

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

「Fe(III)-デオキシムギネ酸」錯体のトランスポーターをコードするトウモロコシの遺伝子 *ZmYS1* と相同性の高い遺伝子 (*OsYSL*) が、イネのゲノム中に 18 個存在した。これらの *OsYSL* の配列は、トウモロコシで単離されている *ZmYS1* と 37~76% の相同性を有していた (水野, 2003)。推定されるアミノ酸配列を基に、分子系統樹を作製した (図 3.1)。そのうち発現が鉄十分条件の根で観察されず、鉄欠乏条件の根で強く誘導される *OsYSL15* について解析を進めた。*OsYSL15* は 673 アミノ酸残基からなり、16 個の膜貫通領域を持つと推定された。*OsYSL15* 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、細胞膜に局在した。*OsYSL15* プロモーター-GUS 実験を行うと、鉄十分条件の根において篩部に弱い発現が観察された。鉄十分条件の葉でも、維管束の篩部に弱く発現した。鉄欠乏条件の根では、表皮細胞、外皮細胞、皮層細胞に発現が観察され、特に篩部伴細胞で強い発現が観察された。*OsYSL15* が輸送する物質を調べるために、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いて、電気生理学的な実験を行った。*OsYSL15* は「Fe(III)-デオキシムギネ酸」錯体を輸送することが明らかとなった。

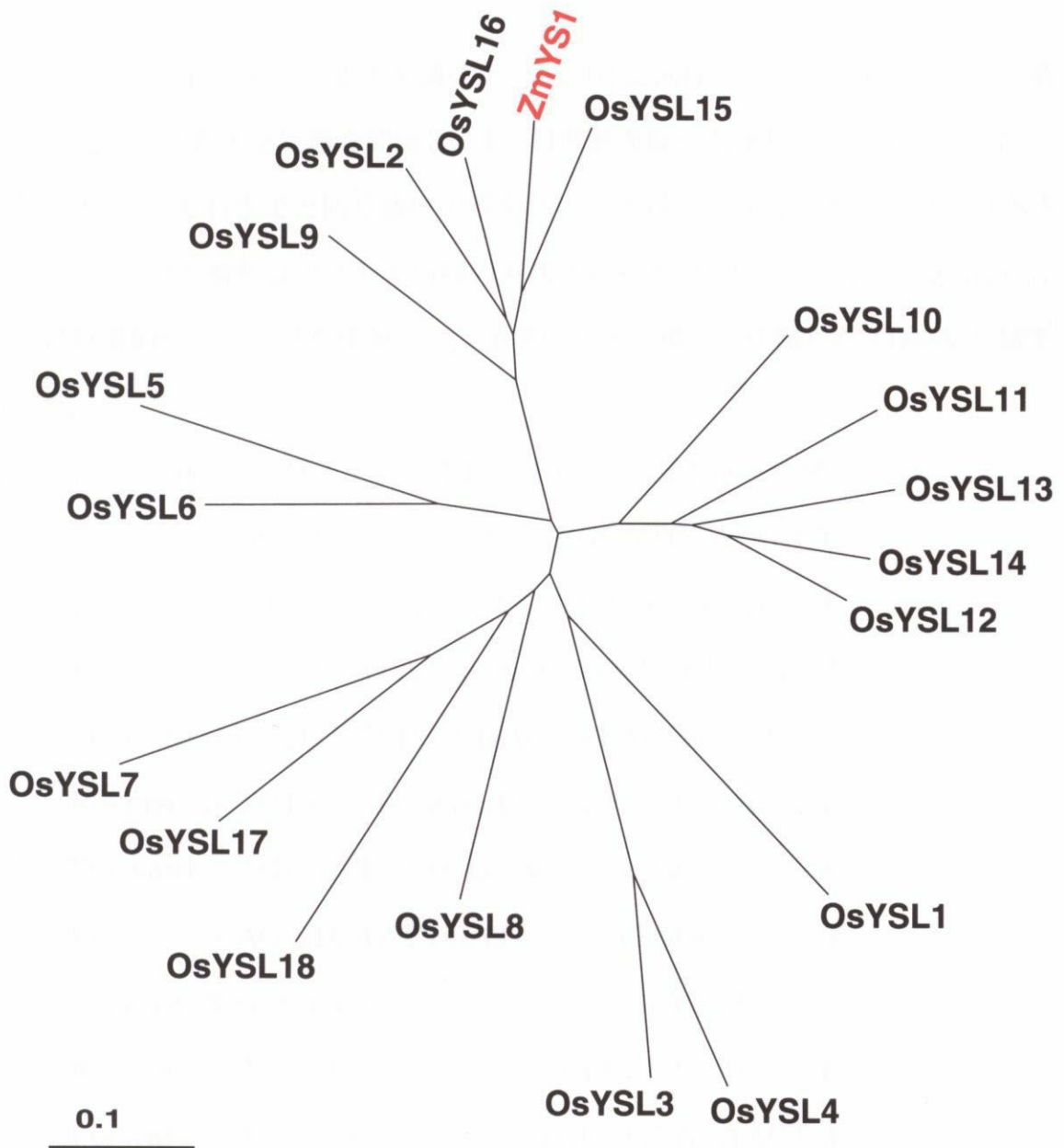


図3.1 OsYSL ファミリーの分子系統樹
 推定ORFのアミノ酸配列について分子系統樹を作製した。

3-2 実験方法

3-2-1 *OsYSL* のノーザン解析

鉄欠乏による *OsYSL* の発現の変化を調べた。2-2-10 と同様の方法にて栽培を行い、第5葉が展開したときに鉄欠乏処理を開始し、10日間鉄を除いた水耕液で栽培を行った。鉄十分条件のイネは、それまでと同じ濃度の鉄を加えた水耕液で栽培した。トータル RNA の抽出および、ノーザン解析は 2-2-1 と同様の方法で行った。以下のプライマーを用いて、各 *OsYSL* に特異的なプローブを作製した。イネの鉄欠乏根から作製した cDNA を鋳型として用いた。

OsYSL2 Forward 5'-TCTGCTGGCTTCTTTGCATTTTCTG-3'

Reverse 5'-ACCATGTCGAACTCAGCATCCAGGA-3'

OsYSL6 Forward 5'-ATCTCAACAGCAACTGTGCCAATGA-3'

Reverse 5'-TCCAAATAAACAACGGATTTTGC GC-3'

OsYSL13 Forward 5'-GCCGTCTTCCGGAGCATAGCGATAC-3'

Reverse 5'-TCTTCATCAGAATCGTTGTTGCAAC-3'

OsYSL14 Forward 5'-AGCAATATTGGCACAAGCGGCACCG-3'

Reverse 5'-AGATCAATTGATCACGATGGCACGA-3'

OsYSL15 Forward 5'-GCGTTCGCCGTGCTCACGAACGTGG-3'

Reverse 5'-ATCCTCCACCCATGAAATTAACAC-3'

OsYSL16 Forward 5'-ACCGACATGAACATGGGGTACAAC-3'

Reverse 5'-TCTATACGTCTGCATTGACGCTGTA-3'

3-2-2 *OsYSL15*-GFP 融合タンパク質による細胞内局在の解析

OsYSL15-GFP 融合タンパク質を発現させるために用いたベクターは、丹羽康夫博士（静岡県立大学）より提供されたベクター（CaMV 35S-sGFP(S65T)-NOS3'）に、インビトロジェン社の Gateway System を導入したものである。まず、*NcoI* サイトと *SalI* サイトに以下のオリゴリンカーを導入した。用いたリンカー配列は、以下の通りである。
5'-TCGAGATATCGGTACCAGATCTGAGCTCGAGGTCGA

5'-CTAGTCGACCTCGAGCTCAGATCTGGTACCGATATC

導入された *EcoRV* サイトで切断し、ここに三つの遺伝子断片 (*aatR1*, クロラムフェニコール抵抗性遺伝子, *ccdB* 配列, *aatR2*) を持つフラグメントを導入した。これを pDEST35S-sGFP と名付けた。

これに, *OsYSL15* の ORF 部分を導入したベクターを作製した。*OsYSL15* 遺伝子の全長を, イネの鉄欠乏根から作製した cDNA を鋳型として, 以下のプライマーを用いて増幅した。

OsYSL15 GFP.F : 5'- CACCATGGAGCACGCCGACGCGGACCGCA-3'

OsYSL15 GFP.R : 5'- GCTTCCAGGCGTAAACTTCATGCAG-3'

増幅した *OsYSL15* 遺伝子断片を, pENTR/D-TOPO (インビトロジェン) にサブクローニングした。このベクターを pENTR-*OsYSL15* と名付けた。続いて, pENTR-*OsYSL15* を LR recombination reaction (インビトロジェン)を用いて, pDEST35S-sGFP に導入した。

タマネギの表皮細胞への遺伝子の導入, および蛍光顕微鏡を用いた観察は Mizuno et al. (2003) の方法に従った。

3-2-3 プロモーター—GUS 実験による *OsYSL15* の組織局在の解析

コンストラクトの作製, イネの形質転換は 2-2-8, 2-2-9 と同様に行った。*OsYSL15* の翻訳開始点を起点として, 上流 1.5 kb 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。

OsYSL15p F 5' GAGAGAAAGCTTGTATAGCATTTGACTCCGCGGACTT3'

OsYSL15p R 5' GAGAGATCTAGAGGCGGCGGCGGCGGCGTTCGATCTCG3'

形質転換イネの GUS 活性の組織化学的観察は, 2-2-11 と同様に行った。

3-2-4 アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた *OsYSL* の輸送活性の測定

OsYSL15 を卵母細胞で発現させるために, cRNA (complementary RNA) を *in vitro*

で合成した。以下のプライマーを用いて *OsYSL15* の全長をイネの鉄欠乏根から作製した cDNA を鋳型として PCR により増幅した。

OsYSL15 F 5'-TCGTGGGAATTCTCGAGCAGCTAAGCGAGATCGACGC-3'

