

ダイズの植物ヘモグロビン遺伝子群の  
非生物ストレス条件下での発現に関する研究

2021年3月

蘭 正人

# 目次

## 第1章：序論

1-1 非生物ストレス耐性ダイズ作出の重要性	1
1-2 非生物ストレス応答と一酸化窒素	3
1-3 冠水ストレス応答と一酸化窒素	4
1-4 植物ヘモグロビンによる一酸化窒素の調節機構	5
1-5 ダイズの植物ヘモグロビンによる非生物ストレス耐性獲得の可能性	10

## 第2章：非生物ストレスによる植物の生長と一酸化窒素量の変化

2-1 序論	11
2-2 材料と方法	11
2-2-1 使用したダイズ品種と発芽	11
2-2-2 長期冠水	13
2-2-3 冠水条件下での一酸化窒素量の測定	13
2-2-4 一酸化窒素供与剤による処理	14
2-3 結果	14
2-3-1 冠水による生重量の変化	14
2-3-2 冠水による一酸化窒素量の変化	17
2-3-3 一酸化窒素供与剤による生重量の変化	18

2-4 考察	19
<b>第3章：ダイズ植物ヘモグロビン遺伝子の一酸化窒素に対する発現応答</b>	
3-1 序論	21
3-2 材料と方法	22
3-2-1 使用したダイズ品種	22
3-2-2 一酸化窒素供与剤 (SNP) 処理	22
3-2-3 一酸化窒素供与剤 (SNAP) 及び NO 除去剤 (cPTIO) 処理	23
3-2-4 全 RNA の抽出と qRT-PCR による植物ヘモグロビン遺伝子の発現解析	23
3-3 結果	25
3-3-1 ダイズ植物ヘモグロビン遺伝子の一酸化窒素応答性	25
3-4 考察	29
<b>第4章：ダイズ植物ヘモグロビン遺伝子の非生物ストレスに対する発現応答</b>	
4-1 序論	33
4-2 材料と方法	35
4-2-1 使用したダイズ品種と根粒菌株	35
4-2-2 長期塩処理	35
4-2-3 塩ストレス条件下での一酸化窒素量の測定	36
4-2-4 短期冠水処理及び塩ストレス処理	36

3-2-5 根粒菌の接種	37
4-3 結果	37
4-3-1 塩による生重量の変化	37
4-3-2 塩による一酸化窒素量の変化	38
4-3-3 ダイズ植物ヘモグロビン遺伝子の冠水及び塩ストレスへの応答性	39
4-3-4 ダイズ植物ヘモグロビン遺伝子の組織特異的発現	40
4-4 考察	43
<b>第5章: 総括</b>	47
<b>引用文献</b>	51
<b>謝辞</b>	

# 第 1 章 序論

## 1-1 非生物ストレス耐性ダイズ作出の重要性

ダイズ (*Glycine max*) は、世界で最も重要な作物の 1 つである。ダイズは、家畜や水産養殖用の飼料、或いは、我々人類の食糧として優れたタンパク質源であると同時に、バイオ燃料の原料に使われる油糧種子でもある。人口の爆発的な増加を考慮すると、ダイズの需要はますます増加すると考えられる (Seto et al. 2011, Angel et al. 2011)。既に現在、ダイズは世界中で広く栽培されており、その生産量は年々増加している。世界のダイズ生産量は 1961 年から 2007 年にかけて毎年平均 4.6% 増加し、2005 年から 2007 年には平均年間生産量は 2 億 1760 万トンに達した。ダイズの世界生産量は 2030 年までに年間 3 億 7,130 万トンになると予測されている (Masuda and Goldsmith 2009)。

ダイズの生産は、環境に大きく左右される。地球温暖化とされる気候の変化から、ダイズの生産に適した土地は地球の南北へとシフトしており (Lant et al. 2016)、ダイズの生産地域はこの半世紀で大きく変化している。1961 年にはアメリカと中国でダイズ農地の 9 割 (アメリカ 48.6%、中国 38.8%) を占めていたが、近年ブラジルやアルゼンチン、インド等の様々な地域がダイズの生産に参入したことにより、2007 年にはアメリカの農地の割合は全体の 31.7%、中国は 9.8% まで減少している (同年ブラジル 23.3%、アルゼンチン 16.0%、インド 8.7%) (Masuda and Goldsmith 2009)。また、温

暖化の進行や、ダイズの需要の増大が現在の予測ベースで変化した場合、2100 年までのダイズ生産地の予測をすると、アメリカや、ブラジル、中国、インド等、現在のダイズ生産地域の多くで引き続きダイズが生産され、加えて、アフリカ大陸の南部、オーストラリア北部、ヨーロッパ北部が新たにダイズ生産のための農地として使用されるとされている (Fodor et al. 2017)。つまり、ダイズを生産しなくなる地域よりもダイズ生産に参入してくる地域が圧倒的に多く、今後もさらにダイズを生産地域が拡大していくだろうと予測される。

日本や東南アジアでも、今後、ダイズ生産地域が拡大すると予想されているが (Fodor et al. 2017)、東南アジアの島国では、温暖化による海面上昇、河川の氾濫が増加している (Muis et al. 2015) ことを考えると、作物の冠水や塩害のリスクが非常に高くなることが予想される。冠水や塩などの非生物ストレスに感受性の高いダイズにとっては、深刻な問題である (Valliyodan et al. 2014, Liu et al. 2017)。我々の住む日本は島国であることに加え、梅雨期や台風による多雨がもたらす畑地の冠水によるダイズ栽培への影響は、非常に深刻な問題となるであろう。このようなダイズの栽培環境を取り巻く将来予想を鑑みると、冠水などの非生物ストレスに対する耐性をもつダイズ品種の作出は喫緊の課題である。

## 1-2 非生物ストレス応答と一酸化窒素

植物では、一酸化窒素 (NO) は L-アルギニンや亜硝酸イオンを基質としてミトコンドリアや葉緑体、ペルオキシソームなどの細胞小器官で生産される (Del Río 2015)。NO は、様々な植物の生理応答で、各種の植物ホルモンと協調して機能する分子である。NO は、休眠の打破や発芽の促進 (Kopyra and Gwózdź 2003, Krasuska et al. 2015)、根の伸長の制御 (Correa-Aragunde et al. 2008, Fernández-Marcos et al. 2011, Lombardo et al. 2006, Pagnussat et al. 2004)、開花 (He et al. 2004, Khurana et al. 2011)、果実の成熟 (Singh et al. 2009, Manjunatha et al. 2010)、植物の老化 (Procházková and Wilhelmová 2011) など様々な場面でシグナル分子として働く。一方、NO は、低酸素、塩、高温、低温、乾燥などの非生物ストレス応答でも、シグナル分子として機能する (Simontacchi et al. 2015)。

NO は、先に述べたように、植物の生長の様々な場面でシグナルとして働く。そのため、ストレス応答によって著しく NO 量が増加することは、植物の生長を変化させる一因であると考えられる。植物の根の生長は、冠水のような非生物ストレスによって抑制されるが (Valliyodan et al. 2014)、同様に、過剰な NO によっても強く抑制される。例えば、トマトでは、根を NO 供与剤である sodium pentacyanonitrosylferrate (III) dihydrate (SNP) で処理すると、高濃度の SNP が著しく根の全長を減少させる。特に、主根の伸長が SNP によって阻害されるが、NO 除去剤である 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-

tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) を共処理することで、主根の伸長阻害は緩和され、cPTIO の単独処理では主根の伸長が促進される (Correa-Aragunde et al. 2004)。

過剰な NO が植物の生長を変化させるのは、NO がシグナル分子として植物の生長の様々な段階に関与していることに加え、NO がタンパク質を酸化修飾するためである。NO はフリーラジカルであり、様々な物質と反応するだけでなく、細胞内のタンパク質を修飾する。例えば、NO は還元型グルタチオンと反応し、S-ニトロソグルタチオンになり、タンパク質のシステインをニトロシル化する。また、スーパーオキシドと反応するとペルオキシナイトライトになり、タンパク質のチロシンをニトロ化する (Del Río 2015)。つまり、NO はタンパク質を修飾してその働きを阻害するため、過剰な NO によって正常な細胞の活動が維持されなくなり、植物の生長が変化するのだろうと考えられる。これらのことから、過剰な NO を適切に制御することが、非生物ストレス条件下でも旺盛に育つ植物を作出することにつながる可能性が大いにある。

### 1-3 冠水ストレス応答と一酸化窒素

冠水は、1-1 で述べたように、非生物ストレスの中でも解決すべき大きな問題である。根系の冠水は、ダイズの根の生長を著しく阻害する。冠水条件下で 10 日間ダイズを栽培すると、地表付近の茎に二次通気組織や不定根が形成され、中心柱や皮層が肥大し空



気の通り道ができる。これらの変化は、冠水耐性品種の方が、冠水感受性品種よりも早く起こる (Valliyodan et al. 2014)。冠水耐性品種では、冠水時に速やかに空気の通り道ができることで、冠水による低酸素状態からより早く脱することができると考えられる。とはいえ、Valliyodan et al. (2014) によると、冠水耐性品種でも、10 日間の冠水により根のバイオマスは非冠水時と比べ 50 % 程度減少し、根の生長が著しく阻害される。ミヤコグサを含む様々な植物において、低酸素条件下で NO 量が上昇する (Benamar et al. 2008, Shimoda et al. 2005, Hebelstrup et al. 2012)。ミヤコグサは、冠水によっても根の NO 量が上昇する (Fukudome et al. 2019b)。トマトを用いた研究では、過剰な NO が根の伸長を抑制することがわかっている (Correa-Aragunde et al. 2004)。ミヤコグサと同じマメ科植物であるダイズも冠水によって根組織内の NO 量が上昇し、過剰な NO によって根の伸長が抑制されることが予想されるが、冠水条件下のダイズでの NO 量がどのように変化するかは明らかではない。そこで、本研究では、第 2 章でダイズの冠水条件下での NO 量の変化について検討した。

#### 1-4 植物ヘモグロビンによる一酸化窒素調節の機構

本研究では、NO 制御にかかわる因子として、植物ヘモグロビンに着目した。植物ヘモグロビン (GLB) は、動物や細菌のヘモグロビンと起源は同じであり、植物界に広く保存されているタンパク質である (Hill 1998)。GLB は、そのアミノ酸配列に基づいて、

クラス 1 植物ヘモグロビン (GLB1)、クラス 2 植物ヘモグロビン (GLB2)、クラス 3 植物ヘモグロビン (GLB3) の 3 つのクレードに分類される (Hunt et al. 2001, Watts et al. 2001)。GLB1 については、NO 調節能力がこれまでに数多く報告されている。ミヤコグサでは GLB1 をコードする *LjGlb1-1* の高発現系統では、根組織の NO 量が低く (Shimoda et al. 2009)、低発現系統では高くなること (Fukudome et al. 2016) が示されている。ダイズのゲノム上にも、GLB をコードする遺伝子が複数存在する (図 1)。それらの中で、GLB1 をコードする遺伝子として、*GmGLB1* と *GmGLB1-like* がある (Anderson et al. 1996, Schmutz et al. 2010) が、NO 調節能力をもつかは明らかになっていない。しかしながら、この 2 つは *LjGlb1-1* と非常に相同性の高いアミノ酸配列を有しており (図 2 A)、*LjGlb1-1* 同様に NO 調節にはたらく可能性が高い。シロイヌナズナでは、GLB1 をコードする *AtGLB1* を強く発現させた系統では、野生系統と比べ葉の NO 量が非常に低く、*AtGLB1* を強く抑制した系統では非常に高くなる (Hebelstrup et al. 2012)。更に、ヤシャブシの GLB1 をコードする遺伝子をミヤコグサの根で恒常的に発現させると、根の NO 量を低く保つことも分かっている (Fukudome et al. 2019b)。これらのことから、GLB1 の NO 調節能力は植物で広く保存されており、やはり、*LjGlb1-1* と相同性の高い *GmGLB1* や *GmGLB1-like* が、NO 調節に働く可能性は非常に高い。ミヤコグサの根での *LjGlb1-1* 遺伝子の発現は、NO 供与剤である S-nitroso-N-acetyl-D, L -penicillamine (SNAP) によって誘導され、SNAP と同時に NO 除去剤

である cPTIO で処理すると、SNAP 単独処理よりも低くなることから *LjGlb1-1* は NO 応答性であることが示されている (Shimoda et al. 2005)。このことと *LjGlb1-1* が NO 調節能力をもつことから、NO に応答して *LjGLB1-1* 遺伝子の発現が上昇し、増加した *LjGlb1-1* が NO 量を調節するというフィードバック調節機構があることが分かる。

*GmGLB1* や *GmGLB1-like* についてもこのようなフィードバック調節機構の存在が考えられるが、これらの遺伝子の NO 応答性については明らかではなかった。第 3 章では *GmGLB1* 遺伝子や *GmGLB1-like* 遺伝子をふくめたダイズの植物ヘモグロビン遺伝子の NO 応答性について検討し、*GmGLB1* や *GmGLB1-like* による NO のフィードバック調節機構の存在を示唆する結果が得られた。

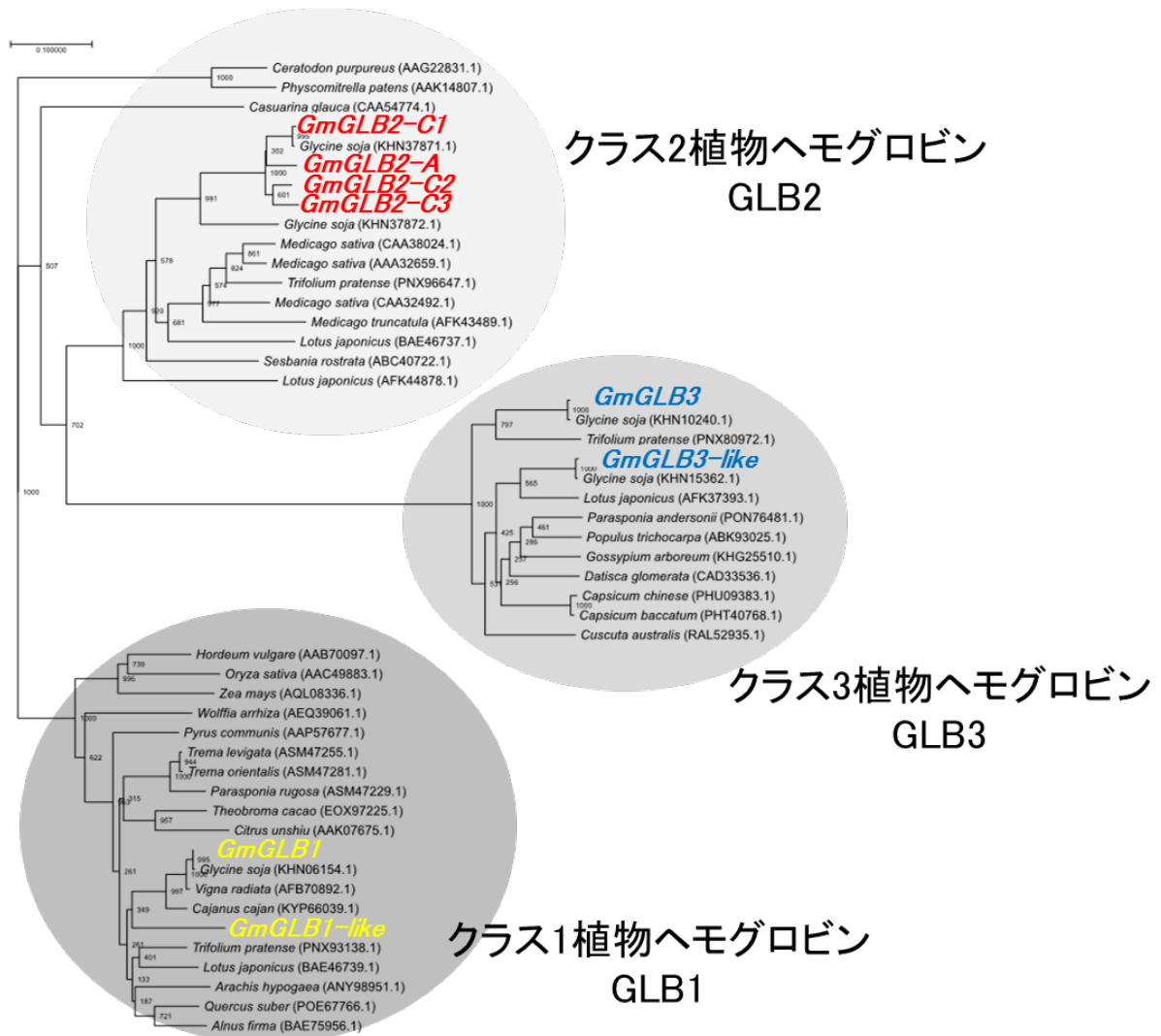


図 1. 植物ヘモグロビンの予測アミノ酸配列に基づく系統樹  
 系統樹はClustalWのneighbor-joining方式で作成した。branchの数値は1000回のresamplingから求められたbootstrap確率を示す。括弧内にはそれぞれの遺伝子のaccession numberを示す。

