マレイン酸ヒドラチドによる緑豆の発芽生長阻害*

永井 康豊, 斎藤 純一, 舟橋 三郎

(東京大学農学部農芸化学科)

昭和 33 年 3 月 28 日 受 理

緒 言

植物ホルモンと呼ばれる一群の物質が高等植物の種々な生長を特異的に促進するのに対し、マレイン酸ヒドラチド (Maleic Hydrazide, 以下 MH と略記する) には特異的な生長抑制作用があり、この作用は若い組織に対して著しいことが知られている⁽¹⁾。MH は通常の使用濃度では植物体を枯死せしめることはまれで、すでに馬鈴薯の発芽防止剤やタバコの腋芽の生長抑制剤などとして実用に供されている。これら抑制作用の原因としてタマネギ⁽²⁾、トマト⁽³⁾、タバコ⁽⁴⁾などでは顕微鏡的に細胞分裂の阻害が観察されてはいるが、また MH の高等植物に対する特異的な作用の原因や機構については説明が与えられていない。そのほかに落果を早めたり⁽¹⁾、開花を遅らせたり⁽⁵⁾する作用のあることも知られている。著者は MH 処理による緑豆の発芽生長阻害がどのような生理化学的反応であるかを知らうとしてこの実験を行った。

材料及び方法 MH は日産化学製結晶を再結して用い、他の試薬は分析用の市販品を用いた。植物材料としての緑豆は種子を一夜充分吸水させた後、種皮を除きシャーレ中で脱脂綿を発芽床として 26° の暗い定温器中で水又は MH 水溶液のみを与えて発芽生長を行わせ、種々の生長段階で実験に供した。根の伸長は物差しで測定したが、この時幼植物を 0.02% メチレンブルー液に 20 分間浸漬し染色された部分を根とした。成分の分析にはすべて常法を用い、窒素はマイクロケルダール法、フルクトース残基は Roe の方法⁽⁶⁾、還元型アスコルビン酸は 2, 6-dichlorophenol indophenol 滴定法⁽⁷⁾、アルギニンは坂口反応法⁽⁸⁾によって求めた。酸素吸収の測定にはワールブルク検圧計を用い、ミトコンドリアは Bonner らの方法⁽⁹⁾に準じ 2° の低温室と -4° の冷却遠心器によって調製した。細部に関してはそれぞれの箇所述べる。

実 験 及 び 結 果

a) MH による幼根及び下胚軸の伸長阻害 吸水種子の種皮を除いた後、それぞれ 5, 10, 50, 100 p.p.m. の MH 水溶液 20 ml を約 0.6 g の脱脂綿に含ませたシャーレに種子 50 粒ずつを植え、一定時間発芽生長を行わせた後、幼根及び下胚軸の長さを測定した。但し対照区には水のみを用い、処理区では MH 処理後 24 時間を経た時に水道水で 3 回洗い過剰の MH を除いた。なお、この期間の発芽床の pH は 5.2~5.6 であったが、別の塩酸を用いたテストで pH 4.2 以上のときには発芽生長に対して pH の影響が殆ど認められないことを確めた。

第 1 表 MH 処理が幼根及び下胚軸の伸長に及ぼす影響

	対照区		5		10		50		100	
	根	下胚軸	根	下胚軸	根	下胚軸	根	下胚軸	根	下胚軸
	mm									
1(日後)	21	9	17	8	14	8	10	6	8	6
2	30	13	23	10	18	9	12	7	9	7
3	38	22	28	18	21	16	14	10	10	9

得なかった。回復実験では pH は塩酸および苛性ソーダで調節した。第 1 表の結果からみて、この処理方法によれば 50 p.p.m. 以上の MH 濃度で充分に緑豆の発芽生長を阻害し得るので以後の実験では 100 p.p.m. 処理のものを材料とした。この処理では根の伸長は完全に阻止されたが、下胚軸の伸長阻害は徐々に回復してゆくこと

第 1 表に示したように、MH 処理による緑豆の幼根、下胚軸の伸長阻害は著しい。この阻害は当量濃度のマレイン酸および硫酸ヒドラジン単独処理による阻害より大きく、5 p.p.m. のマレイン酸処理区では 20% 程度の根の伸長促進さえ認められた。側根を全く生じないことが MH 阻害の特徴であって、この阻害は 10 倍当量のグルタチオン、システイン、チオ尿素、インドール酢酸、2・4-D、アデニン、グアニン、チアミン、リボフラビンなどと MH との同時添加によっては回復し

* Growth Inhibition of the Mung Bean Seedling by Maleic Hydrazide.

