

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石丸 泰寛

イネの新たな Fe 吸収機構の解明

鉄 (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 I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 I機構を持っている。イネも、Strategy I植物である。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の発現の組織特異性を解析したところ、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。

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した。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、 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テ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 Fe^{3+} 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应答し、根の表皮で発現する、すなわち Fe^{2+} 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 Fe^{2+} 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 欠乏条件に应答し、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 Fe^{3+} 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

イネの新規亜鉛 (Zn) トランスポーター遺伝子を単離、解析した。 Fe^{2+} 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 つの遺伝子を単離し、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。*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。

以上、本論文はイネの新たな鉄吸収機構を明らかにすることによって新規の鉄欠乏耐性イネを創製し、また新規のイネ亜鉛トランスポーターを同定することにより、イネの亜鉛栄養の分子機構の一端を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少ない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。