

## 論文の内容の要旨

農学国際専攻  
平成 20 年度進学  
寛 雄介  
指導教員 山川 隆

論文題目 イネの鉄栄養調節因子の解析とその制御シス配列検索法の開発

### 第 1 章 序論

鉄は全ての生物にとって必須な元素である。植物が鉄を吸収しにくい石灰質アルカリ土壌は世界の耕地の 25%をも占め、鉄欠乏による作物の収量や質の低下が重大な農業問題になっている。一方、ヒトにおいても鉄欠乏症は深刻な問題であり、WHO によれば、世界の約 30 億人が鉄欠乏性貧血症と報告されている。植物の鉄栄養制御の分子機構を明らかにすることは、農業分野のみならず、ヒトの健康にとっても重要である。イネ科植物は、金属キレーターであるムギネ酸類を根圏に分泌し、可溶化された錯体として鉄を吸収する。近年、ムギネ酸類の生合成や根からの鉄吸収に関わる遺伝子が数多く単離され、植物の鉄吸収機構は分子レベル、遺伝子レベルで明らかになりつつある。これらの遺伝子の発現は鉄欠乏によって強く誘導される。その発現制御に必須な転写因子やシスエレメントがいくつか明らかにされている。本研究では、イネが合成するムギネ酸類の 2'-デオキシムギネ酸(DMA)と、ムギネ酸類生合成の前駆体であり、かつ金属の体内移行に不可欠なキレーターであるニコチアナミン(NA)に注目し、根から地上部、種子などへの鉄の長距離輸送との関係を明らかにすることを目的とする。さらに、鉄の長距離輸送や鉄-NA、鉄-DMA 錯体の輸送に関

わるトランスポーターの機能を解析した。また、鉄欠乏条件下などにおいて遺伝子発現を制御する、新たなシスエレメントを予測するメソッドを開発することを目指した。

## 第2章 鉄の吸収、移行におけるニコチアナミン、デオキシムギネ酸の役割

植物体内のNA、DMAの濃度は低く、従来の測定方法では少量の試料からの検出が難しかった。そのため測定感度の高い新たな分析手法の開発が望まれていた。本研究では、NA、DMAなどにあるアミノ基、ヒドロキシル基を9-fluorenyl methoxycarbonyl chlorideによって誘導体化し、LC/ESI-TOF-MSで測定することによって、これまでの1000倍以上の測定感度をもつ定量法を開発した。この定量法では測定に必要な試料が少なく済むため、遺伝子組み換え植物の米1粒、導管液10  $\mu$ lように試料の少ない場合でも解析が容易になった。NA合成酵素遺伝子を高発現させた遺伝子組換えイネの種子では、NA濃度だけではなく、DMA濃度が上昇し、さらに鉄濃度も上昇していた。イネ全体におけるNAとDMAの増加により、土壌からの鉄の吸収が増加し、種子へより多く輸送されたためと考えられる。この測定法によって、初めてイネ導管液中のNAを定量することができた。イネを鉄欠乏処理すると二価鉄濃度は急激に減少するのに対し、三価鉄濃度は減少が抑えられた。DMAの濃度は鉄欠乏によって特に顕著に上昇したが、一方、NAの濃度に変化はなかった。鉄欠乏条件下ではDMA濃度の上昇によって、導管液中の三価鉄濃度が維持され、地上部におけるイネの鉄栄養を維持すると考えられた。

## 第3章 イネの新規フェノール性酸排出トランスポーターPEZ1の解析

導管液中の鉄濃度が低い変異体イネを発見し、その導管液を、第2章で開発した定量法を用いて測定した。NAとDMAの濃度には変化がなかったが、フェノール性物質のプロトカテク酸とカフェ酸の濃度が顕著に低下していた。この変異体では、機能未知されていた排出型トランスポーターPEZ1の遺伝子発現が抑制されていた。アフリカツメガエルの卵母細胞を用いてPEZ1がプロトカテク酸を細胞外に輸送することを明らかにした。PEZ1は細胞膜に局在し、導管周辺で遺伝子発現がみられた。また、PEZ1を過剰発現するイネは鉄過剰症状を示した。野生型イネでは根の表面に赤褐色の鉄の沈着が見られるのに対して、PEZ1過剰発現イネでは根における鉄の沈殿は認められなかった。したがって、PEZ1が輸送するフェノール性物質は、鉄を可溶化する。したがってPEZ1は、イネの導管部におけるフェノール性物質の排出トランスポーターであり、導管を介した鉄の輸送に関わる。

