

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580479

研究課題名(和文) 砂漠化防止へのアプローチ：フラビン類分泌植物の鉄欠乏下での生存戦略の解明

研究課題名(英文) An approach to prevent desertification: the survival strategy of plants that excrete flavins under Fe deficiency

研究代表者

北村 美江 (KITAMURA, Yoshie)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(環境)・教授

研究者番号：40108337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では鉄欠乏耐性を示すヒヨスの根の呼吸機構とフラビン類分泌の機構の解明を進めた。プロテオミクスにより、鉄要求性の高い呼吸鎖複合体Iが減少すること、リボフラビンの分泌は結合型フラビンFMNの分解とde novo合成の促進の両方によることを証明した。また、呼吸活性の上昇とリボフラビンの分泌が関連することを示した。加えて、鉄欠乏下では鉄とエネルギーを節約する代謝系に切り替え、これらを根の成長に用いることも示した。形態的特徴として鉄欠乏下では根端の肥大化が見られるが、これは細胞の横幅の増加と根毛の発達によることを非破壊的観察で解明した。細胞表面積の拡大による鉄獲得戦略と推測された。

研究成果の概要(英文)：The mechanism on respiration and riboflavin secretion working under Fe deficiency in Fe deficiency-tolerant *Hyoscyamus albus* roots was studied. Proteomic analysis showed that the mitochondrial complex I which requires high amounts of Fe was decreased under Fe deficiency. Riboflavin secretion occurred by both the enhancements of FMN hydrolysis and de novo synthesis of riboflavin. An increase of respiration activity was closely related to riboflavin secretion, too. Many metabolic pathways were changed into Fe- and energy-saving manners; instead, they utilized Fe and energy for more essential growth. As a morphological change, root-tip swelling has been observed. Nondestructive histochemical analysis with a laser microscope revealed that the enlargement of cell width and rhizodermal development contributed to this phenomenon. Increase in cell surface area must help to acquire Fe.

研究分野：環境科学

キーワード：鉄欠乏 ストレス耐性 双子葉植物 フラビン類 根

1. 研究開始当初の背景

生物多様性の保全や人の生命の安全保障の観点から、今取り組むべき最優先課題に、地球温暖化の原因である二酸化炭素削減や人口増加を支える食糧増産が挙げられる。これらへの最も効果的な対処方法は、植物が育たない不毛な土地を緑化することだと考えられる。実際、不毛の大地は地球の表土の67%を占め、その中、半分はアルカリ土壌によると報告されている(国連食糧農業機関、1998)。近年は、温暖化の進行や地下水を用いる過度の灌漑農業により、土壌のアルカリ化が進行し、事態は一層深刻となっている。

アルカリ土壌で植物が育たず、砂漠化する原因の主なものに、植物が鉄欠乏に陥ることが挙げられる。鉄は土壌に豊富に存在するが、通常は三価鉄として存在しており、中～アルカリ性では水にほとんど不溶で、植物は吸収できない。光合成や呼吸などの酸化還元反応を担う鉄の欠乏は、植物の生育に深刻な問題であるため、世界中の研究者が植物の鉄獲得戦略の解明に取り組んできた。その結果、高等植物には図1に示した Strategy I および II と呼ばれる2つのタイプの存在が明らかにされた。

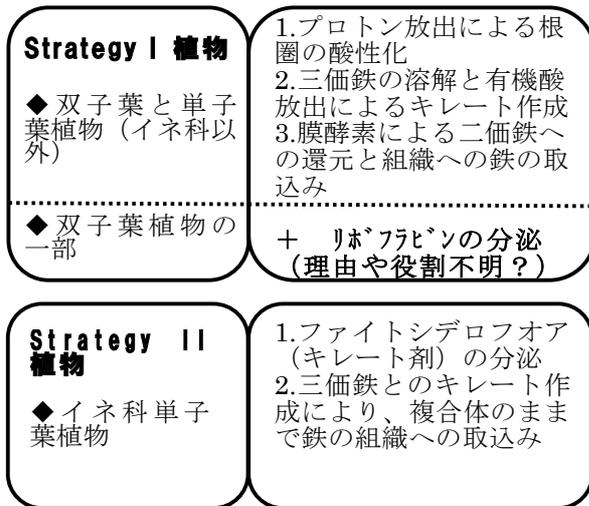


図1. 植物の鉄獲得機構の概要

一方、双子葉植物の一部の種で鉄欠乏時にリボフラビンを根から放出するものが報告されてきたが、この機構や役割は不明なままであった。

報告者は鉄欠乏下で生育可能な植物種を探索し、ナス科のヒヨス (*Hyoscyamus albus*) の根が生育すること、生育時に根からリボフラビンを放出する現象を見出した。生長にはエネルギー供給は必須であるが、好気呼吸を担うミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は多くの鉄イオンを必要とすることから、鉄欠乏時に最も影響を受けると考えた。そこで、鉄欠乏下の呼吸鎖電子伝達系に着目して、呼吸鎖複合体の各構成要素に特異的な阻害剤

