

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07340

研究課題名(和文)微生物型シデロフォアをモデルとした植物用アルカリ耐性鉄供給剤の開発

研究課題名(英文) Development of alkali-resistant iron supply agents for plants inspired by microbial siderophores

研究代表者

松本 健司 (Matsumoto, Kenji)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・講師

研究者番号：30398713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では石灰質アルカリ土壌下における植物用鉄供給剤の開発を目指し、微生物の鉄輸送化合物(シデロフォア)をモデルとした各種人工シデロフォアを合成し、アルカリ耐性植物用鉄供給剤としての機能評価を行なった。今回用いた4種の人工シデロフォアのFe(III)錯体を鉄欠乏状態のミニトマトに対し投与したところ、4種全てで鉄欠乏回復が見られ、これらがミニトマトに対して鉄供給可能であることが明らかとなった。また、それらのうちの1種は、石灰質アルカリ土壌下において植物シデロフォアを合成できないイネに対する鉄欠乏回復効果も示した。

研究成果の概要(英文)：Four microbial artificial siderophores have been synthesized and investigated on the function as alkali-resistant iron supply agents for plant. Giving these four artificial siderophores to seedlings of grape tomato made to iron starvation, the iron concentration in their shoot and root recovered. This result indicates that these artificial siderophores act as iron supply agents for plants. Furthermore, one of them showed the recovery from iron starvation for rice mutant that is not able to synthesize phytosiderophores in an alkali soil.

研究分野：生物無機化学、錯体化学、光化学、触媒化学

キーワード：シデロフォア 鉄輸送 植物栄養代謝 アルカリ土壌 鉄欠乏回復

1. 研究開始当初の背景

植物において鉄は光合成に必要な葉緑体の合成等に必要不可欠な元素であるが、アルカリ性土壤中では不溶性の $\text{Fe}(\text{OH})_3$ として主に存在しているため、植物にとってその獲得は容易ではない。このため植物は次のいずれかの機構を用いて鉄を可溶化し、獲得している。一つは、根から酸を放出して土壤中の不溶性鉄を $\text{Fe}(\text{III})$ イオンとして溶解し、それを根表面で還元することで生じた $\text{Fe}(\text{II})$ イオンを取り込む機構である。もう一つはムギネ酸のようなファイト(植物性)シデロフォアとよばれる鉄キレート剤を分泌し、不溶性鉄を $\text{Fe}(\text{III})$ -ムギネ酸錯体として可溶化し、その錯体ごと根から取り込む機構である。前者はほぼ全ての植物(双子葉植物とイネ科以外の単子葉植物)で用いられ、後者は、イネ科植物のみで用いられる機構である^{1), 2)}。このようなシデロフォアを用いた鉄取り込みは多くの微生物でも行なわれている。

通常、土壤中には植物が生長するために必要な鉄は充分にある。しかしながら、pHが高い土壌は植物自身による鉄の可溶化・摂取が困難となるため、植物の育成には適さない。特に、ほぼ全ての植物で用いられる Strategy I を利用した鉄取り込みを行っている植物において顕著である。実際、国連食糧農業機関の調査によると、世界の陸地の約3割がこうした石灰質を多く含むアルカリ性土壌であると報告されている。このため、今後の人口増大に伴う食糧需要を満たすために、こうした不良土壌の有効活用が緊喫の課題となっている。石灰質アルカリ土壌下における植物の鉄摂取を改善する取組としては、西澤らによる遺伝子組み換え技術を用いたムギネ酸合成能力を高めた石灰質アルカリ土壌耐性イネが挙げられる³⁾。また、硫酸や硫酸散布により直接土壌 pH を下げるという手法もあるが、大量散布による窒素分や硫黄分の増加が新たな問題となる場合がある。一方、植物用鉄供給剤として一般的に用いられる $\text{Fe}(\text{III})$ -エチレンジアミン四酢酸(EDTA)錯体は、鉄以外の金属に対する特異性の低さや、アルカリ条件下における安定性の低さがネックとなっている。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、アルカリ耐性のある植物用鉄供給剤として我々は微生物が算出するシデロフォアに着目した。代表的な天然シデロフォアである deferriferrichrome (DFC) および desferrioxamine B (DFOB) を図1に示す。シデロフォアは他の金属イオンに比べ $\text{Fe}(\text{III})$ に対する特異性が高く、幅広い pH 領域(pH2~10)で EDTA (安定度定数 $\log\beta = \text{約} 25$) と比べてより安定な $\text{Fe}(\text{III})$ 錯体 ($\log\beta = \text{約} 30$) を形成する⁴⁾。 $\text{Fe}(\text{III})$ -シデロフォア錯体は通常、微生物の体内に取り込まれ、還元酵素によって還元されて $\text{Fe}(\text{II})$ として鉄を放出する。しかしながら、極めて還元されにくい(酸化還元電位 (+側ほど還元されやすく、-側

