

「植物の機能と制御」

平成13年度採択研究代表者

西澤 直子

(東京大学大学院農学生命科学研究科 教授)

「植物の鉄栄養制御」

1. 研究実施の概要

地球上の陸域には67%の不良土壌(石灰質アルカリ土壌, 高塩類集積アルカリ土壌, 強酸性土壌, 重金属集積土壌)が存在する。爆発的に増加すると予想される需要に見合う食糧増産の達成は, これらの不良土壌でも生育する「不良土壌耐性」穀物を遺伝子工学によって積極的に創製することにかかっている。石灰質アルカリ土壌では鉄が水酸化第2鉄の結晶として不溶態化しており, 植物は必須元素である鉄を吸収できずに鉄欠乏に陥る。我々はすでに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鉄欠乏耐性イネを作出した。本研究では第一に, さらなる石灰質アルカリ土壌耐性の実用化品種を創製することによって, 食糧生産の増加と沙漠の緑化を目指す。同時にそれを可能にするための基礎研究を行う。第二に, 世界に37億人と推定される鉄欠乏貧血症(anemia)を改善する機能性食品としてのコメを創製することに挑戦する。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品種としてのイネダイズを創製する。

2. 研究実施内容

1) オオムギの鉄欠乏に応答する制御系の解明: 鉄欠乏誘導性のヒドロキシムギネ酸合成酵素遺伝子 (*Ids2*) のプロモーター領域において, 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り, 他国の研究グループに先がけたブレイクスルーとなった。また, 検索の結果, IDE1 と相溶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った。このことは, 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を示している。特許は既に申請済みであり, 論文は, *Plant Journal*の2003年12月号に掲載された。

2) 鉄の吸収, 移行と転流の分子機構の解明: トウモロコシで単離された「鉄・ムギネ

酸」トランスポーター遺伝子 (*YSL*) の塩基配列情報を用いて、「イネの全ゲノム配列」を検索し、イネのゲノム上に存在する18個の「鉄・ムギネ酸」トランスポーター相同性遺伝子 (*OsYSL*) を同定した。現在そのうちの10個の遺伝子を単離し解析を進めているが、なかでも*OsYSL2*について特筆すべき結果を得た。*OsYSL2*の根における発現は、鉄十分条件でも鉄欠乏条件でも非常に弱く、鉄欠乏の葉において強い発現誘導を示すことから、根における土壌からの「鉄・ムギネ酸」取り込みに関与するトランスポーターではなく、鉄の体内移行に関与するトランスポーターである可能性が示された。解析の結果、*OsYSL2*は「鉄・ニコチナミン」と「マンガン・ニコチアナミン」を輸送し、鉄の長距離輸送と種子中への蓄積に関与することが示された(図1)。すなわち、*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。

