

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02941

研究課題名（和文）イネにおける窒素固定能向上を目指したエンドファイトの炭水化物利用メカニズム解明

研究課題名（英文）Physiological mechanisms of carbohydrate utilization by N fixing endophyte for improving N fixation capacity in rice

研究代表者

近藤 始彦（Kondo, Motohiko）

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：00355538

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,400,000円

研究成果の概要（和文）：イネの体内窒素固定エンドファイトによる窒素固定活性の変動要因の解明と向上に関する生理・遺伝的要因の解析を行った。茎部窒素固定能はNSC特に遊離糖の蓄積性の影響を受けることを明らかにし、アフリカイネCG14などで活性が高いことを見出した。またデンプン合成変異系統や遮光処理を用いた解析により糖類の関与を検証した。さらに窒素固定能の異なるイネ品種の茎部の菌叢解析を行い、主に *-*、*-proteobacteria* 窒素固定菌が主体であることを示した。また圃場での積算窒素固定量を評価した結果、窒素吸収全体への寄与は比較的小さかったが、窒素施肥は積算窒素固定能には明確な影響を及ぼさなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでほとんど知見のなかったイネ地上部のエンドファイト窒素固定の変動要因や関与する窒素固定菌叢の一端を示すことができた。活性の品種差異の要因のひとつが窒素固定に必要なエネルギーを供給する基質である可能性は、今後の活性の遺伝的向上のひとつの方向を示すものと考えている。イネは世界において主要作物であり、窒素化学肥料の削減を実現できればそのインパクトは大きいと考える。現状ではエンドファイトの寄与は非常に小さいが、今後土壌および体内エンドファイトを統合的に向上させる要因をさらに解明することが有効であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the physiological and genetic factors related to the variation and improvement of nitrogen-fixing activity by nitrogen-fixing endophytes in rice plants. We found that stem nitrogen fixation activity is affected by the accumulation of NSCs, especially free sugars, and that activity is high in African rice CG14 and other rice cultivars. The involvement of sugars was also verified by analyzing starch synthesis mutant lines and by using shading. Furthermore, we analyzed the flora in the stem of rice cultivars with different nitrogen-fixing ability, and found that *-* and *-proteobacteria* were the main nitrogen-fixing bacteria. The results of the evaluation of the effect of nitrogen fertilization on the nitrogen fixation capacity in the field showed that the contribution to the total nitrogen absorption was relatively small, but nitrogen fertilization did not have a clear effect on the cumulative nitrogen fixation capacity.

