

植物が作る未解明窒素化合物の構造と作用

広島大学大学院理学研究科 教授 森川 弘道

1 研究実施の概要

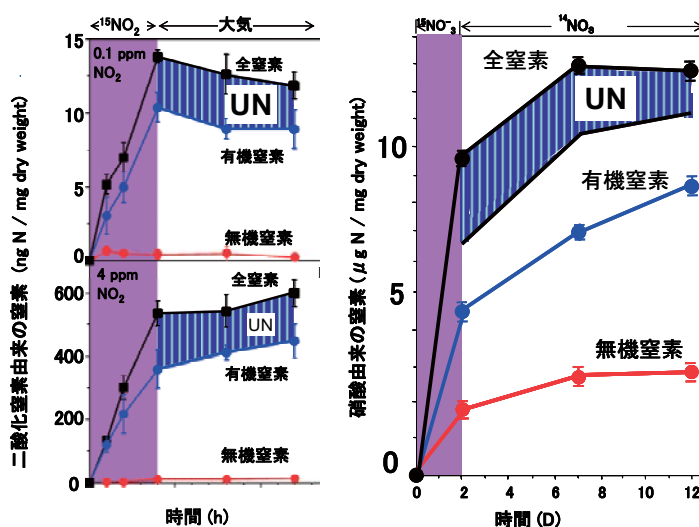
問題の発端：合わない足し算

生体内の全窒素(量)は、教科書の常識では、有機窒素と無機窒素との和で表されるはずである。全窒素は、19世紀のフランス人デュマによって開発された元素分析法であるデュマ法で決定され、有機窒素は、19世紀のドイツ人ケールダールによって開発されたケールダール法で決定される。主な無機窒素は、植物の場合、硝酸であり、亜硝酸やアンモニアは硝酸の二桁またはそれ以下である。我々は、植物における二酸化窒素由来の窒素の代謝的運命を研究する過程で、この「常識」には問題があることを見出した。すなわち、植物に取り込まれた全窒素の約 1/3 は、ケールダール窒素(有機窒素)でも無機窒素でもない、未解明の窒素(unidentified nitrogen, UN)に変換されることを発見した。すなわち、植物を含む生物には、**新規な窒素代謝経路**が存在することが示唆された。

本研究は、「植物が作る未解明窒素化合物の構造と作用」の課題名のもとに、UN 化合物の構造、生成機構、生理作用、分解機構などその全容を解明し、以て、「**新規窒素代謝経路**」の存在を示すことを目的とした。森川、坂本敦、高橋美佐(広島大理)の植物分子生理学グループが、UN 化合物を含む画分を調製・部分精製、鈴木仁美教授(関学大)を中心とする有機化学グループへ提供、構造の解明を進めた。また、藤田耕之輔教授(広島大生物圏)の作物学グループを中心に、作物栽培における UN 生成・生物普遍性の解析を進めた。以下に、本研究の概要を示す。

(1) UN 化合物とはどのような化合物か？

UN 化合物は、「ケールダール法では定量的回収が困難な窒素を含む化合物」である。それはどのようなものか？ケールダール分解法は、窒素分析法としては、「不完全な」方法で、ある種の化合物に含まれる窒素は定量的に回収できないこと、いわゆる分解促進剤(還元剤)を添加すると回収可能であることが知られている。理論的には、この「分解促進剤添加が必要な化合物」が UN 化合物の候補である。その様な化合物とは、別の窒素あるいは 1 個または 2 個の酸素と結合している窒素(例えば、N-N, N=N, N=O, NO₂ 基など)を含む化合物である。ケールダール分解中に、窒素の一部が、N₂ または NO_x などとして損失するためと考えられる。実際、有機ニトロソ、ニトロ化合物のケールダール分解排ガスをアルカリトラップすると、全窒素の最大 20% 近く(NO_x 由来と考えられる)がトラップ中に回収されることが分かった。



合わない足算：シロイヌナズナ葉における未解明窒素の生成
(左図：二酸化窒素処理、右図：硝酸処理)

(2) 二酸化窒素の作る UN

大気中の窒素酸化物(実質的には、NO と NO₂ からなる ; NO_x)は、都市大気の中心的汚染物質で、車が主な発生源であるが、我々は、植物が大気中 NO_x のシンクとなりうると考え、植物による大気中の窒素酸化物の低減除去(ファイトレメディエーション)を研究してきた。具体的には、自然界の植物の二酸化窒素同化能の調査、遺伝子操作した植物の二酸化窒素同化能の調査、NO_x の窒素を唯一の窒素源として生育する“NO_x を好む植物”の開発などを研究した。その結果、街路樹など 217 タクサの二酸化窒素同化能には、657 倍の差異があることを見出した。この原因遺伝子はまだ解明されていない。QTL 解析などの手法で将来解明されるものと考えられる。

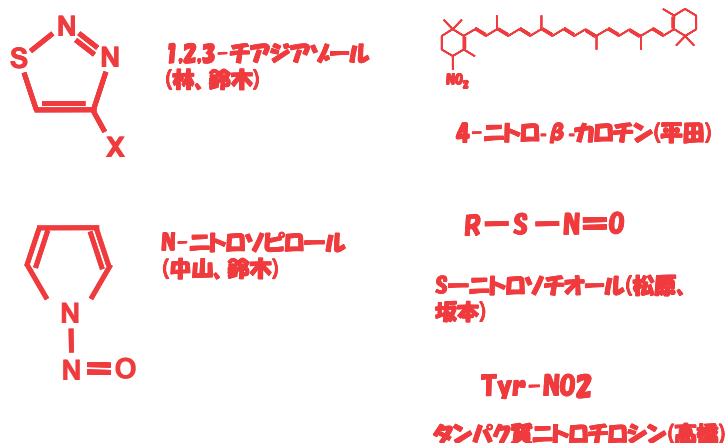
植物体内に取り込まれた NO_x の代謝的運命を調査する目的で、重窒素ラベルした NO₂ をシロイヌナズナなどに取り込ませ、全窒素、ケールダール窒素および無機窒素に分けて元素分析した。その結果、全窒素 = (ケールダール窒素) + (無機窒素) とならず、全窒素の約 1/3 は、ケールダール窒素でも無機窒素でもない、UN となることが初めて分かった(上述参照)。10 種以上の植物で UN が実証された。

(3) 硝酸の作る UN

当初、UN は二酸化窒素に固有のもので、硝酸由来の窒素(代謝が充分理解されており)から UN 生成はありえないと思われていた。高橋らは、野生株タバコと亜硝酸還元酵素遺伝子発現を野生株の 5%以下に抑制した形質転換タバコ(クローン 271)を用いた。クローン 271 は、NO₂ 由来の全窒素の 45%以上が UN となるからである。その結果、野生株もクローン 271 も共に(硝酸塩を与える条件によっては)全窒素の 30%以上が UN となることが分かった。その後シロイヌナズナを含め、種々の植物でも、硝酸由来の窒素から同様に UN が作られることが分かった。さらに、藤田らは、作物や動物も UN を作ることを明らかにし、UN 生成の生物普遍性を提起した。

(4) UN 化合物の構造

鈴木ら中心として、UN を含む化合物(UN 化合物)として、チアジアゾール化合物、ニトロソピロール、ニトロカロチン、ニトロソチオール類が明らかとなり、タンパク質性 UN も存在することも明らかとなった。これらの結果から、UN を生成する新規窒素代



シロイヌナズナ葉で解明された主なUN化合物

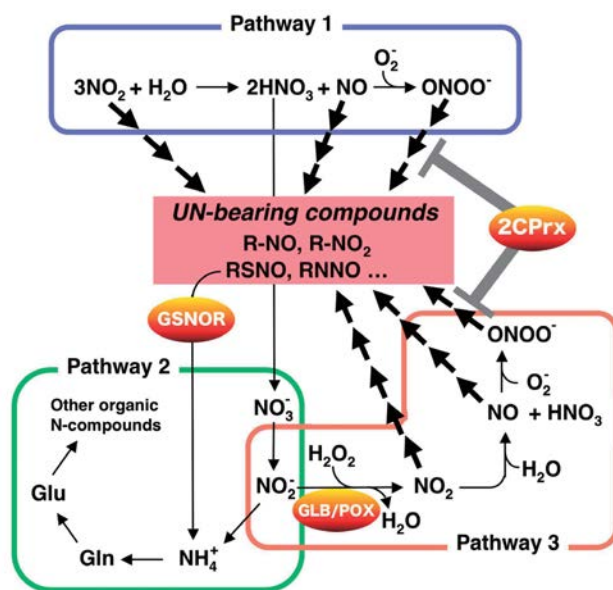
謝経路の存在が示された。また、UN 生成には生物普遍性がある(上述参照)。チアジアゾール誘導体には、SciFinder に掲載されていない新規化合物も含まれていた。チアジアゾール環は、1 個の S、2 個の N、2 個の C からなり(上図参照)、チアジアゾール化合物には、抗炎症剤、抗がん剤などの医薬、増感剤など新素材が知られている。医薬としての作用機構においては、NO シグナル作用との関連が議論されている。また、市販のチアジアゾール農薬として、BTH (1,2,3-Benzothiadiazole-7-carbothioic acid, S-methyl ester; バルティス) や Tiadinil (N-(3-chloro-4-methylphenyl)-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide; 日本農薬; 商品名ブイゲット)が知られている。いずれもいもち病等に対する全身獲得抵抗性(SAR)誘導型「シグナル農薬」である。BTH はサリチル酸アナログである。チアジアゾール環化合物が植物葉の PR1 遺伝子(SAR 誘導マーカー遺伝子)の発現レベルを高めることが分かっている。UN 化合物(少なくとも一部は)は、SAR 誘導(生体防御反応誘導)シグナル活性をもつと考えられる。

(5) UN 生成に関与するタンパク質

坂本らは、シロイヌナズナにおける UN 代謝に関連するタンパク質として、ペルオキシナイトライト還元酵素 (2-Cys ペルオキシレドキシン)、S-ニトロソグルタチオン還元酵素 (GSNOR)、非共生型ヘモグロビン(GLB)、ジャーミン様タンパク質(GLP)、キサントン脱水素酵素 (XDH) の遺伝子のクローニング、生化学的解析を実施し、植物における UN 生成経路、活性窒素(RSNO)代謝および無機窒素同化の間に代謝クロストークが存在することを明らかにした。

(6) UN を生成する新しい窒素代謝系

図に我々が提案している UN を生成する新しい窒素代謝系を示す。Pathway1 の二酸化窒素からの硝酸生成は、工業的硝酸生産法(オストワルド法)の反応式に相当する。同様な反応が植物内外で生ずると考えられる。生成した NO は、スーパーオキシド(O₂) と反応してペルオキシナイトライト(ONOO⁻)を作り、NO₂ 自体、NO、ONOO⁻ が生体成分と反応し、ニトロソ、ニトロ化合物を作るものと考えられる。Pathway 2 は、硝酸還元経路である。硝酸還元経路で生成した亜硝酸は、Pathway 3 で示すとおり細胞内で酸化さ



UN 化合物を生成する新規窒素代謝経路
Morikawa et al. (2004) より一部改変。

れ、NO₂を生成、代謝され NO や ONOO⁻を生成すると考えられる。亜硝酸イオンの酸化は例えば植物の非共生型ヘモグロビンによって触媒されると考えられる。NO 合成酵素の働きで生成した内因性 NO も同様な代謝的運命を辿るものと考えられる。最近我々は、S-ニトロソグルタチオン(GSNO)還元酵素(GSNOR)を過剰発現させると UN レベルが顕著に減少することを見出している。

(7) NO_xの植物バイタリゼーション作用と UN 化合物の作用

高橋らは、“NO_xを好む植物”の研究を契機として、大気中の NO_xは植物の成長、全般的養分吸収の促進、全般的代謝を活性化するシグナル作用をもつことを見出した(「植物バイタリゼーション・シグナル作用」)。植物(*Nicotiana plumbaginifolia*、シロイヌナズナなど)を大気中の NO_x濃度をほぼゼロにした空気(-NO_x区)と NO_x濃度を都市大気の汚染レベル程度に高めた空気(+NO_x区)で栽培(4週間~2.5月)すると、+NO_x区で栽培した植物のバイオマス生産量は、-NO_x区の 1.5-2.0 倍であった。全葉面積、植物当たりの主養分含量(C, N, S, P, K, Ca, Mg)や遊離アミノ酸量および粗タンパク質量は、いずれも +NO_x区が-NO_x区比で、1.5-2.0 倍高かった。さらに、重窒素ラベル NO_x で曝露し、根から N 源として非ラベル硝酸を与えて同期栽培し、植物の窒素分析したところ、NO_x由来の N の全 N に対する貢献度はごく僅か(3~5%)であり、NO_xは N 源としてではなく、シグナルとして作用することが分かった。リアルタイム PCR 解析により、NO₂ 処理は、シロイヌナズナのサイクリン遺伝子、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 遺伝子、エクспанシン遺伝子を活性化することが分かった。連続した NO₂ 曝露の間に植物体内には、何らかの UN 化合物が蓄積しているはずであるが、どの UN 化合物が「バイタリゼーション作用」を担うかはまだ分かっていない。UN 化合物研究は、「合わない足し算」を発端として始まったが、また新たな課題を提供している。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

研究開始時に目指した目標・5年間の研究計画の概要

植物葉を ¹⁵NO₂ で曝露し、全窒素 (TN)、ケールダール窒素 (RN)、無機窒素 (IN) 中の ¹⁵N を測定すると、TN の 20-40% は、RN でもなく IN でもない未説明窒素 (UN と呼ぶ) であった。これまで 10 種の植物 (アラビドプシス、タバコ、ユーカリ、ヒラドツツジ、トベラ、イネ、コムギ、オオムギ、カボチャ、トウモロコシ) について調べたが、全ての植物で同程度の UN 生成が認められた。また、20-50 mM の ¹⁵N 硝酸塩をタバコに与え、同様な解析を行った結果、硝酸由来の全 N の 20-40% が UN となることが分かった。故に、UN を含む化合物 (UN 化合物) の生成は、窒素種や植物種には依存せず、普遍的な N 代謝産物であると考えられる。

植物が作る未説明の窒素メタボライト(UN 化合物と呼ぶ)の構造、生成・分解機構、生理作用を解明し、生物における窒素代謝の新しいパラダイムの提起を目指す。これにより、一酸化窒素(NO)などの活性窒素分子種的作用や硝酸過剰障害の分子機構が解明し、植物の環境修復機能や生産性向上を図る。

基本的には次の3つのサブグループに分けて、研究を進める。

- (1) モデル植物 G: モデル植物を用いた UN 化合物の詳細な分離、分析、精製、生理作用、栽培実験をするグループ(森川 G)
- (2) 有機化学 G: 理論化学的な構造、生成・分解機構の解析をするグループ(鈴木 G)
- (3) 作物 G: 作物における UN 化合物の生成、作物の生産性、品質と UN 化合物との関連の解析(藤田 G)

具体的手法と進め方

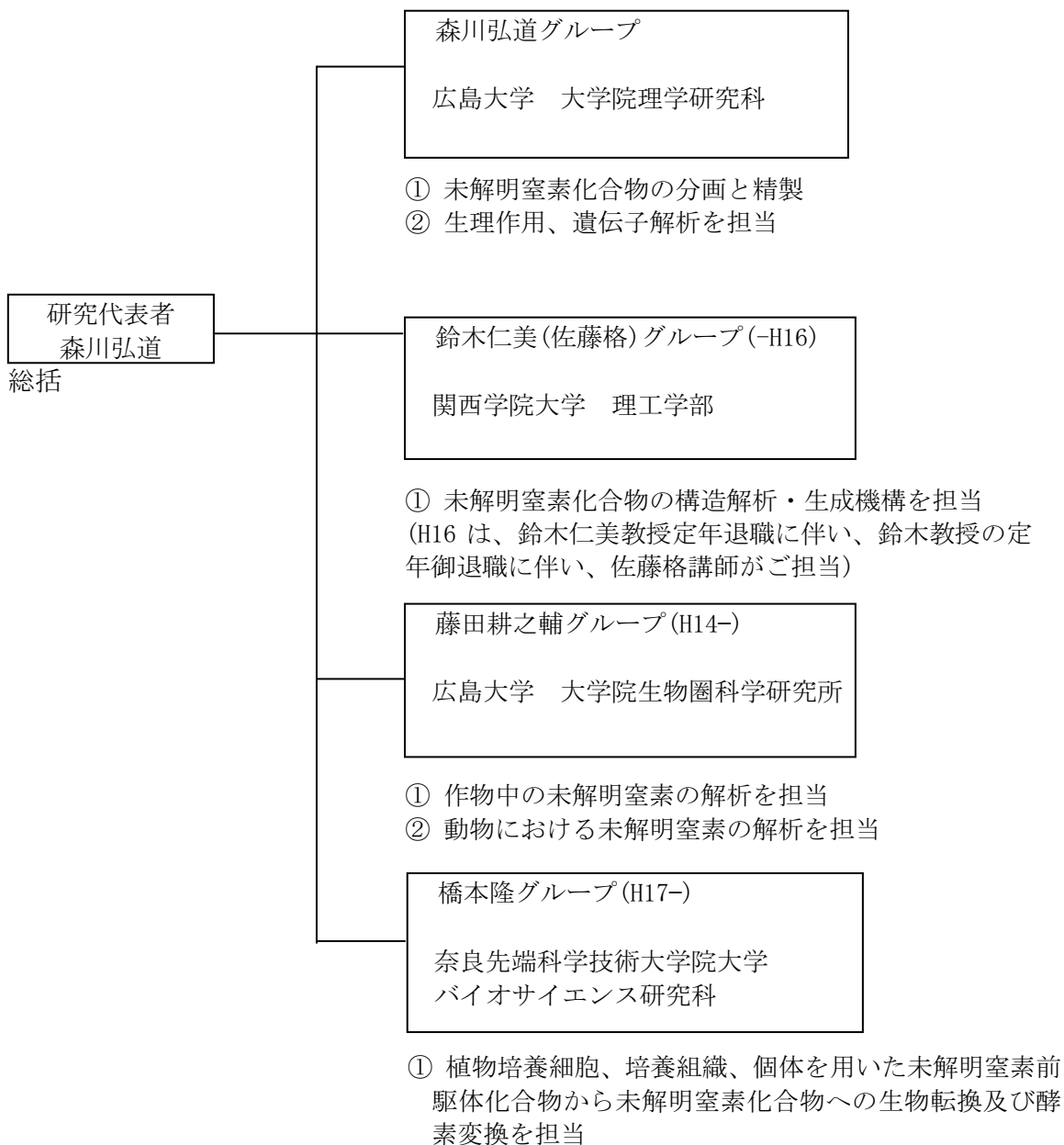
- (1) UN 化合物の構造決定： ^{15}N 処理葉から ^{15}N を多く含むニトロ・ニトロソ化合物を液クロを用いて、分析/分取、精製、構造解析する。ニトロ・ニトロソ化されたタンパク質のアミノ酸配列の決定/同定。
- (2) 生成機構の理論有機化学的解析：モデル物質を用いたニトロ・ニトロソ化合物生成機構を理論的に解析する。
- (3) 生理作用の解析：植物生理機能に対する UN 化合物の生理的効果の解析。 NO_2 を唯一の N 源として長期間植物を育て UN 解析。
- (4) UN 分解機構解明と UN 生成の抑制：(バクテリア)ニトロリダクターゼ、S-ニトロソグルタチオンリダクターゼ、ペルオキシレドキシシン酵素など活性窒素ストレススカベンジャー遺伝子を発現させた遺伝子組み換え植物の育成と解析。
- (5) 作物における UN 化合物の生成と作用：ハウレンソウなど作物中の UN 量と施肥硝酸濃度の相関を解析する。ハウス栽培野菜中の UN 量の定量、UN 化合物量の構造決定。

その後の新展開から生まれた目標等

- (1) UN 前駆体化合物から U 化合物への生物転換及び酵素変換(橋本グループ)
鈴木グループによりチアジアゾリン化合物の前駆体(チアジアゾール)が有機化学合成されているが、チアジアゾリンの全合成は現在試みているところである。このチアジアゾールからチアジアゾリンへの変換は酵素的には 1 ステップと考えられる。そこで、種々の植物細胞やそこから調製した粗酵素液を用いて前駆体からチアジアゾリンへの生物転換および酵素転換を試みる。本課題は UN 化合物の有機化学的実体を証明し、植物細胞内での UN 化合物の生成機構を推定する上で必須である。これまでに、チアジアゾールからチアジアゾリンへの変換には成功するにいたっていない。
- (2) 大気中 NO_x の「バイタリゼーション作用」の発見と研究
“ NO_2 を好む”植物における UN 生成を研究する過程で、偶然にも大気中は、「バイタリゼーション作用」をもつことを発見した(上述参照)。そこで、シロイヌナズナを用い、リアルタイム PCR などによる発現誘導される遺伝子の解析および同様な作用を示す UN 化合物またはその画分について、解析した。これまでに、 NO_2 処理により、シロイヌナズナのサイクリン遺伝子、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 遺伝子、エクспанシン遺伝子を活性化されることが分かった。どの UN 化合物が「バイタリゼーション作用」を担うかはまだ分かっていない。
- (3) UN 生成の生物普遍性の研究
UN 化合物は、当初高濃度の NO_2 を植物に与えた場合にのみ検出される窒素化合物と想像されていたが、硝酸性窒素を与えた場合にも UN 生成が認められること、また、そ

の生成機構において NO₂ のみならず NO や ONOO⁻ など活性窒素分子種の関与が推定されるにいたり、UN 生成の生物普遍性を検討した。動物での UN 生成が確認された。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 サブテーマ名未解明窒素化合物 (UN 化合物) の研究総括未解明窒素化合物の分画と精製、生理作用、遺伝子解析を担当 (広島大学大学院理学研究科 森川弘道教授グループ)

3.1.1 UN の定量

3.1.1-(1) 研究実施内容及び成果

二酸化窒素由来の UN : 4W 齢のシロイヌナズナを既報の条件下で、0.1 ppm または 4 ppm $^{15}\text{NO}_2$ で一定時(4h)間曝露した後、葉を回収、洗浄、凍結乾燥、粉碎後、全窒素、ケールダール窒素および無機態窒素を定量、式(1)に従って、UN を求めた(図 1)。結果の一例を図 2 に示す。

$$\text{UN} = \text{TN} - (\text{RN} + \text{IN}) \cdot \cdot \text{式(1)}$$

硝酸由来の UN : 2W 齢のシロイヌナズナに $^{15}\text{NO}_3$ を含む 1/2MS 培地で 2D 処理、その後 $^{14}\text{NO}_3$ 培地で、合計 10D 栽培し、2D 後、7D 後および 12D 後にサンプリング、上記と同様に全窒素、ケールダール窒素および無機態窒素を定量し、上記式(1)から UN を求めた。結果の一例を図 2 に示す。

図 2 から明らかなように、シロイヌナズナにおいて、二酸化窒素を窒素源とした場合にも硝酸を窒素源とした場合にも与えた窒素の約 1/3 は UN に変換される。

3.1.1-(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、1/2MS 培地で 4W 栽培したシロイヌナズナ(C24)を 4 ppm NO_2 で 4 時間曝露処理し、葉を回収、UN 化合物を抽出した。従って、本サンプルには、 NO_2 由来の UN と硝酸由来の UN が含まれていることになる。

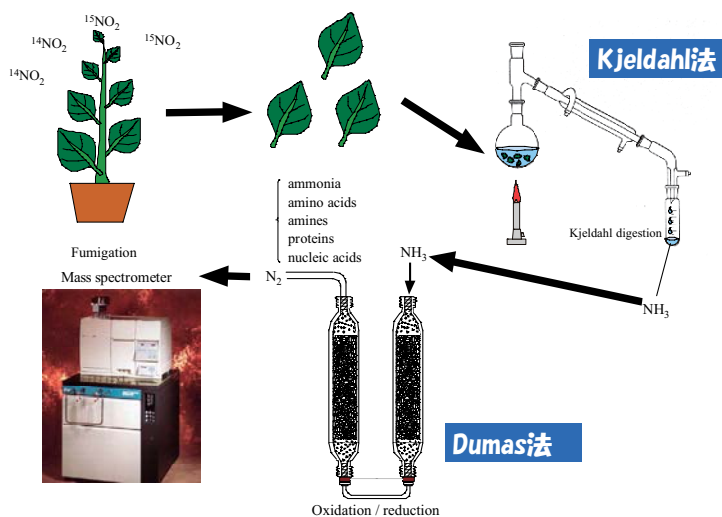


図 1 植物の窒素代謝分析法

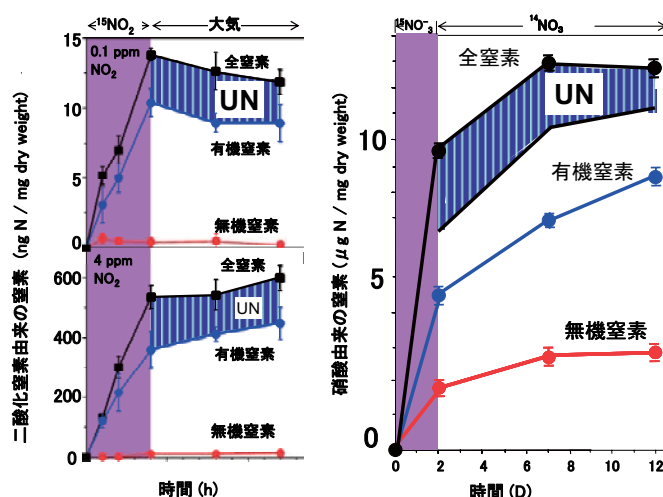


図2 シロイヌナズナ葉における未解明窒素の生成 (左図:二酸化窒素処理、右図:硝酸処理)

表1 シロイヌナズナで解明されたUN化合物

UN化合物名	分離/分析法	
アミノ化合物		
1,2,3チアジアゾール化合物	水溶性画分/NMR	含新規化合物
ニトロ化合物		
N-ニトロピロール化合物	水溶性画分/NMR	有機合成
S-ニトロチオール	水溶性画分/蛍光法	高分子、低分子
ニトロ化合物		
ニトロカロチン	アセトン画分/ HPLC精製	有機合成
タンパク質		
ニトロチロシン	2D-電気泳動法/抗体	