の影響を鉄欠乏時と鉄十分時で比較したところ、顕著な相違が見られた。つまり、鉄欠乏時には鉄含量の顕著な減少にもかかわらず、呼吸活性が上昇し、鉄十分時と異なる電子伝達系が機能していることを示唆する結果が得られた。この結果に基づき、鉄欠乏下で機能する呼吸鎖電子伝達系モデルを提案した (J. Plant Physiol. 2010;167:870-878)。

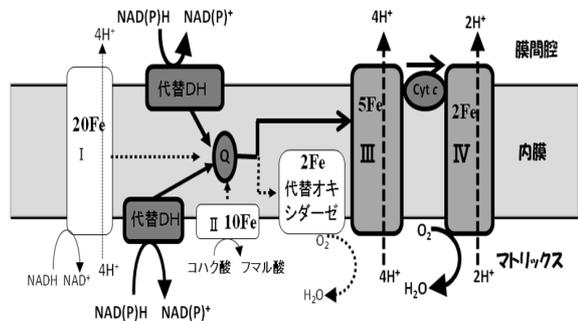


図2. 鉄欠乏下で機能する呼吸鎖電子伝達系モデル (鉄欠乏下の主機構: 太字太枠で表示. 鉄十分下の主機構: 破線細枠で表示. 各要素の鉄要求量を数値で示した)

この仮説では、呼吸鎖電子伝達系に含まれるタンパク質の中で、多くの鉄イオンを必要とするフラビントタンパク質(I および II)、およびエネルギー生産に寄与しない代替オキシダーゼ経路が機能しないことで、鉄の節約とエネルギー効率を向上させていること、また、この事が根からのリボフラビンの放出を引き起こしていることを提唱した。

2. 研究の目的

本研究は報告者が提唱した鉄欠乏耐性植物の呼吸鎖電子伝達系モデルの正当性の検証と耐性機構の解明、およびフラビン類分泌の生理的・生態学的役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

鉄欠乏下と鉄十分下で生育させたヒヨス培養根のプロテオーム解析、遺伝子発現解析、酵素活性測定、および根の形態や活動観察等を行い、多面的に検討することで、モデルの検証を行った。

1) プロテオーム解析

少量の植物材料から Guanidine 法を用いて抽出した少量のタンパク質をミニゲルで二次元解析するための、スモール・スケール解析方法の確立を行った。その後、比較プロテオームの手法により鉄欠乏下で実際に発現が高進したものや低下したタンパク質を TOF-MS で解析し、データベースに基づき同定した。

2) 生合成関連遺伝子発現解析

リボフラビン生合成に関与するヒヨス特異的遺伝子群、RibA/B, RibC, RibD, Riboflavin synthase/FMN hydrolase のクローニングを行い、鉄の有無による遺伝子の発現変動を解析した。同様に、アルカロイド生合成に関与する遺伝子の発現も解析した。

3) 酵素活性測定

呼吸とリボフラビン分泌の相関を見るために、鉄欠乏下での呼吸活性の変動を TTC 還元法で、FMN 分解酵素活性を HPLC で解析した。

4) 根端の非破壊的観察

鉄欠乏下で特異的に観察される根端からのリボフラビンの分泌及び根端の肥大化の詳細を明らかにする為、自家蛍光や蛍光染色を用いて共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV-1000) で非破壊的に根端を観察した。

4. 研究成果

1) 鉄欠乏下のリボフラビン分泌部位と源

本研究課題の目的である、鉄欠乏下に置かれたヒヨスの根からリボフラビンが分泌される現象の解明のために、分泌されるリボフラビンは *de novo* 合成の促進によるものか、または結合型リボフラビン FMN (呼吸鎖複合体 I の補酵素) の分解によるものかの検討を行った。

