

2-3-9 *OsNAS2* の発現は *OsNAS1* 遺伝子の発現に似ている

OsNAS2 の発現様式は *OsNAS1* 遺伝子の発現と非常に類似していた。*OsNAS2* の発現は比較的弱く、発現している細胞も少なかった。*OsNAS2* 遺伝子の発現は、鉄十分条件の内鞘細胞、伴細胞で観察された (図 2.12 B)。

鉄欠乏条件の根においては、*OsNAS2* は全ての細胞で非常に強く発現していた (図 2.12 C)。特に、原生導管に隣接する内鞘細胞で発現が強かった。また、鉄欠乏の葉においても維管束と葉肉細胞で強い発現がみられ、特に伴細胞での発現が顕著であった (図 2.12 D)。鉄十分条件の葉では発現は観察されなかった (データは示さない)。

2-3-10 *OsNAS3* は内鞘細胞と伴細胞で発現している

OsNAS3 遺伝子は、鉄十分条件の根では、伴細胞と原生導管に隣接する内鞘細胞で発現していた (図 2.13 A)。後生導管 I の周りの導管柔細胞においても発現が観察される場合があった (データは示さない)。鉄欠乏条件の根では、若干発現は誘導されたが、発現部位は、鉄十分条件と同様に原生導管に隣接する内鞘細胞と篩部伴細胞のみであった (図 2.13 B)。表皮細胞、外皮細胞、皮層細胞では発現が見られなかった (データは示さない)。また、鉄十分、鉄欠乏条件ともに、分枝根が出る部位では後生導管 I の周囲の導管柔組織で発現が観察された (図 2.13 B)。

地上部での *OsNAS3* 遺伝子の発現は、鉄十分条件の篩部伴細胞、維管束鞘細胞、一部の葉肉細胞で観察された (図 2.13 C)。鉄欠乏条件では発現は抑制され、伴細胞と篩部柔細胞を含む篩部のみに発現がみられた (図 2.13 D)。また、恒常的に孔辺細胞で発現していた (図 2.13 E)。

2-3-11 *OsNAAT1* 遺伝子の発現の組織局在の観察

OsNAAT1 の発現を、同様にプロモーター-GUS 実験で解析した。発現は鉄十分条件の根の中心柱の一部で観察され、表皮細胞、一部の外皮細胞でも観察された (図 2.14 A, C)。中心柱の細胞のうち、原生導管、後生導管 I に隣接する内鞘細胞と、篩部伴細胞にお

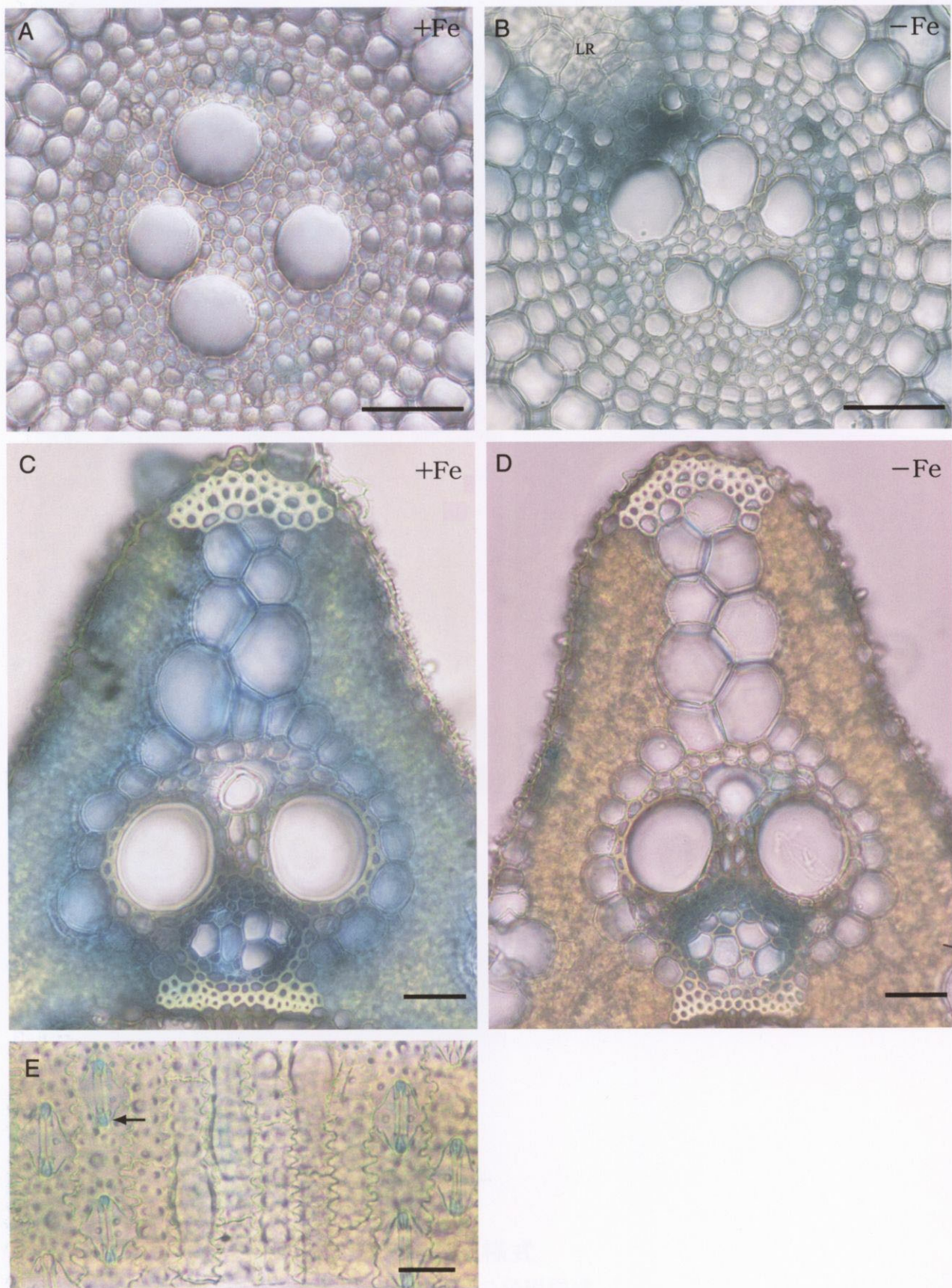


図2.13 *OsNAS3* の発現様式

(A, C, E) 鉄十分条件、(B, D) 鉄欠乏条件。(A, B) 根の中心柱の拡大図、(C, D) 葉の大維管束の拡大図、(E) 葉の表面の気孔付近の拡大図。矢印は気孔を示している。スケールバー：50 μm (A-D)、10 μm (E)。

