

ニコチアナミン合成酵素の研究

樋口 恭子

①

博士論文

ニコチアナミン合成酵素の研究

指導教官

森 敏 教授

平成4年度進学

生物生産育種化学研究室

樋口恭子

目次

第1章 序論	1
第2章 鉄欠乏オオムギ根からのニコチアナミン合成酵素の精製	12
第3章 鉄欠乏オオムギ根由来の ニコチアナミン合成酵素のkinetics	26
第4章 オオムギにおけるニコチアナミン合成酵素活性の発現	29
第5章 オオムギ以外のイネ科植物における ニコチアナミン合成酵素活性	38
第6章 双子葉植物におけるニコチアナミン合成酵素活性	43
第7章 総合考察	51
謝辞	58
引用文献	60

第1章 序論

1-1 研究の背景と目的

鉄は生物に必須の元素である。たとえば呼吸や光合成に必要な電子伝達体（シトクロム、フェレドキシン）、酸化還元酵素（シトクロムCオキシダーゼ、NADHデヒドロゲナーゼ）、過酸化物を消去する酵素（カタラーゼ、ペルオキシダーゼ）などの補因子として機能している。またポルフィリン骨格生合成系路にも鉄を必要とする酵素があり、植物では鉄欠乏になるとクロロフィルを合成できなくなるため葉脈間クロロシスが観察される。鉄は地球上で4番目に多い元素であるが、酸化的条件下では容易に Fe^{3+} となり $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の不溶性沈殿を形成して、生物は鉄を利用することができなくなる。このため陸地で、また海洋でしばしば鉄は生物生産の制限要因となる。半乾燥地では塩類濃度上昇に伴うpHの上昇により $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の不溶性沈殿が形成され鉄欠乏状態になる。このような潜在的鉄欠乏発生土壌は地球上で25~30%を占めると言われる（Wallace and Lunt 1960）。また石灰質土壌では高pHのため、重金属過剰では鉄の吸収が阻害されるため、リン酸過剰では FePO_4 として沈殿するため、いずれの場合も鉄欠乏が引き起こされる。南氷洋や亜北極の海洋の表層では PO_4^{3-} 、 NO_3^- 、 SiO_3^{2-} に比べて鉄が少なく、鉄が植物プランクトンの増殖の制限要因になっている（Martin and Fitzwater 1988）。食料生産のため、また二酸化炭素を固定するための植物生産にとって、今後、鉄栄養問題解決の重要性はますます高まるものと思われる。鉄は元素としては既に生物を取り巻く環境中に豊富に存在しているのであるから、これをどうやって有効利用するのかが問題になる。可溶性のキレート鉄の散布などが試みられているが、持続性、経済性に問題がある。また単なる鉄の添加だけでは効果は小さいと考えられ、植物に有効に利用されうる形態を考慮しなければならない。そこで生物が本来もっている鉄利用戦略を強化してやる、という方法が考えられる。

微生物、植物では鉄獲得のために大きく分けて2つの機構が知られている。ま

ず1つの方法は Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元し、可溶性にしてから吸収するやり方である。もう1つは Fe^{3+} に対するキレーター、すなわちシデロフォアを分泌し、 Fe^{3+} を可溶化して吸収する方法である。

Saccharomyces cerevisiae では Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元する細胞膜上のレダクターゼや、細胞膜上の Fe^{2+} トランスポーターについて遺伝子レベルでの研究が進んでいる (Dancis *et al.* 1994)。一部のバクテリアやカビでは数種類のシデロフォアが存在しており (Neilands and Leong 1986)、その生合成酵素、シデロフォア-鉄のトランスポーターなどの遺伝子が既に単離され (Lorenzo *et al.* 1986)、*Escherichia coli* では trans-acting factor として Fur (Ferric Uptake Regulator) 蛋白質が一連のキレーターの合成系酵素の発現を制御していることもわかっている (Neilands 1990)。植物の鉄吸収能を高めるための方法として、このような微生物の鉄吸収機構を植物に導入することも考えられる。しかし微生物のシデロフォア合成系やトランスポーターは植物には存在しないので一連の遺伝子を全て導入しなければならず、困難であると思われる。微生物のシデロフォアのトランスポーターだけを植物に導入して微生物が可溶化したシデロフォア-鉄を横取りさせることも考えられるが、微生物ごとに合成するシデロフォアは異なっているので根圏でその微生物が繁殖するようにさせなければならず、それは困難であるばかりか、特定の微生物だけを繁殖させて土壌生態系を過度に乱すことになる。

植物の鉄獲得機構は、レダクターゼにより Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元して吸収するもの (主に双子葉植物、strategy I と呼ばれる) と、ムギネ酸類と総称されるキレーターにより Fe^{3+} をキレートして吸収するもの (主にイネ科植物、strategy II と呼ばれる) とに分けることができる (Marschner *et al.* 1986)。Strategy I は、細胞膜上のレダクターゼによって Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元してから、細胞膜上の Fe^{2+} のトランスポーターによって吸収するとともに (Chaney *et al.* 1972, Bienfait *et al.* 1983)、 H^+ を放出し、根圏のpHを下げてレダクターゼ活性を促進する (Bienfait *et al.* 1983) というやり方である。レダクターゼ活性は高濃度の HCO_3^- のような強いpH緩衝能を持つものにより著しく阻害されるので、この機構は石灰質土壌で

の鉄欠乏には有効でない。

イネ科植物が分泌するキレーター、すなわちファイトシデロフォアは、高城により発見された (Takagi 1976)。最初に構造決定された物質がムギネ酸と命名され、その類縁体で鉄溶解力活性を持つものがムギネ酸類と総称されている (Takagi *et al.* 1984)。ムギネ酸類は根から分泌され、土壌からは Fe^{3+} を選択的に可溶化する (Takagi *et al.* 1988, Römheld and Marschner 1986)。その分泌は鉄欠乏によって誘導され、分泌量は根の乾燥重の 1~2% に達することもある。分泌はエネルギー依存性で ATPase が関与している (高城ら 1985, 高城 1989)。また、分泌は日の出後 3~5 時間に集中して行われる (Takagi *et al.* 1984, 高城 1989)。吸収はムギネ酸類- Fe^{3+} の形で行われ、エネルギー依存性で (高城 1984, Mihashi and Mori 1989)、鉄欠乏により吸収活性は上昇する (Marschner *et al.* 1987, Mihashi and Mori 1989)。ムギネ酸類の放出、吸収は Strategy I と違って HCO_3^- によって阻害されない (Marschner *et al.* 1986)、ムギネ酸類による鉄吸収機構を解明し、これを応用することで、石灰質土壌においても効率よく鉄を吸収する植物を造り出すことが可能であると思われる。以上の生理学的知見の蓄積を踏まえて、分子レベルでの鉄吸収機構を解明することが、これから重要な課題であろう。特にオオムギはムギネ酸類の放出量が多く、以前から鉄欠乏耐性作物として知られていた。そこでオオムギがなぜ大量のムギネ酸類を放出できるのかを解明し、その能力を鉄欠乏に弱い他のイネ科作物に付与することができれば、これは効率よく鉄を吸収する植物を造り出すための有力な方法である。

遺伝子導入によって鉄欠乏耐性植物を得るためにはムギネ酸生成系の酵素やムギネ酸類- Fe^{3+} のトランスポーターの遺伝子が単離されなければならない。当研究室ではディファレンシャルスクリーニングによって、鉄欠乏により誘導される遺伝子やペプチドを単離しているが (Okumura *et al.* 1991, Nakanishi *et al.* 1993, Okumura *et al.* 1994, Suzuki *et al.* 印刷中)、直接ムギネ酸類に関した機能が

明らかになったものはまだない。そこで上記の間接的な方法だけでなく、生合成系の酵素やトランスポータータンパク質を単離し、その遺伝子をクローニングすることも試みなければならない。

ムギネ酸類はメチオニンから合成される (Mori and Nishizawa 1987)。メチオニンは活性型のS-アデノシルメチオニン (SAM) になり、これが3分子重合して基本骨格であるニコチアナミンになり、ニコチアナミンからムギネ酸類が合成される (図1-1) (Kawai *et al.* 1988a, Shojima *et al.* 1989a, Shojima *et al.* 1990, Ma and Nomoto 1993)。ニコチアナミンは植物に普遍的に存在するので (第1章1-2)、ニコチアナミンから先の経路がイネ科植物に特有である。現在、*in vitro* 系が確立しているのはニコチアナミン合成酵素 (nicotianamine synthase) (Shojima *et al.* 1989a) とニコチアナミンアミノ基転移酵素 (nicotianamine aminotransferase) (Ohata *et al.* 1993) である。ニコチアナミン合成酵素はムギネ酸の骨格を形成する反応を触媒するので、生合成系路の中でも特に重要な酵素である。また、SAMの3分子重合という新規の反応を触媒する新しい酵素である。本研究ではニコチアナミン合成酵素の単離と、その生理機能、性質の解明を目的とした。

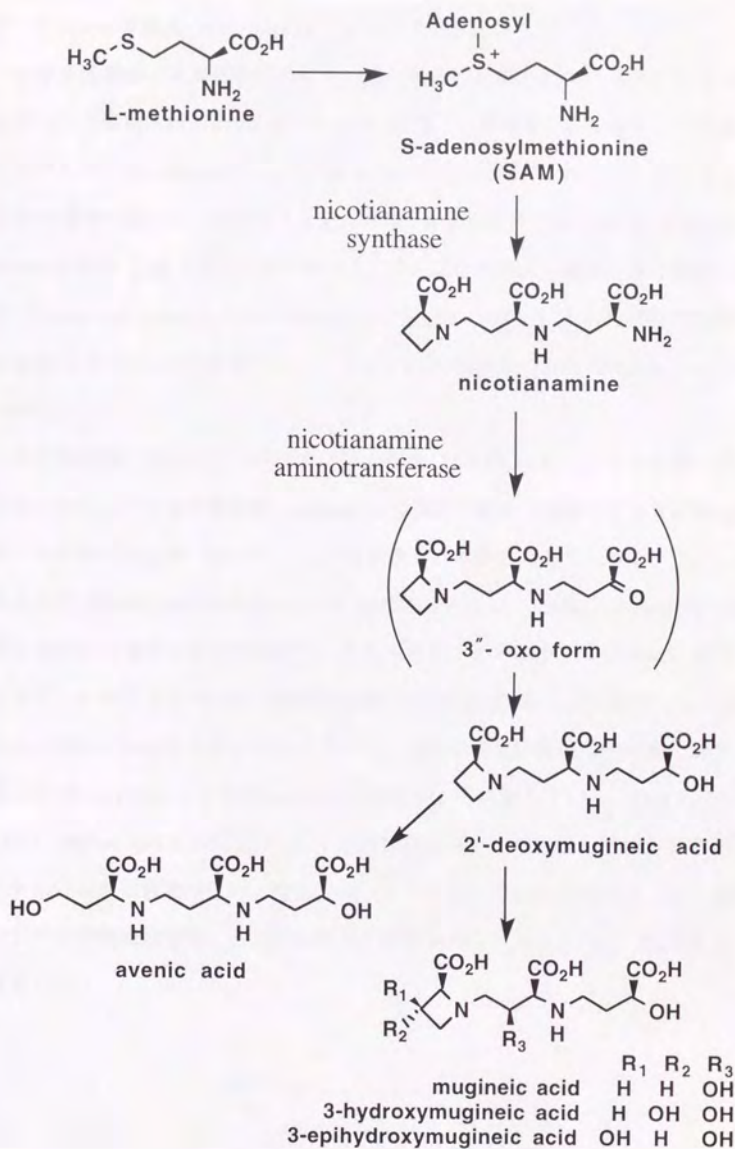


図1-1 ムギネ酸の生合成経路

1-2 トマトの変異株 *chloronerva* とニコチアナミン

ムギネ酸類がイネ科植物だけに見いだされるのに対し、ニコチアナミンは最初にタバコで発見され (Noma and Noguchi 1976)、植物界に広く分布していることが知られている (Rudolph *et al.* 1985)。これまでに報告されたニコチアナミンの植物体内での濃度は、新鮮重 1 g あたり数 n mol から数 100 n mol で (Stephan and Scholz 1993)、地上部でも地下部でも、若い成長の盛んな部位に多く分布している (Noma and Noguchi 1976, Stephan and Scholz 1990)。イネ科植物では新鮮重 1 g あたり 10 n mol 前後である (Noma and Noguchi 1976, Stephan and Scholz 1990)。

