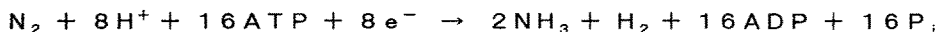


豆科作物の根粒窒素固定能と酸素の関係

農業研究センター豆類栽培生理研究室 島田信二

根粒の特徴

ダイズを始め多くの豆科作物では、根に根粒を着生し、根粒内に共生する根粒菌によって大気窒素固定を行っていることが知られている。宿主根粒細胞内で根粒菌はバクテロイドという形態に変化し、窒素固定酵素であるニトロゲナーゼによって大気窒素をアンモニアに還元している。その反応は以下の式で表される。



窒素は極めて安定的な気体であるため、根粒が1モルの窒素を還元するには理論上16モルのATPが必要で、実際は25～35モルのATPが必要であろうといわれている。化学的大気窒素固定法であるハーバー法では、窒素をアンモニアに還元するのに300～500℃、300気圧以上という高温・高圧と鉄触媒を使用しなければいけないことから、大気窒素固定にどれだけのエネルギーを使うかを理解されよう。このエネルギーはバクテロイドの活発な呼吸によって得ているが、バクテロイド中に存在しているニトロゲナーゼは、遊離酸素によって破壊されて失活するという性質を持つ。そのため、根粒はバクテロイドに対し呼吸のための酸素供給とニトロゲナーゼ保護のための遊離酸素の隔離の相反する要求に対し、特殊な機構を有している。そのメカニズムとして、まず根粒の皮層のガス交換特性があげられる。この部分のガスの透過性はかなり低く、根粒の外部から中心に向かって酸素電極によって酸素濃度の分布をみると、皮層において酸素濃度が急激に低下し(Tjepkema & Yocum, 1974; Witty *et al.*, 1987)、根粒内のバクテロイドが感染している部分の酸素濃度は大気と比べると大変に低い値(大気のおおよそ1万分の1)に保たれている(Denison & Layzell, 1991; Layzell *et al.*, 1990)。根粒の皮層には閉塞した細胞間隙とゆがんだ細胞壁の層を有しており(Brown & Walsh, 1994)、組織におけるガス拡散性を低く保つのに役立っている。さらに根粒菌は宿主植物に酸素との親和性の非常に強いレグヘモグロビンを多量に産出させ、これが酸素の運搬役(Layzell & Hunt, 1990)やバッファーとしての役割を果たしている。また、上述のようにバクテロイドの高い呼吸活性は多くの酸素を消費しており、そのことも根粒内の酸素濃度を低く保つ重要な要因となっている。

根粒の皮層のガス透過性の変化

根粒のガス透過性が分単位で変化することは最初に英国のMinchinらによって明らかにされた。彼らは解放系型のアセチレン還元能測定装置においてエチレン生成速度を分単位で測定したところ、アセチレンにさらされると分単位で急激にエチレン生成が低下し、その低下に伴い根粒の二酸化炭素排出速度も低下することを報告した(Minchin *et al.*, 1983; Witty *et al.*, 1984)。さらにアセチレン以外にも、窒素の代わりにアルゴンやヘリウムなどの不活性ガスに置き換えると同様なことが起きることが報告された(King & Layzell, 1991; Minchin *et al.*, 1983)。このことは、根粒は通常窒素固定で行われているアンモニアの生成が止まると、ガス透過性を低下させることを示していると考えられる(Minchin & Witty, 1989)。

さらに根粒を取り囲む気相の酸素濃度を上昇させると、根粒はガス透過性を分レベルの単位で変化させて根粒内の酸素濃度はほぼ一定の低い値に保たれていることが明らかになった(Witty *et al.*, 1987; Hunt *et al.*, 1987; King *et al.*, 1988; Denison & Layzell, 1991; 島田 & Denison, 1996)。さらに長期にわたり根粒の周囲の酸素濃度を3%あるいは6.1%に設定し生育させたところ、根粒はこれら極端な酸素濃度に対応しても根粒皮層組織を大きく変化させて、ガス透過性を調節していることが報告された(Atkins *et al.*, 1993)。

このように根粒は、根粒皮層組織を変化させてガス透過性を大きく制御すると共に、短期的にも何らかのメカニズムによってガス透過性を制御し、ニトロゲナーゼの保護と呼吸のための酸素の供給のバランスを保っていると思われる。

