

# 根粒窒素固定の硝酸イオンによる阻害機構

名古屋大学図書
和 1058469

金山 喜則

1990年

報告番号 甲 第 2315 号

## 目 次

第1章 緒 言	1
第2章 根粒における亜硝酸イオンの集積とニトロシルレグヘモグロビンの 形成	13
材料および方法	14
結 果	18
考 察	25
要 約	28
第3章 ニトロシルレグヘモグロビンの性質と根粒への集積	29
材料および方法	30
結 果	33
考 察	44
要 約	47
第4章 ニトロシルレグヘモグロビン形成によるオキシレグヘモグロビン形成 の阻害に関する反応速度論的解析	48
材料および方法	49
結果および考察	51
要 約	63
第5章 総合考察	64
謝 辞	69
文 献	70

## 略語表

DTT: dithiothreitol.

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

Lb<sup>2+</sup>: ferrous leghemoglobin.

Lb<sup>3+</sup>: ferric leghemoglobin.

LbO<sub>2</sub>: oxyleghemoglobin.

LbNO: nitrosylleghemoglobin.

LbCO: carboxyleghemoglobin.

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane.

## 第1章 緒 言

ダイズは、味噌や醤油などに加工され日本の食卓に定着すると共に植物油の原料としても重要である。一方、野菜としてのダイズはエダマメの名で親しまれ、未熟種子のまま収穫され利用されている。わが国のダイズの生産量はここ数年横ばい状態で、エダマメはその約1割の作付け面積を占め、安定した需給を維持している（農林水産省統計情報部 1989）。わが国におけるダイズ消費量の8割は製油用で、それには単価の非常に安い輸入ダイズが主に用いられている。国内ダイズの生産は、輸入自由化以来減少し、自給率は数%にまで落ち込んでいる。しかし製油以外の食品用ダイズにおいては、食味の点で国産ダイズの評価は高く、しかも1970年以來の稲作転換やダイズショック（輸入ダイズの価格高騰による）の後、政府の増産政策により生産意欲は高まっている（斉藤 1986）。これまで試験場や生産現場で400 kg/10 aの多収を記録した例はあるが（藤井ら 1987）、全国平均は177 kg/10 a（1987年）と依然低い水準で横ばい状態にある（農林水産省統計情報部 1987）。多収への提言が様々な角度から行われており、それらの共通点として、根粒による窒素固定を最大限に生かしながら窒素施肥を十分に行うことがあげられている（藤井ら 1987, 金森 1986）。一方ダイズの食品としての特徴は、35%をこすタンパク質と20%余りの脂肪を含む点である。この特徴は畜産物利用の少なかった日本人のタンパク源として生かされてきたが、動物性食品に片寄りがちな現代人の食生活においては、高タンパクで繊維を含むダイズは健康

食品としても重要である。また、飼料作物の多量な消費の上に成り立つ畜産物にかわる安価なタンパク源として、ダイズは地球的な規模で食糧需給のバランスをとるという意義も持つ。品質の面では、栄養素として重要なタンパク質のほかに食味にかかわるアミノ酸、およびエダマメでは濃緑色のさやの色づき等が研究対象となっており（千葉 1989）、いずれも窒素栄養と深いかかわりがある。このようにダイズは、収量および品質の両面での進歩が望まれており、そのいずれにおいても窒素栄養が無視できない要因としてあげられる。

#### 「窒素固定の重要性と化合態窒素とのかかわり」

マメ科植物は根粒菌との共生によって、大気中の窒素を固定し利用できるため、窒素肥料を施用しなくても栽培が可能である。しかし実際には、他の作物にくらべて少ない量ではあるが、窒素施肥を行うことにより高い収量を得ている。窒素の施肥基準量の一例をあげると、ダイズ1.2 kg・アズキ2.4 kg・エンドウ2.4 kg・インゲンマメ3.5 kg /10 a（松代 1980）であり、高い窒素固定能を有するダイズは少ない窒素肥料ですみ、逆に優良根粒菌の少ないインゲンマメは（磯井・吉田 1989）多肥が要求される。このように窒素固定は、施肥窒素の節約とそれにとりもなう地力の向上に少なからず寄与している。工業的につくられるアンモニアはハーバーボッシュ法により高温高圧下で合成されるため、多量の化石燃料を必要とする。そのためオイルショック時には、エネルギー節約の観点から窒素固定の重要性が認識され、盛んに研究が行われた。現在、化石燃料を必要とする化学肥

料の節約は、生産のコストダウンや酸性雨および地球の温暖化等の防止の一助としての意味を持つ。また、化学肥料多用による環境悪化、すなわち

- ・ 河川、湖沼、海洋の富栄養化
- ・ 温室効果をもたらす $N_2O$ 発生（巻出 1989）
- ・ Methemoglobin症の誘発や発ガン性をもつ $NO_2$ の地下水における増加（Crosson and Rosenberg 1989）
- ・ 地力の低下や施設園芸における塩類集積

などを抑制する努力の一貫として、生物窒素固定の機能向上や非マメ科作物への窒素固定能の付与などの研究を位置づけることができる。

一方固定窒素は、子実形成に有効であるという利点を持っている。ダイズを化合態窒素のみで生育させると、栄養生長は固定窒素と化合態窒素の両方を使用した場合と同程度だが、子実収量は両窒素を使用した場合の半分しかあげられない（橋本 1976）。窒素固定は生育の初期と子実形成後期には行われなため、固定窒素のみで高い収量を得ることはむずかしいが、逆に化合態窒素のみで固定窒素利用の場合と同様の収量をあげようとする、10 aあたり67.3 kgもの窒素が必要となり（Weber 1966）、これは非現実的である。固定窒素は子実へ優先的に分配されるのに対して、畑地でのおもな化合態窒素である $NO_3^-$ はまず茎葉へ多く分配される（Ohyama 1983, Yoneyama 1984）、また化合態窒素を与えて育てた場合「子実／栄養体」の値が小さくなる（Weber 1966）、など両窒素には利用のされ方に大きな違いがある。そして、子実形成に再優先に利用される固定窒素とともに

に、化合態窒素による栄養体の生長は収量を高めるためには不可欠である。さらに、葉へ分配された窒素はその後アミノ酸として子実へ再転流する (Ohyama 1984)。以上のことから、窒素固定を高いレベルで持続させつつ、栄養生長を維持し子実形成にも貢献する化合態窒素を与えていくことが必要である。

#### 「窒素固定の硝酸イオンによる抑制現象解明の重要性」

よく知られているように、窒素固定は化合態窒素により抑制されるので、高収量を得るため化合態窒素を多量に与えても、それほどの効果は上がらず、むしろ窒素固定が低下し茎葉の過繁茂による収量低下も起こりうる。これが、窒素施肥にともない順調に収量をのばしてきたイネ科作物にくらべ、マメ科作物の収量の伸びが停滞している原因のひとつと考えられる (中村道徳 1980)。高い収量をあげた栽培例を見ると、有機物と少なめの化合態窒素をまず与え、窒素固定が低下する頃に追肥を行っている (梅田 1975)。このように、ダイズ栽培における窒素施肥は、窒素固定の阻害を常に意識しなければならない。そこで、窒素固定の硝酸イオンによる抑制現象を解明することで窒素施肥を容易にするとともに、固定窒素と化合態窒素の両方を十分に生かすことによって一層の増収が期待できる。

一方、根粒形成や窒素固定にかかわる遺伝子の解析が、現在急ピッチで進んでおり、非マメ科植物への窒素固定能の付与も現実味を帯びた課題となってきた。その際、窒素施肥により窒素固定が低下し、両窒素を有効に利用できない危険性が高い。このような観点からも、窒素固定の硝酸イオンによる抑制現象の解明は

重要である。

ここで、 $\text{NO}_3^-$ による共生窒素固定の抑制現象を整理すると、根粒の着生・生長および活性の阻害に分類することができる。本論文では、活性の阻害について論議を進める。共生窒素固定が窒素施肥により抑制されることは、すでに 1916 年に報告されており (Fred and Graul 1916)、以後現在まで、窒素固定能の阻害のメカニズムに関する研究の流れは、大きく二つに分けることができる。一つは、吸収された  $\text{NO}_3^-$  の同化と窒素固定との炭水化物の競合を原因とする説、もう一つは  $\text{NO}_3^-$  の代謝産物の影響によるとする説である。以下に、1970 年代以降を中心に、二つの説に関する研究の流れとその問題点について述べる。

#### 「光合成産物分配の競合説」

この説に関する研究の歴史は古く、20 世紀前半の窒素固定における植物体の炭素分配に関する研究の進歩にともない、窒素施肥により光合成産物の分配がどの様に変化するかが調べられた。その結果、施肥窒素のおもに地上部での同化反応に光合成産物が奪われるため窒素固定が抑制される、という説が有力であった (Strowd 1920, Orcutt and Wilson 1935)。近年のこの説を支持する根拠としては、主に  $^{14}\text{CO}_2$  として与えた炭素の根粒への分配が低下する (Ursino et al. 1982, Russell and Johnson 1975) こと、および根粒へ適切な炭素源を供給することにより阻害を軽減させられる (Noel et al. 1982) ことがあげられる。しかし、こ

これらの研究は長期にわたる炭素配分の検討であるため、窒素固定能低下の原因というよりも、むしろ根粒の活性の低下にともなうシンクとしての能力低下の結果であると考えられる。その証拠に、活性の低下に根粒の可溶性糖含量の減少が対応しない例が多く提出されている (Streeter 1985b, Wasfi and Prioul 1986, Vessey et al. 1988)。Streeter (1981) および Wasfi and Prioul (1986) は根粒に含まれる各種の糖の増減を調べ、根粒で消費されるために転流されるショ糖 (Kouchi and Nakaji 1985) は、むしろ  $\text{NO}_3^-$  添加により若干増加することを報告している。グルコースはわずかに減少を示したが、これは窒素固定の低下を説明し得るものではない。 $^{14}\text{CO}_2$  を用いた光合成産物の分配についても同様に、その時間的経過を  $\text{NO}_3^-$  による窒素固定能の低下と対応させると、窒素固定能の低下に反してむしろ炭素の根粒への分配が上昇するという結果が得られている (Wasfi and Prioul 1986)。さらに Schuller et al. (1986) は、 $\text{NO}_3^-$  による活性の阻害を受けている根粒よりバクテロイドを単離し、外部より炭素源を与えない状態で内生の基質による窒素固定能 (アセチレン還元能) を測定したところ、阻害を受けていない根粒より単離したバクテロイドと同等の活性を示した。すなわち、根粒としての活性は低下しても、バクテロイドはエネルギー不足の状態にはないと考えられる。一方  $\text{NO}_3^-$  添加区と無添加区に、同一個体の根を切断せずに分けて生育させた実験において、 $\text{NO}_3^-$  添加区のアセチレン還元能 (根粒単位重あたり) が顕著に低下するにもかかわらず、無添加区の活性低下はあまり見られないことから、少なくとも地上部の  $\text{NO}_3^-$  同化系との炭水化物競合による活性の低下という説は否定

された (Tanaka et al. 1985)。以上より、 $\text{NO}_3^-$ による窒素固定能の低下が、根粒の炭素源の欠乏に起因するとは考えられない。エンドウやクローバー (Small and Leonard 1986)、フレンチビーン (Wasfi and Prioul 1986)、およびインゲン (Streeter 1986) では、 $\text{NO}_3^-$ 添加により $^{14}\text{CO}_2$ の根粒への分配や糖含量が速やかに低下することから、同じマメ科の根粒でも $\text{NO}_3^-$ に対する反応は種によって異なっている。

#### 「 $\text{NO}_3^-$ 代謝産物の影響」

根粒における $\text{NO}_3^-$ 代謝産物であるアンモニアや有機酸およびアミノ酸含量については、 $\text{NO}_3^-$ 施用による迅速で顕著な変化は見いだされていない (Streeter 1985b, 1987)。現在まで、窒素固定に影響をおよぼす物質としては、 $\text{NO}_2^-$ が有力視されてきた。いずれも *in vitro* の実験により、 $\text{NO}_2^-$ は単離バクテロイドのアセチレン還元能を阻害する (Regaud et al. 1973)、ニトロゲナーゼのMoFeタンパクに結合し可逆的阻害を起こす (Trinchant and Regaud 1980)、あるいはレグヘモグロビンのヘム鉄を3価に酸化することによって不活化する (Regaud and Puppo 1977) ことが報告されている。根粒バクテロイドでは、根粒内の嫌氣的環境下において誘導される硝酸還元酵素の活性が高く (Daniel and Appleby 1972)、それによって生成された $\text{NO}_2^-$ が直接ニトロゲナーゼを不活化する可能性がある。実際、硝酸還元能を有する単離バクテロイドのアセチレン還元能は、 $\text{NO}_3^-$ の存在下で阻害された (Stephens and Neyra 1985)。しかし硝酸還元酵素欠損根粒菌を

用いた実験において、クローバーやマクロブテリウム (Gibson and Pagan 1977)、カウピーおよびルーピン (Manhart and Wong 1980) では、バクテロイドの硝酸還元酵素の存在と、根粒の窒素固定能の $\text{NO}_3^-$ による低下は無関係であった。ダイズでも同様の結果が得られ、硝酸還元酵素欠損根粒菌により形成された根粒に $\text{NO}_3^-$ を与えると、正常な根粒菌により形成された根粒と同様に窒素固定能は低下し、集積した $\text{NO}_2^-$ はわずかであった (Streeter 1985b)。以上より、バクテロイドの硝酸還元酵素により生成された $\text{NO}_2^-$ により、ニトロゲナーゼが直接阻害されることは考えにくい。

一方、根粒サイトゾルの硝酸還元酵素が鍵を握るという考えがあり (Stephens and Neyra 1985)、事実硝酸還元酵素欠損根粒菌により形成された根粒でも、根粒サイトゾルの硝酸還元酵素により形成された $\text{NO}_2^-$ が集積することが報告されている (Streeter 1982)。根粒サイトゾルの硝酸還元能は $\text{NO}_3^-$ 添加の有無に関わらずかなりの活性を保持しており、 $\text{NO}_3^-$ により誘導される根の硝酸還元酵素と異なる性質を示す報告が多い (Streeter 1982, 1985a, Sprent et al. 1987)。また、根粒の亜硝酸還元酵素は、 $\text{NO}_3^-$ 添加によりその活性が低下するという報告 (Wasfi and Prioul 1986) もあることから、根粒に供給された $\text{NO}_3^-$ は根粒サイトゾルにおいて吸収後速やかに $\text{NO}_2^-$ に還元されて集積し、窒素固定系に何らかの影響を与えている可能性が高い。しかし根粒で検出される $\text{NO}_2^-$ は、抽出操作中に $\text{NO}_3^-$ とバクテロイドが接触するために生じる人為的なものであるとの指摘もあり (Giannakis et al. 1988)、 $\text{NO}_2^-$ の集積については慎重な検討が必要であろう。このように、

$\text{NO}_2^-$ 原因説には賛否両論があるが、その双方において有力な阻害のメカニズムは提唱されていない。

#### 「新しい仮説の展開とその問題点」

最近の最も注目すべき成果としては、突然変異体として硝酸塩耐性系統のダイズが得られたことが上げられる。この突然変異体は、植物体の地上部のオートレギュレーション（根に着生する根粒数を制御する機構）を欠いているため、高硝酸塩存在下でも多数の根粒を着生させることができる（Carroll et al. 1985a, b）。この結果からは、窒素固定の硝酸抑制現象が地上部の制御を受けているように思われる。しかし、 $\text{NO}_3^-$ による根粒の着生および生長の阻害は地上部の制御をうけないことがわかっており（Tanaka et al. 1985, Eaglesham 1989）、オートレギュレーションを介した阻害機構は考えられない。さらにこの突然変異体において、高硝酸塩下で着生した根粒の乾物重あたりのニトロゲナーゼ活性は、やはり無窒素下で栽培されたものより低下しており（Delves et al. 1986, Gremaud and Harper 1988）、 $\text{NO}_3^-$ による抑制のメカニズムを解明するには至っていない。

これまで炭水化物競合説は、根粒における糖含量を中心に検討されているが、Heckmann et al. は（1989） $\text{NO}_3^-$ による根粒内のリンゴ酸含量の低下に着目し、根粒内での硝酸還元と窒素固定との還元力の競合が窒素固定能低下の原因であると示した。しかし、Streeter（1987）は $\text{NO}_3^-$ 添加によるリンゴ酸の低下はないと報告しており、今後の検討が待たれる。

一方、バクテロイドの窒素固定に不可欠と考えられる、ジカルボン酸のトランスポーターを持つ (Udvardi et al. 1988) ペリバクテロイド膜に対する  $\text{NO}_3^-$  の透過性が、非常に高いことが最近明らかになった (Udvardi and Day 1989)。すなわち、 $\text{NO}_3^-$  には ATPase により形成された膜のポテンシャルを容易に低下させる作用があり、宿主サイトゾルとバクテロイドの物質交換が、 $\text{NO}_3^-$  により抑制されるという説が提唱されている。

$\text{NO}_3^-$  阻害をうけた根粒において、新たに発見された現象で注目されるのは、バクテロイドへの酸素透過の抑制である。この現象は、最初にホワイトクローバーで (Minchin et al. 1986)、次にダイズで報告された (Carroll et al. 1987, Vessey et al. 1988a)。ダイズ根粒の周囲の酸素分圧を 20 から 60% へ上昇させると、ニトロゲナーゼ活性は、通常の根粒においては無変化 (steady state) あるいは低下した (non steady state) のに対して、 $\text{NO}_3^-$  により阻害をうけた根粒では増加した。ではなぜ、 $\text{NO}_3^-$  により酸素の透過が制限されるのだろうか。根粒内への酸素の拡散に関連する要素としては、根粒の皮層組織に存在する酸素に対する拡散バリヤーと、レグヘモグロビンの存在があげられる。Sprent et al. (1987) は、 $\text{NO}_3^-$  は根粒の感染ゾーンに比べて皮層組織に多く存在することから、何らかの形で拡散バリヤーに  $\text{NO}_3^-$  が影響を与えているのではないかと考えており、また Vessey et al. (1988b) は、光合成産物の根粒への unloading の低下や地下部内での炭水化物の競合が、拡散バリヤーに影響を与えているのではないかと提案している。現在、拡散バリヤーの存在を支持するデータは多く報告されており

(Witty et al. 1987, Hunt et al. 1987, King et al. 1988)、 $\text{NO}_3^-$ 施用のほか  
に環状剥皮 (Vessey et al. 1988a) や暗処理 (Carroll et al. 1987)、および  
アセチレン (Witty et al. 1984) などにより、根粒の酸素に対する拡散抵抗性が  
上昇することもわかっているが、いずれもそのメカニズムは不明である。

一方、レグヘモグロビンに関しては、 $\text{NO}_3^-$ 施用により生じた $\text{NO}_2^-$ により、レグ  
ヘモグロビンが3価に不活性化されるという説が (Rigaud and Puppo 1977) 提出  
されているが、その後これを支持する報告はない。また、 $\text{NO}_3^-$ の供給によりレグ  
ヘモグロビンが減少する事も考えられるが、7日間の20 mM  $\text{NO}_3^-$ 処理ではレグヘ  
モグロビンの各成分組成に変化はなく、総濃度も若干の減少を示すにとどまって  
いる (Becana and Sprent 1989)。これらのことから、 $\text{NO}_3^-$ 施肥後長期的にはレ  
グヘモグロビンの減少が考えられるが、それは窒素固定低下誘導の原因にはなら  
ないと思われる。レグヘモグロビンの減少ばかりでなく、根粒サイトゾルにおけ  
る他の窒素固定関連酵素の活性低下も窒素固定能の低下に対応しないため、根粒  
としての窒素固定能低下につづいてバクテロイドの不活化がおり、その後レグ  
ヘモグロビンなどの根粒サイトゾルにおけるタンパク質の退化がおこるといわれ  
ている (Schuller et al. 1986)。

このように、光合成産物分配の競合が窒素固定能低下の原因である可能性は低  
いが、 $\text{NO}_2^-$ の集積とその窒素固定への影響については、一層の検討が必要である。  
本論文においては、 $\text{NO}_2^-$ の集積について再検討し、 $\text{NO}_2^-$ の集積と窒素固定低下と

