

水稻葉身におけるD-アラニルグリシンの挙動-とくに穂との関連について

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	真鍋, 久
巻/号	58巻5号
掲載ページ	p. 602-605
発行年月	1987年10月

水稻葉身における D-アラニルグリシンの 挙動—とくに穂との関連について

真 鍋 久*

キーワード D-アラニン, D-アラニルグリシン,
水稻の葉身, 出穂期, 穂ばらみ期

ササニキや農林 16 号など日本型栽培イネの葉身部には, D-アラニンが D-アラニルグリシンの形で多量に存在する. 著者らはこれまでに, 上述した水稻の幼植物や切離葉身に種々の条件下で D-アラニンを取り込ませたり, 光合成的に CO_2 を与えてみたり, また幼植物を明・暗処理するなどして, D-アラニルグリシンならびに関連化合物の体内挙動を調べてきた. その結果, D-アラニルグリシンは, その D-アラニン残基をも含めて, 水稻の代謝活性の高い時期に, 光合成に伴うアミノ酸代謝系と密接に関連しあいながら葉身部で活発に生成されかつ蓄積されることを明らかにした^{1,2)}. しかしながら, D-アラニルグリシンの体内挙動については, まだまだ不明な点が多い.

今回著者は, 上述した水稻を水耕栽培し, 葉身部における D-アラニルグリシンならびに関連化合物の体内含量を, 登熟期に至るまで経時的に調査した. その結果, D-アラニルグリシンは栄養生長期には葉身部に高濃度で存在するものの, 栄養生長期を過ぎる頃から体内含量が速やかに低下していくことを見いだした. そこで, とくに穂への養分の転流が活発になされる穂ばらみ期に焦点をあてて, D-アラニルグリシンの穂への移行がどのようなものであるか検討した. その結果, D-アラニルグリシンの大部分は, 葉身内で一般代謝産物に変えられたのち穂で利用される可能性の高いことが示唆された. 以下それらの点について報告する.

水稻種子(農林 16 号)を, バット網上にて第 3 葉が展開するまで水道水で育て, その後 1/5000 a ポットに 6 本ずつ移植した. 移植直前より水耕液を用いたが, 最

初の 20 日間は 1/2 濃度のものを用いた. なお本水耕液(1 倍液)の組成は以下のとおりである. NH_4NO_3 (N として 30 ppm), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (P_2O_5 として 20 ppm), K_2SO_4 (K_2O として 30 ppm), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MgO として 20 ppm), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (CaO として 20 ppm), Fe-EDTA (Fe として 5 ppm), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Mn として 2 ppm), H_3BO_3 (B として 0.5 ppm), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Zn として 0.05 ppm), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu として 0.02 ppm), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Mo として 0.01 ppm). 水耕液は 6 日目ごとに更新し, 液の pH は 5.5 内外に調製した. なお, ポット栽培はガラス室内で 5 月中旬より開始した. 採取は, 原則として水耕液交換後 3 日目の午後 2 時頃, 葉身, 葉鞘, 根に分けてなされた. 採取時期は, 播種後 12 日目(第 3 葉展開中)から 121 日目(登熟期)までである(第 1 図参照). 採取した各部位は, ただちに 70% エタノールに浸漬した. 本抽出液を濃縮乾固し, 適量の水に溶かした. 本溶液を遠心分離して得られた上清, あるいは上清を Dowex 50 (H^+) カラム処理して分画された塩基性画分を, 陽イオン交換カラムを付した HPLC にかける D-アラニルグリシンを定量した^{3,4)}.

