

<平成 28 年度助成>

雑穀の穀粒における鉄、亜鉛のミネラル含有に対する生体キレーター ムギネ酸類とニコチアミンの貢献を明らかにする

中西 玲子

(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

背景と目的

鉄と亜鉛は哺乳動物にも高等植物にも必須の金属元素である。イネ科作物の間では穀粒に蓄積している金属の量が異なることは、食品栄養の観点からはよく知られている。しかし、主要穀物（イネ、トウモロコシ、ソルガム、オオムギ）以外の雑穀の種子への金属動態に関する知見は少ない。イネ科植物が合成するムギネ酸類は、三価鉄などの重金属のキレーターである。鉄は土壌中には豊富に存在しているが、酸化的な環境では三価の不溶態となり可溶性の形ではほとんど存在しない。イネ科植物は、根からムギネ酸類を分泌することで土壌中に不溶化した鉄を「三価鉄-ムギネ酸類」の複合体として可溶化し、それを根の細胞内へと取り込む。これまでに 9 種のムギネ酸類が同定された（図 1）。ムギネ酸類の合成と分泌は鉄欠乏によって大きく誘導される。さらにムギネ酸類は、植物体内での葉や種子などへ

の鉄の長距離輸送にも重要な役割を持つ。そして、ムギネ酸類の生合成前駆体であるニコチアミンも金属のキレーターであり、二価鉄、亜鉛、マンガン、銅の種子への輸送時に機能している。日本食品標準成分表（七訂）によると、雑穀である精白粒ヒエと精白粒アワは精白米に比べ、鉄を 2～6 倍、亜鉛を 1.6～1.8 倍含有する。一方、精白粒ハトムギは精白米より鉄も亜鉛も含有量が少ない。鉄や亜鉛の吸収や体内移行に必要なムギネ酸類とニコチアミンにおける差が、これらの含有量の差につながっている可能性が高い。そこで本研究では、アワ、ヒエ、ハトムギといったイネ科雑穀の穀粒での、鉄と亜鉛の集積におけるニコチアミンやムギネ酸類の貢献度を明らかにすることを目的とし、生合成されるムギネ酸類を同定し、アワにおいては鉄欠乏条件におけるムギネ酸類やニコチアミンの含有量と、それらの生合成遺伝子の発現との相関を調べた。

