

氏 名(本籍)	か 加	とう 藤	かず 一	ひさ 幾
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 7 9 8 号			
学位授与年月日	平 成 1 7 年 3 月 2 5 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科資源生物科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	マメ科植物とグミ科植物の共生窒素固定における硝酸阻 害機構に関する研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	金 濱 耕 基	
	(副 査)	教 授	國 分 牧 衛	
		教 授	南 條 正 巳	
		助教授	金 山 喜 則	

論文内容要旨

まえがき

植物には微生物と共生し、空中窒素の固定（共生窒素固定）を行う種が存在する。マメ科植物はその代表であり、根粒菌との共生によって、環境に優しい固定窒素を効率的に成長に活かすことができる。農業生産現場においては、共生窒素固定のみで多収量を得ることが難しいことが多いので、窒素肥料の施用も必要となる。しかし、好氣的土壌での主な窒素形態である硝酸態窒素の施用（硝酸処理）は根粒の着生や発達とニトロゲナーゼ活性を阻害するので、硝酸阻害機構の解明は農業生産において重要な研究課題となっている。そこで本研究では、ニトロゲナーゼ活性の硝酸処理による阻害（硝酸阻害機構）に注目して研究を行った。硝酸阻害は根粒内への酸素拡散抵抗性の増大によるバクテロイドの呼吸の低下が原因であることが強く示唆されているが、その原因は明らかになっていない。

材料には第1章においては、マメ科のモデル植物として近年注目されているミヤコグサとマメ科植物の代表的作物であるダイズを用いた。マメ科植物以外にも、アクチノリザル植物（グミ科、カバノキ科など）と呼ばれる一群は放線菌⁺の一種であるフランキアと共生し、根粒を形成して共生窒素固定を行うことが知られている。これらの植物は、これまで園芸作物として重要視されてこなかったが、近年になってグミ科の多機能性新規ベリー・オビルピーハが導入されて日本での大規模栽培が始まったことから、第2章においてはオビルピーハを用いることとした。

第1章. マメ科植物の根粒におけるニトロゲナーゼ活性の硝酸阻害機構.

ニトロゲナーゼ活性の硝酸阻害機構に関する研究の歴史は古く、いくつかの仮説が提唱されている。有力な仮説としては、根粒内でのスクロース合成酵素（SS）と硝酸代謝の関与があげられている。そこで本章では、硝酸阻害時における根粒のSS活性の解析（第1節）、根粒の硝酸還元酵素（NR）の解析（第2節）、および硝酸阻害機構における一酸化窒素（NO）の役割（第3節）について調べた。

第1節. 硝酸阻害時における根粒のSS活性の解析.

根粒内に転流した光合成産物（スクロース）は主にSSによって分解され、解糖系を経て有機酸へと代謝され、バクテロイドの呼吸基質として利用される（第1図）。このエネルギー供給過程の鍵酵素の一つであるSSの活性は、ダイズの根粒において、硝酸処理6日後に約50%まで低下することが知られている。SS活性が低下するとバクテロイドへの呼吸基質の供給も低下し、何らかの形で根粒の酸素拡散抵抗性の増大が引き起こされ、ニトロゲナーゼ活性が阻害される可能性が考えられる。そこで、本節ではミヤコグサとダイズを供試して、硝酸処理によるニトロゲナーゼ活性の低下に先立ってSS活性が低下するかどうかを調べた。

その結果、ミヤコグサの根粒のニトロゲナーゼ活性は、硝酸処理2日後で対照区の約70%まで低下し、5日後には50%まで低下した（第2図）。そこで、2日後と5日後のSS活性を測定したところ、可溶性タンパク質当たりのSS活性は硝酸処理5日後においても低下していなかった（第3図）。ダイズの根粒においても調べた結果、硝酸処理3日後にニトロゲナーゼ活性は対照区の約25%まで低下したが、SS活性は低下していなかった（第4図、第5図）。

以上のことから、SS活性の変動は硝酸阻害の原因でないと考えられた。

第2節. 根粒のNRの解析.

硝酸阻害機構において、葉や根における硝酸代謝ではなく、根粒における硝酸代謝が重要であることが示唆されている。また、根粒での硝酸代謝に関連する酵素としては、バクテロイドに存在する根粒菌由来のバクテロイドNRと、根粒の植物細胞質に存在する根粒サイトゾルNR（根粒NRとする）があるが、硝酸阻害に関与しているのは根粒NRであることも示唆されている。そこで、本節ではミヤコグサを供試して、根粒NRを分子生物学的手法によって解析した。

その結果、ミヤコグサの根粒の全RNAからRT-PCRによってクローニングされたNRのcDNAから予想されるアミノ酸配列は、タバコおよびインゲンのNRのアミノ酸配列と高い相同性を示した（第6図）。ゲノミックサザン解析において、このcDNAプローブは根粒菌のゲノムDNAと反応しなかった。一方、本NR遺伝子はミヤコグサゲノム上でシングルコピーとして存在していた

(第7図)。

根粒および根では、*NR* mRNA の量と *NR* 活性が硝酸処理によって上昇した(第8図、第1表)ことから、ミヤコグサの *NR* は硝酸誘導型であることが示された。しかし、硝酸処理しない対照区の根粒において硝酸イオンが検出されなかったにもかかわらず、*NR* mRNA と *NR* 活性が検出されたことから、根粒では *NR* は硝酸非依存的にも発現することが明らかとなった。さらに、対照区の根粒 *NR* の活性化レベルは硝酸処理区と同等であったことから、硝酸処理による誘導を受けなくても機能していると考えられた。*In situ* ハイブリダイゼーションにおいて、硝酸非依存的に発現する *NR* mRNA は感染域および維管束部に局在することが明らかとなった(第9図)。

以上のことから、ミヤコグサの *NR* 遺伝子は硝酸誘導型であるが、根粒においては硝酸非依存的にも発現するというユニークな性質を示した。

第3節. 硝酸阻害機構における NO の役割.