研究分野：作物栄養

キーワード：イネ 窒素固定 エンドファイト 炭水化物 品種

1. 研究開始当初の背景

地球規模での食糧生産の持続的生産のため、化石燃料に依存しない生物窒素固定の作物生産における利用の重要性は今後ますます大きくなると考えられる。窒素固定系のうちマメ科作物 根粒菌共生系についてはそのメカニズムの詳細が明らかにされてきているが、宿主はマメ科作物に限定される。一方、非マメ科作物においてもサトウキビ茎部でエンドファイト窒素固定菌の働きが確認されて以来(Cavalcante and Dobereiner1988)、多様な植物種で窒素固定が植物の窒素獲得に寄与していることが明らかにされており、イネにおいても栽培種や野生種の地上部や根に生息する窒素固定菌が多数確認されている(南澤 2003 など)。植物の窒素獲得へのエンドフィティック窒素固定の寄与は一般には根粒菌に比べてかなり低い、サトウキビやイネを材料として¹⁵Nトレーサー法で推定されたエンドファイトによる窒素固定が植物体窒素の20%以上に達した例も報告されており(Boddy et al 1995)、その潜在能力を活用できれば作物生産に大きなインパクトをもたらすと期待される。窒素固定反応は窒素ガスをアンモニア態窒素に変換する強還元、エネルギー消費反応であり、ニトロゲナーゼ酵素を持つ細菌によって行われる。このため、エンドフィティック窒素固定においては植物の光合成に由来する炭水化物の窒素固定菌への供給が重要なファクターになると考えられる。実際に、多量の非構造的炭水化物(NSC) (遊離糖・デンプン) や有機酸を含有するサトウキビやサツマイモ、パイナップルなどで高い窒素固定の寄与が観察されていることも(Yoneyama et al. 1998)、基質供給が促進要因となっていることを示唆する。イネ茎部にも窒素固定能があることは以前より報告されており(Watanabe et al 1981)、体内の窒素固定菌数も茎部の糖濃度が高まる生殖生長期に増加することが観察されている(Barraquio et al 1997)。これまでに飼料用など多用途利用のために開発されたNSCを茎部に蓄積する多収イネ品種やアフリカイネ品種を比較した結果、茎部に根部と同等以上の活性があること、またNSC特に遊離糖の高い品種で窒素固定活性が高まる傾向があること、さらに茎部にも複数の窒素固定菌が存在することを見出した。これらはNSCが基質として有効である可能性を示唆する。しかしながらイネのエンドフィティック窒素固定反応を駆動する炭素基質の動態や遺伝制御、また有効な菌種や生息部位における酸素環境など、安定的な窒素固定活性の維持・発現に必要な宿主側および菌側の形質や遺伝要因には不明な点が多く、その積極的利用には至っていないのが現状である。近年、イネのNSC蓄積については分子メカニズムが詳細に明らかにされつつあり、茎部のNSC蓄積を増大させた変異体(Okamura et al 2013)や組換え体(米倉ら 2017)も作出されている。そこで本研究ではこれらの材料も活用しながら炭素基質の供給の増強により窒素固定能力が高まることを検証するとともに、菌叢の解明を行う。さらにイネ体内でのエンドファイトの動態、生育促進メカニズムを明らかにする。

2. 研究の目的

これまで明確でなかったイネにおけるエンドフィティック窒素固定系の生理メカニズムとその活性を促進する要因について、主に茎部NSCに着目し宿主とエンドファイト菌側双方から解明することにより、窒素固定能力の向上への寄与を目指す。

- ・窒素固定活性の品種間比較による高NSC蓄積性の有効性の検証とデンプン合成系やイネ糖トランスポーター変異体や組換え体を用いた窒素固定能促進効果の評価と有用遺伝要因の解明
- ・エンドファイト菌叢と基質や酸素要求性の解明
- ・圃場条件における窒素固定ポテンシャルの定量評価と施肥条件の影響
- ・窒素固定エンドファイトによる植物生育促進メカニズムの解明

3. 研究の方法

1. 窒素固定活性の品種間比較による高NSC蓄積の有効性の検証と窒素固定エンドファイトの基質特異性

高NSC蓄積性多収品種を含む多様な品種について活性が高まる幼穂形成～出穂期に茎部の窒素固定活性をアセチレン還元活性(ARA)により比較し、窒素固定ポテンシャルの改良に活用できる高活性品種を選抜する。また遮光処理などによりNSCの影響を解析する。特定された高活性品種については茎部の炭水化物など代謝産物組成を分析するとともに窒素固定菌叢を*nifH*遺伝子のアンプリコン解析により解析する。生息部位や基質特異性、酸素要求性などから菌の特性を整理する。

また、茎部で活性の高い部位を詳細に解明するとともにその菌叢より酸素要求性や基質要求性を推定する。

2. イネ糖トランスポーター変異体や組換え体を用いた窒素固定能促進効果の評価と有用遺伝要因の解明

デンプン合成酵素の一つ ADP グルコースピロホスホリラーゼ (AGP) OsAGPL1 などの Tos17 挿入変異により茎部に遊離糖を高集積する変異体や、糖トランスポーター遺伝子 OsSWEET13 など SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporter) 遺伝子の過剰発現により細胞間隙の糖濃度が高められた組換え体など高糖性の遺伝材料を用いて、親品種と ARA や ^{15}N 法で窒素固定活性を比較評価するとともに NSC の組成・量との関係を解析する。

