

## 第3章 Fe 欠乏耐性イネの創製

### 3-1 要約

地球上のおよそ 30%の耕地は、pH が高く、Fe を吸収しにくい石灰質アルカリ土壌であり、Fe 欠乏は世界の農業において重要な問題となっている。これまでに、イネは土壌から Fe を吸収するために  $\text{Fe}^{3+}$ -MAs による Fe 吸収機構 (Strategy II) を持つことが知られてきた。さらに、イネがこれに加えて  $\text{Fe}^{2+}$  吸収機構も持っていることを本研究の第2章において明らかにした。イネは、このように2つの Fe 吸収機構を持っているにも関わらず、他のイネ科植物に比べて Fe 欠乏条件に弱い。これは、pH の高い条件で Fe 耐性を発揮するために必要な MAs の分泌と、 $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性の両方がイネでは低いためであると考えられる。そこで本章では、酵母の  $\text{Fe}^{3+}$ キレート還元酵素遺伝子 *FRE1* を植物における発現に適した配列に改変し、さらに PCR 法によりランダムミューテーションを導入することにより、高 pH 条件でも高い活性を持つように改変した  $\text{Fe}^{3+}$ キレート還元酵素遺伝子 *refrel/372* (Oki *et al.*, 2004) を、 $\text{Fe}^{2+}$ トランスポーター *OsIRT1* のプロモーターにつなぎ、イネに導入した。形質転換体では、Fe 欠乏条件に応答して根における *refrel/372* の発現誘導が観察された。Fe 欠乏条件下で形質転換体は、ベクターコントロールに比べ、高い  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性を示し、Fe 吸収と蓄積が増大した。さらに、形質転換体は石灰質アルカリ土壌における Fe 欠乏耐性を示し、ベクターコントロールに対して、約 7.9 倍の収量を示した。

## 3-2 実験方法

### イネ形質転換用コンストラクトの作製

第2章で作製した, *OsIRT1* プロモーターに *uidA* 遺伝子を連結したプラスミド pIG121Hm-*OsIRT1*pro をもとに, 作製を行った。*refrel/372* 遺伝子を含む pOH プラスミド (Oki *et al.*, 2004) を *Xba* I と *Sal* I で処理して *refrel/372* を切り出し, pIG121Hm-*OsIRT1*pro の同サイト内の配列と置換した。

### 植物サンプル

第2章に記した形質転換体の栽培条件と同様に行った。但し, Fe 欠乏処理 5 日後に, 各種実験のサンプリングを行った。

イネの形質転換,  $\text{Fe}^{3+}$ キレート還元酵素活性測定とクロロフィル含量測定, PETIS による計測は, 第2章と同様に行った。

### ゲノミック PCR と RT-PCR

形質転換体からのゲノム DNA の抽出は Murray and Thompson (1980) の方法に従った。Fe 欠乏条件の植物サンプルから第2章と同様にトータル RNA を抽出した。*refrel/372* を特異的に認識するために *refrel/372.F*, *refrel/372.R* プライマーを用い, *OsIRT1* を特異的に認識するために *OsIRT1.F*, *OsIRT1.R* プライマーを用い,  *$\alpha$ -tubulin* を特異的に認識するために *Osa-tubulinRT.F*, *Osa-tubulinRT.R* プライマーを用いた。これらのプライマーを用い, ゲノミック PCR と RT-PCR を行った。これらの PCR 産物については, アガロースゲルの電気泳動で長さを, シー

クエンサーで配列を確認した。

## 石灰質アルカリ土壌での Fe 欠乏耐性検定

形質転換体の T<sub>1</sub> 種子を，明期 25℃，14 時間，暗期 20℃，10 時間の条件に制御された天然光気象室で生育させた。2 週間後，1 g の緩効性の被覆肥料 CFR-M2（住友化学）（Morikawa *et al.*, 2004）を加えた 500 g の石灰質アルカリ土壌（富山県，日本海鉱業株式会社）に移植し，自然光の温室で育てた。対照区の培土としては，ボンソル（Sumitomo Chem. Co., Osaka, Japan）を用いた。生育 3 日ごとに各植物の草丈と SPAD 値を計測した。種子成熟期における，種子と茎葉の乾重量を計測した。

### 3-3 実験結果

#### 3-3-1 形質転換体の *refrel/372* の発現様式

酵母由来の改変型  $\text{Fe}^{3+}$  キレート還元酵素遺伝子 *refrel/372* (Oki *et al.*, 2004) を *OsIRT1* プロモーターにつなぎ、アグロバクテリウム法を用いてイネに導入した。 $T_1$  の形質転換体が 45 ライン得られた。そのうち 4 ラインについてゲノミック PCR 法により確認したところ、3 ラインに *refrel/372* が導入されていることを確認した (図 3-1 a)。RT-PCR 法により、形質転換体の Fe 欠乏条件の根で *refrel/372* が発現し、*OsIRT1* も発現していることを確認した (図 3-1 b)。ベクターコントロールでは *OsIRT1* は発現していたが *refrel/372* の発現は検出されなかった。Fe 十分条件では形質転換体、ベクターコントロール共に *refrel/372*、*OsIRT1* は発現していなかった (データは示さない)。このことから導入された *refrel/372* は、*OsIRT1* プロモーターによって、Fe 欠乏に応答した発現制御を受けていることが明らかとなった。

#### 3-3-2 形質転換体の根における $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性

形質転換体の Fe 欠乏根における  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性を測定した (図 3-2)。Fe 欠乏条件で 5 日間生育させた形質転換体の  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性は、ベクターコントロールよりも高い値を示した。すなわち、ライン 7, 8, 11 は、ベクターコントロールに比べ、それぞれ pH 5.5 で 1.8, 2.2, 2.2 倍、pH 8 で 1.6, 1.8, 1.6 倍の  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性を示した (図 3-2)。

#### 3-3-3 形質転換体の Fe 吸収と蓄積量

形質転換体でFeの吸収と蓄積が増大しているかどうかを確認するために、PETIS法を用いて測定を行った。発芽後、2週間Fe十分条件で育てた後、Fe欠乏条件、もしくはFe十分条件に移植し、5日間生育させたイネを用い、根から $^{52}\text{Fe}^{3+}$ -EDTA (0.43 MBq, 30.7 fmol) と  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA (0.1 mM) を投与した。形質転換体（ライン 7）は、ベクターコントロールの約2倍のFe吸収と蓄積を示した（図 3-3 a）。Bio-imaging Analyzer System（BAS）を用いてFeの蓄積を確認したところ、形質転換体は、ベクターコントロールよりも多くのFeを吸収、移行、蓄積していることが確認できた（図 3-3 b-e）。

### 3-3-4 形質転換体のFe欠乏耐性

形質転換体の石灰質アルカリ土壌における生育を検定した（図 3-4, 5）。形質転換体（ライン 7）は石灰質アルカリ土壌でもFe欠乏症状を示さず、通常培土であるボンソルに定植した場合とほぼ同様の生育を示し、種子をつけた（図 3-4 a, b）。石灰質アルカリ土壌での草丈は、形質転換体は、石灰質アルカリ土壌に移植した40日後にはベクターコントロールの約2倍になった（図 3-5 a）。また、最新葉でのクロロフィル含量もベクターコントロールの約2.5倍となった（図 3-5 b）。形質転換体は石灰質アルカリ土壌で生育させた場合にもクロロフィル含量は低下せず、ベクターコントロールをボンソルで生育させた場合と同様の推移を示した。また、ボンソルでの生育には、形質転換体とベクターコントロールの間に差はなかった（データは示さない）。石灰質アルカリ土壌に定植して17週間後の種子を除いた地上部の乾物重は、ベクターコントロールの1.9倍であり、種子の乾物重は7.9倍であった（図 3-5 c, d）。

### 3-4 考察

進化工学の手法により作製した合成  $\text{Fe}^{3+}$  キレート還元酵素遺伝子 *refrel/372* をイネに導入し、Fe 欠乏時の  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性を強化することにより、石灰質アルカリ土壌において Fe 欠乏耐性を示すイネの作出に成功した。これらの形質転換体は、ベクターコントロールに比べ、Fe 欠乏条件下で高い  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性を示し、高い Fe 吸収と蓄積量を示した（図 3-2, 3）。これらの結果は、形質転換イネが  $\text{Fe}^{3+}$ を  $\text{Fe}^{2+}$ に還元し、その  $\text{Fe}^{2+}$ を  $\text{Fe}^{2+}$ トランスポーターによって吸収したことを示している。

イネは、Fe 欠乏条件になっても  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性が誘導されず（図 2-6）、これまで調べられている Strategy I 植物と比較しても還元酵素活性が低い。Strategy I 植物では、 $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素遺伝子を導入することにより、Fe 欠乏耐性を持つタバコを作製することが試みられてきた（Oki *et al.*, 1999; Andrew *et al.*, 1999）。当研究室ではまず、酵母の  $\text{Fe}^{3+}$ キレート還元酵素遺伝子 *FRE1* をタバコに導入したが、形質転換タバコは *FRE1* を発現せず、 $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性の上昇は見られなかった。そこで、植物でもこの  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素が機能するように *FRE1* の配列を改変し、改変型  $\text{Fe}^{3+}$ キレート還元酵素遺伝子 *refrel* を完全合成した。そして、*refrel* を 35S プロモーターに連結してタバコに導入することによって、より強力な  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性を持つ形質転換タバコの作製に成功した（Oki *et al.*, 1999）。さらに、石灰質アルカリ土壌のような高い pH 条件下でも、高い  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性を維持できるようにするために、PCR 法により *refrel* の塩基配列にランダムにミューテーションを導入し、培地 pH 8.0 でも高い活性を示す酵素のスクリーニングを行った。その結果、*refrel/372* が得られた。この *refrel/372* を 35S プロモーターに連結して導入したタバコは、石灰質アルカリ土壌でも高い  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性を示した（Oki *et al.*, 2004）。それゆえ、この *refrel/372* をイネに導入すること

が、石灰質アルカリ土壌のように Fe が利用されにくい土壌に耐性を示す形質転換イネの作製に最適だと考えた。

これまでに、イネに  $\text{Fe}^{3+}$ キレート還元酵素を導入する試みもいくつかなされてきた。Vasconcelos *et al.* (2004) は、アラビドプシスの *FRO2* のゲノム配列をイネに導入したが、mRNA が検出できなかった。当研究室の井上らは、*refrel/372* を *OsNAS1* プロモーターにつなぎ、イネに導入したが、 $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性の上昇は観察されなかった（未発表）。それゆえ、*refrel/372* をイネで機能させるためには、適切なプロモーターを使用することが重要だと考えた。シロイヌナズナでは、Fe 十分条件下では *FRO2* も *IRT1* も発現しないが、Fe 欠乏条件にすると 24 時間後には、根の外皮細胞で *FRO2* と *IRT1* の発現が誘導される。また、*FRO2* あるいは *IRT1* を 35S プロモーターにより強制的に転写させても、Fe 欠乏条件でなければ、タンパク質に翻訳されないという転写後制御も受けている（Connolly *et al.*, 2002, 2003; Vert *et al.*, 2002）。イネでは、 $\text{Fe}^{2+}$ トランスポーター *OsIRT1* が Fe 欠乏条件の根、特に外皮細胞で発現が誘導される（第 2 章）。以上のことから、シロイヌナズナなどの双子葉植物の Fe 吸収機構である Strategy I をイネに付与するためには、*OsIRT1* プロモーターにより  $\text{Fe}^{3+}$ キレート還元酵素の発現を制御することが適切だと考えた。今回、*refrel/372* を *OsIRT1* プロモーターにつないだ遺伝子をイネに導入することにより、*refrel/372* の発現を *OsIRT1* の発現と同調させることが可能になった。Fe 欠乏による  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性の上昇と  $\text{Fe}^{2+}$ トランスポーター活性の上昇が協調することにより、石灰質アルカリ土壌における Fe 欠乏耐性を示す形質転換イネを得ることができた。

*refrel/372* を酵母で発現させ、pH8 で活性測定を行うと、変異導入前の *refrel* の約 6 倍の  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性が観察された（Oki *et al.*, 2004）。しかしながら、*refrel/372* を導入したイネの  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性は、ベクターコントロールに比べ

約 2 倍にしか上昇しなかった。以前、35S プロモーターで *refrel/372* を常時過剰発現させたタバコでも、 $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性の上昇率は約 2 倍であった (Oki *et al.*, 2004)。しかしながら、これらの形質転換体は、 $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性が約 2 倍にしか上昇しないにもかかわらず、石灰質アルカリ土壌で Fe 欠乏耐性を示した。このことから、植物では  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性が必要以上に増加しないように、 $\text{Fe}^{3+}$ 還元力が制御されていることが考えられる。一方で、 $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性を適切な組織および栄養条件で巧みに上昇させることで、さらに Fe 欠乏条件に耐性のあるイネができると考える。