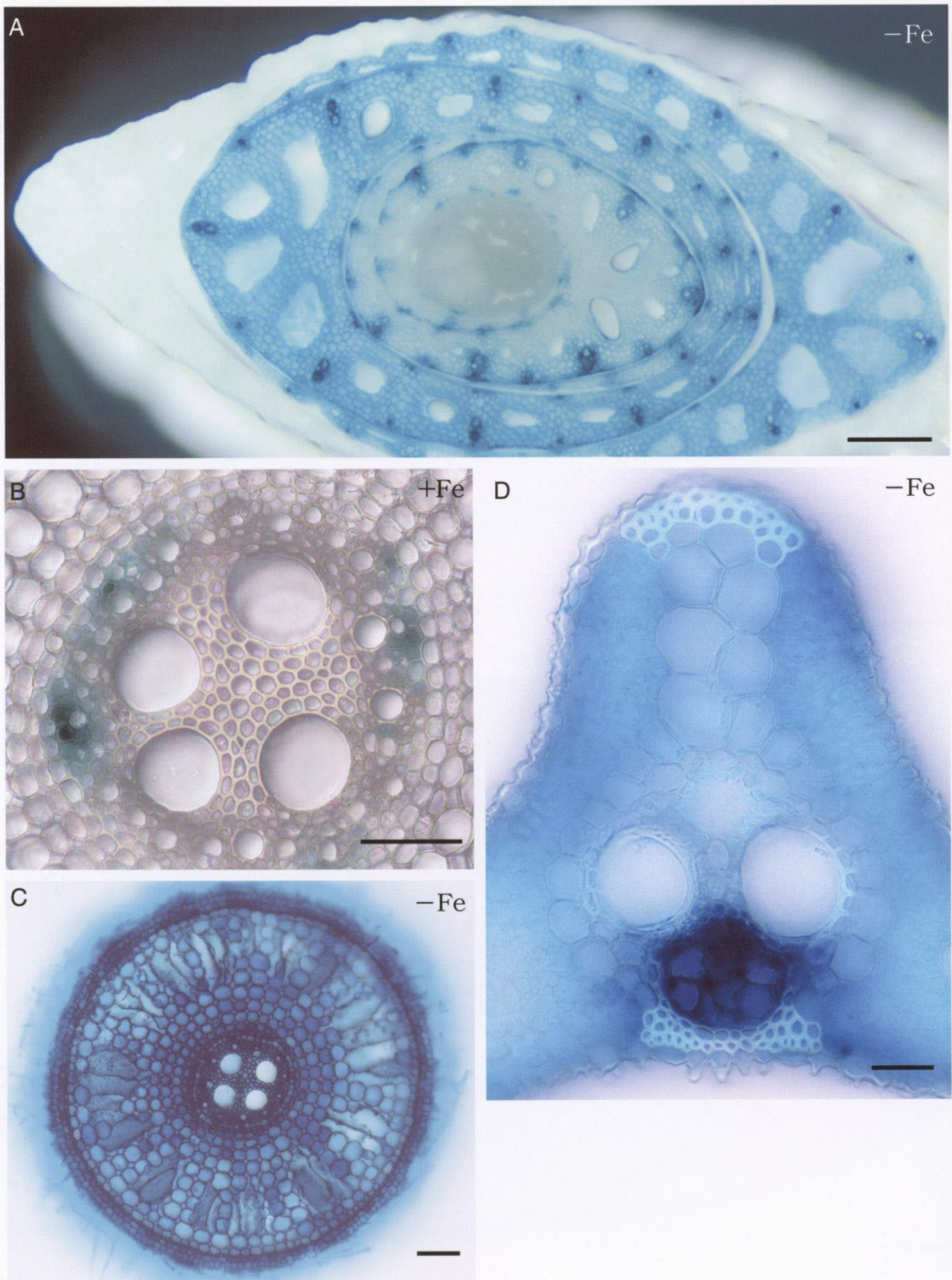


図2.12 *OsNAS1* と *OsNAS2* の発現様式

(A) 鉄欠乏条件の葉鞘における *OsNAS1* の発現様式。

(B) 鉄十分条件の根における *OsNAS2* の発現様式、(C) 鉄欠乏条件の根における

OsNAS2 の発現様式、(D) 鉄欠乏の最新葉における *OsNAS2* の発現様式。

スケールバー：500 μm (A)、100 μm (C)、50 μm (B, D)。

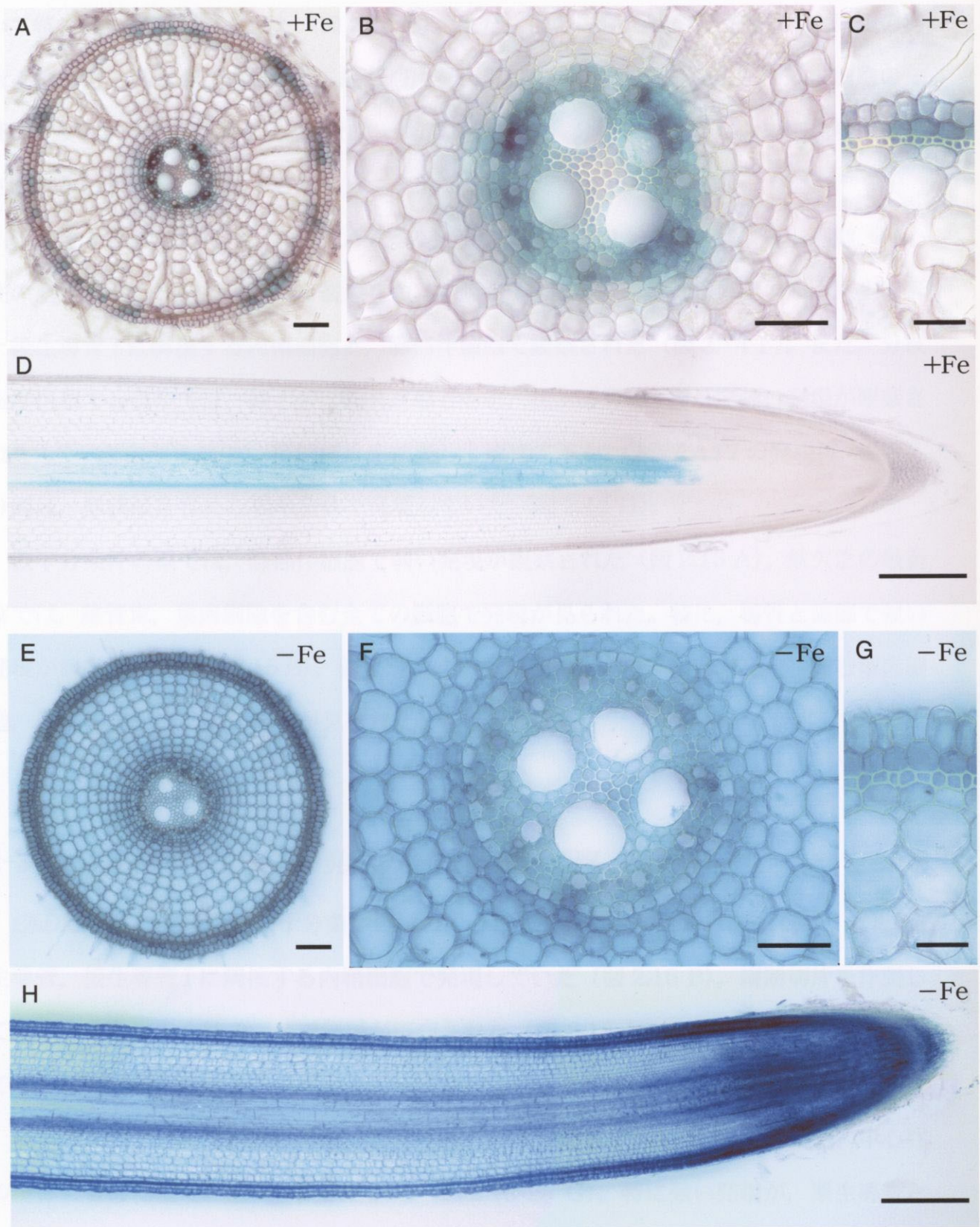


図2.14 根における *OsNAAT1* の発現様式

(A-D) 鉄十分条件、(E-H) 鉄欠乏条件。(B, F) 根の中心柱の拡大図。(C, G) 根の表皮の拡大図。(D, H) 根の縦断面。

スケールバー：500 μm (D, H)、100 μm (A, E)、50 μm (B, F)、25 μm (C, G)。

いて特に強い発現がみられた (図 2.14 B)。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、中心柱や外皮細胞の一部で *OsNAATI* の発現が観察された (図 2.14 D) が、分枝根や根毛において発現は観察されなかった (データは示さない)。

