

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580031

研究課題名（和文）葉菜類のアンモニア耐性品種開発のためのアンモニア代謝鍵酵素の解明

研究課題名（英文）Clarification of key enzyme for ammonium assimilation under excess condition of ammonium to develop a tolerated cultivar against ammonium stress

研究代表者

名田 和義（NADA KAZUYOSHI）

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：40293807

研究成果の概要（和文）：本研究は、好硝酸性葉菜類に NH_4^+ 耐性を付与するための基礎情報を得ることを目的に、 NH_4^+ 過剰ストレス条件下に比較的耐性であるサラダナと感受性であるコマツナを材料に、 NH_4^+ 施肥および NH_4^+ 代謝抑制処理に対する反応性を調査した。 NH_4^+ 過剰ストレス条件下における NH_4^+ 代謝の鍵酵素はグルタミン合成酵素（GS）であり、Gs が機能しない場合は、グルタミン酸脱水素酵素（GDH）による NH_4^+ 代謝が有効に機能するときに NH_4^+ 耐性が得られることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

To get the basic information to give some leafy vegetables, which like nitrate nitrogen, tolerance of ammonium nitrogen, I examined effects of excess ammonium stress on growth and ammonium assimilation in head lettuce which can tolerate it and spinach mustard which is susceptible to it. The results suggest that the key enzyme of ammonium assimilation in both leafy vegetables under excess ammonium stress was glutamine synthetase (GS). But when GS was deactivated by serious ammonium stress, glutamate dehydrogenase (GDH) could mainly assimilate ammonium in the stead of Gs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	4,100,000	1,230,000	5,330,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：アンモニア耐性・サラダナ・コマツナ・グルタミン合成酵素・グルタミン酸脱水素酵素・アンモニア過剰ストレス

1. 研究開始当初の背景

窒素は、植物の生育にとって最も重要な元

素であり、植物は硝酸態窒素あるいはアンモニア態窒素を根から吸収し、これを生命活動

に必須のアミノ酸に変換する。一方、多くの作物はアンモニアに対して感受性を示し、硝酸を好む傾向にある。特に野菜類のほとんどは好硝酸性作物であるため、野菜栽培現場では硝酸態窒素肥料を大量に投与している。しかし、硝酸は土壌に保持されにくいいため、作物に吸収されず残存した硝酸が河川や地下水に流出し水質汚染の原因となっている。また、野菜類の中で葉や茎を直接摂取する葉菜類では、吸収された硝酸塩のうち生育に利用しきれない硝酸塩を植物体内に蓄積するものが多い。硝酸塩は体内に摂取すると発ガン性物質であるニトロソアミンに変化することが知られており、高硝酸含有の葉菜類を摂取することによる健康への悪影響が懸念される。このような環境や健康への悪影響につながる硝酸態窒素多量施肥を改善するため、野菜類をはじめとする農作物の硝酸塩低減化技術開発が国内外で盛んに行われている。これらの研究の多くは硝酸態窒素施肥を制限あるいは適正化することに主眼をおいており、生育や緑色などのその他の品質が低下することが問題となる。また、申請者は環境条件をコントロールすることで収量や品質を維持しつつ植物体内の硝酸塩のみを低下させる技術開発を試み、収穫直前に夜間照明を行うことによって植物体内の硝酸代謝を高く維持し、硝酸塩を低下させることに成功した（科学研究費補助金・基盤研究 C、平成 17 年～19 年）。しかし、環境への悪影響を改善するという課題が残った。以上のような背景から、収量や品質を維持あるいは高めつつ、環境および健康に安全・安心な野菜を生産するためには、野菜にアンモニア耐性を付与し、アンモニアの利用性を高めることが最も有効であるという着想にいたった。アンモニア態窒素が主要な窒素源となれば野菜に蓄積される硝酸塩も必然的に低下するものと考

えられる。また、アンモニア態窒素は安価なうえに土壌に保持されやすく、野菜栽培をはじめとする作物生産現場でアンモニア態窒素肥料の利用が高まれば環境汚染を抑制することができる。しかしながら、特に、アンモニア過剰条件下における植物体内のアンモニア同化機構は十分に解明されておらず、アンモニア耐性付与のターゲットがまだ定まっていないのが現状である。

2. 研究の目的

アンモニアからアミノ酸合成にいたるアンモニア同化過程において GS-GOGAT 経路と NADH グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) 経路の両者がある。GDH はアンモニア生成および代謝を可逆的に調節する。通常のアンモニア条件下では、アンモニア同化の主経路は GS-GOGAT 経路であり、GDH はアンモニアが不足した場合のアンモニア生成が主な役割であるとされている (Purnell と Botella, 2007; Masclaux-Daubresse ら, 2006 など)。

