

5-アミノレブリン酸の植物生理活性と
その応用に関する研究

1998. 9

堀田 康司

①

5-アミノレブリン酸の植物生理活性と
その応用に関する研究

1998.9

(株) コスモ総合研究所

堀田 康司

学 位 論 文 要 旨

5-アミノレブリン酸の植物生理活性とその応用に関する研究

Physiological Effects of 5-Aminolevulinic Acid in Plants and Its Application in Agricultural Production

株式会社コスモ総合研究所

堀田 康司

Yasushi Hotta

5-アミノレブリン酸 (ALA) は、クロロフィルやヘム等のテトラピロール化合物群の生合成における鍵前駆体であり、ALA生合成は、これらの一連の生合成における律速段階でもある。また、植物に内在するALA量は、微量 (50 nmol/g 新鮮重以下) に調節、制御されている。

植物へのALA処理 (例: 濃度 3-5,000ppm) は、プロトクロロフィライド、プロトポルフィリンIX等のクロロフィル中間体の植物体内蓄積を誘起し、光照射に伴う除草作用を示すことが知られている。この光要求性の除草作用の機構については、蓄積したクロロフィル中間体の光増感作用により一重項酸素が発生し、これが植物に障害を与える光動力的な作用と推定されている。

本研究では、除草作用が報告されている濃度域におけるALA処理ではなく、内在のALA量に見合う低濃度域のALA処理が植物に及ぼす生理作用について検討し、さらに、農業分野への応用について検討を行った。

1. 低濃度域のALA処理が植物に及ぼす基礎生理作用について、イネ、ワサビダイコン、ポトス、ハツカダイコンを用いて評価した。その結果、ALAは、植物のクロロフィルの含量を高め、さらに光合成量の増大や暗呼吸の抑制というこれまでに報告されていない新規な生理作用を示すことを明らかにした。また、このような作用の発現には、光や栄養源の有無が関与する可能性が高いことを示した。

さらに、これらの実験を行う過程において、ALAが肥料成分の吸収効率を高め、植物の成長や発根を促進する可能性が示唆された。

2. 植物に対するALAの成長促進作用について至適処理条件を検討した結果、根部浸漬処理では10 ppm以下、茎葉処理では300 ppm以下において有効濃度域が認められた。それ以上の処理濃度では、既に報告されている成長抑制作用や除草作用が観察された。土壌処理においても植物の生育促進が認められたが、その効果は不安定であった。これは、ALAの土壌中における生分解性が高いことに起因すると推測している。

3. イネ、トウモロコシ、インゲンマメ、ハツカダイコン等の幼植物の生育に及ぼすALAの作用を検討した。イネ、トウモロコシでは、ALAの成長促進効果は、草丈よりも乾物重の増加に特徴があった。ハツカダイコン、インゲンマメでは、可食部又は根部という地下部の生育にALA処理の特徴が見られた。

4. ALAがイネ幼苗の耐冷性を向上することを見い出した。ALAは、低温処理により生ずる葉身の萎縮（リーフローリングの比率）を低減し、組織からの電解質の漏出量についても低減する効果を示した。また、低温処理後の温暖な条件下における回復成長に高い効果を示した。低温処理のイネ幼苗に対するALAの作用は、比較剤として用いたブラシノライドと類似し、アブシジン酸とは異なる作用であった。

5. 農業分野への応用として、イネ、オオムギ、コムギ、ジャガイモ、ニンニク、インゲンマメ、ハウレンソウ、芝草等に対するALAの処理効果を検討した。ALA処理は、これらの作物の生育を促進し、無処理区と比較して10-60%の増収を示した。適正な処理濃度に関しては植物種により大きな差はなく、例えば茎葉処理において30-300ppmの範囲にあった。

イネ、オオムギ、コムギという主要穀物における子実収量の増加は、ALA処理により登熟率が高まることが主たる要因であることを明らかにした。また、ジャガイモ、ニンニクの収量増加は、塊茎や鱗茎の肥大を伴う作用であった。

芝草では、成長促進だけでなく、緑色維持にも効果を示した。

6. ALAの植物成長促進活性は、単子葉植物と双子葉植物の間で差がなく、ALAの除草作用が単子葉植物より双子葉植物において強く発現するというこれまでの報告とは異なる挙動を示した。

一方、ALAの成長促進作用は、これまでに報告されている植物成長調節物質と同様に、処理時期、処理回数、処理濃度に大きな影響を受けることも明らかにした。

7. 低濃度域における適正なALA処理は、これまでに報告されている除草活性や成長抑制作用とは全く逆の成長促進作用を示した。

ALAの応用分野として、健苗育成、栽培期間の短縮、主要作物の収量向上、穀類子実の登熟率の向上、環境ストレスの緩和等という農業分野で有用な利用方法を明らかにした。

8. サイトカイニン的一种であるベンジルアデニンの一次作用点
がALA生合成の活性化にあり、その作用は光強度の影響を受け
ると報告されている。ALAが多様な生理作用を示すことを明らか
にしたことは、サイトカイニンの多様な生理作用を解析する上でも
意義深い考える。

9. 以上の結果は、植物においてALAが単なるクロロフィルの前駆
体ではなく、多様な植物成長調節活性を有する物質としての生理活
性をもつことを明らかにした最初の報告である。

Summary

Physiological Effects of 5-Aminolevulinic Acid in Plants and Its Application in Agricultural Production

COSMO Research Institute

Yasushi Hotta

5-Aminolevulinic acid (ALA) is a key precursor in the biosynthesis of porphyrins such as chlorophyll and heme. Porphyrin biosynthesis may be regulated at the level of ALA formation, and ALA concentration is maintained at low levels (less than 50 nmol/g fresh wt.) *in vivo*.

In plants treated with ALA at relatively high concentrations, *i.e.* 3,000 –5,000 ppm, ALA increases the accumulation of several chlorophyll intermediates such as protochlorophyllide and protoporphyrin IX, and elicits herbicidal responses in plants. These herbicidal responses are explained by the fact that excess chlorophyll intermediates act as photosensitizers for the formation of singlet oxygen-triggering photodynamic damage of ALA-treated plants.

The aims on the present study are to evaluate the physiological action of ALA at lower concentrations than those above mentioned, and to apply the physiological activity of ALA to agricultural production.

1. To evaluate the physiological action of ALA at lower concentrations, ALA was tested by several bioassay systems using rice seedlings, horseradish, pothos and radish. ALA was determined to have a variety of physiological effects for biosyntheses, such as the increasing chlorophyll synthesis and photosynthesis, and decreasing respiration. These effects of ALA in plants may be elicited in the presence of light and nutrients. Also, they may be linked to plant growth, rooting and an enhancement of fertilizer uptake.

2. The effects of ALA using different application methods and concentrations were examined. The appropriate ALA treatment less than 10 ppm by root soaking and less than 300 ppm by foliar spray increased the growth of plants. However, the application of higher concentrations gradually suppressed the growth, and finally resulted in damaging the plants. ALA also increased the growth of plants by soil treatment. But soil treatment with ALA must be carried out cautiously, because ALA is easily biodegradable in soil.

3. The effects of ALA on the growth of plant seedlings were evaluated using rice, corn, kidney beans and radish. ALA promoted the growth of seedlings and the effects of ALA were greater on dry weight than on plant length in rice and corn seedlings. The characteristic effects of ALA on kidney beans and radish seedlings were most evident in the underground parts such as roots and edible parts.

4. ALA also prevented injury caused by cold stress in rice plants. Pretreatment of rice seedlings by root-soaking with ALA reduced the ratio of leaf rolling and electrolyte leakage from leaf tissue after cold treatment. In particular, the dry weight of ALA-treated seedlings was significantly larger than that of control plants in recovery growth after cold stress. The protective effect of ALA against cold stress was similar to that of brassinolide, but was different from that of abscisic acid.

5. The application of ALA to agricultural production was evaluated using kidney beans, spinach, rice, barley, wheat, potatoes, garlic and turf grass. The appropriate ALA treatment increased the growth and yield of plants 10-60 % over the control. The appropriate concentration of ALA was similar in all tested plants, 30-300 ppm by foliar spray. An enhancement of yield treated with ALA on paddy rice, barley and wheat was mainly caused by improvement of filling and ripening of the caryopsis. The yield of potatoes and garlic might be increased by ALA treatment with the thickening of the tuber and bulb. In turf-grass tests, ALA increased growth, and delayed etiolation in early winter, and promoted greening in spring.

6. ALA at lower concentrations showed similar promotive effects on both monocotyledonous and dicotyledonous plants. These phenomena did not coincide with the previous work at higher concentrations in which the herbicidal properties of ALA were greater in dicotyledonous than monocotyledonous plants. However, these promotive effects of ALA were dependent on application timing, number and the

concentration.

7. These results showed that ALA has useful plant growth-promoting properties, enhancing agricultural productivity, such as increasing growth, yield and resistance of crops to environmental stress.

8. It was recently suggested that benzyladenine acted to stimulate the synthesis of ALA and its effect was influenced by light intensity. It was also shown that ALA itself has a variety of physiological functions.

9. The promotive effects of ALA described above could not be explained by the fact that ALA was a key precursor in the biosynthesis of porphyrins. The results suggest that ALA might act as a potent plant growth regulator.

目 次

ページ

第1章 序論

第1節	研究の目的と背景	3
第2節	5-アミノレブリン酸、ポルフィリン、ヘムの生合成について	
2.1	ALA合成のC ₄ 経路とC ₅ 経路	7
2.2	クロロフィル、ヘム生合成系の局在生	10
2.3	ALA生合成と調節	12
第3節	植物に対する5-アミノレブリン酸の殺草作用	
3.1	光要求型除草剤の作用機構	13
3.2	ALAの殺草活性	14

第2章 植物における5-アミノレブリン酸の基礎生理活性

第1節	緒言	18
第2節	クロロフィル生合成および光合成に及ぼす影響	
2.1	はじめに	19
2.2	材料及び実験方法	20
2.3	結果と考察	23
2.4	まとめ	36
第3節	幼植物の生育に及ぼす影響	
3.1	はじめに	37
3.2	材料及び実験方法	38
3.3	実験結果	41
3.4	考察	51
3.5	まとめ	55
第4節	イネ苗の耐冷性の向上効果	
4.1	はじめに	56
4.2	材料及び実験方法	57

4. 3	実験結果	59
4. 4	考察	68
4. 5	まとめ	71
第3章 作物の収量増加及び登熟に及ぼすALAの作用		
第1節	緒言	72
第2節	ALA処理による作物の収量向上	
2. 1	はじめに	74
2. 2	材料及び実験方法	74
2. 3	結果と考察	78
2. 4	まとめ	89
第3節	ALA処理によるコムギ及びイネの収量向上と登熟	
3. 1	はじめに	90
3. 2	材料及び実験方法	90
3. 3	結果と考察	93
3. 4	まとめ	104
第4節	コウシュンシバとベントグラスの生育と緑化	
4. 1	はじめに	105
4. 2	材料及び実験方法	105
4. 3	結果と考察	107
4. 4	まとめ	112
第4章 総括		
	引用文献	124
	謝辞	131

