

論文の内容の要旨

農学国際専攻

平成15年度博士課程 進学

氏 名 石丸 泰寛

指導教官名 西澤 直子

論文題目 イネの金属元素トランスポーターに関する研究

2005年現在、64億人に達した世界人口は今なお年間7670万人の割合で急速に増加し続けている。国連の推計では現在から2050年までに約26億人が増加すると見られるが、これは1950年の全世界の人口に匹敵する。しかし、現在ですら人口を支えるだけの食糧の生産は十分とは言えず、世界では、8億人以上が栄養不足に苦しんでいる。今後も不足が予想される食糧の増産をいかに達成するかは、人類にとって重要な問題である。これまでも緑の革命を始めとして単位面積当たりの収穫量を増加させることにより、人口の増加に対応してきた。しかし現在、単位面積当たりの収穫量の増加率は既に頭打ちになってきており、これ以上の収穫量の飛躍的な増加は期待できない。この深刻な食糧問題の有力な解決方法のひとつは耕地面積の拡大である。すなわち、今までは農耕地として利用されていなかった、もしくは利用されていても高い収量を確保出来なかった不良土壌の活用に問題解決の糸口がある。不良土壌の中でも特に、鉄(Fe)欠乏地帯である石灰質アルカリ土壌、あるいは亜鉛(Zn)欠乏地帯は、世界中に広く存在する。

よく耕された好気的な土壌ではFeは Fe^{3+} として存在する。半乾燥地域の炭酸カルシウ

ムが高濃度で集積した石灰質アルカリ土壌では、土壌中のpHが高いために Fe^{3+} の溶解度が低く、植物は十分なFeを吸収できず、Fe欠乏となる。すなわち、Fe欠乏クロロシスを呈し、生長は抑制され、症状が重い場合にはやがて枯死してしまう。このような土壌は世界の耕地面積のおよそ3分の1を占めるため、これらの不良土壌における生産性を改善できれば食糧問題や環境問題の解決に大きく貢献できる。現状では、pH 矯正剤を投与したり、キレートFeを葉面散布したりすることによって、Fe欠乏を回避することが行われている。しかしながら、これらの手法はコストが高く、特に発展途上国では実現不可能であり、根本的な解決にはならない。そこで植物のFe 吸収機構や体内での輸送機構を理解することによって、Fe の吸収能力が高く、また利用効率の高い植物を育種することが重要であると考えられる。

Zn 欠乏地帯では、土壌中の Zn は粘土などの鉱物や有機物に沈着するため、植物が吸収できる土壌溶液中の Zn は、土壌中の全 Zn 量のごく一部でしかなく、還元が進んだ土壌や pH が高いアルカリ土壌では、さらに植物が利用できる Zn の量は少なくなる。そのような土壌では、Zn 欠乏によって植物の生育は阻害され、Fe 欠乏と同様に症状が重い場合にはやがて枯死してしまう。

石灰質アルカリ土壌においても Fe を十分に吸収できるような植物、もしくは少ない体内 Zn を効率よく利用できるような植物、特にイネ科の作物を創製できれば、食糧増産、沙漠の緑化などの様々な問題に対応できる。本研究では、そのような Fe 欠乏耐性、Zn 欠乏耐性を備えた植物の創製を最終的な目標とし、植物の Fe、Zn 栄養、特にこれらの金属元素の根圏からの獲得に関する研究を行った。

イネの新たな Fe 吸収機構の解明

Fe欠乏を回避するために、非イネ科植物は、土壌中の Fe^{3+} を Fe^{3+} キレート還元酵素により Fe^{2+} に還元し、 Fe^{2+} トランスポーターによりFeを吸収する。これは、Strategy と呼ばれるFe 吸収機構である。これに対して、イネ科植物は、ムギネ酸類 (MAs) を根から分泌し、 Fe^{3+} をキレートして可溶化し、その Fe^{3+} -MAsを吸収するというStrategy 機構を持っている。イネ科植物であるイネ (*Oryza sativa*) は、MAsとしてデオキシムギネ