表1にシロイヌナズナにおいてこれまでに同定確認されたUN化合物をまとめた。上述の通り、UN化合物とは、「ケールダール法では定量的回収が困難な窒素を含む化合物」と予想され、例えば、N-N, N=N, N=O, NO₂基を含む窒素化合物と予想された。表1の結果はこの予想が正しかったことを示すものである。

1,2,3チアジアゾリンはSciFinderに記載のない新規化合物である。鈴木、宮脇らを中心に有機合成を試みたが合成はきわめて難しいことが分かった。また、その前駆体となる1,2,3チアジアゾール(市販の試薬から二段階で合成される)から1,2,3チアジアゾリンへのバイオトランスフォーメーションについて、橋本、大木らを中心に試みたが、これまでのところ変換は確認されていない。また、同定された化合物の全UNに占める割合

についての定量的評価は、回収率の見積りの難しさなどの理由により現時点では、困難である。

3.1.2 タンパク質性 UN の解析

3.1.2 - (1) 研究実施内容及び成果

大気中の窒素酸化物 (NO_x ; 実質的に一酸化窒素 NO と二酸化窒素 NO₂ からなる) は、植物体内に取り込まれた後、その一部はケールダール法で回収されない未説明窒素 (UN) 化合物となる。UN 化合物は、1 つまたは 2 つの窒素原子同士または窒素と酸素の結合を持つ化合物である。窒素と酸素の結合を持つニトロ化合物は UN 化合物の 1 つである。ニトロチロシンは、免疫学的な研究などにおいて様々な動物臓器で観察されているニトロ化合物である。ペルオキシナイトライトや亜硝酸イオンから派生する NO₂ によって、チロシンラジカルがニトロ化されることで生じる。そこで、NO₂ 暴露した植物タンパク質中のニトロ化タンパク質を、免疫学的手法、プロテオミクス的手法を用いて解析した。

3.1.2 - (1) - (a) 植物タンパク質のニトロ化

NO₂ 暴露した植物タンパク質中のニトロ化タンパク質を、免疫学的手法であるウェスタンブロットおよび Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて解析した。NO₂ 暴露したシロイヌナズナ、タバコ、ダンドボロギクから抽出した粗タンパク質を SDS PAGE で分離後、抗ニトロチロシン抗体を用いてウェスタンブロット解析したところ各植物において複数のバンドが観察された (図 3)。そのバンド数はタバコで最も多く観察され、次いでシロイヌナズナであった。タバコおよびシロイヌナズナのタンパク質中のニトロ化タンパク質含量について ELISA 解析した。その結果を図 4 に示す。両植物種において NO₂ 暴露によりニトロ化タンパク質量は増加した。その量はシロイヌナズナの方がタバコのそれより多く、約 2 倍であった。以上の結果から、NO₂ 暴露により植物タンパク質中にニトロチロシンが出来ることが明らかとなった。

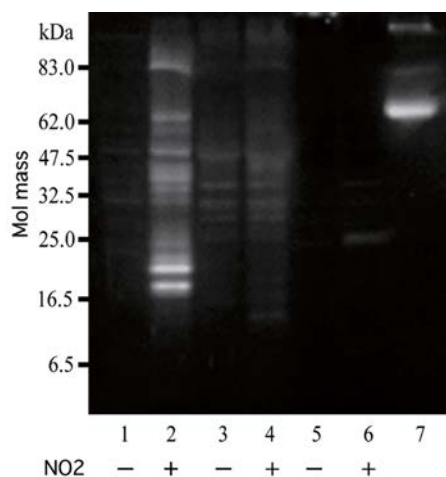


図 3. タンパク質ニトロ化の SDS PAGE とウェスタンブロット解析レーン 1, 2; タバコ, 3, 4; シロイヌナズナ, 5, 6; ダンドボロギク, 7; ニトロ BSA

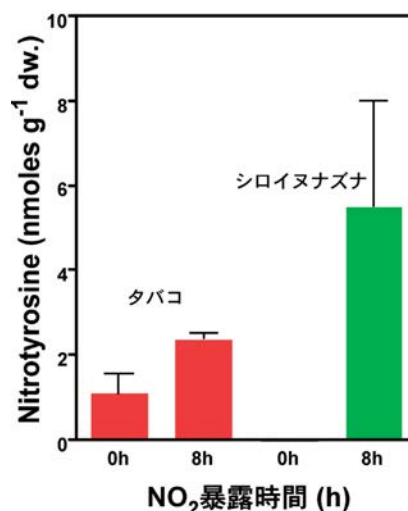


図 4. ニトロ化タンパク質量の ELISA 解析

3.1.2 - (1) - (b) 植物のニトロ化タンパク質

プロテオミクスの手法を用いて植物のニトロ化タンパク質の網羅的に解析を行なった。植物材料として、全ゲノム情報が明らかにされているシロイヌナズナを用いた。NO₂ 暴露したシロイヌナズナから粗タンパク質を抽出、二次元電気泳動と抗ニトロチロシン抗体を用いたウェスタンブロット解析したところ、7タンパク質スポットが抗ニトロチロシン抗体と反応した (図5 A)。これは全タンパク質スポット (> 1000個) の 0.8%であった。これらのニトロ化タンパク質スポットに相当するものをSYPRO-Ruby 染色したゲル (図5 B) から切り出し、トリプシン消化後、MALDI-TOF MS 分析およびペプチドマスフィンガープリンティングによりタンパク質を同定した。その結果、7タンパク質スポット全てが PSII 表在性タンパク質の PsbO (T2, T3, T7) または PsbP (T4, T5, T8, T10) であった。pI7-11 では抗ニトロ Tyr 抗体と反応するスポットが観察されなかったことより PsbO、PsbP 以外の PSII 表在性タンパク質である PsbQ はニトロ化されないと考えられる。単離葉緑体から抽出したタンパク質について同様に解析したところ PsbO と PsbP タンパク質スポットが抗ニトロチロシン抗体と強く反応した。PsbO と PsbP 以外のスポットも抗ニトロチロシン抗体と反応したがそのシグナル強度は PsbO と PsbP のそれと比較して非常に弱かった。また、PsbO と PsbP タンパク質は NO₂ 処理の停止に伴い脱ニトロ化された。以上の結果より、NO₂ 暴露によりシロイヌナズナにおいて、PSII 表在性タンパク質 PsbO と PsbP が優先的可逆的にニトロ化されることが示された。シロイヌナズナからチラコイドを単離して NO₂ 処理でニトロ化させた後、2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone (DMBQ) を電子受容体として酸素発生を測定した。その結果、酸素発生が阻害されることが分かった (図5)。ニトロ化に伴い酸素発生が抑制される、光照射によってニトロ化が促進されることを見出した。

3.1.2 - (2) 研究成果の今後期待される効果

本研究により、NO₂ 暴露された植物体においてタンパク質チロシンがニトロ化されることが明らかになった。そのニトロ化は、葉緑体チラコイド膜上の PsbO と PsbP で優先的に起きることが分かった。タンパク質チロシンのニトロ化は、活性酸素ストレス



図5. NO₂ ガス処理したシロイヌナズナ葉におけるニトロ化タンパクの二次元電気泳動解析。(A)ウェスタンブロット(ニトロ Tyr 抗体), (B)SYPRO Ruby 染色(非公開)



図6. PSB0 タンパク質のニトロ化が酸素発生に及ぼす影響。(非公開)

や活性窒素ストレスのマーカーとして知られており、葉緑体チラコイド膜上のこれらのタンパク質が活性酸素ストレスや活性窒素ストレス下にあることが予想される。今後、これらのタンパク質のチロシン残基が植物、特に葉緑体における活性窒素ストレスや活性窒素ストレス防御応答における役割に関する研究に発展することが期待される。

3.1.3 NO₂ 暴露によるカロチノイド類のニトロ化

3.1.3 - (1) 研究実施の内容及び成果

3.1.3 - (1) - (a) ¹⁵NO₂ 暴露シロイヌナズナの脂溶性画分の分析

播種後 5 週間後のシロイヌナズナに ¹⁵NO₂ を光照射下で 8 時間暴露し、暴露後のシロイヌナズナの葉部分を採取し、アセトン抽出を行った。この抽出物を逆層 HPLC によって分析した。¹⁵NO₂ 暴露をしていないシロイヌナズナの抽出物と比較したところ、¹⁵NO₂ 暴露抽出物において新たなピークがみられた (図 7)。

そこで、このピーク部分を分取し、黄色の油状物質 (化合物 A) を得た。この化合物 A の UV スペクトルは 400-500 nm 付近に β-carotene の UV 吸収と類似した特徴的な吸収が見られた。

また、化合物 A を同位体質量分析計 (EA-MS) によって分析した結果、この化合物は ¹⁵N を含んでいることが明らかになった (図 8)。

これらのことから、化合物 A は二酸化窒素を暴露することで新たに生成した代謝物は β-carotene の窒素化物と予想された。

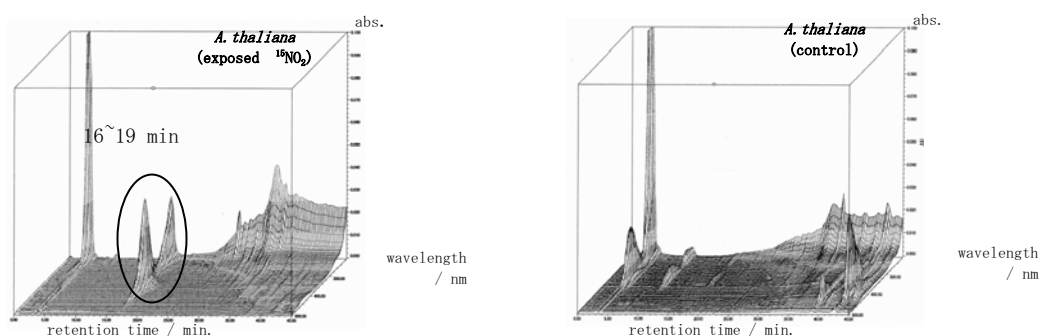


図 7. シロイヌナズナの脂溶性画分の HPLC 分析
(左: 暴露シロイヌナズナ画分, 右: 非暴露シロイヌナズナ画分)

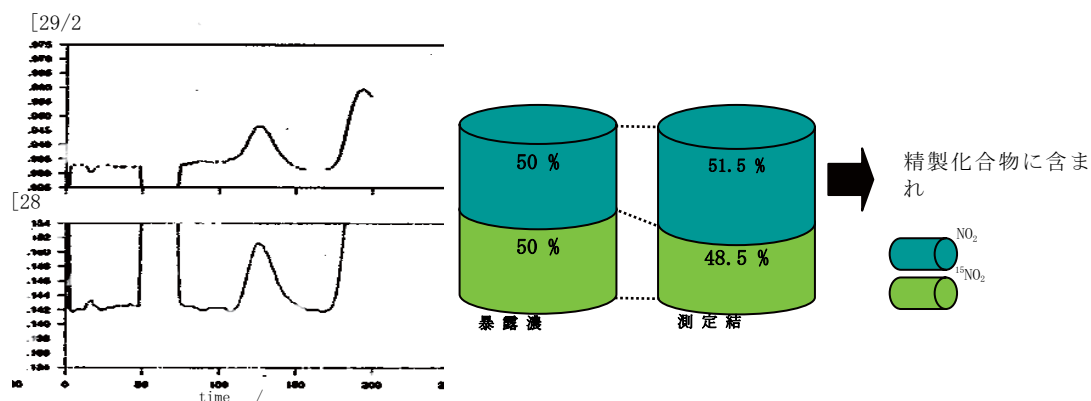


図 8. 化合物 A の含有窒素の同位体分析

3.1.3 - (1) - (b) TNM 曝露シロイヌナズナの脂溶性画分の分析

シロイヌナズナの葉部分にニトロ化試薬であるテトラニトロメタン(以下 TNM と略記)を曝露させた。これをアセトンで抽出し、逆層 HPLC で分析すると、二酸化窒素を曝露したシロイヌナズナと同様の保持時間 (Rt) にピークが見られた。このことから、二酸化窒素曝露で生成した化合物と TNM 曝露で生成した化合物は同一であり、 β -carotene がニトロ化された構造である可能性が示唆された。

3.1.3 - (1) - (c) アルファルファの脂溶性画分の分析

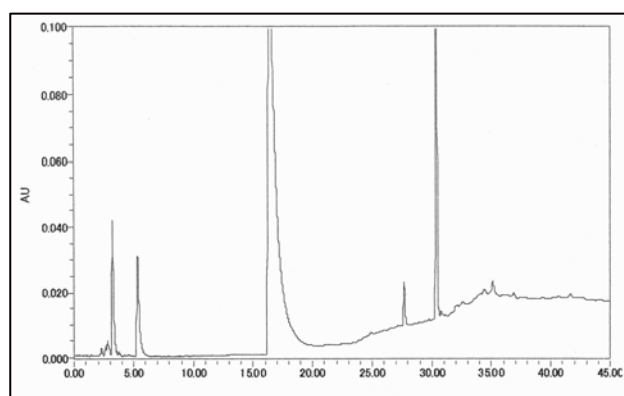
硝酸塩を投与して生育させたアルファルファをアセトン抽出し、これを LC-MS によって分析した。その結果、Rt 17 min にピークが見られ、このピークの UV は 450 nm で吸収極大を示した。また、この画分の MS は、 m/z 581 の値を示した。これらのことから、この化合物は、シロイヌナズナで検出された化合物 A だと同一であることがわかった。このことは、根から硝酸塩を吸収させたアルファルファにおいても、二酸化窒素暴露の場合と同一の窒素化合物ができることを示している。

3.1.3 - (1) - (d) Nitro- β -carotene の合成

二酸化窒素曝露によって生成した化合物 A が、 β -carotene のニトロ化物であることを確認するために、nitro- β -carotene を合成した。 β -carotene をアセトンに溶解し、TNM を加え 30 分間室温で反応させた。反応物を逆層 HPLC で分析した結果、化合物 A に相当する Rt にピークがみられた (図 9)。そこで、これを分取 HPLC で単離した。この生成物の HPLC は二酸化窒素曝露によって生成した化合物 A のそれと一致した。

合成した nitro- β -carotene の ESI-MS は、 m/z 581 にピークが見られ、 β -carotene の一置換ニトロ化物であることが示された。次に、ニトロ基の置換位置を決定するために NMR を測定した。その結果、図 10 に示すように、その構造は 4 位がニトロ化された 4-nitro- β -carotene であることが示された。

また、合成した nitro- β -carotene がケルダール法によって回収されるケルダール窒素を含むかどうかを調べた結果、この化合物からケルダール窒素は回収されなかった。このことから、nitro- β -carotene の窒素はケルダール窒素ではないことが明らかになった。



time (min)

図 9 . Nitro-carotene の HPLC 分析

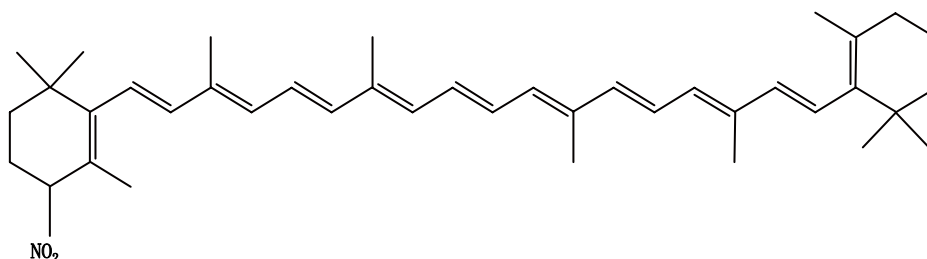


図 10. 4-Nitro- β -carotene の構造

次に、二酸化窒素暴露によって生成した化合物 A の HPLC および MS を合成した合成した 4-Nitro- β -carotene のそれらと比較した。その結果、化合物 A は 4-Nitro- β -carotene であることが確認された。

3.1.3- (1) - (e) $^{15}\text{NO}_2$ 曝露シロイヌナズナの抽出及び HPLC による分析

$^{15}\text{NO}_2$ 曝露シロイヌナズナをカミソリで葉部分をそぎ落とし、葉 100mg を 1.5ml エッペンチューブに入れた。さらにエッペン中にアセトン 1.2ml を加えた。これをインキュベーターで 50°C、3 時間抽出を行った。抽出終了後、上澄み溶液のみを新たなエッペンチューブに移し変えた。この中へ無水硫酸ナトリウム 180mg 加え、軽く振り混ぜることで脱水を行った。これを、10300g で 1 分間遠心分離した。さらにその上澄み溶液を 5ml スクリュー管に入れ、気体窒素によって完全にアセトンを蒸発させた。これにアセトニトリル 1ml を加え溶解し、HPLC で分析した。HPLC の条件は、次の条件を用いた。

Column:

Hewlett-Packard ZORBAX SB-C18 (4.6 mm i.d.×25 cm)

Mobile Phase:

Solvent A: 1% H_3PO_4 + 5% AcN + H_2O

Solvent B: 1% H_3PO_4 + 95% AcN + H_2O

Sol. A : Sol. B = 80 : 20 \rightarrow 10 : 90

3.1.3- (1) - (f) TNM 曝露シロイヌナズナの抽出及び HPLC による分析

1.5ml エッペンチューブにガラスウールを 20mg 詰め、DW 400ml と TNM 4ml をガラスウールに吸収させた。この中に、シロイヌナズナをカミソリで葉部分をそぎ落とし、葉 100mg を入れた。この状態で一日放置し、吸収させた。エッペンチューブから葉を取り出し、大量の蒸留水で葉表面に付着した TNM を洗浄した。水分をふき取った後、エッペンチューブに入れ、さらにアセトン 1.4ml を加えた。これをインキュベーターで 50°C、3 時間抽出を行った。抽出終了後、上澄み溶液のみを新たなエッペンチューブに移し変えた。この中へ無水硫酸ナトリウム 180mg 加え、軽く振り混ぜることで脱水を行った。これを、10300g で 1 分間遠心分離した。その上澄み溶液を 5ml スクリュー管に入れ、気体窒素によって完全にアセトンを蒸発させた。これにアセトニトリル 1ml を加え溶解し、HPLC で分析した。

3.1.3- (1) - (g) 曝露抽出物の LC-MS による測定

$^{15}\text{NO}_2$ 曝露シロイヌナズナをカミソリで葉部分をそぎ落とし、葉 100mg を 1.5ml エッ

ペンチューブに入れた。さらにエッペン中にアセトン 1.2ml を加え、4 °C で、3 時間抽出した。抽出終了後、上澄み溶液のみを新たなエッペンチューブに移し変えた。この中へ無水硫酸ナトリウム 180mg 加え、脱水を行った。これを、10000g で 1 分間遠心分離し、その上澄み溶液を 5ml スクリュー管に入れ、気体窒素によって完全にアセトンを蒸発させた。これにアセトニトリル 1ml を加え溶解し、LC-MS 測定を行った。

3.1.3- (1) - (h) 標品 nitro-carotene の合成

β -carotene 1.2 mg を、50 ml ナシ型フラスコに入れ、これを脱気したアセトン 1.0 ml に溶解させた。この中に TNM 5ml 加え、室温で 5 分間窒素気流下に置き、その後密閉した状態で 25 分間反応させた。この反応溶液を、シリカゲル TLC プレートにチャージし、石油エーテル：アセトン=4：1 で TLC 展開して、反応物を分画し、さらに HPLC によって Rt 17 min のピークを単離・精製した。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: d 0.89 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.17 (s, 6H), 1.37 (m, 2H), 1.41 (m, 2H), d 1.70 (m, 2H), 1.73 (s, 6H), 1.77 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.99 (s, 12H), 2.06 (t, 2H, J= 6 Hz), 4.92 (t, 1H, J= 5 Hz), 6.18 (d, 2H, J= 10 Hz), 6.24 (d, 4H, J= 17 Hz), 6.36 (d, 2H, J= 15 Hz), 6.42 (d, 2H, J= 10 Hz), 6.62 (m, 2H), 6.94 (dd, 1H, J= 10 and 15 Hz).

3.1.3- (1) - (i) アルファルファの脂溶性画分の抽出および LC-MS 分析

凍結乾燥アルファルファ 200mg に対しアセトン 1.2 ml を加え 50 °C で 3 時間抽出を行った。上澄み溶液のみを新たなエッペンチューブに移し変え、この中へ無水硫酸ナトリウム 180mg 加えて脱水した。これを、10000g で 1 分間遠心分離し、その上澄み溶液を 5ml スクリュー管に入れ、気体窒素によって完全にアセトンを蒸発させた。これにアセトニトリル 1ml を加え溶解し、LC-MS 分析を行った。

3.1.3- (2) 研究成果の今後期待される効果

以上のことより、シロイヌナズナに NO_2 暴露をすることによって生成する化合物は、通常の NO_2 代謝経路で形成されるタンパク質やアミノ酸などの還元型窒素代謝化合物だけでなく、酸化型窒素代謝物である 4-nitro- β -carotene であることがわかった。4-Nitro β -carotene は既知の代謝経路を通らずに、葉緑体中の β -carotene が NO_2 によって直接にニトロ化されるものと考えられる。

一方、高濃度の硝酸塩を投与した環境で生育したアルファルファにおいても 4-nitro- β -carotene が生成することがわかった。このことは、二酸化窒素濃度が上昇するにつれ、植物は通常の代謝経路以外の代謝を行うことを示している。これは、植物が環境変化に対抗して示す生体防御の一つではないかとも考えられる。

β -carotene は植物にとって光合成を補助する補助色素として、また抗酸化剤としての重要な役割を担っている。 β -carotene が酸化されることで光合成を担う他の重要な色素を保護し、その機能の維持を図っていることも考えられる。

なお、4-nitro- β -carotene は、人の喫煙によって生じた NO_2 やそのラジカルが β -carotene と反応して肺の中で生成することが報告されている。動物においても同様に、喫煙によって発生する NO_x やラジカルから人体への直接の損傷を軽減していると考えられる。

3.1.4 活性窒素代謝関連タンパク質の同定

3.1.4- (1) 研究実施の内容及び成果

二酸化窒素 ($\cdot\text{NO}_2$) や硝酸 (NO_3^-) など、植物の同化基質となる無機窒素酸化物に由来する UN 化合物の有機構造的考察から、その実体は有機ニトロ化合物や *N*-ニトロソ、*S*-ニトロソ化合物などを含む多様な分子種から構成されていること、またその

生成には一酸化窒素 ($\cdot\text{NO}$) やペルオキシナイトライト (ONOO^-) のような高い分子修飾能を持つ活性窒素が関与している可能性が示唆された。このような活性窒素の代謝制御が UN 化合物の生成や消長を制御する基本的な植物機能の一つであるという考えのもと、植物における活性窒素代謝の存在証明と実態解明を目的に、その遺伝子及び生化学的基盤の解析を主としてシロイヌナズナを用いて行った。

3.1.4- (1) - (a) ペルオキシナイトライト還元酵素 (2-Cys ペルオキシレドキシシン)

ほとんど全ての生体分子に対して酸化損傷を引き起こす ONOO^- は細胞毒性の極めて高い活性窒素ストレス因子であるが、タンパク質や脂質をニトロ化修飾することから UN 化合物の生成機構にも関与していると考えられる。この強力な分子修飾能を持つ活性窒素は、植物では $\cdot\text{NO}_2$ や NO_3^- に由来する $\cdot\text{NO}$ がスーパーオキシド ($\cdot\text{O}_2^-$) と自発的に反応して生成すると推定される ($\cdot\text{NO} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$)。

大腸菌発現組換えタンパク質を用いた生化学的解析により、シロイヌナズナの 2-Cys ペルオキシレドキシシン (2CPrx) が、*in vitro* で ONOO^- を効率的に還元無毒化することを示した。2CPrx はサブユニット内に高度に保存された2つの Cys 残基を有するホモ2量体タンパク質で、チオレドキシシンと共役した Cys 残基の酸化還元サイクルにより過酸化水素 (H_2O_2) やアルキル過酸化物を消去する普遍的なチオール依存性の非ヘムペルオキシダーゼとして知られている。組換え 2CPrx は分子内の Cys 残基が還元状態にある場合に限り高い ONOO^- 消去活性を発揮することから、その機能発現には活性酸素の消去と同様に Cys 残基のレドックス状態が重要な役割を果たすことを示した (図 11)。さらにシロイヌナズナ 2CPrx の遺伝子導入が、出芽酵母変異株の活性窒素超感受性を相補するとともに、 $\cdot\text{NO}$ に誘導される細胞内酸化現象を顕著に抑制することを示した。これは高等生物由来の 2CPrx が生細胞で活性窒素ストレスに対する耐性を与えることを示した最初の事例である。以上の成果は、高等植物における活性窒素代謝酵素の存在を具体的に証明したものであり、 ONOO^- 消去活性を有する酵素の存在は、植物が UN 化合物の生成を代謝制御できる機構を備えていることを示唆している (図 12)。

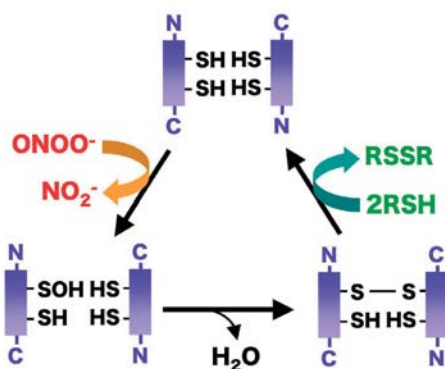


図 11 2CPrx によるペルオキシナイトライト消去の反応機構
RSH はチオレドキシシンなど 2CPrx の再生に働くチオール性の還元物質。

3.1.4- (1) - (b) S-ニトロソグルタチオン還元酵素

S-ニトロソ化合物 (RSNO) はチオール基 (-SH) に $\cdot\text{NO}$ が付加した S-ニトロソ基 (-SNO) を有する化合物の総称で、その構造から UN 化合物の物質化学的基盤を説明する生体分子の 1 つと推定される。代表的な生体 RSNO である S-ニトロソグルタチオン (GSNO) は $\cdot\text{NO}$ のリザーバーやドナーとして働き、 $\cdot\text{NO}$ シグナリングや活性窒素ストレスを介在すると考えられている。

