

## イネ科植物におけるムギネ酸系鉄輸送活性物質の生合成経路

Biosynthetic pathway of mugineic acid family of phytosiderophores in gramineae

代表研究者 岩手大学農学部講師 河合成直  
Lecturer, Faculty of Agriculture, Iwate Univ.  
Shigenao KAWAI

It is speculated that resistance against iron deficiency of the iron inefficient plants could be enhanced by introducing the activity of production of mugineic acid family of phytosiderophores (MAs) by plant bio-engineering. However, the biosynthetic pathway of MAs was not clarified enough to try the production of the resistant plant. Therefore, we aimed to elucidate the MAs biosynthesis focusing on the relationship between Met and MAs biosynthesis, since MAs is known to be synthesized by the connection of three molecules of methionine (Met).

$^{14}\text{C}$ -Glucose (Gluc.), -fructose (Fruc.) and -aspartate (Asp) were fed to the excised root of iron deficient barley (cv. Minorimugi) grown hydroponically, and the incorporation of  $^{14}\text{C}$  into MAs were measured. Carbon-14 of Gluc. were incorporated into MAs significantly in spite of no incorporation of  $^{14}\text{C}$  of Fruc. and Asp. It indicated that the biosynthetic pathway of MAs may not involve Fruc. and Asp.

If Met is the intermediate between Gluc. and MAs,  $^{14}\text{C}$  incorporation from  $^{14}\text{C}$ -Gluc. into MAs in root should be reduced largely with simultaneous feeding of much amount of non-labeled Met. However,  $^{14}\text{C}$  incorporation was little reduced by feeding of the non-labeled Met. This suggested that Met may not be involved in the pathway between Gluc. and MAs.

The excised roots of the plants, which were supplied by iron after showing iron chlorosis, were fed by  $^{14}\text{C}$ -Met and  $^{14}\text{C}$ -Gluc. 0, 4, and 8 days after supply of iron. The  $^{14}\text{C}$  incorporation from Gluc. into MAs did not increase by the supply of iron, whereas the  $^{14}\text{C}$  incorporation from Met into MAs increased three times more than that of the iron deficient root. This suggested that the pathway between Met and MAs was not activated by the iron deficient stress.

Four types of  $^{14}\text{C}$  labeled Gluc., such as 1- $^{14}\text{C}$ , 2- $^{14}\text{C}$ , 3,4- $^{14}\text{C}$  and 6- $^{14}\text{C}$ , were administered to the iron deficient excised root. Incorporation of  $^{14}\text{C}$  into MAs were in the order: 6- $^{14}\text{C}$ , 3,4- $^{14}\text{C}$ , 2- $^{14}\text{C}$  and 1- $^{14}\text{C}$ .

These results ruled out the previous hypothetical biosynthetic pathway of MAs, which passes through Met, and gave the issues for the new unknown pathway for MAs.

### 研究目的

地球上の3割強を占める石灰質土地帯の農業においては、その高い土壌pHに起因する鉄欠乏による減収が問題となっている<sup>1)</sup>。特に、鉄欠感受性作物のとうもろこし、ソルガム、ダイズでその被害が報告されている。近年、イネ科植物が鉄欠乏に際し、ムギネ酸類 (mugineic acid family: MAs と略記) と呼ばれる鉄輸送物質を根より分泌し、土壌中の鉄を溶解、吸収することが、高城

より解明され<sup>2),3)</sup>、この phytosiderophore と総称される物質群の生合成能を、鉄欠感受性作物に付与することにより、鉄欠耐性を強化し、増収を図ることが考えられている。しかし、その生合成経路、及び酵素系が不明であるため、未だ試みられていない。本研究は、鉄欠耐性作物創出のための必須な知見となる MAs 生合成経路の全貌と、鉄が制御している代謝過程を解明することを目的としている。

我々はこれまでに、水耕鉄欠栽培したオオムギ根内で、MAs がアミノ酸の一種 Methionine (Met) 三分子の結合により生合成されるとの明確なデータを得た<sup>4)</sup>が、Met が鉄欠で誘導される MAs 合成経路上の物質であると結論するには、データが不足している。Met が鉄欠誘導性の MAs 合成経路上にあると結論するには、Met から MAs への合成経路の鉄欠処理による活性化や、その経路の活性が、MAs の合成速度 (約 1 mg/日・株: 鉄欠オオムギ根) を説明しうることが示されねばならない。

