



# 亜硝酸態窒素利用性におけるイネとキュウリの差異 の一断面

王子, 善清  
脇内, 成昭  
鳥飼, 康子  
岡本, 三郎

---

**(Citation)**

神戸大学農学部研究報告, 11(2):337-340

**(Issue Date)**

1975

**(Resource Type)**

departmental bulletin paper

**(Version)**

Version of Record

**(JaLCD0I)**

<https://doi.org/10.24546/00228495>

**(URL)**

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00228495>



# 亜硝酸態窒素利用性におけるイネとキュウリ の差異の一断面

王子善清\*・脇内成昭\*・鳥飼康子\*・岡本三郎\*

(昭和49年8月12日受理)

## ONE ASPECT OF DIFFERENCE IN NITRITE UTILIZATION BETWEEN RICE AND CUCUMBER PLANTS

Yoshikiyo OJI, Nariaki WAKIUCHI, Yasuko TORIKAI and Saburo OKAMOTO

### Abstract

Metabolic backgrounds for different ability of rice- and cucumber roots to assimilate nitrite were investigated at the faces of respiratory metabolism.

(1) Oxygen uptake of rice roots was inhibited by nitrite, whereas that of cucumber roots was stimulated.

(2) Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was significantly high in cucumber roots, as compared with rice ones.

These facts appear to be correlated with the differences of nitrite reducing ability and of susceptibility to nitrite toxicity between rice and cucumber roots.

### 緒 言

さきに筆者は、植物の無機態窒素同化に関する一連の栄養生理的実験の中で、好アンモニア性植物であるイネと好硝酸性植物であるキュウリは亜硝酸態窒素利用性において明確な差異のあることをみとめた<sup>6)</sup>。すなわちイネは窒素栄養源として亜硝酸態窒素を与えられると生育が極端に劣り、亜硝酸障害が出現し根は腐敗状を呈するのに対して、キュウリは亜硝酸障害が出現せず、それを同化利用し、外観上異常がみとめられなかった。そしてこの差異は根における亜硝酸の還元同化能の差異にひとつの原因があることをつきとめ、さらに根の亜硝酸還元酵素活性はキュウリがイネにくらべて3倍つよいことを知った。以上のように亜硝酸態窒素の同化能の面からは両植物の差異の原因についてはひとつの裏づけが得られたのであるが、根における亜硝酸態窒素の同化は、その還元のための還元型補酵素、有機化のための炭素骨格、

両供給面において呼吸代謝と密接に関連しているので、今回は呼吸代謝の面からその差異を比較検討することにした。

呼吸代謝に対する亜硝酸の生理作用については、WILLIS と YEMM<sup>9,10)</sup> および BUTT と BEEVERS<sup>1)</sup> の実験が有名である。WILLIS らは無機態窒素の同化と呼吸との関連を大麦根を用いて詳細に調べ、亜硝酸塩の添加はアンモニウム塩の場合と同程度またはそれ以上に酸素吸収、炭酸ガス放出を促進することをみとめ<sup>9)</sup>、これらが亜硝酸塩の同化と密接に関連していることを明らかにした<sup>10)</sup>。また BUTT らはトウモロコシ根のグルコース分解系に対する亜硝酸塩の影響を検討した中で興味深い結果を得ている。すなわち亜硝酸塩はメチレンブルー、フェナジンメトサルフェート、トリフェニールテトラドリウムクロリドのような電子受容色素と同じようにグルコース-1-<sup>14</sup>C からの <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 放出を著しく促進させることを明らかにした。この事実を説明するために彼らはトウモロコシ根においてはグルコース-6-リン酸 (G6P) の酸化によって生成される NADPH が亜硝酸還元のため

\* 植物栄養学研究室

めの還元力の給源となるのではないかと仮説を提案した。

以上のように亜硝酸態窒素の同化と関連した呼吸代謝上の現象として呼吸の上昇、NADP を介して G6P の酸化と亜硝酸還元との共役の二つが報告されている。亜硝酸は遊離の形態で過剰に存在すると植物根に対して有毒であるが、植物の種類によってはそれを還元同化できることも事実である。亜硝酸態窒素同化能の異なるイネとキュウリに酸素吸収に対する亜硝酸塩の影響にちがいがあろうか、また Butt らの立場からすれば亜硝酸同化能のまさるキュウリはグルコース分解系のうちペントースリン酸経路の占める割合がイネにくらべて高く、したがってこの経路の律速酵素である G6P 脱水素酵素 (G6PDH) の活性もつよいのではないかと想像される。