植物において、*NR* は硝酸イオンの還元だけでなく、亜硝酸イオンから NO への生成も触媒することが知られている。NO はシグナル伝達分子としても知られており、硝酸阻害機構に関与している可能性が考えられる。そこで、本節ではミヤコグサを供試して、硝酸処理による根粒内での NO の生成と役割について調べた。

その結果、硝酸処理すると27時間後にニトロゲナーゼ活性が対照区の38%まで低下するとともに、根粒の感染域で NO が生成された(第10図)。NO の生成は低酸素条件によって誘導されることから、根粒内の特異な環境である感染域の低酸素条件が NO の生成に関与していると考えられた。また、硝酸処理によって発生した NO を NO 消去剤(c-PTIO)で処理することによって、硝酸阻害が部分的に回避された(第11図)。

以上のことから、マメ科植物の硝酸阻害機構においては、硝酸処理によって生成された NO が酸素拡散抵抗性の増大を引き起こすなど、何らかの形でニトロゲナーゼ活性を阻害している可能性が示された。

第2章. グミ科の多機能性新規ベリー・オビルピーハとフランキアとの共生関係および硝酸処理の影響.

オビルピーハとはシベリア原産のグミ科の小果樹で、学名は *Hippophae rhamnoides* L. ssp. *mongolica* と命名されている。機能性成分の含有率が著しく高く、特に抗酸化力の強いビタミンEが多く含まれているほか、不飽和脂肪酸などの有効成分も多く含まれている。乾燥、低温、高塩類土壌等の環境ストレスに強く、放線菌の一種であるフランキアとの共生により根粒を形成し、共生窒素固定も行うとされており、荒れ地の緑化や土壌再生などの機能ももっている。そこで本章では、日本での栽培例や研究例がほとんどないオビルピーハの基礎的な知見を得ることを目的として研究を行った。特に、オビルピーハとフランキアとの共生関係（第1節）と、ニトロゲナーゼ活性に及ぼす硝酸処理の影響（第2節）について調べた。

第1節. オビルピーハとフランキアとの共生関係.

はじめに、東北大学大学院農学研究科の圃場で栽培されている4年生の成木を掘り上げて根に着生した根粒を採取し、その形態を観察した。その結果、根粒は小さな粒子の集合体であり（第12図）、各粒子はそれぞれ直径1mm程度の大きさであった。縦断および横断切片を観察すると、維管束部がその中心に位置するとともに、周囲を感染細胞が取り囲んでいた（第13図）。このような形態は、フランキアとの共生によって形成される根粒の形態と一致していた。

次に、実生苗に根粒磨砕液を接種して、根粒着生の有無と、着生した根粒が実生苗の成長に及ぼす影響を調べた。その結果、70%の実生苗に根粒の着生が確認され、根粒の着生した実生苗（第14図）は無窒素栽培条件であるにも関わらず健全な成長を示した（第2表）。また、根粒の着生した実生苗について根粒新鮮重と植物体の成長との関係を調べたところ、正の相関関係が認められた。したがって、オビルピーハの実生苗は根粒が十分に着生すると、窒素条件が十分でない土壌においても健全な成長を行うと考えられた。

次に、圃場で栽培されている4年生の成木から2ヶ月ごとに根粒を採取して、ニトロゲナーゼ活性の季節変動を調べた。その結果、ニトロゲナーゼ活性は11月の葉の黄化や落葉が始まったころに低く、葉が着生していない1月には検出されなかった（第15図）。3月になって新葉が展開し始めると僅かに活

性が上昇し、5月の新梢の伸長時に最大となった。その後7月から9月にかけて高い活性を維持した。したがって、オビルピーハの根粒のニトロゲナーゼ活性は、気温が高く光合成が十分に行われている時期に高く維持されていると考えられた。

第2節. ニトロゲナーゼ活性に及ぼす硝酸処理の影響.

