

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 植物の鉄栄養制御

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

西澤 直子(東京大学大学院農学生命科学研究科 教授)

主たる共同研究者

樋口 恭子(東京農業大学生物応用科学科 講師)

三枝 正彦(東北大学大学院農学研究科 教授)

吉原 利一(電力中央研究所 我孫子研究所 主任研究員)(~平成16年3月)

Nam-Hai Chua(ロックフェラー大学植物分子生物学研究室 教授)(~平成15年3月)

高岩 文雄((独)農業生物資源研究所新生物資源創出研究グループ チーム長)(~平成15年3月)

3. 研究内容及び成果:

3-1. 研究内容

石灰質アルカリ土壌における鉄欠乏に耐性の作物を分子育種することによって、食糧の増産と砂漠の緑化に貢献することを第一の目的とした。同時に、それを可能にするための基礎研究として植物の鉄栄養制御の分子機構を明らかにすることを目指した。第二に、世界に37億人と推定される鉄欠乏性貧血症を改善する機能性食品としての、鉄含有量の高いコメを創製することに挑戦した。最終的に消費者の懸念を払拭するためにマーカー遺伝子を除去した、安心感のある形質転換作物を作出するために、マーカー遺伝子を除去できるベクターの構築を目指した。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

3-2. 研究成果

3-2-1. 石灰質アルカリ土壌耐性イネの開発

○ムギネ酸類生合成経路中の主要酵素であるニコチアナミンアミノ基転移酵素(NAAT)のオオムギゲノム遺伝子を導入した鉄欠乏耐性イネに加えて、オオムギのムギネ酸類生合成系の酵素遺伝子を複数組み合わせ導入した、形質転換イネを新たに作成した。隔離温室における石灰質アルカリ土壌でのポット試験の結果、これらの形質転換イネはいずれも鉄欠乏耐性を示した。(西澤グループ、吉羽グループ)

○東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター内の隔離圃場で、鉄欠乏耐性を検定した。黒ボク土壌水田においては、非形質転換イネと形質転換イネとの生育に明瞭な差は見られず、双方共に良好に生育した。一方、石灰質アルカリ土壌水田では、非形質転換イネと形質転換イネとの間に、顕著な生育の差が観察され、ムギネ酸類合成能を強化した形質転換イネの鉄欠乏耐性が、圃場レベルでも証明された。(西澤グループ、三枝グループ)

3-2-2. 鉄欠乏応答性シスエレメントの同定とトランス因子の探索

○オオムギのIDS2(ムギネ酸類のアゼチジン環の水酸化酵素遺伝子)のプロモーター領域から、2つの鉄欠乏応答性シスエレメント、IDE1、IDE2を同定した。これにより、鉄欠乏を感知して発現が誘導される遺伝子のプロモーター領域に存在する、鉄欠乏応答性シスエレメントを世界で最初に同定することに成功した。鉄に限らず、微量必須元素欠乏応答性のシスエレメントの同定としても初めての例である。(西澤グループ、吉原グループ)

○また、IDE1と相同性のある配列が、オオムギ、イネ、シロイヌナズナで報告されている多くの鉄欠乏誘導性遺

伝子のプロモーターに存在することが明らかになり、鉄欠乏誘導性のシスエレメントが多くの遺伝子や植物種において保存されている可能性が示された。(西澤グループ)

○マイクロアレイ解析により、さらに多くの鉄欠乏誘導性の遺伝子群をイネから同定した。これらの鉄欠乏誘導性遺伝子のプロモーター領域には、IDE1、IDE2と相同性の高い配列が高頻度に存在することを明らかにした。この結果から、イネは鉄吸収に関わる多数の鉄欠乏誘導性遺伝子の発現を、IDE1、IDE2が関与する共通のメカニズムによって制御していると考えられた。さらに、IDE1、IDE2の配列を基本にしてイネ用の強力な鉄欠乏誘導性合成プロモーターを開発した。(西澤グループ)

