

令和元年6月10日現在

機関番号：23303

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05617

研究課題名(和文)植物鉄センシング分子機構の解明

研究課題名(英文)Identification of molecular mechanisms of plant iron sensing

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・准教授

研究者番号：70590206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物の細胞内鉄センサーを明らかにするために、イネの転写因子 IDEF1 およびユビキチンリガーゼ HRZ に注目し、これらの金属との結合と鉄欠乏応答の制御とを繋ぐ分子メカニズムを調査した。IDEF1 の DNA 結合性、タンパク質安定性は鉄栄養条件により明確には変化しなかった。HRZ のタンパク質安定性、局在および機能が、金属との結合で変化する可能性を見いだした。HRZ の下流で、鉄硫黄クラスターの合成と輸送に関わるタンパク質および bZIP 転写因子が機能する可能性を見いだした。イネの鉄欠乏の初期応答と HRZ による鉄栄養制御に、ジャスモン酸経路が関わ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

世界の耕地の30%以上を占める石灰質土壌では、植物は鉄を吸収しにくく生育に適さないが、本研究はこのような土壌でも良好に育つ植物の開発につながる。さらに、植物が土壌中から吸収する鉄は、食物の鉄分の由来となるため、本研究は鉄栄養価の高い米などの食物の開発につながる。学術的には、植物の鉄感知を担う細胞内鉄センサーと鉄欠乏シグナルの実体は未だに明らかになっていない。本研究はこれらの解明につながる重要な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify intracellular iron sensors in plants, we investigated molecular mechanisms linking metal binding and regulation of iron deficiency responses in rice transcription factor IDEF1 and ubiquitin ligase HRZs. We did not observe clear changes in DNA binding property and protein stability of IDEF1 by iron nutritional conditions. In contrast, our results suggested changes in protein stability, localization and function of HRZs by their metal binding. Proteins involved in iron-sulfur cluster biosynthesis and transport, and a bZIP transcription factor, were suggested to function downstream of HRZs. Jasmonate signaling was found to be involved in early responses to iron deficiency and HRZ-based regulation of iron homeostasis in rice.

研究分野：農学(植物栄養学、植物分子生物学)

キーワード：鉄欠乏 イネ 遺伝子発現 転写因子 ユビキチンリガーゼ センサー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-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、通常の好氣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と、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。研究代表者らは、長年にわたってこの発現制御メカニズムを、生理現象からシグナル伝達経路を逆に辿る形で一步一步解明してきた。

(3) 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、イネから IDEF1 と HRZ という2種類の鉄センサー候補分子を見つけ出した。IDEF1 は鉄欠乏応答を正に制御する転写因子であり、二価鉄および他の二価金属と可逆的に結合することから、鉄と他の金属との濃度比を感知している可能性が考えられた。一方、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ことを、研究代表者らは研究開始当初までに明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究では、IDEF1 と HRZ が真の細胞内鉄センサーであるかどうかを明らかにすることを旨として、鉄および関連金属との結合(インプット)と鉄欠乏応答の制御(アウトプット)とを繋ぐ分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 金属との結合状態が IDEF1 の DNA 結合様式に与える影響の解析

完全長または金属結合ドメインを欠失した IDEF1-GFP 融合遺伝子を発現する形質転換イネを作製した。これらを鉄十分条件および鉄欠乏条件で水耕栽培し、IDEF1 と DNA との結合をクロマチン免疫沈降に続く定量的 PCR 法により解析した。

(2) 金属との結合状態が IDEF1 のタンパク質分解に与える影響の解析

非形質転換イネと、IDEF1 タンパク質の安定性に影響を与える可能性がある形質転換イネを鉄十分条件および鉄欠乏条件で水耕栽培し、ウエスタン解析により IDEF1 の発現量を検定した。

(3) 鉄との結合状態が HRZ のタンパク質分解と細胞内局在、機能に与える影響の解析

① HRZ の部分配列、またはその変異配列と GFP との融合遺伝子を発現する形質転換イネを作製した。これらを鉄十分条件および鉄欠乏条件で水耕栽培し、共焦点レーザー顕微鏡で GFP を検鏡し、ウエスタン解析を行った。

② 植物体における HRZ の機能と鉄栄養条件との関連性を調査するために、HRZ の発現量を低下させたイネ (HRZ ノックダウンイネ) を鉄過剰条件で栽培し、生育および鉄関連遺伝子の発現量を調査した。

