

北海道大豆の生成および子実たんぱくの生育における可溶性窒素成分の栄養生理学的意義

誌名	北海道農業試験場研究報告 = Research bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station
ISSN	03675955
著者名	石塚, 潤爾
発行元	北海道農業試験場
巻/号	101号
巻号補足	
掲載ページ	p. 51-121
発行年月	1972年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



北海道の大豆の生育および子実たんぱくの生成における 可溶性窒素成分の栄養生理学的意義

石 塚 潤 爾*

Physiological Roles of Soluble Nitrogenous Components on Vegetative Growth and Seed Protein Formation of Soybean Plants in Hokkaido

Junji ISHIZUKA

目 次

I 緒 言	52
II 落花落莢の原因	54
1 ま え が き	54
2 大豆栽培におけるボーダーエフェクト	54
3 結莢期における茎の全糖および全窒素濃度	56
4 黄化莢, 健全莢の各種成分濃度の差異	57
5 窒素肥料の増施による栄養生長の促進が開花結実に及ぼす影響	60
6 摘 要	61
III 大豆のアラントインの抽出および定量法の検討	62
1 ま え が き	62
2 アラントイン酸カリの製造	62
3 アラントインの定量	63
4 大豆生体試料からのアラントインの抽出	65
5 乾燥粉末試料からのアラントインの抽出	67
6 摘 要	68
IV 大豆の栄養生長の支配要因	68
V 大豆におけるアラントイン生成の場	69
1 ま え が き	69
2 茎およびブリーディングサップのアラントインの濃度間の相関々係	69
3 大豆根のアラントイン生成における茎葉の役割り	70
4 アラントイン生成における根粒着生の必要性	71
5 摘 要	73
VI 大豆根のアラントイン生成における根粒着生の生理的意義	73
1 ま え が き	73
2 根に対する光合成産物の供給停止がアラントインの生成に及ぼす影響	74
3 アンモニアおよび硝酸—Nが大豆のアラントイン生成に及ぼす影響	76
4 根におけるアラントインの生成と全糖/全—N比との関連性	78

* 農芸化学部 土壤肥料第3研究室

5 大豆根の生育抑制とアラントイン生成量との関連性	80
6 摘 要	85
Ⅶ 大豆根におけるアラントインの生成経路	85
1 ま え が き	85
2 尿素とグリオキシル酸の縮合によるアラントインの生成	87
3 ブリンの酸化分解によるアラントインの生成	90
4 根粒の着生が大豆根の核酸代謝に及ぼす影響	94
5 摘 要	98
Ⅷ 子実たんばくの生成におけるアミノ酸およびアラントインの生理的役割	99
1 ま え が き	99
2 Vacuum infiltration により莢に吸収させた ^{14}C —標識アミノ酸の行動	100
3 莢の切り口から吸収させた ^{14}C —標識アミノ酸の行動	104
4 アラントインの子実たんばく生成における生理的役割	109
5 摘 要	110
Ⅸ 総合論議および要約	111
1 総 合 論 議	111
2 要 約	113
引 用 文 献	113
Summary	119

I 緒 言

近年、わが国における大豆作の不振は著しいが、これは国際的競争に堪えられない生産性の低さや、水稻やビートのような行政上の保護が与えられなかったことにもよるが、長年にわたる試験研究の積み重ねにもかかわらず、水稻作にみられたような著しい収量の向上がみられなかったことにも大きな理由がある^{62,78)}。

大豆の全国平均収量は11~14 kg/aで、昭和初年からほとんど増大していない。北海道でも年次による差は大きい、平均収量が17.5 kg/aを超えた年はない。水稻の収量は北陸や東北地方の日本海側では50 kg/aを超え、昭和初年には約20 kg/aにすぎなかった北海道でも、近年は40 kg/aに達している。このような水稻収量の向上には、品種改良による光エネルギーの利用効率の向上が大きく貢献している。それに対して大豆では、光エネルギーの利用効率を高めることがむずかしく、このことが収量の向上を阻んできたと考えられる。

大豆の光エネルギーの利用効率が低く、水稻の約 $\frac{1}{3}$ にすぎない理由の一つは葉の受光態勢にある⁸⁰⁾。水稻では細長い葉が直立に近い状態にあるので、下の葉まで日照を受けやすく、おのおの葉に光が平均的に分配され、大部分の葉が光合成能を十分に発揮できる。これに対して、大豆葉は円形に近く、水平方向に展開しているので、上葉だけが光飽和以上の光を受け、下葉は光量不十分のため、光合成能を十分に発揮することができない⁸⁰⁾。したがって、窒素施肥などにより葉面積を増大させても、その一定値以上では光エネルギーの利用効率は向上しない。北海道の水稻では葉面積指数が5^{注1}までは収量増となるのに対して、大豆では3.5以上で

注1 志賀一一他,(1971): 高位収獲田の環境と水稻群落構造の解析, 水稻の収量限界向上に関する研究, 農林水産技術会議, 東京

は収量増は期待しにくい。収量停滞の第一の理由は、このように光エネルギーの利用効率を高めることがきわめて困難であることにある。

窒素施用量を増大させると、葉面積が増大し、光エネルギーの利用効率は向上するが、葉面積指数が一定値を超えると乾物生産量の増大は頭打ちとなる。子実収量の極大はこのような乾物生産量の極大とは一致せず、前者は後者に比して著しく少ない窒素施用量で得られる場合が多い⁴⁶⁾。このことは水稻の収量が 70 kg/a (北海道の最高レベルの収量) までは乾物総生産量にはほぼ比例して増大することと対照的であり、また、大豆収量の停滞性の原因が乾物生産量、すなわち、光エネルギーの利用効率の低さにもよるが、それ以上に子実生産への分配率を高めることがむずかしいところに問題があることを示すものである。

大豆は施肥反応のにぶい作物であるが^{23,24,32,63)}、このことは施肥によって生育をコントロールすることがむずかしいというよりも、子実収量が変わらないということの意味している。そのためか、窒素の慣行施用量は少なく、北海道での適量は 0.05~0.2 kg/a とされている^{83,104)}。そして、根粒により固定窒素が供給されるので、肥料として与える窒素は、初期生育を確保するに足るだけで十分であり、それ以上の施用は茎葉の過繁茂をまねくだけであるとみられてきた。この現象は大豆が水稻や麦のように、子実に主として澱粉を集積する作物であるならば理解されやすい。しかし、子実に多量のたんばく質を集積する大豆で、施肥によって窒素が補われた場合、その窒素が子実たんばくの形成には役立たず、もっぱら栄養生長のみを促進するという生理機構については注目されなければならない。そして乾物総生産量を高めることができて、その子実生産への分配率を高めることがむずかしい理由を明らかにしなければならない。

本研究ではこの問題に関連して、つぎの二つの可能性について検討した。

1 窒素肥料の多用は根粒の着生を抑制し、固定窒素に対する依存度を低下させ、施肥窒素の吸収量を増大させる。このことが茎葉の発育を促進し、過繁茂の原因となっているのではないか。すなわち、施肥窒素と固定窒素の生理的役割に相異があり、栄養生長の窒素源としては施肥窒素の効率が高いのではないか。

2 大豆には花器の脱落が多いが、そのおもな原因は栄養生長と花器の発育との競合による養分争奪の結果生ずる花器への養分供給の不足、不均衡と考えられ、窒素の多用が上記の生理的機作によって栄養生長を促進して開花数を増大させても、着莢数の増大に結びつかないのではないか。

本研究では、上記二つの可能性を大豆の窒素栄養の特性を解明することにより検討し、窒素の施用が乾物生産量の増大をもたらすが、子実収量増に結びつかない理由を明らかにしようとした。

本研究を取りまとめるにあたり、ご指導、ご校閲の労をとられた東北大学農学部教授藤原彰夫博士、同教授玉利勤治郎博士、同教授志村憲助博士、同助教授大平幸次博士ならびに北海道農試農芸化学部長江川友治博士に対して深く感謝の意を表する。また、本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご援助をいただいた前北海道農試農芸化学部土壌肥料第3研究室長串崎光男技官、現同研究室長仁紫宏保技官ならびに本研究を実施するにあたり多大なるご協力をいただいた土壌肥料第3研究室の一同とくに星忍技官、石黒助実技官、田岡今春技官と元同研究室員沖野(旧姓赤松)房江の各位に対して深甚の謝意を表する。

II 落花、落莢の原因

1. ま え が き

北海道中央部の大豆は、7月中旬～下旬、本葉9～10葉展開期頃から約2週間にわたって開花し、その間もおう盛に栄養生長し、8月下旬、本葉14～17葉の止葉まで栄養、生殖両生長は並行して進行する。水稻^{30,31)}と同様大豆でも、両生長の重複期間は暖地ほど短く、栄養生長が完了に近くなってから、開花、結実する。したがって、結莢数を確保するには、暖地では過繁茂による環境条件の変化や光合成能の頭打ちが問題になるのに対して、北海道では、結莢期における莢の発育が栄養生長との競合により阻害されることに関心が向けられるべきである。両生長の競合は莢の発育に必要な代謝産物の供給不足や不均衡をまねき、発育を阻害し、落莢の原因となっていると考えられる^{37,38,39,59)}。

そのほか花器脱落の原因としては、花芽の分化・発育の欠陥、不授精、機械的障害および干ばつなどがあげられるが^{37,39,50)}、脱落花器の80%以上は莢への特定代謝産物の供給不足、不均衡などによる胚の発育停止に起因すると考えられており³⁸⁾、また、体内養分に関連した問題以外は、作物栄養学的手法では解析が難しいので、体内養分の動きに焦点を合わせ、落莢の原因およびその機作を解明しようとした。

大豆はボーダーエフェクトの大きい作物であり、ボーダー株の着莢数が著しく多くなるが、それは個体間競合が少ないことに起因する。個体間競合除去の効果を地上部および地下部に分けて考えた場合、前者に対する効果は、主として炭素固定量の増大であり、後者は根からの養分吸収量の増大の結果である。そこで、この場合の莢数が著しく多くなる原因が地上部にあるか、地下部にあるかを明らかにするため、大豆をほ場で孤立状態と群落状態で栽培し、その生育状況を調査した。

つぎに、茎の全窒素と全糖の濃度を生育時期別に調査し、落莢の発生する結莢期から登熟初期にかけて、どちらの濃度に問題があって莢の発育が抑制されるのかを予測しようとした。

脱落する莢は、まず生長が停止し、しだいに黄化する。そこで、黄緑化のきざしの認められた莢を採取し、健全莢と比較することにより、莢の発育抑制因子が何であるか明らかにしようとした。

さらに、窒素用量試験ほ場で栽培した大豆の開花、結莢の実態を調査することにより、落莢の原因の一つが栄養生長との競合による莢の発育阻害であるとの推論の妥当性について検討し、窒素の多用が結莢率の低下をもたらし、さらに、このことが乾物生産量の増大と子実収量の増大とが結びつかないことの大きな理由となっていることを明らかにしようとした。

2. 大豆栽培におけるボーダーエフェクト

1) 実験方法

北海道農試羊ヶ丘ほ場において、栽植密度および窒素施用量を異にして栽培した大豆(*Glycine Max* L.)「長葉白」について調査した。

施肥 P_2O_5 2.0 kg/a (過石、熔燐1:1)

K_2O 1.0 kg/a (硫加)

堆肥 150 kg/a

堆肥以外は作条に条施、堆肥は耕起前に散布した。

栽植様式, 群落状態 $55\text{ cm} \times 25\text{ cm}$ } 2 本植
 孤立状態 $110\text{ cm} \times 100\text{ cm}$ }

孤立状態で栽培する株の根域を群落状態で栽培する株と同一にするため, 半数の株には $55\text{ cm} \times 25\text{ cm} \times 30\text{ cm}$ (高さ) の木枠を土中に挿入した。したがって, 株当たり施肥量は木枠を挿入した株と群落状態の株では等しいが, 木枠を挿入しない孤立株では 8 倍となる。

播種 5 月 12 日, 収穫 10 月 16 日 (1969)。

2) 実験結果ならびに考察

収穫物の調査結果 (第 1 表) にみられるように, 群落状態で窒素を施用せずに栽培した大豆の株当たり子実収量を基準とした場合の孤立株の子実収量は, 150~200 % である。この増収は, 地上部の個体間競合から派生する阻害要因が除かれることと, 株当たり根域の拡大により,

第 1 表 孤立および群落状態で栽培した大豆の収穫物調査 (1969)

N 施用量	処 理	項 目	茎 長 (cm)	株当たり子実重 (g)	同 左 比 (%)	千 粒 重 (g)	子実 N 濃度 (%)
0	孤立	枠 あり	52.8	85.6	153	226.0	6.28
	孤立	枠 なし	58.2	92.7	166	226.6	6.12
	群落	(対 照)	68.4	55.8	100	209.0	6.06
1.6 kg/a	孤立	枠 あり	61.5	99.9	179	219.6	6.28
	孤立	枠 なし	66.5	111.5	200	222.0	6.30
	群落	(対 照)	71.4	56.9	102	207.5	6.08

注) 5 株 平均

水と養分吸収量が増大することによる効果と考えられる。そこで, 第 2 表におけるおの要因の増収効果を算出し, 表示した。根域の拡大による効果とは, 木枠で根域を制限された孤立状株の収量を 100 とした場合の枠なしの孤立状株の収量比である。地上部個体間競合除去の効果とは, 同一施肥条件の群落状株の収量を 100 とした場合の孤立状株の収量比である。窒素施用効果とは, 窒素不施用株に対する施用株の収量比である。

第 2 表 各要因の株当たり子実収量に対する増収効果

要 因	条 件	子実収量比 (%)
根 域 の 拡 大	窒素不施用	108
	窒素 1.6 kg/a 施用	111
地 上 部 個 体 間競合の除去	窒素不施用	枠あり 153 枠なし 167
	窒素 1.6 kg/a 施用	枠あり 176 枠なし 202
窒 素 の 施 用	孤 立 状 態	枠あり 117
	孤 立 状 態	枠なし 125
	群 落 状 態	102

第 2 表によると, 地上部個体間競合除去の効果が最も大きく, 50~100 % であり, 根域拡大の効果は小さく, 10 % 前後で, 窒素施用の効果も 20 % にすぎない。この結果から, 大豆栽培におけるボーダーエフェクトは, 根よりも地上部の環境条件の改善による効果とみることができる。

3) 論 議

上述の推論が成立するためには, ほ場が肥沃であることが前提条件であり, 施肥量が少なく, やせたほ場では, 根域拡大の効果が大きく現われる可能性がある。しかし, 本研究の最終目標が単なる施肥法の改善や土地改良によっては困難であると考えられている大豆の多収技術の開発にあるので, 低収地帯の大豆や不健全な生育を研究材料とすることはできない。子実収量

が 30 kg/a 以上の比較的高レベルの大豆を研究対象としているので、その範囲内では上述の推論は成立すると考えられる。落花、落莢の原因が、莢への特定養分の供給不足であるとするならば、その養分は、根から吸収されるものではなく、光合成産物であると予想される。

3. 結莢期における茎の全糖および全窒素濃度

1) 実験方法

北海道農試琴似ほ場（沖積土、壤土）において、大豆（*Glycine Max* L.）「長葉白」を栽培し、本葉第1葉展開期から黄熟期まで、10回サンプリングし、茎を熱風乾燥（80°C, 2 hr, 60°C 20 hr）後粉碎し、全糖、全窒素濃度を定量した。

栽培方法

施肥 P_2O_5 0.8 kg/a （過石，燐 1:1）

K_2O 0.6 kg/a （硫加）

N 0 および 1.6 kg/a （硫安）

栽植様式 50 cm × 25 cm 2 本植

播種 5 月 13 日

定量法

全窒素： 乾燥粉碎試料をケルダール・ガンニング変法^{87,92)}で分解，アンモニアを水蒸気蒸溜する。

全糖： 乾燥粉碎試料を 80 % 熱エタノールで 2 回反復抽出し，抽出液のエタノールを湯煎上で蒸発飛散させ，中性酢酸鉛を加えて除たんぱくし，過剰の鉛塩を醋酸鉛として除き，糖液とする。糖液にその 1/10 量の濃塩酸を添加し，25°C で 18 時間放置して加水分解した後，ソモギー新試薬⁸⁷⁾で全糖を定量する。還元糖のみを定量する場合は，塩酸加水分解前の糖液で定量する。

試薬 80 % エタノール

中性酢酸鉛， $Pb(C_2H_3O_2)_3 \cdot 3H_2O$ 飽和溶液

醋酸ソーダ

ソモギー新試薬

2.5 % 沃化カリ水溶液

2 N 硫酸

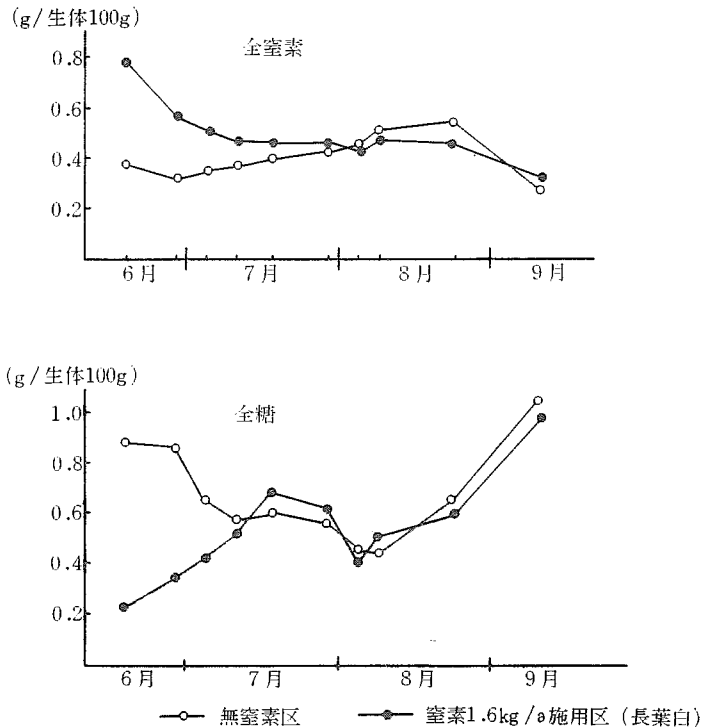
0.005 N チオ硫酸ソーダ標準液

1 % 可溶性澱粉水溶液

2) 実験結果ならびに考察

第1図に示すように、茎の全窒素、全糖濃度とも、7月中旬、開花直前までは窒素施肥の有無により明らかな差が認められるが、開花期以後ではほとんど差がみられなくなる。無窒素区の全窒素濃度は7月中旬以後、8月下旬（黄熟期）まで上昇の傾向があり、窒素施用区でも、落花、落莢の多発する8月上、中旬までは、低下が認められない。

全糖濃度は7月中旬までは窒素施用区で低く、無施用区では高いが、7月下旬（開花期）には差がなくなる。その後8月上旬に一時低下するが、8月中旬以後再び上昇する。落花、落莢が多発する8月上、中旬に全糖濃度が低下することから、莢への炭水化物の供給が抑制されているものと考えられる。



第1図 ほ場栽培大豆の茎の全窒素、全糖濃度の推移

3) 論 議

落花と落莢を正確に区別することはできないが、加藤³⁹⁾は便宜上開花後10日までに落ちるものを落花とし、それ以後のものを落莢とした。落花、落莢の83.7%以上は胚の發育停止によるもので、そのうち胚の發育が子葉期以後に停止するものもあるが、大部分は原胚期に發育を停止したものである。原胚期の胚發育停止は開花後10日目頃に生ずるものが多いことを加藤が顕微鏡観察により明らかにした。開花後20~25日には子葉期の胚發育停止が多発し、落莢の原因となる。開花盛期から25日以後にも脱落する莢があるが、その中には、すでにそれ以前に胚の發育を停止し、その後、徐々に脱落したものが多いと考えられる。

第1図の調査では、開花盛期が7月25日前後であったので、全糖濃度の低下する8月上旬は原胚期に相当し、胚の發育停止が多発する時期である。また、この期間は、栄養生長がおう盛な期間であり、茎の全糖濃度の低下は、光合成産物の栄養生長に消費される割合が高いことに起因し、莢への炭水化物の供給が抑制され、劣勢花器の發育の阻害、落莢の原因となっていると推定できる。

上述のように、茎の全窒素濃度がこの期間でも低下していないことは、根からの窒素供給量が、落花、落莢の原因と直接的関係がないことを暗示するものである。

4. 黄化莢、健全莢の各種成分濃度の差

1) 実験方法

莢への養分供給の不足、不均衡が落花、落莢の原因であると想定し、その原因物質を知るた

め、ほ場栽培の大豆「長葉白」から、最上位葉展開期に発育を停止し、黄緑化のきざしの認められた莢を採取し、その中から長径が約4 mm以上の子実を内蔵している莢を選び、黄化莢とした。対照として、健全な色艶を有し、黄化莢と子実の発育程度が同程度の莢を選んだ。さらに、参考として、発育が進んだ健全莢も供試した。

試験ほ場、北海道農試羊ヶ丘ほ場9号地（火山性土、壤土）

栽培条件は前述2の群落状株の場合に等しい。

定量法 採取した莢は直ちに莢殻と子実に分け、80°Cの熱風乾燥器で乾燥し、粉碎し、次項Ⅲで記載する方法で冷水抽出し、アミノ酸—N、アラントイン—N濃度を測定した。全窒素、全糖濃度は前節の方法で定量した。

〔アラントイン—N〕 次項Ⅲで詳述する。

〔アミノ酸—N〕 MOOREとSTEIN⁵⁶⁾の方法に準じ、変更を加えたニンヒドリン法により定量した。したがって、本研究でアミノ酸—Nとして表示したものは、ニンヒドリンで発色するアミノ酸、アミドの α -アミノ態窒素の総量である。検量曲線は大豆の茎葉中に高濃度で存在するアスパラギン酸について作成した。MOOREら⁵⁶⁾によれば、プロリン、ヒドロキシプロリン以外のアミノ酸の発色強度には大差がないので、個々のアミノ酸の発色強度の差については考慮しなかった。

試薬

クエン酸緩衝液 0.2 M, pH 5.0: クエン酸 21,008 g, 1 N水酸化ソーダ 200 mlおよびチモール 0.5 g（かび止め）に水を加えて500 mlとする。さらに塩化第一錫1 gを添加し、褐色試薬びんに入れ、空気との接触を断つために流動パラフィンを通し込む。ピロガロールアルカリ液の洗気びんと褐色試薬びんをビニール管で接続させ、必要量はあらかじめ設置しておいたビニール管から流出させる。減圧となるので洗気ビンを通して空気を送り込む。

メチルセロソルブ: 鹿印特級試薬

ニンヒドリン: 鹿印特級試薬

標準アスパラギン酸水溶液 1 mM: アスパラギン酸（特級試薬）13.3 mgを100 mlにとかす。1週間毎に更新。

操作法

供試液2 mlを内径1.8 cm、長さ18.0 cmの試験管に取り、ニンヒドリンの2%メチルセロソルブ液に同量のクエン酸緩衝液を加えて混合した液を0.5 ml添加し、沸騰水中で30分加熱する。直ちに、50 mlに希釈し、島津スペクトロニック 20型分光光度計を用い、565 m μ で比色する。

検量曲線は、2 μ mole まで直線で、 μ mole 当たりの吸光度は0.395である。

〔硝酸—N〕 乾燥粉末試料を水で抽出し、常法⁸⁷⁾により妨害物質を除き、フェノール硫酸法で定量する。

2) 実験結果ならびに考察

窒素成分濃度

第3表の健全莢（小）は黄化莢と発育が同程度の子実を内蔵する莢である。両者を比較すると、莢殻の全—N、アラントイン—N、アミノ酸—Nおよび硝酸—N濃度は黄化莢で高いが、その差は小さい。黄化莢子実の全—N濃度は健全莢（小）より高いが、アミノ酸—Nは著しく低濃度である。アラントイン—Nは健全莢（小）の子実ではほとんど検出されないが、黄化莢

第3表 黄化莢，健全莢の各種成分含量

(%対乾物)

N施用量		成 分	全—N	アラントイン—N	アミノ酸—N	硝 酸—N	全 糖	還元糖
莢	0 kg/a	黄化莢	2.71	0.523	0.152	0.052	2.83	2.35
		健全莢 (小)	1.99	0.357	0.169	0.022	9.85	7.64
		健全莢 (大)	1.21	0.141	0.061	0.016	7.90	5.58
殻	0.4	黄化莢	2.73	0.817	0.251	0.037	3.90	2.69
		健全莢 (小)	2.33	0.427	0.288	0.018	7.79	5.65
		健全莢 (大)	1.29	0.124	0.089	0.012	7.10	4.82
子	0	黄化莢	6.80	0.219	0.031		0.44	0.15
		健全莢 (小)	6.01	0.001	0.293		4.53	1.10
		健全莢 (大)	5.49	tr	0.182		5.48	0.63
実	0.4	黄化莢	6.38	0.126	0.045		1.36	0.31
		健全莢 (小)	5.81	0.001	0.265		4.78	0.49
		健全莢 (大)	5.31	tr	0.203		3.28	0.19

注) 供試品種 「長葉白」

健全莢 (小) が黄化莢と同一発育程度であり，健全莢 (大) は登熟の進んだ莢。

の子実では0.1%以上である。各窒素成分濃度を健全莢 (小) と健全莢 (大) で比較すると，莢殻，子実ともに，登熟の進行によって低下する傾向があり，アラントイン—Nの低下が著しい。

糖濃度

莢殻，子実ともに，糖濃度は黄化莢で著しく低い。健全莢の (大) と (小) の比較では，濃度差が小さく，一定の傾向が認められない。

登熟の進行程度によって，窒素成分濃度には変化がみられるが，糖濃度に顕著な差がみられないことは，黄化莢と健全莢の窒素成分濃度を比較する場合，子実の大きさがほぼ等しいとしても，開花後日数が等しいとは限らないので，健全莢 (小) が黄化莢の対照として適当であるか否かを考慮しなければならぬことを示すものである。それを考慮に入れても，莢殻と子実の全—Nおよびアラントイン—N濃度については，両莢間の濃度差が大きいので，黄化莢で高いと言えることができる。

糖濃度は登熟の進行程度によって大きな変化を示さないで，黄化莢で著しく低濃度であることは，莢の発育停止と密接な関連性のある現象であるとみることができる。

3) 論 議

莢の発育停止，黄化の原因が養分の供給障害であるとするならば，上述の実験結果から莢の発育抑制は窒素成分には関係がなく，炭水化物の供給量に関連があると推定できる。黄化莢の子実のアラントイン濃度が健全莢の子実より著しく高く，また，莢殻のアミノ酸濃度に大差がないにもかかわらず，子実のアミノ酸濃度が黄化莢で著しく低い理由は，莢殻のアミノ酸が子実に円滑に転流しないことと，アラントインの形態で窒素が供給されたとしても，炭水化物の供給が抑制される結果，炭素源の欠乏により，それがアミノ酸合成に分解利用されないためであると推定される。加藤らも³⁷⁾，発育を停止した胚のアミノ酸をペーパークロマトグラフィーで調査し，微量のグルタミン酸のみを検出している。これらの問題についてはさらにⅧで論ずる。

5. 窒素肥料の増施による栄養生長の促進が開花結莢に及ぼす影響

1) 実験方法

北海道農試琴似ほ場（沖積土，壤土）で，大豆「長葉白」を供試し，窒素用量試験を行ない，窒素施用量，0，0.8 kg/a，1.6 kg/aの各区から，平均的生育の5株（10個体）を選定し，7月28日（1964）から7日ごとに，節位別開花数，莢数を調査し，開花総数を算出し，また，収穫期には節位別着莢数を調査した。

耕種法は，窒素施用量以外についてはⅡ—2と同様である。

2) 実験結果ならびに考察

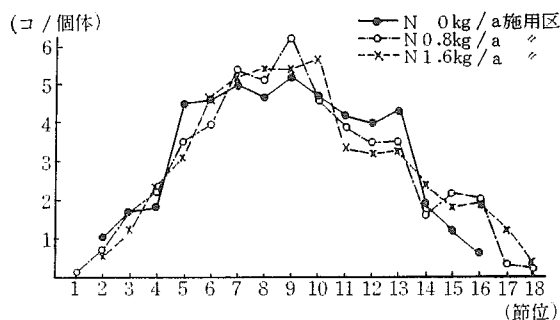
第4表に開花数，結莢数，結莢率を示した。主茎については下位節（第10節以下）と上位

第4表 窒素用量試験大豆の開花数，結莢数，結莢率
「長葉白」
(個体当たり)

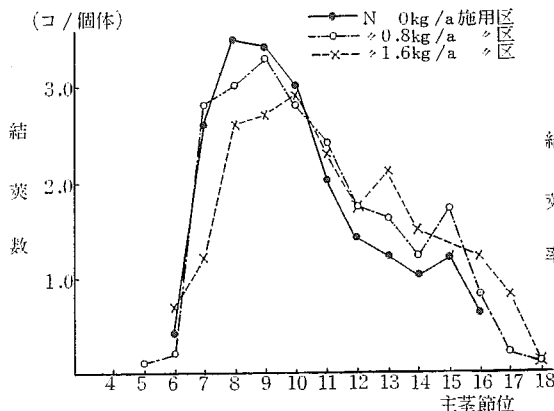
N施用量	開 花 数 (コ)			結 莢 数 (コ)			結 莢 率 (%)		
	0	0.8 (kg/a)	1.6 (kg/a)	0	0.8 (kg/a)	1.6 (kg/a)	0	0.8 (kg/a)	1.6 (kg/a)
主 茎									
第10節以下	32.8	33.5	33.4	12.9	12.2	10.1	39.3	34.4	32.2
第11節以上	18.3	17.2	16.8	7.4	9.7	10.9	40.4	56.3	65.0
分 枝	108.5	112.5	126.5	24.8	31.8	32.8	22.9	28.3	25.9
計	159.6	163.2	176.7	45.1	53.7	53.8	28.3	32.9	30.5

