ダイズにおける硝酸の吸収代謝と窒素固定 大山卓爾*

土壌中の硝酸がダイズ根粒の窒素固定を阻害する機構は未だに解明されていない。ダイズの安定多収には、生育期間全般に多量の窒素供給を必要とするため、収量水準を稲作なみに引き上げるには、根粒着生や窒素固定活性を阻害するのではなく、むしろ促進するような窒素固定と調和した窒素施肥・栽培法をめざす必要がある。本稿では、硝酸の吸収、同化、移動など植物体内の動きについて、根粒の窒素固定と関連しながら概説する。

近年、ダイズの年間世界生産高は約1億トンにも達し、マメ科穀類全体の約半分を占め、人類の生存を支える上で不可欠な作物になってきている。ダイズは“畑の牛肉”とも呼ばれるように、良質な蛋白質を30~45%も含む食用・飼料用としてきわめて有用な作物である。

我が国では、ダイズは豆腐、味噌、醤油などの伝統食品として昔から馴染み深く、また、油脂、蛋白質などの食品加工原料および飼料としても多量に利用されている。古来の伝統作物でありながら、1989年度における日本のダイズ総収穫高は27万トンで、世界の0.3%以下であり、ダイズ消費量の95%は輸入に依存している。また、10a当たりの平均収量は179kgに低迷している。しかし、最高収量事例では、宮城県で786kg/10aの記録があることから、我が国の平均収量レベルはダイズの収穫限界によるのではなく、栽培技術や育種の進歩で収量水準を上げることが可能であろう。

ダイズの安定多収が困難な理由として、土壌・気象条件により生育・収量の変動が大きい、病虫鳥害の被害を受けやすいなどの要因がある。また、養分供給上の制限因子としては生育期間全般にわたり多量の窒素供給を必要とする点があげられる。よく知られているように、ダイズは根粒による固定窒素と根から吸収する施肥・土壌窒素の両者を利用できるが、高濃度の土壌窒素の存在は根粒の着生や窒素固定を抑制し、その阻害効果は畑状態における主な窒素の供給形態である硝酸で著しい。さらに、窒素肥料の多量施用により増収を図ろうとすると、窒素固定を強く抑制するだけでなく、茎葉部の過繁茂(葉ばけ、蔓ばけ)や倒伏を起こし、実付きが悪く、かえ

って減収を招くことが知られている。

ダイズの安定多収のためには、根粒の窒素固定を最大限に発揮させ、さらに窒素固定開始前の初期生育の促進と、窒素固定の低下が起りやすい登熟後期に、土壌からの地力窒素や施肥窒素を施して不足した窒素を補うことが重要である。たとえば、高収量水準の現実的目標でもある400kg/10aの達成には⁽¹⁾、栽培期間全体で約40kgの窒素の同化が必要である。この間における地力窒素供給量がおよそ5~15kgとすると、残りは窒素固定および施肥窒素に依存せざるを得ない。実際、我が国の標準的な栽培法では、ダイズの同化窒素のうち約40~80%くらいを窒素固定に依存していると推定されている。根粒の窒素固定能は、日照不足、土壌水分過剰などの悪条件により急速に低下することがよく知られている。また、登熟後期に子実肥大との競合や葉の老化により、炭水化物の根粒への供給が低下すると窒素固定能の低下や根粒の崩壊が起こる。ダイズの収量および品質は登熟後期まで十分な窒素同化を確保することが鍵であることから、根粒による高い窒素固定を長く維持すること、また不足分は窒素肥料や有機物投与により補給することが多収栽培に必須であると考えられている。

本稿では、土壌中可給態窒素の主成分である硝酸のダイズ体内における挙動と窒素固定との関連について、主に植物の栄養生理の面から概説する。

ダイズの根における硝酸の吸収と移行

1. 硝酸吸収のメカニズム

高等植物の根における硝酸吸収の機構にはまだ不明な部分が多いが、図1のようなモデルが考えられている⁽²⁻⁵⁾。培地中の硝酸イオン(NO_3^-)は、根の表皮また

Nitrate Absorption and N_2 Fixation in Soybean Plants

* Takuji OHYAMA, 新潟大学農学部

図 1 ■ 高等植物の根の硝酸吸収機構

● : NO_3^- , ○ : H^+

は皮層の原形質膜の NO_3^- のトランスポーターにより細胞内に取り込まれる。 NO_3^- の細胞内部への流れ“インフラックス”は、細胞膜内外の H^+ の濃度勾配または電気化学ポテンシャル差により駆動される能動輸送の過程であり、 H^+ との共輸送系と推定されている。ただし、高等植物においては硝酸のトランスポーターの単離には成功していない。また、一般に NO_3^- に対する高親和性 (K_m 値, 数十 μM) と、低親和性 (K_m 値, 数 mM) の吸収サイトがあると予想されている⁽⁵⁾が、詳細は不明である。

植物の根では、 NO_3^- を取り込むと同時に根から培地に NO_3^- の一部を再放出する“エフラックス”の存在が注目されてきている。したがって、根からの正味 (net) の NO_3^- 吸収速度は、インフラックスとエフラックスの差し引きである。エフラックスの機構はほとんど不明であるが、硝酸吸収速度の微調節に関係していると予想されている^(2,4)。

ダイズ根の NO_3^- 吸収についても基本的には図 1 のモデルにあてはまる結果が得られている。正味の NO_3^- 吸収速度は培地の pH に依存し、pH 5~7 では pH が低いほど速く吸収し、pH 8 ではむしろ NO_3^- が根から放出された⁽⁶⁾。また、膜内外の H^+ 勾配を打ち消す CCCP (carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone) を培地に添加すると、 NO_3^- の吸収はただちに停止した⁽⁷⁾。これらの結果は細胞内外の H^+ ポテンシャル差が NO_3^- 吸収の駆動力であることを支持する。

