

氏 名(本籍) 小 原 実 広

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 博 第 702 号

学位授与年月日 平 成 14 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻
(博士課程)

学位論文題目 イネの窒素利用機能を規定している遺伝子座に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 山 谷 知 行
教 授 前 忠 彦
教 授 西 尾 剛

論文内容要旨

序論

窒素は、植物の生産性や品質に大きく作用する栄養素の一つである。世界三大穀物の一つであるイネの穂を構成している窒素の約 8 割は、老化器官から師管を介して転流される窒素に由来しており、師管を流れる転流窒素の主要形態はグルタミン及びアスパラギンであることが知られている。この窒素転流には、日本型 *Sasanishiki* を用いた解析より、老化葉身におけるサイトゾル型グルタミン合成酵素(GS1)と若い生長中の器官における NADH 依存性グルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT)が、重要な機能を担っていると考えられている。しかし、多くの栽培イネ品種における窒素転流の詳細及び窒素転流を制御しているネットワーク全体の機構は明らかとされていない。

本博論においては、*Sasanishiki* で得られた GS1 並びに NADH-GOGAT の窒素転流における機能に関する知見を他の多くの遺伝資源を用いて一般化するとともに、ポストゲノムの立場から窒素転流の制御機構に着目し、解明することを目的とし、GS1 並びに NADH-GOGAT の量を決定している遺伝子座の解析を行った。

第一章では、日本型、インド型、ジャワ型イネ 16 品種を用いて、GS1 及び NADH-GOGAT タンパク質含量の比較を行った。また、イネ葉身の一生を通じた GS1 タンパク質含量と活性の挙動を比較した。第二章では、GS1 の翻訳後修飾による活性調節の可能性を検討した。第三章では、日本型品種 *Nipponbare* とインド型品種 *Kasalath* に由来する 98 系統のバッククロスインブリードライン(BILs)を用いて、老化葉身における GS1 及び生長中の葉身における NADH-GOGAT 含量を規定している遺伝子座(QTL)のマッピングを行い、それらの含量により影響を受けると考えられる形質を規定している QTL との関連性を検討した。第四章では、GS1 含量、主稈の穂重量及び全粒数に関する QTL が検出された領域が置換された準同質遺伝子系統群(NILs)あるいは分離集団を用いて、それらの QTL が存在することの確認及び QTL の機能の推定を行った。

第一章

日本型、インド型、ジャワ型イネの GS1 並びに NADH-GOGAT タンパク質含量と組織内分布

イネ *Oryza sativa* L. には、形態が大きく異なる数多くの品種が存在している。それらは形態的特徴などにより、主に日本型、インド型、ジャワ型の3つの生態型に大別されている。本来の生育環境において、日本型に比較して、一般にインド型、ジャワ型イネは、草丈、分けつ数、及び穂重量が高いことが示されている。日本型イネ *Sasanishiki* と同様に、インド型、ジャワ型においても GS1 並びに NADH-GOGAT が窒素の体内利用に直接的に機能しているならば、形態が大きく異なるイネ品種の中で GS1 並びに NADH-GOGAT の量的変異が期待される。本章では、窒素利用の面から生産性の向上に関わる基礎的な情報を得ることを目的とした。日本型、インド型、ジャワ型イネ 16 品種を用いて、老化葉身における GS1 と生長中の葉身における NADH-GOGAT のタンパク質含量並びに組織内分布の比較を行った。また、葉身の一生を通じた GS1 タンパク質含量と活性の挙動を比較した。

日本型、ジャワ型に比較して、インド型品種の中には老化葉身における新鮮重あたりの GS1 含量が高く、未抽出葉身における NADH-GOGAT 含量が低い品種が存在していた(Fig. 1)。また、*Sasanishiki* と同様に、インド型、ジャワ型においても GS1 タンパク質は維管束組織の伴細胞、師部柔細胞、木部柔細胞に、また NADH-GOGAT タンパク質は維管束組織の木部柔細胞に主に分布していた。着生葉の一生における新鮮重あたりの GS1 含量は、日本型、ジャワ型においてほぼ一定であったが、インド型では日本型の約 1.8 倍まで増加が認められ、その後約 1.3 倍まで減少することがわかった。この結果は、*Sasanishiki* と同様に、多くのイネ品種においても GS1 及び NADH-GOGAT が維管束を介して輸送されるグルタミンの合成と再利用に直接的に関与していることを示唆している。インド型品種は転流窒素の供給能力は高いが、維管束を介して輸送された窒素の同化能力が低い品種が存在している可能性が考えられた。また、日本型品種に比較して、常に GS1 タンパク質含量が高かったインド型品種の GS1 活性は、日本型と同じかやや低く、含量と活性の挙動が一致しないことが判明した。イムノブロット法で求めた GS1 ペプチドあたりの活性には、それらの品種間で大きな差が認められた(Fig. 2)。この結果より、イネ着生葉の老化過程において GS1 が活性調節を受けている可能性が示唆された。

