

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02890

研究課題名（和文）窒素固定増強遺伝子によるマメ科作物の低炭素投入型への転換

研究課題名（英文）Conversion of legume crops to low carbon input lines using nitrogen fixation enhancing genes

研究代表者

鈴木 章弘（Suzuki, Akihiro）

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：50305108

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、窒素固定増強型SEN1遺伝子を導入したフクユタカ（エンレイ型）と従来のSEN1遺伝子を持つ系統（ペキン型）を用いて、エンレイ型による窒素肥料削減効果の検証、エンレイ型の子実生産へ与える影響、SEN1タンパク質の機能解析の3つの中課題を遂行した。その結果、ではエンレイ型の場合は窒素肥料を半分に減じてもペキン型と同等の生長を見せることが判明した。では、窒素固定増強型SEN1の場合には、貧栄養状態においてペキン型よりも収量が増加する傾向があることを示した。では、エンレイ型の根粒内鉄濃度が高かったことから、SEN1タンパク質は鉄の輸送に関与している可能性を支持した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイズにおける窒素固定増強遺伝子を同定し、それを日本で最も栽培面積の大きな品種（フクユタカ）に導入し、その性状解析を行った点は、学術的に大きな意義がある。また得られた結果は、ダイズ栽培においてこの遺伝子を用いれば、窒素肥料の半分程度までの低減を達成できる可能性を示すものであり、肥料価格が高騰している現代社会において非常に大きなインパクトのある成果だと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this research, we used a FUKUYUTAKA SEN1 line (Enrei type) and a conventional line with the SEN1 gene (Peking type), and conducted three research projects: (1) verification of the effect of the Enrei type on nitrogen fertilizer reduction, (2) the effect of the Enrei type on seed yield, and (3) functional analysis of the SEN1 protein. As a result, it was found that (1) the Enrei type showed the same growth as the Peking type even when nitrogen fertilizer was reduced to half. In case (2), the nitrogen fixation enhanced SEN1 showed a tendency to increase yield more than the Peking type in nitrogen poor condition. In (3), the higher concentration of iron in the nodules of the Enrei type supported the possibility that the SEN1 protein is involved in iron transport.

研究分野：作物生理学

キーワード：根粒菌 窒素固定 ダイズ 収量 遺伝子 共生

## 1. 研究開始当初の背景

現在の作物生産では大量の窒素肥料が圃場へ投入されており、必要とするアンモニアはハーバー・ボッシュ法によって生産されるため大量のCO<sub>2</sub>が排出されている。このような背景のもと筆者らは、根粒菌による生物的窒素固定を飛躍的に増強させ、窒素肥料の使用(製造)を大幅に削減することを目標として研究を推進してきた。

根粒菌との共生窒素固定に必須の遺伝子であるマメ科植物の *SEN1* (引用文献) は、ミヤコグサおよびダイズにおいて多型が検出されており、ミヤコグサのMG20型とダイズのエンレイ型を持つ植物では窒素固定活性が有意に高くなり、種子重も増加する。そしてこれらの結果は、マメ科作物栽培において上記の共生窒素固定増強遺伝子を利用することにより、窒素肥料の投与量を削減できる可能性を示している。*SEN1* に関して、申請者らは申請段階で以下の知見を得ていた。

- ・ミヤコグサの *SEN1* 遺伝子は第4染色体上に存在し、その領域には図1に示すように窒素固定(ARA)や種子重(SM)に関するQTL(量的形質遺伝子座)も存在する。
- ・ミヤコグサのB129とMG20間では、*SEN1* 遺伝子の塩基配列が異なる。
- ・ダイズの *SEN1* 遺伝子では、調査した38品種のうちエンレイでのみ塩基配列が異なっている。
- ・ダイズの *SEN1* 遺伝子が座乗する領域にも、種子重に関するQTLが存在する。
- ・窒素固定活性や種子重のQTLを与えている