図 2 ■ ダイズ根における NO_3^- のインフラックスとエフラックスの推定速度

単位: $\text{mgN}/\text{時間}$

一方、 $^{15}\text{NO}_3^-$ 培地で栽培した水耕ダイズを、非標識 NO_3^- 培地に移し、根から培養液への ^{15}N の“エフラックス”速度を経時的に測定した結果から、ダイズの根内部において図 2 のような NO_3^- のインフラックスとエフラックスが同時に起こっていると推定された⁽⁷⁾。この植物の正味の NO_3^- 吸収速度は $2.5 \text{ mgN}/\text{時間}$ である。ただし、通常エフラックスが起こるのは培地に NO_3^- が存在する時のみであり、培地に硝酸がなくなるとエフラックスも停止する⁽⁶⁾。この機構は不明であるが、環境に窒素が不足した場合にも根から硝酸を放出すると、窒素養分の損失に加え、他の植物の生育を助長し生存競争においても不利になろう。

2. ダイズ根の正味の硝酸吸収

水耕培養液中の NO_3^- の減少量を測定することにより、硝酸の正味の吸収速度 (インフラックスとエフラックスの差) を知ることができる。インタクトなダイズの硝酸吸収の性質について、培養液の硝酸濃度を UV 測定装置により連続的にモニターして調べた。図 3 に示したように温度一定条件では、培地の NO_3^- 濃度の低下はほぼ直線的であり、 NO_3^- を吸い切る直前になって吸収速度の低下が見られた。培地 NO_3^- 濃度と NO_3^- 吸収速度の関係から、ダイズ根の NO_3^- 吸収の K_m は約 $19 \mu\text{M}$ であり、高親和性のトランスポーターの関与が示唆

図 3 ■ インタクトなダイズ植物の根の正味の NO_3^- 吸収速度の経時変化
時間 0 で 0.7mM NO_3^- を与えた。硝酸濃度は UV 検出器 (225 nm) で測定した。

された⁽⁶⁾。種々の実験から、さらに高濃度の NO_3^- を培地に与えた場合も、 NO_3^- の吸収速度は培地 NO_3^- 濃度によらずほぼ一定であった。したがって、ダイズでは低親和性の第二の NO_3^- トランスポーターの介在は疑わしく、見掛け上、高親和性の NO_3^- トランスポーターのみが NO_3^- の吸収に関与している。

3. 硝酸吸収速度の日変化

天然光ガラス室で水耕栽培したダイズの培養液中の硝

図 5 ■ 硝酸吸収速度の日変化に及ぼす培養液温度の影響
●：自然の温度条件，○：30°C に保温。根の温度のみ制御し、茎葉部の温度は同処理区で変わらない。

酸濃度と蒸散量を経時的に測定し、硝酸吸収速度の日変化を調べたところ、図 4 のような吸収経過を示した⁽⁷⁾。面白いことに、自然条件では照度、温度、湿度などは時刻々々と変化しているにもかかわらず、 NO_3^- 吸収速度は昼間もしくは夜間ともに時刻によらずほぼ一定であった。蒸散量は天候により大きく変化した。ただし、夜間の吸収速度は昼間より明らかに遅く、約 2/3 程度に留まった。また、夕方と明け方に吸収が一旦停止するという奇妙な現象が見つかった。

このような硝酸吸収の日変化リズムは、連続暗条件下の植物や茎葉部を切除した根でもしばらく繰り返されたことから、光の明暗や蒸散量、茎葉部から送られてくる光合成産物やシグナル物質でコントロールされているのではなく、おそらく根自身が昼夜を感知して NO_3^- 吸収速度を自己制御しているらしい。硝酸吸収の自己制御のメカニズムはわからないが、根(培養液)の温度を 30°C に保つと日変化リズムは完全に消失し、夜間も昼間と同じ速度で吸収を続け、また朝夕の一時停止も起こらなかった(図 5)⁽⁶⁾。したがって、ダイズの根は温度変化により昼夜を認識し、硝酸吸収速度の高速・低速のギャチェンジを行なっているのかも知れない。

高速・低速の切り換えは、インフラックス速度、エフラックス速度のどちらが主に関与しているかは不明であ

図 4 ■ 硝酸吸収速度の日変化

るが、次のような機構が予想される、①根の細胞内の NO_3^- や H^+ 濃度が昼夜で変化する、②硝酸の同化能や茎葉部への移行速度などが昼夜で変化する、その結果吸収速度に差が出る、③硝酸のトランスポーター自身またはその性質が昼夜で異なる。

予備の実験では、根の抽出液の pH は昼夜で大差ないが、根内の硝酸濃度は夜間の方が昼間より高いことが観察されている。また、根の NO_3^- 濃度は培養液の NO_3^- 濃度の影響を受け、高濃度硝酸培地で栽培したダイズの根には高濃度に硝酸が集積することから、ダイズは根内の硝酸濃度のコントロールにより、硝酸吸収速度を制御しているのかも知れない。

培養液にアンモニアや亜硝酸が共存すると硝酸の吸収が抑制されるが、これらの化合物が直接 NO_3^- 吸収を阻害しているのか、アミノ酸など代謝産物の集積により間接的に抑制しているのかはわかっていない^(2,7)。

4. 吸収した硝酸の茎葉部への移行

根粒を着生せず、硝酸のみを窒素源として栽培したダイズの切り株から採取した導管溢泌液の窒素化合物の主成分は硝酸とアスパラギンで、ほぼ等量ずつ含まれる⁽⁸⁾。植物を $^{15}\text{NO}_3^-$ 培地に移した後、最初の 15 分間に採取した溢泌液に含まれる N の約 8% がその間に吸収した $^{15}\text{NO}_3^-$ に由来していたことから、根で吸収した NO_3^- の一部は吸収後速やかに茎葉部に輸送されていることがわかった⁽⁸⁾。