また、我々は、放射性同位体  $^{14}\text{C}$  の標識 Glucose (Gluc.) を水耕鉄欠栽培したオオムギの根に吸収させる実験により、Gluc. の  $^{14}\text{C}$  が MAs に容易に取り込まれることを見出ししている<sup>5)</sup>。根の代謝の究極の炭素源である Gluc. より MAs が合成される際に、Met を経由するか否か、又、経由する場合、その経路が蛋白合成のための Met 合成経路と同じか否かについての検討も必要である。本研究では、以上の問題意識より、水耕鉄欠栽培したオオムギ根における MAs 生合成経路と Met の関わりの解明を試みた。

#### 研究経過

現在、MAs 生合成の基質とされる Met は Gluc. より解糖経路、TCA 回路、アスパラギン酸 (Asp) を経て生合成されると考えられている。最初の実験として、 $^{14}\text{C}$  標識の Gluc., 速やかに解糖経路で代謝される Fructose (Fruc.), Asp を既報の方法で、水耕鉄欠栽培したオオムギの切断根に投与し、MAs への  $^{14}\text{C}$  の取り込みを調べた結果、Gluc. からは MAs に  $^{14}\text{C}$  が取り込まれるのに対し、Fruc. Asp からは取り込まれなかった。このことは、MAs の生合成経路が上述の経路と異なることを示唆していた。

次に、 $^{14}\text{C}$ -Gluc. を投与する時、同時に多量の非標識 Met を根根吸収させ、その  $^{14}\text{C}$  の MAs への取り込み量を、非標識 Met を吸収させないものと比較した。もし、Met が中間体ならば、Gluc. より Met へ代謝された  $^{14}\text{C}$  は、吸収された非標識 Met により根内で希釈され、MAs への  $^{14}\text{C}$  の取り込みが大きく減少するものと予想された。しか

し、実験の結果、大きな減少は見られなかった。

これらと平行して、一度鉄欠症状を呈した植物に鉄を与え、その後の MAs 合成経路の変化を、 $^{14}\text{C}$ -Gluc. と  $^{14}\text{C}$ -Met を同様に根根投与することにより調べた。その結果、Gluc. から MAs への  $^{14}\text{C}$  の取り込み量は、鉄欠ストレス解除により増加しないのに対し、Met からの取り込み量は、約 3 倍に増加した。これは、Met から MAs への生合成経路が、鉄を与えた根でむしろ活発に動くことを示唆し、予想に反するものであった。

Met が Gluc. から MAs への経路上にないことを示唆する。これらの結果をふまえて、我々は改めて、Gluc. を出発物質とする MAs 生合成経路の探索を開始した。そして Gluc. の炭素の位置により MAs への  $^{14}\text{C}$  の取り込み量が異なるという、未知の MAs 合成経路の存在を示唆する。今後の研究の手がかりを得た。

#### 研究成果

##### 材料及び方法

オオムギ品種ミノリムギを、人工気象室内 (昼  $17^\circ\text{C}$ , 14 時間/夜  $10^\circ\text{C}$ , 10 時間) で、10 l ポット上、下記の組成の 1/2 濃度の Arnon & Hoagland No. 2 改変培地を用い水耕鉄欠栽培した。[ $\text{KNO}_3$  3.0,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2.0,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4$  1.0,  $\text{H}_3\text{BO}_3$   $1.5 \times 10^{-3}$ ,  $\text{MnSO}_4$   $0.25 \times 10^{-3}$ ,  $\text{CuSO}_4$   $0.1 \times 10^{-3}$ ,  $\text{ZnSO}_4$   $0.2 \times 10^{-3}$ ,  $\text{H}_2\text{M}_0\text{O}_4$   $0.25 \times 10^{-4}$  (mM), pH 6.5].

