

窒素欠除処理および上位葉への尿素的供給がダイズ幼植物 の蛋白質代謝と窒素の転流に及ぼす影響

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	堀口, 毅 樗木, 直也
巻/号	57巻5号
掲載ページ	p. 474-480
発行年月	1986年10月

窒素欠除処理および上位葉への尿素的供給がダイズ幼植物の 蛋白質代謝と窒素の転流に及ぼす影響*

堀口 毅**・梶木直也**

キーワード 窒素欠乏, 葉蛋白質, 窒素平衡, 再転流, ダイズ

1. 緒言

植物が生長するとき, 生長部位の窒素は根から新たに吸収された窒素と植物体の他の部位からの転流窒素によって構成されていることが知られている。窒素の転流に関する知見は近年重窒素の利用によって急速に増加しつつあり, 転流窒素が植物の生長に果たす役割の重要性についても認識が深まっている。培地からの窒素の供給が絶たれた場合には, 植物は転流窒素のみに依存することになるが, 正常な栄養状態の植物と窒素欠乏の植物とで窒素の再転流の様相がどのように異なるかについての知見はまだ十分には得られていない。植物の老化過程で下位葉の蛋白質量が低下するが, この傾向は窒素欠乏の場合にはさらに大きくなることがよく知られている。生物体中の蛋白質は絶えず代謝回転しているもので, 古い葉では分解速度が合成速度を上回っているものと考えられ, 培地からの窒素の供給が絶たれた場合には基質の不足による合成速度の低下が蛋白質レベルの低下の一因となるであろうことは容易に想像できるが, 下位葉の蛋白質の分解速度や上位葉, 根などへの窒素の再分配が正常な栄養状態の植物と窒素欠乏の植物とで異なるかどうかは, あらかじめ¹⁵Nで標識した植物を用いた実験によって確かめる必要がある。

本研究ではダイズに一時的に¹⁵Nを吸収させたのち, 根から¹⁴Nを供給した場合と欠除させた場合の¹⁵Nの部位別形態別分布について実験を行なった。また窒素欠除とともに, 窒素の sink と考えられる上位葉の葉面から¹⁴N-尿素を吸収させた場合の¹⁵Nの転流に及ぼす影響についても検討した。

2. 実験材料および方法

1) 植物の培養と処理

ダイズ(アキセンゴク)をろ紙上で発芽させたのち,

ボラ土に移植して4日間培養して発芽させ, 続いて1/4容のプラスチックポットで水耕した。培養液は1/4濃度のホーグランド液を用い, 微量要素はFe 2ppm, Mn 0.3ppm, Zn 0.01ppm, Cu 0.01ppm, Mo 0.01ppm, B 0.1ppmの濃度になるように, Fe-EDTA, MnCl₂·4H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, H₃BO₃を与えた。水はイオン交換水(比抵抗5.0×10⁵Ω cm以上)を用い, pHは5~6に調節し, 培養液には通気を行なった。培養液は4日ごとに更新し, 第4複葉が出始める頃まで18日間ガラス室内で栽培した。

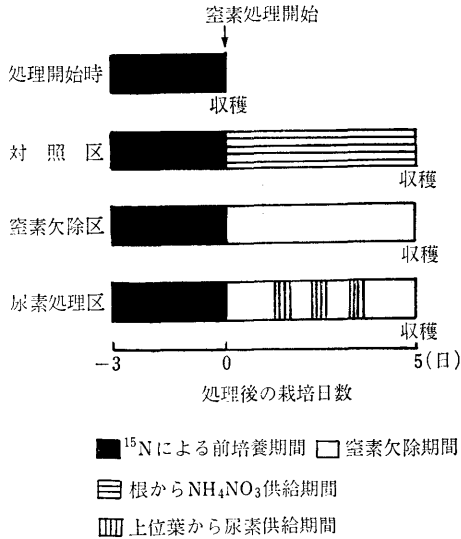
処理方法を第1図に示した。処理開始の3日前から培養液の窒素源としてNH₄¹⁵NO₃(¹⁵N atom%=32.1)を用いた培養液で3日間前培養を行ない, 処理開始時に8個体を採取して分析に供した。残りの27個体を9個体ずつの3区分に分け, 対照区は窒素源を¹⁴Nとしたホーグランド液で栽培し, 窒素欠除区と尿素処理区は窒素を含まない培養液で5日間栽培した。この間尿素処理区については上記の窒素欠除の培養液で栽培した植物については, 第5複葉以上の部分を1日1時間ずつ3日間0.5%尿素溶液に浸した。前培養および処理期間を通じて, 根粒の着生はみられなかった。

