

論文の内容の要旨

農学国際専攻
平成 15 年度博士課程 進学
野副朋子
指導教官 西澤直子

論文題目 鉄栄養制御遺伝子に関する研究

第一章 研究の背景

世界の人口は年々増加しており、2050 年には世界人口が現在の 65 億人から 91 億人に達すると推定されている。人口爆発に伴う食糧不足は今や他人事ではなく、実現可能な解決策を考えていく必要がある。その打開策として、遺伝子導入手法を用いた高収量・高栄養価作物の創製、あるいは不良土壌でも生育可能な作物の創製による耕作可能面積の拡大が有効であると考えられる。不良土壌の一つである石灰質アルカリ土壌は、世界の陸地の約 30% を占めている。石灰質アルカリ土壌における植物の生育阻害の主要因として、pH が高いことにより、鉄が土壌溶液中に十分に溶けていないために植物の利用可能な鉄の量が極少であることがあげられる。石灰質アルカリ土壌で生育した植物は鉄を利用できないために、葉脈間黄白化症（クロロシス）などの鉄欠乏症状を呈し、枯死したりあるいは収量が激減する。現在までに安価な鉄系肥料の開発は成功しておらず、石灰質アルカリ土壌は農業上深刻な問題となっている。

イネ科植物は体内での鉄の要求性が高まると、イネ科植物特有の三価鉄キレーターであるムギネ酸類を合成し、根から分泌する。根圏へ分泌されたムギネ酸類は、土壌中の不溶性の三価鉄をキレートして可溶化し、「三価鉄—ムギネ酸類」錯体として根から再吸収される。この過程は植物の鉄吸収機構の一つであり、Strategy-II と呼ばれる。これまでに、ムギネ酸類生合成経路の全容はほぼ明らかにされてきた。しかし、ムギネ酸類を介した鉄吸収

機構の全体像は複雑であり、まだ解明されていない点が多く残されている。石灰質アルカリ土壌でも生育する鉄欠乏耐性植物を創製するという最終目標を達成するため、イネ科植物のムギネ酸類を介した鉄吸収機構、さらにはそれを含めた鉄栄養制御機構を解明することは重要である。

第二章 ムギネ酸類の分泌機構の解明

ムギネ酸類の分泌に関しては、生理学的な知見が主にオオムギにおいて報告されているが、その分子機構は未知のままである。本章では、イネ科植物の中でも、既にゲノムが解読されており、豊富なデータベースが利用できるイネが分子機構の解析に最適であると考え、イネを対象として用いた。イネはムギネ酸類としてデオキシムギネ酸 (DMA) を分泌する。オオムギにおけるムギネ酸類の分泌は鉄欠乏処理により増加し、日の出後 3 ~ 4 時間にピークを持つ明確な日周変動を示す。そこでまず、イネにおいても DMA 分泌量が鉄欠乏処理により顕著に増加すること、その分泌は朝と昼に比べ夜では少ないという日周変動を示すことを確認した。次に、DMA 生合成経路で働く酵素である、ニコチアナミン合成酵素遺伝子 (*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAS3*)、ニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子 (*OsNAAT1*)、DMA 合成酵素遺伝子 (*OsDMAS1*, *OsDMAS2*) の各遺伝子の根における発現の変化を解析し、DMA 合成能に日周変動があるかどうかを調べた。鉄十分条件ではいずれの遺伝子の発現もほとんど検出できず、遺伝子発現の明確な日周変動は認められなかった。一方、鉄欠乏条件では *OsDMAS2* を除く 5 つの遺伝子 (*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAS3*, *OsNAAT1*, *OsDMAS1*) の根における発現量は上昇していた。これらの遺伝子の発現は、日の出に伴い徐々に減少し、日没後から徐々に増加するという日周変動を示し、DMA 分泌の日周変動と類似していた。このことより、イネの根における DMA 生合成は日周変動を示していると考えられた。