の関連について、特に根粒内の酸素の運搬に関与するレグヘモグロビンへ、 $\text{NO}_2^-$  集積が与える影響について論議した。

## 第2章 根粒における亜硝酸イオンの集積とニトロシルレグヘモグロビンの形成

硝酸還元により形成される  $\text{NO}_2^-$  は、in vitro における ニトロゲナーゼ (Trinchant and Rigaud 1980) やレグヘモグロビン (Rigaud and Puppo 1977) の阻害剤として知られている。そして根粒サイトゾルでは、硝酸還元活性が高く亜硝酸還元活性が低いため  $\text{NO}_2^-$  が集積し (Wasfi and Prioul 1986)、窒素固定能を阻害する可能性が考えられる。一方、硝酸還元酵素欠損根粒菌により形成された根粒では  $\text{NO}_2^-$  はほとんど集積しないにもかかわらず、窒素固定能は阻害された (Stephens and Neyra 1983, Streeter 1985)。このように、 $\text{NO}_3^-$  を与えた根粒において  $\text{NO}_2^-$  が本当に集積したかどうか、そしてその  $\text{NO}_2^-$  が窒素固定能の低下とどのように関係するかについては不明な点が多い。

本章では、 $\text{NO}_3^-$  添加による根粒への  $\text{NO}_2^-$  の集積と、その窒素固定への影響を探るため、 $\text{NO}_2^-$  の検出と、レグヘモグロビンの機能阻害の可能性についての検討を行った。

## 材料および方法

### 1) 植物および根粒菌

Bradyrhizobium japonicum 009系統を接種したダイズ種子 (Glycine max. [L.] Merr. cv A62-1 or T202) をバーミキュライト床に播種し、約一週間後に窒素を除いた水耕液に移し、Matsumoto et al. (1977) の方法を参考に以下のように栽培した。2.5リットルの水耕液 (水耕液組成:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  21.96,  $\text{KCl}$  152.6,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  250,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  213.7,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.25,  $\text{H}_3\text{BO}_4$  0.25,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  48 または  $\text{Fe-EDTA}$  72 mg/l) を入れた1/50007-ル (3.0リットル) のワグナーポットに、ダイズ4個体をザルで支持し、エアーコンプレッサーにつないだエアーストーンから常時通気した。夏期は昼間約26°Cと夜間約20°Cに設定されたファイトトロンで、それ以外の時期は最低20°Cに加温されたガラス室 (自然光下) で栽培した。水耕液は週1回更新し、1~2日おきにpH 6.3に調整した。根粒は開花期および結実初期のものを用いた。根粒菌は、マンニトール・酵母・寒天培地 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3,  $\text{NaCl}$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1, マンニトール 10, 寒天 10, 酵母エキス1.0 g/l, pH 7.0) で純粋培養したものを用いた。

### 2) 窒素固定活性

窒素固定活性は、Kawai and Yamamoto (1986) の方法に従い、アセチレン還元法により測定した。根より採取した根粒、または2~3 cmに切りとった根粒着生

根を、速やかに容積60 mlのフラスコにいれ、内部の空気をアルゴン（79%）－酸素（21%）混合ガスで置換し血清キャップで密封した。分圧が10%になるようにアセチレンガスをシリンジで注入し、30°Cで一定時間インキュベートした後、生成したエチレンをUnibeads Aカラムを取り付けたガスクロマトグラフィー（日本電子）で測定した。

### 3) $\text{NO}_2^-$ の測定

根粒サイトゾルおよびバクテロイドの $\text{NO}_2^-$ の測定は、Sen and Donaldson(1978)の方法を参考にした。抽出操作中の $\text{NO}_2^-$ の分解と硝酸還元酵素による新たな $\text{NO}_2^-$ の生成を避けるため、根粒の摩砕および分画には0.3%NaOHを用い、操作はすべて0-4°Cで行った。根粒サイトゾルおよびバクテロイドの分画については Suganuma and Yamamoto (1987)の方法に従った。根粒を0.3%NaOHとともに乳鉢で摩砕し、その摩砕液を4層のガーゼでこした。ろ液を5,000xgで10分間遠心分離し、得られた上清を根粒サイトゾルとし、沈澱をバクテロイド画分とした。なお沈澱は摩砕用緩衝液で2度洗浄してから20 mlの懸濁液とし、BRANSON Model W-200P 超音波処理機で90 Wで30秒の処理を12回施した。処理後、16,000xgで30分間遠心分離し得られた上清を以下の操作に用いた。サイトゾルとバクテロイド画分は、60-70°Cの湯煎に10分間かけ、 $\text{ZnSO}_4$ を42 mMになるように加えた。さらに 60-70°Cに加熱した後、20,000xgで30分間遠心分離した。得られた上清の1 mlを、1.5 N塩酸に溶かした1% (w/v)スルファニルアミド1 mlおよび0.1% (w/v)N-1-ナフチルエチレンジアミンジハイドロクロライド1 mlと暗所で20分間反応させた後、540 nmの吸

光度を測定した。また根粒を除いてすべての操作を行うことにより、ブランクを求めた。試薬は調製後一週間以内のものを用い、窒素酸化物の混入を避けるため、加熱にはガスを使用しなかった。本法による検出限界は、根粒のグラム新鮮重あたり 20 nmolであった。

#### 4) レグヘモグロビンの精製

根より採取した根粒は、水道水および蒸留水で洗浄し、すぐに使用するかまたは  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した後用いた。レグヘモグロビンの精製は、基本的に Dilworth (1980) の方法に従った。ポリクラール A T (0.3 g/g fresh weight nodules) を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) で根粒を摩砕し、10,000xg で 20 分間遠心分離した。その上清のタンパク質を、55% から 80% 飽和の硫酸アンモニウムで塩析した。沈澱は、0.1 mM EDTA を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液でとかし、透析後 100,000xg で 30 分間遠心分離した。得られた上清を以下の実験に用いた。操作はすべて  $0-4^{\circ}\text{C}$  で行った。

#### 5) レグヘモグロビンの濃度

レグヘモグロビンの濃度は、Dilworth (1980) の方法に従い、ビリジンヘモクロモゲンとして以下のように求めた。レグヘモグロビンを、等量の 0.2 N NaOH を含む 4.2 M ビリジンと混合し、フェリシアン化カリウムまたはジチオナイト ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) を少量加え、フェリシアン化カリウムを加えたものを対照に 556 nm と 539 nm を測定した。

#### 6) $\text{LbO}_2$ と $\text{LbNO}$ の調製

LbO<sub>2</sub>の調製のため、ダイズ根粒より精製されたレグヘモグロビンに少量のジチオナイトを加え、Lb<sup>3+</sup>をLb<sup>2+</sup>に変換した。その溶液を、速やかに空気飽和の0.1 M Tris-HCl緩衝液で平衡化されたセファデックスG-15のカラムに上層した。カラム中のLb<sup>2+</sup>はジチオナイトと分離され酸素にさらされるため、カラム通過中に次第に酸素と結合した。明赤色の画分を集めLbO<sub>2</sub>として用いた。一方、LbN0の調製のため、精製されたレグヘモグロビンにNO<sub>2</sub><sup>-</sup>とジチオナイトを混合し、30分間静置した。その後、LbO<sub>2</sub>と同様にセファデックスG-15のカラムに通し、得られた明赤色の画分をLbN0とした。

#### 7) 空気中およびアルゴンガス下における粗レグヘモグロビンの抽出

空気中で根粒を50 mMリン酸ナトリウム緩衝液で摩砕し、16,000xgで30分間遠心分離した上清を空気中で得られた粗レグヘモグロビンとした。アルゴンガス下における抽出については、根粒をアルゴンガスで常時通気したプラスチックボックス内で、アルゴンガス通気により脱気した0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH 7.7)で摩砕した。摩砕液は、アルゴンガスを満たして密閉した遠沈管を用い、20,000xgで15分間遠心分離した。上清の吸収スペクトルはダブルビーム分光光度計(日立 200-20型)により、遠沈管から出した後大気下で速やかに測定した。

## 結 果

### 1) $\text{NO}_3^-$ によるアセチレン還元能の低下と $\text{NO}_2^-$ の集積

根粒のアセチレン還元能は、水耕液に10 mM  $\text{NO}_3^-$ を供給した後24時間目に、 $\text{NO}_3^-$ を供給しなかった根粒に比べて30%低下し、その後5日目まで低下し続けた (Fig. 1)。一方、 $\text{NO}_2^-$ はバクテロイドには検出されず、サイトゾルにのみ検出された。その含量は、 $\text{NO}_3^-$ 添加後12時間目までは低かったが、その後急激に上昇した (Fig. 2)。しかし $\text{NO}_3^-$ 無添加区では、バクテロイド・サイトゾルともに $\text{NO}_2^-$ は蓄積しなかった。根粒サイトゾルにおける硝酸還元酵素は、 $\text{NO}_3^-$ 存在の有無にかかわらず高い活性を持つので (Streeter 1982, 1985a, Sprent et al. 1987)、水耕液から吸収された $\text{NO}_3^-$ はサイトゾルにおいて還元され、 $\text{NO}_2^-$ として集積したものと考えられる。

### 2) In vitroにおけるLbNOの形成とその吸収スペクトル

ダイズ根粒から精製したレグヘモグロビンから得られた吸収スペクトルは、in vitroにおいて $\text{NO}_2^-$ とジチオナイトとの反応により545 nmと570 nmとに吸収極大を示し、これはSternberg and Virtanen (1952) により報告されたLbNOのものと一致した。そのほか新たに、ソーレ吸収帯として415nmに吸収極大を持つことが明らかになった (Fig. 3)。一方、同じ精製レグヘモグロビンより調製したLbO<sub>2</sub>はすでに報告されているように (Appleby 1969, Imamura et al. 1972)、411, 540および574 nmに吸収極大を示した。さらに、LbNOの吸収極大 (545, 570 nm) と吸収極

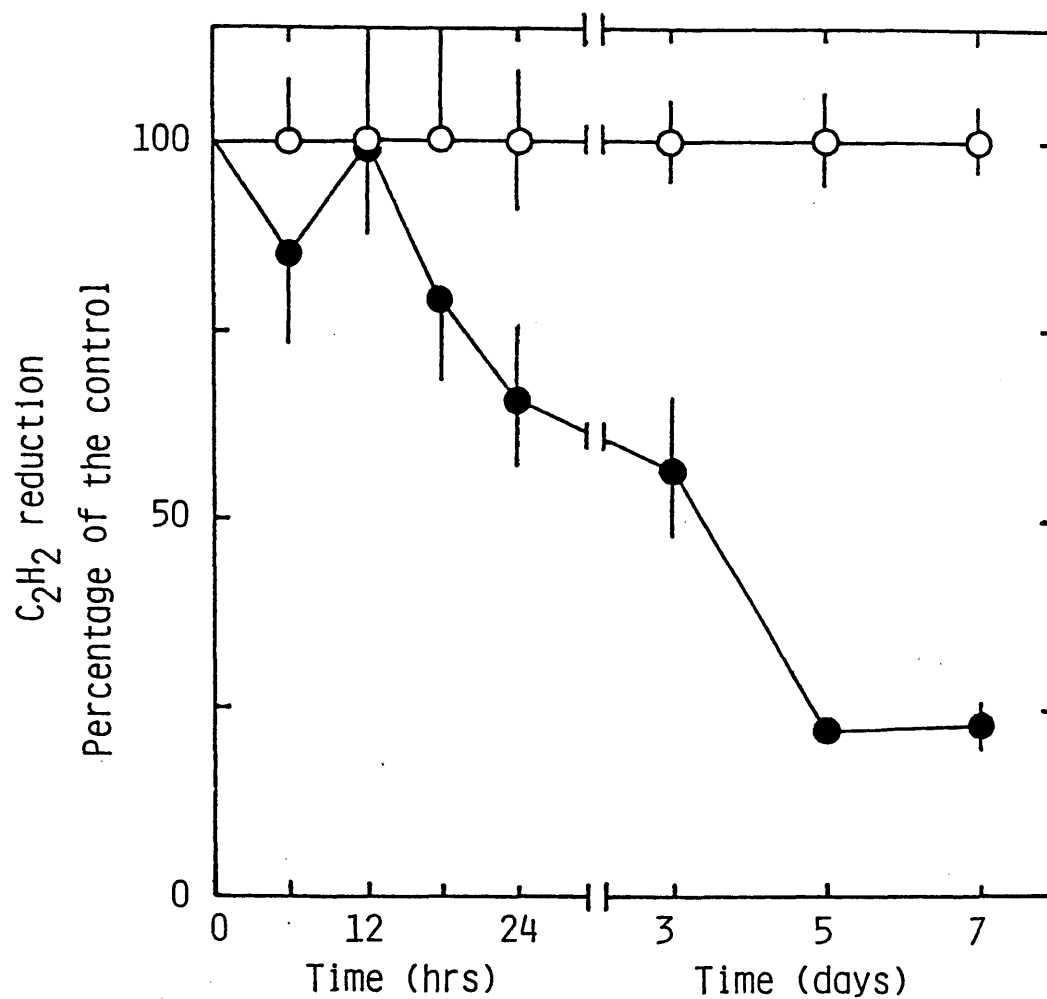


Fig.1 Effect of nitrate on acetylene-reducing activity (ARA) in nodules. The effect is expressed in terms of the ARA in nodules of plants cultured in the culture medium supplied with 10 mM KNO<sub>3</sub> (●) as a percentage of that without KNO<sub>3</sub> (○). Each value represents the mean  $\pm$  standard error of three replicates.

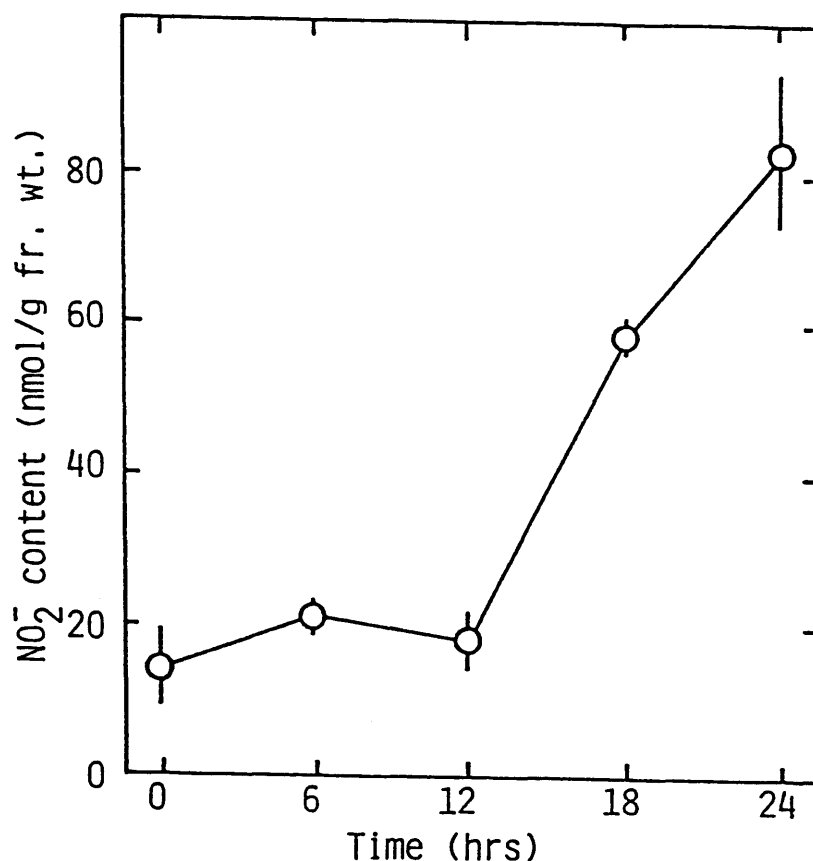


Fig.2 Changes in levels of nitrite in the cytosol and in the bacteroids of nodules of plants supplied with nitrate. Nodules were collected from plants cultured in the culture medium supplemented with 10 mM  $\text{KNO}_3$ . Although the cytosol and bacteroids were fractionated as described in the text, nitrite was not detected in bacteroids. Each value represents the mean  $\pm$  standard error of three replicates.

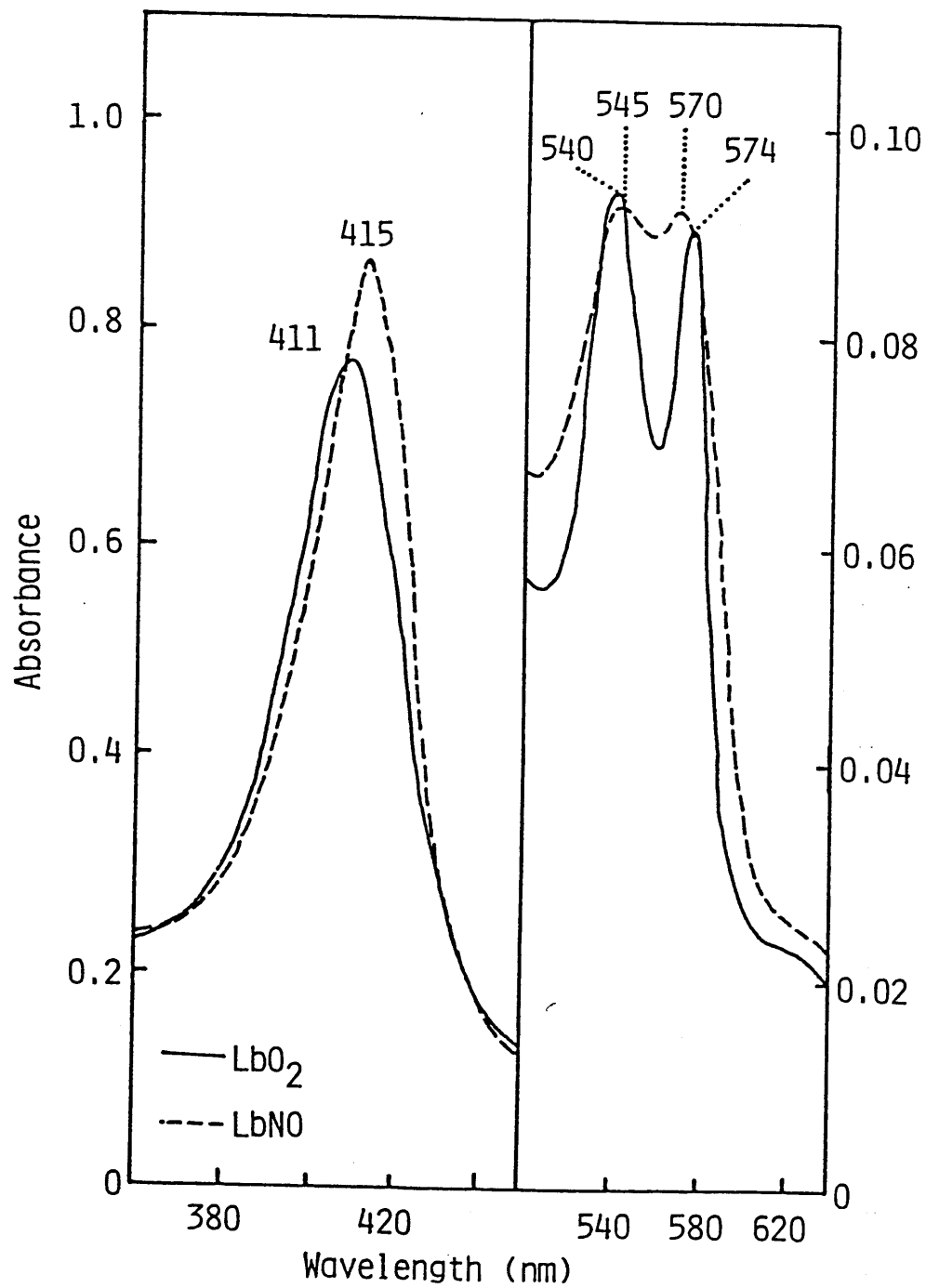


Fig. 3 Absorption spectra of LbO<sub>2</sub> and LbNO. LbO<sub>2</sub> and LbNO were prepared from isolated leghemoglobin as described in Materials and Methods.