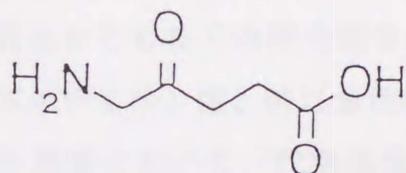
第1章 序論

第1節 研究の目的と背景

本論文は、生体内物質である5-アミノレブリン酸 (ALA) を外部から植物に投与した場合の生理作用について研究したものである。より具体的には、ALAが植物の成長を促進する作用を持つことを明らかにすると共に、その生理作用が、農作物の生産性の向上に応用できる可能性について検討した。

ALAは、 δ -アミノレブリン酸、5-アミノ-4-オキソペンタン酸とも命名される図1. 1の構造式で示される分子量131の化合物であり、自然界においてテトラピロール化合物の共通前駆体として動植物を問わず生物界に広く存在する物質である。

ALAは、非常に不安定な物質であるため、通常はALA塩酸塩として取り扱われている。なお、それぞれのCAS番号は、ALAがRN106-60-5であり、ALA塩酸塩がRN5451-09-2である。



5-Aminolevulinic acid

図1. 1 5-アミノレブリン酸の構造式

テトラピロール化合物には、呼吸系複合体、光集積複合体、カタラーゼ及びペルオキシダーゼの補欠因子等を構成するヘム、クロロフィル、ビタミンB₁₂などの物質があり、これらの化合物は生物にとって必須であるといわれている。

このため、代表的なテトラピロール化合物であるポルフィリンやヘムの生合成に関しては古くから研究されてきた。今日ではポルフィリンやヘムの生合成過程はほぼ解明されており、全てのテトラピロール化合物は、ALAを經由して生合成されていると考えられている (第2節参照)。

生物学的に見た場合、植物の最大の特徴は、光合成という機能をもつことであり、クロロフィルは光合成において最も重要な役割を果たしている色素である。クロロフィルの基本骨格はポルフィリンであるが、同様の基本骨格を有するヘムの生合成に比べて、クロロフィル生合成に関する研究は遅れた。その原因の1つに、ヘム生合成経路の研究においては、1950年代にグリシンとスクシニル CoA からALAを合成するALAシクターゼが解明されたが、この酵素の存在が植物では証明されず、植物体内におけるALAの生合成経路の解明に時間を要したことがあげられる。1970～80年代の研究において、植物内にALAシクターゼは存在せず、グルタミン酸を原料とした3段階の反応によりALAが生合成されることが明らかにされ（第2節参照）、以後、急速にALAを含めたポルフィリン生合成の研究が進展している。

ALAに関する研究は、従来、テトラピロール化合物の生合成経路を解明するという研究の中で進展してきたが、代謝研究の進展に伴い1980年代以降は、実用的な観点からも多くの研究報告がある。

臨床医学分野では、ポルフィリン症、特に急性間欠性ポルフィリン症や、鉛中毒等の重金属障害の患者において、代謝異常により尿中に高濃度のALAが排泄されることから、これらの疾病の診断や予後のモニタリングとして検体中のALAの測定が行われている¹⁾。より具体的には、鉛中毒、先天性高チロシン血症、遺伝性ALAデヒドラターゼ欠損性ポルフィリン症のようにALA脱水素酵素の顕著な活性低下があると血清及び尿中に大量のALAが出現する。特に、日本では鉛作業従事者の尿中のALA測定が労働衛生法により義務づけられている。一方、急性間欠性ポルフィリン症、遺伝性コプロポルフィリン症、急性ポルフィリン症の急性発作時にはALA合成酵素の活性が上昇し、その結果として、尿中のALAやポルフィリンノーゲンが大量出現する。これらの症例は、症状が改善されると出現量が減少することから予後の判定が可能となる。

また、ポルフィリン関連物質の光特性と低密度リポタンパク質等のリポ

タンパク質への親和性の強さによる腫瘍組織集積性という特性を生かした悪性腫瘍の治療法の研究も古くから行われている。今日では、レーザー光線の応用や各種ポルフィリン誘導体の開発から、ヘマトポルフィリン誘導体である Photofrin (日本レダリー) が医薬承認されるまでに進展している。近年、この光動力学的治療法 (PDT) において、ポルフィリン誘導体と比較して ALA は、副作用が少なく、悪性腫瘍の治療にも有効であるとの報告があった²⁾。1990年以降、この分野での ALA 及び ALA 誘導体の研究が注目を浴び、高い治癒率を示していることから、現在も盛んに PDT 治療への応用研究が行われている³⁻⁵⁾。

植物分野においては、クロロフィルの生合成経路が明らかになるにつれて、これらの代謝系を攪乱させることにより除草剤を開発しようとする研究が進められ、ジフェニルエーテル系に代表される光要求型除草剤が開発されている。さらに、ALA 自体も高濃度で植物体に投与した場合に除草活性を示すことが報告され、低毒性の除草剤としての研究が進められた。しかしながら、ALA の単独処理では、市販の合成農薬と比較して除草活性が低かったことから実用化されるに至っていない (第3節参照)。

この他、除草活性と同様の作用メカニズムを応用した殺虫剤としての可能性⁶⁾ やヘムタンパク系酵素の高生産を目的とした培地添加⁷⁾ などの応用研究が報告されている。

さらに、ALA 研究の内容が、ヘムやクロロフィルの生合成研究から上記のような応用研究に拡がりを見たことから、ALA の製造に関する研究も進められている。これまでに原料にレブリン酸⁸⁾、コハク酸⁹⁾、2-ヒドロキシピリジン¹⁰⁾、テトラヒドロフルフリルアミン¹¹⁾ を用いた化学合成法や、*Methanobacterium*¹²⁾、*Methanosarcina*¹³⁾、*Clostridium*¹⁴⁾、*Chlorella*¹⁵⁾、*Rhodobacter*¹⁶⁾ 等の微生物を用いた培養生産法が数多く提案されている。しかしながら、これらの方法には合成の行程が長い、合成収率が低い、微生物法での生成量が少ないという課題を残している。

著者らは、ALAが全てのテトラピロール化合物の鍵中間体であること、また、その生合成が生体内において厳密に制御されていることから、動植物内におけるALAの挙動、特にALA自体の植物に対する生理活性に興味を持ち研究を進めてきた。また、同時にALAの工業的な製造方法についても検討を行っている¹⁷⁻²³⁾。

本研究は、ALAが植物に対して及ぼす作用について、各種の基礎評価系を用いて明らかにすると共に、実験室規模での栽培評価試験により農業分野での利用の可能性を明らかにすることを目的として行ったものである。

2. 1. ALAの生合成、代謝とC₁₅類

ALAは、植物体内で生合成されるALAの生合成におけるC₁₅類の代謝物である。植物、動物、微生物などから、C₁₅類と見られる物質は多く知られており、その中にはALAが含まれる。この物質は、植物体内で生合成されるが、発見されたALAは、植物体内で生合成されたものである。この物質は、植物体内で生合成されるが、発見されたALAは、植物体内で生合成されたものである。この物質は、植物体内で生合成されるが、発見されたALAは、植物体内で生合成されたものである。

植物体内で生合成されるALAは、植物体内で生合成されたものである。この物質は、植物体内で生合成されるが、発見されたALAは、植物体内で生合成されたものである。この物質は、植物体内で生合成されるが、発見されたALAは、植物体内で生合成されたものである。

第2節 5-アミノレブリン酸、ポルフィリン、ヘムの生合成について

ポルフィリン、ヘム等のテトラピロール化合物の生合成経路は、現在ほぼ解明されており、酵素・遺伝子レベルでの研究も進められている²⁴⁾。

5-アミノレブリン酸 (ALA) の生合成には二つの経路が知られている。第一の経路は、ALAシンターゼによりグリシンとスクシニル CoA の縮合反応により合成されるC₄経路である。また、第二の経路は、グルタミン酸の骨格を利用した3段階の反応により生合成されるC₅経路である。

ALAからは、ALAデヒドラダーゼによるALAの2分子縮合反応によりポルフォビリノーゲンが生成し、順次最終産物まで合成される。このALAから最終産物までの合成経路は全ての生物種において非常に類似している。クロロフィルの生合成系を中心にしたポルフィリンの合成経路を図1. 2に示す。ビタミンB₁₂、シロヘムへの分岐点はウロポルフォビリノーゲンⅢであり、ヘムとクロロフィルの分岐点はプロトポルフィリンⅨである。この中でマグネシウムが挿入されるクロロフィル合成系は植物等の光合成生物のみに見出される。

2. 1 ALA合成のC₄経路とC₅経路

ポルフィリン生合成における最大の分岐点は、ALA生合成におけるC₄経路とC₅経路の関係である。動物、酵母、菌類の多くは、C₄経路と呼ばれるグリシンとスクシニル CoA の縮合反応によりALAが合成される。この経路は、1950-60年代に明らかにされたが、発見者に因んで Shemin pathwayとも呼ばれている (図1. 3)²⁵⁾。この反応はALAシンターゼにより行われるが、ヒトや *Rhodobacter spheroides* では、2種類のALAシンターゼが存在することが報告されている²⁶⁻²⁸⁾。

高等植物、藻類、一部の細菌類では、テトラピロール化合物が必須であるにもかかわらず、ALAの合成にグリシンが利用されないことからC₄経路以外の合成系があると想定されていた。1970年代に入り、Bealeらの研究グループは、標識化されたグルタミン酸の炭素骨格が効率よくALA