根に吸収された NO_3^- の一部は、根の硝酸還元酵素 (NR)、亜硝酸還元酵素 (NiR) によりアンモニアに還元される。ダイズは、3 種の NR を持ち、1 つは通常の植物の同化型 NR と同様な性質をもつ基質誘導型の NR で、成葉、根や根粒の NR はこれにあたる。他の 2 つの NR は、子葉や若い葉にのみ検出される構成酵素であり、至適 pH は 6.5 と低い⁽⁹⁾。一般に、根や茎葉部に亜硝酸は検出されないことから、NR により生成した NO_2^- は直ちに NiR により NH_3 に変換されていると考えられる。 NH_4^+ は、根のグルタミン合成酵素 (GS)、グルタミン酸合成酵素 (GOGAT) によりはじめに同化され、アスパラギンに転換した後、茎葉部に移行する。また、硝酸に由来する窒素の一部は根の蛋白質に急速に取り込まれ、うち一部は早いターンオーバー速度で再分解され、主にアスパラギンとして根から茎葉部に窒素

を輸送する。根だけではなく、根粒、茎葉部などでも窒素の同化・再移動に蛋白質のターンオーバーの関与が明らかにされてきている⁽¹⁰⁻¹²⁾。これは、特定の蛋白質、たとえばダイズで最近発見された栄養器官貯蔵蛋白質 (VSP) の合成分解による可能性も指摘されている⁽¹³⁾。

茎葉部に移動した窒素の一部は、葉での同化を受けたのち篩管経路で、または茎や葉脈で直接導管から篩管に乗り移り、地下部へ再循環し、根の窒素栄養源として用いられることが知られている。この再循環窒素は、根端生長部や低窒素条件下の根ならびに窒素固定開始前の根粒の発育に役立つ。実際、根粒着生ダイズを生育全期間にわたり $^{15}\text{NO}_3^-$ 培養液で栽培したところ、根の窒素の半分以上が固定窒素 (非標識窒素) に由来し、根粒窒素の約 10~20% が硝酸 (標識窒素) に由来していた⁽¹⁴⁾。

根粒における窒素の固定と同化

ダイズの根粒は、根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) の細胞内共生組織であり、根より形成されるが、構造的にも機能的にも根とは異なる特異的な器官である。ダイズ根粒における固定窒素の同化と移行については、石塚による根粒着生ダイズにアラントインが高濃度に集積するという重大な発見⁽¹⁵⁾を契機に、①アラントイン生成部位は地下部であり⁽¹⁶⁾、主に根粒であること^(14,17,18)、②プリン塩基の分解経路で合成されること⁽¹⁹⁻²¹⁾、③固定窒素のアラントインへの取り込みは急速かつ活発であること⁽²²⁾、④アラントイン合成はバクテロイドではなく植物側で起こること⁽²³⁾、などの重要な知見が我が国の研究者により明らかにされた。その後さらに国内外で活発な研究が進められ、固定窒素の基本的な流れについては現在図 6 のように理解されている⁽²⁴⁻³⁴⁾。

根粒の中心部に位置する赤色の感染部位 (バクテロイド域) には、バクテロイド (共生関係が成立し窒素固定能が発現した状態の根粒菌) が密に詰まり、 O_2 運搬機能をもつレグヘモグロビン (Lb) を高濃度を含む大型の“感染細胞”と、無色小型の“非感染細胞”がモザイク状に相互に接触して代謝上の役割分担をしている。 N_2 はバクテロイドの持つニトロゲナーゼにより還元固定され、アンモニアに変換される。固定生成したアンモニアは、固定直後に大部分がバクテロイドから植物細胞質に放出され、細胞質のアンモニア同化系により同化される。感染細胞の細胞質には、根粒特異的に発現する GS

図 6 ■ ダイズ根粒における固定窒素の流れ

を多量に含み、バクテロイドから分泌されるアンモニアを活発にグルタミンのアミド基に取り込む。グルタミンはプラスチド内に局在する GOGAT によりグルタミン酸に変換され、さらにトランスアミナーゼの働きにより各種のアミノ酸に変換される。また、感染細胞のプラスチド内には、通常に微生物などで知られているのとはほぼ同様なイノシン酸 (IMP) 経路によるプリン塩基 *de novo* 合成系が存在する。そこで合成されたプリン塩基 (キサンチンと推定されている) は、非感染細胞に移動し、パーオキシソーム中の根粒特異的なウリカーゼで酸化され、アラントイン (ALN) となり、その一部は小胞体 (ER) のアラントイナーゼの働きでアラントイン酸 (ALA) に転換され導管経由で茎葉部へ窒素を運搬する。通常、固定窒素の移動形態のうち、約 80~90% がウレイド (ALA+ALN) で、ALA を ALN より多く含む。ダイズの窒素固定・同化・ウレイド合成は多くの酵素反応を含む複雑な過程であるが、 $^{15}\text{N}_2$ 固定開始数分後には植物細胞質のウレイドに ^{15}N が取り込まれていたことから、根粒ではきわめてターンオーバーの早い活発な代謝が行なわれている。

一方、根粒で固定した窒素のうち約 25~50% は、根粒自身の蛋白質合成に用いられる。その蛋白質のターンオーバーにより再放出された窒素は徐々に他の器官へ移行するが、その時の移行形態もウレイドらしい。

