

各種無機要素の過不足が水稻葉身のパーオキシダーゼ活性 に及ぼす影響

山内益夫*・朝倉和昭*・長井武雄*

昭和62年5月30日付

The Effects of Supplies with Excess and/or Lack of Several Elements on the Peroxidase Activity in Blades of Rice Plants

Masuo YAMANOUCHI*, Kazuaki ASAKURA* and Takeo NAGAI*

When the rice plants were grown in the culture solution supplied with lack of some mobile elements (N, P, K and Mg), the relative activities of peroxidase were higher in older leaves than in younger ones, but in the case of lack of immobile element (Ca) it was higher in younger ones. Twenty-two treatments were made up from culture solution supplied with excess (+) and lack (-) of N, P, K, Ca, Mg and Fe, and excess of I, Cd, Hg, Zn, Mn, Cu, Cr, As, Ni and Co. In 8 treatments, -P, \pm Ca, -Mg, +Fe, +I, +Cd, +Hg, the more increases of relative activity were observed, but other 14 treatments did not show remarkable effects to peroxidase activity. Thus, the measurement of peroxidase activity did not appear to be helpful in identifying special element deficiencies or excess in the rice plants.

緒 言

作物生育の異常やある器官での特徴的な症状の発現等が、病害あるいは栄養障害のいずれかに原因があると考えられた場合、症状観察、病菌の同定、成分分析等の結果から、第一段階の診断が行なわれることが多い。

しかし、無機養分の過不足に問題を限定しても、いろいろな作物について、それぞれの生育時期での主要無機養分濃度の上・下限を決めることはかならずしも容易で

はない。従って、あらかじめ無機養分の過不足の判定基準が出来ている例は少なく、一般には、隣接する正常個体との成分濃度を比較することで、ある無機養分の過不足の推定を行っている。それでもなお推定のつかぬ場合も少なくなく、特に初期段階の軽度の過不足を判定することは不可能に近い。

もし、ある無機養分の過不足が、ある代謝反応あるいは、酵素活性等に対し、特異的に影響していることが判明したならば、それらの反応を対象に追跡することで、

* 鳥取大学農学部農林総合科学科資源利用化学講座

* Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tottori University

無機養分の過不足の判定がより正確になると期待される。

BROWNら²⁾は小麦を対象にCu欠乏の有無はアスコルビン酸酸化酵素活性の低下で判定可能であるとし、鉄不足の判定はトウモロコシ、タバコ、ルーピン等ではカタラーゼ活性の低下で判定できるとした。また、ペカンの葉のZn不足はカルボン酸脱水素酵素活性の低下から判定が可能であるといわれ³⁾、R10ら⁴⁾はえん豆の鉄欠乏の判定の一助として、カタラーゼ活性の測定やパーオキシダーゼ/カタラーゼ活性比の測定が有用であるとした。しかし、多くの場合、それら酵素活性の変動が、当該養分の過不足に特異的に反応しているか否かは問われていない。

そこで、本実験ではパーオキシダーゼを対象に、この活性が種々の無機養分の過不足でいかに変動するかを検討した。

パーオキシダーゼは末端呼吸系に関与する鉄ポルフィリン系酵素の一種で、広く植物一般に分布していることが知られている¹⁾。本酵素活性は一部の植物で鉄の不足により変化することが知られているが、一般的には鉄の不足で変化しづらい酵素に分類されている^{1,4)}。しかし、本酵素活性の測定は比較的容易であること、また、結果の項で詳述するが、水稻では鉄に対する反応が高いことが認められたので、水稻のパーオキシダーゼを対象とすることとした。

材料及び方法

1) 作物の栽培法

実験1 水稻とアズキ 供試作物として水稻(ヤマビコ)とアズキ(栄)のうち、以後の実験材料としてどちらが適切かを判定するために本実験を行なった。水稻は第3葉期まで、水に浮かせたサランネット上で育苗し、樹脂製4 l容ポットに、穴をあけた樹脂製板をのせ、それにポット当り9本立てとなるように移植し、第7本葉展開時まで、第1表に示した基本培養液を用いて、ガラス室内で均一栽培を行なった。アズキは砂床に播種し萌芽させた苗条を、初葉展開時に、樹脂製4 l容ポットに各5本立てとして移植した。その後、第2本葉展開時まで、第1表の基本培養液を用いて連続通気して均一栽培した。いずれの作物も毎日一回pH5.5に調節し、5日毎に培地を更新した。

