

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中 西 啓 仁

この研究は、オオムギからムギネ酸の生合成経路のうちの ムギネ酸合成酵素 遺伝子を単離し、この機能の証明を形質転換イネを用いて行い、また、ムギネ酸生合成経路の酵素遺伝子群をイネに導入し、石灰質アルカリ土壌での鉄欠乏耐性植物の作成を目指したものである。

第1章では、イネ科植物の鉄獲得機構について記述している。イネ科植物はStrategy-IIという鉄獲得機構を持つ。イネ科植物は体内での鉄の要求性が高まると、根においてイネ科植物特有の三価鉄のキレーターであるムギネ酸類を合成し、根圏に分泌する。分泌されたムギネ酸類は土壌中の不溶態鉄をキレートにより溶出し、「Fe(III)-ムギネ酸類」錯体として特有のトランスポーターにより根で再吸収される。

第2章においては、鉄欠乏特異的遺伝子 *Ids3* の単離とその性質について述べている。鉄欠乏オオムギの根から作成したcDNAライブラリーを用いてディファレンシャルスクリーニングを行い、鉄欠乏オオムギの根で発現の強く誘導される遺伝子 *Ids3* (Iron deficiency specific clone no. 3) を単離した。得られたcDNAは1241bpからなり、339アミノ酸をコードしていると予想された。この遺伝子のコードするタンパク質IDS3はジオキシゲナーゼと高い相同性を示し、ジオキシゲナーゼ類で示されてきた、 Fe^{2+} イオンと2-オキソグルタル酸への結合に必須なアミノ酸残基は完全に保存されていた。オオムギの *Ids3* を含むゲノム断片もクローニングし、その塩基配列を解読した。この遺伝子のオオムギ根での発現は鉄欠乏処理により強く誘導された。また、発現は葉ではおこらず、根に特異的であった。*Ids3* 遺伝子発現は、鉄欠乏処理3日目で誘導され始めた。これはムギネ酸類の分泌が見られるよりも少し早く、ムギネ酸生合成のキー酵素であるニコチアナミン合成酵素、ニコチアナミンアミノ基転移酵素の活性誘導のパターンと完全に一致した。以上のことから、IDS3がムギネ酸生合成経路上の水酸化反応を行う酵素ではないかと考えられた。イネ科植物において、IDS3タンパク質はオオムギ、ライムギで検出された。*Ids3* の発現は、オオムギの染色体4H, 4HLを添加したコムギで観察された。このことはIDS3がDMAからMAへの水酸化反応を触媒する酵素であることを強く示していると考えられた。さらに *Ids3* に最も高いホモロジーをもつ *Ids2* 遺伝子の発現は、オオムギの染色体の7H, 7HLを添加したコムギで検出された。IDS3がムギネ酸生合成経路上のDMAからMA, epiHDMAからepiHMAへの2'位の水酸化酵素、IDS2がDMAからepiHDMA, MAからepiHMAへの3位の水酸化酵素であることが強く示唆された。しかし、IDS3の *in vitro* でのジオキシゲナーゼ活性検定は成功しなかった。

第3章では、IDS3はムギネ酸合成酵素であることを示した形質転換イネに関する記述である。*Ids3* 遺伝子を含むオオムギのゲノム断片約20kbを用いてイネの形質転換を行った。鉄欠乏処理を施して形質

転換植物が分泌するムギネ酸類を測定した。野生型のイネがDMAのみを分泌したのに対して、形質転換体はDMAとMAを分泌した。これによりIDS3が2'-デオキシムギネ酸の2'位の水酸化酵素すなわちムギネ酸合成酵素であることが証明された。さらに、形質転換体のうちの1つの系統は野生型の2倍以上のムギネ酸類を放出し、鉄欠乏耐性イネ作成への希望を抱かせるものであった。

第4章は、鉄欠乏耐性植物作成に向けての形質転換イネの作成と石灰質アルカリ土壌での検定試験に関する記述である。Ids3の5'上流領域は、イネの根でも鉄欠乏に応答して、遺伝子発現を誘導する強力なプロモーターとして機能することが分かった。Ids3 5'上流領域にnas遺伝子やnaat遺伝子をつないだコンストラクトを作成し、さらに単独あるいは複合でこれらのコンストラクトを導入した形質転換イネも作成した。作成した形質転換イネを用いて石灰質アルカリ土壌での生育試験を行ったところ、この土壌で生育するいくつかの有望な系統が得られた。

第5章は、まとめと総合考察である。

以上要するに、本研究は、未知であったムギネ酸合成酵素の遺伝子の単離に成功し、また、ムギネ酸合成酵素遺伝子群を導入することによって、石灰質アルカリ土壌に耐性のイネの創製の可能性を示したものであり、学術上応用上、寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は博士（農学）の学位を授与できると認めた。