

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

Soil Science and Plant Nutrition (2004) 50: 1133-1140

5-1 要約

シロイヌナズナの鉄栄養異常変異体の原因遺伝子として単離された *FRD3* 遺伝子と相同性の高い遺伝子 (*OsFRDL*) が、イネのゲノム中に4個存在した。これらの *OsFRDL* の配列は、*FRD3* と 39.1~56.7% の相同性を有していた。これら4つの *OsFRDL* 遺伝子のうち、3つ (*OsFRDL1*, *OsFRDL2*, *OsFRDL3*) をイネの鉄欠乏根から作製した cDNA ライブラリーより単離した。ノーザン解析および定量的 RT-PCR により、これらの遺伝子の発現を解析した。*OsFRDL1* は、鉄十分条件および鉄欠乏条件の根および地上部で発現していた。*OsFRDL2* は、鉄十分条件の根、地上部でともに発現していた。鉄欠乏条件では、地上部で発現が減少した。*OsFRDL3* は、鉄十分条件の地上部で発現しており、鉄欠乏処理によって発現が若干誘導された。*OsFRDL1* と GFP との融合タンパク質をタマネギの表皮細胞で発現させると、細胞膜に局在した。*OsFRDL1* のプロモーター-GUS 実験を行うと、鉄十分条件、鉄欠乏条件ともに、長距離輸送に関与する細胞で発現していた。さらに、*OsFRDL1* は生殖過程においても発現していた。

5-2 実験方法

5-2-1 イネゲノムデータベースを利用した *FRD3* ホモログの検索

AtFRD3 と高い相同性をもつイネの遺伝子 (*OsFRDL*) を探するために *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* (cv. Nipponbare) (Goff et al., 2002) のイネゲノムデータベースに対して Blast 検索を行った。検索の結果 *FRD3* に高い相同性をもつ *OsFRDL* が4つ見出された。

5-2-2 cDNA ライブラリーのスクリーニング

各 *OsFRDL* 遺伝子を認識するプローブを作製し、鉄欠乏処理をしたイネの根から調製した cDNA ライブラリー (Higuchi et al., 2001) のスクリーニングを行った。プローブ作製に用いたプライマーを以下に示す。

OsFRDL1	Forward	5'-CGTTACAACATCATTTGTGGCTGAA-3'
	Reverse	5'-GTGATCTGATTGTTAGGTAGCGAAC-3'
OsFRDL2	Forward	5'-CAGTGTCACGACATCATTTGTTGCG-3'
	Reverse	5'-GAGATCTGACTACCAAGTACTTTAG-3'
OsFRDL3	Forward	5'-AGCATCAGCTGGTATTGGTGTGTCGG-3'
	Reverse	5'-AGCATCTGCAAGCAAAGATACCGCA-3'

5-2-3 *OsFRD3* のノーザン解析

鉄欠乏による *OsFRDL* の発現の変化を調べた。方法は 3-2-1 と同様に行った。プローブには、5-2-2 と同じものを用いた。

5-2-4 定量的 RT-PCR

2-2-2 と同様の方法により行った。用いたプライマーは、以下の通りである。

OsFRDL1F-RT	5'-CTCATGGCGATTATTATTAATCCTC-3'
-------------	---------------------------------

<i>OsFRDL1R-RT</i>	5'-TACTACTAATTAATGTATAATACTT-3'
<i>OsFRDL2F-RT</i>	5'-TGAGGTGGTTGGACTTTGTTGAACA-3'
<i>OsFRDL2R-RT</i>	5'-CCAATGCTCCGTATATCTCACGGTG-3'
<i>OsFRDL3F-RT</i>	5'-GCATGAGGAACCCAAAACAGAGCTA-3'
<i>OsFRDL3R-RT</i>	5'-AGCTGTTTACGCAGCAGCAAACCTGG-3'

5-2-5 *OsFRDL1*-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。*OsFRDL1* の全長を増幅するために、以下のプライマーを用いた。

5'- GAGCTCTGGTACCATGGCTAGGTCTGAAGAAGA

5'- GAGACTCTGTCGACCTTCCGGAGGAACACCCAT

5-2-6 プロモーター-GUS 実験による *OsFRDL1* の組織局在

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。*OsFRDL1* の翻訳開始点を起点として 8.0 kb のプロモーター領域 (2つの Untranslated region を含む) を増幅するために、以下のプライマーを設計した。

OsFRDpF 5'- GAGAGAGGTACCAGAGGCAGATACATTTTTTTTATCG -3'

OsFRDpR 5'-GAGAGAGGTACCGCCGGTGCCGGGCGGGGAAACGTACGTGTT -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。

5-3 結果

5-3-1 cDNA ライブラリーのスクリーニングで得られたクローン

cDNA ライブラリーのスクリーニングにより, *OsFRDL1*, *OsFRDL2*, *OsFRDL3* が単離された。ゲノム検索で見出されたもう一つの *OsFRDL4* は単離することが出来なかった。*OsFRDL1* は 15 個のエキソンからなっており, 1 番目と 2 番目のエキソンは非翻訳領域で, 3 番目のエキソンに開始コドンが存在していた。非常に長いイントロンを持ち, 1 番目のイントロンは約 2.3 kb, 2 番目のイントロンは約 3.9 kb の長さであった。*OsFRDL2* は 12 個のエキソンをもち, 開始コドンは 1 番目のエキソンに存在していた。*OsFRDL3* は 14 個のエキソンをもち, 開始コドンは 1 番目のエキソンに存在していた。Rogers et al. (2002) によれば, シロイヌナズナの *FRD3* は 13 個のエキソンからなり, 1 番目のエキソンは非翻訳領域で, 2 番目のエキソンに開始コドンが存在する。また, 1 番目のイントロンは約 2.6 kb の長さである。各 *OsFRDL* と *FRD3* のゲノム構造の模式図を図 5.1 に示した。

5-3-2 各遺伝子がコードする *OsFRDL* タンパク質

スクリーニングによって単離された遺伝子がコードする各 *OsFRDL* のアミノ酸配列を図 5.2 に示す。*FRD3* で膜貫通領域であると予測された部位は高度に保存されていた。一方, N 末端近傍と, 2 番目と 3 番目の膜貫通領域に挟まれる領域は互いに相同性が低かった。HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/html/document.html>; Tusnady and Simon, 1998) による予測ではこの 2 つの領域は細胞質側に位置すると予測された。

