

水稻の根群の構造と機能に関する研究

Ⅱ 根の α -ナフチルアミン酸化力と2・3の生理活性との関係

巽 二郎・河野 恭 広

(名古屋大学農学部)

緒 言

根の生理的活力判定法として α -ナフチルアミン(以下、 α -NA)酸化力の測定が広く用いられている。その生理的根拠は、着色程度や側根の有無などによって分けられた新根群と古根群の α -NA酸化力と呼吸活性とは正の相関をもつことにあり、 α -NA酸化力の高い根は養分吸収やその他の生理作用が活発であると説明されている⁸⁾。しかし α -NA酸化力の測定の原理は、根中のパーオキシダーゼが体内で生成する H_2O_2 の存在下で α -NAを酸化する性質を利用しているものである^{2,4,7)}、その結果は酵素量と H_2O_2 量によって規制されることとなり、単純ではない。事実、一本の根でみるとパーオキシダーゼの分布は、「古根的」である基部で高く、「新根的」である根端で低いことや⁹⁾、 H_2O_2 量は H_2O_2 供給系の活性に支配されることなどから^{2,4,7)}、 α -NA酸化力の強弱と根の生理活性との関係はさらに検討さるべき課題を残している。このような立場から本報告は種子根各部位のagingにともなう α -NA酸化力の変化と二、三の生理作用との関係を調べ、 α -NA酸化力の生理的意味について検討を加えたものである。なお、本研究は昭和51年度文部省科研費によるものの一部である。

材 料 及 び 方 法

実験1. 1976年10月より12月にかけて催芽した水稻品種「愛知旭」の種子を網付水槽に播種し、人工照明(500lux, 12時間明期)の30℃の恒温器中で生育させた。播種後2日, 4日, 6日, 10日目に100~200個体のめばえを採取し、種子根を供試した。種子根は根端5mmを除き24時間に伸長した根軸を単位とした方法に従って³⁾切り分けた(第1図)。呼吸の測定はワールブルグ法により¹⁰⁾、0.01~0.2gの根を供試し1時間の酸素吸収量を測定した。パーオキシダーゼ活性の測定は以下のように行った。0.01~0.2gの根に、5mlの0.1M磷酸緩衝液(pH7.0)と少量の海砂を加え氷冷下で乳鉢を用いて磨細し、 5×10^2 gで遠沈後、その上澄液を粗酵素液とした。0.1M磷酸緩衝液(pH7.0)と0.1M H_2O_2 のそれぞれ0.5mlと1%o-dianisidine溶液0.05mlを混じ、適当に希釈した粗酵素液0.1mlを加えた後、30℃で15分間反応させた。0.1N HCl 1.8mlで反応を停止させ、分光光度計で400nmの吸光度を測定した。各実験において反応の直線性を確かめた後、5分間の吸光度の変化を新鮮重当りで求め、パーオキシダーゼ活性とした。また、 α -NA酸化力の測定は50~100本の根を供試し、吉田の方法¹⁰⁾によった。

実験2. 実験1と同様に栽培した播種後6日目の材料を用い、根の各部位における α -NA酸化力と H_2O_2 添加の影響を検討した。予備実験により H_2O_2 の添加量は最終濃度30~40ppmの範囲で安定した値がえられることを確めた。