MAs 分泌の起こらない午後、人工気象室内にて  $^{14}\text{C}$  標識化合物 ( $^{14}\text{C}$ -Gluc., -Fruc., -Asp, -Met) を 100 ml のビーカーに 10 又は 20  $\mu\text{M}$ , 放射活性 3 又は 5  $\mu\text{Ci}$  になるように、通気した鉄欠培地に溶解させ、3 時間前に地上部を切断した 1 株 3 個体の根を入れ吸収させた。1 又は 2 時間後、切断根を 80% 熱エタノールに入れ、代謝を停止させ、摩砕、ろ過により、その可溶性成分を抽出した。含まれるアミノ酸類、及び、MAs を陽イオン交換樹脂のカラムに通導、吸着させ、 $\text{IN-NH}_4\text{OH}$  で溶出させ収集し、これを、高速ラジオ液体クロマトグラフィ (HPLC-Radio analyzer) で分析し、その量と取り込まれた  $^{14}\text{C}$  の放射活性を同時定量した。

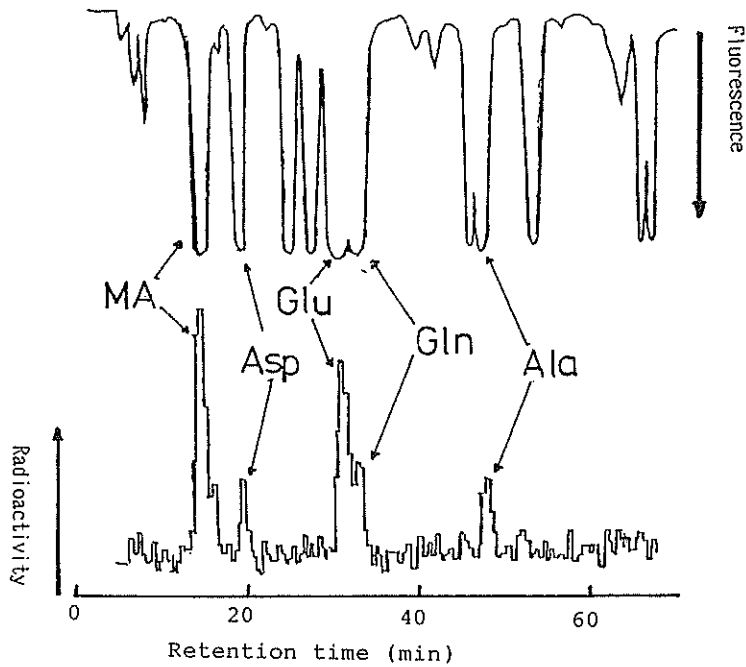


図1.  $^{14}\text{C}$ -Glucose を投与したオオムギ根の Cationic fraction を HPLC-Radioanalyzer で分析したクロマトグラム

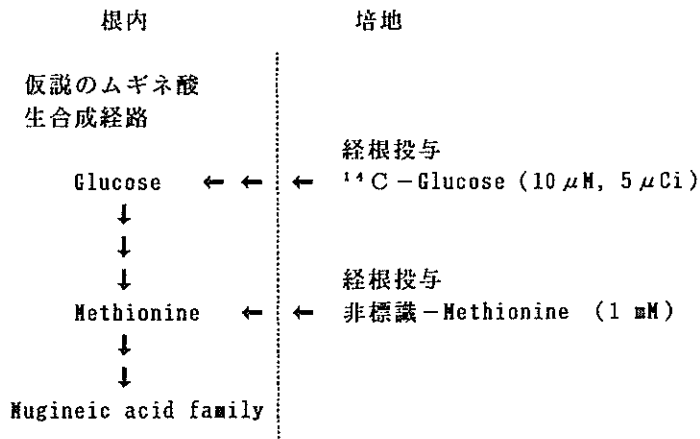


図2.  $^{14}\text{C}$ -Glucose からムギネ酸への  $^{14}\text{C}$  の取り込みに対する非標識 Methionine 添加の影響

## 結 果

### (1) Gluc. から Met へ至る経路の検討

最初に,  $^{14}\text{C}$ -Gluc. を 1 時間, 鉄欠オオムギの切断根に経根投与すると,  $^{14}\text{C}$  が速やかに MAs に取り込まれることが示された (図 1)。 $^{14}\text{C}$  は Glutamate (Glu), Glutamine (Gln), Alanine (Ala), Aspartate (Asp) に取り込まれたが, Methion-

ine (Met) には検出されなかった。 $^{14}\text{C}$ -Gluc. (15  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{Ci}$ ),  $^{14}\text{C}$ -Fruc. (15  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{Ci}$ ),  $^{14}\text{C}$ -Asp (15  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{Ci}$ ) を 1 時間投与した本実験において, MAs への放射活性の取り込みは, 順に,  $10.8 \times 10^4$ , 0, 0 (dpm) であった。これは, これまでの Gluc. → 解糖経路 (Fruc.) → TCA 回路 → Asp → Met → MAs という仮説の MAs 生合成経路を支

