

共生窒素固定研究の最新情報 (3)

— 窒素固定産物の植物体内での移動 —

大山卓爾

1. はじめに

高等植物体内において、導管や篩管を経由する窒素の主な移動形態としては、安定で窒素に富み水への溶解度が高いアミド、アミノ酸、ウレイド、硝酸イオンなどが用いられている。アスパラギンやグルタミンなどのアミドを移動形態とする植物が一般的であるが、カエデ科、トチノキ科では、アラントイン酸などのウレイド化合物(ウレイド基 H_2NCONH -を持つアラントイン、アラントイン酸、シトルリンなどの化合物の総称)を根からの窒素輸送形態とするためウレイド植物と呼ばれている。

植物は、一般に硝酸やアンモニウムなどの無機態窒素を根で吸収し、導管を経由して地上部へ輸送する。根から吸収した硝酸は、そのままあるいは根で還元してアミドなどの有機窒素化合物に同化した後に、根から根圧と蒸散により地上部へ運搬する。また、木本植物や多年生植物では、冬期間などに根や地下茎に貯蔵した窒素を萌芽時に導管経由で地上部に輸送し、新梢や新芽の発育に用いることがある。

一方、葉で還元された硝酸や葉タンパク質の代謝回転や老化に伴い生じた窒素成分は、光合成産物の主要な形態であるショ糖とともに成熟葉から新芽や新葉、花や子実などの生殖器官および根、地下茎、根粒等の地下部へ篩管経由で輸送される。篩管輸送では、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、アスパラギン、その他アミノ酸が主な輸送形態であり、硝酸やウレイドは検出されない場合が多い。

本報告では、共生窒素固定系のうちマメ科植物根粒からの窒素の移動を中心に紹介する。

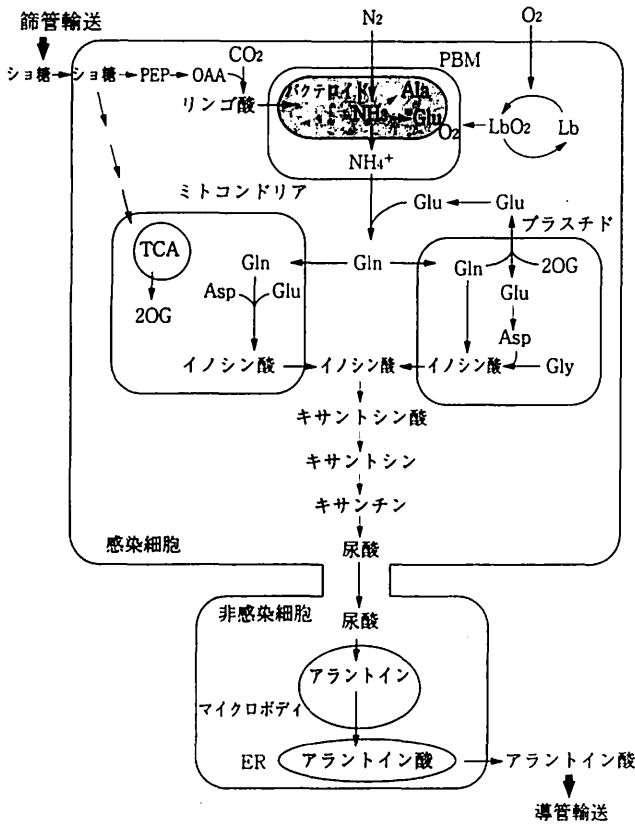
2. マメ科植物根粒からの窒素の移動

マメ科植物 (Leguminosae または Fabaceae) は、キク科、ラン科について種の数が多く、1万8千種に及ぶ²⁸⁾。マメ科は、ジャケツイバラ科(カワラケツメイ科 *Caesalpinioideae*)、ネムノキ科 (*Mimosoideae*)、マメ科 (*Papilionoideae*) の亜科に分類される(岩波生物学辞典第4版によるとマメ目の三科としている)。農業上重要なマメ科植物は、主に *Papilionoideae* に属し、一般に根粒を形成するが、他の2亜科は木本植物が多く、根粒を形成しない種も多い。*Papilionoideae* の族についてみると、*Aeschynomeneae* (ラッカセイなど)、*Loteae* (ミヤコグサ)、*Viciae* (エンドウ、ソラマメ等)、*Cicereae*、*Trifolieae* (アルファルファ等)、*Mirbelieae*、*Bossieae*、*Genisteeae* 族はアスパラギンと一部グルタミンを根粒からの輸送形態とする。一方、*Phaseoleae* 族(ダイズ、インゲン、ササゲ、カウピー、キマメなど)の全ての種と *Robinieae*、*Indigoforesae* と *Desmodieae* の幾つかの種は、アラントインとアラントイン酸を主に導管輸送するウレイド輸送植物である¹⁾。ネムノキ科(ネムノキ、アカシア等)のうち根粒を形成する種では、主にアスパラギンを輸送形態とする。ジャケツイバラ科は根粒を形成するものはまれであり、導管輸送形態に関する報告もない¹⁾。

