

## 植物における鉄代謝機構の解明に向けて

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	樋口, 恭子
巻/号	74巻2号
掲載ページ	p. 237-242
発行年月	2003年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 植物における鉄代謝機構の解明に向けて

樋口 恭子\*

キーワード 植物, 鉄, ニコチアミン, 三価鉄還元酵素

## 1. はじめに

鉄は *Lactobacillus* や *Bacillus* などごく一部のバクテリアを除く全ての生物にとって必須の元素であり、多くの酸化還元反応に関与している<sup>1)</sup>。鉄は地球上で4番目に多く存在する元素であるが、好気的な条件では三価鉄になるため難溶性になり、これに加えて中性以上のpHになると溶解性がさらに低下するため、地球上の生物はしばしば鉄欠乏条件にさらされる。ポルフィリン環の生合成酵素が鉄を必要とするため、植物では鉄欠乏になるとクロロフィルが減少し葉脈間クロロシス症状を呈する<sup>2)</sup>。ヒトでは加えてヘモグロビンに結合するべき鉄が欠乏して貧血になる<sup>1)</sup>。ちなみにヒトの貧血改善に鉄投与が効果的であることは古くから知られており、chlorosis (白化) は鉄欠乏性貧血を指す錬金術師の言葉であった<sup>1)</sup>。一方、生理的に活性化二価鉄はラジカルを発生させるため、遊離で過剰に存在するのは好ましくない。還元状態の水田では二価鉄が過剰になると葉に酸化ストレスによる褐色斑が現れる<sup>3)</sup>。ヒトでは鉄を過剰に摂取すると臓器に色素が沈着する血色素症を起こす<sup>3)</sup>。従って生物は鉄を積極的に吸収する機構と同時に体内の鉄の濃度や化学形態を調節する機構も持っていないなければならない。

作物栽培に関してはアルカリ性土壌での鉄欠乏に対応するため、植物の鉄吸収機構についてすでに多くの研究がなされている。ヒトの鉄欠乏性貧血に対応するためには食品に鉄を添加することが行われてきたが、最近では作物の可食部の鉄含量を増加させる研究もなされている。またヒトが吸収しやすい鉄の形態はヘム鉄であるが動物性食品に比べ植物のヘム鉄含量は低いから、植物のヘム鉄含量を増加させる研究も望まれる。これらの研究を進展させるためには植物の鉄代謝全体が解明される必要がある。また鉄と鉄以外の重金属の代謝機構には類似点があると考えられるの

で、これらの研究成果はファイトレメディエーション用植物の開発や、可食部への有害重金属の移行を抑制する研究にも役立つと思われる。

植物の鉄代謝は、(1) 根での土壌からの吸収、(2) 維管束を介した根から地上部への移行、(3) 細胞内での分配と貯蔵、に大きく分けて考えることができる。(1)の吸収については近年、分子生物学的に詳細に解明されている。三価鉄を二価鉄に還元して吸収する Strategy I 植物からは、三価鉄還元酵素遺伝子<sup>4)</sup>と二価鉄トランスポーター遺伝子<sup>5)</sup>がクローニングされた。ムギネ酸を分泌し不溶態の三価鉄を可溶化して吸収する Strategy II 植物からは、ムギネ酸生合成系の酵素遺伝子<sup>6-8)</sup>、ムギネ酸-鉄トランスポーター遺伝子<sup>9)</sup>と、ムギネ酸分泌に関わると予想される遺伝子<sup>10)</sup>がクローニングされた。(3)の貯蔵は、プラスチド中の鉄貯蔵タンパク質フェリチンによって行われ、フェリチン発現の鉄による調節機構が解明されている<sup>11-13)</sup>。分配については葉緑体への鉄の取り込みが光によって促進されることが分かっている<sup>14)</sup>。しかし分配に関わる分子や鉄濃度の感知機構はほとんど分かっていない。(2)の移行については、キレート物質や生理的データの蓄積はあるが<sup>15)</sup>、移行に関わるトランスポーターや調節機構は分かっていない。

鉄吸収能力(ムギネ酸生合成)を強化した結果、鉄欠乏耐性イネができている<sup>16)</sup>。しかし水耕で極端な鉄欠乏条件にした場合、オオムギは激甚なクロロシスになっても新葉の展開や伸長には大きな影響はないが、イネは新葉の成長が著しく抑制されることから、植物体内の鉄の利用効率は植物種によってかなり異なると思われる。鉄の吸収だけでなく移行や利用効率を高められれば、さらに適用範囲の広い鉄欠乏耐性作物が開発できると思われる。鉄貯蔵能力(フェリチン発現)を強化した結果、イネ穀粒の鉄含量を約3倍に<sup>17)</sup>、レタス葉の鉄含量を2割から7割増加させることに成功している<sup>18)</sup>。これに吸収、移行能力を強化して鉄含量を著しく増加させれば鉄強化食品としての価値を高めることができるであろう。その際には鉄過剰害を起こさないよう鉄の分配や解毒も考慮する必要がある。以上のような目的のため、今後、植物体内の鉄の移行や分配についての研究が進展することが望まれる。

