

「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: これまでの研究により, 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おいて, 2つの鉄欠乏応答性シスエレメント, IDE1, IDE2を世界で最初に同定した。この発見は鉄に限らず, 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ークスルーとなった。

本年度は形質転換イネを用いて, これらのシスエレメントの機能を解析した。その結果 IDE1とIDE2を1コピーずつ持つ合成プロモーターが, イネに強力な鉄欠乏誘導性を与えるのに十分であることを明らかにした。またマイクロアレイ解析を用いて, さらに多くの鉄欠乏誘導性の遺伝子群をイネから単離同定した。これらの多くはムギネ酸類を介した鉄吸収機構に関与している遺伝子であった。データベース検索の結果, イネの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。これらの結果から, 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。IDE1、IDE2と相互作用するトランス因子を同定するために、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引き続き進めている。さらにマイクロアレイ解析により、鉄欠乏初期に顕著に発現が誘導されるトランス因子候補をイネとオオムギから複数単離しており、それらの解析も進めている。

2) 鉄の吸収、移行と転流の分子機構の解明：昨年度までに、トウモロコシで単離された「鉄・ムギネ酸」トランスporter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porter相同性遺伝子 (*OsYSL*) を同定した。そのうちのひとつ、*OsYSL2*は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porterではなく、ムギネ酸類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porter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(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porterである。本年度は、さらに残りの遺伝子について解析を進めている。また、鉄欠乏のイネの根において以前に単離していた*OsIRT1*が二価鉄イオンの吸収に関与していることを示し、鉄ポジトロン核種を用いたトレーサー実験によりこれを証明した。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。その場合、イネは双子葉植物と同様に、二価鉄イオントランスporter*OsIRT1*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」の2つの形態で鉄を吸収すると考えられた。

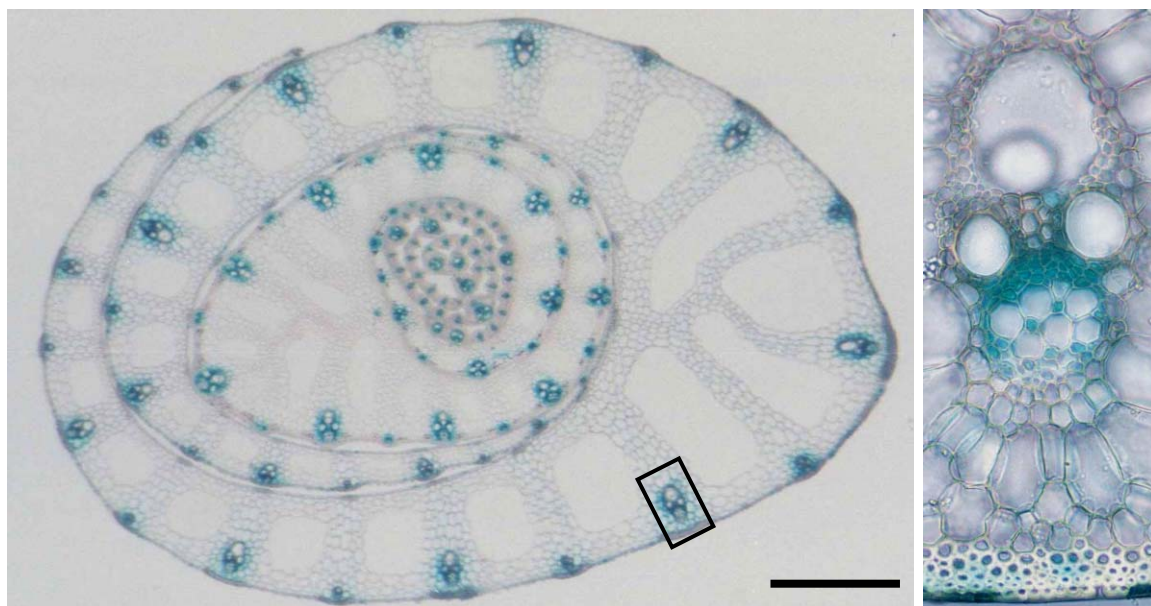


図1 イネ葉鞘における金属ニコチアナミントランスporter遺伝子*OsYSL2*の発現  
維管束部の師管伴細胞に発現がみられ、長距離輸送に関与することを示唆している。

3) ムギネ酸類分泌の分子機構の解明：これまでに、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。本年度は、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たことにより、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。さらに現在、ムギネ酸類分泌トランスポーターと推定される候補遺伝子を得ており、その機能を確認するために、RNAi法によりこの遺伝子のノックアウトイネを作成中である。

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の作出を目指している。新たに開発した「新規大容量イネ用マーカーフリーベクター」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：ポット試験により、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石灰質アルカリ土壌耐性を示す形質転換イネを6ライン選抜した。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、100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、これらのイネの圃場検定に向けて準備を進めている。

### 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

H16年度特許出願件数：2件 (CREST研究期間累積件数：7件)