第五章　直接吸収したアミノ酸の代謝と植物体内の蓄積分布

第一節　はじめに

窒素は植物の生育に必須の栄養素であり、これまで主に無機態窒素である硝酸イオンやアンモニアイオンの取り込みと、その後のアミノ酸への同化について多くの研究が行われてきた。硝酸イオンやアンモニアイオンは、細胞膜にあるトランスポーターで積極的に細胞内に取り込まれる。細胞内で硝酸イオンは、硝酸還元酵素（NR）によって亜硝酸イオンに還元され、さらに亜硝酸還元酵素（NiR）によってアンモニアイオンに還元される。アンモニアイオンは、グルタミン合成酵素（GS）により、グルタミン酸にアミノ基として付加されグルタミンが合成され、グルタミンに取り込まれたアンモニアイオン由来のアミノ基が、グルタミン酸合成酵素（GOGAT）により 2-オキソグルタル酸に転移し 2 分子のグルタミン酸が生成される（山谷　2001）。このようにしてグルタミンから合成されるグルタミン酸のアミノ基がさらに基転移することで他のアミノ酸が合成され、核酸など、ほとんど全ての有機窒素化合物の生合成に利用される（彦坂　1999）ことが明らかになっている。

土壌中のアミノ酸が、植物生育の養分となるためには、無機態窒素のように細胞膜を通して植物体内に取り込まれ、代謝される必要がある。第三章の結果、アミノ酸はその種類により植物生育に対する影響は異なり、無機態窒素以上の生育を示すアミノ酸や生育を阻害するアミノ酸があることが明らかとなった。この要因として、アミノ酸の種類により吸収量が異なることや、吸収後の代謝過程の相違が考えられるが、アミノ酸ごとの吸収量や代謝に関する報告はほとんどない。Mori ら（1979）は、ハダカムギを供試作物とし、生育を良くするアミノ酸としてアルギニン、阻害するアミノ酸としてヒスチジンを取り上げ、吸収後の代謝過程の違いを検討しているが、本研究で用いたイネ幼植物では、アルギニンは無機態窒素より窒素吸収量が劣っており、ハダカムギと吸収や代謝に違いがあると考えられる。

また、第四章よりアミノ酸は直接吸収されることが明らかになっているが、吸収されたアミノ酸態窒素の植物体内でどのように分布し、利用されていくのかはアミノ酸を窒素源として考えたときには興味深い課題である。硝酸イオンやアンモニアイオンなど無機態の窒素形態でも体内分布の相異が報告（米山ら　1972）されており、アミノ酸態窒素

の分布も無機態窒素と比べて異なることが予想される。

さらに、アミノ酸は、通常無機態窒素がエネルギーを使って光合成同化産物と同化した分子であり、吸収されたアミノ酸の代謝が植物体内ですすめば、窒素成分だけでなく、アミノ酸の分解から生じるエネルギーも獲得することが期待できる。窒素源としてのアミノ酸とアンモニアイオンのこれらの比較は、今後、有機質肥料と化学肥料の違いや、有機質肥料の特徴につながると考えられる。

以上のように本章では、異なるアミノ酸ごとの吸収速度の違いを検討し、吸収されたアミノ酸の代謝や窒素、炭素の蓄積分布について、安定同位体標識アミノ酸を用いた実験を行い、さらに、吸収されたアミノ酸態炭素の分解より得られるエネルギーについても検討した。供試したアミノ酸は、主に、生育が良かったグルタミン、アラニン、および生育を阻害したバリンを用いた。特にグルタミンは、第三章において供試した全ての植物（イネ、コムギ、ダイズ、チンゲンサイ、キュウリ）で無機態窒素より生育がよく、吸収されたグルタミンが植物の体内でどのように代謝され、窒素源として利用されているかを解析することで、アミノ酸の生育促進効果の要因の解明につながると考えられる。

第二節　異なる種類のアミノ酸ごとの吸収

1) 目的

前章までの実験により、与えたアミノ酸の種類によって、イネ幼植物の生育には大きな差が生じることが明らかとなった。根から取り入れられたアミノ酸が、植物生育の養分となるためには、無機態窒素のように細胞膜を通して植物体内に取り込まれ、代謝される必要がある。本節では、異なる種類のアミノ酸を 3 段階の濃度で吸収させたときの溶液の減少量や吸収量について検討を行うこととした。供試するアミノ酸は、第三章より、無機態窒素より生育が促進されたグルタミン、アラニン、生育を阻害したセリン、バリン、およびアラニンの光学異性体の D-アラニンを用いた。

2) 材料と方法

供試作物はイネ（*Oryza sativa* L. 日本晴）を用いた。種子サンプルは籾殻を外した玄米を 5 % 次亜塩素酸ナトリウムと 1 % tritonX の混合液で 15 分振とうし、新しい溶液と交換する操作を 3 回繰り返し行った。この滅菌操作後、滅菌水で完全に溶液が置換できるまで洗浄したものを寒天に播種し、28 ℃で 3 日間保温して発芽させた。121 ℃、20 分の熱加圧処理した窒素成分抜き改変木村氏 B 液 25 ml を 50 ml 遠沈管に分注し、発芽種子を 1 個体移植した。この遠沈管 4 本を組織培養用プラントボックス（60 mm x 60 mm x 100 mm）に入れ、同型のプラントボックスを上からかぶせて密封し、無菌栽培した。人工気象器にて、温度 28 ℃、明期 18/暗期 6 時間で移植後 6 日間栽培した。7 日目に、窒素成分抜き改変木村氏 B 25 ml に ^{14}C-放射性同位体元素（全て 2.5 kBq/ml）で標識した下記の各アミノ酸を用いて、窒素濃度が 25、100、1000 μM となる溶液に交換し、吸収試験とした。

^{14}C-L-グルタミン $^{14}CO(NH_2)^{14}CH_2{}^{14}CH_2{}^{14}CH(NH_2)^{14}COOH$

^{14}C-L-アラニン　$^{14}CH_3{}^{14}CH(NH_2)^{14}COOH$

^{14}C-L-セリン　$^{14}CH_2OH^{14}CH(NH_2)^{14}COOH$

^{14}C-L-バリン　$^{14}CH(^{14}CH_3)_2{}^{14}CH(NH_2)^{14}COOH$

^{14}C-D-アラニン　$^{14}CH_3{}^{14}CH(NH_2)^{14}COOH$）

経時的（試験開始初期は 30 分）に 24 時間後まで溶液を 50 μl 採取し、液体シンチレーションカクテル（MicroScint-40™, パーキンエルマー）を 150 μl 添加後よく攪拌して、マイクロプレートシンチレーションカウンタ（1450 MicroBeta Trilux, パーキンエルマー)で溶液中の ^{14}C を測定して、水耕液からのアミノ酸の減少率を算出した。なお、試験期間中の蒸散による溶液減少に伴う濃縮は、水耕液の重量測定後の計算により補正した。また、3、12、24 時間目にイネ幼植物を採取し、地下部を 1 M $CaCl_2$ 液で 30

秒ずつ3回洗浄した後、イメージングプレート（富士写真フィルム 以下IP）にコンタクトした。3日間冷凍庫内でコンタクトした後、スキャナー（FLA-5000，富士写真フィルム）で画像の読み出しを行った。得られた画像を、画像解析ソフト（Image Gauge，富士写真フィルム）により、植物体の各部位における輝度値を測定し、^{14}C の地上部および地下部における分布量を算出した。

3) 結果と考察

① アミノ酸の種類による吸収量について

溶液中の^{14}C-アミノ酸の減少量を図5-2-1に、植物個体当たりの吸収量を図5-2-2に示した。

水耕液のアミノ酸濃度はいずれの種類のアミノ酸でも減少しており、また ^{14}C-アミノ酸の添加量は濃度によらず一定としたため、窒素濃度が薄いほど ^{14}C-アミノ酸の減少率は多かった。

24 時間後の吸収量は、窒素濃度によらず、L-グルタミン、L-アラニン、L-セリン>>L-バリン、D-アラニンであった。第三章の結果から、生育良好なアミノ酸としてグルタミン、L-アラニン、生育を阻害するアミノ酸としてセリン、バリン、D-アラニンを供試したが、セリンを除くと、生育が良好であったアミノ酸（グルタミン、L-アラニン）の吸収量が、生育を阻害するアミノ酸（バリン、D-アラニン）よりも多い結果が得られた。

② オートラジオグラフィー像

3、12、24時間吸収後のイネ幼植物のオートラジオグラフィー像と、24時間吸収後のオートラジオグラフィー像から求めた地上部と地下部の輝度値を図 5-2-3（窒素濃度25 μM）、図5-2-4（窒素濃度100 μM）、図5-2-5（窒素濃度1000 μM）に示した。24時間後の輝度値は、窒素濃度25 μMでは、セリン、バリン>>D-アラニン、L-アラニン、グルタミンとなり、100 μM では D-アラニン、バリン>>セリン>L-アラニン、グルタミン、1000 μMではバリン>セリン>D-アラニン>グルタミン、L-アラニンとなった。濃度が低いと地下部の割合が高く、濃度が高くなる程、地下部の割合が低下し、吸収したアミノ酸を地上部への移行量が多くなっていた。

③ 考察

図5-2-3～5のオートラジオグラフィー像は、^{14}Cで標識したアミノ酸の吸収実験後のイネ幼植物体内 ^{14}C の分布図である。水耕液中の ^{14}C 減少量と植物体内に取り込んだ^{14}Cとは当然相関があると考えられたが、オートラジオグラフィー像から求めた輝度値

と減少量を比較すると、減少量と輝度値が比例しておらず、グルタミンや L-アラニンなどの吸収量が多いアミノ酸の輝度値が低いという結果が得られた。これは、吸収されたアミノ酸が代謝され、早期に分解されて、^{14}C が植物体外へ放出されていることが要因と推測された。吸収したアミノ酸が速やかに代謝されれば、アミノ酸として吸収した窒素や炭素は他のアミノ酸やタンパク質、有機酸などに変換され、炭素の一部は呼吸により体外へ放出される。つまり、グルタミン、L-アラニンの吸収量は多いが、植物体内で円滑に代謝されるため、代謝および呼吸により二酸化炭素として体外に放出される ^{14}C も多くなり、オートラジオグラフィー像では輝度値が低くなったのではないかと考えられた。

一方、バリン、D-アラニンは植物体内に吸収はされるが、代謝されにくいため、^{14}C は体内に蓄積する理由で、吸収量が少ないにも関わらず輝度値が高い結果となったと推測された。

そこで、^{15}N、^{13}C-二重標識アミノ酸を用いて、第三節では水耕液から吸収したアミノ酸の窒素と炭素の植物体地下部と地上部への分配、利用について、第四節ではアミノ酸吸収後の植物体内の遊離アミノ酸の組成と代謝について、さらに詳細に検討することとした。

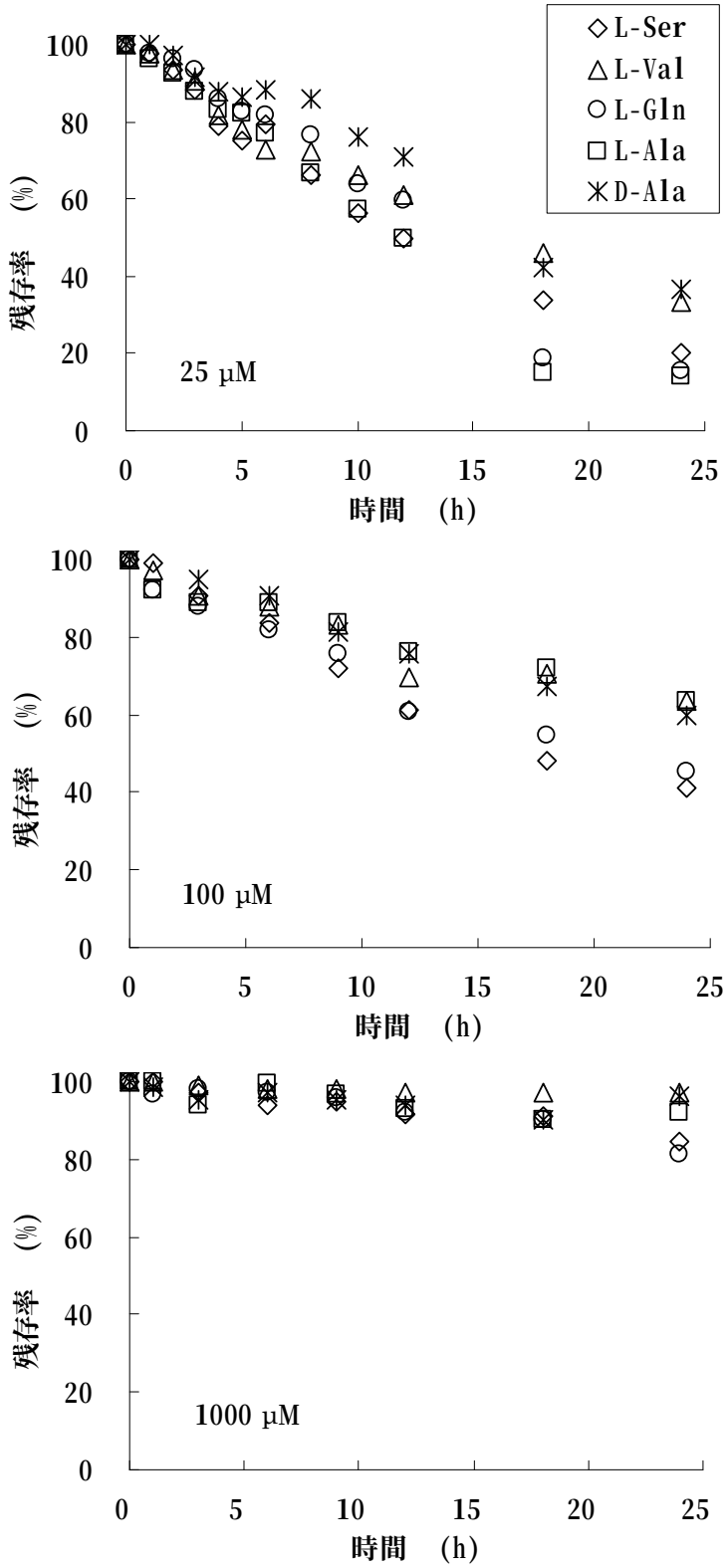

図 5-2-1 イネ幼植物に異なるアミノ酸溶液を 3 段階の濃度で吸収させた時の溶液中のアミノ酸の残存率 (初期吸収濃度を 100 とする)

