

日本学術会議 公開シンポジウム

21世紀の食糧・環境問題解決に向けて  
—植物栄養学からのアプローチ—

講演要旨集

日時：2002年11月2日

場所：東京大学弥生講堂

主催：日本学術会議土壌・肥料・植物栄養学研究連絡委員会

共催：(社)日本土壌肥料学会、日本ペドロロジー学会、

日本土壌微生物学会、日本土壌動物学会、

後援：(独)農業技術研究機構、(独)農業環境技術研究所

## プログラム

司会 山本洋子(岡山大学)

1. 10:00 – 10:10 「開催にあたり」

熊澤喜久雄(日本学術会議・土壌・肥料・植物栄養学研究連絡委員会委員長)

司会 西尾道徳(筑波大学)

2. 10:10 – 10:40 「植物栄養学とは」

米山忠克(東京大学大学院)

3. 10:40 – 11:20 「光合成と近未来環境—Rubisco 量を減じた形質転換体イネから学ぶこと—」

前 忠彦(東北大学大学院)

4. 11:20 – 12:00 「イネの窒素代謝と生産性向上—葉の老化は稔りのため」

山谷知行(東北大学大学院)

12:00 – 13:00 昼休み

司会 犬伏和之(千葉大学)

5. 13:00 – 13:40 「生物的窒素固定を活用した植物生産と環境保全」

大山卓爾(新潟大学)

6. 13:40 – 14:20 「ホウ素から見た植物細胞壁の働き」

間藤 徹(京都大学大学院)

7. 14:20 – 15:00 「鉄代謝遺伝子を健康・食糧・環境に役立てよう」

森 敏(東京大学大学院)

15:00 – 15:20 コーヒーブレイク

司会 岡崎正規(東京農工大学)

8. 15:20 – 16:00 「酸性土壌に多い毒性アルミニウムによる植物の傷害と抵抗性の仕組み」

松本英明(岡山大学)

9. 16:00 – 16:40 「植物による環境浄化(ファイトレメディエーション)—重金属超集積植物と

その利用—」

長谷川 功(日本大学)

10. 16:40 – 17:20 総合討論

司会 吉羽雅昭(東京農業大学)

11. 17:20 – 17:30 「閉会の辞:植物栄養学から作物栄養学へ」

三枝正彦(社団法人日本土壌肥料学会会長、東北大学大学院)

# 目 次

開催にあたり	1
熊澤喜久雄(日本学術会議・土壌・肥料・植物栄養学研究連絡委員会委員長)	
植物栄養学とは	3
米山忠克(東京大学大学院)	
光合成と近未来環境—Rubisco量を減じた形質転換体イネから学ぶこと—	9
前 忠彦(東北大学大学院)	
イネの窒素代謝と生産性向上一葉の老化は稔りのため	17
山谷知行(東北大学大学院)	
生物的窒素固定を活用した植物生産と環境保全	23
大山卓爾(新潟大学)	
ホウ素から見た植物細胞壁の働き	31
間藤 徹(京都大学大学院)	
鉄代謝遺伝子を健康・食糧・環境に役立てよう	35
森 敏(東京大学大学院)	
酸性土壌に多い毒性アルミニウムによる植物の傷害と抵抗性の仕組み	43
松本英明(岡山大学)	
植物による環境浄化(ファイトレメディエーション)—重金属超集積植物と その利用—	51
長谷川 功(日本大学)	
閉会の辞:植物栄養学から作物栄養学へ	59
三枝正彦(社団法人日本土壌肥料学会会長、東北大学大学院)	

## 開催にあたり

日本学術会議土壌・肥料・植物栄養学研究連絡委員会  
委員長 熊澤喜久雄

日本学術会議は、我が国の人文・社会科学、自然科学全分野の科学者の意見をまとめ、国内外に対して発信する日本の代表機関です。科学が文化国家の基礎であるという確信のもとに、科学の向上発達を図り、行政、産業及び国民生活に科学を反映、浸透させることを目的として設置されています。そのために必要な個別的な研究領域における科学者の意見を集約し活動する基礎として研究連絡委員会があります。

土壌・肥料・植物栄養学研究連絡委員会は、日本土壌肥料学会、日本ペドロジー学会、日本土壌微生物学会、日本動物学会の関係者により構成されており、これらの学会の責任領域を中心に、基礎から応用に至る広い範囲の問題を取り上げ、その正しい発展のために活動をしてきました。当面する社会的諸問題とこれらの領域における研究との結びつきを強め、研究成果の社会的還元と普及のために、多くの公開シンポジウムを開催してきました。今までに開催されたシンポジウムの課題と内容については、日本土壌肥料学会のホームページ ([http://www.soc.nii.ac.jp/jssspn/info/scj\\_sympo.html](http://www.soc.nii.ac.jp/jssspn/info/scj_sympo.html)) に掲載されています。

本年度はとくに「植物栄養学」領域における研究を取り上げ、21世紀の世界の当面している食糧問題、環境問題に対する積極的アプローチの内容を広く知り合い、また社会的な認識を深めるために、公開シンポジウムを開催しました。

20世紀の科学の発展は、人類の福祉を増進させたが、その反面、工業化の進展は、都市への過度の人口集中、化石エネルギーとその副産物の過度の使用、様々な産業廃棄物や生活廃棄物などの大量発生により、自然の物質循環のバランスを地域的にも、また地球規模でも崩し、大きな環境問題を惹き起してきました。

2025年には79億にも達しようとする人口の増大の反面、土壌の流亡、砂漠化、塩類集積、アルカリ土壌化、酸性土壌化など、多方面にわたる土壌破壊が進行し、さらに地球温暖化の進行は気象条件の不安定化に伴う干魃、洪水、塩害被害の増大などが予測されています。これらの結果として作物生産力の増強を妨げ食料不足状態の到来が懸念されるようになってきました。このような疲弊した土壌資源を回復し、地球温暖化ガスの増加と、エネルギー・資源の枯渇を防ぎながら、食糧生産の維持と向上を図るため、土壌学・肥料学・植物栄養学分野の研究者は国際的・国内的に多方面な調査・研究・普及・啓蒙活動をしています。

有史以来、人口の増大をまかなうために食糧の増産がなされてきましたが、それを可能にしたものは農業関連諸科学技術の発達であります。その中核をなすものは、栽培植物の育種・改良と土壌の植物栄養分の供給力増強でありました。植物は与えられた環境に適応し、あるいは積極的に環境を改変し、大気及び土壌から必要とする養分・水分を摂取し、様々な化合物を合成・蓄積しています。そのような主体的な能力を研究開発してきた植物の栄養に関する学問すなわち植物栄養学が古くから発展してきたのは言うまでもありません。わが国においても近代農学の発展のはじめより実学としての植物栄養学の講義と研究がなされ、時代の要請に応えて多方面の発展をしてきました。

21世紀に向かって、いわゆるバイオの時代が開け、バイオテクノロジー、あるいはゲノムサイエンスが発展し、文部科学省の科学研究費の分類においても、複合新領域にゲノム科学が新設になり、細目の応用ゲノム科学にはキーワードに示されているように、産業植物ゲノム、産業微生物ゲノム等が入っています。土壌肥料・植物

栄養学研連も植物栄養分野、微生物分野などに関係する研究が多いので、応用ゲノム科学対応研連に加わっています。

与えられた不良環境を克服し植物の栄養要求を満たすことは、食料生産の基礎ですが、とくに植物主体の意識的改造による乾物生産能力の開発、有用物質生産蓄積能の増強、環境適応性の増大、不良環境の改良能の発掘などには多く期待が寄せられています。共生的窒素固定能やリン酸吸収能の増強は化石エネルギー消費の節減のためにも大きな役割を果たします。

本日のシンポジウムはこれらの面における関係領域の最新の成果の紹介と、その社会的意義や発展方向などについて討論し、植物栄養学のさらなる発展に対する期待をまじえて、研究者相互の共通理解を得るとともに、社会的認知度を高め、さらに斯学に対する若い世代の積極的参加を期待しようとするものであります。

おわりに、本シンポジウムの開催に際して、共催、後援の労を惜しまなかった多くの関係者、並びに多忙の中、講演を準備された講師の方々の積極的な協力に感謝致します。

日本学術会議第18期 土壌・肥料・植物栄養学研究連絡委員会委員

熊澤 喜久雄	東京大学名誉教授 (委員長)
石橋 信義	佐賀大学名誉教授
犬伏 和之	千葉大学園芸学部生物生産科学科教授
岡崎 正規	東京農工大学大学院生物システム応用科学研究科教授
西尾 道德	筑波大学農林工学系教授
浜崎 忠雄	(独)農業環境技術研究所農業環境インベントリーセンター長
山本 洋子	岡山大学資源生物科学研究所教授
吉羽 雅昭	東京農業大学応用生物科学部教授
米山 忠克	東京大学大学院農学生命科学研究科教授

# 植物栄養学とは

東京大学大学院農学生命科学研究科

米山忠克

## 1. はじめに

「植物栄養学」は、日本では「肥料学」から 1965～70 年に展開したものです。

「肥料学」では、有機肥料そして第二次大戦後の「化学肥料」の創製、そして工場での大量生産によって、農業生産の現場即ち水田や畑では「化学肥料」によって植物の必要とする「養分」を供給することによって「最適」に支えられることになった。これは次いでおこる農薬による作物の「適切」な防御と対応するもので、工場で生産された「合成資材」によって、従来の **natural resources** (自然資源) に全面的に依存するシステムから、農業生産は、新たに「合理的生産制御」の時代となり、農業生産の手段が大変豊かになりました。

一方、これらの「新しい技術」の基盤を支える主要な学問として、「肥料学」はその”核”又は”基礎”として「植物栄養学」を目指すようになりました。”植物栄養学 **plant nutrition**”では、植物-農業生産の現場では主に作物をさしますが、その周辺植物の雑草も含まれます-の「栄養 **nutrients**」を研究します。”動物の栄養”には、糖、タンパク質、脂肪、ビタミンなどの有機物を中心として、これにミネラルが入ります。このミネラルも多くの場合”食物”の中に含まれるもので、単独で摂取されることはほとんどありません。これに対して”植物の栄養”では、その大部分が元素あるいは無機態の低分子として、植物に吸収されます。植物では無機の元素から、体内の酵素反応によって低分子の基質(すなわち、糖、有機酸、アミノ酸)や微量活性分子(これは最近注目されているシグナル物質)に変換されます。動物例えば人間では、こうした低分子基質や活性物質であるいくつかのアミノ酸やビタミンを合成することが出来ませんが、植物では、無機物からすべてを合成できます。このあと、植物は生存と生産、生殖(次世代生産)に必要な高分子を合成していきます。最後の代謝の多くは、動物-人と共通しています。要約すると、植物の”栄養”は、無機元素の吸収それから低分子の”基質物質”と”活性物質(シグナル物質)”の生産、そして、高分子物質を合成して成長し、作物では人間のための「食物生産」になる過程をさします。これまで植物栄養の研究では、その一部である栄養元素の吸収、栄養元素の同化(低分子の合成)そしてタンパク質など高分子の合成など、その一部が強調された時がありますが、私は、植物栄養は上記の一連の連続した体系的な過程の合成であると考えています。

もう一つ重要なことは、植物のみならず生物はそのおかれた環境の中で生存し、成長することです。植物の環境には、土壌、水、大気、光、温度などがあります。植物の栄養となる元素は、土壌、水、大気を循環する物質から獲得され、適度の光、温度により生体の反応が進み、栄養分の体内利用がなされます。”肥料”の多くは土壌や水の養分が不足する時に添加されるものですが、植物にポテンシャルがある時、多量の”肥料”を施用することで植物(作物)の養分獲得量を増して、最終的な生長量を増大させ、この時人間の食物となる部分(種子、葉など)を特に増大させたり、その成分組成を”食物品質”として良いもの(より多くのビタミン、少ない毒性物質)にすることがなされ、これが”栽培管理”とよばれるものです。

## 2. 「植物栄養学」の内容

具体的に、現在の「植物栄養学」の内容と課題を示します。

その一つは、平成13年12月発刊の「植物栄養学」(森 敏、前 忠彦、米山忠克編、文永堂出版)です。その目次は以下のようです。日本の多くの植物栄養、生理研究者によるものです。

#### I. 植物栄養学とは

1. 陸上植物の進化
2. トランスポーターの機能分化
3. 必須元素の意味するもの
4. 持続的農業に向けて
5. 文明の盛衰

#### II. 植物にとっての必須元素、有用元素

1. 必須元素、必須栄養素、有用元素の定義
2. 植物体を構成する元素とその存在比(菌類・動物との比較、土壌との比較、植物間の比較(栄養特性))
3. 気圏、水圏、土壌圏の物質循環と植物の必須栄養素獲得(物質循環と植物の必須栄養素獲得、耕地生態系の必須栄養素循環)

#### III. 植物による必須栄養素の吸収と移行

1. 必須栄養素と水の吸収、移行と植物構造(根・茎・葉・子実・維管束の構造)
2. 根圏での必須栄養素の動き(根への移動、移動に影響する因子、植物の作用)
3. 根による必須栄養素の吸収機構(無機イオンの吸収、膜吸収の駆動力、受動輸送、能動輸送、輸送体タンパク質の構造とその遺伝子、低分子有機化合物の吸収、高分子有機化合物の吸収と小胞輸送)
4. 必須栄養素、代謝産物および水の体内移動(シンクとソースの概念、シンプラストとアポプラスト、細胞間移行、器官間移行)

#### IV. 炭素同化、炭素代謝

1. 光合成のメカニズム(葉緑体、光合成の仕組み、その他の光合成反応)
2. 呼吸と炭素代謝(呼吸の場と基質、細胞質における代謝、ミトコンドリアにおける代謝、生合成における呼吸の役目、呼吸に影響する環境要因)
3. 光合成産物の転流と蓄積

#### V. 窒素同化、窒素代謝

1. 硝酸、アンモニウム、尿素の吸収と同化(硝酸・アンモニウム・尿素の供給、アンモニウムと硝酸の吸収・同化、硝酸の吸収同化の制御)
2. 窒素代謝(アミノ酸代謝、タンパク質合成と制御)
3. 共生的窒素固定(窒素固定の役割、メカニズム、関連遺伝子)

#### VI. 植物の成育と栄養システム

1. 多量必須元素(窒素、リン、カリウム、イオウ、カルシウム、マグネシウム)
2. 微量必須元素(鉄、マンガン、銅、亜鉛、ニッケル、モリブデン、ホウ素、塩素)

#### VII. 植物の成育と有用元素

1. ケイ素(吸収、移行、集積、有用性)
2. ナトリウム(有用性、必須性、塩害)
3. アルミニウム(存在形態、有用性、吸収と移行、過剰障害)
4. コバルト
5. その他の元素

#### VIII. 植物栄養と肥料

1. 施肥と食糧増産(施肥と生産性、肥料の種類)
2. 施肥と環境負荷(農業による環境負荷、低負荷農業)

#### IX. 植物栄養とバイオテクノロジー

1. 植物バイオテクノロジーの基礎知識(植物遺伝子の構造とタンパク質、未知遺伝子の検索と同定、遺伝子導入、形質転換系の利用)
2. バイオテクノロジーを用いた作物生産性の改良(炭素代謝、窒素代謝、品質関連)
3. 栄養ストレス耐性(乾燥ストレス、アルミニウム過剰、低リン酸、鉄欠乏)
4. クリーンアップ植物(重金属収奪植物、有害有機化合物汚染土壌の修復、NO<sub>x</sub>を“好む”植物)

次は、東京大学農学部3年私の授業「植物栄養学」です。その主なテーマは

植物栄養学 冬学期

1. イネの栄養生理:植物栄養とは？(1)
2. イネの栄養生理:植物栄養とは？(2)
3. 植物のC固定と生産
4. 植物のN吸収、代謝、転流
5. 植物-微生物による窒素固定
6. 共生 Symbiosis
7. 植物の導管、篩管による物質転流と情報伝達 (林 浩昭)
8. 植物のSとBの吸収と代謝 (藤原 徹)
9. 植物のP獲得と代謝
10. 植物によるK、Ca、Mg の吸収、機能
11. 植物によるFe、Cu、Zn、Mn、Ni、Mo の獲得、機能
12. 植物の栄養ストレスの機作
13. 植物の代謝研究における生元素同位体自然存在比の利用
14. 植物栄養のシグナル機能
15. 植物栄養のまとめ:肥料、環境との関連

さらに、東京大学駒場の1-2年次学生対象の自由ゼミナールの植物の機能と役割を考察する「植物に何ができるか」考える”のテーマを示します。これにはテーマごとに講師をお願いしています。

前期課程 物質・生命一般

「植物に何ができるか」を考える

1. 植物のオートトロフ性 東京大学 林浩昭



2. 篩管—植物体内の物質と情報の super highway 東京大学 林浩昭
3. 実験植物シロイヌナズナ 東京大学 藤原 徹
4. 21 世紀の緑の革命 東京大学 米山忠克
5. 植物の共生的窒素固定 東京大学 米山忠克
6. ゲノム時代のバイオテクノロジー 東京大学 藤原 徹
7. 植物が土壌をつくる 筑波大学 田村憲司
8. お茶の世界—栽培から効能— 静岡大学 森田明雄
9. Phytoremediation - 植物による重金属汚染土壌浄化の試みとその可能性-  
日本大学 長谷川 功
10. 砂漠化の原因と植物の利用 アースアンドヒューマンコーポレーション 後藤有右
11. 地球炭素循環での植物の役割 農業工学研究センター 袴田共之
12. 植物は無限のエネルギー源—有機廃棄物の再資源化を考える—  
兵庫県立農林水産技術総合センター 渡辺和彦

### 3. これからの「植物栄養学」について

最後に 30 年「植物栄養学」の勉強をしてきて、感じていることをいくつかあげてみたいと思います。

(1) 植物栄養の研究は、水田や畑、グリーンハウスで栽培される作物や、森林や草地などの自然生態系の植物を対象とする場合(いわゆる現場学)と、実験室で栽培された植物を対象とする場合がある。前者では食糧生産や自然植物資源の管理のための重要な情報が得られる。後者では養分代謝の生理について細胞レベル、器官レベル、個体レベルで重要な情報を得ることができる。最近後者では植物栄養に関わる遺伝子やタンパク質、そしてそれらの制御など分子生物学研究が盛んになっている。これからは、これらの二者が深い関係を持って進むことになると思われる。

(2) 植物栄養の生理は多くの代謝過程が交差しネットワークを形成している。例えば、植物の窒素栄養分の”硝酸”のアミノ酸への同化では、硝酸をアンモニアに還元し、それからアミノ酸のグルタミンを合成するために、硝酸還元酵素、亜硝酸還元酵素、グルタミン合成酵素の三つの酵素が直接担当する。これらの反応に必要な NADH、NADPH、ATP を供給する酸化還元酵素やグルタミン酸を供給する代謝が、そして、葉では、光の力を利用するシステムが作動する。このため、例えば、遺伝子の導入によって硝酸還元酵素タンパク質量を増やしたとしても、それが硝酸のアミノ酸への同化の増大とはならないことが多い。20 年前から、マメ科植物の窒素固定量を増すため、根粒数(量)を 10 倍に増大した根粒超着生系統が突然変異で得られたが、これらの植物では植物が光合成で生産したエネルギーを根粒形成に使うため、植物全体の生育あるいは”マメ”の生産は少なくなってしまう。この根粒超着生系統を遺伝資源として、根粒を多くつける(窒素固定をたくさんする)が、”マメ”生産が減らない系統の育種の努力がなされた。

(3) 植物は”個々”に変異を持っていますが、それを利用する時には、系統の”平均”の性質が重要になる。植物養分の代謝活性や個々の植物の性質は、環境への反応、器官の働き、生育ステージなどで、変異がある。この変異の中から、栽培の目的によって選択する。たとえば、食糧のためのカドミウム(Cd)を吸収しない系統の稲、逆に土壌の Cd 汚染を浄化するための Cd 吸収量の特に多い植物の探索などである。

これらの変異は自然に生ずる変異もあるが、突然変異を誘起したり、遺伝子の導入などの人為操作で広げる。この変異を持つ集団として、それらの能力の”平均”が、植物の利用の場面では変異になる。これらの植物の利用で最も重要なことは、その植物系統がその能力を”現場”で発揮できるかどうかである。”現場”には植物にとって多くの制限因子(constrains)がある。この制限因子に耐えて上記の能力の”変異”を充分発揮しうるかどうかの問題となる。

(4) 20世紀の緑の革命は、トウモロコシ、小麦、イネでおこり、これらの作物の生産の増大を実現した。この20世紀の緑の革命では、主に葉や茎よりも”実”の収穫割合を増大させた変異を利用した。そして現場では、この能力を発揮するために、”現場”の制限因子となっていた水の供給、養分(化学肥料)の供給、病虫害を農薬で防除することが強力になされた。このような現場条件が可能なところ、すなわち、土壌肥沃度(養分供給力)などや給水など自然条件の恵まれた地域で、外から多量の生産資材を挿入することで、20世紀の緑の革命がなされた。この結果、自然資源の充分なところでは成功したが、乾燥地など自然の制限因子の強いところでは20世紀の緑の革命はなく、また無理に実施したところでは、数年のうちに自然資源を荒廃させる要因となる場合も見られた。21世紀の緑の革命は、自然資源の制限因子が厳しいところで、砂漠化のような荒廃に向うのではなく、厳しい自然資源と共存して食糧生産をすることが期待される。ここでは、あらためて”植物の能力の強化”が重要であるし、できれば植物によって荒廃した自然を回復することも期待される。地球上で人間を含め生物が持続的に”豊かに”生存するために植物の能力は高いポテンシャルを持っている。その中で、”植物栄養学”の科学的な、また技術的な研究を深め、その実践力を高めることが望まれていると考える。

#### 講師プロフィール

##### 学歴

1969年 東京大学農学部農芸化学科卒業

1976年 東京大学農学系大学院博士課程農芸化学専攻 修了(農学博士)

##### 職歴

1974～1975年 International Rice Research Institute (フィリピン)客員研究員

1976～1977年 日本学術振興会奨励研究員

1977～1980年 国立公害研究所生物環境部研究員,主任研究員

1980～1983年 農業技術研究所化学部研究員,主任研究官

1983～1986年 農業生物資源研究所機能開発部主任研究官

1986～2000年 農業研究センター土壌肥料部栄養診断研究室長

1992～2000年 筑波大学応用生物化学系教授(併任)

2000年～現在 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

##### 専門

植物栄養学

##### 学会活動、その他

1986年～現在 日本土壌肥料学会 評議員

2002年～現在 日本土壌肥料学雑誌 編集委員長  
1990～2001年 日本アイトープ協会 常任委員  
1998～2002年 International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics (インド) 理事  
1991年 日本土壌肥料学会賞 受賞  
1992年 科学技術庁長官賞(研究功績者)受賞  
2002年 「第四紀研究」論文賞 (井上 弦博士らと共同受賞)

# 「光合成と近未来環境－Rubisco 量を減じた形質転換体イネから学ぶこと－」

東北大学大学院・農学研究科 前 忠彦

## 1. はじめに

過去しばらくの間、安定していた大気 CO<sub>2</sub> (二酸化炭素) 濃度は、近年の人間活動によって過去にない急激な速度で増加し続けており、今世紀後半には現在の 2 倍に達するであろうと予想されている。

私たち人間をはじめとする地球上生物は、究極的には植物の光合成に依存している。近未来に予想される大気 CO<sub>2</sub> 濃度の急激な上昇は、光合成にどのような影響を与えるのであろうか？また植物、とりわけ作物の成育や収量はどう変わるのでしょうか？

その一方で、地球人口は近年猛烈な勢いで上昇し続けており、今世紀末には、現在の 60 億から 100 億に達するであろうと見られている。なかでもコメを主食とするアジア地域での増加が著しいとされ、コメの需要は現在の 1.5 倍以上に増加すると見込まれている。これ以上の耕地面積の拡大が困難とされる中、食糧問題解決のための現実的なシナリオは、土地面積当たりの作物収量を飛躍的に増大させることにある。