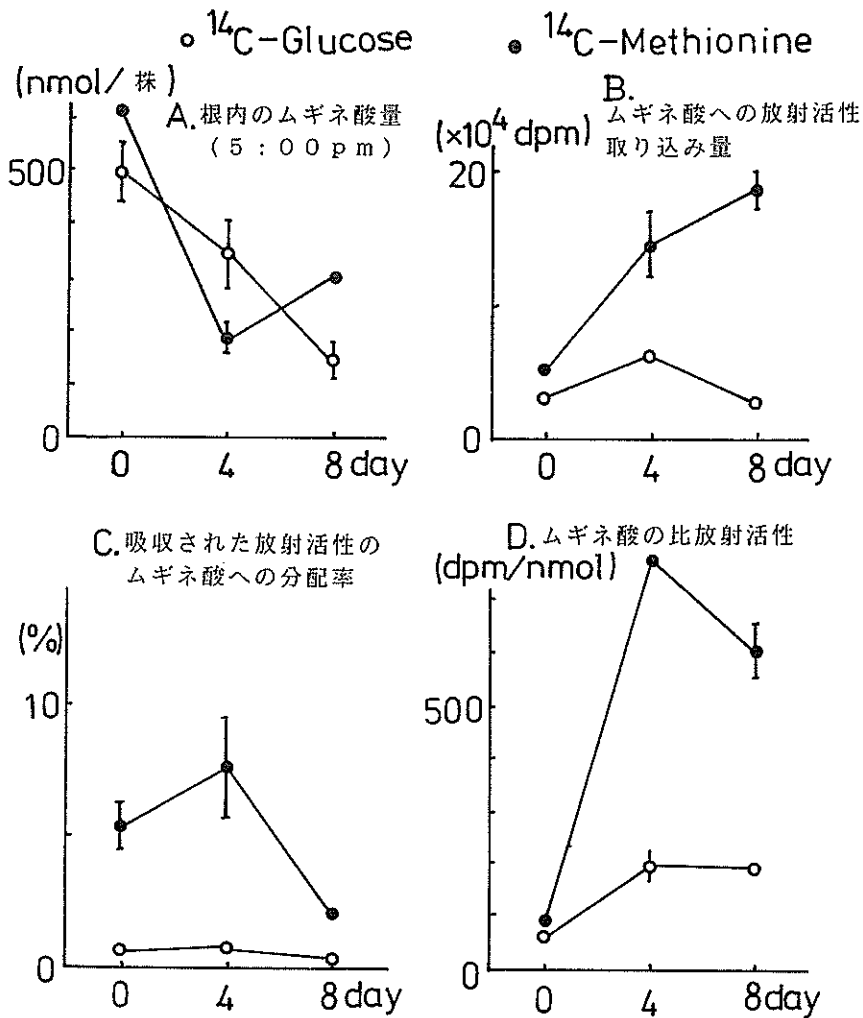


図3. 鉄欠ストレス解除の過程における <sup>14</sup>C-Glucose と <sup>14</sup>C-Methionine (20 μM, 5 μCi) の <sup>14</sup>C の MAs への取り込み量の変動

持しないものであった。

(2) <sup>14</sup>C-Gluc. から MAs への <sup>14</sup>C の取り込みに対する非標識 Met 添加の影響

もし、Met が仮説のように Gluc. から MAs へ至る生合成経路上の物質であれば、<sup>14</sup>C-Gluc. を経根投与する時、同時に、非標識 Met を多量に吸収させれば、Gluc. より MAs への <sup>14</sup>C の取り込みの大きな減少が予想された (図2)。そこで、<sup>14</sup>C-Gluc. 投与の1時間前より非標識 Met (1 mM) を吸収させた切断根と、吸収させないものに対し、<sup>14</sup>C-Gluc. (10 μM, 10 μCi) を二時間投与し、同様

に、MAs への <sup>14</sup>C の取り込み量を測定した。この時、二つの根の <sup>14</sup>C-Gluc. の吸収量の差はなく、又、別の切断根を用いて、<sup>14</sup>C-Gluc. 投与中の非標識 Met の吸収量を <sup>14</sup>C-Met を用いて測定したところ、<sup>14</sup>C-Gluc. のほぼ10倍量の非標識 Met を吸収したと推定された。