アンモニア過剰ストレス条件下では、GS-GOGAT 経路の活性が低下する一方で GDH がアミノ化するかわりにアンモニアを同化する方向に働く可能性があるが、このことを詳細に検討した例は少ない。そこで本研究では、好硝酸性作物の葉菜類を対象に、アンモニア過剰条件下でのアンモニア代謝機構を調査するとともに、GS-GOGAT 経路の代替としての GDH の役割を明確にし、アンモニア耐性品種開発のための基礎情報を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

実験① サラダナ ‘岡山サラダナ’およびコマツナ ‘楽天’をガラス室内でパーミキュライトに播種し、第 6 本葉展開時に水耕栽培に切り替えた。水耕液は $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 比を 10:0、5:

5、0:10に調整した。サラダナは播種77日目、コマツナは播種55日目に根、茎および葉に分けてサンプリングし、新鮮重、光合成関連要因、 NH_4^+ 濃度、GS、GOGATおよびグルタミン酸脱水素酵素(GDH)活性を測定した。**実験②**サラダナ‘岡山サラダナ’およびコマツナ‘楽天’をセルトレイに播種し第6本葉展開時までガラス温室で栽培した。7500倍に希釈したバスタを葉に直接散布した。バスタの代わりに水を散布した区を設定し対照区とした。処理前、処理後1、4、7日目にサンプリングし、葉の NH_4^+ 濃度、GS、GOGATおよびGDH活性を測定した。

4. 研究成果

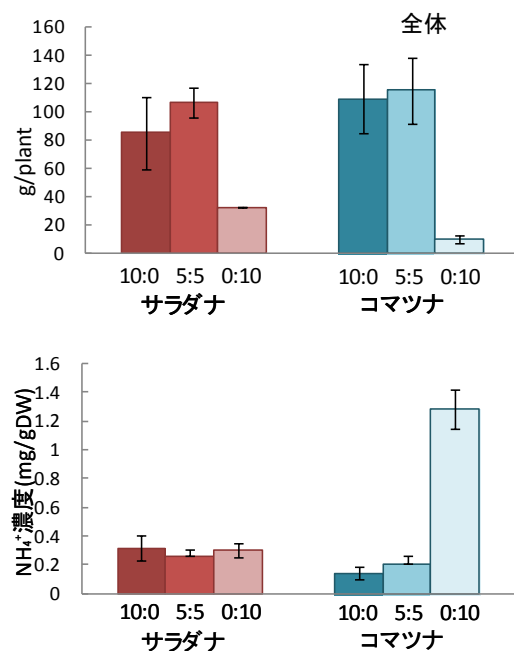
両種において培養液の $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比が0:10の条件で全新鮮重が減少したが、サラダナにおける減少は比較的軽度であった(第1図)。コマツナでは培養液の NH_4^+ 比が増加するに伴って植物体内の NH_4^+ 濃度が増加した(第1図)。一方、サラダナの NH_4^+ 濃度は各処理ではほぼ同程度であった。

NH_4^+ ストレス条件において、コマツナのGS活性およびGOGAT活性は減少したが、サラダナでは NO_3^- のみで栽培した場合と同程度に維持された(第2図)。さらに両種において培養液の NH_4^+ 比の増加に伴ってGDHのアミノ化活性が増加し、脱アミノ化活性が減少した。このことから植物体内の NH_4^+ 蓄積の回避にはGS活性の維持が必要であると考えられる(第3図)。

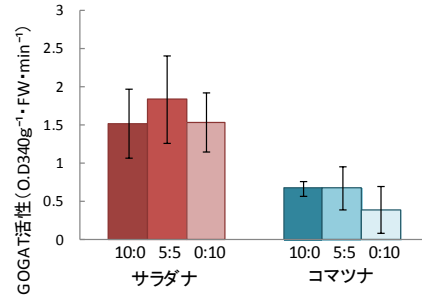
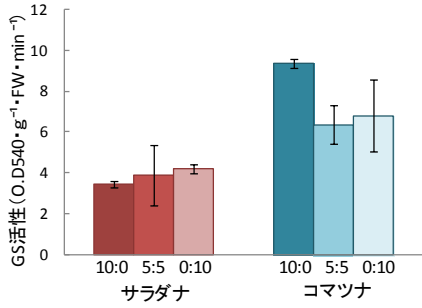
7500倍希釈のバスタ処理直後からコマツナにおいて NH_4^+ 濃度が高まり、生育期間を通じて高いレベルで推移した(第4図)。サラダナの NH_4^+ 濃度は処理直後に増加したが徐々に減少し1週間後は処理前とほぼ同程度であった。コマツナにおいてGSおよびGOGAT活性は急激に減少したが、サラダナにおいてGSは維持されGOGATは減少した

