

植物の鉄栄養の研究 ～不良土壌の緑化を目指して～

野副 朋子

はじめに

鉄はすべての生物にとって必須な元素である。植物は土の中に存在する鉄を根から吸収して利用する。鉄は地殻中に約6%と豊富に存在するが、その大部分が水に溶けにくい難溶性三価鉄として存在する。特に世界の陸地の約30%を占める不良土壌である石灰質土壌では、土壌pHがアルカリ性のため、ほとんどの鉄が水に溶けていない。そのため、植物は深刻な鉄欠乏症状を呈し、収量は激減する。筆者らは植物の鉄欠乏耐性能力を向上し、不良土壌でも生育可能な植物の開発を目指して研究を行ってきた。本報告では、イネやトウモロコシなどの主要な穀類の属するイネ科植物が土壌中の難溶性三価鉄を獲得するために根から分泌するムギネ酸類の分泌機構について述べる。

ムギネ酸類とは

「ムギネ酸類 (mugineic acid family phytosiderophores; MAs)」は1976年、岩手大学名誉教授、高城成一博士により鉄欠乏オオムギの根から分泌される鉄溶解性物質として発見されたムギネ酸 (MA) とその類縁体の総称である。MAsはイネやトウモロコシなどの主要な穀類の属するイネ科植物特有の三価鉄キレーターである。イネ科植物は、土壌中の難溶性三価鉄を獲得するために、根からMAsを分泌する。根圏へと分泌されたMAsは、土壌中の難溶性の三価鉄をキレートして可溶化する。イネ科植物は、「三価鉄-MAs」錯体として鉄を根から吸収する。MAsは鉄だけでなく亜鉛や銅などの金属とも錯体を形成し、植物体内におけるこれら金属の輸送に関与している。また、MAs生合成経路の中間物質であるニコチアナミン (NA) は、イネ科植物だけでなくこれまで調べられた全ての植物において合成され、植物体内における金属の輸送に関与している。MAsの分泌量はオオムギ>コムギ・ライムギ>エンバク≫トウモロコシ≫ソルガム≫イネの順であり、経験的に知られてきたこれらの作物種の鉄欠乏耐性の強さの順序と一致している。つまり、MAsの合成量及び分泌量を向上できれば、植物の鉄欠乏耐性を増強できると期待される。MAsによるイネ科植物の鉄獲得機構の全容解明を目指して研究が行われてきた。

ムギネ酸類分泌トランスポーターTOM1の発見

ムギネ酸類の発見以降、イネ科植物の鉄獲得機構の全容解明を目指して精力的に研究が進められてきた。しかし、ムギネ酸類分泌の分子メカニズムは長い間未知のままであり、特にムギネ酸類分泌を担う膜輸送体はその単離・同定を目指して世界中の研究者がしのぎを削って研究を行ってきた。筆者はイネ科植物の鉄獲得に関わる主要な分子のうち最後まで未解明だったムギネ酸類分泌を担う膜輸送体の単離・同定に成功した (Nozoye et al. 2011; 野副ら2014)。鉄欠乏処理によりその発現が誘導される遺伝子群からムギネ酸類分泌膜輸送体候補遺伝子を4つに絞り込み、アフリカツメガエル卵母細胞において、¹⁴C-S-アデノシルメチオニンから合成した¹⁴C-デオキシムギネ酸 (DMA) およびその前駆物質¹⁴C-ニコチアナミン (NA) の分泌活性を調べた。4つの候補遺伝子のうち1