作物による物質生産は、多くの過程から成り立っている。生産性向上のためには個々の素過程のより深い理解と共にそれらの相互関係を理解することが重要である。なかでも光合成による CO<sub>2</sub> 同化は、特に重要な素過程の一つである。光合成機能そのものの理解に加え、その機能を支える分子的基盤そして機能全体の統御機構のより深い理解、さらには栄養、大気、土壤環境等を含めた環境因子との関係の理解が求められる。

ここでは、葉の光合成とその中枢を担う CO<sub>2</sub> 固定酵素のルビスコ(Rubisco)の関係に的を絞り、最初にルビスコについて概説する。続いて現在の大気 CO<sub>2</sub> 環境と近未来の高 CO<sub>2</sub> 環境下でのイネ葉光合成の律速因子について解説する。最後に遺伝子操作技術を用いて高 CO<sub>2</sub> 環境下でのイネの光合成効率の改善を試みた私たちの研究を紹介し、その成果と今後の問題点について論議する。

## 2. ルビスコは光合成 CO<sub>2</sub> 同化と光呼吸の二つの初発反応を触媒する

光合成による CO<sub>2</sub> 同化は、いわゆるカルビン回路 (炭素還元回路、C<sub>3</sub> 回路) によって葉緑体内で行なわれる。回路は 13 の基本反応から成り立っている。そして、その初発反応を触媒する酵素がルビスコ (リブローズ-1,5-ビスホスフェート(RuBP) カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ) である。炭素五つの糖リン酸、RuBP に CO<sub>2</sub> を付加し、炭素三つの 3-ホスホグリセリン酸を 2 分子生成するカルボキシレーション反応を触媒する。ルビスコは、もう一つの反応も触媒する。すなわち、RuBP に O<sub>2</sub> を付加し、ホスホグリセリン酸 1 分子と炭素二つのホスホグリコール酸を生成するオキシゲネーション反応を触媒する。カルボキシレーション反応とオキシゲネーション反応は互いに拮抗的である。それは両反応が、ルビスコの活性中心における同一部位で共に行なわれることによる。どちらの反応が優先されるかは CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 分圧比(濃度比) に依存する。オキシゲネーション反応は、現在の大気 CO<sub>2</sub>、O<sub>2</sub> 分圧のもとでカルボキシレーション反応の効率を 20-40%

程度低下させている。今日まで、ルビスコのカルボキシレーション/オキシゲネーション反応比を遺伝子操作により改変して光合成効率を改善する試みが、世界の数多くの研究者により試みられてきているが未だ成功には至っていない。

### 3. ルビスコは地球上でもっとも多量に存在するタンパク質である

ルビスコにはその触媒機能の重要性に加えて、もう一つの際立った特徴がある。それは、葉でもっとも多いタンパク質であるという点である。どのくらい多いかというと、イネ、ダイズ、コムギ、ホウレンソウ等の C3 型植物の成熟葉では、ルビスコが可溶性タンパク質のおよそ 50%、葉の全窒素当たりで 20-30%を単一タンパク質として占めている<sup>2)</sup>。葉には数千、或いはそれ以上の種類のタンパク質が存在するであろうことを考えると、ルビスコがいかに多いかは容易に想像出来る。地球上では、もっとも多いタンパク質であろうと見なされている。大型動物の多くが草食動物である。豊富に存在するルビスコは、これら動物にとって得易い貴重なタンパク源であるに違いない。

### 4. ルビスコの触媒速度は、際立って遅い

ルビスコの触媒速度は、他の光合成酵素に較べると驚くほど遅い。例えばカルビン回路の酵素、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼに較べると数百分の一、カルボニックアンヒドラーゼに較べると数万分の一の代謝回転速度である<sup>3)</sup>。このため、植物はルビスコに多大の窒素投資を行ない、光合成機能を支えている。無機炭素の有機化反応は、植物にとってコストのかかる仕事である。

### 5. ルビスコはその大部分が葉の展開過程で合成され、窒素栄養の影響が大きい

イネの場合、ルビスコの生合成は葉の展開中が最も活発であり、葉の展開終了時には既に最大時の四分の一から五分の一にまで減少していた。葉の完全展開直後までに、葉の一生を通しての生合成の大部分を終え、老化過程での生成量は僅かであった<sup>4,5)</sup>。これら葉の一生を通してのルビスコ生成量の変動は、ルビスコを構成する大小サブユニットの mRNA 量の変動とほぼパラレルな関係にあった<sup>6,7)</sup>。したがってその生合成の制御は、葉の一生を通して主に転写レベルにあると考えられる。展開中の葉は、窒素栄養レベルに敏感に応答し、両サブユニットの mRNA レベル、ルビスコ合成量のいずれもが窒素栄養レベルに従って増減した<sup>8)</sup>。一方、老化過程にある葉ではすでに生合成量が少なく窒素栄養に対する mRNA の応答も明確には見られなかった。

### 6. ルビスコは葉の老化と共に分解され、その量はリサイクル窒素のなかで最大である

葉の展開を終える頃にはすでにルビスコの分解が始まっており、老化過程を通して分解速度は合成速度をはるかに上回っていた。葉が枯死する頃にはルビスコは既に検出されなくなっており、ルビスコ由来の転流窒素は、葉からの全転流窒素のおよそ 35%を占めた<sup>5)</sup>。

### 7. ルビスコの消長は、炭素経済、窒素経済の両者に関わっている

2・6で述べたことから明らかなように、ルビスコの葉の一生を通しての量的変動は、光合成機

能を介して炭素経済と、そしてその生成と分解を介して窒素経済と深く関わっており、個体の成長、窒素栄養と深い関係にある<sup>9)</sup>。

#### 8. 葉のルビスコ量は、現大気・光飽和下での光合成の律速因子である

イネ葉のルビスコ含量、その速度定数、葉内 CO<sub>2</sub> 濃度から算定されるルビスコ活性と実際の葉の現大気・光飽和下での CO<sub>2</sub> 同化速度の間には、正の相関関係が認められた。そして両者の関係は、ほぼ 1:1 の関係にあることから、ルビスコ量は、光飽和下での光合成速度の律速因子であると結論した<sup>10)</sup>。最近、この結論の正当性が、ルビスコ・小サブユニットのアンチセンス遺伝子を導入し、ルビスコ量を特異的に減少させたイネ形質転換体を用いた実験により検証された<sup>11)</sup>。すなわち、アンチセンスイネにおいて、ルビスコ量を減じた分に応じて光飽和下での光合成速度が低下していた。

#### 9. 葉のルビスコは、光不飽和下では一部が不活性型、阻害型として存在する

光飽和の場合と異なり、弱光下では算定された活性が実際の葉の光合成速度を上回っており、ルビスコは一部過剰となっていることが示唆された。ルビスコは、生体内では酵素に CO<sub>2</sub>、Mg<sup>2+</sup> が結合した三量体が活性型 (Enzyme-CO<sub>2</sub>-Mg<sup>2+</sup>; ECM) であり、酵素単独は不活性型 (E) である。また不活性型に RuBP が結合した場合 (ER) や活性型に 2-カルボキシ-D-アラビニトール-1-リン酸等のある種の糖リン酸が結合した場合 (ECMI) は、阻害型として活性を持たない。ルビスコ活性化酵素 (Rubisco activase) は、光照射下の葉において酵素から RuBP や阻害物質を解離し活性型への変換を促進する。最近、活性測定法の発達によってこれら不活性型、活性型、阻害型の量比を推定することが可能となった。そこでイネ葉のルビスコの存在形態と光強度の関係について、暗条件から光飽和まで数段階の光強度の下で調べたところ、暗条件下では 20% が活性型として、残りは殆どが阻害型として存在した。活性型は、光強度の増加と共に増加し、100, 300, 900 μmol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> の下ではそれぞれ、40%、60% そして 90% 以上が活性型であった。一方、阻害型はそれぞれの光強度の下で、25%、20%、そして 5% 以下であった。不活性型はそれぞれ、35%、20%、そして 5% 以下であった。これらの結果は、光が弱い条件下においては、ルビスコのかなりの部分が不活性型のみならず、阻害型としても存在していることが明らかとなった<sup>12)</sup>。過去の多くの報告においてルビスコの活性化状態の指標に、E/(ECM+E) 比が使われているが、この場合阻害型で存在するルビスコ量が考慮されていない。このため弱光下では、活性化状態を過大評価してしまうことになり、この点については再考が必要である。最近、我々は高 CO<sub>2</sub>、強光条件下に置かれたイネ葉において、一部のルビスコが阻害型として存在していることを示唆するデータを得ている。阻害物質の実態については未だ不明であるが、高 CO<sub>2</sub>・強光下での阻害物質の存在については未だ報告がない。

以上に示したように、ルビスコの葉での活性調節は、生成と分解による量自体の大まかなレベルでの制御から、カルバミレーションや阻害物質の結合による可逆的で精緻なレベルでの制御まで、葉の発達段階や環境に応じて行なわれている。

#### 10. 葉の成長時の窒素栄養、光、温度、大気 CO<sub>2</sub> 濃度環境と葉のルビスコ含量、葉身窒素に対

## する割合

ルビスコが光合成の律速因子であり、ルビスコへの窒素投資量が格別に多いことから、その量や全葉身窒素(葉身-N)に対する割合が、成育時の環境の違いによりどう変動するのかを正確に知っておくことは、生産に関わる生理学的観点から重要な問題である。そこで窒素栄養、光強度、大気温度、大気 CO<sub>2</sub> 濃度をそれぞれ変えてイネを栽培し、完全展開直後の葉身について、単位葉面積当たりのルビスコ量、葉身-N 量、クロロフィル量、チトクローム f 量等を測定し、その影響について調べた。

### 1) 窒素栄養<sup>13)</sup>

標準栽培条件下で窒素栄養レベルのみを数段階として水耕栽培し、葉の単位葉面積当たりのルビスコ量、葉身-N 量に占めるルビスコ-N 割合を比較した。窒素栄養状態に応じて、葉身-N 量、ルビスコ含量は増減した。欠乏葉ではルビスコ-N の葉身-N に対する割合は 20%程度で、窒素を十分に与えたイネの成熟葉では 30-35%程度であった。すなわち葉身-N に占めるルビスコ-N 割合は一定ではなく、単位葉面積当たりの窒素含量が多いほどその割合が大きくなった。クロロフィル含量、チトクローム f 含量とも葉身-N 量の上昇と共に増加したが、葉身-N に対する割合は変わらず、一定であった。

### 2) 光強度<sup>14)</sup>

強光(1000  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )と弱光(350  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )のもとで窒素栄養レベルを数段階にしてイネを栽培した。単位葉面積当たりの葉身-N、ルビスコ含量は、強光下で成育したイネが、弱光下で成育したイネに比べ高窒素下で高くなる傾向を示した。一方、葉身-N に占めるルビスコ-N 割合については、光強度の影響は全く見られず、同一の関係を示した。一方、クロロフィルの葉身-N に対する割合は、弱光下で高くなり、チトクローム f は逆に低くなり、光合成因子間で光環境に対する応答が明らかに異なっていた。

### 3) 温度<sup>15)</sup>

成育時の大気温度を三段階(昼温/夜温; 30/23°C, 23/18°C, 18/15°C)として窒素栄養レベルを変えてイネを栽培した。展開直後の成熟葉の単位葉面積当たりの葉身-N、ルビスコ含量は、低温下で成育したイネが高温下で成育したイネに比べ高くなる傾向を示したが、葉身-N に占めるルビスコ-N 割合については、光強度の場合と同様、温度処理の影響は全く見られず、同一の関係を示した。一方、クロロフィル、チトクローム f の葉身-N に対する割合は、高温下で高くなる傾向を示した。

### 4) 大気 CO<sub>2</sub> 濃度<sup>16)</sup>

成育時の大気 CO<sub>2</sub> 分圧を現在の低 CO<sub>2</sub> 環境の 36Pa と将来に予想される高 CO<sub>2</sub> 環境の 100Pa として窒素栄養レベルを変えてイネを栽培した。葉身-N 含量、ルビスコ含量は、共に高 CO<sub>2</sub> 下で成育したイネ葉で低くなった。しかし葉身-N に占めるルビスコ-N 割合は、光強度、大気温度の場合と同様、大気 CO<sub>2</sub> 分圧の影響は全く見られず、低 CO<sub>2</sub>、高 CO<sub>2</sub> 間で同一の関係を示した。また、クロロフィル、チトクローム f の葉身-N に対する割合についても、処理間で差がなかった。

以上 1)~4)の結果は、イネの単位葉面積当たりの葉身-N 含量、ルビスコ含量は、成育時の環境条件によって変動するが、葉身-N 含量とルビスコ-N 含量の関係は成長時の環境条件の影響を受けないことを示している。一方、集光機能を担うクロロフィル含量の葉身-N に対する割合は環境

によって異なり、弱光下で増加、低温下で減少した。これらは、弱光下での光合成の効率化と強光低温下での光ストレス回避のためのイネ葉の環境への適応現象とみてとれる。

### 1 1. 高 CO<sub>2</sub> 環境下でルビスコは過剰存在する

イネ葉の光飽和下における葉の CO<sub>2</sub> 同化速度は、低 CO<sub>2</sub> 領域では葉内 CO<sub>2</sub> 濃度(分圧) の上昇とともにルビスコの動力学的特性に従って増加する。すなわち CO<sub>2</sub> 同化速度は、ルビスコ活性により律速される。CO<sub>2</sub> 濃度がさらに上昇し、現大気 CO<sub>2</sub> 濃度を少し越える頃からは同化速度の増加は徐々に緩やかなものとなり、現大気 CO<sub>2</sub> 濃度の 2 倍を越える高 CO<sub>2</sub> 領域では CO<sub>2</sub> 濃度の上昇に対し同化速度の上昇は僅かとなるか全く見られなくなる。そして高 CO<sub>2</sub> 濃度下での実際の葉の CO<sub>2</sub> 同化速度は、ルビスコ量とその酵素的特性から見積もられるポテンシャルの CO<sub>2</sub> 同化能力よりずっと低い速度でしかない。Farquhar と von Caemmerer (1980) によって提唱され、後に Sharkey (1985) によって一部修正された C<sub>3</sub> 光合成の生化学モデルによれば、低 CO<sub>2</sub> 領域から高 CO<sub>2</sub> 領域にかけての CO<sub>2</sub> 同化速度の上昇は、CO<sub>2</sub> 分圧の上昇によるルビスコのカルボキシラーゼ活性の直接的な促進とオキシゲナーゼ活性の抑制、さらには RuBP の再生産に関連しての電子伝達能力による律速が関与し、高 CO<sub>2</sub> 領域での CO<sub>2</sub> 同化速度はデンプンとショ糖合成に伴う無機リン酸の再利用過程が律速になるとされている。これらのことは、高 CO<sub>2</sub> 濃度下の葉の光合成はルビスコ以外の因子により支配されていることを意味している<sup>17, 18)</sup>。実際にイネ葉の場合について、100Pa の CO<sub>2</sub> 分圧下でのルビスコのポテンシャルの CO<sub>2</sub> 固定速度を算出すると、実際の葉での CO<sub>2</sub> 同化速度は、ポテンシャルのルビスコ能力の 50-70%しか発揮していないことになり、葉のルビスコの 30-50%が過剰存在すると算定される<sup>11)</sup>。

### 1 2. ルビスコ量を減じた形質転換体イネの高 CO<sub>2</sub> 下での光合成は改善されるか？

高 CO<sub>2</sub> 下での光合成の律速因子が、電子伝達あるいは無機リン酸の再利用能力にあるのならば、過剰存在するルビスコ量を遺伝子操作技術を用いて減じ適量化することによって、ルビスコの減少分に相当する窒素が律速となっている因子の方に回り、それらの量が増加して高 CO<sub>2</sub> 下での光合成機能の改善が期待される。そこでイネのルビスコ・小サブユニット遺伝子 (*rbcS*)・プロモーターの支配下で *anti-rbcS* 遺伝子が発現するように仕組んだコンストラクトをパーティクル銃を用いてイネに導入し、ルビスコ量を特異的に減少させた形質転換体イネを作出した<sup>11)</sup>。単位葉身窒素当たりのルビスコ含量が様々な形質転換体イネが得られたが、そのうちから *wild-type* イネに対し 35%ルビスコ量が減じたイネを選び、後代のホモ様個体について光合成特性について調べた。形質転換体イネは、光合成の電子伝達系の律速因子と考えられているチトクローム *f*、集光機能を担うクロロフィル、ATP 合成酵素の CF1 等の含量がいずれも 5-15%増加していた。36Pa の低 CO<sub>2</sub> 分圧での光合成速度は、ルビスコ量を減じたことによって低下していたが、高 CO<sub>2</sub> 下 (100-115Pa) での光合成速度は 5-15%上昇していた。すなわち高 CO<sub>2</sub> 下での単位葉身窒素量当たりの光合成効率が改善された。

### 1 3. 形質転換体イネの高 CO<sub>2</sub> 下での成育は改善されたか？

ルビスコ量を 35%減じて高 CO<sub>2</sub> 環境に適量化した形質転換体イネは、高 CO<sub>2</sub> 環境下で *wild-type*



イネに勝る成育を示すことが期待された。しかし予想に反して、70日間成育させた形質転換体イネの成育は、wild-type イネとほとんど変わらなかった<sup>19, 20)</sup>。それは、形質転換体イネの成育初期における相対成長率 (RGR) が低いことに起因していた。なかでも純同化率 (NAR) が低かった。その要因として成育初期におけるアンチセンス効果が特に大きく現れ、単位葉身窒素当たりのルビスコ含量が期待以上に大きく減じていたことにあると考えられた。その理由は明らかではないが、アンチセンス効果は植物の成育時期によって異なる場合があることを示している。成育中期の成育は、形質転換体イネで勝っていた。このため初期における成育の遅れが相殺されていた。

#### 14. 長期間の高 CO<sub>2</sub> 環境はイネの成育をどう変えるか？

短期的に見た場合、高 CO<sub>2</sub> 下でのイネの成育は光合成が活発となることにより促進される。しかし時間が経つにつれ成育の促進程度は小さくなっていくことが一般的である。このことについてイネについて調べたところ、高 CO<sub>2</sub> 下で長期間成育したイネにおいては、単位葉面積当たりの葉身・N 含量、ルビスコ含量、クロロフィル含量等が減少するばかりでなく、葉も小型化して葉身への窒素分配割合が減少することが分かった。代わって葉鞘や根への窒素分配、乾物分配が増加した。すなわち、成長が進むにつれ相対的に乾物生産能力を引き下げる方向へと個体の成長は向かっていた<sup>21, 22)</sup>。どのようなメカニズムで葉の小型化や単位葉面積当たりの窒素含量が減少の方向に向かうのかについては、現在全く分かっておらず、イネの高 CO<sub>2</sub> 環境下での生産性の向上のためには、是非明らかにしなければならない点である。

#### 15. おわりに

ルビスコと光合成の関係を中心に、近未来の高 CO<sub>2</sub> 環境に対するイネの応答を解析した私たちの研究の一部を紹介した。ルビスコは高 CO<sub>2</sub> 環境下で過剰となるにもかかわらず、イネは、高 CO<sub>2</sub> 環境に対してルビスコ量を適量化し、窒素当たりの光合成効率の向上を図るといった応答は一切示さないことが明らかとなった。また、長期にわたって高 CO<sub>2</sub> 環境に置かれたイネは葉身の面積が相対的に小さくなりその単位葉面積当たりの窒素含量も減少することが示され、乾物生産能力をむしろ引き下げる方向に向かうことが明らかとなった。一方、ルビスコ量を高 CO<sub>2</sub> 環境に対して遺伝子操作技術を用いて適量化し、葉身窒素当たりの光合成効率を 5・15% 向上させることに成功した。しかし、アンチセンス遺伝子のルビスコ合成に対する抑制効果は成育初期において大きく現れて初期成育の遅れを生じ、期待した成育とはならなかった。

ここで示したように、イネの窒素栄養と光合成、ルビスコ、個体の成長だけに焦点を絞ってみても、植物の環境への応答は時には分子レベルで、ある場合には器官レベルで、また別の場合には、個体レベルでの応答を示し、粗いレベルから精緻なレベルまで多段階でまた多様に行なわれる。栄養生理学分野での生産性の向上に向けての研究は、最近の研究手法を上手に駆使しながら一つ一つ、分子から個体レベルまで総合的に研究を進め、個々の研究の全体における位置付けを常に評価しながら行うことが重要である。

#### 参考文献

- 1) 牧野 周 植物の環境応答 「細胞工学」別冊 植物細胞工学シリーズ 11、秀潤社、

p.134-141 (1999)

- 2) Evans, JR. *Oecologia*78, 9-19 (1989)
- 3) Heldt, HW. 金井 龍二訳 植物生化学 共立出版 p. 137-145 (2000)
- 4) Mae, T. et al., *Plant Cell Physiol.*, 24, 1079-1086 (1983)
- 5) Makino, A. et al., *Plant Cell Physiol.*, 25, 429-437 (1984)
- 6) Suzuki, Y. et al., *J. Exp. Bot.*, 52, 1575-1579 (2001)
- 7) Suzuki, Y. et al., *Plant, Cell, Environ.*, 25, 625-631 (2002)
- 8) Imai, K. et al., (unpublished data)
- 9) Mae, T. *Plant and Soil* 196, 201-210 (1997)
- 10) Makino, A. et al., *Planta* 166, 414-420 (1985)
- 11) Makino, A. et al., *Plant Physiol.*, 114, 483-491 (1997)
- 12) Yamaguchi, N. et al., (unpublished data)
- 13) Makino, A. et al., *Plant Physiol.*, 105, 173-179 (1994)
- 14) Makino, A. et al., *Planta* 203, 390-398 (1997)
- 15) Makino, A. et al., *Plant Physiol.*, 105, 1231-1238 (1994)
- 16) Nakano, H. et al., *Plant Physiol.*, 115, 191-198 (1997)
- 17) Makino, A. and Mae, T., *Plant Cell Physiol.*, 40, 999-1006 (1999)
- 18) 牧野 周、前 忠彦、米山 忠克 *化学と生物* 35, 104-109 (1997)
- 19) Makino, A. et al., *Aust. J. Plant Physiol.*, 27, 1-12 (2000)
- 20) Makino, A. et al., *J. Exp. Bot.*, 51, 383-389 (2000)
- 21) Makino, A. et al., *Plant Physiol.*, 115, 199-203 (1997)
- 22) 前 忠彦、牧野 周 *植物が未来を拓く 駒嶺 穆編 共立出版* p.171-180 (2002)

## 講師プロフィール

### 学歴

- 昭和 41 年 千葉大学園芸学部卒業
- 昭和 43 年 東北大学大学院農学研究科修士課程修了
- 昭和 46 年 東北大学大学院農学研究科博士課程修了(農学博士)

### 職歴

- 昭和 47 年 オランダ植物生理中央研究所博士研究員
- 昭和 48 年 日本学術振興会特別研究員
- 昭和 51 年 イリノイ大学農学部博士研究員
- 昭和 53 年 宮城県農業センター嘱託
- 昭和 55 年 東北大学農学部助手 (植物栄養学講座)
- 昭和 59 年 東北大学農学部助教授

平成6年 東北大学農学部教授

## 専門

### 植物栄養生理学

- ・生産性に関わる生理生化学—特に窒素の体内利用、光合成、生産性—

## 著書（平成13年以降）

1. “老化”「植物生理学講座4. 成長と分化」、福田裕穂編、朝倉書店(175頁—185頁)、平成13年
2. “窒素代謝”「植物栄養学」、森 敏・前 忠彦・米山忠克編、文永堂出版(96頁—102頁, 117頁—123頁)、平成13年
3. “近未来環境下での高生産イネ作出に向けて—高炭酸ガス環境へのルビスコの適量化—”「植物が未来を拓く」駒嶺 穆編 共立出版 (171頁—180頁)、平成14年
4. “核酸、クロロフィル、その他の窒素化合物の代謝、植物におけるタンパク質の合成”「植物栄養・肥料の辞典」植物栄養・肥料の辞典編集委員会編、朝倉書店 (175頁—180頁)、平成14年
5. “Leaf Senescence and Nitrogen Metabolism” *In* Programmed Cell Death and Related Processes in Plants. Edited by L. D. Noodén Academic Press (In press)