(4) HRZ が鉄硫黄クラスターと結合して機能を変化させるかどうかの検証

HRZ と鉄硫黄クラスターの形成と輸送に関わると推定される Glutaredoxin (GRX) タンパク質との相互作用を酵母 two-hybrid 法と pull-down 法で調査した。また、当該 GRX 遺伝子の発現量を変化させた形質転換イネを作製し、鉄欠乏応答を解析した。

(5) HRZ によるユビキチン化標的タンパク質の同定と解析

① ユビキチン化を触媒する RING-finger ドメインを欠失した HRZ を bait とした酵母 two-hybrid 法により、HRZ の標的タンパク質候補をスクリーニングした。一方、研究代表者らは研究開始までにプロテオーム解析を行い、HRZ ノックダウンイネの根で発現が上昇しているユビキチン化分解標的タンパク質候補を見いだした。これらの候補タンパク質の中から鉄栄養制御に関わる可能性の高いものについて、*in vitro* ユビキチン反応系および細胞抽出液の分解実験系により、HRZ がユビキチン化するかどうか検証した。また、これらの発現量を変化させた形質転換イネを作製し、鉄欠乏応答を解析した。

② HRZ ノックダウンイネで発現量に変化する遺伝子およびタンパク質を探索した結果、ジャスモン酸関連遺伝子が多く見出された。そのため、HRZ ノックダウンイネおよび非形質転換イネを鉄十分条件および鉄欠乏条件で水耕栽培し、根内ジャスモン酸類濃度およびジャスモン酸関連遺伝子の発現を調査した。また、ジャスモン酸による鉄欠乏誘導性遺伝子群の発現制御パターンを調査した。

4. 研究成果

(1) 金属との結合状態が IDEF1 の DNA 結合様式に与える影響の解析

クロマチン免疫沈降の結果、IDEF1 は、結合最小配列である CATGC を含む様々なプロモーター配列と結合した。これらの標的 DNA 配列との結合パターンは、鉄栄養条件で明確には変化しなかったが、金属結合ドメインを欠失させると結合度が減少する傾向が見られた。

(2) 金属との結合状態が IDEF1 のタンパク質分解に与える影響の解析

IDEF1 タンパク質の発現量は低く、HRZ の発現を変化させた形質転換イネや鉄栄養条件により、発現量に明確な差異は認められなかった。

(3) 鉄との結合状態が HRZ のタンパク質分解と細胞内局在、機能に与える影響の解析

① OsHRZ1、OsHRZ2 の全長またはC末端側領域のみをイネに導入すると、根で mRNA は高発現したがタンパク質は全く検出できなかった。一方、鉄・亜鉛が主に結合するN末端側領域をイネに導入すると、根で GFP が検出された。鉄栄養条件により、GFP の局在と発現量に変化が観察された。また、鉄・亜鉛結合ドメインに変異を導入すると、GFP の発現は減少した。以上の結果から、HRZ のC末端側には、自身のタンパク質を恒常的に不安定化させる領域がある一方で、HRZ のN末端側の金属結合ドメインは、鉄栄養条件により自身のタンパク質の安定性または局在を変化させることが示唆された。

② HRZ ノックダウンイネを鉄過剰条件で栽培したところ、極度の鉄過剰に感受性を示した。また、このイネは地上部に非形質転換体よりも多くの鉄を蓄積した。さらに、鉄の吸収や輸送に関与する鉄欠乏誘導性遺伝子群の発現が HRZ ノックダウンイネでは亢進するが、この度合いが鉄過剰条件ではさらに顕著であった。以上のことから、HRZ は鉄過剰条件でも重

要な機能を果たすことが明らかになった（雑誌論文4）。細胞内の鉄濃度が増加すると、HRZ は鉄または亜鉛との結合度の変化により活性または安定性を増大させる可能性が考えられる。しかしながら、*HRZ* の mRNA レベルでの発現量は、これとは逆に鉄欠乏により誘導される。この理由として、鉄欠乏状態の植物が、急な環境変化により鉄の溶解度が急激に上昇した時に過剰な鉄を取り込まないために、あらかじめ負の制御因子である HRZ を多く発現している可能性が考えられる。さらに、HRZ 自身が金属との結合により自らの活性または安定性を制御することにより、適度な鉄の吸収と輸送を維持しているものと考えられる（雑誌論文1, 2, 3）。

