

平成 22 年 4 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18380049
 研究課題名（和文） ダイズ根粒における根粒形成自己制御と硝酸阻害の代謝調節機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of metabolic control of nitrate inhibition on nodules and autoregulation of nodulation in soybean.
 研究代表者
 大山 卓爾（Ohyama Takuji）
 新潟大学・自然科学系・教授
 研究者番号：30152268

研究成果の概要（和文）：ダイズの根粒生長と窒素固定活性の急速かつ可逆的な阻害が、アンモニア、尿素、グルタミンを培養液に投与した場合にも硝酸と同様に認められた。窒素化合物による根粒生長阻害は、 ^{13}C と ^{15}N を用いた実験から光合成産物の根粒への移動低下が原因であると推定された。初生葉の葉柄から各種化合物を投与する実験で、グルタミンを投与したときに顕著な根粒形成の抑制が認められたことから、グルタミンが制御シグナルである可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Rapid and reversible inhibition of soybean nodule growth and nitrogen fixation was observed when ammonium, urea or glutamine was added to the culture solution. This inhibitory effect is due to decrease in photoassimilate to the nodules by ^{13}C and ^{15}N tracer experiment. Various compounds are supplied from cut end of petiole of a primary leaf, and only glutamine gave significant effect on nodule number, suggesting that glutamine may be autoregulation signal of nodule formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：ダイズ、根粒、窒素固定、硝酸、葉、根、根粒超着生変異株、根粒形成自己制御

1. 研究開始当初の背景

(1) 根粒形成の自己制御

1985年、オーストラリアの Gresshoff らのグループは、化学変異剤処理により、ダイズ品種 Bragg から硝酸に対して根粒形成が抑制

されにくい変異株を選抜した。この変異株は、親株よりも根粒を多数着生する根粒超着生変異株の性質をあわせ持っていた。その後、アメリカ合衆国の Harper ら、日本の赤尾らも同様の変異株を、ダイズ品種 Williams お

よびエンレイから分離した。変異株と親株の交互接木実験から、これらの根粒超着生の形質は、根ではなく地上部の遺伝形質に依存することが確認された。根分け実験により、通常のサイズでは根粒菌が感染し細胞分裂が始まると、感染を伝える何らかの物質（感染シグナル）が根から地上部へ運搬され、それを感知した地上部から、根粒形成抑制物質（オートレギュレーションシグナル）が送られ、根粒原基の根粒への生長が抑制され、結果的に根粒数が制限されると予測されている。根粒超着生変異株では、根粒形成自己制御機構が欠損または低下しているために、根粒が過剰に着生するのはと予想されている。ただし、長年に亘る多くの研究者の努力にもかかわらず、感染シグナルも、自己制御シグナルも同定されていない。

我々のグループは、Harper ら、赤尾らのグループと共同研究を行い、根粒超着生株は、親株よりも硝酸吸収能が低下していることにより、硝酸により阻害を受けにくいことを見出した。また、根粒内において、酸素の運搬と遊離酸素によるニトロゲナーゼの失活を防止するために重要な働きをしているレグヘモグロビンの含有量と成分比を測定し、根粒超着生株は多数の根粒を形成するものの、個々の根粒のサイズが小さく、また、レグヘモグロビン含有量も低下し、結果として根粒乾物重当たりの比活性が低下することを確認した。オートレギュレーションは、むしろ、根粒数を生育環境に見合った数に抑えることにより、一つ一つの根粒の肥大を促進し効率的な窒素固定を行うための機構であると考えられる。さらに、一枚の葉身から発根させて作成した単葉根を用い、感染シグナルの受容とオートレギュレーションシグナルの発信は、成熟した葉で起こることを証明した。2002年、川口らのグループにより、モデルマメ科植物であるミヤコグサ根粒超着生変異株における遺伝子変異部位が明らかにされ、サイズの根粒超着生変異株も同じ部位に変異を持つことが報告された。しかしながらこの遺伝子の機能は不明であり、感染シグナルもオートレギュレーションシグナルも未同定のままである。

