

論文の内容の要旨

農学国際専攻

平成 18 年度博士課程 進学

氏 名 増田 寛志

指導教員名 西澤 直子

論文題目 ミネラル栄養価を高めたイネの作出に関する研究

鉄と亜鉛はヒトにとって必須の栄養素である。世界保健機関によれば鉄欠乏症と亜鉛欠乏症の人々は、世界にそれぞれ 20 億人いると言われており、公衆衛生上の重要な問題として国家主導による大規模な対策が望まれている。そこで、世界の半数の人々が主食とするコメの鉄・亜鉛を増加させた品種を作出し、流通させれば、鉄欠乏や亜鉛欠乏の克服に大きく貢献できると考えられる（博士論文・第 1 章）。

ヒトにおける鉄、亜鉛の一日あたりの必要量と各国の白米消費量を考慮し、白米中の鉄含有量を 10 倍に、亜鉛含有量を 2.5 倍に増加させることを目標とした。

種子中の鉄含有量を増やす一つの方法として、鉄肥料の葉面散布による施肥が考えられる。香川県の農家の協力を得て鉄肥料の葉面散布の圃場実験を行った結果、白米中の鉄含有量が 1.5 倍に増加した。しかしながら、より効率よく種子中の鉄を増加させるには、施肥よりも植物の遺伝的性質自体を改良する遺伝子組換えの手法がより効果的であることが示唆された。

また、イネの鉄・亜鉛の濃度を調べたところ、白米に相当する胚乳組織における濃度が低く、葉や穂軸、ぬか等における濃度が非常に高いことが分かった。したがって、登熟期に根から吸収した鉄や亜鉛を、食用となる胚乳組織へ輸送する能力をいかに強化するかが重要であると考えた（第 2 章）。

当研究室では、長年にわたってイネにおける鉄・亜鉛の吸収と体内輸送に関する研究

を行ってきた。そこで博士課程における研究ではこれまでの研究成果をもとにイネ種子中の鉄・亜鉛含有量の増加につながるうる遺伝子と、それを発現させるためのプロモーターを決定し、イネに導入することにより、鉄・亜鉛強化米の作出を目指した。このために表 1 にある四つの方法を考えた。

	導入遺伝子	ねらい
方法 1	<i>Glbpro-Ferritin</i> <i>GluBpro-Ferritin</i>	鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンを種子特異的に発現させ、種子における鉄の蓄積能力を向上させる。
方法 2	<i>35S-HvNAS1</i> <i>Actinpro-HvNAS1</i> <i>OsSUT1pro-HvNAS1</i>	高等植物において鉄・亜鉛の体内輸送に深く関わる金属キレート物質であるニコチアミンの生合成酵素遺伝子、 <i>NAS</i> を過剰発現させ、鉄・亜鉛の体内輸送を促進する。
方法 3	<i>HvNAS1</i> 、 <i>HvNAAT-A,-B</i> 、 <i>IDS3</i> ゲノム断片	イネ科植物の鉄獲得機構、亜鉛の体内輸送機構において重要な役割を果たす鉄・亜鉛キレート物質であるムギネ酸類の生合成を促進し、鉄の吸収と鉄・亜鉛の体内輸送を強化する。
方法 4	<i>35Spro-OsZIP4</i> <i>35Spro-OsYSL2</i> <i>Glbpro-OsYSL2</i> <i>OsSUT1pro-OsYSL2</i>	二価鉄ニコチアミンの膜輸送を担うトランスポーター遺伝子 <i>OsiYSL2</i> や、亜鉛トランスポーター遺伝子 <i>OsiZIP4</i> の発現を増加させ、鉄・亜鉛の体内輸送を強化する。

