

称号及び氏名	博士（学術） Sustiprijatno
学位授与の日付	平成18年3月31日
論文名	「METABOLIC ENGINEERING OF A JAPONICA RICE TO INCREASE NITROGEN USE EFFICIENCY BY INTRODUCING A CHLOROPLAST-TYPE NITRITE TRANSPORTER」 (葉緑体型亜硝酸トランスポーターの導入により日本型イネの窒素収率を改善するメタボリック・エンジニアリング)
論文審査委員	主査 高橋 正昭 副査 汐見 信行 副査 北村 進一

論文要旨

はじめに

イネはアジア、オセアニア、中南米、アフリカ中南部、北米などにおいて広く耕作されている。米収は5億6000万トンを超え（1996年）、世界人口の半分を支える重要な食糧資源である。食糧作物としてイネは反当のカロリー収量が他の穀類よりも高く世界の食糧を支えるためには最も適当な作物であるが、世界の有効耕作面積の1/10がそのためには必要である。予測では2020年までに米を主食とする人口は2倍になる。この人口増と耕作地の減少を考えると、より収穫効率の良い耕作法とイネ品種の改良が焦点の課題となっている。

イネの収量水準を最も左右するものは窒素の施肥量である。灌漑水田では、窒素の施肥量を60 kg/haから120 kg/haに増やすと早生では1 ha当たり2トンを超える収量増が期待される。嫌気的な水田土壌中では施用されたアンモニウム塩は酸化を受けず、また、硝酸塩は微生物の硝酸呼吸により還元されアンモニウム態として存在する。低湿地を好む半水生植物であるイネはこのアンモニアを効率よく窒素源として吸収利用する様に進化し、また、米の味を重視しタンパク臭を抑えた品種への改良により窒素代謝能の益々低い品種が好まれ、窒素肥料の施肥管理と合わさって硝酸代謝の抑制されたイネ品種が主流となっている。

硝酸同化では硝酸がまず硝酸還元酵素(NR)により亜硝酸に還元され、ついで亜硝酸還元酵素(NiR)によりアンモニアに還元される。イネは硝酸を効率よく同化できる植物に匹敵す

る NR と NiR 活性を持っているにもかかわらず亜硝酸を蓄積し、効率の良い硝酸同化を行わず好アンモニア植物と呼ばれる。硝酸同化過程では細胞質から葉緑体に亜硝酸を輸送するトランスポーターが働いていることが土壌植物栄養学研究室において明らかにされ、さらに、その亜硝酸トランスポーター遺伝子が好硝酸植物において始めてクローニングされた。申請者は亜硝酸の葉緑体への輸送がイネでは効率よく行われていないと推定し、好硝酸植物の亜硝酸トランスポーターを導入することにより、イネを硝酸も有効に利用できる作物に改変することを試み、以下の成果を得た。

第 1 章 形質転換イネの作出

形質転換イネの作成は Hiei 等の方法を用いた。日本型イネ (*Oryza sativa* L. japonica cv. Nipponbare) の種籾の胚盤から誘導したカルスにアセトシリゴン存在下で *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 株を感染させて遺伝子を導入し、ハイグロマイシン (50 mg L⁻¹) を含むプレート上で増殖を続けるカルスから個体を再生 (T₀) させ、自家受粉させて後代 (T₁、T₂) を得た。pBluescript に挿入されたキュウリ葉緑体型亜硝酸トランスポーター cDNA (*CsNitr1-L*) を *Xba*I および *Sac*I で切り出しバイナリーベクター *pIG121Hg* の *Xba*I-*Sac*I 部位に挿入し *pBI121Hg::CsNitr1-L* を構築した。*pBI121Hg::CsNitr1-L* を用いて形質転換した *A. tumefaciens* EHA101 を *CsNitr1-L* 形質転換イネの作成に用い、T₀ イネの葉片をハイグロマイシンに浸し、緑色を保っている系統を形質転換イネとしサザン分析により *CsNitr1-L* の導入を確認した。また対照として、*pIG121Hg* を持つ *A. tumefaciens* EHA101 を感染させて *GUS* (β-グルクロニダーゼ) 形質転換イネを作成し、活性染色により遺伝子導入を確認した。

第 2 章 *CsNitr1-L* 形質転換イネにおける硝酸利用の改善

イネは窒素源としてアンモニアを好む。非形質転換イネ、*GUS* 形質転換イネ、および、*CsNitr1-L* 形質転換イネともにアンモニアを与えるとほとんど生育速度に違いがなく、外見も窒素過剰や欠乏症状を示さない。硝酸 (3 mM) を単一窒素源とすると前 2 系統のイネは生育が遅れ、発芽後 2 週目から硝酸栄養に変えた 5 週間の栽培中にアンモニアに比べて約 2 週間の生育の遅れを生じた。一方、*CsNitr1-L* 形質転換イネは、異なった形質転換カルスから得た系統ごとに生育速度は少し異なるが、全ての *CsNitr1-L* 形質転換イネ系統が非形質転換イネや *GUS* 形質転換イネよりも生育が良く、中でも T₁₋₆ 株は硝酸を窒素源としてもアンモニアを与えられた時と同等の生育を示した。高濃度の硝酸 (30 mM) 存在下では全ての系統で第 6 葉期まで分化したが非形質転換イネおよび *GUS* 形質転換イネの草丈は低く葉にはクロロシスがあり硝酸の過剰障害が認められた。*CsNitr1-L* 形質転換イネには全くクロロシスが出ず、また、草丈も 1.5 倍以上になるなど、硝酸が効率よく利用されていた。