## 学会活動

- 日本土壤肥料学会：欧文誌編集委員会委員長、東北支部支部長、欧文誌編集委員、第六部門部門長、学会賞受賞者選考委員会委員、評議員、代議員
- 日本植物生理学会：日本植物生理学会仙台大会会長、評議員、欧文誌編集委員、学会賞受賞者選考委員会委員
- 日本農芸化学会：評議員、「化学と生物」企画編集委員
- 日本無菌生物学会：理事
- 日本光合成研究会：幹事
- New Phytologist：編集委員

## その他

平成3年日本土壤肥料学会賞受賞

## 好きなこと

自然の中に身をおくこと、海釣り

# イネの窒素代謝と生産性向上 葉の老化は稔りのため

東北大学大学院農学研究科

山谷知行

## 1. はじめに

個体の移動手段を持たない植物は、たまたま発芽した環境に最大限適応してその一生をすごします。植物の生命活動を支える全ての源は光エネルギーと無機栄養成分であり、植物はこの二つを利用して身体を作り、また子実を作って次世代に伝えます。動物やヒトは、植物が作ってくれた養分を利用して生命活動を営んでいることから、地球上全体の生命を植物が支えていると言っても過言ではありません。さて個々の植物は、活発な生命活動を行うために、隣の植物よりも1 cmでも大きくなって光エネルギーを獲得し、1 cmでも根を伸ばして多くの栄養分を吸収する競争を常にしています。無機栄養成分の中で、最も植物の成育に重要な成分の一つが窒素です。植物は、硝酸態あるいはアンモニウム態として根の周りにある窒素を食欲に吸収しますが、一般には、絶対量の不足から常に窒素に飢えた状況にあります。吸収された窒素は有機化（同化）されて、タンパク質・核酸・クロロフィルなどの生体高分子やその他の窒素化合物となって生命活動の基盤を支えています。このように、無機態窒素の吸収と同化、さらには細胞内から器官間での輸送に関する研究は植物栄養学分野では重要な位置を占めており、従来から多くの研究がなされてきました。最近の分子生物学や分子遺伝学分野の急速な進展に伴い、窒素代謝やその制御に関する研究も新たな時代を迎えておりますが、現時点では残念ながら植物における窒素代謝の分子機構に関してはまだまだ全貌は解明されておらず、生産性や品質向上といった応用面も含め、研究すべき課題が多く残されています。

## 2. イネにおける窒素リサイクル系

不足しがちな窒素を最大限に活用するために、植物は窒素のリサイクル系を備えていることが、近年わかってきました。ここからは、世界三大穀物の一つで、かつモデル植物としても近年脚光を浴びているイネを取り上げて説明します。安定同位体を用いた研究から、イネの穂を構成している窒素の約80%は老化している器官から転流されてきた窒素に由来していることが20年ほど前に示されました。ご存知のように、イネの成長に伴って葉身は下位から枯れていきますが、これは単に黄色くなっているのではなく、それまでに葉身で活躍していたタンパク質やクロロフィルが分解を受け、その分解された窒素は篩管を介して若い葉身や穂に転流されている姿を示しているのです。まさに、イネの葉の老化は、おコメの稔りのためと言えます。イネ篩管液の主な窒素形態は、グルタミンとアスパラギンであり、アスパラギンはグルタミンからアスパラギン合成酵素によって生合成されます。一方で、老化器官ではこれらのアミドはほとんど検出されません。従って、窒素のリサイクルに当たり、老化器官のどこかで、まずグルタミンが合成されなければいけません。また、若い器官に運ばれたグルタミンやアスパラギンは、輸送されてきたこれらの窒素を再利用して多くの生合成反応を行っています。しかし、これら一連の窒素リサイクルシステムのなかで、老化器官における生体高分子の分解やグルタミンの合成、さらには若い器官におけるグルタミンの再利用に関わる分子機構は全く解っておりませんでした。このグルタミン代謝にかかわるグルタミン合成酵素やグルタミン酸合成酵素には

複数の分子種が存在しており、それぞれが異なる機能を持っていることが推測されます。また、多細胞生物である植物は、器官や組織を構成している個々の細胞が代謝機能を分担しており、個体全体としては成長に伴って個々の細胞機能が統合された形で生命活動を営んでいます。このように、窒素代謝は空間的・時間的な遺伝子発現の特異性を持った形で、非常に巧妙な制御を受けていることが予想されますが、その詳細は全くと言っていいほどわかっておりませんでした。

窒素転流に際しては、老化器官におけるグルタミンの合成と、若い発達中の器官におけるグルタミンの再利用が重要になります。この分子機構の解明に当たり、私たちのグループでは、主として1) 免疫組織学的な解析法と、2) 標的遺伝子の過剰発現系や発現抑制系を目指した形質転換法、さらには3) 量的形質を決定している遺伝子座の解析法などを用いて、研究を進めてきました。以下に、これまでに得られた結果をまとめてみます。

### 3. 代謝のコンパートメンテーション

グルタミンの合成を触媒する酵素には、イネの場合、二つのサイトゾル型グルタミン合成酵素 (GS1 と GSr) と一つの葉緑体型グルタミン合成酵素 (GS2) があります。また、グルタミンを再利用するための主な代謝には、まずグルタミン酸に変換することが大切であり、この反応を触媒する酵素として還元型フェレドキシンを電子供与体とするグルタミン酸合成酵素 Fd-GOGAT と、NADH を用いる NADH-GOGAT の複数の分子種があります。私共は、標的酵素タンパク質の抗体を調整し、抗原で高度に精製することにより組織切片上で特異的に抗原を検出する免疫組織学的解析を行いました。その結果、老化葉身においては、GS1 タンパク質は維管束組織の伴細胞と維管束柔細胞に分布していることが判明しました<sup>1,2)</sup>。伴細胞は師管に隣接し、師管への物質輸送に機能している細胞であることから、検出された GS1 はこれらの細胞群において転流されるグルタミンの合成に機能しているものと考えられました。一方、NADH-GOGAT タンパク質は、未抽出の緑化していない葉身維管束の柔細胞やメストム鞘細胞に、また登熟初期の穎果における背部大維管束組織の柔細胞、珠心突起、珠心表皮に局在していることが判明しました<sup>3)</sup>。これらの細胞群は、導管や篩管からの物質の流路に相当する細胞群と考えられており、輸送の過程でグルタミンからアミノ酸代謝の中枢に位置するグルタミン酸へ変換されていることが強く示唆されました。これらのコンパートメントにおける発現は、対応する mRNA の検出や、NADH-GOGAT に関しては形質転換イネを用いたプロモーター活性の検出からも確認できました<sup>4)</sup>。GS2 と Fd-GOGAT は、葉身ではいずれも葉肉細胞に、また穎果における Fd-GOGAT タンパク質は果皮の横細胞に検出され、これまでの多くの研究結果から示唆されている光呼吸窒素代謝系における機能を指示する結果となりました。

イネ根では、GSr タンパク質はほとんど全ての細胞に検出されましたが、NADH-GOGAT は微量の  $\text{NH}_4^+$  の供給に伴って誘導され、表皮、外皮の表層二層の細胞群に集積することが確認できました<sup>5)</sup>。これらの結果は、NADH-GOGAT が根では  $\text{NH}_4^+$  の同化反応に機能している可能性を示しています。この  $\text{NH}_4^+$  の供給に伴う誘導物質がグルタミンであること<sup>6)</sup>や、この情報伝達系にオカダ酸感受性のプロテインフォスファターゼが関与している可能性も示唆されています<sup>7)</sup>。また長い間不明であった NADH-GOGAT の細胞内局在性を免疫電顕法で解析した結果、このタンパク質はプラスチドに分布していることが判明しました<sup>8)</sup>。

### 3. 遺伝子導入法による機能の検証

免疫組織学的な解析結果は、あくまでも可能性を示唆したもので、例えば mutant 等を用いた機能の証明が必要となります。イネでは、トランスポゾン挿入変異体も作出されていますが、私共はセンスあるいはアンチセンス DNA を導入し、標的酵素発現量を増大あるいは軽減した形質転換イネを用いた解析を行ってきました。本シンポジウムでは、NADH-GOGAT に関して紹介いたします。

イネには、日本型、インド型、ジャワ型と呼ばれる subspecies または ecotype があり、一般にインド型は旺盛な乾物生産をしますが、必ずしも高収量には結びつきません。老化葉身における GS1 含量と若い葉身における NADH-GOGAT 含量を比較したところ、Kasalath を含む複数のインド型イネでは、GS1 含量は日本型のニホンバレやササニシキよりも 2 倍程度高いこと、逆に NADH-GOGAT 含量は半分程度であることがわかりました<sup>9)</sup>。上記の推定が正しければ、Kasalath では窒素の送り出し能力は高いものの、若い器官での再利用能力が劣ることを意味しています。そこで、Kasalath に NADH-GOGAT プロモーターの下流に NADH-GOGAT cDNA をセンス方向で連結したキメラ遺伝子を導入した形質転換イネを作成しました。2000 年度に作出したばかりで、現在後代の解析をすすめています。T0 世代では、若い葉身の NADH-GOGAT 含量は最大で約 80% 増えたラインを含め、複数の過剰発現ラインを獲得できました。同時に co-suppression によると思われる著しく低下の認められるラインも複数得られました。過剰発現ラインの生育状況は野生型と大きな違いはありませんでしたが、一粒当たりの重量が最大で 80% 増になっているラインが認められました<sup>10)</sup>。この結果は 35S プロモーターの制御下でアンチセンス RNA を発現する形質転換ササニシキ (T3 世代、アンチセンス遺伝子 1 コピーを含むホモ接合体) の結果と、ちょうど鏡像の関係にあります。この結果は、NADH-GOGAT が、転流グルタミンの再利用反応において、鍵を握る重要な酵素であることを非常に強く示唆しています。また、アンチセンス T3 の穎果における乾物重当たりの全窒素含量は野生型と同じ値であったことから、窒素再利用のみならず、デンプンの集積にも間接的に影響を与える酵素であることがわかりました。GS1 遺伝子にレトロトランスポゾン *Tos17* が挿入された突然変異体の解析も、現在進めております。

### 4. GS1/NADH-GOGAT 含量を決定している遺伝子座の解析

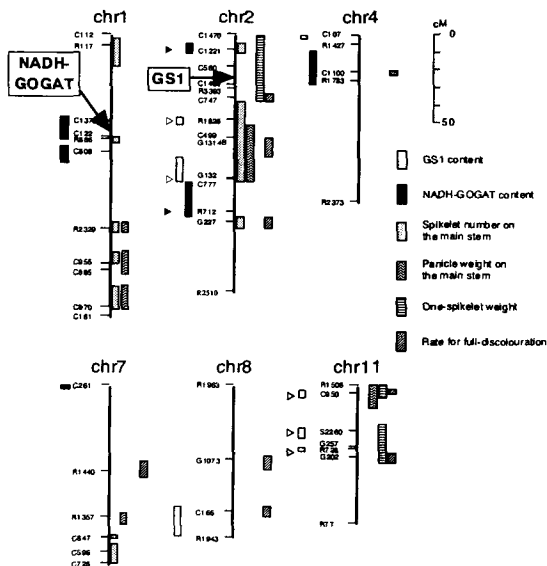


図1 GS1、NADH-GOGAT含量のQTLs

草丈、穂数、分けつ数、出穂時期などの農業形質は、複数の遺伝子作用により決定されています。量的形質を決定している遺伝子座 (quantitative trait loci: QTL) の解析は、DNA マーカーとの連鎖を利用して連鎖地図上に発現形質に関与する複数の遺伝子の位置とその効果を検出する方法であります。検出の確率を高めるためには、交配親は目的形質に関してできるだけ大きい差異を示す系統を選択し、解析のための遺伝子系統集団または系統群を作成することが重要となります。量的形質は共優性型分離を示すために、交配で得られた後代について自殖を複数回繰り返す、遺伝子系統群の遺伝

子型をホモ接合に固定する必要があります。幸いにも、インド型 Kasalath とニホンバレでは、GS1 や NADH-GOGAT 含量が2倍ほどの差が認められましたことから、農水省矢野らが育成しましたこれらの遺伝子系統群でありますバッククロスインブリードライン (BIL) 98 系統を用いて、QTL 解析を試みました。QTL 解析の結果、老化葉身における GS1 含量に関する7個の QTL、並びに未抽出葉身における NADH-GOGAT 含量に関する6個の QTL が、連鎖地図上にマッピングできました<sup>11)</sup>。これらの QTL の中には、老化速度の指標となるクロロフィル含量の減少速度に関する QTL や、登熟に関わる一粒重や穂重に関する QTL と重複あるいは近傍に位置する領域が複数認められています。異なる形質に関する QTL が同じ領域に検出された場合、それらの形質間には関連性があるものと考えられます。現在、この QTL の重複が顕著に認められた第二染色体に焦点をあてて、これらの QTL 領域を狭め遺伝子同定を行うために、QTL 領域のみが置換された準同質遺伝子系統群 (NILs) の作成を進めています。NIL で形質を再確認できましたので、これから領域を狭めていき、最終的にはその領域に含まれる遺伝子を同定する予定です。最近になって、農学と生理学や生化学との融合に基づく QTL 解析は活発に行われるようになりましたが、この QTL 解析法はポストゲノム科学の有力な手法の一つにあげられます。イネに関しては、ゲノム配列の解読も間近で、マッピングされた QTL 領域から多くの新規遺伝子が発見される可能性は高いものと思われまます。

## 5. おわりに

以上述べてまいりましたように、イネにおける窒素のリサイクル機構につきましても、老化器官における GS1 と若い器官での NADH-GOGAT が重要な機能を担っていることがほぼ判明いたしました。また、QTL 解析からは、これらの酵素含量と農業形質の決定にかかわる制御遺伝子を明らかにできることが、大いに期待できます。植物の成育や生産性を規定しています窒素代謝とその制御に関する理解は、その地球規模における重要性にも関わらず、驚くほど進んでいない現状にあります。ようやく代謝地図上に矢印を書くことはできてきましたが、代謝が行われる場所、代謝が行われる時期、基質や補酵素の供給機構、環境に対する応答機構、情報の検知と伝達システム、さらにはこれらの制御システムや代謝間相互の関係等々、まだまだ不明な点が多く残されています。これらの解決の糸口として、代謝のコンパートメンテーションと細胞間・器官間における代謝機能の統合システムに関する理解は、極めて重要であります。本発表でも少しふれましたが、遺伝子導入による形質転換法は、標的遺伝子の機能解明にあたり多くのヒントを与えてくれます。しかし、この方法の最大の欠点は、全く同一の条件下における追試が不可能であることがあげられます。これは、形質転換は比較的簡単にできますが、まだ私たちは導入する場所やコピー数を人為的に制御する方法をもちあわせていないことに起因しています。言い換えますと、形質転換法で得られた結果は、サイドエフェクトを見ている危険性も常にあることとなります。従いまして、形質転換技術で得られた結果をもとに、遺伝資源の活用や分子遺伝学的解析での確認が、今後重要になるものと考えております。また、従来行われてきた、いわゆるボトムアップ方式である個々の標的に関する深い理解に加え、トップダウン方式の QTL 解析のみならず DNA アレイ法、プロテオーム解析、メタボローム解析などを活用して網羅的に解析するポストゲノム手法との融合が、今後ますます重要になるものと思われまます。

## 6. 参考文献

- 1) Kamachi, K. et al.: Plant Physiol., 99: 1481-1486, 1992.
- 2) Sakurai, N. et al.: Planta, 200: 306-311, 1996.
- 3) Hayakawa, T. et al.: Planta, 193: 455-460, 1994.
- 4) Kojima, S. et al.: Aust. J. Plant Physiol., 27: 787-793, 2000.
- 5) Ishiyama, K. et al.: Planta, 204: 288-294, 1998.
- 6) Hirose, N. et al.: Plant Cell Physiol., 38: 1295-1297, 1997.
- 7) Hirose, N. et al.: Plant Physiol., 121: 805-812, 1999.
- 8) Hayakawa, T. et al.: Plant Physiol., 119: 409-416, 1999.
- 9) Obara, M. et al.: Physiol. Plant., 108:11-18, 2000.
- 10) Yamaya, T. et al.: J. Exp. Bot., 53: 917-925, 2002.
- 11) Obara, M. et al.: J. Exp. Bot., 52: 1209-1217, 2001.

## 講師プロフィール

### 学歴

- 昭和47年 東北大学農学部卒業
- 昭和49年 東北大学大学院農学研究科修士課程修了
- 昭和52年 東北大学大学院農学研究科博士課程修了（農学博士）

### 職歴

- 昭和52年 日本学術振興会特別研究員
- 昭和53年 マクマスター大学（カナダ）博士研究員
- 昭和54年 ミシガン州立大学（米国）博士研究員
- 昭和55年 岡山大学農業生物研究所 助手
- 昭和63年 東北大学農学部農芸化学科 助教授
- 平成4年 東北大学農学部農芸化学科 教授
- 平成11年 東北大学大学院農学研究科 教授（改組に伴う移行）
- 平成14年 現在に至る

### 専門

植物栄養学、植物細胞生化学、植物分子生理学

### 著書

朝倉植物生理学講座②代謝 編集 2001年

### 学会活動・その他

日本土壌肥料学会 第4部門長（1999-2002）、SSPN 編集委員



Plant Cell Physiology 編集実行委員 (1999-2002)

日本植物生理学会 評議員

平成12年～ 理化学研究所植物科学研究センター グループディレクター (兼務)

# 生物的窒素固定を活用した植物生産と環境保全

新潟大学農学部

大山卓爾



## 1. 生命進化と地球環境<sup>1)</sup>

ビッグバンと呼ばれる大爆発によって約 150 億年前に誕生し、今も膨張し続ける宇宙。その片隅で約 46 億年前に太陽系が誕生しました。ほどなく目にみえないほど小さい細菌の仲間の微生物が海の中で誕生し(他の天体から来た可能性もある)、その命は途切れることなく現在まで引き継がれ、人を含む多様で複雑な動物、植物、微生物へと進化しています。生命誕生後、微生物は生育環境に応じて、周囲のいろいろな栄養を取り込み増殖できるように進化しましたが、その中でラン藻など光合成により太陽の光エネルギーを利用して空気中の二酸化炭素を同化することができる微生物が、海洋表層で活発に増殖するようになりました。ラン藻は、植物と同様に光合成に伴い酸素を発生します。ラン藻の光合成により、大気中の酸素濃度が増加し、今から約 15 億年前には現在とほぼ同じ約 20%を占めるようになりました。人や動物には酸素が不可欠ですが、それまで酸素の少ない環境で生きていた多くの微生物には酸素は猛毒であるため深刻な脅威を与えました。あるものは死滅し、またあるグループは地中など酸素の少ない場所で生息する道を選びました。反対に、酸素を呼吸に使って大量のエネルギーを得る能力を獲得した微生物にとって、大気酸素の増加は大歓迎でした。また、大気中に蓄積した酸素からは、オゾン層が形成され、生物を有害な紫外線から守り陸上で暮らせる条件が整いました。さらにこのころ、核など複雑な細胞内構造をもつ真核生物が生まれました。真核生物は、酸素を好む微生物を取り込み、ミトコンドリアとして効率的にエネルギーを得ることができるようになりました。さらにラン藻を取り込み光合成能を獲得したものもありました。真核生物は、海中で菌類や動物、植物など複雑で大型の生物へと進化し、今から約 4 億年前に新天地をもとめ陸上へ進出しました。環境条件が安定している海中に比べ、水分、温度などの環境変化が大きい陸上の過酷な環境下でも生命は適応し進化を続けました。植物は大地に根を張り、枝や葉を天高く広げ、土からの養水分と太陽光エネルギーを利用して効率的に有機物をつくり地表を被うようになりました。それらをエサとする多種多様な動物や微生物による食物連鎖と物質循環による安定な地球生態系が作られてきました。このように生物は地球環境に適応して進化してきたと同時に、生命活動が地球環境を作り上げ維持していることを忘れてはいけません。

## 2. 人類の誕生と農業

つい最近、アフリカのチャドで人類が類人猿と別れた直後と推定される頭骨の化石が発見されました。これによると人類誕生は 700 万年前にまでさかのぼることになります。人類は、言語による社会性と道具の使用により次第に勢力を拡大し、約 1 万年前に農業を開始したと考えられています。人々は定住し、草木を切り開き、土を耕し、肥やしを入れ、種を播き、作物を育て、収穫して生活を営みました。きつい肉体勞

働にもかかわらず、生産性は低く、あるときは、台風や冷害にあい、また、病害虫のためほとんど収穫できないこともあったでしょう。また、農民は圧政や戦争の犠牲になることもしばしばでした。第二次世界大戦後、科学技術の発達により農業は大きく変わりました。化学肥料や農薬の使用、農業基盤整備と機械化、育種や栽培技術の革新により、効率的に高い収量を得ることができるようになりました。そのため、20世紀の100年に4倍に増加した世界人口(60億人)を支えています。しかしながら、20世紀の支配的な考え方であった大量生産と大量消費および経済効率のみの追求は、オゾン層破壊、地球温暖化、大気、水、土壌の汚染など環境と生態系に大きな損傷を与えて来ました。農業においても、農薬や化学肥料の不適切なまたは過剰な使用による農地の荒廃や環境汚染が深刻になっており、食の安全に対する不安も高まっています。特に我が国は、戦後工業製品の輸出と経済大国化をめざし、農業を切り捨て、食料を外国に依存してきました。今や、食料自給率は先進国最低水準となり、農民の数は減少し高齢化や後継者不足に悩んでいます。

国連の統計によると、2050年には世界人口は93億人にのぼり、その90%が途上国に住むと推定されています。特に近隣アジア地域には現在世界人口の61%にあたる37億人が暮らしており、さらなる増加が予想されています。今後、農耕地の拡大が困難であることから考えると単位面積あたりの収量を上げることにより食料生産を確保する必要があります。生産性の向上と地力維持や環境保全の両立をはかる困難な課題を解決するためには、作物が土壌や肥料からどのように養分を吸収するか、養分をどの時期にどのくらい必要としているのか、種や実、イモなどの収穫物に養分はどのように移動蓄積するのかなどの植物の栄養生理や養分の循環に関する基礎的研究が不可欠であると思われます。