第二章

老化過程における GS1 のリン酸化を介した活性調節機構の検討

硝酸同化の初発反応を担っている硝酸還元酵素は、葉身における活性が暗処理により極めて短時間で減少することが知られている。その機構は protein kinase により、543 番目の Ser 残基がリン酸化され、14-3-3 タンパク質群と相互作用することにより、活性調節されていることが知られている。近年、*Brassica napus* L. GS1 タンパク質の Ser または Thr 残基がリン酸化され、14-3-3 タンパク質群と相互作用することにより活性調節されることが示された。本章では、葉身の老化過程において認められたイネ品種間の GS1 ペプチドあたりの活性の差を解明する目的で、精製 GS1 の反応動力学的性質の比較並びにリン酸化を介した GS1 活性調節の可能性を検討した。

Nipponbare 及び Kasalath の葉身より GS1 の精製を行った。精製 GS1 の turnover number は、Nipponbare, Kasalath 共に $55.7 \mu\text{mol glutamine} \cdot \text{mol}^{-1}\text{enzyme} \cdot \text{s}^{-1}$ であり、差は認められなかった (Table 1)。また、グルタミン酸、ATP 及び NH_2OH に対する K_m 値は、Nipponbare が 2.91, 0.93 及び 0.42 mM、Kasalath が 3.00, 1.18 及び 0.54 mM であり、大きな差は認められなかった。よって、GS1 タンパク質あたりの活性の差は、両者の酵素的性質の差によるものではないことが判明した。次に、GS1 がリン酸化を受けている可能性を検討するために、精製 GS1 に対する anti-phosphoserine 抗体及び anti-phosphothreonine 抗体の交差性をイムノブロット法により解析した。その結果、両抗体は Nipponbare 及び Kasalath の GS1 を認識し、*in vivo* で GS1 の Ser あるいは Thr 残基がリン酸化されていることが判明にした (Fig. 3)。従って、イネ着生葉の一生において、GS1 はその Ser 残基あるいは Thr 残基のリン酸化を介して活性調節されている可能性が示唆された。現在、ELISA 法により、リン酸化 Ser、Thr 残基が含まれる領域の同定を行っている。

第三章

イネの窒素利用機構に関する QTL 解析

—老化葉身における GS1 及び生長中の葉身における NADH-GOGAT 含量に関する QTL のマッピング—

窒素転流機構を解明する方法として、目的遺伝子の発現解析や形質転換体を用いた解析などがなされてきた。しかし、それらの解析のみでは、機構全体を網羅的に解明するには限界がある。それら全体の機構を解明する一つの方法として、量的形質を決定している遺伝子座(QTL)を解析する遺伝学的な研究と、従来の分子生物学的研究の融合した方法が有効であると考えられる。第一章において、イネ品種間には GS1 及び NADH-GOGAT 含量に遺伝的な多様性があることが認められた。このことは、窒素転流機構を解明するために、イネ遺伝資源を用いることが有効であることを示している。本章では、窒素転流機構全体を網羅的に解明することを目的とした。日本型イネ Nipponbare 及びインド型イネ Kasalath に由来する 98 系統の BILs を用いて、老化葉身における新鮮重あたりの GS1 並びに生長中の葉身における新鮮重あたりの NADH-GOGAT タンパク質含量を規定している遺伝子座の同定を行うとともに、それらの含量により影響を受けると考えられる穂重量、全粒数、一粒重、及び葉身の窒素転流速度を規定している遺伝子座との関連性を検討した。

