

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292036

研究課題名(和文) ダイズにおける根粒固定窒素と根吸収窒素の移動機構と窒素固定硝酸阻害の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of nitrogen transport from fixed N in nodules and absorbed N in roots in soybean related to nitrate inhibition on nitrogen fixation.

研究代表者

大山 卓爾 (Ohyama, Takuji)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：30152268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：根粒菌を接種し無窒素水耕栽培したダイズに硝酸またはアンモニアを与えた後の根と根粒の代謝産物濃度の変動及びRNAseqによる遺伝子発現解析を実施した。窒素投与後、根および根粒でフルクトース及びグルコース濃度が減少し、アンモニウム処理により根で有機酸濃度の減少がみられた。

硝酸供給8時間後の根、根粒の遺伝子発現をRNAseqにより解析した結果、特異的に発現が上昇した遺伝子数は根では12,939あり根粒では2,431あった。根と根粒で共通して上昇した遺伝子は74と少なかった。逆に硝酸投与で減少した遺伝子は、根では8,678、根粒では1,654あり、共通は42であった。

研究成果の概要(英文)：Concentration of metabolites and RNAseq analysis in gene expression were carried out after the addition of nitrate or ammonium to the nodulated soybean plants. After addition of nitrate and ammonium, the concentration of fructose and glucose were decreased, and organic acid concentration was decreased in the root supplied with ammonium. By the RNAseq analysis of roots and nodules after 8 hours of nitrate treatment, about 12,939 genes were promoted in the roots and 2,431 genes in nodules. The common genes are only 74. The gene expressions were depressed by nitrate treatment, about 8,678 genes in roots, and 1,654 genes in nodules, with common genes 42.

研究分野：植物栄養学

キーワード：植物栄養学 ダイズ 窒素固定 根粒 根 硝酸 アンモニウム RNAseq

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ダイズなどのマメ科植物は、土壤細菌である根粒菌を根に取り込むことにより根粒を形成し、共生状態の根粒菌(バクテロイド)の窒素固定により生成するアンモニアを窒素栄養として利用できる。一方、宿主植物は光合成産物であるショ糖を篩管経由で地下部に輸送し、リンゴ酸などに変換してバクテロイドにエネルギーおよび炭素骨格を供給している。

(2) 申請者らは、安定同位体の<sup>15</sup>Nを用いてダイズ根粒固定窒素と根から吸収した硝酸の代謝と移動について研究し、バクテロイドが固定したアンモニアはただちに植物細胞に分泌され、グルタミンに取り込まれた後ウレイド(アラントイン、アラントイン酸)に代謝されて導管経由で地上部に運ばれるが、根で吸収した硝酸は、硝酸またはアスパラギンに代謝されて茎導管を移動することを明らかにした。さらに、経根吸収した硝酸は一旦葉身へ移動し同化されるが、固定窒素は葉と莢に直接移動するという仮説を提出した。しかしながら、固定窒素と経根吸収窒素の移動が異なる生理機構については不明である。

(3) マメ科作物の栽培において窒素肥料の施肥により、根粒の着生、根粒生長、窒素固定活性が抑制され、かつ根粒の老化が促進されることが古くから知られている。阻害機構としては、光合成産物の根粒への供給低下、根粒皮層の酸素透過性低下によるバクテロイドへの酸素供給の低下、根粒で固定した窒素の輸送阻害などが考えられているが、硝酸やその他の窒素化合物による根粒形成と窒素固定活性阻害の生理的機構の全貌は未だ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

(1) 本申請課題では、根粒固定窒素と経根吸収硝酸の移動と分配について窒素同位体を用いて解析するとともに、硝酸による根粒生長と活性阻害機構をメタボローム、トランスクリプトームを用いて網羅的に解析する。本研究により、これまで不明であったダイズの固定窒素、硝酸の体内移動と根粒阻害機構を明らかにし、農業生産に資する意義がある。

(2) 根粒形成に対する硝酸阻害には、根粒着生部位に硝酸を与えたときに引き起こされる直接的効果と、根粒着生部位から離れた位置の根に硝酸を与えた場合に見られる間接的効果に分けられる。申請者らは、水耕培養液に硝酸を添加して根粒生長への直接的効果を調べ、硝酸投与1日後には根粒の生長がほぼ完全に停止するが、培養液から硝酸を除くと1日後に生長が再開することを発見した。同様に窒素固定活性(アセチレン還元活性)も水耕液への硝酸の添加により急速かつ可逆的な阻害を受けた。ポジトロン放出核種の<sup>11</sup>CO<sub>2</sub>を用いたイメージング分析により、ダイズの根に硝酸を与えると葉から移行した