(4) HRZ が鉄硫黄クラスターと結合して機能を変化させるかどうかの検証

2種類の別のサブグループに属する GRX が、HRZ と結合することを明らかにした。これらの *GRX* の発現を低下させた形質転換イネは、鉄欠乏に感受性を示したが、葉の鉄濃度は非形質転換体と顕著な差がなかった。これらのノックダウンイネの鉄十分根では、鉄の吸収や輸送に関わる遺伝子の発現が亢進している一方で、鉄十分葉ではこれらの発現が低下している傾向があった。以上の結果から、GRX は葉における鉄の利用と鉄欠乏応答制御に関与していると考えられた。GRX が鉄硫黄クラスターを介して HRZ の機能に影響を与えているかどうかの検証は今後の課題である。

(5) HRZ によるユビキチン化標的タンパク質の同定と解析

① 酵母 two-hybrid スクリーニングにより、HRZ と相互作用するタンパク質として (4) に記した GRX が同定された。また、プロテオーム比較解析により、鉄硫黄クラスターの合成に関わると予想されるいくつかのタンパク質の発現量が、*HRZ* ノックダウンイネの根で非形質転換体よりも高いことを発見した。これらのことから、HRZ の下流には鉄硫黄クラスターを介した鉄栄養制御が存在すると考えられた。さらに、プロテオーム比較解析で bZIP 転写因子が同様の発現パターンを示していた。in vitro ユビキチン反応系および細胞抽出液の分解実験系により、HRZ が当該 bZIP 転写因子をユビキチン化することが示唆された。当該 bZIP 遺伝子の過剰発現イネは、鉄欠乏に耐性を示し、鉄の吸収や輸送に関わる遺伝子の発現量に変化が見られたことから、この bZIP 転写因子が HRZ の下流で転写制御に関わる可能性が示された。

② HRZ は既知の鉄吸収・輸送に関わる遺伝子群のほか、ジャスモン酸類の生合成に関わる遺伝子群も負に制御していた。非形質転換イネに鉄欠乏処理を施すと、ごく初期にジャスモン酸類の生合成に関わる遺伝子の発現が誘導され、根内のジャスモン酸類濃度が上昇した。*HRZ* ノックダウンイネの根では鉄十分条件でもジャスモン酸類濃度が高かった。鉄欠乏誘導性遺伝子の発現はジャスモン酸類により負に制御されていたが、この制御が鉄欠乏初期に一時的に解除された。以上の結果から、鉄欠乏の初期応答と HRZ による鉄ホメオスタシスの制御にはジャスモン酸経路が関わると考えられた（雑誌論文5）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計5件）（全て査読あり）

1. **Kobayashi, T. (corresponding author)** (2019) Understanding the complexity of iron

sensing and signaling cascades in plants. *Plant Cell Physiol.* in press.
DOI:10.1093/pcp/pcz038

2. Rodríguez-Celma, J., Chou, H., **Kobayashi, T.**, Long, T.A. and Balk, J. (2019) Hemerythrin E3 ubiquitin ligases as negative regulators of iron homeostasis in plants. *Front. Plant Sci.* 10, 98. DOI: 10.3389/fpls.2019.00098
3. **Kobayashi, T.**, Nozoye, T. and Nishizawa, N.K. (2019) Iron transport and its regulation in plants. *Free Radic. Biol. Med.* 133, 11-20. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439
4. Aung, M. S., **Kobayashi, T. (corresponding author)**, Masuda, H. and Nishizawa, N.K. (2018) Rice HRZ ubiquitin ligases are crucial for the response to excess iron. *Physiol. Plant.* 163, 282-296. DOI: 10.1111/ppl.12698
5. **Kobayashi, T. (corresponding author)**, Itai, R.N., Senoura, T., Oikawa, T., Ishimaru, Y., Ueda, M., Nakanishi, H. and Nishizawa, N.K. (2016) Jasmonate signaling is activated in the very early stages of iron deficiency responses in rice roots. *Plant Mol. Biol.* 91, 533-547. DOI: 10.1007/s11103-016-0486-3

[学会発表] (計 19 件)