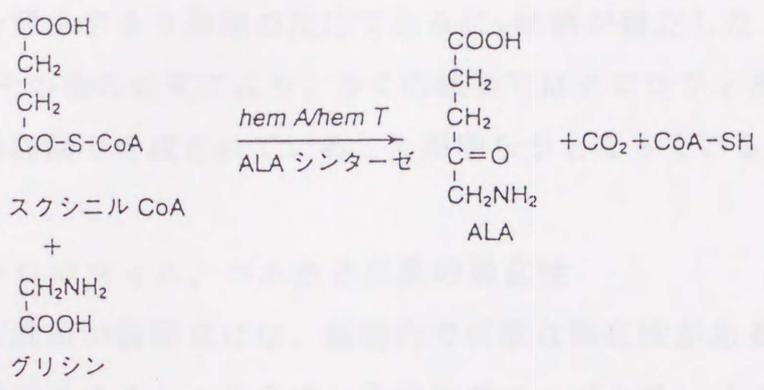
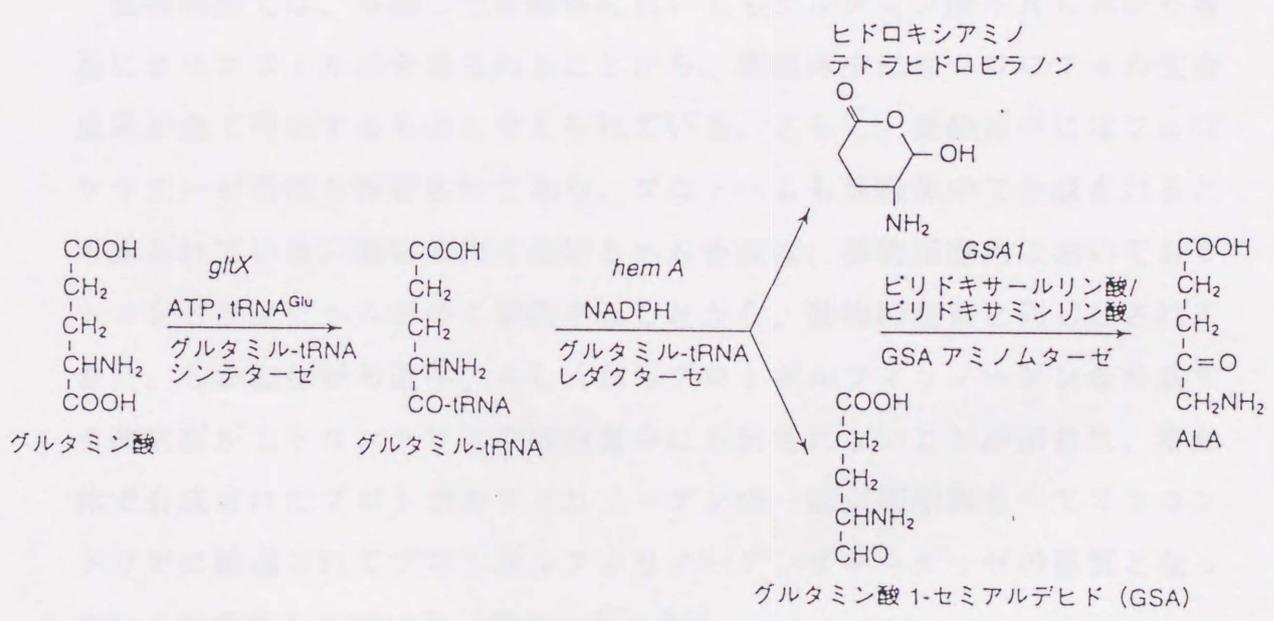


図 1. 3 グリシンからのALA生合成経路 (C₄経路)



各ステップの下に反応を触媒する酵素名を、また、上には遺伝子を示した

図 1. 4 グルタミン酸からのALA生合成経路 (C₅経路)

に取り込まれることを見出した^{29), 30)}。その後の一連の研究によってALAの合成にはRNA分子、ATP、NADPHが必要なことが明らかになり、1985年にグルタミン酸からグルタミル-tRNA、グルタミン酸-1-セミアルデヒドを経由する3段階の反応であるC₅経路が確立した(図1.4)^{31), 32)}。その後の研究により、多くの植物ではクロロフィルだけでなく、ヘムもこの経路で合成されていることが明らかとなっている。

2. 2 クロロフィル、ヘム生合成系の局在性

ヘム生合成系の諸酵素には、細胞内で明瞭な局在性がある。動物系では最初の段階であるALA生合成と後段のプロトポルフィリノーゲン以降の合成がミトコンドリアで行われ、その中間合成段階は細胞質可溶画分で行われる。また、ミトコンドリア内で生成したヘムは、細胞内のしかるべき場所に対応するアポタンパク質と結合してそれぞれの機能を示すヘム蛋白質となる。

植物細胞では、単離した葉緑体においてもグルタミン酸やALAから容易にクロロフィルが合成されることから、葉緑体中にはクロロフィル生合成系が全て存在するものと考えられている。さらに、葉緑体中にはフェロケラターゼ活性も報告されており、プロトヘムも葉緑体中で合成されると考えられている。植物体内におけるヘム合成は、植物細胞内においてもミトコンドリアにヘムが多く存在することから、動物細胞系と同じとされてきた。しかしながら近年、ALAからプロトポルフィリノーゲンを合成する酵素群がミトコンドリアや細胞質中に見出されないことが示され、葉緑体で合成されたプロトポルフィリノーゲンの一部が細胞質をへてミトコンドリアに輸送されてプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの基質となっていると考えられている(図1.5)³³⁾。

このような植物細胞内におけるポルフィリン生合成系の局在化は、後述する光要求型除草剤の作用機構との関連で興味を持たれる。

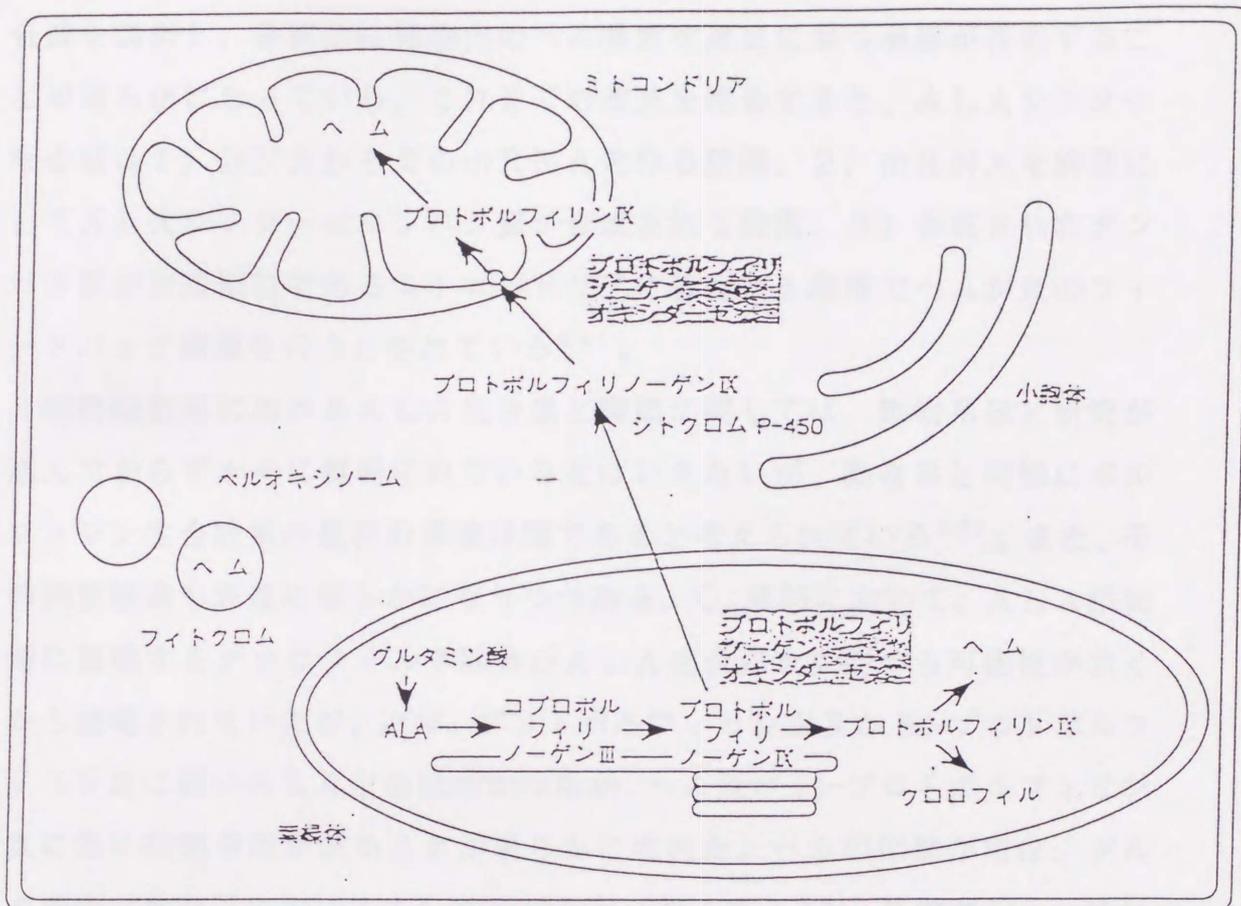


図1. 5 クロロフィルとヘムの合成系と植物細胞内における局在性

2. 3 A L A 生合成と調節

ポルフィリン系化合物の生合成において、動物系では、A L A の生合成反応が律速となっていることは良く知られている。また、動物細胞系では、ヘムが A L A シンターゼ合成を何段階にも調節することにより A L A の生合成を調節し、最終的に細胞内のヘム濃度を適正に保つ機構が存在することが明らかになっている。これまでの知見を総合すると、A L A シンターゼ合成は 1) D N A からその m R N A を作る段階、2) m R N A を鋳型にして A L A シンターゼタンパク質が合成される段階、3) 合成されたタンパク質が作用部位であるミトコンドリアに移行する段階でヘムが負のフィードバック調節を行うとされている³⁴⁾。

植物細胞系における A L A 生合成と調節に関しては、動物系ほど研究が進んでおらず十分に解明されているとはいえないが、動物系と同様にポルフィリン生合成系の最初の律速段階であると考えられている³⁵⁾。また、その調節機構も急速に明らかになりつつある。C₅経路において、A L A 添加時に蓄積するクロロフィル中間体が A L A 生合成を抑制する可能性が古くから提唱されていたが、近年、プロトポルフィリン IX 及び Mg-プロトポルフィリン IX に弱い A L A 生合成抑制作用が、ヘム及び Co-プロトポルフィリン IX に強い抑制作用があることが明らかにされた。ヘムの抑制作用は、グルタチオン共存下においてさらにその作用が強くなる³⁶⁾。外的要因としては、光照射が A L A の生合成を増加させること、光の作用点が 2 段階目の反応に関与するグルタミル-tRNA-レダクターゼの活性を高めることによると報告されている^{37)、38)}。また、適正濃度の酸素も A L A の生合成を増加させる^{39)、40)}。

サイトカイニン的一种であるベンジルアデニンの一次作用点も、光と同様に、2 段階目の反応に関与するグルタミル-tRNA-レダクターゼの活性を高め、A L A の生合成を促進することが報告されている⁴¹⁻⁴³⁾。ベンジルアデニンの生理活性、作用機構を解明する上でも、A L A 生合成の調節に関する研究の発展が期待される。

第3節 植物に対する5-アミノレブリン酸の殺草作用

クロロフィルの生合成経路が明らかになるにつれて、クロロフィル生合成系を攪乱することにより殺草作用を示す除草剤の開発が検討されてきた。これらの薬剤の処理は、植物の細胞内膜系を酸化により破壊し、ついで緑色組織の白化、乾燥が起こった後に植物体を枯死させる。これらの薬剤の作用発現には光が必ず必要であることから、光要求型除草剤として分類されているが、2環構造を有することを特徴とするジフェニルエーテル系、イミド系等の除草剤に代表される。5-アミノレブリン酸 (ALA) にも、光要求型除草剤と類似した殺草活性が報告されている。

3.1 光要求型除草剤の作用機構³³⁾

ジフェニルエーテル系除草剤に代表されるこれらの除草剤は、ヘムとクロロフィル生合成系の最後の共通酵素であるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを阻害することが明らかにされた。これらの薬剤処理では、植物体の光障害が生じる前にプロトポルフィリン IXが組織内に異常蓄積する。プロトポルフィリン IXの蓄積量と薬剤の殺草活性の強さに相関が認められること、この物質が光増感物質であり、光エネルギーにより一重項酸素を生成させる性質を有することから、この物質が除草作用の中心であると推定された。一重項酸素は細胞膜の主成分である脂質と反応し、過酸化物を生成することにより、細胞膜系を破壊するものと推定される。しかしながら、プロトポルフィリン IXが薬剤により阻害を受けるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼの代謝産物であることから、この作用機構についてはさらに研究が進められた。

