

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：12701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22780302

研究課題名（和文）植物におけるヨウ素動態の分子生理学的解明と栄養学的応用

研究課題名（英文）Molecular biological investigation and nutritional application of iodine dynamics in plants

研究代表者

中村 達夫 (NAKAMURA TATSUO)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・准教授

研究者番号：50334636

研究成果の概要（和文）：

ヨウ素欠乏症は世界で最も深刻な微量栄養素欠乏症の一つである。本研究は、作物を通じてヨウ素栄養を普及させるための、高ヨウ素栄養作物の開発を最終目的としている。これまでに、I-イオンをメチル化し大気中へ放出する活性を持つ *AtHOL1* タンパク質の発現抑制により、シロイヌナズナ中のヨウ素含量が上昇することを見出している。この技術をイネに応用し、玄米等に含まれるヨウ素含量を上昇させることに初めて成功した。

研究成果の概要（英文）：

Iodine deficiency is among the most important micronutrient deficiency in the world. The purpose of this study was to develop iodine-rich crops for enhanced delivery of iodine. Previously, we had increased iodine content in Arabidopsis tissues by disruption of *AtHOL1* gene whose product methylates iodide ions making volatile methyl iodide. By using this approach, we succeeded in increasing iodine content in rice tissues such as brown rice for the first time.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：代謝工学

1. 研究開始当初の背景

人の必須栄養素であるヨウ素は、甲状腺ホルモンの構成成分として重要な役割を果たしている。ヨウ素が欠乏すると甲状腺ホルモンの合成が阻害され、甲状腺腫、精神発達の遅滞、成長発達異常、重篤なクレチン症などが引き起こされる。ヨウ素は海水に多く含まれるため、ヨウ素を多く含む海産物を日常的

に摂取する日本人にはヨウ素欠乏症は見られない。しかし、内陸部にある国や山岳地帯においてヨウ素欠乏症は問題となっており、鉄欠乏症、ビタミンA欠乏症と並び、三大微量栄養素欠乏症の一つとも言われる。ヨウ素欠乏症の予防法として、最も重要な方法はヨウ素添加食塩の普及である。米国や欧米など多くの先進国では、ヨウ素添加食塩が一般家

庭で使用され、ヨウ素欠乏症の予防に重要な役割を果たしている。しかし、ヨウ素添加食塩の生産、流通システム等の社会基盤が整備されていない開発途上国では、経済的、技術的要因などにより、ヨウ素添加食塩の普及が困難な状況が続いている。

ヨウ素欠乏症を予防するための農学的技術として、水田や畑にヨウ素含有肥料を施肥し、収穫物のヨウ素含量を上昇させる方法も試みられている。しかし、この方法もヨウ素添加食塩の普及と同様に、生産者へのヨウ素含有肥料の支給、生産技術の伝達、流通システムの整備など、実現には課題も多い。一方、高ヨウ素栄養の作物品種を育種し利用することができれば、ヨウ素栄養の普及において経済面、技術面、文化面からも有利であると考えられる。現地で栽培される作物品種を高ヨウ素栄養化するための初期投資は必要であるが、一度普及すれば維持に要する費用も少ないと考えられる。しかし、ヨウ素含量を改変した植物の開発に関する報告は研究開始当初にはまだなかった。さらに、植物が土壌中のヨウ素をどのように吸収し、代謝、蓄積するのかなど、ヨウ素動態に関する生理学的な知見も非常に少なかった。

一方、S-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基の供与体として、低分子陰イオンにメチル基を転移する活性を持つ酵素群が知られていた。これらの酵素群は、*in vitro* 系での実験により、Cl⁻、Br⁻、I⁻などのハロゲン化物イオンだけでなく、性質の似た硫化水素イオン (HS⁻) やチオシアン酸イオン (NCS⁻) にもメチル基転移活性を示す。そのため各酵素は、methyl chloride transferase (MCT)、thiol methyltransferase (TMT)、halide/thiol methyltransferase (HTMT)、thiocyanate methyltransferase などと、主な酵素活性にもとづいて異なる酵素名 (遺伝子名) で呼ばれているが、タンパク質のアミノ酸配列は互いによく似ている。このグループの酵素遺伝子はシロイヌナズナにおいても3個 (*AtHOL1*、*AtHOL2*、*AtHOL3*) 見ついている。そのうちの1つである *HARMLESS TO OZONE LAYER* (*AtHOL1*) 遺伝子は T-DNA 挿入シロイヌナズナを用いた *in vivo* 解析により、植物体内で Cl⁻、Br⁻、I⁻ のメチル化に関わることが示されていた。研究代表者らは、これらの酵素群 (遺伝子群) を HOL family タンパク質 (遺伝子) と呼んでおり、ゲノム情報の解析から *HOL* 遺伝子が植物に広く存在することを示していた。シロイヌナズナの *AtHOL* タンパク質がヨウ化物イオンを SAM 依存的にメチル化し、揮発性のヨウ化メチルを合成することを *in vitro* 解析で明らかにしていた。これらのことから、根から吸収された I⁻ が *HOL* タンパク質によりヨウ化メチルへと変換される反応を阻害することで、植物体内の I