節に二分して計算し，表示した。主茎の開花数については，窒素施用量によって大きな差は認められない。下位節位の結莢数は施肥量の少ないほど多く，結莢率にも同様の傾向が認められる。上位節位については，結莢数，結莢率とも逆に施肥量の多いほど高くなる。分枝については，主茎上位節位と同様の傾向が認められる。

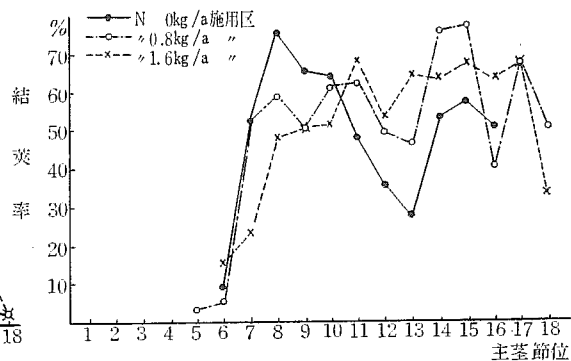
これを節位別に図示したものが第2



第2図 窒素用量試験大豆の主茎節位別開花数



第3図 窒素用量試験大豆の主茎節位別結莢数



第4図 窒素用量試験大豆の主茎節位別結莢率

～4図である。主茎下位節位では、窒素を多用するほど落花、落莢が多くなり、栄養生長との養分競争によって莢への養分供給が阻害され、結莢率が低下するとの推論をうらづけている。主茎上位節位および分枝では、逆に結莢率は窒素施用量が多いほど高くなっている。これらの節位の開花が主茎下位節位の花芽より遅いため両生長の競合が減退することと、窒素肥料の施用が上位葉の生理的機能を高く維持するために役立つことによると推定できる。

3) 論 議

大豆では、水稻や麦と同様に主茎葉位と各分枝発生葉位との間に、同伸葉の関係が認められ^{36,66,67)}、第1次分枝の発生は主茎第5葉展開時に第1葉節で、第6葉展開時に第2葉節で見られるが、本実験では特定の分枝の特定の節位の花が、主茎あるいは他の分枝のどの節位に相当するか調査していないので、開花時期と結莢率との関係を論ずることには、飛躍があるかも知れない。加藤は暖地（三重県）の大豆の花器脱落について調査し³⁹⁾、脱落は花芽の分化および開花の早晩と密接な関係があり、後生花芽ほど枝に止まる期間が短いことを明らかにしているが、この調査結果とは多少相異なる。すなわち、第4図では、花芽の分化、開花の遅い上位節位の結莢率がとくに低下しているとは言えないし、窒素施用量の多い場合にはむしろ上昇の傾向さえ見られる。このような地域差は栄養・生殖両生長の競合の程度の差に起因すると考えられ、北海道の大豆で開花の早い花器の結莢率が必ずしも高くないことは、開花期における両生長の競合が暖地より顕著であるためと考えられる。以上の論議は、供試大豆が2週間にわたり開花し、その間下位節位から順次開花し、また、同一花房の花が短時日のうちに開花を終えることが前提条件であるが、現実には同一花房の花が一時にさくものではないし、上位節位の開花順序は乱れることがある。したがって、窒素の多用によって主茎下位節位の結莢率が低下する原因が、栄養生長が過度に促進されることにあるとの推論には、多少の飛躍があるかも知れない。しかし、上記4実験の結果を総合して考察すると、その推論は北海道における大豆栽培では成立するものと考えられる。

6. 摘 要

落花、落莢は莢相互または莢と茎葉との間の生長競合による莢への養分供給の不足、不均衡によって生ずるとの作業仮説を立て、それを立証しようとした。その結果、莢のおもな发育制限因子となる成分はN、P、Kなど根から吸収される成分ではなく、光合成産物である可能性が大きい。

莢への光合成産物の供給は結莢期に低下し、窒素多施による栄養生長の促進はその傾向を助長し、落花、落莢の増大をもたらす。

发育停止莢（黄化莢）は健全莢に比して、莢殻、子実とも糖濃度が著しく低い、各窒素成分濃度はむしろ高い。

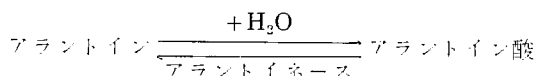
莢数の減少は栄養生長に対する同化産物の供給過剰をもたらす、過繁茂の原因ともなる。したがって、結莢率を高めるには、結莢期における過度の栄養生長を抑制し、莢への光合成産物の供給を円滑にする必要がある。

III 大豆のアラントインの抽出および定量法の検討

1. ま え が き

大豆の可溶性窒素成分としては、アミノ酸、アマイド、硝酸の他、多量のアラントインの集積が予備的な調査から認められた⁴⁷⁾。そこで、大豆からのアラントインの抽出、分離および定量法の確立をはかることにした。

アラントインは、通常植物体内ではアラントイン酸と共存し、



の変化は可逆反応であり^{93,97,100)}、アラントインがアラントインとアラントイン酸の両者を意味する場合が多い。本報告においても、アラントインとアラントイン酸の窒素の含量をアラントイン—Nとして表示することとした。

2. アラントイン酸カリの製造

1) アラントインの加水分解

市販のアラントインは純度が低く、溶解度も低いので比色定量の標準物質に適さない。そこで、YOUNG¹⁰³⁾らの方法に準じ、アラントインを加水分解し、アラントイン酸カリを製造した。

イーストマンコダック社から購入したアラントイン8.4gを1.5N水酸化カリ水溶液40mlにとかし、攪拌しつつ40分、70°Cで加温する。つぎに、99%エタノール300mlを加え、十分に振盪してから7日間4°Cで静置する。生成する沈澱を濾別し、30mlの純水にとかし、99%エタノール200mlを加えて再結晶させる。この操作を3回反復し、得られた結晶を風乾し、さらにシリカゲルを入れたデシケーター中に20日間入れて、乾燥させる。

アラントイン酸カリの収量 8.28 g

分子量 ($\text{KC}_4\text{H}_7\text{N}_4\text{O}_4$) 214.23

C 含有率 22.42 %

N 含有率 26.14 %

理論収量は、 $8.40 \times 214.23 / 158.12 = 11.381$ g となる。

したがって、収率は $8.28 / 11.381 = 0.728$

2) 加水分解生成物の同定

(1) 生成物のC, N%の測定

CN コーダー (柳本 MTN 500 型) で、炭素および窒素の含有率を測定し、理論値と対比した。

供試量

実測値

31.51 mg C……6.847 mg (22.44 %), N……7.941 mg (26.02 %)

36.27 mg C……8.176 mg (22.54 %), N……9.530 mg (26.27 %)

実測値は理論値にきわめて近く、使用したCN コーダーの精度を考慮すると、この程度の開きは誤差範囲と見なすことができる。

(2) 加水分解生成物のイオン交換クロマトグラフィー

Dowex 1-X8 (formate-200~400 メッシュ) のカラムに精製した加水分解生成物を吸着させ、0.5N 蟻酸アンモン水溶液を用い、グラジエント法で展開し、各画分を次項3で記す方法

で加水分解し、生成するグリオキシル酸を定量した。展開方法は500 mlの三角フラスコに400 mlの純水を入れ、混液槽とし、流出量に応じて貯液槽の蟻酸アンモン水溶液 (pH 7.0) が滴加されるようにした。混液槽は常時マグネティックスターラーで攪拌した。流出速度は調節しなかったが、おおよそ15 ml/時間となり、5 mlずつ分取した。

グリオキシル酸の生成量を定量した結果、No. 33~No. 46の画分に単一のピークを認めた。各画分の酸加水分解によって生成されるグリオキシル酸量の和は、展開前の加水分解生成物から生ずるグリオキシル酸量の98~101%であった。また、未処理のNo. 33~No. 46の画分では、遊離のグリオキシル酸は検出されなかった。したがって、それらの画分の酸加水分解液で測定されたすべてのグリオキシル酸はアラントイン酸から生成されたものと判断した。

未分解のアラントインや尿素が混在しておれば、No. 0~3の画分に含まれるはずである。そこで、No. 0~3の画分を濃縮し、濾紙に吸着させ、エールリッヒ試薬を噴霧したが、呈色は認められなかった。したがって、アラントイン、尿素の混在はなかったと判断した。

(3) ペーパークロマトグラフィー

加水分解生成物を水にとかし、東洋濾紙 No. 51 に吸着させ、下記の展開剤を用い、下降法により展開し、エールリッヒ試薬で発色させたが、発色は黄色のスポット1個のみであった。

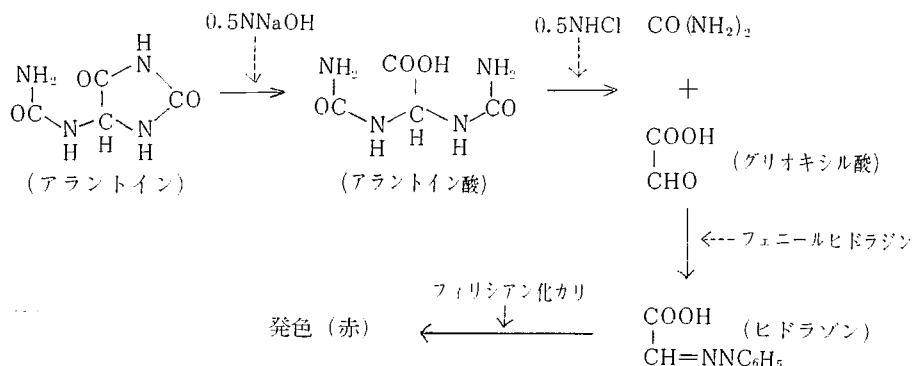
ブタノール、酢酸、水 (4:1:1)

水飽和フェノール

以上の実験結果から、供試した加水分解生成物がアラントイン酸カリであり、アラントイン酸カリ以外の生成物を含まず、比色定量の標準物質として使用可能であると判断した。

3. アラントインの定量法

アラントインはアルカリ加水分解でアラントイン酸となり、アラントイン酸は酸加水分解により尿素とグリオキシル酸となる。グリオキシル酸はフェニールヒドラジンを加えてヒドラゾンとし、フェリシアン化カリで酸化すると赤色を呈する。この反応は RIMINI—SCHRYVER 反応と呼ばれ、第5図に示される。YOUNG¹⁰³⁾、CHRISTMAN¹⁴⁾、ARCHIBALT¹⁾らは、この反応による血液や尿中のアラントインの定量法を確立した。



第5図 Rimini-Schryver 反応

グリオキシル酸のヒドラゾンの発色は温度が低いほど強く、安定であると考えられていたもので、YOUNG¹⁰³⁾らは -10°C で発色させている。しかし、 -10°C の低温は結露や凍結の原因となるので、CHRISTMAN¹⁴⁾らは、 0°C の氷水中で発色させる方法を採用した。本研究では、それに準じて、大豆の水抽出液のアラントイン濃度を定量することにした。

(1) 試 薬

0.5 N 塩酸 1 級試薬

0.5 N 水酸化ソーダ 1 級試薬

塩酸フェニールヒドラジン水溶液 100 mg/30 ml ウロコ印特級試薬

フェリシアン化カリ水溶液 500 mg/30 ml ウロコ印特級試薬

10 N 塩酸 1 級試薬

標準アラントイン酸溶液 貯蔵液

21.423 mg/100 ml 安定剤として 1 ml の 0.5 N 水酸化カリを加える。

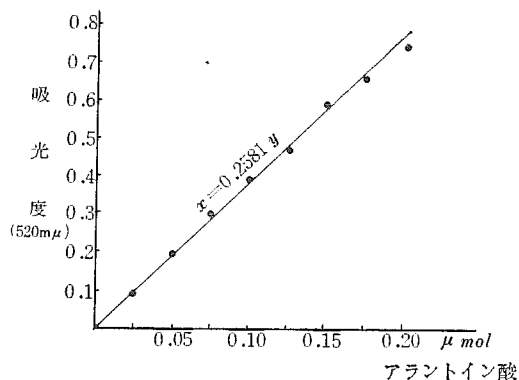
標準液は 4°C の低温室で保存し、使用に際して、20 倍に希釈する。その希釈液の濃度は 0.5 mM であり、1 ml はアラントイン-N, 28 μ g に相当する。

(2) 操 作 法

つぎの 3 種の操作によって得られた値からアラントイン、アラントイン酸および遊離グリオキシル酸濃度を算出した。

A. 5 ml の供試液を内径 1.8 cm, 長さ 18.0 cm の試験管に取り、0.5 N 水酸化ソーダ 1 ml を添加し、7 分間沸騰水につける。つぎに水道水で冷却し、0.5 N 塩酸 1.3 ml とフェニールヒドラジン液 1 ml を加えて 2 分間沸騰水につける。その後氷水中で 20 分間冷却する。発色はあらかじめ氷で冷やしておいた 10N 塩酸 4 ml とフェリシアン化カリ 1 ml を加え、十分に混合し、氷水中で 30 分間静置する。比色は島津スペクトロニック 20 型分光光度計を用い、520 m μ で行なった。

第 6 図はその検量曲線であるが、0.15 μ mol までは完全に Beer の法則にしたがっており、0.1 μ mol の吸光度は 0.387 である。

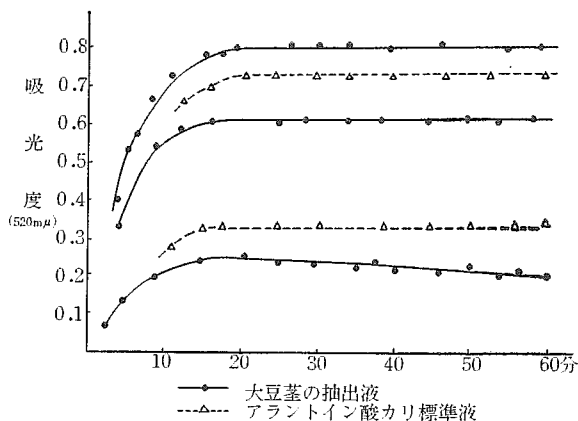


第 6 図 アラントイン酸検量曲線 (島津スペクトロニック 20)

B. 5 ml の供試液に 2 ml の純水、0.3 ml の 0.5 N 塩酸および 1 ml のフェニールヒドラジン溶液を加え、約 2 分間沸騰水につけてから氷水に移し、冷却する。その後の発色、および、比色の操作は前記 A と同じ。

C. 5 ml の供試液に 2.3 ml の水と 1 ml のフェニールヒドラジン溶液を加え、約 10 分間室温に放置してから、氷水中につけて冷却する。それ以後の発色、および比色の操作は A と同様である。

上記 A, B, C の方法によって得られた数値から、おのおの濃度を算出する。



第 7 図 グリオキシル酸のフェニールヒドラゾン化物の吸光度の時間的变化 (520 m μ)

アラントイン	A—B
アラントイン酸	B—C
グリオキシル酸	C

(3) 発色の安定性

上記の実験条件でアラントイン酸を加水分解し、発色させた場合の吸光度の時間的变化を第7図に示した。発色後30分で最高濃度に達し、吸光度が0.5以上では発色後2時間以内の褪色は認められないが、低濃度では多少褪色の傾向がみられるので、25～30分の間に比色することにした。

4. 大豆生体試料からのアラントインの抽出

1) 生体の冷水抽出操作中におけるアラントインの分解

作物体から特定の成分を定量を目的として抽出する場合、つぎの3条件が満たされなければならない。

- 1 抽出が完全である。
- 2 抽出操作中の分解による損失や他成分からの生成などによる量的な変化がない。
- 3 試料が均質である。

乾燥粉末試料は均質であるため、少量の試料で全体を代表させることが可能であるが、生体試料は一般に粗大で、均質ではないので、多量の試料を供試しなければ目的を達することはできない。したがって、大豆が生長するに伴って供試量を増大させなければならず、生体から抽出することは不可能となる。一方、乾燥粉末試料も第3の条件を満たすけれども、熱による分解や不溶性化の可能性がある。

NAGAI⁵⁸⁾らは緑豆の幼植物をトリクロロ酢酸で抽出し、アラントインを定量しているが、この方法では、分解酵素によるアラントインおよびアラントイン酸の分解を阻止することはできないが、アラントイン酸が酸性で不安定であり⁹⁸⁾、また、トリクロロ酢酸の混在はクロマトグラフィーなど、その後の実験操作上障害となるので、この方法を採用することはできない。そこで、まず冷水抽出法について検討し、その方法が上記の条件1および2を満たすものであることを明らかにしようとした。冷水抽出の操作中にアラントインの分解が起らず、また抽出が完全であるならば、その方法によって得られた値を基準とし、他の抽出法の効率を検討することができる。

微生物におけるアラントインの分解酵素については、すでに解明されているが、植物でその存在が確認されているのはアラントイネースまでで^{58, 69)}、アラントイケースについての報告はほとんどない。しかし、大豆では成熟期までにアラントインが消失してしまうので、大豆体内でアラントインが分解されないという訳ではない。大豆のアラントイケースが非常に不安定な酵素であるためか、あるいは、微生物などにおけるアラントインの分解とは全く異なる代謝経路を経て分解されているために、*in vitro* ではグリオキシル酸の生成を認めることができなかったのかも知れない。

抽出操作中におけるアラントイン $\rightleftharpoons$ アラントイン酸の変化は、水抽出液のアラントイネース活性が高いこと²³⁾から推して起り得るものと予想しなければならないが、アラントインとアラントイン酸の比率が問題となる場合以外はそれを考慮する必要がない。本研究ではアラント

注) 大豆の生理化学的解析と高位収獲技術に関する研究，昭和38年度
北海道農試農芸化学部試験研究成績書，Ⅲ—27～37

インとアラントイン酸の窒素の含量, すなわち, アラントイン-Nを問題にしようとしているので, 抽出操作中におけるアラントイン→アラントイン酸の変化については考慮する必要がない。したがって, 水抽出液におけるアラントイン酸の分解が起らなければ, 定量のための抽出法として, 冷水抽出法を採用することができる。そこで, VOGELS^{91,97)} や VALENTINE¹⁰⁰⁾らの方法に準じて, 大豆の茎, 葉, 根および莢殻の水抽出液によりアラントイン酸が分解されるか否かを調査した。

(1) 実験方法および材料

供試材料: 温室で水耕栽培した大豆「A 62—1」を開花期と着莢期に供試した。

粗酵素液の調製: 大豆を茎, 葉, 根, 莢殻に分け, 乳鉢に入れ, -25°C で約1時間放置して凍結させる。粉碎し, 海砂と 4°C に冷却した pH 6.5 または pH 7.0 の 0.1 N トリエタノールアミン塩酸緩衝液, または純水を加えて磨碎, 抽出した。遠心分離し ($5000\times g$, 15 分), 上澄液を粗酵素液とした。

酵素活性の検出: 粗酵素液 2 ml, 硫酸マンガン $0.87\ \mu\text{mol}$, 基質としてアラントイン酸カリ $100\ \mu\text{mol}$ (21 mg) または $1\ \mu\text{mol}$ を内径 1.8 cm, 長さ 18.0 cm の試験管に入れ, 水を加えて 4 ml とする。 30°C で 30 分間静置後, その一部を取り, 希釈し, 生成するグリオキシル酸を前項 3 で記した方法 C で比色定量した。

(2) 実験結果

抽出材料, 抽出溶媒の如何にかかわらず, グリオキシル酸の生成は認められなかった。基質量を 1/100 に減じてインキュベーションした場合にも, アラントインの減少は認められなかった。

以上の実験結果から生体の磨碎や水抽出操作中のアラントイン酸の分解は無視し得ると考えられ, 大豆のアラントインの抽出法として冷水抽出法が採用可能であると判断した。

2) 生体冷水抽出の効率

生体試料の水抽出操作中では, アラントイン酸の分解のおそれがほとんどないので, 水抽出によるアラントインの定量が可能である。そこで, その抽出法と抽出効率について検討した。

実験方法

供試材料: 前項で供試したのと同じ大豆「A 62—1」の葉, および, 茎。

抽出方法: 試料各 5 g を細かく切り (約 5 mm), 乳鉢で海砂 5 g を加えて磨碎し, その後は次の 2 種の操作により抽出する。

a 反復抽出 磨碎物に水を加え, 攪拌し, 4°C で 10 分間遠心分離する ($10000\times g$)。上澄液を取り, 残渣はさらに磨碎し, 遠心分離を反復し, 上澄液にアラントインが検出されなくなるまで抽出操作をくり返す。4 回の反復抽出で完了する。上澄液を混合し, 水を加えて 500 ml とし, 供試液とする。

b 1 回抽出 磨碎物を 500 ml メスフラスコに洗い込み, BTBpH 試験紙を用いて中和し, 500 ml として一夜 4°C で放置する。十分混合し, 乾燥濾紙で濾過し, 供試液とする。

第5表 冷水による生体試料からのアラントインの抽出効率

	葉		茎	
	1 回 抽出	反 復 抽出	1 回 抽出	反 復 抽出
1	18.8	18.2	23.5	24.3
2	17.8	18.8	24.3	24.9
平 均	18.3	18.5	23.9	24.6

単位 $\mu\text{mol}/\text{生体 } 5\text{g}$

供試材料 水耕栽培大豆「A 62—1」開花期

上記 a, b の抽出液について, アラ

ントインおよびアラントイン酸濃度を定量した。

実験結果ならびに考察

第5表によると、1回抽出は反復抽出に比較して抽出効率では劣らない。反復抽出によりアラントインが完全に抽出されているとするならば、1回抽出でも十分に目的が達せられるものと判断した。

5. 乾燥粉末試料からのアラントインの抽出

幼植物や少量の試料のアラントイン含量を測定する場合は、生体からの抽出が確実かつ簡便で有利であるが、生育の進んだ試料については抽出に困難をとまなう。乾燥粉末試料では少量の試料で全体の濃度を代表させることができるが、乾燥の過程で加熱によるアラントインの分解や難溶性化のおそれがある。そこで、熱風による加熱と乾燥が冷水抽出法によるアラントイン-Nの回収率にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

1) 実験方法

(1) 試料の調製

温室栽培の大豆「A62-1」の茎を開花期に採取し、長さ約1cmに切断し、80°Cの熱風乾燥器で2時間、その後、60°Cで20時間乾燥し、粉碎した。

(2) 抽出法

a) 200 mgの乾燥粉末試料を乳鉢にとり、0.5 gの海砂と少量の水を加えて磨砕し、水を加えて50 mlとする。時々振盪し、4°Cで24時間放置した後、乾燥濾紙で濾過し、供試液とする。

b) a)の操作から磨砕の操作を省く。

c) 乾燥粉末試料200 mgと海砂0.5 mgを50 mlのメスフラスコに入れ、水約30 mlを加えて沸騰水に30分つけて加温する。冷却後、水を加えて50 mlとし、4°Cで24時間放置し、乾燥濾紙で濾過する。

d) 乾燥前の同一試料10 gに海砂5 gを加えて乳鉢で磨砕し、前項で記述した生体1回抽出法により抽出液を得た。

各々の抽出液につき、アラントイン、アラントイン酸濃度を定量した。

2) 実験結果ならびに考察

第6表 乾燥粉碎試料の各種水抽出法の抽出効率

成分 抽出法	アラントイン				アラントイン酸			
	1	2	平均	指数	1	2	平均	指数
A 磨 砕	1.82	1.85	1.84	93.0	2.36	2.30	2.33	94.5
B	1.77	1.70	1.74	87.9	2.30	2.34	2.32	94.0
C 加 熱	1.43	1.26	1.35	68.2	1.30	1.54	1.41	57.2
D 生体抽出	1.96	1.99	1.98	100.0	2.51	2.43	2.47	100.0

注) 単位 m mol 乾物 100 g 当りに換算
供試材料 水耕栽培大豆「A62-1」開花期の茎

第6表によると、抽出法d)に比して各抽出法の回収率は、a)では93~95%、b)では88~94%となるが、c)では加熱によりアラントイン、アラントイン酸ともに分解されるためか定量値が低く、一定値を示さない。

前節で述べたように抽出法d)が実用化可能な最善の方法であるとしたとしても、a)、b)、c)のいずれの方法も完全な抽出法と考えることはできない。しかし、本研究では、多数の粗

大な試料を取扱わなければならないので、乾燥粉末試料を使用せざるをえず、したがって、その場合操作が簡単で、しかも抽出効率が最も高い a) 法により抽出することにした。

6. 摘 要

大豆のアラントインの抽出法、定量法を検討し、その方法を確立した。

1) 市販のアラントインを水酸化カリで加水分解し、アラントイン酸カリを製造した。

加水分解生成物の炭素および窒素含有率を測定し、それがアラントイン酸カリであることを推定し、その純度をペーパークロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーにより検討し、アラントイン酸定量の標準物質として使用可能であることを確認した。

2) YOUNG-CONWAY 法が大豆のアラントイン定量に利用できることを確かめた。

3) 大豆のアラントインを定量するため、生体または乾燥粉末試料を磨碎し、冷水で抽出する方法を検討した。生体試料の抽出操作中におけるアラントイン酸の分解による損失は無視し得る。また、生体試料からの抽出に比して乾燥粉末試料からの抽出は、抽出効率が多少 (5~7%) 劣るが、生体試料からの抽出が困難な場合が多いので、乾燥粉碎試料から抽出することにした。

IV 大豆の栄養生長の支配要因

1. ま え が き

北海道のような冷涼な気象条件下の大豆栽培では、十分な初期生育を確保することも難しいが、施肥とくに窒素施肥などによって初期生育を促進させた状態で、後期の栄養生長を適度に調整しようとすることは、さらに難しい課題であると思われる。そこで、大豆の栄養生長を規制している内部要因を検討し、窒素の多用が栄養生長のみを促進する生理的機作を明らかにすることにより、栄養生長の人為的調整の可能性について考察することにした。

本項の実験方法ならびに結果の概要はすでに北海道農試彙報第 98 号 (27~33 頁) で報告済みであるので、摘要を記載するにとどめる。

2. 摘 要

北海道農試琴似ほ場で大豆「長葉白」, 「A 62—1」および「A 62—2 (「A 62—1」と同一遺伝系統の根粒非着生系統)」を供試し、窒素用量試験を行ない、根粒着生状況、各種体内窒素成分の濃度などと栄養生長速度との関連を調査した。

6 月下旬以後の栄養生長速度 (相対生長率⁸⁹⁾RGR) は、根粒着生の有無にかかわらず、窒素施用量の多い区ほど大きかった。

全窒素濃度は根粒着生の有無にかかわらず、生育初期では窒素施用量の多いほど高いが、根粒着生系統大豆ではしだいにその差が小さくなり、開花期以後ではほとんど差がみられなくなる。根粒非着生系統大豆では全生育期間を通して窒素施用量の多い区ほど高い。

アミノ酸および硝酸—N 濃度は窒素施用量が多いほど高い。アラントイン—N 濃度は窒素施用量が少なく、根粒着生が良好なほど高く、根粒非着生系統では著しく低い。

全窒素、アミノ酸、硝酸—N 濃度と RGR との間には正の相関々係があり、栄養体たんばくの生成の直接の素材と考えられるアミノ酸濃度との相関が最も高い。

アラントイン濃度と RGR との間には負の相関が示されたが、これはアラントインが栄養生

長の窒素源としては効率の低い窒素の貯蔵形態であるためと考えられる。

したがって、窒素肥料の多用による乾物総生産量の増大が子実収量増に結びつかない原因の一部は、窒素肥料の施用により茎葉のアミノ酸濃度が上昇することであり、窒素施用量の少ない場合に、茎葉の全窒素濃度が窒素多用区に比して低くないにもかかわらず、栄養生長が抑制される理由は、根粒の着生が促進され、アミノ酸濃度は低い、それに代わって貯蔵形態の窒素化合物と考えられるアラントイン濃度が高まるためと考えられる。

V 大豆におけるアラントイン生成の場

1. ま え が き

動物や微生物におけるアラントインの生成経路や生理学的意義については多くの研究報告があり^{7,20)}、現在のところプリン核の酸化分解によって生成されるとの説が有力である^{45,50,75)}。したがって、アラントインは核酸が生成、分解されるすべての組織で生成される可能性があり、植物もその例外ではない。しかし、大豆で多量に生成されるアラントインの主要部分が、プリンの分解産物であるという確証は今のところない。また、かりにそうであったとしても、核酸代謝の進行しているすべての器官が、アラントインの生成に対して平等に貢献しているとは考えられない。前章で明らかにしたごとく、大豆が正常に生育している場合、アラントインの集積量は根粒着生状況に左右され、また、根粒非着生系統では集積量が著しく少ないことなどから、アラントインの生成には根粒が何んらかの形で関与し、根粒の影響を最も大きく受けると予想される根がおもな生成の場であると推定される。

そこで、アラントインの生成経路、集積の機作、および、それらに対する根粒着生の影響などを明らかにするための前段階として、大豆におけるアラントイン生成の場が根であり、根粒着生によりアラントイン生成が促進されること、および、根粒着生がアラントインの生成を促進させる十分条件であることなどを確認しようとした。

