

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450021

研究課題名(和文) イネの生物学的窒素固定に関与する栽培的ならびに遺伝的要因に関する解析

研究課題名(英文) Research for cultivated and genetic characteristics of biological nitrogen fixation in rice

研究代表者

井上 博茂 (INOUE, Hiromo)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40260616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：真砂土および水田土壌について土壌の物理化学性を調査するとともに、真砂土が、アンモニア態窒素をほとんど発現させないことを明らかにした。イネ品種を、¹⁵Nで標識された硫酸を施用窒素として水田土壌を用いてポット栽培したところ、イネの生物学的窒素固定由来の吸収N量を推定することができなかった。イネ品種C5444 × 台中65号の交雑F2集団を、同様に真砂土を用いてポット栽培したところ、イネの生物学的窒素固定由来のN吸収量を推定することができ、また、親品種の能力を超越するF2個体を見出した。栽培土壌からDNAを抽出し、これらDNAを鋳型とするPCRを行い、窒素固定微生物が栽培土壌中に存在することを示した。

研究成果の概要(英文)：I investigated both the physical and chemical characteristics of Masa-soil and paddy soil, and it was revealed that nitrogen contained in Masa-soil does not mineralize in rice growth period. Rice cultivars were grown in the pot filled up with paddy soil using ¹⁵N labeled ammonium sulfate as nitrogen fertilizer. But amount of N absorption from biological nitrogen fixation could not be estimated. F2 population of the cross C5444 × T65 were grown in the pot filled up with Masa-soil according to the same method. Amount of N absorption in rice from biological nitrogen fixation could be estimated in all rice individuals and some F2 individuals show higher ability in biological nitrogen fixation than C5444, which shows higher than T65 in biological nitrogen fixation. Soil total DNAs were extracted from these cultivation soils and PCR were carried out using soil DNAs as template. DNA fragment was amplified, so it was revealed that nitrogen fixation microbes existed in these cultivation soils.

研究分野：作物学

キーワード：栽培・作付体系 生物学的窒素固定 重窒素追跡 アセチレン還元活性

1. 研究開始当初の背景

イネ根圏における生物的窒素固定(以下BNF)に関する研究は、1970年代後半より1980年代にかけて、国立遺伝学研究所を中心に、主としてアセチレン還元活性(以下ARA)をその指標として盛んに行われた。それら一連の研究では、多数のイネインド型品種および日本型品種についてARAが調べられ、イネ出穂期頃に高いARAを示すこと、インド型品種C5444が、日本型品種台中65号に比較して高いARAを発現することなどが示されるとともに、これら2品種の交雑後代におけるARAを測定した結果から、ARAの発現が量的形質遺伝によって支配されていることが示唆されている。これらの研究では、主として灰色低地土、グライ土、多湿黒ボク土といったわが国水田土壌を用いて栽培されたイネが用いられており、大陸などに多く分布する赤色土、黄色土といった土壌において栽培されたイネは用いられていない。そこで、有機物含量がほとんどなく極端に粘土含量が大きい赤色土壌(島根大学本庄総合農場の畑地下層土を供試)を用いてイネを湛水条件下および畑条件下(PF=2.0)で栽培したところ、湛水条件下において高いARAを認め、BNFの存在を示唆した(井上ら2012)。これらのことは、土壌条件に関わらず、水田条件下においてBNFが存在することを示唆しており、水田生態系における自然肥沃度の維持へのBNFの寄与の可能性を示唆するものである。また、土壌よりDNAを抽出することができるようになり、抽出されたDNAを鋳型にPCRを行うことによって、土壌中に含まれる微生物の存在を容易に推定することができるようになった。水田土壌を用いてイネをポット栽培し、高いARAを認めたポットの土壌からDNAを抽出して土壌微生物について調べたところ、微好気性の窒素固定微生物であるAzospirillumの存在を確認している(井上ら未発表)。一方、量的形質に関する遺伝学的解析では、分子生物学的手法を用いることにより、微働遺伝子の作用力まで詳細に解析することができるようになった。これらの分析手法を利用すれば、BNFに関する遺伝学的解析を行うことができると考えられるが、そのためには、BNFを高発現させるための栽培条件の検討ならびに品種・系統間差異の検出が必要である。真砂土を用いてポット栽培を行ったイネC5444、台中65号およびキヌヒカリについてARAを測定するとともに15Nによるイネの吸収Nについて解析し、20~30[gN/m²]施用条件下で推定窒素固定量に品種間差異を検出している(井上ら未発表)。しかしながら、これらの栽培条件は実際の水田条件と大きく異なっていることから、水田土壌における栽培条件を詳細に検討する必要がある。さらに、分離集団を分析の対象とするときには、破壊検査による評価では後代種子の獲得が行えなくなることから、非破壊による評価を行う必要がある。非破壊による