光合成産物が根で優先的に利用され、根粒への光合成産物の供給が低下し、根粒の生長と窒素固定活性の低下を引き起こすと推定された。さらに、ダイズ根を上下に区切る根分け法で、間接効果については、培養液の硝酸濃度ならびに投与期間により大きく影響を受け、下部根に高濃度(5 mM)硝酸を長期に与えると上部根の根粒形成が抑制されたが、低濃度(1 mM)硝酸の継続的投与ではむしろ上部根の根粒生長と窒素固定活性が促進された。

(3) これらのことから、硝酸の供与部位、濃度、供与期間などにより、根と根粒の間で窒素代謝と炭素代謝に関して複雑でダイナミックな変化が生じており、代謝産物濃度や移行量の変動が根粒生長や窒素固定活性に影響していることが予想された。そこで、硝酸による根粒生長阻害作用解明のため、画像解析による根粒生長の測定、水素発生による窒素固定の連続測定、代謝産物、遺伝子発現、タンパク質の網羅的解析により、ダイズ体内における窒素代謝と炭素代謝間の複雑な調節機構を明らかにしようとする本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

(1) ダイズ根粒固定窒素と経根吸収窒素の移動と分配について安定同位体やポジトロン放出核種を用いたトレーサー解析を行なう。さらに、ダイズの根粒生長と窒素固定に対する化合態窒素の阻害機構の解明をめざし、根粒画像解析、水素発生による窒素固定活性測定、メタボローム解析、トランスクリプトーム解析などの網羅的手法を用いて追跡する。

(2) 窒素栄養条件と根粒と根の炭素代謝、呼吸変動についても詳細に検討し、硝酸等の化合態窒素による根粒生長や窒素固定阻害機構の全体像を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) 培養液に5mM硝酸を添加して1日後のダイズの根粒と根の遺伝子の発現をマイクロアレイで解析した。硝酸添加により無添加に比べて遺伝子の発現が4倍以上上昇した遺伝子数は、根で145、根粒で85あり、共通する遺伝子は9であった。一方、硝酸添加で4倍以上低下した遺伝子数は、根で93、根粒で120あり、共通する遺伝子は1であった。硝酸添加で根では硝酸の輸送、硝酸還元や窒素代謝に関する遺伝子の発現が顕著に高まった。さらに、根では、解糖系、TCA回路、ペントースリン酸経路の炭素代謝関係遺伝子の発現も硝酸添加で上昇した。一方、根粒では、アスパラギン合成酵素を除いて、窒素代謝に関与する遺伝子の発現は変わらず、炭素代謝関連遺伝子はむしろ抑制傾向が認められた。

(2) メタボロームでは、ダイズの根と根粒に含まれる315の化合物を網羅的に測定した。硝酸添加により濃度が2倍以上上昇した化合

物は根では17、根粒では6であった。根で上昇した化合物は、グルタミン、アスパラギン、アラニンなどであった。根粒では、アスパラギン濃度の顕著な上昇とアラントイン、アラントイン酸濃度の上昇が見られたが、その他のアミノ酸濃度はあまり変化がなかった。

(3) ダイズ体内における代謝産物の網羅的解析のため、現有のUPLC装置に接続できる質量分析器システム(日本ウオーターズ(株)製・QDa検出器システム)を導入した。アンモニアおよび22種のアミノ酸遊離アミノ酸をAQC誘導体に変えて逆相カラムで分離後のアミノ酸AQC誘導体を質量分析測定できた。

(4) 日本原子力研究開発機構との共同研究で、ダイズ根粒で固定した $^{13}\text{N}_2$ の地上部への移動を観察でき、移動速度を推定した。

(5) 根粒からの水素発生によりニトロゲナーゼ活性をモニタリングする方法を検討した結果、水素センサーが温度により大きな影響を受け、温度変化を伴う測定では注意が必要であることが分かった。