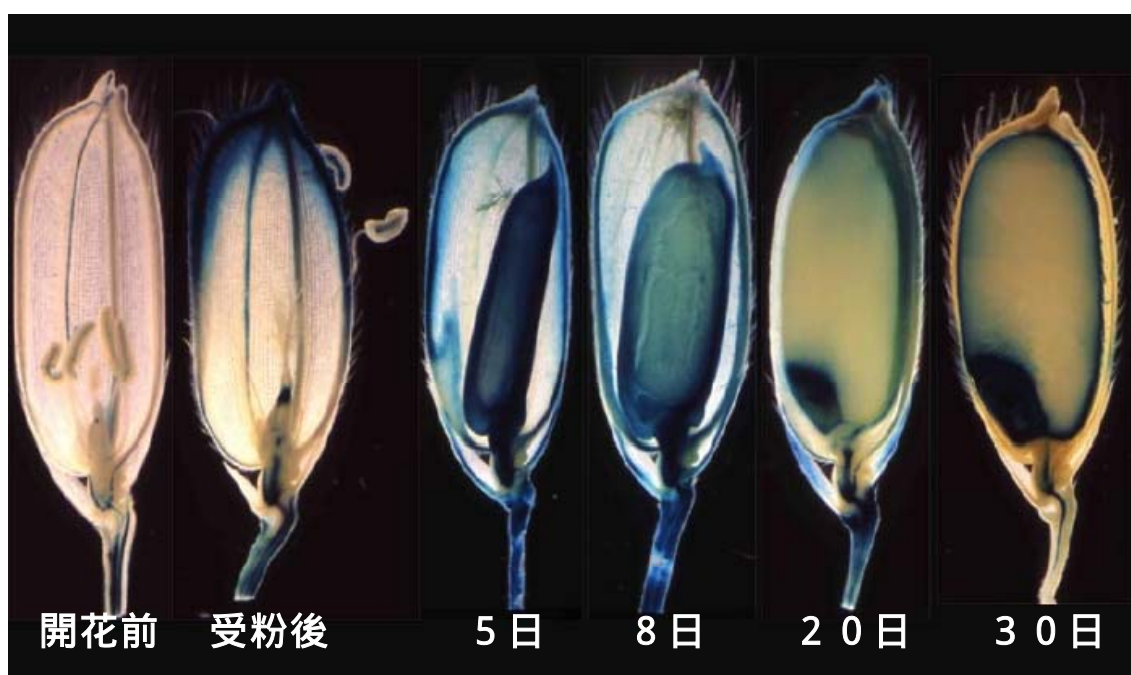


図1 イネ種子登熟期における鉄ニコチアナミントランスポーター遺伝子の発現

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欠損となった形質転換タバコを用いて、イネ科以外の植物では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、論文は *Plant Cell* の2003年6月号に掲載された。またイネの3種類のニコチアナミン合成酵素遺伝子 (*OsNAS*) は、師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、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はなく、鉄の長距離輸送にも関与する可能性を示した。デオキシムギネ酸を分泌するイネにおいても「金属・ニコチアナミン」トランスポーターが存在し、それが師部に発現していることの見解は、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

送が行われていることを示すものである。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。

3) ムギネ酸類分泌の分子機構の解明：これまでに、マイクロアレイ法とノーザン解析によりオオムギのムギネ酸類分泌の概日リズムに細胞内極性小胞輸送が関与する可能性を示した。この過程に関与し、転写量が日周変動を示すことが明らかになった5個の遺伝子のうち3個をオオムギから単離したので、これらの遺伝子の解析をすすめる。またイネにおいてもムギネ酸合成に関与する遺伝子の発現が日周変動を示すことを明らかにし、これまで明瞭ではなかったイネにおけるムギネ酸類分泌の日周変動が示唆された。

4) 鉄欠乏耐性作物の創製：引き続き、オオムギのムギネ酸類生合成に関わる遺伝子を複数組合わせてイネに導入し、さらに強い石灰質アルカリ土壌耐性を示す形質転換イネを作出する。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、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」の開発に成功した。このベクターを用いてイネを形質転換中である。

5) 鉄欠乏耐性作物の閉鎖系温室検定と圃場検定：ムギネ酸合成系の複数の遺伝子を導入した形質転換イネの中から、ポット試験により石灰質アルカリ土壌耐性を示す形質転換イネを選抜する作業を引き続きおこなう。また同様に石灰質アルカリ土壌耐性を示したすべての形質転換イネの種子中の鉄含有量と可食部の鉄およびその他の金属含有量を測定する。東北大学の形質転換植物を栽培することができる隔離圃場に、1トンの石灰質アルカリ土壌を搬入して、水田(10m×10m×50cm)と畑地(10m×10m×1m)を造成し、アルカリ土壌における被覆肥料の検定試験をおこなった結果、微量元素を含有する被覆肥料に一定の効果があることが明らかにした。ポット試験で鉄欠乏耐性が確認されたNAATイネのT2世代の開放系温室での検定を行った。

3. 研究実施体制

東京大学グループ

- ① 研究分担グループ長：西澤 直子（東京大学大学院農学生命科学研究科、教授）
- ② 研究項目：オオムギの鉄欠乏に応答する制御系の解明
鉄の吸収、移行と転流の分子機構の解明
鉄欠乏耐性作物の創製