## 2. 植物生産に対する土の微生物の働き

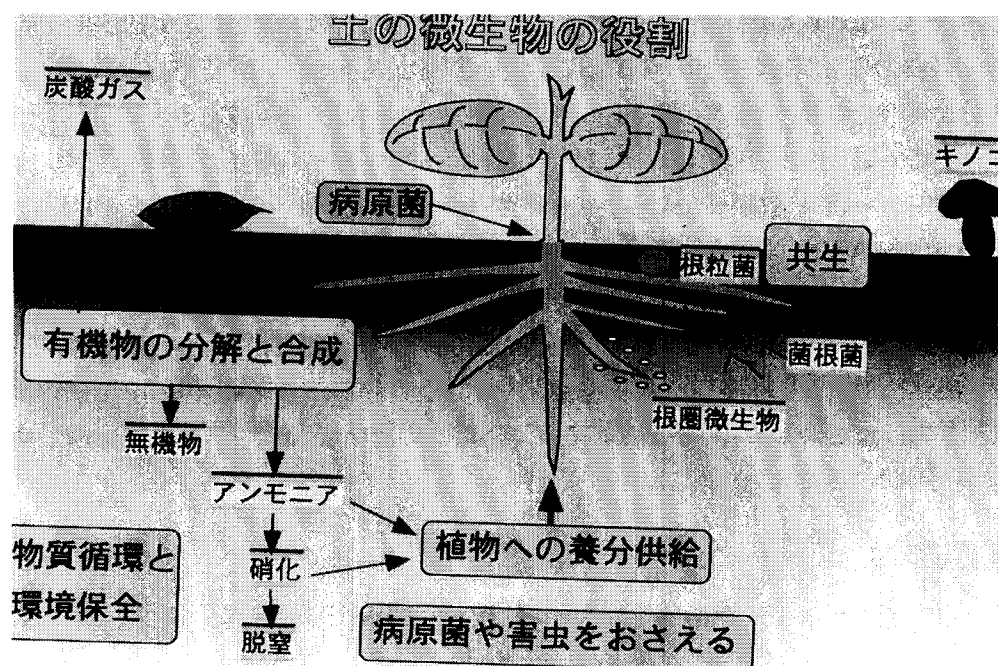


図1. 土の微生物の働き

水耕栽培など土を使わない栽培方法を除いて、多くの農作物は土に植えられます。土は作物の栄養を供給する重要な役割を果たしています。また、土壌中には、ミズなどの小動物とともにスプーン一杯に地球の全人口と同じくらい多数の微生物が生息しています。図1に概略図を示しますが土の微生物や小動物の働きによって、動植物の遺体やふん尿等不要な有機物が分解されて、二酸化炭素と無機物に戻ることにより土壌の環境が保たれるとともに、植物に無機養分を供給し作物の生育を助けています。有機物が分解してできたアンモニアを硝酸に変える硝化作用や、硝酸を窒素ガスにもどす脱窒と呼ばれる化学変化も土の中の特定の微生物が担っています。一部の土壌微生物は病原菌として作物生産に悪影響を及ぼしますが、根近辺(根圏)や植物体内にすんでいる微生物には病原菌を押さえる働きをするものもいます。また、土壌微生物の中には、大豆などのマメ科植物と共生して、根に根粒と呼ばれる器官を形成し、空中の窒素を固定して、植物に与える根粒菌と呼ばれる細菌や、多くの植物の根に共生して根から離れた場所まで菌糸を伸ばすことにより養分吸収域を拡大してリン吸収を助けるカビの仲間の菌根菌、また、植物が利用しにくいリンや鉄等の養分などの溶解を促進する菌などのように植物の生育を直接助ける微生物もいます。これらの微生物を作物栽培に用いるバイオ肥料は、収量を高めつつ化学肥料の使用量を低減することができるため、作物生産と環境保全の両立をはかるためのホープとして大きな期待が寄せられています。

#### 4. 大豆を助ける根粒菌の働き<sup>3)</sup>

人や動物は、タンパク質、炭水化物、脂質、ビタミン等の有機物を植物や他の動物から摂取しなければ生きていけません。植物は、光合成により取り込む二酸化炭素と根から吸収する水と無機養分のみから自分の身体を作り上げることができます。植物に不可欠な養分元素を必須元素といい、9種類の多量元素と7または8種類の微量元素が認定されています。多量元素の中でも窒素は横綱格で、植物の生育や収量は窒素の供給の過不足で大きく左右されます。特に、大豆は、種子にタンパク質を大量に含むため多量の窒素を必要とします。通常植物は土壌有機物の分解によって生じるアンモニアや硝酸、施肥した窒素肥料を吸収しますが、大豆などのマメ科植物は根に根粒とよばれるコブをつくり、その中に土壌微生物である根粒菌を飼い、空気中の窒素ガスをアンモニアに変換して自分の栄養にしています。このように空気中の窒素ガスをアンモニアに変換することを窒素固定と呼びます。根粒菌のように微生物による窒素固定を生物的窒素固定とよび、人工的に窒素ガスからアンモニア肥料を製造することを工業的窒素固定と呼びます。マメを栽培すると土が肥沃になることは古くから知られており、ヨーロッパの輪栽式農業では、休閑のかわりにクローバーなどのマメ科牧草が植えられ、積極的に地力の向上がめざされました。おおまかな見積もりですが、生物的窒素固定による年間窒素供給は、陸上で13,900万トン(農耕地4,400万トン、草地と牧場4,500万トン、その他5,000万トン)、海洋で3,600万トンと見積もられており、窒素化学肥料の使用量8,000万トンを上回っています。

窒素固定を行う微生物の仲間は、細菌、放線菌、ラン藻など細胞核を持たない原核生物に限られています。窒素固定菌には単独生活をする菌と植物と共生して窒素固定を行う菌がいます。共生的窒素固定としてはマメと根粒菌の関係が有名ですが、マメ科以外の植物でも荒地にはじめに進出するパイオニア植物であるハンノキ、ヤマモモ、モクマオウなどが放線菌と共生する根粒を形成して窒素固定を行います。また、ソテツはラン藻と共生する根粒を形成します。根粒以外にも、根の周りや根や茎などに住み着いて窒素を固定する内生菌(エンドファイト)と呼ばれる菌があり、養分が少なくても旺盛に育つサトウキビの内

性菌による窒素固定が注目されています。

農業的にも重要な作物が多い、マメ科植物と根粒菌の共生について詳しく研究されています。我が国の畑で栽培した大豆の窒素のうち、60%から 80%が根粒の窒素固定に依存していることから大豆栽培においては窒素固定をいかに高めるかが大変重要です。図 2 に根粒着生大豆と遺伝的に根粒が着かない非着生大豆を並べて栽培した様子を示します。根粒が着かないと生育は著しく劣り、子実もわずかししか取れません。



図 2. 根粒着生大豆(左)と根粒非着生大豆(右)の生育の様子

##### 5. マメと根粒菌はどのようにして共生にいたるのか<sup>4,5)</sup>

マメ科植物と根粒菌とはお互いに相性があり、宿主特異性とよべれます。大豆は大豆根粒菌とは、根粒を作り窒素固定しますが、クローバー根粒菌が周囲にたくさんいても根粒はできません。マメと根粒菌はお互いにどのようにして相手の存在を知り、根粒形成にいたるのかということは長い間なぞとされて来ましたが、最近、図 3 のようにその最初のステップが明らかとなってきました。

根粒菌とマメとはお互いに口はききませんが、化学物質のシグナルを送ってパートナーであることを確かめあっていたのです。根粒菌は土壌中で単独で生活している時には窒素を固定せず、有機物を分解して生活しています。宿主植物の根から分泌される宿主に特有のフラボノイド化合物(大豆の場合にはダイゼインやゲニステイン)を根粒菌が感知して宿主の存在を知ります。すると、根粒菌の遺伝子が活性化されて、NOD ファクター(根粒形成因子)とよばれるリポキチンオリゴ糖を合成して分泌します。植物は NOD ファクターを認識すると根の細胞が分裂をはじめ、根粒形成の準備に入ります。根粒菌は根の近くへ泳いでゆき、根毛の先に接着します。すると、根毛は根粒菌を巻き込んで感染糸と呼ばれる筒状のトンネルを作りその中を根粒菌は分裂しながら移動していき、最後には皮層細胞の中へ放出され窒素固定をはじめます。根の維管束と根粒の維管束が結合して根粒菌と植物の物質の受け渡しができるようになります。

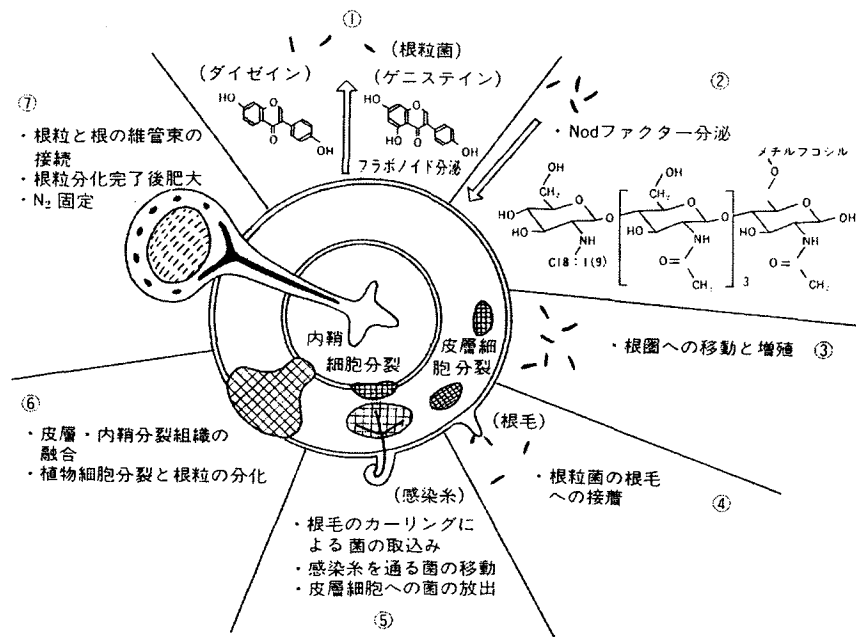


図3. 大豆根と根粒菌の相互認識と根粒がつくられるまで<sup>4)</sup>

フラボノイドはもともと植物が病原菌を抑えるために分泌する抗菌物質です。また、キチンオリゴ糖は、カビなどの細胞壁に含まれ、病原菌が感染した時に植物が防御反応を開始するためのシグナルです。このように、もともとは病原菌と植物の戦いに用いた武器をマメと根粒菌は共生を行うためのコミュニケーションの手段に転用したのです。生命が生き延びるためのしたたかさや柔軟さには本当に驚かされます。

さらに、大豆には、根粒を必要以上につくらず、初期の感染が引き続く根粒の生長を抑えます。接木や単葉根を用いた実験から、根粒菌が感染したという「感染シグナル」が葉へ送られると、葉で根粒の生長を抑制する「オートレギュレーションシグナル」を合成して地下部に送っていると考えられています。病原菌の感染を知らせるサリチル酸が、根粒菌の感染シグナルである可能性も示唆されています<sup>6)</sup>が、まだ最終的な結論は得られていません。

## 6. 大豆の根粒で固定した窒素と根から吸収した窒素の違い

大豆などのマメは、根粒で固定する窒素と根から吸収する無機窒素(主に硝酸)の二つの窒素を同化できます。いわば、窒素同化に関して二つのエンジンを持っているのです。しかし欲張って、窒素肥料を大量に与えると、根粒は着かず、窒素固定エンジンは停止してしまいます。さらに、窒素肥料を与え過ぎると、葉や茎ばかり大きくなり莢つきが悪くなったり、倒れやすくなります。一方、根粒だけに頼ると、根粒の着生や窒素固定活性は気象や土壌条件で変化しやすいため、葉や茎の初期生長が遅れたり、登熟期に早く葉が枯れ上がったたりして十分な収量が得られないことがあります。このように、根粒で固定する窒素と根から吸収する硝酸は、大豆の生長に違った影響を与えますが、その違いはなぜなのでしょう。これは、図4に示すように大豆根粒で固定した窒素は、導管を通して主にウレイド(アラントイン酸とアラントインという化合物)として葉へも莢へも同時に輸送されるのに対して、根から吸収した硝酸は同じく導管を経由しますが、主に、硝酸(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)またはアスパラギンとして大部分が葉へ送られることによると考えられます。このため、根から吸収した窒素は葉や茎の生長を促進する効果がありますが、過剰に与えるとバランスを崩し

て、葉ばかりに栄養が片寄り莢着きが悪くなるのです。

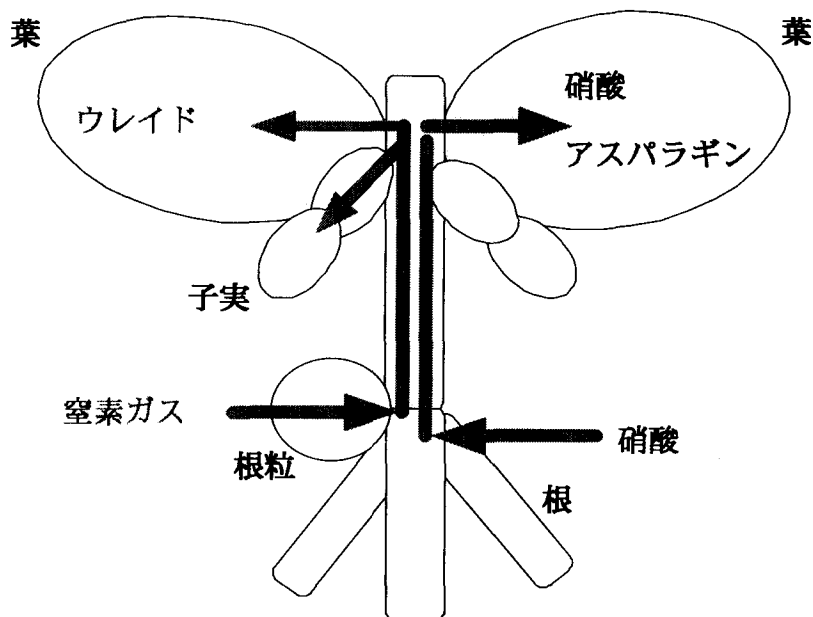


図 4. 根粒で固定した窒素と根から吸収した窒素の違い

根粒で固定した窒素も根から吸収した窒素も大豆の体内に入れば見分けが付きません。そこで、私達は、これらの窒素にマークをつけてその動きを追いかけています。すなわち窒素のアイソトープを使って区別しています。放射能を持たない窒素のアイソトープ(安定同位体)には、多量に存在している  $^{14}\text{N}$  (99.6%)と微量に存在する  $^{15}\text{N}$  (0.4%)が混在していますが、 $^{15}\text{N}$  を濃縮して窒素ガス( $\text{N}_2$ )または硝酸( $\text{NO}_3$ )として与え、熊澤喜久雄先生が開発された発光分光法や質量分析法で分析することができます<sup>7-9)</sup>。また、最近では、大学と原研の共同プロジェクトにより寿命の短いラジオアイソトープ(放射性同位体)の  $^{13}\text{N}$  を使って、窒素の動きの変化を画像としてみることもできるようになりました<sup>10)</sup>。私達の研究室では、目に見えない窒素の動きをアイソトープを使って研究しています。

## 7. 根粒の窒素固定と両立する窒素施肥技術

窒素肥料を与えると根粒の形成と窒素固定活性が抑制されますが、この抑制作用は硝酸で強いことが知られています。最近、私達の研究室で、大豆根粒の肥大と活性の阻害と回復が、水耕培地中の硝酸の有無により急速にかつ可逆的に起こることを発見しました<sup>11)</sup>。ただし、硝酸の根粒生長阻害効果は、直接硝酸と接触している根でのみ強くあらわれ、離れた部分では通常抑制を受けません。そこで、新潟県農業総合研究所の高橋能彦氏は、緩効性窒素肥料の被覆尿素を基肥として大豆の播種位置直下 20cm の深さに埋め込む深層施肥法を考案しました<sup>12)</sup>。この新しい施肥法により、大豆の収量は飛躍的に増加しました。その理由としては、深層部にゆっくりと窒素を放出する被覆尿素を埋め込んだため、地表近辺の硝酸濃度は低く保たれ、地表近くに多く着生する根粒の形成と窒素固定を阻害しなかったこと、また、下部の根から持続的に吸収する窒素は生育後半まで葉の活性を保ち、光合成産物の莢や根粒への供給を持続したことによることが分かりました。さらに深層施肥した  $^{15}\text{N}$  標識肥料の植物への回収率の測定から、施肥した被覆尿素は窒素の 60%以上が植物に吸収されたのに対し、通常慣行的に与えられている基肥

硫安は 10%しか利用されていないことが分かりました。したがって、被覆尿素の深層施肥は肥料が硝酸となって地下水に流入したり、脱窒によりロスすることを防ぐ意味で環境にやさしい施肥技術といえます。昨年、新潟県の 3 ヶ所の圃場で深層施肥の実験を行った結果、緩効性窒素肥料であり、硝酸化成抑制作用を併せ持つ石灰窒素の深層施肥でも、被覆尿素の深層施肥に劣らない生育促進と増収効果が見られました。

新潟県農業総合研究所と私達の研究室は 15 年近く深層施肥について共同研究を続けており、大学での基礎的研究と農業現場により近い試験場との密接な協力の大切さを痛感しています。

## 8. アジアにおける生物的窒素固定など微生物を活用する環境保全型農業の発展<sup>13, 14)</sup>

世界人口の 61%を抱えるアジア地区では持続的農業生産による食料供給の維持が不可欠ですが、すでに中国をはじめ多くの国々で、化学肥料を過剰に与えたり、不適切な使用により、農地の荒廃や生産性の低下、水質汚染等が起きています。化学肥料自体が悪いという意見もありますが、私はそうではなく、使い方が悪いと考えています。化学肥料による増収効果に目を奪われ、必要量の何倍も与えたり、また、取り扱いやすい化学肥料に頼るばかりに堆肥や有機物の農地への還元を断ち切ってしまったところに問題があると思います。

そのような中で、根粒菌や菌根菌はじめ土壌微生物の働きを上手に利用して、化学肥料の低減をはかることを目的に、今年からアジア原子力協力フォーラムで、日本、中国、インドネシア、韓国、マレーシア、フィリピン、タイ、ベトナムの 8 ヶ国の参加のもとバイオ肥料プロジェクトがはじまりました。根粒菌による窒素固定は、その大部分が植物に利用されるだけでなく、枯葉や残さも地力の向上に役立ち、化学肥料の使用量を減らし環境と土壌を保護する上でおいに活用するべきだと思います。また、菌根菌は、雲仙普賢岳の溶岩に被われた土地の植生回復に驚異的な効果を示しました。土壌中にすでに存在しているこれらの微生物を活用すると共に、人工的に増殖して植物や土壌に積極的に接種することも大切です。我が国では、転換畑による大豆の作付けが強く奨励されていますが、十勝など昔からの大豆畑作産地以外では根粒菌の接種があまり行われていません。これはアジアの多くの国でも共通のようです。しかし、大豆の大生産国(1280 万 ha で平均収量  $2.5\text{t ha}^{-1}$  をあげている)であるブラジルでは、毎年、優良菌株の選別と配布が行われ 58%の農家が根粒菌を接種(接種剤としては、ピート剤が 55%、液体が 45%)しているそうです。我が国でもダイズや他のマメ類の安定多収と環境保全型農業をめざして、微生物の接種方法の改良も含めて根粒菌接種について再検討すべきであると感じています。

日本だけでなく、世界の農民、研究者、技術者、消費者、市民、関連企業が手をたずさえて、人類の生存と地球環境保全に向けた新しい農業技術の開発をめざす必要があると思います。植物栄養学は、その中心となる学問分野ですので若い高校生や学生の皆様におおいに関心を持って頂き、将来この分野で活躍されることを心より期待しております。

## 9. 参考文献

- 1) 大山卓爾:第 2 章、微生物と植物の助けあい、—マメ科植物と根粒菌の共生のしくみ—、福田雅夫・大山卓爾・堀秀隆・小島誠・早川徹(著):微生物からのメッセージ —21 世紀に活かす道—、エンタプライズ、産学社、2001.
- 2) 大山卓爾:第 5 章、微生物と植物生産技術、池田武・葭田隆治(編):植物資源生産学概論、養



- 賢堂、p105-146、2000.
- 3) 大山卓爾:ダイズ栽培の基礎理論、I ダイズの特性と収量の考えかた、転作全書(第二巻)ダイズ・アズキ、農文協、p181-214、2001
  - 4) 大山卓爾:V. 3.(1) 窒素固定の役割と共生的窒素固定、森敏・前忠彦・米山忠克(編):植物栄養学、文永堂出版、p103-110、2001.
  - 5) 大山卓爾:植物の根に関する諸問題—マメ科植物の根粒形成と窒素固定の制御、農業および園芸、72 巻、p321-324、p427-432、1997.
  - 6) Sato, T., Fujikake, H., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Takahashi, T. Sato, A. , Ohyama, T.: Effect of exogenous salicylic acid supply on nodule formation of hypernodulating mutant and wild type of soybean. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 48, p413-420, 2002
  - 7) 大山卓爾:ダイズ根粒に固定された窒素の挙動、日本土壤肥料学会編:根粒の窒素固定—ダイズの生産向上のために—、博友社、p107-150. 1982.
  - 8) 大山卓爾:ダイズの共生的窒素固定と化合態窒素の代謝、—トレーサー窒素を追いかけて—、肥料科学、21 号、p27-80、1999.
  - 9) 大山卓爾:ダイズにおける硝酸の吸収代謝と窒素固定、化学と生物、29、p433-443、1991.
  - 10) 山崎慎一・吉羽雅昭・藤田耕之輔・関根俊明・内田博・松橋信平・大山卓爾・中西友子・森敏:ポジロン放出核種の植物体における非破壊的・経時的・動的解析、日本土壤肥料学雑誌、71 巻、p927-933、2000.
  - 11) Fujikake,H. Yashima, H., Sato, T., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Ohyama, T.: Rapid and reversible nitrate inhibition of nodule growth and N<sub>2</sub> fixation activity in soybean (*Glycine max* (L.) Merr), *Soil Sci. Plant Nutr.*, 48, p211-217, 2002
  - 12) 高橋能彦・池主俊昭・中野富夫・大山卓爾:緩効性窒素肥料(被覆尿素)の深層施肥によるダイズ安定多収技術の植物栄養学的解析、農業および園芸、68 巻、p282-288、1993.
  - 13) 大山卓爾:アジアにおけるバイオ肥料の研究と利用技術の交流を目指して—アジア原子力協力フォーラムでプロジェクト開始—、*Isotope News*, 2002 年 6 月号、p2-9
  - 14) 赤尾勝一郎・田島茂行・大山卓爾・安藤象太郎・南澤究:共生窒素固定研究の展開と持続的食糧生産、日本土壤肥料学雑誌、73 巻、p73-78、2002.

