

「極限環境状態における現象」

平成7年度採択研究代表者

森 敏

(東京大学大学院農学生命科学研究科 教授)

「極限ストレス土壌における植物の耐性戦略」

1. 研究実施の概要

世界の耕地土壌の40%を占める石灰質アルカリ土壌（主成分が炭酸カルシウム）では、土壌中に鉄があるが、鉄は水に溶けない状態になっていて、多くの作物は鉄を吸収することが出来ず、鉄欠乏症（黄白化症：クロロシスという）になって枯死する。これは葉緑素の生合成に必要な鉄が吸収できないために光合成（炭酸ガスの同化）が出来ないためである。石灰質アルカリ土壌でも、鉄欠乏症にならずに元気に生育するオオムギは、体内に鉄が無いというシグナルを感知すると「ムギネ酸」という化合物を根で大量に合成し、それを根から分泌し、土壌中の水に溶けにくい鉄を「鉄・ムギネ酸」錯体という水に溶ける形にして、そのまま根から吸収する能力を永い永い進化の過程で獲得している。このようにして、オオムギは石灰質土壌でも鉄欠乏症になりにくい形質を備えている。我々はこのオオムギの持つムギネ酸の複雑な生合成系路を解明し、鉄欠乏条件になったときに、その生合成系路を活発に働かせ、大量のムギネ酸を合成するのに必要な酵素の遺伝子群を単離（クローニング）した。そしてこの遺伝子を、石灰質アルカリ土壌ではムギネ酸の合成・分泌量が少ないために鉄欠乏症になりやすいイネに導入し、「鉄欠乏耐性スーパー・イネ」の作出に世界ではじめて成功した。このイネは水田状態ばかりでなく、畑状態でもきわめて旺盛に生育する。

2. 研究実施内容

2-1-1. *naat* cDNA を CaMV35S プロモーターとつないで遺伝子を全身で発現させた入れた形質転換イネの第2世代の石灰質土壌での生育は、新葉のクロロシス（黄白化症、鉄欠乏の典型的な症状）が直ったり、また出たりを繰り返して、（したがって図1で示すようにある系統では草丈の生育曲線に停滞時期がある）移植後2カ月あたりから急速に緑色が回復し正常な生育を示した。ベクターのみを導入した対照区のイネは極端な生育遅延を示した。（図1）（図2）。

naat のゲノム遺伝子（11kb）を丸ごと導入した形質転換イネ（第1世代）を直接石灰質土壌に移植した。このイネは遺伝子が鉄欠乏の根でのみ発現しているため

かその生育は、初期のクロロシス症状が軽く、その後はまったく鉄欠乏を示すことなく、ベクターのみを導入した対照区に比べて驚異的な成長を示した。(図3)(図4)。現在第2世代も生育の初期から旺盛な生育を示している。

naat 遺伝子が茎葉部で過剰に発現すると、体内ニコチアナミンを代謝してしまうので、鉄のキャリアーであるニコチアナミン欠乏になり、主として鉄の地上部への移行や転流が阻害されるので、クロロシスになる場合があることはすでに、この naat cDNA を CaMV35S プロモーターとつないで形質転換したタバコで確認している。

2-1-2. 以上のように、石灰質アルカリ土壌で旺盛に生育するイネの開発に成功したので、このイネを母本にして、高収量性、高品質の品種と掛け合わせるにより、石灰質アルカリ土壌での優良新種を開発したいと考えている。更に各国の研究者と共同研究を行い、それを世界の現地圃場で試験して、現地に適応した品種として開発したいと考えている。さらに、イネのインデイカ種への導入、トウモロコシへの導入、ソルガムへの導入を早急に行う予定である。後の二者はアメリカや中国が重視するアルカリ土壌での重要な作物であるので、ぜひ、成功させたいと考えている。そのためには、これらの大型作物を育成するP-2型隔離温室が更に必要である。

2-2-1. Al 抵抗性のソバの抵抗性機構について解析を行い、Al 排除機構として根から蔞酸が Al よって特異的に分泌され、その分泌は非常に迅速で、Al 処理後30分以内に起こり、分泌量は Al 処理濃度の増加につれ増加した。蔞酸は Al と錯体を作り、Al 毒性を軽減する作用を持っている。これがソバの Al 耐性機構の1つであると考えられる。葉においても Al と蔞酸が1:3の比率で無毒な錯体を形成していた。

