

平成 22 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20780047

研究課題名（和文）イネの生殖過程における金属制御機構の解明

研究課題名（英文）Study of metal regulation mechanism at reproductive stage of rice plant

研究代表者

高橋 美智子 (MICHIKO TAKAHASHI)

宇都宮大学 農学部 准教授

研究者番号：90345182

研究成果の概要（和文）：イネの胚発生過程において重要な遺伝子を探索するため、野生型イネの開花前および開花後、種子成熟の初期の 3 段階の子房および未熟種子を集め葉に対する発現を比較するマイクロアレイ解析を行った。花粉発芽時の遺伝子発現解析も行った。実験で明らかになった、イネ胚発生時に重要な遺伝子および花粉発芽時に重要な遺伝子には数種の金属トランスポーターがあり、イネ胚発生時および花粉発芽時に金属が重要であることを示唆した。

研究成果の概要（英文）： To find important genes expressed during embryogenesis of rice plant, microarray analysis was performed using ovary before and after anthesis and during seed development. In this study, we illuminated the importance of metal during embryogenesis and pollen germination of rice plant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学

キーワード：植物、発生・分化、発現制御、金属栄養、ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

① 鉄、亜鉛、銅、マンガンなどの必須金属元素の欠乏は栄養成長期の生育を阻害するだけでなく、生殖成長にも影響を与え不稔や収量の低下を招く。金属キレート物質であるニコチアナミン(NA)は全ての高等植物に存在し、その欠如は生殖器官の金属濃

度の低下、花器官の形態や数の異常、花粉形成の異常、不稔 (Takahashi ら 2003) を惹起し、さらには胚発達にも異常を起こすことを明らかにした。この表現型は鉄・硫黄クラスターを持つ核タンパク質である DNA グリコシラーゼ DEMETER、zinc finger 型転写因子の SERRATE や FIL の欠損変異体

に類似している。これらのタンパク質が機能するためには補因子として金属元素を必要とすることから、タンパク質は存在していても金属元素が十分に供給されない、あるいは細胞内での金属輸送の制御が異常になったことがこれらの現象の原因として考えられた。in vitro系においてFILの亜鉛、およびシス因子との結合は、金属キレーターである EDTA によって制御され (Kanaya ら 2001)、ミトコンドリア局在の鉄・硫黄クラスタータンパク質 aconitase の鉄との結合、およびその活性は Frataxin タンパク質によって制御される (Bulteau ら 2004) ことが報告されている。このように金属タンパク質の機能発現には金属元素の結合と解離による制御が不可欠であるが、生殖成長期における金属元素の役割や、その細胞内輸送制御の詳細はほとんど明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

鉄、亜鉛、銅、マンガンなど必須金属元素の欠乏により花粉形成の異常、不稔、収量低下が起こる。同様に植物の金属キレーター、ニコチアミンの欠如も花器官の形態や数の異常、不稔、胚形成の異常を引き起こす。これは、生殖成長および胚発生に必須の多くの金属タンパク質の正常な機能発現に、金属元素および金属制御物質が重要であることを示唆している。このように金属タンパク質の機能発現には金属元素の受け渡しによる制御が不可欠であるが、生殖成長における金属元素の役割や、その細胞内輸送制御の詳細は未解明である。本研究では金属タンパク質および金属キレート物質に着目し、生殖成長と胚発生における金属元素の役割を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 野生型イネの開花前および開花後、種子成熟の初期の3段階の子房および未熟種子を集め葉に対する発現を比較するマイクロアレイ解析

(2) プロモーターGUS 遺伝子をイネに導入し、遺伝子発現部位の同定

(3) SPring-8における植物組織内の金属分

布の解析

## 4. 研究成果

イネの胚発生過程において重要な遺伝子を探索するため、野生型イネの開花前および開花後、種子成熟の初期の3段階の子房および未熟種子を集め葉に対する発現を比較するマイクロアレイ解析を行った。花粉発芽時の遺伝子発現解析も行った。実験で明らかになった、イネ胚発生時に重要な遺伝子および花粉発芽時に重要な遺伝子には数種の金属トランスポーターがあった。OsYSL18 は鉄と鉄キレート物質の鉄錯体のトランスポーターであり、花粉発芽時に遺伝子発現していた (主な発表論文、Aoyama ら 2009)。これは世界ではじめて、鉄のトランスポーターが花粉発芽に発現することを示したことで非常にインパクトのある研究成果である。また、SPring-8における植物組織内の金属分布解析結果はいずれも世界ではじめて明らかにされたものであり、主な発表論文のTakahashi ら (2009) 他、多数の国内外の学会において研究成果を報告した。本研究によりイネ胚発生時および花粉発芽時に金属が重要であることを示唆された。

## 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は下線)

〔雑誌論文〕 (計 12 件)

高橋美智子 高等植物におけるニコチアミンの機能解析と有用作物の作出、農林水産技術研究ジャーナル、査読なし、33 巻、2010、54-57

Ishimaru Y, Masuda H, Bashir K, Inoue H, Tsukamoto T, Takahashi M, Nakanishi H, Aoki N, Hirose T, Ohsugi R, Nishizawa NK. Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for long distance transport of iron and manganese. **Plant J.**, 査読有、in press、2010、