今日では、以下のように作用機構が整理されている。植物に処理されや薬剤は、速やかに細胞内に取り込まれ、葉緑体及びミトコンドリア内のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを阻害する。葉緑体内のポルフィリン生合成系はプロトポルフィリノーゲン以降が遮断されているため、生成したプロトポルフィリノーゲンは、多量に細胞質へ移送される。しかしな

がら、ミトコンドリア内の酵素も阻害されているため利用されないプロトポルフィリノーゲンが細胞質で酸化され、プロトポルフィリン IX に変換される (図 1. 6)。この酸化反応には、細胞質内のペルオキシダーゼが関与する可能性が報告されている。このプロトポルフィリン IX は、生合成系の局在性 (2. 2 項参照) のため代謝されにくく、光エネルギーで一重項酸素を発生させることにより枯死作用を示すものと考えられている (図 1. 7)。

3. 2 ALA の殺草活性

ALA を植物に処理する研究は古くから行われており、1959 年には Granik らが、ALA 処理によりプロトクロロフィライドが異常に蓄積することを報告している⁴⁴⁾。その後の一連の研究は、クロロフィル生合成系の解析や、黄化葉のグリーニング⁴⁵⁾ という研究の中で論じられてきた。

1984 年に Rebeiz らは、ALA を外部から処理した場合に ALA 処理がプロトポルフィリン IX や Mg-プロトポルフィリン IX をも異常蓄積することを明らかにし、さらに、ALA がジフェニルエーテル系除草剤と類似した殺草作用を示すことを見出した⁴⁶⁾。この殺草作用は、ALA 濃度に依存して高濃度になるに従い強くなること、暗条件下にて処理した後に照射をすると効果が大きいこと、 α, α' -ジピリジルのようなキレート剤を共存させることで殺草力が相乗効果を示すこと、単子葉植物よりも双子葉植物に対して効果が大きいことを報告している。また、その後の研究により、ALA 処理により蓄積するクロロフィル中間体は、プロトクロロフィライドが最も多いが、増加率から見ればプロトクロロフィライドよりもプロトポルフィリン IX が高いこと⁴⁷⁾、ALA の殺草作用の発現には一重項酸素が関与していること⁴⁸⁾、⁴⁹⁾、植物内在の SOD 活性が異なる植物で ALA の殺草作用が異なることなどが明らかにされている⁴⁸⁾。

しかしながら、ALA はクロロフィルの前駆体であり、代謝中間酵素であるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを光要求型除草剤のように

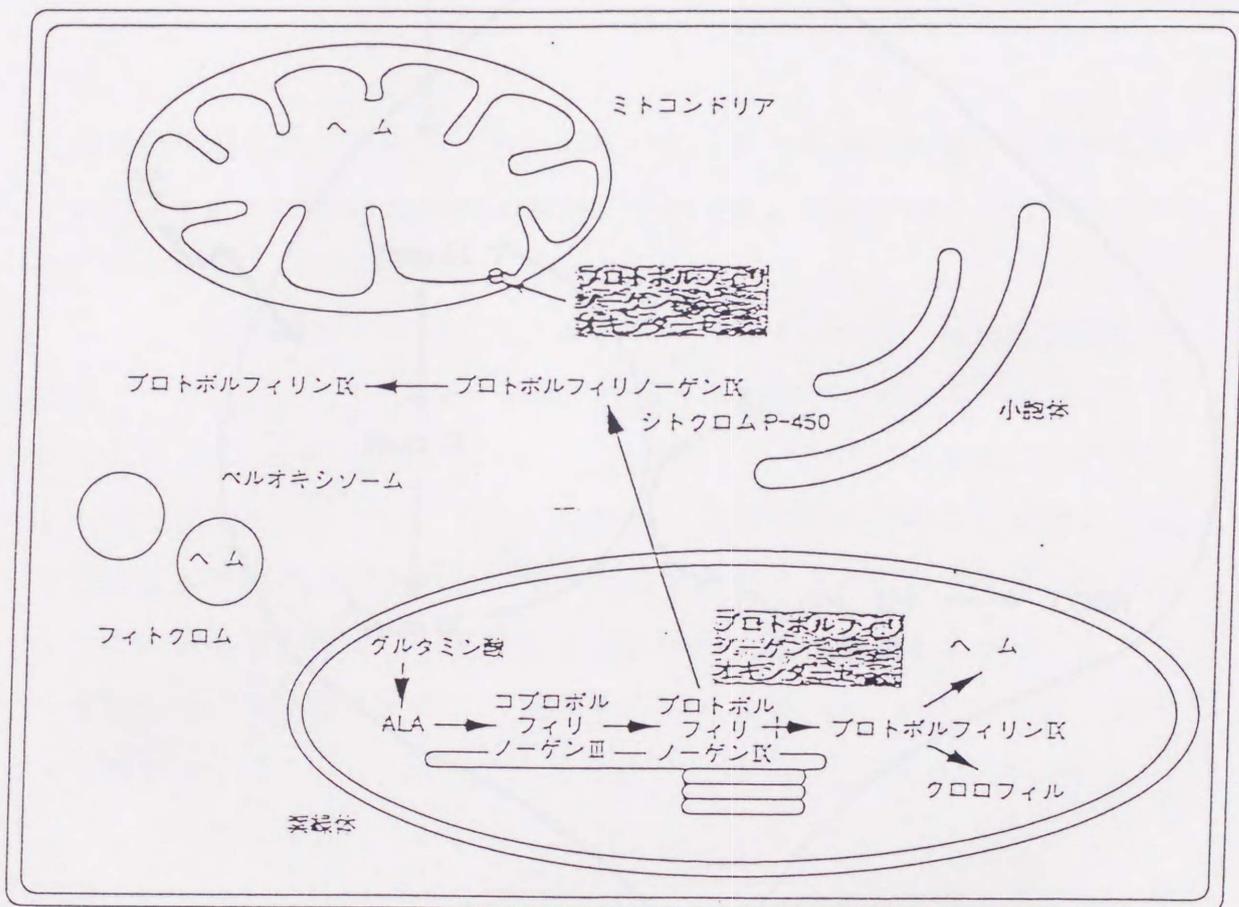


図1. 6 プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害時におけるプロトポルフィリンIXの蓄積機構

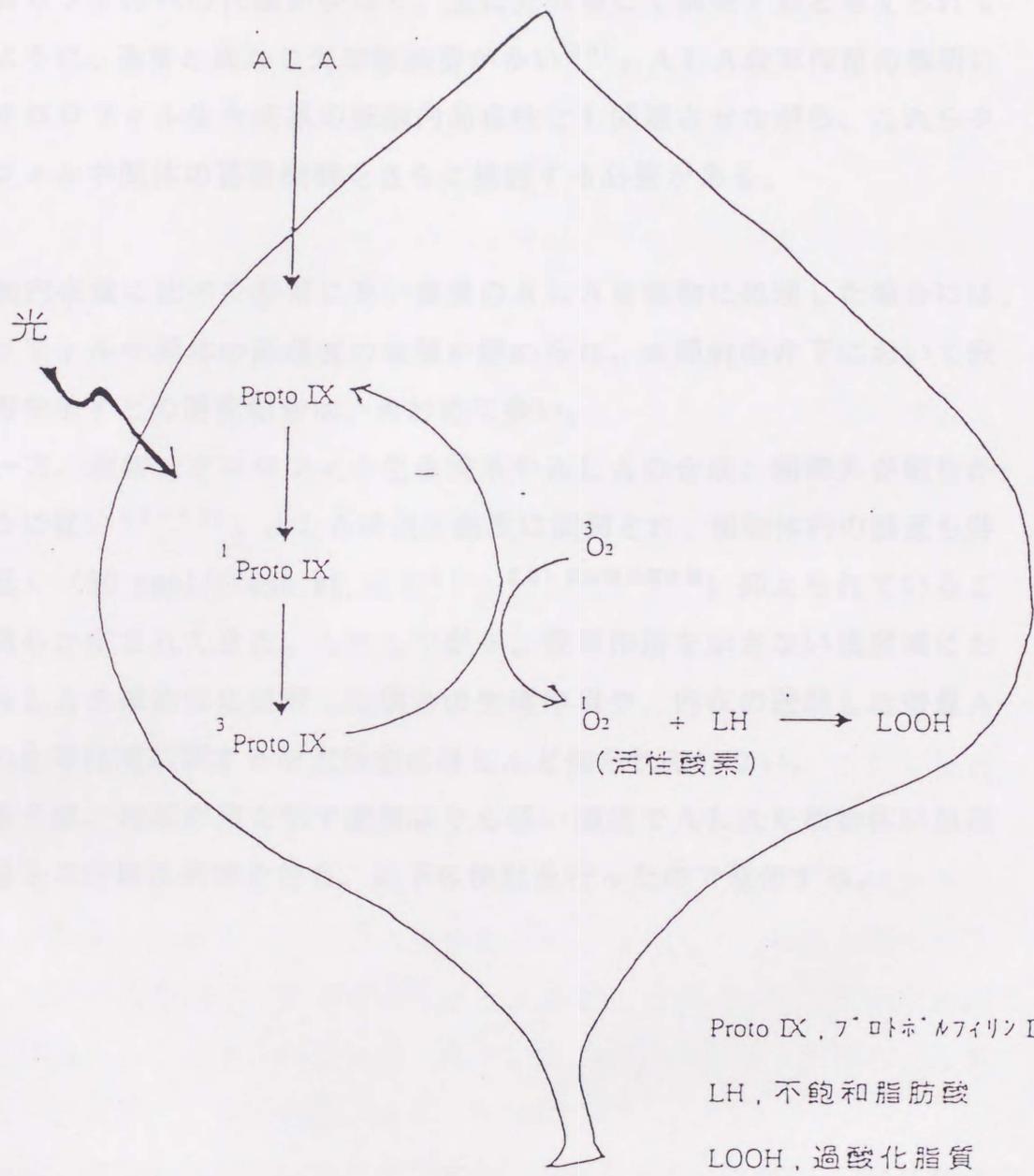


図 1. 7 光要求型除草剤の作用機構 (一重項酸素の発生と酸化反応)

阻害しないと考えられており、3. 1項に記した除草剤の殺草機作とALAの作用機構は必ずしも同一ではないとされている。高濃度ALAの処理による植物中でのクロロフィル中間体の異常蓄積に関しては、現象としては明らかであるが十分に解明されていない。クロロフィル中間体の蓄積物はクロロフィルへの代謝が少なく、主に光分解にて消失すると考えられているように、通常と異なり光非転換型が多い⁵⁰⁾。ALA殺草作用の解明には、クロロフィル生合成系の細胞内局在性とも関連させながら、これらクロロフィル中間体の蓄積機構をさらに検討する必要がある。

植物内在量に比べて非常に高い濃度のALAを植物に処理した場合には、クロロフィル中間体の高濃度の蓄積が認められ、光照射条件下において殺草作用を示すとの研究報告は、きわめて多い。