A

```

LjGLB1-1 MSTLGGSTCFTEEQEALVVKSWVVMKKNSEELGLKFLKIFEIAPSAQKLF SFLRDSKVPL
GmGLB1 MTTTLERGFSEEEQEALVVKSWVMKKNSEELGLKFFLKFIFEIAPSAQKLF SFLRDSKVPL
GmGLB1-like ---MEGKGFTEEQEALVVKSWVMKKNSEELGLKFFKIFEIAPAAQQLFSFLKDSVPL

EENPKLPHAMSVFVMTCEAAQLRKAGKVTVRESLTKKLGATHYKYGVMNEHFVETKFA
EQNPCLKPHAMSVFVMTCEAAVQLRKAGKVTVRESNLKKGATHFRITGVANEHFVETKFA
EENPKLPHAMSVFVMTCEAAVQLRKAGKVTVRESNLKRLGATHFRITGVANEHFVETKFA

LLETIKEAVPEMWSPEMKNAWTQAYDQLVDAIKSEMPPSS
LLETIKEAVPEMWSPEMKNAWTQAYDQLVDAIKSEMPPSS
LLETIKEAVPEMWSPEMKNAWTQAYDQLVDAIKSEMPPSS

```

B

```

GmGLB1 MTTTLERGFSEEEQEALVVKSWVMKKNSEELGLKFFLKFIFEIAPSAQKLF SFLRDSKVPL
GmGLB1-like ---MEGKGFTEEQEALVVKSWVMKKNSEELGLKFFLKFIFEIAPAAQQLFSFLKDSVPL
GmGLB2-A ----MVAFTKQDQALVSSSFEAFKANIPQYSVVFYTSILEKAPAAKDLFSFLANGVDP-
GmGLB2-C1 ----MGAFTKQDQALVSSSFEAFKANIPQYSVVFYTSILEKAPAAKDLFSFLANGVDP-
GmGLB2-C2 ----MGAFTKQDQALVSSSFEAFKANIPQYSVVFYTSILEKAPAAKDLFSFLANGVDP-
GmGLB2-C3 ----MGAFTKQDQALVSSSFEAFKANIPQYSVVFYTSILEKAPAAKDLFSFLANGVDP-
GmGLB3 -----MQSLQQKASEWSGVSIADAF
GmGLB3-like -----MQSLQQKASEWSGVSIADAF

EQNPCLKPHAMSVFVMTCEAAVQLRKAGKVTVRESNLKKGATHFRITGVANEHFVETKFA
EENPKLPHAMSVFVMTCEAAVQLRKAGKVTVRESNLKRLGATHFRITGVANEHFVETKFA
-TNPKLTGHAEKLFALVRDSAGQLKASGTV-VADAAL---GSIHAQKAVTDPOFVVMKEA
-TNPKLTGHAEKLFALVRDSAGQLKASGTV-VADAAL---GSIHAQKAVTDPOFVVMKEA
-TNPKLTGHAEKLFALVRDSAGQLKASGTV-VADAAL---GSIHAQKAVTDPOFVVMKEA
-TNPKLTGHAEKLFALVRDSAGQLKASGTV-VADAAL---GSIHAQKAVTDPOFVVMKEA
-TNPKLTGHAEKLFALVRDSAGQLKASGTV-VADAAL---GSIHAQKAVTDPOFVVMKEA
AIDEANLFFHKLGLQTLVNLSTNFYNRVYDDQEWFRSIFANSKQNAIQNQIEFLVQRMG
GIDDTNLFKRLGLQTFINLSTNFYNRVYDDEEWFERSIFANSEKENAIQNQYEFFVQRMG

LLETIKEAVPEMWSPEMKNAWTQAYDQLVDAIKSEMPPSS-----
LLETIKEAVPEMWSPEMKNAWTQAYDQLVDAIKSEMPPSS-----
LLKTIKAAVGDKWSDELSSAWEVAYDELAAAIAKKA-----
LLKTIKAAVGDKWSDELSSAWEVAYDELAAAIAKKA-----
LLKTIKAAVGDKWSDELSSAWEVAYDELAAAIAKKA-----
LLKTIKAAVGDKWSDELSSAWEVAYDELAAAIAKKA-----
LLKTIKAAVGDKWSDELSSAWEVAYDELAAAIAKKA-----
LLKTIKAAVGDKWSDELSSAWEVAYDELAAAIAKKA-----
GPTLYSQRGGHPALIAHRPFPLTHEAANRWLHHMQALDSTSAIDDDSKIKLINFFRHT
GPPLFSQRGGHPALIAHRPFPLTHEAANRWLHHMQALDSTTDIDDDSKTKMMNFFRHT

-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----
AYFLVAGVEQKQNFHVPCKDAALKQHPCKNF
AYFLVAGDELKNQNHIPCKHAAAKKDDSDS---

```

**図 2. 植物ヘモグロビンの予測アミノ酸配列に基づくアラインメント**  
 GENETYXをもちいて、植物ヘモグロビンの予測アミノ酸配列に基づくアラインメントを行った。赤枠で囲まれる部分が、遺伝子間で高く保存されているアミノ酸である。(A) ミヤコグサのGLB1であるLjGlb1-1とダイズGLB1であるGmGLB1とGmGLB1-likeについてアラインメントした。(B) ダイズの全GLBをアラインメントした。

## 1-5 ダイズの植物ヘモグロビンによる非生物ストレス耐性獲得の可能性

ミヤコグサでは、低温や低酸素といった非生物ストレスで組織内の NO 量が上昇し、これらのストレスは *LjGlb1-1* の発現も誘導する (Shimoda et al. 2005)。また、組換えタンパク質や *LjGlb1-1* の変異系統を用いた研究により、*LjGlb1-1* は NO 調節能力を持つことが示されている (Shimoda et al. 2005, Shimoda et al. 2009, Fukudome et al. 2016)。これらのことから、低温や低酸素などの非生物ストレスによって上昇した NO に応答して *LjGlb1-1* の発現が誘導され、過剰な NO を調節するのだろうと考えられる。

ダイズの GLB1 をコードする *GmGLB1* も、冠水によって誘導される (Valliyodan et al. 2014)。また、冠水時に冠水感受性品種と耐性品種間で *GmGLB1* の発現を比較すると、冠水感受性品種で常に高いことが示されている (Valliyodan et al. 2014)。*GmGLB1* も *LjGlb1-1* と同様に、*GmGLB1* も NO 応答性を有しているため、冠水によって上昇した NO を介して *GmGLB1* の発現が誘導されるのだろうと考えられる。一方、ダイズで GLB1 をコードするもう一つの遺伝子である *GmGLB1-like* については、非生物ストレス応答性についての知見はない。そこで、第 4 章では、*GmGLB1-like* を含めたダイズの GLB をコードする遺伝子の非生物ストレス応答性について検討することにより、非生物ストレス条件下で働いていると予想されるダイズの *GLB* 遺伝子を明らかにし、その機能についても議論した。

## 第2章：非生物ストレスによる植物の生長と一酸化窒素量の変化

### 2-1 序論

ダイズは非生物ストレスに感受性が高く、例えば、根に対して冠水処理を施すと、根の生長が著しく阻害される (Valliyodan et al. 2014)。NO は植物の生長の様々な段階に参与しており、非生物ストレス応答においても重要な役割をもつ (Simontacchi et al. 2015)。ダイズと同じマメ科植物であるミヤコグサでは、冠水によって根組織内の NO 量が上昇する (Fukudome et al. 2019b) ことから、ダイズでも同様のことが起こりうると思われるが、冠水によってダイズの根で、NO の生産が上昇するかどうかについての知見はない。そこで、本章では、非生物ストレスに対するダイズの応答を明らかにすることを目的として、冠水条件下でのダイズの生長と NO 量の変化を検討した。

### 2-2 材料と方法

#### 2-2-1 使用したダイズ品種と発芽

実験には *Glycine max* cv. Fukuyutaka を使用した。殺菌のため種子を 0.5% 次亜塩素酸ナトリウムに 1 分間浸漬し、蒸留水で 10 回洗浄したのち、蒸留水中で 10 分間攪拌した。その後、Leonardo jar 1 個につき、4 つの種子を 2.5 cm の深さで播種した。

Leonardo jar は 300 mL のダイズ水耕液 (SS, 表 1) を十分に吸水させたバーミキュ

ライトを充填し滅菌したものを使用した。播種後4日間、28° C（16時間明期/8時間暗期）に保存し、発芽した種子を Leonardo jar1 個あたり 1 つになるよう間引いた [本研究では、この日を発芽後 0 日（dpg, days post germination）と定義した]。

**表 1. ダイズ水耕液（SS）の組成**

<b>Stock Solution A</b>	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	99.5 g/L
$\text{K}_2\text{SO}_4$	49.6 g/L
<b>Stock Solution B</b>	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	262.0 g/L
<b>Stock Solution C</b>	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	245.0 g/L
<b>Stock Solution D</b>	
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.43 g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25 g/L
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.25 g/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.031g/L
<b>Stock Solution E</b>	
$\text{EDTA Na Fe} \cdot \text{H}_2\text{O}$	40.1 g/L

滅菌水にそれぞれのストック液1 mLを加え、最後に1 Lに定容する



### 2-2-2 長期冠水

2-2-1 のようにして Leonardo jar に準備した実生に対して、0 dpg から 10 日間(28°C, 16 時間明/ 8 時間暗)、根が完全に沈むように SS を満たした容器に Leonardo jar ごと沈めた。0 dpg に 300mL の SS を Leonardo jar に加え、10 日間栽培したものを対照区とし、それぞれ葉と根について生重量を測定した。この実験では、根粒菌 USDA110 は接種しなかった。

### 2-2-3 冠水条件下での一酸化窒素量の測定

200 mL の蒸留水を吸水させたバーミキュライトを充填し滅菌したシャーレ(直径 16 cm×深さ 4 cm) を用意した。このシャーレに 100 粒の種子を播種した。24 時間(28° C, 16 時間明/ 8 時間暗) 後、種子を 0.5%次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌し、5 mL の 1%アガロースを含む滅菌したプラントボックス(幅 7 cm×長さ 7 cm×深さ 9 cm) それぞれに 3 粒を播種し、7 日間(28° C, 16 時間明/8 時間暗) 栽培した。その後、プラントボックスに 100 mL の蒸留水を加えて冠水区とした。対照区として、プラントボックスに 100 mL の蒸留水を注ぎ、すぐに水気を切った。3 時間、6 時間、および、24 時間後、冠水区と対照区の各プラントボックスを 100 mL の蒸留水で洗い流したのち、5 mL の蒸留水を追加し、室温で 30 分間静置した。5mL の蒸留水から 10  $\mu$ L をサンプリングして 10  $\mu$ L の DAR-4M 溶液(diaminorhodamine-

4M を蒸留水で 1 : 100 に希釈した水溶液) と混合し、蛍光強度を測定した。混合液の蛍光強度はマイクロ蛍光分光光度計 ES-2 をもちい、excitation は 560 nm、emission は 575 nm で測定した。根の乾燥重量あたりの相対蛍光強度を放出 NO 量とした。この実験では、根粒菌 USDA110 は接種しなかった。

#### 2-2-4 長期一酸化窒素供与剤による処理

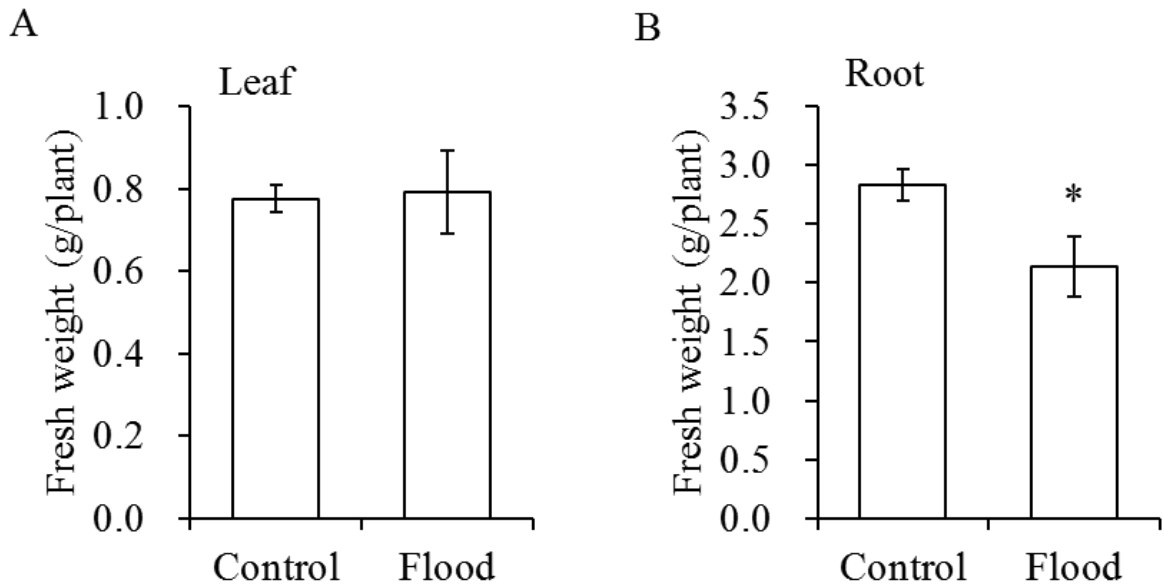
2-2-1 のようにして準備した実生を NO 供与剤で処理して 10 日間 (28°C, 16 時間明 / 8 時間暗) 栽培したのち、葉と根それぞれの生重量を測定した。NO 供与剤処理として、0 dpg に 300 mL の SNP (20  $\mu$ M もしくは 200  $\mu$ M になるように SS に溶解) を Leonardo jar に加えた。SNP のアナログとして potassium ferrocyanide (PF) を使用した。PF 処理として、0 dpg に 200  $\mu$ M PF (SS に溶解) 300 mL を Leonardo jar に加えた。300 mL の SS を 0 dpg に Leonardo jar に加え、10 日間栽培したものをそれぞれの対照区とした。この実験では、根粒菌 USDA110 は接種しなかった。