最初に、分泌部位を特定するために、リボフラビンの組織レベル、細胞レベルでの分布を、その自家蛍光に基づき共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、リボフラビンの分泌は鉄欠乏下の根に特有で、組織レベルでは根端付近に、細胞レベルではアポプラストに主にリボフラビンが分布していることを示した (図3)。

次に、リボフラビンが *de novo* 合成の促進によるものか、または結合型リボフラビン FMN (呼吸鎖複合体 I の補酵素) の分解によるものかを明らかにするために、リボフラビンの生合成に関与するヒヨスの遺伝子 RibA/B, RibC, RibD, Riboflavin synthase のクローニングを行った。その遺伝子配列に基づき、特異的プライマーを設計して、これら遺伝子群の発現を RT-PCR 法で解析した (図4)。その結果、生合成に関与する RibA/B, RibC, RibD のいずれもが、鉄欠乏下で発現が顕著に増加すること、鉄欠乏に置かれて早い段階で増加することがわかった (図4)。

ただし、リボフラビン生合成の最終段階に関与する Riboflavin synthase は FMN hydrolase と同じ遺伝子上にあることが判明し、遺伝子発現の結果からは判定できなかった。そこで FMN hydrolase の酵素活性を測定することにした。

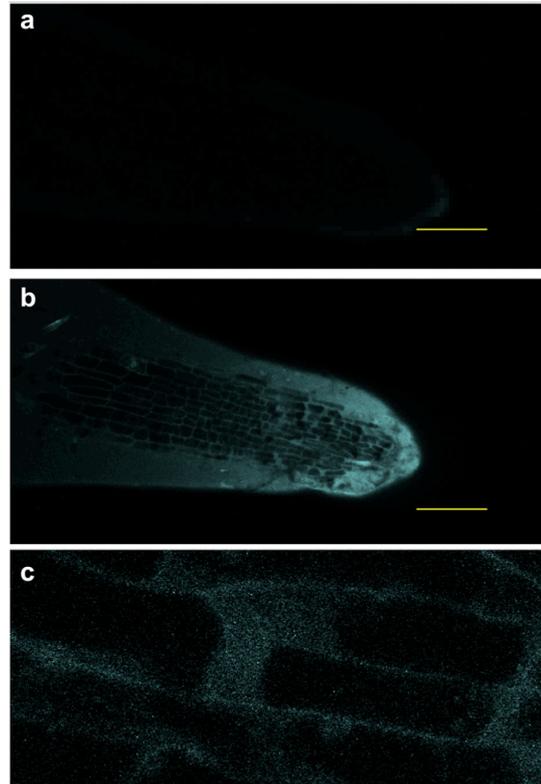


図3. a, 鉄十分 ; b, 鉄欠乏 ; c, 鉄欠乏の根端から100-200 μm 付近の細胞像

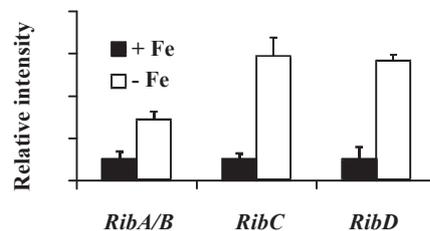


図4. リボフラビン生合成遺伝子の発現 (16時間後の発現量の比較)

その結果、鉄欠乏下に置かれて3日目以降には FMN hydrolase の活性が有意に高くなることが明らかになった。これは鉄欠乏下のリボフラビンの分泌や呼吸活性の上昇ともほぼ一致した。

以上の結果から、鉄欠乏下でのリボフラビンの分泌にはリボフラビンの *de novo* 合成の促進と FMN (呼吸鎖複合体 I の補酵素) の分解の両方が関与していることが判明した。また、リボフラビンの分泌と呼吸との密接な関係が示唆された。

2) 比較プロテオーム解析による鉄欠乏耐性根の特性

鉄欠乏による影響が最も顕著に顕れるのは根端である。そこで根端を材料として比較プロテオーム解析を行うために、まずは少量の材料で解析可能なスモール・スケールの解析法の確立を行った。植物材料の特性を考量し、ラージ・スケールの従来法の中から最適なものを選び、改良を加えることで植物組織 100 mg から抽出した 20 μ g のタンパク質量を二次元電気泳動により分離し、蛍光染色することにより 200 以上のスポットを分離することが出来た。更に、ヒヨスはモデル植物ではないものの、ナス科のデータベースを利用して、鉄欠乏時に特異的に蓄積が変動するタンパク質 48 個を見出し、そのうち 36 個を同定できた (図 5、表 1)。