表 1 イネの白米中の鉄・亜鉛含有量を増加させるための方法

方法 1 に関しては、すでに後藤らによって *GluBpro-Ferritin* を用いた形質転換イネの作出と解析が報告されており、種子中の鉄含有量が 2 倍から 3 倍に増加することが確認されている(Goto et al.1999 *Net. Biotech.* **17**: 282-286)。ただし、この方法だけでは前述の目標には至っていない。また、フェリチンをさらに多く発現させても鉄含有量はそれ以上増加せず、鉄の吸収や体内輸送能力を強化しなければいけないことが示唆されていた(Qu et al. 2005 *Planta.* **222**:225–233)。

そこで、筆者はまず方法 3 に従い、オオムギのムギネ酸類生合成酵素遺伝子のゲノム断片のうち、*HvNAS1*、*HvNAS1+HvNAAT-A,-B*、*IDS3* をそれぞれ導入した 3 種類の形質転換イネを用いて、2006 年度、東北大学の複合生態フィールド教育研究センターの隔離圃場にて黒ボク土壌での栽培検定を行った。その結果、*IDS3* ゲノム断片を導入した組換えイネの白米における鉄、亜鉛含有量がそれぞれ 1.4 倍、1.35 倍に増加した(掲載論文 1 ; 第 3 章)。

次に、上記の方法 1 と方法 3 を組み合わせ、高鉄米 1 を作出した。鉄貯蔵タンパク質であるフェリチン遺伝子を胚乳特異的に発現させるコンストラクトと、オオムギのムギネ酸類生合成酵素遺伝子のゲノム断片、*HvNAS1*、*HvNAAT-A,-B*、*IDS3* を同時に導入したイネを作出した。ベクターには、将来的に実用化された場合を念頭に入れ、形質転換後に選抜マーカー遺伝子を外すことが可能なマーカーフリーベクターを用いた。約 100 系統の形質転換体を作成し、3 世代に渡って金属含有量の測定と選抜を行った。その結果、導入した 4 つの遺伝子すべてが発現する系統が得られ、白米の鉄含有量が 2 倍から 4 倍に増加した。(第 4 章)。

さらに、方法 2 に従い、オオムギのニコチアナミン合成酵素遺伝子 *HvNAS1* をイネの *Actin* プロモーター制御下で過剰発現させた。形質転換イネを作成し解析した結果、 T_1 植物体における地上部のニコチアナミン含有量は、非形質転換体に比べて 5 倍から 20 倍に増加した。また T_2 種子の白米中の鉄含有量が 3 倍に、亜鉛含有量が 2 倍に増加した系統が得られた(投稿準備中; 第 5 章)。

次に、方法 4 に従いトランスポーターを利用して植物体内の金属元素の輸送能力を高めることにより、種子中の鉄・亜鉛を増加させることを試みた。まず亜鉛トランスポーターである *OsZIP4* を過剰発現させれば、植物体内における亜鉛の輸送が活発となり種子の亜鉛含有量が増加するのではないかと考えた。しかしながら根における亜鉛含有量は 10 倍に増加したものの、予想に反して茎葉と種子における亜鉛含有量は 5 分の 1 に減少した(掲載論文 2; 第 6 章)。

また、*OsYSL2* は二価鉄ニコチアナミンのトランスポーターであり、鉄の篩管輸送に関わると考えられている。この *OsYSL2* の発現抑制体を解析したところ、白米中の鉄含有量が 3 割減少していた。そこで、*OsYSL2* がイネの種子への鉄の輸送に重要な役割を果たすことが示された。しかしながら *OsYSL2* の過剰発現体の場合にも、種子の鉄含有量は約 2 割減少した。*OsZIP4* と *OsYSL2* の過剰発現体の結果より、トランスポーター遺伝子を利用する場合は単に過剰発現させる方法は有効ではないと考えられた(第 7 章)。そこで、イネの維管束や胚乳組織の表層に強く発現し、イネの登熟期において白米にショ糖を多量に輸送するのに必須なショ糖のトランスポーターである *OsSUT1* の発現特性に着目した。この *OsSUT1* のプロモーター制御下で *OsYSL2* を発現させたところ、白米における鉄含有量が 2 倍から 4 倍に増加した(第 8 章)。