Kyoko Higuchi : Toward Understanding Iron Homeostasis in Plants

\* 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科 (156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

2002年9月24日 受付・受理

日本土壤肥科学雑誌 第74巻 第2号 p.237~242 (2003)

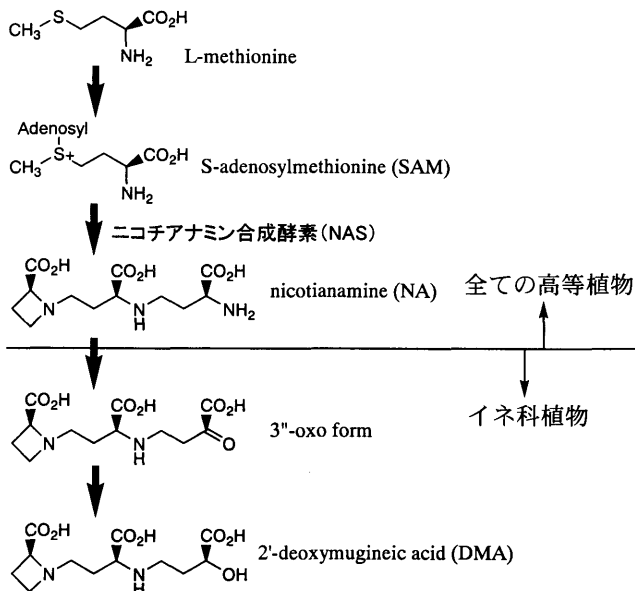


図1 ニコチアナミンの生合成経路

今回は、高等植物全般で鉄の代謝に深く関わっているニコチアナミンについて紹介するとともに、植物体内の鉄栄養について現在分かっていることを紹介する。

## 2. ニコチアナミンとは

ニコチアナミンは新規アミノ酸としてタバコから単離、命名された<sup>19)</sup> (図1)。一方、鉄代謝異常のトマト変異株 *chloronerva* の症状を回復させる物質 normalizing factor が親株から得られていたが<sup>20)</sup>、これがニコチアナミンと同定された<sup>21)</sup>。ニコチアナミンは高等植物に広く分布しており<sup>22)</sup>、植物の正常な鉄代謝に必須のキレート物質と考えられる。*In vitro* 実験で、ニコチアナミンは単独の  $Fe^{2+}$  あるいは  $Fe^{3+}$  のどちらともキレート結合するが、 $Fe^{2+}$  と  $Fe^{3+}$  が共存する場合には  $Fe^{2+}$  と優先的に結合することが明らかにされている<sup>23)</sup>。またニコチアナミンと結合した鉄は Fenton 反応を起こしにくくなることも分かっており<sup>23)</sup>、植物体内で鉄過剰害の防止機構として働いている可能性もある。

なおニコチアナミンは医薬の分野では、血圧上昇に関与するアンジオテンシン変換酵素の阻害活性を持つこと<sup>24)</sup>、またガン細胞浸潤の際の基底膜分解に関与する酵素ゲラチナーゼの阻害活性を持つことが知られている<sup>25)</sup>。

## 3. ニコチアナミン合成酵素およびその遺伝子の研究

イネ科植物は不溶態の鉄を可溶化して吸収するために三価鉄のキレーターであるムギネ酸類を分泌する<sup>26)</sup>。鉄欠乏耐性の研究の中でムギネ酸類生合成経路の解明が行われ、ムギネ酸類はメチオニンからニコチアナミンを経て合成されることが明らかにされた<sup>27)</sup> (図1)。筆者らは S-アデノシルメチオニン (活性メチオニン) からニコチアナミンを合成する酵素、ニコチアナミン合成酵素 (NAS) をオオ

ムギから精製し、その遺伝子をクローニングした<sup>9)</sup>。遺伝子データベースの検索を行うと、NAS に類似の配列が種々の植物に存在することが分かるが、これはニコチアナミンが高等植物に広く存在していることと一致する。