### 2-3 結果

#### 2-3-1 冠水による生重量の変化

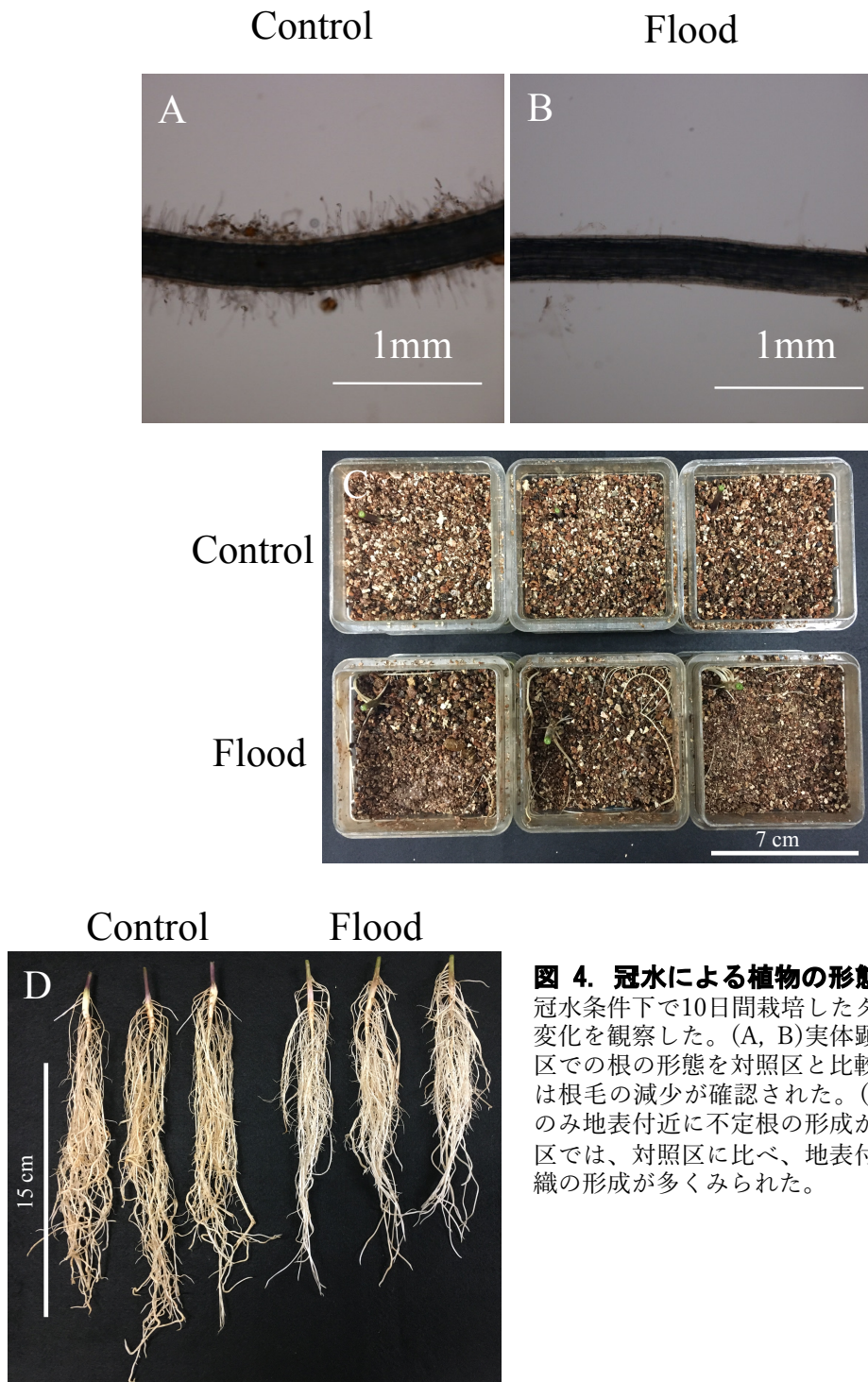
10 日間の連続した冠水ののち、葉と根の生重量を測定した。冠水区の葉は対照区の葉と比べ有意な生重量の変化は見られなかった (図 3 A)。しかしながら、冠水区の

根の生重量は、対照区と比べ大幅に減少した（図3B）。また、冠水区では根毛の減少（図4A, B）、不定根や二次通気組織の発達（図4C, D）がみられた。



### 図 3. 冠水条件下での植物の生長

冠水条件下で10日間育てた葉(A)と根の生重量(B)を測定した。値は3回の独立した実験の平均値 ± 標準誤差で示す（それぞれの実験はn=3）。\*は対照区に対して有意差があることを示す（Student's *t*-test \**P* < 0.05）。

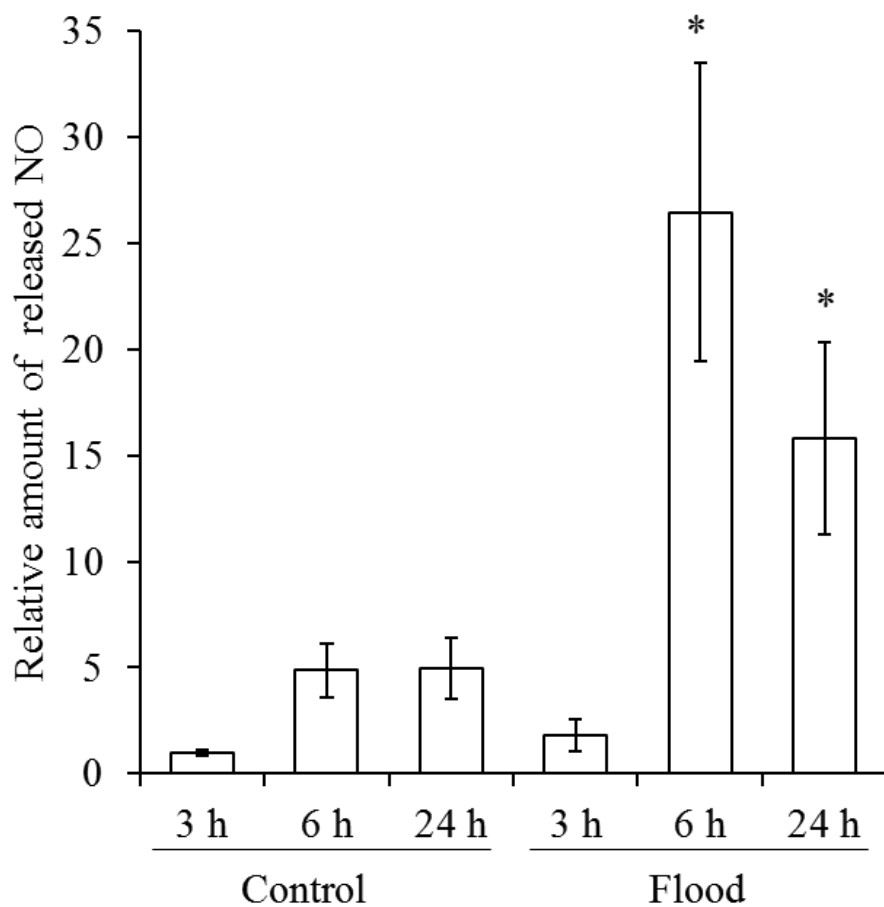


**図 4. 冠水による植物の形態変化**

冠水条件下で10日間栽培したダイズの根の形態変化を観察した。(A, B)実体顕微鏡を用い冠水区での根の形態を対照区と比較した。冠水区では根毛の減少が確認された。(C, D) 冠水区でのみ地表付近に不定根の形成がみられた。冠水区では、対照区に比べ、地表付近で二次通気組織の形成が多くみられた。

### 2-3-2 冠水による一酸化窒素量の変化

3時間、6時間、24時間の冠水処理を行い、NO 特異的蛍光試薬によって根からの放出NO量を測定した。冠水区と対照区の同時間での放出NO量を比較したところ、冠水処理6時間後と24時間後に有意に高い値を示した（図5）。

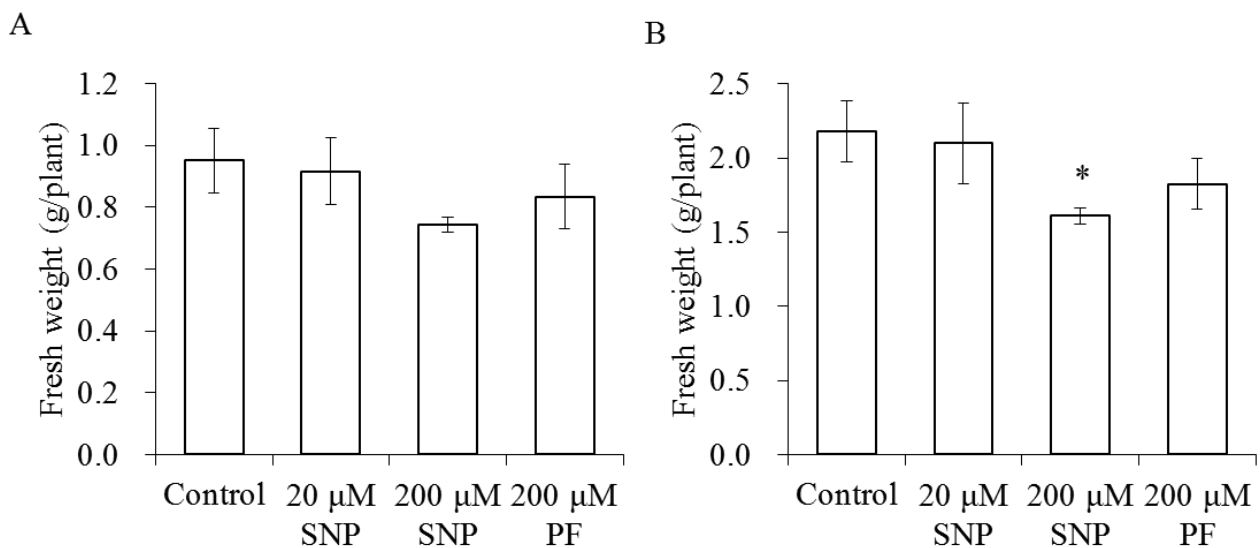


**図 5. 冠水条件下での根からの放出NO量**

冠水3時間、6時間、24時間の根から放出されたNO量を示す。冠水区ではSSで根を冠水した。SSを添加後すぐに排水したものを対照区とした。値は三回の独立した実験の平均値 ± 標準誤差で示す（それぞれの実験はn=3で）。\*は同じ時間の対象区と塩処理区の間で有意差があることを示す (Student's *t*-test \**P* < 0.05)。

### 2-3-3 一酸化窒素供与剤による生重量の変化

SNP 処理、及び、PF 処理 10 日後に、根と葉の生重量を測定した。SNP 処理区の葉は対照区の葉と比べ有意な生重量の変化は見られなかった(図 6 A)。しかしながら、SNP 処理区の根は対照区の根と比べ有意に生重量が減少した(図 6 B)。SNP は NO だけでなく、シアン化物または鉄-シアン化物錯体、あるいは、その両方を生成する(Bethke et al.2006)。そこで、SNP のアナログである PF による根の生重量の変化についても調べた。PF 処理区の根の生重量は対照区の根と比較して、有意ではないものの、減少していた(図 6 B)。



**図6. SNPとPF存在下でのダイズの生長**

SNPまたはPFを添加して10日間育てた葉(A)と根(B)の生重量を測定した。値は3回の独立した実験の平均値 ± 標準誤差で示す(それぞれの実験はn=3)。\*は対照区に対して有意差があることを示す(Student's *t*-test \**P* < 0.05)。

## 2-4 考察

ダイズの根は、冠水によって生重量の減少 (図 3 B)、根毛の減少 (図 4 B)、不定根の誘導 (図 4 C, D) といった根の形態変化を引き起こした。同時に冠水は、根の NO 量を著しく増加させた (図 5)。NO は、根や共生特異的な器官である根粒の維持と形成においてシグナル分子として機能する物質である (Simontacchi et al. 2015) ことから、冠水によって起こった様々な根の形態的变化に、NO が関与するのではないかと考えた。そこで、NO そのものによっても、冠水と同様の変化が引き起こされるかどうかを調べた。NO 供与剤である SNP を加えてダイズを 10 日間栽培したところ、根の生重量が減少した (図 6)。しかしながら、SNP は、NO だけでなく、シアン化物、または、鉄-シアン化物錯体、あるいは、その両方を生成する (Bethke et al. 2006)。SNP が発生するシアン化物と鉄-シアン化物錯体が、根の生重量に影響するのではないかということを考え、SNP のアナログである PF で処理し、同様に 10 日間栽培したダイズの根の生重量を測定した。PF 処理区では対照区と比較して有意差はないものの、根の生重量が減少する傾向にあった (図 6 B)。このことから、SNP から生じるシアン化物や鉄-シアン化物錯体もまた、根の生長を阻害する可能性がある。しかしながら、SNP 処理区の根は、PF 処理区よりも更に生重量の減少がみられた (図 6 B)。シアン化物や鉄-シアン化物錯体による根の生長阻害の可能性を考慮すべきではあるが、他の植物と同様 (Correa-Aragunde et al. 2004, Wang et al. 2017)、ダイズでも NO によっても根の生長が阻害さ

れたと考えられた。このことに加えて、冠水ではダイズの根の生重量が減少し (図 3 B)、根から放出された NO 量が増加した (図 5) ことを加味すると、冠水によって NO が過剰に生産されたことが、根の生長を阻害した一因であると考えられた。

NO はオーキシンの分解を促進する (Terrile et al. 2012) ため、オーキシンの濃度勾配によって根の生長や発達を適切に制御する (Overvoorde et al. 2010) ことができなくなり根の生長を阻害すると考えられる。くわえて、細胞内では、過剰な NO は多くのタンパク質を修飾するため (Del Río 2015)、細胞の正常な活動を維持できなくなることも根の生長が阻害される一因であると考えられる。ダイズでも、冠水によって NO が過剰に生産されたことにより、恐らく、NO の細胞毒性の顕在化や植物ホルモンのバランスの変化が引き起こされ、ダイズの根の生重量が減少したのだらうと考えられる。加えて、不定根 (Pagnussat et al., 2004) や根毛 (Lombardo et al., 2006) の形成にも NO が関係することが知られており、本研究で観察された冠水による根毛の減少 (図 4 A, B) や不定根の形成 (図 4 C, D) も、過剰な NO による形態変化だらうと考えられる。以上のことから、冠水で見られた根の形態的な変化の多くに NO が関与していることが示唆される (Araragi et al. 2021)。



