成は以下の通りである。1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-gluc), 3 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0.5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0), 20% methanol. 37°C で 20 分間から一晩 GUS 反応を行わせた。反応液に 70% エタノール 700 μL を加え, 反応を停止した。クロロフィル等の色素を除去するために, 70% エタノールに浸漬し, ゆっくりと振盪した。

70% エタノールに保存した試料から, 少量のエタノールを抜きとり, そこに蒸留水を加えた。これを繰り返し, ゆっくりと液を蒸留水に置換した。その後, ピンセットの先で切片を丁寧に広げてスライドグラスに載せた。その上に 70%のグリセロールを 2~3 滴たらして, カバーグラスを静かにかぶせた。余分なグリセロールは, キムワイプをカバーグラスの縁に密着させて取り除いた。観察には Axiophoto microscope (Carl Zeiss, Tokyo, Japan)を用い, 取扱いは付属のマニュアルに従った。

2-3 実験結果

2-3-1 3つの *OsNAS* 遺伝子の発現様式

イネを鉄欠乏処理したときの *OsNAS* 遺伝子の発現変化を、それぞれの *OsNAS* 遺伝子を特異的に検出するプローブを用いたノーザン解析によって明らかにした(図 2.2)。鉄十分条件の根、地上部および、鉄欠乏条件の根、クロロシスを呈した最新葉と、ならびにその時点での最大展開葉を用いた。*OsNAS1* 遺伝子の発現は鉄十分条件の根で弱く観察され、鉄欠乏により、根、地上部ともに強く誘導された。この発現様式は、*OsNAS1* 遺伝子の ORF 全体をプローブにして行ったノーザン解析と同じ結果であった(Higuchi et al., 2001)。*OsNAS2* 遺伝子の発現様式は、*OsNAS1* 遺伝子と非常に類似していた。一方、*OsNAS3* 遺伝子の発現様式は *OsNAS1*, 2両遺伝子とは大きく異なっていた。*OsNAS3* 遺伝子は鉄十分条件の根で弱く発現しており、鉄欠乏によって若干誘導された。さらに、*OsNAS3* 遺伝子は鉄十分条件の葉で発現しており、鉄欠乏によって発現が抑制された。すなわち、*OsNAS3* 遺伝子は鉄欠乏によって根と、地上部で異なる遺伝子発現応答を示した。

ノーザン解析の結果を確認するために、*OsNAS* の発現量を定量的 RT-PCR を用いて検出した(表 2.1)。*OsNAS1*, 2 遺伝子の発現は根で鉄欠乏により、140~250 倍誘導されていた。さらに、*OsNAS1*, 2 は鉄欠乏葉で、クロロシスを呈した葉の方が、最大展開葉よりもそれぞれ 30 倍、16 倍の遺伝子発現が観察された。一方、*OsNAS3* 遺伝子の発現は、鉄欠乏根で鉄十分根に対して 5 倍の誘導が観察された。また、*OsNAS3* 遺伝子の発現は鉄欠乏の葉では観察されなかった。これらの結果は、ノーザン解析の結果と良く一致していた。

2-3-2 *OsNAS* タンパク質の *in vitro* での活性検出

OsNAS 遺伝子が NAS 活性のあるタンパク質をコードしているかどうかを確かめるため、*in vitro* で *OsNAS* の NAS 活性を測定した。*OsNAS1* が NAS 活性を持つことはすでに Higuchi et al. (2001) によって報告されている。*OsNAS2* および *OsNAS3* タンパク質をそれぞれマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として大腸菌で大量合成した。これらの融合タンパク質はともに NAS 活性を示した(図 2.3)。一方、

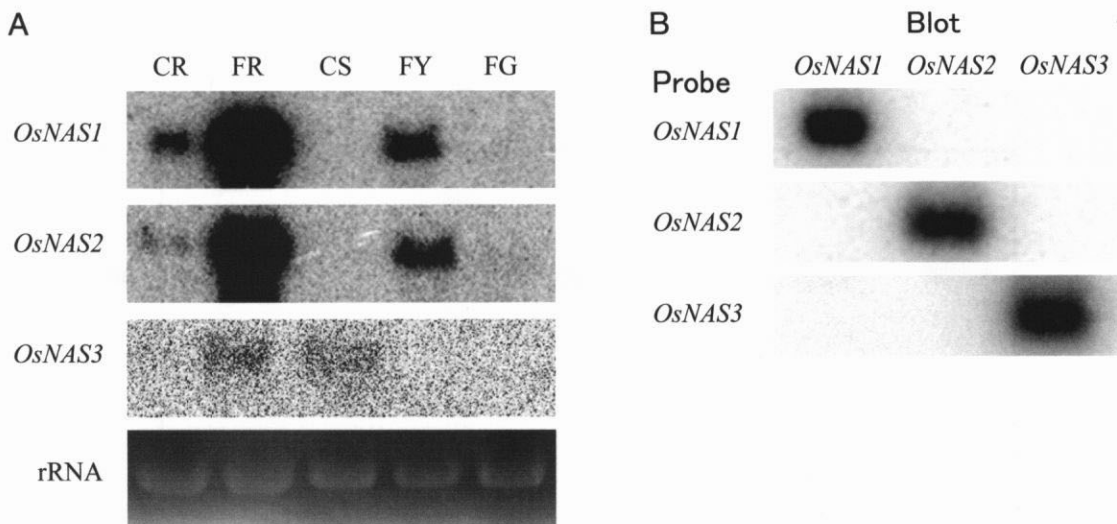


図2.2 *OsNAS* 遺伝子の鉄十分条件および鉄欠乏条件における発現様式

(A) *OsNAS* 遺伝子のノーザン解析。CR：鉄十分根、FR：鉄欠乏根、CS：鉄十分葉、FY：鉄欠乏の最新葉、FG：鉄欠乏の最大展開葉。

(B) 用いたプローブが各 *OsNAS* 遺伝子を持異的に認識するかどうかを、各遺伝子をプロットしたメンブレンでのプラスミドサザン解析により確認した。

表2.1 *OsNAS* 遺伝子の定量的 RT-PCR

Plant parts and condition	Number of copies ($\times 10^6$ copies/ μg RNA)					
	<i>OsNAS1</i>		<i>OsNAS2</i>		<i>OsNAS3</i>	
CR	8.3	\pm 1.1	5.2	\pm 7.3	0.60	\pm 0.21
FR	1100	\pm 330	1300	\pm 42	3.1	\pm 1.4
CS	nd		nd		1.2	\pm 0.45
FY	10	\pm 2.4	23	\pm 2.4	nd	
FG	0.33	\pm 0.24	1.5	\pm 0.50	nd	