鉄欠乏条件においては、*OsNAATI* 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 2.14 E, G)。特に強い発現が、原生導管と後生導管 I に隣接する内鞘細胞と、篩部伴細胞で観察された (図 2.14 F)。また、分枝根が出根する部位では、鉄十分、鉄欠乏根ともに、後生導管 I の周りで強い発現が観察された (データは示さない)。縦断切片を作製して観察すると、*OsNAATI* の発現は、根冠、分裂域、伸長域を含めた根の全体で発現していた (図 2.14 H)。

鉄十分条件の葉では、篩部伴細胞で弱い発現が観察された (図 2.15 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、導管と篩部で強い発現が観察された (図 2.15 B)。鉄欠乏条件の最大展開葉では、維管束を取り囲む葉肉細胞、篩部伴細胞において発現が見られた (図 2.15 C)。

2-3-12 *OsDMASI* 遺伝子の発現の組織局在の観察

OsDMASI の発現は、鉄十分条件の根の中心柱の一部で見られた (図 2.16 A, C)。原生導管、後生導管 I に隣接する内鞘細胞で発現していた (図 2.16 B)。縦断切片を作製して観察すると、中心柱の一部で発現が観察された (図 2.16 D) が、分枝根や根毛において発現は観察されなかった (データは示さない)。

鉄欠乏条件においては、*OsDMASI* 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 2.16 E, G)。特に強い発現が、原生導管と後生導管 I に隣接する内鞘細胞と、篩部伴細胞で観察された (図 2.16 F)。縦断切片を作製して観察すると、*OsDMASI* の発現は、根冠、分裂域、伸長域を含めた根の全体で発現していた (図 2.16 H)。