評価としては、ARAの測定が考えられるものの、たとえば、圃場で栽培されたイネなど、集団について個々にin situ条件下でARAを測定することは測定時期、測定回数などの制限から非常に困難である。これらのことから、分離集団を分析対象としたBNFに関する評価法が確立されているとはいえないのが現状である。

2. 研究の目的

イネにおけるBNFの発現とその評価を行うための手法を確立するために、以下の3点について研究を実施した。

- (1) 栽培土壌に関する検討
 - (2) 水田土壌で栽培した場合のBNFの発現とその評価
 - (3) 真砂土を用いて交雑F₂集団を栽培した場合のBNFの発現とその評価
- (1)では、BNF発現の評価を行うための栽培条件の検討として、土壌に着目し、有機物含有量が極端に少ないと考えられる真砂土の栽培特性について詳細に解析した。(2)では、実際の栽培条件に近づけるために、水田土壌を用いてイネ品種をポット栽培し、BNFの発現とその評価について検討した。ここでは、イネ分析対象として、固定型品種を供試した。(3)では、BNFの発現とその量的評価を行うことを目的として、真砂土を用いてイネを栽培し、BNFの発現について詳細に検討した。イネ分析対象として、C5444×台中65号の交雑F₂集団を供試して、親品種とともにポット栽培を行い、F₂集団内でのBNFの発現程度について調べ、BNFの遺伝的制御の可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 栽培土壌に関する検討

京都大学大学院農学研究科附属高槻農場の水田より採種した土壌(灰色低地土)および市販されている真砂土について、風乾後に土壌の理化学性を調査した。また、これら2つの土壌を用いて、イネ品種キヌヒカリおよび台中65号を、窒素無施用条件下でポット栽培して、生育期間中の土壌溶液に含まれるアンモニア態窒素の濃度を測定した。1/5,000[a]ワグナーポットに風乾させた土壌を3,000[g]充填し、代かき処理後にイネをポットあたり3個体移植した。イネ無栽培のポットを同様に作成した。栽培をビニルハウス内で行い、灌水には水道水を用いて、イネ生育期間を通して湛水状態を保った。土壌溶液の採取を、ポットに埋設したポーラスカップを用いて、1週間ごとに収穫前までに行い、採取した土壌溶液中のアンモニア態窒素濃度をインドフェノール法に従って測定した。

(2) 水田土壌における生物的窒素固定の発現の評価

- (2)-1 水田土壌を用いてイネを栽培した場合のBNFの発現程度の解析

イネ品種カサラス、日本晴、C5444 および台中 65 号を、水田土壌を用いてポット栽培を行った。京都大学大学院農学研究科附属農場(大阪府高槻市)の水田より土壌を採取し、ビニルハウス内で風乾させた後、2[mm]の篩で篩別して、栽培土壌を準備した。準備した風乾土 2,800[g]を 1/5,000[a]ワグネルポットに充填した。催芽処理を施した種子をポットあたり 2 粒直播し、播種後 1 週間畑状態を保った。播種後 8 日目より湛水処理とし、施肥窒素として、15N で標識された硫安 (10.7[atm%]) をポットあたり 0.2[gN] (10[gN/m²]に相当)となるように湛水処理開始 1 日後に施用した。イネ生育期間を通して、灌水には脱イオン水を用いた。出穂期ごろに ARA を測定するとともに、収穫後にはイネおよび土壌についてケルダール法に従って窒素濃度を測定し、乾物重(土壌の場合は風乾重)との積から全窒素保有量(土壌の場合は全窒素残存量)を算出した。併せて、窒素の含有率を測定して、吸収窒素量における施肥由来窒素量を推定した。なお、窒素含有率の測定を SI サイエンス社に依頼して行った。

