

二国間交流事業 共同研究報告書

令和5年4月25日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]
鹿児島大学 大学院理工学研究科
[職・氏名]
教授・内海 俊樹
[課題番号]
JPJSBP 120209930

1. 事業名 相手国: スペイン (振興会対応機関: OP) との共同研究

2. 研究課題名

(和文) 一酸化窒素制御機能を活用したダイズ根粒共生系の機能強化

(英文) Improvement of symbiotic nitrogen fixation by modulating nitric oxide formation in soybean nodules3. 共同研究実施期間 2020年4月1日～2023年3月31日 (3年 0ヶ月)【延長前】 2020年4月1日～2022年3月31日 (2年 0ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

Estacion Experimental del Zaidin, Consejo Superior de Investigaciones
Cientificas ・Scientific Researcher ・ Maria Jesus Delgado

5. 委託費総額(返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		2,139,567 円
内訳	1年度目執行経費	1,134,916- 円
	2年度目執行経費	1,004,651- 円
	3年度目執行経費	- 円

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	7名
相手国側参加者等	6名

* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1年度目			()
2年度目			()
3年度目			()

* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

派遣:委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。

受入:相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は委託費で滞在費等を負担した内数。

8. 研究交流の概要・成果等

(1)研究交流概要(全期間を通じた研究交流の目的・実施状況)

気候変動から農作物を保護し、生産性を維持、あるいは、向上させる方策が求められている。本研究の目的は、ダイズを研究材料とし、ダイズの生産性に直接影響を及ぼす根粒の窒素固定活性について、根系の冠水および根粒の老化による窒素固定活性の低下の分子機構を解明し、冠水耐性と老化抑制に貢献することである。そこで、当初の計画では、日本チームは、「クラス1植物ヘモグロビンを高発現するダイズの形質転換毛状根を作出し、冠水耐性付与や根粒の老化の抑制が可能かどうかを検討する。」ことを主とした。一方、スペインチームは、「根粒内部で共生状態にある根粒菌(=バクテロイド)の NifA タンパク質のニトロ化と窒素固定活性の低下との関係を検討し、根粒内の一酸化窒素(NO)発生と根粒菌の脱窒作用との関係も明らかにする。」ことを主として、共同でこれらの課題に取り組むこととしていた。特に、「バクテロイドの NifA タンパク質のニトロ化」については、大学院生の相互派遣により、共同で実験に取り組む計画であった。しかし、新型コロナウイルス感染拡大の影響を受け、実験を計画どおりに進行することが困難となり、研究の進捗は大幅に遅れた。また、相互派遣による共同実験や国際会議への参加は、断念せざるを得なくなった。そこで、スペインチームと共同で取り組む研究は、「根粒内の NO 発生と根粒菌の脱窒作用との関係」に絞ることとした。

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

ダイズの形質転換毛状根を作出する手法の確立は、非常に困難であった。全ての手順を再検討するなどして、一応の手法を確立したが、実験者によって作出効率はまちまちであり、その原因を明らかにするまでには、至らなかった。ダイズの形質転換毛状根作出法については、未だ改良の余地がある。

本研究では、ダイズのクラス1植物ヘモグロビン(*GmGLB1*)遺伝子の高発現コンストラクトを導入したダイズ(品種:フクユタカ)の形質転換毛状根を作出した。この形質転換毛状根の *GmGLB1* 遺伝子の発現は、通常栽培時でも冠水状態でも、非形質転換根の 5 倍から 10 倍程度の高い発現を示した。しかしながら、*GmGLB1* 遺伝子の高発現は、根粒のニトロゲナーゼ活性の向上や冠水耐性の向上などの有益な効果には結び付かなかった。ミヤコグサとは大きく異なるこの結果は、ダイズ根粒とミヤコグサ根粒では、窒素代謝の中でも脱窒系に違いがあることが原因であろうと考えた。スペインチームは、ダイズ根粒の脱窒系を検討し、冠水時には根粒内部のバクテロイドによって温室効果ガスの一つである N_2O が発生し、その発生量の調節には銅イオンが関与することを明らかにした。スペインチームの知見と考え合わせると、冠水時のダイズ根粒では、ダイズ根粒菌バクテロイドの脱窒系の酵素活性により、根粒中で発生した NO は速やかに N_2O へと還元されるため、*GmGLB1* 遺伝子の高発現による NO の除去とその効果は低いものと予想される。一方、ミヤコグサ根粒菌は、脱窒系の遺伝子が不完全である(NO を N_2O へと還元する酵素の遺伝子が欠けている)ため、冠水時に根粒中の NO 量が多くなり、クラス1植物ヘモグロビンが NO を除去(NO を硝酸イオンへと酸化)することによって得られる効果が、顕著に現れるものと考えられる。本研究によって、このような根粒菌の脱窒系の違いが、冠水時の根粒の窒素固定(ニトロゲナーゼ)活性や根粒の活性寿命に影響を及ぼす可能性を示すことができた。