両作物の均一栽培後、水稻は0, 100, 200, 500ppm Feとなる4段階のFe処理(FeSO₄使用)、アズキは0, 2, 10, 50, 100, 200ppm Feとなる6段階のFe処理(FeSO₄使用)を施し、水稻は10日間、アズキは7日間栽培した。その後、各葉位の葉身を採取し、パーオキシダーゼ活性の測定に

第1表 イネ・アズキの水耕栽培用の基本培養液組成

要素	濃度(ppm)	使用塩
N	40	NH ₄ NO ₃
P	10	NaH ₂ PO ₄ ・H ₂ O
K	40	K ₂ SO ₄
Ca	40	CaCl ₂ ・2H ₂ O
Mg	40	MgCl ₂ ・7H ₂ O
Mn	0.5	MnCl ₂ ・4H ₂ O
Mo	0.05	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ・4H ₂ O
B	0.2	H ₃ BO ₃
Zn	0.1	ZnSO ₄ ・7H ₂ O
Cu	0.01	CuSO ₄ ・5H ₂ O
Fe	2	FeSO ₄ ・7H ₂ O

pH 5.5

あて、一部は乾燥、秤量してFe分析に供した。

実験2 水稻 実験1と同様に育苗、均一栽培した20日苗のヤマビコを用い、チ素素(N)、リン(P)、カリ(K)、カルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)を欠除した区と、それら要素を基本培養液濃度の10倍となる様に添加した区と対照区(基本培養液)を設けて、3週間栽培し、その間一週間毎に葉位別に葉身を採取し、パーオキシダーゼの活性測定に供した。また、一部は乾燥秤量して、Fe及び当該処理要素の分析に供した。

また、上記と同様の方法で育苗した20日苗を用い、上記多量要素の処理に加えて、+Fe(200ppm Fe)、-Fe(0ppm Fe)、+Mn(10ppm Mn)、+Cu(0.5ppm Cu)、+Zn(5ppm Zn)、+Co(0.3ppm Co)、+Ni(0.3ppm Ni)、+I(1ppm I)、+Hg(0.5ppm Hg)、+Cd(5ppm Cd)、+Cr(10ppm Cr)と+As(5ppm As)の処理区と対照区の計23区を設けて、8~12月まで適宜栽培し、欠乏症あるいは過剰症の発現を目やすとし、その時点の上から三番目の葉身を採取し、生重を秤量後、一部はパーオキシダーゼ活性の測定に、一部は乾燥秤量して当該無機要素の分析に供した。従って、各処理区での処理期間は異なることになるが、葉身採取時には常に対照区の葉身も採取し、結果は対照を100とした指数で示し、処理区間の比較にあてた。

2) 分析方法

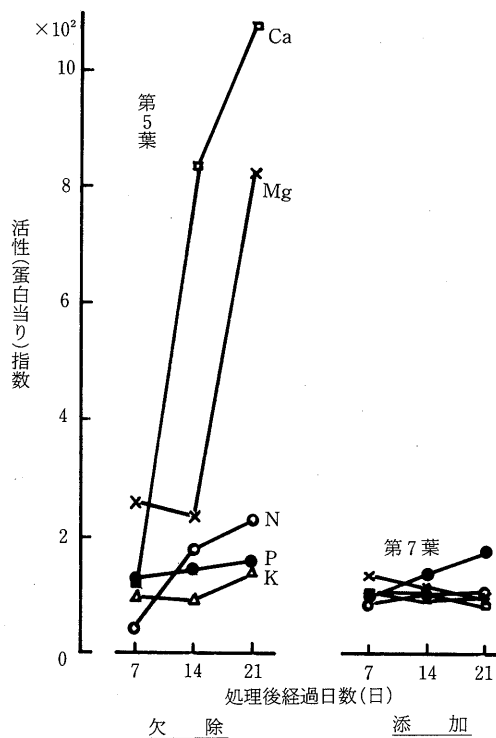
パーオキシダーゼ活性：葉身の採取は朝9時に行ない、速やかに水中で乳鉢を用いて磨砕抽出し、遠心分離(1500

