

ムギネ酸類分泌の分子機構に関する研究

野副 朋子 (明治学院大学教養教育センター、東京大学大学院農学生命科学研究科)

nozoyet@gen.meijigakuin.ac.jp, atom1210@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

「ムギネ酸類 (mugineic acid family phytosiderophores; MAs)」は土壤中から必須元素である鉄を獲得するためにイネ科植物が根から分泌する三価鉄キレートである。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¹⁾。ムギネ酸類の合成量及び分泌量は植物の鉄欠乏耐性能と正の相関があるため、植物のムギネ酸類合成・分泌量を高めることができれば植物の鉄欠乏耐性能力を向上できると期待される。そのため、ムギネ酸類を用いた植物の鉄獲得機構の全容解明を目指し研究が行われてきた。本稿では本研究により明らかになったムギネ酸類分泌の分子機構とその応用展開について述べる。

はじめに

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三価鉄として存在している。特に石灰質土壌のようなpHの高い不良土壌中では、ほとんどが水に溶けない状態で存在している。石灰質土壌で生育した植物は、鉄を十分に吸収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収量が激減し、深刻な場合は枯死する。石灰質土壌は世界の陸地の約30%を占めるため農業上深刻な問題となっており、鉄欠乏耐性能力の高い作物の開発が望まれる。また、鉄は植物だけでなく人にとっても必須な元素である。人は食べ物から鉄を獲得するが、究極的にはこれらは植物が土の中から吸収して可食部へと蓄えたものに由来する。作物の可食部の鉄含量を高めることができれば人の健康に寄与できると期待される。そのため、可食部への鉄の輸送機構の全容解明が求められる。

植物は水に溶けにくい鉄を土壌から獲得するために様々な適応戦略を進化させてきた。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は土壌中の鉄を獲得するためにムギネ酸類を根から分泌する。根圏へ分泌されたムギネ酸類は土壌中の難溶性三価鉄をキレートして可溶化する。イネ科植物は三価鉄・ムギネ酸類錯体の形で根から鉄を獲得する。ムギネ酸類は植物体内における三価鉄の輸送にも関与している^{2,3)}。また、ムギネ酸類生合成の中間物質であるニコチアミンも、植物体内で二価鉄と錯体を形成し、種子への金属輸送など植物体内の金属輸送を担っている。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、ムギネ酸類やニコチアミン分泌の分子機構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。本研究では鉄欠乏耐性作物の創製を最終目標とし、植物の鉄獲得機構の全容解明を目指してきた⁴⁾。

ムギネ酸類分泌トランスポーターTOM1の発見

オオムギにおいてムギネ酸類分泌は日の出後3~4時間で一気になされるという明確な日周変動を示す⁵⁾。また、ムギネ酸類分泌は等モルのカリウムの放出を伴い、アニオンチャネル阻害剤によって阻害されたことから、ムギネ酸類は一価のアニオンとして放出されると示唆された⁶⁾。

このことから、濃度勾配に伴う受動的な輸送ではなく、何らかのトランスポーターがムギネ酸類の分泌を担っているであろうことは以前から想定されてきた。しかし、ムギネ酸類がどのように分泌されるのかは長い間謎のままだった。本研究で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 TOM1 の単離・同定に成功した⁷⁾。ムギネ酸類生合成酵素遺伝子や三価鉄・ムギネ酸類錯体吸収トランスポーター *YSI* 遺伝子の発現は鉄欠乏処理により強く誘導される⁸⁾ため、ムギネ酸類分泌を担うトランスポーターも鉄欠乏により発現が誘導されると考えた。そこで、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-デオキシムギネ酸およびその前駆物質 ¹⁴C-ニコチアミンの分泌活性を調べた。4 つの候補遺伝子のうち 1 つが ¹⁴C-デオキシムギネ酸分泌活性を、2 つが ¹⁴C-ニコチアミン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 Transporter Of MAs 1 (TOM1)、ニコチアミン分泌膜輸送体 Efflux transporter of Nicotianamine (ENA) 1、2 と名づけた。さらにオオムギから *TOM1* と相同性の高い遺伝子をコロニーハイブリダイゼーションにより単離し、その翻訳産物が ¹⁴C-デオキシムギネ酸放出活性を示すことも見出した (HvTOM1)。*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⁹⁾と同様に日周変動を示した。タマネギの表皮細胞、イネの根の細胞において TOM1 と緑色蛍光タンパク質 sGFP との融合タンパク質は細胞膜に局在したことから、TOM1 は根の細胞から根圏へとデオキシムギネ酸を分泌するトランスポーターであると考えられた。*TOM1* を過剰発現させたイネ、*TOM1* の発現を抑制したイネをそれぞれ作出して、根から分泌されるデオキシムギネ酸量を調べたところ、*TOM1* 過剰発現イネではデオキシムギネ酸分泌が高まり、*TOM1* 発現抑制イネではデオキシムギネ酸分泌が減少した。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。

