

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻

平成 16 年度博士課程 入学

氏 名 二瓶 直登

指導教員名 中西 友子

論文題目 「植物のアミノ酸吸収・代謝に関する研究」

1 背景・目的

化学肥料の多投や農薬の使用による環境負荷が懸念される中、将来に渡る持続的な食糧生産を維持するため、環境にやさしい有機農業が見直されている。有機農業では、有機質肥料の肥効発現が作物の収量や品質に大きな影響を与えるが、その効果は、個々の経験による部分が大きく、安定した肥効が得られないことも多い。有機農業による農産物生産を普及・拡大するためには、科学的根拠に基づいた施肥技術を提示し、より効果的に肥料の効果を引き出すことにより、農業者が有機農業に、より取り組み易くする必要がある。

作物栽培において生育を最も大きく左右する養分は窒素である。従来、有機質肥料の窒素肥効を予測する試みは、リービヒの無機栄養説に基づき、土壌微生物の分解により完全に無機化した NH_4^+ 、 NO_3^- を測定することが行われている。一方で、土壌で生成した無機態窒素量と作物の生育が比例していない事例 (Matsumoto 1999) や、ツンドラ地帯の森林や牧草がアミノ酸を積極的に吸収・利用している報告 (Chapin et al. 1993, Nasholm et al. 1998) もある。

有機質肥料は土壌に施用された後、微生物の分解によりタンパク質、ペプチド、アミノ酸を経て最終的に無機態窒素となる。したがって、有機質肥料を使用する有機栽培圃場では、化学肥料を施用する慣行栽培より、その分解過程で生成する低分子の有機態窒素の存在が多い。しかし、実際の有機栽培作物や今後普及が期待できる作物について、有機態窒素の生育への影響、吸収特性、吸収後の代謝に関する研究はこれまでほとんど行われていない。

本研究では、有機質肥料の施用効果解明への第一歩として、タンパク質の構築単位であり有機

態窒素の無機化過程で必ず生成されるアミノ酸の植物による直接利用について解析を行った。概要は以下のとおりである。

- ① 有機質肥料の植物別施用効果および有機態窒素の生育に対する影響の解析
- ② アミノ酸を単一窒素源とした栽培におけるアミノ酸の種類が生育に与える影響の解析
- ③ アミノ酸の直接吸収の証明、吸収過程のリアルタイムイメージングおよび吸収速度、特性の解析
- ④ 直接吸収したアミノ酸の代謝と植物体内の蓄積分布の解析

以上の実験により、植物へのアミノ酸直接吸収と吸収したアミノ酸の植物体内での利用の経路の解明、また無機態窒素を吸収した場合との相違点などについて考察した。

2 研究内容

① 有機質肥料の植物別施用効果および有機態窒素の生育に対する影響の解析

有機栽培がよく行われる植物について、数種類の有機質肥料を施用した栽培試験を行った。栽培試験の結果、有機質肥料の効果は植物の種類により大きく異なり、イネ、コムギ、チンゲンサイは有機質肥料の施用効果が高く、キュウリ、トマト、ピーマンでは低かった。また根系の発達も、地上部同様、植物や有機質肥料の種類で大きく異なり、特にイネとコムギでは有機質肥料を施用すると根系も非常によく発達することが明らかになった。

土壌の無機態窒素量と植物の窒素吸収量を比較すると、キュウリでは無機態窒素量と窒素吸収量に高い相関がみられたが、イネ、チンゲンサイでは相関はなかった。特に、有機質肥料施用区では無機態窒素施用区より生育期間を通しての土壌の無機態窒素量が少ないにもかかわらず、イネの窒素含有量が多いという結果が得られ、イネが無機態窒素のみではなく、有機態窒素をも吸収して生育していることが示唆された。