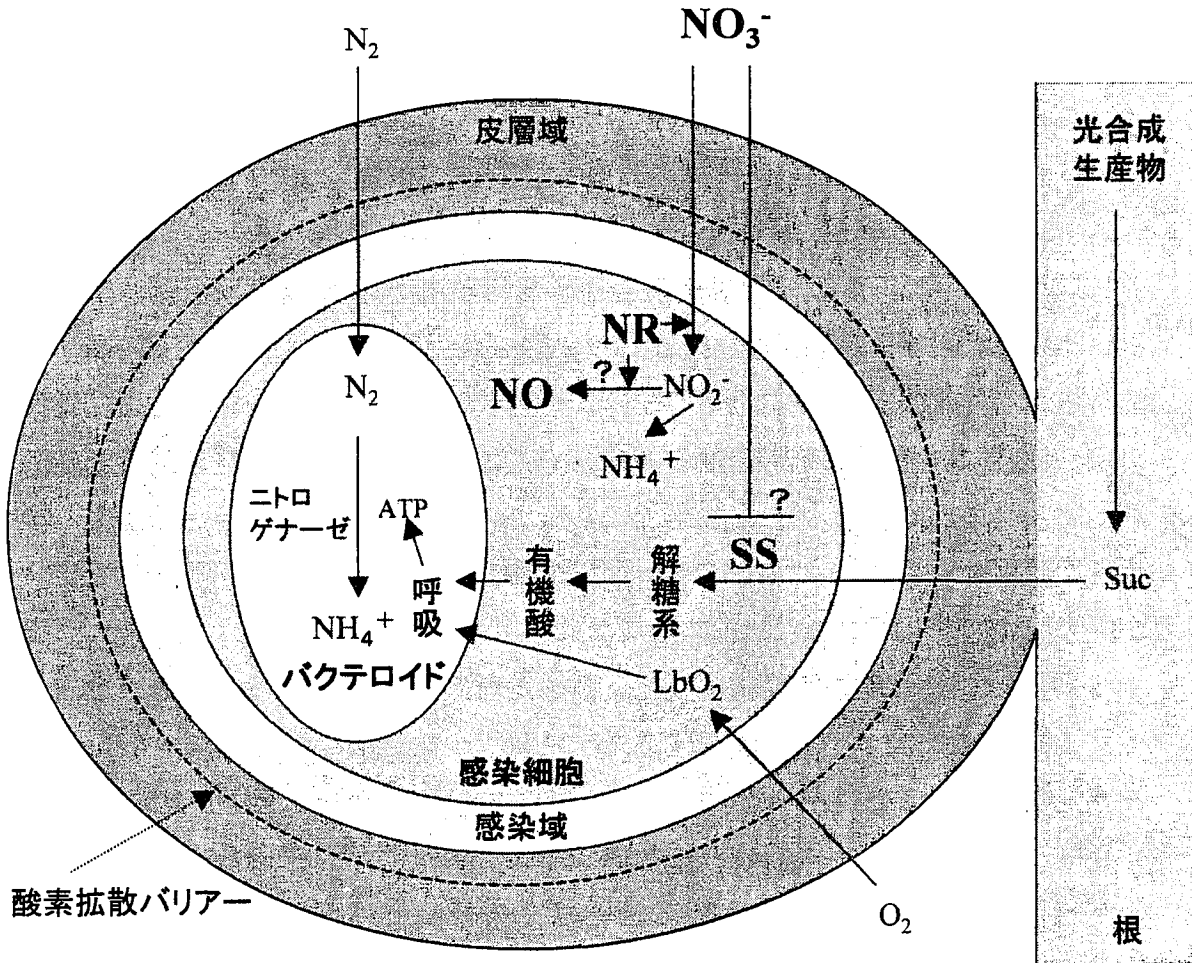
オビルピーハを園芸作物として利用する場合、ニトロゲナーゼ活性の硝酸阻害は栽培上の問題となる可能性がある。そこで本節では、硝酸処理濃度と処理期間を変えて、ニトロゲナーゼ活性に及ぼす影響を調べた。

その結果、挿し木苗に10mMから50mMの高濃度の硝酸処理を5日間行い短期間での影響を調べたが、ニトロゲナーゼ活性の阻害はみられなかった(第16図)。次に、比較的長期間にわたる硝酸処理の影響を調べることを目的として、5または10mMの硝酸処理を1ヶ月間行った結果、明らかにニトロゲナーゼ活性が低下した(第17図、第18図)。本節で調べたような硝酸処理は短期間であっても、マメ科植物の根粒のニトロゲナーゼ活性を著しく阻害することが知られている。したがって、オビルピーハの根粒は、マメ科植物の根粒と比べて、硝酸阻害を受けにくいものと考えられた。

以上のことから、オビルピーハの栽培にあたっては高濃度の速効性肥料を施用しても、ニトロゲナーゼ活性を阻害せずに生育を促進することができると考えられた。

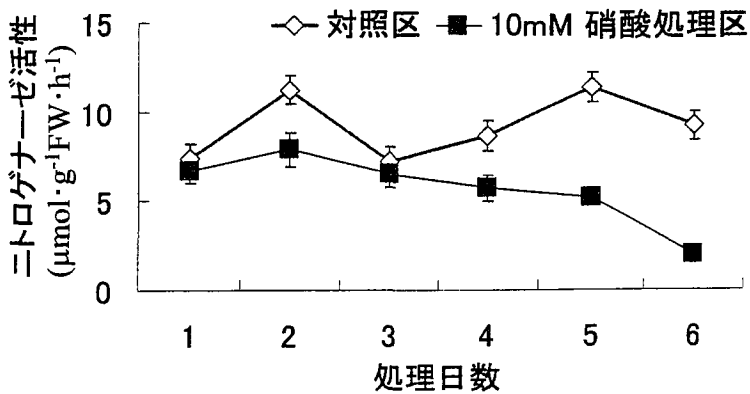
ま と め

マメ科植物においては、短期間の比較的高濃度の硝酸処理でニトロゲナーゼ活性は阻害され、その阻害にはNOの関与が示唆された。一方、グミ科植物においては短期間であれば高濃度の硝酸処理でもニトロゲナーゼ活性は阻害されなかったことから、マメ科植物とは異なる硝酸阻害機構をもっていることが考えられる。今後、マメ科植物では硝酸阻害におけるNOの生成経路やシグナル伝達経路(酸素拡散抵抗性の増大との関係など)について明らかにする、グミ科植物では適切な窒素施肥体系を確立するとともに、両者の硝酸阻害機構の違いを明らかにする必要があるだろう。

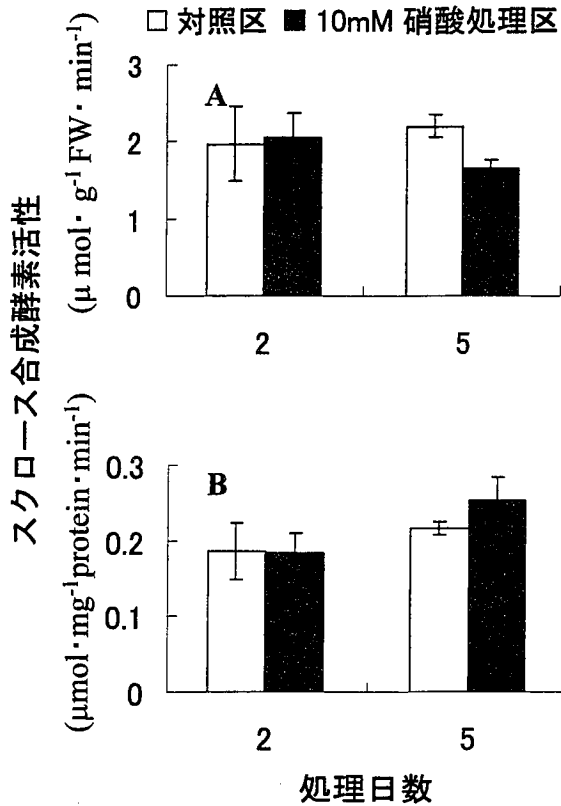


第1図. ミヤコグサ根粒におけるバクテロイドへの呼吸エネルギーの供給経路と硝酸代謝経路.