各 *OsNAS* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて定量的にリアルタイムPCRを行った。逆転写にはノーザン解析と同じRNAを用いた。トータル RNA 1 μg 当たりの *OsNAS* のコピー数を示す。(mean \pm SD; n=3)。CR：鉄十分根、FR：鉄欠乏根、CS：鉄十分葉、FY：鉄欠乏の最新葉、FG：鉄欠乏の最大展開葉、nd：検出されず。

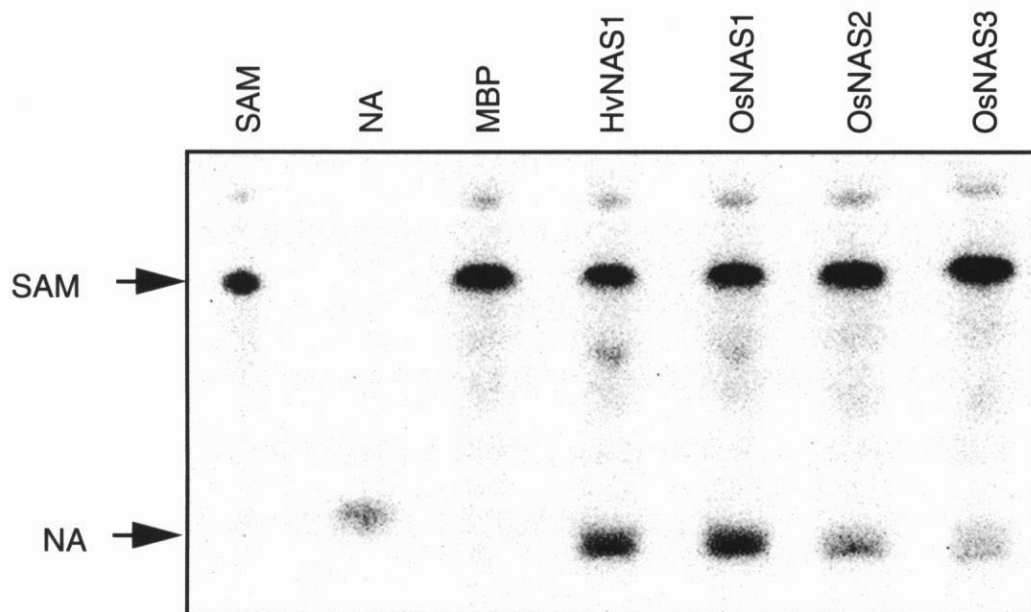


図2.3 OsNAS タンパク質の NAS 活性

NASタンパク質をマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として発現させ、 $[^{14}\text{C}]$ S-アデノシルメチオニン (SAM) を基質とした酵素反応液を薄層クロマトグラフィーで展開した。NA、SAM のレーンには $[^{14}\text{C}]$ でラベルした標準ニコチアミン、標準 SAM をそれぞれスポットした。HvNAS1のレーンには、すでに酵素活性を持つことが報告されているオオムギのHvNAS1タンパク質による酵素反応液をスポットした。

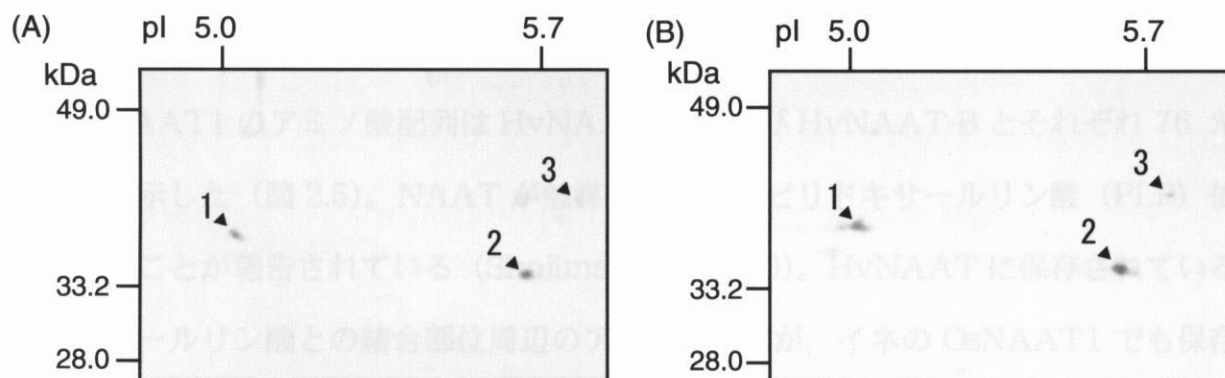


図2.4 イネの根に存在する NAS タンパク質の検出

(A) 鉄十分条件の根、(B) 鉄欠乏条件の根。図中の数字は OsNAS タンパク質を示す。1: OsNAS1、2: OsNAS2、3: OsNAS3。

MBP のみでは活性は検出されなかった。

2-3-3 イネの根のウエスタン解析による NAS タンパク質の検出

抗 NAS タンパク質抗体を用いて 2D-PAGE でのウエスタンブロット解析を行った (図 2.4)。Higuchi et al. (2001) の報告通り, OsNAS1 および OsNAS2 タンパク質は鉄欠乏により誘導されていた。さらに分子量と pI の値から判断して, OsNAS3 のスポットを同定した。ノーザン解析の結果と同様に, OsNAS3 タンパク質の発現は, 鉄十分条件で微弱に検出され, 鉄欠乏によって若干誘導された。

