

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02115

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼと鉄硫黄クラスターによる鉄栄養制御機構

研究課題名(英文) Regulation mechanism of iron nutrition by ubiquitin ligases and iron-sulfur clusters

研究代表者

小林 高範 (Kobayashi, Takanori)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：70590206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：イネのユビキチンリガーゼHRZの基質候補であるグルタレドキシン(GRX)、bZIP転写因子、bHLH転写因子等について、*in vitro* 実験を行った。GRX、bZIPがHRZ依存的に26Sプロテアソーム系により分解されることを明らかにした。これらの遺伝子および、鉄欠乏誘導性ペプチドの遺伝子 IMA について過剰発現イネ、発現抑制イネを作製、解析した。GRX、bZIP転写因子は HRZ の新規下流因子であり、鉄の体内輸送や利用を促進することを明らかにした。また、bHLH転写因子、IMAペプチドは鉄欠乏応答を正に制御する因子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、イネにおいてHRZ が鉄の吸収や蓄積を抑える際に、GRX、bZIP転写因子、bHLH転写因子、IMAペプチドを介して鉄の輸送や吸収を調節していることが明らかになった。また、植物細胞内における鉄欠乏の感知とシグナル伝達に関する知見が得られた。本研究の知見は、HRZ の働きを適切に調節し、鉄分を吸いにくい土壌でも良好に生育する植物、鉄分が豊富な作物を創出することに貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted *in vitro* analysis for putative substrates of rice HRZ ubiquitin ligases, including glutaredoxins (GRX), and bZIP and bHLH transcription factors. We found that GRXs and bZIP are subjected to HRZ-dependent degradation via the 26S proteasome pathway. We also produced and analyzed transgenic rice plants overexpressing or repressing these genes or iron deficiency-inducible IMA peptide genes. We found that GRXs and bZIP are novel downstream factors for HRZs, and are facilitating iron utilization in rice plants. We also found that bHLH and IMAs are novel positive regulators for rice iron deficiency responses.

研究分野：植物栄養学

キーワード：鉄欠乏 ユビキチンリガーゼ 鉄硫黄クラスター イネ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 鉄は全ての動植物とほぼ全ての微生物にとって必須な元素である。土壌中には鉄は豊富に存在するが、通常の好気的条件下では鉄の溶解度はきわめて低い。特に世界の耕地の約30%を占める石灰質土壌では鉄がさらに溶けにくいいため、植物は鉄を十分に吸収できず、鉄欠乏になりやすい。鉄欠乏になると植物の生育は抑えられ、農作物の収量は著しく低下する。
- (2) 植物は体内の鉄が足りなくなると、鉄の吸収や移行に関わる遺伝子群を一斉に発現誘導する。この鉄欠乏応答経路の最上流に位置する、鉄欠乏シグナルとそれを感知する植物細胞内センサー分子の実体は未だ不明だが、研究代表者は研究開始当初までに、HRZ という鉄センサー候補分子を見つけ出した。HRZ は鉄欠乏応答を負に制御するユビキチンリガーゼであり、鉄および亜鉛と結合する。
- (3) 鉄硫黄クラスターは生体内での鉄の主要な機能ユニットであり、植物においては光合成・呼吸における電子伝達系と酸化還元反応など多様な生体反応に補因子として必須の役割を果たしているが、シグナル伝達への関与は知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、イネのユビキチンリガーゼ HRZ と鉄硫黄クラスターが鉄欠乏応答・鉄栄養制御に果たす役割を分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) HRZ の新規ユビキチン化基質の同定と鉄欠乏応答経路への関与の検証
申請者らがこれまでに見出した HRZ のユビキチン化基質の候補である、鉄硫黄クラスター生成に関わると想定されるタンパク質 [グルタレドキシン (GRX) など] bZIP 型転写因子および、他のグループにより基質候補と推定された bHLH 型転写因子などについて、リコンビナントタンパク質を大腸菌で発現・精製した。これらのタンパク質とイネ抽出液を用いた *in vitro* 分解実験を行い、HRZ 発現抑制イネで分解活性が低下するかどうかを検証した。これらのタンパク質と、リコンビナントの HRZ タンパク質とを用いて、HRZ による *in vitro* ユビキチン化反応を測定した。また、酵母 two-hybrid 法、BiFC 法により、これらのタンパク質と HRZ との相互作用を調査した。
これらのタンパク質の当該遺伝子の発現を増減させた形質転換イネをそれぞれ作製した。これらのイネの鉄欠乏応答、鉄関連遺伝子の発現変化、金属の蓄積を調査し、鉄欠乏応答経路への関与を検証した。
- (2) 鉄硫黄クラスターと鉄シグナルの伝達との関連性の調査
鉄硫黄クラスターと結合すると予想されるアコニターゼ (ACO) および GRX の遺伝子の発現抑制・過剰発現イネについて、鉄欠乏応答および鉄硫黄クラスター依存性酵素の活性を調査した。また、酵母 two-hybrid 法、BiFC 法、形質転換イネの解析により GRX と bZIP との相互作用を調査した。
- (3) HRZ の Rubredoxin type-fold の機能解析
HRZ が持つ鉄結合ドメインのうち、鉄と結合することで鉄硫黄クラスターを形成すると推定される Rubredoxin type-fold について、CRISPR/Cas9 により変異を導入したイネを作製し、鉄欠乏応答、鉄関連遺伝子の発現変化、金属の蓄積を調査した。
- (4) HRZ と病害虫応答との関連性の調査
HRZ 発現抑制イネと bZIP 過剰発現イネについて、病原菌への感受性を調査した。また、HRZ の推定基質である bZIP 過剰発現イネにおけるサリチル酸・ジャスモン酸関連遺伝子の発現変化を調査した。

