

論文の内容の要旨

論文題目 ムギネ酸合成酵素に関する研究

氏名 中西 啓仁

はじめに：「ムギネ酸生合成系酵素の遺伝子を導入して鉄欠乏耐性植物を作り、沙漠を緑化する。」これはムギネ酸研究に携わる者の究極の目標である。ここ数年のムギネ酸研究において、酵素精製から始まる遺伝子の単離が急速に進んだことで、植物分子生理学研究室では、ついにアルカリ土壌鉄欠乏耐性イネを作成するところまでこぎつけた。不良環境下でも生育することのできる植物、特に穀物を作成することは今後の地球規模での人口問題を考える上で重要な課題である。不良土壌の中でも特に、潜在的な鉄欠乏地帯は世界中に広く存在する。このような土壌では表層に塩類とりわけ石灰が集積し、土壌はアルカリ化している。土壌中には植物の健全な生育に十分すぎる量の鉄が存在しているにもかかわらず、水酸化第二鉄として不溶化していることで、植物が利用しにくい。そのためアルカリ土壌では、葉緑素の欠乏により葉が淡黄色化するという鉄欠乏クロロシスの症状を呈する。このような世界中に広がる鉄欠乏地帯でも青々と育つ植物、特にイネ科の穀類を作成することが最終的な目標である。

鉄欠乏オオムギ根からの *Ids3* 遺伝子の単離 [1]：イネ科植物は Strategy-II という鉄獲得機構を持つ。イネ科植物は体内での鉄の要求性が高まると、根においてイネ科植物特有の三価鉄のキレーターであるムギネ酸類を合成し、根圏に分泌する(図1)。分泌されたムギネ酸類は土壌中の不溶態鉄をキレートにより溶出し、「Fe(III)-ムギネ酸類」錯体として特有のトランスポーターにより根で再吸収される。世界中で栽培され

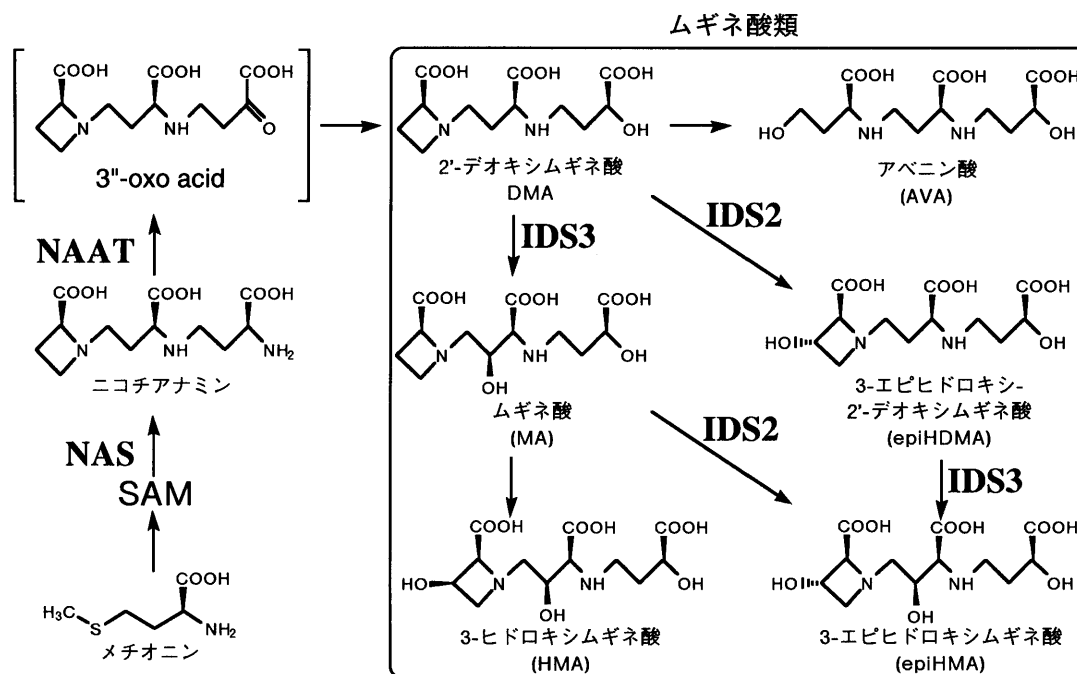


図1 ムギネ酸の生合成経路とIDS3, IDS2の機能. NAS: ニコチアナミン合成酵素, NAAT: ニコチアナミンアミノ基転移酵素.