By Yasutoyo NAGAI, Jun-ichi SAITO and Saburo FUNAHASHI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture University of Tokyo)

が認められた。

b) MH 処理による酸素吸収量の低下 MH 100 p. p. m. で処理後数個体ずつをとり、その酸素吸収量を日を追って3回ずつ測定し、1個体1時間当りの酸素吸収速度の平均値を求め第1図に示す結果を得た。測定にはワールブルク検圧計を用い、主室には水 $\bar{1}$.5 ml と幼植物、副室には 20% 苛性カリ 0.2 ml と濾紙を入れ 30°

第1図 MH 処理が発芽生長時の酸素吸収量に及ぼす影響

●— 対照区
○— 処理区, 100 p. p. m. M.H.

第2表 MH 処理が新鮮重の増加に及ぼす影響 (g)

	処理時	1(日後)	2	3	4	5
対 照 区	7.5(g)	12.5	20.7	26.3	30.8	35.2
処 理 区	7.5	12.2	13.8	14.3	17.6	20.4

第2図 MH 処理が乾物量の変化に及ぼす影響 (mg/個体)

●— 対照区 a 全個体
○— 処理区 b 子葉 c 胚

第3表 MH 処理が胚の生長に及ぼす影響

	根		葉		下胚軸	
	対照区	処理区	対照区	処理区	対照区	処理区
乾物量*{3(日後)	151	94	206	41		
mg {5	228	120	410	96	1227	663
窒素量*{3	12.2	7.7	10.6	3.6		
mg {5	38.4	20.0	33.3	11.2	19.8	12.3

* 乾燥試料 100 個体当りの mg 数

でも胚の生長が著るしく抑制されている事が認められる。全個体についての变化は殆ど認められないが、みかけ上子葉より胚への窒素の移行が阻害されている。この時の胚部における乾物量及び窒素量の分布を 100 個体について第3表に示した。この表から胚の生長のうち幼葉の生長がことに大きな抑制を受けていることがわかる。根及び下胚軸についていえば処理区では対照区に比し約 50% 以上の生長が認められるが、幼葉の生長は乾物量に関しては 25%, 窒素量に関しては 30% に抑制されている。またこの場合下胚軸の生長抑制が伸長阻害の場合

で振った。幼植物の容積は水置換法で求めた。MH 処理は発芽生長期の酸素吸収に著るしい影響を及ぼし対照区では発芽後 48 時間頃に最高を示すが、処理区では減少を続け酸素吸収量は処理区での約 1/2 である。但し測定値には ± 10% 程度のフレがあった。著者⁽¹⁰⁾は前報で MH 処理は発芽自体には殆ど影響を及ぼさないことを認めたが、発芽後に処理を行った場合には 15 時間後頃から影響が認められた。

c) MH 処理による化学的組成の変化

(イ) 新鮮重及び乾物量の変化 : MH 処理区では新鮮重の増加が著るしく遅れ、また酸素吸収の低下に伴って乾物の減少量も少いことが認められた(第2表及び第2図)。乾物量の変化は 105°, 12 時間乾燥により求めた。乾物量の変化からみて胚の生長が抑制されている事がわかる。新鮮重の増加が MH 処理により抑制されるのは吸水機構の混乱が原因であろう。第2表の値はすべて 100 個体当りのものである。

