

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 -2008

課題番号：19780048

研究課題名（和文） イネ科植物の鉄欠乏応答遺伝子発現制御に関する研究

研究課題名（英文） Gene regulation system under Fe deficiency in rice

研究代表者

中西 啓仁(NAKANISHI HIROMI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：80282698

研究成果の概要：

イネ科植物の鉄欠乏に応答して遺伝子の発現を引き起こすシスエレメント IDE1 と IDE2 に結合する転写因子の検索とそれらの解析を行った。IDEF1 と IDEF2、二つの転写因子を単離・同定することに成功した。また、鉄獲得に重要な転写因子 IR02 も単離した。これらの転写因子を用いて鉄欠乏耐性の組換え植物を作成した。DEF1、IDEF2、OsIR02 が鉄欠乏応答に關与する多段階の遺伝子制御ネットワークを担うことによって鉄欠乏応答性と耐性を制御することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：植物成長・生理

1. 研究開始当初の背景

世界の耕地土壌の約 3 分の 1 は石灰質アルカリ土壌です。この石灰質アルカリ土壌では高 pH のために鉄は難溶性の状態が存在するため、鉄(III)イオンはわずかの低濃度でしか土壌溶液中に溶解していません。イネ科植物(Strategy-II plants)は鉄欠乏条件下では植物で唯一の鉄キレーターであるムギネ酸類を放出しています。これまでにこのムギネ酸類の生合成経路を確定し、また、ムギネ酸類の生合成に関わる全ての酵素の精製、ある

いはそれらの遺伝子の単離に成功していません。鉄欠乏条件下で強く発現する遺伝子(IDS1、IDS2、IDS3)およびタンパク質(APRT、FDH)やその遺伝子に関して、種々の性質を明らかにしてきました。また、IDS2 プロモーターを用いてタバコ、シロイヌナズナ、イネでの発現解析を行うことによって、植物の鉄欠乏応答性シスエレメントとして、IDE1、IDE2 という 2 つの配列を明らかにしました。この IDE1 と IDE2 は、プロモーター上で協調的に機能し、根特異的かつ鉄欠乏誘導性の遺伝子

発現を付与します。植物では、重金属欠乏において働くシス因子として初めて同定されたものです。この IDE1 と IDE2 はムギネ酸合成系の酵素遺伝子の上流領域に見つかるので、ムギネ酸類の分泌量の増加した鉄欠乏耐性の植物を作成するためにもこの2つのシスエレメントに結合するトランス因子の同定と単離は必須な課題でした。このシスエレメント IDE1、IDE2 による解析とは独立にイネのマイクロアレイ解析を行うことにより新たな bHLH 型転写因子 IR02 を見出しました。OsIR02 は鉄欠乏による発現の誘導を強く受けます。IR02 はイネでもオオムギでも、鉄十分では主に根で発現していますが、鉄欠乏処理により全身で強く発現上昇します。本研究では IDE1、IDE2 に結合する転写因子の検索、IR02 による鉄欠乏に応答した遺伝子発現制御、これらとは異なる鉄欠乏応答性遺伝子発現制御機構を明らかにすることをめざしました。

2. 研究の目的

本研究ではイネ科植物、特にイネとオオムギのムギネ酸類による鉄獲得機構に関与する遺伝子の鉄欠乏による発現に大きく関与するシス因子 IDE1 と IDE2 に結合するトランス因子の単離、鉄欠乏によってそれ自身が大きく発現誘導される bHLH 型転写因子 IR02 によって制御を受ける遺伝子およびその発現制御機構の解明、それ以外の鉄欠乏応答性転写因子の単離を行い、それらからイネ科植物の鉄欠乏時の遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目的としました。