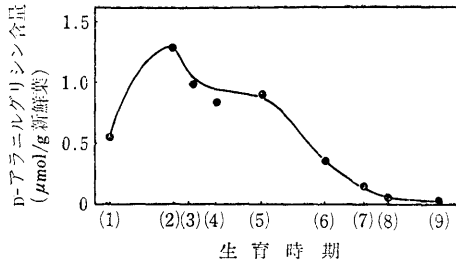
第 1 図は, 葉身部における D-アラニルグリシン含量を示したものである. 移植期から分けつ旺盛期にかけて, 本物質は新鮮葉 1g あたりおよそ $1 \mu\text{mol}$ という高い値を維持していた. ここでとくに移植期の含量が $1.3 \mu\text{mol}$ と高くなったのは, この時期は水栽培から水耕液栽培に切りかわったばかりであることに加えて, 植物体がまだ小さい時期ゆえ, 体内の窒素濃度が高まったことによるものと推察される. 実際, 多量の窒素培地中で水稻幼植物を育てた場合, 体内の窒素濃度が高くなり D-アラニルグリシン含量も効率よく高まることが明らかにされている⁵⁾. 一方, D-アラニルグリシンの体内含量は, 分けつが終わる頃から速やかに下がりはじめ, 出穂期以降はきわめて低含量となった(第 1 図). なお, 津村らも分けつ最盛期以降アラニルグリシン含量が経時的に減少することを, 水稻農林 29 号を用いて明らかにしている⁶⁾. これらの結果より, 葉身部に D-アラニルグリシンが高濃度で蓄積される時期は栄養生長期であるといえる. D-アラニルグリシンが光合成に伴うアミノ酸代謝系と密接に関連しながら生成されていること²⁾を考慮すれば, D-アラニルグリシンの生成活性は, 光合成活性に大きく依存するものと考えられる. 分けつ完了期頃の D-アラニルグリシン含量の低下は, この時期の葉身の光合成活性がそれ以前に比べて低下するため, それに応じて D-アラニルグリシンの生成速度が以前ほど早くはなくなった

Hisashi MANABE

* 福島県立会津短期大学(965 会津若松市一箕町大字八幡字門田 1-1)

昭和 62 年 11 月 13 日受理

日本土壤肥科学雑誌 第 58 巻 第 5 号 p. 602~605 (1987)

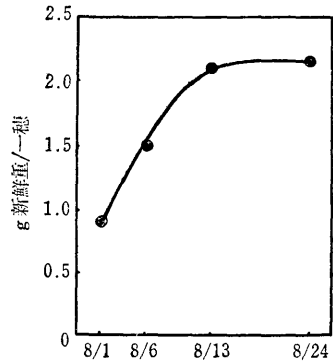


第1図 登熟期に至るまでの水稻葉身における D-アラニルグリシン含量の変動パターン

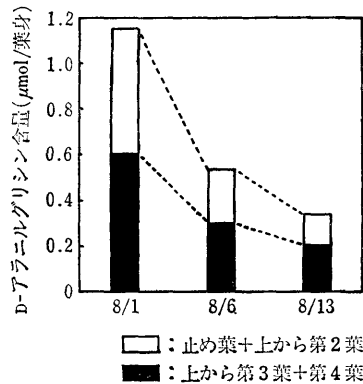
(1) 播種後12日目 (第3葉展開中), (2) 33日目(移植期), (3) 38日目 (分けつ前期), (4) 47日目 (分けつ初期), (5) 62日目 (分けつ旺盛期), (6) 83日目(分けつ完了期), (7) 96日目 (出穂直前期), (8) 104日目 (出穂完了期), (9) 121日目 (登熟期).

ことによるものと予測される。さらに、出穂期あたりから後の葉身における D-アラニルグリシン含量の低下については、上述した D-アラニルグリシン生成活性の低下だけではなく、本物質が穂に転流したことによる可能性も大である。そこで、D-アラニルグリシンと穂とのかかわり合いがどのようなものであるかを次に検討した。

4月下旬に播種した種子(ササニシキ)を、常法に従いガラス室で土耕栽培し、出穂しはじめた7月25日に水耕栽培に切りかえた。すなわち、根を水道水で洗浄後、1株ごと1倍水耕液の入った2lのビーカーに入れ栽培を開始した。6日後の7月31日に水耕液を交換したが、その後は、液が減少した段階で適宜水道水を入れ、水耕液は加えなかった。穂および葉身を8月1日、6日、13日(穂ばらみ期)ならびに24日(登熟期)に採取した。その際、葉身は止め葉(最上位葉)から第4番目までを葉位別に分取した。採取した各部位は、ただちに70%エタノールに浸漬した。抽出液を乾固後、適量の水に溶かし遠心分離して上清を得た。この上清を、陽イオン交換カラムを付した HPLC につけて D-アラニルグリシンを定量した^{3,4)}。D-アラニンについても定量を行ったが、その方法は以下のとおりである。すなわち、上清の一部について、ろ紙による電気泳動(pH 2.0, 2000 V, 20分)を行いアラニン画分を得た。ついでこの画分を配位子交換カラムを付した HPLC につけて、アラニンを D-および L-体に分離した⁷⁾。そして、全アラニンに対する D-体の割合を求めた。D-アラニルグリシンを定量する際に利用した先のクロマトグラムにはアラニンのピークも検出されているので、このものからアラニンの全量を算出した。その値に、ここで得られた D-体の割合を乗じて D-アラニンの量とした。