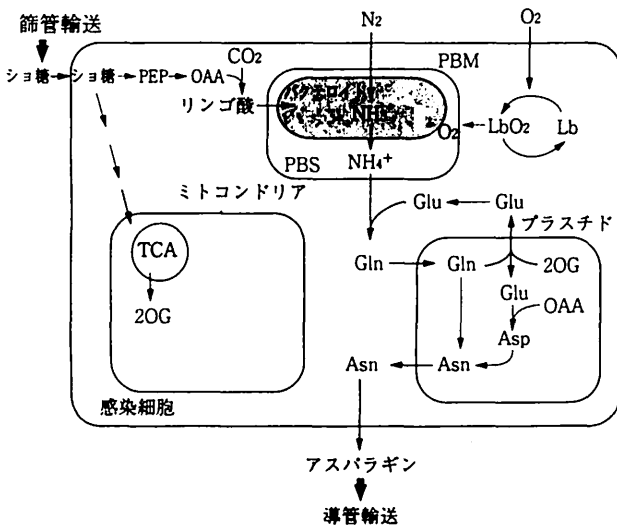
根粒の形態および発育様式の違いから、ダイズ、ササゲなどのような熱帯産マメ科植物に多く見られる球形の有限伸育型根粒と、アルファルファ、エンドウ、クローバーのような温帯産マメ科に多い円筒形の無限伸育型根粒に分類される。前者にはウレイド輸送植物が多く、後者にはアミド輸送植物が多い。ただし、球形の有限伸育型根粒を持

Takuji OHYAMA: Progress on Symbiotic Nitrogen Fixing Bacterial Research. — Transport of Nitrogen Fixation Products —. 農業技術57(9), 2002.

新潟大学農学部 応用生物化学科教授



第1図 ウレイドを輸送形態とするマメ科根粒における窒素代謝経路 (AtkinsとSmithの総説³⁾より改変)



第2図 アミドを輸送形態とするマメ科根粒における窒素代謝経路 (Vanceの総説⁴⁾より改変)

ウレイド植物ではバクテロイドのニトロゲナーゼにより N_2 から固定生成したアンモニアはバクテロイド膜を拡散により通過し、ペリバクテロイドスペース (PBS) でアンモニウムイオンとなり、ペリバクテロイド膜 (PBM) のアンモニウムトランスポーターにより細胞質に輸送される。固定窒素の一部はバクテロイド内でアラニンアミドログナーゼ (ADH) またはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) の作用でアラニン (Ala) またはグルタミン酸 (glu) に取り込まれる。感染細胞の細胞質でアンモニウムイオンは、グルタミン合成酵素 (GS) の働きではじめにグルタミン (Gln) 同化される。Gln のアミド基窒素はプラスチドに局在するグルタミン酸合成酵素の作用でグルタミン酸に渡される。感染細胞のプラスチドおよびミトコンドリア内でグルタミンのアミド窒素、アスパラギン酸、グリシンの窒素からイノシン酸 (イノシン-1-リン酸: IMP) が、ホスホリボシルピロリン酸アミドトランスフェラーゼ (PRAT)、グリシナミドリボヌクレオチド合成酵素 (GART)、ホルミルグリシナミジンリボヌクレオチドアミドトランスフェラーゼ (FGAR-AT)、アミノイミダゾールリボヌクレオチド合成酵素 (AIRS)、アミノイミダゾールリボヌクレオチドカルボキシラーゼ (AIRC)、ホスホリボシルアミノイミダゾールスクシノカルボキサミド合成酵素 (SICARS)、アデニロスクシネートAMPリアーゼ (ASAL)、アミノイミダゾールカルボキサミドリボヌクレオチドトランスホルミラーゼ (AICART)、イノシン-1-リン酸シクロハイドロラーゼ (IMPCH) の9段階の酵素反応で、de novo合成されると考えられている。感染細胞の細胞質でイノシン酸はIMPオキシドレダクターゼによりキサンチル酸 (キサンチン-1-リン酸: XMP) になり、酸性ホスファターゼで脱リン酸されてキサンチンとなり、キサンチンヌクレオシダーゼの作用でキサンチンを経て、NAD-キサンチンオキシドレダクターゼ (XDH) の作用で尿酸となると考えられている。尿酸は非感染細胞に運搬されてマイクロボディに局在する酵素ウリカーゼの作用でアラントインになり、さらに小胞体 (ER) でアラントイナーゼの働きでアラントイン酸となり細胞外へ放出され導管経路で地上部へ輸送される。