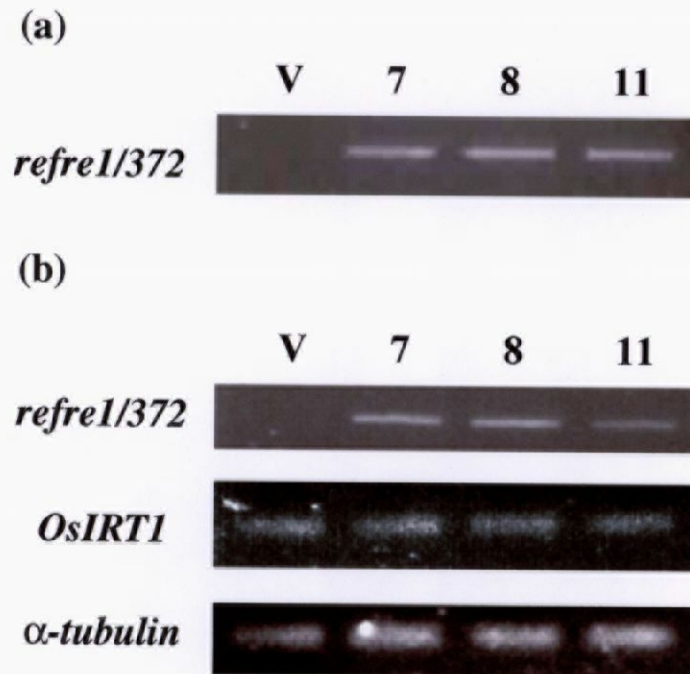


図 3-1 PCR法による*refre1/372*の導入確認と発現解析

(a) ゲノミックPCRによる*refre1/372*の検出。形質転換体 (7, 8, 11), ベクターコントロール (V)。 (b) Fe欠乏条件における*refre1/372*と *OsIRT1*のRT-PCR解析。

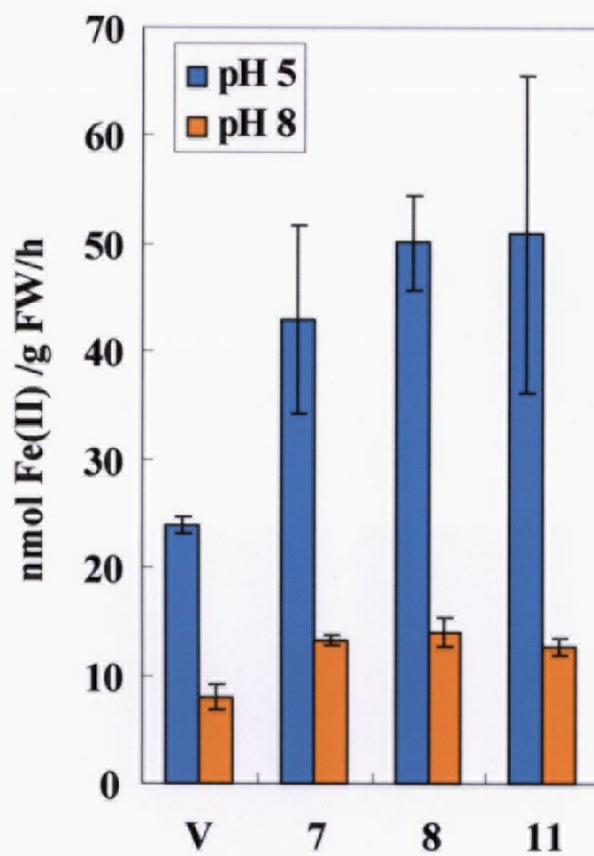


図 3-2 形質転換体Fe欠乏根のFe<sup>3+</sup>還元酵素活性

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、5日後に根のFe<sup>3+</sup>還元酵素活性を測定した。形質転換体(7, 8, 11), ベクターコントロール(V)。活性測定は、pH 5, もしくはpH 8で行った。各9連の平均 ± 標準偏差。

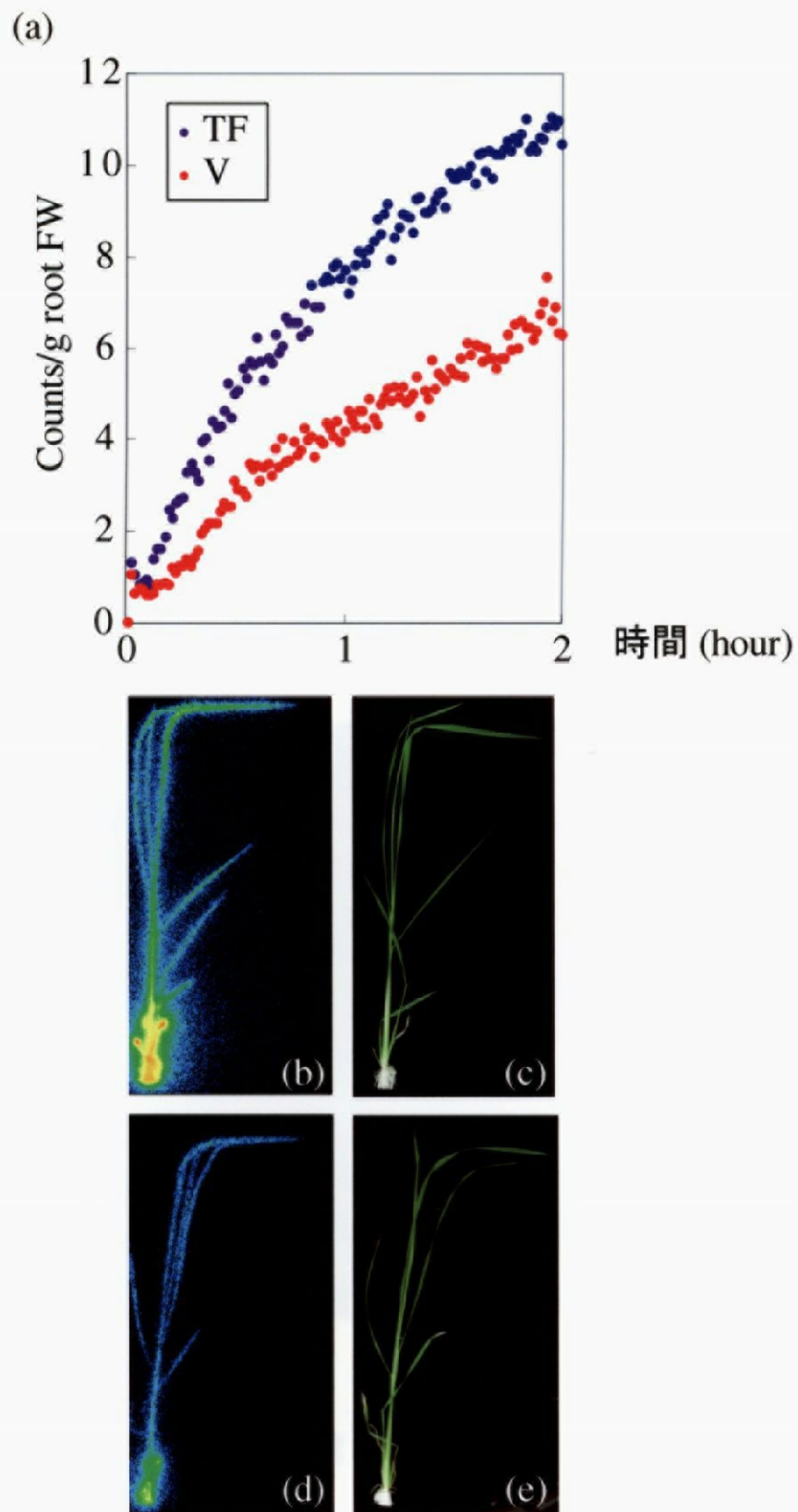


図 3-3 PETIS法を用いたFe吸収実験

(a) 茎でのFeのカウントの相対値。形質転換体ライン7 (TF), ベクターコントロール (V)。(b) 形質転換体のBAS画像。赤, 橙, 黄, 緑, 青の順にFe存在量が多いことを示す。(c) bの植物の写真。(d) ベクターコントロールのBAS画像。(e) dの植物の写真。

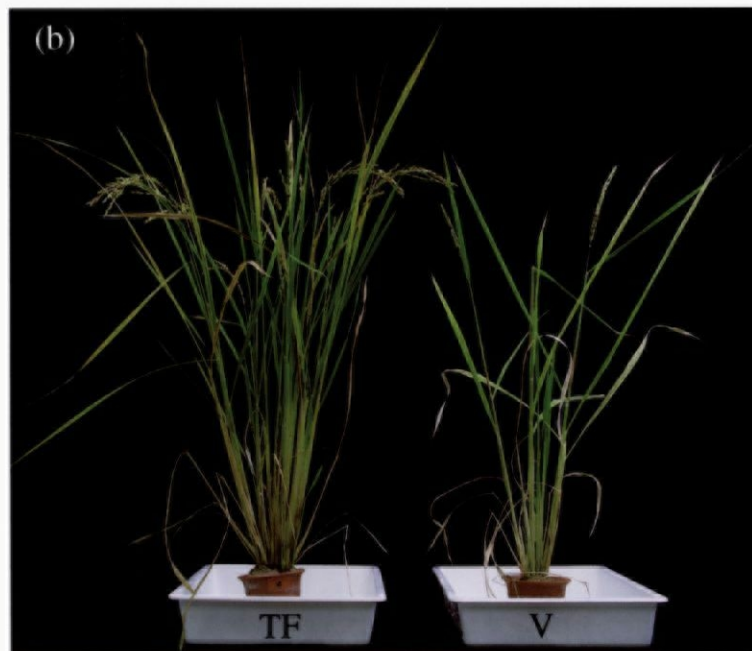
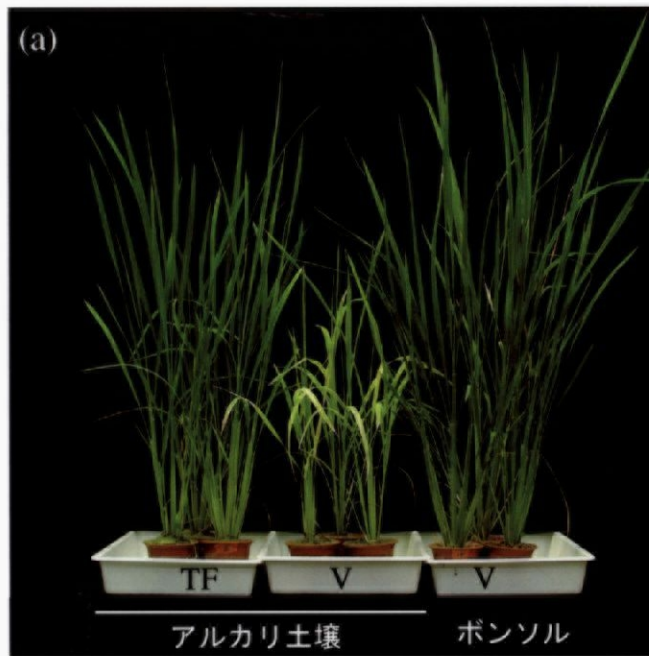


図 3-4 石灰質アルカリ土壌での形質転換体とベクターコントロールの生育の様子

(a) 石灰質アルカリ土壌およびボンソル（通常培土）での生育（移植4週間後）。形質転換体（TF：左）、ベクターコントロール（V：中，右）。(b) 石灰質アルカリ土壌での生育（移植17週間後）。形質転換体（TF：左）、ベクターコントロール（V：右）。

