5-アミノレブリン酸による作物の成育促進効果へのヘムタンパクと窒素代謝の関与

2014 年 1 月

米 澤 朋 起

5-アミノレブリン酸による作物の成育促進効果へのヘムタンパクと窒素代謝の関与

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

博士（農学）学位論文

米　澤　朋　起

目次

略語一覧

ALA	5-アミノレブリン酸
APO-HRP	セイヨウワサビペルオキシダーゼアポタンパク
CAT	カタラーゼ
Chl	クロロフィル
Chlide	クロロフィリド
DMSO	ジメチルスルフォキシド
GOGAT	グルタミン酸合成酵素
GS	グルタミン合成酵素
HRP	セイヨウワサビペルオキシダーゼ
NiR	亜硝酸還元酵素
NR	硝酸還元酵素
Pchlide	プロトクロロフィリド
PPIX	プロトポルフィリン IX
Protox	プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ
ROS	活性酸素

諸言

作物とは人類により多収性、食味、栄養性、低毒性などの改良を重ねて作られた植物であり、このことからヒトにとって価値のある植物となった一方で、作物は他の雑草や病害虫などのストレスに弱くなってしまったものも多い（日本学術会議農学委員会植物保護科学分科会, 2011)。作物の収量の確保のため、これらのストレスから植物を保護することを目的に古くから化学的手法が用いられてきた。例えば日本の害虫防除では江戸時代に水田で鯨油が用いられ、明治になり除虫菊が使用されるようになった（岡本大二郎, 1992)。現在では化学合成物質である農薬により害虫獣、雑草、病原菌などから作物が保護されている。また生物的ストレスだけでなく気温や塩、乾燥ストレスの様な非生物的ストレスも植物保護を考える上で重要である。

我が国の食料自給率は主要先進国の中でも最も低く、2012 年には 39%となっており（農林水産省, 2013)、日本国内で消費される食料は輸入に頼っている。一方で、今日世界人口は約 70 億人に達し、そのうち 8.4 億人が飢餓状態にあるとされ（FAO, 2013)、将来の世界的な食料不足が懸念されている。その中で新興国での人口増加や食料の国内消費の増加などによる日本の食料輸入可能量が減少した場合は日本国内の食料不足の原因となりうる。日本の食料品および動物（魚介類、肉類、穀物、野菜、生きた動物等を含む）の輸入額はアメリカからのものが最も多く、2012 年度では総額の 23.1%を占めているが、これは 1990 年度の 31.7%と比較すると減少傾向を示している。一方で中国からの輸入額は 1990 年度に 6.8%だったものが、2012 年度には 15.3%を示し食品の中国への依存は増加しているといえる（表 A)。中国は世界の 19%の人口を持ちながら (UNFPA, 2012) 8%の耕地面積しか持たないこともあり（CIA, The world factbook-land use; CIA, The world factbook-area)、今後も中国からこれまでと

同様の輸入を続けられるかという懸念もある。すなわち、今後の日本の食料自給率の増加が大きな課題として存在しているといえる。しかし、山地の割合が高い日本においてこれ以上耕地面積を増やすことは環境保全の観点から難しく、限られた耕地面積で作物の収量を増加させてゆくことが重要である。

農薬や成長調節剤といった化学物質を利用した作物保護は労力、コストの観点から優れた方法であると考えられる。また、農薬を用いて病害虫や雑草の防除をしないとイネやコムギで 25~35%、キャベツやキュウリで 60%、ダイコンやトマト、ジャガイモで 20~40%の減収となり、モモやリンゴなどの果樹にいたってはほとんど収穫ができないとの調査もあり（日本植物防疫協会, 2008)、病害虫や雑草を防除することで作物を保護することが作物生産にとって非常に重要である。また、成長調節剤を用いて成長促進、発芽促進を行う方法も利用されている。しかし近年、化学肥料や農薬の使用は環境に負荷をかけるものとされ、この負荷の軽減に配慮した持続的な農業（環境保全型農業）が推進されている。このためこれらの化学物質は土壌中での高い分解性が求められており、既登録農薬については、2005 年の時点で 392 剤の内 235 剤の半減期が 30 日以内であるとされている（食品安全委員会農薬専門調査会, 2005)。この様に環境への負荷の軽減のために圃場で使用される化学物質には、低薬量で効果を発揮する、易分解性を持つ等の特徴が求められている。その中で化学物質の成長調節剤への利用に関して 5-アミノレブリン酸が注目されている。

・5-アミノレブリン酸とテトラピロール化合物

5-アミノレブリン酸（ALA）はクロロフィル（Chl）やヘムといったテトラピロール化合物に共通の前駆体である。この ALA は植物体内で C5 経路と呼ばれるグルタミン酸からの 3 段階の反応を経て合成される（Huang and Castelfranco, 1990; Terry and Smith, 2013; 図 A)。ALA 以降の反応は、ALA2

分子からポルフォビリノーゲンが合成され、ポルフォビリノーゲン 4 分子から直鎖のテトラピロール化合物であるヒドロキシメチルビランが合成されることで進む。ヒドロキシメチルビランは環化され環状のテトラピロール化合物であるウロポルフィリノーゲン III が合成され、側鎖のカルボキシル基が順次外れコプロポルフィリノーゲン III、プロトポルフィリノーゲン IX が合成される。プロトポルフィリノーゲン IX は酸化されプロトポルフィリン IX (PPIX)が合成される（Yaronskaya and Grimm, 2006; 図 B)。この PPIX 以降の物質はポルフィリンと呼ばれるが、光によって励起しエネルギーを酸素に渡すことで活性酸素種（ROS）である一重項酸素を発生させる光増感作用を持つことが知られている。

PPIX からは Mg キラターゼによる Chl、フェロキラターゼによるヘムへの分岐が存在する。Chl 合成は PPIX に Mg が配位した Mg-プロトポルフィリン IX、Mg-プロトポルフィリン IX モノメチルエステル、プロトクロロフィリド (Pchlide)、クロロフィリド（Chlide)、Chl の順で進む（Tottey ら, 2003; Terry and Smith, 2013; 図 C)。

・高濃度の外因性の 5-アミノレブリン酸による生理作用

Rebeiz ら（1984）は 5 mM 以上の ALA を植物に散布すると成育阻害作用を示すことを報告した。この時 Pchlide の顕著な増加も報告しており、蓄積したポルフィリンの光増感作用による ROS の発生が成育阻害の原因であると考えられた。また Matsumoto ら（1994）は高濃度の ALA によるポルフィリンの蓄積に関して、ウキクサ（*Lemna paucicostata* Hegelm.）に 1 mM の ALA を処理した時、無処理区に対し Pchlide は 8.6 倍だった一方で PPIX は 101 倍の蓄積があったと報告した。このことから高濃度の ALA による成育阻害には、合成に必要な Mg や Fe の不足による PPIX の蓄積の影響が大きい可能性を示した。またこの

とき電解質の漏出も報告しており、ROS の発生による細胞膜の過酸化が成育阻害において大きな役割を果たしていると考えられた。

この高濃度のALAによる成育阻害作用は除草剤への利用を期待させるものであった。抵抗性の発生を考えると除草剤のターゲットや作用機序はより多様であることが望ましい。PPIX の蓄積はジフェニルエーテル系除草剤等のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（Protox）阻害剤によっても引き起こされると知られているが（Sherman ら, 1991)、高濃度の ALA は Protox を阻害せず PPIX を蓄積させることが特徴である。しかし、当時は大量の ALA を工業的に安価で生産する手段が無く、ALA を利用した除草剤の開発は現実的ではないとされていた。ただし、後に発酵法という低コストでの ALA 生産技術が開発されることとなったが（上山ら, 2000; 佐々木ら, 2002)、その頃には以下の低濃度による成長調節剤への利用に向けた研究がなされるようになっていた。

・低濃度の外因性の 5-アミノレブリン酸による生理作用

高濃度の ALA による成育阻害作用に対し、Hotta ら（1997）は低濃度の ALA が成育促進作用を示すことを報告した。この時、Chl の増加と光合成活性の増加を報告したため、ポルフィリンの蓄積が起こらない濃度の ALA によって最終産物の一つである Chl 含量が増加し、それによって光合成活性が増加することで成育促進効果が得られる可能性が示された。

また Nishihara ら（2003）は低濃度の ALA によるホウレンソウ（*Spinacia oleracea*）への耐塩ストレス性の付与を報告した。この時、抗酸化酵素（カタラーゼ（CAT)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ、グルタチオンリダクターゼ）の活性の増加と ROS の一種である過酸化水素の減少も報告しており、抗酸化能の強化が耐塩ストレス性の付与に寄与していることを示した。Wongkantrakorn ら（2009）は塩ストレス下のイネ（*Oryza sativa* L.）において ALA による抗酸

化酵素活性の増加に加えて、過酸化されたリノレン酸の分解によって生じるエタンの発生が ALA によって減少していたと報告しており、抗酸化能の強化が耐塩ストレス性の付与に貢献していると考えられた。ALA による耐ストレス性の付与は塩ストレス以外にも低温（Hotta ら, 1998)、低照度（Wang ら, 2004)、除草剤（Zhang ら, 2008）等のストレスを軽減することが報告されており、これらの耐ストレス性にはいずれも Chl 含量の増加と光合成活性の増加や、抗酸化能の強化が関わっていると考えられている。

さらに ALA は生物界に広く存在する天然アミノ酸であるため土壌中での分解性が高いことが期待できる。土壌に ALA を処理した直後に水抽出した場合 70~80%の ALA が回収され、処理 2 日後にはほとんど回収できなかった一方で、熱処理した土壌からは処理 2 日後でも処理直後と同程度の ALA が回収されたという報告もあり（堀田ら, 1997)、ALA は土壌中で容易に微生物分解を受けることが示されている。

成育促進効果や耐ストレス性の付与といった植物に対する効果はとても重要であるが、同時に土壌中での分解性が高いことも上述の環境保全型農業の観点から非常に好ましい性質であり、これらのことから ALA は成長調節剤としての利用が期待されている。

・ヘムの役割

テトラピロール合成系の最終産物に Chl とヘムがあり、Chl は植物にとって最も重要な代謝系である光合成の集光性色素である。よって ALA による成育促進効果に対する Chl の役割は非常に重要であると考えられるが、ヘムもまた生体内で重要な役割を果たしている。上述した抗酸化酵素はヘム含有タンパクであり、抗酸化酵素は生体内で発生する ROS の消去に不可欠である。光合成組織においてはチラコイド膜に存在する光化学系の反応中心や電子伝達系から ROS

が発生する。この阻害作用の防御のため、葉緑体には補助色素でありながら抗酸化物質でもあるカロチノイドやキサンチンを使ったキサントフィルサイクル等と共に抗酸化酵素が抗酸化システムとして存在している（Mittler, 2002; Demmig-Adams and Adams, 1996)。ALA による Chl 含量の増加は電子伝達活性の増加を引き起こし、炭酸固定量を増加させていると考えられているが、ROS 発生のリスクも増大していると考えられるため、抗酸化酵素の活性増加も ALA による成育促進効果に重要であると考えられる。

さらに Mishra and Srivastava (1983) は ALA 溶液に切除したトウモロコシの葉を 24 時間浸漬することで硝酸還元酵素（NR）の活性が増加すると報告した。この NR も抗酸化酵素と同様ヘム含有タンパクである（Campbell, 1996)。NR は NO_3^-から亜硝酸 NO_2^-への還元反応を触媒する窒素代謝の最初の酵素であり、窒素代謝も光合成と同様成育にとって重要な代謝系であるため、ALA による窒素代謝能への影響も成育促進効果に関与している可能性がある。

Woodson ら（2011）は葉緑体でのヘム合成が核での遺伝子発現の調節に関与していると報告し、Schmidt ら（2002）はヘミンによって CAT の翻訳が活性化したと報告した。これらの報告からヘムはタンパクの発現や活性を異なる段階で調節すると考えられ、さらに ALA を植物に処理した際のヘム合成の変化が様々なタンパクの活性に影響を与えることも考えられる。上述した抗酸化酵素活性の増加も ALA によるヘム含量の増加によって引き起こされる可能性が指摘されているが（Nishihara ら, 2003)、実際にヘム含量との関わりは調査されていない。

したがって、ALA による成育促進効果には複数の要因が関与している可能性があるが、詳細な報告はない。

・ALA 含有肥料

上述の通り、ALA による成育促進効果に関して不明な部分が残っているものの、現在 ALA 含有の窒素肥料が市販されており（ペンタキープ®V, ペンタキープ®Super 等)、その成分は表 B に示した。このペンタキープ®の植物への作用は Chl 生合成増大、光合成能力の増強、暗呼吸の抑制、気孔開度の拡大、肥効促進、環境ストレス耐性向上とされており、それにより葉色維持、生長促進、健苗育成、収量向上、品質向上、なり疲れの軽減、不良環境下での健全な成育といった効果が期待されるとされている（ペンタキープ®V のカタログより)。このペンタキープ®の対象作物は様々であるが（表 C)、全ての植物種において上述の作用、効果が全て得られるわけではない。また、Wang ら（2004）は低温、低照度環境下でのメロンにおいて ALA による暗呼吸の増加を報告したが、堀田と渡辺 (1999) はコウシュンシバとハツカダイコンにおいて ALA による暗呼吸の減少を報告した。このことから植物種や成育環境によって ALA による作用や効果は異なる可能性も考えられる。

・本研究の目的

ALA の成育促進効果や耐環境ストレス性の付与等は成長調節剤への利用に大いに期待でき、実際に ALA 含有肥料が市販されているものの、ALA の生理作用については十分に解明されていない。ALA による生理作用の理解が深まることはより適切な処理方法や植物種の選別、不良環境下での植物の育成等の ALA の利用の幅の拡大に対する知見につながると考えられる。ALA による生理作用について、特にヘム合成とヘムタンパクの活性への影響や窒素代謝への影響を示唆する報告はあるものの、詳細に調査されていない。そこで本研究では ALA による成育促進効果とこれらの代謝系との関わりを明らかにするため、ALA 処理後の植物の成育、Chl 含量、NR 活性、亜硝酸還元酵素（NiR）活性、NH_4^+含

量、ヘム含量、アミノ酸含量を解析し、ALA による成育促進効果のメカニズムの解明を目指した。

表 A 食料品及び動物の USA と中国からの輸入額の推移

年度	総額	USA	中国
1990	4092775009	1296746634 (31.70%)	281626336 (6.88%)
1995	4386431456	1283038539 (29.30%)	446693917 (10.20%)
2000	4488459427	1217500701 (27.10%)	642409371 (14.30%)
2005	5000391516	1120292958 (22.40%)	874325424 (17.50%)
2012	5221592597	1208406004 (23.10%)	799118733 (15.30%)

財務省貿易統計(http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm、2014 年 1 月 10 日参照)、概況品別国別表より作成 (単位:千円)

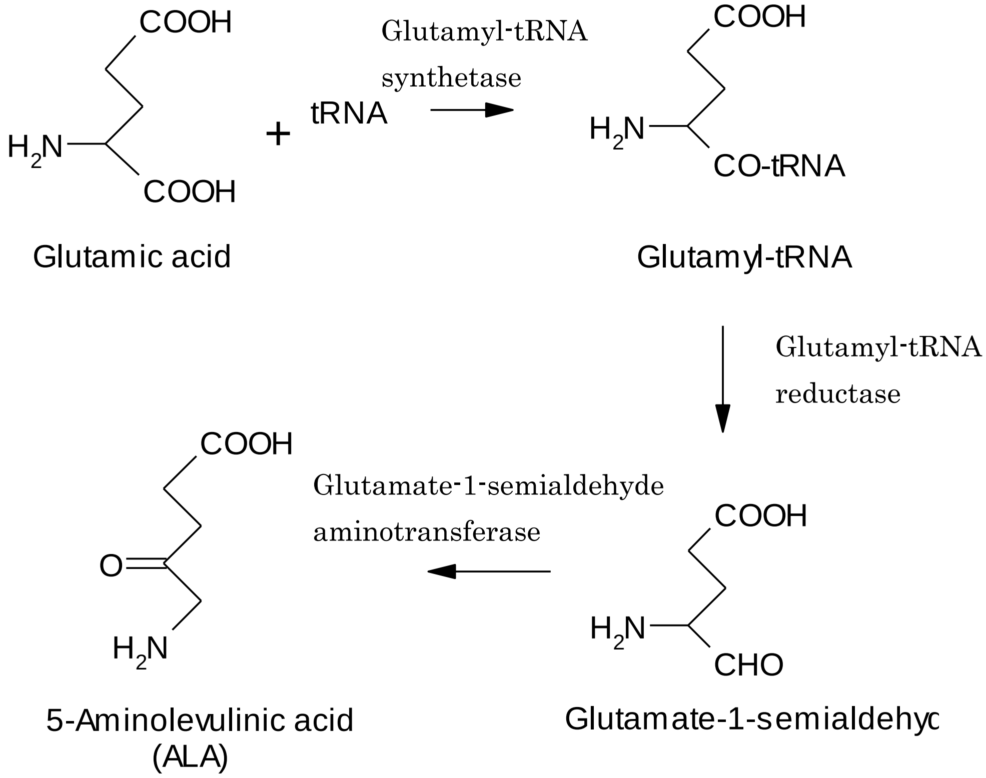


図 A グルタミン酸から 5-アミノレブリン酸までの合成経路（Huang and Castelfranco, 1990; Terry and Smith, 2013）

