

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成10年度博士課程進学
氏名 大木 宏之
指導教官名 森 敏

論文題目

in vitro evolution 法によるアルカリ土壌耐性タバコの作出

鉄は全ての生物にとって必要不可欠で、光合成や呼吸など細胞を機能させるのに関わる多くの酵素に必要である。鉄は地殻中において、酸素、ケイ素、アルミニウムに次いで4番目に多い元素であり、絶対量として不足する鉄欠乏土壌というものは存在しない。しかしながら現実には豊富に存在する鉄を利用できないために植物の生育が阻害される土壌は存在する。そのような土壌のうちの1つが石灰質アルカリ土壌である。石灰質アルカリ土壌は土壌 pH が高く、鉄が溶解度の低い水酸化鉄(III)として不溶態化しているため、フリーの Fe^{3+} と Fe^{2+} イオンの濃度は 10^{-15} M 以下である。それゆえ土壌中の鉄を吸収できず植物は鉄欠乏症を示す。イネ科以外の高等植物は鉄欠乏に対して次のような応答 (Strategy I) を示す。

- 1) 根圏へのプロトンの放出
- 2) 根の細胞膜における三価鉄還元活性の増加
- 3) 還元・キレート性物質の根からの分泌

など。つまり放出したキレート物質により三価鉄をキレートし、根のフリースペース中の三価鉄-キレートを細胞膜上で三価鉄還元酵素によって二価鉄に還元し、二価鉄トランスポーターを通して吸収するという仕組みである。根圏へプロトンを放出し、フリースペースの pH を下げることで還元酵素の活性を増加させているとも考えられている。しかし三価鉄の還元活性は高 pH で阻害されるため、高濃度の炭酸カルシウムによる強い pH 緩衝作用により石灰クロロシスを起こすという問題がある。

「三価鉄還元酵素遺伝子を植物で過剰発現することにより、石灰質アルカリ土壤での鉄欠乏に耐性な植物を作ることが出来る」という考えで研究を始めた。実験を開始した当初は植物の三価鉄還元酵素遺伝子はクローニングされていなかったため、酵母の遺伝子を用いた（植物の三価鉄還元酵素遺伝子は1999年になってようやくシロイヌナズナから単離された）。真核生物のモデルとして知られる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における鉄の獲得機構はイネ科を除く植物の鉄獲得機構 (Strategy I) に類似している。*Saccharomyces cerevisiae* では、まず三価鉄還元酵素 (FRE1 と FRE2) により三価鉄の二価鉄への還元を行った後、高親和性 (FTR1) および低親和性 (FET4) のトランスポーターで細胞内に取り込む。*Saccharomyces cerevisiae* の三価鉄還元酵素遺伝子 *FRE1* は三価鉄還元酵素活性を示さない変異株をコンプリメントする遺伝子として 1992年にクローニングされた。本研究ではアルカリ土壤耐性植物の作出を目的として、*FRE1* 遺伝子を植物にあった配列に設計し直し、さらに進化工学的手法により高 pH で活性を持つ三価鉄還元酵素を作出し、植物へ導入してアルカリ土壤での検定を行った。

1. 再構築した酵母の *FRE1* 遺伝子 (*refre1*) のタバコへの導入

FRE1 遺伝子をタバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1) へアグロバクテリウム法により導入したが、形質転換タバコは三価鉄還元酵素活性を示さなかった。その理由は *FRE1* の転写産物が酵母で発現しているときよりも短く、コーディングリージョンの途中で poly(A) が付加していたからであった。そこで *FRE1* 遺伝子の塩基配列を植物用に設計し

直し、全塩基配列を人工的に合成した。新しく合成した遺伝子を *refre1* (reconstructed *FRE1*) と命名し、CaMV35S プロモーターの下流につないでタバコへ導入した。*refre1* 遺伝子を持つ形質転換タバコは完全長の mRNA を生産し、恒常的な強い三価鉄還元酵素活性を示した。形質転換タバコの葉における金属含量を分析したところ、鉄の含量が約 1.7 倍に増加していた。しかし水耕栽培での鉄欠乏条件における三価鉄還元酵素活性は、野生型の植物と比較して差が見られなかった。これは鉄欠乏条件下では野生型の植物においても三価鉄還元酵素活性が強く誘導されることに起因していると考えられた。

