

■受領No.1438

鉄の吸収と体内輸送能力を強化したアルカリ性不良土壌でも 良く育つ樹木ポプラの作出とバイオマス増産

代表研究者

増田 寛志

秋田県立大学 助教



Production of novel poplar which shows superior growth in calcareous soils with enhanced iron absorption and translocation ability, and increased biomass production

Principal Researcher

Hiroshi Masuda,

Akita Prefectural University, Assistant Professor

アルカリ性不良土壌では植物が鉄欠乏に陥りやすい。樹木ポプラの鉄吸収能力を高める三価鉄還元酵素遺伝子 *refre1/372* と、鉄の体内輸送を促進するニコチアミンの生合成酵素遺伝子 *HvNAS1* を導入した形質転換ポプラを作出した。鉄欠乏の水耕栽培と、アルカリ土壌を用いた栽培実験の両方において、形質転換ポプラは鉄欠乏症状が緩和され、野生型に比べ良好な生育を示した。本法により、アルカリ性不良土壌におけるポプラのバイオマス生産量の向上が期待される。

Plants are susceptible to iron deficiency in calcareous soils. We produced poplar transformants by introducing the ferric reductase gene *refre1/372*, which enhances the iron absorption capacity of poplar, and the nicotianamine biosynthetic gene *HvNAS1*, which promotes the transport of iron in the plant body. In both iron-deficient growing experiments, -Fe hydroponic cultivation and calcareous soil cultivation, the transformed poplar exhibited less iron deficiency symptoms and grew better than the wild type. This finding will contribute to increased poplar biomass production in calcareous soils.

1. 研究内容

1.1 研究の背景と目的

バイオエタノールなどのバイオ燃料はガソリンのように貯蔵や運搬が容易である。また、バイオマス資源は、バイオマスプラスチックなど素材や資材として活用できるなど、化石燃料の代替に用いることが可能である。このようにバイオマス生産を高めることが、化石燃料の使用の抑制と、地球温暖化対策には必須である。一方で、サトウキビやトウモロコシ、ソルガムなどの草本バイオマス植物では、それ自体が重要な作物であり食糧生

産と競合する。樹木バイオマスは、それ自体が食糧ではないことに加え、斜面や丘陵地など、耕作に適さないところでも栽培可能であり、食糧生産と競合しないという利点がある。特にポプラは生育が早く、高温、低温、乾燥などの環境ストレスにも強く、砂漠の緑化にも用いられており、不良土壌におけるバイオマス生産に大変有望な植物である。

不良土壌のうち、北アフリカ、中東、中国西部、アメリカ中央部など、アルカリ土壌が世界の 1/3 を占める。アルカリ土壌では、鉄イオンが土壌中

に沈殿し、ほとんど溶けださないため、植物が吸収出来ず、これが植物の生育の主な制限要因となる。そこで、鉄を土壌から吸収・体内輸送しやすく、鉄欠乏に強いポプラの新品種を作出することで、アルカリ性不良土壌におけるバイオマス生産を向上出来ると考えた。

ポプラが土壌から鉄を吸収するには、他の双子葉植物と同様に、沈殿しやすい三価鉄をより溶けやすい二価鉄に還元する酵素（三価鉄還元酵素）の働きが重要である(図 1)。また、植物が合成するニコチアミンが植物体内で鉄イオンをキレートして錯体を作ることで、植物体内における鉄の輸送と分配に寄与する(図 1)。ポプラのこの二つの能力を強化する遺伝子を導入することで、ポプラの鉄吸収と体内輸送能力を強化し、鉄欠乏耐性能を付与することが出来ると考えた。

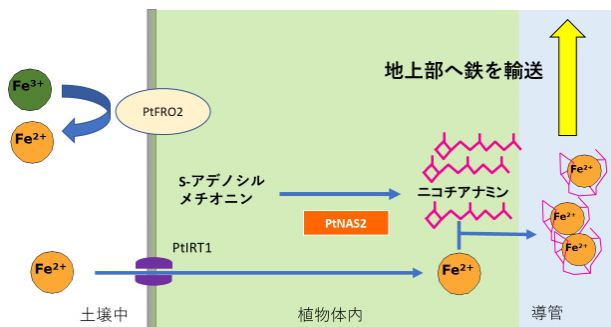


図 1 ポプラの鉄吸収機構

PtFRO2：ポプラの内生の三価鉄還元酵素遺伝子、
PtIRT1：ポプラの二価鉄輸送体（土壌から根への鉄の吸収関わっている）、**PtNAS2**：ポプラのニコチアミン合成酵素遺伝子

1.2 研究内容

1.2.1 耐性植物の作成

ポプラの鉄の吸収能力と体内輸送能力を強化するため、高 pH でも活性を保持する三価鉄還元酵素の遺伝子 (*refre1/372*) を、ポプラの根で鉄欠乏時に発現が誘導されるプロモーターの制御下で発現させる遺伝子発現カセットを作成した。また、ニコチアミン合成酵素遺伝子 (*HvNAS1*) を、ポプラの体内全体で高発現させるプロモーター