アミド植物でも、バクテロイドで固定したアンモニアの放出と植物細胞質でのグルタミンへの同化、プラスチドに局在するグルタミン酸合成酵素でのグルタミン酸への変換がおこる。プラスチド内でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AAT) の働きでグルタミン酸とオキサロ酢酸からアスパラギン酸が合成される。アスパラギン酸合成酵素 (AS) の働きでアスパラギン酸にグルタミンのアミド基窒素が転位し、アスパラギン酸を合成した後、細胞質からアポプラストへ放出されて導管経路で地上部へ運搬される。

つマメ科植物の中には、ミヤコグサやラッカセイのようにアミドを根粒からの輸送成分にするという例外もある。

特殊な窒素成分、例えばラッカセイに含まれる4-メチレングルタミン、ナタマメのカナバニン、エンドウのホモセリンが、窒素固定産物の輸送形態と考えられたこともあったが、現在ではこれらの窒素化合物は、種子貯蔵窒素由来の移動形態として生育初期に用いられる場合はあるが、根粒由来の固定窒素の移動形態ではない、と考えられている^{1, 3, 8)}。

マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定系以外について、放線菌フランキアと非マメ科植物との共生系およびラン藻とソテツの共生系の一部においてはシトルリンが主要な固定窒素移動形態と考えられている^{1, 3)}。

第1図にウレイド輸送型根粒の、第2図にアミド輸送型根粒の固定窒素の代謝過程を示す。どちらのタイプの根粒でもバクテロイド(根粒内で窒素固定活性を発現した状態の根粒菌)は、感染細胞内にペリバクテロイド膜(PBM)に包まれており、バクテロイドとPBMおよびその間の空間(シンビオソームスペース:SBP)を含めてシンビオソームと呼ぶこともある³⁴⁾。バクテロイドまたはシンビオソームは、ミトコンドリアや葉緑体のような細胞内器官と良く似た状態にある。

N_2 分子は拡散により、根粒表面からバクテロイドへ到達し、酵素ニトロゲナーゼの働きによりアンモニアに還元、固定される。生成したアンモニアは速やかにバクテロイド膜を NH_3 として拡散した後、酸性のPBS中で NH_4^+ イオンとなり、PBMに高密度に存在するアンモニウムトランスポーターにより、植物細胞質に放出されると考えられている³⁴⁾。

植物細胞質に放出されたアンモニウムイオンは、細胞質内のグルタミン合成酵素(GS)の働きでグルタミン酸(Glu)に結合してグルタミン(Gln)となる。根粒特異的なGSは、感染細胞内に高濃度に存在し、固定生成したアンモニアを効率的に同化して、毒性のあるアンモニアの細胞内集積を防いでいる。グルタミンはプラスチド局在性のグルタミン酸合成酵素(GOGAT)の触媒作用で2-オキシ

グルタル酸(2OG)と反応し、2分子のグルタミン酸を生産する。

バクテロイドへのエネルギー源としての炭素化合物としては、主にリンゴ酸などの C_4 ジカルボン酸であり、光合成産物として篩管經由で送られてくるショ糖が感染細胞内で代謝を受けることにより供給される。根粒菌内膜の C_4 ジカルボン酸トランスポーターを欠損した根粒菌株は、窒素固定能を持たない(Fix-)根粒を形成するため、ジカルボン酸の供給は根粒の窒素固定維持に必須であると考えられている。