双子葉植物におけるニコチアナミンの機能については主にトマトを用いて研究されている。トマトの変異株 *chloronerva* は通常の培地で栽培しても常に葉脈間クロロシスを呈するが (図1-2)、これを回復させる物質としてニコチアナミンが同定された (Scholz and Rudolph 1968, Buděšínský *et al.* 1980)。*chloronerva* は鉄の吸収能力に問題があるのではなく、内生ニコチアナミンを欠くためにアポプラストからシンプラストへの鉄の移動が抑えられて鉄欠乏になるとされている (Scholz *et al.* 1985)。Scholz らは、ニコチアナミンは双子葉植物体内の鉄代謝に関与する遺伝子の regulator として機能するのではないかと推測している (Pich and Scholz 1993, Stephan and Scholz 1993)。イネ科植物においても同様の機能があるのかどうかについては報告はない。なお、ニコチアナミンには血圧降下剤 (アンジオテンシン変換酵素阻害剤) としての作用が認められている (大内ら 公開特許、木下ら 1994)。



図1-2 トマトの変異株 *chloronerva*

通常の鉄濃度でも激しいクロロシスを呈し、生育が著しく阻害される。また葉が裏側へ巻き込んだような形になる。(図6-3も参照)

上：変異株 *chloronerva*

下：野生株

1-3 スペルミジン合成酵素とスペルミン合成酵素

ポリアミンは生物界に広く分布し、細胞の分化と増殖に関与している。ニコチアナミンの構造と生合成経路をポリアミンのそれと比較すると、いずれもS原子にアデノシル基がついた活性型ユニットが反応することによりN-C結合が生じる点が共通である(図1-3)。ポリアミン合成系の酵素はよく研究されており、スペルミジン合成酵素の遺伝子も単離されている(Tabor and Tabor 1987, Wahlfors *et al.* 1990, Myöhänen *et al.* 1991)。スペルミジン合成酵素とスペルミン合成酵素の知見はニコチアナミン合成酵素のカラムクロマトグラフィーでの挙動を予測するために参考にした。

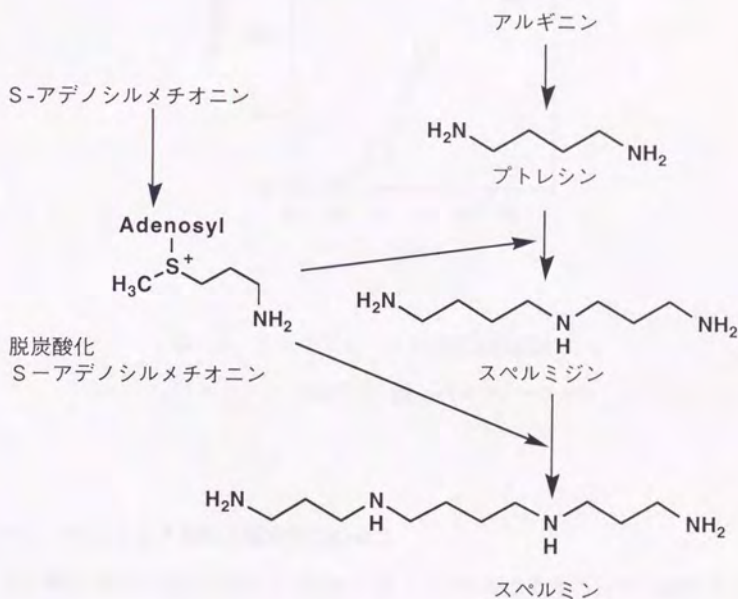


図1-3 ポリアミン生合成経路

1-4 修士論文で述べた結果

本研究は修士課程から継続して行っているものである。修士論文の時点で明らかになっていた結果についてまとめておく。以下のデータは全て鉄欠乏オオムギ（エヒメハダカ1号）根を用いて出したものである。

1-4-1 至適 pH

図1-4のように至適pHは9付近であった。

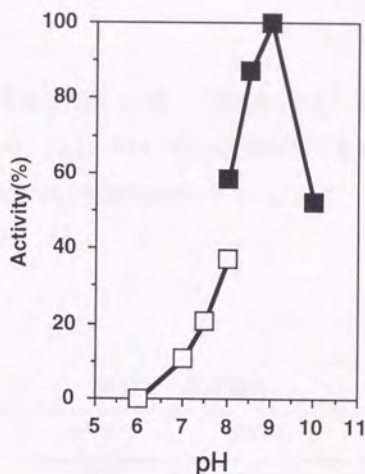


図1-4 ニコチアナミン合成酵素の至適pH

□：バッファーHEPES ■：バッファーTAPS

1-4-2 TLC による酵素活性分析法の確立

従来は酵素反応生成物の分析に HPLC を用いていたが1検体の分析に時間がかかるので（1日4検体が限度）これに代わる方法としてTLCによる分析法を確立した。数種の展開溶媒を検討した結果、シリカゲルプレートを用いてフェノール：n-ブタノール：ギ酸：水（12：3：2：3）で展開すると、ニコチアナミンがほかの

生成物や SAM と最もよく分離することが分かった。TLC による分析法ならば数十検体を一晚で分析することができる。また HPLC ではニコチアナミンのピークの絶対量だけを測定するのであるが、TLC では、反応液中の全ての生成物や残った基質を同時に検出することができるため基質の何%がニコチアナミンに変換されたのかを正確に計算できることになり、酵素活性をより正しく評価できるようになった。

1-4-3 pH 安定性

酸性からアルカリ性の4通りのpHに1晩4℃で放置した後、pH8.7の反応バッファーに戻して活性を測定した。pH8.7を100%として相対値で表わすと表1-1のように、pH7.0以上で安定で酸性では不可逆に失活した。

表1-1 pH安定性

pH4.0	pH5.5	pH7.0	pH8.7
10%	20%	90%	100%

1-4-4 ゲルろ過による分子量の推定

セファクリル S-300HR (ファルマシア) カラムを用いて未変性での分子量を測定したところ、約45000であった(図1-5)。

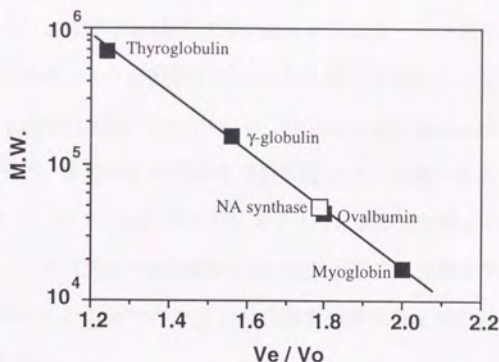


図1-5 ゲルろ過による分子量の推定

■：分子量マーカー Thyroglobulin (Mr 670000), γ -globulin (Mr 158000), Ovalbumin (Mr 44000), Myoglobin (Mr 17000) □：ニコチアナミン合成酵素

1-4-5 未変性状態での pI

未変性等電点電気泳動により、pI は5~6であった。しかし泳動中に等電点沈殿をおこしたため分離が悪く、正確な値は分からなかった。

第2章 鉄欠乏オオムギ根からの

ニコチアナミン合成酵素の精製

(Higuchi *et al.* 1994、Higuchi *et al.* 投稿中a)

2-1 概要

- ◆ニコチアナミン合成酵素は抽出材料に由来するチオールプロテアーゼによって非常に分解され易いことが判明した。分解を防ぐ阻害剤として、調べた範囲内では *trans*-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino)butane (E-64) がもっとも効果的であった。またニコチアナミン合成酵素と、問題になるプロテアーゼとはブチルトヨパールカラムクロマトグラフィーによって分離することができた。
- ◆ニコチアナミン合成酵素の活性維持には SH基が重要な役割を果たしている。
- ◆鉄欠乏大麦根からのニコチアナミン合成酵素の精製法を確立した。精製操作の流れは以下の通り。

抽出

↓

ブチルトヨパール650M

↓

ヒドロキシルアパタイト100~350メッシュ

↓

Econo-Pac Q

↓

エーテルトヨパール650M

↓

分取 SDS-PolyAcrylamido Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

この方法により SDS-PAGE ゲル上で 1 バンドに精製されたが、二次元電気泳動ゲル上では、等電点の異なるいくつかのスポットが現れた。

2-2 実験方法

第3章以降の実験で、植物の栽培法、酵素の抽出法、酵素活性の検出法は、特に断らないかぎりここで述べる方法によった。

2-2-1 植物材料の調整法

用いたオオムギ *Hordeum vulgare* L. cv Ehimehadakamugi no.1

水耕液の組成 7×10^{-4} M K_2SO_4 , 1×10^{-4} M KCl, 1×10^{-4} M KH_2PO_4 , 2×10^{-3} M $Ca(NO_3)_2$, 5×10^{-4} M $MgSO_4$, 1×10^{-5} M H_3BO_3 , 5×10^{-7} M $MnSO_4$, 5×10^{-7} M $ZnSO_4$, 2×10^{-7} M $CuSO_4$, 1×10^{-8} M $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 1.5×10^{-4} M Fe-EDTA

水耕液の作成には全て脱イオン蒸留水を用い、毎日pHが5.5付近となるように1 N HClを用いて調整した。ポンプで通気した。

栽培環境 自然光の下、空調のないガラス室内で栽培した。時期は4、5月と9、10月。

栽培手順

- ・水を含んだペーパータオルの上に3日ほど置いて発芽させた。
- ・水耕液に浮かべたネットの上に芽生えを置いて培養した。
- ・ネットに置いてから約1週間経過し第2葉が見えるようになったところで、3個体をまとめてウレタンで巻き、穴をあけた蓋に差し込んで20Lプラスチックコンテナで水耕栽培した。
- ・20Lコンテナに移植して約10日経過し第4葉が見えるようになったところで、根を水で軽く洗い、ウレタンを新しくしてから鉄を除いた水耕液に移した。1週間毎に水耕液を取り替えた。
- ・鉄欠乏処理開始から2～3週間後に収穫した。明瞭なクロロシスを呈さなくてもニコチアナミン合成酵素活性は十分である場合が多かった。20Lコンテナ1箱から新鮮重70～100gの根が取れた。

収穫方法 根を蒸留水で軽くすすいだ後、ペーパータオルで余分な水滴をふき取ってから液体窒素で凍結した。その際、褐変のひどい根は除いた。使用するまで

-80℃フリーザー中で保存した。

2-2-2 酵素活性測定法

ゲルろ過 (NAPカラム、Pharmacia)、あるいは分画分子量1万の限外ろ過膜 (ウルトラフリーあるいはモルカット、Millipore) を用いて酵素液を反応バッファの組成にした。

〈反応バッファ組成〉

Tris - HCl 50mM, EDTA 1mM, (p-amidinophenyl) methane-sulfonylfluoride hydrochloride (p-APMSF) 0.1mM, DTT 3mM,

アンチパイン20μg / ml, pH 8.7

基質として [14 C]-SAM (S-Adenosyl-L-methionine, [14 C] 1.8 GBq / mmol, Du Pont) を終濃度 20μMとなるように加え、25℃で15分間反応させた。反応液と等容のエタノール、又は1/40容の5N HClを加えて反応を停止させた後、反応液をシリカゲルTLCプレートLK6 (Whatman) にスポットした。タンパク質濃度の高い粗酵素液の場合には、スポットする前にウルトラフリーによって高分子を除去した。

〈TLC展開溶媒組成〉

フェノール：n-ブタノール：ギ酸：水 = 12：3：2：3 (体積比)

TLC展開後、ドライヤーで乾燥させてからイメージングプレートで1晩露光した。イメージアナライザーBAS2000 (富士フィルム) で放射活性を検出し、全放射活性のうち何%がニコチアナミンに変換されたのかを読み取り、ニコチアナミン合成酵素活性を計算した。TLC像の例を図2-1に示す。

タンパク質量は Protein Assay Kit (Bio Rad) を用いて定量した。

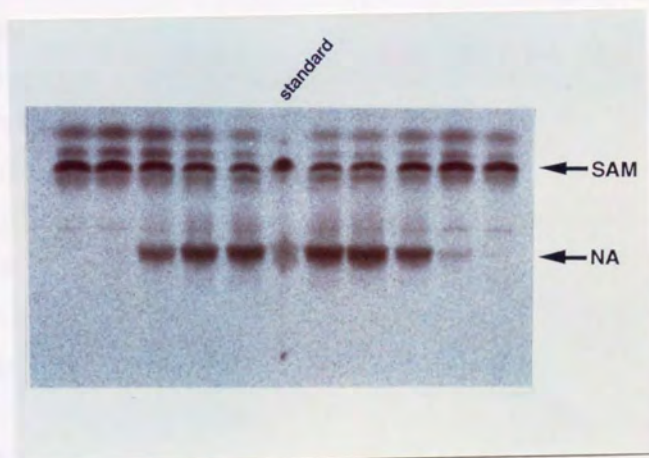


図 2 - 1 TLC による酵素活性検出の例

NA：ニコチアナミン

2-2-3 抽出、精製操作

以下の抽出、カラムクロマトグラフィーは全て低温室（4～10℃）で行った。

抽出

〈抽出バッファー組成〉

Tris - HCl 0.2M, EDTA 10mM, p-APMSF 0.1mM, DTT 10mM,

グリセロール5%(v/v), E-64 1mM, 不溶性PVP 5%(w/v), pH 8.7

液体窒素中でよく粉碎した植物材料 500 g を抽出バッファー 750ml に少しずつ加え、家庭用ジューサーでホモジナイズした。これを約8000×g で30分遠心し、上清を得た。抽出上清に固形硫酸を10%飽和（約0.4M）になるように加え、完全に溶解した後、約8000×g で30分遠心し上清を得た。

