

審査の結果の要旨

氏名 緑川 景子

出穂期以降の窒素追肥は、米の収量を増加させる一方で食味を低下させる。そのような米では、プロラミン等の貯蔵タンパク質が増加しており、これが食味低下の原因との指摘がある。しかし、それを直接的に証明した研究結果はなく、また粘りや硬さ、甘みや香りといった食味構成要素の変化全てを貯蔵タンパク質の増加で説明することはできない。一般に、植物は限られた栄養素を効率よく利用するため、炭素(C)と窒素(N)のバランス調節機構を有し、栄養状態により炭素源の分配先を調節する。追肥による食味低下も、種子内部で C/N バランスの調節が起きた結果としてもたらされると考えられるが、メカニズムの詳細はわかっていない。本研究は、分子生物学的な手法を用いることで、米の登熟途上の遺伝子発現変化から収穫種子内の成分変化を予測・紐付けし、米の生産性と品質の向上を分子レベルで目指したものである。

第 1 章で背景を述べた後、第 2 章では登熟期の窒素追肥によって引き起こされる現象を俯瞰的に捉えることを目的とし、イネ登熟種子における DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現から種子中の代謝変動を解析した。窒素追肥によって、光合成活性が促進され、種子へ輸送される Glu/Gln, Asp/Asn などのアミノ酸や Sucrose 量は増加すると予想された。しかし、これらに由来する構成成分の全てが増加するわけではなく、13 kDa Cys-poor プロラミンを中心とした貯蔵タンパク質は増加する一方で、細胞壁や貯蔵デンプンなどの多糖類は減少することを、mRNA の発現変動と成分分析から明らかにした。また、種子重量は増加しないことから、追肥によって窒素含有量が増加すると何らかの C/N バランス調節機構により、多糖類集積を抑えることで炭素骨格をタンパク質合成に優先的に振り分けられていることが予想された。本章では、米の成分バランスが窒素集積側に傾くことで引き起こされる「多糖類の量的・質的变化」が品質低下の原因であるという新たな仮説を提示した。

第 3 章では、第 2 章で窒素追肥によって変動した遺伝子発現に関与する代謝産物を明らかにすることを目的とし、開花後 15 日目の遺伝子発現変動から Trehalose 合成系とそれにより制御されている候補遺伝子 *SnRK1b* (Sucrose non-Fermenting Related Kinase 1b) に

着目した。特に Trehalose 合成の中間代謝産物である Trehalose-6-phosphate (T6P)は生体内で重要な役割を果たすことが報告されていることから、MALDI-TOF-MS によるイメージング分析を行った。その結果、開花後 7 日目の追肥群において、種子内の T6P 蓄積量が顕著に増加していることを明らかにした。さらに、開花後 10 日目の登熟種子における主要代謝産物を GC-MS により測定したところ、Trehalose が追肥群で減少していることを見出した。しかし、Trehalose 合成に関与する遺伝子がマイクロアレイの結果から複数抽出されており、またそれぞれ異なる挙動を示したことから、実際に追肥群の種子内で T6P の代謝に関与する分子の絞込を行った。培地内の C/N バランスを改変した培地で生育したイネ胚盤由来カルスによる栄養環境応答解析を行った結果、Trehalose-6-phosphate phosphatase 7 (TPP7)が細胞内の窒素シグナルに応答し、T6P の蓄積量を調整している可能性を見出した。また、*SnRK1b*についても RNAi 法による発現抑制株を作出し、 β -amylase (Os03g0141200) が発現制御下に位置している可能性を示した。

第 4 章では、第 2 章のトランスクリプトーム解析から明らかとなったイネ種子の細胞壁成分の減少から、胚乳の細胞壁形成に関わると考えられる *OsBC1L6* に着目した。*BC1L6* はカマイラズ変異体の原因遺伝子の一つ、*BC1* のホモログである。*OsBC1L6* は登熟後期の種子で発現が高くなり、特に胚乳の外周部に発現がみられることを、*in situ* hybridization 法や RT-PCR 法により明らかにした。このことから、*OsBC1L6* が種子内の貯蔵物質蓄積に伴う細胞肥大化のための細胞壁合成に関与している可能性を見出した。さらに、*OsBC1L6* のノックアウト変異体を用いた解析により、*OsBC1L6* の細胞壁合成への関与を *in vivo* で示した。胚乳細胞壁は量こそ少ないものの、物性に与える影響は大きい。これまでに、細胞壁量が減少した変異体はいくつか得られているが、それらでは茎や葉に対する影響が大きくなるため、種子形成そのものへの影響を評価できなかった。本研究により、*OsBC1L6* の品質に果たす細胞壁の機能を明らかにすることで、米の品質制御に関する更なる知見が得られるものと期待される。

第 5 章にて研究のまとめと、今後の課題・展望について議論を行った。

本研究は、登熟期の窒素追肥でみられる現象から、胚乳多糖類の合成・集積経路に着目し、従来知られていた窒素追肥の米への影響を分子レベルで解明したものである。このことによって、未知の微量成分変化や他の代謝系への影響も明らかになった。本研究は追肥によって種子の中で引き起こされる生理学的な変化と“食味の低下”という事象を紐付けることで、米の品質向上に役立つものと考えられる。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）の論文として価値あるものと認めた。