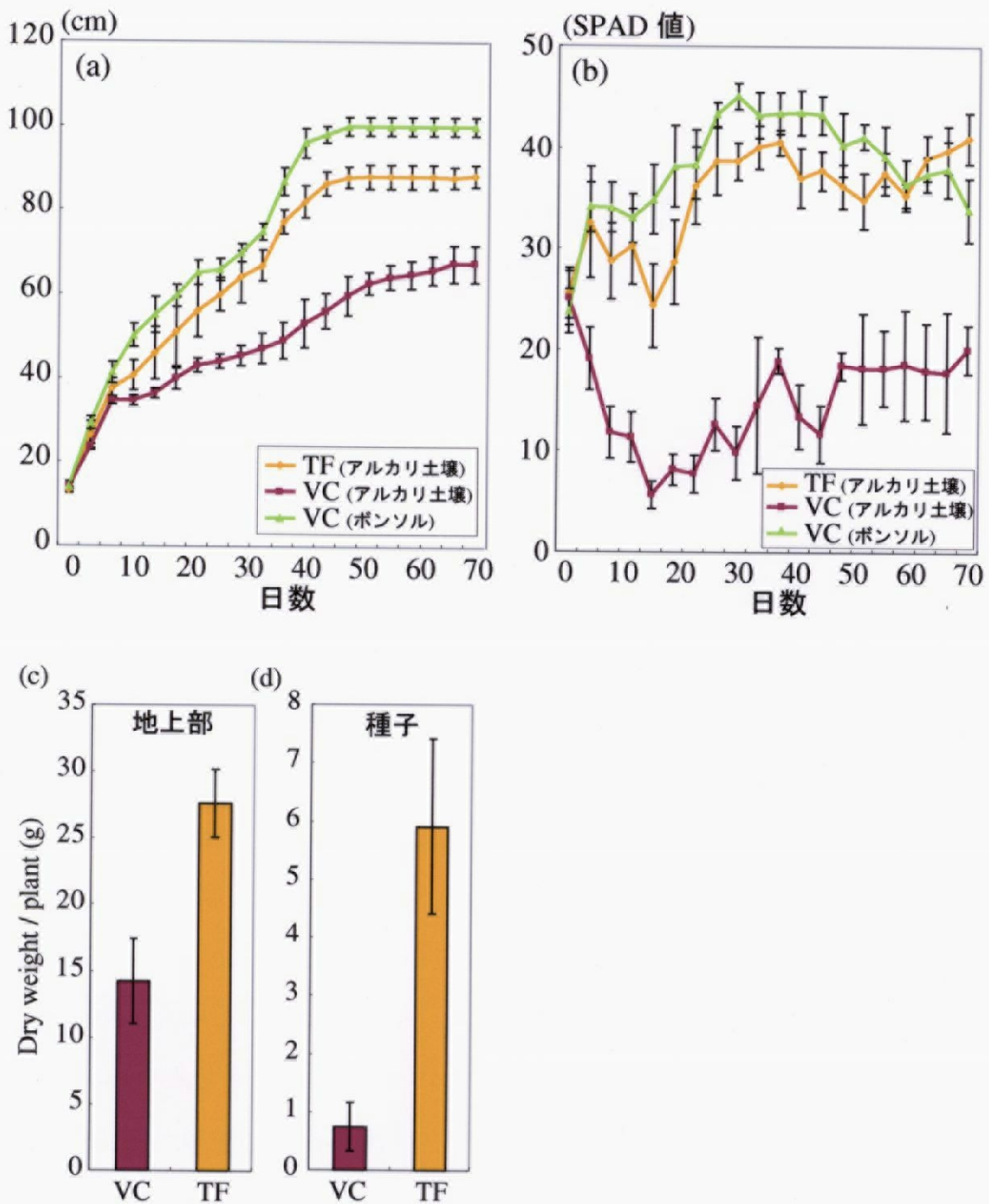


図 3-5 石灰質アルカリ土壌での形質転換体とベクターコントロールの生育検定

(a) 石灰質アルカリ土壌およびボンソルでの生育曲線。移植後、0日から70日までの草丈。TF (形質転換体) : 各5連の平均  $\pm$  標準偏差, V : 各3連の平均  $\pm$  標準偏差。(b) クロロフィル含量の変化。TF : 各5連の平均  $\pm$  標準偏差, V : 各3連の平均  $\pm$  標準偏差。(c) 種子を除く地上部の乾重量。TF : 各5連の平均  $\pm$  標準偏差, V : 各3連の平均  $\pm$  標準偏差。(d) 種子の乾重量。TF : 各5連の平均  $\pm$  標準偏差, V : 各3連の平均  $\pm$  標準偏差。



## 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

(Ishimaru *et al.*, *J. Exp. Bot.* (2005) **56**, 3207-3214)

### 4-1 要約

Zn は、植物の正常な生育に必要な不可欠な元素であるが、イネにおける Zn 輸送の分子機構に関しては研究開始当時ほとんど知見がなかった。本章では、イネの  $\text{Fe}^{2+}$  イオントランスポーター遺伝子 *OsIRT1* に相同性の高い配列を持つ4つの遺伝子、*OsZIP4*, *OsZIP5*, *OsZIP6*, *OsZIP7* を単離した。マイクロアレイ解析とノーザン解析により、*OsZIP4* は、Zn 欠乏条件の茎葉と根で強く発現が誘導されることが明らかになった。定量的 RT-PCR により測定した、Zn 欠乏条件下の茎葉での *OsZIP4* の転写産物の量は、2003年に報告されたイネの Zn トランスポーター遺伝子 *OsZIP1* および *OsZIP3* (Ramesh *et al.*, 2003) の転写産物量の1000倍以上であった。*OsZIP4* の導入により Zn 吸収欠損酵母 (*Δzrt1*, *Δzrt2*) の生育が回復したことから、*OsZIP4* は Zn のトランスポーターであることが示された。*OsZIP4*-GFP 融合タンパク質を、タマネギの表皮細胞に一過的に発現させたところ、細胞膜に局在した。*In situ* ハイブリダイゼーション法により、*OsZIP4* 転写産物の組織局在を検出したところ、*OsZIP4* は、Zn 欠乏条件の植物体全体で発現し、特に篩部細胞で強く発現していた。さらに、*OsZIP4* は、Zn 欠乏条件の分裂組織で顕著に発現していた。これらの結果より、*OsZIP4* は、イネの植物体内の Zn 輸送と転流に関わる Zn トランスポーターであることが示唆された。

## 4-2 実験方法

植物サンプル、金属含量の測定、酵母の金属吸収欠損株の作製、GFP 融合タンパク質による細胞内局在の解析は、第 2 章と同様に行った。

### マイクロアレイ実験

イネの完全長 cDNA 計画 (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>) の配列情報をもとに合成された 21,938 遺伝子を含む、イネの 22 K custom oligo DNA microarray kit (Agilent Technology, Tokyo, Japan) を用いて、マイクロアレイ実験を行った。RNeasy Plant Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用い、イネの茎葉と根から RNA を SDS-フェノール法により抽出した。RNA の濃度を分光光度計で測定し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology) で分解されていない RNA の存在を確認した。Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technology) を用いて 200 ng の RNA を Cy-3 または Cy-5 で標識した。この標識プローブを Agilent rice 22 K oligo DNA マイクロアレイにハイブリダイズし、Agilent Microarray Scanner (Agilent Technology) と Feature Extraction software (Agilent Technology) で測定した。詳細な実験方法およびデータの処理方法は、付属の説明書に従った。

### PCR 法による *OsZIP4* の単離

Knowledge-based Oryza Molecular Biological Encyclopedia website (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>) を検索したところ、*OsIRT1* に相同性の高い遺伝子として、*OsZIP4*, *OsZIP1*, *OsZIP3* の配列が確認できた。PCR 法を用いて、*OsZIP4*, *OsZIP1*, *OsZIP3* を単離するために、*OsZIP4* forward, *OsZIP4* reverse, *OsZIP1* forward, *OsZIP1* reverse, *OsZIP3* forward, *OsZIP3* reverse プライマーを作

製した。Zn 欠乏条件および Fe 欠乏条件のイネの根をもとに作られた cDNA ライブラリー (Buglio *et al.*, 2002) を鋳型として、上記のプライマーを用いて PCR を行った。得られた増幅断片を pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) にサブクローニングし、それぞれ pENTR-*OsZIP4*, pENTR-*OsZIP1*, pENTR-*OsZIP3* と名づけた。Thermo Sequenase Cycle Sequencing kit (Shimadzu, Kyoto) と DNA sequencer (DSQ-2000L; Shimadzu) を用いたシーケンシングにより、配列を確認した。

## ノーザン解析

第 2 章と同様に行った、ただし、各レーンにつき 10 µg のトータル RNA を用いた。PCR 法で増幅した *OsZIP4*, *OsIRT1*, *OsZIP1* の ORF を <sup>32</sup>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。

## 定量的リアルタイム-PCR

第 2 章と同様の方法でトータル RNA 1 µg あたりの *OsZIP4*, *OsZIP1*, *OsZIP3* の転写産物量を算出した。*OsZIP4* を特異的に認識するために *OsZIP4* RT.F, *OsZIP4* RT.R プライマー, *OsZIP1* を特異的に認識するために *OsZIP1* RT.F, *OsZIP1* RT.R プライマー, *OsZIP3* を特異的に認識するために *OsZIP3* RT.F, *OsZIP3* RT.R プライマーを用いた。

## 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、*ADHI* プロモーター下に *Hind*III, *Pvu*II, *Pst* I, *Xho* I, *Sst* I,



*Xba* I, *Not* I サイトを持つ。この pYH23 を *Hind*III と *Xba* I で処理し, 1,579 bp の MultiSite Gateway Three-fragment (Invitrogen) の Reading Frame Cassette A をサブクローニングした。このフラグメントには, Gateway システムに必要な *att*R1 サイト, *att*R2 サイトをがあり, その間に chloramphenicol 耐性遺伝子, *ccd*B 遺伝子を含んでいる。この改変したプラスミドを, destination ベクターとして, pDESTADH と名づけた。destination ベクター (pDESTADH) と, entry ベクター (pENTR-*OsZIP4*) を混合し, LR 反応 (*att*L サイト, *att*R サイトと *att*R1 サイト, *att*R2 サイトの相同組換え反応;Invitrogen) を行い, *ADHI* プロモーターに *OsZIP4* をつないだベクター pYH23-*OsZIP4* を作製した。*OsZIP1* や *OsZIP3* 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)。

## OsZIP4-GFP 融合タンパク質の発現ベクターの作製

CaMV35S-*Sal* I -*Kpn* I -sGFP(S65T)-NOS3' を *Eco*RV で切断し, 1711 bp の Gateway Vector Conversion System (Invitrogen) の Reading Frame Cassette A を挿入した。得られたプラスミドを pDEST35S-sGFP とした。*OsZIP4* の ORF を, *OsZIP4* ORF5, *OsZIP4* ORF3 のプライマーを用いて, 増幅した。増幅した *OsZIP4* 断片を pENTR/D-TOPO (Invitrogen) にサブクローニングし, pENTR-*OsZIP4* を作製した。これを用いて LR 反応を行い, 35S-*OsZIP4*-sGFP を作製した。

## *In situ* ハイブリダイゼーション

2 週間 Zn 十分条件で生育させた後 10 日間 Zn 欠乏条件で生育させたイネを用いた。4% (w/v) のパラホルムアルデヒドで 36 時間固定し, エタノールで脱水

を行った。脱水後、組織片をパラホルムに包埋し、厚さ 10  $\mu\text{m}$  で切片化し、スライドグラスに載せた。*OsZIP4* RT.F, *OsZIP4* RT.R プライマーを用いて、cDNA ライブラリー (Buglio *et al.*, 2002) を鋳型として、PCR 法により増幅した配列を pCR-TOPO ベクター (Invitrogen) にサブクローニングした。このプラスミドを *Hind*III で処理し直鎖状にした後、T7 RNA polymerase で転写し、*in situ* ハイブリダイゼーション用のセンスプローブ、アンチセンスプローブを作製した。digoxigenin-11-UTP (Roche, Mannheim, Germany) で、それぞれのプローブを標識し、脱パラフィン化したサンプルと 42°C で 20 時間ハイブリダイズした後、50% SSC と 50%ホルムアルデヒド混合溶液で洗浄した。これを anti-digoxigenin alkaline phosphatase conjugate (Roche) と 30 分間、室温でインキュベートした後、nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate を基質として発色を行った。このサンプルを Axiophoto microscope (Carl Zeiss, Tokyo, Japan) で観察した。以上の実験手法の詳細は、各キット、酵素に付属の説明書に従った。

## 4-3 実験結果

### 4-3-1 イネにおける ZIP ファミリー遺伝子の単離と系統樹解析

イネの ZIP ファミリー遺伝子として、第 2 章で解析した *OsIRT1*, *OsIRT2* の他に本研究の進行中に報告された *OsZIP1*, *OsZIP2*, *OsZIP3* 遺伝子が存在する (Ramesh *et al.*, 2003)。本章では、イネの Zn 輸送機構に関して更なる知見を得るために、イネの完全長データベース (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>) から、*OsIRT1* に相同性の高い遺伝子を検索した。その結果、新たに 4 つの *OsZIP* 遺伝子 ; *OsZIP4* (accession. no. AB126089), *OsZIP5* (accession. no. AB126087), *OsZIP6* (accession. no. AB126088), *OsZIP7* (accession. no. AB126090) を発見したので、これらを PCR 法により単離した。*OsZIP4*, *OsZIP5*, *OsZIP6*, *OsZIP7* はアミノ酸配列で *OsIRT1* とそれぞれ 54%, 51%, 33%, 50%の同一性を示し、シロイナズナの ZIP1 とは 58%, 49%, 44%, 35%の同一性を示した (図 4-1)。また、*Oryza sativa* L. ssp. Japonica cv. Nipponbare (Goff *et al.*, 2002) のゲノムデータベース上を検索したところ、さらに 3 つの *OsZIP* 遺伝子 (*OsZIP8*, *OsZIP9*, *OsZIP10*) を同定した。それゆえ、イネには 2 個の *OsIRT* 遺伝子と 10 個の *OsZIP* 遺伝子が存在することが明らかとなった (図 4-1)。

### 4-3-2 *OsZIP* 遺伝子ファミリーのマイクロアレイ解析

Zn 欠乏条件によりどのような遺伝子が発現制御を受けているかを網羅的に解析するために、特に金属トランスポーターをコードすると予測される遺伝子の発現変化に注目して、21,938 個の遺伝子を含むイネの 22K マイクロアレイスライドを用いて、マイクロアレイ実験を行った。このマイクロアレイスライド上