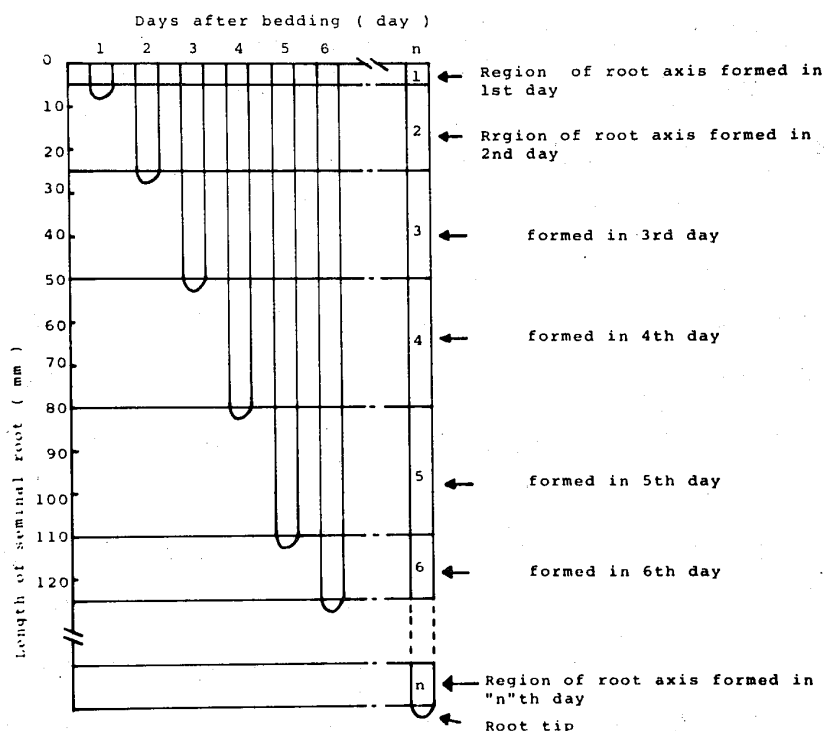


Fig. 1 Diagram in explanation of region of root axis

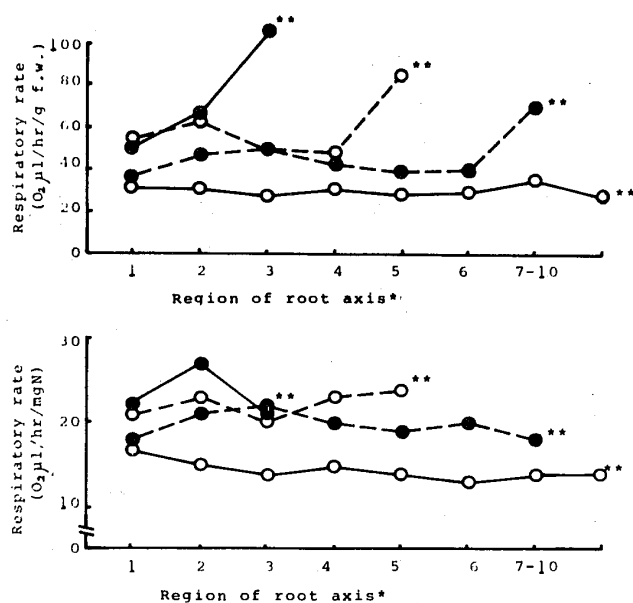


Fig. 2 Changes in distribution patterns of respiratory rate on different aged regions of root axis during seminal root growth

A. O₂ uptake on fresh weight basisB. O₂ uptake on nitrogen basis

●—●; 2 days aged root ○—○; 4 days aged root

●—●; 6 days aged root ○—○; 10 days aged root

* see Fig. 1

** root tip

さらにパーオキシダーゼ活性の分布パターンは、2日目の根では先端部が高いが、6日目、10日目のものではそれに加えて中間部で高い型をとり、 α -NA 酸化力とよく似た分布パターンを示し（第4図）、吉田らの結果のように基部で高く先端部で低い単純な型を示さなかった。

根の各部位の aging でみると、概して呼吸作用はその進行とともに低下するが、 α -NA 酸化力は増加

実験3. 実験1と同様に栽培した播種後8日目のインタクトな根を室温下（約20℃）で α -NA 溶液と o - dianisidine 溶液に浸漬し、H₂O₂添加（最終濃度30ppm）による着色状態の変化をH₂O₂ 添加区では浸漬後10～20分、無添加区では20時間後にそれぞれ観察した。なおH₂O₂添加区では10～20分で着色程度は最大となったが、無添加区では20時間以後も着色は増した。

実験結果ならびに考察

一本の根の各部位の新鮮重ベースで表示した酸素吸収量は、10日目の根を除いていずれも根端部で高く基部で低い傾向を示し、従来の報告と一致している（第2図A）。しかし、窒素ベースで表示した場合のはどの age の根においても部位による差は少ない（第2図B）。

一方、2日目、4日目の根の α -NA 酸化力は先端部で低く基部で高いが6日目、10日目の根では中間部にピークを有するかたちとなる（第3図）。この部位はいずれの根でも側根の伸長域に相当し