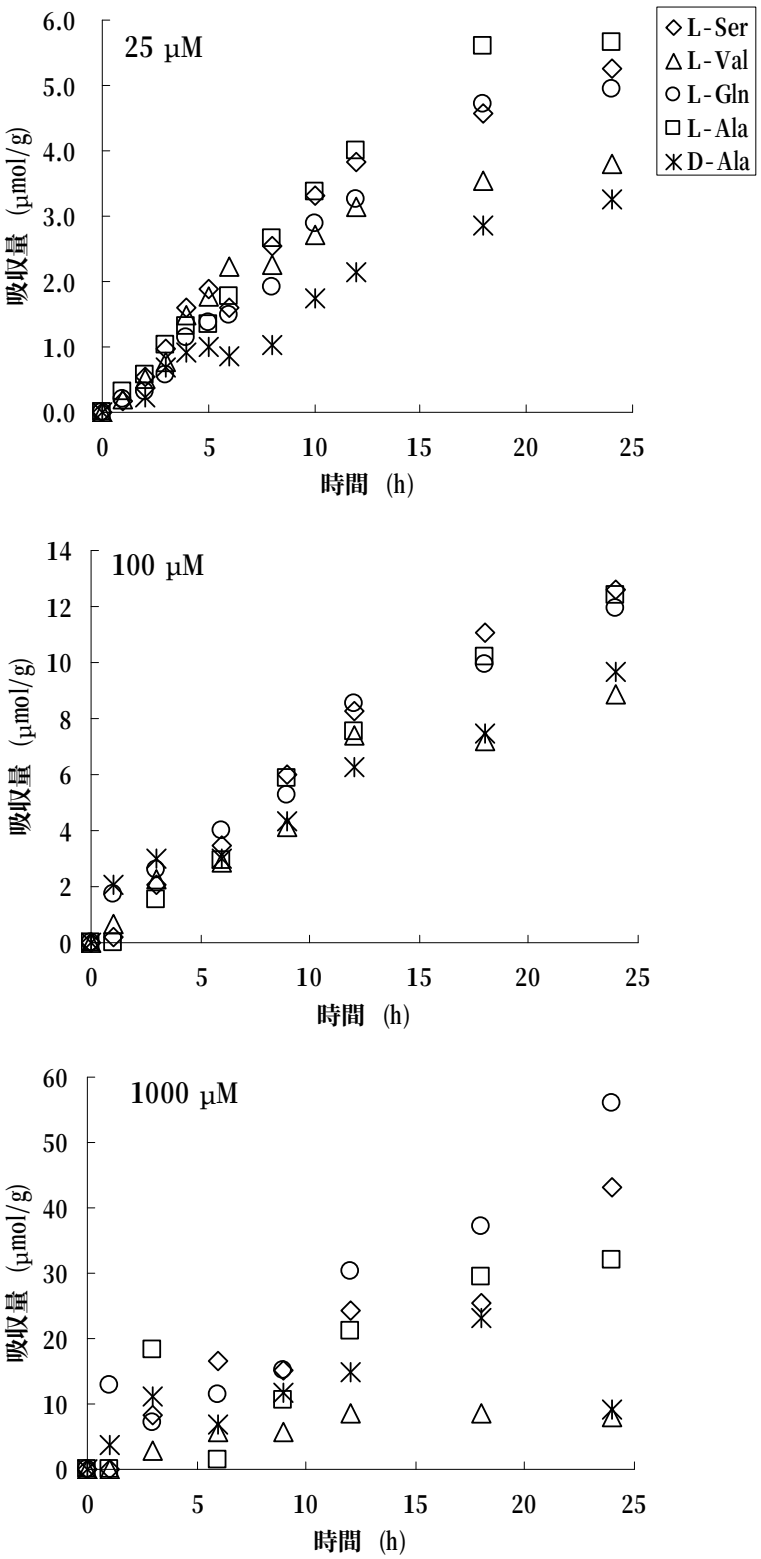

図 5-2-2 異なるアミノ酸溶液を 3 段階の濃度で吸収させたイネ幼植物の吸収量

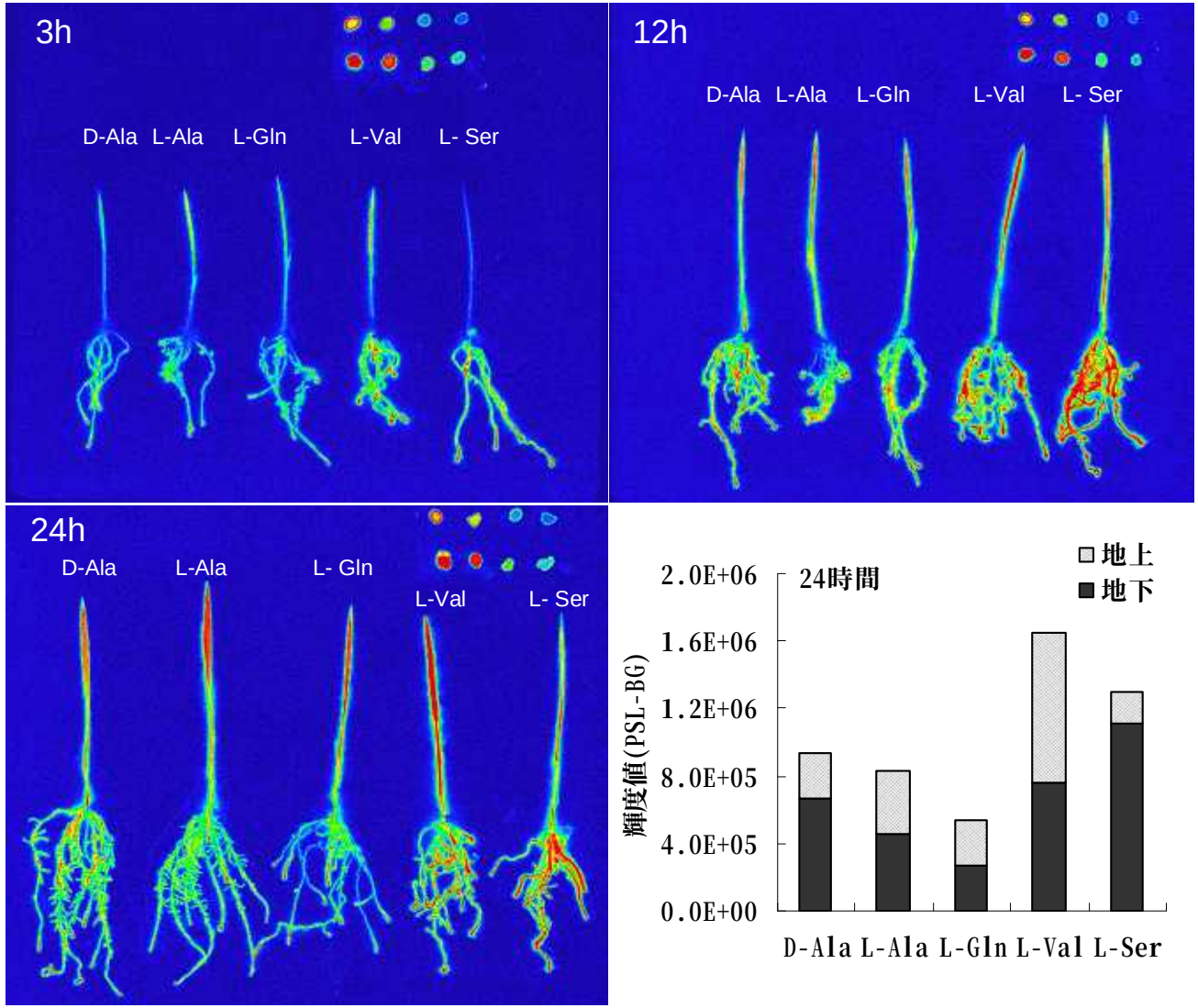

図 5-2-3　25 μM アミノ酸を吸収させたイネ幼植物のオートラジオグラフィー像（3,12,24 時間後）および地上・地下部の輝度値（24 時間後）

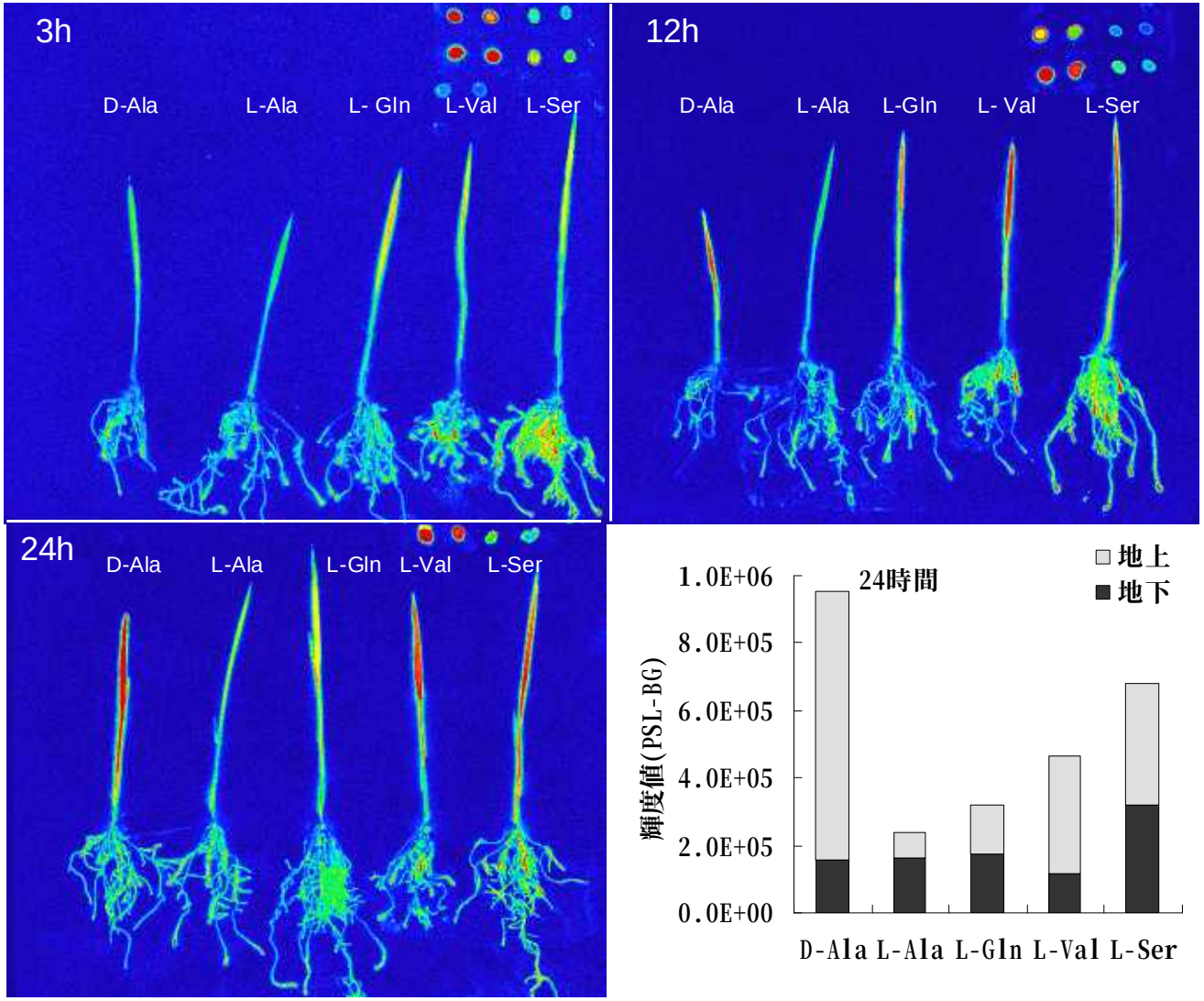

図 5-2-4　100 μM アミノ酸を吸収させたイネ幼植物のオートラジオグラフィー像（3,12,24 時間後）および地上・地下部の輝度値（24 時間後

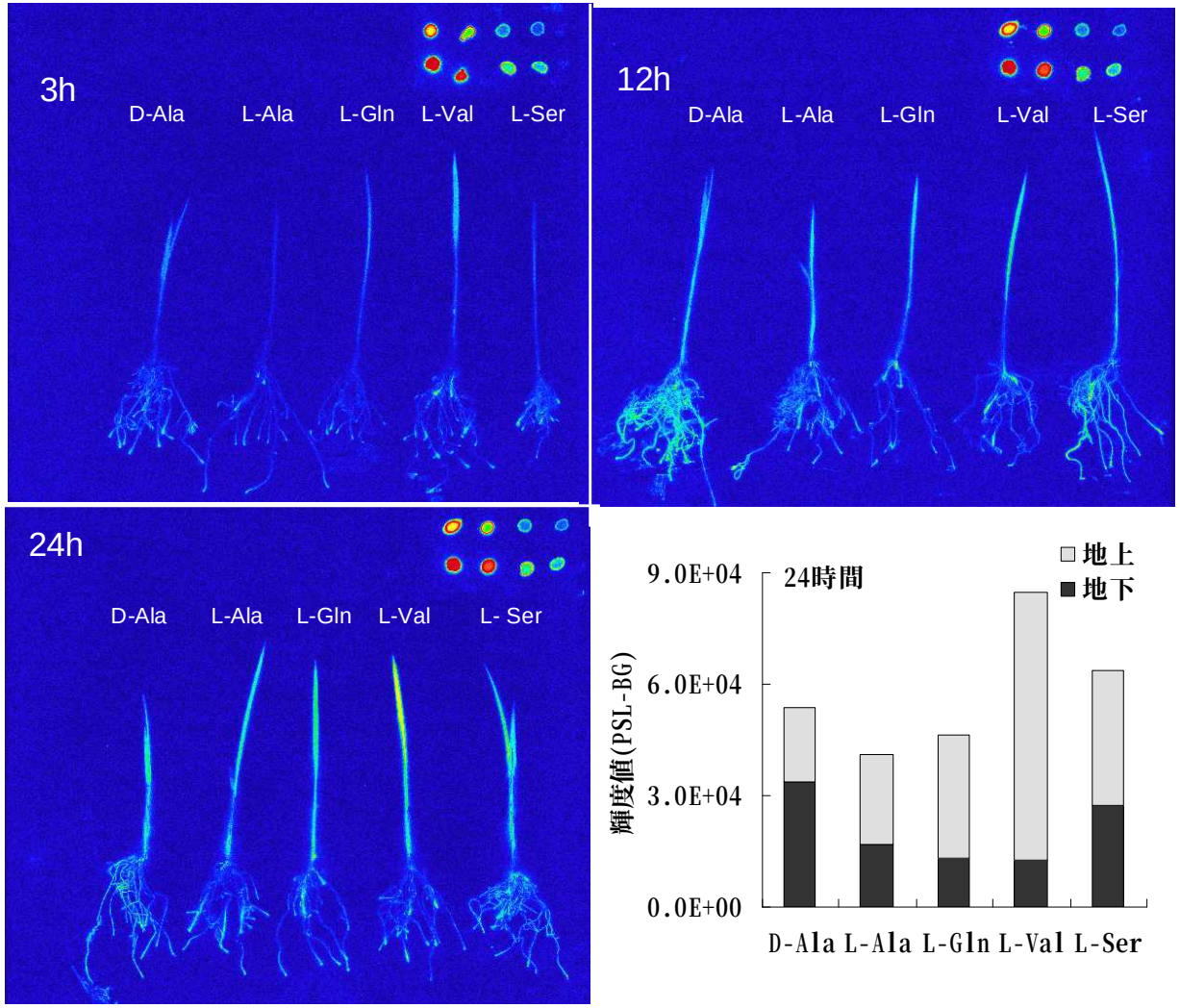

図 5-2-5　1000 μM アミノ酸を吸収させたイネ幼植物のオートラジオグラフィー像（3,12,24 時間後）および地上・地下部の輝度値（24 時間後）

第三節　直接吸収したアミノ酸の構成窒素および炭素の地下部から地上部への移行およびアミノ酸から得られるエネルギーについて

1) 目的

前節では ^{14}C-アミノ酸を用いて、アミノ酸の吸収量および吸収したアミノ酸の植物体内分布を検討した。その結果、吸収量（溶液の減少量）と、オートラジオグラフィー像の輝度値による吸収実験後の植物体内の存在量が一致しないことから、炭素（^{14}C）成分が植物体から放出していることが示唆された。放出された炭素を植物体内での呼吸による二酸化炭素の放出と考えれば、呼吸により植物はエネルギーを獲得していると考えられる。したがって、吸収されたアミノ酸の炭素の減少量からエネルギーの獲得量を算出できれば、アミノ酸の直接吸収の意義が高まる。

また、吸収されたアミノ酸態窒素の植物体内での分布についても、アミノ酸を窒素源として考えたときには大変興味深い課題である。無機態窒素形態でも体内分布の相異があり、アミノ酸態窒素の分布も無機態窒素と比べて異なることが予想される。

そこで、異なる窒素形態（グルタミン、アラニン、バリン、塩化アンモニウム）の窒素を安定同位体二重標識アミノ酸として与えた後の植物体地上部と地下部の標識窒素および標識炭素存在量の測定を行った。

2) 材料と方法

供試作物はイネ（*Oryza sativa* L. 日本晴）を用いた。第一節と同様な種子滅菌を行った後、発芽した種子を無窒素の改変木村氏 B 液で 6 日間無菌的に水耕栽培した。7 日目に、生育の揃ったイネ幼植物を供試溶液に移植し、生育時と同じ人工気象器内にて 24 時間明条件での吸収実験を行った。供試溶液は、窒素成分抜き改変木村氏B液 25 mlに、以下の ^{15}N,^{13}C-二重標識安定同位体アミノ酸（^{15}N,^{13}C 98 atom%、昭光通商）と ^{15}N-安定同位体塩化アンモニウム（^{15}N 98 atom%、昭光通商）を、窒素成分で 25 μM、100 μM、1000 μM となるように添加した。

(U-)^{15}N,^{13}C-L-グルタミン　$^{13}CO(^{15}NH_2)^{13}CH_2{}^{13}CH_2{}^{13}CH(^{15}NH_2)^{13}COOH$

(U-)^{15}N,^{13}C-L-アラニン　$^{13}CH_3{}^{13}CH(^{15}NH_2)^{13}COOH$

(U-)-^{15}N,^{13}C-L-バリン　$^{13}CH(^{13}CH_3)_2{}^{13}CH(^{15}NH_2)^{13}COOH$

^{15}N-塩化アンモニウム　$^{15}NH_4Cl$

吸収実験後、植物体を回収し、氷冷水で 30 秒ずつ 3 回根を洗い、地上部と地下部に分離し 80 ℃で一昼夜乾燥させ、それぞれの乾燥重を測定した。試料を 2 ml エッペンチューブに入れ、液体窒素で凍結しながら、ベッセルにて微粉砕した。安定同位体比の測定は、粉砕サンプルを約 3 mg ずつスズカプセルに包み、同位体比質量分

析装置（Delta V, Thermo Fisher Scientific K.K.）にて、atom%^{15}N （^{15}N/(^{14}N+^{15}N)）、atom%^{13}C （^{13}C/(^{12}C+^{13}C)）を測定した。同位体標識アミノ酸（グルタミン、アラニン、バリン）および同位体標識塩化アンモニウムを吸収した試料の atom%^{15}N（または atom%^{13}C）から、通常のアミノ酸および塩化アンモニウムを吸収した試料の atom%^{15}N（または atom%^{13}C）を引き、atom%^{15}N excess（または atom%^{13}C excess）とした。植物中の全窒素（または全炭素）量と atom%^{15}N excess（または atom%^{13}C excess）から、吸収した窒素（または炭素）量（μmol）を算出し、地上部/地下部比、^{13}Ce/^{15}Ne 比を求めた。

また、より長期間アミノ酸を吸収させた時の代謝の追跡を行うため、イネを発芽後、窒素濃度 1000 μM の安定同位体標識アミノ酸および塩化アンモニウムを用いた水耕液で 6 日間無菌的に水耕栽培した。長期的な吸収で栽培後イネ幼植物の atom%^{15}N（または atom%^{13}C）が高くなり、同位体比質量分析装置の測定範囲を超えることが予想されたため、安定同位体アミノ酸は 1/10 とし、残りは通常のアミノ酸を用いて、溶液を作成した。抽出、測定は上記と同様に行った。

さらに、6 日間生育したイネ幼植物の結果から、吸収したアミノ酸から得るエネルギーについて、次の二式を用いて評価した。

一つ目は、植物の生育量は光合成量と呼吸量のバランスで決まるとする（Tanaka et al. 1968）次式で示される成長効率（Growth Efficiency,GE ）を用いた。

GE=⊿W/（⊿W+R）

⊿W：一定期間内における乾物増加量（mg）

R：呼吸量（mgCO_2）をグルコース量に換算（CH_2O/CO_2 の比 0.68 を乗じる、mgCH_2O）

なお、Yamaguchi(1978)の報告より、作物の生育期における生長効率は 60~65%とされている。本節では GE を 0.6 とし、栽培後の乾物重から得られる呼吸量（成長に必要な呼吸量）に対して、アミノ酸の分解（植物体内からの炭素の減少量）で生じる呼吸量を評価した。

二つ目は、植物体を構成する各種成分を、グルコースより生合成する効率について、生化学的な代謝系に基づいて試算された生産効率（production value , PV）を用いた（Penning et al. 1974）。PV はグルコース 1g からの合成量とされ、タンパク質、脂肪、炭水化物でそれぞれ 0.40g、0.33g、0.83g である。この考えに基づき Sinclair et al.(1975) は、1g のグルコースから、イネでは 0.75g の収穫部位が合成されるとしている。この PV 値を用いて、栽培後の乾物重をグルコース量に変換し、グルコースの合成に必要なエネルギーと、アミノ酸の分解から得られる ATP 量をエネルギーに換算して比較した。

なお、グルコースの合成には12NADPHと18ATPが必要とし、NADPHの酸化とATPの加水分解による自由エネルギーがそれぞれ 220kJ/mol、30.5kJ/mol から、グルコース合成に必要なエネルギーは 3189kJ/mol とした。また、グルタミン態の炭素はその炭素骨格から2-オキソグルタル酸（C=5）、アラニンはピルビン酸(C=3)としてTCA回路に取り込まれるとした。TCA回路1サイクルで2分子のCO_2と30分子のATPを生産するため、炭素数5の2-オキソグルタル酸の分解は2.5サイクル(70 ATPの生産）と仮定した。ピルビン酸の分解は、TCA回路に入る前に3ATPが生産されるためTCA回路を含め1サイクルで2分子のCO_2と33分子のATPを生産し、炭素数3のピルビン酸の分解は1.5サイクル(49.5 ATPの生産)と仮定した。バリンのTCA回路内での分解は明確ではなかったため、炭素数から 2－オキソグルタル酸としてグルタミンと同様に計算した。

3) 結果と考察

① 溶液の減少量とイネ幼植物の吸収量

表5-3-1と図5-3-1に水耕液からの^{15}Nと^{13}Cの減少量と植物の地上部と地下部の存在量を示した。24時間後の吸収量は、塩化アンモニウムで最も多く、バリンが最も少なかった。溶液の^{15}N減少量に対する植物の^{15}N吸収量は、85%以上でほぼ同じとなったが、^{13}Cの減少量に対する植物の^{13}C存在量は、グルタミン、アラニンでは38～47%、バリンでは 62～70%であり、窒素に対してかなり低いものもあり、前節で示唆された植物体から気体となり体外へ放出されていることが確認された。

② 植物体内^{15}N存在量から算出した^{13}Cの減少率

表5-3-2に、植物体地上部と地下部の^{15}N存在量から算出した^{13}Cの減少率を示した。24時間吸収後のグルタミンでは、水耕液濃度が低いと地下部の^{13}C減少率が高く、吸収されたグルタミンの分解が主に地下部で行われ、地上部への移行は少ないと推測された。濃度が高くなると地上部、地下部とも^{13}C減少率が同様となった。アラニンは、地上部での^{13}C分解が多かった。バリンは、地上部に比べて地下部での減少率が高いが、グルタミン、アラニンに比べると^{13}C減少率は低かった。

6日間生育したイネ幼植物体でも、24時間吸収後とほぼ同様な値となった。

③ 植物体内の^{15}N,^{13}C存在量と全窒素（炭素）に対する^{15}N（^{13}C）比率（Atom%）について

表5-3-3に全窒素（炭素）に対する^{15}N（^{13}C）の比率（Atom%）を示し、図5-3-2、図5-3-3に地上部および地下部の全窒素（あるいは炭素）量と^{15}N（あるいは^{13}C）量を示

した。植物体内の ^{15}N 存在量は、各濃度とも、塩化アンモニウム>>グルタミン>アラニン>バリンとなり、^{13}C の存在量は、バリン>>グルタミン、アラニンであった。

24 時間吸収試験を実施したイネ幼植物の植物体全体の全窒素に占める ^{15}N の割合（Ne atom%）は、塩化アンモニウムの吸収区が高く、溶液濃度が1000 μMでは、グルタミンが 16.1 %、アラニンが 15.7 %、バリンが 8.1 %に対して、塩化アンモニウムが 54.0 %であった。発芽から 6 日間吸収試験を実施したイネ幼植物の植物体全体の全窒素に対する ^{15}N の割合は、塩化アンモニウムが 71.9%、グルタミンが 61.2 %、アラニンが 48.2 %、バリンが 27.0 %であった。地上部と地下部の比較をすると、25 μM では各条件とも、地下部が地上部より高かったが、1000 μM では塩化アンモニウムで地上部が高くなり、各アミノ酸ではほぼ同じ割合であった。

全炭素に対する ^{13}C の割合（Ce atom%）は、バリンを吸収したイネ幼植物で高く、溶液濃度が 1000 μM の全体では、グルタミンが 0.7%、アラニンが 0.8%、バリンが 1.0%であった。発芽から 6 日間吸収試験を行ったイネ幼植物では、グルタミンが 6.2%、アラニンが 3.4%、バリンが 6.8%であった。

④ ^{15}N、^{13}C の地上部/地下部比について

表 5-3-3、図 5-3-4、図 5-3-5 にイネ幼植物体内の ^{15}N、^{13}C の吸収量と地上部と地下部の分布を示した。また、図 5-3-6 に ^{15}N、^{13}C の地上部/地下部比を示した。

^{15}N の地上部/地下部比を塩化アンモニウムとグルタミンを吸収したイネ幼植物で比較すると、溶液濃度が高くなるに伴い地上部/地下部比は高くなり、十分量の窒素を根に吸収すると積極的に地上部へ輸送していることがわかる。同濃度の溶液で比べると、塩化アンモニウムの地上部/地下部比がグルタミンより高かった。このことから、植物根へアンモニムイオンとして吸収した窒素は、地下部で蓄積せず、積極的に地上部へ送られていることがわかる。植物体全体の ^{15}N 存在量が同程度（25 μM の塩化アンモニウムと 100 μM のグルタミン、100 μM の塩化アンモニウムと 1000 μM のグルタミン）で比較しても、塩化アンモニウムの地上部/地下部比がグルタミンより高かった。発芽から 6 日間長期的な吸収試験を行ったイネ幼植物では、塩化アンモニウムの地上部/地下部比が 17.7、グルタミンでは 4.5 であった。

アミノ酸間の ^{15}N の地上部/地下部比を比較すると、グルタミンとアラニンは溶液の濃度が高くなるに伴い地上部/地下部比は高くなるが、バリンは低下した。同濃度の溶液では、100 μM までは地上部/地下部比は同程度であるが、1000 μM ではグルタミン、アラニンは高く、バリンは低くなった。良好な生育を示すグルタミン、アラニンの窒素は、地上部へ盛んに輸送され、積極的に窒素源として利用されていることが示唆されるのに対し、生育が悪いバリンは地下部で蓄積することが示された。発芽から 6 日間吸

収試験を行ったイネ幼植物では、ほぼ同等であった。

^{13}C の地上部/地下部比については、24 時間吸収試験ではグルタミン、アラニンでは溶液の濃度が高くなるに伴い地上部/地下部比は高くなり、バリンでは低下した。発芽から 6 日間吸収試験を行ったイネ幼植物では、バリンが高かった。

窒素と炭素の地上部/地下部比を比較すると、グルタミンとアラニンは同等の値であるが、バリンは炭素の地上部/地下部比が窒素より高かった。

以上のことから、グルタミンやアラニンでは、アミノ酸を吸収した後、その炭素部分は、前節で ^{14}C を付加した実験結果が示すように、一部は地下部で呼吸で消費し、一部はアミノ酸などの形態で地上部へ輸送していることがわかる。バリンは代謝が進んでいないと推測された。

⑤ C/N 比および $^{13}Ce/^{15}Ne$ 比

表 5-3-3 と図 5-3-7、図 5-3-8 に C/N 比および $^{13}Ce/^{15}Ne$ を示した。24 時間吸収試験の C/N 比は、地上部、地下部とも 1000 μM のアンモニアで低下した。

$^{13}Ce/^{15}Ne$ 比は、溶液濃度にかかわりなく、グルタミン、アラニンで 0.8～2.0 と低く、バリンでは 2.3～4.5 と高かった。これは、各アミノ酸の C/N 比（グルタミン:2.5、アラニン:5、バリン:5）に対する植物中の $^{13}Ce/^{15}Ne$ 比が、グルタミンが 40～52%、アラニンが 26～32%、バリンが 66～74%と、バリンがアミノ酸の C/N 比に近く、代謝がほとんどすすんでいないことが示唆された。また、地上部と地下部を比べると、グルタミンは 100 μM までは地上部、アラニンは地下部、バリンは地上部が高かった。

⑥ 生長効率（GE）より呼吸量の算出

表 5-3-4 と図 5-3-9 に吸収されたアミノ酸から得るエネルギーが生育に必要な全エネルギーに対しどの程度のものになるかを算出するため、GE を用いて呼吸量からの試算を行った。6 日間グルタミンを与えて生育したイネ幼植物の乾物重の増加量は 15.8mg で、GE 値を 0.6 とすると、呼吸量（R）は 15.5 mgCO_2 となる。一方、吸収されたグルタミンの代謝により放出された ^{13}C 量は 33 μmol で、これは 1.5 mg CO_2 に相当する。したがって、吸収されたグルタミンから得た呼吸量は、生育に必要な呼吸量の 9.4%に相当している。また、グルタミンから得られた呼吸量を引いた呼吸量（13.9 mg CO_2）は、アンモニアで生成したイネ幼植物の呼吸量は 13.3 mg CO_2 とほぼ同等となった。

