

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 野副 朋子

第一章 研究の背景

世界の人口は年々増加している。その打開策として、遺伝子導入手法を用いた高収量・高栄養価作物の創製、あるいは不良土壌でも生育可能な作物の創製による耕作可能面積の拡大が有効であると考えられる。不良土壌の一つである石灰質アルカリ土壌では、生育した植物が鉄を利用できないために、葉脈間黄白化症（クロロシス）などの鉄欠乏症状を呈し、枯死したりあるいは収量が激減する。現在までに安価な鉄系肥料の開発は成功しておらず、石灰質アルカリ土壌は農業上深刻な問題となっている。

イネ科植物は体内での鉄の要求性が高まると、根圏から鉄を吸収するために三価鉄キレーターであるムギネ酸類を合成し、根から分泌する。ムギネ酸類は、土壌中の不溶態の三価鉄をキレートして可溶化し、「三価鉄・ムギネ酸類」錯体として根から再吸収される。これまでに、ムギネ酸類生合成経路の全容はほぼ明らかにされてきたが、ムギネ酸類を介した鉄吸収機構の全体像は複雑であり、まだ解明されていない点が多く残されている。石灰質アルカリ土壌でも生育する鉄欠乏耐性植物を創製するという最終目標を達成するため、イネ科植物のムギネ酸類を介した鉄吸収機構、さらにはそれを含めた鉄栄養制御機構を解明することは重要である。

第二章 ムギネ酸類の分泌機構の解明

ムギネ酸類の分泌の分子機構は未知のままである。本章ではイネを用いて分泌の分子機構を解析した。イネはムギネ酸類としてデオキシムギネ酸（DMA）を分泌する。イネにおいて DMA 分泌量が鉄欠乏処理により顕著に増加すること、その分泌は朝と昼に比べ夜では少ないという日周変動を示すことを確認した。次に、DMA 生合成経路で働く酵素である、ニコチアミン合成酵素遺伝子（*OsNAS1*、*OsNAS2*、*OsNAS3*）、ニコチアミンアミノ基転移酵素遺伝子（*OsNAAT1*）、DMA 合成酵素遺伝子（*OsDMAS1*、*OsDMAS2*）の各遺伝子の根における発現の変化を解析し、DMA 合成に日周変動があるかどうかを調べた。鉄欠乏条件では *OsNAS2* の根における発現は明確な日周変動を示し、DMA 分泌の日周変動と類似していた。このことより、イネの根における DMA 生合成は日周変動を示していると考えられた。オオムギでは、ムギネ酸類の生合成は粗面小胞体由来の顆粒（ムギネ酸顆粒）内で行われ、ムギネ酸顆粒は日の出前になると細胞膜付近へ細胞内を移動すると考えられている。鉄欠乏処理を行ったイネの根でもムギネ酸顆粒と同様の顆粒構造が観察され、オオムギ以外のイネ科植物で初めてムギネ酸顆粒が存在することを示した。イネの根においてもオオムギと同様に、DMA 合成がムギネ酸顆粒内で行われ、日の出前になると細胞内小胞輸送により細胞膜付近へ輸送されていることが考えられる。さらに、マイクロアレイ解析をもとに、DMA の分泌を担う放出トランスポーターの候補として、イネの根において鉄欠乏処理により発現の誘導される *OsMFS2* を単離し、その解析を行った。現在までのところ輸送基質は

未知であるが、DMA 分泌に何らかの関与をしている可能性が示唆された。

第三章 イネ種子発芽時における鉄関連遺伝子群の発現様式

DMA やムギネ酸類生合成の中間物質であるニコチアナミン (NA) は体内において金属の輸送にも関与していると考えられている。イネの完熟種子には DMA や NA が蓄積されており、発芽時においても鉄の運搬体として利用されていると考えられる。DMA 合成経路で働く酵素遺伝子 *OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAS3*, *OsNAAT1*, *OsDMAS1*, *OsDMAS2*, 及び金属錯体トランスポーター遺伝子 *OsYSL2*, *OsYSL15*, 二価鉄イオントランスポーター遺伝子 *OsIRT1* のイネ種子発芽時における発現様式をプロモーターGUS 法により解析し、発芽時における DMA と NA の合成部位や鉄錯体の輸送経路を考察した。イネ種子発芽初期 (吸水から 3 日間) の胚乳では *OsNAS1* のみが発現しており、胚乳では主に NA 合成が行われると考えられた。胚乳から胚への養分を供給する組織である柵状吸収細胞では、鉄錯体のトランスポーター遺伝子である *OsYSL2* や *OsYSL15* の発現が誘導された。*OsYSL2* 及び *OsYSL15* はそれぞれ「二価鉄 - NA」, 「三価鉄 - DMA」を輸送することが示されており、イネ種子発芽時に鉄は NA や DMA と錯体を形成し、胚乳から胚へと輸送されることが考えられた。またこの際、主に NA が利用されている可能性が高いと考えられた。これに対し胚では、胚盤、胚盤維管束、幼根、幼芽において、*OsNAS1*, *OsNAS2*, *OsNAS3*, *OsNAAT1*, *OsDMAS2*, *OsYSL2*, *OsYSL15* の発現が誘導され、NA だけでなく DMA の合成も行われ、これらの鉄錯体を輸送していると考えられた。また、胚が初めて外界と接する組織である芽鱗・根鞘では *OsNAAT1*, *OsDMAS2*, *OsYSL15* の発現のみが誘導されており、発芽初期においても「三価鉄 - DMA」錯体が吸収・利用されていると考えられた。一方 *OsIRT1* は他の遺伝子と異なり、幼根基部表皮において局所的な発現が誘導され、外部からの二価鉄イオンも胚へ吸収されることが考えられた。

第四章 高ニコチアナミン含有ダイズの創製

遺伝子組換え技術による新たな作物の創製は、食糧問題の解決策としてのみならず、栄養価を高めた機能性作物の開発においても今後重要な役割を担っていくものと考えられる。ムギネ酸類の生合成中間体 NA は血圧降下作用を持ち、高血圧症を抑える機能性食品として非常に有効であると考えられる。本研究では、オオムギのニコチアナミン合成酵素遺伝子 *HvNAS1* をダイズの種子特異的に発現させ、ダイズ種子中の NA 含有量を高めることを試みた。本章では、アメリカのミネソタ大学においてダイズの形質転換技術を学び、東京大学においてダイズの形質転換技術を確立しようと試みた。試行錯誤の結果、ダイズの子葉から再生体を得ることに成功した。

以上、本論文はイネにおける鉄栄養制御遺伝子の発現を解析することにより、ムギネ酸類分泌の分子機構の一端を解明し、またイネ種子発芽過程における鉄栄養の重要性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くない。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。