OsYSL15 R 5'-TTTATTTCTAGAATCCTCCACCCATGAAATTAAACAC-3'

増幅された PCR 断片を, *EcoRI* と *XbaI* で消化し pBluescriptII(SK-) に導入し, 目的のコンストラクトを得た。

OsYSL15 の cRNA の合成には, MEGAscript SP6 kit (Ambion, Austin, TX, USA) を用いた。方法は, 付属する説明書に従った。

刺激溶液は, 「金属—ニコチアナミン」または「金属—デオキシムギネ酸」を用いた。金属とニコチアナミンまたはデオキシムギネ酸を量りとり, イオン交換水に溶解した。次に, 最終濃度が 5 mM となるように HEPES バッファーを加え, 2 N NaOH で pH を調整した。得られた刺激溶液を 4°C の暗所で一晩静置した。沈殿が生じた場合は, 遠心して上清を使用した。

OsYSL15 の cRNA 10 ng を, Igarashi et al. (2000) の方法により調製した卵母細胞に注入し, 48 時間インキュベートした。卵母細胞を 1 ml の 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 5 mM HEPES(NaOH) 溶液 (pH7.5) に置き, 固定電圧法により電流を測定した。クランプ電圧は -60 mV \sim -120 mV の範囲で固定し, 作製した刺激溶液 (10 μ l) を加えた時の内向き電流を測定した。

1 つのアッセイについて, *OsYSL15* を発現させた卵母細胞を 6 つと, *OsYSL15* を発現させない卵母細胞 (ネガティブコントロール) の 6 つを, 独立に用いて測定を行った。

3-3 結果

3-3-1 鉄欠乏条件による *OsYSL* の発現様式

イネを鉄十分条件と、鉄欠乏条件で水耕栽培し、*OsYSL* 遺伝子の発現様式をノーザン解析によって明らかにした。ノーザン解析で転写産物が検出できたものについてのみ、図 3.2 に示す。*OsYSL15* と *OsYSL16* は根特異的に発現していた。*OsYSL15* は鉄十分条件では根においてもほとんど発現していなかったが、鉄欠乏処理によって発現が強く誘導された。一方、*OsYSL16* は根において鉄十分条件で微弱に発現し、鉄欠乏条件で僅かに発現が誘導された。*OsYSL2* は鉄欠乏条件の葉でのみ、発現が観察された。*OsYSL6* は葉、根のどちらでも鉄十分条件で発現していて、鉄欠乏処理により発現が抑制された。*OsYSL13* は葉でも根でも鉄十分条件で発現していた。葉における発現は鉄欠乏処理によって抑制されたが、根における発現に変化はなかった。一方、*OsYSL14* は葉、根のどちらでも鉄十分条件で発現しており、鉄欠乏処理による発現の変化は観察されなかった。その他の遺伝子に関してはこの栽培条件では発現は観察されなかった。他の金属による制御、あるいは他の生育ステージにおける発現が考えられる。

3-3-2 *OsYSL15* の構造

OsYSL15 は推定 ORF が 673 アミノ酸残基からなっていた。HMMTOP プログラム (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>; Tusnady and Simon, 1998) で膜貫通領域を推定したところ、16 個の膜貫通領域を持つと推定された。*OsYSL15* のアミノ酸配列を図 3.3 に示し、推定される膜貫通領域を下線で示した。

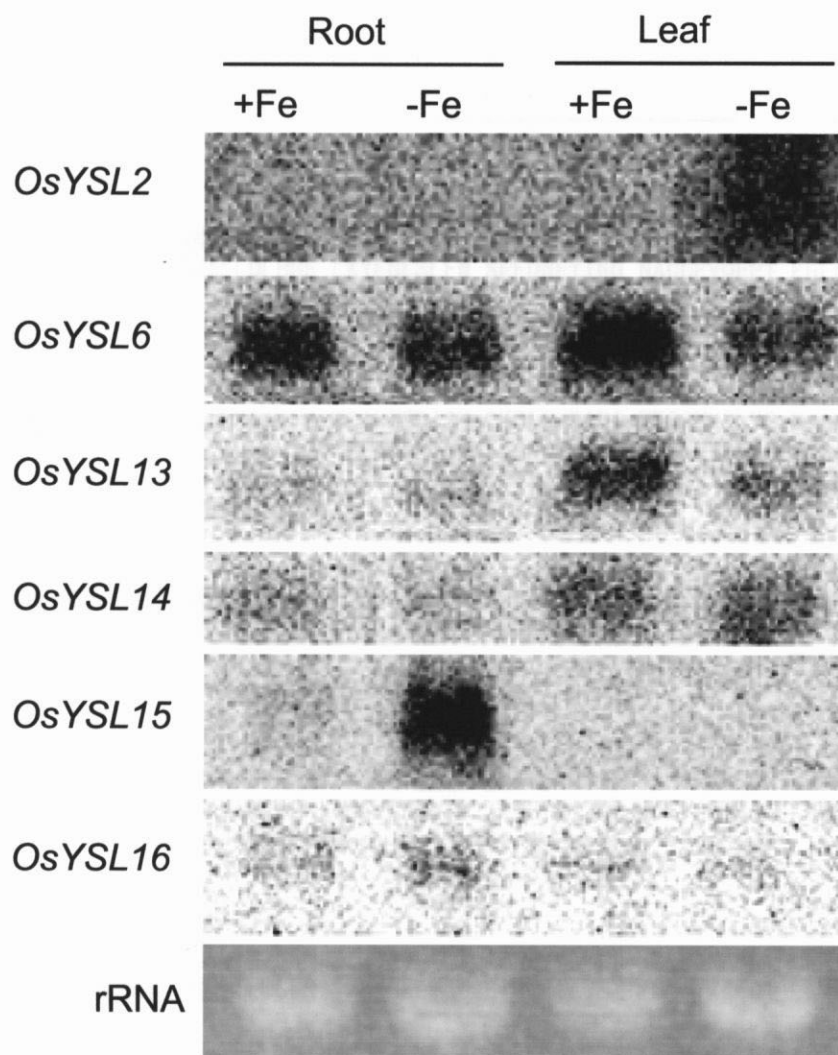


図3.2 OsYSL の鉄欠乏による発現の変化

+Feは鉄十分条件、-Feは鉄欠乏条件で栽培したイネを示す。

ZmYS1	MDLARRGGAA	GADDEGEIER	HEPAPEDMES	DPAAAREKEL	ELERVQSWRE	QVTLRGVVAA	LLIGFMYSVI	
OsYSL15	MEHADADRTR	VAPEIGSLH-	----DEDAEA	DPARAR----	EMERLQPWRE	QVTARGVVAA	ALIGFVFSVI	
						TM1		
ZmYS1	VMKIALTTGL	VPTLNVSAAL	MAFLALRGWT	RVLERLGVVAH	RPFTRQENCV	IETCAVACYT	IAFGGGFGST	
OsYSL15	VMKIALTTGL	VPTLNISAAL	LAFALALRGWT	RALERLGFSP	RPFTRQENTV	VQTCAVACYT	IAFGGGFGST	
						TM2	TM3	
ZmYS1	LLGLDKKTYE	LAGASPNV	GSYKDPGFGW	MAGFVAAISF	AGLLSLIPLR	KVLVIDYKLT	YPSGTATAVL	
OsYSL15	LLGLNKRTYE	LAGNSPGNV	GSYKEPGIGW	MVGLLLAISF	AGNLSLIPLR	KALVVNYKLT	YPSGTATAVL	
						TM4	TM5	
ZmYS1	INGFHTKQGD	KNARMQVRGF	LKYFGLSFVW	SFFQWFYTG	EVCQFVQFPT	FGLKAWKQTF	FFDFSLTYVG	
OsYSL15	INGFHTAQGD	KNAKLQLHGF	LKYFGLSLFW	SFFQWFYTG	NACQFVQFPT	FGLKAWKQSF	FFDFSLTYVG	
						TM6		
ZmYS1	AGMICSHLVN	ISTLLGAILS	WGILWPLISK	QKGEWYPANI	PSSMKSLYG	YKAFLCIALI	MGDGYHFFK	
OsYSL15	AGMICSHLVN	LSTLLGAVIS	WGIMWPLISK	HKGDWYPANI	PSSMKSLYG	YKFLCIALI	MGDGLYHFVK	
						TM7	TM8	
ZmYS1	VFGVTVKSLH	QRLSRKRATN	RVANGGDEMA	ALDDLQRDEI	FSDGSFPAWA	AYAGYAALTV	VSAVIIPHMF	
OsYSL15	VTGVTAKSLH	NRFNRKSVSN	TASEEGD-MV	SLDDLQRDEV	FKRGTVPSSM	AYSQYFLLSI	IAVITIPIMF	
						TM9		
ZmYS1	RQVKWYYVIV	AYVLAPLLGF	ANSYGTGLTD	INMAYNYGKI	ALFIFAAWAG	RDNGVIAGLA	GGTLVKQLVM	
OsYSL15	RQVKWYYVVI	AYALGPVLGF	ANSYGAGLTD	INMGYNYGKI	ALFVFAAWAG	KDNGVIAGLV	VGTLVKQLVL	
						TM10	TM11	TM12
ZmYS1	ASADLMHDFK	TGHLTMTSPR	SLLVAQFIGT	AMGCVVAPLT	FLFYNAFDI	GNPTGYWKAP	YGLIYRNMAI	
OsYSL15	VSADLMHDLK	TGHLTLTSPR	SMLVGELIGT	GIGCFIAPLT	FMLFYRAFDI	GNPDGYWKAP	YALIYRNMAI	
						TM13		
ZmYS1	LGVEGFSVLP	RHCLALSAGF	FAFAVFSVA	RDVLPKRYAR	FVPLPMAMAV	PFLVGGSFAT	DMCVGSLAVF	
OsYSL15	LGIEGISAALP	KHCLSLSVGF	FAFAVLTNVA	RDALPARYKK	LVPLPTAMAV	PFLVGASFAI	DMCVGSLVLF	
						TM14	TM15	
ZmYS1	VWEKVNRKEA	VFMVPAVASG	LICGDGIWTF	PSSILALAKI	KPPICMKFTP	GS.....		
OsYSL15	AWNKMNKKEA	AFMVPAVASG	LMCGDGIWTF	PSSILALAKI	KPPICMKFTP	GS.....		
						TM16		