一方、分離したバクテロイドにグルタミン酸やアラニン、グリシン、アスパラギン酸などのアミノ酸を与えると、それらはバクテロイドに取り込まれて代謝されること^{12, 20)} およびグルタミン酸、グルタミン、グリシン、セリン、トリプトファン要求性の根粒菌でも有効根粒を形成することから、バクテロイド膜は一定程度アミノ酸の透過能を持つと考えられる。しかし、アミノ酸や糖のPBM透過速度は遅いため、アミノ酸がバクテロイドのエネルギー源として用いられている可能性は小さいと考えられている³⁵⁾。

マメ科植物根粒において、固定した窒素は、アンモニアとして排出され、植物細胞質でGS/GOGAT系ではじめに代謝されるという経路は、トレーサー実験、酵素の局在性、遺伝子発現の解析などから、ほぼ確立したものと考えられていたが、1998年ミズーリ大学のWatersらは、ダイズの根粒において、バクテロイドから植物に移行する窒素はアラニンであり、アンモニアではないと報告した³⁷⁾。これは、「ショ糖密度勾配法で精製したバクテロイドに $^{15}N_2$ ガスを供与したところ、 ^{15}N 標識アラニンが外液に分泌されたがアンモニアは検出されなかった」という実験結果に基づいている。さらに「バクテロイドから植物細胞質へ出たアラニンはその後リンゴ酸に変換し、再度バクテロイドへ戻る」というシャトルモデルも提出している³⁸⁾。しかしながら、その後Liらがショ糖密度勾配とパーコール密度勾配遠心法で厳密にバクテロイドを精製し、さらに基質やレグヘモグロビンを連続的に与えるフローシステムを用いてバクテロイドの環境条件を一定にして $^{15}N_2$ を供給し

たところ、窒素固定産物はアンモニアであるという従来の説を支持するデータが得られた¹³⁾。

20年以上前に筆者らが行ったダイズ根粒に対する一連の¹⁵N₂供与実験において、バクテロイドで固定した窒素の大部分がアンモニアとして速やかに植物細胞質へ放出され、GS/GOGAT経路で同化されているという結果を示した。ダイズ根粒に¹⁵N₂を5分間供給後、直ちにバクテロイドと植物細胞質に分画し¹⁵Nの分配を調べた結果、可溶性¹⁵N窒素の97%が細胞質に分布していた²⁰⁾。また、インタクトなダイズ根粒へ¹⁵N₂供与後、根粒内の各化合物への標識経過を調べた実験では、¹⁵N₂開始数分後には、アンモニアとグルタミンのアミド基が標識され、グルタミン酸、アラニン、ウレイドへの¹⁵Nの取り込みがそれに続いた¹⁸⁾。さらにグルタミン合成酵素、グルタミン酸合成酵素、アミノ基転移酵素の各阻害剤を用いた実験結果¹⁹⁾も根粒内でアンモニアは、GS/GOGAT系で同化されており、根粒全体では、アラニンは主にグルタミン酸のアミノ基転移により生成していることと一致した。確かに、固定生成したアンモニアの一部または外部から与えたアンモニアからバクテロイド内でアラニンが合成されるが、根粒全体で見るとアラニンへの¹⁵Nの取込みは、主に植物側におけるグルタミン酸からのアミノ基転位による。カウピー根粒においても同様な結果が示された³⁾。

Watersらが¹⁵N₂標識実験で過った結論に陥った原因としては、単離したバクテロイドの実験から得られた結果のみから結論を導き出したこと、および微量のアンモニアは、揮散や吸着により失われやすく、また試薬や水に不純物として含まれるため、正確な分析が難しいためと思われる。

*Krebsiella*や*Azotobacter*のような単独窒素固定菌は、利用可能な窒素化合物が環境に欠乏すると窒素固定能を発現するが、根粒菌の窒素固定遺伝子は窒素欠乏により発現するのではなく、低酸素条件により誘導される。むしろ、窒素固定能を発現しているバクテロイドではアンモニア同化系のGSが抑制を受けており、N₂を固定してNH₃を放出するオルガネラとして感染細胞内で働くように進化してきたと考えられている。

グルタミン酸からは、アミノ基転位酵素等の働

きでアスパラギン酸やアラニンその他のアミノ酸が合成される。アミド植物では、アスパラギン合成酵素(AS)の働きでアスパラギン酸にグルタミンのアミド基窒素が転移し、アスパラギンを合成して細胞外アポプラストへ放出されて導管経由で地上部へ運搬される(第2図)。