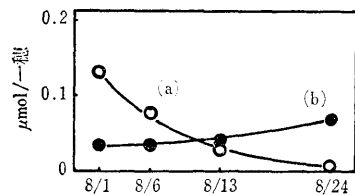


第2図 穂ばらみ期から登熟期にかけての穂重量の推移 8/1, 穂ばらみ期前期; 8/6, 穂ばらみ期中期; 8/13, 穂ばらみ期後期; 8/24, 登熟期.



第3図 穂ばらみ期の葉身における D-アラニルグリシン含量の推移 (一穂あたり)

□, 止め葉+上から第2葉; ■, 上から第3葉+第4葉. 8/1, 穂ばらみ期前期; 8/6, 穂ばらみ期中期; 8/13, 穂ばらみ期後期.



第4図 穂ばらみ期から登熟期にかけての穂における D-アラニルグリシン (a) ならびに D-アラニン含量 (b) の推移

8/1, 穂ばらみ期前期; 8/6, 穂ばらみ期中期; 8/13, 穂ばらみ期後期; 8/24, 登熟期.

第2図は、8月1日から24日にわたっての穂の重さを示したものである。経時的にその重量が上昇するものの、13日以降はほぼ一定値になった。したがって、穂への養分の転流が、1日から13日の間に活発になされた

ものと理解される。この時期の葉身部における D-アラニルグリニン含量を第 3 図に示した。本物質は、8 月 1 日には $1.16 \mu\text{mol}$ (止め葉～第 4 葉全体あたり) 存在していたが、その後大きく減少した。この傾向は、葉位別に調べた場合にも同様であった。第 4 図(a)は、この時期の穂における D-アラニルグリニン含量の推移を示したものである。本物質は 8 月 1 日には $0.13 \mu\text{mol}$ 存在していたが、以降その体内含量は経時的に徐々に減少するだけであり、葉身での減少パターンに対応して増加する傾向にはなかった。この時期には、代謝産物が活発に葉身から穂に移行し、それが穂で貯蔵物質に変換されるので、D-アラニルグリニンについても、これがこの時期に穂に転流しさらには貯蔵物質に組み込まれるであろうことは十分考えられる。その際、D-アラニルグリニンが速やかに貯蔵物質に取り込まれるのであれば、本物質がジペプチドの状態に穂に蓄積することはないだろうから、第 4 図(a)の結果が納得できる。しかしながら、D-アラニルグリニンの貯蔵物質への転換に関しては、D-アラニルグリニンもしくはその構成成分である D-アラニンが D-体のままで貯蔵物質に多量に組み込まれるとは現状ではきわめて考えにくい。それよりも、D-アラニルグリニンは後述のようにまず D-アラニンとグリニンに分解され、D-アラニンはさらにラセミ化反応で L-アラニンに変換される^{9,10)} などして一般代謝産物にまで転換されてから貯蔵物質に組み込まれると考えるのが自然であろう。このような仮定にたてば、D-アラニルグリニンが貯蔵物質に組み入れられるに先立って、中間代謝産物として D-アラニンが生成されることになる。一般に、D-アラニンの代謝は L-アラニンの場合に比べて、かなり緩慢になされる^{9,11,12)} ので、多量の D-アラニルグリニンが分解されれば、一時的にせよ D-アラニンが組織中に蓄積するはずである。ところで、8 月 1 日から 8 月 13 日までの間、穂ではきわめて徐々に D-アラニン含量が上昇するだけであった(第 4 図(b))。また、その期間中に葉身から消失した D-アラニルグリニンが約 $0.8 \mu\text{mol}$ であるのに対し、同期間中に穂に蓄積した D-アラニンは、わずか $0.01 \mu\text{mol}$ 内外にすぎなかった(第 3 図、第 4 図(b)参照)。したがって、D-アラニルグリニンは穂では分解されなかった可能性が大である。そうであれば D-アラニルグリニンが穂に多量に蓄積されてしかるべきであるのに、必ずしもそうなってはいない(第 4 図(a))。結局、大部分の D-アラニルグリニンは、ジペプチドの状態に穂に移行したわけではないであろうことが強く示唆される。それゆえ、本物質は葉身内でまず分解を受け、さらに一般代謝産物に転換されたあとで穂に移行したと考えるのが