(2) 根粒形成、肥大、窒素固定活性への硝酸阻害について

サイズの根粒形成、肥大、窒素固定活性に対する硝酸の阻害作用は古くから知られている。また、硝酸の阻害効果には、硝酸と直接接触している根の部位で強くあらわれる局所的効果と、長期的全身的に現れる間接的効果があることが知られているが、それぞれの硝酸阻害機構は十分に明らかにされていない。申請者らは、水耕サイズへ硝酸を供与すると、硝酸と直接接触している部位の根粒生長と活性が急速に抑制され、培地から硝酸

を除去すると急速に回復することを発見した。さらにこの急速かつ可逆的な阻害には、光合成産物の分配が関与していることをポジトロンイメージング等によって解析した。一方根を上部と下部に分ける二重ポット栽培試験で、下部から硝酸を与えた場合、高濃度硝酸を与えると上部ポットの根粒形成と活性を抑制するが、低濃度硝酸投与では逆に促進することを示した。これにより、全身的な効果は、窒素栄養状態に依存すると推定した。

2. 研究の目的

近年、サイズ等マメ科植物は、根粒の過剰着生を防ぐための根粒形成の自己制御機構を持つことが明らかにされた。この機能が低下または欠損した変異株は通常のサイズの数倍から10倍と多数の根粒を形成し、根粒超着生形質をしめす。根粒形成の自己制御機構は全身的制御であるのに、硝酸阻害は短期的には局所的作用であるという違いがあるが、根粒超着生変異株は全て硝酸に対して阻害を受けにくいという性質を合わせ持っており、二つの抑制機構にはなんらかの共通部分があると予想される。本申請研究では、通常のサイズと根粒超着生サイズに含まれるアミノ酸、ウレイド、植物ホルモンなどの植物成分を詳細に分析し、根粒形成制御と硝酸阻害の硝酸阻害の相互関係を明らかにする。多数の試料のアミノ酸分析には効率の良いプレカラム誘導体作成方式によるHPLC分析が適している。

3. 研究の方法

(1) 水耕培養液に添加した窒素化合物の根粒生長と窒素固定に及ぼす影響。

硝酸、アンモニア、尿素、グルタミンが、根粒生長と窒素固定活性（アセチレン還元活性）に及ぼす影響を水耕栽培サイズで調べた。根粒菌を接種し無窒素栽培したサイズに、硝酸または、アンモニア、尿素、グルタミンを窒素として1mMとなるように添加し、その後の根粒粒径変化とアセチレン還元活性および各種アミノ酸濃度を測定した。また、窒素化合物を5日間培養液に投与した後、無窒素培地に変えてその後の根粒生長を調べた。

次に、投与する硝酸または、アンモニア、尿素、グルタミンに¹⁵N標識化合物を用い、かつ¹³CO₂を葉から供給し、窒素と炭素の根粒への動きを追跡した。

(2) 根粒形成自己制御と光合成産物の地下部への供給

根粒超着生変異株 NOD1-3 と親株 Williams に根粒菌を接種した後、水耕栽培し、¹⁴C 標識した二酸化炭素を与えて根粒を含む植物体内における¹⁴Cの分配を調査した。

(3) 根粒形成自己制御と茎葉部の性質

これまで根粒超着生変異株における茎葉部の表現型に関する詳細な調査はほとんど行われていなかった。そこで、根粒形成自己制御が個体全体としてどのように調節されているかを超着生以外の形質に着目することで、根粒形成自己制御が個体全体としてどのように調節されているかを調査した。実験材料はダイズ品種Williamsより分離された根粒超着生変異株NOD系統 (NOD1-3、NOD2-4及びNOD3-7) を用いた。



図: ダイズ親株Williams(左上)と根粒形成変異株 NOD1-3(右上)、NOD2-4(左下)、NOD3-7(右下) 伊藤小百合博士論文

- (4) 初生葉葉柄から投与した化合物が、根粒形成や各部位の生長に及ぼす影響。
ダイズ幼植物の初生葉1枚を切断し、葉柄切断部から、さまざまなシグナル物質を投与して、根粒形成や、各器官の生長に及ぼす影響を調べた。投与物質としては、スクロース、サリチル酸、アスパラギン、グルタミンを各種濃度で投与した。それとともに、根粒超着生変異株の原因遺伝子NST1は、アラビドプシスの茎頂分裂組織の形態形成に関与するCLAVATA1と高いホモロジーがあることが示されていることから、CLAVATA1と結合すると予想されるペプチドを合成し、WilliamsとNOD1-3の葉柄から葉身に蒸散流で投与し、根粒形成への影響を調べた。
- (5) ダイズの根(主根と側根)の伸長速度におよぼす、硝酸の影響。
根の生長に対する影響を、水耕栽培Williamsの根で観察した。根をガラス板ではさんで、水耕栽培し、デジタルカメラで、主根と側根の伸長を1時間毎に撮影し、生長速度

