

大豆根粒中に固定された窒素の挙動に関する研究

〔新潟大学農学部 大山 卓爾〕

大豆は、食用のみならず飼料としても広く用いられ、植物性蛋白・油脂資源としてきわめて有用な穀物である。大豆の世界的な総生産量は近年急激に増加し、豆科穀物全体の約半分を占めるに至っている。子実中の蛋白含有率が高いことから大豆の生育には多量の窒素が必要であり、窒素がしばしば生育や収量の制限因子になるといわれている。ところで、大豆は通常土壌中の窒素（主に硝酸態）を根から吸収して利用するとともに、根粒で空中窒素を固定同化するという特徴を持っている。しかしながら両者の利用は必ずしも両立せず、窒素の多投は窒素固定を阻害することから、窒素増施により子実収量を高めようとする試みは十分には成功していない。本研究は、大豆における窒素の代謝過程・体内各組織間移動形態などについて、根粒で固定した分子状窒素と根から吸収した硝酸の挙動を比較しながら解析し、農業上重要な問題である大豆の窒素栄養に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

実験手法としては主として窒素の安定同位体である ^{15}N をトレーサーとして用い、試料の同位体比の測定は発光分光法で行った。これまで根粒で $^{15}\text{N}_2$ の同化を調べた実験では切断した根粒を用いる場合が多かったが、切断処理で窒素固定能が急激に低下することが最近示されており、また根粒とそれ以外の部分との物質交換を妨げることにより正常な代謝過程を攪乱するおそれもあることから、 $^{15}\text{N}_2$ 供与に際しては、植物を傷つけることなく、 ^{15}N 標識空気を入れた容器内に根部全体を密封して固定同化させ、その後の標識経過を追跡した。

はじめに、無窒素培地を用いた水耕法で栽培して根基部に根粒のよく着生した植物を2群に分け、根粒を $^{15}\text{N}_2$ に曝し根には標識していない硝酸を与える $^{15}\text{N}_2$ 処理と、その逆に N_2 は標識せず培地に ^{15}N 標識の硝酸を添加する $^{15}\text{NO}_3$ 処理を同時に施した。両処理とも窒素栄養上は差がなく、標識部位のみ異なる。標識開始8時間後の試料を比較すると、 $^{15}\text{N}_2$ 処理区の根粒ではグルタミン酸、アラニン、 γ -アミノ酪酸などの ^{15}N 濃度が高かったが、一方、 $^{15}\text{NO}_3$ 処理区の根ではアスパラギンが最も高い値を示した。分子状窒素も硝酸もそれぞれ最初の段階でアンモニアに還元されたあとに同化されることはよく知られているが、両者のその後の同化過程は必ずしも同様ではないことが示唆された。さらに茎の遊離窒素化合物については、 $^{15}\text{N}_2$ 処理ではアラントインの ^{15}N 濃度が最も高く、また、 $^{15}\text{N}_2$ に由来した窒素量と $^{15}\text{NO}_3$ に由来した窒素量の比を計算し、固定窒素と吸収窒素に対する依存率を調べたところ、アラントインが特異的に高く他の化合物の10~50倍も高い値を示した。このことは、根粒で固定窒素からアラントインが活発に作られ茎葉部へと移行していることを示唆している。ここで、根から吸収した $^{15}\text{NO}_3$ の根粒への移動が認められたが、根粒内では $^{15}\text{NO}_3$ は $^{15}\text{N}_2$ と全く同様に同化されていたため、両処理間にみられた移動形態の違いは根粒の窒素代謝の特殊性に起因すると推定した。

次に、生育期間中に同化した固定窒素全量と吸収窒素全量の分布を調べる目的で、初生葉展開直後から低濃度の $^{15}\text{NO}_3$ を水耕培地に連続的に供給した。本実験では標識窒素に由来する窒素量から硝酸に由来する窒素の分布がわかり、残りの非標識窒素は固定窒素に由来したと考えられ長期間にわたる両者の利用の差異がわかる。数日間では根粒に若干の移動しかみられなかった硝酸由来の窒素が長期的には根粒の発育にかなり利用されており、とくに生育初期にその割合が高かった。一方、根の窒素

についてもその半分以上が固定窒素に由来しており、茎や葉などの両窒素源の分布割合と大差なかった。体内各部位の遊離窒素化合物における固定窒素と吸収窒素に由来した割合を調べたところ、アミノ酸については、茎や葉の比率はほぼ根の値と同じであったが、根粒では固定窒素に依存する割合が高かった。一方、アラントインは茎葉部と根粒でほぼ同じ値を示し、固定窒素に依存する割合が高かった。これらの結果から、長期的にみても茎葉部のアラントインが大部分根粒に由来しており、根でも若干のアラントインが生成するがそれは地上部へほとんど移動しないことが明らかになった。また、アラントインは主に茎の木質部を通して地上部へ移動し子実の蛋白合成にも活発に利用されていることが認められた。