この実験において、<sup>14</sup>C-Gluc. のみを投与した根の MAs への放射活性の取り込み量は  $9 \times 10^4$  dpm で、同時に非標識 Met を吸収させた根のそれは、 $7.2 \times 10^4$  dpm であり、大差はなかった。非標識 Met が10倍量、同時に吸収されたことを考

慮すると、この結果は、Met が Gluc. と MAs の中間体であることを支持しない。

(3) 鉄欠ストレス解除の過程における、 $^{14}\text{C}$ -Gluc. と  $^{14}\text{C}$ -Met の  $^{14}\text{C}$  の MAs への取り込み量の変動

次に、鉄欠症状を呈し、MAs 合成が誘導されたオオムギに鉄を与え鉄欠ストレスを解除し、その鉄欠解除後の、Met と Gluc. からの  $^{14}\text{C}$  の取り込み量の変動を調べた。 $^{14}\text{C}$ -Gluc. (20  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{Ci}$ ),  $^{14}\text{C}$ -Met (20  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{Ci}$ ) の投与は、鉄欠解除後 0, 4, 8 日目の同時刻に 1 時間行った。

その結果、鉄欠ストレスの解除により根内の MAs 含量の低下が見られた (図 3-A)。これは吸収された鉄による MAs 合成の抑制を示す。ところが、 $^{14}\text{C}$ -Met から MAs への放射活性の取り込みは、鉄欠解除 4, 8 日後に上昇し、8 日目には 0 日目の 3 倍以上となった (図 3-B)。又、吸収された  $^{14}\text{C}$ -Met の放射活性の MAs への分配率は、4 日目に、MAs 含量の減少にもかかわらず減少しなかった (図 3-C)。さらに、MAs 1 nmol 当たりの放射活性 (比放射活性) は、 $^{14}\text{C}$ -Met 投与の根においては、鉄欠の解除により鉄欠時 (0 日目) の 6~7 倍に高まった。(図 3-D)。これら図 3-B, C, D の結果は  $^{14}\text{C}$ -Gluc. 投与の根においては顕著ではなかった。

(4) 鉄欠の根と正常な根への  $^{14}\text{C}$ -Gluc. と  $^{14}\text{C}$ -Met の投与

鉄欠栽培したオオムギの切断根に、 $^{14}\text{C}$ -Gluc. と  $^{14}\text{C}$ -Met (20  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{Ci}$ ) を 1 時間投与し、その MAs への  $^{14}\text{C}$  の取り込みを正常植物のそれと比較した。この時、注目すべきことに、鉄欠処理をしない、MAs 合成をしていない根において、 $^{14}\text{C}$ -Met の吸収による MAs 合成と MAs への放射活性の取り込みが見られた。その比活性は 3410 dpm/nmol で、鉄欠根のそれ (92 dpm/nmol) の 30 倍以上であった。この現象は  $^{14}\text{C}$ -Gluc. 投与の根においては見られなかった。 $^{14}\text{C}$ -Met 投与により、正常な根のほうが高い比活性の MAs を生産するという結果は、Met が鉄欠誘導性の MAs 生合成経路上の中間体であるという仮説に否定的なものであった。

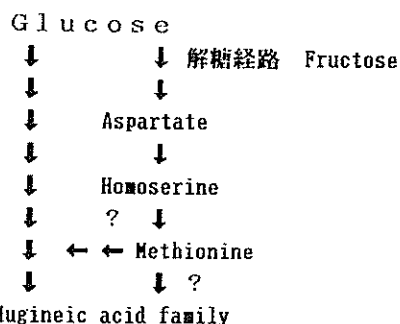


図 4. ムギネ酸類の生合成経路の新しい仮説

以上 (1)-(4) の結果は、いずれも、主に Met に注目して研究を進めて来た我々の仮説の見直しを迫るものであった。そこで、我々は図 4 に示す新たな仮説を考えた。すなわち、それは、遊離の Met が鉄欠で誘導される MAs 生合成経路上にないもので、(1) の結果の Fruc. や Asp から  $^{14}\text{C}$  が MAs に取り込まれないのに、Gluc. からは取り込まれることを説明し得る。しかし、Met が MAs へ合成されるとの明確な実験結果があり<sup>4)</sup>、Met 経由の経路も存在する。しかし、その経路は (3), (4) の結果で示されたように、鉄欠により促進されていない。又、この Met 経由の経路が Gluc. 由来の経路と共通部分を持つか否かは未だ不明である。

