

研究報告書

「植物の鉄センシング機構解明による生産力の強化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 小林 高範

1. 研究のねらい

植物が生育し、炭酸固定と物質生産を行うためには鉄が必要である。植物は土壌中から鉄を吸収して利用するが、好気的な環境下では鉄はほとんど溶けていない。世界の土壌のおよそ 30% を占めている石灰質アルカリ土壌では鉄の溶解度がとりわけ低く、植物にとって鉄欠乏が生育の主要な制限要因となる。したがって、より高い植物生産性のためには、植物が鉄を効率的に吸収・利用するメカニズムを理解して応用することが必須である。植物は鉄欠乏に応答して、種々の遺伝子を発現誘導するが、その根本となる鉄欠乏シグナルと鉄センサー分子の実体は未だ不明である。

本研究では、この鉄欠乏シグナルと鉄センサー分子の実体を解明することにより、植物の鉄欠乏応答メカニズムの全貌を概観することを目指した。具体的には、イネの二種類の鉄結合因子に着目して解析を行い、これらが鉄センサー分子である可能性を探索した。

一つ目の因子は、イネの鉄欠乏応答を正に制御する転写因子 IDEF1 である。IDEF1 は二価鉄および他の二価金属と可逆的に結合する。また、鉄欠乏の進行に伴って IDEF1 が制御する標的遺伝子の種類が変化することから、IDEF1 は鉄栄養状態を感知するセンサー分子である可能性が示唆された。

二つ目の因子は、鉄欠乏誘導性 RING-finger タンパク質 HRZ である。HRZ の機能は全く知られていなかったが、HRZ タンパク質は鉄結合ドメインとユビキチン化触媒ドメインを持ち、これは哺乳類の鉄センサー FBXL5 と似たドメイン構造であることから、植物の新規鉄センサー候補分子と考えられた。

本研究ではこれらの因子の鉄感知における役割を解明することにより、鉄の利用性を向上させた植物、とりわけ穀物を創製・適用するための遺伝子工学的技術とその基盤的知見を提示することを狙った。これにより、植物による物質生産性の高効率化、二酸化炭素資源化に貢献することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

- ・ IDEF1 と GFP との融合タンパク質を発現する形質転換イネを作製・解析した。IDEF1-GFP は鉄栄養条件に関わらず常に核に局在した。
- ・ IDEF1 と相互作用するタンパク質を酵母 two-hybrid 法により探索・同定した。これらのうち Bowman-Birk 型トリプシンインヒビターを IBP1 と命名した。IBP1 の発現は IDEF1 依存的に鉄欠乏で誘導された。IDEF1 タンパク質の分解は IBP1 により阻害された。以上の成果を論文発表した(論文2)。

- ・ イネの鉄欠乏誘導性 RING-finger 型ユビキチンリガーゼを2種類同定し、OsHRZ1、OsHRZ2 と命名した。これらが鉄および亜鉛と結合し、ユビキチン化活性を持つことを証明した。これらの発現を低下させたイネは鉄欠乏耐性と鉄蓄積を示し、鉄の吸収・移行を担う鉄欠乏誘導性遺伝子の発現が鉄十分条件で亢進していたことから、これらは鉄欠乏応答を負に制御する因子であり、鉄センサーの候補分子と考えられた。以上の結果から特許を出願し、論文発表・プレスリリースを行った(特許1、論文1、プレスリリース1)。
- ・ 非形質転換イネおよび HRZ の発現を低下させたイネを用いてマイクロアレイ解析とプロテオーム解析を行った。イネ根の鉄欠乏応答には転写制御とタンパク質レベルの制御の両方が重要であることが示唆された。
- ・ 植物の鉄センシングに関する総説(総説1)、イネ根の鉄欠乏応答に関する総説(総説2)を発表した。

(2) 詳細

・研究テーマ1-a 「IDEF1 のイネ体内における動態の解析」

オオムギの鉄欠乏誘導性 *IDS2* 遺伝子のプロモーターおよび、*IDEF1* 遺伝子自身のプロモーターの2種を用いて、完全長の *IDEF1*、または金属結合ドメインを欠失した *IDEF1* と GFP との融合タンパク質を発現する形質転換イネを作製した。コントロールとして、*ccdB* と GFP との融合タンパク質を発現するイネを作製した。これらのイネを様々な鉄栄養条件下で生育させ、GFP 蛍光を観察したところ、*IDEF1*-GFP は常に核に観察された。当初期待していたような鉄栄養条件による細胞内局在の変化は認められなかった。

ウエスタン解析により *IDEF1* タンパク質の発現量(分解制御)を調査した。非形質転換植物では *IDEF1* の発現量が低いため明確な結果が得られなかったが、一過的に遺伝子導入した *IDEF1* は 26S プロテアソーム阻害剤である MG132 により発現量が上昇したことから、*IDEF1* が 26S プロテアソーム系により分解されることが示唆された。