鉄十分条件の葉では、GUS 活性は観察されなかった (図 2.17 A)。鉄欠乏の最新葉で

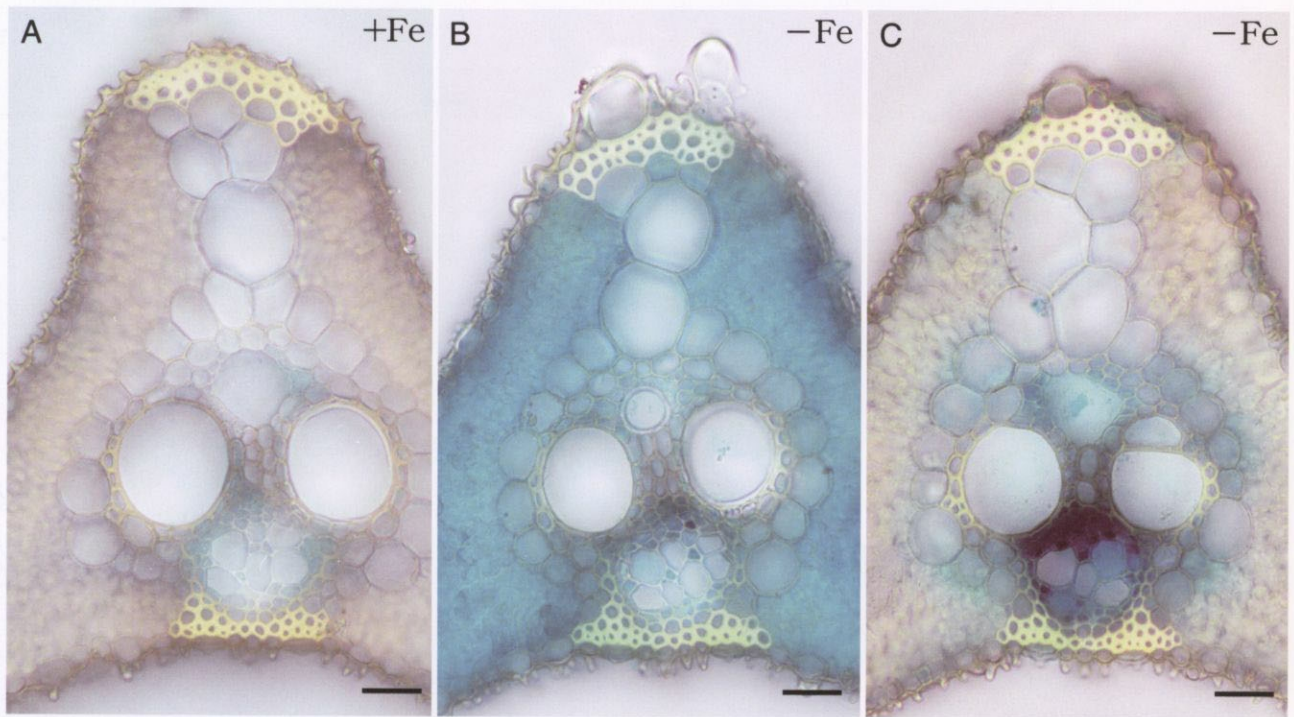


図2.15 地上部における *OsNAAT1* の発現様式

(A) 鉄十分条件、(B) 鉄欠乏条件の最新葉、(C) 鉄欠乏の最大展開葉。

スケールバー：50 μm (A, B, C)。

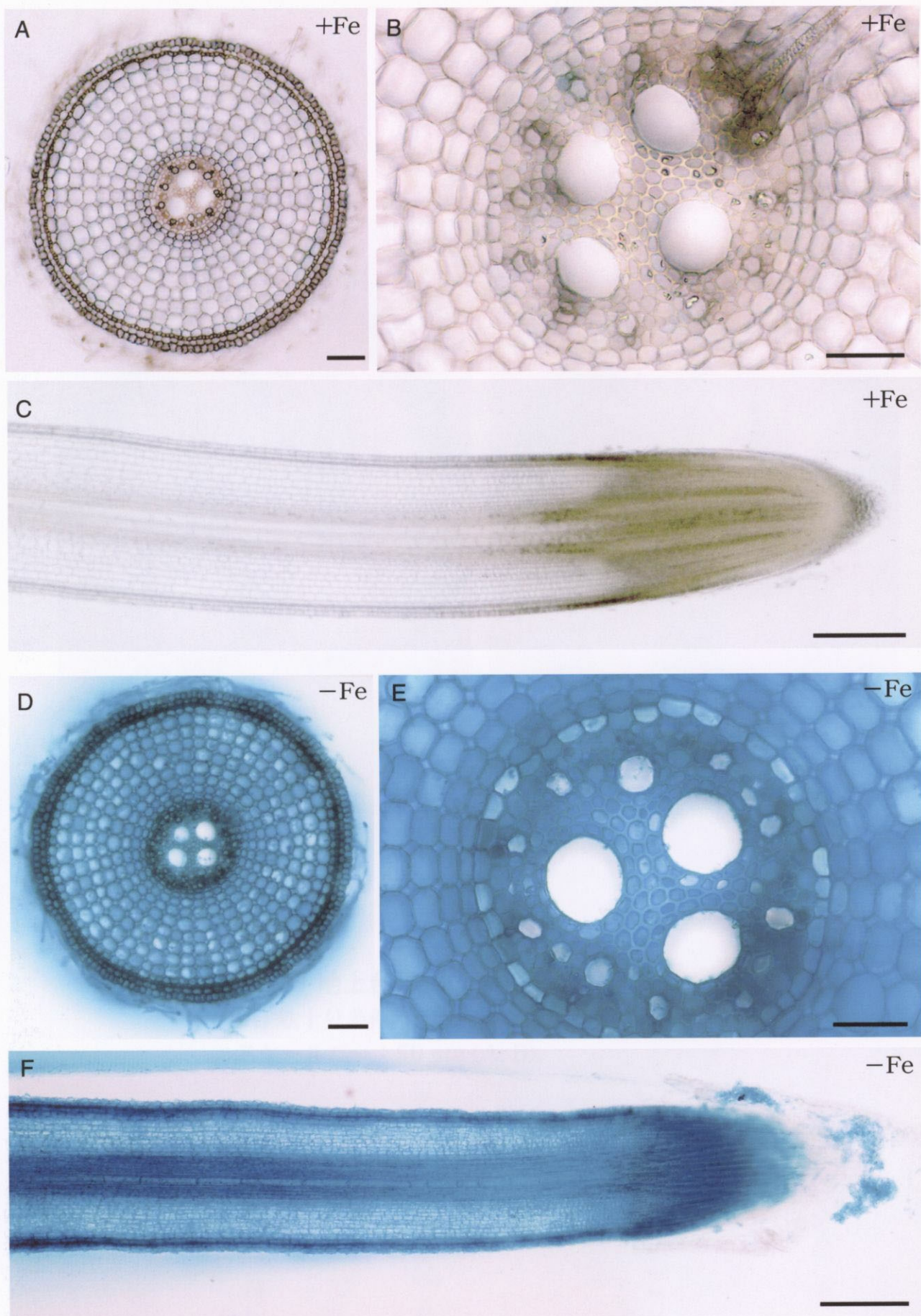


図2.16 根における *OsDMAS1* の発現様式

(A-C) 鉄十分条件、(D-F) 鉄欠乏条件。(B, E) 根の中心柱の拡大図。(C, F) 根の縦断面。
 スケールバー：500 μm (C, F)、100 μm (A, D)、50 μm (B, E)。

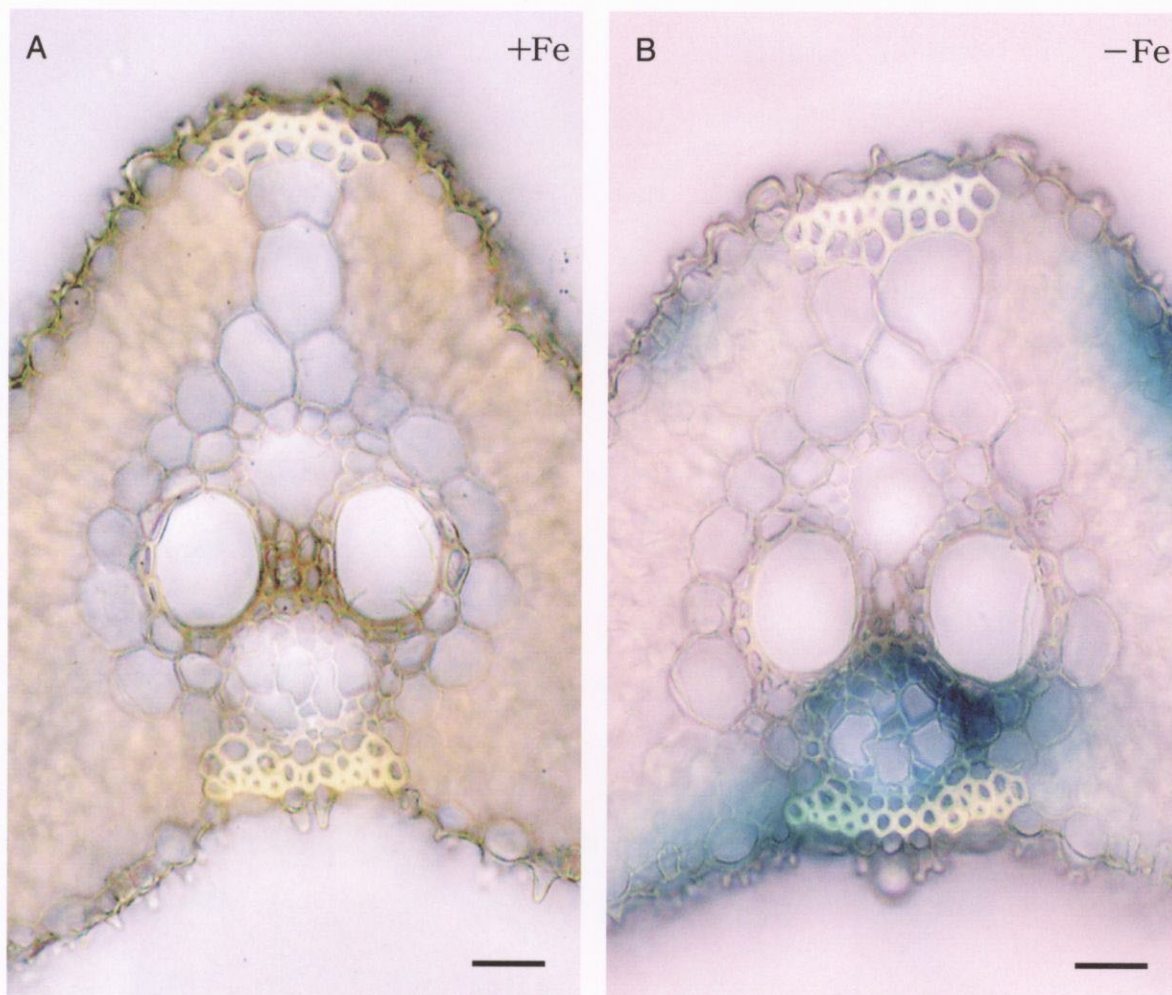


図2.17 地上部における *OsDMAS1* の発現様式
(A) 鉄十分条件、(B) 鉄欠乏条件の最新葉。
スケールバー：50 μm (A, B)。

は、篩部で発現が観察された。特に、篩部伴細胞に発現が観察された (図 2.17 B)。鉄欠乏条件の最大展開葉では、最新葉の発現様式と変わらなかった (データは示さない)。