には、*OsIRT1* を含め、6 つの *OsZIP* ファミリー遺伝子が存在した (表 4-1)。これらのうち、*OsIRT1*, *OsZIP4*, *OsZIP5* 遺伝子は Zn 欠乏条件の根で発現が誘導され、*OsZIP4*, *OsZIP5*, *OsZIP7* 遺伝子は Zn 欠乏条件の茎葉で発現が誘導されていた。*OsZIP4* の Zn 欠乏による発現誘導は特に顕著であり、Zn 欠乏条件での発現量を Zn 十分条件での発現量で割った値 (発現比) は、マイクロアレイ上の全 21,938 個の遺伝子中、茎葉では 4 番目、根では 14 番目に高い値を示した。

### 4-3-3 *OsZIP4* および他の *OsZIPs* の様々な金属栄養素欠乏条件における発現解析

Zn 欠乏条件、Fe 欠乏条件、Mn 欠乏条件、Cu 欠乏条件で生育させたイネにおける *OsZIP4*, *OsIRT1*, *OsZIP1* の発現変化をノーザン解析により調べた。*OsZIP4* の発現は、Zn 欠乏条件の茎葉と根で強く誘導されていたが、他の金属欠乏条件では、ほとんど変化はなかった (図 4-2-1)。これに対して、*OsIRT1* は Fe 欠乏条件の根で発現が誘導されていた。また、*OsZIP1* は、Zn 欠乏条件下では発現の誘導が見られず、Cu 欠乏条件の根で発現の誘導が見られた (図 4-2-1)。また、*OsZIP3* の転写産物は、検出できなかった (データは示さない)。

定量的 RT-PCR 解析を行い、*OsZIP4* の発現が、Zn 欠乏条件の根、茎、葉で誘導されていることを確認した (図 4-2-2)。また最新葉で最も強く発現が誘導されていた。一方、*OsZIP1* の発現を、定量的 RT-PCR 法により検出したところ、ノーザン解析の結果と一致して、発現は Zn 欠乏条件により抑制されていた (図 4-2-3)。注目すべきことに、*OsZIP4* の転写産物量は、Zn 欠乏条件の地上部では、*OsZIP1* に比べ、1000 倍以上多かった。また、*OsZIP3* の転写産物は、定量的 RT-PCR 法でも検出できなかった。

次に、Zn 欠乏の進行度による *OsZIP4* の発現量の変化を調べるために、経時的に育てたイネを採取し、ノーザン解析を行った (図 4-3)。*OsZIP4* の発現は、Zn 欠乏条件の根では 3 日目から誘導が始まり、7 日目で最大となった後、下降に転じた (図 4-3)。一方、茎葉では 5 日目から誘導が始まり、14 日目で最大となった。また、Zn の再投与後、8 日目には根、茎葉ともに発現が完全に検出できなくなった。

マイクロアレイ解析に用いたイネの体内における金属含量を計測した (図 4-4)。Zn 欠乏条件のイネの茎葉では、Zn 含量が 10 分の 1 に減少していた。また、Zn 欠乏条件の根では、Fe 含量は 2 倍になっていたが、Mn 含量と Cu 含量には変化がなかった。Zn 欠乏条件の茎葉では、Zn 以外の金属含量に変化はなかった。同様に、Fe 欠乏条件、Mn 欠乏条件、Cu 欠乏条件で生育させたイネの金属含量は、欠乏処理した金属含量が低下した以外には、変化が見られなかった (データは示さない)。

#### 4-3-4 *OsZIP4* のトランスポーター機能の解析

酵母の高親和性 Zn トランスポーターを相同組換えにより破壊した Zn 吸収欠損株 CM-ZRT ( $\Delta zrt1$ ,  $\Delta zrt2$ ) を用いて、*OsZIP4* による相補実験を行った (図 4-5)。ネガティブコントロールとしてベクター (pYH23) のみを導入した株、ポジティブコントロールとして Ramesh *et al.* (2003) により Zn のトランスポーター活性が報告された *OsZIP3* を導入した株を作製した。Zn 欠乏培地において、ベクターのみを導入した Zn 吸収欠損株と比較すると、*OsZIP4*、または *OsZIP3* を導入した株は、顕著に生育が回復した (図 4-5 a, b)。

また、*OsZIP4* を Fe 吸収欠損株 CM-FET ( $\Delta fet3$ ,  $\Delta fet4$ ) に発現させ、相補実験を行った。*OsIRT1* を導入したものをポジティブコントロールとして用いた。

Fe 欠乏条件にした培地上では, OsZIP4 を導入した株は生育が回復しなかったが, OsIRT1 を導入した株は, 生育が回復した (図 4-5 c)。同様に, Mn 吸収欠損株 CM-SMF ( $\Delta smf1$ ), Cu 吸収欠損株 FTRUNB1 ( $\Delta ctr1$ ) を用いて, それぞれ Mn, Cu 欠乏培地で相補実験を行ったが, OsZIP4 を発現させても, 生育は回復しなかった (データは示さない)。

#### 4-3-5 OsZIP4 の細胞内局在解析

OsZIP4-GFP 融合タンパク質をタマネギの表皮細胞に一過的に発現させると, 細胞膜に局在した (図 4-6 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 4-6 b)。

#### 4-3-6 OsZIP4 発現の組織局在

*In situ* ハイブリダイゼーション法を用いて, Zn 欠乏イネにおける OsZIP4 転写産物の組織局在を調べた (図 4-7)。Zn 欠乏条件の根では, 主に維管束, 特に篩部で発現が観察された (図 4-7-2 b)。さらに, 根端分裂組織で, 強い発現が観察された (図 4-7-1 c)。Zn 欠乏条件の葉では, OsZIP4 の転写産物は, すべての維管束と, 葉肉細胞に存在した (図 4-7-2 b)。また, 根と同様に茎頂分裂組織でも, 特に強い発現が観察された (図 4-7-2 c)。

## 4-4 考察

イネの *OsZIP* 遺伝子群を単離し、発現様式を解析したところ *OsZIP4* が Zn 欠乏条件により顕著に発現誘導される遺伝子であることを明らかにした (図 4-1, 2, 3 ; 表 4-1)。さらに, *OsZIP4* は, 細胞膜に局在する Zn トランスポーターであることが明らかとなった (図 4-5, 6)。また *OsZIP4* が, Zn 欠乏条件の篩部で発現していたことから (図 4-7), Zn の転流に関わる可能性のあるトランスポーターであることが考えられる。Ramesh *et al.* (2003) が単離した *OsZIP1*, *OsZIP3* は, Zn 欠乏条件によって, 発現が誘導されるイネの Zn トランスポーターであると報告されている。また, *OsZIP1*, *OsZIP3* は葉の維管束, 根の維管束, 外皮細胞で発現すると報告された。しかしながら, 本研究による解析では, Zn 欠乏による *OsZIP1*, *OsZIP3* の発現誘導は見られなかった (図 4-2-1, -3)。一方, *OsZIP1* の発現は, Cu 欠乏条件の根で誘導されていた。このことから, *OsZIP1* は Zn 輸送に加え, Cu 栄養にも関わる遺伝子であることが示唆された。対照的に, *OsZIP4* の発現は Zn 欠乏条件で強く誘導された (図 4-1, 2, 3 ; 表 4-1)。マイクロアレイ解析では, Zn 欠乏条件での *OsZIP4* の発現誘導比は, アレイ上の全遺伝子のうち地上部では 4 番目に高いものであった。さらに定量的 RT-PCR 解析により, *OsZIP4* の転写産物量は *OsZIP1* や *OsZIP3* の転写産物量よりも圧倒的に多いことが明らかになった (図 4-2-3)。このことから, イネの植物体内において *OsZIP4* はすでに報告されている *OsZIP1*, *OsZIP3* と同等, もしくはそれ以上に Zn の恒常性維持に関して重要な役割を担っていると考えられた。Zn 欠乏条件の葉では *OsZIP4* は維管束と葉肉細胞で発現し, Zn 欠乏条件の根では, 表皮細胞や皮層細胞では発現せず, 主に維管束で発現していた (図 4-7)。このことから, *OsZIP4* は土壌から Zn を吸収するトランスポーターではなく, 植物体内での Zn の移行に関わるトランスポーターであると考えられる。*OsZIP4* の

発現部位は、イネにおける金属の長距離輸送に関わる金属-NA トランスポーター *OsYSL2* (Koike *et al.*, 2004) の発現部位と非常によく似ている。さらに興味深いことに、根端分裂組織および茎頂分裂組織で、強い *OsZIP4* の発現が検出された (図 4-7-1 c, 2 c)。Zn は DNA の複製, RNA の代謝, 細胞分裂, タンパク質合成など様々な場面で必要であるとされる (Uchiyama *et al.*, 2002)。イネにおいて Zn は分裂組織に高濃度 (750 mg/kgDW) に集積されており, 分裂組織の Zn を高濃度に維持するために, イネは根から吸収した Zn を分裂組織に優先的に送り込む機構を備えていることが報告されている (Haslett *et al.*, 2001)。分裂組織における Zn 要求性を満たすために, *OsZIP4* が重要な機能を果たしていることが考えられる。

二酸化炭素固定を行うためには, 二酸化炭素と炭酸水素イオンを相互に変換するカーボニックアンヒドラーゼが必要である。この酵素は, 立体構造を維持するために Zn が必要である。従って, Zn を細胞内に取り込む *OsZIP4* は光合成においても重要であると考えられる。Hacisalihoglu *et al.* (2004) は, コムギにおいて, Zn の増加によりカーボニックアンヒドラーゼの発現と活性が増加すると報告している。根での *OsZIP4* の発現は, Zn 欠乏の初期に誘導され, 10 日目でピークをむかえ, それ以降, Zn 欠乏状態が長く続くと徐々に発現の誘導は減少した (図 4-3)。今回の実験で用いたイネは, Zn 欠乏に移してから 10 日目までは, 根も茎葉も伸長が続いたが, それ以降は Zn 欠乏により著しく生育は抑制された (データは示さない)。つまり, 根の生育が止まるまで, 根の *OsZIP4* の発現が誘導されていると考えられる。対照的に, Zn 欠乏条件の茎葉での *OsZIP4* の発現は, 根での発現誘導よりも遅れて起こり, Zn 欠乏条件が長くなるにつれて増加した。*OsZIP4* は, Zn 欠乏条件の葉では葉肉細胞に存在した (図 4-7-2 b)。また, Zn 欠乏条件によって, 特に最新葉で *OsZIP4* の発現が増加した (図 4-2-2)。



これらの結果は、OsZIP4 が、最大展開葉から最新葉への Zn の長距離輸送に重要であることを示唆している。

Zn 欠乏は多くの場合、茎葉における Fe 含量を増加させ、酸化障害を引き起こす。たとえば、タバコ、オオムギでは、Zn 欠乏条件における植物の Fe 含量は、Zn 十分条件の植物に比べ高くなっている (Zhang *et al.*, 1989; Kobayashi *et al.*, 2003)。しかしながら、Zn 欠乏条件のイネの Fe, Mn, Cu の金属含量は、Zn 十分条件のイネと同等であった (図 4-4)。酵母における相補実験では、OsZIP4 は、Zn 以外の金属 (Fe, Mn, Cu) を輸送しなかった (図 4-5 c)。また、OsZIP1 や OsZIP3 も Zn を輸送するが、Fe や Mn は輸送せず、OsIRT1 と OsIRT2 は Fe を輸送するが Zn, Mn, Cu を輸送しない (Ramesh *et al.*, 2003; 本論文第 2 章)。つまり、OsZIP4 を含む、イネの ZIP ファミリー遺伝子は、特有の金属イオンに特異性が高いことが考えられる。もし、OsZIP4 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、他の金属過剰害を引き起こす可能性がある。それゆえ、イネに *OsZIP4* を導入することにより、Zn 欠乏条件に耐性を持ち、かつ他の金属の過剰害を引き起こさないような形質転換イネを創製できると考える。

遺伝子名	根	茎葉	Accession No.
<i>OsIRT1</i>	2.1 ± 0.3	1.4 ± 0.1	AB070226
<i>OsZIP3</i>	1.1 ± 0.2	0.4 ± 0.0	AY323915
<i>OsZIP4</i>	4.7 ± 0.7	20.9 ± 5.7	AB126089
<i>OsZIP5</i>	1.7 ± 0.4	3.8 ± 1.0	AB126087
<i>OsZIP6</i>	0.8 ± 0.1	1.8 ± 0.2	AB126088
<i>OsZIP7</i>	1.4 ± 0.2	4.6 ± 1.0	AB126090