4. 研究成果

- (1) bHLH 型転写因子

(4) 鉄欠乏誘導性ペプチド

HRZ によって発現制御を受ける鉄欠乏誘導性ペプチド遺伝子 OsIMA1、OsIMA2 について過剰発現イネ、発現抑制イネをそれぞれ作製した。OsIMA 過剰発現イネは鉄欠乏耐性と地上部への鉄の蓄積を示した。また、これらのイネの鉄十分根では、鉄ホメオスタシスに關与する鉄欠乏誘導性遺伝子のほぼ全てが顕著に発現誘導されており、その誘導率は鉄欠乏による誘導率と正の相関を示した。一方、OsIMA 発現抑制イネは顕著な表現型を示さなかったが、発現誘導イネと逆の傾向を示した。これらの結果をまとめて論文発表した (Kobayashi et al. 2021 J. Exp. Bot. 72, 2196-2211)。

(5) HRZ の Rubredoxin type-fold の機能解析

HRZ の Rubredoxin type-fold に CRISPR/Cas9 により変異を導入したイネを形質転換により作製し、遺伝子型・表現型調査と次世代の獲得を行った。ホモで変異が導入された系統で、鉄欠乏応答と金属濃度の測定を行ったところ、Rubredoxin type-fold の変異により HRZ の機能が欠失し、鉄の蓄積と鉄欠乏耐性が付与されることが示された (論文未発表)。