疎水クロマトグラフィー（ブチルトヨパール650M）

〈吸着バッファー組成〉

Tris - HCl 20mM, EDTA 1mM, p-APMSF 0.1mM, DTT 3mM,

(NH₄)₂SO₄ 0.4M, pH 8.0

溶出液組成

EDTA 1mM, p-APMSF 0.1mM, DTT 3mM, グリセロール1%(v/v)

硫酸10%飽和抽出上清を吸着バッファーで平衡化したブチルトヨパール650M（東ソー）50ml カラムに通した。吸着バッファーでゲルを洗浄した後、300ml の溶出液で溶出した。溶出液にアンチパインを20μg/ml となるように加えた。

ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー

〈バッファー組成〉

リン酸カリウムバッファー 1 mM, p-APMSF 0.1mM, DTT 3mM, KCl

10 mM, pH 8.0

疎水クロマトグラフィーの溶出液にリン酸カリウムバッファー終濃度 1 mM と KCl 終濃度 10 mM を加え、上記のバッファーで平衡化したヒドロキシルアパタイト 100～350メッシュ（Nacalai Tesque）15 ml カラムに通した。酵素活性は吸着されずにそのまま溶出された。これを濃縮するために、溶出液に10%飽和となるよう

に硫安を加え、ブチルトヨパール650M 2 mlを用いて再度疎水クロマトグラフィーを行った。溶出液にアンチパインを20 μ g / ml となるように加えた。

陰イオン交換クロマトグラフィー (エコノパック Q)

〈バッファー組成〉

Tris - HCl 20mM, EDTA 1mM, p-APMSF 0.1mM, DTT 3mM,

KClなし、又は 0.3M, pH 8.0

ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー後、濃縮したものを、KClを含まない上記バッファーで平衡化した。エコノパック Q 5 mlカラム (Bio Rad) に吸着させた。KCl 0M から 0.3Mへのグラジエント100mlで溶出した。酵素活性はグラジエントの中央付近で溶出された。活性画分にアンチパインを20 μ g / ml となるように加えた。

疎水クロマトグラフィー (エーテルトヨパール650M)

〈吸着バッファー組成〉

Tris - HCl 20mM, EDTA 1mM, p-APMSF 0.1mM, DTT 3mM,

(NH₄)₂SO₄ 1.2M, pH 8.0

陰イオン交換クロマトグラフィーの活性画分に終濃度1.2Mとなるように硫安を加え、上記バッファーで平衡化したエーテルトヨパール650M (東ソー) 0.3mlに通した。酵素活性は吸着されずにそのまま溶出された。これにアンチパインを20 μ g / ml となるように加えた。

分取SDS-PAGE

Laemmliの方法に準じた非連続ゲル SDS-PAGE を行った (Laemmli 1970)。最後の疎水クロマトグラフィーで得られた活性画分をモルカットを用いて反応バッファーで脱塩、濃縮し、SDSサンプルバッファーに溶解した。ゲルは標準サイズスラブゲル (15 cm \times 15 cm \times 1mm) アクリルアミド 12.5%を用いた。泳動終了後、銅染色を行った (Dzandu *et al.* 1988)。0.3 M CuCl₂で染色した後、ゲルをバンド毎にきり分け、ゲル断片をそれぞれ脱色液 (0.25 M Tris, 0.25 M EDTA, pH 9.0) で10分間3回洗浄した。断片を SDSランニングバッファーで1時間平衡化した後、

SDSランニングバッファーを用いてエレクトロエリューションを行ってタンパク質を回収した。これにアンチバインを20 μ g / ml となるように加えた。エレクトロエリューションの回収液からSDSを取り除き、濃縮するためにヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーを行った。リン酸カリウムバッファー1mMで平衡化したヒドロキシルアパタイト0.5ml に回収液を添加したところ、酵素活性は吸着され、リン酸カリウムバッファー 1 Mで溶出された。(SDS と結合したニコチアナミン合成酵素はヒドロキシルアパタイトによく吸着した。)

2-3 結果

生嶋らがニコチアナミン合成の *in vitro* 系を確立した当時は植物材料として新しい根の先端だけを凍結せずに使用していた。しかしこの方法では植物体当りに得られる材料の量が少なすぎるため、根全体の使用を検討した。小さい規模の短時間の実験においては根全体を用いても問題はないようだったので、全根を用いて大規模な精製を試みたところ、速やかにプロテアーゼによって分解されてしまいニコチアナミン合成酵素活性を回収することができなかった。そこで有効なプロテアーゼインヒビターの検索を行った(表2・1)。その結果、E-64とアンチバインがとくに効果的であった。どちらもチオールプロテアーゼのインヒビターである。またキモスタチンもチオールプロテアーゼのインヒビターである。したがってニコチアナミン合成酵素は特定のチオールプロテアーゼによって分解されやすいと思われた。ブチルトヨパールカラムクロマトグラフィーを速やかに行った後はニコチアナミン合成酵素活性は安定になり、非ニコチアナミン合成酵素画分を活性画分に加えると失活したことから、問題となるプロテアーゼ活性の大部分はブチルトヨパールカラムクロマトグラフィーによって排除できることがわかった。

Protease inhibitor	nicotianamine synthase activity
antipain 100 μg / ml	100%
E-64 1mM	100%
NEM 25mM	0%
leupeptin 100 μg / ml	22%
chymostatin 100 μg / ml	38%
pepstatin 100 μg / ml	27%
trypsin inhibitor (soybean) 100 μg / ml	20%
none	21%

表 2 - 1 抽出バッファー中のプロテアーゼインヒビターの検討

全ての抽出バッファーは10 mM EDTAと0.1 mM p-APMSFを含む。新鮮重0.5 g の鉄欠乏オオムギ根をそれぞれ上表のインヒビターを加えた1 mlの抽出バッファーで抽出し、ブチルトヨパールカラムクロマトグラフィーを行った後、ニコチアミン合成酵素活性を測定した。酵素活性は最大のものを100%として相対値で示した。

アンチパインとE-64 は高価であるため安価なチオールプロテアーゼインヒビターの使用についても検討した。ところが、抽出バッファーにDTTを加えておかないと、反応バッファーにDTTを加えてもニコチアナミン合成酵素活性は検出できないことが判明し、ニコチアナミン合成酵素は酵素分子中のSH基が酸化されると失活してしまうことが示唆された。N-エチルマレイミド (NEM) のような安価なチオールプロテアーゼインヒビターはプロテアーゼに限らず広くSH酵素を阻害する。したがって、特異性の低いSH基修飾剤をプロテアーゼインヒビターとして使用することは好ましくない。

以上のことから以下の事項に留意して2・2・3に述べたような精製方法を確立した。

- ・抽出時、細胞内の構造物が壊れてプロテアーゼとニコチアナミン合成酵素が混じりあい、分解されるのをできるだけ抑えるため、プロテアーゼインヒビターを含んだ抽出バッファーが速やかに混和されるようにする。
- ・E-64 はアンチパインより高価だが、不可逆に働くので抽出バッファーにはE-64 を使う。
- ・抽出後は速やかにブチルトヨパールカラムクロマトグラフィーを行う。
- ・クロマトグラフィー後の活性画分には常にアンチパインを加える。

精製結果の例を表2・2に示す。また各段階のタンパク質組成をSDS-PAGEで調べたものを図2・2に示す。分取SDS-PAGEにより、図2・2の矢印のあたり約30 kDaのところからニコチアナミン合成酵素活性が検出された。分取SDS-PAGE後の活性画分を二次元電気泳動したものを図2・3に示す。図2・3のように最終精製物には非常に近接したいくつものスポットが見られたことからニコチアナミン合成酵素タンパク質が糖やリン酸などで修飾されている可能性が考えられた。そこで糖鎖に親和性のあるアミノフェニルボロン酸カラムにニコチアナミン合成酵素画分を通して見たが、全く吸着されず、少なくとも糖タンパク質ではないと思われた。

	酵素活性 (p kat)	タンパク質量 (mg)	比活性 (p kat / mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
硫酸10%上清	257	1500	0.171	100	1
ブチルトヨパール	160	121	1.32	62.3	7.7
ヒドロキシルアパタイト	136	20.1	6.77	52.9	39.6
ブチルトヨパール	122	9.5	12.8	47.5	74.9
エコノパック Q	20	0.6	33.3	7.8	194
エーテルトヨパール	5	<0.05	>100	1.9	>585

表 2 - 2 鉄欠乏オオムギ根の新鮮重 500 g からの精製結果の例

最後のタンパク質量は非常に微量であったので正確な測定ができなかった。

図2-2 各精製段階での SDS-PAGE (表2-2とは別に新鮮重500gから精製したもの) の例

クマシーブリリアントブルーで染色。分取 SDS-PAGEにより矢印の辺りからニコチアミン合成酵素活性が検出された (ここではバンドは見えていない)。

M: 分子量マーカー

a: 1回目のブチルトヨパール後の117 μ g

b: ヒドロキシルアパタイトと2回目のブチルトヨパール後の130 μ g

c: エコノバック Q後の1/100

d: エーテルルトヨパール後の20 μ g。

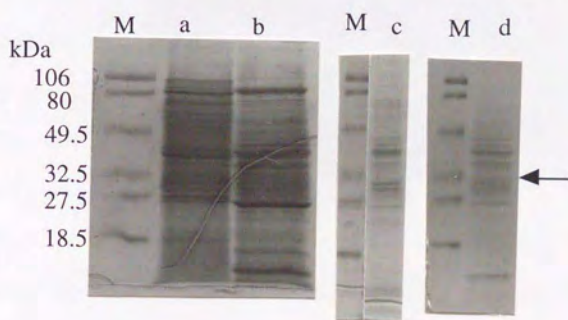
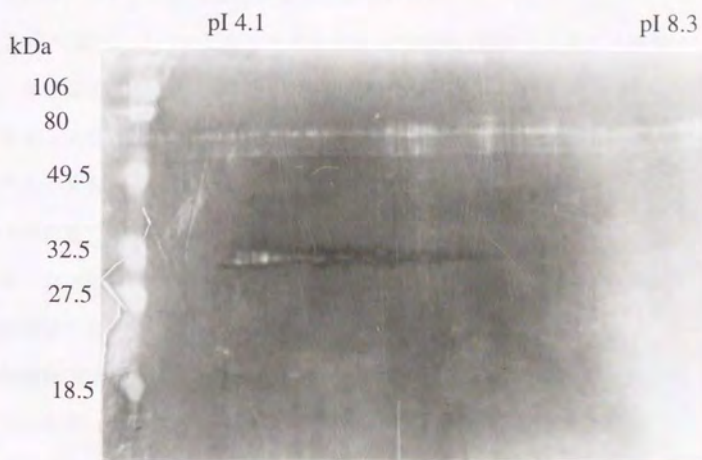


図 2 - 3 分取 SDS-PAGE 後のもっとも精製された画分を二次元電気泳動した例
O'Farrellの方法 (O'Farrell 1975) に準じて変性剤 (尿素、Triton X-100, SDS) を含
むゲルで行った。染色は銀染色を用いた。



2-4 考察

ニコチアナミン合成酵素はチオールプロテアーゼによって非常に分解され易いことがわかった。特定のプロテアーゼによって分解され易いという性質は、植物体内の鉄栄養状態に応じてニコチアナミン合成酵素分子が液胞やプロテアソームに輸送され速やかに分解されることによってニコチアナミン合成活性をきめ細かく調節している、ということの意味するのかも知れない。

第1章1・3で述べたように、ニコチアナミン合成酵素は触媒する反応の機構がポリアミン合成酵素に類似していると考えられることから、ニコチアナミン合成酵素とポリアミン合成酵素の間には何らかの共通点があると思われた。この章ではニコチアナミン合成酵素がヒドロキシアパタイトに吸着されにくく、また活性回収にDTTが必要である、というポリアミン合成酵素と同様の性質をもつことが明らかになった (Bowman *et al.* 1973, Samejima and Yamanoha 1982)。このことだけから両酵素のタンパク質の構造が類似であるかどうかは判断できないが、ポリアミン合成酵素はホモダイマーとして存在しており、ニコチアナミン合成酵素も分取 SDS-PAGE で分子量約30kDa のほぼ単一バンドから活性を回収できるにもかかわらず、ゲルろ過による未変性での分子量が45000と SDS-PAGE の結果よりはるかに大きいことから (第1章1・4・4)、ニコチアナミン合成酵素がホモダイマーあるいは分子量のよく似たサブユニットより成るヘテロダイマー構造をもつ可能性が考えられる。