最後に、上記の知見に基づき方法 1,3,4 を組み合わせた。フェリチンを胚乳特異的に発現する遺伝子配列、ニコチアナミンを過剰発現する遺伝子配列、*OsSUT1* プロモーター制御下で *OsYSL2* を発現させる遺伝子配列等を同時にイネに導入し、高鉄米 4 または高鉄米 5 を作出した。その結果、白米における鉄含有量を最大で約 6 倍に増加させることに成功した(第 9 章)。

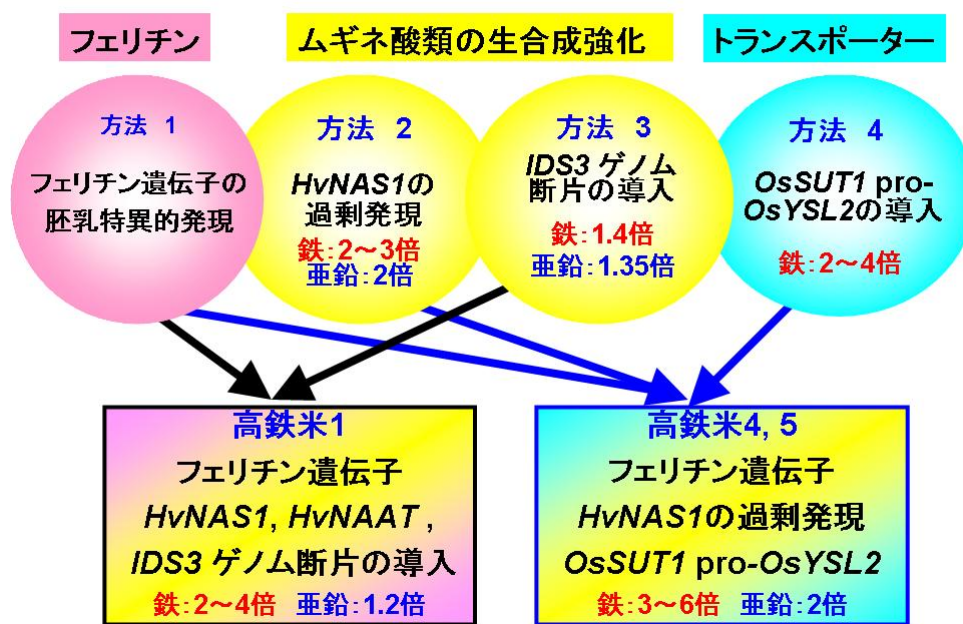


図1 ミネラル含有量増加戦略の概要と
非形質転換体に対する鉄・亜鉛含有量の増加率

結論として、亜鉛含有量を 2.5 倍に増加させるという目標は、おそらくニコチアナムン合成酵素を過剰発現させれば達成可能であることが示唆された。また、方法 1,3,4 を組み合わせたところ鉄含有量が最大で 6 倍に上がったことから、これにもう一つ何らかの方法を組み合わせれば鉄含有量を 10 倍にするという目標もおそらく達成可能であると考えられた。本研究により得られた知見はイネのみならずコムギやトウモロコシなどの他の重要な穀物にも応用可能である。本研究の成果が、ミネラル栄養価を高めた作物を作出することにより世界の鉄欠乏や亜鉛欠乏の人を減少させることに貢献することを期待している(第 10 章)。

掲載論文

1. Masuda, H., Suzuki, M., Morikawa, K.C., Kobayashi, T., Nakanishi, H., Takahashi, M., Saigusa, M., Mori, S. and Nishizawa, N.K. (2008) *Rice* 1:100-108.
2. Ishimaru, Y., Masuda, H., Suzuki, M., Bashir, K., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., and Nishizawa, N.K. (2007) *J.Exp.Bot.* 58: 2909-2915