g, 10分間) 後, 上清を全容25mlに調整し, これを粗酵素液とした。活性の測定はグアヤコール法¹⁾によった。また, 粗酵素液の一部を用いて LowRY 法³⁾で蛋白量を測定した。活性は反応で生じたテトラグアヤコールmg/蛋白mg・15分あるいは生じたテトラグアヤコールmg/新鮮重g・15分のいずれかで求めた。

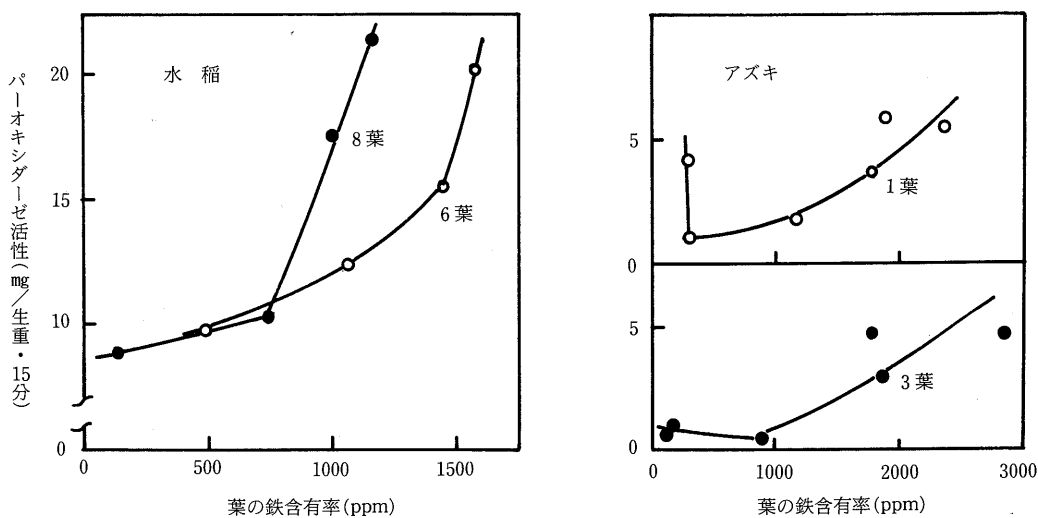
無機要素: Nはセミマイクロケルダール法で分解後ネスラー法で定量した。P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Niは混酸(10HNO₃: 4HClO₄: H₂SO₄)で分解後, 分解液につき, Pは比色法, Kは炎光法その他の要素は原子吸光法によって定量した。

結 果

実験1 鉄処理を施して栽培した水稻とアズキの葉の鉄含有率とパーオキシダーゼ活性(以下活性と称す)の関係を第1図に示した。水稻では葉のFe含有率の上昇にともなって活性は顕著に増加した。一方, アズキでは300~1000ppm FeのFe含有率では活性に変化なく, 300ppm以下では1000ppm Feの葉よりもむしろ活性は高まる傾向を示した。また2000ppm Feよりも高い所で活性は高まった。このことは, 鉄が不足していても過剰でもパーオキシダーゼ活性は増加するというえん豆の結果⁵⁾と類似していた。アズキの葉では, 2000~3000ppm Feの葉で5mg/新鮮重g・15分の活性を示したに過ぎず, 1500ppm Feを含む水稻の葉の活性の1/4であった。



