

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名: 鈴木雄二

2. 養成カリキュラム名: 「難溶性リン酸の可溶化能力を強化したユーカリの作出及び分子生理学的解析」

3. 養成カリキュラムの達成状況

3年間で予定した植物栄養吸収能力(酸性土壌耐性)の向上を2年間でほぼ達成した。次年度からこれまで得られた成果をもとに野外環境で実証する段階に移行する。一方、これまで研究を担当した養成技術者・鈴木氏は養成技術者を退職し、東北大学に採用(平成16年度)となったが、王子製紙が実施する実証研究の一部を産学連携によって継続する予定で進めている。

4. 成果

酸性土壌では施肥リンの多くが土壌中のAlやFeと結合して、難溶性リン酸塩を生成し利用効率が低下する。昨年度までの研究により、難溶性リン酸の可溶化にはクエン酸の放出量を増やすことが効果的であることが明らかになっている。さらに、TCA回路のクエン酸合成酵素(CS)の発現量増加及びNADP特異的イソクエン酸脱水素酵素(NADP-ICDH)の発現量の低下が、クエン酸放出能力に関与することが示唆されていたため、それぞれの遺伝子あるいは両遺伝子の組換えによる効果をシロイヌナズナで検証した。CSを単独で過剰発現させた場合、CS活性が野生型の2倍増加した形質転換体においては酸性土壌からのリン酸吸収量と個体生育量がそれぞれ30%および40%増加することがこれまでに明らかとなっている。NADP-ICDHの発現抑制を行った組換え体においても予備的ではあるが同様にポジティブな結果が得られている。これら両遺伝子を同時に組換えしたシロイヌナズナについては現在解析を継続している。

モデル植物で得られた結果から、ユーカリにそれぞれの遺伝子を導入し、難溶性リン酸の可溶化効果を調査した。まずCS過剰発現ユーカリをリン酸アルミニウムを含む水耕液で栽培し、根におけるCS活性は野生型と比べ最大で2.2倍に増加していた。このとき、根のクエン酸含量に形質転換体と野生型との間で差は認められなかったものの、リンゴ酸含量が形質転換体において増加した(図1)。しかし、CS活性の増加が最大であった形質転換体(CS19)では、根からのクエン酸放出量が増加した(図2)。これらのことから、ユーカリにおいてCS過剰発現は根からのクエン酸放出能の強化に貢献することが示唆された。

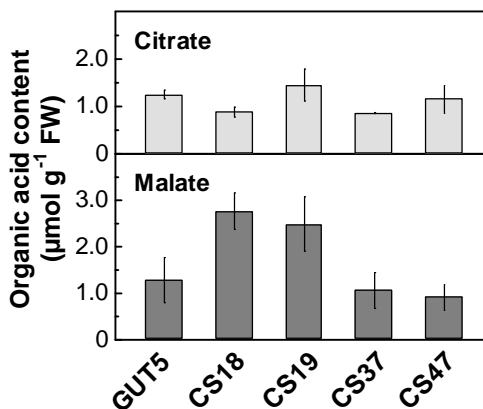


図1. 野生型およびCS過剰発現ユーカリの根のクエン酸およびリンゴ酸の含量

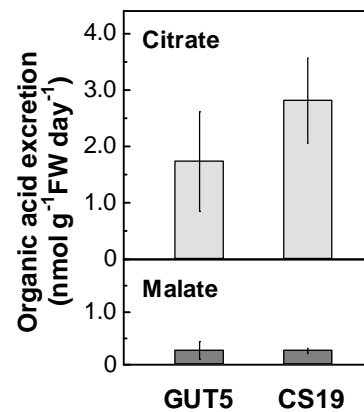


図2. 野生型ユーカリおよびCS過剰発現ユーカリCS19の根からのクエン酸およびリンゴ酸の放出量

次に、リン酸アルミニウムを含む水耕栽培した野生型ユーカリおよびユーカリ形質転換体 CS19 のリン含量を測定した。野生型においては老化葉のリン含量は若い葉の約半分に低下していたが、CS19 においては大きな低下は認められず、CS19 の老化葉のリン含量は野生型の 1.8 倍であった。リン欠乏の症状は老化葉などの古い組織から現れることが知られているが、形質転換体では野生型と比べその症状が緩和されていた。これらのことから、CS 過剰発現ユーカリでもシロイヌナズナで得られた結果と同様に、難溶性リン酸の可溶化能が強化されることでリン吸収が改善されることが強く示唆された。さらに、野生型ユーカリおよび CS19 を酸性土壌で栽培し、その個体生育について評価することとした。栽培開始後 3 ヶ月目の樹高、枝数、葉数および最大枝長において CS19 が野生型ユーカリを上回る傾向にあった。栽培開始後 4 ヶ月目に地上部および根の新鮮重を測定したところ、いずれも CS19 の方が高く、特に根では 24% の重量増加が認められた(図 3)。以上より、ユーカリにおいて CS 過剰発現は酸性土壌での生育をある程度改善させることが強く示唆された。