つが¹⁴C-DMA分泌活性を、2つが¹⁴C-NA分泌活性を示したことから、それぞれムギネ酸類分泌膜輸送体TOM1、ニコチアミン分泌膜輸送体ENA1、ENA2と名づけた。オオムギからTOM1相同性遺伝子 (*HvTOM1*) を単離し、その翻訳産物は¹⁴C-DMA分泌活性があることを示した。*TOM1*、*HvTOM1* の発現はいずれも鉄欠乏の根において強く誘導され、ムギネ酸類生合成酵素遺伝子の発現 (Nozoye et al., 2004) と同様に日周変動を示した。*TOM1*過剰発現イネ、*TOM1*発現抑制イネを作出し、ムギネ酸類の分泌は*TOM1*の発現量と正の相関があることを明らかにした。また、ムギネ酸類を分泌できないトウモロコシ自然突然変異体*ys3*を解析し、トウモロコシ*TOM1*相同性遺伝子*ZmTOM1*の発現が*ys3*では野生型株に比べて激減していることを見出した (Nozoye et al. 2013)。*ys3*における*ZmTOM1*の転写産物にはイントロンや塩基の挿入が存在した。これにより*ZmTOM1*が*ys3*表現型の原因遺伝子であることが強く示唆された。ムギネ酸類の発見から35年、ついにムギネ酸類を用いた鉄獲得機構の役者が全て出揃った。

ムギネ酸顆粒の研究

ムギネ酸類分泌の行われる夜明け前の根細胞では粗面小胞体由来の顆粒が細胞膜近傍に蓄積している様子が観察される。そこで、ムギネ酸類はムギネ酸顆粒と名づけられたこの顆粒内で合成され、分泌されるまで顆粒内に蓄えられているという仮説が立てられた (Nozoye et al., 2004)。ムギネ酸顆粒は日の出前に細胞内小胞輸送システムにより細胞膜付近に移動し、その後一気に分泌されると推測されている。ムギネ酸類がムギネ酸顆粒で合成されているとすると、ムギネ酸類生合成に関わる酵素はムギネ酸顆粒に局在すると考えられる。ムギネ酸類生合成経路で働くNA合成酵素OsNAS2とsGFPの融合タンパク質は細胞内で活発に動く顆粒に局在することを明らかにした (Nozoye et al. 2014a,b)。ムギネ酸類はこれらの顆粒で生合成されると考えられる。NA合成酵素に保存されている二つの細胞内小胞輸送配列に変異を導入した実験から、OsNAS2の顆粒への局在、及び顆粒の動きがムギネ酸類の合成量及び分泌量に関与していることを見出した。

NAを高蓄積するダイズの創製

ダイズ種子はしょうゆの原料であるが、しょうゆに血圧降下作用があり、その機能物質がダイズ種子中に含まれるNAであることが報告された。ダイズ種子のNA含量は高く、イネなどの他の作物に比べて10倍ものNAが含まれている。このNA含量をさらに高めることができれば高血圧予防に有効なダイズが作出できる。筆者はダイズのNA合成酵素遺伝子の発現を高め、NA含量の高いダイズの作出を目指した。アグロバクテリウムを用いたダイズの形質転換技術はその効率の低さから一般的に普及していない。そんな中、アメリカミネソタ大学のポーラ・オルファット博士が形質転換効率を16%まで高める方法を開発したという論文を発表した (Olhott et al., 2002)。筆者はポーラ博士からダイズの形質転換を習得するべく、2006年の6月にミネソタ大学に滞在した。ミネソタ大学

での滞在期間は約2週間と短かったため、感染法をメインに習い、その後の過程はポーラ博士が行っている形質転換の様々なステージを見させてもらうという料理番組のような習い方だった。楽しいアメリカ滞在を終え帰国した筆者は、ダイズの形質転換を開始した。日本で行ってみると、アメリカで習ったのと同じように行っても、アメリカで習ったようにはうまくいかず、色々な条件検討をしながら悪戦苦闘する日々が続いた。形質転換開始から7年目、ようやくオオムギのNA合成酵素遺伝子*HvNAS1*を高発現する形質転換ダイズを得ることができた。*HvNAS1*過剰発現ダイズは、種子中のNA含量が非形質転換ダイズの約4倍の768.1 $\mu\text{g/g DW}$ に高まった。種子中の鉄・亜鉛含量も非形質転換の約2倍に増加した。また、*HvNAS1*過剰発現ダイズは石灰質土壌における鉄欠乏に耐性を示した (Nozoye et al., 2014c)。