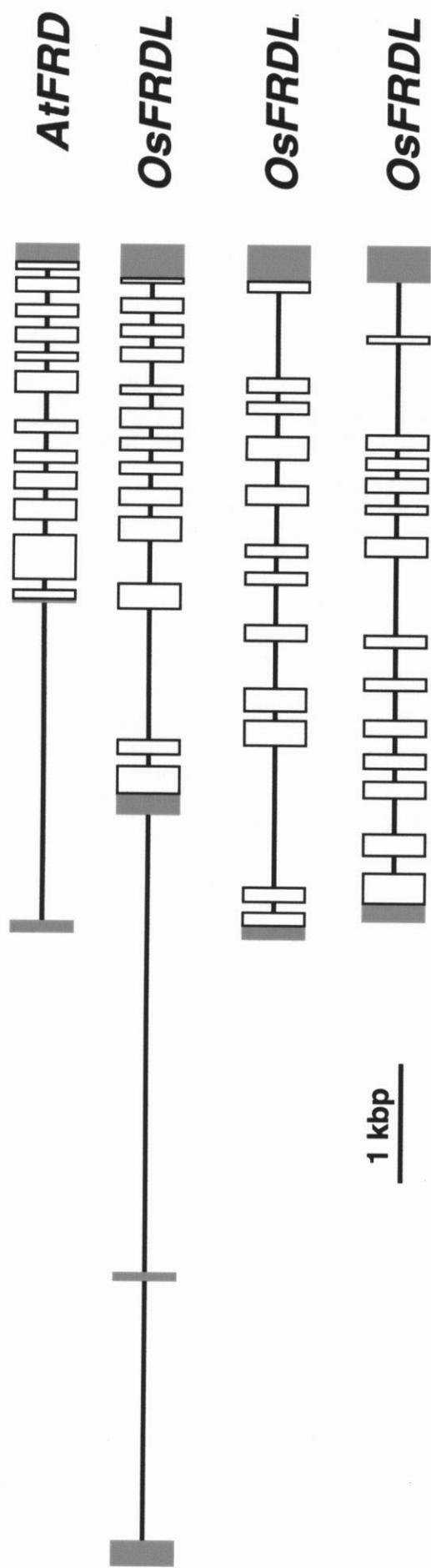


図 5.1 *OsFRDL* のゲノム構造の模式図

エキソンを四角で表した。灰色の四角は非翻訳領域を、白色の四角は ORF を表す。

```

FRD3      1  -----MTETGDDLATVKKPIP-----FLVIFKDLRHVFSRDITGRILGIAF
OsFRDL1   1  -MAGLKKMEVTAASAAVAASSTA EKRAAAVVVPAALTMNGAAGAEKTAASAAAPEDLPAPAALSGWPRRVGLYLFVMNI RSVFKLDELGSVLRITAV
OsFRDL2   1  -----MNGESLLDRSSSADAAMNDVPE-----GHRHHHPLSVFLRDARLAFRWDELGRIMGIIV
OsFRDL3   1  MKAVMMHHHHAARPARCPRPISSSSSSALLGSRPTRVSSPSNLKLLINRRHITPLATNAPHAVAE-DDGAISFANATPEPPIIDLPGGVRNELLILLAL
                                                                                                     TM1

FRD3      43  PAALALAADPIASLIDTAFVGRLEGAVQLAAVGVSI AIFNQASRITIFPLVSLTTSFVAEEDTMEKMKEEANKLVHAETILVQDSLEKGISSTPSNDTN
OsFRDL1   100 PASLALAADPIASLVDTAFIGRLGSVEIAAVGVSI AIFNOVSKVGIYPLVSVTTSFVAEEDAISKCIENSSQDLEKASPVDSNTNLPVSGPDKVECV
OsFRDL2   56  PGALALMADPVASLVDTAFIGHIGPVELAAVGVSI AIFNOVSRITAFPLVSVTTSFVAEEDATSSD-REKYEINGENEFNVSDSEMEELVSHHEASAAPS
OsFRDL3   100 PAVLGQAIDPLAQIMETAYIGRLGALELASAGIGVSVENIVSKIFNIPLLSIATSFVAED-----ISKNASKHSS
                                                                                                     TM2

FRD3      143  QPQQPPADPTKSNNGKSNKKEKRTIRTASTAMILGLILGLVQAIFIFSSKLLIGVMGVKPNSPMLSPAHKYLSIRALGAPALLSLAMQGI FRGFKDT
OsFRDL1   200 NSCIPTECTNPDSQGCK-----RKYIPSVTSAVIVGSFLGLLQAVFVFSKAFVNLNMGVKNDSPLRPAVRYLITIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDT
OsFRDL2   155 KSSFETDSSD-VKIEHK-----RKNIPSVSTALLGGVLGLLQALLLVICAKPLIGYMGVKGSSAMLPALKYVVRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDT
OsFRDL3   170 SG-----KLELSSVSSALVLAAGIGTIEALAFGLGSLFLKLMGVSPASPMPHKPAKLFISLALGAPAVNIMLAVQGI FRGFKDT
                                                                                                     TM3
                                                                                                     TM4

FRD3      243  KTFPLFATVVADYINIVDPIFIFVLRIGIIGAAIAHVISOYFMTLIFVFLAKKVNLI PPNFGDLQFGRFKNQLLLRARTI AVTFCQTLAAMAAARLGT
OsFRDL1   295 KTFLYATVVGDAANIIDPILMFVCHMGVTGAAVAHVISOYLITMILCRIRQVDVIPPPLKSLKFGRFKGCFLLRVAVVAVTFCVILASSLAARLGP
OsFRDL2   249 KTFLYATVAGDATNIVDPIFMFVFGYGVSGAAIAHVISOYFIASILWRRLHVDLLPPSFKHMQFSRFKNQFLLRVIAATCCVILSASMAARLGS
OsFRDL3   250 KTFVFFIGLGNLSAVVLLPLLIVFRLGITGAAISTVASOYIITILQLQSKRAVLLPPRLDQLEFSGYKSGMLLGRITLSILLTMIIIGTSMARGGP
                                                                                                     TM5
                                                                                                     TM6
                                                                                                     TM7

FRD3      343  TPMAAFQICLQVWLTSSLLNDGLAVAGOAIALCSFAEKQYNKVTAVASRVLMGFVGLGLSVFVGLGLYFGAGVSKOPAVIHLMAIGIPPIAATQPIN
OsFRDL1   395 TIWAAAFQICCLWLTSSLLADGLAVAGOAIALSAFAKNDKGVVAVTSRVLQLSIVLGMGLTVVLGVGMKFGAGITKQIDVIDVIHKGIPIVAGTQPIN
OsFRDL2   349 VPMAAFQICLQIWLASSLLADGLAFAGOAIALSAFARQDHSKAAATASRIQLGLVGLLSIFLGI GLRLGSRLFTDDQDVLHHIYLGIPVSLTOPIN
OsFRDL3   350 TAWAAHQCICLQVWLVAVSLADALAVSAQAMIASSYAILDYKRQVQIAMFALQIGVVSGLALSAGLYTFSNIARLFTSDPVVLMVVKSCSLFVCASQPIN
                                                                                                     TM8
                                                                                                     TM9
                                                                                                     TM10

FRD3      443  SLAFVLDGVNFGASDFAYTAYSMVGVAAISIAAVIYMAKTNFIGIWIALTIIYALRAITGIARMATGTGPWRFLRGRSSSSS-----
OsFRDL1   495 SLAFVFDGINFASDYTYSAYSMVGVAAISIPCLVYL SAHNGFIGIWIALTIIYMSLRTIASTWRNGAARGPWPVLRK-----
OsFRDL2   449 ALAFVFDGINYASDFGAYAYSMILVAIVSIFIVTLASYNFVGIWIALTIIYMSLRMLAGFLRIGTARGPWTIYAAQRMSHEVVGLC-----
OsFRDL3   450 ALAFIFDGLHYGVSDFDYVAQATIAVGISSVLLVLYAPSVFGLAGVWAGLITLGLRMSAGILRLWKSQPWSLHEEPKTELAG-----
                                                                                                     TM11
                                                                                                     TM12

```

図5.2 OsFRDL ファミリーとシロイヌナズナの FRD3 とのアミノ酸配列の比較

TM: OsFRDL 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)。

5-3-3 3つの *OsFRDL* の発現様式

鉄欠乏処理したイネを用いて、ノーザン解析を行った。*OsFRDL1*は恒常的に根で発現していて、鉄欠乏処理によって、発現が若干誘導された(図 5.3)。葉では発現が観察されなかった。*OsFRDL2*と*OsFRDL3*の発現は、鉄十分条件および鉄欠乏条件の根、地上部ともにノーザン解析では検出されなかった(データは示さない)。

次に、*OsFRDL*の発現量を定量的RT-PCRを用いて検出した(表 5.1)。*OsFRDL1*は恒常的に根で発現しており、鉄十分条件と鉄欠乏条件の葉でも弱く発現していた。根、地上部とともに鉄欠乏により発現が若干減少した。*OsFRDL2*は、鉄十分条件と鉄欠乏条件の、根、地上部ともに発現しており、根、地上部とともに鉄欠乏により発現が減少した。*OsFRDL3*は地上部で主に発現しており、鉄欠乏によって発現がわずかに誘導された。

5-3-4 *OsFRDL1* の細胞内局在解析

OsFRDL1-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。*OsFRDL1*-GFP 融合タンパク質は、細胞膜に局在した(図 5.4)。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(データは示さない)。

5-3-5 プロモーター-GUS 実験による *OsFRDL1* の発現の組織局在の解析

*OsFRDL1*の発現の組織局在を解析するために、*OsFRDL1*のプロモーター領域を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、*OsFRDL1*は中心柱の一部分において発現していた(図 5.5 A)。表皮細胞や外皮細胞では発現が観察されなかった(図 5.5 C)。中心柱の細胞のうち、*OsFRDL1*は特に原生導管、後生導管 I に隣接する内鞘細胞と、篩部伴細胞において発現していた(図 5.5 B)。鉄欠乏条件の根においては、発現の組織局在性は変化しなかった(図 5.5D, E)。鉄欠乏の根の表皮細胞や外皮細胞では発現が検出されなかった(図 5.5 F)。

鉄十分条件の地上部において、*OsFRDL1*の発現は維管束と葉肉細胞において観察さ

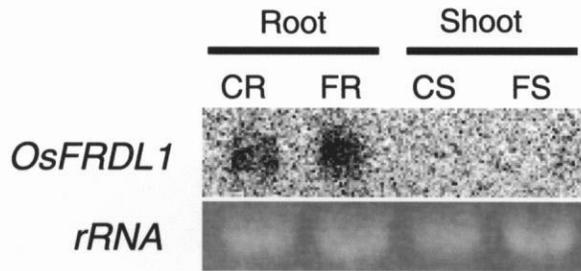


図5.3 *OsFRDL* 遺伝子の鉄十分条件および鉄欠乏条件における発現様式

OsFRDL1 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、FS：鉄欠乏葉。

表5.1 *OsFRDL* 遺伝子の定量的 RT-PCR

Plant parts and condition	Number of copies ($\times 10^7$ copies per microgram RNA)		
	<i>OsFRDL1</i>	<i>OsFRDL2</i>	<i>OsFRDL3</i>
CR	186 \pm 69.9	1.5 \pm 0.7	0.4 \pm 0.2
FR	73.6 \pm 24.9	1.1 \pm 0.3	0.5 \pm 0.2
CS	17.7 \pm 10.7	1.0 \pm 0.3	1.1 \pm 0.4
FS	14.8 \pm 22.3	0.4 \pm 0.4	1.3 \pm 0.4

各 *OsFRDL* 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 μ g 当たりの *OsFRDL* のコピー数を示す。(mean \pm SD; n=3)。CR：鉄十分根、FR：鉄欠乏根、CR：鉄十分根、FR：鉄欠乏根、CS：鉄十分葉、FS：鉄欠乏葉。