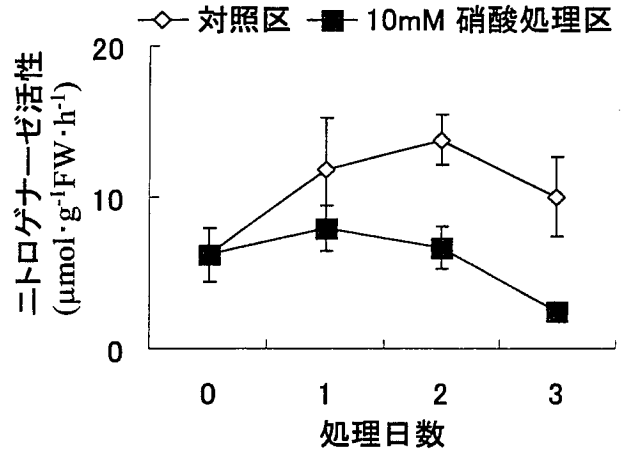
SS : スクロース合成酵素. NR : 硝酸還元酵素
 Suc : スクロース Lb : レグヘモグロビン



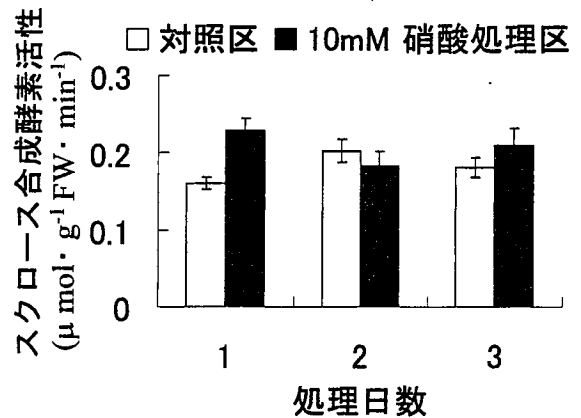
第2図. ミヤコグサの根粒のニトロゲナーゼ活性に及ぼす硝酸処理の影響.
 図中の縦線は標準誤差 (n=5).



第3図. ミヤコグサの根粒のSS活性に及ぼす硝酸処理の影響.
 A: 根粒新鮮重当たりのSS活性.
 B: 可溶性タンパク質当たりのSS活性.
 図中の縦線は標準誤差 (n=5).



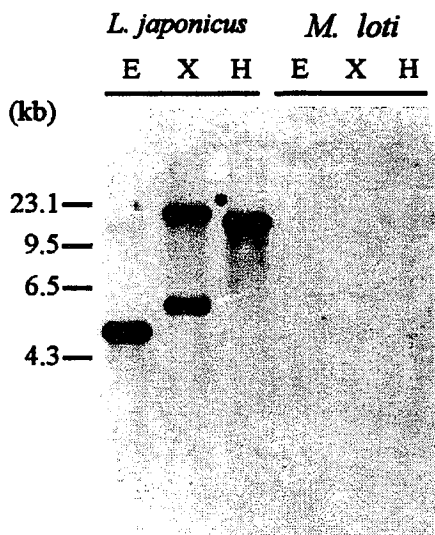
第4図. ダイズの根粒のニトロゲナーゼ活性に及ぼす硝酸処理の影響.
 図中の縦線は標準誤差 (n ≥ 5).



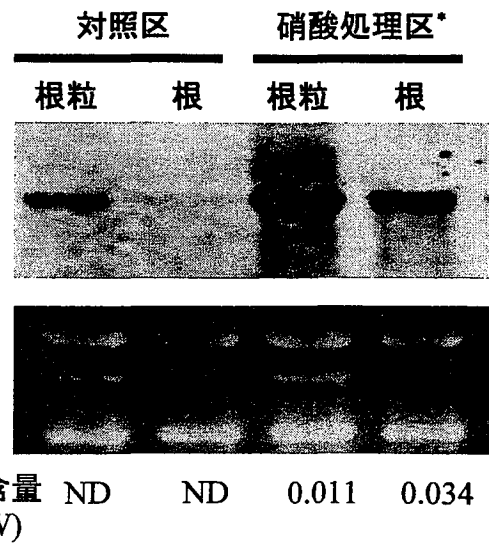
第5図. ダイズの根粒のSS活性に及ぼす硝酸処理の影響.
 根粒新鮮重当たりのSS活性.
 図中の縦線は標準誤差 (n=4).

