

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井上 晴彦

イネ科植物における鉄吸収機構におけるムギネ酸類の役割はよく知られているが、その前駆体であるニコチアナミン(NA)の植物体内における機能は詳細には明らかになっていない。NAはムギネ酸類合成の前駆体であるとともに、二価の金属イオンと安定な錯体を形成するキレート物質である。本研究ではイネから、NA とイネの分泌するムギネ酸類であるデオキシムギネ酸(DMA)合成に関与する遺伝子、さらに「Fe-DMA」錯体、「Fe-NA」錯体を輸送するトランスポーター遺伝子を単離し、それぞれがどの組織でいつ発現するかを3次元的に解析することによって、イネ科植物における鉄獲得の分子機構を明らかにすることを目的にした。

序論に続き、第2章ではDMA 生合成に関わる遺伝子群をイネから単離し、その発現について解析した。イネから、3つのニコチアナミン合成酵素遺伝子(*OsNAS1-3*)を単離した。ニコチアナミンアミノ基転移酵素(NAAT)は、NAを基質としてケト体を生成する酵素である。オオムギの NAAT遺伝子と相同性の高い遺伝子5つをイネ NAAT 候補として単離した。DMA 合成酵素(DMAS)は、NAAT によって生成されたケト体を還元する酵素である。イネのマイクロアレイ解析により、新たに *OsDMAS1* 候補遺伝子を見いだし単離した。上記の遺伝子の遺伝子産物は、それぞれ、NAS, NAAT, DMAS 活性を有することを証明した。これらの遺伝子の各プロモーター領域をレポーター遺伝子である β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子に連結したコンストラクトを作成し、イネに導入して発現部位を解析した。その結果、これら3つの酵素の遺伝子は、同じ細胞で働き DMA 合成を行っていると考えられた。また、3種の酵素遺伝子がともに維管束で強く発現することから、NA または DMA が鉄の長距離輸送に関与していると推定された。

第3章では、「Fe(III)-DMA」錯体を輸送する遺伝子(*OsYSL15*)の単離と解析を行った。トウモロコシの「Fe(III)-DMA」錯体トランスポーター遺伝子(*ZmYSL*)に相同性が高い18個のホモログ(*OsYSL*)をイネゲノム中に見いだし、これらのうち鉄欠乏の根で発現が強く誘導される *OsYSL15* の解析を行った。*OsYSL15* は16個の推定膜貫通領域を持ち細胞膜へ局在した。プロモーター-GUS 形質転換イネを用

いて発現部位を解析したところ、鉄十分条件では根の篩部伴細胞で弱く発現し、鉄欠乏条件では、根の表皮細胞と外皮細胞で強く、篩部伴細胞においても強く発現した。アフリカツメガエルの卵母細胞を用いて電気生理学的に輸送基質を調べたところ、OsYSL15は「Fe(III)–DMA」錯体を輸送した。

第4章では、「金属–NA」錯体を輸送する遺伝子(*OsYSL2*)を単離し解析した。18個のOsYSLのうち、鉄十分、鉄欠乏の根では発現が観察されず、鉄欠乏の地上部で発現が強く誘導される*OsYSL2*に着目し研究を進めた。OsYSL2は14個の膜貫通領域を持ち細胞膜へ局在した。プロモーター–GUS解析を行うと、鉄十分の根において篩部に*OsYSL2*の弱い発現が観察された。鉄十分の葉でも、維管束の篩部に*OsYSL2*は発現した。鉄欠乏の葉では、*OsYSL2*は全ての細胞で発現しており、特に篩部伴細胞で強い発現が観察された。また、*OsYSL2*は種子の登熟過程においても維管束を中心に発現した。OsYSL2の輸送基質を卵母細胞を用いて解析した。OsYSL2は「Fe(II)–NA」錯体と、「Mn(II)–NA」錯体を輸送し、「金属–DMA」錯体を輸送しなかった。すなわちOsYSL2は生物界で初めて単離された「金属–NA」錯体トランスポーターである。OsYSL2はFe(II)、Mn(II)の篩管輸送に関わっており、さらに、Fe(II)とMn(II)を種子へ集積させる重要な役割を担っていると考えられる。

第5章では、シロイヌナズナの鉄栄養異常変異株から単離された遺伝子、*AtFRD3*のイネのホモログである*OsFRDL*遺伝子の解析を行った。OsFRDLは、NAまたはDMAの放出トランスポーターとして機能しているのではないかと考え研究を進めた。イネのゲノムには、*AtFRD3*遺伝子と相同性の高い遺伝子(*OsFRDL*)が4つ存在した。*OsFRDL1*のプロモーター–GUS植物の解析を行うと、*OsFRDL1*は鉄十分、鉄欠乏条件ともに維管束で発現しており、特に篩部伴細胞での発現が強かった。以上、本論文ではイネの鉄獲得に関わる遺伝子群を単離し、その発現を詳細に解析することによって、イネ科植物の鉄獲得の分子機構の一端を明らかにしたものであり、学術、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。