小 (556-558nm) の吸光度の差は、 $\text{LbO}_2$ にくらべると非常に小さかった。このように、 $\text{LbNO}$ の吸収スペクトルは明らかに $\text{LbO}_2$ のものと区別することができた。

### 3) 根粒内での $\text{LbNO}$ の形成

ダイズの水耕液に10 mM  $\text{NO}_3^-$ を与えた後24時間目の根粒から、粗レグヘモグロビンを空気中で抽出したところ、そのスペクトルは典型的な $\text{LbO}_2$ のものであった (Fig. 4)。すなわち、574 nmでの吸光度の540 nmに対する割合は約1であり、Appleby and Bergersen (1980) の報告と一致した。このことは、根粒においては2価のレグヘモグロビンが主要なタイプであり、 $\text{NO}_3^-$ 添加による生育中においてもレグヘモグロビンは決して酸化されないことを意味する。次に根粒中での $\text{LbNO}$ の存在を確認するために、アルゴンガス下での抽出を試みた。なぜなら空気中で抽出した場合、レグヘモグロビンに一酸化窒素が結合し $\text{LbNO}$ を形成していても、酸素と置換されてしまう可能性があるからである。水耕液に、10 mM  $\text{NO}_3^-$ を加えた時と同じ程度にアセチレン還元能の阻害を誘導する15 mM  $\text{NO}_3^-$ を添加し、48時間後に根粒より粗レグヘモグロビンをアルゴンガス下で調製した。得られたレグヘモグロビンの吸収スペクトルは、543 nmおよび570 nm付近に吸収極大を持ち、吸収極大と極小の差が $\text{LbO}_2$ より明らかに小さかった (Fig. 5)。このスペクトルは Fig. 3に示された $\text{LbO}_2$ と $\text{LbNO}$ の中間型であり、 $\text{LbNO}$ と $\text{LbO}_2$ が混在していることを示し、 $\text{LbNO}$ が $\text{NO}_3^-$ 添加により根粒中に形成されることを予想させるものである。一方、 $\text{NO}_3^-$ 無添加の根粒から得られたレグヘモグロビンは $\text{LbO}_2$ タイプを示し、 $\text{LbNO}$ が形成されないことを示唆している。

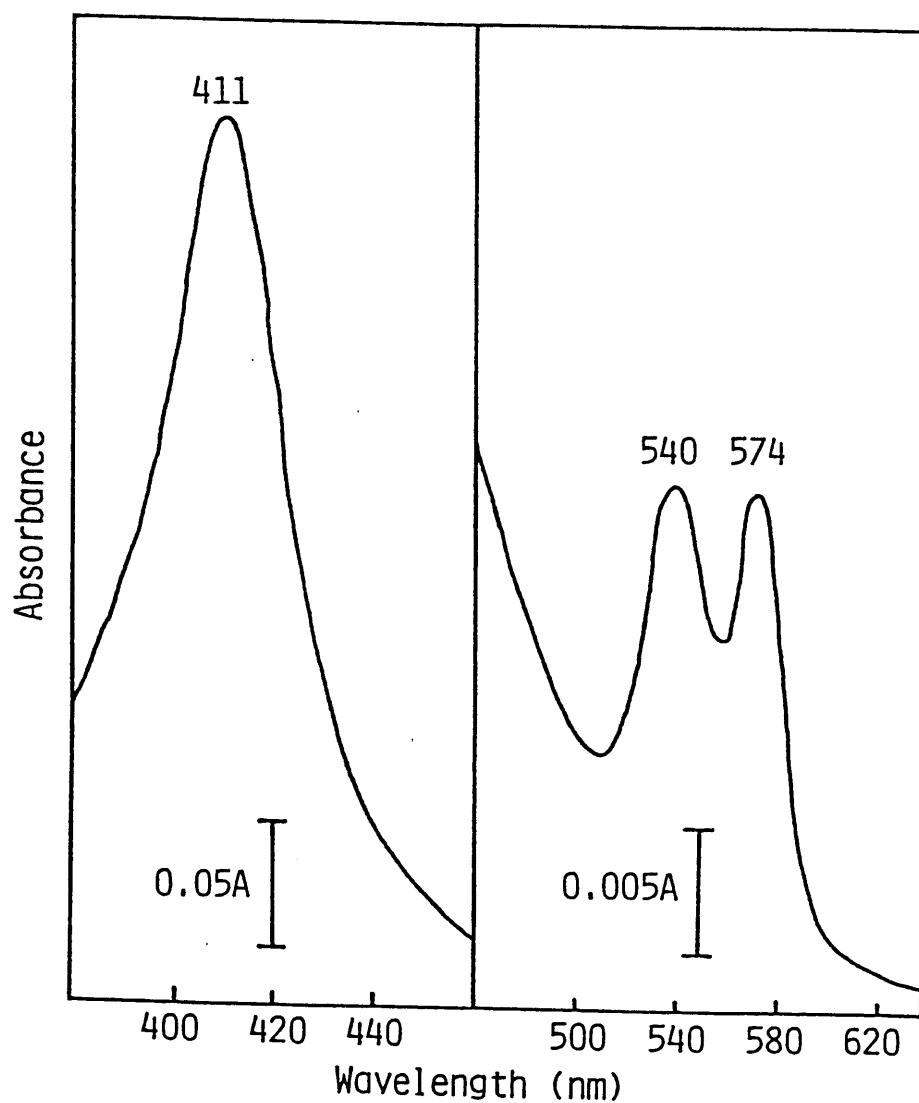


Fig.4 Absorption spectrum of leghemoglobin aerobically extracted from nodules of plants supplied with nitrate. The leghemoglobin was prepared from nodules of soybean plants cultured for 24 h with 10 mM  $\text{NaNO}_3$  in air, as described in Materials and Methods.

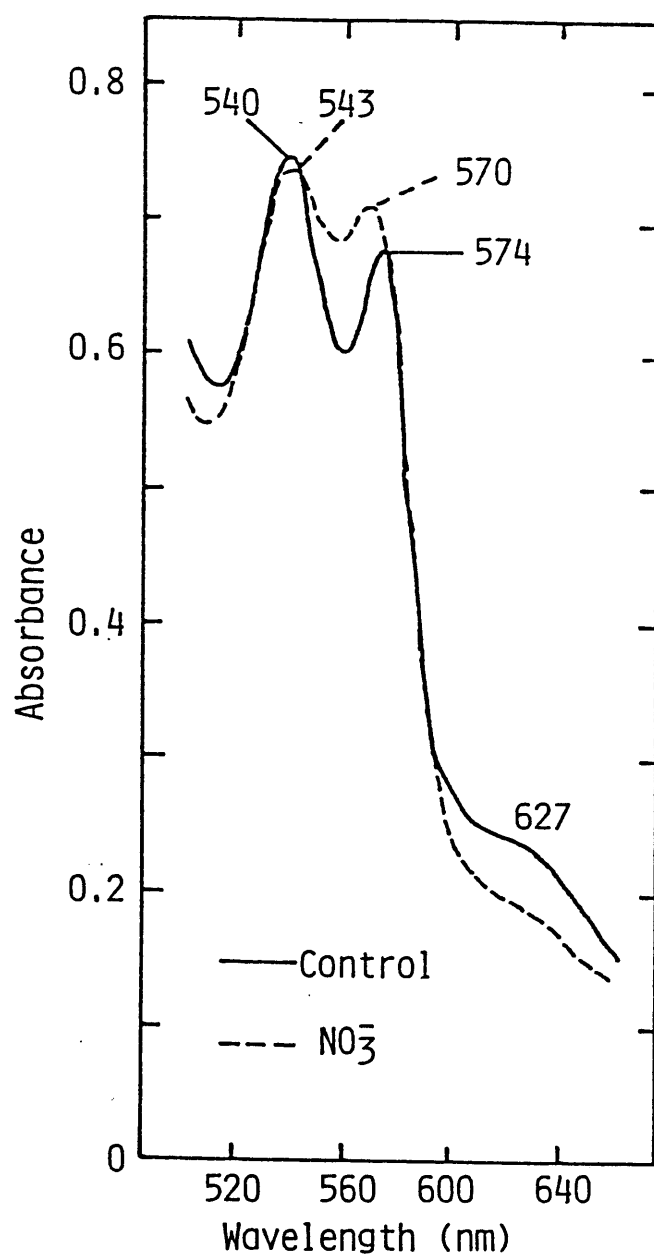


Fig.5 Absorption spectra of crude leghemoglobin extracted under Ar gas from nodules of plants supplied with nitrate. Leghemoglobin was extracted under a stream of Ar gas from nodules of plants cultured for 48 h in the culture medium supplemented with 15 mM KNO<sub>3</sub>.

## 考 察

### 1) 根粒における $\text{NO}_2^-$ の集積

本実験により、 $\text{NO}_3^-$ を与えて生育したダイズの根粒サイトゾルには、 $\text{NO}_2^-$ が集積することが明らかになった。さらに、1) 本実験で用いられた Bradyrhizobium japonicum 009は、20 mM  $\text{NO}_3^-$ を含む培地で育成された場合でもほとんど硝酸還元活性 (*in vivo*) を示さなかった； 2) 単離バクテロイドにおいても、既報 (Stephens and Neyra 1983, Giannakis et al. 1988) の根粒バクテロイドの10分の1から100分の1の活性しか示さなかった； 3)  $\text{NO}_3^-$ を添加した根粒から得られたバクテロイドでは $\text{NO}_2^-$ は検出されなかった： 以上の理由によって、根粒サイトゾルにおける $\text{NO}_2^-$ の集積は、バクテロイドで形成されたものがサイトゾルに集積したのではなく、主にサイトゾルの硝酸還元によって形成されたと考えられる。

これに対してStephens and Neyra (1983) は、硝酸還元酵素欠損根粒菌により形成された根粒において、 $\text{NO}_3^-$ 添加により $\text{NO}_2^-$ の集積が認められないにもかかわらずアセチレン還元能が阻害されたと報告した。しかし彼らが用いた $\text{NO}_2^-$ の定量法は、 $\text{NO}_2^-$ 検出における反応液の発色が弱く濁りもでてくるため、グラム新鮮重あたり100 nmol以下の低濃度の $\text{NO}_2^-$ の測定には適さず、今回著者が検知できた集積を彼らは検知できなかったものと思われる。Streeter (1985) もまた同様の報告をしているが、彼の方法によっても $\text{NO}_2^-$ 含量は過小評価される可能性がある。なぜならば、スルファニルアミドを酢酸溶液に溶解しているので、 $\text{NO}_2^-$ はNADH

の存在下で非酵素的に消失する可能性があるからである (Nicholas and Nason 1957)。本実験で用いた測定法はこれらにくらべて感度がよく、また  $\text{NO}_2^-$  が NADH 存在下で非酵素的に分解する恐れもない。一方、Giannakis et al. (1988) は、 $\text{NO}_3^-$  添加根粒における  $\text{NO}_2^-$  の集積は、緩衝液による抽出操作中に硝酸還元酵素により  $\text{NO}_2^-$  が形成されるための人為的なものであると示唆した。しかし本論文においては、0.3% NaOH を根粒の摩砕液として用いているので、抽出操作中の酵素的な  $\text{NO}_2^-$  の形成は考えられない。また根粒を摩砕前に  $100^\circ\text{C}$  で完全に失活させた場合でも、 $\text{NO}_2^-$  は検出された。さらに、後述する LbNO の根粒での形成は、根粒サイトゾルに  $\text{NO}_2^-$  が集積することを支持している。以上より、 $\text{NO}_3^-$  添加により根粒のサイトゾルに  $\text{NO}_2^-$  が集積することが明らかになった。

## 2) 根粒における LbNO の形成

$\text{NO}_3^-$  添加により、根粒のアセチレン還元能はサイトゾルへの  $\text{NO}_2^-$  の集積とともに低下した (Fig. 1, 2)。また、根より採取した根粒を、 $\text{NO}_3^-$  あるいは  $\text{NO}_2^-$  とともにインキュベートしアセチレン還元能の阻害程度を測定したところ、 $\text{NO}_2^-$  による阻害が  $\text{NO}_3^-$  による阻害を大きく上回った (渡辺 1984)。これらの結果より、 $\text{NO}_2^-$  の存在がアセチレン還元能の低下に関わっている可能性が強く示唆された。一方、根粒バクテロイドには  $\text{NO}_2^-$  が検出されなかったことから、 $\text{NO}_2^-$  がニトロゲナーゼ活性を直接阻害することは考えられない。

では、根粒サイトゾルに集積した  $\text{NO}_2^-$  はどのように窒素固定の低下と結びつくのだろうか。著者は次の理由により、 $\text{NO}_2^-$  による LbNO 形成がその原因となること

を示唆した。1) レグヘモグロビンはジチオナイトの存在下で、 $\text{NO}_2^-$ と反応し LbNOを形成した (Fig. 3) ; 2)  $\text{NO}_3^-$ 添加によりアセチレン還元能が約60%に低下した際に、LbNOが形成されていた (Fig. 1, 5) : すなわち、きわめて低い濃度の酸素条件下で、好氣的ATP生産を行うバクテロイドへ酸素を供給しているレグヘモグロビンが、 $\text{NO}_2^-$ によってニトロシルレグヘモグロビンになることによって酸素運搬機能を低下させるのではないか。ヘモグロビンは、酸素にくらべて非常に高い一酸化窒素に対する親和性を持ち、容易にニトロシルヘモグロビンを形成する (Olson 1981)。レグヘモグロビンも同様に一酸化窒素に高い親和性を持つことが予想され、しかも根粒内の酸素濃度はきわめて低いため (Kings et al. 1988)、LbNOは安定に存在している可能性が高い。したがって、LbNOの役割については注目すべきである。一方 Rigaud and Puppo (1977) は、 $\text{NO}_2^-$ によるレグヘモグロビンの3価への酸化による失活が窒素固定の低下の原因となるとしたが、 $\text{NO}_3^-$ を添加した根粒においてもほとんどのレグヘモグロビンが2価の状態を保っていたことから (Fig. 4)、そのような阻害機構は考えにくい。これまで、低濃度の $\text{NO}_3^-$ の存在下で生育したダイズの根粒において、LbNOを検出したという報告はあるが (Maskall et al. 1977)、LbNOの形成と窒素固定との関連は検討されなかった。LbNOの形成の証明については第3章において述べる。

## 要 約

ダイスに $\text{NO}_3^-$ を与えた場合の根粒の窒素固定能低下の機構を明らかにするため、根粒における $\text{NO}_2^-$ の集積を調べ、その影響について考察した。根粒のアセチレン還元能は $\text{NO}_3^-$ 添加後24時間以内に低下し、その間に根粒サイトゾルには $\text{NO}_2^-$ が集積した。一方、根粒バクテロイドには $\text{NO}_2^-$ は検出されなかった。さらにその根粒からの抽出液の吸収スペクトルより、ほとんどのレグヘモグロビンが2価として存在し、さらにLbNOが含まれることが示された。In vitroでも、 $\text{NO}_2^-$ とジチオナイトの存在下でレグヘモグロビンからLbNOが形成されることが認められた。

以上より、根粒サイトゾルにおける硝酸還元の後集積した $\text{NO}_2^-$ は、LbNOを形成しレグヘモグロビンの酸素運搬機能を阻害することが示唆された。

### 第3章 ニトロシルレグヘモグロビンの性質と根粒への集積

根粒におけるレグヘモグロビンは酸素に対する高い親和性を持ち、低い酸素濃度下でのバクテロイドの活発な呼吸や酸化リン酸化、そして窒素固定のために、酸素の拡散を促進すると言われている (Appleby 1984)。またレグヘモグロビンは、単離したバクテロイドのニトロゲナーゼ活性や有機酸の好氣的代謝速度を促進することも明らかになっている (Tajima et al. 1985, Wittenberg et al. 1974)。多量のATPを要するニトロゲナーゼ反応にとって、レグヘモグロビンは酸素供給の面で不可欠な存在である。 $\text{NO}_3^-$ の添加によりその機能が低下するならば、窒素固定能は速やかに低下するものと考えられる。

第2章で、 $\text{NO}_3^-$ の添加による窒素固定の低下は根粒のサイトゾルにおける $\text{NO}_2^-$ の集積と関係しており、 $\text{LbO}_2$ にかわる $\text{LbNO}$ の形成がレグヘモグロビンの酸素運搬機能の低下を通して、窒素固定能の低下につながることを示唆された。本章ではさらに、in vitroでの $\text{NO}_2^-$ のレグヘモグロビンにおよぼす影響と形成された $\text{LbNO}$ の性質を明らかにするとともに、根粒中に含まれる $\text{LbNO}$ を定量した。

## 材料および方法

### 1) 植物および根粒菌

第2章の材料および方法に述べた。

### 2) レグヘモグロビンの精製およびLbN0とLbO<sub>2</sub>の調製

第2章の材料および方法に述べた。

### 3) アルゴンガス下での粗レグヘモグロビンの抽出

第2章の材料および方法に述べた。

### 4) 根粒からのLbN0の精製

アルゴンガスで置換したグローブボックス内で、根粒を5 mlの20 mMリン酸ナトリウム・カリウム緩衝液(pH 8.0)を用いて乳鉢で摩砕した。用いた緩衝液はすべて、あらかじめアルゴンガスで飽和させ酸素を除去した。またグローブボックス内の酸素は0.3%に保った。摩砕液は4層のガーゼを通した後、アルゴンガスで内部を置換した遠沈管に移し、12,000xgで15分間遠心分離した。その上清を、55から80%飽和の硫酸アンモニウムで塩析した。得られた沈澱を0.5 mlの摩砕用緩衝液にとかし、その緩衝液で平衡化したセファデックスG-15(1.1 cm i.d. x13 cm)カラムに上層し、同じ緩衝液でゲルろ過した。明赤色の画分を、LbN0を含むレグヘモグロビン溶液として集めた。上記の操作はすべて約10°Cで行い、遠心分離以外の操作はグローブボックス内で行った。得られたレグヘモグロビン溶液に2 mgのジチオナイトを加え、グローブボックスより出して迅速に吸収スペクトルを測

定した。

#### 5) LbNO含有率の算出

Fig. 6で示されたように、吸光度415 nm ( $A_{415}$ ) はLbNOのソーレ吸収極大に、吸光度422 nm ( $A_{422}$ ) はLbNOと $Lb^{2+}$ の等吸収点に対応している。レグヘモグロビンの総量に対するLbNOの含有率は、基本的にGiarkina and Amiconi (1981)の方法に従い以下のように算出した。

$$\begin{aligned} \frac{\text{LbNO}}{\text{Total leghemoglobin}} &= \frac{A_{415} - A_{415}(Lb^{2+})}{A_{415}(LbNO) - A_{415}(Lb^{2+})} \\ &= \frac{A_{415}/A_{422} - A_{415}/A_{422}(Lb^{2+})}{A_{415}/A_{422}(LbNO) - A_{415}/A_{422}(Lb^{2+})} = \frac{A_{415}/A_{422} - 0.88}{0.43} \end{aligned}$$

この計算において、 $A_{415}/A_{422}$  の値は絶対値を必要としない点で便利である。

$A_{415}/A_{422}(Lb^{2+})$  と  $A_{415}/A_{422}(LbNO)$  の基準値は、Fig. 6で得られたそれぞれの吸収スペクトルより算出した。

#### 6) 窒素固定活性

第2章の材料および方法に述べた。

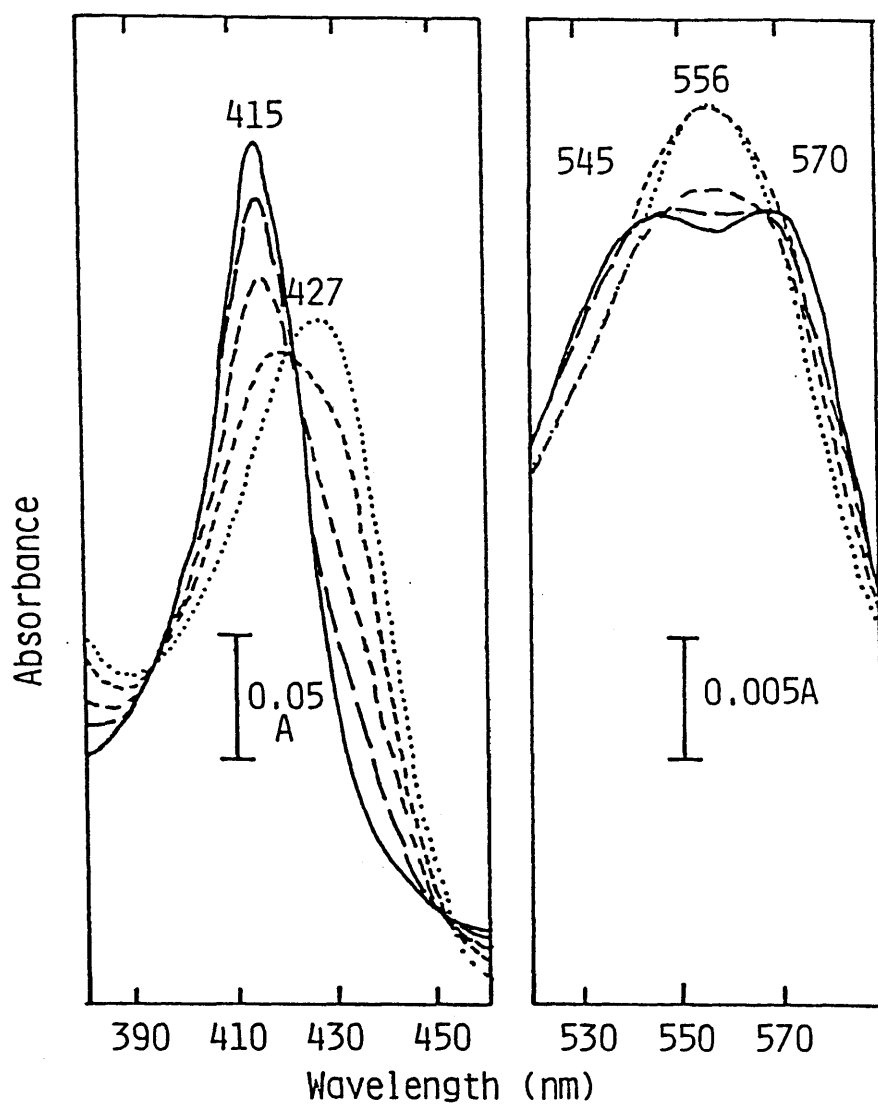


Fig. 6 Absorption spectra of  $\text{Lb}^{2+}$ ,  $\text{LbNO}$  and the mixture. Leghemoglobin ( $2.6 \mu\text{M}$ ) was reduced to the  $\text{Lb}^{2+}$  form by dithionite, then the mixture was supplemented with various concentrations of nitrite. Spectra of  $\text{Lb}^{2+}$ ,  $\text{LbNO}$  and their mixtures are shown by  $\cdots$ ,  $\text{---}$  and other lines, respectively.