(ロ) 窒素量の変化 : 乾燥試料についてマイクロケルダール法で窒素量の変化を追い、その結果を 100 個体当りについて第3図に示した。窒素代謝の面からみ

第3図 MH 処理が窒素量の変化に及ぼす影響

乾燥試料 100 個体当り窒素 mg 数
—— 対照区 a: 全個体 b: 胚 c: 子葉
----- 処理区

第4図-a. MH処理がフルクトース残基量の変化に及ぼす影響

—— 対照区 --- 処理区
a: 全個体 b: 胚 c: 子葉

第4図-b. MH処理が還元型アスコルビン酸の変化に及ぼす影響

—— 対照区 --- 処理区
a: 全個体 b: 胚 c: 子葉

第4図-c. MH処理がアルギニン量の変化に及ぼす影響

—— 対照区 --- 処理区
a: 全個体 b: 胚 c: 子葉

と同じく最も速く回復する傾向が認められた。

(ハ) その他の発芽特徴物質の変化：発芽生長時の特徴的な酸溶性物質としてフルクトース残基、アスコルビン酸、及びアルギニンの三者を選び、日を追ってその消長を追って各 100 個体について処理区を対照区と比較した。その結果を第4図-a, -b, -c に示したがこの面からみても MH 処理により発芽生長が全般的に低下していることがわかる。これらの酸溶性物質は大部分が胚のうち下胚軸に集積し特に下胚軸基部に多く先端に近づくにつれて減少する傾向がある。

d) MH処理がミトコンドリアのコハク酸酸化能に及ぼす影響 対照区及び処理区的全個体、根および下胚軸よりミトコンドリアを分離し一回洗滌後、コハク酸酸化能をワールブルグ検圧計を用いて測定した。また in vitro で MH を添加したとき (終濃度 $10^{-3}M$) の測定をも行った。反応液の全容は 2.5 ml とし、主室には 2.0 ml となるように終濃度 0.2 M のショ糖、 $4 \times 10^{-2}M$ のリン酸緩衝液 (pH 6.8), $2 \times 10^{-2}M$ のコハク酸カリウムをいれ、側室には 0.5 ml (窒素として約 2 mg) のミトコンドリア懸濁液をいれた。副室には 0.2 ml の 20% 苛性カリと濾紙片をいれ、 30° で 10 分子振後、反応を開始し 40 分間 5 分毎に酸素吸収量を求め、この平均速度から窒素 1 mg 当りの Q_{O_2} を算出しコハク酸酸化能とした。結果を第4表に示す。

第4表 MH処理がミトコンドリアのコハク酸酸化能に及ぼす影響 ($\mu l O_2 / mg N / 時間$)

	対 照 区					
	全植物体	根	下胚軸	全植物体	根	下胚軸
	+ MH	+ MH	+ MH	+ MH	+ MH	+ MH
処 理 区	168	170				
1 (日後)	155	152				
2	140	138	120	136	194	192
3	163					
4	120	117				
	処 理 区			全植物体	根	下胚軸
				+ MH	+ MH	+ MH
処 理 時	158					
1 (日後)	121					
2	144	119	114	114	244	246
3	178					
4	83					

反応液組成：本文参照

第4表から明らかなように、幼植物の種々の生長段階のミトコンドリアの活性は、対照区と処理区の間ほとんど差が認められず、MH 処理はミトコンドリアのコハク酸酸化の比活性に関してはほとんど影響を及ぼさないように思われる。また対照区及び処理区のそ

れぞれより得たミトコンドリアに更に *in vitro* で MH を加えた場合にも影響は認められなかった。すなわち、これらのミトコンドリアの主室の反応混液に 2×10^{-2} M のマロン酸カリウム及び 10^{-3} M の *p*-chloromercuribenzoate を加えた時、それぞれ 80% 及び 70% の阻害を受けたが、MH 添加の場合には 10^{-4} M から 10^{-2} M にわたって、酵素と同時添加の実験においても、酵素と共に 15 分間 *preincubate* した実験においても何らの阻害も促進も認められず、更に 10^{-3} M の ATP と Mg^{++} を加えても効果がなかった。また上述の両区より得た 2～4 日生長後の幼植物のミトコンドリアに上記の反応条件で植物ホルモンとしてインドール酢酸および 2,4-D を終濃度を 10^{-3} M として加えたがコハク酸酸化能には影響がなく、また 10^{-3} M のトランス桂皮酸を加えても効果がなく、ただ対照区のミトコンドリアに 10^{-3} M のクマリンを加えた時にのみ 20～40% の阻害効果が認められた。

