

高等植物におけるニコチアミンの機能に関する研究

高橋美智子（東京大学大学院・農学生命科学研究科）

amichiko@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

ニコチアミン(NA)は広く高等植物に存在する金属のキレーターである。イネ科植物はさらにこの NA から金属のキレーターであるムギネ酸類を合成する(図1)。ムギネ酸類は根から分泌された後、根圏の鉄を可溶化し、鉄・ムギネ酸類として再吸収され鉄獲得に寄与するだけでなく、体内においても機能すると考えられている。一方で NA は土壌中には分泌されず、植物体内において機能すると考えられている。本研究では NA を基質とするムギネ酸類生合成経路上の酵素、ニコチアミンアミノ基転移酵素(NAAT)の研究を通して新たな NA の機能を見いだした。

1. NAAT と鉄欠乏耐性

イネ科植物はアルカリ土壌などの鉄欠乏条件下において、鉄を獲得するためにムギネ酸類を大量に合成し、根から分泌する。ムギネ酸類生合成経路上の酵素のうち NAAT 以降はイネ科植物に特異的な酵素であり、NAAT は NA を基質としてそのアミノ基を転移する。NAAT は鉄欠乏条件下において活性が著しく上昇し、ムギネ酸類の分泌量の多い植物ほど NAAT 活性も高い。また、ムギネ酸類の分泌量の多い植物ほど鉄欠乏耐性も高いことが報告されている。

NAAT を精製・単離することを目的とし、水耕栽培によって鉄欠乏処理したオオムギの根から粗タンパク質を抽出し、4本のカラムクロマトグラフ

ィーの後に2次元電気泳動を行った。その結果、数個のタンパク質が検出された。そこで対照区よりも鉄欠乏処理したオオムギの根に多く存在し、なお NA をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーで濃縮されたタンパク質を NAAT 候補としてその部分アミノ酸配列を決定した¹⁾。決定された配列をもとにデジェネレートプライマーを作成し、鉄欠乏オオムギ根の cDNA ライブラリーを鋳型にして PCR を行ってプローブを作成した。このプローブを用いて鉄欠乏オオムギ根の cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、NAAT 候補タンパク質をコードする遺伝子として *HvNAAT-A* と、それに相同性の高い *HvNAAT-B* を単離した。この遺伝子を酵母に発現させたタンパク質を用いて NAAT 活性を測定したところ、NAAT-A、NAAT-B 共に活性を有することが証明された。従ってこの2つの遺伝子はオオムギの NAAT をコードする遺伝子であることが明らかとなった。*HvNAAT-A* はアミノ酸配列においてラットのチロシナミノ基転移酵素と 33%の相同性を有していた。オオムギの根において *HvNAAT-A* および *HvNAAT-B* は、鉄欠乏ストレスによってその遺伝子発現が強く誘導された。これらの cDNA に加え、*HvNAAT-A* と *HvNAAT-B* が1コピーずつタンデムに並んだ *HvNAAT* のゲノム遺伝子をオオムギのゲノムライブラリーから単離した。

前述のように鉄欠乏に強いイネ科植物はムギネ酸類の分泌量が多く、NAAT 活性も高い。従って、

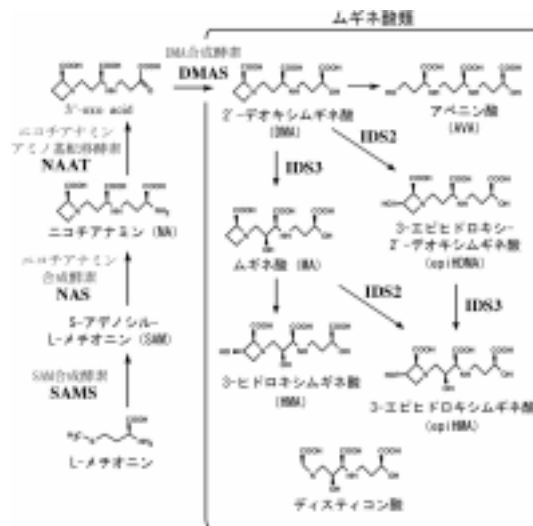


図1 ムギネ酸類の生合成経路

NAAT 活性を増強することによって、ムギネ酸類の分泌量が増加し、鉄欠乏耐性が增大することが考えられた。そこで上記のオオムギの *NAAT* ゲノム遺伝子をそのままイネに導入した²⁾。オオムギ *NAAT* のゲノム断片を導入したイネは *NAAT* 活性が約 60 倍に増大し、デオキシムギネ酸 (DMA) の分泌量は 1.8 倍に増大した。このことから *NAAT* 活性を増強することにより、ムギネ酸類の分泌量を高められることが示された。この *NAAT* ゲノム遺伝子導入イネの鉄欠乏耐性を検定するために、アルカリ土壌を用いて栽培したところ、最終的に穂重で非形質転換体の 4.1 倍、穂を除く地上部で 4.2 倍の乾物重が得られた (図 2)。これによりオオムギゲノム *NAAT* 遺伝子を導入することで、ムギネ酸類の分泌量が増加し、イネに鉄欠乏耐性が付与されたことが明確に示された。このイネは遺伝子導入によって鉄欠乏耐性が付与された最初のイネである。その後、さらに鉄欠乏耐性を増強するために、*NAAT* 遺伝子に加えてムギネ酸合成経路上の他の酵素遺伝子を組み合わせ導入した形質転換イネを作出した。現在、そのうちのいくつか (上記のゲノム *NAAT* 遺伝子導入イネを含む) について東北大学の隔離圃場において鉄欠乏耐性を検定中である。