図3.3 OsYSL15 とトウモロコシの ZmYS1 とのアミノ酸配列の比較

TM：OsYSL15の予想される膜貫通領域。

膜貫通領域の予測には、HMMTOPプログラムを用いた (Tusnady and Simon, 1998)。

3-3-3 OsYSL15 の細胞内局在

OsYSL15 と GFP との融合タンパク質を、パーティクルボンバートメントによってタマネギの表皮細胞に導入して一過的に発現させ、細胞内局在解析を行った。OsYSL15-GFP 融合タンパク質は、細胞膜に局在した (図 3.4 A)。一方、GFP のみを一過的に発現させると、細胞質と核に局在した (図 3.4 B)。これらの結果と、OsYSL15 が膜貫通領域を持つことと合わせると、OsYSL15 は細胞膜において機能していると考えられる。

3-3-4 OsYSL15 の発現の組織局在

OsYSL15 の発現の組織局在を、プロモーター—GUS 実験で解析した。発現は鉄十分根の中心柱の一部で観察された (図 3.5 A)。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、篩部伴細胞において特に強い発現がみられた (図 3.5 B)。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 OsYSL15 の発現が観察された (図 3.5 C) 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、OsYSL15 の発現は、表皮細胞、外皮細胞、皮層細胞、中心柱の一部の組織で観察された (図 3.5 D)。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 3.5 E)。縦断切片を作製して観察すると、OsYSL15 の発現は、分裂帯から伸長帯の外皮細胞で発現していた (図 3.5 F)。また、一部の中心柱でも発現が観察された (図 3.5 F)。

鉄十分条件の葉では、篩部伴細胞と、葉肉細胞の一部、維管束鞘細胞で発現が観察された (図 3.6 A)。鉄欠乏条件の最新葉でも、篩部伴細胞と、葉肉細胞の一部、維管束鞘細胞で発現が観察された。後生導管と原生導管の周囲で発現が観察される場合があった (図 3.6 B)。鉄欠乏条件の最大展開葉では、鉄欠乏条件の最新葉の発現様式と同様であった (データは示さない)。

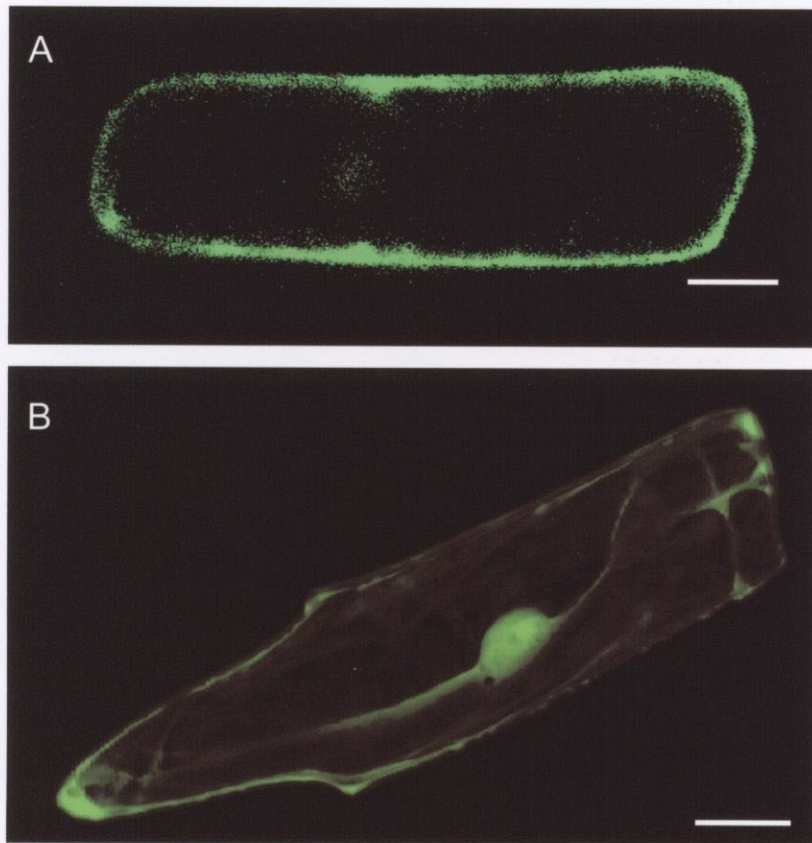


図3.4 OsYSL15-GFP タンパク質のタマネギ表皮細胞における細胞内局在

35S プロモーターによって OsYSL15-GFP 融合タンパク質を一過的に発現しているタマネギの表皮細胞を共焦点顕微鏡で観察し、三次元構築した像。

A : OsYSL15-GFP を発現している細胞, B : GFP のみ。

スケールバー : 50 μm (A, B) 。

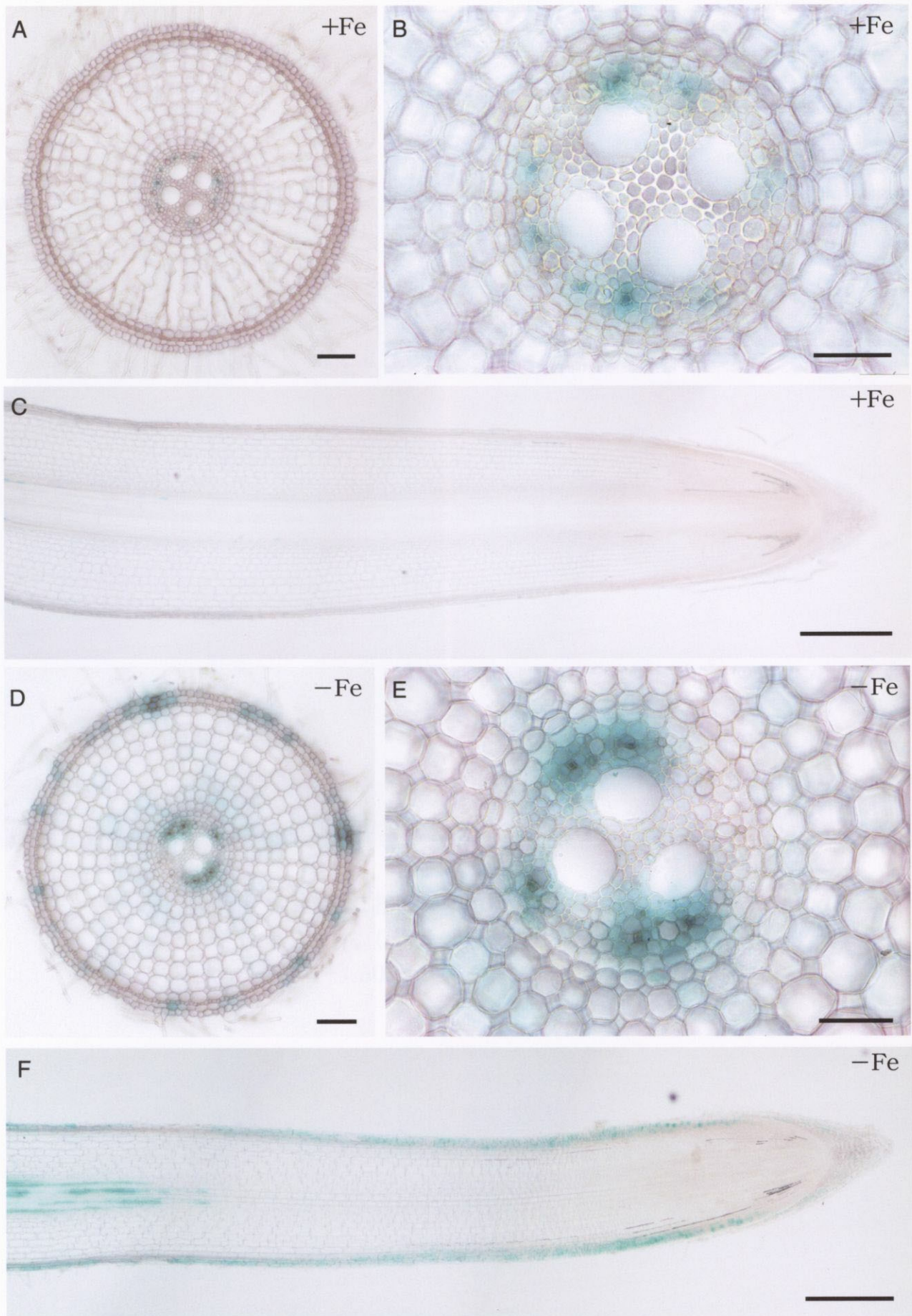


図3.5 根における *OsYSL15* の発現様式

(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)。

3-3-6 顕微鏡を用いた OsYSL15 の発現様式の可視化

OsYSL15 の発現様式を可視化するために、OsYSL15 の発現を誘導する Fe 欠乏条件下で栽培した植物の地上部を採取し、OsYSL15 の発現を可視化した。OsYSL15 の発現は、葉の表皮細胞、気孔の副細胞、および葉脈の細胞に局所的に観察された。また、葉脈の細胞に OsYSL15 の発現が観察されたことは、鉄欠乏条件下で栽培した植物の地上部の鉄代謝に関与していることを示唆している。