ている穀物の大部分はイネ科植物であり、今後の食糧需要に十分に應えるためには、アルカリ土壌でも生育する鉄欠乏耐性植物を作成することは必須である。そのためにはまず、ムギネ酸による鉄獲得機構の詳細な解明とムギネ酸生合成に関わる遺伝子を単離することが重要となる。

ムギネ酸生合成に関与する遺伝子を探索する目的で、鉄欠乏オオムギの根から作成した cDNA ライブラリーを用いてディファレンシャルスクリーニングを行い、鉄欠乏オオムギの根で発現の強く誘導される遺伝子 *Ids3* (Iron deficiency specific clone no. 3) を単離した。この遺伝子のオオムギ根での発現は鉄欠乏処理により強く誘導され、水耕液への鉄の再添加で迅速に抑制された。また、発現は葉ではおこらず、根に特異的であった。*Ids3* 遺伝子から予想されたアミノ酸配列は、植物や微生物などの 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼと相同性が高かったが、他のジオキシゲナーゼ類と比較して短いものであった。さらに *Ids3* と同時期にやはり上記の方法でオオムギ根から単離された *Ids2* に最も高い相同性を示した。しかし、*Ids3* のコードするタンパク質の機能に関しての手がかりはまったく得られなかった。

IDS3 はムギネ酸合成酵素か？ [2]：上記で得た cDNA は完全長ではない可能性が高かったため、改めて cDNA ライブラリーを作成し、全長 cDNA の単離を行った。得られた cDNA は 1241 bp からなり、339 アミノ酸をコードしていると予想された。この

遺伝子のコードするタンパク質 IDS3 はジオキシゲナーゼと高い相同性を示し、いくつかのジオキシゲナーゼ類で示されてきた、 Fe^{2+} イオンとアスコルビン酸への結合に必須なアミノ酸残基は完全に保存されていた。オオムギの *Ids3* を含むゲノム断片もクローニングし、その塩基配列も解読した。*Ids3* 遺伝子発現は、鉄欠乏処理3日目で誘導され始めた。これはムギネ酸類の分泌が見られるよりも少し早く、ムギネ酸合成の鍵酵素であるニコチアナミン合成酵素、ニコチアナミンアミノ基転移酵素の活性誘導のパターンと完全に一致した。また、鉄欠乏以外の栄養ストレス条件、嫌気条件下での発現は観察されなかった。以上のことから、IDS3 がムギネ酸合成経路上の水酸化反応を行う酵素ではないかと考えられた。しかし、IDS3 の *in vitro* でのジオキシゲナーゼ活性検定は成功しなかった。ジオキシゲナーゼの活性には Fe^{2+} イオンと分子状酸素が必要である。ところが、酸化的な条件下では Fe^{2+} イオンの一部は酸化されて Fe^{3+} イオンへと変化する。ムギネ酸は Fe^{3+} イオンへの親和性が高い。基質として加えた DMA または MA は、生じた Fe^{3+} イオンとキレートして、Fe(III)-DMA または Fe(III)-MA となり立体構造が変化して、もはや IDS3 による水酸化反応の基質になり得なかったものと考えられる。

分泌されたムギネ酸類を分析すると、エヒメハダカとライムギはムギネ酸の 2'位と 3 位の水酸化を行う酵素を発現しており、ミノリムギは 2'位の水酸化を行う酵素は発現しているが、3 位の水酸化を行う酵素は発現していないことがわかる。また、コムギへのオオムギ染色体添加系統により、2'位の水酸化を行う酵素遺伝子はオオムギの染色体の 4H 長腕にコードされていることが知られている。IDS3 タンパク質はオオムギ(エヒメハダカ、ミノリムギ)、ライムギで検出された。*Ids3* の発現は、このオオムギの染色体 4H、4HL を添加したコムギで観察された。このことは IDS3 が DMA から MA への水酸化反応を触媒する酵素であることを強く示していると考えられた。さらに *Ids3* に最も高いホモロジーをもつ *Ids2* 遺伝子の発現は、オオムギの染色体の 7H、7HL を添加したコムギで検出された。この 7H、7HL を添加したコムギは、DMA に加えて epiHDMA を放出した。以上のことから IDS3 がムギネ酸合成経路上の DMA から MA、epiHDMA から epiHMA への 2'位の水酸化酵素、IDS2 が DMA から epiHDMA、MA から epiHMA への 3 位の水酸化酵素であることが強く示唆された。

