

ふりがな サルワ アハメッド モハメッド アブデル ラティフ
氏名 Salwa Ahmed Mohamed Abdel-Latif
学位 博士 (学 術)
学位記番号 新大院博 (学) 第 159 号
学位授与の日付 平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名

Studies in Regulation of *In Vivo* Nitrate Reduction in Barley (*Hordeum vulgare* L.)
(オオムギにおける生体内硝酸還元の研究)

論文審査委員 主査 教授 大山 卓爾
副査 教授 尾和 尚人
副査 教授 福山 利範
副査 助教授 野中 昌法
副査 助教授 末吉 邦

博士論文の要旨

植物は土壌中の窒素源として主に硝酸を利用する。植物の根から体内に取り込まれた硝酸は、硝酸還元酵素 (NR) によって亜硝酸に還元され、さらに亜硝酸は亜硝酸還元酵素によりアンモニウムに還元された後、このアンモニウムがアミノ酸の窒素として利用される。この一連の過程は、硝酸同化と呼ばれ、植物の窒素利用効率を決定付けている重要な代謝系と位置づけられている。硝酸同化の最初の反応である硝酸還元は、硝酸同化を律速しているとされ、この反応を担う NR は、植物の内的および外的環境要因によって高次に統御されているが、その全容は明らかになっていない。これまでの NR の制御機構に関する研究の多くは、遺伝子の発現と生化学的な制御機構の解明に集中しており、生体内における実際の硝酸還元がどのように制御されているかが不明であった。また、オオムギをはじめとするイネ科植物には、電子供与体として NADH を利用する NADH-NR と NADH と NADPH の両方を電子供与体として利用できる NAD(P)H-NR の 2 つの NR アイソザイムがあり、それぞれについての制御系についても不明な点が多い。本論文では、2 つの NR のうち NADH-NR が欠失したオオムギ突然変異株 (Az12) とその野生株 (Steptoe) を材料に用い、Gojon らの ^{15}N 取り込みモデルを適用することによって根および葉における *in vivo* 硝酸還元を見積もった。また、 ^{13}N 標識された硝酸の短時間での取り込みを見ることにより、両植物における硝酸吸収特性も比較検討した。

本論文で明らかにされた主要な点は以下のとおりである。

1. 連続光条件下における *in vivo* 硝酸還元の見積もり

無窒素で育てたオオムギ幼植物を ^{15}N 標識された 2.3 mM NO_3^- と 0.2 mM NO_2^- を含む培養液で処理し、連続光下でラベルした。NAD(P)H-NR に由来する *in vitro* NR 活性は野生株 (Steptoe) のわずか 10% であった。Az12 では、 $^{15}\text{NO}_3^-$ の全取り込み量と地上部への移行量は Steptoe のそれより 25% 高かった。Az12 の根部における硝酸還元量は、処理前期 (0-24h) においては Steptoe の 2 倍、処理後期 (24-48h) においては 1.3 倍であった。しかし、Az12 の地上部における硝酸還元量は Steptoe より 10% から 30% 下回っていた。結果として、硝酸塩は Az12 の地上部に多く蓄積した。処理の全期間では Az12 の根部における還元態 ^{15}N 蓄積量は Steptoe の根部より 2 倍高かったが、Az12 の地上部においては Steptoe の地上部より 10% 低かった。Az12 において、道管を介した還元態 ^{15}N の上方移行量は、全処理期間を通して Steptoe のそれより 2 倍高かった。これらの結果より、Az12 の地上部に出現した NAD(P)H-NR は NADH-NR の欠失を補償できることが示唆された。さらには、根部の硝酸還元量の増加は Az12 の地上部の限定された硝酸還元量を補っていると示唆された。

2. ^{13}N 標識硝酸を用いた取り込みの比較

上記と同じ条件で生育させたオオムギ幼植物に放射性同位体の ^{13}N でラベルした硝酸を 40 分供与し、地上部でのポジトロン放出に伴う γ 線を測定したところ、Az12 においては Steptoe の数倍の放射活性を示した。また、植物全体の放射活性をオートラジオグラフィで検出したところ、根および葉においても Az12 でシグナルが強かった。これらの結果から、上記 1. で得られた Az12 における硝酸の高濃度集積は、硝酸吸収が高められた結果であることが示唆された。

3. 明暗処理条件下における *in vivo* 硝酸還元の見積もり

上記 1. においては、連続光下で生育させた幼植物において *in vivo* 硝酸還元の見積もりを行った。ここでは、明暗条件下(明期 14 時間、暗期 10 時間、明期 14 時間)においた幼植物に ^{15}N 取り込みモデルを適用した。その結果、2 番目の明期においては Az12 の葉に硝酸の蓄積が観察されたのを除き、Az12 においても野生株と同等の *in vivo* 硝酸還元があることが見積もられた。ここでも、根が葉の硝酸還元を支えていることが示唆された。

また、あらかじめ ^{14}N の硝酸で十分に窒素を与えたオオムギ幼植物に明期 14 時間、暗期 10 時間の条件で ^{15}N 取り込みモデルを適用した。NR 活性を測定したところ、Steptoe の NR 活性は、暗所においてリン酸化による不活性化を受けた。一方、Az12 の NR 活性はリン酸化による不活性化とともに、タンパク質分解による不活性化も受けていることが示唆された。ここでも、Az12 における根での硝酸還元は Steptoe のそれよりも高いことが示された。また、Steptoe および Az12 の両方で、葉における硝酸還元が暗所で増加した。個体全体における硝酸還元に対する根の寄与は、Steptoe より Az12 の方が大きかった。また、Az12 では、根で同化された窒素の多くが道管を経由して地上部に送られていた。

審査結果の要旨

本研究では、植物の無機窒素同化において重要な硝酸還元について、*in vitro* における NR 活性が著しく低下したオオムギ変異株を用いて、生体内における硝酸還元がどのように制御されているかを明らかにしようとしたものである。オオムギにおいて主要なものとされる NADH-NR が欠失した変異株において、残存する NAD(P)H-NR によって葉の *in vivo* 硝酸還元が野生株の 7 割程あること、根における *in vivo* 硝酸還元量の増加と同化窒素量の道管輸送量増加による補償作用があることを明らかにした。これらの結果は、植物の硝酸還元能は、生化学的に測定された *in vitro* 活性ではなく *in vivo* 硝酸還元を見積もることが必要であることを示したものとして重要である。また、変異株においては硝酸の取り込み量が増加していたが、 ^{13}N 標識硝酸を用いた硝酸吸収測定によってこれを裏付けた。

研究業績の主要な部分は、Soil Science and Plant Nutrition 誌に掲載された。

本研究は、オオムギにおける硝酸同化の制御機構について、硝酸還元酵素欠失突然変異体を用い、植物栄養学的手法と放射線化学的方法を組み合わせた学際的なものであり、博士(学術)がふさわしいと判断した。

よって、論文審査委員会は、本論文が博士(学術)の論文として十分であると判定した。