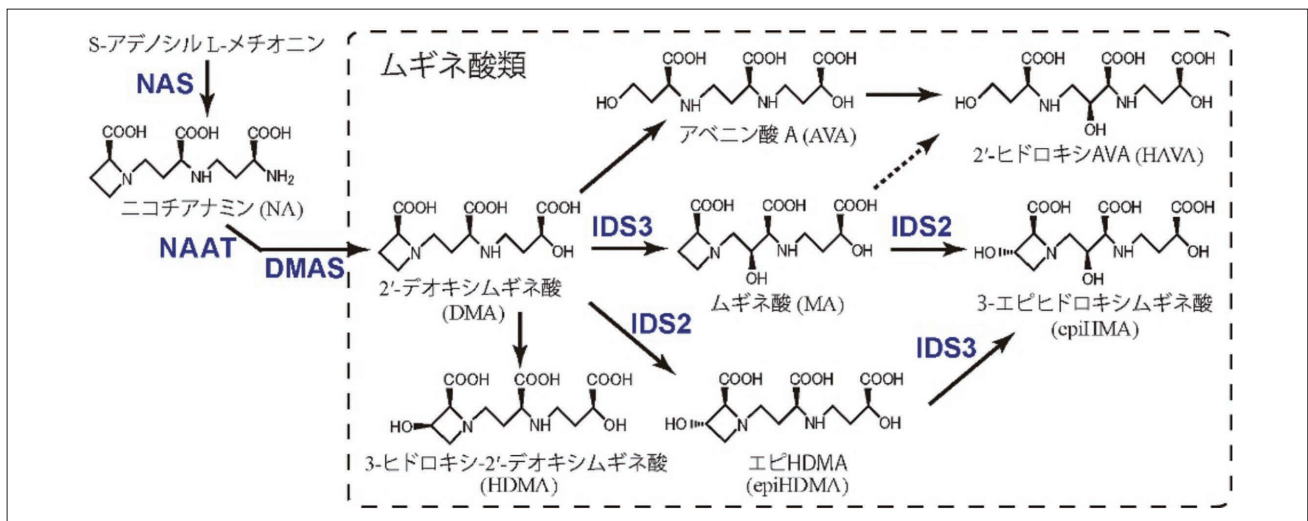


図 1 ムギネ酸類の生合成経路

これまでに同定されているムギネ酸類 9 種のうち、7 種の構造を示した。NAS、ニコチアミン合成酵素：NAAT、ニコチアミン・アミノ基転移酵素：DMAS、デオキシムギネ酸合成酵素：IDS2 と IDS3、ムギネ酸類水酸化酵素。

アワ、ヒエ、ハトムギにおける 分泌ムギネ酸類の同定

水耕栽培で十分な大きさに育てた植物を、1週間鉄栄養のみを除いた水耕液で育てることで鉄欠乏ストレスを与えた。そして日の出前後4時間の根の分泌物を回収した。根からの分泌物をイオン交換樹脂で精製・濃縮し、HPLC分析を行った。アワでは、ムギネ酸 (MA)、デオキシムギネ酸 (DMA) に加え、アベニン酸 A (AVA) が、55%、44%、1% 未満存在した (図 2)。ハトムギでは、主に MA が分泌されていた (図 3A)。しかしヒエにおいては、未知のピークが主であった (図 3B)。このピークが出現する位置から、ヒドロキシムギネ酸 (HMA) かヒドロキシデオキシムギネ酸 (HDMA) であることが推定され、ミナトカモジグサの根分泌物と同時に HPLC 測定を行うことで、HDMA であることが確認された (図 3C)。

ムギネ酸類の測定結果から、アワとハトムギには、オオムギのみから同定されているムギネ酸類水酸化酵素 IDS3 と相同な遺伝子があると予想された (図 1)。また、ヒエでは鉄欠乏下で働く IDS2 様の水酸化酵素遺伝子が存在するはずであるが、エピ体はほぼ合成しない酵素であるようだ。AVA はエンバクにおける主要ムギネ酸類として初めて同定されたが、

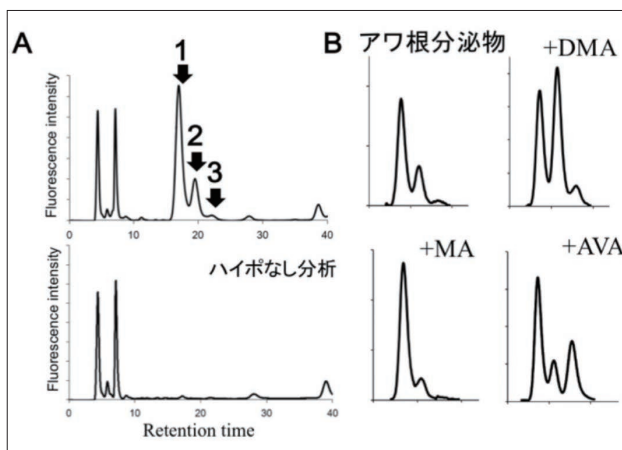


図2 鉄欠乏アワの根分泌物の同定
A. 通常の HPLC 解析 (上段) と次亜塩素酸 (ハイボ) 添加なしのときの分析 (下段) の結果。ハイボを添加しないときにはピークが現れないことで、ムギネ酸類であることが確認できる。ピーク 1 から 3 はムギネ酸類と推測された。B. ムギネ酸類と思われるピーク部分の拡大 (左上)。同じサンプルに各標準化合物を添加 (+MA、+DMA、+AVA) した場合、3つのピークの比率が変わり、ピーク 1 は MA、2 は DMA、3 は AVA と同定された。

