

氏名	佐々木 明正
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第4984号
学位授与の日付	平成26年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	植物の金属の吸収・分配に関する輸送体遺伝子の同定
論文審査委員	教授 馬 建鋒 教授 佐藤 和広 准教授 且原 真木

学位論文内容の要旨

土壌中にある金属元素は植物の生育にとって必要不可欠なものと有害なものが含まれている。したがって、これらの金属の輸送機構を理解することは作物の生産性と安全性において非常に重要である。根による金属元素の吸収、根から地上部への輸送及び体内での分配に様々なトランスポーターが関与していると思われるが、その多くはまだ未同定である。本研究では、イネの *Nramp* (Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins) ファミリーに属する機能未同定の *OsNramp5* と *OsNramp3* について金属輸送における役割を解析した。

OsNramp5 は各生育時期を通して主に根で発現し、他の部位での発現は僅かであった。また根では、基部側が先端部より発現が高かった。各種必須金属欠乏に対する *OsNramp5* の発現応答を調べた結果、マンガン、鉄、銅、亜鉛のいずれの欠乏によっても発現が誘導されず、恒常的に発現していた。抗体染色で *OsNramp5* の組織・細胞局在性を調べた結果、*OsNramp5* は根の内皮と外皮細胞に局在していた。しかも、これらの細胞の遠心側に偏在する極性局在を示した。また GFP との融合遺伝子をタマネギの表皮細胞に発現させて細胞内局在を観察したところ、*OsNramp5* は細胞膜に局在していた。この遺伝子の役割を明らかにするために T-DNA 挿入による遺伝子破壊株を取得し、生理的な解析を行った。まず、野生株と破壊株を通常条件で水耕栽培し、生育及び地上部と根の金属濃度を比較した。その結果、破壊株の地上部と根の生育は野生株と比べ、低下していたが、その生育阻害は培養液中のマンガン濃度を増やすことによってかなり回復された。またマンガン、カドミウム濃度が野生株に比べ破壊株で劇的に減少していた。さらに、地上部の鉄濃度も破壊株で減少していたが、亜鉛と銅の濃度は野生株と破壊株との間に差がなかった。土耕栽培を行った結果、野生株と比較して破壊株の籾収量が著しく減少し、破壊株の玄米中のマンガンとカドミウム濃度が大幅に低下していた。さらに、野生株と破壊株の根を用いてマンガンとカドミウムの短期吸収実験を行った結果、破壊株ではマンガン、カドミウム吸収能力がほとんど損なわれていた。以上の結果より、*OsNramp5* はイネの根において主要なマンガンとカドミウムの吸収を担うトランスポーターであると考えられる。

一方、*OsNramp3* は主に節で発現していた。GFP との融合遺伝子をタマネギの表皮細胞に発現させて細胞内局在を観察したところ、細胞膜に局在していた。マンガン、鉄吸収欠損酵母変異体を用いて相補性試験を行った結果、*OsNramp3* はマンガンを輸送できることが明らかとなった。この遺伝子の役割を解析するために T-DNA 挿入株を用いて、生理的な解析を行った。マンガン欠乏処理を行い、野生株と破壊株の生育を比較した結果、マンガン欠乏処理下では破壊株は新葉に顕著なクロロシスを示して生育が阻害され、破壊株の根端にはネクロシスが見られた。この時の地上部と根のマンガン濃度は野生株と破壊株との間にほとんど差はなかった。しかし、詳しく部位別のマンガン濃度を比較したところ、破壊株の新葉のマンガン濃度及び根端のマンガン濃度が野生株と比べ、著しく減少していた。以上の結果より、節に局在する *OsNramp3* は、主にマンガンを新葉や根の先端など必要な器官に優先的に分配するために機能していると考えられる。

論文審査結果の要旨

本研究では、イネの Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins) ファミリーに属する機能未同定の OsNramp5 と OsNramp3 について金属輸送における役割を解析した。

OsNramp5 は主に根で発現しており、また基部側が先端部より発現が高かった。その発現はマンガン、鉄、銅、亜鉛のいずれの欠乏によっても誘導されなかった。抗体染色で OsNramp5 の組織・細胞局在性を調べた結果、OsNramp5 は根の内皮と外皮細胞の遠心側に局在していた。また GFP との融合遺伝子をタマネギの表皮細胞に発現させて細胞内局在を観察したところ、OsNramp5 は細胞膜に局在していた。この遺伝子を破壊すると、地上部と根の生育は野生株と比べ、低下していたが、その生育阻害は培養液中のマンガン濃度を増やすことによってかなり回復された。またマンガン、カドミウム濃度が野生株に比べ破壊株で劇的に減少していた。土耕栽培を行った結果、野生株と比較して破壊株の籾収量が著しく減少し、破壊株の玄米中のマンガンをカドミウム濃度が大幅に低下していた。さらに、野生株と破壊株の根を用いてマンガンとカドミウムの短期吸収実験を行った結果、破壊株ではマンガン、カドミウム吸収能力がほとんど損なわれていた。以上の結果より、OsNramp5 はイネの根において主要なマンガンとカドミウムの吸収を担うトランスポーターであると考えられる。

一方、OsNramp3 は主に節で発現していた。GFP との融合遺伝子をタマネギの表皮細胞に発現させて細胞内局在を観察したところ、細胞膜に局在していた。マンガン、鉄吸収欠損酵母変異体を用いて相補性試験を行った結果、OsNramp3 はマンガンを輸送できることが明らかとなった。この遺伝子の T-DNA 挿入株を用いて、マンガン欠乏処理を行い、野生株と破壊株の生育を比較した結果、マンガン欠乏処理下では破壊株の新葉に顕著なクロロシスを示して生育が阻害され、破壊株の根端にはネクロシスが見られた。この時の地上部と根のマンガン濃度は野生株と破壊株との間にほとんど差はなかった。しかし、詳しく部位別のマンガン濃度を比較したところ、破壊株の新葉のマンガン濃度及び根端のマンガン濃度が野生株と比べ、著しく減少していた。以上の結果より、節に局在する OsNramp3 は、主にマンガンを新葉や根の先端など必要な器官に優先的に分配するために機能していると考えられる。

これらの成果はすでに国際誌に 2 本の論文として公表されており、博士学位論文として十分に値すると判定した。