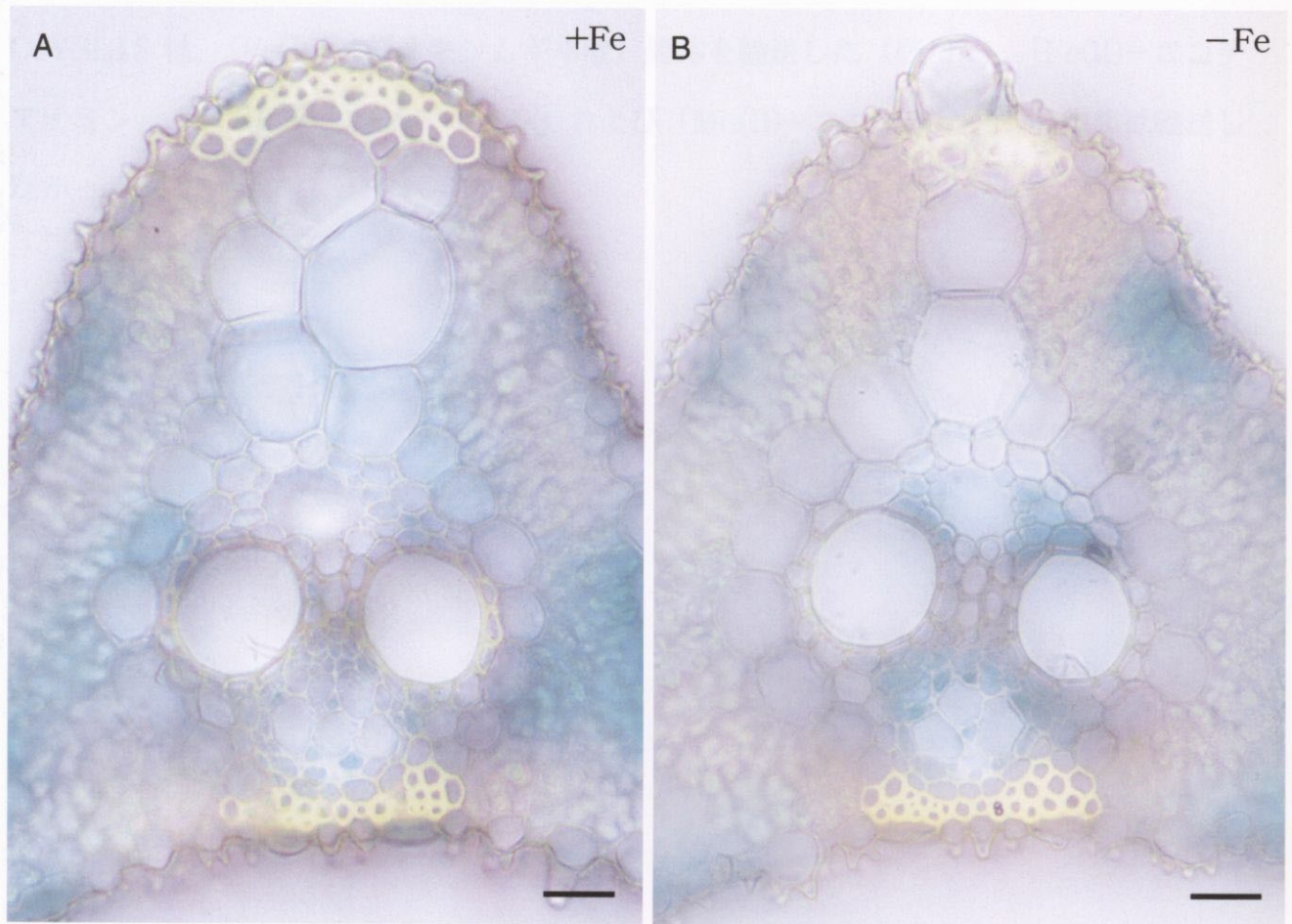


図3.6 地上部における *OsYSL15* の発現様式
(A) 鉄十分条件、(B) 鉄欠乏条件の最新葉。
スケールバー：50 μm (A, B)。

3-3-5 卵母細胞を用いた OsYSL15 の輸送物質の同定

アフリカツメガエルの卵母細胞に OsYSL15 を発現させ、クランプ電圧をかけて物質を与えたときの卵母細胞に流れる内向電流を測定することにより、輸送活性を調べた。OsYSL15 は、「Fe(III)-デオキシムギネ酸」錯体を輸送した (図 3.7)。「Fe(II)-ニコチアミン」、「Fe(III)-ニコチアミン」および「Mn(II)-ニコチアミン」錯体は輸送しなかった。

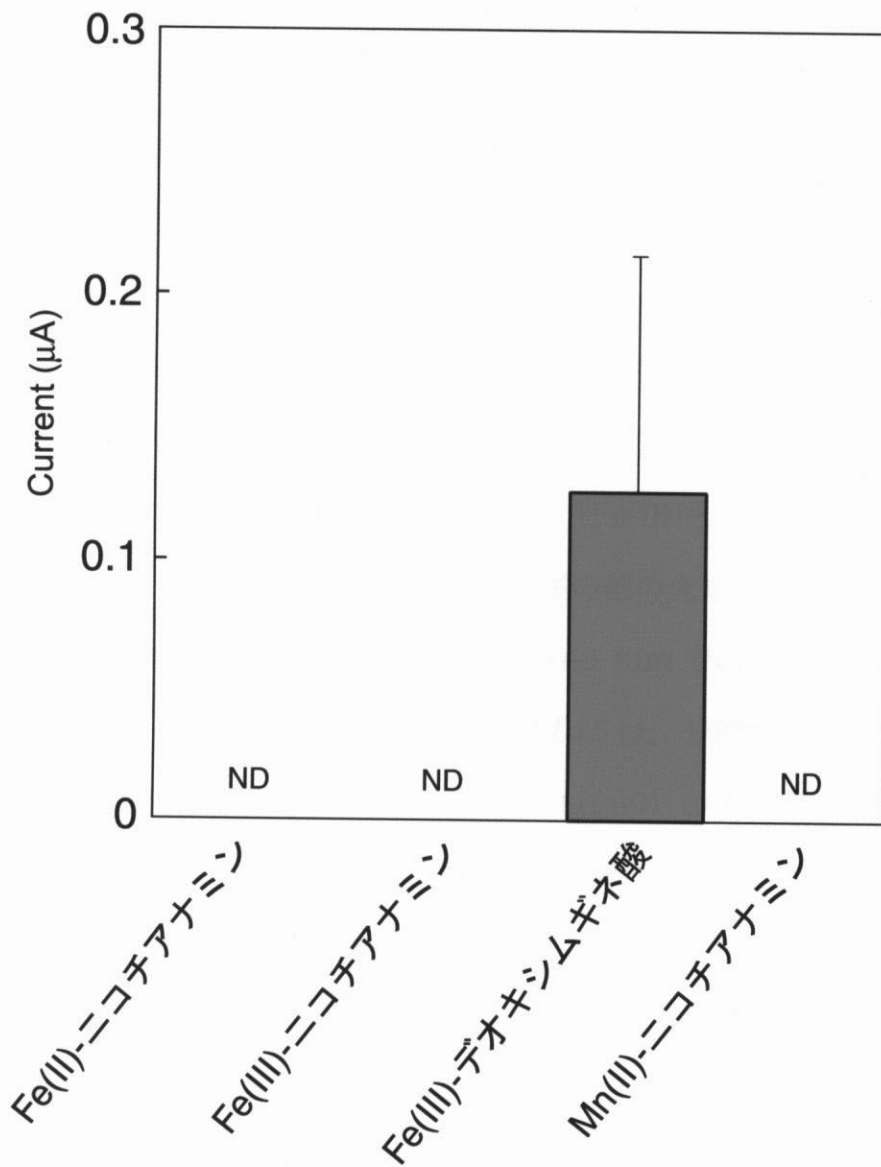


図3.7 OsYSL15 の輸送活性の測定
 バーは平均値±SD を示す。ND, 検出されず。

3-4 考察

3-4-1 *OsYSL15* による鉄の輸送について

アフリカツメガエルの酵母細胞を用いた輸送活性の測定により、*OsYSL15* は「Fe(III)—デオキシムギネ酸」錯体を輸送する事が明らかになった (図 3.7)。さらに、プロモーター—GUS 実験より、鉄欠乏根の表皮細胞と外皮細胞で強く発現する事が明らかになった (図 3.5 D, F)。これらのことから、*OsYSL15* は鉄欠乏条件において、分泌されたデオキシムギネ酸によって可溶化された鉄を根圏から吸収するための、主要なトランスポーターであると考えられる。

「Fe(III)—デオキシムギネ酸」錯体が吸収される部位は、鉄欠乏根の分裂域と伸長域の外皮細胞と表皮細胞とが考えられる。Mihashi et al. (1989) は、multi-compartment transport box を用いて、オオムギの根における「Fe(III)—デオキシムギネ酸」錯体の吸収の部位を調べた。この実験によると、オオムギの根の先端では、「Fe(III)—デオキシムギネ酸」錯体の吸収が少なく、根の先端から 5~40 mm での吸収が最も多かった。本論文の、プロモーター—GUS 実験によれば *OsYSL15* は、分裂域と伸長域の外皮細胞と表皮細胞で発現していることから、Mihashi et al. (1989) の実験と非常によく一致している。Yoshida et al. (2004) は、ムギネ酸類の鉄溶解力を利用して、オオムギの鉄欠乏根の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起こることが示された。

根は、根体と根冠に分けることができる。根冠は、根体の先端を帽子のように覆い保護している。デオキシムギネ酸生合成に関わる遺伝子の発現は、根体の生長点で強いことから (第2章)、根体の先端でデオキシムギネ酸生合成も盛んであると考えられる。従って、ムギネ酸類の根圏への分泌は、根体の先端で最も盛んであると考えている。この付近で、*OsYSL15* が発現していることは、ムギネ酸類の分泌と、「Fe(III)—デオキシムギネ酸」の吸収がほぼ同じ部位で行われている可能性が高いことを示している。今後、未同定のムギネ酸類分泌トランスポーターの単離と組織局在の解析によって、さらに詳細に分子レベルでの解明が進むと期待される。