考 察

MH が植物体に及ぼす作用は植物の種類、処理時の植物の生長段階また MH の使用濃度などにより異なり、その反応は一様ではない。種子の発芽に及ぼす影響に関していえば、発芽現象自体の阻害は認められないが⁽¹¹⁾、処理方法の如何によっては発芽生長が著しい阻害を受けるようである^(12,13,14)。この傾向はこの緑豆を用いた実験においてもはっきりと認められた。この実験では、MH による緑豆の発芽生長阻害はまず種子の吸水阻害を惹起することに始まり、根の伸長と側根の発生が止まり下胚軸の伸長が遅延し、ために胚の生長が著しく阻害されるという外見的な結果を与えた。この外見的な結果に伴ない、処理区では酸素吸収量が低下し、平行的に子葉乾物量の減少が抑えられた。胚および子葉における乾物量と窒素量の変化からみると、子葉から胚への物質の転流が MH 処理により阻害され、原因は種々あるがその結果胚の生長が抑制されたと考えられることもできる。発芽に特徴的な下胚軸集積性物質のうち、フルクトース残基、還元型アスコルビン酸及びアルギニンの変化を追い、この結果を乾物量及び窒素量の分析値と比較すれば、胚の生長に関したもののうち葉及び根の生長阻害が最も大きいということができよう。MH 処理による遊離成分の変動に関してはタバコ⁽¹⁵⁾、トマト⁽¹⁶⁾、馬鈴薯⁽¹⁷⁾、甜菜⁽¹⁸⁾などについて種々の報告があり、その様相は複雑であるが、著者の実験では生長の低下と上記成分量の低下とが常に相伴って認められた。著者の実験からは酸素吸収量の低下をコハク酸を基質として与えた時のミトコンドリアの比活性の面から説明することはできなかった。コハク酸を基質とした実験のみから一般的にミトコンドリアの活性を論ずることはできないであろうが、今述べた結果から処理区では呼吸酵素系の生成量が減少しこれが原因となって植物体全体の酸素吸収量が低下したのではないかと想像できる。また逆に基質の供給が欠乏したためと想像することもできるが、この点に関しては更に実験を進めぬ以上原因を明らかにすることはできない。

植物ミトコンドリアの性質に関しては多数の研究があり^(11,19,20) 調製法や反応条件などによって活性が変動することが知られ⁽²¹⁾、また豆類幼植物でミトコンドリアのコハク酸酸化能が幼植物の生長日数や器官によって差を生ずるという報告もあるが⁽²²⁾、著者の得たミトコンドリアがコハク酸の酸化に関しマロン酸や *p*-chloromercuribenzoate で著しい阻害を受けるにもかかわらず、MH による影響が認められなかったことから、MH によるミトコンドリアのコハク酸酸化能に対する阻害はないと判断した。Isenberg ら⁽²³⁾は MH 処理を行ったタマネギの懸濁液についてコハク酸を与えた場合、MH 濃度の低いときには酸素吸収量が増し、MH 濃度が高いときには影響がなかったことを報じているが、緑豆ミトコンドリアに関してはこの刺激現象は認められなかった。

要 約

緑豆の発芽生長は発芽時の 100 p. p. m. の MH 処理により著しい阻害を受ける。MH 処理を受けた緑豆幼植物は水分吸収量を減じ、根の伸長および側根の発生が止まり、酸素吸収量が低下し、これに伴って子葉乾物量の減少が抑えられる。乾物量及び窒素量からみても胚の生長が遅れ、発芽に特徴的な下胚軸集積性物質のうちフルクトース残基、アスコルビン酸及びアルギニンの生長に伴う増加も対照区に比して少くなる。しかし分離したミトコンドリアのコハク酸酸化の Q_{O_2} は植物体の MH 処理により影響をうけず、まこのミトコンドリアのコハク酸酸化能は *in vitro* での MH 添加によっても影響をうけない。

(1) V. H. Greulach: <i>Texas J. Sci.</i> , 3, 322 (1951); <i>C. A.</i> , 46, 3202.	(3) V. A. Greulach, J. G. Haesloop: <i>Am. J. Bot.</i> , 41, 44 (1954).
(2) V. A. Greulach, E. Atchinson: <i>Bull. Torrey Bot. Club</i> , 77, 262(1950); <i>C. A.</i> , 44, 10811.	(4) 志村 喬, 大曾根兼一, 松下 智: 日本植物学会記事, 23, 297 (1955).
	(5) T. J. Muzik, J. H. Cruzado: <i>Plant Phy</i>