(3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

クラス1植物ヘモグロビン遺伝子を高発現するミヤコグサの形質転換植物は、根粒のニトロゲナーゼ活性が向上し、根粒が冠水耐性となり、活性寿命も伸びる。しかし、ダイズでは、*GmGLB1* 遺伝子を高発現させても、ミヤコグサのような効果は得られなかった。その原因については、スペインチームとの交流をとおして考察し、根粒菌

バクテロイドの脱窒系の違いによるとの仮説を立てた。この仮説については、根粒菌の脱窒系や窒素代謝に詳しい国内研究者とも議論し、その妥当性を確認した。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

気候変動や環境ストレスに対応できる農作物品種の開発には、クラス1植物ヘモグロビン遺伝子を活用できる可能性がある。本研究によって、少なくとも根粒共生系の機能向上に応用する場合には、根粒の窒素代謝について、根粒菌とマメ科植物双方の視点から特性を理解しておく必要があることを示すことができた。また、脱窒系の一部が機能しないダイズ根粒菌と *GmGLBI* 遺伝子を高発現するダイズとを組み合わせることによって、温室効果ガスである N_2O の発生を抑制できる可能性もある。社会実装までの道のりは長いですが、窒素固定活性が高く、活性寿命の長いマメ科植物を開発できれば、食の安定供給に止まらず、窒素肥料の消費量の削減、ひいては、化石燃料の消費量の削減、すなわち、二酸化炭素の排出量の削減を達成することができる。さらに、根粒からの N_2O 発生もほとんどないマメ科植物を開発することができれば、地球温暖化の抑制にも大きく貢献することができる。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取組、成果)

本研究の日本チームには、2名の協力研究員と4名の大学院生が参加した。初年度に研究チームに加わった2名の協力研究員は、国立大学で博士研究員として採用され、現在は、それぞれ、助教または特任研究員として研究に携わっている。両名とも、マメ科植物の根粒共生の研究分野で活躍しており、特に1名は、ダイズの植物ヘモグロビンに関する研究を継続している。また、博士前期課程を修了した4名の大学院生のうち2名は、生命科学関連企業の研究・開発職に就くことができた。当初計画では、電子メールのやり取りでは気がつきにくいノウハウの取得やスキルアップ、あるいは、研究に対する姿勢やさらには人生観などを、相互派遣によって直に感じ取ることを期待していたが、残念ながら、この目標は達成できなかった。

本研究のスペインチームには、グラナダ大学の2名のPhD studentが含まれていた。うち1名は、本研究で取り組んだダイズ根粒の脱窒系と N_2O 発生をテーマとした学位論文(Efecto del cobre sobre la emisión del óxido nitroso procedente de ladesnitrificación en la simbiosis rizobio-leguminosa)を仕上げた。この学生の学位審査には、日本側代表者が加わり、学位が授与された。

(6)将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

日本チームの研究結果から、根粒菌バクテロイドの脱窒系の違いが、クラス1植物ヘモグロビン遺伝子の高発現の効果に影響を及ぼすことが示唆された。このことは、クラス1植物ヘモグロビン遺伝子を活用して、マメ科農作物の根粒共生系の改良を試みる場合、そこに存在する共生根粒菌の特性を理解する必要があることを示しており、非常に重要な知見である。今後は、NO_x制御に関与する根粒菌のヘモグロビン(*Bjgb*)遺伝子を高発現するダイズ根粒菌や、脱窒系遺伝子の一部が機能しないダイズ根粒菌の応用など、根粒菌を改良することも視野に入れ、ダイズ栽培時に畑地から発生する温室効果ガスである N_2O の削減を目指した研究へと展開できる可能性がある。

(7)その他(上記(2)~(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

例: 大学間協定の締結、他事業への展開、受賞など

根粒菌バクテロイドの脱窒系の違いが、クラス1植物ヘモグロビン遺伝子の高発現の効果に影響を及ぼすことを証明し、さらに、根粒菌を改良することにより、ダイズ栽培時に畑地から発生する N_2O の削減を目指した研究

へと展開するプロジェクトを計画した。この研究プロジェクトは、日本側代表者に加え、英国・イーストアングリア大学とメキシコ国立自治大学の研究者も参画することとし、本研究のスペイン側代表者である Delgado 博士が取りまとめた。N₂O の温室効果は、二酸化炭素の 300 倍とも見積もられており、今後、ダイズの栽培面積が増加することを考慮すると、この研究プロジェクトは、地球温暖化の抑制に大きく貢献できる可能性がある。2022 年 7 月、スペイン科学革新省の知識創生プロジェクトの一つとして採択された旨 Delgado 博士から連絡があった。