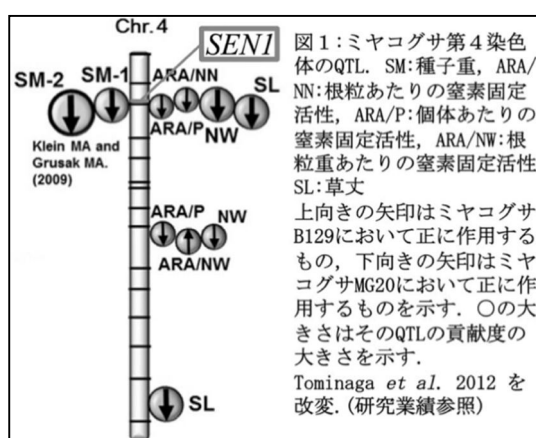


図1: ミヤコグサ第4染色体のQTL. SM: 種子重, ARA/NN: 根粒あたりの窒素固定活性, ARA/P: 個体あたりの窒素固定活性, ARA/NW: 根粒重あたりの窒素固定活性, SL: 草丈  
 上向きの矢印はミヤコグサB129において正に作用するもの、下向きの矢印はミヤコグサMG20において正に作用するものを示す。○の大きさはそのQTLの貢献度の大きさを示す。  
 Tominaga *et al.* 2012 を改変。(研究業績参照)

- 遺伝子が *SEN1* であるという作業仮説を証明するために、窒素固定活性に関して正に作用するミヤコグサのMG20型 *SEN1* をB129へ、同じくダイズのエンレイ型 *SEN1* を日本で最も多く栽培されているフクユタカ (Peking型: エンレイ型以外の総称) へ交配によって導入し準同質遺伝子系統 (NIL: near isogenic line) を作出した。その結果、予想通り根粒菌接種28日後のそれらの窒素固定活性は対照区よりも有意に高くなる傾向にあった。
- ・交配によって作出したMG20型を持つNIL及びエンレイ型 *SEN1* をもつNIL (以下、フクユタカ *SEN1* とする) の種子重は対照区と比較して重い傾向にあった。

これらの予備的データは、エンレイ型 *SEN1* のような共生窒素固定増強遺伝子を導入することによって生産性が向上するだけでなく、作物へ与える窒素肥料の削減を可能とし、ひいてはCO<sub>2</sub>の排出削減に貢献できることを強く示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ダイズの窒素固定増強遺伝子による窒素肥料削減効果の検証、ダイズの窒素固定増強遺伝子の子実生産へ与える影響、*SEN1* タンパク質の機能解析の3つの中課題を遂行し、窒素固定活性増強のメカニズムを理解するとともに、低炭素投入型農業が実現可能であるか否かを明らかにすることとした。

## 3. 研究の方法

### ダイズの窒素固定増強遺伝子による窒素肥料削減効果の検証

一般的なダイズ栽培では、10あたり6kg程度の窒素を投入しているため、本中課題では、そこからどれだけ窒素量を低減できるか具体的には0kg, 3kg, 6kgの窒素量でダイズの生長がどのような影響を受けるか調査した。材料に用いたNILはBC<sub>5</sub>F<sub>3</sub>またはその子孫であり、エ

ンレイ型は窒素固定増強遺伝子(エンレイ型 *SEN1*)を持つ系統であり,ペキン型は,それを持たない(通常の *SEN1* を持つ)系統のことである。

### ダイズの窒素固定増強遺伝子の子実生産へ与える影響

一般的なダイズ栽培では,10 あたり 6 kg 程度の窒素を投入しているため,本中課題では,2022 年度は 10 あたり 6 kg 又は土壌窒素のみ,2023 年度は 10 あたり 3 kg 又は土壌窒素のみの条件で,佐賀大学及び静岡大学において栽培試験を行った。