2) 窒素および重窒素の分析

採取した試料は下位葉(第3複葉以下の葉), 中位葉(第4複葉), 上位葉(第5複葉以上の葉), 茎(葉柄を含む), および根に分けて70℃以下で通風乾燥して風乾物重を測定した。風乾した試料は各個体の各部位ごとに全量を, 茎は粉碎機で粉碎後, その他の部位ははさみで細かく切って乳鉢に入れ, 15mlの5%トリクロ酢酸(TCA)溶液を加えて磨砕し, 10,000×gで15分間遠心分離して上澄液と沈殿とに分けた。沈殿はさらに15mlのTCA溶液で2回洗浄, 遠心分離し上澄液はすべて合併した。沈殿は常法によってケルダール法, 上澄液はガニング変法¹⁾により分解し, 蒸留, 滴定を行なって窒素を定量した。滴定した溶液から窒素として1mgを含む量をコンウェイ容器の外室に入れ, 10%酸化マグネシウム懸濁液を加えて生じたアンモニアを内室の1N塩酸に再吸収させた。液量が多い場合は三角フラスコを

* 本報告の一部は1983年5月, 日本土壤肥科学会九州支部春季例会において発表した。本研究の一部は文部省科学研究費(一般研究B, 課題番号56470098)によった。

** 鹿児島大学農学部(890 鹿児島市郡元1-21-24) 昭和60年9月7日受理
日本土壤肥科学雑誌 第57巻 第5号 p.474~480(1986)

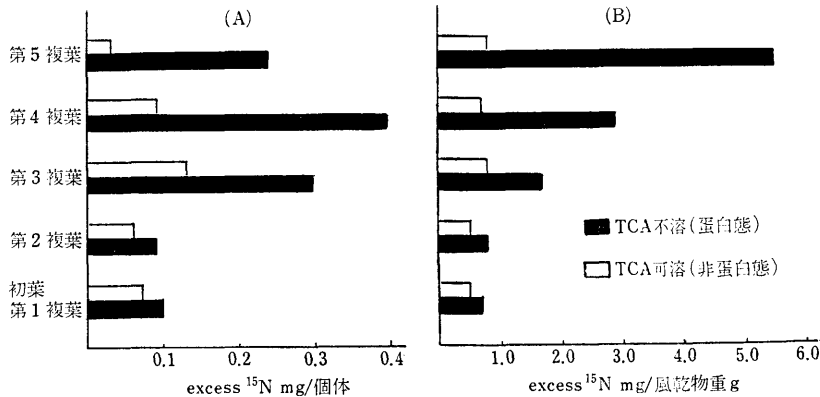


用いた方法²⁾で10%水酸化ナトリウムを加えてアンモニア化し、1N塩酸に再吸収させた。アンモニアを吸収した塩酸0.1mlを試料として、リッテンベルグ法により放電管を作製し、日本分光製NIA-1型 ^{15}N アナライザーを用いて、発光法により ^{15}N の存在比を測定した。

3. 実験結果

1) $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ による前培養直後の各葉位における excess ^{15}N の分布

3日間 $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ による前培養を行なった直後の各葉位の excess ^{15}N の分布を第2図に示した。個体当たりの excess ^{15}N (第2図A)は、展開のはほぼ完了した第4複葉のTCA不溶部に最も多く配分されていたが、下位の古い葉のTCA不溶部には少量しか配分されなかつ