DMA から AVA へ変換する酵素は未だ同定されていない (図 1)。

アワのムギネ酸類合成酵素遺伝子群の 鉄欠乏ストレスによる発現変動

アワのゲノム配列情報はすでに公開されている。ムギネ酸類合成に重要な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) のいずれについても、既知のムギネ酸類合成に関わる酵素 (図 1) の遺伝子とホモロジーの高いものが存在した。鉄欠乏 1 日目、4 日目、6 日目、10 日目の経時的なサンプルから RNA を抽出し、各遺伝子の発現変化を定量 PCR 法により測定した。2つの NAS 遺伝子、NAAT 遺伝子、DMAS 遺伝子は、根でも地上部でも鉄欠乏によって強く発現誘導を受け、鉄欠乏処理 1 日目から発現が増加し、10 日目までこの発現上昇は続いた。この発現様式は、イネとよく似ており、トウモロコシとは異なっていた。イネもトウモロコシもムギネ酸類として DMA しか合成しないが、イネやムギ類は C3 型の光合成を行い、トウモロコシ、アワ、ヒエ、ハトムギはいずれも C4 光合成機構を持つ。イネ科植物に共通のムギネ酸類を利用した鉄獲得機構は、光合成機構が分離する以前に確立したと推測す

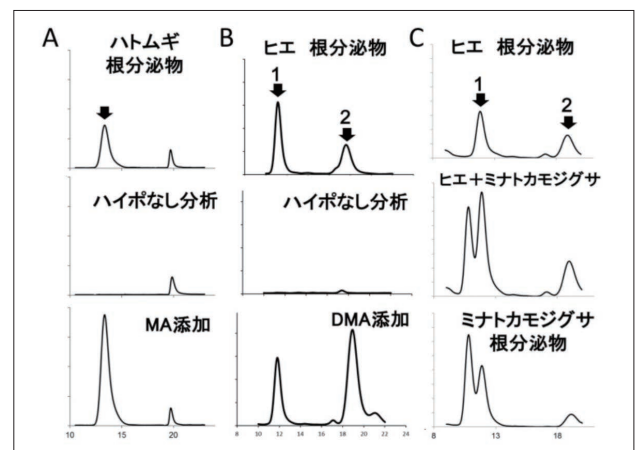


図3 鉄欠乏ハトムギと鉄欠乏ヒエの根分泌物の同定
A. ハトムギの根分泌物の HPLC 分析。矢印で示したピークが MA と同定された。B と C. ヒエの根分泌物の HPLC 分析。B. ピーク 2 は DMA と同定された。C. 鉄欠乏ミナトカモジグサが分泌するムギネ酸類は epiHDMA、HDMA、DMA である (下段のピークの左から)。ヒエとミナトカモジグサの根分泌物のサンプルを同量混ぜると、ピーク 1 が増加した (中段) ので、ピーク 1 は HDMA と同定された。