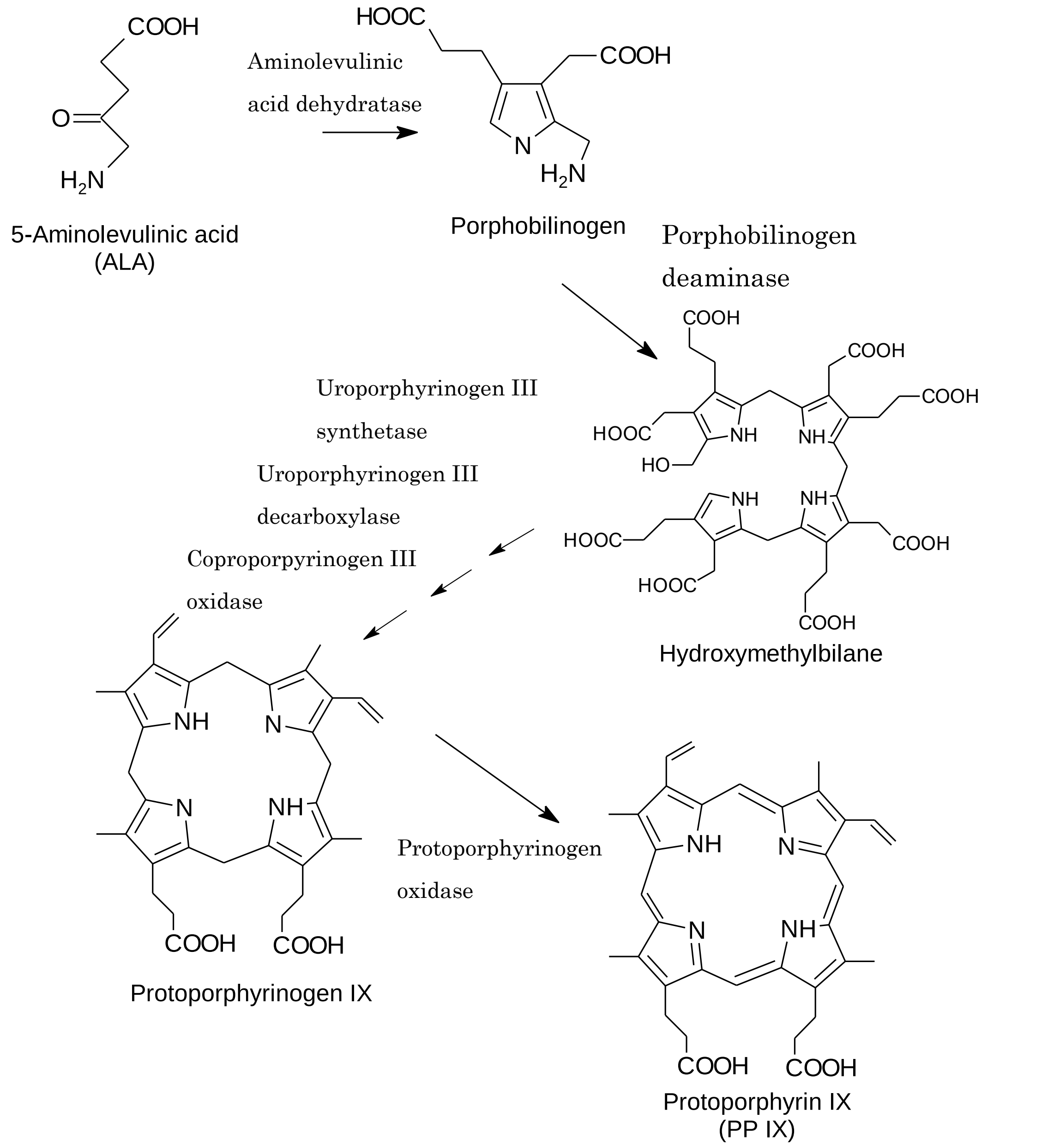


図 B 5-アミノレブリン酸からプロトポルフィリン IX までの合成経路

(Yaronskaya and Grimm, 2006)

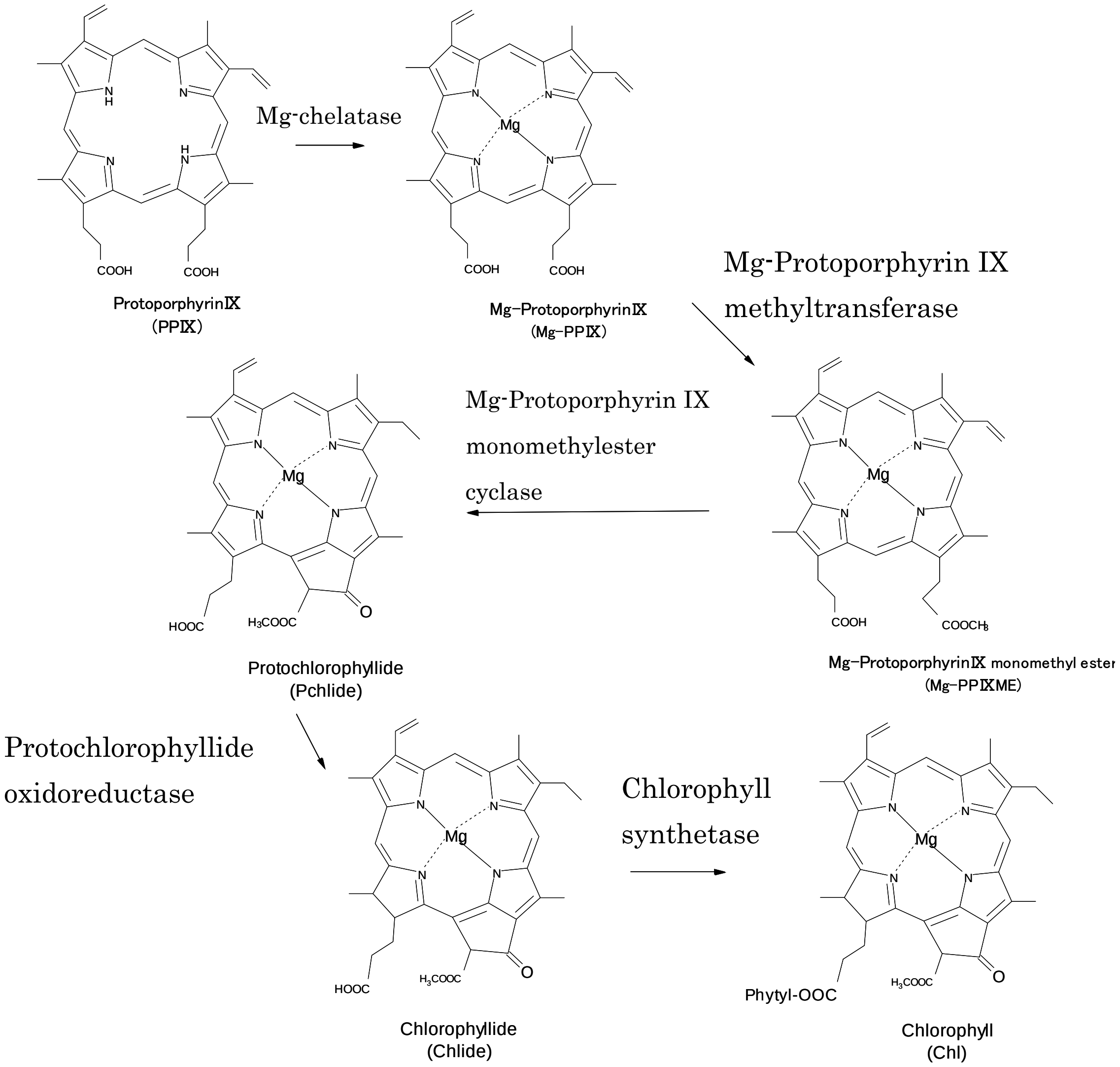


図 C プロトポルフィリン IX からクロロフィルまでの合成経路（Tottey S.ら, 2003; Terry and Smith, 2013）

表 B ペンタキープ®V の生産業者保証票の内容

登録番号		生第 86041 号
肥料の種類		液状窒素肥料
肥料の名称		CSA 液肥 1 号
保証成分量（%）	窒素全量	9.5
	内硝酸性窒素	3.8
	水溶性苦土	5.7
	水溶性マンガン	0.3
	水溶性ほう素	0.45
材料の種類		効果発現促進剤
効果発現促進剤の内容	DTPA-鉄、硫酸亜鉛、硫酸銅、モリブデン酸ナトリウム、5-アミノレブリン酸	

表 C ペンタキープ®V、Super の対象作物とされているもの

果菜類	トマト、キュウリ、イチゴ、ピーマン、ナス、メロン 等
葉菜類	ホウレンソウ、コマツナ、レタス 等
切り花	バラ、キク、トルコギキョウ、スイートピー、スターチス 等
果樹類	ミカン、リンゴ、ブドウ、ブルーベリー 等
鉢物	プリムラ、シネラリア、ベンジャミン 等
その他	ジャガイモ、ナガイモ、テンサイ、シバ、チャ、ニンニク 等

ペンタキープ®V、Super 使用の手引きより

第 1 章　ALA による植物の成育への影響

ALA による成育促進効果は複数の植物種で報告されている。堀田ら（1997）はイネ全体において 0.1 ppm (≒ 0.6 μM) ALA の 12 時間の根部浸漬処理により対無処理区比で 114%の乾燥重を得られ、30~100 ppm ALA の茎葉散布処理により対無処理区比で約 150%の乾燥重を得られたと報告している。またこの時、ハツカダイコン可食部において 30~300 ppm ALA の茎葉散布により対無処理区比で約 130~140%、トウモロコシ地上部において 30 ppm ALA の茎葉散布により対無処理区比で 128%、インゲンマメ根部において 30 ppm ALA の茎葉散布により対無処理区比で 197%の乾燥重が得られたと報告している。Hotta ら（1997）は 0.06 μM ALA を含む MS 培地にて成育させたポトスで Chl 含量と炭酸固定効率の増加を報告しており、ALA による成育促進効果にはテトラピロール合成系の最終産物の一つである Chl の増加が関与していると示した。また Nishihara ら（2003）は塩ストレス下のホウレンソウにおいても炭酸固定効率の増加を報告している。よって ALA による成育促進効果において Chl 含量の増加による光合成活性の増加はとても重要であると考えられる。

本研究では、ALA による成育促進効果の解明にあたり、ALA の 12 時間の根部浸漬処理、常時の根部浸漬処理、短時間の茎葉浸漬処理による成育促進効果を得られる条件の検討を行った。

また成育促進効果が得られた条件での Chl 含量の測定も行った。

第 1 節

1.1 ALA による成育促進効果の検討（12 時間根部処理）

1.1.1 材料および方法

・供試植物

トウモロコシ（*Zea mays* L. cv. ハニーバンタム）

ハツカダイコン（*Raphanus sativus* L. var. sativus cv. アカマルハツカ）

キュウリ（*Cucumis sativus* L. cv. トキワカゼミドリ）

コムギ（*Triticum aestivum* L. cv. ノウリン 61）

・供試薬剤

ALA（5-aminolevulinic acid, Wako, 98.0%）

・植物の成育および生物試験

トウモロコシとコムギは播種前に蒸留水に浸漬（30°C, 暗所, 1 日）し給水させた。バーミキュライトを敷き詰めたバット（31 cm × 22 cm × 9 cm）に種子を播種し十分に湿らせ、グロースチャンバー（明/暗: 12/12 時間, 25/20°C, 湿度 60%, 光強度 250 μE/m²/s）内で本葉 1 葉期まで成育させた。その後基本の春日井水耕液（表 1）を 1/10 の濃度にしたもので成育させた。基本の春日井水耕液には本来硝酸態窒素とアンモニア態窒素が 20 ppm ずつ入っているが、本研究では後に窒素代謝能への影響を調査するため硝酸態窒素のみを植物に与えた。2 葉期程度まで成育させた後、成育の揃った個体を選び 1/5 の濃度にした水耕液に移し、2 日後に ALA を処理し、4 日毎に植物体全体の生体重を測定した。処理 0 日後の生体重は ALA 処理直前に測定した。ALA 処理後の成育は ALA 処理直前と同じ条件だった。

・ALA 処理

ALA は 12 時間根部を浸漬することで処理した。グロースチャンバーの明期（12 時間）に合わせ植物の根部を ALA 溶液（0, 0.1, 0.5, 1 μM）に浸漬した後、暗期に入る時に根部を水で洗い 1/5 の濃度の水耕液に移した。実験は 3 連で 2 回以上繰り返し行った。

1.1.2 結果および考察

これまでに成育促進効果が報告されていることや、実験室で成育させやすいことを考慮し、トウモロコシ、ハツカダイコン、キュウリ、コムギを供試植物として選抜し、ALA の 12 時間根部処理による成育促進効果を調査した。コムギ以外では、いずれの植物でも処理 12 日後に 0.1~0.5 μM ALA の処理によって成育促進効果の傾向が見られた（図 1-1-1, 1-1-2, 1-1-3, 1-1-4)。中でもトウモロコシの 0.1 μM ALA 処理区で処理 12 日後に対無処理区比 115%の成育量が得られ、供試した植物の中ではトウモロコシが ALA による成育促進効果を得やすい植物種であると考えられた。しかし、いずれの植物種でも有意な成育促進効果は認められなかった。ALA を処理することによるポルフィリンの蓄積は植物に成育阻害を起こす可能性があるため、ALA の処理をより低濃度で長期間に渡り行うことでポルフィリンの蓄積を回避し成育促進効果が得やすくなると考えた。そこで成育促進効果を得やすいと考えられるトウモロコシにおいて、ALA を含む水耕液で成育させることで継続的に ALA が供給される条件にし、成育促進効果の検討を行った。さらに、生体内の ALA 合成、Pchlide から Chlide への反応、最終産物の 1 つである Chl を結合するタンパクである集光性クロロフィル結合タンパクの発現等が光によって増加するため、テトラピロール合成にとって光の条件が重要な役割を担っていると考えられた。グロースチャンバーの光は蛍光灯によるものであり、太陽光により植物を成育させることでより成育促進効

果が得やすくなる可能性があると考えたため筑波大学農林技術センターのプラスチックハウスを利用し植物を成育させることとした。

表 1 今回使用した水耕液の組成（春日井水耕液）

元素	溶存化合物	濃度（ppm）
N	NO_3	40
P	P_2O_5	40
K	K_2O	40
Ca	CaO	40
Mg	MgO	10
Fe	Fe_2O_3	7
Mn	Mn	0.5
B	B	0.05
Mo	Mo	0.05
Cu	Cu	0.02
Zn	Zn	0.05

pH は 1 N HCl を用い 5.5~6.0 に調節した。本来畑地用の春日井水耕液はアンモニア態窒素と硝酸態窒素が 20 ppm ずつであるが今回は硝酸態窒素のみを使用した。

