

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 秀蓮

---

### 「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食糧の確保が考えられる。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。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。本論文は不良土壌に耐性の穀物品種の開発を目指したものである。

#### 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。そこで本研究では、石灰質アルカリ土壌における鉄欠乏に耐性である植物の創製を目的とした。

##### 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、進化工学的手法により作成した高 pH でも高い活性を持つ三価鉄還元酵素である。この人工遺伝子をタバコへ導入し、再生体を得ることに成功した。石灰質アルカリ土壌を用いて鉄欠乏耐性を検定した結果、形質転換体では鉄の吸収が促進されており、石灰質アルカリ土壌における鉄欠乏に耐性を示す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。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取り、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。その結果、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が、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

*lds3* (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。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、*lds3* の 5' 上

流領域 2.2 kbの下流に *VARIANT 372* 遺伝子と *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た検定により耐性を示す系統( INV-8 )が得られた。さらに、Positron-Emitting Tracer Imaging System (PETIS)法により INV-8 は高pHにおいても非形質転換体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

ダイズは双子葉植物としては最も重要な作物の1つである。しかしながら、ダイズは鉄欠乏に対する耐性が低く、収量増大のためにも、鉄欠乏耐性ダイズの創製が望まれる。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。本研究ではマーカーフリーベクターを用いて鉄欠乏耐性ダイズの作出を試みた。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ナミン

Fe, Zn, Mn, Cu, Cd, Ni などの重金属は土壌や水に高濃度で蓄積すると、動物や植物を介して人間の健康に問題を引き起こす。また、植物自身もそのような環境では生育が困難となる。しかしながら、植物はこれらの過剰毒性に対し様々な防御のメカニズムを持つと考えられる。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 濃度は非形質転換体と比べて高く、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。重金属過剰培地を用いた重金属過剰耐性の検定では、形質転換シロイヌナズナは、過剰の Fe, Mn, Zn, Cu, Cd や Ni に対して耐性がみられ、特に Ni 過剰耐性が顕著であった。また、形質転換タバコでは Ni のみに強い耐性を示すことが明らかになった。さらに、蛇紋岩由来の Ni 過剰土壌を用いて耐性検定を行った。非形質転換体は草丈が低く、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。

以上、本論文は植物の鉄吸収機構を明らかにすることにより、石灰質アルカリ土壌に耐性の植物を創製し、二価金属キレーターであるニコチアナミンを高生産することにより、重金属耐性植物を創製することに成功したものであり、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。