一方、近年、クロロフィル生合成系やALAの合成、制御系が明らかになるに従い³⁴⁻⁴³⁾、ALAは通常厳密に制御され、植物体内の濃度も非常に低く(50 nmol/fresh wt. 以下⁵¹⁾、⁵²⁾及び著者測定値)抑えられていることも明らかにされてきた。しかしながら、殺草作用を示さない濃度域においてALAを植物体に処理した場合の生理作用や、内在の遊離した微量ALAの生理作用に関する研究報告はほとんど知られていない。

著者らは、殺草作用を示す濃度よりも低い濃度でALAを植物体に処理した場合の作用に興味を持ち、以下の検討を行ったので報告する。

第2章 植物における5-アミノレブリン酸の基礎生理活性

第1節 緒言

5-アミノレブリン酸 (ALA) は、クロロフィルやヘムのようなテトラピロール化合物の生合成系における鍵前駆体である。植物中でALAは、グルタミン酸からグルタミル-tRNA 中間体を經由し、ATP、NADPH をコファクターとして要求する3段階の反応により合成される⁵³⁻⁵⁵⁾。また、正常な植物中のALA濃度は、非常に低い濃度 (50 nmol/g fresh wt. 以下) に保たれている。

また、クロロフィル生合成は、第一律速としてALAが生成する段階で制御されていると考えられている³⁹⁾。

ALAを外生的に植物に処理する研究はGranickら(1959)に始まり⁴⁴⁾、初期の研究ではALA処理によりプロトクロロフィライド、プロトポルフィリン IX等のクロロフィル生合成中間体を異常蓄積することや、黄化葉のグリーニングを早めることが報告されている^{44)、45)、56-58)}。しかしながら、これらの研究の大部分は、内在のALA量に比べて高い濃度、より具体的には840 ppm (5 mM) 以上に濃度にて研究されている。

その後、3,000-5,000 ppm の濃度のALAで茎葉処理した植物を一定の期間暗条件下に置き、その後光照射を行うと、ジフェニルエーテル系除草剤と類似の殺草作用を示すことが報告されている^{46-49)、59)、60)}。植物内在物質であるALAが、殺草作用という植物にとって有害な生理活性を示すことに興味を持たれる。ALAの殺草作用については、植物を暗条件下でALA処理した後に光条件下に置くと、蓄積したクロロフィル中間体が光増感作用により一重項酸素を発生させ、これが処理を行った植物に障害を与える引き金となると推定されている^{48)、49)}。

この他、ALA処理による生育抑制作用も報告されているが、その作用機構については明らかになっていない。

これらの一連の研究は、植物に内在するALA濃度と比べて大過剰のALAを処理した場合の生理作用を検討したものであり、より低い濃度での

A L A の植物に対する生理作用については殆ど報告がない。

本章は、A L A が光合成色素であるクロロフィルの前駆体であり、かつ光合成や呼吸に深く関与するチトクロム類の前駆体でもあることに着目し、殺草作用を示さない濃度域におけるA L A 処理が、植物体に及ぼす作用について、以下の観点から検討を行った。

- 1) クロロフィル生合成と光合成に及ぼす影響
- 2) 幼植物の生育に及ぼす影響
- 3) 低温ストレスに及ぼす影響

第2節 クロロフィル生合成と光合成に及ぼす影響

2.1 はじめに

クロロフィルやヘム蛋白の鍵中間体であるA L A の植物体への処理は、従来、クロロフィル含量よりもプロトクロロフィライド等のクロロフィル生合成中間体を多く蓄積すると報告されてきた。また、その過剰蓄積は、植物に対して光動学的な殺草作用を示すことも第一章で述べた。

一方、Tanaka らは、キュウリ子葉に500 ppm のA L A を処理すると、子葉内のクロロフィルbやLHCII apoproteins の蓄積量が増加したと報告している⁶¹⁾。また、Sasaki らは、藍藻の一種である*Spirulina platensis* において、培地中に500 ppm のA L A を添加することにより藻類の生育が増大すること、クロロフィルやフィコシアニンという色素量の増加ならびに光合成の増大が認められたことを報告している⁶²⁾。これらの報告は、殺草作用を示さない濃度域において、A L A 処理が殺草作用とは異なる生理作用を示す可能性を示唆している。

そこで、イネ、ワサビダイコン、ポトスライム、ハツカダイコン、シバを用いた数種の評価系を用いて、A L A 処理が植物のクロロフィル生合成ならびに光合成に及ぼす影響について検討を行った⁶³⁾。

2. 2 材料および実験方法

2. 2. 1 A L A 処理をしたイネ苗の生育に及ぼす光の影響

イネ苗（品種；アキニシキ）を200倍希釈したベンレートT（活性成分；ベノミル、デュポン社製）にて24時間滅菌した後、蒸留水にて洗浄した。これらの種子はコンテナにて30℃、3日間培養した。発芽した種子は、カッターにて溝を付けたポリエチレンシート上にシート当たり10粒播種した。シートは、A L A 濃度が0.01～3 ppm の各水溶液150 ml を入れた背の高いガラス容器に浮かべた。その後、この種子を光照射量 $67 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件下ならびに暗条件下において、28℃、7日間培養した。実験は各区3反復で行い、培養後に各イネ苗の種子根と幼葉鞘の長さを測定して、平均値を求めた。

2. 2. 2 ワサビダイコン苗状原基の増殖とクロロフィル含有量に及ぼすA L A の作用

ワサビダイコンより誘導した苗状原基約20 g を培地40 ml を含む試験管（直径40 mm、長さ150 mm）に移植した。培地には、1-ナフタレン酢酸（2 ppm）、ベンジルアデニン（0.02 ppm）、シュクロース（3%）ならびに0.01～10 ppm のA L A を含む Linsmaier-Skoog 培地を用いた。苗状原基は明条件16時間、光照射量 $80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ のサイクルにて25℃、4週間培養した。なお、培地は2週間目に交換を行った。培養後の苗状原基新鮮重を測定したのち、約20 g を採取して海砂にて微細にすりつぶした。これにアセトン/水（85：15）の溶媒を加えてクロロフィルを抽出した。次に抽出溶液にエチルエーテルを加え、クロロフィルをエチルエーテル層に転溶した。脱水後、660 nm および642.5 nm における吸光度の測定を行った。試料中の全クロロフィル量は次式により算出した。

全クロロフィル量 (mg/g)

$$= \{ \text{吸光度}(660) \times 7.12 + \text{吸光度}(642.5) \times 16.5 \} \times \text{希釈率} / \text{試料量} (\text{g})$$

2. 2. 3 ポトスライムの光合成に及ぼすALAと栄養剤の作用

ポトスライムの葉を葉柄を付けて切り取り、切り口を Murashige-Skoog 培地 (pH 5.5) に浸漬して、グーロスチャンバー内にて発根するまで培養した。発根した葉 (モデル植物) は、それぞれ水、0.0001~10 ppm のALA水溶液、シュクロースおよびホルモンを含まない Murashige-Skoog 培地 (MS)、0.01 ppm のALAを含むMSの各培地を用いてグーロスチャンバー内にて培養した。なお、培地は2週間ごとに交換した。培養条件は、温度27℃、相対湿度70%、光照射時間12時間サイクル、光照射量72 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ を用いた。ポトスライムモデル植物の光合成およびクロロフィル含量は、赤外分析計 (LI-6200型、リコー製) および光学分析計 (SPAD-502型、ミノルタ製) にて2週間ごとに測定した。

2. 2. 4 ハツカダイコンの光合成、暗呼吸、生育に及ぼすALAの作用

元肥として化成肥料 (N/P/K=8:8:8) をN換算でポット (表面積200 cm^2) 当たり0.2 g施した土壌を充填したポットを調製してハツカダイコン (品種: コメット) を播種し、温室内 (15-20℃) にて育てたのち、3-4葉期に、同一サイズの苗がポット当たり6本となるように間引きした。次に、展着剤ネオエステリン (2.6項参照) を2,000倍に希釈したALA濃度30、100 ppmの各水溶液をポット当たり4 ml 茎葉処理して温室内で栽培した。

光合成量および暗呼吸の評価は、ハツカダイコンのポットをグーロスチャンバー (SPB-03型、島津製作所製、27℃、光照射条件930 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 又は暗条件) 内に移し、30分間空気 (流量8L/min) をした後に行った。各試験ポットについて、光合成は光照射条件下でのCO₂吸収量を、暗呼吸は暗条件下でのCO₂放出量を赤外ガス分析計 (IRA-102型、島津製作所製、リファレンスガス及び測定ガス流量 0.5L/min) にて測定した。なお、測定は、処理前、処理2日後、5日後に行った。

また、処理26日後にハツカダイコンの可食部について新鮮重を測定した。

2. 2. 5 コウシュンシバの光合成と呼吸に及ぼすALAの作用

宇都宮大学の芝生圃場にて生育した植付け10年目のコウシュンシバ(*Zoysia matrella* Merr.)のターフを1990年7月1日に切り取り、元肥として化成肥料(ミツイ8-8-8)をN換算10kg/10a施した畑土壌を充填した1/2,500aポットに植栽し、適宜、かん水した。

7月31日に生育のよく揃った6ポットを選び、各ポットをグーロスチャンバー(SP B-03型、島津製作所製、27℃、光照射条件80,000lx又は暗条件)内に移し、30分間空気(流量8L/min)を流した後、光合成量および暗呼吸の評価を行った。各試験ポットについて、光合成および、暗呼吸をハツカダイコンの試験と同様の方法で測定した。

その後、展着剤ネオエステリン[®](クミアイ化学製)1,000倍希釈液を含むALA塩酸塩の100ppm水溶液を3ポットに300L/10aの割合で小型手動噴霧器により茎葉処理した。他の3ポットは、コントロールとして展着剤のみを含む水溶液を同様に散布した。処理1、3、7、14日後に、前述の方法でCO₂の吸収量及び放出量を測定し、それぞれの平均値を得た。

2. 2. 6 材料

実験に用いた植物は、次の通りである。

ハツカダイコン(サカタのタネ)、イネ、ワサビダイコン、ポトスライム(野原種苗)、コウシュンシバ(宇都宮大学の芝生圃場より採取)

試薬類は、次のものを使用した。

5-アミノレブリン酸塩酸塩(ALA·HCl、和光純薬)

ベンレートT(殺菌剤、活性成分；ベノミル、デュポン社製)

ネオエステリン(展着剤、活性成分；非イオン系界面活性剤、クミアイ化学製) 記載外の試薬に関しては、全て試薬特級品を購入し、使用した。

2. 3 結果と考察

A L A 処理が植物の生育に及ぼす影響を評価する目的で、光照射条件および暗条件下におけるイネ発芽種子のフローティング試験を行った。

光照射条件下における発芽種子の伸長試験において、0.01-0.1 ppm の A L A 根部浸漬処理は、種子根および幼葉鞘の伸長を促進する傾向を示した。(図 2. 1 a)。しかしながら、1 ppm 以上の A L A 処理は、生育促進作用が減少し、特に種子根の伸長は明らかに無処理区と比べ抑制された。