ものの速やかに回復した(第5図)。両種においてGDHのアミノ化活性は上昇した(第6図)。このことはGS-GOGATサイクルが正常に機能しないとき、GDH活性が NH_4^+ 代謝の代替経路として重要な役割を果たすことを示唆する。コマツナではGDHによる代謝だけでは追い付かず NH_4^+ 蓄積を回避できなかったが、サラダナではGDHによるアンモニア代謝によりGS活性が維持され NH_4^+ 蓄積を回避できたと考えられる。

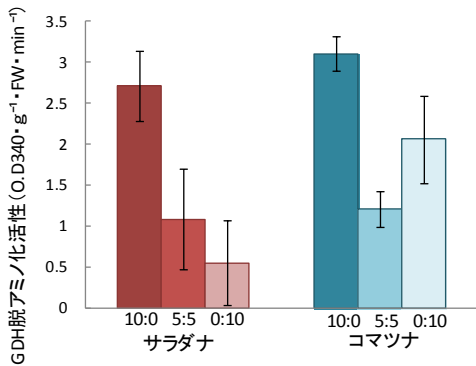
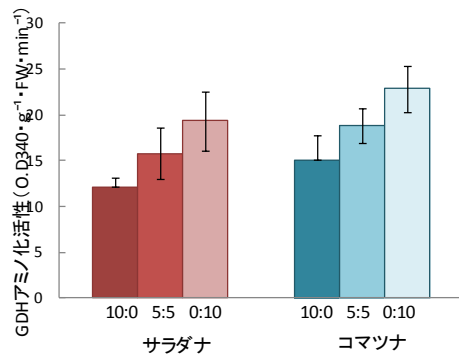
以上の結果より、 NH_4^+ ストレス条件下において NH_4^+ 代謝にはGS活性の維持が必要であり、GS-GOGATサイクルが機能しないあるいは低下した場合、GDHによる NH_4^+ 代謝で NH_4^+ 蓄積を回避することができることが NH_4^+ 耐性の条件となると考えられる。



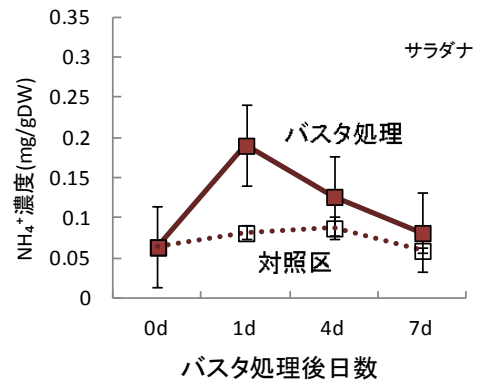
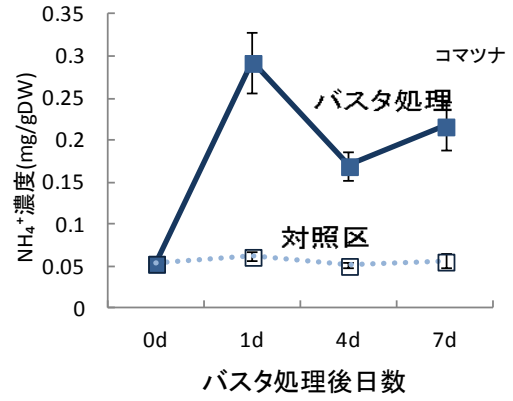
第1図 異なる培養液の $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 比がサラダナおよびコマツナの生体重および NH_4^+ 濃度に及ぼす影響



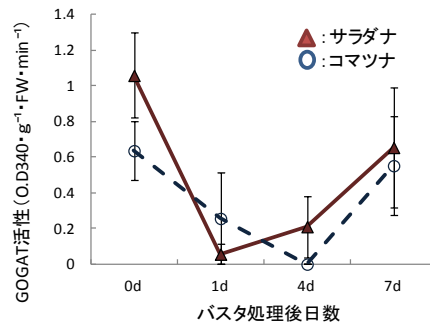
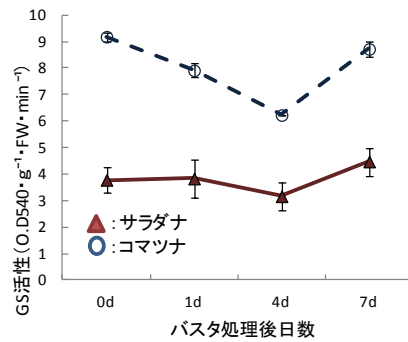
第2図 異なる培養液のNO₃⁻/NH₄⁺比がサラダナおよびコマツナのGsおよびGOGAT活性に及ぼす影響