表 4-1 *OsZIP* 遺伝子ファミリーのZn欠乏条件における  
マイクロアレイ解析

Zn欠乏条件での発現量をZn十分条件での発現量で割った値（発現比）を示す。各4連の平均 ± 標準偏差。

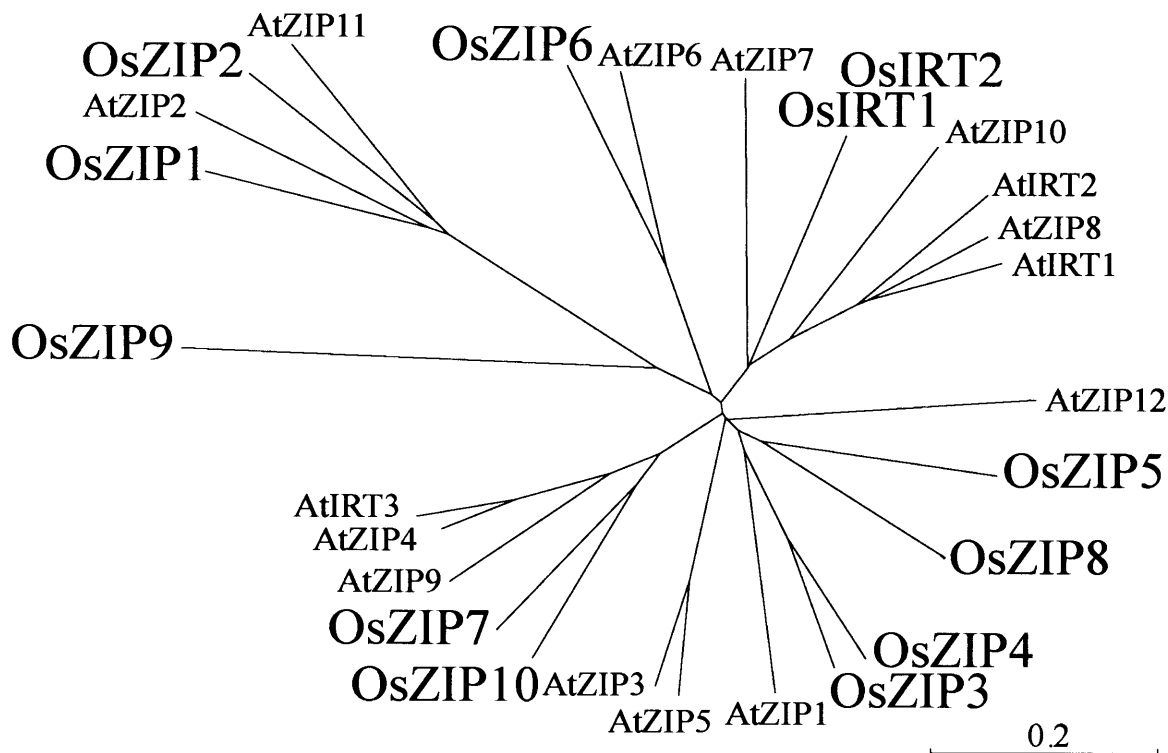


図 4-1 ZIPファミリー遺伝子の分子系統樹

イネ、およびシロイヌナズナに存在するすべてのZIPファミリー遺伝子の分子系統樹。推定ORFのアミノ酸配列について、CLUSTAL W neighbor-joining法を用い、分子系統樹を作製した。Os: イネ (*Oryza sativa*), At: シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)。

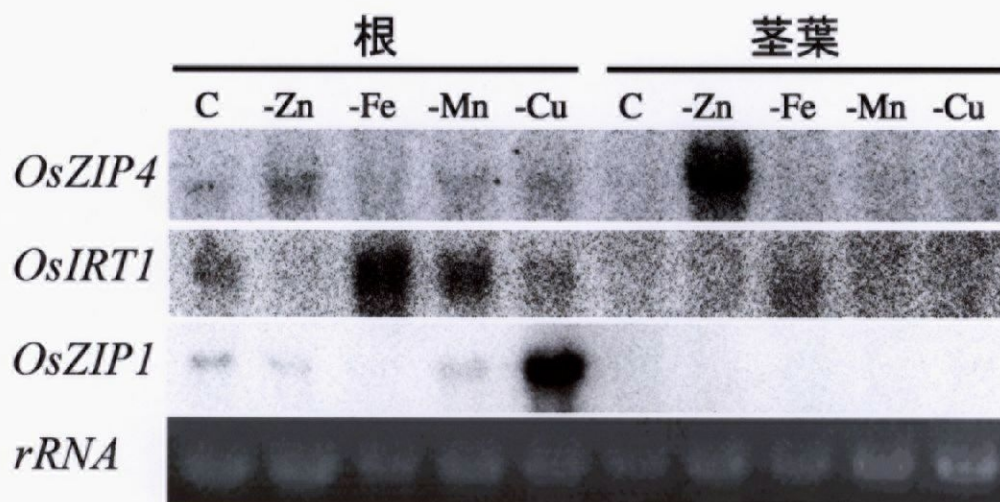


図 4-2-1 *OsZIP4*および他のZIPsの様々な金属栄養素欠乏条件における発現解析

*OsZIP4*, *OsIRT1*, *OsZIP1*のノーザン解析。C : Zn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。

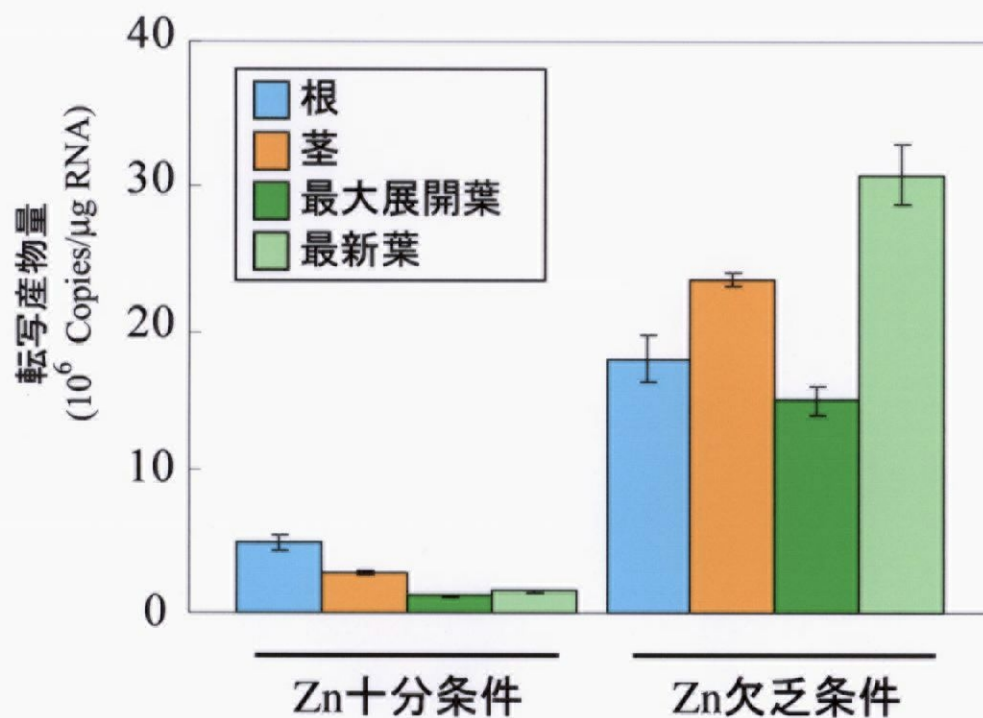


図 4-2-2 *OsZIP4*の発現解析

各部位での*OsZIP4*の定量的RT-PCR解析。*OsZIP4*に特異的なプライマーを用いた。トータルRNA 1  $\mu\text{g}$ 当たりの*OsZIP4*の転写産物量を示す。各3連の平均  $\pm$  標準偏差。

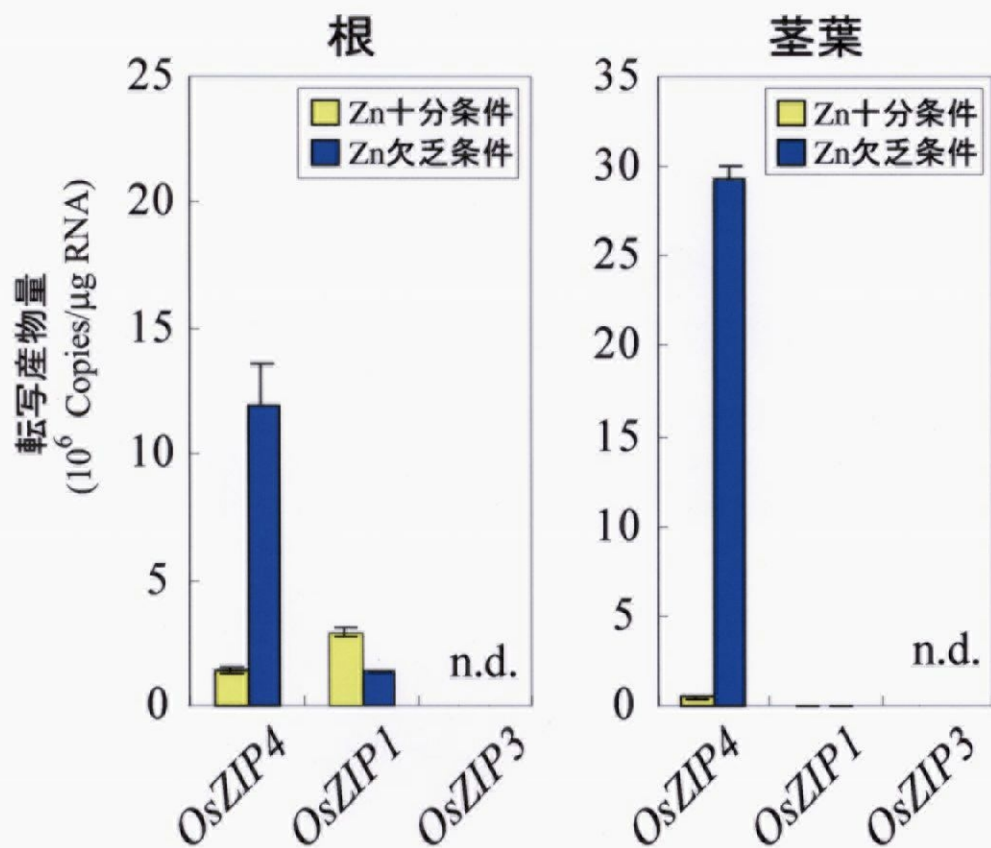


図 4-2-3 *OsZIP4*および他のZIPsの発現解析

*OsZIP4*, *OsZIP1*, *OsZIP3*の定量的RT-PCR解析。各*OsZIP*に特異的なプライマーを用いた。トータルRNA 1  $\mu\text{g}$ 当たりの*OsZIP4*, *OsZIP1*, *OsZIP3*の転写産物量を示す。各3連の平均  $\pm$  標準偏差。n.d.: 検出さ

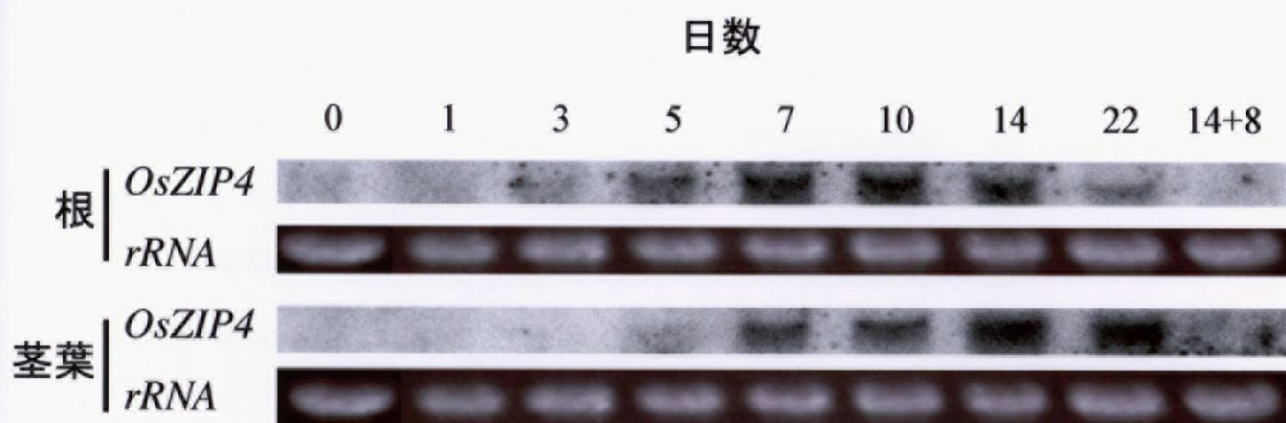


図 4-3 *OsZIP4*のZn欠乏条件による経時的な発現変化

2週間Zn十分条件で生育させたイネをZn欠乏条件に移植し、0、1、3、5、7、10、14、22日目にそれぞれサンプリングを行った。また、14日間Zn欠乏処理をしたイネをZn十分条件に移植して8日間生育させてサンプリングした (14+8)。