2. 茎およびブリーディングサップのアラントイン濃度間の相関関係

1) 実験方法

大豆のアラントインの主要部分が根で生成され、茎葉に転流されたものであるならば、アラントインは、茎を切断した場合に溢出するブリーディングサップ中に存在する筈である。また、前章で論じたように、茎葉で分解されにくいものであるならば、莢への転流が開始されるまでは茎の切断直後のブリーディングサップとその茎のアラントイン—N濃度との間には、正の相関があると考えられる。これを確認するため、窒素用量試験の大豆、「A 62—1」と「A 62—2」からブリーディングサップを採取し、そのアラントイン—N濃度を定量した。また、切除した茎を熱風乾燥し、粉碎後、そのアラントイン—N濃度を定量し、両者の相関関係を検討した。

調査日：開花期（7月28日，1964）

登熟初期（8月10日）

ブリーディングサップ採取法：茎を初葉の下で切断し、液がもれないように切株の側壁にワセリンをぬり、ゴム管をはめ、それに曲げたガラス管をつけ、ガラス管の末端をトルオールを一滴入れた試験管にさし込む。3時間以内に溢出した液について、アラントイン—N濃度を測定した。

2) 実験結果ならびに考察

第8図は両濃度の相関を示したものである。これによると、両アラントイン濃度の間には密接な相関々係の存在が認められる。とくに、開花期（7月28日）ではその傾向が顕著である。根から転流するアラントイン量に、茎のアラントイン集積量が比例しているといふことができる。

3) 論 議

上述の実験では、その調査時点までに根から転流してきたアラントインの総量を知ることができないし、また、

茎葉でアラントインが分解されず、登熟の開始までに損失がないという確証もないので、根から転流するアラントイン量と茎中の集積量との間に比例関係があったとしても、ただちに大豆のアラントインの大部分が根で生成されたものであるとは言えない。しかし、アラントインが茎葉で分解利用されにくいと考えるならば^{27,28)}、結莢期までは全量が茎葉に蓄積されることになる。ブリーディングサップに高濃度のアラントインが含まれていることと、その濃度と茎葉における集積量との間に高い正の相関があるということは、茎葉のアラントインの大部分が根から供給されたものであることを示すものである。

莢が形成され、アラントインの莢への移動が開始されると、相関がいだいに低くなると予想されるが、第8図の相関図でも、登熟期の両濃度間の相関は予想どおり低下している。

以上の実験結果は大豆におけるアラントインの生成の場が根であるという仮説を支持するものである。

3. 大豆根のアラントイン生成における茎葉の役割

1) 実験方法

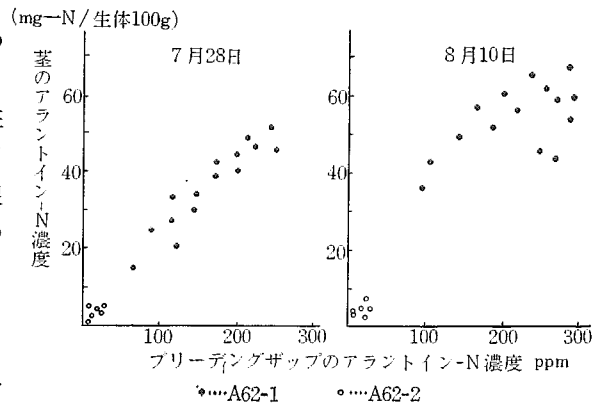
5000分の1アール磁製ワグネルポットに、琴似沖積壤土を充填し、大豆「A 62—1」および「A 62—2」（「A 62—1」と同一遺伝系統の根粒非着生系統）をポット当たり4個体生育させた。施肥は両系統とも、過石、熔燐、硫加各1g/ポット、窒素は硫酸を用い、「A 62—1」では1g、「A 62—2」では2.5g/ポットを全層に施用した。

本葉第4葉展開期に初葉の下、約1cmのところまで茎を切断し、上部を接穂、下部を台木とし、第7表に示す組合せで接木し、4週間後サンプリングし、乾燥、粉碎し、アラントイン—N濃度を定量した。

接木法は、まず安全かみそりの刃で台木を切断面に直角に約1cmの深さまで切込む。接穂は下端をくさび状に切り、台木のさけ目にさし込む。接合部を糸で巻き、ラノリンを塗布し、放置する。蒸散量を少なくするため、約1週間ポリエチレン袋をかぶせておく。

前節の実験では、アラントイン生成の場が根であるか否かを明らかにしようとしたが、本実験では、アラントイン生成を促進する機能が根にあるか、地上部にあるかを推定しようとした。

2) 実験結果ならびに考察



第8図 窒素用量試験ほ場の大豆茎とそのブリーディングサップ中のアラントイン—N濃度間の相関

第7表 接木4週間後の茎のアラントイン-N濃度

調査部位	台 木 接 穂	A 62-1		A 62-2	
		A 62-1	A 62-2	A 62-1	A 62-2
台 木		25.6	20.4	0.8	0.5
接 穂		45.3	46.2	1.2	0.8

注) 単位: 生体 100 g 当たりアラントイン-Nmg。
N濃度は著しく低い。

第7表は接木4週間後のアラントイン濃度を台木、接穂に分けて定量したものである。台木が「A 62—1」の場合は接穂のいかにかわらず、アラントイン—N濃度が高くなるが、台木が「A62—2」の場合はアラントイ—N

3) 論 議

根粒着生系統の大豆では、アラントインは主として根で生成されると考えられるが、その生成速度を支配する機能も根にあると推定された。すなわち、その生成は茎葉から供給される何んらかの刺激や物質によって促進されるものではなく、根に存在する機能が根粒の着生によって賦活されることにより、アラントインの生成が促進されることができると考えることができる。

4. アラントイン生成における根粒着生の必要性

1) 実 験 方 法

大豆のアラントイン濃度が根粒着生状況により左右され、根粒の着生のない場合に集積量が著しく少ないこと、あるいはV—3の実験結果などから、根粒がアラントインの生成や集積を促進しているように思われる。しかし、大豆根のアラントインの生成が根粒着生系統の大豆根にのみ存在する特殊な機能の有無により左右されている可能性もある。すなわち、アラントインの生成には根粒の着生が必要なのではなく、根粒を着生させる能力を持つ系統の根そのものが必要であるのかも知れない。そこで、この可能性を明らかにするため、根粒着生系統の大豆「A 62—1」を根粒の着生を完全に抑制して栽培し、非着生系統の「A 62—2」と対比させ、検討した。

5000分の1アールワグネルポット(磁製)に、断熱用パーミキュライト(商品名、パーミックスG)を詰め、施肥、給水後、硫酸紙で被い、オートクレーブで滅菌した(20ポンド/平方インチ、30分間)。施肥量は共通肥料としてポット当たり過石、熔燐、硫加を各1g施用し、窒素については無窒素区、硫酸区、硝酸ソーダ区の処理区を設けた、その施用量はNとして、2.5g/ポットである。そのうち0.2gを基肥として施用し、残りは6月21日から8月9日までの50日間に6回に分施した。滅菌後放冷し、無菌箱中で被っていた硫酸紙を取りはずし、0.1%塩化第二水銀水溶液で滅菌し、滅菌水で洗浄した種子を8粒ずつ播種し、エタノールで滅菌したビニール膜で被った。無窒素区には寒天培養した根粒菌(*Rhizobium japonicum*, 道立中央農試保存株)を接種した。発芽まで直射日光をさけ、ガラス室に放置した。

処理	系 統	根粒菌	施用窒素
A	A 62—1	接 種	0 g
B	A 62—1	不接種	2.5 g (硫酸)
C	A 62—1	〃	2.5 g (硝酸ソーダ)
D	A 62—2	〃	2.5 g (硫酸)
E	A 62—2	〃	2.5 g (硝酸ソーダ)

播種 5月17日(1963)

サンプリング 7月9日, 7月29日

8月9日

発芽後、幼植物が生長し、ビニール膜に接するようになった時、膜に穴を開け、4 個体の子葉を膜上に引出し、残りは引きぬいた。給水および窒素の分施は滅菌水を用い、できるかぎり雑菌の汚染を防いだ。

試料は熱風乾燥後、全—N、アミノ酸—N、アラントイン—N、硝酸—N および全糖濃度を定量した。なお、供試したバーミキュライトのケールダール分解液からアンモニアは検出されなかったもので、A 区は完全な無窒素区であった。

2) 実験結果ならびに考察

ポットの内部を完全に無菌状態で維持することはできないが、根粒菌を接種しなかったポット (B, C) の大豆には、最終サンプリング時まで、根粒の着生は認められなかった。また、サンプリング後の硫酸区 (B, D) のバーミキュライトから硝酸は検出されなかった。

7 月 29 日は結莢期、8 月 9 日は登熟初期に相当するが、両調査時とも葉色は根粒菌を接種した「A 62—1」(A 区) で多少劣っていたが、他の処理区には外観上差は認められず、いずれも生育は正常であった。

第 8 表から明らかなように、A 区のみに多量のアラントインが集積している。また、根粒菌不接種の B, C 区 (A 62—1) では、施肥窒素にのみ依存して生育したとみることができるが、これと「A 62—2」の互いに施用窒素の形態が等しいポット同士を比較すると、外観上も、体内成分濃度についても、全く差が認められなかった。

第 8 表 滅菌ポットで栽培した大豆の茎、莢殻の各種成分濃度

成分	系統・施用窒素・ 根粒菌 調査月日・ 調査部位		A 62-1			A 62-2		
			—		(NH ₄) ₂ SO ₄	NaNO ₃		(NH ₄) ₂ SO ₄
			接	種		不	接	
全 窒 素	7.27	茎	529	428	363	420	482	
	8.9	茎	618	395	435	326	412	
		莢 殻	526	418	396	428	415	
ア ミ ノ 酸 N	7.27	茎	38	49	32	47	32	
	8.9	茎	29	52	54	47	65	
		莢 殻	14	26	53	21	45	
ア イ ラ ン ト N	7.27	茎	35	2	4	2	4	
	8.9	茎	43	3	5	3	4	
		莢 殻	192	24	48	12	16	
硝 酸 — N	7.27	茎	4	2	35	3	41	
	8.9	茎	2	1	26	tr	35	
		莢 殻	—	—	—	—	—	
全 糖	7.27	茎	367	659	628	628	595	
	8.9	茎	353	597	382	524	371	
		莢 殻	334	940	312	825	305	

mg/100 g 生体重 (1963)

3) 論 議

根粒菌を接種した「A 62—1」(A 区) のみにアラントインが多量に集積し、B, C 区の濃度が

著しく低く、「A 62—2」に等しかったことは根粒着生系統大豆の持つ遺伝的特性、あるいは「A 62—1」の根にのみ存在する特定の機能がアラントイン生成の促進に関与するのではなく、根粒の着生によって生ずると予想される根組織の生理的变化が、アラントインの生成を促進していることを示すものと思う。根粒の着生の有無を決める要因は、TANNER⁹¹⁾らの研究によれば、発芽直後子葉から根に移行する *cotyledon factor* であって、非着生系統の大豆ではこれを欠くと言われている。「A 62—1」と「A 62—2」の遺伝的特性の差は、前者のみが *cotyledon factor* を生産することであって、根粒着生系統大豆「A 62—1」の根において、アラントインの生成速度をそれ独自で支配するような遺伝子、あるいは、「A 62—2」の根に存在しない特殊な機能があるとは考えられない。

5. 摘 要

大豆におけるアラントインの主な生成の場が根であり、根粒の着生がその生成を促進する要因であることを確認しようとした。

ブリーディングサップと茎のアラントイン濃度との間に高い相関が認められたことなどから、おもな生成の場は根であると推定した。

「A 62—1」と「A 62—2」を茎葉と根に分離し、交互に接木し、そのアラントイン濃度を定量した結果、アラントインの生成を規制する機能が根に存在することが明らかとなった。

根粒着生系統大豆を根粒の着生を完全に抑制して栽培し、そのアラントイン濃度を定量し、非着生系統大豆のそれと比較した結果、全く差がなかったので、両系統の大豆をほ場などで栽培した時にみられるアラントイン濃度の差は、根粒の着生によって生じたものであって、根粒の着生はアラントインの生成を促進する十分条件であると推定した。

VI 大豆根のアラントイン生成における根粒着生の生理的意義

1. ま え が き

植物におけるアラントインは、窒素の貯蔵形態であり、光合成産物の供給に対して窒素の供給が過剰な場合に生成、集積され、また、アンモニア毒性に対する解毒作用の産物の一種であるとも考えられている⁵⁶⁾。この考え方によると、アラントインの生成が根粒の着生により促進される理由は、根粒菌が寄主の光合成産物を消費し、固定—N を供給することにより、窒素の過剰現象が出現するためであると考えることができる。根粒が供給する窒素の形態については、最初に生成される安定な化合物がアンモニアであると考えられているので⁸⁾、それが局部的に多量に供給された場合、解毒機構が働き、アラントインが生成されるものと予想される。

MOTHES⁵⁶⁾らは切り取ったコンフリーや小豆の葉にアンモニアを投与し、暗所に放置した場合にアラントインの生成を認めたが、明所では検出できなかったことから、光合成の抑制と窒素の過剰供給がアラントインの生成を促進したと判断した。さらに、この葉組織中の変化を詳細に調査し、最初にグルタミンの濃度が上昇し、それが低下し始めると、つぎにはアスパラギンの濃度が上昇する。さらに時間が経過すると、アスパラギンが減少し、それに代わってアラントイン濃度が上昇するが、それが最高濃度に達した後にはアンモニア濃度の上昇が認められた。この一連の変化から、アラントインは植物のアンモニア毒性に対する解毒作用の産物の一種であり、その C/N 比の小さいことから推して、最も炭素源が欠乏した状態で生成されるもの

であると考えた。

かえでやコンフリーでは、冬期間根に貯蔵されていたアラントインが、春には地上部に移動し、新葉のたんばく合成の窒素源として分解、利用され、秋、落葉前に再びアラントインの形にもどり、根に移行する^{56,75)}。葉がしだいに生理的機能を失い、老化が進むとたんばく質が分解し、それによって生成されるアミノ酸の炭素鎖もエネルギー源として消耗され、アンモニアが遊離されることが考えられる。このようにして生じたアンモニアが解毒機構の作用でアラントインに取り込まれ、貯蔵器官である根に集積されると説明されている。

このように考えてくると、小豆、かえで、あるいは、コンフリーのアラントインは、それぞれ生成の場は異なるけれども、アンモニアの解毒作用の産物である点では、大豆のアラントインと差がないことになる。

そこで、アラントイン生成における根粒の役割りを検討するにあたり、上述の説明にあるような状態を大豆根に生じさせ、アラントインの生成が促進されるか否かを調査しようとした。すなわち、大豆根に対する光合成産物の供給を人為的に抑制したり、多量のアンモニアを供給した場合、アラントインの生成が促進されるか否か、あるいは、根粒の着生により根の窒素濃度の上昇やC/N比の低下がみられるか否かなどについて検討した。

つぎに考慮しなければならぬことは、大豆におけるアラントイン集積量が単に生成速度のみによって決まるものではなく、分解速度にも左右されているのではないかということである。もし、分解と生成が同時に根で進行しているとするならば、根粒の着生が良好なほど、アラントインの分解が抑制されていることになり、分解速度に対する根粒着生の影響が問題となる。たとえば、根におけるアラントインの生成速度は根粒着生状況により影響されないが、根粒が根のアラントイン分解酵素の阻害物質を供給し、分解を抑制しているのかも知れない。また、根粒の着生による何んらかの影響により、寄主の栄養生長が抑制されるならば、たんばくやアミノ酸合成のための窒素の需要が低下し、アラントインの分解、利用の必要性が減少する。その結果として、アラントインの分解が抑制される可能性もでてくる。

このような可能性について検討するため、根粒の着生により根の生育がどのような変化を受けるか、あるいは、生育抑制物質の投与により、生育をコントロールした場合の生育状況とアラントイン集積量との間に因果関係があるか否かについて検討しようとした。

2. 根に対する光合成産物の供給停止がアラントインの生成に及ぼす影響

1) 実験方法

供試材料

ほ場栽培の大豆： 北海道農試琴似ほ場（沖積土壌土）における窒素用量試験の大豆「長葉白」、「A 62—1」および「A 62—2」の窒素施用量 0 および 1.2 kg/a の各区から平均的生育の5個体を選び、根に対する光合成産物の供給を停止させるために茎葉を切除し、V—2と同じ方法でブリーディングサップを69時間にわたって採取した。実験は8月7日～9日（登熟初期）に行なった。

砂耕栽培の大豆： 5000分の1アールポットに石英砂を詰め、4粒播種した。培養液の組成は第9表のとおりで、窒素濃度は「A 62—1」では10 ppm、「A 62—2」では40 ppmとした。培養液をポットの下部側壁の穴から1日1回流入させ、液面を砂上に押し上げた後元に戻すが、常時、約3 cmの深さに滞留するようにした。発芽2ヵ月後、茎を初葉の下から切除し、直後、24時間後および48時間後残存部を抜き取り、茎、根に分け、80°Cで乾燥し、粉碎した。

定 量

ブリーディングサップはそのまま、乾燥粉末試料はⅡおよびⅢに記載した方法で、全—N、アミノ酸—N、アラントイン—N、硝酸—N、全糖濃度を定量した。

2) 実験結果ならびに考察

第9図はほ場栽培大豆のブリーディングサップ液量を示したものであるが、液量は切断直後多く、しだいに減少している。昼間に多く、夜間に少ないことをPATE⁷⁰⁾がえんどう(*Pisum arvens L.*)を使った実験で認めているが、本実験では試料採取回数が少なかったため、日変化として表わすことはできなかった。

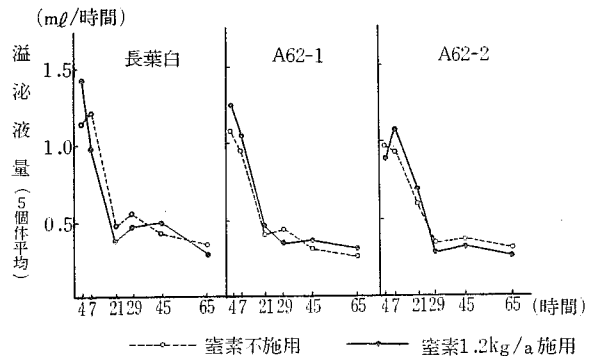
ブリーディングサップの各窒素成分濃度の時間的変化を図示した第10図によると、アラントイン—N濃度は、「長葉白」「A 62—1」では切除直後150~300 ppmの高濃度で、その後も大きな変化がないのに対して、「A 62—2」では初めは著しく低いが、しだいに上昇して根粒着生系統とほぼ同レベルに達しており、特徴的な差異が認められる。単位時間当たりのアラントイン溢出量は、根粒着生系統では分泌液量が切除後1昼夜を経過すると急速に減少するのに対して、濃度の変化が小さいので、しだいに減少しているが、「A 62—2」ではアラントイン濃度が急速に上昇しているため、その溢出量も増大しているとみられる。2昼夜以降では、濃度、溢出量ともに根粒着生の有無による差は見られなくなる。

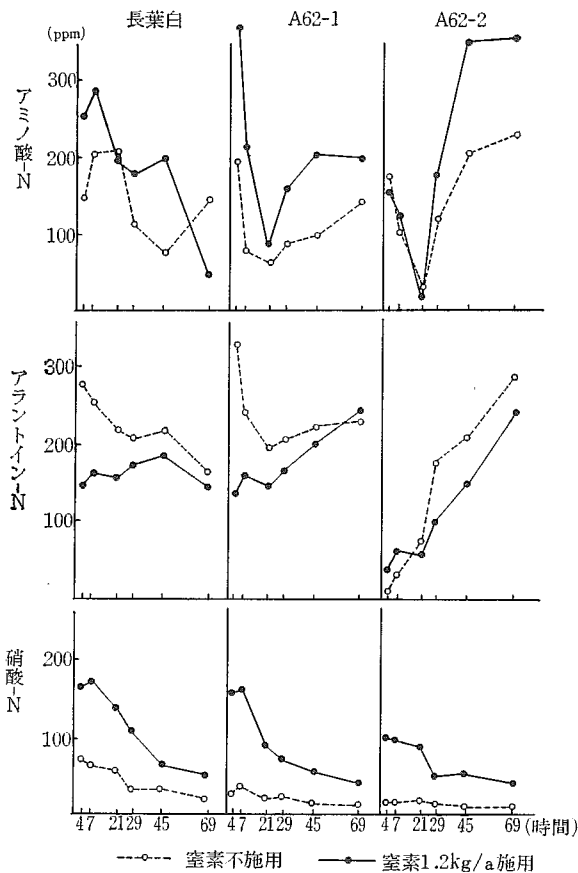
アミノ酸については、「長葉白」の窒素施用区を例外とするならば、その濃度は、茎切除24時間後に一時低下し、その後再び上昇するものとみることができる。硝酸—Nが全調査期間をとおして検出されているので、少なくとも切断後69時間以内は、土壌からの硝酸イオンの吸収が継続していたと推定される。アミノ酸濃度の上昇は、たんばくやペプチドの分解によって生成されたアミノ酸も関与しているものと思われる。

第11図は砂耕栽培の大豆の茎葉を切除し、放置した場合、放置時間により残存部の茎と根の全—N、アラントイン—N、全糖濃度がどのように変化したかを調査したものである。アラントイン濃度は、茎、根ともに放置時間が長いほど高くなっている。また、全糖濃度が低下しているのに対して、全—N濃度にはほとんど変化がみられない。この現象は上述のブリーディングサップに見られた現象と同様、光合成産物の供給停止による炭素源の欠乏が、アラントインの生成を促進するとの推論をうらづけるものである。

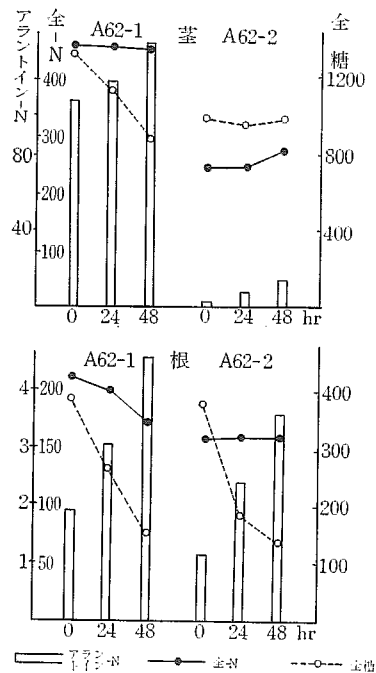
第9表 水耕液の組成

PH 6.5 調整			
KH ₂ PO ₄	95.9 mg/l	P ₂ O ₅	50 ppm
K ₂ SO ₄	49.6	K ₂ O	60
CaCl ₂ ·2H ₂ O	131.0	CaO	50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	245.0	MgO	40
NH ₄ NO ₃ ·NaNO ₃ or (NH ₄) ₂ SO ₄		N	0~100
Miner element mixture	1 ml		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	1.02 g/l	Mn	0.25 ppm
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.039	Cu	0.01
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.110	Zn	0.025
H ₃ BO ₃	1.430	B	0.25
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·H ₂ O	0.0092	Mo	0.005
FeSO ₄ ·7H ₂ O	8.71	Fe ₂ O ₃	2.5
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.034	CO	0.01
EDTA·Na ₂ ·2H ₂ O	11.65		

第9図 茎切除後時間の経過による分泌液量の変化
ml/時間/個体 (1964. 8. 7~9)



第10図 茎切除後時間の経過による分泌液のアラントインー、アミノ酸ー、硝酸ーN濃度の変化 (1964. 8. 7~9)



第11図 地上部切除後経過時間が残存部体内成分に及ぼす影響 mg/生体 100 g

3) 論 議

茎葉の切除は光合成産物の供給を停止させるが、残された茎や根は、その後しばらくは生きつづけ、炭水化物や有機酸をエネルギー源として消費する。また、たんぱく質の加水分解も進行し、アミノ酸が生成されるが、そのアミノ酸の炭素鎖もエネルギー源として消耗し、そこで遊離されたアンモニアが、解毒機構の働きにより、アラントインに再合成されたとみることができる。

3. アンモニアおよび硝酸ーNが大豆のアラントイン生成に及ぼす影響

1) 実験方法

3月中旬(1970)、温室で畑土壌を詰めた苗箱で発芽、生育させた大豆「北見白」を4月10日、初葉展開期に水耕栽培に移した。水耕法は5000分の1アールワグネルポットに、第9表に示した培養液4.5lを入れ、窒素濃度は50ppmとし、アンモニア区 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、硝安区 NH_4NO_3 、硝酸区 NaNO_3 の3処理区を設けた。ポット当たり4個体で出発し、培養液のpHは毎日補正し、6.5に維持されるように努めた。培養液の交換は週1回とした。

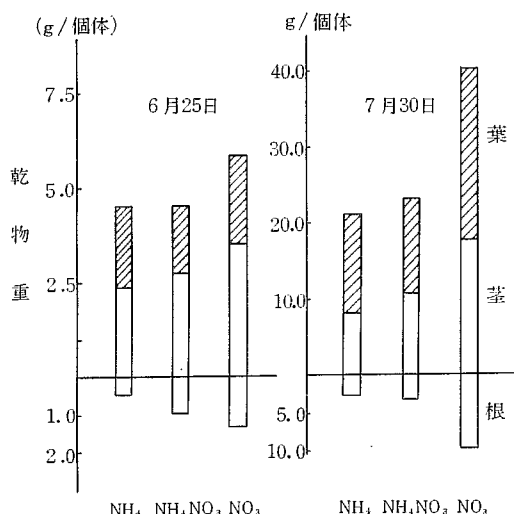
6月10日から所定の処理を施し、6月25日(開花始)、7月30日(結莢期)に各区から4個

体ずつを採取し、茎、葉、根に分け秤量し、80°Cで乾燥し、粉碎後各成分濃度を定量した。

2) 実験結果ならびに考察

第12図に示された生育状況によると、アンモニア区の生育が劣り、とくに根は異常と思われるほど抑制された。アンモニア区の培養液のpHの変動が大きく、その影響も無視できないかも知れないが、生育抑制の最大の原因はアンモニアの過剰であると思われる³⁾。

第10表の茎と根のアラントイン濃度は、アンモニア区が高く、他の2区の間には明確な差はない。アンモニア区は全-Nおよびアミノ酸-N濃度も高いが、全糖濃度は、7月30日の根以外では低下していない。したがって、アンモニアが吸収されることによって、根の糖濃度は必ずしも低下していないので、糖濃度の低下によってアラントインの生成が促進されると速断する



第12図 培養液の窒素形態と大豆生育量（乾物重）との関係（4個体平均）

第10表 水耕液の窒素形態が大豆の体内成分組成に及ぼす影響

部位	成分	6月25日			7月30日		
		NH ₄ ⁺	NH ₄ NO ₃	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NH ₄ NO ₃	NO ₃ ⁻
茎	全-N	2.48	1.48	1.52	1.68	0.83	0.93
	アラントイン-N	0.077	0.013	0.010	0.140	0.029	0.067
	アミノ酸-N	0.512	0.152	0.141	0.234	0.110	0.118
	硝酸-N	0.006	0.021	0.102	0.005	0.009	0.015
	全糖	0.390	4.77	4.53	3.13	6.10	6.33
根	全-N	3.36	2.70	2.30	3.01	1.82	1.82
	アラントイン-N	0.013	0.001	0.001	0.008	0.001	0.001
	アミノ酸-N	0.124	0.098	0.088	0.146	0.087	0.089
	硝酸-N	0.000	0.003	0.035	0.000	0.026	0.043
	全糖	4.27	3.89	3.95	1.88	3.47	3.00

%対乾物

ことはできないが、この実験結果からアラントインがアンモニア毒性の解毒作用の産物であるとの仮説は肯定される。

3) 論 議

V-4の滅菌ポットで硫酸および硝酸ソーダを単一の窒素源として栽培した大豆のアラントイン濃度（第8表B, C, D, E区）は、本実験結果（第10表）と比較すると著しく低い。両者の実験条件のおもな相異点は根粒の着生の有無であるが、根粒が着生している本実験で高濃度のアラントインの集積がみられたのは当然の結果とみるべきである。しかし、第8表のアンモニア区（B, D区）のアラントイン濃度が硝酸ソーダ区（C, E区）より低いことは、本実験結果とは異なる点であり、アラントインがアンモニア毒性の解毒作用の産物であるとの仮説

に反するかのようにみえる。しかし、まえがきで引用した MoTHES⁵⁶⁾の報告によると、アラントインはアンモニア毒性の解毒作用の産物ではあるが、炭素源の最も欠乏した状態で生成されるものであって、炭素源に余裕のある場合は、まずグルタミン、アスパラギンが生成されている。したがって、前章の減菌ポットの実験の硫安区でアラントイン濃度が低かったのは、糖濃度が他の処理区に比して高いこと（第 8 表）から推して、MoTHES⁵⁶⁾の報告にあるグルタミン、アスパラギンを生成する段階であって、アラントインを生成してアンモニアを解毒する段階には至っていなかったことを示すものと考えられる。

4. 根におけるアラントインの生成と全糖/全—N 比との関連性

1) 実験方法

根粒がアラントインの生成を促進する生理的機作を、根粒が固定—N を供給し、光合成産物を消費することであると考えるならば、根粒着生が良好なほど根の窒素濃度が高く、糖濃度が低くなると予想される。そこで、根粒着生状況の異なる調査個体として、窒素用量試験ほ場の大豆を供試し、茎のアラントイン濃度、根の全—N、全糖濃度および根粒着生状況を調査し、相互の関連性を検討した。