ほど還元されにくい): $-400 \sim -470 \text{ mV vs. NHE}$ (標準水素電極基準)、微生物が産出するシデロフォアをそのまま Strategy I 植物に対する鉄供給剤として利用することはできなかった。

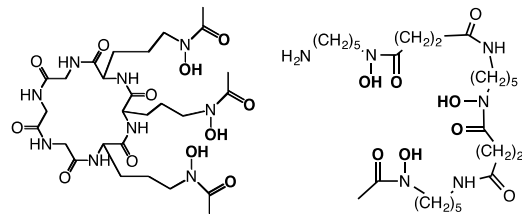


図1 天然シデロフォア (左:DFC, 右 DFOB)

松本らは過去に天然シデロフォア DFC をモデルとした人工シデロフォア tris[2-{(N-acetyl-N-hydroxy)glycylamino}ethyl]amine (TAGE) (図2)を開発した⁴⁾。さらに、この TAGE は DFC 同様、非常に安定な $\text{Fe}(\text{III})$ 錯体を形成する一方で、その $\text{Fe}(\text{III})$ 錯体が DFC と比べ遥かに還元されやすい性質をもつ ($\log\beta = 28.6$, $E_{1/2} : -230 \text{ mV vs. NHE}$) ことを見出した。

この結果をふまえ、本研究では、石灰質アルカリ土壌下における新たな植物用鉄供給促進剤を目指し、TAGE をベースとした各種人工シデロフォア(図2)を合成し、アルカリ耐性植物用鉄供給剤としての機能評価を行なった。

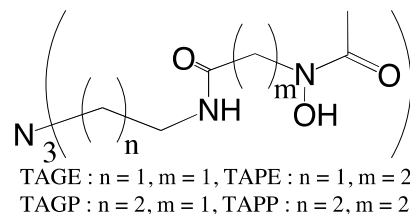


図2 本研究で用いた人工シデロフォア

3. 研究の方法

各種人工シデロフォアおよびその $\text{Fe}(\text{III})$ 錯体は既報⁵⁾の方法により合成した。合成した人工シデロフォア- $\text{Fe}(\text{III})$ 錯体を下記の測定手法により評価した。

(1) 植物による被還元活性

Waters らの方法⁶⁾を用いて、鉄欠乏状態にしたミニトマトの幼苗の根における還元されやすさを $\text{Fe}(\text{III})$ 錯体の還元によって生じる $\text{Fe}(\text{II})$ 錯体の量から評価した。

(2) 双子葉植物に対する鉄欠乏回復効果

Strategy I を利用した鉄の取り込みを調べるため、双子葉植物であるミニトマトを供試植物として、水耕栽培 (pH5.8) により検討した。具体的には、鉄欠乏状態にしたミニトマトの幼苗に対し、 $1 \mu\text{M}$ の各人工シデロフォア- $\text{Fe}(\text{III})$ 錯体を投与した時の鉄欠乏からの回復効果を地上部(葉・茎)と根の鉄濃度から評価した。