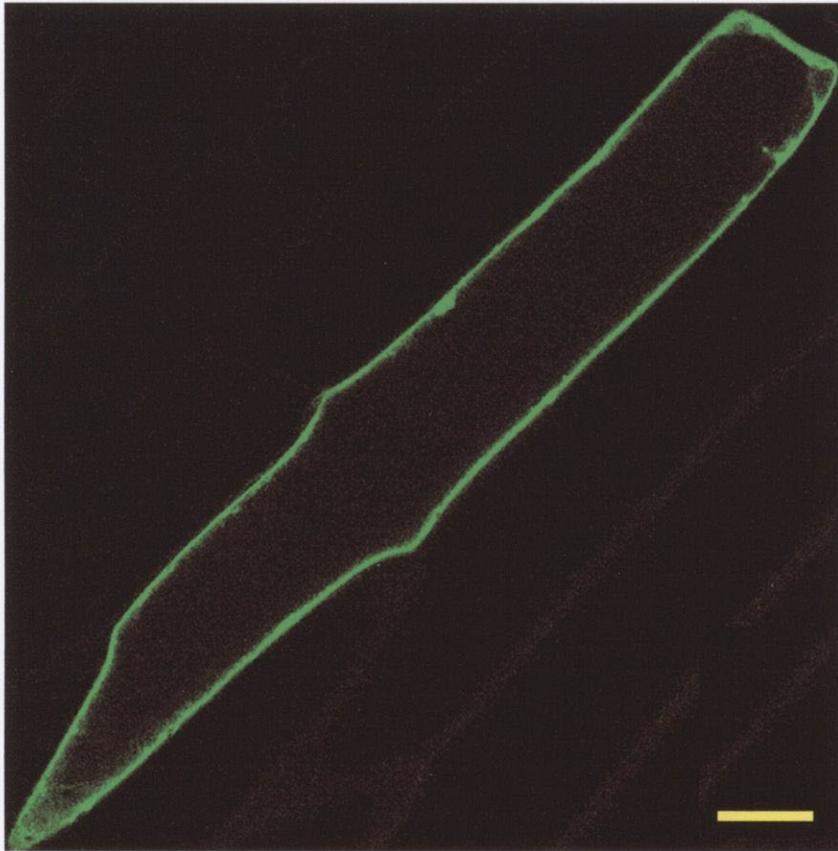


図5.4 *OsFRDL1*-GFP タンパク質のタマネギ表皮細胞における細胞内局在

35S プロモーターによって *OsFRDL1*-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。

スケールバー：50 μm 。

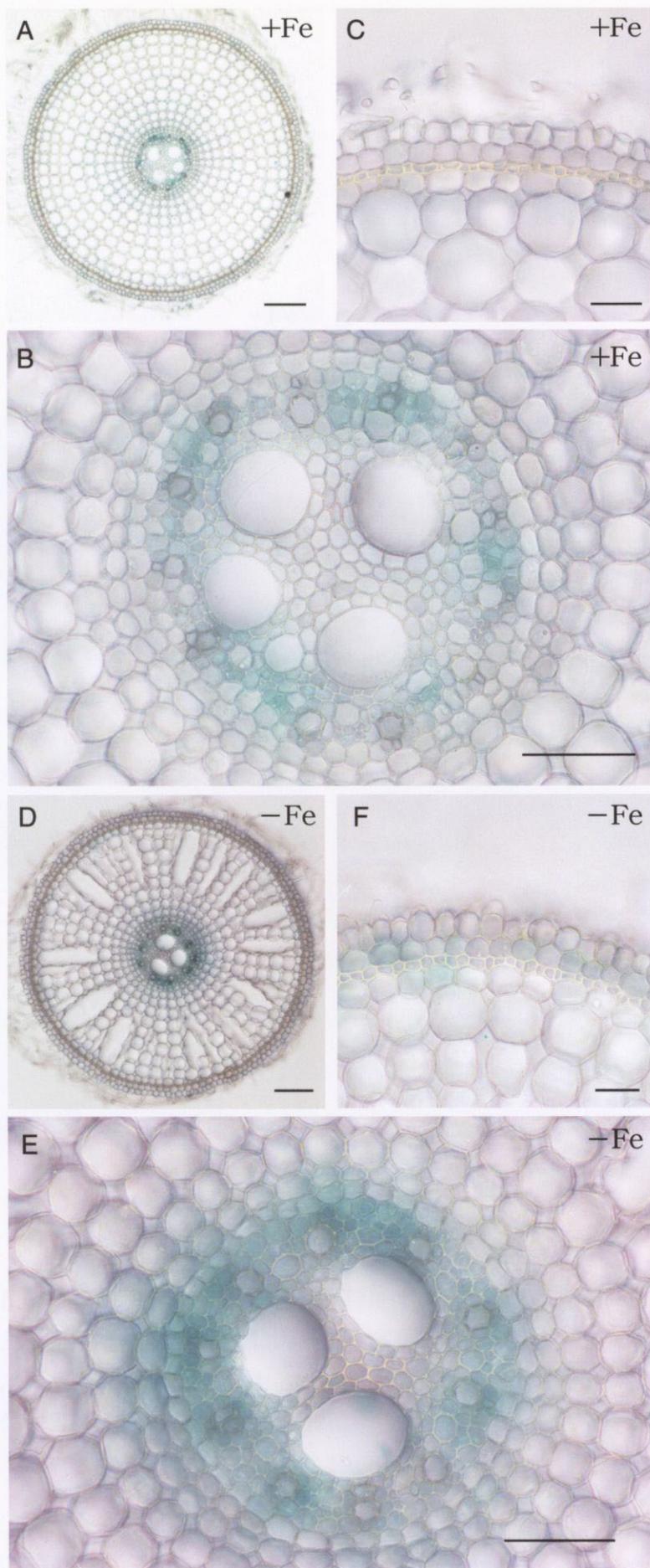


図5.5 根における *OsFRDL1* の発現様式

(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) 根の表皮の拡大図。

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

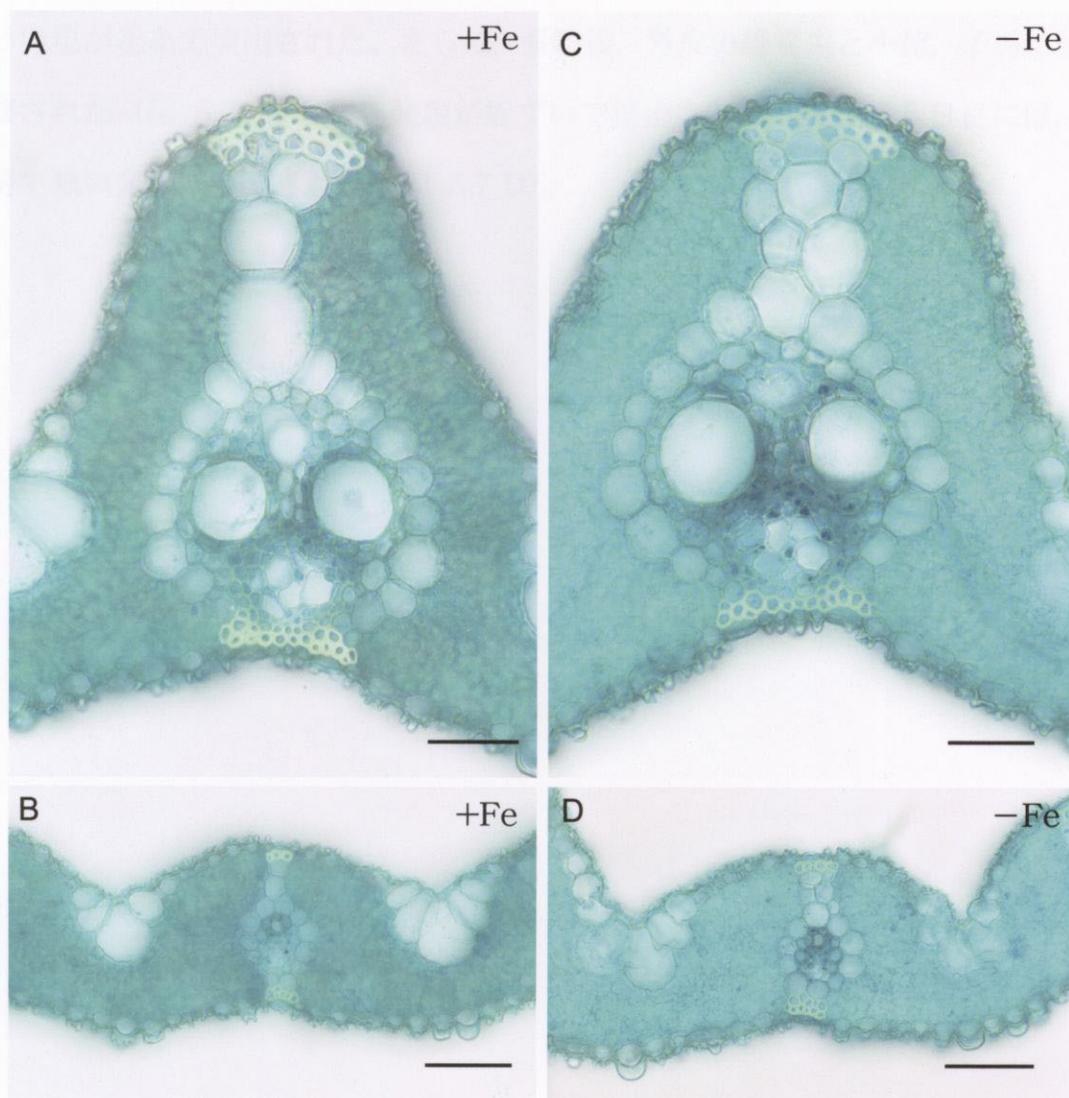


図5.6 地上部における *OsFRDL1* の発現様式
 (A, B) 鉄十分条件、(C, D) 鉄欠乏条件の最新葉。
 (A, C) 大維管束の拡大図、(B, D) 小維管束の拡大図。
 スケールバー：50 μm 。

れた (図 5.6 A, B)。一方, 鉄欠乏の地上部においては, 大維管束, 小維管束の篩部伴細胞において強い発現が観察された (図 5.6 C, D)。葉肉細胞にも発現が観察された。

生殖器官においては, *OsFRDL1* は開花前の小穂と外皮で発現していた (図 5.7 A)。葯においても発現が観察され (図 5.7 B), 特に花粉で強い発現が観察された (図 5.7 B)。弱い発現が花糸で検出された。さらに, 受粉後, 外皮の維管束と小穂, 子房に強い発現が観察された (図 5.7 C)。弱い発現が雌ずいで検出された。受粉後5日目には, 発達中の子房で強い発現が観察された (図 5.7 D)。

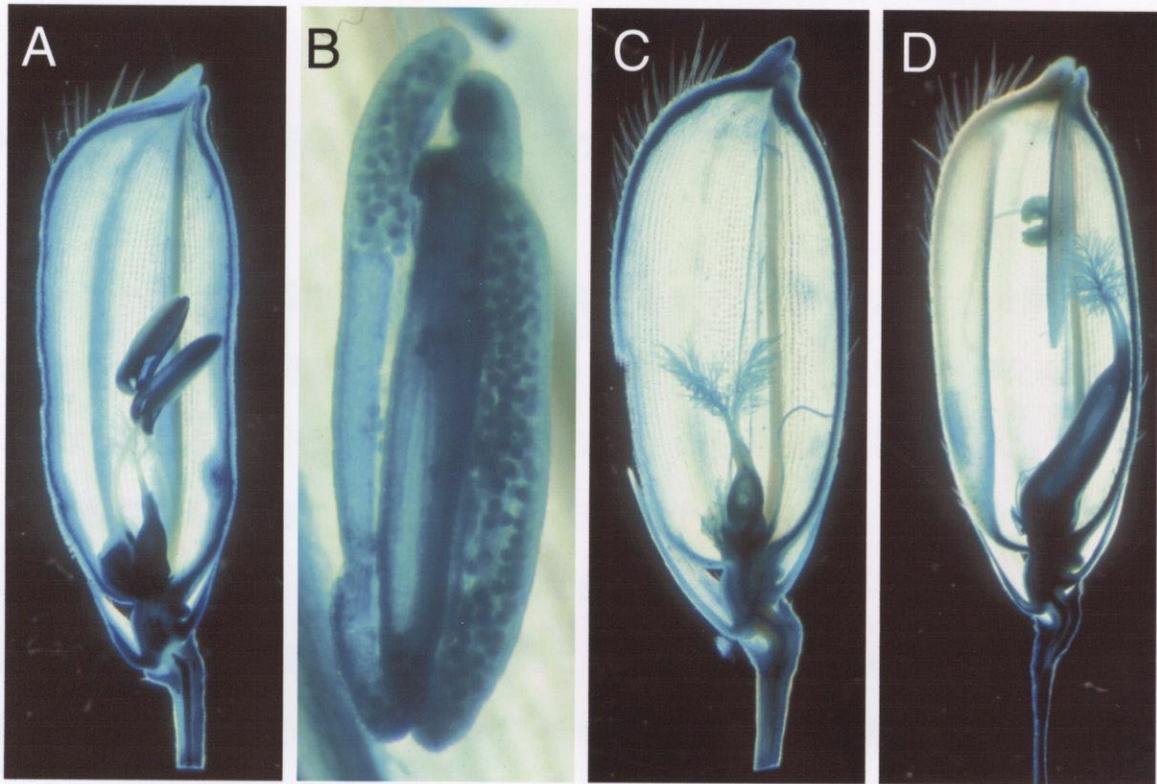


図5.7 *OsFRDL1* の発現の登熟過程での組織局在
 (A) 開花前, (B) 開花前の葯の拡大図, (C) 受粉後, (D) 受粉後5日。

5-4 考察

本章では、シロイヌナズナの鉄栄養異常変異株の原因遺伝子として単離された *FRD3* 遺伝子に着目した。このホモログがイネではムギネ酸類の放出トランスポーターとして機能しているのではないかと考えた。以下に、その仮説にたどり着いた過程を記す。

5-4-1 鉄栄養異常を示すシロイヌナズナの変異株 *frd3*

(Rogers et al., 2002)