## 結 果

### 1) $\text{NO}_2^-$ による $\text{LbO}_2$ の $\text{LbNO}$ への変換

$\text{NO}_2^-$ による、 $\text{LbO}_2$ からの $\text{LbNO}$ の形成を調べるため、レグヘモグロビンの酸化を防止するために加えたDTTの存在下で、ダイズ根粒レグヘモグロビンより調製した $\text{LbO}_2$ を $\text{NO}_2^-$ とともにインキュベートした。Fig. 7にみられるように、 $\text{NO}_2^-$ の存在しない場合 $\text{LbO}_2$ は若干減少した。しかしこの減少は、吸収極大と極小の両方の低下をとまなうこと (Rigaud and Puppo 1977) から、 $\text{LbO}_2$ の軽い酸化のためであると判断された。これに対して $\text{NO}_2^-$ の存在下では、レグヘモグロビンの酸化に特異的な627 nmに肩が若干現れてはいるが、吸収極小の低下はみられず、そのスペクトルはむしろFig. 3でみられた $\text{LbNO}$ のものに近いといえる。さらに、 $\text{LbO}_2$ に由来する574 nmの吸光度の減少は、 $\text{NO}_2^-$ 濃度の増加にしたがって顕著になった (Fig. 8)。

これらの結果から、in vitroにおけるDTTの存在下で、 $\text{NO}_2^-$ により $\text{LbO}_2$ の酸素が置換され、 $\text{LbNO}$ が形成されたと考えられる。

### 2) 還元剤による $\text{LbNO}$ 形成の促進

1)と同様、in vitroの実験系において検討したところ、 $\text{LbNO}$ の形成は $\text{LbO}_2$ の酸化防止剤であるDTTの濃度やアスコルビン酸の存在に依存しており、対照的にSH基の阻害剤であるモノヨード酢酸は $\text{LbNO}$ の形成を抑制した (Fig. 9)。このことは、 $\text{LbNO}$ の形成が $\text{Lb}^{2+}$ に由来することを示唆した。

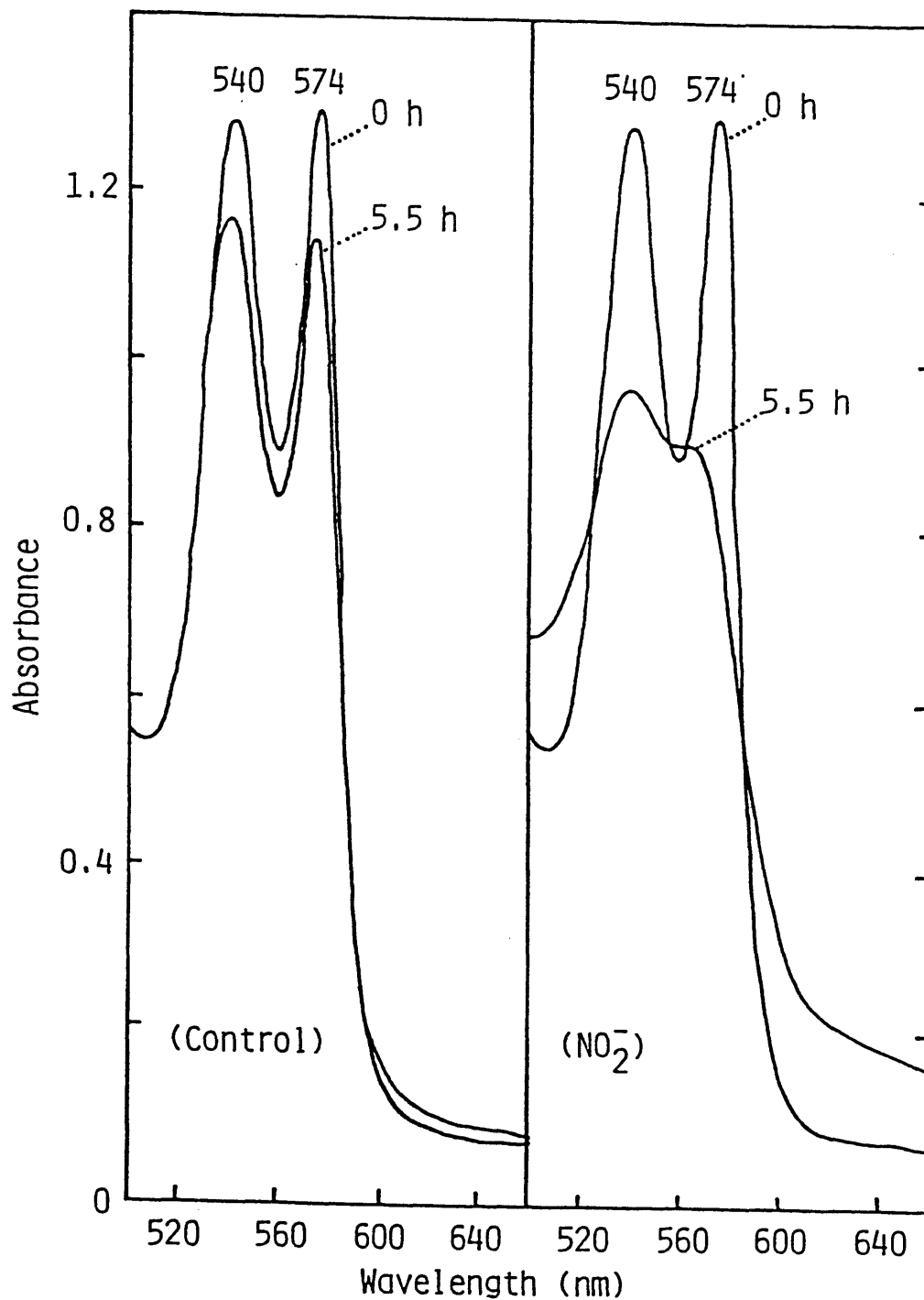


Fig.7 The shift in the absorption spectrum of LbO<sub>2</sub> to that of LbNO by addition of nitrite. LbO<sub>2</sub> (0.1mM) was incubated in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.7) that contained 50 mM DTT and 10 mM KNO<sub>2</sub> at 25°C.

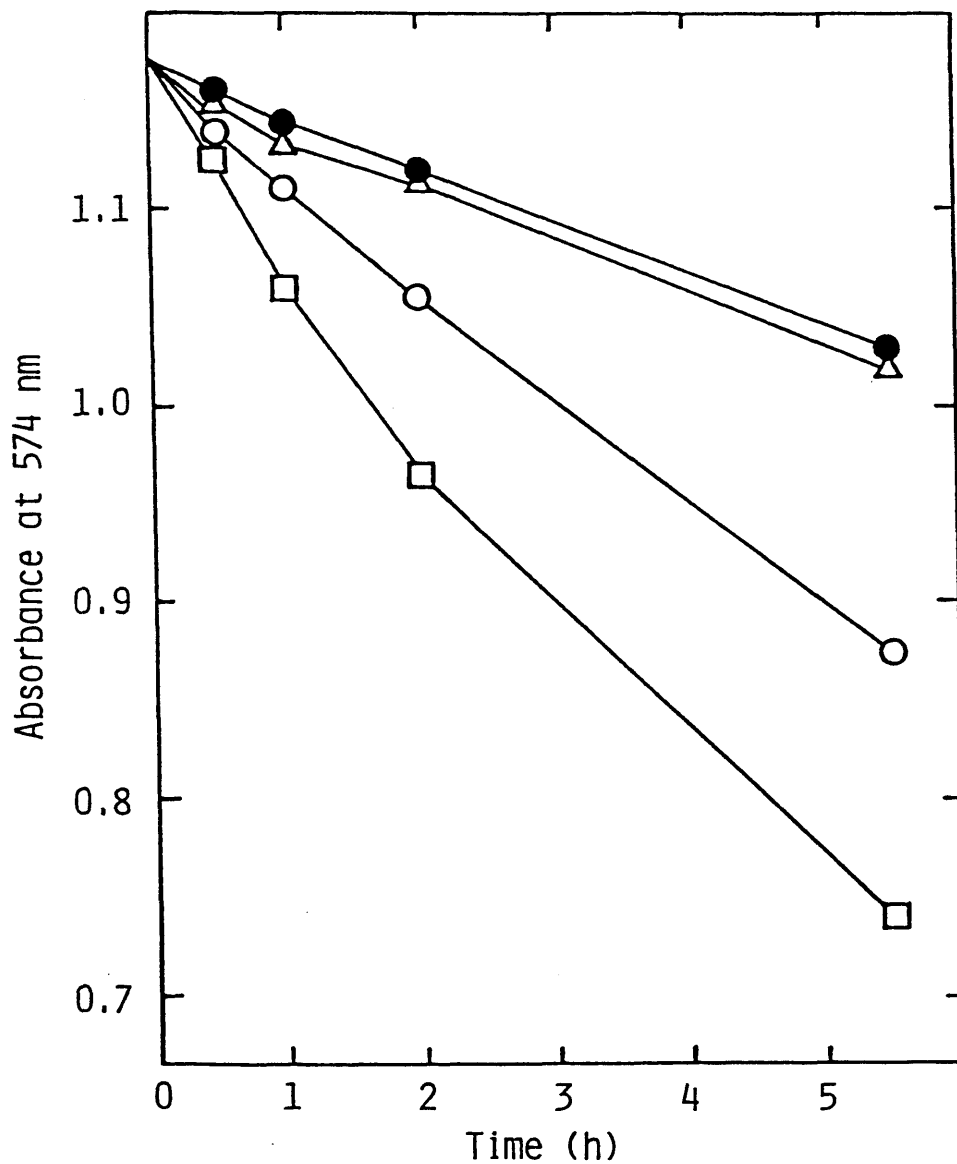


Fig.8 Decrease in the absorbance of LbO<sub>2</sub> with increasing concentrations of nitrite. LbO<sub>2</sub> (0.1 mM) was incubated in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.7) that contained 50 mM DTT and various concentrations of KNO<sub>2</sub> (●, 0 mM; △, 0.5 mM; ○, 4 mM; □, 10 mM). Then the absorbance at 574 nm of LbO<sub>2</sub> was used for representation of the results.

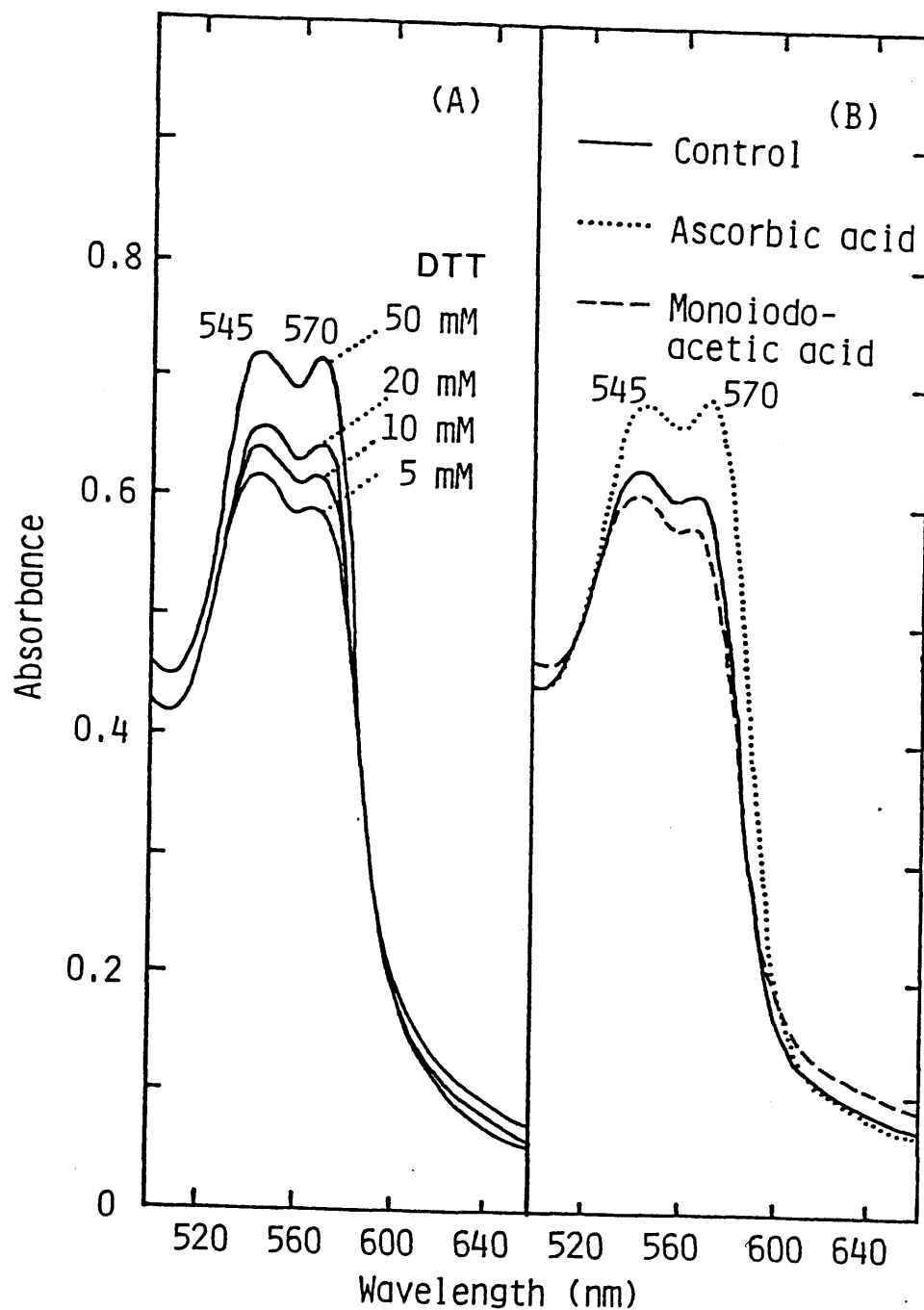


Fig.9 Effects of reducing agents and an inhibitor of SH-groups on the formation of LbNO. (A) Leghemoglobin ( $57 \mu\text{M}$ ) was incubated for 1 h in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.7) that contained 10 mM  $\text{KNO}_2$  and various concentrations of DTT, at  $25^\circ\text{C}$ , in the dark. (B) Leghemoglobin ( $57 \mu\text{M}$ ) was incubated for 3 h in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.7) that contained 10 mM  $\text{KNO}_2$ , 10 mM DTT, and 10 mM ascorbic acid (or 2 mM moniodoacetic acid instead), at  $25^\circ\text{C}$ , in the dark.

### 3) レグヘモグロビンと一酸化窒素の結合

上記結果よりLbNOは、LbO<sub>2</sub>を構成するLb<sup>2+</sup>とNO<sub>2</sub><sup>-</sup>から生ずる一酸化窒素とが反応して形成されることが考えられるので、in vitro においてLb<sup>2+</sup>と一酸化窒素を直接反応させてLbNOが形成するかどうかを確かめた。Fig. 10に示されるようにLb<sup>2+</sup>と一酸化窒素との結合により、415、545および570 nmに吸収ピークを有するスペクトルを持つ反応生成物が得られた。この吸収スペクトルはFig. 3、7および9で得られたLbNOのものと一致した。一方、Lb<sup>3+</sup>と一酸化窒素との結合により得られた吸収スペクトルは、LbNOのものとはまったく異なっていた。この結果は、Lb<sup>2+</sup>に一酸化窒素が結合する事によってLbNOが形成されることを支持した。

### 4) LbNOの可視光による解離

LbO<sub>2</sub>あるいはLbNOを強可視光下に40分間おくと、LbO<sub>2</sub>は安定だったのに対し、LbNOは解離しLb<sup>3+</sup>の吸収スペクトルを示すようになった(Fig. 11)。LbNOは光によって解離するLbCOのように(Imamura et al. 1972)可逆的に結合しており、Lb<sup>2+</sup>と一酸化窒素に解離し、還元剤なしで好氣的な状態におかれたLb<sup>2+</sup>は、一酸化窒素を解離後速やかにLb<sup>3+</sup>に酸化されたものと思われる。そこで10 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>添加後24時間目のダイズ根粒より、レグヘモグロビンの自動酸化とレグヘモグロビンに結合している一酸化窒素の酸素による置換を回避するために、アルゴンガス下で粗レグヘモグロビンを抽出したところ、得られたレグヘモグロビンはLbNOの吸収スペクトルを示した。このレグヘモグロビンにFig. 11と同様に可視光を照射したところ、Lb<sup>3+</sup>のスペクトルに変化した(Fig. 12)。このことは、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を添加した

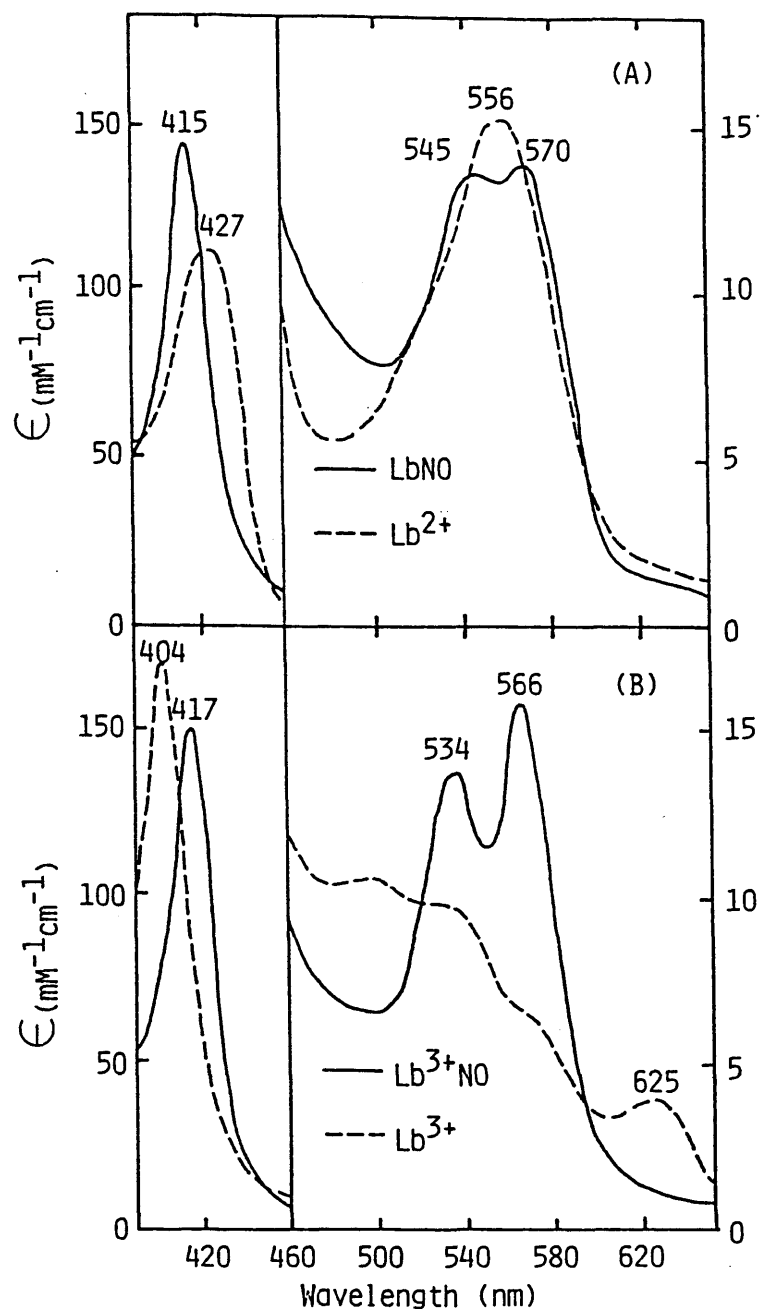


Fig.10 Absorption spectra of the complex of  $\text{Lb}^{2+}$  or  $\text{Lb}^{3+}$  with nitric oxide.  $\text{Lb}^{2+}$  (A) and  $\text{Lb}^{3+}$  (B) were prepared by addition of a minimal amount of dithionite and potassium ferricyanide, respectively, to leghemoglobin, then collected by passage through a column of Sephadex G-15. The reaction of  $\text{Lb}^{2+}$  or  $\text{Lb}^{3+}$  with nitric oxide was performed anaerobically in a vial with a serum cap. Argon gas was passed over the surface of the solution of leghemoglobin, with occasional stirring, for 20 min, then argon was replaced anaerobically with nitric oxide for 5 min. The nitric oxide was previously washed by passage through 1 M KOH. The combination of leghemoglobin with nitric oxide was performed essentially by the method of Yonetani et al. (1972).

