

平成21年6月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18510200

研究課題名（和文）ムギネ酸によるイネ科植物の3価鉄イオン取り込みの分子機構

研究課題名（英文）Iron acquisition mechanism of graminaceous plants by mugineic acids

研究代表者

村田 佳子（MURATA YOSHIKO）

財団法人 サントリー生物有機科学研究所・研究員

研究者番号：60256047

研究成果の概要：イネ科植物はキレート化合物であるムギネ酸類を分泌し、土壌中の不溶態3価鉄と錯体を形成して植物内に取り込んでいる。我々はムギネ酸類の簡便かつ高収率な合成方法を確立した。また、鉄欠乏状態で生育させたオオムギの根からムギネ酸類鉄錯体トランスポーターHvYS1を同定し、根の表皮細胞特異的な局在を明らかにした。HvYS1はムギネ酸3価鉄錯体のみを輸送し、他の金属錯体は輸送しない。この基質特異性を担っているのが6番目の膜外ループであることを解明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：ムギネ酸、鉄錯体、イネ科植物、トランスポーター、ファイトシデロフォア

## 1. 研究開始当初の背景

(1) イネ科植物は生合成したムギネ酸類（ファイトシデロフォア）を根から分泌し、土壌中の難溶性の鉄(III)イオンと錯体を形成し、これを可溶化して再吸収することにより鉄イオンの効率的取り込みを可能にしている。この発見が契機となって、生物学的研究が活発化したが、約25年経過した現在でも、その取り込みの機能は未だ解明されていない。

(2) 2001年、トウモロコシからファイトシデロフォア鉄錯体トランスポーター遺伝子(ZmYS1)が同定された。このタンパク質はムギネ酸鉄錯体のみならず、コバルト、ニッ

ケル、銅、亜鉛錯体も輸送し、また植物生体内で鉄を輸送するニコチアミンの鉄錯体も輸送することが報告されている。しかし、オオムギは同位体元素を用いた取り込み実験でコバルトや亜鉛などの他の金属錯体を取り込まず、鉄錯体選択的に輸送することが示唆されていた。

## 2. 研究の目的

(1) ムギネ酸を中心とするファイトシデロフォア・鉄(III)錯体とトランスポータータンパク質の協同作業によって鉄イオンを取り込む際の分子機構を明らかにする。そのため

には基質の安定供給が必要であり、ムギネ酸の大量合成法を確立する。また、ムギネ酸鉄錯体は結晶化が困難であり、鉄が常磁性であるため NMR 解析も容易ではなく、その構造は推定の域に止まっている。故に、結晶化を容易にするムギネ酸類縁体の合成等を再検討する。

(2) オオムギから単離したトランスポーター HvYS1 は 3 価鉄・ムギネ酸錯体の組み合わせだけを厳密に輸送する。このムギネ酸鉄錯体特異的トランスポーター HvYS1 と広範な基質を輸送するトウモロコシの ZmYS1 のアミノ酸配列を比較しつつ、これらタンパク質のムギネ酸類・鉄錯体に対する輸送選択性を調べる。

### 3. 研究の方法

(1) 2'-deoxymugineic acid (DMA) は、アゼチジン-2-カルボン酸、アスパラギン酸、リンゴ酸の三つのユニットが還元的に結合した構造を有している。これまでに DMA の合成は数多く報告されているが、いずれもアミノ酸ユニットの保護、脱保護に多くの工程を要していた。そこで我々はアミノ酸の保護基の使用を最小限に抑えることによって工程数の短縮化を行い、かつ中間体の単離精製を行わず次の工程に進めることができる方法を構築することによって、合成の効率化を図った。

(2) HvYS1 トランスポーターの遺伝子とタンパク質の局在を RT-PCR と抗体染色で解析した。また、輸送選択性を明らかにするために、鉄吸収欠損酵母やアフリカツメガエルの卵母細胞にオオムギの HvYS1 とトウモロコシの ZmYS1 を発現させて活性を比較した。

(3) HvYS1 の基質特異性に起因するアミノ酸配列を決定するために、相同性の低い膜外ループを入れ替えたキメラ体の輸送活性を測定した。このループ部分の 40 アミノ酸ペプチドを化学合成し、CD スペクトルを測定して、 $\alpha$  ヘリックス度を計算した。

