

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07554

研究課題名(和文) マメ科植物は窒素を贅沢に使っているのか：老化する葉からの窒素回収とその要因

研究課題名(英文) Do legumes use nitrogen luxuriously?: nitrogen resorption from senescing leaf

研究代表者

及川 真平(OIKAWA, SHIMPEI)

茨城大学・理工学研究科(理学野)・准教授

研究者番号：90400308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、仮説「マメ科植物の窒素回収能力は非マメ科植物に比べて低い」を検証することを目的とした。温帯に普遍的なマメ科植物と非マメ科植物、計50種を対象とし、葉の窒素濃度を4年間測定した。窒素回収の程度は枯葉の窒素濃度で評価し、これを緑葉の窒素濃度と窒素回収率の関数として解析した。枯葉の窒素濃度は非マメ科植物よりもマメ科植物で高かった。これは、高い葉窒素濃度を示したマメ科の種で窒素回収率が低いためであった。次にグループ間差の至近要因を探った。マメ科植物の枯葉にはより多くの代謝・構造タンパク質が残った。これは、緑葉の代謝タンパク質濃度が高いこと、構造タンパク質の分解率が低いことが原因であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「窒素固定するマメ科植物は、老化中の葉から窒素を回収する能力が低く、リターには多くの窒素が多く残る」という考えは半ば通説化していた。しかし、これまで研究の対象となった種は少なく、系統だった解析は皆無であった。本研究課題では、野外調査と適切な統計的手法を用いてこの通説の真偽を明らかにした。Hierarchical partitioning解析を用いて枯葉の窒素濃度の変異に対する各要因の相対的貢献度を調べたところ、種の貢献度が最も高く、グループの貢献度は小さかった。これは、窒素固定の有無が窒素回収の主要な決定要因でないことを示唆する。このように、新たに窒素固定の有無以外の要因の重要性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：I studied nitrogen (N) resorption from senescing leaves of 25 legumes and 25 nonlegumes in a temperate region of Japan to test the hypothesis that high N resorption has not evolved in legumes that fix atmospheric N<sub>2</sub>. Senesced leaf N concentration was higher in legumes than in nonlegumes. The higher senesced leaf N concentration of legumes was associated with a lower proportion of leaf N resorbed during senescence, particularly in species with higher leaf N concentrations. I also found that legumes retained more metabolic proteins and structural proteins in their senesced leaves than nonlegumes, but the determination mechanism was different between metabolic- and structural proteins.

研究分野：生態学

キーワード：マメ科植物 生物的窒素固定 窒素利用 窒素回収効率 構造タンパク質 代謝タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

窒素は陸上植物の生産を制限する主要因のひとつである。植物は葉が老化し枯死する前に、持っていた窒素の一部を回収、再利用する。これは、土壌から吸収した窒素をより長く利用するための植物の重要な窒素保持機構である。貧栄養な環境に生育する種ほど葉からの窒素回収能力が高いことを、多くの研究が明らかにしてきた (e.g., Killingbeck 1996)。窒素固定植物は、共生する根粒菌が同化した大気中の窒素を惜しげなく利用できる。そのため、窒素固定植物は進化の過程で高い窒素回収能力を獲得してこなかったと考えられており、これは半ば通説化していた。本研究を開始した時点で、これを支持する研究もあったが、窒素回収能力に機能型間差がないとする報告もあった (e.g., Yuan et al. 2005, Stewart et al. 2008, Hayes et al. 2014)。しかし、窒素固定植物の窒素回収についての研究は少なく、また各々の研究が扱っている種数も少なかった。このように、データの集積が乏しく、調査の対象が少数の分類群に偏っていたことが、一貫した結論が得られていない主な原因のひとつであり、適切な種間比較研究によりこの通説を見直す必要があった。