#### 講師プロフィール

学歴:昭和 50 年 東京大学農学部農芸化学科卒業

昭和 52 年 東京大学大学院農学系研究科修士課程修了

昭和 55 年 東京大学大学院農学系研究科博士課程修了(農学博士)

職歴:昭和 55 年-57 年 日本学術振興会奨励研究員

昭和 57 年- 新潟大学農学部助手、昭和 61 年より同助教授、平成 9 年より同教授

抱負:植物の栄養生理に関する基礎的研究を通して、大豆の生産や品質向上に貢献したい。

# ホウ素から見た植物細胞壁の働き

京都大学大学院農学研究科

間藤 徹

## 1. ホウ素の必須作用

ホウ素が高等植物の必須元素であることは 1923 年厳密な水耕栽培によって明らかにされた。ホウ素が欠乏すると新芽が枯れ根が伸長しない。その後、トマト果の尻腐れ、ハクサイ結の芯腐れ、チューリップの首折れ、オオムギの不稔などがホウ素の欠乏によって生じることが明らかになった。植物の生育には水と大気から得られる炭素、水素、酸素以外に 13 の無機元素が必須である。これらの元素のうち欠除によって直ちに根の伸長が停止するのはホウ素とカルシウムだけである<sup>1)</sup>。さらにホウ素が欠乏すると不稔になることが多い。花粉に水分を与えると花粉が発芽し花粉管が伸長する。このとき根と同様にホウ素とカルシウムが必須である。つまりホウ素が欠乏した植物では花粉管が十分に伸長できないので受精が阻害され不稔になる。トマト果実やハクサイ結球の急激な増大も細胞の伸長肥大によって生じ、このときホウ素の不足が顕在化する。ホウ素は細胞の伸長生長に必要であると推察されてきた。

ホウ素の欠乏による障害は上位葉や茎頂、根端にまず発生するのでホウ素の体内での移動性は低いと考えられてきた。しかしヒマワリ上位葉のホウ素欠乏は、下位葉の水溶性のホウ素がほとんどなくなるまで、発生しなかった。培地からホウ素を欠除した場合、ダイズ、ヒマワリ、ナスなどでは下位葉のホウ素が上位葉に移動し欠乏症がなかなか発生しないが、キュウリやサトウダイコンでは下位葉のホウ素は動きにくく上位葉にただちに欠乏症が発生する。これらの結果はホウ素の体内での易動性が種によって異なることを示唆している。開花が始まるまでホウ素を与えて栽培したダイズをホウ素欠除培地に移すと、新芽、花、根端は壊死したが、中位葉、下位葉は枯れることなく緑を保ち個体は生存を続けた。ホウ素は細胞が伸長、肥大する、細胞壁代謝が活発な時期に特に要求されるようである。

このようなホウ素の機能を知るため、まずホウ素が植物の細胞のどこに存在しているのかを知ろうと考えた。

## 2. ダイコンのホウ素多糖複合体

ダイコンをすりおろすとダイコンに含まれるホウ素の約半分は水で洗い出され、残りは細胞残さに結合していた。水で洗い出されるホウ素はホウ酸であった。細胞残さ中ではホウ素は細胞壁に結合していた。細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、ペクチン、タンパク質などの高分子化合物から構成される。細胞壁にこれらの分解酵素を作用させたところペクチナーゼによって細胞壁に結合したホウ素がもつとも多く可溶化された。ホウ素とともに可溶化される多糖断片を精製して分子量約1万のホウ酸多糖複合体を得た<sup>2)</sup>。ホウ素の含有率は約 0.2%であった。ホウ酸多糖複合体を 0.1M 希塩酸で 30 分加水分解すると多糖は分解されなかったがホウ酸が離脱し分子量は半減した。この結果はホウ酸が分子量 5000 の2本のペクチン鎖を架橋していることを示唆する。この多糖の構造を解析したところペクチン質多糖の一つとして知られていたラムノガラクトシロナン II(RGII)であった<sup>3)</sup>。これらの一連の実験結果は細胞壁のペクチナーゼ分解物の中にホウ酸で架橋された二量体 RGII が存在していることを示している。この複合体はすべての高等植物

に存在した。さらにこの複合体はホウ素と等モルのカルシウムイオンを含んでいた。

ペクチン質糖鎖は、ガラクトuron酸だけから構成されるホモガラクトuron領域、ラムノースとガラクトuron酸が交互に連結したラムノガラクトuron I 領域、そしてポリガラクトuron主鎖に希少糖に富む4本の側鎖のついたラムノガラクトuron II (RGII) 領域の3つの部分から構成されている。つまり細胞壁の中では2本のペクチン質糖鎖が RGII 領域でホウ酸とカルシウムイオンによって架橋されていると結論した。

このホウ酸-RGII 複合体の抗体を用いて細胞内の分布を検討した<sup>4)</sup>。この複合体はすべての細胞の細胞壁に存在した。細胞壁内部では細胞膜に近接した若い細胞壁や細胞の角の部分に多く検出された。つまり細胞壁に分泌されたペクチン質多糖は分泌後直ちにホウ酸によって RGII 領域が架橋され高次構造を形成していくと推察される。ホウ素の欠除によって伸長が直ちに停止する花粉管でもホウ酸-RGII 複合体は高い密度で細胞壁に検出された。ホウ素が欠乏すると細胞壁ペクチンが架橋されないと思われる。そこで培地ホウ素濃度を下げて培養したタバコ培養細胞のホウ酸-RGII 複合体を調べた。ホウ素が充分与えられている細胞壁の RGII はすべてホウ酸で架橋された二量体だった。一方、ホウ素欠乏の特徴である細胞壁の膨潤したホウ素を制限した細胞では細胞壁 RGII の 30%が二量体、70%が単量体で存在した<sup>5)</sup>。これらの結果からホウ素欠乏下では RG-II 部分が十分に架橋されず、その結果として細胞壁は膨潤してしまうと考えた。

細胞壁の吸水性、保水性はガラクトuron酸のカルボキシル基の解離状態で決まる性質である。細胞壁が膨潤している状態とは解離したカルボキシル基が水分子をたくさん引きつけている状態をいう。しかし、カルボキシル基にカルシウムイオンが配位結合すると水が追い出され細胞壁は堅く薄くなる。カルボキシル基の解離状態を制御するのはカルシウムイオン濃度である。ホウ酸が欠乏して RG-II 部分で二本のペクチン質多糖鎖が架橋されないとカルシウムイオンがペクチン質カルボキシル基に配位結合できず、その結果膨潤してしまうのではないだろうか？ホウ素はペクチンとカルシウムイオンの結合を介して細胞壁の性質を制御しているのではないかと考える。

### 3. 細胞壁のカルシウムイオン

カルシウムイオンは細胞内で濃度の変化によってシグナルを伝達するセカンドメッセンジャーとして植物細胞においても動物細胞と同様の機能を果たしている。動物細胞ではカルシウムイオンは骨に集積し血液中の濃度はホルモンによって制御されている。植物細胞ではカルシウムイオンがもっとも多く存在するのは細胞壁で、ペクチン質多糖のガラクトuron酸カルボキシル基に結合して存在する。ダイコン細胞壁をキレート剤で処理してカルシウムイオンを除去するとペクチン質多糖の 40-50%が流出する。しかし同時にペクチン分解酵素による断片化も生じる。そこでペクチナーゼの作用を除くため細胞壁をまず界面活性剤 SDS で処理したところ細胞壁カルシウムのほとんどが溶出した。しかしペクチン質多糖は大部分が保持されたことから、SDS で溶出するカルシウムイオンはペクチン質多糖の保持には関与していないと考えた。SDS で処理して大部分のカルシウムを除いた細胞壁をペクチナーゼで分解すると残存するカルシウムはホウ素、RG-II と同じ位置に溶出された。つまり SDS で溶出しないカルシウムは RG-II に会合したカルシウムイオンであり、RG-II 領域のホウ素とカルシウムイオンによる架橋こそがペクチン質多糖を細胞壁にとどめる機能を果たしていた<sup>6)</sup>。

では RG-II に会合せず SDS で溶出するカルシウムイオンはどのような機能を果たしているのだろうか。動物細胞では細胞内のカルシウムイオン濃度は常に  $10^{-7}$ M 程度に保たれている。何かの刺激が細胞に

伝えられると細胞内のカルシウムイオン濃度が急激に上昇して細胞活性に変化が生じ情報の伝達が完成する。このために動員されるカルシウムイオンの給源として細胞外のカルシウムイオンが有力視されている。つまり細胞膜のカルシウムチャンネルが刺激を受けて開口し細胞外のカルシウムイオンが流れ込む。細胞外のカルシウムイオン濃度、すなわち血液中のそれは  $10^{-3}\text{M}$  に維持されており、細胞膜の内外で1万倍もの濃度勾配が保たれている。カルシウムイオンは細胞内から排除されているといわれるが、シグナルトランスダクションを円滑に行うために内外に濃度勾配をもち細胞の外側に高濃度で分布すると考えることもできる。先に述べたように植物細胞では細胞壁ペクチン質多糖がカルシウムイオンを保持している。植物根が接する土壌溶液のカルシウム濃度は土壌母材や水分条件に影響され、根からのプロトン放出などによって変化するだろう。細胞膜の内外に適切なカルシウム濃度勾配を形成、維持するためにペクチン質多糖のカルボキシル基が細胞膜直上のカルシウムイオン濃度を制御しているのではないだろうか？

最近、我々の共同研究者がホウ素を培地から欠除すると細胞のエキソサイトーシスが停止することを見つけた。エキソサイトーシスはカルシウムイオン濃度に強く影響される。また、先に述べたようにホウ素が欠乏した細胞壁ではペクチン質多糖の水和、膨潤が生じている。適切なカルシウムイオンの配置-それは細胞壁の水分状態から推察することができる-が細胞膜内外のカルシウムイオンの濃度勾配を形成するために必要であろう。ホウ素はペクチン質多糖鎖の配置を制御することで細胞壁-細胞膜界面のカルシウム濃度を制御しているのではないだろうか？

#### 4. 細胞壁

細胞壁は細胞の外側を取りまき細胞に強度を与えたり、形を決めたり、大きさを調節したり、菌糸の侵入や食害を防ぐ、といったどちらかというと不活発な器官だと考えられてきた。細胞壁は土壌環境との接点でもある。環境から植物へのよい作用であれ悪い作用であれ最初にその作用が及ぶのは根の細胞壁である。植物はいったん根を下ろすとその場から動くことができない。根を下ろした土壌環境がよくない場合でも何とか折り合って生長しようとする。ホウ素とカルシウムは欠乏すると根の伸長が直ちに停止する。その環境で根が伸ばせるかどうかはその土壌にホウ素とカルシウムが十分あるかどうかにかかっている。この点からホウ素とカルシウムこそが環境元素と呼べるかもしれない。

植物に対する塩害、酸性害、アルミニウム過剰害などの障害がカルシウムの増施で軽減される。逆の見方をすれば、これらの障害は根でのカルシウムの機能を阻害する結果生じているのかもしれない。イネの塩害は培養液のカルシウム濃度を高めると軽減された。さらにポリエチレングリコールを培養液に共存させるとナトリウムイオンの根への侵入が低下し耐塩性が強化された。高濃度のナトリウムイオンはカルシウムのペクチン質多糖への結合を拮抗的に妨害しペクチンネットワークの形成を妨害する。ポリエチレングリコールはペクチン質多糖に疎水結合することでペクチンネットワークを安定化している可能性が考えられる。アルミニウム過剰害への耐性機構の一つに根からの有機酸の分泌がある。根はリンゴ酸、クエン酸、シュウ酸などを放出して根近傍のアルミニウムイオンをキレートしてしまうことによって障害を軽減する。カルシウムによる障害軽減作用と併せて考えると、これらの有機酸はカルシウムが本来結合する部位にアルミニウムが結合することを妨害することで耐性を与えるのだろう。土壌 pH が低下しても細胞壁のカルシウムイオン濃度が高ければペクチンネットワークは影響を受けにくい。

最近ラオスの焼き畑の調査を行っている。石灰岩を母材とする土壌は無施肥でトウモロコシを連作しても高い収量を維持する。連作による収量の低下とは有機物や土壌無機窒素の枯渇ではなく土壌鉍物か

ら土壌溶液へのカルシウム供給が作物の吸収に追いつかないことで起こるのではないだろうか。カルシウムに富む土壌はよい土壌である。しかし高等植物の中にはイネのようにカルシウムを嫌う嫌石灰植物もある。イネは多くの高等植物が嫌う低カルシウム酸性土壌に適應するためにカルシウムの代わりにケイ酸を要求するようになったのではないだろうか。イネでもホウ素もカルシウムも必須であるが、それらの要求量もペクチンの含有率も少ない。

細胞壁は細胞の中から見たら一番の外側、細胞膜の外側だが、外から土壌から見れば中の始まりである。食料生産を維持しつつ環境への負荷をできるだけ下げるためには植物根細胞壁の機能解明が必須であり、それは植物栄養学が大きく貢献できる領域でもある。

## 5. 参考文献

- 1) Kouchi, H and Kumazawa, K.: Soil Sci. Plant Nutri., 21: 21-28, 1975.
- 2) Matoh, T. et al.: Plant Cell Physiol., 37: 636-540, 1993.
- 3) Kobayashi, M. et al.: Plant Physiol., 110: 1017-1020, 1996.
- 4) Matoh, T. et al.: Plant Cell Physiol., 39: 483-491, 1998.
- 5) Matoh, T. et al.: Plant Cell Physiol., 41: 363-366, 2000.
- 6) Kobayashi, M. et al.: Plant Physiol., 119: 199-203, 1999.

## 講師プロフィール

### 学歴

昭和 52 年 3 月 京都大学農学部卒業

昭和 57 年 3 月 京都大学農学博士課程修了

### 職歴

昭和 57 年 5 月 京都大学農学部助手

平成 6 年 5 月 京都大学農学部助教授

現在に至る

### 専門

#### 植物栄養学

特にナトリウム、ホウ素、カルシウムの植物における機能について研究してきた。最近では堆肥の品質評価法、有機栽培の実態に興味がある。さらにタイ、ベトナム、ラオス、ガーナなどでの農業開発に従事している。

### 学会活動・その他

日本土壌肥料学会, 日本植物生理学会, 熱帯農業学会など

# 鉄代謝遺伝子を健康・食糧・環境に役立てよう

東京大学・大学院農学生命科学研究科・森 敏

## 1. はじめに－植物の鉄代謝研究

植物の鉄欠乏症(クロロシス:黄白化症)は、土壌のpHが高いために、鉄が不溶態( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ )となつて沈殿してしまい、植物が吸収できないために起こる。鉄はクロロフィルやヘムの前駆体であるポルフィリン環の生合成に必要であるので、鉄が吸収されないと、クロロフィルが合成されないために葉緑体での光合成が行われぬ。また、ヘムも合成されないために、ミトコンドリアでの呼吸ができなくなる。その結果植物は枯死する。世界の30%はアルカリ土壌であり、とりわけ20%を占める石灰質土壌では、炭酸カルシウムによる強いアルカリ緩衝能のために、土壌改良や施肥による生産力向上は困難であった。従つて過去30年の研究の主流は、このような不良土壌でも成育できる植物を育種選抜することと同時に、この不溶態の鉄を植物が如何に吸収するのか、そのメカニズムを解明することであった。

## 2. 植物の鉄代謝に関わる遺伝子 (*AHA2*, *IRT1*, *FRO2*, *YS1* など)

これまでの研究の結果、図1に示すように、イネ科以外の植物の鉄獲得機構(Strategy-I)と、イネ科植物特有の鉄獲得機構(Strategy-II)が解明された。これらの機構に関わる遺伝子も全てクローニングされた。しかし、地上部で導管や師管に鉄が転流したり、細胞内で代謝されたりする場合に必要なタンパク質についてはまだ完全には明らかになってはいない。Strategy-IIの主体をなす鉄のキレーターであるムギネ酸類について、その生合成経路が明らかにされ、筆者のグループによって、メチオニン以降のすべての関連遺伝子(*SAMS*, *NAS*, *NAAT*, *DMAS*, *IDS3*, *IDS2*)がクローニングされた(図2)

## 3. 食糧生産に関わる植物の鉄代謝遺伝子

### 3-1. 石灰質土壌における鉄欠乏耐性イネ、トウモロコシの創製 (*HvNAAT*, *HvNAS1*, *IDS3* など)

石灰質土壌でも稲作ができれば、世界の30億人が米を主食としているので、朗報となる。そこで筆者らの研究室では、まずニコチアナミンアミノ基転移酵素のゲノム遺伝子 *HvNAAT* (11kb) を導入したイネを作出して石灰質土壌で検定し耐性系統を選抜した(2)。現在、オオムギの *SAM*・*NAS*・*NAAT*・*DMAS*・*IDS3* の全ての遺伝子を同時に導入して、オオムギ並みの石灰質土壌耐性イネを作出しつつある。同じくトウモロコシも作出しつつある。アメリカのコーンベルト地帯には実は広大な石灰質土壌があり、この不良土壌耐性種トウモロコシの創製は強く望まれているものである。

Strategy I 植物の鉄代謝機構

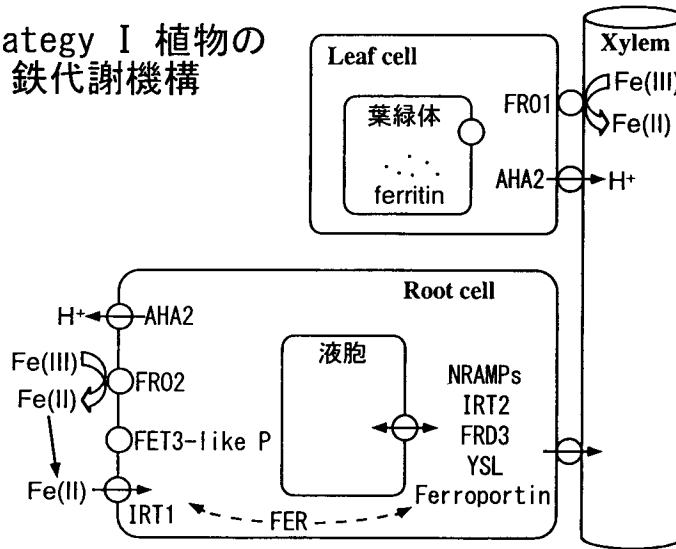


図1 高等物の2種類の鉄獲得機構：Strategy-I, Strategy-II

Strategy II 植物の鉄代謝機構

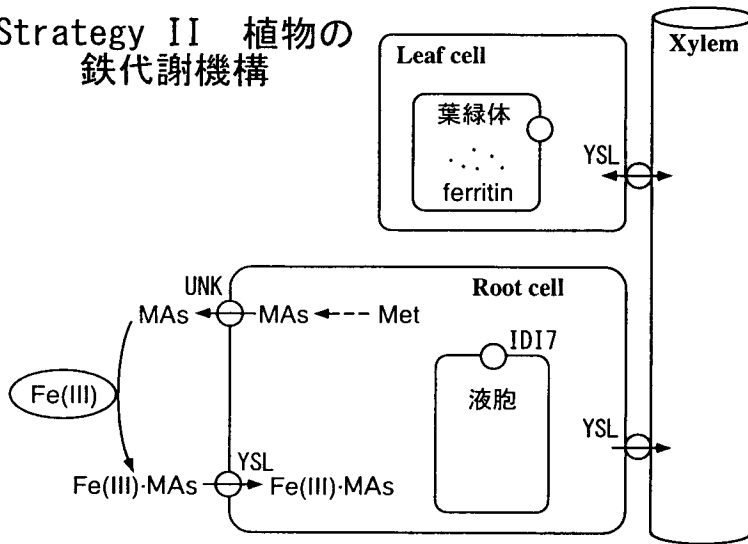


図2 イネ科植物のムギネ酸合成経路

### 3-2. 石灰質土壌における鉄欠乏耐性ダイズの創製 (*REFREI-1*, *HvNAS1*)

双子葉植物の鉄欠乏耐性種を得るための試みとして、酵母の3価鉄還元酵素の遺伝子 *FRE1* を進化工学的に改変して、アルカリ条件でも強い酵素活性を示すようにした *REFREI-1* の遺伝子を作成した。これを 35S プロモーターにつないでタバコの導入し、石灰質土壌に強い耐性のタバコを作成した。つぎにこの *REFREI-1* 遺伝子と *HvNAS1* (ニコチアナミン合成酵素遺伝子: 図1 Strategy-II 参照) を同時に大豆に導入して、石灰質土壌耐性の大豆を作成している最中である。*HvNAS1* を入れる理由は、この酵素によって合成されるニコチアナミンは鉄の導管中のキャリアーとして、吸収された鉄を有効に地上部に運ぶと考えられるからである。アメリカのピーンベルト地帯や中国にも、実は広大な石灰質土壌が存在し、ダイズの耐性種が強く望まれている。

### 4. 環境修復に関わる植物の鉄代謝遺伝子 (*AtIRT1*)

Strategy-I (図1) タイプの代表である *Arabidopsis* は全遺伝子が解読された。このキープタンパク質である2価鉄トランスポーターの遺伝子 *IRT1* (図1) の特定の塩基を他の塩基に遺伝子操作で置換して、アミノ酸としての翻訳産物を Ala に変化させると、Ni や Cd の吸収が促進される事が Guerinot ML らによって報告されている (3)。しかしこれらの変異 *Arabidopsis* はこのままでは重金属過剰症のために生育不良である。そこで、これらの変異種子に再度  $\gamma$  線や重イオン (4) を照射することによって突然変異をおこさせて、重金属土壌でも旺盛に生育する重金属耐性の品種を選抜する事が可能となってきた。重イオン照射については日本原子力研究所・高崎研究所が精力的にその有効化技術を開発している。このようにして重金属が過剰集積しても枯れずに植物体のバイオマスが大きく育つ植物が得られれば、どんな方法よりも低廉に重金属汚染した土壌を浄化できる。土壌浄化法 (スー

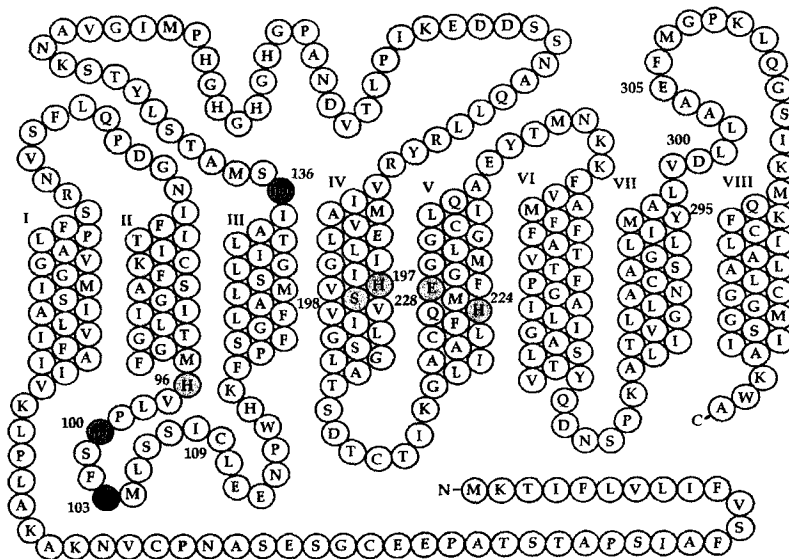


図3 本来2価鉄のトランスポーターの遺伝子である *IRT1* に点突然変異を与えた場合の重金属親和性輸送能の変化。Asp 100 Ala の置換で亜鉛 (Zn) とカドミウム (Cd) が、Asp 136 Ala の置換で、亜鉛の吸収が促進される。



パーファンド)が日本においても成立したので、既存の種の中から重金属を集積する遺伝子資源を発見することばかりでなく、「積極的に新しい重金属耐性植物を創製すること」はいまや植物遺伝子産業化の有望な戦略目標である。たとえばトウモロコシやソルガムやひまわりは生育のスピードが速くバイオマスも大きいので、これに上記の Arabidopsis の変異遺伝子を導入して、つぎに、放射線による突然変異種の選抜を行えばよいことになる。同様に、ダイオキシンなどの有機塩素化合物の一連の分解酵素遺伝子を導入した植物を創製して土壌浄化する研究も試みられている。

## 5. 健康に関わる植物の鉄代謝遺伝子

### 5-1. 高鉄含有米の創製 (*PsFerritin*)

世界の人口のうち2分の1(30億人)は貧血症であるといわれている。日本でも成人女性の血液は比重不足で初回献血者として訪れた平均25.3%は不適合である。そして全献血者のうち比重不足献血者は1992年の11.5%から2001年の19.2%まで確実にふえ続けている事が高松赤十字病院の内田立身院長らによって報告されている(表1)。そこで、鉄含量の高い穀物を創製してそれを常食する事が貧血に伴う多くの重い病気を回避するのに必要である。ダイズのフェリチン遺伝子をグルテリン・プロモーターとともに導入した稲を電力中央研究所の後藤らのグループがすでに開発している。このお米は通常米の平均2.5倍の鉄含量を示す(表2)。彼らは若い女性の嗜好にあった素材を提供しようとしてレタスにもフェリチン遺伝子を導入し、通常の品種の数倍の高鉄含有レタスを創製した。フェリチンは1分子に4000コの鉄分子を結合する能力を有しているので、植物体内での鉄のシンク(受け取り方)ある。しかし、フェリチン遺伝子の導入によってシンクを増やせてもソース(供給方)を増やさなければ、実際の鉄含量増加にはつながらない場合が考えられる。植物の場合、いったん組織に沈着した不溶態の鉄はなかなか可溶化して再転流して種子に移行してこない。たとえばイネの登熟期に必要な鉄はそのとき根から吸収された鉄で

年度	申込者数	比重不足	比率	表1 女性の年度別比重不足献血者(7)
1992	268,480	30,828	11.5	
1993	354,209	41,986	11.9	
1994	513,524	76,050	14.8	
1995	668,413	109,068	16.3	
1996	704,771	111,463	15.8	
1997	721,886	114,116	15.8	
1998	746,917	123,380	16.5	
1999	817,538	146,030	17.9	
2000	828,141	149,519	18.1	
2001	862,640	165,706	19.2	

なければならない。そこでわれわれは、稲の生育の登熟期に種子（シंक）の遺伝子導入フェリチンが鉄を要求するときに、ここの鉄欠乏のシグナルを根が感じて根（ソース）でムギネ酸合成酵素類の活性を高めてムギネ酸分泌量を高め、結果的に鉄の総吸収量が高まる事をねらったベクター（albumin-promotor: *Ps ferritin*・*HvNAAT*・*HvNAS*）を開発して、現在これを遺伝子導入したイネを作出しつつある。