ニコチアナミン合成酵素を、SDS-PAGEゲル上で1バンドになるまで精製できたが、新鮮重500gの根を抽出し最終精製品をすべて2次元電気泳動しても銀染色でなければ検出できない程度のタンパク質量、すなわち多く見積っても0.1 μ gぐらいしか得られなかった。したがって、鉄欠乏オオムギ根からニコチアナミン合成酵素を単離して部分アミノ酸配列を分析するためには少なくともあと10倍、5kgの根を抽出しなければならない。しかし大量に抽出しようとするとも抽出効率の大幅な低下は避けられないし、E-64が高価であるので非現実的であろう。したがって、比活性の高い良い抽出材料の発見、あるいは酵素タンパク質回収法の大

幅な改善などの努力が必要である。そのうえで、現在最終精製品の2次元電気泳動像に見られる複数のスポットのうち、どれがニコチアナミン合成酵素であるかを決めるため、さらに別の原理のクロマトグラフィーの適用を検討しなければならない。

まず考えられるのはニコチアナミンや基質 SAM のアナログであるS-アデノシルホモシステイン (SAH) をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーの使用である。ポリアミン合成酵素の精製にはスベルミンや、基質のアナログ、S-アデノシルチオプロピルアミンのアフィニティークラムが利用されている (Pajula et al. 1979, Samejima and Yamanoha 1982)。メチル基転移酵素精製を目的とする、SAH をリガンドに用いたアフィニティークラムの作製も報告されている (Izzo and Gantt 1977)。しかし当研究室の生嶋と筆者がそれぞれ SAH アフィニティークロマトグラフィーを試みたが、何も吸着されない、あるいはほとんどのタンパク質が吸着され、まとまって溶出される、など成功していない。ニコチアナミンアフィニティークラムの合成は当研究室の大畑、三橋、金澤により試みられたが、いずれもニコチアナミンの結合量が不十分であり成功していない。ほかの精製法として、ニコチアナミン合成酵素の活性維持に SH基が重要であることから、SH基に特異的なチオプロピルカラムの利用が考えられる。ただし、このカラムに吸着させるためにはDTTなどを除去しなければならず、そうするとニコチアナミン合成酵素は失活してしまうことから、最終段階でのみ利用可能であろう。

第3章 鉄欠乏オオムギ根由来の ニコチアナミン合成酵素の kinetics

(Higuchi *et al.* 投稿中a)

3-1 概要

- ◆基質 SAM に対する K_m 値は $40\mu\text{M}$ であった。これは SAM を基質とする酵素の中では低い方であり、細胞内では低濃度であると思われる SAM を基質として効率よくニコチアナミンを生産するのに有利であると思われる。
- ◆ SAM に因る基質阻害が見られた。

3-2 実験方法

鉄欠乏オオムギ根から、第2章2・2・3に述べた方法でエコノパックQカラムまで精製を進めたニコチアナミン合成酵素画分を用いて実験を行った。基質SAMの濃度は $2\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$ に設定した。 $100\mu\text{M}$ と $200\mu\text{M}$ については $[^{14}\text{C}]$ SAM を $20\mu\text{M}$ 加え、足りない分は cold SAM を加えた。反応条件は2・2・2に述べたとおりである。何分か毎に（最短1分間）反応液を分取して反応を停止させ初速度を求めた。どの基質濃度でも少なくとも5分間は直線性があった。

3-3 結果

図3・1にS-Vプロットのグラフを示す。およそ $50\mu\text{M}$ 以上で基質阻害が起こっているのが分かる。一方、ニコチアナミンによる生成物阻害は調べたが、認められなかった。

図3・2に Lineweaver-Burk プロットのグラフを示す。 K_m 値は $40\mu\text{M}$ と読み取れた。

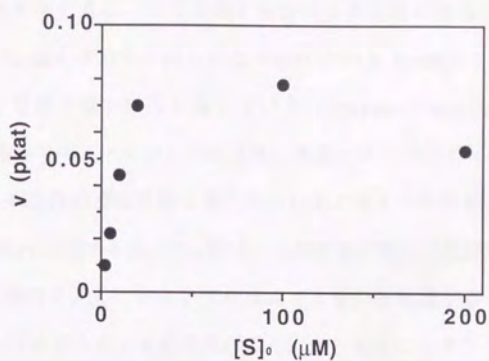


図3-1 S-Vプロット

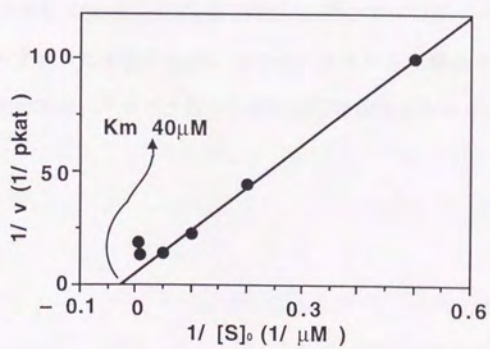


図3-2 Lineweaver-Burkプロット

3-4 考察

ニコチアナミン合成酵素の触媒する反応は同一 3 分子の重合反応であるが、反応機構の詳細は不明である。ここでは 1 基質の 1 次反応の場合の解析を行って SAM に対する K_m 値を求めた。得られた $40\mu\text{M}$ という K_m 値は SAM を基質とする酵素のうちでは最も低いほうに属している (Enzyme Nomenclature 1992)。SAM はメチル基供与体、エチレンの前駆体、あるいはポリアミンの前駆体として幅広く使われ、細胞内の濃度は低く保たれていると考えられるが、ニコチアナミン合成酵素の SAM に対する低い K_m 値は、この酵素が低い基質濃度においても効率よく働ける可能性を示している。これはムギネ酸の分泌量が多く、したがって前駆体であるニコチアナミンも低濃度の SAM から大量に合成されなければならないという事実と一致する。

ニコチアナミン合成酵素は SAM による基質阻害を受けた。ポリアミン合成酵素は基質の 1 つである脱炭酸化 SAM によって基質阻害を受けることが知られており (Samejima and Yamanoha 1982)、やはりニコチアナミン合成酵素の反応様式や性質はポリアミン合成酵素のそれとよく似ていると思われる。ACC (アミノシクロプロパンカルボン酸、エチレンの生合成中間体) 合成酵素でも SAM による基質阻害が見られ、放射性同位体でラベルした SAM により ACC 合成酵素をラベルしたという報告がある (Sato and Yang 1989)。そこでニコチアナミン合成酵素を SAM でラベルすることを試みたが、ニコチアナミン合成酵素タンパク質の存在量が少なすぎたためか、タンパク質から放射活性は検出されなかった。

第4章 オオムギにおける ニコチアナミン合成酵素活性の発現

4-1 概要

- ◆ニコチアナミン合成酵素活性は鉄欠乏処理により、3日以内に誘導される (Higuchi *et al.* 投稿中a)。
- ◆ムギネ酸鉄の投与により、1日で酵素活性が抑制される (Higuchi *et al.* 投稿中a)。
- ◆鉄欠乏による酵素活性の誘導は成育初期でも起こる。
- ◆鉄欠乏クロロシスを呈した葉では、鉄欠乏の根に比べて酵素活性は非常に低い。 (Higuchi *et al.* 1994)
- ◆以上のことからニコチアナミン合成酵素活性量は植物体内の鉄栄養の状態に鋭敏に反応し、根特異的に誘導されることが分かる。

4-2 実験方法

以下の実験では全て、1つの処理区につき複数個体の根を1つにまとめて液体窒素で粉砕した後、その一部を取り出して抽出し、酵素活性を測定した。

4-2-1 鉄欠乏によるニコチアナミン合成酵素活性の誘導

オオムギを人工気象室中（昼19℃、14時間、夜15℃、10時間）で栽培した。第3葉が出てきたところで鉄欠乏処理を開始し、1点につき9個体を用いて、0日、1日、3日、5日、7日目に根を収穫した。鉄を与えたコントロール区も同様に収穫した。根を取る前にムギネ酸を採取した。点灯が午前10:30でムギネ酸の採取は午前11:30～12:30の1時間にわたって採取した。このムギネ酸採取法は、ムギネ酸の分泌が日の出後3～5時間に集中して行われるという現象に基づいたものである (Takagi *et al.* 1984)。それぞれ根を0.5 gずつ取って粗抽出液のニコチ

アナミン合成活性を検出した。活性測定は2連で行い平均値を求めた。ムギネ酸の分析方法は Mori and Nishizawa (1987) によった。

4-2-2 鉄投与によるニコチアナミン合成酵素活性の抑制

オオムギを人工気象室で栽培した。鉄欠乏処理してから第4~5葉が出たところでFeを1ppmの濃度で与え、0、6、12、24、48時間後に根を収穫した。1点につき3個体を使用した。Feの形態はEDTA- Fe^{3+} とエビヒドロキシムギネ酸- Fe^{3+} で行った。鉄欠乏のままのコントロール区も設けた。根をそれぞれ0.5 gずつ抽出し、粗抽出液からニコチアナミン合成酵素活性を検出した。活性測定は2連で行い平均値を求めた。

4-2-3 幼植物でのニコチアナミン合成酵素活性

オオムギを人工気象室で栽培した。播種後5日目のもの150個体、播種後5日目に鉄欠乏処理を開始し8日たったもの150個体、播種後13日目に鉄欠乏処理を開始し9日たったもの50個体、播種後22日目に鉄欠乏処理を開始し7日たったもの50個体を用意し、新しい根を収穫した。鉄を与えたコントロール区も同様に収穫した。それぞれ根を1 gずつE-64を加えずに抽出し、ブチルトヨパールカラムに通した後(第2章2-2-3)、活性を検出した。活性測定は2連で行い平均値を求めた。

4-2-4 クロロシスを呈した葉でのニコチアナミン合成酵素活性

オオムギを人工気象室で栽培した。第3葉が出たところで鉄欠乏処理を開始し、第5葉が出たところで50個体の新しい根と、クロロシスを呈した新しい葉を収穫した。それぞれ根を1 gずつE-64を加えずに抽出し、ブチルトヨパールカラムに通した後、活性を検出した。活性測定は2連で行い平均値を求めた。

4-3 結果

ムギネ酸類分泌の誘導、抑制の直接の原因が生合成酵素活性の誘導、抑制であることを確かめるため、以下の4-3-1、4-3-2の実験を行った。

4-3-1 鉄欠乏による誘導

図4-1のように処理開始3日目で明瞭に酵素活性の誘導が観察された。ムギネ酸放出量の増加と共に酵素活性も増加した。



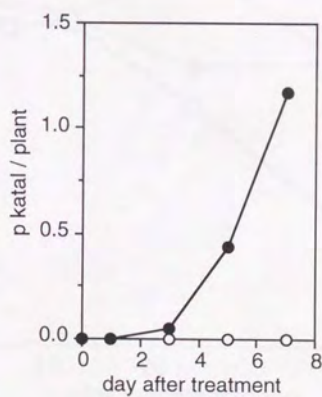
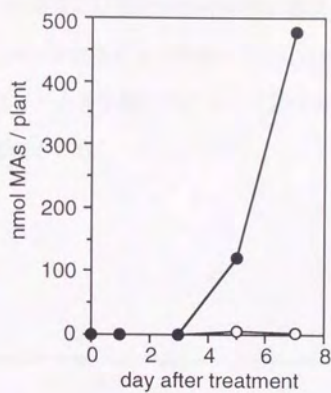


図4-1 鉄欠乏処理によるムギネ酸類分泌とニコチアナミン合成活性の誘導
 上段：個体当たりの総ムギネ酸類 (MAs) の分泌量 下段：個体当たりのニコチアナミン合成活性
 ●：鉄欠乏処理区 ○：コントロール区

4-3-2 鉄投与によるニコチアミン合成酵素活性の抑制

図4-2のように、鉄欠乏処理したオオムギにエピヒドロキシムギネ酸 - Fe^{3+} として鉄を与えた場合には24時間後には酵素活性の抑制が観察され、48時間後には鉄を与えて栽培した場合と同じレベルにまで抑制された。EDTA - Fe^{3+} として鉄を与えた場合にはエピヒドロキシムギネ酸 - Fe^{3+} として鉄を与えた場合に比べて、約1日酵素活性の抑制が遅れていた。