図2. アルカリ土壌栽培による鉄欠乏耐性検定後の対照のイネ(左)とゲノムNAAT遺伝子導入イネ(右)

2. NA と生殖成長

イネ科植物に特異的な酵素を双子葉植物で過剰発現させるとどうなるか、という興味から *HvNAAT-A* をタバコに導入し過剰発現させた³⁾。その結果、このタバコは新葉に葉脈間クロロシスを呈し、花粉が正常に形成されず、葯、雌蕊、花弁、がくの数や形態にも異常を示し、不稔であった (図 3)。そこでこの植物の内生 NA を測定したところ、NA 濃度が著しく低く検出限界以下であることがわかった。これは導入された *NAAT* によって基質の NA が消費されてしまった結果であると考

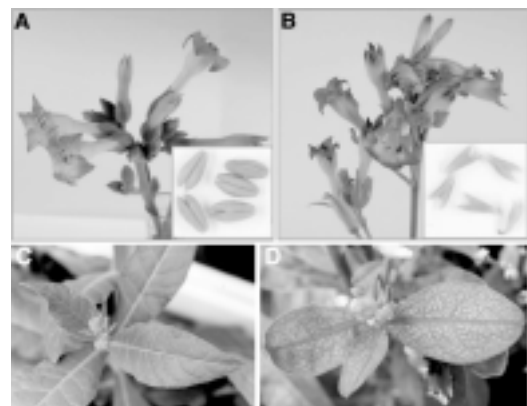


図3. 非形質転換タバコ (A, C) とNAATタバコ (B, D) の花、葯、新葉

えられた。また新葉や花の各器官の金属含量は鉄、亜鉛、銅のすべてで低かった。これらの金属元素の欠乏は NA の欠乏に由来すると考えられ、NA の欠乏により金属元素の移行と分配が正常に行われず、その結果金属元素が欠乏することにより形態の異常や不稔の形質が表れたと考えられた。実際に、*NAAT* 導入タバコの腋芽を NA を含む溶液に浸すと葉脈間クロロシスが回復した。また、つぼみを形成する前から NA を投与していた腋芽も正常な花を形成した。さらに、オオムギのニコチアミン合成酵素 (*HvNAS*) を過剰発現させたタバコに接ぎ木することによって、葉脈間クロロシス、花の形態異常、不稔のすべての異常が回復した。NA 溶液や接ぎ木によって NA を与えた *NAAT* 導入タバコは、鉄、亜鉛、銅の含量がいずれも投与していない植物に比較して増加していた。また、*HvNAS1* 過剰発現タバコは新葉、花、種子のすべてで鉄や亜鉛の含量が高く、種子では鉄含量が非形質転換体

の2.3倍、亜鉛含量が1.8倍であった。これらの結果は *NAAT* 導入タバコの表現型の原因が NA 欠乏とそれに伴う金属欠乏であることを示すとともに、NA が生殖器官への金属輸送に関与することや、NA 自身および NA が輸送する金属が生殖器官の形態形成に重要な機能を果たしていることを意味している。

NA の生殖成長期における重要性が示されたため、生殖成長期における NA の機能を明らかにすることを目的として、双子葉植物とイネ科植物の花や種子における NAS の発現部位と発現時期を調べた。シロイヌナズナの4種のNAS (*AtNAS1*, *AtNAS2*, *AtNAS3*, *AtNAS4*) の上流領域に s-グルクロニダーゼ遺伝子をつないだもの

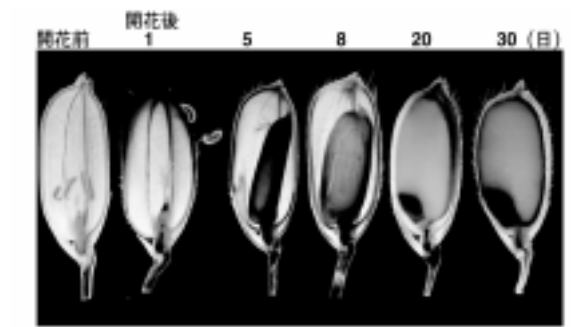


図4. *OsYSL2* promoter::GUSの生殖成長および種子成熟期における発現

、イネの3種のNAS (*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAS3*) および Fe(II)-NA, Mn(II)-NA の錯体のトランスポーター遺伝子をコードする *OsYSL2* の上流領域に s-グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子をつないだものを、シロイヌナズナ、イネのそれぞれの植物に導入した(図4)⁴⁾。さらに DMA が生殖成長へ関与する可能性も考慮し、イネの *NAAT* 遺伝子、*OsNAAT1*、および Fe(III)-DMA 錯体のトランスポーターをコードする *OsYSL15* 遺伝子についても同様にプロモーターGUS 導入形質転換イネを作成した。