一方、ウレイド植物では感染細胞と非感染細胞の共同作業により、複雑な過程を経てアラントイン、アラントイン酸が作られる。第1図のように、感染細胞のプラスチド内で、グルタミンのアミド窒素、アスパラギン酸、グリシンの窒素からイノシン酸(イノシン-1-リン酸:IMP)が9段階の酵素反応で、de novo合成されると考えられている。これらの酵素の多くは細胞内局在性や遺伝子が明らかにされているがまだ未解明のものも残されている¹⁾。細胞質でイノシン酸は、IMPオキシドレダクターゼによりキサントシン酸(キサントシン-1-リン酸:XMP)になり、さらにキサントシン、キサントチンを経て尿酸となると考えられている。

尿酸は非感染細胞に運搬されて、ミクロボディーに局在する酵素ウリカーゼの作用でアラントインになり、さらに小胞体(ER)でアラントイナーゼの働きでアラントイン酸となり細胞外へ放出され導管経由で地上部へ輸送される。Takaneらは、ダイズのウリカーゼにはUR2とUR9の二つのタイプがあり、根粒でアラントインを合成するウリカーゼは、根粒特異的なUR2で、UR9はどの器官でも発現しており、不要なプリン塩基を分解するハウスキーピングな働きをしていることが示唆された³³⁾。

Atkinsらのモデル⁴⁾と約10年前の総説^{5, 36)}に示されたモデルとの主な違いは、①ミトコンドリアにおいてもイノシン酸合成が行われる、②イノシン酸から尿酸までの代謝が感染細胞の細胞質でおこなわれる、③キサントチンを中間体としている、④感染細胞から非感染細胞への窒素の移動がキサントチンから尿酸に変更されていることである。Atkinsらのモデルは、パーコール遠心分離で分画して調べたカウピー根粒の実験結果を根拠している²⁾。

ダイズにおいて根粒からの窒素移動形態は、接種する根粒菌が、*Rhizobium fredii*, *Brady-*

*rhizobium japonicum*にかかわらず、ウレイドが主成分であることが確認された³⁹⁾。またダイズ導管液成分では、ウレイドのうち、アラントインが20%程度で、アラントイン酸が約80%を占める²⁷⁾。

3. マメ科植物の根からの吸収窒素の移動形態

一般に、根粒からの移動形態がアミドであってもウレイドであってもマメ科植物の根からの窒素の主要な導管移動形態は硝酸とアミド(アスパラギン)である²¹⁾。一般に、導管液中の硝酸とアミドの割合は、土壌や培地中の硝酸濃度および植物種や生育段階、生育環境による根の硝酸還元酵素活性の違いにより影響を受ける。一般にイネ科植物に比べて、マメ科植物は根の硝酸還元の寄与が比較的高い場合が多い。

ダイズなど根粒からの固定窒素の移動形態がウレイドである植物でも根からの吸収窒素の移動成分としてはアミドの割合が高いことが知られている。最近、Fentesらは、地下部にイモを形成するヤムビーンでは、根粒にのみ依存する場合も、化合態窒素にのみ依存する場合も、導管液成分としては、アスパラギンとアラントイン、アラントイン酸が約6:2:2と同比率で含まれ、根における窒素代謝と根粒の窒素代謝が同様であることを発見した⁷⁾。ヤムビーンの根と根粒のウレイド代謝を調べることにより、根粒におけるウレイド合成機構解明のヒントが得られるかも知れない。

二重のポットで根を上下に分け、上部の根のみ根粒が形成されるような条件でダイズを栽培したところ、ウレイドは、下根にはほとんど検出されなかったことから根粒着生時にダイズ体内に存在するウレイドの大部分は根粒由来であると判断された²³⁾。しかしながら、根粒非着生ダイズT201の導管液からも低濃度ではあるが常にウレイドが検出され、根粒着生ダイズT202よりはひと桁少ない量であるが、ウレイドが常時合成され地上部へ移動している³⁰⁾。また、根粒非着生ダイズにおいて、培養液の硝酸濃度を高めると導管液のウレイド濃度は上昇し、また、硝酸よりもアンモニアを与えた方が導管液のウレイドは高濃度に検出された¹⁵⁾。さらに、根粒非着生ダイズ根では、根端部にウレイドが高濃度に集積しており、根端部で

