

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21310148

研究課題名（和文）イネ科植物のムギネ酸類による鉄取り込み機構の解明

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)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機化学研究所・主席研究員

研究者番号：60256047

研究成果の概要（和文）：植物における土壌からの鉄吸収は、すべての生物の食物連鎖の根本を成しており、非常に重要である。イネ科植物におけるムギネ酸類による鉄取り込み機構を解明するために、ムギネ酸類鉄錯体トランスポーターと基質であるムギネ酸の両面から解析を行った。オオムギの根から同定した新規トランスポーターの局在と基質選択性を比較し、さらに、ムギネ酸標識体合成と輸送活性を測定して、ムギネ酸を用いた鉄輸送に関する基礎的知見を集積し、その応用展開を検討した。

研究成果の概要（英文）：Iron uptake from the soil in plants is a crucial event for all living creatures. Gramineous plants have developed a specific strategy based on the phytosiderophores, mugineic acids. We identified transporters in barley and synthesis the mugineic acids derivatives as molecular probes. These studies are essential for further biological studies, and will hopefully lead to better crop production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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、ファイトシドロフォア

1. 研究開始当初の背景

(1) イネ科植物はムギネ酸類と総称されるファイトシドロフォアを生合成し、これを根から分泌することで、土壌中の難溶性の3価鉄と錯体を形成し、可溶化して、YSトランスポーターを介して再吸収することにより、鉄イオンを効率的に取り込んでいる。YSトランスポーター遺伝子を応用して世界の不良土壌の約30%を占めるアルカリ土壌での栽培を促進するイネの開発が行われている。

(2) 様々な植物から異なった基質特異性を持つYS、YSL(YSL様)トランスポーターが同定されているが、類似するムギネ酸・鉄錯体トランスポーターの間でそれぞれに特徴的な基質特異性を規定する分子基盤が解明されていない。

2. 研究の目的

イネ科植物、特にオオムギを材料として、

根圏に存在するムギネ酸・鉄錯体を認識し、植物組織内へ取り込むトランスポーターの分子メカニズムの解明を、ムギネ酸を軸に明らかにすることを目的とする。そのために、

(1) ムギネ酸・鉄錯体選択的なトランスポーターHvYS1の基質選択性を決定している膜外ループに焦点を当て、この領域内の基質選択性を担うアミノ酸を特定する。

(2) ムギネ酸を最も多く分泌するオオムギにおいてHvYS1トランスポーターのホモログを同定し、その局在と基質選択性の違いを解明する。

(3) YSトランスポーターと基質の結合部位を決定するためにムギネ酸の蛍光標識体を作成する。

(4) 結晶X線構造解析により基質選択性を解明するために、YSトランスポータータンパク質の全長を精製する。

3. 研究の方法

(1) HvYS1とZmYS1の7番目の膜外ループ部分は、アミノ酸配列相同性の少ないことが知られており、このループ部分に相当する43残基ペプチドの2次元¹H-¹⁵N相関NMRスペクトル(HSQC)を測定した。また、 α ヘリックス度をAGADIRプログラムにより計算した。その際、 α ヘリックス形成への寄与が高いHvYS1の20アミノ酸(a.a. 373-392)を1つずつ相当するZmYS1のアミノ酸に置換した。計算の結果、HvYS1の377番目のセリンをアラニンに置換したHvYS1(S377A)の配列の α ヘリックス度が3分の1に低下したので、この1アミノ酸変異体のベクターをクイックチェンジ法により作成し、HvYS1(S377A)、および、その逆に相当するZmYS1(A381S)のcRNAを各々アフリカツメガエル卵母細胞(oocytes)においてタンパク質を発現させ、トランスポーター活性を測定した。

(2) 鉄欠乏状態で栽培したオオムギの根からゲノム解析とRNAの5'RACE法により、ムギネ酸鉄錯体選択的なトランスポーターHvYS1のホモログであるHvYSL2を同定し、その局在を抗体染色で同定し、輸送活性をoocytes発現系により測定した。