Takahashi M, Nozoye T, Kitajima N, Fukuda N, Hokura A, Terada Y, Nakai I, Ishimaru Y, Kobayashi T, Nakanishi H, Nishizawa NK. In vivo analysis of metal distribution and expression of metal transporters in rice seed during germination process by microarray and X-ray Fluorescence Imaging of Fe, Zn, Mn, and Cu. **Plant**

**Soil、査読有、325 卷、2009、39-51**

Aoyama T, Kobayashi T, Takahashi M, Nagasaka S, Usuda K, Kakei Y, Ishimaru Y, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. **OsYSL18 is a rice iron(III)-deoxymugineic acid transporter specifically expressed in reproductive organs and phloem of lamina joints.** **Plant Mol. Biol.**、査読有、70 卷、2009、681-692

Kobayashi, T., Nakanishi I. R., Ogo, Y., Kakei, Y., Nakanishi, H., Takahashi M., Nishizawa, NK., The rice transcription factor IDEF1 is essential for the early response to iron deficiency and induces vegetative expression of late embryogenesis abundant genes. **Plant J.**、査読有、60 卷、2009、948-961

Nagasaka S, Takahashi M, Itai RN, Bashir K, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. Time course analysis of gene expression over 24 hours in Fe-deficient barley roots. **Plant Mol. Biol.**、査読有、69 卷、2009、621-631

Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, Takahashi M, Kakei Y, Suzuki K, Nakazono M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. A highly sensitive, quick, and simple quantification method for nicotianamine and 2'-deoxymugineic acid from minimum samples using LC/ESI-TOF-MS achieves functional analysis of these components in plants. **J. Biol. Chem.**、査読有、284 卷、2009、3470-3479

Kakei Y, Yamaguchi I, Kobayashi T, Takahashi M, Nakanishi H, Yamakawa T, Nishizawa NK. A highly sensitive, quick, and simple quantification method for nicotianamine and 2'-deoxymugineic acid from minimum samples using LC/ESI-TOF-MS achieves functional analysis of these components in plants. **Plant Cell Physiol.**、査読有、50 卷、2009、1988-1993

Masuda H, Usuda K, Kobayashi T, Ishimaru Y, Kakei Y, Takahashi M, Higuchi K, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. **Overexpression of the barley nicotianamine synthase gene HvNAS1 increases iron and zinc concentrations in rice grains.** **Rice**、査読有、2009、2 卷、155-166

Ogo Y, Kobayashi T, Nakanishi Itai R, Nakanishi H, Kakei Y, Takahashi M, Toki S, Mori S, Nishizawa NK. A novel transcription factor IDEF2 that recognizes the iron deficiency-responsive element 2 regulates

the genes involved in iron homeostasis in plants. **J. Biol. Chem.**、査読有、2008、283 卷、13407-13417

Suzuki M, Tsukamoto T, Inoue H, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. Deoxymugineic acid increases Zn translocation in Zn-deficient rice plants. **Plant Mol. Biol.**、査読有、2008、66 卷、609-617

Ishimaru Y, Suzuki M, Ogo Y, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. Synthesis of nicotianamine and deoxymugineic acid is regulated by OsIRO2 in Zn excess rice plants. **Soil Sci. Plant Nutr.**、査読有、2008、54 卷、417-423

〔学会発表〕（計 6 件）

臼田華奈子、高橋美智子、草野都子、及川彰、斉藤和季、平井優美、西澤直子、イネの種子成熟過程におけるメタボローム解析、日本土壤肥料学会2009年度京都大会、2009年9月17日、京都大学

高橋美智子、臼田華奈子、草野都子、及川彰、斉藤和季、平井優美、西澤直子、イネの種子成熟過程における遺伝子発現およびメタボローム解析、第 5 1 回日本植物生理学会年会、2010年3月21日、熊本大学

Michiko Takahashi, Nobuyuki Kitajima, Naoki Fukuda, Akiko Hokura, Yasuko Terada, Izumi Nakai, Naoko K Nishizawa. Metal Distribution in Rice Seeds during The Germination Process using X-ray Fluorescence Imaging of Fe, Zn, Mn, and Cu. International Symposium on Metallomics Conference、2009年6月7-9日、シンシナティ U.S.A.

Michiko Takahashi, Tomoko Nozoye, Nobuyuki Kitajima, Naoki Fukuda, Akiko Hokura, Yasuko Terada, Izumi Nakai, Naoko K Nishizawa., *In vivo* analysis of metal distribution in rice seeds during the germination process using X-ray fluorescence imaging of Fe, Zn, Mn, and Cu. The International Plant Nutrition Colloquium. 2009年8月26-30日、Sacramento, California U.S.A.

高橋美智子、北島信行、福田直樹、保倉明子、寺田靖子、中井泉、西澤直子、種子発芽過程における金属移行、日本土壤肥料学会 2008 年大会、2008年9月10日、名古屋市立大学 畑キャンパス川澄キャンパス、

高橋美智子、北島信行、福田直樹、長坂征治、保倉明子、寺田靖子、中井泉、西澤直子、生殖成長期および種子成熟期における金属元素動態の解明、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月21日、名古屋大学 東山キャンパス

〔その他〕

ホームページ等

<http://c-bio.mine.utsumiya-u.ac.jp/PNP/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 美智子 (TAKAHASHI MICHIKO)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：90345182