ウレイド合成が活発であることが示唆された¹⁵⁾。根粒からの輸送形態がアスパラギンであるアルファルファにおいても、導管液中に微量のアラントイン、アラントイン酸が検出され、根端部の集積が確認された²²⁾。

ウレイドを主な輸送形態とするマメ科植物の根粒では、プリン塩基の合成と分解という複雑な反応を採用して、アラントインやアラントイン酸を輸送形態として用いる理由はいまだに解明されていない。根端部において吸収した窒素、特に高濃度のアンモニアからウレイド合成が促進されることから類推すると、根粒内の窒素過剰や、炭素源不足、またはその両者が窒素のアミド合成からウレイド合成への代謝、ギアチェンジの引き金になっているのかも知れない。根端部において根粒特異的なウリカーゼが発現しているかどうかは興味深い。植物において炭素と窒素の代謝は、相互に関連し、複雑かつ高度な制御を受けて環境や生育に合わせて最適化されていると考えられているが、炭素窒素代謝制御の分子機構についてはよく分かっていない部分が多い。

近年、短半減期放射性核種である¹³Nの植物における二次元分布を経時的に観察できるポジトロンイメージングシステムが、硝酸の移動の解析等に用いることができるようになった。インゲンとダイズの一本の根に与えた¹³N標識硝酸は、根粒菌感染部位である根端部に集積が観察されたことから硝酸の感染阻害機構との関連が示唆された¹⁴⁾。また、根から吸収した硝酸の一部は10分程度で葉身に到達すること、根粒非着生株の方が、着生株よりも硝酸吸収と茎葉部への分配が活発であることが示された²⁶⁾。また、ダイズの根から吸収した硝酸は、一旦葉での代謝を受けた後に莢へ再移動するが、窒素飢餓状態では莢への移動速度が早まることが観察された¹⁷⁾。これらの結果は、植物の窒素栄養状態や器官ごとの窒素要求性の違いが窒素の移動速度や分配量に大きな影響を与えていることを示している。

ラッカセイは、莢が地中で肥大する特異な性質を持つ。このため、莢自身も窒素を吸収するが、根、根粒および、茎葉部からの再転流窒素を子実肥大に利用する。Gotoらの報告によると、根粒か

らの導管液の主成分はアスパラギンであり、根から吸収した窒素では、硝酸とアスパラギンであった⁸⁾。稲永らの報告でも、根粒のみに依存する無窒素栽培でも、硝酸またはアンモニアを与えた植物でも茎基部から採取した導管液の窒素成分としては、アスパラギンが半分以上を占めた。しかし、子房柄から採取した液の成分はグルタミンが主成分であったことから茎葉部よりの再転流窒素の主成分はグルタミンであると結論付けた¹¹⁾。

4. 相対ウレイド法による窒素固定活性の推定

Herridgeらは、根粒からの移動形態が主にウレイドであるマメ科作物の窒素固定と根からの吸収窒素に対する依存率の推定に、切断直後の茎基部から採取する導管液、または、茎葉部から吸引採取した液中のウレイド態窒素、 α アミノ態窒素、硝酸態窒素濃度を吸光分析により定量し、総窒素量にしろるウレイド窒素の割合から窒素固定依存率を推定する相対ウレイド法を開発した¹⁰⁾。茎から採取する液よりも根からの導管液の方がよりサンプリング時点の窒素固定と吸収窒素の移動形態を反映していると考えられるが、土壌水分条件や植物の生育段階などにより根からの導管液が採取できない場合もあるため、地上部からの採取も行われる。ただし、地上部から採取した液の成分組成は根から採取したものと若干異なるため注意が必要である。そのため、Herridgeらは、濃度段階を変えて¹⁵N標識肥料を与え、窒素固定と吸収窒素の割合を実測して実験的に補正式を出し、相対ウレイド値から窒素固定依存率を算出することを提案した¹⁰⁾。キマメ²⁵⁾、インゲン⁹⁾においても相対ウレイド法が適応できることが確認された。

高橋らは、新潟の転換畑におけるダイズ施肥試験に相対ウレイド法を適用した³¹⁾。施肥の違いや生育段階で導管液のアミノ酸やアミドの組成は変化するが、通常のダイズ導管液の主要な成分は窒素原子を二つ持つアスパラギンであることから、相対ウレイド値を求める式を改変して、ウレイド態窒素、 $2 \times \alpha$ アミノ態窒素、硝酸態窒素の総量に占めるウレイド態窒素の割合を指標とする