2-3-4 *OsNAAT1* の単離と発現様式の解析

イネのゲノム上に 5 つの *OsNAAT* 様遺伝子を見いだした。これら 5 つの *OsNAAT* について特異的なプローブを作製し, イネでの発現をノーザン解析で検出した。5 つの *OsNAAT* のうちの 1 つは, 鉄欠乏の根で強く誘導された (図 2.8)。これを *OsNAAT1* と命名した。また, 3 つの *OsNAAT* 様遺伝子の発現は鉄栄養に影響されず, 地上部, 根において恒常的に発現していた (データは示さない)。残りの 1 つは発現が全く観察されなかったことから, 他の生育条件あるいは, 生殖成長期に発現すると考えられた (データは示さない)。*OsNAAT1* は全長 1332 bp であり, 推定 ORF は 444 アミノ酸残基であった。*OsNAAT1* のアミノ酸配列は HvNAAT-A および HvNAAT-B とそれぞれ 76 % の相同性を示した (図 2.5)。NAAT が触媒する反応はピリドキサルリン酸 (PLP) 依存的事であることが報告されている (Shojima et al., 1990)。HvNAAT に保存されているピリドキサルリン酸との結合部位周辺のアミノ酸残基が, イネの *OsNAAT1* でも保存されていた。しかし, HvNAAT-A に 3 つ, HvNAAT-B に 6 つ保存された機能未知のペプチド配列 "SNGH" (Takahashi et al., 1999) は, *OsNAAT1* では保存されていなかった。

	10	20	30	40	50	60	70
OsNAAT1	-----	---MAPTTAA	AAASSNGG	--GESDGSSK	-----	-----	-----
HvNAAT-A	--MVHQSNQ	--HGEAAAAA	ANGKSNGH	AAAANGKSN	-----	-----	-----
HvNAAT-B	MATVRQSDGV	AANGLAVAAA	ANGKSNGHGV	AAAVNGKSNQ	HGVDADANGK	SNGHGVAADA	NGKSNGHAEA
	80	90	100	110	120	130	140
OsNAAT1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	EWRLTAPTRG
HvNAAT-A	-----	-----	-----	-----	-----GHA	AAAA-----V	EWNFAR-GKD
HvNAAT-B	TANGHGATA	NGKTNGHRES	NGHAEAADAN	GESNEHAEDS	AANGESNGHA	AAAAEEEEAV	EWNFAG-AKD
	150	160	170	180	190	200	210
OsNAAT1	GAMAAAGDKM	SIRAVRYKIS	ASVDDRGRPR	VLPLAHGDPS	VFPEFRTAAE	AEDAVADALR	SGDFNCYPAG
HvNAAT-A	GILATTGAKN	SIRAIRYKIS	ASVEESGPRP	VLPLAHGDPS	VFPAFRTAVE	AEDAVAAALR	TGQFNCYAAG
HvNAAT-B	GVLAATGANM	SIRAIRYKIS	ASVQEKGRPR	VLPLAHGDPS	VFPAFRTAVE	AEDAVAAAVR	TGQFNCYPAG
	220	230	240	250	260	270	280
OsNAAT1	VGLPAARRAV	ADHLSRDLPY	KLSSDDIFLT	AGGTQAIIEV	ISILAQP-GT	NILLPRPGYP	NYEARAAFNN
HvNAAT-A	VGLPAARSAV	AEHLSQGVPI	KLSADDVFLT	AGGTQAIIEVI	IPVLAQTAGA	NILLPRPGYP	NYEARAAFNK
HvNAAT-B	VGLPAARSAV	AEHLSQGVPI	MLSADDVFLT	AGGTQAIIEVI	IPVLAQTAGA	NILLPRPGYP	NYEARAAFNR
	290	300	310	320	330	340	350
OsNAAT1	LEVRHFDLIP	EKGWEIDLNS	LESIADKNTT	AIVIINPNNP	CGNVYTYEHL	SKVAEVARKL	GILVITDEVY
HvNAAT-A	LEVRHFDLIP	DKGWEIDIDS	LESIADKNTT	AMVIINPNNP	CGSVYSYDHL	AKVAEVARKL	GILVIADEVY
HvNAAT-B	LEVRHFDLIP	DKGWEIDIDS	LESIADKNTT	AMVIINPNNP	CGSVYSYDHL	SKVAEVAKRL	GILVIADEVY
	360	370	380	390	400	410	420
OsNAAT1	GNLVFGSSPF	VPMGCFGHIV	PILTIGSLSK	RWIVPGWRLG	WVAICDPKKT	LQETKIATLI	TNFLNVSTDP
HvNAAT-A	GKLVLGSAPF	IPMGVFGHIA	PVLSIGSLSK	SWIVPGWRLG	WVAVYDPTKI	LEKTKISTSI	TNYLNVSTDP
HvNAAT-B	GKLVLGSAPF	IPMGVFGHIT	PVLSIGSLSK	SWIVPGWRLG	WVAVYDPRKI	LQETKISTSI	TNYLNVSTDP
	430	440	450	460	470	480	490
OsNAAT1	ATFIQALPN	ILKNTKEEFF	KRIIDLLET	SDICYRGIKD	IKCITCPHKP	EGSMFVMVKL	NLYLLEGIHD
HvNAAT-A	ATFVQEALPK	ILENTKADFF	KRIIGLLKES	SEICYREIKE	NKYITCPHKP	EGSMFVMVKL	NLHLLLEEIHD
HvNAAT-B	ATFIQAALPQ	ILENTKEDFF	KATIGLLKES	SEICYKQIKE	NKYITCPHKP	EGSMFVMVKL	NLHLLLEEIDD
	500	510	520	530	540	550	560
OsNAAT1	DVDFCCQLAK	EESVILCPGS	VLGMKNWVRI	TFAIDSSLL	DGLERIKSFC	QRHKKKNPLN	YI.....
HvNAAT-A	DIDFCCKLAK	EESVILCPGS	VLGMENWVRI	TFACVPSSLQ	DGLERVKSFC	QRNKKKNSIN	GC.....
HvNAAT-B	DIDFCCKLAK	EESVILCPGS	VLGMANWVRI	TFACVPSSLQ	DGLGRIKSFC	QRNKKRNSSD	DC.....