3. 研究の方法

酵母 one hybrid 法を用いたトランス因子の同定・単離：オオムギの *IDS2* 遺伝子のプロモーター領域から明らかとなった鉄欠乏応答性シスエレメント IDE1 と IDE2 を用いて、市販の酵母の one hybrid スクリーニングキットでトランス因子のスクリーニングを行った。スクリーニング用のライブラリーには、鉄欠乏のイネとオオムギの根から抽出した RNA を元に作成した cDNA プールを用いた。Bait 配列としては、IDE1、IDE2 を単独で複数回繰り返したもの、もしくは IDE1 と IDE2 を接続したものなどいくつかの配列を作成する予定である。

アフィニティクロマトグラフィーを用いたトランス因子の同定・単離：シスエレメント IDE1 と IDE2 を含む *IDS2* プロモーター領

域の一部を合成した。この際に 5' 端をビオチンでラベルしておいた。鉄欠乏栽培したオオムギもしくはタバコの根から核抽出物を得た。ビオチンラベルされた DNA と核抽出物をいろいろな条件下で結合させた。これをストレプトアビジンが結合された樹脂の詰めてあるカラムを通した。その後、LC-MS/MS などによるタンパク質配列の決定を行い、該当する cDNA の単離を行うことを試みた。

マイクロアレイによって得られた bHLH 型転写因子 OsIR02 の解析：IR02 がムギネ酸を介した鉄獲得に関与しているかどうかを調べた。OsIR02 を過剰発現するイネ、RNAi 法により発現を抑制したイネを作成し、鉄欠乏栽培することにより鉄欠乏に対する耐性、ムギネ酸分泌量、ニコチアミンやムギネ酸の生体内の存在量、植物体内の金属含量、ムギネ酸合成に関わる遺伝子あるいは鉄欠乏で発現の誘導される遺伝子の発現量を確認し、OsIR02 の植物体内での役割を明らかにすることを試みた。また、過剰発現体、発現抑制体を用いてマイクロアレイ解析を行うことにより OsIR02 の発現変化によって影響を受けた遺伝子を探索し、OsIR02 の関わる鉄欠乏応答性の遺伝子発現ネットワークモデルを構築した。

マイクロアレイからの鉄欠乏応答性転写因子の解析：イネとオオムギのマイクロアレイ解析から DNA 結合能、核移行能を持つと予想される約 20 個の遺伝子が鉄欠乏によって発現誘導を受けていた。これらの遺伝子についてノーザン解析によってその発現の誘導性を確かめるとともに、RNAi による発現抑制植物の作成、過剰発現植物の作成を試みた。さらに、プローブの数が約 44,000 となった新たなイネのマイクロアレイを用いて新たに鉄欠乏処理による遺伝子発現の変化を測定することにより更に数多くの転写因子が明らかにすることを試みた。

IDEF1、IDEF2 の機能解析：IDEF1、IDEF22 を過剰発現するイネ、RNAi 法により発現を抑制したイネを作成し、鉄欠乏栽培することにより鉄欠乏に対する耐性、ムギネ酸分泌量、ニコチアミンやムギネ酸の生体内の存在量、植物体内の金属含量、ムギネ酸合成に関わる遺伝子あるいは鉄欠乏で発現の誘導される遺伝子の発現量を確認し、IDEF1、IDEF2 の植物体内での役割を明らかにする。また、過剰発現体、発現抑制体を用いてマイクロアレイ解析を行うことにより IDEF1、IDEF2 の発現変化によって影響を受けた遺伝子を探索し、IDEF1、IDEF2 の関わる鉄欠乏応答性の遺伝子発現ネットワークモデルを構