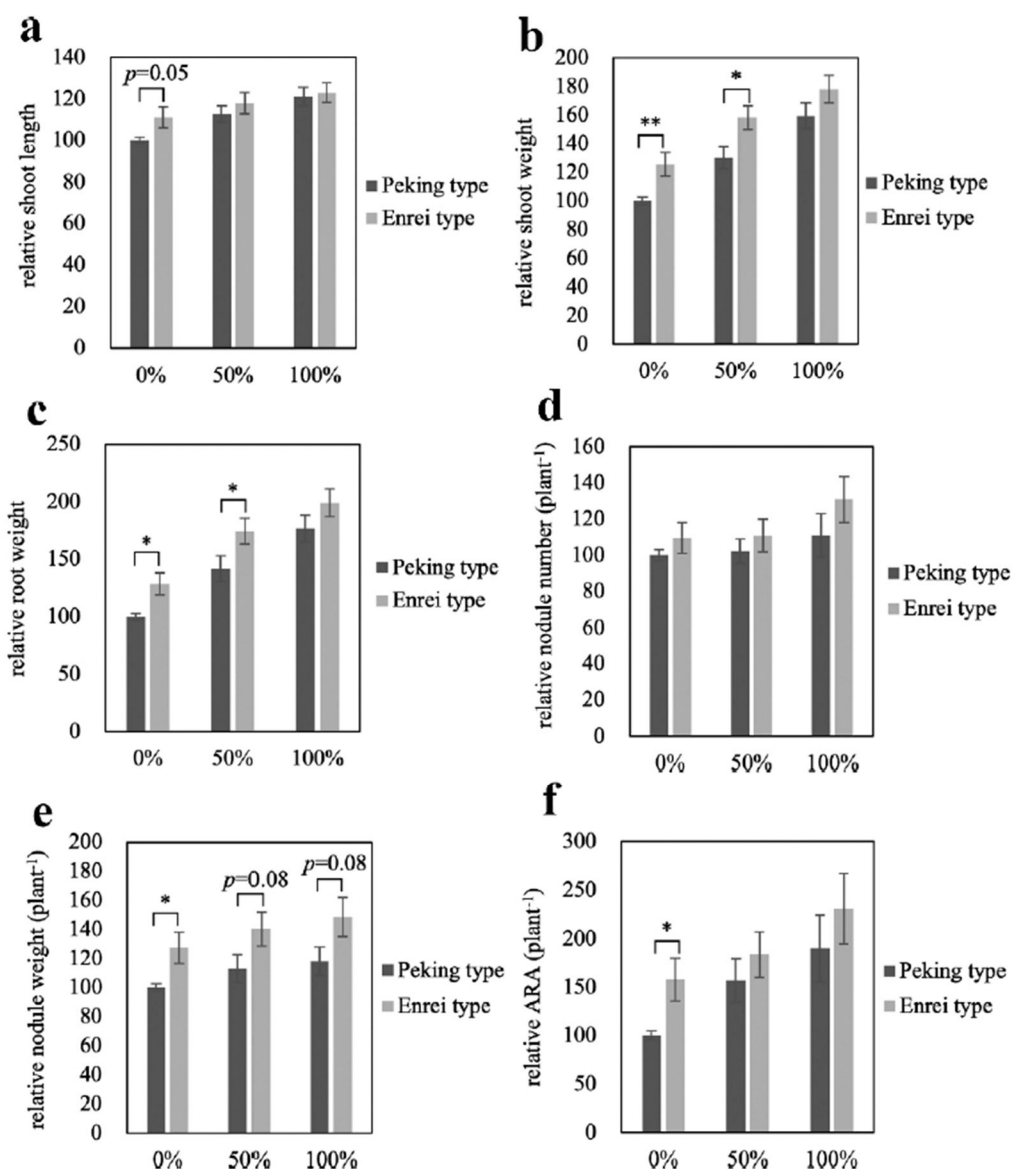
### SEN1 タンパク質の機能解析

ダイズ *SEN1* (*GmVTL1a*) について他の研究グループが機能解析を先行して行っており(引用文献),それによれば,このタンパク質は膜局在性の鉄輸送タンパク質であるとされている。そこでエンレイ型及びペキン型の根粒における鉄含量を蛍光 X 線分析によって評価した。