一方、暗条件下の試験においては、3 ppm の A L A 濃度域まで幼葉鞘の伸長は、やや抑制傾向を示すものの殆ど A L A 処理の影響が認められなかった。種子根の伸長に関しては、A L A 処理は全ての濃度域で抑制作用を示した(図 2. 1 b)。これらの結果は、A L A 処理が植物の生育に影響を及ぼすこと、種子根および幼葉鞘の伸長促進には光照射が関与すること、光存在条件下での伸長促進には適切な A L A 濃度域が存在することを示唆している。A L A がクロロフィルの前駆体であることや A L A の生合成が光によって制御されている^{37)、38)、64)}ことから、植物に対する A L A 処理の作用が光照射の有無により異なるという現象は、非常に興味深い結果である。

A L A の光存在下における生育促進という現象を解明する方法として、A L A を添加した培地によるワサビダイコン苗状原基の培養を行った。本試験では、クロロフィル生合成および苗状原基の増殖に対する A L A の添加効果を定量化することを試みた。

A L A を添加した試験区の苗状原基は、培養期間中に無添加区に比べて濃い緑色を呈する傾向を示した。培養4週間後の苗状原基の増殖量とクロロフィル濃度および全含量を表 2. 1 に示す。クロロフィル濃度に対する A L A の添加効果は、比較的高濃度の 0.1-1.0 ppm の試験区でその増加が観察されたが、低濃度域である 0.01-0.03 ppm の試験区では認められなかった。

苗状原基の新鮮重は 0.01 ppm の A L A 添加区で増加し、A L A 処理濃

度が高くなるにつれてその効果が減少し、0.1 ppm 添加区より高い濃度試験区では徐々に生育抑制を示した。

全クロロフィル含量（クロロフィル濃度×新鮮重）は、クロロフィル濃度の増加が認められなかった0.01 ppm 添加区において、明らかな増加を示した。

ALA 添加効果は、全クロロフィル量、クロロフィル濃度、増殖量に対して比例しない結果が得られた。各試験区に添加したALA量を考慮すると、ALAが前駆体としてクロロフィルに全て変換されたという単純な解釈では、表2.1の結果を説明することはできなかった。ALAが植物に及ぼす作用は、増殖とクロロフィル生合成の調節において必ずしも一致しない形で作用することが示唆される。

ウキクサのクロロフィル濃度および増殖に及ぼすALAの添加効果について、他の試験機関において追試的な検討がなされている。その結果も、ALAはクロロフィル濃度を上昇し増殖を促進するが、それぞれの至適添加濃度は異なるとしている⁶⁵⁾。

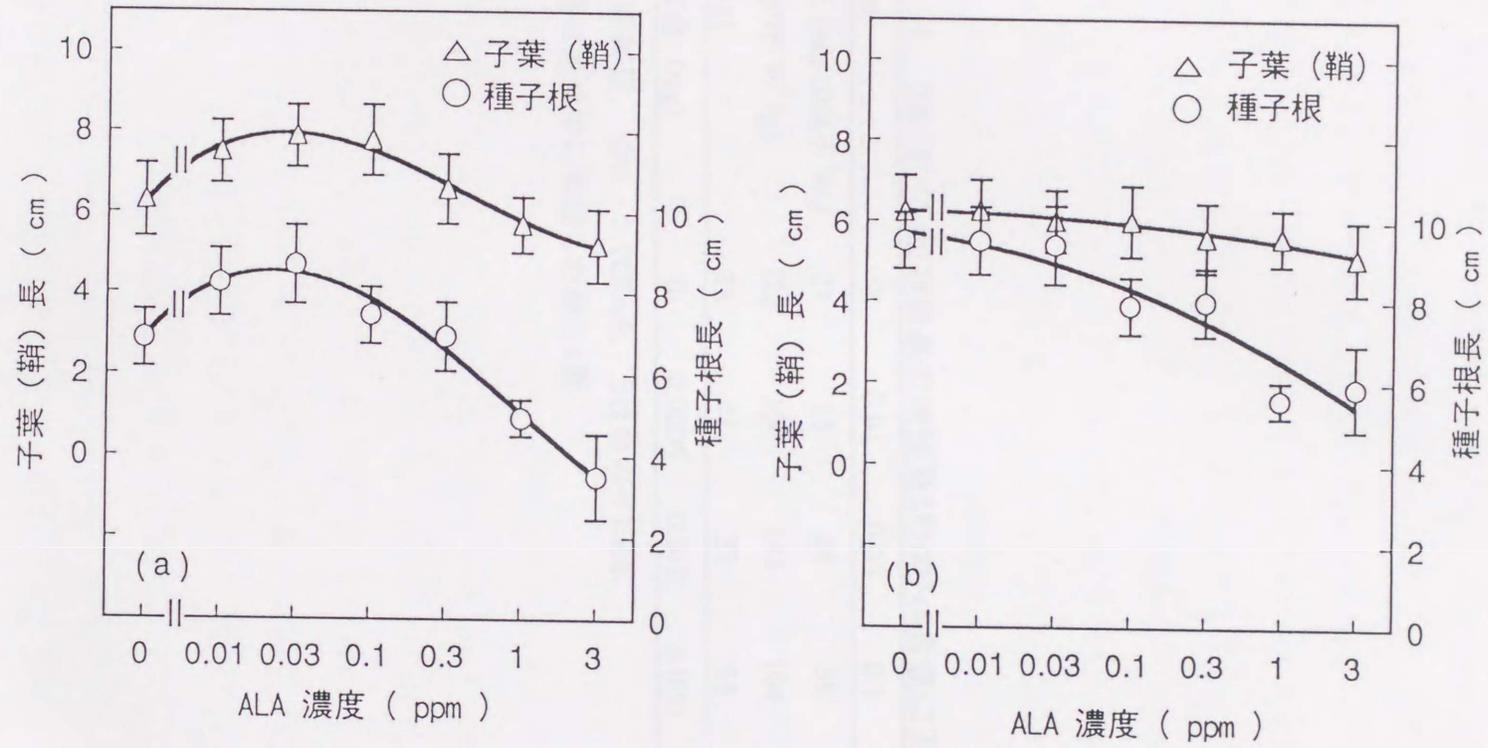


図 2. 1 光照射条件 ($67 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, a) 及び暗条件 (b) での、種子根伸長試験における種子根長及び子葉の生育に及ぼす ALA の効果

30 個体の平均値、バーは標準偏差

表 2. 1 ワビダイコン苗状原基の増殖及びクロフィル含量に及ぼすALAの効果

ALA (ppm)	0	0.01	0.03	0.1	1	10
Chl. 濃度. (mg/100g F. W.)	27	25	26	35	34	29
苗状原基のF. W. (g)	128	164	143	104	98	92
全 Chl (mg)	35	41	37	36	33	27
ALA 添加量 (mg)	0	0.0006	0.018	0.006	0.06	0.6

F. W. : 新鮮重. Chl. : クロフィル. 3反復の平均値.

ALA添加量は培地中に添加した総ALA量

次に、ALA処理を行った植物におけるクロロフィル含量と光合成の関係について、ポトスライムを用いて検討を行った。0.0001-1 ppm濃度のALA水溶液を用いた栽培2週間後の結果を図2.2に示す。ALA無添加の水溶液区では、栽培2週間後においてクロロフィル含量(Chl)ならびに最大光合成速度(Pmax)は、ほとんど変化しなかった。一方、0.0001-0.1 ppm濃度のALA水溶液では、2週間後において無処理区よりもクロロフィル濃度が9-15%増加した。最大光合成速度(Pmax)は、クロロフィル濃度が増加しているにもかかわらず、無処理区の80-90%という値を示した(図2.2)。この現象は、ワサビダイコン苗状原基という組織において観察されたALA添加によるクロロフィル生合成の促進という現象と一致する。しかしながら、ALA添加によりクロロフィル濃度の上昇が観察されても、最大光合成速度(Pmax)は上昇せず、むしろ低下する傾向を示している。即ち、ALAの添加効果は、クロロフィル濃度と光合成に対して異なる挙動を示すことが示唆された。

ポトスライムのクロロフィル濃度および最大光合成速度(Pmax)の経時変化について、水、Murashige-Skoog培地(MS、ホルモンとショ糖無添加)、MS(ホルモンとショ糖無添加)培地+0.01 ppmALAの3種の培地を用いて評価した結果を図2.3a、bに示す。水を用いた場合、6週間の間にクロロフィル濃度はほとんど変化せず、最大光合成速度(Pmax)は徐々に減少した。一方、MS(ホルモンとショ糖無添加)培地+0.01 ppmALAの場合には、6週間後までクロロフィル濃度および最大光合成速度(Pmax)は徐々に増加した。培養6週間後において、クロロフィル濃度および最大光合成速度(Pmax)は実験開始時の値に対して、それぞれ約40%および約80%増加している。クロロフィル濃度および最大光合成速度(Pmax)は、MS(ホルモンとショ糖無添加)培地においても上昇しているが、ALAを添加したMS(ホルモンとショ糖無添加)培地ではより大きな値が得られた。

キュウリの光化学系IIの活性を3,350 ppm(20 mM)濃度のALA

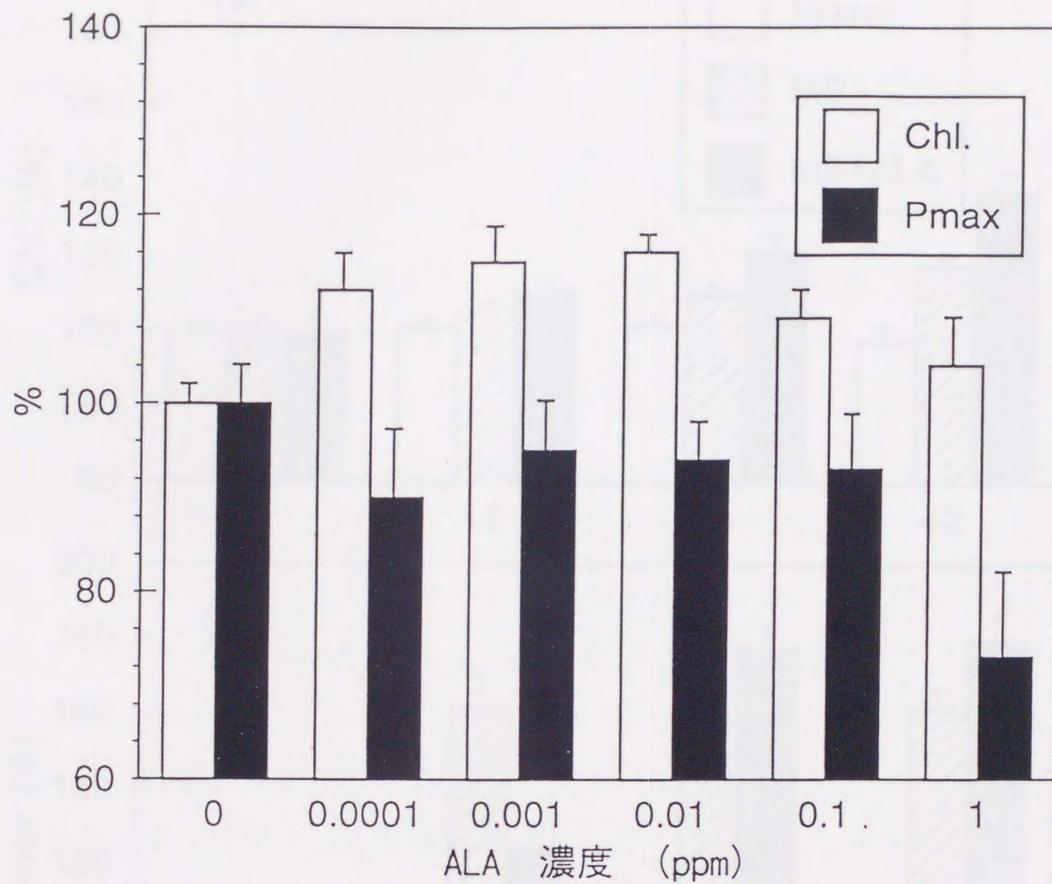


図 2. 2 ポトモデル植物のクロロフィル量 (Chl.) と最大光合成速度 (Pmax) に及ぼすALAの効果 (培養2週間後)