## 第 3 章：ダイズ植物へモグロビン遺伝子の

### 一酸化窒素に対する発現応答

#### 3-1 序論

植物へモグロビン (GLB) は植物界に広く保存されているタンパク質であり、アミノ酸配列に基づいて、GLB1、GLB2、GLB3 の 3 つのクレードに分類される (Hunt et al. 2001, Watts et al. 2001)。そのなかで、GLB1 の NO 調節への関与が、これまでに数多く報告されている。アブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナでは、GLB1 をコードする *AtGLB1* を強く発現させた系統は、野生系統と比べて組織内の NO 量が低く、*AtGLB1* を発現を強く抑制した系統では、反対に高くなる。(Hebelstrup et al. 2012)。マメ科のモデル植物であるミヤコグサでも、GLB1 をコードする *LjGlb1-1* の高発現系統では NO 量が低く (Shimoda et al. 2009)、低発現系統では高くなること (Fukudome et al. 2016) が示されている。これらのことから、さまざまな植物で、GLB1 が NO 制御に働いていると予想される。

ダイズでは、少なくとも 8 遺伝子が GLB をコードする遺伝子として同定されている (図 1)。GLB1 に分類されるタンパク質をコードする遺伝子として *GmGLB1* と *GmGLB1-like* (Anderson et al. 1996, Schmutz et al. 2010)、GLB2 として *leghemoglobin A*、*C1*、*C2*、*C3* (Hyldig-Nielsen et al. 1982, Wiborg et al. 1982)、GLB3 としては

*GmGLB3* が同定されている (Lee et al. 2004)。加えて、NCBI データベースには、*GmGLB3* と相同性の高い遺伝子 (79% アミノ酸同一: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_001249232.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001249232.2)) が存在する (本研究ではこの遺伝子を *GmGLB3-like* とした)。ダイズでも GLB1 に分類されるタンパク質をコードする *GmGLB1* については、冠水によって発現が誘導されること、冠水感受性品種と耐性品種間で冠水時の *GmGLB1* の発現を比較すると、冠水感受性品種で *GmGLB1* の発現が常に高いことが示されており (Valliyodan et al. 2014)、*GmGLB1* が冠水条件下での NO 調節に寄与しているのではないかと期待される。しかしながら、*GmGLB1* を含めたダイズの *GLB* 遺伝子の機能や特徴についての網羅的な報告はない。そこで、本章では、ダイズの *GLB* 遺伝子の NO 応答性を明らかにし、その機能について議論した。

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 使用したダイズ品種

実験には *Glycine max* 'Fukuyutaka' を使用した。

### 3-2-2 一酸化窒素供与剤 (SNP) 処理

2-2-1 に示したようにダイズの種子を殺菌、播種、間引きを行った。その後、9日間 (28°C, 16時間明/8時間暗) 栽培したのち、NO 供与剤としての SNP で処理し 24

時間 (28°C, 16 時間明/ 8 時間暗) 栽培した。 SNP のアナログとして、 PF を使用した。 各処理として、 Leonardo jar に 500  $\mu$ M SNP 100 mL (SS に溶解)、もしくは 500  $\mu$ M PF 100 mL (SS に溶解) を加えた。 対照区には 100 mL の SS を使用した。 24 時間後、全 RNA 抽出用の試料として、根を液体窒素ですばやく凍結した。この実験では、根粒菌 USDA110 は接種しなかった。

### 3-2-3 一酸化窒素供与剤 (SNAP)、NO 除去剤 (cPTIO) 処理

2-2-1 に示したようにダイズの種子を殺菌、播種、間引きを行った。その後、7 日間 (28°C, 16 時間明/ 8 時間暗) 栽培した植物から根を切り出して各処理を施した。 NO 供与剤として S-nitroso-N-acetyl-D, L-penicillamine (SNAP) を、NO 除去剤として cPTIO を使用した。各処理として、1 mM SNAP または 1 mM SNAP と 1 mM cPTIO の混合液、または 1mM cPTIO のみを含む蒸留水 5 mL で湿らせた濾紙の間に、切り出した 7 dpg のダイズの根をはさみ、暗所にて室温で 12 時間静置した。対照区には 5 mL の蒸留水を使用した。12 時間後、全 RNA 抽出用の試料として、根を液体窒素ですばやく凍結した。この実験では、根粒菌 USDA110 は接種しなかった。

### 3-2-4 全 RNA の抽出と qRT-PCR による植物ヘモグロビン遺伝子の発現解析

全 RNA は、Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogen BioTek Corporation)

を用いて 100 $\mu$ L の RNase フリーの水に抽出した。抽出溶液全量に対して 2unit/ $\mu$ L RT-grade DNase (株式会社ニッポン・ジーン)を 1  $\mu$ L と 40 unit/ $\mu$ L Recombinant RNase Inhibitor (タカラバイオ株式会社)を 0.1  $\mu$ L 加え 30 分 37 °C で静置したのち、3M 酢酸ナトリウム 5  $\mu$ L と 100 % イソプロパノール 400  $\mu$ L を加え 15,000 rpm で 30 分遠心分離し全 RNA を沈殿させた。上澄を除いたのち沈殿に 70 % エタノール 1 mL を加え洗浄した。その後、沈殿を 50  $\mu$ L RNase フリーの水に溶解した。

qRT-PCR には、根、根粒、葉から抽出・精製した全 RNA を 5 ng/ $\mu$ L になるように調整し使用した。One Step TB Green PrimeScript Plus RT-PCR キット (タカラバイオ株式会社) を用いて反応液を 1 well 当たり 18.75 ng の cDNA を含む 15  $\mu$ L とするよう調製し、96 well plate に分注した。qRT-PCR の温度プロファイルは、42° C で 5 分間、95° C で 10 秒間の第一段階と 95° C で 5 秒間、61° C で 30 秒間、72° C で 1 分間を 40~50 回繰り返す第二段階と設定し、Applied Biosystems 7300 realtime PCR system (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)を用いて行った。

得られたデータは 7300 Systems SDS v.1.2.2 software (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) で分析した。内在性コントロールとして *F-BOX* 遺伝子を使用し、それぞれの *GLB* 遺伝子の発現を定量した。それぞれの遺伝子用のプライマーセットは、Primer3 Web v.4.1.0 software (<http://primer3.sourceforge.net/>) をもちいて設計したが、*GLB2* をコードする 4 つの遺伝子については、共通して保存さ

れる領域を認識するユニバーサルプライマーセット一組を設計した。それぞれのプライマーの塩基配列は表 2 に示す。

表 2. qRT-PCRに使用したプライマー

	description	accession mRNA	sequence	
GmGLB1	non-symbiotic hemoglobin	NM_001357481	F	5'-ACAAGGTAAGCCACACAAATGGGA-3'
			R	5'-GTGATTCCAGTGAAAAGTGGATGAGG-3'
GmGLB1-like	non-symbiotic hemoglobin 1-like	NM_001255274	F	5'-GGGTCGTGCTTCCTCGTTGTATGA-3'
			R	5'-TCCGACATAGCAACCCCAATAGCA-3'
GmGLB2	leghemoglobin A	NM_001248999	F	5'-TAATCCTAAGCTCACGGGCCATGCTG-3'
	leghemoglobin C1	NM_001358072		
	leghemoglobin C2	NM_001248319	R	5'-CCTTCTTAATAGCTGCTGCCAATTC-3'
	leghemoglobin C3	NM_001248494		
GmGLB3	2-on-2 hemoglobin	NM_001250415	F	5'-CTGAAGCAGCACCCATGTAAAAACT-3'
			R	5'-TGATGATACCTTATTCGTGTCAACG-3'
GmGLB3-like	uncharacterized LOC100526931	NM_001249232	F	5'-AGTGTGGGGAGATGAAAACGAAGC-3'
			R	5'-TATGCTTACAATCATCAACCTCGTC-3'
F-box	F-box protein SKIP16-like	NM_001254106	F	5'-CTAATGGCAATTGCAGCTC-3'
			R	5'-AGATAGGGAAATTGTGCAGGT-3'

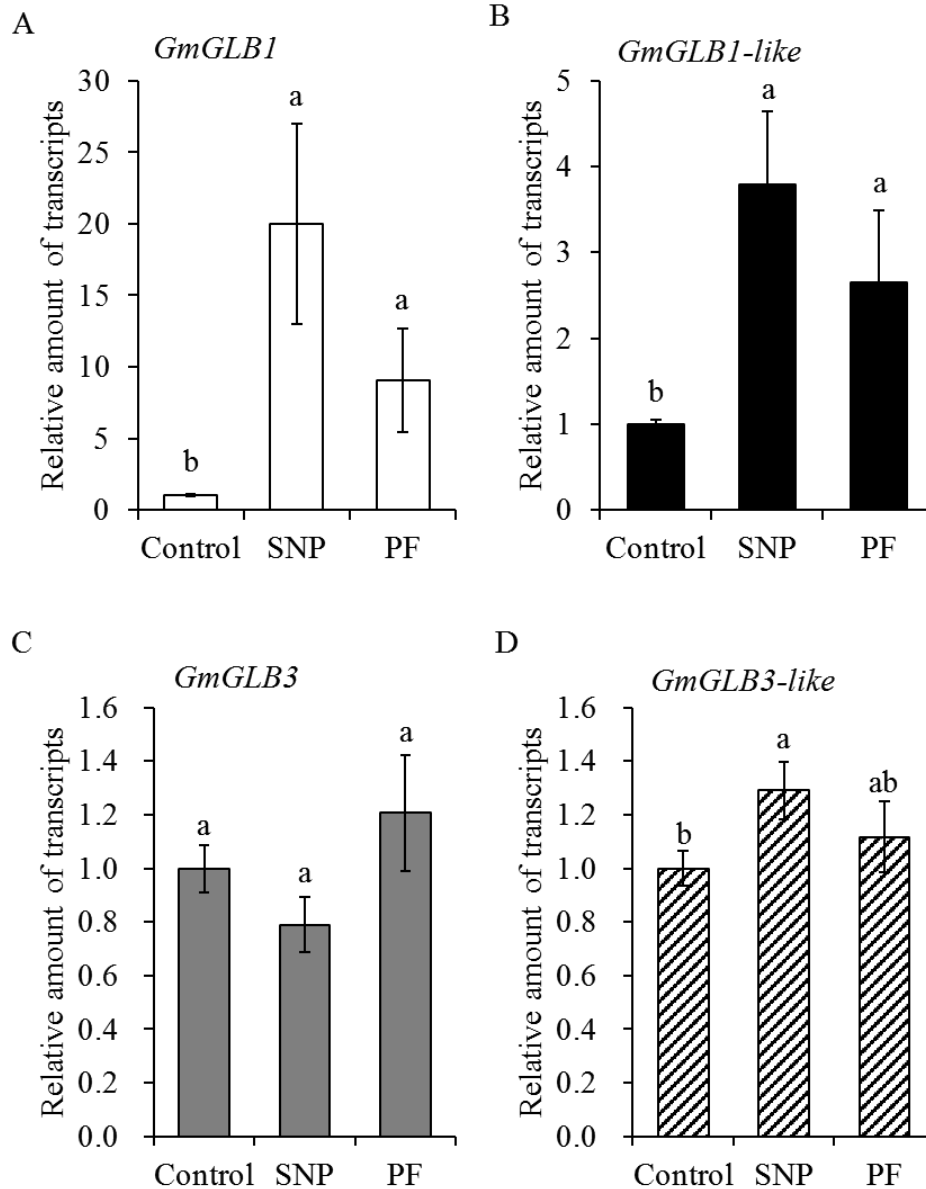
F, forward primer, R, reverse primer

### 3-3 結果

#### 3-3-1 ダイズ植物ヘモグロビン遺伝子の一酸化窒素応答性

SNP と SNAP を NO 供与剤として使用し、*GLB* 遺伝子の発現を測定した (図 7, 8, 9)。 SNP 処理 24 時間後の根では、対照区と比較して有意に *GmGLB1* の発現が誘導された (図 7 A)。*GmGLB1-like* も SNP によって有意に発現が上昇したが、その程度は、*GmGLB1* ほど強くはなかった (図 7 B)。 SNP のアナログである PF によっても *GmGLB1* と *GmGLB1-like* の発現は上昇した。 SNP 処理区の方が PF 処理区よりも高い傾向を示したが、有意差はなかった (図 7 A, B)。*GmGLB3* は、SNP 及び PF に対する発現の応答はみられなかった (図 7 C)。*GmGLB3-like* は、

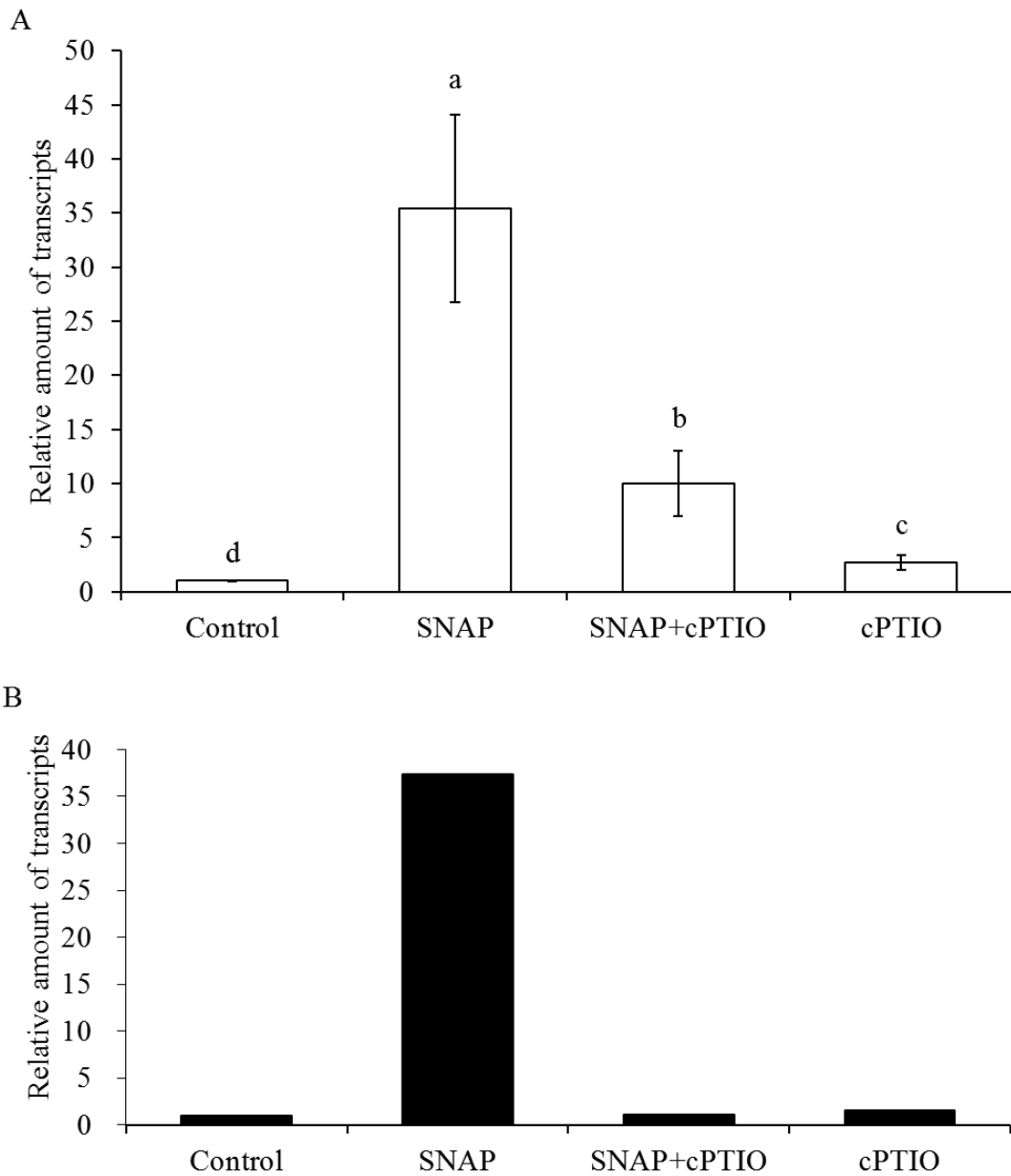
SNPによって、わずかではあるものの有意に発現が上昇した(図7D)。 *GmGLB3-like*のPFに対する応答は、ほとんど見られなかった。