表2 ダイズのフェリチン遺伝子を導入したお米の鉄含量 (1)

	種子	葉	茎	根
遺伝子導入イネ				
(1)	266.4	87.8	95.8	100.6
(2)	251.0	82.8	103.2	101.1
野生株	100	100	100	100

#### 5-2. 高ニコチアナミン含有米の創製 (*HvNAS1*)。

全ての植物にはニコチアナミンが存在する。近年種々の食用植物からアンジオテンシン-I 転換酵素 (ACE) の酵素活性阻害を指標にして化合物を精製していったところ、その実体がニコチアナミンであることが明らかにされた (表3)。アンジオテンシンはこの ACE の作用によって分解されてアンジオテンシン II (AII) という昇圧ペプチドになり血圧が上昇する (図4)。逆にこの酵素活性を阻害すれば血圧降下作用が起こる。したがってニコチアナミンは有力な天然の血圧降下剤である。そこでわれわれは、われわれがクローニングしたオオムギのニコチアナミン合成酵素遺伝子 (*Hvnas1*) (図1、Strategy-II) を胚乳で発現するアルブミン・プロモーターとつないで、うまく胚乳で発現させた稲を創製している。このお米を機能性食品のつもりで高血圧の人が常食すれば、低血圧を維持できる可能性がある。

表3 食品中のニコチアナミン含量

種名	新鮮重あたりの含量 (ppm)
ハヤトウリ	10
ニガウリ	15
セリ	12
あしたば	17
モロヘイヤ	22
クレソン	37
大豆	74
豆乳	90

(木元幸一ら、未発表)

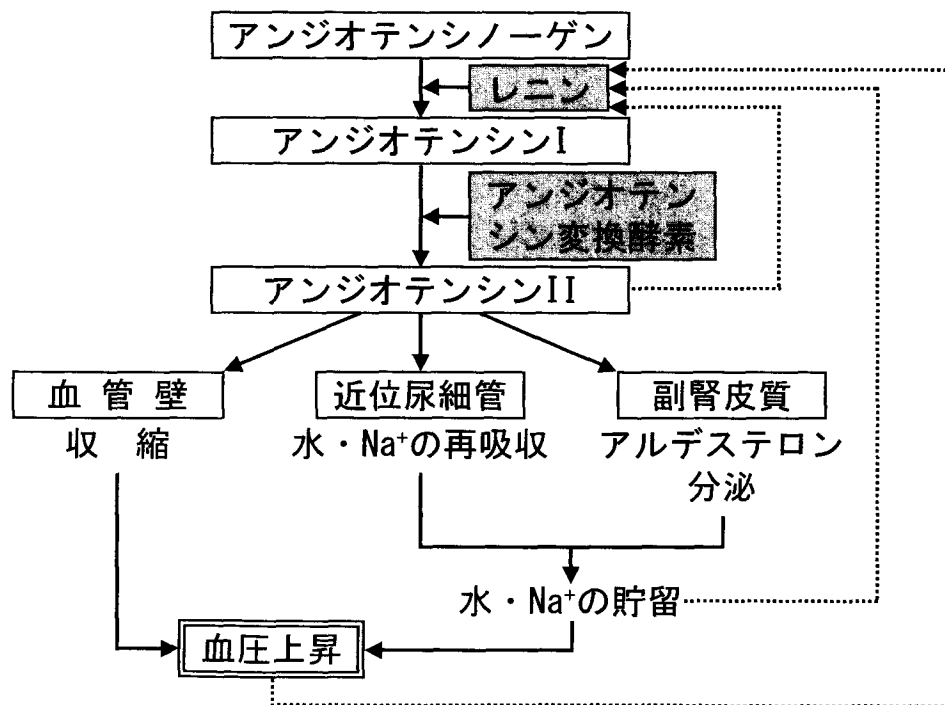


図4. レニン・アンジオテンシン系の概略図 (6)

### 5-3. 高S含有米 (MT)

オオムギのメタロチオネイン (MT) は鉄欠乏処理 2 日という短時間で転写が誘導されてすぐに消える機能不明の分子量約 1 万の蛋白質である。通常 MT は銅過剰で遺伝子が誘導される。この場合は鉄欠乏で体内銅イオン濃度が増加するためその解毒に関わる蛋白質とも想定された。もともとイネ胚乳蛋白質は S 含量が低いのが、この MT は銅イオンの結合の配位座としてのシステインの含量 (すなわち S 含量) が高いので MT 遺伝子をイネ胚乳内で恒常的に高発現させて高 S 含有米を創製しているグループがいる。

### 5-4. 合成ニコチアミンの医療への応用

#### 5-4-1. 除鉄療法への薬として

現在日本に 400 万人存在する C 型慢性肝炎、欧米人に非常に多いヘモクロマトーシス (HFE 遺伝子疾患で家系性が高い) は、鉄が臓器や脳に沈着し、2 価鉄イオンが酸化され

て3価鉄イオンになるときに生成するラジカルの反応により肝硬変や肝ガンを併発して死亡する。日本鉄代謝研究会は26年も続いている主として医者集団である。現在の日本で鉄が医療面で主に問題になっているのはC型慢性肝炎であり、その治療法の研究がこの集団によって精力的に進められている。鉄が肝臓に集積する理由はまだ解明されていない。これらのC型慢性肝炎患者に対して、対処療法として、血液を抜く（瀉血）方法や、食品成分表を基準に作成された厳密な鉄制限食がほどこされている。毎日の食事から鉄を摂取してはいけないということは患者にとっては苦痛を強いるものである。一方、血中鉄を尿からの排泄を促進する方法として、鉄をキレートしていない微生物起源のシデロフォア製剤（Desferrioxamine B）などを経口投与することがおこなわれている。これらの製剤は高価な上に食欲減退などの副作用が強く、より有効な薬剤が望まれている。臨床医の意見では未だに有効な経口的除鉄製剤はないと断言されている。

野間正明氏がたばこで最初に発見したニコチアナミンや、高城成一氏が発見したムギネ酸類(5)はその後の研究により、アルカリでも安定な鉄キレート剤である事がわかっている。すでに述べたように、ニコチアナミンは全ての野菜に存在し、我々が食事から恒常的に摂取している天然物である。また、デオキシムギネ酸は全てのイネ科植物の葉や根に含まれるものである。従ってこれらの人体毒性はきわめて低いと考えられる。現在ニコチアナミンおよびムギネ酸の大量合成法が我々との共同研究により北原武教授（東大・大学院農学生命科学研究科）によって開発されつつあり、現在ニコチアナミンに関しては試薬レベルでの販売の企業化に成功している。

上記の日本鉄代謝研究会において病院の内科の医師や管理栄養士から、C型慢性肝炎患者に、

- ① ふつうの食事をさせて、後にこのニコチアナミンやムギネ酸を飲み薬として飲んでもらうことによって、胃や腸に移動した鉄をキレート化して、腸管吸収させないようにして、全体として鉄の体内への摂取量を軽減できないか？
- ② またこれらの試薬を急性的に静脈注射して、血中のヘム鉄をキレート化して尿から排泄させることはできないだろうか？

という強い期待が寄せられている。まず動物実験を経て、つぎに人間への臨床試験を得て、ニコチアナミン（またはその誘導体）やムギネ酸（またはその誘導体）が晴れてC型慢性肝炎の進行を抑制する薬として認可される日も夢ではない。

#### 5-4-2. 貧血治療鉄剤として

ニコチアナミンやムギネ酸を上記のように鉄除去剤としてではなく、逆に、鉄賦加剤として使用することも考えられる。これらの化合物に3価鉄をかませた「鉄・キレート」をゼラチンカプセルに詰めて、飲み薬であたえ、腸管からの鉄吸収を促すのである。腸管での鉄の吸収機構は不明であるが、仮にトランスフェリン経由のエンドサイトシス（細胞膜のくびれ込み）だとすると、この薬を常習的に摂取することによって、徐々に平衡論的に

鉄がニコチアナミンから体内に摂取されていき、血中鉄濃度が正常値に回復することが期待される。実用化に向けた試験研究と、これらの試薬のさらに安価な大量製造法の開発が望まれる。

#### 5-5. 消費者の不安を除くためのマーカーフリー・ベクターの使用

目的の遺伝子が遺伝子導入植物に導入されているかどうかを容易に検出するために、通常は目的遺伝子の上流や下流に隣接してマーカー（標識）用の遺伝子をつないだ状態で、遺伝子を導入する。採集された種子にこのマーカー遺伝子が導入されていると、マイカー遺伝子産物であるタンパク質がたとえば抗生物質であるハイグロマイシン分解酵素であれば、その抗生物質を種子発芽時の培地にまいておけば、遺伝子導入された植物は抗生物質を分解して無毒化するので発芽できる。しかし、マーカー遺伝子が導入されていない種子は抗生物質に負けて種子が死んでしまう。このようにして発芽した種子は目的遺伝子がほぼ導入されていると判断されうる。しかし、この発芽種子のその後の成長にとって、マーカー遺伝子は不要である。またこの種子をヒトが食べる場合に、ヒトの腹の中の大腸菌群が抗生物質分解酵素の遺伝子を腸内で受け取ると、病気になったときに腸内病原菌に対して抗生物質を投与しても効かなくなる可能性がある。大腸菌から病原菌への遺伝子の水平移動が起こった場合である。それを消費者が嫌がっている。そこで、マーカー遺伝子による目的遺伝子導入の有無の検定が終了した後は、植物体染色体中の不要になったこのマーカー遺伝子を取り除く方法がロックフェラー大学の ChuaN-H らによって開発された。現在このベクターに我々の目的遺伝子を入れて、石灰質アルカリ土壌での鉄欠乏耐性作物や、上記の機能性食品の作出を行っている。

## 6. 参考文献

1. Goto F, Yoshihara T, Shigemori N, Toki S, Takaiwa F (2000) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology*.17,282-286
2. Takahashi M, Nakanishi H, Kawasaki S, Nishizawa NK, Mori S (2000) Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature Biotechnology* 19: 466-469.
3. Rogers EE, Eide DJ, Guerinot ML (2000) Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter. *PNAS USA* 97:12356-12360
4. 小泉好司, 小嶋和明, 貴家康尋, 武長宏, 田中重雄, 坂田洋一, 大野豊, 小林泰彦 (2002) シロイヌナズナのカドミウム感受性変異体の作出 第11回 TIARA 研究発表会要旨集 p 133-134
5. Takagi S, Nomoto K, Takemoto S (1984) Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *J. Plant Nutr* 7:469-477
6. 日和田邦男, からだの科学増刊号 p66-67
7. 内田立身 (2002) 増加傾向にある鉄欠乏性貧血への対策 一食品への鉄添加の必要性一 第26回鉄代謝研究会プログラム抄録集 p32-33

## 講師プロフィール

学歴 昭和39年 東京大学農学部農芸化学科卒業、  
平成6年 東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

専門 植物分子生理学

テーマ 植物の有機物吸収、植物の鉄代謝

著書 植物栄養学（共著、文永堂出版）2001, その他 総説・原著論文多数

受賞 日本土壌肥科学会賞、日本農学賞・読売農学賞

# 酸性土壌に多い毒性アルミニウムによる植物の傷害と抵抗性の仕組み

岡山大学資源生物科学研究所

松本英明

## 1. はじめに

母なる大地といわれるように、文明は肥沃な土壌を持つ地域で発達して来た。一方、現在地球上の農耕地は植物の生育にとり、様々な問題をかかえた土壌が多く約 70%の土壌が農業生産上、問題土壌と言われ、それには塩類集積土壌、アルカリ土壌、酸性土壌などが含まれる。このうち、酸性土壌は農耕地の約 30~40%を占めるといわれ、その面積は 3.95 億ヘクタールにおよぶと計算されている。

一般的な酸性土壌の生成は、長い年月をかけた土壌の風化の結果である。雨水は炭酸ガスが溶け込み酸性を示すが、何千年という長期間、土壌が雨水にさらされると土壌中の塩基が溶脱され、酸性土壌が生成する。この反応は温度の高い地域でより早く進行する。従って、酸性土壌は基本的に Ca、Mg、K といった植物に必要な元素が欠乏したやせた土地である。また近年、工業化による酸性雨問題として知られるように、地球上の土壌は徐々に酸性化が進行していると考えられている。酸性土壌は地球上に広く分布している。特にアジア、アフリカに多く、このような地域には人口の増加の激しい発展途上国が多い。従ってこのような地域は人口増からくる食糧不足の問題をかかえ、酸性土壌をうまく使って食糧の増産が強く求められている。

酸性土壌では作物の生産が抑えられるが、その最大の問題は酸性土壌中で溶解する毒性のアルミニウム (Al) イオンによると言われている<sup>1,2)</sup>。Al は最多の土壌中の金属元素で約 7%を占める。土壌 pH が中性ないし弱酸性では、Al はケイ酸と結合して不溶性のケイ酸アルミニウムとして存在し毒性を示さない。しかし pH が低下すると様々なイオン形態をとって溶解する(図 1)。pH が 4.5 以下になると、大部分が毒性の最も強い  $Al^{3+}$ として存在する。Al は反応性の強い元素であり、生体内の様々な物質、例えば原形質膜、細胞壁、DNA、タンパク質などと結合して、それらの機能を阻害する。その結果、個体レベルでは根の伸長が阻害され水分や養分の吸収が抑制され、作物の収量が低下する。またリン酸とも強く結合し不溶性のリン酸アルミニウムを形成するので、Al ストレスによりリン酸欠乏が誘発される場合もある。

## 2. アルミニウム傷害

1)  $Al^{3+}$ 毒性は極めて強く Ca 溶液中では 10~50  $\mu M$  程度の  $Al^{3+}$ によって、コムギ根の伸長は短時間で抑制される<sup>3)</sup>。根端(根冠、分裂域、分裂域から伸長域にいたる部位、伸長域が含まれる)が特異的に傷害を受ける。このことは根端のみを  $Al^{3+}$ で処理すると、根の伸長阻害が認められることから明らかである。多くの単子葉植物では伸長域に傷害が認められ、コムギでは表皮より少し内側の細胞の縦方向の伸長が著しく阻害される。逆に横方向に肥大した細胞が認められる<sup>4)</sup>(図 2)。

### 2) 細胞分裂阻害

伸長阻害が認められるよりも長時間の Al 処理で細胞分裂が阻害される。例えばタマネギ根端の中期分裂細胞は Al 処理後、7~8 時間で完全に認められなくなる。根の伸長阻害は短時間で認められるが、分裂域で新たに分裂した細胞が伸長域へ移動する限り伸長を開始するので、たとえ伸長域の

細胞が傷害を受けても、細胞分裂が起こっている限り、根は Al によって致死に至らない。従って、根の Al による致死的な現象は根端における細胞分裂の停止であると考えられる。細胞分裂の阻害は Al と DNA の結合それに伴うクロマチン構造の変化<sup>6)</sup>、紡錘体やフラグモプラストの破壊が関係している<sup>7)</sup>。

### 3. アルミニウムの集積部位

Al による傷害は根端で認められるが、Al の集積も根端の細胞で認められる。興味深い現象であるが Al 耐性植物は Al 感受性植物に比べて根端に集積する Al は少ない<sup>3)</sup>。このことは Al 耐性機構を考える際、大変重要な意味を持っている。すなわち、後述するように耐性植物は根内に Al を取り込まないようにする Al 排除機構を働かせている<sup>1,2)</sup>。

### 4. カルシウム代謝とアルミニウム傷害

Al 傷害や耐性機構に Ca 代謝が関連している<sup>8)</sup>。すなわち、Ca チャンネルが Al で阻害され Ca の取り込みが阻害される。また細胞壁や原形質膜には Ca がこれらの構造と機能の保持に重要な役割を果たしているが、恐らく Al はこれらの Ca と置換してその機能を阻害する。これまで生根の Ca 吸収や吸収された Ca の輸送が Al で阻害されたり、原形質膜ベシクルの Ca 膜輸送が Al で阻害されることが明らかにされている<sup>9)</sup>。他方、短時間の Al 処理によって遊離の Ca が増加し、細胞内の Ca の恒常性が破壊されることが Al 傷害の一因であることを示す結果が最近、得られているが、細胞内に一時的に増加する Ca の供給機構については、よく分かっていない<sup>10)</sup>。一つの考え方は、細胞壁や原形質膜の Ca が Al で置換されたものが細胞内に入り、一過性の Ca の増加をもたらすというものである。

### 5. 細胞壁

吸収された大部分の Al (50~90%) はアポプラストに集積する。細胞壁では Al はペクチンと結合すると考えられているが、*in vivo* での十分な証拠は得られていない。一方、*in vitro* の実験でペクチン膜に Al を結合させると、水の透過性が急速に低下する<sup>11)</sup>。このことは一般に Al 処理により細胞は水分含量を下げるが、その一因になっているのかも知れない。また、Al によりカロースの合成が根の伸長阻害と平行して認められる。合成されたカロースの一部は、原形質連絡の近傍に集積する。その結果、原形質連絡の管が圧力を受けるので、水や他の物質の原形質連絡を經由した細胞間輸送が阻害されると考えられている<sup>12)</sup>。

細胞壁の伸展性は細胞伸長の重要な制御機構である。すなわち、伸展性は細胞壁の固さに関する物理的な特性であり、伸展性の低下によって細胞伸長は抑制される。Al 感受性コムギ (Scout 66) を Al 処理すると、根端のヘミセルロース含量と分子量の増加が認められるとともに伸展性の減少が観察された<sup>13)</sup>。一方、耐性コムギ (Atlas 66) は Scout 66 と異なり Al ストレス下でも細胞の伸長が認められる。Atlas 66 においても Al により伸展性の低下が弱いながらも起こる。このことは細胞壁の伸展性の減少に打ち勝つ細胞の伸長力、すなわち吸水によって細胞内の浸透圧の増加が起こり、膨圧に打ち勝って細胞伸長が起こっていることを示している。逆に Scout 66 では浸透圧の増加は認められなかった。そこでその浸透圧の差を生ずる原因を調べると、Atlas 66 の細胞質には Al により可溶性の糖類、特にグルコースとフラクトースが蓄積しており、Scout 66 では糖類の蓄積は認められなかった。この糖類の蓄積の機構は今後の課題である。

### 6. 原形質膜

原形質膜は Al の主要な標的部位とされている。その理由は細胞の一番、外環境に近い所に存在する

ということと、膜の組成であるリン脂質に多量に存在するリンと Al の結合によると考えられる。Al が原形質膜に結合すると膜の流動性が変化し、膜の機能も変動する<sup>14)</sup>。

カボチャを Al 処理すると根端細胞の原形質膜の脱分極が起こる。この脱分極は根端から基部へ移行した根部では小さい。またコムギで調べると耐性種ほど表面荷電の脱分極（プラス側への変動）の程度は小さい。一方、原形質膜の重要な機能の一つは H<sup>+</sup>ポンプであり、その駆動力となる H<sup>+</sup>-ATPase の活性は Al ストレスにより減少した。すなわち、表面荷電（ゼータ電位）の増加と H<sup>+</sup>-ATPase 活性の減少との間に正の相関が認められた<sup>15)</sup>。Al 耐性コムギ (ET8) と感受性コムギ (ES8) の原形質膜に *in vitro* で低濃度の Al を加えると、100 kDa に相当する H<sup>+</sup>-ATPase が ES8 で顕著に減少した。原形質膜の H<sup>+</sup>-ATPase の機能からみた Al 傷害は、以下のように説明出来る。

- a. Al の結合により原形質膜の表面荷電（原形質膜の外側に相当）の脱分極が起こり、プラスの荷電を持つ H<sup>+</sup>は脱分極のより大きい側への移動が阻害される。
- b. 原形質膜の構造が Al との結合により変化し、それにとまって H<sup>+</sup>-ATPase の含量が減少する（ターンオーバーの変動）。

一方、原形質膜の Al による傷害として膜の脂質過酸化の誘導がある。エンドウの場合、Al によって脂質過酸化が引き起こされ、それは抗酸化物剤によって抑制された<sup>16)</sup>。しかし脂質過酸化は根の伸長阻害と直接関係しない。脂質過酸化は活性酸素類によって誘導される。この点を詳しくタバコ培養細胞を用いて調べると、ミトコンドリアの機能の減少とともに活性酸素類の増加が認められた。これらの結果は、Al 傷害の初期応答はミトコンドリア機能の障害によることを示している<sup>17)</sup>。さらに今後、Al ストレスシグナルの伝達と原形質膜を介したシグナル変換系の研究などが残された重要な問題である。

## 7. Al 抵抗性機構

生物は生育の過程で様々なストレスに遭遇する。植物と異なり動物は移動することによりストレスのある環境から逃れることも可能である。一方、植物は根で土中に固定されており、ストレスに対し独特な抵抗性、耐性機構を発達させてきた。土壤環境には様々なストレス要因が存在する。養分の欠乏もその一つである。特にリン酸は三大栄養素の一つであるが、植物はリン酸欠乏環境におかれると、リン酸を吸収するため根の面積を大きくするのも、植物独特の耐性機構の一つである。

酸性土壌における Al 毒性に対して、植物栄養学の研究者の最終の目標は、酸性土壌すなわち Al 毒性に対しても抵抗性を発現する作物の選抜あるいは遺伝子工学的手法を動員して耐性植物を作出することである。そのため進化の過程で獲得してきた Al 毒性に対する耐性機構を解明し、そこから耐性に関わる機能を制御する遺伝子を見つけ、その遺伝子を導入し Al 毒性に対して抵抗性を示す植物を育成することである。“はじめに”で述べたように Al 毒性は大変複雑なもので、残念ながら我々はまだ Al 毒性に対して抵抗性を示す植物を、学問的に十分な証拠をもって作り出すことに成功していない。これまで様々な Al 耐性機構が提唱されてきたが、大きく分けて次の二つに分けられる。

### 1) Al 排除機構

この機構は単純で明解なものであり、最も研究が進み特に単子葉植物で解析が進んでいる。様々な証拠から最もその重要性が指摘されている<sup>1,2)</sup>。すなわち毒性の Al を根端に取り込ませないで排除しようとするものである。

#### a) 根圏 pH の変動



pH を上昇させることにより根圏に存在する可溶性の  $Al^{3+}$  を減少させようとするものである。Al 耐性変異株のシロイヌナズナ (alr-104) と野生株を用いた研究によると alr-104 は Al により根圏の  $H^+$  の取り込み活性を2倍増加し、その結果として pH が 0.15 単位上昇し、 $Al^{3+}$  の量が減少し抵抗性を獲得する。Alr-104 は Al が存在しないと  $H^+$  を取り込まない<sup>18)</sup>。

#### b) ムシラーゲの集積

根端は 50  $\mu m$  から 1 mm の厚さのムシラーゲ (粘性多糖) で被われている。ムシラーゲはウロン酸を特徴的な成分として含み、Al との結合性が強く Al の植物内への侵入を抑制する<sup>19)</sup>。

#### c) 有機酸分泌

植物は Al ストレスにより植物種固有の有機酸を根から分泌することが知られている。例えばコムギはリンゴ酸<sup>20)</sup>、トウモロコシ、ダイズはクエン酸<sup>21)</sup>、ソバはシュウ酸<sup>22)</sup>を分泌する。その分泌は Al ストレスを与えた直後に見られるものや、数時間のラグを経て見られるものがある。この有機酸分泌は光合成により炭素化合物を豊富に供給することが出来る植物独特のもので、学問的意味も大変興味深いものである。有機酸分泌の意義は根圏に存在する  $Al^{3+}$  と有機酸がキレート結合を形成し Al 毒性を抑制するということである。有機酸の分泌部位、体内有機酸との関係、耐性種ほど多くの有機酸を多く分泌するなど、これまで多くの生理学的側面の研究がある<sup>1,2,23)</sup>。

最も研究の進んでいるのはコムギのリンゴ酸分泌である。Al 耐性コムギ (Atlas 66) は Al 処理後、数分で根端 5 mm 以内からリンゴ酸を分泌する。このことは植物の側からみれば、合理的な営みと考えられる。Al 傷害を受ける部位にのみ有機酸を分泌することはエネルギー、炭素源の消費からみれば合目的である<sup>20)</sup>。