### 4. 研究成果

(1) 図 1 で示すように、市販の Boc-L-allylglycine を出発原料とし、オゾン酸化、続く無保護アゼチジン-2-カルボン酸との NaBH<sub>3</sub>CN 処理によって **6** とした。メタノールを減圧除去した後、エタノール塩酸処理によって Boc 基の除去とカルボン酸のエステル化を同時に行なって **7** とし、ついでエタノール塩酸を減圧除去し、**8** との還元的アミノ化を行って DMA の保護体である **9** を allylglycine より収率 55% ワンポットで合成した。ここで得られた **9** は有機層への抽出が可能であることから、主な副生成物であるアミノ酸類との分離が容易である。ついで脱保護によって DMA を得た。

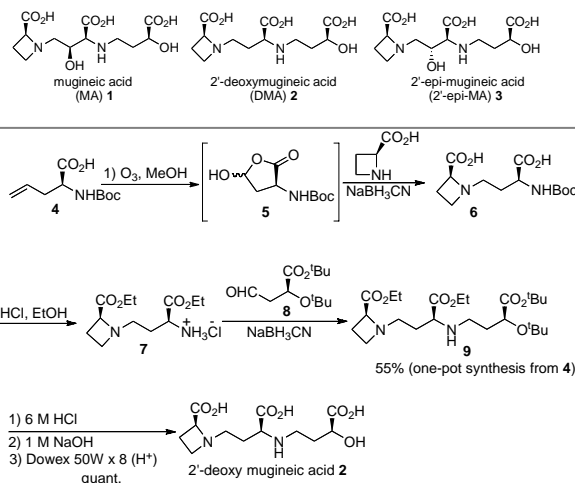


図 1 DMA の効率的合成法

MA も同様に合成し 3'-epi 体とともに 1 : 2 の割合で 6 ステップで得ることができた。本合成法によって全工程のスピードアップ化、製造操作の簡便化を図ることができ、ムギネ酸類を安価に大量に供給することを可能にした。

(2) HvYS1 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、電気生理実験で輸送活性を測定するとムギネ酸の 2'-水酸基のない DMA や立体異性のエピ体もムギネ酸と鉄錯体の活性に差がなかった (図 2)。このことからムギネ酸 2'-水酸基に標識基をつけることを考えた。プロパルギル基を導入してクリック反応経路でベンゾフェノン、クマリン、トリアゾールなどの標識体を作成し、ムギネ酸類鉄錯体輸送メカニズムの解明に発展させる。

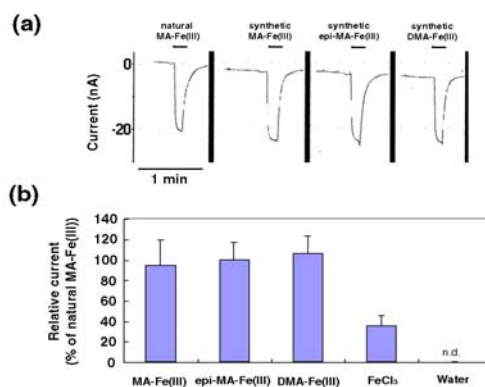


図 2 天然ムギネ酸と合成 MA、2'-エピ MA、DMA 鉄錯体の輸送活性比較

(2) HvYS1 遺伝子は、オオムギの遺伝子情報データベースから ZmYS1 のホモロジー検索を行い、全長 2430 bp (678 アミノ酸) の cDNA を同定した。ZmYS1 とアミノ酸配列と比較すると相同性が 72.7% と高く、予想される 12 個の膜貫通領域では特に高い相同性を示した。HvYS1 遺伝子はオオムギの根に主に発現しており、鉄欠乏状態にすると mRNA 量が約

50 倍増加することがわかった。HvYS 1 タンパク質はオオムギの根の表皮細胞の細胞膜に強く発現していた。

(3) アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた HvYS1 は、ムギネ酸鉄(III)錯体と比較すると、他の金属、銅、亜鉛、ニッケル、マンガン、コバルトのムギネ酸錯体やニコチアミン鉄(II)錯体には低い輸送活性を示した。HvYS1 は ZmYS1 に比べて、ムギネ酸鉄(III)錯体特異的に輸送するトランスポーターであることが示された(図 3)。