2-2-2. タバコ培養細胞を栄養培地で Al 処理した場合、Fe が共存するときのみ脂質過酸化が増加し、増殖が阻害される。この脂質過酸化反応が増殖阻害の直接的な原因であることを脂溶性抗酸化剤を用いて明らかにした。一方、タバコ培養細胞から分離した Al 耐性細胞株において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性が通常の6.5倍も高く、フェニルプロパノイドが通常の1.0倍も蓄積しており、これらが Al 耐性物質の可能性が高い。

2-2-3. デファレンシャルスクリーニング法により11個の Al ストレス誘導性遺伝子を単離し、これを酵母に遺伝子導入して、高 Al 培地で Al 耐性クローンと思われるシロイヌナズナの BCB(blue copper binding protein)遺伝子とタバコ培養細胞由来の NtGDP(GDP dissociation inhibitor)遺伝子を選抜した。

2-2-4. オオムギ根を Al (1mg/L) で処理し、根の形態を CCD カメラを搭載したデジタルマイクロスコープでリアルタイムで観察した。

Al 処理後30分以内に根端から1mmの表皮表面に粗い起伏が生じた。約40分

後には根冠と表皮との境界から直径 60mm 程度の球状の塊が短時間（数秒から 2 分程度）の内に突出した。この部位の表皮下には、更に物質の蓄積が見られ、同時に表皮上の蓄積も増加した。このような球状塊の分泌は、根伸長の停止（約 50 分）以降急激に増加した。

低真空走査型電子顕微鏡(LV-SEM)での観察でも同様の球状塊の存在が確認された。また、根の伸長域では、表皮全体が分泌物でおおわれていることが明らかとなった。分泌物は、アニリンブルーで蛍光染色され、カロースと同定された。

2-2-5. このカロース合成は処理の Al 濃度に依存して増加した。また、根伸長速度は、Al 濃度とともに減少し、カロースの合成量と逆相関を示した。カロースは Al 処理後 30 分から急激に合成され、極めて短時間の内にカロース合成系が活性化されるものと考えられた。Al 処理後 1 時間に合成されたカロースは、Al 非処理の根伸長に必要なセルロース量の約 80%に匹敵する。カロースもセルロースもその合成には UDP-Glc を基質としているが、Al 処理のオオムギ根では UDP-Glc がカロースの急激な合成に費やされるものと推定される。その結果、最終的に根伸長を停止させたものと考えられた。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- Suzuki K, Itai R, Suzuki K, Nakanishi H, Nishizawa NK, Yoshimura E, Mori S: Formate dehydrogenase, an enzyme of anaerobic metabolism, is induced by iron deficiency in barley roots. *Plant Physiol.* 116,725-732 (1998)
- Kanazawa K, Higuchi K, Nakanishi H, Nishizawa NK, Mori S: Characterizing nicotianamine aminotransferase: Improving its assay system and details of the regulation of its activity by Fe nutrition status. *Soil Sci Plant Nutri* 44, 717-721 (1998)
- Masaoka Y, Chino M, Mori S: Amino acid sequence of proteins induced in Fe-deficient stressed Alfalfa (*Medicago sativa* L.) roots. *Soil Sci Plant Nutr* 44, 453-458 (1998)
- Mori S: Iron transport in graminaceous plants. in *Metal Ions in Biological Systems*. ed. by Sigel A and Sigel H. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong 215-238
- Yoshimura E, Kitai K, Nishizawa NK, Satake K, Mori S and Yamazaki S: Accumulation of metals and cellular distribution of Aluminum in the livewort *Scapania undulata* in acidic and neutral streams in Japan. *J. Environ Sci Health A33*, 671-680 (1998)
- 森 敏 植物資源と人間 「土と食糧」所収 日本土壌肥料学会編 朝倉書店 1998 年

- Higuchi K, Suzuki K, Nakanishi H, Yamaguchi H, Nishizawa NK, Mori S: Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol.* 119, 471-479 (1999)
- Nakanishi H, Bughio N, Matsubashi S, Ishioka NS, Uchida H, Tsuji A, Osa A, Sekine T, Kume T, Mori S: Visualizing real time [¹¹C]methionine translocation in Fe-sufficient and Fe-deficient barley using a positron emitting tracer imaging system (PETIS). *J Exp Bot* 50, 637-643 (1999)
- Kanazawa K, Higuchi K, Nakanishi H, Nishizawa N K, Mori S: Characterization of nicotianamine aminotransferase: Improvement of its assay system and the details of regulation of its activity by Fe nutrition status. *Soil Sci and Plant Nutri* 44,717-721(1998)

