

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 倉井 友寛

窒素は植物の必要栄養素の一つであり生育に不可欠であるが、人為的な大量の窒素施肥は環境に悪影響を与え、持続的農業にとって大きな問題となっている。このため、作物の窒素同化・利用効率の向上が求められている。窒素代謝は炭素代謝とも密接に関係しており、その両代謝経路に含まれる酵素量が極めて多いため、単一もしくは少数の酵素の変化のみで代謝経路全体に有効な影響を与えることは簡単ではない。転写因子の多くは複数の遺伝子発現に影響を与えることが知られている。転写因子の一つであるトウモロコシ由来の *Dof1* (*ZmDof1*) は窒素同化の向上に結びつくことがシロイヌナズナ等で示されている。このため、本研究では *ZmDof1* 遺伝子を主要作物であるイネに導入し、イネにおける *ZmDof1* の効果を窒素応答の側面から解析することを目的とした。

第1章では、*ZmDof1* 遺伝子を導入したイネ (*Dof1* イネ) の作出を行った。CaMV35S プロモーター又は *ZmUbi-1* プロモーターを用いる2種類の形質転換体の作出を試みたところ、*ZmUbi-1* プロモーター系でのみ再分化個体を得ることができた。T₁ 世代では、1~5コピーの *ZmDof1* 遺伝子の挿入が確認されたが、*ZmDof1* 遺伝子を1コピーのみ有する *Dof1* ホモ形質転換イネは獲得できなかった。これに対し *ZmDof1* 遺伝子を2コピー有する形質転換イネでは、*ZmDof1* 遺伝子の後代への遺伝、生育および種子生産が安定的であったため、その後の研究はこれら *ZmDof1* 遺伝子を2コピー有する形質転換イネの内、独立した3系統を用いて行った。

第2章では、得られた *Dof1* イネの窒素応答を検討する条件を確立した。本研究の目的が *ZmDof1* 導入効果を窒素応答の側面から解析することであることから、これらの試験を標準窒素区 (360 μ M の N 相当)、及び低窒素区 (90 μ M の N 相当) にて水耕栽培で行うこととした。また、栄養生長期のうち、幼苗期、栄養生長期初期、栄養生長期後期をそれぞれ播種後 2、4、8 週間後とし、イネにおける *ZmDof1* の影響が最も明確になる時期を調査した結果、*Dof1* イネと VC イネの差は生育時期が長くなるにつれ大きくなったため、以後の詳細な解析は栄養生長期後期である播種後 8 週間後に行うことが最適であると判断した。

第3章では、第2章までに確立した実験条件で *Dof1* イネの窒素応答に関する様々な機能解析を行った。シロイヌナズナにおいて *ZmDof1* が *AtPEPC* 遺伝子発現を上昇させていたことから、*Dof1* イネの *PEPC* 発現解析を行ったところ、*ZmDof1* 発現量に比例していくつかの *OsPEPC* について葉内発現量の有意な上昇が確認された。またこれに応じて *Dof1* イネ葉身の *PEPC* 最大酵素活性も上昇していた。これまでに *PEPC* を介した TCA サイクルへのアナプレロ

ティックな炭素骨格の供給が報告されていたため、TCA サイクルに関与する遺伝子の発現解析と有機酸濃度の測定を行ったところ、イソクエン酸脱水素酵素や NADP 依存型リンゴ酸脱水素酵素の発現上昇が認められ、またイソクエン酸の減少など有機酸濃度にも変化が見られた。このように Dof1 イネの有機酸供給の活性化が示唆されたことから、窒素含量及び濃度の測定を行ったところ、Dof1 イネでは葉、葉鞘、根において有意な上昇が確認された。また、葉と根中アミノ酸濃度の測定を行ったところ、葉よりも根で大きく変化し、特にグルタミン及びアスパラギン濃度が有意に上昇した。しかし、窒素代謝関連遺伝子の発現には大きな違いは認められなかった。

低窒素区においても同様の実験を行ったところ、同様の結果が認められた。加えて低窒素区では Dof1 イネの乾物重、特に根の乾物重が有意に増加した。その結果、乾物重の地上部対地下部比は Dof1 イネで有意に減少した。さらに Dof1 イネで特に弱光条件化における光合成速度の有意な上昇が認められた。

第4章では、窒素飢餓回復時にアンモニウム同化に及ぼす ZmDof1 の効果を検討した。前章で Dof1 イネにおける窒素同化能の上昇が示されたが、アスパラギン濃度以外のアミノ酸に大きな変化は認められなかった。そこで窒素飢餓状態にある Dof1 イネに安定同位体で標識した塩化アンモニウムを与え、Dof1 イネの窒素吸収及び代謝の経時変化を調べた。その結果、Dof1 イネでは、初期のアンモニウム同化産物であるグルタミン濃度の上昇幅が大きく、窒素同化1時間後の根中グルタミン濃度は有意に高かった。また Dof1 イネでは、グルタミンから派生するグルタミン酸やアスパラギン酸、アスパラギンの濃度も順じて高くなった。窒素同化後概ね24時間までには、ほぼ全てのアミノ酸が一定の濃度に達したが、48時間になると、Dof1 イネの葉内アミノ酸濃度が顕著に減少した。これはタンパク質合成の促進に起因すると考えられた。Dof1 イネと VC イネ間では総じて代謝産物の変動パターンが似ていることから、ZmDof1 のイネにおける窒素代謝への効果は、代謝経路の改変ではなく、窒素代謝の活性化であることが示唆された。

以上、本研究では、ZmDof1 遺伝子を導入したイネ (Dof1 イネ) を初めて作出し、ZmDof1 遺伝子が高発現することで PEPC を介した TCA サイクルへのアナプレロティックな炭素骨格の供給上昇を通じた窒素同化の促進が示唆された。また、特に低窒素条件下で窒素吸収量および乾物重の増大などが認められた。一連の研究結果は、作物における窒素同化・利用効率の向上のために重要な情報を提供するものであり、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。