大腸菌組換えタンパク質の生化学的解析と出芽酵母を用いた遺伝子相補により、GSNO を還元代謝する酵素 (GSNOR) をシロイヌナズナから同定した。GSNOR はこれまでのところ唯一報告のある RSNO 代謝関連酵素である。シロイヌナズナにおける GSNOR の過剰発現は RSNO レベルを著しく低下させるが、逆に T-DNA 挿入突然変異による遺伝子破壊はそのレベルを増大させることを明らかにし、GSNOR が RSNO 代謝の鍵酵素であることを示した。 $\cdot\text{NO}_2$ 曝露によりシロイヌナズナ野生株では UN 化合物レベルとともに RSNO レベルも増大したが、GSNOR の過剰発現は RSNO の生成のみならず UN 化合物の生成をも有意に抑制したことから、RSNO が UN 化合物の 1 種であることが示された。すなわち、GSNOR は初めて同定された UN 化合物代謝酵素といえる (図 12)。

興味深いことに、シロイヌナズナに吸収された $\cdot\text{NO}_2$ や NO_3^- の代謝解析から、GSNOR の過剰発現はこれらの無機窒素酸化物の吸収や同化を促進することを明らかにし、その遺伝子が大気中窒素酸化物の浄化や土壌硝酸態窒素の効率的同化を目指すファイトレメディエーションの重要な標的となることを示した。また、これらの結果は RSNO 代謝、UN 生成経路および無機窒素同化の間に代謝クロストークが存在することを示唆している。

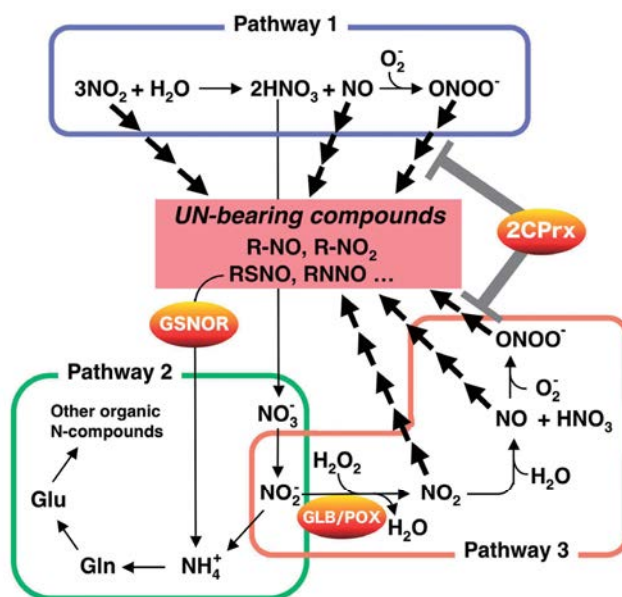


図 12 推定される UN 化合物の生成機構と活性窒素代謝関連酵素との関連

Morikawa *et al.* (2004) より一部改変。

3.1.4- (1) - (c) 非共生型ヘモグロビン

ヘモグロビンは原核生物・真核生物を問わず広く生物界にみられる普遍的なヘムタンパク質であり、生物種やその生息環境に応じて多様な分子機能と生理的役割を担っている。

ることが近年明らかになってきた。高等植物にはマメ科植物に固有な共生型ヘモグロビン（レグヘモグロビン）の他に、これとは遺伝的にも構造的にも異なる非共生型のヘモグロビンが広く分布しているが、その生理機能や存在意義はよくわかっていない。

シロイヌナズナは、高等植物に見られる3種類の非共生型ヘモグロビン・イソタンパク質（class I, class II および truncated hemoglobin）を全て有する。大腸菌組換えタンパク質を用いた生化学的解析から、これらのシロイヌナズナ・ヘモグロビン（それぞれ AtGLB1, AtGLB2, AtGLB3）は共通してヘムペルオキシダーゼ（POX）様活性を呈すること、さらに一部の分子種は亜硝酸（NO₂⁻）を電子供与体としてこれを酸化し、 $\cdot\text{NO}_2$ を生成することを見出した（ $2\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 2\cdot\text{NO}_2$ ）。同化的硝酸還元代謝中間体である NO₂⁻ から UN 化合物の原因物質となる $\cdot\text{NO}_2$ を産出する POX 活性は、NO₃⁻ に由来する UN 化合物の生成機構を生化学的に説明するものとして非常に興味深い（図 12）。 $\cdot\text{NO}_2$ 生成能は3種のヘモグロビン間で顕著に異なり、AtGLB1 で最も高かったが AtGLB2 では非常に弱く、AtGLB3 はほとんどその活性を示さなかった（図 13）。また $\cdot\text{NO}_2$ 生成能が高いヘモグロビンほど、シロイヌナズナ実生において NO₃⁻ や NO₂⁻ により遺伝子発現が転写レベルで活性化されることが分かった（図 13）。以上の成果は、高等植物のヘモグロビンが無機窒素酸化物の代謝や活性窒素の生成に関連することを示唆するとともに、高等植物が $\cdot\text{NO}$ 以外のガス状活性窒素ラジカル（ $\cdot\text{NO}_2$ ）の酵素的生成系を有する可能性を指摘するものである。

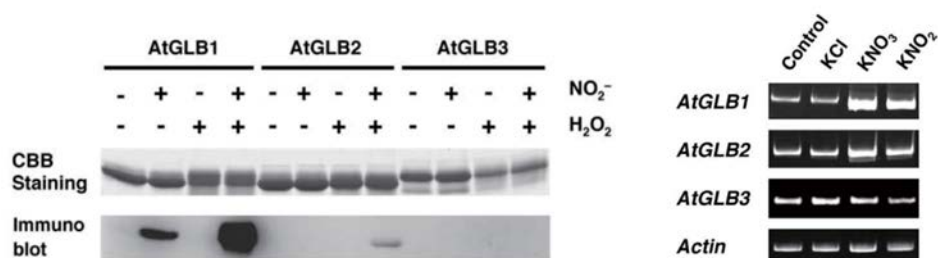
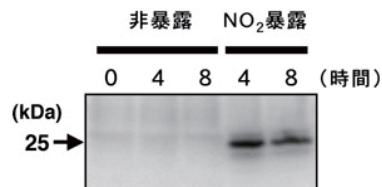


図 13 タンパク質チロシン残基のニトロ化を指標としたヘモグロビンによる亜硝酸から二酸化窒素の生成（左）と無機窒素酸化物による遺伝子発現の誘導（右）

3.1.4- (1) - (d) ジャーミン様タンパク質

UN 化合物発見の契機となった $\cdot\text{NO}_2$ は主要な大気汚染物質として知られているが、生理学的には活性窒素であり、 $\cdot\text{NO}$ バイオロジーの観点からも最近注目されているガス状ラジカル分子である。しかし、 $\cdot\text{NO}_2$ に対する生理的および代謝的応答については依然未解明な点が多く、遺伝子発現やタンパク質機能にかかる知見も乏しい。 $\cdot\text{NO}_2$ に応答する植物タンパク質として、街路樹ツツジの1種 (*Rhododendron mucronatum*) からジャーミン様タンパク質 (GLP) を同定した。GLP は巨大なファミリーを形成する植物に普遍的な細胞外マトリクス局在性の糖タンパク質で、耐病性、細胞死、二次細胞壁の構築など多様な現象に関わると推定されている。ツツジ葉では少なくとも2種類の

GLP 分子種 (RmGLP1, RmGLP2) が $\cdot\text{NO}_2$ に応答し, そのタンパク質レベルは $\cdot\text{NO}_2$ 曝露後 4 時間以内でプラトーに達するが (図 14), この発現応答は転写レベルで制御されていることを明らかにした。さらに, タバコ培養細胞を用いて RmGLP2 の大量発現系を構築し, その組換えタンパク質が H_2O_2 の生成を触媒するスーパーオキシドディスムターゼとシュウ酸酸化酵素の両活性を併せ持つことを示した。RmGLP2 遺伝子が $\cdot\text{NO}_2$ に転写発現応答し, その遺伝子産物が H_2O_2 生成酵素である事実は, 活性窒素や活性酸素などの生理活性分子と GLP の機能的関連を示唆するものとして興味深い。



3.1.4- (1) - (e) キサンチン脱水素酵素

キサンチン脱水素酵素 (XDH) はプリン類の異化的代謝に関わる普遍的な古典的酵素であるが, 近年 NO_2^- から $\cdot\text{NO}$ を生成する触媒活性が示唆されており, UN 化合物や活性窒素の生成に関連している可能性がある。そこで XDH の生理的役割を検証するために, RNAi により XDH の発現を抑制したシロイヌナズナを作出した (図 15)。XDH レベルの抑制に伴い形質転換植物は生育遅延や稔性の低下などの生理的障害を呈し, 遺伝子レベルで老化プログラムを促進していることを明らかにした。このような表現型は $\cdot\text{NO}$ 生成を阻害された植物に類似したものであり, 活性窒素との関連を現在調査している。

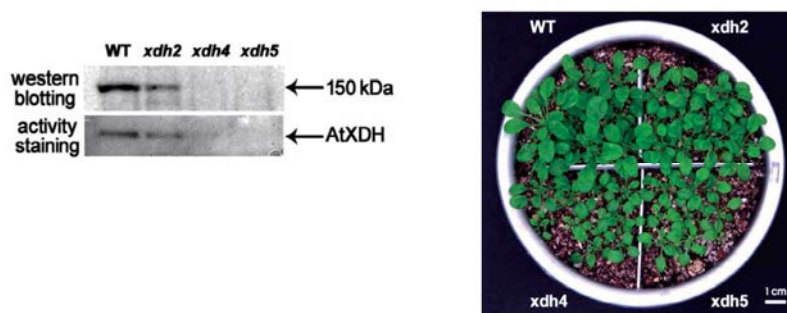


図 14 ツツジ葉の $\cdot\text{NO}_2$ 曝露による GLP の誘導

3.1.4- (2) 研究成果の今後期待される効果

本研究は UN 化合物の生成や分解を制御する植物機能について, 生化学的・分子生物学的知見がほとんど蓄積されていなかった活性窒素代謝と関連づけて解析をすすめる, その分子基盤の一端を明らかにしたものである。植物における活性窒素代謝の先駆的研究でもある本研究の成果からは, 以下の波及効果が期待される。

- UN 化合物と同化的硝酸還元を具体的に関連づける活性窒素代謝の存在は、有機還元態窒素の供給が一義的役割と見なされてきた植物の無機窒素同化代謝に新たな研究視点をもたらすもので、光合成と並び最も重要なこの植物一次代謝にかかる新規な代謝生理学研究の創出とその発展の契機になるものと考えられる。
- 活性窒素は活性酸素とともに両刃の剣に例えられるが、本研究はそのストレス作用に対する植物解毒酵素の実体を初めて明らかにしたのものである。活性窒素代謝関連タンパク質の同定は、シグナル機構の解明が先行する植物・NO 研究において看過されてきた活性窒素作用の代謝制御について重要な基礎的知見をもたらすものであり、本研究の成果は今後の植物科学において中心的課題の1つになるであろう。NO や活性窒素の多面的作用の実態把握とその包括的理解を大いに進展させるものと考えられる。
- GSNOR の過剰発現に例証されるように、活性窒素代謝酵素の遺伝子操作は同化的硝酸還元の効率化のための基本原理を提供するものである。そのバイオテクノロジーへの応用は、作物増産や大気汚染、土壌の硝酸態窒素汚染など今世紀の植物科学に課せられた食糧や環境を巡る喫緊な課題の解決に向けて貢献するものと期待される。

3.1.5 UN化合物の生理機能

3.1.5- (1) 研究実施の内容及び成果

3.1.5- (1) - (a) チアジアゾール化合物の SAR 誘導作用

UN 化合物として同定されたチアジアゾール化合物¹⁾は、医薬 (抗狭心症・不整脈緩和・抗血栓剤) や農薬 (抗いもち病菌全身抵抗性誘導剤) のリード化合物であり、動物、微生物、植物で多様なシグナル伝達活性を有する (第四回本領域シンポジウム)。一方、大気中に含まれる NO_x ガスは、植物の“バイタリゼーションシグナル”として作用することを我々は見出したが、UN 化合物とこのNO_x ガスのバイタリゼーションシグナル作用との関連は、必ずしもはっきりしていなかった。本研究では、UN 化合物であるチアジアゾールの SAR 作用とUNリッチ画分のバイタリゼーション作用について研究した。

合成チアジアゾール化合物の中で、benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid (BTH) やチアジニール (3'-chloro-4,4'-dimethyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxanilide; 日本農薬) は、いずれも、いもち病農薬として市販されている。これらの作用機構は、全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 誘導シグナルとされる。タバコの切り取り葉にチアジアゾール溶液を真空浸透させた。また、タバコ植物の根にチアジアゾール溶液を与えた。一定時間後に葉を採取し、全 RNA を抽出、リアルタイム PCR 解析した。SAR の指標遺伝子として PR1、PR2、PR5 を用いた。その結果、図16に示すとおり、チアジアゾール

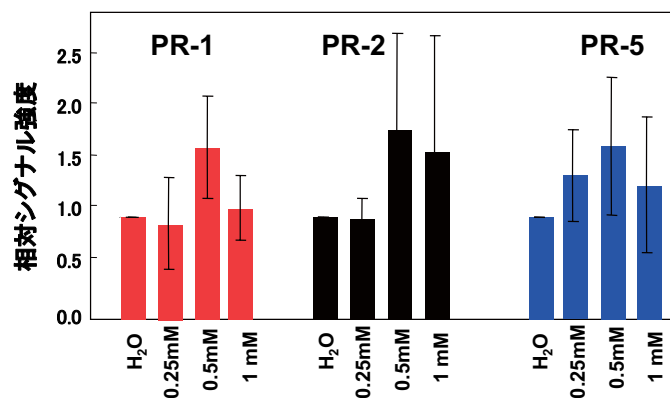


図16 タバコ葉でのチアジアゾールによるPR遺伝子の活性化

ルは、PR1、 PR2、 PR5 遺伝子の転写が活性化した。以上のことから、チアジアゾールはタバコにおいて SAR シグナル伝達に關与するものと結論される。

3.1.5- (1) - (b) UN 化合物画分の植物の成長活性化作用

これまでの研究で同定された UN 化合物は、アニオン交換樹脂吸着画分が主であった。本研究では、カチオン交換樹脂吸着画分を溶出 (0.1 N→1.0 N HCl, 0.1 N毎) し、シロイヌナズナに対する成長への効果をアッセイした。NO_x による植物成長バイタリゼーション作用との関連を調べるため、植物の成長実験は、NO_x を含まない空气中 (NO_x ガス制御チャンバー内) で実施した。自然光下、NO_x ガス制御チャンバー内 (<5 ppb, NO_x) で栽培した、シロイヌナズナに、一定濃度の UN 画分を含む 1/2 MS 培地を与えた (2回/週)。対照区として、1/2 MS 培地のみ (ただし、pH は UN 画分添加区と同一に調整) およびチアジアゾール添加区を用いた。4週間後、植物の形態、バイオマス量、全葉面積などを解析した。

UN 画分添加区では、対照区に比べ植物のサイズは大きく、シュートバイオマスおよび根バイオマスともに約3倍大きかった。また、本葉の数も7枚から9枚に増えていた(図 17)。全葉面積は、2倍以上大きくなった(図 18)。現在、この UN 画分に含まれる化合物の同定を研究中である。本画分は、従来同定されたチアジアゾール化合物類や化合物 B (ピロール化合物) とは異なり、カチオン性であり、「NO_x の植物バイタリゼーション作用の鍵」となる新しい UN 化合物の解明が期待される。

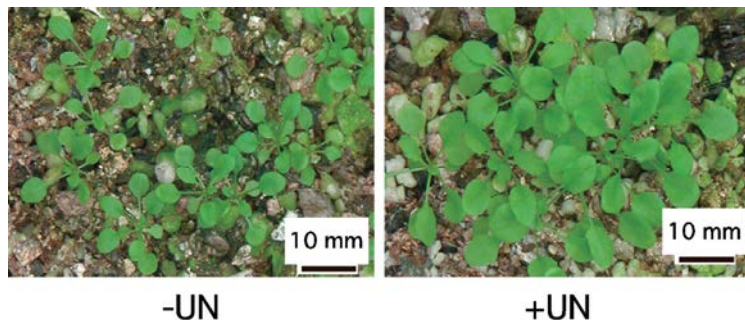


図 17 UN 画分を添加(+UN)または非添加(-UN)して 4 週間栽培したシロイヌナズナ



図 18 UN 画分の存在(+UN)または非存在(-UN)下で 4 週間栽培したシロイヌナズナ個体の葉

3.1.5- (2) 研究成果の今後期待される効果

生体内でのチアジアゾール環をもつ化合物の報告は、我々の報告が唯一最初の報告である。チアジアゾール化合物は、医薬、農薬、新素材(増感剤)として近年注目されているところである。医薬作用では、NO シグナリングとの関連が指摘されている。また、農薬としては、抗菌性作用ではなく、全身獲得抵抗性(SAR)を誘導する“シグナル作用”があるとされる。これらの作用において、チアジアゾール環は重要な役割を果たすと理解されている。他方、動物、植物においてNO生物学は依然として発展しつつあり、NOなど活性窒素分子種は、生体防御、成長・分化制御多面的な生理作用をもつシグナル作用を持つことが広く認識されている。しかし、NO分子自体がシグナリングの実体であるか、NOなどで化学修飾を受けた生体内成分がその実態であるのかは、まだ解明されていない。内在NOにより、チアジアゾール環化合物が作られ、NOシグナル作用を担う可能性は高いと思われる。

また、UN画分が、植物(シロイヌナズナ)の成長を大きく増進するとの結果は、UN化合物には、成長促進物質が含まれることを示しており、今後その同定が望まれる。

以上、本研究は、NOシグナル作用「実体」分子種、「新規植物成長促進物質」など新たな「有機生理化学」ともいべき新学問分野を提起するものである。

3.1.6 NO_xのバイタリゼーション作用と発現誘導される遺伝子群

3.1.6- (1) 研究実施の内容及び成果

「NO₂を唯一の窒素源とする植物」の育成について、研究する中で、思いもかけず窒素酸化物NO_x(NOとNO₂)は植物体の生育(バイオマス生産量、総葉面積)および養分(C, N, S, P, K, Ca, Mg)吸収や代謝(アミノ酸, 粗タンパク質含量)を全般的に活性化すること、さらに、体内に取込まれたNO_x由来の窒素は全窒素の数パーセント以下にすぎないことを発見した¹⁾。この大気中NO_xの作用は植物の成長発達を全般的に活性化する植物ホルモン様作用であり、「植物バイタリゼーション・シグナル作用」と命名した。本研究では、シロイヌナズナを用いて植物バイタリゼーション・シグナル作用の分子機構の研究を行った。

シロイヌナズナ種子をパーライトとバーミキュライト(1:1, v/v)上に播種した後、直ちに2つのグループに分け、一方のグループを100 ppb NO₂を含む大気に制御した暴露チャンバー(+NO_x植物)に、もう一方のグループを<5 ppb NO₂以下に制御した暴露チャンバー(-NO_x植物)に移して4週間栽培した。その後、植物を採種、洗浄した後、葉数、葉面積、葉厚さ、根の長さを測定した。次いで、茎葉と根に分けて凍結乾燥洗浄した後、それぞれの乾燥重量を測定した。茎葉乾燥試料をHNO₃: HClO₄混合液で分解した後、ICP-MS(model 8500, Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いてS, P, K, Ca, Mg含量を分析した。炭素(C)、窒素(N)、NO₂由来の窒素含量はEA-MSを用いて分析した。図19にNO_x存在下、非存在下で4週間栽培した植物体の写真を示す。各植物のシュート重量、根重量、根長、葉数、全葉面積、葉厚、C, N, S, P, K, Ca, Mg含量いずれも+NO_x植物の方が-NO_x植物に比べて約1.7倍増加していた(図19)。+NO_x植物のNO₂由来の窒素含量は、5%以下で、植物体に取り込まれたNO₂の窒素源としての寄与は無視しうる程度であった。以上の結果から、シロイヌナズナ植物においても大気中NO_xの植物バイタリゼーション・シグナル作用が観察された。

塚谷裕一東大教授のご協力を得て、+NO_x植物および-NO_x植物の細胞の大きさを測定したところ、+NO_xで4週間生育させたシロイヌナズナの第5葉の葉幅は-NO_xの1.5倍であったが、細胞の大きさは42.2 ± 3.6 μm (-NO_x)、41.6 ± 5.4 μm (+NO_x)であった。故に、細胞数が1.5倍以上増えることになる。よって、シロイヌナズナで観察された、大気中NO_xによる植物バイタリゼーション効果は、細胞数の増加によるものであること

100 ppb NOx, 4週間 < 5 ppb NOx, 4週間

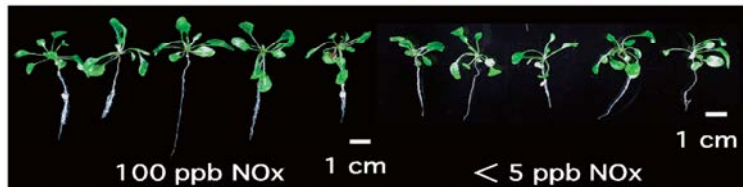
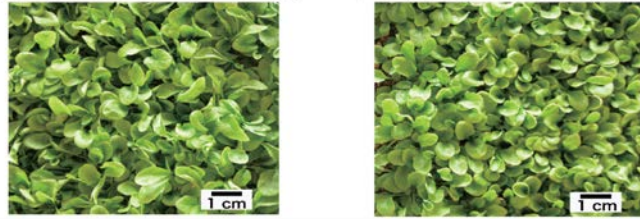


図19 シロイヌナズナにおけるNOxの植物バイタリゼーション作用

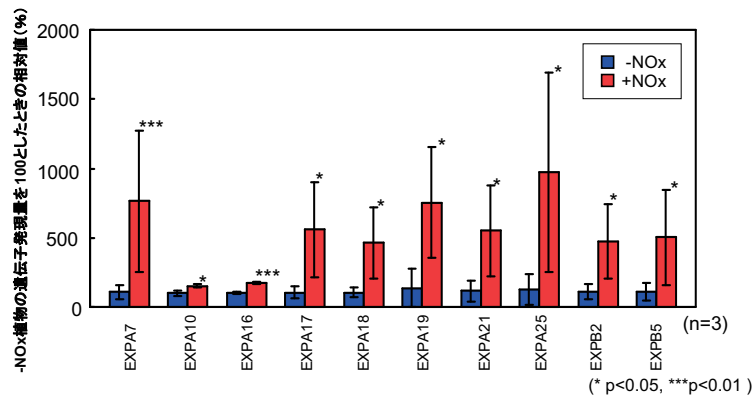
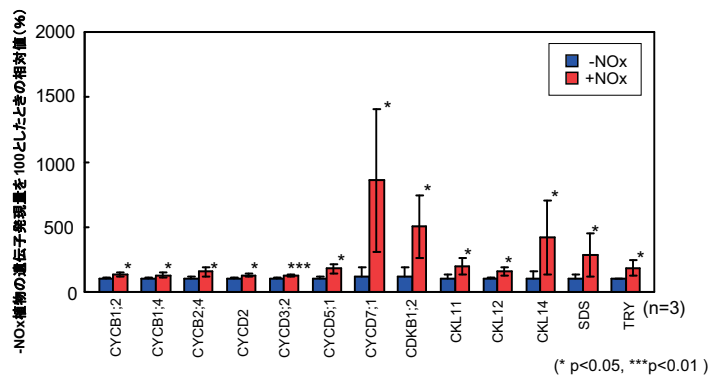


図20 細胞分裂制御遺伝子およびその関連遺伝子のNOxに対する応答のリアルタイムPCR解析

が結論された。

+NOx および -NOx 植物から RNA を抽出して、細胞分裂制御遺伝子およびその関連遺伝子の NOx に対する応答をリアルタイム PCR 解析により調べた(図 20)。その結果、細胞分裂を制御しているサイクリン遺伝子やサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 遺伝子、さらに細胞伸長に関与していると考えられているエクспанシン遺伝子の発現量の増加が確認された。エクспанシンは機能未知なものが多くバイタリゼーション・シグナル作用にどのように関わっているかは不明だが、細胞周期制御遺伝子の発現量が増加していることから、遺伝子レベルでも NOx が細胞分裂を促進していることがわかった。

3.1.6- (2) 研究成果の今後期待される効果

これまでに、内在 NO_x による植物の成長・分化の制御の報告は多数見られるが、大気中のいわば「外在」NO_x による植物の成長促進は、我々の報告が最初である。植物に対する NO_x の作用の研究は歴史が古く、過去の文献を調査すると、NO_x が植物の成長を阻害するとの報告があるが、成長を促進するという文献も確かに存在する。しかし、いずれも NO_x は追加的窒素肥料として作用するとの解釈がなされ、実験系もその点に焦点が絞られている。たとえば、与える窒素肥料濃度を低く設定した条件で NO_x 効果を調査するなどの実験である。不思議なことに植物体内の全窒素に対する NO_x 窒素の貢献度の化学量論は見落とされていた。

いずれにせよ、本研究の成果は、大気中 NO_x が「バイタリゼーション作用」を発揮するシグナル物質であることを示しており、今後、「外在」活性窒素のシグナル作用の研究と言う基礎的応用的新分野の展開が期待される。基礎的には、NO_x を構成する NO と NO₂ のどちらかまたは両方が「バイタリゼーション作用」を担うか、植物種による濃度効果は、また器官特異性は、などが課題となる。

また、「バイタリゼーション作用」を担う遺伝子として、シロイヌナズナではサイクリン遺伝子、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 遺伝子、エクспанシン遺伝子が浮かび上がっているが、タグラインや RNAi による裏づけ研究も課題である。

他方、進化学的には、NO_x は生命の誕生と共に生物進化の早い時期の原始大気に含まれていた可能性が高く、また植物自身も NO_x を低濃度ではあるが発生することが知られるにいたり、NO_x の「バイタリゼーション作用」研究は、生物進化学的にも重要である。応用的には、農業生産シグナルとしてガス制御農業への展開が可能である。NO_x は各種の野菜類の成長に対して、「バイタリゼーション作用」をもつことが判明しつつある。

3.2 未解明窒素化合物の構造解析・生成機構解析 (関西学院大学理工学部 鈴木仁美教授グループ、鈴木教授の定年御退職に伴い、H16 年は佐藤格講師がご担当)