有機酸の分泌機構を理解し、その機能を高めた植物を作出することは Al 研究者にとり夢であり、激しい競争が繰り広げられている。幸いにもこれらの研究にとり重要な武器になる同質遺伝子系統のコムギ (ET8、ES8) が、オーストラリアの研究者により作られている。両者の違いは、ET8のみがリンゴ酸を分泌して Al 耐性を示す。従ってこれに関する遺伝子は Alt1 と呼ばれ、この発見にしのぎが削られてきた。

最近、我々の研究室でこの遺伝子、即ち Al によりリンゴ酸を分泌するタンパク質 (リンゴ酸チャンネルと考えられる) をコードする遺伝子を単離し、これを ATS1 (aluminium-tolerant specific) と名付けた。ATS1 は ET8 の根端で特異的に構成的に発現していた。この遺伝子をリンゴ酸を分泌しないイネに導入すると、Al により見事にリンゴ酸を分泌した。Al ストレスによりリンゴ酸が分泌される仕組みは、原形質膜に存在するリンゴ酸チャンネルが Al によってそのゲートを開孔しているものと考えられ (図3)、その機能を証明するため、cRNA をアフリカツメガエルの卵母細胞に注入して2日間培養した。それにリンゴ酸を注入し、さらに Al を与えて二電極膜電位固定法により電気生理学的測定を行った。その結果、cRNA を注入した卵母細胞のみがリンゴ酸を注入し、Al 処理をすると膜電位のマイナス方向への過分極にともなった内向き電流の増大 (リンゴ酸によるマイナスイオンの溶出) が観察された。これらの結果は、ATS1 遺伝子がコードしたタンパク質が、Al 依存的に作用するリンゴ酸チャンネルである可能性を強く示唆した。

#### 2) 細胞内 Al 抵抗性機構

Al 排出機構によらない耐性機構の総称である。植物体内に侵入した Al 毒性を抑制しようとするもので、植物体内で有機酸を初めとするキレート物質と結合して毒性を減少させる。これにはアジサ

イ<sup>24)</sup>やソバ<sup>22)</sup>の体内におけるクエン酸、シュウ酸とAlの結合が知られている。フェノール化合物も有力な候補化合物である。

またAl毒性機構の発現に活性酸素類の誘発にともなう酸素ストレス傷害が関係している<sup>25)</sup>。そこでその抵抗性機構として活性酸素消去系の導入が考えられる。その一つがパーオキシダーゼ遺伝子である。他に、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、NtGDI1 (GDP解離阻害タンパク質)等を導入したアラビドプシスが弱いながらAl抵抗性を示すことが明らかにされている<sup>26)</sup>。

## 8. 参考文献

- 1) Kochian, L.V. : *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46:237-260, 1995.
- 2) Matsumoto, H. : *Int. Rev. Cytol.*, 200:1-46, 2000.
- 3) Sasaki, M. et al. : *Soil Sci. Plant Nutr.*, 43:1009-1014, 1997.
- 4) Sasaki, M. et al. : *Physiol. Plant.*, 96:193-198, 1996.
- 5) Morimura, S. et al. : *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 88:395-401, 1978.
- 6) Matsumoto, H. : *Plant Cell Physiol.*, 29:281-287, 1988.
- 7) Sivaguru, M. et al. : *Physiol. Plant.*, 107:110-119, 1999.
- 8) Rengel, Z. : *Plant, Cell Environ.*, 15:931-938, 1992.
- 9) Huang, J.W. et al. : *Plant Physiol.*, 98:230-237, 1992.
- 10) Zhang, W-H., Rengel, Z. : *Aust. J. Plant Physiol.*, 26:401-409, 1999.
- 11) Blamey, F.P.C. et al. : *Plant Soil*, 149:87-94, 1993.
- 12) Sivaguru, M. et al. : *Plant Physiol.*, 124:991-1005, 2000.
- 13) Tabuchi, A., Matsumoto, H. : *Physiol. Plant.*, 112:353-358, 2001.
- 14) Vierstra, R., Haug, A. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84:136-143, 1978.
- 15) Ahn, S.J. et al. : *Plant Physiol.*, 126: 1381-1390, 2001.
- 16) Yamamoto, Y. et al. : *Plant Physiol.*, 125:199-208, 2001.
- 17) Yamamoto, Y. et al. : *Plant Physiol.*, 128:63-72, 2002.
- 18) Degenhardt, J. et al. : *Plant Physiol.*, 117:19-27, 1998.
- 19) Li, X.F. et al. : *Physiol. Plant.*, 108:152-160, 2000.
- 20) Osawa, H., Matsumoto, H. : *Plant Physiol.*, 126:411-420, 2000.
- 21) Yang, Z.M. et al. : *Physiol. Plant.*, 113:64-71, 2001.
- 22) Ma, J.F. et al. : *Nature*, 390:569-570, 1997.
- 23) Ryan, P.R. et al. : *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52:527-560, 2001.
- 24) Ma, J.F. et al. : *Plant Physiol.*, 113:1033-1039, 1997.
- 25) Ezaki, B. et al. : *Physiol. Plant.*, 96:21-28, 1996.
- 26) Ezaki, B. et al. : *Plant Physiol.*, 127:918-927, 2001.

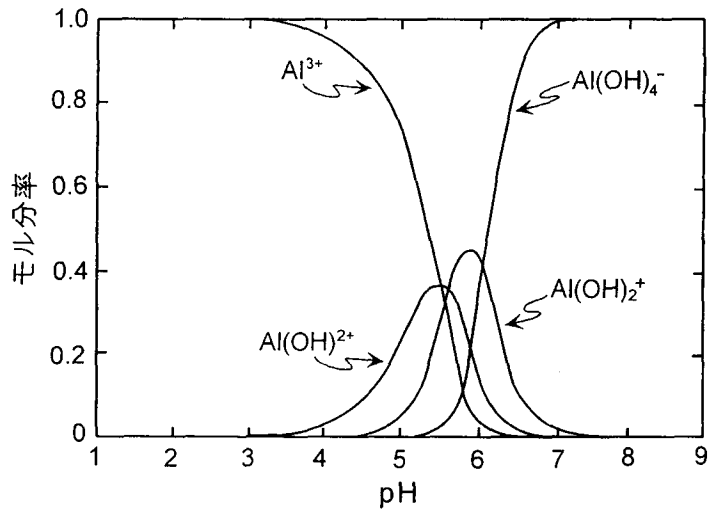


図1 水溶液中の可溶性、単量体AlのpHによる分布  
(MacDonald, T.L. et al., 1988)

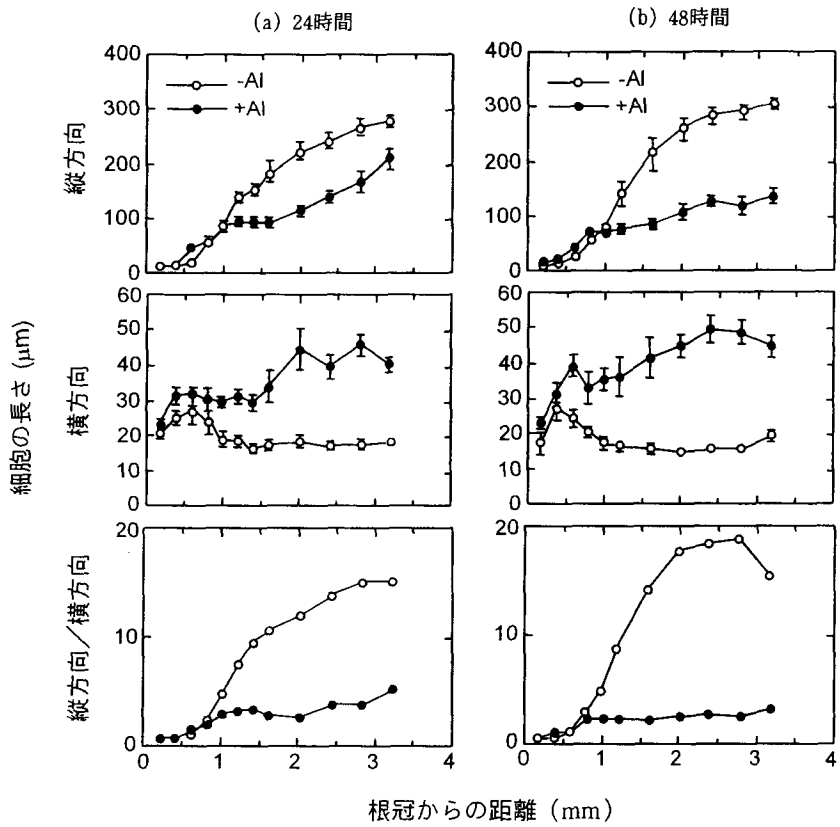


図2 コムギ根端のアルミニウムストレスによる細胞形態の変化  
コムギ (Atlas 66) を  $20 \mu\text{M AlCl}_3$  で24時間 (a), 48時間 (b) 処理した根端の表皮から、内側へ2層目の細胞の長さや幅を測定した。

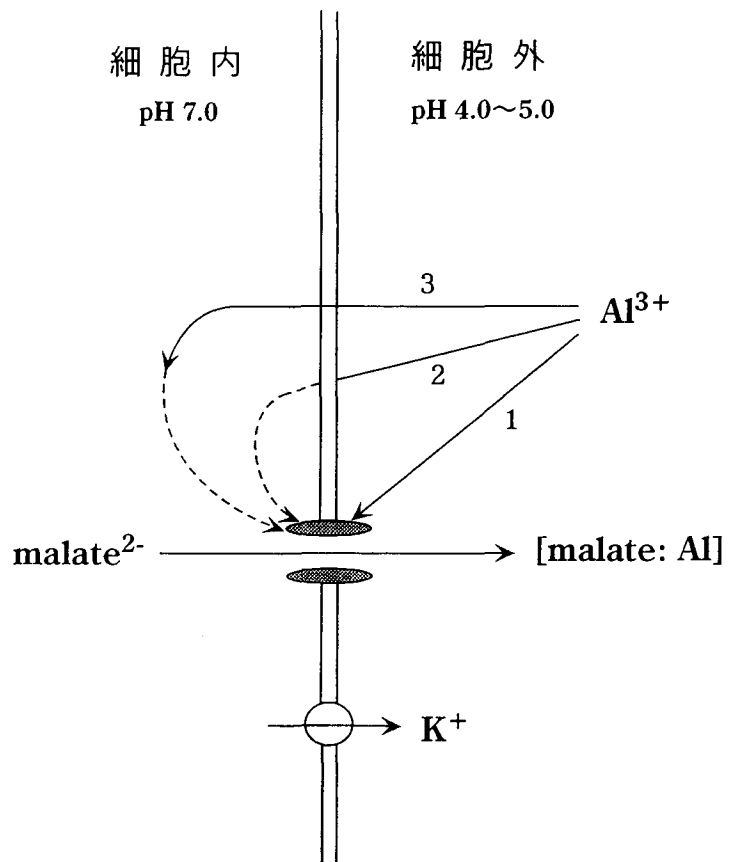


図3  $\text{Al}^{3+}$ がどのような方法で原形質膜上のリンゴ酸チャンネルに働きかけ、リンゴ酸を放出するかを示したモデル。 $\text{K}^+$ は電氣的バランスをとるために放出され则认为されている。  
(Delhaize and Ryan 1995)

## 講師プロフィール

### 学歴

- 昭和37年 東京水産大学水産学部卒業
- 昭和39年 京都大学大学院農学研究科修士課程修了
- 昭和42年 京都大学大学院農学研究科博士課程修了（京大農博）

### 職歴

- 昭和42年 京都大学農学部助手
- 昭和54年 岡山大学農業生物研究所助教授
- 平成元年 岡山大学資源生物科学研究所教授
- 平成12年 岡山大学資源生物科学研究所所長
- 平成12年 中国浙江大学客員教授

### 専門

植物栄養生理学

### 著書

- Matsumoto, H. (2000) Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* Academic Press 200: 1-46
- Matsumoto, H., Yamamoto, Y. and Devi, S.R. (2001) Aluminum toxicity in acid soils: Plant response to aluminum. *In Metals in the Environment : Analysis by Biodiversity*, Prasad, M.N.V. (ed). pp.289-319. Marcel Dekker, Inc.
- 松本英明 (2002) アルミニウム耐性. 植物代謝工学ハンドブック (新名惇彦・吉田和哉 監修). pp. 692-706. エヌ・ティー・エス
- Matsumoto, H. (2002) Plant roots under aluminum stress : Toxicity and tolerance. *Plant Roots : The Hidden Half. Third Edition.* Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (eds). pp. 821-837. Marcel Dekker, Inc.
- Matsumoto, H. (2002) Metabolism of organic acids and metal tolerance in plants exposed to aluminum. *In Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Prasad, M.N.V., Strzalka, K. (eds). pp. 95-109. Kluwer Academic Publishers

### 学会活動

- 土壤肥料学会： 評議員、関西支部長、学会賞等選考委員、*Soil Sci. Plant Nutr.* 誌編集委員
- 植物生理学会： 評議員、*Plant Cell Physiol.* 誌編集委員

# 植物による環境浄化(ファイトレメディエーション)

## － 重金属超集積植物とその利用 －

日本大学生物資源科学部

長谷川 功

### 1. はじめに

重金属とは、密度が比較的大きい金属で、 $4\text{g}/\text{cm}^3$  以上のものをさすことが多いが、長周期型周期率表の 1B～5B の金属元素を指すこともある。この重金属の中で、銅(Cu)、鉄(Fe)、亜鉛(Zn)、モリブデン(Mo)、ニッケル(Ni)は植物の必須栄養素(微量元素)であり、植物体内では主にタンパク質と結合して物質の合成や分解などに携わっているため、これらが欠乏すると生育が著しく不良となり、著しい場合は枯死する。しかし、必須の栄養素であってもこれらの重金属が過剰に供給されると著しい過剰害(生育障害や枯死)を引き起こす。

一方、環境汚染物質としての重金属、例えばカドミウム(Cd)、鉛(Pb)、水銀(Hg)、ヒ素(As)などは微量でも植物にとって有害で、これらによって土壌が汚染されると作物の生育が抑制され、収量が低下するばかりでなく、吸収された重金属が食物連鎖によって人間の健康をも脅かすことになる。

一般に、植物は多量の重金属を吸収すると枯死するものが多いが、高濃度の重金属を含有しても平気で生育できる植物が、最近、いくつか見つかっている。重金属集積植物が発見され、その集積機構の解析に関する研究が進むにつれ、有害な重金属を無害にする様々な仕組みが明らかにされてきている。こうした研究は、重金属汚染土壌に重金属集積植物を植え、土壌から重金属を吸収させて土壌を浄化する、すなわちファイトレメディエーションに用いようとの試みの一環として行われている。

2001年の世界人口は約62億人であるが、2025年には約80億人、2050年には90億人となることが予測されており、21世紀の最重要課題の一つは増加する人口に見合う安全な食料の確保である。人口の急激な増加と共に世界経済の著しい発展と豊かな生活は、地球環境の悪化という高価な代償を払って手に入れたものであると言っても過言ではない。地球温暖化にともなう陸地の乾燥化や砂漠化、塩類集積、さらに熱帯雨林の破壊、酸性雨など環境破壊は枚挙にいとまがない。こうした人間活動に起因した地球環境の悪化は、食料生産に適した土地をさらに減少させることとなり、増加する人口に見合う安全な食料を確保するには、破壊された環境を修復すると共に、作物生産に不適當な問題土壌(Problem soil)での農業生産を可能にしなければならない。そのためには、不良環境由来の各種ストレスに耐性能を有する植物を探索して利用することや、遺伝子工学的手法によって機能開発・強化した植物の利用などが必要となる。

Problem soil のひとつに有害重金属や化学物質による汚染土壌がある。地球上には現在でも広大な面積の汚染地域が存在するが、それに加えて、世界における重金属や化学物質の使用量が年々増加するのにもなつて土壌中の濃度も急速に増加しており<sup>1)</sup>、汚染土壌の面積はまさに拡大基調にあると言えよう。そのため、WHO/FAO 合同委員会による CODEX 食品安全規格が検討され、特に重金属の Cd は現在の1ppm(玄米)

から 0.2ppm(米、小麦、大豆)あるいは 0.05-0.1ppm(野菜)へと下方修正されようとしており<sup>2)</sup>、そのための対策は急務である。

## 2. 重金属超集積植物 (Hyperaccumulator plants)

R.R.Brooks<sup>3)</sup>は Ni を 1,000ppm 以上含有する植物を Hyperaccumulator plant (重金属超集積植物)と名付けたが、ファイトレメディエーションへの期待が高まり、その有効性が認識されるにしたがって、諸外国では重金属超集積植物の探索が精力的に行われており、多数の Hyperaccumulator plant が発見されている。表1に示されるように、セイヨウカラシナ (*Brassica juncea*) やアブラナ科の *Alyssum lesbiacum*, *Thlaspi caerulescens* など は Ni、Pb、Cd など地上部に著しく集積することが知られており、乾物当り1-5%に達する場合もある。演者の研究室では数十種類の野生植物や栽培植物を用いて、各種の重金属(Ni, Cr, Cd, Pb, Cu, Zn など)に対する耐性植物の探索を行っており、野生植物の中から高濃度の重金属を含有しても枯死しないものや、特殊な集積機構を有するもの<sup>4)</sup>をいくつか発見し、その有効利用についての検討を行っている。

表1 重金属超集積植物の例

金属	含有率(mgKg <sup>-1</sup> )	植 物 名	論文発表者	発表年
As	31,000	<i>Jasione montana</i>	Steubing	1989
Au	57*	<i>Brassica juncea</i> (アブラナ科カラシナ)	Anderson	1998
Cd	1,800	<i>Thlaspi caerulescens</i> (アブラナ科の植物)	Brown	1995
Cd	2,000	<i>Pesicaria thunbergii</i> H.Gross (ミゾソバ)	Hasegawa <sup>4)</sup>	1999
Cu	12,300	<i>Ipomoea alpina</i> (ヒルガオ科サツマイモ)	Scott	1996
Mn	8,000	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.(ツツジ科ツルコケモモ)	Medappan	1970
Mn	7,000	<i>Mechotria grandiflora</i>	Ernst	1990
Ni	15,000	<i>Alyssum bertolonii</i> (アブラナ科の植物)	Vanselow	1996
Ni	30,000-50,000	<i>Alyssum lesbiacum</i> (アブラナ科の植物)	Kamer	1996
Ni	45,000	<i>Psychotria douarrei</i> (アカザ科の植物)	Ernst	1990
Pb	34,500	<i>Brassica juncea</i> (アブラナ科カラシナ)	Wbbs	1997
Pb	11,400	<i>Minuartia verna</i> (ナデシコ科コバノツメクサ)	Baumeiser	1978
Se	15,000	<i>Astragalus adsurgens</i> (マメ科ムラサキモメンヅル)	Anderson	1961
Zn	15,700	<i>Thlaspi sylvestre</i> (アブラナ科の植物)	Denayer	1970
Zn	3,400	<i>Minuartia verna</i> (ナデシコ科コバノツメクサ)	Denayer	1970
Zn	4,000	<i>Ambrosia elatior</i> (キク科ブタクサ)	Bear	1957
Zn	51,600	<i>Thlaspi caerulescens</i> (アブラナ科ゲンバイナズナ)	Brown	1995
U	70*	<i>Astragalus preussi</i> (マメ科カラスノエンドウの仲間)	Ernst	1978
U		<i>Beta vulgaris</i> (アカザ科ビート)	Stephan	1998

\*Hyperaccumulator plant ではないが、金(Au)やウラン(U)を比較的高濃度に含有する植物の例

## 3. 植物の体内における重金属の無害化機構<sup>5)</sup>

植物が体内に入って来た有害重金属を無害化する機構については多くの研究があり、体内の重金属イオンをクエン酸などの有機酸と結合、あるいはヒスチジンやシステインなどのアミノ酸と結合させて無害化している。例えば、アブラナ科の *Alyssum bertolonii* は Ni をヒスチジンと結合させて無毒化し、液胞内に貯蔵していることが知られている<sup>6)</sup>。また、植物の重金属に対する恒常性の維持や耐性には、グルタチオン (Glu-Cys-Gly のトリペプチド)、フィトケラチン ( $\gamma$  (Glu-Cys)<sub>n</sub>Gly, n=2-11 のオリゴペプチド)、メタロチオネイン (Cys-Xaa-Cys をモ

チーフとしたポリペプチド)などのシステイン含量の多いペプチドが関与しており、重金属イオンはシステイン残基のSH基と安定なチオール結合複合体をつくり無害化される。フィトケラチンはカドミウムなどの重金属によってフィトケラチン合成酵素( $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl-transpeptidase)が活性化されて合成される。また、カルボキシペプチダーゼによっても生成することが知られている。メタロチオネインは遺伝子から直接翻訳されて生成するポリペプチド(4~8Kda)で、多くの真核生物から発見されており、当初は植物には無いとされていたが、その後、シロイヌナズナやオオムギからその合成遺伝子が見つかった。

重金属耐性植物の探索は、それをファイトレメディエーションに直接利用することばかりでなく、それらの耐性機構を生理・生化学的あるいは分子生物学的に解析すると共に、その遺伝子をクローニングし、それを耐性能を持たないバイオマスの大きな植物に導入して耐性能を付与するための遺伝子資源としても重要である。筆者の研究室における重金属耐性植物研究の戦略を図1に示す。

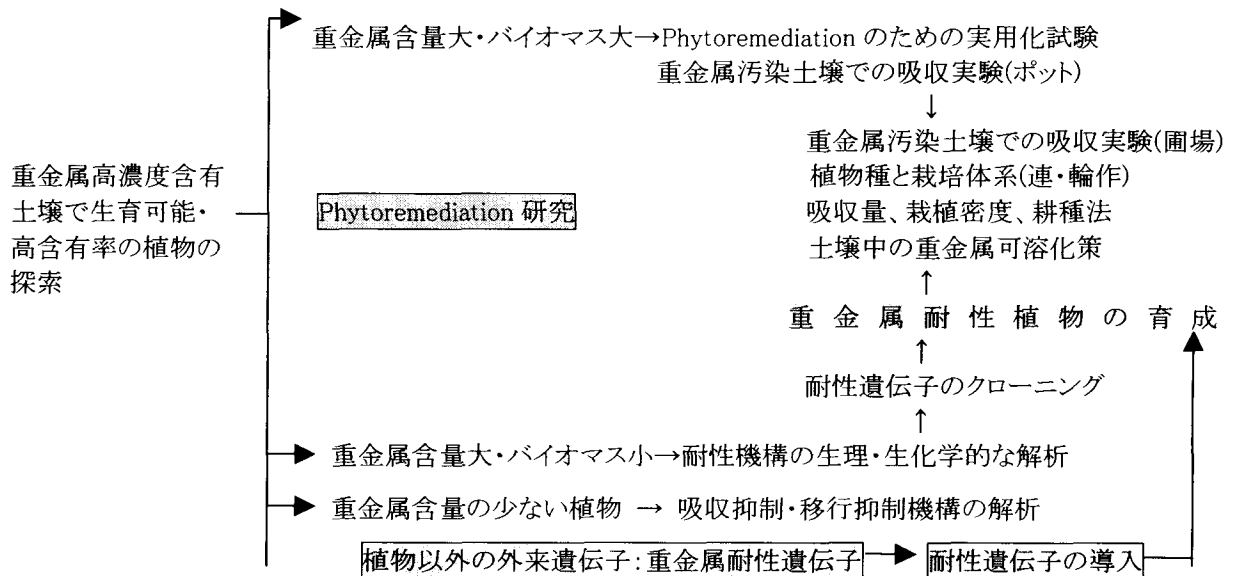


図1 筆者の研究室における Phytoremediation に関する研究戦略

#### 4. 植物を用いた重金属汚染土壌の浄化(ファイトレメディエーション)<sup>7-9)</sup>

従来の重金属汚染土壌の対策としては、反転耕、排土・客土法などの農業土木的方法があり、これらは、重金属の濃度を一時的に低下させて作物中に吸収される量を低下させる効果があるため、高濃度でも面積が比較的小さい汚染地では有効で、実際に多用されてきた。しかし、こうした対策はコストが高いうえ客土に使用する非汚染土壌の入手が困難になってきたことや、重金属の絶対量が減少するわけではないため根本的な解決にはならない。ましてや低濃度ではあるが広大な面積となることが予測される今後の重金属の土壌集積に対しては、ほとんど適用できないといっても過言ではない。