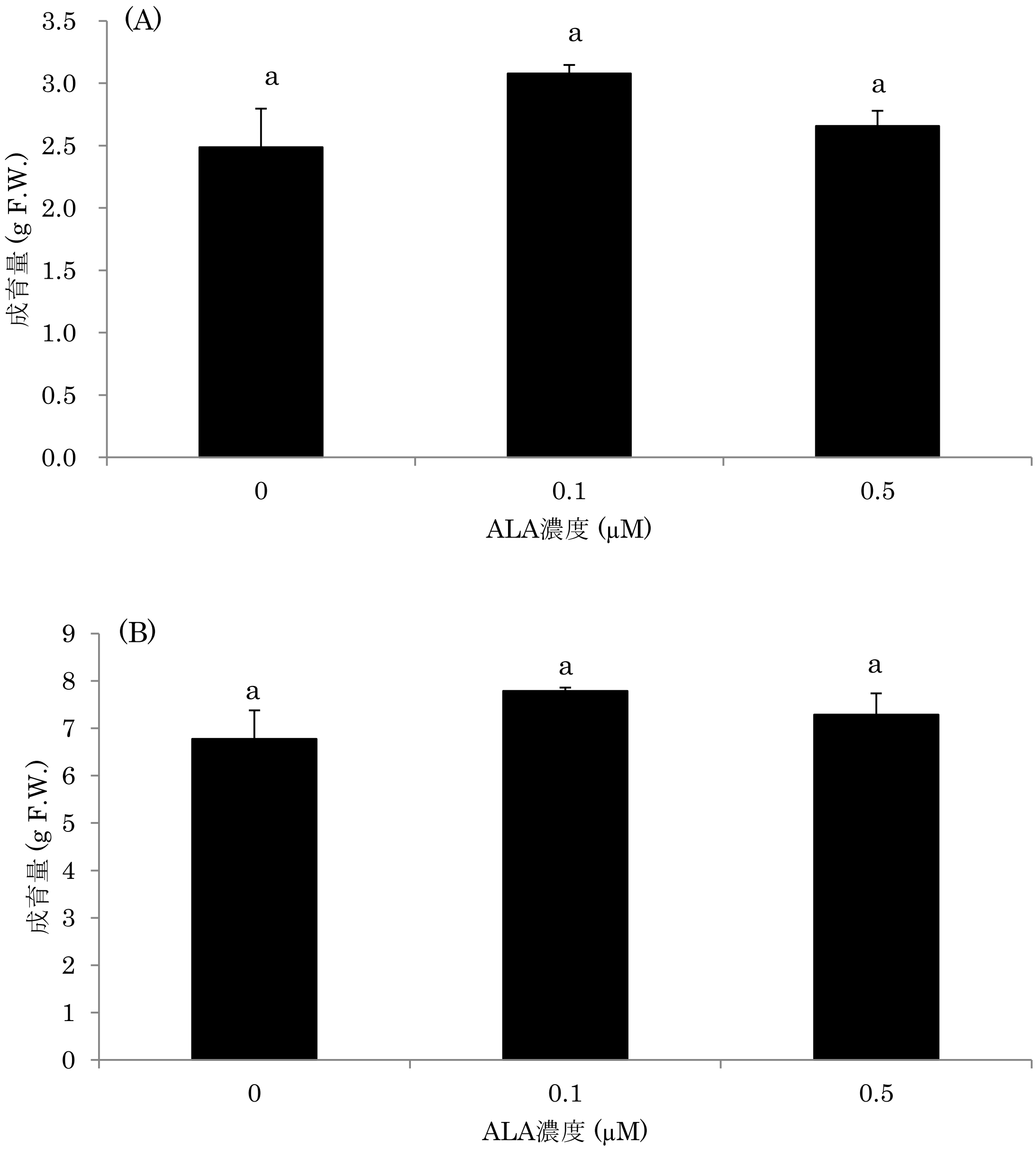


図1-1-1 ALAを12時間根部処理したトウモロコシ幼苗の（A）処理4日後と（B）処理 12 日後の成育量

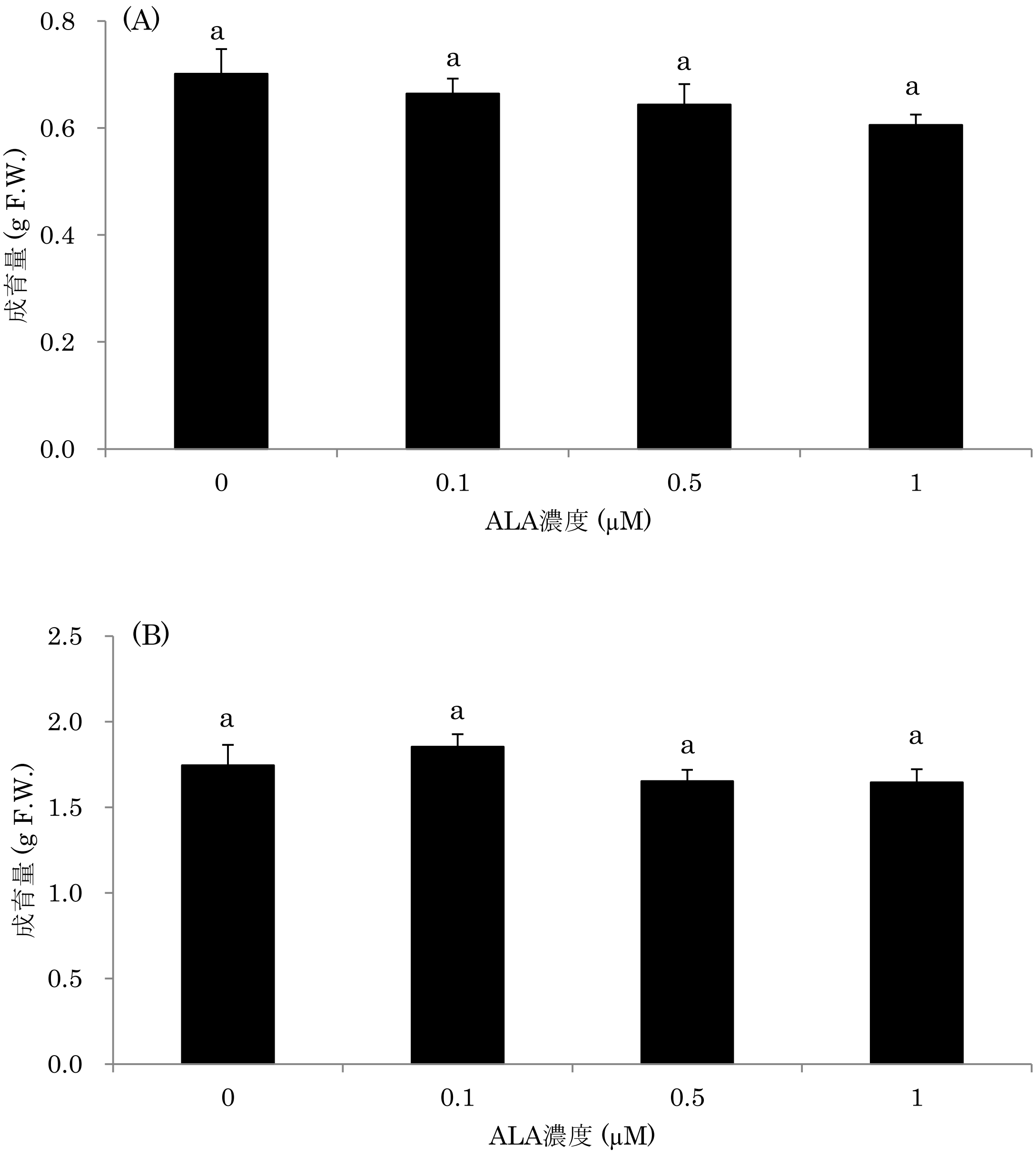
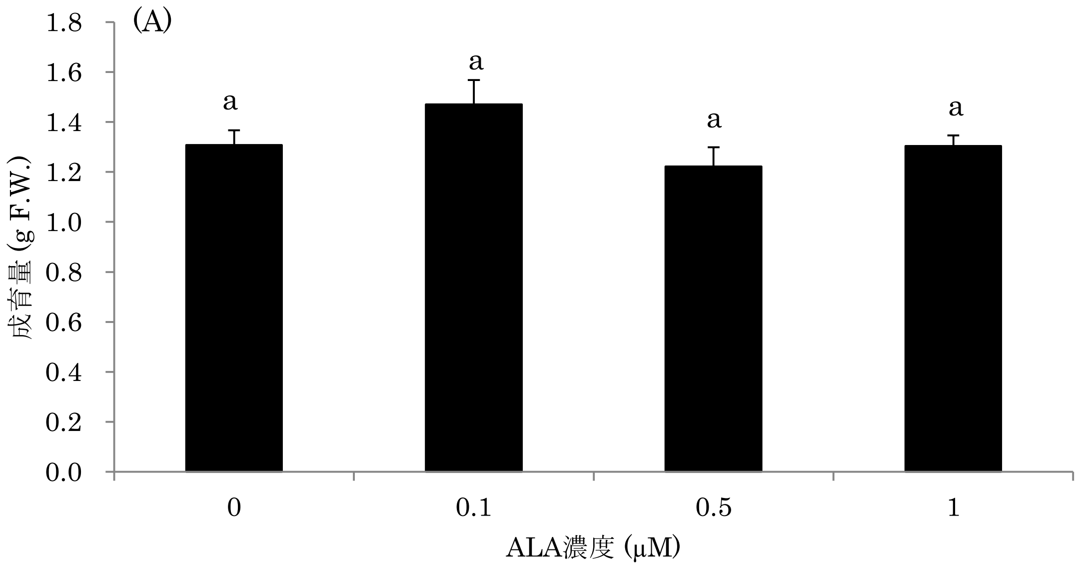


図 1-1-2 ALA を 12 時間根部処理したハツカダイコン幼苗の（A）処理 4 日後と（B）処理 12 日後の成育量



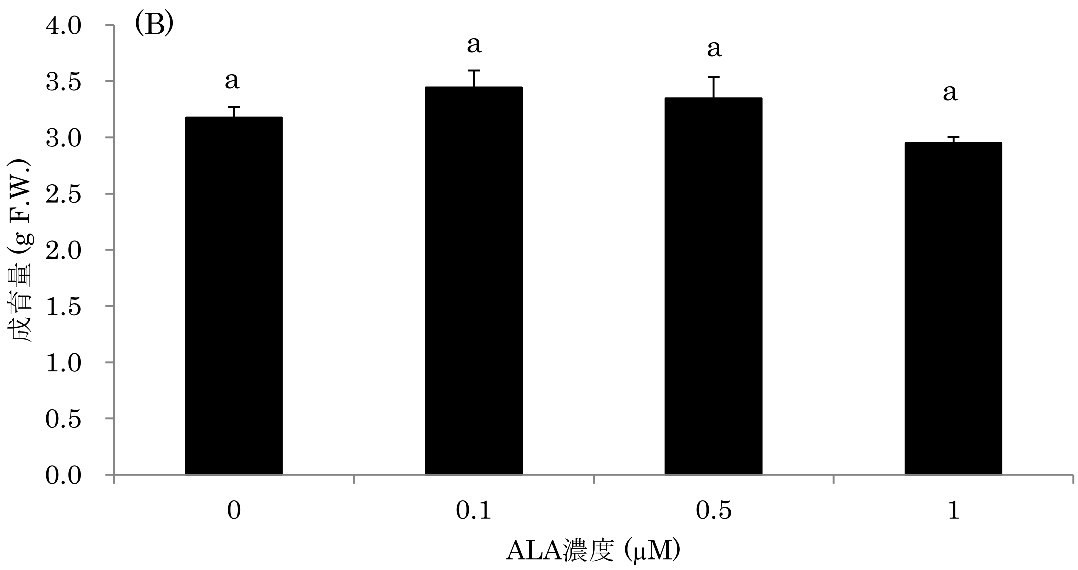
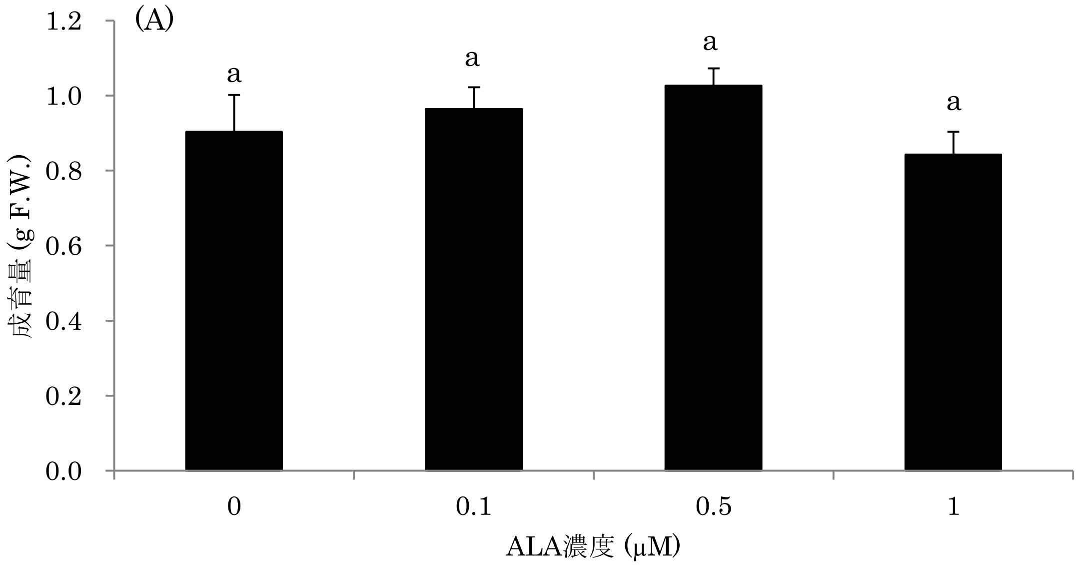


図 1-1-3 ALA を 12 時間根部処理したキュウリ幼苗の (A) 処理 4 日後と (B) 処理 12 日後の成育量

A: 処理 4 日後, B: 処理 12 日後



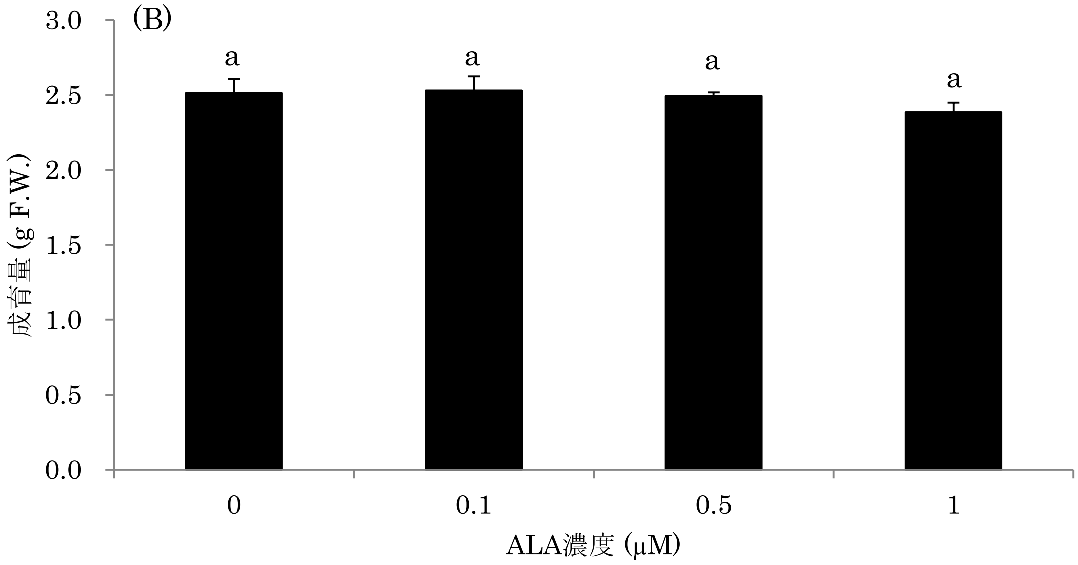


図 1-1-4 ALA を 12 時間根部処理したコムギ幼苗の（A）処理 4 日後と（B）処理 12 日後の成育量

第 2 節

1.2 ALA による成育促進効果の検討（継続根部処理）

1.2.1 材料および方法

・供試植物

トウモロコシ（*Zea mays* L. cv. ハニーバンタム）

・供試薬剤

ALA (5-aminolevulinic acid, Wako, 98.0%)

・植物の成育および生物試験

植物の成育および生体重の測定は第 1 節と同様に行ったが、播種から 2 葉期まではプラスチックハウス（筑波大学農林技術センター）において成育させた。

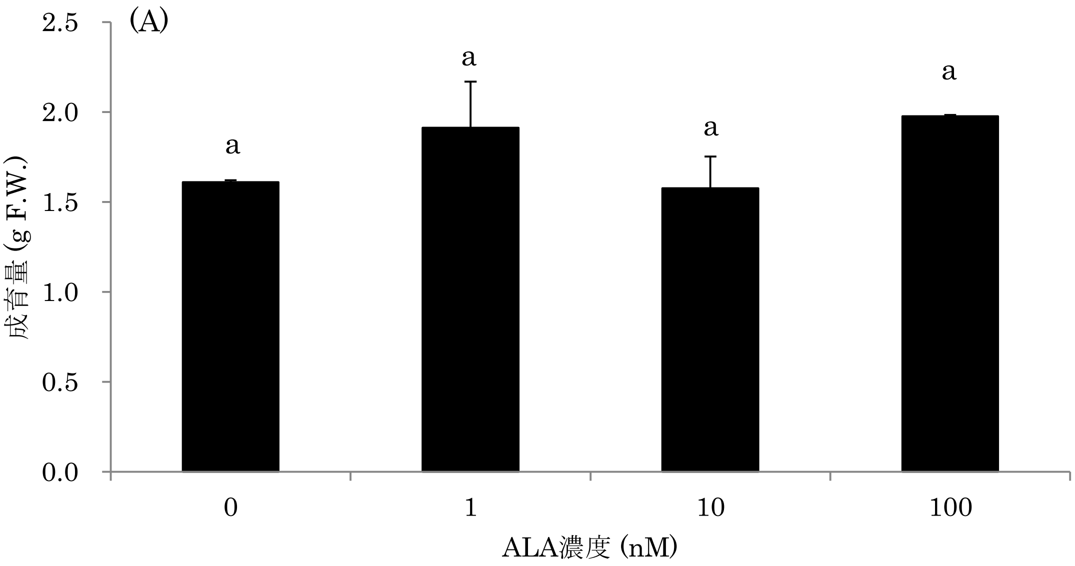
・ALA 処理

トウモロコシは ALA を含む（0, 1, 10, 100 nM）1/5 の濃度の水耕液で成育させ、根が試験期間中継続して ALA を吸収する条件とした。ALA を含む水耕液は 4 日毎に新しいものと交換した。実験は 3 連で 2 回繰り返し行った。

1.2.2　結果および考察

トウモロコシにおいて ALA を含む水耕液で成育させたところ 1~100 nM で成育促進効果が得られる傾向が見られた（図 1-2)。最も高い効果が得られたのは 100 nM ALA 処理区で、対無処理区比で処理 4 日後に 123% (図 1-2A)、処理 12 日後に 118%の成育量を示した（図 1-2B)。このことから ALA による成育促進効果は処理 4 日後には判定できると考えられた。また 100 nM (0.1 μM) ALA 処

理区では 12 時間根部処理において成育促進効果の傾向が見られており、継続処理ではポルフィリンが蓄積し成育阻害が起こる濃度である可能性も考えられたが、継続処理でも成育促進効果の傾向が見られた。このことから 100 nM ALA はポルフィリンの蓄積を起こす濃度ではないとも考えられるが、トウモロコシの成育をプラスチックハウスで行ったことにより、ポルフィリンが蓄積し難い状態かある程度蓄積しても酸化ストレスに対応できる状態になっていた可能性があると考えられる。いずれにしても成育促進効果を得られる条件の検討に当たり、プラスチックハウス内で植物を成育させることが適切であると考えられた。しかし、12 時間根部処理での生物試験と同様、継続根部処理でも有意な成育促進効果は認められなかった。根部ではヘム合成のために ALA が合成されているが、地上部では Chl の合成も行うためテトラピロール合成量は地上部の方が多いと考えられる。よって、根部処理よりも地上部に直接 ALA を処理することで ALA による成育促進効果が得やすい可能性があると考えた。そこで ALA を茎葉処理し成育促進効果の検討を行うこととした。



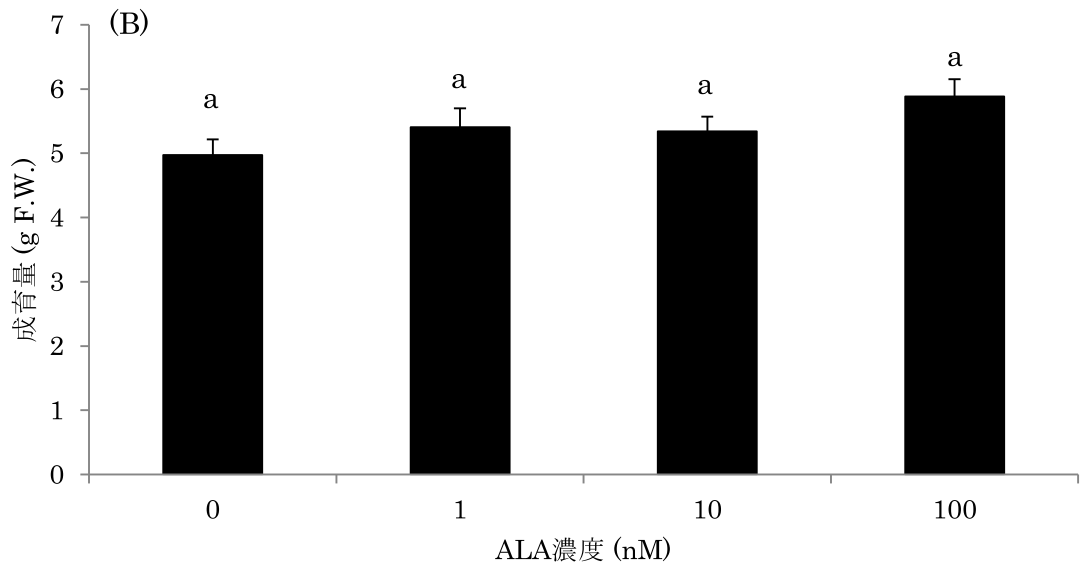


図 1-2 ALA を継続根部処理したトウモロコシ幼苗の（A）処理 4 日後と（B）処理 12 日後の成育量

第 3 節

1.3 ALA による成育促進効果の検討（茎葉処理）

1.3.1 材料および方法

・供試植物

トウモロコシ（*Zea mays* L. cv. ハニーバンタム）

ハツカダイコン（*Raphanus sativus* L. var. sativus cv. アカマルハツカ）

コムギ（*Triticum aestivum* L. cv. ノウリン 61）

・供試薬剤

ALA (5-aminolevulinic acid, Wako, 98.0%)

・植物の成育および生物試験

植物の成育および生体重の測定は第 2 節と同様に行った。

・ALA 処理

ALA は短時間の茎葉浸漬によって処理した。植物の地上部を ALA 溶液（0, 22.5, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 360 μM）に 2 秒間 2 回浸漬した。このとき根部は乾かないように留意した。ALA 溶液には界面活性剤として 0.05% (v/v) ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレートを加えた。実験は 3 連で 2 回以上繰り返し行った。

1.3.2 結果および考察

トウモロコシにおいて処理 4 日後の 90 μM ALA 処理区において成育促進効果の傾向が見られた（図 1-3-1)。一方で 180 μM ALA 処理区では成育促進効果が

見られなくなったため、90 μM 前後の濃度による成育への影響を調査した。その結果、150 μM までの範囲で ALA 濃度依存的な成育量の増加が認められ、150 μM ALA 処理区では対無処理区比 147%の成育量を示した（図. 1-3-2)。またこれは繰り返し実験でも同じ結果が得られた（P< 0.01)。よって根部処理よりも茎葉処理の方が ALA による成育促進効果を得やすいと考えられ、根部処理による成育促進効果が認められなかったハツカダイコンとコムギにおいても同様の方法で ALA による成育への影響を調査した。しかし、この 2 種では ALA 濃度依存的な成育への影響は認められなかった（Fig. 1-3-3, 1-3-4)。コムギではむしろ 150 μM ALA により成育阻害が起こる傾向が見られた。堀田ら（1997）の報告ではハツカダイコンとトウモロコシでどちらも 30 ppm ALA の茎葉散布によって成育促進効果が認められたものの、今回の条件ではトウモロコシのみで成育促進効果が認められた。よってトウモロコシへの茎葉散布が比較的成育促進効果を得やすい条件であると考えられた。一方でコムギは成育阻害を受けやすい植物種である可能性が示唆された。

