

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780062

研究課題名(和文) ムギネ酸顆粒の形成，輸送機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of mugineic acid vesicles

研究代表者

長坂 征治 (Seiji, Nagasaka)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：60534013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：イネ科植物の鉄吸収機構の解明を目的とし、細胞内でのムギネ酸類生合成過程を解析するため、生合成に関わる3つの酵素(OsNAS1、OsNAAT1、OsDMAS1)を蛍光タンパク質との融合タンパク質としてイネ培養細胞内で発現させ各酵素の細胞内での局在性を解析した。各酵素とGFPとの融合タンパク質の局在解析では、NAS-GFPは小胞に、NAAT-GFPは小胞の周囲に局在していたがDMAS-GFPは細胞質全体で蛍光が観察され、他の二つとは異なり局在性を示さなかった。これらの結果は、これまで考えられてきた小胞内でのムギネ酸類の生合成とは異なっており、イネの鉄吸収機構の全貌解明に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Graminaceous plants have unique iron uptake system termed as Strategy II, which uses mugineic acids phytosiderophores (MAs). MAs are proposed to be synthesized in particular vesicles, named as MAs vesicles, however the site of synthesis of MAs has not been validated experimentally. We investigated the localization of three enzymes participating in the mugineic acids synthesis using a transient expression method of GFP fusion proteins in suspension-cultured rice cells (Oc cells). OsNAS-GFP and OsNAAT-GFP localized to MAs vesicles in a distinct fashion. OsNAS-GFP localized to whole body of MAs vesicles, while OsNAAT-GFP localized to the outer layer of these vesicles. In contrast to these fusion proteins, the fluorescence of OsDMAS1-GFP was observed throughout the cytoplasm. These results suggest that the first two steps of mugineic acid biosynthesis occur in MAs vesicles, while DMA is synthesized in the cytoplasm.

研究分野：植物無機栄養

キーワード：ムギネ酸 ムギネ酸顆粒 鉄栄養

## 1. 研究開始当初の背景

鉄は、すべての植物にとって必須微量栄養素の一つであり、光合成系や呼吸系の電子伝達、様々な酸化還元反応に関与する重要な元素である。そのため、植物の鉄吸収機構については、作物の増収や鉄欠乏症状の発症しやすい不良土壌でも生育可能な鉄欠乏耐性植物の創製など、農業への貢献を目的として研究が進められてきた。近年では鉄吸収機構の研究を進展させ、鉄の蓄積量を高めた機能性食品として開発させた形質転換イネの報告がなされている。これは鉄欠乏を原因とする貧血症状が問題となっている地域で、食品から鉄を摂取することで症状を改善するための方策に用いられる植物であり、植物の鉄吸収機構研究の結実の一つであるといえる。

イネ科植物は、三価鉄のキレーターであるムギネ酸類を介した機構で土壌から鉄を吸収している。ムギネ酸類の生合成経路において最初に合成されるデオキシムギネ酸は、3分子の *S*-アデノシルメチオニンを基質として、ニコチアナミン合成酵素 (NAS)、ニコチアナミンアミノ基転移酵素 (NAAT)、デオキシムギネ酸合成酵素 (DMAS) の3つの酵素の触媒により生合成される。現在までに9種類のムギネ酸類が同定されているが、全てのムギネ酸類は、デオキシムギネ酸から水酸化酵素などの触媒により合成される。イネ科植物は、このムギネ酸類を根圏へと分泌し、土壌中の鉄をムギネ酸類との錯体として可溶化し、鉄-ムギネ酸錯体として根圏の鉄を吸収している。現在までにムギネ酸類の生合成に関わる酵素タンパク質、ムギネ酸類の根圏への分泌、細胞への吸収に関わる輸送体タンパク質の遺伝子などの単離、解析が進められ、ムギネ酸類を介した鉄吸収機構とその制御機構の全貌が明らかになりつつある。

主要な分子の情報が揃ったことから、今後は、鉄吸収機構に関する詳細な解析と生理現象から見た全体像の解明に向けた研究が期待

されており、その中で、ムギネ酸類の分泌に関わる研究は、重要課題の一つである。

生理学的な研究から、鉄欠乏処理によるムギネ酸類生合成量の増加、分泌量の増加、またムギネ酸類の根圏への分泌量の変動に、日周性があることが報告されている。特にムギネ酸類の分泌量の日周変動は、日の出後、数時間のうちにほぼ全てのムギネ酸類の分泌が行われ、その後、次の日の出に向けて、ムギネ酸類が細胞内で生合成され、蓄積されるという特徴的なものである。生合成量の増加については、遺伝子発現量、酵素活性等の解析から分子生理学的な裏付けがなされているが、実際に細胞内でムギネ酸類が合成される部位、分泌までの細胞内でのムギネ酸類の輸送については、鉄欠乏処理を行ったオオムギ根の表皮細胞内で特異的に観察される小胞 (ムギネ酸顆粒) の存在が示唆されているのみで、この小胞とムギネ酸類の生合成との関連性はほとんど明らかにされていない。

ムギネ酸類の分泌機構の解明に向けた研究は、イネ科植物の鉄吸収機構の理解を深めるだけでなく、他の分野への貢献も期待できる。例えば、ムギネ酸顆粒は、その表層にリボソームが付着していることから、小胞体由来であると考えられるが、同様の小胞で酵素反応の場を提供しているものの報告はほとんどなく、ムギネ酸顆粒の機能が解明されれば、細胞内小胞の機能について新たな知見が得られるものと期待される。さらに、分泌の日周性と小胞輸送の制御機構が解明されれば、植物生理における概日性の役割についての情報が提供されるものと考えられる。本研究は、イネ科植物の鉄吸収機構の解明という点だけでなく、細胞生理学の分野、また、形質転換植物の創製を通じた農業分野、環境分野の発展に大きく寄与するものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、ムギネ酸顆粒に焦点を絞

