

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名  恵 上 知 人

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。しかし、近年、作物の増収を目指して大量の窒素が投入されており、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高めた品種の開発は、多量の窒素施肥による環境問題を解決しつつ作物の生産拡大を図る方策の 1 つとして重要である。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) は、微生物のアンモニア同化に関わる酵素であり、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、更には収量の増大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: 麹菌由来の 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 遺伝子を導入したバレイショ (GDH バレイショ) 1 系統 (TG8) を用いて、通常の窒素条件である標準区と 5 分の 1 の窒素条件である低窒素区の 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。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が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。収穫期の塊茎乾物重も TG8 で有意に増加した。このように、麹菌由来の GDH 遺伝子を導入することによりソース機能が向上し、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 遺伝子の効果は、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

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も増加していた。塊茎肥大期では、GDH バレイショの塊茎数と塊茎乾物重が増加した。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。このように、バレイショに麴菌由来の GDH 遺伝子を導入することで、ソース能力が向上し、塊茎乾物重等が増大することが 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

閉鎖系温室内でのポット試験で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 遺伝子の効果を隔離圃場において検討した。その結果、塊茎への乾物および窒素分配率は標準区、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も増加傾向にあった。このように、GDH バレイショは塊茎へ乾物を分配する能力および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。

### 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および根の解析

第 1 章の結果から 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た徒長茎と根の新鮮重および乾物重を調べた。その結果、GDH バレイショでは根の新鮮重および乾物重が有意に増加していた。また、地上部乾物重/根乾物重比は、GDH バレイショでは WT と比較して有意に低下した。このように、GDH バレイショ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。また、このことを通じて、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。

以上本研究において、麴菌 *A. nidulans* 由来の GDH 遺伝子をバレイショに導入することで、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ることを明らかにした。一連の研究結果は、麴菌 *A. nidulans* 由来の GDH 遺伝子が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 つであることを示したもので、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。