同様に吸収されたアラニンとバリンから得た呼吸量は、生育に必要な呼吸量の 4.7%、3.7%に相当した。

⑦　生産効率（PV）よりエネルギー量の算出

表 5-3-5 と図 5-3-9 に吸収されたアミノ酸から得るエネルギーが生育に必要な全エネルギーに対しどの程度のものになるかを算出するため、PV 値からも試算を行った。6 日間グルタミンで生成したイネ幼植物の乾物重増加量は 15.8 mg であり、これは PV 値を 0.75 とすると、117　mol のグルコースがこの生育には必要となる。

グルコース 1 分子の生合成には、下記のように 18 分子の ATP と 12 分子の NADPH が必要である。

$$6CO_2 + 12H_2O + 18ATP + 12NADPH \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6H_2O$$

ATP の加水分解と NADPH の酸化による自由エネルギーがそれぞれ 30.5kJ/mol 、220kJ/mol から、グルコース合成に必要なエネルギーは 3189kJ/mol となり、117　mol のグルコースを生合成するためには熱量として 373J のエネルギーが必要である。

一方、炭素の減少量から、吸収されたグルタミンの 55%が分解されていることから、グルタミンの炭素骨格（2-オキソグルタル酸、C=5）の分解が全て TCA 回路内で行われたとすると、TCA 回路 1 サイクルで 2 分子の CO_2 と 30 の ATP が放出されるため、2.5 サイクルを要し、498　mol の ATP が生産されたことになる。ATP の加水分解による自由エネルギーが 30.5kJ/mol から、熱量として 15J となる。したがって、熱量（J）換算で乾物量増加に必要なグルコース生産に必要なエネルギーを算出すると、吸収したグルタミンの炭素部分から供給されるエネルギーの寄与率は 4.1 %である。また ATP 換算で算出するため、呼吸鎖の場合の計算を適用し、NADPH1 分子が ATP3 分子に相当すると仮定するとグルタミン供給のエネルギーの寄与率は 7.9%であった。

いずれもＧＥよりは低い値となったが、このＰＶ値の計算から新たに見えてきたこととして、グルコースをはじめとする同化産物の生合成には膨大なエネルギーが必要であり、グルコースの合成（18ATP＋12NADPH）には 100 のエネルギー（3189kJ/mol）の投入が必要だとすると、できたグルコースの完全分解（グルコース 1 分子から 36 分子の ATP を生産）ではわずか 30 のエネルギー（1098kJ/mol）しか取り出せないということである。地上部で生産される同化産物はこの計算からわかるとおり非常に貴重であり、地上部から送られてくる同化産物をアミノ酸合成時に必要としないアミノ酸を直接吸収する経路は植物にとってきわめて有益なものであるといえよう。吸収したアミノ酸の代謝から得られるエネルギーに加え、本来無機態窒素の固定に使用するはずの同化産物のエネルギーを節約できることが植物の生育促進、特に根系の発達を促進させて要因であると考えられる。

⑧　考察

窒素の吸収量は塩化アンモニウムがアミノ酸より多かった。第四章第三節で求めたグルタミンの最大吸収速度（*Vmax*）は 2.9 μmol/g/h、アラニンは 1.2 μmol/g/h に対し

て、アンモニウムの *Vmax* が 3.4～12.8 μmol/g/h (Wang et al. 1993) や 216 μmol/g root /h (Youngdahl et al. 1982)と報告されており、アンモニウムの吸収速度がアミノ酸より速く、窒素の吸収量も多いと考えられた。アミノ酸間の比較をすると、第二節と同様、吸収量はグルタミン、アラニンで多く、バリンで少なかった。

アミノ酸の吸収と代謝で特に重要であると考えられるのは、水耕液からの減少量と植物中の存在量は、^{15}N ではほぼ同じ量になったが、^{13}C では植物の存在量は減少量より少なかったことである。これは、アミノ酸が吸収された後の代謝により、窒素は植物体内で利用されるが、炭素の一部が呼吸経路を経て二酸化炭素として植物外へ放出するため減少すると推察される。特に、グルタミンやアラニンはバリンより減少量が多く、これはグルタミンやアラニンでは代謝が円滑に行われ、二酸化炭素としての放出量が多かったものと考えられる。つまり、アミノ酸の炭素部分も呼吸の基質として利用され、アミノ酸は植物に窒素源としての役割のみならず、エネルギー源としても機能していることが示唆された。

そこで、吸収されたアミノ酸から得られるエネルギーを呼吸量や ATP として試算した。吸収されたアミノ酸がグルタミンでは、グルタミンから得られるエネルギーは生長に必要なエネルギーの 4.1～9.4 %に相当した。生育に必要な全エネルギーからグルタミンの分解で得たエネルギーを差し引いた量は、アンモニアで生育したイネ幼植物と同等になるため、グルタミンの代謝にはアンモニア代謝に加えて余分なエネルギー消費がなく、グルタミンから得られるエネルギーが、そのまま生育にプラスされたと考えられる。

アラニンから得られるエネルギーはグルタミンより低く、生長に必要なエネルギーの 3.2～4.7%に相当した。また、生育に必要な全エネルギーからアラニンの分解で得たエネルギーを差し引いた量は、アンモニアで生育したイネ幼植物よりわずかに低かった。次節で詳しく検討するが、アラニンは一度グルタミンへ代謝されてから分解されると考えられ、そのためにエネルギーを若干消費したものと考えられる。

一方、バリンは生育を阻害するアミノ酸であったが、本節の結果からも、グルタミン、アラニンと比較すると炭素の残存量が 1.5 倍以上であり、バリンを吸収してもイネ幼植物は代謝しにくく、利用しにくいと考えられる。これは、各アミノ酸の C/N 比（グルタミン:2.5、アラニン:5、バリン:5）に対する植物中の ^{13}Ce/^{15}Ne 比が、グルタミンが 40～52%、アラニンが 26～32%、バリンが 66～74%と、バリンがアミノ酸の C/N 比に近く、代謝がほとんどすすんでいないことからも明らかである。また、第二節で、グルタミンやアラニンの吸収量がバリンより多いにも関わらず、オートラジオグラフィー像の輝度値はバリンが高くなっており、このこともバリンの代謝されにくさが裏付けられる。したがって、植物はいずれの種類のアミノ酸でも吸収するが、吸収後の代謝過程の難易により、窒素源として植物生育によい影響を与えるかどうかが決まると考えられた。

グルタミンやアラニンとして供給した窒素の植物体内の分布は、溶液濃度が同濃度および吸収量が同程度で比較しても、塩化アンモニウムの窒素より地上への移行割合が低かった。つまり、アミノ酸として吸収した窒素は、塩化アンモニウムとして吸収した窒素より地下部に蓄積する割合が高かった。アミノ酸はわずかであるが、炭素も植物に供給している。^{14}C-アミノ酸を用いて、第四章第四節でリアルタイムオートイメージングや、第五章第二節のオートラジオグラフィー像から、アミノ酸から供給した炭素は特に根端に蓄積するが確認されている。窒素や炭素の地下部での利用が、第二章で確認しているグルタミンやアラニンで生育したイネ幼植物の旺盛な根系発達につながったものと考えられる。グルタミンとアラニンの ^{13}Ce/^{15}Ne 比を比較すると、100 μM まではグルタミンは地上部が高く、アラニンは地下部が高い。100 μM までのグルタミンは、地下部で代謝されるものもあるが、一部はグルタミンの形で地上へ移行していると考えられる。アラニンは、アラニンのまま地上部へ移行する割合が少なく、他のアミノ酸や有機酸へ代謝後移行されるため、地上部の ^{13}Ce/^{15}Ne 比が低くなるのではないかと考えられる。

表 5-3-1 異なる濃度の ^{15}N,^{13}C-アミノ酸および ^{15}N-塩化アンモニウム溶液の 24 時間後の減少量とイネ幼植物体中の ^{15}N,^{13}C 存在量

・^{15}N

	分子中の窒素数	溶液（25 μmol)中の^{15}N量			^{15}N-減少率			^{15}N-減少量			^{15}N-存在量			^{15}N-存在量/^{15}N-減少量		
		25 μM (μmol)	100 μM (μmol)	1000 μM (μmol)	25 μM (%)	100 μM (%)	1000 μM (%)	25 μM (μmol)	100 μM (μmol)	1000 μM (μmol)	25 μM (μmol)	100 μM (μmol)	1000 μM (μmol)	25 μM (%)	100 μM (%)	1000 μM (%)
NH_4^+	1	0.6	2.5	25.0	97	96	68	0.6	2.4	16.9	0.6	2.3	16.5	98	97	98
Gln	2	0.6	2.5	25.0	82	50	11	0.5	1.2	2.8	0.5	1.1	2.5	92	91	91
Ala	1	0.6	2.5	25.0	70	29	9	0.4	0.7	2.4	0.4	0.6	2.0	87	90	85
Val	1	0.6	2.5	25.0	66	31	5	0.4	0.8	1.2	0.4	0.7	1.1	96	94	94

・^{13}C

	分子中の炭素数	溶液（25μmol)中の^{13}C量			^{13}C-減少率			^{13}C-減少量			^{13}C-存在量			^{13}C-存在量/^{13}C-減少量		
		25 μM (μmol)	100 μM (μmol)	1000 μM (μmol)	25 μM (%)	100 μM (%)	1000 μM (%)	25 μM (μmol)	100 μM (μmol)	1000 μM (μmol)	25 μM (μmol)	100 μM (μmol)	1000 μM (μmol)	25 μM (%)	100 μM (%)	1000 μM (%)
NH_4^+																
Gln	5	1.6	6.3	62.5	82	50	11	1.3	3.1	6.9	0.6	1.4	2.6	47	45	38
Ala	3	1.9	7.5	75.0	70	29	9	1.3	2.1	7.1	0.5	1.0	2.7	40	47	38
Val	5	3.1	12.5	125.0	66	31	5	2.1	3.8	5.8	1.3	2.7	3.6	65	70	62

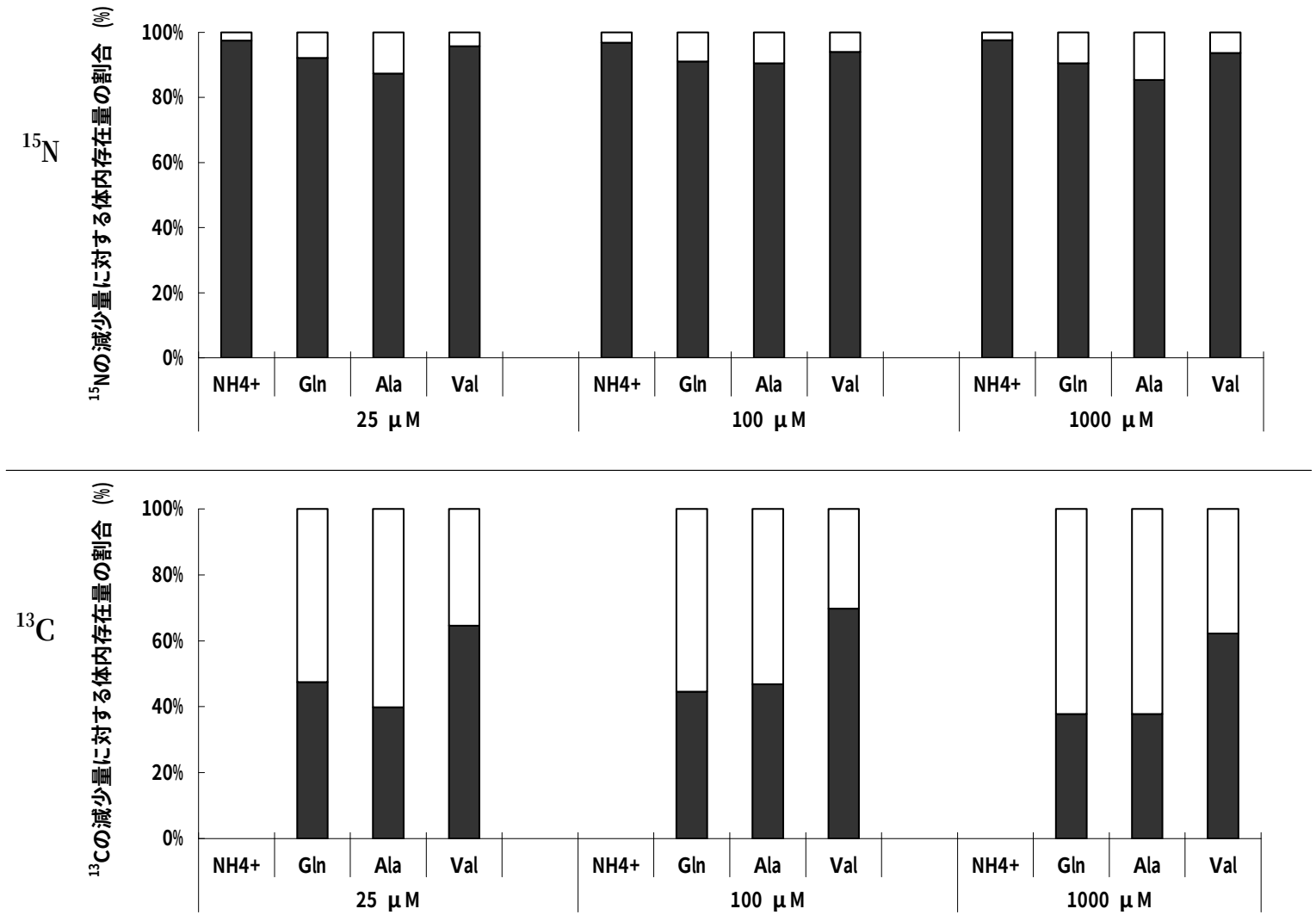

図 5-3-1 異なる濃度の ^{15}N,^{13}C-アミノ酸および ^{15}N-塩化アンモニウム溶液の24時間後の減少量に対するイネ幼植物体中の ^{15}N,^{13}C 存在量割合 (24時間後の減少量を100とする)

表 5-3-2 異なる濃度の ^{15}N・^{13}C-アミノ酸および ^{15}N-塩化アンモニウムを 24 時間または 6 日間吸収させたイネ幼植物体内の ^{15}N 存在量から算出した ^{13}C の減少率

・24時間

窒素濃度		^{15}Ne 地上 (μmol)	^{15}Ne 地下 (μmol)	^{15}Ne 全体 (μmol)	^{13}Ce 地上 (μmol)	^{13}Ce 地下 (μmol)	^{13}Ce 全体 (μmol)	^{13}Cの減少率 地上 (%)	^{13}Cの減少率 地下 (%)	^{13}Cの減少率 全体 (%)
25 μM	NH_4^+	0.36	0.23	0.59						
	Gln	0.18	0.30	0.48	0.29	0.32	0.61	36	56	48
	Ala	0.12	0.26	0.38	0.15	0.37	0.52	57	53	54
	Val	0.19	0.20	0.40	0.88	0.46	1.34	10	54	33
100 μM	NH_4^+	1.59	0.74	2.33						
	Gln	0.59	0.54	1.13	0.79	0.59	1.38	46	57	51
	Ala	0.30	0.35	0.65	0.34	0.66	1.01	62	36	48
	Val	0.35	0.37	0.72	1.54	1.14	2.68	13	38	26
1000 μM	NH_4^+	13.29	3.23	16.52						
	Gln	1.72	0.79	2.51	1.73	0.88	2.61	60	55	58
	Ala	1.14	0.89	2.03	1.36	1.33	2.69	60	50	56
	Val	0.41	0.69	1.09	1.48	2.16	3.64	27	37	34

・6日間

窒素濃度		^{15}Ne 地上 (μmol)	^{15}Ne 地下 (μmol)	^{15}Ne 全体 (μmol)	^{13}Ce 地上 (μmol)	^{13}Ce 地下 (μmol)	^{13}Ce 全体 (μmol)	13Cの減少率 地上 (%)	13Cの減少率 地下 (%)	13Cの減少率 全体 (%)
1000 μM	NH_4^+	22.39	1.35	23.74						
	Gln	19.02	5.28	24.30	20.83	6.74	27.57	56	49	55
	Ala	5.86	2.47	8.33	6.95	4.79	11.74	61	35	53
	Val	1.42	0.30	1.72	5.08	0.91	5.99	28	39	30

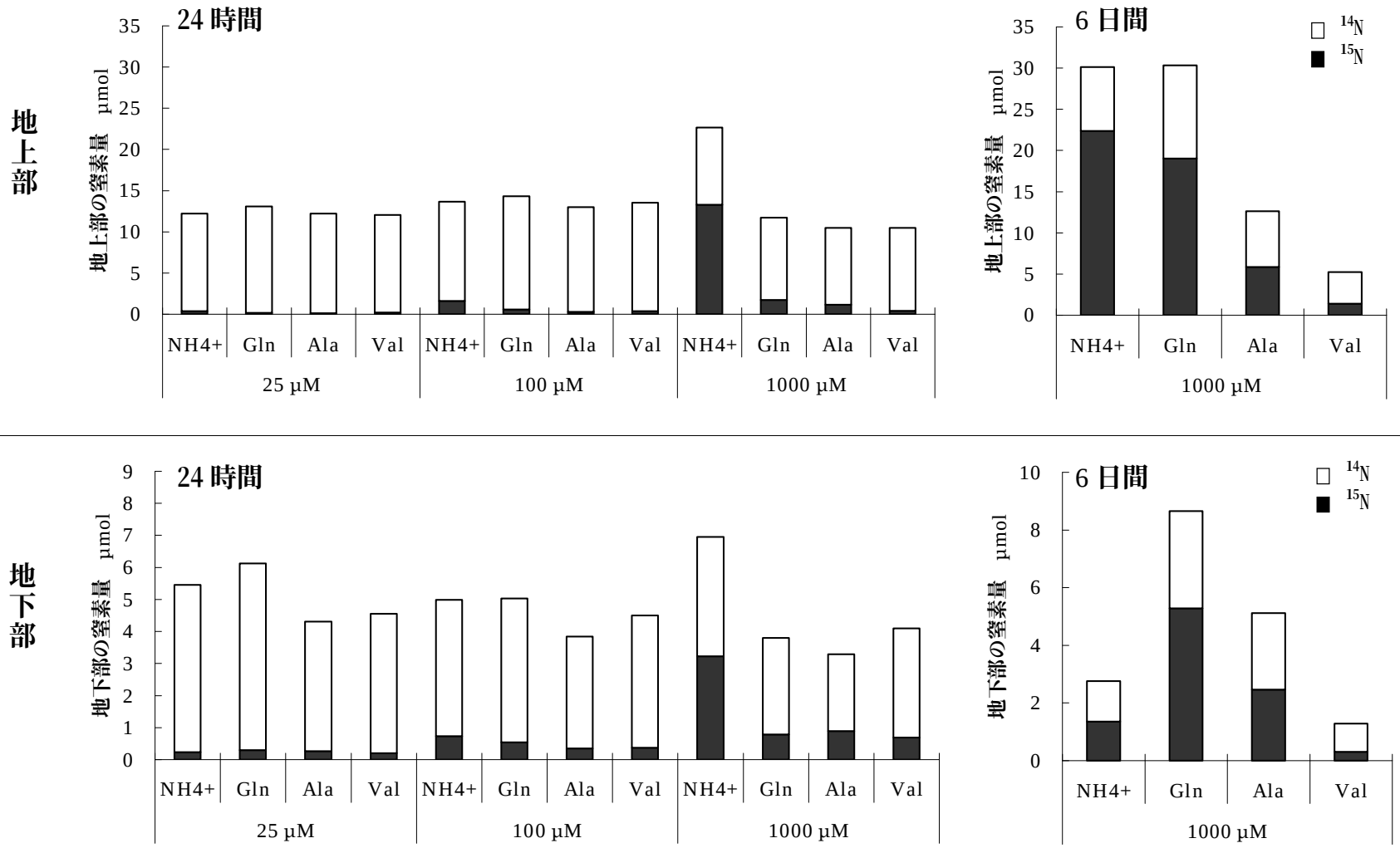

図 5-3-2 異なる濃度の ^{15}N・^{13}C-アミノ酸および ^{15}N-塩化アンモニウムを 24 時間または 6 日間吸収させたイネ幼植物の<u>地上部、地下部の窒素量</u>

表 5-3-3 $^{15}N,^{13}C$-アミノ酸および ^{15}N-塩化アンモニウムを 24 時間または 6 日間吸収させたイネ幼植物の地上部と地下部の $^{15}N,^{13}C$ の存在量

・24時間

窒素濃度		乾物重			^{15}Ne							^{13}Ce							C/N			$^{13}Ce/^{15}Ne$		
		地上 (mg)	地下 (mg)	全体 (mg)	地上 (μmol)	地下 (μmol)	全体 (μmol)	地上/地下	地上 (atom%)	地下 (atom%)	全体 (atom%)	地上 (μmol)	地下 (μmol)	全体 (μmol)	地上/地下	地上 (atom%)	地下 (atom%)	全体 (atom%)	地上	地下	全体	地上	地下	全体
25 μM	NH_4^+	8.7	3.7	12.4	0.36	0.23	0.59	1.7	3.0	4.3	3.4								21.1	26.3	22.7			
	Gln	9.4	4.5	13.8	0.18	0.30	0.48	0.7	1.4	4.8	2.5	0.29	0.32	0.61	0.9	0.1	0.2	0.1	21.0	26.0	22.6	1.6	0.8	1.3
	Ala	8.9	3.9	12.8	0.12	0.26	0.38	0.5	1.0	6.1	2.5	0.15	0.37	0.52	0.4	0.0	0.3	0.1	21.4	32.6	24.8	1.3	1.5	1.4
	Val	8.2	3.8	12.0	0.19	0.20	0.40	1.0	1.7	4.5	2.6	0.88	0.46	1.34	1.9	0.3	0.5	0.3	20.2	31.4	23.7	4.5	2.3	3.4
100 μM	NH_4^+	9.3	3.8	13.1	1.59	0.74	2.33	2.3	11.9	14.8	12.7								20.0	28.7	22.5			
	Gln	10.1	4.2	14.3	0.59	0.54	1.13	1.1	4.0	10.8	6.0	0.79	0.59	1.38	1.3	0.2	0.4	0.2	20.8	28.5	23.0	1.4	1.1	1.2
	Ala	9.1	3.5	12.6	0.30	0.35	0.65	0.9	2.3	9.0	4.2	0.34	0.66	1.01	0.5	0.1	0.5	0.2	20.7	31.1	23.6	1.1	2.0	1.6
	Val	9.5	3.8	13.3	0.35	0.37	0.72	1.0	2.5	8.0	4.1	1.54	1.14	2.68	1.4	0.4	0.8	0.5	20.7	28.8	23.0	4.3	3.3	3.7
1000 μM	NH_4^+	9.5	4.8	14.3	13.29	3.23	16.52	4.2	57.9	46.2	54.0								11.8	19.3	14.3			
	Gln	8.9	4.1	12.9	1.72	0.79	2.51	2.1	14.0	20.7	16.1	1.73	0.88	2.61	1.9	0.7	0.8	0.7	21.1	29.6	23.8	1.0	1.1	1.0
	Ala	9.0	3.8	12.9	1.14	0.89	2.03	1.3	10.9	27.0	15.7	1.36	1.33	2.69	1.0	0.5	1.3	0.8	24.2	30.8	26.2	1.2	1.5	1.3
	Val	9.2	4.4	13.7	0.41	0.69	1.09	0.6	4.0	16.6	8.1	1.48	2.16	3.64	0.7	0.6	1.8	1.0	24.9	28.5	26.1	3.6	3.1	3.3