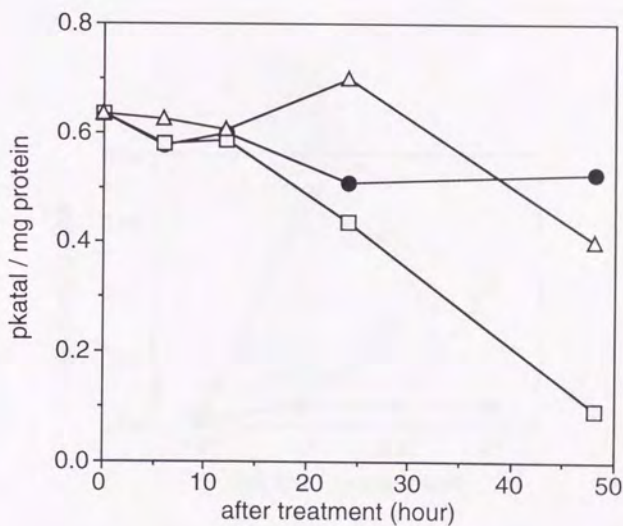


図4-2 鉄投与によるニコチアミン合成酵素活性の抑制

●: 鉄欠乏処理継続区 △: EDTA - Fe^{3+} 投与区 □: エピヒドロキシムギネ酸 - Fe^{3+} 投与区

4-3-3 幼植物でのニコチアナミン合成酵素活性

オオムギを大きく育ててから収穫するのは時間もかかるし、水耕液の交換も大変なので、幼植物で高い酵素活性が得られるかどうか検討した。図4-3のように成育初期でも鉄欠乏処理により酵素活性が誘導された。タンパク質当たりの比活性は図4-2と比べるとかなり低いですが、新鮮重当たりの活性は大きく育てた場合とあまり変わらなかった。酵素の精製材料としては幼植物が特に有利というわけではないことがわかった。

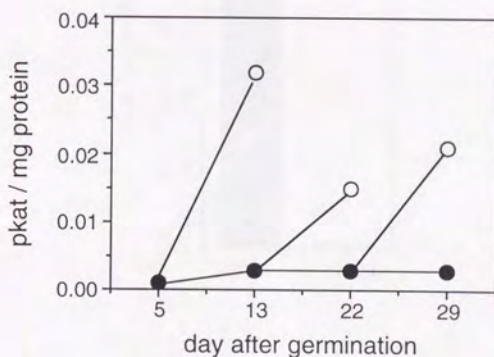


図4-3 幼植物での鉄欠乏処理によるニコチアナミン合成酵素活性の誘導

●：コントロール区 ○：鉄欠乏処理区

4-3-4 地上部でのニコチアナミン合成酵素活性

ムギネ酸は根から放出されるが、ムギネ酸の生合成が根に局在しているかどうかを調べた。図4-4に示すようにクロロシスを呈した葉でのニコチアナミン合成活性は根に比べるとかなり弱かった。

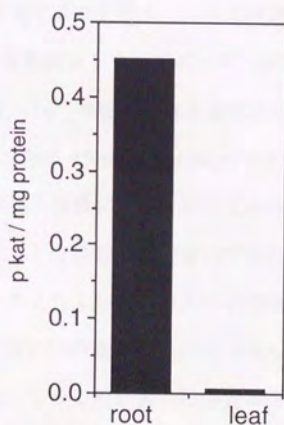


図4-4 鉄欠乏時の地上部と地下部でのニコチアナミン合成酵素活性

4-4 考察

ニコチアナミン合成酵素活性の誘導パターンはムギネ酸分泌の誘導パターンとよく一致した。鉄欠乏によるニコチアナミン合成酵素活性の誘導は1日では見られなかったが3日目にははっきり確認できた。水耕液から鉄を除いても、根の表面には鉄が沈着していると思われ、すぐには鉄欠乏にはならないので、正確な鉄欠乏開始時期は水耕液から鉄を除いた時点よりも遅れていたものと思われる。沈着した鉄をキレート剤で洗い落としてやれば、鉄欠乏の開始が早まり、もっと早く誘導が起こるかも知れない。鉄投与による酵素活性の抑制において、EDTA- Fe^{3+} の投与では48時間たたないと抑制が見られないが、エビヒドロキシムギネ酸- Fe^{3+} の投与では24時間でニコチアナミン合成酵素活性の抑制が見られた。これはムギネ酸類- Fe^{3+} に特異的なトランスポーターが存在することによりEDTA- Fe^{3+} に比べてムギネ酸類- Fe^{3+} が吸収される速度ははるかに速いということと一致する(Marschner *et al.* 1986, Mihashi and Mori 1989)。このようにニコチアナミン合成酵素活性は鉄栄養の状態に良く対応していることがわかった。第2章で述べたようにニコチアナミン合成酵素が特定のプロテアーゼによって非常に分解され易いことから、ニコチアナミン合成酵素の半減期が短いのであればムギネ酸類- Fe^{3+} の投与から6時間や12時間後には抑制が見られるのではないかと考えられたが、そうではなかった。しかし根が葉の鉄栄養状態の情報を受け取って生合成系を制御していると仮定するなら、根で吸収された鉄が葉に到達し、葉で何らかの変化が起こり、その情報が根に到達するための時間が必要であるから、酵素活性の抑制に1日かかってもおかしくない、とも考えられる。地上部の鉄栄養状態の情報が根に伝わっていることを示唆する知見として、亜鉛欠乏になると地上部への鉄の移行が阻害され、その結果鉄欠乏状態が生じ、ムギネ酸が分泌されるという報文が最近発表された(Walter *et al.* 1994)。

第1葉が展開した段階でも鉄欠乏処理によるニコチアナミン合成酵素の誘導が見られたことから、種子中の鉄は発芽後速やかに必要な部分に分配され、固定されてしまうと考えられる。また少なくとも栄養成長中は生育段階にかかわらず、

いつでも鉄欠乏になればニコチアナミン合成酵素は誘導されると思われる。

鉄欠乏時のニコチアナミン合成酵素活性は根に局在していることがわかった。ニコチアナミン合成酵素遺伝子の制御領域に根特異的な誘導に必要なシスエレメントが存在する、あるいは根の細胞には根特異的な鉄欠乏応答トランスエレメントが存在する可能性が考えられる。

第5章 オオムギ以外のイネ科植物 におけるニコチアナミン合成酵素活性

(Higuchi *et al.* 投稿中a)

5-1 概要

- ◆オオムギばかりでなく、イネ、コムギ、トウモロコシ、ソルガムにおいて鉄欠乏によるニコチアナミン合成酵素活性の顕著な誘導が見られた。
- ◆鉄欠乏時のニコチアナミン合成酵素活性には、ムギネ酸類の放出量および経験的な鉄欠乏耐性能力に対する相関があった。植物に鉄欠乏耐性を付与するための遺伝子の候補としてニコチアナミン合成酵素遺伝子は重要であると思われる。

5-2 実験方法

オオムギ (*Hordeum vulgare* L. cv Ehimehadakamugi No. 1)、イネ(*Oryza sativa* L. cv Koshihikari)、トウモロコシ(*Zea mays* L. cv Alice)、ソルガム(*Sorghum bicolor* (L.) MOENCH. cv Big jim)、カラスムギ(*Avena sativa* L. cv Yakushin)、コムギ(*Triticum aestivum* L. cv Chinese Spring)、これらを人工気象室で栽培した (Kanazawa *et al.* 印刷中)。カラスムギ、イネ、コムギ、オオムギは第3葉が出たところで、トウモロコシは第5葉が出たところで、ソルガムは第6葉が出たところで鉄欠乏処理を開始し、カラスムギ、イネ、コムギ、オオムギは第5葉が出たところで、トウモロコシは第7葉が出たところで、ソルガムは第9葉が出たところで根全体を収穫した。収穫の前日に、点灯してから4時間にわたってムギネ酸を採取した。コントロール植物も同様に栽培し収穫した。それぞれ根を新鮮重0.5 gずつ、アンチパインを加えて抽出し、ブチルトヨパールカラムに通してからニコチアナミン合成酵素活性を測定した。活性測定は2連で行い平均値を求めた。

5-3 結果

イネ科作物では鉄欠乏耐性とムギネ酸類の分泌量に相関があるといわれ、例えば分泌量の少ないソルガムを分泌量の多いオオムギと混植すると、ソルガムの鉄吸収量が増える、という報告もある (Marschner *et al.* 1986)。このムギネ酸類分泌能力の違いとニコチアナミン合成活性は関係があるのかどうか調べた。図5のように、ニコチアナミン合成酵素活性とムギネ酸類の放出量には正の相関が見られた。本実験ではカラスムギは鉄欠乏でもムギネ酸類の放出量が全く増えていないが、これは鉄が混入したものと思われる。

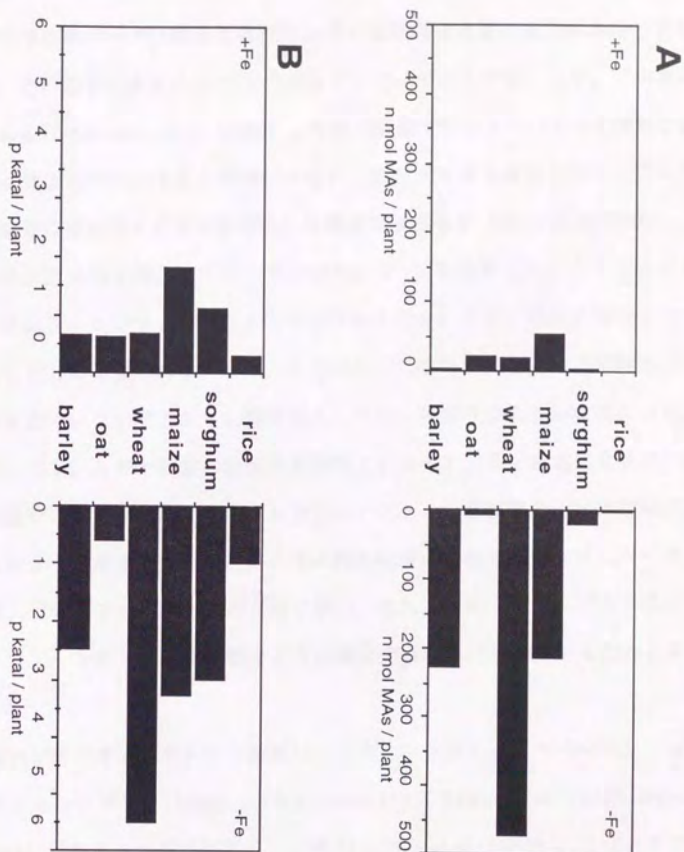


図5

A：個体当たりのムギネ酸類の分泌量

B：個体当たりのニコチアナミン合成酵素活性

5-4 考察

イネ科の作物の中では鉄欠乏耐性とムギネ酸類の分泌量に相関があると言われており、その順序はオオムギ> カラスムギ> コムギ> トウモロコシ、ソルガム> イネである (Marschner *et al.* 1986)。今回の実験ではコムギのムギネ酸類分泌量が多くカラスムギの分泌量が極端に少ない。鉄欠乏処理を開始してからのムギネ酸類分泌量の増加率や分泌の持続性には種間差があるが (Mori *et al.* 1991)、ここでは鉄欠乏処理を開始してから葉が新たに 2~3 枚展開したところでムギネ酸採取及び収穫、というように 1 点のみで実験を行ったので、以前の報告と食い違いが生じたものと思われる。また、カラスムギについては全くムギネ酸類の分泌が誘導されていないことから、鉄が混入していた可能性が大きいと思われる。いずれにしても、ムギネ酸類の分泌量の順位とニコチアナミン合成酵素活性の順位には相関があった。イネとソルガムのニコチアナミン合成酵素活性は比較的高いが、このように酵素活性の量比がムギネ酸分泌量のそれとかならずしも一致しないのは、プロテアーゼの影響と (第 2 章)、それを緩和するためにカラムクロマトグラフィーを行っている影響でより正確な定量が妨げられているためと考えられる。

各植物が分泌する主なムギネ酸類は、イネ、ソルガム、トウモロコシ、コムギではデオキシムギネ酸 (Mori and Nishizawa 1987, Kawai *et al.* 1988b, Nomoto *et al.* 1981)、カラスムギではアベニン酸 (Fushiya *et al.* 1980)、オオムギではエビヒドロキシムギネ酸 (野本ら 1979)、というように異なっているが、ムギネ酸類 - Fe^{3+} としての吸収されやすさは、ムギネ酸の種類には因らない (Römheld and Marschner 1990)。一方、ムギネ酸類 - Fe^{3+} の吸収能力はイネ科植物種間で異なるが、吸収能力と鉄欠乏耐性との間に相関はなく、例えばイネやソルガムはオオムギの 1.5~2 倍の吸収能力を示す (Römheld and Marschner 1990)。鉄欠乏耐性能力がムギネ酸の分泌量だけに支配されているとは限らず、吸収された鉄の利用効率も考慮されなければならないが、ムギネ酸類の分泌量を増やすことは、イネ科植物の鉄欠乏耐性能力を高めるための重要事項であろう。ニコチアナミン合成

