

## 論文の内容の要旨

論文題目 イネ科作物の鉄欠乏誘導性遺伝子とその発現制御機構に関する研究

氏名 板井 玲子

イネ科植物は土壤中の鉄を吸収するために、三価鉄キレーターであるムギネ酸類を合成する。鉄欠乏条件下のイネ科植物の根ではムギネ酸類の合成活性が上昇し、その活性化は転写レベルから起こっている。鉄の吸収や移行に関与する多くのタンパク質は鉄欠乏によって発現誘導される。イネ科作物における、鉄欠乏による遺伝子発現制御機構を解明することを目指し、研究を行った。

### オオムギの鉄欠乏誘導性アデニン・リボースリン酸基転移酵素 (APRT) 遺伝子の単離と解析

鉄十分で栽培したオオムギと鉄欠乏処理をしたオオムギの根から抽出したタンパク質を二次元電気泳動することにより、鉄欠乏でのみ増加するスポットをいくつか見出した。増加した C スポットタンパク質から部分アミノ酸配列を決定し、その部分配列を基に鉄欠乏オオムギの根の cDNA ライブラリをスクリーニングした。単離したクローンはアデニン・リボースリン酸基転移酵素 (APRT) の遺伝子 *HvAPT1* をコードしていた。APRT は細胞質中のフリーのアデニンを AMP として回収する。*HvAPT1* の遺伝子発現は、鉄欠乏により根で強く誘導された。

また、鉄欠乏のオオムギの根では、APRT の酵素活性が鉄十分区にくらべて数倍に上昇していた。鉄欠乏根での APRT 活性の上昇は、他のイネ科作物 (イネ、トウモロコシ、ライムギ) でも確認されたが、双子葉植物であるタバコでは確認されなかった。オオムギは鉄欠乏になると非常に多量のムギネ酸類を根で生合成する。ムギネ酸類の原料であるメチオニン、ホモシステインからの *de novo* な生合成

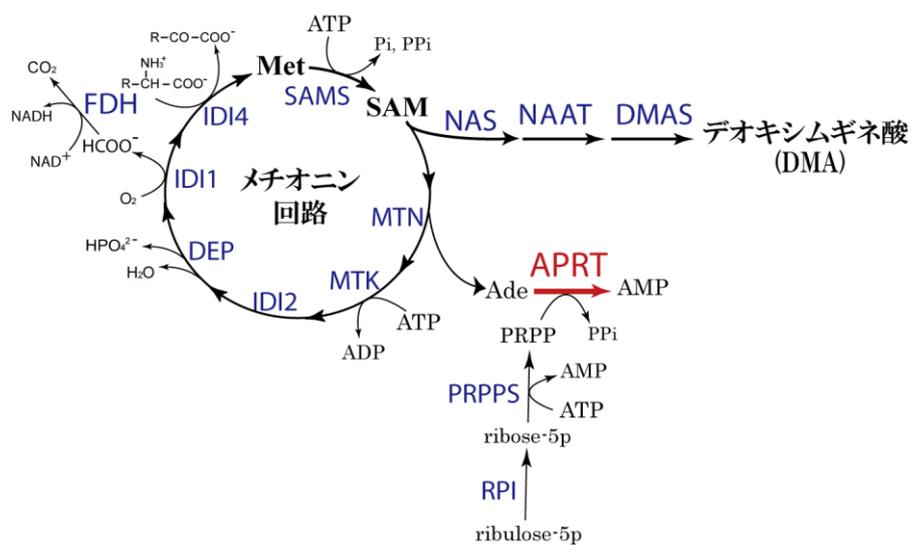


図1 ムギネ酸類の生合成経路とメチオニン回路

系からも、メチオニンを再生するメチオニン回路からも供給される。ムギネ酸類1分子の合成では3分子のメチルチオアデノシン (MTA) が副産物として生成され、その後メチオニンへのリサイクル過程では MTA からアデニンが放出される。このアデニンを効率よく回収するために、鉄欠乏のイネ科作物の根では APRT 活性が上昇すると考えられた (図 1)。

### 鉄欠乏初期のイネの根における遺伝子発現応答

鉄欠乏応答を制御する転写因子 IDEF1 と IDEF2 (本研究)、IDEF1 の下流で機能する転写因子 OsIRO2 が同定され、イネ科植物の鉄欠乏に応答する遺伝子の発現制御機構の研究は大きく進展した。しかし、鉄欠乏初期における遺伝子応答は未解明のままだった。そこで、鉄欠乏処理後 3, 6, 9, 12, 24, 36 時間という鉄欠乏初期のイネの根を用いてマイクロアレイ解析を行った。

鉄貯蔵タンパク質フェリチンの遺伝子発現は鉄欠乏処理後 6 時間から減少しており、細胞内での鉄利用度は 6 時間目には減少していたことがわかった。一方、重金属結合タンパク質であるメタロチオネイン遺伝子のいくつかは 6 時間から 36 時間まで発現上昇していた。メタロチオネインの増加は、細胞内の重金属バランスを保つために鉄欠乏の早い時期から起こったと考えられた。鉄吸収の増加につながる、ムギネ酸類に関与する遺伝子群の発現上昇は、処理後 24 時間から見られた。発現解析をした 6 時点では、ムギネ酸類生合成酵素遺伝子群とムギネ酸類分泌トランスポーター TOM1、三価鉄—ムギネ酸類複合体の吸収トランスポーター OsYSL15 の遺伝子は、非常によく似た発現パターンを示した。さらに、OsIRO2 とメチオニン回路およびその周辺反応の遺伝子群 (図 1) もムギネ酸類生合成酵素遺伝子とよく似た発現パターンを示した。OsIRO2 と二価鉄トランスポーター遺伝子 OsIRT1 はいずれも鉄欠乏の根で IDEF1 に強く制御される遺伝子である (図 2) が、鉄欠乏初期での OsIRO2 と OsIRT1 は異なる発現パターンを示した。鉄欠乏初期における遺伝子の発現誘導には複数のシグナルカスケードが関わっていると考えられる。