(3) ムギネ酸の2-ヒドロキシ基にプロパルギル基を導入して、クリック反応により標識体をベンゾフェノン、クマリン、トリアゾール、アクリジンなどの標識体を作製した。鉄錯体の形成をFTICRMSで確認し、輸送活性はアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて比較した。

(4) 基質選択性の異なるHvYS1, ZmYS1トランスポーターの結晶化を目指し、HISタグ付きタンパク質の精製を試みた。昆虫細胞系の発現ベクターにYSトランスポーターの全長および糖鎖修飾アミノ酸変異体遺伝子を

挿入し、Invitrogen社のBac-to-Bacバキュロウイルス発現システムを用いて昆虫細胞(Sf9)に感染させ、トランスポーターを発現させた。昆虫細胞での発現をGFPとYS抗体染色で確認した後、トランスポーター活性は⁵⁵Fe-DMAの取り込み量をシンチレーションカウンターで測定することによって求めた。1Lの細胞培養液から膜タンパク質画分を得て、Ni-NTAカラムでタンパク質を精製した。

4. 研究成果

(1) ムギネ酸類・鉄錯体トランスポーターの基質特異性に重要なアミノ酸配列の解明：トウモロコシ由来でムギネ酸以外の金属錯体も輸送するトランスポーターであるZmYS1とHvYS1の基質選択性の違いを解明するため、それぞれに特徴的な6番目の膜外ループのペプチド(約40アミノ酸残基)が基質選択性に関与していることは既に報告している(基盤C研究成果報告書)。本研究ではこのループ部分のNMR解析において、43残基ペプチドの2次元¹H-¹⁵N相関NMRスペクトル(HSQC)を測定し、NMRピークのアミノ酸を同定し、CD実験と同様にHvYS1がZmYS1に比較して、より明確な2次構造をとっていることを明らかにした。DPC(ドデシルホスホコリン)ミセル存在下でデオキシムギネ酸鉄錯体の滴定実験を行い、HvYS1のみループ後半部分のシグナルがシフトしたことから、この部分が膜に結合し、基質輸送に関与することが示唆された。

また、HvYS1の1アミノ酸変異体であるS377A、および、これに相当するZmYS1の変異体(A381S)を導入したベクターを各々作成し、oocytesにトランスポーターを発現させた。両変異体を用いて、デオキシムギネ酸(DMA)のFe(III)、Cu(II)、Zn(II)錯体のトランスポート活性を電気生理活性によって測定した。ZmYS1(A381S)はHvYS1同様にDMA-Fe(III)を選択的に輸送する活性を示したが、逆にHvYS1(A377S)はもとのHvYS1の鉄選択性が消失し、Cu(II)やZn(II)錯体も輸送するようになった。これらの結果を合わせると、HvYS1の377番目のセリンが鉄選択性に関与していることが強く示唆された(図1)。

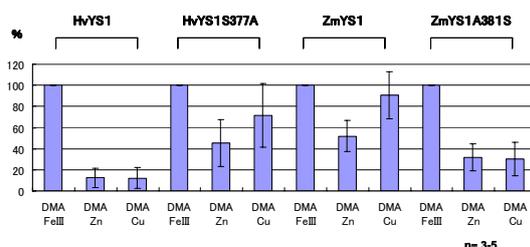


図1 HvYS1, ZmYS1, 1アミノ酸変異体の輸送活性における鉄選択性比較

(2) HvYSL2の同定：鉄欠乏状態で栽培したオオムギの根からムギネ酸鉄錯体選択的なトランスポーターHvYS1と67.3%の相同性があるHvYSL2を同定した。HvYS1が表皮細胞に発現しているのに対し、HvYSL2は内皮細胞に局在していることを抗体染色により明らかにした(図2)。この結果は、HvYS1により土壌から吸収されたムギネ酸類鉄錯体をさらに地上部に移行するために、HvYSL2が働いていることを示唆している。また、HvYS1がムギネ酸鉄錯体選択的に輸送するのに対し、HvYSL2は他の亜鉛、ニッケル、銅、マンガン、コバルトなどの金属錯体も輸送して、ZmYS1同様に広範な基質を輸送するトランスポーターであることを明らかにした。