2. *in vitro* evolution 法による *refre1* 遺伝子の改良

過剰発現による耐性の付加があまり効果的ではないと考えられたので、三価鉄還元酵素の量的な変化ではなく、質的な変化を求めた。至適 pH がアルカリ側にシフトした、あるいはアルカリ条件でも強い活性を持っている三価鉄還元酵素を *refre1* 遺伝子への変異の導入とスクリーニングによって作出した。*refre1* 遺伝子は植物用に書き直した配列を持っているが *Saccharomyces cerevisiae* でも機能する。*refre1* 遺伝子へのランダムな変異の導入は Mn^{2+} を加えた PCR により行い、*refre1* 遺伝子 (約 2000bp) に平均で 5 塩基の置換が入るように Mn^{2+} の濃度を調節した。変異を導入した遺伝子群を酵母のアルコール脱水素酵素 (ADH1) のプロモーターとターミネーターを持つ発現ベクターに挿入し、ライブラリーを作成した。ライブラリーのスクリーニングには酵母の *in vivo* アッセイ系を用いた。pH 8.0 と pH 8.5 でのスクリーニングにより、10個の候補遺伝子が得られた。定量的解析は同様に *in vivo* で行った。最も優れた変異遺伝子 (variant 372) を持つ酵母は元の *refre1* 遺伝子を持つ酵母に比

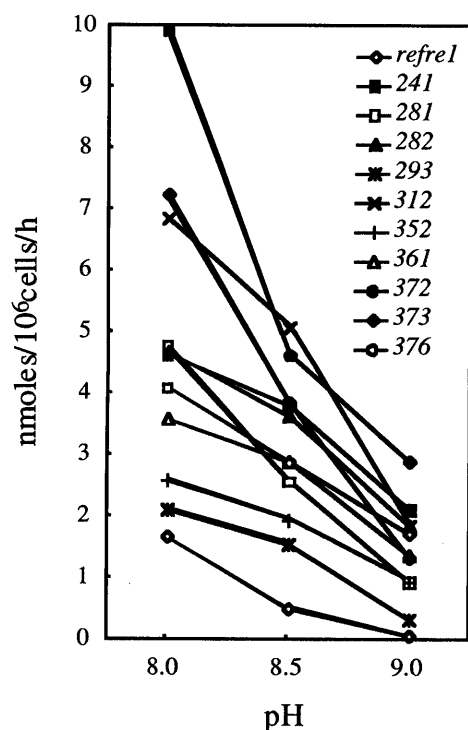


図1 variant の三価鉄還元酵素活性

べ、pH 8.0, 8.5, 9.0 においてそれぞれ 6.0, 8.7, 38 倍の活性を示した (図 1)。

得られた変異遺伝子の配列の解析から N 末から 312 番目のアミノ酸への共通した変異が確認された。この変異が高 pH での強い三価鉄還元酵素活性に重要な役割を果たしていると考えられる。この変異部位はヘムを配位するヒスチジン残基の近くに存在し、細胞質に近い側の細胞膜内に存在していると思われる。得られた変異遺伝子はアルカリ土壌での鉄欠乏ストレスに耐性を持つ植物の作出に役立つと思われる。

3. アルカリ土壌耐性タバコの作出

変異の導入によって得られた高 pH で強い三価鉄還元酵素活性を示す変異遺伝子 (variant 241, 281, 282, 372) を CaMV35S プロモーターの下流につないでタバコへ遺伝子導入した。アルカリ条件で最も活性の強かった変異遺伝子 (variant 372) についてはおそらく強すぎる三価鉄還元酵素活性のために再生体を得ることが出来なかった。それ以外の variant 241, 281, 282 については再生体を得ることが出来、開花結実に至るこれまでの 2 回にわたる繰り返し実験の結果、T₂ 植物 (形質転換当代を T₁ として) が野生型の植物に比べて石灰質アルカリ土壌に対してより耐性であることが確認されている。

まとめ

石灰質アルカリ土壌で良好な生育を示す形質転換タバコの作出に成功した。

1. Oki, H., Yamaguchi, H., Nakanishi, H. and Mori, S. 1999. Introduction of the reconstructed yeast ferric reductase gene, *refre1*, into tobacco. *Plant and Soil* 215: 211-220.
2. Oki, H., Yamaguchi, H., Nakanishi, H. and Mori, S. Directed evolution of yeast ferric reductase. (submitted)