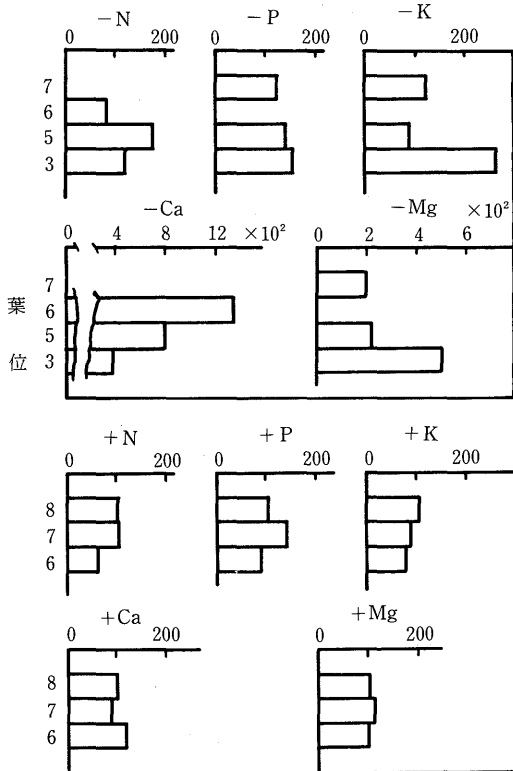
第2図 葉のPeroxidase活性の経日変化
添加処理は対照区の10倍, 但しPは14日以降5倍



第1図 水稻とアズキにおける葉の鉄含有率とパーオキシダーゼ活性の関係

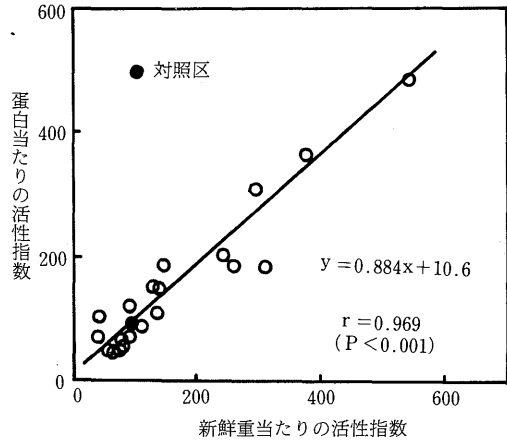
以上の様に、鉄に対するパーオキシダーゼ活性の反応は水稲の方がアズキより著しく高く、また鉄の体内濃度の上昇にともない活性は増加する傾向をみせる等、以下の実験には水稲が適切と判断された。

実験2 多量要素(N, P, K, Ca, Mg)を欠除あるいは過剰添加処理後、1週間毎に3週間、葉身のパーオキシダーゼ活性 (mg/蛋白mg・15分) を測定し、結果を対照区を100とした指数で示した (第2図)。Pを除く4要素では、欠除処理における処理の影響が添加処理区のそれより大きく現われた。N, PとCa欠除区では、それらの当該要素が葉で不足するにつれて、活性は高まった。Mg欠除区では、ある限界濃度値を割ると急に活性が高まる傾向を示した。処理後21日目の結果では、CaとMg欠除区の活性増加が特に顕著であった。過剰添加処理区では、P添加区のみ経日的に漸増を示したが、他の4要素の添加の影響は3週間の処理期間ではあまり明らかで



第3図 葉位別のパーオキシダーゼ活性に及ぼす各種要素の影響

処理後14日目の試料、-は欠除処理、+は対照区の10倍添加処理



第4図 単位蛋白当たりと単位新鮮重当たりの Peroxidase活性の関係

なかった。

処理後2週間目の葉位別の活性を比較するために、対照区を100とした指数を第3図に示した。要素欠乏症が下位葉からあらわれ易い易動性の要素 (N, P, K, Mg) では、下位葉ほど対照区に比べ活性が高まる傾向にある。-N区において、第3葉が第5葉より低い活性指数を示したのは、第3葉は強いN欠乏のため枯死しかかっていたことによると思われる。一方、欠乏症が上位葉からあらわれる-Ca区では、活性指数は上位葉程高くなっている。添加処理区では、いずれの要素においても対照区に比べ、あまり大きな変化はなく、本実験の処理期間内では、生育、症状にも大きな変化がなかったことと対応していた。