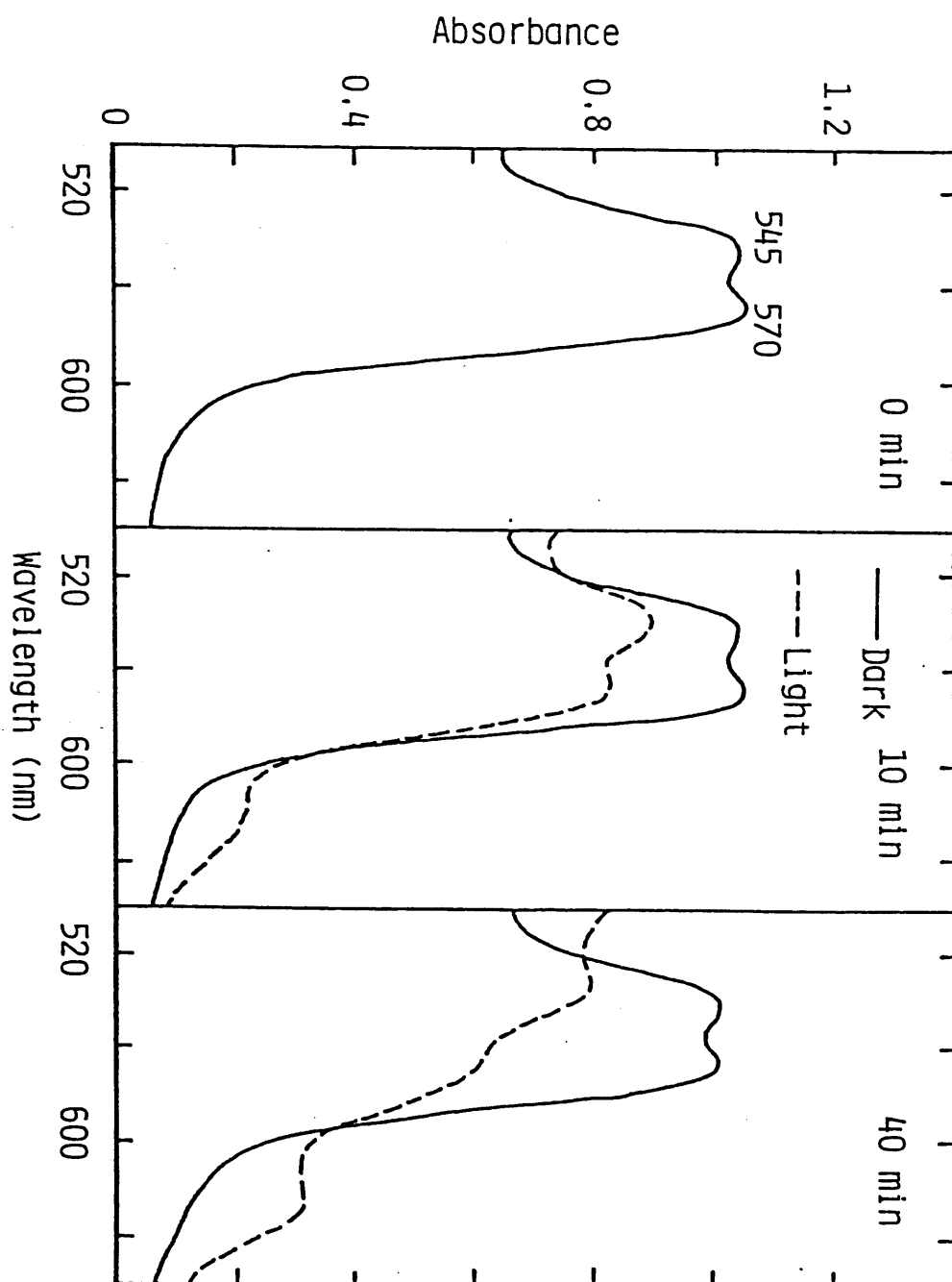


Fig.11 Disappearance of the absorption spectrum of LbNO caused by exposure to visible light. LbNO ( $80\mu\text{M}$ ) in solution was placed under visible light (15,400 Lux) at 25°C.

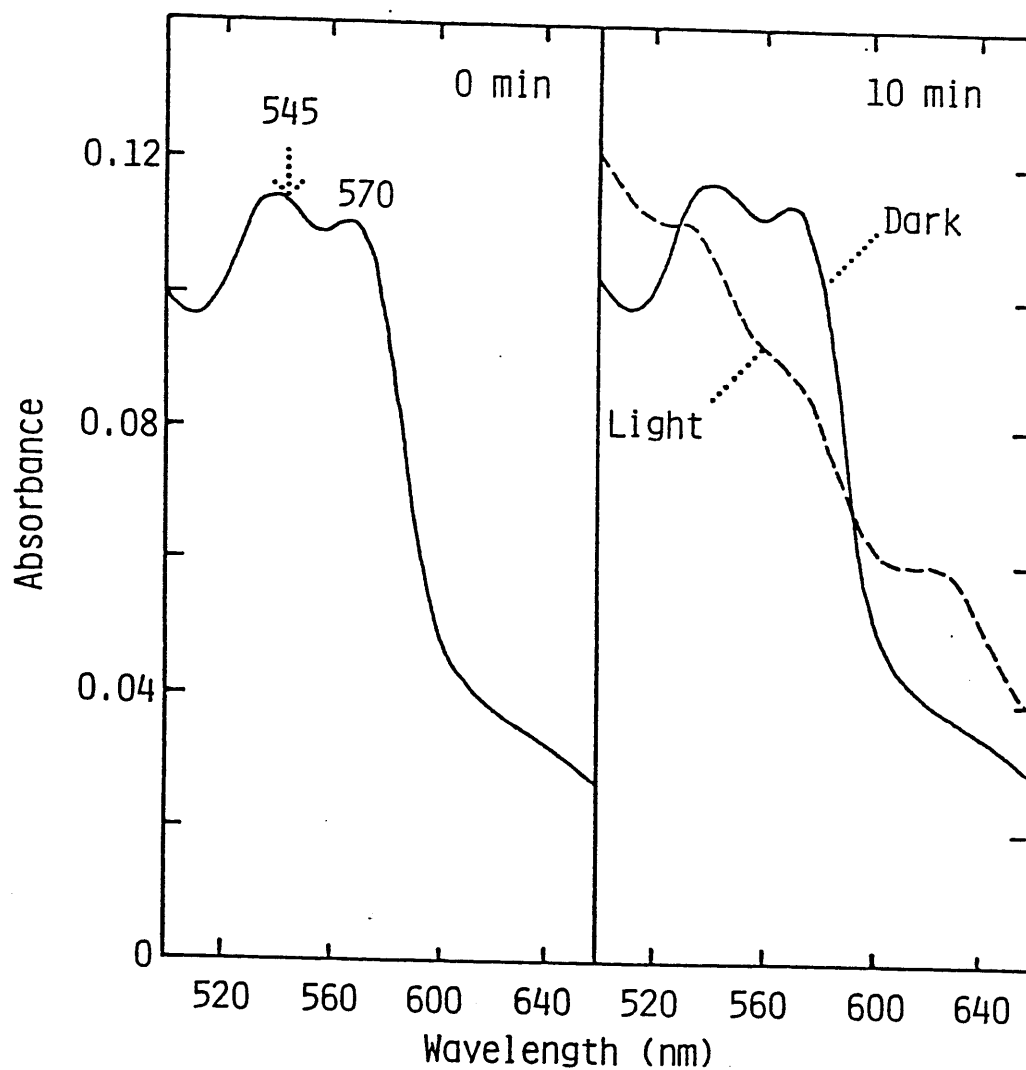


Fig.12 Changes in the absorption spectrum of the crude leghemoglobin extracted from nodules of plants supplied with nitrite caused by exposure to visible light. The crude leghemoglobin was extracted under Ar gas from nodules of plants cultured for 24 h with 10 mM  $\text{KNO}_2$ , and then placed under visible light (15,400 Lux) at 25°C.

根粒においてLbNOが形成されることを示した。

#### 5) $\text{NO}_3^-$ 添加根粒におけるLbNOの集積

10 mM  $\text{NO}_3^-$ を添加したダイズ根粒より、アルゴンガス下でレグヘモグロビンを精製し、LbNOを定量した。抽出緩衝液は、レグヘモグロビンのニコチン酸との結合を避けるためpH 8.0とした(Maskall et al. 1977)。Fig. 13に示される吸収スペクトルより、 $\text{NO}_3^-$ 無添加根粒では $\text{Lb}^{2+}$ が主なレグヘモグロビンのタイプであったのに対し、 $\text{NO}_3^-$ 添加根粒ではLbNOが主なレグヘモグロビンであることが明らかになった。次に材料および方法に述べた計算式に従って、LbNOのレグヘモグロビン中に占める割合を求めると、 $\text{NO}_3^-$ 添加後12時間目にはLbNOは60%を占め、24時間目には86%にまで達した(Fig. 14)。このLbNO含有率の増加はアセチレン還元能の低下とよく対応した。

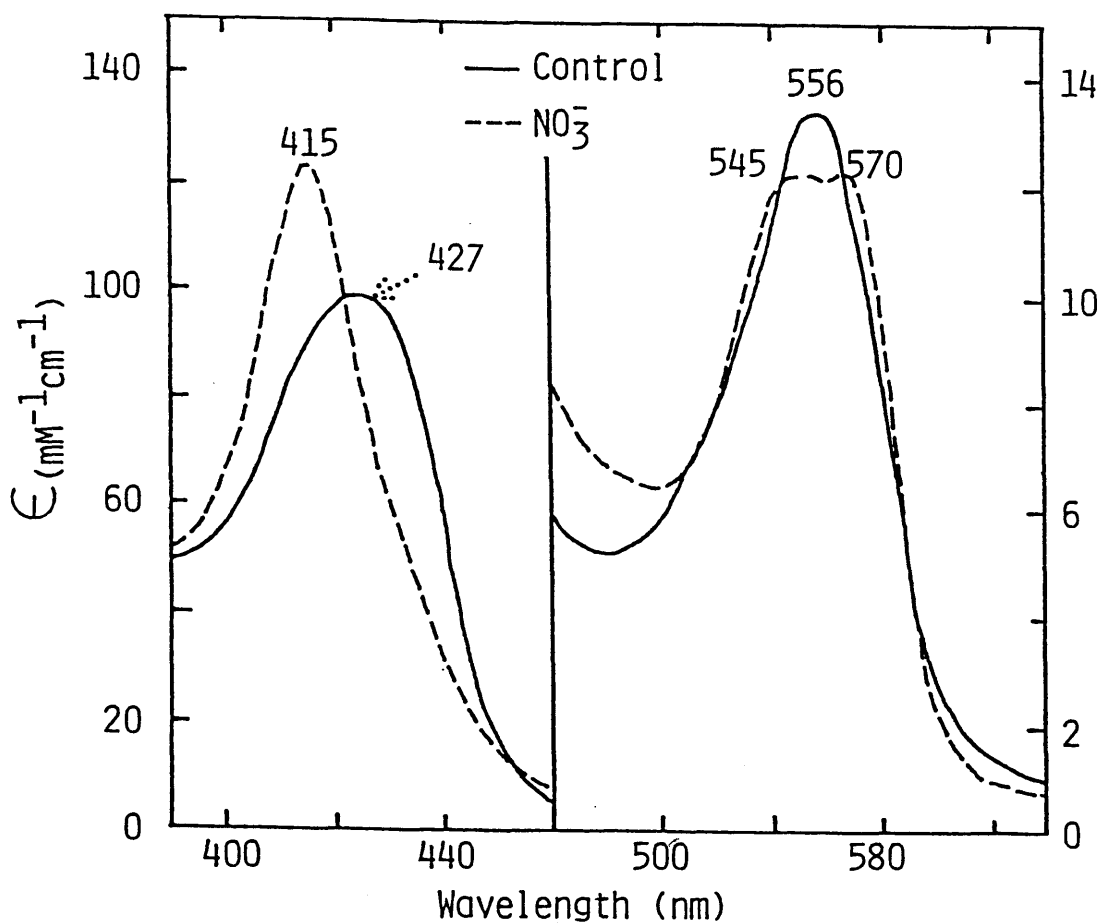


Fig. 13 Absorption spectrum of leghemoglobin isolated from nodules of plants supplied with nitrate. The leghemoglobin was extracted under Ar gas (0.3% oxygen) from nodules of soybean plants cultured for 24 h in the culture medium supplemented with 10 mM  $\text{NaNO}_3$ .

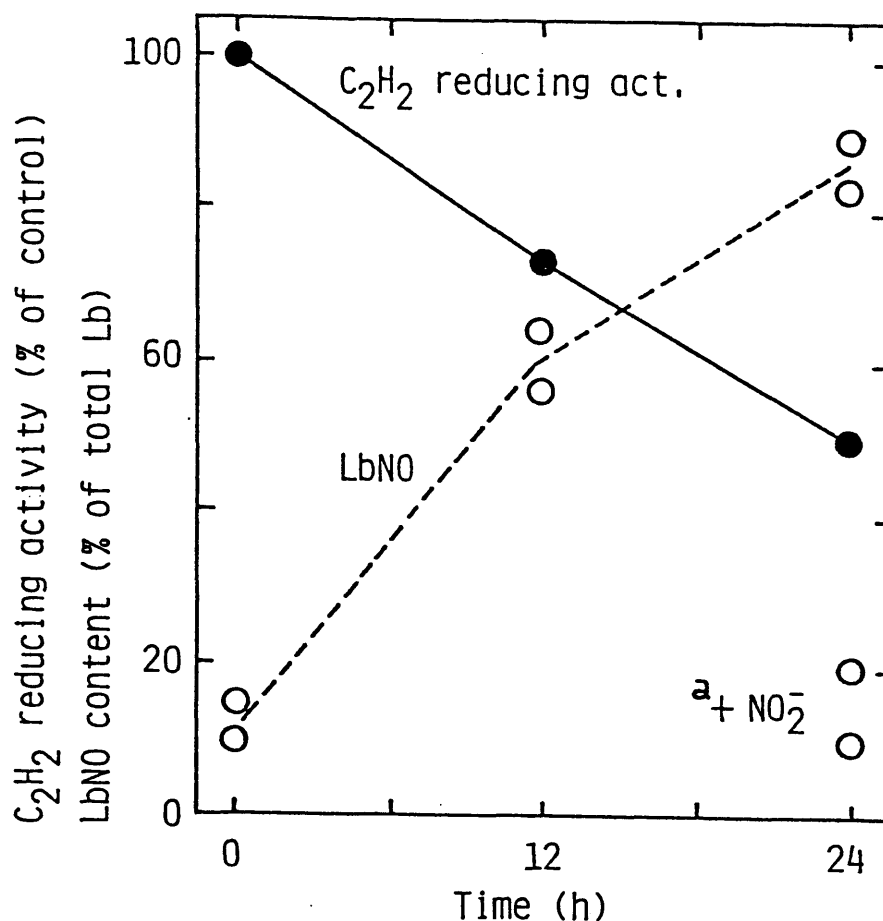


Fig. 14 Effect of nitrate on the acetylene reducing activity and level of LbNO in nodules. The leghemoglobin was extracted under Ar gas (0.3% oxygen) from nodules of soybean plants cultured in the medium supplemented with 10 mM  $NaNO_3$ . The level of LbNO in the leghemoglobin was calculated as shown in Materials and Methods. Acetylene reducing activity is given as the mean of results from three replicates. Levels of LbNO were determined in duplicate. \*As a control, nodules of plants not supplied with nitrate were homogenized with  $NaNO_2$  (100 nmol/g fresh weight of nodules) for extraction of leghemoglobin.

## 考 察

$\text{NO}_3^-$ 添加によって根粒中にLbNOが形成されたかどうかを、それらのスペクトルの特徴から解析した。LbNOの吸収スペクトルはすでに Sternberg and Virtanen (1952) により報告されており、その結果は Dilworth and Appleby (1979) や Dilworth (1980) によって支持されている。本実験によって得られたLbNOと思われる物質の特異的なスペクトルは、これらの報告と一致した。また、Maskall et al. (1977) は電子スピン共鳴法により、0.5 mM  $\text{NO}_3^-$ 存在下で育成した根粒においてLbNOを検出しており、そこで得られた400nm台の吸収スペクトルはまた本論文のものと一致した。これらの結果は根粒内にLbNOが形成されたことを示唆したが、さらにLbNOの形成をその性質を通して明らかにするために、in vitroの実験を行った。In vitroにおいて、 $\text{NO}_2^-$ とジチオナイトの添加によって2価のヘムタンパクの一酸化窒素結合型を作る方法は、Yonetani et al. (1972), Maskall et al. (1977) そしてAscenzi et al. (1981, 1989) によってすでに広く用いられているものであり、これにより形成された物質がLbNOであることは、以下の3つの理由により明らかである。1)  $\text{Lb}^{2+}$ に一酸化窒素を嫌氣的（無酸素下）に通気する事により得られたレグヘモグロ빈は、他の場合において得られたものと同様に典型的なLbNOのスペクトルを示した (Fig. 10) ; 2) LbNOは強可視光の照射により解離した (Fig. 11, 12) ; 3) LbNOの形成は還元剤により促進された (Fig. 9)。以上より、in vivoおよびin vitroでの結果を総合すると、 $\text{NO}_3^-$ を与えた根粒にお

いて形成されたのはLbNOであり、そのLbNOは $\text{Lb}^{2+}$ と一酸化窒素とが結合した物質であると考えられる。

本実験のLbNOの測定方法によると、 $\text{NO}_3^-$ 無添加の根粒においては約10%のLbNOが検出されただけであり、この測定法は本研究の目的に合致したものといえる。さらに $\text{NO}_3^-$ 無添加の根粒を、高濃度の $\text{NO}_2^-$  (100 nmol/g fresh weight nodules) 共存下で摩砕し、レグヘモグロビンを抽出した場合、そのLbNO含有率は $\text{NO}_2^-$ を共存させないものと変わらなかった。すなわち、得られたLbNOは抽出中の人為的な形成によるものではないことが明らかになった。

レグヘモグロビンは好氣的条件下で、 $\text{NO}_2^-$ により容易に酸化されることが報告されており (Rigaud and Puppo 1977)、さらに根粒に直接 $\text{NO}_2^-$ を与えると非常に多量の $\text{NO}_2^-$ が根粒内に集積する ( $>1 \mu\text{mol/g fresh weight}$ ) ので、 $\text{NO}_2^-$ を水耕液に与える実験においてはレグヘモグロビンが酸化されていることが予想された。しかし、実際はレグヘモグロビンの酸化は起こらず、むしろLbNOが形成された (Fig. 12)。このことから、根粒内はレグヘモグロビンや $\text{NO}_2^-$ の還元に適した酸化還元電位の低い環境であることが予想される。この還元的な環境は、一酸化窒素の生成にとって有利であると思われる。たとえば、ニトロシルミオグロビンを形成させる実験において、アスコルビン酸は $\text{NO}_2^-$ から一酸化窒素の形成を促進する (Fox and Thomson 1963) という報告がある。また、一酸化窒素はダイズの硝酸還元酵素の主要な産物としてすでに同定されている (Dean and Harper 1986)。これらのことより、根粒内に一酸化窒素が存在する可能性は十分に考えられる。

しかし、根粒における一酸化窒素の生成とその役割にはいまだ不明な点が多い。

LbNOは、フェリシアン化カリウムによる酸化に安定である (Maskall et al. 1977) ように、暗所での自動酸化に安定であった。また、空気飽和で $\text{NO}_2^-$ を除いた緩衝液中でも、LbNOにはほとんど酸素は結合しなかった (Fig. 11)。このLbNOの安定性は、 $\text{NO}_2^-$ によるLbO<sub>2</sub>の解離とそれに続くLbNOの形成が、空気中でのインキュベーションでおこることによっても支持される (Fig. 7, 8)。このことは、Lb<sup>2+</sup>に対する一酸化窒素の親和性が酸素の親和性よりも強いことを示唆している。そしてLbNOの酸化に対する安定性や、一酸化窒素の酸素による置換の困難さは、根粒内におけるLbNOの集積につながるのではないかとと思われる。