## 4. ニコチアナミンの生理作用機作解明の手がかり

ムギネ酸類を分泌して鉄を吸収するイネ科植物では、ニコチアナミンの主な機能はムギネ酸類の生合成中間体としてであると思われる、NAS 活性も鉄欠乏により誘導される<sup>28)</sup>。一方、ムギネ酸類を分泌しない双子葉植物では NAS 活性は低く、鉄栄養状態による変動はなく<sup>29)</sup>、ニコチアナミンは恒常的に植物体内の鉄栄養調節に働いていると考えられる。それではイネ科植物ではニコチアナミンは体内の鉄栄養調節に働いているのだろうか。

筆者らは種々の植物から NAS 遺伝子をクローニングしてその発現パターンを調べてきたが<sup>9,30)</sup>、そのなかでオオムギとイネには興味深い違いがあることが分かった<sup>31)</sup>。ムギネ酸は根から分泌されるため、オオムギでは鉄欠乏時にムギネ酸類合成のため NAS 遺伝子発現が根のみで誘導される。ところがイネでは鉄欠乏時に NAS 遺伝子発現が根でも葉でも誘導された。またオオムギでは鉄が十分にあると NAS 遺伝子発現はほとんど検出されないのに対し、イネではある程度の発現が根でも葉でもみられる。イネの体内ニコチアナミン濃度もオオムギよりかなり高い。少なくともイネにおいてはニコチアナミンは根表面での鉄の吸収だけでなく体内の鉄栄養調節にも働いていると思われる。

双子葉植物では先に述べたように鉄代謝異常のトマト変異株 *chloronerva* の症状は葉にニコチアナミンを塗布することによって回復する<sup>32)</sup>。鉄を十分に与えて栽培しても *chloronerva* は常に顕著な葉脈間クロロシスを呈し、鉄欠乏時に活性が上昇する根の三価鉄還元酵素やアコニターゼの活性が常に高く、生理的な鉄欠乏状態にあることが分かっている<sup>33)</sup>。しかし鉄含量は根、葉ともに親株より高いことから<sup>34)</sup>、根での鉄の吸収および根から地上部への移行能力は十分であることが明らかである。電子線エネルギー損失分光法 (electron energy loss spectroscopy) により *chloronerva* の葉緑体ストロマ、液胞、ミトコンドリアには、親株にはない鉄を含む粒子が存在することが分かった<sup>35)</sup>。これらの諸現象は全てニコチアナミンの葉面塗布により回復することから、ニコチアナミンは維管束からの鉄の unloading や細胞内の鉄の分配に必須であると考えられる。さらに *chloronerva* と親株を X 線吸収端微細構造 (X-ray absorption near-edge structure) で分析した結果から<sup>36)</sup>、親株の葉脈に存在する鉄の一部は二価鉄であると考えられるのに対し、*chloronerva* の葉脈に存在する鉄はほとんど三価鉄であると考えられることから、ニコチアナミンは維管束付近で二価鉄を安定化させる役割を持っていると推察される。

これに関連して、筆者らがイネ科植物であるオオムギ由来の NAS 遺伝子 *HvNAS1* のプロモーターに GUS をつ

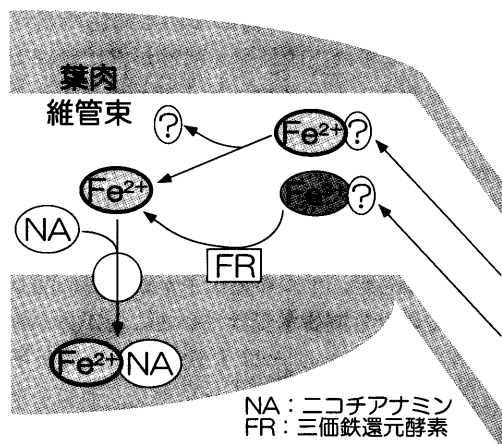


図2 ニコチアミンの機能についての仮説

ないで双子葉植物であるタバコに導入したところ、鉄を十分に与えた状態では葉の主脈や根の維管束周辺で弱く発現していることが分かった<sup>37)</sup>。イネ科植物、双子葉植物のそれぞれのNAS遺伝子とその植物のどの部位で発現しているかについては現在、森らのグループにより解析が進められている。

一方、最近トウモロコシの変異株 *yellow stripe1* からムギネ酸-Fe(III) のトランスポーター遺伝子 *ys1* が単離されたが<sup>6)</sup>、これと相同性の高い遺伝子が双子葉植物であるシロイヌナズナに多数存在する。双子葉植物はムギネ酸の合成、分泌を行わないため、*ys1* 様遺伝子は構造のよく似たニコチアミンと金属（例えば二価鉄）の錯体のトランスポーターとして植物体内で機能している可能性が高い。