QTL 解析を行ったところ、老化葉身における GS1 含量を規定している QTL が 7 個、生長中の葉身における新鮮重あたりの NADH-GOGAT 含量を規定している QTL が 6 個検出された(Fig. 4, Table 2)。異なる形質を規定している QTL が、染色体上の同じ領域に検出された場合、それらの形質間には関連性があると考えられる。老化葉身における新鮮重あたりの GS1 含量を規定している 7 個の内 5 個の QTL が検出された領域には、老化葉身における新鮮重あたりの可溶性タンパク質含量、主稈の穂重量、全粒数、一粒重、及び葉身の窒素転流速度を規定している QTL が検出された。このことはこの集団において、GS1 タンパク質含量の差によって老化器官から生長中の器官へと転流されるグルタミンの量に変化し、主稈の穂重量、全粒数、一粒重、及び葉身の窒素転流速度が影響を受けたことを示唆している。また、GS1 の構造遺伝子を遺伝地図上にマッピングしたところ、一粒重を規定している QTL が検出された領域に座位していた。一方、生長中の葉身における新鮮重あたりの NADH-GOGAT 含量を規定している 6 個の内 2 個の QTL が検出された領域には、生長中の葉身における新鮮重あたりの可溶性タンパク質含量、主稈の全粒数、一粒重、窒素転流速

度を規定している QTL が検出された。このことはこの集団において、NADH-GOGAT タンパク質含量の差によって維管束を介して輸送されてきたグルタミンからグルタミン酸への変換率が変化し、主稈の全粒数、一粒重、窒素転流速度が影響を受けたことを示唆している。また、NADH-GOGAT 構造遺伝子は、その含量を規定している QTL が検出された領域に座位していた。

第四章

GS1 含量、可溶性タンパク質含量、主稈の穂重量及び全粒数を規定している第二染色体上の QTL に関する NILs を用いた解析

第三章において、老化葉身における GS1 並びに生長中の葉身における NADH-GOGAT タンパク質含量、可溶性タンパク質含量、穂重量、全粒数、一粒重、及び葉身の窒素転流速度を規定している遺伝子座が統計学的に検出された。QTL が存在することの直接的な証明として、部分的に染色体が置換された系統群、NILs を用いた形質評価が必要である。NILs を作製するためには、戻し交配を何度も繰り返し行うために、数年の歳月を要する。日本型イネ Nipponbare 及びインド型イネ Kasalath に由来する NILs はなかったものの、日本型イネ Koshihikari 及びインド型イネ Kasalath に由来する系統群が Yano らにより作出されていた。その系統群は、GS1 含量、主稈の穂重量及び全粒数を規定している QTL が検出された第二染色体の DNA マーカー G132 から C747 の間の領域約 65cM がヘテロ接合であり、そのほかのほとんどの領域が Koshihikari に固定された系統の自植後代であった。すなわち、NILs ではなく、それ自体が分離集団であった。本章においては、QTL の確認及び機能の推定を目的としその分離集団あるいはその自植後代を用いて解析を行うとともに、原因遺伝子特定を目的とした組み換え個体の選抜を行った。

分離集団(F₁世代)C 系統 42 個体を野外にて完熟するまで生育させた。DNA マーカーによる遺伝型の決定を行い、NILs として C-22 を選抜した。C-22 の自植後代(F₂世代)を基肥窒素処理し、ガラス室及び圃場にて生育させた。ガラス室内にて生育させた標準窒素区の Koshihikari 及び NILs を第 12 葉身が第 11 葉鞘より抽出し始めた時点に、第 8 葉身から第 11 葉身まで収穫し、GS1 含量の定量を行った。その結果、Koshihikari に比較して、C-22 の新鮮重あたりの可溶性タンパク質及び GS1 含量は、すべての葉位において 20-30%低かった(Fig.

5). これより、葉身における新鮮重あたりの GS1 含量及び可溶性タンパク質含量を規定している QTL の存在が確認された。ガラス室並びに圃場に生育させた場合、栄養生長期の初期から、Koshihikari に比較して C-22 の分けつ数は 20-50%多く、旺盛な生育を示した。Koshihikari に比較して、C-22 は主稈の穎果原基数は多かったものの、完熟穂主稈あたりの穎果数や重量は大きな差は認められなかった。しかし、Koshihikari に比較して C-22 の個体あたりの穂重及び穂数は最大で 30%高く、特に低基肥窒素処理区において顕著な差が認められた(Table.2, 3)。よって、この QTL は分けつあるいは穂の分化に機能していることが推察され、この QTL の効果により低基肥窒素において生産性の向上が期待できる。しかし、GS1 含量と穂重あるいは穂数との直接的な関係を見いだすには至らなかった。原因遺伝子の特定を目的とし、DNA マーカー C777 と C10005 の間での組み換え個体の選抜を行ったところ、組み換えが生じていた個体は 4191 個体中 304 個体であった。現在、この組み換え個体を用いた原因遺伝子の特定を行っている。