酵素活性の発現量を増やすことはムギネ酸類の生合成量増加の必要条件であることから、ニコチアナミン合成酵素遺伝子は鉄欠乏耐性遺伝子の候補であると思われる。

第6章 双子葉植物における

ニコチアナミン合成酵素活性

(Higuchi *et al.*投稿中b)

6-1 概要

- ◆ニコチアナミンはイネ科植物にも双子葉植物にも存在する。タバコ、トマトにおいても SAM からニコチアナミンを合成する活性が検出された。
- ◆イネ科植物は鉄欠乏になるとムギネ酸類を合成するが、双子葉植物は合成しない。タバコとトマトではイネ科植物と違って鉄欠乏によるニコチアナミン合成酵素活性の誘導はなかった。
- ◆トマトの変異株 *chloronerva* では根、葉、共にニコチアナミン合成酵素活性は検出されなかった。

6-2 実験方法

6-2-1 タバコ

Nicotiana tabacum L. cv. Xanthi、*N. rustica* L.、*N. megalosiphon* L.、*N. debneyi* L.、*N. plumbaginifolia* L. これら比較的ニコチアナミン含量の高い5種の種子をバーミキュライト上で発芽させた。本葉が2~3枚出たところで水耕に移し、7~8葉が出たところで鉄欠乏処理を開始した。処理開始2週間後に根と若い葉を収穫した。同時に新鮮な根を1 gずつ取り *in vivo* での Fe^{3+} 還元力活性を測定した (Chaney *et al.* 1972)。根を数 cm の長さに切り、アルミホイルで遮光した30mlのバイアルに入れ、 Fe^{3+} -EDTA と bathophenanthrolinedisulphonate (BPDS) を終濃度 $500 \mu\text{M}$ となるように加えた。1時間室温でインキュベートした後、生じた Fe^{2+} -BPDS を吸光度535 nm で検出した。ニコチアナミン合成酵素活性は、葉と根それぞれ1 gずつ抽出し、NAPカラムで反応バッファーに交換してから粗抽出液での活性を測定した。活性測定は2連で行い平均値を求めた。

6-2-2 トマト

Lycopersicon esculentum Mill. cv. Bonner Beste とこれの変異株 *chloronerva* をバーミキュライト上で発芽させた。子葉が展開したところで、穴のあいた浮きを用い水耕栽培をした(平井ら1993)。2~3葉期にウレタンでまいて大きな水耕箱に移した。このとき *chloronerva* は通常の Fe 濃度の4倍(0.6mM)で培養した。4~5葉期にそれぞれ3個体ずつ Fe 0mM, Fe 0.15mM, Fe 0.6mM の水耕液に移した。17日後に根全体と若い葉を収穫した。ニコチアナミン合成酵素活性は、葉と根それぞれ 1 g ずつ抽出し、NAP カラムで反応バッファーに交換してから粗抽出液での活性を測定した。活性測定は2連で行い平均値を求めた。

6-3 結果

6-3-1 タバコ

ニコチアナミン合成酵素活性が鉄欠乏で誘導されるかどうかを調べるに際し、鉄欠乏状態の指標として根の *in vivo* での Fe^{3+} 還元力活性も測定した。これは双子葉植物では鉄欠乏時に Fe^{3+} 還元力活性が誘導されることがわかっているためである(Chaney *et al.* 1972)。図6-1に Fe^{3+} 還元力活性を示す。どの種でも鉄欠乏により顕著に誘導されていることが分かる。

図6-2にニコチアナミン合成酵素活性を示す。どの種でも鉄欠乏による変化はなかった。図6-2にはオオムギでの典型的な値も一緒に示したが、タバコ根での活性は鉄を与えて育てたオオムギ根と同じレベルであることが分かる。鉄欠乏クロロシスの程度から判定した、使用した5種の鉄欠乏耐性能力は *Nicotiana tabacum* > *N. rustica* > *N. megalosiphon* > *N. debneyi* = *N. plumbaginifolia* の順であったが(データ省略)、 Fe^{3+} 還元力活性もニコチアナミン合成酵素活性もこの順序と相関はなかった。

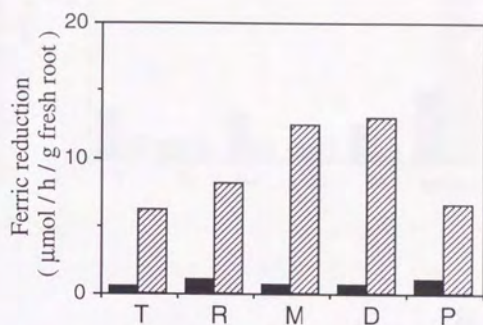


図6-1 タバコの根の *in vivo* Fe^{3+} 還元力活性

黒：コントロール区 斜線：鉄欠乏処理区

T: *Nicotiana tabacum* R: *N. rustica* M: *N. megalosiphon* D: *N. debneyi* P: *N. plumbaginifolia*

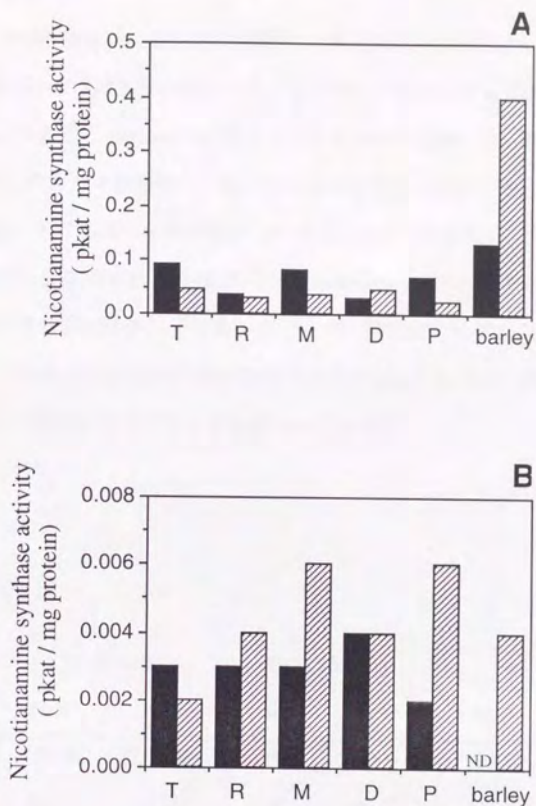


図6-2 ニコチアナミン合成酵素活性

A: 根 B: 葉 黒: コントロール区 斜線: 鉄欠乏処理区

T: *Nicotiana tabacum* R: *N. rustica* M: *N. megalosiphon* D: *N. debneyi* P: *N. plumbaginifolia*
ND: データなし

6-3-2 トマト

図6-3は Fe 0mM, 0.15mM, 0.6mMで栽培した野生株と *chloronerva* の若い葉の写真である。0.15mMは野生株を栽培するときに用いる通常の濃度である。鉄を過剰に (0.6mM) 与えると *chloronerva* のクロロシスは少し回復した。野生株を Fe 0 mMで栽培したもので葉脈間クロロシスは見られなかったが、水耕液が酸性化しており鉄欠乏に対する根の応答が起こっているものと思われた。

ニコチアナミン合成酵素活性を表6に示す。*chloronerva* では根においても若い葉においても活性は検出限界以下であった。一方、野生株では根においても葉においてもタバコのおよそ 1/10の活性が検出された。しかしタバコと同様、水耕液の鉄濃度によって酵素活性が大きく変動することはなかった。

	Fe 0 mM		Fe 0.15 mM		Fe 0.6 mM	
	root	leaf	root	leaf	root	leaf
wild type	0.0049	0.0008	0.0061	0.0014	0.0042	0.0011
<i>chloronerva</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

(pkat / protein mg)

表6 トマトの野生株と変異株 *chloronerva* のニコチアナミン合成酵素活性

N.D.は検出限界以下であったことを示す。



図6-3 トマトの野生株と変異株 *chloronerva*

6-4 考察

オオムギで確立されたニコチアナミン合成酵素の *in vitro* 系を用いてタバコ、トマトでもニコチアナミン合成酵素活性が検出された。従って双子葉植物でも SAM からニコチアナミンを合成する経路が存在する。

タバコ、トマトとも葉と根で比活性が大きく違うが、これは葉のタンパク質含量が多いためで、新鮮重当たりの活性は葉と根であまり変わらない。これは葉と根でニコチアナミン含量がさほど変わらないという報告と一致する (Noma and Noguchi 1976)。

タバコ、トマトにおいて鉄欠乏によるニコチアナミン合成酵素活性の誘導が見られなかったが、このほかにもダイズで予備的な実験を行ったところやはり誘導は見られなかった。従って双子葉植物ではイネ科植物とは異なり、鉄欠乏によるニコチアナミン合成酵素活性の誘導はないものと思われる。*N. debneyi* を除くタバコとトマトの根で鉄欠乏によりニコチアナミン合成酵素活性の若干の低下が認められたが、これはヒマワリを鉄欠乏にしたとき根のニコチアナミン含量が若干低下したという報告と一致する (Stephan and Scholz 1990)。イネ科植物においては鉄欠乏でニコチアナミン合成酵素活性が誘導され双子葉植物では誘導されない、という違いの理由は2つ考えられる。1つはニコチアナミン合成酵素遺伝子の発現を制御する機構が違うという場合。もう1つは遺伝子には大きな違いがなく、フィードバック制御が働く場合、すなわち鉄欠乏のイネ科植物の根ではムギネ酸を合成するためにニコチアナミンが大量に消費され、それに伴ってニコチアナミン合成酵素活性が誘導されるという場合が考えられる。

トマトの変異株 *chloronerva* (第1章1-2) ではニコチアナミン合成酵素活性は検出できなかった。これは *chloronerva* の葉からニコチアナミンが検出されないという事実 (Rudolph and Scholz 1972) を説明するものである。*chloronerva* は劣性の一遺伝子変異であることがわかっており (Böhme and Scholz 1960)、ニコチアナミン合成酵素遺伝子に変異が起こっている可能性がある。しかし葉脈間クロロシスを呈するという以外に、葉が縮れるなど鉄欠乏に直接関係ないと思わ

れるほかの形質も観察されるので、ニコチアナミン合成酵素活性の発現以外にも
いろいろな遺伝子の発現にかかわっている何らかの調節因子に変異が起こってい
る可能性も考えられる。

第7章 総合考察

結果のまとめ

- ◆鉄欠乏オオムギ根より、ニコチアナミン合成酵素を SDS-PAGE ゲル上で 1 バンドになるまで精製した。(第2章)
- ◆ニコチアナミン合成酵素はチオールプロテアーゼによって分解されやすかった。(第2章)
- ◆ニコチアナミン合成酵素の活性維持には SH基が保存されていることが重要であった。(第2章)
- ◆SAM に対するニコチアナミン合成酵素の K_m 値は $40\mu\text{M}$ であった。また SAM による基質阻害がおこった。(第3章)
- ◆ニコチアナミン合成酵素の酵素タンパク質としての性質は以下のようないろいろな点でポリアミン合成酵素と似ていた。
 - ・至適 pH が高い (Samejima and Yamanoha 1982)
 - ・pI が低い (Pajula *et al.* 1979)
 - ・ヒドロキシapatite に吸着しにくい (Bowman *et al.* 1973)
 - ・活性維持に SH基が重要 (Samejima and Yamanoha 1982)
 - ・基質阻害が見られる (Samejima and Yamanoha 1982)
- ただしポリアミン合成酵素は SAM を基質として認識しない (Pajula *et al.* 1979)。
- ◆オオムギにおいてニコチアナミン合成酵素活性は鉄欠乏処理により誘導され、鉄投与により抑制された。酵素活性の誘導は根で特異的に起こった。また成育の極く初期にも酵素活性の誘導は起こった。(第4章)
- ◆オオムギ以外のイネ科の主要作物 5 種において、ニコチアナミン合成酵素活性は鉄欠乏により誘導され、またその活性の強弱はムギネ酸類分泌の多寡とはば一致した。(第5章)
- ◆ニコチアナミン合成酵素活性はタバコ、トマトからも検出されたが、鉄欠乏

による誘導は見られなかった。(第6章)

◆トマトの変異株 *chloronerva* ではニコチアナミン合成酵素活性は検出されなかった。(第6章)