		10	20	30	40	50	
Lotus	1	KRIIVVTEDE	VDSEHYHYKEN	RVLPSHVDAE	LANEDEGWYK	PEYIINELNI	50
Phaseolus	1	KRIIVVTEDE	VDSEHYHYKDN	RVLPSHVDEE	LANEDEGWYK	PEYIINELNI	50
Nicotiana	1	KRIIVVTEDE	SDGTVHRKDN	RVLPSHVDAE	LANTDEAWYK	PEYIINELNI	50
		60	70	80	90	100	
Lotus	51	NSVITTPCHD	EILPINAWIT	CRPYTLRGYS	YSGGGRKVTR	VEVTLDGGET	100
Phaseolus	51	NSVITTPCHD	EILPINAWIT	CRPYTVIRGYA	YSGGGRKVTR	VEVTLDGGET	100
Nicotiana	51	NSVITTPCHD	EILPINAWIT	CRPYTLRGYS	YSGGGRKVTR	VEVTLDGGET	100
		110	120	130	140	150	
Lotus	101	KVFCALDQDE	KENKYGKYWG	WCFWSLEVEV	LDLIGTKELA	VRAWDEALNI	150
Phaseolus	101	KVFCALDQDE	KENKYGKYWG	WCFWSLEVEV	LDLIGTKELA	VRAWDEALNI	150
Nicotiana	101	KVFCALDQDE	KENKYGKYWG	WCFWSLEVEV	LDLLEAKELA	VRAWDEALNI	150
		160	170	180	190	200	
Lotus	151	QPEMLIWNVM	GMNNCWFRV	KTNVCKPHKG	EIGIVFEHPT	QFGNDFGGWM	200
Phaseolus	151	QPEMLIWNVM	GMNNCWFRV	KTNVCKPHKG	EIGIVFEHPT	QFGNDFGGWM	200
Nicotiana	151	QPEMLIWNVM	GMNNCWFRV	KTNVCKPHKG	EIGIVFEHPT	QFGNDFGGWM	200
		210	220	230	240	250	
Lotus	201	AKKHELEISQ	QDSRITLKKG	VSPFMNTPT	KMYSLSEVKK	HSSPDSAWII	250
Phaseolus	201	AKKHELEISQ	EDAKSLKKG	VSTPFMNTAS	KMYSLSEVKK	HSSPDSAWII	250
Nicotiana	201	AKKHELEISA	EDAPETLKKG	TSTPFMNTAS	KMYSMSEVKK	HSSPDSAWII	250
		260	270	280	290	300	
Lotus	251	VHGHVYDCTR	FLKDHFGGAD	SILINAGT	300
Phaseolus	251	VHGHVYDCTR	FLKDHFGGAD	SILINAGT	300
Nicotiana	251	VHGHVYDCTR	FLKDHFGGSD	SILINAGT	300

第6図. ミヤコグサの根粒より得られたNR cDNAから推定されたアミノ酸配列.
 上段:ミヤコグサのNR.
 中断:インゲンのNR.
 下段:タバコのNR.



第7図. ミヤコグサの根粒NR cDNAをプローブとしたゲノミックサザン解析.
 E : *EcoRI*.
 X : *XbaI*.
 H : *HindIII*.



第8図. ミヤコグサの根粒と根におけるNRのノーザン解析と硝酸イオン含量に及ぼす硝酸処理の影響.
 ND: 検出感度以下.
 * 5日間の10 mM 硝酸処理.

第1表. ミヤコグサの根粒と根におけるNR活性に及ぼす硝酸処理の影響.

	対照区		硝酸処理区 ^z	
	根粒	根	根粒	根
NRAmax ^x	0.076±0.004 ^y	trace	0.325±0.042	0.291±0.013
NRAact ^w	0.050±0.002	trace	0.203±0.039	0.135±0.008
活性化レベル ^v	65.8	-	62.5	46.4

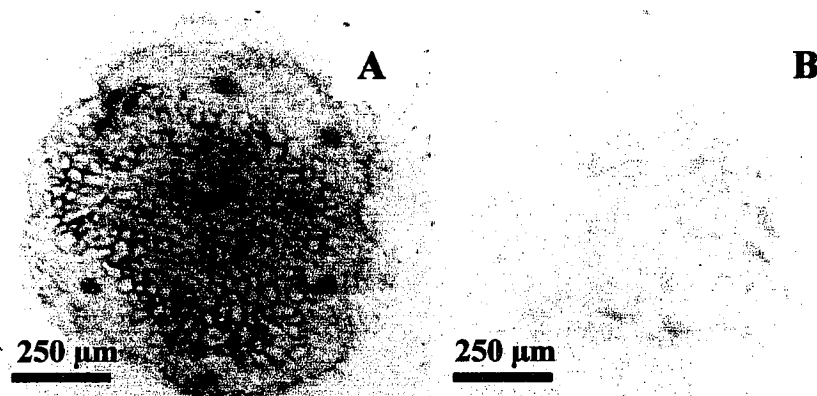
^z 5日間の10 mM 硝酸処理.

^y 平均値±標準誤差 (n=3) ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$).

^x 最大活性.

^w 活性化状態にあるNRの活性.

^v $\text{NRAact} / \text{NRAmax} \times 100(\%)$.

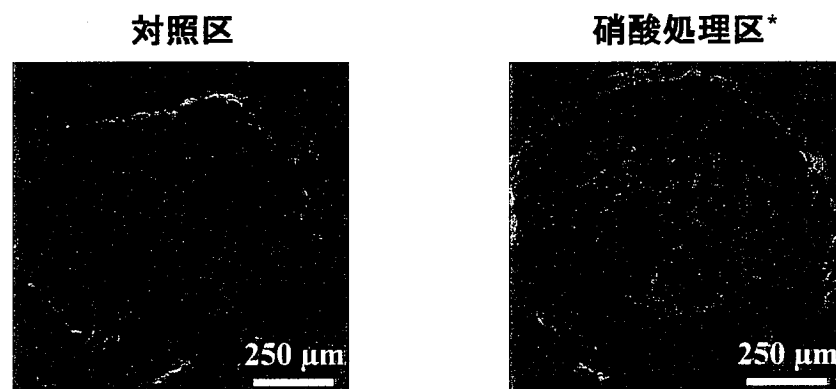


第9図. ミヤコグサの根粒における硝酸非依存的に発現したNR mRNAの局在.

A: DIGラベルされたアンチセンスRNAプローブを用いた.

B: 対照としてセンスRNAプローブを用いた.

青いシグナルがNR mRNAを表す.