シロイヌナズナの変異株 *frd3* は複雑な表現型を示す。*frd3* では鉄十分条件においても鉄欠乏状態の野生株と同程度に二価鉄トランスポーター遺伝子 (*IRT1*) が発現している。*frd3* では三価鉄キレート還元酵素遺伝子 (*FRO2*) の発現も同様に常に高く、根における還元活性も常に高い状態にある。また、*frd3* は鉄十分条件においても根から水素イオンを放出し、根圏の pH を低下させている。二価鉄トランスポーターの発現誘導、根における還元活性の増加、根圏 pH の低下というこれら3つの応答は Strategy I 植物の鉄欠乏応答として知られている。つまり、*frd3* は恒常的に鉄欠乏応答のメカニズムが働いている異常株である。常に鉄欠乏応答を示しているため、*frd3* は鉄および他の金属を地上部に過剰に集積する。また葉は鉄欠乏の典型的な症状であるクロロシスを呈する。このように、*frd3* は体内に鉄を過剰に集積しているにもかかわらず、クロロシスを呈し、あたかも鉄欠乏状態であるかのような応答を示すという、一見複雑な表現型を持っている。このような異常な表現型を引き起こす原因遺伝子がポジショナルクローニングによって特定された。その遺伝子が *FRD3* である。

シロイヌナズナの野生株での *FRD3* 遺伝子の発現は根に特異的で、その発現量はわずかであり、鉄欠乏処理によってわずかに増加する。一方、変異株 *frd3* では鉄十分条件において野生株の10倍から100倍以上の発現がみられる。プロモーター-GFP 実験によると、発現は根の維管束周辺のごく限られた部位で特異的に観察された (Green et al., 2004)。*FRD3* がコードするタンパク質は12個の推定膜貫通領域を持ち、Multidrug and Toxin Efflux Family に属することが明らかとなった。

Rogers et al. (2002) は表現型の観察から FRD3 がニコチアナミンのトランスポーターである可能性を示唆していた。しかし、Rogers et al. (2002) は、ZmYS1 (Curie et al., 2001) が「鉄-ニコチアナミン」錯体のトランスポーターではなく、ニコチアナミン単体のトランスポーターであると考えていて、FRD3 がその YSL と相同性が低かったために、FRD3 はニコチアナミンのトランスポーターである可能性は低いと結論づけた。そして、FRD3 は Multidrug and Toxin Efflux Family に属するトランスポーターであるにも関わらず、鉄栄養状態を示す情報物質のレセプターではないかと推論していた。

5-4-2 FRD3 がニコチアナミントランスポーターである可能性

一見複雑な *frd3* の表現型はトマトの変異株 *chloronerva* の表現型に非常によく似ている。*chloronerva* は *NAS* 遺伝子を欠損した変異株で (Ling et al., 1999), 体内にニコチアナミンは検出されない (Higuchi et al., 1996a)。この変異株は土壌から吸収した鉄を植物体内で正しく利用することが出来ない (Becker et al., 1995)。表現型としては、特に地上部の若い葉で葉脈間クロロシスを呈し (Stephan and Grün, 1989), 地下部では常に鉄欠乏応答をしている。そのために鉄や他の金属を土壌から過剰に吸収し、地上部に過剰集積する (Scholz, 1985; Becker et al., 1992)。

これらの知見から、土壌から吸収した鉄を体内で正しく利用するにはニコチアナミンが必須であることが明らかである。葉脈間クロロシスという表現型から、維管束からの鉄の積みおろしにニコチアナミンが大きく関与している事が考えられる。おそらく、この積みおろしは「鉄-ニコチアナミン」錯体の形で行われ、複数種存在する YSL のうちのいずれかが機能しているのであろう。根から吸収された養分は一度、導管または篩管の通導組織に入った後に地上部に運ばれる。YSL によって通導組織から鉄が積みおろされるためには、通導組織内にニコチアナミンが存在する必要がある。*chloronerva* はニコチアナミンを体内で合成しないために積みおろしができないのだろう。一方、*frd3* 変異株はニコチアナミンを合成するが、導管内にニコチアナミンを積み込むことができないのではないかと考えた。なぜなら、*frd3* 変異株は導管内に三価鉄が沈着しており、鉄は細胞内には

取り込まれておらずアポプラストに存在すると報告されたからである (Green et al., 2004)。

導管内はアポプラストであるので、導管内への積み込みは細胞外への放出にあたり、FRD3 が efflux に関与しているファミリーに属していたことと矛盾しない。もし、FRD3 がニコチアナミンの導管への積み込みをしているならば、原生導管に接する内鞘細胞で行っている可能性が高い。なぜなら、ニコチアナミンを合成する *NAS* はイネの根の内鞘細胞で強い発現が観察されたからである (第2章)。このように既往の知見を整理することによって、「シロイヌナズナでは FRD3 が導管へのニコチアナミンの積み込みを行っている」という仮説を立てた。

イネ科植物に特有のムギネ酸類の前駆体がニコチアナミンであることは、前述したとおりである。ムギネ酸類とニコチアナミンの炭素骨格は等しく、第 3'位の炭素に結合する官能基がムギネ酸類では水酸基であるのに対し、ニコチアナミンではアミノ基である。そこで、イネの FRD3 ホモログはニコチアナミンではなく、ムギネ酸類を細胞外に放出するトランスポーターとして機能しているのではないかと考え、本研究に着手した。

OsFRDL1 の発現の組織局在は、*OsNAS* と *OsYSL2* の発現の組織局在に類似しており、同じ細胞で機能している可能性がある。これら 3 種類の遺伝子は、鉄十分条件の根の原生導管に隣接する内鞘細胞と、篩部伴細胞において発現している (第2章, 第4章, 図 5.5)。さらに、鉄欠乏条件の地上部では、*OsNAS1*, *OsNAS2* および *OsYSL2* が、篩部伴細胞において強く誘導される (第2章, 第4章, 図 5.6)。従って、*OsFRDL1* はこれらの遺伝子と、同じ細胞で働いている可能性が考えられる。おそらく、内鞘細胞や篩部伴細胞で合成されたニコチアナミンが、*OsFRDL* によって導管や篩管に放出され、鉄をキレートすることで、鉄が導管や篩管からの積みおろしや細胞に取り込むことが可能になると考えている。

5-4-3 *OsFRDL* の機能の証明のために

OsFRDL が、ニコチアナミンまたはムギネ酸類の放出トランスポーターであることを

証明するには、*in vitro*での実験が不可欠である。放出トランスポーターの*in vitro*実験は吸収の場合と比べて格段に難しい。吸収トランスポーターの場合、酵母の金属トランスポーターは数多く単離されており、これらのトランスポーターを破壊した吸収変異株の相補実験によって証明できる。しかし、放出トランスポーターは吸収トランスポーターほど明らかにされておらず、破壊株を用いた相補実験が難しい。放出トランスポーターの機能決定が難しいなかで、シロイヌナズナから単離された *BORI* 遺伝子は、酵母を用いた *in vitro* 実験でホウ素の放出型のトランスポーターをコードしていることが証明された (Takano et al., 2002)。そこで、本研究にも応用出来ると考え、酵母を用いた *in vitro* 実験を設計中である。

具体的には、酵母のゲノムにムギネ酸類の生合成経路上の遺伝子群を組み込み、過剰発現させることによりムギネ酸類を大量に合成する酵母を作製する。そして、その酵母を *OsFRDL* を含むプラスミドで形質転換し、酵母内及び、培地中のニコチアミンまたはムギネ酸類の量を測定することにより *OsFRDL* によるムギネ酸類の放出活性を観察する。

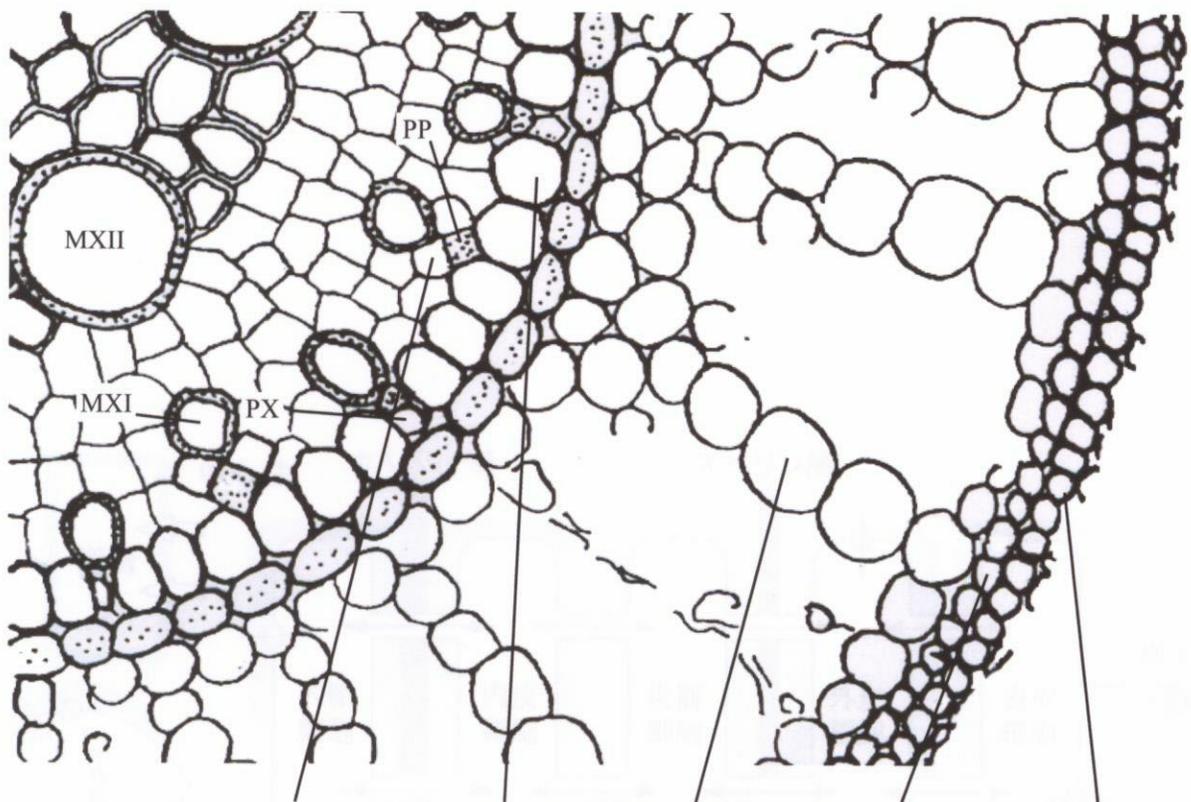
酵母を用いた実験の他にアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた実験系も考えられる。Sasaki et al. (2004) はアルミニウム耐性に関与する、リンゴ酸の放出トランスポーターをコードする遺伝子 (*ALMT1*) を単離し、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いてそのタンパク質の有機酸の放出活性を証明した。ニコチアミンまたはムギネ酸類と *OsFRDL* の遺伝子を卵母細胞内に導入し、物質の膜通過を電気生理的に検証することによって放出トランスポーターであることを証明できるのではないかと考えている。