・6日間

窒素濃度		乾物重			^{15}Ne							^{13}Ce							C/N			$^{13}Ce/^{15}Ne$		
		地上 (mg)	地下 (mg)	全体 (mg)	地上 (μmol)	地下 (μmol)	全体 (μmol)	地上/地下	地上 (atom%)	地下 (atom%)	全体 (atom%)	地上 (μmol)	地下 (μmol)	全体 (μmol)	地上/地下	地上 (atom%)	地下 (atom%)	全体 (atom%)	地上	地下	全体	地上	地下	全体
1000 μM	NH_4^+	12.0	1.6	13.6	22.39	1.35	23.74	17.7	74.9	48.3	71.8								11.8	16.8	12.3			
	Gln	11.1	4.7	15.8	19.02	5.28	24.30	4.5	62.7	61.0	61.2	20.83	6.74	27.57	3.7	6.8	4.8	6.2	10.7	16.9	12.5	1.1	1.3	1.1
	Ala	8.1	4.6	12.7	5.86	2.47	8.33	2.7	48.0	48.7	48.2	6.95	4.79	11.74	1.7	3.2	3.6	3.4	18.3	25.8	21.0	1.2	1.9	1.4
	Val	2.4	0.8	3.2	1.42	0.30	1.72	4.8	28.3	23.1	27.0	5.08	0.91	5.99	5.6	8.1	3.0	6.8	13.9	23.7	16.3	3.6	3.1	3.5

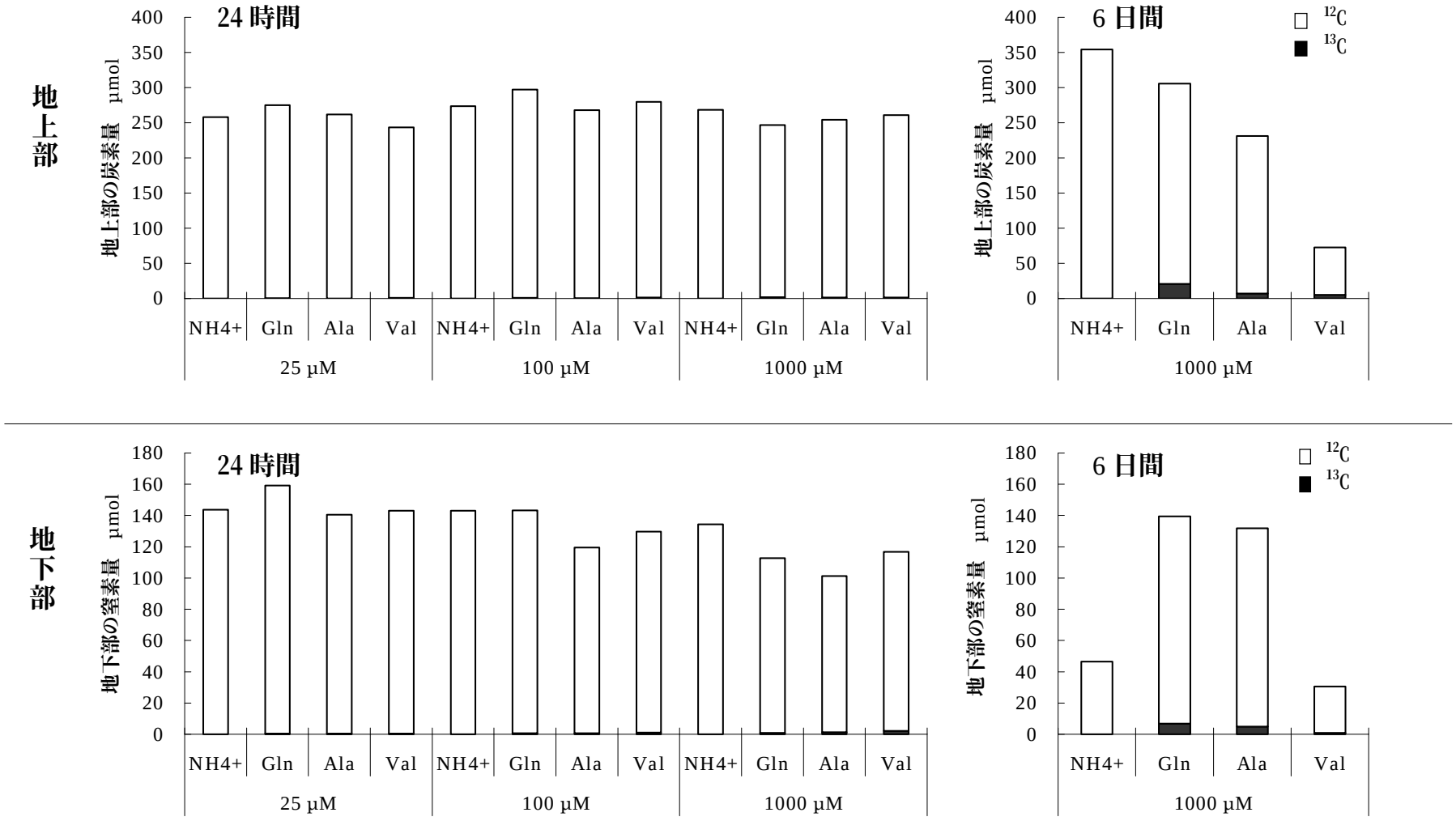

図 5-3-3 異なる濃度の ^{15}N・^{13}C-アミノ酸および ^{15}N-塩化アンモニウムを 24 時間または 6 日間吸収させたイネ幼植物の<u>地上部、地下部の炭素量</u>

表 5-3-4 吸収されたアミノ酸から得られるエネルギーの試算（生長効率（GE）を用いて二酸化炭素量として算出）

・生育に必要な呼吸量の算出

窒素源	乾物重 (mg)	呼吸量* ($mgCH_2O$)	呼吸量* ($mgCO_2$)
NH_4^+	13.6	9.1	13.3
Gln	15.8	10.5	15.5
Ala	12.7	8.5	12.5
Val	3.2	2.1	3.1

*生長効率GE=W/（W+R）、GE=0.6（Yamaguchi 1978）

・吸収されたアミノ酸の分解から放出される二酸化炭素量

窒素源	植物体内存在量 ^{15}N (μmol)	植物体内存在量 ^{13}C (μmol)	炭素の減少量* (μmol)	CO2 放出量 (mg)
Gln	24.3	27.6	33	1.5
Ala	8.3	11.7	13	0.6
Val	1.7	6.0	3	0.1

*植物体存在窒素量よりアミノ酸のC/N比（Gln;2.5、Ala;3、Val;5）から算出

・吸収されたアミノ酸の分解で生じる呼吸量の生育に対する割合

窒素源	生育に必要な呼吸量 ($mgCO_2$)	吸収されたアミノ酸の分解で生じた呼吸量 ($mgCO_2$)	差 ($mgCO_2$)	吸収されたアミノ酸から得る呼吸の割合 (%)
NH_4^+	13.3		13.3	
Gln	15.5	1.5	14.0	9.4
Ala	12.5	0.6	11.9	4.7
Val	3.1	0.1	3.0	3.7

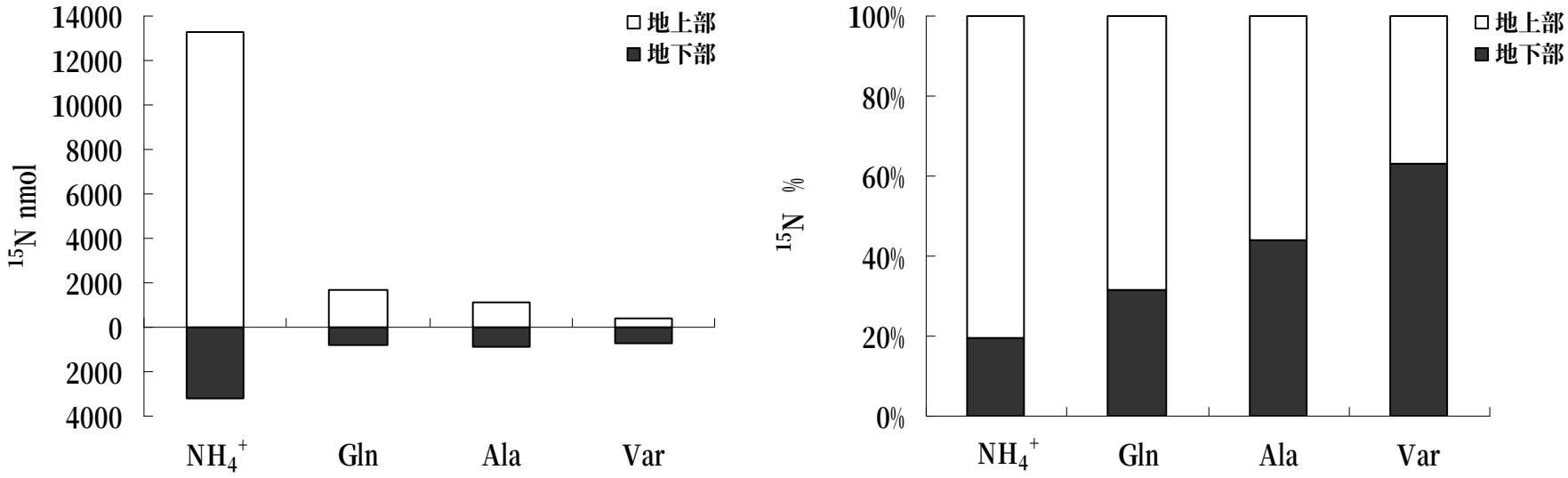

図 5-3-4　窒素濃度 1000 μM の ^{15}N・^{13}C-アミノ酸および ^{15}N-塩化アンモニウムを 24 時間吸収させたイネ幼植物における全 ^{15}N の地上部と地下部の分布

表 5-3-5　吸収されたアミノ酸から得られるエネルギーの試算（生産効率（PV）を用いてエネルギーとして算出）

・生育に必要なエネルギーの算出

窒素源	乾物重 (mg)	グルコース換算* (μmol)	グルコース生産に必要なエネルギー** (J)	グルコース生産に必要なATP*** (μmol)
NH_4^+	13.6	101	321	5440
Gln	15.8	117	373	6324
Ala	12.7	94	301	5096
Val	3.2	24	75	1276

* イネのPV値0.75 (Sinclair et al.　1975)

** $6CO_2+12NADPH+18ATP \rightarrow C_6H_{12}O_6+12NADP^+ +18ADP+18Pi$

ATPの加水分解に伴うエネルギー　30.5kJ/mol

NADPHの酸化に伴うエネルギー　220kJ/mol

グルコース生産に必要なエネルギー　3189kJ/mol

*** NADPHより3分子のATPが生産すると仮定

・吸収されたアミノ酸の分解から得るエネルギーの算出

窒素源	植物体内存在量 ^{15}N (μmol)	植物体内存在量 ^{13}C (μmol)	炭素の減少量* (μmol)	炭素の減少割合 (%)	分解されたアミノ酸 (μmol)	アミノ酸の分解**に関する条件 TCA回路1サイクルで放出するCO2	分解に要するTCA回路のサイクル数	1サイクルで生産されるATP	分解で生産されたATP (μmol)	ATPから得られるエネルギー (J)
Gln	24.3	27.6	33	55	6.6	2.0	2.5	30.0	498	15
Ala	8.3	11.7	13	53	2.2	2.0	1.5	33.0	109	3
Val	1.7	6.0	3	30	0.3	2.0	2.5	30.0	19	1

*植物体存在窒素量よりアミノ酸のC/N比 (Gln;2.5、Ala;3、Val;5) から算出

**吸収されたアミノ酸がTCA回路で分解すると仮定　ATPの加水分解に伴うエネルギー　30.5kJ/mol

・吸収されたアミノ酸から得られるATPの生育に対する割合

窒素源	生育に必要なエネルギー (J)	吸収されたアミノ酸から得られたATP (J)	差 (J)	吸収されたアミノ酸から得る熱量の割合 (%)	吸収されたアミノ酸から得るATPの割合 (%)
NH_4^+	321		321		
Gln	373	15	358	4.1	7.9
Ala	301	3	298	1.1	2.1
Val	75	1	75	0.8	1.5

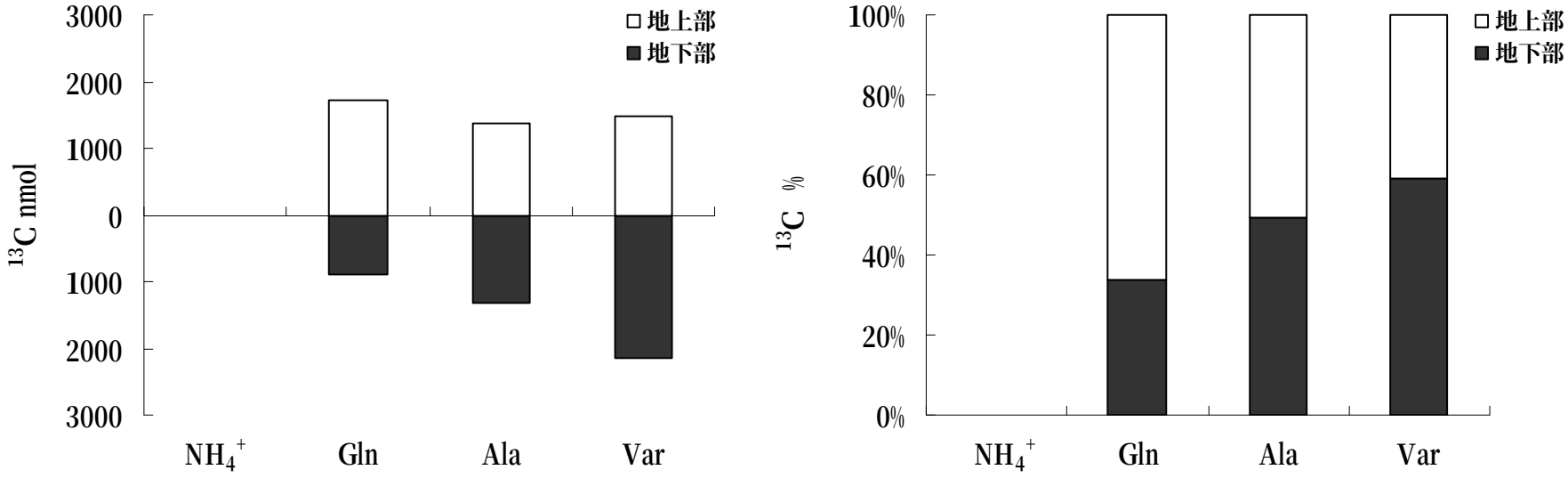

図 5-3-5 窒素濃度 1000 μM の ^{15}N･^{13}C-アミノ酸および ^{15}N-塩化アンモニウムを 24 時間吸収させたイネ幼植物における全 ^{13}C の地上部と地下部の分布

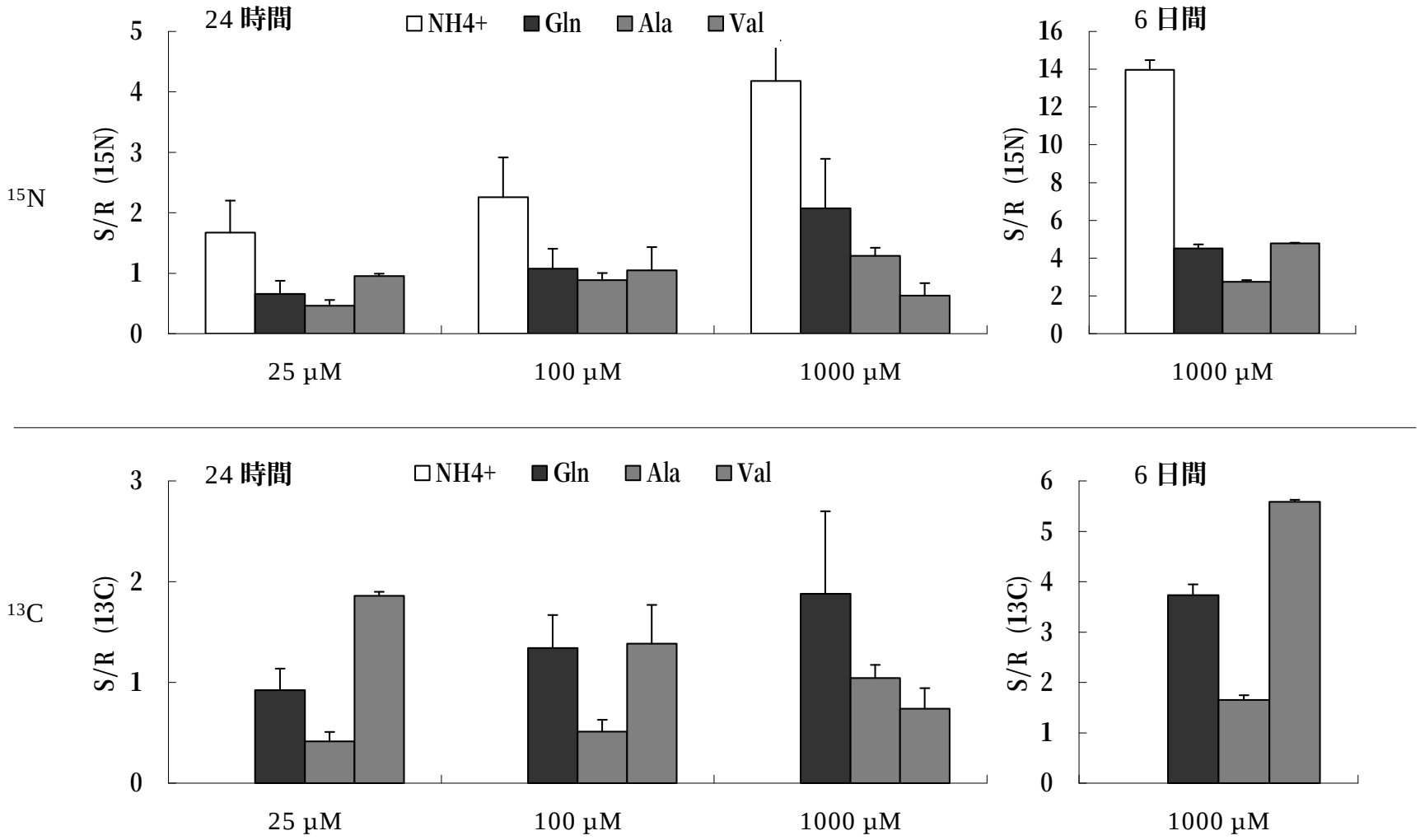

図 5-3-6 異なる濃度の ^{15}N・^{13}C-アミノ酸および ^{15}N-塩化アンモニウムを 24 時間または 6 日間吸収したイネ幼植物の ^{15}N、^{13}C 存在量の地上部/地下部比

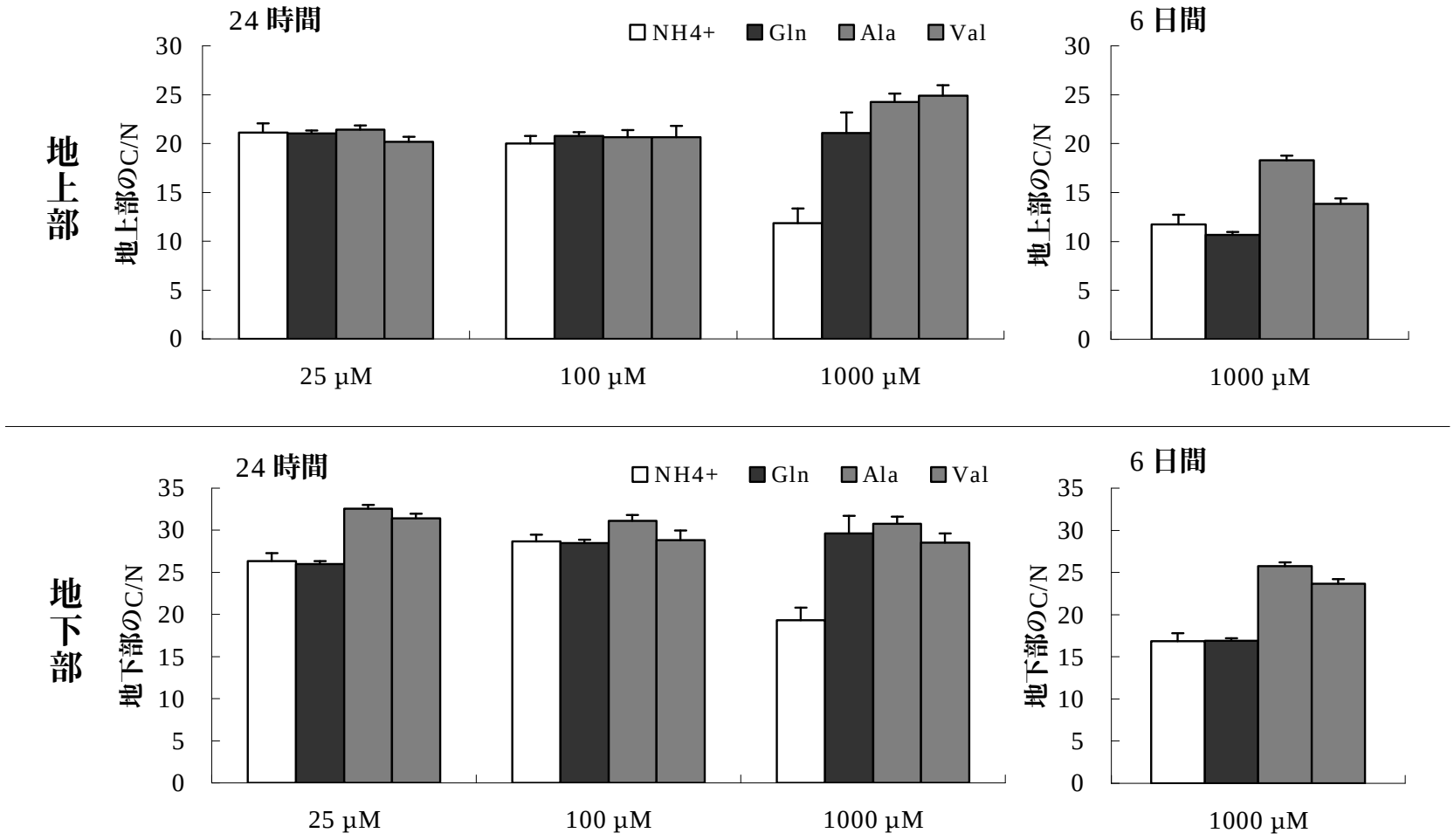

図 5-3-7　異なる濃度の ^{15}N・^{13}C-アミノ酸および ^{15}N-塩化アンモニウムを 24 時間または 6 日間吸収させたイネ幼植物の地上部と地下部の C/N 比