におよぼす、硝酸添加と、明暗条件の変化を調べた。

(6) マイクロアレイを用いた硝酸投与後の根粒における遺伝子発現解析

根粒菌を接種した水耕ダイズに、硝酸投与時の、根粒における遺伝子発現を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) 水耕培養液に添加した窒素化合物の根粒生長と窒素固定に及ぼす影響。

投与後、硝酸だけでなくどの窒素形態(アンモニア、尿素、グルタミン)添加区でも、根粒の生長阻害および窒素固定の抑制がみられたが、硝酸の阻害効果が最も強かった。各種窒素化合物を5日間連続的に与えた後、無窒素培地で栽培を続けたところ、どの処理区でも、根粒の生長ならびに窒素固定活性がすみやかに回復した。これらの結果は、根粒生長と窒素固定活性の可逆的阻害効果は、硝酸以外の窒素化合物でも共通に見られることが明らかとなった。

次に、投与する硝酸または、アンモニア、尿素、グルタミンに¹⁵N標識化合物を用い、かつ¹³CO₂を葉から供給し、窒素と炭素の根粒への動きを追跡した結果、短時間には、¹⁵Nの根粒への移行量は少なく、根粒生長と窒素固定活性の阻害との関連は見られなかった。一方、光合成により取り込まれた¹³Cの根粒への取り込みは、根粒生長と窒素固定活性の阻害と強く関係し、阻害を強く受けた区ほど、¹³Cの根粒への移行量が少なかった。この結果は、培養液に供給した窒素またはその代謝産物が、根粒の生長と窒素固定活性を阻害しているのではなく、培養液に窒素化合物を与えることにより、光合成産物の根粒への輸送が低下することが根粒生長の停止と窒素固定活性の低下の原因であることが明らかとなった。

アミノ酸分析によると、根粒中のアミノ酸は、硝酸投与で増加し、特にアスパラギン酸が増加した。根では、アンモニア投与でアミノ酸が増加したが、硝酸投与では増加しなかった。

(2) 根粒形成自己制御と光合成産物の地下部への供給

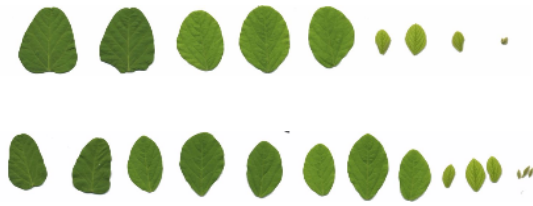
根粒形成自己制御機構は茎葉部の遺伝型がポイントになることから、光合成産物の分配が異なる可能性があると考え、根粒形成自己制御機構の抑制ターゲットとなる根粒原基の発達過程について、光合成産物の要求量を比較した。¹⁴C標識した二酸化炭素を与え、植物体内での分配を調査した結果、根粒超着生形質は、光合成産物の分配が原因ではないことが明らかになった。

(3) 根粒形成自己制御と茎葉部の性質

米国の品種Williamsから誘導されたNOD根粒超着生変異株では、葉身の生長が、早い時点で停止することを発見した。1枚の葉身あたりの細胞数が減じていることから、根粒

形成抑制と葉の細胞分裂との関連が示唆された。

日本の品種エンレイとその根粒超着生変異株 En6500 の形質を比較した。根粒菌接種の有無と培地への硝酸供与の有無で水耕栽培し、両者の生長を比較した。播種 18 日後の主根長では、エンレイは、栽培条件に関わらず、約 40-50cm と大きな差が見られなかったが、En6500 では、根粒菌非接種、無窒素では、53cm とエンレイを凌駕したが、根粒菌接種条件や、硝酸供与条件では、主根の伸長が約 30cm と抑制された。En6500 の葉身の大きさはエンレイより小さく、NOD 変異株と同様な結果を示した。