窒素含有率を用いた施肥由来窒素吸収量の算出には、以下の式を用いた。なお、本実験では、供試した窒素標識硫安の濃度が高かった(10.7[atm%])ことから、窒素による同位体分別を無視し、また、窒素の自然存在比を 0.366[%]として、この値を除することで excess%の値を求めた。

施肥由来窒素吸収量[mg]

= (サンプルの excess%)/(窒素標識硫安の excess%) × サンプルの全窒素保有量[mg]

(2)-2 イネ栽培後土壌より抽出した DNA を鋳型とした PCR

C5444 および台中 65 号を、水田土壌を用いて個体別にポット栽培したときの栽培前土壌および栽培後土壌から DNA を抽出した。土壌の抽出を、ニッポンジーン社製 ISOIL for BEADS BEATING を用いて、ポットごとに行った。抽出法としては、風乾させた土壌サンプル約 0.6[g]をビーズチューブに入れ、予め 65[]に加温した抽出バッファを添加後、5,000[rpm]・45 秒で BEADS BEAT を行った。本補助金で購入した Micro Smash MS-100(トミー精工社製)を用いて BEADS BEAT を行った。その後、65[]で 1 時間インキュベートした後に遠心して上澄み液を得た。以降の操作をプロトコルに従って行った。エタノール沈殿の操作時には、Ethachinmate を加えず、転倒混和による DNA 洗浄を行い、遠心した後に、キムタオル上で乾燥させた。得られた DNA を鋳型として、窒素固定微生物と考えられる Azospirillum および Herbaspirillum の 16S リボゾーム DNA 領域を特異的に増幅するプライマー対を用いて PCR を行い、DNA 断片の増幅の有無を調査した。

(3) C5444 × 台中 65 号の交雑 F₂ 集団における

生物的窒素固定の発現

(3)-1 窒素で標識された硫安を施肥窒素に用いて栽培した場合の BNF の評価

C5444 × 台中 65 号の交雑 F₂ 集団を、真砂土を用いて個体別にポット栽培を行った。出芽処理を施した種子を、風乾させた真砂土を 1,000[g]充填した 1/10,000[a]ホワイトポットに、ポットあたり 1 個体を直播し、出芽を確認した。播種後 10 日目に、ポットあたり 0.1[gN]となるように窒素で標識された硫安 (10.7[atm%]) を施用後、湛水を行った。これ以降、収穫期まで湛水状態を維持して栽培を行った。なお、灌水にはフィルター水を用いた。イネ登熟後に、籾型(長粒、中粒および短粒)、脱粒性の有無およびふ先着色について調査した。これらの形質を調査した後にイネをサンプリングし、80[]・72 時間の通風乾燥を行った後、乾物重を測定するとともに、ケルダール法に従ってサンプルの窒素濃度を測定し、乾物重と窒素濃度との積からイネ窒素保有量を算出した。また、イネサンプルの窒素含有率を測定して、イネ窒素保有量のうちの施肥窒素由来分について求めた。なお、窒素の分析は、SI サイエンス社に依頼して行った。なお、窒素含有率を用いた施肥由来窒素吸収量の算出を、(2)-1 の方法と同様の方法に従って行った。

(3)-2 イネ栽培後土壌より抽出した DNA を鋳型とした PCR

C5444 × 台中 65 号の交雑 F₂ 集団を、真砂土を用いて個体別にポット栽培したときの栽培前土壌および栽培後土壌から DNA を抽出した。土壌の抽出を、ニッポンジーン社製 ISOIL for BEADS BEATING を用いて、ポットごとに行った。抽出法としては、風乾させた土壌サンプルを約 0.6[g]ビーズチューブに入れ、予め 65[]に加温した抽出バッファを添加後、5,000[rpm]・45 秒で BEADS BEAT を行った。本補助金で購入した Micro Smash MS-100(トミー精工社製)を用いて BEADS BEAT を行った。その後、65[]で 1 時間インキュベートした後に遠心して上澄み液を得た。以降の操作をプロトコルに従って行った。エタノール沈殿の操作時には、Ethachinmate を加えず、転倒混和による DNA 洗浄を行い、遠心した後に、キムタオル上で乾燥させた。得られた DNA を鋳型として、窒素固定微生物と考えられる Azospirillum および Herbaspirillum の 16S リボゾーム DNA 領域を特異的に増幅するプライマー対を用いて PCR を行い、DNA 断片の増幅の有無を調査した。