*OsYSL15*は鉄欠乏根の篩部伴細胞で強く発現していることから、「Fe(III)-デオキシムギネ酸」錯体の篩管内輸送にも関与していると考えられる。植物が吸収した無機元素は、通常導管を通り地上部へ輸送されると考えられている。しかし、鉄欠乏条件では、地上部の生長点部位が鉄を早急に必要とするために、根から直接篩管を経由して地上部へ輸送する可能性がある。生長点などの新しい組織では導管は発達しておらず篩管が主な輸送経路となることが考えられる。これらの仮説を裏付ける報告がいくつかある。デオキシムギネ酸生合成に関与する遺伝子群は、鉄欠乏根の篩部伴細胞で強く発現している（第2章）。Mori et al. (1991)は篩管中にデオキシムギネ酸が存在することを報告している。さらに、Tsukamoto et al. (未発表)は、根から「Fe(III)-デオキシムギネ酸」錯体として投与した鉄は、鉄欠乏オオムギの最新葉へは篩管を通じて輸送されることを、Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS) 法を用いて巧妙に証明している。

3-4-2 *OsYSL* の多様な発現様式

*OsYSL6*と*OsYSL13*は鉄十分条件の葉で発現し、鉄欠乏処理によって発現が抑制された（図 3.2）。さらに、これらの遺伝子の発現様式は*OsNAS3*の発現様式（図 2.2）と類似していることから、*OsNAS3*と協同的に働いている可能性も考えられる。同様にシロイヌナズナの*AtYSL*のうちの一つは鉄十分条件の葉で発現し、鉄欠乏処理によって発現が抑制される（Jean et al., 2002）。この遺伝子は鉄過剰処理により葉での発現が誘導され、この遺伝子を破壊した変異株は過剰の鉄に感受性を示す（Jean et al., 2002）。

*OsYSL14*は葉、根のどちらでも発現しており、鉄欠乏処理による発現の変化は見られなかった（図 3.2）。ニコチアナミンは鉄だけでなく、マンガン、亜鉛、コバルト、ニッケル、銅などの遷移二価金属をキレートする（Benes et al., 1983）。従って、*OsYSL14*は鉄以外の金属とニコチアナミンとの錯体を輸送している可能性があり、鉄以外の金属欠乏処理をしたイネで発現が誘導されているかもしれない。

上記以外の12個の*OsYSL*の発現は観察されなかった（データは示さない）。これらの遺伝子は他の金属欠乏ストレスや、過剰ストレス、または生育段階によって発現が制御さ

れていて、今回の栽培条件では発現していなかったのかもしれない。今回発現が確認できなかった *OsYSL4*, *OsYSL8*, *OsYSL10*, *OsYSL12* はイネゲノムプロジェクトによる完全長 cDNA ライブラリー中に見出された。これらの4種類の cDNA クローンは花から抽出した mRNA をもとに作った cDNA ライブラリー由来であった (菊池尚志, 私信)。これらの遺伝子は生殖生長段階において特異的に発現しているのかもしれない。農業生物資源研究所遺伝子機能研究チームによって作製されている, *Tos17* によるイネの遺伝子破壊系統の中に *OsYSL12* が破壊された変異株 (NE7024) が見出された。この変異株は半分が不稔形質を示していた (宮尾 安藝雄, 私信)。さらに, 生殖生長期において, *OsNAS1* と *OsNAS3* 遺伝子が発現していることが報告されている (Takahashi et al., 2004)。したがって, 18 個の *OsYSL* のうちのいくつかは, 生殖生長段階で「金属-ニコチアミン」錯体の輸送に関与している可能性は非常に高い。

第4章 「金属-ニコチアナミン」錯体を輸送する OsYSL2 の解析

Plant Journal (2004) 39: 415-424

4-1 要約

第3章で見出した18個のOsYSLファミリーのうち、鉄十分条件、鉄欠乏条件の根で発現が観察されず、鉄欠乏条件の地上部で発現が強く誘導されるOsYSL2 (図3.2)に着目した。OsYSL2は674アミノ酸残基からなり、14個の推定膜貫通領域を持っていた。OsYSL2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、細胞膜に局在した。OsYSL2のプロモーター-GUS実験を行うと、鉄十分条件の根において篩部にOsYSL2の弱い発現が観察された。鉄十分条件の葉でも、維管束の篩部にOsYSL2は発現した。鉄欠乏条件の葉では、OsYSL2は全ての細胞で発現しており、特に篩部伴細胞で強い発現が観察された。また、OsYSL2は生殖器官においても発現した。OsYSL2の輸送する物質を調べるために、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いて、電気生理学的な実験を行った。OsYSL2は「Fe(II)-ニコチアナミン」錯体と、「Mn(II)-ニコチアナミン」錯体を輸送した。OsYSL2は「金属-ムギネ酸類」錯体を輸送しなかった。これらのことから、OsYSL2はFe(II)、Mn(II)の篩管輸送に関わっていると考えられる。さらに、OsYSL2は種子の登熟過程において発現していることから、Fe(II)とMn(II)を種子へ輸送する重要な役割を担っていると考えられる。

4-2 実験方法

4-2-1 OsYSL2-GFP 融合タンパク質による細胞内局在の解析

3-2-2 と同様の方法で行った。OsYSL2の全長を増幅するために、以下のプライマーを用いた。

5'-CACCATGGAAGCCGCGCTCCCGAGATAG

5'-GCTTCCGGGAGTGAACCTTCATGCAG

4-2-2 プロモーター-GUS 実験による OsYSL2の組織局在の解析

コンストラクトの作製、イネへの遺伝子の導入は2-2-8, 2-2-9と同様に行った。OsYSL2の翻訳開始点を起点として1.5 kb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。

OsYSL2pF 5'-GAGAGAAAGCTTAAAGGGAGTACTTCGCATGTAGAT-3'

OsYSL2pR5'-GAGAGATCTAGAGTGAAAGGTGGCGGCACCAGCTTAG-3'

形質転換イネのGUS活性の組織化学的観察は、2-2-11と同様に行った。

4-2-3 卵母細胞を用いた OsYSL2 の輸送活性の測定

3-2-4と同様の方法で行った。OsYSL2を卵母細胞で発現させるために、cRNAを *in vitro* で合成した。以下のプライマーを用いてOsYSL2の全長をPCRにより増幅した。

OsYSL2 F 5' -GAGAAGGAATTCCTAAGCTGGTGCCGCCACCTTTCAC-3'

OsYSL2 F 5' -CTCACCTCTAGAACCATGTTCGAACTCAGACTCCAGGA-3'

4-3 結果

4-3-1 OsYSL2 の構造

OsYSL2 の推定 ORF は、674 のアミノ酸残基であった。SOSUI プログラム (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>; Hirokawa et al., 1998) で膜貫通領域を推定したところ、14 個の膜貫通領域を持つと推定された。推定されるアミノ酸配列と、推定される膜貫通の構造を図 4.1 に示す。ZmYS1 には N 末端側にグルタミン酸を多く含む配列が保存されている (Curie et al., 2001) が、*OsYSL2* には保存されていなかった。

4-3-2 OsYSL2 の細胞内局在

OsYSL2-GFP 融合タンパク質を、パーティクルボンバートメントによってタマネギの表皮細胞で一過的に発現させた。*OsYSL2*-GFP 融合タンパク質は、細胞膜に局在した (図 4.2 A)。一方、GFP のみを一過的に発現させると、細胞質と核に局在した (図 4.2 B)。

4-3-3 *OsYSL2* の発現の組織局在

OsYSL2 の発現の組織局在を解析するために、*OsYSL2* のプロモーター領域 1.5 kb を *GUS* につないだコンストラクトを作製し、イネに導入した。鉄十分条件の根においては、*OsYSL2* は中心柱の一部、とくに篩部伴細胞において発現していた (図 4.3 A)。鉄欠乏の根においては、篩部伴細胞における発現が誘導されていた (図 4.3 B)。鉄欠乏の根の表皮細胞、外皮細胞、皮層細胞において発現は観察されなかった。