結論として、 $\text{NO}_3^-$ 添加根粒における窒素固定能の低下は、LbNOの形成に由来するレグヘモグロビンの機能阻害により引き起こされるといえる。Carroll et al. (1987) や Vessey et al. (1987) はすでに、 $\text{NO}_3^-$ を与えたダイズのニトロゲナーゼ活性が、根粒中の酸素供給により制御されるのではないかと提案している。本研究における結果は、これらの仮説を支持するものである。

## 要 約

ダイズ根粒におけるLbNOの集積と、in vitroでのLbNOの性質から、 $\text{NO}_3^-$ による窒素固定能低下の機構を検討した。

水耕液に $\text{NO}_3^-$ を与えた場合、アルゴンガス下で根粒から精製されたレグヘモグロ빈は主にLbNOであった。このことは、得られたレグヘモグロ빈の吸収スペクトルが、in vitroでレグヘモグロ빈と $\text{NO}_2^-$ からジチオナイトの存在下で形成されたLbNOや、 $\text{Lb}^{2+}$ と一酸化窒素との結合によって得られたLbNOの吸収スペクトルと一致したことから明らかであった。さらに、in vivoで形成された物質が、in vitroで形成されたLbNOと同様に、可視光照射によって容易に解離したことからこの物質がLbNOであることが支持された。

In vitroで、 $\text{LbO}_2$ の酸素が $\text{NO}_2^-$ から生ずる一酸化窒素に置換されることが示された。このようにして根粒中で形成されたLbNOの含有率の上昇は、アセチレン還元活性の低下とよく対応した。

以上より、 $\text{NO}_3^-$ による窒素固定能の低下は、レグヘモグロ빈がバクテロイドへ酸素を供給する機能が、LbNOの形成により抑制されるために起こると考えられた。

#### 第4章 ニトロシルレグヘモグロビン形成によるオキシレグヘモグロビン形成の 阻害に関する反応速度論的解析

$\text{NO}_3^-$ によるダイズ根粒の窒素固定能の低下は、硝酸代謝産物による直接的なニトロゲナーゼの阻害や、硝酸同化と窒素固定反応との間のエネルギー競合のための炭水化物の不足によるのではなく、レグヘモグロビンの酸素運搬能の低下によって起こることをこれまで述べてきた。Minchin et al. (1986) はホワイトクローバーの根粒において、バクテロイドへの酸素の供給が $\text{NO}_3^-$ によるニトロゲナーゼ活性の阻害にともなって低下すると報告した。また、 $\text{NO}_3^-$ を添加したダイズにおいて、根粒バクテロイドへの酸素の拡散が困難になることが、Vessey et al. (1988) により報告された。さらに、 $\text{NO}_3^-$ により阻害された根粒の窒素固定活性は、根粒周囲の酸素濃度を上げることにより回復させることができた (Carroll et al. 1987)。これらの結果から、根粒中の酸素の拡散抑制が、レグヘモグロビンの機能低下と密接につながっていることが予想される。すでに第3章において、根粒への $\text{NO}_2^-$ の集積がLbNOの形成につながり、それによるレグヘモグロビンの機能阻害がニトロゲナーゼ活性の低下を誘導することが示された。しかし、 $\text{NO}_2^-$ のLbNO形成を経由してのレグヘモグロビンへの影響は、分光学的に検討されるにとどまっている。本章では、LbNOの形成が真に酸素の拡散の阻害につながるか否かについて明らかにするため、レグヘモグロビンの酸素結合能に対する $\text{NO}_2^-$ の影響や一酸化窒素との親和性を詳細に調べた。

## 材料および方法

### 1) 植物および根粒菌

第2章の材料および方法に述べた。

### 2) レグヘモグロビンの調製

酸素結合能の測定のために用いたレグヘモグロビンの調製法は、第2章の材料および方法に述べた。LbN<sub>0</sub>形成の反応速度論に用いたレグヘモグロビンは、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) と0.1 M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.7) のかわりに、0.1および0.05 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた点を除いては第2章の材料および方法に述べたように調製し、その後さらにセファデックスG-75カラムを通したものをを用いた。

### 3) レグヘモグロビンの濃度

第2章の材料および方法に述べた。

### 4) 酸素結合能の測定

血清キャップで密閉した50 mlフラスコ中で、0.7 mMのレグヘモグロビンを含む0.1 M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.7) 900  $\mu$ lを、15.4 mgのDTTおよび種々の濃度の100  $\mu$ l亜硝酸カリウム溶液と混合した。フラスコ内の空気を完全にアルゴンガスで置換した後25°Cで1時間振とうし、レグヘモグロビン溶液をマイクロシリンジで10  $\mu$ l抜き取り、あらかじめ酸素濃度の調節してある酸素電極用反応セル内の0.1 M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.7) に注入し、酸素量の減少を測定した。酸素濃度

の調節は、25°Cにおいて適当量のジチオナイト溶液（10 mg/ml）を注入することにより行った。反応終了後セル内の反応液をキュベットに移し、迅速に吸収スペクトルを測定した。

#### 5) LbNO形成の反応速度論

レグヘモグロビンと $\text{NO}_2^-$ からの、LbNO形成における結合の速度定数や平衡定数は、一酸化炭素のレグヘモグロビンに対する結合の速度定数決定のための方法に従い測定した（Wittenberg et al. 1972）。3.8 mMジチオナイトを含む0.05 Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）にとかしたレグヘモグロビン（2.6  $\mu\text{M}$ ）を、素早く亜硝酸ナトリウム溶液と混合した後、LbNOの吸収ピークである415 nmの吸光度を測定することにより反応を追った。

## 結果および考察

根粒に吸収された $\text{NO}_3^-$ は、サイトゾルで硝酸還元酵素によって $\text{NO}_2^-$ に還元され、その $\text{NO}_2^-$ に由来する一酸化窒素がレグヘモグロビンと結合し $\text{LbNO}$ を形成すると考えられる。本章では、 $\text{NO}_2^-$ 存在下での $\text{LbO}_2$ および $\text{LbNO}$ 形成の関係を速度論的に解析することによって、 $\text{NO}_3^-$ によるニトロゲナーゼ活性の阻害機構をより詳細に説明することを試みた。

### 1) 酸素結合能の測定による $\text{NO}_2^-$ 存在下での $\text{LbO}_2$ および $\text{LbNO}$ の形成

#### ① 酸素結合能測定による $\text{LbO}_2$ 形成の確認

レグヘモグロビンによる酸素の結合を、酸素電極により測定した。レグヘモグロビン添加後の酸素結合は非常に速く、数秒で一定レベルに達した (Fig. 15)。高濃度の酸素条件下 ( $80 \mu\text{M}$ ) での $\text{NO}_2^-$ 無添加区 (対照区) の酸素減少量は  $6.2 \mu\text{M}$  で、この値はセル内に存在するレグヘモグロビンの濃度とほぼ一致した。これに対して、 $0.8 \text{ mM}$  の $\text{NO}_2^-$ と反応させたレグヘモグロビンによる酸素の結合量は  $0.7 \mu\text{M}$  であり、酸素結合能は90%阻害された (Fig. 15)。これら酸素結合能の測定における結果は、Fig. 16B における吸収スペクトルとよく対応し、 $\text{NO}_2^-$ を反応させない場合のレグヘモグロビンはほとんどが $\text{LbO}_2$ になることは明らかである。

#### ② $\text{LbNO}$ の形成による酸素結合能 ( $\text{LbO}_2$ の形成) の低下

$\text{LbNO}$ の形成が酸素結合能の低下に結びつくことを明らかにするため、様々な濃度の $\text{NO}_2^-$ と反応させたレグヘモグロビンの酸素結合能と吸収スペクトルを測定し

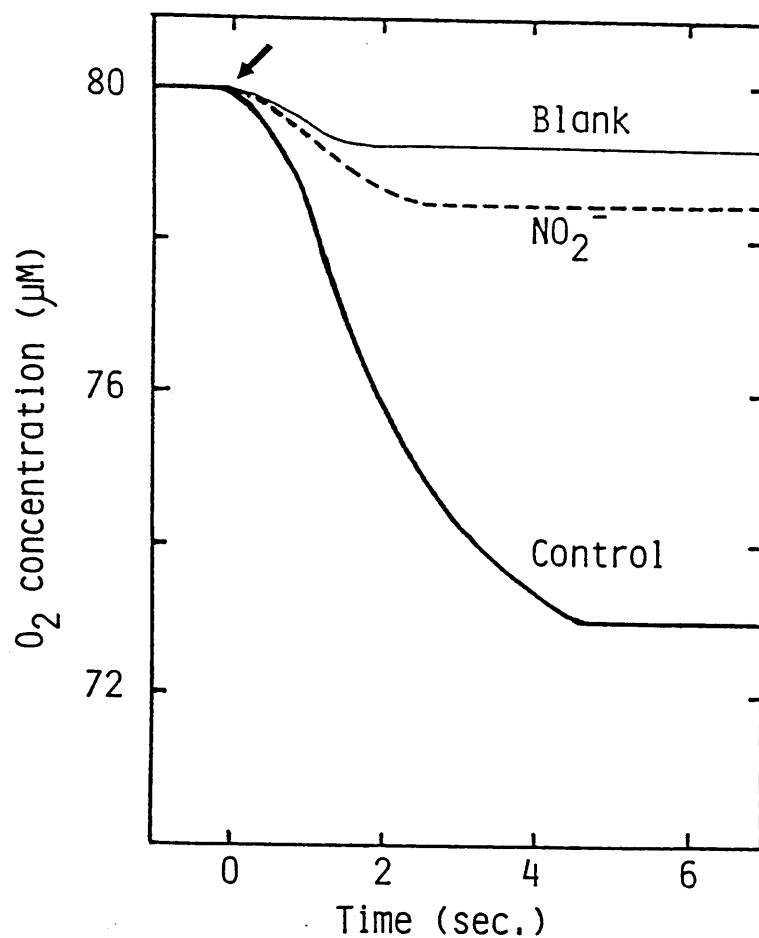


Fig. 15 Time-course of oxygen consumption by leghemoglobin in the presence or absence of nitrite. Leghemoglobin (0.63 mM) was incubated with or without (control) KNO<sub>2</sub> (0.8 mM) under argon gas, then injected into the cell of an oxygen electrode. The mixture omitting only leghemoglobin incubated under argon gas was injected into the cell as a blank.

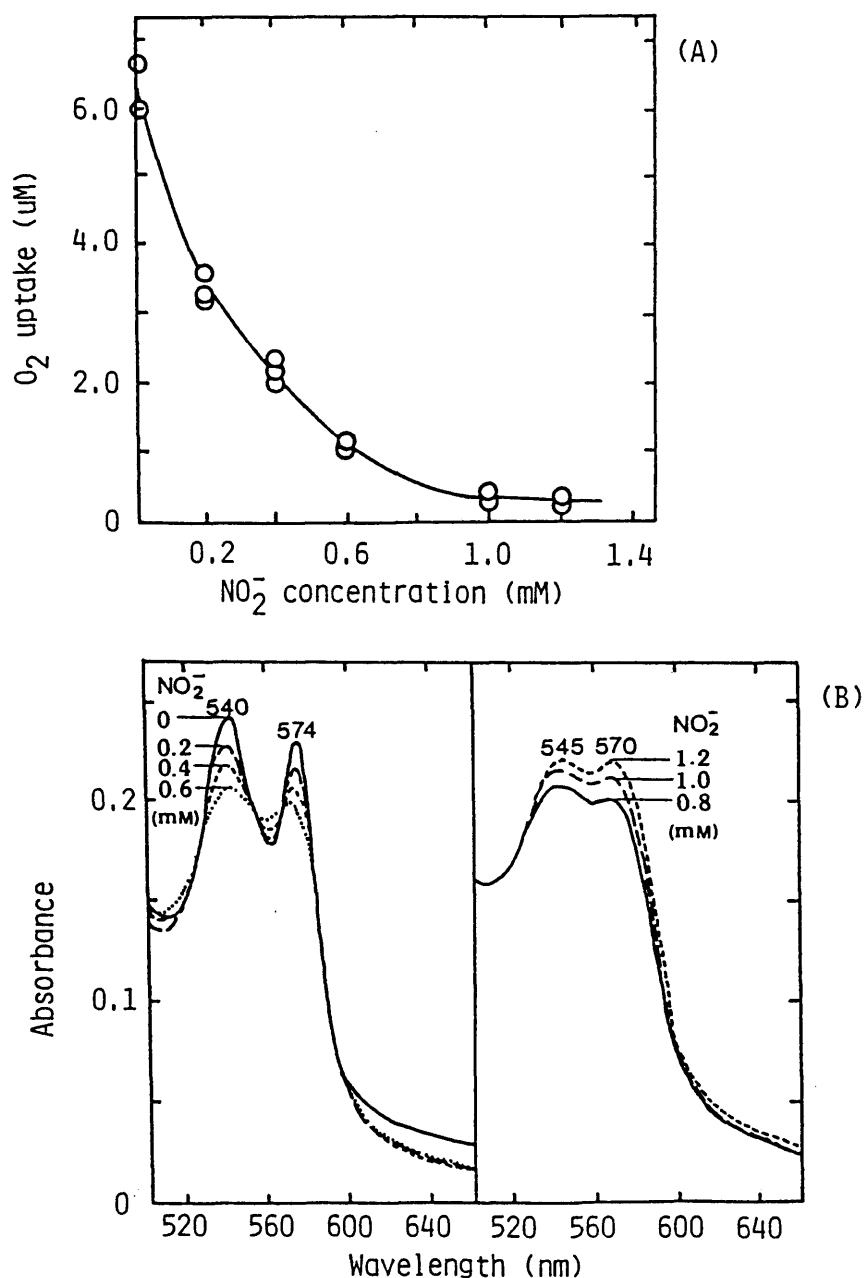


Fig. 16 Alteration of the oxygen uptake and the absorption spectrum of leghemoglobin by nitrite.

(A) Leghemoglobin (0.63 mM) incubated with different concentrations of  $KNO_2$  under argon gas for 1 h was injected into the cell containing 100  $\mu M$  oxygen in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.7). (B) The absorption spectrum of each reaction mixture after the detection of oxygen consumption was measured.

た (Fig. 16)。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>無添加のレグヘモグロビンは540と574 nmに吸収ピークを持ち、吸収極大と極小の吸光度の差が大きい、いわゆるLbO<sub>2</sub>のスペクトルの特徴 (Fig. 3) を示したので、ほとんどが酸素と結合したことになる (Fig. 16B)。そのときの酸素結合量も、レグヘモグロビンの濃度と一致していた (Fig. 16A)。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度を上げると吸収極大と極小の差が小さくなり、540と574 nmのピークは 545と570 nmへ移行した。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>が0.8 mM以上の場合には、吸収ピークは完全に545と570 nmになった。この吸収ピークの移行は、第3章で示したようにLbO<sub>2</sub>の減少にともなうLbNOの形成をあらわしている。このようなスペクトルの変化にともなって酸素結合能も低下し、レグヘモグロビンの機能は大きく低下したことになる。これらの結果より、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>によるLbO<sub>2</sub>の減少は、LbNOの形成によることが明らかとなった。

## 2) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>によるLbO<sub>2</sub>形成の拮抗阻害

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>によるレグヘモグロビンの酸素結合能の阻害は、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>に由来する一酸化窒素のヘムとの結合によると考えられる。そこで様々な濃度の酸素と、0.6 mMのNO<sub>2</sub><sup>-</sup>を反応させたレグヘモグロビンとを平衡になるまで反応させたところ、Fig. 17のようになった。すなわち、レグヘモグロビンと酸素とが数秒で平衡に達したときの酸素結合量を、反応液中の酸素濃度に対してプロットした。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>無添加の場合、すべての酸素濃度においてほとんどのレグヘモグロビンは酸素と結合していた。レグヘモグロビンは、0.09 μMの酸素濃度でその半分以上が酸素と結合できるため (Appleby 1962)、これは当然の結果である。これに反して、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>と反応させ

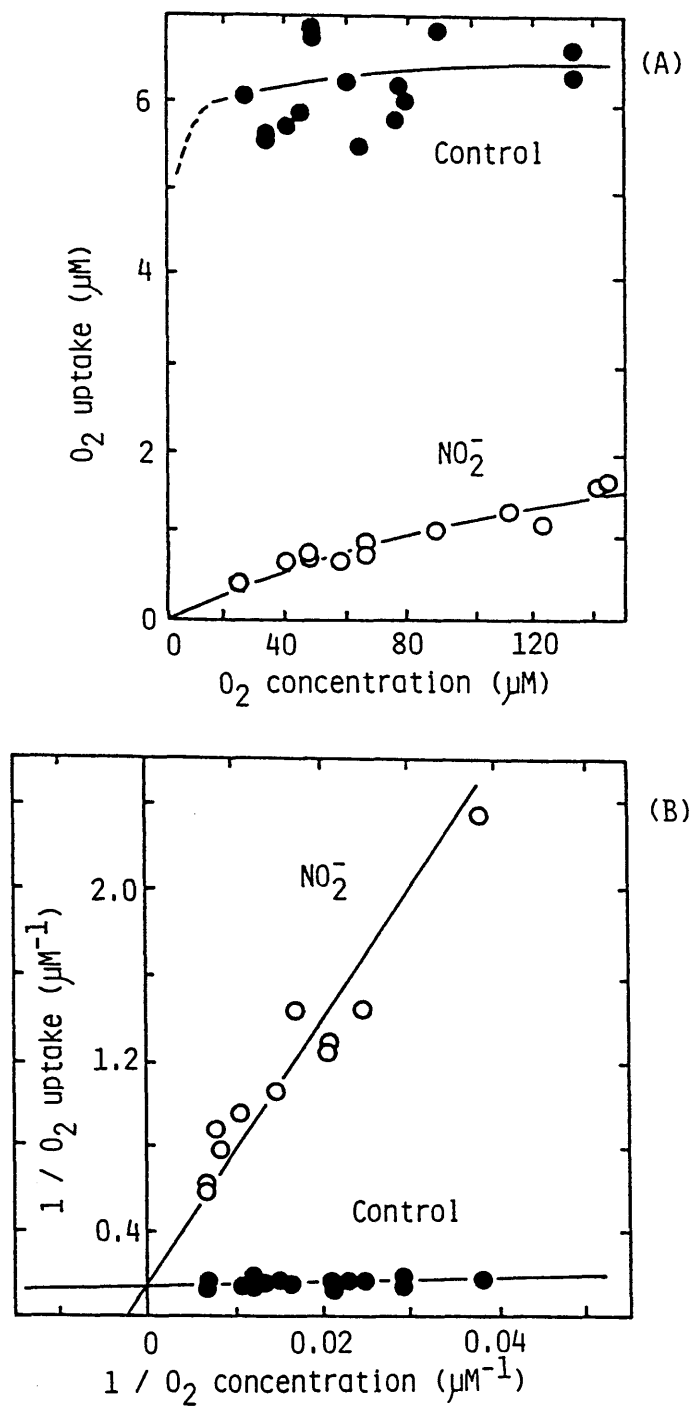


Fig. 17 Inhibition of oxygen-binding ability of leghemoglobin by nitrite. Leghemoglobin incubated with or without (control) 0.6 mM  $KNO_2$  under argon gas was injected into the cell containing various concentrations of oxygen in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.7). The oxygen uptake of leghemoglobin was shown as a function of oxygen concentration in (A). The double reciprocal plots were described in (B).