根粒の活発な代謝を維持するためには、多量の光合成産物と十分な酸素の供給が必須である。根粒の呼吸速度は根の約 4 倍程度高いことが知られている。光合成産物はシュクロースとして地上部から根粒に運搬されるが、バクテロイドへの直接の炭素源は、コハク酸などのジカルボン酸と考えられている。また、根粒の活性維持に酸素の供給はきわめて重要であり、過湿などで O_2 欠になると窒素固定活性は低下する。筆者らの実験でも、 O_2 濃度を下げると窒素固定は直線的に低下した⁽³⁵⁾。 O_2 濃

度 10% では、分子状酸素を必要とするウレイド合成が特に抑制され、また、 O_2 濃度 0% では、窒素固定はほとんど即時停止し、ニトロゲナーゼ反応だけでなくアンモニア同化系も強く阻害された。最近、乾燥条件やアセチレンを与えた時に窒素固定活性が急激に低下する原因は、酸素の透過を制御する“バリアー”の O_2 拡散抵抗が増すためと考えられている。このバリアーの実体は確認されていないが、Layzell ら⁽³⁶⁾は根粒皮層細胞間の気相間隙が水が塞ぎ、 O_2 拡散速度を遅らせると推定している。

根から吸収された硝酸は、そのまましくはアスパラギンに同化されて移行しているのに対し、根粒ではウレイドを主な移行形態とする理由は、よくわかっていない。生育の全期間に $^{15}\text{NO}_3^-$ を投与する実験などから、通常の濃度 (1 mM 程度) の硝酸培地でダイズを栽培した時、根でも NO_3^- から若干のウレイドが合成されるが、それは茎葉部にはほとんど移行せず、茎葉部や莢に高濃度に検出されるウレイドは大部分が根粒由来であることが確認された⁽¹⁴⁾。

Herridge は、窒素固定に由来する窒素の主成分がウ

レイドで、根から吸収した窒素の主な移行形態が、硝酸とアミノ酸（アスパラギン）であることを利用し、導管溢泌液もしくは茎葉部から真空採取した樹液の成分を分析することにより、窒素の何%を固定窒素に、残り何%を吸収窒素に依存しているかを推定する“相対ウレイド法”を開発した⁽³⁷⁻³⁹⁾。高橋らは、圃場栽培ダイズに本法を適用し、開花期から登熟期までの窒素固定と吸収窒素に依存する割合を推定した⁽⁴⁰⁾。この方法は、サンプリング時の試料植物の固定窒素と吸収窒素の“依存割合”を推定できるが、さらに窒素集積量の経時変化を併せて実測しておくことにより、生育時期別の“窒素固定量”および“吸収窒素量”の概算も可能である。

ところで、根粒の着生していないダイズでも地上部を切除した数日後には溢泌液にウレイドが検出される場合がある^(16,41)。しかし、根粒のウレイド合成系は窒素固定能の確立に伴い誘導され、根粒のウリカーゼは、根粒特異的に発現する蛋白質“ノジュリン”であることが知られている。根粒内で窒素固定および共生系の確立に伴い、どのような機構でウレイド合成系の発現が誘導されているかの解明は残された問題である。ダイズの根粒特異的なGSのmRNAの集積は、窒素固定開始に伴うアンモニア集積により誘導されるらしい。ウレイド合成系も高濃度のアンモニアやグルタミンその他の化合物の集積により誘導されるのか、もしくは低酸素分圧条件、根粒菌からのシグナルなどが発現調節に関係しているのかも知れない。

茎葉部における固定窒素と吸収窒素の代謝

窒素固定も硝酸還元もはじめにアンモニアに還元された後、同化される点は共通であるが、窒素固定は根粒で、硝酸還元は主に根と葉で行なわれるという違いがある。先述のように同化器官の差異を反映し、ウレイドが固定窒素の、硝酸とアスパラギンが吸収窒素の主な移行形態であるという大きな違いを生じる。

図7 ■ 根から吸収した硝酸と根粒で固定した窒素の動き
P: 蛋白質

この窒素輸送形態の違いにより、茎葉部における両窒素源の利用のされ方や、ダイズの生育状態にも違いを生じると考えられている。図7に硝酸に由来する窒素と固定由来窒素の体内移動のアウトラインを示す^(11,12)。根から吸収した硝酸由来窒素は大部分が一旦葉の蛋白質に同化され、その蛋白質分解により生じた窒素が主にアスパラギンに変換され、篩管を經由して莢実へ移動し子実生産に利用される⁽⁴²⁾。一方、根粒由来のウレイドは葉へも莢へも直接輸送される。莢へ移行したウレイドは、莢または種皮でアミノ酸に転換し、子実生産に用いられる。また、葉へ移動したウレイドは吸収窒素同様、一旦葉の蛋白質の合成分解を経た後、アスパラギンとして篩管經由で莢実に移動すると予想されている⁽⁴²⁾。

窒素の過剰施肥によって茎葉部の過繁茂が引き起こされ、むしろ種実生産が低下する現象は、固定窒素と吸収窒素の移動の違い、すなわち窒素固定に由来するウレイドは葉と莢実の両者に一次分配されるのに対し、吸収窒素の硝酸とアスパラギンはまず葉の蛋白質に同化され、二次的に莢へ分配されることによって説明できるかも知れない。葉への吸収窒素の過剰な流入は、葉や茎の伸長や蛋白質の集積を促進するが、莢実への光合成産物の供給や葉身窒素の再分配が低下し、実入りが悪くなるとも考えられる。

