

博士論文

イネの金属元素トランスポーターに関する研究

農学国際専攻

平成 15 年度博士課程 進学

氏名 石丸 泰寛

指導教官 西澤 直子

目次

略語表

使用したプライマー

使用した酵母の欠損株

第1章 序文

- 1-1 研究の背景
- 1-2 植物の Fe 吸収機構
- 1-3 植物の Zn トランスポーター
- 1-4 本論文の概要

第2章 イネの新たな Fe 吸収機構

- 2-1 要約
- 2-2 実験方法
- 2-3 実験結果
- 2-4 考察

第3章 Fe 欠乏耐性イネの創製

- 3-1 要約
- 3-2 実験方法
- 3-3 実験結果
- 3-4 考察

第4章 イネの新規 Zn トランスポーター遺伝子 (*OsZIP4*) の単離と解析

- 4-1 要約
- 4-2 実験方法
- 4-3 実験結果
- 4-4 考察

第5章 総括

- 5-1 イネの Fe トランスポーターについて
- 5-2 イネの Zn トランスポーターについて

謝辞

参考文献

略語表

BPDS	bathophenanthroline disulphonic acid
DMA	2'-デオキシムギネ酸
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FRO	Fe ³⁺ キレート還元酵素遺伝子 (Fe ³⁺ chelate reductase)
GUS	β-グルクロニターゼ (β-glucuronidase)
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
IRT	Fe ²⁺ トランスポーター (<u>I</u> ron <u>R</u> egulated <u>T</u> ransporter)
NA	ニコチアナミン (nicotianamine)
NAS	ニコチアナミン合成酵素 (nicotianamine synthase)
NAAT	ニコチアナミンアミノ基転移酵素 (nicotianamine aminotransferase)
MA	ムギネ酸 (muginetic acid)
MS	Murashige & Skoog
PETIS	<u>P</u> ositron <u>E</u> mitting <u>T</u> racer <u>I</u> maging <u>S</u> ystem
ZIP	<u>Z</u> inc-regulated transporters, <u>I</u> ron-regulated transporter-like <u>P</u> rotein
ZRT	Zn トランスポーター (<u>Z</u> inc <u>R</u> egulated <u>T</u> ransporter)

使用したプライマー

OsIRT2RT.F (5'-CGTTCCACACGCGGGGCAGCAAG)
OsIRT2RT.R (5'-GGATGATGATCCGTACGGCAGAAG)
OsIRT1RT.F (5'-CGTCTTCTTCTTCTCCACCACGAC)
OsIRT1RT.R (5'-GCAGCTGATGATCGAGTCTGACC)
Os α -tubulinRT.F (5'-TCTTCCACCCTGAGCAGCTC)
Os α -tubulinRT.R (5'-AACCTTGGAGACCAGTGCAG)
Adaptor-GFP5' (5'-TCGAGATATCGGTACCAGATCTGAGCTCGAGGTCGA)
Adaptor-GFP3' (5'-CTAGTCGACCTCGAGCTCAGATCTGGTACCGATATC)
OsIRT1G.F (5'-GTTGGAATTCGTCACGGCATGGCGACGCCGCGGACACTGGT)
OsIRT1G.R (5'-ACAATAATGGCGGCCGCTCACGCCCACTTGGCCATGACG)
OsIRT2G.F (5'-CACGCGGTACCCCACTTGGCCATGACGGAC)
OsIRT2G.R (5'-GCTGGTACCTAACATCGAAGCTTTGTA)
OsIRT1p F (5'-CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTTCTTTC)
OsIRT1p R (5'-CGCTGTGCACTCTAGATTTTGCTACGTACGTACTCAGG)
OsFRO1-5 (5'-CAGCCGGCCTGCTAATGTGG)
OsFRO1-3 (5'-CCAAGCACCTTGATCAGGATCGACAT)
OsFRO2-5 (5'-GGCATAGAACTCGCCTTCTTTCTC)
OsFRO2-3 (5'-CGCGTAGAAGAAGAGCTCGAACATC)
refre1/372.F (5'-GCGCGCGGTACCTCTAGATGGTTAGAACCAGAGTC)
refre1/372.R (5'-GCGCGGCTCGAGCCAAGTAAACTCTCCTCCTCTA)
OsZIP4 forward (5'-CACCATGGACGCCATGAGGCAGAGCACGCG)
OsZIP4 reverse (5'-TCATGCCCATATGGCAAGCAGAGACATCAT)
OsIRT1 forward
(5'-CACCGAATTCCGTACGGCATGGCGACGCCGCGGACACTGGT)
OsIRT1 reverse (5'-ACAATAATGGCGGCCGCTCACGCCCACTTGGCCATGACG)
OsZIP1 forward (5'-CACCGGCGCAAGCTTCGACCATGGCCAGGA)
OsZIP1 reverse (5'-GAAGCAAGTCTAGAACTAGGATGGATGGATC)
OsZIP3 forward (5'-CACCATGGGAGCCAAGAAGCATACTTGA)
OsZIP3 reverse (5'-CTATGCCCATATGGCAAGCATTGACATCAG)
OsZIP4 RT.F (5'-GCGAAAGCAACAGTGATCATGGCGACTTTC)
OsZIP4 RT.R (5'-GCAGCTCTTGGTTGCTCTGAAGATCTCATG)
OsZIP1 RT.F (5'-CTCTTCAAGTTCCTCGCCGTCCT)
OsZIP1 RT.R (5'-CGGCCACGATTAATGAATGGGGTG)
OsZIP3 RT.F (5'-AATGTGCATAGCTCAACTGCCTT)
OsZIP3 RT.R (5'-CAAAATCAAGCCTATCTGGGA)
OsZIP4 ORF5 (5'-CACCATGGACGCCATGAGGCAGAGCACGCG)
OsZIP4 ORF3 (5'-TGCCCATATGGCAAGCAGAGACATCATCCC)

使用した酵母の欠損株

CM3260 (parent strain) : *MATalpha trp1-63 leu2-3,112 gcn4-101 his3-609 ura3-52*,

CM-FET (Fe 吸収欠損株) : *MATalpha trp1-63 leu2-3,112 gcn4-101 his3-609 ura3-52*
Δfet4::TRP Δfet3::HIS

CM-SMF (Mn 吸収欠損株) : *MATalpha trp1-63 leu2-3,112 gcn4-101 his3-609 ura3-52*
Δsmf1::URA3

CM-ZRT (Zn 吸収欠損株) : *MATalpha trp1-63 leu2-3,112 gcn4-101 his3-609 ura3-52*
Δzrt1::URA3 Δzrt2::HIS3

FTRUNB1 (Cu 吸収欠損株) : *MATalpha trp1-63 leu2-3,112 gcn4-101 his3-609 ura3-52*
Δctr1::URA3

第 1 章 序論

1-1 研究の背景

2005 年現在、64 億人である世界人口は今なお年間 7600 万人の割合で急速に増加している（世界人口白書、2005）。国連の推計では現在から 2050 年までに約 25 億人が増加するとされるが、これは 1950 年の全世界の人口に匹敵する。しかし、現在ですらこの人口を支えるだけの食糧の生産は十分とは言えず、世界では、8 億人以上が栄養不足に苦しんでいる（The State of Food Insecurity in the World, 2001）。今後も不足が予想される食糧の増産をいかに達成するかは、人類にとって重要な問題である。これまでも緑の革命を始めとして単位面積当たりの収穫量を増加させることにより、人口の増加に対応してきた。しかし現在、単位面積当たりの収穫量の増加率は既に頭打ちになってきており、これ以上の収穫量の飛躍的な増加は期待できない。この深刻な食糧問題の有力な解決方法のひとつは耕地面積の拡大である。すなわち、今までは農耕地として利用されていなかった、もしくは利用されてはいても高い収量を確保出来なかった不良土壌の活用に問題解決の糸口がある。不良土壌の中でも特に、鉄（Fe）欠乏地帯である石灰質アルカリ土壌、あるいは亜鉛（Zn）欠乏地帯は、世界中に広く存在する。

よく耕された好気的な土壌では、Fe は Fe^{3+} として存在する。半乾燥地域の炭酸カルシウムが高濃度で集積した石灰質アルカリ土壌では、土壌中の pH が高いために Fe^{3+} の溶解度が低く、植物は十分な Fe を吸収できずに Fe 欠乏となる。すなわち、Fe 欠乏クロロシスを呈し、生長は抑制され、症状が重い場合にはや

がて枯死してしまう。このような土壌は世界の耕地面積のおよそ 3 分の 1 を占めるため、これらの不良土壌における生産性を改善できれば食糧問題や環境問題の解決に大きく貢献できる。現状では、pH 矯正剤を投与したり、キレート Fe を葉面散布したりすることによって、Fe 欠乏を回避することが行われている。しかしながら、これらの手法はコストが高く、特に発展途上国では実現不可能であり、根本的な解決にはならない。そこで植物の Fe 吸収機構や体内での輸送機構を理解することによって、Fe の吸収能力が高く、また体内利用効率の高い植物を育種することが重要であると考えられる。

Zn 欠乏地帯では、土壌中の Zn は粘土などの鉱物や有機物に沈着するため、植物が吸収できる土壌溶液中の Zn は、土壌中の全 Zn 量のごく一部でしかなく、還元が進んだ土壌や pH が高いアルカリ土壌では、さらに植物が利用できる Zn の量は少なくなる。そのような土壌では、Zn 欠乏によって植物の生育は阻害され、Fe 欠乏と同様に症状が重い場合にはやがて枯死してしまう。

石灰質アルカリ土壌においても Fe を十分に吸収できるような植物、もしくは少ない体内 Zn を効率よく利用できるような植物、特にイネ科の作物を創製できれば、食糧増産、沙漠の緑化などの様々な問題に対応できる。本研究では、そのような Fe 欠乏耐性、Zn 欠乏耐性を備えた植物の創製を最終的な目標とし、植物の Fe、Zn 栄養、特にこれらの金属元素の根圏からの獲得に関する研究を行った。

1-2 植物の Fe 吸収機構

植物において Fe は、クロロフィル生合成、光合成、呼吸など多くの機能を果たすために、必要不可欠な元素である。Fe は土壌中に豊富に存在しているが、好氣的条件下では、そのほとんどは酸化され、植物が容易に利用できない $\text{Fe}(\text{OH})_3$

という不溶態となる (Guerinot and Yi, 1994)。高等植物は一般的に Fe 欠乏条件を克服するために、土壌から Fe を吸収するための Strategy I, Strategy II という 2 種類の異なった戦略を進化させた (Römheld and Marschner, 1986) (図 1)。

双子葉植物および非イネ科植物が持つ Strategy I は、土壌溶液中の pH を下げるためにプロトンを分泌し、 Fe^{3+} キレート還元酵素で Fe^{3+} を Fe^{2+} イオンに還元し、 Fe^{2+} トランスポーターにより Fe^{2+} イオンを吸収する機構である。 Fe^{3+} キレート還元酵素遺伝子 *FRO2*, *FRO1*, *FRO3* (Robinson *et al.*, 1997, 1999), および Fe^{2+} トランスポーター遺伝子 *IRT1* (Eide *et al.*, 1996), *IRT2* (Vert *et al.*, 2001) は、シロイヌナズナから単離されている。 Fe 欠乏条件を感知することで、*FRO2* の発現が誘導され、根の表皮における Fe^{3+} キレート還元酵素活性が上昇するとともに、*IRT1* の発現も誘導される (Robinson *et al.*, 1999; Waters *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2004)。

イネ科植物が持つ Strategy II 機構では、MAs を根から分泌し、土壌中に存在する Fe^{3+} をキレートして可溶化する (Takagi, 1976; Takagi *et al.*, 1984)。これまでの生化学的、遺伝学的解析により、メチオニンを前駆体とした MAs の生合成経路が明らかにされた (Mori and Nishizawa, 1987; Kawai *et al.*, 1988; Shojima *et al.*, 1990; Ma and Nomoto, 1993; Ma *et al.*, 1999)。この生合成経路上の各ステップを触媒する酵素の遺伝子は、オオムギ (*Hordeum vulgare*) から単離されている (Herbik *et al.*, 1999; Higuchi *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2001; Nakanishi *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 1999; 井上, 2005)。また、これらのうちいくつかの遺伝子は、他のイネ科植物であるイネ (*Oryza sativa*) , トウモロコシ (*Zea mays*) から単離されている (Higuchi *et al.*, 2001; Mizuno *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2005; 井上, 2005)。イネ科植物は、 Fe 欠乏条件に応答して MAs の合成と分泌を増加させ、 Fe^{3+} -MAs 複合体の形で、 Fe^{3+} -MAs 複合体トランスポーターを介して吸収する。