図2.5 OsNAAT1 とオオムギの HvNAAT-A、HvNAAT-Bとのアミノ酸配列の比較

水色枠は推測されるピリドキサルリン酸 (PLP) 結合部位(リジン*) 周辺のコンセンサス配列を示す。

2-3-5 OsNAAT タンパク質の *in vitro* での活性検出

OsNAAT1 遺伝子が NAAT 活性のあるタンパク質をコードしているかどうかを確認するため、*in vitro*での NAAT 活性の測定を行った。*OsNAAT1* と MBP との融合タンパク質は、NAAT 活性を示した (図 2.6)。一方、MBP のみでは、NAAT 活性は検出されなかった。

2-3-6 *OsDMAS1* の単離と活性検出

デオキシムギネ酸生合成の最終ステップの反応は、ニコチアミンのアミノ基が NAAT により転移され生成したケト体を還元することである。これに類似する反応として、ケシの aldo-keto reductase の一つが、morphinone のケトン基を morphine の水酸基へと還元する反応を触媒する (Unterlinner et al., 1999)。Shojima et al. (1990) は、デオキシムギネ酸への還元反応は NADPH を介して行われていると報告している。従って、NADPH 依存的な aldo-keto reductase superfamily に属する還元酵素によって、この反応が行われると予想された。この反応を触媒する遺伝子を同定するために、農業生物資源研究所の DNA バンク長 長村吉晃博士のご協力により、鉄欠乏および鉄十分条件のイネを用いた 22K マイクロアレイ解析を行った (データは示さない)。鉄欠乏の根で強く誘導される数多くの遺伝子の中から、aldo-keto reductase に属する還元酵素をコードすると推定される遺伝子を見いだした。

この遺伝子が、デオキシムギネ酸合成 (DMAS) 活性のあるタンパク質をコードしているかどうかを確認するため、*in vitro*で DMAS 活性を測定した。MBP との融合タンパク質は、DMAS 活性を示した (図 2.7)。また、反応液中の NADPH の濃度を 25 μM から 5 μM , 3.8 μM へと低下させることにより DMAS 活性が低下したことから、この還元酵素の活性は NADPH 依存的であることが明らかになった。一方、MBP のみでは、DMAS 活性は検出されなかった (データは示さない)。以上により、この還元酵素遺伝子はコードするタンパク質が DMAS 活性を有し、鉄欠乏の根で強く誘導されることから、これを *OsDMAS1* と命名した。