(6) HRZ と病害虫応答との関連性の調査

HRZ 発現抑制イネと bZIP 転写因子の過剰発現イネについて、いもち病菌、白葉枯病菌への耐性を調査したが、明確な結果は得られなかった (論文未発表)。

(7) その他

上記以外のいくつかの HRZ 基質候補についても、リコンビナントタンパク質の *in vitro* 実験により、HRZ 依存的な 26S プロテアソーム系による分解が示唆された。また、当該タンパク質の発現を増減させた形質転換イネおよび CRISPR/Cas9 による変異イネを順次作製し、鉄欠乏応答、鉄関連遺伝子の発現変化、金属の蓄積に関する解析を進めた。いくつかの遺伝子がこれらの形質に影響することを見いだした (論文未発表)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kobayashi Takanori, Ozu Asami, Kobayashi Subaru, An Gynheung, Jeon Jong-Seong, Nishizawa Naoko K.	4. 巻 101
2. 論文標題 OsbHLH058 and OsbHLH059 transcription factors positively regulate iron deficiency responses in rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 471 ~ 486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-019-00917-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi Takanori	4. 巻 60
2. 論文標題 Understanding the Complexity of Iron Sensing and Signaling Cascades in Plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1440 ~ 1446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Takanori, Nozoye Tomoko, Nishizawa Naoko K.	4. 巻 133
2. 論文標題 Iron transport and its regulation in plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 11 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rodriguez-Celma Jorge, Chou Hsuan, Kobayashi Takanori, Long Terri A., Balk Janneke	4. 巻 10
2. 論文標題 Hemerythrin E3 Ubiquitin Ligases as Negative Regulators of Iron Homeostasis in Plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.00098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 KOBAYASHI Takanori	4. 巻 57
2. 論文標題 Iron Recognition and Expressional Regulation of Iron-Related Genes in Plants-toward Production of Iron Deficiency-Tolerant and High Mineral Nutrition Rice-: How Plants Sense and Respond to Iron Deficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 728 ~ 735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.57.728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Senoura Takeshi, Kobayashi Takanori, An Gynheung, Nakanishi Hiromi, Nishizawa Naoko K.	4. 巻 104
2. 論文標題 Defects in the rice aconitase-encoding OsACO1 gene alter iron homeostasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 629 ~ 645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-020-01065-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wang Fan, Itai Reiko N., Nozoye Tomoko, Kobayashi Takanori, Nishizawa Naoko K., Nakanishi Hiromi	4. 巻 66
2. 論文標題 The bHLH protein OsIRO3 is critical for plant survival and iron (Fe) homeostasis in rice (<i>Oryza sativa</i> L.) under Fe-deficient conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 579 ~ 592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2020.1783966	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Takanori, Nagano Atsushi J, Nishizawa Naoko K	4. 巻 72
2. 論文標題 Iron deficiency-inducible peptide-coding genes <i>OsIMA1</i> and <i>OsIMA2</i> positively regulate a major pathway of iron uptake and translocation in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 2196 ~ 2211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/eraa546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bashir Khurram, Ahmad Zarnab, Kobayashi Takanori, Seki Motoaki, Nishizawa Naoko K	4. 巻 72
2. 論文標題 Roles of subcellular metal homeostasis in crop improvement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 2083 ~ 2098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erab018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi Takanori, Shinkawa Haruka, Nagano Atsushi J., Nishizawa Naoko K.	4. 巻 未定
2. 論文標題 The basic leucine zipper transcription factor OsZIP83 and the glutaredoxins OsGRX6 and OsGRX9 facilitate rice iron utilization under the control of OSHRZ ubiquitin ligases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/TPJ.15767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小林 高範	4. 巻 92
2. 論文標題 進歩総説：植物のミネラル輸送研究最前線 10. 鉄の輸送とその制御機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本土壌肥科学雑誌	6. 最初と最後の頁 141 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20710/dojo.92.2_141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Takanori Kobayashi, Asami Ozu, Subaru Kobayashi, Naoko K. Nishizawa
2. 発表標題 Regulation of iron deficiency responses by glutaredoxins and bHLH transcription factors interacting with HRZ ubiquitin ligases