yellow stripe 3 (*ys3*)は通常条件で生育した場合でも葉脈間クロロシスなどの典型的な鉄欠乏症状 (*yellow stripe*) を示すトウモロコシの自然突然変異体であり、その原因はムギネ酸類を分泌できないためであることが示されていたが、原因遺伝子は特定されていなかった。そこで、マイクロアレイ解析により *ys3* を解析し、トウモロコシの *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¹⁰⁾。さらに *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することを見出した。*ZmTOM1* は第 3 染色体の *ys3* の変異が位置するとされる領域に含まれており、*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¹¹⁾。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。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、ムギネ酸顆粒から細胞質へとムギネ酸類が分泌された後、一気に細胞外へ分泌されると推測されている⁹⁾。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。この仮説を検証するため、イネのニコチアミン合成酵素 *NAS* 遺伝子 (*OsNAS2*) と *sGFP* との融合遺伝子 (*OsNAS2-sGFP*) をイネに導入し、その細胞内局在を調べた。*NAS* は膜 2

回貫通型のタンパク質であり、ムギネ酸顆粒の膜に局在すると考えられる。また NAS の N 末端には極性輸送に関わるとされるダイロイシン (LL) とチロシンモチーフ (YXXΦ) のアミノ酸配列が存在し、ムギネ酸顆粒の細胞内小胞輸送に関与していると推測される。*OsNAS2-sGFP* 導入イネの解析により、*OsNAS2-sGFP* 融合タンパク質はイネの根細胞において細胞内をダイナミックに動く顆粒に局在することを明らかにした¹²⁾。これによりイネでは少なくともニコチアナミン合成までは顆粒で行われていると考えられた。また、*OsNAS2* タンパク質に存在するチロシンモチーフに変異を導入すると *OsNAS2-sGFP* 顆粒の動きが阻害されることを見出した。このことから *OsNAS2-sGFP* 顆粒の動きにはチロシンモチーフを介した細胞内小胞輸送機構が関与する可能性が示唆された。さらに、*OsNAS2-sGFP* 顆粒の小胞輸送が植物の鉄恒常性に関与している可能性を見出した¹³⁾。*OsNAS2-sGFP* 導入イネではニコチアナミンが高蓄積し、鉄欠乏誘導性遺伝子群が鉄十分条件にも高発現していた。一方、チロシンモチーフ変異型 *OsNAS2-sGFP* 導入イネでは融合タンパク質に活性があるにも関わらず、ニコチアナミンの高蓄積は認められず、鉄恒常性にも変化は認められなかった。以上から、イネではムギネ酸類やニコチアナミンが顆粒で合成され、小胞輸送により適切な場所へ輸送されることが、鉄の恒常性維持に必要であると考えられた。ニコチアナミンが鉄欠乏シグナル物質として機能することは以前から示唆されていたが¹⁴⁾、その分子機構は明らかにされていない。ムギネ酸顆粒やその小胞輸送は、TOM1 や ENA1 を介したムギネ酸類やニコチアナミンの分泌だけでなく、鉄恒常性維持にも関与していると考えられ、非常に興味深い。今後、ムギネ酸顆粒の小胞輸送をさらに解析することにより、ムギネ酸類の分泌機構のみならず、ムギネ酸類やニコチアナミンを介した鉄恒常性維持の分子メカニズム解明の突破口となる事が期待される。