図 8 ■ ダイズの葉におけるウレイドの分解経路

Blevins らの研究⁽³¹⁾によると、葉におけるウレイドの代謝は図 8 の経路で、ウレイドグリコール酸を経て、 4NH_4^+ 、 2CO_2 とグリオキシル酸まで分解される経路が主要であると推定されている。この分解系では、尿素は中間体として生成しない。この経路の存在は、ウレアーゼ欠損ダイズ変異株が、窒素固定にのみ依存して正常に生育することからも裏づけられた。また、筆者と Blevins らの共同研究で、葉柄下端から蒸散により吸収させた ALA の葉身での分解は、アスパラギン共存下で強く抑制されることが示された。このことは、吸収窒素の移動形態であるアスパラギンが葉身でのウレイドの利用を阻害している可能性を示唆している。また、根粒着生ダイズに硝酸を与えると、窒素固定は抑えられるが、逆に根粒や茎葉部のウレイド濃度が増加する現象が見つかった^(43,44)。硝酸やアスパラギンの存在がウレイドの根粒からの輸送や葉での利用を阻害することは、ダイズが硝酸吸収を窒素固定より優先する機構とも関連するかも知れない。

根粒における硝酸の代謝

バクテロイドが強い NR 活性を持っていることは古くから知られており、また根粒の植物細胞質側にも植物由来の NR の存在が確認されていることから、根粒においても培地から吸収した NO_3^- の還元同化を行ないうる⁽⁴⁵⁾。

根粒への NO_3^- の流入経路は、①根粒表面から直接吸収する、②根から吸収した NO_3^- が導管經由で根粒に運搬される、③篩管經由で地上部から再循環する、の 3 通りが考えられる。筆者らが最近得た結果では、根粒着生根の下半分を $^{15}\text{NO}_3^-$ 培地に漬け、上半分は空中に曝して 5 日間栽培すると、培養液中の根粒の ^{15}N 濃度は、すぐ上の培地と接触していない根粒の約 5~10 倍程度高かった。この結果は、根粒が培地と直接接触している時には、①根粒表面からの NO_3^- の吸収が主であるように見える。ただし、培地に接触していない根粒にも $^{15}\text{NO}_3^-$ が検出されることから、量的には①より少ないが、②導管經由でも NO_3^- が移行しうる。また、茎葉部から根へ再循環した ^{15}N は根粒でも利用されるが、篩管經由の再循環窒素の主体はアスパラギンなどであり、 NO_3^- は少ないと思われる。

ところで、 NO_3^- は根粒内でどのように代謝されるのであろうか。根粒着生ダイズに $^{15}\text{NO}_3^-$ を吸収させた後の根粒内の各窒素化合物への ^{15}N 標識パターンは、根粒に $^{15}\text{N}_2$ を固定させた場合と酷似しており⁽⁴⁸⁾、ウレイドへも活発な ^{15}N の取り込みがみられた。さらに、根粒切片に $^{15}\text{NO}_3^-$ 、 $^{15}\text{NH}_4^+$ や $^{15}\text{NO}_2^-$ を投与した実験結果から、根粒内で NO_3^- は主にバクテロイドで還元され、アンモニアとして植物細胞質に放出された後は、図 6 に示した固定窒素の同化経路とまったく同様に代謝されるものと筆者は推定している⁽⁴⁶⁾。ただし、Streeter は、根粒内で植物細胞質の NR の役割のほうが大きい可能性を考えている⁽⁵¹⁾。

バクテロイドの硝酸還元

単生根粒菌では、NR は基質誘導酵素であるのに、根粒バクテロイドでは NO_3^- を与えなくてもきわめて高い NR 活性を示すことから、バクテロイド NR の窒素固定・代謝への関与が予想されたこともあった。しかし、現在では NR を欠く根粒菌変異株でも根粒形成・

図 9 ■ 根粒菌 *B. japonicum* の無機化合物の酸化還元能
太線は、すべての株が持つ能力。細線は菌株により示される能力。

窒素固定が正常にできることから、NR の存在は窒素固定に必須ではないと考えられてきている。バクテロイドの NR の発現は低酸素分圧条件下で誘導されるらしい。バクテロイドの NR は、Kennedy らにより精製され、他のバクテリアの呼吸型 NR と類似していることが示されている⁽⁴⁷⁾。

根粒中で NO_3^- は主にバクテロイドで還元されると考えられたため、単離したバクテロイドにおける硝酸還元⁽⁴⁸⁾の性質について検討した⁽⁴⁹⁾。興味深いことに、ダイズ根粒菌 (J-501 株) の単離バクテロイドでは、好気条件よりも嫌気条件下で 10 倍以上活発に NO_3^- を NO_2^- 、 NH_4^+ にまで還元する。しかし、この時還元生成したアンモニアはバクテロイドのアミノ酸にはまったく同化されなかった。また、嫌気条件下でのバクテロイドの硝酸還元は CO_2 放出とリンクしており、ATP 生産やニトロゲナーゼ活性とも共役しうる。これらの結果から、J-501 のバクテロイドは、 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ の異化型 (呼吸型) 硝酸還元能を持つことが示唆された。この菌株では N_2O の発生は検出されないことから、脱窒型の硝酸還元は行わないと思われる。

石沢⁽⁴⁹⁾は、種々の培養根粒菌株の硝酸還元の性質について調べ、菌株により、同化型、異化型 (呼吸型・脱窒型) の硝酸還元を示すという先駆的な発見をした。最近、単生根粒菌の脱窒能が、湛水土壤など嫌気条件の土壤における、根粒菌の生存およびエネルギーの獲得に役だっていると考えられる者もある。

図 9 に示すように、根粒菌は実に多様な無機化合物の酸化還元能を持つ。ニトロゲナーゼは、 N_2 を還元して NH_3 に変えると同時に反応副産物として H_2 を発生する。一方、菌株によっては uptake ヒドロゲナーゼを持ち、ニトロゲナーゼでロスした H_2 を再酸化してエネルギーを回収している。大部分のダイズ根粒菌バクテロイドは、高い NR 活性を持ち NO_3^- を NO_2^- に変換する。また、脱窒、呼吸、同化型の亜硝酸還元能を有する菌がいる。さらに、ある種の根粒菌では硝酸化能も併せ持つ可能性が示唆されている。アミノ