**図7. SNPによるGLB遺伝子の発現誘導**

500  $\mu$ M SNP 100 mL、もしくは、500  $\mu$ M PF 100 mL処理24時間後での根における (A) *GmGLB1*, (B) *GmGLB1-like*, (C) *GmGLB3*, (D) *GmGLB3-like* の発現量を示す。qRT-PCRによって得られた結果について、対照区でのそれぞれの遺伝子の発現を1とした場合の相対的発現量を示す。*F-BOX*遺伝子を内在性コントロールとして使用した。*GmGLB1*と*GmGLB1-like*の値は5回、*GmGLB3*と*GmGLB3-like*の値は4回の独立した実験の平均値  $\pm$  標準誤差で示す(それぞれの実験はn=3)。それぞれのバーの上部に示すアルファベットの小文字が異なる場合、有意差があることを示す(Student's *t*-test \* $P < 0.05$ )。

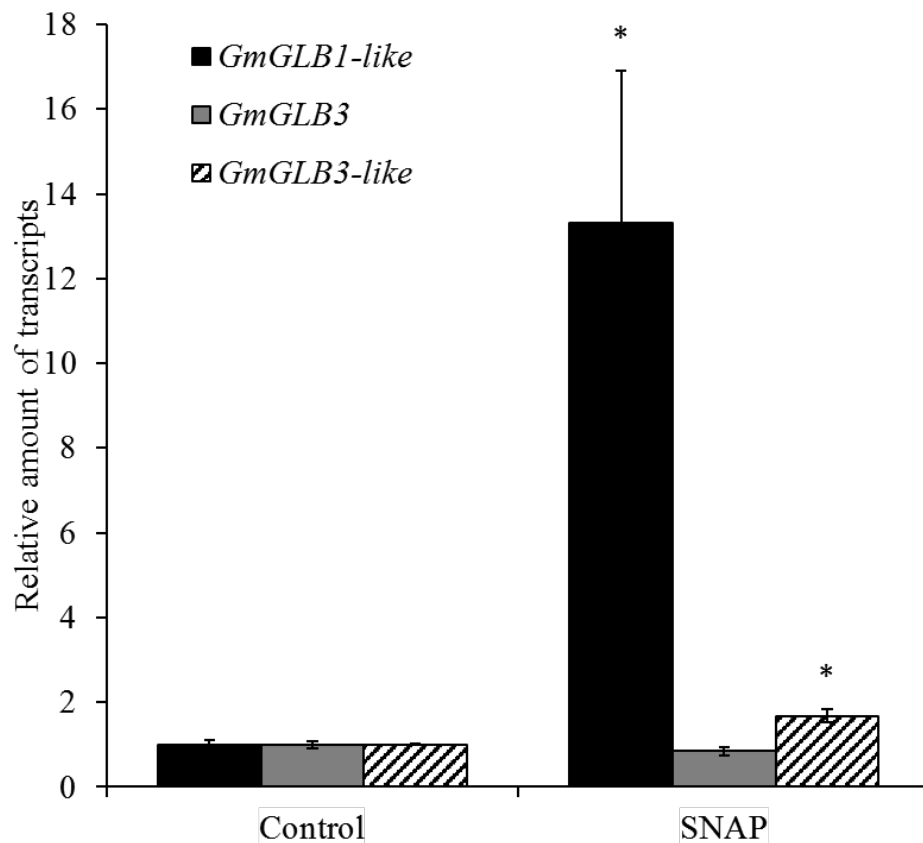
切断した根を 1mM SNAP で 12 時間処理すると、対照区と比較して *GmGLB1*、*GmGLB1-like* の発現が有意に誘導された (図 8 A, 9)。NO 供与剤である SNAP を NO 除去剤である cPTIO と共処理して *GmGLB1* の発現を比較したところ、SNAP 単独処理よりも *GmGLB1* の発現が有意に低かった (図 8 A)。*GmGLB1-like* については、反復実験は実施していないが、SNAP 単独処理よりも cPTIO と SNAP の共処理で発現が低かった (図 8 B)。*GmGLB2* は、いずれの処理でも発現しなかった (data not shown)。*GmGLB3* は、SNAP に対する応答性がまったくみられなかった。*GmGLB3-like* は、SNAP によって、わずかではあるものの有意に発現が上昇した (図 9)。



**図 8. SNAPによる *GLB* 遺伝子の発現誘導**

切断した根を1 mM SNAP と1 mM cPTIOで単独、または、混合処理し、12時間後の発現量を定量した。(A) *GmGLB1*, (B) *GmGLB1-like*. 対照区での遺伝子の発現を1とした場合の相対的発現量を示す。対照区では蒸留水を使用した。*F-BOX*遺伝子を内在性コントロールとして使用した。*GmGLB1*の値は3回の独立した実験の平均値 ± 標準誤差で示す(それぞれの実験はn=3)。それぞれのバーの上部に示すアルファベットの小文字が異なる場合、有意差があることを示す(Student's *t*-test \**P* < 0.05)。*GmGLB1-like*の値は、一回の実験の値を示す(実験はn=1)。





**図 9. SNAPによるGLB 遺伝子の発現誘導**

切断した根を1 mM SNAP と1 mM cPTIOで単独、または、混合処理し、12時間後の発現量を定量した。qRT-PCRによって得られた結果について、対照区での遺伝子の発現を1とした場合の相対的発現量を示す。対照区では蒸留水を使用した。*F-BOX*遺伝子を内在性コントロールとして使用した。値は3回の独立した実験の平均値で示す (n=3)。\*は対照区に対して有意差があることを示す (Student's *t*-test \* $P < 0.05$ )。

### 3-4 考察

NO 応答性の *GLB* 遺伝子を同定するため、SNP と SNAP を NO 供与剤として使用し、それぞれの *GLB* の発現を解析した。SNP によって、*GmGLB1* の発現が誘導された (図 7 A)。*GmGLB1-like* も SNP によって有意に発現が上昇したが、*GmGLB1* ほど強くは誘導されなかった (図 7 B)。SNP は、NO だけでなく、シアン化物と鉄-シアン

化物錯体の両方を生成する (Bethke et al.2006)。そのため、SNP による実験結果だけでは、NO に応答した発現の上昇だとは結論づけられない。そこで、SNP のアナログとして、シアン化物などを生成するが NO は生成しない PF を用いて *GLB* 遺伝子の発現を調べた。PF も対照区と比較して有意に *GmGLB1*、*GmGLB1-like* の発現を誘導し、SNP 処理区と PF 処理区の間には有意差はなかった (図 7 A、B)。このことは、*GmGLB1* と *GmGLB1-like* は NO だけではなく、シアン化物などの副産物に応答していることを示している。従って、SNP と PF を用いた実験だけでは、*GLB* 遺伝子の NO 応答性を判断することはできないと考えた。

次に、SNP とは NO の発生機序が異なる NO 供与剤である SNAP を用いて、*GmGLB1* と *GmGLB1-like* の発現を解析した。SNAP は、NO とジスルフィドを生成する (Singh et al. 1996)。切断した根を 1 mM SNAP で 12 時間処理すると、対照区と比較して *GmGLB1* と *GmGLB1-like* の発現が有意に誘導された (図 8 A、9)。更に、NO 除去剤である cPTIO と SNAP で共処理し、*GmGLB1* の発現を定量したところ、SNAP 単独処理より発現が有意に低かった (図 8 A)。このことから、*GmGLB1* の発現は明らかに NO によって誘導されることが判明した。*GmGLB1-like* の発現についても、cPTIO と SNAP で共処理したところ、SNAP 単独処理より発現が低いことから (図 8 B)、NO によって誘導されると考えられた。

ダイズと同じマメ科植物であるミヤコグサでは、*GLB1* をコードする *LjGlb1-1* の高

発現系統で根組織内の NO 量が低く (Shimoda et al. 2009)、低発現系統では高い (Fukudome et al. 2016)。 *LjGlb1-1* の発現は、非常に高い NO 応答性を有しており (Shimoda et al. 2005)、植物で NO 量が上昇した際に、NO を調節するフィードバック機構を有していると予想される。 *GmGLB1* と *GmGLB1-like* は *LjGlb1-1* と非常に相性の高いアミノ酸配列を有しており (図 2 A)、 *LjGlb1-1* 同様に NO 調節に働く可能性が高く、また、NO 応答性のある *GmGLB1* や *GmGLB1-like* も *LjGlb1-1* と同様のフィードバック機構を有しているのではないかと考えられる。 *GmGLB1-like* は、 *GmGLB1* に比べ根での NO 供与剤、特に SNP への応答が低く (図 7 A、 B、 8 A、 9)、根における *GmGLB1-like* の NO 応答性は *GmGLB1* よりも低いことが示唆される。そのため、 *GmGLB1-like* が、根での NO 調節に積極的に関与しているかは不明である。

*GmGLB3* は SNP、 SNAP いずれに対してもまったく応答しなかった (図 7 C、 9) ことから、NO 応答性はないと結論付けた。 *GmGLB3-like* は SNP、 SNAP いずれに対してもわずかではあるが有意に発現が上昇したことから、低いながらも NO 応答性を有していると考えられる。また、他の GLB と比べ *GmGLB3* や *GmGLB3-like* のアミノ酸配列が非常にユニークであり (図 2 B)、機能的にも分化している可能性があるが、発現応答の解析結果だけからは、どのような機能を有するかを議論するには及ばなかった。

これらの結果から、ダイズのゲノム上に存在する GLB をコードする 8 遺伝子のうち、 *GmGLB1* と *GmGLB1-like* に NO に対する発現の応答性があり、また、 *GmGLB1* が、

*GmGLB1-like* より強く応答することが明らかとなった (Araragi et al. 2021)。ダイズにおける NO 制御機構で、GmGLB1 と GmGLB1-like のどちらが中心的役割を果たしているかは、遺伝子の発現応答の解析だけで議論することは困難である。今後は、GmGLB1 と GmGLB1-like の組織におけるタンパク質の存在量、及び、NO との親和性の解析などが重要な課題であろう。

## 第4章：ダイズ植物ヘモグロビン遺伝子の 非生物ストレスに対する発現応答

### 4-1 序論

GLB1 が非生物ストレス条件下で生産される NO の制御に大きくかかわることは、ダイズと同じマメ科植物であるミヤコグサで多数報告されている。ミヤコグサでは、低温や低酸素など NO の上昇がみられる非生物ストレス条件下では、*LjGlb1-1* の発現が上昇する。一方、スクロース添加による浸透圧ストレスのような NO の上昇がみられないストレス条件下では、*LjGlb1-1* の発現は上昇しない (Shimoda et al. 2005)。加えて、*LjGlb1-1* は非常に高い NO 応答性を有していることから (Shimoda et al. 2005)、非生物ストレスに応答した *LjGlb1-1* の発現の上昇は、NO を介すると考えられる。また、*LjGlb1-1* の高発現系統では、組織内の NO 量が低く (Shimoda et al. 2009)、低発現系統では高い (Fukudome et al. 2016) ことから、非生物ストレス条件下で生産される *LjGlb1-1* は、過剰に存在する NO 量を調節すると考えられる。

ダイズでは、GLB1 をコードする遺伝子の一つである *GmGLB1* の発現は、冠水に応答すると報告されている (Valliyodan et al. 2014, Casarotto et al. 2019)。GmGLB1 は *LjGlb1-1* とアミノ酸配列の相同性が高く (図 2 A)、GmGLB1 は、冠水条件下での NO 制御の役割を持つ可能性がある。*GmGLB1* とは異なるクレードに属する *GmGLB3* の

発現も冠水によって上昇することが報告されており (Lee et al. 2004)、冠水などの非生物ストレスにダイズの *GLB* 遺伝子が広く応答し、植物ホルモンなどと協調して働いている可能性がある。しかしながら、ダイズの *GLB* 遺伝子について、非生物ストレスに対する応答を網羅的に解析した事例はなく、その役割についても明らかではない。

耐塩性の植物であるベンケイソウでは、塩ストレスによって NO が生産される。NO は  $\text{Ca}^{2+}$  流入を促進し、 $\text{Ca}^{2+}$  の流入は  $\text{Na}^+$  排出の促進と  $\text{K}^+$  排出を抑制することでイオンバランスを変化させる (Chen et al. 2019)。シロイヌナズナでも、塩ストレスによって過剰に NO が生産される。シロイヌナズナでは、塩ストレスに応答して過剰に生産された NO が、オーキシンを介して根端分裂組織を減少させ、その結果、根の生長が阻害される (Liu et al. 2015) しかし、すべての非生物ストレス条件下で、NO 量の上昇がみられるわけではない。例えば、ダイズでは、塩ストレスに応答した NO 生産は見られないとの報告 (Kataria et al. 2020) がある。イオンバランスについて、ダイズは高塩条件下で、根組織での  $\text{Na}^+$  および  $\text{Cl}^-$  濃度の増加がみられる (Umezawa et al. 2000)。冠水感受性のダイズ品種ではこの傾向が強く、高塩処理によって塩感受性の低い品種より  $\text{Na}^+$  や  $\text{Cl}^-$  の含有量が高くなり、 $\text{K}^+$  の含有量が低くなる (Liu et al. 2017)。現在のところ、NO が生産されない非生物ストレスに対して、ダイズの *GLB* が応答するかどうかという報告はない。そこで、本章では、ダイズに対して NO を生産を誘導する非生物ストレスである「冠水」と NO を生産を誘導しない非生物ストレスとして「塩」を用いて、

*GLB* 遺伝子の発現を網羅的に解析し、それぞれの遺伝子の非生物ストレスへの応答性や、各組織での発現プロファイルと合わせて役割について議論した。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 使用したダイズ品種と根粒菌株

実験には *Glycine max* cv. 'Fukuyutaka' を使用した。ゲノム配列が明らかになっている *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 (Kaneko et al. 2002) を共生根粒菌として使用した。根粒菌 USDA110 は、yeast-mannitol 培地 (Keele et al. 1969) で7日間培養した。培養菌体を遠心洗浄後、蒸留水に  $1 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup> となるように希釈した菌体懸濁液を調製し、ダイズに接種した。