今回の条件ではトウモロコシにおいて茎葉浸漬処理の方が根部浸漬処理よりも成育促進効果が得やすいという結果となったが、これは根部と地上部でのテトラピロール合成系の活性の違いによる可能性が考えられる。また、ハツカダイコンやコムギで成育促進効果が得にくかったことも ALA から Chl やヘム等の最終産物への合成効率がトウモロコシよりも低かったことが原因であると考えられる。さらにコムギは成育阻害の傾向が見られたことからテトラピロール中間体が蓄積しやすい植物種である可能性が考えられた。

ALA による成育促進効果には Chl 含量の増加による光合成活性の増加が関与しているという報告が多々あるため、今回成育促進効果が認められたトウモロコシで ALA による Chl 含量への影響を調査することとした。

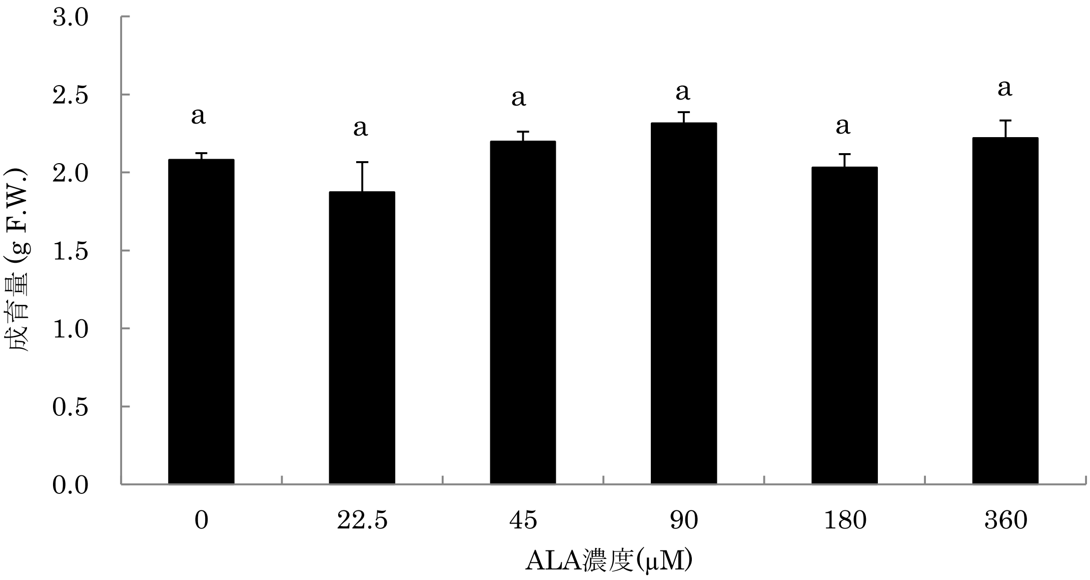


図 1-3-1 ALA 処理 4 日後のトウモロコシ幼苗の成育量

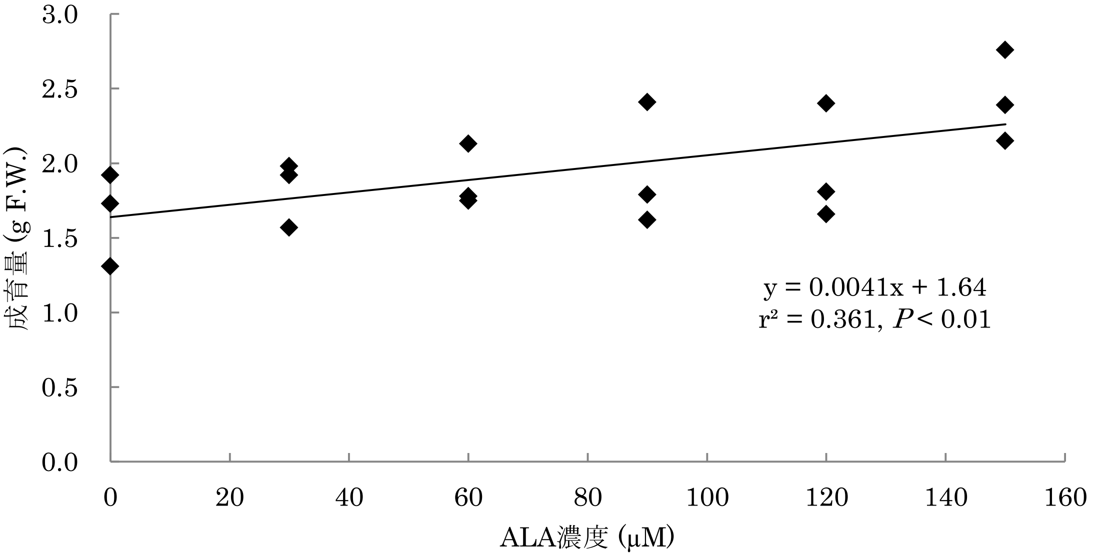


図 1-3-2 ALA 処理 4 日後のトウモロコシ幼苗の成育量

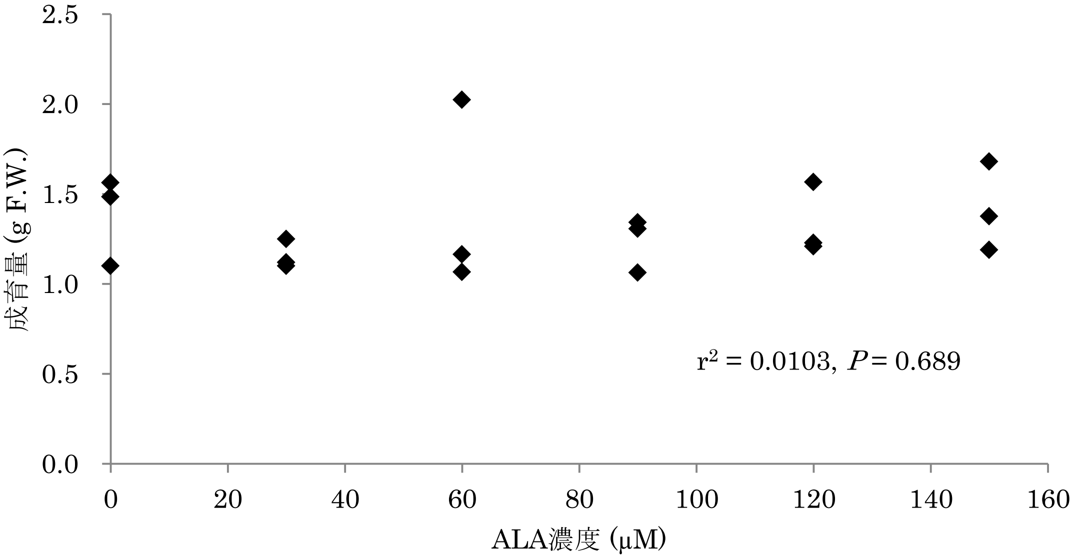


図 1-3-3 ALA 処理 4 日後のハツカダイコン幼苗の成育量

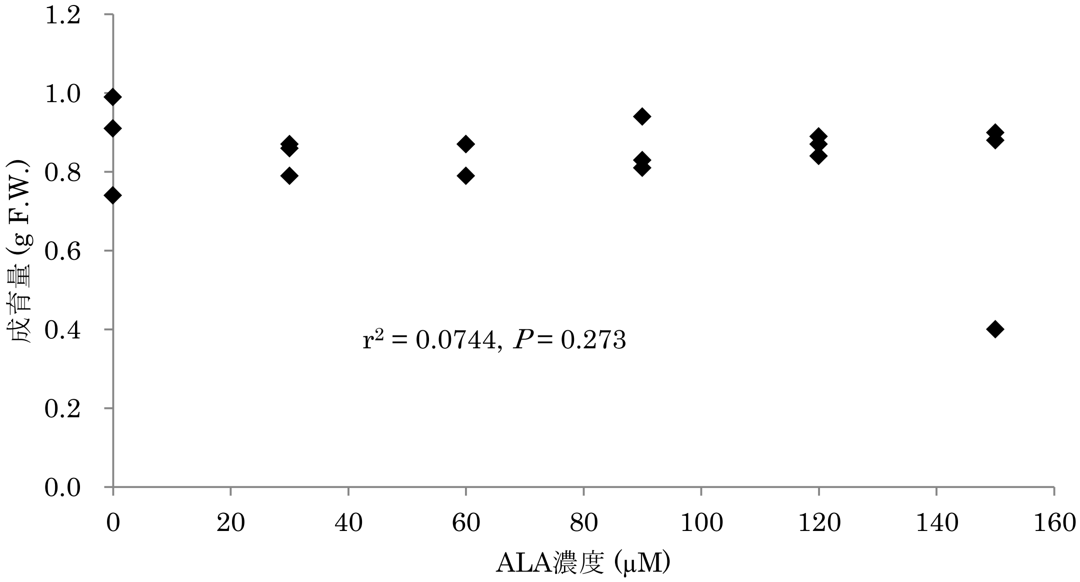


図 1-3-4 ALA 処理 4 日後のコムギ幼苗の成育量

第 4 節

1.4 ALA によるトウモロコシの Chl 含量への影響

1.4.1 材料および方法

・供試植物

トウモロコシ（*Zea mays* L. cv. ハニーバンタム）

・供試薬剤

ALA (5-aminolevulinic acid, Wako, 98.0%)

・植物の成育および ALA 処理

　トウモロコシの成育および ALA 処理は第 3 節と同様に行った。

・Chl の抽出および測定

　Chl の測定は Chappelle and Kim (1992) の方法を参考にして行った。ALA 処理 2 日後のトウモロコシの第 3 葉の中央部分からリーフディスク（直径 1 cm）をリーフパンチャーによって切り出した。リーフディスクは 2 個体から 1 枚ずつ採取し、5 ml ジメチルスルフォキシド（DMSO）に浸漬した。暗所にて 2 日置いた後、DMSO に抽出された Chl を分光光度計で 648 nm と 664 nm の吸光度から下の式によって算出した。実験は 3 連で 2 回繰り返し行った。

$$\text{Total Chl content } (\mu g/ml) = 7.15 \times A_{664} + 18.71 \times A_{648}$$

1.4.2 結果および考察

上に示した以外にも、ALA による成育促進効果に Chl 含量の増加が関与していると多く報告されており、クズにおいて 30~100 ppm ALA 溶液の散布処理によって 112~149%の Chl 含量が得られ、0.08%のペンタキープ®を加えた水耕液で成育させたナツメヤシで 179%の Chl 含量が得られたとされている（Xu ら, 2010; Youssef and Awad, 2008)。

本研究では処理 4 日後にトウモロコシにおいて成育促進効果が認められたため、ALA による生理的影響は処理 4 日よりも早い段階で起きていると考え、ALA 処理 2 日後に Chl 含量の増加が成育促進効果に関与しているか調査した。しかし、成育促進効果が得られる条件での ALA 濃度依存的な Chl 含量の増加は認められなかった（図 1-4)。ただし 30 μM ALA 処理区ではわずかに Chl 含量が増加する傾向が見られた。このことからテトラピロール化合物の前駆体である ALA 添加による最終産物である Chl の含量の増加が起こっていたと考えられたものの、生物試験で見られたような 150 μM まででの濃度依存的な Chl 含量の増加は認められなかったことから Chl 含量の増加は成育促進効果に大きく影響していないと考えられた。また 60 μM 以降では生体重あたりの Chl 含量の維持は見られたため、生体重の増加が認められたことを考慮すれば植物体全体としての光合成活性が増加している可能性は考えられる。しかし、これまで生体重あたりの Chl 含量の増加が多く報告されており、やはり今回の条件での成育促進効果には Chl 含量の変化は強く影響していないと考えられた。

Lepedus ら（2011）は葉の光合成器官の発達は、最初に Chl や光化学系に関わるタンパクが作られ、葉の成熟に従い電子伝達や炭酸固定に関わるタンパクの発現が増加していくと報告した。このことから若い葉で構成される幼苗に ALA を処理しても電子伝達や炭酸固定に関わるタンパクの発現が少ないことから Chl を利用しきれず分解されたか、PPIX からの分岐においてヘムへ流れる量

が増えていた可能性があり、それによって Chl 含量が増加し難かったと考えられる。さらに ALA による Chl 含量の増加が成育促進効果に大きく影響していないと考えられることからヘム等の他のテトラピロール化合物の成育促進効果への関与が考えられた。

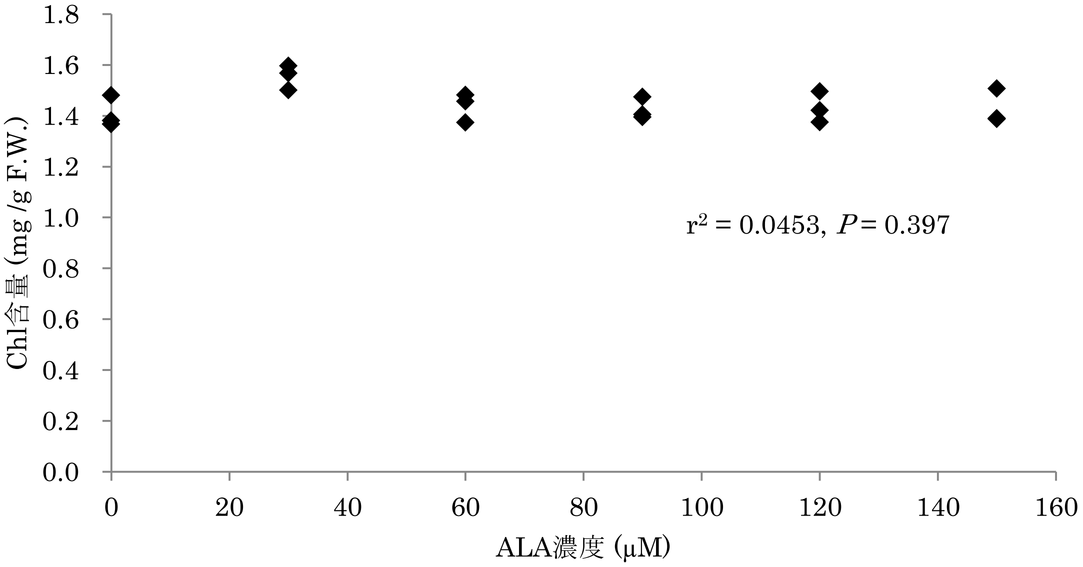


図 1-4 ALA 処理 2 日後のトウモロコシ幼苗の Chl 含量

第 2 章　ALA による窒素代謝能への影響

窒素代謝は光合成と同様植物の成育にとって非常に重要な代謝系である。切除したトウモロコシの葉に 200 µM の ALA 溶液を 24 時間浸漬と NR 活性が増加することが報告されている（Mishra and Srivastava, 1983)。NR は窒素代謝の最初の反応である NO_3^-から NO_2^-への反応を行うタンパクであり、この反応は窒素代謝の律速段階でもある（Kaiser ら, 1999)。NO_2^-はこの後 NiR によって NH_4^+へと代謝され、NH_4^+はグルタミン合成酵素によりグルタミン酸へ同化されグルタミンが生じる。さらにグルタミン酸合成酵素によりグルタミンと 2-オキソグルタル酸から 2 分子のグルタミン酸が生じ、このグルタミン酸から各種アミノ酸合成が進む。NR と NiR はどちらもテトラピロール含有タンパクであり NR はヘム（Campbell, 1996)、NiR はシロヘム含有（Murphy ら, 1974）であり、ALA によるテトラピロール合成への影響はこの 2 つのタンパクに対する影響へとつながる可能性がある。そして、NH_4^+の供給に関わるこれらのタンパクの活性の変化は窒素代謝能の変化へとつながる可能性があるため NR と NiR の活性の測定を行った。さらに実際に NH_4^+の供給量に変化が起きているかを調査するため NH_4^+の含量を測定した。

第 1 節

2.1 ALA によるトウモロコシの NR 活性への影響

2.1.1 材料および方法

・供試植物

トウモロコシ（*Zea mays* L. cv. ハニーバンタム）

・供試薬剤

ALA（5-aminolevulinic acid, Wako, 98.0%）

・トウモロコシの成育および ALA 処理

トウモロコシの成育および ALA 処理は第 1 章第 3 節と同様の方法で行った。

・NR の抽出

NR の抽出と活性の測定は Hageman and Flesher（1960）の方法を参考に行った。ALA 処理 2 日後のトウモロコシの第 2~4 葉を切除し直ちに液体窒素にて凍結させた。凍結させた葉（約 1 g F.W.）を乳鉢と乳棒を用い液体窒素存在下で磨砕し、4 ml の抽出バッファーを加えホモジェナイズした。抽出バッファーは 0.1 M Tris、0.3 mM EDTA-2Na、10 mM システインを含み、2 N HCl によって pH を 7.5 付近に調節した。破砕物は 20,000×*g*、15 分、4°C で遠心分離し、上清を 1 層の Miracloth®で濾過したものを粗酵素液として NR 活性の測定に用いた。抽出操作中は氷を用いて活性の測定まで常に低温の状態で維持し、抽出開始から活性の測定のための酵素反応を停止させるまでが 3 時間以内になるように留意した。

・NR 活性の測定

NR 活性は基質である NO_3^-と還元剤である NADH と粗酵素を混合し、生じる NO_2^-をナフチルエチレンジアミン法によって測定することで評価した。試験管に 1 ml の 0.1 M リン酸カリウムバッファー (pH 7.5)、0.2 ml の 0.1 M KNO_3、0.1 ml の蒸留水を入れ 30°C で保温した。この混合物に 0.5 ml の 0.1% (w/v) NADH を加え 30 秒間保温した後 0.2 ml の粗酵素液を加え酵素反応を開始した。30°C、15 分間の保温の後 1.5 M HCl を含む 1 ml の 1% (w/v) スルファニルアミドを加え、次に 0.3 M HCl を含む 1 ml の 0.02% (w/v) ナフチルエチレンジアミンを加えることで酵素反応の停止と NO_2^-の呈色反応を起こした。ナフチルエチレンジアミンを加えた後 30 分間静置し呈色反応を完了させ、分光光度計によって 540 nm の吸光度を測定した。酵素反応液の代わりに KNO_2 溶液を用い検量線を作成し、生じた NO_2^-の量を算出した。実験は 3 連で 2 回繰り返し行った。

2.1.2 結果および考察

生物試験により 150 μM までの範囲で処理 4 日後に成育促進効果が見られ、この成育促進効果に NR 活性の変化が関与しているかを調査するために処理 2 日後の NR 活性を測定した。90 μM のまで範囲で ALA 濃度依存的な活性の増加が認められた一方で (図 2-1A)、90~150 μM の範囲では濃度依存的な減少が認められた (図 2-1B)。またこれらは繰り返し実験でも同じ結果が得られた (どちらも $P < 0.05$)。