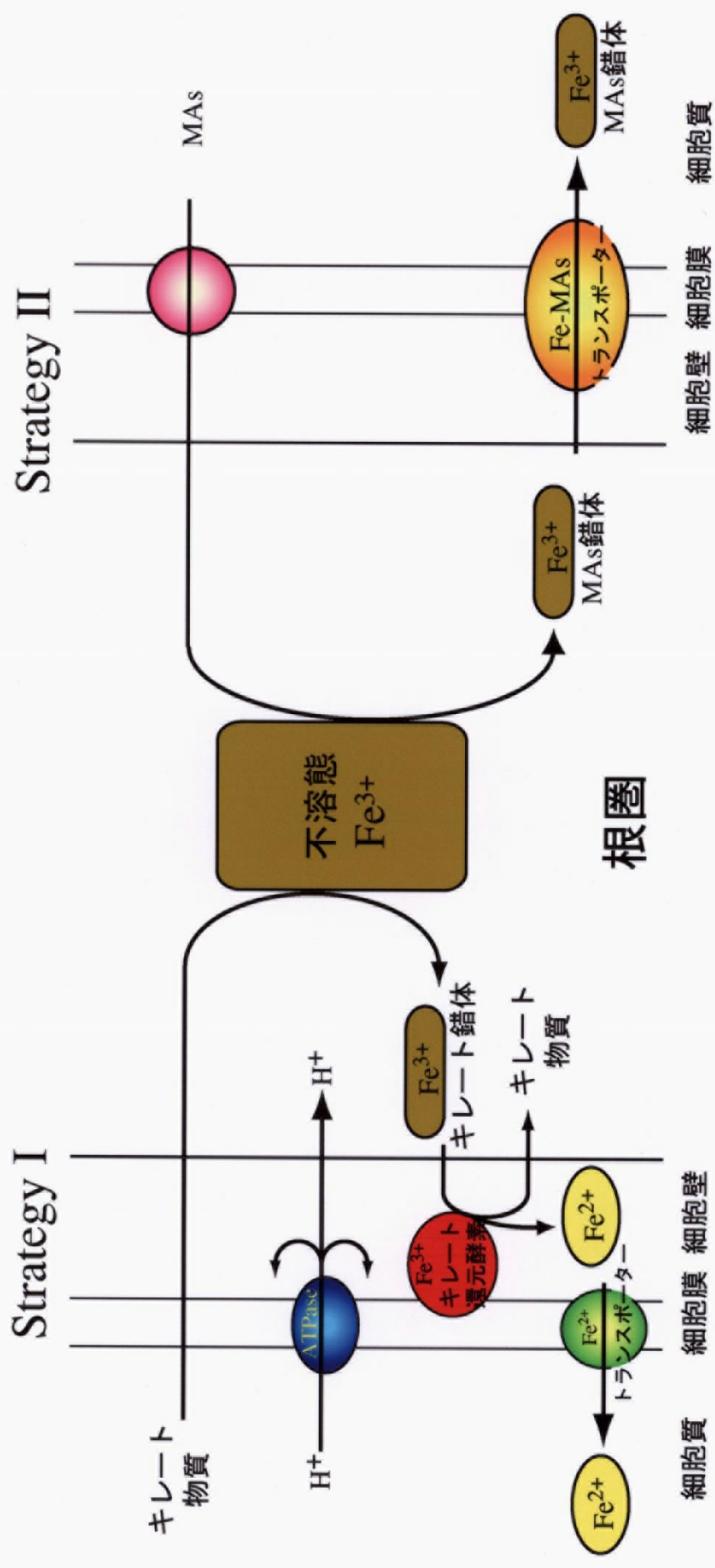


図 1 高等植物のFe獲得機構：Strategy IとStrategy II

高親和性の Fe^{3+} -MAs 複合体トランスポーターをコードするトウモロコシの *YSL* 遺伝子が単離され、その輸送基質の特異性などが解析されている (Curie *et al.*, 2001; Schaaf *et al.*, 2004)。イネにも *YSL* に相同性の高い 18 個の *OsYSL* 遺伝子が存在し、その一つである *OsYSL2* は、 Fe-NA 、マンガン (Mn) -NA を輸送する金属-NA トランスポーターであることが報告されている (Koike *et al.*, 2004)。

Strategy II 植物であるイネは、 Fe 欠乏条件で MAs のうち DMA を分泌する。イネは根から Fe を可溶化できる物質を分泌することが初めて発見された植物である (Takagi, 1976)。しかし、多くのイネ科植物と異なり、イネやその野生種は、 Fe^{3+} より Fe^{2+} が多く存在する湛水条件に適応して生育している。それゆえ、イネは Fe^{3+} -MAs の他に、 Fe^{2+} を吸収しているのではないかと考えられたが、イネの Fe^{2+} 吸収の分子機構に関する知見は全くなかった。以前、当研究室では、イネの Fe^{2+} トランスポーターをコードする遺伝子 *OsIRT1* を単離した (Buglio *et al.*, 2002)。*OsIRT1* は、シロイヌナズナの Fe^{2+} トランスポーター *IRT1* と共通のドメインを持ち、 Fe や Zn 吸収を行う ZIP 遺伝子ファミリートランスポーターの一員である。すなわち、*OsIRT1* は 8 つの推定膜貫通領域を持ち、その第 3、第 4 領域では、*IRT1* の特徴である複数のヒスチジン残基が保存されている。このヒスチジン残基が、輸送される金属を認識していると考えられている (Eng *et al.*, 1998; Guerinot, 2000; MacDiarmid *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2000)。このように、イネは、Strategy II 機構に加え、Strategy I の構成要素である Fe^{2+} トランスポーターを持っているため、土壌中から、 Fe^{2+} を直接吸収している可能性が考えられた。

1-3 植物の Zn トランスポーター

Zn は、多くの酵素の補因子や、転写制御タンパク質における重要な構造モチーフの一部であり、植物における数多くの生理過程で重要な役割を果たす必要不

可欠な元素である。それゆえ、Zn が欠乏することにより、植物の生育は阻害される。その一方で、細胞内の Zn が過剰になると、Fe など他の金属元素の取り込みが阻害されるために、葉脈間が黄白色化するクロロシスなどの症状が出て、光合成が阻害される場合がある。従って、Zn の吸収と体内での輸送は、厳密に制御されなければならない。細胞内の Zn の恒常性は、細胞内への Zn の流入、細胞外への排出、細胞内における液胞での Zn の区分化といった、部位特異的なトランスポーターが調和して働くことにより成立している。

シロイヌナズナのゲノムには、金属イオンの恒常性に関わる可能性のある数多くのカチオントランスポーターが存在し、そのいくつかについては機能が同定された (Maser *et al.*, 2001)。例えば、15 個の ZIP 遺伝子ファミリー (Guerinot, 2000) が同定され、シロイヌナズナにおける金属吸収や輸送に関わることが示された (Eide *et al.*, 1996; Korshunov *et al.*, 1999; Vert *et al.*, 2001, 2002; Connolly *et al.*, 2002)。前述のように、ZIP 遺伝子ファミリーの第 3, 第 4 領域にあるヒスチジン残基が、輸送される金属を認識していると考えられるが、この保存されたヒスチジン、あるいは金属イオンが結合する残基を変異によって置換すると、輸送される金属が変化したり、輸送活性は失われたりする (Rogers *et al.*, 2000)。

シロイヌナズナの ZIP1, ZIP3 および ZIP4 は、Zn 吸収に欠損のある酵母 (*Δzrt1*, *Δzrt2*) を相補する (Grotz *et al.*, 1998; Guerinot, 2000)。ZIP1 と ZIP3 は Zn 欠乏条件に応答して根で発現するため、土壌からの Zn 吸収に関わっていると考えられている。一方、ZIP4 は根や葉で発現していることから、細胞内や植物体内での Zn 輸送に関わっていると考えられている (Grotz *et al.*, 1998; Guerinot, 2000)。ZIP2 や ZIP4 は、銅 (Cu) 吸収に欠損のある酵母を相補し、ZIP4 の発現は Cu 欠乏条件の根で強く誘導される (Wintz *et al.*, 2003)。その他にも、様々な植物種からの ZIP トランスポーターのホモログが単離、解析され、ZIP トランスポーターは Zn

栄養に関わる遺伝子群であることが提唱された。例えば、ダイズから単離された GmZIP1 は、Zn 吸収欠損酵母 ($\Delta zrt1$, $\Delta zrt2$) を相補し、Zn を輸送する。しかし、Fe や Mn は輸送しないことから、輸送基質の特異性が高いと考えられる (Moreau *et al.*, 2002)。GmZIP1 は、根や茎葉では発現しないが、根粒特異的に発現し、ペリバクテロイド膜に局在しているため、共生に関わっていると考えられる。イネにおいても、Ramesh *et al.* (2003) により、Zn のトランスポーターである OsZIP1, OsZIP3 が報告されている。また、酵母の ZRT1 は高親和性 Zn トランスポーターであり、ZRT2 は低親和性 Zn トランスポーターである (Eide, 1998; Guerinot, 2000)。

1-4 本論文の概要

当研究室では、イネ科植物から Strategy II 機構に関わる遺伝子を単離、解析してきた。しかし、イネの Fe^{2+} 吸収の分子機構については全く明らかになっていない。そこで本研究では、「新たなイネの Fe 吸収機構」(第 2 章)を解析し、さらにその Fe 吸収機構を応用した「Fe 欠乏耐性イネの創製」(第 3 章)を行った。さらに、OsIRT1 に相同性の高い遺伝子「イネの新規 Zn トランスポーター遺伝子 (*OsZIP4*) の単離と解析」(第 4 章)を行った。

第2章 新たなイネのFe吸収機構

(Ishimaru *et al.*, *Plant J.* (2006) in press)

2-1 要約

イネ科植物は、 Fe^{3+} -MAs を介した Strategy II 機構により Fe を吸収する。しかしながら、イネ (*Oryza sativa*) は Strategy II 植物であるにもかかわらず、 Fe^{2+} を輸送する Fe^{2+} トランスポーター遺伝子 *OsIRT1* を持っている (Buguho *et al.*, 2002)。本章では、イネが Strategy II 機構に加えて、根圏に存在する Fe^{2+} イオンを直接吸収するという新たな Fe 吸収機構を有することを以下のようにして立証した。まず始めに、*OsIRT1* と非常に相同性の高い遺伝子 *OsIRT2* をイネから単離した。定量的 RT-PCR 法により、*OsIRT1* と *OsIRT2* は、主に Fe 欠乏条件の根で発現が強く誘導されることを見出した。Fe 吸収欠損酵母を用いた相補実験では、*OsIRT1* または *OsIRT2* を発現させることにより、Fe 欠乏培地での生育が回復した。*OsIRT1* または *OsIRT2* と GFP との融合タンパク質をタマネギ (*Allium cepa* L.) の表皮細胞に一過的に発現させると、これらのタンパク質は細胞膜に局在した。*OsIRT1* プロモーター-GUS 実験により、*OsIRT1* プロモーターが誘導する発現の組織特異性を検出した。発現は Fe 欠乏により誘導され、根の根端近くでは、主に表皮細胞と外皮細胞に、基部に近い部分では内皮細胞に隣接する皮層細胞に局在していた。さらに、根の伴細胞にも強い発現が見られた。Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS) 法を用いて、イネは Fe^{3+} -DMA の吸収に加え Fe^{2+} も吸収していることを明らかにした。しかし、その一方、イネの Fe 欠乏根では Strategy II 機構にみられる Fe^{3+} キレート還元酵素活性の上昇はみられず、FRO2 に相同性の高い *OsFRO1*, *OsFRO2* の発現も検出されなかった。すなわち、イネ科以外の植

物は、Fe 欠乏を感知すると、 Fe^{3+} キレート還元酵素活性と Fe^{2+} トランスポーターとの双方の活性を高めるのに対して、イネは Fe^{2+} トランスポーターのみの発現上昇で対応していると考えられえた。これらの結果により、イネは Fe^{3+} -DMA を吸収する機構に加え、 Fe^{2+} を根圏から直接吸収する機構を持つことを明らかにした。イネの Fe^{2+} 吸収機構は、水田のように、還元状態となり Fe^{2+} が豊富に存在する湛水条件で生育するイネにとって、非常に適していると考えられる。

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レイテッド」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。