図：根粒菌非接種栽培の親株 Williams の葉（上）と NOD3-7 変異株の葉（播種後 18 日）
伊藤小百合博士論文

(4) 初生葉葉柄から投与した化合物が、根粒形成や各部位の生長に及ぼす影響。

根粒超着生変異株の原因遺伝子 NST1 は、アラビドプシスの茎頂分裂組織の形態形成に関与する CLAVATA1 と高いホモロジーがあることが示されていることから、CLAVATA1 と結合すると予想されるペプチドを合成し、Williams と NOD1-3 の葉柄から葉身に蒸散流で投与し、根粒形成への影響を調べた。結果的に、根粒形成への影響は認められなかった。光合成産物であるスクロース、病原菌感染と関連するサリチル酸、窒素化合物であるグルタミン、アスパラギンを濃度段階を変えて供与した。その結果、スクロース、サリチル酸、アスパラギンでは根粒の着生数、粒径共に有意な差は見られなかったが、グルタミン供与については 10 μ M、100 μ M 濃度の処理区に置いて根粒着生数が有意に減少した。これにより窒素栄養状態を反映する化合物であるグルタミンが根粒着生にかかわる物質である可能性が示唆された。

(5) ダイズの根(主根と側根)の伸長速度におよぼす、硝酸の影響。

根の生長に対する影響を、水耕栽培 Williams の根で観察した。主根の伸長については、根粒同様に、硝酸を投与するとすぐに伸長が抑制され、培地から硝酸を除去するとすぐに回復した。一方、側根の伸長は、硝酸を培地に与えた方が促進された。

水耕ダイズの地下部を一時間ごとに撮影した画像から根粒面積の増加を PC 上で測定する方法を開発した。硝酸 0mM 区と硝酸 5mM 区で、明期には処理開始から 4 時間後まではほぼ同様の肥大生長を観測したが、処理開始

5 時間後からは硝酸 5mM 区で肥大生長の阻害が見られた。根の伸長生長については、硝酸 5mM 区の主根では明期区、暗期区ともに処理開始 1~3 時間で硝酸添加による伸長成長の抑制が見られた。側根は主根、根粒とは逆に伸長成長の促進が見られ、硝酸添加 1~3 時間ほどで現れることが明らかになった。

(6) マイクロアレイを用いた硝酸投与後の根粒における遺伝子発現解析

次に、硝酸阻害とオートレギュレーションの関係をしらべるために、水耕栽培したダイズに硝酸を与える区と与えない区を設けて、根粒の遺伝子発現量のマイクロアレイ解析を行なった。発現量の比が 4 倍以上を目安にして解析したところ、5 mM 硝酸添加 1 日後の根粒中の mRNA 発現解析では、硝酸添加により増加した遺伝子は、88 個、抑制された遺伝子は 121 個であった。硝酸添加後増加したい出んしは、タンパク質分解酵素、サリチル酸応答遺伝子、水ストレス応答遺伝子、などであった。硝酸投与で抑制された遺伝子は、サリチル酸応答遺伝子、水外レス応答遺伝子などであった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Sayuri Ito, Taichi Kato, Norikuni Ohtake, Kuni Sueyoshi, Takuji Ohshima; The autoregulation of nodulation mechanism is related to leaf development. *Plant Cell Physiology*, 49, 121-125 (2008) 査読有り

Sayuri Ito, Norikuni Ohtake, Kuni Sueyoshi, Takuji Ohshima; Characteristics of initial growth of hypernodulation soybean mutants, NOD1-3, NOD2-4, and NOD3-7, affected by inoculation of bradyrhizobia and nitrate supply. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 53, 66-71 (2007) 査読有り

Sayuri Ito, Norikuni Ohtake, Kuni Sueyoshi, Takuji Ohshima; Comparison of initial growth of hypernodulation soybean mutants, NOD1-3, NOD2-4, and NOD3-7, and their parent cv. Williams. *Bull. Facul. Agric. Niigata Univ.*, 59, 39-43 (2006) 査読なし

伊藤小百合、大竹憲邦、末吉邦、大山卓爾、硝酸イオンによるダイズ根粒の肥大生長と窒素固定活性の阻害機構。化学と生物、44, 752-756 (2006) 査読なし

Sayuri Ito, Norikuni Ohtake, Kuni Sueyoshi, Takuji Ohshima; Allocation of photosynthetic products in hypernodulation mutant of soybean NOD1-3 in early stage of nodule formation.

