

はしがき

本報告書は平成14年度-16年度、日本学術振興会科学研究費、基盤研究(A)(2)によって行われた「耐塩性窒素固定菌の海水農業への利用」の結果をまとめたものである。日本学術振興会と研究を分担していただいた研究者各位、そして多くの学生諸君の協力により成果が得られた。ここに深く感謝の意を表する。

研究組織

研究代表者:新名惇彦(奈良先端科学技術大学院大学・
バイオサイエンス研究科・教授)

研究分担者:吉田和哉(奈良先端科学技術大学院大学・
バイオサイエンス研究科・助教授)

研究分担者:富澤健一(地球環境産業技術研究機構・主席研究員)

研究協力者:加藤 晃(奈良先端科学技術大学院大学・
バイオサイエンス研究科・助手)

研究協力者:仲山英樹(奈良先端科学技術大学院大学・
バイオサイエンス研究科・助手)

研究経費

	直接経費	間接経費	計
平成14年度	19,300 千円	5,790 千円	25,090 千円
平成15年度	13,900 千円	4,170 千円	18,070 千円
平成16年度	8,600 千円	2,580 千円	11,180 千円
計	41,800 千円	12,540 千円	54,340 千円

研究発表

発表論文

- 1) Mäser P, Hosoo Y, Goshima S, Horie T, Eckelman I B, Yamada K, Yoshida K, Bakker E P, Shinmyo A, Oiki S, Schroeder J I & Uozumi N: Potassium-Channel-like Selectivity Filters Determine Potassium Selectivity in HKT/Trk/KtrB Transporters from Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6428-33 (2002)
- 2) Yonamine I, Yoshida K, Kido K, Nakagawa A, Nakayama H & Shinmyo A: Overexpression of *NtHAL3* genes confers increased levels of proline biosynthesis and the enhancement of salt tolerance in cultured tobacco cells. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 387-395 (2004)
- 3) Nakayama H, Yoshida K, & Shinmyo, A: Yeast plasma membrane Enalp ATPase alters alkali-cation homeostasis and confers increased salt tolerance in tobacco cultured cells. *Biotechnol Bioeng*, **85**, 776-789 (2004)
- 4) 與那嶺育子、吉田和哉: 植物 CoA 生合成系遺伝子とその応用、*バイオサイエンスとインダストリー*, **62**, 35-36 (2004).

学会発表

- 1) 菅原満男、堀江智明、仲山英樹、吉田和哉、新名惇彦: イネの *HAK* カリウムイオン輸送体遺伝子の単離と機能解析、第 20 回日本植物細胞分子生物学会大会、奈良、2002 年 7 月
- 2) 岡村さおり、菅原満男、堀江智明、吉田和哉、新名惇彦: 耐塩性の異なるイネ品種における K^+/Na^+ 共輸送体遺伝子の機能解析、2002 年度日本農芸化学会関西支部大会、奈良、2002 年 10 月
- 3) 菅原満男、堀江智明、仲山英樹、吉田和哉、新名惇彦: イネの K^+ 輸送体をコードする *HAK* 遺伝子の単離と機能解析、日本生物工学会平成 14 年度大会、大阪、2002 年 10 月
- 4) 與那嶺育子、木戸啓司、仲山英樹、吉田和哉、新名惇彦: タバコ *HAL3* ホモログ遺伝子の機能解析、日本生物工学会平成 14 年度大会、大阪、2002 年 10 月
- 5) 與那嶺育子、木戸啓司、仲山英樹、吉田和哉、新名惇彦: タバコ *HAL3* ホモログ遺伝子の機能解析、第 9 回日本生物工学会九州支部大会、沖縄、2002 年 12 月

