

論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻

平成 18 年度博士課程 入学

氏名 恵上 知人

指導教員 東京大学教授 大杉 立

論文題目 麹菌由来のグルタミン酸脱水素酵素遺伝子を導入したバレイショの
生理・生態的研究

窒素は植物にとって必須栄養素であり、窒素施肥は作物の成長や収量に重要である。近年、作物の増収を目指して大量の窒素が投入されているが、過剰な窒素は水系に流亡したり、大気中に放出されたりして環境汚染を引き起こす要因として懸念されている。このため、作物の窒素の吸収、同化、利用に関わる能力を改善し、低窒素施肥でも収量が維持されるような品種、あるいは、多窒素施肥でも土壌の残留窒素が少なくなるような品種の開発は、多量の窒素施肥が引き起こす環境問題を解決しつつ作物の生産拡大を図る方策の 1 つである。

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) は、2-オキソグルタル酸のアミノ化におけるグルタミン酸の生成とグルタミン酸の脱アミノ化による 2-オキソグルタル酸の生成を可逆的に触媒する酵素である。これまで、大腸菌や麹菌の GDH 遺伝子を導入したトマト、イネ、タバコにおいて、アミノ酸含量や窒素含量、更には収量の増加等が報告されている。

本研究では、麹菌 *Aspergillus nidulans* 由来の GDH 遺伝子 (*gdhA*) をこれまで報告のない栄養繁殖性作物であるバレイショ (GDH バレイショ) に導入し、GDH 遺伝子導入が生理・生態的特性に与える影響について検討した。

第 1 章：麹菌 *Aspergillus nidulans* 由来のグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) 遺伝子を導入したバレイショ形質転換体における光合成およびバイオマス生産の解析。

本章では、GDH バレイショの 1 系統(TG8)を用いて、通常の窒素条件の標準区と、標準区の 5 分の 1 の窒素条件にした低窒素区の 2 処理区を設け、閉鎖系温室内にてポット栽培を行なった。開花期に光合成速度、呼吸速度、葉面積、塊茎数、ストロン数、塊茎新鮮重、各部の乾物重を測定した。また、地上部の完全に枯死した時期を収穫期として、塊茎数、塊茎新鮮重、乾物重、塊茎の窒素・炭素含量を測定し、塊茎の炭素含量と窒素含量の割合 (C/N) 比を算出した。

その結果、非形質転換体 (WT) に比べて TG8 は、開花期の光合成速度は特に低窒素区において有意に高く、葉面積は標準区、低窒素区ともに有意に大きかった。開花期のストロン数や開花期および収穫期の塊茎数は増加し、開花期の各部位の乾物重も標準区、低窒素区ともに増加していた。収穫期の塊茎の C/N 比は、TG8 において高い傾向がみられ、特に低窒素区においては有意で高かった。

以上の結果より、麴菌由来の GDH 遺伝子を導入することによりソース機能が向上し、そのため開花期の地上部、塊茎のバイオマス生産、更には収穫期の収量が向上することが明らかとなった。また、GDH 遺伝子の導入は、低窒素区において、より効果的であることが示唆された。

第 2 章：GDH 遺伝子を導入した複数系統のバレイショ形質転換体における光合成、バイオマス生産、窒素利用効率および葉、塊茎の代謝産物の解析。

前章では、GDH バレイショ 1 系統を用いた検討を行い、GDH 遺伝子導入による様々な効果が確認できた。本章では GDH バレイショを複数系統 (TG1,2,3,5,8) 用い、前章で得られた効果を再確認するとともに、GDH 活性、開花期におけるソース葉の可溶性タンパク質濃度、ソース葉および塊茎の代謝産物等について詳細な検討を行なった。

その結果、GDH バレイショ 5 系統全てにおいて、NADP(H)-GDH 活性の有意な上昇が認められ、導入した GDH 遺伝子が機能していることが確認された。開花期において、GDH バレイショでは光合成速度が高くなり、葉の可溶性タンパク質濃度は増加していた。塊茎肥大期において、GDH バレイショの塊茎数は増加の傾向が見られ、塊茎乾物重は増加した。塊茎への窒素および炭素の分配は GDH バレイショで増加しており、塊茎乾物重に対する窒素利用効率(塊茎の乾物重 / 総窒素吸収量)も GDH バレイショで高い傾向が見られた。塊茎のグルタミン酸およびアスパラギン濃度は GDH バレイショで増加傾向が認められた。

以上の結果より、バレイショに麴菌由来の GDH 遺伝子を導入することで、ソース能力および塊茎乾物重等が向上することが GDH バレイショの複数系統において確認された。また、塊茎への窒素および炭素の分配が増大し、窒素利用効率が向上することが新たに明らかになった。