たレグヘモグロビンの酸素結合能は、高濃度の酸素条件下でも飽和しなかった (Fig. 17A)。また、逆数プロットにおいて示されるように (Fig. 17B)、レグヘモグロビンの酸素結合能は $\text{NO}_2^-$ により拮抗的に阻害された。これらのことから、レグヘモグロビンの酸素結合部位は一酸化窒素の共存により拮抗的に阻害されるが、酸素濃度を増加させることにより回復することが明らかとなった。

### 3) レグヘモグロビンと $\text{NO}_2^-$ からのLbNO形成の反応速度論

本実験で、LbNO形成の反応速度論から求めた定数は、一酸化窒素ではなく $\text{NO}_2^-$ に対するものであった。一般に $\text{NO}_2^-$ が酵素的に生成され集積するのに対し、一酸化窒素はその $\text{NO}_2^-$ から非酵素的に形成されと考えられる (Doyle et al. 1981, Fox and Thomson 1963)が詳細は不明である。それ故、硝酸施肥によるレグヘモグロビンの機能阻害におけるLbNOの役割を検討するには、根粒内でのその安定した存在が確認できない一酸化窒素より、その生成のメカニズムと根粒への集積量が明確な $\text{NO}_2^-$ を用いた方が適当であると考えられる。

#### ①LbNO形成の速度定数

Fig. 18で求められたLbNO形成の初速度は、各 $\text{NO}_2^-$ 濃度に対して直線関係を示した (Fig. 19)。この直線の傾きから算出した $\text{NO}_2^-$ の結合の速度定数は、酸素や一酸化炭素に対するものよりかなり小さかった (Table 1)。これは、15 mMジチオナイトと0.5 mM  $\text{NO}_2^-$ の存在下での一酸化窒素の形成速度が、0.15  $\mu\text{M}/\text{min}$ と非常に小さい (Mayer 1981) ことに由来し、 $\text{NO}_2^-$ から一酸化窒素への還元が律速となっていると考えられる。還元状態である根粒内でも、 $\text{NO}_2^-$ の一酸化窒素への還元

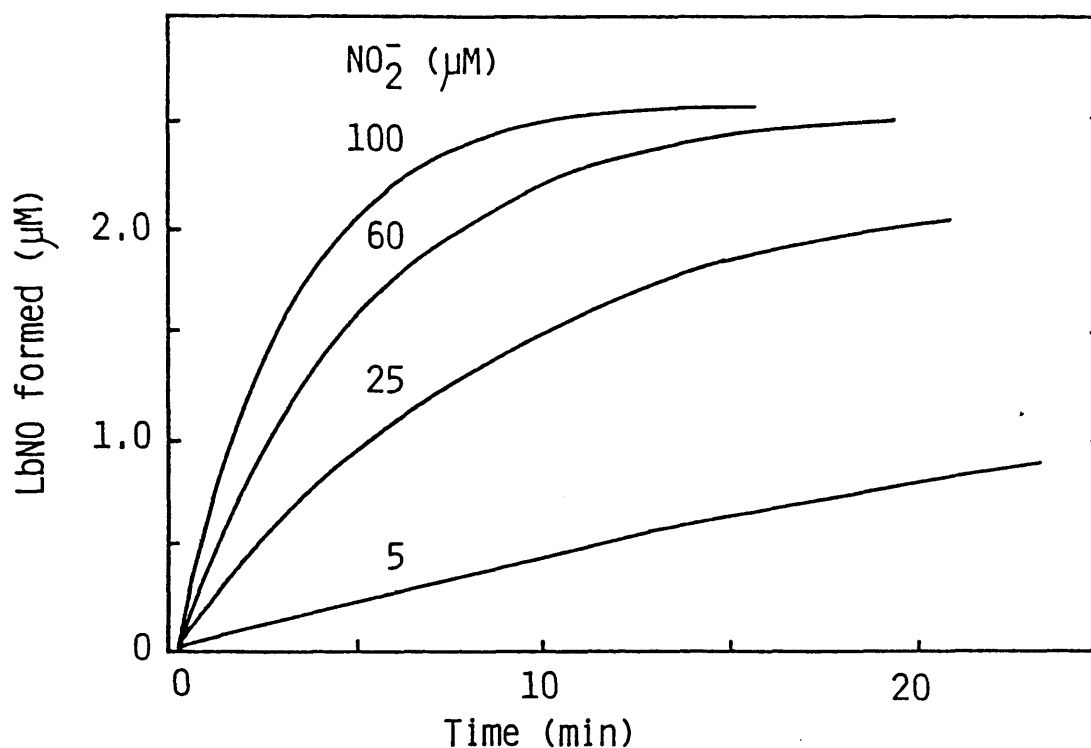


Fig. 18 Time-course of the formation of LbNO under different nitrite concentrations. Leghemoglobin ( $2.6 \mu\text{M}$ ) was rapidly mixed with each concentration of  $\text{NaNO}_2$ , then  $A_{415}$ , the peak of LbNO, was measured. The amount of LbNO generated was calculated based on the experimental data that the difference of absorbance at 415 nm between 100%  $\text{Lb}^{2+}$  and 100% LbNO was 0.115 (Fig. 6).

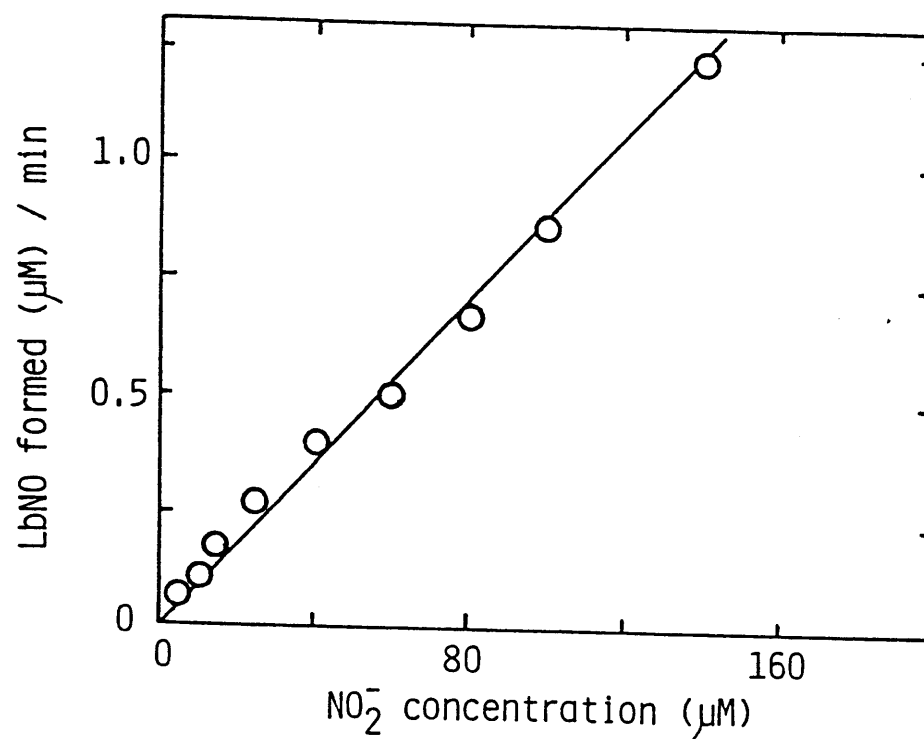


Fig. 19 Initial velocities of LbNO formation from leghemoglobin and nitrite. Each initial velocity taken from Fig. 18 was plotted as a function of nitrite concentration.

Table 1 Kinetic data of leghemoglobin.

	<sup>a</sup> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<sup>b</sup> O <sub>2</sub>	<sup>b</sup> CO
Equilibrium constant <u>K</u> (M <sup>-1</sup> )	1.3x10 <sup>6</sup>	1.16x10 <sup>7</sup>	0.993x10 <sup>9</sup>
Association rate constant <u>k'</u> (M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> )	5.7x10	1.5x10 <sup>8</sup>	1.35x10 <sup>7</sup>
Dissociation rate constant <u>k</u> (sec <sup>-1</sup> )	4.4x10 <sup>-5</sup>	1.1x10	1.2x10 <sup>-2</sup>

<sup>a</sup> The constants were determined as shown in the text.

<sup>b</sup> Constants were previously described by Imamura et al. (1972).

が律速段階となり、緩やかにLbNOが形成されていることが予想される。しかし本実験におけるLbNOの形成速度 ( $0.9 \mu\text{M}/\text{min}$ ) は、 $\text{NO}_2^-$  ( $0.1 \text{ mM}$ ) やジチオナイト ( $3.8 \text{ mM}$ ) が低濃度であるにもかかわらず、上記の $\text{NO}_2^-$ 還元速度よりも速かった。 $\text{NO}_2^-$ からの一酸化窒素の形成は、ヒトのデオキシヘモグロビンの酸化と共役することが報告されているので (Doyle et al. 1981)、本実験においても $\text{Lb}^{2+}$ によって一酸化窒素の形成が促進され、結果的に速いLbNO形成速度につながったことも考えられる。

## ②LbNOと $\text{NO}_2^-$ との平衡定数

LbNOの形成量は、反応が平衡に達した段階での吸収ピークである415 nmの吸光度より求めた (Fig. 18)。 $\text{NO}_2^-$ 濃度に対するLbNO形成量をプロットすると、典型的なミカエリスメンテン型の曲線を示し (Fig. 20)、その逆数プロットより求めた平衡定数は、 $1.3 \times 10^6$ であった (Table 1)。この反応においては反応液からの一酸化窒素の消失を無視したので、求められた定数は真の平衡定数より若干低い可能性がある。

## ③ $\text{NO}_2^-$ 存在下でのレグヘモグロビン中のLbO<sub>2</sub>の割合

Table 1 に示された定数を用いて、 $\text{NO}_2^-$ 存在下での総レグヘモグロビン中のLbO<sub>2</sub>の割合を以下のように計算した。

$$\begin{aligned} \frac{[\text{LbO}_2]}{[\text{Lb}^{2+}][\text{O}_2]} &= K_{\text{O}_2}, & \frac{[\text{LbNO}]}{[\text{Lb}^{2+}][\text{NO}_2^-]} &= K_{\text{NO}_2^-}, \\ [\text{Lbt}] &= [\text{Lb}^{2+}] + [\text{LbO}_2] + [\text{LbNO}], \\ \text{ゆえに } \frac{[\text{LbO}_2]}{[\text{Lbt}]} &= \frac{K_{\text{O}_2}[\text{O}_2]}{1 + K_{\text{O}_2}[\text{O}_2] + K_{\text{NO}_2^-}[\text{NO}_2^-]} \\ & \quad (\text{[Lbt], 総レグヘモグロビン濃度}). \end{aligned}$$

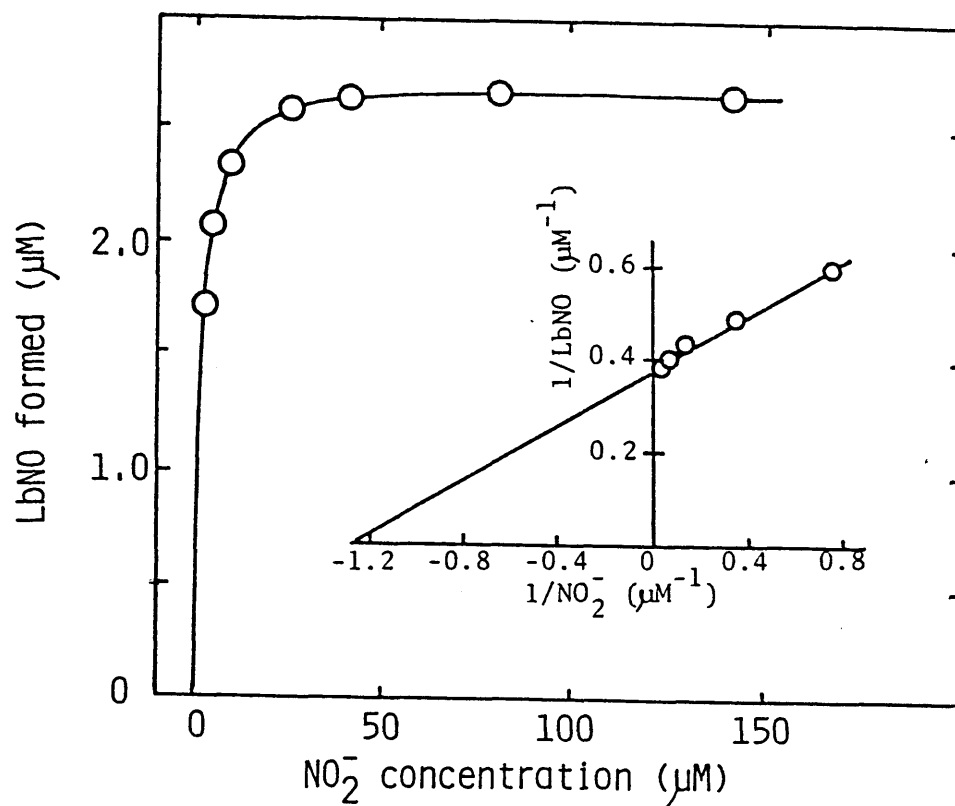


Fig. 20 Kinetics of LbNO formation from leghemoglobin and nitrite. The amount of LbNO was determined from the values shown in Fig. 18 when the formation of LbNO reached the respective maximum. The inset shows the double reciprocal plots.

根粒サイトゾルには21.5 nMの酸素が含まれているので (King et al. 1988)、 $\text{NO}_2^-$ の存在しない場合には、レグヘモグロビン中の20%が酸素と結合していることになる。これに対して、 $\text{NO}_3^-$ を与えたダイズの根粒サイトゾルにおいて測定された $\text{NO}_2^-$  (0.103 mM; 第2章の測定値と、根粒の含水率から算出) が存在する場合は、わずか0.18%しか酸素と結合することができない。すなわち $\text{NO}_2^-$ により、レグヘモグロビンの酸素キャリアーとしての機能は甚大な障害をうけていることが推察できる。

#### ④LbNOの解離の速度定数

「結合の速度定数／平衡定数」から算出したLbNOの解離の速度定数は $4.4 \times 10^{-5}$ で、LbO<sub>2</sub>やLbCOの値と比較すると非常に低かった (Table 1)。この値は、ヒトヘモグロビンのサブユニットに対する一酸化窒素の値とほぼ一致した (Olson 1981)。LbNOの解離の速度定数が非常に小さいことから、LbNOがいったん形成されると、LbO<sub>2</sub>やLbCOにくらべ、 $\text{Lb}^{2+}$ と一酸化窒素に解離しにくく、結果として根粒に集積することが考えられる。

以上の事実に基づいて、 $\text{NO}_2^-$ によるLbO<sub>2</sub>形成の障害について以下の仮説が導かれた。ダイズに $\text{NO}_3^-$ が与えられると、低酸素濃度下の根粒サイトゾルに $\text{NO}_2^-$ が集積し、 $\text{NO}_2^-$ から生ずる一酸化窒素はレグヘモグロビンの結合部位を酸素と競合し、LbNOを形成するとともにLbO<sub>2</sub>の形成を著しく障害する。いったん形成されたLbNOは解離しにくく、再び酸素と結合することは困難となる。

## 要 約

$\text{NO}_2^-$ による $\text{LbO}_2$ 形成の阻害、および $\text{LbNO}$ 形成の機構を明らかにするため、酸素結合能の測定と吸収スペクトルの分析により反応速度論的解析を行った。

$\text{NO}_2^-$ によるレグヘモグロビンの酸素結合能の低下は、レグヘモグロビンの酸素結合部位に、 $\text{NO}_2^-$ に由来する一酸化窒素が拮抗的に結合し $\text{LbNO}$ を形成することによっておこる。

レグヘモグロビンと $\text{NO}_2^-$ からの、 $\text{LbNO}$ 形成に関する反応速度論的解析による定数は以下のとおりである：結合の速度定数は $5.7 \times 10$ 、解離の速度定数は $4.4 \times 10^{-5}$ 、そして平衡定数は $1.3 \times 10^6$ 。平衡定数を用いた計算により、 $\text{NO}_3^-$ を与えた根粒においては、酸素と結合しているレグヘモグロビンは通常の数に減少すると推定された。さらに、解離の速度定数は $\text{LbO}_2$ や $\text{LbCO}$ とくらべると著しく低いため、 $\text{LbNO}$ がいったん形成されると非常に解離しにくいと考えられる。

以上より、 $\text{NO}_3^-$ による根粒窒素固定の阻害は、レグヘモグロビンの酸素結合能が $\text{NO}_2^-$ により拮抗的に阻害され、その結果生成された解離しにくい $\text{LbNO}$ が集積することにより、 $\text{LbO}_2$ が不足して起こることが示唆される。

## 第5章 総合考察

共生窒素固定は、施肥窒素の節約や地力の向上に役立つとともに、子実形成に有効である。そして、現場においては窒素固定を高いレベルで維持しつつ、栄養生長を促進し子実形成にも貢献する化合態窒素を与えていくことが生産性向上に重要である。しかし、窒素固定は化合態窒素により抑制されることが知られているので、現在すでに利用されているマメ科作物の共生系や将来開発されるであろう非マメ科作物の共生系における窒素施肥の有効性を高め、生産性の向上に結びつけるには、その抑制現象の機構解明が不可欠である。現在まで、硝酸同化と窒素固定反応の光合成産物をめぐる競合が窒素固定能低下の原因であるとする説と、 $\text{NO}_3^-$ 代謝産物の影響であるとする説とが主に検討されてきた。炭水化物競合説については、窒素固定能の低下に、根粒の糖含量の低下や根粒への光合成産物の分配の低下がともなって起こっていないことが明らかになっており、窒素固定能抑制の原因としては適切でない。一方、 $\text{NO}_3^-$ 代謝産物の影響として特に有力視されてきた $\text{NO}_2^-$ については、その根粒への集積が実験技術上の問題から不明確なままであった。そこで本論文においては、 $\text{NO}_2^-$ の集積に関して再検討を行うとともに、根粒内への酸素の拡散に関与し、窒素固定において重要な役割を果たすレグヘモグロビンの機能と $\text{NO}_2^-$ との関わりについて検討した。

ダイズを水耕で育て、その水耕液に $\text{NO}_3^-$ を与えた後のアセチレン還元能や $\text{NO}_2^-$ 含量の経時変化を測定した。その結果、アセチレン還元能は24時間以内に低下し、

その低下は根粒サイトゾルへの $\text{NO}_2^-$ 集積と同時に進行した。 $\text{NO}_2^-$ はニトロゲナーゼの阻害剤となりうるが、根粒バクテロイドでは検出されなかったので、ニトロゲナーゼの直接阻害ではなく、根粒サイトゾルにおける $\text{NO}_2^-$ が何らかの機構で窒素固定能低下に結びつくと考えられた。 $\text{NO}_2^-$ の抽出と測定においては、抽出・測定中の $\text{NO}_2^-$ の消失や生成を避け、比色定量時に濁りも発生しない方法を用い、従来の実験技術上の問題点を改善した。

次に、根粒サイトゾルへ集積した $\text{NO}_2^-$ とレグヘモグロビンとの関わりを調べるため、水耕液に $\text{NO}_3^-$ を加えた後窒素固定能が低下した時点の、根粒抽出液中のレグヘモグロビンの吸収スペクトルを検討した。In vitroではレグヘモグロビンは $\text{NO}_2^-$ により酸化され失活するが、好氣的抽出により得られた吸収スペクトルは典型的な $\text{LbO}_2$ のものであり、 $\text{NO}_3^-$ 添加によっても根粒内でのレグヘモグロビンは2価の状態を保つことが明らかとなった。一方、in vitroにおけるジチオナイトの存在下で、レグヘモグロビンと $\text{NO}_2^-$ から $\text{LbNO}$ が形成されたが、 $\text{NO}_3^-$ により窒素固定能が60%に低下した根粒からの嫌氣的な粗抽出液においても、 $\text{LbNO}$ のスペクトルが認められた。窒素固定能の低下と $\text{LbNO}$ の集積の関係をさらに詳細に検討するため、 $\text{NO}_3^-$ 添加後の根粒に含まれる $\text{LbNO}$ の定量を試みた。その結果、アセチレン還元能が50%阻害された時点で抽出されたレグヘモグロビンは主に $\text{LbNO}$ であった。このことは、根粒から抽出されたレグヘモグロビンが、in vitroで調製した $\text{LbNO}$ と同様の分光特性や可視光により解離する性質を示したことにより明らかであった。そして、根粒への $\text{LbNO}$ の集積とアセチレン還元能の低下がよく対応したため、

LbNOの形成が窒素固定能低下の原因であると考えた。

ダイズに $\text{NO}_3^-$ が与えられた場合、根粒サイトゾルには $\text{NO}_2^-$ が集積し、その影響としてLbNOが形成される。またin vitroにおけるDTTの存在下では、LbO<sub>2</sub>は $\text{NO}_2^-$ によりLbNOへ変換されることも明らかになった。このLbNOの形成が、根粒バクテロイドのニトロゲナーゼの低下とどのように結びつくか明らかにするため、分光学的な手法に加え、酸素電極によるレグヘモグロビンの酸素結合能の阻害を検討した。その結果、レグヘモグロビンの酸素結合部位に対して、 $\text{NO}_2^-$ に由来する一酸化窒素が酸素と拮抗し、LbNOが形成されることが明らかになった。また、レグヘモグロビンと $\text{NO}_2^-$ からのLbNO形成に関する反応速度論的解析により得られた定数から、 $\text{NO}_3^-$ により窒素固定能が阻害された根粒におけるLbO<sub>2</sub>は通常の百分の一に減少し、かわりに形成されたLbNOは、非常に遅い解離速度のため安定に集積することが推察された。

以上より、Fig. 21に示された過程を経て、阻害が誘導されることが考えられた。すなわち、根粒に吸収された $\text{NO}_3^-$ は、サイトゾルにおいて $\text{NO}_2^-$ へ還元され集積する。その $\text{NO}_2^-$ はレグヘモグロビンを酸化することなく、むしろその酸素結合能を拮抗的に阻害しLbNOを形成する。形成されたLbNOは、酸素分圧の上昇により解離する可逆的な結合を行っているが、根粒の酸素濃度が低いこととLbNOの解離速度が遅いことから根粒に集積し、それにとまってLbO<sub>2</sub>は減少する。その結果、バクテロイドへの酸素の供給が低下し、好氣的ATP生産に依存するニトロゲナーゼ反応は抑制される。

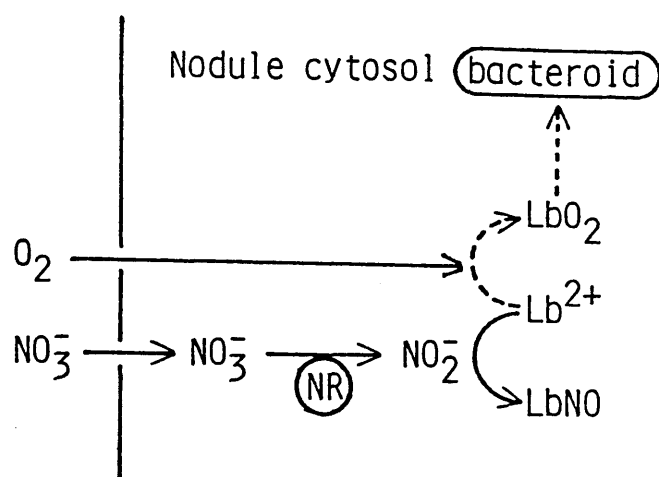


Fig.21 Scheme for the inhibition of nitrogen fixation in soybean nodules by nitrate. Dotted lines represent inhibited processes.