○IDE1、IDE2と相互作用するタンパク質を同定するために、IDE1、IDE2の配列を用いて、酵母のワンハイブリッド法によりトランス因子を単離する作業を行った。その結果、IDE1、IDE2、それぞれに結合する2つのトランス因子を同定した。(西澤グループ)

○鉄欠乏初期に顕著に発現が誘導されるbHLH型転写因子をイネとオオムギから単離し、IRO2と命名した。IRO2は転写アクチベーターとして機能した。IRO2の結合配列を決定したところIDE1、IDE2とは異なっていたが、いくつかの鉄吸収に関わる遺伝子の発現を制御しており、また複数の鉄欠乏誘導性転写因子の発現も制御していた。(西澤グループ)

○OsIRO2自身は上流にIDEsに相同性の高い配列を持つことから、鉄欠乏時において次のような遺伝子発現制御ネットワークが想定される。まずIDEs結合性転写因子が、OsIRO2のプロモーター領域に存在するIDEsに作用してOsIRO2の発現を誘導し、発現量が増加したOsIRO2が、さらにその下流の鉄欠乏誘導性転写因子や、鉄吸収に関わる遺伝子の発現を誘導するというカスケードである。(西澤グループ)

### 3-2-3. ニコチアナミンの機能解明とその応用

○オオムギの7つのニコチアナミン合成酵素遺伝子に加えて、新たにイネから3つ、トウモロコシから3つ、またイネ科には属さないシロイヌナズナから4つのニコチアナミン合成酵素遺伝子を単離した。(西澤グループ)

○ニコチアナミンアミノ基転移酵素を過剰発現させることにより、内生ニコチアナミンが消費され、ニコチアナミン欠損となった形質転換タバコを用いて、ニコチアナミンが鉄、亜鉛、マンガンなどの金属栄養素の体内輸送において必須であること、また細胞内の金属輸送にも関与する可能性を明らかにした。逆にニコチアナミン合成酵素遺伝子を過剰発現させることにより、ニコチアナミンの生合成量が増加した植物では、種子中の鉄や亜鉛含量が増加することを見いだした。また、これらのニコチアナミン高生産植物は重金属過剰に対して強い耐性を示し、ファイトレメディエーションに応用可能であることを明らかにした。(西澤グループ)

○イネの3種類のニコチアナミン合成酵素遺伝子が、篩部伴細胞を始めとする長距離輸送に関わる細胞で発現していることを明らかにし、ニコチアナミンはイネにおいてムギネ酸類の前駆体として寄与するだけでなく、鉄の長距離輸送にも関与する可能性を示した。イネにもシロイヌナズナにも「金属・ニコチアナミン」トランスポーターが存在することを考え合わせると、土壌からの鉄の吸収機構が異なるイネ科植物とそれ以外の植物においても、ニコチアナミンを介する同一の機構によって鉄の体内長距離輸送が行われていると考えられる。すなわち、ニコチアナミンは、すべての高等植物において金属イオンの体内輸送に必須の物質であることが明らかになった。(西澤グループ)

○さらにニコチアナミンにはアンジオテンシン変換酵素の阻害効果があり、血圧降下作用を示すことが明らかになったので、機能性食品として、ニコチアナミンを大量に含むニコチアナミン米とニコチアナミン酵母を開発した。イネ種子中のニコチアナミン含有量が約5倍になった系統が得られた。ニコチアナミンを高生産する酵母を作出した。(西澤グループ、高岩グループ)

### 3-2-4. 鉄ムギネ酸類トランスポーター、鉄ニコチアナミントランスポーターの同定

○イネのゲノム上に18個の「鉄・ムギネ酸類」トランスポーター相同性遺伝子(OsYSL)を同定した。それらのうち、OsYSL2は根における土壌からの「鉄・ムギネ酸類」取り込みに関与するトランスポーターではなく、ムギネ酸類生合成前駆体であるニコチアナミンと金属との錯体「鉄・ニコチアナミン」と「マンガン・ニコチアナミン」のトランスポーターであり、鉄やマンガンの長距離輸送と種子中への蓄積に関与することを明らかにした。OsYSL2は、生物界において初めて同定された「金属・ニコチアナミン」トランスポーターである。(西澤グループ)

