

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大 木 宏 之

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の
で、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) Fe^{2+} イオンの根からの吸収
など。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。そこで、「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、石灰質アルカリ土壌での鉄欠乏に耐性な植物を作る」という目的で研究を始め
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
(*Saccharomyces cerevisiae*) の三価鉄還元酵素遺伝子 (*FRE1*) を用いた。本研究では *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壌での検定を行った。

第 1 章では、再構築した酵母の *FRE1* 遺伝子 (*refre1*) のタバコへの導入について述べている。

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、この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。しかし水掛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。

第 2 章では *in vitro* evolution 法による *refre1* 遺伝子の改良について述べている。

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酵母によるスクリーニングによって作
出した。pH8.0 と pH8.5 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。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べ、pH8.0, 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。得られた変異遺伝子の配列の解析から主として 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た。

第3章ではこの改変酵素遺伝子を導入したアルカリ土壌耐性タバコの作出について述べている。

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(4種)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。しかしそれ以外の3種については再生体を得ることが出来、開花結実に至る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を確認した。

以上要するに、本研究により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。ここで開発された技法は今後の双子葉の食用作物の作出に適用可能であり、アルカリ土壌の農業生産力の向上に貢献すると考えられ、学術上応用上に貢献するところが少なくない。よって審査委員一同本研究が博士(農学)に値すると認めた。