Bull. Facul. Agric. Niigata Univ., 59, 33-38 (2006) 査読なし

Sayuri Ito, Norikuni Ohtake, Kuni Sueyoshi, Takuji Ohyama; Allocation of photosynthetic products in soybean during early stages of nodule formation. Soil Sci. Plant Nutr., 52, 438-443 (2006) 査読有り

〔学会発表〕(計7件)

加藤太一・伊藤小百合・佐々木誉臣・大竹憲邦・末吉邦・大山卓爾、窒素、光合成産物によるダイズ根粒の形成と生長の制御植物微生物研究会第19回研究交流会(松本), (2009)

齋藤明德・伊藤小百合・七夕高也・田嶋誠也・大竹憲邦・末吉邦・大山卓爾、明暗期におけるダイズ根粒と根の生長に及ぼす硝酸の効果、植物微生物研究会第19回研究交流会(松本), (2009)

加藤太一、伊藤小百合、大竹憲邦、末吉邦、大山卓爾、ダイズ根粒超着生変異株における根粒以外の形質の調査、日本土壤肥料学会2008年度愛知大会(2008)

齋藤明德、木村拓也、大竹憲邦、末吉邦、大山卓爾、硝酸によるダイズ根粒の肥大生長阻害について<光および根の伸長との関連>、日本土壤肥料学会2008年度愛知大会(2008)

Sayuri Ito, Norikuni Ohtake, Kuni Sueyoshi, Takuji Ohyama.; Comparison of leaf growth of hypernodulation soybean mutants, NOD1-3, NOD2-4, and NOD3-7 with their parent cv. Williams. 15th International Congress on Nitrogen Fixation, Cape Town (2007)

Takuji Ohyama, Akihiko Yamazaki, Natsumi Yamashita, Takuya Kimura, Sayuri Ito, Norikuni Ohtake, Kuni Sueyoshi.; Mechanism of quick and reversible inhibition of soybean nodule growth and nitrogen fixation activity by nitrate and its metabolites. 15th International Congress on Nitrogen Fixation, Cape Town (2007)

種田祐土、伊藤小百合、大竹憲邦、末吉邦、大山卓爾、ダイズ葉柄から供与した植物ホルモンの移動と根粒形成に及ぼす影響、日本土壤肥料学会2007年度東京大会(2007)

〔図書〕(計3件)

Takuji OHYAMA, Norikuni OHTAKE, Kuni SUEYOSHI, Kaushal TEWARI, Yoshihiko TAKAHASHI, Sayuri ITO, Toshikazu NISHIWAKI, Yoshifumi NAGUMO, Satomi ISHII, and Takashi SATO, Nova Scientific Publishers Inc., Nitrogen fixation and metabolism of soybean, (2009), 1-131

Takuji OHYAMA, Akihiko YAMAZAKI, Natsumi YAMASHITA, Takuya KIMURA, Sayuri ITO, Norikuni OHTAKE, Kuni SUEYOSHI. Springer, Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture. (2008), 89-90

Sayuri ITO, Norikuni OHTAKE, Kuni SUEYOSHI, Takuji OHYAMA, Springer, Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture. (2008), 193-194

Takuji OHYAMA, Norikuni OHTAKE, Kuni SUEYOSHI, Kaushal TEWARI, Yoshihiko TAKAHASHI, Sayuri ITO, Toshikazu NISHIWAKI, Yoshifumi NAGUMO, Satomi ISHII, and Takashi SATO, Nitrogen fixation research progress Nova Scientific Publishers Inc., (2008), 15-109

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
総説

大山卓爾、伊藤小百合、大竹憲邦、末吉邦、化学と生物、44(11), 2006, 752-756

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 卓爾(OHYAMA TAKUJI)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号：30152268

(2)研究分担者

末吉 邦 (SUEYOSHI KUNI)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：10216278

大竹 憲邦 (OHTAKE NORIKUNI)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：50313507