○さらにOsYSL15が「鉄・ムギネ酸類」トランスポーターであり、土壌からの「鉄・ムギネ酸類」吸収と種子への鉄集積に関わることを明らかにした。(西澤グループ)

### 3-2-5. イネ二価鉄イオントランスポーターの同定と新規鉄欠乏耐性イネの作出

○鉄欠乏のイネの根において、OsIRT1が二価鉄イオンの吸収に関与していることを明らかにした。水田においては、アルカリ土壌の場合を除いて根圏に二価鉄イオンが豊富に存在する。そのような環境では、イネは二価鉄イオントランスポーターによっても鉄を吸収すると考えられる。すなわち、イネは「二価鉄イオン」と「鉄・ムギネ酸類」の2つの形態で鉄を吸収すると考えられた。(西澤グループ)

○この新知見に基づき、進化工学的に完全合成した、高pHでも酵素活性の高い改変型三価鉄還元酵素遺伝子(refre1-372)を導入することにより、石灰質アルカリ土壌における鉄欠乏に耐性のイネを新規に開発することに成功した。さらにOsIRT1はカドミウムを吸収することも明らかにし、鉄欠乏を回避することによって、イネのカドミウム吸収を抑制できる可能性を示した。(西澤グループ)

### 3-2-6. デオキシムギネ酸合成酵素遺伝子の単離

○ムギネ酸類合成経路上に、唯一未解明のまま残されていた、デオキシムギネ酸を生成する酵素の遺伝子、デオキシムギネ酸合成酵素遺伝子を、イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシから単離した。これにより、ムギネ酸類合成経路上のすべての酵素の遺伝子を同定することに成功した。(西澤グループ)

### 3-2-7. 超高鉄含有米の作出

○ダイズフェリチン遺伝子と共に、ムギネ酸類の生合成に関わるオオムギの遺伝子をイネに導入し、イネの鉄吸収・転流能力を向上させることにより、超高鉄含有米を作出することを試みた。種子中の鉄含量が非形質転換イネより高い形質転換イネが得られた。(西澤グループ、高岩グループ、吉原グループ)

### 3-2-8. 関連基盤技術の開発

○数十キロ塩基対を安定して植物に導入することが可能なイネ用ベクターに、ロックフェラー大学グループが開発したDNAリコンビネーションシステムを応用することにより、「新規大容量イネ用マーカーフリーベクター」を開発した。このベクターを用いて新たに鉄欠乏耐性イネ、超高鉄含有米創製のための形質転換イネを作出した。(西澤グループ、Nam-Hai Chuaグループ)

○LC/ESI-TOF-MSによる新規のニコチアナミン高感度測定法の開発に成功し、微量試料中のニコチアナミン含量測定が可能となった。同時に、この手法を用いてデオキシムギネ酸の高感度測定も可能となった。(西澤グループ)

○元素の移行を非破壊的にリアルタイムで計測できるPETIS(Positron Emitting Tracer Imaging System)の手法を確立したことにより、生体内の鉄の吸収と移行の動態を明らかにすることに成功した。(西澤グループ)

## 4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待・口頭・ポスター		報道	特許	
国内	国外	国内	国外		国内	海外
15	91	112	80	6	9	2

○論文発表された雑誌(IF)に関しては、必ずしも全てが極めて高いとは言えないが、着実に成果を積み重ね、十分な研究発表がなされていると評価する。

○ムギネ酸類の代謝工学に必要な遺伝子に加え、金属イオントランスポーター、鉄欠乏応答性シス因子、鉄欠乏応答性トランス因子等の特許出願がなされていることは、今後の実用化の可能性も含め評価できる。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

