

「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

本研究は世界の陸地の67%を占める、2種類の不良土壌であるアルカリ土壌と酸性土壌について、植物が進化的に持つ不良土壌耐性機構を解明し、その耐性に関係する遺伝子を改変強化して主要穀物に遺伝子導入することによって、不良土壌耐性穀物の作出を行おうとするものである。我々の15年以上にわたる研究の結果として本年、アルカリ土壌に関しては、オオムギの持つニコチアナミン・アミノ基転移酵素をイネに導入して、世界ではじめて、鉄欠乏耐性イネを作出した。酸性土壌に関してはアルミニウム含量200ppmという驚異的な濃度のアルミニウムイオンを含有する強酸性の草津温泉水に生息する「いでゆこごめ」からアルミニウム含有顆粒を同定した。関連タンパクの精製を行っている。

2. 研究実施内容

研究目的

2025年には80億人と予想される人口を支えるためには、現在の60億人の3割増の食糧生産が必要である。そのためには従来型の「高収量性品種を育成する」という、育種目標のみでは達成できない、不良土壌耐性穀物の作出が必須である。我々はその育種目標を「The Third Green Revolution」と呼んでいる。そのために、アルカリ不良土壌と、酸性不良土壌に対して感受性、あるいは耐性のメカニズムを解明し、最終的に不良土壌耐性穀物品種の作出を目指している。

方法

- (1) 過去において我々は、アルカリ土壌に適応した、イネ科作物のオオムギが天然の3価鉄のキレーターであるムギネ酸類を根から分泌する現象を解析し、オオムギ根におけるムギネ酸生合成経路を明らかにした。このムギネ酸生合成経路の中で、特に鉄欠乏処理によって強く誘導される酵素である、ニコチアナミン合成酵素と、ニコチアナミン・アミノ基転移酵素の遺伝子をクローニングした。後者の遺伝子を、「35S-プロモーター・*naat* cDNA」、あるいは「ゲノム*naat*」の形で鉄欠乏感受性であるイネ(品種: つきの光)から作成したカルスにアグロバクテリウム法で導入し、カルスからの再生体を直接アルカリ土壌(貝化石土壌)で収穫

期まで栽培し、鉄欠乏耐性を検定した。

- (2) オオムギのニコチアナミン合成酵素の遺伝子*nas1*をプローブにして、イネ、シロイヌナズナ、トウモロコシからのクローニングを試みた。
- (3) ニコチアナミン合成酵素と、ニコチアナミン・アミノ基転移酵素の抗体を作成し、これを用いて電子顕微鏡的immunocytochemistry法により細胞内局在をしらべた。
- (4) マクロアレイ法により鉄欠乏誘導性遺伝子のクローニングをおこなった。
- (5) イネを用いて、リンによるアルミニウム傷害の軽減効果とその機構を調べた。
- (6) 好熱・好酸性紅藻*Cyanidium caldarium*のAl耐性遺伝子の探索をおこなった。

結論

1. 「35S-プロモーター・*naat* c DNA」、あるいは「ゲノム*naat*」を導入したいずれの形質転換イネからも鉄欠乏耐性系統を得ることが出来た。前者の系統はさまざまな表現形が現れたが、後者の系統は比較的生育パターンがそろった系統が得られた。いずれも、1コピーから数コピーの導入遺伝子をもっていた。
2. ノーザン解析の結果、「ゲノム*naat*」の系統では鉄欠乏の根で*naat*-A、*naat*-Bが共に発現していたが、鉄欠乏の地上部でも*naat*-Aは弱く、*naat*-Bは強く発現していた。
3. イネから3種(*Osnas1*, *Osnas2*, *Osnas3*)、アラビドプシスから3種(*Atnas1*, *Atnas2*, *Atnas3*)、トウモロコシから1種(*Zmnas1*)の*nas*遺伝子をクローニングした。イネからはゲノム*nas*遺伝子もクローニングした。これを解析すると*Osnas1*と*Osnas2*が背中あわせに並んでいた。ドイツのグループが我々がオオムギの遺伝子(*Hvnas1* ~ *Hvnas7*)をクローニングした直後に、クローニングしたトマトの*nas* (*cln*と呼んでいる)などを含めて、これまでの*nas*遺伝子すべてを進化解析すると、双子葉タイプと単子葉タイプにきれいに分類された。
4. ニコチアナミン合成酵素は遺伝子の配列に1ヶ所疎水領域があることから膜貫通ドメインがあると考えられた。ニコチアナミン合成酵素の抗体を用いた電子顕微鏡的immunocytochemistry法による観察の結果、ムギネ酸顆粒の内膜側にこの酵素は接在していた。一方、ニコチアナミン・アミノ基転移酵素はやはりこの酵素の抗体を用いて電子顕微鏡的immunocytochemistry法による観察の結果、ムギネ酸顆粒の内部に存在していた。したがって、われわれが、15年前に見つけていた、粗面小胞体由来のムギネ酸顆粒となづけていた顆粒が、やはりムギネ酸合成の場であることが確認された。この顆粒はオオムギ根がムギネ酸を分泌する前にふくらみ、ムギネ酸を分泌した後にはしぼんで粗面小胞体に戻ることがわかっている。
5. 鉄欠乏誘導性遺伝子の更なるクローニングを行った。*IDI1*となづけた遺伝子は、鉄欠乏オオムギ根でムギネ酸の前駆体であるメチオニン供与に關与するメチオニ