第2図 $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ による前培養直後の各葉位における excess ^{15}N の分布

第1表 窒素欠除および尿素処理が各部位の風乾物重に及ぼす影響

	風乾物重 (mg/個体)			茎	根
	下位葉*	中位葉*	上位葉*		
処理開始時	423	131	44	479	174
対照区	494	258	529	1017	341
窒素欠除区	580	276	365	1047	368
尿素処理区	560	271	348	1063	393

*下位葉, 初葉~第3複葉; 中位葉, 第4複葉; 上位葉, 第5複葉以上。

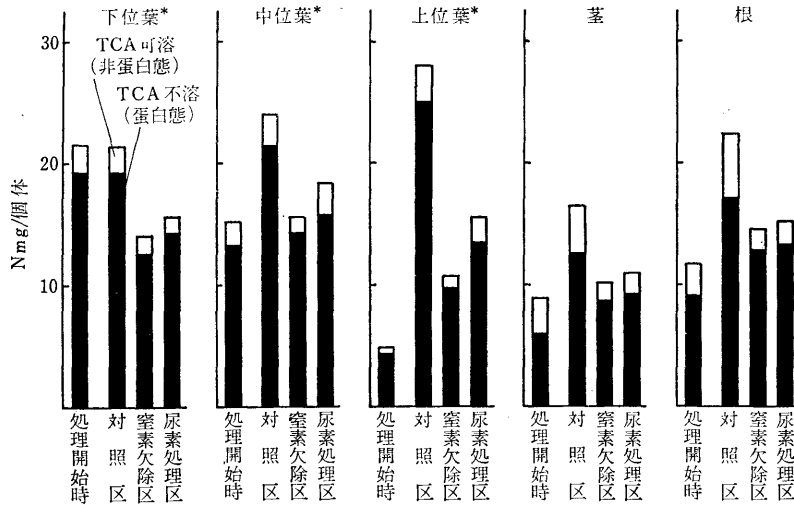
た。風乾物重当たりの ^{15}N とりこみ強度(第2図B)は、生長の最も盛んな上位葉のTCA不溶部ほど大であった。TCA不溶窒素は大部分蛋白態窒素と考えられるので以下では蛋白質として考察する。

2) 窒素欠除および尿素処理が各部位の風乾物重に及ぼす影響

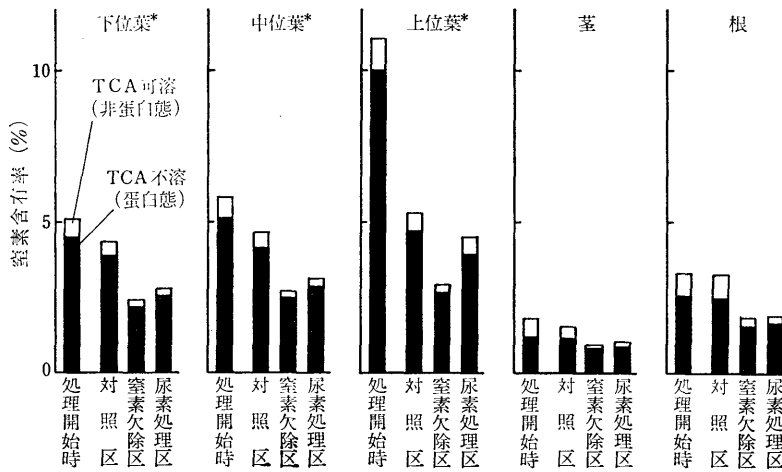
処理前後における風乾物重の変化を第1表に示した。いずれの部位でも5日間の処理期間中に風乾物重が増加したが、とくに対照区の上位葉の増加が著しかった。下位葉は窒素欠除区および尿素処理区の増加のほうが対照区の増加よりも大であった。窒素欠除区と尿素処理区の風乾物重はほとんど等しかった。