それでは植物体内でのニコチアミンの主な結合相手であると思われる二価鉄の供給はどうなっているのでしょうか。三価鉄還元酵素活性やその遺伝子の発現は鉄を吸収する根の表面だけでなく、植物体全体で見られる<sup>38)</sup>。葉の中では主脈で還元活性が高い（樋口、未発表）。植物体内で三価になってしまった鉄は必要に応じ三価鉄還元酵素により二価に還元されると思われる。

以上の知見から、筆者はニコチアミンの機能について図2のような仮説を考えている。すなわち、ニコチアミン以外の何らかのキレート物質と結合して道管中を根から地上部へ移行してきた鉄は、もし三価であれば三価鉄還元酵素により二価になり直ちにニコチアミンへ受け渡され、ニコチアミン-Fe(II) に特異的なトランスポーターによって柔細胞や葉肉細胞へ輸送される、というものである。

### 5. 植物体内の鉄移行制御に関するその他の知見

以上述べてきたこと以外にも鉄移行制御に関して様々な知見が蓄積しつつある。鉄は光合成系や電子伝達系が機能するために必須なので、鉄代謝は光によっても調節される必要がある。これに関連して、葉では明所でヘムの合成が抑制されクロロフィルの合成が促進され、暗所ではその逆

になる<sup>39)</sup>。実際に、葉脈から葉肉細胞への鉄の移行、および葉緑体への鉄の移行は光によって促進される<sup>14,40)</sup>。また、これらの輸送には三価鉄還元酵素が関わっている可能性が示されている<sup>41)</sup>。

それでは細胞内や細胞小器官内に運ばれた二価鉄は何と結合して機能するのだろうか。また二価鉄の濃度はどのように認識されるのだろうか。シロイヌナズナのミトコンドリアではABCトランスポーターである *Stal*（何を輸送するのかは不明）が欠損すると、非ヘム鉄やタンパク質と結合していない鉄が増えることが分かっている<sup>42)</sup>。鉄以外の重金属の研究からも興味深い知見が得られている。イソプレニル化タンパク質は情報伝達、小胞輸送などに関与するものとして知られていたが、さらに金属結合モチーフを持ち金属と結合することができるイソプレニル化タンパク質が植物からみつかった<sup>43)</sup>。カドミウムの害を軽減し、金属結合モチーフを持つイソプレニル化タンパク質もみつかった<sup>44)</sup>。また大腸菌や酵母では、金属シャペロンと呼ばれるタンパク質により、銅や亜鉛の機能が厳密に調節されていることが分かってきた。すなわち、酵母の Cu, Zn-superoxide dismutase は the copper chaperone for the superoxide dismutase 遺伝子産物により直接 Cu を付加されることにより活性化する<sup>45)</sup>。大腸菌では亜鉛輸送に関する遺伝子の発現は Zur タンパク質が Zn(II) の存在下で DNA と結合することによって調節されているが、この現象は遊離の Zn(II) 濃度がわずかに  $10^{-15}$  M を境にして起こる<sup>46)</sup>。鉄についても細胞内で厳密に分配を行うため、以上に紹介したのと同様の機構が働いている可能性が考えられる。

鉄栄養状態の情報伝達については、鉄により誘導されるフェリチンの蓄積には一酸化窒素が必要で、経路上で一酸化窒素は鉄よりも下流に位置することが最近分かってきた<sup>13)</sup>。

根での鉄吸収に関与し、鉄欠乏により根で特異的に発現が誘導される鉄トランスポーターは近年多数クローニングされているが<sup>5,47-49)</sup>、地上部での恒常的な生理機能がはっきりしている鉄トランスポーターについてはまだ分からないことが多い。しかし地上部で発現する鉄トランスポーターもクローニングされつつある。例えばシロイヌナズナの *AtNramp4*<sup>50)</sup> やトウモロコシの *ys1*<sup>6)</sup> の発現は鉄欠乏により根でも葉でも誘導される。これらのトランスポーターは植物体内の鉄の分配に働いている可能性がある。

### 6. 鉄の長距離輸送について

根表面での鉄吸収や地上部細胞内での鉄代謝についてはその機構が分子レベルで解明されつつあるが、維管束内での鉄の長距離輸送については長い研究の歴史があるにもかかわらず明確でない。これは純粋な道管液や師管液を採取するのが簡単ではないこと、採取してから分析するまでの操作中に容易に酸化還元反応が起こり、植物体内での状態を保つのが簡単ではないこと、など技術的な問題があるた