ンサイクル (Yang cycle) を駆動させる酵素の遺伝子であることが判明した。他に *IDI2* から *IDI7* まで 6 つの遺伝子をクローニングした。鉄欠乏耐性との関係で、これらの遺伝子の機能を解明している。これら以外にわれわれがこれまでにあきらかにした鉄欠乏誘導性の遺伝子群は、ニコチアナミン合成酵素、ニコチアナミンアミノ基転移酵素、ギ酸脱水素酵素、アデニンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ、ムギネ酸合成酵素 (デオキシムギネ酸 (2') 水酸化酵素)、エピハイドロキシムギネ酸合成酵素 (ムギネ酸 (3 - C) 水酸化酵素) である。

6 . 従来 *Ids3* 遺伝子としてクローニングしていた遺伝子が「ムギネ酸合成酵素遺伝子」であることを、このゲノム遺伝子をイネに導入して、通常、イネが鉄欠乏条件下ではデオキシムギネ酸しか分泌しないにも関わらず、この形質転換イネが、デオキシムギネ酸ばかりでなくムギネ酸まで分泌したことにより証明した。

7 . イネにおけるアルミニウム傷害は、種々の生育条件でその程度が異なってくる。ここでは、前処理中のPの有無に絞り、AIのイネの植物体内における動態と存在形態について調べた。Arkansas(イネAI耐性種)を発芽後種子栄養で6日間育て、その後春日井氏液P(+)]あるいはPを含まない春日井氏液[P(-)]で、pH 4.3の条件で7日間水耕栽培を行った。根を洗浄後、AI 300 ppmを含む水耕液で7日間処理した。AI処理後4、5日目からP(-)区の植物体で古い葉から黄化が観察され、P(+) 区の植物体と比べて地上部で明確な生育の差が観測された。AI濃度は、根部ではP(+) 区がP(-) 区より高く、逆に地上部ではP(+) 区の方がP(-) 区より低かった。lumogallionによるAIの染色から、P(-)、P(+) 両区の第一葉で、表皮細胞の細胞壁もしくは膜への局在が明らかとなった。根部のCP/MAS 27Al-NMRスペクトルから、AIはリン酸と結合せず、 Al^{3+} の周りに酸素原子が正八面体型に配位した構造をとっているものと推定された。

イネにおいて、AIを根部に集積させ地上部への移行を抑えることによる個体レベルでの耐性機構の存在が示唆され、この機構の中に多量必須元素であるリン酸が深く関与している事が明らかとなった。これらの詳細な機構は未だ不明であるが、リン酸の前処理による細胞壁や原形質膜の構造変化、あるいは何らかのエネルギー代謝機構が関与していると考えられる。

8 . *Cyanidium caldarium* はAIに対して強い耐性を示す。この原因遺伝子の単離を目的とした。AIを含む培地で培養した*C. caldarium* からcDNAライブラリーを作製し、これを酵母(*S. cerevisiae*)に形質転換し、プレート法でAI耐性遺伝子の探索を行った。スクリーニングで得られたプラスミドを、再度、酵母に導入し、アルミニウム耐性を確認した。今回は、このうちの一つであるNo.15のクローンについての解析を行った。3 mMのアルミニウムを含む培地で培養すると、No.15を導入した酵母では鉄濃度が増加し、カルシウム濃度が減少していた。他の金属については、