結論

本研究で以下のことが明らかとなった。

1. 日本型、ジャワ型に比較して、多くのインド型イネは老化葉身における新鮮重あたりの GS1 含量が高く、未抽出葉身における NADH-GOGAT 含量が低いことが判明した。日本型イネと同様に、インド型、ジャワ型イネにおいても GS1 及び NADH-GOGAT が維管束を介して輸送されるグルタミンの合成と再利用に直接的に関与している可能性が示唆された。
2. イネ着生葉の一生において、GS1 はその Ser 残基あるいは Thr 残基のリン酸化を介して活性調節されている可能性が示唆された。
3. 日本型イネ Nipponbare 及びインド型イネ Kasalath に由来する 98 系統の BILs を用いて、老化葉身における GS1 含量及び生長中の葉身における新鮮重あたりの NADH-GOGAT 含量に関する QTL が、それぞれ 7 及び 6 個検出された。それらの QTL のいくつかは、穂重量、全粒数、一粒重、及び葉身の窒素転流速度に関する QTL と同じ領域に検出され、穂重量、全粒数、一粒重、及び葉身の窒素転流速度は GS1 及び NADH-GOGAT 含量により影響を受

けることが示唆された。

4. 老化葉身における GS1 含量及び可溶性タンパク質含量、並びに主稈の穂重量及び全粒数に関する QTL 領域が置換された系統群、C-22 を選抜した。GS1 含量、個体あたりの総穂重及び穂数に関する QTL が、その領域に存在していることが確認された。総穂重及び穂数に関する QTL は、分けつ及び穂の分化に機能していることが推察された。

原著論文

Yamaya T, Obara M, Hayakawa T, Sato T (1997) Comparison of contents for cytosolic-glutamine synthetase and NADH-dependent glutamate synthase proteins in leaves of japonica, indica, and javanica rice plants. *Soil Science and Plant Nutrition* 43:1107-1112

Obara M, Sato T, Yamaya T (2000) High content of cytosolic glutamine synthetase does not accompany a high activity of the enzyme in rice (*Oryza sativa*) leaves of indica cultivars. *Physiologia Plantarum* 108: 11-18.

Obara M, Kajiura M, Fukuta Y, Yano M, Hayashi M, Yamaya T, Sato T (2001) Mapping of QTLs associated with cytosolic glutamine synthetase and NADH-glutamate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 52, 359: 1209-1217.

Yamaya T, Obara M, Nakajima H, Sasaki S, Hayakawa T, Sato T (2001) Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *Journal of Experimental Botany*. in press.

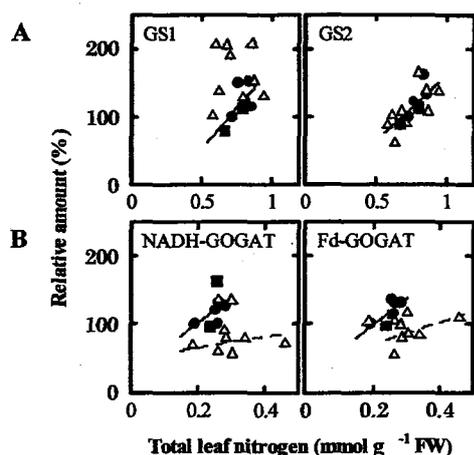


Fig. 1. A. Relationship between contents of total leaf nitrogen and relative amount of GS1 (left panel) or GS2 (right panel) protein in the oldest leaf blade (6th position from the primary leaf) of various cultivars of japonica (●), indica (△), and javanica (■) rice plants. The GS1 protein contents are expressed relative to the content of Sasanishiki obtained from densitomerical readings on a fresh weight basis. Ten or 5 μg of total soluble protein was loaded on an SDS gel to quantify GS1 or GS2 protein, respectively, after immunoblotting with anti-GS1 IgG or GS2 IgG, respectively. B. Relationship between contents of total leaf nitrogen and relative amount of NADH-GOGAT (left panel) or Fd-GOGAT (right panel) in the non-green portion of 10th leaf blades of various cultivars of rice. The contents are expressed relative to the content of Sasanishiki on a fresh weight basis. Thirty or 5 μg of total soluble protein was loaded on an SDS gel to quantify NADH-GOGAT or Fd-GOGAT protein, respectively, after immunoblotting with anti-NADH-GOGAT IgG or anti-Fd-GOGAT IgG, respectively. Independent triplicate analyses with different samples were performed and the mean values are plotted.