2-4 考察

2-4-1 デオキシムギネ酸は鉄欠乏の根の全体で合成されている

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、*NAS*, *NAAT* および *DMAS* の各遺伝子産物が必要である。イネにおけるこれらの遺伝子の発現を、ノーザン解析で検出すると、*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAAT1*, *OsDMAS1* 遺伝子の発現が鉄欠乏処理によって主に根で強く誘導されていた (図 2.2, 2.8)。さらに、これらの遺伝子の発現の組織局在をプロモーター-GUS 実験によって解析すると、全ての遺伝子が鉄欠乏の根の全体で発現しており、特に根の分裂域、伸長域においてその発現が強かった (図 2.10, 2.12, 2.14, 2.16)。Yoshida et al. (2004) は、ムギネ酸類の鉄溶解力を利用して、鉄欠乏オオムギの根においてムギネ酸類が分泌される部位を調べた。これによると、ムギネ酸類の分泌は、新しい鉄欠乏根の先端でよく起こり、根の基部においても先端ほど多くないが起こることが示された。プロモーター-GUS 解析の結果から、根の先端でこれらの遺伝子の発現が強く、かつ根全体で発現が観察されることから、合成される場と分泌の場との間には良い相関があると考えられる。

トウモロコシの *ZmNAS* と Green Fluorescent Protein (GFP) との融合タンパク質を用いた細胞内局在解析によると、鉄欠乏の根で強く発現が誘導される *ZmNAS1* と *ZmNAS2* は直径数 μm の小顆粒に局在していた (Mizuno et al., 2003)。オオムギの *HvNAS1* および *HvNAAT-A* も、やはり細胞質基質中の小顆粒に局在していた (根岸, 1999)。さらに、*HvNAS1*, *HvNAAT-A* については免疫染色法による解析も行われ、鉄欠乏のオオムギ根端で増加する粗面小胞体由来の小顆粒 (Nishizawa and Mori, 1987) にこれらの酵素が局在することが明らかとなっている (Nagasaka et al., 2004)。おそらく、鉄欠乏で発現が強く誘導され、かつ *HvNAS1* と相同性が高い *OsNAS1* と *OsNAS2*, さらに *OsNAAT1* も同様の小顆粒に局在し、機能していると予想される。さらにこの小顆粒が、鉄欠乏の根の先端で観察されることは、*OsNAS1* と *OsNAS2* の発現が根の先端で強いことと一致している (図 2.10)。イネでは、この小顆粒の存在は報告されていないが、イネにおいてもムギネ酸類の生合成と貯蔵の場として機能する、粗面小胞体由来の小

胞に相当する顆粒が存在すると考えられる (Nozoye et al., 2004)。

また、*OsNAS1* と *OsNAAT1* は、鉄十分条件の根の外皮細胞で発現が見られる場合があった (図 2.9, 2.14)。鉄十分条件のイネ (Highuchi et al., 1996) やオオムギ (Takagi et al., 1984) でも、微量なムギネ酸類の分泌が報告されている。これらの細胞での遺伝子発現は、局所的に鉄を必要とした細胞が、鉄を獲得するためにデオキシムギネ酸類を合成するためのものではないかと考えられる。

2-4-2 *OsNAS1*と *OsNAS2* 遺伝子は長距離輸送に関与する細胞で発現している

プロモーター-GUS 実験によれば、*OsNAS1* および *OsNAS2* は原生導管と後生導管 I に隣接する内鞘細胞で強く発現していた (図 2.9, 2.12)。また、同じ細胞で *OsNAAT1*, *OsDMAS1* も発現していた (図 2.14, 2.16)。このことから、ニコチアナミンもしくはデオキシムギネ酸が導管での鉄の輸送に関与している可能性が考えられる。この可能性を支持する報告がいくつかある。鉄十分条件と鉄欠乏条件のイネの導管液中に、デオキシムギネ酸が検出される (Mori and Nishizawa, 1987 ; Kawai et al., 2001)。地上部に鉄を運ぶために、植物は導管を利用して輸送していると考えられている。「Fe(III)-デオキシムギネ酸」錯体は、導管中の pH5.2-6.0 では、「Fe(III)-ニコチアナミン」錯体よりも安定である (von Wirén et al., 1999)。導管中にクエン酸が多く存在することから、「Fe(III)-デオキシムギネ酸」または「Fe(III)-クエン酸」錯体が導管における鉄の輸送形態として、可能性が高いと考えている。

OsNAS1 と *OsNAS2*, *OsNAAT1*, *OsDMAS1* は、鉄欠乏条件の地上部の伴細胞でも発現していた (図 2.11, 2.12, 2.15, 2.17)。鉄欠乏のイネの地上部には、ニコチアナミンとデオキシムギネ酸双方の存在が報告されている (Highuchi et al., 2001)。従って、全てのニコチアナミンがデオキシムギネ酸へ変換されているわけではなく、ニコチアナミン自体も鉄のキレーターとして地上部で働いているものと考えられる。

篩管内の pH は、7.8-8.0 である。この pH 領域では「鉄-ニコチアナミン」錯体の安定性は、「鉄-デオキシムギネ酸」や「鉄-クエン酸」錯体よりも高いことが、コンピュ

ーターシミュレーションから明らかになった (von Wirén et al., 1999)。これらのことから、篩管内の鉄の移動はニコチアナミンを介した輸送が、有力であると考えられる。ニコチアナミンを合成できないトマトの変異体 *chloronerva* では、鉄が地上部のアポプラスト内に沈殿している (Scholz et al., 1992 ; Yoshimura et al., 2000)。さらに、*chloronerva* の地上部を野生株の台木に接ぎ木すると、クロロシスの表現型が回復する (Rudolph et al., 1985)。これらのことから、トマトの *NAS* 遺伝子も、導管周囲の内鞘細胞や篩部伴細胞で発現していることが考えられる。

2-4-3 OsNAS3 は細胞内で金属栄養の恒常性に関わる

これまでの結果から、イネ科の *NAS* は、機能によって2種類に分類できると考えられる。1つ目は、分泌するムギネ酸類の前駆体であるニコチアナミンを合成する役割である。2つ目は、細胞内でニコチアナミンを合成し、金属の恒常性に関与すると考えられる。*OsNAS3* は、以下に述べる理由により、トウモロコシの *ZmNAS3* とともに主に後者の機能を担っていると考えられる。

OsNAS3 は、発現様式、組織局在が *OsNAS1* および *OsNAS2* と大きく異なっていた。ノーザン解析により、*OsNAS3* の発現は鉄十分条件の根では観察されず、鉄欠乏条件の根において若干の誘導が観察された (図 2.2)。さらに、定量的 RT-PCR の結果から、*OsNAS3* は根での鉄欠乏誘導性が、*OsNAS1* と *OsNAS2* に比較して極めて低かった (表 2.1)。鉄欠乏イネの根を用いたウェスタンブロット解析においても、*OsNAS3* のスポットは *OsNAS1* と *OsNAS2* のスポットよりも微弱であった (図 2.4 B)。イネ科植物では、鉄欠乏によってムギネ酸類の合成量が増大するため、ムギネ酸類生合成経路上の主要な酵素である *NAS* の発現が、鉄欠乏処理によって抑制されるという結果は予想外であった。プロモーター-GUS 実験により組織局在を調べると、鉄欠乏条件では、*OsNAS3* は根の中心柱の一部に局在し、根圏に近接する表皮細胞、外皮細胞、皮層細胞での発現は観察されなかった (図 2.13 B)。さらに、*OsNAS3* は地上部で恒常的に発現しており、この発現パターンは根から分泌するムギネ酸類の前駆体であるニコチアナミンを供給する目的と