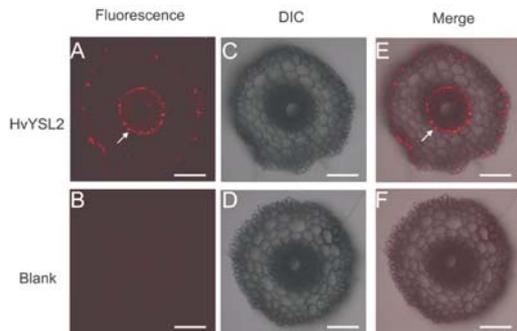


図2 鉄欠乏オオムギの根でのHvYSL2の発現
HvYSL2抗体染色(A, C, E)、ブランク(B, D, F) 矢印で示す赤く発色している内皮細胞が抗体でHvYSL2の発現を示している。スケール、50 μm

(3) ムギネ酸標識体の合成：

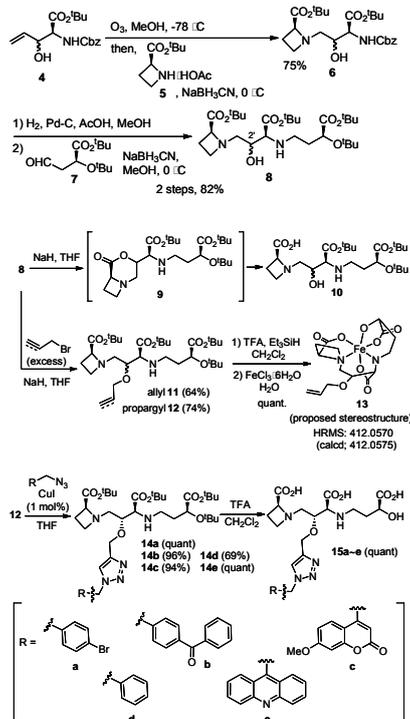


図3 ムギネ酸標識体の合成

ムギネ酸の2'-ヒドロキシ基にプロパルギル基を導入して、クリック反応によりベンゾフェノン(5b)、クマリン(5c)、アクリジン(5e)などの標識体を化学合成した(図3)。また、これらが鉄錯体を形成することをフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置(FTICRMS)で確認した。HvYS1トランスポーターを発現させた卵母細胞の電気生理実験を用いて、これらのムギネ酸標識鉄錯体の輸送活性を測定した結果、ムギネ酸より若干減少するものの、20-60%の顕著な輸送活性を有することが分かった(図4)。

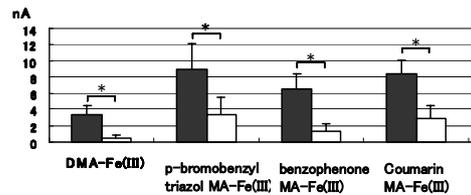


図4 ムギネ酸標識鉄錯体の輸送活性

黒ボックス；HvYSL2 cRNA, 白ボックス；水インジェクションした oocytes の輸送活性

さらに、ムギネ酸クマリン標識鉄体においては卵母細胞内で蛍光を観測したことにより、トランスポーターを介して取り込まれていることを確認した。しかし、ムギネ酸3'アクリジン標識体は電気生理実験や蛍光観察で活性を認められなかった。この結果により輸送活性のあったベンゾフェノン体に、リンカーでキャップとしてアクリジンを繋げたものを合成し、光親和標識体として使用できるか検討する。

(4) ムギネ酸類・鉄錯体トランスポーターの精製：基質選択性の異なるHvYS1, ZmYS1トランスポーターの結晶化を目指し、昆虫細胞系の発現ベクターにYSトランスポーターの全長および糖鎖修飾アミノ酸変異体遺伝子を導入して、このベクターを昆虫細胞に感染、発現させた。ZmYS1-GFP-HISを昆虫細胞に発現させて、ZmYS1抗体染色を行った結果、細胞膜にGFPとともに発現しており、発現タンパク質の局在を確認した(図5)。HvYS1, ZmYS1のHISタグたんぱく質の発現細胞においても、共に細胞膜に発現していた。