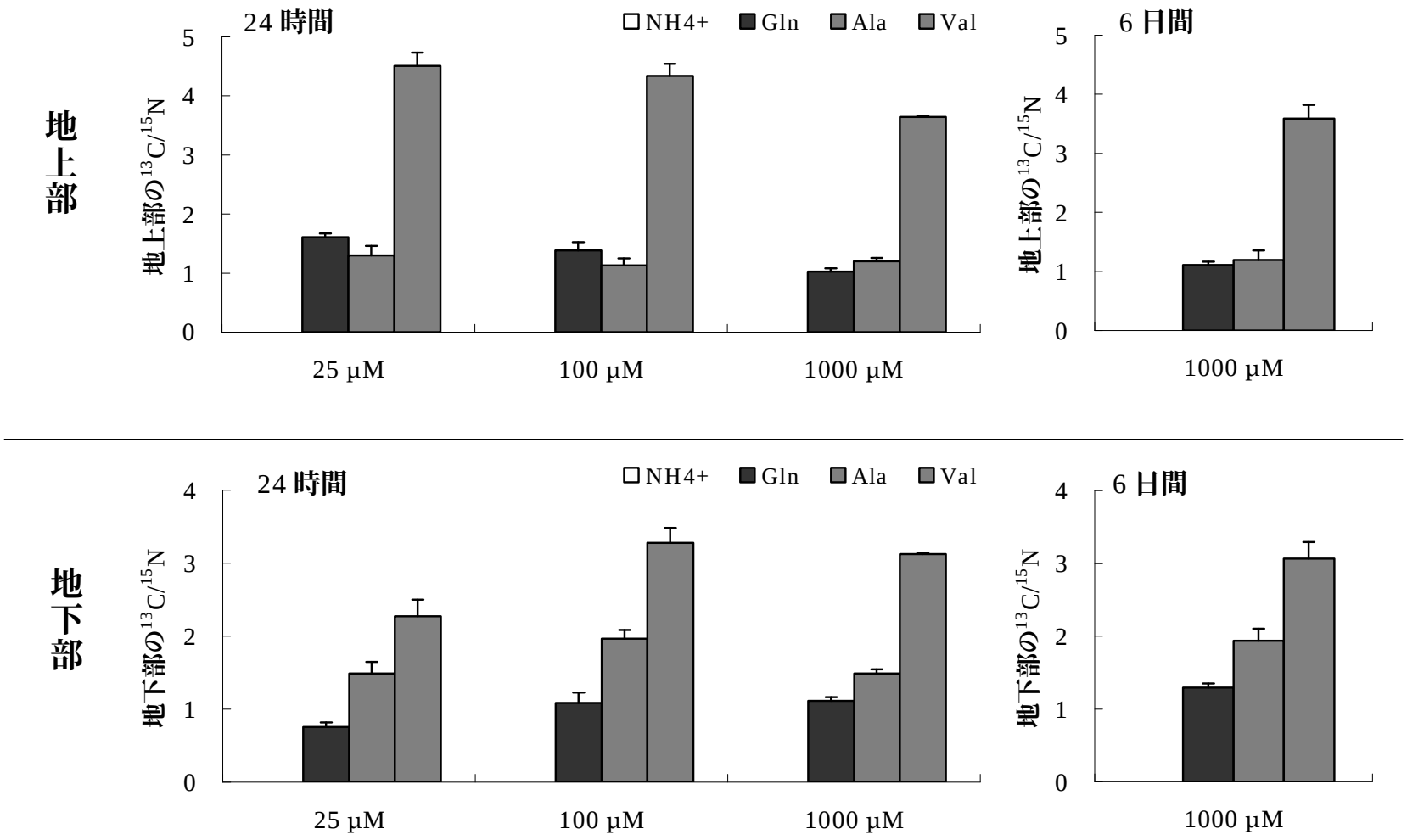

図 5-3-8　異なる濃度の ^{15}N・^{13}C-アミノ酸および ^{15}N-塩化アンモニウムを 24 時間または 6 日間吸収させたイネ幼植物の地上部と地下部の $^{13}C/^{15}N$ 比

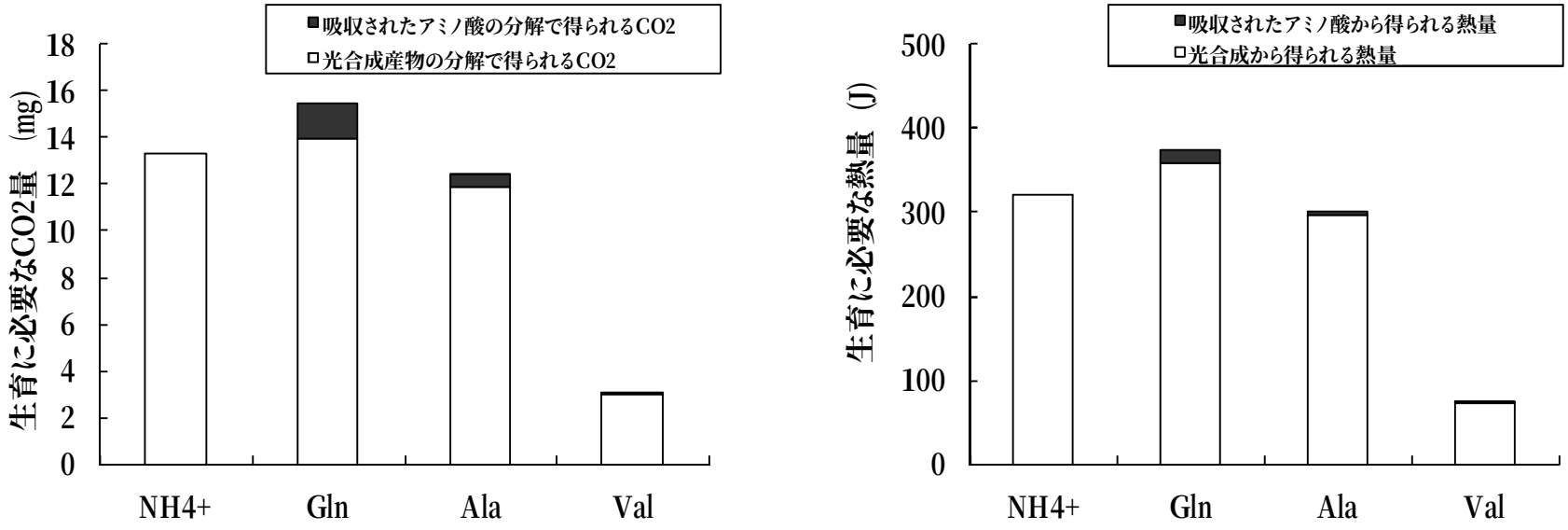

図 5-3-9　6 日間吸収させたイネ幼植物の吸収されたアミノ酸から得られるエネルギー量

第四節　異なる種類のアミノ酸ごとの代謝経路の違い

1) 目的

異なる種類のアミノ酸が植物生育に与える影響の違いを検討するため、$^{15}N,^{13}C$-安定同位体二重標識アミノ酸を用いて、24 時間吸収後の植物体内遊離アミノ酸を定量することでアミノ酸の代謝経路の推定を行った。供試したアミノ酸は、第三章でイネ幼植物の生育が良好であったグルタミン、アラニン、生育を阻害したバリン、および対照として無機態窒素（塩化アンモニウム）を用いた。

2) 材料と方法

供試作物はイネ（*Oryza sativa* L. 日本晴）を用いた。第五章第一節と同様に、種子滅菌を行った後、発芽した種子を無窒素の改変木村氏 B 液で 6 日間無菌的に水耕栽培した。7 日目に、生育の揃ったイネ幼植物を供試溶液に取換え、生育時と同じ人工気象器内にて 24 時間明条件で吸収させた。供試溶液は、窒素成分抜き改変木村氏 B 液 25 ml に以下の $^{15}N,^{13}C$-安定同位体二重標識アミノ酸 ^{15}N・^{13}C 98 atom%、昭光通商）と ^{15}N-安定同位体塩化アンモニウム（^{15}N 98 atom%、 昭光通商）を、窒素成分で 25 μM、100 μM、1000 μM となるように溶解した。

(U-)$^{15}N,^{13}C$-L-グルタミン　$^{13}CO(^{15}NH_2)^{13}CH_2{}^{13}CH_2{}^{13}CH(^{15}NH_2)^{13}COOH$

(U-)$^{15}N,^{13}C$-L-アラニン　$^{13}CH_3{}^{13}CH(^{15}NH_2)^{13}COOH$

(U-)-$^{15}N,^{13}C$-L-バリン　$^{13}CH(^{13}CH_3)_2{}^{13}CH(^{15}NH_2)^{13}COOH$

^{15}N-塩化アンモニウム　$^{15}NH_4Cl$

24 時間後の吸収実験後、氷冷水で 30 秒ずつ 3 回根を洗い地上部と地下部に分離し、それぞれの新鮮重を測定後、液体窒素で凍結して 0.5m と 5mm 径ビーズの入ったエッペンチューブに入れ、80 %エタノールを 1 ml 添加した。ビーズビーダーで破砕（5000 rpm、1 分×3 回）後、60 ℃にて 30 分間振とうを行い遊離アミノ酸を抽出した。遠心（11500 rpm、10 分）後、上澄みを遊離アミノ酸抽出液として回収した。

第四章第二節と同様に、抽出液の誘導体化を行い、液体クロマトグラム・イオントラップ型質量分析計（Finigan LTQ, Thermo Fisher Scientific K.K.）でアミノ酸量と抽出アミノ酸の質量分析を行った。

また、より長期的な吸収、代謝を追跡するため、イネを発芽後、改変木村氏 B 液に塩化アンモニウム、グルタミン、アラニン（窒素濃度 1000 μM）を窒素源して、6 日間イネ幼植物を無菌栽培し、上記と同様に遊離アミノ酸量を測定した。

3) 結果と考察

① 遊離アミノ酸量とアミノ酸組成

表 5-4-1、図 5-4-1 に、^{15}N－塩化アンモニア（窒素濃度 1000 μM）を 24 時間吸収したイネ幼植物の地上部と地下部の遊離アミノ酸量とその組成を示した。遊離アミノ酸量は、地上部、地下部とも吸収時間とともに増加し、24 時間後には実験開始時のアミノ酸量に比べて、地下部で 16 倍、地上部で 28 倍となった。地下部では、遊離アミノ酸の組成は吸収後 3 時間ではアンモニアイオンが増加したが、その後、グルタミン、アスパラギン、アラニンが増加し、24 時間後では、グルタミンの割合が最も高くなった。地上部では、グルタミン酸、アラニン、セリンが吸収後 3 時間から増加し、24 時間後では、グルタミンの割合が高くなった。

表 5-4-2、図 5-4-2 に、^{15}N,^{13}C-安定同位体二重標識グルタミン（窒素濃度 25, 100, 1000 μM）を 24 時間吸収したイネ幼植物の地上部と地下部の遊離アミノ酸量とその組成を示した。窒素濃度が 25 μM や 100 μM の遊離アミノ酸量は、地上部、地下部とも、吸収後 3 時間後には 0 時間後のアミノ酸量と比較してほぼ同じであった。窒素濃度 1000 μM では、吸収後 3 時間までは地下部で遊離アミノ酸量が減少したが、吸収後 24 時間には地下部で約 2 倍、地上部で約 6.5 倍に増加した。遊離アミノ酸の組成は、窒素濃度が 25 μM や 100 μM では、地上部、地下部とも、0 時間と同じであった。窒素濃度が 1000 μM の地下部では、アンモニアイオン、アスパラギン、グルタミンが増加し、地上部では、グルタミン、グルタミン酸、グリシンが増加した。

表 5-4-3、図 5-4-3 に、^{15}N,^{13}C-安定同位体二重標識アラニン（窒素濃度 25, 100, 1000 μM）を 24 時間吸収した地上部と地下部の遊離アミノ酸量とその組成を示した。窒素濃度が 25 μM や 100 μM の遊離アミノ酸量は、地上部、地下部とも、0 時間のアミノ酸量とほぼ同等であった。窒素濃度 1000 μM では、吸収後 1 時間までは地下部で遊離アミノ酸量が減少したが、吸収後 24 時間には地下部で約 2 倍、地上部で約 5 倍となった。遊離アミノ酸の組成は、窒素濃度が 25 μM や 100 μM では、地上部、地下部とも、0 時間と同じであった。窒素濃度が 1000 μM の地下部では、アンモニアイオン、グルタミン、グルタミン酸、アラニン、セリンが増加し、地上部では、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、セリンが増加した。

表 5-4-4、図 5-4-4 に、^{15}N,^{13}C-安定同位体二重標識バリン（窒素濃度 25, 100, 1000 μM）を 24 時間吸収した地上部と地下部の遊離アミノ酸量とその組成を示した。窒素濃度が 25 μM や 100 μM の遊離アミノ酸量は、地上部、地下部とも、0 時間のアミノ酸量とほぼ同じであった。窒素濃度 1000 μM では、吸収後 3 時間までは地下部で遊離アミノ酸量が減少したが、吸収後 24 時間には地下部で約 2 倍、地上部で約 4.5 倍となった。遊離アミノ酸の組成は、窒素濃度が 25 μM や 100 μM では、吸収後 24 時間では、地上部、地下部ともてロイシンが増加した。窒素濃度が 1000 μM の地下部では、アスパラギン、セリン、バリン、ロイシンが増加し、地上部では、グルタミン、アスパ

ラギン酸、グルタミン酸、バリン、ロイシンが増加した。

表 5-4-5、図 5-4-5 に、^{15}N－安定同位体塩化アンモニア、^{15}N,^{13}C-安定同位体二重標識グルタミン、アラニン、バリン（窒素濃度 1000 μM）で 6 日間生育した地上部と地下部の遊離アミノ酸量とその組成を示した。遊離アミノ酸量は、塩化アンモニウムを吸収させた地下部で約 6.4 倍、グルタミンで約 3.4 倍、アラニンで約 2.4 倍となり、地上部では塩化アンモニウムで生育させたイネで約 13 倍、グルタミンで約、7.6 倍、アラニンで約 5.5 倍となった。遊離アミノ酸の組成は、ほぼ同じであった。

② 他のアミノ酸への ^{15}N,^{13}C の取り込みの質量分析

図 5-4-6 に、^{15}N－塩化アンモニア（窒素濃度 1000 μM）を 24 時間吸収した地上部と地下部の主な遊離アミノ酸についてその質量分布を示した。^{15}N を窒素源として利用してアミノ酸を合成した場合、質量分布が各アミノ酸のアミノ基数により、+1 もしくは +2 高い質量側へシフトする。質量の増加する順は、地下部では、アンモニアイオン、グルタミン＞アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸＞アスパラギン、セリン＞バリン、ロイシンであった。地上部では、グルタミン、グルタミン酸＞アスパラギン酸、アンモニアイオン、アラニン、セリン＞アスパラギン＞バリン、ロイシン、グリシンであった。

図 5-4-7 に、^{15}N^{13}C-安定同位体二重標識グルタミン（窒素濃度 1000 μM）を 24 時間吸収させたイネ幼植物の地上部と地下部の主な遊離アミノ酸の質量分布を示した。質量の増加する順は、地下部では、グルタミン>グルタミン酸、アスパラギン酸>セリン、アラニンであった。地上部では、グルタミン>グルタミン酸、アスパラギン酸>セリン>グリシンであった。グルタミン、グルタミン酸の増加は、窒素数（グルタミン 2、グルタミン酸 1）以上の増加を示しており、炭素も含む代謝の結果と考えられた。

図 5-4-8 に、^{15}N^{13}C-安定同位体二重標識アラニン（窒素濃度 1000 μM）を 24 時間吸収した地上部と地下部の主な遊離アミノ酸ごとの質量分布を示した。質量の増加する順は、地上部、地下部とも、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸>アラニン>セリンであった。

図 5-4-9 に、^{15}N^{13}C-安定同位体二重標識バリン（窒素濃度 1000 μM）を 24 時間吸収した地上部と地下部の主な遊離アミノ酸ごとの質量比を示した。質量の増加する順は、地上部、地下部とも、バリン>ロイシンであった。

付録に 25、100 μM の遊離アミノ酸ごとの質量分布を示した。遊離アミノ酸量は変わらなくても、遊離アミノ酸の質量は増加しており、外部由来のアミノ酸が代謝され、他のアミノ酸に ^{15}N を含むアミノ基部分が転移して、窒素源として利用されていることがわかる。

③ 質量シフトを示した遊離アミノ酸とそれから推測される吸収アミノ酸の代謝経路

表 5-4-5 に窒素濃度 1000 μM の ^{15}N,^{13}C-アミノ酸を 24 時間吸収させたイネ幼植物中の遊離アミノ酸に対する質量シフトした遊離アミノ酸割合とアミノ酸量を示し、図 5-4-10 に質量シフトした遊離アミノ酸の経時変化を示した。

^{15}N－安定同位体塩化アンモニアを吸収したイネ幼植物の質量シフトを示した遊離アミノ酸で増加したものは、地下部では、グルタミン、アスパラギン、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリンで、地上部では地下部で増加したアミノ酸とグリシンであった。

$^{15}N^{13}C$-安定同位体二重標識グルタミンを吸収したイネ幼植物では、地下部では、グルタミン、アスパラギン、セリンで、地上部では、地下部で増加したアミノ酸に加えグルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンであった。

$^{15}N^{13}C$-安定同位体二重標識アラニンを吸収したイネ幼植物では、地下部では、グルタミン、アスパラギン、アラニンで、地上部では、地下部で増加したアミノ酸に加えグルタミン酸、アスパラギン酸、セリンであった。

$^{15}N^{13}C$-安定同位体二重標識バリンを吸収したイネ幼植物では、地下部では、バリンとロイシンのみで、地上部では、地下部で増加したアミノ酸に加えグルタミン酸、グルタミンであった。

④ 考察

窒素濃度 1000 μM の塩化アンモニアを吸収したイネ幼植物では、同濃度のアミノ酸を吸収したイネ幼植物より遊離アミノ酸量の増加量は多かった。第 1 節から塩化アンモニアはアミノ酸に比べて吸収が早く、吸収量が多い（*Vmax* 3.4～12.8 μmol/g/h Wang et al. 1993）ことから、遊離アミノ酸量の増加量も多かったと考えられる。また、本節の実験は、はじめの 6 日間を無窒素条件で生育させたため、吸収実験開始時に十分量の同化産物が地上部、地下部に集積していたことが予想された。アンモニア同化時は、地上部でつくられた同化産物と合成するが、今回の実験条件では、この同化産物の量は制限要因とならないことが考えられた。

これまでの研究から、アンモニアはグルタミン合成酵素（GS）を触媒としてグルタミンのアミド基に同化し、生成したグルタミンはグルタミン酸合成酵素（GOGAT）を触媒として 2 分子のグルタミン酸を生成することが明らかにされている（山谷 2001）。このグルタミン酸から、アスパラギン酸、アラニン、アスパラギンがすぐに合成される（平井 2001）。アスパラギン酸から、リジン、スレオニン、メチオニンが合成される。本試験の結果でも、遊離アミノ酸量の増加、およびアミノ酸の質量数の増加から、グルタミン、グルタミン酸、

アスパラギン酸、アスパラギン、アラニンなどへのアミノ基が転移していることが確認された。

グルタミンを吸収した場合、窒素濃度が 100 μM までは遊離アミノ酸量や組成には大きな影響はなかった。第四章より、グルタミンの *Vmax* は 25 μM で 0.3 μmol/g/h、100 μM で 0.5 μmol/g/h で、植物個体重約 0.1 g をかけて計算すると、個体あたりではそれぞれ 30 nmol/h、50 nmol/h となる。この数値から計算すると 1 時間アミノ酸を吸収すると、0 時間の地下部の全遊離アミノ酸量（67 nmol/個体）より少し少ない程度のアミノ酸が体内へ吸収されるはずであるが、吸収されたグルタミンは、タンパク質や有機酸への代謝が円滑に進み、遊離アミノ酸量はほとんど増加しなかったと考えられる。一方、窒素濃度が 1000 μM になると、吸収速度が増加し、グルタミンの吸収量が多くなっていたが、その場合もグルタミンがイネ幼植物の生育を阻害するなどの現象は見られなかった。試験開始時のイネ幼植物は、発芽から 6 日間、無窒素環境で生育したものであり、窒素欠乏に近い状態であると考えられる。したがって、遊離アミノ酸量も少ないと考えられ、多量のグルタミンが吸収され、遊離アミノ酸量も増加したと推察される。