(*35S promoter*) につなげた遺伝子発現カセットを作成した。それらをつなげ、ポプラの土壌からの鉄を吸収する能力を高める遺伝子 (*refre1/372*) と、鉄の植物体内での輸送能力を高める遺伝子 (*HvNAS1*) を同時に野生型ポプラ (*P. tremula* と *P. tremuloides* の掛け合わせ品種) に導入し、形質転換ポプラを作成した(図 2)。

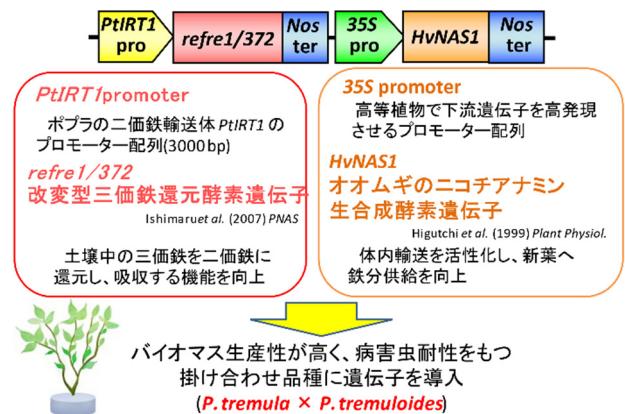


図 2 今回の研究に用いたポプラに鉄欠乏耐性能を付与する遺伝子と導入した品種

1.2.2 鉄欠乏水耕栽培による耐性検定

ポプラの苗を鉄も含んだ通常の水耕液（ホーランド液を一部改変）で栽培した。その後、鉄を完全に抜いた状態（鉄欠乏状態）で水耕栽培した。鉄欠乏栽培後 30 日目において、野生型のポプラ (WT) では、新葉が白くなり、深刻な鉄欠乏クロロシスの症状を示した。クロロフィルの合成に鉄は必須であるため、植物が鉄欠乏状態になるとこのように葉が黄色から真っ白に変化する。一方で、形質転換ポプラの R/W 1-1 では、新葉が緑色を示し、生育も良好であった(図 3A)。葉のクロロフィル含有量と高い相関のある SPAD 値を調べると、野生型では鉄欠乏の栽培日数と共に新葉の SPAD 値が低下していくのに対し、形質転換ポプラは高い SPAD 値を維持出来ていた(図 3B)。さらに、形質転換ポプラの乾物重が野生株に比べて 1.5 から 2 倍に増加した。また、形質転換ポプラにおける導入遺伝子の発現を鉄欠乏条件の根において定量的 RT-PCR で確認した(図 3C)。野生型では

Refre1/372 は全く発現が見られず、*HvNAS1* の発現もほとんど見られなかった。わずかに発現が見られるのは、内生の *PtNAS2* の発現を検出しているものと推測される。一方で、形質転換ポプラの R/W 1-1 と R/W4-1 系統では、概ねどの個体でも導入遺伝子である *Refre1/372* と *HvNAS1* の顕著な発現が確認された。また新葉のニコチアナミンの内含量を調べると、形質転換ポプラ R/W1-1 と R/W4-1 において、顕著な蓄積を確認することが出来た(図 3D)。また鉄欠乏にて水耕栽培後、39 日目の葉の鉄濃度を分析した(図 3E)。野生型ポプラに対し、形質転換ポプラの葉の鉄濃度が 2 倍から 3 倍高く、鉄の土壌からの吸収や体内輸送能力が強化されていることが示唆された。