- 6) 平良安聡、安藤候平、仲山英樹、河内孝之、吉田和哉、新名惇彦：耐塩性植物の分子育種に有用なプロモーターの探索・単離、第9回日本生物工学会九州支部大会、沖縄、2002年12月
- 7) 與那嶺育子、木戸啓司、仲山英樹、吉田和哉、新名惇彦：タバコ *HAL3* ホモログ遺伝子の機能解析、第21回日本植物細胞分子生物学会大会、香川、2003年8月
- 8) 菅原満男、吉田和哉、新名惇彦：イネの K^+ 輸送体をコードする *OsHAK* 遺伝子の単離と機能解析、第21回日本植物細胞分子生物学会大会、香川、2003年8月
- 9) 平良安聡、安藤候平、仲山英樹、河内孝之、吉田和哉、新名惇彦：耐塩性植物の分子育種に有用なプロモーターの探索・単離、第21回日本植物細胞分子生物学会大会、香川、2003年8月
- 10) Mitsuo Sugawara, Kazuya Yoshida, and Atsuhiko Shinmyo : Isolation and characterization of *OsHAK* genes encoding rice potassium transporters, 11th European Congress on Biotechnology, スイス、2003年8月
- 11) Ikuko Yonamine, Kazuya Yoshida, Atsuhiko Shinmyo : Function of the *NtHAL3* genes in proline biosynthesis and salt tolerance of tobacco cells.: 11th European Congress on Biotechnology, スイス、2003年8月
- 12) 平良安聡、安藤候平、仲山英樹、河内孝之、吉田和哉、新名惇彦：耐塩性植物の分子育種に有用なプロモーターの探索・単離、日本生物工学会平成15年度大会、熊本、2003年9月
- 13) 菅原満男、吉田和哉、新名惇彦：イネの K^+ 輸送体をコードする *HAK* 遺伝子の機能解析、日本生物工学会平成15年度大会、熊本、2003年9月
- 14) Yasutoshi Taira, Kohei Ando, Hideki Nakayama, Takayuki Kohchi, Kazuya Yoshida, Atsuhiko Shinmyo : Isolation of salt-stress inducible promoters in Arabidopsis root with using DNA microarray. The 5th SLB-KRIBB-NAIST Joint Symposium, 韓国、2003年11月
- 15) Ikuko Yonamine, Kazuya Yoshida, and Atsuhiko Shinmyo : Overexpression of *NtHAL3* genes confers increased levels of proline biosynthesis and results in the enhancement of salt tolerance in cultured tobacco cells. 2004 COE 国際シンポジウム、奈良、2004年1月

- 16) Ikuko Yonamine, Kazuya Yoshida, Atsuhiko Shinmyo : Isolation and functional analysis of *HAL3* homologue gene in *Nicotiana tabacum*. Gordon Research Conference [Salt & Water Stress in Plant]、香港、2004 年 6 月
- 17) Yasutoshi Taira, Kohei Ando, Hideki Nakayama, Takayuki Kohchi, Kazuya Yoshida, Atsuhiko Shinmyo: Isolation of salt-stress inducible genes in *Arabidopsis* root with using DNA microarray. Gordon Research Conference [Salt & Water Stress in Plant]、香港、2004 年 6 月
- 18) 與那嶺育子、吉田和也、新名惇彦、小笠原直毅:好塩性菌 *H.elongata* のゲノム解析および蛋白質発現解析. 2004 Bio-COE Summer Meeting、奈良、2004 年 7 月
- 19) 平良安聡、岩田英治、安藤候平、仲山英樹、河内孝之、吉田和哉、新名惇彦 : DNA マイクロアレイを用いたシロイヌナズナの根における塩ストレス応答性遺伝子の探索・単離、日本生物工学会平成 16 年度大会、愛知、2004 年 9 月
- 20) 岩田英治、平良安聡、安藤候平、仲山英樹、河内孝之、吉田和哉、新名惇彦 : シロイヌナズナにおいて根特異的に塩で発現誘導されるプロモーターの機能解析、日本生物工学会平成 16 年度大会、愛知、2004 年 9 月
- 21) 平良安聡、岩田英治、安藤候平、仲山英樹、河内孝之、吉田和哉、新名惇彦 : DNA マイクロアレイを用いたシロイヌナズナの根における塩ストレス応答性遺伝子の探索・単離、第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月
- 23) Ikuko Yonamine, Kazuya Yoshida, Atsuhiko Shinmyo:Functional analysis of *HAL3* homologue gene in *Nicotiana tabacum*. 2005 COE 国際シンポジウム、奈良、2005 年 1 月

目 次

序 論.....	1
第 1 章 耐塩性植物の分子育種.....	3
1. 1 従来の研究経過.....	3
1. 2 本研究の成果.....	7
補足資料 多重遺伝子連結技術の開発.....	48
第 2 章 海洋性窒素固定藍藻の海水農業への応用.....	57
2. 1 序 論.....	57
2. 2 材料と方法.....	58
2. 3 実験結果および考察.....	60