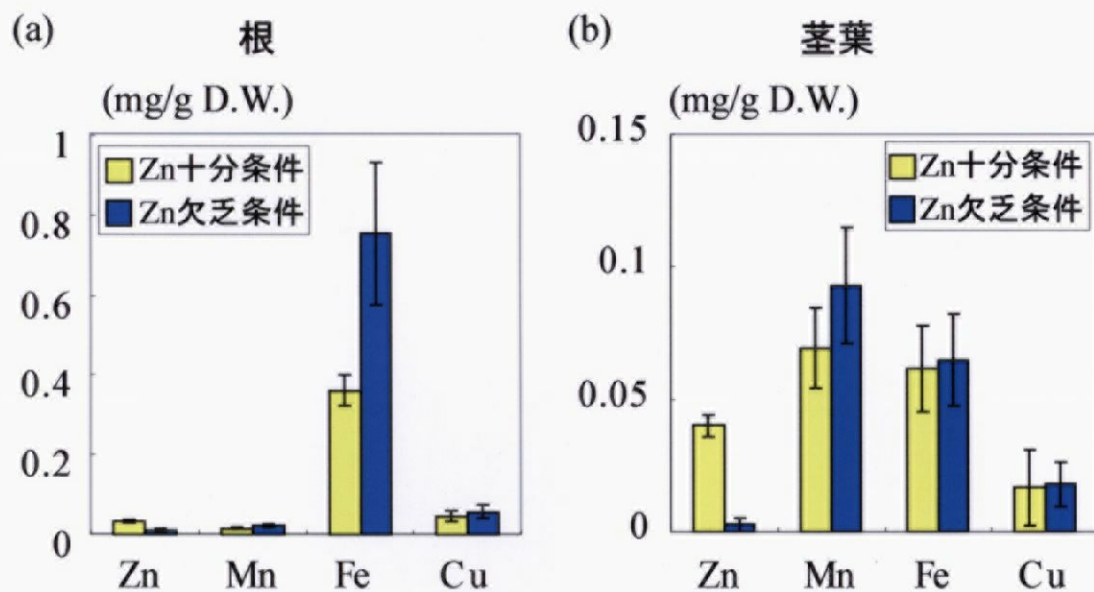


図 4-4 Zn欠乏条件で生育させたイネの金属含量

2週間、Zn十分条件で生育させたイネを、Zn欠乏条件に移植し、2週間後にサンプルリングを行った。各3連の平均 ± 標準偏差。



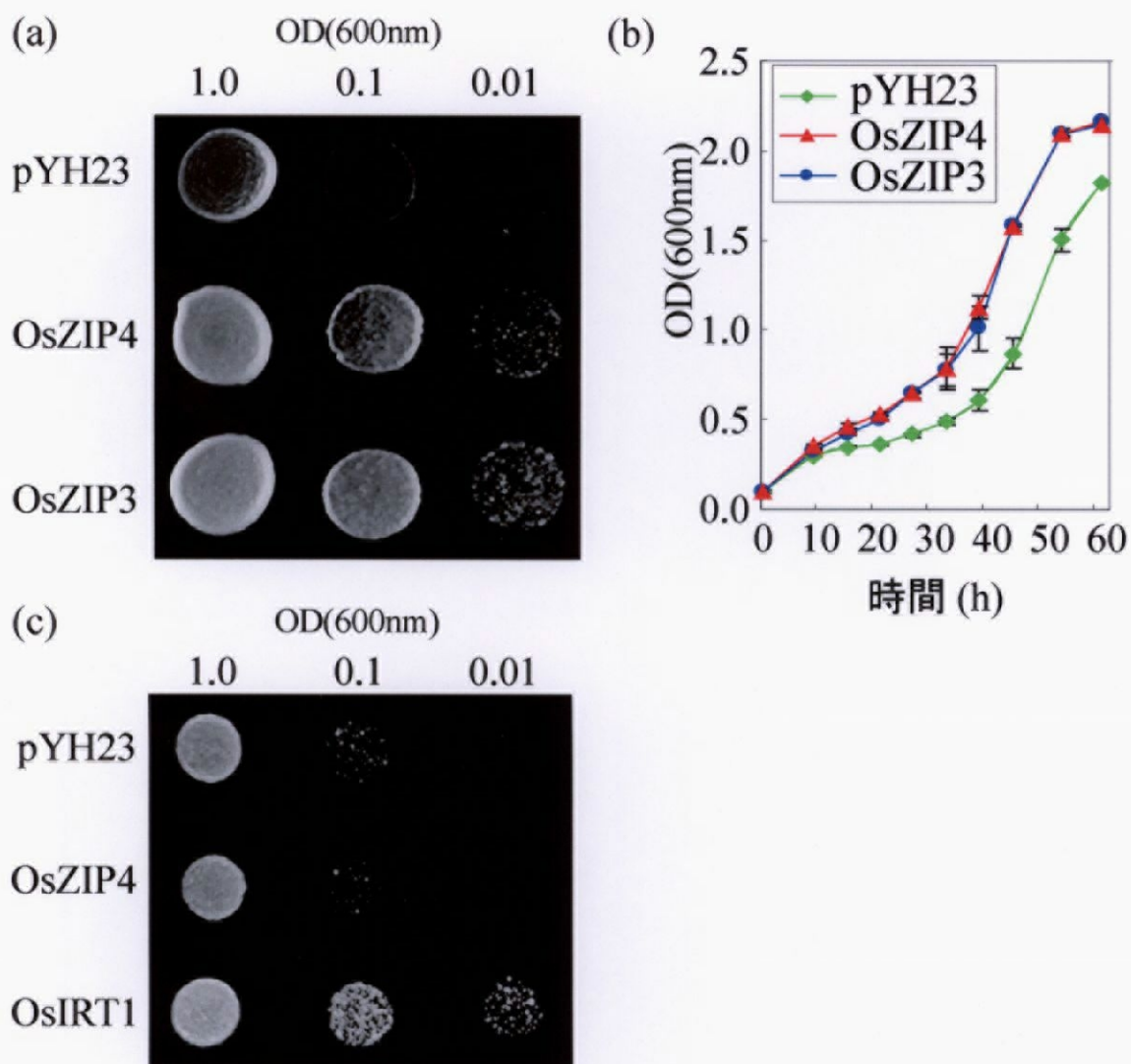


図 4-5 酵母のZn吸収欠損株を用いたOsZIP4の相補実験

(a) Zn吸収欠損株に、ベクターコントロール(pYH23), OsZIP4, OsZIP3を発現させた株のZnを除いたSD固形培地上での生育。(b) SD液体培地での生育曲線。各9連の平均 ± 標準偏差。(c) Fe 吸収欠損株に、ベクターコントロール(pYH23), OsZIP4, OsZIP3を発現させた株の50  $\mu$ M BPDSを加えたFe欠乏SD固形培地上での生育。

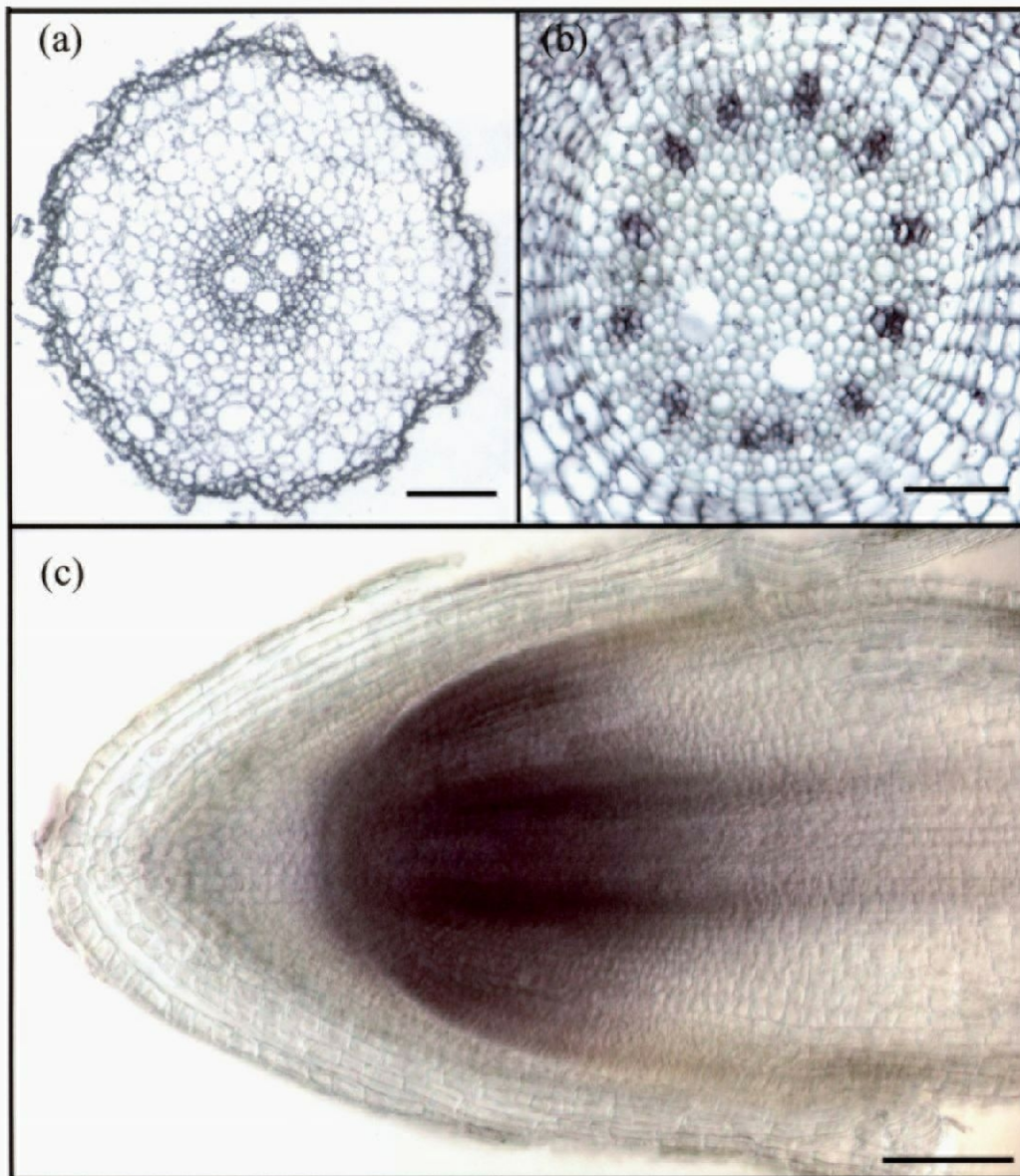


図 4-7-1 *In situ* ハイブリダイゼーション法によるZn欠乏イネの根における*OsZIP4*の組織局在

(b, c) *OsZIP4*のアンチセンスプローブを用いた切片像。(a) *OsZIP4*のセンスプローブを用いた切片像。(a) 根の横断面。(b) 根の中心柱の横断面。(c) 根端分裂組織の縦断面。スケールバー：(a) 100  $\mu\text{m}$ , (b) 50  $\mu\text{m}$ , (c) 400  $\mu\text{m}$ 。



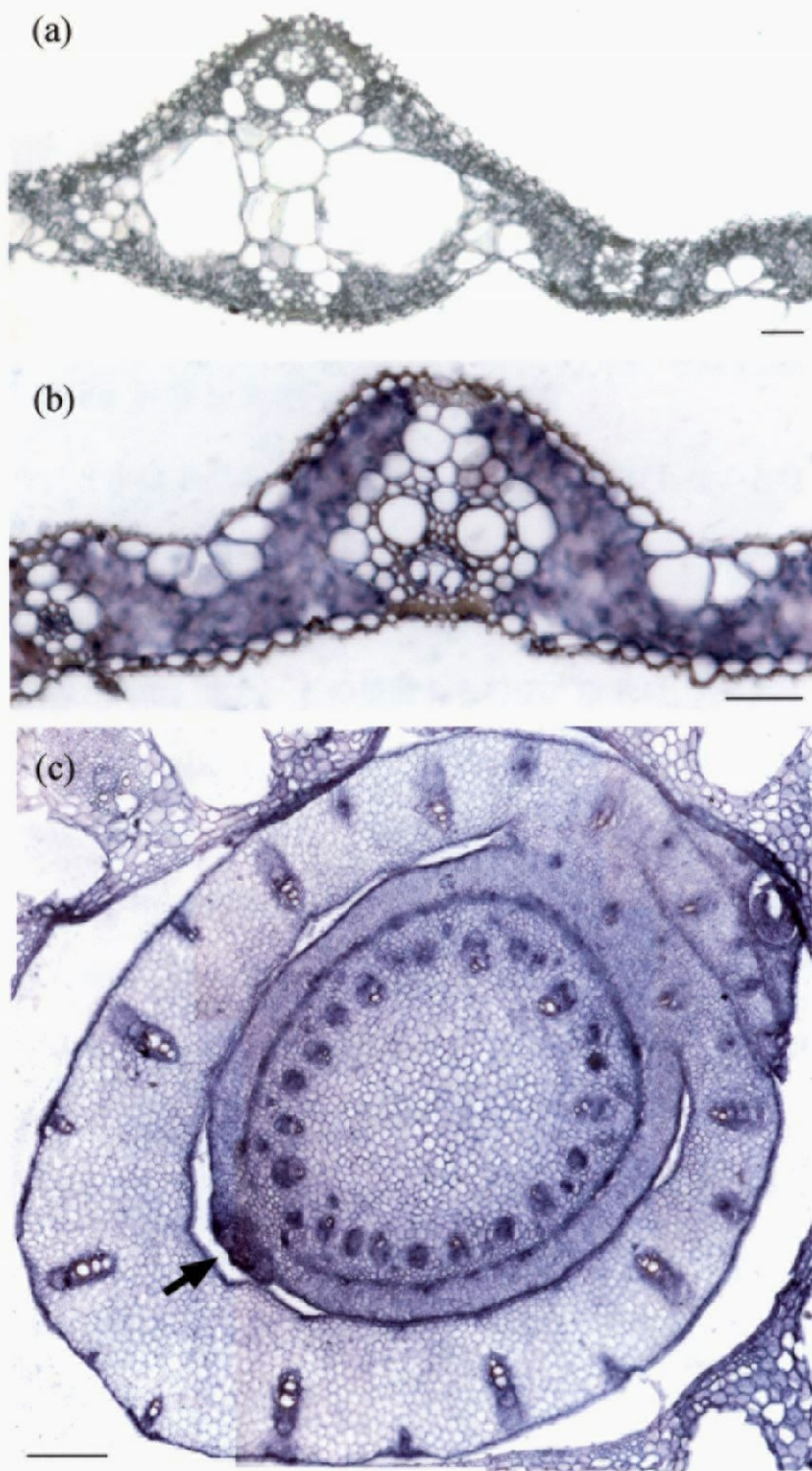


図 4-7-2 *In situ* ハイブリダイゼーション法によるZn欠乏イネの茎葉における*OsZIP4*の組織局在

(b, c) *OsZIP4*のアンチセンスプローブを用いた切片像。(a) *OsZIP4*のセンスプローブを用いた切片像。(a) 最新葉の大維管束の横断面。(b) 大維管束の横断面。(c) 茎頂分裂組織の縦断面。矢印は、茎頂を示している。スケールバー：(a, b) 400  $\mu\text{m}$ , (c) 800  $\mu\text{m}$ 。