植物サンプル

以下の実験に用いたイネの発芽は, 湿ったペーパータオル上で, 明期 25°C, 14 時間, 320 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$, 暗期 20°C, 10 時間の条件に制御された気象室で行った。発芽後, 水耕液の入ったフロート上で 1 週間生育させ, その後 20 L 水耕箱を用いた水耕栽培を天然光気象室で行った。水耕液の組成は以下の通りである。0.7 mM K_2SO_4 , 0.1 mM KCl , 0.1 mM KH_2PO_4 , 2.0 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.5 mM MgSO_4 , 10 μM H_3BO_3 , 0.5 μM MnSO_4 , 0.2 μM CuSO_4 , 0.5 μM ZnSO_4 , 0.05 μM Na_2MoO_4 , 0.1 mM Fe-EDTA 。水耕液は毎週取り替え, pH は毎日 1 M HCl で 5.3 に調整した。水耕箱での水耕栽培を 2 週間行った後, Fe-EDTA を水耕液から完全に取り除くことにより Fe 欠乏処理を行った。Fe 欠乏処理 1 週間後に, サンプルリングを行った。Zn 欠乏処理, Mn 欠乏処理, Cu 欠乏処理は, それぞれの金属を水耕液から除くことにより行い, それぞれ 2 週間, 2 週間, 3 週間後にサンプルリングを行った。

金属含量の測定

植物サンプルを 1 週間 65°C で乾燥させたものを用いた。乾燥させた植物サン

プル 30-50 mg に 11 M HNO₃ 2 mL を加え、150°C で 5 時間分解した。金属含量は、原子吸光光度計 (SPS1200VR; Seiko, Tokyo, Japan) を用い測定した。Fe は 238.204 nm, Zn は 213.856 nm, Mn は 293.930 nm, Cu は 324.754 nm の波長で計測した。

***OsIRT2* の単離**

Syngenta rice genome database (<http://www.tmri.org/EN/partnership/access.aspx>) を検索したところ、*OsIRT1* に相同性の高い遺伝子 *OsIRT2* の配列があることを確認した。プライマー *OsIRT2RT.F* と *OsIRT2RT.R* を用いて、cDNA ライブラリー (Bugchio *et al.*, 2002) を鋳型として増幅した PCR 断片をプローブとして、Fe 欠乏イネより調製した cDNA ライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションにより cDNA クローンの単離を行った。10 cm x 25 cm の Luria-Bertani (LB) プレート 1 枚につき、25000~50000 コロニーになるようにして計 6 枚のプレートに Fe 欠乏イネの根 cDNA ライブラリー大腸菌を塗付した。1 次スクリーニングでポジティブなクローンを得た後、3 次スクリーニングまで行って単一クローンを得た。その後、得られた *OsIRT2*cDNA クローンの塩基配列を決定した。シーケンシングには、Thermo Sequenase Cycle Sequencing kit (Shimadzu, Kyoto) と DNA sequencer (DSQ-2000L; Shimadzu) を用いた。

定量的リアルタイム-PCR

Fe 十分条件、Fe 欠乏条件、Zn 欠乏条件、Cu 欠乏条件、Mn 欠乏条件の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 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。逆転写反応には SuperScript II (Invitrogen) を用いた。こ

これらの処理は、付属の取扱説明書に従った。

Smart Cyclor (TaKaRa) を用いて定量的リアルタイム (RT) -PCR を行った。測定溶液の組成、機器の使用方法は、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 1 μg あたりの *OsIRT1*, *OsIRT2* 転写産物量を算出した。*OsIRT1*, *OsIRT2* を特異的に認識するために、*OsIRT1* にはプライマー OsIRT1RT.F と OsIRT1RT.R, *OsIRT2* にはプライマー OsIRT2RT.F と OsIRT2RT.R を用いた。内部標準を測定するためにハウスキーピング遺伝子である *α -tubulin* の転写産物の発現を調べ、同時に、ゲノムのコンタミネーションを確認するために、 *α -tubulin* のイントロンを挟んだエクソン内でプライマー Osa-tubulinRT.F, Osa-tubulinRT.R を作製した。これらの PCR 産物について、アガロースゲルの電気泳動で長さを、シーケンサーで配列を確認した。

酵母の金属吸収欠損株の作製

金属吸収の相補実験を行うための金属吸収欠損株は、相同組換え法を用い作製した。これらの株は、1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose (YPD) もしくは、適切なアミノ酸等を加えた synthetic defined (SD) 培地で生育させた。固形培地には 2% のアガロースを加えた (Sherman, 1991)。Fe 欠乏条件培地には、Fe を除いた SD 培地に、コンタミネーションの Fe をキレートさせ、その Fe を酵母が吸収できないよう、さらに 50 μM BPDS を添加したものをを用いた。

酵母での発現ベクターの作製

酵母の発現ベクターとして pYH23 (Buglio *et al.*, 2002) を用い、相補実験を行っ

た。pYH23 は、*ADH1* プロモーターの下流に *Hind*III, *Pvu*II, *Pst* I, *Xho* I, *Sst* I, *Xba* I, *Not* I サイトを持つ。この pYH23 を *Xho* I と *Not* I で処理し、*OsIRT1*cDNA の入ったプラスミドから *Xho* I と *Not* I で切り出した *OsIRT1* をつないだベクターpYH23-*OsIRT1* を作製した (Buglio *et al.*, 2002)。 *OsIRT2* も同様の手法を用い、発現ベクターの作製を行った。酵母への形質転換には、lithium-acetate 法を用いた (Gietz and Schiestl, 1995)。すべての酵母は、シングルコロニーを SD 液体培地 3 mL で 2 日間、前培養を行い、その後、500 μ L の前培養液を SD 液体培地 3 mL に加え、6 時間本培養を行った。相補実験では、培養した酵母を SD 液体培地で OD₆₀₀=0.1 に合わせ、10 μ L ずつ 10 倍希釈液系列を作製し、50 μ M BPDS を含む SD 培地上にスポットした。

OsIRT1-GFP, OsIRT2-GFP 融合タンパク質による細胞内局在の解析

OsIRT1-GFP, OsIRT2-GFP 融合タンパク質を発現させるためには、丹羽康夫博士 (静岡県立大学) より提供されたベクター(CaMV35S-sGFP(S65T)-NOS3')を用いた。CaMV35S-sGFP(S65T)-NOS3'には、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの 3'側に *Sal* I サイトと *Nco* I サイトが存在する。*Nco* I サイトである CCATGG は sGFP の開始コドンを含んでいる。*Sal* I サイトである GTCGAC と、*Kpn*I サイトである GGTACC を新たに作るために、*Sal*I サイトと *Nco*I サイトの間に、Adaptor-GFP5', Adaptor-GFP3'プライマーをアニールさせたものを挿入した。この得られたプラスミドを CaMV35S-*Sal*I-*Kpn*I-sGFP(S65T)-NOS3'とした。

イネの Fe 欠乏根から作製した cDNA を鋳型として、*OsIRT1* の ORF を OsIRT1G.F, OsIRT1G.R プライマー、*OsIRT2* の ORF を、OsIRT2G.F, OsIRT2G.R プライマーを用いて、増幅した。増幅した *OsIRT1*, *OsIRT2* 断片を *Sal*I と *Kpn*I で処理し、

CaMV35S-*SalI*-*KpnI*-sGFP(S65T)-NOS3'の同サイトにサブクローニングした。

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以下のように行った。Bio-Rad 社製 Biolistic PDS 1000/He パーティクルガン装置および同社の消耗品キットを用い, 基本的に同社のマニュアルに従って以下のように導入を行った。導入用のプラスミド DNA 液は, QIAGEN plasmid kit (QIAGEN) により高純度に精製したものをを用いた。直径 1.6 μm の金粒子をあらかじめ 99.5% エタノールで洗浄滅菌し, 滅菌蒸留水中に 60 mg/mL に懸濁したものを用意した。うちこみ 1 回分につき, この金粒子液 10 μl に, 1 μg の導入用プラスミド DNA 液, 10 μL の 2.5 M CaCl_2 , 4 μL の 0.1 M スペルミジンを順に攪拌しながら加え, 3 分間攪拌を続けた。室温で数分間静置後, 20 秒間遠心して上清を捨て, 70% エタノールで洗浄した。これを 10 μl の 99.5% エタノールに懸濁し, あらかじめ 99.5% エタノールに浸して滅菌した後乾燥させておいたマクロキャリアーの中心に懸濁液をのせて広げ, 乾燥させた。うちこむ数が複数の場合には, 数に比例して各試薬の量を増やし, うちこむ数と同枚数のマクロキャリアーに均等に懸濁液をのせた。パーティクルガンチャンバー内を 70% エタノールでふき, 消耗品キットを 99.5 % エタノールに浸して滅菌した後乾燥し, 使用した。チャンバー内の真空度は 28 inch Hg, flight distance (マクロキャリアーとストッピングプレート間の距離) は 1.6 cm とし, マクロキャリアーを最上段, 試料を上から 3 段目に装着した。すなわち target distance は 6 cm とした。ヘリウム圧は, 基本的に 1350 psi とし, 場合により 1100 psi とした。ヘリウム圧により細胞内局在パターンに変化は見られなかった。

遺伝子導入後のプレートは, 最初の検鏡までの約 5 時間は, 26°C, 14 時間明/10 時間暗周期の人工気象器内においた。その後は 23°C, 16 時間明/8 時間暗周期の人工気象器内においた。

共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss) により観察, 作像を行った。まず膜状の表皮細胞層をはがし, メスで 1 cm 角程度の大きさに切断し, その細胞を含むタマネギの表皮角片をスライドグラスに載せカバーグラスをかけてプレパラートを作製し, アルゴンレーザー (488nm) による作像を行った。数 μ m ごとに細胞断面像を取得した。

イネ形質転換用コンストラクトの作製

OsIRT1 遺伝子のプロモーター領域を増幅するために, *OsIRT1pF*, *OsIRT1pR* プライマーを設計した。翻訳開始点を起点として, 上流 0.8 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。増幅された PCR 断片を, プライマーに組み込んである制限酵素サイト (*Hind*III, *Xba*I) を用いて pBluescript II SK+ (Stratagene) にサブクローニングした。DSQ-2000L DNA シーケンサー (Shimadzu, Japan) を用いて, 配列を確認し, ベクター pIG121Hm (Hiei *et al.*, 1994) の GUS をコードしている *uidA* 遺伝子上流の制限酵素サイト *Hind*III, *Xba*I の間に挿入した。このプラスミドを pIG121Hm-*OsIRT1pro* とした。

イネの形質転換

農業生物資源権研究所の川崎信二博士にご教示いただいた, Hiei *et al.* (1994) の改変法を用いて, アグロバクテリウム法により, 前段で作製したコンストラクトをイネ (*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。続いて再分化誘導を 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 クラフオリン, 50 mg/L ハイグロマイシン B を含む Murashige & Skoog (MS) 培地 (Murashige and Skoog, 1965) で 2 週間行った。その後, 30 g/L スクロース, 250 mg/L クラフオリン, 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 時間暗期で培養し再分化を行った。再分化した植物は土壌に定植して温室で栽培し, 7 ラインの T₁ 種子を得た。

形質転換イネの GUS 活性の組織化学的観察

形質転換体の T₁ 種子を MS 培地に播種し, 明期, 25°C, 14 時間, 320 μ mol photons/m²/sec, 暗期, 20°C, 10 時間の条件に制御された天然光気象室で 2 週間生育させた。その後, 20 L 水耕箱を用いて 2 週間水耕栽培を行った。その後, Fe-EDTA を水耕液から完全に取り除くことにより, Fe 欠乏処理を 1 週間行い, サンプルングをし, 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が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、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 である。37°C で 20 分間から一晩 GUS 反応を行った。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。これを繰り返す、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。

レーザーマイクロダイゼクション法

Fe 欠乏条件で栽培したイネの根端から約 1 cm を使用した。切断した根に、固定液 (エタノール: 酢酸=3:1) を加え、4°C で 15 分間、脱気しながら固定した。さらに 4°C で 1 晩固定した。固定したサンプルを徐々にエタノールで置換し、さ

らにキシレンで置換した。これをパラフィンに包埋し、切片厚 16 μm で横断切片を作製した後、LMD (Leica AS LMD) を用いて、表皮細胞と外皮細胞、皮層細胞、中心柱にそれぞれを切り分け、単離した (Nakada *et al.*, 2005)。

単離した組織から、RNeasy micro kit (Qiagen) を用い、RNA を採取した。そのトータル RNA を T7 RNA polymerase based RNA amplification 法 (Nakazono *et al.*, 2002) を用いて増幅した。増幅させた RNA から、逆転写酵素として super script II を、プライマーとしてヘキサヌクレオチドミックス (Roche) を用いて逆転写させ cDNA を作製した。

この cDNA を鋳型として、Amplitaq Gold (Applied Biosystems) を用いて RT-PCR を行った。RT-PCR 反応は、94°C で 10 分間熱変性を行ってから、98°C (熱変性) 10 秒間、50°C (アニーリング) 30 秒間、72°C (伸長反応) 1 分間を 30 回繰り返した。プライマーは RT-PCR で使用したものを用了。