窒素回収の種間差を裏付けるメカニズムも分かっていなかった。窒素はタンパク質の主要構成要素であり、葉内のタンパク質の分解が窒素回収の重要な初期ステップである。葉内のタンパク質 (タンパク質は主要な窒素化合物である) のうち、分解されにくいと考えられている構造タンパク質の割合が高いほど、老化する葉からの窒素回収率が低いことが、非窒素固定植物を用いた先行研究で示唆されていた (e.g., Takashima et al. 2004, Yasumura et al. 2006)。そこで、葉内タンパク質組成の違いに着目することで、窒素固定植物と非窒素固定植物の間の窒素回収能力の違いを説明することができるかもしれないと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、仮説「窒素固定植物の窒素回収能力は非窒素固定植物に比べて低い」を多種間比較によって検証することを目的とした。窒素固定植物として、日本の温帯域で多くの種が観察できるマメ科を対象とした。マメ科は3つのサブグループ (亜科) に分類され、このうちマメ亜科とネムノキ亜科に属する種のほとんどは窒素固定を行うことが知られているが、ジャケツイバラ亜科に属する種の多くは、窒素固定を行うという証拠が見つかっていない。そこで、マメ科植物 vs. 非マメ科植物という比較に加えて、マメ亜科 vs. ジャケツイバラ亜科の比較を行うことにした。(ネムノキ亜科は、日本の温帯域で観察される種数が少ないため、この比較から除外した。) また、非窒素固定植物を対象とした過去の研究から、窒素固定能力には生活型や種などが影響することも知られていたため、窒素固定の有無、生活型または種の相対的影響を解析することにした。

次に、成果の一般化に向けて窒素回収能力の種間差の生化学的要因の解明を目指した。窒素はタンパク質の主要構成要素であり、葉内のタンパク質の分解が窒素回収の重要な初期ステップであること、そして、過去の研究において、葉齢に伴う葉内の窒素濃度の変異とタンパク質濃度の変異には強い正の相関が観察されていたことから、老化時のタンパク質分解の種間差に着目した。マメ科植物では、易分解性と考えられている代謝タンパク質に対して難分解性の構造タンパク質の比が高いため、窒素回収能力が低いという仮説をたて、複数のマメ科植物と非マメ科植

物を用いて検証実験を行った。

### 3. 研究の方法

温帯に普遍的に見られるマメ科植物 25 種と、同所的に生育する非マメ科植物 25 種を対象に、緑葉と収縮前の枯葉を採取し（それぞれ  $n = 5\sim 30$ ）、窒素濃度を測定した。葉の採取は、茨城県常陸太田市、茨城県常陸大宮市、茨城県水戸市、茨城県つくば市、千葉県鴨川市の落葉樹を主体とした二次林と河畔林、放棄地と河川脇の草本群落、茨城大学理学部実験圃場で行った。マメ科のうち、19 種がマメ亜科、1 種がネムノキ亜科、5 種がジャケツイバラ亜科であった。ジャケツイバラ亜科の 5 種のうち、根粒形成が確認されたのはカワラケツメイのみであった。根粒形成の有無は、可能な限り生育地において確認したが、生育地での確認が困難な場合は、実験圃場における栽培実験や数種の根粒菌を接種したポット実験などを併用して確認した。緑葉の採取は 6 月～8 月に、枯葉の採取は 8 月～12 月に行った。本研究では、Killingbeck (1996) に従い、枯葉の窒素濃度を窒素回収能力の指標として用いた。葉が老化する際には、窒素だけでなく炭素や他の無機塩類も回収されるため、単位葉重あたりの窒素濃度に以下の補正項  $m$  (van Heerwaarden et al. 2003) を乗じることで補正した。

$$m = 1 - (1 - [\text{枯葉の乾燥重量} / \text{緑葉の乾燥重量}])$$

枯葉の窒素濃度は、緑葉の窒素濃度と窒素回収率  $r_N$  の関数として解析した。

$$\text{枯葉の窒素濃度} = \text{緑葉の窒素濃度} \times (1 - r_N)$$

種間比較解析では、各種を独立と仮定した。これは、枯葉の窒素濃度において系統シグナル (Blomberg et al. 2003) が検出されなかったためである。Hierarchical partitioning 解析を用いて、枯葉の窒素濃度に対する機能型 (マメ科 vs. 非マメ科)、亜科 (マメ亜科 vs. ジャケツイバラ亜科)、生育型 (木本 vs. 草本)、種の相対貢献度を解析した。

窒素回収能力の種間差を裏付ける生化学的メカニズムを探るため、野外調査の対象種からマメ科 4 種 (イタチハギ、クズ、フジ、ヤマハギ) と非マメ科 4 種 (イヌシデ、ウリカエデ、ミツバアケビ、ヤマザクラ) を選出し、緑葉と収縮前の枯葉を採取した。ニンヒドリン法を用いて、これらの葉のタンパク質組成を分析した。易分解性と考えられている代謝タンパク質 (ストロマ内酵素やチラコイドタンパク質等) は窒素固定の有無にかかわらず良く分解されるが、難分解性と考えられている構造タンパク質 (細胞壁内のタンパク質) はマメ科植物よりも非マメ科植物で分解されると予測した。

