

報告番号 \* 甲 第 2315 号

## 主論文の要旨

題名 根粒窒素固定の  
硝酸イオンによる阻害機構

氏名 金山喜則

# 主論文の要旨

報告番号

※甲第

号

氏名

金山喜則

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、硝酸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、硝酸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 $\text{NO}_2^-$ の、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での、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オキシレグヘモグロビン ( $\text{LbO}_2$ ) 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 $\text{NO}_2^-$ からニトロシルレグヘモグロビン ( $\text{LbNO}$ ) 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で調整した $\text{LbNO}$ 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、 $\text{LbNO}$ 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 $\text{LbNO}$ が形成される。また、in vitroにおけるジチオスレイトールの存在下では、 $\text{LbO}_2$ は $\text{NO}_2^-$ により $\text{LbNO}$ へ変換されることも明らかになった。この $\text{LbNO}$ 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を明らかにするため、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、 $\text{LbNO}$ 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 $\text{LbNO}$ 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 $\text{LbO}_2$

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、次のような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、それにともなって $\text{LbO}_2$ 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、好氣的エネルギー生産に依存するニトロゲナーゼ反応は抑制されるものと思われる。