② アミノ酸を単一窒素源とした栽培におけるアミノ酸の種類が生育に与える影響の解析

タンパク質を構成するアミノ酸 20 種類を窒素源として、5 種類の植物(イネ、コムギ、チンゲンサイ、ダイズ、キュウリ)を無菌的に栽培した。その結果、アミノ酸の生育に対する効果は植物の種類で異なった。ダイズはアミノ酸の種類により、生育に大きな差は見られなかったが、イネ、チンゲンサイ、コムギ、キュウリでは一部のアミノ酸が無機態窒素と同等の生育を示す一方で、アミノ酸によっては強い生育阻害を引き起こすなど、生育に対して正負の大きな影響が見られた。無機態窒素以上の生育を示したのは Gln で、無機態窒素とほぼ同等の生育が Ala、Arg、Asp、Asn、Glu、Gly、Pro で得られた。逆に Trp、Leu、Val、Tyr、Met、Cys、Ile、Lys、Phe では強い生育阻害が見られた。

根系発達に関してもアミノ酸の影響が強く見られ、イネでは、Gln、Asn の施用で種子根や側根の生長が旺盛になった。本結果より、植物によってはいくつかのアミノ酸を窒素源としての生育が可能であり、無機態窒素以上の生育も可能であることが示された。また生育がよかったアミノ酸はいず

れも植物体内に比較的多く含まれるアミノ酸であることから、植物がアミノ酸を直接吸収し、速やかに代謝、利用していることが予測された。

③ アミノ酸の直接吸収の証明、吸収過程のリアルタイムイメージングおよび吸収速度、特性の解析

イネ幼植物を用い、アミノ酸の直接吸収の証明を試みた。また、吸収経路の解明、吸収速度の算出および根圏の窒素環境がアミノ酸の吸収に与える影響の検討を行った。

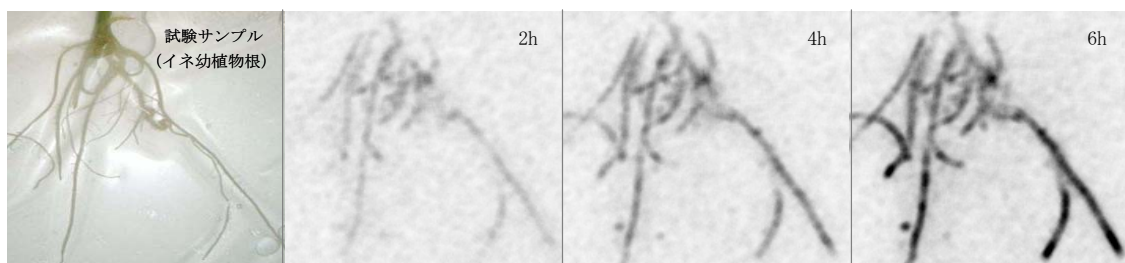
アミノ酸の直接吸収を証明するため、 ^{15}N と ^{13}C の安定同位体二重標識 Gln を吸収させた後、地上部と地下部のそれぞれから遊離アミノ酸を抽出し、質量分析による測定を行った。その結果、地下部に加え、地上部でも二重標識 Gln の存在が確認されたこと、栽培後の溶液中には無機態窒素や他のアミノ酸などが検出されなかったことから、溶液中の Gln は根から直接吸収されることを明らかにすることができた。

次に、アミノ酸の吸収過程や吸収部位を検討するため、植物体中の物質動態を非破壊的にリアルタイムで画像化するリアルタイムオートラジオグラフィシステム (Rai et al.2008) を用い、連続的なアミノ酸吸収のイメージングをおこなった。イネの根が溶液中の Gln を吸収する過程を撮影し、画像解析から、Gln の吸収活性が主に根端部分において高いことが示された。

また、アミノ酸の吸収がトランスポーターを介していると考えられる (Hirner et al.2006) ことから、Gln の溶液濃度を変えた吸収実験の結果、吸収速度はミカエリス・メンテン式にあてはまり、その K_m 値は $199.7 \mu\text{M}$ 、 V_{max} 値は $2.9 \mu\text{mol/g/h}$ であった。また、 $10 \mu\text{M}$ 以下という低濃度でも積極的な吸収を示したことから、土壌中のアミノ酸が微量な場合でも吸収できる可能性が示された。