A

ZmYS1	MDLARRGGAAGADDEGEIERHEPAPEDMESDPAAREKELELERVQSWREQVTLRGVVAALLIGFMYSVIVMKIALTTGL
OsYSL2	MEAAAP-----EIERCDAGDVESDHDGAAAAA-----ERVPPWREQVTARGMVAALLIGFVYTVIIMKLALTTGI
	TM1
ZmYS1	VPTLNVAALMAFLALRGWTR----VLERLGVAH----RPFTRQENCVIETCAVACYTAFGGGFGSTLLGLDKKTYEL
OsYSL2	IPTLNVAALLAFLALRGWTRAPALLPGGGAASSSSWRRPFTRQENTVVQTCVAVACYTMFGGGFGSSLLALNRKTYEL
	TM2
	TM3
ZmYS1	AGAS-PANVPGSYKDPGFGWMAGFVAAISFAGLLSLIPLRKVLVIDYKLTYPSTGATAVLINGFHTKQGDKNARMQVRGF
OsYSL2	AGVSTPGNSPGSYKEPGVWMTGFLFAISFVGLLNLLPLRKALIDYKLTYPSTGATAVLINGFHTPQGENSAKKQVRGF
	TM4
	TM5
ZmYS1	LKYFGLSFVWSFFQWFYTGGEVCGFVQFPTFGLKAWKQTFDFDSLTYVGAGMICSHLVNI STL LGAILSWGILWPLISK
OsYSL2	LNCFGISLLWSFFQWFYTGGEVCGFVQFPTFGLKAWKQTFDFDSLTYVGAGMICSHLVNL S ALFGAILSWGIMWPLISI
	TM6
ZmYS1	QKGEWYPANIPESMKSLYGYKA-----FLCIAIMGDGTYHFFKVFVTVKSLHQRLSRKRATNRVANGGDEM
OsYSL2	QKGKWYPGNVPESMSTSLFGYKVRHTIYFLKISFMCVALIMGDGLYHFIKVTGITAKSLHERSNRRHAKKATD---EDT
	TM7
ZmYS1	AALDDLQRDEIFSDGSFPAWAAYAGYAALTVVSAVIPHMFQVKWYYVIVAYVLAPLLGFANSYGTGLTDINMAYNYGK
OsYSL2	FVADMQRDEFFNKDYIPNWLAYAGYALLSIVAVIPI MFQQVKWYYVVAVFLAPVLGFSNAYGTGLTDMNMSYNYGK
	TM8
	TM9
	TM10
ZmYS1	IALFIFAAWAGRDNGV IAGLAGGTLVKQLVMASADLMHDFKTGHLTMTSPRSLLVAQFIGTAMGCVVAPLTFLLFYNAFD
OsYSL2	IALFIFAAWGGRDNGV IAGLVGCGIVKQLVQVSADLMHDFKTGHLTMTSPRSMLVGQAIGTAMGCIAPLTFLLFYKAFD
	TM11
ZmYS1	IGNPTGYWKAPYGLIYRNMAILGVEGFSVLP RHCLALSAGFFAFVFSVARDVLP RKYARFVPLPMAMAVPFLVGGSF A
OsYSL2	IGNPDGYWKAPYALIFRNMAILGVEGFSALPKHCLALSAGFFAFVSVLINLMRDFLP RKYRDYVPLPTAMAVPFLVGANFA
	TM12
	TM13
ZmYS1	IDMCVGLAVFVWEKVNRKEAVFMVPAVASGLICGDGIWTFPSSI LALAKIKPPI CMKFTPGS
OsYSL2	IDMCVGSLLVFAWHKINSKESALLVPAVASGFI CGDGIWMFPSSLLSLAKVKPPI CMKFTPGS
	TM14

B

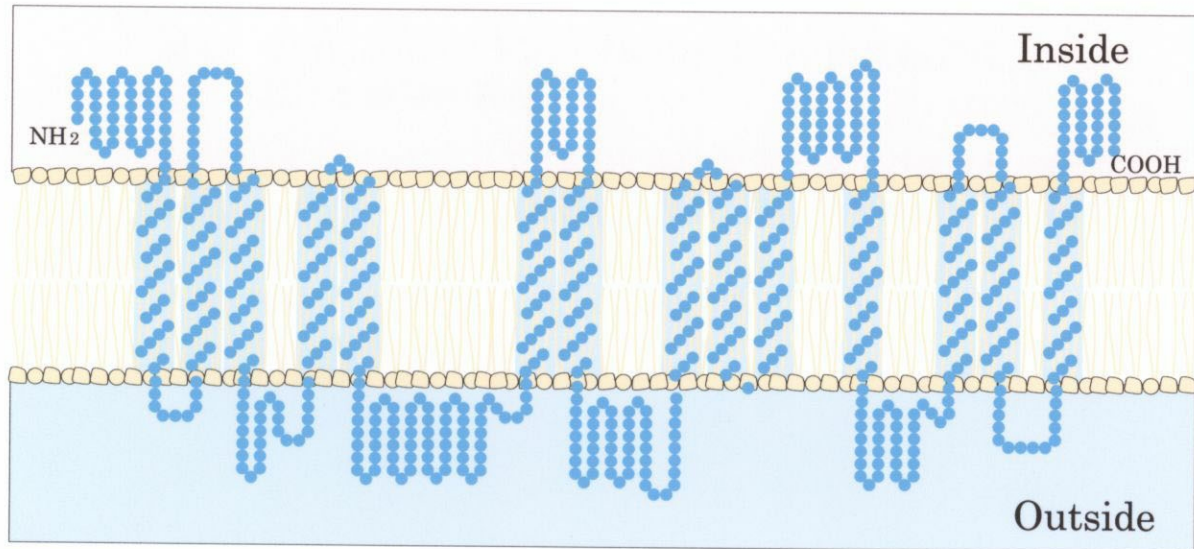


図4.1 OsYSL2 と ZmYS1 とのアミノ酸配列の比較と推定される膜貫通構造

TM: OsYSL2 の予想される膜貫通領域を示した (A)。膜貫通領域の予測には、SOSUI プログラムを用いた。SOSUIによって得られた推定される膜貫通構造 (B)。

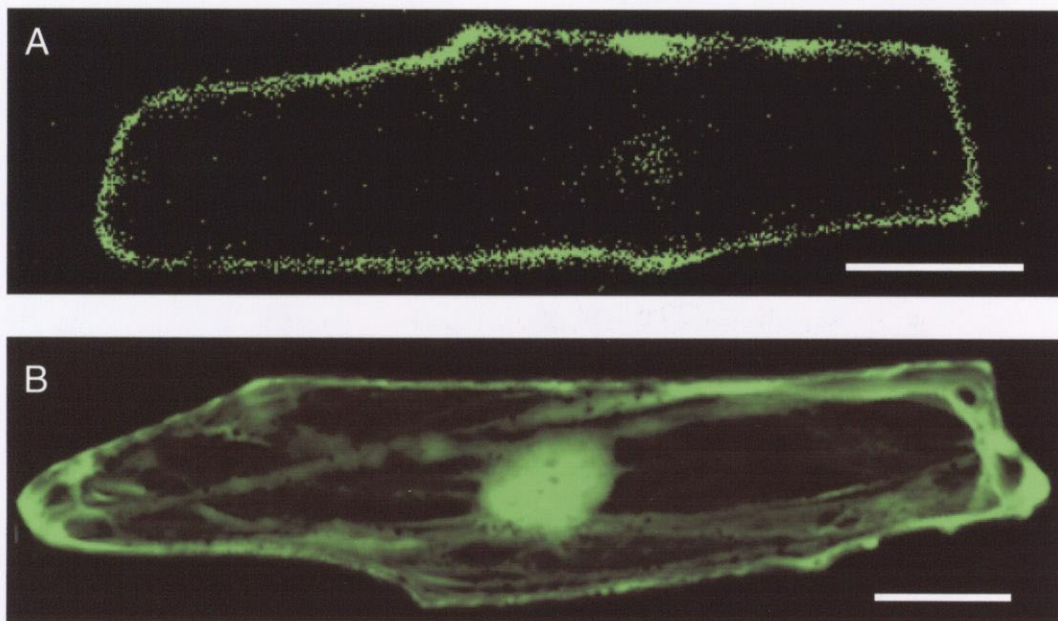


図4.2 OsYSL2-GFP タンパク質のタマネギ表皮細胞における細胞内局在

35S プロモーターによって OsYSL2-GFP 融合タンパク質を一過的に発現しているタマネギの表皮細胞を共焦点顕微鏡で観察し、三次元構築した像。

A: OsYSL2-GFP を発現している細胞, B: GFP のみ。

スケールバー: 50 μm (A, B)。

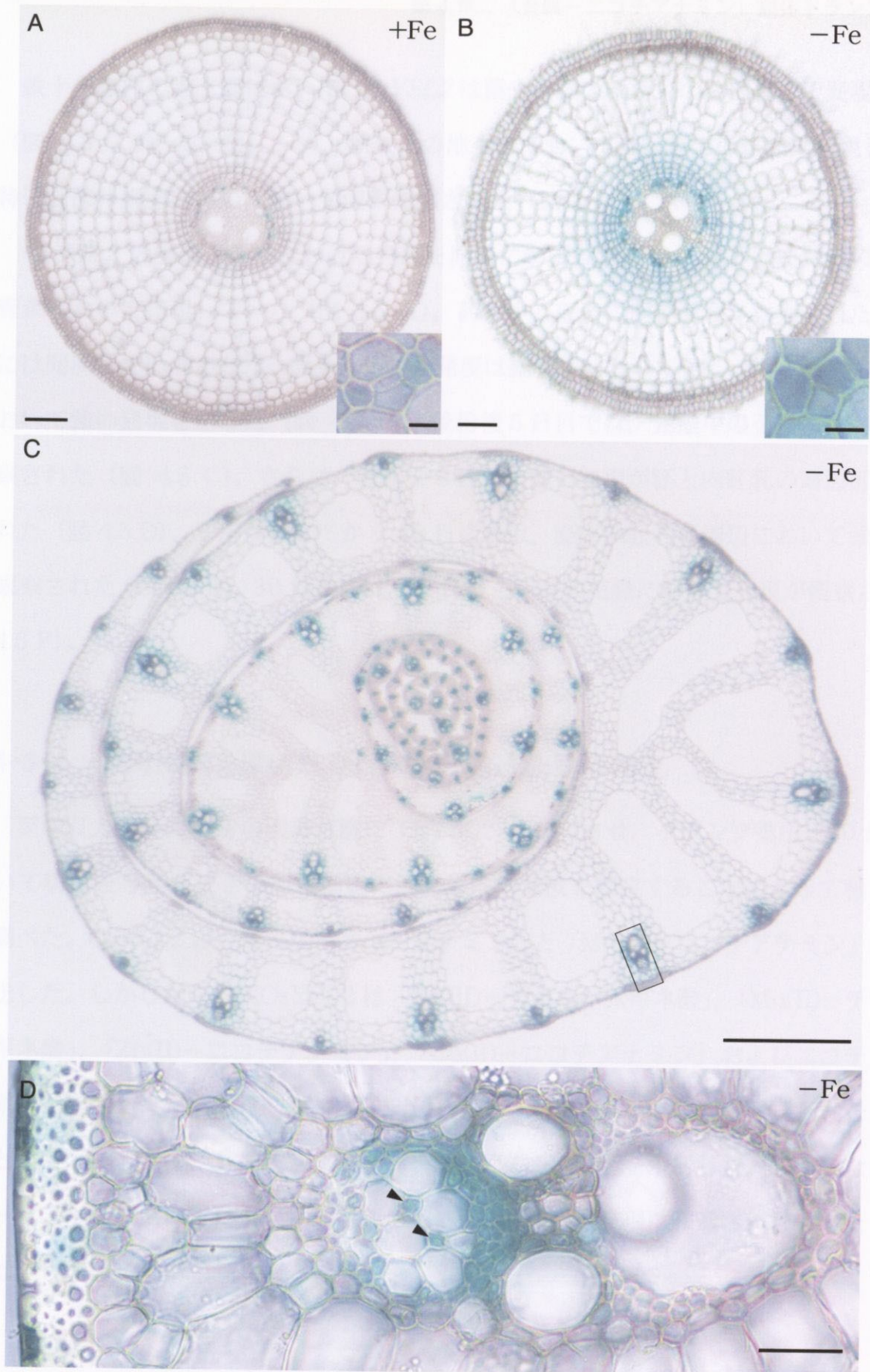


図4.3 *OsYSL2* の発現の根と葉鞘における組織局在

(A) 鉄十分条件の根, (B) 鉄欠乏条件の根。挿入図はそれぞれの中心柱の篩部伴細胞の拡大図。(C) 鉄欠乏葉鞘。(D) 葉鞘の維管束の拡大図。黒三角は篩部伴細胞を示す。
 スケールバー：500 μm (C), 100 μm (A, B), 25 μm (D), 5 μm (A, B 挿入図)。