めである。中性条件、好気条件では遊離の鉄はほとんど水に溶けていられないので有機酸などとキレート結合をして輸送されるものと考えられてきた。初期の研究では茎を切って得られる溢泌液を分析するとクエン酸が鉄の数倍のモル濃度で存在することや、電気泳動によりクエン酸鉄が主に検出されることから、クエン酸鉄が鉄の輸送形態であろうと推定されてきた<sup>51)</sup>。改良された採取法により得られたアポプラスト液と道管液の鉄、有機酸、アミノ酸、糖の濃度を測定した結果から、鉄の主な存在形態は  $[\text{FeCitOH}]^{-1}$  と  $[\text{FeCit}_2]^{-3}$  であろうと算出されている<sup>52)</sup>。しかしその直接的証拠は得られていない。

非破壊で植物体中の鉄の電価数を分析した報告がいくつかある。<sup>57</sup>Feを使ったメスbauer-分光法では、葉で遊離の二価鉄はほとんど検出されず主にフェリチンと結合しているという結果が得られた<sup>53)</sup>。先に述べたX線吸収端微細構造では太い葉脈が見分けられる解像度で鉄の形態を予測することができ、葉脈間より葉脈の方が二価鉄の割合が高い<sup>36)</sup>、という結果が得られているが、大規模な装置であることが難点である。蛍光プローブであるカルセインは二価鉄共存下で三価鉄を検出することができ、シロイヌナズナ培養細胞の鉄の取り込みを測定した報告がある<sup>54)</sup>。一方、フェロジンは二価鉄に特異的な蛍光プローブで、葉脈が見分けられる解像度で三価鉄還元反応を観測した報告がある<sup>55)</sup>。蛍光プローブを使う方法は大型の装置を必要とせず、性能のよいCCDカメラが入手できる現在、植物体中の鉄の形態や動態を研究する有力な方法であると思われる。

鉄の移行そのものについては、森らのグループが<sup>52</sup>Feを用いた植物用PETIS (Positron Emitting Tracer Imaging System) により解析を進めている<sup>56)</sup>。この方法は<sup>59</sup>Feを用いた従来のオートラジオグラフィと異なり、非破壊で2次元情報が得られるため、無傷の1個体中の鉄の移行を経時的に観察できるが<sup>57)</sup>、解像度は部位レベルにとどまっておき、維管束組織を見分けられるよう解像度の向上が望まれる。また限られた施設でしか利用できないのは難点である。

## 7. 鉄代謝異常の変異株

シロイヌナズナを初めとして植物の研究でも遺伝子操作技術の向上やゲノムプロジェクトの進行に伴い、多くの生理現象が分子生物学を通じて解明されている。変異株からの原因遺伝子の取得も容易になってきた。鉄代謝に関しても、先に述べたトマトの *chloronerva* からはニコチアミンの機能を推定する重要な手がかりが、トウモロコシの *ys1* からはムギネ酸-鉄のトランスポーターが得られている。これらの他に、トマトの *fer* は鉄欠乏応答が起こらず鉄を十分に与えても鉄欠乏クロロシス症状を示す変異株で、原因遺伝子 *FER* は鉄濃度を感知して鉄吸収関連の遺伝子群の発現を調節するタンパク質をコードしていると考えられている<sup>58)</sup>、一方、エンドウマメの変異株 *dgl* と *brz*

は鉄を過剰集積し過剰害の特徴である褐色の壊死斑を示す<sup>59,60)</sup>。どちらも根の三価鉄還元活性が常に親株より高いが、変異株を台木として親株の地上部を接ぎ木すると活性は下がることから<sup>61)</sup>、地上部から地下部への鉄栄養情報伝達物質が欠損しているものと考えられている。また *dgl* と *brz* を用いて三価鉄還元酵素遺伝子 *FRO1* の発現を調べたところ、地上部での発現は親株でも変異株でも変わらなかったことから<sup>38)</sup>、1つの遺伝子が鉄栄養に関して地上部と地下部で異なる制御を受けていることが分かり、興味深い。シロイヌナズナの *frd3* も鉄欠乏応答遺伝子が常に高発現している変異株で、鉄、マンガン、亜鉛を地上部に高集積するが、鉄により誘導されるフェリチンの発現がみられない<sup>62)</sup>。原因遺伝子 *FRD3* は根で発現する膜タンパク質であり、具体的な機能の解明が待たれる。

## 8. おわりに

植物の他の研究分野と同様、鉄栄養においてもマイクロアレイ解析や変異株の解析は今後ますます重要な研究手段であると思われる。しかし最終的には実際に植物体内における鉄の形態や動態がどうなっているのかという直接的証拠が必要になるであろう。そのためには鉄の化学形態が識別できる非破壊分析法のさらなる開発が望まれる。これらの研究の進展により、まだあまり解明の進んでいない鉄の体内移行も早晚明らかになっていくと思われる。