第6章 総合考察

6-1 鉄の輸送経路について

本研究によって得られた、デオキシムギネ酸生合成に関わる遺伝子群 (*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAS3*, *OsNAAT1*, *OsDMASI*), 「鉄-デオキシムギネ酸」錯体トランスポーター遺伝子 (*OsYSL15*) および「金属-ニコチアナミン」錯体トランスポーター遺伝子 (*OsYSL2*) の発現様式を、鉄欠乏条件と鉄十分条件の根についてまとめた (図 6.1)。根での輸送経路について、推定されるモデルを図 6.2 に示す。根圏で可溶化された鉄は、トランスポーターを介して根のシンプラストへ吸収される。「Fe(III)-デオキシムギネ酸」錯体は、これを輸送するトランスポーター (*OsYSL15*) が表皮細胞および外皮細胞で発現していることから (図 3.5 D, F), これらの細胞で吸収されると考えられる。また, Strategy I 機構で主要な役割を果たす二価鉄トランスポーター遺伝子 (*OsIRT1*) のホモログがイネからも単離された (Bughio et al., 2002)。このことから, イネ科植物は二価鉄イオンの形態でも鉄を吸収している可能性がある (石丸, 2003)。しかし, フリーの金属イオンは細胞内に存在すると毒性が生じるので, 植物体内では鉄の大部分がキレーターによって錯体を形成していると考えられる (Finney and O'Halloran, 2003)。おそらく, *OsIRT1* によって根でシンプラストに吸収された二価鉄は, 即座にこれと親和性の高いニコチアナミンと錯体を形成すると考えている。

吸収された鉄はシンプラストを通過して, 内鞘細胞まで輸送される。ここで, 未同定の鉄の放出トランスポーターによって, 導管 (アポプラスト) へと放出されると考えられる。この過程は, おそらくニコチアナミンは介さない。なぜなら, ニコチアナミンを合成できない *chloronerva* は, 地上部まで鉄を輸送する事ができるからである (Scholz, 1985; Becker et al., 1992)。他の金属では, シロイヌナズナのP-Type の ATPaseの一つが, 亜鉛の導管への積み込みを行うことが示唆されている (Hussain et al., 2004)。鉄におい



	伴細胞		内鞘細胞		皮層細胞		外皮細胞		表皮細胞	
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
<i>OsNAS1</i>	○	◎	○	◎	—	◎	△	◎	△	◎
<i>OsNAS2</i>	○	◎	○	◎	—	◎	△	◎	△	◎
<i>OsNAS3</i>	△	○	△	○	—	—	—	—	—	—
<i>OsNAAT1</i>	○	◎	○	◎	—	◎	△	◎	△	◎
<i>OsDMAS1</i>	△	◎	△	◎	—	◎	△	◎	△	◎
<i>OsYSL15</i>	△	○	—	—	—	△	—	○	—	○
<i>OsYSL2</i>	△	○	△	○	—	—	—	—	—	—
<i>OsFRDL1</i>	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—

図6.1 本研究で決定された根における遺伝子発現の組織局在のまとめ

◎：強く発現している。 ○：発現している。
 △：弱く発現している。 —：発現が観察されない。

MXI: 後生導管I、MXII: 後生導管II、PP: 原生篩管、PX: 原生導管。

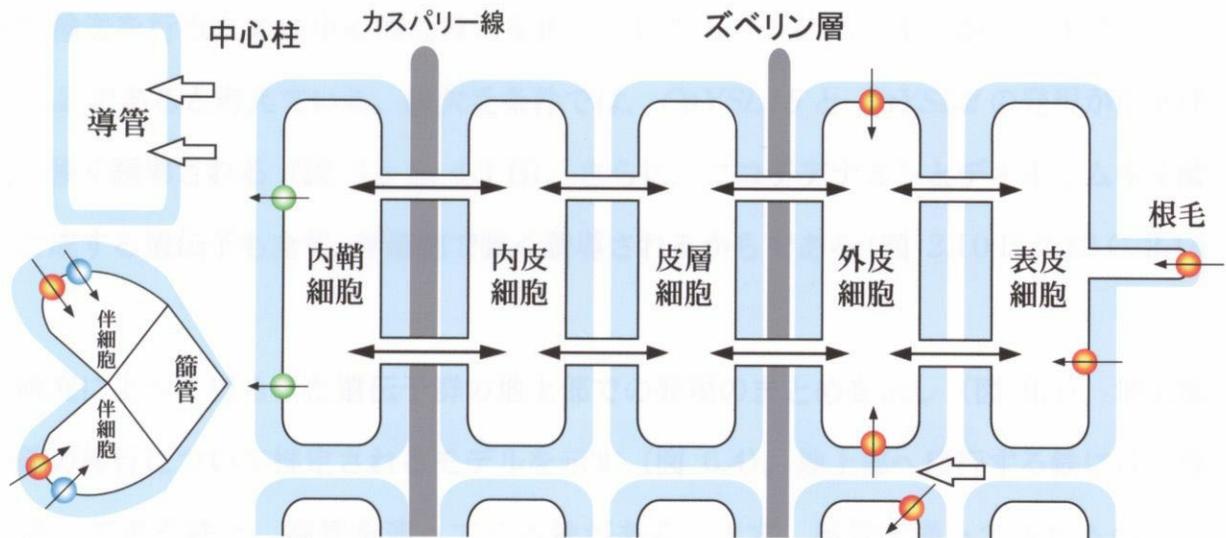


図6.2 根における鉄移行の模式図

- : OsYSL15 (外から内への移動)
- : OsYSL2 (外から内への移動)
- : 推定される未知の鉄放出トランスポーター (内から外への移動)
- ⇨ : アポプラスト移動
- ↔ : シンプラスト移動
- : 細胞壁
- : 細胞膜

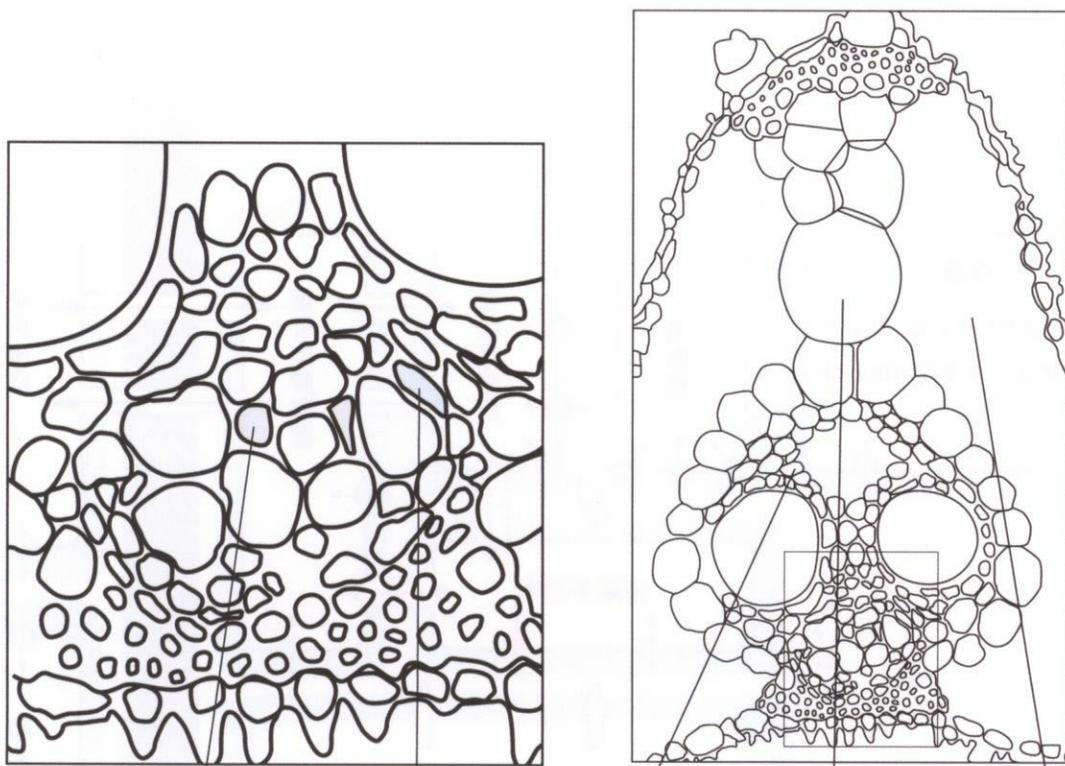
でも、このようなトランスポーターが存在し、導管への積み込みを行っているかもしれない。

一般に、「無機栄養は導管を通過して地上部に運ばれ、葉で積みおろしが行われる」と言われる。しかし、この植物栄養の常識がうち破られた。Tsukamoto et al. (未発表) は、根から吸収された鉄が、篩管を通じて地上部へと輸送されることを証明している。この鉄の篩管輸送を行うために中心的な役割を担っているトランスポーターが、*OsYSL15* と *OsYSL2* であると考えている。鉄欠乏条件では、*OsYSL15* と *OsYSL2* の発現が篩部伴細胞で強く誘導される (図 3.5 E, 4.3 B)。さらに、ニコチアナミンとデオキシムギネ酸を生合成する遺伝子も全て、伴細胞で強く誘導されるからである (図 2.10 B, 2.12 C, 2.14 F)。

本研究によって得られた遺伝子群の地上部での発現のまとめを示し (図 6.3)、地上部での鉄の移行について推定されるモデルを示す (図 6.4)。地上部へ移行する鉄には、導管を通過して来る鉄と、篩管を通過してくる鉄がある。まず、導管を通過してきたものは、*OsYSL2* が鉄欠乏条件で導管柔細胞、篩部柔細胞および維管束鞘細胞で発現していることから、これらの細胞でシンプラストへ取り込まれると考えられる。シンプラストに取り込まれた鉄は、光合成の中心の場である葉肉細胞へと輸送されることが考えられる。次に、篩管を通過してきた鉄は、一度伴細胞において、未同定の放出トランスポーターによってアポプラストへ放出されることが考えられる。その後は、導管から送られてきた鉄と同様の輸送経路で、葉肉細胞へと輸送されることが考えられている。

6-2 今後の展望

本研究により、金属の輸送するために必要なキレーター (ニコチアナミン、デオキシムギネ酸) の合成酵素遺伝子と、これらのキレート錯体のトランスポーター遺伝子の発現の局在が明らかになった。今後はこれらの遺伝子、および他の金属トランスポーター遺伝子による、植物体内での金属の輸送について、分子レベルでの研究が活発になると期待される。特に、予想される研究成果は、大きく分けて以下の3つであると考えられる。



	伴細胞		篩部柔細胞		導管柔細胞		維管束鞘細胞		葉肉細胞	
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
<i>OsNAS1</i>	—	◎	—	◎	—	◎	—	◎	—	◎
<i>OsNAS2</i>	—	◎	—	◎	—	◎	—	◎	—	◎
<i>OsNAS3</i>	○	△	○	△	△	—	△	—	△	—
<i>OsNAAT1</i>	△	◎	○	◎	—	◎	—	◎	—	◎
<i>OsDMAS1</i>	—	◎	—	◎	—	—	—	—	—	△
<i>OsYSL15</i>	△	△	△	△	—	△	△	△	△	△
<i>OsYSL2</i>	△	◎	△	◎	—	◎	—	◎	—	◎
<i>OsFRDL1</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