鉄十分条件の地上部において、*OsYSL2*は葉や葉鞘の維管束の篩部細胞で発現していた（図 4.3 C, D, 4.4 A）。一方、鉄欠乏の地上部においては、全ての組織で発現しており、特に篩部伴細胞において強い発現が観察された（図 4.4 B）。

OsYSL2 の生殖生長期における発現を同様に解析した。*OsYSL2* は開花前の小穂の維管束において発現していた（図 4.5 A）。葯の中心部分に弱い発現が観察されたが、花粉には発現していなかった。開花後には、発現は維管束において強く、特に穀皮の上端部において強い発現を示した（図 4.5 B）。受粉後5日目では、発達中の子房に強い発現が観察された（図 4.5 C）。さらに、受粉後8日目に強い発現が胚と内胚乳の周辺部に観察された（図 4.5 D）。子房が熟してから20日後には、胚と内胚乳の周辺において強い発現が観察された（図 4.5 E）。30日後には、20日後と同様の組織において発現が観察された（図 4.5 F）。

4-3-4 卵母細胞を用いた *OsYSL2* の輸送物質の同定

アフリカツメガエルの卵母細胞に *OsYSL2* を発現させ、クランプ電圧-60 mV において物質を与えたときの卵母細胞に流れる内向電流を測定することによって輸送活性を調べた。*OsYSL2* は、「Fe(II)-ニコチアナミン」と「Mn(II)-ニコチアナミン」錯体を輸送した。しかしながら、*OsYSL2* は「Fe(III)-デオキシムギネ酸」、「Mn(II)-デオキシムギネ酸」、「Zn(II)-ニコチアナミン」、「Cu(II)-ニコチアナミン」およびニコチアナミン単体を輸送しなかった（図 4.6）。「Mn(II)-ニコチアナミン」錯体の輸送活性を示したことから、イネにマンガン欠乏処理を行い *OsYSL2* の発現を解析した。しかしながら、ノーザン解析においては、根、地上部ともに *OsYSL2* の発現は誘導されなかった（データは示さない）。

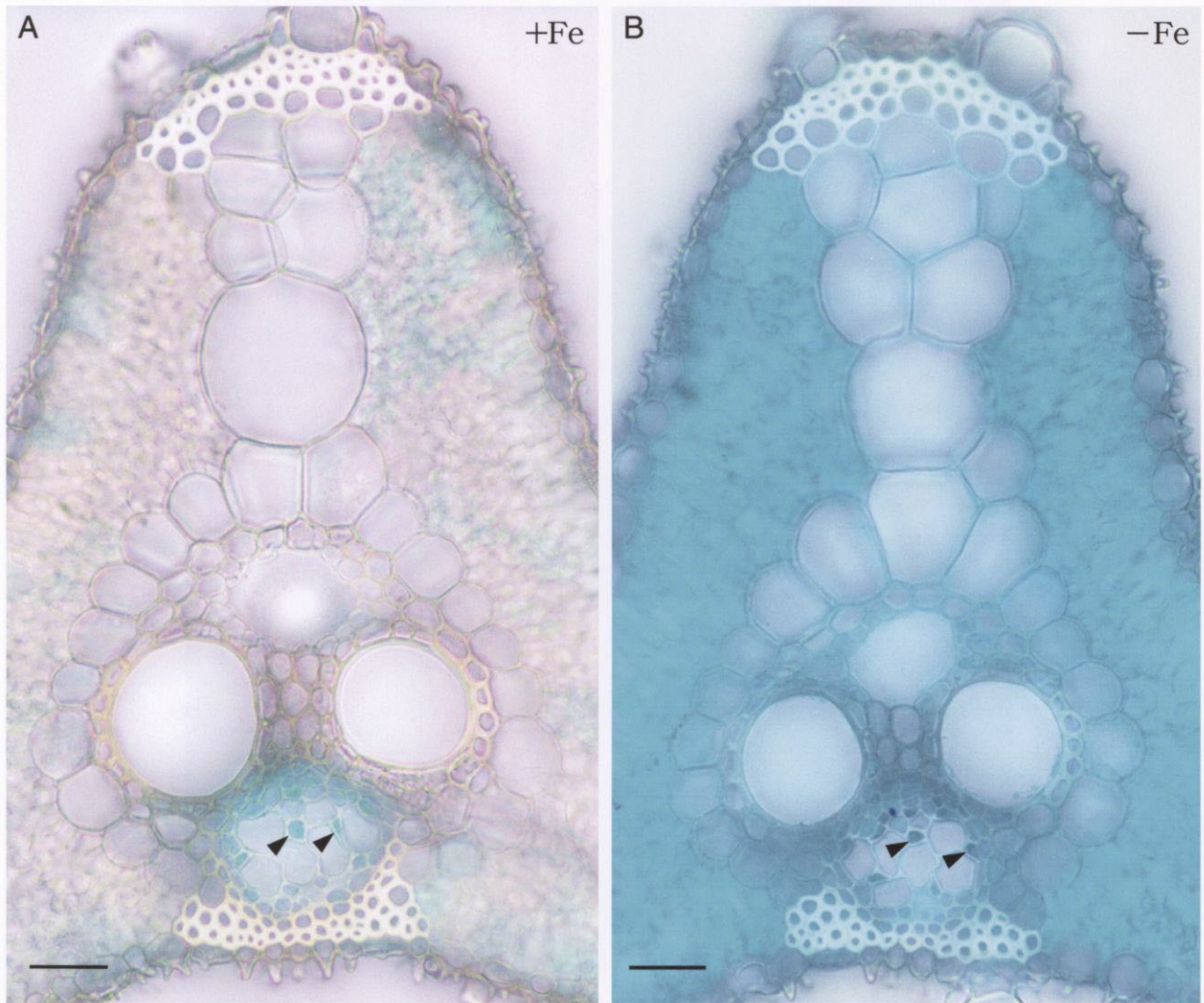


図4.4 OsYSL2 の発現の葉における組織局在
 (A) 鉄十分条件, (B) 鉄欠乏条件。黒三角は篩部伴細胞を示す。
 スケールバー：25 μm (A, B)。