(6) 無窒素培地で栽培したダイズ幼植物に5 mM 硝酸または5mM アンモニウムを供給後、短時間における体内各部位のアミノ酸、光合成産物等の成分濃度を測定した。ダイズ(品種 Williams)に根粒菌(USDA110株)を接種し、パーミキュライトで発芽させ、5日間後に水耕栽培に移植した。その後、人工気象装置内で、昼期間28・16時間、夜期間18・8時間、無窒素条件で栽培した。播種後19日目に培養液に5 mM 硝酸または5mM アンモニウムを加え、添加0,4,8,16,24時間後に、葉身、茎、根上部(根粒着生部位)、根下部(根粒非着生部位)、根粒に分け、サンプリングを行った。21種のアミノ酸とアンモニアは、UPLCを用いて分析した。根においては、アンモニア投与でグルタミン、アスパラギン濃度が投与4時間目から急激に上昇したが、硝酸投与では、投与8時間後から徐々に上昇した。根粒において、硝酸またはアンモニウムの供与後、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸濃度が増加した。茎、葉身でも、アンモニア投与8時間目からアスパラギン、グルタミンの濃度が上昇したが、硝酸投与では葉身のアスパラギンのみ上昇がみられ他のアミノ酸には大きな変動はなかった。

(7) 無窒素培地で水耕栽培したダイズに5 mM 硝酸または5mM アンモニアを与えた後の根と根粒の代謝産物の濃度の変動解析を実施した。

ダイズの根粒成長を比較したところ、硝酸処理では時間単位の急激な抑制がかかるのに対して、アンモニウム処理では日単位の緩やかな抑制にとどまった。ダイズに短時間硝酸もしくはアンモニウムを供給したところ、根および根粒でスクロース濃度は差がみられなかったが、フルクトース及びグルコース濃度が減少した。アンモニウム処理により根

で種々の有機酸濃度の減少がみられた。アスパラギン濃度は両区とも増加したが、アンモニウム処理のほうが速やかにかつ高濃度に増加した。

(8) 硝酸供給8時間後の根、根粒及び葉身の遺伝子発現をRNAseqにより解析した。硝酸供給8時間後のRNAseq解析の結果から、硝酸供給で特異的に発現が上昇した遺伝子数は根では12,939あり根粒では2,431あった。根と根粒で共通して上昇した遺伝子は74と少なかった。逆に硝酸投与で減少した遺伝子は、根では8678、根粒では1654あり、共通して減少したものは42であった。8時間の硝酸処理で根では硝酸同化経路の遺伝子の発現が上昇したが最も発現上昇したものはNodulin MtN21であり、最も減少したものはNodulin-26Bであった。根粒で最も上昇した遺伝子はPentatricopeptide repeat-containing proteinであり、最も減少したものはRapid alkalization factor preproproteinであった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

小野雄基・大竹憲邦・末吉邦・大山卓爾、根粒着生ダイズにおける尿素の存在とウレイド代謝との関係、植物微生物研究会、2016年9月7-9日、東北大学(仙台)

Shinji ISHIKAWA, Akinori SAITO, Shiori WATANABE, Keisuke ISHIKAWA, Norikuni OHTAKE, Kuni SUEYOSHI, Takuji OHYAMA, Nitrate supply enhances the N and C metabolism in the roots but not in the nodules of soybean plants. International Conference on Nitrogen Fixation. Asilomar, CA, USA, 2015年10月4-9日

小野雄基・後藤大輝・大竹憲邦・末吉邦・大山卓爾、無機態窒素供給によるダイズの根と根粒の代謝成分、植物微生物研究会、2015年9月14-16日、つくば国際会議場(つくば)

小野雄基・後藤大輝・大竹憲邦・末吉邦・大山卓爾、短時間の無機態窒素供給によるダイズ体内成分の変動、日本土壌肥料学会、2015年9月9-11日、京都大(京都)

〔図書〕(計 1件)

Takuji Ohyama, Kaushal Tewari, Shinji Ishikawa, Kazuya Tanaka, Satoshi Kamiyama, Yuki Ono, Soshi Hatano, Norikuni Ohtake, Kuni Sueyoshi, Hideo Hasegawa, Takashi Sato, Sayuri Tanabata, Yoshifumi Nagumo, Yoichi Fujita, Yoshihiko Takahashi, Role of nitrogen on growth and seed yield of soybean and a new fertilization techyque to promote nitrogen fixation and seed

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大山 卓爾 (OHYAMA, Takuji)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号： 3 0 1 5 2 2 6 8

(2)研究分担者

末吉 邦 (SUEYOSHI, Kuni)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号： 1 0 2 1 6 2 7 8

大竹 憲邦 (OHTAKE, Norikuni)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号： 5 0 3 1 3 5 0 7