4. 研究成果

(1) 栽培土壌に関する検討

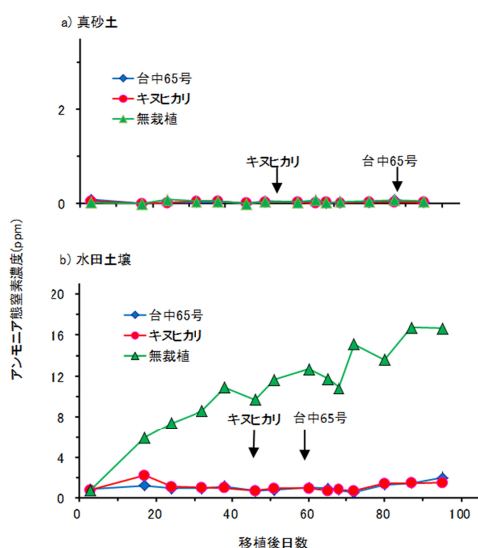
第 1 表に、真砂土および水田土壌の物理化学性について示した。水田土壌と比較して、真砂土では、砂質であり、極端に C 含量および N 含量が低いこと、また窒素の無機化レベルが極めて低いことが明らかになった。これらのことは、真砂土における有機物含量が極

めて小さいことを示しており、真砂土を用いてイネを栽培する場合には、Nの施用が不可欠であることが示唆された。

第1表 真砂土および水田土壌の物理化学性

調査項目	真砂土	水田土壌
pH(H ₂ O)	5.74	6.01
全炭素(%)	0.11	2.17
全窒素(ppm)	52	1,862
可給態窒素(mgN/kg)	0.3	121.9
可給態リン(mgP ₂ O ₅ /kg)	97	1,594
CEC(cmolc/kg)	4.5	8.7
粒径組成(%)		
砂	87.3	62.7
シルト	8.8	23.0
粘土	3.9	14.3

第1図にアンモニア態窒素濃度の推移を示した。水田土壌については、イネ無栽植ポットにおいてアンモニア態N濃度が増加しているが、イネ栽植ポットではアンモニア態Nがほとんど検出されなかったことから、イネ生育期間を通して土壌より無機化したNが主としてイネによって吸収されたと考えられた。一方、真砂土については、イネ無栽植ポット、イネ無栽植ポットの両者において、アンモニア態Nがほとんど検出されず、イネ栽植ポットにおいて、イネの著しい生育遅延が観察された。このことから、イネ生育期間を通して、真砂土からはNの供給がほとんどなく、そのためイネに著しい生育遅延が生じたと考えられた。



第1図 真砂土および水田土壌における土壌溶液中のアンモニア態N濃度の推移

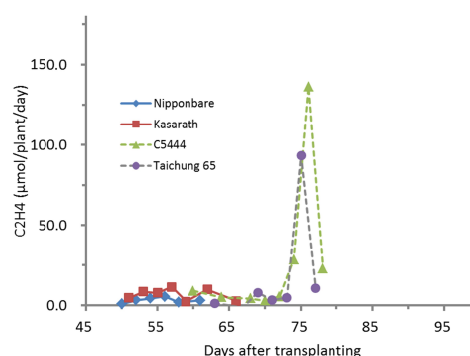
以上の結果より、真砂土では、イネの栽培期間を通して、土壌からのN無機化がほとんどないことから、真砂土を用いたイネ栽培では、イネにおける土壌由来のN吸収量を0とすることができ、イネにおける吸収N量の由来別内訳を調査するのに、適した土壌である

ことが明らかになった。

(2) 水田土壌における生物的窒素固定の発現の評価

(2)-1 水田土壌を用いてイネを栽培した場合のBNFの発現程度の解析

第2図に、イネ4品種における日本晴、カサラス、C5444および台中65号の生育時期別エチレン生成量の推移を示した。ここで、エチレン生成量の大きさがARAの大きさに相当する。カサラスおよび日本晴では、エチレン生成量について明瞭なピークを認めることができなかったが、C5444および台中65号では、出穂期のころに明瞭なエチレン生成量のピークが認められた。また、BNFが小さいとされる台中65号において大きいピークが得られたことから、ARAをBNFの指標として用いるには難しいことが考えられた。