## 4. 研究成果

### ダイズの窒素固定増強遺伝子による窒素肥料削減効果の検証

本中課題では,10 あたり 6 kg の窒素 (8.57 mM  $\text{KNO}_3$ ) を 100%とした場合に 0 kg (0%), 3 kg (50%), 6 kg の窒素量でダイズの生長がどのような影響を受けるか調査した。図 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g に根粒菌接種 28 日後の窒素 0%のペキン型の値を 100 とした時の,相対主茎長,相対地上部重,相対地下部重,相対根粒数,相対根粒重,個体あたりの相対アセチレン還元活性,根粒重当たりの相対アセチレン還元活性をそれぞれ示す。0%に注目した場合,植



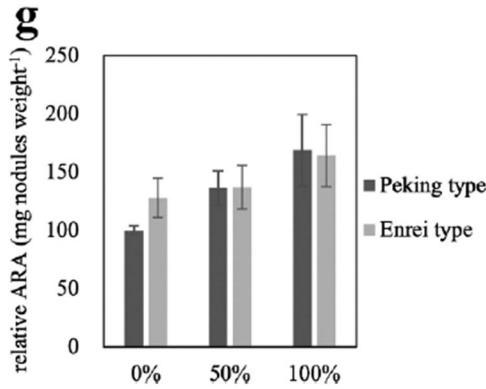


図2 : Relative growth of NILs at 28 days after inoculation with *B. diazoefficiens* with KNO<sub>3</sub>. Each graph is expressed as a relative value when the value of Peking type of 0% is 100. Relative shoot length (a), relative shoot weight (b), relative root weight (c), relative nodule number (d), relative nodule weight (e), relative ARA per plant (f), and relative ARA per nodule weight (g). 0% of Peking type and Enrei type; n = 10, 10. 50% of Peking type and Enrei type; n = 10, 10. 100% of Peking type and Enrei type; n = 9, 9, respectively. Error bars represent standard error (SE). \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01 by Student's *t*-test.

物体の生長や根粒の生長，窒素固定活性（アセチレン還元活性）の値はエンレイ型で有意に高い，又は高い傾向にあった。窒素量が 50%の時は地上部及び地下部の生長は有意に促進され，他のパラメーターはエンレイ型の時に値が高い傾向にあった。100%の時は根粒重当たりの窒素固定活性は差が無く，他の項目はエンレイ型で高い傾向にあったが有意差は検出されなかった。また地上部重及び地下部重に注目すると，いずれも 50%のエンレイ型と 100%のペキン型の値がほぼ同程度になっていた。これらの結果は，エンレイ型に与える窒素量を半分に減じても，従来の系統（ペキン型）と同程度の成長を示すことを意味しており，窒素固定増強遺伝子を利用することによって圃場栽培における窒素肥料を半分にまで減らすことができる可能性を示している。

### ダイズの窒素固定増強遺伝子の子実生産へ与える影響

一般的なダイズ栽培では，10 あたり 6 kg 程度の窒素を投入しているため，本中課題では，2022 年度は 10 あたり 6 kg 又は土壌窒素のみ，2023 年度は 10 あたり 3 kg 又は土壌窒素のみの条件で，佐賀大学及び静岡大学において栽培試験を行った。表1に見られるように，

year	place	planting density	nitrogen content	line	shoot length (cm)	number of seedlings pods (/plant)	number of seed (/plant)	yield (kg/a)	percentage to Fukuyutaka (%)
2022	Saga Univ.	14.29 plants/m <sup>2</sup>	6.0 kg/10a (100%)	Fukuyutaka	53.58	44.89	59.64 a	22.31 a	100.00
				Peking type	52.50	46.39	49.20 b	17.97 b	80.55
				Enrei type	52.67	47.62	59.07 a	21.85 a	97.95
	Shizuoka Univ.	8.33 plants/m <sup>2</sup>	0.4 kg/10a (7%)	Fukuyutaka	44.65 b	45.52 b	46.91 b	17.72 b	100.00
				Peking type	46.87 a	48.72 a	49.35 b	18.39 b	103.80
				Enrei type	47.07 a	48.67 ab	54.75 a	20.26 a	114.34
2023	Saga Univ.	21.43 plants/m <sup>2</sup>	3.0 kg/10a (50%)	Fukuyutaka	49.64	53.83	51.81 b	29.78 b	100.00
				Peking type	48.57	57.51	51.79 b	30.15 ab	101.22
				Enrei type	48.57	56.57	61.03 a	35.64 a	119.65
	Shizuoka Univ.	8.33 plants/m <sup>2</sup>	1.4 kg/10a (23%)	Fukuyutaka	55.39	52.72 ab	61.45	35.87	100.00
				Peking type	54.42	55.11 a	62.20	35.14	97.98
				Enrei type	54.10	47.88 b	62.20	35.15	98.00
Shizuoka Univ.	8.33 plants/m <sup>2</sup>	1.4 kg/10a (23%)	Fukuyutaka	54.75 b	82.70 b	53.53 b	12.10 a	100.00	
			Peking type	52.10 b	86.80 ab	38.70 c	9.23 b	76.33	
			Enrei type	58.47 a	98.80 a	65.07 a	14.20 a	117.41	