・研究テーマ1-b 「IDEF1 と相互作用する分子の探索と解析」

酵母 two-hybrid 法を用いて *IDEF1* と相互作用するタンパク質をコードする遺伝子を33種類同定した。これらのうち鉄の感知に直結するものは見いだされていないが、鉄欠乏誘導性 Bowman-Birk 型トリプシンインヒビターが2種類含まれていた。これらは互いに相関性が高く、*IDEF1*-binding protein 1;1 (*IBP1;1*)、*IBP1;2* と命名した。これらの発現は *IDEF1* によって正に制御されていた。*IBP1;1* についてプルダウン法により *IDEF1* との結合を確認した。*IBP1;1* を過剰発現する形質転換イネを取得した。このイネでは *IDEF1* が制御する鉄・キレーター複合体のトランスポーター遺伝子 *OsYSL2* の発現量が上昇していた。*IBP1;1* が *IDEF1* のタンパク質分解を抑制することが *in vitro* 分解実験および一過的発現系により明らかになった。鉄欠乏により誘導された *IBP1* が、鉄欠乏応答に必要な *IDEF1* の量の確保に貢献していると推察されるが、この現象が鉄の感知に関わるかどうかは不明である。

・研究テーマ2 「鉄欠乏誘導性 RING-finger タンパク質の解析」

イネの鉄欠乏誘導性遺伝子の中から鉄結合ドメインとユビキチン化触媒ドメインを持つ2つの遺伝子を見だし、それらを *Oryza sativa* Hemerythrin motif-containing Really Interesting New Gene (RING)- and Zinc-finger protein 1 (*OsHRZ1*)、*OsHRZ2* と命名した。大腸菌で発現

させたりコンビナントタンパク質の解析により、OsHRZ1、OsHRZ2 およびシロイヌナズナの本モログである BRUTUS が鉄および亜鉛と結合し、ユビキチン化活性を持つことを証明した。OsHRZ1、OsHRZ2 の発現は鉄欠乏誘導性であり、IDEF1 により正に制御された。OsHRZ1 と OsHRZ2 の発現を低下させた形質転換イネを作製した。これらのイネは水耕栽培と石灰質土壌における長期的なポット栽培の両方で鉄欠乏耐性を示した。また、これらのイネは栽培時の鉄栄養条件に関わらず非形質転換イネに比べて2~4倍程度の鉄を種子と葉に蓄積した。亜鉛も非形質転換イネよりも多く蓄積した。韓国の隔離圃場における栽培(業者委託)でも種子への鉄・亜鉛の蓄積が認められた。これらのイネの鉄十分条件の根では、鉄の吸収・移行を担う鉄欠乏誘導性遺伝子の発現が亢進していた。以上のことから、HRZ は鉄欠乏応答を負に制御する因子であり、鉄センサーの候補分子と考えられた。

非形質転換イネおよび HRZ の発現を低下させたノックダウンイネを用いて 44K マイクロアレイ解析とプロテオーム解析(業者委託、iTRAQ 法)を行った。これらの結果を比較したところ、イネ根の鉄欠乏応答には転写制御とタンパク質レベルの制御の両方が重要であることが示唆された。また、HRZ ノックダウンイネで発現が上昇しているタンパク質は HRZ がユビキチン化により分解する標的タンパク質の候補と考えられる。

まとめ(鉄センシング機構解明に向けて)

細胞内の鉄センサーに関しては明確な定義がない。そこで、鉄センサーの定義を提唱した(総説1)。ある分子が鉄センサーであるためには、(i)鉄または関連分子と結合すること(input)、(ii)それにより機能が変化すること(transmission)、(iii)鉄栄養の恒常性を制御すること(output)という3つの条件を満たすことが必要十分であると考えられる。

これらの条件のうち、IDEF1 に関しては(i)と(iii)が本研究以前に明らかになっており、本研究で(ii)の証明を試みたが現在までに達成できていない。一方、HRZ に関しては本研究で(i)と(iii)が明らかになった。(ii)の証明は現在までに達成できていない。

3. 今後の展開

IDEF1 と HRZ の双方に関して、鉄センサーであることを証明するための残りの必須条件である「鉄または関連分子との結合により機能が変化すること(transmission)」の証明を目指す。特に、IDEF1 の DNA 結合活性とタンパク質安定性、HRZ の細胞内局在とタンパク質安定性が鉄または他の金属との結合に影響を受けるかどうかについて検討を進める。これにより、IDEF1 と HRZ が真の細胞内鉄センサーであることが証明され、これらが結合する鉄または他の金属が鉄欠乏シグナルの実体であることが同時に証明されるものと期待される。

IDEF1 と HRZ による鉄センシング機構の実体が解明されれば、これを応用して、既存のものよりも優れた鉄欠乏耐性植物および鉄・亜鉛富化作物の創製に取り組む。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

IDEF1 に関しては、金属との結合状態が転写因子の機能と直結することを示す証拠は未だ得られていない。仮説の一つであった細胞内局在の変化に関しては否定的な結果が得られた。残りの仮説である DNA 結合活性、転写活性、分解に関しては、実験系の構築や