3.2- (1) 研究実施内容及び成果

大気中の二酸化窒素 (NO₂) は植物体へ取込まれると、細胞組織の水分と速やかに反応して硝酸 (HNO₃) と一酸化窒素 (NO) に変る。発生した NO の大部分は酸素との錯形成に続く過酸化物質 (ONOONO) の生成を経て硝酸と亜硝酸 (HNO₂) へ変化するが、一部はスーパーオキシドイオン (O₂⁻) に捕捉されてペルオキシナイトロイオン (ONOO⁻) へ変換され、二次的な過程を経て分解する。硝酸と亜硝酸はアンモニウムイオン (NH₄⁺) へ還元されて、植物体による有機窒素化合物の合成に利用される。従って、植物体に含まれる NO₂ 由来の窒素の総量は、硝酸イオン (NO₃⁻) やアンモニウムイオンなどの無機態窒素と、キエルダール分析による回収が可能な有機態窒素の総和として近似される筈である。

しかし、最近、森川らは ¹⁵N-標識法を用いた詳細な検討から、多くの植物体は NO₂ に暴露されると新しい代謝経路を作動させて、取込んだ NO₂ 窒素の約 1/3 量をキエルダール分析でうまく定量できない未解明の窒素化合物 (Unidentified nitrogen compounds; 以下、UN 化合物) へ変換することを見出した。この UN 化合物が解明できれば、植物体が NO₂ で暴露された場合に発揮する独自の防御的な代謝経路が明らかとなり、NO₂ に対する耐性とその代謝機能に優れた植物体を遺伝子工学的な手法で具体化すること

が可能と見られ、NO₂による大気汚染問題の解決に寄与できると考えられる。

一般にキエルダール分析で有機態窒素の回収量が低い値を示すのは、ニトロ、ニトロソ、アゾ、ジアゾ、オキシムなどの極性または多窒素官能基をもつ化合物である。そこで、当研究グループでは、未解明のNO₂代謝生成物であるUN化合物はこのタイプに属するとの作業仮説のもとに、植物体からUN化合物を単離して同定し、その生成機構の解明を試みることにした。

3.2- (1) - (a) 研究の実施方針

微量の天然物成分の同定は、通常、標品からの抽出物を目的成分が含まれる区分に分画し、クロマトグラフィーで当該成分を分別、精製後、分光法を主とする物理的な手法で解析して化学構造を推定し、別途の方法で合成した標準試料と比較して、その完全な一致により確認するという手順で行われる。

本研究においては、NO₂を含む大気環境下で生育させた *Arabidopsis thaliana* や *Arabidopsis thaliana* の凍結乾燥した葉から抽出したUN化合物に富む画分を、分析機能の異なる液体クロマトグラフを用いてさらに粗く分画した。これらの画分について構成要素を¹H-、¹³C-および¹⁵N-NMRにより検討した結果、UN化合物と見なされる物質は、大部分がアミノ酸領域に集まっており、糖、リグナン、テルペノイド、ステロイド領域の窒素化合物は無視できることが確認された。

そこで、UN化合物の単離と構造決定は図21に示す作業手順に従って行ない、アミノ酸関連化合物に焦点を絞って探索を行なうことにした。UN化合物の分画は精製法AとBで示す二通りの方法で実施し、濃縮された各UN画分について測定したMass、NMR、UV、IRなどのスペクトルデータに基づいて化学構造を推定し、推定構造の化合物を別途の方法で合成して天然物試料と照合することにした。

3.2- (1) - (b) 実験結果

3.2- (1) - (b) - (i) UN化合物を含む区分の分画

精製法Aにおいては、4 ppmの¹⁵NO₂を含む大気環境に4時間暴露したシロイヌナズナの葉を凍結乾燥後、粉碎してMilli-Q水で抽出し、得られた試料を先ず陰イオン交換樹脂Q-Sepharoseに通じ、その非吸着画分を陽イオン交換樹脂Dowex 50Wに通じて分画したところ、UNの全量の約50~70%が含まれると思われる画分を得ることができた。

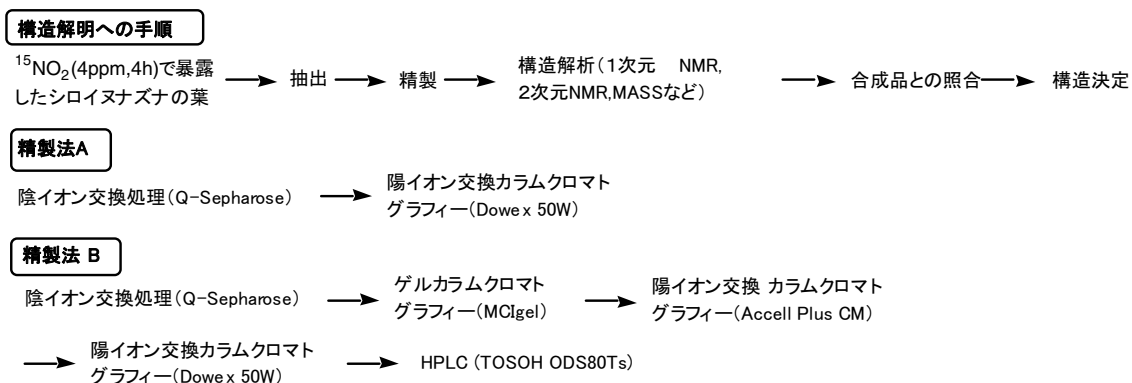
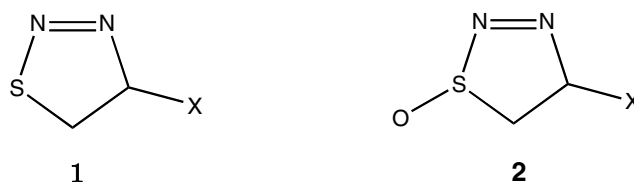


図 21 UN化合物を含む区分への分画手順

この画分について、UN を構成する成分を $^1\text{H-NMR}$ 、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 、EI-、CI-および FAB-Mass など で検討したところ、主要な含窒素化合物はコリン、プロリン、GABA、グリシンなど既知のアミンおよびアミノ酸であった。しかし、分取された画分に含まれる化合物は種類が多いので、通常の $1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ ではピークの重なりが激しく、微小なピークをうまく観察することができない。また、測定条件下の僅かな pH 変化によっても化学シフトの移動が起るため、構成要素の帰属に困難が加わる。そこで、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ により二次元展開したスペクトルについてクロスピークを詳細に調べたところ、新規な成分として Δ^2 -1,2,3-チアジアゾリン誘導体 **1** とそのオキシド **2** でないかと推定される、かなり不安定な化合物が含まれることが判った。九州大学基礎有機化学研究センターの成田吉徳教授の協力を得て行なった FAB-MASS やアニオン-MASS の測定結果も、**1** の構造を支持するものであった。残念なことに、化合物 **1** は濃縮した溶液状態では冷暗所に保存しても徐々に変質し、1 ヶ月ほどで完全に分解した。加熱および化学的処理では容易に分解するため、通常の方法で単離、精製を行なうことは困難であった。また、化合物 **2** でないかと推定した物質は量的に少なく、分離を試みる過程で失われて、濃縮状態で得ることはできなかった。



NO_2 に対する暴露時間が増すと UN 化合物が増加するだろうとの期待のもとに、暴露時間の異なる試料についてアミノ酸領域の $^1\text{H-NMR}$ 吸収の経時変化を追跡したところ、アミノ酸の構成にかなりの相対的な量変化が認められた。GABA、グリシンおよびプロリンは時間経過とともに顕著な増加を示したが、UN 化合物に帰属できる新しい吸収に際立った変化は見られなかった。

精製法 B においては、抽出した試料を陰イオン交換樹脂 Q-Sepharose に通じて得られた非吸着画分を、MCIgel を用いたゲルグロマトグラフィーと Accell Plus CM を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーでさらに分画して UN 区分を濃縮し、これを陽イオン交換樹脂 Dowex 50W に通じてから、TOSOH ODS80Ts を用いた HPLC でその主成分を分取することに成功した。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 、Mass など で検討したところ、この化合物は *N*-ニトロピロール化合物 (**10**) と推定された。別途の方法で合成した標準化合物とスペクトルデータを照合すると完全な一致が見られ、UN 化合物の一つが本 *N*-ニトロピロール化合物であることが判明した。この化合物についてキエルダール分析をおこなうと、窒素量の回収は不完全で、UN 化合物の一部を構成することが確認された。

3.2- (1) -(b) -(ii) 標準試料の合成

i) Δ^2 -1,2,3-チアジアゾリン誘導体 **1** の合成アプローチ

3 種のチアジアゾール異性体のうち、1,2,3-チアジアゾールの化学はまだ詳しく調べられておらず、 Δ^2 -1,2,3-チアジアゾリン誘導体に関する文献も極めて少ない。SciFinder、Chemical Abstracts などの国際的な文献検索機構を利用して検索の結果、推定構造の化合物 **1** を記載した医薬品関係の論文が 1 編だけ見つかった。そこで外資系製薬企業（日本レダリー（株））に在職した時期にこの論文を執筆した原著者に直接に接触し、標準試料として化合物 **1** の提供を依頼し、合成法の詳細を尋ねたところ、論文に記載の化合物は別物質で、データベースの情報処理における誤りと判明した。

化合物 **1** は環構造の一部として $-S-N=N-$ という活性な官能基をもつため、高い構造的な安定性は期待できない。そこで、方法論として確立された既存の反応を組み合わせた四通りの経路により **1** の合成を試みることにした。

第一の方法では、市販のカルバジン酸エチルとピルビン酸エチルの縮合生成物へ塩化チオニルを作用させると容易に合成できる 1,2,3-チアジアゾール-4-カルボン酸エチル **3** の $C=C$ 結合を、既存の方法で水素化して **4** とした後、そのエステル部分を加水分解することにより **1** の合成を試みた。表 1 に実験結果の一部を例示したように、既存の 25 通りの $C=C$ 結合還元法を用いて幅広い条件下で還元を試みたが、**3** は 6π 電子系により安定化されているためか、期待した水素化は困難であり、原料が未反応のまま回収されるか、解析が不可能な複雑な混合物を与えるかの何れかであった。

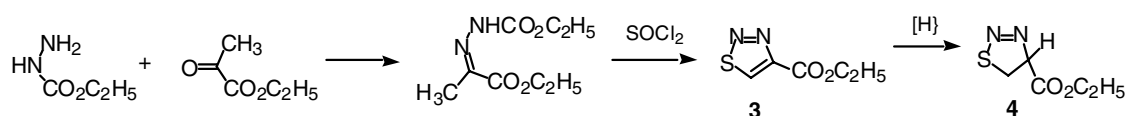
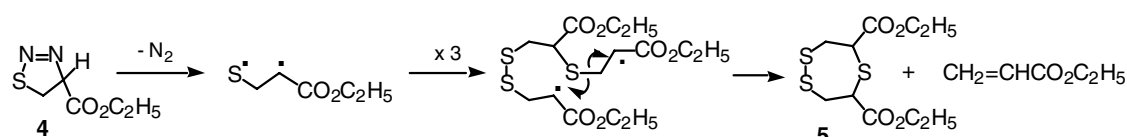
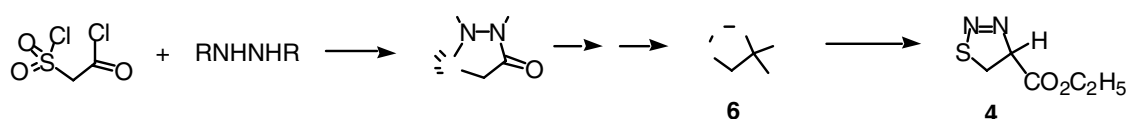


表 1 化合物 **4** の部 $C=C$ 結合の選択的な水素化の試み

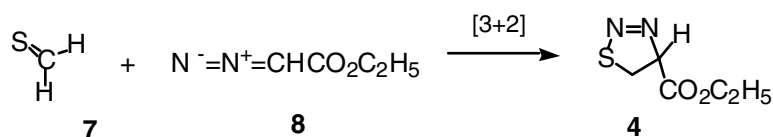
ただし、金属サマリウム (Sm) -ヨウ素 (I_2) を還元剤として用いた場合には、**4** の還元的な環開裂を経て生成したとみられる予期しない 7 員環化合物、1,2,5-トリチエパン誘導体 (**5**) が得られた。従って、期待した **4** は生成するが、芳香族性により安定化された **3** が水素化される条件下では、**4** のほうが優先的に脱窒素を伴った環開裂を受けて分解したと考えられる。1,2,5-トリチエパン骨格をもつ生理活性物質として、lissoclinotoxin F が自然界で見出されている。



第二の方法では、1,2,3-チアジアゾリジン化合物 **6** を適当なエステルへ誘導してから、そのヒドラゾ結合を脱水素してアゾ結合に変え、エステル部分を加水分解するという経路で **1** の合成を試みた。1,2,3-チアジアゾリジン環の構築法は少なく、今までに数例しか報告がない。そこで、この経路の鍵とみられるチアジアゾリジン環の形成を種々の方法で試みたところ、混合型酸塩化物と適当に保護したヒドラジン誘導体の分子間縮合環化で 1,2,3-チアジアゾリジン-4-オン誘導体が合成できることがわかった。しかし、この化合物をうまく目的のチアジアゾリジンカルボン酸エステル (**6**) へ導く試みは失敗した。

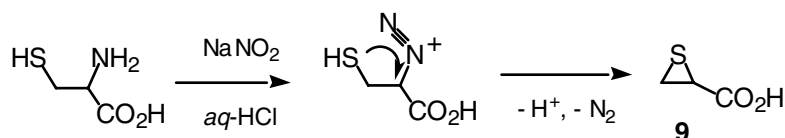


第三の方法では、ジアゾ酢酸エチル（**8**）の共存下で短寿命のチオホルムアルデヒド（**7**）を発生させ、チオカルボニル基とジアゾメチン基間の1,3-双極子付加環化により1,2,3-チアジアズリン環を構築した後、エステル部分を加水分解して**1**を合成する経路を試みた。大阪大学大学院工学研究科の井上佳久教授の研究室の光化学反応装置を用いて、フェナシルメチルスルフィド、*S*-メチルチオスルフィネート、*S*-（ベンゼンスルホニル）チオアセタートなど数種の異なる前駆体から発生させたチオアルデヒドについて1,3-双極子付加環化反応を種々の条件下で検討したが、何れの場合も生成物は極めて複雑な構成の混合物であった。単離が可能な主生成物はジアゾ化合物から発生したカルベンの二量体および三量体で、**4**と見られる化合物の確認には成功しなかった。

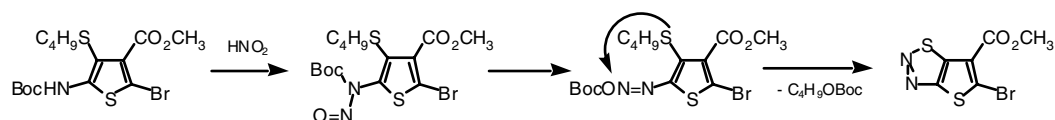


ただし、チラン-2-カルボン酸エチル(**9**)や3-メルカプト-4,4-ジメチル-2-ペンテン酸エチルなどの生成が認められたことから、1,2,3-チアジアズリン誘導体も生成しているが、基質と同程度か、それ以上の容易さで光化学的な脱窒素を受けて分解したものと考えられる。

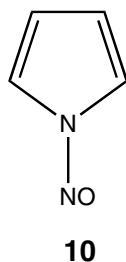
第四の方法では、化合物**1**が生体内でシステインの*S*-または*N*-ニトロソ化により生成するという仮定のもとに、生理条件と比較するには非現実的であるが、氷酢酸溶液中で亜硝酸ナトリウムとの反応を行なった。チラン-2-カルボン酸（**9**）が好収率で得られたから、*N*-ニトロソ化で先ずα-ジアゾニオ-β-カルボン酸が発生し、これがメルカプト基の分子内攻撃で閉環して**9**が生じたと考えられるが、期待した*S*-*N*カップリングによる**1**の生成は確認できなかった。



ただし、文献 (*J. Heterocyclic Chem.* 2002, **39**, 487) には*S*-*N*カップリングによる次式ので示すような1,2,3-チアジアズリン縮合環の構築法が報告されているので、この合成法については、もう少し詳しい検討が必要であったかもしれないと考えている。



ii) *N*-ニトロソピロール 10 の合成(非公開)



3.2- (2) 研究成果の今後期待される効果

二酸化窒素 (NO_2) は常磁性の気体分子であるため、二量化によって安定化する傾向が大きい。希薄な気体状態では単量体として存在するが、凝縮相では単量体と二量体 (N_2O_4) の可逆的な平衡状態で存在し、室温の近辺では、約 80%が二量体の状態である。反応性に乏しい有機溶媒中では、 NO_2 と N_2O_4 は安定な平衡混合物として存在するが、水分が加わると何れも容易に反応して、前者からは硝酸 (HNO_3) と一酸化窒素 (NO)、後者からは HNO_3 と亜硝酸 (HNO_2) が生成する。

気孔から植物体へ取込まれた NO_2 は、細胞の水分に触れると硝酸と NO へ変換されるが、油脂部分に触れた NO_2 は有機相へ溶解して、 NO_2 より反応性の低い N_2O_4 として安定化された後、周辺の極性官能基の影響を受けて分極し、次式に示す内部イオン対 $[\text{NO}^+\text{NO}_3^-]$ との可逆的な平衡状態をつくると考えられる。



液相における NO_2 と有機化合物の反応については、近年、物理化学的な手法による詳しい研究が多くなされ、その結果、極性環境下で酸化電位が 1.5 eV 以下の基質は $[\text{NO}^+\text{NO}_3^-]$ により一電子酸化され、カチオンラジカル種を経由して反応することが明らかになっている。また、アミノ基、メルカプト基、フェノール基などの電子豊富な官能基の場合にはしばしばニトロソ化が起り、それぞれ *N*-ニトロソ、*S*-ニトロソまた *C*-ニトロ化合物を生成することも知られている。*C*-ニトロ化合物は、最初に生成した *C*-ニトロソ化合物が NO_2 でさらに酸化されて生成すると考えられている。

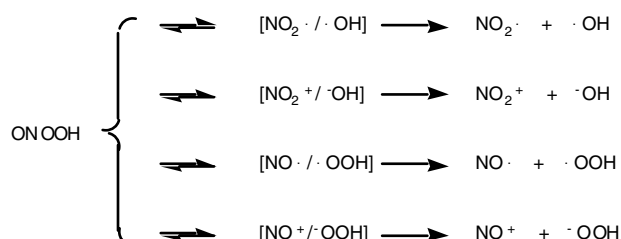
生体関連化合物に対する NO_2 の作用についても多くの研究がなされており、第一級アミンはアルコールへ、第二級アミンは *N*-ニトロソアミンへ変換される。システインやグルタチオンは *S*-ニトロソ化合物またはジスルフィドに変わり、チロシンはフェノール基のオルト位がニトロ化されてニトロチロシンを与える。従って、タンパク質が NO_2 に暴露された場合には、リシンの δ -アミノ基、システインのメルカプト基、チロシンのフェノール基およびプロリンのピロリジン窒素が最も攻撃を受けやすい位置と考えられる。アミノ酸の α -アミノ基は分子内塩として保護された状態にあるため、一般に反応性は低く、水溶液中で NO_2 と直接には反応はしないと考えられる。

a) Δ^2 -1,2,3-チアジアゾリン誘導体 1 の想定される生成経路 (本項目非公開)

b) *N*-ニトロピロール化合物の想定される生成経路 (本項目非公開)

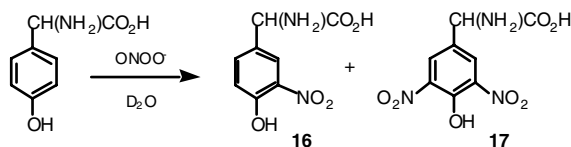
c) アミノ酸およびオリゴペプチドとペルオキシナイトライトの反応

UN 化合物はアミノ酸の画分へ濃縮されるが、この画分を NMR 分光法で詳しく調べても、主要なピークはすべて既知のアミンまたはアミノ酸に帰属される。そこで、UN 化合物は単一の物質ではなく、植物体へ取込まれた NO₂ またはそれから発生するペルオキシナイトライトイオン (ONOO⁻) がアミノ酸と反応して生じる多様な含窒素化合物の集合体であろうと推定した。ペルオキシナイトライトイオンは高 pH 領域では安定であるが、pH 7 の辺りではプロトン化されて遊離酸になった後、基質の構造や反応条件に応じて次の四通りの形式で分解し、多彩な反応性を示すことが知られている。



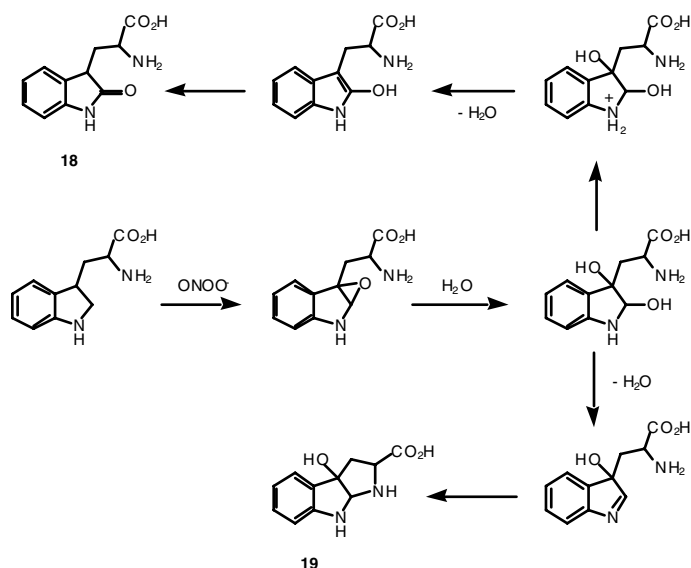
そこで、アジ化ナトリウム (NaN₃) のオゾン酸化により発生させたナトリウムペルオキシナイトライト (NaOONO) を、pH 7 の Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ の重水緩衝液中、室温で一連の天然アミノ酸と 1:1.0~1:1.2 のモル比で反応させ、その生成物を ¹H-NMR で *in situ* に観測した。その結果、脂肪族アミノ酸は反応しないが、システイン、シスチン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジンなど芳香族および含硫黄アミノ酸の場合には、反応率は低い、何らかの化学変化が起ることが判った。*S*-または *N*-ニトロソ化が UN 化合物の生成の鍵反応であると想定して、反応率を上げるため、強力なニトロソ化試薬であるニトロソニウムフルオロボレート (NOBF₄) を入手してシステインのエチルエステルと反応させてみたところ、化合物 1 と同様に 2.8~3.4 ppm の領域に数組の AB パタンの dd 吸収が観測された。反応混合物を集めてキエルダール分析に付した結果、UN に相当する化合物が 21%含まれるとの結果が得られた。

チロシンが生体内でニトロ化されて 3-ニトロチロシンを与えることは既に知られているが、ペルオキシナイトライトとの反応ではさらなるニトロ化が起って、3-ニトロ-および 3,5-ジニトロチロシン (16 と 17) の混合物が生成することが標準試料との比較から判明した。しかし、天然の UN 化合物中に 3-ニトロ-および 3,5-ジニトロチロシンの存在は確認出来なかった。



また、 NaNO_2 /希塩酸を用いて市販品を *N*-ニトロソ化することにより合成した一連の天然アミノ酸関連化合物の *N*-ニトロソ誘導体、*N*-ニトロソサルコニン、*N*-ニトロソピペコリン、*N*-ニトロソアルギニン、*N*-ニトロソアゼチジン-2-カルボン酸などについても UN 化合物の可能性を $^1\text{H-NMR}$ で調べて見たが、めぼしいピークにこれらと一致するものはなかった。

検討したアミノ酸のうちでは、pH 7 のリン酸緩衝重水溶液の条件下でトリプトファンが比較的高い反応性を示し、酸化および縮合環化を受けてオキシインドール (18)、ピロロ[2,3-*b*]インドール誘導体 (19)、および 18 の分解によると見られるキヌレニンを与えることが判った。トリプタミンも同様な反応生成物を与えるが、*N*-Boc 保護したトリプトファンは反応せず、またインドール-3-カルボン酸もまったく反応しないことから、ペルオキシナイトライトによるインドール環の酸化過程には、遊離アミノ基の寄与が大きいことが示唆される。しかし、これらの反応では新たな窒素原子の取込みが見られないので、UN 化合物の生成への関与はないと思われる。



オリゴペプチドとペルオキシナイトライトの反応も併せて検討した(本事項非公開)。

要約

1. $^{15}\text{NO}_2$ に暴露した *Arabidopsis thaliana* や *Arabidopsis thaliana* の葉を凍結乾燥、粉碎後、Milli-Q 水で抽出して得られた試料を精製法 A により分画した結果、UN 化合物が濃縮された画分を分離することに成功した。この画分には、新規な UN 化合物として 1 の存在が各種スペクトルデータの解析から推定された。
2. 精製法 B により分画した UN の豊富な画分からは、別の UN 化合物として *N*-ニトロピロール化合物が単離され、別途合成した標準試料と直接に比較することで確認された。
3. UN 化合物はクロマトグラフィーによる分画の過程で、アミノ酸の画分へ濃縮される特性をもつ。そこで、UN 化合物は NO_2 またはそれから発生するペルオキシナイトライトとアミノ酸または水溶性のオリゴペプチドとの反応により生じるニ

トロおよびニトロソ化合物の集合体ではないかとの作業仮説に基づいて、一連の当該化合物の反応をリン酸緩衝重水溶液中で行い、反応の進行状況を *in situ* に $^1\text{H-NMR}$ で観察した。一部のアミノ酸の反応生成物から、キエルダール分析において UN 化合物としての挙動を示すニトロおよびニトロソ誘導体を単離し、同定することに成功した。

4. 化合物 **1** の化学合成を試みた過程で、1,2,5-トリチエパン骨格の新しい、効率的な構築法が見つかった (*Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**, 2870-2873 に公表済み)。

3.3 作物中の未解明窒素の解析、動物における未解明窒素の解析 (広島大学大学院生物圏科学研究科 藤田耕之輔教授グループ)

3.3-(1) 研究実施内容及び成果

3.3-(1)-(a) 実験 1. 主要作物の通常の栽培条件下における未同定窒素の集積状態

通常の栽培条件下で栽培した主要作物において、未同定窒素 (UN) 化合物が集積するか否かを調査した。野菜類および飼料作物について、標準的な無機元素濃度下で水耕栽培を行い、生育、各種窒素含有率、UN などについて検討した。