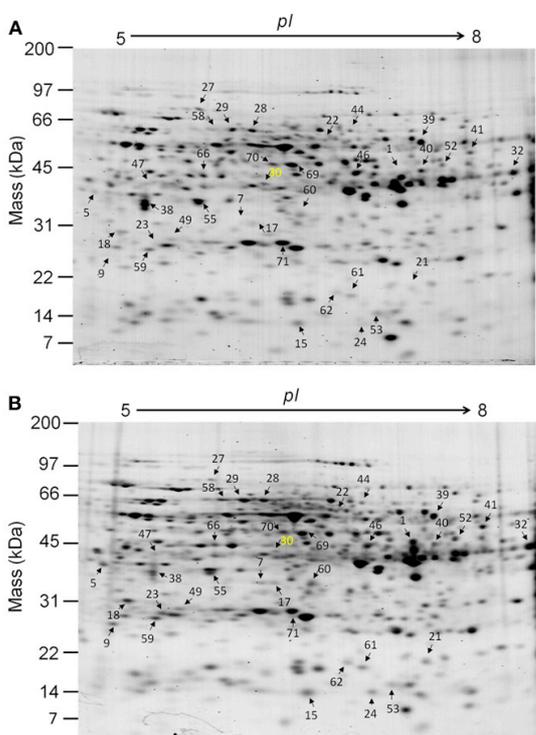


図 5. タンパク質の二次元解析
A: 鉄十分 ; B: 鉄欠乏

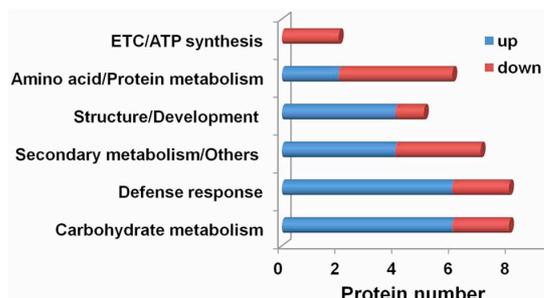


図 6. 同定されたタンパク質の機能別分類

これら 36 個のタンパク質をその機能の違いにより、糖代謝、タンパク質・アミノ酸代謝、二次代謝等、エネルギー生産、構造と成

長、防御に関わるものの 6 つに分類した (図 6)。

表 1. 比較プロテオーム解析データ

Protein yield and spot number	+Fe	-Fe
Root tips (mg FW)	100	100
Protein yields (mg protein g ⁻¹ FW)	4.92 ± 0.60	5.57 ± 0.56
No. of spots detected	218 ± 4	219 ± 4
Comparative protein profile		
No. of spots changed*	48	
(increased in abundance)	(30)	
(decreased in abundance)	(18)	
No. of spots identified	36	
(increased in abundance)	(22)	
(decreased in abundance)	(14)	

得られた結果が示していることは、糖の異化が促進され、それに伴って有機酸、特にリンゴ酸の根からの分泌が促進されたことである。また、アミノ酸の *de novo* 合成が抑制される一方、タンパク質の分解が促進されていることから、不要なタンパク質の分解によって生じたアミノ酸を組織の成長や分化に使用している様子が伺える。

同様に、アミノ酸起源の窒素を含む二次代謝産物 (アルカロイド) の生合成に関与するタンパク質、Cyp80F1 及び H6H をコードする遺伝子発現は鉄欠乏下で抑制され (図 7)、実際にアルカロイドの蓄積の減少も検出された。このように、貴重なアミノ酸の節約が見られるのが鉄欠乏時の特徴だ。

一方、鉄欠乏特有の現象であるリボフラビンの分泌が、リボフラビンの生合成に関わる RibD 遺伝子の発現の上昇と関係していることも判明した (図 7)。これは先に 1) で示した結果と一致するものである。