酸 (DMA) を合成・分泌し, Strategy 機構をもつ。しかしながら, イネは同時に Fe^{2+} トランスポーター *OsIRT1* を持つことが明らかになっている。本研究では, *OsIRT1* と非常に相同性の高い遺伝子 *OsIRT2* をイネから単離した。定量的 RT-PCR 法により, *OsIRT1* と *OsIRT2* は主に Fe 欠乏条件の根で強く発現が誘導されることを確認した。 Fe 吸収欠損酵母を用いた相補実験では, *OsIRT1* または *OsIRT2* を発現させることにより, 生育の回復がみられた。*OsIRT1* または *OsIRT2* と Green Fluorescent Protein (GFP) との融合タンパク質をタマネギ (*Allium cepa* L.) の表皮細胞に一過的に発現させると, これらのタンパク質は細胞膜に局在した。*OsIRT1* プロモーター (0.8 kb) を β -グルクロニターゼ遺伝子 (*GUS*) に連結してイネへ導入し, *OsIRT1* の発現の組織特異性を解析した。*OsIRT1* の発現は Fe 欠乏条件によって誘導され, 根端では表皮細胞と外皮細胞で発現し, 根の基部に近い部分では内皮細胞に隣接する皮層細胞で発現していた。さらに, 根の篩部伴細胞で強く発現が誘導されていた。Positron Emitting Tracer Imaging System法を用いて, イネは Fe^{3+} -DMAの吸収に加え Fe^{2+} も吸収することを明らかにした。しかし, Strategy I 植物が示すような, 鉄欠乏による根の表面での Fe^{3+} 還元酵素活性の上昇は, イネでは観察されなかった。以上の結果により, イネは Fe^{3+} -DMAを吸収する機構に加え, Fe^{2+} を直接吸収する独特の機構を持つことを明らかにした。イネの Fe^{2+} 吸収機構は, 水田のように Fe^{2+} が豊富に存在する湛水条件で生育するイネにとって, 非常に適していると考えられる。

Fe 欠乏耐性植物の作製

前述のように, イネは Fe^{3+} -DMA の吸収機構に加え Fe^{2+} の吸収機構を備えていることが明らかになった。しかし, イネはこれらの 2 つの Fe 吸収機構を持っているにも関わらず, 他のイネ科植物に比べて, Fe 欠乏条件に弱い。これは, pHの高い条件で Fe 欠乏耐性を発揮するために必要なDMAの分泌量が少ないためと, Fe^{3+} 還元酵素活性がイネでは低いためであると考えられる。そこで, イネの根において Fe^{3+} 還元酵素活性を上昇させることにより, Fe^{2+} 吸収を促進し, イネに鉄欠乏耐性を付与できるのではないかと考え, 以下の実験を行った。酵母の Fe^{3+} キレート還元酵素遺伝子である *FRE1*

を植物での発現に適したコドンの利用率に改変し、さらに PCR 法によるランダムミュートレーションの導入により、高 pH 条件でも高い活性を持つように改変した Fe³⁺ キレート還元酵素遺伝子 *refre1/372* をイネに導入した。その際、この遺伝子が鉄欠乏にตอบสนองし、根の表皮で発現する、すなわち Fe²⁺ トランスポーターの発現と同調することが望ましいと考え、プロモーターとして Fe²⁺ トランスポーター *OsIRT1* のプロモーターを用いた。形質転換体では Fe 欠乏条件にตอบสนองし、根で *refre1/372* の発現誘導が観察された。Fe 欠乏条件下で、形質転換体はベクターコントロールに比べ高い Fe³⁺ 還元酵素活性を示し、Fe 吸収と蓄積が増大していた。さらに、形質転換体は、石灰質アルカリ土壌において Fe 欠乏耐性を示し、ベクターコントロールに対して約 7.9 倍の収量を示した。

イネの Zn トランスポーター遺伝子 (*OsZIP4*) の単離と解析

イネの新規 Zn トランスポーター遺伝子を単離、解析した。まず、Fe²⁺ トランスポーター遺伝子 *OsIRT1* に相同性の高い配列を持つ 4 つの遺伝子、*OsZIP4*、*OsZIP5*、*OsZIP6*、*OsZIP7* を単離した。これらのうち *OsZIP4* が Zn 欠乏条件の茎葉と根で強く発現が誘導されることを、マイクロアレイ実験とノーザン解析により明らかにした。*OsZIP4* の導入により Zn 吸収欠損酵母 (*Δzrt1*, *Δzrt2*) の Zn 欠乏培地における生育が回復したことから、*OsZIP4* は Zn を輸送することが示された。定量的 RT-PCR の結果、Zn 欠乏条件での *OsZIP4* の転写産物の量は、以前イネの Zn トランスポーターとして報告された *OsZIP1* や *OsZIP3* の転写産物量の 1000 倍以上であった。*OsZIP4*-GFP 融合タンパク質を、タマネギの表皮細胞に一過的に発現させたところ、細胞膜に局在した。*In situ* ハイブリダイゼーション法により、*OsZIP4* の発現部位を解析した。*OsZIP4* は、篩部細胞や分裂組織で顕著に発現していた。また、*OsZIP4* は Zn 欠乏条件の葉肉細胞でも強く発現していた。これらの結果により、*OsZIP4* は、イネの体内の Zn 輸送と転流に関わる Zn トランスポーターであることが示された。