3. 圃場におけるエンドフィティック窒素固定の最大寄与率の定量化

圃場試験において高 NSC 蓄積性の多収品種やインディカ・ジャポニカ品種 (*Oryza sativa* L.) およびアフリカイネ (*O. glaberrima* Steud.) を含む多様な品種・系統について茎部の窒素固定活性を比較する。このために圃場で栽培したイネ地上部の ARA と乾物重を継続的に測定し、積算窒素固定量の増強効果を定量的に評価する。また窒素施肥の影響を調査した。これらによりイネの窒素吸収に対するエンドフィティック窒素固定の寄与ポテンシャルを推定する。

4. ホスト-エンドファイト窒素固定菌間の交互作用の解明と生育促進メカニズムの解明

サツマイモより単離した *Burkholderia* 属窒素固定菌に蛍光タンパク (DsRED、GFP) を導入し、イネへ接種した場合の茎部及び根での局在性や細胞間隙など微小部位での生息部位を明らかにする。またポットおよび圃場条件で生育や窒素蓄積促進と窒素固定の関与を評価する。菌の感染部位でのホストの遺伝子発現への影響を RNA-seq により解析する。

4. 研究成果

1. 窒素固定活性の品種間比較による高 NSC 蓄積の有効性の検証と窒素固定エンドファイトの基質特異性

これまでに観察されていた茎部の窒素固定活性 (ARA) の品種差異と糖含有率の関係は圃場試験によって再現することができ、アフリカイネ CG14 など糖の蓄積が大きくまた ARA 高い活性をもつことが検証された。また茎部の窒素固定活性 (ARA) は糖を高蓄積するデンプン合成変異体 *agl1* で親品種より高かったが、遮光処理によって糖の蓄積を抑制すると ARA も低下した (図 1)。これらのことから茎部の ARA の発現に遊離の糖が関与していることが示された。

日本晴や *agl1*、CG14、およびデンプンを高集積するリーフスターについて茎部の全菌叢および窒素固定菌の菌叢をそれぞれ 16sRNA、*nifH* のアンプリコン解析により解析した。その結果 16sRNA、*nifH* とともに品種や系統によって共通および特有の菌叢を持つことを示した。*nifH* の解析結果より窒素固定菌としては好気性菌、嫌気性菌が存在するが前者が主体である可能性を示した。茎部では Proteobacteria 特に γ 、 β -proteobacteria 窒素固定菌が主体であった (図 2)。またイネ品種間でも差異があり、ある程度品種特有の菌叢を有していると考えられた。*Bradyrhizobium* や *Paraburkholderia*、*Koasakonia* など多くの菌種が糖類の資化能力をもつことが推定された。

茎部における高活性部位の推定

地上部で最も活性の高かった茎部下部分についてさらに微細部位別に ARA を比較した。その結果、不伸長茎部の外側および葉鞘基部で高い活性が認められ、茎の最下部で窒素固定活性が高いことを明らかにした。さらに $^{15}\text{N}_2$ の取り込みによってもその傾向を確認した。不伸長茎部の外側で活性が高い要因としては、菌が土壌より侵入しやすい冠根の発生部位などの存在や基質や酸素の濃度、などが想定されたが今後検証が必要である。

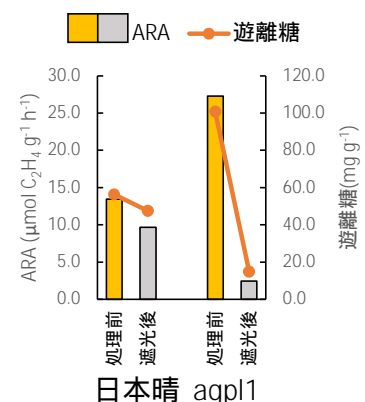


図 1 日本晴と *agl1* (デンプン合成変異体) の窒素固定活性 (ARA) と遮光の影響

土壤水分の影響

異なる土壤水分（湛水、湿潤）で生育させたイネ茎部 ARA に明確な違いが認められなかった。有機物（セルロース）添加により増加する傾向があった。基質の供給や嫌気的環境が茎部窒素固定活性を高める可能性が示唆された。