Mishra and Srivastava (1983) は 200 μM ALA に切除したトウモロコシの葉を 24 時間浸漬させることで対無処理区比 221%の NR 活性が得られたと報告したが、本研究では 90 μM ALA 処理区で 161%の NR 活性が得られた。本研究では浸漬時間が 2 秒間 2 回の合計 4 秒間であり、処理時間が短いため Mishra and Srivastava の報告より NR 活性の増加が少なかったと考えられる。ただし、処

理時間は 24 時間と 4 秒間と大きく違うため、処理時間と NR 活性の相関はそれほど大きくない可能性がある。

本研究の結果から、90 μM までの範囲では NR の活性増加による窒素代謝能の変化が ALA による成育促進効果に関与していると考えられたが、90~150 μM の範囲では成育促進効果に対する窒素代謝能の関与は弱い可能性があると考えられた。しかし、NH_4^+の供給に関わるタンパクとして NiR も存在し、NiR の活性の変化が窒素代謝能に影響する可能性があると考え、次に NiR 活性の測定を行った。

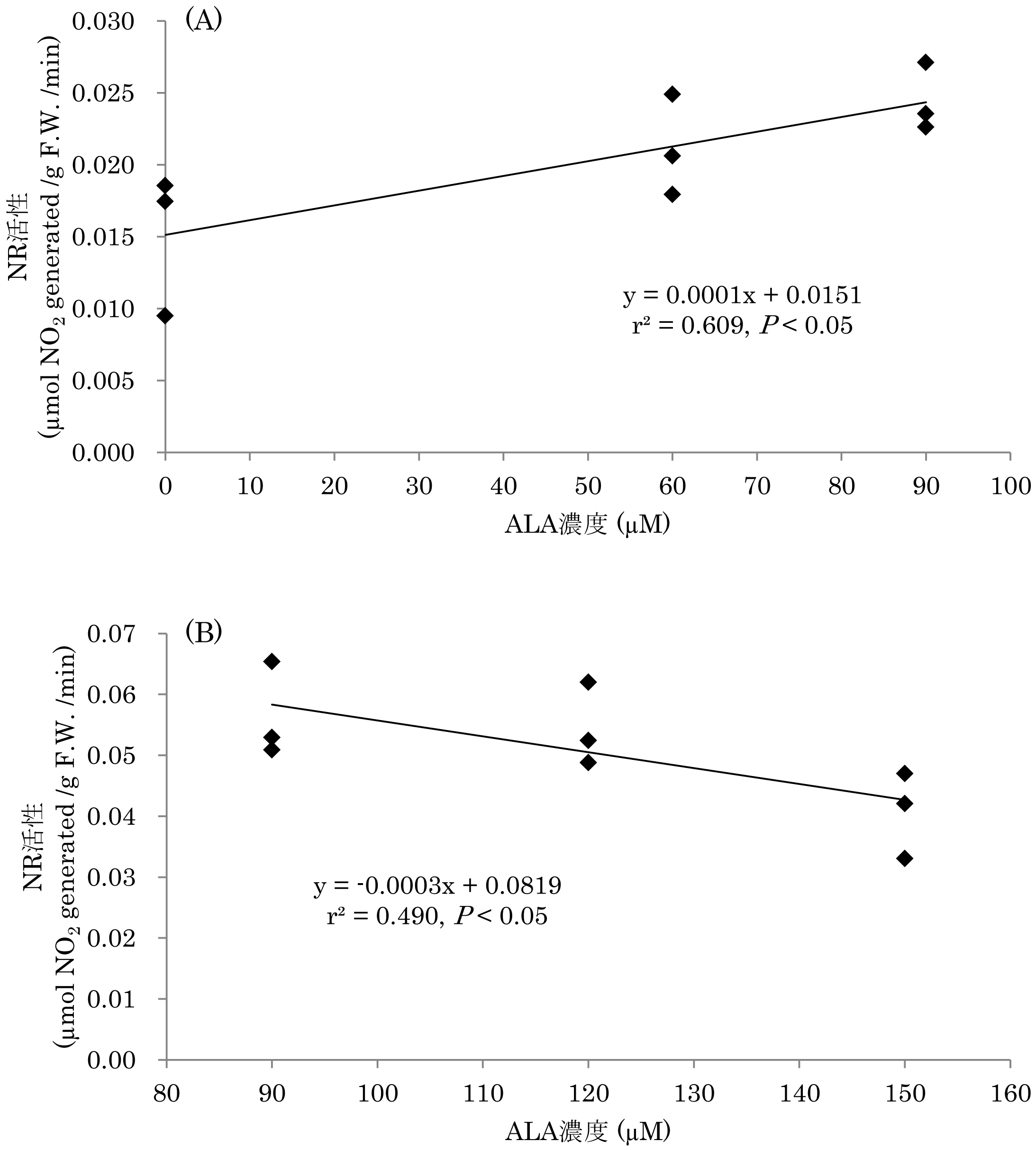


図 2-1 (A) 0~90 μM と (B) 90~150 μM ALA 処理 2 日後のトウモロコシ幼苗のNR 活性

第 2 節

2.2 ALA によるトウモロコシの NiR 活性への影響

2.2.1 材料および方法

・供試植物

トウモロコシ（*Zea mays* L. cv. ハニーバンタム）

・供試薬剤

ALA（5-aminolevulinic acid, Wako, 98.0%）

・トウモロコシの成育および ALA 処理とサンプリング

トウモロコシの成育と ALA 処理は第 1 章第 3 節、サンプリングは第 1 節と同様の方法で行った。

・NiR の抽出

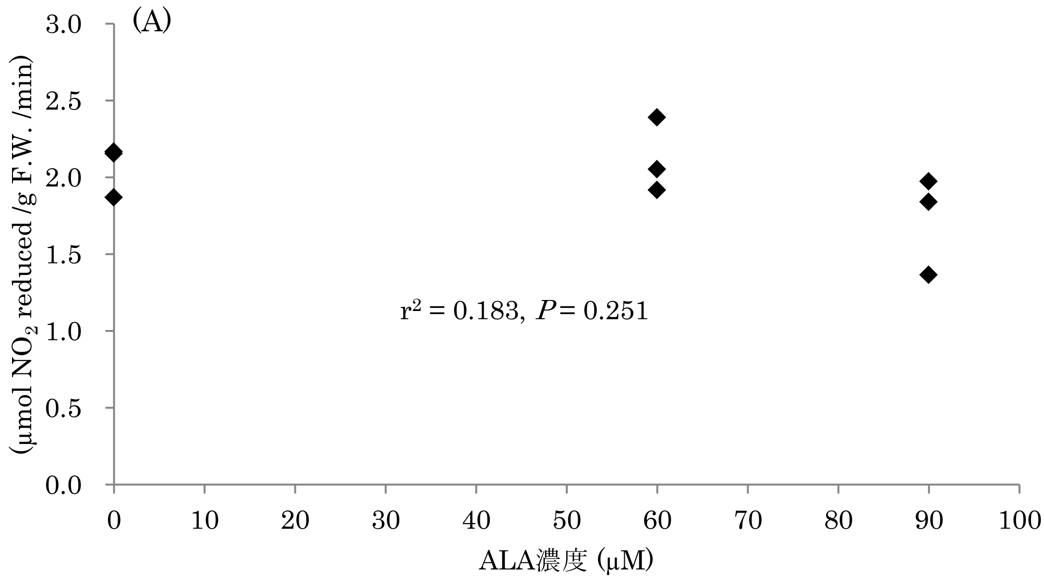
NiR の抽出および活性の測定は Ozawa and Kawahigashi (2006) の方法を参考に行った。凍結させた葉（約 1 g F.W.）を乳鉢と乳棒を用い液体窒素下で磨砕し、5 ml の抽出バッファーを加えホモジェナイズした。抽出バッファーは 0.05 M トリス、2 mM EDTA-2Na、5 mM システインを含み、2 N HCl によって pH を 7.9 付近に調節した。破砕物は 27,000×*g*、20 分、4°C で遠心分離し、上清を 1 層の Miracloth®で濾過したものを粗酵素液として NR 活性の測定に用いた。

・NiR 活性の測定

NiR 活性は、基質である NO_2^-と還元剤の $Na_2S_2O_4$、NiR への電子伝達担体のパラコート、粗酵素を混合し、減少する NO_2^-をナフチルエチレンジアミン法によって測定することで評価した。試験管に 0.5 ml の 0.2 M Tris (pH 7.5)、0.3 ml の 5 mM $NaNO_2$、0.1 ml の 20 mM パラコート、0.3 ml の蒸留水、0.6ml の粗酵素液を入れ 30°C で保温した。この混合物に 0.2 M $NaHCO_3$ を含む 0.2 ml の 0.12 M $Na_2S_2O_4$ を加え酵素反応を開始した。30°C、15 分間の保温の後激しく振盪することでパラコートの酸化を促し酵素反応を止め、反応液 0.1 ml と蒸留水 1.9 ml を混合し希釈した。希釈した反応液に 1.5 M HCl を含む 1 ml の 1% (w/v) スルファニルアミドを加え、次に 0.3 M HCl を含む 1 ml の 0.02% (w/v) ナフチルエチレンジアミンを加えることで NO_2^-の呈色反応を起こした。ナフチルエチレンジアミンを加えた後 30 分間放置し呈色反応を完了させ、分光光度計によって 540 nm の吸光度を測定した。検量線は NR と同様に作成し、減少した NO_2^-の量を算出した。実験は 3 連で 2 回繰り返し行った。

2.2.2 結果および考察

NR とは異なり、NiR では処理 2 日後に ALA 濃度依存的な活性の変化は認められなかった (図 2-2A, B)。生体内において NiR は NR よりも活性が高く NR が窒素代謝における律速段階とされている (Kaiser ら, 1999)。そのため ALA による NiR への影響が認められないとはいえ、第 1 節で認められた濃度依存的な NR 活性の変化によって窒素代謝能の変化が起きている可能性があると考えられた。そこで次に窒素代謝能の変化の証拠として NH_4^+の含量を測定した。



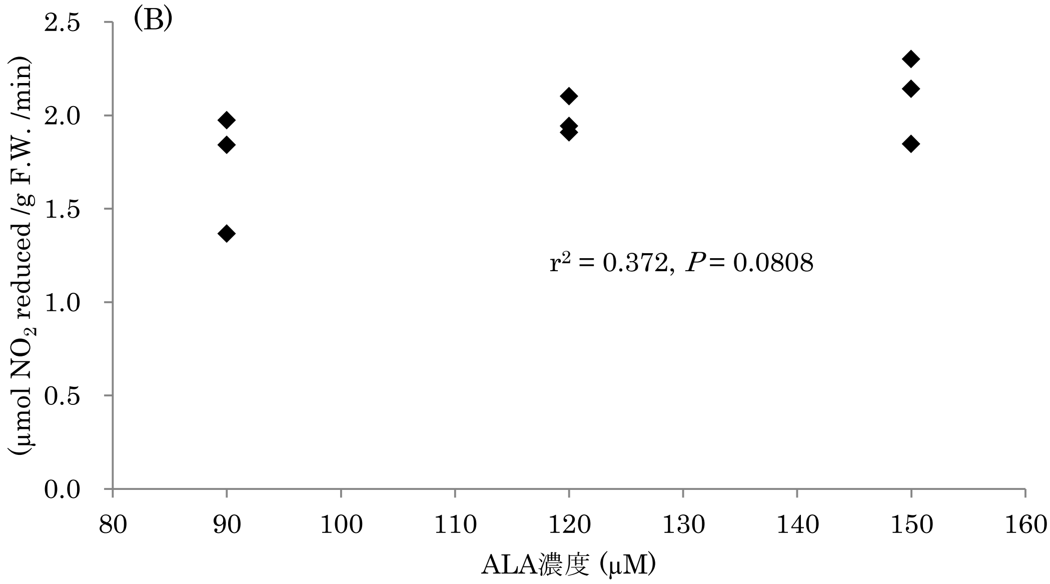


図 2-2 (A) 0~90 μM と (B) 90~150 μM ALA 処理 2 日後のトウモロコシの NiR 活性

第3節

2.3 ALAによるトウモロコシのNH_4^+含量への影響

2.3.1 材料および方法

・供試植物

トウモロコシ（*Zea mays* L. cv. ハニーバンタム）

・供試薬剤

ALA（5-aminolevulinic acid, Wako, 98.0%）

・トウモロコシの成育およびALA処理およびサンプリング

トウモロコシの成育およびALA処理は第1章第3節、サンプリングは第1節と同様の方法で行った。

・NH_4^+の抽出

NH_4^+の抽出はIwata and Deguchi（1995）の方法を参考に行った。凍結させた葉（約1 g F.W.）を乳鉢と乳棒を用い液体窒素下で磨砕し、10 mlの80% エタノールを加えホモジェナイズした。破砕物は 70°C、15 分で可温した後、10,000×*g*、15分、4°Cで遠心分離し、上清を回収した後、残渣を5 mlの80% エタノールで 2 回洗い最初の上清と合わせた。エタノール抽出物はロータリーエバポレーターで乾固させ、5 ml の蒸留水でNH_4^+を再溶解した。再溶解液を再度遠心分離しChl等の沈殿を取り除き以降のNH_4^+の精製に使用した。

・NH_4^+の精製および定量

　NH_4^+の定量はインドフェノール法によって行ったが、この定量法は様々なアミンを呈色してしまうため NH_4^+の精製を行う必要があった。Conway and Byrne (1933) は小さい容器内で高 pH により揮散した NH_3 は同じ容器内にある酸性の NH_3 吸収剤に効率よく回収されることを示した。この方法は Conway 微量拡散法と呼ばれ、Conway 装置と呼ばれる器具が知られているが、筆者はこの原理を参考に以下の様なバイアル瓶を用いた NH_4^+の精製を試した。30 ml バイアル瓶中で 1 ml の再溶解液と 1 ml の飽和ホウ酸バッファー（pH 10）を混ぜ、100 µl の 0.25 M H_2SO_4 を染み込ませた濾紙をバイアル瓶の上から垂らし、ゴム栓とアルミキャップにより密封した。2 日間静置後、濾紙を 5 ml の蒸留水に浸漬することで NH_4^+を回収し、定量に用いた。NH_4^+の呈色反応はアンモニア-テストワコー（Wako, Japan）を使い、分光光度計で 625 nm の吸光度を測定した。$(NH_4)_2SO_4$ を用い検量線を作成した。また$(NH_4)_2SO_4$ を用い上述の精製作業を行ったが、ほぼ 100%の回収率が得られた。実験は 5 連で 2 回繰り返し行った。

2.3.2 結果および考察

　NH_4^+含量では NR 活性と同様の結果が得られた。処理 2 日後において 90 µM までの範囲では ALA 濃度依存的な NH_4^+含量の増加が認められ、90~150 µM の範囲では ALA 濃度依存的な減少が認められた（図 2-3A, B)。またこれらは繰り返し実験でも同じ結果が得られた（どちらの濃度域も $P < 0.05$)。窒素代謝の律速段階は NR であることが知られているが（Kaiser ら, 1999)、今回の条件でも NR 活性の増加が NH_4^+の供給力の強化につながったと考えられ、90 µM までの範囲では NR 活性の増加による窒素代謝能の強化が成育促進効果に関与していると考えられた。一方で 90~150 µM の範囲では成育促進効果に対する窒素代謝の関与は弱いものと考えられた。

NH_4^+の同化に関わるグルタミン合成酵素（GS）の阻害剤が知られており、このGS阻害剤によってNH_4^+の蓄積が起こることが知られているが、この時グルタミン酸が枯渇することで光呼吸でのグリオキシル酸、グリコール酸の蓄積が起こり、炭酸固定効率の低下からチラコイド膜の過還元が起こる（日本農薬学会, 2003)。チラコイド膜の過還元は酸化ストレスにより成育阻害を起こすことが知られているが（Mittler, 2002)、本研究では成育促進効果が確認されている。したがって、今回認められたNH_4^+含量の増加はNH_4^+の消費が抑制されていた可能性よりも NH_4^+の供給が増加していた可能性の方が高いと考えられた。またNH_4^+の蓄積自体も植物の成育阻害を起こすことが知られているが、今回認められたNH_4^+含量の増加は成育阻害につながる程度のものではないと考えられた。

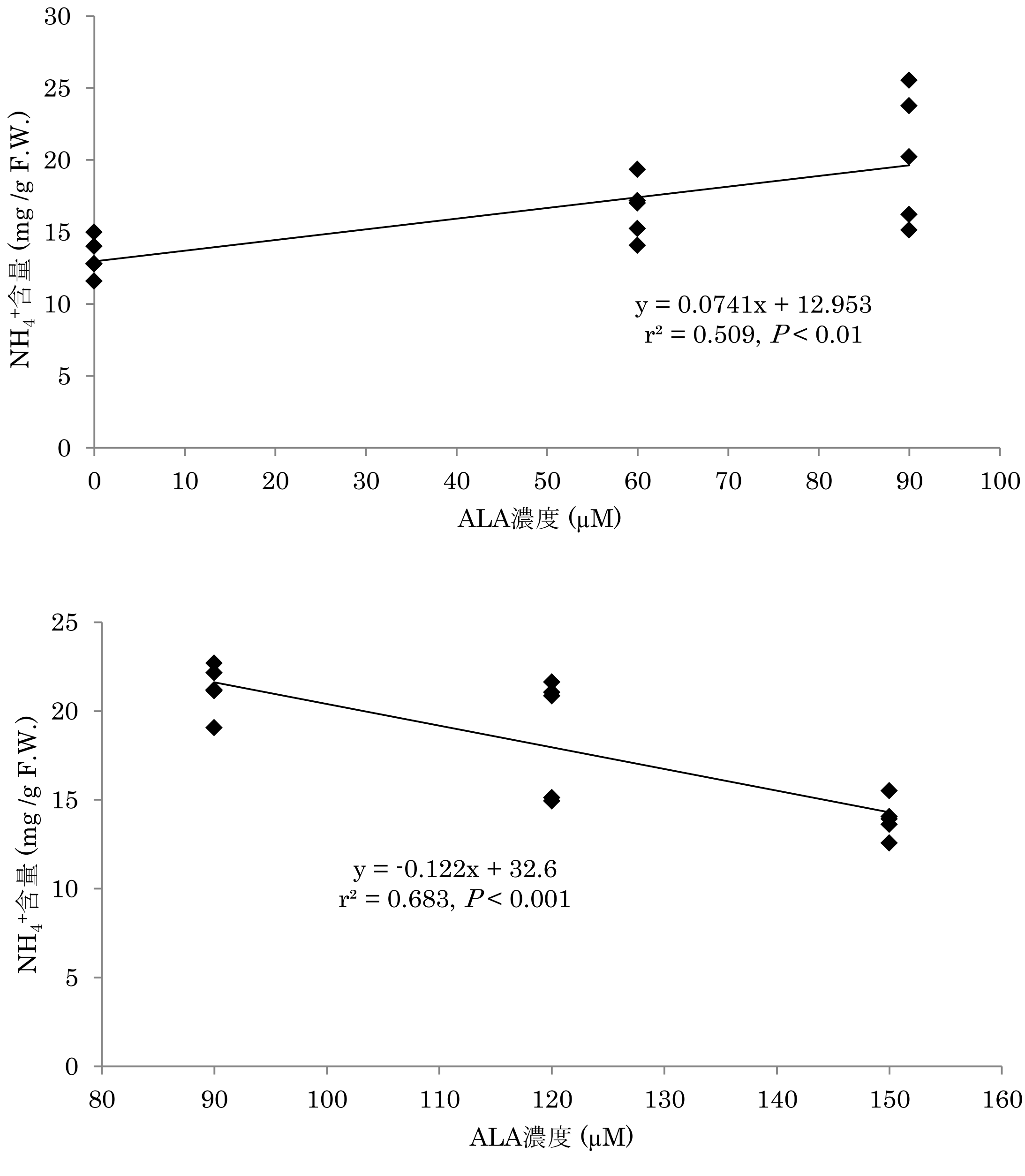


図 2-3 (A) 0~90 μM と (B) 90~150 μM ALA 処理 2 日後のトウモロコシの NH_4^+ 含量

第 3 章　ALA によるトウモロコシのヘム含量への影響

ここまでの結果から 90 μM までの範囲では ALA による成育促進効果に窒素代謝能の強化が関与していることが示唆され、窒素代謝能の強化には NR 活性の増加が寄与していると考えられた。NR はヘム含有タンパクであり（Campbell, 1996)、これまでに ALA によるヘム含量の増加がヘム含有タンパク（抗酸化酵素）の活性増加を引き起こす可能性が指摘されているが（Nishihara ら，2003)、ALA による成育促進効果が得られる条件下でのヘムとヘム含有タンパクの関わりを解析した報告はない。