図6.3 本研究で決定された遺伝子の発現の葉における組織局在のまとめ

◎：強く発現している。

○：発現している。

△：弱く発現している。

—：発現が観察されない。

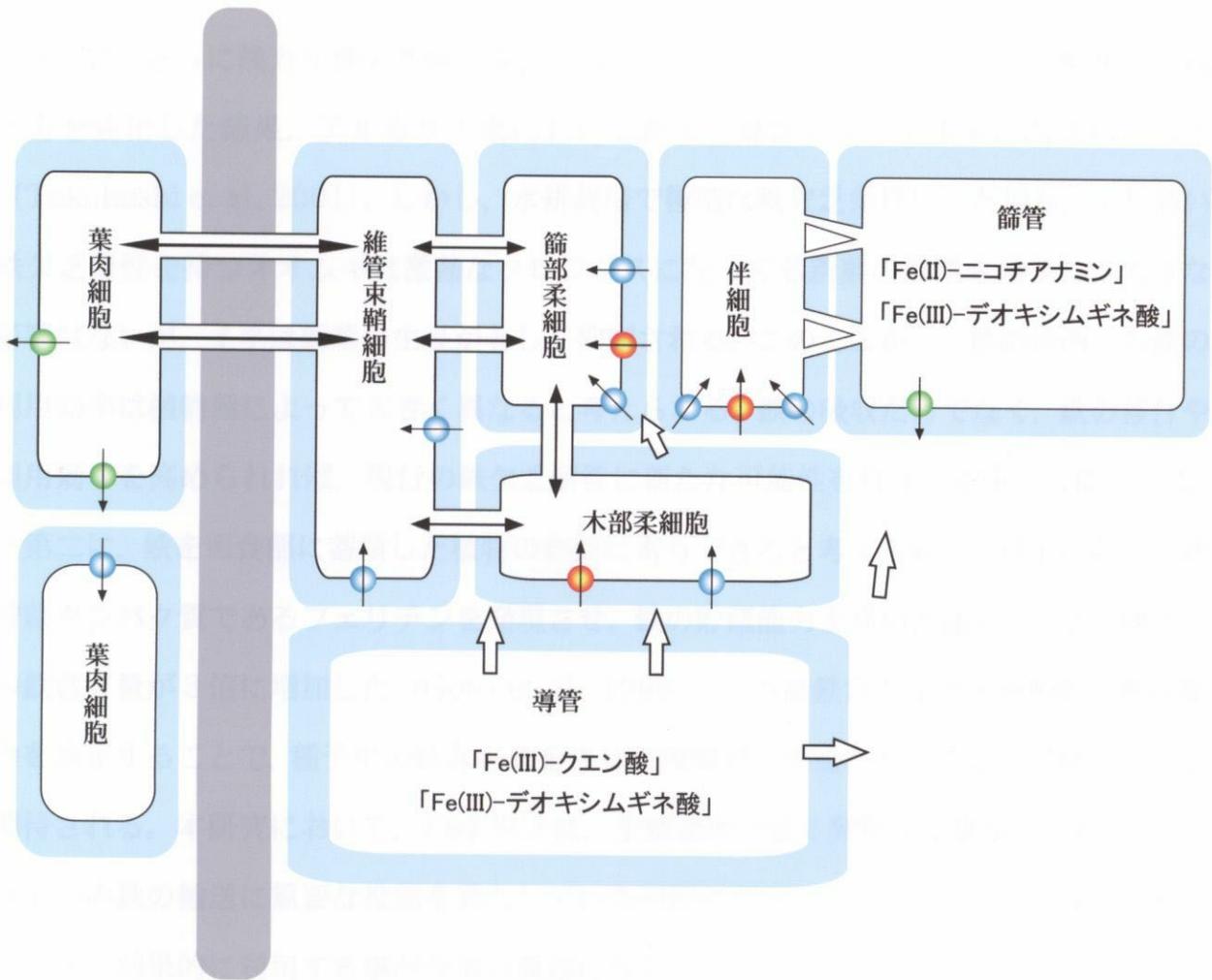


図6.4 葉の維管束周辺における鉄移行の模式図

- : OsYSL15 (外から内への移動)
- : OsYSL2 (外から内への移動)
- : 推定される未知の鉄放出トランスポーター (内から外への移動)
- ⇒ : アポプラスト移動
- ⇔ : シンプラスト移動
- : 細胞壁
- : 細胞膜
- : 維管束鞘細胞の細胞壁に存在する不透層をあらわす。

第一に、さらに強力な鉄欠乏耐性植物の創製への寄与である。すでにムギネ酸類合成能力を強化した結果、アルカリ土壌において鉄欠乏耐性を示すイネが作出されている (Takahashi et al., 2001)。しかし、水耕栽培で極端な鉄欠乏条件にした場合、より高い鉄欠乏耐性を持つオオムギは激甚なクロロシスになっても新葉の展開や伸長には大きな影響はないが、イネは新葉の生長が著しく抑制される。このことから、植物体内での鉄の利用効率は植物種によって大きく異なると考えられる。鉄の吸収だけでなく、鉄の移行や利用効率を高められれば、現行の鉄欠乏耐性に新たな可能性を付与する事が可能となる。

第二に、鉄を可食部に蓄積した植物の創製に寄与できると考えられる。種子において鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンを発現させ、鉄の貯蔵能力を高めた結果、イネの種子中の鉄含有量が3倍に増加した (Goto et al., 1999)。この高铁含有イネの鉄吸収、移行能力を強化することで、種子中の鉄含有量をさらに飛躍的に増強させることが可能になると期待される。本研究において、*OsYSL2* は、生殖過程で強く発現する事が示されており、種子への鉄の輸送に重要な役割を果たしている可能性が示された。これらのトランスポーターを、効果的に利用する事が今後の課題になると思われる。

第三に、可食部への有害重金属の移行の抑制に寄与できると考えられる。植物体内での鉄の動態は他の重金属の動態と密接に関連している。有害な金属であるカドミウムなどの動態は今後の研究対象として重要になると予想される。FAO/WHO 合同食品規格委員会 (コーデックス委員会) では、コメ、小麦、野菜、軟体動物などの食品にカドミウムの国際的な基準値 (上限許容量) を設定するための検討を行っている。平成 16 年 3 月において、コメ 1 kg 中に含まれるカドミウムの上限許容量を 0.4 mg としている。将来的には、カドミウムの上限許容量を 0.2 mg (= 0.2 ppm) とする案が提唱されている。このような状況の中、有害な重金属の可食部における蓄積量の少ない植物は、今後ますます需要が高まっていくと考えられる。

各種金属トランスポーターの機能と関連する遺伝子の発現を詳細に解明する事により、植物体内の望む部位へ自由に金属を輸送、蓄積することが可能になる日も、そう遠くはないかもしれない。

謝辞

本論文を作製するにあたり、多くの方々にご協力を得ました。

22K マイクロアレイ解析を行うにあたり、農業生物資源研究所 DNA バンク長、長村吉晃博士にご協力をいただきました。厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻植物分子生理学研究室の森敏名誉教授には、ご在籍中からご退官後にわたって、研究の方向性をしっかりと明示していただき、機に応じて叱咤激励していただきました。吉村悦郎助教授には、錯体化学についてご教授いただき、化学的な見地立って研究を進めることを教えていただきました。中西啓仁先生には、分子生物学的な実験を丁寧に指導していただき、困ったときにはいつも助けていただきました。農学国際専攻新機能植物開発学研究室の西澤直子教授には、形態観察についてご指導、ご助力をいただき、本論文作成に多大なご助力をいただきました。高橋美智子先生には、有益なご指導をいただいたほか、常に研究動向を気にかけていただきました。小林高範博士には、本論文作成に関して、研究の討論に加え、非常に丁寧な校閲をしていただきまして、感謝の言葉が見つからないほどです。東京農業大学生物科学部の樋口恭子博士には、大学院入学当初から実験の指導をしていただき、私の研究の基礎を築いていただきました。鈴木基史氏には、本論文第2章の *OsNAATI* と *OsDMASI* のノーザン解析を手伝っていただきました。これらの方々をはじめ、新機能植物開発学研究室の全ての方々に、本研究を進める上で、ディスカッションにつきあっていただき、ご助力、ご指導いただきました。ありがとうございました。

参考文献

- クローニングとシーケンス (1989) 農村文化社
- 植物の細胞を見る実験プロトコール (1997) 秀潤社
- バイオ実験イラストレイテッド ① 分子生物学実験の基礎 (1995) 秀潤社
- バイオ実験イラストレイテッド ② 遺伝子解析の基礎 (1995) 秀潤社
- バイオ実験イラストレイテッド ③ 本当にふえる PCR (1996) 秀潤社
- バイオ実験イラストレイテッド ④ 苦勞しないクローニング (1997) 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 (1996) 秀潤社
- 世界人口白書 (2004) 国連人口
- 石丸泰寛 (2003) 東京大学大学院農学生命科学研究科農学国際専攻
修士論文：イネの二価鉄トランスポーターに関する研究
- 根岸孝至 (2002) 東京大学大学院農学生命科学研究科農学国際専攻
博士論文：ムギネ酸類生合成系の酵素遺伝子に関する研究
- 水野大地 (2003) 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻
修士論文：イネ科植物の鉄代謝に係わる遺伝子 (*ZmNAS*, *OsYSL*, *OsFRD3*) に係わる研究
- 村上 高, 大橋祐子(1992)形質転換植物の組織切片中における GUS レポーター遺伝子発現の検出法, 植物細胞工学 4(4):281
- 高城誠一 (1984) 根における鉄吸収調節機構とその植物間差異。「東北の農業と土壌肥料」日本土壌肥料学会
- The State of Food Insecurity in the World (2001) The Food and Agricultural Organization of the United Nations**
- Bashir, K., Neghishi, T., Nagasaka, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K. (2004) Characterization of deoxymugineic acid synthase. In the book of abstracts for XII International symposium on iron nutrition and interactions in plants, Tokyo-Japan, p226.**
- Becker, R., Fritz, E. and Manteuffel, R. (1995) Subcellular Localization and Characterization of Excessive Iron in the Nicotianamine-less Tomato Mutant chloronerva. *Plant Physiol*, 108, 269-275.**
- Benes, J., Schreiber, K., Ripperger, H. and Kircheis, A. (1983) Metal complex formation by nicotianamine, a possible phytosiderophore. *Experientia*, 39, 261-262.**
- Böhme, H. and Scholz, G. (1960) Versuche zur Normalisierung des Phänotyps Mutante *Chloronerva* von *Lycopersicon esculentum* Mill. *Kulturpflanze*, 8, 93-109.**
- Bohren, K. M., Page, J. L., Shankar, R., Henry, S. P. and Gabbay, K. H. (1991) Expression of human aldose and aldehyde reductases. Site-directed mutagenesis of a critical lysine 262. *J Biol Chem*, 266, 24031-7.**
- Budesinsky, M., Budzikiewicz, H., Prochazka, Z., Ripperger, H., Römer, A., Scholz, G.**