(1) 供試材料

供試品種 「A 62—1」 「A 62—2」

試験ほ場 北海道農試琴似ほ場 沖積土・壤土

施肥 共通肥料 P_2O_5 (過石, 熔燐 1:1) 1.0 kg/a

K_2O (硫加) 1.0 kg/a

堆肥 100 kg/a

窒素肥料 N (硫安) 0, 0.4, 0.8, 1.2 kg/a

栽植様式 50 cm×25 cm, 2 本植 800 株/a

播種 5 月 14 日, 収穫 10 月 16 日

(2) 試料の採取, 調整

サンプリングは 6~15 日間隔で行ない, 8 月 6 日以前は各区から平均的生育の 20 株, それ以後は 10 株を選び, 第 11 表の日程により実施し, それぞれ調査時 I, II, ……VIII として表示した。

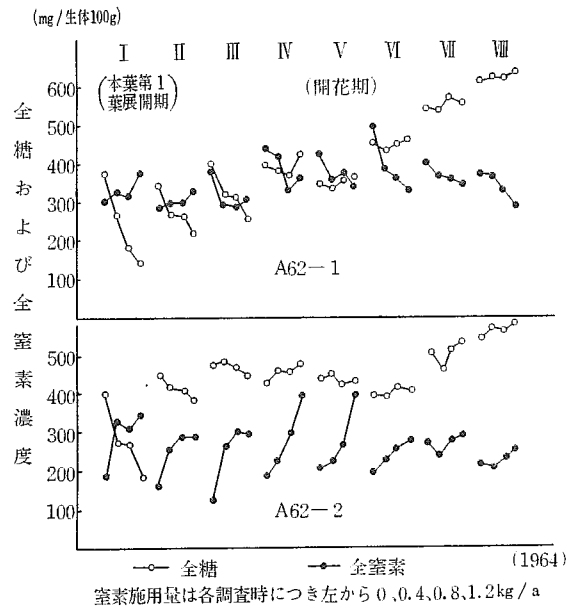
第 11 表 試料採取日程

調査時	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
系 統	第 1 本葉 展開期 (月日)			開 花 始	開 花 期	開 花 終		黄 熟 期
A 62-1	6.15	6.26	7. 1	7.10	7.22	8. 4	8.18	9. 8
A 62-2	6.15	6.26	7. 1	7.10	7.22	8. 4	8.19	9. 9

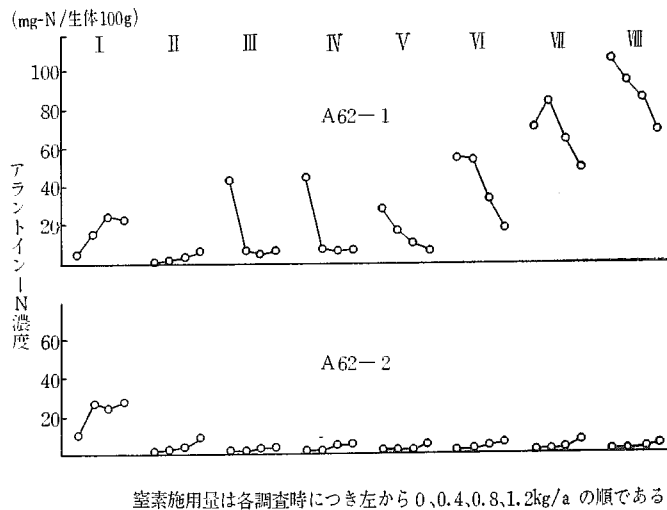
試料は葉, 茎, 根 (根粒は除く) に分け, 80°C の熱風で乾燥し, 粉碎した。

2) 実験結果ならびに考察

第 13 図に根の全糖, 全—N 濃度の推移, 第 14 図に茎のアラントイン濃度を示した。これによると, 6 月中 (調査時 I, II) は, 両系統とも窒素施用量の多いほど根の全—N 濃度が高く, 全糖濃度が低く, したがって, 第 15 図に示した全糖/全—N 比が小さくなっている。茎のアラントイン濃度は高くなっているのに, 全糖/全—N 比が小さいほどアラントイン 集積量が多いといえる。



第13図 窒素用量試験大豆の根の全糖および全窒素濃度の推移



第14図 窒素用量試験大豆の茎のアラントイン-N濃度の推移

7月中旬(V)以後、「A 62—1」では、窒素施用量が少ないほど茎のアラントイン濃度は高くなるが、全糖/全—N比も小さくなるので、この期間においても根の全糖/全—N比が小さいほどアラントイン生成量が多いといえる。

「A 62—2」の茎のアラントイン濃度は、生育初期を除き「A 62—1」に比して著しく低い、全生育期間をとおして窒素施用量の多いほど高い傾向が認められる。根の全—N濃度も高く、全糖/全—N比も低下する傾向がある。したがって、「A 62—2」においても根の全糖/全—N比が低いほどアラントイン生成量が多いとみることができる。

生育初期は根粒の影響が小さく、窒素施用量が支配的な影響を及ぼしており、後期では根粒着生状況の影響が生育相や体内成分の組成に大きく現われる。このようにおのおのの生育時期別に根の全糖、全—N濃度を左右する要因が相異している、大豆が自然かつ正常に生育している限り、MOTHES⁵⁶⁾らの指摘しているように、C/N比または全糖/全—N比とアラントイン生成量との間には明らかな負の相関がみられる。

3) 論 議

根粒菌が光合成産物を消費することにより、根における炭素源が欠乏し、過剰の窒素がアラントインの形で貯蔵されとしても、その光合成産物あるいは炭素源とは全糖として定量される炭水化物の全量を意味するものではない。特定の組織における一部の炭水化物であるかも知れないし、有機酸であるかも知れない。また、窒素濃度についてもどのような形態の窒素濃度が上昇しているか不明である。それゆえに、アラントインの生成と全糖/全—N比との間に明確な負の相関関係が示されただけでは、窒素の過剰状態がアラントインの生成を促進しているということもできないし、また、アラントインがアンモニア毒性に対する解毒作用の産物であるとの説明の根拠にはならない。アラントインの生成に直接関与するものがアンモニアであるとするならば、本実験で供試した大豆では、根の特定の組織に対するアンモニアの供給が多かった個体の根の全糖/全—N比が、たまたま小さかったのかも知れない。また、Ⅵ—3の実験でアンモニアを単一の窒素源として生育させた大豆の根の全—N濃度が顕著に高かったことから推して、アンモニアの存在が全—N濃度を高めるのかも知れない。そして、その限られた特定の組織（たとえば、根粒に隣接している組織）では、アンモニアに対する解毒機構が働き、アラントインの生成が促進されたと言うことはできても、全—N濃度の上昇や全糖/全—N比の低下はアラントイン生成の直接的原因であると言うことはできない。

しかし、正常に生育しているほ場栽培の大豆で、アラントイン濃度の高い個体ほど根の全—N濃度の高いことは普遍的な現象であるので、根粒の着生、根の全—N濃度の上昇、および、アラントインの生成の促進の3者間には直接的な因果関係はないとしても、何んらかのつながりがあるものと予想される。すなわち、全—N濃度の上昇はある特定の窒素代謝に何んらかの変化が生じたことを示すものであり、根粒の着生がその原因の一部であると考えられる。

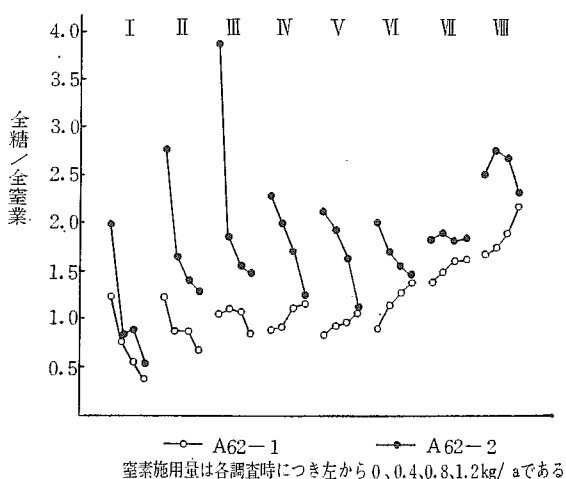
5. 大豆根の生育抑制とアラントイン生成量との関連性

1) 実験方法

根粒着生状況と根重の調査

(1) 供試材料

ほ場栽培大豆：Ⅵ—4で供試した窒素用量試験の大豆「A 62—1」, 「A 62—2」の各処理区から、7月22日（開花期）、8月4日（結莢期）および8月14日（登熟期）の3回、平均的生



第15図 窒素用量試験における大豆根の全糖/全窒素比の推移

育の10株を採取した。

水耕栽培大豆：大豆「A 62—1」, 「A 62—2」を市販の根粒菌（十勝生産連製）を接種した土壤に生育させ、初葉展開期（7月7日）に水耕に移した。水耕法はⅥ—3の方法に準じ、窒素は硝酸—Nとアンモニア—Nとの比率を3:1とし、濃度は「A 62—1」では0と40 ppmの2処理, 「A 62—2」では40 ppmとした。調査は9月4日（開花期）および9月18日（結莢期）に行なった。

(2) 調 査 法

茎葉と根に分け、根粒を除去して秤量した。根重は茎の切断位置の高低により誤差を生じやすいので、主根重は茎葉重に加算した。根重/茎葉重比はほ場栽培の大豆では乾物重により、水耕栽培の大豆では生体重により算出した。

生育抑制剤投与の影響

(1) 供 試 材 料

生育抑制剤：BCB〔2 (Bromoethyl) trymethyl ammonium bromide〕片山化学製。

予備実験としてCCC, BCB, Bナイン, カイネチン, IAAなどの投与がアラントインの集積に及ぼす影響を調査した結果, BCBの促進効果が最大であったので, BCBを用いることにした。

供試大豆：大豆「A 62—1」, 「A 62—2」をポットで水耕および土耕栽培し、供試した。

土耕栽培は5000分の1アールプラスチック製ワグネルポットに北海道農試羊ヶ丘ほ場の土壤（火山性壤土）を充填し、過石、熔燐、硫加各1g、窒素は「A 62—1」には硝安1g, 「A 62—2」には2.0gを施用した。

水耕栽培はⅥ—3の培養条件で実施し、窒素濃度は40 ppm（硝安）とした。

(2) BCBの投与

土耕大豆に対しては、BCB 200 ppm水溶液に展着剤（アグラール）0.001%を添加し、葉面から水滴が落下する程度に噴霧した。噴霧は7月4日に開始し、週2回。

水耕大豆に対しては調査3週間前（本葉第7葉展開期）から、培養液に200 ppmのBCBを添加した。培養液の更新は週1回。

(3) 調 査 項 目

試料は葉、茎、主根、支根、莢、根粒に分け、秤量し、乾燥粉末試料により全—N, アラントイン—N, アミノ酸—N, 全糖、還元糖濃度を定量した。

第12表 根重/茎葉重比におよぼす
窒素施用量の影響 (1964)

N使用量 kg/a		0	0.4	0.8	1.2
調査日	系統				
7.22	A 62-1	0.073	0.082	0.096	0.113
	A 62-2	0.125	0.104	0.106	0.101
8. 4	A 62-1	0.058	0.056	0.070	0.082
	A 62-2	0.089	0.079	0.065	0.064
8.14	A 62-1	0.052	0.058	0.061	0.077
	A 62-2	0.075	0.087	0.076	0.060

注) 窒素用量試験ほ場、大豆、開花期～結莢期、根重/茎葉重比は乾物重から計算した。
根重には主根および根粒は含まない。

2) 実験結果ならびに考察

根粒着生状況と根の生育との関係

(1) 窒素用量試験ほ場の大豆

茎葉重に対する根重の比率を示した第12表によると, 「A 62—1」では窒素施用量が多いほどその比率が高くなるが, 「A 62—2」では逆に低下している。このことから窒素施肥と根粒の着生はともに根重/茎葉重比の低下をもたらすが、根粒は窒素施肥以上の根に

対する生育抑制力を有するとみることができる。

(2) 水耕栽培の大豆

第13表によると「A62-1」の無窒素区の根粒重は40 ppm 区の約3倍であるが、根重/茎

第13表 水耕栽培大豆の根重に及ぼす根粒と培養液窒素濃度の影響 (1969)

調査日・ 系統・ N濃度 重 量	9.4			9.18		
	A62-1		A62-2	A62-1		A62-2
	0	40	40	0	40	40
茎 葉 重	142.6	163.5	175.0	173.5	183.8	221.5
根 重	62.3	88.6	164.2	74.5	93.2	152.0
根 粒 重	8.2	2.4	—	7.1	3.1	—
根重/ 茎葉重	0.437	0.542	0.893	0.430	0.506	0.688

注) 茎葉重, 根重, 根粒重は生体g/ポット (4個体) 根重は主根, 根粒を除いて秤量した。

葉重比は小さく, 80%前後である。また, 40 ppm 区の「A62-1」の根重/茎葉重比は「A62-2」の75%以下である。この事実から, 根粒は寄主に対して固定-Nを供給し, 寄主の光合成産物を消費するだけでなく, 根の生育を抑制する機能も有していると推定できる。

生育抑制剤投与の影響

(1) BCBの葉面散布がアラントイン濃度に及ぼす影響

通常 BCB を生育抑制に利用する場合は1000~3000 ppm の溶液として散布するが¹⁰²⁾, 本実験では僅かに生育抑制が認められる程度の濃度, 200 ppm とし, 2 または 4 回散布した。第14表によると茎長, 茎重の増大は抑制されているが, 葉身重には影響がない。

第14表 BCB葉面散布が大豆の生育に及ぼす影響 (1966)

調査月日 系統・ BCB 処理		主茎長 cm			葉身重 g/個体			茎 重 g/個体		
		7. 7	7.14	7.20	7. 7	7.14	7.20	7. 7	7.14	7.20
A62-1	－	21	28	37	12.5	18.5	24.5	6.3	12.8	18.6
	＋	—	27	32	—	19.2	23.0	—	10.5	14.3
A62-2	－	24	30	36	11.2	16.3	28.7	5.7	13.6	19.5
	＋	—	29	33	—	17.5	26.8	—	14.0	17.3

注) 4個体/5000分のアールポット 栽培 1処理 6ポット

各ポットより 1コ体ずつ 根ぎわより切り取り秤量 6コ体平均。

第15表によると, BCB 散布により全-N濃度は一時低下するが, その後上昇している。アラントイン-N, アミノ酸-N濃度も上昇するが, 糖濃度は低下している。

(2) 水耕栽培大豆の水耕液に添加した BCB がアラントイン濃度に及ぼす影響

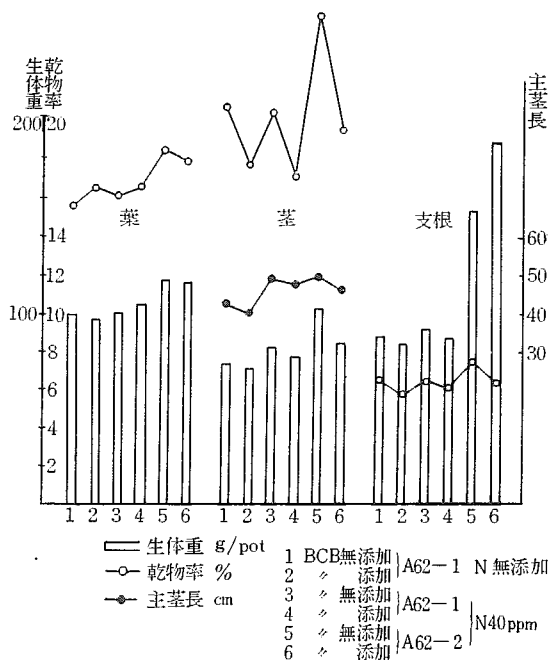
第16図は水耕液に200 ppm の BCB を添加し, 3週間栽培し, 生育状況を調査し, 図示したものである。BCB 処理により茎重は多少低下しているが, 葉身重にはほとんど変化はない。根重は「A62-1」では減少しているが「A62-2」では逆に増加している。乾物率はいずれも BCB 処理により低下した。

第16表は茎, 葉, 根の各種成分濃度の変化を表示したものであるが, 葉面散布の場合と同様, 全-N, アミノ酸-N, アラントイン-N濃度が上昇し, 糖濃度は低下している。「A62-1」では, BCB 投与により根の生育が促進されているが, 低濃度の CCC (chlorocholine chloride) や BCB の投与により生育が促進されることは, 二, 三の研究者によって認められており^{12, 101)}, 大豆では BCB 200 ppm ($7.8 \times 10^{-4}M$) が, 根の生育に対しては抑制と促進の限界

第15表 BCB葉面散布が各種体内成分濃度におよぼす影響(対乾物)(%)

成分・ 系統・ BCB処理	部位	全-N		アラントイゾン-N		アミノ酸-N		全 糖		還 元 糖	
		葉	莖	葉	莖	葉	莖	葉	莖	葉	莖
7月7日 BCB処理前											
A62-1	—	—	2.50	—	0.030	—	0.087	—	9.42	—	7.15
A62-2	—	—	2.60	—	0.002	—	0.135	—	6.85	—	4.79
7月14日 BCB 2回散布											
A62-1	—	4.19	2.69	0.015	0.026	0.072	0.059	3.71	10.15	2.02	8.06
	+	2.90	2.00	0.051	0.092	0.111	0.100	4.27	8.18	2.06	6.19
A62-2	—	3.95	2.33	Tr	0.016	0.103	0.124	4.21	7.35	1.84	5.45
	+	2.30	1.64	0.020	0.027	0.130	0.231	4.66	7.09	2.13	5.21
7月20日 BCB 4回散布											
A62-1	—	4.10	1.26	0.086	0.198	0.132	0.116	4.88	8.02	2.22	6.15
	+	5.23	1.41	0.117	0.367	0.159	0.187	3.99	4.76	1.82	3.56
A62-2	—	4.49	1.29	0.015	0.017	0.119	0.115	4.54	7.82	2.48	6.33
	+	5.20	1.29	0.016	0.024	0.131	0.147	4.10	5.83	1.82	4.43

注) 土耕ポット(1967)。



第16図 BCBの水耕液添加が大豆の生体重量乾物率および主茎長に及ぼす影響

濃度であると思われる。BCB 投与による糖濃度の低下と葉色の濃緑化も^{13,17,40,68,101)}、通常、観察される現象である。

第16表 水耕液に添加されたBCBが各種体内成分に及ぼす影響

系統・N濃度 BCB処理		A62-1				A62-2	
		0 ppm		40 ppm		40 ppm	
		—	+	—	+	—	+
成分	部位	—	+	—	+	—	+
		—	+	—	+	—	+
		—	+	—	+	—	+
		—	+	—	+	—	+
全窒素	葉	4.61	4.87	4.76	5.04	2.65	3.24
	茎	1.94	2.22	1.60	2.24	0.93	1.22
	主根	1.08	1.31	1.06	1.68	0.91	1.06
	支根	1.71	2.52	2.92	3.24	2.31	2.56
アミノ酸	葉	0.136	0.165	0.147	0.202	0.159	0.162
	茎	0.154	0.213	0.103	0.162	0.042	0.132
	主根	0.024	0.028	0.023	0.039	0.023	0.025
	支根	0.035	0.033	0.062	0.077	0.041	0.074
アラントイン	葉	0.076	0.086	0.073	0.077	0.018	0.018
	茎	0.532	0.742	0.402	0.608	0.017	0.023
	主根	0.059	0.093	0.046	0.074	0.010	0.010
	支根	0.020	0.014	0.022	0.014	0.014	0.012
糖	葉	2.63	2.69	2.69	2.50	2.83	2.63
	茎	2.23	1.18	2.56	1.51	3.58	2.50
	主根	1.77	1.05	1.31	0.85	2.50	2.23
	支根	1.71	1.25	1.64	1.18	3.09	2.04

注) 水耕ポット (1969)。

3) 論 議

ほ場では根粒の着生が良好なほど、根の発達が悪くことは経験的に知られている。一般的には、根粒の着生が良好な個体は窒素施用量の少ない個体であるので、地上部の生育も劣っている。したがって根の生育に対する根粒の影響を論ずる場合、根だけについての比較は意味がない。そこで、根重/茎葉重の比を取り上げた。

ほ場栽培、水耕栽培をとわず根粒の着生により根の発育が抑制されるとみることができるが、Ⅵ—4で論じた根の窒素濃度の上昇も、生育抑制と関係のない現象とは思われない。詳しくはつぎのⅦでアラントインの生成経路と関連させて論ずるが、アラントインのおもな生成経路がプリンの酸化分解であるとするならば、根粒が根の核酸代謝に影響を及ぼし、その結果として、根の全—N濃度を上昇させたり、アラントインの生成を促進したり、リボ核酸に依存するたんぱく合成を阻害し、根の生育を抑制する可能性がある。

BCB投与によるアラントイン濃度の上昇も全—N濃度の上昇を伴う現象であり、BCBの窒素代謝に対する影響の現われとみることができる。

根粒が着生することにより根の全—N濃度が上昇し、アラントインの生成が促進される現象の背後にある窒素代謝の変動と、BCBの吸収によって起こることが予想される窒素代謝の変動とが同種のものであると推定する根拠はない。しかし、根粒菌が生理的活性物質の生成に関与するとの報告もあり^{41,89,90)}、根粒が供給する物質が根の窒素代謝を攪乱し、生育を抑制したり、アラントインの生成を促進している可能性は否定できない。

これまで述べてきたアラントイン生成に関するいろいろの可能性の真偽については、アラントインの生成経路が明らかとなり、根粒着生の影響がその経路のどの段階に及び、アラントインの生成が促進されるのかを明らかにすることができなければ真の解決にはならない。

6. 摘 要

大豆根におけるアラントインの生成に及ぼす根粒の影響について検討し、つぎの結果を得た。

自然かつ正常に生育している大豆では、根粒の着生が良好なほどアラントイン濃度が高く、根の全糖/全—N比が低く、全—N濃度が高い。

茎を切除して、根に対する光合成産物の供給を断つと、「A 62—2」においてもアラントインの生成が促進されるが、この場合も根の全糖/全—N比が低下する。

アンモニアを吸収させると、アラントイン濃度が上昇し、根の全—N濃度も上昇した。

根粒の着生や少量の生育抑制物質の投与によって生育が抑制されるが、同時にアラントインと全—N濃度の上昇が認められた。

このように大豆におけるアラントインの生成は、根粒の着生、生育抑制剤の投与、アンモニアの吸収、光合成産物の供給停止などによって促進されるが、いずれの条件でも、根の全—N濃度の上昇が認められる。また、これらの条件はアラントインの生成に関連のある窒素代謝に影響を及ぼし、その生成を促進するものと考えられる。

したがって、アラントイン生成における根粒の役割は光合成産物の消費、アンモニアの供給、あるいは、生理的活性物質の供給などにより、寄主の窒素代謝に変動を与えることであり、その結果としてアラントインの生成が促進され、根の全—N濃度が上昇するものと考えられる。

VII. 大豆根におけるアラントインの生成経路

1. ま え が き

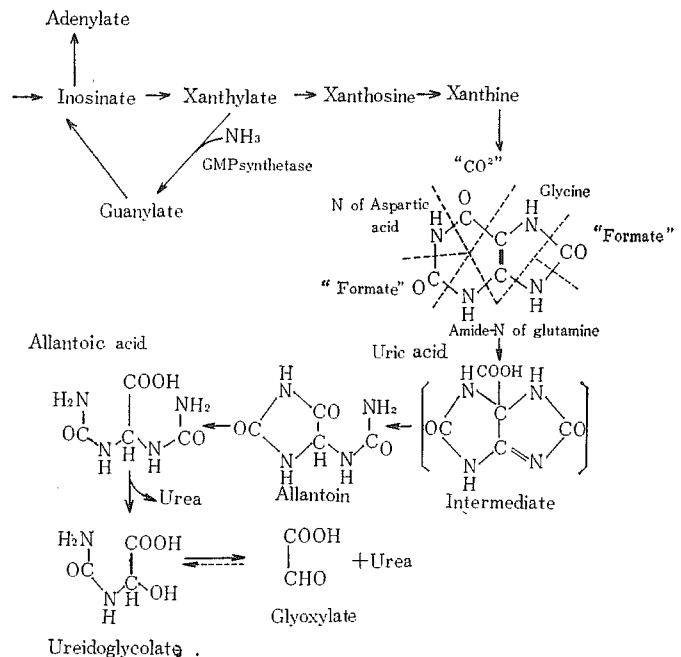
植物におけるアラントインの生成経路としては

1. 尿素とグリオキシル酸の縮合

2. プリンの酸化分解

の二つの説があり、前者は第17図、プリン分解経路を逆に進行するものである。1960年頃までに、両説について多くの研究成果が報告されており、現在では後者のプリン分解説が有力である。

前者については、SHANTZ⁸¹⁾らがニンジンとばれいしょの組織培養において、尿素とアラントインが生育を顕著に促進することから、尿素とグリオキシル酸が縮合し、アラン



第17図 プリンヌクレオチドの代謝経路

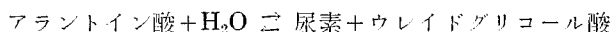
トインが生成され、さらにそれが核酸の生成に関与する可能性を推定した。FREIBERG¹⁹⁾らはバナナの葉に尿素— ^{14}C を投与し、多量の放射性炭素がアラントインに取り込まれたことを報告している。また、マッシュルーム、その他の菌類のホモジネートで、尿素— ^{14}C とグリオキシル酸の縮合により放射性アラントインが生成されたとの報告もある⁷⁵⁾。

これに対して、KRUPKA⁴⁸⁾らは ^{14}C で標識された尿素、グリオキシル酸、グリシンなどを小麦の根から吸収させ、またはバキュームインフィルトレーション法で葉片に吸収させ、アラントインの ^{14}C 取り込みの有無を調査した。その結果、グリシンを投与した場合に最も多く取り込まれ、尿素やグリオキシル酸の投与では、ほとんど取り込みは認められなかった。彼等はこの実験結果に基づき、尿素がアラントイン生成の前駆物質であるとの説を批判した。ついでBARNES⁴⁾はカエデ (*Acer saccharinum*) の葉にアデニン—8— ^{14}C を投与し、アラントイン、アラントイン酸および尿素に多量の ^{14}C が検出されたことから、動物や微生物で²⁰⁾広く認められているように、植物においてもプリンの酸化分解によりアラントインが生成されると推定した。その後、BUTLERら¹¹⁾もグリシン—2— ^{14}C 、尿素— ^{14}C およびハイポキサンチン—8— ^{14}C をコンフリー (*Symphytum uplandicum* L.) の根および葉組織の無菌培養に投与し、ハイポキサンチン—8— ^{14}C を投与した場合に、多量の放射性炭素がアラントインに取り込まれることを認めた。グリシンの放射性炭素は葉のアラントインにはほとんど取り込まれなかったが、根に吸収させた場合には取り込まれた。尿素の放射性炭素は葉根双方の実験で取り込みを認めることができなかった。また、抽出したアラントインを分解し、放射性炭素の取り込み位置を調査することにより、ハイポキサンチン—8— ^{14}C の ^{14}C がアラントインのウレイド基に、グリシン—2— ^{14}C の ^{14}C が主としてアラントインの4の位置の炭素にそれぞれ取り込まれることを明らかにし、おのおのの放射性炭素はプリンの生成、分解経路を経て、アラントインに取り込まれたものであると推定した。

しかし、これらの研究結果は、いずれも ^{14}C —標識化合物を使って得られたものであり、すでに動物や微生物で確認されているプリンの分解と同一の代謝経路⁵¹⁾の存在を証明したにすぎない。植物においても、動物や微生物と同じように、そのプリンが第17図に示される代謝経路を経て分解されることは当然予想しなければならない。したがって、 ^{14}C で標識されたプリンまたはプリン生成の前駆物質を投与した場合、大豆のアラントインに ^{14}C が取り込まれたことが明らかとなっても、大豆のアラントインのすべてがこの代謝経路を経て生成されたものであることを証明したことにはならない。

一方、尿素— ^{14}C を投与した場合、アラントインに ^{14}C の取り込みがなかったとしても、それは外部から与えられた尿素が代謝されやすく、アラントイン生成の場に到達しえなかったためとも考えられ、尿素とグリオキシル酸の縮合が完全に否定されたことにはならない。PATE⁷¹⁾らが窒素飢餓状態で生育させたえんどう (*Pisum arvense* L.) に尿素、アンモニア、硝酸を与え、水溶性成分の濃度を調査した結果、24時間以内にアラントインの集積が認められたのは、尿素処理区のみであった。

VALENTINE⁹⁹⁾は尿素とグリオキシル酸の縮合は、酵素作用なしでも起こりうることを示した。近年、TRIJBELS⁹³⁾らは *Pseudomonas aeruginosa* から抽出、精製したアラントイケースを用い、



の変化が可逆反応であり、ウレアーゼの添加により分解反応が促進され、尿素の添加により縮

台反応が進むことを報告している。平衡定数は

$$K = \frac{[\text{Allantoate}]}{[\text{Urea}] [(-) \cdot \text{Ureidoglycolate}]} = 4.5 \sim 5.1$$

で、平衡は縮合側に傾いている。したがって、アラントイケースを持つ植物では、尿素とグリオキシル酸からウレイドグリコール酸を経て、アラントインが生成される可能性は十分にあり、二、三の研究者の報告のように、尿素— ^{14}C がアラントインに取り込まれなかったのは^{11,45)}、外界から取り入れられた尿素がウレアーゼの作用を受けやすいことに原因があるのかも知れない。また、大豆根におけるように、多量に生成されるアラントインのすべてが、複雑な過程を経て生成されるプリンの分解産物であることに、簡単には納得できないものがある。