高ニコチアナミンダイズの作出

ダイズはアミノ酸や脂質に富む機能性作物として重要であるが、鉄欠乏耐性能力が低い。特にアメリカにおけるダイズの鉄欠乏は農業上深刻な問題となっている。また、ダイズの形質転換効率は非常に低く、一般にあまり普及していない。本研究では約 10 年前よりアグロバクテリウム形質転換法によりダイズにオオムギのニコチアナミン合成酵素遺伝子 *HvNAS1* を導入するべく研究を継続してきた。ニコチアナミンはこれまで調べられた全ての植物に存在し、植物体内での鉄の輸送に関与しており、ニコチアナミンの高蓄積により鉄含量が高まると考えた。またニコチアナミンは人の血圧降下作用を示すことが報告されているため、ニコチアナミンを豊富に含む食品は高血圧予防に効果的であると期待される。本研究ではアグロバクテリウムを用いたダイズ子葉の形質転換技術を確認するとともに、*HvNAS1* を高発現するダイズの作出に成功した¹⁵⁾。形質転換ダイズ種子中のニコチアナミン含量は非形質転換体の 4 倍に高まった。ニコチアナミン含量は *HvNAS1* の発現量と正の相関を示し、ニコチアナミンの高蓄積は次世代の種子でも維持された。形質転換ダイズ種子の鉄含量は非形質転換体の約 2 倍に高まった。さらに形質転換ダイズは、鉄溶解度の低い石灰質アルカリ土壌において、非形質転換体に比べ鉄欠乏耐性を示した。

今後の展望

ムギネ酸類やニコチアナミンは鉄だけでなく亜鉛や銅、マンガンなどの金属と錯体を形成し、植物体内における金属の移行や可食部への金属の蓄積に関与する。細胞内においても、ムギネ酸類やニコチアナミンは細胞質から細胞内小器官や細胞外への金属輸送に関与していると考えら

れる。植物には *TOM1* や *ENAI* に相同性の高い遺伝子群、*TOM*・*ENA* ファミリーが存在する。*TOM*・*ENA* ファミリーは根圏へのムギネ酸類分泌だけでなく植物体内および細胞内におけるムギネ酸類やニコチアナミンの移行・輸送を担っている可能性が考えられる^{16,17}。また、ムギネ酸類やニコチアナミンは鉄欠乏シグナル物質として機能することが示唆されるが、その分子機構は明らかにされていない。私は、*TOM*・*ENA* ファミリーの植物における機能解析、*OsNAS2-sGFP* 顆粒の解析により、ムギネ酸類やニコチアナミン分泌の分子機構を解明し、植物におけるムギネ酸類やニコチアナミンを介した鉄移行、鉄恒常性維持機構を分子レベルで理解することを目指していきたい。

謝辞

日本農学進歩賞の受賞にあたっては、日本土壤肥料学会より推薦を賜りました。間藤徹会長をはじめ、ご支援いただきました原田靖生先生、犬伏和之先生および職員の皆様に深く感謝を申し上げます。本稿で紹介した研究内容は東京大学大学院農学生命科学研究科農学国際専攻新機能植物開発学研究室において西澤直子名誉教授（現石川県立大学教授）の指揮のもと行われました。また魚住信之教授（東北大学）には *Oocyte* 実験を、長村吉晃先生にはマイクロアレイ実験でお世話になりました。この場を借りて心から御礼申し上げます。以上の方々に加え、本研究の推進にあたりご協力くださいましたすべての方に、厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Takagi S.: *Soil Sci Plant Nutr* 45:993-1002 (1976).
- 2) Nozoye T., Inoue H., Takahashi M., Ishimaru Y., Nakanishi H., Mori S. and Nishizawa N.K. *Plant Mol Boil* 64:35-47 (2007).
- 3) Nozoye T., Takahashi M., Kitajima N., Fukuda N., Hokura A., Terada Y., Nakai I., Ishimaru Y., Kobayashi T., Nakanishi H., and Nishizawa N.K. *Plant and soil* 325:39-51(2009).
- 4) 野副朋子, 中西啓仁, 西澤直子: *化学と生物*, 52(1):15-22 (2014).
- 5) Takagi S., Nomoto K., and Takemoto T.: *J Plant Nutr* 7:469-477 (1984).
- 6) Sakaguchi T, Nishizawa N.K., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S.: *Plant and Soil* 215:221-227 (1999).
- 7) Nozoye T., Nagasaka S., Kobayashi T., Takahashi M., Sato Y., Uozumi N., and Nishizawa N.K. *J Biol Chem* 18:5546-5554 (2011).
- 8) Inoue H., Kobayashi T., Nozoye T., Takahashi M., Kakei Y., Suzuki K., Nakazono M., Nakanishi H., Mori S. and Nishizawa N.K. *J Biol Chem*, 284:3470-3479 (2009).
- 9) Nozoye T., Itai R.N., Nagasaka S., Takahashi M., Nakanishi H., Mori S. and Nishizawa N.K. *Soil Sci Plant Nutr* 50:1125-1131 (2004).
- 10) Nozoye T., Nakanishi H., and Nishizawa N.K. *PLoS One*, 8:e62567 (2013).
- 11) Nishizawa N. and Mori S. *J. Plant Nut* 10:1013-1020 (1987).
- 12) Nozoye T., Nagasaka S., Bashir K., Takahashi M., Kobayashi T., Nakanishi H. and Nishizawa N.K. *Plant Journal* 77:246-260(2014).
- 13) Nozoye T., Tsunoda K., Nagasaka S., Bashir K., Takahashi M., Kobayashi T., Nakanishi H., and Nishizawa, N.K. *Plant Signaling & Behavior* 4:9(2014).
- 14) Curie C and Briat J.F. *Ann Rev Plant Biol* 54:183-206(2003)..
- 15) Nozoye T., Kim S., Kakei Y., Takahashi M., Nakanishi H. and Nishizawa, N.K. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 22:1-8 (2014).
- 16) Bashir K, Nozoye, T., Ishimaru Y, Nakanishi, H. and Nishizawa, N.K. *Biotechnology Advance* 31:1624-1633(2013).
- 17) Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, Sato Y, Uozumi N, Nakanish H and Nishizawa NK. *J Biol Chem*. In press (2015).