- and Schreiber, K. (1980) Nicotianamine, a possible phytosiderophore of general occurrence. *Photochemistry*, **19**, 2295-2297.
- Bughio, N., Nakanishi, H., Kiyomiya, S., Matsushashi, S., Ishioka, N. S., Watanabe, S., Uchida, H., Tsuji, A., Osa, A., Kume, T., Hashimoto, S., Sekine, T. and Mori, S. (2001) Real-time [¹¹C]methionine translocation in barley in relation to mugineic acid phytosiderophore biosynthesis. *Planta*, **213**, 708-15.
- Bughio, N., Yamaguchi, H., Nishizawa, N.K., Nakanishi, H. and Mori, S. (2002) Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. *J Exp Bot*, **53**, 1677-82.
- Church, G. M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1991-5.
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S. L., Briat, J. F., and Walker, E. L. (2001) Maize *yellow stripe1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*, **409**, 346-349.
- Eide, D., Brodrius, M., Fett, J., and Guerinot, M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5624-5628.
- Finney, L. A. and O'Halloran, T. V. (2003) Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science*, **300**, 931-6.
- Fushiya, S., Sato, Y., Nozoe, S., Nomoto, K., Takemoto, T. and Takagi, S. (1980) Avenic acid A, a new amino acid possessing an iron-chelating activity. *Tetrahedron Lett*, **1980**, 3071-3072.
- Fushiya, S., Takahashi, K., Nakatsuyama, S., Sato, Y., Nozoe, S. and Takagi, S. (1982) Co-occurrence of nicotianamine and avenic acids in *Avena sativa* and *Oryza sativa*. *Phytochemistry*, **21**, 1907-1908.
- Gerbeau, P., Amodeo, G., Henzler, T., Santoni, V., Ripoche, P. and Maurel, C. (2002) The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J*, **30**, 71-81.
- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B. M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W. L., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T. C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R. M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalima, T., Oliphant, A. and Briggs, S. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*, **296**, 92-100.
- Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S. and Takaiwa, F. (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nat Biotechnol*, **17**, 282-6.
- Green, L. S., and Rogers, E. E. (2004) FRD3 Controls Iron Localization in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **136**, 2523-31.
- Hether, N., Olsen, R., and Jackson, L. (1984) Chemical identification of iron reductants

- excluded by plant roots. *J. Plant Nutr.*, **7**, 667-676.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T** (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, **6**, 271-282.
- Higuchi, K., Kanazawa, K., Nishizawa, N.K., Chino, M. and Mori, S.** (1994) Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots. *Plant Soil*, **165**, 173-179.
- Higuchi, K., Nishizawa, N.K., Yamaguchi, H., Römheld, V., Marschner, H. and Mori, S.** (1995) Response of nicotianamine synthase activity to Fe-deficiency in tobacco plants as compared with barley. *J Exp Bot*, **46**, 1061-1063.
- Higuchi, K., Nishizawa, N., Römheld, V., Marschner, H. and Mori, S.** (1996a) Absence of Nicotianamine Synthase Activity in the Tomato Mutant '*Chloronerva*'. *J Plant Nutr*, **19**, 1235-1239.
- Higuchi, K., Kanazawa, K., Nishizawa, N.K. and Mori, S.** (1996b) The role of nicotianamine synthase in response to Fe nutrition status in gramineae. *Plant and Soil*, **178**, 171-177
- Higuchi, K., Suzuki, K., Nakanishi, H., Yamaguchi, H., Nishizawa, N. K. and Mori, S.** (1999a) Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol*, **119**, 471-80.
- Higuchi, K., Nakanishi, H., Suzuki, K., Nishizawa, N.K. and Mori, S.** (1999b) Presence of nicotianamine synthase isozymes and their homologues in the root of graminaceous plants. *Soil Sci Plant Nutr*, **45**, 681-691.
- Higuchi, K., Watanabe, S., Takahashi, M., Kawasaki, S., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. and Mori, S.** (2001) Nicotianamine synthase gene expression differs in barley and rice under Fe-deficient conditions. *Plant J*, 159-167.
- Hussain, D., Haydon, M. J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S. M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J. F. and Cobbett, C. S.** (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**, 1327-39.
- Igarashi, Y., Yoshiba, Y., Takeshita, T., Nomura, S., Otomo, J., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (2000) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding proline transporter in rice. *Plant Cell Physiol*, **41**, 750-56.
- Jean, M.L., Briat, J.F. and Curie, C.** (2002) Involvement of AtYSL1 in plant resistance to iron excess. In the book of abstracts for XI International symposium on iron nutrition and interactions in plants, Udine-Italy, p128.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions :
-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 63901-63907.
- Kaminaka, H., Morita, S., Nakajima, M., Masumura, T. and Tanaka, K.** (1998) Gene cloning and expression of cytosolic glutathione reductase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol*, **39**, 1269-80.
- Kanazawa, K., Higuchi, K., Nishizawa, N.K., Fushiya, S., Chino, M. and Mori, S.**

- (1994) Nicotianamine aminotransferase activities are correlated to the phytosiderophore secretions under Fe-deficient conditions in Gramineae. *J Exp Bot*, **45**, 1903-1906.
- Kasai, T., Larsen, P. and Sorensen, H.** (1978) Free amino acids and glutamyl peptides in Fagaceae. *Phytochem*, **17**, 1911-1915.
- Kasai, T., Larsen, P. and Sakamura, S.** (1979) Amino acid composition of elm seed. *Agri. Biol. Chem*, **43**, 2197-2198.
- Kawai, S., Itoh, K., Takagi, S. and Nomoto, K.** (1988) Studies on phytosiderophore: biosynthesis of mugineic acid and 2'-deoxymugineic acid in *Hordeum vulgare* L. var Minorimugi. *Tetrahedron Lett*, **29**, 1053-1056.
- Kawai, S., Kamei, S., Matsuda, Y., Ando, R., Kondo, S., Ishizawa, A. and Alam, S.** (2001) Concentrations of iron and phytosiderophores in xylem sap of iron-deficient barley plants. *Soil Sci Plant Nutr*, **47**(2):265-272
- Khan, H.R., McDonald, G.K. and Rengel, Z.** (2004) Zinc fertilization and water stress affects plant water relations, stomatal conductance and osmotic adjustment in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Soil*, **0**, 1-14.
- Kobayashi, T., Nakanishi, H., Takahashi, M., Kawasaki, S., Nishizawa, N. K. and Mori, S.** (2001) In vivo evidence that *Ids3* from *Hordeum vulgare* encodes a dioxygenase that converts 2'-deoxymugineic acid to mugineic acid in transgenic rice. *Planta*, **212**, 864-71.
- Kosugi, S., Suzuka, I., Ohashi, Y., Murakami, T. and Arai, Y.** (1991) Upstream sequences of rice proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene mediate expression of PCNA-GUS chimeric gene in meristems of transgenic tobacco plants. *Nucleic Acids Res* **19**, 1571-1576
- Kristensen, I. and Larsen, P.** (1974) Azetidine-2-carboxylic acid derivatives from seeds of *Fagus silvatica* L. and a revised structure for nicotianamine. *Pytochem.*, **13**, 2791-2798.
- Ling, H. Q., Koch, G., Baumlein, H. and Ganai, M. W.** (1999) Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7098-103.
- Lytle, C.M. and Jolley, V.D.** (1991) Iron deficiency stress response of various C-3 and C-4 grain crop genotypes: strategy II mechanism evaluated. *J Plant Nutr*, **14**, 341-361.
- Ma, J.F. and Nomoto, K.** (1993) Two related biosynthetic pathways of mugineic acids in gramineous plants. *Plant Physiol*, **102**, 373-378.
- Ma, J.F., Taketa, S., Chang, Y.C., Iwashita, T., Matsumoto, H., Takeda, K. and Nomoto, K.** (1999) Genes controlling hydroxylations of phytosiderophores are located on different chromosomes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **207**: 590-596.
- Marschner, H.** (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Ed. *Academic Press*,
- Marschner, H., Römheld, V. and Kissel, M.** (1986) Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J Plant Nutr*, **9**, 695-713.
- Mihashi, S. and Mori, S.** (1989) Characterization of mugineic acid-Fe transporter in Fe-deficient barley roots using the multicompartment transporter box method. *Biol*

Metals, **2**, 146-154.

- Mino, Y., Ishida, T., Ota, N., Inoue, M., Nomoto, K., Takemoto, T., Tanaka, H. and Sugiura, Y.** (1983) Mugineic acid-iron(III) complex: Characterization and implication of absorption and transport of iron in gramineous plants. *J Am Chem Soc*, **105**, 6971-4676.
- Mizuno, D., Higuchi, K., Sakamoto, T., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N. K.** (2003) Three nicotianamine synthase genes isolated from maize are differentially regulated by iron nutritional status. *Plant Physiol*, **132**, 1989-97.
- Mori, S., Nishizawa, N., Hayashi, H., Chino, M., Yoshimura, E. and Ishihara, J.** (1991) Why are young rice plants highly susceptible to iron deficiency? *Plant and Soil*, **130**, 143-156.
- Mori, S. and Nishizawa, N.** (1987) Methionine as a dominant Precursor of Phytosiderophores in Gramineae Plants. *Plant Cell Physiol*, **28**, 1081-1092.
- Morjana, N. A., Lyons, C. and Flynn, T. G.** (1989) Aldose reductase from human psoas muscle. Affinity labeling of an active site lysine by pyridoxal 5'-phosphate and pyridoxal 5'-diphospho-5'-adenosine. *J Biol Chem*, **264**, 2912-9.
- Murakami, T., Ise, K., Hayakawa, M., Kamei, S. and Takagi, S.** (1989) Stabilities of metal complexes of mugineic acids and their specific affinities for iron(III). *Chemistry Letters*, 2137-2140.
- Nagasaka, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K.** (2004) Morphological and immunocytochemical analysis on synthesis and secretion of MAs in *Hordeum vulgare*. In the book of abstracts for XII International symposium on iron nutrition and interactions in plants, Tokyo-Japan, p238.
- Nakanishi, H., Bughio, N., Matsushashi, S., Ishioka, N., Uchida, H., Tsuji, A., Osa, A., Sekine, T., Kume, T. and Mori, S.** (1999) Visualising real time [¹¹C]methionine translocation in Fe-sufficient and Fe-deficient barley using a Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS). *J Exp Bot*, **50**, 637-643.
- Nakanishi, H., Okumura, N., Umehara, Y., Nishizawa, N. K., Chino, M. and Mori, S.** (1993) Expression of a gene specific for iron deficiency (*Ids3*) in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Cell Physiol*, **34**, 401-10.
- Nakanishi, H., Yamaguchi, H., Sasakuma, T., Nishizawa, N. K. and Mori, S.** (2000) Two dioxygenase genes, *Ids3* and *Ids2*, from *Hordeum vulgare* are involved in the biosynthesis of mugineic acid family phytosiderophores. *Plant Mol Biol*, **44**, 199-207.
- Nakazono, M., Qiu, F., Borsuk, L. A., and Schnable, P. S.** (2003) Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *Plant Cell*, **15**, 583-96.
- Negishi, T., Nakanishi, H., Yazaki, J., Kishimoto, N., Fujii, F., Shimbo, K., Yamamoto, K., Sakata, K., Sasaki, T., Kikuchi, S., Mori, S. and Nishizawa, N. K.** (2002) cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *Plant J*, **30**, 83-94.