IDS3 はムギネ酸合成酵素である [3] : *in vitro* での証明はうまくいかなかったため、形質転換イネを用いて *in vivo* での実証を行った。*Ids3* 遺伝子を含むオオムギのゲノム断片約 20 kb をイネ形質転換用バイナリーベクターに導入し、イネの形質転換を行った。約 60 系統の形質転換イネが得られ、この後代を水耕栽培し、鉄欠乏処理を施してこれらが分泌するムギネ酸類を測定した。野生型のイネが DMA のみを分泌したの

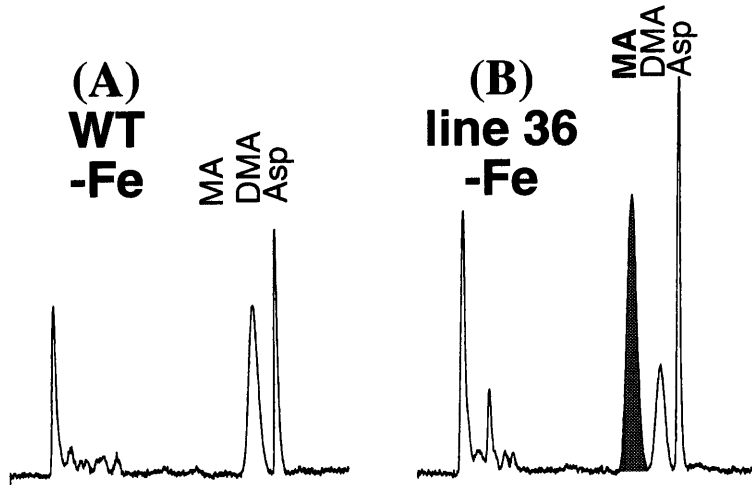


図2 野生型(A)と形質転換イネ(B)の分泌したムギネ酸類。形質転換イネは DMA に加えて MA も分泌した。

に対して、形質転換体は DMA と MA を分泌した(図2)。これにより *IDS3* が 2'-デオキシムギネ酸の 2'位の水酸化酵素すなわちムギネ酸合成酵素であることが証明された。さらに、形質転換体のうちの1つの系統は野生型の2倍以上のムギネ酸類を放出し、鉄欠乏耐性イネ作成への希望を抱かせた。

鉄欠乏耐性植物作成に向けて：*Ids 3*の5'上流領域は、イネの根でも鉄欠乏に応答して、遺伝子発現を誘導する強力なプロモーターとして機能することが分かった。現在、上記で作成した形質転換イネ以外にも、*Ids 3* 5'上流領域に *nas* 遺伝子や *naat* 遺伝子をつないだコンストラクトを作成し、さらに単独あるいは複合でこれらのコンストラクトを導入した形質転換イネも作成した。作成した形質転換イネを用いて石灰質アルカリ土壌での生育試験を行ったところ、この土壌で生育するいくつかの有望な系統が得られた。今後は鉄欠乏耐性能の検定、分泌されるムギネ酸類の検定を行い、鉄欠乏耐性植物の作成を目指している。

参考文献

- [1] Nakanishi H., Okumura N., Umehara Y., Nishizawa N. K., Chino M., Mori S. (1993) Expression of a gene specific for iron deficiency (*Ids3*) in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant & Cell Physiology* 34: 401-410.
- [2] Nakanishi H., Yamaguchi H., Sasakuma T., Nishizawa N. K., Mori S. (2000) Two dioxygenase genes, *Ids3* and *Ids2*, from *Hordeum vulgare* are involved in the biosynthesis of mugineic acid family phytosiderophores. *Plant Molecular Biology* 44(2): 199-207.
- [3] Kobayashi T., Nakanishi H., Takahashi M., Kawasaki S., Nishizawa N. K., 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* (in press).