また、質量数の増加は、標識グルタミン由来の ^{15}N、^{13}C がそれぞれ転移したことでおこる。質量数が 1 または 2 の増加は、グルタミンのアミノ基転移による窒素の転移が要因と考えられるが、遊離グルタミン、グルタミン酸の質量数の増加は、窒素数（グルタミン 2、グルタミン酸 1）以上の増加を示しており、アミノ基転移のみでなく、吸収されたグルタミンの炭素骨格もグルタミン酸へ代謝されていることが考えられる。これは、吸収されたグルタミンは、アンモニアの同化でこれまで研究されているのと同様に、グルタミン→グルタミン酸への合成が進んでいることを示している。地下部では、質量数が増加したグルタミン酸量は増加していないため、グルタミン酸からアスパラギン酸、アスパラギンへのアミノ基転移が即座におこっているものと考えられる。グルタミンはアミノ酸合成の起点であり、グルタミンを吸収した場合でも容易に代謝されるため、植物は積極的に窒素源として利用して、生育が促進されると推測される。

アラニンでも、窒素濃度が 100 μM までは遊離アミノ酸量や組成には大きな影響はなかった。グルタミンと同様で、窒素濃度が 100 μM までは吸収速度が遅いため、吸収量が少なく、遊離アミノ酸量はほとんど増加しないと考えられた。窒素濃度が 1000 μM ではと、吸収量が大きく増加し、遊離アミノ酸量が大きく増加している。

質量数の増加から、アラニン由来の窒素は、地下部でグルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸への転移が考えられる。アラニンの炭素部分がグルタミンに導入されていることが早くからみられることから、アラニンから有機酸を経由して、アラニン由来の炭素骨格がグルタミンに取り入れられ、グルタミン酸、アスパラギン酸へ代謝していく可能性が示唆された。また、地上部で観察されるアラニンは、質量数の増加が 1 程度であ

るため、外部から吸収されたものがそのまま地上部へ移行するのではなく、アミノ基部分が基転移によりオキサロ酢酸へ移り、代謝して合成されたものと考えられる。アラニンは、グルタミンのようにアミノ酸合成の起点ではないが、代謝され窒素源として利用して植物は生育していると考えられる。しかし、アラニンを一度グルタミンに代謝して利用しているため、生育がグルタミンより劣ることのではないかと推察される。

バリンでは、ロイシン以外、他のアミノ酸への転移が見られなく、バリンとロイシンが蓄積していた。バリンは、アミノ酸合成の末端であり、ロイシン以外の他のアミノ酸へ代謝することができない。そのため組織内に蓄積してしまい、生育が阻害されたと推察される。

以上より、植物はいずれの種類のアミノ酸も吸収するが、吸収後の代謝過程により、植物生育によい影響を与えるかどうかが決まると考えられた。

表 5-4-1　異なる濃度の ^{15}N-塩化アンモニウムを 24 時間吸収させたイネ幼植物の地上部、地下部の遊離アミノ酸量およびアンモニアイオン量 (nmol/個体)

部位	N源	濃度	時間	NH_4^+	Asn	Gln	Asp	Glu	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Thr	Pro	Lys	Cys	Tyr	Met	Ile	Arg	Phe	計
地上	NH_4^+	1000μM	0h	22	27	16	4	9	5	7	4	0	0	2	1	1	0	1	1	0	0	1	98
				(22)	(28)	(16)	(5)	(9)	(5)	(7)	(4)	(0)	(0)	(2)	(1)	(1)	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(1)	(100)
			3h	48	21	11	69	144	94	136	59	18	17	22	8	15	0	11	0	12	0	11	695
				(7)	(3)	(2)	(10)	(21)	(14)	(20)	(8)	(3)	(2)	(3)	(1)	(2)	(0)	(2)	(0)	(2)	(0)	(2)	(100)
			9h	159	67	573	79	183	177	94	61	20	5	12	1	2	0	18	0	3	0	6	1462
				(11)	(5)	(39)	(5)	(13)	(12)	(6)	(4)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	88	340	1365	62	197	248	139	149	47	14	52	1	3	0	41	0	9	0	11	2768
				(3)	(12)	(49)	(2)	(7)	(9)	(5)	(5)	(2)	(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
地下	NH_4^+	1000μM	0h	25	17	12	2	2	1	3	3	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	67
				(38)	(25)	(17)	(3)	(3)	(2)	(4)	(4)	(0)	(1)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(100)
			3h	162	16	65	0	0	3	20	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	271
				(60)	(6)	(24)	(0)	(0)	(1)	(7)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			9h	141	34	164	0	2	38	16	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	398
				(36)	(9)	(41)	(0)	(0)	(10)	(4)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	83	224	531	13	46	109	38	10	6	2	5	2	3	0	6	0	2	0	2	1084
				(8)	(21)	(49)	(1)	(4)	(10)	(4)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)

（）内は、遊離アミノ酸とアンモニウム量の合計に対する割合　%

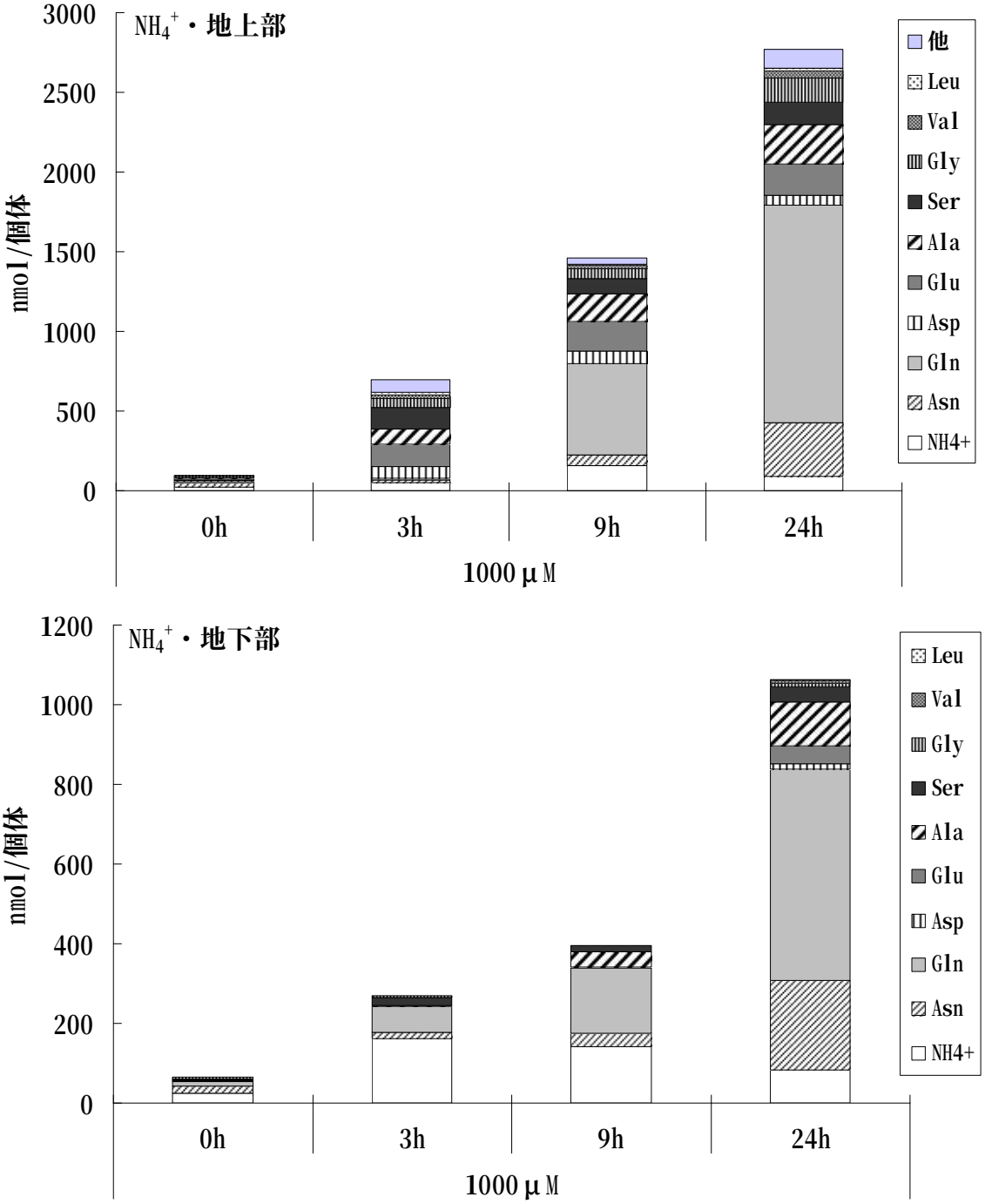

図 5-4-1　1000μM･塩化アンモニウムを 24 時間吸収させたイネ幼植物地上部、地下部の遊離アミノ酸量

表5-4-2 異なる濃度の^{15}N,^{13}C-グルタミンを24時間吸収させたイネ幼植物の地上部、地下部の遊離アミノ酸量およびアンモニアイオン量(nmol/個体)

部位	N源	濃度	時間	NH_4^+	Asn	Gln	Asp	Glu	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Thr	Pro	Lys	Cys	Tyr	Met	Ile	Arg	Phe	計
地上	Gln	25μM	3h	24	21	25	7	14	8	10	4	1	1	2	1	1	0	1	0	1	0	1	119
				(20)	(18)	(21)	(6)	(12)	(7)	(8)	(3)	(1)	(0)	(2)	(1)	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)	(100)
			24h	28	21	12	4	8	4	6	4	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	90
				(32)	(23)	(13)	(5)	(9)	(5)	(6)	(4)	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(100)
		100μM	3h	25	27	31	9	15	6	10	4	1	0	2	1	1	0	1	0	0	0	1	133
				(19)	(20)	(23)	(7)	(12)	(4)	(7)	(3)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(100)
			24h	17	9	9	4	5	3	4	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	55
				(31)	(17)	(16)	(7)	(10)	(5)	(7)	(3)	(1)	0	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
		1000μM	1h	38	64	4	3	45	0	18	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	176
				(21)	(37)	(2)	(2)	(25)	(0)	(10)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			3h	10	7	28	2	38	3	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97
				(10)	(7)	(29)	(2)	(39)	(3)	(10)	(0)	(0)	0	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			9h	5	14	4	5	83	1	25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	139
				(4)	(10)	(3)	(3)	(60)	(1)	(18)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	46	75	203	41	155	5	49	58	0	1	2	1	1	0	4	7	0	0	0	650
				(7)	(12)	(31)	(6)	(24)	(1)	(8)	(9)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(100)
地下	Gln	25μM	3h	27	21	18	1	6	3	4	3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	85
				(32)	(24)	(21)	(1)	(7)	(3)	(4)	(4)	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	20	14	9	2	3	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	56
				(36)	(25)	(16)	(4)	(5)	(3)	(5)	(4)	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
		100μM	3h	26	19	18	3	5	2	3	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	81
				(32)	(23)	(22)	(4)	(6)	(3)	(4)	(4)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	14	16	13	3	1	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	56
				(24)	(29)	(23)	(5)	(2)	(4)	(6)	(5)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
		1000μM	1h	3	13	2	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21
				(14)	(62)	(8)	(2)	(4)	(0)	(3)	(3)	0	(0)	(0)	(0)	(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	0	(100)
			3h	1	15	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21
				(3)	(72)	(10)	(0)	(8)	(0)	(3)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			9h	11	31	7	0	5	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	61
				(18)	(51)	(12)	(0)	(7)	(0)	(7)	(2)	(0)	(0)	(0)	0	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	41	45	37	1	2	0	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	134
				(30)	(34)	(28)	(0)	(1)	(0)	(5)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)

( ) 内は、遊離アミノ酸とアンモニウム量の合計に対する割合 %

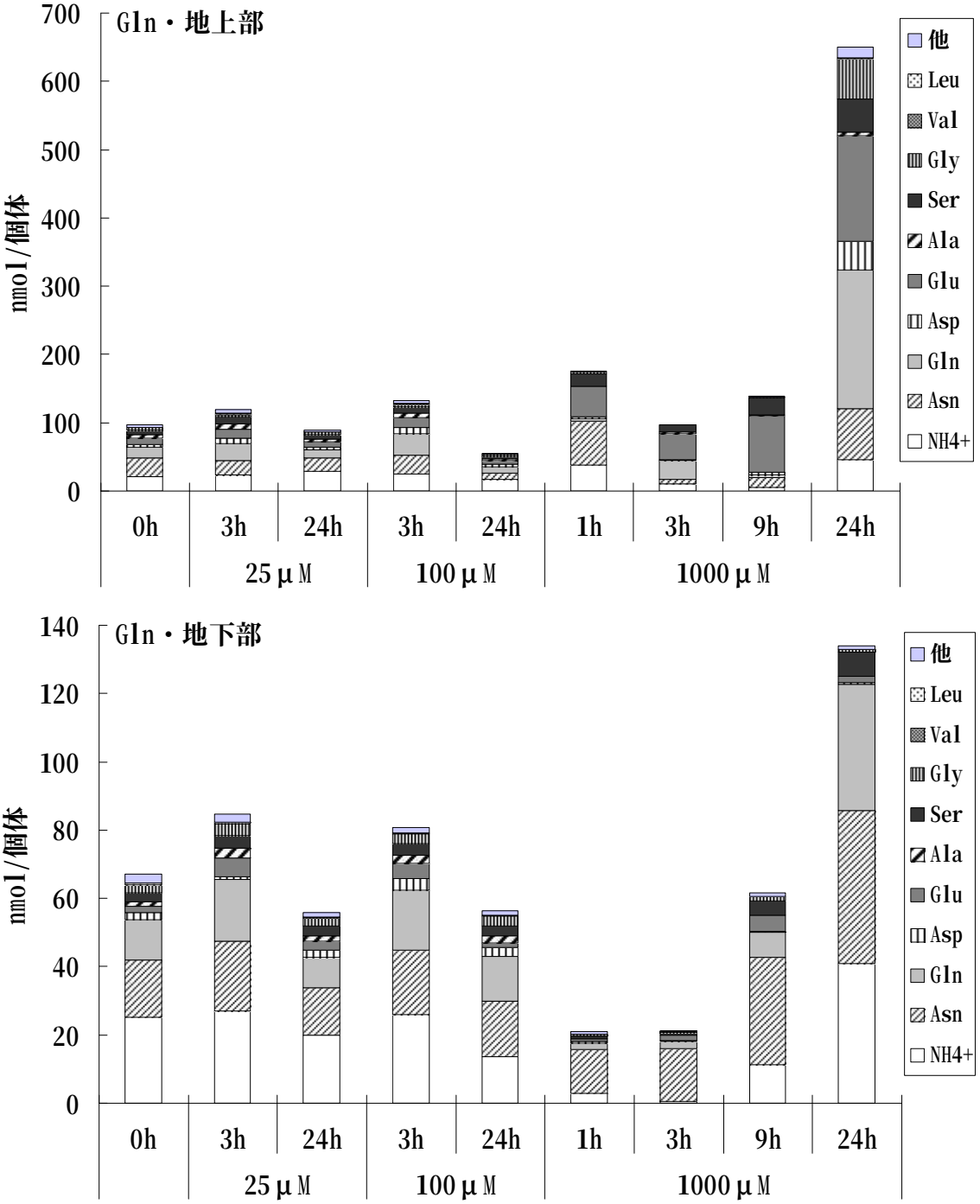

図 5-4-2　異なる濃度のグルタミンを 24 時間吸収させたイネ幼植物地上部、地下部の遊離アミノ酸量

表 5-4-3 異なる濃度の $^{15}N,^{13}C$-アラニンを 24 時間吸収させたイネ幼植物の地上部、地下部の遊離アミノ酸量およびアンモニアイオン量 (nmol/個体)

部位	N源	濃度	時間	NH4	Asn	Gln	Asp	Glu	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Thr	Pro	Lys	Cys	Tyr	Met	Ile	Arg	Phe	計
地上	Ala	25μM	3h	22	23	14	5	8	4	6	4	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	91
				(25)	(26)	(16)	(6)	(9)	(4)	(7)	(4)	(1)	0	(2)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	25	19	13	3	3	2	3	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	73
				(34)	(27)	(18)	(4)	(5)	(3)	(4)	(4)	(0)	(0)	(1)	0	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
		100μM	3h	22	21	19	8	13	5	7	3	1	0	2	0	1	0	1	0	0	0	1	102
				(21)	(20)	(18)	(7)	(12)	(5)	(7)	(3)	(1)	(0)	(2)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(100)
			24h	26	19	14	4	6	2	3	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	80
				(32)	(24)	(18)	(5)	(7)	(3)	(4)	(4)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
		1000μM	1h	13	49	2	2	14	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	87
				(15)	(56)	(2)	(2)	(16)	(0)	(6)	(2)	(0)	(0)	(0)	0	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			3h	72	19	4	27	102	28	58	9	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	322
				(22)	(6)	(1)	(8)	(32)	(9)	(18)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			9h	31	17	27	15	97	80	68	1	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	1	341
				(9)	(5)	(8)	(5)	(29)	(23)	(20)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	58	14	89	45	122	63	81	10	1	1	2	1	2	0	2	0	1	0	2	492
				(12)	(3)	(18)	(9)	(25)	(13)	(16)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
地下	Ala	25μM	3h	23	23	4	1	1	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	58
				(40)	(39)	(8)	(1)	(1)	(2)	(3)	(5)	(0)	0	(0)	0	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	20	15	14	3	3	2	3	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	65
				(31)	(23)	(21)	(4)	(5)	(3)	(5)	(4)	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
		100μM	3h	26	18	14	6	9	5	6	3	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	91
				(28)	(20)	(16)	(6)	(10)	(6)	(7)	(3)	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(100)
			24h	14	17	14	3	1	2	3	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	59
				(24)	(29)	(24)	(5)	(2)	(4)	(5)	(5)	(1)	(0)	(1)	0	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
		1000μM	1h	3	13	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
				(17)	(66)	(5)	(1)	(3)	(0)	(4)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	0	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			3h	31	15	2	0	2	4	6	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	64
				(48)	(23)	(3)	(1)	(4)	(6)	(10)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			9h	32	18	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	56
				(58)	(32)	(2)	(0)	(1)	(0)	(5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	40	22	23	4	8	13	10	4	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	132
				(30)	(16)	(17)	(3)	(6)	(10)	(8)	(3)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)

（）内は、遊離アミノ酸とアンモニウム量の合計に対する割合　%

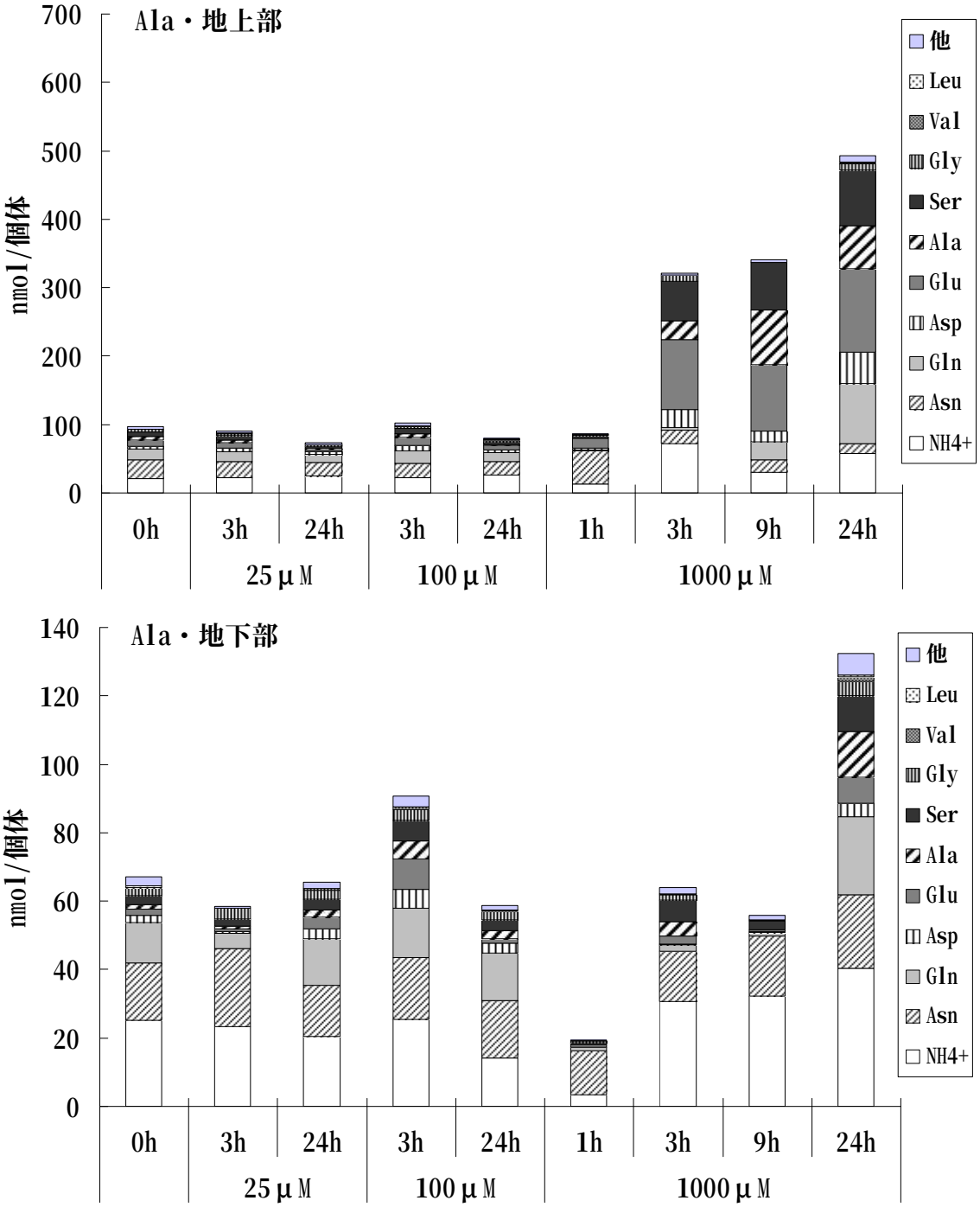

図 5-4-3 異なる濃度のアラニンを 24 時間吸収させたイネ幼植物地上部、地下部の遊離アミノ酸量

表 5-4-4 異なる濃度の $^{15}N,^{13}C$-バリンを 24 時間吸収させたイネ幼植物の地上部、地下部の遊離アミノ酸量およびアンモニアイオン量 (nmol/個体)