表1: 窒素固定増強遺伝子を導入したダイズの栽培試験結果

2022 年度は佐賀大学において窒素量 6.0 kg/10 または 0.4 kg/10 ，静岡大学において

1.3 kg/10 , 2023 年度は佐賀大学において窒素量 3.0 kg/10 または 1.4 kg/10 , 静岡大学において 1.4 kg/10 の条件で栽培試験を行った。

いずれの条件でも、ペキン型と比較してエンレイ型の方が収量が多くなる傾向にあった。またオリジナル品種のフクユタカとエンレイ型を比較した場合は、2022 年は窒素が十分な条件では両者に有意差はなかったが、貧栄養な条件では佐賀大でも静岡大でもエンレイ型の方が収量が高い傾向になった。2023 年度は、佐賀大における窒素が 1.4 kg (貧栄養) の場合はエンレイとフクユタカ間に差は見られなかったが、3 kg の佐賀大と静岡大ではエンレイ型が、ペキン型及びフクユタカのいずれよりも収量の値が多くなるきらいがあった。これらの結果は、*SEN1* 遺伝子が窒素固定増強型 (エンレイ型) の場合に子実の収量が多くなる可能性を示唆している。ただ、オリジナル品種のフクユタカと比較した場合は必ずしもそうになっていないことから、*SEN1* 遺伝子以外のゲノム領域の関与についても調査を行う必要がある。

#### SEN1 タンパク質の機能解析

ダイズ *SEN1* (GmVTL1a) について他の研究グループが機能解析を先行して行っており、それによれば、このタンパク質は膜局在性の鉄輸送タンパク質であると報告されている。そこでこの中課題ではエンレイ型及びペキン型の根粒における鉄含量を蛍光 X 線分析によって評価した。根粒サンプルは乾燥させた後、万力で平らにして測定に供した。その結果図3に見られるように、根粒の単位重さ当たりの蛍光 X 線強度は、ペキン型と比較してエンレイ型が有意に高い値を示した。この結果は、窒素固定増強遺伝子 (エンレイ型) を持つ系統の方が根粒内の鉄濃度が高くなっていることを示しており、*SEN1* タンパク質が根粒内への鉄の輸送に関与している可能性を支持した。

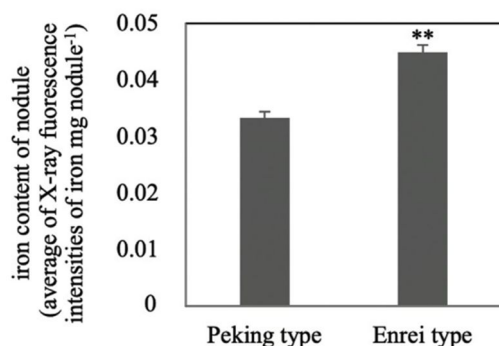


図3 : The relative iron content of nodule formed in roots of Peking type and Enrei type. Peking type and Enrei type;  $n = 30$ . Bars represent standard error (SE). \*\* $p < 0.01$  by Student's  $t$ -test.