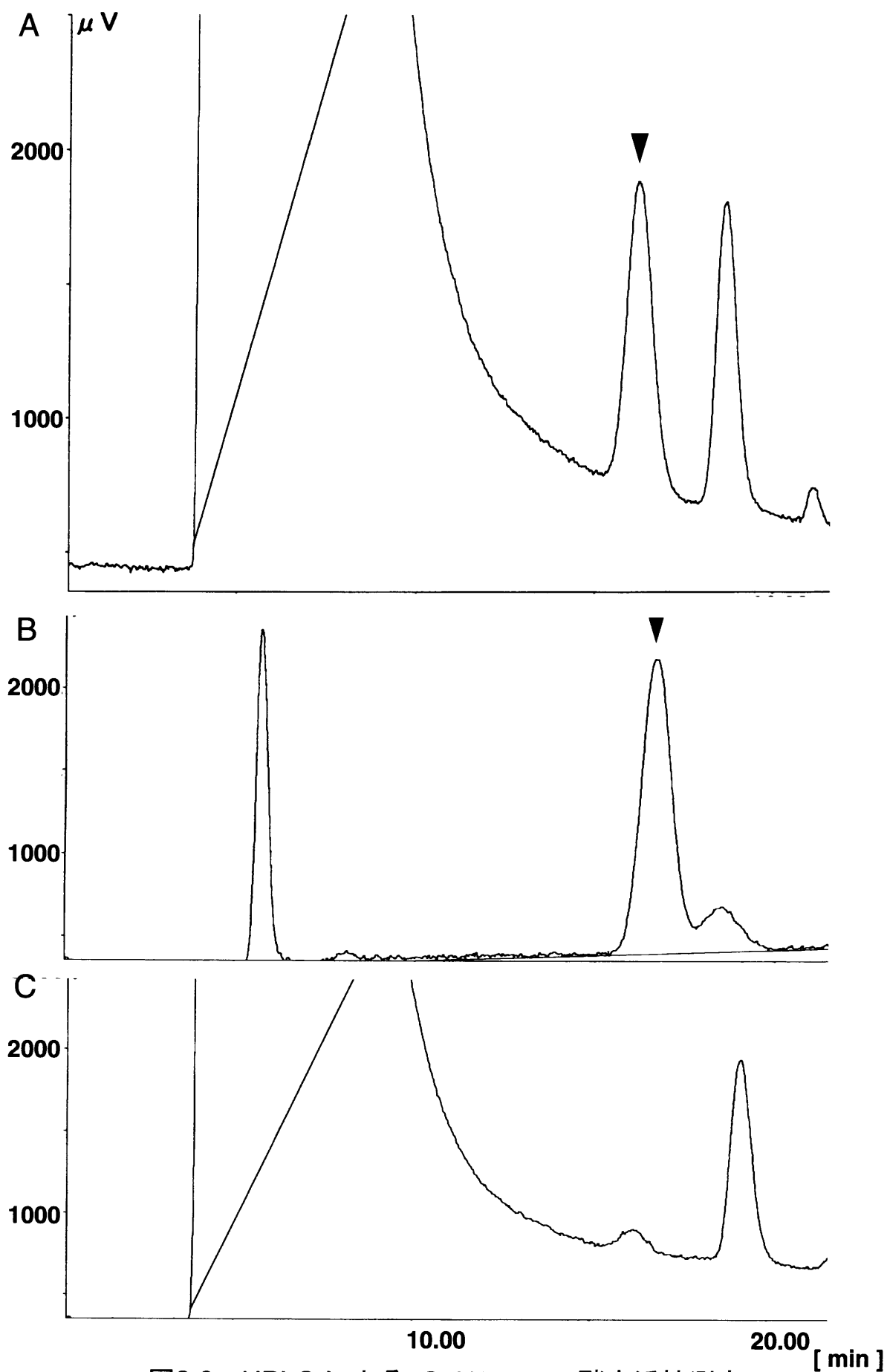


図2.6 HPLCによる OsNAAT1の酵素活性測定

(A) OsNAAT1, (B) DMA Standard, (C) MBPのみ。

黒三角はデオキシシムギネ酸のピークを示す。

他のピークは夾雑物である。MBPのチャートで見られるピークはデオキシシムギネ酸とは溶出時間が異なっている。

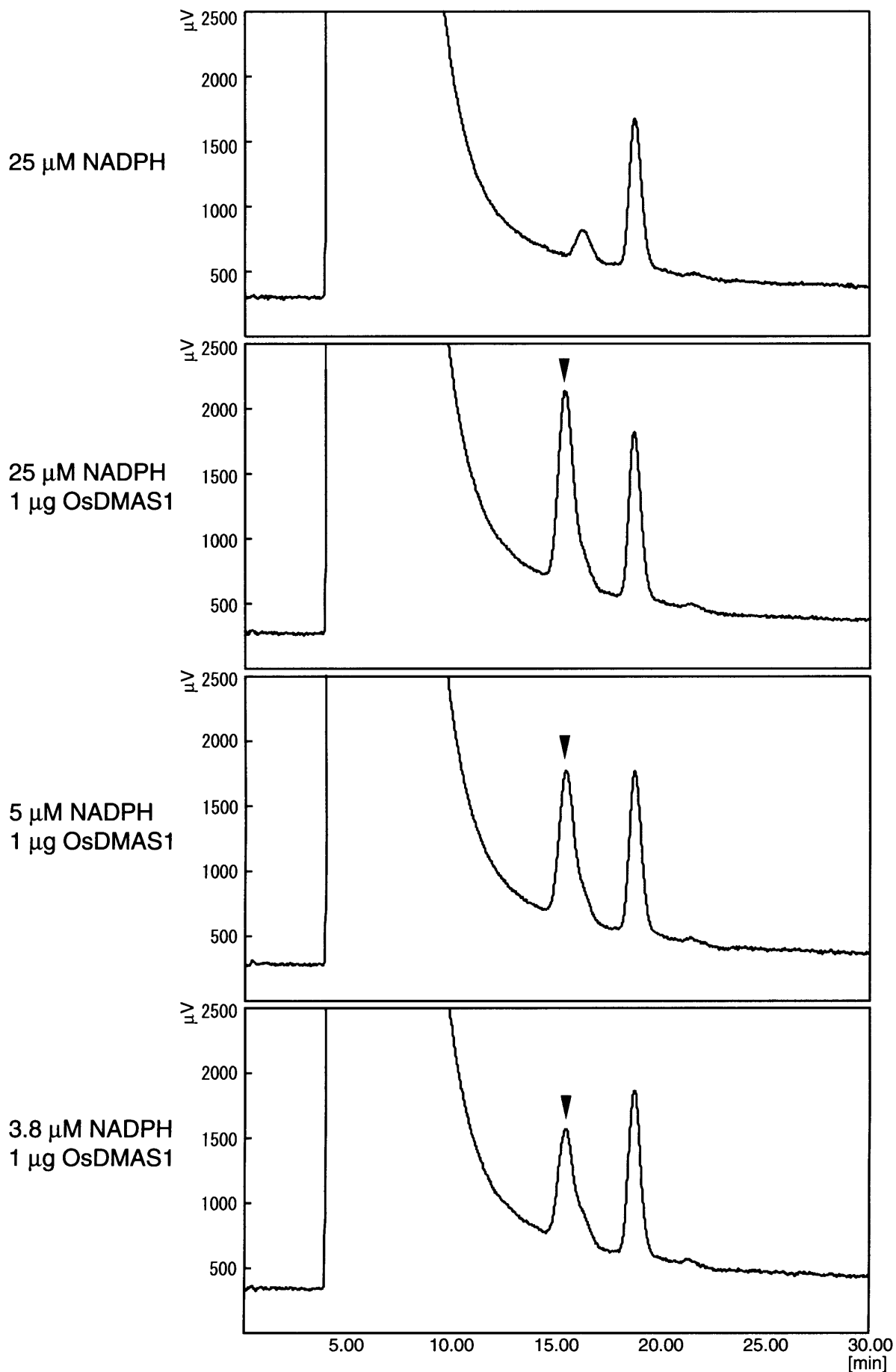


図2.7 HPLC による OsDMAS1 の酵素活性の測定

還元酵素活性を図2.1の方法に従って HPLC により測定した。黒三角はデオキシムギネ酸のピークを示す。他のピークは夾雑物である。25 μM NADPHに見られるピークはデオキシムギネ酸とは溶出時間が異なる。

*OsDMAS1*は全長1285 bpであり、推定ORFは318アミノ酸残基であった。*OsDMAS1*は aldo-keto reductase に見られる特徴的な3つの配列を有していた（データは示さない）。aldo-keto reductase についてはX線を用いた結晶構造解析の研究も多くなされており、NADPHとの結合部位を探索する研究が報告されている。動物の aldo-keto reductase に高度に保存された Lys-11 は、NADPHの結合サイトであるとされ (Schade et al., 1990), *OsDMAS1*にも Lys-9に保存されていた。ヒトの aldo-keto reductase の変異導入や化学的修飾による研究から、Lys-262を含む4つのアミノ酸残基 (IPKS) は PLP と NADPH の結合サイトであるとされている (Morjana et al., 1989; Bohren et al., 1991)。この4つのアミノ酸残基のうち、*OsDMAS1*は Lysを含めた3つのアミノ酸残基 (IVKS) を持っていた。

2-3-7 *OsNAAT1*と *OsDMAS1*の発現様式の解析

イネを鉄欠乏処理したときの、*OsNAAT1*と *OsDMAS1*の発現変化を、ノーザン解析によって明らかにした (図 2.8)。鉄十分条件の根、地上部および鉄欠乏条件の根、クロロシスを呈した最新葉と、その時点での最大展開葉を用いた。*OsNAAT1*は鉄十分条件で、恒常的に発現していた。*OsNAAT1*の発現は、根、地上部とも鉄欠乏により強く誘導された。地上部での発現は、鉄欠乏の最新葉で最大展開葉よりも若干強かった。

*OsDMAS1*は、鉄十分条件で恒常的に発現していた。鉄欠乏により、*OsDMAS1*の発現は根で強く誘導された。*OsDMAS1*の地上部での発現は、鉄欠乏の最新葉と最大展開葉とで顕著な差は見られず、恒常的な発現が観察された。