Woodson ら（2011）は葉緑体でのヘム合成が核での遺伝子発現の調節に関与していると報告しており、Schmidt ら（2002）はヘミンによって CAT の翻訳が活性化することを報告した。これらのことからヘムはタンパクの発現や活性を異なる段階で調節すると考えられ、さらに外因性の ALA によるヘム合成の変化が様々なタンパクの活性に影響を与えることも考えられる。

そのため、今回の成育促進効果と NR 活性の増加が認められた条件でヘム含量が増加しているか検討した。

3.1 材料および方法

・供試植物

トウモロコシ（*Zea mays* L. cv. ハニーバンタム）

・供試薬剤

ALA (5-aminolevulinic acid, Wako, 98.0%)

・トウモロコシの成育および ALA 処理およびサンプリング

トウモロコシの成育および ALA 処理は第 1 章第 3 節、サンプリングは第 2 章と同様の方法で行った。

・ヘムの抽出

ヘムの抽出および定量は高橋と増田（2009）の方法を参考に行った。凍結させた葉（約 1 g F.W.）を乳鉢と乳棒を用い液体窒素存在下で磨砕し、20 ml の 80% (v/v) アセトンを加えホモジェナイズした。破砕物は 10,000×*g*、10 分、4°C で遠心分離した。Chl やその中間体等の色素が含まれる上清は捨て、残渣を 80% アセトンで洗い再度遠心分離した。この残渣を洗う操作は上清に色素が完全に含まれなくなるまで繰り返した。ヘムは 2% (w/v) HCl を含む 20 ml のアセトンで抽出した。遠心分離後、再度抽出操作を行い 2 回分の上清を合わせヘム粗抽出液とした。粗抽出液は測定の直前に Tris-HCl（pH 8.4）で 100 倍に希釈し定量に用いた。

・ヘムの定量

ヘムの定量は酵素学的手法を用いて行った。セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）は補因子としてヘムを必要とし、ルミノールと過酸化水素による蛍光

を発する反応を触媒する。そのためヘムを含まない HRP のアポタンパク(APO-HRP) とヘムを混合することで、HRP を再構成させルミノール反応による化学発光の量からヘムの濃度を測定することができる。この方法は高感度で精度も高く簡便にヘムを測定できる優れた方法である。96 ウェルのプレートの各ウェルに 10 μl の 25 nM APO-HRP、85~90 μl の 100 mM Tris-HCl (pH 8.4)、5 μl のヘム抽出物もしくは 0~5 μl の 0.5 nM ヘム標準液を全量 100 μl となるように混合し、室温にて 30 分放置し HRP の再構成を行った。ヘム標準液はヘミンを用いて作成した。その後 HRP 基質 (Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP substrate, MILLIPORE, USA) を等量混合したものを 100 μl ずつ加え、2 分後にルミノメーターを用い蛍光を測定した。ヘム標準液による蛍光から検量線を作成し、ヘムの含量を算出した。実験は 4 連で 2 回繰り返し行った。

3.2 結果および考察

90 μM までの範囲で認められた ALA 濃度依存的な NR 活性の増加にヘム含量が関与している可能性を調査するために、処理 2 日後のヘムの定量を行った。90 μM までの範囲では NR 活性や NH_4^+含量、成育量と同様 ALA 濃度依存的なヘム含量の増加が認められた (図 3A)。またこれは繰り返し実験でも同じ結果であった ($P < 0.05$)。これらの結果から 90 μM までの範囲での ALA による成育促進効果は NR 活性の増加による窒素代謝能の強化が関与しており、NR 活性の増加はヘム含量の増加が関わっていると考えられた。これまでに ALA によるヘム含有タンパクである抗酸化酵素の活性の増加が報告されており (Nishihara ら, 2003)、ALA によるヘム含量の増加がヘム含有タンパクの活性を増加させると考えられてきたが、詳細には調査されていなかった。本研究では 90 μM まで

の範囲で NR 活性の増加とヘム含量の増加が認められた。ALA によるヘム含量の増加とヘムタンパクの活性増加を同時に示したものは本研究が初めてである。

一方で、90~150 μM の範囲では ALA 濃度依存的なヘム含量の変化は認められなかった（図 3B)。これは NR 活性や NH_4^+含量で認められた濃度依存的な減少とは異なる結果となった。すなわち、150μM ALA 処理区では 90 μM ALA 処理区と同程度のヘムが存在していたとみなすことができ、90~150 μM の範囲で無処理区よりも高いレベルのヘムが存在していた可能性が考えられた。これにより、90~150 μM の範囲でも増加したヘムにより NR を含むヘムタンパクの活性に影響があったと考えられた。

よって処理 2 日後において 90~150 μM の範囲では NR 活性や NH_4^+含量の濃度依存的な減少が認められたものの、その前後でヘム含量の増加により窒素代謝能が強化された可能性があると考えられた。

ALA 合成に関わるグルタミル-tRNA はヘムによって阻害されることが知られている（Meskauskiene and Apel, 2002)。本研究では ALA によるヘム含量の増加が認められたため、このフィードバック阻害により内因性の ALA 合成が阻害されていた可能性があり、この内因性の ALA 合成の阻害により Chl 含量が増加し難くなっていた可能性も考えられる。

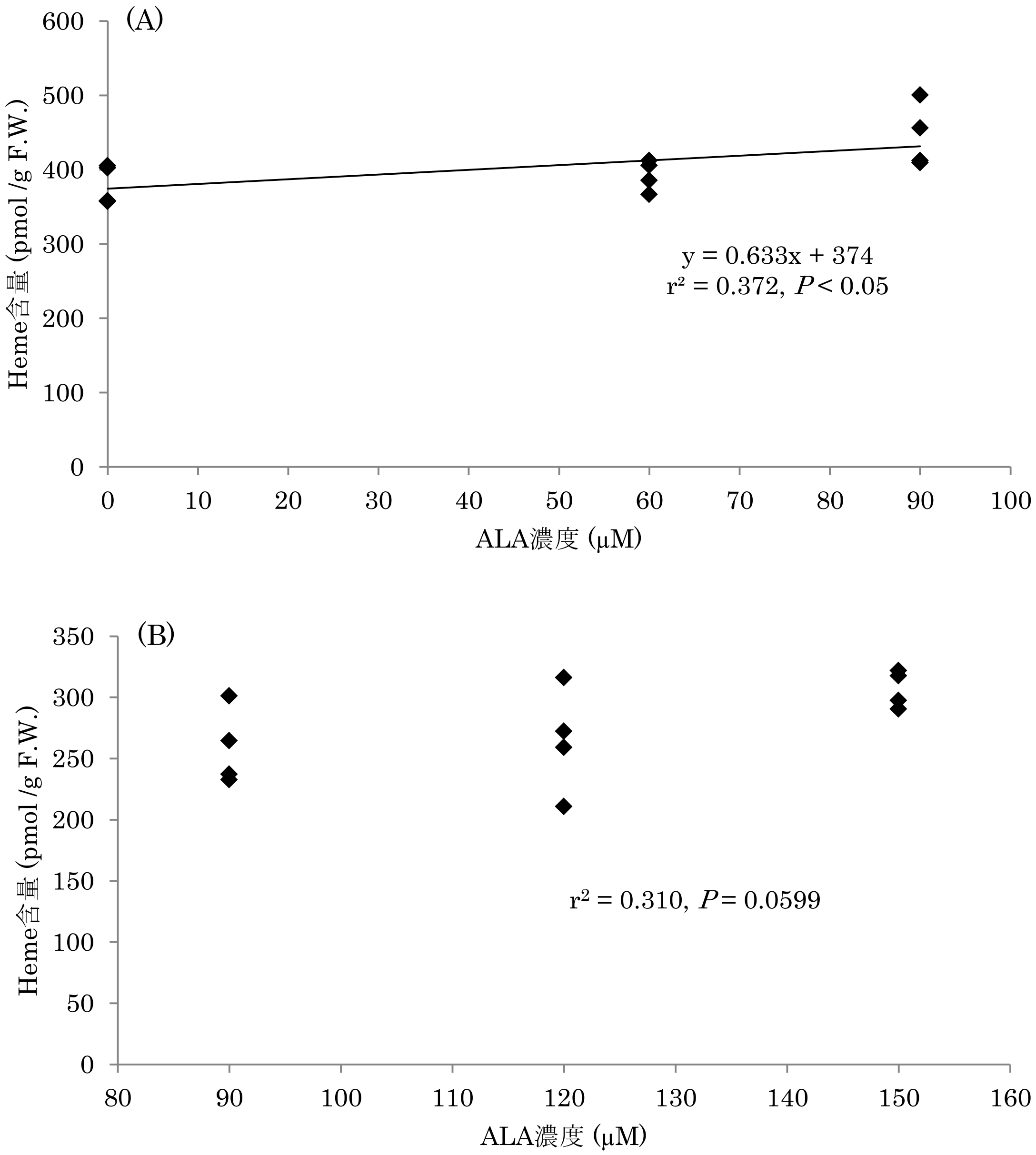


図 3 (A) 0~90 μM と (B) 90~150 μM ALA 処理 2 日後のトウモロコシのヘム含量

第 4 章　ALA 処理後短時間でのトウモロコシの窒素代謝能への影響

NR と NiR によって供給された NH_4^+はグルタミン合成酵素（GS）とグルタミン酸合成酵素（GOGAT）により同化され（GS-GOGAT サイクル）、2 分子のグルタミン酸が作られ、このグルタミン酸から他のアミノ酸へと合成が進む。

これまでの結果から 90 μM までの範囲では ALA による成育促進効果に窒素代謝能の強化が関わっていると考えられた。一方で 90~150 μM の範囲では成育促進効果に対する窒素代謝能の強化の関与は弱いと考えられたものの、ヘムは無処理区よりも高いレベルで存在している可能性が示されたため、90~150 μM の範囲でもヘム含量増加による窒素代謝能の変化が起きていた可能性が考えられた。また、NR は NO_2^-の毒性を回避するため様々な調節を受けており（Kaiser and Huber, 1994）、ALA 処理等の外因性の影響により NR 活性が増加しても、そのまま継続はしないとも考えられる。

ALA 処理 2 日後では 90~150 μM ALA による窒素代謝能の強化が認められなかったため、処理 2 日の前後の窒素代謝能の変化を調査するために、処理 1 日後と 3 日後の遊離アミノ酸の定量を行った。さらにより早い段階での窒素代謝能への影響を調査するため ALA 処理 8 時間後の NH_4^+含量を測定した。

第 1 節 ALA による遊離アミノ酸含量への影響

4.1.1 材料および方法

・供試植物

トウモロコシ（*Zea mays* L. cv. ハニーバンタム）

・供試薬剤

ALA（5-aminolevulinic acid, Wako, 98.0%）

・トウモロコシの成育および ALA 処理およびサンプリング

トウモロコシの成育および ALA 処理は第 1 章第 3 節、サンプリングは第 2 章と同様の方法で行った。

・遊離アミノ酸の抽出および定量

遊離アミノ酸の定量は Lim ら（2007）の方法を参考に行った。凍結させた葉（約 1 g F.W.）を乳鉢と乳棒を用い液体窒素存在下で磨砕し、2.5 ml の 15 mM HCl を加えホモジェナイズした。2,000×*g*、2 分で遠心分離し、上清の 0.5 ml を取り、0.1 ml の 10% 5-スルホサリチル酸を加え氷上で 15 分静置し除タンパクした。その後 2,000×*g*、15 分で遠心分離し、上清を 1 N NaOH で pH 2.2 に調節した。自動アミノ酸分析装置を使いアミノ酸の測定を行った。実験は 3 連で 2 回繰り返し行った。

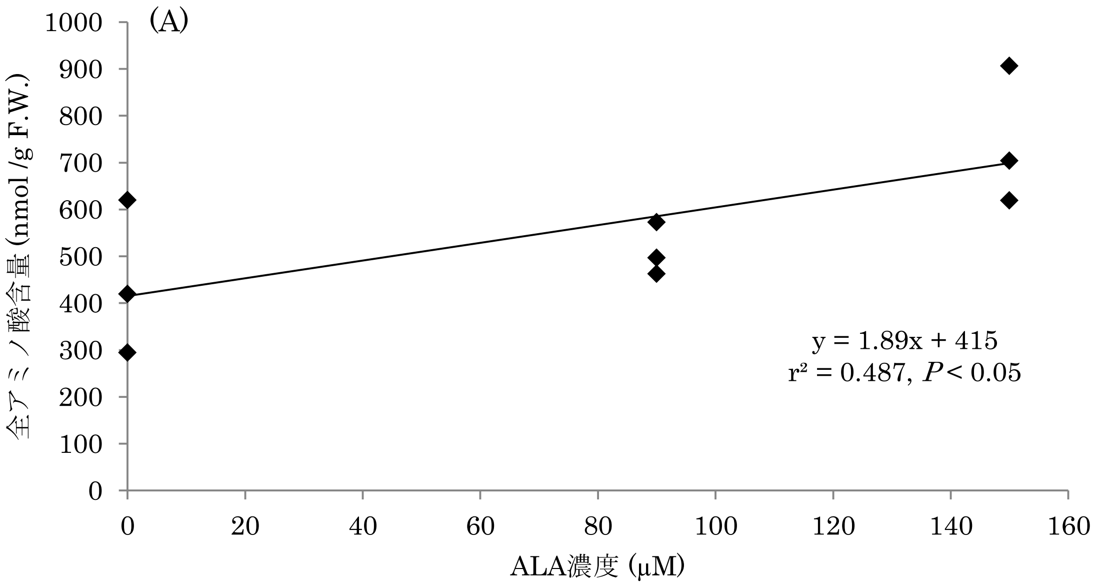
4.1.2　結果および考察

窒素代謝能への影響の結果としてアミノ酸含量の変化が起こると考え、遊離アミノ酸の定量を行った。処理 1 日後と 3 日後共に生物試験と同様、150 μM ま

での範囲で ALA 濃度依存的なアミノ酸含量の増加が認められた（図 4-1A, B)。またこれらは繰り返し実験でも同じ結果が得られた（どちらも $P < 0.05$)。よって 90 μM までの範囲だけでなく 90~150 μM の範囲でも成育促進効果に窒素代謝能の強化が関与していると考えられた。

測定は各アミノ酸に分けて定量しており、合計したものを結果として示したが、それぞれのアミノ酸で特異的に含量が変化したものはなく、どのアミノ酸も概ね ALA による含量の増加を示した。NH_4^+の同化は GS-GOGAT サイクルによって行われるため、グルタミンやグルタミン酸が増加しやすいと考えられたが、各アミノ酸への合成が早く進むためにこれら 2 つのアミノ酸が特別多く蓄積することは無かったと考えられた。

さらに処理 1 日後の時点でアミノ酸含量の増加が認められたことから処理 1 日以前に窒素代謝能の強化が起きていた可能性が示唆された。そこで処理 8 時間後の NH_4^+含量を測定することとした。



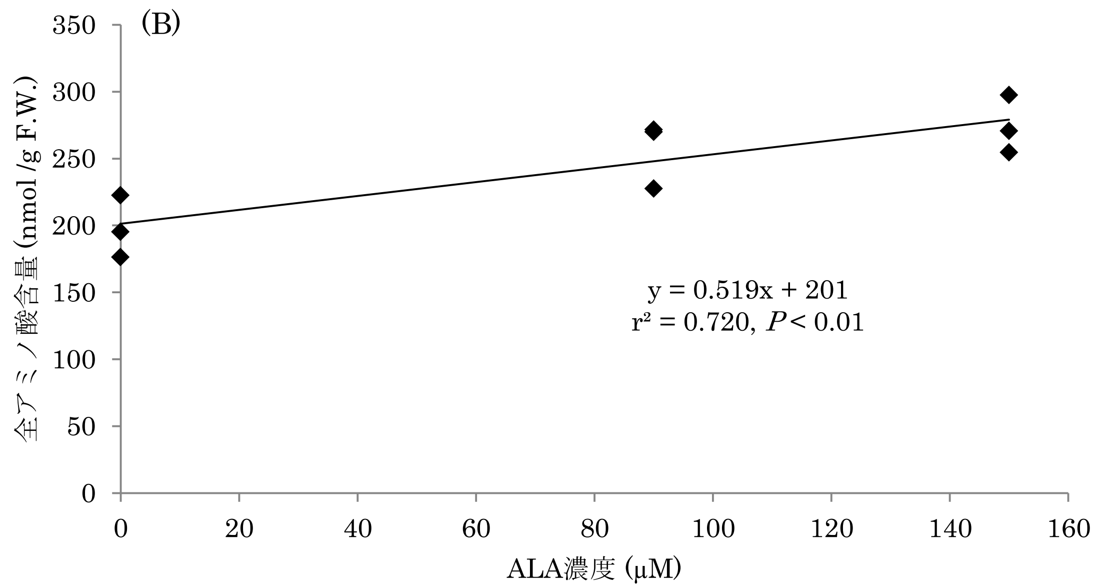


図 4-1 ALA 処理したトウモロコシ幼苗の（A）処理 1 日後と（B）処理 3 日後の全アミノ酸含量

第 2 節　ALA 処理 8 時間後の NH_4^+含量への影響

4.2.1　材料および方法

・供試植物

トウモロコシ（*Zea mays* L. cv. ハニーバンタム）

・供試薬剤

ALA（5-aminolevulinic acid, Wako, 98.0%）

・トウモロコシの成育および ALA 処理およびサンプリング

トウモロコシの成育および ALA 処理は第 1 章第 3 節、サンプリングは第 2 章と同様の方法で行った。40 ppm の NO_3 で成育させる場合は 2 葉期以降の水耕液中の NO_3 の濃度を増やした。