単純相対ウレイド法を圃場栽培の根粒着生ダイズにおける窒素固定依存率の簡易推定法として提案した²²⁾。実際、生育時期や施肥条件をかえて導管液内各種アミノ酸の1アミノ酸あたりの平均窒素原子数を求めたところ約1.5~1.9であり、2に近かった²⁴⁾。

相対ウレイド値はあくまで固定窒素と吸収窒素の相対的な依存割合を示し、直接窒素固定活性を示す値ではないが、生育段階別に試料を採取し窒素集積量の変化を勘案することにより、生育時期別窒素固定速度と窒素吸収速度を見積もることができる²²⁾。また、積算により、生育全体の窒素固定量と窒素吸収量も推定可能である。

農業現場で窒素固定能や窒素吸収速度を解析することは重要であり、¹⁵N標識肥料による稀釈法や根粒着生、非着生系統の窒素集積量の差から推定する差し引き法などがあるが、相対ウレイド法は、簡便で経費もあまりかからず、信頼性のあるデータが得られる利点がある。最近、キャピラリー電気泳動法により、1回の分析で導管液中の硝酸、アスパラギン、アラントイン、アラントイン酸を分析できる方法が開発され導管液の分析が容易になった²⁷⁾。

単純相対ウレイド法を圃場試験に適用して、被覆尿素の深層施肥が根粒の窒素固定を阻害せずダイズの収量増加に極めて効果的であること³¹⁾、³²⁾、ダイズ品種Williamsから分離された根粒超着生系統では、生育時期を通して窒素固定に依存する割合は高いが、栄養生長が親株より劣るために窒素固定速度と窒素吸収速度が親株よりも低いこと²⁹⁾などが確認されている。

参考文献

- 1) Atkins C. A. 1991. Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. In: *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*. Elsevier Science Publishers, 293-319
- 2) Atkins C.A. et al. 1997. Reexamination of the intracellular localization of de novo purine synthesis in cowpea nodules. *Plant Physiol.* 113. 127-135
- 3) Atkins C. A. Thumfort P. P. 2002. Assimilation of fixed-N in a ureide-forming symbiosis. *Nitrogen Fixation: Global Perspectives*. CABI Publishing. 256-257
- 4) Atkins C. A. Smith P. 2000. Ureide synthesis in legume nodules. *Prokaryotic Nitrogen Fixation*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. 559-587