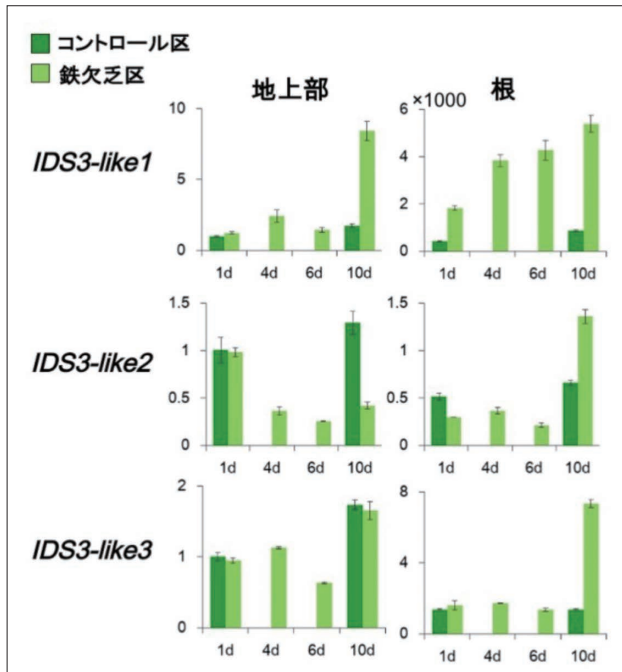


図4 アワの *IDS3-like* 遺伝子の鉄欠乏における発現変化
オオムギのムギネ酸類水酸化酵素 *IDS3* に相同な遺伝子3つに *IDS3-like1*~*3* と名付け、地上部と根における発現変化を定量PCRで調べた。発現量は、コントロール区の地上部1日目における発現量を1とした相対値で表した。*IDS3-like1* は根では経時的な発現上昇をしているが、地上部では鉄欠乏処理10日目以前はあまり誘導が顕著でない。

ると、アワとトウモロコシのムギネ酸類合成における遺伝子制御の差は、光合成機構が分離した後を生じたことになり、非常に興味深い。

アワの *IDS3* 様遺伝子の3種についても遺伝子発現解析を行い、タンパク質配列が最も近い *IDS3-like1* 遺伝子が *NAS* 遺伝子などと同様に、根で鉄欠乏により経時的に強く発現誘導を受けることを確認した(図4)。しかし、この *IDS3-like1* の葉における発現誘導は非常に弱かったことから、アワにおけるMA合成は主に根で起こると想定された。

アワの内生ムギネ酸類とニコチアミン量

鉄欠乏区と鉄十分のコントロール区の、若い葉と根における内生ムギネ酸類とニコチアミン量の定量を行った。熱水で抽出した抽出液を根分泌物と同様に精製・濃縮処理をした後、HPLC分析を行った。ムギネ酸類の前駆体であるニコチアミンは、コントロール区の根では 3.9 ± 0.2 nmol/g FW で、葉では 58.8 ± 4.6 nmol/g FW 存在した。鉄欠乏区の根

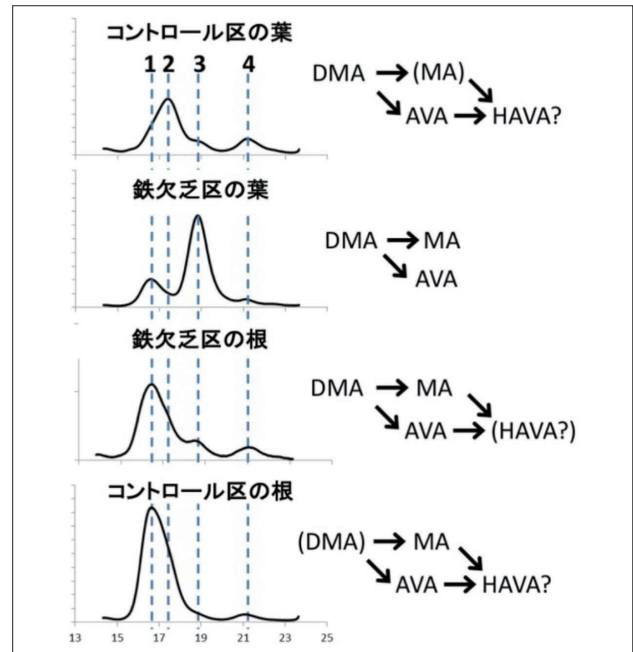


図5 HPLCによるアワの内生ムギネ酸類の検出
1、MA； 2、HAVAと推定(未同定)； 3、DMA； 4、AVA。
コントロール区の葉と根には、HAVAらしきピークが見られる。
右に予想される合成経路を表した。