2. 窒素固定促進遺伝子の探索

SWEET 組換え系統については再現性よく高い活性を示す系統の特定には至らなかった。これは温室栽培であったことが一因と考えられる。アフリカイネ CG14 は活性が高いことが再確認されたことから有効な遺伝子を持つ可能性がある。現在、染色体断片置換系統群の予備的評価を進めている。

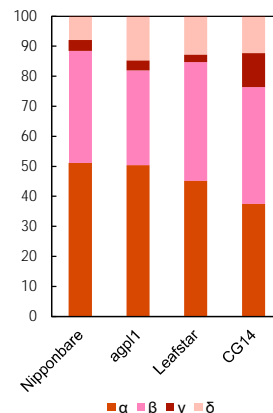


図 2 nifH アンプリコン解析による茎部の Proteobacteria の構成の品種比較

3. 圃場におけるエンドフィティック窒素固定の寄与の評価と窒素施肥の影響

標準ジャポニカ品種である日本晴、多収インディカ品種北陸 193 号やこれまで高い ARA が認められたアフリカイネ品種 CG14 および ADP グルコーススピロホスホリラーゼ (AGP) sAGPL1 の Tos17 挿入変異変異体 Agp11 系統について、経時的、植物体部位別に ARA の窒素施肥反応性を圃場にて解析した。茎部や葉の ARA は分けつ期では高窒素によって抑制されたが、それ以降は影響は小さくなった。一方、根の ARA は生育後半に高窒素による抑制がみられ、地上部と異なる傾向を示した。Agp11 は出穂期の茎部において日本晴より高い活性と糖蓄積を示した。しかし、経時的な ARA の変化から推定した作期間中の積算窒素固定量には日本晴と agp11 で有意な差は認められなかった。また CG14 の茎部 NSC は分けつ期までデンプンを蓄積していなかったが出穂期では窒素条件によって異なり、窒素施肥下ではほぼ糖のみを蓄積したが、低窒素ではデンプンもやや蓄積する傾向が認められた。このようにアジアイネとは異なる炭水化物代謝特性をもち、このことが窒素固定活性の変動のひとつの要因となる可能性が示唆された。

日本晴と北陸 193 号について経時的 ARA と乾物重の推移から積算窒素固定量の寄与を推定した。いずれの品種も地上部全体の窒素固定に対しては茎部の寄与が最も大きかった。乾物重は北陸 193 号で高く特に高窒素区で差が大きくなった。一方 ARA との積算で求めた窒素固定量については窒素吸収量全体に占める割合は小さく 2 品種で明確な差は見られなかった。このことからバイオマスの大きさだけでなく活性を高めることが窒素固定の寄与率を高めるために必要であることが示唆された。

4. 窒素固定エンドファイトの動態と植物生育促進メカニズムの解明

サツマイモから単離した窒素固定エンドファイト RS1 株に DsRED を導入した変異株を用いてイネへの接種後の体内での菌の存在箇所を解析した。その結果、根に局在しており、また側根の発生する亀裂が侵入箇所のひとつとなっていることが示唆された。また菌量の経時変化より比較的長期間イネ体内に存在できる可能性を示した。

RS1 株をイネに接種すると生育および窒素吸収が促進された。その要因を解析した結果、RS1 株を接種したイネでは根重あたりの窒素吸収速度が増加しており（表）、一方 ARA の明確な増加は認められなかった。根の RNA-seq 解析の結果、接種により根での硝酸輸送体や窒素同化関連遺伝子の発現増加が認められた。これらより RS1 株による植物の生育促進には、窒素固定以外に植物による窒素、特に硝酸の吸収や代謝の促進が関与している可能性が高いことを示唆した。窒素固定エンドファイトによる生育促進には多様なメカニズムが存在し、相乗作用によって植物生育は影響されていることを示したと考えている。