なお、本稿受理後に内容に関わる以下の重要な論文が発表されたので参照されたい。

Ling, H. Q., Bauer, P., Bereczky, Z., Keller, B. and Ganai, M.: The tomato *fer* gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 13938~13943 (2002)

Graziano, M., Beligni, M. V. and Lamattina, L.: Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiol.*, **130**, 1852~1859 (2002)

謝辞 まず本稿執筆の機会をお与え下さいました米山忠克東京大学大学院教授に感謝いたします。東京大学大学院の森敏教授、西澤直子教授には筆者が行った研究のご指導をいただきました。但野利秋東京農業大学教授(北海道大学名誉教授)には本稿を御校閲頂きました。ここに感謝いたします。

## 文 献

- 1) Beard, J. L., Dawson, H. and Piñero, D. J.: Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr. Rev.*, **54**, 295~317 (1996)
- 2) Marschner, H.: Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd ed., p. 313~320, 626~644, Academic Press, London (1995)
- 3) Sean, R. and Lynch, M. D.: Iron overload: prevalence and impact on health. *Nutr. Rev.*, **53**, 255~260 (1995)
- 4) Robinson, N. J., Procter, C. M., Connolly, E. L. and Gueriot, M. L.: A ferric-chelate reductase for iron uptake from soil. *Nature*, **397**, 694~697 (1999)
- 5) Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F.,

- Guerinot, M. L., Briat, J. F. and Curie, C.: IRT 1, an arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell*, **14**, 1223~1233 (2002)
- 6) Kobayashi, T., Nakanishi, H., Takahashi, M., Kawasaki, S., Nishizawa, N. K. and Mori, S.: *In-vivo* evidence that *Ids3* from *Hordeum vulgare* encodes a dioxygenase that converts 2'-deoxymugineic acid to mugineic acid in transgenic rice. *Planta*, **212**, 864~871 (2001)
- 7) Higuchi, K., Suzuki, K., Nakanishi, H., Yamaguchi, H., Nishizawa, N. K. and Mori, S.: Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol.*, **119**, 471~480 (1999)
- 8) Takahashi, M., Yamaguchi, H., Nakanishi, H., Shioiri, T., Nishizawa, N. K. and Mori, S.: Cloning two genes for nicotianamine aminotransferase, a critical enzyme in iron acquisition (Strategy II) in graminaceous plants. *ibid.*, **121**, 947~956 (1999)
- 9) Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S., Briat, J. F. and Walker, E. L.: Maize *yellow stripe1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*, **409**, 346~349 (2001)
- 10) Negishi, T., Nakanishi, H., Yazaki, J., Kishimoto, N., Fujii, F., Shimbo, K., Yamamoto, K., Sakata, K., Sasaki, T., Kikuchi, S., Mori, S. and Nishizawa, N. K.: cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *Plant J.*, **30**, 83~94 (2002)
- 11) Lescure, A. M., Proudhon, D., Pesey, H., Ragland, M., Theil, E. C. and Briat, J. F.: Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 8222~8226 (1991)
- 12) Wei, J. and Theil, E. C.: Identification and characterization of the iron regulatory element in the ferritin gene of a plant (soybean). *J. Biol. Chem.*, **275**, 17488~17493 (2000)
- 13) Murgia, I., Delledonne, M. and Soave, C.: Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **30**, 521~528 (2002)
- 14) Bughio, N., Takahashi, M., Yoshimura, E., Nishizawa, N. K. and Mori, S.: Light-dependent iron transport into isolated barley chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **38**, 101~105 (1997)
- 15) Abadía, J., López-Millán, A. F., Rombolá, A. and Abadía, A.: Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant Soil*, **241**, 75~86 (2002)
- 16) Takahashi, M., Nakanishi, H., Kawasaki, S., Nishizawa, N. K. and Mori, S.: Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature Biotechnol.*, **19**, 466~469 (2001)