(3) 単子葉植物に対する鉄欠乏回復効果

単子葉植物における Strategy I を利用した鉄の取り込みを調べるため、植物シデロフォア（ムギネ酸）を合成できないイネの変異株 (*naat1*) を供試植物として、ゲル寒天栽培 (pH5.4) により検討した。具体的には、発芽種子を 100 μ M の TAGE-Fe(III)錯体を含むゲル寒天で育成した際の地上部（葉・茎）と根の鉄濃度を、鉄未処理および天然シデロフォア DFOB-Fe(III)錯体と比較した。

(4) 貝化石土壌における植物への鉄供給能

石灰質アルカリ土壌下における植物への鉄供給能を調べるため、モデル土壌として貝化石土壌（石灰分 38%、pH9）を用い、TAGE-Fe(III)錯体の *naat1* に対する鉄欠乏回復効果を鉄未処理および DFOB-Fe(III)、EDTA-Fe(III)錯体と比較した（濃度はいずれも 1 mM）。

4. 研究成果

(1) 植物による被還元活性

実験結果を図 3 に示す。どの人工シデロフォアも天然シデロフォア DFOB と比較して、高い被還元活性を示した。興味深いことに、還元電位が低く、還元されにくいと予想された TAGE、TAPP において、植物根による被還元性が高く、各 Fe(III)錯体の還元的な植物への鉄の受け渡しと錯体自身の還元電位とは必ずしも相関性がないことが判明した。TAGE や TAPP の Fe(II)錯体は極めて不安定であることから、植物根による Fe(III)錯体の被還元活性には、Fe(III)錯体の還元電位だけでなく、Fe(II)錯体の不安定性も重要な要素であることが示唆された。

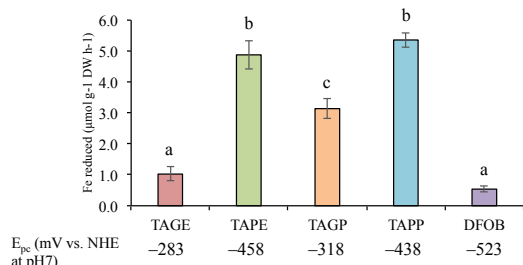


図 3 各人工シデロフォアおよび天然シデロフォア DFOB の Fe(III)錯体のミニトマトの根による被還元活性。各項目の下の数値は、Fe(III)錯体の還元電位 (E_{pc}) を表す。

(2) 双子葉植物に対する鉄欠乏回復効果

実験結果を図 4 に示す。全ての人工シデロフォアにおいて、鉄未処理のものと比較して、地上部（shoot）の鉄濃度の向上が見られた。また、DFOB と比較しても 1.4~2 倍の鉄濃度であった。この結果から、これらの人工シデロフォアが双子葉植物に対して鉄供給可能であることが明らかとなった。一方、根中（root）の鉄濃度は TAGE、TAGE では鉄未処理のものと比較して約 2 倍となったのに対し、TAGP、TAPP ではあまり変わらなかった。これは TAGP や TAPP の鉄供給能が十分でないためと考えられる。