部位	N源	濃度	時間	NH4	Asn	Gln	Asp	Glu	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Thr	Pro	Lys	Cys	Tyr	Met	Ile	Arg	Phe	計
地上	Val	25μM	3h	22	22	16	6	10	4	8	4	3	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	98
				(22)	(22)	(16)	(6)	(10)	(4)	(8)	(4)	(3)	(2)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	23	13	15	5	6	4	9	3	8	16	1	0	1	0	0	0	0	0	0	105
				(22)	(13)	(14)	(5)	(6)	(4)	(9)	(3)	(8)	(15)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
		100μM	3h	25	21	12	5	7	3	7	3	3	4	1	0	1	0	0	0	0	0	0	93
				(27)	(23)	(12)	(5)	(8)	(3)	(8)	(4)	(3)	(5)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	25	15	13	6	9	3	12	3	11	25	1	0	1	0	0	0	0	0	0	126
				(20)	(12)	(10)	(5)	(7)	(3)	(9)	(2)	(9)	(20)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
		1000μM	1h	4	27	2	2	16	0	8	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66
				(6)	(41)	(3)	(3)	(25)	(0)	(13)	(2)	(7)	(0)	(0)	0	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			3h	0	2	0	0	11	0	6	0	12	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33
				(0)	(7)	(0)	(0)	(33)	(0)	(18)	(0)	(35)	(5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			9h	17	28	10	3	54	0	45	5	80	69	0	0	1	0	1	0	0	0	0	312
				(5)	(9)	(3)	(1)	(17)	(0)	(15)	(1)	(26)	(22)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	30	37	53	23	97	3	53	13	75	66	0	0	1	0	1	0	0	0	0	452
				(7)	(8)	(12)	(5)	(21)	(1)	(12)	(3)	(16)	(15)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
地下	Val	25μM	3h	22	21	10	2	2	1	4	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	67
				(32)	(30)	(14)	(3)	(3)	(2)	(6)	(5)	(2)	(1)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	20	21	9	2	2	1	6	3	2	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	76
				(27)	(27)	(12)	(2)	(3)	(2)	(8)	(4)	(3)	(9)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
		100μM	3h	25	22	7	2	2	1	4	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	70
				(36)	(31)	(10)	(2)	(2)	(2)	(6)	(5)	(2)	(1)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	12	16	9	2	2	1	7	3	2	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	64
				(19)	(25)	(15)	(3)	(2)	(2)	(11)	(4)	(4)	(13)	(1)	0	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
		1000μM	1h	2	9	1	0	1	0	1	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
				(10)	(45)	(5)	(1)	(3)	(0)	(5)	(3)	(25)	(1)	(1)	0	(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			3h	1	9	1	0	1	0	4	0	15	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34
				(2)	(27)	(2)	(0)	(2)	(0)	(12)	(1)	(43)	(8)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(100)
			9h	31	5	1	1	1	0	14	1	24	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99
				(32)	(5)	(1)	(1)	(1)	(0)	(14)	(1)	(24)	(20)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
			24h	30	33	2	0	1	0	18	1	23	18	0	0	1	0	0	0	0	0	0	127
				(23)	(26)	(2)	(0)	(1)	(0)	(14)	(1)	(18)	(14)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)

（）内は、遊離アミノ酸とアンモニウム量の合計に対する割合　%

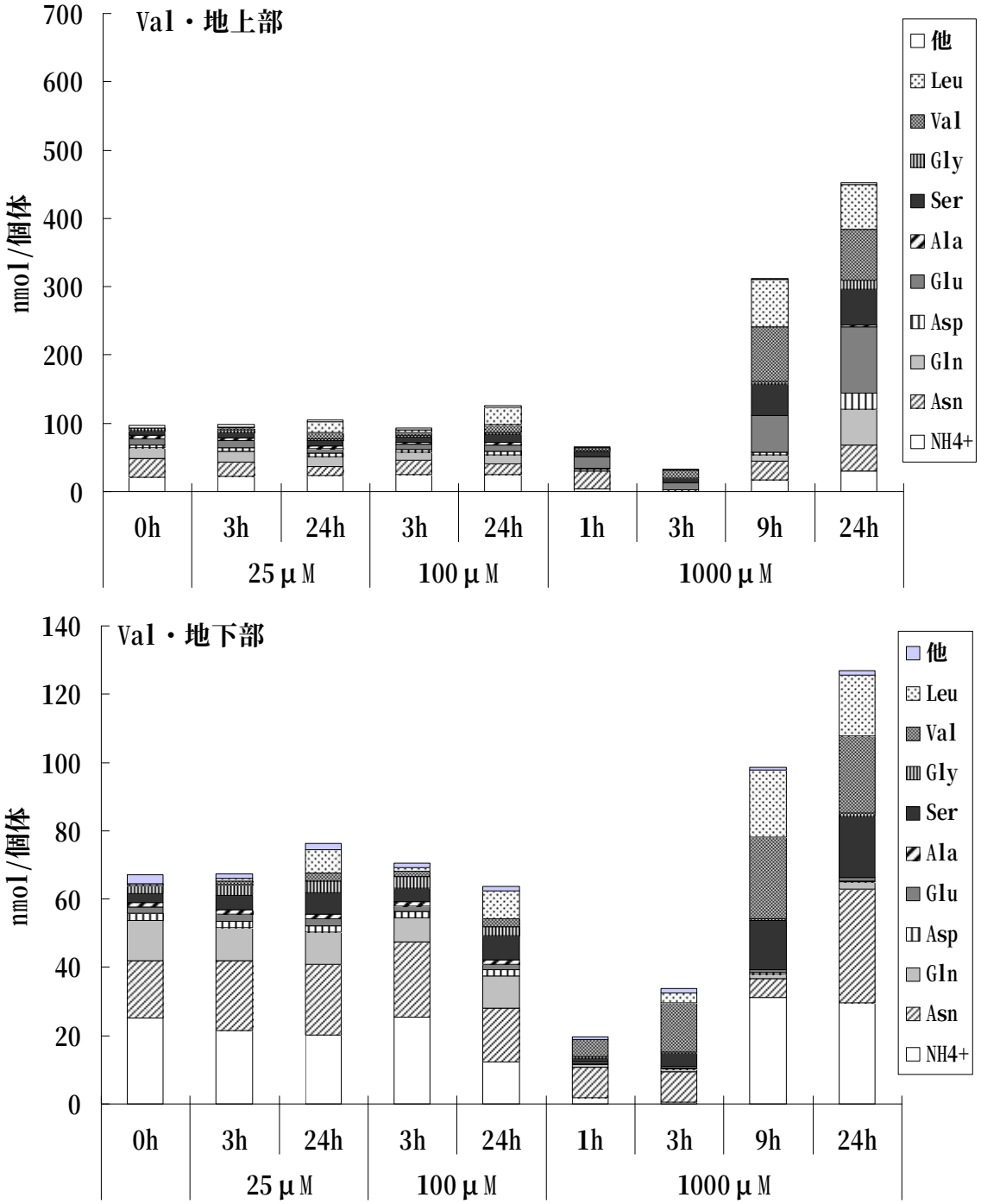

図 5-4-4 異なる濃度のバリンを 24 時間吸収させたイネ幼植物地上部、地下部の遊離アミノ酸

表 5-4-5 異なる種類のアミノ酸で 6 日間生育させたイネ幼植物の地上部、地下部の遊離アミノ酸量およびアンモニアイオン量 (nmol/個体)

部位	N源	濃度	時間	NH4	Asn	Gln	Asp	Glu	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Thr	Pro	Lys	Cys	Tyr	Met	Ile	Arg	Phe	計
地上	NH_4^+	1000μM	6d	155	292	175	117	289	93	89	23	20	7	39	18	12	2	2	3	0	5	0	1341
				(12)	(22)	(13)	(9)	(22)	(7)	(7)	(2)	(1)	(1)	(3)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)
	Gln			122	13	46	132	201	95	87	8	11	3	12	9	6	2	4	3	1	5	0	760
				(16)	(2)	(6)	(17)	(26)	(12)	(11)	(1)	(1)	(0)	(2)	(1)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(0)	(100)
	Ala			111	9	30	85	156	48	52	5	9	2	9	8	5	2	3	2	2	5	0	545
				(20)	(2)	(6)	(16)	(29)	(9)	(10)	(1)	(2)	(0)	(2)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(100)
地下	NH_4^+	1000μM	6d	121	134	151	30	70	33	35	6	10	4	9	10	8	2	1	3	6	10	0	643
				(19)	(21)	(24)	(5)	(11)	(5)	(5)	(1)	(1)	(1)	(1)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)	(0)	(100)
	Gln			100	32	61	23	31	32	25	5	1	0	5	6	3	2	3	2	3	5	0	340
				(29)	(9)	(18)	(7)	(9)	(10)	(7)	(2)	(0)	(0)	(2)	(2)	(1)	(0)	(1)	(1)	(1)	(2)	(0)	(100)
	Ala			102	6	27	16	25	17	14	3	1	0	4	5	3	2	2	2	2	8	0	239
				(43)	(3)	(11)	(7)	(10)	(7)	(6)	(1)	(0)	(0)	(2)	(2)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(3)	(0)	(100)

（）内は、遊離アミノ酸とアンモニウム量の合計に対する割合　%

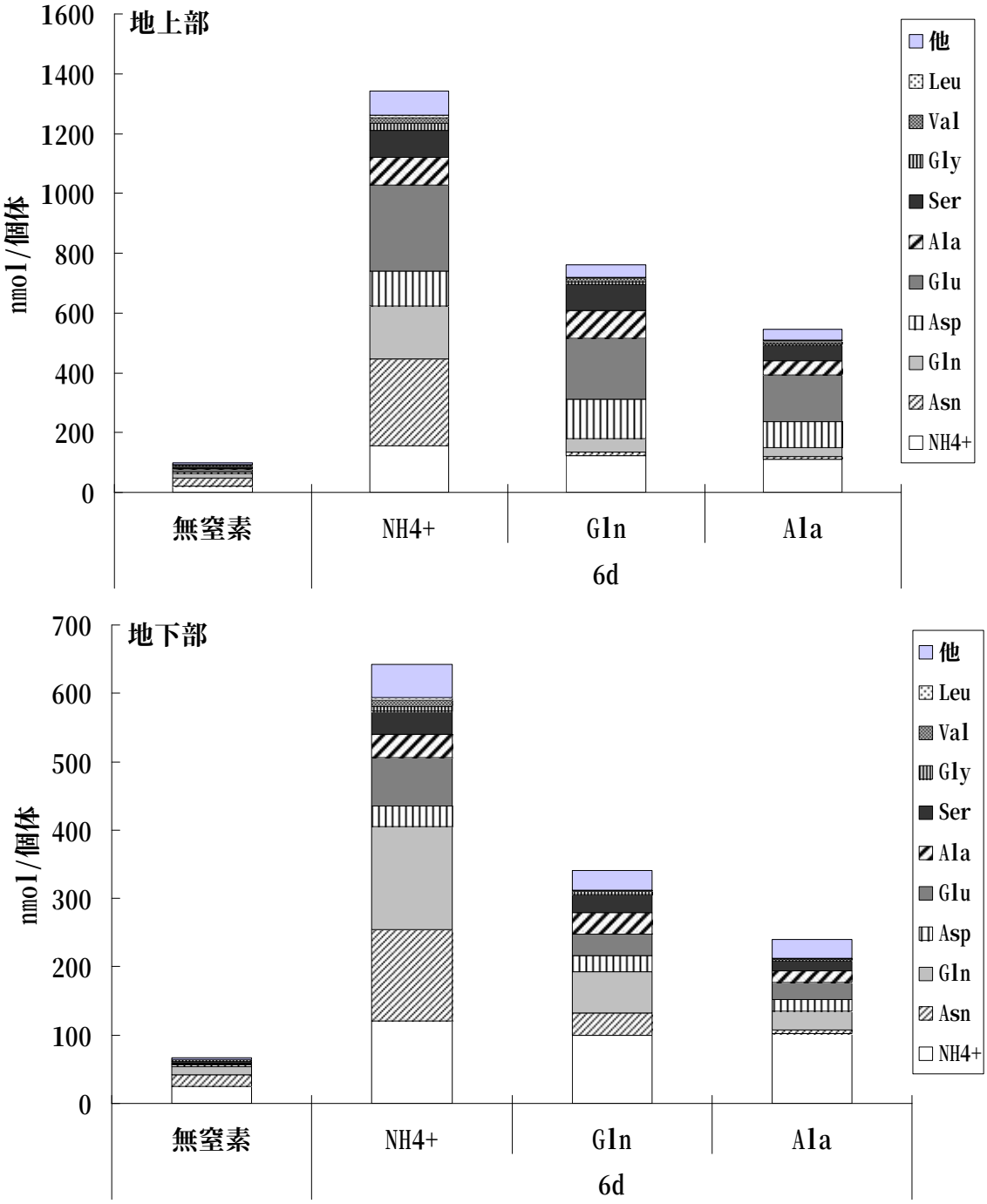

図 5-4-5　窒素濃度 1000 μM･塩化アンモニウム、グルタミン、アラニン、バリンで 6 日間生育させたイネ幼植物の地上部、地下部の遊離アミノ酸量

表 5-4-6 窒素濃度 1000 μM の ^{15}N,^{13}C-アミノ酸を 24 時間吸収させたイネ幼植物中の遊離アミノ酸に対する質量シフトを示した遊離アミノ酸割合 (%) と量 (nmol/個体)

遊離アミノ酸に対する質量シフトを示したアミノ酸割合 (%)

・地上部

供試形態	吸収時間	NH_4^+	Asn	Ser	Gln	Gly	Asp	Glu	Ala	Val	Leu
NH_4^+	3h	0	3	9	34	2	20	22	9	3	3
	9h	50	43	71	97	31	80	81	76	42	46
	24h	60	85	87	99	37	87	90	87	64	70
Ala	1h	0	20	7	27	4	10	13	0	1	0
	3h	11	48	38	80	6	50	53	46	12	13
	9h	0	59	23	60	2	38	42	25	3	7
	24h	0	85	37	75	4	53	57	38	15	17
Gln	1h	0	22	8	42	3	18	21	9	1	3
	3h	6	47	33	77	18	47	55	38	0	0
	9h	8	59	46	84	19	61	61	43	35	34
	24h	5	70	59	84	12	69	76	56	0	29
Val	1h	0	4	7	12	5	4	6	0	26	19
	3h	1	48	27	35	11	34	14	0	49	65
	9h	0	59	10	25	2	13	17	7	54	72
	24h	3	85	16	29	2	19	24	0	58	74

質量シフトを示した遊離アミノ酸量 (nmol)

供試形態	吸収時間	NH_4^+	Asn	Ser	Gln	Gly	Asp	Glu	Ala	Val	Leu	計
NH_4^+	3h	0	1	12	8	1	14	32	9	1	0	78
	9h	80	29	67	556	19	64	149	134	9	2	1107
	24h	52	289	121	1350	55	54	177	217	30	10	2355
Ala	1h	0	1	0	1	0	0	2	0	0	0	4
	3h	8	9	22	3	1	13	54	13	0	0	114
	9h	0	10	16	16	0	6	41	20	0	0	100
	24h	0	12	30	67	0	24	69	24	0	0	215
Gln	1h	0	2	1	2	0	0	9	0	0	0	15
	3h	1	3	3	22	0	1	21	1	0	0	49
	9h	0	8	12	3	0	3	51	0	0	0	73
	24h	2	64	29	171	7	29	118	3	0	0	368
Val	1h	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	4
	3h	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1	10
	9h	0	1	5	2	0	0	9	0	43	50	110
	24h	1	1	9	15	0	4	23	0	43	49	146

・地下部

供試形態	吸収時間	NH_4^+	Asn	Ser	Gln	Gly	Asp	Glu	Ala	Val	Leu
NH_4^+	3h	63	3	18	95	1	44	22	55	7	8
	9h	63	32	41	99	2	65	82	86	27	18
	24h	35	78	76	99	3	83	89	92	57	50
Ala	1h	2	10	25	61	7	71	54	0	2	2
	3h	0	43	19	82	1	58	72	51	2	5
	9h	0	56	28	84	3	60	76	58	7	9
	24h	0	56	43	94	3	70	88	73	25	25
Gln	1h	4	28	31	80	6	41	40	0	3	0
	3h	7	43	44	58	5	64	68	46	13	37
	9h	7	56	36	84	5	58	71	56	19	11
	24h	1	56	49	77	4	58	86	92	32	16
Val	1h	1	6	25	12	6	5	9	0	44	29
	3h	6	14	19	31	5	16	19	18	64	63
	9h	0	4	13	29	3	16	15	0	62	77
	24h	4	6	18	38	6	39	29	0	66	86

供試形態	吸収時間	NH_4^+	Asn	Ser	Gln	Gly	Asp	Glu	Ala	Val	Leu	計
NH_4^+	3h	103	0.415	3.6	62.25	0.042	0.06	0.043	1.393	0.005	0.009	170.6
	9h	89	11	7	162	0	0	1	33	0	0	302
	24h	29	176	29	526	0	11	41	100	3	1	917
Ala	1h	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
	3h	0	6	1	1	0	0	2	2	0	0	7
	9h	0	10	1	1	0	0	0	0	0	0	3
	24h	0	12	5	21	0	3	7	10	0	0	46
Gln	1h	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3
	3h	0	7	0	1	0	0	1	0	0	0	5
	9h	1	17	2	6	0	0	3	0	0	0	16
	24h	0	24.99	3	29	0	0	2	0	0	0	38
Val	1h	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	3
	3h	0	1	1	0	0	0	0	0	9	2	14
	9h	0	0	2	0	0	0	0	0	15	15	32
	24h	1	2	3	1	0	0	0	0	15	15	38