第 3 章 *CsNitr1-L* 形質転換イネの亜硝酸利用

植物根は亜硝酸を能動吸収する機構を持たない。しかし、弱酸性の培地では亜硝酸は無電荷の酸の形で拡散により植物内に入る。好硝酸植物は亜硝酸を窒素源として生育可能であるがイネは枯死する。硝酸アンモニウムで生育させたイネを亜硝酸培地に移すと非形質転換イネと *GUS* 形質転換イネは 2 週間のうちに枯死した。*CsNitr1-L* 形質転換イネは、それらとは全く異なり顕著な亜硝酸障害も受けず、正常に生育を続け、亜硝酸を窒素源の一つとして利用することができた。

第 4 章 硝酸同化酵素および代謝物蓄積に対する *CsNitr1-L* 導入の影響

CsNitr1-L 形質転換イネの NR 活性は非形質転換体と変わらなかったが、NiR 活性はわずかに高い値を示した。亜硝酸の還元が行われている日中の葉の亜硝酸の定常濃度は非形質転換体に比較して 1/3 以下に低下し、一般的に亜硝酸が毒性を示すレベル以下になっていた。硝酸の定常濃度も約 80% に *CsNitr1-L* 形質転換イネでは低下していた。これは亜硝酸還元促進の結果還元型の窒素化合物が増加し、硝酸トランスポーターの発現を抑制した結果であると考えられる。亜硝酸濃度の低下には硝酸還元からの亜硝酸の供給速度の減少もわずかに寄与していると考えられるが、主に亜硝酸輸送の促進により消費速度が増加した結果であると推定した。

第 5 章 *CsNitr1-L* 形質転換イネの光エネルギー利用効率の改善

葉緑体内での亜硝酸の還元は光合成の電子伝達系で造られた還元力を必要としている。亜硝酸還元促進は光合成の還元力をより有効に利用することに直結する。*CsNitr1-L* 形質転換イネの光エネルギー利用効率をクロロフィルの蛍光消光により測定した。*CsNitr1-L* 形質転換イネ、非形質転換イネおよび *GUS* 形質転換イネともに蛍光の誘導からみてほとんど同じ光化学系の活性を持っていたが、要求量を超える光化学反応を回避する機構の指標である非光化学的消光(non-photochemical quenching)は、*CsNitr1-L* 形質転換イネでは非形質転換イネや *GUS* 形質転換イネに比較して遅く現れ、亜硝酸還元への還元力の必要量が増していることが認められた。

第 6 章 *CsNitr1-L* 形質転換イネカルスの増殖

コシヒカリのカルスは褐変を起こして増殖が停止する。遺伝子導入されたカルスから個体を再生させる方法では数多くの形質転換体を得ることが困難である。カルス増殖の障害となっているのは亜硝酸の蓄積であることが示唆されている。本研究では亜硝酸の蓄積を軽減する機能を発現する *CsNitr1-L* を無菌処理した玄米に *A. tumefaciens* を用いて導入すれば、その種子から脱分化させたカルスのうち盛んに増殖するカルスを選抜することによってコシヒカリの形質転換体を得ることが出来るのではないかと考えた。この *in planta* 感染を受けた後に増殖するコシヒカリの胚盤カルスの大部分は同時に T-DNA にコードされていた抗生物質耐性を示すことから、*CsNitr1-L* は植物由来の形質転換マーカーとしてコシヒ

カリシステムの形質転換に用いることが出来ることを明らかにした。

まとめ

1. キュウリの葉緑体型亜硝酸トランスポーター遺伝子を日本型イネのカルスに導入し形質転換イネ (*CsNitr1-L* 形質転換イネ) を作成した。
2. *CsNitr1-L* 形質転換イネは硝酸を窒素源として用いてもアンモニアに匹敵する生育を示した。
3. イネは *CsNitr1-L* の導入により亜硝酸により生育障害を受けず、窒素養分として利用し成長することができるようになった。
4. イネ葉中の亜硝酸含量は *CsNitr1-L* の導入により非形質転換イネの 1/3 以下になった。
5. *CsNitr1-L* の導入により光合成で作られた還元力の利用効率が増加した。
6. *CsNitr1-L* 遺伝子のイネ種子への *in planta* 導入により、コシヒカリ系統でも胚盤カルスが活発に増殖するようになった。この機能を利用して新たな形質転換の選抜マーカーを開発した。