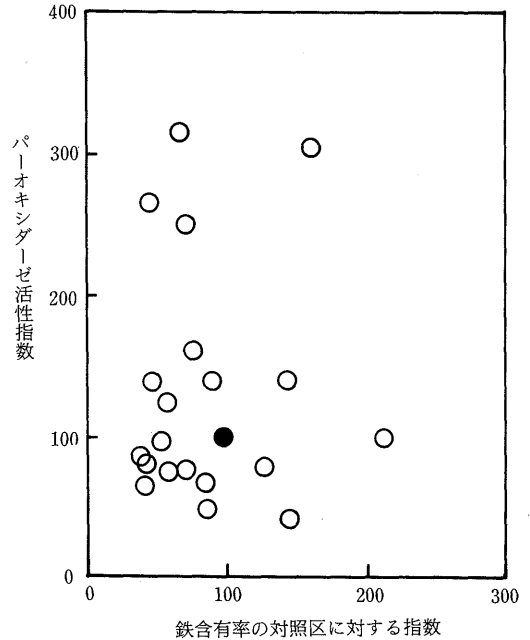
多量要素及び鉄の欠除と添加の処理区、I, Cd, Hg, Zn, Mn, Cr, Cu, As, Ni, Coの添加処理区と対照区の計23処理区の処理後33日目の葉身の単位新鮮重当たりの活性指数と、単位蛋白当たりの活性指数の間には高い正の相関関係 ($r = 0.969$) が認められた (第4図) ので、以下のパーオキシダーゼ活性には、単位新鮮重当たりの値を用いた。

8月、10月と12月の三期に栽培し、欠乏あるいは過剰の症状の発現を目安に適宜採取した上から三番目の葉身の活性指数の平均値とその標準偏差 (σ) を第5図に示した。これら22処理区のうち、対照区より活性の低下を示したのは-N区 (指数71) と+P区 (61) の2つだけであつ60以上の指数を示して、その低下割合も小さかつた。仮りに、150以上の指数を示す区は、処理によりパーオキシダーゼ活性が強く影響を受けたとして区分すると、-P

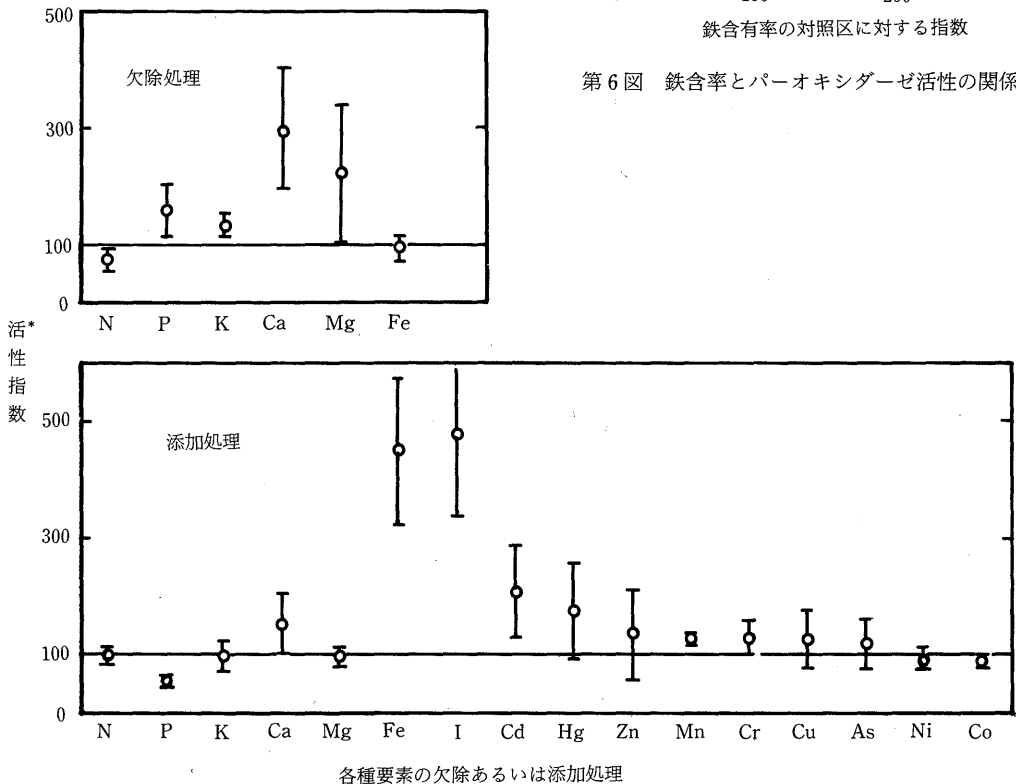
区(161), +Ca区(155), -Ca区(295), -Mg区(224), +Fe区(451), +I区(480), +Hg区(177), +Cd区(209)の8処理区が入り, 残りの12処理区(-K, -Fe, +N, +K, +Mg, +Zn, +Mn, +Cr, +Cu, +As, +Ni, +Coの各区)と-N区と+P区はほとんど処理の影響を受けな
いか, 弱い影響を受けたに過ぎなかった。