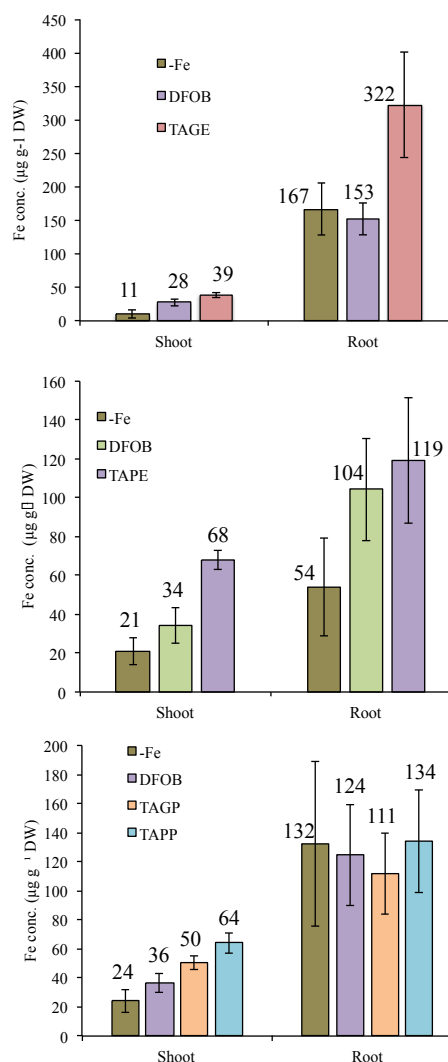


図 4 各人工シデロフォア-Fe(III)錯体処理後のミニトマト幼苗中の鉄濃度。

(3) 単子葉植物に対する鉄欠乏回復効果

実験結果を図 5 に示す。図 5 左の写真より、人工シデロフォア TAGE の Fe(III)錯体で処理した *naat1* 株は、鉄未処理や DFOB と比較して、明らかに生長していることが分かる。*naat1* 株は Strategy I による鉄取り込みしかできないため、TAGE が Strategy I を利用した鉄供給を行っていることが明らかとなった。

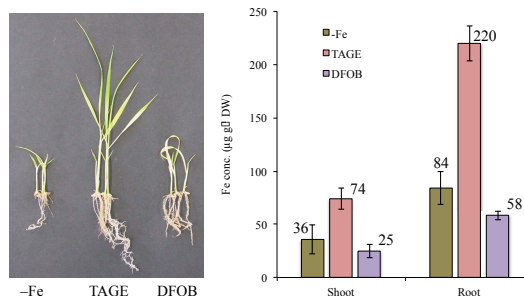


図 5 ゲル栽培での TAGE-Fe(III)錯体処理後のイネ(*naat1*)幼苗の収穫時(左)と鉄濃度(右)

(4) 貝化石土壌における植物への鉄供給能

実験結果を図 6 に示す。図 6 上の写真より、人工シデロフォア TAGE の Fe(III)錯体で処理

した *naat1* 株は、鉄未処理、天然シデロフォア DFOB、一般的な植物用鉄供給剤用配位子 EDTA などと比較しても葉が明らかに緑に戻り、生長していることが分かる。さらに、株中の鉄蓄積量は DFOB や EDTA の約 2 倍となっていた。この結果から、石灰質アルカリ土壌において人工シデロフォア TAGE が DFOB や EDTA よりも植物に対して効果的に鉄を供給できることが明らかとなった。

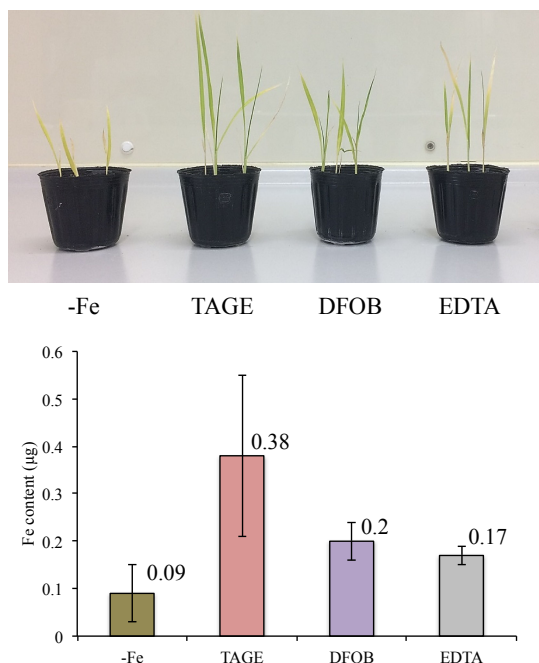


図 6 貝化石土壌による TAGE-Fe(III)錯体処理後のイネ(*naat1*)幼苗の収穫時の様子(左)と鉄濃度(右)

以上を総括すると、本研究で用いた 4 種の微生物型人工シデロフォアはいずれも植物に対する鉄供給能を持ち、中でも TAGE は単子葉植物であるイネに対しても Strategy I 機構を介した鉄供給が可能であることがわかった。さらに、アルカリ土壌下においても鉄供給が可能であることが示された。