第 3 章：圃場栽培における GDH 遺伝子を導入したバレイショ形質転換体のバイオマス生産、

窒素利用効率，塊茎の代謝産物の解析。

前章までは，閉鎖系温室内におけるポット栽培での GDH 遺伝子導入の効果について検討した。前章までに得られた導入遺伝子の効果が一般の畑圃において同様に得られるかどうかは，遺伝子の有用性を評価するうえで重要である。本章では，導入した GDH 遺伝子の効果が隔離圃場においてもポット栽培と同様に得られるかどうかを検討した。

材料には WT と GDH バレイショ 2 系統 (TG3,8) を用いた。一般にバレイショを圃場栽培する際の施肥条件である標準区と窒素施肥を行わない無窒素区の 2 処理区を設けた。開花約 4 週間後にソース葉の SPAD 値，地上部・地下部の新鮮重および乾物重，塊茎数，地上部・地下部の窒素・炭素含量，塊茎の代謝産物を測定した。

その結果，SPAD 値は標準区および無窒素区ともに，WT と GDH バレイショで差は認められなかった。また，塊茎数も同様であった。地上部の新鮮重および乾物重は標準区では両者で差がなかったが，無窒素区では GDH バレイショで有意に低かった。地上部の窒素含量は乾物重の影響を受けて，無窒素区において GDH バレイショで低かった。塊茎に関しては，標準区の新鮮重は WT と GDH バレイショで違いは見られなかったが，無窒素区では TG3 が WT より有意に高かった。乾物重は，標準区では，GDH バレイショで高い傾向がみられ，TG8 は有意に高かった。炭素含量は標準区，無窒素区ともに WT と比較して TG3 で増加する傾向が見られた。塊茎への乾物分配率および窒素・炭素分配率は標準区，無窒素区ともに GDH バレイショが WT より高かった。また，塊茎乾物重に対する窒素利用効率（塊茎の乾物重 / 総窒素吸収量）も GDH バレイショは WT より増加傾向にあった。塊茎の代謝産物は，標準区ではグルタミン濃度および総アミノ酸濃度に，無窒素区ではアスパラギン濃度に GDH バレイショで有意な増加が見られた。

以上の結果より，GDH バレイショは塊茎へ乾物を分配する能力および塊茎乾物重に対する窒素利用効率が向上していることが圃場栽培においても確認された。また，塊茎のアミノ酸濃度においても影響を与えていることが圃場栽培でも認められた。

第 4 章：GDH 遺伝子を導入したバレイショ形質転換体の徒長茎の解析

第 1 章の結果，GDH バレイショは萌芽時期が早い傾向にあった。このことから GDH バレイショは種芋の出芽から土壌表面への萌芽までの成長に違いが生じていることが示唆された。本章では，出芽したバレイショの芽を暗黒下で生育させることで徒長茎を作成し，その徒長茎の地上部と地下部（根）の新鮮重および乾物重を調べることで GDH バレイショの出芽後の生育について検討した。

材料は第 3 章同様，WT と GDH バレイショ 2 系統 (TG3, 8) を用いた。約 10mm に出芽した芽を含んだ直径 15mm，高さ 20mm の円柱状組織片を作成し，それをパーミキュライトに移植して，23℃に設定したバイオトロン内にて暗所下で生育させた。施肥条件は，標準区と標準区の 5 分の 1 の窒素濃度に設定した低窒素区の 2 処理区を設けた。パーミキ

ユライトから 1cm 萌芽した時点をも 0 日と考へ、そこから 3 週間後の徒長茎の長さ、新鮮重および乾物重、根の新鮮重および乾物重を測定した。

その結果、GDH バレイシヨでは根の新鮮重および乾物重が有意に増加した。また、地上部と根の乾物重から Top / Root 比を算出した結果、GDH バレイシヨでは WT と比較して有意に低下した。

以上の結果より、GDH バレイシヨは出芽から初期成長の時期において、根の成長を優先的に促進させていることが明らかになった。これによって、土壌からの栄養吸収が向上し、地上部および塊茎の成長につながる可能性が示唆された。

以上のことから、麴菌 *A. nidulans* 由来の GDH 遺伝子を導入したバレイシヨにおいて、ソース機能の向上、塊茎乾物重の増大、塊茎への窒素・炭素分配の向上、窒素利用効率の向上などが認められた。塊茎乾物重の増大以外のこれらの優れた特徴は本研究で初めて明らかにされたものである。これらの結果から、麴菌 *A. nidulans* 由来の GDH 遺伝子は施肥窒素の効率的利用を図ることの出来る作物を開発するために有効な手段の 1 つであることが明らかになった。