

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05755

研究課題名（和文）イネのビウレット傷害発生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Clarification of the mechanism of biuret injury in rice plants

研究代表者

落合 久美子 (Ochiai, Kumiko)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：40533302

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ビウレットは尿素二分子が縮合して生じる含窒素化合物であり、過剰に存在すれば作物の生育を阻害する。本研究ではイネのビウレット傷害発生機構について検討し、植物体内にビウレットが比較的高い濃度で蓄積することが傷害の原因であることを明らかにした。また、イネ懸濁培養細胞を用いた検討により、ビウレットを与えた場合に発現量が変動する遺伝子や蓄積量が変化する代謝産物を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過剰のビウレットが作物を傷害することは古くから知られていたが、その機構は未だ明らかでない。本研究では、ビウレットによるダメージを受けたイネの代謝変化の一端を示した。尿素肥料の製造過程においてビウレットは低濃度ではあるが必ず生成するので、本研究の成果を踏まえてさらに、ビウレットの作用点を明らかにしていくことは、潜在的なビウレット傷害の回避に有効である。

研究成果の概要（英文）：Biuret is a nitrogen-containing compound produced by the condensation of two urea molecules, and in excess, it inhibits the growth of crops. In this study, we investigated the mechanism of biuret injury in rice plants. We found that the accumulation of biuret in relatively high concentrations in the plant is the cause of the injury. In addition, by using rice suspension-cultured cells, we identified genes whose expression levels change and metabolites whose accumulation changes when cells are exposed to biuret.

研究分野：植物栄養学

キーワード：ビウレット イネ 尿素肥料 アラントイン 緩効性肥料

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 尿素窒素肥料には一般的な不純物として低濃度のビウレット[(CONH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH]が含まれている。肥料中のビウレットは造粒工程での加熱により、尿素二分子が縮合して生じる。過剰のビウレットは作物に生育の低下やクロロシスを発生させるので、肥料取締法には尿素肥料中のビウレット性窒素量を窒素全量の2%以下とする上限が定められている。

(2) ビウレットを与えた葉や芽生えで、タンパク質合成が阻害されることが報告されている。しかし、ビウレットによる傷害発生の詳細な機構は未だ明らかにされていない。その解明は潜在的なビウレット傷害発生の回避に有効であると考えた。

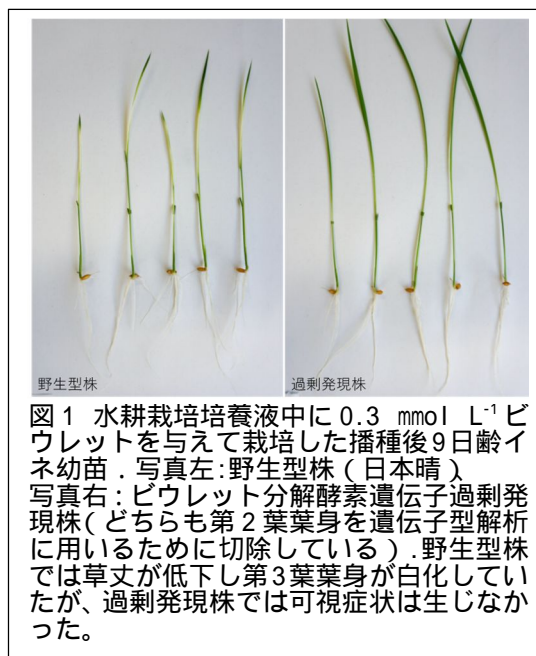
(3) ビウレットの動物に対する毒性は知られていない。

(4) 土壌に与えた場合、ビウレットは微生物による分解を受け、最終的にビウレット1分子から2分子の二酸化炭素と3分子のアンモニウムイオンを生じる。反応は2段階で進行し、1段階目の反応では、ビウレットからアロファン酸とアンモニウムイオンが生成する。この反応はビウレット加水分解酵素に触媒される。次にアロファン酸がアロファン酸加水分解酵素によって炭酸水素イオンとアンモニウムイオンに分解される。あるいは中性から酸性のpH環境において、アロファン酸は自発的な脱炭酸により分解される。

(5) 土壌中でのビウレットの分解速度は尿素と比較して比較的緩やかである。また、ビウレットの窒素含有率は40%と高い。作物にビウレット耐性を付与して傷害を回避すれば、ビウレットを抑草効果をもつ機能性窒素肥料として利用できるのではないかと考えた。