このように、アミノ酸吸収に能動輸送システムの関与が示唆されたことから、植物がどのような条件でこのアミノ酸吸収機構を発現しているかを検討するため、異なる窒素環境 (Gln、 NH_4^+ 、無窒素) で生育したイネ幼植物の Gln 吸収を測定した。その結果、いずれの処理においても減少率、吸収量に差はみられず、Gln 吸収に関与する能動輸送のシステムは、窒素欠乏や根圏の Gln に応答して発現するのではなく、常時発現しているものと推察された。

図 イネ幼植物根の ^{14}C -Gln のリアルタイムオートラジオグラフィ画像



④ 直接吸収したアミノ酸の代謝と植物体内の蓄積分布の解析

イネ幼植物の生育が良好であった Gln、Ala、阻害した Val について、吸収されたアミノ酸の地下

部、地上部における代謝について安定同位体二重標識アミノ酸を与え、トレーサー実験を行った。

Gln を吸収したイネ幼植物の遊離アミノ酸は、地下部では、Gln、Asn、地上部では、Gln、Asn、Glu、Asp、Ser が増加した。吸収された Gln は、 NH_4^+ の窒素同化とほぼ同様に GS-GOGAT 経路に取り込まれ、Glu、Asp へアミノ基が転移し、他のアミノ酸合成の窒素源として使用されたと考えられた。また、Gln 態の窒素は NH_4^+ と比較すると、特に地下部において 90%近くがタンパク質合成に利用されており、遊離アミノ酸画分に存在する割合は低かった。Gln 態として吸収された窒素は、窒素同化の最初の段階において地上部からの光合成産物を必要とせず、地上部からの同化産物の供給に制限されることなくタンパク質や核酸などに比較的早く変換できることが示唆された。一方、Gln 態で吸収した炭素は、地下部では 56%、地上部では 60%近くが消失しており、窒素をアミノ基転移により利用した後は、TCA サイクルの有機酸などとして呼吸により二酸化炭素として放出されることが示唆された。特に地下部においては炭素の大部分がアミノ酸画分には存在していないことから、有機酸などアミノ酸以外の物質への変換も活発に行われ、呼吸基質の炭素源などとしても積極的に利用されていることが予想される。以上の結果から、Gln は地上部からの同化産物を使用せずに速やかに窒素をタンパク質合成へ使用することが可能であり、呼吸により炭素部分も使用することで、特に地下部において取り込んだ窒素を根系発達に効率よく利用することが、無機態窒素との異なる点と考えられた。

Ala を吸収したイネ幼植物では、吸収された Ala は Gln にアミノ基を転移させ、その後は Gln と同様な代謝経路となっていると考えられた。Ala を吸収させたイネ幼植物の生育は、塩化アンモニウムより優るが、Gln で生育したイネ幼植物に比べて生育は劣る。これは、Ala が植物体内で利用されるためには、Gln へ一度代謝しなければならず、そのための代謝の基質とエネルギーが必要となるためであると考えられる。

吸収された Val は、代謝され生成されるアミノ酸が Leu のみであり、他のアミノ酸等へは代謝が進まないため体内で蓄積してしまい、生育を阻害したものと推測された。

3 まとめ

植物はいずれの種類のアミノ酸でも吸収するが、吸収後の代謝過程により、窒素源として植物生育により影響を与えるかどうかが決まると考えられた。一部のアミノ酸では、無機態窒素と同等以上の生育促進効果(特に良好な根系発達)をもたらした。また、極低濃度でも植物がアミノ酸を吸収していることから、通常低濃度とされている土壌においてもアミノ酸を吸収していることが予想された。

以上のことから、土壌のアミノ酸濃度を高める堆肥や有機質肥料を施用する有機農業の施肥管理技術の確立には、窒素の無機化量だけでなく、分解過程で生成するアミノ酸の植物生育への影響がより一層重要となると考えられる。