5個体の平均値、バーは標準偏差
コントロール (水) に対する相対値 (%)

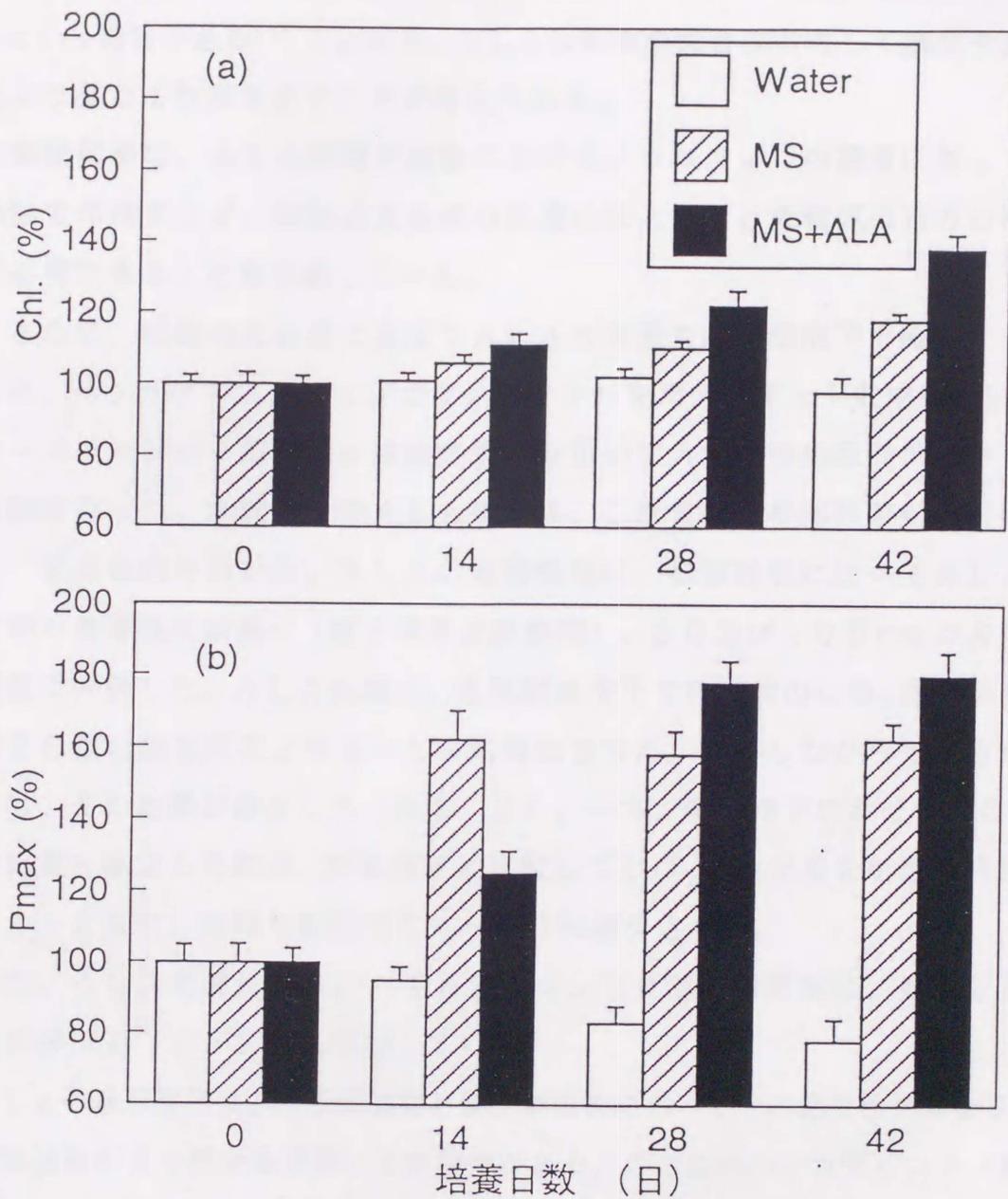


図 2.3 ポトモデル植物のクロロフィル量 (Chl. a) と最大光合成速度 (Pmax, b) に及ぼす培地組成とALAの影響

培地 : Water ; 水

MS ; ショ糖及び植物ホルモン抜きMS培地

MS+ALA ; ショ糖及び植物ホルモン抜きMS培地+0.01ppmALA

5個体の平均値、バーは標準偏差

コントロール (水) の初期値に対する相対値 (%)

処理は50%低下させるとの報告や⁴⁹⁾、500ppmのALAを培地添加することにより藍藻の一種である *Spirulina platensis* の光化学系IIの活性が増大するという報告がある⁶²⁾ ことから、ALAは植物の光合成の対して濃度や条件により異なる作用を示すことが考えられる。

本実験結果は、ALA処理が植物におけるクロロフィルの蓄積に対しては単独で作用するが、植物の光合成の促進にはALAと栄養源の両方の存在が必要であることを示唆している。

さらに、植物の光合成に及ぼすALAの効果を栽培環境下で確認するために、ハツカダイコンおよびコウシュンシバを用いたポット栽培を行い、グロースチャンバー型の光合成測定装置を用いてALAの処理効果について実験を行った。本試験でのALA処理は、これまでの根部吸収処理ではなく、茎葉処理を用いた。ALAの茎葉処理は、根部吸収に比べてALAの有効な処理濃度は高く（第2章第3節参照）、30及び100ppmのALA濃度で評価した。ALA処理は、光照射条件下での植物のCO₂固定量を処理2日後に無処理区より9-12%増加させた。しかしながら処理5日後には、その効果が減少した（表2.2）。一方、暗条件下におけるCO₂の放出量を測定した結果、無処理区と比較してCO₂の放出量を処理2日後で11-25%、処理5日後で24-30%減少させた。

また、ALA処理により、ハツカダイコン可食部の新鮮重は、処理26日後の評価で19-29%増加していた。

ALAの殺草作用は、単子葉植物と双子葉植物においてその感受性が異なり、双子葉植物がより感受性が高いとの報告がある。このためハツカダイコン（双子葉植物）と同様方法を用いて、単子葉植物であるコウシュンシバの光合成（CO₂の固定量）、ならびに暗呼吸（CO₂の放出量）に及ぼすALAの作用について検討を行った。

コウシュンシバの光照射条件下におけるCO₂吸収量を図2.4に、暗条件下におけるCO₂放出量を図2.5に示す。なお、図中、ALA処理前のコウシュンシバにおける明条件下でのCO₂吸収量、及び暗条件下でのCO₂放出量を

表 2.2 ハツカダイコンの光合成及び暗呼吸活性に及ぼすALAの効果

ALA 濃度 (ppm)	光合成活性 (%)			暗呼吸活性 (%)			処理26日後の 乾物量(D.W.,g)
	0日	2日	5日	0日	2日	5日	
0 (control)	100	112 (100)	114 (100)	100	128 (100)	200 (100)	2.97 (100)
30	---	126 (112)	115 (101)	---	96 (75)	139 (70)	3.83 (129)
100	---	122 (109)	120 (106)	---	114 (89)	153 (76)	3.53 (119)

24個体の平均値

()内はコントロールに対する相対値(%)

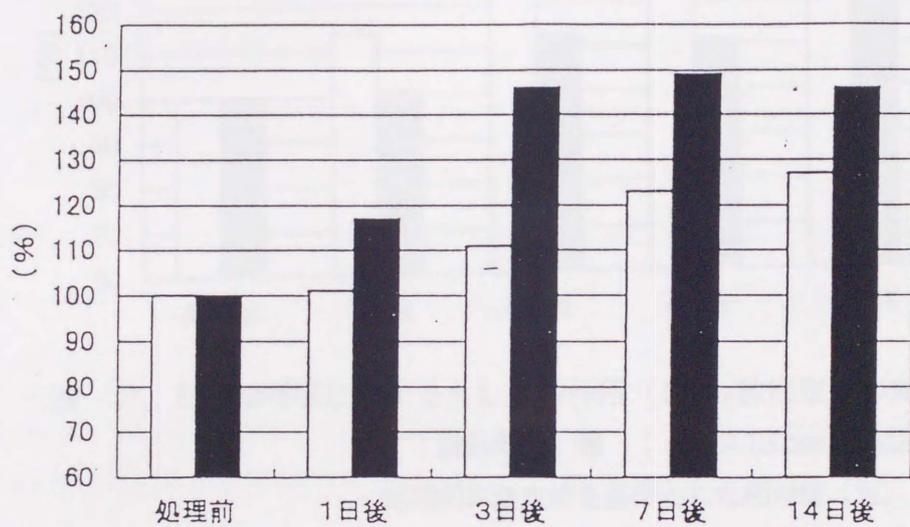


図 2. 4 光合成に対するALAの作用 (CO₂吸収量の変化)
 ; 無処理区、■ ; ALA100ppm 処理区
 処理前の測定値を基準とした相対値 (%)

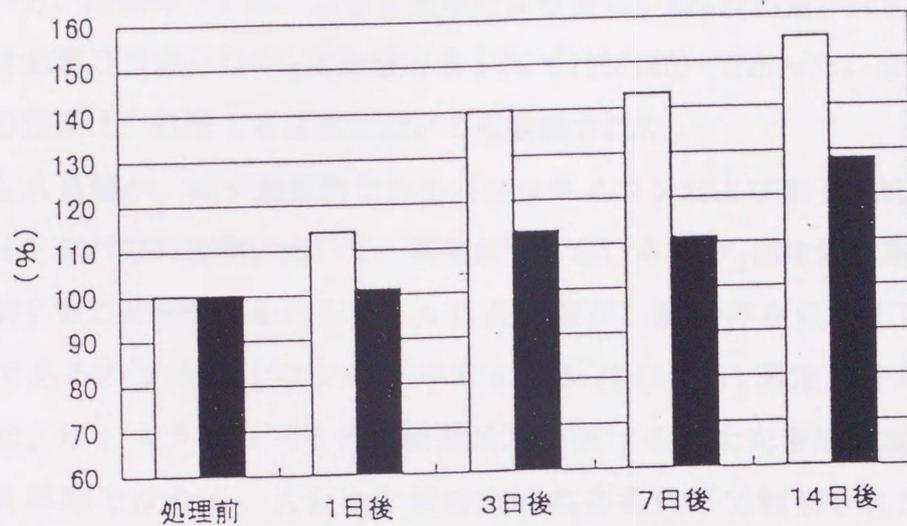


図 2. 5 暗呼吸に対するALAの作用 (CO₂放出収量の変化)
 ; 無処理区、■ ; ALA100ppm 処理区
 処理前の測定値を基準とした相対値 (%)