そこで、初めに大豆根において尿素とグリオキシル酸の縮合によるアラントインの生成の可能性があるか否かを検討するため、 ^{14}C —で標識された尿素を根に吸収させ、根の組織中における尿素の行動を追跡するとともに、水耕栽培の窒素源として尿素を吸収させた場合のアラントインの集積状況を調査することにした。

Ⅵでは、大豆根のアラントイン生成における根粒の役割りが、寄主の窒素代謝に影響を及ぼし、攪乱することであり、その結果としてアラントインの生成の促進や根の生育の抑制が起きると推論したが、上述のように、大豆根においてもアラントインがプリンの酸化分解によって生成されるものとするならば、核酸または核酸関連物質の代謝にも検討が加えられなければならない。

アラントインの生成機作を核酸代謝と関連させて考える場合には、まず、大豆根の核酸の代謝回転速度に対する根粒着生の影響が問題になる。また、プリンヌクレオチドの代謝が根粒着生の影響により攪乱されること、たとえば、第 17 図に示されるグアニル酸の生成が阻害されることにより、キサントシン酸が集積し、それがアラントインの生成量の増大につながる可能性などについても、考慮しなければならない。

大豆におけるアラントインの生成経路を解明するには、トレーサー実験により生成経路の存在を確認するに止まらず、根粒の着生によりその生成が促進される機作をも合せて説明することができれば、その代謝経路によって、アラントインの大部分が生成されていることの証明にはならない。したがって、プリンの酸化分解によってアラントインが生成されていることを証明するには、根粒が根の核酸代謝にどのような影響を及ぼしているかについて検討しなければならない。

以上の観点から、両説の実験を大豆根について追試し、いずれの経路によりアラントインの主要部分が生成されているかを明らかにしようとした。

2. 尿素とグリオキシル酸の縮合によるアラントインの生成

1) 実験方法

大豆の水耕液に尿素— ^{14}C を添加し、吸収させた後、作物体から水溶性成分を抽出、イオン交換クロマトグラフィーおよびペーパークロマトグラフィーで分離し、アラントインへの放射性炭素の取り込みを調査した。また、尿素を窒素源として水耕栽培し、アラントインの集積状況を調査した。

(1) 供試材料

1970 年 3 月、温室で播種、生育させた大豆「北見白」を初葉展開期に水耕に移した。窒素濃度および窒素の形態以外の培養条件は、Ⅵ—3 に等しい。

窒素の形態と添加物により、つぎの 3 種の処理区を設けた。

No. 1	尿素区	尿素—N 20 ppm
No. 2	尿素+ヒドロキシ尿素区	$\left\{ \begin{array}{l} \text{尿素—N 20 ppm} \\ \text{ヒドロキシ尿素 } 10^{-4}\text{M (7.5mg/l)} \end{array} \right.$
No. 3	対照区	$\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{—N 5 ppm} \\ \text{NO}_3\text{—N 15 ppm} \end{array} \right.$

(2) 試 薬

尿素— ^{14}C , 20.0mCi/m mol は第一化学 KK より, ヒドロキシ尿素 (特級) は東京化成より購入した。

シンチレーターはトルエンにドータイト DPO (2,5—Diphenyloxazole) およびドータイト POPOP (1,4—Bis [2—(phenyloxalyl)]—benzen) のおのおの 0.4 % および, 0.01 % 相当量をとかしたものである。

(3) 尿素— ^{14}C の投与

ポット (5000 分の 1 アールワグネルポット) 当たり 50 μCi の尿素— ^{14}C を午前 9 時 30 分に水耕液に添加し, ガラス室に静置して吸収させる。実験当日は快晴。静置時間は 6 時間と 24 時間で, 供試大豆の水耕条件は No. 3 (対照区) とした。その他, 尿素を尿素—N として 50 ppm になるように添加して栽培した大豆についても, 尿素— ^{14}C を投与した。

(4) アラントインの抽出, 分離

所定の処理を加えた大豆から根と茎を切り取り, 80°C で熱風乾燥し, 粉碎した。粉末 1 g を乳鉢に取り, 水と海砂を加えて磨砕し, 濾過, 洗滌する。残渣について同様の操作を 3 回くり返し, 得られた濾液, 洗液を合わせ, Dowex 50 (H^+ , 100 メッシュ) を詰めた径 1.8 cm, 長さ 25 cm のカラムに流し込み, 250 ml の純水で洗滌する。滲透液と洗液を合わせ, 水酸化ソーダで中和し, さらに 0.5 N 水酸化ソーダ 1 ml を添加して微アルカリ性とし, ロータリーエバポレーター (60°C) で約 20 ml に濃縮し, 塩酸で中和する。Dowex 1 (Formate⁻, 200~400 メッシュ) のカラム (0.9 cm × 25 cm) に吸着させて, 約 200 ml の純水で洗い, III—2 で記載した方法で展開し, 10 ml の画分として分取した。

Dowex 1 カラムからの滲透液と洗液を合わせ, 水を加えて 250 ml とし, これを No. 0 画分 (非吸着画分) とする。その 200 ml をエバポレーター (60°C) で濃縮し, 6 ml とする。濃縮液 0.1 ml を東洋濾紙 No. 51 に吸着させ, ブタノール, 酢酸, 水 (4:1:1) 混液で展開し, エーリッヒ試薬で発色させる。

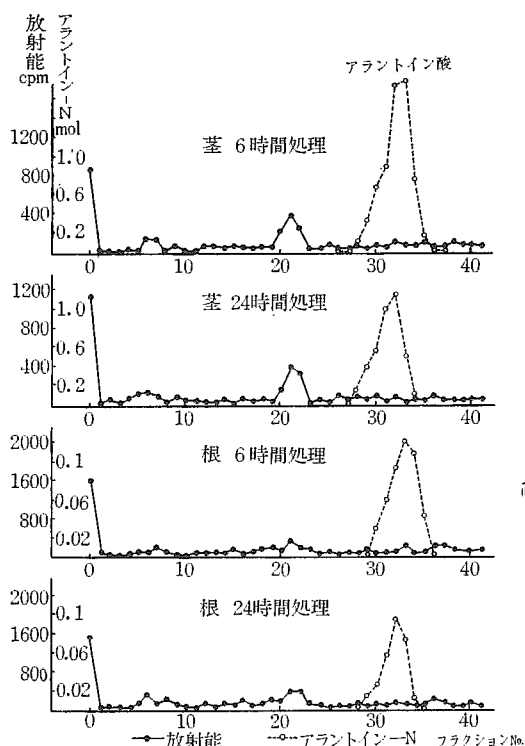
(5) 放射能の測定

イオン交換クロマトグラフの各画分の放射能は, 溶出液 2 ml を径 25 mm のステンレス製試料皿に取り, 赤外線ランプで乾固し, アロカ JDC-102 型ガスフローカウンターで測定した。

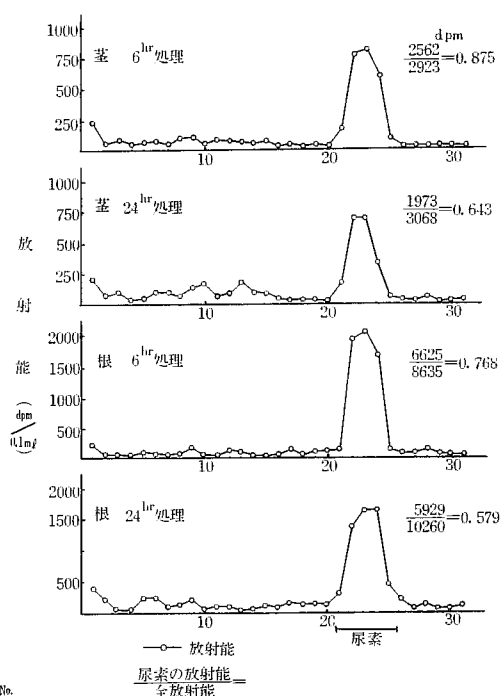
ペーパークロマトグラム上の放射能は, 濾紙を展開方向にそって幅 7.5 cm で切り, さらに直角方向に切り, 7.5 × 1.0 cm の短冊状とし, 試料びんに入れ, シンチレーター 15 ml を加えて, テン 263 型液体シンチレーションカウンターで測定した³⁵⁾。

2) 実験結果ならびに考察

No. 3 の水耕条件 (対照区) により栽培した大豆の水耕液に 50 $\mu\text{Ci/pot}$ の尿素— ^{14}C を添加, 吸収させ, 茎および根の冷水抽出物のアニオンフラクションをイオン交換クロマトグラフで分画した。第 18 図はアラントイン酸と放射能の分布を示したものである。試料中のアラントインは濃縮の過程でアルカリ加水分解され, 全量アラントイン酸となっているので,



第18図 尿素— ^{14}C 処理大豆の冷水抽出物のイオン交換クロマトグラム (1970)



第19図 ^{14}C —尿素処理大豆の冷水抽出物のDowex 50(H^+), Dowex 1. (OH^-) カラム非吸着画分のペーパークロマトグラム

Dowex 1 に吸着されない物質を含む No. 0 フラクションの放射性炭素はアラントインのものではない。また、フラクション No. 21 前後に放射能が検出されたが、アラントイン酸フラクションには検出されていない。

吸収された尿素— ^{14}C が分解されず、尿素として残存しているか否かを知るため No. 0 フラクションを濃縮し、ペーパークロマトグラフィーに展開し、放射能の分布を調査した結果が第19図である。唯一の放射能ピークがエールリッヒ試薬で発色させた尿素のスポットと一致したので、尿素— ^{14}C であると判定した。このようにして、投与された尿素— ^{14}C の一部が根の組織中に分解されずに存在しうることを確認したが、グリオキシル酸との縮合によるアラントインの生成は認めることができなかった。

植物体内では微量の尿素が検出されることがあるが⁹⁵⁾、それは抽出操作中にアラントイン酸から生成されたものである場合が多い^{75, 95)}。しかし、局所的には高濃度で存在する可能性も否定することはできない。上記の実験で水耕液に添加した尿素— ^{14}C 、50 μCi は、尿素—N 0.07 mg に相当し、未分解の尿素— ^{14}C が根組織中に存在したとしても、著しく濃度は低く、まもなくウレアーゼで分解し尽され、アラントイン生成の場まで到達しえなかった可能性もある。アラントインの生成に高濃度の尿素の存在が必要であるならば、上記の実験条件では縮合は起こりえない。そこで、キャリアーとして N 濃度が 50 ppm となるように尿素を添加して、同様の実験を行ない、イオン交換クロマトグラムのアラントインフラクションの放射能を測定した

が、バックグラウンドと差がなかった。

Dowex 50 および Dowex 1 カラムの非吸着フラクションのペーパークロマトグラム上の尿素の放射能を測定し、根あるいは茎（乾物）1g 当たりに換算して、第17表に示した。キャリア

第17表 尿素- ^{14}C 投与大豆の茎および根における残存尿素- ^{14}C

水耕液尿素- ^{14}C 系統・ 処理時間 部 位		0.55 μM 20 mCi/m mol				1.79 mM 6.2 $\mu\text{Ci}/\text{m mol}$	
		A 62-1		A 62-2		A 62-1	
		6	24	6	24	6	24
残 存 尿 素 の 放 射 性 炭 素 μCi	茎	0.087	0.067	0.043	0.058	0.146	0.239
	根	0.225	0.202	0.134	0.168	0.472	0.826
残 存 炭 素 μmol	茎	4.3	3.3	2.2	2.9	36.2×10^3	38.6×10^3
	根	11.2	10.1	6.7	8.4	76.2	133.2

注) 供試大豆 開花期 乾物 1g 当たり。

ヤーの尿素を添加しない場合の水耕液の尿素濃度は 0.55 μM 、キャリアーの添加で 1.79 mM となる。放射性炭素の濃度は 11.1 $\mu\text{Ci}/\text{l}$ であるから水耕液から吸収された尿素の体内濃度は第17表の下欄のとおりとなる。これによると、キャリアーの添加によって体内濃度は約 10000 倍に上昇しているが、尿素- ^{14}C のアラントインへの取り込みは認められなかった。

第18表は6月12日から7月30日まで、尿素を単一の窒素源として水耕栽培した大豆「北

第18表 大豆茎の各種成分濃度に及ぼす尿素ヒドロキシ尿素の影響

月日・処理 成 分	7月14日			7月30日		
	尿 素	尿素+ ヒドロキシ尿素	NH_4NO_3	尿 素	尿素+ ヒドロキシ尿素	NH_4NO_3
全-N	1.10	0.94	1.04	1.15	1.00	1.17
アミノ酸-N	0.085	0.067	0.080	0.079	0.104	0.088
アラントイン-N	0.039	0.018	0.030	0.094	0.051	0.096
全 糖	5.70	6.27	6.47	4.57	4.65	4.83

注) 品種 「北見白」

(1970)

水耕液N濃度 20 ppm ヒドロキシ尿素 10^{-4}M

見白」の茎の各種成分濃度を調査し、 NH_4NO_3 で栽培したものと比較したものである。これによると、尿素区でアラントイン濃度が上昇しているとは認められない。ウレアーゼの阻害剤⁴³⁾、ヒドロキシ尿素の添加も全く効果がなかった。

3) 論 議

大豆ではすべての器官でウレアーゼの活性が高く、根から吸収された尿素はただちに分解される可能性があるが、本実験では、根と茎において、吸収された尿素- ^{14}C が分解されずに存在しうることが確認された。しかし、アラントインへの縮合は認められなかった。大豆の組織中では遊離グリオキシル酸も全く検出されないので、尿素とグリオキシル酸の縮合によるアラントインの生成の可能性は非常に少ないとみななければならない。

3. プリンの酸化分解によるアラントインの生成について

1) 実験方法

実験A ^{14}C -標識プリン投与

(1) 供試材料

5000 分1 アールのワグネルポットにパーミキュライト（商品名、パーミックスG）をつめ、大豆「T 202」と「T 201（T 202と同一遺伝系統の根粒非着生系統）」を栽培し、着蕾期に

初葉の下で切り取り、上部を供試した。

施肥は、基肥としてポット当たり、過石、熔燐各 5 g、硫加 1 g、硫安 2.5 g を施用し、「T 201」にはさらに硫安 2 g ずつ 5 回追肥した。また、「T 201」には根粒菌 (*R. japonicum*, 道立農試保存株) を接種した。

(2) 標識化合物

キサンチン—8— ^{14}C	22.0 m Ci/m mol
ハイポキサンチン—8— ^{14}C	20.3 μ
グアニン—8— ^{14}C	25.5 μ
アデニン—8— ^{14}C	25.8 μ

いずれも RCC (The Radiochemical Centre.) の製品を日本同位元素協会をとおして購入した。

(3) 標識化合物の投与法

各標識化合物 0.5~2.0 μCi を 10 ml の水道水にとかし、試験管 (1.8 cm $\times$ 14.0 cm) に入れる。供試大豆 2 個体を茎の切り口が液にひたるようにさし込み、試験管の開口部に綿を詰めて茎を固定し、ガラス室内で水を補給しながら 2~6 時間放置する。1 処理は 6 個体とした。

(4) アラントインの ^{14}C の取り込みの調査

^{14}C —標識プリンを吸収させた大豆茎 5 g を乳鉢に取り、水 5 ml と海砂 5 g を加えて磨碎し、遠心分離 (10000 $\times$ g, 10 分) する。上澄液 1 ml を試料皿に取り、赤外線ランプで乾固し、アロカ JDC—102 型ガスフローカウンターで放射能を測定し、それを全放射能とした。

上澄液 0.05 ml を東洋濾紙 No. 51 に吸着させ、ブタノール、酢酸、水 (4:1:1) 混液で展開する。標準物質として使用した尿素のエールリッヒ試薬発色部を Rf 1 とし、原点から Rf 1 までが 20 等分されるように濾紙を切り、水で抽出し、全放射能と同様の方法で放射能を測定した。また、エールリッヒ試薬で発色すると思われる部分 (Rf 0.35~0.65) を切り取り、水で抽出、濃縮してから水飽和フェノール、および、ブタノール、酢酸、水 (4:1:1) 混液を展開剤として、二次元ペーパークロマトグラムに展開し、そのオートラジオグラムを作成した。

実験 B 蟻酸— ^{14}C の投与

(1) 供試材料

前節で供試した水耕栽培の大豆「A 62—1」と「A 62—2」を開花期と結莢期に供試した。水耕条件は前節の No. 3 (対照区 NH_4NO_3) である。

(2) 標識化合物

蟻酸— ^{14}C ($\text{H}^{14}\text{COONa}$) 10.5 mCi/m mol 日本同位元素協会から購入した。

(3) 蟻酸— ^{14}C の投与法

水耕液量を約 1/2 (2 l) に減じ、蟻酸— ^{14}C , 100 $\mu\text{Ci}/\text{pot}$ を添加、吸収させた。

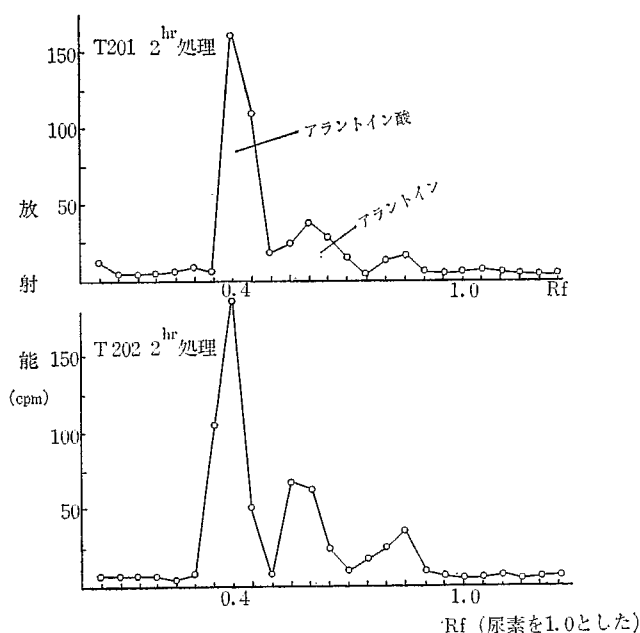
(4) 放射能の測定

蟻酸— ^{14}C を投与した大豆の茎および根を乾燥、粉碎し、水で抽出する。その抽出液は Dowex 50 (H^+) でカチオニックフラクションを除いた後、前節と同様にしてイオン交換クロマトグラフィにより分画し、各画分の放射能を測定した。

2) 実験結果ならびに考察

A. ^{14}C —標識プリンからアラントインの生成

第 20 図はキサンチン—8— ^{14}C を 2 時間吸収させた大豆の茎の冷水抽出物のペーパークロマ



第 20 図 キサンチン-8- ^{14}C 投与大豆茎の冷水抽出物のペーパークロマトグラムの放射能の分布

トグラムの放射能の分布を調査したものである。Rf 0.4 と 0.6 にピークが認められる。いずれもエールリッヒ試薬で黄色に発色し、並行して展開させた標準のアラントイン酸とアラントインの Rf と一致したので、両スポットがアラントインとアラントイン酸であると推定した。

さらにこれを確かめるために、上記のペーパークロマトグラムの Rf 0.35~0.65 の濾紙を切り抜き、水で抽出、濃縮し、その二次元ペーパークロマトグラムのオートラジオグラムを作製した。オートラジオグラムには 2 個の黒変部が認められ、それらはエールリッヒ試薬の発色部と完全に一致した。また、確認し得た黒変部は上記の二箇所のみであったので、先に測定した Rf 0.35~0.65 の放射性炭素は、両ウイレドに取り込まれていたものと判断した。

そこでキサンチン以外のプリン投与大豆の抽出液についても同様に全放射能（ペーパークロマトグラフィーで展開する前）とアラントイン放射能（ペーパークロマトグラムのエール

第 19 表 プリン-8- ^{14}C 投与大豆茎におけるアラントインフラクションの ^{14}C の取り込み

投与物質 投与量 μCi ・処理時間	系 統		全放射能 cpm		アラントイン放射能 cpm		アラントイン-N mg	
			T201	T202	T201	T202	T201	T202
キサンチン-8- ^{14}C	0.5	2	10500	13620	8230	9860	0.04	1.36
	0.5	4	14560	17320	10650	12170	0.01	1.45
	0.5	6	13620	15380	11320	11250	0.01	1.26
ハイポキサンチン-8- ^{14}C	2.0	6	14250	13620	8650	7360	0.02	1.63
グアニン-8- ^{14}C	1.0	6	7750	8230	4270	5360	0.01	1.28
アデニン-8- ^{14}C	1.0	6	6250	5360	4110	3280	0.01	1.05

注) 放射能 cpm, および, アラントイン-Nmg は抽出液 1 ml に換算した。

(1963)

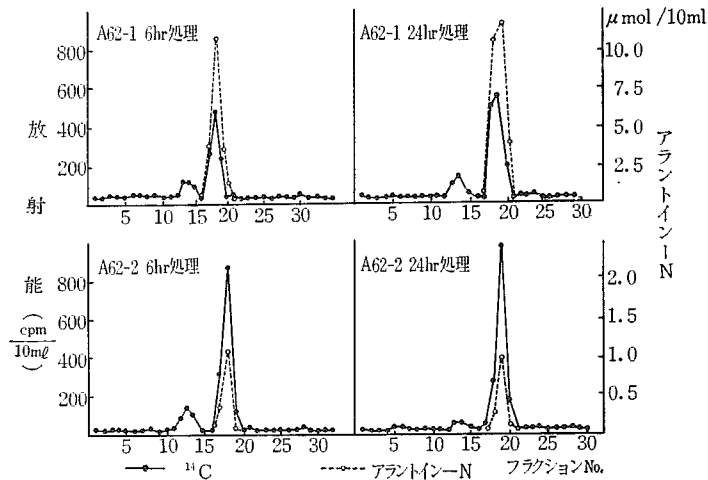
T201 根粒非着生系統。

T202 根粒着生系統。

リッヒ試薬発色部)を測定し、第19表に示した。この表によると両放射能には、根粒着生の有無による差が認められない。また、実験は2回に分けて行なわれたので、気温、日照などの実験条件に多少の差があったと考えられるため、この結果から塩基の種類とアラントイン生成量との関係を論ずることはできない。

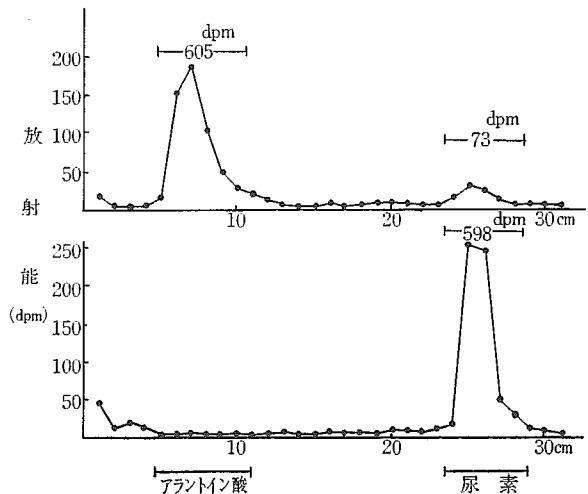
B. 蟻酸- ^{14}C のアラントインへの取り込み

第21図はプリンの生成に関与すると考えられている^{18,20,22,82,83)}蟻酸- ^{14}C を根から吸収させ、



第21図 ^{14}C -蟻酸投与大豆の茎の冷水抽出物のイオン交換クロマトグラム (開花期1970)

その水抽出液を前節と同様の方法で Dowex 1 イオン交換クロマトグラフィーで分画し、アラントイン酸への ^{14}C の取り込みを調査したものである。これによるとアラントイン酸を含む画分に多量の放射能の取り込みが認められる。その画分を集め、液を二分し、一方には希水酸化カリを加えて微アルカリとし、他方には 0.5 N 塩酸を加えて pH を 2 として、おのおのを 60 °C 以下で減圧濃縮し、ブタノール、酢酸、水 (4:1:1) 混液を展開剤とするペーパークロマトグラムに展開し、その放射能の分布を測定し、第22図に示した。これによるとアルカリ性濃縮液 (上段) では尿素のスポットにも僅かではあるが放射能が測定されるが、大部分はアラントイン酸のスポットに分布している。酸性濃縮液ではアラントイン酸は完全に分解されている筈であり、アラントイン酸のスポットには全く放射能が検出されなかった。以上の実験結果からイオ



第22図 蟻酸- ^{14}C 投与大豆茎の冷水抽出物を Dowex 1 イオン交換カラムで分離し、そのアラントイン酸フラクションの dilKOH 加水分解物のペーパークロマトグラム (上段は加水分解前、下段は分解後)

ン交換クロマトグラフィーのアラントイン酸フラクションの放射能はアラントイン酸に取り込まれ、しかもそれは主としてウレイド基に存在するものと推定できる。

蟻酸— ^{14}C の投与実験は開花期と結莢期に 2 系統の大豆に実施したが、第 21 図はその一部を示したものである。同様にして得られた図から、各試料のアラントイン酸の量（アラントインのアルカリ加水分解により生成されたアラントイン酸を含む）とその放射能を算出し第 20 表に示した。

第 20 表 ^{14}C -蟻酸投与大豆の冷水可溶性成分をイオン交換クロマトグラフィーで分離したアラントイン酸フラクションの ^{14}C の取り込み

時期	系統・時間	部 位	アラントイン酸 μmol			アラントイン酸フラクション放射能 cpm			比放射能 cpm/ μmol			
			葉	茎	莢 殻	葉	茎	莢 殻	葉	茎	莢 殻	
開 花 期	A62-1	6	8.6	18.2	—	29.6	790	—	35.4	43.4	—	
		24	12.5	26.5	—	32.5	1185	—	26.0	44.7	—	
	A62-2	6	0.8	1.8	—	41.8	1336	—	523.0	743.0	—	
		24	0.4	1.3	—	32.0	1420	—	800.0	1095.0	—	
結 莢 期	A62-1	24	16.3	53.5	52.5	9.2	820	1480	5.6	15.3	28.2	
		72	18.5	83.5	42.9	11.5	1170	1750	6.2	14.0	41.7	
	A62-2	24	0.3	1.6	2.4	tr	tr	2680	—	—	1120.0	
		72	0.9	1.1	3.6	tr	tr	4180	—	—	1160.0	

注) アラントイン酸およびアラントイン酸フラクションへの ^{14}C 取り込み量は乾物 1 g 当たりに換算 (1970)

これによると、アラントイン酸の量は、どの部位においても「A 62—1」が「A 62—2」より多い。しかし、放射性炭素の取り込み量は、開花期では両系統の間に大きな差が認められない。また、結莢期では「A 62—2」の茎と葉のアラントイン酸には放射能を検出することができなかったが、莢殻には「A 62—1」の約 2 倍の放射能が測定されている。正確には各部位の乾物重と第 20 表の値からアラントインに取り込まれた放射能の総量を算出し、比較しなければならぬが、結莢期においても両系統の放射性アラントイン酸の生成量には、アラントイン酸の量に見られるほど大きな差はないとみることができる。

3) 論 議

プリン—8— ^{14}C の投与により放射性アラントインが生成されたことから、大豆でもプリンの酸化分解によりアラントインが生成されるという。

動物組織や微生物では、蟻酸の炭素原子はプリンの 2 と 8 の位置に取り込まれることが知られており⁸²⁾、また、プリンの酸化分解によりアラントインが生成されるならば、プリンの 2 と 8 の炭素原子はウレイド基の炭素となると考えられる。蟻酸— ^{14}C を大豆に投与した場合、アラントインのウレイド基に多量の ^{14}C が取り込まれていたことは、そのアラントインがプリンの生成および分解経路を経て生成されたことを裏づけるものである。

一方、大豆体内のアラントイン濃度には、根粒着生の有無により大きな差がみられるが、第 19, 20 表ののアラントイン画分の放射能には顕著な差があると言えない。したがって本節の実験結果からは、投与した蟻酸— ^{14}C がプリンの生成、分解経路を経てアラントインに取り込まれたと言うことはできても、大豆のアラントインの主要部分がその代謝経路により生成されていると速断することはできない。

4. 根粒の着生が大豆根の核酸代謝に及ぼす影響

1) 実験方法

大豆のアラントインが根でプリンの酸化分解により生成されるものとする、根粒着生状況により根の核酸代謝に変化があると予想される。そこで、蟻酸— ^{14}C 、プリン— $8-^{14}\text{C}$ および磷酸— ^{32}P を吸収させた大豆根の RNA を抽出、加水分解し、プリンヌクレオチドの放射能の取り込み状況を調査した。

(1) 供試材料

標識化合物： 蟻酸— ^{14}C とプリン— $8-^{14}\text{C}$ は VII—3 で供試したと同種のもの、磷酸— ^{32}P (Carrier-free) は第一化学薬品 KK より購入した。

(2) 標識化合物の投与法

蟻酸— ^{14}C ： VII—3 の実験で蟻酸— ^{14}C を吸収させた大豆の根の一部を使用した。

プリン— $8-^{14}\text{C}$ および磷酸— ^{32}P ： ガラス室で水耕栽培した大豆「A 62—1」「A 62—2」(開花期) を供試した。窒素濃度以外の培養条件は VII—2 に記載したとおりである。窒素濃度はプリン— $8-^{14}\text{C}$ 処理の大豆については 0 と 80 ppm, 磷酸— ^{32}P 処理では「A 62—1」で 0, 20, 50, 100 ppm, 「A 62—2」で 20, 50, 100 ppm とした。水耕液にプリン— $8-^{14}\text{C}$ を $20 \mu\text{Ci}$, 磷酸— ^{32}P は 0.82 mCi をおのおの添加し、一定時間ガラス室に放置し、吸収させた。