- 17) Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S. and Takaiwa, F.: Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *ibid.*, **17**, 282~286 (1999)
- 18) Goto, F., Yoshihara, T. and Saiki, H.: Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin. *Theor. Appl. Genet.*, **100**, 658~664 (2000)
- 19) Noma, M., Noguchi, M. and Tamaki, E.: A new amino acid, nicotianamine, from tobacco leaves. *Tetrahedron Lett.*, **22**, 2017~2020 (1971)
- 20) Rudolph, A. and Scholz, G.: A biochemical mutant of *Lycopersicon esculentum* Mill. Isolation and properties of the ninhydrin-positive "normalizing factor." *Phytochemistry*, **7**, 1759~1764 (1968)
- 21) Buděšínský, M., Budzikiewicz, H., Procházka, Ž., Ripperger, H., Römer, A., Scholz, G. and Schreiber, K.: Nicotianamine, a possible phytosiderophore of general occurrence. *ibid.*, **19**, 2295~2297 (1980)
- 22) Rudolph, A., Becker, R., Scholz, G., Procházka, Ž., Toman, J., Macek, T. and Herout, V.: The occurrence of the amino acid nicotianamine in plants and microorganisms. A reinvestigation. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **180**, 557~563 (1985)
- 23) Von Wirén, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J. F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R. A. and Hider, R. C.: Nicotianamine chelates both Fe<sup>III</sup> and Fe<sup>II</sup>. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol.*, **119**, 1107~1114 (1999)
- 24) 木下恵美子・山越 純・菊池 護：醤油中の血圧降下物質について，日本醸造協会誌，**89**，126~130 (1994)
- 25) Suzuki, K., Shimada, K., Nozoe, S., Tanzawa, K. and Ogita, T.: Isolation of nicotianamine as a gelatinase inhibitor. *J. Antibiotics*, **49**, 1284~1285 (1996)
- 26) Takagi, S.: Production of phytosiderophores; in *Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms*, ed. L. L. Barton and B. C. Hemming, p.111~131, Academic Press, San Diego, U.S.A. (1993)
- 27) Shojima, S., Nishizawa, N. K., Fushiya, S., Nozoe, S., Irifune, T. and Mori, S.: Biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol.*, **93**, 1497~1503 (1990)
- 28) Higuchi, K., Nakanishi, H., Suzuki, K., Nishizawa, N. K. and Mori, S.: Presence of nicotianamine synthase isozymes and their homologues in the root of graminaceous plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **45**, 681~691 (1999)
- 29) Higuchi, K., Nishizawa, N. K., Yamaguchi, H., Römheld, V., Marschner, H. and Mori, S.: Response of nicotianamine synthase activity to Fe-deficiency in tobacco plants as compared with barley. *J. Exp. Bot.*, **46**, 1061~1063 (1995)
- 30) Suzuki, K., Higuchi, K., Nakanishi, H., Nishizawa, N. K. and Mori, S.: Cloning of nicotianamine synthase genes from *Arabidopsis thaliana*. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **45**, 993~1002 (1999)
- 31) Higuchi, K., Watanabe, S., Takahashi, M., Kawasaki, S., Nakanishi, H., Nishizawa, N. K. and Mori, S.: Nicotianamine synthase gene expression differs in barley and rice under Fe-deficient conditions. *Plant J.*, **25**, 159~167 (2001)
- 32) Scholz, G., Becker, R., Pich, A. and Stephan, U. W.: Nicotianamine. A common constituent of strategies I and II of iron acquisition by plants: A review. *J. Plant Nutr.*, **15**, 1647~1665 (1992)
- 33) Scholz, G. and Pich, A.: The relationship between the activity of various iron-containing and iron-free enzymes and the presence of nicotianamine in tomato seedlings. *Physiol. Plant.*, **88**, 172~178 (1993)
- 34) Becker, R., Grün, M. and Scholz, G.: Nicotianamine and the distribution of iron into the apoplasm and