野菜類：

主要な野菜類 (コマツナ、カリフラワー、トマトの 3 作物種) を窒素無添加および通常量の窒素濃度 (50ppm $\text{NO}_3\text{-N}$) 下で水耕栽培し、処理開始 14 日目に生育調査を行った。植物体を採取し、各器官ごと凍結乾燥後に UN の量を測定した。

- ① 生育は無窒素区よりも窒素区で大きかった。
- ② 各種とも、窒素添加によってケルダール N、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、UN 含有率が共に上昇する傾向を示した (図 22)。
- ③ UN 含有率は無窒素区では 0.33 ~ 1.83, 窒素区では 0.76 ~ 4.81 $\mu\text{gN}/\text{mgDW}$ と無窒素区より高く、コマツナの根で最も高かった。UN/全 N 比は、無窒素下の 2.2 ~ 9.0, に比較し、窒素区で 5.1 ~ 15.0% と上昇し、この上昇はカリフラワーの根やトマト茎・根で著しかった (図 23)。以上の結果より、野菜では、窒素栄養状態の改善に伴い、UN の集積が葉よりも茎・根でおこる。N 供給状態に関らず、いずれの野菜種、器官でも UN 生成が起こることが分かった。

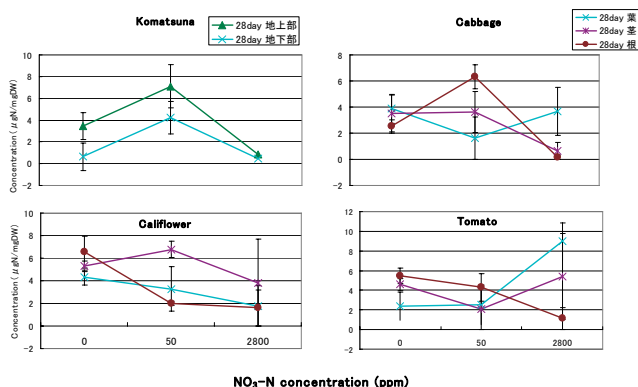


図 22 培地窒素濃度が野菜類各器官の UN 含有率に与える影響

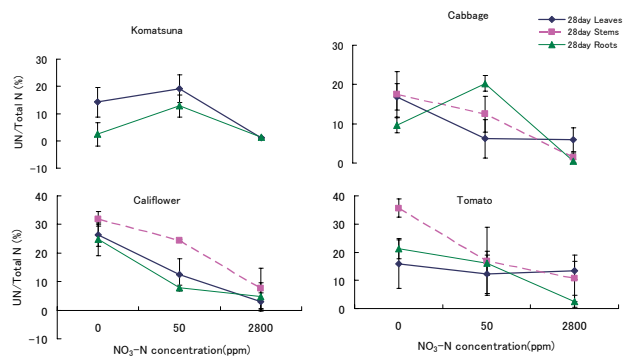


図 23 培地窒素濃度が UN/全 N 比に与える影響

飼料作物：

飼料作物（チモシー、アカクローバ）を窒素無添加および添加条件下（窒素濃度：50, 1600ppmNO₃-N）で水耕栽培し、処理開始時、7、14 日目において、生育、ケルダール-N, 無機態-N (NO₃-N NO₂-N)、および UN 集積状態を調査した。

- ① 各作物種とも、全 N 含有率は、無窒素下で低く、培地 N 濃度の上昇に伴い上昇した。集積 N の中、ケルダール-N 含有率が最も多かった。チモシーでは、無窒素下で UN が、N 添加下で無機態-N がそれぞれより高い含有率を示した（表 3）。
- ② これと類似の傾向がアカクローバでも観察された。但し、アカクローバでは、N 添加の有無にかかわらず、UN 含有率が無機態-N よりも高い傾向を示した。
- ③ UN 含有率は、チモシーでは無窒素下で、アカクローバではこれと 50 ppmNO₃-N 下でそれぞれ高く、いずれも 1600ppmNO₃-N 下で最も低かった。UN/全 N 比 (%) は、無窒素下で最も高く、高 N 濃度下では低下した。

以上の結果より、栽培条件、特に N 濃度条件に関わらず、主要作物において、UN が集積することが判明した。すなわち、UN 集積は、潤沢な N 供給条件下よりも N ストレスもしくは N 供給が生育の律速因子として働く条件下の方が、旺盛に行われると推察される。

表 3. チモシーおよびアカクローバにおける UN および各種 N 化合物の生成に対する培地 N 濃度の影響

	Total N (μ gN/mg DW)	Kjeldahl N (μ gN/mg DW)	Inorganic N (μ gN/mg DW)	UN (μ gN/mg DW)	% (UN/Total N)
<チモシー>					
処理開始前 (0 p p m)	50.51 \pm 0.08	44.07 \pm 2.23	4.79 \pm 0.29	2.47 \pm 0.91	4.89 \pm 1.81
処理 7 日目 (0 p p m)	31.33 \pm 0.58	27.76 \pm 1.84	0.15 \pm 0.046	3.42 \pm 1.31	10.99 \pm 4.38
(50 p p m)	50.73 \pm 0.95	41.38 \pm 0.30	6.57 \pm 1.03	2.78 \pm 1.68	5.43 \pm 3.22
(1600 p p m)	50.37 \pm 0.42	40.47 \pm 1.96	7.56 \pm 0.26	2.33 \pm 1.53	4.64 \pm 3.05
処理 14 日目 (0 p p m)	23.09 \pm 0.69	18.64 \pm 0.88	0.01 \pm 0.002	4.45 \pm 1.47	19.14 \pm 5.87
(50 p p m)	48.43 \pm 1.23	37.10 \pm 0.94	7.51 \pm 1.27	3.81 \pm 1.58	7.82 \pm 3.06
(1600 p p m)	45.48 \pm 0.94	35.46 \pm 0.17	7.97 \pm 0.84	2.04 \pm 0.06	.49 \pm 0.11
<アカクローバ>					
処理開始前 (0 p p m)	49.18 \pm 0.69	43.42 \pm 1.16	0.32 \pm 0.19	5.44 \pm 0.66	11.07 \pm 1.49
処理 7 日目 (0 p p m)	27.87 \pm 2.10	23.21 \pm 2.36	0.01 \pm 0.005	4.66 \pm 0.26	16.83 \pm 2.19
(50 p p m)	44.11 \pm 3.69	35.74 \pm 4.99	0.43 \pm 0.28	7.93 \pm 2.65	18.19 \pm 6.47
(1600 p p m)	50.80 \pm 1.69	44.28 \pm 2.30	3.09 \pm 0.82	3.42 \pm 0.28	6.74 \pm 0.76
処理 14 日目 (0 p p m)	18.71	13.43	0.01	5.27	28.15
(50 p p m)	49.79 \pm 3.24	39.74 \pm 1.67	2.76 \pm 1.19	7.30 \pm 0.79	14.66 \pm 1.26
(1600 p p m)	51.73 \pm 1.49	43.80 \pm 1.59	4.19 \pm 2.39	3.74 \pm 1.37	7.29 \pm 2.90

3.3- (1) - (b) 実験 2. 植物における未解明窒素の集積機構の解析

培地窒素濃度の影響

これまでの研究で、UN 生成は主要作物において普遍的に起こる現象であることが明らかにされている。次に、UN 生成の機構を解析するための糸口をさぐるため、培地の硝酸態窒素濃度にどのように影響をうけるかについて、主要な野菜類に例に検討した。主要な野菜類（コマツナ、カリフラワー、キャベツ、トマトの 4 作物種）を上記の植物種の幼苗を供試し、約 2 週間後、植物体をプラスチック製コンテナ（70L 容）に移植し、水耕栽培を行った。窒素濃度処理は 0、50、1600、2200、2800、及び 3200ppmN の 6 段階で行った。水耕期間中はエアレーションを行い、培養液は 2 週間のサンプリング毎に交換し、pH を 5.8~6.0 に保った。

乾物重に及ぼす培地窒素濃度の影響

個体重は、植物種、培地窒素濃度、窒素処理後の日数によって変動した。最も高い個体重は、コマツナ、およびカリフラワーでは 14 日目、および 28 日目の 1600ppm 区、キャベツでは 14 日目、および 28 日目ともに 2200、および 2800ppm 区だった。トマトは生育期間によって異なり、14 日目で 1600ppm 区、28 日目で 50ppm 区だった。この結果は、生育の最適窒素濃度に作物種間差があることを示している。作物生育は、N 集積と密接に関連し、その N の主体はケルダール-N が占めた。

培地窒素濃度と UN 集積の関係

ケルダール-N 含有率は、各器官とも培地窒素濃度の上昇で高まり、2800ppm 下で低 N 下 (0、50ppm) を上回った。同様の傾向は、無機態 N 含有率でも観察された。但し、この値は 2800ppm 下で特に高かった。このため、無機 N/全 N 比 (%) は 0 及び 50ppm 下 (1%以下) より 2800ppm (25~40%) で著しく上昇した。UN 含有率は、無窒素下で経時的に上昇し、UN/全 N 比 (%) も 28 日の方が 14 日より高かった (図 22,23)。この値は、特に茎で高く、キャベツ 18%、カリフラワー 32%、トマト 35%であった。

このように、野菜類でも、無窒素下の方が培地からの N 供給が高い場合よりも UN 生成が活発に行われるものと推定される。

以上の結果は、UN 生成が培地 N 濃度、作物種、器官に関わらず行われるというこれまでの結果と一致している。UN 生成は、N ストレスによって N 供給が生育の限定要因として働く条件下で促進されるものと推察される。

培地窒素化合形態の影響

実験 2-1) と同様のねらいから、本研究では、特に培地窒素の化合形態が UN 生成に与える影響を検討した。

イネ・トウモロコシを N 化合形態・濃度を変えて ($\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ または $\text{NH}_4\text{-N}$ をそれぞれ 50ppmN 及び 400ppmN) 水耕栽培し、処理開始 11 日目に生育調査、各器官ごとのケルダール N、UN 生成などを測定した。

- ① 生育は、 NO_2 区で阻害されたが、 NO_3 区及び NH_4 区では良好だった。
- ② 両種とも、ケルダール N 含有率が最も高く、無機態 N や UN 含有率が低い傾向を示した。無機態 N 含有率は、イネでトウモロコシより低かった。
- ③ UN 含有率は約 $4 \mu\text{gN}/\text{mgDW}$ 、UN/全 N 比は約 13.5% でそれぞれ最高値を示し、両種とも全ての器官で UN が検出された (図 24)。UN 含有率は、イネにおいては、50ppm $\text{NO}_3\text{-N}$ では葉で、 NO_2 では根でそれぞれ高く、 NH_4 では各器官とも著しく低かった。一方、トウモロコシでは、 NO_2 および NO_3 区では葉で、 NH_4 区では根でそれぞれ高い傾向を示した。以上の結果より、イネ科作物では、UN は N 化合形態・濃度に関わらず各器官に集積し、この集積状態に種間差が認められる。

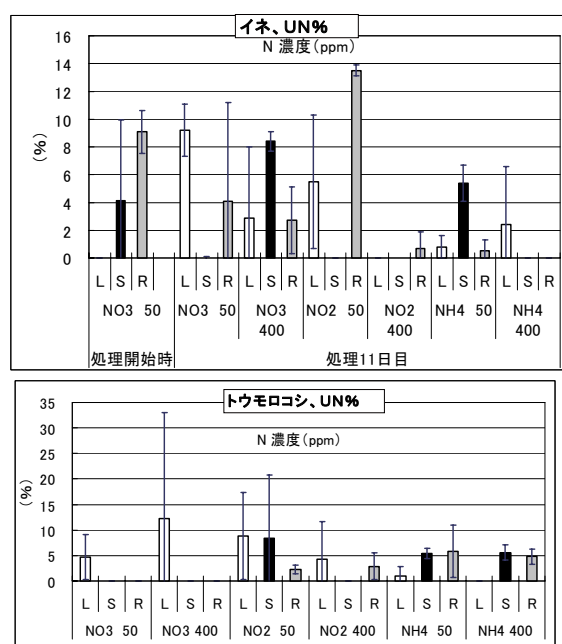


図 24 UN 化合形態が各器官の UN/全 N 比 (%) に与える影響

UN 生成と酸化ストレス

UN 生成は、多くの作物種において低培地窒素濃度下 (0~50ppmN) で高濃度下 (100~3200ppmN) よりも盛んに行われることが本研究で明らかになった。一方、窒素供給が不十分な条件下で酸化ストレスが高まることが報告されている。そこで、低窒素供給の条件下で UN 生成が高い要因が酸化ストレスと関連するか否かについて検討した。

主要な野菜類 (コマツナ、キャベツ、カリフラワー、トマトの 4 作物種) を窒素濃度 (0, 50, 1600, 2200, 2800 and 3200 ppmN) を 6 段階で水耕栽培し、処理開始 14 および 28 日目にケルダール N、UN 含有率などを測定した。これとは別途に同様の作物種を用いて、窒素濃度 (0, 10, 50, 100, 800, 1600 ppmN) 処理を行い、酸化ストレスのパラメーター (アスコルビン酸、グルタチオン濃度、カタラーゼ活性、スーパーオキシドデスムターゼ (SOD)、マロンデアルデヒド (MDA) など) を測定した。

- ① 生育量は、無窒素下では小さく、培地 N 濃度の上昇で増大し、ピークを示した後、さらに N 濃度が上昇すると減少するパターンを示し、これまでの結果と一致する。
- ② これと同様の傾向は、ケルダール N 含有率でみられたが、無機態 N および UN 含有率とは異なり、例えば UN 含有率は培地 N 濃度が低い方が高い場合を上回った (図 22,23)。
- ③ 葉の DAH 濃度は、無窒素下の方が高 N 下より高かったが (図 25)、GSSG 及び GSSG:GSH 比は逆の傾向を示した (図 26)。また、無窒素下では、SOD,MDA 濃度が上昇した (図 27,28)。しかしながら、カタラーゼ活性には一定の傾向は認められなかった (図 29)。これらの結果から、N ストレス下で UN 生成能が高い原因は、参加ストレスによるものと考えられる。これは、電子受容体である NO₃ が低 N 培地下では限られているためと想像される。

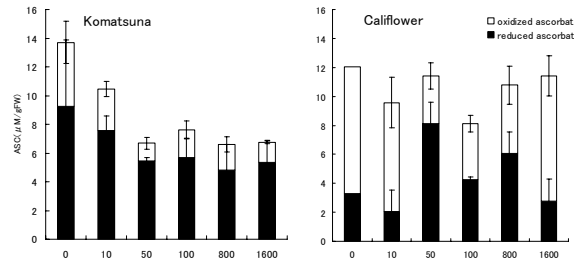


図 25 培地窒素濃度が野菜類の葉におけるアスコルビン酸濃度に与える影響

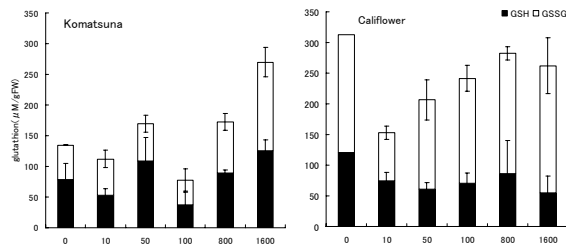


図 26 培地窒素濃度が野菜類の葉における

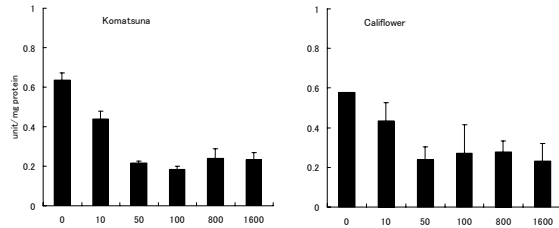


図 27 培地 N 濃度が野菜類の葉における SOD 活性に与える影響

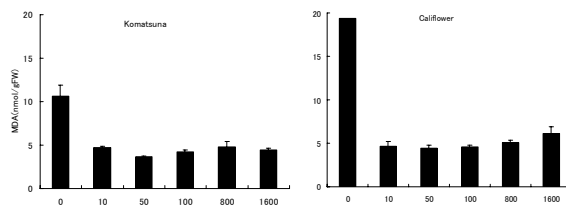


図 28 培地窒素濃度が野菜類の葉における MDA 濃度に与える影響

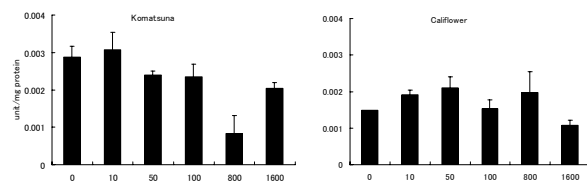


図 29 培地窒素濃度が野菜類の葉におけるカタラーゼ活性に与える影響

3.3- (1) - (c) 実験 3. 動物における未同定窒素の集積状態に対する硝酸態窒素投与の影響

家畜では、多肥条件下で生育し高濃度の硝酸を集積した牧草の摂取によって硝酸中毒が発症し、この解決が重要な課題となっている。また、同様な条件下では、幼児で発症するいわゆるブルーベビーも知られている。しかし、いずれもその要因が完全に解明されるに至っていない。そこで、硝酸中毒に対して未同定N化合物（UN：ケルダール法で測定不可の窒素）が関与しているか否かを探るため、動物における UN 集積状態について調査を実施した。実験動物として、単数胃としてニワトリ、反芻動物としてヒツジを用いた。

ヒツジ：生後約 6 ヶ月のサフォーク種 (*Ovis aries*) 4 頭を供試動物とした。上記の 4 頭を、約 1 ヶ月間、1 日 2 回朝と夕方、1 回あたり通常の乾草及び濃厚飼料を 100g、合計 1 日 200g 与えて飼育した後に、2 頭をコントロールとし、別の 2 頭を窒素処理（餌に硝酸カルシウム ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) を 1 回 10g ずつ混合）を与えた。ヒツジの解体は窒素処理後 1 ヶ月目及び 2 ヶ月目の 2 回行った。解体時、体重を測定し、解体後は各器官を脱塩水で洗浄し、水分を十分に切って新鮮重を秤量した。採取した器官は、第 1 胃、第 2 胃、第 4 胃、肝臓、すい臓、小腸、大腸、腎臓、小脳、大脳、延髄、及び筋肉である。秤量後、各器官ごとに液体窒素で凍結し、 -80°C で冷凍保存した。冷凍保存した試料は凍結乾燥し、植物体と同様に、全 N、ケルダール N、無機態 N、UN 等を測定した。ヒツジを用いた実験は、2 反復で 2004 年および 2006 年の 2 年度に渡って繰り返し実施した。

ニワトリ：生後約 1 ヶ月のニワトリ (*Gallus gallus domesticus* 品種 ハクショクレグホン) 12 羽を供試し、硝酸態窒素の投与実験を実施した。処理は、2 日に 1 回、1 回あたり通常の濃厚飼料を 50g/羽与えて飼育した後に、6 羽をコントロール、もう 6 羽を処理対象として窒素処理（餌に硝酸カリウム (KNO_3) を 1 回 2.1g/羽ずつ混合）を行った。

ニワトリの解体は窒素処理後 1 ヶ月目に行った。解体時、体重を測定し、解体後は各器官を脱塩水で洗浄し、水分を十分に切って新鮮重を秤量した。採取した個体は、胃、肝臓、腎臓、すい臓及び筋肉などの器官に分けた。秤量後、各器官ごとに液体窒素で凍結し、 -80°C で冷凍保存した。冷凍保存した試料は凍結乾燥し、植物体と同様に、全 N、ケルダール N、無機態 N、UN 等を測定した。実験は 3 反復で実施した。

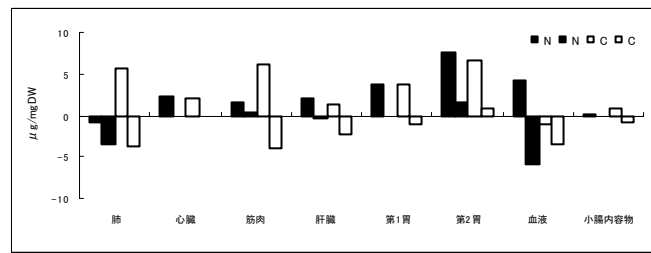
結果

ヒツジ：全 N 含有率は、筋肉で約 $141 \mu\text{gN}/\text{mg}$ 乾物重と最も高く、筋肉や胃で高く、延髄で低い傾向を示した（図 30）。UN 含有率は、処理後 2 ヶ月目の第 4 胃で約 $12 \mu\text{gN}/\text{mg}$ 乾物重と最も高かった。全 N に対する UN の比率は、第 4 胃、肝臓および筋肉では $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ の添加によって上昇し、処理後 2 ヶ月目の第 4 胃で約 15% と最も高い値を示した（図 30）。また、この比率は、小脳では $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 添加の有無に関らず高く、これら以外の器官では処理による一定の傾向が見られなかった。以上の結果より、ヒツジの体内の臓器には UN を集積することが分かり、この集積は第 4 胃、筋肉などの臓器では $\text{NO}_3\text{-N}$ の摂取によって増大する傾向があると推定される。

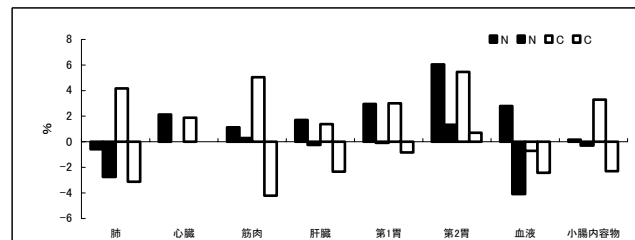
各器官を UN% の変動状態に基づいて 3 つのグループに分類した。

【グループ I】 生育期間の経過とともに、UN% が高くなるグループ：（肝臓、小腸、小脳、筋肉）；【グループ II】 生育期間の経過とともに、UN% が低くなるグループ：（第 1 胃、第 2 胃、大腸、大脳、延髄）；【グループ III】 生育期間が経過しても、変動が少なく、あまり影響を受けないグループ：（第 4 胃、すい臓、腎臓）

このように、UN はヒツジの各臓器で検出された。この集積は、生育時期や臓器間で変動することも分かった。また、UN の生成は、肝臓、小腸、小脳、筋肉などで高まる場合があり、この上昇は高濃度の硝酸態窒素を含む飼料中の給与と関連することが示唆された。

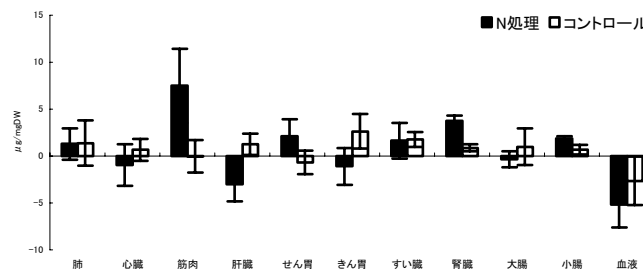


ヒツジの各器官における UN 含有率
* 各器官毎に左から処理 1、2、対照 1、2 (計 4 頭)



ヒツジの器官における UN/Total N 比 (%)
* 各器官毎に左から処理 1、2、対照 1、2 (計 4 頭)

図 30 ヒツジの各器官における UN 集積状態に対する NO₃-N 投与の影響



鶏の各器官における UN 含有率

図 31 ニワトリの各器官における UN 集積状態に対する NO₃-N 投与の影響

ニワトリ：UN 含有率は、腎臓、小腸、筋肉で KNO₃ の添加によって上昇した (図 31)。これ以外には、器官、NO₃-N 投与にかかわらず一定の傾向が認められなかった。

以上のように、動物においても、UN 集積し、この集積がヒツジと鶏では異なる可能性がある。UN 生成を一般的な主要作物について明確にしたこと、特に無窒素条件下でその生成が高まることは、特に窒素施肥が困難な発展途上国では重要な解決すべき課題である。

3.3- (2) 研究成果の今後期待される効果

本研究によって、UN が通常の栽培条件下における主要作物において集積することが判明した。さらに、家畜においても、UN が集積し、硝酸態 N の給与によって増大することも指摘される。UN 化合物の実態が解明されるに伴い、これらの UN の動・植物の生理機能に与える影響やその生長に及ぼす影響が問われるものと推定される。

UN 生成・集積が窒素ストレス条件下で多いことが指摘された。このことは窒素施肥が可能な一部の先進国を除いて、90%以上の農耕地では窒素ストレスによって低収性を余儀なくされており、このような地域で UN 生成が起これば、UN 化合物の生理作用しだいでは、この課題が将来の解決すべき課題として登場する可能性が考えられる。

3.4 未解明窒素前駆体化合物から未解明窒素化合物への生物転換及び酵素変換 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科橋本隆 教授グループ、H17—)

3.4-(1) 研究実施内容及び成果

植物に ^{15}N ラベルの二酸化窒素または硝酸を与えると、全窒素の約 1/3 はケルダール窒素でもなく無機窒素でもない未解明窒素 (UN) となる。これまでに三種以上の UN 化合物が同定されたが、そのうちの一つは現在までに報告されていない新規な窒素化合物、 Δ^2 -1,2,3-チアジアゾリン誘導体であると考えられた。天然物成分の構造決定は標品から目的成分を抽出して単離、精製後、物理的手法で解析し、その化学構造を推定し、別途に合成したものと比較して、これらの一致により構造を確認するという手順で行われる。 Δ^2 -1,2,3-チアジアゾリン誘導体と見られる化合物の合成を行うため、市販の出発原料から 2 段階で容易に合成できるチアジアゾール誘導体からの化学合成を試みたが、期待した還元反応は困難であった。そこで植物の酵素を利用して、チアジアゾール誘導体から Δ^2 -1,2,3-チアジアゾリン誘導体への変換を試みることにした。

酵素液の調整には植物材料としてタバコ培養細胞 BY-2 (bright yellow 2) を用いた。BY-2 細胞から細胞抽出液を調整し、硫酸沈殿を行った後脱塩処理を行った。チアジアゾール誘導体および酵素反応生成物の検出には感度をあげるため、蛍光標識およびメチルエステル化を行った。分析は高速液体クロマトグラフィーにより行い、ピークを測定した。酵素反応の補酵素として NADH を加えた場合に特異的なピークが観察され、LC-MS の結果から目的とする Δ^2 -1,2,3-チアジアゾリン誘導体である可能性が高いことが明らかとなった。現在、NMR 法などによる詳細な分析による確認を行っている。