### 4-2-2 長期塩処理

2-2-1 のようにして準備した実生に対して、塩を処理して10日間 (28°C, 16時間明 / 8時間暗) 栽培したのち、それぞれ葉と根について生重量を測定した。塩として、0 dpg で300 mL の NaCl 溶液 (5 mM または 50 mM になるように NaCl を SS に溶解) を Leonardo jar に加え10日間栽培した。300 mL の SS を 0 dpg に加え10日間栽培したものを対照区とした。この実験では、根粒菌 USDA110 は接種しなかった。

#### 4-2-3 塩ストレス条件下での一酸化窒素量の測定

2 L の蒸留水を吸水させたバーミキュライトを充填したトレイ（幅 37 cm×長さ 26 cm×奥行き 5 cm）に 200 粒の種子を播種した。播種後 5 日または 6 日の実生を、300 mL の SS を吸水させたバーミキュライトで充填した 6 つの Leonardo jar に移植（6 実生/Leonardo jar）した。13 日間または 14 日間（28°C, 16 時間明/8 時間暗）栽培したのち、塩処理した。Leonardo jar に 50 mM NaCl（SS に溶解）を 100 mL 加えて、塩処理とした。対照区には、100 mL の SS を与えた。各処理の 3 時間、6 時間、または 24 時間後に、100 mL の蒸留水を Leonardo jar に通し、浸出液を回収した。10  $\mu$ L の浸出液に 10  $\mu$ L の DAR-4M（蒸留水で 1 : 500 に希釈）を加え、蛍光強度を測定した。混合液の蛍光強度はマイクロ蛍光分光光度計 ES-2 をもちい、excitation は 560 nm、emission は 575 nm で測定した。根の乾燥重量あたりの相対蛍光強度を放出 NO 量とした。この実験では、根粒菌 USDA110 は接種しなかった。

#### 4-2-4 短期冠水処理及び塩ストレス処理

2-2-1 に示したようにダイズの種子を殺菌、播種、間引きを行った。その後、9 日間（28°C, 16 時間明/8 時間暗）栽培したのち、冠水、もしくは塩処理し 24 時間（28°C で 16 時間明/8 時間暗）栽培した。冠水処理として、SS で満たした容器に根が完全に沈むように Leonardo jar を静置した。塩処理として、50 mM NaCl 100 mL（SS に



溶解)を Leonardo jar に加えた。対照区には 100 mL の SS を与えた。24 時間後、全 RNA 抽出用の試料として、根を液体窒素ですばやく凍結した。得られた根より、3-2-4 に示す方法で全 RNA を抽出し、qRT-PCR にて標的遺伝子の発現量を定量した。この実験では、根粒菌 USDA110 接種しなかった。

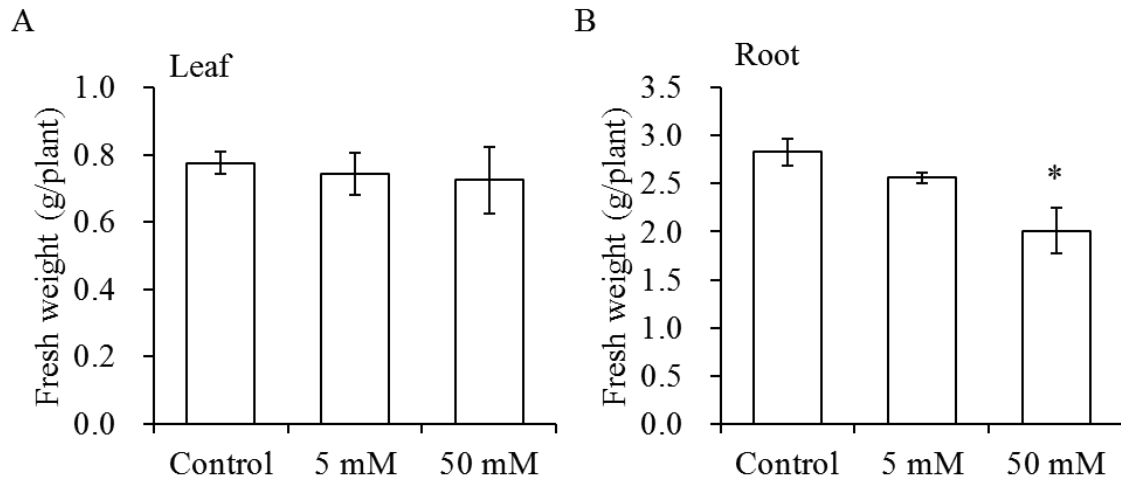
#### 4-2-5 根粒菌の接種

2-2-1 に示したようにダイズの種子を殺菌、播種した直後に、4-2-1 に示すように調製した菌体懸濁液 10 mL を接種した。0 dpv で Leonardo jar1 個に 1 個体となるように実生を間引いた。その後 4 週間 (28°C で 16 時間明/ 8 時間暗) 栽培した。根粒、根、及び、葉をそれぞれ分離してサンプリングし、液体窒素ですばやく凍結して保存した。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 塩による生重量の変化

塩 (5 mM または 50 mM NaCl) 処理 10 日後、葉と根の生重量を測定した。塩処理した葉と対照区の葉との間には、有意な生重量の差は見られなかった (図 10A)。しかしながら、塩処理 (50 mM NaCl) した根では、生重量が対照区と比べ有意に減少した (図 10B)。



**図10. 塩ストレス条件下での植物の生長**

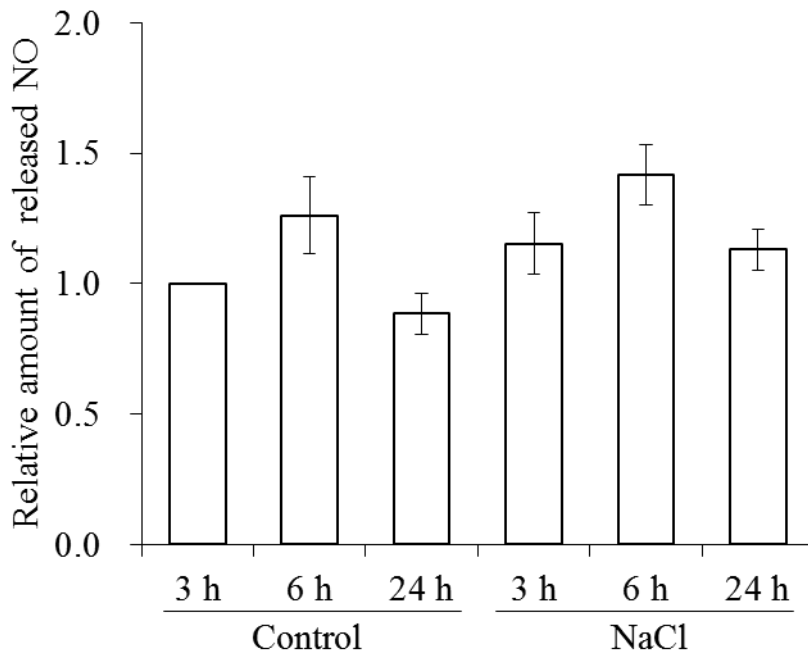
塩 (NaCl) 処理して10日間栽培した葉(A)と根(B)の生重量を測定した。値は3回の独立した実験の平均値 ± 標準誤差で示す (それぞれの実験はn=3)。\*は対照区に対して有意差があることを示す (Student's *t*-test \**P* < 0.05)。

#### 4-3-2 塩による一酸化窒素量の変化

3 時間、6 時間、24 時間の塩 (50 mM NaCl) 処理後、NO 特異的蛍光試薬 DAR-4M

によって、根から放出されたNO量を測定した。すべての測定点で、対照区と比較し

て、塩処理した根の放出NO量に有意な差はなかった (図11)



**図 11. 塩ストレス条件下での根からの放出NO量**

塩処理3時間、6時間、24時間後の根から放出されるNO量を示す。塩処理にはSSに溶解した50 mM NaCl溶液100 mLを使用した。値は3回の独立した実験の平均値 ± 標準誤差で示す（それぞれの実験はn=1）。同じ処理時間の対象区と塩処理区の間では、有意差は見られなかった (Student's *t*-test \**P* < 0.05)。

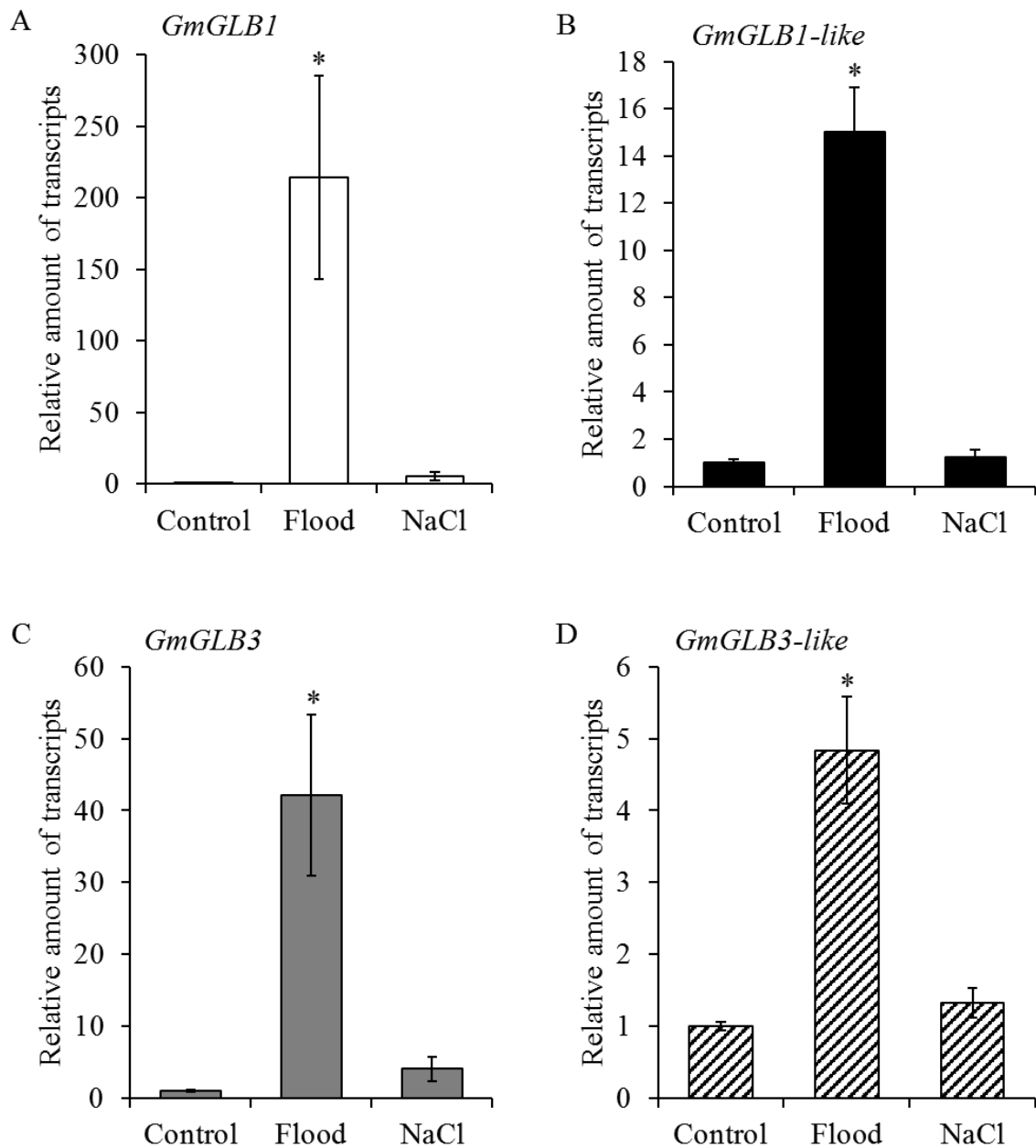
#### 4-3-3 ダイズ植物ヘモグロビン遺伝子の冠水及び塩ストレスへの応答性

9 dpv ダイズ根に対して、冠水もしくは塩処理を 24 時間施し、各 *GLB* 遺伝子の発現を定量した。冠水では、すべての *GLB1* と *GLB3* 遺伝子の発現が有意に上昇した (図 1 2)。塩として 50 mM NaCl で処理したが、いずれの *GLB* 遺伝子の発現も変化しなかった (図 1 2)。根粒特異的に発現する遺伝子である *GmGLB2* は冠水、塩、

対照区のいずれの根においても発現していなかった (data not shown)。

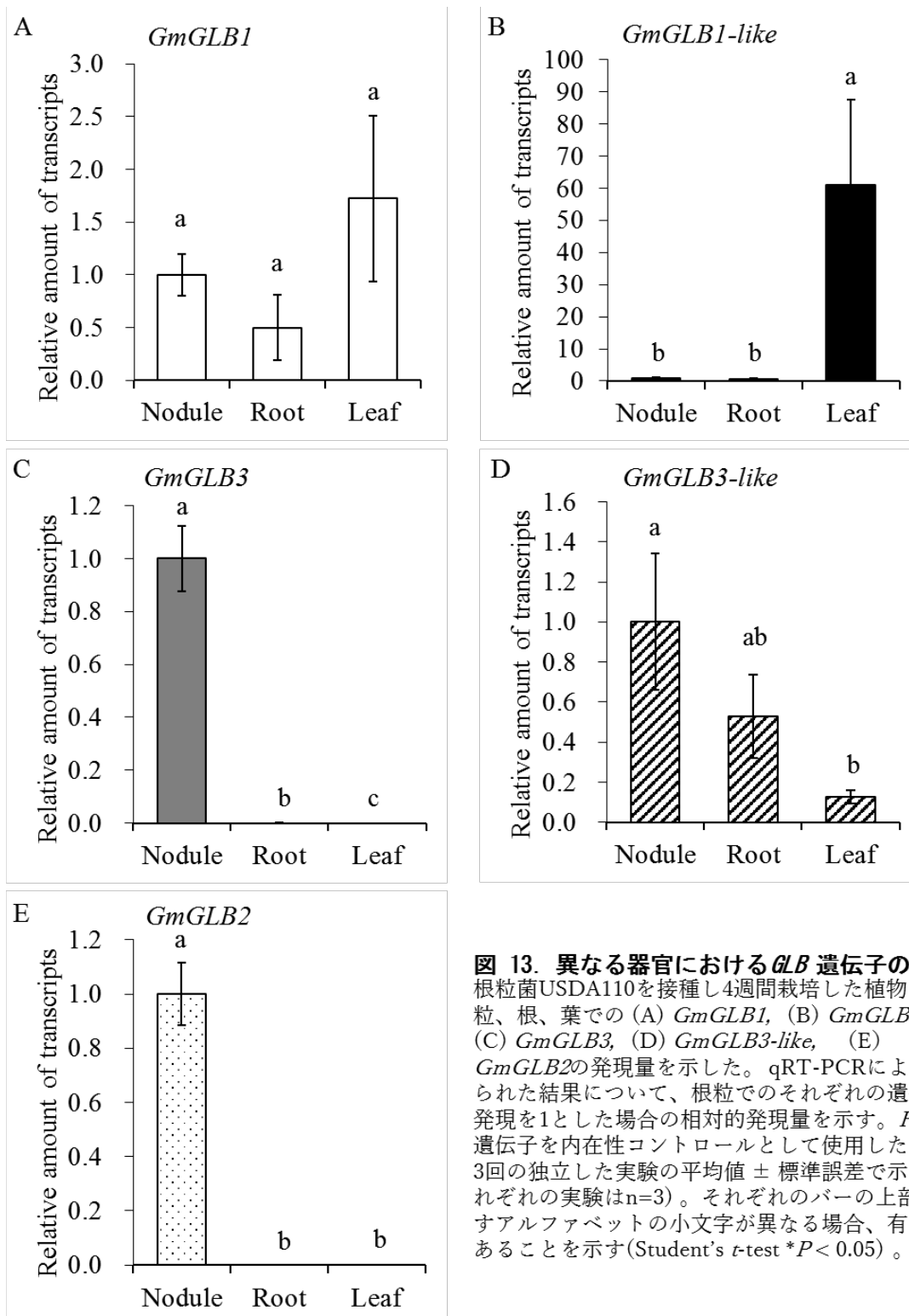
#### 4-3-4 ダイズ植物ヘモグロビン遺伝子の組織特異的発現

根粒菌接種後 4 週後の根粒、根、葉での各 *GLB* 遺伝子の発現を定量した。*GmGLB1* は、全ての組織で不偏的に発現していた (図 1 3 A)。*GmGLB1-like* は、葉で有意に高く発現していた (図 1 3 B)。*GmGLB3* は根粒で、*GmGLB3-like* は根粒と根で、有意に高く発現していた (図 1 3 C, D)。*GmGLB2* は根粒でのみ、強く発現していた (図 1 3 E)。