(3) RNA の抽出、加水分解

OGUR と ROSEN⁵⁴⁾の方法に準じ、第 23 図の操作を経て抽出、精製した根の RNA を 0.3 N 水酸化カリ溶液とし、 37°C で 20 時間放置して加水分解した。それを過塩素酸で中和し、 0°C で 24 時間静置し、析出する結晶を濾別し、RNA 加水分解液をうる。

(4) RNA 加水分解液の分画

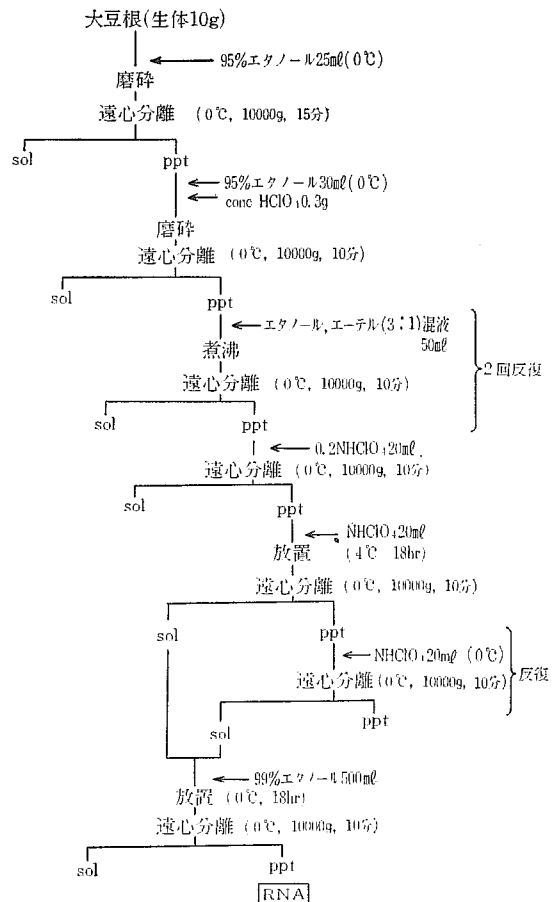
Dowex 1—(formate, 200~400 メッシュ) のカラム ($0.7 \times 30 \text{ cm}$) に加水分解液を吸着させ、下記の蟻酸—蟻酸アンモニウム系の溶媒で溶出させ、 10 ml の画分として分取した。

シチジル酸 0.01 N HCOOH (170 ml)
 アデニル酸 0.15 N HCOOH (450 ml)
 ウリジル酸 $0.01 \text{ N HCOOH} \cdot 0.05 \text{ N HCOONH}_4$ 混液 (400 ml)

グアニル酸 $0.1 \text{ N HCOOH} \cdot 0.2 \text{ N HCOOH}_4$ 混液 (500 ml)

溶出液の吸光度は日立分光光度計 EPU—2 A 型で測定し、アデニル酸、グアニル酸の $255 \text{ m}\mu$ における分子吸光係数を 13.7×10^3 , 12.2×10^3 ⁹⁵⁾ としてモル濃度を算出した。

放射能は溶出液 2 ml を試料皿中で乾固

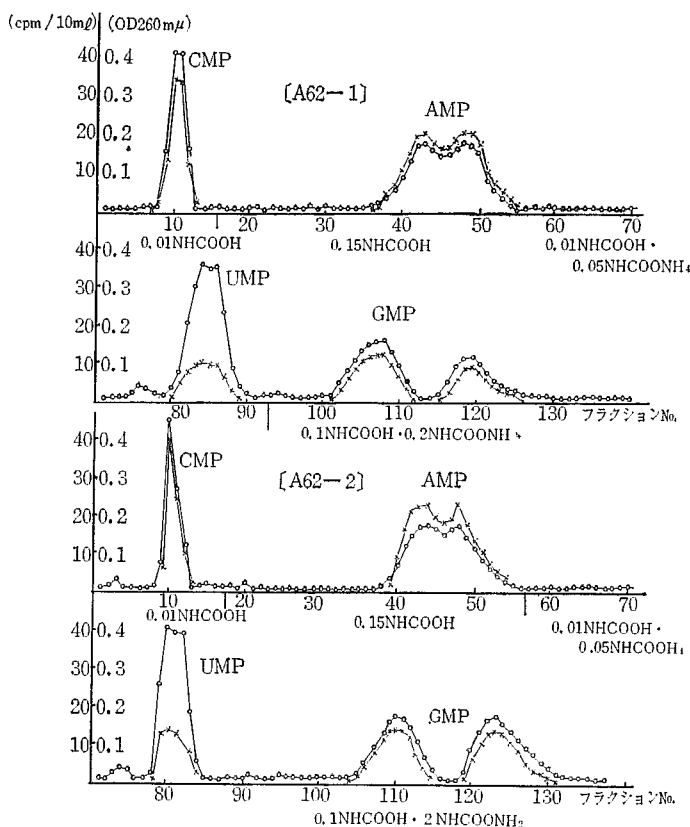


第 23 図 大豆根の RNA の抽出法

し、アロカ JDC—102 型ガスフローカウンターで測定し、アデニル酸の比放射能 (A) とグアニル酸の比放射能 (G) とその両者の比 G/A を算出した。

2) 実験結果ならびに考察

第 24 図は蟻酸— ^{14}C を投与 (24 hr) した大豆「A 62—1」, 「A 62—2」の根の RNA 加水分解



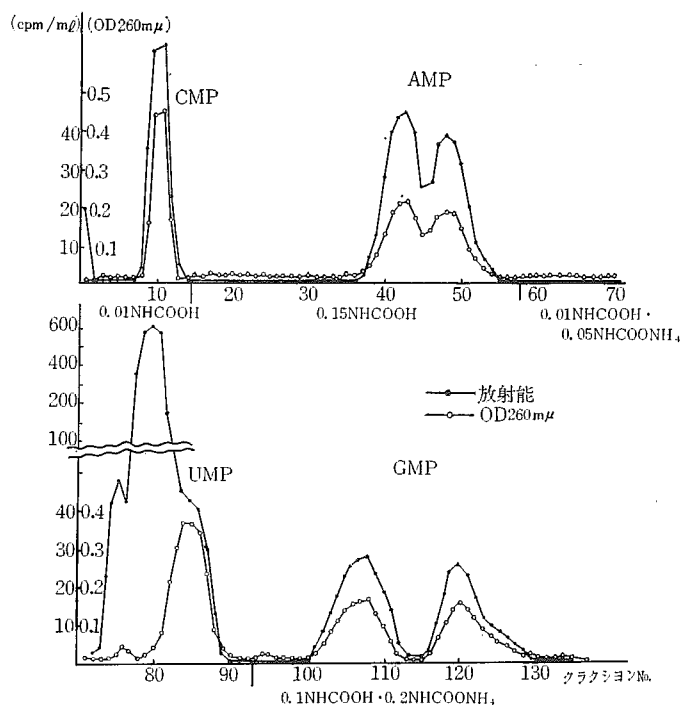
第 24 図 蟻酸— ^{14}C 投与大豆の根の RNA 加水分解物のイオン交換クロマトグラム (開花期 24 時間処理) (1969)

液のイオン交換クロマトグラムである。紫外外部吸収のみられる画分の吸光度曲線を日立 124 型分光光度計で作り、その吸収極大、極小を示す波長により第 24 図のおおのの紫外外部吸収が予想どおりのおおのヌクレオチドによるものと判断した。また、放射能と紫外外部吸光度との間に比例関係が認められるので、おおのの放射能はヌクレオチドに取り込まれていると判断した。

第 25 図はリン酸— ^{32}P を投与した大豆の根の RNA 加水分解液のクロマトグラムである。ウリジル酸の前に多量の ^{32}P の溶出が見られるが、アデニル酸、グアニル酸画分の ^{32}P はその分布から推して、おおののヌクレオチドに取り込まれていると推定した。

おおのの試料についての測定値から比放射能と G/A を求め、第 21, 22 表に示した。第 21 表の蟻酸投与の場合では、両プリンヌクレオチドの比放射能は処理時間の長いほど高くなっているが、根粒着生の有無によって差があるとは認められず、G/A についても差はない。

リン酸— ^{32}P 処理でも、水耕液窒素濃度が等しければ、根粒着生の有無による比放射能の差は認められない。G/A についても差があるとは言えない。



第25図 $H_3^{32}PO_4$ 投与大豆の根のRNA加水分解物のイオン交換クロマトグラム (A.62-1, 開花期 培養液N濃度40ppm 24時間処理)

第21表 根粒着生の有無と根のRNA代謝との関係

投与物質 N濃度・時間			A アデニル酸の比放射能		G グアニル酸の比放射能		G/A	
			A62-1	A62-2	A62-1	A62-2	A62-1	A62-2
蟻酸- ^{14}C	ppm	6	81.1	73.3	58.3	50.1	0.71	0.71
	40	24	135.2	156.6	99.2	102.3	0.73	0.65
H_3PO_4	0	24	3,650	—	3,060	—	0.86	—
	20	24	2,570	1,870	2,230	1,780	0.87	0.95
	50	24	2,730	2,460	2,290	2,020	0.84	0.83
	100	24	2,460	2,250	2,040	1,965	0.85	0.87

注) アデニル酸, グアニル酸のモル濃度は Molar extinction coefficient を各々 13.7×10^3 , 12.2×10^3 とし, 吸光度 (OD. 255 mμ) から算出した。

第22表 根粒着生の有無が大豆根のRNA代謝に及ぼす影響
RNA構成プリンヌクレオチドの ^{14}C -標識プリンの取り込み

投与物質・処理 時間・培養液N濃度			アデニル酸比放射能A		グアニル酸比放射能G		G/A	
			A62-1	A62-2	A62-1	A62-2	A62-1	A62-2
アデニン- ^{14}C	6 hr	80 ppm	67.1	45.1	31.2	19.6	0.465	0.472
	6 hr	0 ppm	1.3	2.0	22.3	42.3	17.2	21.2
グアニン- ^{14}C	6 hr	80 ppm	1.8	2.1	35.6	39.3	19.8	18.7
	6 hr	0 ppm	82.6	62.3	44.8	33.4	0.543	0.530
ハイポキサンチン- ^{14}C	24 hr	80 ppm	24.7	28.6	11.5	15.8	0.466	0.553
	24 hr	0 ppm	—	—	—	—	—	—

注) 比放射能 1,000 cpm/μmole

第 22 表によれば、アデニン—8— ^{14}C 、ハイポキサンチン—8— ^{14}C 処理では「A 62—1」の比放射能が高く、グアニン—8— ^{14}C 処理では「A 62—2」が高いが、この程度の差から「A 62—1」の RNA 代謝回転速度が根粒の着生によって増大しているとは言えない。また、いずれの場合も両系統の G/A に差がなかったことから推して、根の核酸代謝が根粒の着生により影響を受け、アラントインの生成が促進されたと考えることはできなかった。

3) 論 議

植物の分化や生長に関連した核酸代謝の研究は多いが^{6,42,74,77)}、それらとアラントインの生成の三者を結びつける研究はほとんどない。一方動物では DINING¹⁶⁾がビタミン欠乏ラットの尿中に健全ラットの約 1.5 倍のアラントインが排泄されていることを見出した。このラットに燐酸— ^{32}P および蟻酸— ^{14}C 投与し、肝臓の RNA を構成するプリンスクレオチドの比放射能が健全ラットの約 3 倍に増大していたことを認め、ビタミン E 欠乏ラットでアラントインの排泄量が増大する原因が RNA の代謝回転速度が病的に増大することであり、その結果筋たんぱく合成の阻害と生育の抑制が起こると推論している。しかし、第 21, 22 表からは、根粒の着生により RNA の代謝回転速度が増大しているとは認められないので、大豆根におけるアラントインの生成が根粒の着生により促進される現象が RNA 代謝回転速度の増大よると考えることはできない。

BALIS²⁾らは *Aerobacter aerogenes* の突然変異種 (Purineless mutant) の一種、グアニン要求株が、培養液にキサンチンを集積することを発見した。この変異株はキサンチン酸からグアニル酸を生成する酵素、guanosine monophosphate synthetase を欠くために、菌体内にキサンチン酸を集積し、それが培養液に排泄され、脱燐酸されてキサンチンとして集積したものであると説明されている。この培養液に ^{14}C で標識したグリシンを添加し、菌体の RNA を構成するプリンスクレオチドの ^{14}C 取り込み状況を調査すると、アデニル酸に対するグアニル酸の比放射能の比、G/A が、野生株に比して著しく低かった。大豆でも、根粒の着生により核酸代謝に変化が起こり、アラントインの生成が促進されるものとするならば、プリンスクレオチドの比放射能に変化がみられる可能性がある。しかし、本実験結果では、グアニル酸とアデニル酸の比放射能の比、G/A について、根粒着生の有無、処理時間あるいは栽培条件による差は全く認められなかった。したがって、根粒の着生によるアラントイン生成の促進は、根粒が寄主に何らかの影響を及ぼし、Purineless mutant にみられたような核酸代謝の変化が生じた結果であると考えすることはできない。

根粒の着生によりアラントインの生成は促進されるが、上述のように核酸代謝の変化を認めることができなかったこと、および、蟻酸— ^{14}C を投与した前節の実験で、アラントインの ^{14}C 取り込み量に根粒着生の有無による差が認められなかったことから、現段階では、大豆におけるおもなアラントインの生成経路がプリンの酸化分解であると断定することはできない。

5. 摘 要

根粒の着生によりアラントインの集積が促進される生理的機作を明らかにし、その人為的調整の可能性の有無を知るために、 ^{14}C および ^{32}P —標識化合物を使用し、大豆根におけるアラントインの生成経路について検討を加えた。

植物におけるアラントインの生成経路としては、二つの仮説が提出されているが、その一つ、尿素とグリオキシル酸の縮合によるアラントインの生成は、大豆において確認することができなかった。

プリンの酸化分解については、プリン—8— ^{14}C と蟻酸— ^{14}C をトレーサーとして使い、大豆においてもアラントインがプリンの酸化分解によって生成されうろという結論を得た。

大豆のアラントインの大部分がプリンの酸化分解の産物であることを確認するためには、根粒の着生状況、アラントインの集積量および根の核酸または核酸関連物質の代謝の三者間に因果関係の存在をうらづける相互の関連性が解明されなければならない。しかし、これまでの実験から得られた結果は、

1. 大豆のアラントイン生成の前駆物質とみられる蟻酸およびプリンを ^{14}C で標識して投与した場合、 ^{14}C はアラントインに取り込まれるが、その取り込量には根粒着生の有無による差は認められなかった。

2. 根における核酸の代謝回転速度には、根粒着生の有無あるいは着生状況の差による増減は認められなかった。また、根の RNA を構成しているプリンヌクレオチドの放射能の取り込み状況、すなわちグアニル酸とアデニル酸の比放射能の比 G/A についても、根粒着生の影響は認められなかった。

したがって、根粒の着生によるアラントイン生成の促進が、根粒菌との共生によって生ずる何んらかの影響が根の核酸代謝に及んだ結果であると考えすることはできなかった。

VIII. 子実たんばくの生成におけるアミノ酸およびアラントインの生理的役割

1. ま え が き

すでにⅣで論じたように大豆のアラントインは他の植物の場合とは異なり、栄養生長の窒素源として重要な役割りを果たしているとは思われない^{26,27,28,29}。大豆では莢殻のアラントイン—N 濃度は茎よりも高く、窒素として 0.2~0.8% (対乾物) にも達し、全窒素の 1/2 を占める場合もある。

アラントイン濃度が茎や葉で著しく低い根粒非着生系統の大豆「A 62—2」「T 201」でも、通常、莢殻には 0.2% 前後のアラントイン—N の集積が認められる。このような事実から、アラントインは栄養生長よりも子実たんばく形成に重要な役割りを果たしているものと推定される。

アラントインは窒素の貯蔵形態であり、移動のための形態でもあり、急速に多量の窒素の供給を必要とする器官や組織に移動し、分解利用されるものである⁷⁵と考えられている。かえでやコンフリーにおけるそのような受容器官は新葉展開期の葉や茎であり、大豆では登熟期における莢である。したがって、大豆のアラントインが栄養生長よりも生殖生長の窒素源として重要であるということは、大豆の窒素代謝の特性とみることでもできるが、単に分解利用される器官が異なるだけであって、大豆のアラントインが本質的に異なる生理的役割りを有しているとは言えない。

アラントインが子実たんばく生成のための貯蔵窒素として、また、転流のための形態として有利であるためには、他の窒素化合物に比較して C/N 比が低いことと、移動性にまざることが必要である。アラントインの C/N 比は、0.86 であり、グルタミン (2.24)、アスパラギン (1.72) アルギニン (1.29) などに比して小さく、効率の高い形態とみることができるが、移動性についてはアミノ酸やアミドと比較してみる必要がある^{10,33,72,73}。

窒素施肥により、容易に莖葉中の濃度を上昇させることのできるアミノ酸やアミドが、アラントインよりも速かに莢殻→種皮→胚へと移動するものであるならば、アラントインの子実たんばく生成における重要性は、それほど大きいとは考えられない。移動性について、アラントインとアミノ酸やアミドを直接比較することは難しいので、まず、窒素施肥によって濃度を高めることのできるアスパラギン酸やアラニン、 γ -アミノ酪酸などの主要なアミノ酸が速かに胚に移動して、子実蛋白の生成に関与しうるか否か、あるいは、アミノ酸の種皮透過に選択性があるか否かなどについて検討するとともに、アラントインの生殖生長における役割りについても考察を加えることにした。

2. Vacuum infiltration により莢に吸収させた ^{14}C -標識アミノ酸の行動

1) 実験方法および材料

(1) 供試材料

北海道農試羊ヶ丘ほ場で栽培した大豆「長葉白」から、登熟中期に莢を採取し、子実の長径がほぼ成熟期の大きさまでに成長した 3 粒莢を選び供試した。

^{14}C -標識化合物

L-アスパラギン酸-(u)- ^{14}C	152 mCi/m mol
L-アルギニン-(u)- ^{14}C	112 mCi/m mol
L-ロイシン-(u)- ^{14}C	210 mCi/m mol
グリシン-(u)- ^{14}C	130 mCi/m mol
L-バリン(u)- ^{14}C	179 mCi/m mol
L-フェニールアラニン(u)- ^{14}C	75 mCi/m mol

ロイシン、バリン、アスパラギン酸は第一化学薬品から、他は RCC (The Radiochemical Centre) の製品を同位元素協会をとおして購入した。

(2) Vacuum infiltration

各標識アミノ酸、20 μCi を 100 ml のビーカーに入れ、莢 20 個を横にして詰める。No.10 のゴム栓で押え、水 20 ml を加え、莢を完全に水没させる。ビーカーを真空デシケーターに入れ徐々に空気を抜き、気圧を 10 mmHg まで下げ、発泡が止むまで約 10 分経過してから、急激に空気を入れる。この操作をさらに 1 回繰返した後、ビーカーの中身を内径 7 cm のシャーレに移し、一定時間室温で放置する。

(3) 放射性炭素の抽出、分離

莢を水洗し、莢殻、種皮、胚に分け、沸騰中の 80 % エタノール中に、約 30 分浸漬し、冷却後濾過する。残渣を乾燥し、薬研で粉碎し、さらに、エタノール抽出を 2 回反復する。抽出液は合わせ、100 ml とする。

濾液は混合し、ロータリーエバポレーターで (50°C 以下) 蒸発乾固させ、エーテルでリピッドを除き、Dowex 50 (H⁺100 メッシュ)、および、Dowex 1-X8 (OH⁻200~400 メッシュ) のカラムをとおし、カチオニック、アニオニック、ニュートラルの 3 フラクションに分ける。カラムからの溶出には 1:3 アンモニア水を用い、溶出液はロータリーエバポレーターで乾固し、50 % エタノール 6 ml に溶解した。ニュートラルフラクションも同様に乾固し、6 ml の 50 % エタノール溶液とした。

(4) 放射能の測定

抽出残渣については、0.5 g をステンレス製試料皿 (直径 25 mm) に取り、アロカ JDC-102

型ガスフローカウンターで測定した。

エタノール抽出物の各画分の放射能は、濃縮液 0.1 ml を 1.5 cm × 7 cm の濾紙に吸着させ、その濾紙を試料びんに入れ、テン 263 型液体シンチレーションカウンターで測定した。シンチレーターはトルエンに、POPOP 0.01 %, DPO 0.4 % を溶解させたものである。

(5) ペーパークロマトグラフィー

東洋濾紙 No. 51 (40 × 40 cm) を使用し、展開剤としては、1 % の濃アンモニア水を添加した水飽和フェノールおよびブタノール、酢酸、水 (4:1:1) 混液を用い、下降法で二次元展開した。

(6) オートラジオグラフィー

ペーパークロマトグラムを X 線用カセットに入れ、X 線フィルム (252mm × 303mm Cronex II, ジュポン) を用いてオートラジオグラムを作成した。露出時間は約 3 ヶ月である。

2) 実験結果ならびに考察

Vacuum infiltration は過激な処理法であるため、投与アミノ酸が瞬間的に胚にまで浸入するおそれがある。その有無を確かめるため、 ^{14}C —標識アルギニン、グリシン、ロイシンを供試し、処理直後、4 時間後および 24 時間後に、 ^{14}C がどこまで浸入しているかを調査した結果が

第 23 表 Vacuum infiltration により吸収させた ^{14}C —アミノ酸の移行状況

—1 80 % 熱アルコール可溶性画分

cpm/ml アルコール抽出液

部位・ アミノ酸	処理時間	英 殻			種 皮			胚		
		0	4	24	0	4	24	0	4	24
Arg		—	1,380	3,920	—	75	471		111	2,040
Gly		528	633	3,030	2	81	714	rt	274	2,780
Leu		—	588	1,026	—	70	74		240	1,830

—2 80 % 熱アルコール抽出残渣

cpm

部位・ アミノ酸	処理時間	英 殻		種 皮		胚	
		4	24	4	24	4	24
Arg		4,120	25,200	384	3,460	55	932
Gly		3,130	12,300	232	2,860	60	1,320
Leu		3,640	16,500	190	1,420	192	270

注) 測定サンプル量は英殻、胚は 0.5 g 種皮は少量であったので全量 (0.2~0.3 g)。

第 23 表である。処理直後は英殻には浸入しているが、種皮、胚にはほとんど放射能の汚染がない。時間の経過にしたがって、放射能が高くなっている。したがって、Vacuum infiltration によって、 ^{14}C —標識アミノ酸が浸入するのは、英殻までで、処理 4 時間以後に計測された種皮や胚の放射性炭素は、機械的な作用で移行したものではないとみることができる。下段の抽出残渣の放射能についても、同様な傾向が認められ、英殻→種皮→胚への転流と、可溶性低分子化合物の高分子化合物への取り込みが行なわれたことを示すもので、処理後 24 時間は分離英の生理的活性が維持されていたものと推定される。したがって、アミノ酸の種皮透過に選択性があるとするならば、この実験条件でもそれが実験結果に現われるものと期待される。

そこで、第 24 表に示される 5 種類の ^{14}C —標識アミノ酸を、Vacuum infiltration によって吸収させ、24 時間後、80 % 熱エタノールで抽出し、カチオニック、アニオニック、ニュウトラルの 3 フラクションに分画し、放射能を測定した。第 24 表によれば、投与したいずれのアミノ酸の炭素鎖も種皮をとおり、胚に到達しているが、放射性炭素の取り込みはアミノ酸の種

第24表 Vacuum infiltration により莢に吸収させた ^{14}C 標識アミノ酸
の炭素鎖の80%熱エタノール可溶性画分への移行状況

 $\mu\text{Ci}/20\text{ pods}$

部位・ 投与アミノ酸	画分	カチオニック	アニオニック	ニュートラル	計
莢 殻	Arg	428 (72)	39 (7)	129 (22)	596
	Leu	261 (67)	44 (11)	87 (22)	392
	Val	161 (38)	42 (10)	225 (52)	428
	Asp	166 (21)	157 (19)	488 (60)	811
	Phe	232 (21)	88 (8)	806 (71)	1,126
種 皮	Arg	94 (75)	13 (10)	18 (15)	125
	Leu	6 (20)	12 (38)	14 (42)	32
	Val	10 (12)	12 (14)	63 (74)	85
	Asp	26 (12)	58 (26)	140 (62)	224
	Phe	17 (9)	43 (23)	125 (68)	185
胚	Arg	145 (64)	33 (14)	49 (21)	227
	Leu	15 (30)	21 (40)	15 (30)	51
	Val	20 (32)	20 (32)	23 (36)	63
	Asp	29 (15)	102 (52)	66 (33)	197
	Phe	36 (23)	85 (53)	39 (24)	158

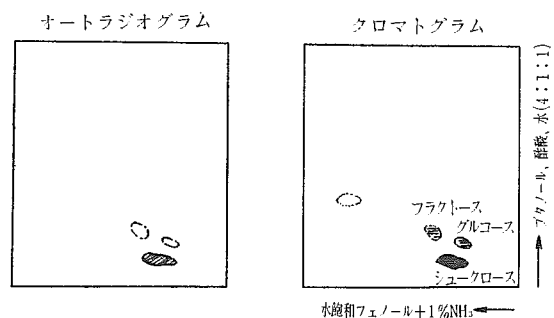
注) () 内は計に対する比率 %

類によって差がみられる。

量的には、フェニールアラニン、アスパラギン酸、アルギニンを投与した莢で多く、ロイシン、バリンでは少ない。3フラクションの比率については、アルギニンを投与した莢の各部位におけるカチオニックフラクションの比率が他のアミノ酸を投与した莢に比して著しく高い。

種皮と胚のエタノール抽出物のカチオニックフラクションのペーパークロマトグラムのオートラジオグラフィーにより、放射能の移行状況を調査した。供試した5アミノ酸のうち、その炭素鎖が代謝されずに、投与されたままの形で多量に種皮や胚に存在しているのはアルギニンのみである。アスパラギン酸およびフェニールアラニンを投与した莢の種皮のオートラジオグラムでは、おのおのの投与したアミノ酸の淡いスポットが認められたが、胚のオートラジオグラムでは検出されなかった。ロイシンとバリン投与莢の種皮と胚のオートラジオグラムでは、ロイシン、バリンの位置に淡い黒変部が認められた。投与アミノ酸の種類にかかわらず、オートラジオグラムで普遍的に濃厚なスポットとして現われるアミノ酸はグルタミン酸であり、それにつぐものは γ -アミノ酪酸とアラニンである。

莢殻のカチオニックフラクションについても種皮、胚と同じ方法で検討したが、どのアミノ酸を投与した場合でも、投与したアミノ酸のスポットが最も濃厚であり、その他にはグルタミン酸、 γ -アミノ酪酸、アラニンの黒変部が共通的に認められた。



第26図 フェニールアラニン- (u) - ^{14}C 投与莢の種皮の80%熱エタノール可溶性ニュートラルフラクションのオートラジオグラム

第26図はフェニールアラニン-(u)- ^{14}C を投与した莢の種皮のニュートラルフラクションのペーパークロマトグラムとオートラジオグラムである。ペーパークロマトグラムの発色はエールリッヒ試薬を噴霧し、加熱した後、さらにアンモニア性硝酸銀溶液で発色させたものである。シュクロースはエールリッヒ試薬の塩酸により加水分解されたために、還元性を示したものと考えられる。比較的鮮明な4個のスポット、すなわち、グルコース、フラクトース、シュクロースおよび未同定の淡い、1個のスポットが認められるが、それらの発色の強度はシュクロースが最も濃い。また、オートラジオグラムの黒変部の濃さはシュクロースが最高である。したがって、シュクロースは濃度および放射能の取り込みともに他の糖より著しく多い。

フェニールアラニン以外のアミノ酸を投与した莢の種皮のニュートラルフラクションについても、全く同様なオートラジオグラムが得られた。

3) 論 議

本実験は、大豆の胚への物質の転流に対して種皮が選択性を発揮し、とくに、アミノ酸、アマイドについては、すべての種類のアミノ酸やアマイドが容易に種皮を透過するものではないという作業仮説を立て、それを立証しようとしたものである。上記の分画法ですべてのアミノ酸がカチオニックフラクションに入り、さらにカチオニックフラクションに取り込まれた放射性炭素の主要部分がアミノ酸とアマイドに取り込まれていると仮定して第24表を検討すると、アルギニンの種皮透過性は他の4種のアミノ酸に比して、著しく大きいと考えることができる。したがって、上記の作業仮説は正しいようにみえる。しかし、これは吸収されたアルギニンの炭素鎖が代謝されにくく、アルギニンの大半が変化せずに存在しうのに対して、他のアミノ酸、とくにフェニールアラニンやアスパラギン酸の炭素鎖が莢殻の組織中で代謝されやすく、すみやかに他の成分に移行するために、このような結果となったものとも考えられる。その可能性については、第24表から明確な結論を求めることはできないが、莢殻のカチオニックフラクションのオートラジオグラフィーで、アルギニン以外のアミノ酸投与の場合でも、おのおのの投与されたアミノ酸が高濃度で検出されており、また、第24表の莢殻のカチオニックフラクションの放射能もアルギニン投与の場合の $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ に低下しているにすぎないので、それらのアミノ酸がアルギニンと比較して代謝されやすいことのみが原因となって、種皮や胚におけるそれらのアミノ酸の放射能が著しく低くなったとは考えられない。そのおもな原因はアミノ酸の種皮透過に選択性があり、アルギニン以外の供試アミノ酸の種皮透過性が著しく小さいためと考えられる。