り、形態観察、分子生物学手法を中心に研究を進め、ムギネ酸顆粒の機能、形成、輸送機構の解明を目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1) イネ培養細胞 (Oc 細胞) におけるムギネ酸類合成酵素発現の解析

Oc 細胞を通常の培養液、鉄を含まない培養液、鉄を過剰に含む培養液で1週間培養し回収した。それぞれの条件で培養した細胞からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットリング法により、ニコチアナミン合成酵素、ニコチアナミンアミノ基転移酵素、デオキシムギネ酸合成酵素の発現を解析した。

(2) 融合タンパク質発現用ベクターの作成と形質転換

一過性発現用のベクターとして、pUC18のマルチクローニングサイトにプロモータ、ムギネ酸類生合成酵素、蛍光タンパク質、ターミネータの順に配列したコンストラクトを導入した。プロモーターには過剰発現のためのカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターと、NAS遺伝子のプロモーター領域(2 kbp)の2種類を用いた。局在解析の対象とした酵素は、ニコチアナミン合成酵素、ニコチアナミンアミノ基転移酵素、デオキシムギネ酸合成酵素の3種類を用いた。蛍光タンパク質には、GFP、CFP、mKate2、YFPの4種類について検討を行った。これらの遺伝子の下流にNOSターミネータを導入し、発現用ベクターを作製した。Oc細胞のゲノムに導入した形質転換体の作成のために、上記のコンストラクトを形質転換用ベクター(pCAMBIA1320)に導入した。

Oc細胞の一過的発現のための遺伝子導入はPEG法で行い、形質転換にはアグロバクテリウム法を用いた。

(3) 形質転換したOc細胞の蛍光観察

融合タンパク質を発現するためのベクターを導入した培養細胞は、経時的に共焦点顕微鏡で観察を行った。

一過性発現の実験では、複数のベクターを混合してPEG法による遺伝子導入を行う事で、同一細胞内でのムギネ酸類生合成関連酵素の局在解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) Oc細胞におけるムギネ酸類合成酵素の発現

鉄濃度の異なる条件下で培養したOc細胞のウエスタンブロットリング解析から、ニコチアナミン合成酵素(NAS)、ニコチアナミンアミノ基転移酵素(NAAT)、デオキシムギネサン合成酵素(DMAS)の鉄欠乏誘導性発現が確認された。このことから、Oc細胞内のムギネ酸類合成系が植物体と同様に制御されていることが示唆され、本研究の主題である酵素遺伝子の局在解析への利用が可能であると判断した。一方、Oc細胞では鉄過剰条件下においてもこれらの酵素群の発現が誘導されていることが明らかになった。鉄過剰条件によるムギネ酸類生合成酵素の発現誘導はイネやオオムギの植物体では調べられていないことから、Oc細胞に特有の発現制御かどうかは不明であるが、ムギネ酸類を介した鉄吸収機構における重要な生理現象である可能性がある。

(2) 融合タンパク質を用いた細胞内局在解析

ムギネ酸類生合成酵素タンパク質とGFPの融合タンパク質の局在解析の結果、NAS-GFPとNAAT-GFPはともにイネ培養細胞内の小胞への局在が認められたが異なる局在を示した。NAS-GFPでは小胞の全体で蛍光が観察され、NAAT-GFPは主に小胞の周囲で蛍光が認められた。一方でDMAS-GFPは、他の2つのタンパク質とは異なり細胞質全体で蛍光が観察され、局在性は認められな

った。次に3つの酵素タンパク質をそれぞれ波長の異なる蛍光タンパク質との融合タンパク質として1つの細胞内で発現させると、NAS—GFPとNAAT-CFPのほとんどは同じ小胞に局在し、DMAS-mKateはDMAS-GFPの発現と同様に細胞質に存在していた。これらの結果から、ムギネ酸類の生合成部位として考えられてきたムギネ酸顆粒では、生合成の最初の段階であるニコチアナミンの合成が行われ、その後の反応は顆粒の周囲で行われていることが示唆された。

Oc細胞のゲノムにアグロバクテリウム法により融合タンパク質発現用のコンストラクトを導入した細胞株では、強い蛍光が観察される系統は得られなかった。しかしながら、融合タンパク質の発現は確認されたことから、他のプロモーターの利用などを検討する事で融合タンパク質の発現性改善を行う予定である。

## 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 2件)

1. Nozoye T, Tsunoda K, Nagasaka S, Bashir K, Takahashi M, Kobayashi T, Nakanishi H, Nishizawa NK. Rice nicotianamine synthase localizes to particular vesicles for proper function. *Plant signaling & behavior* 9 e28660, 10.4164/psb.2866, April, 2014. 査読有
2. Nozoye T, Nagasaka S, Bashir K, Takahashi M, Kobayashi T, Nakanishi H, Nishizawa NK. Nicotianamine synthase 2 localizes to the vesicles of iron-deficient rice roots, and its mutation in the YXXφ or LL motif causes the disruption of vesicle formation or movement in rice *Plant J.* 77, 246-260, 10.1111/tpj.12383 January, 2014. 査読有

2. [学会発表](計 2件)

1. 古賀悠介、新井菜月、長坂征治 ムギネ酸類生合成に参与している酵素の局在日本農芸化学会 2015年度大会、岡山大学(岡山県岡山市) 2015.3.26~29
2. 古賀悠介、長坂征治 イネ培養細胞におけるムギネ酸類生合成酵素の局在解析日本農芸化学会 2014年度大会、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市) 2014.3.27~30

## 6．研究組織

(1)研究代表者

長坂 征治 (Nagasaka Seiji)  
東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：60534013