序 論

中国の大黄河が2000年に数ヶ月間、河口から1,000kmも干上がった。黄河の断流として有名なニュースであるが、このような現象は世界の多くの河川で起こっている。理由は明解である。上流にダムを造り農業・工業用水を大量に取水したので、少々雨が降っても途中で吸い込まれ、下流に回ってこないのである。大黄河といえども全体の水量は一定である。地球上で利用できる河川水の総量は年間7兆トンあるが、2000年の使用量は6兆トンに達した。深刻なのは、2050年の水需要が30兆トンと予測されていることである。人口が2倍になると水使用量は6倍になるとの経験からの予想である。無い袖は振れない。食糧や環境問題より水問題が最も身近に迫っている。国をまたがって流れる国際河川は世界の河川の45%ある。上流国の過剰取水は下流国の渇水を招き、汚染も国にまたがる。これが国際紛争の火種になることが心配されている。島国のわが国とは事情が異なる。紛争を避け、何とか話し合いで解決しようとの意図で1997年、国際連合にWorld Water Forumが組織され、3年に1回会議が開かれており、第3回が2003年、日本で開催された。

河川水に次いでよく利用されるのが地下水であるが、地下水も世界各地で激減している。涵養量より揚水量の方が多いので、インド、中国、米国、アラビア半島、北アフリカと世界中で目に見えて減少しており、世界の灌漑面積の2/3が危機状態にある。農地への中途半端な灌漑水の散水は、地下の塩分を溶かし、毛細管現象で表土に塩分が集積してくる。これにより世界各地で塩土化が進んでいる。このように水問題が律速となるため、205年の世界人口90億人への食糧供給はこのままでは不可能である。

地球上の水は97%が海水である。河川水は0.0009%に過ぎない。3%NaClの海水を農業・工業用水に使用すれば水問題は一気に解決する。そのために3%NaCl存在下でも生育できる耐塩性植物の分子育種が急務であり、世界的に取り組まれている。耐塩性作物ができれば塩類集積土壌、砂漠の緑化にも多いに道が開ける。植物が受ける塩ストレスは、細胞外からの高浸透圧ストレスと細胞内へ流入するNa⁺の毒性の2つに分けられ、耐塩性を向上させるにはそれぞれのストレスに対する抵抗性を高めなければならない。それには後に詳しく述べるが、複数の鍵遺伝子を導入しなければならない。

3%NaClでも育つ耐塩性植物が創出され、これを海水で栽培する場合、水田に単純に海水を

導いていたのでは、2, 3年後に NaCl が濃縮され、植物は生育できないであろう。そこで、海水が循環する水耕栽培が考えられるが、問題は窒素、リン酸、カリウムの3大栄養源の供給である。海水の窒素含量は硝酸態 N が表面海水で約 $5 \mu\text{g/l}$ である。一方、植物の生育には少なくとも $10\text{--}20\text{mg/l}$ の窒素が必要である。リン酸、カリウムの供給は比較的容易であるが、窒素固定菌と共生関係にあるマメ科植物以外では窒素供給が律速になる。かといって、海洋上で水耕栽培するにも窒素を化学肥料で補うことはできないし、水耕栽培でも循環水を環境に放出する際、環境汚染の要因となる。

東海大学熊澤修造教授は沖縄海域より窒素固定能を有する藍藻、*Cyanothece* sp. TU126 を分離した。この藍藻は炭酸固定も同時に行う。そこで、*Cyanothece* sp. TU126 を耐塩性植物の根圏で共存させることにより、植物の生育が可能かを工学的に検証することを試みた。まず、*Cyanothece* sp. TU126 の人工海水における増殖と窒素固定の培養工学的検討を行った。次いで、植物の根圏で共存させるには、水中のネット内でゲルビーズに固定して増殖させた藍藻と植物の根を接触させる栽培法が有効であると考え、ゲル固定化藍藻の培養特性を明らかにした。まだ実用の耐塩性植物の育種ができていないので、モデル植物として、耐塩性緑藻、*Clamydomonas* sp. の生育が *Cyanothece* sp. が固定した窒素で可能であることを示した。

本研究では、炭酸固定能、窒素固定能を有する海産性の藍藻を海水農業に利用すべく、生物工学的手法により、藍藻をゲルビーズに固定し、自然の海水に近い条件で果たして窒素固定ができるか、それは植物の生長を支えるに足る量であるかを、モデル植物として、海産性の窒素固定能を有しない緑藻、クラミドモナスの増殖を指標として評価した。