

極限ストレス土壌における植物の耐性戦略

—アルカリ土壌耐性イネとタバコの創製—

森 敏 東京大学農学生命科学研究科 教授

1. はじめに

2025年には確実に人口が現在の60億から80億に増加する。それにもかかわらず、人為による土壌劣化のために、一人当たりの穀物耕作面積が25年後には現在の0.12 haから0.08 haに低下すると予想されている（World Watch 研究所）。今後は、開墾による優良土壌の確保が期待できないので、地球上の不良土壌での食糧増産が緊急の課題となりつつある。ところが、これまでの育種家は優良土壌での生産能率の高い品種を育種選抜してきたので、栽培作物の選抜の過程で必然的に不良土壌耐性に係わる種々の未知遺伝子を脱落させてきたと考えられる。そこでわれわれは、世界の不良土壌のうちの25%を占める石灰質アルカリ土壌に特有の症状である鉄欠乏症に対して耐性（すなわち鉄欠乏になりにくい）の作物を、異種間の遺伝子導入法によって創製することを1983年ころから考えて研究を進めてきた。

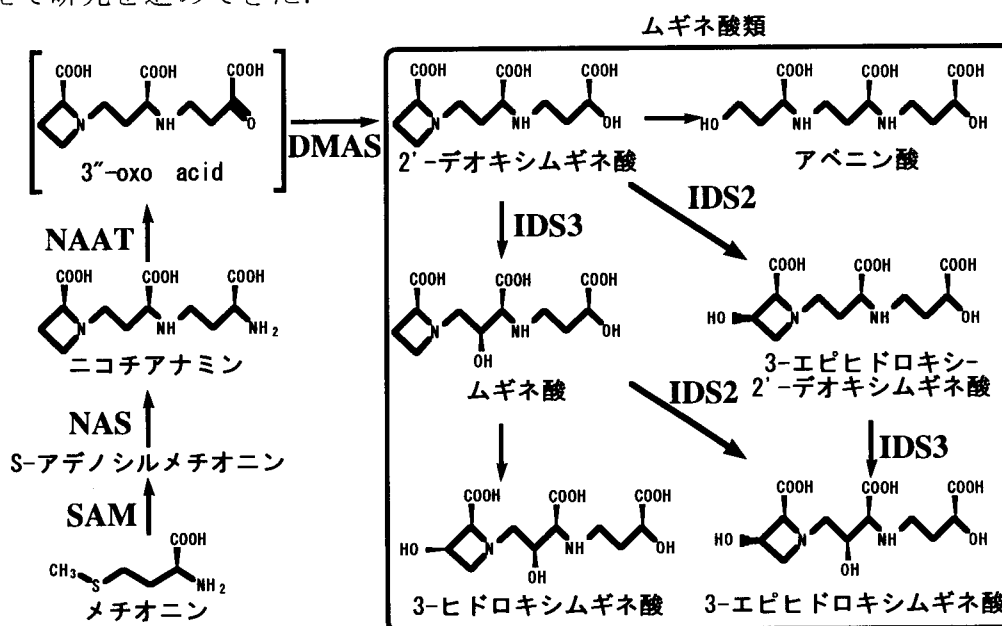


図1 オオムギ根のムギネ酸生合成経路と関連酵素

2. ムギネ酸生合成経路の確定

イネ科植物の中でも最もアルカリ土壌に耐性であるオオムギは、アルカリ土壌で不溶態である鉄を可溶化するために、根から3価鉄イオンのキレーターであ

るムギネ酸を根圏に分泌する。われわれはこのオオムギの根で働いているムギネ酸の生合成経路を1986-1990年のうちに確定した(図1)。またこの生合成経路に係わる酵素(図1)の遺伝子群をつい最近までにすべてクローニングした。ムギネ酸合成酵素(IDS3)とヒドロキシ・デオキシムギネ酸合成酵素(IDS2)の遺伝子はデファレンシャルスクリーニング法によりクローニングした。ニコチアナミン合成酵素(NAS)とニコチアナミンアミノ基転移酵素(NAAT)の遺伝子は酵素精製法ののちにCNBr分解した部分アミノ酸配列情報を基にPCR法によりクローニングした。デオキシムギネ酸合成酵素(DMAS)はオキシドリダクテースの共通配列から、巧妙なPCR法により、s-アデノシルメチオニン合成酵素(SAM)は塩基配列のホモロジーから、それぞれクローニングした。SAM遺伝子以外はすべて未知のものであった。また、SAM遺伝子以外はすべて鉄欠乏処理により2日以内にオオムギの根に遺伝子発現が誘導されることが確認された。

3. 鉄欠乏耐性イネの創製

これらの遺伝子のうち、イネ科植物のみが特有に進化的に獲得したと考えられたオオムギのNAAT酵素の遺伝子のゲノム断片(*naatB*と*naatA*が隣り合ってタンデムに乗っている)を、イネ(品種:月の光)のカルスにアグロバクテリウム法で遺伝子導入し、カルスからの再生個体をアルカリ土壌に移植して、鉄欠乏耐性の検定を行ない、最後まで生育した優良株(図2)を選抜した。対照区(野生株)

