

審査の結果の要旨

氏名 張海波

収量を最大化するための窒素肥料の過剰な投与は大気・地下水汚染を通じた環境への負荷を増大させる。このため、作物に窒素吸収・同化・代謝機能を高めることで窒素肥料の利用効率を向上させることが求められている。近年、イネについては発酵粗飼料（WCS）用品種が多数開発されているが、これらの収量増大のためには食用イネ以上の窒素施肥が必要となっている。本研究では、*Aspergillus niger* 由来の窒素同化酵素であるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH）をコードする遺伝子（*gdhA*）を導入した WCS 用イネ系統を作出し、成長量、ソース機能、乾物生産量、窒素利用効率などを解析し、窒素利用効率の高い WCS 用イネ開発のための基礎知見を得ることを目的とした。

1. *A.niger* 由来の *gdhA* を導入した WCS 用イネの作出

本遺伝子を WCS 用品種（モミロマンとリーフスター）に導入したところ、遺伝子の発現と活性上昇が確認された。両品種について形質転換体 3 系統の幼植物を供試して高窒素および低窒素条件下で成長量、ソース関連形質などを調査した結果、モミロマンの形質転換系統（TG7 と TG10）は野生型に比べて、高窒素条件下で草丈、根長、葉緑素含量、ルビスコ含量、可溶性タンパク含量が有意に増大していた。これに対して、リーフスターの 3 系統は全ての測定形質において野生型と変わらないか野生型より低い値を示した。このため、更なる詳細な解析には TG5 を含めたモミロマンの形質転換 3 系統を用いた。

2. *gdhA* 発現が幼植物の GDH 活性、乾物生産量、窒素含量等に及ぼす影響

窒素以外の要因の影響をできるだけ排除するために水耕栽培で実験を行った。また、窒素源として NH_4NO_3 を用い、高窒素条件（ $360\ \mu\text{M}$ ）と低窒素条件（ $90\ \mu\text{M}$ ）の処理区を設けた。供試した 3 系統のうち、TG7 と TG10 は TG5 に比べて高い GDH 活性を示した。このため、TG7 および TG10 を高発現系統、TG5 を低発現

系統として解析を進めた。高発現 2 系統では、窒素条件に関わらず、葉面積、地上部重、地下部重が野生型よりも優れていたが、低発現系統では野生型と変わらない値を示した。また、窒素含量および培養液中の残存窒素量から推定した窒素吸収効率も高発現系統で高かった。これらの結果から、*gdhA* の発現により生育初期において窒素の吸収能力が高まり、葉面積の拡大、乾物重の増大に結びついたことが示唆された。また、その効果には *gdhA* の発現量の多さが関わっていることが示唆された。

3. *gdhA* 発現が出穂期および収穫期の光合成速度、種子重量、窒素含量などに及ぼす影響

2. において解析した形質転換系統を更に水耕栽培して、その後の解析に供試した。2. の結果から窒素吸収能力の向上は光合成速度などのソース機能の向上に結びついていることが考えられたため、出穂期の光合成速度を比較した。その結果、高発現系統、低発現系統ともに野生型よりも窒素条件に関わらず高い光合成速度を示した。また、高窒素条件下の高発現系統は収穫期の穂数と一穂もみ数が有意に多く、結果として個体当たりの種子重も有意に大きかった。高発現系統の TG7 は低窒素条件下でも同様の傾向を示した。ただし、低発現系統では種子重などは野生型と変わらなかった。これらの結果から、高発現系統はソース機能に優れ、そのことが高い種子重に結びついたと考えられた。

4. *gdhA* 発現がストレス耐性に及ぼす影響

塩ストレス (50mM, 100mM, 150mM NaCl) および水ストレス (10% PEG 6000) 下での幼植物における GDH 活性、乾物重および窒素含量を調査したところ、高発現系統では全ての塩ストレス条件下および水ストレス条件下で乾物重と窒素含量が野生型よりも有意に多かった。これらの結果から、*gdhA* 導入による GDH 活性の上昇が、ストレス条件下で蓄積しやすい有害物質である NH_4^+ の代謝を促進してストレス耐性を向上させたことが示唆された。

以上、本研究により、*A.niger* 由来の *gdhA* を WCS 用イネに導入することで窒素吸収効率が上がり、光合成速度、葉面積などのソース機能の向上、成長量、乾物生産量、種子重の増大、更には塩ストレスなどのストレス耐性の向上に結びつくことが明らかとなり、新規の WCS 用イネ作出に繋がり得る知見が得られた。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。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。