

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14367

研究課題名（和文）イネの鉄過剰耐性に関わる遺伝子の機能解析と鉄過剰耐性イネの作出

研究課題名（英文）Elucidation of the genes involved in Fe excess response mechanism and enhancement of Fe excess tolerance in rice

研究代表者

May Sann・Aung (Aung, May Sann)

秋田県立大学・生物資源科学部・特任助教

研究者番号：20799671

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：酸性土壌における天水稲作では、鉄過剰症は大きな問題であり、その耐性機構を解明することを目的に研究を実施し、次の3つの成果を得た。(1) OsNAS3がイネの鉄過剰耐性に重要な役割を持つことを明らかにした(2) 鉄過剰で発現が高く誘導される遺伝子のT-DNA挿入変異株を鉄過剰条件下で栽培し表現型を観察・分析することで、対象遺伝子の鉄過剰における役割を推測した。(3) バイオインフォマティクス手法により、鉄過剰応答に関わる新規シス制御因子とプロモーター構造を探索した。本研究成果により、鉄過剰耐性イネの育種や、鉄過剰を回避するイネの栽培方法を確立する上で有用な知見になることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界の30%の土壌は酸性土壌であり、特に中国や東南アジアあるいはアフリカの天水稲作地でのイネの生産において深刻な問題となっている。鉄過剰によりイネの収量が1割から5割低下し、まったく収穫できないこともある。毎年世界中で、8000万トンの収量が失われ、400億ドルの経済的損失が引き起こされている。本研究成果は、鉄過剰耐性のイネを育種したり、鉄過剰症を回避するイネの栽培方法を確立することで、鉄分過剰が発生しやすい土壌でのイネの生産性を向上することに、非常に役立つと期待される。本研究成果をもとに、近い将来、遺伝子導入や品種改良などの様々な方法で、新しい鉄耐性イネが誕生することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Iron excess is a major problem in rainfed rice cultivation in acidic soils.

I conducted research to elucidate the tolerance mechanism, and obtained the following results. (1) OsNAS3 plays an important role in iron excess tolerance in rice. (2) T-DNA insertion mutant genes whose expressions are highly induced by iron excess were used. They were grown under iron-excess conditions, and the phenotypes were observed, and physiological data were analyzed. The results suggested that target genes play important roles in iron excess tolerance. (3) Using bioinformatics methods, I searched for novel cis-regulatory elements and promoter structures involved in the iron excess response. The results of these studies are expected to contribute to breeding of iron excess-tolerant rice and establishing a cultivation method for rice that avoids iron excess toxicity.

研究分野：植物栄養

キーワード：鉄過剰 イネ OsNAS3 ニコチアミン シス制御因子 ストレス耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鉄はすべての生物にとって必須の栄養素である反面、過剰時には害となる。世界の 30 %の土壌は酸性土壌であり、特に中国や東南アジアあるいはアフリカの天水稲作地でのイネの生産において深刻な問題となっている。鉄過剰害によりイネの収量が1割から5割低下し、まったく収穫できないこともある。毎年世界中で、8000万トンの収量が失われ、400億ドルの経済的損失が引き起こされている。生理学的知見があるものの、イネが鉄過剰条件下でどのような分子応答を示すのか、また鉄過剰耐性に関連する遺伝子の報告は大変限られている。これらを理解することは、鉄過剰に耐性のある作物を育種するために非常に重要である。そこで私は、イネの鉄過剰応答の分子機構解明を目指した。

2. 研究の目的

鉄過剰耐性のあるイネを作るために、イネの鉄過剰応答の分子機構に関わるシスエレメントや標的遺伝子を探索し、その機能を解明する必要がある。この目的を達成するために、私は以下のような研究を計画した。

(計画 1) 鉄過剰耐性に関わるニコチアナミン合成酵素(*OsNAS3*)の詳細な機能解析

(計画 2) T-DNA 挿入変異株を用いた鉄過剰耐性関連遺伝子の機能解析

(計画 3) 鉄過剰応答に関連するシスエレメントの探索

3. 研究の方法

(1) 計画 1 (鉄過剰耐性機構における *OsNAS3* の役割)

