

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 山本 美祥  
学位 博士 ( 農学 )  
学位記番号 新大院博 ( 農 ) 第 1 3 2 号  
学位授与の日付 平成 2 5 年 9 月 2 0 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 チューリップ (*Tulipa gesneriana*) におけるアミノ酸代謝に関する研究

論文審査委員 主査 教授 ・ 大山卓爾  
副査 教授 ・ 末吉 邦  
副査 教授 ・ 高橋能彦  
副査 准教授 ・ 中野 優  
副査 准教授 ・ 大竹憲邦

### 博士論文の要旨

チューリップは、単子葉植物綱ユリ科チューリップ属の秋植え春萌芽型球根植物である。チューリップは古くから多くの品種が育成され、世界的に広く栽培されているが、その生理・生化学的機構については未知の部分が多く残されている。チューリップは冬期間、培地から窒素を多量に吸収し、根にグルタミンを集積する。チューリップの根におけるグルタミン集積にはグルタミン合成酵素(GS)が関与すると予想されるがこれまで実証されていない。そこで、本研究ではチューリップにおけるアミノ酸代謝について詳細に検討することを目的とした。

まず、外科的手法を用いてチューリップの根の縦方向と横方向に分離し、根の部位によるアミノ酸集積の違いを明らかにした。また、 $^{15}\text{N}$  とグルタミン合成酵素の阻害剤を用いてチューリップの根に集積するグルタミンがグルタミン合成酵素によることを実証した。さらに、本研究では、チューリップのアミノ酸代謝において重要な役割を果たしていると考えられるグルタミン合成酵素の遺伝子をクローニングし、生育時期別のグルタミン合成酵素遺伝子の発現と活性変化、および窒素応答解析を行った。

#### 1. 冬期間におけるチューリップ根のアミノ酸集積部位について

はじめに根を皮層と中心柱に分離して根の横方向のグルタミン集積を比較した。その結果、冬期間チューリップの根において培地から吸収した窒素の主な集積部位は中心柱よりもむしろ皮層であった。この結果は、チューリップの根は、表皮または皮層細胞で窒素を吸収し、その場でグルタミンに変えて集積しており、中心柱経由で根内を上下に窒素を輸送していないことを示唆している。根を縦方向に 5 分割する実験によって、培地から吸収した窒素はそのまま吸収した部位に貯蔵されるということを明らかにした。窒素処理は根のどの部位においても 4-メチルグルタミンの集積に影響を与えなかった。従って、4-メチルグルタミンは培地由来の窒素によるものではなく、球根由来の窒素によるということが示唆された。

## 2. グルタミン合成酵素阻害剤と $^{15}\text{N}$ 標識培地を用いたチューリップ根のグルタミン集積に関する研究

冬期間、チューリップの根に集積する窒素は主に 80%エタノール可溶性の形で集積するということが確認された。また、グルタミンがチューリップの根に集積するアミノ酸の中ではもっとも主要なものであり、培地から吸収した窒素に由来した。さらに、グルタミン合成酵素の阻害剤であるメチオニンスルフォキシミン (MSX) 処理により培地に MSX を処理した+N+MSX 区ではグルタミンの濃度はほぼ変わらず、 $^{15}\text{N}$  標識培地からの  $^{15}\text{N}$  の吸収が完全に阻害された。これらの結果から、チューリップの根に集積するグルタミンの合成はグルタミン合成酵素によることが実証された。4-メチレングルタミンの  $^{15}\text{N}$  分析結果より、根内の 4-メチレングルタミンは培養液窒素由来率が低く、球根窒素由来率が高かった。

## 3. グルタミン合成酵素遺伝子のクローニング

チューリップと同じ単子葉の球根植物であるサンダーソニアのグルタミン合成酵素の遺伝子断片 *SAND3* の遺伝子配列をプローブに用いてチューリップのグルタミン合成酵素遺伝子をクローニングして *TgGS* と命名し、新規遺伝子として GenBank に登録した (Accession: AB683151)。*TgGS* 遺伝子は全長 1382bp で、1059bp の翻訳領域、を持ち、352 のアミノ酸をコードするものであった。そして、系統学的解析により *TgGS* はサイトゾル型の GS、すなわち GS1 であることが示唆されたので、*TgGS1* と名付けた。

## 4. GS 遺伝子発現および GS 活性の窒素応答解析

生育ステージの変化によって GS 活性は開花以降減少していったが、GS 遺伝子の発現はほぼ均一であった。また、*TgGS1* の外部窒素に対する発現応答解析では、外部窒素の種類や濃度に関わらず恒常的と発現していることが示された。しかしながら、GS 活性は外部窒素濃度の上昇とともに上昇していく傾向が確認できたことから、遺伝子発現レベルと酵素活性レベルでは異なる窒素応答を行うことが示唆された。グルタミン合成酵素の阻害剤である MSX の培地への添加処理は GS 活性を減少させたが、*TgGS1* の発現には影響が認められなかった。チューリップ各器官の GS 活性を比較したところ、グルタミン合成酵素活性は葉においてもっとも高かったが、根以外の *TgGS1* 発現はほぼ一定であった。

## 審査結果の要旨

本研究は、今まで明らかになっていなかった、チューリップのアミノ酸代謝に関して、生理学的、遺伝子学的、分子生物学的側面から明らかにし、チューリップの特異的な性質の一部を解明し、花卉球根植物の栄養生理の分野の研究の進展に大きく貢献した。

本研究のうち、根内のアミノ酸の集積部位について、*Soil Science and Plant Nutrition* に筆頭著者として発表した。また、2010年7月に開催された *International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants* で、2011年9月、2012年9月に日本土壌肥料学会で、2011年第4回農学部国際シンポジウム (中国)、タイ新潟セミナーで、2012年12月に開催された園芸学会北陸支部会で本人が発表を行なった。

本研究は、チューリップの根の窒素集積機構とアミノ酸代謝の理解に重要な進歩をもたらせたものであり高く評価される。

以上のことから、本申請論文は、博士 (農学) の学位論文として十分な内容を持つものと判定した。