(6) 土壌微生物がもつビウレット分解酵素遺伝子のホモログは植物には存在しない。我々は土壌微生物由来のビウレット加水分解酵素遺伝子を改変 35S プロモーター制御下で過剰発現する形質転換イネを作成した。ビウレット分解酵素過剰発現イネは野生型イネに比べてビウレットに耐性であった(図1)。このことから、植物体内にビウレットが蓄積することが傷害発生の原因であると推察した。

(7) ビウレットの作用点は先述した通り明らかにされていない。その解明を進めるにあたり我々は、植物体内に蓄積したビウレットが植物体内に存在する類似した構造をもつ化合物(ウレイド化合物)の代謝を阻害するのではないかと仮定した。



### 2. 研究の目的

本研究は、イネのビウレット傷害発生機構の解明、及び、ビウレットを機能性窒素肥料として利用することが可能であるかを検討することを目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) イネ幼苗のビウレット吸収量、蓄積量を検討した。検討には野生型イネ(日本晴)とビウレット分解酵素遺伝子過剰発現イネを用いた。<sup>15</sup>N 標識ビウレットを19日齢イネ幼苗の水耕栽培培養液に与えて48時間吸収させ、植物体の窒素含有率及び窒素安定同位体比を測定して、ビウレット吸収速度を算出した。また、ビウレットを与えて栽培したイネの地上部と根のビウレット含有率を定量した。ビウレットは親水性相互作用(HILIC) HPLC カラムを用いて分離し、紫外吸収により検出した。

(2) ウレイド化合物の一つとしてアラントイン(C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>)に着目した。アラントインはプリン塩基分解経路上の中間代謝産物である。分子内に窒素原子を4つ含み、マメ科植物では根から地上部へと長距離輸送される窒素の主要な形態の一つである。また、多くの植物種においてストレス下で蓄積することが示されている。まず、ビウレットを与えたイネ幼苗のアラントイン含有率を測定した。次に、イネ葉粗酵素抽出液を用い、ビウレットによるアラントイン分解酵素活性の阻害について検討した。さらに、アラントインの合成、分解に関わる遺伝子のビウレット処理による発現量変化をリアルタイムPCR法で測定した。

(3) イネ懸濁培養細胞を用い、ビウレットを与えた場合の遺伝子発現量変化、代謝物蓄積量変化を網羅的に解析した。検討に用いた培養細胞(0c株)は理化学研究所バイオリソース研究センターから分与頂いた。培地へのビウレット添加濃度は0または0.3 mmol L<sup>-1</sup>とし、移植後3日目と5日目に収穫した細胞を試料とした。

(4) ビウレットの肥料としての効果を検討した。野生型イネとビウレット加水分解酵素遺伝子過

剰発現イネに、10 アールあたり 6kg の窒素を全量尿素または尿素とビウレット半量ずつで与えて、1/5000a ワグネルポットで栽培した。種子はポットに直播し、登熟まで栽培した。

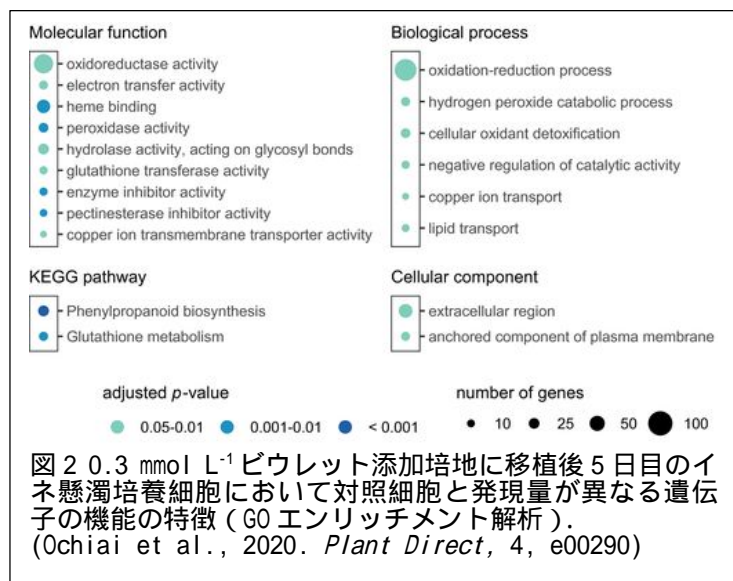
#### 4. 研究成果

(1)  $^{15}\text{N}$  標識ビウレットを用いた検討から、野生型イネに  $0.3\text{mmol L}^{-1}$  のビウレットを与えると、48 時間で地上部に  $13.5\ \mu\text{mol/g DW}$ 、根に  $5.8\ \mu\text{mol/g DW}$  のビウレット由来窒素が移行することが示された。この結果から、根に与えたビウレットはイネ根に吸収され地上部に移行して蓄積することが示唆された。ビウレット分解酵素遺伝子過剰発現イネ地上部へのビウレット由来窒素の移行量は野生型イネに比べて 3~6 倍大きい値を示した。