妥当と思われる。ただ、葉身内で未分解の少量の D-アラニルグリニンについては、これが直接穂に転流され、穂で分解されたのち貯蔵物質に組み込まれるものと思われる。たとえば、第 4 図は D-アラニルグリニン含量が経時的に徐々に減少し、それに対応して D-アラニン含量が漸増する様を示しているが、これは葉身から移行してきた D-アラニルグリニンが穂で徐々に分解されて D-アラニンとグリニンに分解されたことを示すものと考えられよう。一方、D-アラニン含量の経時的な上昇割合が D-アラニルグリニン含量の減少割合よりも小さくみえるが、これは生じた D-アラニンが先述の系に從って徐々に貯蔵物質に組み込まれたからではないだろうか。

なお、D-アラニルグリニンは栄養生長期の水稻の葉鞘や根からはほとんど見いだされていない^{3,8)} が、葉身内の D-アラニルグリニン含量が激減する穂ばらみ期～登熟期においても、本物質はこれらの部位からはほとんど検出されなかった。また、これらの部位に見いだされる D-アラニンもきわめて少量であった。したがって、この時期における D-アラニルグリニンの葉鞘や根への移行は、ほとんどないものと思われる。

以上の考え方より、出穂期以降の葉身における D-アラニルグリニン含量の急速な低下は、本物質の分解が促進されたことによる可能性が高い。この時期に D-アラニルグリニンの多くが葉身で分解を受け、引き続いて一般代謝産物にまで変換されるならば、これが穂で速やかに貯蔵物質に組み込まれるであろう。したがって、D-アラニルグリニンが葉身で分解されることは、穂での本物質の利用効率を上げるためにきわめて合目的な現象といえるのではないだろうか。なお、上述した一連の考察を確証するためには、たとえば出穂期の葉身に放射性 D-アラニルグリニンを投与してそのゆくえをつぶさに追跡するなど、より綿密な検討を要することは言うまでもない。

文 献

- 1) 真鍋 久: 水稻における可溶性結合型 D-アラニンの存在とその代謝に関する研究, 土肥誌, **56**, 175~176 (1985)
- 2) 真鍋 久: 水稻における D-アラニルグリニンの存在とその代謝, 化学と生物, **23**, 347~349 (1985)
- 3) MANAEE, H.: Analysis by HPLC of D-Alanyl-glycine and Its Related Compound in Rice Plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **30**, 589~593 (1984)
- 4) MANAEE, H.: Occurrence of D-Alanyl-D-Alanine in *Oryza australiensis*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1203~1204 (1985)
- 5) MANAEE, H.: Effect of Exogenous Nitrogen on

- the D-Alanylglycine Content in Rice Seedlings. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **31**, 141~144 (1985)
- 6) 津村昭人・駒村美佐子・小林宏信：イネの遊離ペプチド，アラニルグリシンについて，土肥誌，**48**，101~102 (1977)
- 7) MANABE, H.: Optical Configuration of Alanyl-alanine Detected in the Leaf Blades of Japonica Rice Plants Fed with D-Alanine. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **32**, 327~331 (1986)
- 8) MANABE, H., YAMAUCHI, M. and OHIRA, K.: Studies on D-Amino Acids in Rice Plants: Behaviors of D-Alanylglycine in Rice Seedlings. *Plant Cell Physiol.*, **22**, 333~336 (1981)
- 9) MANABE, H. and OHIRA, K.: Metabolic Patterns of D- and L-Alanine Fed to Suspension-Cultured Rice Cells. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26**, 517~523 (1980)
- 10) MIURA, G. A. and MILLS, S. E.: The Conversion of D-Tryptophan in Cell Cultures of Tobacco. *Plant Physiol.*, **47**, 483~487 (1971)
- 11) MANABE, H. and OHIRA, K.: Fate of D- and L-Alanine Fed to Rice Leaf Blades. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26**, 375~381 (1980)
- 12) MANABE, H. and OHIRA, K.: Studies on the D- and L-Alanine-Feeding Ability of Suspension-Cultured Rice Cells. *ibid.*, **27**, 455~461 (1981)