- siol.*, 31, 81 (1956).
- (6) J. H. Roe : *J. Biol. Chem.*, 107, 15 (1934).
- (7) 藤田秋治 : 「ビタミン定量法」, p. 542, 南江堂, 東京 (1955).
- (8) J. W. Dubnoff, H. Borsook : *J. Biol. Chem.*, 138, 381 (1941).
- (9) A. Millerd, J. Bonner, B. Axelrod, R. S. Bandurski : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 37, 855 (1951).
- (10) 永井康豊 : 本誌, 32, 851 (1958).
- (11) G. Nétien, M. Briffaz : *Bull. mens. soc. linnéenne Lyon*, 20, 179 (1951); *C. A.*, 46, 3202.
- (12) J. B. Carlson : *Iowa State Coll. J. Sci.*, 29, 105 (1954); *C. A.*, 48, 12910.
- (13) E. V. Miller, A. E. Miller, E. Mesiano : *Botan. Gaz.*, 117, 76 (1955).
- (14) F. A. Haskins, H. W. Chapman : *Physiol. Plantarum*, 9, 356 (1956).
- (15) E. L. Petersen, A. W. Naylor : *ibid.*, 6, 816 (1953).
- (16) V. A. Greulach : *Botan. Gaz.*, 114, 481 (1953).
- (17) M. G. Payne, J. L. Fults : *Am. Potato J.*, 32, 144 (1955); *C. A.*, 49, 10447.
- (18) C. Livingston, M. G. Payne, J. L. Fults : *Botan. Gaz.*, 116, 148 (1954).
- (19) J. Bonner, A. Millerd : *Arch. Biochem. and Biophys.*, 42, 135 (1953).
- (20) G. S. Beaudreau, L. F. Remmert : *ibid.*, 55, 469 (1955).
- (21) G. G. Laties : *Plant. Physiol.*, 28, 557 (1953).
- (22) A. P. Withrow, J. B. Wolff : *Physiol. Plantarum*, 9, 339 (1956).
- (23) F. M. R. Isenberg, C. O. Jensen, M. L. Odland : *Science*, 120, 464 (1954).

P. ovalis 並びに *P. fluorescens* による gluconate 及び 2-ketogluconate 生成に対する鉄の影響について

高 橋 健, 栢 森 寿 (東京農工大学農学部)

昭和 33 年 3 月 28 日 受 理

所謂酸化醗酵並びにそれに関連する醗酵に於ける鉄の影響についてはいくつかの報告がある。

即ち Koepsell⁽¹⁾ は *P. fluorescens* による gluconate より pyruvate, α -ketoglutarate の生成に, MacGee, Doudoroff⁽²⁾ は *P. saccharophila* の 6-phosphogluconate より 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate の生成に, 朝井, 相田⁽³⁾ 等は *Serratia marcescens* の pyruvate, α -ketoglutarate の生成に, 片桐, 柄倉⁽⁴⁾ 等は *E. coli* による pyruvate からの α -ketoglutarate の生成に各々鉄が必要であると報告している。

一方 glucose $\rightarrow$ gluconate $\rightarrow$ 2-ketogluconate の main path についてはその dehydrogenase が cytochrom に link しているので, ここにも当然鉄は関与している。

我々は主として glucose $\rightarrow$ 2-ketogluconate の経路に対する鉄の影響を調べ若干の知見を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株等 応用微生物研究所第四研究室保管の *P. ovalis* 40 F (gluconate 生産菌) 及び *P. fluorescens liquefaciens* (2-ketogluconate 生産菌) で下記の如き鉄欠乏培地に 30°, 24 時間, 振盪培養したものを前培養とした。

2. 培養基及び培養方法 基本培養基はグルコース 10%, 醋酸アンモン 0.18%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, pH 7.0~7.2 で殺菌後 CaCO_3 3.0% を加え 30° で振盪培養した。

鉄の混入を防ぐ為, 無機塩類及び醋酸アンモンは全て特級試薬を用い, グルコースは局方のものを IR 120 及び IRA 410 の樹脂を通過せしめた。水は通常の蒸溜水を更に上記樹脂を通過せしめ, オルガノ社製の水質器で樹脂通過直後 100 万 Ω 以上の抵抗を有するものをポリエチレンフラスコに溜めて使用した。

容器は鉄欠乏培地の場合全て東芝製 Terex を, 含鉄培地には同形の普通硬質ガラスのものをを用いた。

* The Influence of Iron on the Production of Gluconate and 2-Ketogluconate by *P. ovalis* and *P. fluorescens*.

By Takeshi TAKAHASHI and Hisashi KAYAMORI

(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)