植物酵素によるチアジアゾール化合物の還元

Δ^2 -1,2,3-チアジアゾリン化合物の構造を確認するため、まず化学合成を試みた。市販の出発原料から 2 段階で容易に合成できるチアジアゾール誘導体を種々の条件下で幅広く還元を試みたが、期待した還元は困難であった。そこで目的とするチアジアゾリン誘導体が植物体内で生産されることから、植物の酵素を用いて還元反応を行うことを試みることにした。

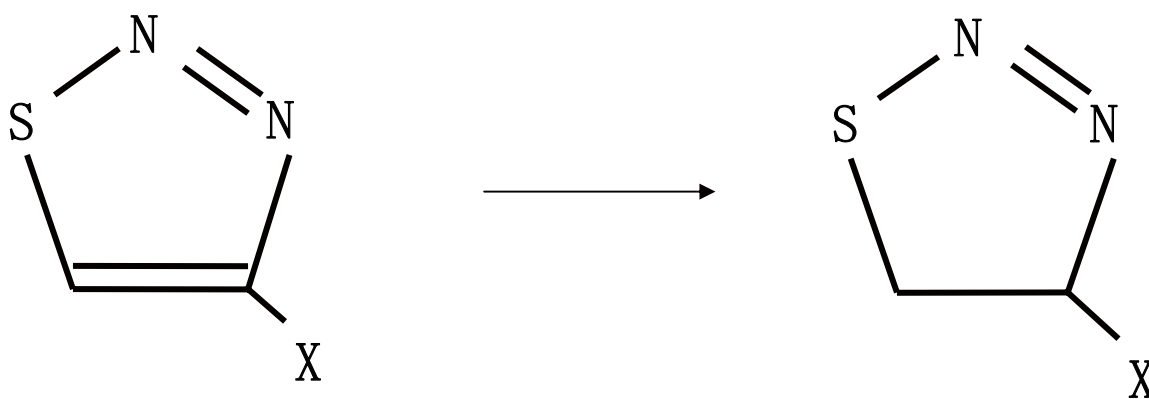


図32 目的とする還元反応

酵素液の調整

酵素液の調整には植物材料としてタバコ培養細胞 BY-2 (bright yellow 2) を用いた。BY-2 細胞は植物細胞の中では増殖速度が極めて速く、大量の材料を容易に準備することができる。BY-2 細胞は液体の改変 LS 培地で継体し、100 mL の改変 LS 培地に 2 mL 植え継いだものを一週間培養したものから細胞抽出液を調整し、80%飽和での硫酸沈殿を行った後、PD-10 カラムによる脱塩処理を行った。

100°Cで 30 分熱処理し、遠心分離した後上清を回収したものを熱処理酵素として使用した。

酵素反応

チアジアゾール誘導体の反応には基質である 10 mM チアジアゾール誘導体 60 μ L に BY-2 酵素液 (0.8 mg / ml) 85 μ L と補酵素として NADH(6 mM)または NADPH(6 mM) 5 μ L を加えて 30°Cで 30 分間インキュベートした。必要に応じて反応液量をスケールアップして行った。反応液は遠心により酵素を除いた後、凍結乾燥して保存した。

DMEQ-H による誘導体化

誘導体化方法

Takagi らの方法に従った (Chromatography p85-90. Vol 22, 2001)

試薬 DMEQ-H (和光純薬)、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide 塩酸 (WSC)、ピリジン

サンプル (NADPH + 酵素 +チアジアゾール誘導体、NADPH + 熱処理酵素 +チアジアゾール誘導体、NADH + 酵素 +チアジアゾール誘導体、NADH + 熱処理酵素 +チアジアゾール誘導体、buffer +チアジアゾール誘導体の凍結乾燥品) を 20 μ l の水に溶解したものを用いた。

誘導体化反応系

サンプル 1 μ l

4% ピリジン/EtOH 1 μ l

50 mM DMEQ-H/DMF 1 μ l

0.2 M WSC/H₂O

1. 37°C 1 h 反応
2. 15 mg SCX をカラムに充填
3. 500 μ l MeOH を通液
4. 500 μ l H₂O 通液
5. 誘導体化反応液をカラムにアプライ
6. 27 μ l の H₂O で溶出
7. 100 μ l の MeOH で溶出
8. MeOH 溶出画分をエバポレーターで乾燥
9. 30 μ l の H₂O に溶解
10. 15 μ l を LC-MS 分析

Trimethylsilyldiazomethane によるメチルエステル化

DMEQ-H による誘導体化は、

- (1) 試料が低濃度の際、誘導体化効率が低下する
- (2) 未反応の DMEQ-H を取り除くことが困難

であったことから、誘導体化効率の高い、メチルエステル化を行うことにした。

試薬

Trimethylsilyldiazomethane (0.6 mol/L in n-hexane) (東京化成)

メタノール

ベンゼン

誘導体化方法は試薬に添付されたプロトコルに従った。

1. サンプル (NADH + 酵素 + チアジアゾール誘導体)、(NADH + 熱処理酵素 + チアジアゾール誘導体) の凍結乾燥品を 20 μ l の水に溶解
2. サンプル 1 μ l を凍結乾燥
3. 10 μ l の MeOH を加えボルテックス
4. 40 μ l の ベンゼンを加えボルテックス
5. 25 μ l の メチル化試薬を加えボルテックス
6. 30 min 反応
7. 125 μ l の MeOH を加え、12000 rpm 10 min 遠心後、上清をバイアルに移した
8. 15 μ l LC-MS 分析

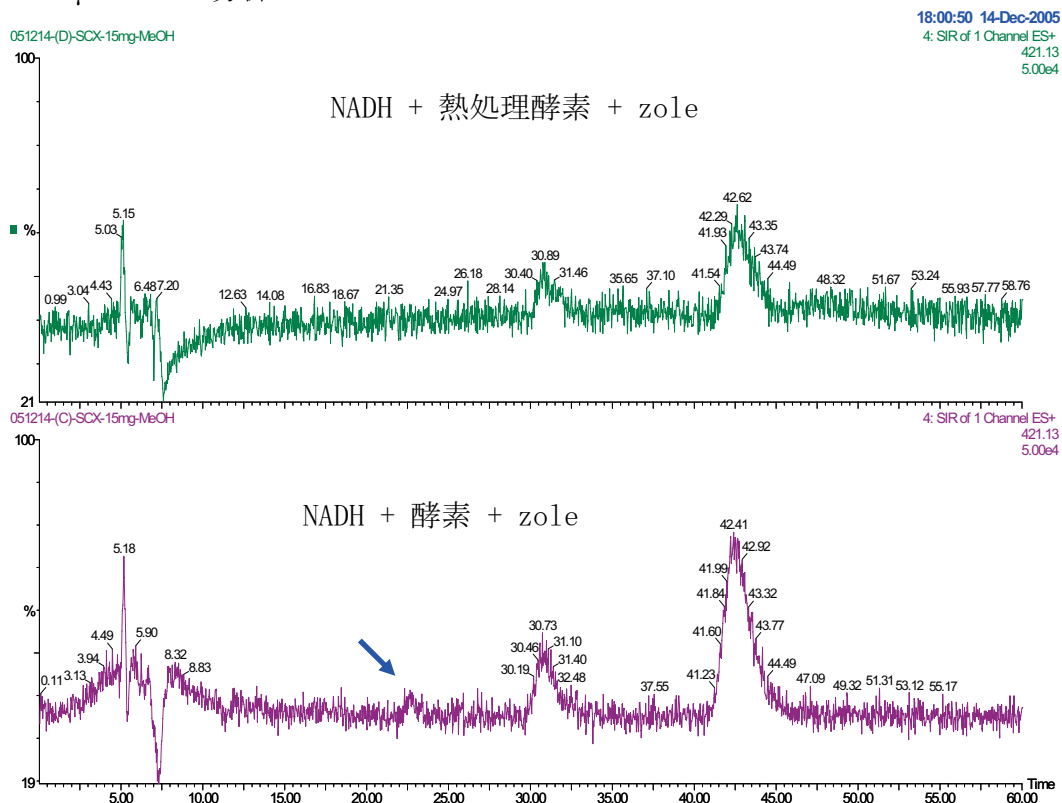


図33 DMEQ-H による誘導体化のLC-MSスペクトル

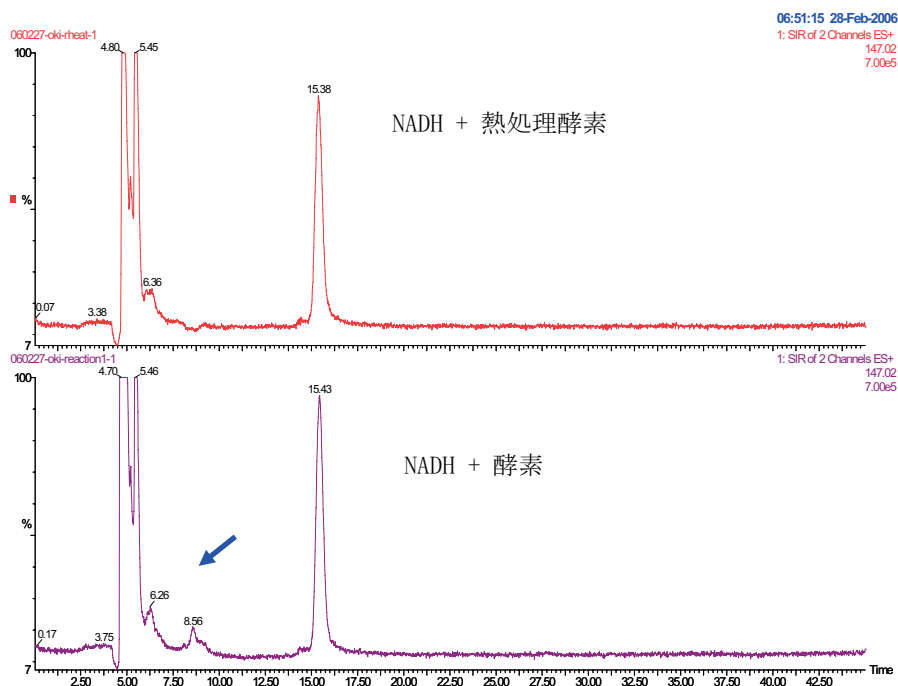


図34 メチルエステル化のLC-MSスペクトルのLC-MSスペクトル

LC-MS 条件

0.01% ギ酸 : MeOH = 70 :30

流速 0.5 ml/min

SIR モードと蛍光検出器で検出 (励起波長 367 nm 蛍光波長 445 nm)

m/z 421.13 ゴリン-DMEQ-H 誘導体

m/z 419.11 ゴール -DMEQ-H 誘導体

m/z 307.14 未反応 DMEQ-H

3.4-(2) 研究成果の今後期待される効果

タバコ培養細胞 BY-2 から調整した粗酵素標品を用いた変換反応によるチアジアゾール誘導体のオレフィン二重結合の飽和による Δ 2-1,2,3-チアジアゾリンへの変換を試みた。補酵素として NADH を加えた場合に特異的なピークが観察され、LC-MS の結果から目的とする Δ 2-1,2,3-チアジアゾリン誘導体である可能性が高いことが明らかとなり、NMR 法などによる詳細な分析による確認を試みたが、未だ Δ 2-1,2,3-チアジアゾリン誘導体であると確定するにはいたっていない。

チアジアゾールのチアジアゾリンへの有機化学的変換はきわめて困難とされることに鑑み、本研究は未完ではあるが、今後の本分野の展開の大きな手がかりを与えるものと我々は考えている。本研究が、完成され酵素的なチアジアゾールからチアジアゾリンへの変換が成功すれば、画期的手法として新しい学問分野技術分野の展開を生むことは間違いないと考えられる。また、本研究で確立した蛍光標識およびメチルエステル化法と高速液体クロマトグラフィーを組み合わせた高感度検出法は、今後の本分野の研究に大きな礎を提供するものである。

4 研究参加者

①森川 弘道 研究グループ (未解明窒素化合物(UN 化合物)の研究の総括
UN 化合物の精製、UN 化合物の生理作用と関連遺伝子解析の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
森川弘道	広島大学大学院理学研究科	特任教授	総括、UN 分離分析	平成13年12月～平成19年3月
平田敏文	広島大学大学院理学研究科	教授	UN 化合物の分離と生理活性	平成15年4月～平成19年3月
坂本 敦	広島大学大学院理学研究科	助教授	遺伝子クローニング・操作	平成13年12月～平成19年3月
高橋美佐	広島大学大学院理学研究科	助手	NOx シグナル・プロテオミクス	平成13年12月～平成19年3月
中保 建	広島大学大学院理学研究科	CREST 研究員	モデル植物 UN 分画・精製	平成14年5月～平成15年7月
松原俊之	広島大学大学院理学研究科	CREST 研究員	脱窒植物・UN 分画	平成15年4月～平成18年6月
中山忠宣	広島大学大学院理学研究科	CREST 研究員	作物 UN 化合物、生理作用の解析	平成15年4月～平成15年5月
福永一成	広島大学大学院理学研究科	CREST 技術員	植物の管理、分離分析補助	平成13年12月～平成15年11月
中山睦美	広島大学大学院理学研究科	CREST 研究補助員	実験植物の栽培・管理	平成14年5月～平成15年5月
井野 香	広島大学大学院理学研究科	CREST 研究補助員	実験植物の栽培・管理	平成15年6月～平成17年5月
高橋美奈	広島大学大学院理学研究科	CREST 研究チーム事務員		平成13年12月～平成14年6月
木津美和子	広島大学大学院理学研究科	CREST 研究チーム事務員		平成14年6月～平成18年3月
山本知枝	広島大学大学院理学研究科	CREST 研究チーム事務員		平成18年2月～平成19年3月
河村義史	広島大学大学院理学研究科	D5	UN 分離分析	平成13年12月～平成14年3月
Erkin Özgür Cem	広島大学大学院理学研究科	D3	UN 分離分析	平成13年12月～平成15年3月
加藤千晴	広島大学大学院理学研究科	D5	化合物 B の作用	平成13年12月～平成16年5月

車田麻美	広島大学大学院理学研究科	D5	生理作用	平成13年12月～平成18年3月
近藤功明	広島大学大学院理学研究科	D4	プロテオミクス	平成13年12月～平成16年3月
羽方 誠	広島大学大学院理学研究科	D4	脱窒植物	平成13年12月～平成16年5月
青木大輔	広島大学大学院理学研究科	D2	生理作用	平成14年4月～平成17年3月
栗原 要	広島大学大学院理学研究科	D5	トランスジェニック植物	平成14年4月～平成19年3月
田中利明	広島大学大学院理学研究科	D1	分解機構	平成14年4月～平成14年9月
塚本成文	広島大学大学院理学研究科	D3	分解機構	平成14年4月～平成16年12月
外菌寛郎	広島大学大学院理学研究科	D5	UN 分離分析	平成14年4月～平成18年3月
重藤 潤	広島大学大学院理学研究科	D4	プロテオミクス	平成15年4月～平成19年3月
Sueli Kohama	広島大学大学院理学研究科	D4	植物選抜	平成15年4月～平成19年3月
中川彩美	広島大学大学院理学研究科	D4	酵素精製	平成15年4月～平成19年3月
Suaad Elradi Hamid Adam	広島大学大学院理学研究科	D3	関連遺伝子	平成16年4月～平成19年3月
橋本愛美	広島大学大学院理学研究科	D2	トランスジェニック植物	平成15年4月～平成17年10月
中川真紀子	広島大学大学院理学研究科	D1	NOx シグナル	平成15年4月～平成17年9月
吉原早苗	広島大学大学院理学研究科	M2	樹木形質転換	平成15年4月～平成16年3月
稲村太郎	広島大学大学院理学研究科	M2	脱窒植物	平成15年4月～平成17年3月
小中大輔	広島大学大学院理学研究科	M2	NOx シグナル	平成15年4月～平成17年3月
清水由美子	広島大学大学院理学研究科	M2	酵素精製	平成15年4月～平成17年3月
前田 暢	広島大学大学院理学研究科	M2	UN 化合物の合成と分離	平成16年4月～平成17年3月
甫出一将	広島大学大学院理学研究科	M2	化合物 B の作用	平成16年4月～平成18年3月
村田朋子	広島大学大学院理学研究科	M2	樹木の形質転換	平成16年4月～平成18年3月
門田佳子	広島大学大学院理学研究科	M2	プロテオミクス	平成16年4月～平成18年3月

宮木洋一	広島大学大学院理学研究科	M2	UN 化合物の生成・分解酵素遺伝子	平成17年4月～平成19年3月
本山裕一	広島大学大学院理学研究科	M2	NOx 曝露で発現する遺伝子の解析	平成17年4月～平成19年3月
古橋孝将	広島大学大学院理学研究科	M1	NOx のホルモン様効果	平成18年1月～平成19年3月
高木端之	広島大学大学院理学研究科	M1	NOx のホルモン様効果	平成18年4月～平成18年9月
阪本沙央理	広島大学大学院理学研究科	4年	NOx シグナル	平成18年4月～平成18年9月
岡 沙衣子	広島大学大学院理学研究科	4年	NOx シグナル	平成18年4月～平成19年3月
鴨崎義智	広島大学大学院理学研究科	4年	UN 解析	平成18年4月～平成19年3月
野田明日香	広島大学大学院理学研究科	4年	NOx のホルモン様効果	平成18年4月～平成19年3月
西村 崇	広島大学大学院理学研究科	4年	NOx シグナル	平成18年4月～平成19年3月

②鈴木仁美研究グループ(UN 化合物の構造解析、UN 化合物および関連化合物の合成の研究)

平成16年4月より 佐藤 格 研究グループとして研究継続

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
佐藤 格	関西学院大学理工学部	講師	理論有機化学的解析	平成16年4月～平成17年3月
鈴木仁美	関西学院大学理工学部	非常勤特別研究員	理論有機化学的解析	平成13年12月～平成17年3月
林 宣之	科学技術振興機構	研究員	UN の構造解析	平成14年4月～平成15年3月
中山忠宣	科学技術振興機構	研究員	構造解析	平成15年6月～平成16年3月
宮脇和博	科学技術振興機構	研究員	有機合成	平成15年8月～平成16年3月
大島啓志	関西学院大学大学院理学研究科	大学院生(M2)	UN 生成のモデル実験	平成13年12月～平成15年3月
福井直之	関西学院大学大学院理学研究科	大学院生(M2)	UN 生成のモデル実験	平成13年12月～平成16年3月

③藤田耕之輔研究グループ (作物における UN 生成蓄積機構の解析と動物における UN 生成の解析の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
藤田 耕之輔	広島大学大学院生物圏科学研究科	教授	植物の環境ストレスが UN 生成に及ぼす影響(低温・遮光など)	平成14年4月～平成19年3月
諏訪竜一	広島大学大学院生物圏科学研究科	D3	野菜類の UN 集積	平成16年4月～平成19年3月
グエン・チャン・グエン	広島大学大学院生物圏科学研究科	D1	作物栽培条件の効果	平成14年4月～平成15年3月
有本潤二	広島大学大学院生物圏科学研究科	M2	光合成量への効果	平成14年4月～平成15年3月
重松友子	広島大学大学院生物圏科学研究科	M2	野菜類の UN 集積	平成15年4月～平成16年3月
山田恭介	広島大学大学院生物圏科学研究科	M2	牛の UN 生成	平成15年4月～平成17年3月
ムチア・スンダラ	広島大学大学院生物圏科学研究科	M2	羊の UN 生成	平成15年4月～平成17年3月
本間圭奈	広島大学大学院生物圏科学研究科	M2	UN 集積機構	平成16年4月～平成18年3月
佐々木祥子	広島大学大学院生物圏科学研究科	M2	ヒツジにおける UN 生成	平成17年4月～平成19年3月
金井俊輔	広島大学大学院生物圏科学研究科	D1	栄養ストレスが UN 生成に及ぼす影響 (N, S 欠乏、低温など)	平成18年4月～平成19年3月

④橋本 隆 研究グループ(植物培養細胞、培養組織、個体を用いた UN 前駆体化合物から U 化合物への生物転換及び酵素変換の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
橋本 隆	奈良先端科学技術大学院大	教授	酵素活性の測定	平成17年3月～平成19年3月

	学バイオサイ エンス研究科			
大木 宏之	JST	CREST 研 究員	UN 前駆体の生物変 換、酵素変換	平成17年3月～ 平成18年3月
吉田安希	奈良先端科学 技術大学院大 学バイオサイ エンス研究科	M2	前駆体の投与、植物体 育成	平成17年3月～ 平成18年3月

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0件、国際誌24件)

≪著者、論文タイトル、掲載誌 巻、号、発行年≫

国際誌

1. M.Takahashi, Y. Sasaki, S. Ida and H. Morikawa. Enrichment of nitrite reductase gene improves the ability of *Arabidopsis thaliana* plants to assimilate nitrogen dioxide. *Plant Physiol.*, 126(2): 731-741 (2001).
2. K. Shimizu, M. Takahashi, N. Goshima, S. Kawakami, K. Irifune and H. Morikawa. Presence of an SAR-like sequence in junction regions between an introduced transgene and genomic DNA of cultured tobacco cells : its effect on transformation frequency. *Plant Journal*, 26(4): 375-384(2001).
3. Y. Kawamura, K. Fukunaga, A. Umehara, M. Takahashi and H. Morikawa. Selection of *Rhododendron mucronatum* plants that have a high capacity for nitrogen dioxide uptake. *Acta Biotechnol.*, 22:113-120 (2002).
4. H. Morikawa, M. Takahashi and Y. Kawamura. Metabolism of nitrogen dioxide in plants-Assimilation, dissimilation and novel metabolites. *Physiol. Mol. Biol. Plant.* 8(1) 19-29 (2002)
5. Sakamoto, A., Ueda, M. & Morikawa, H. *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an *S*-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett.* 515: 20-24 (2002).
6. K. Kondo, M. Takahashi and H. Morikawa. Regeneration and transformation of a roadside tree *Pittosporum tobira* Ait. *Plant Biotechnol.*, 19(2) 135-139 (2002)
7. A. Sakamoto, S. Tsukamoto, H. Yamamoto, M. Ueda-Hashimoto, M. Takahashi, H. Suzuki and H. Morikawa. Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species. *Plant J.* 33, 841-851 (2003).
8. O.C. Erkin, M. Takahashi, A. Sakamoto, H. Morikawa. Development of regeneration and transformation systems for *Rhaphiolepis umbellata* L. plants using particle bombardment.

- Plant Biotechnol. 20(2): 145-152 (2003).
9. M. Takahashi, K. Kondo and H. Morikawa. Assimilation of nitrogen dioxide in selected plant taxa. *Acta Biotechnol.* 23(2-3):241-247 (2003).
 10. M. Hakata, M. Takahashi, G. Zumft, A. Sakamoto, and H. Morikawa. Conversion of the nitrogen of nitrate and nitrogen dioxide to nitrous oxide in plants. *Acta Biotechnol.* 23(2-3):249-257 (2003).
 11. H. Morikawa, M. Takahashi, A. Sakamoto, T. Matsubara, G. Arimura, Y. Kawamura, K. Fukunaga, K. Fujita, N. Sakurai, T. Hirata, H. Ide, N. Nonoyama and H. Suzuki. Formation of unidentified nitrogen in plants: an implication for a novel nitrogen metabolism. *Planta* 219:14-22 (2004).
 12. C. Kato, M. Takahashi, A. Sakamoto and H. Morikawa. Differential expression of the nitrite reductase gene family in tobacco as revealed by quantitative competitive RT-PCR. *J. Exp. Bot.* 55 (403): 1761-1763 (2004).
 13. A. Sakamoto, S. Sakurao, K. Fukunaga, T. Matsubara, M. Ueda-Hashimoto, S. Tsukamoto, M. Takahashi and H. Morikawa. Three distinct *Arabidopsis* hemoglobins exhibit peroxidase-like activity and differentially mediate nitrite-dependent protein nitration. *FEBS Lett.* 572:27-32 (2004).
 14. K. Miyawaki, H. Suzuki and H. Morikawa. Attempted reduction of 1,2,3-thiadiazole-4-carboxylates with samarium/iodine in methanol. Unexpected ring enlargement to 1,2,5-trithiapan-4,6-dicarboxylates. *Org. Biomol. Chem.*, 2: 2870-2873 (2004).
 15. M. Takahashi, S. Kohama, K. Kondo, M. Hakata, Y. Hase, N. Shikazono, A. Tanaka and H. Morikawa. Effect of ion beam irradiation on the regeneration and morphology of *Ficus thumbergii* Maxim. *Plant Biotechnol.* 22(1): 63-67 (2005).
 16. H. Morikawa, M. Takahashi, A. Sakamoto, M. Ueda-Hashimoto, T. Matsubara, K. Miyawaki, Y. Kawamura, T. Hirata, H. Suzuki. Novel metabolism of nitrogen in plants. *Zeit. Naturfors.* 60c: 265-271 (2005).
 17. M. Takahashi, D. Konaka, A. Sakamoto and H. Morikawa. Nocturnal uptake and assimilation of nitrogen dioxide by C3 and CAM plants. *Zeit. Naturfors.* 60c: 279-284 (2005).
 18. M. Kurumata, M. Takahashi, A. Sakamoto, J. L. Ramos, A. Nepovim, T. Vanek, T. Hirata and H. Morikawa. Tolerance to, and uptake and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) are enhanced by the expression of a bacterial nitroreductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Zeit. Naturfors.* 60c: 272-278 (2005).
 19. H. Hokazono, M. Takahashi, A. Sakamoto and H. Morikawa. TJ1 is an orientation-independent transformation enhancer sequence. *Plant Biotechnol.* 22: 137-140 (2005).
 20. M. Takahashi, M. Nakagawa, A. Sakamoto, C. Ohsumi, T. Matsubara and H. Morikawa. Atmospheric nitrogen dioxide gas is a plant vitalization signal to increase plant size and the contents of cell constituents. *New Phytol.* 168: 149-154 (2005).
 21. M. Takahashi, S. Tsukamoto, A. Kawaguchi, A. Sakamoto and H. Morikawa. Phytoremediators from abandoned rice field. *Plant Biotechnol.* 22: 167-170 (2005).
 22. M. Takahashi, A. Higaki, M. Nohno, M. Kamada, Y. Okamura, K. Matsui, S. Kitani and H. Morikawa. Differential assimilation of nitrogen dioxide by 70 taxa of roadside trees at an urban pollution level. *Chemosphere* 61(5): 633-639 (2005).
 23. Moghaieb R.E.A., N. Tanaka, H. Saneoka, Y. Murooka, H. Ono, H. Morikawa, A. Nakamura, N.T.Nguyen, R. Suwa and K. Fujita. Characterization of salt tolerance in ectoine-transformed tobacco plants (*Nicotiana tabacum*): photosynthesis, osmotic adjustment, and nitrogen partitioning. *Plant Cell Environ.* 29:173-182 (2005).
 24. J. Shigeto, S. Yoshihara, S.E.H. Adam, K. Sueyoshi, A. Sakamoto, H. Morikawa, M. Takahashi. Genetic engineering of nitrite reductase gene improves uptake and assimilation of nitrogen dioxide by *Rhaphiolepis umbellata* (Thunb.) Makino. *Plant Biotechnol.* 23:111-116 (2006).