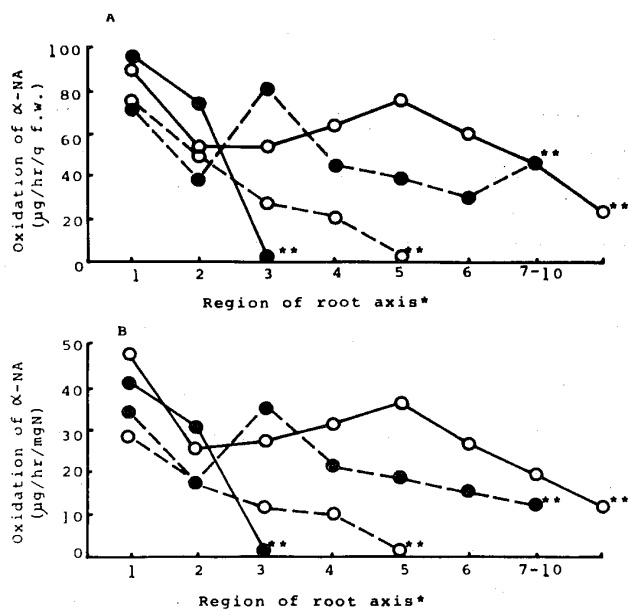


Fig. 3 Changes in distribution patterns of α -NA oxidation by different aged regions of root axis during seminal root growth
 A. Oxidation of α -NA on fresh weight basis
 B. Oxidation of α -NA on nitrogen basis
 ●—●: 2 days aged root ○—○: 4 days aged root
 ●—●: 6 days aged root ○—○: 10 days aged root
 * see Fig. 1 ** root tip

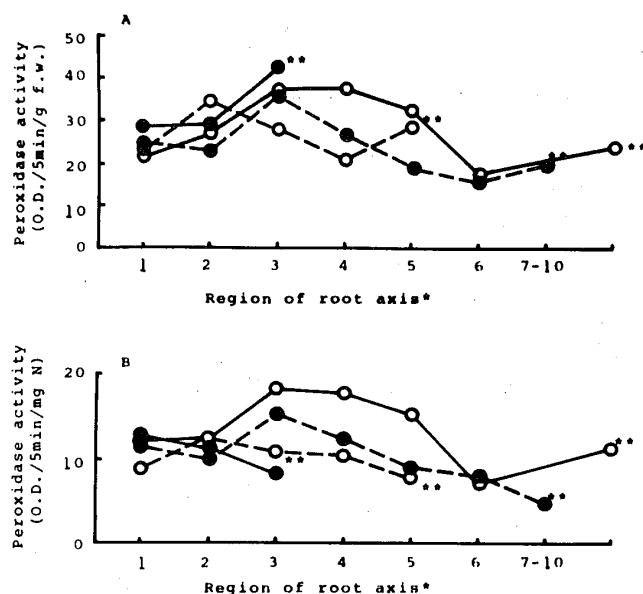


Fig. 4 Changes in distribution patterns of peroxidase activity of different aged regions of root axis during seminal root growth
 A. Peroxidase activity on fresh weight basis
 B. Peroxidase activity on nitrogen basis
 ●—●: 2 days aged root ○—○: 4 days aged root
 ●—●: 6 days aged root ○—○: 10 days aged root
 * see Fig. 1 ** root tip

な役割を果していることを示すように思われる。H₂O₂添加による変化は、根円柱ではあまり認められないが、側根群では無添加の場合とは逆に先端部が著しく着色し、基部はほとんど着色しないことが観察された。

本実験の結果、根の aging にともない呼吸作用は低下するが、逆に α -NA 酸化力は増大の傾向を示し、呼吸作用と α -NA 酸化力との関係は平行的ではないことがわかった。さらに、 α -NA 酸化力の増加が側根群の発根、伸長と時間的にも位置的にも一致することから、根軸上での側生器官の発育にともなって、根

し、特に側根伸長域で高くなる。またパーオキシターゼ活性は α -NA 酸化力の変化と平行的に推移する。また一本の根全体でみた場合、age の進行にともない酸素吸収量は明らかに低下するが、 α -NA 酸化力は発根後一時低下し、4 日目以後再び側根の伸長にともない増加の傾向を示し、呼吸活性とは必ずしも一致しない(第 1 表)。