第24表の種皮に関する数値から推して、アルギニン以外のアミノ酸の炭素鎖の大半は、ニュートラルフラクションとして胚に転流するものと考えられる。第26図から明らかなように、ニュートラルフラクションの中では、シュクロースが主要部分を占めている。昆野⁴⁴⁾らは登熟初期における大豆子実の糖組成の推移を調査して、登熟初期にはグルコース、フラクトース、ゲンチオビオースが主要部分を占めているが、開花3週間以後では、シュクロースが大部分を占めることを報告しており、本実験結果の糖組成もこれに近いものと思われる。オートラジオグラフの黒変もシュクロースのスポットが最も高濃度であり、フェニールアラニンの炭素鎖は主としてシュクロースに再生されて、種皮を透過していると考えられる。他のアミノ酸を投与した莢についても類似したオートラジオグラムが得られているので、一般的には Vacuum infiltration により吸収させたアミノ酸の炭素鎖は代謝され、主としてシュクロースに再生されて種皮を透過すると考えられる。

Vacuum infiltration は多量の標識化合物をすみやかに組織に吸収させるには有利である

が、莢の全表面から滲透させたアミノ酸が、自然な状態で通導組織をを通して送り込まれたアミノ酸と同じように行動するという保証はない。そこで、より自然な形でアミノ酸の行動を調査するため、莢の切り口から蒸散流にのせて吸収させ、追跡することにした。

3. 莢の切り口から吸収させた ^{14}C —標識アミノ酸の行動

1) 実験方法および材料

Ⅷ—2 の実験結果から、種皮のアミノ酸に対する透過性には選択性があり、供試アミノ酸のうち、アルギニンのみを速やかに透過させると推定したが、その選択性はアミノ酸の分子構造に原因があると予想される。そこで、アルギニンのグアニジン基に注目し、供試アミノ酸にカナバニンを追加した。さらに、アルギニン以外のアミノ酸の炭素鎖の大半がシュクロースとして、種皮を透過すると予想されたのでシュクロースについても検討することとした。

(1) 供試材料

前節と同様な登熟中の大豆莢を供試した。投与 ^{14}C —標識アミノ酸は、カナバニンの他はⅧ—2 で供試したものと同種のアミノ酸—(u)— ^{14}C 6 種類である。

カナバニン—(グアニド)— ^{14}C 120 mCi/m mol

シュクロース—(u)— ^{14}C 25.3 mCi/m mol

カナバニンは RCC の製品を日本同位元素協会から、また、シュクロースは第一化学薬品より購入した。

(2) ^{14}C —標識化合物の投与方法

各標識化合物、20 μCi を 10 ml の純水に溶かし、内径 3.3 cm 深さ 1.7 cm のシャーレに入れ、莢 20 個を切り口を下に向けて、シャーレの中に立てる。室内に静置し、蒸散を促すため扇風機で送風し、溶液の減少は純水で補った。24 時間後水洗し、前節と同様の方法で抽出、分画した。

(3) ペーパークロマトグラムの放射能の測定

二次元ペーパークロマトグラム上の放射能の測定は、ニンヒドリン発色部分を切り抜き、試料びんに入れ、液体シンチレーションカウンターで測定した。

(4) たんぱく質加水分解物中のアミノ酸の分離および放射能の測定

胚の熱エタノール抽出残渣をソックスレーの装置を用い、エーテルで抽出し、その残渣 200 mg を容量 5 ml のアンプルに入れ、6 N 塩酸 2 ml を加えて封じ、圧力 2 kg/cm² のオートクレーブで 3 時間加熱し、加水分解する。分解完了後希釈し、18 mm×150 mm の Dowex 50(H⁺ type 100 メッシュ) および Dowex 1—X 8 (OH⁻ type 100 メッシュ) カラムにとおし、カチオニック、アニオニックおよびニュートラルの 3 画分に分け、前節における熱エタノール可溶性成分と同様の方法で、放射性炭素の取り込みを調査した。

2) 実験結果ならびに考察

第 25 表、26 表はエタノール抽出液および残渣の放射能を測定した結果である。ロイシン、バリン投与莢の抽出残渣の放射能が比較的高いことと、アスパラギン酸およびフェニールアラニンを投与した莢のエタノール可溶性ニュートラルフラクションの放射能が低いことはⅧ—2 の実験結果とは異なる点であるが、グアニジン基を持つ両アミノ酸を投与した莢の種皮と胚のカチオニックフラクションの放射能が他のアミノ酸処理に比して、著しく高いことは予想されたとおりである。

第25表 英の切り口から吸収させた ^{14}C -アミノ酸の炭素鎖の分布

画分・ 部位 アミノ酸	アルコール抽出残渣 cpm			熱アルコール可溶性成分 μCi		
	英 殻	種 皮	胚	英 殻	種 皮	胚
Arg	2,618	504	218	685	52	73
Can	1,198	174	60	753	105	186
Asp	1,100	187	126	316	12	15
Leu	2,848	257	258	306	17	18
Val	2,169	147	162	293	13	12
Phe	1,898	64	56	456	21	14
Gly	725	53	84	356	28	17

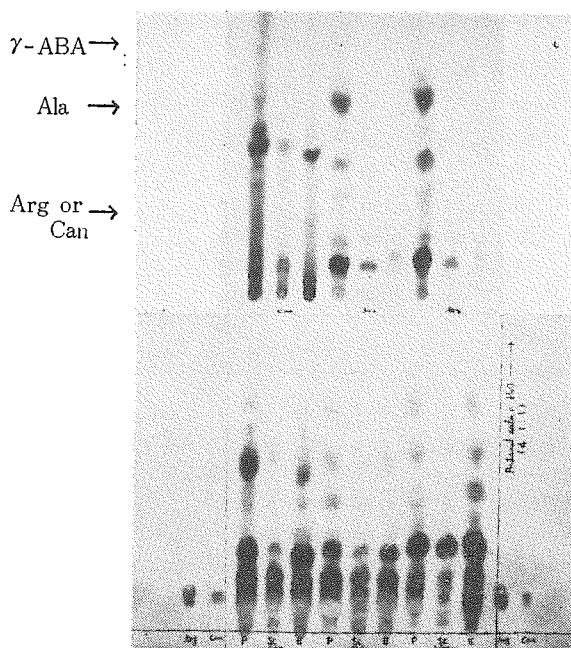
注) アルコール抽出残渣 cpm/0.5 g (但し種皮は全量 0.2~0.3 g 当たり), アルコール可溶性成分については 20 英当りに換算。

第26表 英の切り口から吸収させた ^{14}C -アミノ酸の炭素鎖のカチオニック, アニオニック, ニュートラルフラクションへの取り込み

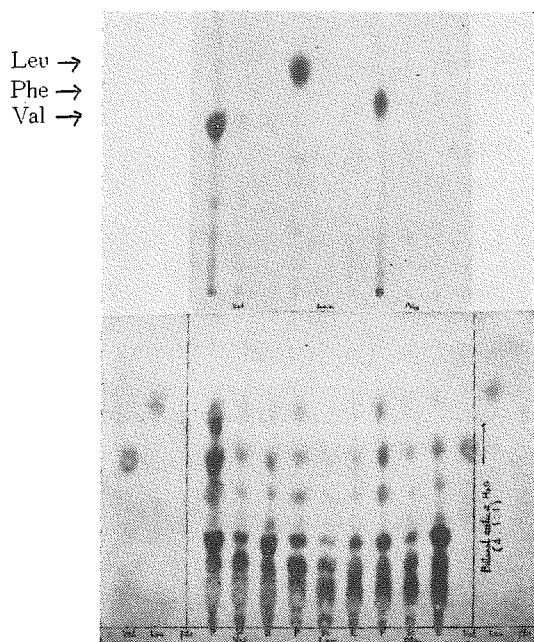
部位・ アミノ酸	フラク ション	カチオニック	アニオニック	ニュートラル	計
英 殻	Arg	366 (70)	89 (17)	64 (12)	519
	Can	482 (83)	49 (9)	48 (8)	579
	Asp	68 (32)	115 (55)	28 (13)	211
	Leu	162 (72)	33 (16)	15 (7)	210
	Val	175 (80)	22 (10)	22 (10)	219
	Phe	204 (71)	38 (13)	44 (16)	286
	Gly	105 (44)	64 (26)	72 (30)	241
種 皮	Arg	20.4 (54)	5.6 (15)	11.8 (31)	37.8
	Can	82.8 (84)	12.4 (13)	3.9 (4)	99.1
	Asp	2.9 (27)	2.1 (20)	5.7 (53)	10.7
	Leu	6.5 (57)	3.7 (32)	1.7 (11)	11.9
	Val	5.0 (56)	2.6 (29)	1.3 (14)	8.9
	Phe	7.4 (41)	8.1 (46)	2.3 (13)	17.8
	Gly	3.9 (25)	4.2 (26)	7.8 (49)	15.9
胚	Arg	39.7 (61)	16.7 (26)	8.3 (13)	64.7
	Can	139.8 (91)	9.8 (6)	4.6 (3)	149.6
	Asp	4.4 (33)	3.2 (23)	5.9 (24)	13.5
	Leu	9.0 (58)	4.9 (32)	1.6 (10)	15.5
	Val	6.6 (79)	1.1 (13)	0.7 (8)	8.4
	Phe	5.3 (48)	4.6 (45)	0.8 (7)	11.0
	Gly	4.2 (31)	5.6 (41)	3.9 (28)	13.7

注) () 内は比率% μCi 供試 20 英に換算。

第 27, 28 図は, ^{14}C -標識アミノ酸を投与した英のエタノール可溶性カチオニックフラクションの一次元 (展開剤, ブタノール, 酢酸, 水) ペーパークロマトグラムと, そのオートラジオグラム (上段) である。第 27 図の左からカナベニン, アルギニン, 参考としてアルギニンを Vacuum infiltration により吸収させたもの, 第 28 図はバリン, ロイシン, フェニールアラニンの順で, おのおのについて英殻, 種皮, 胚の抽出物を並べてある。このオートラジオグラムから明らかなように, 英殻 (P) の抽出物では, いずれもおのおのの投与アミノ酸のスポッ



上段 オートラジオグラム
 第27図 Can-(guanido)- ^{14}C , Arg-(u)- ^{14}C 投与英
 のカチオン性フラクションのペーパーク
 ロマトグラムとそのオートラジオグラム



上段 オートラジオグラム
 第28図 Val-(u)- ^{14}C , Leu-(u)- ^{14}C , Phe-(u)- ^{14}C 投与
 英のカチオン性フラクションのペーパーク
 ロマトグラムおよびそのオートラジオグラム

トに最も多量の放射能が検出されている。その他、アルギニン投与では γ -アミノ酪酸、アラニン、およびグルタミン酸に放射性炭素の取り込みが多く、カナバニン投与では分離が不完全なため、どのアミノ酸に放射性炭素が取り込まれたか明らかでない。

種皮 (SC) の抽出物では、投与されたアミノ酸のスポットに放射性炭素の存在が確認できるのは、アルギニンとカナバニンでバリンも淡い黒変が認められる。しかし、ロイシンとフェニールアラニンの投与では感光は認められない。

胚 (E) の抽出物についても、明瞭なスポットが認められるのは、カナバニンとアルギニンで、他のアミノ酸投与ではほとんど感光は認められない。カナバニン投与では、カナバニンとそれ以外にその分解生成物と考えられる未同定の濃厚なスポットが認められる。

これらのオートラジオグラムおよび第 26 表から推定されることは、7 種のアミノ酸を分離英の切り口から吸収させた場合、グアニジン基を持つアルギニンとカナバニンが、そのままの形で容易に種皮を透過して胚に到達しようということである。しかし、この実験結果のみからはただちに両アミノ酸以外のアミノ酸がそのままの形では全く種皮を透過しないと判断することはできない。むしろ逆に、それらのアミノ酸の種皮透過速度が大きいために、種皮におけるその濃度が著しく低くなり、また、胚についてはそのアミノ酸のたんばくへの取り込みがすみやかなために、遊離のアミノ酸として存在しえず、第 28 図または第 26 表のような実験結果が得られたとも考えることができる。この疑問点を解決するため、 ^{14}C -アミノ酸の子実たんばくへの取り込み状況を調査した。

第 27 表 ^{14}C -標識化合物を吸収させた胚の 80 % 熱エタノール抽出残渣の加水分解物の放射性炭素

フラクション 標識化合物	分画後放射性炭素				分画前加水 分解物の 全放射能	エーテル 可溶物
	カチオニック	アニオニック	ニュートラル	合計		
Arg	82.5	0.2	42.5	125.2	152.3	134.8
Leu	48.7	0.1	72.7	121.6	162.5	122.5
Phe	43.5	0.1	53.6	97.2	114.5	73.6
Sucrose	36.8	0.2	61.5	98.5	109.4	172.7

(注) 標識はいずれも μCi ラベル μCi 供試 20 莢当りに換算。

第 27 表は ^{14}C で標識されたアルギニン、ロイシン、フェニールアラニンおよびシュクロースを吸収させた英から取り出した胚の 80 % 熱エタノール抽出残渣を塩酸加水分解し、イオン交換樹脂で 3 フラクションに分け、おのおのフラクションの放射性炭素の取り込みを調査した結果である。さらにそのカチオニックフラクションについては、二次元ペーパークロマトグラムに展開し、アミノ酸のスポットの放射能を測定した。これを 80 % 熱エタノール可溶性アミノ酸と対比させた表が第 28 表である。

第 28 表によると、80 % 熱エタノール可溶性のカチオニックフラクションでは、前述のオートラジオグラムから明らかなように、アルギニンを投与した英のアルギニンには、多量の放射能が取り込まれており、ロイシンおよびフェニールアラニン投与英のおおのロイシンまたはフェニールアラニンには、ほとんど取り込まれていない。しかし抽出残渣の加水分解液のロイシンやフェニールアラニンには、アルギニンよりは少ないが ^{14}C が取り込まれている。したがって、ロイシンやフェニールアラニンの炭素鎖が投与されたままの形で種皮を透過している可能性を否定することはできないが、アルギニンに比して著しく少ない量であると考えらるこ

第28表 莢の切り口から ^{14}C -標識化合物を吸収させ、その胚の80%熱エタノール可溶性、および抽出残渣のアミノ酸の ^{14}C 取り込み

画分・ アミノ酸	80%熱エタノール可溶性				80%熱エタノール抽出残渣 (加水分解物)			
	Arg	Leu	Phe	Sucrose	Arg	Le	Phe	Sucrose
Asp	2.1	0.1	0.2	1.6	4.2	1.2	2.6	2.4
Asp-NH ₂	0.2	0.1	0.3	2.3	—	—	—	—
Glu	6.7	3.7	2.6	10.5	18.3	4.8	8.2	7.2
Gly	—	—	—	0.5	0.9	0.1	1.0	0.5
Thr	—	—	—	0.1	0.6	0.2	0.6	0.2
Ala	1.2	1.8	1.6	2.1	3.6	1.0	2.3	1.3
γ -ABA	5.2	1.4	0.2	2.1	—	—	—	—
Phe	—	—	0.2	—	—	—	0.3	—
Val	—	0.1	0.1	0.1	0.5	0.2	0.4	0.3
Leu	—	0.2	0.1	0.2	1.2	1.3	0.8	0.4
Arg	20.5	0.1	0.2	0.4	10.8	1.2	1.5	1.6
Total	49.7	9.0	5.3	21.4	46.5	16.7	21.6	16.5

注) μCi 供試20莢当りに換算。

(1969)

とができる。

これらの3アミノ酸の投与で、共通して多くの放射性炭素を取り込んでいるアミノ酸は、グルタミン酸、 γ -アミノ酪酸とアラニンであり、それはシュクロースを投与した場合も同様である。また、これらのアミノ酸は TCA サイクルに近縁なアミノ酸であることなどから、胚においてシュクロースの形で転流してきた放射性炭素を利用して合成されたものと考えた方が妥当である。ただしアルギニンのように、特殊な分子構造を持つアミノ酸は、容易に種皮を透過しうると思われる。

3) 論 議

細胞膜のアルギニンの選択的透過は古くから注目されていた。HATTORI²¹⁾は *Chlorella ellipsoidea* の培養液のアルギニン濃度の減少がすみやかであることを発見し、その理由はアルギニンが選択的に吸収されるためであると推論した。NICKELL^{52,53,60,61)}らは砂糖きびの cell culture で、培養液へのアルギニン添加が特異的に生長を促進することを発見し、その現象は細胞膜のアルギニン透過性が他のアミノ酸より大きいために生じたものと推論した。またアルギニンはたんぱく合成の素材であるばかりでなく、アラントイン同様、C/N 比が小さく、窒素の貯蔵や移動の役割りを果たしていると考えられる^{64,65,84,85)}。種子たんぱくにはアルギニン含量の高いものが多く、大豆でも^{34,79)}その濃度はグルタミン酸、アスパラギン酸について高い。SPLITTSTOESSER^{84,85)}は、かぼちゃの発芽時におけるアルギニンの消長を調査し、アルギニンが、窒素の移動に重要な役割りを果たしていることを報告している。

このように、アルギニンは植物の窒素代謝において、特異な生理的機能を持つと考えられ、上記の実験結果もその一面が現われたものと言える。しかし、大豆の莢殻や種皮のエタノール抽出液のペーパークロマトグラムのニンヒドリン発色強度から推して、アルギニン濃度は、グルタミン酸や γ -アミノ酪酸などに比して決して高くはない。したがって、この実験結果から、ただちにアルギニンが大豆莢における窒素の移動に重要な役割りを果たしていると断定することはできない³⁴⁾。

また、本実験ではアルギニン、カナバニン以外のアミノ酸の炭素鎖が投与されたままの形で

胚に移動しにくいという実験結果に基づき、それらのアミノ酸の種皮透過性が著しく小さいと推定したが、アミノ酸の炭素鎖がそのままの形で転流しないということと、そのアミノ酸の種皮透過性が小さいということとは別問題であるかも知れない。この疑問点の解明は、 ^{14}C —標識アミノ酸のトレーサー実験のみからでは不可能と考えられるので、今後、方法を変えて検討して行きたい。

4. アラントインの子実たんばく生成における生理的役割

Ⅳでは、莖葉におけるアラントイン濃度と相対生長率を対比することにより、アラントインが栄養生長とは関係のうすい窒素形態であると推定したが、子実たんばく生成の窒素源としての分解利用についても、現在、まだ推論の域を出ていない。

アラントインの分解過程については、VALENTINE⁹⁹⁾や VOGELS^{93, 94, 95, 97)}らが、バクテリアのアラントイン代謝の研究で、分解酵素を分離、精製し、その性質を明らかにした。しかし植物については、NAGAI⁵⁸⁾らが緑豆の発芽時におけるアラントインの生成、分解について研究し、アラントイネースを検出しているが、アラントイケースについてはふれていない。その後、LEE⁴⁹⁾や ORY⁶⁰⁾らも castor bean soybean および酵母からアラントイネースを検出したが、アラントイケースは酵母以外からは検出できなかった。筆者も、大豆の莖、葉、莢殻、子実などからアラントイネースを検出することができたが、アラントイケースの活性を確認することはできなかった。このように、アラントインの分解過程は植物組織ではまだ解明されておらず、大豆の子実たんばく生成の窒素源としての重要性も間接的立証に止まらざるをえない。

Ⅶでは、蟻酸— ^{14}C を根から吸収させ、アラントインに ^{14}C を取り込ませることができたが、そのアラントインの行動を第 20 表から推測してみる。開花期では「A 62—1」, 「A 62—2」ともに、莖葉に放射性アラントインが存在し、放射性炭素の取り込み量にも大差はないが、結莢期の「A 62—2」の莖葉のアラントインには放射能が検出されなかった。これは、「A 62—2」の根で新たに生成されたアラントインが、莖に滞留蓄積されることなく素通りして、莢に転流したことを示すもので、莢殻には「A 62—1」より多量の放射能が、アラントインに取り込まれている。結莢期の「A 62—1」では、莖に多量のアラントインが集積しており、根から送り込まれる放射性アラントインが、莖のそのプールに混入される。「A 62—1」の莖葉のアラントインに放射能が検出されたのは、莖のアラントインのプールから徐々にアラントインが莢に移行するためである。

このように、アラントインは根で生成され、莖と葉に貯蔵されるが、莢が形成されると、莢に移動し、子実たんばく生成の窒素源として分解、利用されるものと考えられる。

莢殻に転流したアラントインが、アラントインの形で種皮を透過するか、あるいは、莢殻で分解され、別の化合物として種皮を透過しているかについて、明確な判断の材料はない。しかし、第 29 表に示すように、微量ではあるが、種皮や胚にもアラントイン酸は検出されており、アラントインも種皮には、存在が認められているので、アラントインが種皮を透過しないとは言えない。また、Ⅱ章における黄化莢の調査結果では、健

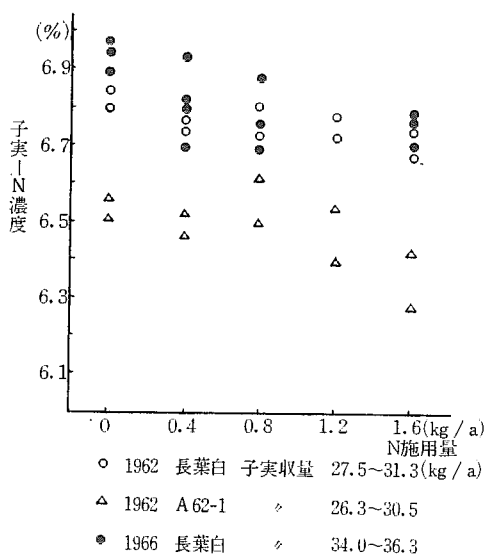
第 29 表 莢の各部位におけるアラントイン-N 濃度
mg/生体 100 g

部位	莢 殻	柔組織	種 皮	胚
生 体 重 g	73.2	3.1	3.2	39.3
アラントイン -N	24.3	28.8	1.0	0.0
アラントイン酸 -N	57.6	43.2	1.2	0.7

土耕ポット栽培大豆「長葉白」より採取 (1967)
柔組織：莢殻と種皮の中間にある白色の組織
アラントインにはアラントイン酸を含まない。

全英の子実のアラントイン濃度は著しく低いが、黄化英では高濃度であった。これはアラントインの種皮透過性が大きく、胚にすみやかに移行するが、そこではすでにアラントインの分解やアミノ酸合成が停止しているために、分解利用されることなく集積されたとみることができる。

このように、アラントインの種皮透過性が大きく、子実たんばく生成の窒素源として、有利な窒素形態であるとするならば、アラントインの集積量が多いほど、子実たんばく濃度が高いと予想される。ほ場や土耕ポット栽培の大豆では、窒素施用量が少なく、根粒着生良好なほど、アラントイン集積量が多いので、窒素施用量が少ないほど、子実窒素濃度が高いと推定される。赤城らは、12品種の大豆を無窒素区、窒素0.2 kg/a 施用区、0.4 kg/a 施用区で栽培し子実窒素濃度を比較検討した結果、3品種が無窒素区で最高濃度を示し、8品種が0.2 kg/a 施用区で最高であった。0.4 kg/a 施用区が最高であったのは1品種のみであった。筆者も、ほ場で窒素用量試験を行ない、気象条件に恵まれ、栄養生長が旺盛で多収の得られた年には、窒素施用量の少ない区ほど子実窒素濃度の高いことを認めている。第29図は1962年(琴似ほ場)と1967年(羊ヶ丘ほ場)での調査結果であるが、いずれも無窒素区が最高である。低温や寡照で生育の抑制された年では、概して無窒素区の子実窒素濃度が低く、一定の傾向が認められない。また、BCB投与により、アラントイン濃度の上昇をはかった場合、子実収量や千粒重は多少減少するが、子実窒素濃度が上昇することが認められている²⁹⁾。これらの例は、アラントインが子実に選択的に移行し、子実たんばく生成に関与



第29図 窒素用量試験大豆の子実窒素濃度 (高収年) 乾物 %

していることを裏付けるものと思われる。

5. 摘 要

窒素肥料の多用による乾物総生産量の増大が子実収量の増大に結びつかない理由の一端が種皮のアミノ酸透過に対する選択性にあり、窒素の多用によって容易にその体内濃度を高めることのできるアミノ酸、アミドの大部分が、そのままの形では種皮を透過しにくいためであると想定し、それを立証しようとした。

Vacuum infiltration および英の切り口から吸収させた7種の¹⁴C—標識アミノ酸のうち、投与されたままの形で種皮を容易に透過していることが認められるアミノ酸は、アルギニンとカナバニンである。

吸収された¹⁴C—標識アミノ酸の炭素鎖の大半は英穀中で代謝され、糖や種々のアミノ酸に再合成される。¹⁴Cを多量に取り込む糖はシュクロースであり、アミノ酸としてはグルタミン酸、 γ -アミノ酪酸、アラニンの放射能が高い。

種皮や胚のグルタミン酸、 γ -アミノ酪酸、アラニンにも¹⁴Cの取り込みが認められるが、これらのアミノ酸の¹⁴C—の大部分は、シュクロースの形で種皮や胚に転流し、そこでアミ

ノ酸合成に利用されたものであると推定される。莢殻で生成された ^{14}C —グルタミン酸などのアミノ酸が種皮や胚に移行したものでないと考えた方が妥当である。

アラントインは栄養器官では分解利用されにくく、莢の形成後は莢に移行し、集積される。子実の肥大にともない、種皮を透過し、子実たんばくの生成の重要な窒素源となると考えられる。

以上の実験結果から、窒素の多用により茎葉中における濃度が上昇するアミノ酸、アミドは主として栄養生長に関与するものであり、根粒の着生により生成が促進されるアラントインは主として生殖生長、すなわち、子実たんばくの生成に重要な役割りを果たすものであると推定される。また、このことは窒素肥料の多用が栄養生長のみを促進し、子実たんばくの生産増に結びつかない理由の一部をなすものと考えられる。

IX. 総合論議および要約

1. 総合論議

大豆の窒素吸収量を高めることは、窒素肥料の増施によって容易に達成できるが、それを増収に結びつけることは難しい²⁴⁾。窒素の多用は開花数を増大させるが、落花、落莢を増大させるし、また過剰に吸収された窒素が茎葉の過繁茂を促進し、倒伏などの原因となり収量と品質の低下をまねく。大豆の収量を高めるには、開花数の50%以上におよぶと言われている花器脱落を防ぎ、莢数を確保することが第一条件であり、つぎには登熟期における光合成能を高く維持することと、根からの円滑な養分吸収を確保することが必要条件となる。後者の課題については、気象条件に左右される要素が多く、とくに北海道では8月下旬からの気温の低下や9月末の早霜の襲来により登熟が阻害され、粒重が著しく低下する年がある。著者が過去9年にわたり栽培した「長葉白」の千粒重は160~230 gの範囲におよび、年次変化が大きい。また、落花、落莢は正常な栽培条件下での健全な作物の生理的平衡作用として、自然発生的な摘花、摘果の効果により粒の肥大を助けるためのものであるとの見方もある⁵⁹⁾。したがって、粒数を確保することが必ず増収に結びつくとは限らない。しかし子実収量を高めるには、粒数を確保することが前提条件であるということではできる。

筆者は莢への代謝産物の供給不足や不均衡が莢の発育を阻害し、花器脱落の主な原因となっていると想定し、大豆の代謝産物の動向を調査検討した。発育停止莢(黄化莢)の成分調査結果や窒素の多用による栄養生長の促進が下位節位の結莢率の低下をまねく事実などから、莢の発育の制限因子が光合成産物であり栄養生長と莢の発育の間の生長競合による光合成産物の莢への供給の制限が莢の発育を阻害していると推定した。このような原因で発生する花器脱落の防止には、結莢期以前の栄養生長量を十分に確保し、その後は過度の栄養生長を抑制する必要がある。しかし栄養生長の抑制は市販の生育抑制物質(BCB, CCC, B ナイン)などの投与によっても可能であるが、光合成能¹²⁾の抑制をとまなうので、かりに落莢の防止に効果があったとしても、大きな増収は期待できない。

それを可能にするためには、まず栄養生長を規制している内部要因を洗い出し、他の代謝機能を阻害することなく、栄養生長をコントロールすることが必要であろう。

イネ科作物と異なり、大豆の茎葉の窒素濃度は登熟中期までは低下しない^{23,27)}。生育前半では、窒素施用量により体内窒素濃度も異なり、全窒素濃度が高いほどおう盛に生育する。結莢

期になると窒素施用量による全窒素濃度の差はほとんどなくなるが、生長速度はやはり窒素施用量の多いほど大きい^{26,29)}。水溶性窒素成分組成を調査した結果、相対生長率とアミノ酸(アミドを含む)濃度との間に、高い相関々係の存在を認めた²⁶⁾。アミノ酸濃度は窒素施用量の多い個体ほど高い。窒素施用量の少ない個体では根粒着生が多く、アラントイン濃度が高い^{26,47)}。アラントイン濃度と相対生長率との間に負の相関が認められることから、アラントインが栄養生長とは無関係な窒素形態であると推定した。したがって、窒素施用量が少なく、根粒着生状況が良好な個体で、全窒素濃度が低いにもかかわらず栄養生長が抑制される理由は、アミノ酸濃度が低くなり、その反面アラントイン濃度が高くなるためである。このように大豆の栄養生長はアミノ酸およびアラントイン濃度により左右されているとみることもできるが、逆に栄養生長を調整する他の内部要因があり、生長が抑制されると、結果として生ずる窒素の過剰がアラントインの生成を促進するとみられ、生長と可溶性窒素成分組成とは、いずれが原因であり、結果であるかは分らない。しかし、可溶性窒素成分組成は栄養生長を規制している栄養状態の指標となりうると言うことはできる。したがって、栄養生長をコントロールするには、アミノ酸およびアラントインの濃度の調整を計ることが一方法となりうる。