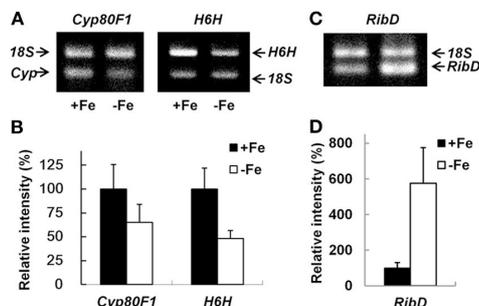


図 7. トロパンアルカロイド及びリボフラビンの生合成関連遺伝子の発現比較

3) 鉄欠乏下での根の形態変化

双子葉植物で広範に見られるようにヒヨスにおいても、鉄欠乏時に根端の肥大化現象が観察されている。この肥大化は細胞数の増加によるものか、または細胞のサイズの増大によるものかを明らかにするため、鉄欠乏下での細胞数とサイズの変動を調査した。

細胞を蛍光試薬 SYTO14 で染色することで、非破壊的に共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞数とサイズを測定することが可能となった(図8)。そこで根端から1 mm 間隔で4 mm までの根の分裂領域の細胞数とサイズの変動を経時的に観察した。その結果、鉄欠乏に晒されて2日目で根端1 mm の部分で細胞の縦方向のサイズの短縮化が顕著に観察された(図8)。

実際に計測したところ、鉄欠乏処理5日目には細胞の長さが有意に減少し、幅と厚みが有意に増加していた(表2)。また、細胞数の変動についても調査したところ、細胞のサイズの変動ほど顕著ではないものの、細胞数の増加も見られた(結果省略)。更に、根端の表面構造の観察結果から細胞の表面に多数の根毛状の発達が観察された(図9)。

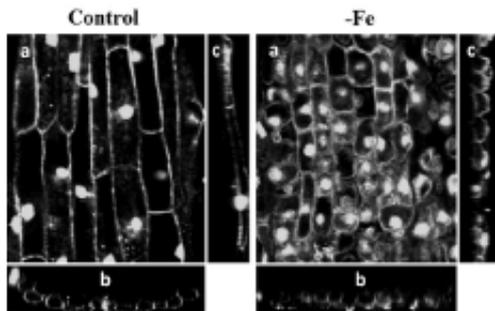


図8. 根端細胞の蛍光染色イメージ画像 (a, 根軸に平行面 ; b, 横断面 ; c, 縦断面)

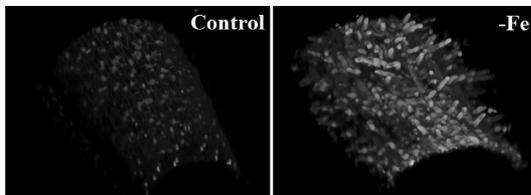


図9. 根端付近の表面構造

表2. 根端細胞のサイズの計測

		point 1	
Day 1	-Fe	length	110.8 ± 31.3
		width	20.3 ± 2.2
		depth	10.1 ± 2.0
Control		length	112.5 ± 25.7
		width	19.5 ± 3.5
		depth	9.4 ± 2.2
Day 5	-Fe	length	29.8 ± 7.0 ***
		width	24.1 ± 3.5 ***
		depth	20.8 ± 4.0 ***
Control		length	114.1 ± 28.9
		width	16.6 ± 2.3
		depth	12.0 ± 2.8
Day 10	-Fe	length	32.7 ± 8.8 ***
		width	27.5 ± 4.5 ***
		depth	18.4 ± 4.5 ***
Control		length	119.7 ± 32.2
		width	17.6 ± 3.0
		depth	9.2 ± 1.9

(有意差 *** p < 0.001)

このように、鉄欠乏下に置かれた根では根の伸長方向の成長が抑制され、代わりに肥大化することが明らかになった。また、この肥大化には細胞の幅の増大が主な要因であり、加えて細胞表面における根毛の発達が寄与していることを明らかにした。

以上の結果から、本研究は報告者が提唱したヒヨスにおける呼吸鎖電子伝達系モデルの中、実際に呼吸鎖複合体Iが低下していることをプロテオミクスのデータより証明することができた。また、フラビン類の分泌が *de novo* 合成の促進だけでなく、結合型フラビン類の分解促進によるものであることを示し、モデルの正当性を強調した。生理的特徴からも呼吸とフラビン分泌が密接に関連することを示した。加えて、鉄欠乏耐性の耐性機構が呼吸機構のみでなく、他の代謝系においても、鉄とエネルギーを節約する仕組みによることを解明できた。そして節約したエネルギーを根端の成長に使用することが示唆された。根端では肥大化が観察されるが、これは細胞の横方向への増加と根毛の発達によることが明らかになった。肥大化させることで表面積を大きくし、鉄の吸収能を高めていると推測された。