- 5) Blevins D. G. 1988. An overview of nitrogen metabolism in higher plants. *Plant Nitrogen Metabolism*. Plenum Press 1-41
- 6) Cheng X. G., et al. 1999. *Soil Sci. Plant Nutr.* 45, 921-927
- 7) Fentes, J. B. et al. 2000. Identification of the type of nitrogenous compounds (including amino acids) relating to the translocation of fixed nitrogen in yam bean, *Pachyrhizus erosus* L. Urban. 植物微生物研究会10回要旨集126-127
- 8) Goto S. et al. 1987. Xylem sap composition of nodulated and non-nodulated groundnut plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 33, 619-627
- 9) Hansen A. P. et al. 1993. Xylem-solute technique to measure N₂ fixation by *Phaseolus vulgaris* L. : Calibration and sources of error. *Plant and Soil* 150, 223-231
- 10) Herridge D. F. Peoples M. B. 1990. Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ¹⁵N methods. *Plant Physiol.* 93, 495-503
- 11) 稲永醇二 井元ゆかり. 1994. ラッカセイの莢実部への窒素の転流形態. 土肥誌. 65, 554-559
- 12) Kouchi, H. et al. 1991. Metabolism of glutamate and aspartate in bacteroid isolated from soybean root nodules. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2901-2910
- 13) Li Y. et al. 2001. Supply of O₂ regulates demand for O₂ and uptake of malate by N₂-fixing bacterioids from soybean nodules. *Microbiology.* 147, 663-670
- 14) Matsunami H. et al. 1999. *Soil Sci. Plant Nutr.* 45, 955-962
- 15) 森(鈴木) 百子他1997. 植物微生物研究会 7 回要旨集 62-64
- 16) Ohtake N. et al. 1995. Amino acid composition in xylem sap of soybean related to the evaluation of N₂ fixation by the relative ureide methods. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 41, 95-102
- 17) Ohtake N. et al. 2001. Rapid N transport to pods and seeds in N-deficient soybean plants. *J. Exp. Bot.* 52, 277-283
- 18) Ohyama, T. Kumazawa K. 1978. Incorporation of ¹⁵N into various nitrogenous compounds in intact soybean nodules after exposure to ¹⁵N₂ gas. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, 525-533
- 19) Ohyama, T. Kumazawa K. 1980. Nitrogen assimilation in soybean nodules I. The role of GS/GOGAT system on the assimilation of ammonium produced by N₂-fixation. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 26, 109-115
- 20) Ohyama, T. Kumazawa K. 1980. Nitrogen assimilation in soybean nodules II. ¹⁵N₂ assimilation in bacteroid and cytosol fractions of soybean nodules. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 26, 205-213
- 21) 大山卓爾1991ダイズにおける硝酸の吸収代謝と窒素固定. 化学と生物. 29, 433-443
- 22) 大山卓爾他. 1992. 単純相対ウレイド法による圃場栽培ダイズの窒素固定活性と窒素吸収速度の評価. 農業および園芸, 67, 1157-1164
- 23) 大山卓爾他. 1993, 二重ポットで栽培したダイズにおける根粒由来のウレイドと下根由来の硝酸の分布. 新潟大学農学部研究報告. 45, 107-116
- 24) Ohyama T. et al. 1994. Effect of N fertilization on seed quality and xylem transport forms in nodulating and non-nodulating soybean isolines. *Bull. Facul. Agric. Niigat Univ.* 46, 57-70
- 25) People, M.B. et al. 1989. Development of the xylem ureide assay for the measurement of nitrogen fixation by pigeon pea (*Cajanus cajan* [L.] millsp.) *J. Bot.* 40, 535-542
- 26) Sato T. et al. 1999. Analysis of nitrate absorption and transport in non-nodulated and noduled soybean plants with ¹³NO₃⁻ and ¹⁵NO₃⁻. *Radioisotopes.* 48, 450-458
- 27) Sato T. et al. 1998. Determination of leghemoglobin components and xylem sap composition by capillary electrophoresis in hypernodulation soybean mutants cultivated in the field. *Soil Sci. Plant Nutr.* 44, 635-645
- 28) Sprent, J. I. 2001. *Nodulation in Legumes*. Royal Botanic Garden Kew.
- 29) Sukanuma T. et al. 2001. Comparison of the growth and nitrogen fixation activity of the hypernodulation soybean mutant NOD1-3 and its parent cv. Williams in field cultivation. *Bull. Facul. Agric. Niitata Univ.* 53, 123-132
- 30) 高橋能彦他1991. ダイズ根粒着生に関する同質遺伝子系統の導管液中のウレイド態窒素の含有率. 土肥誌, 62, 431-433
- 31) 高橋能彦他1993. 緩効性窒素肥料(被覆尿素)の深層施肥によるダイズ安定多収技術の植物栄養学的解析. 農業および園芸, 68, 282-288
- 32) Takahashi Y. Ohyama T. 1999. Technique for deep placement of coated urea fertilizer in soybean cultivation. *JARQ.* 33, 235-242
- 33) Takane K. et al. 1997. Expression of a gene for uricase II (nodulin-35) in cotyledons of soybean plants. *Plant Cell Physiol.* 38, 149-154
- 34) Udvardi, M. K., Day, D.A. 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 493-523.
- 35) Vance C. P. 2000 Amide biosynthesis in root nodules of temperate legumes. In : *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*. Elsevier Science Publishers 589-607
- 36) Verma D. P. S. 1988. Plant genes involved in carbon and nitrogen massimilation in root nodules. *Plant Nitrogen Metabolism*. Plenum Press. 43-63
- 37) Waters J. K. et al. 1998. Alanine, not ammonia is excreted from N₂-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 12038-12042
- 38) Waters J. K. Emerich, D. W. 2000. Transport of metabolites to and from symbiosomes and bacteroids. In : *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*. Elsevier Science Publishers 549-558
- 39) Yamakawa T. Shirai T. Ishizuka J. 2000. Effects of symbiosis with *Rhizobium fredii* on transport of fixed nitrogen in xylem sap of soybean plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 46, 885-892