

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23248004

研究課題名(和文)作物の窒素利用効率向上メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analyses of the mechanism for improvement of nitrogen use efficiency in crops

研究代表者

大杉 立(Ohsugi, Ryu)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40343107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 26,000,000円、(間接経費) 7,800,000円

研究成果の概要(和文)：窒素の多投入による環境負荷軽減、貧栄養条件下での生産性向上、環境保全型農業の促進などに貢献できる窒素利用効率の高い作物の開発に資するため、窒素の吸収・同化の促進が期待できる真菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)遺伝子を導入したイネおよびバレイショの解析を行った。その結果、GDHイネ、GDHバレイショともに、ソース機能の向上、乾物重の増大、窒素吸収・利用効率の向上などが認められた。効率的に吸収・同化された窒素は光合成速度などのソース機能の向上に結びつき、最終的な乾物重などの増大に貢献したと考えられ、GDH遺伝子の窒素利用効率向上メカニズムの一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the mechanism of high nitrogen use efficiency caused by the introduction of fungal glutamate dehydrogenase(GDH) gene into rice and potato, some physiological and agronomical traits of GDH-introduced rice and potato were investigated. A certain improvement of source function such as photosynthetic rate, growth rate, yield and nitrogen absorption efficiency and/or nitrogen use efficiency were found. These results suggest that nitrogen absorbed in roots might transport into source leaves more effectively, improve source function like photosynthetic rate and result in the increase of dry matter and yield in both GDH rice and GDH potato.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生産環境農学・作物生産科学

キーワード：窒素利用効率 グルタミン酸デヒドロゲナーゼ 遺伝子組換え作物 炭素代謝 窒素代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 増え続ける地球人口を養うためには作物の生産性の向上による食料生産の増大が急務の課題である。これまでの生産性の向上は窒素等の施肥量の増加と相まって達成されてきた。

また近年、水田の有効利用、食料自給率の向上などの観点から水田での飼料用イネの栽培が増大している。飼料用イネ栽培においては生産コスト削減のため一層の収量向上が求められ、食用イネ栽培の3-5倍の窒素が施肥されている。

しかしながら、窒素の多投入は同時に環境汚染(水系への窒素流亡、N<sub>2</sub>O等の温室効果ガスの増大等)を引き起こすため、窒素による環境汚染を軽減する環境保全型農業が望まれている。このため、より低窒素条件で効率よく窒素を吸収して高い生産性を示す品種や栽培技術の開発が求められている。

(2) 私たちは先行研究において、麹菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)遺伝子を導入したイネおよびバレイショ(GDHイネ、GDHバレイショ)の乾物生産特性、窒素吸収・利用特性等を解析してきた。その結果、これらの形質転換作物において、窒素吸収量の増大、成長の促進、収量の増大等が認められた(Planta 232: 299-311(2010))。また予備的ではあるが、吸収窒素当たりの乾物生産量(収量)、すなわち、作物生産において重要な意味を持つ窒素利用効率の向上も認められた。本研究では、これらの形質転換作物を用い、窒素利用効率の向上がどのようなメカニズムによって実現されているかを明らかにしようとするものである。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、GDHイネおよびGDHバレイショを用いて、GDH遺伝子導入がどのようなメカニズムによって窒素利用効率の向上に結びつくかについて、光合成機能解析、メタボローム解析等を行い、今後の窒素施肥の抑制を通じた環境保全型農業の促進、地球規模での食料問題の解決および現在国を挙げて推進している低炭素社会の実現に貢献しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 材料

麹菌由来のGDH遺伝子を導入したイネ(野生型品種ヤマホウシを含めて4系統。また、野生型品種モミロマンを含めて4系統)およびバレイショ(野生型品種メークインを含めて6系統)を用いた。モミロマンは多収性飼料用イネとして近年栽培が盛んになっている品種である。遺伝子導入に際しては、ヤマホウシとメークインでは35Sプロモータを、モミロマンではEF-1プロモータを用いた。

(2) 栽培方法

水耕栽培

グロースチャンパ内で栽培した。水耕液は吉田氏液を用い、標準窒素区(10ppmN)と低窒素区(2.5ppmN)の2段階とした。GDHイネは昼27、夜22、GDHバレイショは昼21、夜17で栽培した。