酸のみの培地で培養した単生根粒菌の培養残液に亜硝酸が検出されたという報告もある⁽⁵⁰⁾。また、筆者らの実験結果においても、インタクトな根粒に $^{15}\text{N}_2$ を曝露した直後の根粒、特にバクテロイド内の硝酸画分に ^{15}N が検出され⁽²²⁾、さらに根粒や単離バクテロイドに $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ の酸化活性が示された⁽⁴⁴⁾。また、Streeter は硝酸を含まない培地で栽培したダイズの根粒に誘導型の植物 NR 活性を検出し、これはバクテロイドから放出された NO_3^- により誘導された結果かも知れないと述べている。バクテロイドの硝酸化能の状況証拠は多いが、その生理的意義はよくわからない。

根粒菌は、ダイズ栽培圃場では普通に生息している土壤細菌でもあり、きわめて多様な能力を持つ菌株が存在することにより、様々な環境変化に対応したり、土壤団粒のいろいろな部位に棲み分けているのかも知れない。

硝酸による窒素固定の阻害機構

土壤中に高濃度の窒素が存在すると共生的窒素固定が阻害されることは古くから知られているが、その機構についてはいまだに十分理解されていない^(45,51-53)。硝酸の阻害効果は特に顕著であり、感染過程、根粒の生長、単位根粒重量当たりの窒素固定活性、根粒の機能の維持、根粒の寿命など、窒素固定の種々の面で阻害作用を示す。したがって、硝酸による窒素固定の阻害現象は、単一の機構では説明できず、複数の要因により多重または多段階に阻害が起こっているかも知れない。これらの

阻害効果のうちダイズに特に強く現われるのは根粒の肥大の阻害である。NO₃⁻を長期に与えたダイズ根粒では、感染細胞、非感染細胞、皮層細胞の数は、NO₃⁻を与えない根粒と変わらないが、細胞伸長（肥大）が阻害されることが観察されている。

硝酸による窒素固定阻害機構の仮説としては、①光合成産物が硝酸の還元同化に優先的に利用され、根粒への分配が低下する。②NO₃⁻またはNO₂⁻の還元産物（NO₂⁻、NO、NH₄⁺など）がニトロゲナーゼ活性やLbのO₂運搬機能を阻害する。③根粒内部へのO₂拡散調節機能を持つ“酸素拡散バリア”のO₂拡散抵抗が硝酸により増加し、呼吸能が低下する。④NO₃⁻は根粒からの窒素化合物の転流を阻害したり、窒素固定産物の集積をひき起こす結果、窒素固定が低下する。いずれの仮説も単独で窒素固定の阻害を説明できるものではない。硝酸の阻害効果については、窒素固定を行なっている根粒に硝酸を投与した直後にみられる可逆的な活性の低下という短期的阻害効果と、根粒の発達阻害や老化をひき起こす不可逆的な長期的効果を分けて考える必要がある。

マメ科植物が、窒素固定より硝酸を優先的に利用する理由については未だ理解されていない。従来、窒素固定・同化に要するエネルギーが硝酸還元・同化のエネルギーより大きいからと説明されてきたが、両者の過程に必要なエネルギーに本当に差があるのか疑問が出されている。他に硝酸同化を優先する生態学的理由として、土壌に窒素が存在する時は先に土壌窒素を吸いつくしたほうが、他の植物の生育を押さえ生存競争に有利になるという考えもある。

窒素固定と窒素吸収の調和による安定多収への道

1. 施肥法や栽培技術による両立

ダイズの安定多収のためには、根粒の窒素固定を十分活用する必要がある。さらに窒素施肥も窒素固定の阻害ができるだけ少ないように工夫するだけでなく、むしろ個体当たりの窒素固定を促進させる、より積極的な栽培技術が求められている。高濃度の速効性窒素肥料を一度に与えると窒素固定および根粒の発達を阻害するが、低濃度の窒素が生育期間全般にわたり徐々に供給されるようなときは、阻害効果は比較的少ないだけでなく、莖葉部の生長を促進したり葉の老化を遅らせ、その結果根粒着生を増したり、窒素固定活性期間の延長効果が期待で

図 10 ■ 緩効性窒素肥料の深層施肥法による窒素固定と施肥の調和

きる。また、窒素を局所的に施用すると、窒素濃度の低い土壌に位置する根では根粒形成が抑制されないだけでなく、促進する場合もある⁽⁵⁴⁾。その他、培土などで新しい根粒を地表面近くに形成させることも収量増に効果があるといわれている。そこで、これまで堆肥の施用など土壌肥沃度を高めたり、緩効性窒素肥料の施肥、窒素の追肥、中耕培土などが推奨されている。

最近、新潟県農業試験場の高橋らは、緩効性窒素肥料（被履尿素）を基肥として深層施用することにより、窒素固定能を抑制しないだけでなく、生育後半登熟期の窒素固定活性の保持にプラスの効果があることを認めた⁽⁵⁵⁾。これは図 10 に示すように、①緩効性窒素肥料を用いたため、低濃度の窒素を土壌の深層部から長期間にわたり徐々に供給した、②窒素が深層部に施肥されたため、根粒着生の良好な表層近辺の窒素濃度が低く抑えられ、根粒形成・窒素固定の阻害を受けにくかった、③登熟期後半まで深部の根が硝酸を吸収し続けることにより葉の老化を遅らせ、根粒への光合成産物の供給期間を延長し、窒素固定活性を長期に維持した、④その結果、子実肥大を促進し、高収量が得られたのかも知れない。

2. ダイズに硝酸耐性窒素固定能を付与する

硝酸が培地に存在しても、窒素固定能や根粒形成があ

図 11 ■パーミキュライト・パーライトで栽培したダイズ

品種 Williams と根粒形成変異株 NOD 1-3. 左: 5mM NO_3^- を含む培養液で栽培した NOD 1-3, 中: 無窒素培地で栽培した NOD 1-3, 右: 無窒素培地で栽培した Williams.