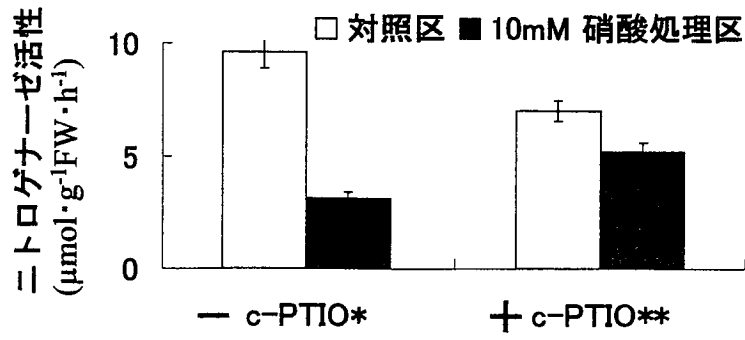
第10図. ミヤコグサの根粒におけるNOの生成に及ぼす硝酸処理の影響.

NOの生成をDAF-2DAによって映像化した.

緑のシグナルがNOの生成を表す.

表皮組織のシグナルは自家蛍光による.

* 27時間の10 mM 硝酸処理.

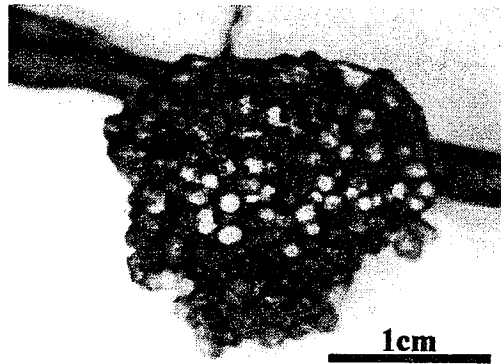


第11図. ミヤコグサの根粒のニトロゲナーゼ活性の硝酸阻害に及ぼすNO除去剤(c-PTIO)の影響.

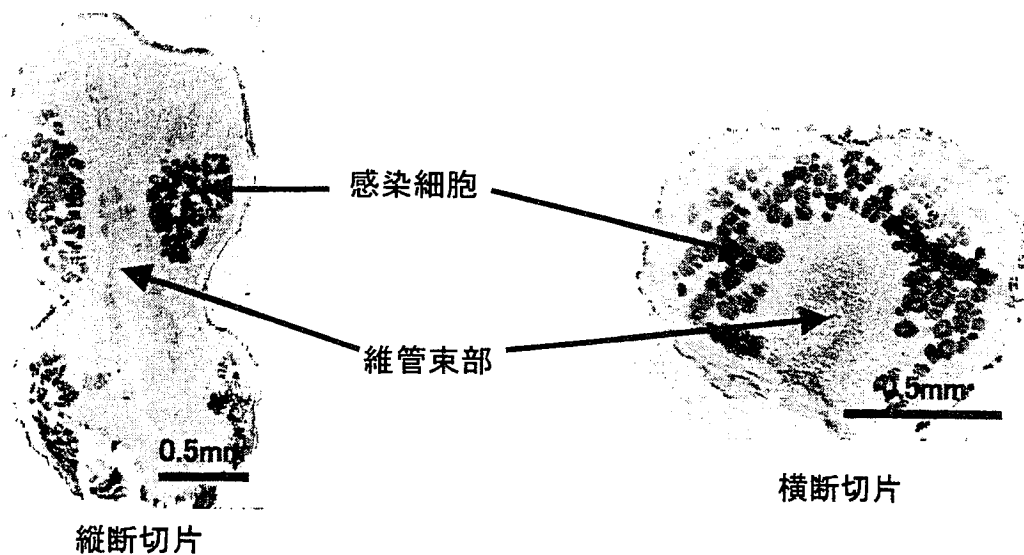
図中の縦線は標準誤差 (n=10).

** 1 mM c-PTIOを24時間前処理し, 27時間の10 mM 硝酸処理(1 mM c-PTIOを含む).

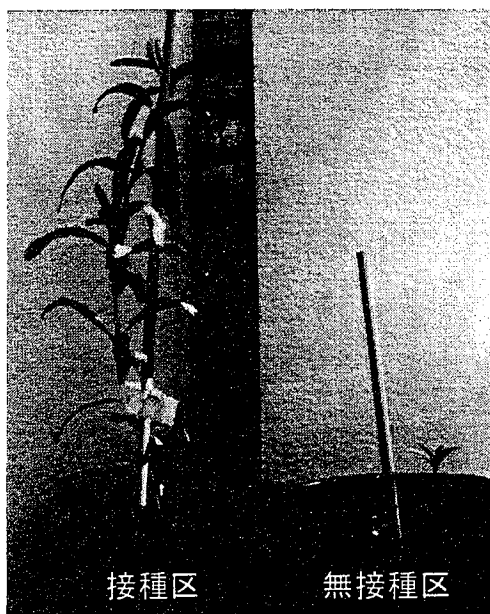
*c-PTIOの代わりに水で処理.



第12図. オビルピーハの成木に着生した根粒の外部形態.



第13図. オビルピーハの挿し木苗に着生した根粒の内部形態.



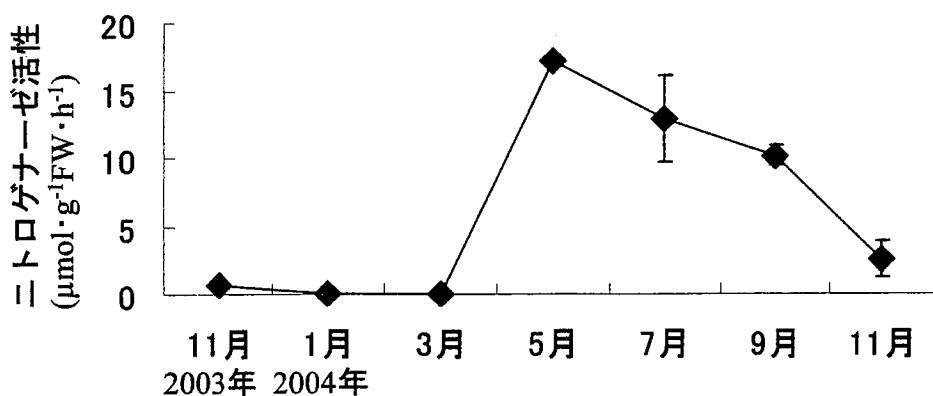
第14図. オビルピーハの実生苗の成長に及ぼす根粒磨砕液の接種の影響. 接種3ヵ月後の実生苗.