3) 窒素欠除および尿素処理が各部位の窒素量に及ぼす影響

1個体当たりの部位別形態別窒素含有量の処理前後における変化を第3図に示した。窒素の大部分は蛋白態窒素であり、全窒素と蛋白態窒素はほとんど同じ傾向を示している。上位葉, 中位葉, 茎および根では各区とも窒素の含有量が処理期間中に増加し、とくに対照区の上位葉で著しかった。これに対して、下位葉では窒素の含有量は対照区ではほとんど変化しなかったが、窒素欠除区および尿素処理区では処理開始時よりも減少した。各部



第 3 図 窒素欠除および尿素処理が各部位の窒素量に及ぼす影響
* 下位葉：初葉～第 3 複葉，中位葉：第 4 複葉，上位葉：第 5 複葉以上。



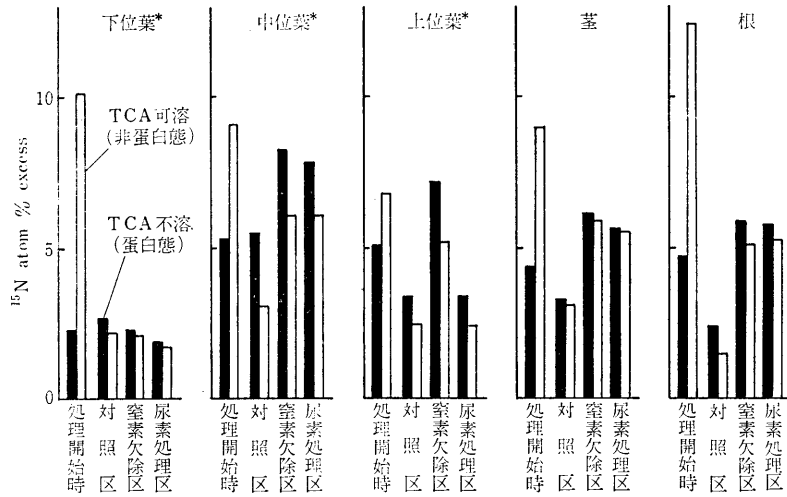
第 4 図 窒素欠除および尿素処理が各部位の窒素含有率に及ぼす影響
* 下位葉：初葉～第 3 複葉，中位葉：第 4 複葉，上位葉：第 5 複葉以上。

位とも尿素処理区は窒素欠除区よりも窒素含有量が多く、とくに上位葉、次いで中位葉で差が大きかった。非蛋白態窒素は、対照区の根と茎でとくに多く、上位葉および中位葉の尿素処理区では窒素欠除区の約 2 倍量が含まれていた。

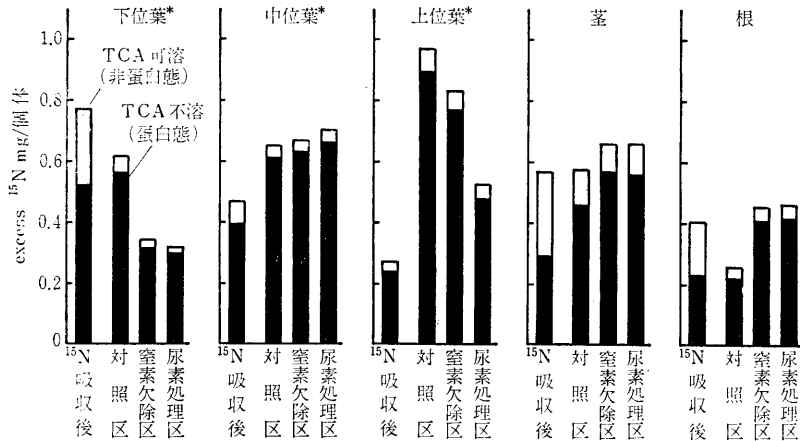
窒素含有率の変化を第 4 図に示した。処理後の窒素含有率は対照区 > 尿素処理区 > 窒素欠除区 の順に高く、葉位別には上位葉 > 中位葉 > 下位葉 の順に高かったがとくに尿素処理区で葉位別の差が著しかった。非蛋白態窒素の含有率は対照区の根、葉、および茎、尿素処理区の上位葉で高かった。