は考えにくい。

OsNAS3 と ZmNAS3 は、遺伝子の発現パターン、タンパク質の構造、組織局在が非常に良く似ていることから、イネ科植物において同じ役割を果たしていると考えられる。この2つの遺伝子は、地上部で恒常的に発現しており、鉄欠乏処理によってその発現が抑制される。タンパク質の構造は、N末端に親水性の残基を持っていて、他のNASと比べて長い。現在までに単離されたNASの分子系統樹を示す(図2.18)。OsNAS3は今まで単離されたNASの中で、分子系統樹においてトウモロコシのZmNAS3、オオムギのNASHOR2の近縁に位置する(Mizuno et al., 2003)。Nakazono et al. (2003)がLaser Capture Microdissection法を用いて、トウモロコシの子葉鞘において維管束のみのRNAを抽出しマイクロアレイ解析を行ったところ、*ZmNAS3*が発現していた。これは、*OsNAS3*が篩部伴細胞に発現することと非常に類似している(図2.13 C)。これらの共通点は、*OsNAS3*と*ZmNAS3*が属する第2のNASグループが、イネ科植物において同様の役割を果たしていることを示唆している。

2-4-2節にも記したように、ニコチアナミンはStrategy II植物だけでなく、Strategy I植物にとっても必須の物質である。トマトの変異株*chloronerva*はNAS活性を欠損しており(Higuchi et al., 1996a)、植物体内で鉄を正しく利用することができない(Becker et al., 1995)。この変異株は野生株に比べ、全ての組織で鉄含量が高い(Scholz, 1985; Becker et al., 1992)にもかかわらず、若い葉での葉脈間クロロシスという典型的な鉄欠乏症状を示す(Stephan and Grün, 1989)。野生株を台木にして変異株*chloronerva*を接ぎ木することにより変異株の表現型は正常化する(Böhme and Scholz, 1960)。また、ニコチアナミンの葉面塗布によっても表現型の正常化が見られる(Budesinsky et al., 1980)。また、HvNAAT-A遺伝子をタバコへ導入し、過剰発現させると内生のニコチアナミンがケト体へと変換されて、結果的にニコチアナミン欠損となり*chloronerva*に似た表現型を示した(Takahashi et al., 2003)。これらの報告はニコチアナミンが非イネ科植物においても、体内の鉄の恒常性に必要不可欠であることを示唆している。

ZmNAS3とGFPとの融合タンパク質をタマネギの表皮細胞で一過的に発現させると、細胞質に局在した(Mizuno et al., 2003)。従って、*OsNAS3*の属するNASグループは、

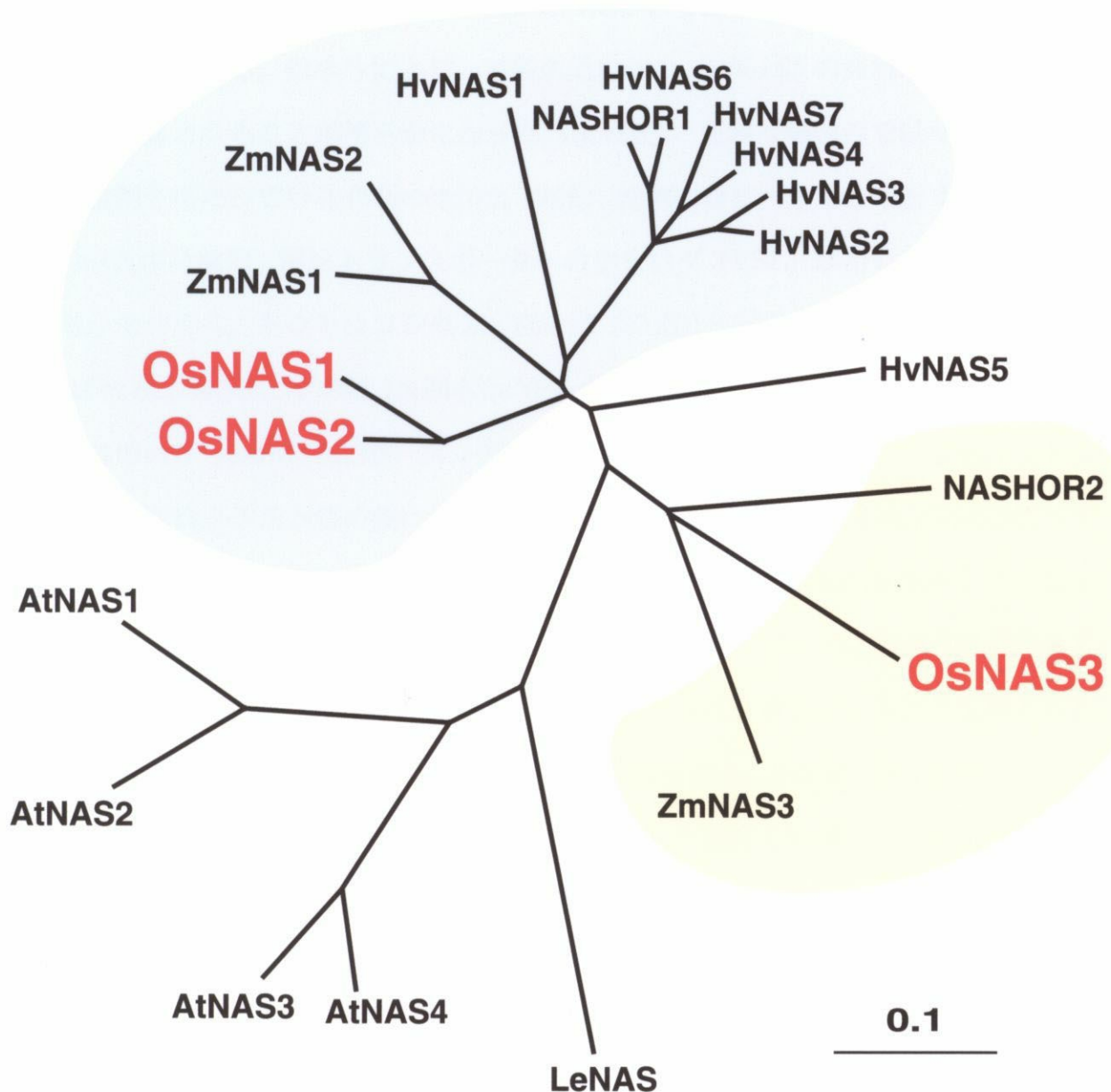


図2.18 NAS ファミリーの分子系統樹

ORF の確定した NAS タンパク質の分子系統樹。OsNAS はイネ、AtNAS はシロイヌナズナ、HvNAS および NASHOR はオオムギ、LeNAS はトマトから単離された NAS を表す。それぞれの遺伝子のアクセッション番号を以下に記す。

OsNAS1(AB021746)、OsNAS2(AB23818)、OsNAS3(AB023819)、ZmNAS1(AB061270)、ZmNAS2(AB061271)、ZmNAS3(AB042551)、AtNAS1(AB021934)、AtNAS2(AB021935)、AtNAS3(AB021936)、AtNAS4(BAD22596)、HvNAS1(AB010086)、HvNAS2(AB011265)、HvNAS3(AB011264)、HvNAS4(AB011266)、HvNAS5(AB011268)、HvNAS6(AB011269)、HvNAS7(AB019525)、NASHOR1(AF136941)、NASHOR(AF136942)、LeNAS(AJ242045)。