はほとんど生育しなかった。

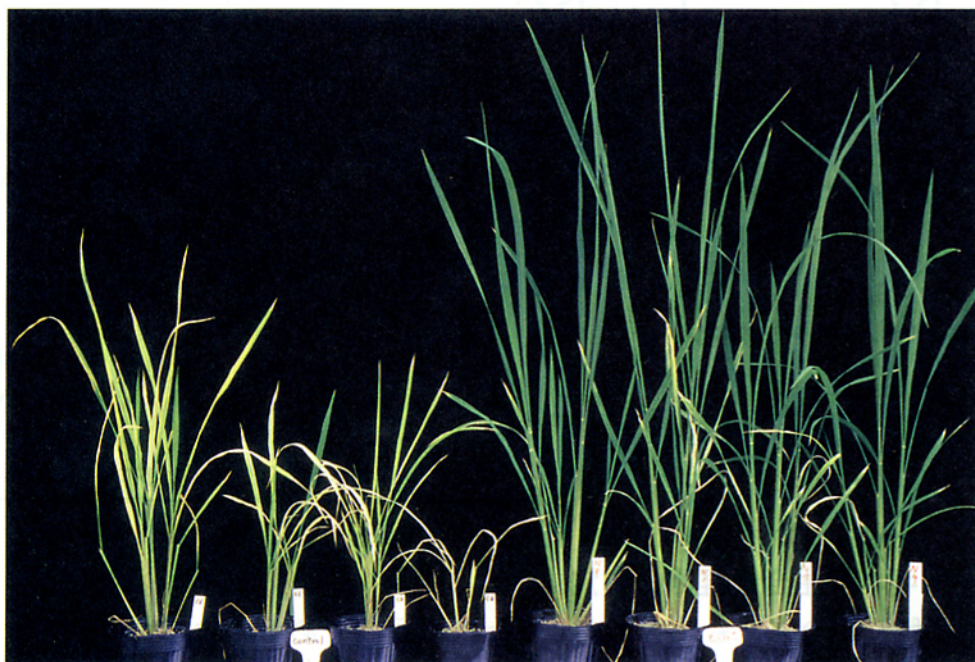


図2. アルカリ土壌での遺伝子導入鉄欠乏耐性イネ

4. 鉄欠乏耐性タバコの創製

イネ科以外の植物は、根の細胞膜表層で3価鉄イオンを2価鉄イオンに還元して、この2価鉄イオンを細胞膜表層の2価鉄イオン・トランスポーターで吸収する。この3価鉄イオン還元酵素活性がアルカリ土壌条件下での鉄欠乏耐性に高い相関があることが知られている。われわれが1997年に遺伝子導入実験を開始しようとしたときには、まだ植物から3価鉄還元酵素の遺伝子はクローニングされていなかった(これはRobinson Nらにより1999年にクローニングされた)。そこで、われわれは、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の3価鉄イオン還元酵素の遺伝子, *FRE1*, をタバコに導入した。ところが、この遺伝子は途中までしか転写されておらず、酵素活性が発現しなかった。そこでこの遺伝子の暗号(コドン)をタバコ用に全面的に書き直して全翻訳領域(Open Reading Frame)を転写する様に改変した遺伝子, *refre1*, を全合成して、全身発現用プロモーター(35S)につないでこれをタバコに導入したところ、根で強い活性が検出された。つぎに、この遺伝子をさらに、アルカリ側でも強い活性を有する酵素にするために、さらに改良を加えた。すなわち、人為的に変異を導入する試験管内進化(*in vitro* evolution)の方法を適用し、高いpHでも野生株の数倍から数十倍の活性を有する酵素の遺伝子 *refre1:1* を取得した。これをタバコに導入して、アルカリ土壌でも花が咲き、実がなるタバコを創製した。野生株は生長点が壊死して全く生殖生長が押さえられた。このようにしてアルカリ土壌耐性タバコの創製に成功した(図3,

右4ポット).



図3. 酵母の3価鉄還元酵素遺伝子を導入したアルカリ土壌耐性タバコ

5. おわりに

初期の目的である、遺伝子導入法によるアルカリ土壌耐性作物(イネとタバコ)の創製に成功した。これらの種子の中からホモラインを選抜し(現在進行中), それらを将来交配する育種の素材(母本)として使うつもりである。すなわち, このイネを用いて食品としての優良形質を持つイネと交配し, アルカリ不良土壌で生育する優良イネ(高品質)への品種改良をおこない増産することができる。イネ以外にトウモロコシにも同様の遺伝子を導入し, 飼料作物の増産にも貢献したいと考えている(現在進行中)。今回われわれが作出したタバコは食糧ではないが, ここで用いたわれわれが開発した *refrel:1* 遺伝子を他の栽培作物(ダイズ, ポテト, トマト, 等の双子葉作物)に遺伝子導入して, つぎつぎと, アルカリ土壌耐性の品種を作出することが可能である。また, この遺伝子を果樹や樹木(アカシヤ, ユーカリなど)にも導入して, アルカリ砂漠土壌の緑化にも貢献できる。世界の石灰質不良土壌の1%が緑化されるだけでも, 試算によれば日本が1年間に排出している炭酸ガスの10倍量を吸収する事ができる。また, われわれが取得したタバコの変異株の中には, 重金属を異常に還元して体内に集積する系統株もあるので, これを用いて重金属汚染土壌からの重金属の収奪という環境修復への貢献も期待できる。