## 第5章 総括

### 5-1 イネの Fe トランスポーターについて

これまで、イネは  $\text{Fe}^{3+}$ -MAs によってしか Fe を吸収しないと考えられてきた (Römheld, 1987; Römheld and Marschner, 1986)。しかし、イネは、根の表皮での  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性は検出できないが、根圏から直接  $\text{Fe}^{2+}$ を吸収できることが、本研究により示された。また、この根圏からの  $\text{Fe}^{2+}$ 吸収は、OsIRT1 と OsIRT2 が担っていることが示唆された。イネが根圏から  $\text{Fe}^{2+}$ を直接吸収する機構は、これまでに提唱された Strategy I, Strategy II のいずれとも異なる、イネ独自の Fe 吸収機構である。この機構は、 $\text{Fe}^{2+}$ が豊富に存在する湛水条件に適応したイネが、進化の過程で獲得したものであると考えられる。現在、OsIRT1, OsIRT2 がイネの根における  $\text{Fe}^{2+}$ 吸収にどの程度寄与しているかを知るために、RNAi システムを用い、OsIRT1 変異体、OsIRT2 変異体の作製を行っている。

さらに、進化工学の手法により作製した合成  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素遺伝子 *refrel/372* をイネに導入し、Fe 欠乏時の  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性を強化することにより、石灰質アルカリ土壌における Fe 欠乏耐性を示すイネの作出に成功した。オオムギの NA アミノ基転移酵素ゲノム遺伝子をイネに導入することにより、MAs の分泌量を増加させ Strategy II 機構を強化した形質転換イネは、石灰質アルカリ土壌での Fe 欠乏耐性を示した (Takahashi *et al.*, 2001)。今回作製した  $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素活性を強化したイネに、NA アミノ基転移酵素ゲノム遺伝子あるいは他の MAs 合成酵素遺伝子を導入することにより、さらに Fe 欠乏条件に強い耐性を持ち、石灰質アルカリ土壌でも収量の高いイネを創製できると考える。

イネは、本研究で明らかにした  $\text{Fe}^{2+}$  吸収機構に加え、Strategy II の構成要素である DMA の生合成経路と  $\text{Fe}^{3+}$ -DMA の吸収機構を持つことが明らかにされている。まだ未解明の DMA 分泌機構が明らかになれば、DMA の生合成から分泌、植物体内への Fe 吸収までの一連の過程、つまり土壌からの Fe 獲得機構が明らかになると考える。

一方で、植物体内の Fe の形態、移行経路は、いくつかの実験によって示されている。OsYSL2 は篩部で発現し、 $\text{Fe}^{2+}$ -NA の形態で Fe を細胞内に取り込んでいる (Koike *et al.*, 2004)。In vitro の実験でも、 $\text{Fe}^{2+}$  は NA との結合定数が高いことから、植物体内でも  $\text{Fe}^{2+}$ -NA の形態で移行していることが示唆されている (von Wiren *et al.*, 1999)。また、トマトのクロロネバは、NAS 遺伝子の変異により、酵素活性を持たず、NA が合成できない変異体であり、葉脈間クロロシスを示す (Higuchi *et al.*, 1996)。また、NA アミノ基転移酵素遺伝子をタバコに導入し、植物体内の NA をケト体に変換することによって、植物体内の NA を減少させると、葉脈間クロロシスが生じた (Takahashi *et al.*, 2003)。これらの結果は、NA 欠損植物では Fe が葉肉細胞に輸送されないことを示しており、少なくとも葉脈から葉肉細胞へは Fe は  $\text{Fe}^{2+}$ -NA の形態で移行していると考えられる。

一方で、クロロネバの葉脈部分に注目すると、クロロシス症状の出ていないことが分かる (Higuchi *et al.*, 1996)。 $\text{Fe}^{2+}$ -NA の形態とは異なった何らかの Fe の形態、および何らかの機構で、根から葉脈まで Fe が移行していると考えられる。これまでに、導管では Fe は体内にあるクエン酸とキレートして  $\text{Fe}^{3+}$ -クエン酸錯体を形成していることも報告されているため (Lopez-Millan *et al.*, 2000)、これが Fe の導管における輸送形態の 1 つであると考えられる。

このように、植物体内での Fe の移行形態、移行経路のほとんどは、まだ充分に明らかになっていない。根の外皮細胞から吸収された Fe は、葉に移行するま

で、以下のような様々なトランスポーターによって移行が制御されていると考えられる。

- 1, Feが外皮細胞から中心柱へ向かうための細胞間におけるトランスポーター。
- 2, 篩部柔組織から篩管へ送り込むための Fe 放出型トランスポーター
- 3, 篩部での Fe 流入型トランスポーター
- 4, 導管へ送り込むための Fe 放出型トランスポーター
- 5, 葉脈の篩管からの Fe 放出型トランスポーター
- 6, 葉肉細胞での Fe 流入型トランスポーター
- 7, 種子での Fe 流入型トランスポーター

また、Fe は多くの移行形態をとって移行していることを考えると、それらの形態にそれぞれ対応した数多くの金属トランスポーターが存在すると考えられる。これらのトランスポーターの中でも、実験手法が確立されている Fe 流入型トランスポーターの解析は、比較的進んでいる。一方、動物界では、ferroportin という Fe 放出型トランスポーターの解明が進んでいるが (Donovan *et al.*, 2000), 植物界において、Fe 放出型トランスポーターは一切同定されておらず、今後の大きな研究課題になると考える。

また、細胞内における Fe の分配、移行、蓄積も同様に、ほとんどが未解明である。細胞内に取りこまれた Fe は、ミトコンドリア、葉緑体、液胞など、様々な器官に輸送、貯蔵される。酵母では、MRS3, 4 といったミトコンドリア Fe 流入型トランスポーター (Foury *et al.*, 2002), CCC1 といった液胞 Fe 流入型トランスポーター (Chen *et al.*, 2000) が同定されている。このような遺伝子が、植物界にも存在することが考えられ、さらに葉緑体膜上での Fe トランスポーターも存在するのではないかと考えられる。

## 5-2 イネの Zn トランスポーターについて

OsZIP4 は、Zn 欠乏誘導性の Zn トランスポーターであることが示された。また、植物全体に発現すると共に、篩部や分裂域で顕著に発現した。OsZIP4 は、新しい細胞群で発現することから、種子での Zn 蓄積にも関わることが予想される。適切なプロモーターに OsZIP4 をつなぎ、イネに導入することにより、Zn 欠乏耐性イネ、あるいは種子中に Zn を多く蓄積するイネの創製が可能になると考える。

イネの Zn トランスポーターの解析は、本研究の OsZIP4 と Ramesh *et al.* (2003) による OsZIP1, OsZIP3 が報告されているだけである。これまで他の植物種では、Zn-DMA を輸送するトウモロコシの YS1 流入型トランスポーター (Schaaf *et al.*, 2004), 維管束で Zn を輸送するシロイナズナの HMA1, HMA2 流出型トランスポーター (Mills *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2004), 液胞に Zn を蓄積させるシロイナズナの ZAT 流出型トランスポーター (van der Zaal *et al.*, 1999) が知られている。イネにおける、これらの相同遺伝子の発現と局在、あるいはタンパク質の機能を同定することが望まれる。

これらの遺伝子を用いて、一度吸収された植物体内の Zn を必要な部位に効率よく分配し、液胞に隔離して蓄積した Zn を再利用することが Zn 欠乏耐性に最も有効だと考えられる。例えば、Zn 欠乏を感知した時に液胞膜の流出型トランスポーターを発現させて細胞質への Zn の供給を強化したり、流出型のトランスポーターを古い組織の細胞の細胞膜に発現させて、積極的に Zn を新しい組織細胞に送り込んだりすることにより Zn 欠乏耐性植物を作製できると考えられる。その際、流入型のトランスポーターと流出型のトランスポーターを発現させることによって、植物体内の Zn の恒常性が崩れないように、それぞれ巧みに制御されることが必要である。もちろん、植物が吸収できる Zn の少ない土壌で、根

からの Zn 吸収機構を強化することによって、Zn 欠乏耐性植物を作製していくことも、今後の魅力的な研究課題であろう。

同時に、ヒトの健康増進に役立つ可食部の Zn 含量の高い穀物の創製が求められている。ヒトが必須元素として摂取する Zn は、動物由来の食品であれ植物由来の食品であれ、究極的にはすべて植物が土壌から吸収した Zn である。植物を食糧とするヒト、さらに家畜にも Zn 欠乏の症状が多く報告されている。そのため、穀物や飼料となる作物の可食部の Zn 含量を増加させることが絶対的に必要である。そのためにも、Zn の輸送機構を解明し、可食部に Zn を蓄積する穀物を創製し、日々の主食から安定的に Zn を摂取できるようにすることが、今後の展望である。



# 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々のご協力を得ました。

22K マイクロアレイ解析では、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。PETIS 法による解析では、(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、渡辺智博士、松橋信平博士にご協力をいただきました。LMD 法による解析では、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遺伝学研究室、中園幹生助教授と鈴木一正氏にご協力をいただきました。金属元素の定量の解析には、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻分析化学研究室、吉村悦郎教授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国際専攻新機能植物開発学研究室の西澤直子教授には、ご指導、ご助力をいただき、本論文作成にも多大なご助力をいただきました。高橋美智子助手には、イネの形質転換をはじめとして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。

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。中西啓仁助手には、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。

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 苦労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
- 井上晴彦 (2005) 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻, 博士論文:  
イネ科植物の鉄獲得に関わる遺伝子群の3次元発現解析
- The State of Food Insecurity in the World** (2001) The Food and Agricultural Organization of the United Nations
- 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**, 1677-1682.
- Becker, R., Fritz, E., Manteuffel, R.** (1995) Subcellular localization and  
characterization of excessive iron in the nicotianamine-less tomato mutant  
*chloronerva*. *Plant Physiol.*, **108**, 269-275.
- Bauer, P., Thiel, T., Klatte, M., Berczky, Z., Brumbarova, T., Hell, R., and Grosse, I.** (2004) Analysis of Sequence, Map Position, and Gene Expression Reveals  
Conserved Essential Genes for Iron Uptake in Arabidopsis and Tomato. *Plant Physiol.*, **136**, 4169-4183.
- Cakmak, I., Gülüt, K., Y., Marschner, H., Graham, R., D.** (1994) Effect of zinc and  
iron deficiency on phytosiderophore release in wheat genotypes differing in zinc  
efficiency. *Journal of Plant Nutrition* **17**, 1-17.

- Cakmak, I., van de Wetering, D. A. M., Marschner, H., and Bienfait, H. F. (1987)**  
Involvement of superoxide radical in extracellular ferric reduction by iron-deficient bean roots. *Plant Physiol.*, **85**, 310-314.
- Chen, O., S., Kaplan, J. (2000)** CCC1 suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. *J. Biol Chem*, **275**, 7626-7632
- Connolly, E., L., Campbell, N., H., Grotz, N., Prichard, C., L., Guerinot, M., L. (2003)** Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiol*, **133**, 1102-1110.
- Connolly, E. L., Fett, J. P., and Guerinot, M. L. (2002)** Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell*, **14**, 1347-1357.
- 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.
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S., J., Moynihan, J., Paw, B., H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T., C., Brugnara, C., Lux, S., E., Pinkus, G., S., Pinkus, J., L., Kingsley, P., D., Palis, J., Fleming, M., D., Andrews, N., C., Zon, L., I. (2000)** Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, **17**, 776-781
- Eckhardt, U., Mas, M., A., and Buckhout, T., J. (2001)** Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Mol. Biol.*, **45**, 437-448.