第2図 日本晴、カサラス、C5444および台中65号の生育時期別エチレン生成量の推移

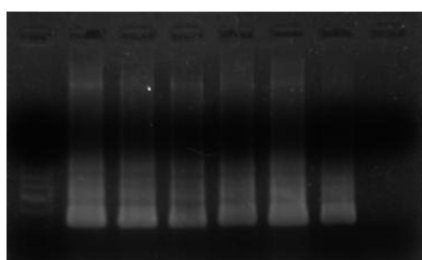
第2表に、イネ収穫後における乾物重、N保有量およびその由来別内訳について示した。いずれの処理区においても、200[mg]のNを施用したにもかかわらず、111.35~114.07[mg]のNが回収され、残りはポット外に流出していることが明らかになった。また、水田土壌では土壌に含まれるNが施用N量と比較して極端に大きく、イネが吸収した全N量のうち、施肥外由来吸収N量が大きくなり、結果としてBNFによる吸収N量を推定することができなかった。

第2表 イネ収穫後におけるN保有量とその由来別内訳

		乾物重(g)	N保有量(mg)		
			全N	施肥N	施肥外N
T65	Plant	22.99	235.05	81.55	153.49
	Soil	2,800.00	3,825.73	30.95	3,795.78
	Total			112.50	
C5444	Plant	30.72	270.70	89.46	181.24
	Soil	2,800.00	3,455.97	24.55	3,432.42
	Total			114.01	
日本晴	Plant	19.19	234.18	84.99	149.19
	Soil	2,800.00	3,769.28	26.61	3,742.67
	Total			111.59	
カサラス	Plant	26.41	265.04	89.19	176.84
	Soil	2,800.00	3,941.96	22.16	3,919.80
	Total			111.35	
無栽植		2,800.00	3,844.58	114.07	3,730.51

(2)-2 イネ栽培後土壌より抽出したDNAを鋳型としたPCR

栽培前土壌および栽培後土壌のすべてにおいて、土壌DNAを抽出することができた。これらDNAを鋳型としてPCRを行ったところ、すべてにおいてAzospirillumおよびHerbaspirillumの16SリボゾームDNA領域の増幅断片とみられるDNAバンドが確認された。第3図にPCRの結果を例示した。本実験で対象とした土壌微生物は、AzospirillumおよびHerbaspirillumの2種であったが、水田土壌に存在する土壌微生物は極めて多様であることから、他の土壌微生物についても調査を行う必要がある。現在、16SリボゾームDNAの領域に着目して、プライマーセットの作成を試みている。



第3図 Azospirillumの16SリボゾームDNA領域の増幅結果

(3) C5444 × 台中65号の交雑F₂集団における生物的窒素固定の発現

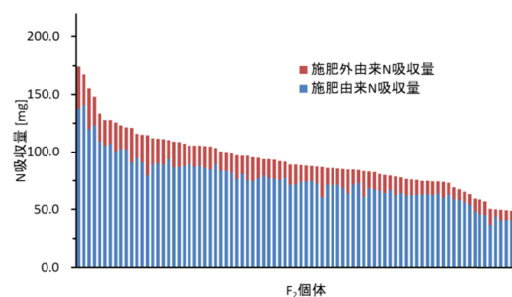
(3)-1 重窒素で標識された硫酸を施肥窒素に用いて栽培した場合のBNFの評価

105粒について、交雑F₂個体として播種を行ったものの、正常に出芽した個体は84であった。そこで、正常な出芽が認められた84個体について調査を行った。

C5444は長粒種であり、脱粒性を示し、ふ先着色を伴わない。一方、台中65号は短粒種であって、非脱粒性を示し、アントシアンによるふ先着色を有する。可視的形質表現として、これら3形質が、C5444 × 台中65号の交雑F₂集団において分離が認められた。粒型については、長粒:中粒:短粒が25:43:16となり、1遺伝子分離の理論比1:2:1に適合していた。脱粒性については、脱粒:非脱粒が53:31、ふ先着色については着色個体:非着色個体が70:14にそれぞれ分離した。これらはいずれも1遺伝子分離の理論比3:1とみなすことができた。しかしながら、これら3形質の間には連鎖関係が認められず、いずれも独立であることが明らかになった(データ省略)。また、これら3形質とBNFとの連鎖関係を調査するために、BNFの指標として施肥外由来N吸収量を用いて評価したところ、いずれの形質とも連鎖関係が認められなかった(データ省略)。