本研究は、以上のような視点からイネとキュウリの亜硝酸態窒素利用性の差異の背景を呼吸代謝の面からさらに一歩掘り下げるために行なったものである。

### 【実験 1】 イネおよびキュウリ根の酸素吸収に対する亜硝酸塩の影響のちがい

#### 実験材料および方法

イネ種子 (コシヒカリ) はサランの網の上に、キュウリ種子 (翠青 2 号) はパーミキュライト中にそれぞれ播種し、イネは 9 日間、キュウリは 3 日間、30°C の恒温器中、暗所で培養した黄化幼植物を実験に供した。イネとキュウリは培養期間が異なるが、これは根長をそろえるためであった。

酸素吸収量はそれぞれの切断根を供試し、ワールブルグ検圧計を用いて、30°C pH6.0 (3.3 mM リン酸緩衝液) の条件下で測定した。

#### 実験結果

第 1 表に示したように、亜硝酸塩 (4mM) の添加はイネ根の酸素吸収を阻害したのに対して、キュウリ根のそれを促進した。しかも亜硝酸塩は硝酸塩を上回る促進効果を示した。硝酸塩はイネ根の酸素吸収を促進したが、これはいわゆる salt-stimulated respiration の反映と思われる。このことは両植物根の呼吸に対して亜硝酸塩は異なった場面で生理作用を及ぼしていると考えられる。

本実験にはすべて黄化幼植物根を供試したのであるが、このような植物では体内糖レベルが低く、したがって両植物根中の糖レベルにおけるわずかなちがいが第 1 表に示した酸素吸収に対する影響のちがいとなって現われてくる可能性も考えられるので、この点を確かめるた

第 1 表 イネおよびキュウリ根の酸素吸収に対する亜硝酸塩と硝酸塩の影響

植 物	酸素吸収量 ( $\mu\text{l/g}$ 新鮮重/時間)		
	コントロール	4mM NaNO <sub>2</sub>	4mM NaNO <sub>3</sub>
イ ネ	572 (100)	517 (90)	625 (109)
キュウリ	232 (100)	292 (126)	271 (117)

第 2 表 グルコース添加時のイネおよびキュウリ根の酸素吸収に対する亜硝酸塩の影響のちがい

植 物	酸素吸収量 ( $\mu\text{l/g}$ 新鮮重/時間)		
	コントロール	グルコース*	グルコース* + 4mM NaNO <sub>2</sub>
イ ネ	654 (100)	693 (106)	585 (90)
キュウリ	211 (100)	248 (117)	293 (139)

\* 10 mM

第 3 表 亜硝酸塩添加時のキュウリ根の酸素吸収に対するグルコース添加効果とコハク酸添加効果の比較

添 加 物	酸素吸収量 ( $\mu\text{l/g}$ 新鮮重/時間)
4mM NaNO <sub>2</sub>	277(100)
// +10mM グルコース	313(113)
// +10mM コハク酸*	284(103)

\* NaOH で pH6 に中和

めに十分量の呼吸基質を添加したときの亜硝酸塩の影響を比較検討した。その結果が第 2 表である。グルコース (10 mM) の添加は両植物根の酸素吸収を促進したが、亜硝酸塩の共存下では著しい差異がみとめられた。すなわち亜硝酸塩は、イネではグルコースの促進効果を完全に打ち消しコントロール以下に低下させるのに対して、キュウリではグルコースの促進効果をさらに上積みする効果をもつことが明らかとなった。

このことはイネ根では十分量の呼吸基質の存在下においても亜硝酸塩は酸素吸収を阻害するのに対して、キュウリ根では促進し、しかも亜硝酸の還元とグルコース分解系とがカップルしていることを暗示している。

第3表は亜硝酸塩添加時のキュウリ根の酸素吸収に対するグルコースとコハク酸の添加効果を比較したものであるが、第2表と同じくグルコースは亜硝酸塩添加時の酸素吸収を一層増加させたが、コハク酸にはこのような効果がみとめられなかった。

すなわち亜硝酸の還元同化はTCA回路以前の段階でグルコース分解系とカップルしているように推察される

## 【実験2】イネ根とキュウリ根のG6PDH活性のちがいを調べる

### 実験材料および方法

イネ種子は一昼夜30°Cで浸漬したあとサランの網上に播種し、4日目にガラス室に移した。8日間水道水を毎日更新しながら育成した幼植物を3ℓポットに30個体を移植し、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>をNとして20ppm含む培養液<sup>6)</sup>で6日間生育させ実験に供した。