(5) 標識位置の異なる  $^{14}\text{C}$ -Gluc. から MAs への放射活性の取り込み

図 4 のような新しい仮説を考えるならば、 $^{14}\text{C}$ -Gluc. を用いて未知の MAs 生合成経路を探索せねばならない。そこで我々は、標識位置の異なる  $^{14}\text{C}$ -Gluc. (10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{Ci}$ ) を同様の方法で 1 時間、切断根に投与し、MAs への  $^{14}\text{C}$  の取り込みを調べた。その結果、標識化合物の入手できない 5 位を除く、すべての Gluc. の炭素が MAs に取り込まれた。1 位, 2 位, 3-4 位, 6 位の  $^{14}\text{C}$ -Gluc. から MAs への放射活性の取り込みは順に、3.49, 3.89, 4.97, 5.87 ( $\times 10^4$  dpm) であり、1 位から 6 位に向かって MAs への取り込み量が増えるという再現性のある結果を得た。もし、MAs 生合成経路が解糖経路を経由するならば、1 位と 6 位の炭素は経路途中で区別されず、MAs へ同じ取り込み量を示すはずである。由に、MAs 生合成経路は

解糖経路と異なる例えば、ペントースリン酸経路のような1位の炭素が脱離する反応を含むと思われる。

これら(1)-(5)の結果はいずれも、未知のMAs生合成経路が鉄欠ストレス下のオオムギ根内で誘導されることを強く示唆するものであった。

#### 今後の課題と発展

Met 3分子がMAsに変換されるという知見と定説により作られていた仮説が、本研究によりほぼ否定され、イネ科植物に特異的に存在するMAs生合成経路が、鉄欠ストレスにより誘導される未知の経路であるという最初の手がかりが得られた。しかし、その経路の中間体は未だ知られておらず、経路の探索はようやく出発点に立ったばかりと言える。そして、この経路が真に鉄欠誘導性であるか否か、Met経由の経路といかに関わるかなどを解明して行くことが、鉄欠耐性作物創出をめざすために不可欠なMAs生合成経路解明への糸口を与えるものと思われる。

#### 引用文献

- 1) Vose, P. B.: *J. Plant Nutr.*, 5, 233-250 (1982).
- 2) Takagi, S., K. Nomoto and T. Takemoto: *J. Plant Nutr.*, 7, 469-477 (1984).
- 3) Nomoto, K., Y. Sugiura and S. Takagi: In: Iron

Transport in Microbes, Plants and Animals. G. Winkelmann *et al.* (eds.). Weinheim VCH, pp. 401-425 (1987).

- 4) Kawai, S., K. Itoh and S. Takagi: *Tetrahedron Lett.*, 29, 1053-1056 (1988).
- 5) 石神政直, 高城成一, 河合成道: 日本土壤肥料学会講演要旨集, 37, 69 (1991).

#### 発表論文

- 1) Kawai, S., S. Takagi and K. Ojima: Application of phytosiderophore to plant cell cultures and production of phytosiderophore by iron-deficiency stressed plant cell culture., *J. Plant Nutr.*, 15, 1613-1624 (1992).

#### 口頭発表

- 1) 戸澤清徳, 中島良比古, 内藤善美, 河合成直: ムギネ酸類採取法の検討と課題—根浸漬液の容量と培地条件の検討—, 日本土壤肥料学会講演要旨集, 38, 60 (1992).
- 2) 平井 健, 河合成直: オオムギ根のムギネ酸生合成系に関する研究—<sup>14</sup>C, <sup>35</sup>S 標識メチオニンのタンパク質への取り込み—, 日本土壤肥料学会講演要旨集, 38, 61 (1992).
- 3) 河合成直, 神 正志, 柳久保美保子: オオムギ根のムギネ酸生合成系に関する研究—メチオニンを經由する生合成経路の検討—, 日本土壤肥料学会講演要旨集, 38, 62 (1992).
- 4) 亀井 茂, 高城成一, 早川水門, 菊池淑子, 河合成直: ムギネ酸鉄(III)錯体の光還元, 分解と光条件, 日本土壤肥料学会講演要旨集, 38, 62 (1992).