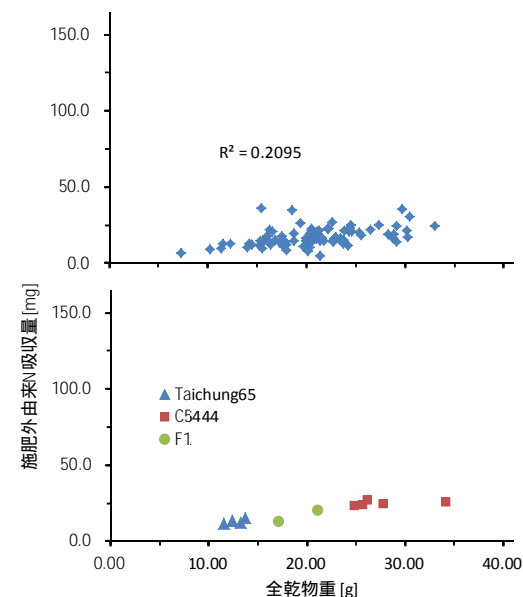
真砂土を用いたイネ栽培系において、土壌由来Nのイネによる吸収を無視することがで

きる。そこで、15N含有率の変化から、イネの全N吸収量のうち施肥N由来吸収N量を推定し、全N吸収量から除することで、BNFによるN吸収量を推定した。第4図は、F₂個体における全N吸収量とその由来別内訳を示したものである。



第4図 交雑F₂集団における全N吸収量とその由来別内訳

交雑F₂集団における全N吸収量とBNF由来N吸収量との関係について、第5図に示した。なお、図には交雑親である台中65号、C5444およびそれらの交雑F₁の値も併せて示した。全N吸収量とBNF由来N吸収量の間には、有意な相関関係が認められず、また、全乾物重とBNF由来N吸収量の間においても、有意な相関関係が認められなかった。



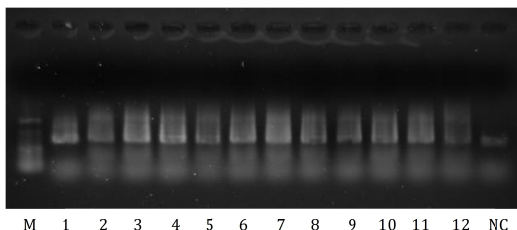
第5図 交雑F₂集団における全乾物重と施肥外由来N吸収量との関係

しかしながら、BNFが高いとされるC5444を超越すると考えられるF₂個体が出現しており、BNFが遺伝的制御可能な形質であることが示唆された。

(3)-2 イネ栽培後土壌より抽出したDNAを鋳型としたPCR

Azospirillumのプライマー対を用いたPCRでは、栽培前土壌から抽出したDNAを鋳型としたときには増幅が見られなかったものの、

栽培後土壌ではすべての F₂ 個体の栽培後土壌からの DNA において、増幅が認められた。一方、Herbaspirillum のプライマー対を用いた PCR では、Azospirillum の場合と同様に栽培前土壌では増幅が認められず、また 84 の F₂ 個体中、4 つの個体で増幅が認められなかったものの、残りの 80 個体の栽培後土壌では断片の増幅が認められた。第 6 図は、Herbaspirillum の 16S リボゾーム DNA 領域を増幅した場合の結果である。しかしながら、BNF の高低と増幅断片の有無との間には明瞭な関係性が認められなかった。栽培前土壌では、いずれの土壌微生物もその存在を確認することができなかったが、栽培後土壌からはその存在を確認することができた。真砂土には、含まれる土壌有機物が極めて少ないことから、稗生まれる土壌微生物も極端に少ないことが考えられる。栽培を行ったイネの種子については、殺菌剤および殺虫剤を用いて種子消毒処理を行ったが、これら薬剤の土壌微生物（籾殻などに付着したものなど）に対する効果は今のところ不明である。イネ栽培を通して、Azospirillum および Herbaspirillum が土壌中に侵入した経路等について、調査する必要があるかもしれない。



第 6 図 Herbaspirillum の 16S リボゾーム DNA 領域の増幅結果

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 1 件)

井上 博茂 他、イネ交雑後代における生物的窒素固定の発現、日本作物学会第 237 回講演会、2014 年 3 月 30 日、千葉大学総合校舎(千葉県・松戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 博茂 (INOUE, Hiromo)
京都大学・農学研究科・講師
研究者番号：40260616

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者