### 4. 研究成果

枯葉の窒素濃度は、非マメ科植物よりもマメ科植物で高かった (図 1)。この結果から、仮説「マメ科植物の窒素回収能力は非マメ科植物に比べて低い」が支持された。マメ科植物の枯葉の窒素濃度が高かったのは、高い葉窒素濃度を示した種で窒素回収率  $r_N$  が低いためであった。マメ科植物において、ジャケツイバラ亜科の枯葉の窒素濃度はマメ亜科に比べて低い傾向が観察されたが、統計的な有意差は検出されなかった。マメ科植物と非マメ科植物の両方で、枯葉窒素濃度の生活型間 (草本種 vs. 木本種) 差は検出されなかった。Hierarchical partitioning 解析を用

いて枯葉の窒素濃度の変異に対する各要因の相対的貢献度を調べたところ、種の貢献度が最も高く(89.7%)、機能型(マメ科 vs. 非マメ科)と亜科(マメ亜科 vs. ジャケツイバラ亜科)の貢献度は小さかった(それぞれ 2.0%, 7.6%)。生育型(木本 vs. 草本)の貢献度は最小であった。このように、仮説は支持されたが、窒素固定の有無が窒素回収の主要な決定要因でないこと(すなわち、マメ科の中でも種によって窒素回収能力に大きな違いがあること)が示唆された(Oikawa et al. 2020)。また、窒素固定の有無にかかわらず、老化する葉からの窒素回収は葉群全体の光合成速度を高めることに寄与していることも分かった(Tanaka, Kurokawa, Oikawa 2018)。

マメ科植物の枯葉には、非マメ科植物に比べて、より多くの代謝タンパク質と構造タンパク質が残ることが分かった。しかし、その決定メカニズムはタンパク質間で異なっていた。マメ科植物の枯葉に代謝タンパク質が多く残ったのは、緑葉の代謝タンパク質濃度が高いことが原因であった。代謝タンパク質の分解率は、グループ間で差がなかった(図2)。一方、マメ科植物の枯葉に構造タンパク質が多く残ったのは、その分解率が低いためであった(図2)。マメ科植物と非マメ科植物の両方において、葉の窒素濃度と代謝タンパク質濃度の間には有意な正の相関が見られた。非マメ科植物では、窒素濃度と構造タンパク質濃度の間には弱い正の相関が見られたが、マメ科植物では相関は検出されなかった。この結果は、葉の加齢に伴う窒素濃度の低下が、主に代謝タンパク質の分解によって説明できることを示唆している。

「窒素固定するマメ科植物では、葉の老化中の窒素回収能力は低く、リターには窒素が多く含まれる」という考えは半ば通説化していたが、これまで系統だった解析は皆無であった。本研究課題では、野外調査と適切な統計的手法を用いてこの通説の真偽を明らかにした。そして、この機能型間差は、タンパク質の分解性の違いと関係していることが分かった。窒素回収能力の変異に対する窒素固定の有無以外の要因(種)の重要性が新たに示唆された。

## 引用文献

- Blomberg SP, Garland Jr. T, Ives AR (2003) Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* 57: 717-745.
- Drenovsky RE, Pietrasiak N, Short T (2019) Global temporal patterns in plant nutrient resorption plasticity. *Global Ecology and Biogeography* 28:728-743.

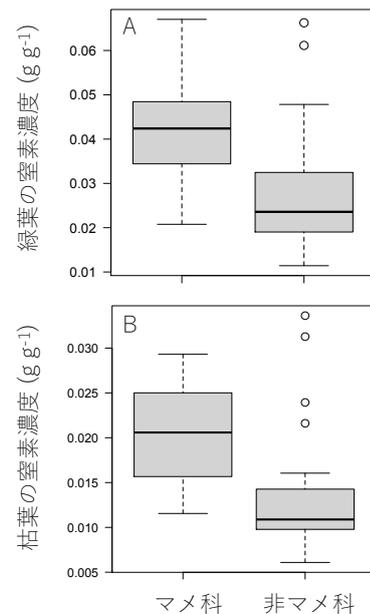


図1 マメ科植物 ( $n=25$ ) と非マメ科植物 ( $n=25$ ) の緑葉 (A) と枯葉 (B) の窒素濃度。水平太線は中央値、箱の上辺と下辺はそれぞれ第三四分位数と第一四分位数、ひげは四分位範囲 $\times 1.5$ 、白丸は外れ値を示す。