・NH_4^+定量

NH_4^+の抽出および精製、定量は第 2 章第 3 節と同様の方法で行った。実験は 3 連で 2 回繰り返し行った。

4.2.2　結果および考察

ALA 処理 1 日後に遊離アミノ酸含量が増加していたため、処理 1 日以前に窒素代謝能の強化が起きていた可能性があると考え、処理 8 時間後の NH_4^+含量を測定した。これまでと同じ条件である 2 葉期以降に 8 ppm NO_3 で成育させた場合は ALA 濃度依存的な NH_4^+含量の変化は認められなかった（図 4-2-1)。そこで NH_4^+が蓄積しやすい条件を作るため 2 葉期以降に 40 ppm NO_3 で成育させたところ 150 μM までの範囲で ALA 濃度依存的な NH_4^+含量の増加が認められた

(図 4-2-2)。またこれは繰り返し実験でも同じ結果が得られた（P< 0.05)。よって ALA 処理 8 時間後には窒素代謝能の強化が起こっていた可能性が示された。しかし、処理2日後では8 ppm NO_3で成育させた場合でも90 µM処理区でNH_4^+含量の増加が認められたため、処理 8 時間以降で窒素代謝能はさらに強化されたと考えられる。また処理2日後ではNR活性やNH_4^+含量の増加が認められなかった90~150 µMの範囲においても処理8時間後では窒素代謝能が強化されていたと考えられた。この 40 ppm NO_3で成育させた時の処理 8 時間後の NH_4^+含量の増加は、生物試験と同様に 150 µM までの範囲で濃度依存的な増加を示したことから、この処理後短時間の窒素代謝能の強化が成育促進効果に大きく影響している可能性が考えられた。

さらに90~150 µMにおいて処理2日後ではNR活性やNH_4^+の含量の減少が見られたことからこの範囲でのALAによる窒素代謝能の強化は一時的なものであった可能性が示された。NH_4^+が NO_3^-の取り込みを妨げ NR 活性を阻害することが知られているが（Losada ら, 1970; Oaks ら, 1977)、90~150 µM ALA 処理区では処理8時間後から2日後の間で蓄積したNH_4^+によってNR活性が阻害されていた可能性が考えられ、蓄積したNH_4^+は処理1日後にはアミノ酸へと同化されたため処理2日後にNH_4^+の蓄積が認められなかったと考えられた。またこの一時的なNR活性の増加に関して、上述したように外因性のALAにより増加したヘムが内因性のALA合成に対しフィードバック阻害を起こし、ヘムの合成が抑えられることで、90 µMまでの範囲で見られた増加したNR活性も処理2日以降に下がると考えられる。

トウモロコシの成育は150 µMまでの範囲でALA濃度依存的に促進され、これは処理8時間後の150 µM までのALA濃度依存的なNH_4^+含量の増加と一致していることから、ALA 処理後短時間での窒素代謝能の強化が成育促進効果に大きく影響していると考えられた。

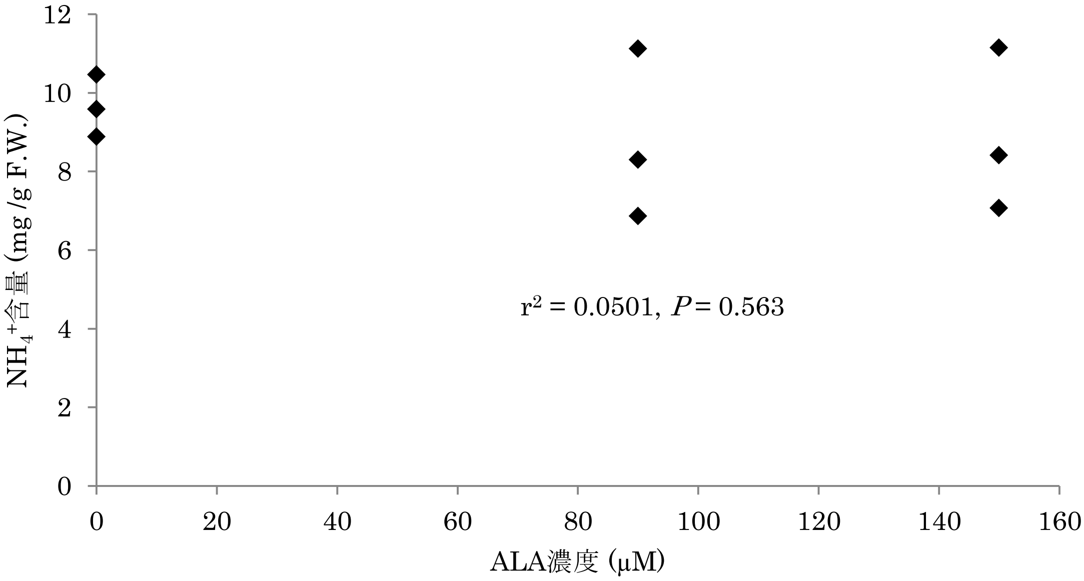


図 4-2-1 ALA 処理 8 時間後のトウモロコシ幼苗の NH_4^+含量

トウモロコシは 8ppm NO_3 を含む水耕液で成育させた。

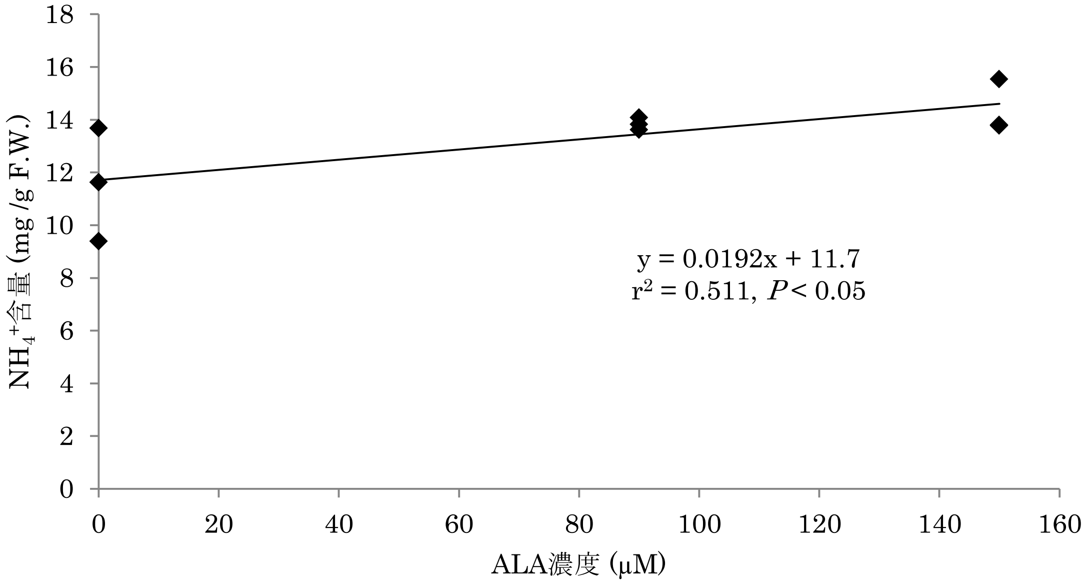


図 4-2-2 ALA 処理 8 時間後のトウモロコシ幼苗の NH_4^+含量

トウモロコシは 40ppm NO_3 を含む水耕液で成育させた。

第 5 章　総合考察

今日、世界的には食料不足の問題が存在し、自給率の低い我が国において近い将来食料危機が訪れる可能性がある。我が国での耕地面積の拡大は期待できず、今後ますます耕地の有効利用や耕地面積あたりの作物収量を増加させることが重要になってくる。労力やコストの観点から除草剤や成長調節剤などの化学物質を使った植物保護は優れた方法であると考えられるが、一方で化学資材は環境に負荷を与えるものであると考えられており、環境への負担を軽減した持続可能な農業が求められている。

ALA は成長調節剤として利用が期待されているアミノ酸である。ALA は Chl 含量の増加とそれによる光合成活性の増加を引き起こし、成育促進効果をもたらすと考えられている（Hotta ら, 1997; Youssef and Awad, 2008; Xu ら, 2010)。さらに ALA による抗酸化酵素活性の増加による耐塩性の付与も報告されている (Nishihara ら, 2003; Wongkantrakorn ら, 2009)。ALA による耐ストレス性の付与は塩ストレス以外にも低温（Hotta ら, 1998)、低照度（Wang ら, 2004)、除草剤（Zhang ら, 2008）等のストレスを軽減することが報告されており、これらの耐ストレス性にはいずれも Chl 含量と光合成活性の増加や、抗酸化能の強化が関わっていると考えられている。また ALA は生物界に広く存在する天然アミノ酸であるため、土壌中での分解性が高く環境に対する負荷が低いことも成長調節剤への利用が期待される要因の 1 つである（堀田ら, 1997)。

ALA による NR 活性の増加も報告されており（Mishra and Srivastava, 1983)、テトラピロール化合物である Chl やヘムを中心に成育促進効果には複数の要因が関与していると考えられるが、詳細には検討されていない。ALA による生理作用の理解が深まることはより適切な処理方法や植物種の選別、不良環境下での植物の育成等の ALA の利用の幅の拡大に対する知見につながると考え

られる。そこで本研究では ALA による成育促進効果のメカニズムの解明を目指した。

まず第 1 章で複数の植物種を用いて ALA による成育促進効果を得られる条件の検討を行った。第 1 節ではトウモロコシ、ハツカダイコン、キュウリ、コムギの根部を明所で 12 時間 ALA 溶液に浸漬し、その後の成育を調査した。概ね 0.1~0.5 μM ALA により成育促進効果が得られる傾向が見られ、中でもトウモロコシで比較的大きな成育の増加が見られたものの、いずれも ALA による有意な影響は認められなかった。そこで第 2 節で ALA を含む水耕液にてトウモロコシにおける成育促進効果を調査した。1~100 nm ALA で成育が増加する傾向が得られたものの、12 時間根部処理と同様有意な影響は認められなかった。テトラピロール合成では Chl やヘムを合成しており、Chl 合成は地上部のみで行われている。また、成育促進効果に対する Chl 含量の増加の関与が指摘されているため(Hotta ら, 1997; Youssef and Awad, 2008; Xu ら, 2010)、地上部に ALA を処理した方が成育促進効果を得やすい可能性があると考えた。そこで第 3 節でトウモロコシ、ハツカダイコン、コムギを用い ALA 溶液に植物の地上部を 2 秒間 2 回浸漬した時の成育を調査した。その結果、トウモロコシで処理 4 日後に 150 μM までの範囲において濃度依存的な成育量の増加が認められた。一方で、ハツカダイコンとコムギでは濃度依存的な成育量の変化は認められず、コムギにおいては 150 μM ALA により成育阻害が起きる傾向が見られた。これらの結果から今回の条件ではトウモロコシは ALA による成育促進効果を得やすく、ハツカダイコンとコムギは成育促進効果を得にくい植物種であると考えられた。またコムギは成育阻害を受けやすい植物種である可能性も考えられた。高濃度の ALA による成育阻害はテトラピロール化合物の中間体の蓄積が原因であると考えられているため (Rebeiz ら, 1984; Matsumoto ら, 1994)、コムギでは他の

植物種よりも中間体が蓄積しやすい可能性が考えられた。そこで以降の成育促進効果のメカニズムの解明にトウモロコシを使用することとした。

これまでALAによる成育促進効果にはChl含量の増加が関与していると報告されているため (Hotta ら, 1997; Youssef and Awad, 2008; Xu ら, 2010)、第4節では成育促進効果が認められた条件で処理2日後の Chl 含量の変化を調査した。しかし、ALA による Chl 含量の変化は認められなかった。よって今回の条件では成育促進効果に対し Chl や光合成活性の変化は大きく影響していないと考えられ、植物の成育に重要な他の代謝系の変化を調査することとした。

窒素代謝は植物の光合成と同様、植物の成育にとって非常に重要な代謝系である。Mishra and Srivastava (1983) は切除したトウモロコシの葉を 200 µM の ALA 溶液に 24 時間浸漬することで NR 活性が増加することを報告した。NR は窒素代謝の最初の反応である NO_3^-から NO_2^-への反応を行うタンパクであり、この反応は窒素代謝の律速段階でもある (Kaiser ら, 1999)。そのため ALA による窒素代謝能への影響が成育促進効果に関与している可能性があると考え、第2章では窒素代謝能の変化を調査した。

第1節では、処理2日後の NR 活性を測定した。90 µM までの範囲では ALA 濃度依存的な NR 活性の増加が認められたものの、90~150 µM では濃度依存的な減少が認められた。よって 90 µM までの濃度域では NR 活性の増加による窒素代謝能の強化が成育促進効果に関与していると考えられたものの、90~150 µM では窒素代謝能の変化の影響は強くないと考えられた。

第 2 節で処理 2 日後の NiR 活性を測定した結果、90 µM までの範囲でも 90~150 µM でも ALA 濃度依存的な変化は認められなかった。しかし、窒素代謝の律速段階は NR による NO_3^-の還元であり、90 µM ALA での NR 活性の増加が窒素代謝能の強化を起こした可能性があると考えた。

窒素代謝ではNRとNiRによってNH_4^+が合成されるため、NR活性の変化はNH_4^+含量の変化を引き起こすと考えられた。よって第 3 節では処理 2 日後のNH_4^+の定量を行った。結果は90 μMまでの範囲でも90~150 μMでもNR活性と同様となり、90 μM までの範囲では ALA 濃度依存的な NH_4^+含量の増加、90~150 μMでは濃度依存的な減少となった。よって90 μMまでの濃度域ではやはり NR 活性の増加による窒素代謝能の強化が成育促進効果に関与していると考えられた。一方で90~150 μMでは成育促進効果に対する窒素代謝能の変化の影響は大きくないと思われた。

ヘムは補因子として多くのタンパクに含まれ、NRもまたヘム含有タンパクである。Woodson ら（2011）は葉緑体でのヘム合成が核での遺伝子発現の調節に関与していると報告しており、Schmidt（2002）らはヘミンによってCATの翻訳が活性化することを報告した。これらのことからヘムはタンパクの発現や活性を異なる段階で調節すると考えられ、さらにALAを植物に処理した際のヘム合成の変化が様々なタンパクの活性に影響を与えることも考えられる。そこで第3章ではALAによるヘム含量の変化を解析するため、処理2日後のヘムの定量を行った。その結果、90 μMまでの範囲ではALA濃度依存的なヘム含量の増加が認められた。これは成育量やNR活性、NH_4^+含量の結果と同様でヘム含量の増加による NR 活性の増加が窒素代謝能の強化を引き起こし成育促進効果につながったと考えられた。一方で90~150 μMの範囲では有意な変化は認められず、NR活性やNH_4^+含量で認められた濃度依存的な減少という結果とは異なっていた。このことから150 μM ALA処理区でも90 μM ALA処理区と同じく、無処理区よりも高いレベルのヘム含量が存在していたと考えられた。よって90~150 μMでもヘム含量の増加による窒素代謝能の強化が起きていた可能性があると考えた。90~150 μMにおいて処理2日後の時点ではNR活性もNH_4^+含量も減少していたため、その前後での窒素代謝能の変化を検討することとした。

さらにNRはその産物であるNO_2^-の毒性を回避するため様々な調節を受けている（Kaiser and Huber, 1994)。そのため、ALA 処理等の外因性の影響による継続的な NR 活性の増加は期待できないと考え、90~150 μM では今回調査した処理 2 日後よりも早い段階で窒素代謝能の変化が起きていた可能性も考えられた。

窒素代謝によって生じたNH_4^+は GS-GOGAT cycle によって同化され、合成されたグルタミン酸から他のアミノ酸合成が進む。よって窒素代謝能の変化はアミノ酸含量の変化を引き起こすと考えられる。上述した通り、90~150 μM ALA では処理 2 日の前後で窒素代謝能の変化が起こっていた可能性が考えられたため、第 4 章第 1 節では遊離アミノ酸含量を窒素代謝能の変化の指標として処理 1 日後および 3 日後の遊離アミノ酸の定量を行った。その結果、処理 1 日後、3 日後共に 150 μM までの範囲で ALA 濃度依存的な遊離アミノ酸含量の増加が認められた。これは生物試験の結果と一致しており、90 μM までの範囲だけでなく 90~150 μM の範囲でも窒素代謝能の強化が成育促進効果に関与していると考えられた。さらに処理 1 日後の時点でアミノ酸含量が増加していたため、窒素代謝能の強化は処理 1 日以前から起こっていたと考えられた。そこで第 2 節で ALA 処理 8 時間後のNH_4^+含量を測定した。その結果、40 ppm NO_3の水耕液で成育させた時に 150 μM までの範囲で ALA 濃度依存的なNH_4^+含量の増加が認められた。よって処理 8 時間後の時点で窒素代謝能の強化が起きていたと考えられた。しかし、処理 2 日後に 90 μM までの範囲で ALA 濃度依存的なNH_4^+含量の増加が認められた 8 ppm NO_3の水耕液で成育させた条件では処理 8 時間後に ALA 濃度依存的なNH_4^+含量の変化は認められなかったため、窒素代謝能の強化はこの処理 8 時間以降に起こった可能性が考えられた。

NH_4^+の蓄積はNO_3^-の取り込みを妨げ、NR 活性を阻害することが知られている（Oaks ら, 1977; Losada ら, 1970)。よって今回の条件では 90~150 μMALA において処理 8 時間以降に NR 活性が増加し、急激に蓄積したNH_4^+によって処

理 2 日後には NR 活性が阻害され、その一方で蓄積した NH_4^+は処理 2 日後にはアミノ酸に同化されていたため処理 2 日後に ALA による NH_4^+含量の増加が認められなかったと考えられた。

以上のことから ALA による成育促進効果には NR 活性の増加による窒素代謝能の強化が関与していると考えられた。特に処理 1 日後のアミノ酸含量と 40 ppm NO_3で成育させた時の処理 8 時間後の NH_4^+含量では成育量と同様 150 μM までの範囲で増加が認められたため、処理 1 日以前での窒素代謝能の強化が ALA による成育促進効果に重要であると考えられた。さらに ALA による NR 活性の増加にはヘム含量の増加が関わっている可能性が示された（図 5)。これまでに抗酸化酵素のようなヘムタンパクの ALA による活性増加は報告されており、ALA によるヘムの増加がヘムタンパクの活性増加につながっていると指摘されてきたものの、実際にヘムタンパクの活性増加とヘム含量の増加を同時に示した報告はない。そのため今回ヘムタンパクである NR 活性とヘムの ALA による増加を示せたことは非常に重要である。またヘムはグルタミル-tRNA リダクターゼを阻害することで ALA 合成のフィードバック阻害を行うことが知られている（Meskauskiene and Apel, 2002)。よって外因性の ALA によるヘム含量の増加が内因性の ALA 合成を抑制したため Chl 含量が増加し難かった可能性があり、ALA 合成の抑制により 90 μM までの濃度の ALA による NR 活性もいずれ下がると考えられる。