- symplasm of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta*, **187**, 48~52 (1992)
- 35) Liu, D. H., Adler, K. and Stephan, U. W.: Iron-containing particles accumulate in organelles and vacuoles of leaf and root cells in the nicotianamine-free tomato mutant *chloronerva*. *Protoplasma*, **201**, 213~220 (1998)
- 36) Yoshimura, E., Sakaguchi, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N. K., Nakai, I. and Mori, S.: Characterization of the chemical state of iron in the leaves of wild-type tomato and of a nicotianamine-free mutant *chloronerva* by X-ray absorption near-edge structure (XANES). *Phytochem. Anal.*, **11**, 160~162 (2000)
- 37) Higuchi, K., Tani, M., Nakanishi, H., Yoshiwara, T., Goto, F., Nishizawa, N. K. and Mori, S.: The expression of a barley *HvNAS1* nicotianamine synthase gene promoter-*gus* fusion gene in transgenic tobacco is induced by Fe-deficiency in roots. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1692~1696 (2001)
- 38) Waters, B. M., Blevins, D. G. and Eide, D. J.: Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol.*, **129**, 85~94 (2002)
- 39) 増田 建・鈴木琢雄・高宮建一郎: 光合成生物におけるクロロフィル・ヘム生合成系の金属配位酵素, 蛋白質・核酸・酵素, **45**, 700~709 (2000)
- 40) Bughio, N., Takahashi, M., Yoshimura, E., Nishizawa, N. K. and Mori, S.: Characteristics of light-regulated iron transport system in barley chloroplasts. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **43**, 959~963 (1997)
- 41) González-Vallejo, E. B., Morales, F., Cistué, L., Abadía, A. and Abadía, J.: Iron deficiency decreases the Fe(III)-chelate reducing activity of leaf protoplasts. *Plant Physiol.*, **122**, 337~344 (2000)
- 42) Kushnir, S., Babiychuk, E., Storozhenko, S., Davey, M. W., Papenbrock, J., De Rycke, R., Engler, G., Stephan, U. W., Lange, H., Kispal, G., Lill, R. and Van Montagu, M.: A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Stal* leads to dwarfism and chlorosis in the Arabidopsis mutant *stark*. *Plant Cell*, **13**, 89~100 (2001)
- 43) Dykema, P. E., Sipes, P. R., Marie, A., Biermann, B. J., Crowell, D. N. and Randall, S. K.: A new class of proteins capable of binding transition metals. *Plant Mol. Biol.*, **41**, 139~150 (1999)
- 44) Suzuki, N., Koizumi, N. and Sano, H.: Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.*, **24**, 1177~1188 (2001)
- 45) Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. and O'Halloran, T. V.: Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, **284**, 805~808 (1999)
- 46) Outten, C. E. and O'Halloran, T. V.: Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *ibid.*, **292**, 2488~2492 (2001)
- 47) Eide, D., Broderius, M., Fett, J. and Guerinot, M. L.: A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 5624~5628 (1996)
- 48) Eckhardt, U., Marques, A. M. and Buckhout, T. J.: Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Mol. Biol.*, **45**, 437~448 (2001)
- 49) Bughio, N., Yamaguchi, H., Nishizawa, N. K., Nakanishi, H. and Mori, S.: Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. *J. Exp. Bot.*, **53**, 1677~1682 (2002)
- 50) Thomine, S., Wang, R., Ward, J. M., Crawford, N. M. and Schroeder, J. I.: Cadmium and iron transport by member of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 4991~4996 (2000)
- 51) Tiffin, L. O.: Translocation of iron citrate and phosphorus in xylem exudate of soybean. *Plant Physiol.*, **45**, 280~283 (1970)
- 52) López-Millán, A. F., Morales, F., Abadía, A. and Abadía, J.: Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *ibid.*, **124**, 873~884 (2000)
- 53) Kilcoyne, S. H., Bentley, P. M., Thongbai, P., Gordon, D. C. and Goodman, B. A.: The application of  $^{57}\text{Fe}$  Mössbauer spectroscopy in the investigation of iron uptake and translocation in plants. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B*, **160**, 157~166 (2000)
- 54) Thomas, F., Serratrice, G., Béguin, C., Aman, E. S., Pierre, J. L., Fontecave, M. and Laulhére, J. P.: Calcein as a fluorescent probe for ferric iron. *J. Biol. Chem.*, **274**, 13375~13383 (1999)
- 55) Kosegarten, H. U., Hoffmann, B. and Mengel, K.: Apoplastic pH and  $\text{Fe}^{3+}$  reduction in intact sunflower leaves. *Plant Physiol.*, **121**, 1069~1079 (1999)
- 56) 塚本崇志・清宮正一郎・中西啓仁・森 敏・渡辺智・伊藤岳人・水庭千鶴子・石岡典子・松橋信平・関根俊明・内田 博: トウモロコシの鉄吸収変異株 'ysl' における鉄 ( $^{57}\text{Fe}$ ) の吸収・移行, 第11回 TIARA 研究発表会要旨集, p. 145~146 (2002)
- 57) <http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/pmp/index.html>
- 58) Bienfait, H. F.: Proteins under the control of the gene for Fe efficiency in tomato. *Plant Physiol.*, **88**, 785~787 (1988)
- 59) Kneen, B. E., LaRue, T. A., Welch, R. M. and Weeden, N. R.: Pleiotropic effects of *brz*. A mutation in *Pisum sativum* (L.) cv. 'Sparkle' conditioning decreased nodulation and increased iron uptake and leaf necrosis. *ibid.*, **93**, 717~722 (1990)
- 60) Welch, R. M. and LaRue, T. A.: Physiological characteristics of Fe accumulation in the 'Bronze' mutant of *Pisum sativum* L., cv. 'Sparkle' E107 (*brz brz*). *ibid.*, **93**, 723~729 (1990)
- 61) Grusak, M. A. and Pezeshgi, S.: Shoot-to-root signal transmission regulates root Fe(III) reductase activity in the *dgl* mutant of pea. *ibid.*, **110**, 329~334 (1996)
- 62) Rogers, E. E. and Guerinot, M. L.: FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in Arabidopsis. *Plant Cell*, **14**, 1787~1799 (2002)