根粒内酸素濃度計の開発

根粒内の酸素濃度は、酸素電極法で正確に測定できる範囲よりもかなり低いために、微細な濃度変化を正確に測定することは困難であった。ところが根粒内のレグヘモグロビンの酸化状態を分光光度計と同じ原理で測定することにより、より微細な酸素濃度変化を測定しうる根粒内酸素濃度計 (Nodule oximeter) が開発された (Layzell *et al.*, 1990; Denison & Layzell, 1991)。この装置では根粒内酸素濃度の他に根粒のガス透過性、感染部分の呼吸速度などの根粒生理に関わる有力な情報が得られる (Denison & Layzell, 1991)。この方法は近年さらに改良され、圃場条件下 (Denison *et al.*, 1991) や根粒内部の酸素濃度の分布まで測定できるようになった (島田 & Denison, 1996)。

根粒内酸素濃度とニトロゲナーゼ活性

根粒の呼吸速度とアセチレン還元法によるエチレン生成量 (窒素固定能) は高い正の相関にあり、根粒外部の酸素濃度を 50% 程度まで上昇させると根粒活性は呼吸速度の上昇と共に高まることが報告された (Witty *et al.*, 1983)。近年、根粒内酸素濃度計を用いて、より正確な根粒内酸素濃度と根粒活性との関係が調べられた。硝酸施用、師部環状剥離、暗黒処理などを行って根粒活性を低下させたところ、これら処理によって根粒内酸素濃度が低下し、それに伴ってニトロゲナーゼ活性が低下していることが報告された (Layzell *et al.*, 1990)。さらに一つの根粒において根粒内酸素濃度とニトロゲナーゼ活性を測定したところ、ニトロゲナーゼ活性を最大にする根粒内酸素濃度が存在し、その濃度より低くても高くてもニトロゲナーゼ低下すること、および通常の根粒では最適な根粒内酸素濃度かなり低く、酸素が根粒活性の制限要因になっていることが明らかになった (Denison *et al.*, 1992; Kuzma *et al.*, 1993)。その他の報告 (Hunt *et al.*, 1989; Layzell & Hunt, 1990) においても、通常の条件下では根粒内酸素濃度が根粒活性を左右している最大の要因であると推察されている。

光合成産物の供給と根粒内酸素濃度

摘葉、師部の環状剥離や地上部の切除等によって根粒へ光合成産物の供給を停止すると、ニトロゲナーゼ活性は呼吸活性の低下と共に急速に低下することが知られている (Hunt & Layzell, 1993)。ところが、このときの根粒内の炭水化物を調べてみると、これら処理によって含量はほとんど変化せず (Walsh *et al.*, 1987; Hartwig *et al.*, 1990)、その一方で根粒のガス透過性はこれら処理によって低下していることが報告されている (Layzell *et al.*, 1990; Denison *et al.*, 1991; Denison *et al.*, 1992)。さらにこれら処理における障害は、根圏の酸素濃度を上昇させることでかなり回復することが明らかになった (Hartwig *et al.*, 1987; Vessey *et al.*, 1988; Denison *et al.*, 1992; Dia Del Castillo *et al.*, 1992)。このように光合成産物の供給停止は根粒のガス透過性を低下させ、その結果である低い根粒内酸素濃度がニトロゲナーゼ活性低下の主因であると推定されている (Hunt & Layzell, 1993)。このように光合成産物の供給停止が根粒のガス透過性を招く理由として、つぎのようなメカニズムが考えられている。すなわち、根粒へ炭水化物が供給されなくなると呼吸の基質が不足して呼吸速度の低下をもたらす、酸素の消費が減少する。すると根粒内の酸素濃度を低く保てなくなり、ニトロゲナーゼの失活を招いてしまう。そのため、根粒は炭水化物が枯渇する前にガス透過性を低下させてニトロゲナーゼを保護していると推測される (Layzell & Hunt, 1990)。

硝酸態窒素の施用と根粒内酸素濃度

硝酸態窒素の施用は根粒の着生を阻害するとともに現存する根粒の活性を低下させる。硝酸態窒素による窒素固定能の阻害は、バクテロイドへの直接的な作用ではなく、バクテロイドを取りまく環境への作用によると推察されている (McNeill *et al.*, 1984)。事実、根粒周囲の酸素濃度の上昇である程度ニトロゲナーゼ活性は回復することが知られている (Heckmann *et al.*, 1989; Minchin *et al.*, 1990; Vessey *et al.*, 1988)。さらに、根粒内酸素濃度計による測定によって、硝酸施用は根粒内酸素濃度を低下させていることが明らかになった (Layzell *et al.*, 1990)。しかし、根粒皮層のガス透過性の低下以外にも、細胞質内の硝酸はレグヘモグロビンと結びついてニトロシルレグヘモグロビン (nitrosyl-leghemoglobin) を形成し (Kanayama *et al.*, 1990)、レグヘモグロビンがバクテロイドへ酸素を供給するのを妨げると推察した報告 (金山, 1990; Kanayama & Yamamoto, 1990) がある。一方で、