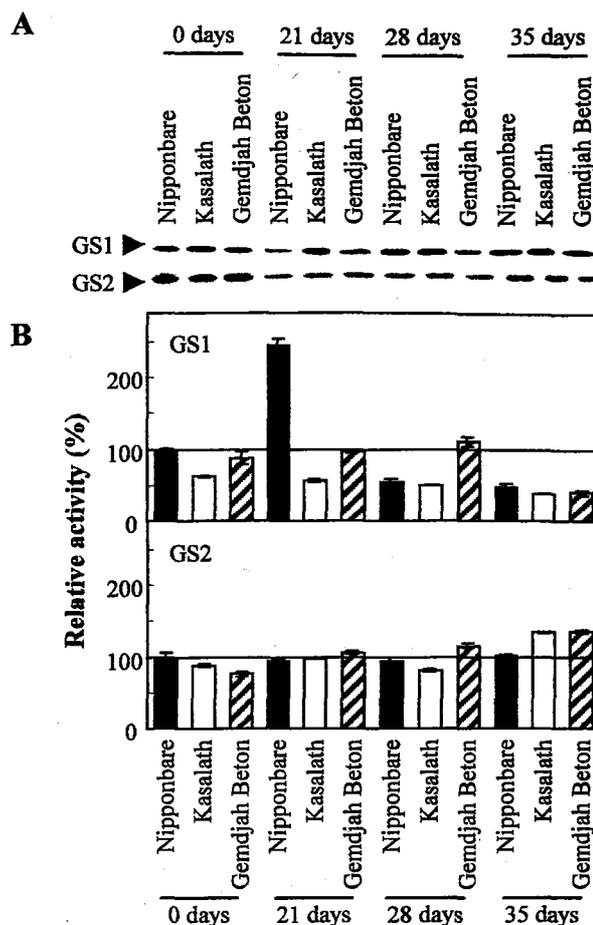


Fig. 2. Comparison of the relative specific activity of GS1 and GS2 from the 6th leaf blade of Nipponbare, Kasalath, and Gemdjah Beton. The partially purified fractions were obtained after Chromatography on an ion-exchange column. A, Immunoblots of GS1 (top panel) and GS2 (bottom panel) were carried out after the same activity of each enzyme, i.e. 0.1 mU for GS1 and 0.3 mU for GS2 was separated by SDS-PAGE at 12.5% (w/v) gel concentration. B, Relative specific activity was calculated as the *in vitro* activity divided by the amount of GS1 and GS2 protein, respectively. Relative activities were expressed as a percentage of the activity of Nipponbare at day 0 for GS1 and GS2. Vertical bars represent standard errors of at least 3 independent experiments.

Table 1. Comparison of kinetic properties of GS1 purified from rice leaf blades

Properties	Nipponbare	Kasalath
Turnover number (μmol^{-1} glutamine \cdot mol ⁻¹ enzyme protein \cdot s ⁻¹)	55.7	55.7
Substrate affinity; Km values (mM)		
L-glutamate	3.00	2.91
ATP	1.18	0.93
NH ₂ OH	0.54	0.42
Vmax values (nkat)		
L-glutamate	0.72	0.73
ATP	0.72	0.64
NH ₂ OH	0.71	0.65

^aOne kat=1 mol γ -glutamyl hydroxamate formed sec⁻¹ at 30 °C

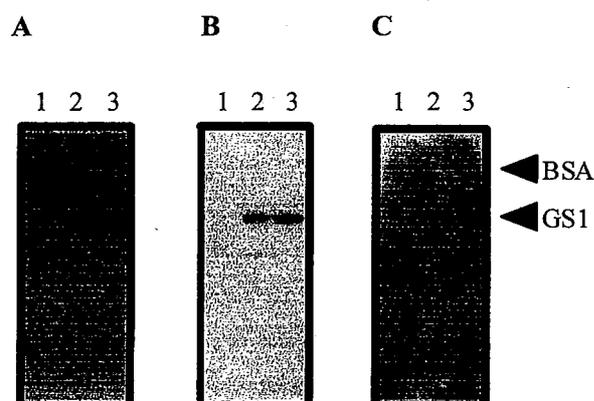


Fig. 3. GS1 protein was phosphorylated *in vivo*. GS1 was purified from leaf blades of Kasalath and Nipponbare with column chromatography using DEAE cellulose, Resource Q, Superdex 200, and Hydroxyapatite. A hundred ng of total protein, i.e. BSA (lane 1), GS1 of Kasalath (lane 2) or Nipponbare (lane 3), was loaded on an SDS gel. A, Stained with silver stained kit. B, Immunoblotting with anti-GS1 IgG. C, Immunoblotting with anti-phosphoserine IgG.