キュウリ種子は20分間浸漬したあとパーミキュライト中に播種し一夜30°Cで発芽させたあとガラス室に移した。7日間水道水を与えて生育させたのち3ℓポットに3個体を移植し、イネと同じ培養液を与えて12日間生育させ実験に供した。

実験はイネおよびキュウリの幼植物にNO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N(NaNO<sub>3</sub>)、またはNO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N(NaNO<sub>2</sub>)を56ppm(4mM)含む培養液<sup>6)</sup>を与えて経目的にそれぞれの根部をとりG6PDH活性の測定に供した。

粗酵素液の調製は以下のように行なった。すなわちそれぞれの根1gに対して石英砂0.3g、0.05Mシステインを含む0.4Mトリス緩衝液(pH7.6)1mlの割合で加え、乳鉢を用いて冷所ですりつぶした。ホモジネートは4層のガーゼでこし、残渣は同じ緩衝液半量で抽出し先の濾液と合した。濾液は12,000rpmで30分間4°C以下で遠心分離を行ない、その上澄を粗酵素液とした。

G6PDH活性の測定はCLAYTON<sup>2)</sup>の方法に準拠して行なった。すなわち反応はG6P(5μモル)、NADP(0.5μモル)、pH7.6トリス緩衝液(200μモル)、MgCl<sub>2</sub>(10μモル)を含む総液量3mlの液中で行ない、日立124型ダブルビーム分光光度計を用いて340nmの吸光度増加を記録した。この際、基質G6Pのみを除いた反応液をブランクとした。

なおG6Pを基質とする解糖系の酵素であるG6Pイソメラーゼ(G6PI)の活性も同じ粗酵素液を用いて測定した。すなわち反応はフラクトース-6-リン酸(5μモル)、NADP(0.3μモル)、pH9.0トリス緩衝液(200μモル)、MgCl<sub>2</sub>(15μモル)、G6PDH(シグマ製、2ユニット)を含む総液量3mlの液中で行ない<sup>4)</sup>、G6PDHの場合と同様にNADPHの340nmの吸光度増加を記録した。

粗酵素液中のタンパク質は5%トリクロロ酢酸沈殿物を1N NaOHに溶解したあとLowryらの方法により定量した。

### 実験結果

イネ根とキュウリ根のG6PDH活性を比較した結果が第4表である。窒素源としてNO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-Nのいずれを与えた場合でもキュウリ根の活性はイネ根にくらべて著しく高いことがわかった。イネ根ではNO<sub>2</sub><sup>-</sup>-Nを与えると活性が増加したが、キュウリ根の活性には遠く及ばない。また第5表にG6PIの活性を比較した結果を示したが、イネとキュウリで大きなちがいがあっても思えなかった。

すなわちキュウリ根はイネ根にくらべてG6PDH活性がつよくペントースリン酸経路を経由するグルコース分解系の割合が高いことが明らかである。

### 【実験1】、【実験2】に対する考察

窒素の形態に対して異なった嗜好性を示すイネとキュ

第4表 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N または NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N を与えたときのイネおよびキュウリ根のG6PDH活性のちがいを調べる

植 物	窒 素 源	処 理 後 の 日 数			
		0	1	3	5
		ΔE <sub>340</sub> /mgタンパク/分			
イ	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0.07(0.06)	0.08(0.05)	0.09(0.06)	0.06(0.05)
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N		0.19(0.15)	0.25(0.28)	0.28(0.38)
キュウリ	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0.76(2.48)	1.07(1.65)	1.11(2.23)	0.81(1.46)
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N		1.30(2.27)	1.02(2.51)	0.97(2.02)

カッコ内の数値は1g新鮮重当たり

第5表  $\text{NO}_3^-$ -N または  $\text{NO}_2^-$ -N を与えたときのイネおよびキュウリ根の G6PI 活性のちがい

植物	窒素源	処理後の日数		
		1	3	5
		$\Delta E_{340}/\text{mgタンパク/分}$		
イネ	$\text{NO}_3^-$ -N	6.92	8.22	7.92
	$\text{NO}_2^-$ -N	7.70	7.19	7.84
キュウリ	$\text{NO}_3^-$ -N	10.27	8.13	9.05
	$\text{NO}_2^-$ -N	8.45	7.83	8.65

ウリの亜硝酸態窒素同化能の差異の背景を呼吸代謝の面から、さらに一步掘り下げるため、根の酸素吸収に対する亜硝酸塩の影響のちがいおよびペントースリン酸経路の律速酵素である G6PDH 活性のちがいの両面から比較検討を加えた。