6 日目の根に過酸化水素を添加した場合の α -NA 酸化力の変化をみると(第 6 図 A)，無添加の場合に比べいづれの部位においても酸化が促進されるが、その促進効果は特に根端部で著しい(第 6 図 B)。この傾向はパーオキシターゼの活性(第 5 図)と必ずしも平行的でないことは注目する必要がある。

α -NA 及び o-dianisidine 溶液にインタクトの根を浸漬した場合の着色状態は(第 7 図)両者ともよく類似している。H₂O₂ 無添加の場合、根円柱ではその先端部からやや離れた部位が、側根群についてはその基部がよく着色する。これは実験 1 でえられた側根伸長域で α -NA 酸化力が高いという結果とあわせ考えると、根の基部に近い部位での α -NA 酸化力に側根が重要

Table 1. Changes in nitrogen content, respiratory rate, oxidation of α -NA, and peroxidase activity of roots during growth of seedling

Days after bedding	N content	O ₂ uptake	Oxidation of α -NA	Peroxidase activity
	mg N/g f.w.	μ l/hr/g f.w.	μ g/hr/g f.w.	O.D./5min/g f.w.
2	0.28	68.2	71.5	31.0
4	0.26	56.7	45.5	27.9
6	0.22	44.8	52.5	25.6
10	0.21	30.9	62.0	27.6

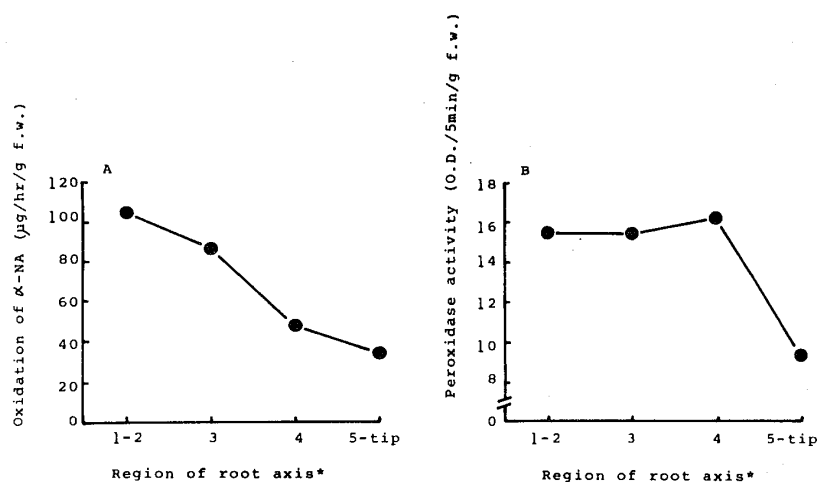


Fig. 5 Distribution patterns of α -NA oxidation and peroxidase activity on seminal root axis at 6 days after bedding

A. Oxidation of α -NA B. Peroxidase activity

* See Fig. 1

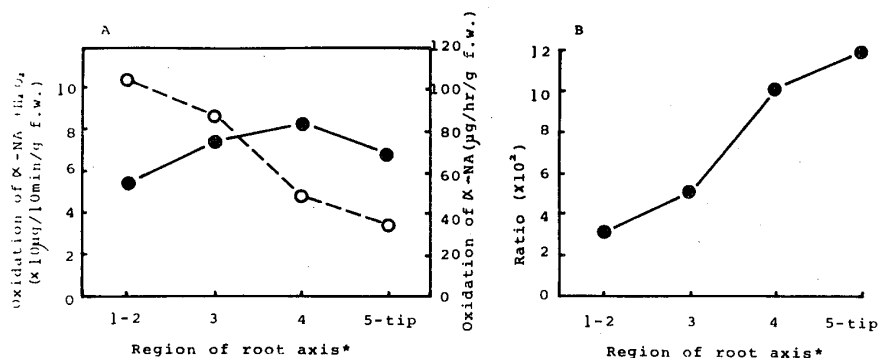


Fig. 6 Changes in distribution patterns of α -NA oxidation by root axis when H₂O₂ are added (6 days aged seminal root used)