鉄過剰における *OsNAS3* の機能を理解するために、さまざまな組織でのプロモーター-GUS による遺伝子発現局在の解析と行った。また、*OaNAS3* ノックアウトイネを用いて次のような分析を行った。 遺伝子発現解析 : *OsNAS3* ノックアウトおよび野生型のイネを通常の鉄および 70 倍の鉄濃度の水耕液で栽培し、葉から RNA を抽出した。また、上記のイネを通常の鉄濃度、または 10 倍、20 倍、30 倍、50 倍、70 倍のさまざまな鉄過剰濃度で栽培し、*OsDMAS1* 遺伝子、*OsNAAT1* 遺伝子の発現レベルを調べ、NA, DMA の濃度も測定した。 鉄の組織化学的局在分析 : プルシアンブルー染色法を使用して、通常の鉄濃度、および 70 倍の鉄濃度の条件下で成長した *OsNAS3* ノックアウトおよび野生型のイネの葉組織における鉄の分布を検出した。

(2) 計画 2 (T-DNA挿入変異株を用いた、新規鉄過剰関連遺伝子の機能解析)

マイクロアレイのデータから、鉄過剰条件下で様々な組織で強く発現する遺伝子は、鉄過剰耐性機構に重要な役割を果たすことが予想された。そこで、そのような遺伝子のT-DNA変異株と野生イネを鉄過剰条件下で栽培し、生育検定、表現型の観察、金属含有量測定、鉄関連遺伝子の発現解析などを行い、その遺伝子の機能を推測した。

(3) 計画 3 (バイオインフォマティクスによる鉄過剰応答を示すシスエレメントの探索)

イネの鉄過剰処理の網羅的遺伝子発現データ (マイクロアレイ) を元に、農研機構の筧雄介博士と共同研究を行い、筧博士の開発したシスエレメントを探索する革新的なプログラムである MAMA を用いてバイオインフォマティクスの手法により鉄過剰応答に関わるシスエレメント配列の候補を探索した。さらに候補となるシスエレメントから、鉄過剰の制御機構を解明した。

4. 研究成果

(1) 研究1. 鉄過剰耐性機構における *OsNAS3* の役割

ニコチアナミンは高等植物に広く存在する鉄キレート物質で、鉄の体内輸送に関わっている。*OsNAS3*は、ニコチアナミン生合成酵素の一つであり、鉄過剰条件下で、様々な組織で強く発現された(引用文献)。上記の実験により次のような結果を得た。

遺伝子発現解析: *OsNAS3* ノックアウトおよび野生型のイネを通常の鉄および 70 倍の過剰な鉄濃度の水耕液で栽培し、葉から RNA を抽出した。また、上記のイネを通常の鉄濃度、または 10 倍、20 倍、30 倍、50 倍、70 倍のさまざまな過剰な鉄濃度で栽培し、*OsDMAS1* 遺伝子、*OsNAAT1* 遺伝子の発現レベルを調べ、NA、DMA 濃度も測定した。その結果、NA と DMA は鉄過剰下においても植物体内に存在し、鉄過剰下においても鉄の恒常性に関わる何らかの役割があることが示唆された。根における *OsNAAT1* と *OsDMAS1* の発現は減少したが、鉄過剰条件下でも完全に発現は抑制されなかった。また、根と地上部の接続部位、茎、古い葉、および最新の葉において、鉄過剰時に発現が誘導された。したがって、NA だけでなく DMA も鉄過剰条件下での鉄無害化プロセスに関与する可能性があることが示唆された。

鉄の組織化学的局在分析: プルシアンブルー染色法を使用して、通常の鉄濃度および 70 倍の過剰な鉄濃度の条件下で栽培した *OsNAS3* ノックアウトおよび野生型イネの葉組織における鉄の組織化学的局在を観察した。野生イネよりもノックアウト植物の最新葉と古葉で鉄染色がより顕著であり、鉄が多く蓄積されていることが分かった(図 1)。ノックアウト植物における鉄蓄積は、ノックアウト植物がニコチアナミンを十分に合成できず、過剰鉄を根の適切な組織に移動し隔離させることができなかつたため、根から地上部へ鉄を輸送させてしまったことに起因する可能性がある。

私は以前、*OsNAS3* がすべてのイネ組織で鉄過剰時に高度に発現誘導されることを発見した(引用文献)。また、プロモーター-GUS分析により、*OsNAS3*は、対照条件と比較して、鉄過剰下の根、茎、および古い葉組織で広範囲に発現していることが明らかになった。*OsNAS3*ノックアウト植物は過剰な鉄が弱かった。まとめると、*OsNAS3*はイネの鉄の過剰ストレスを抑制するのに重要な役割を果たしている可能性があることが示唆されている(引用文献)。