Fe³⁺還元酵素活性測定とクロロフィル含量測定

根の表面で Fe³⁺還元酵素活性を測定するために、イネの根を切り取らずに植物全体を用いて測定を行った。イネの根の表面を脱イオン水で洗い、根の部分を 50 mL の測定溶液 (0.2 mM CaSO₄, 5 mM HEPES (pH 5.5), 0.1 mM Fe³⁺-EDTA, 0.2 mM BPDS) に浸した。25°C で 1 時間暗室に置いた後、溶液の 535 nm の吸光度を測定した。既知の Fe²⁺濃度で検量線を作製し、生成した Fe²⁺量を算出した。測定は、各試料につき 3 回行った。

SPAD-502 クロロフィルメーター (Minolta Co., Tokyo, Japan) を用い、Fe³⁺還元酵素活性を測定したイネの最新葉でのクロロフィル含量を測定した。測定は、1 個体あたり 9 回行った。

ノーザン解析

それぞれの金属欠乏条件のイネから SDS-フェノール法を用いて、トータル RNA を抽出した。20 μg のトータル RNA を 0.66 M ホルムアルデヒドを含む 1.2% (w/v) アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロンメンブレン Hybond-N+ (Amersham, USA) にブロットした。このメンブレンに、*OsFRO1*, *OsFRO2* の cDNA 配列を ^{32}P でラベルしたものをプローブとしてハイブリダイズした。*OsFRO1* を増幅するために *OsFRO1*-5, *OsFRO1*-3 プライマー, *OsFRO2* を増幅するために *OsFRO2*-5, *OsFRO2*-3 プライマーを用いた。

^{52}Fe の製造と放射化学分離

^{52}Fe (半減期: 8.27 時間) は、10 mm x 10 mm x 1.5 mm の Cr 板 (自然同位体組成, 純度 99.9%, Goodfellow Metals Ltd.) に (独) 日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所イオン照射研究施設 (TIARA: Takasaki Ion Accelerators for Advanced Radiation Application) の AVF サイクロトロンで加速した 80 MeV の α 粒子ビームを照射することにより, $^{\text{nat}}\text{Cr}(\alpha, 4n) ^{52}\text{Fe}$ の反応で得られた (Watanabe *et al.*, 2001)。4 μA のビーム電流で 3 時間照射することにより, 約 2 MBq (143 fmol: 照射後 17 時間の放射活性) の ^{52}Fe が得られた。Cr ターゲットからの ^{52}Fe の放射化学分離は Watanabe *et al.* (2001) に従った。分離後の $^{52}\text{Fe}^{3+}$ 溶液 pH 約 0.1 と強い酸性であったので, 1 N KOH で pH 約 3 に調整した。溶液に終濃度 9.8 mM となるように DMA を加えて暗所で 1 時間以上攪拌し, キレートさせ ^{52}Fe -DMA とした。また, Fe^{2+} は, 0.1 mM のヒドロキシルアミンを加え 2 時間攪拌することにより作製した。

PETIS 法

PETIS (Positron Emitting Tracer Imaging System) は、医療用の PET (Positron Emission Tomography) で用いられている技術を基に植物及び小動物計測用として、より小型な装置として開発されたものである。この装置は比較的偏平な被検体を対象としているため、植物形態にあった動態イメージング計測が可能となっている。

ポジトロン (陽電子: e^+) は、 β^+ 崩壊によりニュートリノと共に核外へ放出される ($p \rightarrow n + \nu + e^+$)。放出されたポジトロンは最大で 0.6-1.7 MeV のエネルギーを持ち、周囲の原子中の電子と衝突して運動エネルギーを減じながら移動し、運動エネルギーがゼロになると近傍の電子と結合して消滅する。この時、電子とポジトロンの質量は互いに反対方向 (180 度) に放出される 2 つの γ 線 (511 keV) に変換される。PETIS は対向配置した γ 線二次元入射位置検出器によって、この 1 対の消滅 γ 線を同時に計測し、それぞれの検出面上の γ 線検出位置を結ぶ中点をポジトロン消滅位置として記録する。検出範囲は 143 mm x 216 mm で、空間分解能は約 2.4 mm である。

ポジトロン放出核種 ^{52}Fe の半減期は 8.3 時間であり、吸収実験に要する時間から考えると半減期を無視することはできないので、計測時に半減期補正を行った。その他、検出器自身の感度むら及び計測手法からくる幾何学的感度分布の補正を行った。

PETIS による計測

Fe を除いた水耕液 15 mL を含むポリエチレン製の袋に Fe 欠乏状態のイネの根を浸した。一方、同様の水耕液に窒素でバブリングしながら酸素を除いたもの

に Fe 欠乏状態のイネの根を浸したものも用意した。植物体と袋をアクリル板に固定し，温度 30℃，湿度 65%，光量約 250 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の人工気象器内の 1 対の PETIS 検出器の中央に置いた。以下の (1) ～ (3) のいずれかを根から投与し，PETIS による計測を 6 時間行った。(1) $^{52}\text{Fe}^{3+}$ -DMA (0.43 MBq, 30.7 fmol) と Fe^{3+} -DMA (1.12 μmol)，(2) $^{52}\text{Fe}^{2+}$ (0.43 MBq, 30.7 fmol) と Fe^{2+} (1.12 μmol) とヒドロキシルアミン (0.1 mM)，(3) $^{52}\text{Fe}^{3+}$ (0.43 MBq, 30.7 fmol) と Fe^{3+} (1.12 μmol)。

2-3 実験結果

2-3-1 *OsIRT2*の単離

コロニーハイブリダイゼーション法により, Fe 欠乏イネの cDNA ライブラリーから *OsIRT2* cDNA (accession number AB126086) を単離した。OsIRT2 は OsIRT1 と非常に高い相同性を示し, アミノ酸配列で 73% 同一であった (図 2-1-1 a)。*OsIRT1* と *OsIRT2* は, 第 3 染色体上に直列に存在していた (図 2-1-1 b)。*OsIRT2* の cDNA の 5' 末端の配列は, *Oryza sativa* L. ssp. Japonica cv. Nipponbare (Goff *et al.*, 2002) のゲノムデータベース上の配列と異なっていたが, シンジェンタのイネゲノムデータベースとはと完全に一致した (図 2-1-1 b 黒色部分)。

2-3-3 *OsIRT1* と *OsIRT2* の発現解析

OsIRT1 と *OsIRT2* の相同性が非常に高いため, ノーザン解析では, それぞれの発現を区別することができなかった (データは示さない)。そこで, *OsIRT1* と *OsIRT2* のそれぞれに特異的なプライマーを用い, 定量的 RT-PCR を行った (図 2-1-2, 表 2-1)。*OsIRT1* の発現様式は, *OsIRT1* をプローブとしたノーザン解析の結果 (Buglio *et al.*, 2002) とほぼ一致しており, Fe 欠乏条件の根でのみ強い発現の誘導がみられた。*OsIRT2* も Fe 欠乏条件の根でのみ強い発現の誘導がみられたが, その蓄積量は *OsIRT1* の蓄積量に比べて 17.5 倍低かった (表 2-1)。

2-3-4 *OsIRT1* と *OsIRT2* の機能解析

酵母の高親和性 Fe 吸収に関わる Multi-copper oxidase (FET3), 低親和性 Fe²⁺ トランスポーター (FET4) を相同組換えにより破壊した Fe 吸収欠損株 CM-FET

(*Δfet3*, *Δfet4*) を用いて, OsIRT1, OsIRT2 の Fe 吸収相補実験を行った。Fe が少ない培地上では, この Fe 吸収欠損酵母にベクターコントロール (pYH23) を導入したものは良好に生育できなかったが, OsIRT1 または OsIRT2 を導入したものは, 生育が回復した (図 2-2)。OsIRT1 を導入した酵母は, OsIRT2 を導入した酵母に比べ, さらに生育が良好であった。

OsIRT1 および OsIRT2 の Cu, Zn, Mn 吸収相補実験を同様に行った。酵母の吸収欠損変異株としては, 高親和性 Cu トランスポーター (CTR1) を相同組換えにより破壊した Cu 吸収欠損株 (*Δctr1*) (Dancis *et al.*, 1994), 高親和性 Zn トランスポーター (ZRT1, ZRT2) を相同組換えにより破壊した Zn 吸収欠損株 CM-ZRT (*Δzrt1*, *Δzrt2*), 高親和性 Mn トランスポーター (SMF1) を相同組換えにより破壊した Mn 吸収欠損株 CM-SMF (*Δsmf1*) をそれぞれ使用した。しかしながら, OsIRT1 または OsIRT2 の導入により, それぞれの金属欠乏の培地上での生育に変化は見られず, 金属吸収欠損を相補しなかった (データは示さない)。すなわち, OsIRT1 および OsIRT2 は, Cu, Zn, Mn は輸送しないと考えられた。

2-3-5 OsIRT1 と OsIRT2 の細胞内局在

OsIRT1 または OsIRT2 と, 蛍光タンパク質である 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法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, 細胞内局在を観察した。OsIRT1-GFP 融合タンパク質および, OsIRT2-GFP 融合タンパク質は, 細胞膜に局在した (図 2-3 a-h)。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 2-3 i, j)。これらの結果と, OsIRT1, OsIRT2 が推定の膜貫通領域を持つことから, OsIRT1, OsIRT2 は細胞膜において機能していると考えられる。

2-3-6 *OsIRT1* の発現の根での組織局在

OsIRT1 発現の組織局在を調べるために、*OsIRT1* プロモーター (0.8 kb) の下流にレポーター遺伝子である *GUS* を連結してイネに導入し、プロモーター活性を組織化学的に検出した。*OsIRT1* プロモーター-*GUS* 形質転換イネは 7 ライン得られ、T₂ ラインはすべて同じ発現様式を示した (データは示さない)。

Fe 十分条件では、根端近くにおいては中心柱に発現が観察された (図 2-4-1 a)。また、根の基部に近い部分の伴細胞を含む篩部で、強い発現が観察された (図 2-4-1 b)。分岐根が出ている主根の中心柱では特に強い発現が観察された (図 2-4-1 c)。一方、Fe 欠乏条件によって発現は強く誘導された (図 2-4-2 a, b, 2-4-3 a-d)。さらに、根端近くでは、表皮細胞と外皮細胞で強く発現し (図 2-4-2 a)、特に分岐根では、すべての細胞で強く発現していた (図 2-4-2 b)。基部に近い部分では、内皮に隣接する皮層細胞で発現が観察された (図 2-4-3 a-d)。側根が出ている主根の中心柱では、篩部、特に篩部伴細胞で強い発現が観察された (図 2-4-3 a, b)。

レイザーマイクロダイセクション法を用いて、Fe 欠乏イネの根の切片から、中心柱、皮層細胞、表皮細胞を分離して、それぞれサンプリングし、定量的 RT-PCR を行った。*OsIRT1* プロモーター-*GUS* 実験の結果とよく一致し、*OsIRT1* の転写産物は主に、中心柱と表皮細胞に検出された (図 2-4-2 c)。

2-3-7 *OsIRT1* の発現の茎葉における組織局在

イネの植物体を根、茎、葉鞘、最大展開葉、最新葉に分離して、定量的 RT-PCR 解析により、*OsIRT1* の発現を検出した (表 2-2)。*OsIRT1* は、Fe 欠乏条件の根で、強く発現が誘導されていたが、茎および葉鞘でも、根の 10 分の 1 程度の

mRNA の蓄積が観察できた。*OsIRT1* プロモーター-GUS 形質転換体で、茎での発現を観察したところ、Fe 十分条件および、Fe 欠乏条件の篩部で強い発現が見られた (図 2-5)。発現量は Fe 欠乏により明確に上昇していた。

2-3-8 イネにおける Fe^{3+} 還元酵素の解析

イネが、 Fe^{2+} トランスポーター活性に加えて、 Fe^{3+} キレート還元酵素活性を有するかどうかを検証するため、シロイナズナの Fe^{3+} キレート還元酵素遺伝子 (*FRO2*) に相同性の高い遺伝子をイネのゲノム上で検索した。イネのゲノム上には、2 つの *FRO2* 類似遺伝子が存在した。これらを *OsFRO1* (accession number AB126084), *OsFRO2* (accession number AB126085) と命名した (図 2-6-1 a)。

OsFRO1, *OsFRO2* はそれぞれ、*FRO2* とアミノ酸レベルで、それぞれ 30.4%, 48.2% という同一性を示した。*FRO2* には、FAD や NADPH の結合に関わる 2 つのモチーフ (アミノ酸配列で、HPFT, GPYG) が存在する。しかしながら、これらのうち *OsFRO1* は HPFT の部分の T が S に置換され、*OsFRO2* は GPYG の部分の G が S に置換されていた (図 2-6-1 a 下線部)。