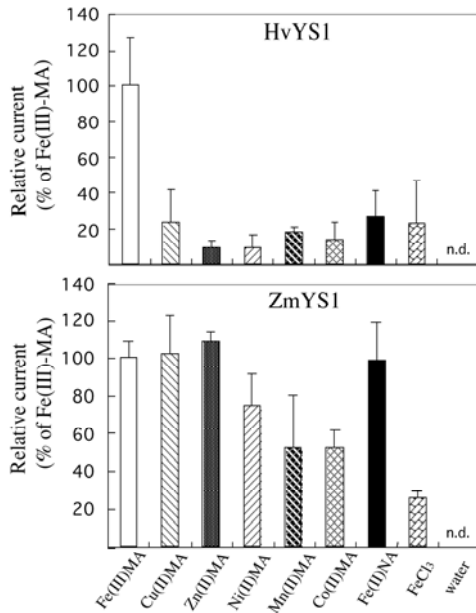


図 3 オオムギ HvYS1 とトウモロコシ ZmYS1 トランスポーターの輸送選択性の違い

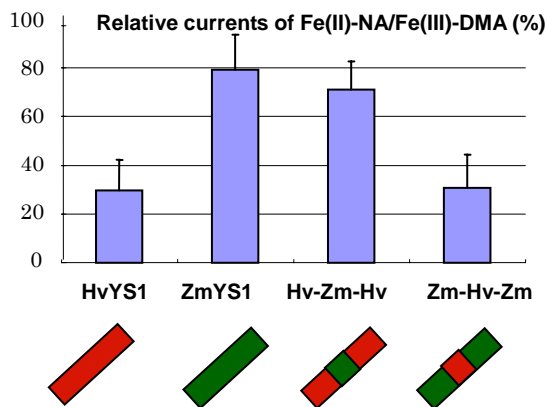


図 4 HvYS1 と ZmYS1 キメラタンパク質とその輸送活性

(4) HvYS1 と ZmYS1 のループ部分を入れ替えたキメラ体を作成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ電気生理実験を行った。その結果、N 末や C 末端に関係なく 6 番目の膜外ループが基質特異性を担うことが明らかになった(図 4)。この膜外ループ内の約 40 アミノ酸からなるペプチドの CD 測定によ

り解析すると、ZmYS1 はほとんど  $\alpha$  ヘリックス度が 0 に対し、HvYS1 は  $\alpha$  ヘリックス構造を 17% とることを確認した。

#### 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〔雑誌論文〕(計 5 件)

下記の雑誌論文はすべて査読有り。

① Murata Y, Harada E, Sugase K, Namba K, Horikawa M, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K, Iwashita T, Kusumoto S; specific transporter for iron (III)-phytosiderophore complex involved in iron uptake by barley roots. *Pure and Applied Chem.* 80(12) 2689-2697 (2008)

② Namba K, Murata Y, Horikawa M, Iwashita T, and Kusumoto S A Practical Synthesis of the Phytosiderophore 2'-Deoxymugineic Acid: A Key to the Mechanistic Study of Iron Acquisition by Gramineous Plants *Angew. Chem. Int. Ed.* 46(37), 7060-7063 (2007)

③ Harada E, Sugase K, Namba K, Iwashita T and Murata Y; Structural Element Responsible for the Fe(III)-phytosiderophore Specific Transport by HvYS1 Transporter in Barley. *FEBS Lett.* 581(22), 4298-4302 (2007)

④ Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y, Sato K, Katsuhara M, Takeda K and Ma JF; An Aluminum-activated Citrate Transporter in Barley. *Plant Cell Physiol.* 48(8), 1081-1091 (2007)

⑤ Murata Y, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K, Iwashita T; A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *Plant J.* 46(4), 563-572 (2006)

[学会発表] (計 12 件)

① 村田佳子、伊藤喜之、難波康祐、原田英美子、岩下孝、田中良和; 「ムギネ酸類鉄(III)錯体トランスポーター-HvYS1 トランスジェニックペチュニアの解析」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 2008.12.9-12、神戸

② Murata Y, Harada E, Sugase K, Namba K, Horikawa M, Iwashita T, Kusumoto S; Structural Element Responsible for the Specific Transport by Iron(III)-phytosiderophore Transporter HvYS1 in Barley. XIV International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants (ISINIP) 2008.10.11-16, Beijing, China

