

## 論文の内容の要旨

農学国際専攻

平成11年度博士課程 進学

根岸 孝至

指導教官名 西澤 直子

## 論文題目

ムギネ酸類合成系の酵素遺伝子に関する研究

鉄は地殻上で第4番目に存在量の多い元素であるにもかかわらず、通常の好気条件下では3価鉄の不溶態として存在しており、植物はこれを吸収することができない。特に、母材が石灰岩の場合には土壌はアルカリ性となって、多くの植物は不溶態の鉄を吸収、利用することができずに鉄欠乏によって枯死する。植物は不溶態の三価鉄を利用するための戦略を進化的に獲得してきた。

イネ科植物はファイトシデロフォアと総称される天然の鉄キレーターであるムギネ酸類を根から分泌し、土壌中の不溶態の3価鉄を「鉄-ムギネ酸」として可溶化し、キレートの形で根から吸収することによって鉄欠乏を回避する巧妙なメカニズムを持っている。

ムギネ酸類の合成と分泌は鉄欠乏条件によって強く誘導される。これまでに知られているムギネ酸類は6種類存在し、それぞれのイネ科植物によって分泌されるムギネ酸の種類と分泌量は異なっており、この違いがイネ科植物間の鉄欠乏耐性の差となっていると考えられている。ムギネ酸分泌の特徴的な現象として、日周性が挙げられる。オオムギは日の出後からムギネ酸の分泌を始め、3~5時間をピークに減少し、日没時には分泌が終了する。鉄欠乏によってオオムギ根の微細構造は変化する。鉄欠乏オオムギの根の皮層細胞、表皮細胞それに根冠細胞内に

は、特殊な顆粒が観察される。その顆粒は表面にリボソームがついていて、粗面小胞体 (rER) 由来と考えられた。この顆粒はムギネ酸が分泌される日の出前には膨潤した状態で存在し、ムギネ酸類が分泌されるに伴い収縮することから、ムギネ酸類の合成・貯蔵部位であると推定されていた。ムギネ酸生合成経路の酵素タンパク質 (NAS, NAAT) の細胞内局在解析をしたところ、いずれの酵素タンパク質も鉄欠乏オオムギの根で増加する特殊な顆粒に局在し、その顆粒がムギネ酸類の合成部位であることが明らかになった。オオムギにおいてムギネ酸類の生合成経路は既に確定しており、メチオニン→S-アデノシルメチオニン (SAM) →ニコチアナミン (NA) →ケト体→デオキシムギネ酸 (DMA) →ムギネ酸 (MA) の順に生合成される。ムギネ酸はさらに水酸化されると (エピ) ハイドロキシムギネ酸 ((epi)-HMA) となる。イネ、トウモロコシ、コムギはムギネ酸類生合成経路の最初のムギネ酸類である DMA までを分泌し、オオムギとライムギは DMA と、MA、(epi)-HMA を分泌する。エンバクは DMA, アベニン酸 (AVA) を分泌する。調べられている限りイネ科植物はすべて DMA を分泌し、DMA までの合成経路をもっていると考えられる。

ムギネ酸類合成系において SAM から NA への反応を触媒するニコチアナミン合成酵素 (NAS) と NA からケト体への反応を触媒するニコチアナミンアミノ基転移酵素 (NAAT) の活性は鉄欠乏処理で強く誘導される。いずれの酵素も鉄欠乏オオムギ根から精製され、その遺伝子が単離された。その他ムギネ酸類生合成経路に関わるタンパク質として IDS3 とがあげられる。Ids3 遺伝子は、鉄欠乏処理で最も強く発現する。最近になって、Ids3 遺伝子を導入した形質転換イネは、DMA に加えて MA を分泌することが明らかになり、IDS3 が DMA から MA を合成する酵素であることが証明された。また、メチオニンから SAM を生成する SAM 合成酵素の遺伝子も単離されており、ムギネ酸生合成経路上のほぼすべての酵素遺伝子が単離された。しかし、唯一、ケト体から DMA を生成する酵素は NADH、または NADPH 依存型還元酵素であることが知られてはいたが、そのタンパク質、遺伝子のいずれも精製・単離には至っていない。そこで、本研究ではムギネ酸類生合成経路中の酵素で唯一単離されていないケト体から DMA を生成させる“デオキシムギネ酸合成酵素遺伝子”の単離を目的とした。

### デオキシムギネ酸合成酵素遺伝子の単離

デオキシムギネ酸合成酵素について得られている知見は、NAD(P)H 依存型還元酵素であることのみである。そこで、まずデオキシムギネ酸合成酵素が属する可能性のある還元酵素ファミリーの検索を行った。その結果、様々な NAD(P)H 依存型還元酵素を網羅する aldo-keto reductase superfamily が最も可能性のある酵素ファミリーであると考えられた。そこで、デオ