ノーザン解析により *OsFRO1*, *OsFRO2* の発現を検出した (図 2-6-1 b)。*OsFRO1* は、Zn 欠乏条件、Mn 欠乏条件、Cu 欠乏条件の地上部で発現が誘導されたが、Fe 欠乏条件での誘導は見られなかった。*OsFRO2* は、Fe 欠乏条件での地上部のみで発現が誘導されていた。これらの遺伝子は、いずれも根では発現が検出されなかった。

Fe 欠乏条件でのイネの根表面における Fe^{3+} 還元酵素活性を経時的に測定した (図 2-6-2 a)。Fe 欠乏が進行することにより、イネの Fe^{3+} 還元酵素活性は減少した。同時に測定した葉におけるクロロフィル含量を示す SPAD 値は減少したことから、Fe 欠乏であることは確認された (図 2-6-2 b)。また Fe の再投与により、

根表面の Fe^{3+} 還元酵素活性と最新葉のクロロフィル含量は回復した。

2-3-9 イネにおける Fe^{2+} 吸収と Fe^{3+} -DMA 吸収の測定

イネが、 Fe^{2+} もしくは Fe^{3+} -DMA を実際に吸収しているかどうかを調べるために、PETIS 法を用いて、Fe 欠乏処理したイネにける Fe の吸収、移行、蓄積を測定した。 Fe^{2+} 区としては $^{52}\text{Fe}^{2+}$ (0.43 MBq, 30.7 fmol), Fe^{2+} (1.12 μmol) およびヒドロキシルアミン (0.1 mM) を与え、 Fe^{3+} -DMA 区としては $^{52}\text{Fe}^{3+}$ -DMA (0.43 MBq, 30.7 fmol) と Fe^{3+} -DMA (1.12 μmol) を与えた。ヒドロキシルアミンは、強力な還元剤であり、 Fe^{2+} の状態を保つために加えた。

茎部分における Fe の蓄積量を測定したところ、 Fe^{2+} も Fe^{3+} -DMA も、根で吸収され、茎部分に移行したことが明らかとなった (図 2-7 a)。 Fe^{3+} -DMA の移行量は、 Fe^{2+} の移行量よりも多かった。このことは、イネにおいて Fe^{3+} -DMA 吸収は Fe^{2+} 吸収よりも効率的ではあるが、イネが Fe^{2+} も吸収することを示している。吸収実験の後に植物体の各部位における Fe の蓄積量を計測した (図 2-7 b)。 Fe^{2+} を吸収させたイネでは、根に最も多くの Fe が蓄積していた。一方、 Fe^{3+} -DMA を吸収させたイネは地上部の各部位に Fe を効率的に蓄積していた。Bio-imaging Analyzer System (BAS) を用いて、Fe の蓄積を確認したところ、 Fe^{2+} も Fe^{3+} -DMA も、吸収、移行、蓄積されていることが確認できた (図 2-7 c-f)。

また、 Fe^{2+} の吸収、蓄積量は、遊離イオンの Fe^{3+} のみを与えた場合の吸収、蓄積量よりも多かった (図 2-7 g)。この結果は、イネは、根圏に大量の Fe^{3+} があっても DMA あるいは他の DMA 類などの特定のキレート物質がなければ、 Fe^{3+} を吸収できないことを示している。

2-4 考察

2-4-1 OsIRT1 は湛水条件での Fe^{2+} 吸収を行うトランスポーターである

本章の研究により、OsIRT1 と OsIRT2、とりわけ OsIRT1 が、イネの Fe^{2+} 吸収に関わっていることが強く示唆された。*OsIRT1*、*OsIRT2* の発現は Fe 欠乏根で顕著に誘導された（図 2-1-2, 表 2-1）。OsIRT1 と OsIRT2 は酵母の Fe 吸収欠損変異株の生育を回復させたことから、双方とも Fe^{2+} 吸収を担うトランスポーターであることが明らかとなった（図 2-2）。OsIRT1、OsIRT2 と GFP との融合タンパク質は、細胞膜に局在した（図 2-3）。*OsIRT1* は、根の表皮細胞と、内皮細胞に隣接する皮層細胞で強く発現していた（図 2-4）。PETIS 法により、イネは Fe^{2+} を直接吸収することが示された（図 2-7）。一方、Fe 欠乏条件の根で Fe^{3+} キレート還元酵素活性の増加は見られず、FRO に相同性の高い遺伝子の発現も検出されなかった（図 2-6）。これらの結果により、イネは Strategy I 機構および Strategy II 機構のいずれとも異なる固有の機構で根圏から Fe^{2+} を直接吸収し、その Fe^{2+} 吸収に OsIRT1 と OsIRT2 が関わる可能性がきわめて高いことが示された。

石灰質アルカリ土壌においては、 Fe^{3+} の存在量が多いにも関わらず可溶性の Fe がほとんどないために、イネは生育できない。しかしながら、石灰質アルカリ土壌においても Fe^{2+} を徐々に放出する緩効性の被覆肥料を加えることにより、イネの生育は回復する（Morikawa *et al.*, 2004）。このことは、イネは FRO2 ホモログによる Fe^{3+} キレートの還元活性を持たないが、 Fe^{2+} が存在すれば、OsIRT1 によって直接 Fe^{2+} を吸収できることを示している。この Fe^{3+} キレート還元を伴わずに Fe^{2+} を直接吸収する機構は、水田などの Fe^{2+} が豊富な湛水条件に生育するイ

ネが進化の過程で特異的に獲得したのではないかと考えられる。

一方で、イネは以前から知られてきた Strategy II 機構も持っている。イネは、DMA を生合成するが、イネが分泌する DMA の量は、他のイネ科植物に比べ非常にわずかである (Takagi, 1976; Mori *et al.*, 1991; Higuchi *et al.*, 2001)。OsIRT1 による Fe^{2+} 吸収は、イネの DMA の分泌量が少なく、イネが十分な Fe^{3+} -DMA 吸収を行えないことを補っているものと考えられる。

2-4-2 *OsIRT1*, *OsIRT2* は Fe 欠乏誘導性の制御された Fe^{2+} 特異的トランスporterである

定量的 RT-PCR 解析により、*OsIRT1* と *OsIRT2* は Fe 欠乏条件の根で発現が誘導され、*OsIRT1* の転写量は *OsIRT2* の転写量よりも多いことを明らかにした (表 2-1)。

シロイヌナズナの *IRT1* と *IRT2* は表皮細胞、皮層細胞で発現するが、*IRT1* の発現量の方が *IRT2* の発現量よりも圧倒的に多い (Vert *et al.*, 2001, 2002)。*IRT1* は、Fe, Zn, Mn を輸送し、*IRT2* は、Fe と Zn の輸送を行う (Korshunova *et al.*, 1999; Vert *et al.*, 2001)。さらに、トマト (*Lycopersicon esculentum*) の *LeIRT1* と *LeIRT2* は、Fe, Zn, Mn, Cu を輸送する (Eckhardt *et al.*, 2001)。これらのイネ科以外の植物の IRT とは対照的に、*OsIRT1* と *OsIRT2* は、Fe を輸送したが Zn, Mn, Cu を輸送しなかった。それゆえ、*OsIRT1* と *OsIRT2* は Fe^{2+} に特異性が高いトランスporterであると考えられる。イネの ZIP ファミリートランスporterである *OsZIP1*, *OsZIP3*, *OsZIP4* は、Zn を輸送するが、Fe, Mn を輸送しない (Ramesh *et al.*, 2003; 本論文第 4 章)。水稻は通常、金属が主に遊離イオンの形態で存在する湛水条件で生育する (Yoshida *et al.*, 1981; Kyuma, 2003)。もし *OsZIP* ファミリー

トランスポーターの輸送基質特異性が高くなければ、ある金属欠乏条件により誘導されたトランスポーターが、他の金属も同時に輸送し、他の金属過剰症状を引き起こすと考えられる。それゆえ、それぞれのトランスポーターが、一つのイオンに特異性が高いことは、理にかなっていると考えられる。

2-4-2 *OsIRT1* は土壌からの Fe 吸収および、篩部での Fe 輸送を担うトランスポーターである

OsIRT1 プロモーター-GUS 実験により、*OsIRT1* の植物体における働きに関する重要な知見が得られた（図 2-4, 5）。*OsIRT1* は、シロイヌナズナの *IRT1* と同様に根の表皮細胞に発現し、また *IRT2* と同じように分岐根に発現している（Vert *et al.*, 2001, 2002）。根の内皮細胞には、イオンが自由に中心柱に入ることを妨げるカスパリー線が存在する。内皮細胞に隣接する皮層細胞で *OsIRT1* が発現していることから、皮層細胞における Fe^{2+} 吸収を *OsIRT1* が行っていることが推察される。これらの発現様式から、*OsIRT1* が土壌からの Fe^{2+} 吸収を行う機能を持つことが考えられる。

一方で、*OsIRT1* の発現は、篩部、特に伴細胞でも検出できた（図 2-4, 5）。つまり、*OsIRT1* は、Fe の篩部における輸送、すなわち長距離輸送に関わることが考えられる。Fe 十分条件での *OsIRT1* の発現部位は、NA 合成酵素遺伝子 *OsNASs* の発現部位（Inoue *et al.*, 2003）と非常によく似ている。Fe 欠乏条件では、*OsNAS* 遺伝子は根や茎で強く発現が誘導され、篩部、特に伴細胞で、強く発現する。*OsIRT1* によって吸収された Fe^{2+} が、*OsNASs* によって合成された NA によってキレートされていることも考えられる。*OsIRT1* トランスポーターによって細胞内に取り込まれた遊離の Fe^{2+} が NA によってキレートされ Fe-NA の形態で存在

すれば、フリーの Fe^{2+} が Fe^{3+} に酸化される際に生じる酸素ラジカルの生成や、その蓄積による障害を防ぐことができる。

つまり、OsIRT1 は、土壌からの Fe^{2+} 吸収に加え、篩部への Fe^{2+} 輸送、篩部からの Fe^{2+} 輸送にも関わるものと考えられる。

2-4-3 イネは直接 Fe^{2+} を吸収する

PETIS 実験により、イネは、湛水条件で多く存在する Fe^{2+} を直接吸収することを明らかにした。また、Fe 欠乏条件において、 Fe^{3+} -DMA 吸収は、 Fe^{2+} 吸収よりも効率がよかった（図 2-7）。このことから、Fe 欠乏条件のイネには Fe^{2+} よりも Fe^{3+} -DMA を与えたほうが、Fe 欠乏クロロシスから回復しやすいと考えられる。オオムギの NA アミノ基転移酵素遺伝子 *HvNAAT-A*, *HvNAAT-B* を含むゲノム断片をイネに導入したイネでは、DMA 分泌量が増加し、石灰質アルカリ土壌における生育が改善されたことが報告されている (Takahashi *et al.*, 2001)。イネの DMA 合成、分泌を強化することにより、Fe 欠乏条件への耐性を強化できると考えられる。

	根		茎葉	
	<i>OsIRT1</i>	<i>OsIRT2</i>	<i>OsIRT1</i>	<i>OsIRT2</i>
Fe十分条件	12 ± 1	2.1 ± 0.3	6.6 ± 0.7	1.0 ± 0.1
Fe欠乏条件	460 ± 60	26 ± 1	1.1 ± 0.1	0.10 ± 0.10
転写産物量 (× 10 ⁶ copies/μg RNA)				

表 2-1 *OsIRT1*と*OsIRT2*の定量的RT-PCR解析

OsIRT1, *OsIRT2*に特異的なプライマーを用いて定量的RT-PCRを行った。
トータルRNA 1 μg当たりの*OsIRT1*, *OsIRT2*の転写産物量を示す。各3連の
平均 ± 標準偏差。

	Fe十分条件	Fe欠乏条件
根	7.1 ± 0.9	550 ± 110
茎	16	71 ± 7
葉鞘	14	38 ± 9
最大展開葉	8.6 ± 1.8	13 ± 1
最新葉	7.8 ± 1.9	13 ± 2
転写産物量 (× 10 ⁶ copies/μg RNA)		

表 2-2 部位別の*OsIRT1*の定量的RT-PCR解析

*OsIRT1*に特異的なプライマーを用いて定量的RT-PCRを行った。トータルRNA 1 μg当たりの*OsIRT1*の転写産物量を示す。各3連の平均 ± 標準偏差。