6. 主要発表論文

Takahashi M. et al.(2001) Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature biotechnology* in press.

Higuchi K. et al.(2001) Nicotianamine synthase gene expression differs in barley and rice under Fe-deficient conditions. *Plant Journal* 25: 159-168.

Kobayashi T. et al. (2000) In-vivo evidence that *Ids3* from *Hordeum vulgare* encodes a dioxygenase that converts 2'-deoxymugineic acid to mugineic acid in transgenic rice. *Planta* (in press)

Yamaguchi H. et al (2000) Induction of the IDI1 gene in Fe-deficient barley roots: a gene encoding a putative enzyme that catalyzes the methionine salvage pathway for phytosiderophore production. *Soil Sci Plant Nutr* 46: 1-9

Itai R. et al.(2000) Induced activity of adenine phosphoribosyltransferase (APRT) in iron-deficient barley roots: a possible role for phytosiderophore production. *J Exp Bot* 51: 1179-1188

Oki H. et al.(1999) Introduction of the reconstructed yeast ferric reductase gene, *refrel*, into tobacco. *Plant and Soil* 215: 211-220.

Nakanishi H. (1999) Visualizing 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.

Suzuki K.(1998) Formate dehydrogenase, an enzyme of anaerobic metabolism, is induced by iron deficiency in barley roots. *Plant Physiology* 116: 725-732