大きな差異は認められなかった。従って、このタンパク質の機能として、カルシウムの流入の防止、あるいは鉄の吸収の促進が考えられた。No. 15 cDNAは一つのopen reading frameを持つ全長874 bpのcDNAで、201個のアミノ酸からなる24.3 kDa、pI 9.5のタンパク質をコードしていた。このタンパク質のアミノ酸配列はイチゴ (*Fragaria ananassa*) のLow Molecular Weight Heat Shock Proteinと高いホモロジーを示した。このタンパク質は、様々なストレス条件下でのタンパク質の安定に関わるシャペロンとして働いていると想像されており、Alストレス下で不安定化したタンパク質の活性の維持に関わっている可能性が考えられる。今後、この遺伝子を導入したAl耐性植物の創成が可能になるものと考えられる。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Yamaguchi H., Nakanishi H., Nishizawa N. K., Mori S. Induction of the IDI1 gene in Fe-deficient barley roots: a putative enzyme that catalyses the methionine salvage pathway for phytosiderophore production. *Soil Science and Plant Nutrition* 46:1-9(2000)

Higuchi K., Nakanishi H., Suzuki K., Nishizawa N. K., Mori S. Presence of nicotianamine synthase isozymes and their homologues in the root of graminaceous plants. *Soil Science and Plant Nutrition* 45(3): 681-691 (1999).

Higuchi K., Suzuki K., Nakanishi H., Yamaguchi H., Nishizawa N. K., Mori S. Cloning of nicotianamine synthase genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiology* 119(2): 471-480(1999).

Mori S. Iron acquisition by plants. *Current Opinion of Plant Biology* 2: 250-253(1999).

Nakanishi H., Bughio N., Matsubashi S., Ishioka N. S., Uchida H., Tsuji A., Osa A., Sekine T., Kume T., Mori S. Visualising real time [¹¹C]methionine translocation in Fe-sufficient and Fe-deficient barley using a positron emitting tracer imaging system (PETIS). *Journal of Experimental Botany* 50: 637-643(1999).

Oki H., Yamaguchi H., Nakanishi H., Mori S. Introduction of the reconstructed yeast ferric reductase gene, *refr1*, into tobacco. *Plant and Soil* 215: 211-220(1999).

Sakaguchi T., Nishizawa N. K., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S. The role of potassium in the secretion of mugineic acids family phytosiderophores from iron-deficient barley roots. *Plant and Soil* 215: 221-227(1999).

Suzuki K., Higuchi K., Nakanishi H., Nishizawa N. K., Mori S. Cloning of nicotianamine synthase genes from *Arabidopsis thaliana*. *Soil Science and Plant Nutrition* 45: 993-1002(1999).

Takahashi M., Yamaguchi H., Nakanishi H., Shioiri T., Nishizawa N. K., Mori S. Cloning two genes for nicotianamine aminotransferase, a critical enzyme in iron acquisition (Strategy II) in graminaceous plants. *Plant Physiology* 121: 947-956(1999).

.Etsuro Yoshimura, Seiji Nagasaka, Yoshiyuki Sato, Kenichi Satake and Satoshi Mori : Extraordinary high aluminium tolerance of the acidophilic thermophilic algae, *Cyanidium caldarium* Soil Sci. Plant Nutr. (1999) 45, 721-724.

Maiko Kaneko, Etsuro Yoshimura, Naoko K. Nishizawa and Satoshi Mori : Time course study of aluminum-induced callose formation in barley roots as probed by digital microscopy and low-vacuum scanning electron microscopy. Soil Sci. Plant Nutr. (1999) 45, 701-712.

Shie-Jea Lin, Takayoshi Wakagi, Hiroshi Matsuzawa and Etsuro Yoshimura : Lanthanum binding to aqualysin I, a thermostable serine protease, as probed by Lanthanum-139 nuclear magnetic resonance spectrometry. Inorg. Biochem. 77(3/4), 205-208 (1999).

Etsuro Yoshimura, Tamami Sakaguchi, Hiromi Nakanishi, Naoko K. Nishizawa, Izumi Nakai and Satoshi Mori : Characterization of the chemical state of iron in the leaves of wild-type tomato and nicotianamine-free mutant chloronerva by X-ray absorption near-edge structure (XANES) . Phytochem. Anal.(2000) 11, 160-162.

Etsuro Yoshimura, Rinya Kobayashi, Kazuo Furihata, Hideyuki Kajiwara and Sunao Yamazaki: ¹H and ¹³C NMR spectral assignment of phytochelatin. Magnetic Resonance in Chemistry (2000), 38, 141-142.

著書 吉村悦郎 : 酸性雨研究と²⁷Al-NMR分光法 in 酸性雨研究と環境試料分析、佐竹研一 編 (愛智出版) 2000年3月