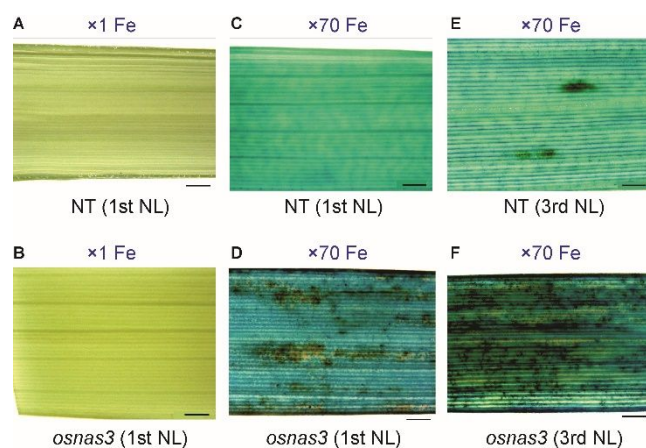


図1 野生イネ(NT)と *osnas3* の葉の鉄局在

(2) 研究2. T-DNA 挿入変異株を用いた新規鉄過剰関連遺伝子の機能解析

私は以前、鉄過剰のマイクロアレイ結果に基づき、イネの鉄過剰耐性に関与する遺伝子の候補を見出した。その遺伝子の詳細な機能解析を行うことを目的として次の研究を行った。鉄過剰において発現が顕著に誘導される遺伝子の T-DNA 挿入変異株を用いて、鉄過剰条件下で水耕栽培を行い、表現型(生育、元素分析、鉄の組織染色)を調べ、鉄過剰耐性における遺伝子の役割を推測した。その結果、3つの遺伝子の T-DNA 挿入変異株において、鉄 70 倍で生育が顕著に抑制された。また、変異株で顕著な葉の斑点や褐色化が生じ、鉄過剰に感受性を示していた。また、鉄過剰栽培時に、変異株の一つは、鉄濃度が古葉で 1.4 倍上昇したが、根では低下して

いた。このことから、対象の遺伝子は鉄過剰耐性において重要な役割を果たすことが示唆された。

(3) 研究3. バイオインフォマティクスによる鉄過剰応答を示すシスエレメントの探索

転写因子が結合する遺伝子配列であるシスエレメントが、遺伝子の適切な発現制御に重要な役割を果たしている。しかし、イネの鉄過剰応答に関連するシスエレメントについては、ほとんど知られていない。私の網羅的なマイクロアレイデータ(引用文献)を使用して、バイオインフォマティクスのアプローチを使用して、イネの新規シスエレメントとプロモーター構造をさらに探求した。

ネットワーク解析: まず、遺伝子発現の網羅的ネットワーク解析を行い、鉄過剰反応性転写レギュロンの遺伝子発現パターンを分類し、4つの主要な発現クラスターを発見した。鉄貯蔵型、鉄キレーター型、鉄取り込み型、WRKYなどの共発現型である。

MAMA解析: 次に、この4つの遺伝子発現タイプのクラスター内のシスエレメントを、筧博士らが2013年に確立したMAMA (microarray-associated motif analyzer) と呼ばれる機械学習手法を用いて探索した。その結果、すべての組織における鉄過剰反応は、MAMAが予測したCRE候補によって85%以上の精度で説明された。

シスエレメント候補の解明: MAMA解析により、560のシスエレメントの候補を抽出し、イネの各組織における鉄過剰反応に直接関係する42の重要な保存配列を同定した。そこには、GCWGCWGC、CGACACGC、Myb結合様モチーフなど、いくつかの新しいシスエレメントが鉄過剰シスエレメントの候補が含まれている(図2)。

また、既知のシスエレメントが鉄過剰反応に新たな役割を果たしていることを発見し、鉄過剰反応遺伝子の中にIDEF1-, Zinc Finger-, WRKY-配列を含むモチーフがあることを明らかにした。

鉄過剰応答遺伝子の制御の分子モデル: 鉄過剰応答遺伝子の発現パターンを新たに発見したシスエレメントに基づいて、鉄過剰反応遺伝子を制御する分子モデルとプロモーター構造を推定した。