まり影響を受けないダイズを育成することにより、植物の必要に応じた自由な窒素施肥が可能になるかも知れない。Herridge は世界のダイズ品種を調べ、朝鮮系のダイズに硝酸耐性根粒形成株を見つけた⁽⁵⁶⁾。一方、最近、Gresshoff⁽⁵⁷⁾, Harper⁽⁵⁸⁾, 赤尾⁽⁵⁹⁾らが化学変異剤処理後選抜した超根粒着生ダイズ変異株は、例外なく硝酸耐性を併わせ持つことが示されている(図 11)。これらの根粒形成変異株はいずれも親株に比べ数倍から十倍も多くの根粒を着生する。この理由は、変異により茎葉部支配の根粒形成のオートレギュレーション機構を欠くことによると考えられている。オートレギュレーション機構は、①根の一部に根粒の形成が始まると感染シグナル(未知物質)が根から茎葉部へ輸送される、②感染シグナルを受け取った茎葉部でオートレギュレーションシグナル(構造不明)が合成され、根系へ移行し新しい根粒の発達を抑制する、という経路が考えられている。これは、植物が根粒の過剰着生を防ぐ機構らしい⁽⁶⁰⁾。

超根粒着生変異株がいずれも硝酸耐性を示すため、 NO_3^- による根粒形成の阻害はオートレギュレーションと関連している可能性がある。しかし、オートレギュレーションが根系全体の根粒形成を抑制するのに対し、 NO_3^- の阻害は、直接 NO_3^- を含む培地に接触している根部位に限定される局所的現象である。最近、筆者らがアメリカの品種 Williams とそれから選抜された根粒形成変異株の性質を比較し、次のようなことが明らかになった⁽⁶¹⁾。

① $^{15}\text{N}_2$ を親株、変異株に固定させたところ、単位根粒重当たりの窒素固定活性は、硝酸を培地に与えるところとも約半分に低下した。したがって、変異株の硝酸耐性はおもに根粒の肥大が NO_3^- で抑制されにくいことによる。

② $^{15}\text{NO}_3^-$ 吸収実験から、変異株では親株より、 NO_3^- の吸収同化能が低く、さらに根内の NO_3^- 濃度も低く保たれていた。根内の(恐らく細胞質部分の) NO_3^- 濃度と根粒形成に対する硝酸の阻害効果には因果関係があるかも知れない。根の中の高濃度の硝酸の存在は、オートレ

ギュレーションによる根粒の発育阻害効果を増強しているかも知れない。

③ 根や根粒の可溶性炭水化合物濃度は、変異株と親株で差がなく、培地硝酸の有無にも影響されなかった。これらの変異株の硝酸耐性機構はまだわからないが、耐機性構を調べることにより、硝酸による窒素固定の阻害機構を理解するヒントが得られるかも知れない。

*

ダイズは他のマメ科作物に比べて窒素固定に依存する割合が高く、高い活性を登熟後期まで維持することが安定多収につながる。また、施肥や土壌から吸収する化合態窒素は、窒素固定開始までの初期生長を促進したり、窒素固定能が低下しやすい登熟後期に窒素を補給して収量や品質を改善するのに役立つ。緩効性窒素肥料の深層施肥や根粒形成変異株の利用は、窒素固定と調和した安定多収技術としてきわめて有望である。

現在、肥料・農業の過剰施用による土壌の荒廃や地下水の汚染などが大きな問題となっており、“環境にやさしい低投入持続型農業”の必要性が訴えられている。共生的窒素固定を十分に生かす栽培法や窒素の施肥法は、省エネルギー・環境保全型の農業である。

近年、遺伝子工学的手法により、共生や窒素固定に関与する根粒菌遺伝子の構造や発現機構が急速に解明されつつあるが、植物側の根粒の形成・窒素固定同化移行の分子機構については十分理解されていない。本稿で概説

したように、ダイズは根粒による窒素固定と土壌からの硝酸の吸収により窒素を獲得しているが、どちらの過程も植物自身で高度に制御しているようにみえる。今後、ダイズの根粒形成のメカニズムや硝酸吸収と窒素固定の関係についてさらに詳しく研究が進めば、ダイズ栽培技術確立に役立つだけでなく、21世紀には実現が期待されるイネ、ムギ、トウモロコシなどに根粒、もしくは根粒様の器官を形成させ窒素固定を行なわせるために何が必要であるかというヒントが得られるかも知れない。