キシムギネ酸合成酵素がそのファミリーに属するという仮定に基づいて、このファミリーに属する酵素群に共通して保存されているアミノ酸配列からディジェネレートプライマーを作成し PCR を行った。鋳型には、鉄欠乏オオムギ根 cDNA ライブラリーを用いた。その結果、3つの PCR 断片が得られた。ムギネ酸類生合成経路中で、デオキシムギネ酸合成酵素の前後に働く酵素、すなわち、NA からケト体への反応を触媒する NAAT と、DMA から MA への反応を触媒する IDS3 がいずれも鉄欠乏でその発現が誘導されることから、デオキシムギネ酸合成酵素遺伝子の発現も鉄欠乏で誘導される可能性が高い。そこで、上記で得られた3つの PCR 断片をプローブに用いてノーザン解析を行ったところ、そのうちのひとつにおいて、鉄欠乏による発現の誘導がみられた。よって、デオキシムギネ酸合成酵素遺伝子は、この PCR 断片の塩基配列を含んだ cDNA であると考えられた。そこで、その PCR 断片をプローブにコロニーハイブリダイゼーションによって、デオキシムギネ酸合成酵素遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、4つの cDNA クローンが得られた。次に、各々のクローンが、ケト体から DMA の反応を触媒する酵素活性を持つことがどうかを確認した。それぞれの遺伝子を酵母に形質転換して得られるタンパク質を用いて酵素反応は行い、生成産物の DMA は HPLC により検出した。その結果、4つのクローンのうち3つのクローンで活性がみられた。3つのクローンについて、塩基配列を決定したところ、2つのクローンについては同一のものであった。従って、2つの独立したデオキシムギネ酸合成酵素遺伝子が得られ、それぞれ、*DMAS1* (DeoxyMugineic Acid Synthase 1)、*DMAS2* と名づけた。いずれもイネの glutathione reductase に高い相同性を示した。*DMAS1* と *DMAS2* について、ノーザン解析を行ったところいずれも鉄欠乏に応答していた。

イネ科植物における鉄欠乏耐性機構の研究は主にオオムギを用いてなされ、ムギネ酸類生合成経路の決定とそれに関わる酵素の精製と遺伝子の単離が中心となっていた。イネ科植物において、ムギネ酸類生合成経路に関連する遺伝子以外の鉄欠乏誘導遺伝子として、Fe-MAs トランスポーター遺伝子である *ys1* がある。*ys1* は、とうもろこしから単離され、鉄欠乏の根でその発現が誘導される。他には、metallothionine-like gene (*lds1*)、eIF2B  $\alpha$ -like gene (*ID12*)、ABC-type transporter gene (*ID17*)、36kD タンパク質をコードする unknown gene (*lds6*) がオオムギ根から鉄欠乏誘導遺伝子として単離されている。

このように、イネ科植物の鉄欠乏耐性機構に関わる遺伝子は、ムギネ酸類生合成経路に関連するものがほとんどで、それは鉄欠乏耐性機構の一部に過ぎないと考えられる。さらに、ムギネ酸類の分泌の分子機構は全く分かっていない。オオムギにおいて、分泌の日周性と、ムギ

ネ酸類 1 分子がアニオンチャネルを介して分泌されることが示されているが、それを制御する分子機構、あるいはムギネ酸類の分泌トランスポーター同定についても全く分かっていない。

そこで、ある条件のもとで発現が誘導・抑制される遺伝子群の網羅的解析を行うのに最適な cDNA マイクロアレイ法を用いてイネ科植物の鉄欠乏回避の分子機構の解明を目指した。

#### cDNA マイクロアレイ法による鉄欠乏誘導性遺伝子群の網羅的解析

cDNA マイクロアレイ法は、cDNA がスポットされたスライドグラス上に、逆転写した RNA を蛍光標識してハイブリさせて、蛍光強度によって発現差をみるものである。本研究では、8987 個のイネ独立 EST クローンののったスライドグラスを用いて、鉄欠乏オオムギ根でその発現が誘導される遺伝子群の同定を試みた。蛍光強度が鉄欠乏区/鉄供給区 $\geq 2$  のものを、鉄欠乏誘導性遺伝子とした。その結果、約 200 個の鉄欠乏誘導性遺伝子が検出された。その中には、これまでに単離されているほとんどの鉄欠乏誘導性遺伝子が検出された。新たに鉄欠乏誘導性遺伝子として検出されたものの中には、メチオニン合成に関わる遺伝子が含まれていた。鉄欠乏下では、Yang cycle によるメチオニンの再利用だけでなく、transsulfuration pathway を介したメチオニン新規合成が盛んであることを示唆していた。さらに、約 200 個の鉄欠乏誘導性遺伝子のうち、ムギネ酸類分泌の日周変動に関連する遺伝子を明らかにするために、盛んにムギネ酸類が分泌されている時間と分泌の終了している時間の鉄欠乏オオムギ根を用いて、マイクロアレイを行った。ムギネ酸類分泌に関わっている遺伝子は、蛍光強度が(ムギネ酸類分泌の盛んな時間帯) / (ムギネ酸類分泌の止まっている時間帯)  $\geq 2$  のものとした。その結果、約 50 個の遺伝子が検出された。その中には、ムギネ酸類分泌の日周性に、前記のムギネ酸類を合成する部位である顆粒の polar transport が関与することを示唆するものがあった。