#### 第4章 イネの鉄錯体トランスポーターOsYSL16の解析

イネの鉄栄養に重要なトランスポーターの候補である、OsYSL16の遺伝子発現解析と機能解析を行った。OsYSL16は鉄欠乏によって遺伝子発現が誘導された。OsYSL16は細胞膜に局在した。鉄吸収欠損酵母を用いた相補実験により、OsYSL16は「三価鉄-DMA」を輸送することが明らかとなった。OsYSL16は根の表皮を含めてほぼ全ての組織に発現していた。しかし、花粉では発現が見られず、胚乳での発現も弱かった。地上部では維管束組織で強い発現が観察された。これまでに機能が解析されたOsYSL2、OsYSL15、OsYSL18が篩部で強く発現するのは異なり、地上部の導管周辺に強い発現が見られた。野生型イネは鉄欠乏処理3週後に植物体全体が鉄欠乏クロロシス症状を示したが、OsYSL16発現抑制イネは枯死した。OsYSL16は土壌からの「三価鉄-DMA」の吸収とともに、導管を介した「三価鉄-DMA」の根から地上部への長距離輸送と、導管から各組織への分配に重要なトランスポーターであると考えられる。

#### 第5章 鉄欠乏に応答した遺伝子の発現制御に関わるシスエレメントの予測

同調して発現調節を受ける遺伝子の上流配列に共通してみられる配列を見つけ出し、*in silico*で新規シスエレメントを予測するメソッドが10年以上開発されてきた。しかし、これらはいまだに高等真核生物ではほとんど役に立たない。植物における実験によって同定された既知の鉄欠乏応答性シスエレメントも、既存のメソッドでは抽出されてこなかった。本研究ではマイクロアレイ解析の結果を用いて、シスエレメントを予測する新たなメソッドを開発し、MAMA(Microarray associated motif analyzer)と名付けた。このメソッドでは、配列の類似性とマイクロアレイ解析における遺伝子発現プロファイルから導くスコアを基にして、シスエレメントの予測をする。MAMAではシスエレメントをモチーフと呼ぶ配列グループとして予測する。このメソッドをイネ、シロイヌナズナ、ヒトに適用したところ、使用したデータに応じた既知のシスエレメントが抽出され、さらにいくつかの新たなシスエレメント候補が予測された。これらの予測されたモチーフの多くは、それぞれの条件下で発現調節を受けていると考えられる遺伝子上流で、強い共局在性を示した。さらに、モチーフ間の距離が非常に高く保存されているものがあつた。以上から、予測されたモチーフと、そのモチーフ同士の距離が、遺伝子発現の制御に重要であることが示唆された。亜鉛欠乏イネの根のマイクロアレイデータをMAMAに適用した。予測された亜鉛欠乏応答性シスエレメント候補の1つは、今年、亜鉛欠乏応答性シスエレメントであることが証明された。MAMAは高等真核生物の新規シスエレメントの予測ができる実践的なプログラムである。

## 第6章 総合討論

植物は鉄ホメオスタシスの維持のために、複雑な鉄の吸収・輸送機構を発達させてきたことが明らかになってきている。本研究においてもその機構の巧妙さを裏付けるように、多くの因子が相互に組み合わされている様子がみられた。

イネでは鉄や亜鉛の土壌からの吸収と、種子までの長距離輸送に NA、DMA を用いた機構が存在すると考えられた。長距離輸送の中でも本研究では特に、導管を介した鉄の輸送について多くのことが明らかとなった。イネには導管において「三価鉄-DMA」と、OsYSL16 によって鉄を輸送する機構がある。また、フェノール性物質と PEZ1 もイネの導管を介した鉄の輸送に重要であることが示唆された。これまでにイネの導管での鉄の輸送にはクエン酸が重要であることが知られており、イネの導管を介した鉄の輸送においては NA、DMA、フェノール性物質、クエン酸などの様々な金属キレーターが組み合わさって機能することが明らかとなった。

またフェノール性物質は、イネ科以外の植物が根から鉄を吸収する際に重要であることが知られている。イネの根からの鉄吸収に重要である DMA は導管を介した鉄の輸送にも重要であった。根において土壌溶液中から三価鉄-DMA を吸収するトランスポーター OsYSL15 に対して、OsYSL16 は導管液から三価鉄-DMA を細胞内に吸収する際に機能すると考えられる。イネの導管を介した鉄輸送に機能する PEZ1 についても、根において機能する相同タンパク質が存在する可能性が考えられる。フェノール性物質はイネ科以外の植物の根からの鉄吸収に重要であることは 20 年以上前に発見されているが、その排出を担うトランスポーターはいまだ見つかっていない。イネ科以外の植物では PEZ1 の相同タンパク質がフェノール性物質を排出する可能性が考えられる。

鉄ホメオスタシスに関わる遺伝子の鉄欠乏に応答した発現のために、いくつかのシスエレメントが重要であることが知られていた。しかし、これらのシスエレメントは誘導性でない遺伝子の上流にも多く存在し、どのような条件で遺伝子が強く発現誘導されるのかはわかっていなかった。既に明らかにされていた 3 つのエレメントを含め、いくつもの予測シスエレメントが鉄欠乏誘導性遺伝子の上流配列に特異的に、同時に存在しており、さらにそれらの間の距離が共通していた。したがって、鉄欠乏に応答した遺伝子発現の強化では、これらのシスエレメントが複数組み合わせることで下流の遺伝子の発現が制御されることが示唆された。