積極的にムギネ酸類の合成には関与せず、細胞内において様々な金属の恒常性に関わっているものと考えられる。鈴木らにより、亜鉛欠乏により *OsNAS3* の発現が地上部、根の両方で強く誘導されることが明らかになった（未発表）。亜鉛は細胞内で様々な生体反応に重要な役割を果たしている (Marschner, 1995)。細胞内器官へ亜鉛を輸送するために、「Fe(III)-ムギネ酸類」錯体トランスポーターのホモログ (YSL) が用いられている可能性がある。なぜなら、トウモロコシの *ZmYS1* は「Zn(II)-デオキシムギネ酸」を輸送し (Schaaf et al., 2004)、イネは 18 個もの YSL がゲノム上に存在する (第 3, 4 章)。これらのうちのいくつかは「Zn(II)-ニコチアナミン」錯体を輸送基質とし、液胞、ミトコンドリアやクロロプラスト等の膜に局在して働いている可能性が高いからである。従って、亜鉛要求性が高まった細胞では、*OsNAS3* がニコチアナミンを積極的に生産しその濃度を上げ、亜鉛をキレートすることにより利用効率の向上を図っていると推定される。またニコチアナミンは、金属の過剰ストレスから植物を守る機能を有していることも考えられる。Fe 過剰 (Pich et al., 2001)、Ni 過剰 (Vacchina et al., 2003)、Zn 過剰 (Weber et al., 2004) に対して、ニコチアナミンが液胞に過剰な金属を隔離して、細胞への傷害を回避している可能性がある。現在、金らによりニコチアナミン合成酵素を過剰発現させた形質転換タバコを用いて、様々な金属過剰への耐性検定が行われている (未発表)。今後、ニコチアナミンの金属欠乏・過剰への役割が、分子レベルで詳細に解明されていくだろう。

2-4-4 *OsDMAS1* の活性と構造について

ムギネ酸類生合成経路のうちケト体からデオキシムギネ酸への反応を触媒する酵素は、Shojima et al. (1990) による RI 取り込み実験によって NAD(P)H 依存性であることが確認されていた。根岸 (2002) は、オオムギのデオキシムギネ酸合成酵素遺伝子の単離を試みた。この酵素が aldo-keto reductase superfamily に属するとの仮説に基づき、このファミリー内に存在する保存されたアミノ酸配列から、ディジェネレートプライマーを設計し PCR を行った。得られた PCR 断片を用いて鉄欠乏オオムギ根 cDNA ライブラ

リーから遺伝子のスクリーニングを行った結果、グルタチオン還元酵素に相同性の高い鉄欠乏誘導性遺伝子を二つ単離した。これらの遺伝子産物のタンパク質はケト体からデオキシムギネ酸を生成する反応の触媒活性をもつことから、これらの遺伝子は *HvDMAS1*, *HvDMAS2* と命名された。その後、これらの遺伝子と相同性の高い *HvDMAS3* が単離された (Bashir et al., 2004)。

本研究を始めるにあたり、イネよりデオキシムギネ酸合成酵素遺伝子の単離を試みた。*HvDMAS1* の配列を基に、これと相同性の高い遺伝子をイネのデータベースで検索した。その結果、イネのグルタチオン還元酵素遺伝子 (*OsGR*) が最も高い相同性を有していた (Kaminaka et al., 1998)。そこで、ノーザン解析によって、*OsGR* の発現を調べた。*OsGR* は恒常的に地上部で強く発現しており、根での発現は弱かった。鉄欠乏処理によって遺伝子の発現の変化が観察されなかった (データは示さない)。これらのことから、イネには *HvDMAS* に相同性の高いデオキシムギネ酸合成酵素は存在しない可能性が考えられた。すなわち、*HvDMAS* に相同性の高いタンパク質以外にもケト体を還元する酵素が存在することが予想された。

そこで、農業生物資源研究所の協力により 21,938 個のクローンを独立に認識するオリゴマイクロアレイを用いて、鉄欠乏イネの根で発現が誘導される遺伝子の探索を行った。その結果、鉄欠乏により誘導される aldo-keto reductase superfamily に属する還元酵素遺伝子の一つを見いだした。この遺伝子の産物であるタンパク質は、デオキシムギネ酸合成酵素活性を示したことから (図 2.7)、イネのデオキシムギネ酸合成酵素 (*OsDMAS1*) と命名した。

OsDMAS1 と相同性の高い遺伝子を他の植物種で検索し、予想されるアミノ酸配列をもとに、分子系統樹を作成した (図 2.19)。*OsDMAS1* と高い相同性を持つ遺伝子が、オオムギ (*HvDMAS4*)、トウモロコシ (*ZmDMAS1*)、コムギ (*TaDMAS1*)、ソルガム (*SbDMAS1*) などの、ムギネ酸類を合成するイネ科植物に存在することが明らかになった。一方、ムギネ酸類を合成しないシロイヌナズナで、最も相同性の高い At1g59950.1 は 57% の相同性しかなかった。さらに、現在までに当研究室で行われたイネ科のマイクロアレイ解析から、*OsDMAS1* と相同性の高い遺伝子の発現パターンを検証した。その結