SAM からニコチアナミンが生成するには SAM が3分子鎖状に結合し、またその一端は4員環を形成しなければならないため、従来から単一の酵素によって触媒されるとは考えがたいとされてきた。しかし、以前に想定された SAM からニコチアナミンへの中間体が (Shojima *et al.* 1989b)、*in vivo* あるいは *in vitro* でニコチアナミンやムギネ酸類に変換されたという報告はない。本研究で筆者は SAM を基質としてニコチアナミンを生成するニコチアナミン合成酵素を、SDS-PAGE ゲル上で1バンドになるまで精製する方法を確立した。また、確立したアッセイ法を用いて得られたニコチアナミン合成酵素活性のデータは、いずれも従来の知見、ムギネ酸類の分泌量やニコチアナミンの存在量と矛盾しないものであった。したがって、反応中間体を遊離せずに SAM からニコチアナミンを合成する単一の酵素タンパク質分子、ニコチアナミン合成酵素は確実に存在する(分子量がほとんど同じサブユニットが会合し、そのサブユニットがいくつかの反応を分担する

ことによって活性を示すという可能性はある)。

Maらはニコチアナミンの生合成系路について、メチオニンがアゼチジン酸(図7)になり、アゼチジン酸3分子が反応することによりニコチアナミンが生合成されるという仮説を出している (Ma and Nomoto 1994)。アゼチジン酸はニコチアナミンの

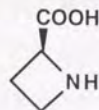


図7 アゼチジン酸

4員環の部分だけを取り出した形の分子で植物中に存在する (Fowden 1956)。Maらの仮説の根拠の1つは、アゼチジン酸をアルカリ中で熱すると収率は極めて悪いがニコチアナミンが生成することである (Ripperger *et al.* 1982)。2つめは ^2H でラベルしたメチオニンを*in vivo* で投与するとメチオニンの α 位の ^2H だけが ^1H に置換したデオキシムギネ酸が得られること (Ma and Nomoto 1994)、またメチオニンが

らアゼチジン酸が生合成されるときにも同じ現象が見られることである (Leete *et al.* 1986)。一方、SAMから直接ニコチアナミンが合成される機構を考えたとき、 α 位の置換を説明することができない。では*in vivo*でメチオニンからアゼチジン酸が生合成するときの α 位の置換はなぜ起こるのか？これについては、メチオニンのSAMへの代謝に先立って、PLP (pyridoxal phosphate) 関与の反応によりメチオニンの α 位に置換がおこった結果であるとする仮説が出されている (Leete *et al.* 1986)。そこで筆者は、L-メチオニン- γ -リアーゼというPLP酵素がメチオニンの特に α 位の水素の置換反応を触媒することが知られていることから (Esaki *et al.* 1982)、メチオニンからアゼチジン酸が生合成するときの α 位の置換はL-メチオニン- γ -リアーゼの働きによるものであると考える。同様にメチオニンからデオキシムギネ酸が生合成される際にも、メチオニンのSAMへの代謝に先立ってL-メチオニン- γ -リアーゼによる α 位の置換が起こると考えることができ、メチオニンからニコチアナミンへの反応の中間体としてアゼチジン酸を想定しなくても α 位の水素の置換反応を説明できる。以上の理由と、前段落で述べたことから、SAMから直接ニコチアナミンが合成されるのが主要経路であると考えられる。

現在のニコチアナミン合成酵素 *in vitro* 系で検出できる活性の絶対値からは、計算上ムギネ酸の1日当たりの分泌量をまかなうことができない。たとえばオオムギでは必要量の15%程度である。現在まで、ニコチアナミン合成酵素のコファクターは見つかっていない。しかしポリアミン合成酵素では特にコファクターが知られていないこと、粗抽出液からのコファクターの混入によって活性が見えているのだとすると、精製操作中にそれほど大きな失活は起こらないという事実に反することから、なんらかのコファクターを与えないために酵素活性を過少評価しているとは考えにくい。ニコチアナミン合成酵素活性を回収するための最も有効なプロテアーゼインヒビターとしてE-64が見つかっているが、もっとよいインヒビターあるいは効果的な抽出方法があるかも知れない。しかし、もし本来の活性の1/10ぐらしか抽出できていないとしたら酵素活性とムギネ酸類分泌量とのあいだの相関が観察できるほ

どの定量性は確保できなかったのではないかと、とも思われる。*in vivo* と *in vitro* の大きな違いは *in vivo* では生じたニコチアナミンが速やかにデオキシムギネ酸へと代謝され反応系に残らないことである。これに対して *in vitro* では、ニコチアナミンアミノ基転移酵素が共存している粗抽出液の場合でもアミノ基受容体を与えなければニコチアナミンは代謝されない (Shojima *et al.* 1990)。そこで、ニコチアナミンによる生成物阻害が起こるかどうか、SAM 20 μ M に対しニコチアナミン 10 μ M を共存させて酵素反応を行ったが、阻害は観察されなかった。しかし実際の植物体内でのニコチアナミン濃度ははるかに低いと思われていることから、もっと低い濃度で既に生成物阻害が起こっている可能性は否定できない。以上のこととニコチアナミン合成酵素の SAM に対する K_m 値が比較的低いことなども考え合わせると、たとえ *in vitro* では十分な活性が検出できなくても *in vivo* では少ない酵素分子で効率よく十分量のニコチアナミンを合成しているのかもしれない。

第4章、第5章で述べたイネ科植物でのニコチアナミン合成酵素活性の分布、強弱はニコチアナミンアミノ基転移酵素のそれと同様であった (Kanazawa *et al.* 印刷中、金澤1995)。ムギネ酸生成経路のうち、*in vitro* 系が確立しているのはこの2つの酵素だけなので、他の酵素活性については現在調べることはできないが、他の酵素も恐らく同様に鉄栄養の変化に対して鋭敏に反応すると思われる。そしてこれらの酵素遺伝子の制御領域には鉄栄養による発現調節のための共通の配列が存在する可能性がある。シデロフォアとしてアエロバクチンを分泌する *E. coli* では *fur* タンパク質によって、トランスポーターや一連の生合成酵素遺伝子の発現が制御されていることが知られている (Braun and Hantke 1991)。

第5章の考察で述べたように、ニコチアナミン合成酵素遺伝子は鉄欠乏耐性遺伝子の候補の1つである。そこで最後にニコチアナミン合成酵素遺伝子単離の可能性について考えてみたいと思う。

酵素タンパク質を精製して部分アミノ酸配列を決定できる見込みはあるだろうか？

第2章の考察で述べたように、格段により抽出材料、抽出方法を探しだせるかどうかにかかっているだろう。まず抽出方法の改善点としては、凍結されていた細胞が解凍される際、ただちにプロテアーゼインヒビターを含むバッファーと接触するよう、抽出材料をさらに細かい粉末にしておくことが挙げられる。精製後の活性回収率を向上させるため、極めて効果的なアフィニティーカラムクロマトグラフィーを開発し、精製段階の数を減らすよう工夫するのも良いと思われる。オオムギの幼植物、オオムギ以外のイネ科5種、タバコ、トマト、いずれも現在使用している抽出材料より格段に優れたものはなかった。しかし図5のようにコムギの個体当たりの活性は大麦の約2倍で、またイネは新鮮重当たりに計算しなおすと活性はオオムギの約2倍であった。コムギはオオムギに比べて倒伏しやすく水耕栽培中の取り扱いが不便であり、イネは成長が遅い、という不利な点はあるものの試してみる価値はあるかも知れない。ただし、この場合でも2~3 kgの規模で抽出しなければならず、プロテアーゼ阻害剤であるE-64の投入が高くつくという問題は残る。ハエカビ *Basidiobolus meristosporus* MK3988は6日間で培地中に数100 μ Mのニコチアナミンを分泌するという報告がある（大内ら 公開特許）。オオムギは1日で根新鮮重1 g当たり約1 μ molのムギネ酸類を分泌する（高城 1979）。そうするとオオムギの根500g相当のニコチアナミン合成酵素活性が5 Lの培養液中のハエカビ菌体から取れる計算になる。計算上は、ハエカビを50 L培養すれば、部分アミノ酸配列を決定できるくらいのニコチアナミン合成酵素が回収できることになる。ハエカビからのニコチアナミン合成酵素活性回収を試みたが、現在使われている培地成分は大豆粉末などに由来するタンパク質を多く含むものであり、酵素精製材料として不適切であることが明らかになった。ハエカビを利用しようとするならば培地成分の最適化や抽出効率を上げる工夫がまず必要である。

次に酵素タンパク質を精製せずに直接遺伝子を単離する可能性について考えてみたい。

まず考えられるのは、トマトの変異株 *chloronerva* である。第6章の考察で述べたように *chloronerva* はニコチアナミン合成酵素遺伝子に変異が起きている可能性が

ある。しかし *chloronerva* についての遺伝学的解析は余り行われておらず、またトマトで形質転換植物の実験を行おうとするとかなりの規模の場所と時間が必要になる。そこで、アラビドプシスの利用が考えられる。すなわち突然変異を起こさせたアラビドプシスから *chloronerva* 様の形質（通常培地で鉄欠乏クロロシスを呈し、ニコチアナミンを与えるとクロロシスが軽減され、ニコチアナミン合成活性が検出されない）をもつ変異株をスクリーニングし、その形質を回復させる遺伝子を単離するのである。植物分子遺伝学の技術も日進月歩であるから目的の変異株が取れば期待できる方法だと考える。これと同様にさらに取り扱いが楽で時間もかからない酵母でニコチアナミン要求性変異株を取ってくる、という方法も考えられる。しかし *Saccharomyces* からはニコチアナミンは検出されなかったという報告があることや (Rudolph *et al.* 1985)、酵母でニコチアナミンが必須かどうかは全く分からないことから、余り大きな期待はできない。変異株の利用以外に考えられることはスベルミジン合成酵素の遺伝子配列の利用である。ニコチアナミン合成酵素とスベルミジン合成酵素は触媒する反応が似ていること、酵素タンパク質としての性質が似ていることから、部分的にホモロジーが見られてもおかしくないと思われる。しかしプロンプやプライマーが機能するほど連続的に似た領域が存在するかどうかは全く分からない。一方でタバコでは、スベルミジン合成酵素活性はないものの、スベルミジン合成酵素とホモロジーのある遺伝子（プトレシン N-メチルトランスフェラーゼ）が見つかっており、基質 SAM を認識すると思われる領域も予想されている (Hibi *et al.* 1994)。しかし、これらのホモロジーを利用する場合、ニコチアナミン合成酵素以外の遺伝子を除外する方法を工夫しなければならない。

したがって、ニコチアナミン合成酵素遺伝子を直接単離しようとするならばアラビドプシスで *chloronerva* 様変異株、あるいは酵母でニコチアナミン要求性変異株をスクリーニングしつつ、一方でスベルミジン合成酵素の配列や、SAM を基質とするメチルトランスフェラーゼの SAM 認識領域の配列などの利用を試みるのがよいのではないかと考える。

総括

ムギネ酸類の分泌量とニコチアナミン合成酵素活性には相関があったことから、鉄欠乏耐性作物の分子育種という目的のためにニコチアナミン合成酵素遺伝子の単離が重要であることが明確になった（第4、5章）。しかし、当初最も近道と思われた酵素タンパク質の単離および部分アミノ酸配列決定はかなり困難であることが明らかとなった（第2章）。そのかわりポリアミン合成酵素との類似性や（第2、3章）、ニコチアナミン合成活性欠損株が確認できたことから（第6章）、遺伝子単離への別なアプローチの可能性が示された。

謝辞

本研究を進めるにあたり、以下の方々にご指導、ご協力をいただきました。ここに深く感謝いたします。

- 森敏教授、西澤直子博士両先生には修士課程以来5年間、日々直接にご指導頂きました。
- 吉村悦郎助教授には酵素タンパク質の取り扱いについて助言を頂きました。
- 茅野充男教授には温かい励ましとご指導を頂きました。
- 林浩昭助教授、藤原徹博士両先生には最新の植物分子生物学についてお話を聞かせて頂きました。
- Horst Marschner 教授、Volker Römheld 教授（ホーヘンハイム大学）にはトマトの種子を提供して頂きました。また投稿論文についてご指導頂きました。
- 日本タバコ産業株式会社遺伝育種研究所からはタバコの種子を提供して頂きました。
- 生嶋伸介博士（現 住友化学）にはニコチアナミン生合成の研究を引き継ぐにあたり多くの示唆を頂きました。
- 三橋秀一博士（現 日本石油）には実験の進め方について助言を頂きました。
- 入船友裕氏（現 味の素）にはニコチアナミン合成*in vitro*系の基本を教えてくださいました。
- 鈴木宏一郎氏には酵素タンパク質の取り扱いについて助言を頂きました。
- 金澤健二氏には植物材料の調製から実験の計画、実施に至るまで常に協力と助言を頂きました。
- 坂口圭美氏にはハエカビの培養をして頂きました。

●山口博隆氏にはタバコの Fe^{3+} 還元力活性の測定をして頂きました。

●鐘ヶ江亮太氏、滝沢隆一氏、笹子達弥氏、佐藤信之氏には大麦の大量栽培に協力して頂きました。

このほか日々共に学び、実験し、遊んだ研究室の皆さんにお世話になりました。

引用文献

- Bienfait HF, Bino RJ, van der Blik AM, Duivenvoorden JF and Fontain JM (1983) Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe-deficient *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* **59** : 196-202
- Braun V and Hantke K (1991) Genetics of bacterial iron transport. In Winkelmann eds, Handbook of microbial iron chelates. CRC press, Boca Raton pp. 107-138
- Böhme H and Scholz G (1960) Versuche zur Normalisierung des phänotyps der mutante chloronerva von *Lycopersicon esculentum* Mill. *Kulturpflanze* **8**: 93-109
- Bowman W, Tabor CW and Tabor H (1973) Spermidine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **248** : 2480-2486
- Buděšný M, Budzikiewicz H, Procházka Z, Ripberger H, Römer A, Scholz G and Schreiber K (1980) Nicotianamine, a possible phytosiderophore of general occurrence. *Phytochemistry* **19** : 2295-2297
- Chaney RL, Brown JC and Tiffin LO (1972) Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake of soybean. *Plant Physiol.* **50** : 208-213
- Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Eide D, Moehle C, Kaplan J and Klausner RD (1994) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: An unexpected role for copper in iron transport. *Cell* **76** : 393-402
- Dzandu JK, Johnson JF and Wise GE (1988) Sodium Dodecyl Sulfate - Gel Electrophoresis : Staining of polypeptide using heavy metal salts. *Anal. Biochem.* **174** : 157-167
- Esaki N, Sawada S, Tanaka H and Soda K (1982) Enzymatic preparation of α - and β -deuterated or tritiated amino acids with L-methionine γ -lyase. *Anal. Biochem.* **119** : 281-285
- Fowden L (1956) Azetidine-2-carboxylic acid: a new cyclic imino acid occurring in plant.