や葉ではニコチアミンを検出できなかった。鉄欠乏条件ではムギネ酸類合成遺伝子群の発現上昇に付随して、ムギネ酸類合成が盛んとなり積極的にニコチアミンが消費されたと考えられる。ムギネ酸類の測定では、根分泌物にあったMA、DMA、AVAに加え、MAのごく近傍にピークが増加した(図5)。それぞれの存在比にはサンプル間で顕著に差があり、新規のピークはコントロール区の葉と根で顕著に存在した。新しく出現したピークは、その位置からヒドロキシアベニン酸(HAVA)と考えられた。これら3つのピークが重なった状態を改善できなかったため、MAとDMAも定量ができなかった。

IDS3-like1 がコードするタンパク質がMA合成を行うとすると、アワでのMA合成は鉄欠乏の根で顕著で、鉄欠乏の葉では少ないと考えられる。内生ムギネ酸類の分析では、鉄欠乏の若い葉ではDMAがMAよりも多く存在し、根ではMAがDMAよりも多く存在していたので、やはり鉄欠乏の葉ではMA合成はあまりされないようだ。また、コントロール区の葉ではMAは見られず、HAVAと思われる未知の物質が主であった。今後、これらの4種のピークを分離するように改善することに加え、アワにおけ

るAVAの合成に関わる酵素を明らかにしていきたい。

アワ穀粒内におけるムギネ酸類やニコチアミンの分析も試みたが、現在までのところ成功していない。

まとめ

穀粒への鉄や亜鉛の蓄積は、植物が根から吸収した鉄イオン、亜鉛イオンがイオン状態を保ちながら種子へと輸送された結果である。イネ科植物では生体キレート物質として、ムギネ酸類とその前駆体であるニコチアミンが、重金属イオンの種子への輸送に不可欠である。鉄欠乏ストレスを与えた植物では、ニコチアミンとムギネ酸類の合成が特に顕著に増加するが、通常の栽培条件の植物でも体内での鉄の欲求性が高まると合成の増加が起こり、必要なだけの鉄が根圏から吸収され、運ばれる。種子が形成される際の鉄の欲求性と鉄欠乏時の遺伝子発現には相関がある。本研究では鉄欠乏条件の遺伝子変化を指標に、アワのムギネ酸合成酵素を探索した。アワでは複数のムギネ酸類の存在が明らかになった。今後、これらを合成するムギネ酸類水酸化酵素や開環酵素の解明が、アワ、ヒエ、ハトムギの穀粒に蓄積される鉄や亜鉛の量差を解明するために重要となるだろう。

謝 辞

研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

Contribution of Mugineic Acid Family Phytosiderophores and Nicotianamine to Iron and Zinc Storage in Grains of Millet Species

Reiko Nakanishi

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Graminaceous plants utilize mugineic acid family phytosiderophores (MAs) and nicotianamine (NA) for the transport of heavy metals, such as uptake from soil of iron (Fe) and zinc (Zn), as well as their translocation inside the plant body. Foxtail millet and Japanese barnyard millet contain more Fe and Zn in their polished grains than rice, while pearl barley contains less of both metals. Accordingly, in this study, foxtail millet, Japanese barnyard millet, and pearl barley were used to elucidate the contribution of MAs and NA in Fe and Zn uptake, translocation, and storage in millet grains. First, varieties of MAs secreted from roots were determined using Fe-deficient plants by HPLC. Foxtail millet secreted MA, deoxymugineic acid (DMA), and avenic acid A (AVA), while Japanese barnyard millet secreted hydroxy-deoxymugineic acid and DMA. Only MA was secreted from the roots of pearl barley. Gene expression of the predicted genes, including NA synthase, NA aminotransferase, and DMA synthase was strongly induced by Fe deficiencies in both the roots and shoots of foxtail millet. On the other hand, a gene similar to barley *IDS3*, whose product converts DMA into MA, was strongly induced in roots but not in shoots, indicating that the synthesis of MA in foxtail millet is limited in roots. Endogenous MAs in roots and young leaves of control and Fe-deficient foxtail millet showed that it may utilize four types of MAs inside the plant body. Further investigation to identify the genes for AVA synthesis and MAs synthesis in millet species is necessary to clarify differences in metal accumulation.