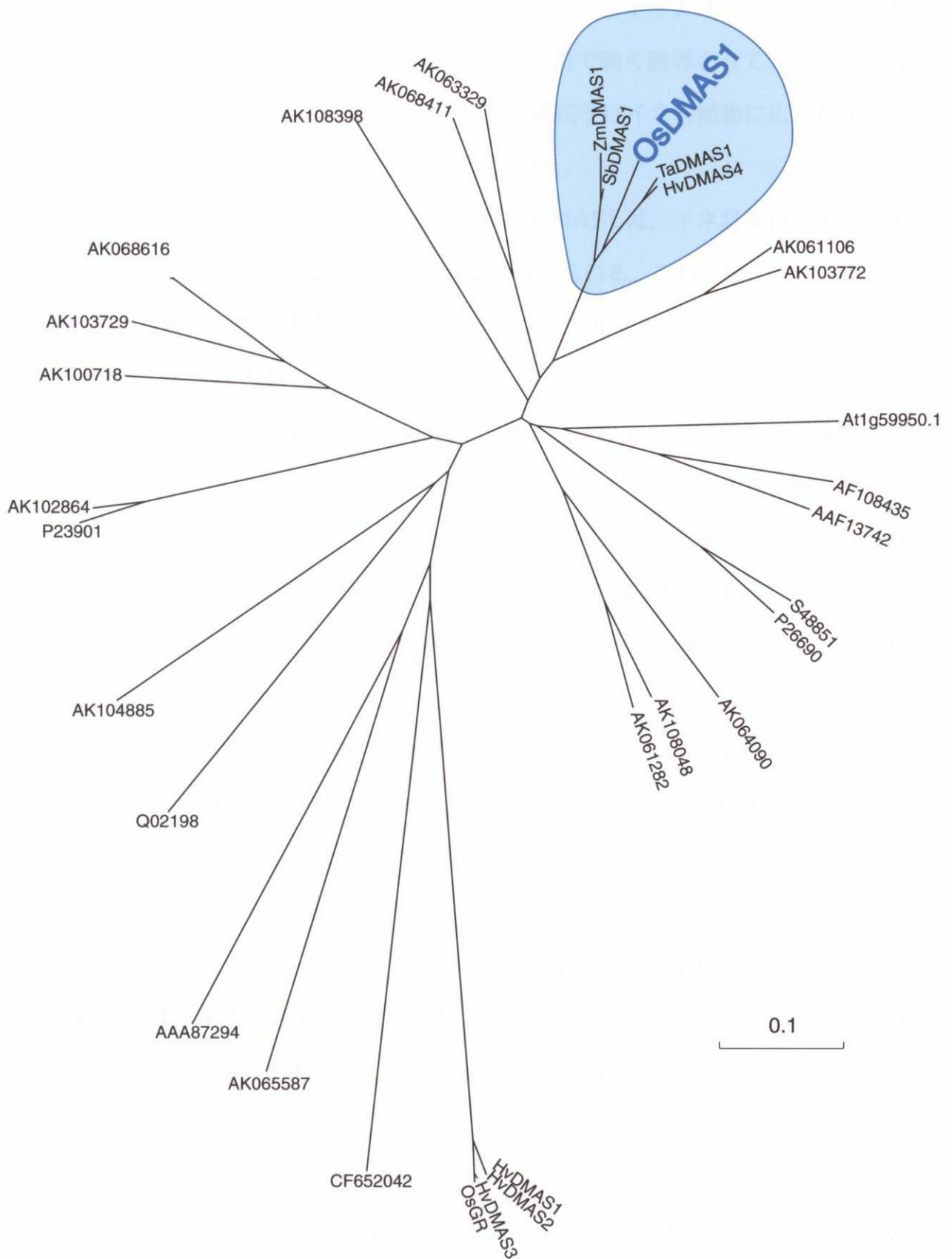


図2.19 OsDMAS1 類似遺伝子の分子系統樹
 推定 ORF のアミノ酸配列について分子系統樹を作製した。

果、OsDMAS1 と相同性の高い遺伝子の発現が、鉄欠乏オオムギ (Suzuki et al., submitted), 鉄欠乏トウモロコシ (根岸, 未発表) の根で強く誘導されていることが明らかになった。したがって、これらの *OsDMAS1* 様遺伝子はイネ科植物に広く存在し、デオキシムギネ酸合成に関与している可能性が示された。

本研究で単離した、aldo-keto reductase 型の *OsDMAS1* は、イネ科植物に広く存在し、基本的なデオキシムギネ酸合成を担っていると考えられる。これに加えて、オオムギでは多量のムギネ酸類を生合成するために、ケト体から還元する過程を強化するために、グルタチオン還元酵素を基にして、独自の還元酵素 (*HvDMAS1*, *HvDMAS2*, *HvDMAS3*) を進化させた可能性が考えられる。オオムギのムギネ酸類の分泌量は、イネと比較して数十倍以上に達し (Higuchi et al., 1996b), ムギネ酸類合成の酵素活性も非常に強い。例えば、ニコチアミン合成酵素遺伝子は、イネには全ゲノム中に3つしか存在しないのに対し、オオムギでは現在までに9つの存在が確認されている。または、ムギネ酸類生合成を行うために、効率の良い細胞内局在をとるために *HvDMAS1*~3 が進化してきた可能性も考えられる。

OsDMAS1 の酵素活性の測定の際、限外濾過で *OsNAAT1* と *OsDMAS1* を濃縮し、NAAT 反応液と NADPH を同時に添加することで、*OsNAAT1* と *OsDMAS1* をニコチアミンに同時に反応させると、連続して反応を行った場合と比較してデオキシムギネ酸の生成量が 60 % 低下した (データは示さない)。反応性が低下した原因として、*OsDMAS1* の Lys-260 を含む4つのアミノ酸残基 (IVKS) に、PLP が結合することによって DMAS 活性が大きく低下する機構があると考えている。このアミノ酸残基に PLP と NADPH が競合的に結合することは、オオムギの aldo-keto reductase ファミリーの内の、glyceraldehyde と erythrose を特異的に還元する酵素の研究から明らかにされた (Roncarati et al., 1995)。野生型の glyceraldehyde 還元酵素は、反応液への PLP の添加によって反応効率が著しく低下する。一方、Lys-262 を含む4つのアミノ酸残基 (IPKS) の内の Lys が Met に置換された変異型酵素は、通常条件での活性が低いものの、PLP による活性の低下が軽減される。この原因として、「IPKS」のアミノ酸配列の変異によって、PLP との結合能が低下したことが考えられている。さらに、反応を行う前に野

生型の還元酵素を NADPH 溶液に加え、NADPH を還元酵素と結合させた場合、PLP の添加による活性の低下が軽減される。以上のことより、NAAT 反応と DMAS 反応を同時に行った場合、NAAT 反応液に含まれる PLP が NADPH よりも先に OsDMAS1 に結合したために、DMAS 活性が低下したものと考えられる。従って、効率良くデオキシムギネ酸を合成するためには、OsNAAT1 と OsDMAS1 は異なる細胞内局在をとる必要がある可能性が示唆される。

2-4-5 *OsNAS1* と *OsNAS3* は水の輸送に関与する可能性がある

OsNAS1 と *OsNAS3* は、それぞれ機動細胞と孔辺細胞で発現していた(図 2.11 H, 2.13 E)。これらの細胞は共に水の輸送によって機能が制御されることを特徴としている。このことから、ニコチアナミンもしくは、「金属—ニコチアナミン」錯体が、水の輸送の制御を通してこれらの細胞の機能制御に関わる可能性がある。機動細胞は、イネ科植物の葉の上表皮に特有の組織で、葉の水分が減少すると、機動細胞が膨圧を失って収縮する。この収縮によって稜と稜が引き寄せらる。これが上表面側の機動細胞で一斉に起こることにより、葉は上表面側に巻き込まれる。機動細胞内の水の調節を行う原形質膜上の水チャンネルが、二価カチオンによって阻害されることにより、この制御を行っているとの報告がある (Gerbeau et al., 2002)。このことは、「二価金属—ニコチアナミン」錯体が水チャンネル活性化の制御を行っている可能性を示唆している。

OsNAS はアブジシン酸によって、発現が制御されている可能性がある。なぜなら、アブジシン酸に応答するシス配列 (ABRE) 様配列 ACGTG が、*OsNAS* 遺伝子のプロモーター領域に存在するからである。*OsNAS1* の上流領域に一つ (-1544~-1549)、*OsNAS2* の上流領域に一つ (-386~-391)、*OsNAS3* の上流領域に二つ (-148~-153, -360~-365) 存在する。これらのシス配列は、アブジシン酸を感知し遺伝子の発現制御を行っている可能性も考えられる。

一方、植物体内の水分の制御には亜鉛が関与する。気孔の開閉に亜鉛が必要とされることがカリフラワーで調べられている (Sharma et al., 1995)。亜鉛欠乏のヒヨコマメで

は、水ストレス条件下で、浸透圧の調節が適切にできなくなることも報告されている (Khan et al., 2004)。さらに、亜鉛欠乏のオオムギは、水の地上部への移行が抑制されることが示されている (Tsukamoto et al., 未発表)。上述したように、OsNAS3は亜鉛の栄養との関係が深い可能性がある。これらのことから、「亜鉛-ニコチアミン」錯体が、気孔の開閉や浸透圧の調節に介在している可能性が考えられる。