2-3-8 *OsNAS1*遺伝子の発現の組織局在の観察

*OsNAS*遺伝子の植物体内での生理的役割を明らかにするために、3種の *OsNAS*遺伝子の各プロモーター領域の下流に *GUS*遺伝子を連結したコンストラクトをイネに導入し、鉄十分条件と鉄欠乏条件での各 *OsNAS*遺伝子の発現の組織局在について解析した (プロモーター-GUS 実験)。3つの *OsNAS*はいずれも維管束の長距離輸送に関わる細胞で発

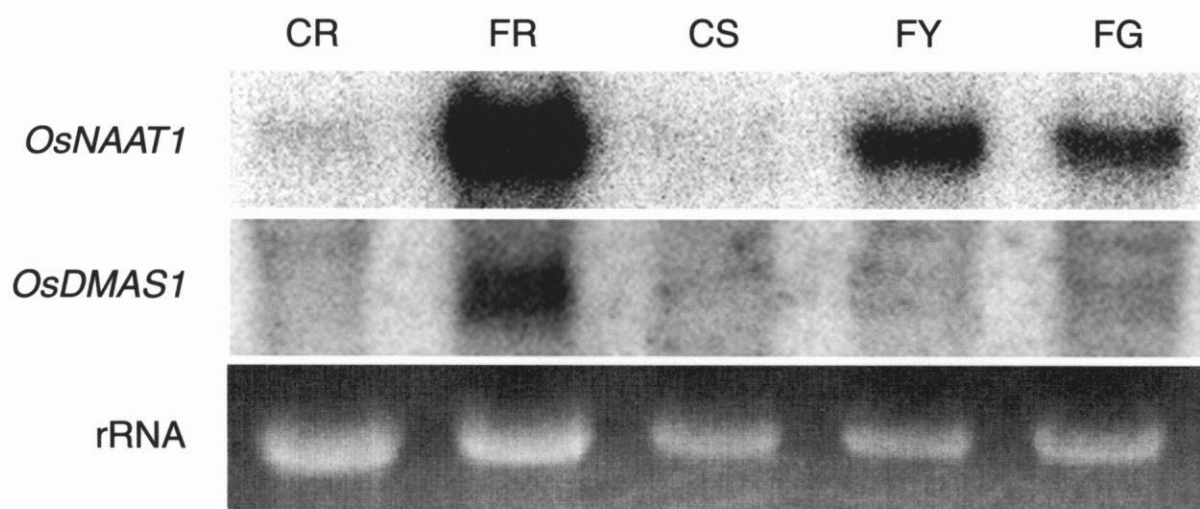


図2.8 *OsNAAT1* と *OsDMAS1* の鉄欠乏による発現の変化

CR: 鉄十分根, FR: 鉄欠乏根, CS: 鉄十分葉,
 FY: 鉄欠乏の最新葉, FG: 鉄欠乏の最大展開葉。

現していた。*OsNAS1* の発現は、鉄十分条件の根において中心柱で見られたが、表皮細胞、外皮細胞、皮層細胞では見られなかった (図 2.9 A)。ただし、時折、表皮細胞と外皮細胞でも発現が検出される場合があった (図 2.9 G)。中心柱の細胞のうち、*OsNAS1* 遺伝子は特に原生導管、後生導管 I に隣接する二つの内鞘細胞と、篩部伴細胞において発現していた (図 2.9 B, C, D)。また、他の内鞘細胞や後生導管 I の周辺の導管柔細胞でも発現が観察された。縦断切片を作製して観察すると、*OsNAS1* 遺伝子の発現は中心柱や外皮細胞の一部で観察された (図 2.9 E) が、分枝根や根毛において発現は観察されなかった (図 2.9 F)。

鉄欠乏条件の根においては、*OsNAS1* 遺伝子の発現は、表皮細胞、外皮細胞、皮層細胞、中心柱の全体を含めた全ての組織で観察された (図 2.10 A)。原生導管と後生導管 I に隣接する内鞘細胞と、伴細胞で特に強い発現が観察された (図 2.10 C, D)。また、分枝根が出根する部位では、鉄十分、鉄欠乏のイネともに、後生導管 I の周りで強い発現が観察された (図 2.9B, 2.10 B)。鉄欠乏根の根冠、分裂域、伸長域を含めた根の全体で発現が観察された (図 2.10E, F, G)。

次に、地上部での *OsNAS1* の発現を同様に観察した。鉄十分条件の葉では、GUS 活性は通常は観察されなかった (図 2.11 A)。鉄欠乏の最新葉では、維管束、葉肉細胞を含む全ての細胞で発現が見られた。特に、導管と篩部で顕著な発現が観察された (図 2.11 B, F)。鉄欠乏条件の最大展開葉では、維管束で強い発現が見られ、維管束を取り囲む葉肉細胞においても発現が見られた (図 2.11 C, E)。また、篩部伴細胞においても強い発現が観察された (図 2.11 G)。*OsNAS1* 遺伝子は鉄欠乏の葉鞘の維管束でも発現が見られた (図 2.12 A)。葉鞘は外側の古い組織から、新しい組織へと層を形成している。これらの層の、外側から二層までは発現が観察されなかった。第三層と第四層の基本柔組織で発現が観察され、特に維官束で強い発現が観察された。鉄十分条件での葉鞘での発現はみられなかった (データは示さない)。また、時折、機動細胞での発現が観察された (図 2.11 H)。