表 Burkholderia vietnamiensis RS1 の接種によるイネの生育と窒素吸収への影響

処理区	地上部乾物重 g plant ⁻¹	地下部乾物重 g plant ⁻¹	N蓄積量 mg plant ⁻¹	根重あたりのN吸収速度 gN g ⁻¹ d ⁻¹
対照	1.27 ± 0.07 *	0.15 ± 0.02 ns	67.4 ± 3.3 *	0.062 ± 0.003 *
<i>B. vietnamiensis</i> RS1 接種	1.66 ± 0.05	0.20 ± 0.01	81.4 ± 2.4	0.076 ± 0.004

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okamoto Takanori, Shinjo Rina, Nishihara Arisa, Uesaka Kazuma, Tanaka Aiko, Sugiura Daisuke, Kondo Motohiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Genotypic Variation of Endophytic Nitrogen-Fixing Activity and Bacterial Flora in Rice Stem Based on Sugar Content	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 719259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.719259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shinjo Rina, Tanaka Aiko, Sugiura Daisuke, Suzuki Takamasa, Uesaka Kazuma, Takebayashi Yumiko, Kojima Mikiko, Sakakibara Hitoshi, Takemoto Daigo, Kondo Motohiko	4. 巻 450
2. 論文標題 Comprehensive analysis of the mechanisms underlying enhanced growth and root N acquisition in rice by the endophytic diazotroph, Burkholderia vietnamiensis RS1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Soil	6. 最初と最後の頁 537 ~ 555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11104-020-04506-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 堀田幸奈・岡本卓哲・杉浦大輔・近藤始彦
2. 発表標題 連用圃場におけるイネの体内エンドファイト窒素固定能への窒素施肥の影響
3. 学会等名 021年度日本土壌肥料学会中部支部・中部土壌肥料研究会例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takanori Okamoto, Rina Shinjo, Arisa Nishihara, Kazuma Uesaka, Aiko Tanaka, Daisuke Sugiura, Motohiko Kondo
2. 発表標題 What Factor Affects Genotypic Difference in Endophytic Nitrogen-fixing Ability in Rice?
3. 学会等名 The 10th Asian Crop Science Association Conference（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本卓哲, 堀田幸奈, 新庄莉奈, 西原亜理沙, 上坂一馬, 田中愛子, 杉浦大輔, 近藤始彦
2. 発表標題 茎部の非構造性炭水化物蓄積および窒素固定細菌叢
3. 学会等名 日本作物学会第251回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本卓哲, 新庄莉奈, 西原亜理沙, 上坂一馬, 田中愛子, 杉浦大輔, 近藤始彦
2. 発表標題 非構造性炭水化物蓄積量の異なるイネ品種における茎部窒素固定エンドファイトの菌叢解明
3. 学会等名 日本作物学会第249回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Okamoto, Rina Shinjo, Aiko Tanaka, Daisuke Sugiura, Motohiko Kondo
2. 発表標題 Major microflora of endophytic nitrogen-fixing bacteria as Affected by non-structural carbohydrate in rice genotypes
3. 学会等名 21st International Conference on Nitrogen Fixation, (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Okamoto, Rina Shinjo, Aiko Tanaka, Daisuke Sugiura, Michelle Anne Bunquin, Olivyn Angeles, Pauline Chivenge and Motohiko Kondo
2. 発表標題 Can nitrogen fixing activity in rice stem be enhanced by high sugar concentration and low nitrogen fertilizer?
3. 学会等名 5th Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	杉浦 大輔 (SUGIURA DAISUKE) (50713913)	名古屋大学・生命農学研究科・講師 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------