今回得られた鉄過剰関連シスエレメントおよび保存された配列は、鉄過剰応答経路に関与する遺伝子や転写因子の発見、イネの鉄過剰応答機構の解明、さらには今後の鉄過剰応答研究のための包括的なリソースとなる。さらに今回の知見は、鉄過剰耐性品種の作出にも応用しうる(引用文献)。

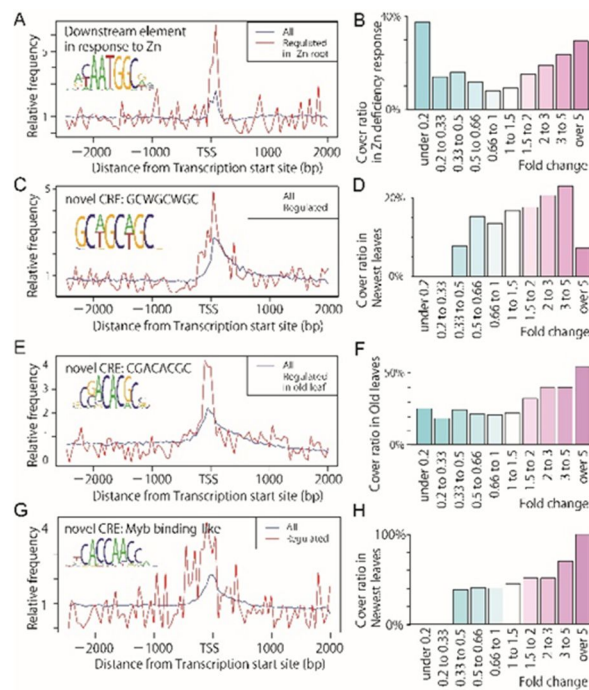


図2 発見したシスエレメントとプロモーター領域における分布

(4) 最新の報告と私の報告(引用文献 -)に基づいて、私は次のように鉄過剰害に応答するイネの4つの分子防御機構を提案した(引用文献)。防御1: 根の鉄排除による鉄過剰耐性。防御2: 根の鉄の保持と地上部への鉄の転流の回避による鉄過剰耐性。防御3: 地上部の鉄の隔離による鉄過剰耐性。防御4: 鉄過剰によって生じる酸化ストレスによる鉄過剰耐性。これら

の鉄過剰耐性メカニズムの発見に基づいて、鉄過剰耐性イネを生産するためのアプローチを検討することができる。

T-DNA 挿入変異株の分析により、新しい対象遺伝子の機能を分析することで、この鉄過剰に対する防御メカニズムを詳細に解明できるだろう。また、本研究で得られた鉄過剰関連シスエレメント候補は、イネの鉄過剰耐性メカニズムをさらに解明するための重要なデータとなり、また、耐性イネの新品種を生み出すための遺伝子発現の増強に役立つと考えられる。私の研究成果は、鉄過剰耐性イネを育種し、鉄過剰耐性を回避するイネの栽培方法を確立し、鉄過剰耐性が発生しやすい土壌でのイネの生産性を向上させるために、非常に役立つと期待されている。