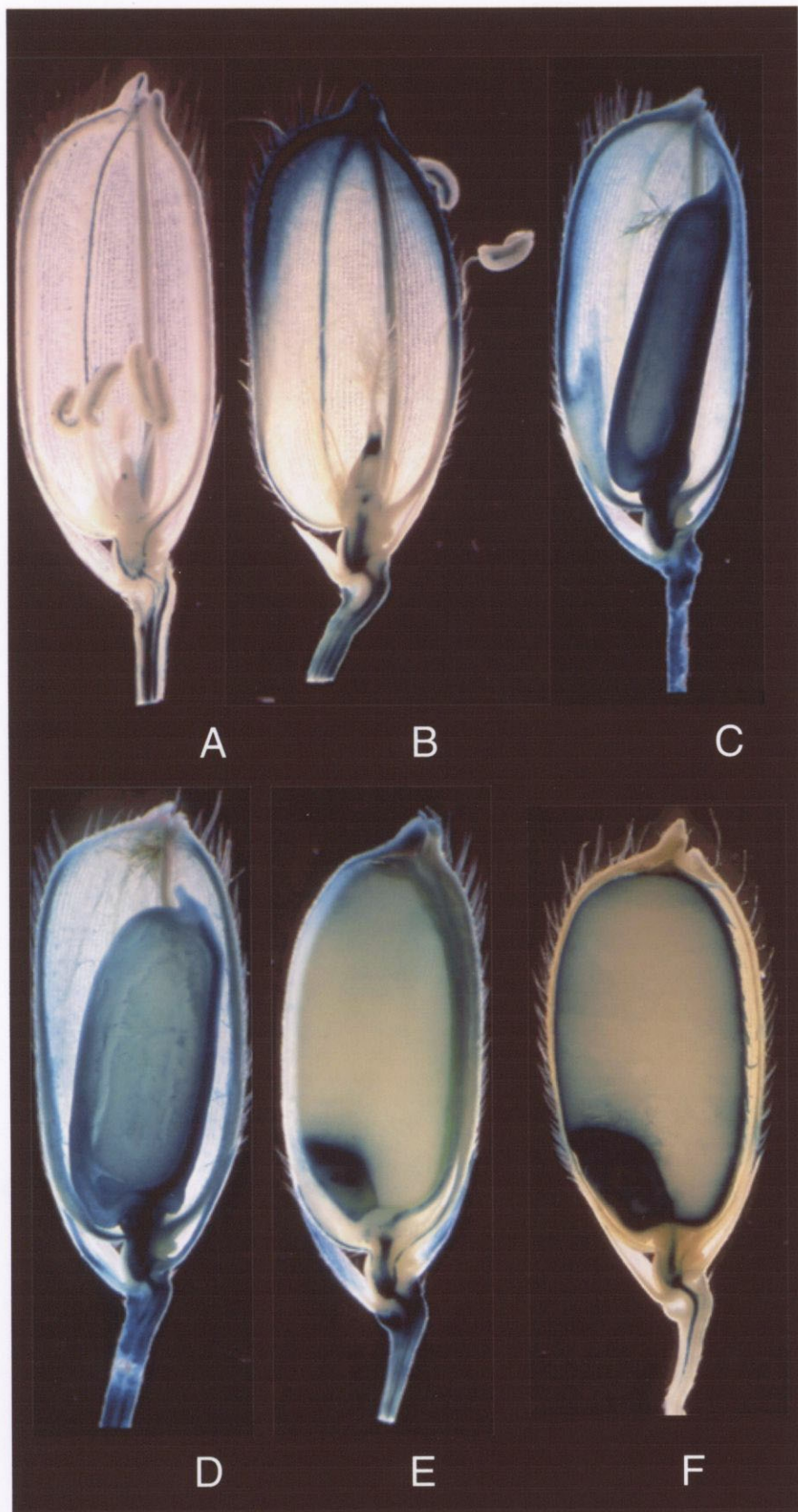


図4.5 OsYSL2 の発現の登熟過程での組織局在
(A) 開花前, (B) 受粉後, (C) 受粉後5日, (D) 受粉後8日, (E) 受粉後20日, (F) 受粉後30日。

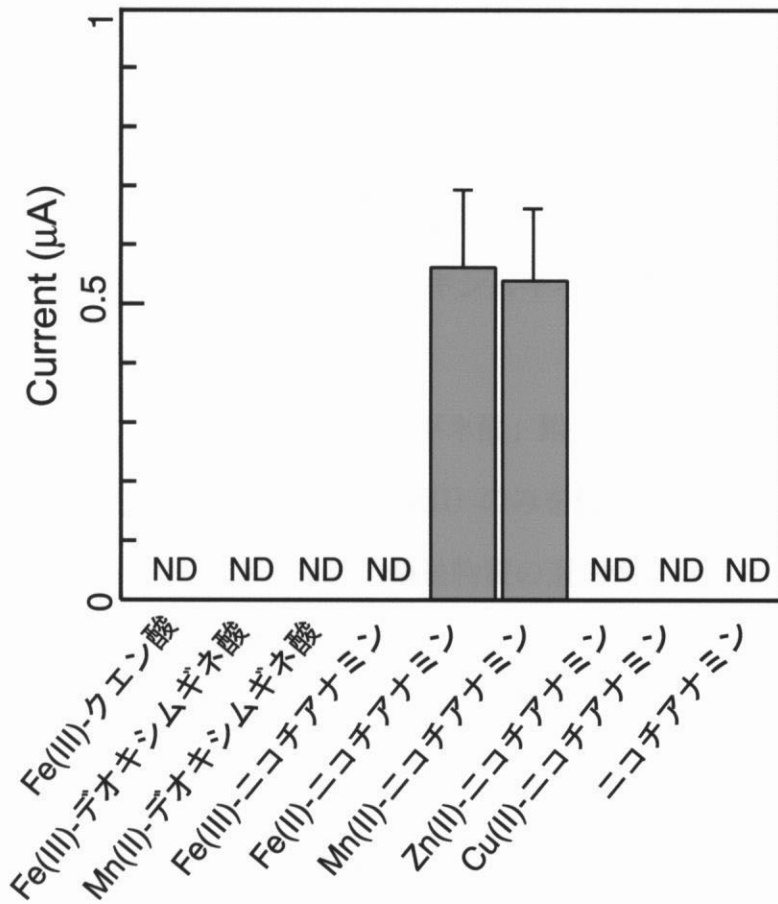


図4.6 OsYSL2 の輸送活性の測定

バーは平均値±SEを示す。ND, 検出されず。

4-4 考察

4-4-1 OsYSL2 の輸送物質特異性について

OsYSL2 の輸送物質特異性は、トウモロコシの ZmYS1 よりも高いことが判明した。ZmYS1 の輸送物質は、Schaaf et al. (2004) によって酵母と卵母細胞を用いて解析が進められている。その報告によると、ZmYS1 は様々な金属錯体を輸送することが明らかになっている。デオキシムギネ酸をキレーターとして、Fe(III), Zn(II), Cu(II), Ni(II), そして低い活性であるが Mn(II), Cd(II) をも輸送した。ニコチアナミンをキレーターとして、Ni(II), Fe(II), Fe(III) を輸送した。輸送活性のを示す電流値は、「金属-デオキシムギネ酸」錯体で刺激したほうが、「金属-ニコチアナミン」錯体より高いと報告されている。したがって、ZmYS1 は「金属-デオキシムギネ酸」錯体に対して、高い輸送親和性を持つと結論づけている。

一方、OsYSL2 は、「金属-デオキシムギネ酸」錯体は輸送しなかった。「金属-ニコチアナミン」錯体のうちでも、Fe(II) と Mn(II) のみを輸送し、Fe(III), Zn(II) や Cu(II) は輸送しなかった (図 4.6)。OsYSL2 の輸送物質の選択性について、Robert. C. Hider 博士に化学的な見地からご助言をいただいた。以下の3つの理由により、輸送物質の選抜が行われていると考えられる。

- 1) Fe(II), Mn(II) は原子半径が似ており、ニコチアナミンとキレートした錯体は八面体構造をとる。
- 2) Fe(II), Mn(II) のニコチアナミン錯体は共に、Net charge (-1) である。
- 3) Cu(II), Zn(II) は四配位であり、ニコチアナミンとの錯体は四面体構造をとる。

さらに、Fe(III) は電子密度が高く (錯体を形成する場合、水分子が配位すると考えられる)、ニコチアナミンとの錯体は Net charge が中性になることが明らかになっている (von Wirén et al., 1999)。以上のことから、OsYSL2 が「Fe(II)-ニコチアナミン」と「Mn(II)-ニコチアナミン」錯体のみを輸送し、他の金属錯体を輸送しないことは推定される金属錯体の構造と性質からも裏付けられた。しかし、詳細な認識機構の解明には、これらの金属錯体と OsYSL タンパク質の結晶構造解析などを行う必要がある。

4-4-2 OsYSL2 は根からの鉄吸収に関与しない

OsYSL2は OsYSL15とは異なり、鉄欠乏の根の表皮細胞や外皮細胞では発現していない (図 4.3 B)。さらに、卵母細胞を用いた物質の輸送活性の測定においても、OsYSL2は「Fe(III)-デオキシムギネ酸」を輸送しなかった。したがって、OsYSL2は鉄欠乏時に根圏から「Fe(III)-デオキシムギネ酸」錯体を吸収するために働くトランスポーターではないと考えられる。

4-4-3 OsYSL2 は鉄のイネ体内での長距離輸送に関与している

一方、OsYSL2は維管束の篩部伴細胞で発現することから、少なくとも鉄とマンガンはニコチアナミンと錯体を形成し、篩管を通じて長距離輸送されていると考えられる。鉄十分条件において、地上部、根とともに植物体内にニコチアナミンの存在が HPLC によって確認されている (Higuchi et al., 2001)。さらに、3つの OsNASは、篩部伴細胞で発現している (第2章) ことより、篩管へのニコチアナミンの供給を積極的に行っていると考えられる。したがって、篩管内ではニコチアナミンが金属に対して過剰に存在し、効率良く鉄とマンガンを輸送していると考えられる。

OsYSL2は鉄欠乏によって、発現が強く誘導されることから、鉄欠乏時に鉄輸送を促進するために重要な役割を果たしていると考えられる。ノーザン解析では、根では発現しておらず、鉄欠乏の地上部で強く誘導される (図 3.2)。プロモーター-GUS 実験からは、鉄欠乏の葉のみならず、鉄欠乏の根の篩部で発現が強くなった (図 4.3 B, 4.4 B)。鉄欠乏により組織局在は変化せず、発現する強度が増していた。鉄欠乏条件では、植物体に含まれるニコチアナミン含量が、鉄十分条件に比較して葉で2~3倍に上昇する (Higuchi et al., 2001)。さらに、Tsukamoto et al. (未発表) は、鉄欠乏オオムギの最新葉へ移行する鉄は、篩管を介して輸送されることを PETIS 法を用いて巧妙に示した。これらのことから、鉄欠乏条件では根より吸収した鉄の一部は、篩管を介して鉄を要求する組織や細胞へと速やかに輸送される可能性がある。この輸送形態として、「Fe(III)-デオキシムギネ酸」

錯体とともに「Fe(II)-ニコチアナミン」錯体が想定され、OsYSL2がこれらの金属錯体の輸送に重要であると考えている。

OsYSL2はOsNAS1、OsNAS2と同じく鉄欠乏の最新葉で葉肉細胞全体に発現し、植物体内の鉄の輸送に関与している可能性がある。OsYSL2の発現は、鉄欠乏の最新葉において強く誘導されていた(図4.4 B)。さらに、OsNAS1とOsNAS2も鉄欠乏の最新葉の全体で、非常に強く発現が誘導されていた(第2章)。鉄欠乏時に、鉄を効率良く利用するために、植物体内ではOsNASがニコチアナミンを多量に生産し、ニコチアナミンで鉄をキレートしOsYSL2により「鉄-ニコチアナミン」錯体として細胞内に輸送しているものと考えられる。また、種子の登熟過程において、OsNAS1、OsNAS3が発現することが報告されている(Takahashi et al., 2004)。登熟過程において、種子へ鉄を輸送するために、OsNASとOsYSL2は協同して働いていると考えられる。