-蓄積量が上昇することが予想され、実際に *AtHOL1* 遺伝子を T-DNA 挿入により破壊することで、シロイヌナズナにおけるヨウ素蓄積量を野生型株の蓄積量と比較して上昇させることに成功していた。植物のヨウ素含量を上昇させることが可能な本技術については、本研究計画開始前に特許出願を終えていた。

2. 研究の目的

植物のヨウ素動態に影響を与える遺伝的因子に関する知見はほとんどなかった。しかし、植物におけるヨウ素動態を計画的に改変し高ヨウ素栄養化するためには、関与する遺伝的因子の特徴を明らかにする必要がある。本研究計画では、植物のヨウ素動態に影響を与えると推測される *HOL* 遺伝子に着目し、シロイヌナズナおよびイネの逆遺伝学的手法を用いた解析からその関与を明らかにすることを目的とした。また、得られた知見に基づき、重要な作物であるイネの高ヨウ素栄養化技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 融合タンパク質の作製と反応速度論的解析：

AtHOL1、*AtHOL2*、*AtHOL3*、*OsHOL1*、*OsHOL2* の各遺伝子の cDNA を大腸菌に導入し発現させることで各融合タンパク質を合成し精製し、反応速度論的解析に用いた。酵素活性の測定には液体クロマトグラフを用いた。

(2) シロイヌナズナの遺伝子破壊株：

AtHOL1、*AtHOL2*、*AtHOL3* の各遺伝子に T-DNA がホモ挿入された遺伝子破壊株を解析に用いた。

(3) イネの遺伝子破壊株：

OsHOL1、*OsHOL2* 遺伝子に内在性トランスポゾンである *Tos17* が挿入された遺伝子破壊株の候補種子を独立行政法人農業生物資源研究所農業生物先端ゲノム研究センターより分譲していただき、ホモ挿入系統の単離を行い解析に用いた。

(4) 遺伝子発現の定量 PCR 解析：

シロイヌナズナおよびイネの野生型株と遺伝子破壊株における mRNA 蓄積量の分析には、リアルタイム PCR 法を用いた。

(5) ヨウ素含量の分析：

植物組織に含まれるヨウ素の分析には、誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) および液体クロマトグラフを用いた。

4. 研究成果

(1) 融合 *HOL* タンパク質の反応速度論的解析：

シロイヌナズナの *AtHOL1*、*AtHOL2*、*AtHOL3* について作製した融合タンパク質が、I⁻ に対する S-アデノシルメチオニン依存的なメチル基転移活性を有することは、本研究計画開

始前までに明らかにしていた。しかし、これらの酵素やイネに2個存在するHOLタンパク質(OsHOL1, OsHOL2)についての反応速度論的な特性については未知であった。そこで、これらの酵素について融合タンパク質を作製し反応速度論的解析を行った。その結果、シロイヌナズナではAtHOL1とAtHOL3が、イネではOsHOL1がI-に対する酵素活性(k_{cat}/K_m)が高いことなどを明らかにした。これらのことは、シロイヌナズナおよびイネのヨウ素代謝において、各HOLアイソフォームの関与が異なることを示唆した。

(2) AtHOL 遺伝子破壊シロイヌナズナの解析:

AtHOL1 遺伝子破壊株では、野生型株と比較して、全組織においてヨウ素含量が上昇することを明らかにした。しかし、AtHOL2 および AtHOL3 遺伝子の破壊株では、ヨウ素含量の上昇は確認できなかった。これは、AtHOL2 と AtHOL3 の遺伝子発現レベルが、AtHOL1 の遺伝子発現レベルと比較して低いために、ヨウ素含量に与える影響が AtHOL2、AtHOL3 遺伝子の各破壊株では見られなかったと予想された。一方で、AtHOL1 はアミノ酸配列に基づく系統解析により、アブラナ目特異的なアイソフォームであることが示唆されている。そのため、アブラナ目以外の植物においても、HOL 遺伝子の破壊がヨウ素含量を上昇させるかを調べる必要があると考えられた。

(3) OsHOL 遺伝子破壊イネの単離と解析:

アブラナ目以外の植物として、重要な作物植物であるイネに着目した。OsHOL1、OsHOL2 遺伝子を破壊したイネ系統を得るために、Tos17 挿入株を含む種子プールからホモ挿入株を単離した。OsHOL1 については2系統、OsHOL2 については1系統の Tos17 挿入株を得ることができた(図1)。これらの Tos17 挿入株の定量PCR解析により、いずれの系統においても当該 mRNA の蓄積量が抑制されていることが確認された。OsHOL2 遺伝子については、Tos17 挿入系統が1系統しか得られなかったため、OsHOL2 遺伝子の発現レベルを改変した遺伝子組換えイネを作製した。