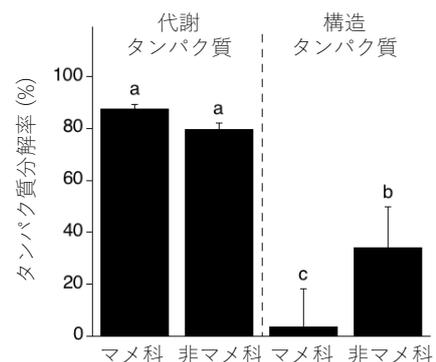


図2 マメ科植物 ( $n=4$ ) と非マメ科植物 ( $n=4$ ) の代謝タンパク質と構造タンパク質の分解率。異なるアルファベットは統計的有意差を示す (Tukey's test,  $P < 0.05$ )。

- Hayes P, Turner BL, Lambers H, Laliberté E (2014) Foliar nutrient concentrations and resorption efficiency in plants of contrasting nutrient-acquisition strategies along a 2-million-year dune chronosequence. *Journal of Ecology* 102:396–410.
- Killingbeck K (1996) Nutrients in senesced leaves: keys to the search for potential resorption and resorption proficiency. *Ecology* 77:1716–1727.
- Oikawa S, Matsui Y, Oguro M, Okanishi M, Tanabe R, Tanaka T, Togashi A, Itagaki T. (2020) Legumes are not proficient at resorbing nitrogen from senescing leaves. *Journal of Plant Research* 133: 639-648.
- Stewart JR, Kennedy GJ, Landers RD, Dawson JO (2008) Foliar-nitrogen and phosphorus resorption patterns differ among nitrogen-fixing and nonfixing temperate-deciduous trees and shrubs. *International Journal of Plant Sciences* 169:495–502.
- Takashima T, Hikosaka K, Hirose T (2004) Photosynthesis or persistence: nitrogen allocation in leaves of evergreen and deciduous *Quercus* species. *Plant, Cell and Environment* 27: 1047-1054.
- Tanaka T, Kurokawa C, Oikawa S (2018) Leaf shedding increases the photosynthetic rate of the canopy in N<sub>2</sub>-fixing and non-N<sub>2</sub>-fixing woody species. *Tree Physiology* 38: 1903-1911.
- van Heerwaarden LM, Toet S, Aerts R (2003) Current measures of nutrient resorption efficiency lead to a substantial underestimation of real resorption efficiency: facts and solutions. *Oikos* 101:664–669.
- Yasumura Y, Hikosaka K, Hirose T (2006) Seasonal changes in photosynthesis, nitrogen content and nitrogen partitioning in *Lindera umbellata* leaves grown in high or low irradiance. *Tree physiology* 26: 1315-1323.
- Yuan ZY, Li LH, Han XG, Huang JH, Jiang GM, Wan SQ, Zhang WH, Chen QS (2005) Nitrogen resorption from senescing leaves in 28 plant species in a semi-arid region of northern China. *Journal of Arid Environment* 63:191–202.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomoki Tanaka, Chiharu Kurokawa, Shimpei Oikawa	4. 巻 38
2. 論文標題 Leaf shedding increases the photosynthetic rate of the canopy in N2-fixing and non-N2-fixing woody species	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tree Physiology	6. 最初と最後の頁 1903-1911
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/treephys/tpy104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimpei Oikawa, Yusuke Matsui, Michio Oguro, Masanori Okanishi, Ryo Tanabe, Tomoki Tanaka, Ayaka Togashi, Tomoyuki Itagaki	4. 巻 133
2. 論文標題 Species-specific nitrogen resorption proficiency in legumes and nonlegumes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 639-348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-020-01211-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 智紀, 黒川 千晴, 及川 真平
2. 発表標題 落葉は葉群光合成を最適化した: 3年間の野外調査より
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田邊 亮, 及川 真平
2. 発表標題 葉のタンパク質組成は窒素回収能力を決定するか: マメ科植物と非マメ科植物の比較
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富樫 絢夏, 及川 真平
2. 発表標題 栽培化に伴う葉の形質の変化: 祖先種ツルマメとダイズ品種の比較
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究内容 <a href="http://plantecology.sci.ibaraki.ac.jp/oikawa/workJ.html">http://plantecology.sci.ibaraki.ac.jp/oikawa/workJ.html</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------