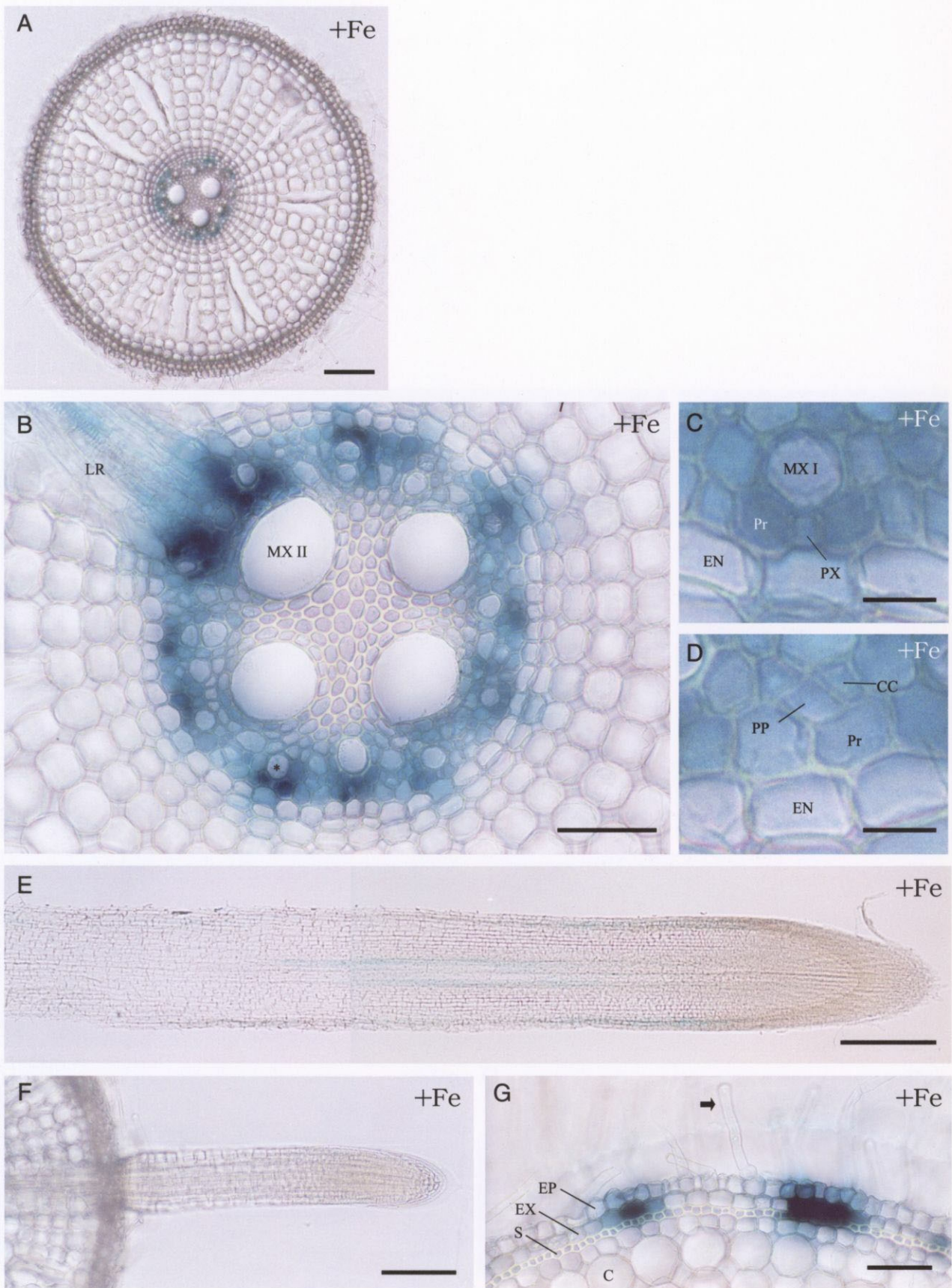


図2.9 鉄十分条件の根における *OsNAS1* の発現様式

*、MXI: 後生導管I、MXII: 後生導管II、CC: 伴細胞、EN: 内皮細胞、LR: 分枝根、Pr: 内鞘細胞、PX: 原生導管、PP: 原生篩管、EP: 表皮細胞、EX: 外皮細胞、S: ズベリン層。

スケールバー: 500 μm (E)、100 μm (A-E)、50 μm (B, G)、10 μm (C, D)