上記23処理区のパーオキシターゼの活性指数と葉身の鉄含有率の関係を処理32日目の(10月5日)の試料で見ると(第6図), 両者の間には有意な相関関係はなく, 処理による活性の変動は, 植物体内の鉄の濃度変化を通して発現したものではないと思われる。

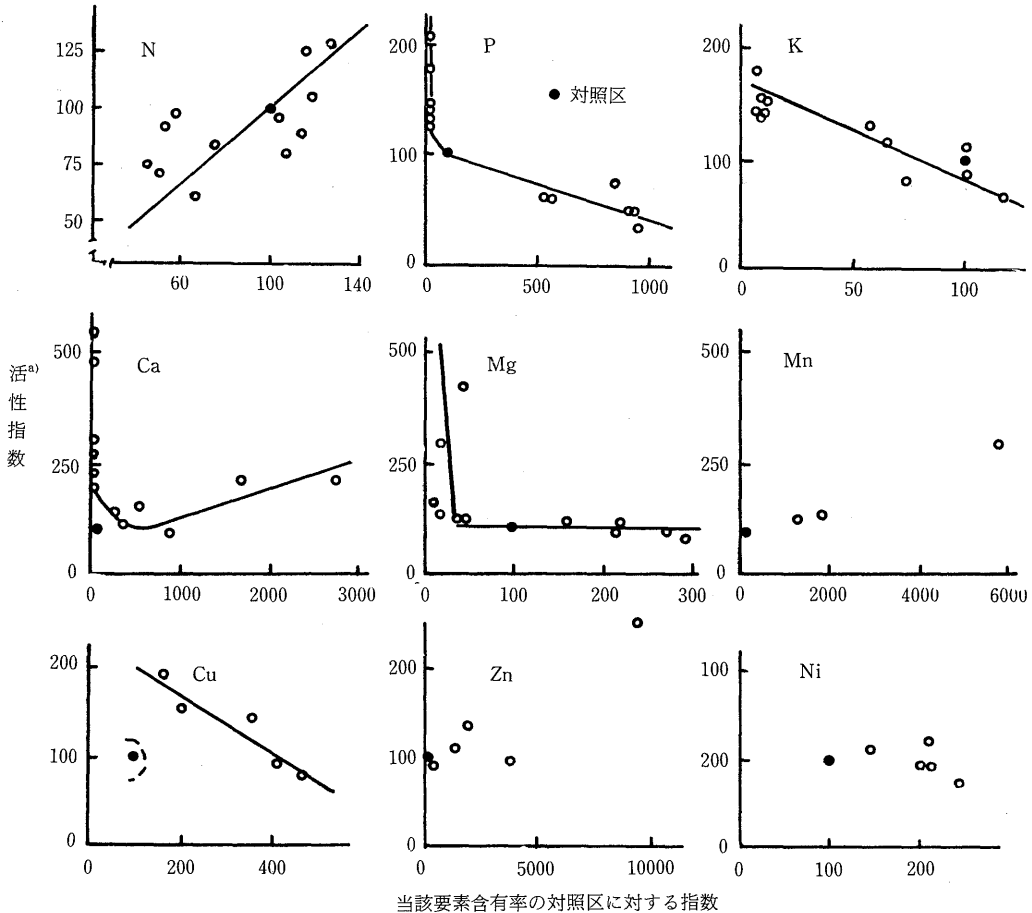
パーオキシターゼ活性を測定した試料のうち, いくつかの処理当該要素の葉身中の含有率の対照区に対する指数と活性の指数の関係を第7図に示した。多量要素については, それぞれ両者の間に明瞭な関係を認めたが, 重金属添加区については, 点数が少ないこともあって, その影響を多量要素ほど明確に断ずることはできない。