(2)その他の著作物(総説、書籍などを記載してください。)

和文

1. 森川弘道 ファイトレメディエーションにおける農業技術の重要性 (1)、「農業技術」**57**(3) p97-101 (2001)
2. 森川弘道 “ファイトレメディエーションとファイトテクノロジー—米国におけるプライベートセクターの活動と大気汚染修復壁面緑化”, ケミカル・エンジニアリング, **46**, p665-673 (2001).
3. 森川弘道 ファイトレメディエーション概論、三重大学地域共同研究センター、平成13年度高度技術研修テキスト、p115-178 (2001)
4. 森川弘道 ”植物で環境を修復する”子供の科学2001年7月号 p4-8 (2001)
5. 森川弘道 ”欧米ファイトレメの実例と日本における実用性”, 環境緑化新聞, **446**, p4-5 (2001).
6. 森川弘道、高橋美佐 ”植物利用による都市の再生-ファイトレメディエーションによる都市環境の修復の展望”, 都市緑化技術, **42**, p15-21 (2001)
7. 森川弘道. 排気ガスを好む植物を創る-植物体内に取り込まれた NOx の代謝的運命と香気成分の構造 Aroma Research, **3**, p256-264 (2001)
8. 森川弘道、高橋美佐、河村義史. ファイトレメディエーションによる環境修復の新展開 環境バイオテクノロジー学会誌 **1**, No.1 p1-14 (2001)
9. 森川弘道 (分担執筆) “NOx を ‘好む’ 植物” 「植物栄養学」文永堂, p271-276 (2001)
10. 森川弘道. ファイトレメディエーションの新展開 「バイオインダストリー」, **19** p51-62 (2002)
11. 森川弘道. ファイトレメディエーションにおける農業技術の重要性(2)、「農業技術」**57**(4), p145-148 (2002)
12. 森川弘道、高橋美佐、河村義史. ファイトレメディエーションによる環境保全修復の新展開 「環境情報科学」, **31**, p30-36 (2002)
13. 森川弘道 “ファイトレメディエーション—知られていない植物の環境修復能力” 「植物が未来を拓く」 共立出版 p181-203 (2002)
14. 坂本 敦, 高橋美佐, 森川弘道. 植物細胞の膜輸送系とファイトレメディエーション 「植物細胞工学」 p146-150 (2003)
15. 森川弘道. ファイトレメディエーションの新展開 「環境修復と有用物質生産」シーエムシー出版, p70-80 (2003)
16. 森川弘道、坂本 敦、高橋美佐. 窒素同化と NOx 代謝 「蛋白質核酸酵素」 共立出版 Vol.48, No.15, p2130-2137 (2003)
17. 森川弘道. ファイトレメディエーション 「ファルマシア」日本薬学会 Vol.39, No.9 p876-880 (2003)
18. 高橋美佐・森川弘道. 樹木によるファイトレメディエーション 「林木の育種」林木育種協会 No.207, p26-28 (2003)
19. 坂本 敦、松原俊之、高橋美佐、森川弘道. 活性窒素代謝—植物窒素代謝の新しい課題— 日本農芸化学会誌 Vol.78 (10) p958-961 (2004)
20. 森川弘道、高橋美佐. 植物利用による大気および土壌汚染の修復 「環境保全型農業事典」 丸善, p672-689 (2005)
21. 森川弘道. ファイトレメディエーション 「生物工程ハンドブック」コロナ社, p753-758 (2005)
22. 森川弘道、高橋美佐、松原俊之、坂本敦 「UN を作る新しい窒素代謝系」 甲斐昌一、森川弘道監修 プラントミメティックス—植物に学ぶ (株式会社エヌ・ティー・エス) p220-225 (2006)
23. 森川弘道、高橋美佐、坂本敦 大気中の NOx は植物を “元気付ける” シグナルであ

- る 甲斐昌一、森川弘道監修 プラントミメティックスー植物に学ぶ (株式会社エヌ・ティー・エス) p385-389 (2006)
24. 森川弘道、高橋美佐、松原俊之、坂本敦 ファイトレメディエーション 甲斐昌一、森川弘道監修 プラントミメティックスー植物に学ぶ (株式会社エヌ・ティー・エス) p660-664 (2006)

英文

1. H. Morikawa and M. Takahashi. Remediation of Soil, Water and Air by Naturally Occurring and Transgenic Plants, *Gamma Field Symposia*, 39: 81-101 (2001)
2. M. Takahashi, S. Kohama, M. Hakata, Y. Hase, N. Shikazono, A. Tanaka, and H. Morikawa. Production of Mutants that Have High Ability to Assimilate Nitrogen Dioxide by the Irradiation of Ion Beams in *Ficus stipulata*, *Annual Reports of TIARA*, 39: 62-63 (2001)
3. H. Morikawa, M. Takahashi and G. Arimura. Manipulation of genes for nitrogen metabolism in plants. In "Air Pollution and Biotechnology in Plants". Ed. by K. Oomasa et al., Springer-Verlag, pp. 383-401 (2002)
4. T. Yoneyama, H. Y. Kim, H. Morikawa and H. S. Srivastava. Metabolism and detoxification of nitrogen dioxide and ammonia in plants. In *Air Pollution and Biotechnology in Plants* ed. by K. Oomasa et al., Springer-Verlag, pp. 221-234 (2002)
5. Morikawa, H., Sakamoto, A., Hokazono, H., Irifune, K. and Takahashi, M. Mechanism of transgene integration into a host genome by particle bombardment. *Plant Biotechnol.* 19: 219-228 (2002).
6. H. Morikawa, O.C. Erkin. Basic Processes in Phytoremediation and Some Applications to Air Pollution Control. *Chemosphere* 52(9):1553-1558 (2003)
7. H. Morikawa, M. Takahashi and Y. Kawamura. Metabolism and genetics of atmospheric nitrogen dioxide control using pollutant-philic plants. In "Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants", ed by S. C. McCutcheon and J.L. Schnoor, John Wiley and Sons, Inc. pp. 765-786 (2003).
8. H. Morikawa, M. Takahashi, M. Hakata and A. Sakamoto. Screening and genetic manipulation of plants for decontamination of pollutants from the environments. *J. Biotechnol. Adv.* 22 (1) 9-15 (2003).
9. H. Morikawa, M. Takahashi, M. Hakata, T. Matsubara and A. Sakamoto. Higher plants and metabolism of oxides of nitrogen. In *Nitrogen and sustainable plant productivity*. Eds. R.P. Singh, N. Shankar and P.K. Jaiwal. Studium Presss, Hoston (2006) pp. 103-133.
10. M. Takahashi, T. Matsubara, A. Sakamoto and H. Morikawa. Uptake, assimilation and novel metabolism of nitrogen dioxide in plants. In "Methods in Biotechnology: Phytoremediation Methods and Reviews", (ed.), N. Willey, Humana Press, (2006, in press).

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

- | | |
|----------|-------------------|
| ① 招待講演 | (国内会議15件、国際会議 7件) |
| ② 口頭発表 | (国内会議73件、国際会議 0件) |
| ③ ポスター発表 | (国内会議54件、国際会議14件) |

招待講演

国内会議

1. H. Morikawa, *Remediation of Environments by Plants : Present and Future*, 日本植物生理学会第42回シンポジウム (2002年3月28-30日、岡山市)
2. 坂本敦: 植物に活性窒素代謝系は存在するか? 日本農芸化学会中四国若手シンポジウム (2002年9月20日、島根)
3. 森川弘道、高橋美佐: 「ファイトレメディエーションの新展開」日本化学会中国四国

- 支部 愛媛地区化学講演会 (2003年2月15日、愛媛大学理学部)
4. 森川弘道、坂本 敦、高橋美佐：ファイトレメディエーションによる環境修復の新展開、日本植物細胞分子生物学会市民フォーラム(2003年8月9日、高松市)
 5. 高橋美佐、Sueli Kohama, 森川弘道：ヒメイタビを用いた高環境修復植物の創世 第2回イオンビーム生物応用研究ワークショップ (2003年11月21日、高崎)
 6. 坂本 敦, 松原俊之, 高橋美佐, 森川弘道：植物窒素代謝の新しい課題 日本農芸化学会 (2004年3月31日、広島)
 7. 坂本 敦, 高橋 美佐, 森川 弘道：植物が作る未解明窒素化合物と活性窒素 –その代謝と作用– 日本植物学会第68回大会・シンポジウム (2004年9月11日、藤沢)
 8. 森川弘道：植物はどの様にして環境を守り、環境とたたかっているか、日本植物生理学会シンポジウム–植物科学をもっと楽しもう (2005年8月20日、神戸)
 9. 森川弘道：植物は窒素酸化物とどの様に対峙しているか–新規窒素代謝経路と新規生理作用の発見、広島大学 第4回東京イブニングセミナー (2005年8月26日、東京)
 10. 森川弘道：植物の新しい窒素代謝経路と窒素酸化物の植物バイタリゼーション・シグナル作用 岡山大学・学内 COE キックオフシンポジウム (2005年10月25日、岡山)
 11. 森川弘道：ファイトレメディエーション技術の現状と課題 平成17年度環境部会第4回例会 (2005年11月18日、山口)
 12. 森川弘道：植物における窒素酸化物(NO)の作用 第3回環境毒の化学動態分析と生物適応機構に関するワークショップ (2006年3月18日、国立環境研究所)
 13. 森川弘道、高橋美佐、坂本敦：植物利用による環境修復–ファイトレメディエーションの現状と将来 第6回エネルギー・環境ビジネス総合展2006「九州・バイオマスソリューション」及び「環境再生へのバイオの挑戦」(2006年9月8日、福岡国際センター)
 14. 森川弘道、高橋美佐、坂本敦：植物が作る新規有機窒素(UN)化合物の構造、機能、生物普遍性 平成18年度日本農芸化学会中四国支部大会 (2006年9月15日、愛媛大学)
 15. 森川弘道、高橋美佐：植物の二酸化窒素曝露で応答するタンパク質のプロテオーム解析 第2回シンポジウム「植物プロテオーム研究の最前線」2006年11月17日、つくば農林ホール)

国際会議

1. H. Morikawa: Phytoremediation of Air, Water and Soil-an Overview. International Conference on Environmental and Public Health Management. (2002.3. 12-14, Hong Kong)
2. H. Morikawa and M. Takahashi: Characterization of proteinous factors secreted in the rhizosphere from Rumex plants. International Symposium on Environmental Biotechnology (2002.6.19-12, Veracruz, Mexico)
3. H. Morikawa, M. Takahashi, K. Kondo, and A. Sakamoto: Advances in Phytoremediation Technology in Japan. U.S. EPA International Applied Phytotechnologies Conference (2003.3.3-5, Chicago)
4. H. Morikawa, M. Takahashi, T. Matsubara and A. Sakamoto. Phytoremediation of Air Pollution. Riken Plant Science Center Symposium 2003 (Nov. 10 – 11, 2003)
5. H. Morikawa, M. Hashimoto-Ueda, M. Takahashi, A. Sakamoto: Enrichment of S-nitrosoglutathione reductase gene improves the ability of *Arabidopsis thaliana* plants to uptake and assimilate nitrogen dioxide. Phytoremediation: Environmental and Molecular Biological Aspects (OECD) (2004.9.9-12, Keszthely, Hungary)
6. A. Sakamoto, M. Takahashi and H. Morikawa: Reactive nitrogen metabolism: a novel

- frontier in plant nitrogen metabolism. Korea-Japan Joint Symposium on Platform Technology for Plant Bioproducts (2005.11.1-5, Jejudo, Korea)
7. H. Morikawa, M. Takahashi, M. Nakagawa, A. Sakamoto, C. Ohsumi and T. Matsubara: Atmospheric nitrogen dioxide as a plant vitalization signal to improve size and cell constituent. The 1st scientific Workshop and Management Committee of the COST Action 859 “Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety” (2005.6.13-16, Pisa, Italy)

口頭発表

国内会議

1. 高橋美佐、重藤潤、森川弘道：二酸化窒素暴露により植物内で生成するニトロチロシンに関する研究. 日本植物生理学会 (2002年3月28-30日、岡山)
2. 加藤千晴、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：タバコ「葉型」及び「根型」亜硝酸還元酵素 (NiR) 遺伝子の発現解析. 日本植物生理学会 (2002年3月28-30日、岡山)
3. 河村義史、高橋美佐、森川弘道：植物葉内に取り込まれた二酸化窒素から生成する新規窒素 (UN) 化合物の解析. 日本植物生理学会 (2002年3月28-30日、岡山)
4. 坂本敦、上田愛美、森川弘道：アラビドプシスのグルタチオン依存型ホルムアルデヒド脱水素酵素は S-ニトロソグルタチオン還元酵素である. 日本植物生理学会 (2002.3. 岡山)
5. 森川弘道、外菌寛郎、高橋美佐、坂本敦：外来遺伝子のインテグレーションを促進する MAR 配列に関する研究 第20回日本植物細胞分子生物学会 (2002年7月29日～30日、奈良)
6. 高橋美佐、Sueli Kohama、近藤功明、羽方誠、長谷純宏、鹿園直哉、田中淳、森川弘道：イオンビーム照射を用いた二酸化窒素吸収代謝能力が高いヒメイタビ植物の育成 第20回日本植物細胞分子生物学会 (2002年7月29日～30日、奈良)
7. O. C. Erkin, M. Takahashi and H. Morikawa: Production of transgenic *Rhaphiolepis umbellate*, “Sharinbai” plants bearing chimeric Arabidopsis nitrite (nii) gene by using particle bombardment. 第20回日本植物細胞分子生物学会 (2002年7月29日～30日、奈良)
8. 近藤功明、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：低木街路樹トベラ (*Pittosporum tobira* A.) の形質転換に関する研究 第20回日本植物細胞分子生物学会 (2002年7月29日～30日、奈良)
9. 坂本敦、塚本成文、橋本愛美、山本 宏、森川弘道: 活性窒素分子種 (RNS) に対するアラビドプシスの2-Cys ペルオキシレドキシンの防御的役割 第44回日本植物生理学会年会 (2003年3月27日～29日、大阪)
10. 高橋美佐、重藤潤、森川弘道: 二酸化窒素暴露により植物葉で生成するニトロチロシンに関する研究 日本植物生理学会 (2003年3月27日～29日、大阪)
11. 外菌寛郎、高橋美佐、坂本敦、森川弘道: トランスジェンインテグレーションに対する MAR の効果 第44回日本植物生理学会年会 (2003年3月27日～29日、大阪)
12. 中川真紀子、福永一成、高橋美佐、坂本敦、森川弘道: 二酸化窒素を唯一の窒素源として生育するニコチアナ属植物の育成と解析 第44回日本植物生理学会年会 (2003年3月27日～29日、大阪)
13. 石川伸二、伊藤百佳、大竹憲邦、高橋美佐、森川弘道、大山卓爾、末吉邦: オオムギ根における硝酸トランスポータータンパク質の発現解析 第44回日本植物生理学会年会 (2003年3月27日～29日、大阪)
14. 松原俊之、福永一成、中保 建、高橋美佐、坂本 敦、森川弘道：植物が作る未解明窒素化合物の解明 日本農芸化学会 2003年度大会 (2003年3月31日～4月3

- 日、横浜)
15. 森川弘道、坂本 敦、高橋美佐、福永一成、鈴木仁美、藤田耕之輔、平田敏文：植物が作るケールダール法で回収できない未解明窒素化合物の解析 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 16. 坂本 敦、櫻尾尚平、松原俊之、福永敬子、高橋美佐、森川弘道：植物に普遍的に存在する非共生型ヘモグロビンの機能 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 17. 高橋美佐、小中大輔、河口篤美、坂本 敦、森川弘道：夜間に高い二酸化窒素吸収同化能力を持つ植物の探索 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 18. 高橋美佐：NO_x および POPs の浄化を目指したファイトレメディエーション・バイオテクノロジーの研究 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 19. S. Kohama, M. Takahashi, K. Kondo, M. Hakata, Y. Hase, N. Shikazono, A. Tanaka, and H. Morikawa: Morphological and physiological mutations induced by ion beam irradiation in *Ficus thunbergii* Maxim. 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 20. 羽方誠、稲村太郎、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：亜酸化窒素(N₂O)の発生は高等植物に共通して見られる 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 21. 加藤千晴、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：Competitive RT-PCR による 4 つのタバコ亜硝酸還元酵素 (NiR) 遺伝子の器官特異的発現解析 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 22. 外菌寛郎、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：トランスジーン・インテグレーションに対する MAR 由来の DNA 配列の効果 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 23. 吉原早苗, Ozger Cem ERKIN, 高橋美佐, 坂本敦, 森川弘道：アグロバクテリウム法による街路樹シャリンバイ (*Raphiolepis umbellata*) の形質転換 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 24. 近藤功明、高橋美佐、坂本 敦、森川弘道：ツツジ植物葉で二酸化窒素暴露に応答して発現する germin-like protein の cDNA クローニング 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 25. 車田麻美、高橋美佐、坂本敦、Juan L. Ramos、森川弘道：シロイヌナズナにおけるニトリリダクターゼ遺伝子の導入と解析 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 26. 高橋美佐、重藤潤、坂本敦、平田敏文、森川弘道：二酸化窒素暴露による植物葉 PR タンパク質のニトロ化 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 27. 小中大輔、松原俊之、河村義史、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：二酸化窒素で暴露したタバコが作る未解明窒素化合物について 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 28. 橋本愛美、塚本成文、中保 建、高橋美佐、坂本 敦、森川弘道：植物の活性窒素 (RNS) 代謝関連酵素の解析 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
 29. 中川真紀子、福永一成、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：植物に対する二酸化窒素の成長促進作用と毒性作用 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）

30. 福永一成、松原俊之、高橋美佐、坂本 敦、藤田耕之輔、森川弘道：植物が作る未解明窒素化合物の解析—硝酸を窒素源とする場合 第 21 回日本植物細胞分子生物学会（香川）大会（2003 年 8 月 7 日～8 日、高松）
31. 森川弘道：地球環境と植物—なぜ植物か？植物はどこまで分かっているか？広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻第一回公開シンポジウム（2003 年 8 月 28 日～29 日、広島大学）
32. 重松友子、森川弘道、高橋美佐、有本潤二、藤田耕之輔 植物における未同定窒素の挙動の栄養生理学的解析（第 1 報）野菜類における未同定窒素の集積状態 日本土壤肥料学会（2003 年 8 月 22 日、東京）
33. 有本潤二、森川弘道、高橋美佐、重松友子、藤田耕之輔 植物における未同定窒素の挙動の栄養生理学的解析（第 2 報）イネ科・マメ科植物における未同定窒素の集積状態 日本土壤肥料学会（2003 年 8 月 22 日、東京）
34. 森川弘道、高橋美佐、坂本 敦、松原俊之、鈴木仁美、藤田耕之輔：植物が作る未解明窒素化合物の解析 第 45 回日本植物生理学会年会（2004 年 3 月 27～29 日、東京都立大学）
35. 坂本 敦、福永敬子、櫻尾尚平、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：植物に普遍的に存在するヘモグロビンの機能：窒素代謝との関連 第 45 回日本植物生理学会年会（2004 年 3 月 27～29 日、東京都立大学）
36. 高橋美佐、中川真紀子、小中大輔、坂本 敦、松原俊之、大住千栄子、鈴木仁美、森川弘道：大気中 NO_x は植物ホルモン様シグナル作用をもつ 第 45 回日本植物生理学会年会（2004 年 3 月 27～29 日、東京都立大学）
37. 近藤功明、高橋美佐、坂本 敦、森川弘道：NO_x 暴露に応答してツツジ植物葉で発現する germin-like protein の解析 第 45 回日本植物生理学会年会（2004 年 3 月 27～29 日、東京都立大学）
38. 宮脇和博、鈴木仁美、森川弘道：二酸化窒素に暴露された植物が生産する未解明有機窒素化合物の合成研究—チアジアゾールからトリチエパンへの環拡大反応の発見— 第 39 回ヘテロ原子化学セミナー（2004 年 7 月 22 日～24 日、高山）
39. 橋本愛美、高橋美佐、坂本 敦、森川弘道：植物 S-ニトロソチオール還元酵素による NO₂ 代謝の促進 第 2 回日本植物細胞分子生物学会（秋田）大会（2004 年 8 月 9 日～8 月 10 日、秋田）
40. 重藤 潤、吉原早苗、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：シャリンバイ *Rhaphiolepis umbellata* (Thunb.) Makino における形質転換体の作出と解析 第 2 回日本植物細胞分子生物学会（秋田）大会（2004 年 8 月 9 日～8 月 10 日、秋田）
41. 外薮寛郎、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：完全なトランスジーン発現カセットのインテグレーションを促進する MAR 配列 第 2 回日本植物細胞分子生物学会（秋田）大会（2004 年 8 月 9 日～8 月 10 日、秋田）
42. 塚本成文、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：イネおよびギシギシによるビスフェノール A の吸収と分解 第 2 回日本植物細胞分子生物学会（秋田）大会（2004 年 8 月 9 日～8 月 10 日、秋田）
43. 車田麻美、高橋美佐、坂本敦、Juan L. Ramos、平田敏文、森川弘道：ニトロリダクターゼ遺伝子を発現させたシロイヌナズナの解析 第 2 回日本植物細胞分子生物学会（秋田）大会（2004 年 8 月 9 日～8 月 10 日、秋田）
44. 松原俊之、平田敏文、中山忠宣、宮脇和博、鈴木仁美、高橋美佐、坂本 敦、森川弘道：植物が作る未解明窒素化合物 B の迅速定量 第 2 回日本植物細胞分子生物学会（秋田）大会（2004 年 8 月 9 日～8 月 10 日、秋田）
45. 高橋美佐、中川真紀子、小中大輔、坂本 敦、松原俊之、大住千栄子、鈴木仁美、森川弘道：大気中に含まれる微量活性窒素ガスの生理作用 第 2 回日本植物細胞

- 分子生物学会（秋田）大会（2004年8月9日～8月10日、秋田）
46. 坂本 敦、櫻尾尚平、福永敬子、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：植物ヘモグロビンのペルオキシダーゼ活性と無機窒素代謝 第22回日本植物細胞分子生物学会（秋田）大会（2004年8月9日～8月10日、秋田）
 47. 森川弘道、高橋美佐、坂本敦、平田敏文、松原俊之、中山忠宣、宮脇和博、藤田耕之輔、鈴木仁美：植物において二酸化窒素および硝酸から作られる未解明窒素第22回日本植物細胞分子生物学会（秋田）大会（2004年8月9日～8月10日、秋田）
 48. 前田暢、泉俊輔、平田敏文、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：NO₂ 暴露により生成する未解明窒素化合物 - カロチノイド類のニトロ化 第22回日本植物細胞分子生物学会（秋田）大会（2004年8月9日～8月10日、秋田）
 49. 福本和宏、中山忠宣、鈴木仁美、森川弘道：二酸化窒素暴露で生じる未解明窒素化合物の探索-ペルオキシナイトライトと芳香族アミノ酸および関連化合物の反応 第22回日本植物細胞分子生物学会（秋田）大会（2004年8月9日～8月10日、秋田）
 50. 宮脇和博、鈴木仁美、森川弘道：二酸化窒素暴露で生成する未解明窒素化合物の合成を目指して-トリチエパン誘導体の新規合成法の発見 第22回日本植物細胞分子生物学会（秋田）大会（2004年8月9日～8月10日、秋田）
 51. H. Morikawa, M. Takahashi, A. Sakamoto, T. Matsubara, M. Ueda-Hashimoto, K. Miyawaki, T. Hirata, and H. Suzuki: Novel Metabolism of Nitrogen in Plants. 第46回日本植物生理学会年会（2005年3月24日～26日、新潟）
 52. 坂本敦、橋本愛美、奥田、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：Genetically engineered alteration in *S*-nitrosoglutathione metabolism and its impact in Arabidopsis plants. 第46回日本植物生理学会年会（2005年3月24日～26日、新潟）
 53. 高橋美佐、S. E.-H. Adam, M. 中川真紀子、小中大輔、坂本敦、松原俊之、森川弘道：Novel vitalization effect of atmospheric reactive nitrogen species on plants. 第46回日本植物生理学会年会（2005年3月24日～26日、新潟）
 54. 松原俊之、宮脇和博、高橋美佐、坂本敦、S. E.-H. Adam, 平田敏文、鈴木仁美、森川弘道：Formation of a novel thiadiazoline derivative in plants in response to fumigation with reactive nitrogen species. 第46回日本植物生理学会年会（2005年3月24日～26日、新潟）
 55. 森川弘道、松原俊之、高橋美佐、坂本敦、宮脇和博、鈴木仁美、平田敏文：植物が作る未解明窒素(UN)化合物と環境への影響 環境バイオテクノロジー学会 2005年度大会（2005年6月27日～28日、東京）
 56. 高橋美佐、Suaad E.H. Adam、坂本敦、森川弘道：大気中に含まれる窒素酸化物の生物シグナル作用 環境バイオテクノロジー学会 2005年度大会（2005年6月27日～28日、東京）
 57. 森川弘道、松原俊之、高橋美佐、坂本敦、平田敏文：植物におけるNOのシグナル作用と未解明窒素(UN)化合物との関係 第23回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会（2005年8月5日～6日、京都）
 58. 坂本 敦、中川彩美、宮木洋一、近藤功明、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：タバコ BY-2 細胞で発現させたヒラドツツジのジャーミン様タンパク質 (GLP) の解析 第23回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会（2005年8月5日～6日、京都）
 59. 高橋美佐、Suaad E.H. Adam、坂本敦、森川弘道：大気中に含まれる窒素酸化物の植物バイタリゼーション・シグナル効果の解析 第23回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会（2005年8月5日～6日、京都）
 60. 中川彩美、坂本 敦、高橋 美佐、森川 弘道：RNAi 法によりキサントニン脱水素酵素の発現を抑制したシロイヌナズナの解析 第23回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会（2005年8月5日～6日、京都）