Biochem. J. **64**: 323-332

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.* **21**: 3071-3072

Hibi N, Higashiguchi S, Hashimoto T and Yamada Y (1994) Gene expression in tobacco low-nicotine. *The Plant Cell* **6**: 723-735

Higuchi K, Kanazawa K, Nishizawa NK, Chino M, Mori S (1994) Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots. *Plant and Soil* **165**: 173-179

Higuchi K, Kanazawa K, Nishizawa NK, Mori S (投稿中a) Isolation and characterization of nicotianamine synthase in the roots of Gramineae.

Higuchi K, Nishizawa NK, Yamaguchi H, Römhild V, Marschner H and Mori S (投稿中b) Response of nicotianamine synthase activity to Fe-deficiency is different between in tobacco plants and in barley plant.

Izzo P and Gantt R (1977) Partial purification and characterization of N²-Guanine RNA methyltransferase from chicken embryos. *Biochemistry* **16**: 3576-3581

Kanazawa K, Higuchi K, Nishizawa NK, Fushiya S, Chino M and Mori S (印刷中) Nicotianamine aminotransferase activities are correlated to the phytosiderophore secretions under Fe-deficient condition in Gramineae. *J. Exp. Bot.*

Kawai S, Itoh K, Takagi S, Iwashita T and Nomoto K (1988a) Studies on phytosiderophores: biosynthesis of mugineic acid and 2'-deoxymugineic acid in *Hordeum vulgare* L. var. Minorimugi. *Tetrahedron Lett.* **29**: 1053-1056

Kawai S, Takagi S and Sato Y (1988b) Mugineic acid-family phytosiderophores in root-secretions of barley, corn and sorghum varieties. *J. Plant Nutr.* **11**: 633-642

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680

Leete E, Louters LL and Rao HSP (1986) Biosynthesis of azetidine-2-carboxylic acid in

- Convallaria Majalis*: studies with N-15 labeled precursors. *Phytochem.* **25** : 2753-2758
- de Lorenzo V, Bindereif A, Paw BH and Neilands JB (1986) Aerobactin biosynthesis and transport gene of plasmid ColV-K30 in *Escherichiacoli* K-12. *J. Bacteriol.* **165** : 570-578
- Ma JF and Nomoto K (1993) Two related biosynthetic pathway of mugineic acids in Gramineous plants. *Plant Physiol.* **102** : 373-378
- Ma JF and Nomoto K (1994) Incorporation of label from ^{13}C -, ^2H -, and ^{15}N -labeled methionine molecules during the biosynthesis of 2'-deoxymugineic acid in roots of wheat. *Plant Physiol.* **105** : 607-610
- 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.
- Marschner H and Römheld V, Kissel M (1987) Localization of phytosiderophore release and of iron uptake along intact barley roots. *Physiol. Plant* **71** : 157-172.
- Martin JH and Fitzwater SE (1988) Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic. *Nature* **331** : 341-343
- Mihashi S and Mori S (1989) Characterization of mugineic-acid-Fe transporter in Fe-deficient barley roots using the multi-compartment transport box method. *Biol. Metals* **2**: 146-154
- Mori S and Nishizawa N (1987) Methionine as a dominant precursor of phytosiderophore in Gramineae plant. *Plant Cell Physiol* **28**: 1081-1092
- Mori S, Nishizawa N, Hayashi H, Chino M, Yoshimura E and Ishihara J (1991) Why are young rice plants highly susceptible to iron deficiency? In Y Chen and Y Hadar eds. , *Iron nutrition interactions in plants*, 175-188
- Myö hänen S, Kauppinen L, Wahlfors J, Alhonen L and Jänne J (1991) Human spermidine synthase gene: structure and chromosomal localization. *DNA Cell Biol.* **10**: 467-474
- Nakanishi H, Okumura N, Umehara Y, Nishizawa NK, Chino M and Mori S

- (1993) Expression of a gene specific for iron deficiency (*Ids 3*) in the roots of *Hordeum vulgare*. Plant Cell Physiol. **34**: 401-410
- Neilands JB and Leong SA (1986) Siderophores in relation to plant growth and disease. Ann. Rev. Plant Physiol. **37**: 187-208
- Neilands JB (1990) Molecular aspects of regulation of high affinity iron absorption in microorganisms. In: Eichhorn GL, Marzilli LG eds, "Metal-Ion Induced Regulation of Gene Expression vol. 8" ELSEVIER, Amsterdam pp. 63-90
- Noma M and Noguchi M (1976) Occurrence of nicotianamine in higher plants. Phytochemistry **15**: 1701-1702
- Nomoto K, Yoshioka H, Arima M, Takemoto T, Fushiya S and Takagi S (1981) Structure of 2'-deoxymugineic acid, a novel amino acid possessing an iron chelating activity. Chimia **35**: 249-250
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250**: 4007-4021
- Ohata T, Kanazawa K, Mihashi S, Nishizawa NK, Fushiya S, Nozoe S, Chino M and Mori S (1993) Biosynthetic pathway of phytosiderophores 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 NK, Umehara Y and Mori S (1991) An iron deficiency-specific cDNA from barley roots having two homologous cysteine-rich MT domains. Plant Mol. Biol. **17**: 531-533
- Okumura N, Nishizawa NK, Umehara Y, Ohata T, Nakanishi H, Yamaguchi H, Chino M and Mori S (1994) A dioxygenase gene (*Ids 2*) expressed under iron deficiency conditions in the roots of *Hordeum vulgare*. Plant Mol. Biol. **25**: 705-719
- Pajula RL, Raina A and Eloranta T (1979) Polyamine synthesis in mammalian tissues. Eur. J. Biochem. **101**: 619-626
- Pich A and Scholz G (1993) The relationship between the activity of various

iron-containing and iron-free enzymes and the presence of nicotianamine in tomato seedlings.

Physiologia Plantarum **88** : 172-178

Ripperger H, Faust J and Scholz G (1982) Synthesis and biological activity of (+)-nicotianamine. Phytochemistry **21**: 1785-1786

Römheld V and Marschner H (1986) Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. Plant Physiol. **70** : 175-180

Römheld V and Marschner H (1990) Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron phytosiderophores. Plant and Soil **123** : 147-153

Rudolph A and Scholz G (1972) Physiological investigations on mutant *chloronerva* from *Lycopersicon esculentum* Mill. IV. A method for quantitative determination of the "normalizing factor" and its distribution in the plant kingdom. Biochem Physiol. Pflanzen **163** : 156-168

Rudolph A, Becker R, Scholz G, Procházka Ž, Toman J, Macek T and Herout V (1985) The occurrence of the amino acid nicotianamine in plants and microorganisms. A reinvestigation. Biochem. Physiol. Pflanzen **180** : 557-563

Samejima K and Yamano B (1982) Purification of spermidine synthase from rat ventral prostate by affinity chromatography on immobilized S-adenosyl (5')-3-thiopropylamine. Arch. Biochem. Biophysics **216** : 213-222

Sato S and Yang SF (1989) Specificity of S-adenosyl-L-methionine in the inactivation and the labeling of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isolated from tomato fruits. Arch. Biochem. Biophys. **271** : 107-112

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

Scholz G, Schlesier G and Seifert K (1985) Effect of nicotianamine on iron uptake by the tomato mutant 'chloronerva'. Physiol. Plant. **63** : 99-104

- Shojima S, Nishizawa NK and Mori S (1989a) Establishment of a cell-free system for the biosynthesis of nicotianamine. *Plant Cell Physiol* **30**: 673-677
- Shojima S, Nishizawa NK, Fushiya S, Nozoe S, Kumashiro T, Nagata T, Ohata T and Mori S (1989b) Biosynthesis of nicotianamine in the suspension-cultured cells of tobacco (*Nicotiana glauca*). *Biol. Metals* **2**: 142-145
- Shojima S, Nishizawa NK, Fushiya S, Nozoe S, Irifune T and Mori S (1990) Biosynthesis of phytochelatins. *Plant Physiol.* **93**: 1497-1503
- Stephan UW and Scholz G (1990) Nicotianamine concentrations in iron sufficient and iron deficient sunflower and barley roots. *J. Plant Physiol.* **136**: 631-634
- Stephan UW and Scholz G (1993) Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? *Physiologia Plantarum* **88**: 522-529
- Suzuki K, Hirano H, Yamaguchi H, Irifune T, Nishizawa NK, Chino M and Mori S (印刷中) Partial amino acid sequences of a peptide induced by Fe-deficiency in barley roots. In Aabadia eds, *Iron Nutrition in Soil and Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Tabor CW and Tabor H (1987) The *speEspeD* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**: 16037-16040
- 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**: 4232-433
- Takagi S, Nomoto K and Takemoto S (1984) Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytochelatone of graminaceous plants. *J. Plant Nutr.* **7**: 469-477
- Takagi S, Kamei S and Yu M (1988) Efficiency of iron extraction from soil by mugineic acid family phytochelatones. *J. Plant Nutr.* **11**: 643-651
- Wahlfors J, Alhonen L, Kauppinen L, Hyvönen T, Jänne J and Eloranta TO (1990) Human spermidine synthase: cloning and primary structure. *DNA and Cell Biology* **9**: 103-110
- Wallace A and Lunt OR (1960) Iron chlorosis in horticultural plants - a review. *Proc.*

Amer. Soc. Hort. Sci. 75 : 819-841

Walter A, Römheld V, Marschner H and Mori S (1994) Is the release of phytosiderophores in zinc-deficient wheat plants a response to impaired iron utilization? *Physiol. Plant.* 92: 493-500

The Enzyme Nomenclature 1992 : Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology of the nomenclature and classification of enzymes. Prepared for NC-IUBMB by Webb E C Academicpress, Inc. San Diego

大内章吉、松橋祐二、宮道慎二、三川 隆、平山耕一郎、大 岸治行「微生物によるニコチアナミンの製造法」公開特許、昭63-87990

金澤健二 (1995) 博士学位論文「ニコチアナミンアミノ基転移酵素の研究」

木下恵美子、山越純、菊地護 (1994) 「醤油中の血圧降下物質について」日本醸造協会誌 89 : 126-130

高城成一 (1979) 昭和54年度科研費一般研究C「植物の鉄吸収機構に関する比較生理化学的研究」研究成果報告書1-10

高城成一 (1984) 土壤肥科学会編「東北土壤肥料における最近の諸問題とその研究」190-195

高城成一 (1989) 昭和63年度科研費総合研究A「根圏における作物生育制御要因に関する研究」研究成果報告書6-13

高城成一、河合成直、菊池政洋 (1985) 土壤肥科学会講演要旨集 38 : 78

野本享資、吉岡日出子、竹本常松、伏谷 眞二、野副重男、高城成一 (1979) 第22回天然物有機化合物討論会講演要旨集 pp619-629

平井(横田)優美、内藤哲、茅野充男 (1993) 「アラビドプシスの水耕栽培法」植物細胞工学 5 : 484-487