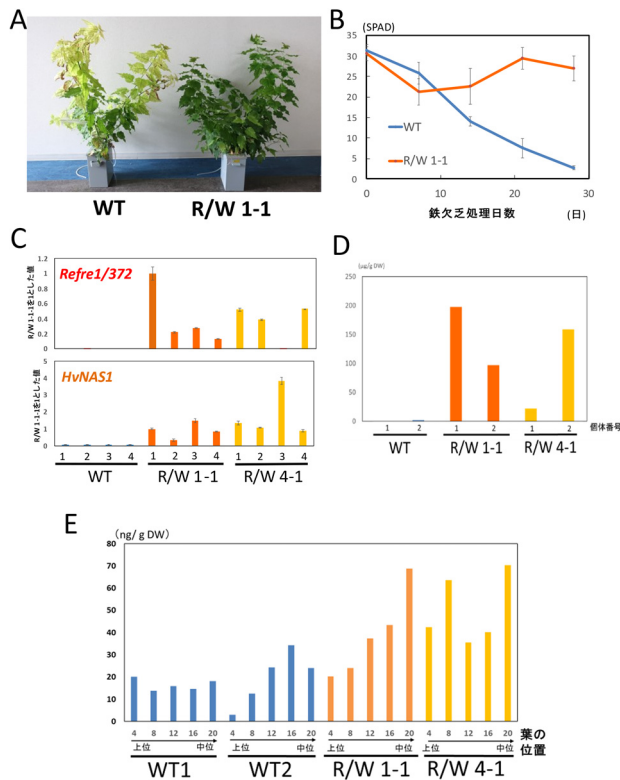


図 3 ポプラの鉄欠乏水耕栽培による耐性評価試験
A: 鉄欠乏の水耕液で 30 日間栽培した個体の写真、B: 第 4 葉目の新葉の SPAD 値の経日変化(n=4)、C: 鉄欠乏 30 日目の各個体の根における導入遺伝子の発現量の定量的 RT-PCR による解析(n=3)、D: LC-MS/MS による新葉におけるニコチアナミンの内材量の解析(n=1)。E: 水耕栽培後のポプラの葉の鉄濃度、鉄欠乏

水耕液にて栽培後 39 日目の個体の葉を 1 枚ずつサンプリングし、ICP-OES による鉄の濃度を分析した(n=1)。WT: 野生型のポプラ、R/W 1-1、R/W 4-1: 形質転換ポプラの系統

1.2.3 高アルカリ性土壌における耐性検定

さらに pH 9.6 の高アルカリ性である貝化石土壌を用いた栽培実験を行った(図 4)。ポットは 1/5000 a のサイズのワグネルポットを用い、肥料として上記の鉄欠乏水耕液を週に 1 度、各個体 50ml 施用し栽培した。土壌栽培試験においても、形質転換ポプラは野生型に比べ良好な生育を示した(図 4A)。野生株は栽培と共に新葉の SPAD 値の低下がみられ、クロロフィル含有量が低下していたが、形質転換ポプラは高い SPAD 値を維持し、クロロフィル含有量の低下は見られなかった(図 4B)。

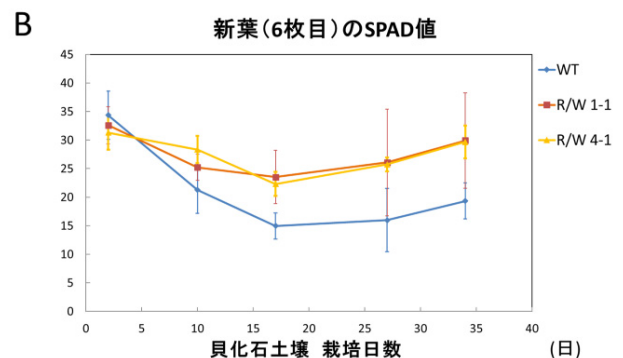
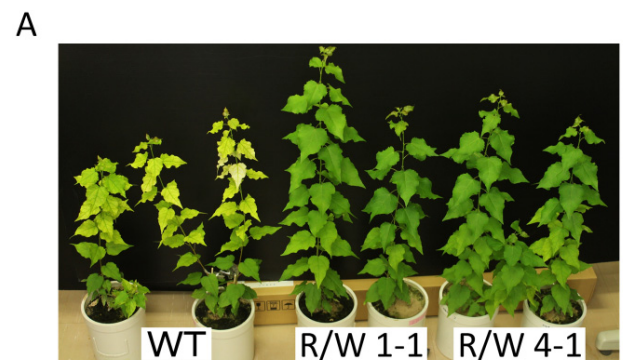


図 5 貝化石土壌における栽培実験
pH 9.6 の貝化石土壌でポプラをポット栽培した。A: 栽培後 34 日目の植物体の写真 B: 第 6 葉目の新葉の SPAD 値の経日変化 WT: 野生型のポプラ、R/W 1-1 と 4-1: 形質転換ポプラ (n=4)

1.3 まとめと展望

これらの結果から、*Refre1/372*と*HvNAS1*の二つの導入遺伝子は形質転換ポプラで適切に発現、機能し、鉄の吸収や体内輸送能力が強化されることで、形質転換ポプラに鉄欠乏耐性能を強化できることが明らかになった。本手法により作出されたポプラを用いることで、貝化石土壌、石灰質土壌等の高アルカリ性不良土壌におけるポプラのバイオマス生産量が向上し、不良土壌の緑化や地球温暖化の解決へつながることが期待される。

2. 発表(研究成果の発表)

学会講演会

氏名：増田寛志、成田匠、MAY SANN AUNG、
前田慶介、坂本真吾、光田展隆、小林高範、
勝田幹也、小川敦史、頼泰樹、服部浩之、
西澤直子

題目：鉄欠乏耐性能を強化した樹木ポプラの作出

学会名：日本土壌肥料学会年会(北海道大学(オンライン)、2021年)