3. 学会等名 17th International Symposium on Rice Functional Genomics (ISRFG 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akari Murota, Naoko K. Nishizawa, Takanori Kobayashi
2. 発表標題 Production and analysis of ubiquitin ligase OsHRZ rice mutants by CRISPR/Cas9
3. 学会等名 17th International Symposium on Rice Functional Genomics (ISRFG 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Maeda, Rintaro Yuki, Takeshi Senoura, Hiroshi Masuda, May Sann Aung, Naoko K. Nishizawa, Takanori Kobayashi
2. 発表標題 Production of new iron deficiency-tolerant rice lines by combination of HRZ knockdown and introduction of mutational reconstructed ferric chelate reductase
3. 学会等名 17th International Symposium on Rice Functional Genomics (ISRFG 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林高範、小津亜沙美、小林昂、西澤直子
2. 発表標題 イネ転写因子OsbHLH058、OsbHLH059は鉄欠乏応答を正に制御する
3. 学会等名 日本土壤肥料学会2019年度静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室田明星・西澤直子・小林高範
2. 発表標題 CRISPR/Cas9によるユビキチンリガーゼOsHRZ 変異イネの作出と解析
3. 学会等名 日本土壤肥料学会2019年度静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田慶介・結城麟太郎・瀬野浦武志・増田寛志・メイ サン アウン・西澤直子・小林高範
2. 発表標題 HRZ ノックダウンと三価鉄還元酵素の組み合わせによる新規鉄欠乏耐性イネの創出
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Kobayashi
2. 発表標題 Regulation of iron deficiency responses by HRZ ubiquitin ligases and their interacting partners
3. 学会等名 19th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants (ISINIP) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林高範、西澤直子
2. 発表標題 HRZ 結合性グルタレドキシンによるイネの鉄欠乏応答制御
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2018年度神奈川大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林高範、メイサンアウン、増田寛志、瀬野浦武志、西澤直子
2. 発表標題 鉄結合性ユビキチンリガーゼ HRZ による鉄栄養制御
3. 学会等名 第11回北陸合同バイオシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林高範
2. 発表標題 鉄・亜鉛結合性ユビキチンリガーゼHRZによる植物の鉄欠乏応答と鉄感知
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会シンポジウム「生命金属科学の新展開」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林高範
2. 発表標題 植物の新規鉄欠乏応答制御因子の発見
3. 学会等名 令和2年度石川県立大学生物資源工学研究所公開講座(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 室田明星, 井原崇斗, 西澤直子, 小林高範
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼHRZのゲノム編集による鉄欠乏耐性・鉄蓄積イネの作製
3. 学会等名 日本土壌肥料学会中部支部2020年度例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林高範
2. 発表標題 鉄の研究による植物の生産性と栄養価の向上
3. 学会等名 2020年度日本海イノベーション会議(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林高範, 永野惇, 西澤直子
2. 発表標題 イネの鉄欠乏誘導性ペプチドOsIMA1、OsIMA2は鉄欠乏応答を促進する
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takanori Kobayashi
2. 発表標題 Regulation of plant iron deficiency responses by iron-sensing HRZ/BTS ubiquitin ligases
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacificem Basin Societies 2021 (Pacificem 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林高範, 新川はるか, 永野惇, 西澤直子
2. 発表標題 イネ OsbZ1P83 転写因子はユビキチンリガーゼ OsHRZ の制御下で鉄の体内輸送を促進する
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新川はるか, 小林高範, 永野惇, 西澤直子
2. 発表標題 イネのグルタレドキシンはユビキチンリガーゼ HRZ の制御下で鉄の利用を調節する
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林高範
2. 発表標題 新規鉄肥料PDMAの効果検定とイネの鉄欠乏誘導性ペプチドOsIMAの機能解析
3. 学会等名 令和3年度 石川県立大学生物資源工学研究所 公開講座 2021年12月2日（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林高範
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼ HRZ によるイネの鉄シグナリング
3. 学会等名 植物の栄養研究会 第6回研究交流会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井原崇斗, 室田明星, 西澤直子, 小林高範, 中西啓仁
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼOsHRZのドメイン変異による鉄欠乏耐性・鉄蓄積イネの作製
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度例会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 小林高範	4. 発行年 2019年
2. 出版社 石川県立大学産学官学術交流センター	5. 総ページ数 5
3. 書名 「農業生産と環境保全、高ミネラル作物の開発へ向けた植物の鉄の研究」石川県立大学産学官ネットワークナウ	

1. 著者名 小林高範	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 8 (本人担当部分)
3. 書名 「植物の鉄欠乏応答メカニズム、ミネラル含量の多い作物の創出」生命金属ダイナミクス 生体内における金属の挙動と制御 監修：城典嗣、津本浩平	

1. 著者名 Masuda, H., Aung, M.S., Kobayashi, T. and Nishizawa, N.K.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Inc.	5. 総ページ数 29 (本人担当部分)
3. 書名 Iron biofortification: the gateway to overcoming hidden hunger; in The Future of Rice Demand: Quality Beyond Productivity, ed. de Oliveira, A.C., Pegoraro, C., Viana, V.E.	

1. 著者名 小林高範, 鈴木基史, 難波康祐	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (一財) バイオインダストリー協会	5. 総ページ数 2 (本人担当部分)
3. 書名 アルカリ性不良土壌での農業を可能にする環境調和型鉄吸収促進剤の開発 Vol. 79, No. 5, p. 386-387. バイオサイエンスとインダストリー	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------