植物のアラントインは窒素の貯蔵形態であり、移動のための形態でもある^{56,75)}。C/N 比の低い状態で、あるいは、アンモニア毒性に対する解毒作用の産物として生成されるとも言われている。大豆が正常かつ自然に生育している場合、根粒の着生が良好なほどアラントインは高濃度となる。したがって、大豆のアラントインは根で生成され、根粒が何んらかの形でそれに関与しているものと予想される。しかし、根粒が寄主にアラントインの形で窒素を供給しているとは認められないし、また根粒菌がどのような機作で寄主のアラントインの生成に関与しているかは想像の域を出ない。根粒着生による何んらかの影響、たとえばアンモニアや生理的活性物質の供給などによって根の窒素代謝が攪乱され、その結果として全窒素濃度が上昇し、アラントインの生成が速進され、あるいは生育が抑制されたものと考えた方が妥当である。

植物におけるアラントインの生成経路としては、プリンの酸化分解および尿素とグリオキシル酸の縮合の二つの仮説が提出されているが⁷⁵⁾、現在では前者が有力である。しかし後者については尿素を用いたトレーサー実験によって実証することはできなかったけれども、それを否定するには、根の組織中における尿素の行動についてさらに十分な検討がなされなければならない。前者のプリンの酸化分解については、アラントインがプリンの生成および分解経路を経て生成されうるとを明らかにすることができたが、根粒の着生が根の核酸または核酸関連物質の代謝に影響を及ぼし、その結果としてアラントインの生成が促進されていることを証明することはできなかった。このことは大豆根で生成されるアラントインの主要部分がプリンの酸化分解によって生成されたものであるという考え方に、検討の余地があることを示すものである。また大豆根で多量に生成されるアラントインがプリンの代謝経路のような複雑な経路を経て生成されなければならぬということには理解しにくい面がある。

アラントインの生成の促進、核酸代謝および根粒の着生の三者の関連性を明らかにすることはできなかったが、根の発育が根粒着生によって抑制される事実やアラントインの集積量の多い個体で生育が抑制される事実等は中間に核酸代謝の変動が介在することを予想させる。すなわち、生育にはたんぱく合成が必要であり、そのたんぱく合成には核酸の合成がともなう筈である⁴²⁾。根粒の着生による何んらかの影響により、寄主の核酸代謝が攪乱され核酸合成が阻害されることにより、生成されるプリンが過剰となり、それがアラントインとなると考えること

ができる。一方、核酸合成の阻害は生育の抑制に結びつく。

アラントイン濃度と相対生長率との間に負の相関があることから^{26,32)}、大豆の茎葉でアラントインが分解利用されにくいと推定したが、茎で高濃度に集積されることや、莢の形成後はすみやかに莢殻に集中すること、あるいは発育停止莢の子実を高濃度のアラントインが検出されることなどから子実たんばくの形成に重要な役割りをになう窒素化合物であると考えられる。

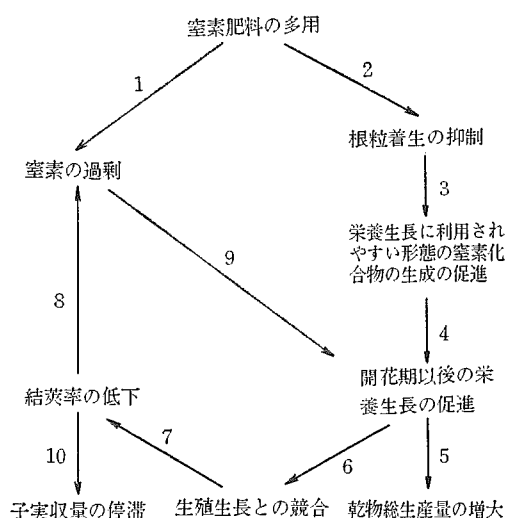
¹⁴C—標識アミノ酸を用いたトレサー実験から、種皮のアミノ酸透過には選択性があり、グアニジン基を持つアミノ酸以外は種皮を透過しにくいことが推定された。したがって子実たんばくを構成するアミノ酸の大多数は、シュウクロスの炭素とアラントインの窒素から、胚において合成されたものと考えられる。しかし、アラントインについては、アラントインの形で種皮を透過するのかあるいは莢殻の組織中で分解され、特殊な窒素化合物となって透過するのか明らかでない。

したがって、窒素施肥によって濃度が上昇する茎葉のアスパラギン酸、アラニン、 γ -アミノ酪酸などのアミノ酸やアミドは、栄養生長促進の原動力となるが、子実たんばくの生成にはアラントインに比して貢献度が低いと推定される。

2. 要 約

大豆栽培において乾物生産量や窒素吸収量の増大をはかることは、窒素質肥料の施用によって達成できるが、これを子実収量増に結びつけることは難しい。その理由を明らかにするために大豆の窒素栄養の特性について検討し、以下の結果を得た。

第30図に示すように、窒素肥料の多用は根粒の着生を抑制し、茎葉のアミノ酸濃度を上昇させ、アラントイン濃度を低下させる。その結果、栄養生長が過度に促進され、栄養、生殖の両生長の競合は結莢期における莢への炭水化物の供給を抑制し、胚の発育阻害、花器脱落の原因となる。このようにして受容器官である莢の数の増大が阻害されると窒素はますます供給過剰となり、栄養生長が一層促進され、乾物生産量の増大が子実収量増に結びつかないことになる。



第30図 乾物総生産量と子実収量に及ぼす窒素多用と影響

参 考 文 献

- 1) ARCHIBALD, R. M. (1944): Determination of citulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *J. Biol. Chem.*, 156, 121-142.
- 2) BALIS, M. E., BROOKE, M. S., BROWN, G. B. and MAGSANIK, B. (1956): The utilization of purines by purineless mutants of *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. chem.*, 219, 917-926.
- 3) BARKER, A. W., MYNARD, D. N., MIODUCHOWSKA, B. and BUCH, A. (1970): Ammonium and

- salt inhibition of some physiological process associated with seed germination. *physiol. plant.*, 23, 898-907.
- 4) BARNES, R. L. (1959): Formation of allantoin and allantoic acid from adenine in leaves of *Acer saccharinum* L., *Nature*, 184, 1944.
 - 5) BEEVERS, L. and HAGEMAN, R. H. (1969): Nitrate reduction in higher plant. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20, 495-522.
 - 6) BENDANA, F. E., GALSTON, A. W., KAUR-SAWHNEY, R. and PENNY, P. J. (1965): Recovery of labeled RNA following administration of labeled auxin to green pea stems sections. *Plant physiol.*, 40, 977-983.
 - 7) BENTLEY, R. and NEUBERGER, A. (1959): The mechanism of the action of uricase. *Biochemical J.*, 52, 694-699.
 - 8) BERGERSEN, F. J. (1965): Ammonia- an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodule. *Aust. J. Biol. Sci.*, 18, 1-9.
 - 9) BOLLARD, E. G. (1965): Nitrogenous compounds in plant xylem sap. *Nature*, 178, 1189-1190.
 - 10) BRENNAN, H., PATE, F. J. and WALLACE, W. (1964): Nitrogen containing compounds in the shoot system of *Pisum arvense* L., I. Amino compounds in the bleeding saps from petioles. *Ann. Botany*, 28, 527-540.
 - 11) BUTLER, G. W., FERGUSON, J. D. and ALLISON, R. M. (1964): The biosynthesis of allantoin in *Symphytum*. *Physiol. Plant.*, 14, 310-321.
 - 12) CATHEY, H. M. (1964): physiology of growth retarding chemicals. *Ann. Rev. plant physiol.*, 15, 271-302.
 - 13) 長南信雄・大田敏郎・川原治之助 (1961): BCBに関する研究, 第4報, 二三の作物における細胞の分裂と伸長におよぼす影響, 茨城大学農学部学術報告, 9, 15-18.
 - 14) CHRISTMAN, A. A., FOSTER, P. W. and ESTERER, M. B. (1944): The allantoin content in blood. *J. Biol. Chem.*, 155, 161-172.
 - 15) COLLINS, F. I. and CARTER, J. L. (1956): Variability in chemical composition of seed from different portion of the soybean plant. *Agr. J.*, 48, 216-219.
 - 16) DINNING, J. S. (1955): The role of vitamin E in regulating the turnover rate of nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 212, 735-739.
 - 17) DOWNS R. J. and CATHEY, H. M. (1960): Effects of light, gibberellin and a quaternary ammonium compound on the growth of dark grown red kidney beans. *Botani. Gaz.*, 121, 233-237.
 - 18) ELWYN, D. and SPRINGSON, D. B. (1950): The role of serine and acetate in uric acid formation. *J. Biol. chem.*, 184, 465-474.
 - 19) FREIBERG, S. R., BOLLARD, E. G. and HAGARTY, M. P. (1957): The natural occurrence of urea and ureides in soluble nitrogen in the banana plant. *plant physiol.*, 32, lii.
 - 20) FRUTON, J. S. and SIMMONDS, S. (1961): End products of amino acid metabolism. *General Biochemistry*, 2nd ed., 847-863, Charles E. Tuttle Company, Tokyo.
 - 21) HATTORI, A. (1958): Studies on the metabolism of urea and other nitrogenous compounds in *Chlorella ellipsoidea*. *J. Biochemistry*, 45, 57-64.
 - 22) HENDERSON, J. F. and LAPAGE, G. A. (1957): Purine biosynthesis de novo in mouse tissues and mouse tumor. *J. Biol. Chem.*, 234, 2364-2368.
 - 23) 平井義孝, (1961): 大豆の無機栄養に関する調査, 第1報, 生育に伴う吸収移動の経過について, 北海道立農試集報, 7, 47-57.

- 24) HOWELL, R. H. (1960): Physiology of the soybean. *Advances. in Agronomy*, 12, 265-310, Academic press. New York.
- 25) HYMOWITZ, T. and WALKER, W. M. (1970): Leaf analysis as a selection index for soybean seed oil and protein. *Agronomy. J.* 62, 631-632.
- 26) 石塚潤爾・沖野房江・星忍・(1970): 大豆の栄養生理学的研究, 第3報, 茎の各種窒素成分含量と栄養生長との関係, 土肥誌, 41, 78-82.
- 27) 石塚潤爾 (1970): 荳科作物の窒素代謝, 農園, 45, 1053-1057.
- 28) ISHIZUKA, J. (1970): Effects of soluble nitrogenous components on the growth of soybean plants. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 5(3), 16-20.
- 29) 石塚潤爾 (1971): 大豆の窒素栄養に関する研究, 第1報, 体内成分と生育との関係, 北海道農試彙報, 98, 27-33.
- 30) 石塚喜明・田中明・(1956): 水稻生育相とくにその栄養生理的特性の地域性について, 第1報, 生育概況並びに気象条件, 土肥誌, 27, 1-6.
- 31) 石塚喜明・田中明・(1956): 水稻生育相とくにその栄養生理的特性の地域性について, 第3報, 本田における水稻の生育にともなう三要素含量の消長, 土肥誌, 27, 95-99.
- 32) 岩淵春郎 (1969): 主要畑作物の施肥, 第2節豆類, 北海道農業と土壤肥料, 179-192, 北農会, 札幌
- 33) JOY, K. W. and ANTICLIFF A. J. (1966): Translocation of amino acid in sugar beet. *Nature*, 211, 210-211.
- 34) KASAI, T., ISHIKAWA, Y. and OBATA, Y. (1966): Changes in amino acid composition during germination of soybean. Part I. Changes in free amino acids, several nitrogen compounds and total amino acids. *Agr. Biol. Chem.*, 30, 973-978.
- 35) 樫田義彦・岩倉哲男・(1965): Liquid scintillation counting の最近の進歩, *Radioisotopes*, 14, 152-165.
- 36) 片山佃 (1951): 稲麦の分けつの研究, 13-38, 養賢堂, 東京
- 37) 加藤一郎・坂口進 (1954): 大豆不稔粒の発生機構並びに, その防止に関する研究, 東海近畿農試研究報告, 1, 115-132.
- 38) 加藤一郎 (1964): 大豆における脱落花器及び不稔実粒の組織学的並びに発生学的研究, 東海近畿農試研究報告, 11, 1-52.
- 39) 加藤一郎 (1962): 大豆の生育, 作物大系第4編豆類, 1-62, 養賢堂, 東京
- 40) 川原治之助・大田敏郎・長南信雄 (1962): BCB と Gibberellin の相互作用, その一, 日作紀, 30, 257-260.
- 41) KEFFORD, N. P., BROCKWELL, J. and ZWAR, J. A. (1953): The symbiotic synthesis of auxin by legumes and nodule bacteria and its role in nodule development. *Aust. J. Biol. Sci.*, 13, 456-467.
- 42) KEY, J. L., BARNETT, N. H. and LIN, C. Y. (1967): RNA and protein biosynthesis and the regulation of cell elongation. *Ann. New York Academy of Sciences*, 144, 49-62.
- 43) 鬼頭俊而・堀士郎 (1970): クロレラによる尿素の代謝, 土肥学会講演要旨集 16, 80.
- 44) 昆野昭晨 (1967): ダイズの子実生産機構の生理学的研究, ダイズ粒内での糖およびアミノ酸の登熟にともなう消長, 日作紀, 36, 273.
- 45) KRUPKA, R. M. and TOWERS, G. H. N. (1959): Studies on the metabolic relation of allantoin in the wheat. *Can. J. Botany*, 37, 539-545.
- 46) 串崎光男・石塚潤爾・赤松房江 (1964): 大豆の栄養生理学的研究, 第1報, 根粒着生状況が大豆の生育, 収量養分吸収に及ぼす影響, 土肥誌, 35, 319-322.
- 47) 串崎光男・石塚潤爾・赤松房江 (1964): 大豆の栄養生理学的研究, 第2報, 根粒の着生が大豆の窒素

成分組成に及ぼす影響, 土肥誌, 35, 323-327.

- 48) LATHWELL, D. J. and EVANS, C. E. (1951): Nitrogen uptake from solution by soybean at successive stage of growth. *Agr. J.*, 43, 264-270.
- 49) LEE K. W. and ROUSH, A. H. (1964): Allantoinase assay and their application to yeast and soybean allantoinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 108, 460-467.
- 50) LUTTAGE, U. (1961): Über die Zusammensetzung des Nektars und den Mechanismus seiner Sekretion. *Planta*, 56, 189-212.
- 51) MAHLER, H. R., HAROLD, M. and HUBSCHER, G. (1956): Enzymatic oxidation of urate. *Science*, 124, 705-708.
- 52) MARETZKI, A., NICKELL, L. G. and THOM, M. (1969): Arginine in growing cell of sugarcane. Nutritional effects, uptake and incorporation into proteins. *Physiol. Plant.*, 22, 827-839.
- 53) MARETZKI, A., THOM, M. and NICKELL, L. G. (1969): Products of arginine catabolism in growing cell of sugarcane. *Phytochemistry*, 8, 811-818.
- 54) MARKHAM, R. (1955): Nucleic acid, their components and related compounds. *Modern methods of plant analysis. Vol. 4*, 246-304, Springer Verlag, Berlin.
- 55) MOOR, S. and STEIN, W. H. (1948): Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 175, 367-388.
- 56) MOTHES, K. and ENGELBRECHT, L. (1961): The metabolism of urea and ureides. *can. J. Botany*, 39, 1785-1806.
- 57) 村山登・谷田沢道彦 (1957): 植物成分分析法・作物試験法, 303-335, 農業技術協会, 東京
- 58) NAGAI, Y. and FUNAHASHI, S. (1961): Allantoinase from mung bean seedlings. *Agr. Biol. Chem.*, 25, 265-268.
- 59) 永田忠男 (1956): 性状, 農学大系作物部門大豆編, 31-100, 養賢堂, 東京
- 60) NICKELL, L. G. and KORTSCHAK, H. P. (1962): Arginine: its role in sugarcane growth. *Hawaiian Plantner' s Record*, 57, 230-236.
- 61) NICKELL L. G. and MARETZKI, A. (1969): Growth of suspension culture of sugarcane cells in chemically defined media. *Physiol. Plant.*, 22 117-125.
- 62) 農林省農林経済局統計調査部 (1968): 作物統計 11, 28, 農林統計協会, 東京
- 63) OHLROGGE, A. J. (1960): Mineral nutrition of soybean. *Advances in Agronomy*, 12, 229-263.
- 64) OLAND, K. and YEMM, E. W. (1956): Nitrogenous reserves of apple trees. *Nature*, 178, 219.
- 65) OLAND, K. (1959): Nitrogenous reserves of apple trees. *physiol. Plant.*, 12, 468-592.
- 66) 大泉久一, 桂勇 (1958): 大豆の分枝に関する研究, 第1報, 出葉秩序について, 日作紀, 27, 80-82.
- 67) 大泉久一 ((1962): 大豆の分枝発生機構並びに栽培学的意義に関する研究, 東北農試研究報告, 25, 1-95.
- 68) 大田敏郎・長南信雄・川原治之助 (1961): BCB (Bromocholine bromide) に関する研究, 第1報, 土壌処理が小麦および水稻の生育に及ぼす影響, 茨城大学農学部学術報告, 9, 1-6.
- 69) ORY, R. L., GORDON, V. and SINGH, R. (1969): Ureide metabolism in castor beans. Evidence for a particle-bound allantoinase. *Phytochemistry*, 8, 401-404.
- 70) PATE, J. S. and GREIG, J. M. (1964): Rhythmic fluctuations in the synthetic activities of the nodulated root of legume. *Plant and Soil*, 21, 163-184.
- 71) PATE, J. L. and WALLACE, J. (1964): Movement of assimilated nitrogen from the root system of the field pea (*Pisum arvense* L.). *Ann. Botany*, 28, 83-99.
- 72) PATE J. S., WALKER J. and WALLACE, W. (1965): Nitrogen containing compounds in the shoot of *Pisum arvense* L. II. The significance of amino acids and amides released from

- nodulated root. *Ann. Botany*, 29, 475-499.
- 73) PATE, J. S. (1966): Photosynthesizing leaves and nodulated roots as donors of carbon to protein of shoot of the field pea (*Pisum arvense* L.). *Ann. botany*, 30, 93-109.
- 74) PENNY, P. and GALSTON, A. W. (1966): The kinetics of inhibition of auxin induced growth in green pea stem segment by actinomycin D and other substances. *Amer. J. Botany*, 53, 1.
- 75) REINBOTHE, H. and MOTHES, K. (1962): Urea, ureides and guanidines in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 13, 129-150.
- 76) RITENOUR, G. L., JOY, K. W., BUNNING, J. and HAGEMAN, R. H. (1966): Intercellular localization of nitrate reductase, nitrite reductase and glutamic acid dehydrogenase in green leaf tissue. *Plant Physiol.* 42, 233-237.
- 77) SACHER, J. A. (1964): Senescence: hormonal control of RNA and protein synthesis in excised bean pod tissue. *Amer. J. Bot.*, 52, 841-848.
- 78) 斎藤正隆 (1967): 豆類, 北海道農業技術研究史, 194-223, 北海道農試, 札幌
- 79) 佐々木絃一 (1969): 大豆子実のアミノ酸分析について, 大豆に関する試験成績集, 65-66. 十勝農試, 芽室
- 80) 赤城迎哉・佐々木絃一 (1964): 大豆の子実成分について, 第1報, 環境条件の影響, 北農 31, 5-8.
- 81) SHANTZ, E. M. and STEWARD, F. C. (1959): Investigation on growth and metabolism of plant cells. 7. Source of nitrogen for tissue cultures under optimum condition for their growth. *Ann. Botany*, 23, 371-390.
- 82) SONNE, J. C., BUCHANAN, J. M. and DELLUVA, A. M. (1949): Biological precursors of uric acid. I. The role of lactate, acetate and formate in the synthesis of the ureide groups of uric acid. *J. Biol. chem.* 173, 69-80.
- 83) SONNE, J. C., BUCHANAN, J. M. and DELLUVA, A. M. (1949): Biological precursors of uric acid. II. The role of lactate, glycine and carbon dioxide as precursors of the carbon chain and nitrogen atom 7 of uric acid. *J. Biol. Chem.*, 173, 81-98.
- 84) SPLITTSTOESSER, W. E. (1969): Metabolism of arginine by aging and 7 days old pumpkin seedlings. *Plant Physiol.*, 44, 361-366.
- 85) SPLITTSTOESSER, W. E. (1969): The appearance of arginine and arginase in pumpkin cotyledon. Characterization of arginase. *Phytochemistry*, 8, 753-758.
- 86) 角田重三郎 (1967): 形態と機能から見た多収品種, 稲の形態と機能, 3版, 180-195, 農業技術協会, 東京
- 87) 高橋治助 (1957): 植物無機成分分析法, 作物試験法 282, 農業技術協会, 東京
- 88) 武田友四郎 (1967): 光合成と子実生産, 稲の形態と機能, 3版, 131-179, 農業技術協会, 東京
- 89) TANNER, J. W. and ANDERSON, I. C. (1963): External effect of inorganic nitrogen in root nodulation. *Nature*, 198, 303-304.
- 90) TANNER, J. W. and ANDERSON, I. C. (1963): Investigation on non-nodulating and nodulating strains. *Can. J. Plant Science*, 43, 542-546.
- 91) TANNER, J. W. and ANDERSON, I. C. (1964): External effect of combined nitrogen on nodulation. *Plant Physiol.*, 39, 1039-1043.
- 92) 東京大学農学部農芸化学教室 (1954): 肥料分析法, 実験農芸化学上巻, 3版, 66-86, 朝倉書店, 東京
- 93) TRIJBEIS, F. and VOGELS, G. D. (1967): Degradation of allantoin by *Pseudomonas acidovorans*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 113, 293-301.
- 94) TRIJBELS, F. and VOGELS, G. D. (1967): Allantoinate and ureidoglycolate degradation by

- Pseudomonas Aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 132, 115-126.
- 95) TRACEY, M. V. (1955): Urea and ureides. *Modern methods of plant analysis*, vol. 4, 119-141, Springer, Berlin.
- 96) VOGELS, G. D. (1966): Reversible activation of allantionate amido-hydrolase by acid-pmetrent and other properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.*, 113, 277-291.
- 97) VOGELS, G. D. (1969): Specificity of binding subsites of allantoinase. *Biochim. Biophys. Acta.* 185, 186-187.
- 98) VOGELS, G. D and VAN DER DRIFT, C. (1969): Hydrolysis of allantoate. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 88, 951-957.
- 99) VALENTINE, R. C. and WOLFE, R. S. (1961): Glyoxylurea. *Biochim. Biophys. Research comm.*, 5, 305-308.
- 100) VALENTINE, R. C. and WOLFE, R. S. (1962): Mechanism of allantoin fermentation. *J. Biol. Chem.*, 237, 2271-2277.
- 101) WITTWER, S. H. and TOLBERT, N. E. (1960): (2-Chloroethyl) trimethyl-ammonium chloride and related compounds as plant growth substances. III. Effect on growth and flowering of the tomato. *Amer. J. Botany.*, 47, 560-565.
- 102) 吉野実 (1968): 作物に対する生育抑制剤の作用について, 第4報, 主として糖代謝に及ぼす影響について, 土肥学会講演要旨集, 14, 80.
- 103) YOUNG, E. G. and CONWAY, C. F. (1942): On the estimation of allantoin by the Rimini-Shryver reaction. *J. Biol. Chem.*, 142, 839-853.
- 104) 雑穀奨励会 (1958): 十勝地方における大豆栽培技術の実態分析, 北海道大豆の技術的経営的調査研究, 46-99, 雑穀奨励会, 東京

Summary

Physiological roles of soluble nitrogenous components on vegetative growth and seed protein formation of soybean plants in Hokkaido

Junji Ishizuka

The average soybean yield in Hokkaido has been about 1400 kg/ha in recent years. An upward trend of the yield, however, has not been for the last 40 years. Nitrogen application to soybean plants results in the increase of total nitrogen uptake and dry matter production, but it is not always followed by an increase in soybean yield. As for this problem, the following two points of view may be considered:

a) In general, less than 40 % of all the flower buds can be matured as pods, and the acceleration of the vegetative growth may increase the dropping of immature pods.

b) The application of nitrogen fertilizer may repress nodulation and decrease the ratio of nitrogen supplied by the root nodules to the total nitrogen uptake.

From these points of view, this paper deals with the reason why nitrogen application does not always result in an increase of soybean yield though the vegetative growth increase.

I. Causes of the dropping of immature pods:

In soybean plants, one of the most dominant factors which inhibit the growth of embryos and cause pod-dropping, is recognized to be the shortage of carbohydrates to the pods. When large amounts of nitrogen are applied, vegetative growth is increased, which causes a reduction of carbohydrates to the pods at the pod-setting stage.

II. The comparative effects of soluble nitrogenous components on the growth of soybean plants:

a) RGR (relative growth rate) is increased when the nitrogen application is increased.

b) The nitrogen application results in a decrease in allantoin-N concentration and in an increase in α -amino-N and nitrate-N concentration in the nodulating type plants. The allantoin concentration increases rapidly after flowering. In the non-nodulating type, the accumulation of allantoin-N is so small to be neglected. But the concentration of α -amino-N is almost the same as in the nodulating type when they are applied with the same amounts of nitrogen. The above evidence may prove that α -amino-N is controlled by the amount of applied nitrogen and that allantoin-N is controlled by the degree of nodulation.

c) The concentration of α -amino-N and nitrate-N correlates positively with RGR. The acceleration of vegetative growth by nitrogen application is thought to be caused by the increase of α -amino-N concentration. This is because amino acids in the vegetative portion seem to be used directly as block materials for protein formation.

d) On the contrary, the allantoin concentration correlates negatively with RGR. Therefore, allantoin can hardly be considered for use as the main nitrogen source for the vegetative growth of soybean plants.

III. The synthesizing organs for allantoin in soybean plants:

Most of the allantoin was recognized to be synthesized in the roots, and then pass up to the stems. The rate of allantoin formation is increased remarkably by nodulation.

IV. The role of root nodules in the allantoin formation:

Root nodules utilize the carbohydrates of the host plants, provide the host roots with fixed nitrogen (most likely ammonia) and decrease the ratio of carbon to nitrogen in the roots. Allantoin might be synthesized in the roots as an end-product of ammonia detoxication or a storage form of nitrogen.

V. Biosynthetic routes of allantoin in soybean roots:

The plausible modes of allantoin synthesis in plants are as follows:

1. The condensation of urea with glyoxylic acid.
2. The aerobic purine degradation.

the above routes were followed by a radioactive tracer.

a) Allantoin synthesis by glyoxylate-urea condensation was not recognized.

b) Sodium formate- ^{14}C and four kinds of purine-8- ^{14}C were fed to water-cultured soybean plants through the roots. It was found that the labeled carbon were incorporated into the urea moieties of the allantoin molecules in the stems, but the radioactivities of allantoin fractions did not seem to depend on the degree of nodulation.

c) Phosphoric acid- ^{32}P , sodium formate- ^{14}C and purine-8- ^{14}C were fed to the soybean plants through the roots. The incorporation of ^{32}P and ^{14}C into the purine nucleotides, which were the components of ribonucleic acids extracted from the roots, were investigated. The ribonucleic acid metabolism in the roots was not recognized to be affected by nodulation.

Although the above facts may provide some evidence in favour of allantoin formation by purine degradation, they do not prove that most of the allantoin in soybean plants is synthesized by purine degradation.

VI. Physiological roles of amino acids and allantoin on seed protein formation:

Several kinds of ^{14}C -labeled amino acids were fed to the excised pods by a section of pod or by vacuum infiltration, and they were traced.

Arginine and canavanine were smoothly transported to the embryos, but the carbon skeletons of the other amino acids were metabolized in the hull tissues and were incorporated into other compounds such as sucrose therefore those amino acids seem

to be slightly transported to the embryos.

There is not sufficient data on the transport of allantoin via the seed coats of soybean plants, but it can be assumed that the allantoin which is deposited in the vegetative portions, is carried to the pods after the pod-setting stage and that it plays an important role on seed protein formation.

One of the reasons why only the vegetative growth is accelerated by nitrogen application, may be attributed to the increase of the concentration of amino acids, such as aspartic acid, which might be slightly transported by the seed coats.

VII. Conclusion

When a large amount of nitrogen is applied to soybean plants, the root nodule formation is repressed, the concentration of amino acids and amides is remarkably increased, and only the vegetative growth is accelerated. Under the above conditions, the dropping of immature pods, especially in the lower nodes, is increased because of the reduced supply of carbohydrates to the pods, and then the growth of the embryos is inhibited. Therefore the increase of the vegetative portions by nitrogen application hardly results in the increase of soybean yield.

When a small amount of nitrogen is supplied to soybean plants, the concentration of amino acids and amides is distinctly low in the leaves and the stems. On the contrary, the allantoin, which might be a main nitrogen source of seed protein formation, is deposited in the vegetative portions. Under these conditions, vegetative growth is repressed in spite of the fact that the total nitrogen concentration of the vegetative portions is not so low when compared to heavily fertilized plants. In consequence, pod-dropping in lower nodes is reduced.