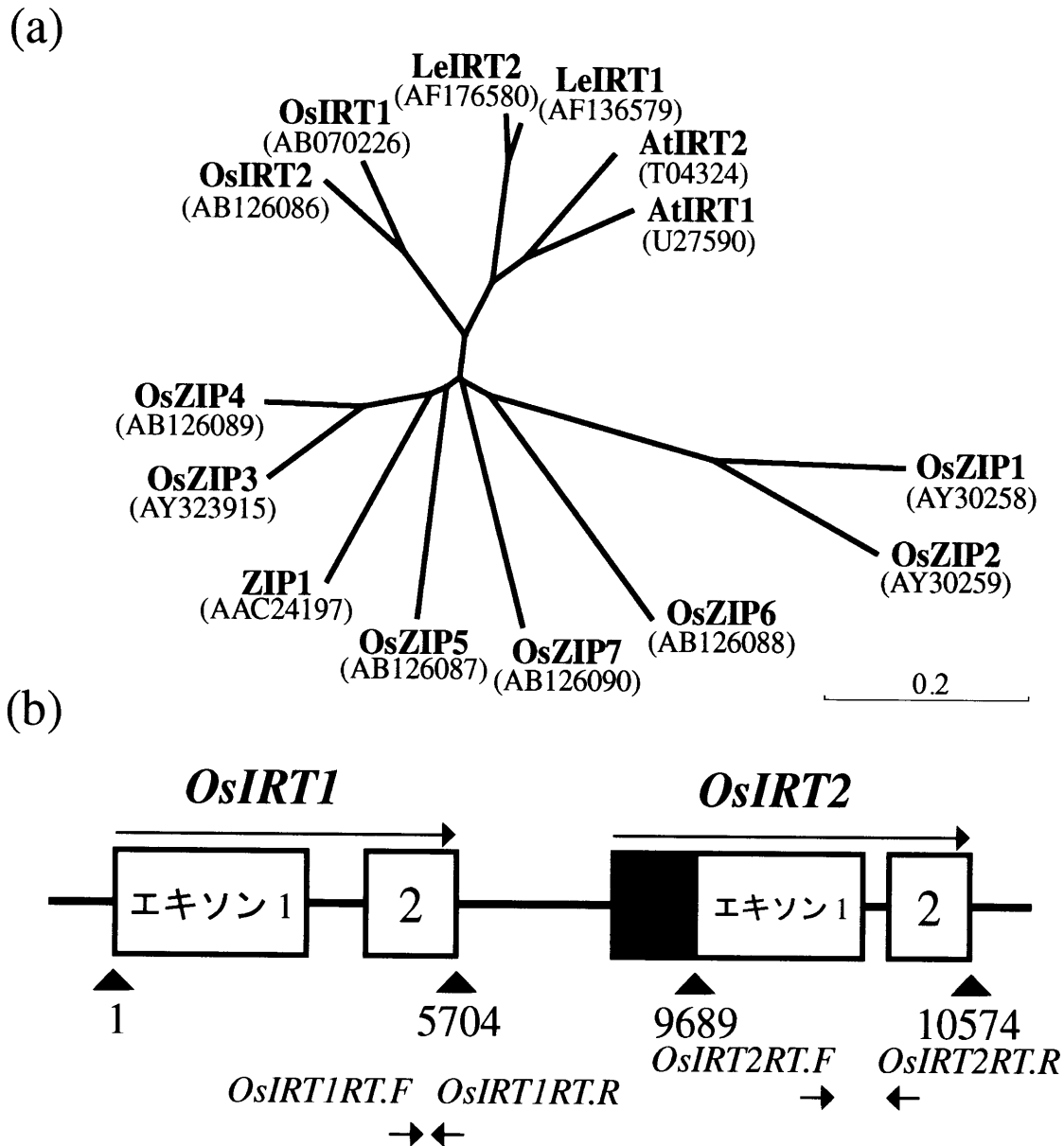


図 2-1-1 *OsIRT1*と*OsIRT2*の配列的特徴と発現様式

(a) 代表的なZIPファミリー遺伝子の分子系統樹。Os: イネ (*Oryza sativa*), Le: トマト (*Lycopersicon esculentum*), At: シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)。 (b) ゲノム上の*OsIRT1*と*OsIRT2*の位置関係。*OsIRT1*の翻訳開始点を1とした。第3染色体に*OsIRT1*と*OsIRT2*は存在する。黒色部分は、データベースのゲノムの配列が一致しなかった部分。*OsIRT1RT.F*, *OsIRT1RT.R*, *OsIRT2RT.F*, *OsIRT2RT.R*: RT-PCRに用いた各遺伝子に特異的なプライマーの位置。

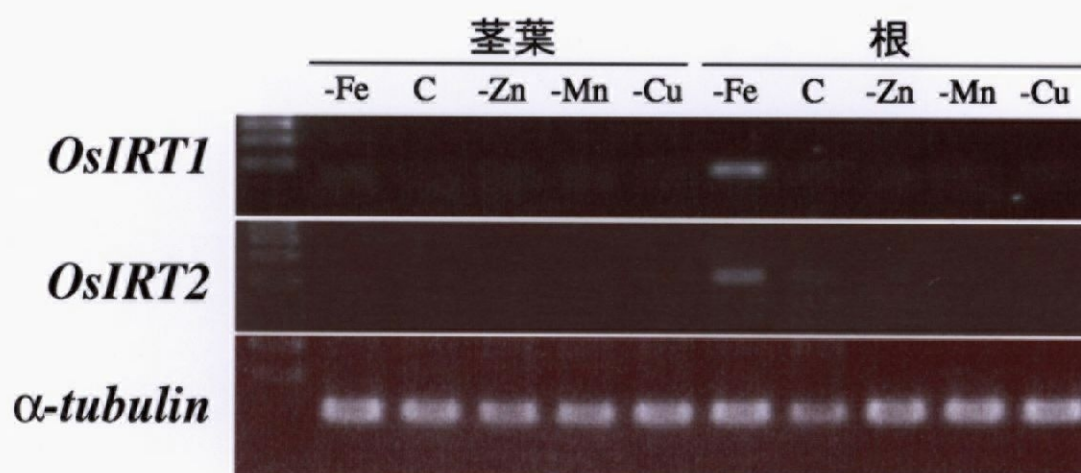


図 2-1-2 *OsIRT1* と *OsIRT2* の発現様式

OsIRT1 と *OsIRT2* の RT-PCR 解析。サイクル数は 30 回。-Fe : Fe 欠乏条件, C : Fe 十分条件, -Zn : Zn 欠乏条件, -Mn : Mn 欠乏条件, -Cu : Cu 欠乏条件。

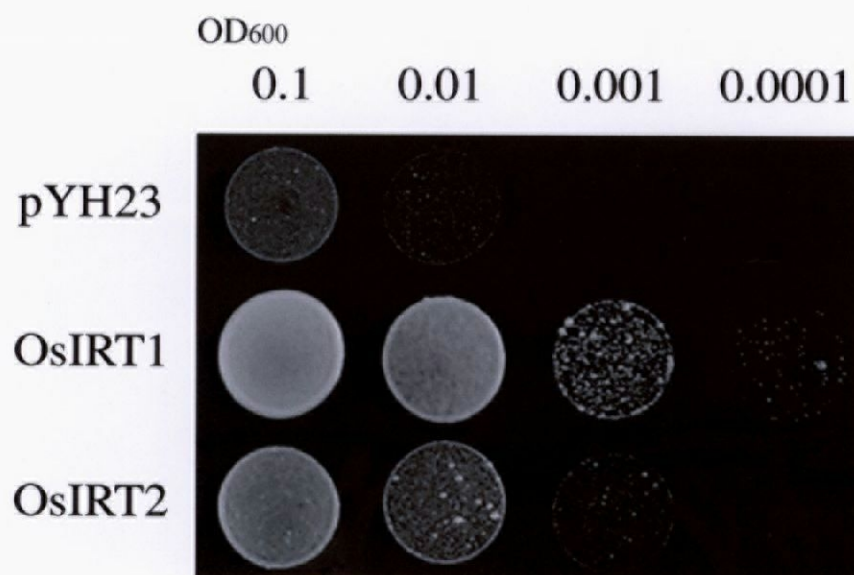


図 2-2 酵母のFe吸収欠損株を用いたOsIRT1とOsIRT2の相補実験

Fe吸収欠損株に、ベクターコントロール (pYH23), OsIRT1, OsIRT2を発現させ、Feを除き、さらに50 μ M BPDSを加えたSD固形培地上での生育をみた。

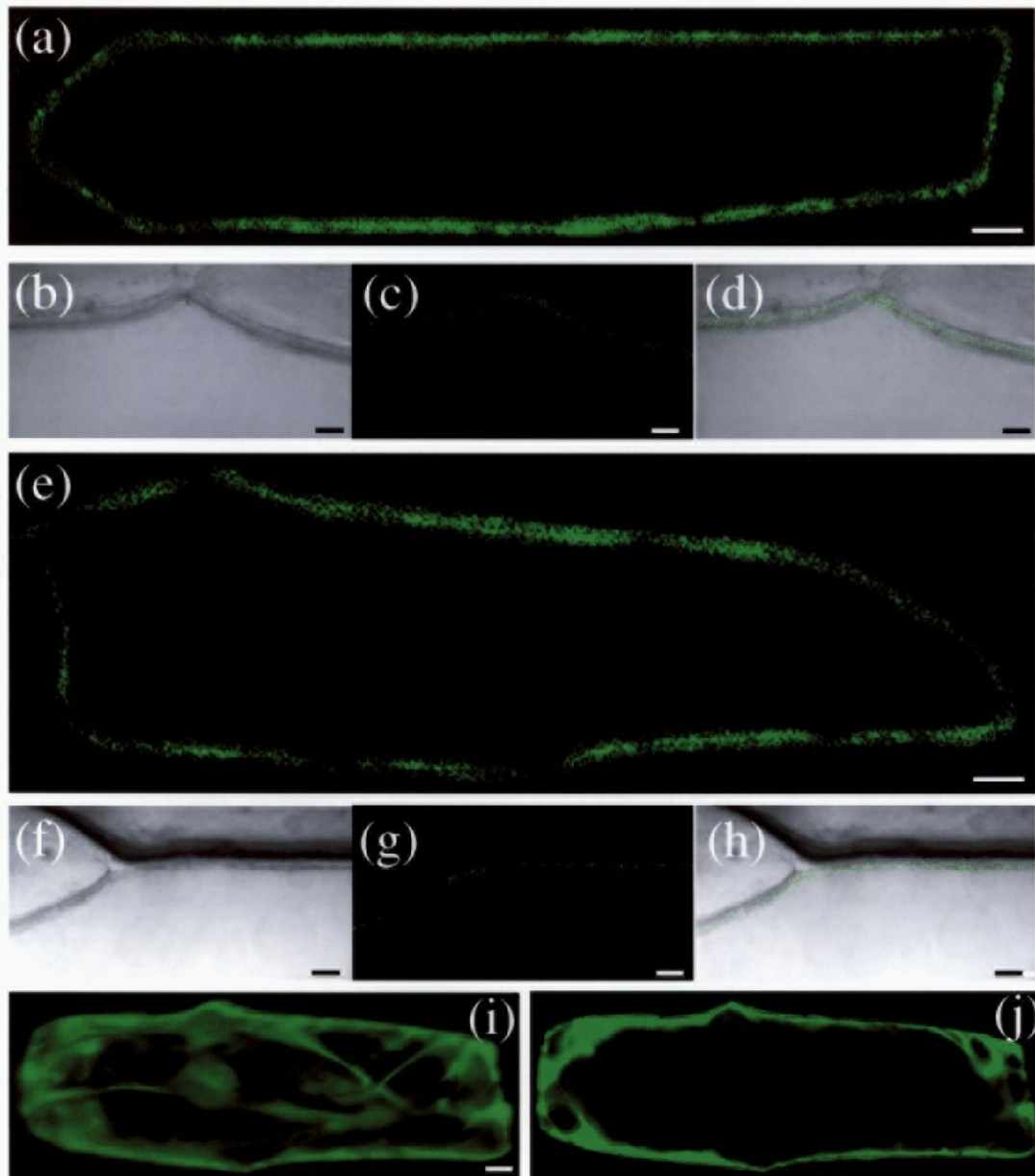


図 2-3 OsIRT1-GFP融合タンパク質, OsIRT2-GFP融合タンパク質のタマネギ表皮細胞における細胞内局在

(a, c, e, g, i, j) GFP蛍光像。(b, f) 微分干渉像。(d, h) GFP蛍光像と微分干渉像の重ね合わせ。(a-d) OsIRT1-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た断面像。(e-h) OsIRT2-GFP融合タンパク質を発現させた断面像。(i) GFPのみを発現させた像。(j) (i)の断面像。スケールバー:(a, e, i) 20 μm 、(b, c, d, f, g, h) 10 μm 。