酸素吸収の面からは、イネの酸素吸収が亜硝酸塩によって阻害されたのに対して、キュウリ（これは亜硝酸を根で相当還元同化でき、耐亜硝酸性がつよい）の場合には促進され、しかも亜硝酸の還元がグルコース分解系と TCA 回路以前の段階でカップルしているように思われた。植物根において亜硝酸の還元同化過程が進行しているときには呼吸が増加することは WILLIS<sup>9)10)</sup>らの実験によって明らかにされているが（彼らは大麦根を供試し、これは亜硝酸同化能が著しくつよいことが筆者<sup>6)</sup>によって明らかにされている）、亜硝酸の還元同化能のつよいキュウリ根においては WILLIS らの実験結果と同じような現象がみとめられたのに対して、その能力の微弱なイネ根ではそのような現象がおこる以前に亜硝酸は別の場面で害作用を呈し、酸素吸収の阻害となってあらわれてくるものと思われる。このことは亜硝酸態窒素を与えたイネの根は著しく亜硝酸障害をうけ、ついには腐敗状を呈するようになることのひとつの原因ではないかと推察される。

つぎに G6PDH 活性の面からは、キュウリ根の活性がイネ根のそれにくらべて著しく高いことがわかった。根のような非緑色組織にフェレドキシンが存在するか否か未確定の現時点にあっては、亜硝酸の根における還元機構の面からこのことを立ち入って議論することができないにしても、亜硝酸還元のための還元力の供給能のちがいという面から G6PDH 活性のちがいと耐亜硝酸性のちがいを結びつけて考えることができるように思われる。すなわち、根の亜硝酸還元酵素はその酵素化学的諸性質において緑葉のそれときわめて類似しているのであるが<sup>3,5)</sup>、緑葉においては亜硝酸の暗還元が  $\text{NADPH} \rightarrow$

フェレドキシン $\rightarrow\text{NO}_2^-$ と進行すること<sup>7)</sup>、また緑葉の光合成電子伝達系においては  $\text{NADP}$  還元が  $\text{NO}_2^-$  還元を優先し、 $\text{NO}_2^-$  還元がおこるためには体内  $\text{NADPH}$  レベルが常に高く維持されていなければならないという新ら<sup>8)</sup>の観察、および本研究で明らかにしたように亜硝酸の還元は TCA 回路以前の段階でグルコース分解系と関連していると思われるのに G6PI の活性にはイネとキュウリの間に大差がなかったこと、などを念頭におくとき、イネとキュウリの耐亜硝酸性の差異は G6PDH を介した  $\text{NADPH}$  供給能のちがいにひとつの原因があるのではないかと推察されるのである。

## 要 約

亜硝酸態窒素利用性におけるイネとキュウリの差異を呼吸代謝の面から検討を加えた。

(1) 亜硝酸塩はイネ根の酸素吸収を阻害したのに対して、キュウリ根では促進した。(2) キュウリ根の G6PDH 活性はイネ根にくらべて著しく高いことがわかった。

イネとキュウリのこのようなちがいが両植物の亜硝酸態窒素同化能または亜硝酸障害感受性の差異のひとつの原因であると推論した。

謝辞 本実験の一部は昭和48年度文部省科学研究費（課題番号876037）の援助を得て行なったものである。記して謝意を表する。

## 文 献

- 1) BUTT, V. S. and H. BEEVERS: *Biochem. J.*, **80**, 21—27, 1961.
- 2) CLAYTON, R. A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **79**, 111—123, 1959.
- 3) DALLING, M. J., D. P. HUCKLESBY and R. H. HAGEMAN: *Plant Physiol.*, **51**, 481—484, 1973.
- 4) DEVLIN, R. M. and R. A. GALLOWAY: *Physiol. Plant.*, **21**, 11—25, 1968.
- 5) 井田正二: 京大食研報, 第37号, 60—78, 1974.
- 6) 王子善清: 植物の無機態窒素同化に関する比較栄養生理的研究, 学位論文, 京都大学, 1974.
- 7) PANEQUE, A., J. M. RAMIRETZ, F. F. del CAMPO and M. LOSADA: *J. Biol. Chem.*, **239**, 1737—1741, 1964.
- 8) SHIN, M. and Y. ODA: *Plant Cell Physiol.*, **7**, 643—650, 1966.
- 9) WILLIS, A. J. and E. W. YEMM: *New Phytol.*, **54**, 163—181, 1955.
- 10) YEMM, E. W. and A. J. WILLIS: *New Phytol.*, **55**, 229—252, 1956.