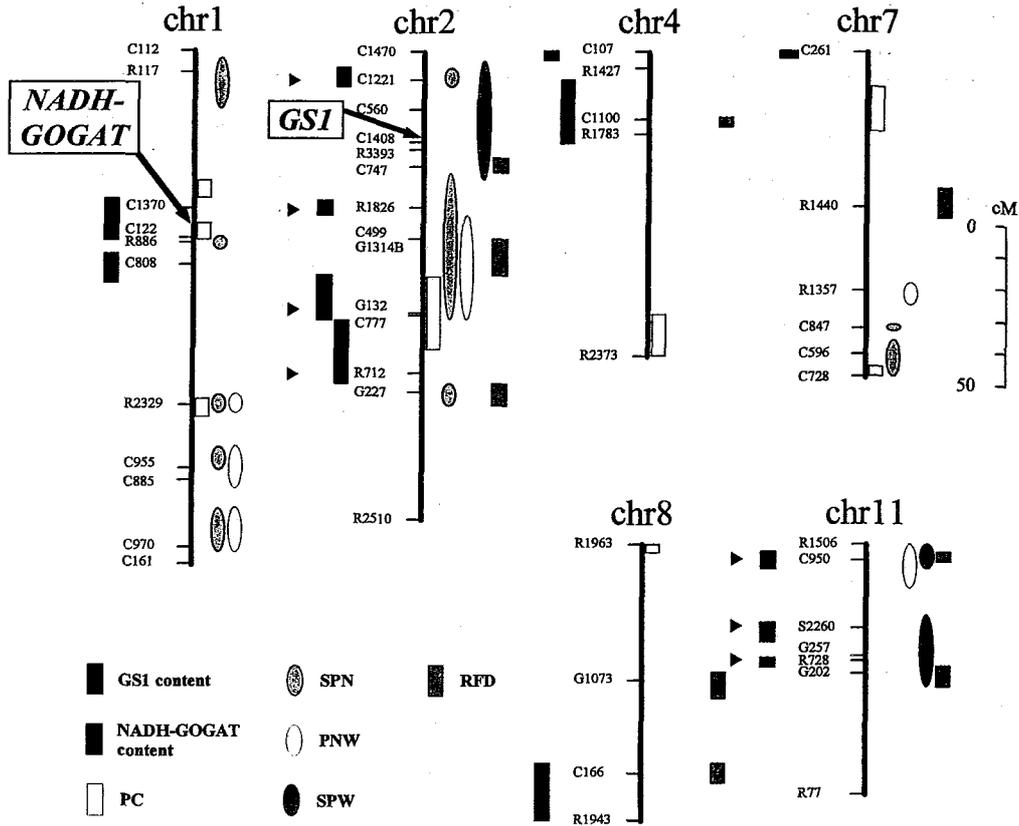


Fig. 4. The regions of putative QTL for GS1 protein content in senescing leaf blade, NADH-GOGAT protein content in developing leaf blade, and physiological/agronomic traits. The chromosomes in which QTLs were examined for GS1 and NADH-GOGAT protein contents are shown. The QTLs for content of GS1 (black) and NADH-GOGAT (red) are shown on the left of the chromosome arms, those for physiological/agronomic traits on the right. PC, soluble protein content; SPN, spikelet number on the main stem; PNW, panicle weight on the main stem; SPW, one-spikelet weight; RFD, rate for full-discolouration. The arrows on the left of chromosome arms show the locus of structural gene for GS1 (in this study) and NADH-GOGAT (Sasaki et al. 1994). Black and red arrow heads on the left of the chromosome arms indicate the co-localization of QTLs for GS1 or NADH-GOGAT and other physiological traits, respectively. Genetic distance, in cM, is based on linkage analysis of 98 BILs (Lin et al 1998). A probability of less than 0.05 was used to define the borders of the confidence intervals for QTLs.