4) 窒素欠除および尿素処理が各部位の¹⁵N 濃度 (¹⁵N atom% excess) に及ぼす影響

各区部位別の蛋白態および非蛋白態 ¹⁵N 濃度 (¹⁵N atom% excess) を第 5 図に示した。蛋白態 ¹⁵N 濃度は、下位葉の対照区では処理開始時に比べてやや高くなっていたが、窒素欠除区ではほとんど変化せず、尿素処理区ではやや低下した。他の部位の蛋白態 ¹⁵N 濃度は、窒素欠除区では、処理開始時よりも高くなり、対照区の上位葉、茎、根では低下した。尿素処理区の蛋白態 ¹⁵N 濃度は上位葉で窒素欠除区より著しく低く、中位葉、下位葉でもやや低かった。非蛋白態 ¹⁵N 濃度は処理開始時にはいずれの部位においても蛋白態よりも高かったが、処理



第5図 窒素欠除および尿素処理が各部位の ^{15}N 濃度 (^{15}N atom% excess) に及ぼす影響
* 下位葉：初葉～第3複葉，中位葉：第4複葉，上位葉：第5複葉以上。



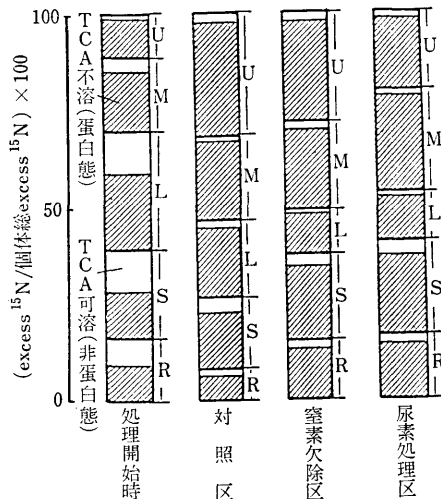
第6図 窒素欠除および尿素処理が個体当たり excess ^{15}N 量に及ぼす影響
* 下位葉：初葉～第3複葉，中位葉：第4複葉，上位葉：第5複葉以上。

後は低くなった。尿素処理区の上位葉では対照区と同程度まで低下した。

5) 窒素欠乏および尿素処理が excess ^{15}N の再分布に及ぼす影響

処理前後の各部位の個体当たり excess ^{15}N の分布を第6図に示した。処理開始後は新たな excess ^{15}N の供給はなされなかったから、吸収後根から培養液に分泌された部分を無視すれば個体当たりの総 excess ^{15}N 量は各区とも理論的には同一のはずである。しかし実際には個体差などのため、各部位、各分画の excess ^{15}N 量の測定値を総計した値は各区で若干異なった。そこで各区の個体当たりの総 excess ^{15}N 量を100とし、部位別、形態別の

分布割合を示したのが第7図である。第6図と第7図における excess ^{15}N の分布の傾向は両者の間で比較的よい一致をみたが、微細な点では異なる個所もある。第7図の excess ^{15}N の分布割合のほうが、処理間の excess ^{15}N の再分布の様相をよりよく表わしていると思われるので、以下の考察はおもに第7図で行なった。処理開始時よりも、下位葉、莖、および根の非蛋白態 excess ^{15}N が著しく減少し、各処理区とも、上位葉、中位葉および莖の蛋白態 excess ^{15}N が増加した。とくに上位葉の蛋白態 excess ^{15}N の増加が著しかったが、尿素処理区では増加の程度が小さかった。下位葉の蛋白態 excess ^{15}N は、窒素欠除区と尿素処理区で処理開始時および対照区に比



第7図 窒素欠除および尿素処理が $\text{excess } ^{15}\text{N}$ の再分布に及ぼす影響

U: 上位葉(第5複葉以上), M: 中位葉(第4複葉),
L: 下位葉(初葉~第3複葉), S: 茎, R: 根。

べて著しく減少した。根では窒素欠除区と尿素処理区の蛋白態 $\text{excess } ^{15}\text{N}$ が処理開始時および対照区と比べて著しく増加した。