61. 森川弘道、高橋美佐、坂本敦、松原俊之、重藤潤、平田敏文、益田勝吉、宮脇和博、鈴木仁美、八十川伯博、富田啓文、橋本隆：1,2,3 チアジアゾール誘導体は二酸化窒素曝露したシロイヌナズナ葉において形成される UN 化合物である 第 47 回日本植物生理学会年会 (2006 年 3 月 21 日、筑波大学)
62. 坂本敦、橋本愛美、阪本沙央理、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：S-ニトロソチオールと植物窒素同化系の代謝的関連 第 47 回日本植物生理学会年会 (2006 年 3 月 21 日、筑波大学)
63. 高橋美佐、Suaad E.-H.Adam、門田佳子、塚谷裕一、松原俊之、坂本敦、森川弘道：大気中活性窒素の植物バイタリゼーション・シグナル作用の解析 第 47 回日本植物生理学会年会 (2006 年 3 月 21 日、筑波大学)
64. 森川弘道、高橋美佐、Suaad E.-H.Adam、藤田耕之輔、小櫃剛人、松原俊之、平田敏文、坂本敦：植物発 UN (未解明窒素) 生成の生物普遍性 第 24 回日本植物細胞分子生物学会 (つくば) 大会 (2006 年 7 月 29 日～30 日、筑波大学)
65. 坂本敦、中川彩美、山田敬三、泉俊輔、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：タバコ培養細胞で発現させた NO_x 応答性 GLP の局在性と生化学特性 第 24 回日本植物細胞分子生物学会 (つくば) 大会 (2006 年 7 月 29 日～30 日、筑波大学)
66. 高橋美佐、重藤潤、坂本敦、森川弘道：シロイヌナズナ葉の二酸化窒素暴露による OEC タンパク質チロシンのニトロ化 第 24 回日本植物細胞分子生物学会 (つくば) 大会 (2006 年 7 月 29 日～30 日、筑波大学)
67. 中川彩美、坂本敦、高橋美佐、森川弘道：シロイヌナズナのキサントニン脱水素酵素遺伝子発現抑制株の作出とその解析 第 24 回日本植物細胞分子生物学会 (つくば) 大会 (2006 年 7 月 29 日～30 日、筑波大学)
68. 本山裕一、古橋孝将、松原俊之、八十川伯朗、富田啓文、大橋裕子、坂本敦、森川弘道：タバコにおけるチアジアゾール化合物の生体防御・シグナル作用 第 24 回日本植物細胞分子生物学会 (つくば) 大会 (2006 年 7 月 29 日～30 日、筑波大学)
69. 古橋孝将、Suaad E.-H.Adam、門田佳子、塚矢裕一、坂本敦、高橋美佐、森川弘道：大気中窒素酸化物の植物バイタリゼーション・シグナル作用のリアルタイム PCR 解析 第 24 回日本植物細胞分子生物学会 (つくば) 大会 (2006 年 7 月 29 日～30 日、筑波大学)
70. 森川弘道、高橋美佐、坂本敦：植物が作る未解明窒素(UN)化合物研究の現状と課題 48 回日本植物生理学会年会 (2007 年 3 月 28-30 日、松山)
71. 高橋美佐、重藤潤、浅田浩二、坂本敦、森川弘道：外在活性窒素による PSII 表在タンパク質の選択的優先的ニトロ化と酸素発生への影響 第 48 回日本植物生理学会年会 (2007 年 3 月 28-30 日、松山)
72. 高橋美佐、古橋孝将、Suaad. E. H. Adam、重藤潤、坂本敦、森川弘道：大気中窒素酸化物の「植物バイタリゼーション作用」の植物種・器官共通性と特異性 第 48 回日本植物生理学会年会 (2007 年 3 月 28-30 日、松山)
73. 中川彩美、高橋美佐、森川弘道、坂本 敦：キサントニン脱水素酵素の発現抑制は植物の生育・稔性・セネッセンスに影響を及ぼす 第 48 回日本植物生理学会年会 (2007 年 3 月 28-30 日、松山)

ポスター発表

国内会議

1. 高橋美佐、Sueli Kohama、羽方誠、長谷純宏、鹿園直哉、田中淳、森川弘道：ヒメイタビ培養体へのイオンビーム照射による高環境浄化株の育成 第 11 回 TIARA 研究発表会 (平成 14 年 7 月 12 日、高崎)

2. 高橋美佐, Sueli Kohama, 近藤功明、羽方誠、森川弘道、田中淳、長谷純宏：イオンビーム照射による高い NO₂ 吸収同化能をもつヒメイタビの育成 第12回 TIARA 研究発表会 (2003年6月20日、高崎)
3. 高橋美佐, Sueli Kohama, 近藤功明、羽方 誠、長谷純宏、鹿園直哉、田中 淳、森川弘道：イオンビーム照射を用いた二酸化窒素吸収代謝能力が高いヒメイタビ植物の育成 第19回環境バイオテクノロジー学会 シンポジウム(2003年7月2日、東京)
4. 塚本成文, 橋本愛美, 高橋美佐, 坂本 敦, 鈴木仁美, 森川弘道:アラビドプシス 2-Cys ペルオキシレドキシシンによるペルオキシナイトライトの消去 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
5. 外菌寛郎, 高橋美佐, 坂本 敦, 森川弘道：トランスジーンの完全なコピーのインテグレーションを高める配列の研究 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
6. 重藤潤、吉原早苗、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：街路樹シャリンバイ *Rhaphiolepis umbellata* (Thunb.) Makino の形質転換 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
7. 橋本愛美, 高橋美佐, 坂本 敦, 森川弘道：植物における S-ニトロソチオール還元酵素の作用と機能 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
8. 坂本 敦, 櫻尾尚平, 福永敬子, 松原俊之, 高橋美佐, 森川弘道：植物に普遍的に存在するヘモグロビンの機能解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
9. 平田敏文, 前田 暢, 泉 俊輔, 松原俊之, 高橋美佐, 坂本 敦, 森川弘道: NO₂ 暴露により生成する未解明窒素化合物ーカロチノイド類のニトロ化 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
10. 松原俊之、平田敏文、中山忠宣、宮脇和博、鈴木仁美、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：植物が作る未解明窒素化合物 B の迅速定量 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
11. Suaad E.Hamid-Adam, 甫出一将, 高橋美佐, 坂本敦, 松原俊之, 平田敏文, 鈴木仁美, 森川弘道：UN 化合物 B の生理作用 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
12. 加藤千晴、高橋美佐、横田徹生、坂本敦、森川弘道：タバコ植物における4つの亜硝酸還元酵素遺伝子の発現応答 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
13. 高橋美佐、重藤潤、坂本敦、森川弘道：二酸化窒素暴露により植物葉で生成するニトロチロシンに関する研究 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
14. 車田麻美、高橋美佐、坂本敦、Juan L. Ramos、平田敏文、森川弘道：ニトロリダクターゼ遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナの解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
15. 近藤功明、高橋美佐、坂本 敦、森川弘道：NO₂ 暴露に応答してツツジ植物葉で発現する Germin-Like Protein (GLP) の解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
16. 森川弘道, 高橋美佐, 坂本敦, 松原俊之, 宮脇和博, 平田敏文, 藤田耕之輔, 鈴木仁美:植物における未解明窒素化合物の生成ー新規窒素代謝経路は存在するか? JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム(2004年10月26日、品川)
17. 森川弘道, 高橋美佐, 坂本敦, 松原俊之, 宮脇和博, 平田敏文, 藤田耕之輔, 鈴木仁美:これまで明らかとなった植物が作る未解明窒素化合物の構造 JST/CREST 研究領域「植物の機

- 能と制御」第2回公開シンポジウム (2004年10月26日、品川)
18. 中山忠宣, 鈴木仁美, 松原俊之, 高橋美佐, 坂本敦, 森川弘道: 二酸化窒素暴露で生成する未解明有機態窒素化合物の探索 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム (2004年10月26日、品川)
 19. 宮脇 和博, 鈴木仁美, 森川弘道: 二酸化窒素暴露で生成する未解明有機態窒素化合物の合成研究 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム (2004年10月26日、品川)
 20. 中川真紀子, 高橋美佐, Adam, S.E.H., 小中大輔, 松原俊之, 坂本 敦, 大住千栄子, 鈴木仁美, 森川弘道: 大気中に含まれる微量活性窒素ガスの生理作用 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム (2004年10月26日、品川)
 21. 藤田耕之輔, 佐々木祥子, 本間圭奈, 高橋美佐, 森川弘道: 植物における未同定窒素の集積に及ぼす窒素添加の影響 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム (2004年10月26日、品川)
 22. 藤田耕之輔, 小櫃剛人, 本間圭奈, 佐々木祥子, 諏訪竜一, 高橋美佐, 森川弘道: 動物における未同定窒素の集積状態に対する硝酸態窒素投与の影響 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム (2004年10月26日、品川) (2004年10月26日、品川)
 23. 藤田耕之輔, 本間圭奈, 高橋美佐, 森川弘道: 植物における未同定窒素の集積に及ぼす培地窒素化合形態の影響 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第2回公開シンポジウム (2004年10月26日、品川)
 24. 森川弘道 松原俊之 高橋美佐 坂本敦 平田敏文: 植物における NO_x シグナル作用と未解明窒素(UN)化合物との関係 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第3回公開シンポジウム (2005年9月27日、品川)
 25. 坂本 敦 橋本愛美 松原俊之 高橋美佐 森川弘道: S-ニトロソグルタチオン還元酵素を遺伝子操作した形質転換植物の解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第3回公開シンポジウム (2005年9月27日、品川)
 26. 高橋美佐 Suaad E.H.Adam 坂本敦 森川弘道: 大気中に含まれる窒素酸化物の植物バイタリゼーション・シグナル効果 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第3回公開シンポジウム (2005年9月27日、品川)
 27. 中川彩美 坂本 敦 松原俊之 高橋美佐 森川弘道: RNAi 法によりキサントニン脱水素酵素の発現抑制したシロイヌナズナの育成と解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第3回公開シンポジウム (2005年9月27日、品川)
 28. 外薮寛郎, 高橋美佐, 坂本 敦, 森川弘道: トランスジーン・インテグレーションを促進する MAR 配列に結合する核タンパク質の解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第4回公開シンポジウム (2006年1月23日、品川)
 29. 森川弘道, 高橋美佐, 坂本敦, 松原俊之, 重藤 潤, 平田敏文, 益田勝吉, 宮脇和博, 鈴木仁美, 橋本隆: UN 化合物の構造はどこまで分かったか? JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第4回公開シンポジウム (2006年1月23日、品川)
 30. 高橋美佐, 本山裕一, 古橋孝将, 松原俊之, 坂本敦, 八十川伯博, 富田啓文, 森川弘道: UN 化合物チアジアゾールのシグナル作用の解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第4回公開シンポジウム (2006年1月23日、品川)
 31. 高橋美佐, Suaad E.H.Adam, 松原俊之, 坂本 敦, 塚谷裕一, 森川弘道: 大気中に含まれる NO_x ガスのバイタリゼーション作用 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第4回公開シンポジウム (2006年1月23日、品川)
 32. 高橋美佐, 清水由美子, 泉俊輔, 坂本 敦, 森川弘道: NO_x ガス曝露に応答するタンパク質の網羅的解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第4回公開シン

- ポジウム (2006年1月23日、品川)
33. 車田麻美、高橋美佐、坂本敦、森川弘道：植物由来のニトロリダクターゼ遺伝子の解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第4回公開シンポジウム (2006年1月23日、品川)
 34. 高橋美佐、重藤潤、吉原早苗、Suaad. E. H. Adam、坂本敦、森川弘道：街路樹シャリンバイ *Rhaphiolepis umbellata* (Thunb.) Makino の形質転換 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第4回公開シンポジウム (2006年1月23日、品川)
 35. 高橋美佐、加藤千晴、坂本敦、森川弘道：植物における亜硝酸還元酵素遺伝子の系統樹解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第4回公開シンポジウム (2006年1月23日、品川)
 36. 坂本 敦、橋本愛美、阪本沙央理、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：形質転換植物を用いた S-ニトロソチオール代謝解析：窒素同化との代謝クロストーク JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第4回公開シンポジウム (2006年1月23日、品川)
 37. 坂本 敦、山田敬三、中川彩美、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：形質転換タバコ培養細胞を用いたツツジ NO₂ 応答性 Germin-like Protein (GLP) の解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第4回公開シンポジウム (2006年1月23日、品川)
 38. 中川彩美、坂本 敦、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：ジーンサイレンシングによりキサントニン脱水素酵素を機能破壊した形質転換植物の作出と解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第4回公開シンポジウム (2006年1月23日、品川)
 39. 藤田耕之輔、小櫃剛人、本間圭奈、佐々木祥子、諏訪竜一、高橋美佐、森川弘道：動物における UN の集積 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第4回公開シンポジウム (2006年1月23日、品川)
 40. 高橋美佐、古橋孝将、Suaad E.H.Adam、坂本 敦、塚谷裕一、森川弘道：大気中に含まれる NO_x ガスのバイタリゼーション・シグナル作用の RPCR 解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
 41. 坂本 敦、橋本愛美、阪本沙央理、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：S-ニトロソ化合物代謝における GSNO 還元酵素の役割 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
 42. 中川彩美、坂本 敦、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：シロイヌナズナのキサントニン脱水素酵素遺伝子発現抑制株の作出とその解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
 43. 坂本 敦、中川彩美、山田敬三、松原俊之、高橋美佐、森川弘道：NO₂ 応答性ジャーミン様タンパク質の植物培養細胞における発現とその局在性および生化学特性 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
 44. 高橋美佐、加藤千晴、坂本敦、森川弘道：ナス科植物は根型および葉型亜硝酸還元酵素(NiR)遺伝子をもつ JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
 45. 高橋美佐、重藤潤、吉原早苗、Suaad. E. H. Adam、坂本敦、森川弘道：二酸化窒素の取込と同化能を向上させた形質転換街路樹シャリンバイ *Rhaphiolepis umbellata* (Thunb.) Makino の作出 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
 46. 高橋美佐、車田麻美、坂本敦、森川弘道：植物由来のニトロリダクターゼ(NTR)遺伝子の解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム

(2006年7月31日、つくば、茨城)

47. 高橋美佐、清水由美子、泉俊輔、坂本 敦、森川弘道：NO_x 曝露に応答するタンパク質のプロテオミクス解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
48. 高橋美佐、重藤潤、坂本敦、森川弘道：二酸化窒素曝露により植物葉でニトロ化されるタンパク質の研究 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
49. 高橋美佐、本山裕一、古橋孝将、坂本敦、八十川伯博、富田啓文、大橋裕子、森川弘道：チアジアゾール化合物の生理作用のリアルタイム PCR 解析 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
50. 藤田耕之輔、佐々木祥子、本間圭奈、有本潤二、重松友子、高橋美佐、森川弘道：植物における未解明窒素化合物の生成に対する培地窒素濃度の影響 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
51. 森川弘道、高橋美佐、坂本敦、藤田耕之輔、小櫃剛人：植物発 UN 生成の生物普遍性について JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
52. 大木宏之、橋本隆、高橋美佐、松原俊之、坂本 敦、森川弘道、：UN 化合物チアジアゾールからチアジアゾリンへの酵素的変換の研究 JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
53. 森川弘道、高橋美佐、坂本敦、松原俊之、平田敏文、鈴木仁美、藤田耕之輔、橋本隆：UN 化合物の構造はどこまで解明されたか？ JST/CREST 研究領域「植物の機能と制御」第5回公開シンポジウム (2006年7月31日、つくば、茨城)
54. 高橋美佐：シロイヌナズナ葉の OEC タンパク質チロシンは二酸化窒素によってニトロ化される 第2回シンポジウム「植物プロテオーム研究の最前線」(2006年11月17日、つくば農林ホール)

国際会議

1. M. Takahashi, S. Kohama, K. Kondo, M. Hakata, Y. Hase, N. Shikazono, A. Tanaka and H. Morikawa: Production of plant mutants by Ion-Beam irradiation for phytoremediation of urban environments. International Conference on Ion Beam Modification of Materials (IBMM) 2002 (2002.9.6, Kobe)
2. K. Kondo, M. Takahashi and H. Morikawa: Production and characterization of a transgenic roadside tree *Pittosporum tobira* A. bearing chimeric nitrite reductase gene. International Symposium on Environmental Biotechnology (2002.6.19-12, Veracruz, Mexico)
3. M. Hakata, M. Takahashi, W. G. Zumft and H. Morikawa: Production of Transgenic Gas-Gas Converting Plants that Directly Convert Nitrogen Dioxide to Nitrogen Gas. International Symposium on Environmental Biotechnology (2002.6.19-12, Veracruz, Mexico)
4. M. Takahashi, E. Kaimi, Y. Honda, M. Kuwahara and H. Morikawa: Production and characterization of transgenic plants that are transformed with manganese peroxidase gene from white rot fungi. International Symposium on Environmental Biotechnology (2002.6.19-12, Veracruz, Mexico)
5. Sakamoto, M. Ueda and H. Morikawa: Metabolic engineering of S-nitrosoglutathione decomposition in higher plants. International Symposium on Environmental Biotechnology (2002.6.19-12, Veracruz, Mexico)
6. Yoshifumi Kawamura, Misa Takahashi, Atsushi Sakamoto and Hiromichi Morikawa: Novel Metabolites Formed from Nitrogen Dioxide in Plants. International Symposium on

- Environmental Biotechnology (2002.6.19-12, Veracruz, Mexico)
7. M. Kurumata, M. Takahashi, A. Sakamoto, J. L. Ramos, and H. Morikawa: Introduction and expression of nitroreductase gene in *Arabidopsis thaliana*. International colloquium on plant biotechnology (2003.11.21 日, Osaka Prefecture University, Osaka)
 8. M. Takahashi, D. Konaka, A. Sakamoto, and H. Morikawa: Do plants take up nitrogen dioxide during night? Phytoremediation: Environmental and Molecular Biological Aspects (OECD) (2004.9.9-12, Keszthely, Hungary)
 9. M. Kurumata, M. Takahashi, A. Sakamoto, J. L. Ramos, A. Nepovim, T. Vanek, T. Hirata, and H. Morikawa: Degradation of nitrocompounds by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase gene. Phytoremediation: Environmental and Molecular Biological Aspects (OECD) (2004.9.9-12, Keszthely, Hungary)
 10. M. Takahashi, Y. Shimizu, S. E.-H. Adam, Y. Monden and H. Morikawa: Peptide Finger-printing Analysis of Proteins of *Arabidopsis thaliana* that Respond to Atmospheric Nitrogen Oxides (NO_x) The 1st scientific Workshop and Management Committee of the COST Action 859 “Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety” (2005.6.13-16, Pisa, Italy)
 11. J. Shigeto, M. Takahashi, K. Yoshizato, S. Izumi and H. Morikawa: Nitration of Protein-tyrosines in Plant Organelles by Atmospheric Nitrogen Oxides (NO_x) The 1st scientific Workshop and Management Committee of the COST Action 859 “Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety” (2005.6.13-16, Pisa, Italy)
 12. A. Nakagawa, A. Sakamoto, M. Takahashi and H. Morikawa: RNAi-mediated reduction of xanthine dehydrogenase results in increased biomass of *Arabidopsis* seedlings. Korea-Japan Joint Symposium on Platform Technology for Plant Bioproducts (2005.11.1-5, Jeju, Korea)
 13. Morikawa, H., Takahashi, M., Sakamoto, A., Matsubara, Toshiyuki T., Hirata, T., Suzuki, H.: An alternative metabolic pathway of nitrogen in plants. COST Action 859 (2006.8.31-9.2, Saint-Etienne, France)
 14. Takahashi, M., Suaad E.-H. Adam, Monden, Y., Tsukaya, H., Matsubara, T., Sakamoto, A., Morikawa, H.: Atmospheric nitrogen oxides are a plant vitalization signal. COST Action 859 (2006.8.31-9.2, Saint-Etienne, France)

(4)特許出願

①国内出願 (14件)

1. ヒメイタビの培養細胞及び該培養細胞を用いた組織培養法、森川弘道、高橋美佐、広島大学、2001年、2月6日、願2001-029649号
2. シャリンバイの培養細胞及び該培養細胞を用いた組織培養法、森川弘道、高橋美佐、広島大学、2001年、2月6日、特願2001-029613号
3. トベラの培養細胞及び該培養細胞を用いた組織培養法、森川弘道、高橋美佐、広島大学、2001年、1月19日、特願2001-011435号
4. 物の活性窒素ストレス耐性能の増強方法、森川弘道、坂本敦、科学技術振興事業団、2003年2月18日、特願2003-38338
5. 物における活性窒素ストレスの抑制方法、森川弘道、坂本敦、科学技術振興事業団、2003年3月19日、特願2003-76527
6. 織特異的プロモーター及びそれを用いる遺伝子発現方法、森川弘道、坂本敦、高橋美佐、加藤千晴、科学技術振興事業団、2003年5月15日、特願2003-137588
7. 外来遺伝子の導入方法、森川弘道、高橋美佐、外菌寛郎、科学技術振興事業団、2004年2月6日、特願2004-30088

8. 植物生育促進法、森川弘道、高橋美佐、中川真紀子、科学技術振興事業団、2004年2月23日、特願2004-47091
9. 土壌中の重金属の除去又は低減方法、森川弘道、高橋美佐、中川真紀子、科学技術振興事業団、2004年2月23日、特願2004-47092
10. 植物による二酸化窒素代謝の促進方法、高橋美佐、森川弘道、坂本敦、橋本愛美、科学技術振興事業団、2004年8月6日、特願2004-231332
11. ビスフェノール類縁化合物の除去方法、森川弘道、高橋美佐、塚本成文出、広島大学、2004年8月6日、特願2004-231604
12. 有機塩素化合物分解植物の検出方法発、森川弘道、高橋美佐出、科学技術振興機構、2005年10月3日、特願2005-290110
13. 向上された二酸化窒素取り込み能および同化能を有する木本植物、森川弘道、高橋美佐、科学技術振興機構、2006年2月28日、特願2006-053286
14. ヒメイタビ変異体及びその利用、森川弘道、高橋美佐、田中淳、長谷純宏、国立大学法人広島大学/独立行政法人日本原子力研究開発機構、2006年12月5日、特願2006-328680

②海外出願 (2件)

1. Cultured Cells of Rhipiolepis Umbellata Thunb. And a Method for Culturing Tissues of the Rhipiolepis Umbellata Thunb. By Using Said Cultured Cells, Canadian Patent, Application No. 2,371,047 (May 11, 2006)
2. Cultured Cells of Australian Laurel Pittosporaceae and a Method for Culturing Tissues by Using Said Cultured Cells, US Patent No. 6,800,482 B2 (issued on October 5, 2004)

(5)受賞等

①受賞

②新聞報道

日刊工業新聞、「芽はぐくむ研究室」、2002年10月24日掲載

③その他

雑誌取材

土木施行、「植物による環境修復はどこまでできたか」、2004年5月掲載

テレビ放映

番組名:クリックオン!らいふサイエンス(サイエンスチャンネル)、「大気を浄化」、

2005年7月11日放送

(6)その他特記事項

7 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要

8 結び

本研究の発端は、植物体内の全窒素がケールダール窒素と無機窒素の合計に一致しない「合わない足し算」であった。窒素代謝は充分研究され「尽くし」、足し算が合わないのは誤差範囲との意見もあった。しかし、本研究を遂行する幸運に恵まれ、当初の目標であった、合わない足し算の実体としての数種の UN 化合物の構造が決定されるに至り、「誤差範囲」ではなく、UN 化合物を生成する新しい窒素代謝経路が生体内に存在することが示されたことは、大きな成果であると考えている。

しかし、UN 化合物の量と質については、シロイヌナズナを例にとってもまだまだ未解明のままである。また、植物が異なると UN 化合物の量や質は異なることが大いに考えられる。また、植物以外に動物や微生物でも UN 化合物があるのか否か、UN 生成の生物普遍性の課題もまだ完全には回答できていない。

他方、本研究の過程で思いもかけず NO_x の「バイタリゼーション作用」が発見されたことは、大変幸運であった。本研究成果は最終的には英国の一流誌にアクセプトされたが、当初はどのジャーナルのレフェリーからも「事実」であることを信じてもらえず苦勞した。これらの「苦勞」は、UN の発見と同様に新発見の鮮度を端的に物語っていると自画自賛している。



元素分析計直結型質量分析計
植物体内の窒素化合物の窒素をデューマ法により、窒素ガス(N₂)に変換し、装置の裏側にある細管を通して質量分析計の検出器部分に直接導入し、窒素の同位体組成、量を調査する。未解明窒素は本装置を使った実験がきっかけでその存在が予見された。



ある日のセミナー後の研究室写真(040131)

研究室写真(040131)

本研究代表者の個人としての本研究の源流は、植物を利用した環境修復（ファイトレメディエーション）の基礎と応用研究にある。本研究の成果は、環境問題の奥の深さを示しており、「修復」へ進むには、より一層の基礎的な理解が必須であることを示していると思う。

本研究で解明を目指した事象には、依然として未解明な部分があり、また本研究の過程で未解明な事象がむしろ増えた感がある。この「不完全さ」は、統括のお言葉通り本研究を乗り越えて新しい植物科学の研究分野が開拓され展開される契機となることが期待される。

本研究は、タイプ I でチームのサイズが適正で、全体の研究遂行は滑らかに進行したと考えている。研究費の使い方についても他のプロジェクトではとても考えられない滑らかさがあり、緊張感を高めて研究に専念できた。若手研究者の育成等については、鈴木仁美教授を中心に優秀なポストドクが巣立たれたことが特記すべきと思う。また、本研究の過程で坂本敦教授が誕生されたことも特記すべきである。

最後に、鈴木昭憲統括および東京事務所の参事・皆様の絶大なるご理解とご支援に厚くお礼申し上げます。五年半にわたり緊張感を持って研究が遂行できたことは、ひとえに皆様のご支援のお陰であります。