そこで最近注目されるようになったのが生物的な土壌の浄化方法である。生物的方法とは、土壌中の特定の元素を特異的に吸収濃縮あるいは分解する植物を利用して、土壌中の汚染物質を除去する方法である。植



物を利用して汚染された水質、土壌、大気などの浄化を行う技術はアメリカやEUで盛んに研究が行われ、一部は実用化されている。このように、植物を利用して環境浄化を行う試みはファイトレメディエーション(Phytoremediation)と呼ばれている。

植物を用いる重金属汚染土壌の浄化は、重金属を植物に吸収させ、それを地上部で濃縮・集積させたものを収穫することで土壌から重金属を取り除くことを狙った技術である。なぜなら、ダイオキシンなどのような有機化合物は、それを分解して無害な化合物に変化させればよく、それには微生物が有効と考えられる。しかし、金属元素はそれ以上分解されることがなく、微生物では体内に取り込まれて一旦は非吸収態となっても菌が死滅すると再可溶化してくるが、植物に吸収させたものは、それを抜取ることによって土壌から有害な重金属を除去できる。しかも、重金属を高濃度に含有した植物体(抜取ったもの)は、灰化してそこから重金属を回収することは比較的容易と考えられ、希少で貴重な重金属資源の再利用(リサイクル)にもなる(図2)。このファイトレメディエーション技術は、重金属のみならず放射性同位元素の土壌からの除去にも適用でき、チェルノブイリ原発事故による放射能汚染地ではヒマワリを植えて<sup>137</sup>Csなどの放射性同位元素を吸収させて除去する試みがなされている。各種の汚染土壌を対象としたファイトレメディエーションは世界中で多くの研究が行われ、一部では実用化の段階に至っている。わが国でも1970年代のCdによる汚染が問題となった時期にファイトレメディエーションが試みられたが、供試した植物体内の含有率が思ったほど増加せず、土壌から除去するまでに何十年もかかることになるなどの試算が出されたことと、折からの高度経済成長に乗って高額投資であっても短期間に成果の出る土木工法が主な

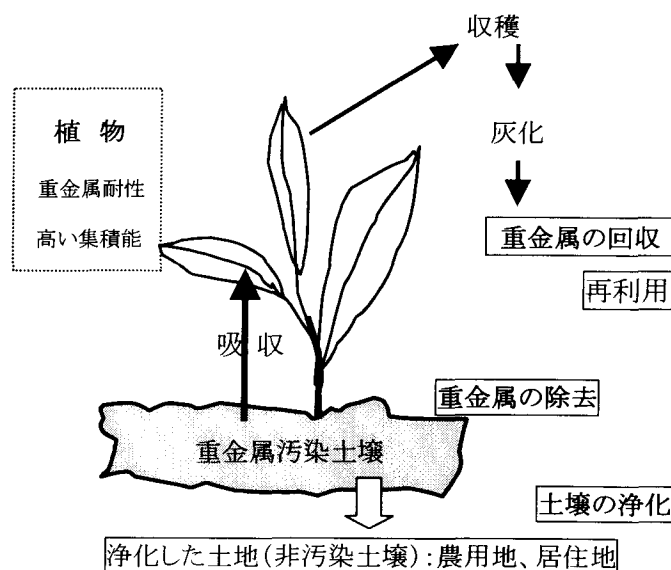


図2 植物による土壌からの重金属の除去

対策として取り上げられた。その結果、わが国でのファイトレメディエーションに関する研究が大幅に遅れることとなった。しかし、ファイトレメディエーションは土木工法よりコストが安く、環境への負荷が少ないことから、低濃度ではあるが広範囲におよぶ汚染土壌からの重金属除去法として期待されている。

## 5. 遺伝子組換えによる重金属耐性植物の分子育種

植物による土壌からの重金属の収奪量は、植物体内の重金属含有率×植物体の大きさ(単位面積当たり

の乾物生産量=Biomass)である。そのため、ファイトレメディエーションに用いる植物には、重金属を高濃度に集積でき(重金属耐性)、しかも Biomass が大きいことが要求される。

重金属耐性の超集積植物は、重金属の集積能は高いが Biomass の小さいものが多く、ファイトレメディエーションに用いるものとして必ずしも適当ではない。そこで、遺伝子組換え技術を用いて重金属耐性遺伝子を Biomass が大きい植物に導入して重金属耐性植物を育成することが試みられている<sup>10)</sup>。外来の重金属耐性遺伝子を導入することで植物に重金属耐性能を付与する試みは、1989年に Misra らがヒトのメタロチオメイン合成遺伝子をタバコに導入、また 1991年に Maiti らがマウスのメタロチオメイン合成遺伝子をタバコに導入して Cd 耐性能を検討している。1996年には Rugh らが細菌の水銀還元酵素の合成遺伝子をシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)に導入して Hg 毒性の軽減を検討した例などがある。また、最近では、グラム陰性細菌の *merB* 遺伝子を植物に導入することによる水銀耐性付与や、タバコ(*Nicotiana tabacum*)の NtCBP4 遺伝子を同じタバコで過剰発現させることによる Ni 耐性付与が試みられており、それぞれ耐性能が付与されたことなども報告されている(表2)。

表2 世界における遺伝子組換えによって作られた重金属耐性植物

導入遺伝子	遺伝子供与体	付与機能	対象金属	導入植物	研究者	発表年
Metallothionein	ヒト	耐性	Cd	タバコ	S.Misra <i>et al</i>	1989
Metallothionein	マウス	耐性	Cd	タバコ	I.B.Maiti <i>et al</i>	1989
Metallothionein	ハムスター	耐性	Cd	タバコ	E.J.Bandle <i>et al</i>	1993
Metallothionein	ヒト	耐性	Cd	タバコ	A.Pan <i>et al</i>	1994
Hg(II) reductase <i>mer A</i>	細菌	還元	Hg	シロイヌナズナ	C.L.Rugh <i>et al</i>	1996
Metallothionein <i>CUP1</i>	酵母	耐性	Cd	カリフラワー	I.Hasegawa <i>et al</i> <sup>11)</sup>	1997
Hg(II) reductase <i>mer A</i>	細菌	還元	Hg	ポプラ	C.L.Rugh <i>et al</i>	1998
Hg(II) reductase <i>mer B</i>	細菌	還元	Hg	シロイヌナズナ	Meagher <i>et al</i>	1999
Metallothionein-like protein	タバコ	耐性	Pb	タバコ	M.C.Suh <i>et al</i>	1999
Glutathione synthetase		耐性	Cd	カラシナ	Y.L.Zhu <i>et al</i>	1999
ATP sulfueylase		吸収・還元	Se	カラシナ	EAH.Smite <i>et al</i>	1999
Glutathione synthetase		耐性	Cd	カラシナ	Y.L.Zhu <i>et al</i>	1999
Zn-transporter	シロイヌナズナ	吸収・耐性	Zn	シロイヌナズナ	B.J.Zaal <i>et al</i>	1999
Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase	シロイヌナズナ	吸収・輸送	B	タバコ	Brown <i>et al</i>	1999
Calmodulin-binding transpoter	シロイヌナズナ	感受性	Ca	タバコ	K.D.Hirschi <i>et al</i>	1999
CAX 1	タバコ	耐・感受性	Ni,Pb		T.Arazi <i>et al</i>	1999
CAX 2	シロイヌナズナ	集積・耐性	Mn	タバコ	K.D.Hirschi <i>et al</i>	2000
Carboxypeptidase (Rice Type 1)	イネ	耐性	Cd	タバコ(Callus)	A.Tsuchizaki <i>et al</i>	2000
NtBP4 channel protein	タバコ	耐性	Pb	シロイヌナズナ	R.Sunker <i>et al</i>	2000
Metallothionein <i>CUP1</i>	酵母	耐性	Cd	ヒマワリ	M.Watanabe <i>et al</i> <sup>13)</sup>	2001

演者らは、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のメタロチオネイン合成遺伝子 *CUP1* を Biomass の大きいいくつかの植物に導入して重金属耐性植物を作成して重金属存在下で生育させ、その吸収能を検討し、最終的にはファイトレメディエーションに供する植物の分子育種を試みている。これまでの研究で、この *CUP1* 遺伝子をカリフラワーに導入し、Cd に対する耐性能を付与することに成功した<sup>11)</sup>。遺伝子組換えカリフラワーの再生個体を水耕栽培で馴化させたものと、実生苗から水耕栽培で生育させた非組換えカリフラワーを用い、CdCl<sub>2</sub>を0~400 μM 含有する水耕液で栽培したところ、非組換えカリフラワーは Cd25 μM までは生育できたが Cd50 μM では枯死したのに対し、組換えカリフラワーは Cd400 μM でも正常な生育を示し、組換え体は非組換え体の 16 倍以上の高い耐性が付与さ

れていた。また、最近では Biomass の大きいヒマワリ (*Helianthus annuus*)<sup>13)</sup> やカラシナ (*Brassica juncea*)<sup>14)</sup> を宿主植物として同遺伝子を導入し、重金属耐性植物を作成した。非組換えカラシナは Cd を高濃度で処理 (400  $\mu$ M) すると1週間で枯死したが、組換えカラシナは30日間も生育でき、その時の地上部カドミウム含有率は約3,000ppmとなった。また、Cd を含む砂質土と黒ボク土でこの組換えカラシナを栽培した結果、体内 Cd 濃度は非組換えカラシナの2.3倍の濃度、約500ppmとなり、ファイトレメディエーションに利用可能なことが示された。これから、この植物を実用化するため遺伝子組換え植物の安全性試験を実施する予定であるが、同時に組換え体を用いた環境浄化のためのパブリックアクセプタンス(PA)を得る必要もあると考えている。これは冒頭に述べたような変りゆく地球環境の現状を鑑みると、環境修復を目的とし、しかもこの場合、組換え体は最終的には採取焼却することから、PAは容易に得られるものと考えている。現在の地球環境の悪化は、こうした遺伝子組換えによって機能強化した植物を用いなければ修復ができないような状況になりつつあると危惧するのは演者だけであろうか。

## 6. 今後の課題と展望

前述したように重金属耐性遺伝子の導入によって耐性能や集積能を強化した植物を育成することが可能で、Biomass が大きい宿主植物を用い、汚染土壌から重金属を除去させる Hyperaccumulator Plant としてファイトレメディエーションに活用できることが明らかとなった。しかも植物体の灰化によって重金属が回収できリサイクルも可能となろう。

しかし、そのためには今後の検討しなければならない課題も多い。前述した我々の研究例から大胆なシミュレーションを試みたのが表3である。無謀に近い前提があることは認めるが、体内に

表3 遺伝子組換え重金属超集積植物による土壌浄化のシミュレーション<sup>15)</sup>

<p>前提条件: 土壌中の Cd 濃度 10ppm、汚染土壌面積 1ha、土壌の比重 1、土壌の深さ 30cm          土壌重量 = 10,000m<sup>2</sup> × 比重 1 × 深さ 30cm = 3,000t/ha 土壌中の Cd 量 = 30Kg          カラシナの栽培を年2作 地上部乾物重 4t/ha/1作 × 2作 = 8t/ha/年</p> <p>ケース1:          形質転換植物の Cd 含量が 500ppm の植物が 8t 採れるとすれば Cd 4Kg/年 が収穫できるので、          Cd 30Kg を吸収するのに、30Kg/4Kg = 7.5 年を要する。</p> <p>ケース2:          形質転換植物の Cd 含量が 3,000ppm の植物が 8t 採れるとすれば Cd 24Kg/年 が収穫できるので、          30Kg の土壌中の Cd は、30Kg/24Kg = 1.2 年で無くなる。</p>
--

3,000ppm のカドミウムを含有しても枯死しない植物が育成できたのであるから、この程度のカドミウム含有率になるまで植物が吸収さえしてくれれば、数トン/ha の乾物生産をする植物を年2-3作栽培できれば実用性があるといふことになる。しかし、実際には、水耕と違って土壌からのカドミウムの吸収は少なく、しかも土壌の種類や Cd 含量によって吸収量が大きく異なる。そのため、筆者らは、土壌からの Cd 吸収の多い植物や根量が多い植物を組換えの宿主植物に用いることを試みている。また、重金属集積植物の栽培時に土壌中の Cd を可溶化させる方法、例えばキレート材の散布などを併用する方法なども考えられる。土壌中の重金属濃度が高い場合はよく吸収されるが、低濃度になると吸収量が著しく低下することもわかって来たので、その対応も必要である。さらに、土壌浄化を要す

る地域(気候条件等)によって植物の生育量が異なるので、西南暖地向き・寒冷地向きの耐性植物種を用意し、それらの輪作体系を構築することも重要と考えている。こうした研究は、基礎研究と同時に実用化研究を早急に進める必要があり、そのためには表4に示したような課題を解決しなければならない。多くの研究者がこの課題を取り上げ、地域(気候、土壌の種類・立地など)を有機的に結んだ共同研究が推進されなければならないと考えており、

表4 植物による土壌からの重金属の除去に関する検討課題<sup>15)</sup>

- 
1. 重金属耐性で体内集積量が多い植物→野生植物からの探索、遺伝子組換えによる集積能付与
  2. 単位面積当りの乾物生産量が大きい植物→大きい植物、短期生育植物の連・輪作体系の確立
    - (1). 植物の種類を複数:地域・気象条件適応型
    - (2). 同上 :土壌適応型(土壌による生育の違い、土壌からの吸収能の違い)
  3. 重金属吸収能の大きい植物→根量の多い植物、遺伝子組換えで根量増加・トランスポーター付与
  4. 土壌中の重金属の可溶化促進\* →植物栽培時にキレート剤の散布、土壌の酸性化
  5. 重金属含有植物の経済的な処理法と回収技術の確立
- 

\*地下水への二次汚染に注意を要する。

本シンポジウムがそうした研究進展へのきっかけとなり、多くの若手研究者がこうした研究に興味を持って頂ければ望外の喜びである。

演者らは酵母の重金属耐性遺伝子を用いたが、植物の中にはより高度な吸収・集積機能を有しているものが存在する可能性がある。演者の研究室では野生植物の中から高濃度に重金属を吸収する植物種をいくつか得ている。それらに付いて、吸収・集積(耐性)機構を生理・生化学的に解析するとともに、それを制御する遺伝子の解析を通して、より効率的な Hyperaccumulator Plant の分子育種をめざしている。また、それらの中には部位間での移行抑制機構(特定部位に集積)を有する植物<sup>16)</sup>もあり、その機構解析を通して重金属を吸収しても可食部(子実など)へ移行しない作物が育成できれば、重金属含有土壌でも安全な作物生産が可能となり、しかも重金属を含有する根や茎葉はそれを収穫することで土壌の浄化ができる。そのうえ茎葉・根を集めて灰化すれば、そこから重金属を回収することも可能となる。将来的には重金属含有土壌でも安全な食料生産の途を開きたいと考えている。

## 7. 参考文献

- 1) 浅見輝男 日本土壌の有害金属汚染、アグネ技術センター、東京、2001.
- 2) 朝倉健司 カドミウムの国際食品規格の検討、土肥誌、72(5): 707、2001.
- 3) Brooks, R.R., *et al.* Detection of nickelferous rocks by herbarium specimens of indicator plants. *J. Geochem. Explo.*, 7, 49-87, 1977.
- 4) Shinmachi, F., *et al.* Translocation and accumulation of cadmium in cadmium tolerant *Polygonum Thunbergii*. *Soil Sci. Plant Nutri.*, 2002, (Submitted).
- 5) 森 敏、前 忠彦、米山忠克編著 植物栄養学、pp.260-261、文永堂出版、東京、2001.
- 6) Kramer, U., *et al.*, Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379,

- 635-638, 1996.
- 7) American Chemical Society, Assessing Phytoremediation Progress, the United States and Europe, *Environmental Science and Technology*, pp.447-452, 2001.
  - 8) Chaney, R.L., *et al.* Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**, 279-284, 1997.
  - 9) Raskin, I. Phytoremediation of metals: Using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**, 221-226, 1997.
  - 10) Kramer, U., *et al.* The use of transgenic plants in the phytoremediation of soils contaminated with trace elements. *Appl. Microbiol., Biotechnol.*, **55**, 661-672, 2001.
  - 11) Hasegawa, I., *et al.* Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (*CUP1*). *Plant and Soil*, **195**, 277-281, 1997.
  - 12) 長谷川功 遺伝子組換えによる重金属耐性植物の育成と重金属汚染土壌浄化の試み、植物による環境負荷低減技術、pp.171-206、NTS、東京、2000.
  - 13) Watanabe, M., *et al.* Heavy-metal tolerant transgenic plants - Expression of the yeast metallothionein gene *CUP1* in plants and evaluation of heavy-metal tolerance in transgenic plants at the stage of callus. W.J.Horst *et al.* (Eds), *Plant Nutrition - Food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research*. pp.56-57, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2001.
  - 14) Watanabe, M., *et al.*, Introduction of yeast metallothionein gene (*CUP1*) in plants and evaluation of the heavy-metal tolerance of transgenic plants at the stage of callus. *Plant Biotechnol.*, 2002, (Submitted).
  - 15) 長谷川功 植物による重金属汚染土壌の浄化、農林水産技術ジャーナル、25(4): 5-12、2002.
  - 16) Shinmachi, F., *et al.*, A stem specific cadmium accumulation mechanism in cadmium tolerant plant *Polygonum Thunbergii*. *Soil Sci. Plant Nutri.*, 2002, (Submitted).

#### 講師プロフィール

- ・学歴: 昭和 44 年 日本大学農獣医学部農芸化学科卒業
- ・職歴: 昭和 44 年ー 民間企業の研究所等の勤務を経て  
平成元年ー 日本大学農獣医学部(現、生物資源科学部)勤務
- 現職 日本大学生物資源科学部 教授 農学博士  
同 大学院生物資源科学研究科生物環境科学専攻ストレス耐性科学分野教授
- ・専門: 植物栄養生理学、植物細胞化学、ストレス植物生理学
- ・著書(共著): 植物栄養学(文永堂出版,2000)、植物栄養・肥料の事典(朝倉書店,2001)など
- ・学会活動・その他: 日本土壌肥料学会評議員、日本植物生理学会会員、日本植物細胞培養・分子生物学会会員、(財)日本肥糧検定協会理事、(社)日本有機資源協会委員など

## 植物栄養学から作物栄養学へ

東北大学大学院農学研究科附属農場：三枝正彦

植物栄養学の進歩は目覚ましく、まさに“日進月歩 10 年一昔”から“時進日歩 1 年一昔”になってきた。そして群落生理、生態から個体→組織→細胞→遺伝子レベルの世界に飛び込み微生物や動物、人間に共通な DNA がツールであり、またターゲットな時代となった。またその成果は誰が見ても一目で優劣が明らかなインパクトファクター、サイテーションインデックスなる物差しで計られている。本日のシンポジウムの諸氏はいずれもその道の大家であり、これら秒速の世界においても、また生物共通の遺伝子の世界においても素晴らしい成果を上げられてきた。しかしながら、かつて土壌肥料学研究室で作物栄養学を志し、土壌学を経て現在、アグロノミーを専門とする小生にとって一抹の寂しさと不安を感じるのは何故だろうか？小生の修士論文のテーマは“小麦のゲノム間差異とタンパクの電気泳道パターン”というとてもつもない挑戦であり、アクリルアミドのディスク電気泳道装置の手作りから始まり、毎日アイソザイムパターンの検討に悪戦苦闘したことが思い出される。それが現在では遺伝子を切った、貼ったが日常的に瞬時に行えるようになってきている。そんな訳で、小生も遺伝子の世界までそこそこ理解して来たつもりであり、現在も組換え植物の隔離圃場試験に携わっているが、植物栄養学の世界になんとなく寂しさと不安を禁じえないのは老婆心であろうか？今回の”21 世紀の食糧・環境問題解決に向けて—植物栄養学からのアプローチ—”のシンポジウムに際して、植物栄養学が辿ってきたこれまでの道を振り返って見ると何となくその原因が解るような気がする。

日本土壌肥料学会は設立 80 年の歴史を持つが、植物栄養学は土壌学、肥料学から発展し、作物栄養学を経て、現在の植物栄養学に到達し、もう既に植物細胞工学の域に大半が足を踏み込んでいる。もちろん学問の進歩という点からこの方向性は決して誤っているとは思わないが、何か忘れ物をしている感じがする。それは日本土壌肥料学会の植物栄養学は農学の世界であり、耕地生態系での食糧生産の向上を最終目標とする戦略的基礎研究であるということである。もちろん本日の演者の大半は植物栄養学の変遷を経験しその点を常に念頭において仕事をされているように見受けられるが、問題はこの事を経験していない多くの次世代の研究者が、現実の農学ひいては生産現場から如何に問題点を抽出し、逆に得られた成果を如何に生産現場に還元するかということである。

植物栄養学が細分化し高度化するのには当然の道筋ではあるが、その一方で常に結果の総合化、応用化をも考えておく必要がある。生産現場では土壌、水、大気環境の下に植物個体の生理に加えて、耕地生態系の一員としての群落生理、生態が重要である。細胞培養や水耕栽培は植物栄養学の最大の武器であり、その有効性は極めて明確であるが、その反面大きな落とし穴もある。それは生産現場では土壌という巧妙な媒体があり、良しにつけ、悪しきにつけ植物の生育を大きく左右しているからである。土壌中ではコロイドや化学成分、微小生物によって吸着、固定、溶解、不溶化、無機化、有機化、緩衝作用など様々な反応が存在し、植物への養分供給を支配している。

例えば、酸性土壌の主な生育阻害要因については、水耕栽培ではその本体としてポリマーアルミが一時高い関心を集めたが、土壌溶液中では現在でも依然としてモノマーアルミが重要である。また、水耕栽培で多くの議論のあった窒素形態と植物の生育も、実際の畑土壌では硝酸態が、水田土壌ではアンモニウム態が主体を占めている。さらに水耕栽培では一般に養分濃度を低濃度から徐々に高濃度にあげて栽培されるが、圃場では元肥施用によってむしろ生育初期が最も高い養分濃度である。すなわち実際の圃場では多くの要因が同時に、複雑に発現し、植物側も群落として成立している。このことを考慮した植物栄養学の研究であって戴きたい。

これまで我が国の植物栄養学や植物細胞工学は目覚ましい発展を遂げてきたが、反面、それらを応用した遺伝子組み換え植物は未だ殆ど実用化していない。また組換え植物に対する社会への説明も社会からの理解も充分得られていない。加えて、この分野をリードする我が国の大学には実用化に必要な非閉鎖系温室や組換え植物隔離圃場も極めて少ないのが現状である。もちろん植物栄養学としての学術的基礎研究は極めて重要であるが、土壌肥料学会、あるいは農学分野の植物栄養学は作物栄養学としての貢献、すなわち食糧生産向上のための戦略的基礎研究も重要である。現場経験の極めて少ない若い植物栄養学研究者にもその重要性を認識して戴きたい。またそのことが土壌肥料学会、農学分野の植物栄養学のアイデンティティであり、プライオリティでもあると思われる。土壌、微生物、植物生理、細胞工学、環境科学など多様な分野を包含する土壌肥料学会の機能を最大限に活用し、純粋な植物栄養学と共に、生産現場にも貢献する作物栄養学としての発展を期待したい。その意味では本日、土壌肥料学、作物栄養学の豊富な経験をもつ第一線の研究者が一堂に会し、次世代の研究者に今後の植物栄養学のあり方を提示したことは極めて意義が深いものと思われる。

終わりに、農学分野の植物栄養学はこれからの世代も、作物栄養学への“フィードバック”であると共に、生産現場への応用すなわち“フィールドバック”であることを願って止まない。