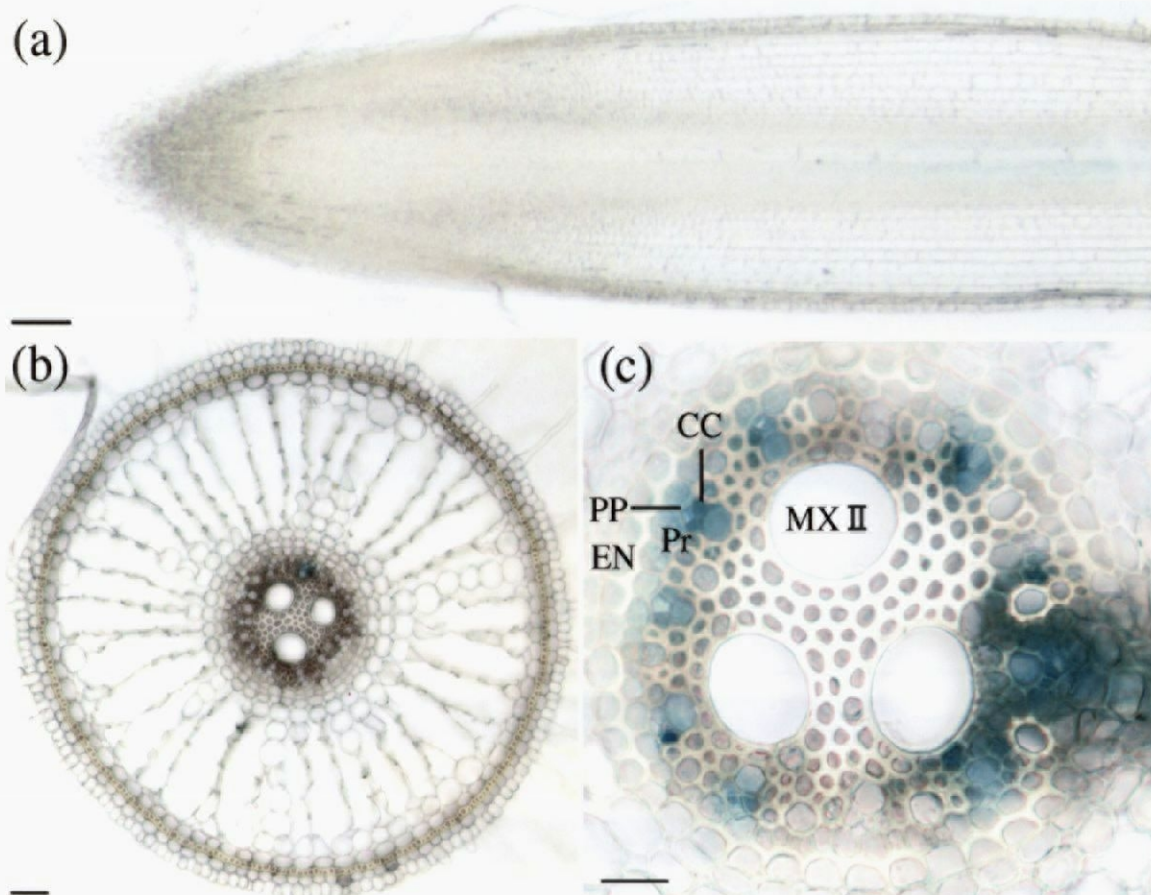


図 2-4-1 Fe十分条件の根における*OsIRT1*の発現

(a) 縦断切片。(b) 横断切片。(c) 側根の出ている部位の中心柱の拡大図。MXII : 後生導管, CC : 伴細胞, EN : 内皮細胞, Pr : 内鞘細胞, PP : 原生篩管。スケールバー : (a) 400 μm, (b) 100 μm, (c) 50 μm。

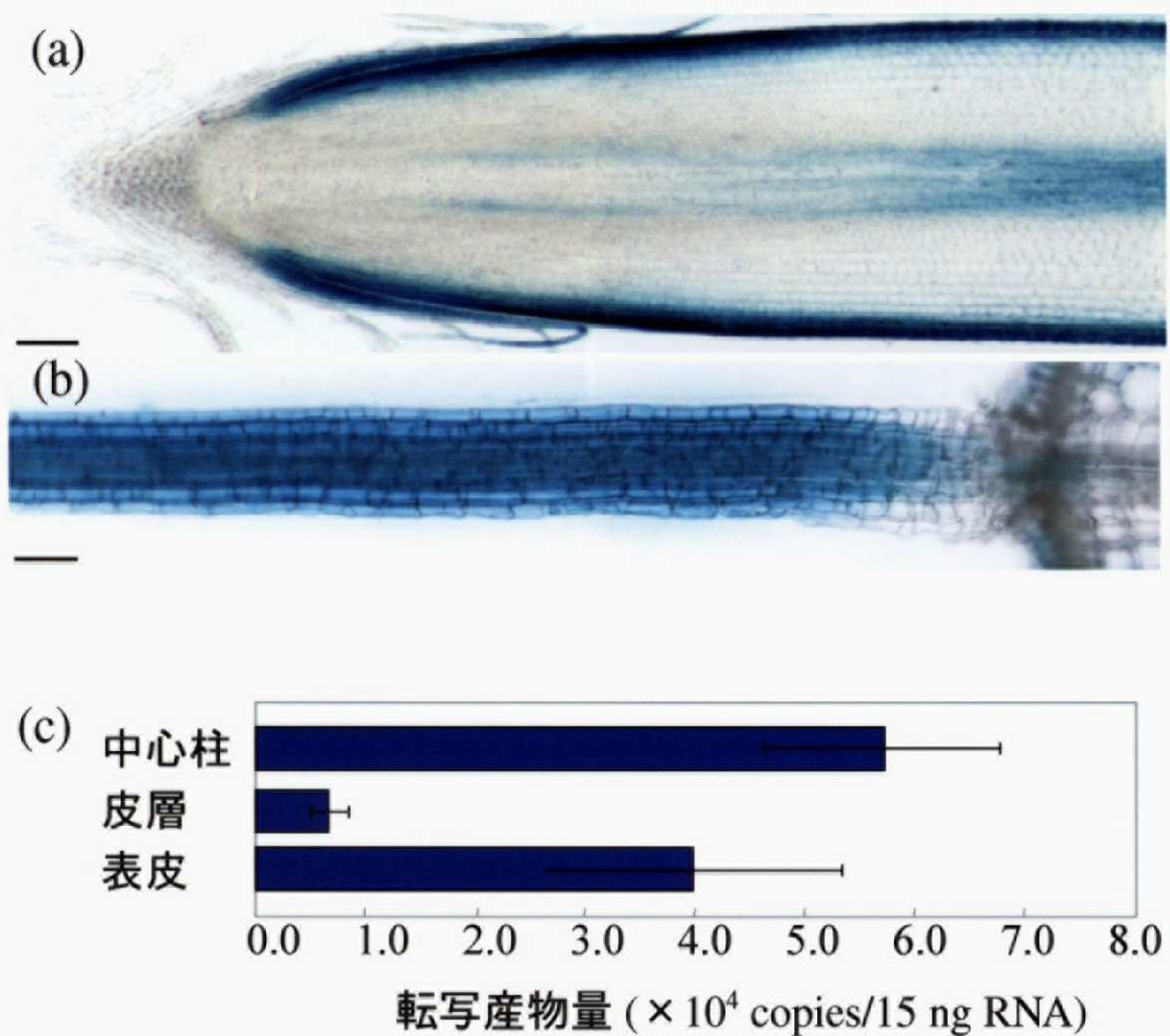


図 2-4-2 Fe欠乏条件の根における*OsIRT1*の発現

(a) 縦断切片。(b) 側根。スケールバー：(a) 400 μm , (b) 100 μm 。(c) レーザーマイクロダイセクション法により分離したイネFe欠乏根の各部位における定量的RT-PCR。トータルRNA15 ng当たりの*OsIRT1*の転写産物量を示す。各3連の平均 \pm 標準偏差。

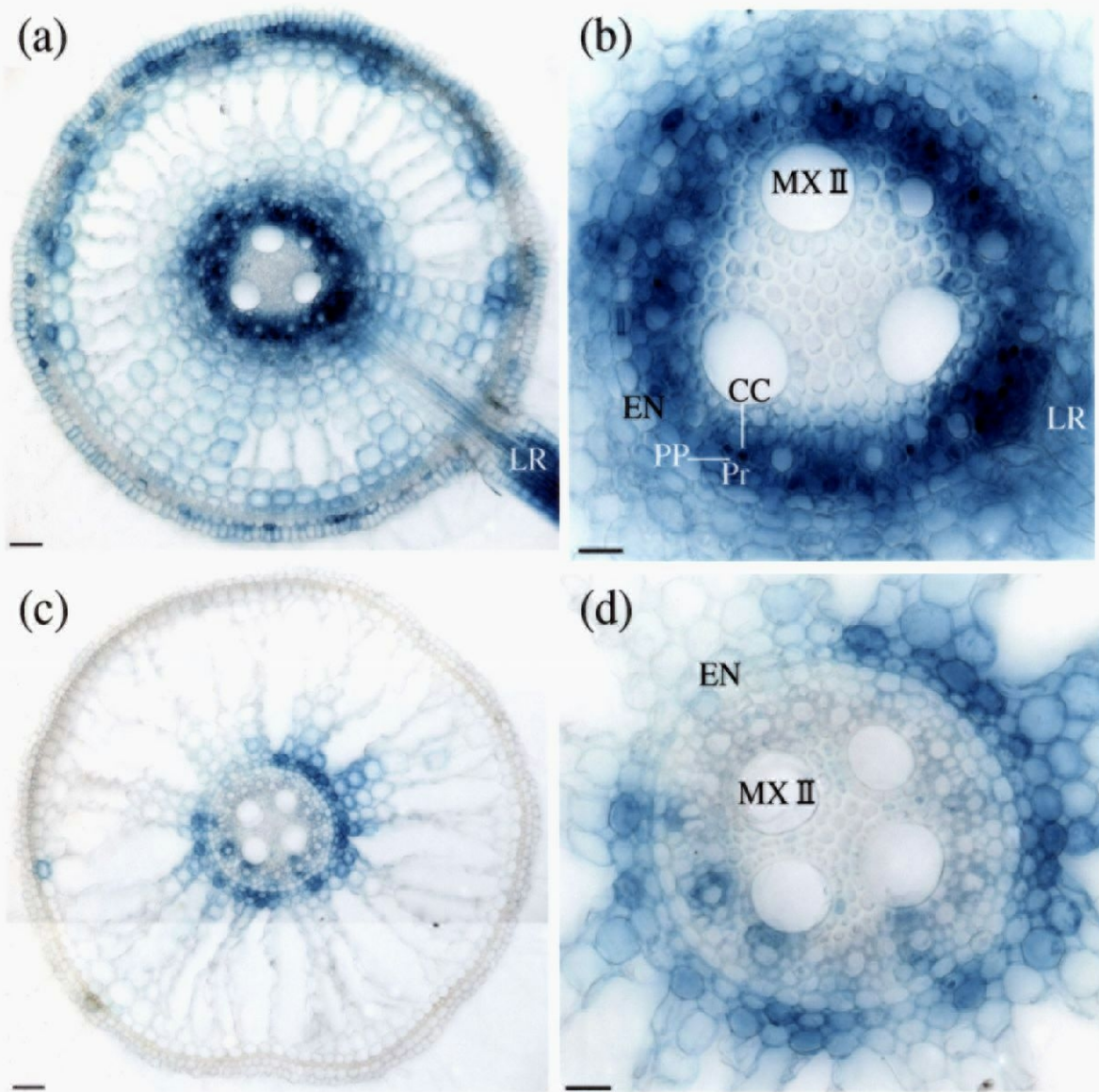
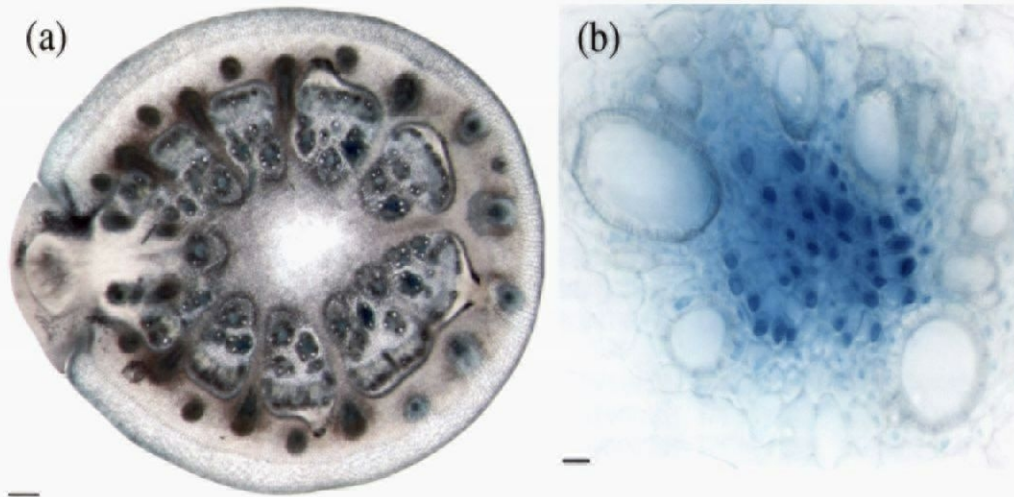