今後、可能ならばLbNOの形成をin situで検出・測定するとともに、レグヘモグロビンの機能低下がバクテロイドのATPの減少と対応する事を明らかにする必要がある。また、 $\text{NO}_3^-$ による窒素固定活性の低下が、やがてバクテロイドおよび根粒全体の生長の停止につながる過程も明らかにされねばならない。

単生微生物による窒素固定と比べて、根粒による共生窒素固定の特性は、ニトロゲナーゼの酸素による失活に対する防御機構を宿主植物が提供するとともに、窒素固定産物とエネルギーとの交換を緊密に行う場を確立している点である。これらの特性を、今後とも農業に最大限に生かして行かねばならない。そのためには、本論文で提唱された阻害機構のどのステップを改善するか検討する必要がある。可能性として、以下の4点が考えられる。1) 根粒サイトゾルの硝酸還元能を抑制し、 $\text{NO}_2^-$ の集積を回避する； 2) 根粒サイトゾルの亜硝酸還元能を向上させ、 $\text{NO}_2^-$ の集積を回避する； 3)  $\text{NO}_2^-$ からの一酸化窒素形成のステップを明らかにし、これを改善する； 4) レグヘモグロビンの一酸化窒素に対する親和性を低下させる： いずれかのステップを改良することにより、窒素肥料の効果的利用が期待されるであろう。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり終始変わらぬ御指導を頂きました、名古屋大学名誉教授山本幸男博士に深く感謝します。また、本論文をまとめる当たって御尽力頂きました、名古屋大学農学部山木昭平教授に深く感謝します。研究途上有益な御助言御指導を頂きました、手塚修文助教授、大野始教官をはじめ園芸学研究室の皆様  
に心からお礼を申し上げます。

## 引用文献

Appleby, C. A. 1962 The oxygen equilibrium of leghemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* 60:226-235.

Appleby, C. A. 1969 Properties of leghemoglobin in vivo, and its isolation as ferrous oxyleghemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* 188:222-229.

Appleby, C. A. and Bergersen, F. J. 1980 Preparation and experimental use of leghemoglobin. In *Methods of Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Edited by Bergersen, F. J. pp.315-335. John Wiley & Sons, Ltd., New York.

Appleby, C. A. 1984 Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:443-478.

Ascenzi, P., Brunori, M., Coletta, M. and Desideri, A. 1989 pH effects on the haem iron co-ordination state in the nitric oxide and deoxy derivatives of ferrous horseradish peroxidase and cytochrome c peroxidase. *Biochem. J.* 258:473-478.

Becana, M. and Sprent, J. I. 1989 Effect of nitrate on components of nodule leghemoglobin. *J. Exp. Bot.* 40:725-731.

Carroll, B. J., McNeil, D. J. and Gresshoff, P. M. 1985a Isolation and properties of soybean (Glycine max) mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4162-4166.

Carroll, B. J., McNeil, D. J. and Gresshoff, P. M. 1985b A supernodulation and nitrate tolerant symbiotic (nts) soybean mutant. *Plant Physiol.*

78:34-40.

Carroll, B. J., Hansen, A. P., McNeil, D. L. and Gresshoff, P. M. 1987 Effect of oxygen supply on nitrogenase activity of nitrate- and dark-stressed soybean (Glycine max (L.) Merr.) plants. Aust. J. Plant Physiol. 14:679-687.

Crosson, P. R. and Rosenberg, N. J. 1989 Strategies for agriculture. Scientific Amer. 261(3):78-85.

千葉泰弘 1989 エダマメ子実肥大期の成分変化と収穫適期. 農耕と園芸 44:98-99.

Daniel, R. M. and Appleby, C. A. 1972 Anaerobic-nitrate, symbiotic and aerobic growth of Rhizobium japonicum: Effect on cytochrome P<sub>450</sub>, other haemoproteins, nitrate and nitrite reductase. Biochim. Biophys. Acta 275:347-354.

Dean, J. V. and Harper, J. E. 1986 Nitric oxide and nitrous oxide production by soybean and winged bean during the in vivo nitrate reductase assay. Plant Physiol. 82:718-723.

Delves, A. C., Mathews, A., Day, D. A., Carter, A. S., Carroll, B. J. and Gresshoff, P. M. 1986 Regulation of the soybean-Rhizobium nodule symbiosis by shoot root factors. Plant Physiol. 82:588-590.

Dilworth, M. J. and Appleby, C. A. 1979 Leghemoglobin and Rhizobium hemoproteins. In A Treatise on Dinitrogen Fixation, Sect. I & II. Edited by Hardy, R. W. F., Bottomely, F. and Burns, R. C. pp.691-764. John Wiley and Sons, Ltd., New York.

Dilworth, M. J. 1980 Leghemoglobin. In Methods in Enzymology. Vol. 69.

Edited by Pietro, A. S. pp. 812-823. Academic Press, Inc., New York.

Doyle, M. P., Pickering, R. A., DeWeert, T. M., Hoekstra, J. W. and Pater, D.

1981 Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. J. Biol. Chem. 256:12393-12398.

Eaglesham, A. R. J. 1989 Nitrate inhibition of root-nodule symbiosis in

doubly rooted soybean plants. Crop Sci. 29:115-119.

Fox, J. B. and Thomson, J. S. 1963 Formation of bovine nitrosylmyoglobin. I.

pH 4.5-6.5. Biochemistry 2:465-470.

Fred, E. B. and Graul, E. J. 1916 The effect of soluble nitrogenous salts on

nodule formation. J. Amer. Soc. Agron. 8:316-328.

藤井弘志, 荒垣憲一, 中西政則, 佐藤俊夫 1987 ダイズ多収への挑戦 [1] [2].

農業および園芸 62:527-534, 617-621.

Giannakis, C., Nicholas, D. J. D. and Wallace, W. 1988 Utilization of nitrate

by bacteroids of Bradyrhizobium japonicum in the soybean root nodule.

Planta 174:51-58.

Giardina, B. and Amiconi, G. 1981 Measurement of binding of gaseous and

nongaseous ligands to hemoglobins by conventional spectrophotometric

procedures. In Methods in Enzymology. Vol. 76. Edited by Antonini, E.,

Rossi-Bernardi, L. and Chiancone, E. pp. 417-427. Academic Press, Inc.,

New York.

Gibson, A.H. and Pagan, J.D. 1977 Nitrate effect on the nodulation of legumes inoculated with nitrate reductase-deficient mutants of Rhizobium. *Planta* 134:17-22.

Gremaud, M.F. and Harper, J.E. 1989 Selection and initial characterization of partially nitrate tolerant nodulation mutants of soybean. *Plant Physiol.* 89:169-173.

橋本鋼二 1976 大豆の収量とその関連形質に及ぼす窒素栄養の意義－特に低温障害との関連において－ 北海道農試研報 114:1-87.

Heckmann, M.O., Drevon, J.J., Saglio, P. and Salsac, L. 1989 Effect of oxygen and malate on  $\text{NO}_3^-$  inhibition of nitrogenase in soybean nodules. *Plant Physiol.* 90:224-229.

Hunt, S., King, B.J., Canvin, D.T. and Layzell, D.B. 1987 Steady and nonsteady state gas exchange characteristics of soybean nodules in relation to the oxygen diffusion barrier. *Plant Physiol.* 84:164-172.

Imamura, T., Riggs, A. and Gibson, Q.H. 1972 Equilibria and kinetics of ligand binding by leghemoglobin from soybean root nodules. *J. Biol. Chem.* 247:521-526.

磯井俊行、吉田重方 1989 各種農耕地および未耕地におけるインゲン根粒菌の分布と根粒着生および窒素固定 土肥誌 60:451-453.

金森哲夫 1986 寒地ダイズ多収の条件[1][2][3]. 農業および園芸 61:965-968, 1074-1078, 1192-1194.

Kawai, Y. and Yamamoto, Y. 1986 Increase in the formation and nitrogen

fixation of soybean nodules by vesicular-arbuscular mycorrhiza. Plant Cell Physiol. 27:399-405.

King, B. J., Hunt, S., Weagle, G. E., Walsh, K. B., Pottier, R. H., Canvin, D. T. and Layzell, D. B. 1988 Relation of O<sub>2</sub> concentration in soybean nodules observed by in situ spectroscopic measurement of leghemoglobin oxygenation. Plant Physiol. 87:296-299.

Kouchi, H. and Nakaji, K. 1985 Utilization and metabolism of photoassimilated <sup>13</sup>C in soybean roots and nodules. Soil Sci. Plant Nutr. 31:323-334.

巻出義紘 1989 大気中微量気体による地球温暖化 現代化学 11:49-54.

Manhart, J. R. and Wong, P. P. 1980 Nitrate effect on nitrogen fixation (acetylene reduction): activities of legume root nodules induced by rhizobia with varied nitrate reductase activities. Plant Physiol 65:502-505.

Maskall, C. S., Gibson, J. F. and Dart, P. J. 1977 Electron-paramagnetic-resonance studies of leghemoglobins from soya-bean and cowpea root nodules. Identification of nitrosyl-leghemoglobin in crude leghemoglobin preparations. Biochem. J. 167:435-445.

Matsumoto, T., Yatazawa, M. and Yamamoto, Y. 1977 Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulating and non-nodulating soybean plants. Plant Cell Physiol 18:353-359.

松代平治 1980 マメ科植物による共生窒素固定. 「生物窒素固定」 中村道徳編 学会出版センター pp. 213-222.

Meyer, J. 1981 Comparison of carbon monoxide, nitric oxide, and nitrite as inhibitors of the nitrogenase from Clostridium pasteurianum. Arch. Biochem. Biophys. 210:246-256.

Minchin, F. R., Minguez, M. I., Sheehy, J. E., Witty, J. F. and Scot, L. 1986 Relationships between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation by white clover. J. Exp. Bot. 37:1103-1113

中村道徳 1980 豆科植物と根粒菌の共生窒素固定 「生物窒素固定」 中村道徳編 学会出版センター pp. 56-58.

Nicholas, D. J. D. and Nason, A. 1957 Determination of nitrate and nitrite. In Methods in Enzymology. Edited by Colowick, S. P. and N. O. Kaplan Vol. 3 pp. 981-984. Academic Press, New York.

Noel, K. D., Carneol, M and Brill, W. J. 1982 Nodule protein synthesis and nitrogenase activity of soybeans exposed to fixed nitrogen. Plant Physiol. 70:1236-1241.

農林水産省統計情報部 1989 第64次農林水産省統計表（昭和62年-63年）

Ohyama, T. 1983 Comparative studies on the distribution of nitrogen in soybean plants supplied with  $N_2$  and  $NO_3^-$  at the pod filling stage. Soil Sci. Plant Nutr. 29:113-145

Ohyama, T. 1984 Comparative studies on the distribution of nitrogen in soybean plants supplied with  $N_2$  and  $NO_3^-$  at the pod filling stage. II. Assimilation and transport of nitrogenous constituents. Soil Sci. Plant Nutr. 30:219-229.

Olson, J. S. 1981 Stopped-flow, rapid mixing measurements of ligand binding to hemoglobin and red cells. In *Methods in Enzymology*. Edited by Antonini, E., Ross-Bernardi, L. and Chiancone, E. Vol. 76. pp.631-651. Academic Press, New York.

Orcutt, F.S. and Wilson, P.W. 1935 The effect of nitrate-nitrogen on the carbohydrate metabolism of inoculated soybeans. *Soil Sci.* 39:289-296.

Rigaud, J., Bergersen, F. J., Turner, G. L. and Daniel, R. M. 1973 Nitrate dependent anaerobic acetylene-reduction and nitrogen-fixation by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 77:137-144.

Rigaud, J. and Puppo, A. 1977 Effect of nitrite upon leghemoglobin and interaction with nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta* 497:702-706.

Russell, W. J. and Johnson, D. R. 1975 Carbon-14 assimilate translocation in nodulated and nonnodulated soybeans. *Crop Sci.* 15:159-161.

斉藤正隆 1986 大豆栽培の歴史と技術の変遷. 「大豆の生態と栽培技術」  
大久保隆弘・斉藤正隆編 農文協 pp.15-33

Schuller, K. A., Day, D. A., Gibson, A. H. and Gresshoff, P. M. 1986 Enzymes of ammonia assimilation and ureide biosynthesis in soybean nodules: Effect of nitrate. *Plant Physiol.* 80:646-650.

Sen, N. P. and Donaldson, B. 1978 Improved colorimetric method for determining nitrate and nitrite in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61:1389-1394.

- Small, J. G. C. and Leonard, O. A. 1969 Translocation of  $^{14}\text{C}$ -labeled photosynthate in nodulated legumes as influenced by nitrate nitrogen. Amer. J. Bot. 56:187-194.
- Sprent, J. I., Giannakis, C. and Wallace, W. 1987 Transport of nitrate and calcium into legume root nodules. J. Exp. Bot. 38:1121-1128.
- Stephens, B. D. and Neyra, C. A. 1983 Nitrate and nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and Rhizobium japonicum bacteroids. Plant Physiol. 71:731-735.
- Sternberg, H. and Virtanen, A. I. 1952 Studies in the absorption spectrum of leghemoglobin, especially of leghemoglobin. Acta. Chem. Scand. 6:1342-1352.
- Streeter, J. G. 1981 Effect of nitrate in the rooting medium on carbohydrate composition of soybean nodules. Plant Physiol. 68:840-844.
- Streeter, J. G. 1982 Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. Plant Physiol 69:1429-1434.
- Streeter, J. G. 1985a Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. I. Long term studies with a continuous supply of nitrate. Plant Physiol. 77:321-324
- Streeter, J. G. 1985b Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. II. Short term studies with high nitrate supply. Plant Physiol. 77:325-328.
- Streeter, J. G. 1986 Effect of nitrate on acetylene reduction activity and

carbohydrate composition of Phaseolus vulgaris nodules. *Physiol. Plant.* 68:294-300.

Streeter, J. G. 1987 Effect of nitrate on the organic acid and amino acid composition of legume nodules. *Plant Physiol.* 85:774-779.

Streit, L. Nelson, R. S. and Harper, J. E. 1985 Nitrate reductase from wild-type and  $nr_1$ -mutant soybean (Glycine max [L.] Merr.) leaves. *Plant Physiol.* 78:80-84.

Strowd, W. H. 1920 The relation of nitrates to nodule production. *Soil Sci.* 10:343-356.

Suganuma, N. and Yamamoto, Y. 1987 Carbon metabolism related to nitrogen fixation in soybean root nodules. *Soil Sci. Plant Nutr.* 33:79-91.

Tajima, S., Sasahara, H., Kouchi, H., Yoneyama, T. and Ishizuka, J. 1985 Effect of oxygen concentration and leghemoglobin on organic acid degradation by isolated soybean nodule bacteroids. *Agric. Biol. Chem.* 49:3473-3479.

Tanaka, A., Fujita, K. and Terasawa, H. 1985 Growth and dinitrogen fixation of soybean root system affected by partial exposure to nitrate. *Soil Sci. Plant Nutr.* 31:637-645.

Taylor, D. C., Shelp, B. J., Nelson, L. M. and Grodzinski, B. 1988 Carbon and nitrogen partitioning in young nodulated pea (wild type and nitrate reductase-deficient mutant) plants exposed to  $NH_4NO_3$ . *Physiol. Plant.* 74:593-601.

Trinchant, J.C. and Rigaud, J. 1980 Nitrite inhibition of nitrogenase from soybean bacteroids. Arch. Microbiol. 124:49-54.

Udvardi, M.K., Price, G.D., Gresshoff, P.M. and Day, D.A. 1988 A dicarboxylate transporter on the peribacteroid membrane of soybean nodules. FEBS Lett. 231:36-40

Udvardi, M.K. and Day, D.A. 1988 Electric ATPase activity on the peribacteroid membrane of soybean (Glycine max L.) root nodules. Plant Physiol. 90:982-987.

梅田三夫 1975 密植、開花期の追肥で473 kg. 精農家のダイズ栽培技術 pp. 47-54. 「農業技術体系 作物編 6」 農文協

Ursino, D.J., Hunter, D.M., Laing, R.D. and Keighley, J.L.S. 1982 Nitrate modification of photosynthesis and photoassimilate export in young nodulated soybean plants. Can. J. Bot. 60:2665-2670.

Vessey, J.K., Walsh, K.B. and Layzell, D.B. 1988a Oxygen limitation of N<sub>2</sub> fixation in stem-girdled and nitrate-treated soybean. Physiol. Plant. 73:113-121.

Vessey, J.K., Walsh, K.B. and Layzell, D.B. 1988b Can a limitation in phloem supply to nodules account for the inhibitory effect of nitrate on nitrogenase activity in soybean? Physiol. Plant. 74:137-146.

Wasfi, M. and Prioul, J.L. 1986 A comparison of inhibition of french-bean and soybean nitrogen fixation by nitrate, 1% oxygen or direct assimilate deprivation. Physiol. Plant. 66:481-490.

渡辺郁子 1984 ダイズ根粒の窒素固定能に及ぼす硝酸イオンの影響 名古屋大学  
農学部 修士論文

Weber, C. R. 1966 Nodulating and nonnodulating soybean isolines:

I. Agronomic and chemical attributes. *Agronomy J.* 58:43-46.

Wittenberg, J. B., Appleby, C. A. and Wittenberg, B. A. 1972 The kinetics of  
the reactions of leghemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *J. Biol.  
Chem.* 247:527-531.

Wittenberg, J. B., Bergersen, F. J., Appleby, C. A. and Turner, G. L. 1974  
Facilitated oxygen diffusion. *J. Biol. Chem.* 249:4057-4066.

Witty, J. F., Minchin, F. R., Sheehy, J. E. and Minguez, M. I. 1984 Acetylene-  
induced changes in the oxygen diffusion resistance and nitrogenase  
activity of legume root nodules. *Annal. Bot.* 53:13-20.

Witty, J. F., Skot, L. and Revsbech, N. P. 1987 Direct evidence for changes  
in the resistance of legume root nodules to O<sub>2</sub> diffusion. *J. Exp. Bot.*  
38:1129-1140.

Yonetani, T., Yamamoto, H., Erman, J. E., Leigh, Jr. J. S. and Reed, G. H. 1972  
Electromagnetic Properties of hemoproteins. *J. Biol. Chem.* 247:2447-2455.

Yoneyama, T. 1984 Partitioning and metabolism of nitrate, asparagine, and  
allantoin in the soybean shoots at the grain-filling stage. *Soil Sci.  
Plant Nutr.* 30:583-587.

## 報文目録

Kanayama, Y., Watanabe, I. and Yamamoto, Y. 1990 Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate. I. Nitrite accumulation and formation of LbNO in nodules. Plant Cell Physiol. (in press)

Kanayama, Y. and Yamamoto, Y. 1990 Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate. II. Accumulation and properties of nitrosylleghemoglobin in nodules. Plant Cell Physiol. 31(2) (in press)

Kanayama, Y. and Yamamoto, Y. 1990 Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate. III. Kinetics of LbNO formation and of inhibition, by nitrite, of LbO<sub>2</sub> formation. Plant Cell Physiol. (submitted for the publication)