4. 考 察

植物の生長, 老化の過程で下位葉の蛋白質が分解し, 非蛋白態窒素の形態で転流再利用されることはよく知られている。また, 窒素欠乏植物ではとくに下位葉の蛋白質が著しく減少することが報告されている³⁾。初期の研究は, 部位別に全窒素量を分析し, 見かけの窒素量の増減に基づいて転流についての推察を行っていた。しかし, 生物体中の蛋白質は絶えず代謝回転しているので, すでに吸収されている窒素がどのように再移動したかは同位元素を用いた実験によってはじめて明らかにできる。近年, ^{15}N の利用によって窒素の転流に関する知見は急速に増加しつつあり, ダイズの生長過程における窒素の転流についても KATO ら⁴⁾ によって詳細な研究がなされている。しかし, 正常な栄養状態の植物と窒素欠乏の植物とで窒素の再分布の様相がどのように異なるかについての知見はまだ十分には得られていない。

根の生長のために地上部とくに下位葉からの転流窒素の重要性について, 最近いくつかの報告がなされている^{5,6)}。本実験において, 根の非蛋白態 $\text{excess } ^{15}\text{N}$ は処理期間中に著しく減少しており(第6図), 代謝回転の速いことが ^{15}N 濃度(第5図)の急激な低下からもわかる。対照区では大部分が新たに吸収された ^{14}N と置き換

ったものと思われる。根の蛋白態 $\text{excess } ^{15}\text{N}$ は, 窒素欠除区および尿素処理区では処理期間中に増加していた。全窒素(第3図)も処理期間中に増加しており, 明らかに根以外の部位からの窒素の流入が考えられる。したがって, 蛋白態 $\text{excess } ^{15}\text{N}$ の増加分も根自体の非蛋白態 $\text{excess } ^{15}\text{N}$ および他の部位からの $\text{excess } ^{15}\text{N}$ による場合が考えられるが, 本実験の結果からだけでは両者の区別はできない。しかし, 巽⁷⁾によれば, 水稻の節根は自己の生長に必要な窒素を培地からの窒素よりも地上部から供給される窒素に強く依存しており, 本実験の場合も, 処理開始時に根に存在していた $\text{excess } ^{15}\text{N}$ の一部は地上部に移動し, 根において新たに合成された蛋白態 $\text{excess } ^{15}\text{N}$ の一部は, 下位葉など地上部からの再転流によってまかなわれたのではないと思われる。

上位葉では個体当たりの全窒素(第3図)が処理期間中に各区とも増加し, とくに対照区で著しく, 次いで尿素処理区, 窒素欠除区の順であったが, ^{15}N でみると(第7図), 対照区, 窒素欠除区, 尿素処理区の順であった。尿素処理区では sink である上位葉に直接窒素を供給したことによって他の部位からの $\text{excess } ^{15}\text{N}$ の転流が抑えられたものと思われる。尿素処理区の下位葉では窒素欠除区とほぼ同量の $\text{excess } ^{15}\text{N}$ が減少したが, 上位葉への転流が抑えられた分だけ中位葉, その他の部位により多く配分された。上位葉の $\text{excess } ^{15}\text{N}$ 濃度(第5図)においては, 対照区および尿素処理区の値が処理開始時よりも低下しており, これは対照区では根から, 尿素処理区では直接葉からの ^{14}N による希釈効果によるものと考えられる。

下位葉の非蛋白態 ^{15}N 濃度(第5図)は, 処理開始時には非常に高かったが, 処理後は各区とも急速に低下しており, 回転の速いことを示している。処理開始時に下位葉に存在した非蛋白態 $\text{excess } ^{15}\text{N}$ の大部分は, 処理期間中に他の部位へ転流したものと考えられる。植物体外から ^{14}N が供給されなかった窒素欠除区の下位葉の ^{15}N 濃度の低下は, 下位葉の ^{15}N 濃度の低い蛋白質の分解によってもたらされたものと思われる。