- Eide, D.** (1998) The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Nutrition* **18**, 441-469.
- Eide, D., Broderius, 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.
- Eng, B. H., Guerinot, M. L., Eide, D., and Saier, M. H., Jr.** (1998) Sequence analyses and phylogenetic characterisation of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.*, **166**, 1-7.
- Foury, F., and Roganti, T.** (2002) Deletion of the mitochondrial carrier genes MRS3 and MRS4 suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain *J. Biol. Chem.* **277**, 24475-24483
- Gietz, R. D., and Schiestl, R. H.** (1995) Transforming yeast with DNA. *Methods in Mol. Cell Biol.*, **5**, 255-269.
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M. L., and Eide, D.** (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7220-7224.
- Guerinot, M. L.** (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1465**, 190-198.
- Guerinot, M. L., and Yi, Y.** (1994) Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.*, **104**, 815-820.
- Hacisalihoglu, G., Hart, J. J., Vallejos, C. E., Kochian, L. V.** (2004) The role of shoot-localized processes in the mechanism of Zn efficiency in common bean. *Planta* **218**, 704-11.
- Haslett, B. S., Reid, R. J., Rengel, Z.** (2001) Zinc Mobility in Wheat: Uptake and

- Distribution of Zinc Applied to Leaves or Roots. *Ann. of Bot.* **87**, 379-386
- Henriques, R, Jasik, J., Klein, M., Martinoia, E., Feller, U., Schell, J., Pais, M. S., Koncz, C.** (2002) Knock-out of Arabidopsis metal transporter gene IRT1 results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. *Plant Mol Biol*, **50**, 587-597
- 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., Mori, S.** (1994) Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots. *Plant Soil*, **165**, 173-179
- Higuchi, K., Nishizawa, N.K., RoÈ mheld, V., Marschner, H. and Mori, S.** (1996) Absence of nicotianamine synthase activity in the tomato mutant 'Chloronerva'. *J. Plant Nutr.* **19**, 1235-1239.
- Higuchi, K., Kanazawa, K., Nishizawa, N., K., Mori, S.** (1996) The role of nicotianamine synthase in response to Fe nutrition status in Gramineae. *Plant Soil*, **178**, 171-177
- Higuchi, K., Suzuki, K., Nakanishi, H., Yamaguchi, H., Nishizawa, N. K., and Mori, S.** (1999) Cloning of nicotianamine synthase, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol.*, **119**, 471-480.
- 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.*, **25**, 159-167.
- Herbik, A., Koch, G., Mock, H. P., Dashkow, D., Czihal, A., Thielmann, J., Stephan,**

- U. W., and Baumlein, H.** Isolation, characterization and cDNA cloning of nicotianamine synthase from barley. A key enzyme for iron homeostasis in plants. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **265**, 231-239.
- Hiroyuki, O., Suyeon, K., Hiromi, N., Michiko, T., Hirotaka, Y., Satoshi, M., and Naoko, K. N.** (2004) Directed evolution of yeast ferric reductase to produce plants with tolerant to iron deficiency in alkaline soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **50**, 1159-1165.
- Hussain, D., Haydon, M., J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S., M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J., F., Cobbett, C., S.** (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*. **16**, 1327-1339
- Inoue, H., Higuchi, K., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., and Nishizawa, N. K.** (2003) Three rice nicotianamine synthase genes, OsNAS1, OsNAS2, and OsNAS3 are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron. *Plant J.*, **36**, 366-381.
- Jefferson, R., A., Kavanagh, T., A., and Bevan, M., W.** (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, **6**, 3901-3907.
- 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.
- Kyuma, K.** (2003) Paddy Soil Science, Kyoto university press/Trans Pacific Press, Melbourne, Australia, 96-114 pp
- 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**, 864-871.

**Kobayashi, T., Suzuki, M., Inoue, H., Itai, R. N., Takahashi, M., Nakanishi, H.,**

**Mori, S., and Nishizawa, N. K.** (2005) Expression of iron-acquisition-related genes in iron-deficient rice is co-ordinately induced by partially conserved iron-deficiency-responsive elements. *J. Exp. Bot.*, **56**, 1305-1316.

**Kobayashi, T., Yoshihara, T., Jiang, T., Goto, F., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa,**

**N., K.** (2003) Combined deficiency of iron and other divalent cations mitigates the symptoms of iron deficiency in tobacco plants. *Physiologia Plantarum* **119**, 400-408.

**Koike, S., Inoue, H., Mizuno, D., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa,**

**N., K.** (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *The Plant Journal* **39**, 415-424.

**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.

**Korshunova, Y., O., Eide, D., Clark, W., G., Guerinot, M., L., Pakrasi, H., B.** (1999)

The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology* **40**, 37-44.

**Kume, T., Matsubashi, S., Shimazu, M., Ito, H., Fujimura, T., Adachi, K., Uchida,**

**H., Shigeta, N., Matsuoka, H., Osa, A., and Sekine, T.** (1997) Uptake and transport of positron-emitting tracer ( $^{18}\text{F}$ ) in plants. *Applied Radiat. Isot.*, **48**, 1035-1043.

**Lopez-Millan, A., F., Morales, F., Abadia, A., Abadia, J.** (2000) Effects of iron

- deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiol.* **124**, 873-884.
- 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., Romheld, V., and Kissel, M.** (1986) Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.*, **9**, 3-7.
- Maser, P., Thomine, S., Schroeder, J., I., Ward, J., M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I., N., Amtmann, A., Maathuis, F., J., M., Sanders, D., Harper, J., F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M., W., Salt, D., E., Kim, S., A., Guerinot, M., L.** (2001) Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of Arabidopsis. *Plant Physiology* **126**, 1646-1667.
- MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A., and Eide, D.** (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **19**, 2845-2855.
- 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**, 1989-1997.
- Mills, R., F., Krijger, G., C., Baccarini, P., J., Hall, J., L., Williams, L., E.** (2003) Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *Plant J.*, **35**, 164-176
- Mori, S., and Nishizawa, N.** (1987) Methionine as a dominant Precursor of Phytosiderophores in Gramineae Plants. *Plant Cell Physiol.*, **28**, 1081-1092.



- Morikawa, C., K., Saigusa, M., Nakanishi, H., Nishizawa, N., K., Hasegawa, K., and Mori, S.** (2004) Co-situs Application of controlled-Release Fertilizers to Alleviate Iron Chlorosis of Paddy Rice Grown in Calcareous Soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **50**, 1013-1021.
- Moreau, S., Thomson, R., M., Kaiser, B., N., Trevaskis, B., Guerinot, M., L., Udvardi, M., K., Puppo, A., Day, D., A.** (2002) GmZIP1 encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean. *Journal of Biological Chemistry* **15**, 4738-4746.
- Nakada, M., Komatsu, M., Ochiai , T., Ohtsu, K., Nakazono, M., Nishizawa, N. K., Nitta, K., Nishiyama, R., Kameya, T., and Kanno, A.** (2005) Isolation of *MaDEF* from *Muscari armeniacum* and analysis of its expression using laser microdissection. *Plant Sci.*, In press.
- Naito, S., Duke, P. H., and Beachy, R. N.** (1988) Differential expression of conglycinin alpha and beta subunit genes in transgenic plants. *Plant Mol. Bio.*, **11**, 109-124.
- Oki, H., Kim, S., Nakanishi, H., Takahashi, M., Yamaguchi, H., Mori, S., Nishizawa, K. N.** (2004) Directed evolution of yeast ferric reductase to produce plants with tolerant to iron deficiency in alkaline soil. *Soil Sci Plant Nutr*, **50**, 1159-1165
- Oki, H., Yamaguchi, H., Nakanishi, H., Mori, S.** (1999) Induction of the reconstructed yeast ferric reductase gene, *refrel*, into tobacco. *Plant soil*, **215**, 211-220
- Okumura, N., Nishizawa, N. K., Umehara, Y., Ohata, T., Nakanishi, H., Yamaguchi, H., Chino, M., and Mori, S.** (1994) A dioxygenase gene (*Ids2*) expressed under iron deficiency condition in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Mol. Biol.*, **25**, 705-719.

- Ramesh, S. A., Shin, R., Eide, D. J., and Schachtman, D. P.** (2003) Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. *Plant Physiol.*, **133**, 126-134.
- Robinson, N. J., Sadjuga, M., R., and Groom, Q. J.** (1997) The *froh* gene family from *Arabidopsis thaliana*: putative iron-chelate reductases. *Plant Soil*, **196**, 245-248.
- Robinson, N., J., Procter, C., M., Connolly, E., L., and Guerinot, M., L.** (1999) A ferricchelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, **397**, 694-697.
- Rogers, E., E., Eide, D., J., and Guerinot, M., L.** (2000) Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12356-12360.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Samuelson, A., I., Martin, R., C., Mok, D., W., Mok, M., C.** (1998) Expression of the yeast FRE genes in transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, **118**, 51-58.
- Schaaf, G., Ludewig, U., Erenoglu, B., E., Mori, S., Kitahara, T., and von Wiren, N.** (2004) ZmYS1 Functions as a Proton-coupled Symporter for Phytosiderophore- and Nicotianamine-chelated Metals. *J. Biol. Chem.*, **279**, 9091-9096.
- Sherman, F.** (1991) Getting started with yeast. *Meth. Enzym.*, **194**, 3-21.
- Shatwell, K. P., Dancis, A., Cross, A. R., Klausner, R. D., and Segal, A. W.** (1996) The FRE1 ferric reductase of *saccharomyces cerevisiae* is a cytochrome b similar to that of NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 14240-14244.
- 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.
- Takagi, S.** (1976) Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root

washing. I. Activity measurement and preliminary characterization. *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**, 1-5.

**Takahashi, M., Yamaguchi, H., Nakanishi, H., 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., Nishizawa, N., K., and Mori, S.** (2001) Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature biotech.*, **19**, 466-469.

**Uchiyama, Y., Hatanaka, M., Kimura, S., Ishibashi, T., Ueda, T., Sakakibara, Y., Matsumoto, T., Furukawa, T., Hashimoto, J., Sakaguchi, K.** (2002) Characterization of DNA polymerase delta from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.). *Gene* **24**, 19-26.

**Varotto, C., Maiwald, D., Pesaresi, P., Jahns, P., Salamini, F., Leister, D.** (2002) The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **31**, 589-599

**van der Zaal, B., J., Neuteboom, L., W., Pinas, J., E., Chardonens, A., N., Schat, H., Verkleij, J., A., Hooykaas, P., J.** (1999) Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol.* **119**, 1047-1055

**Vasconcelos, M., Musetti, V., Li, C. M., Datta, K. S., Grusak, A. M.** (2004) Functional analysis of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) transformed with an *Arabidopsis thaliana* ferric reductase (*AtFRO2*). *Soil Sci Plant Nutr*, **50**, 1051-1021

- Vert, G., Briat, J. F., and Curie, C.** (2001) Arabidopsis IRT2 gene encodes a rootperiphery iron transporter. *Plant J.*, **26**, 181-189.
- Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. L., Briat, J. F., and Curie, C.** (2002) IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell*, **14**, 1223-1233.
- von Wiren, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J., F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R., A. and Hider, R., C.** (1999) Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol.* **119**, 1107-1114.
- Wallace, A., Lunt, O., R.** (1960) Iron chlorosis in horticultural plants. *J.Am. Soc. Hortic. Sci.*, **75**, 819-840
- Watanebe, S., Ishioka, N. S., Osa, A., Koizumi, M., Sekine, T., Kiyomiya, S., Nakanishi, H., and Mori, S.** (2001) Production of positron emitters of metallic elements to study plant uptake and distribution. *Radiochim. Acta.*, **89**, 853-858.
- Waters, B., M., Blevins, D., G., and Eide, D., J.** (2002) Characterization of FRO1, a Pea Ferric-Chelate Reductase Involved in Root Iron Acquisition. *Plant Physiol.*, **129**, 85-94.
- Wintz, H., Fox, T., Wu, Y., Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H., S., Zhu, T., Vulpe, C.** (2003) Expression profiles of Arabidopsis thaliana in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **28**, 47644-47653.
- Yoshida, S.** (1981) Fundamentals of rice crop science. Laguna International Rice Research Institute
- Zaharieva, T., and Römheld, V.** (2000) Specific Fe<sup>2+</sup> uptake system in Strategy I plants inducible under Fedeficiency. *J. Plant Nutr.*, **23**, 1733-1744.

**Zhang, F., Romheld, V., Marschner, H.** (1989) Effect of zinc deficiency in wheat on release of zinc and iron mobilizing root exudates. *Z.Pflanzenernaehr Bodenkd* **152**, 205-210.