- Nishizawa, N. and Mori, S.** (1987) The particular vesicle appearing in barley root cells and its relation to mugineic acid secretion. *J Plant Nutr*, **10**, 1013-1020.
- Noma, M., Noguchi, M. and Tamaki, E.** (1971) A new amino acid, nicotianamine, from tobacco leaves. *tetrahedron Lett*, **22**, 2017-2020.
- Noma, M. and Noguchi, M.** (1976) Occurrence of nicotianamine in higher plants. *Phytochem*, **15**, 1701-1702.
- Nomoto, K., Mino, Y., Ishida, T., Yoshioka, H., Ota, N., Inoue, M., Takagi, S. and Takemoto, T.** (1981a) X-ray crystal structure of the copper(II) complex of mugineic acid, a naturally occurring metal chelator of graminaceous plants. *J.C.S.Chem.Comm.*, 338-339.
- Nomoto, K., Yoshioka, H., Arima, M., Fushiya, S., Takagi, S., and Takemoto, T.** (1981b) Structure of 2'-deoxymugineic acid, a novel amino acid possessing an iron chelating activity. *Chimia*, **35**, 249-250.
- Nomoto, K. and Ohfune, Y.** (1982) Studies on structures, synthesis and metal complexes of mugineic acids. *J. Syn. Org. Chem. Japan*, **40**, 401-414.
- Nozoye, T., Nakanishi, R.I., Nagasaka, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K.** (2004) Diurnal changes in the expression of genes that participate in phytoalexin synthesis in rice. *Soil Sci Plant Nutr*, **50**, 1125-1131.
- Ohata, T., Kanazawa, K., Mihashi, S., Nishizawa, N.K., Fushiya, S., Nozoe, S., Chino, M. and Mori, S.** (1993) Biosynthetic pathway of phytoalexins in iron-deficient graminaceous plants: Development of an assay system for the detection of nicotianamine aminotransferase activity. *Soil Sci Plant Nutr*, **39**, 745-749.
- Okumura, N., Nishizawa, N.K., Umehara, T., Ohata, T., Nakanishi, H., Yamaguchi, T., Chino, M. and Mori, S.** (1994) A dioxygenase gene (*Ids2*) expressed under iron deficiency conditions in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Mol. Biol.*, **25**, 705-719.
- Olsen, R. and Brown, J.** (1980) Factors related to iron uptake by dicotyledonous and monocotyledonous plants. *J. Plant Nutr.*, **2**, 629-660.
- Pich, A., Manteuffel, R., Hillmer, S., Scholz, G. and Schmidt, W.** (2001) Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta*, **213**, 967-76.
- Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L. and Guerinot, M.L.** (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, **397**, 694-697.
- Rogers, E. E. and Guerinot, M. L.** (2002) FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**, 1787-99.
- Römheld, V.** (1987) Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Plant Physiol*, **70**, 231-234.
- Römheld, V. and Marschner, H.** (1981) Rhythmic iron stress reactions in sunflower at suboptimal iron supply. *Physiol Plant*, **71**, 949-954.
- Roncarati, R., Salamini, F. and Bartels, D.** (1995) An aldose reductase homologous gene from barley: regulation and function. *Plant J*, **7**, 809-22.
- Rudolph, A., Becker, R., Scholz, G., Procházka, Z., Toman, J., Macek, T. and Herout, V.** (1985) The occurrence of the amino acid nicotianamine in plants and microorganisms:

- A reinvestigation. *Biochem. Physiol. Pflanz*, **180**, 557-563.
- Rudolph, A., Becker, R., Scholz, G. Z. P., Toman, J. T. M. and Herout, B.** (1985) The occurrence of the amino acid nicotianamine in plants and microorganism. *Biochem. Physiol. Pflanz*, **180**, 557-563.
- Sakaguchi, T., Nishizawa, N.K., Nakanishi, H., Yoshimura, E. and Mori, S.** (1999) The role of potassium in the secretion of mugineic acids family phytosiderophores from iron-deficient barley roots. *Plant Soil*, **215**, 221-227.
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S. J., Ryan, P. R., Delhaize, E. and Matsumoto, H.** (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J*, **37**, 645-53.
- Schaaf, G., Ludewig, U., Erenoglu, B. E., Mori, S., Kitahara, T. and von Wirén, N.** (2004) ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J Biol Chem*, **279**, 9091-6.
- Schade, S. Z., Early, S. L., Williams, T. R., Kezdy, F. J., Henrikson, R. L., Grimshaw, C. E. and Doughty, C. C.** (1990) Sequence analysis of bovine lens aldose reductase. *J Biol Chem*, **265**, 3628-35.
- Scholz G** (1965) *Kulturpflanze*, **13**: 239-245
- Scholz, G., Schlesier, G. and Seifert, K.** (1985) Effect of nicotianamine on iron uptake by the tomato mutant '*chloronerva*'. *Physiol Plant*, **63**, 99-104
- Scholz, G., Becker, R., Pich, A. and Stephan, U.W.** (1992) Nicotianamine- a common constituent of strategies I and II of iron acquisition by plants: a review. *J. Plant Nutr.*, **15**, 1647-1665.
- Scholz, G. and Rudolph, A.** (1968) A Biochemical mutant of *Lycopersicon esculentum* Mill. Isolation and properties of the ninhydrin-positive "Normalizing Factor". *Phytochemistry*, **7**, 1759-1764.
- Sharma, P. N., Tripathi, A. and Bisht, S. S.** (1995) Zinc Requirement for Stomatal Opening in Cauliflower. *Plant Physiol*, **107**, 751-756.
- Shojima, S., Nishizawa, N.K. and Mori, S.** (1989) Establishment of a cell-free system for the biosynthesis of nicotianamine. *Plant Cell Physiol*, **30**, 673-677.
- Shojima, S., Nishizawa, N.K., Fushiya, S., Nozoe, S., Irifune, T. and Mori, S.** (1990) Biosynthesis of phytosiderophores. *In vitro* biosynthesis of 2'-deoxymugineic acid from L-methionine and nicotianamine. *Plant Physiol*, **93**, 1497-1503.
- Stephan, U.W. and Grün, M.** (1989) Physiological disorders of the nicotianamine-auxotroph tomato mutant *chloronerva* at different levels of iron nutrition. II: Iron deficiency response and heavy metal metabolism. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **185**, 189-200.
- Stephan, U. and Rudolph, A.** (1984) An improved and standardized method for extraction of nicotianamine from plant tissue. *Biochem. Physiol. Pflanz*, **179**, 517-523.
- Sugiura, Y., Tanaka, H., Mino, Y., Ishida, T., Ota, N., Nomoto, K., Yoshioka, H. and Takemoto, T.** (1981) Structure, properties, and transport mechanism of iron(III) complex of mugineic acid, a possible phytosiderophore. *J Am Chem Soc* **103**, 6979.

- Suzuki, K., Higuchi, K., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. and Mori, S.** (1999) Cloning of nicotianamine synthase genes from *Arabidopsis thaliana*. *Soil Sci Plant Nutr*, **45**, 993-1002.
- Takagi, S.** (1976) Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washings. *Soil Sci Plant Nutr*, **22**, 423-433.
- Takagi, S., Nomoto, K. and Takemoto, T.** (1984) Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *J. Plant Nutr.*, **7**, 469.
- Takahashi, M., Nakanishi, H., Kawasaki, S., Nishizawa, N. K. and Mori, S.** (2001) Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nat Biotechnol*, **19**, 466-469.
- Takahashi, M., Yamaguchi, H., Nakanishi, H., Shioiri, T., Nishizawa, N. K. and Mori, S.** (1999) Cloning two genes for nicotianamine aminotransferase, a critical enzyme in iron acquisition (Strategy II) in graminaceous plants. *Plant Physiol*, **121**, 947-956.
- Takahashi, M., Terada, Y., Nakai, I., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S. and Nishizawa, N. K.** (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell*, **15**, 1263-80.
- Takahashi, M., Inoue, H., Ushio, Y., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K.** (2004) Role of nicotianamine and deoxymugineic acid in plant reproductive development. In the book of abstracts for XII International symposium on iron nutrition and interactions in plants, Tokyo-Japan, p220.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Fujiwara, T.** (2002) Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature*, **420**, 337-40.
- Takemoto, T., Nomoto, K., Fushiya, S., Ouchi, R., Kusano, G., Hikino, H., Takagi, S., Matsuura, Y. and Kakudo, M.** (1978) Structure of mugineic acid, a new amino acid possessing an iron-chelating activity from roots washing of water-cultured *Hordeum vulgare* L. *Proc. Japan Acad*, **54**, 469-473.
- Takizawa, R., Nishizawa, N.K., Nakanishi, H. and Mori, S.** (1996) Effect of iron deficiency on S-adenosyl-methionine synthetase in barley roots. *J Plant Nutr*, **19**, 1189-1200.
- Tusnady, G. E. and Simon, I.** (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, **17**, 849-50.
- Ueno, D., Iwashita, T., Nomoto, K., Rombola, A.D. and Ma, J.F.** (2004) Identification of two new phytosiderophores secreted from perennial grasses. In the book of abstracts for XII International symposium on iron nutrition and interactions in plants, Tokyo-Japan, p102.
- Unterlinner, B., Lenz, R. and Kutchan, T. M.** (1999) Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. *Plant J*, **18**, 465-75.
- Vacchina, V., Mari, S., Czernic, P., Marques, L., Pianelli, K., Schaumlöffel, D., Lebrun, M. and Lobinski, R.** (2003) Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass

- spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. *Anal Chem*, **75**, 2740-5.
- von Wirén, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J. F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R. A. and Hider, R. C.** (1999) Nicotianamine chelates both Fe^{III} and Fe^{II} implications for metal transport in plants. *Plant Physiol*, **119**, 1107-1114.
- Walker, E.L.** (2002) Functional analysis of the *Arabidopsis* yellow stripe-like (YSL) family. Heavy metal transport and partitioning via metal-nicotianamine (NA) complexes. *Plant Physiol*, **129**, 431-432.
- Wallace, A. and Lunt, O.R.** (1960) Iron chlorosis in horticultural plants. *Proc Am Soc Hort Sci*, **75**, 819-841.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E. and Clemens, S.** (2004) Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J*, **37**, 269-81.
- Weinberg, E .D.** (1989) Cellular regulation of iron assimilation. *Q Rev Biol*, **64**, 261-90.
- Yoshida, T., Kawai, S. and Takagi, S.** (2004) Dtection of the regions of phytosiderophore release from barley roots. *Soil Sci Plant Nutr*, **50**, 1111-1114.
- Yoshimura, E., Sakaguchi, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., Nakai, I. and Mori, S.** (2000) Characterization of the chemical state of iron in the leaves of wild-type tomato and of a nicotianamine-free mutant chloronerva by X-ray absorption near-edge structure (XANES). *Phytochemical Analysis*, **11**, 160-162.