オオムギでは、ムギネ酸類の生合成は粗面小胞体由来の顆粒 (ムギネ酸顆粒) 内で行われている。ムギネ酸類分泌の起こる日の出直前の根端細胞では、ムギネ酸顆粒が細胞膜付近に集まっている様子が観察されることから、ムギネ酸類は日の出前になると細胞内小胞輸送により細胞膜付近へ輸送されると考えられている。鉄欠乏処理を行ったイネの根でもムギネ酸顆粒と同様の顆粒構造が観察され、オオムギ以外のイネ科植物で初めてムギネ酸顆粒が存在することを示した。イネの根においてもオオムギと同様に、DMA 合成がムギネ酸顆粒内で行われ、日の出前になると細胞内小胞輸送により細胞膜付近へ輸送されていることが考えられる。オオムギでムギネ酸顆粒の細胞内輸送に関わると考えられている遺伝子のイネのホモログ ADP ribosylation factor 1 (*OsARF1*)、Ras-related small GTP binding protein (*OsRIC1*) を単離した。*OsARF1*、*OsRIC1* と GFP との融合タンパク質はタマネギの表皮細胞において、いずれも細胞質では顆粒状に存在した。また、二つの遺伝子の発現は、鉄欠乏処理による誘導は見られなかったが、日の出に伴い徐々に減少し、日没に伴い増加しており、DMA 分泌量の変化と類似した日周変動を示した。*OsARF1*、*OsRIC1* はイネにおいてもムギネ酸顆粒の細胞内小胞輸送に関与している可能性が示唆された。

Major facilitator superfamily (MFS) は植物から動物まで、生物界に多数見出されているトラ

ンスポーターであり、単糖トランスポーター (MST) やリン酸トランスポーター (PT) 等が含まれる。マイクロアレイ解析をもとに、DMA の分泌を担う放出トランスポーターの候補として、イネの根において鉄欠乏処理により発現の誘導される *OsMFS2* ファミリー (*OsMFS2-1*, *OsMFS2-2*, *OsMFS2-3*) を単離し、その解析を行った。*OsMFS2* ファミリーのうち *OsMFS2-1* の発現のみが鉄欠乏の根において特異的に誘導され、*OsMFS2-1* と GFP との融合タンパク質はタマネギの表皮細胞において細胞膜に局在した。*OsMFS2-1* プロモーター-GUS 植物を用いた発現解析の結果、鉄十分条件では、根の表皮細胞のみで発現が見られ、地上部での発現は認められなかった。しかし鉄欠乏処理により発現部位が増加することが認められた。鉄欠乏処理 3 日目では *OsMFS2-1* は根の表皮細胞と中心柱付近の内皮細胞で発現し、地上部では鉄十分条件と同様に発現は見られなかった。鉄欠乏処理 10 日目では維管束、内皮細胞、外皮細胞、表皮細胞、根毛など、根の全体に強く発現し、地上部では葉及び葉鞘の維管束篩部に発現が認められた。*OsMFS2-1* を過剰発現する形質転換イネを作成し、DMA の分泌量を測定したところ、根から分泌される DMA 量は野生型に比べ減少していた。現在までのところ *OsMFS2-1* の輸送基質は未知であるが、DMA 分泌に何らかの関与をしている可能性が示唆された。

第三章 イネ種子発芽時における鉄関連遺伝子群の発現様式

ムギネ酸類生合成の中間体であるニコチアミン (NA) は、それ自身も二価金属あるいは三価鉄のキレーターであり、イネ科以外の植物も含めた全ての植物に存在する。NA が検出されないトマトの変異体や NAAT を過剰発現することによって内生 NA が消費された形質転換タバコでは、胚発生が異常となり、種子中の鉄含有量が低下する。このことから、NA は胚発生過程において鉄の輸送や種子への鉄の蓄積に関与していると考えられた。また、イネの完熟種子には NA や DMA が含まれており、発芽時において DMA や NA が鉄の運搬体として利用されていると考えられる。DMA 合成経路で働く酵素遺伝子 *OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAS3*, *OsNAAT1*, *OsDMAS1*, *OsDMAS2*, 及び金属錯体トランスポーター遺伝子 *OsYSL2*, *OsYSL15*, 二価鉄イオントランスポーター遺伝子 *OsIRT1*, そして前述の *OsMSF2-1*, *OsMSF2-2*, *OsMSF2-3* のイネ種子発芽時における発現様式をプロモーター-GUS 法により解析し、発芽時における DMA と NA の合成部位や鉄錯体の輸送経路を考察した。