築する。

4. 研究成果

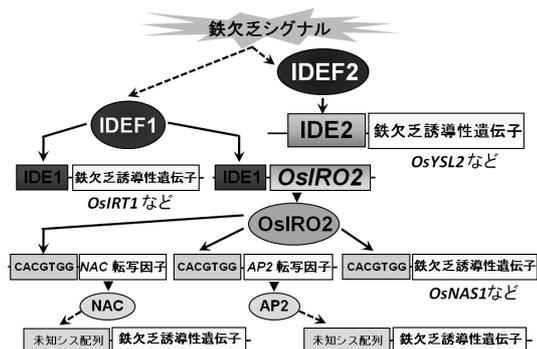
イネ科植物の鉄欠乏応答性のシスエレメント IDE1、IDE2 に結合する転写因子の検索を行った。IDE1 はこれまでに知られている転写因子の中でも植物特有の転写因子ファミリーABI3/VP1 の未だ解析されていないサブグループに属し、IDE1 内の CATGC 配列に特異的に結合することが分かった。IDEF1 を恒常的にタバコで高発現させると鉄欠乏の根でのみ IDE1 を介した発現が活性化された。さらに鉄欠乏応答性 IDS2 プロモーターの制御下で IDEF1 を発現させた形質転換イネは、鉄欠乏水耕液での鉄欠乏クロロシスの進行が遅く、石灰質アルカリ土壌で良好な初期生育を見せた。この形質転換イネは鉄欠乏条件下での二価鉄トランスポーター遺伝子 OsIRT1 と鉄欠乏誘導性の転写因子 OsIRO2 の発現を促進させた。IDEF1 は鉄欠乏応答に関与する多段階の遺伝子制御ネットワークの初期段階を担うことによって鉄欠乏耐性と耐性を制御することがわかった。

イネの鉄欠乏誘導性 bHLH 型転写因子 OsIRO2 はムギネ酸類の生合成経路に関わる酵素遺伝子、鉄トランスポーター遺伝子の発現制御に必須である。この OsIRO2 の過剰発現イネは非組換えイネに比べてムギネ酸類生合成経路の遺伝子の発現が高く、ムギネ酸類の分泌量も多かった。

酵母を用いた one hybrid スクリーニングにより IDE2 に結合する転写因子の検索を行った。鉄欠乏処理をしたイネの根から作成した cDNA ライブラリーを用いた。スクリーニングにより新規な転写因子 IDEF2 を単離した。またその相同遺伝子をオオムギからも単離した。IDEF2 は NAC 転写因子ファミリーに属し、これまでは明らかにされていないグループに存在する。ゲルシフト電気泳動解析および cyclic amplification and selection of targets 実験によって IDEF2 は IDE2 に存在する CA(A/C)G(T/C)(T/C/A)(T/C/A) を結合認識配列とすることが分かった。IDEF2 遺伝子の発現はイネの根と地上部では恒常的であった。RNAi および CRES-T により IDEF2 の機能を欠損させた組換えイネでは、鉄の恒常性に異常が起こった。通常のイネで鉄欠乏で発現の誘導される二価鉄ニコチアミンのトランスポーターである OsYSL2 が IDEF2 機能欠損イネでは発現誘導されなくなった。また、この IDEF2 機能欠損イネでの発現が抑制された遺伝子のプロモーター領域の多くで IDE2

様配列が見出された。

以上から、イネ科植物においては、鉄欠乏というシグナルが何らかの形で伝えられ、それを受け取って、まず、IDEF1、IDEF2 の機能が活性化され、OsIRO2 のような上流に IDE1、IDE2 を持つ遺伝子の発現が誘導させる。そして、OsIRO2 によってムギネ酸類生合成に関わる遺伝子およびさらに下流の転写因子、鉄欠乏誘導性遺伝子の発現へとつながっていく鉄欠乏応答性遺伝子の遺伝子発現ネットワーク(下図)が新たに明らかとなった。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Kobayashi T, Ogo Y, Nakanishi Itai R, Nakanishi H, Takahashi M, Mori S, Nishizawa NK, The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 104, 19150-19155, 2007, 有

Ogo Y, Nakanishi Itai R, Nakanishi H, Kobayashi T, Takahashi M, Mori S, Nishizawa NK, The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. Plant J, 51, 366-377, 2007, 有

Ogo Y, Kobayashi T, Itai RN, Nakanishi H, Kakei Y, Takahashi M, Toki S, Mori S, Nishizawa NK, A novel NAC transcription factor IDEF2 that recognizes the iron deficiency-responsive element 2 regulates the genes involved in iron homeostasis in plants. J Biol Chem, 283 13407-13417, 2008