これまで微生物型天然シデロフォアは植物に対する鉄供給剤としては適していなかったが、本研究により、Fe(III)錯体を還元されやすくしたり、Fe(II)錯体を不安定化させることにより、植物への鉄供給を可能とすることを見出した。また、被還元性と錯体の安定性をうまく調整することにより、TAGE のようにアルカリ土壌下においても効果的に植物へ鉄供給できることを見出したことは、今後、アルカリ耐性植物用鉄供給剤を開発する上で重要な知見を与えるものである。

<引用文献>

- D. Ueno *et al.* *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 3513–3520.
 D. Ueno *et al.* *New Phytol.* **2007**, *174*, 304–310.
 Nishizawa, N. *et al.* *PNAS* **2007**, *104*, 7373–7378.

Hider, R. C., Kong, X. *Nat. Prod Rep.* **2010**, *27*, 637–657.

K. Matsumoto *et al.* *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 8538–8546.

Waters, B. M. *et al.* *Plant. Physiol.* **2002**, *129*, 85–94.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1)松本健司, 渡邊武士, 鶴園克敏, 寺内亨, 西山伸雄, 江波拓磨, 常光優太, 岩崎貢三, 上野大勢, 微生物型人工シデロフォアの植物用鉄供給剤としての利用, アグリバイオ, Vol.2, 2018, 72-74, 査読無.

(2)Matsumoto, K., Watanabe, T., Tsuruzono, K., Ueno, D., Iron Supply to Plants Using an Easily Reducible Artificial Microbial Siderophore, FEBS Journal, 282(Suppl.1), 364 (2015), 査読無.

〔学会発表〕(計 8 件)

(1)Matsumoto, K., Nishiyama, N., Terauchi, T., Enami, T., Tsunemitsu, Y., Ueno, D., Influence of the properties of hydroxamate-type artificial siderophores on the recovery from iron starvation in grape tomato, The 24th International SPACC Symposium, Auckland, New Zealand (2017)

(2)橋本俊樹, 立石貴大, 米村俊昭, 松本健司, こはく酸エチル部位を有するトリヒドロキサム酸型人工シデロフォアの合成と性質, 錯体化学会第 67 回討論会, 札幌 (2017)

(3)江波拓磨, 西山伸雄, 寺内亨, 岩崎貢三, 上野大勢, 松本健司, 人工シデロフォア - 鉄錯体の単子葉植物に対する鉄供給能の解析, 2016 年度日本土壌肥料学会関西支部講演会, 京都 (2016)

(4)Matsumoto, K., Watanabe, T., Tsuruzono, K., Terauchi, T., Nishiyama, N., Enami, T., Ueno, D., Application of artificial microbial siderophores as iron supply agents for plant, The 23rd International SPACC Symposium, Okayama (2016)

(5)西山伸雄, 寺内亨, 江波拓磨, 上野大勢, 松本健司, 三級アミンをアンカーとした人工シデロフォアの植物に対する鉄欠乏回復効果の検討, 2016 年日本化学会中国四国支部大会, 香川 (2016)

(6)寺内亨, 三好晃裕, 米村俊昭, 松本健司, 3-アミノプロピル基で修飾した没食子酸をアンカーとしたトリスヒドロキサム酸型人工シデロフォアの合成と性質, 錯体化学会第 66 回討論会, 福岡 (2016)

(7)寺内亨, 渡邊武士, 鶴園克敏, 岩崎貢三, 上野大勢, 松本健司, 作物の鉄欠乏改善への人工シデロフォア-鉄錯体の利用, 2015 年度(第 111 回)日本土壌肥料学会関西支部講演会, 松山 (2015)

(8)Matsumoto, K., Watanabe, T., Tsuruzono, K., Ueno, D., Iron Supply to Plants Using an Easily

Reducible Artificial Microbial Siderophore, 40th
Congress of the Federation of the European
Biochemical, Berlin, Germany (2015)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 健司 (MATSUMOTO, Kenji)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域
科学部門・講師

研究者番号：30398713

(2)研究分担者

上野 大勢 (UENO, Daisei)

高知大学・教育研究部総合科学系生命環境
医学部門・准教授

研究者番号：90581229