第6図 鉄含有率とパーオキシターゼ活性の関係



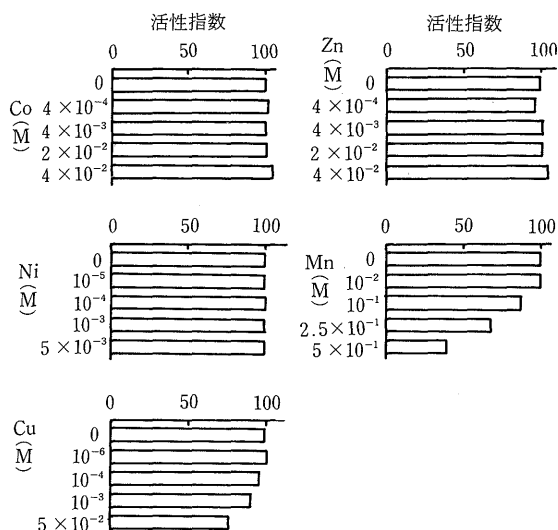
第5図 各種要素の欠除あるいは添加処理のPeroxidase活性に及ぼす影響
*新鮮物当りの活性値を使用



第7図 葉の当該要素含有率の変動がPeroxidase活性に及ぼす影響
a) 単位新鮮重当りの活性値を用いた。10月15日(32日目)の試料

なわち、NではN含有率の変動も40~140とあまり大きくなく、また、活性指数の変動も小さいが、この範囲でゆるいながら、正の相関関係を示した。Pはその不足により急速に活性が高まった。また、P含有率が対照区の5~10倍と大過剰になると、活性の低下が認められた。Kは本実験の対象葉では急速に含有率の高まりをみせる場合が少なく、高含有率の試料はなかったが、含有率の低下で活性は高まる傾向を示した。CaとMgは不足側ではPよりも激しく急速に活性を増大させるが、含有率が過剰側に向うにつれて、Ca区は漸増、Mg区は変化を受けないという変動傾向を示した。Mgの場合はその含有率は対照区の3倍であり、Ca区と同じようにさらに10倍以

上に含有率が高まった時にどうなるかはあきらかでない。Mnはその含有率が対照区の20倍までは、活性に影響を与えないが、60倍では活性の上昇をもたらした。しかし、その中間の濃度の試料がないため、一般的傾向とは断言できない。Cuは対照区と添加区が別の範ちゅうに入り、明確ではないが、少しの濃度の上昇は活性の増加をもたらした。対照区の2倍以上の濃度では、含有率の上昇にともない活性の漸減を示すのかもしれない。ZnもMnと同様で、対照区の50倍以下の濃度では活性の受ける影響は小さく、100倍もの濃度になると活性の増加を認めた。Niは対照区の2倍以内ではほとんど影響を受けなかった。



第8図 各種重金属の添加がパーオキシターゼ活性に及ぼす影響

考 察

水稻の葉身から抽出した粗酵素液を用いたパーオキシターゼ活性の変動を利用して、ある無機要素の栄養状態を判定する一手段とすることはできないことがあきらかとなった。即ち、いくつかの要素の過不足(+Fe, -P, ±Ca, -Mg, +I, +Cd, +Hg)によって、パーオキシターゼ活性の強い上昇がもたらされた(第5図)が、ある要素に対して特異的に反応するという関連は得られなかった。