図 2-4-3 Fe欠乏条件の根における*OsIRT1*の発現

(a) 側根が出ている部位での横断切片。(b) aの部分の中心柱の拡大図。(c) 基部に近い部分の横断切片。(d) cの中心柱の拡大図。MXII：後生導管，CC：伴細胞，EN：内皮細胞，Pr：内鞘細胞，PP：原生篩管，LR：側根。スケールバー：(a, c) 100 μ m, (b, d) 50 μ m。

Fe十分条件



Fe欠乏条件

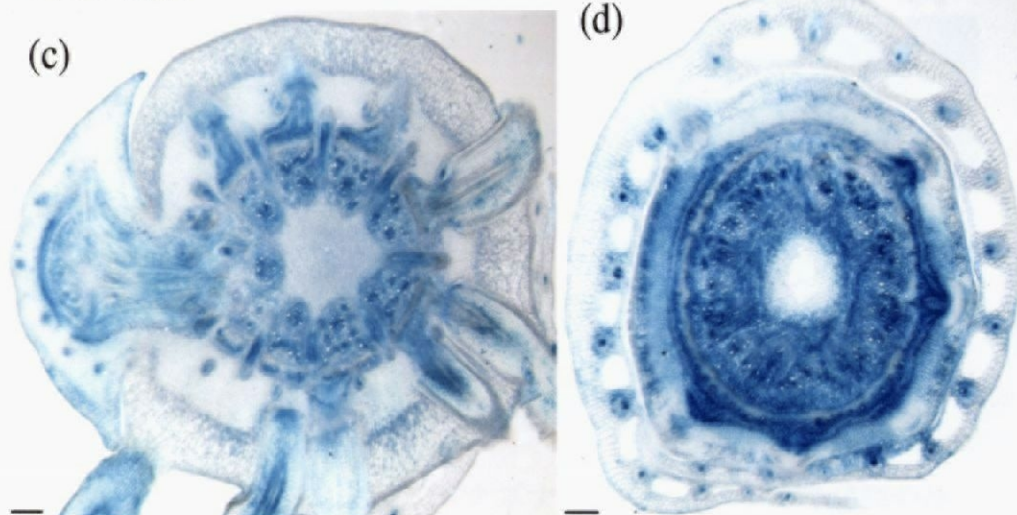


図 2-5 茎における*OsIRT1*の発現

(a, c) 横断切片。(b) 篩部の拡大図。(d) 茎上部の横断切片。スケールバー : (a, c, d) 800 μm , (b) 50 μm 。

(a)

OsFRO1	RAKVDIISAS	CRPCGTVELV	FSKPASLRYN	ALSFIFVQVR	ELSFLVHPF
OsFRO2	RVRVRLVSAR	LLACDAVELN	FCKSPHLTHS	PMSTVFINVP	CVSRLQWHPF
FRO2	RENVRLAAR	ILPSDTMELT	FSKNSKLVYS	PTSIMFVNIP	SISKLQWHPF

OsFRO1	S	VSSSPMDGR	YHMSILIKVL	GSWTEKLRGI	ITDAQEQGRN	GSESETGRIT
OsFRO2	T	VTSSSSLEP	DRLSVVVKRA	GRWTEKLYET	ISSL——	—PPSQPGHLD
FRO2	T	TSSSKLEP	EKLSIVIKKE	GKWSTKLHQR	LSS——	—SDQIDRLA

OsFRO1	ACVE	GPYGHE	SPYH-LMYEN	LILVAGGIGI	SPFLAILSDI	IHRIEEGKPC
OsFRO2	VSVE	GPYSQA	TPASFLQYDS	LVMISGGGGI	TPFISVIREL	VHRSGTAAEA
FRO2	VSVE	GPYGA	S-ADFLRHEA	LVMVCGGSGI	TPFISVIRDL	IATSQKET-C

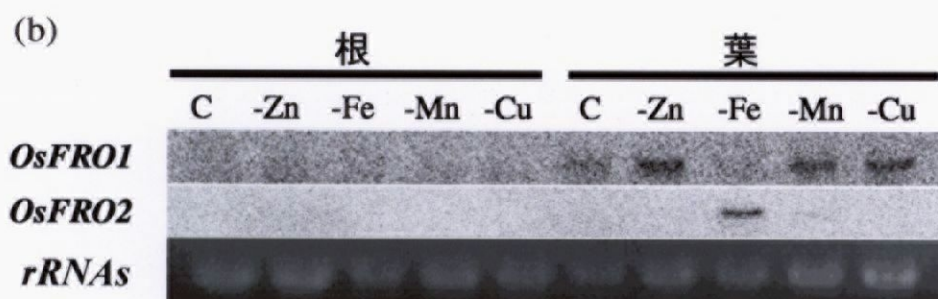


図 2-6-1 OsFRO1, OsFRO2の部分配列と発現解析

(a) OsFRO1とOsFRO2, シロヌナズナのFRO2のアミノ酸配列の比較。下線は推測される, FADおよび, NADPH結合ドメイン。(b) *OsFRO1*, *OsFRO2*のノーザン解析。C: Fe十分条件, -Zn: Zn欠乏条件, -Fe: Fe欠乏条件, -Mn: Mn欠乏条件, -Cu: Cu欠乏条件。

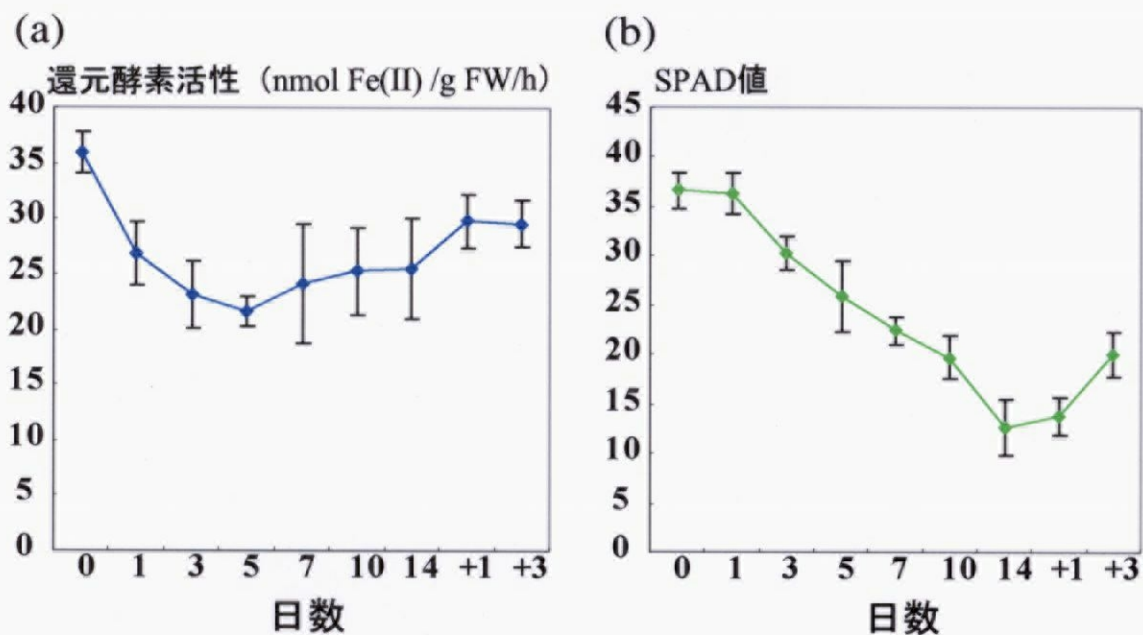


図 2-6-2 イネの Fe^{3+} 還元酵素活性とクロロフィル含量

(a) イネの根における Fe^{3+} 還元酵素活性。3週間Fe十分条件で生育させたイネを、Fe欠乏条件に移植し、0, 1, 3, 5, 7, 10, 14日後にそれぞれ測定した。さらにFeを再投与し、1, 3日後に測定した。各3連の平均 \pm 標準偏差。(b) Fe欠乏条件によるクロロフィル含量の変化。aで用いた植物のクロロフィル含量をSPAD-502で測定した。各3連の平均 \pm 標準偏差。

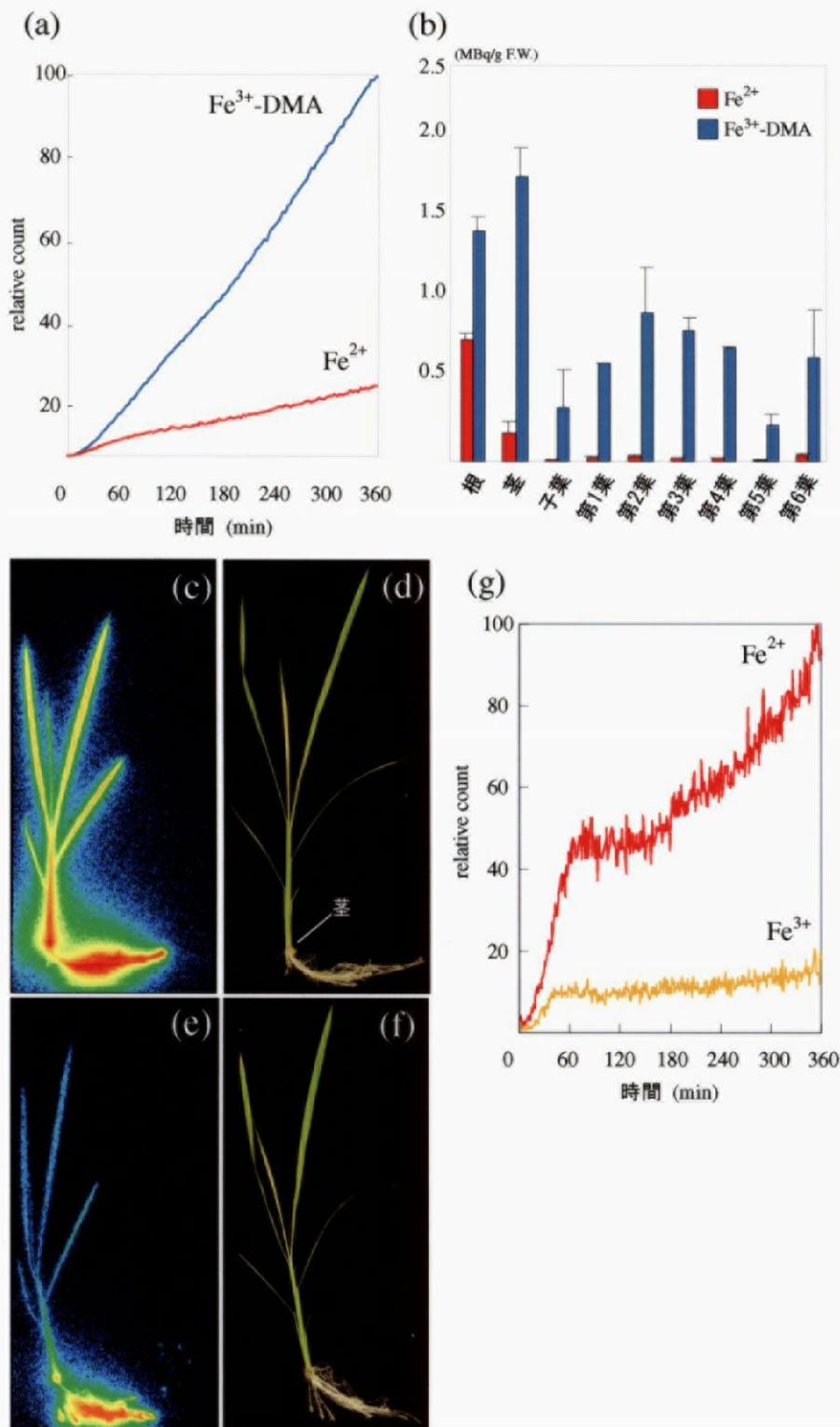


図 2-7 PETIS法による Fe^{2+} , Fe^{3+} -DMAおよび Fe^{3+} の吸収実験

(a) Fe^{2+} または Fe^{3+} -DMAを根から吸収させたときの茎でのFeのカウントの相対値。(b) 6時間の吸収実験後の根, 葉, 茎におけるFeの蓄積量。各3連の平均 ± 標準偏差。(c) Fe^{3+} -DMAを与えたイネのBAS画像。赤, 橙, 黄, 緑, 青の順にFe含量が多いことを示す。(d) cの植物体の写真。(e) Fe^{2+} を与えたイネのBAS画像。(f) eの植物体の写真。(g) Fe^{2+} または Fe^{3+} を根から吸収させたときの茎でのFeのカウントの相対値。