次に、根粒中における固定窒素の初期同化過程を詳細に検討する目的で、無窒素栽培した大豆の根粒に21分間 $^{15}\text{N}_2$ を供給し、その後さらに29分間大気に戻すパルス標識実験を行い、種々の根粒内遊離窒素化合物の ^{15}N 濃度を経時的に追跡した。窒素固定の一次産物であるアンモニアの ^{15}N 濃度は最も早くから立ち上がるが数分の内に頭打ちを示したことは、窒素固定により生成するアンモニアは根粒内のごく一部分に局在しており他のアンモニアとは容易に混り合わないことを意味している。そして固定生成したアンモニアはまずグルタミンのアミド基に取り込まれ、続いてグルタミン酸、アラニン等へと同化された。この結果は、根粒中で固定生成したアンモニアがグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) よりむしろグルタミン合成酵素 (GS) /グルタミン酸合成酵素 (GOGAT) 系で初めに同化されていることを支持するものである。また、根粒からの窒素の主要な移動形態であるアラントインへは5分前後のタイムラグののちに ^{15}N の急速な取り込みが認められ、新たに固定した窒素を用いてアラントインが活発に合成されていることを示した。アスパラギン酸とアスパラギンへの ^{15}N の取り込みは初期には低く、のち徐々に行われた。

大豆根粒内で固定生成したアンモニアの一次同化経路を確認するため、アンモニア同化酵素の特異的な阻害剤と ^{15}N 標識化合物の投与を組み合わせた実験を行った。GSの阻害剤であるメチオニンサルフォキシミン (MSX) またはGOGATの阻害剤であるアザセリン (AS) 溶液を根粒に注射したのちに $^{15}\text{N}_2$ を曝露して ^{15}N の取り込みを調べた。MSX前処理では、アンモニアの ^{15}N 濃度は6倍以上に高まったが、グルタミンのアミド基はじめ大部分のアミノ酸の ^{15}N 濃度が対照に比べて低下した。他方、AS前処理ではアンモニアとグルタミンアミド基の ^{15}N 濃度は増加したが、グルタミン酸、グルタミンのアミノ基やその他の化合物の ^{15}N 濃度は低くなった。この結果は、単独窒素固定細菌と同様に大豆の根粒でも固定生成したアンモニアを主にGS/GOGAT経路で同化していることを示すものである。さらにアミノ基転移酵素の阻害剤であるアミノオキシ酢酸がアラニン、セリン等への ^{15}N の取り込みを強く阻害したことから、根粒内で代謝回転の速いこれらのアミノ酸は主にグルタミン酸からのアミノ基転反応で生成すると考えられる。

ところで、根粒は根粒菌と植物の共生器官であり、窒素固定能を発現・維持するために高度に組織化されていることから、窒素の固定と同化に関しても一定の役割分担が成立している可能性がある。そこで両者の窒素の代謝過程を区別するために根粒を遠心法でバクテロイド (B) 画分と細胞質 (C) 画分に分離した。まず、窒素化合物の組成を比べたところ全く異なっており、B画分では相対的にアンモニアを多量に含有していたのに対し、C画分ではアラントインとアスパラギンが多かった。次に根粒に $^{15}\text{N}_2$ を固定させただけにB、C画分に分離して両画分の標識経過を調べた。その結果、バクテロイドで固定生成したアンモニアは大部分植物細胞質に放出され、ただちにGS/GOGATを経由し

て種々のアミノ酸に取り込まれたのち、最終的にアラントインなどとして茎葉部へ運搬されることが考えられた。一方、量的には少ないが、バクテロイド内ではアンモニアはGDH やアラニン脱水素酵素で最初に同化されるらしい。

根粒細胞質中でのアラントイン合成経路を確認するために¹⁵N もしくは¹⁴C 標識の化合物を投与したところ、プリン分解により生成するという説と一致する結果を得た。

根粒を¹⁵N₂に曝露した際、数分以内に硝酸画分への¹⁵N の取り込みが認められ経時変化はアンモニアのそれと類似しており、とくにB画分で高い¹⁵N 濃度を示した。バクテロイドの近傍で硝酸生成が行われている可能性がある。

最後に、根圏の酸素分圧が窒素固定・同化に及ぼす影響を調べたところ、無酸素条件下ではアンモニアへの¹⁵N の取り込みは認められたもののアミノ酸など他の化合物はほとんど標識されなかった。このことは窒素固定それ自身よりも、固定生成したアンモニアの同化過程のほうが無酸素条件に感受性が高いことを示唆している。

以上のように大豆体内の窒素の動態を¹⁵N を用いることにより明らかにすることができた。

注 本論文は日本土壌肥科学会奨励賞を受けた業績の概要であり、同学会誌 第54巻第3号所載の論文に基づいて記述した。