○総合的には、アルカリ土壌において生育する形質転換イネの作出と圃場でのアルカリ土壌耐性の確認という当初の目的に加え、植物の金属元素輸送におけるニコチアナミンの必須性の解明、ニコチアナミンの生理的機能など、多くの成果が出ている。具体的には、以下のような点が評価された。1)アルカリ土壌において生育する形質転換イネの作出と圃場でのアルカリ土壌耐性の確認は当初の目的を達成したものである。今後の農業、環境保全に大きなプラス効果をもたらすものと期待される。2)基礎的な成果がベースにあった上での研究発展であるが、分子育種に応用できる遺伝子(鉄欠乏応答性シスエレメントやトランス因子、トランスポーター等)の単離ができています。3)鉄欠乏誘導遺伝子の発現制御機構の解明、植物の金属元素輸送におけるニコチアナミンの必須性の解明、イネの2価鉄イオントランスポーターならびに、鉄-ニコチアナミントランスポーターや鉄-デオキシムギネ酸トランスポーターの同定と機能解析など、多くの成果を得ている。4)形質転換イネを圃場で栽培し、自らの研究作業仮説を証明する等、現場を考えた研究態度は高く評価できる。

○科学技術への貢献に関しては、確実に研究成果を積み重ねたという点は評価できる。具体的には、イネ科のみがもつ鉄獲得機構であるムギネ酸類を介した鉄イオンの吸収から出発し、植物全体に共通する金属元素の輸送機構の解明へと発展させたことは自然科学の発展に貢献するインパクトのある成果である。また、その科学的成果をうまく利用して、圃場試験まで含めて分子育種の有効性(GM植物の有効性)を示し、鉄欠乏耐性植物(作物)の育成の基盤を築いた点は高く評価できる。耕作適地の減少が世界的規模で顕在化しつつある現状では、その対応策として重要な基礎研究といえる。今後、イネ以外の禾本科作物への遺伝子導入によって地球環境の保全、バイオマス原料の生産効果が期待される。重金属汚染土の浄化への展開は将来の発展が見込まれると期待できる。

○今後の展開としては、実用性ならびに基礎の両面において期待できる。実用性という観点からは、不良アルカリ土壌耐性のイネが実用化されれば、特に、不良アルカリ土壌が多い海外において「緑の革命」につながる可能性がある。また、他の重金属のトランスポーターの単離により、水銀やカドミウム等のファイトレメディエーションにも期待できる。一方、鉄強化米やニコチアナミン米などの生理機能については、成果として評価する意見とともに、本課題研究とは全く別の課題として考えるべきではないかという意見もあった。関連する評価として、食糧・機能性成分の育種より、地球環境への展開に期待するという意見があったことを付記したい。また、遺伝子組換え体を利用することから、野生種との交雑の問題、実用化をどう考えるかが今後の課題とする意見もあったことを付記する。

基礎研究の分野としては、金属イオンによる遺伝子発現の制御機構や金属元素の輸送機構に関してさらなる発展が期待される。特に、ニコチアナミンの金属元素輸送機能は植物の一般的機構として考えられる可能性がある。主題ではないが、マーカーフリーベクターの開発は重要なテーマであり、今後の展開を期待したいとの意見もあった。以上、研究期間中着実に研究が進められており、この体制が維持できれば、さらなる展開は期待できる。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

○今回、大学からの研究発信として、基礎から応用まで多くの特筆すべき成果を挙げるとともに、圃場レベルでの実証実験を行ない、全世界的貢献が期待されることは特記事項として評価したい。また、副次的成果として、ニコチアナミンのフェントン反応抑止物質(抗酸化物質)としての機能の汎用性を評価する意見があった。

○受賞歴としては、肥料学会日本土壌奨励賞(中西啓仁);日本土壌肥料学会奨励賞(高橋美智子);日本農学会進歩賞(高橋美智子);日本土壌肥料学会奨励賞(小林高範)の4件。