**図 12. 塩と冠水による *GLB* 遺伝子の発現誘導**

冠水もしくは塩処理24時間での根における発現量を示す。(A) *GmGLB1*, (B) *GmGLB1-like*, (C) *GmGLB3*, (D) *GmGLB3-like*. 根系を完全にSSに沈めて冠水処理とした。塩ストレスにはSSに溶解した50 mM NaCl溶液100 mLを使用した。qRT-PCRによって得られた結果について、対照区でのそれぞれの遺伝子の発現を1とした場合の相対的発現量を示す。*F-BOX*遺伝子を内在性コントロールとして使用した。値は3回の独立した実験の平均値 ± 標準誤差で示す(それぞれの実験はn=3)。\*は対照区とそれぞれの処理区の間有意差があることを示す(Student's *t*-test  $P < 0.05$ )。



**図 13. 異なる器官における *GLB* 遺伝子の発現**  
 根粒菌USDA110を接種し4週間栽培した植物の根粒、根、葉での (A) *GmGLB1*, (B) *GmGLB1-like*, (C) *GmGLB3*, (D) *GmGLB3-like*, (E) *GmGLB2*の発現量を示した。qRT-PCRによって得られた結果について、根粒でのそれぞれの遺伝子の発現を1とした場合の相対的発現量を示す。*F-BOX* 遺伝子を内在性コントロールとして使用した。値は3回の独立した実験の平均値 ± 標準誤差で示す(それぞれの実験はn=3)。それぞれのバーの上部に示すアルファベットの小文字が異なる場合、有意差があることを示す(Student's *t*-test \**P* < 0.05)。

#### 4-4 考察

Valliyodan らの報告 (Valliyodan et al. 2014) と同様に、*GmGLB1* の発現は、冠水によって強く誘導された (図 1 2 A)。*GmGLB1* が NO 応答性を有していた (図 7 A, 8 A) ことと考え合わせると、*GmGLB1* は、冠水条件下で NO を介して誘導されるのだろうと考えられる。同じく NO 応答性のある *GLB1* であるミヤコグサの *LjGlb1-1* (Shimoda et al. 2005, Shimoda et al. 2009, Fukudome et al. 2016) と同様に、ダイズの *GmGLB1* も、NO の上昇を伴う冠水のような非生物ストレス条件下で、NO 制御に働く可能性が期待される (Araragi et al. 2021)。加えて、*GmGLB1* の発現は、根、葉、根粒に普遍的であること (図 1 3 A) から、様々な組織で NO 制御に関与している可能性がある (Araragi et al. 2021)。

冠水は、*GmGLB1-like* の発現も誘導したが、*GmGLB1* ほど強くは誘導されなかった (図 1 2 B)。これは、根での *GmGLB1-like* の NO 応答性が *GmGLB1* よりも低いためであろう (図 8 B, 9)。*GmGLB1-like* は、葉での発現が非常に高いことから (図 1 3 B) 主に葉で機能していることが予想される。それぞれ *GmGLB1*、*GmGLB1-like* がコードするタンパク質の存在量と NO との親和性は明らかではないものの、*GmGLB1-like* の根での NO 制御に果たす役割は、*GmGLB1* 程ではないのかもしれない。むしろ、*GmGLB1-like* は NO によって引き起こされる葉での変化に深く関与しているのかもしれない。例えば、葉では、気孔の開閉に NO が関与していることが知られている。非生

物ストレスである UV や高濃度の二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>)、植物ホルモンであるアブシシン酸(ABA)やジャスモン酸(JA)によって NO の生産は上昇する (Neill et al. 2002, He et al. 2005, Liu et al. 2005, Kolla and Raghavendra 2007)。UV、CO<sub>2</sub>、ABA、JA は、NO だけでなく、活性酸素種 (ROS) の生産も誘導する (Zhang et al. 2001, Desikan et al. 2004, She et al. 2004, Suhita et al. 2004, He et al. 2005, Kolla et al. 2007)。ROS は亜硝酸や NO と反応して活性窒素種(RNS)を形成する (van der Vliet et al. 1997)。更に、この RNS が、cGMP をニトロ化し 8-nitro-cGMP を生産すると考えられている (Yermilov et al. 1995, Sawa et al. 2007)。cGMP が暗所で気孔の開放に働く一方、8-nitro-cGMP は明所で気孔の閉鎖に働く (Joudoi et al. 2013)。つまり、非生物ストレスや植物ホルモンによって葉での NO 量が上昇すると、cGMP のニトロ化を介して明所でも気孔が閉鎖するということが考えられる。GmGLB1-like は、葉で NO 量を調節することで、明所で気孔が閉鎖しないようにする役割を持っているのかもしれない。今後は、GLB 遺伝子の発現と光との関係、あるいは、概日リズムとの関係を検討することも必要であろう。

*GmGLB3* と *GmGLB3-like* も冠水によって発現が上昇した (図 1 2 C, D)。特に、Lee らが既に報告 (Lee et al. 2004) しているように、*GmGLB3* は強く発現が誘導された (図 1 2 C)。しかしながら、*GmGLB3* は NO 応答性が全くない (図 7 C, 9) ことから、*GLB* 遺伝子を誘導する要因は NO だけでなく、NO 以外の要因が存在していることを示唆している。マメ科植物では *GLB3* の発現が、根粒に限られていることは、既



に知られている (Lee et al. 2004, Bustos-Sanmamed et al. 2011)。本研究でも、ダイズの GLB3 遺伝子である *GmGLB3* の発現は、根粒でのみ強い発現が検出された (図 1 3 C)。Leghemoglobin (Lb) をコードしている *GmGLB2* もまた、その発現は根粒特異的であった (図 1 3 E)。Lb は、酸素との高い親和性を持ち根粒内での酸素分圧を調節し、酸素によるニトロゲナーゼ活性の低下を阻止している (Appleby 1992)。冠水条件下のダイズでは、地表付近の茎に二次通気組織や不定根が形成され、中心柱や皮層が肥大して空気の通り道ができる (Valliyodan et al. 2014) ことから、根系が低酸素状態になっていると考えられる。すなわち、根粒の内部組織も冠水条件下の根の組織も低酸素条件にさらされていることを考慮すると、*GmGLB3* は、低酸素条件下で酸素分圧の調節に関与しているのかもしれない。いずれにしても、*GmGLB3* が何に応答して冠水条件下で発現が誘導されたのかについては不明ではあるが、根粒の生長段階で強く発現し、細胞分裂を促進する植物ホルモンであるカイネチンにも応答する (Lee et al. 2004) ことを考慮すると、すくなくとも根粒の生長に関する役割を担っていることが示唆される。しかしながら、これらダイズの GLB の機能をさらに理解するには、各組織でそれぞれの *GLB* 遺伝子が何に応答するのか、また、コードするタンパク質の存在量、さらには、酸素や NO との親和性などの生化学的特性を明らかにする必要がある (Araragi et al. 2021)。

塩は *GmGLB1* を含むすべての *GLB* 遺伝子の発現を誘導しなかった (図 1 2) こと

から、ダイズでは、塩ストレスに対する応答には、GLB は関与しないのだろうと考えられる (Araragi et al. 2021)。しかしながら、ベンケイソウでは、NO が  $\text{Ca}^{2+}$  流入を促進し、 $\text{Ca}^{2+}$  の流入は  $\text{Na}^{+}$  排出を促進して  $\text{K}^{+}$  排出を抑制することでイオンバランスを変化させ、塩に対する感受性を低く保っている (Chen et al. 2019)。ダイズにおいても、塩感受性の低い品種は  $\text{Na}^{+}$  を低く、また、 $\text{K}^{+}$  を高くすることで、感受性を低く保っていると考えられている (Liu et al. 2017)。ダイズでは、塩ストレスに応答して発現が上昇する *GLB* 遺伝子は存在しないが、*GLB* 遺伝子の発現量を人為的に調節することで NO 量を増加させ、塩耐性を獲得した品種を開発できる可能性もある。

## 第 5 章: 総括

ダイズは、世界の食糧安全保障を牽引する重要な作物である。しかしながら、ダイズの生産は、環境の変化の影響を受けやすい。将来の人口増加に備えて、安定したダイズ生産体制を構築するためには、非生物ストレスに対する耐性をもつダイズ品種の作出や栽培方法の確立が必須である。

多くの植物で、非生物ストレスが NO の生産を誘導する (Shimoda et al. 2005, Benamar et al. 2008, Hebelstrup et al. 2012, Liu et al. 2015, Fukudome et al. 2019b)。NO は、植物の生長の様々な段階でシグナル分子としての役割を持つこと (Simontacchi et al. 2015)、細胞内で非特異的にタンパク質を修飾すること (Del Río 2015) から、非生物ストレス条件下での過剰な NO の生産は、植物の生長を阻害する。そのため、非生物ストレス耐性の獲得には、NO 生産あるいは NO 量を調節する必要がある。

NO 調節への関与が報告されている植物の遺伝子として、植物ヘモグロビン遺伝子 (*GLB*) がある (Shimoda et al. 2005, 2009, Hebelstrup et al. 2012, Fukudome et al. 2016)。ダイズのゲノム上には *GmGLB1* を含め 8 つの *GLB* 遺伝子が同定されている。本研究では、それぞれの *GLB* 遺伝子の発現について、NO に対する応答性、及び、非生物ストレスに対する応答性を明らかにし、いずれの遺伝子が NO 調節に関与するの

かを議論した (図14)。

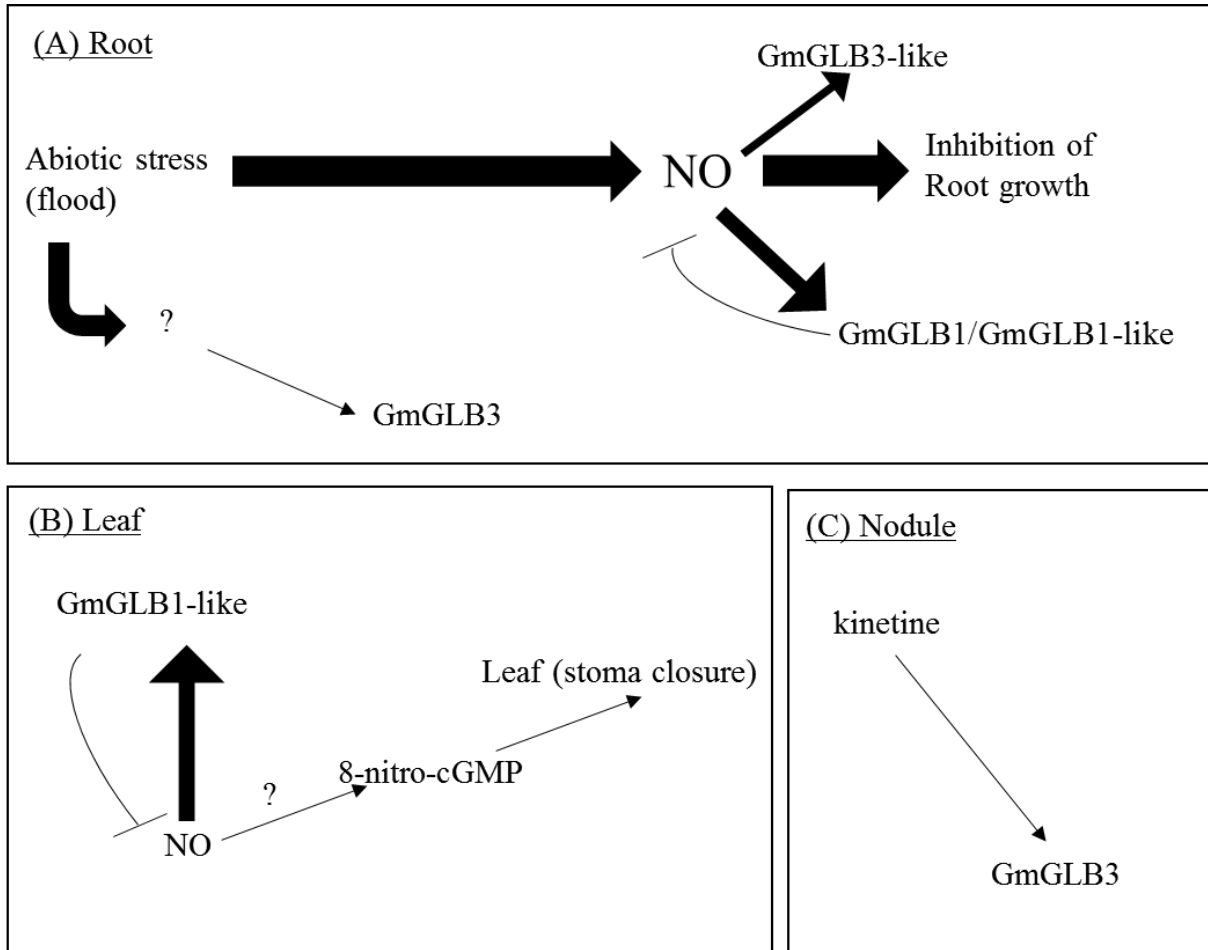


図14. ダイズGLB1とGLB3の応答性に関する概要

(A) 根での発現応答。冠水条件下では、*GmGLB1*と*GmGLB1-like*はNOを介して誘導される。*GmGLB1*と*GmGLB1-like*は冠水に限らず、NO調節に働くと考えられる。*GmGLB3*と*GmGLB3-like*も冠水によって誘導された。*GmGLB3-like*もNOを介して誘導されると考えられるが、*GmGLB3*の誘導経路は、NOを介さないと考えられる。冠水条件下の根での*GmGLB3*や*GmGLB3-like*の役割は不明である。(B) 葉での発現応答。NO応答性遺伝子である*GmGLB1-like*は葉での発現が非常に高く、葉でNOが関与するイベント、例えば、気孔の開閉などに関与していると考えられる。(C) 根粒での発現応答。根粒では*GmGLB3*の発現が非常に高く、カイネチンに応答することから、根粒の発達に関与していると考えられる。