Molecular mechanism of mugineic acid family phytosiderophores secretion

Tomoko Nozoye

(Meiji Gakuin University, The Center for Liberal Arts; The University of Tokyo, Department of Global Agricultural Sciences)

nozoyet@gen.meijigakuin.ac.jp, atom1210@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Abstract

Iron (Fe) is essential for all living organisms, including humans and plants. To acquire Fe in the soil, graminaceous plants produce and secrete mugineic acid family phytosiderophores (MAs) from their roots. MAs chelate and solubilize insoluble Fe hydroxide in the soil. Subsequently, plants take up Fe-MAs complexes through specific transporters on the root cell membrane. MAs and nicotianamine (NA), an intermediate of the MAs biosynthesis, are both important for the translocation of Fe in the plant body. In this study, we analyzed molecular mechanism of MAs secretion. We show that the efflux of deoxymugineic acid, the primary MAs from rice and barley, involves the *TOM1* and *HvTOM1* genes, respectively¹. We have also identified two genes encoding efflux transporters of nicotianamine, *ENA1* and *ENA2*. In addition, we analyzed *Yellow stripe 3* (*ys3*), the recessive mutants of maize (*Zea mays* L.) that show typical symptoms of Fe deficiency, and found that the expression level of a homolog of *TOM1* in maize decreased significantly in the *ys3* mutant, suggesting that *ZmTOM1* may be involved in the *ys3* phenotype². Our identification of MAs efflux transporters has revealed the final piece in the molecular machinery of iron acquisition in graminaceous plants. We also analyzed the particular vesicles that are speculated to be involved in MAs biosynthesis. We developed transgenic rice plants that express rice nicotianamine synthase (NAS) 2 (*OsNAS2*) fused to synthetic green fluorescent protein (*sGFP*) under the control of its own promoter^{3,4}. In root cells, OsNAS2:sGFP fluorescence was observed in a dot-like pattern, moving dynamically within the cell. This suggests that these vesicles are involved in MAs biosynthesis. Finally, we succeeded to produce the soybean plants overexpressing the barley NAS1 (*HvNAS1*) gene driven by the constitutive CaMV 35S promoter were produced using Agrobacterium-mediated transformation⁵. The NA content of transgenic soybean seeds was up to four-fold greater than that of non-transgenic (NT) soybean seeds and showed tolerance to low Fe availability in calcareous soil.

Reference

- 1 Nozoye T., Nagasaka S., Kobayashi T., Takahashi M., Sato Y., Uozumi N., and Nishizawa N.K. J Biol Chem 18:5546-5554 (2011).
- 2 Nozoye T., Nakanishi H., and Nishizawa N.K. PLoS One, 8:e62567 (2013).
- 3 Nozoye T., Nagasaka S., Bashir K., Takahashi M., Kobayashi T., Nakanishi H. and Nishizawa N.K. Plant Journal 77:246-260(2014).
- 4 Nozoye T., Tsunoda K., Nagasaka S., Bashir K., Takahashi M., Kobayashi T., Nakanishi H., and Nishizawa, N.K. Plant Signaling & Behavior 4:9(2014).
- 5 Nozoye T., Kim S., Kakei Y., Takahashi M., Nakanishi H. and Nishizawa, N.K. Bioscience Biotechnology Biochemistry 22:1-8 (2014).