

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 金 秀 蓮

指導教員名 西澤直子

論文題目

環境耐性植物の創製に関する研究

1. はじめに

2050 年には世界人口が 89 億人に達すると予測されており、21 世紀の最も重要な課題の一つとして、増加する人口に見合う安全な食糧の確保が考えられる。急激な人口の増大の反面、土壌の流亡、砂漠化、塩類集積、アルカリ土壌化、酸性土壌化など、多方面にわたる土壌破壊が進行し、さらに地球温暖化など気象条件の不安定化に伴う干ばつ、洪水、塩害の増大なども予測されている。このような主に人間活動に起因した地球環境の悪化は、食糧生産に適した土地をさらに減少させることとなり、地球規模の食糧危機の到来が懸念されている。地球上には地質年代的な不良土壌がある上に、人為的な不良土壌の面積が急速に拡大している。これらの不良土壌は地球上の陸地の約 67% を占めるといわれ、高塩類蓄積アルカリ土壌、石灰質アルカリ土壌、酸性土壌、重金属集積土壌などがある。食糧問題に対応するためにはこれらの耕作放棄土壌や不良土壌を耕作可能な土壌として活用しなければならない。そのためには不良土壌に耐性の穀物品種の開発に向かわざるを得ない。本研究では、上記の不良土壌のうち石灰質アルカリ土壌と重金属集積土壌に着目し、それらの土壌に耐性を示す植物の作出を行った。

2. 石灰質アルカリ土壌と植物 - 鉄欠乏耐性植物の創製

石灰質アルカリ土壌では土壌 pH が高く、鉄が不溶態となって沈殿し、植物が吸収できなくなるため、欠乏症はまず、葉脈間が黄白化する鉄欠乏クロロシスとして現れ、枯死に至る。イネ科以外の単子葉植物や双子葉植物は三価の鉄を還元して、二価鉄イオンの形で吸収する Strategy-I という鉄獲得機構を持つ。三価鉄を還元するステップが鉄吸収に必須であることから、本研究では、石灰質アルカリ土壌における鉄欠乏に耐性である植物を創製するために、この三価鉄還元酵素に着目しタバコとダイズに遺伝子導入を行った。

2-1. 鉄欠乏耐性タバコの作出

1) 合成遺伝子 (*VARIANT 372*)の導入

VARIANT 372 酵素は高 pH でも高い三価鉄還元活性を持つ。この *VARIANT 372* 遺伝子は当研究室の大木ら (2004) により、酵母の三価鉄還元酵素遺伝子 (*FRE1*) をタバコが繁用するコドンに書き換え、さらに PCR によってランダムな変異を導入することにより進化工学的に作成された。この遺伝子のタバコへの導入も大木らにより試みられたが、*VARIANT 372* 導入タバコは、その再生過程で葉片が濃緑色となるような異常を示し、再生体を得られなかった。この原因として、*VARIANT 372* タンパク質の強力な還元活性に伴う培地中の Fe, Zn, Cu などの重金属元素の過剰還元による、重金属のカルス葉片への過剰集積が考えられた。本研究では、遺伝子導入の際に用いる培地の鉄と他の微量元素の濃度を 1/2 や 1/10 に減らすことによって、再生体を得ることに成功した。また、石灰質アルカリ土壌を用いて *VARIANT 372* 導入タバコの鉄欠乏耐性を検定した結果、形質転換体は鉄欠乏耐性を示し、鉄の吸収が促進されていることが明らかになった。

2) ニコチアミン合成酵素遺伝子の導入

鉄欠乏耐性をさらに増強するためには、鉄の吸収とともに体内での移行や利用性を増強する必要があると考えられた。そこで、*VARIANT372* 遺伝子とオオムギのニコチアミン合成酵素遺伝子 (*HvNAS1*)を組み合わせることを考えた。ニコチアミン (NA)は鉄(二価, 三価)や他の二価金属のキレーターであり、植物における金属元素の恒常性の維持に関与すると考えられている。まず、CaMV35S プロモーターによって *HvNAS1* を過剰発現するタバコに *VARIANT 372* 遺伝子を再導入するという方法をと

再導入されたタバコの鉄欠乏耐性の検定、金属含量の測定、収量の測定などを行った。得られた結果から、種子や新葉の鉄・亜鉛含量を高めるためには *HvNAS1* 遺伝子との組み合わせが有効であることがわかった。しかし、同時に遺伝子導入法やプロモーターの改善の必要性も明らかになった。