Table 2. Putative QTLs of GS1 content in the senescing leaf blades and NADH-GOGAT content in the developing leaf blades

	NML ^a	Chr	LOD	% Variation ^b	Positive allele ^c
GS1 content	R1826	2	1.00	4.8	N
	C777	2	0.96	4.9	N
	C107	4	1.11	5.4	N
	R1943	8	1.28	6.0	K
	C950	11	1.25	5.9	N
	S2260	11	1.34	6.3	K
	R728	11	0.90	4.4	K
			Total ^d	21.8	
NADH-GOGAT content	C122	1	1.04	5.0	K
	C808	1	0.91	4.4	K
	C1221	2	1.00	5.0	K
	R712	2	1.64	7.7	N
	R1783	4	1.14	5.6	K
	C261	7	0.93	4.5	K
			Total ^d	19.4	

^a Nearest marker locus of putative QTLs

^b Phenotypic variation explained by each QTL

^c N and K indicate Nipponbare and Kasalath

^d Estimates obtained from multiple QTL model

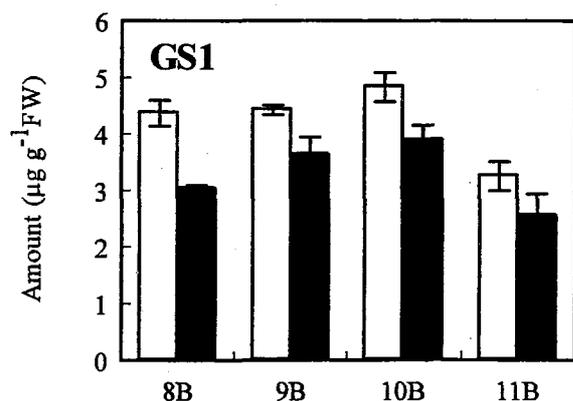


Fig. 5. Changes in the content of GS1 protein in leaf blade at various leaf positions in Koshihikari (open bars) and NIL C-22 (black bars). Ten µg of total soluble protein were loaded to determine the amount of GS1 after immunoblotting with anti-GS1 IgG. The contents are expressed as micrograms of GS1 protein on a fresh weight basis using purified GS1 as the standard. Independent triplicate analyses with different samples were performed and the mean values are plotted. Vertical bars represent standard errors.

Table 3. Differences in total panicle weight and panicle number between Koshihikari and C-22 grown in a green house under the different supply of nitrogen.

Plant	Total panicle weight ^a (g plant ⁻¹)	Panicle number ^a (plant ⁻¹)
1/2N		
Koshihikari	7.69±1.36 (100)	5.5±0.8 (100)
C-22	10.08±2.38 (131) **	7.1±1.1 (129) **
1N		
Koshihikari	13.52±1.33 (100)	6.8±1.5 (100)
C-22	15.44±2.40 (114) *	8.5±1.3 (126) **
2N		
Koshihikari	19.89±2.05 (100)	10.4±1.8 (100)
C-22	20.80±3.88 (105)	10.8±2.5 (103)

^a Data are means with S.D. values (n=12). Percentages in parentheses are calculated based on Koshihikari, grown with either N-supply, being 100%. Significant difference was estimated by the LSD test. They were denoted "*" at 5% and "***" at 1% , respectively.

Table 4. Differences in total panicle weight and panicle number between Koshihikari and C-22 grown in a field under the different supply of nitrogen.

Plant	total panicle weight ^a	panicle number ^a
	(g plant ⁻¹)	(plant ⁻¹)
0N		
Koshihikari	39.0±6.8 (100)	17.4±3.2 (100)
C-22	44.1±6.7 (113) *	21.8±4.2 (125) **
1/4N		
Koshihikari	45.2±6.9 (100)	21.3±3.6 (100)
C-22	47.4±6.3 (105)	24.0±3.4 (113) *
1/2N		
Koshihikari	49.8±7.3 (100)	22.4±4.1 (100)
C-22	51.1±6.4 (103)	26.6±3.2 (119) **
1N		
Koshihikari	55.1±6.8 (100)	25.8±3.6 (100)
C-22	57.9±10 (105)	28.9±4.2 (112) *

^a Data are means with S.D. values (n=20). Percentages in parentheses are calculated based on Koshihikari, grown with either N-supply, being 100%.