<引用文献>

Aung et al. 2018a, Soil Sci Plant Nutr, 64: 370-385

Aung et al. 2018b, Physiol Plant, 163: 282-296

Aung et al. 2019, Front Plant Sci, 10:660

Takei et al. 2021, Front Plant Sci, 12: 660303

Aung and Masuda 2020, Front Plant Sci, 11:1102

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 May Sann Aung, Hiroshi Masuda, Tomoko Nozoye, Takanori Kobayashi, Jong-Seong Jeon, Gynheung An, Naoko Kishi Nishizawa.	4. 巻 10
2. 論文標題 Nicotianamine synthesis by OsNAS3 is important for mitigating iron excess stress in rice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Sciences	6. 最初と最後の頁 660
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2019.00660	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 Hiroshi Masuda, May Sann Aung, Takanori Kobayashi, Hamada, Takeshi, Naoko Kishi Nishizawa.	4. 巻 10
2. 論文標題 Enhancement of iron acquisition in rice by the mugineic acid synthase gene with ferric iron reductase and OsIRO2 confers tolerance in submerged and nonsubmerged calcareous soils.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Sciences	6. 最初と最後の頁 1179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2019.01179	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 3.Hiroshi Masuda, May Sann Aung, Keisuke Maeda, Takanori Kobayashi, Naoki Takata, Toru Taniguchi, Naoko Kishi Nishizawa	4. 巻 64
2. 論文標題 Iron-deficiency response and expression of genes related to iron homeostasis in poplars	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 576-588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00380768.2018.1480325	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 May Sann Aung, 増田寛志	4. 巻 2
2. 論文標題 イネの鉄過剰：生理的応答と分子メカニズム	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 91-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Aung MS, Kobayashi T, Masuda H, Nishizawa NK	4. 巻 163
2. 論文標題 Rice HRZ ubiquitin ligases are crucial for the response to excess iron.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiological Plant	6. 最初と最後の頁 282-296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pp1.12698	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 Suzuki M, Urabe A, Sasaki S, Tsugawa R, Nishio S, Mukaiyama H, Murata Y, Masuda H, Aung MS, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of a mugineic acid family phytosiderophore analog as an iron fertilizer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21837-6	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 Kakei Y, Masuda H, Nishizawa NK, Hattori H, Aung MS (Aungが責任著者)	4. 巻 12
2. 論文標題 Elucidation of novel cis-acting elements and promoters involved in iron excess response mechanisms in rice by bioinformatics approach.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Sciences	6. 最初と最後の頁 660303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.660303	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 Aung MS and Masuda H. (Aungが責任著者)	4. 巻 11
2. 論文標題 How does rice defend against excess iron?: Physiological and molecular mechanisms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Sciences	6. 最初と最後の頁 1102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.01102	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 Masuda H and Aung MS	4. 巻 6
2. 論文標題 Boosting crop nutrition to improve lives.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 68-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21820/23987073.2020.6.68	査読の有無 無
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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 May Sann Aung, Hiroshi Masuda, Takanori Kobayashi, Naoko K. Nishizawa
2. 発表標題 Iron biofortification of rice by introduction of GmFerritin, HvNAS1, OsYSL2 and mugeinic acid synthase gene (IDS3) with rice OsALS as a marker gene
3. 学会等名 第65回 日本土壌肥料学会 全国大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 May Sann Aung, Hiroshi Masuda, Takanori Kobayashi, Naoko K. Nishizawa
2. 発表標題 Nicotianamine synthase, OsNAS3, mitigates iron excess in rice
3. 学会等名 17th International Symposium on Rice Functional Genomics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 May Sann Aung, Hiroshi Masuda, Tomoko Nozoye, Takanori Kobayashi, Gynheung An, Jong-Seong Jeon, Naoko K. Nishizawa
2. 発表標題 Nicotianamine synthesis by OsNAS3 is important for mitigation of iron excess stress in rice
3. 学会等名 19th International Symposium on Iron Nutrition and Interaction in Plants (ISINIP) (Taipei, Taiwan) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 May Sann Aung, Hiroshi Masuda, Tomoko Nozoye, Takanori Kobayashi, Naoko K. Nishizawa
2. 発表標題 Nicotianamine synthesis by OsNAS3 is important for iron excess tolerance in rice
3. 学会等名 第64回 土壤肥料学会神奈川大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 May Sann Aung
2. 発表標題 イネの鉄過剰症と鉄過剰応答に関わる分子メカニズム
3. 学会等名 第42回 日本鉄バイオサイエンス学会 金沢大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 May Sann Aung, Hiroshi Masuda, Takanori Kobayashi, Naoko K. Nishizawa
2. 発表標題 Iron toxicity in rice: Physiological and transcriptomic analysis in various rice tissues
3. 学会等名 16th International Symposium on Rice Functional Genomics (Tokyo) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 May Sann Aung, Hiroshi Masuda, Takanori Kobayashi, Naoko K. Nishizawa.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 28 pages (149-177)
3. 書名 Iron Biofortification: The Gateway to Overcoming Hidden Hunger. In: Costa de Oliveira A., Pegoraro C., Ebeling Viana V. (eds) The Future of Rice Demand: Quality Beyond Productivity.	

〔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
研究協力者	増田 寛志 (Masuda Hiroshi)	秋田県立大学	
研究協力者	笈 雄介 (Kakei Yusuke)	農研機構	
研究協力者	西澤 直子 (Nishizawa Naoko K.)	石川県立大学	
研究協力者	小林 高範 (Kobayashi Takanori)	石川県立大学	

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