硝酸施用は根粒のガス透過性を実際に低下させており、レグヘモグロビンの化学的変化ではその現象は起こり得ないことを、根粒内酸素濃度計とコンピュータシミュレーションから推定された(Denison & Harter, 1995)。根粒周囲の酸素濃度上昇で、硝酸による阻害がある程度回復されることから分かるように、酸素が硝酸による根粒活性阻害に重要な位置を占めているものの、生化学的な反応を含め今後の解明に待つ点も多い(Hunt & Layzell, 1993)。

水ストレスと根粒内酸素濃度

水ストレスによって根粒活性は大きく低下することが知られており(Huang *et al.*, 1975; Weisz *et al.*, 1985)、光合成への阻害よりもより軽度の水ストレスでもすでに根粒活性は低下し始めているといわれている(Sinclair *et al.*, 1987)。水ストレスで根粒活性が低下した際に、根粒周囲の酸素濃度を上昇させると活性がある程度回復するとの報告がある(Pankhurst & Sprent, 1975)。さらに 圃場で干ばつが根粒活性に及ぼす影響を調べたところ、窒素固定能の低下はガス透過性の低下と関連がみられた(Weisz *et al.*, 1985)。しかし、近年、より進んだ技術を用いて検討されたところ、水ストレスによる窒素固定能の低下はガス透過性の低下よりも先行して起ったこと(Purcell & Sinclair, 1995)、根粒の周囲の酸素濃度を上昇させてもわずかしか回復せず、根粒のガス透過性よりも生化学的なダメージによるとする報告(Diaz del Castillo *et al.*, 1994; Diaz Del Castillo & Layzell, 1995)があることから、水ストレスの場合、根粒活性の低下は、酸素以外の要因が支配的であると思われる。

アセチレン還元法の問題点

根粒の活性を測定する方法の一つとして、アセチレン還元法が広く一般に利用されてきた(金森, 1986; Hunt & Layzell, 1993)。従来のアセチレン還元法は、根粒や根粒が着生した根をアセチレンを含んだチャンパーに封入してエチレンの生成速度を測定していた(金森, 1986)。この方法では数分から数十分間におけるエチレン生成速度(=ニトロゲナーゼ活性)の平均値を測定している。ところが、上述のように分単位でエチレン生成速度が測定できる通気型アセチレン還元法(Flow-trough Acetylene Reduction Assay)によって測定したところ、根粒はアセチレンにさらされるとエチレン生成速度は数分のうちに急激に低下することが報告された(Minchin *et al.*, 1983)。さらに従来のアセチレン還元法で測定時に行っていた地上部切除や土壌の除去も、それ自体が根粒のガス透過性を大きく低下させて、窒素固定能を過小評価してしまうことが分かった(Minchin *et al.*, 1986)。これらのことから、インタクテナ植物で通気型アセチレン還元法を用いて得られたエチレン生成速度の最大値のみが、正確なニトロゲナーゼ活性を示していることが¹⁵N₂吸収速度やH₂発生速度との比較で明らかになった(Minchin *et al.*, 1986)。このように従来のアセチレン還元法ではニトロゲナーゼ活性を過小評価する可能性があり、通気型アセチレン還元法を使用すべきであると指摘されている(Minchin *et al.*, 1994)。

圃場での意義

圃場条件のサイズにおいて、阿江らは酸素が根粒に与える影響について先駆的な研究を行った。梓圃場において異なる5種類の土壌を用いて、サイズ、水稻の収量と土壌の物理性等との関係を調べたところ、水稻では窒素肥沃度と収量の相関が高かったのに対して、サイズでは土壌の酸素拡散係数と収量の相関が高かった(阿江 & 仁紫, 1983)。さらに通気性が大豆の窒素固定に与える影響を確かめるために、同一容量のポットに土壌を3kg 充填した粗充填区、および4 kg を締め固めて充填した密充填区を設け、根粒着生、非着生系統を栽培した。その結果、非着生系統は密充填区の収量が高かったが、着生系統では粗充填区が高かった。このことから阿江は根粒活性において土壌の通気性の重要性を指摘した(阿江, 1985)。水ストレスは上述のように根粒活性を大きく低下させる原因だが、一方で過剰な土壌水分も通気性の低下を招いて窒素固定能を低下させ、根粒にとっての好適な土壌水分の範囲は光合成よりもかなり狭いと思われる(Huang *et al.*, 1975)。根粒のガス透過性は、環境調節された場所で生育した豆科作物よりも圃場で生育しているものの方が劣ると推察されているが(Sheehy *et al.*, 1991)、圃場レベルでの解析は非常に少ない。