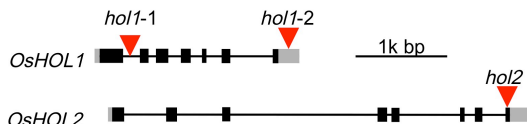


図1 OsHOL 遺伝子破壊イネにおける Tos17 挿入部位

野生型イネ(日本晴)と OsHOL1 遺伝子破壊イネ(hol1-1, hol1-2)を約4ヶ月栽培し、組織に含まれるヨウ素の含量を、ICP-MSを用いて解析した。その結果、野生型イネと比較して hol1-1 系統および hol1-2 系統において、

葉身のヨウ素含量がそれぞれ約3倍、約2倍に上昇していた(図2)。また、野生型イネと比較して、hol1-1 系統では玄米中のヨウ素含量が約2倍に上昇していた(図3)。

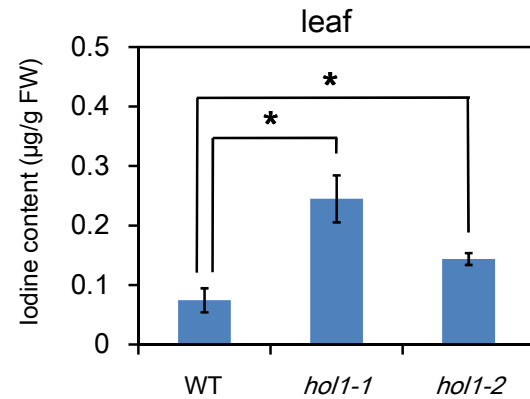


図2 OsHOL1 遺伝子破壊イネの葉身におけるヨウ素含量

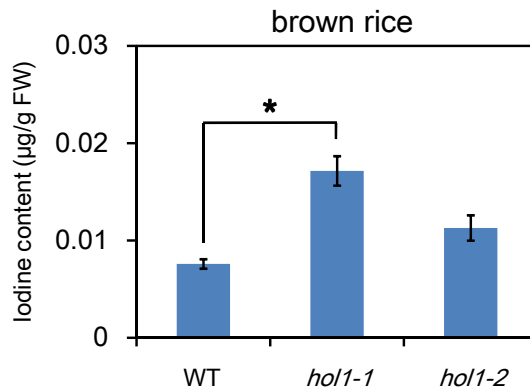


図3 OsHOL1 遺伝子破壊イネの玄米におけるヨウ素含量

(4) 結論:

植物に広く存在するHOL familyタンパク質はI-をメチル化する活性を持つが、その酵素活性は同一植物内のアイソフォーム間でも異なることを、シロイヌナズナとイネの融合HOLタンパク質を用いた解析により示した。

シロイヌナズナとイネのHOL遺伝子を破壊した系統の解析により、両植物ともにI-に対する酵素活性の高いアイソフォームの遺伝子を破壊した系統において、ヨウ素含量の上昇が確認された。このことから、酵素の特性に関する情報は、遺伝子発現情報等とともに、植物におけるヨウ素含量を上昇させるための重要な知見となることが示唆された。

イネにおけるHOL遺伝子の破壊が、ヨウ素含量の上昇を引き起こすことを示した。これは、作物植物の遺伝的改変によりヨウ素含量を上昇させた初めての例である。また、本研究で用いたTos17挿入イネ系統は非遺伝子組

換えであることから、高ヨウ素栄養イネの作製に向けての応用可能性が高いと考えられる。一方で、本研究で確認された遺伝的改変によるヨウ素含量の上昇は、応用の観点から見ると十分とは言えない。植物におけるヨウ素蓄積に関わる新たな因子の探索と解析が必要と考える。

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1件)

- (1) Y. Takekawa and T. Nakamura, Rice OsHOL1 and OsHOL2 proteins have S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase activities toward iodide ions. *Plant Biotechnol.* 29: 103-108 (2012). 査読有

[学会発表] (計2件)

- (1) 中村達夫, モノハロメタン合成に関わる植物遺伝子の機能解析, 第216回生存圏シンポジウム「植物と微生物: C1化合物を介した気候変動との関わりの理解に向けて」, 京大大学生存圏研究所, 2012年12月, 京都
- (2) 武川祐子, 永利友佳理, 中村達夫, 遺伝子改変による高ヨウ素蓄積シロイヌナズナの作製と解析, 日本植物細胞分子生物学会, 2011年9月, 福岡

[図書] (計1件)

- (1) 中村達夫, 第14章 植物バイオテクノロジー, 「遺伝子工学」(近藤昭彦・芝崎誠司 編著, 化学同人), pp.195-205, 2012年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 達夫 (Nakamura Tatsuo)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・准教授

研究者番号: 50334636