図1. 35S-naat-A
 遺伝子導入イネ
 (第2世代) の
 生育曲線

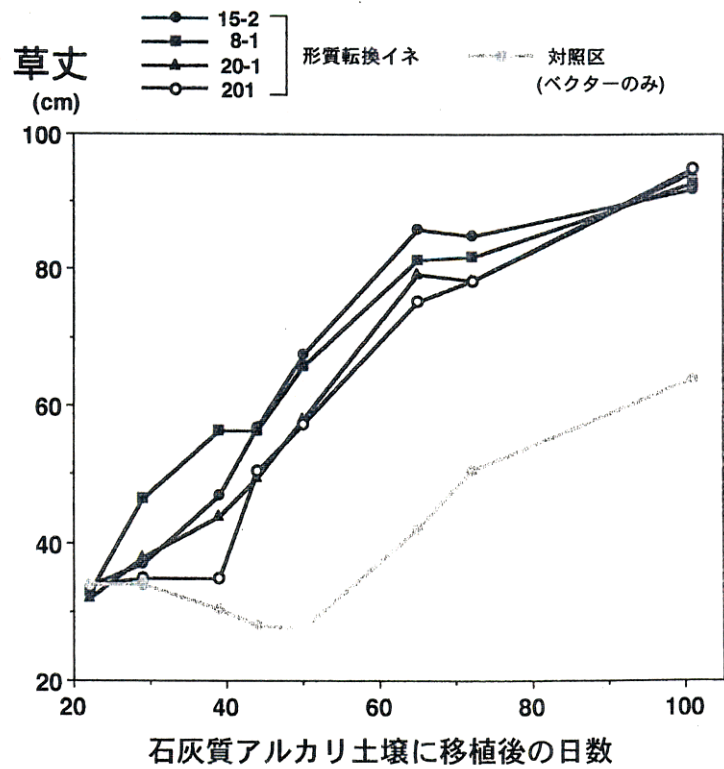


図2. 35S-naat-A
 遺伝子導入イネ
 (第2世代) の
 幼穂形成期の様相



図3. ゲノム *naat* 遺伝子
導入第1世代イネの
生育曲線 (草丈)

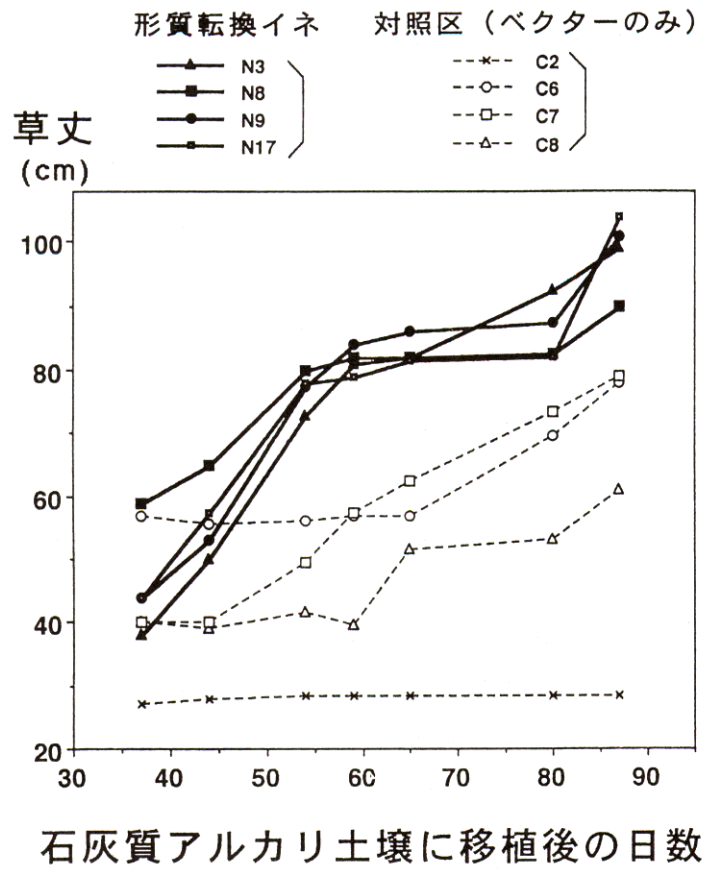


図4. ゲノム *naat* 遺伝子
導入第1世代イネの
栄養成長期と収穫期の様相