[学会発表](計13件)

Kobayashi T, Nakayama Y, Yoshihara T, Suzuki M, Inoue H, Itai RN, Ogo Y,

Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK, Regulation of iron acquisition-related rice genes by novel iron deficiency-responsive cis-acting elements, IDE1 and IDE2. 第5回イネ国際機能ゲノムミックスシンポ、2007.10.15-17、つくば

小郷裕子、板井玲子、中西啓仁、小林高範、高橋美智子、森敏、西澤直子、ムギネ酸類合成に関わる遺伝子群を制御する転写因子OsIRO2過剰発現イネは鉄欠乏耐性を示す、日本土壤肥料学会、2007.8.22-24、東京

小林高範、小郷裕子、板井玲子、中西啓仁、高橋美智子、森敏、西澤直子、植物の鉄欠乏応答と耐性を制御する新規転写因子IDEF1、日本植物生理学会、2008.3.20-22、札幌

小郷裕子、板井玲子、中西啓仁、小林高範、高橋美智子、森敏、西澤直子、鉄欠乏誘導性転写因子 OsIRO2 過剰発現は石灰質アルカリ土壌においてイネの鉄吸収および移行を向上させる、日本植物生理学会、2008.3.20-22、札幌

中西啓仁、小林高範、小郷裕子、板井玲子、西澤直子、鉄の吸収と体内移行に関わる遺伝子の発現機構、日本土壤肥料学会、2008.9.9-13、愛知

小林高範、小郷裕子、板井玲子、中西啓仁、高橋美智子、西澤直子、IDE1 結合性転写因子 IDEF1 は鉄欠乏応答と耐性を制御する、日本土壤肥料学会、2008.9.9-13、愛知

小郷裕子、小林高範、板井玲子、中西啓仁、寛雄介、高橋美智子、土岐精一、森敏、西澤直子、鉄欠乏応答性シスエレメント IDE2 に結合する新規 NAC 型転写因子 IDEF2 の単離と解析、日本土壤肥料学会、2008.9.9-13、愛知

Kobayashi T, Ogo Y, Itai RN, Nakanishi H, Takahashi M, Mori S, Nishizawa NK, The novel transcription factor IDEF1 (IDE binding factor 1) regulates the iron deficiency response and tolerance in plants. XIV International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants, 2008.10.11-16, Beijing

Itai RN, Ogo Y, Kobayashi T, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK, Gene profiling in the early iron deficiency stress in rice roots. XIV International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants,

2008.10.11-16, Beijing

Ogo Y, Itai RN, Nakanishi H, Kobayashi T, Takahashi M, Mori S, Nishizawa NK, Overexpression of the transcription factor OsIRO2 improved both uptake and translocation of iron in rice under low iron availability conditions. XIV International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants, 2008.10.11-16, Beijing

Ogo Y, Kobayashi T, Itai RN, Nakanishi H, Kakei Y, Takahashi M, Toki S, Mori S, Nishizawa NK, A novel NAC transcription factor IDEF2 that recognizes the iron deficiency-responsive element 2 regulates the genes involved in iron homeostasis in plants. XIV International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants, 2008.10.11-16, Beijing

小郷裕子、小林高範、板井玲子、中西啓仁、寛雄介、高橋美智子、土岐精一、森敏、西澤直子、鉄欠乏応答性シスエレメント IDE2 に結合する新規 NAC 型転写因子 IDEF2 の単離と解析、日本植物生理学会、2009.3.21-24、名古屋

小林高範、板井玲子、小郷裕子、寛雄介、中西啓仁、高橋美智子、西澤直子、鉄欠乏応答性シスエレメント結合性転写因子 IDEF1 は鉄欠乏の初期応答に必須である、日本植物生理学会、2009.3.21-24、名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 啓仁 (NAKANISHI HIROMI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：80282698

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者