電力中央研究所グループ

- ① 研究分担グループ長：吉原 利一（電力中央研究所、主任研究員）
- ② 研究項目：オオムギの鉄欠乏に応答する制御系の解明
超高鉄含有米の創製

東京農業大学グループ

- ① 研究分担グループ長：樋口 恭子（東京農業大学生物応用科学科、講師）
- ② 研究項目：鉄欠乏耐性作物の創製と耐性検定

ロックフェラー大学グループ

- ① 研究分担グループ長：Nam-Hai Chua（ロックフェラー大学植物分子生物学、教授）
- ② 研究項目：イネ形質転換用マーカーフリーベクターの開発

東北大学グループ

- ① 研究分担グループ長：三枝 正彦（東北大学農学部、教授）
- ② 研究項目：鉄欠乏耐性イネのフィールド検定

農業生物資源研究所グループ

- ① 研究分担グループ長：高岩 文雄（農業生物資源研究所、チーム長）
- ② 研究項目：超高鉄含有米の創製

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Terauchi K, Asakura T, Nishizawa NK, Matsumoto I, Abe K.
Characterization of the genes for two soybean aspartic proteinases and analysis of their different tissue-dependent expression.
Planta 218:947-957 (2004)
- Nagasaka S, Nishizawa NK, Mori S, Yoshimura E.
Metal metabolism in the red alga *Cyanidium caldarium* and its relationship to metal tolerance.
BioMetals 17: 177-181. (2004)
- Blamey FPC, Nishizawa NK, Yoshimura E.
Timing, magnitude and location of initial soluble aluminum injuries to mungbean roots.
Soil Science and Plant Nutrition 50:67-76. (2004)
- Li, Y., K. Ohtsu, K. Nemoto, N. Tsutsumi, A. Hirai and M. Nakazono
The rice *pyruvate decarboxylase 3* gene, which lacks introns, is transcribed in mature pollen.
J. Exp. Bot., 55: 145-146 (2004)
- Schnable, P.S., F., Hochholdinger and M. Nakazono
Global expression profiling applied to plant development.
Curr. Opin. Plant Biol., 7: 50-56 (2004)
- Arimura, S., G.P. Aida, M. Fujimoto, M. Nakazono and N. Tsutsumi

Arabidopsis dynamin-like protein 2a (ADL2a), like ADL2b, is involved in plant mitochondrial division.

Plant Cell Physiol., 45: 236-242 (2004)

- Arimura, S., J. Yamamoto, G.P. Aida, M. Nakazono and N. Tsutsumi
Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 7805-7808 (2004)
- Nakazono, M., F. Qiu, L.A. Borsuk and P.S. Schnable
Laser capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: Identification of genes differentially expressed in epidermal cells or vascular tissues of maize.
Plant Cell, 15: 583-596 (2003)
- Tsuji, H., N. Meguro, Y. Suzuki, N. Tsutsumi, A. Hirai and M. Nakazono
Induction of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by submergence facilitates oxidation of acetaldehyde during re-aeration in rice.
FEBS Lett., 546: 369-373 (2003)
- Tsuji, H., N. Tsutsumi, T. Sasaki, A. Hirai and M. Nakazono
Organ-specific expressions and chromosomal locations of two mitochondrial aldehyde dehydrogenase genes from rice (*Oryza sativa* L.), *ALDH2a* and *ALDH2b*.
Gene, 305: 195-204 (2003)
- Kobayashi T, Nakayama Y, Nakanishi-Itai R, Nakanishi H, Yoshihara T, Mori S, Nishizawa N K.
Identification of novel cis-acting elements, IDE1 and IDE2, of the barley IDS2 gene promoter conferring iron-deficiency-inducible, root-specific expression in heterogeneous tobacco plants.
The Plant Journal 36:780-793. (2003)
- Inoue H, Higuchi K, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa N.K.
Three rice nicotianamine synthase genes, OsNAS1, OsNAS2 and OsNAS3 are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron.
The Plant Journal 36:366-381. (2003)
- Kobayashi T, Yoshihara T, Jiang T, Goto F, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK.
Combined deficiency of iron and other divalent cations mitigates the symptoms of iron deficiency in tobacco plants.
Physiologia Plantarum 119:400-408. (2003)
- Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, Makino A, Mae T.

Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by the body in naturally-senescing leaves of wheat.

Plant & Cell Physiology 44(9):914-921. (2003)