豆科作物の多収化技術の開発にあたり、土壌の水分や物理性、化学性が土壌の通気性や根粒のガス透過性の変化を通して、いかに窒素固定に影響を与えているかを解明することは今後の重要な研究課題である。

おわりに

根粒が有する根粒内酸素濃度を維持する機構は、葉の気孔の開閉による二酸化炭素の取り込みと水分損失の調節に似ている。根粒では感染部分の酸素濃度の過剰な上昇からニトロゲナーゼを保護し、葉では過剰な水分損失から葉肉組織を保護している。このように植物の機能は我々が想像するよりもはるかに精緻にできているように思う。

引用文献

- Atkins, C. A., et al. (1993) *Physiol. Plant.* 87:89-95.
Brown, S. M. & Walsh, K. B. (1994) *Aust. J. Plant Physiol.* 21:49-68.
Denison, R. F. & Layzell, D. B. (1991) *Plant Physiol.* 96:137-143.
Denison, R. F., et al. (1991) *Agron. J.* 83:166-169.
Denison, R. F., et al. (1992) *Plant Physiol.* 98:894-900.
Denison, R. F., et al. (1992) *Plant Physiol.* 100:1863-1868.
Denison, R. F. & Harter, B. L. (1995) *Plant Physiol.* 107:1355-1364.
Dia Del Castillo, L., et al. (1992) *Physiol. Plant.* 86:269-278.
Diaz del Castillo, L., et al. (1994) *Plant Physiol.* 106:949-955.
Diaz Del Castillo, L. & Layzell, D. B. (1995) *Plant Physiol.* 107:1187-1194.
Hartwig, U., et al. (1987) *Ann. Bot.* 59:285-291.
Hartwig, U., et al. (1990) *Ann. Bot.* 65:97-105.
Heckmann, M. O., et al. (1989) *Plant Physiol.* 90:224-229.
Huang, C. Y., et al. (1975) *Plant Physiol.* 56:222-227.
Hunt, S., et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:164-172.
Hunt, S., et al. (1989) *Plant Physiol.* 91:315-321.
Hunt, S. & Layzell, D. B. (1993) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:483-511.
金森哲夫 (1986) *農業および園芸* 61:705-710.
金山喜則 (1990) *農業および園芸* 65:1016-1022.
Kanayama, Y., et al. (1990) *Plant Cell Physiol.* 31:341-346.
Kanayama, Y. & Yamamoto, Y. (1990) *Plant Cell Physiol.* 31:207-214.
King, B. J., et al. (1988) *Plant Physiol.* 87:296-299.
King, B. J. & Layzell, D. B. (1991) *Plant Physiol.* 96:376-381.
Kuzma, M. M., et al. (1993) *Plant Physiol.* 101:161-169.
Layzell, D. B. & Hunt, S. (1990) *Physiol. Plant.* 80: 322-327.
Layzell, D. B., et al. (1990) *Plant Physiol.* 92:1101-1107.
McNeil, D. L., et al. (1984) *Symbiotic Nitrogen Fixat.* 1:79-88.
Minchin, F. R., et al. (1983) *J. Exp. Bot.* 34:641-649.
Minchin, F. R., et al. (1986) *J. Exp. Bot.* 37:1581-1591.
Minchin, F. R. & Witty, J. F. (1989) In *Torrey & Winship (ed.) Applications of Continuous and Steady-State Methods to Root Biology*, pp79-95., Kluwer Academic.
Minchin, F. R., et al. (1990) *Planta* 180:46-52.
Minchin, F. R., et al. (1994) *Plant and Soil* 158:163-167.
Pankhurst, C. E. & Sprent, J. I. (1975) *J. Exp. Bot.* 26:287-304.
Purcell, L. C. & Sinclair, T. R. (1995) *Plant Cell Environ.* 18:179-187.
Sheehy, J. E., et al. (1991) *Ann. Bot.* 67:131-136.
島田信二 & Denison, R. F. (1996) *日作紀* 65(別1):206-207.
Sinclair, T. R., et al. (1987) *Agron. J.* 79:986-991.
Tjepkema, J. D. & Yocum, C. S. (1974) *Planta* 119:351-360.
Vessey, J. K., et al. (1988) *Physiol. Plant.* 73:113-121.
Walsh, K. B., et al. (1987) *Plant Physiol.* 85:137-144.
Weisz, P. R., et al. (1985) *Plant Physiol.* 78: 525-530.
Witty, J. F., et al. (1983) *J. Exp. Bot.* 34:951-963.
Witty, J. F., et al. (1984) *Ann. Bot.* 53:13-20.
Witty, J. F., et al. (1987) *J. Exp. Bot.* 38:1129-1140.

Oxygen and nitrogen fixation of legume nodules

Shinji SHIMADA