1. **小林高範**、西澤直子「HRZ 結合性グルタレドキシシンによるイネの鉄欠乏応答制御」日本土壌肥料学会 2018 年度神奈川大会 (2018 年 藤沢)
2. **Takanori Kobayashi** “Regulation of iron deficiency responses by HRZ ubiquitin ligases and their interacting partners” 19th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants (ISINIP) (2018年 台北、台湾) (基調講演)
3. **小林高範**、西澤直子「イネのグルタレドキシシンはユビキチンリガーゼ HRZ とともに鉄欠乏応答を制御する」第 59 回日本植物生理学会年会 (2018 年 札幌)
4. **小林高範**「植物の鉄欠乏応答と鉄感知」日本農芸化学会 2018 年度大会 シンポジウム講演 (2018 年 名古屋)
5. メイサンアウン、**小林高範**、増田寛志、西澤直子「イネのユビキチンリガーゼ HRZ は鉄過剰耐性に関与する」日本土壌肥料学会 2017 年度仙台大会 (2017 年 仙台)
6. **Takanori Kobayashi**, May Sann Aung, Reiko Nakanishi Itai, Takeshi Senoura, Hiroshi Masuda, Takaya Oikawa, Yasuhiro Ishimaru, Minoru Ueda, Hiromi Nakanishi, Naoko K. Nishizawa “Rice HRZ ubiquitin ligases are involved in both iron deficiency and excess responses and jasmonate signaling” XVIII International Plant Nutrition Colloquium (XVIIIth IPNC) (2017年 Copenhagen, デンマーク)
7. **Takanori Kobayashi**, May Sann Aung, Reiko Nakanishi Itai, Takeshi Senoura, Hiroshi Masuda, Takaya Oikawa, Yasuhiro Ishimaru, Minoru Ueda, Hiromi Nakanishi, Naoko K. Nishizawa “HRZ ubiquitin ligases negatively regulate rice iron uptake, transport and

accumulation under various iron conditions” ASPB annual meeting in 2017 (Plant Biology 2017) (2017年 Honolulu, 米国)

8. メイサンアウン、小林高範、増田寛志、西澤直子「イネのユビキチンリガーゼ HRZ は鉄過剰条件でも重要である」第 58 回日本植物生理学会年会 (2017 年 鹿児島)
9. 小林高範「ユビキチンリガーゼ HRZ による植物の鉄栄養制御と鉄感知」第 40 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 シンポジウム講演 (2016 年 名古屋)
10. Takanori Kobayashi, Reiko Nakanishi Itai, Takeshi Senoura, Takaya Oikawa, Yasuhiro Ishimaru, Minoru Ueda, Hiromi Nakanishi, Naoko K. Nishizawa “HRZ ubiquitin ligases and jasmonate signaling regulate iron deficiency responses in rice roots” 18th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants (2016年 Madrid, スペイン)
11. 小林高範、板井玲子、瀬野浦武志、及川貴也、石丸泰寛、上田実、中西啓仁、西澤直子「イネ鉄欠乏応答の初期にジャスモン酸経路が活性化される」第 57 回日本植物生理学会年会 (2016 年 盛岡)
12. Takanori Kobayashi “Regulation of rice iron deficiency response and possible iron sensing by HRZ ubiquitin ligases” International Workshop on Soil-Microbe-Plant Interaction (2016年 倉敷)
13. 小林高範、板井玲子、瀬野浦武志、及川貴也、石丸泰寛、上田実、中西啓仁、西澤直子「イネ鉄欠乏応答におけるユビキチンリガーゼ HRZ とジャスモン酸経路の関与」日本土壤肥料学会 2015 年度京都大会 (2015 年 京都)
14. 小林高範「植物細胞の鉄栄養感知機構」第 1 回植物の栄養研究会 講演 (2015 年 東京)
15. 小林高範、瀬野浦武志、板井玲子、西澤直子「イネ鉄欠乏応答におけるタンパク質発現制御と OsHRZ の関与」第 56 回日本植物生理学会年会 (2015 年 東京)

その他 4 件 (計 19 件)

[図書] (計 2 件)

1. 小林高範 (2019)「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. 石川県立大学産学官学術交流センター vol. 22, p. 5.

その他 1 件 (計 2 件)

[その他]

ホームページ

<http://ribb.ishikawa-pu.ac.jp/pct/index.html>