図 3. 酸性土壌で 4 ヶ月栽培した野生型ユーカリおよび CS 過剰発現ユーカリ CS19 の個体生育

さらに NADP-ICDH の発現抑制を行ったユーカリに関する解析を行った。早生分枝の段階で NADP-ICDH の酵素活性を指標にスクリーニングを行い、活性の低下が大きかったものに関しては植物体への再分化を行った。その結果、根における NADP-ICDH 活性が野生型のそれぞれ 32% および 50% にまで低下した 2 ラインを得ることができた。現在はこれらの形質転換体の土耕法による生育調査および有機酸代謝関連の試験に関する準備を平行して行っているところである。

ユーカリにおいて CS 過剰発現は根からクエン放出を促進し、難溶性リン酸からリン吸収能力を強化するため、酸性土壌における生育が改善する結果を得た。また、細胞質型 NADP-ICDH の発現抑制は体内の窒素経済に大きな障害を引き起こすことなく同様の効果を示すことがシロイヌナズナにおいて強く示唆された。このため、現在行っている NADP-ICDH RNAi 形質転換体ユーカリにおいても好結果が期待される。本プロジェクトの研究を通じて、世界中に広く存在する酸性土壌による植物の生育阻害の問題は、遺伝子組換えにより解決できる可能性が強く示唆された。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表

- Suzuki Y, Hibino T, Kawazu T, Wada T, Kihara T and Koyama H (2003) Extraction of total RNA from leaves of *Eucalyptus* and some other woody and herbaceous plants using sodium isoascorbate. *BioTechniques* 34:988-90, 992-3.
- Kihara T, Wada T, Suzuki Y, Hara T, Koyama H (2003) Alteration of Citrate Metabolism in Cluster Roots of White Lupin. *Plant Cell Physiol.* 44: 901-908.

(2) 口頭発表

- Suzuki Y, Hibino T, Kawazu T, Wada T, Kihara T and Koyama H.; Extraction of total RNA from leaves of *Eucalyptus* and some other woody and herba

- ceous plants using sodium isoascorbate. *Plant Biology* 2003, Honolulu, Hawaii, 25-30 July 2003.
- Kawazu T, Suzuki Y, Kondo K, Wada T, Koyama H.; Overexpression of a plant mitochondrial citrate synthase in *Eucalyptus* trees. *Plant Biology* 2003, Honolulu, Hawaii, 25-30 July 2003.
 - Suzuki Y, Kawazu T, Wada T, Hara T and Koyama H.; Characteristics of transgenic *Eucalyptus* hybrids with an overexpression of a plant mitochondrial citrate synthase. The 2nd International Symposium on Phosphorus Dynamics in the Soil-Plant Continuum. Perth, Western Australia, 21-26 September 2003.
 - Suzuki Y, Kawazu T, Wada T, Hara T and Koyama H.; Characteristics of transgenic *Eucalyptus* hybrids with an overexpression of a plant mitochondrial citrate synthase. The 3rd International Symposium on the Dynamics of Physiological Process in Woody Roots. Perth, Western Australia, 29 September to 03 October 2003.
 - 和田 巽、鈴木雄二、河津 哲、近藤啓子、小山博之；「難溶性リン酸存在下でのクエン酸合成酵素の過剰発現ユーカリの有機酸代謝の応答および生育」日本土壌肥料学会2003年度年会（神奈川）2003年8月20-22日
 - 鈴木雄二、小山博之、原 徹夫、河津 哲；「難溶性リン酸存在下で生育した低リン酸耐性ニンジン培養細胞の窒素利用特性」日本土壌肥料学会2003年度年会（神奈川）2003年8月20-22日
 - 鈴木雄二ら「Characteristics of transgenic *Eucalyptus* hybrids with an overexpression of a plant mitochondrial citrate synthase.」日本植物生理学会2004年度年会 平成16年3月27日

(3) 特許等

特になし