本研究では、窒素固定に必須である *SEN1* 遺伝子について、ダイズではエンレイ型を持つ場合にペキン型よりも窒素固定活性が増強され、植物体の生長も促進されることを示した。その際、従来の栽培条件 (8.57 mM  $\text{KNO}_3$ ) の半分まで窒素量を減らしても同等の生長を示す可能性が考えられた。また NIL を用いた圃場栽培試験からは、窒素が十分な条件ではエンレイ型の収量が増加するとは限らないが、窒素が不足した条件ではエンレイ型の収量が高くなる可能性が示された。そして今の所 2 年のみの栽培試験の結果であるため、今後もこの栽培試験を継続して行う必要があると考えられた。

#### < 引用文献 >

- ① T. Hakoyama et al., The integral membrane protein *SEN1* is required for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Cell Physiol.* 53: 225-236. (2012)
- ② E. M. Brear et al., GmVTL1a is an iron transporter on the symbiosome membrane of soybean with an important role in nitrogen fixation. *New Phytologist* 228: 667-681. (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Terakado-Tonooka Junko, Tanaka Fukuyo, Karasawa Toshihiko, Suzuki Akihiro, Ohwaki Yoshinari	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of Inoculating the Diazotrophic Endophyte Bradyrhizobium sp. AT1 on Different Cultivars of Sweet Potato ( <i>Ipomoea batatas</i> [L.] Lam.)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Agronomy	6. 最初と最後の頁 963 ~ 963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/agronomy13040963	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 Nishida Yuki, Hiraoka Reona, Kawano Satomi, Suganuma Norio, Sato Shusei, Watanabe Satoshi, Anai Toyooki, Arima Susumu, Tominaga Akiyoshi, Suzuki Akihiro	4. 巻 66
2. 論文標題 <i>SEN1</i> gene from <i>Lotus japonicus</i> MG20 improves nitrogen fixation and plant growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 864 ~ 869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2020.1834829	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 Shimomura Aya, Nishida Yuki, Yamamoto Shion, Suganuma Norio, Watanabe Satoshi, Anai Toyooki, Arima Susumu, Tominaga Akiyoshi, Suzuki Akihiro	4. 巻 27
2. 論文標題 Effect of nitrogen fixation enhancing type <i>SEN1</i> gene on soybean growth	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Production Science	6. 最初と最後の頁 137 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1343943X.2024.2326643	査読の有無 無
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 6件）

1. 発表者名 Akihiro Suzuki
2. 発表標題 Effect of nitrogen fixation enhancing gene on soybean growth and yield
3. 学会等名 The 6th Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation (6th APMNF) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 下村彩, 西田雄輝, 山本土温, 菅沼教生, 渡邊啓史, 穴井豊昭, 有馬進, 富永晃好, 鈴木章弘
2. 発表標題 ダイズ窒素固定増強遺伝子の生育および収量への効果
3. 学会等名 日本作物学会講演会(国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木章弘
2. 発表標題 窒素固定増強遺伝子を導入したダイズの表現型
3. 学会等名 動物植物生態九州支部三学会合同佐賀大会2022(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下村彩
2. 発表標題 窒素固定増強ダイズ品種の作出
3. 学会等名 第255回日本作物学会講演会(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木章弘
2. 発表標題 窒素固定増強遺伝子を導入したフクユタカの優位性
3. 学会等名 日本作物学会第253回講演会(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田雄輝
2. 発表標題 窒素固定増強遺伝子を導入したフクユタカの性状解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会（国際学会）
4. 発表年 2021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	渡邊 啓史 (Watanabe Satoshi) (40425541)	佐賀大学・農学部・准教授  (17201)	
研究分担者	富永 晃好 (Tominaga Akiyoshi) (50776490)	静岡大学・農学部・助教  (13801)	
研究分担者	下村 彩 (Shimomura Aya) (20802771)	佐賀大学・農学部・助教  (17201)	
研究分担者	遠城 道雄 (Onjyo Michio) (60194651)	鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授  (17701)	
研究分担者	穴井 豊昭 (Anai Toyoaki) (70261774)	佐賀大学・農学部・招へい教授  (17201)	



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