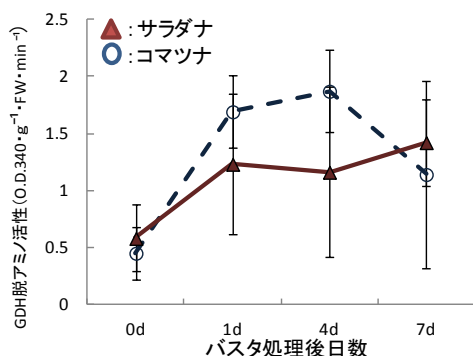
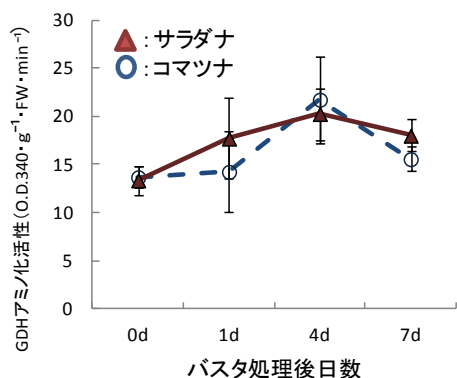
第3図 異なる培養液のNO₃⁻/NH₄⁺比がサラダナおよびコマツナのGDH活性に及ぼす影響



第4図 コマツナとサラダナのNH₄⁺濃度に及ぼすGS阻害剤(バスタ)処理の影響



第5図 バスタ処理後のサラダナおよびコマツナのGSおよびGOGAT活性の経時的変化



第6図 バスタ処理後のサラダナおよびコマツナのGDH活性の経時的変化

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5件)

① 名田和義・中井広樹・吉田洋人・磯崎真英・平塚伸. 養液栽培トマトの生育, 光合成および果実成熟に及ぼすホウ素過剰の影響. 園芸学研究. 査読有. 9巻2号. 2010. pp.203-208.

② By Jing W., L. Ji-Hong, T. Kurosawa, K. Nada, Y. Ban and T. Moriguchi. Cloning, biochemical identification, and expression analysis of a gene encoding S-adenosylmethionine decarboxy-lase in navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *J. Hort. Sci. Biotech.* 85. 2010. pp. 219-226. 査読有

③ Pang X. M., K. Nada, T. Kurosawa, Y. Ban and T. Moriguchi. Effect of methylglyoxal bis-(guanyldrazone) on polyamine and ethylene biosynthesis of apple fruit after harvest. *Acta Physiol. Plant.* 32. 2010. pp. 1005-1010. 査読有

④ Liu J. H., K. Nada, T. Kurosawa, Y. Ban, T.

Moriguchi. Potential regulation of apple in vitro shoot growth via modulation of cellular polyamine contents. *Sci. Hortic.* 119. 2009. pp. 423-429. 査読有

⑤ 平塚伸・堀川晃宏・名田和義・伊藤寿・大野秀一・三井友宏・加田弘. リンゴの自家不和合性打破剤のニホンナシに対する効果の検証. 園芸学研究. 8巻4号. 2009. pp. 469-473. 査読有

[学会発表] (計8件)

① 名田和義・永田憲司・平塚伸. ナバナ (*Brassica napus*) の育成と品質に及ぼす NaCl 施与の効果. 園芸学会. 2012年3月28日. 大阪府立大学.

② 北出晋太郎・名田和義他. クロロフィル蛍光シーリング法を用いたトマトの光合成活性評価法の開発と応用. 園芸学会. 2011年9月24日. 岡山大学

③ 名田和義・永田憲司・薮田信次・平塚伸. 産地および収穫期による‘三重なばな’の品質変動 - グルコシノレート類の同定と含量変化について -. 園芸学会東海支部研究発表会. 2011年10月31日. 静岡市産学交流センター.

④ 名田和義・光根真人・平塚伸. キュウリの光合成における高温順化反応と熱ストレス耐性機構. 日本作物学会. 2011年3月30日. 東京農業大学

⑤ 名田和義・松浦勇生・長菅輝義・平塚伸. 高温下におけるキュウリの光合成反応と根からの糖滲出増加との関係 - 外生スクロースおよび Heat girdle 処理の効果 -. 園芸学会. 2011年3月21日. 宇都宮大学.

⑥ 川久保理恵・名田和義・永田憲司・平塚伸. ホウレンソウの成長と品質に及ぼすグルタミン施与の影響. 園芸学会. 2010年9月20日. 大分大学.

⑦ 名田和義・神田亜佐美・永田憲司・平塚伸. 葉菜類のアンモニア代謝機構に関する研究 ~ アンモニア代謝に及ぼすグルタミン合成酵素 (GS) 阻害剤の影響 ~. 園芸学会. 2010年9月19日. 大分大学.

⑧ 永田憲司・名田和義・薮田信次・平塚伸. 異なる窒素施用形態に対する栄養生長期のナバナの生育反応. 園芸学会. 2009年9月19日. 秋田大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

名田 和義 (NADA KAZUYOSHI)

三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授

研究者番号: 40293807

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：