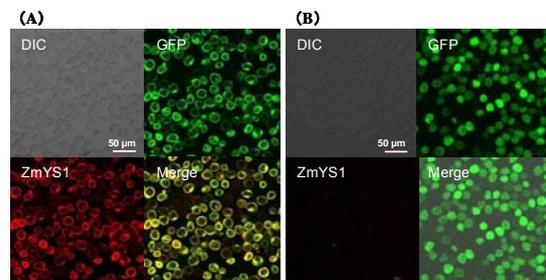


図5 YSタンパク質を発現させた昆虫細胞での局在
(A) ZmYS1-GFP-HIS発現 (B) control (GFP-HIS発現ベクターのみ)での抗体染色

さらに、ZmYS1-GFP-HIS, ZmYS1-HIS, HvYS1-HISタンパク質を各々発現させた昆虫細胞はDMA-⁵⁵Fe(III)の取り込み活性があることを証明した(図6)。

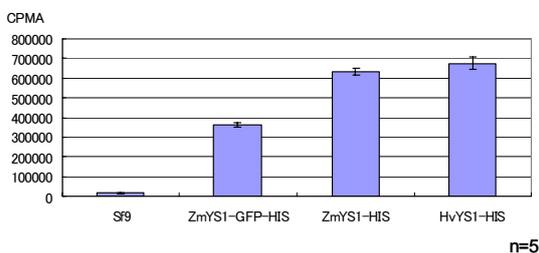


図6 YSタンパク質を発現させた昆虫細胞(Sf9)でのDMA-⁵⁵Fe(III)の取り込み活性

このことにより、植物のYSトランスポーターの局在と機能を昆虫細胞でも保持していることを確認した。これまでに、HvYS1およびZmYS1の全長、GFP無し、HISタグ付きでタンパク質の収量を増やすことができた。昆虫細胞の膜画分からYSタンパク質を精製し、結晶化を試みることができた。

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5件)

- ① Araki, R., Murata, J. and Murata, Y. "A novel barley yellow stripe 1-like transporter (HvYSL2) localized to the root endodermis transports metal-phytosiderophore complexes." *Plant Cell Physiol.* 査読有り **52**, (2011) 1931-1940. doi:10.1093/pcp/pcp126.
- ② Namba, K., Kobayashi, K., Murata, Y., Hirakawa, H., Yamagaki, T., Iwashita, T., Nishizawa, M., Kusumoto, S. and Tanino, K. "Mugineic acid derivatives as molecular probes for the mechanistic elucidation of iron acquisition in barley." *Angew. Chem. Int. Ed.* 査読有り **49**, (2010) 9956-9959. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201004853>
- ③ Namba, K., Murata, Y. "Toward mechanistic elucidation of iron acquisition in barley: efficient synthesis of mugineic acids and their transport activities." *The Chemical Record*, 査読有り **10**, (2010) 140-150. doi: 10.1002/tcr.2009000028.
- ④ 村田佳子「ムギネ酸類によるイネ科植物の鉄取り込み機構」*化学と生物* 査読有り **48**, (2010)528-534.
- ⑤ 村田佳子、その他10名(1番目)「ムギネ酸によるイネ科植物の鉄取り込み機構の解明」SUNBOR ANNUAL REPORT 査読無し

(2009) 67-74. <http://www.sunbor.or.jp>

〔学会発表〕(計14件)