A. ●—●; Addition of H₂O₂ ○---○; No addition of H₂O₂

B. Ratio of α -NA oxidation with H₂O₂ to α -NA oxidation without H₂O₂

* See Fig. 1

** Final concentration of H₂O₂; 38 ppm

の α -NA酸化力が増大することも明らかとなった。

一本の根の各部位におけるパーオキシダーゼ活性と α -NA酸化力との分布パターンは良く対応していた。しかし、呼吸作用が活発で酸化力が強いとされている根端部で、低い α -NA酸化力を示したことや、H₂O₂添加によって、パーオキシダーゼ活性の低い根端部において α -NA酸化力が著しく促進されたこと、また α

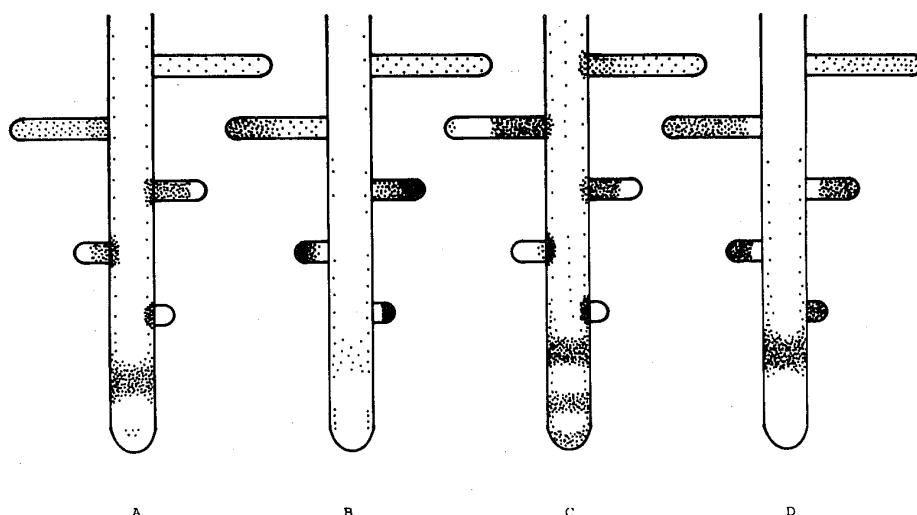


Fig. 7 Diagrams of seminal root stained with α -Naphthylamine and o-dianisidine
(8 days aged root used)

A, α -NA, 20 ppm, 20 hr; B, α -NA, 20 ppm, addition of H_2O_2 (final conc., 30 ppm), 30 min;

C, o-dianisidine, 0.004 %, 20 hr; D, o-dianisidine, 0.004 %, addition of H_2O_2 (final conc., 30 ppm), 15 min.

-NAとo-dianisidineによる着色状態の観察で H_2O_2 添加によって側根群と根円柱との反応が相違していたことなどは、一本の根軸上においても側根群と根円柱あるいはagingにともなう根の先端と基部との生理機能のちがいが存在する可能性を示す証拠と思われた。このように根における α -NA酸化の機作が従来の説明だけでは理解困難であり、根のagingにともなう H_2O_2 供給系^{5, 6)}や種々の終末酸化酵素系^{1, 9)}の変化などにも検討が加えられ、根の α -NA酸化力と養分吸収などの生理的諸活性との関係がさらに追求される必要があろう。

なお、本研究を進めるにあたり適切な御助言をいただいた本学大学院生角田素行氏と本学教官山下興亜博士に謝意を表します。

引用文献

1. Aimi, R. and K. Fujimaki 1958 Proc. Crop. Sci. Soc. Japan 27: 21-23
2. 相見霊三・藤巻和子 1959 日作紀 28: 205-207
3. 河野恭広・山田記正 1972 日作紀 41: 256-266
4. Matsunaka, S. 1960 Jour. Biochem. 47: 820-829
5. 三井進午・熊沢喜久雄 1961 土肥誌 32: 433-439
6. 三井進午・熊沢喜久雄・堀口毅 1961 土肥誌 32: 455-460
7. 坂井弘・吉田富男 1957 北海道農試彙報 72: 82-91
8. Yamada, N. and Y. Ota 1958 Proc. Crop. Sci. Soc. Japan 27: 155-160
9. 吉田武彦・高橋治助 1960 土肥誌 31: 420-426
10. 吉田武彦 1966 土肥誌 37: 63-68