(2) イネ植物試料中のビウレットの直接定量のための HPLC 条件を検討し、HILIC カラムを用いることで測定を可能にした。 $0.3\text{mmol L}^{-1}$  ビウレットを与えた播種後 7 日齢の野生型イネでは、地上部に約  $10\ \mu\text{mol/g DW}$ 、根に約  $2\ \mu\text{mol/g DW}$  のビウレットが蓄積していた。一方、ビウレット分解酵素過剰発現イネにはビウレットは検出されなかった。以上の結果から、ビウレットが比較的高い濃度で蓄積することが傷害発生の原因であることを示した。

(3) 培養液に  $0.3\text{mmol L}^{-1}$  のビウレットを与えて栽培したイネ幼苗地上部のアラントイン含有率は対照植物に比べて有意に増加していた。イネ葉粗酵素抽出液を用いた試験において、反応液へのビウレットの添加はアラントインを基質とするアラントイン酸生成活性を低下させなかった。ビウレットはアラントイン分解酵素(アラントイナーゼ)を直接阻害するのではないと判断した。

(4) アラントイナーゼ遺伝子の発現量は、 $0.3\ \text{mmol L}^{-1}$  ビウレットを与えて栽培したイネ幼苗の地上部で対照植物に比べて抑制される場合もあったが、差がない場合もあった。アラントイン合成に関わる遺伝子の発現量は基本的には培地へのビウレット添加の有無によって変動しなかった。以上の結果から、プリン塩基分解量の増加、または、アラントインの植物体内での輸送の変化がビウレットを与えたイネ幼苗地上部で見られたアラントイン蓄積をもたらすことが示唆された。



(5) マイクロアレイを用いたイネ懸濁培養細胞の遺伝子発現変化の網羅的解析により、ビウレット処理区 ( $0.3\ \text{mmol L}^{-1}$ , 移植後 5 日目) の細胞では対照細胞に比べ 736 遺伝子の発現量が有意に増加、230 遺伝子の発現量が低下することが示された。GO エンリッチメント解析により、発現が変動した遺伝子には酸化還元に関わるものが多いことを明らかにした (図 2)。

(6) イネ懸濁培養細胞を用いたメタボローム解析においては、イネ幼苗で蓄積がみられたアラントインのピークはビウレット処理区対照区のいずれにおいても検出されなかった。処理間で有意な変動が見られた

ピークは 38 あり、ビウレット処理区の細胞で *S*-アデノシルホモシステイン (SAH) が顕著に増加することが示された。SAH は、*S*-アデノシルメチオニンをメチル基供与体とするメチル化反応の副産物であり、メチル化反応を競合的に阻害しうる化合物である。

(7) メタボローム解析の結果からはまた、非タンパク質構成アミノ酸であるシトルリン ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ ) の含有率がビウレット処理区の細胞で有意に増加することが示された。シトルリンは分子内に窒素原子を 3 つ含む。イネ幼苗でみられたアラントイン含有率の増加と合わせ、ビウレットにより生育が低下する条件では、窒素を高含有する化合物が増加することが示唆された。

(8) 土耕ポット栽培試験において、窒素の半量をビウレットとして与えた場合、野生型イネ幼苗にクロロシスが生じた。また、野生型イネでは栄養成長期には尿素肥料を与えた対照区に比べて草丈が低下し、栽培期間を通じ対照区よりも分けつ数が少なかった。ビウレット分解酵素遺伝子過剰発現イネでは、このような傷害は見られなかった。野生型イネ、ビウレット分解酵素遺伝子過剰発現イネ共に、モミ収量には対照区とビウレット区で有意差はなかった。また、登熟後に測定した植物体の窒素含有量に処理間で差はなかった。長期的にはビウレットに由来する窒素は尿素に由来する窒素と同程度イネに吸収されることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ochiai Kumiko, Uesugi Asuka, Masuda Yuki, Nishii Megumi, Match Toru	4. 巻 4
2. 論文標題 Overexpression of exogenous biuret hydrolase in rice plants confers tolerance to biuret toxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pld3.290	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村洋介・落合久美子・間藤徹
2. 発表標題 イネのビウレット傷害発生機構の検討（2）
3. 学会等名 2020年度（第116回）日本土壌肥料学会関西支部講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村洋介・上杉明日香・落合久美子・間藤徹
2. 発表標題 イネのビウレット傷害発生機構の検討
3. 学会等名 2019年度（第115回）日本土壌肥料学会関西支部講演会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------