おわりに

筆者は本年度、明治学院大学に着任した。明治学院大学は文系大学であるため研究設備が十分であるとはいえずどのように研究を継続していくか模索している。ただ近年のバイオテクノロジーの発展は目覚ましく、文系大学の学生といえども生物学・生命科学に関する知識を身に付ける必要があると考える。本報告で述べたTOM1やENA1に似た仲間、TOM・ENAファミリーが植物には存在しており、それぞれ重要な働きを担っていると考えられる。筆者は現在TOM・ENAファミリーの解析を進めており、TOMファミリーの一つであるTOM2が植物体内の金属輸送に関与し、植物の生育に必須であることを見出した (Nozoye et al., 2015)。これからも自らが最先端の研究を行い、その知識を学生に還元していけるようにしたい。今年度は様々な受賞を受けることができた。また私生活では子どもが誕生した。出産に際しては様々な方々に温かいご支援を賜った。これらの受賞やご助力を糧にして少しでも役に立つ研究を展開していけるように精進していきたい。

参考文献

- 野副朋子, 中西啓仁, 西澤直子2014「ムギネ酸トランスポーターの発見」、化学と生物、vol.52、No.1 p15～22
- Nozoye, T., Tsunoda, K., Nagasaka, S., Bashir, K., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nakanishi, H. and Nishizawa, N.K., 2014a. Rice nicotianamine synthase localizes to particular vesicles for proper function. *Plant Signal Behav.* 4, 9.
- Nozoye, T., Nagasaka, S., Bashir, K., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nakanishi, H. and Nishizawa, N.K., 2014b. Nicotianamine synthase 2 localizes to the vesicles of iron-deficient rice roots, and its mutation in the YXX ϕ or LL motif causes the disruption of vesicle formation or movement in rice. *Plant J.* 77, 246-260.
- Nozoye, T., Kim, S., Kakei, Y., Takahash, M., Nakanishi, H. and Nishizawa, N.K., 2014c. Enhanced

levels of nicotianamine promote iron accumulation and tolerance to calcareous soil in soybean. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. **22**, 1-8.

Nozoye, T., Nakanishi, H. and Nishizawa, N.K., 2013. Characterizing the crucial components of iron homeostasis in the maize mutants *ys1* and *ys3*. *PLoS One*. **8**, e62567.

Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Takahashi, M., Sato, Y., Uozumi, N. and Nishizawa, N.K., 2011. Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *J. Biol. Chem.*, **18**, 5546-5554. (* :equal contribution)

Nozoye, T., Itai, R.N., Nagasaka, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K., 2004. Diurnal changes in the expression of genes that participate in phytosiderophore synthesis in rice. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **50**, 1125-1131.

本年度の業績

受賞

第33回日本土壌肥料学会奨励賞 「ムギネ酸類分泌の分子機構に関する研究」

平成27年度（第14回）日本農学進歩賞 「ムギネ酸類分泌の分子機構に関する研究」

(公財)浦上食品・食文化振興財団 財団設立30周年記念研究助成（研究室立上支援）「植物工場における作物の品質向上を目指した、ムギネ酸類・ニコチアナミン分泌を介した鉄移行と鉄恒常性維持の分子メカニズムの解明」

科研費若手研究（B）「ムギネ酸類・ニコチアナミン分泌を介した鉄移行と鉄恒常性維持の分子メカニズムの解明」

論文

Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Sato, Y., Uozumi, N., Nakanishi, H. and Nishizawa, N.K., 2015. The Phytosiderophore Efflux Transporter TOM2 Is Involved in Metal Transport in Rice. *J Biol Chem*. **290**, 27688-27699.

プレスリリース：植物の生育に必要な金属輸送に関与するタンパク質の発見TOM2は植物体内の金属輸送を担う：<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/identification-of-a-crucial-metal-transporter-for-plant-growth.html>

Identification of a crucial metal transporter for plant growth TOM2 involved in metal translocation within plants:<http://www.u-tokyo.ac.jp/en/utokyo-research/research-news/identification-of-a-crucial-metal-transporter-for-plant-growth.html>