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 6 件)

- ① Ari Sako, Jebunnahar Khandakar, Noriko Tamari, Ataru Higa, Kenichi Yamaguchi, Yoshie Kitamura
Copper excess promotes propagation and induces proteomic change in root cultures of *Hyoscyamus albus*.
Plant Physiology and Biochemistry (査読有) 2016; 103: 1-9 (DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.02.032)
- ② Yuki Kawahara, Yoshie Kitamura
Changes in cell size and number and in rhizodermal development contribute to root tip swelling of *Hyoscyamus albus* roots subjected to iron deficiency.
Plant Physiology and Biochemistry (査読有) 2015; 89: 107-111 (DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.02.018)
- ③ Noriko Tamari, Akemi Mine, Ari Sako, Seiya Tamagawa, Yasuhiro Tabira, Yoshie Kitamura
Possible application of the medicinal plant *Hyoscyamus albus* in phytoremediation: excess copper compensates for iron deficiency, depending on the light conditions.
American Journal of Plant Sciences (査読有) 2014; 5: 3812-3822 (DOI: 10.4236/ajps.2014.526399)
- ④ Jebunnahar Khandakara, Md. Shafiqul islam, Tsuyoshi Nakamura, Koichiro Sera, Toshihiro Takatsuji, Yoshie Kitamura
Health risk assessment of arsenic and other heavy metals from vegetables grown in Bangladeshi village, Bangladesh.
International Journal of PIXE (査読有) 2014; 22: 287-298 (DOI: 10.1142/S0129083512400372)
- ⑤ Jebunnahar Khandakara, Izumi Haraguchi, Kenichi Yamaguchi, Yoshie Kitamura
A small scale proteomic approach reveals a survival strategy, including a reduction in alkaloid biosynthesis, in *Hyoscyamus albus* roots subjected to iron deficiency.
Frontiers in Plant Science (査読有) 2013; 4: 331:1-13 (DOI: 10.3389/fpls.2013.00331)
- ⑥ Ataru Higa, Jebunnahar Khandakar, Yuko Mori, Yoshie Kitamura
Increased *de novo* riboflavin synthesis and hydrolysis of FMN are involved in riboflavin secretion from *Hyoscyamus albus* hairy roots under iron deficiency.
Plant Physiology and Biochemistry (査読有) 2012; 58: 166-173 (DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.07.001)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Yuki Kawahara, Takashi Hashimoto, Hideki Nakayama, Yoshie Kitamura
Glx may be not involved in iron deficiency-induced morphological changes in the roots of *Hyoscyamus albus*
International Society of Root Research 9th Symposium (ISRR 9), Camberra (Australia). 2015年10月06日～10月09日
- ② 原口泉, Jebunnahar Khandakar, 山口健一, 北村美江
鉄欠乏がヒヨス培養根の代謝に与える影響

第31回日本植物細胞分子生物学会 札幌大会・シンポジウム (北海道・札幌市) 2013年09月10日～09月12日

- ③ 川原優紀, 北村美江
鉄欠乏ストレスによるヒヨス培養根の組織構造の変化
第31回日本植物細胞分子生物学会 札幌大会・シンポジウム (北海道・札幌市) 2013年09月10日～09月12日
- ④ 迫亜莉, 峯朱未, 玉川聖也, 田平泰広, 北村美江
ヒヨスの生長とミネラル蓄積に及ぼす光と重金属の影響
第30回日本植物細胞分子生物学会 生駒大会・シンポジウム (奈良県・生駒市) 2012年08月03日～08月06日
- ⑤ 原口泉, Jebunnahar Khandakar, 比嘉中, 山田耕史, 北村美江
鉄欠乏下での双子葉植物のフラビン類分泌
第30回日本植物細胞分子生物学会 生駒大会・シンポジウム (奈良県・生駒市) 2012年08月03日～08月06日

[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]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 美江 (KITAMURA, Yoshie)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科 (環境)・教授
研究者番号: 40108337

(2) 研究分担者

山口 健一 (YAMAGUCHI, Kenichi)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科 (水産)・准教授
研究者番号: 90363473
西山 雅也 (NISHIYAMA, Masaya)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科 (環境)・教授
研究者番号: 50263801

(3) 連携研究者

山田 耕史 (YAMADA, Koji)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (薬学系)・准教授
研究者番号: 00253469