- ① 村田佳子、向坂佳代子;「オオムギのムギネ酸・鉄錯体トランスポーターHvYS1の基質選択性に関わるアミノ酸の解析」第84回日本生化学会大会、2011年9月21-24日、京都国際会議場(京都)
- ② Murata, Y.; IUPAC Workshop in Recent Advances of Natural Products. Iron acquisition mechanism of barley as explored by mugineic acids. The 14th Asian Chemical Congress 2011年9月6-9日、Bangkok, Thailand
- ③ 村田佳子;「研究は他分野を経験するとよりおもしろい—有機化学から分子生物学へ—」女性研究者による理工学部講演会 2011年5月28日、関西学院大学理工学(兵庫)
- ④ 小林香織、難波康祐、村田佳子、西沢孝夫、楠本正一、谷野圭持;「ムギネ酸類の実用的合成を基盤とする標識ムギネ酸の設計と合成」第27回有機合成化学セミナー2010年9月2-4日、シーサイドホテル舞子ビラ神戸(兵庫)
- ⑤ 村田佳子、原田英理砂、菅瀬謙治、岩下孝;「オオムギのムギネ酸類・鉄錯体トランスポーターHvYS1における基質選択性に関与する膜外ループの解析」第21回日本微量元素学会年会、2010年7月3, 4日、京都大学百周年時計台記念館(京都)
- ⑥ Murata Y., Itoh Y., Namba K., Iwashita, T., Tanaka, Y.; Analysis of transgenic petunia expressing phytosiderophore-iron (III) transporter, *HvYS1* gene from barley. XV International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants (ISINIP) 2010年6月26-30日ブタペスト(ハンガリー)
- ⑦ Araki, R., Murata, J., Kousaka, K., Murata Y.; Characterization of a novel metal-phytosiderophore transporter with broad substrate specificity from barley. XV International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants (ISINIP) 2010年6月26-30日、ブタペスト(ハンガリー)
- ⑧ 村田佳子、伊藤喜之、難波康祐、岩下孝、田中良和;「オオムギのムギネ酸類3価鉄錯体トランスポーターHvYS1を遺伝子導入したペチュニアの解析」第51日本植物生理学会年会 2010年3月18-21日、熊本大学(熊本)
- ⑨ 原田英理砂、村田佳子、菅瀬謙治; Structural analysis of an outer membrane loop responsible for substrate specificity of Fe(III)-phytosiderophore transporters. 第

32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9-12 日、パシフィコ横浜 (横浜)

- ⑩ 村田佳子、原田英理砂、菅瀬謙治、岩下孝；「オオムギのムギネ酸類・3 価鉄錯体トランスポーターHvYS1 の基質特異性の解析」第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 21-24 日、神戸ポートアイランド (神戸)
- ⑪ 村田佳子、難波康祐、馬 建鋒、菅瀬謙治、堀川 学、岩下 孝、楠本正一；「ムギネ酸類を介したイネ科植物の鉄取り込み機構」第 51 回天然有機化合物討論会 2009 年 10 月 7-9 日、名古屋大学 (名古屋)
- ⑫ Namba, K., Kobayashi K., Murata, Y., Tanino, K. ; Synthesis and Its Iron Transport Activities of Labeled Mugineic Acid] 5th Japan-Korea Young Scientists Meeting on Bioorganic and Natural Products Chemistry 2009. 2009 年 8 月 27-29 日、Yugawara Training Institute (静岡)
- ⑬ 村田佳子、伊藤喜之、難波康祐、岩下 孝、田中良和；「ムギネ酸類 3 価鉄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鉄欠乏アルカリ培地における耐性」第 20 回日本微量元素学会、2009 年 7 月 2, 3 日、京王プラザホテル (東京)
- ⑭ 村田佳子、原田英理砂、菅瀬謙治、難波康祐、岩下 孝；「オオムギのムギネ酸類 3 価鉄錯体トランスポーターHvYS1 の基質特異性に関わる膜外ループの解析」第 4 回トランスポーター研究会、2009 年 5 月 23, 24 日、東京大学 (東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：ムギネ酸類金属錯体トランスポーター及びその用途

発明者：村田佳子、荒木良一

権利者：サントリーホールディングス

種類：特許権

番号：2010-141792

出願年月日：2010年6月22日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://sunbor.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 佳子 (MURATA YOSHIKO)

公益法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・主席研究員

研究者番号：60256047

(2) 研究分担者

難波 康祐 (NAMBA KOSUKE)

北海道大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：50414123

(3) 連携研究者

菅瀬 謙治 (SUGASE KENJI)

公益法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・主席研究員

研究者番号：00300822

山垣 亮 (YAMAGAKI TOHRU)

公益法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・主席研究員

研究者番号：40313209

村田 純 (MURATA JUN)

公益法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・研究員

研究者番号：90500794

荒木 良一 (ARAKI RYOICHI)

公益法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・研究員

研究者番号：00530841