予備実験に時間がかかったため本格的な実験は始まったばかりである。IDEF1 と相互作用する因子の探索と解析に関しては、IDEF1 タンパク質の分解を抑制する因子 IBP1 を同定することができたが、鉄センシング機構に直結する結果は得られなかった。また、IDEF1 を利用した新規鉄欠乏耐性植物を創製することはできなかった。以上のように、IDEF1 に関して当初の目的は達成できなかったが、今後この目的を達成するための基盤作りはある程度達成できたものとする。

HRZ に関しては、当初の期待通り、鉄結合タンパク質であることと、鉄欠乏応答を制御する因子であることが証明できた。また、HRZ は予想に反して鉄だけでなく亜鉛も結合することが明らかになり、鉄栄養制御と他の金属との関連性を解く鍵が見いだされた。HRZ の発現を低下させたイネは鉄欠乏に耐性を示し、本領域の目的である二酸化炭素資源化に貢献できる可能性が見いだされたが、このイネの耐性は既存のものとは比べて高いものではなく、今後さらなる改良が必要である。一方、このイネは鉄栄養条件に関わらず茎葉と種子に顕著な鉄の蓄積を示した。この形質は、鉄欠乏性貧血を予防するための鉄富化作物の創製に貢献するものである。以上の結果から特許を出願し、論文・学会発表・プレスリリースを行うことができた。

HRZ が鉄センサーであることを証明するための様々な実験を現在遂行中であり、興味深い予備の結果を得ている。また、HRZ の持つドメイン構造は、哺乳類の鉄センサー分子および種々の植物ホルモン受容体と類似していることから、植物の鉄センシング機構と他の分子認識機構との間の共通性と特異性を解き明かすための基盤的知見が整ってきたものとする。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

鉄イオンを吸収しにくい塩基性土壌などで十分に生育する植物を育成するための方策として、鉄センサータンパク質候補の機能を明らかにし、その活用によって、鉄吸収を可能とする植物を作成することを目的に研究が進められた。この研究によって候補タンパク質が鉄欠乏を負に制御する鉄欠乏反応タンパク質そのものであることを明らかにし、鉄蓄積量が増加した植物を作成することができた。また、このタンパク質が鉄ばかりでなく亜鉛の吸収をも促進する活性を持つという予想外の成果も得た。こうした成果は、学術上も、また、産業への応用という点からも高く評価される。また、我が国で研究が進んでいる本分野の中心的な研究者としても評価されており、本年度終了課題の中で、特に優れた研究の一つである。

今後は、本研究課題で詰め切れなかった鉄センサーを正に制御する因子の機能解明を進めるとともに、亜鉛のように、他の金属のセンシングや吸収の機能を明らかにすることが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kobayashi, T., Nagasaka, S., Senoura, T., Itai, R.N., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K.



Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation. *Nat. Commun.* (2013) 4, 2792.

2. Zhang, L., Itai, R.N., Yamakawa, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., Kobayashi, T. The Bowman-Birk trypsin inhibitor IBP1 interacts with and prevents degradation of IDEF1 in rice. *Plant Mol. Biol. Rep.* (2014) 32, 841-851.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発明者: 小林高範、西澤直子

発明の名称: 新規鉄・亜鉛結合性制御因子と、その発現調節による植物の鉄欠乏耐性向上及び可食部への鉄・亜鉛蓄積の促進技術

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 2012/7/26

出願番号: 特願2012-166233

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・総説発表

1. Kobayashi, T., Nishizawa, N.K. Iron sensors and signals in response to iron deficiency. *Plant Sci.* (2014) 224, 36-43.

2. Kobayashi, T., Itai, R.N., Nishizawa, N.K. Iron deficiency responses in rice roots. *Rice* (2014) 7, 27.

3. Kobayashi, T., Nishizawa, N.K., Intracellular iron sensing by the direct binding of iron to regulators, *Front. Plant Sci.* (2015) doi: 10.3389/fpls.2015.00155

・学会発表

1. Kobayashi, T., Nagasaka, S., Senoura, T., Itai, R.N., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. "Regulation of plant iron response and accumulation by iron-binding regulators." Fifth Congress of the International BioIron Society (IBIS), Biennial World Meeting (2013; London, UK)

2. 小林高範 「植物の鉄欠乏応答と鉄センシング」 日本土壌肥料学会 2014年度東京大会 シンポジウム講演

他 10件(国際学会 4件、国内学会 6件)

・プレスリリース

1. 「少ない鉄でもよく育ち、鉄を効率的に貯めるイネ」 2013/11/14 科学技術振興機構・石川県立大学 6紙に記事掲載(2013/11/21 北國新聞 35面、2013/11/22 日刊工業新聞 21面、2013/11/26 北陸中日新聞 1面、2013/11/26 日経産業新聞 10面、2013/12/11 日本経済新聞 35面(北陸経済面)、2014/1/1 科学新聞 4面)