- Mizuno D, Higuchi K, Sakamoto T, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK.
Three nicotianamine synthase genes isolated from *Zea mays* are differentially regulated by iron nutritional status.
Plant Physiology 132(8): 1989-1997. (2003)
- Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura H, Mori S, Nishizawa N. K.
The Role of Nicotianamine in the Intracellular Delivery of Metals and Plant Reproductive Development.
The Plant Cell 15(6): 1263-1280. (2003)
- Nagasaka S, Nishizawa NK, Watanabe T, Mori S, Yoshimura E.
Evidence for iron storage role of electron-dense bodies in *Cyanidium caldarium*.
BioMetals 16: 465-470. (2003)
- Yoshihara T, Masuda T, Jiang T, Goto F, Mori S, Nishizawa NK.
Analysis of some divalent metal contents in tobacco expressing the exogenous soybean ferritin gene.
J. Plant Nutr. 26: 2253-2265. (2003)
- Masuda T, Mikami B, Goto F, Yoshihara T, Utsumi S.
Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of plant ferritin from glycine max.
Biochim Biophys Acta 1645, 113-115 (2003).
- Takahashi M.
Overcoming Fe deficiency by a transgenic approach in rice.
Plant Cell Tissue and Organ Culture 72: 211-220. (2003)
- Yoshihara T, Kobayashi T, Goto F, Masuda T, Higuchi K, Nakanishi H, Nishizawa NK
Regulation of Fe-deficiency responsive gene, *Ids2* of barley in tobacco.
Plant Biotech 20:33-41. (2003)
- Seo HS, Watanabe E, Tokutomi S, Nagatani A, Chua NH
Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling.
GENE DEVELOP MAR 15;18(6):617-622 (2004)
- Lopez-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua NH
AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5

protein degradation.

GENE DEVELOP FEB 1;17(3):410-418 (2003)

- Sung JQ, Niu QW, Tarkowski P, Zheng BL, Tarkowska D, Sandberg G, Chua NH, Zuo JR
The Arabidopsis AtIPT8/PGA22 gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in de novo cytokinin biosynthesis.
PLANT PHYSIOL JAN;131(1):167-176 (2003)
- Guo HS, Fei JF, Xie Q, Chua NH
A chemical-regulated inducible RNAi system in plants.
PLANT J MAY;34(3):383-392 (2003)
- Ilgenfritz H, Bouyer D, Schnittger A, Mathur J, Kirik V, Schwab B, Chua NH, Jurgens G, Hulskamp M
The Arabidopsis STICHEL gene is a regulator of trichome branch number and encodes a novel protein.
PLANT PHYSIOL FEB;131(2):643-655 (2003)
- Seo HS, Yang JY, Ishikawa M, Bolle C, Ballesteros ML, Chua NH
LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1.
NATURE JUN 26;423(6943):995-999 (2003)
- Duque P, Chua NH
IMB1, a bromodomain protein induced during seed imbibition, regulates ABA- and phyA-mediated responses of germination in Arabidopsis.
PLANT J SEP;35(6):787-799 (2003)
- Yuan P, Jedd G, Kumaran D, Swaminathan S, Shio H, Hewitt D, Chua NH, Swaminathan K
A HEX-1 crystal lattice required for Woronin body function in *Neurospora crassa*.
NATURE STRUCT BIOLOGY APR;10(4):264-270 (2003)
- Wu Y, Sanchez JP, Lopez-Molina L, Himmelbach A, Grill E, Chua NH
The abil-1 mutation blocks ABA signaling downstream of cADPR action.
PLANT J MAY;34(3):307-315 (2003)
- Moller SG, Kim YS, Kunkel T, Chua NH
PP7 is a positive regulator of blue light signaling in Arabidopsis.
PLANT CELL MAY;15(5):1111-1119 (2003)
- Hare PD, Moller SG, Huang LF, Chua NH
LAF3 a novel factor required for normal phytochrome A signaling
PLANT PHYSIOLOGY DEC;133(4):1592-1604 (2003)

- Kuno N, Moller SG, Shinomura T, Xu XM, Chua NH, Furuya M
The novel MYB protein EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1 is a component of a slave circadian oscillator in Arabidopsis.
PLANT CELL OCT;15(10):2476-2488 (2003)
- Hoth S, Ikeda Y, Morgante M, Wang XJ, Zuo JR, Hanafey MK, Gaasterland T, Tingey SV, Chua NH
Monitoring genome-wide changes in gene expression in response to endogenous cytokinin reveals targets in Arabidopsis thaliana.
FEBS LETT NOV 20;554(3):373-380 (2003)
- Hare PD, Seo HS, Yang JY, Chua NH
Modulation of sensitivity and selectivity in plant signaling by proteasomal destabilization.
CURR OPIN PLANT BIOL OCT;6(5):453-462 (2003)
- Hu YX, Xie O, Chua NH
The Arabidopsis auxin-inducible gene ARGOS controls lateral organ size.
PLANT CELL SEP;15(9):1951-1961 (2003)
- Lois LM, Lima CD, Chua NH
Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in Arabidopsis.
PLANT CELL JUN;15(6):1347-1359 (2003)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：5件）