以上のことを踏まえると実際に ALA を利用する際には継続的な使用が好ましいと考えられる。ALA による窒素代謝能の強化は数日という短期間で得られると考えられる一方で、テトラピロール化合物の蓄積による光依存的な成育阻害の懸念もあるため 1 週間に 1 度程度での使用が安全であると考えられる。また窒素代謝能が強化されるという観点から、窒素肥料との相乗効果も期待できる。ペンタキープ®は元々ALA 含有の窒素肥料であるが別の窒素肥料を追加で使用

した方がより高い効果を得られる場合もあると考えられる。とはいえ、アンモニアの蓄積も懸念されることから土壌中の窒素の量を一定の幅に抑える必要はあるだろう。本研究ではトウモロコシを用いたが、ALA の茎葉浸漬処理による窒素代謝能の強化が得やすい植物種であった可能性がある。また葉の光合成器官の発達は、最初に Chl や光化学系に関わるタンパクが作られ、葉の成熟に従い電子伝達や炭酸固定に関わるタンパクの発現が増加していくと報告されている (Lepedus ら, 2011)。そのため、若い葉の多い幼苗の地上部全体に ALA を処理しても光合成器官が完成されていないことが原因で、増えた Chl を利用しきれず Chl の分解が起きた可能性や、Chl とヘムの分岐において通常よりもヘムの方へ多く流れた可能性もある。このように植物種やその成育段階によっても ALA による影響は変わる可能性があり、本研究ではトウモロコシ幼苗に関する知見を示したに過ぎないことに留意しなければならない。しかし、トウモロコシは主食として消費される一方で家畜飼料や工業用にも使用されるなどその用途は広く、今回トウモロコシの初期成育において ALA による窒素代謝能の強化の可能性が示されたことは非常に重要な知見であると考えられる。

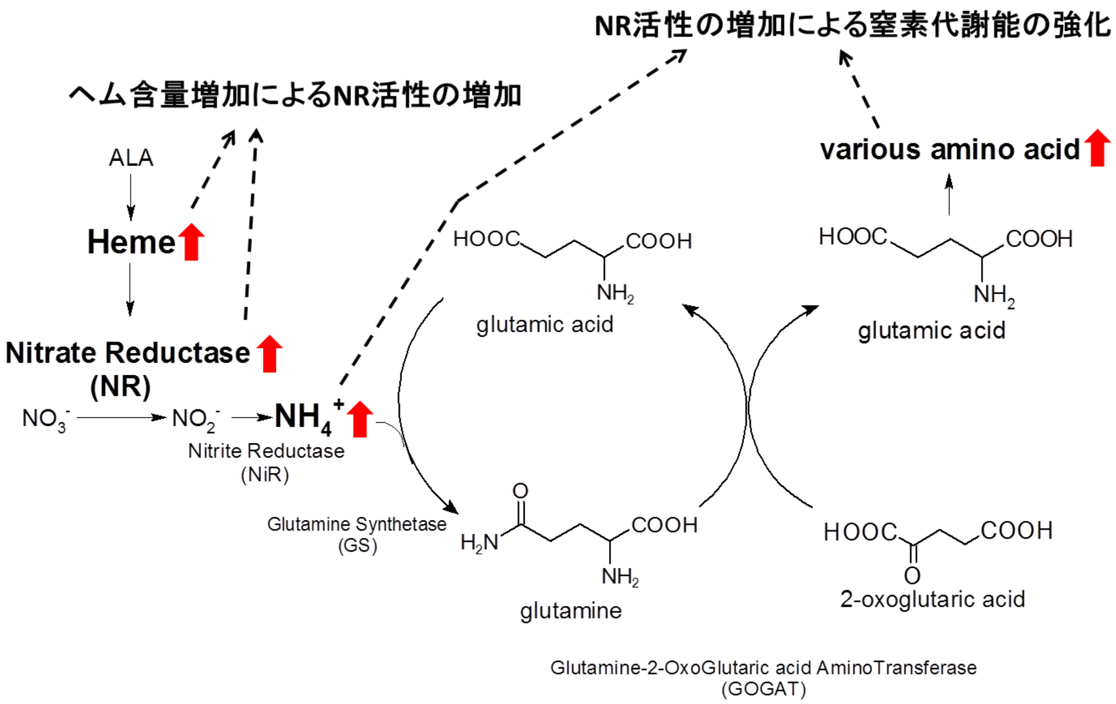


図 5 ALA によるトウモロコシ幼苗の成育促進作用のメカニズム

要約

5-アミノレブリン酸（ALA）はクロロフィル（Chl）やヘムに代表されるテトラピロール化合物に共通の前駆体である。ALA は高濃度での除草作用と低濃度での成育促進作用があることが知られ、成長促進剤としての利用に期待されている。本研究では、低濃度の ALA による成育促進作用のメカニズムの解明を目指した。

まずトウモロコシ（*Zea mays* L. cv. ハニーバンタム）、ハツカダイコン（*Raphanus sativus* L. var. sativus cv. アカマルハツカ）、キュウリ（*Cucumis sativus* L. cv. トキワカゼミドリ）、コムギ(*Triticum aestivum* L. cv. ノウリン 61）の成育に対する ALA の影響を調査したところ、トウモロコシに短時間の茎葉浸漬処理した場合に 150 μM までの範囲で ALA 濃度依存的な成育量の増加が認められた。一方で他の植物種や処理法では明確な ALA による成育促進効果が認められなかった。そこで本研究では成育促進効果が認められたトウモロコシに短時間の茎葉浸漬処理を行った時の成育促進効果のメカニズムを調査することとした。

これまでに ALA による成育促進効果には Chl 含量と光合成活性の増加が関与していると報告されていることからトウモロコシの Chl 含量を測定した。その結果 ALA による Chl 含量への顕著な影響は認められなかったため、今回の条件では ALA による成育促進効果には Chl は強くは関与していないと考えられた。

そこで、窒素代謝への影響を調査した。まず硝酸還元酵素（NR）と亜硝酸還元酵素（NiR）の活性を測定したところ、90 μM までの範囲で ALA 濃度依存的な NR 活性の増加と 90~150 μM で濃度依存的な減少が認められた。一方 NiR では 90 μM までの濃度域でも 90~150 μM でも ALA による影響は認められなかった。よって 90 μM までの濃度の ALA では NR 活性増加による窒素代謝能の

強化が起きている可能性があると考え NH_4^+ の定量を行った。その結果、NR 活性と同様 90 μM までの範囲では ALA 濃度依存的な NH_4^+ 含量の増加、90~150 μM では濃度依存的な減少が認められた。よって ALA による成育促進効果には、90 μM までの範囲では窒素代謝能の強化が関与していると考えられたものの、90~150 μM では大きく関与していないと考えられた。

NR はヘムを含むタンパクであり 90 μM までの濃度域での NR 活性の増加はヘム含量の増加によるものであると考えられたため、ALA によるヘム含量への影響を調査した。90 μM までの範囲では ALA 濃度依存的なヘム含量の増加が認められた。よって 90 μM までの濃度域ではヘムにより NR 活性が増加し、窒素代謝能の強化につながり成育促進効果が得られたと考えられた。一方で 90~150 μM の範囲では濃度依存的なヘム含量の変化は認められなかった。つまり 150μM ALA 処理区においても 90 μM ALA 処理区と同様無処理区よりも高いヘム含量が存在していた可能性が示された。

次に、窒素代謝能の変化の指標として遊離アミノ酸の定量を行った。NR 活性や NH_4^+ 含量等は処理 2 日後に測定しており、処理 2 日前後の 90~150 μM ALA による窒素代謝能への影響を調査するため処理 1 日と 3 日後のものを測定した。その結果、処理 1 日と 3 日後で共に 150 μM までの範囲で ALA 濃度依存的な遊離アミノ酸含量の増加が認められた。これは生物試験の結果と同様であったことから、90 μM までの範囲だけでなく 90~150 μM の範囲でも ALA による成育促進効果には窒素代謝能の強化が関与していると考えられた。さらに処理 1 日後でアミノ酸含量の増加が認められたことから、処理後短時間に 90~150 μM の範囲でも窒素代謝能の強化が起きていた可能性が考えられたため、処理 8 時間後の NH_4^+ 含量を測定した。その結果、40 ppm NO_3 を含む水耕液で成育させた時に 150 μM までの範囲で ALA 濃度依存的な NH_4^+ 含量の増加が認められた。よって処理後 8 時間の段階で ALA による窒素代謝能の強化が起こっていたと考

えられ、この窒素代謝能の強化は 90~150 μM の範囲では一時的なものであったと考えられた。

以上のことから ALA による成育促進効果にはヘム含量の増加による窒素代謝能の強化が関与していると考えられた。これまでに ALA によるヘムタンパクの活性増加は報告されており、この活性増加はヘム含量の増加によるものと考えられてきたが、実際に ALA によってヘムタンパクの活性とヘム含量が両方増加していることを示したものは本研究が初めてである。

謝辞

本研究の遂行および論文作成は、終始、筑波大学生物機能科学専攻教授 松本宏博士の御指導のもとに行われたものであり、その間、多大な御助言、御教示を賜りました。ここに謹んで感謝申し上げます。

また、本稿の作成にあたり、御助言と審査をしていただきました、同大学同専攻教授 田中 俊之博士、同大学生物圏資源科学専攻教授 林 久喜博士、ならびに同大学生物機能科学専攻講師　春原 由香里博士には深く感謝申し上げます。

本学 植物機能制御学研究室の諸先輩方、同輩後輩諸氏には、日常生活、本研究の遂行において多大な御協力をいただきました。心より感謝申し上げます。

引用文献

Campbell, W.H. 1996. Nitrate reductase biochemistry comes of age. *Plant Physiol.* 111: 355-361.

CIA The world factbook-area.
https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/fields/2147.html
(2014 年 1 月 10 日参照)

CIA The world factbook-land use.
https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/fields/2097.html
(2014 年 1 月 10 日参照)

Conway, E.J. and Byrne, A. 1933. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances: The micro-determination of ammonia. *Biochem. J.* 27: 419-429.

Demmig-Adams, B. and Adams, W.W.. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1: 21-26.

FAO 2013. The state of food insecurity in the world 2013.
http://www.fao.org/docrep/018/i3434e/i3434e00.htm
(2014 年 1 月 10 日)

Hageman, R.H. and Flesher, D. 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant Physiol.* 35: 700-708.

堀田 康司, 渡辺 圭太郎. 1999. 5-アミノレブリン酸の植物生理活性. *植物の化学調節* 34: 85-95.

堀田 康司, 渡辺 圭太郎, 田中 徹, 竹内 安智, 近内 誠登. 1997. 5-アミノレブリン酸が幼植物の生育に及ぼす影響. *日本農薬学会誌* 22: 102-107

Hotta, Y., Tanaka, T., Takaoka, H., Takeuchi, Y. and Konnai, M. 1997. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: The increase of photosynthesis, chlorophyll content, and plant growth. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 2025-2028.

Hotta, Y., Tanaka, T., Takaoka, H., Takeuchi, Y. and Konnai, M. 1998. Improvement of cold resistance in rice seedlings by 5-aminolevulinic acid. *J. Pestic. Sci.* 23: 29-33.

Huang, L. and Castelfranco, P.A. 1990. Regulation of 5-aminolevulinic acid (ALA) synthesis in developing chloroplasts. *Plnat Physiol.* 92: 172-178.

Iwata, K. and Deguchi, M. 1995. Metabolic fate and distribution of ^{15}N-ammonia in an ammonotelic amphibious fish, *Periophthalmus modestus*, following immersion in ^{15}N-ammonium sulfate: A long term experiment. *Zool Sci.* 12: 175-184.

Kaiser, W.M. and Huber, S.C. 1994. Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiol.* 106: 817-821.

Kaiser, W.M., Weiner, H. and Huber, S.C. 1999. Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. *Physiol. Plant.* 105: 385-390.

上山 宏輝, 堀田 康司, 田中 徹, 西原 誠司, 佐々木 健. 2000. 光合成細菌変異株による 5-アミノレブリン酸の工業的生産. *生物工学会誌* 78: 48-55.

Lepedus, H., Gaca, V., Viljevac, M., Kovac, S., Fulgosi, H., Simic, D., Jurkovic, V. and Cesar, V. 2011. Changes in photosynthetic performance and antioxidative strategies during maturation of Norway maple (*Acer platanoides* L.) leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 49: 368-376.

Lim, S.J., Sunohara, Y. and Matsumoto, H. 2007. Action of fentrazamide on protein metabolism and cell division in plants. *J. Pestic. Sci.* 32: 249-254.

Losada, M., Paneque, A., Aparicio, P.J., Mvega, J., Cardenas, J. and Herrera, J. 1970. Inactivation and repression by ammonium of the nitrate reducing system in Chlorella. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 38: 1009-1015.

Matsumoto, H., Tanida, Y. and Ishizuka, K. 1994. Porphyrin intermediate involved in herbicidal action of δ-aminolevulinic acid on duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.). *Pest. Biochem. Physiol.* 48: 214-221.

Meskauskiene, R. and Apel, K. 2002. Interaction of FLU, anegative regulator of tetrapyrrole biosynthesis, with the glutamyl-tRNA reductase requires the tetratricopeptide repeat domain of FLU. *FEBS letters* 532: 27-30.

Mishra, S.N. and Srivastava, H.S. 1983. Stimulationof nitrate reductase activity by delta amino levulinic acid in excised maize leaves. *Experientia* 39: 1118-1120.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.

Murphy, M.J., Siegel, L.M., Tove, S.R. and Kamin, H. 1974. Siroheme: A new prosthetic group participating in six-electron reduction reactions catalyzed by both sulfite and nitrite reductases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 612-616.

日本学術会議農学委員会植物保護科学分科会 2011. 提言 植物保護科学の展望－農業生産の向上と生物多様性－.
http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-21-t133-4.pdf
(2014 年 1 月 10 日参照)

日本農薬学会編 2003. 次世代の農薬開発－ニューナノテクノロジーによる探索と創製－. ソフトサイエンス社.

日本植物防疫協会編 2008. 病害虫と雑草による農作物の損失. 日本植物防疫協会.

Nishihara, E., Kondo, K., Parvez, M.M., Takahashi, K., Watanabe, K. and Tanaka, K. 2003. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated sphinach (*Spinacia oleracea*). *J. Plant Physiol.* 160: 1085-1091.

農林水産省大臣官房食料安全保障課 2013. 平成 24 年度食料需給表 (概算).
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/zyukyu/
(2014 年 1 月 10 日参照)

Oaks, A., Aslam, M. and Boesel, I. 1977. Ammonium and amino acids as regulators of nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol.* 59: 391-394.

岡本大二郎 1992. 虫獣除けの原風景. 日本植物防疫協会.

Ozawa, K. and Kawahigashi, H. 2006. Positional cloning of the nitrite reductase gene associated with good growth and regeneration ability of calli and establishment of a new selection system for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* 170: 384-393.

Rebeiz, C.A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen, H.J. and Wu, S.M. 1984. Photodynamic herbicides: Concept and phenomenology. *Enzyme Microb. Technol.* 6: 391-401.

佐々木 健, 渡辺 昌規, 田中 享, 田中 徹. 2002. 5-アミノレブリン酸 (ALA) の低コスト発酵生産技術の開発. *BIO INDUSTRY* 19: 25-37.

Schmidt, M., Dehne, S. and Feierabend, J. 2002. Post-transcriptional mechanisms control catalase synthesis during its light-induced turnover in rye leaves through the availability of the hemin cofactor and reversibile changes of the translation efficiency of mRNA. *The Plant Journal* 31: 601-613.

Sherman, T.D., Becerril, J.M., Matsumoto, H., Duke, M.V., Jacobs, J.M., Jacobs, N.J. and Duke, S.O. 1991. Physiological basis for differential sensitivities of plant species to Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Plant Physiol.* 97: 280-287.

食品安全委員会農薬専門調査会 2005. 農薬評価書 土壌残留に係る農薬登録保留基準の見直し.
http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-hyouka-170511-dojyounouyaku.pdf
(2014 年 1 月 10 日参照)

高橋 重一, 増田 健. 2009. ヘムの分析. *低温科学* 67: 327-337.

Terry, M.J. and Smith, A.G. 2013. A model for tetrapyrrole synthesis as the primary mechanism for plastid-to-nucleus signaling during chloroplast biogenesis. *Front. Plant Sci.* 4: 1-14.

Tottey, S., Block, M.A., Allen, M., Westergren, T., Albrieux, C., Scheller, H.V., Merchant, S. and Jensen, P.E. 2003. *Arabidopsis* CHL27, located in both envelope and thylakoid membranes, is required for the synthesis of protochlorophyllide. *PNAS* 100: 16119-16124.

UNFPA 2012. 世界人口白書 2012.
http://www.unfpa.or.jp/cmsdesigner/data/entry/publications/publications.00036.00000006.pdf
(2014 年 1 月 10 日参照)

Wang, L.J., Jiang, W.B. and Huang, B.J. 2004. Promotion of 5-aminolevulinic acid on photosynthesis of melon (*Cucumis melo*) seedlings under low light and chilling stress conditions. *Physiol. Plant.* 121: 258-264.

Wongkantrakorn, N., Sunohara, Y. and Matsumoto, H. 2009. Mechanism of growth amelioration of NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) by δ-aminolevulinic acid. *J. Pestic. Sci.* 34: 89-95.

Woodson, J.D., Perez-Ruiz, J.M. and Chory, J. 2011. Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants. *Current Biology* 21: 897-903.

Xu, F., Zhu, J., Cheng, S., Zhang, W. and Wang, Y. 2010. Effect of 5-aminolevulinic acid on photosynthesis, yield, nutrition and medicinal values of kudzu (*Pueraria phaseoloides*). *Tropical Grasslands* 44: 260-265.

Yaronskaya, E. and Grimm, B. 2006. The pathway from 5-aminolevulinic acid to protochlorophyllide and protoheme. *Advances in Photosynthesis and Respiration* 25: 173-188.

Youssef, T. and Awad, M.A. 2008. Mechanisms of enhancing photosynthetic gas exchange in date palm seedlings (*Phoenix dactylifera* L.) under salinity stress by a 5-aminolevulinic acid-based fertilizer. *J. Plant Growth Regul.* 27: 1-9.

Zhang, W.F., Zhang, F., Raziuddin, R., Gong, H.J., Yang, Z.M., Lu, L., Ye, Q.F. and Zhou, W.J. 2008. Effects of 5-aminolevulinic acid on oilseed rape seedling growth under herbicide toxicity stress. *J. Plant Growth Regul.* 27: 159-169.