イネ種子発芽初期 (吸水から 3 日間) の胚乳では *OsNAS1* のみが発現しており、胚乳では主に NA 合成が行われると考えられた。胚乳から胚への養分を供給する組織である柵状吸収細胞では、鉄錯体のトランスポーター遺伝子である *OsYSL2* や *OsYSL15* の発現が誘導された。*OsYSL2* 及び *OsYSL15* はそれぞれ「二価鉄 - NA」、「三価鉄 - DMA」を輸送することが示されており、イネ種子発芽時に鉄は NA や DMA と錯体を形成し、胚乳から胚へと輸送されることが考えられた。またこの際、主に NA が利用されている可能性が高いと考えられた。これに対し胚では、胚盤、胚盤維管束、幼根、鞘葉において、*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAS3*, *OsNAAT1*, *OsDMAS2*, *OsYSL2*, *OsYSL15* の発現が誘導され、NA だけでなく DMA の合成も行われ、これらの鉄錯体を輸送していると考えられた。また、芽鱗・根鞘では *OsNAAT1*,

OsDMAS2、*OsYSL15* の発現のみが誘導された。芽鱗・根鞘は種子根の生長に必要な養分が蓄えられていると考えられており、鉄は DMA 錯体として種子根へ輸送される可能性が示唆された。一方 *OsIRT1* は他の遺伝子と異なり、吸水に伴い芽鱗・根鞘、胚盤での発現が減少し、葉原基、幼根基部表皮における発現が誘導された。幼根基部表皮における *OsIRT1* の発現は吸水後 2 日目から誘導されたため、吸水後 2 日目付近以降は外部からの二価鉄イオンも胚へ吸収されることが考えられた。

イネ種子発芽時における鉄栄養制御機構に関する理解を深めるために、完熟種子及び吸水後 1-3 日目の種子から RNA を抽出し、22K マイクロアレイ解析を行った。当研究室においては、マイクロアレイ解析により鉄欠乏のイネの根において発現が誘導される 93 個の遺伝子が既に確認されている。これらの遺伝子は、イネにおける鉄栄養機構に関与していると考えられる。今回用いた 22K マイクロアレイにはこれらの 93 個の鉄欠乏誘導性遺伝子のうち 70 個の遺伝子がスポットされており、このうち 40 個の遺伝子がイネ種子発芽時において強く発現していることが明らかになった。前述のムギネ酸類合成経路で働く酵素遺伝子や、基質となるメチオニンを供給するためのメチオニンサイクルで働く酵素遺伝子、転写因子等が含まれており、イネ種子発芽時において鉄欠乏誘導性遺伝子の多くの発現が認められたことから、発芽時の鉄要求性が極めて高いことが示唆された。*OsNAS3*、*OsNAAT2*、*OsDMAS2*、*OsMFS2-2* は鉄欠乏処理による発現上昇は少ないが、イネ種子発芽時においてその発現量が高いことが示された。このことより、イネ種子発芽時におけるムギネ酸類の生合成は、鉄欠乏状態とは異なる制御も受けている可能性が示唆された。

第四章 高ニコチアナミン含有ダイズの創製

遺伝子組換え技術による新たな作物の創製は、食糧問題の解決策としてのみならず、栄養価を高めた機能性作物の開発においても今後重要な役割を担っていくものと考えられる。

ムギネ酸類生合成経路の中間体であるニコチアナミンは血圧降下作用を持ち、ニコチアナミンを豊富に含む食品は高血圧症を抑える機能性食品として非常に有効であると考えられる。本研究では、オオムギのニコチアナミン合成酵素遺伝子 *HvNAS1* をダイズの種子特異的に発現させ、ダイズ種子中のニコチアナミン含有量を高めることを試みた。ダイズはタンパク質、脂質源として重要性の高い作物であるが、イネやタバコなどに比べアグロバクテリウム法による形質転換効率が非常に低く、遺伝子組換え体の作成はあまり普及していない。アグロバクテリウム法による安定的なダイズの形質転換系を確立できれば、組換え作物の機能性食品への応用範囲がさらに広がるものと期待される。アメリカのミネソタ大学において、アグロバクテリウムをダイズへ感染させる際、還元剤を加えることにより、ダイズの形質転換効率を上げたという報告がなされた。アメリカのミネソタ大学においてダイズの形質転換技術を学び、東京大学においてダイズの形質転換技術を確立しようと試みた。試行錯誤の結果、ダイズの子葉からカルスを誘導し、アグロバクテリウムが感染していることを確認した。現在、湿度や光、培地条件等を検討し、シュート形成の最適化を目指している。