Significant difference was estimated by the LSD test. They were denoted "*" at 5% and "**" at 1% , respectively.

論文審査結果要旨

日本型イネのササニシキでは、穂を構成している窒素の約80%が老化器官からグルタミンやアスパラギンの形態で転流してきた窒素に由来していることが知られており、この転流に際して老化器官ではサイトゾル型グルタミン合成酵素 (GS1) が、また穂や若い葉身ではNADHグルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) がそれぞれ重要な機能を担っている結果が示されてきた。

イネには形態が大きく異なる数多くの品種があり、主に日本型、インド型、ジャワ型の3つの生態型に大別されている。本研究は、ササニシキで得られた窒素転流機構に関して、多くの遺伝資源を用いて一般化を試みると同時に、窒素転流の制御に関する遺伝子群の網羅的な解析を目指して、GS1とNADH-GOGATタンパク質の量的形質を決定している遺伝子座 (QTL) の解析を試みたものである。

日本型、インド型、ジャワ型イネ16品種を供試して、老化葉身におけるGS1含量と未抽出の若い葉身におけるNADH-GOGAT含量を比較した結果、インド型イネの約半数の品種では葉身全窒素当たりのGS1含量が日本型イネなどに比較して約2倍あること、逆に全てのインド型イネでは未抽出葉身のNADH-GOGAT含量は約半分であることが判明した。両酵素タンパク質の組織内分布には違いはなく、同一の細胞群における酵素タンパク質の蓄積に差があることがわかった。差の認められた代表的な品種を用いて葉身の一生を追跡したところ、同様な結果が得られたが、GS1タンパク質当たりで比較したGS1活性は必ずしも同じ挙動を示さず、翻訳後の活性調節機構が存在していることが示唆された。これらの結果は、植物栄養学・生理学分野の国内英文誌と国際誌に公表した。

GS1タンパク質含量とNADH-GOGATタンパク質含量に大きく差が認められた日本型イネのニホンバレとインド型イネのKasalath、並びに両品種に由来する98系統のバッククロスインブリードラインを農水省イネゲノムプロジェクトから分譲して頂き、それぞれの酵素タンパク質の含量に関するQTLを染色体上にマッピングし、窒素転流により影響を受けることが期待される農業形質のQTLとの関連性を検討した。老化葉身におけるGS1含量を規定するQTLは7個、若い葉身のNADH-GOGAT含量を規定しているQTLは6個マッピングされ、そのうちの多くは葉身のタンパク質含量、葉身の老化速度、主幹の全粒数、一粒重などを決定しているQTLと重複して検出され、用いた集団において、それぞれのQTLが密接に影響しあっていることが示唆された。同時にGS1とNADH-GOGAT構造遺伝子を、それぞれ染色体上にマッピングした。この結果は極めて新規性に富むものであり、植物生理学分野の国際誌に公表した。

QTLの存在を直接的に証明し、さらにQTL領域から原因遺伝子を特定するにあたり、まず部分的に染色体が置換された系統群を探索し、イネゲノムプロジェクトからGS1含量、穂重量、全粒数を規定するQTLが検出された第二染色体のDNAマーカーG132からC747がKasalathにヘテロ接合で固定され、他の領域はコシヒカリに固定された系統の自殖後代を分譲して頂いた。この分離集団C系統42個体を野外で栽培し、準同質遺伝子系統群のC-22を獲得した。C-22の自殖後代を用いてガラス室並びに圃場で栽培し、GS1含量他のQTLの存在を確認するとともに、表現型の差異を解析した。C-22はコシヒカリに比較して分けつ数、総穂数、穂重が大きく上まわっており、特に低基肥窒素処理区で顕著であった。また、原因遺伝子特定のため、DNAマーカーC777とC10005の間での組み換え個体4191個体中・組み換えが確認できた304個体を選抜し、準備を進めている。

以上のように、本研究により、ポストゲノム研究の一環として遺伝資源を活用し、イネにおける窒素転流制御と関連農業形質のQTL解析を進め、遺伝子機能の網羅的研究に関わる端緒を開くことができた。同時に、原因遺伝子 (群) の特定にあたり、分子遺伝学的な基盤を構築できた。いずれも新規な発見であり、植物における窒素利用の分子機構の解明に大きく寄与しているものと評価できる。従って、審査員一同、著者は博士 (農学) の学位を授与されるに十分な資格を有すると判定した。