

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木 基史

1. 亜鉛の吸収、輸送におけるムギネ酸類の役割

「ムギネ酸類」はイネ科植物における土壌からの鉄の吸収に関わっていることが知られている。本研究では、オオムギにおいて亜鉛の吸収にもムギネ酸類が寄与していることを立証した。オオムギにおいては、ムギネ酸類の分泌量が亜鉛欠乏によって増加し、「亜鉛-ムギネ酸類錯体」が亜鉛イオンよりも吸収されやすい形態であることを明らかにした。一方、イネにおいては亜鉛欠乏によってムギネ酸類の分泌量は減少した。また、「亜鉛-ムギネ酸類錯体」よりも亜鉛イオンをよく吸収した。このことはイネ科植物の中でも種によって、ムギネ酸類の亜鉛吸収における寄与率が異なることを示唆している。

本研究では、さらにムギネ酸類が植物体内における亜鉛の輸送にも関わっているかどうかも調べた。イネでは、亜鉛欠乏により地上部におけるデオキシムギネ酸の内在量が増加した。Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS) 実験により、亜鉛欠乏のイネでは、「亜鉛-ムギネ酸類錯体」が亜鉛イオンよりも植物体内で輸送されやすいことを明らかにした。また、イネ、オオムギともにムギネ酸類合成経路上の遺伝子の発現量が亜鉛欠乏により地上部で増加した。この発現パターンは鉄欠乏の場合とは異なっていた。このことは、イネ科植物における亜鉛の体内輸送にムギネ酸類が関与していることを示唆している。

2. マイクロアレイを用いた亜鉛欠乏誘導性遺伝子群の網羅的解析

亜鉛欠乏に応答するイネの遺伝子を網羅的に解析することにより、ムギネ酸類以外の亜鉛の吸収、輸送機構や亜鉛欠乏耐性に関わる因子の探索を行った。(i) 亜鉛欠乏により発現量が根と地上部の両方で増加するトランスポーター遺伝子から新規亜鉛トランスポーターOsZIP4 を単離した。OsZIP4は亜鉛欠乏以外の金属欠乏には応答しなかった。in situハイブリダイゼーションによる解析では、OsZIP4 の発現は根では根端分裂組織と維管束細胞にのみ観察された。このため、OsZIP4 は土壌からの亜鉛の吸収には関与しておらず、植物体内の亜鉛の輸送に関わっていることが示唆された。(ii) 亜鉛欠乏イネの根、地上部ではデンプン合成に関わる遺伝子群の発現誘導が見られ、デンプン顆粒も観察された。亜鉛は糖代謝の酵素活性に必要とされており、亜鉛欠乏により代謝されにくくなった単糖がデンプンに変換されていると考えられた。根では特にカスパー線に近接する細胞にデンプン顆粒が見られ、浸透圧ストレスとの関連が予想される。(iii) 亜鉛欠乏イネの地上部では、2種類の不活性型RNaseの発現誘導が見られた。一方、活性型RNaseの発現誘導は見られなかった。しかし、亜鉛欠乏の地上部から粗抽出したタンパク質はRNAの分解活性が高かった。粗抽出タンパク質とRNAをインキュベートする際に亜鉛を加えると、RNAの分解活性は抑制された。このことから、RNAの分解活性は転写レベルで制御されているのではなく、タンパク質レベルで制御されていることが示唆された。2種類の不活性型RNaseは発現量が多

いことから貯蔵タンパク質としての役割を持っていることが予想される。(iv) 亜鉛欠乏イネの地上部では PR-1, chitinase, glucanase, osmotin などの感染特異的タンパク質 (PR) 遺伝子の発現誘導が見られた。PR 遺伝子の発現は zinc finger モチーフを含んだ WRKY 転写因子によって制御されることが知られており、亜鉛欠乏下では WRKY 転写因子による制御が正常に機能しなくなる可能性がある。また、glucanase の必要以上の発現は植物自身の細胞壁を破壊し、亜鉛欠乏に典型的な葉の茶色い斑点症状の原因となっている可能性がある。(iv) 亜鉛欠乏により根と地上部の両方で誘導される遺伝子から、亜鉛栄養の恒常性の維持に関わっている因子を探索した。細胞内亜鉛輸送に関わると予想される metallothioneine や亜鉛欠乏特異的に応答する MADS-box 転写因子を同定した。

3. 隔離圃場における鉄欠乏耐性イネ生育評価試験

閉鎖系温室で選抜された「鉄欠乏耐性イネ」を将来実用化するためには、野外圃場で生育を評価する必要がある。自然天候下で群落としての生育を評価することによって、鉄欠乏耐性イネの農業利用が現実的なものとなる。本研究では、第一種使用規定による隔離圃場での栽培許可を農水省から得るために3年間にわたる生物多様性の評価試験を行い、その後2年間2回の生育評価試験を行った。9項目における生物多様性評価試験では、いずれの試験においても生物多様性への影響は見られなかった。圃場実験に用いた6種類の形質転換イネは、いずれもムギネ酸類の生合成にかかわるオオムギの酵素遺伝子を導入したものである。この中で、*HvNAS1* genome を導入したイネと、*IDS3* genome を導入したイネの生育が石灰質アルカリ土壌水田で良好な生育を示した。*HvNAS1* の発現によって、ムギネ酸類の分泌量の増加と、植物体内の鉄の転流が促進されたことが示唆される。また、イネは通常デオキシムギネ酸しか分泌しないが、*IDS3* の発現により、ムギネ酸など他のムギネ酸類も分泌され、鉄の吸収能が増加したことが示唆される。本研究では、栽培の許可書類を作成した6種類のイネについて1ラインずつしか検定できなかったが、他のラインの検定を行うことによって、さらに鉄欠乏耐性能が高い形質転換イネを選抜することが期待される。

4. 石灰質アルカリ土壌における鉄資材の評価試験

イネは鉄を「鉄-ムギネ酸類錯体」として吸収するだけでなく、二価鉄イオンの形態でも吸収することを分子生物学的に明らかにした。その知見から、二価鉄を含んだ資材による石灰質アルカリ土壌における鉄欠乏症状の改善を試みた。石灰質アルカリ土壌畑で鉄や亜鉛など微量元素を含んだ被覆肥料を陸稲の根元からある程度距離を置いて施肥したところ、微量元素を含まない被覆肥料を施肥したものよりも良好な生育を示した。また、酸化第一鉄 (FeO) を主成分とする鉄資材をポット試験で検定したところ、接触施用、全層施用の両方で効果が現れた。この資材では接触施用による害も見られなかった。

以上、本論文は植物の亜鉛の吸収と輸送を中心にして亜鉛栄養に関わる因子を明らかにし、また鉄栄養の分子生物学知見を応用して圃場での石灰質アルカリ土壌における栽培技術を確立したものであり、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。