第2表. オビルピーハの実生苗の成長に及ぼす根粒磨砕液の接種の影響.

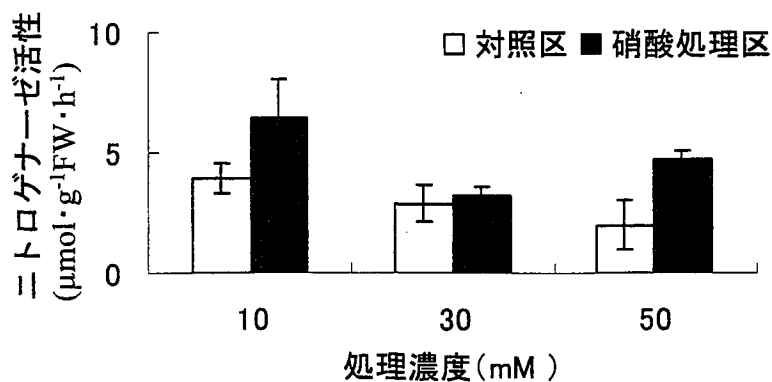
	接種区 ^z	無接種区
根粒新鮮重 (mg)	86.1 ± 7.70 ^y	0
全新鮮重 (g)	1.8 ± 0.15	0.2 ± 0.02
草丈 (cm)	15.7 ± 0.71	4.0 ± 0.13
展開葉数 (枚)	28.4 ± 0.79	10.2 ± 0.29

^z 根粒の着生した実生苗.

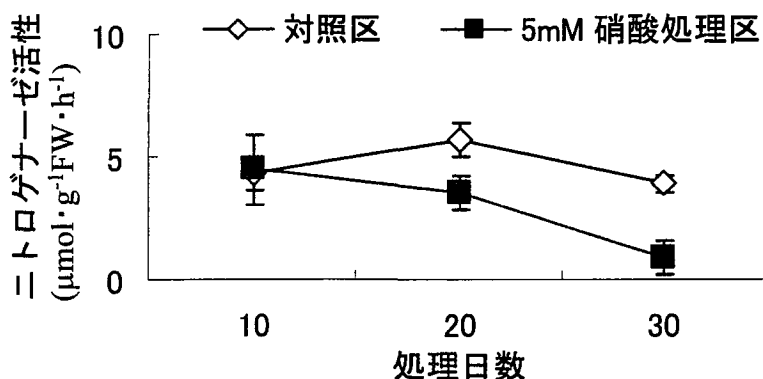
^y 平均値 ± 標準誤差 (接種区はn=40、無接種区はn=20).



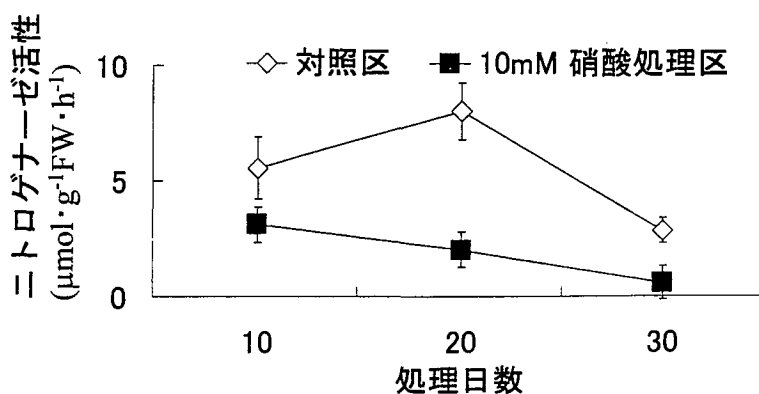
第15図. オビルピーハの成木から採取した根粒のニトロゲナーゼ活性の季節変動. 図中の縦線は標準誤差 (n ≥ 3).



第16図. オビルピーハの挿し木苗から採取した根粒のニトロゲナーゼ活性に及ぼす硝酸処理濃度の影響.
5日間の硝酸処理.
図中の縦線は標準誤差 (n=4).