### 鉄欠乏応答性シスエレメント IDE2 に結合する NAC 型転写因子 IDEF2 の単離と解析

鉄欠乏条件下のイネ科作物では、鉄吸収に関与する多くの遺伝子の発現が根で誘導される。オオムギのムギネ酸類水酸化酵素遺伝子 IDS2 のプロモーター領域から発見された鉄欠乏応答性シスエレメント IDE1 と IDE2 は、タバコやイネで機能することから、IDE を介した転写制御は高等植物に広く保存されていると考えられた。本研究では、酵母を用いた one-hybrid スクリーニングによって IDE1 と IDE2 へ結合する転写因子の探索を行った。IDE1-IDE2 配列を 2 回繰り返したものを bait 配列として、イネの鉄欠乏根より作成した cDNA ライブラリをスクリーニングした。3.2×10<sup>6</sup> 個をスクリーニングした結果、新規 NAC 型転写因子をコードするクローンが単離された。このクローンは

IDE2 に結合することが確認されたため、IDE-binding factor 2 (IDEF2) と名付けられた。ゲルシフト解析により、IDEF2 は 27 塩基ある IDE2 配列中の "CAAGTTT" に結合することを確認した。さらに CASTing 解析などにより、IDEF2 の結合コア配列 "CA(A/C)G(T/C)(T/C/A)(T/C/A)" を決定した。IDEF2 遺伝子の発現は鉄欠乏によって誘導されず、根でも葉でも恒常的であった。さらに、IDEF2 は細胞内では核に局在し、酵母実験によりアクチベーター活性も確認されたので、転写アクチベーターであると考えられた。IDEF2 の遺伝子発現を抑制した RNAi イネと機能を阻害した CRES-T イネを作出した。マイクロアレイ解析を行うと、RNAi イネでは鉄欠乏誘導性遺伝子が多く抑制されており、特に、二価鉄-ニコチアミンのトランスポーター OsYSL2 の遺伝子発現の抑制が顕著であった。また、

CRES-T イネでも *OsYSL2* 発現の抑制が確認された。そして、*OsYSL2* のプロモーター領域に IDEF2 が直接結合することを確認した。また、RNAi イネと CRES-T イネでは体内の鉄の分配が異常であったことから、IDEF2 は鉄欠乏に応答した遺伝子制御ネットワークの上位に位置する転写活性因子として、イネの鉄ホメオスタシスに重要であると考えられる (図 2)。

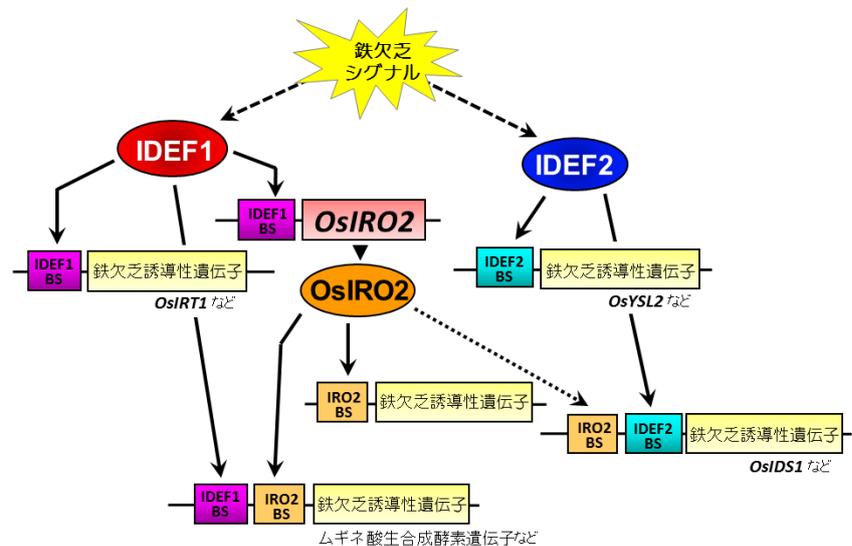


図 2 イネにおける鉄欠乏誘導性遺伝子の制御機構

## 論文リスト

- Itai R *et al.* (2000) Induced activity of adenine phosphoribosyltransferase (APRT) in iron-deficiency barley roots: a possible role for phytosiderophore production. *J Exp Bot.* 51:1179-1188
- Itai RN *et al.* (2008) A novel NAC transcription factor, IDEF2, that recognizes the iron deficiency-responsive element 2 regulates the genes involved in iron homeostasis in plants. *J Biol Chem.* 283:13407-13417
- Itai RN *et al.* (2013) Rice genes involved in phytosiderophore biosynthesis are synchronously regulated during the early stages of iron deficiency in roots. *Rice.* 6: article no. 16