3) 根特異的鉄欠乏応答性プロモーターの利用

Ids3 (Iron deficiency specific clone no.3)は本研究室でオオムギから単離された、鉄欠乏のオオムギの根で発現が強く誘導される遺伝子であり、ムギネ酸合成酵素をコードしている。この *Ids3* の 5'上流領域はタバコにおいても鉄欠乏応答性を示すことが確認されている。鉄欠乏に応答して高pH条件でも高い三価鉄還元酵素活性を示すタバコを作出するため、*Ids3* の 5'上流領域 2.2 kbの下流に *VARIANT 372* 遺伝子を組み込みタバコに導入した。この際、前述の結果に基づいて植物体内における鉄の移行や利用性の向上を考え、*HvNAS1* 遺伝子をタンデムにつないで導入した。アルカリ土壌を用いて形質転換タバコの鉄欠乏耐性の検定を行ったところ、耐性を示す系統が得られた。さらに、Positron-Emitting Tracer Imaging System (PETIS)法により耐性を示す系統 (INV-8) と野生型 (WT)タバコにおける ^{52}Fe の経時的な吸収及びその移行を計測した。その結果、高pHにおいても形質転換タバコは野生型に比べ根から多くの鉄を吸収し、吸収した鉄を積極的に地上部へ移行していることが分かった。

2-2. 鉄欠乏耐性ダイズの作出 - マーカーフリーベクター

通常の形質転換植物の多くは、遺伝子導入の確認のために植物由来ではないマーカー遺伝子が入っていることから、有用な作物が作出されても人体への影響が懸念され、一般に受け入れられ難いのが現状である。また、ダイズは双子葉植物としては最も重要な作物のひとつであり、主要穀類の中でもとりわけタンパク質と脂質が多いことから、食品素材や加工原料として利用されるばかりでなく、タンパク質あるいは油脂源として工業的にも極めて重要な作物である。そこで、本研究では上記の *Ids3* の 5'上流領域下流に *VARIANT 372* 遺伝子と *HvNAS1* 遺伝子をタンデムにつないだコンストラクトをマーカーフリーベクターに組み込み、これを用いて鉄欠乏耐性ダイズの作出を試みた。マーカーフリーベクターとは、マーカー遺伝子による目的遺伝子導入の有無の検定が終了した後に、形質転換植物の染色体中のマーカー遺伝子を取り除くことが可能なベクターで

ある。現在、安定した形質転換系の確立と形質転換効率の向上に努めている。

3. 重金属集積土壌と植物 - 重金属過剰耐性とニコチアミン

鉄、亜鉛、マンガン、銅、ニッケルのような金属元素は植物によって土壌から吸収される。しかしながら、これらの金属元素は植物の生育に必須な栄養素として重要な役割を果たす一方で高濃度では毒性を示す。植物はこれらの毒性を回避するための様々な機構を持つ。最近、金属元素の輸送と解毒に NA が関与することが示唆された。NA は NAS による S-アデノシルメチオニンの 3 分子重合により生合成される。そこで本研究では、CaMV35S プロモーターによって *HvNAS1* 遺伝子を過剰発現するシロイヌナズナとタバコを作成し、これらの形質転換植物を用いて、重金属の毒性回避に関わる NA の役割を調べた。

HvNAS1 遺伝子を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナとタバコの内生 NA 含量を HPLC によって測定した。その結果、*HvNAS1* を過剰発現する形質転換体の NA 濃度は野生型と比べて高く、形質転換シロイヌナズナの系統 15-3 は野生型の約 5 倍、形質転換タバコの系統 S1 では約 10 倍だった。系統間では *HvNAS1* 遺伝子の発現量が高いほど NA 濃度が高かった。次に重金属過剰培地を用いて重金属過剰耐性を検定した。形質転換シロイヌナズナでは、過剰の鉄、マンガン、亜鉛、銅、カドミウムやニッケルに対して耐性がみられ、特にニッケル過剰耐性が顕著であった。また、形質転換タバコではニッケルのみに強い耐性を示すことが明らかになった。そこで、北海道雨竜郡幌加内町で採取した蛇紋岩由来のニッケル過剰土壌を用いて耐性検定を行った。野生型は形質転換タバコに比べて草丈が低く、古い葉に葉脈間クロロシス様の症状を示し、最終的にはネクローシスによる斑点を示した。これに対して、形質転換植物ではこのようなニッケル過剰症状が見られず正常に生育した。これらの結果により NA は過剰な重金属、特にニッケルの過剰に対し、植物に耐性を与えることが明らかになった。*HvNAS1* 過剰発現タバコは、バイオマスが大きいことから、ファイトレメディエーションへの利用が期待される。