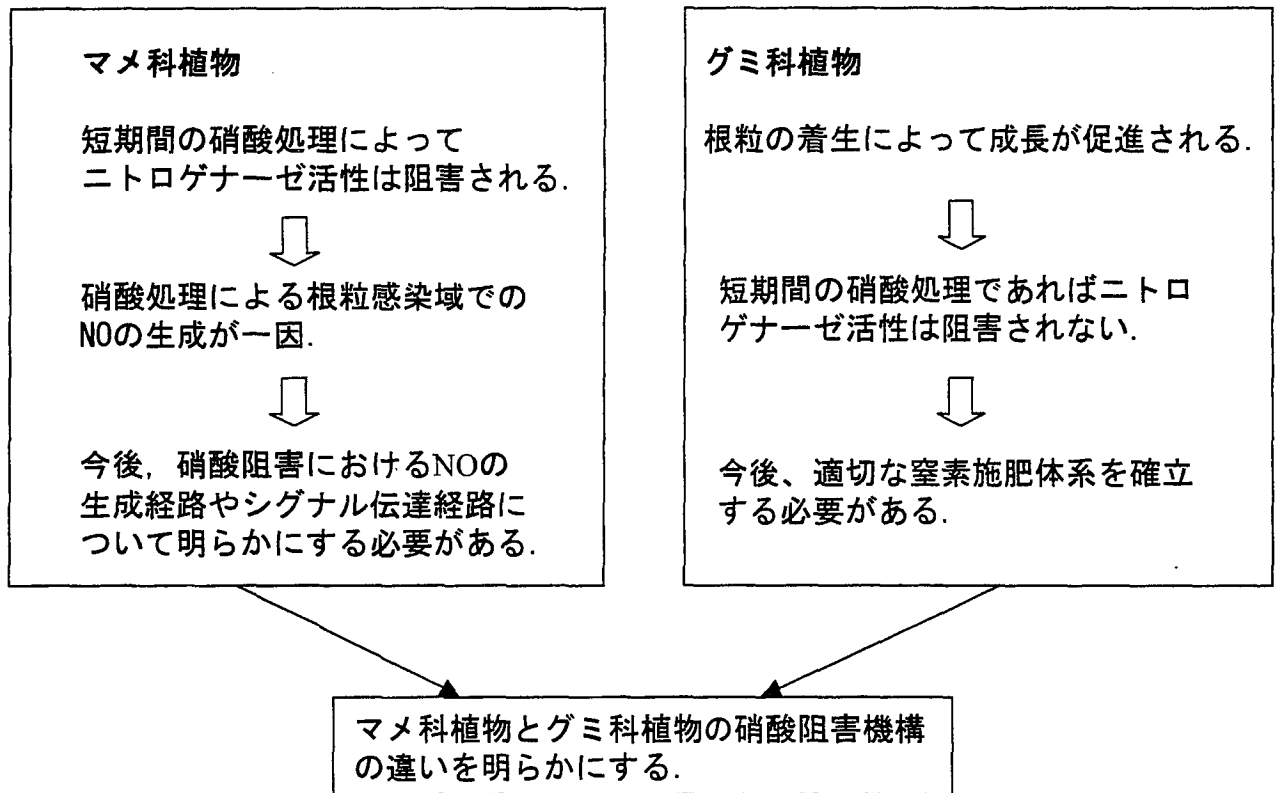


第17図. オビルピーハの挿し木苗から採取した根粒のニトロゲナーゼ活性に及ぼす硝酸処理日数の影響.
図中の縦線は標準誤差 (n=4).



第18図. オビルピーハの挿し木苗から採取した根粒のニトロゲナーゼ活性に及ぼす硝酸処理日数の影響.
図中の縦線は標準誤差 (n=4).

まとめ



論文審査結果要旨

植物の中には微生物と共生し空中窒素の固定を行う種類が存在する。作物生産現場では共生窒素固定と窒素施肥の併用によって収量をあげることになるが、窒素の主な吸収形態である硝酸態窒素の施用は共生窒素固定（ニトロゲナーゼ活性）を阻害する。したがって、硝酸阻害機構を解明し、窒素固定能を高いレベルで持続させつつ、適切な硝酸態窒素の供給を可能にすることは、農業生産において重要である。

マメ科食物と根粒菌の共生窒素固定における硝酸阻害機構にはバクテロイドに呼吸基質を供給するときの鍵酵素としてはたらくスクロース合成酵素(SS)と、硝酸代謝の鍵酵素である硝酸還元酵素(NR)が関与しているという説がある。本研究は代表的なマメ科作物であるダイズと、マメ科のモデル植物として用いられているミヤコグサを供試して、窒素固定関連酵素・遺伝子の解析を行ったものである。また、ロシアより導入され、園芸作物として将来性が有望なグミ科の多機能性新規ペリー・オビルピーハに関して、フランキアとの共生関係、硝酸態窒素の施用の影響など、基礎的な知見を得ることを目的として研究を行ったものである。

その結果、ダイズとミヤコグサを用いて硝酸態窒素の施用によるニトロゲナーゼ活性と根粒のSS活性の変動を詳細に調べたところ、ニトロゲナーゼ活性の低下に先立ってSS活生は低下しなかったため、硝酸阻害機構にはおいてSSは関与していないことが示された。

次に、ミヤコグサを用いて、NRについて分子レベルでの解析が行われた。NRcDNAをクローニングし、サザン解析を行ったところ、ミヤコグサゲノム上においてNRはシングルコピーとして存在することが示された。NRmRNAの発現とNR活性は根粒および根において硝酸態窒素の施用によって誘導されたが、硝酸イオンが検出されなかった対照区の根粒においてもみとめられた。以上のことから、ミヤコグサのNRは硝酸誘導型ではあるが、根粒においては硝酸非依存的にも発現することが示された。また、この硝酸非依存的に発現するNRmRNAは根粒の感染域に局在することが示された。

NRは硝酸イオンから亜硝酸イオンの生成を触媒するだけでなく、亜硝酸イオンから一酸化窒素(NO)の生成も触媒することが知られている。NOはシグナル伝達分子として働くため、硝酸阻害への関与も予想された。そこで硝酸態窒素の施用による根粒でのNO生成を調べたところ、感染域でのNO生成の誘導がみとめられた。生成されたNOを消去剤によって消去したところ、ニトロゲナーゼ活性の硝酸阻害が部分的に回避された。よって、硝酸阻害機構にNOが関与していることが示された。

圃場で栽培したオビルピーハの根には根粒が着生し、その根粒は放線菌の一種であるフランキアとの共生によって形成される形態を示した。また、根粒磨砕液の接種によって成長が著しく促進された。ニトロゲナーゼ活性の季節変動を調べたところ、気温が高く光合成が盛んに行われている時期に活性は高いことが示された。硝酸態窒素の影響を調べたところ、長期間の施用でニトロゲナーゼ活性は低下したが、短期間の施用では、マメ科植物とは異なって、ニトロゲナーゼ活性が阻害されなかったため、マメ科植物の硝酸阻害とは異なる機構をもっている可能性が示唆された。

本研究で得られた知見を用いることにより、マメ科植物においてはニトロゲナーゼ活性の硝酸阻害を回避することで共生窒素固定能と窒素肥料の両方を有効に利用できることが示された。グミ科植物においては短期間で硝酸阻害が起こらないことから、速効性肥料の利用により共生窒素固定能を有効に利用できることが示された。このように園芸学的に優れた成果が得られたため、審査員一同は博士(農学)の学位を授与するに値するものと判断した。