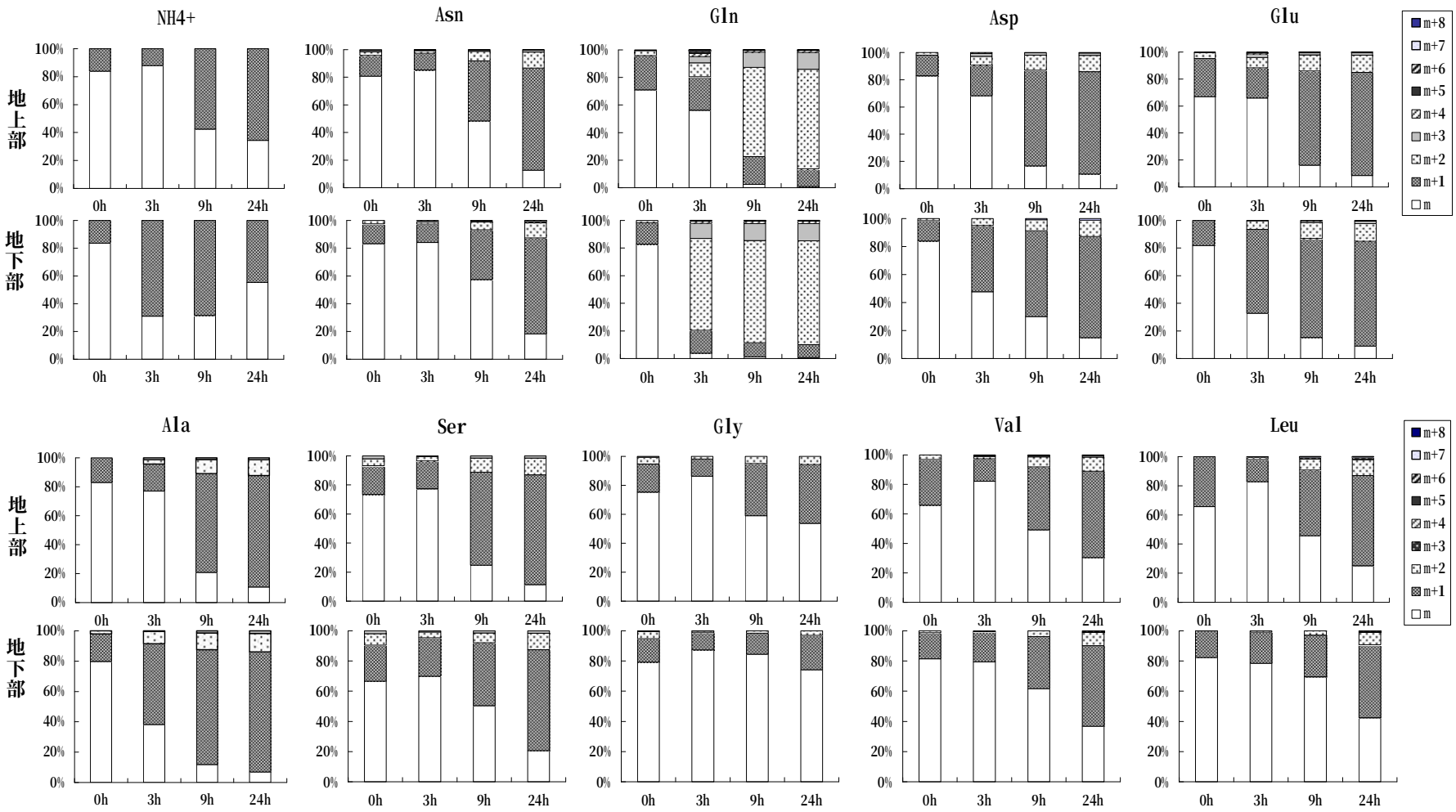

図 5-4-6 1000 μM･^{15}N-アンモニアを 24 時間吸収させたイネ幼植物の地上部と地下部の遊離アミノ酸の質量分布

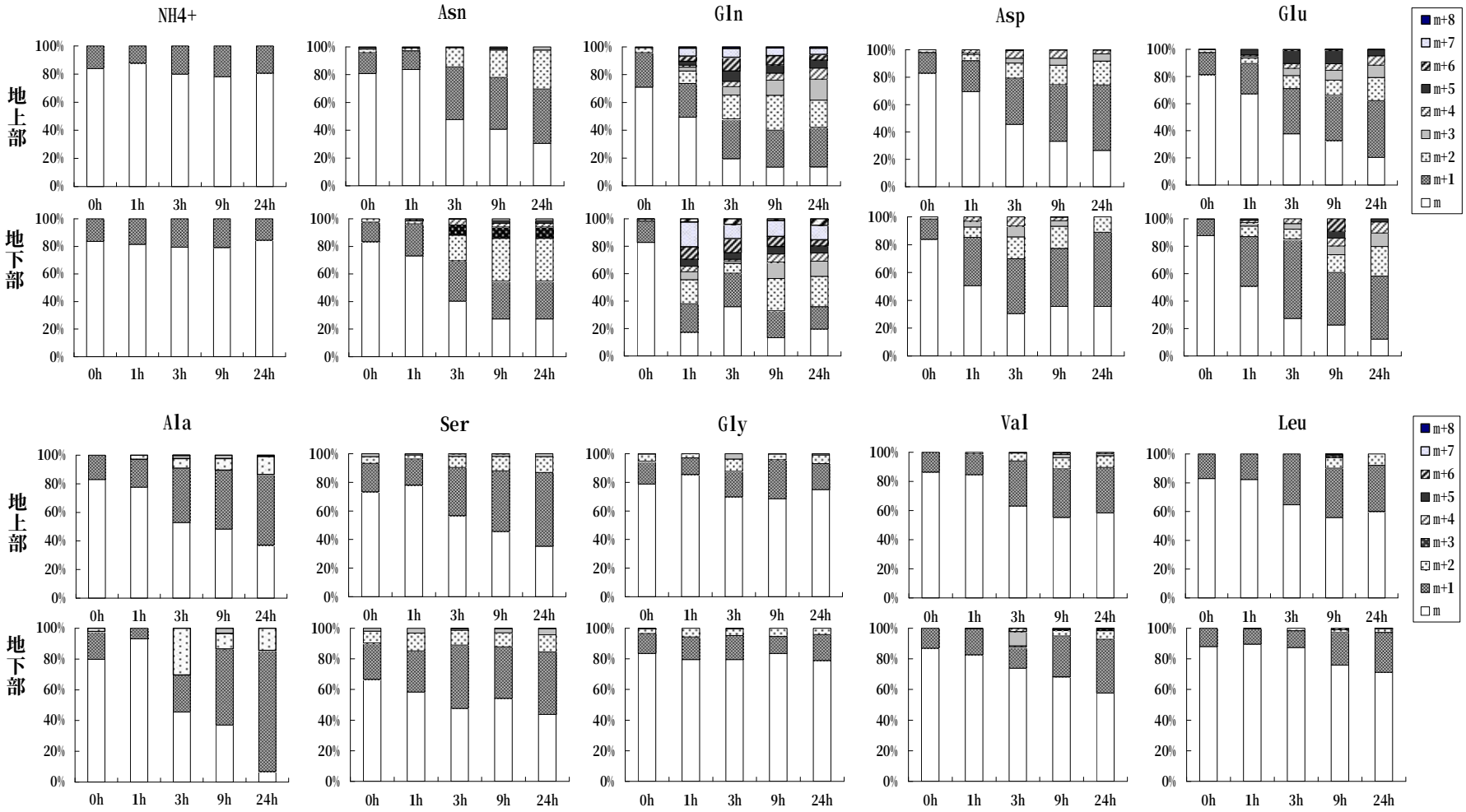

図 5-4-7 1000 μM･^{15}N,^{13}C-グルタミンを 24 時間吸収させたイネ幼植物の地上部･地下部の遊離アミノ酸の質量分布

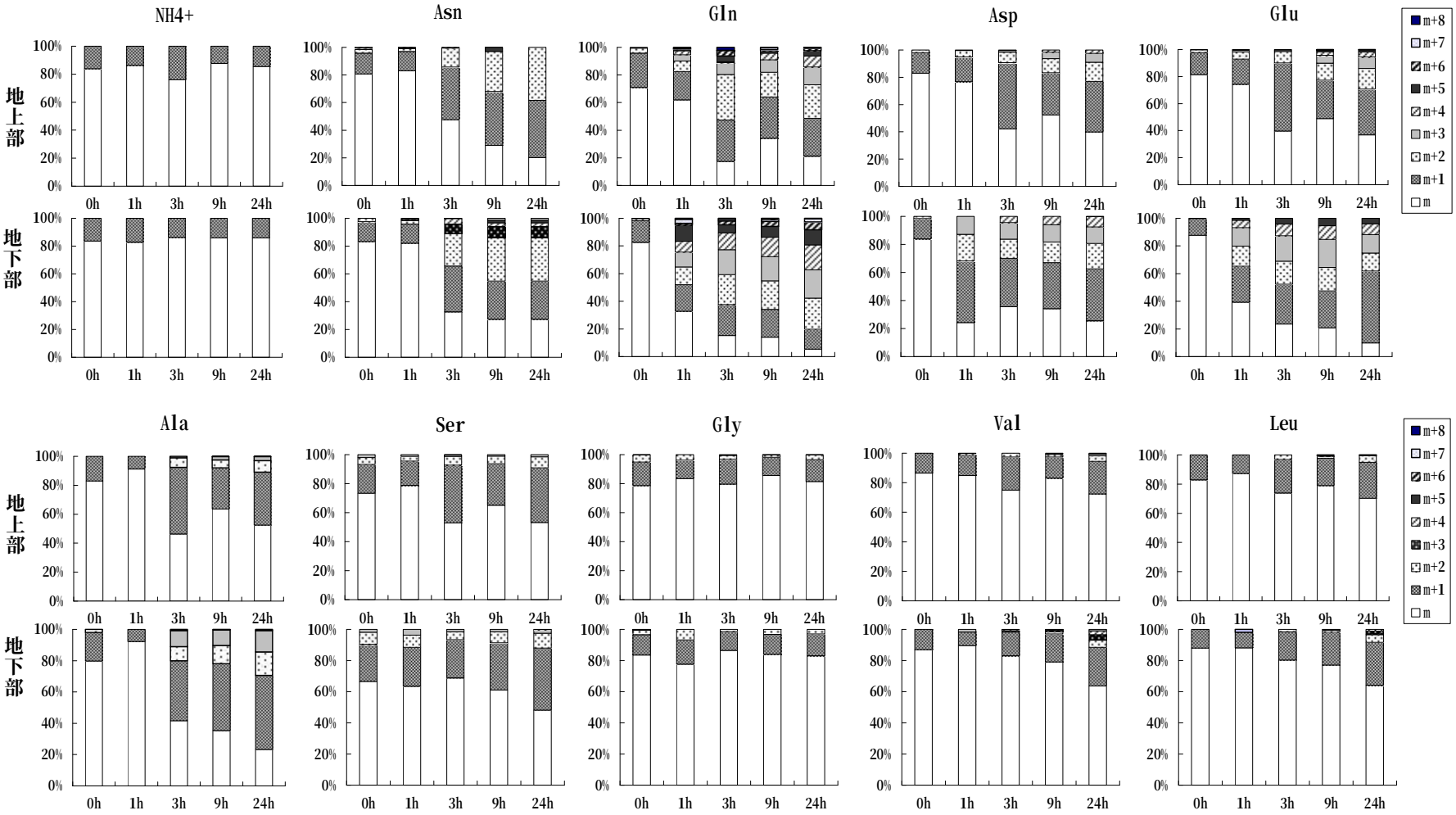

図 5-4-8　1000 μM･^{15}N,^{13}C-アラニンを 24 時間吸収させたイネ幼植物の地上部･地下部の遊離アミノ酸の質量分布

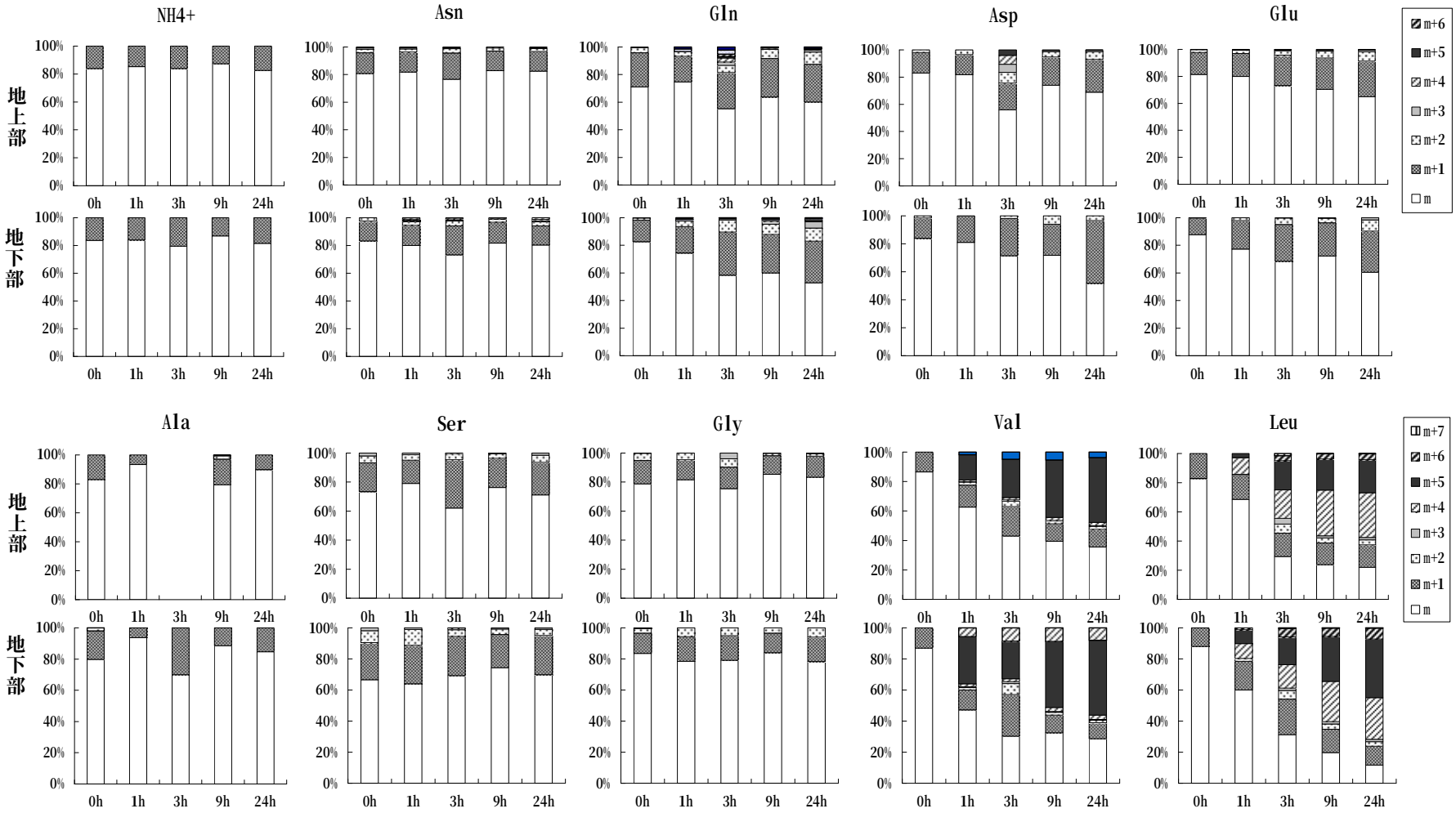

図 5-4-9 1000 μM･^{15}N,^{13}C-バリンを 24 時間吸収させたイネ幼植物の地上部･地下部の遊離アミノ酸の質量分布

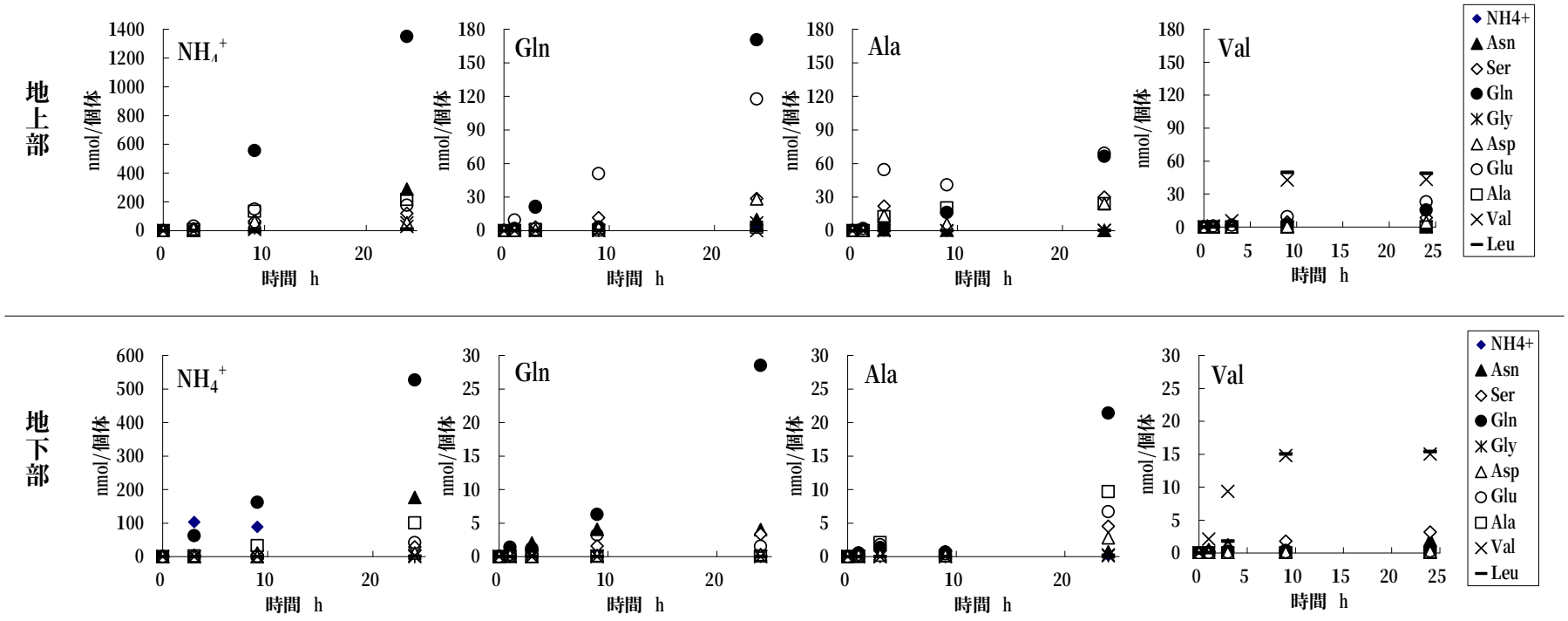

図 5-4-10 窒素濃度 1000 μM の ^{15}N,^{13}C- アミノ酸を 24 時間吸収させたイネ幼植物中の質量シフトを示した遊離アミノ酸の経時変化

第五節　まとめ

イネ幼植物の生育が良好であったグルタミン、アラニン、阻害したバリンについて、吸収されたアミノ酸の地下部、地上部における代謝経路を解明するため、安定同位体二重標識アミノ酸を与えるトレーサー実験を行った。

植物は、吸収量に差はあるがいずれの種類のアミノ酸も吸収しており、グルタミンを吸収したイネ幼植物の遊離アミノ酸は、地下部では、グルタミン、アスパラギン、地上部では、グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリンが増加した。吸収されたグルタミンは、アンモニアイオンの窒素同化とほぼ同様に GS-GOGAT 経路に取り込まれ、グルタミン酸、アスパラギン酸へアミノ基が転移し、他のアミノ酸合成の窒素源として使用されたと考えられた。第三節と第四節から、吸収された全 ^{15}N のうち、遊離アミノ酸の質量シフトが ^{15}N-アミノ基転移により起こったとして、遊離アミノ酸画分に存在する ^{15}N とそれ以外（タンパク質や核酸に取り込まれたと想定）の画分に存在する ^{15}N を計算した（表 5-5-1、図 5-5-1）。グルタミン態の窒素はアンモニアイオンと比較すると、特に地下部において 90%近くがタンパク質合成に利用されており、遊離アミノ酸画分に存在する割合は低かった。グルタミン態として吸収された窒素は、窒素同化の最初の段階において地上部からの光合成産物を必要とせず、地上部からの同化産物の供給に制限されることなくタンパク質や核酸などに比較的早く変換できることが示唆された。

一方、グルタミン態で吸収した炭素は、24 時間後には地下部では 55%、地上部では 60%近くが消失しており、窒素をアミノ基転移により利用した後は、TCA サイクルの有機酸などに組み込まれ呼吸により二酸化炭素として放出されることが示唆された。そこで、吸収されたアミノ酸から得られるエネルギーを呼吸量や ATP として試算した。吸収されたアミノ酸がグルタミンでは、グルタミンから得られるエネルギーは生長に必要なエネルギーの 4.1～9.4%に相当した。生育に必要な全エネルギーからグルタミンの分解で得たエネルギーを差し引いた量は、アンモニアで生育したイネ幼植物と同等になった。窒素源としてのグルタミンはアンモニアイオンをグルタミンにするために通常使われているグルタミン酸、ＡＴＰを必要とせず、地上部からの同化産物の消費、エネルギーの使用がない。さらにグルタミンの代謝から得られるエネルギーが、そのまま生育にプラスされることにより主に根系の発達が旺盛になった理由であると考えられる。

アラニンを吸収したイネ幼植物では、吸収されたアラニンはグルタミンにアミノ基を転移させ、その後はグルタミンと同様な代謝経路となっていると考えられた。アラニンを吸収させたイネ幼植物の生育は、塩化アンモニウムより優るが、グルタミンで生育したイネ幼植物に比べて生育は劣る。生育に必要な全エネルギーからアラニンの分解で得た

エネルギーを差し引いた量は、アンモニアで生育したイネ幼植物よりわずかに低かった。これは、アラニンが植物体内で利用されるためには、グルタミンへ一度代謝しなければならず、そのための代謝の基質とエネルギーの消費となるためであると考えられる。

吸収されたバリンは、代謝して生成されるアミノ酸がロイシンのみであり、他のアミノ酸等へは代謝が進まないため体内で蓄積してしまい、生育を阻害したものと推測された。

以上の結果から、グルタミンは地上部からの同化産物を使用せずに速やかに窒素をタンパク質合成へ使用することが可能であり、呼吸により炭素部分も使用することで、特に地下部において取り込んだ窒素を根系発達に効率よく利用することが、無機態窒素との異なる点と考えられた。

表 5-5-1 ^{15}N 標識アミノ酸を吸収させたイネ幼植物中の 24 時間後の ^{15}N の形態

供試形態	部位	吸収された全^{15}N*	遊離アミノ酸画分の^{15}N**	遊離アミノ酸画分以外の^{15}N	全^{15}Nに対する遊離アミノ酸画分の^{15}N 率
		(A) nmol	(B) nmol	(A-B) nmol	(B/A) %
NH_4^+	地上部	13292	3995	9298	30
	地下部	3226	1620	1606	50
	計	16518	5614	10904	34
Gln	地上部	1718	549	1169	32
	地下部	787	71	717	9
	計	2505	619	1886	25
Ala	地上部	1137	282	855	25
	地下部	889	69	821	8
	計	2026	351	1676	17
Val	地上部	406	163	243	40
	地下部	689	41	648	6
	計	1095	203	891	19

*第五章第三節より
**第五章第四節より

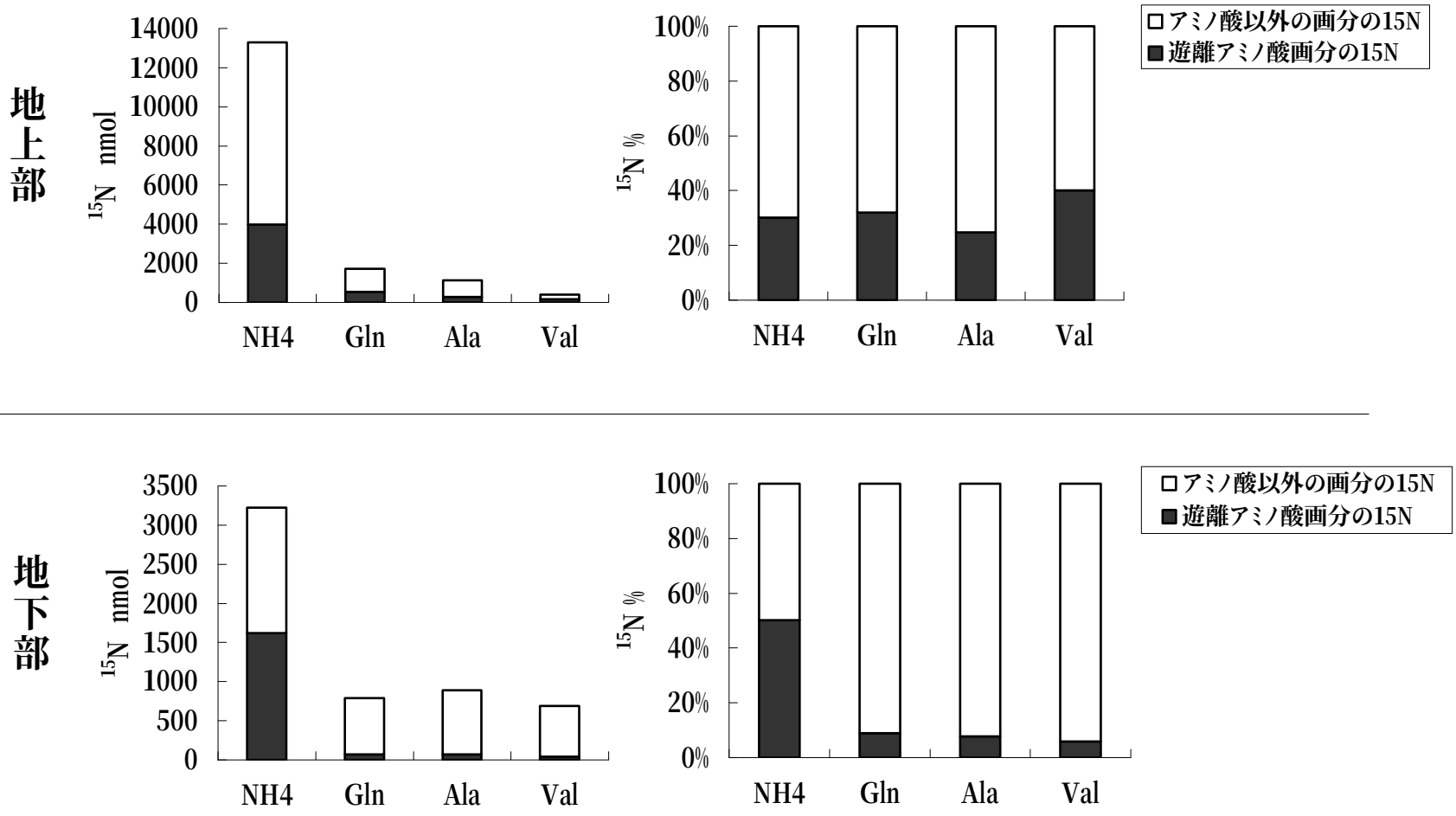

図 5-5-1 ^{15}N 標識アミノ酸を吸収させたイネ幼植物中の 24 時間後の ^{15}N の形態