本稿を執筆する機会を与えて頂いた石塚潤爾先生、ならびに、研究遂行に当たり御指導頂いた熊沢喜久雄先生に感謝の意を表します。

文献

- 1) 御子柴公人：“写真・図解 転作ダイズ 誰でもできる400キロどり”，農文協，1990。
- 2) D. T. Clarkson：“Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants”，Martinus Nijhoff Publ., 1986, p. 3.
- 3) W. A. Jackson, W. L. Pan, R. H. Moll & E. J. Kamprath：“Biochemical Basis of Plant Breeding”，Vol. 2, CRC Press, 1986, p. 73.
- 4) C. E. Deane-Drummond：“Nitrogen in Higher Plants”，Research Studies Press, 1990, p. 1.
- 5) D. J. Pilbeam & E. A. Kirkby：*ibid.*, 1990, p. 39.
- 6) 大山卓爾，荒木 創，前田 浩，五十嵐太郎：土壤肥科学会講演要旨集，1991, p. 73.
- 7) T. Ohyama, K. Saito & N. Kato：*Soil Sci. Plant Nutr.*, 35, 33 (1989).
- 8) T. Ohyama, N. Kato & K. Saito：*ibid.*, 35, 131 (1989).
- 9) J. E. Harper：“Soybeans”，ASA, CSSA, SSSA Publ., 1987, p. 497.
- 10) 加藤泰正：農園，57, 1115 (1982).
- 11) T. Ohyama：*Soil Sci. Plant Nutr.*, 29, 133 (1983).
- 12) T. Ohyama：*ibid.* 30, 219 (1984).
- 13) P. E. Staswick：*Plant Cell*, 2, 1 (1990).
- 14) T. Ohyama, N. Owa, Y. Fujishima & K. Kumazawa：*Soil Sci. Plant Nutr.*, 27, 55 (1981).
- 15) 石塚潤爾：北海道農業試験場報告，101, 51 (1972).
- 16) 石塚潤爾：農園，45, 1053 (1970).
- 17) 松本哲男，山本幸男，谷田沢道彦：土肥誌，47, 447 (1976).
- 18) T. Ohyama & K. Kumazawa：*Soil Sci. Plant Nutr.*, 25, 9 (1979).
- 19) S. Fujihara & M. Yamaguchi：*Plant Physiol.*, 62, 134 (1978).
- 20) S. Tajima, M. Yatazawa & Y. Yamamoto：*Soil Sci. Plant Nutr.*, 23, 225 (1977).
- 21) T. Ohyama & K. Kumazawa：*ibid.*, 27, 111 (1981).
- 22) T. Ohyama & K. Kumazawa：*ibid.*, 24, 525 (1978).
- 23) T. Ohyama & K. Kumazawa：*ibid.*, 26, 205 (1980).
- 24) 大山卓爾：“根粒の窒素固定”，日本土壤肥科学会編，博友社，1982.
- 25) 田島茂行：土肥誌，57, 319 (1986).
- 26) K. Kumazawa, Y. Arima, T. Ohyama & K. Minamisawa：*Proc. Jpn. Acad.*, 63 B, 223 (1987).
- 27) 大山卓爾：新潟アグロノミー，22, 3 (1986).
- 28) 米山忠克：農園，63, 1217 (1988).
- 29) H. Kouchi：*Physiol. Plant.*, 73, 327 (1988).
- 30) K. R. Schubert：*Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37, 539 (1986).
- 31) D. G. Blevins：“Plant Nitrogen Metabolism”，Plenum Pub., 1989, p. 1.
- 32) J. S. Pate：*ibid.*, p. 65.
- 33) K. R. Schubert & M. J. Boland：“The Biochemistry of Plants”，Vol. 16, Academic Press, 1990, p. 197.
- 34) C. Atkins & L. Beevers：“Nitrogen in Higher Plants”，Research Studies Press, 1990, p. 223.
- 35) T. Ohyama & K. Kumazawa：*Soil Sci. Plant Nutr.*, 26, 321 (1980).
- 36) D. B. Layzell：“Plant Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology”，Longman Scientific Technical, 1990, p. 389.
- 37) D. F. Herridge：*Crop Sci.*, 24, 173 (1984).
- 38) 大山卓爾：“植物栄養実験法”，日本土壤肥科学会編，博友社，1990, p. 174.
- 39) 蒲生卓磨：農園，65, 445 (1990).
- 40) 高橋能彦，池主俊昭，南雲芳文，中野富夫，大山卓爾：土肥誌，印刷中。
- 41) 松本哲男，山本幸男，谷田沢道彦：土肥誌，47, 463 (1976).
- 42) T. Ohyama & S. Kawai：*Soil Sci. Plant Nutr.*, 29, 227 (1983).
- 43) T. Yoneyama：*ibid.*, 31, 133 (1985).
- 44) T. Ohyama, K. Saito & N. Kato：*ibid.*, 35, 9 (1989).
- 45) M. Bacana & J. I. Sprent：*Physiol. Plant.*, 70, 757 (1987).
- 46) T. Ohyama & K. Kumazawa：*Soil Sci. Plant Nutr.*, 26, 109 (1980).
- 47) I. R. Kennedy, J. Rigaud & J. C. Trinchant：*Biochim. Biophys. Acta*, 397, 24 (1975).
- 48) T. Ohyama & K. Kumazawa：*Soil Sci. Plant Nutr.*, 33, 69 (1987).
- 49) 石沢修一：“微生物と植物生育”，博友社，1977.
- 50) T. Sik & I. Barabas：“Recent Development in N₂ Fixation”，Academic Press, 1977, p. 365.
- 51) J. Streeter：*CRC Critical Rev. Plant Sci.*, 7, 1 (1988).
- 52) B. J. Carroll & A. Mathews：“Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation”，CRC Press, 1990, p. 159.
- 53) 金山喜則：農園，65, 1016 (1990).
- 54) 田中 明，斉藤 豊：土肥誌，52, 467 (1981).
- 55) Y. Takahashi, T. Chinushi, Y. Nagumo, T. Nakano & T. Ohyama：*Soil Sci. Plant Nutr.*, in press.
- 56) D. F. Herridge & J. H. Betts：*Plant Soil*, 110, 129 (1988).
- 57) B. J. Carroll, D. L. McNeil & P. M. Gresshoff：*Plant Physiol.*, 78, 34 (1985).
- 58) M. G. Gremaud & J. E. Harper：*Plant Physiol.*, 89, 169 (1989).
- 59) 赤尾勝一郎：化学と生物，29, 144 (1991).
- 60) 田川不士夫，丸山芳治：農園，64, 439 (1989).
- 61) T. Ohyama & J. E. Harper：植物生理学会講演要旨，1990, p. 62.