③ 村田佳子、原田英美子、菅瀬謙治、難波康祐、岩下孝; 「オオムギのファイトシデロフォア・鉄錯体トランスポーターにおける基

質特異性の解析」第19回日本微量元素学会  
2008.7.3-4、東京

④ 村田佳子、原田英美子、菅瀬謙治、難波康祐、岩下孝；「オオムギのムギネ酸類鉄(III)錯体トランスポーターHvYS1における基質特異性の解析」第3回トランスポーター研究会 2008.6.7-8、京都

⑤ 村田佳子、原田英美子、菅瀬謙治、難波康祐、岩下孝；「オオムギのファイトシデロフォア・鉄錯体トランスポーターHvYS1の基質特異性に関する膜外ループの解析」第49回日本植物生理学会年会 2008.3.20-22、札幌

⑥ 村田佳子、原田英美子、菅瀬謙治、難波康祐、岩下孝；「ファイトシデロフォア・鉄錯体トランスポーターHvYS1の基質特異性を決定するアミノ酸配列の解析」第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 2007.12.11-15、横浜

⑦ Murata Y, Harada E, Sugase K, Namba K, Horikawa M, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K, Iwashita T, Kusumoto S; A Specific Transporter for Iron(III)-phytosiderophore, Mugineic Acid, Responsible for Barley Iron-Deficiency, International Symposium on Metallomics 2007 (ISM 2007) 2007.11.28-12.01, Nagoya, Japan

⑧ 村田佳子、馬建鋒、山地直樹、上野大勢、野本享資、岩下孝；「オオムギの根に特異的なファイトシデロフォア（ムギネ酸）鉄錯体トランスポーター」第18回日本微量元素学会学術集会 2007.7.5-6、福井

⑨ 村田佳子、馬建鋒、山地直樹、上野大勢、野本享資、岩下孝；「オオムギの根に特異的なファイトシデロフォア（ムギネ酸）鉄錯体トランスポーターの解析」第2回トランスポーター研究会 2007.6.9-10、東京

⑩ Murata Y, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K, Iwashita T; A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore, mugineic acid in barley roots. ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC; International Conference on Biodiversity and Natural Products 2006.7.23-28, Kyoto, Japan

⑪ Murata Y, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K, Iwashita T; A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore, HvYS1 in iron-deficient barley roots. 13<sup>th</sup> International Symposium on Iron Nutrition and Interaction in Plants (ISINIP) 2006.7.3-7 Montpellier, France

⑫ Murata Y, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K, Iwashita T; A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. 20<sup>th</sup> IUBMB International congress of

biochemistry and molecular biology  
2006.6.18-23 Kyoto, Japan

〔図書〕(計1件)

① 村田佳子、岩下孝；シーエムシー出版  
「ミネラルの科学と最新応用技術」第3章  
大麦の鉄取り込み機構 136-143、2008

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：ムギネ酸類の効率的製造方法

発明者：難波康祐、村田佳子

権利者：サントリー株式会社

種類：特許権

番号：特願2006-307397

出願年月日：2006年11月14日

国内外の別：国内、中国、台湾、EU他

名称：植物の色素量を増加させる方法

発明者：村田佳子、岩下孝

権利者：サントリー株式会社

種類：特許権

番号：PCT/JP2009/55516

出願年月日：2009年3月19日

国内外の別：国内、中国、台湾、EU他

○取得状況(計1件)

名称：ムギネ酸類の効率的製造方法

発明者：難波康祐、村田佳子

権利者：サントリー株式会社

種類：特許権

番号：第4117009

取得年月日：2008年4月25日

国内外の別：国内、中国、台湾、EU他

〔その他〕

ホームページ <http://www.sunbor.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田佳子 (MURATA YOSHIKO)

財団法人サントリー生物有機科学研究所・  
研究員

研究者番号：60256047

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岩下孝 (IWASHITA TAKASHI)

財団法人サントリー生物有機科学研究所・  
研究員

研究者番号：00150144

難波康祐 (NAMBA KOSUKE)

北海道大学・大学院理学研究院・講師

研究者番号：50414123

馬建鋒 (MA JIAN FENG)

岡山大学・資源生物科学研究所・教授

研究者番号：80260389