窒素欠乏植物の下位葉の蛋白質レベルが著しく低下する現象の説明としては, ①蛋白質合成速度の低下, ②蛋白質分解速度の促進, が考えられるが, これまではこの点はあまり明確にされておらず, 蛋白質合成のための基質の低下を理由に主として合成速度の低下があげられていた。本実験において, 窒素欠除区および尿素処理区の下位葉の蛋白態 $\text{excess } ^{15}\text{N}$ が対照区よりも著しく低下した(第6図)が, この場合も見かけ上の減少であって, $\text{excess } ^{15}\text{N}$ の流入量と流出量の厳密な区別はできな

いが、培地から新たに吸収された ^{14}N との区別はできるので、流入量も再転流によるものだけを考えればよい。

下位葉蛋白態 excess ^{15}N の低下について考えられる要因として、①下位葉の非蛋白態および根や茎などの excess ^{15}N の下位葉蛋白態への流入量が、対照区のほうが窒素欠除区および尿素処理区よりも多かった、②下位葉の蛋白態 excess ^{15}N の分解量が、窒素欠除区および尿素処理区のほうが対照区よりも多かった、が考えられる。KATOら⁴⁾はダイズの根から地上部へ再転流する窒素は、下位葉からの再転流に比べるとわずかであり、転流窒素の流れは主として上位葉の方向に流れていると報告している。一方、下位葉では可溶性プールのみを経て、蛋白質プールを経ないで転流する窒素が多いという報告もある⁸⁾。したがって、下位葉蛋白態 excess ^{15}N の変化に対する寄与は、①より②のほうが大きいように思われる。THOMSONら⁹⁾によれば、窒素欠乏のインゲンの葉のクロロプラストは、上位葉では微細構造の発達が未熟であったが、下位葉では老化葉と類似しており、微細構造が崩壊し、ストロマの減少がみられた。このことは、窒素欠乏の上位葉では葉の主要な蛋白質であるクロロプラスト蛋白質の合成速度が低下し、下位葉では分解速度が増大することを示唆している。WITLENBACHら¹⁰⁾はダイズの老化した下葉ではクロロプラストの構造の変化が起こり、蛋白質分解酵素の活性が高まると報告している。最近DALLINGら¹¹⁾はクロロプラストに結合したペプチド分解酵素の存在を報告しており、クロロプラストの微細構造の崩壊により、ストロマの蛋白質が分解酵素との接触によって分解される機構も予想できるようになった。本実験の段階では excess ^{15}N の流入、流出の区別ができないので明確な結論は得られないが、これまでの報告から得られた知見も合わせて考えるならば、窒素欠乏植物においては健全植物よりも下位葉の老化が速まり、蛋白質の分解速度も大きくなって、転流窒素である excess ^{15}N の再分布が健全植物とは異なるものとなった可能性が大きいことが示唆される。このような機構を明確にするためにはさらに詳細な研究が必要であろう。

下位葉の蛋白態 excess ^{15}N の減少は、根を通して窒素を供給した場合には著しく抑えられたが、上位葉から尿素有吸収させてもほとんど影響を受けなかった。WAGNERら¹²⁾は窒素欠乏植物ではサイトカイニンの合成が抑えられると報告している。サイトカイニンが根で合成され、地上部に移動すること¹³⁾、サイトカイニン処理した植物では膜構造が強固になっており、加水分解酵素が組織中に流れ出さないこと¹⁴⁾、などを考え合わせると、根の窒素レベルの変化がサイトカイニンのような物

質を通して、葉蛋白質の分解に影響するような機構を想定することも可能であろう。

5. 要 約

ダイズ幼植物を処理開始前3日間 $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ を吸収させて ^{15}N で標識し、標識されない窒素を含む培養液と含まない培養液に移して引き続き5日間生育させた。処理開始後3日間窒素欠除区の半分は上位葉から標識されない尿素有1日1時間吸収させた。処理開始時と終了時に植物を収穫し、上位葉、中位葉、下位葉、茎、および根に分け、蛋白態 ^{15}N と非蛋白態 ^{15}N を測定した。