土耕栽培

GDHバレイショを閉鎖系温室内でポット栽培した。栽培土壌は含有窒素量の少ない土壌にパーライトおよびバーミキュライトを混合したものをを用いた。標準窒素区(5gN/ポット)と低窒素区(1g/ポット)の2段階とし、昼21、夜17で栽培した。

(3) 解析項目

遺伝子発現、メタボローム、酵素活性、光合成機能、収量・窒素利用効率などを解析した。

4. 研究成果

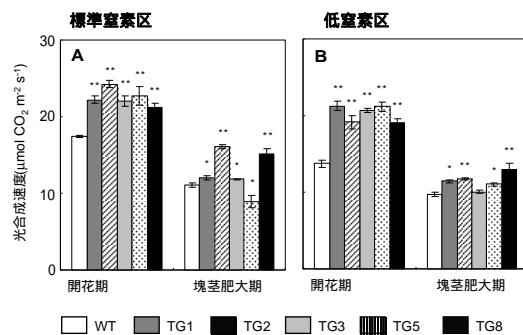
(1) GDHバレイショ複数系統の解析

光合成、バイオマス生産、窒素利用効率および葉、塊茎の代謝産物の解析

GDHバレイショを5系統用い、GDH活性、開花期におけるソース葉の可溶性タンパク質濃度、ソース葉および塊茎の代謝産物等について検討を行なった。

その結果、GDHバレイショ5系統全てにおいて、NADP(H)-GDH活性の有意な上昇が認められ、導入したGDH遺伝子が機能していることが確認された。

開花期および塊茎肥大期において、GDHバレイショでは標準窒素区および低窒素区ともに光合成速度が高くなり、葉の可溶性タンパク質濃度は増加していた(第1図)。



第1図 GDHバレイショにおける開花期と塊茎肥大期における光合成速度

WT;野生型、TG;GDH遺伝子導入バレイショ

塊茎肥大期において、GDHバレイショの塊茎数は増加の傾向が見られ、塊茎乾物重は増加した。塊茎への窒素および炭素の分配はGDHバレイショで増加しており、塊茎乾物重に対する窒素利用効率(塊茎の乾物重/総窒素吸収量)もGDHバレイショで高い傾向が見られた。

塊茎のグルタミン酸およびアスパラギン濃度はGDHバレイショで増加傾向が認められ

た。

#### 徒長茎の解析

これまでの実験から、GDH バレイショは出芽から萌芽までの成長が WT より優れている可能性が示唆されたため、出芽した芽の徒長茎の成長量などを解析した。その結果、地下部（根）の新鮮重と乾物重に有意な増加が見られ、地上部/地下部比は有意に低下した。このことから、GDH バレイショは出芽から萌芽までの根の成長を盛んにすることで、土壌からの栄養吸収能力を向上させ、地上部の成長を促進させていることが示唆された。

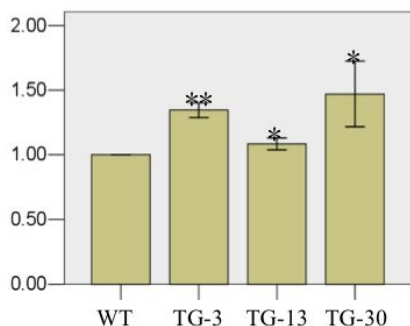
以上のことから、麹菌由来の GDH 遺伝子を導入したバレイショにおいて、ソース機能の向上、塊茎乾物重の増大、塊茎への窒素・炭素分配の向上、窒素利用効率の向上、出芽から萌芽までの成長促進などが認められた。窒素利用効率の向上には、特にソース機能の向上が貢献していると考えられた。

これらの優れた特徴は本研究で初めて明らかにされたものであり、これらの結果から、麹菌由来の GDH 遺伝子は施肥窒素の効率的利用を図ることの出来る作物を開発するために有効な手段の1つであることが明らかになった。