ダイズの 8 つの *GLB* 遺伝子の中で、*GmGLB1*、*GmGLB1-like* は、NO によって発現が誘導され、加えて、冠水によっても誘導された。このことから、*GmGLB1* と *GmGLB1-like* は、冠水条件下で低酸素応答の一環として植物によって生産された NO を介して発現が誘導されたものと考えられ、ダイズの NO 調節に関与している可能性が高いことが判明した (図 1 4 A)。特に、NO 応答性が高く、冠水によって非常に強く誘導された *GmGLB1* は、冠水条件下の根における NO の制御で、大きな役割を持つということが示唆された (Araragi et al. 2021)。一方、*GmGLB1-like* の発現は、葉で特に強いことから、*GmGLB1-like* は、冠水によって葉で起こるなんらかのイベントで大きな役割を持つ可能性がある (図 1 4 B)。

冠水では、*GmGLB1* と *GmGLB1-like* 遺伝子だけではなく *GmGLB2* を除くすべての *GLB* 遺伝子の発現が根で誘導された。その中には、NO によってまったく誘導されない *GmGLB3* も含まれていた (図 1 4 A)。つまり、冠水による *GLB* 遺伝子の発現誘導の経路には、NO を介さずに *GmGLB3* を誘導する (もしくは NO と何らかのファクターが協調して *GmGLB3* を誘導する) 経路の存在が予想される。いずれにしても、*GmGLB3* 遺伝子も、冠水において何らかの役割を担っていることが示唆されるが、本研究では、その役割について議論するまでには至らなかった。また、*GmGLB3* の発現が根粒に限定されていることと、根粒の生長段階で強く発現し、細胞分裂を促進する植物ホルモンであるカイネチンにも応答する (Lee et al. 2004) ことから、*GmGLB3* は少

なくとも根粒で機能していると考えられる (図 1 4 C)。GmGLB3 の機能を明らかにするためには、今後、冠水条件下で、*GmGLB3* が何に応答するのかに加え、根粒内での遺伝子発現の変化を明らかにすることが必要であろう。

塩によって発現が誘発される *GLB* 遺伝子はなかったことから、ダイズでは、塩ストレスに対する応答には、*GLB* は関与しないのであろう。現在のところ、ダイズへの塩耐性付与に *GLB* 遺伝子が応用できるかどうかは不明である。しかしながら、ベンケイソウのように、NO 量を増加させることで対塩性を獲得する植物種 (Chen et al. 2019) が存在することを考慮すると、ダイズでも *GLB* による NO 量の調節機能を強化することにより、塩耐性を獲得できる可能性も排除できない。

ミヤコグサと根粒菌の共生では、LjGlb1-1 による NO 量の調節により、根粒の窒素固定活性の増加や根粒の老化の遅延がみられ (Fukudome et al. 2019a)、根粒に冠水耐性を付与することにも成功している (Fukudome et al. 2019b)。ダイズもミヤコグサと同じマメ科植物であり、根粒の形態形成や老化の過程も互いによく似ているので、GmGLB1 によって根粒内 NO 量を調節することができれば、共生能力を向上できる可能性が十分ある。本研究では、GmGLB1 が、ダイズの NO 調節に関与する可能性を提示したが、今後、GmGLB1 が NO 調節で機能することをより明確にすることで、GmGLB1 による非生物ストレス耐性の付与はもちろんのこと、根粒菌とダイズの共生窒素固定系の機能の強化にも応用できると考える。

## 引用文献

Anderson CR, Jensen EO, Llewellyn DJ, Dennis ES, Peacock WJ (1996) A new hemoglobin gene from soybean: a role for hemoglobin in all plants *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5682–5687

Angel S, Parent J, Civco DL, Blei A, Potere D (2011) The dimensions of global urban expansion: estimates and projections for all countries, 2000–2050. *Prog Plan* 75: 53–107

Appleby CA (1992) The origin and function of haemoglobin in plants. *Sci Prog* 76: 365–398

Araragi M, Ikeura A, Uchiumi T (2021) Expression of soybean plant hemoglobin gene family under abiotic stresses *Plant Biotechnol* 38: 1–8

Bustos-Sanmamed P, Tovar-Méndez A, Crespi M, Sato S, Tabata S, Becana M. Regulation of nonsymbiotic and truncated hemoglobin genes of *Lotus japonicus* in plant organs and in response to nitric oxide and hormones. (2011) *New Phytol* 189: 765–76

Benamar A, Rolletschek H, Borisjuk L, Avelange-Macherel MH, Curien G, Mostefai HA, Andriantsitohaina R. Macherel D. (2008) Nitrite–nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia. *Biochim Biophys Acta* 1777: 1268–1275

Bethke PC, Libourel IG, Reinöhl V, Jones RL (2006) Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* 223: 805–12

Casarotto G, Kaspary TE, Cutti L, Thomas AL, Barbosa Neto JF (2019) Expression of genes related to soil flooding tolerance in soybeans. *Acta Sci Agron* 4: e42709

Chen Z, Zhao X, Hu Z, Leng P (2019) Nitric oxide modulating ion balance in *Hylotelephium erythrostictum* roots subjected to NaCl stress based on the analysis of transcriptome, fluorescence, and ion fluxes. *Sci Rep* 9: 18317

Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218: 900–905

Correa-Aragunde N, Lombardo C, Lamattina L (2008) Nitric oxide: an active nitrogen molecule that modulates cellulose synthesis in tomato roots. *New Phytol* 179: 386–396

Del Río LA (2015) ROS and RNS in plant physiology: an overview. *J Exp Bot* 66: 2827–37

Desikan R, Cheung K, Clarke A, Goulding S, Sagi M, Fluhr R, Rock C, Hancock JT, Neill SJ (2004) Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Funct Plant Biol* 31: 913–920

Fernández-Marcos M, Sanz L, Lewis DR, Muday GK, Lorenzo O (2011) Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED1(PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 18506–18511

Fodor N, Challinor A, Drouzas I, Ramirez-Villegas J, Zabel F, Koehler AK, Foyer CH (2017) Integrating plant science and crop modeling: Assessment of the impact of climate change on soybean and maize production. *Plant Cell Physiol*. 58: 1833-1847

Fukudome M, Calvo-Begueria L, Kado T, Osuki K, Rubio MC, Murakami E, Nagata M, Kucho K, Sandal N, Stougaard J, Becana M, Uchiumi T (2016) Hemoglobin LjGlb1-1 is involved in nodulation and regulates the level of nitric oxide in the *Lotus japonicus*-*Mesorhizobium loti* symbiosis. *J Exp Bot* 67: 5275–5283.

Fukudome M, Watanabe E, Osuki KI, Imaizumi R, Aoki T, Becana M, Uchiumi T (2019a) Stably transformed *Lotus japonicus* plants overexpressing phytohemoglobin LjGlb1-1 show decreased nitric oxide levels in roots and nodules as well as delayed nodule senescence. *Plant Cell Physiol* 60: 816–825



Fukudome M, Watanabe E, Osuki KI, Uchi N, Uchiumi T (2019b) Ectopic or over-expression of class 1 phytohemoglobin genes confers flooding tolerance to the root nodules of *Lotus japonicus* by scavenging nitric oxide. *Antioxidants* 8: 206

He JM, Xu H, She XP, Song XG, Zhao WM (2005) The role and the interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B-induced stomatal closure in broad bean. *Funct Plant Biol* 32: 237–247

He Y, Tang R-H, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei ZM (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305: 1968–1971

Hebelstrup KH, van Zanten M, Mandon J, Voeselek LA, Harren FJ, Cristescu SM, Møller IM, Mur LA (2012) Haemoglobin modulates NO emission and hyponasty under hypoxia-related stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 63: 5581–5591

Hill RD (1998) What are hemoglobins doing in plants? *Can J Bot* 76: 707–712.

Hunt PW, Watts RA, Trevaskis B, Llewelyn DJ, Burnell J, Dennis ES, Peacock WJ (2001) Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants. *Plant Mol Biol* 47: 677–692.

Hyldig-Nielsen JJ, Jensen EO, Paludan K, Wiborg O, Garrett R, Jørgensen P, Marcker KA (1982) The primary structures of two leghemoglobin genes from soybean. *Nucleic Acids Res* 10: 689–701

Joudoi T, Shichiri Y, Kamizono N, Akaike T, Sawa T, Yoshitake J, Yamada N, Iwai S (2013) Nitrated cyclic GMP modulates guard cell signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 558–71

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A,

- Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K et al. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 9: 189–197
- Kataria S, Jain M, Tripathi DK, Singh VP (2020) Involvement of nitrate reductase-dependent nitric oxide production in magnetopriming-induced salt tolerance in soybean. *Physiol Plant* 168: 422–436
- Keele BB, Jr Hamilton PB, Elkan GH (1969) Glucose catabolism in *Rhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 97: 1184–1191.
- Khurana A, Khurana J, Babbar S (2011). Nitric oxide induces flowering in the duckweed *Lemna aequinoctialis* Welw. (Syn. *L. paucicostata* Hegelm.) under noninductive conditions. *J Plant Growth Regul* 30: 378-385
- Kolla VA, Raghavendra AS (2007) Nitric oxide is a signaling intermediate during bicarbonate-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Physiol Plant* 130: 91–98
- Kolla VA, Vavasseur A, Raghavendra AS (2007) Hydrogen peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal closure in abaxial epidermis of *Arabidopsis*. *Planta* 225: 1421–1429
- Kopyra M, Gwózdź EA (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol Biochem* 41: 1011-1017
- Krasuska U, Ciacka K, Andryka-Dudek P, Bogatek R (2015) “Signaling and communication in plants,” in *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants*, eds KJ Gupta and AU Igamberdiev (New York City, NY: Springer International Publishing) 316

Lant C, Stoeber TJ, Schoof JT, Crabb B (2016) The effect of climate change on rural land cover patterns in the Central United States. *Climatic Change* 138: 585–602

Lee H, Kim H, An CS (2004) Cloning and expression analysis of 2-on-2 hemoglobin from soybean. *J Plant Biol* 47: 92–98

Liu H, Song J, Dong L, Wang D, Zhang S, Liu J (2017) Physiological responses of three soybean species (*Glycine soja*, *G. gracilis*, and *G. max* cv. Melrose) to salinity stress. *J Plant Res* 130: 723–733

Liu W, Li RJ, Han TT, Cai W, Fu ZW, Lu YT (2015) Salt stress reduces root meristem size by nitric oxide-mediated modulation of auxin accumulation and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 168: 343–356

Liu X, Shi WL, Zhang SQ, Lou CH (2005) Nitric oxide involved in signal transduction of jasmonic acid-induced stomatal closure of *Vicia faba* L. *Chin Sci Bull* 50: 520–525

Lombardo MC, Graziano M, Polacco JC, Lamattina L (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behav* 1: 28–33

Manjunatha G, Lokesh V, Neelwarne B (2010) Nitric oxide in fruit ripening: trends and opportunities. *Biotechnol Adv* 28: 489–499

Masuda T, Goldsmith P (2009) World soybean production: Area harvested, yield, and long-term projections. *Int Food Agribus Man Rev* 12: 143–162

Muis S, Güneralp B, Jongman B, Aerts JC, Ward PJ (2015) Flood risk and adaptation strategies under climate change and urban expansion: A probabilistic analysis using global data. *Sci Total Environ* 538: 445–57

Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* 128: 13–16

Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001537

Pagnussat GC, Lanteri ML, Lombardo MC, Lamattina L (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of amitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol* 135: 279–286

Procházková D, Wilhelmová N (2011) Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. *Nitric Oxide* 24: 61–65

Sawa T, Zaki MH, Okamoto T, Akuta T, Tokutomi Y, Kim-Mitsuyama S, Ihara H, Kobayashi A, Yamamoto M, Fujii S, Arimoto H, Akaike T (2007) Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nat Chem Biol* 3: 727–735

Schmutz J, Cannon S, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, et al. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178–183

Seto KC, Fragkias M, Güneralp B, Reilly MK (2011) A meta-analysis of global urban land expansion. *PLoS One* 6: e23777

She XP, Song XG, He JM (2004) Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in *Vicia faba*. *Acta Bot Sin* 46: 1292–1300.

Shimoda Y, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Sato S, Kato T, Tabata S, Higashi S, Uchiumi T (2005) Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* 46: 99–107

Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Kanamori N, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiumi T (2009) Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant J*57: 254–63

Simontacchi M, Galatro A, Ramos-Artuso F, Santa-María GE (2015) Plant survival in a changing environment: The role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Front Plant Sci*6: 977

Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B (1996) Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 271: 18596–603

Singh SP, Singh Z, Swinny EE (2009) Postharvest nitric oxide fumigation delays fruit ripening and alleviates chilling injury during cold storage of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). *Postharvest Biol Technol*53: 101–108

Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A (2004) Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol*134: 1536–1545

Terrile MC, París R, Calderón-Villalobos LI, Iglesias MJ, Lamattina L, Estelle M, Casalongué CA (2012) Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the *Arabidopsis* transport inhibitor response 1 auxin receptor *Plant J*70: 492–500

Umezawa T, Shimizu K, Kato M, Ueda T (2000) Enhancement of salt tolerance in soybean with NaCl pretreatment. *Physiol Plant* 110: 59–63.

Valliyodan B, Van Toai TT, Alves JD, de Fátima P Goulart P, Lee JD, Fritschi FB, Rahman MA, Islam R, Shannon JG, Nguyen HT (2014) Expression of root-related transcription factors associated with flooding tolerance of soybean (*Glycine max*). *Int J Mol Sci*15: 17622–43

Van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE (1997) Formation of reactive nitrogen

species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 272: 7617–7625

Wang J, Wang Y, Lv Q, Wang L, Du J, Bao F, He YK (2017) Nitric oxide modifies root growth by S-nitrosylation of plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 488: 88–94

Watts RA, Hunt PW, Hvitved AN, Hargrove MS, Peacock WJ, Dennis ES (2001) A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10119–10124.

Wiborg O, Hyldig-Nielsen JJ, Jensen EO, Paludan K, Marcker KA (1982) The nucleotide sequences of two leghemoglobin genes from soybean. *Nucleic Acids Res* 10: 3487–3494

Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B, Ohshima H (1995) Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis* 16: 2045–2050.

Zhang X, Miao YC, An GY, Zhou Y, Shangguan ZP, Gao JF, Song CP (2001) K<sup>+</sup> channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in *Vicia* guard cells. *Cell Res* 11: 195–202

## 謝 辞

本研究の遂行と本論文の取りまとめにあたり、ご指導を賜った鹿児島大学・大学院理工学研究科の内海俊樹教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行と本論文の審査において、数々の御助言と御指導を賜りました鹿児島大学・大学院理工学研究科の九町健一准教授、塔筋弘章准教授、濱田季之准教授に厚くお礼申し上げます。

本研究の議論・検討にあたり、御教示並びに御激励賜りました鹿児島大学名誉教授 東四郎先生に深謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、御助力頂きました研究室の皆さまに感謝申し上げます。