パーオキシターゼは鉄を含む酵素¹⁾でありながら、鉄の不足に敏感でないといわれている¹⁵⁾が、本実験においても、鉄の若干の不足では、活性の低下はもたらされなかった(第1図)。また、鉄以外の要素の過不足でもたらされたパーオキシターゼ活性の上昇は、葉身の鉄含有率の上昇を通して、もたらされたものでもなかった(第6図)。

パーオキシターゼ活性は葉身の各種要素含有率の変動にともない、その要素別に特徴的な変動を示した(第7図)。この場合、第2図に示した-N区でみられた、N不足の進行にともなう活性増加という結果と、第7図での活性低下という結果が矛盾するようであるが、これは、要素別に蛋白当たりの活性と新鮮重当たりの活性の比較をすると、Nの場合のみ逆相関になることから説明される。

パーオキシターゼ活性に及ぼす各種要素の含有率変動の影響、特に要素過剰の影響に関して、対照区に対して、その含有率が同じ様な割合で増加した葉を作ることが難しいこと、また、用いた処理濃度で類似した生育抑制を引き起こしたということではないことのため、活性に対してどの要素の影響が大であるという判定は困難である。しかし、第7図に示した要素に関しては、Cnを除き、当該要素の含有率が対照区の2~3倍ではあまり影響しないといえるようである。

パーオキシターゼ活性測定の実験液に、Co, Ni, Cu, Zn, Mnなど重金属を添加して、反応阻害効果をみると(第8図)、いずれの場合もかなりの高濃度でなければ阻害効果は認められなかった(Mn>10⁻¹M, Cu>10⁻³M)。もし、分子量60の金属が葉身に1%含まれるとして、水による抽出率が100%であるとしても、反応液中の濃度は5.5×10⁻⁶Mにしかならず、それら重金属が直接的に反応液中で阻害効果を発揮することはないと考えられる。

マンガン(Mn)やZnでは大過剰が葉身に蓄積される条件下では、むしろ活性は高まる傾向を示した(第7図)。これは、葉身の褐色斑の発現や葉辺の褐変化から推定されるフェノール生成の活発化と関係しているのかもしれない。

要 約

無機養分の過不足が水稻の葉身のパーオキシターゼ活性に及ぼす影響を調べた。また、パーオキシターゼ活性の変動がある特定の要素(例えば鉄)の栄養状態に対して特異的に反応するか否かを検討した。

1) 易動性要素(N, P, K, Mg)の欠除栽培では、下位葉ほど対照区の活性(mg/蛋白mg・15分)に対する指数が高くなる傾向にあり、難移動性の要素(Ca)の欠除処理では上の葉身ほど活性指数が高くなった。

2) N, P, K, Ca, Mg, Feの欠除と多量添加処理、I, Cd, Hg, Zn, Mn, Cu, Cr, As, NiとCoの多量添加の22処理中、-P, ±Ca, -Mg, +Fe, +I, +Cd, +Hgの8処理で、大きな活性増加を認め、その他の14処理では、あまり大きな影響はなかった。

3) パーオキシターゼ活性の変動を、ある特定の要素の過不足の判定の一助として使用することは妥当でないと思われる。

文 献

1) 赤堀四郎：酵素研究法(II)，朝倉書店(1972) pp. 335~343

- 2) Brown, J. C., and Hendricks, S. B., : Enzymatic activities as indicators of copper and iron deficiencies in plants, *Plant Physiol.*, **27**, 651~660 (1952)
- 3) 水島三一郎・赤堀四郎：蛋白質化学(2), 共立出版, 東京 (1961) pp. 120~121
- 4) Price, A., : Iron compound plant nutrition, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **19**, 233~248 (1968)
- 5) Rio, L. A. D., Gomez, M., Yanez, J., and Gorge, J. L., : Iron deficiency in pea plants, effect on catarase, peroxidase, chlorophyll and proteins of leaves, *plant and Soil*, **49**, 343~353 (1978)
- 6) Snir, I., : Carbonic anhydrase activity as an indicator of zine deficiency in peacan leaves, *Plant and Soil*, **74**, 287~289 (1983)