近年の環境中硝酸濃度の増加は飲料水の硝酸汚染を導き、健康を心配するレベルに近づいている。硝酸を栄養分として有効に利用し生育できるイネは灌漑水の硝酸濃度を下げ硝酸汚染を防ぐと同時に、肥料を節約でき、今後の品種改良の方向を示すものである。

審査結果の要旨

コメは世界人口の半分を支える重要な食糧資源である。食糧作物としてイネは反当のカロリー収量が他の穀類よりも高く世界の食糧需要に応えるためには最も適当な作物である。2020年までにコメを主食とする人口は倍加すると予測され、同時に問題となる耕作地の減少を考えると、より収穫効率の良い耕作法とイネ品種の改良が焦眉の課題となっている。

イネの収量水準を最も左右するものは窒素の施肥量である。低湿地を好む半水生植物であるイネは硝酸よりもアンモニアを窒素源として利用するように進化し、また、米の味を重視しタンパク臭を抑えた品種への改良により窒素代謝能の益々低い品種が好まれ、硝酸代謝の抑制されたイネ品種が主流となっている。イネは効率の良い硝酸同化を行うことができず、硝酸同化の中間体である亜硝酸を体内に蓄積する。硝酸同化過程では細胞質から葉緑体に亜硝酸を輸送するトランスポーターが働いていることが土壌植物栄養学研究室において明らかにされ、さらに、その亜硝酸トランスポーター遺伝子が始めてクローニングされた。申請者は亜硝酸の葉緑体への輸送がイネでは効率よく行われていないと推定し、好硝酸植物の亜硝酸トランスポーターを導入することにより、硝酸も有効に利用できるイネに改変するメタボリック・エンジニアリングを試み、以下の成果を得ている。

1. 日本型イネ(*Oryza sativa* L. japonica cv. Nipponbare)ゲノムにはキュウリ葉緑体型亜硝酸トランスポーター(*CsNitr1-L*)のホモログが2種コードされ、そのうち双子葉植物に近いホモログはRT-PCRによりほとんど発現しないことを確認した。そこで、亜硝酸輸送能を向上させた *CsNitr1-L* 形質転換イネを *Agrobacterium tumefaciens* 感染法を用いて作出した。

2. 非形質転換イネ、*GUS*(β -glucuronidase)形質転換イネ、および、*CsNitr1-L* 形質転換イネともにアンモニアではほとんど生育速度に違いがなく、外見も窒素過剰や欠乏症状を示さないが、硝酸(3 mM)では前2系統のイネは生育が遅れた。一方、全ての *CsNitr1-L* 形質転換イネ系統は、硝酸を窒素源としてもアンモニアを与えられた時と同等の良い生育を示した。高濃度の硝酸(30 mM)存在下では非形質転換イネおよび *GUS* 形質転換イネの草丈は低く葉には黄化が認められたのと比較して *CsNitr1-L* 形質転換イネには全く黄化葉が出ず、また、草丈も1.5倍以上になるなど、硝酸が効率よく利用されていた。

3. 亜硝酸の能動吸収機構がない植物根にも弱酸性の培地では自由拡散により植物内に入る。硝酸アンモニウムから亜硝酸培地に移すと非形質転換イネと *GUS* 形質転換イネは2週間のうちに枯死したが、*CsNitr1-L* 形質転換イネは正常に生育を続け、亜硝酸を窒素源として利用した。

4. *CsNitr1-L* 形質転換イネでは、葉の亜硝酸濃度は非形質転換体に比較して1/3以下に低下し、一般的に亜硝酸が毒性を示すレベル以下になっていた。亜硝酸輸送の促進により消費速度が増加した結果であると推定している。

5. *CsNitr1-L* 形質転換イネ、非形質転換イネおよび *GUS* 形質転換イネのクロロフィル蛍光のキネティックスの解析から、*CsNitr1-L* 形質転換イネでは、非形質転換イネや *GUS* 形質転換イネに比較して、亜硝酸還元への光合成電子伝達系で生成された還元力の必要量が増していることを認めた。

6. コシヒカリのカルスは亜硝酸の蓄積により褐変を起こして壊死し、形質転換体を得ることが困難である。亜硝酸の蓄積を軽減する機能を発現する *CsNitr1-L* をコシヒカリ玄米に *A. tumefaciens* を *in planta* 感染させて導入し、次いで活発に増殖するカルスを選抜することによりコシヒカ리를形質転換する方法を開発した。*CsNitr1-L* はコシヒカリだけでなく広く形質転換植物の選抜に応用できることを示し、これまでの細菌由来の薬剤耐性遺伝子を用いない新しい方法を提案している。

近年の環境中硝酸濃度の増加は飲料水の硝酸汚染を導き、健康を心配するレベルに近づいている。硝酸を栄養分として有効に利用し生育できるイネは灌漑水の硝酸濃度を下げ硝酸汚染を防ぐと同時に、肥料を節約でき、今後の品種改良の方向を示すものである。以上に記載された成果は、植物栄養学やイネの育種学の発展に対し貢献するところが大きく、本論文の審査ならびに最終試験の結果を併せて、申請者に対し、博士(学術)の学位を授与することを適当と認める。