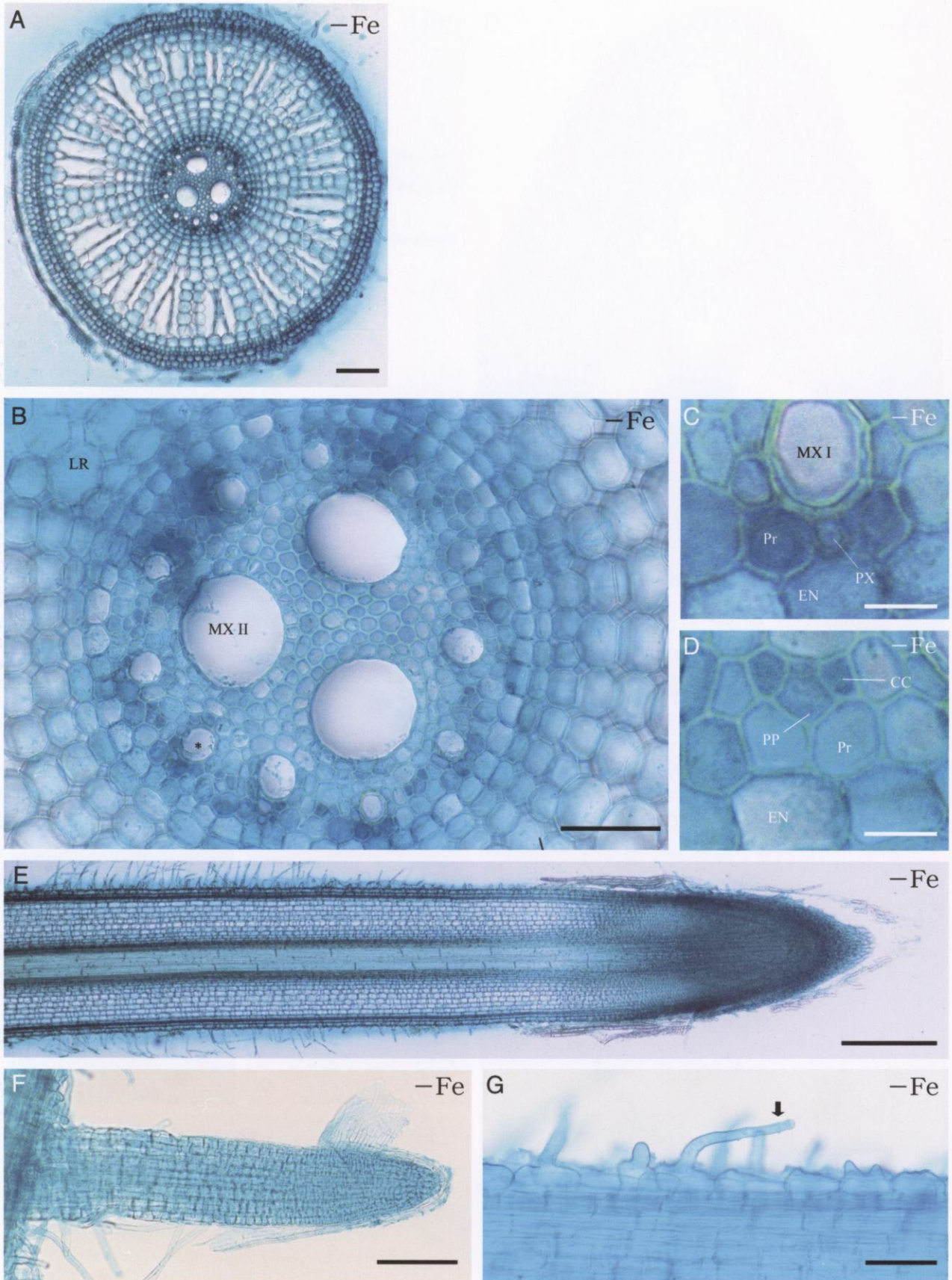


図2.10 鉄欠乏条件の根における *OsNAS1* の発現様式

*、MXI: 後生導管I、MXII: 後生導管II、CC: 伴細胞、EN: 内皮細胞、LR: 分枝根、Pr: 内鞘細胞、PP: 原生篩管、PX: 原生導管。矢印は根毛細胞を示している。

スケールバー：500 μ m (E)、100 μ m (A-E)、50 μ m (B, G)、10 μ m (C, D)

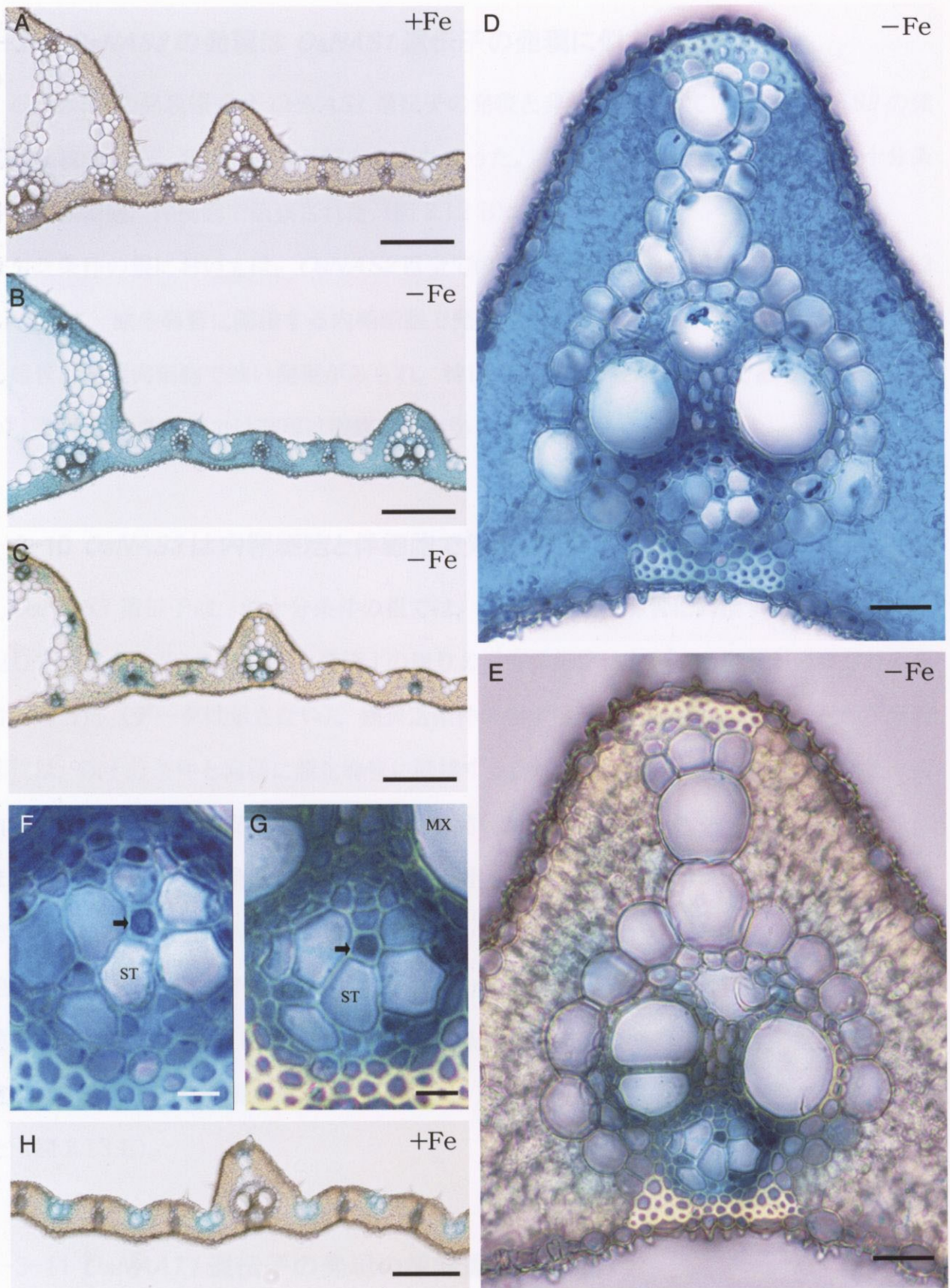


図2.11 地上部における *OsNAS1* の発現様式

(A, H) 鉄十分条件、(B, D, F) 鉄欠乏条件の最新葉、(C, E, G) 鉄欠乏の最大展開葉。
 MX: 後生導管、ST: 篩管、矢印: 篩部伴細胞。スケールバー: 500 μm (I), 200 μm (A
 -E), 50 μm (D, E), 10 μm (F, G)。