1) 培地から窒素を吸収した根の非蛋白態窒素は、主として新たに培地から吸収された窒素から成り、回転が速かった。

2) 窒素欠除処理した根の蛋白態 excess ^{15}N の再分布割合は、培地から窒素を供給した根よりも著しく多かった。

3) excess ^{15}N は、上位葉の蛋白質で最も増加したが、sinkである上位葉に尿素有供給すると上位葉での excess ^{15}N の増加が抑えられ、中位葉など、他の部位への分布割合が増加した。

4) 下位葉の非蛋白態 excess ^{15}N は速やかに代謝回転し、他の組織に移動した。

5) 窒素欠除した下位葉の蛋白態 excess ^{15}N は根から窒素を供給した植物の下位葉よりも著しく減少した。一方、上位葉から尿素有供給しても下位葉の蛋白態 excess ^{15}N の減少にはほとんど影響しなかった。

これらの結果は、根からの窒素の供給が、下位葉の老化と蛋白質分解を制御しており、窒素欠乏によって下位葉の蛋白質分解が促進されるであろうことを示唆している。

文 献

- 1) MOORE, H.C.: Determination of Nitrate Nitrogen in Nitrates and Fertilizers. *Ind. Eng. Chem.*, **12**, 669~673 (1920)
- 2) 熊沢喜久雄: 発光分光分析法による重窒素の定量法, *ぶんせき*, **9**, 603~612 (1975)
- 3) GREGORY, F.G. and Sen, P.K.: Physiological Studies in Plant Nutrition. VI. The Relation of Respiration Rate to Carbohydrate and Nitrogen Metabolism of the Barley Leaf as determined by Nitrogen and Potassium Deficiency. *Ann. Bot. N. S.*, **1**, 521~561 (1937)
- 4) KATO, Y. and KITADA, S.: Studies on Nitrogen Metabolism of Soybean Plants. IV. The Dynamic Aspect of Leaf Nitrogen and Its Relation to Protein Turnover. *Jpn. J. Crop Sci.*, **48**, 229~242 (1979)

- 5) OGHOGHORIE, C.G.O. and PATE, J.S. : Exploration of the Nitrogen Transport System of a Nodulated Legume Using ^{15}N . *Planta*, **104**, 35~49(1972)
- 6) TATSUMI, J. and KONO, Y. : Translocation of Foliar-applied Nitrogen to Rice Roots. *Jpn. J. Crop Sci.*, **50**, 302~310 (1981)
- 7) 巽 二郎・河野恭広 : 地上部からの窒素供給と水稻根の生長, 日作記, **49**, 112~119 (1980)
- 8) 米山忠克・竹葉 副 : 成熟葉における窒素の流れの定量化, 土肥要旨集, **29**, 87 (1983)
- 9) THOMSON, W. W. and WEIER, T. E. : The Fine Structure of Chloroplasts from Mineral-deficient Leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Am. J. Bot.*, **49**, 1047~1055 (1962)
- 10) WITLENBACH, V.A., ACKERSON, R.C., GIAQUINTA, R. T. and HEBERT, R. R. : Changes in Photosynthesis, Ribulose Biphosphate Carboxylase, Proteolytic Activity, and Ultrastructure of Soybean Leaves during Senescence. *Crop Sci.*, **20**, 225~231 (1980)
- 11) DALLING, M. J., TANG, A. B. and HUFFAKER, R. C. : Evidence for the Existence of Peptide Hydrolase Activity Associated with Chloroplasts Isolated from Barley Mesophyll Protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.*, **111**, 311~318 (1983)
- 12) WAGNER, H. and MICHAEL, G. : Effect of a Varied Nitrogen Supply on the Synthesis of Cytokinins in Roots of Sunflower. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **162**, 147~158 (1971)
- 13) 古谷雅樹 : 植物生理学 7, p.109, 朝倉書店, 東京 (1982)
- 14) 倉石 晋 : 植物ホルモン, p. 94, 東大出版会, 東京 (1976)