#### (2) GDH イネ

GDH イネ（原品種ヤマハウシ）におけるソース機能解析

既に私たちの先行研究（Planta 232: 299-311(2010)）で導入遺伝子の窒素利用効率向上に関する効果が明らかにされている系統について、ソース葉におけるクロロフィル含量、可溶性タンパク含量および炭酸固定酵素であるルビスコ含量を測定した。その結果、ルビスコ含量は3系統とも有意に高かった。また、クロロフィル含量と可溶性タンパク含量はGDH イネ3系統でいずれも有意ではないが高い傾向を示した。このことから、GDH イネの高い窒素利用効率の一因としてソース機能、特にルビスコ含量の増大が示唆された（第2図）。



第2図 GDH イネ（原品種ヤマハウシ）における出穂期止葉のルビスコ含量（相対値）。WT;野生型、TG;GDH 遺伝子導入イネ

GDH イネ（原品種モミロマン）におけるソース機能、成長、窒素吸収機能等の解析

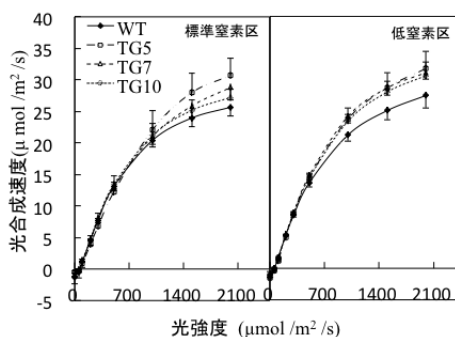
GDH イネ(TG5, TG7, TG10)における導入 GDH 遺伝子の発現量を調べたところ、TG7 と TG10 は十分な発現量があったが、TG5 では発現量が少なかった。

幼植物（5葉期）における乾物重は、標準窒素区、低窒素区ともに TG7 と TG10 では WT に比べて根、茎、葉、全体すべてにおいて有意に高かった。TG5 では、標準窒素区では全て有意に高かったが、低窒素区では茎のみが有意に高かった。

また、窒素含量も標準窒素区、低窒素区ともに TG7 と TG10 では WT に比べて根、茎、葉、全体すべてにおいて有意に高かったが、TG5 は WT と大差なかった。

収穫期における乾物重および窒素含量は標準窒素区、低窒素区ともに TG7 と TG10 では WT に比べて有意に高かったが、TG5 では高い傾向は見られたものの有意ではなかった。

出穂期における止葉の光合成速度は、3系統ともに光強度が一定以上(1000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) で高かった（第3図）。



第3図 GDH イネ（原品種モミロマン）における出穂期止葉の光合成速度。WT;野生型、TG;GDH 遺伝子導入イネ

水耕液中の窒素をどの程度吸収したかで評価した窒素吸収効率は、高窒素区、低窒素区ともに TG7 と TG10 では WT に比べて有意に高かったが、TG5 では大差なかった。

このように、発現量の多かった TG7 と TG10 では調査した項目全てに置いて WT より有意に優れていたが、発現量の少なかった TG5 ではその差は大きくなかった。

このことから、一定の GDH 遺伝子の発現量が確保されれば、飼料用イネであるモミロマンにおいても窒素吸収効率の増大によるソース機能の向上を通じた乾物生産の増大が期待できることが示唆された。

これまでのヤマハウシを原品種として利用した GDH イネに関する解析も含めて、GDH 遺伝子が窒素の吸収・利用の面で有効であることが明らかにできたことは、今後のイネ栽培における窒素の有効利用、環境保全型農業の促進などの観点で意義のある成果と考える。

これらの成果については、現在投稿論文を作成中である。

#### 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 1件)

1. Egami T, Wakayama M, Aoki N, Sasaki H, Kisaka H, Miwa T, Ohsugi R. The effects of introduction of a fungal glutamate dehydrogenase, gene (*gdhA*) on the photosynthetic rates, biomass, carbon and nitrogen contents in transgenic potato. Plant Biotechnology, 2012, 査読有, 29: 57-64

〔その他〕

ホームページ等

<http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/lcs/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

大杉 立 (OHSUGI, Ryu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40343107

##### (2)研究分担者

青木 直大 (AOKI, Naohiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70466811