シロイヌナズナにおいて *AtNAS* 遺伝子は花の各器官と維管束、さや、さやの維管束、若い種子、珠柄、胚に発現しており、分子種によって発現時期や発現部位に違いがみられた。イネにおいても *OsNAS* の発現は分子種によって時期や部位に差がみられた。*OsNASs* および *OsYSL2* はいずれも開花前から種子成熟の過程の期間を通して小枝梗の維管束で発現しており、花の各器官や胚乳、胚、背部維管束で発現していた。また *OsNAAT* 遺伝子も *OsNASs* と類似の発現を示したが、発現の時期や部位は完全には一致しなかった。イネにおけるこれらの遺伝子発現の解析から、種子発達過程および休眠時に DMA は胚乳、NA は胚において機能する可能性が高いことが示唆された。以上の結果はイネ科植物だけでなく、イネ科以外の植物においても、NA が花の各器官や種子への金属輸送のみならず、胚発生においても重要な役割を持つことを示唆している。さらに、イネ科植物においては DMA も NA と同様に生殖成長や胚発生に重要な役割を果たすことを示唆している。

3. NA と環境ストレス

NAS は鉄欠乏だけではなく金属過剰によってもその遺伝子発現が誘導され、金属過剰への防御機構としての NA の機能を示唆している。*HvNAS* を過剰発現させたタバコやシロイヌナズナは、特にニッケル過剰に耐性を示した(図5)⁵⁾。このことは今後ファイトレメディエーションのツールとして NAS が非常に有効であることを示している。

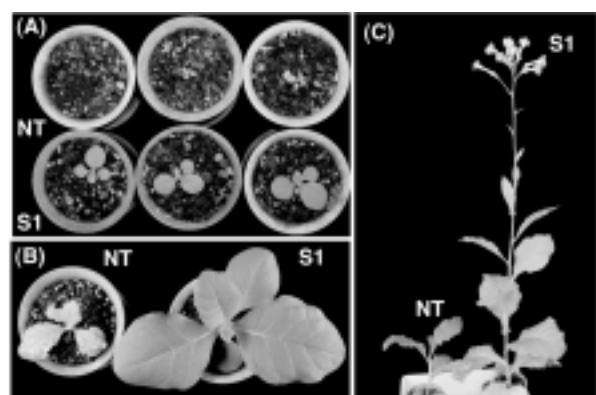


図5. Ni 過剰土壌における形質転換タバコ(MT)とNAS過剰発現タバコ(S1) 播種後25日(A), 35日(B), 2ヶ月(C)

謝辞

本研究は主に東京大学大学院農学生命科学研究科において行いました。東京大学 西澤直子教授 森

敏名誉教授には、博士論文に始まり研究全般にわたって適切な御指導と御助言を賜りましたことに深く感謝申し上げます。東京大学 吉村悦郎教授には特にICPを用いた金属分析や高エネルギー加速器研究機構における金属分布の分析に関して御指導頂きました。東京大学 中西啓仁助手には博士論文に始まり研究全般に渡って適切な御指導と御助言を頂きました。東京理科大学 中井泉教授、高輝度光科学研究センター 寺田靖子先生には高エネルギー加速器研究機構における実験のご指導とご助言を頂きました。農業生物資源研究所 川崎信二博士には非常に有用なベクターであるpBIGRZを御供与頂きました。最後に日々の研究にご協力頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科新機能植物開発学研究室、植物分子生理学研究室、植物栄養肥料学研究室の皆様には厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Takahashi, M., Terada, Y., Nakai, I., Nakanishi, H., Yoshimura, H., Mori, S. and Nishizawa, N. K. (2003) The Role of Nicotianamine in the Intracellular Delivery of Metals and Plant Reproductive Development. *Plant Cell* 15 : 1263-1280.
- 2) Takahashi, M., Nakanishi, H., Kawasaki, S., Nishizawa, N.K. and Mori, S. (2001) Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature Biotech* 19 : 466-469.
- 3) Takahashi, M., Yamaguchi, H., Nakanishi, H., Shioiri, T., Nishizawa, N.K., and Mori S. (1999) Cloning Two Genes for Nicotianamine Aminotransferase, a Critical Enzyme in Iron Acquisition (Strategy II) in Gramineous Plant. *Plant Physiol* 121 : 947-956.
- 4) Koike, S., Inoue, H., Mizuno, D., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N-K. (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J* 39 : 415-424.
- 5) Kim, S., Takahashi, M., Higuchi, K., Tsunoda, K., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S. and Nishizawa, N.K. (2005) Increased nicotianamine biosynthesis confers enhanced tolerance of high levels of metals, in particular nickel, to plants. *Plant Cell Physiol* (in press).

A study of nicotianamine in higher plants

Takahashi Michiko (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

amichiko@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp