

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292039

 研究課題名(和文) Biological nitrification inhibition (BNI) activity in wild-wheat (*Leymus racemosus*), and its chemical and genetical characterizations

 研究課題名(英文) Biological nitrification inhibition (BNI) activity in wild-wheat (*Leymus racemosus*), and its chemical and genetical characterizations

研究代表者

Subbarao Guntur (Subbarao, Guntur)

国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生産環境・畜産領域・主任研究員

研究者番号：00442723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：コムギの遠縁野生種オオハマニンニク(*Leymus racemosus*)の高い生物的硝化抑制(BNI)能は、染色体Lr#Nにより、しかも短腕側により制御されていた。Lr#NでのBNI形質はコムギの3B染色体への転座時に発現された。コムギ3B染色体へのLr#N短腕側の部分的転座で作成した1系統で、根系におけるBNI活性がほぼ2倍となり、また生育にも正の効果があった。BNI活性物質の精製は途中段階で終了となったが、いくつかの活性ピークは認められた。設計した70個のプライマーのうち20個でオオハマニンニクでのPCR増幅がみられ、そのうち7つでCSの遺伝的背景でのLr#N染色体を検出できた。

研究成果の概要(英文)：The high-BNI capacity of wild wheat, *Leymus racemosus* (LR) is mostly controlled by Lr#N chromosome, expressed in Chinese Spring. Further, the short-arm of the Lr#N chromosome controls BNI-capacity. BNI-trait from Lr#N expressed in cultivated wheat only when translocated on 3B, but not on 7B wheat-chromosome. Three shortened-short-arm-Lr#N translocations were developed on to 3B chromosome and were evaluated for BNI-capacity. One of the translocations in CS genetic background, nearly doubled the BNI-activity of root systems and also has a positive effect on wheat growth. The BNI activity purification reached an intermediate stage with several active peaks were identified and in the process of purification. Out of seventy primers designed and tested, only twenty primers amplified PCR products from *L. racemosus*. Further work is needed to design additional primers that can work for N chromosome in CS background.

研究分野：土壌・肥料学

キーワード：生物的硝化抑制 BNI コムギ 遠縁野生種 気候変動 肥料利用効率 亜酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

(1) 硝化(硝酸化成)は、好気条件下で微生物の酸化作用によりアンモニアから亜硝酸を経て硝酸が生ずる過程を指し、地球上の窒素循環において重要な経路である。植物の中には自身の根から物質を出して硝化菌の活性を制御するものがあり、この植物の機能を「生物的硝化抑制」(BNI)と呼んでいる。(Subbarao, G.V.ら、2006)

植物の生育にとって硝化は必要不可欠であるが、現代農業では、工業的に合成した窒素肥料や農畜産廃棄物からの堆肥の不適切な施用により、農地での硝化の速度が速すぎる状態にある。施用された、あるいは生成されたアンモニアは速やかに酸化されて硝酸となってしまう。硝酸になると、降雨等で速やかに地下へと溶出しやすくなり、地下水、さらに河川、湖沼、及いては海洋汚染を引き起こすことになる。また、強力な温室効果ガスの発生を促すことになる。このことは、逆に施用した肥料の植物(作物)の吸収する機会を減らし、結果として利用効率が悪化する。ここで、もし植物が自分自身で硝化速度を低下させるように制御することができれば、上記の問題の解決に大きく寄与すると考えられる。

(2) コムギは世界三大穀物の一つであるが、現在、収量を確保するためには多量の窒素肥料の投入が必要となっている。それは施用肥料の利用効率が低下しているからであるが、この副作用として水圏および大気圏の汚染の大きな源となっている。

現代の栽培コムギの根にこの BNI 能があるという報告は、これまでのところない(Subbarao, G. V.ら、2007a)。これに対し、コムギの遠縁野生種であるオオハマニンク(*Leymus racemosus*)には、根に高い硝化抑制活性があった(Subbarao, G. V.ら、2007b)。コムギとオオハマニンクの交雑は、困難を伴うが可能であることから、オオハマニンクの BNI 遺伝子を栽培コムギへの導入による BNI 能強化した品種の開発が期待される。しかし、オオハマニンクの BNI 遺伝子は不明であり、またその硝化抑制物質についての未解明のままである。これまでの研究から、オオハマニンクの BNI 形質に制御している染色体は、*Lr#N*、*Lr#I*、*Lr#J* の 3 つの可能性が高いことが示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) オオハマニンクの 3 つの染色体 *Lr#N*、*Lr#I*、*Lr#J* のうちどれが BNI 形質を主に制御しているか、また栽培コムギに導入したときにその形質は発現されるかどうかを明らかにする。

(2) BNI 形質を制御している染色体を栽培コムギに転座させた系統を作成し、その染色体のうちどの部分が BNI 形質を制御しているか

を評価する。

(3) オオハマニンクの根から生産される生物的硝化抑制物質を単離し、同定する。

(4) 栽培コムギに導入したオオハマニンクの染色体断片を確認するための遺伝的マーカーを開発する。

3. 研究の方法

(1) オオハマニンクの染色体 *Lr#N*、*Lr#I*、*Lr#J* をコムギの実験用品種 Chinese Spring にそれぞれに添加した系統と染色体の添加のない Chinese Spring (対照) を人工気象室で 45 日間栽培し、各植物体の根からの滲出液の硝化抑制活性をバイオアッセイ(スバラオら、2006)により決定した。

(2) オオハマニンクの染色体 *Lr#N*、*Lr#I*、*Lr#J* についてそれぞれに転座系統を作成し、その転座を GISH (Genomic in situ hybridization) 法により確認した。転座が確認された系統について、上記と同様な方法で硝化抑制活性を評価した。

(3) オオハマニンクの根の滲出液および根組織からおよそ 20,000ATU (allylthiourea unit) 相当の活性を回収し、ここから各種クロマトを用いて精製を行い、活性を上記のバイオアッセイにより確認した。

(4) オオハマニンクの染色体 *Lr#N* に対する遺伝的マーカーの開発のために、illumina HiSeq 2500 で RNA-seq (RNA シークエンシング) を決定した。ゲノムシークエンシングは、illumina MiSeq で実施した。オオハマニンクの塩基配列を認識できるようにプライマーを手作業で設計し、Chinese Spring と Chinese Spring へのオオハマニンク染色体添加系統 (TACBOW lines) について PCR により検証した。

4. 研究成果

(1) オオハマニンクの染色体 *Lr#N* がその BNI 形質を制御しており、*Lr#I* と *Lr#J* は制御していないことが明らかとなった。BNI 形質は、Chinese spring の遺伝的背景の中で継続的に発現していた。Chinese spring の *Lr#N* 染色体添加系統は、対象とした Chinese spring と比べて根から非常に大きな生物的硝化抑制物質を生産していた。

(2) Chinese spring への導入実験から *Lr#N* の短腕側が BNI 形質を制御していることが示された。これに対し、その長腕側には何ら効果はみられなかった。

染色体 *Lr#N* の短腕をコムギの 3B 染色体に転座させた場合に BNI 形質はみられたが、コムギ 7B 染色体への転座では効果がなかった(図 1)。

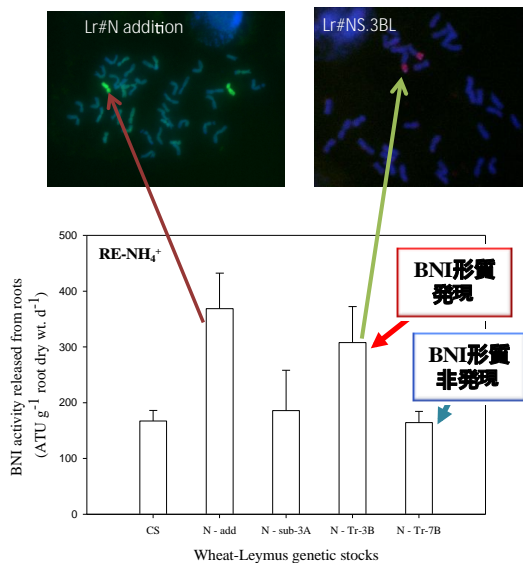


図1 オオハマニンニクの染色体 *Lr#N* の添加、置換、転座系統の根から滲出物の生物的硝化抑制活性の比較

Lr#N の短腕をさらに縮めた部位を Chinese spring の遺伝的背景にコムギ 3B 染色体に転座した系統を作成し、それらの BNI 活性を調べた (図 2)。3 つの染色体転座系統 (GISH 法で確認) のうち 1 つで非常に高い生物的硝化抑制物質の生産がみられた。具体的には、45 日齢の 4 植物分をまとめて測定した場合、Chinese spring の根からは 60 ATU であったのに対し、転座系統ではおよそ 250% 増の 160 ATU であった (図 3)。また対照の Chinese spring に比べ当該系統の乾物生産量はよくなっていた。

(3) 根浸出液からの BNI 活性の精製: 1 mM の塩化アンモニウムにより 24 時間処理して得られた根浸出液 (RE) に BNI 活性が検出された。RE をプールして、濃縮後、メタノールに溶解し、逆相 HPLC により分画した。活性は極性の異なる多くのフラクションに検出され、多くの物質が活性を示していると考えられ、精製を中断した。

オオハマニンニクの根組織に含まれる BNI 活性成分の部分精製: 根組織の凍結乾燥物から活性物質をメタノールにより抽出し、これを濃縮後、ジエチルエーテルおよび水により液液分配し、活性の多くがエーテル画分に回収されることを確認した。エーテル画分を更にメタノール可溶画分 (LEM) とメタノール不溶画分 (LEE) に分画した。活性は両画分にはほぼ同程度確認された。次に LEE 画分を順相シリカゲルカラムにより分画した。活性が一定の画分に濃縮されていることが確認された。一方、LEM 画分を逆相 HPLC により分画したところ活性は多くの画分に分散しており、精製が困難であることが判明した。

(4) 評価した 76 個のプライマーのうち 20 個

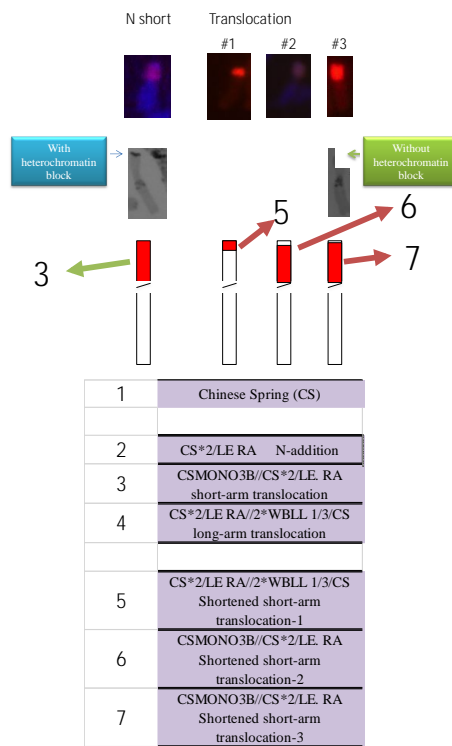


図2 Chinese spring の遺伝的背景にオオハマニンニク染色体 *Lr#N* の短腕を転座させた系統とその短腕部分

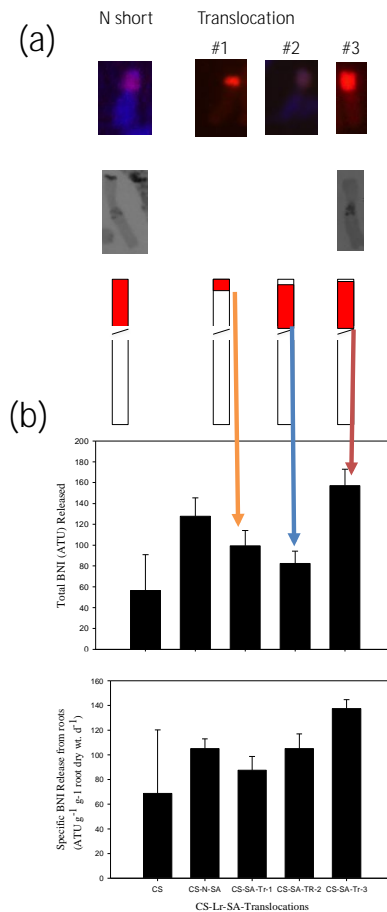


図3 Chinese spring の遺伝的背景にオオハマニンニク染色体 *Lr#N* の短腕を転座させた各系統の根からの BNI 活性

でオオハマニンニク染色体添加系統 (TACBOW 系統) について PCR 増幅がみられた。上記のうち全部で7つのプライマーセットが染色体 *Lr#N* の短腕と長腕の各転座系統で増幅がみられた。3種類のプライマーセットが *Lr#N* 染色体の長腕を、また他の3種類のセットが短腕を認識した(表1)。また、これらのプライマーセットを *Lr#N* 染色体のコムギに転座した系統に適用したところ、*Lr#N*の短腕を認識した2つのセットが *Lr#N*転座系統 No.1 でも機能した。*Lr#N*の短腕と長腕を認識した4種類のセットが *Lr#N*転座系統 No.2 で機能していた。*Lr#N*転座系統 No.3 では一つも機能しなかった。

表1 Chinese spring の遺伝的背景にオオハマニンニク染色体 *Lr#N* の転座系統の PCR による検出に用いたプライマーセットとその結果

N-CHROMOSOME RECOMBINATION LINES PDR RESULT							
Genotype	LR Primer						
	1	12	21	24	59	63	71
N Short					×	×	×
N long	×	1 sample		×			
N recomb 1		×		×	×	×	×
N recomb 2					×	×	×
N recomb 3	×	×	×	×	×	×	×

PCR増幅あり
× PCR増幅なし

< 引用文献 >

Subbarao, G. V. ら、Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems – Challenges and opportunities、Critical Reviews in Plant Sciences、25 巻、2006、1-33
 Subbarao、G. V. ら、Biological nitrification inhibition (BNI) – is it a widespread phenomenon?、Plant and Soil、294 巻、2007a、5-18
 Subbarao、G. V. ら、Can biological nitrification inhibition (BNI) genes from perennial *Leymus racemosus* (*Triticeae*) combat nitrification in wheat farming?、Plant and Soil、299 巻、2007b、55-64
 Subbarao、G. V. ら、A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with *Brachiararia humidicola*、Plant and Soil、288 巻、2006、101-112

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

スバラオ ゲントウール (SUBBARAO、Guntur)
 国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生産環境・畜産領域・主任研究者
 研究者番号：00442723

(2)研究分担者

中原 和彦 (NAKAHARA、Kazuhiko)
 国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・プロジェクトリーダー
 研究者番号：90241778

安藤 康雄 (ANDO、Yasuo)
 国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生産環境・畜産領域・プロジェクトリーダー
 研究者番号：80353548

辻本 壽 (TSUJIMOTO、Hisashi)
 鳥取大学・乾燥地研究センター・教授
 研究者番号：50183075