

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 増田 寛志

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（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、鉄肥料の施用が考えられる。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ことが効果的であると考えられた。イネ種子の鉄・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いことが分かった。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強化することが重要であると考えた（第 2 章）。

イネにおける鉄・亜鉛の吸収と体内輸送に関する研究の知見に基づいて、イネ種子中の鉄・亜鉛含有量の増加に寄与すると想定される遺伝子と、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、以下のアプローチを考えた（表 1）。

	導入遺伝子	目的
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>OsYSL2</i> や、亜鉛トランスポーター遺伝子 <i>OsZIP4</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が、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。

そこで、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を導入した 3 種類の形質転換イネを用いて、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(第 3 章)。

次に、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 によって形質転換イネを作成し解析した。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(第 5 章)。

次に、方法 4 により、まず亜鉛トランスポーターを過剰発現させたが、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(第 6 章)。また、二価鉄ニコチアナミンのトランスポーター遺伝子 *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 割減少した。以上の結果より、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)。

次に方法 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)。

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が期待される(第 10 章)。

以上、本論文は植物の鉄と亜鉛栄養に関わる遺伝子を利用することによって、白米中のミネラル栄養価の高いイネの作出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。