それぞれ100%として表した。無処理区では、試験期間中のコウシュンシバの生育に伴い経時的に明条件下でのCO₂吸収量、暗条件下でのCO₂放出量が増加している。

ALA処理区は、光照射条件下において無処理区と比較して常にCO₂吸収量が大きく、その効果は処理3日後にCO₂吸収量で132% (146/111)を示した。一方、暗条件下では、ALA処理により常にCO₂放出量が抑制され、その効果は処理3日後にCO₂放出量で81% (113/140)であった。また、ALA処理の効果は、処理14日後においても観察された。

ALA処理が、双子葉植物であるハツカダイコンおよび単子葉植物であるコウシュンシバの両植物において、明条件下におけるCO₂固定能を高め、暗呼吸を抑制することを明らかにした。ALA処理が、肥料存在条件下において実植物であるハツカダイコンやコウシュンシバのCO₂固定量を増加させる結果は、ポトスライム（モデル植物系）における最大光合成速度の上昇が、ALA単独ではなく、ALAと栄養源の共存条件下で観察されたことと良く一致する。

栄養源の関与に関しては、植物組織を用いた実験においてALAが硝酸還元酵素の活性を高めるとの報告がある⁶⁶⁾。植物の窒素取り込み速度が硝酸態窒素の還元プロセスにより制御されていることを考えれば、興味深い報告である。著者らもALAが生育促進作用を示す条件下において、生育促進と共に植物中の窒素含量の増大を確認している（第3章）⁶⁷⁾。ALAが植物に及ぼす成長促進作用の要因の1つとして、ALA自体が、肥料の吸収効率を高めることによる光合成の上昇が考えられる。

ALA処理が、暗条件下において暗呼吸を抑制する現象については、これまでに呼吸系に関する研究事例が殆ど無く、良く理解できない。ALAは、処理濃度の違いにより殺草作用とは異なる作用を示すことを明らかにしたが、クロレラや高等植物において、 μM オーダーのヘムがALA合成を阻害することや^{36)、68)、69)}、ALA自体が呼吸に関与するヘム酵素の前駆体であることを考えると、ALAによる植物の呼吸抑制に関してはさら

に検討すべき興味ある課題である。

また、植物のクロロフィルや光合成に対して促進作用が報告されている物質としてサイトカイニンがある。ALAは、植物中でグルタミン酸からグルタミル-tRNA 中間体を経由し、ATP、NADPH をコファクターとして要求する3段階の反応により合成される⁵³⁾、⁵⁴⁾が、最近の研究によれば、サイトカイニン的一种であるベンジルアデニンの作用点の1つがALA生合成段階の促進作用であり⁷⁰⁾、ベンジルアデニンの効果が光により増加すると報告されている⁴¹⁻⁴³⁾。植物内におけるサイトカイニンの作用が十分に解明されていない中で、その作用点であるALAが単なるクロロフィル前駆体ではなく様々な生理作用を持つことを明らかにしたことは、サイトカイニンの作用を解析していく上でも大変意義深いと考えられる。

さらに、植物組織においてサイトカイニン処理が呼吸抑制作用を示すという報告は⁷¹⁾、⁷²⁾、ALA処理による暗呼吸抑制との関連からも興味深い。

2. 3 まとめ

数種の評価方法を用いて、ALAが植物に及ぼす作用を検討した。その結果、ALAが植物において単に生合成中間体と存在するだけでなく、植物のクロロフィル合成、光合成、暗呼吸、及び生育に対して生理活性を示すことを明らかにした。また、適切なALAの処理はこれらの作用を増大させるが、過剰処理は、その作用を減少させた。

1) 植物に対するALA処理は、光存在下の特定の濃度域で植物の成長を促進した。一方、暗条件下では、植物の成長を促進する濃度域が認められなかった。

2) 植物の組織培養における培地へのALA添加は、クロロフィル生合成及び増殖量に影響を与えた。これは、ALAが単にクロロフィルの前駆体ではなく、多様な生理作用を示すことを示唆した。また、ALAの作用は、クロロフィル濃度と増殖促進に対して異なる至適濃度が存在すると考えられた。

3) ALAは、クロロフィル生合成を単独で促進する作用を示した。光合成の増大はALA単独処理では観察されず、光と栄養の存在する条件でのALA処理により見出された。

4) 双子葉、単子葉植物にかかわらず、ALA処理は肥料存在条件下での植物の光合成能力を高めた。また、暗条件下では暗呼吸の抑制作用が観察された。

ALA処理後の作用期間がハツカダイコンとシバで異なる結果を示した点に関しては、植物種間の差か、試験上の差であるかをさらに検討する必要がある。

5) ALAの植物に対する成長促進作用は、光合成の促進と暗呼吸の抑制による同化産物の蓄積量の増大によることが示唆された。

6) 植物に対するALAの根部浸漬処理及び茎葉処理が類似の生理作用を示すことは、ALAの成長促進作用を実際の植物栽培や農業に広く応用できる可能性を示唆した。

第3節 幼植物の生育に及ぼす影響

3. 1 はじめに

正常な植物中のALA濃度は、非常に低い濃度に保たれている。

ALAは、クロロフィル、ヘム、ビタミンB₁₂等の多様なテトラピロール化合物群の重要かつ共通の生合成中間体であるが、その生理作用に関しては植物内在量に比べて高い濃度で処理した場合の殺草作用が研究されているだけであった。今回、殺草作用を示す濃度よりも低い濃度域におけるALAの生理作用を検討した結果、ALAは単なる生合成中間体としての役割だけでなく、クロロフィル生合成、光合成、暗呼吸等に対して生理作用を示すことを明らかにした。また、光と栄養源が存在する特定の処理条件下では殺草作用とは全く逆の成長促進作用を示すことも見出した。

本節では、ALAの持つ新規な生理作用、特に成長促進という生理活性に関して詳細な検討を行った。即ち、イネやハツカダイコン、トウモロコシ等の幼苗を用い、初期生育を指標としてALAの生育促進作用に及ぼす処理方法や処理濃度の影響について検討を行った⁷³⁾。

また、ALAが植物をはじめとして生物界に広く存在する天然物質であることから、土壌中における安定性についても検討した。

3. 2 材料及び実験方法

3. 2. 1 イネ幼苗を用いた処理方法と処理濃度の検討

3. 2. 1. 1 根部浸漬処理濃度の検討

育苗箱で育てた3. 5葉期のイネ幼苗（品種；アキニシキ、草丈約12 cm）の根を、ALA濃度0、0. 01、0. 1、1、10、100 ppmの各水溶液に12時間浸漬処理した。処理後のイネ苗を、水田土壌を充填した1/2000 aのポットに2本4株植えで各処理区4反復にて移植し、水深2 cmとして温室内（20～30℃）にて通常の栽培管理を行った。移植18日後に水洗し、草丈及び全乾燥重量を測定した。

3. 2. 1. 2 土壌処理濃度の検討

育苗箱で育てた3. 5葉期のイネ幼苗（品種；アキニシキ、草丈約12 cm）を上記と同様に調製した試験ポットに、2本4株植えとした。移植1日後にALAを10 a当たり0、10、30及び100 gを土壌表面に処理し、その後水深2 cmとして温室内（20～30℃）にて通常管理を行った。移植17日後に水洗し、草丈及び全乾燥重量を測定した。

3. 2. 1. 3 茎葉処理濃度の検討

育苗箱で育てた3. 3葉期のイネ幼苗（品種；アキニシキ、草丈約10 cm）を上記と同様に調製した試験ポットに、2本4株植えとした。移植1日後に展着剤ネオエステリン（クミアイ化学社製）を2,000倍希釈にて添加したALA濃度0、10、30、100及び300 ppmの各水溶液をポット当たり4 ml 茎葉に噴霧した。その後水深2 cmにて温室内（20～30℃）にて通常管理を行った。移植21日後に水洗し、草丈、全乾燥重量及び分けつ数を測定した。

3. 2. 2 植物種とALA茎葉処理濃度の検討

元肥として化成肥料（ミツイ 8-8-8）をN換算で10 kg/10 aを施した

畑土壌を充填した 1/5000 a の試験ポットを調製した、ハツカダイコン（コメット，サカタ）種子、トウモロコシ（ハニーバントムスイートコーン，サカタ）種子、及びインゲンマメ（アーロン，サカタ）種子 10 粒を個別に試験ポットへ播種した。温室内で栽培し、本葉 3、5 葉期（ハツカダイコン，トウモロコシ）及び第一複葉期（インゲンマメ）に 1 ポット当たり 4 個体を残し他を間引きした。これに各区 4 反復として、展着剤ネオエステリンを 2,000 倍希釈にて添加した A L A 濃度 0、1 又は 3、10、30、100、300 ppm の各水溶液をポット当たり 2 ml 茎葉に噴霧した。通常管理を行った後、ハツカダイコン（処理 22 日後）、トウモロコシ（処理 12 日後）、インゲンマメ（処理 12 日後）をそれぞれ収穫し、各植物体を水洗した後に、可食部乾物重（ハツカダイコン）、草丈、地上部乾物重（トウモロコシ）、及び根の乾物重、地上部新鮮重、葉数（インゲンマメ）について測定した。

3. 2. 3 A L A 茎葉処理後の生育経時変化の検討

元肥として化成肥料（ミツイ 8-8-8）を N 換算で 10 kg/10 a を施した培養土（メトロミックス 350）を充填した 1/5000 a の試験ポットにハツカダイコン（コメット，サカタ）種子 10 粒を播種した。温室内で栽培し、本葉 2 葉期に 1 ポット当たり 4 個体を残し他を間引きした。各区 7 反復で試験区を設定し、展着剤ネオエステリンを 2,000 倍希釈にて添加した A L A 濃度 100 ppm の水溶液をポット当たり 2 ml 茎葉に噴霧した。通常管理を行い処理 1 週間、2 週間及び 3 週間後に収穫した。各植物体は水洗し、地上部重量、地下部重量及び全重量を測定した。

3. 2. 4 土壌中における A L A の生分解性の検討

120℃、1 時間蒸気滅菌した畑土壌ならびに非滅菌土壌 30 g を 100 ml 三角フラスコ 8 個に採取し、各フラスコに 840 ppm の A L A 水溶液 30 ml を加えた。これを混合攪拌して A L A を土壌吸着させたのちにシリ

コ栓にて蓋をし、各フラスコを恒温槽内で30℃に保温した。ALA添加後0、1、2、3及び4日後に各フラスコに蒸留水120mlを加え、振とう機で1時間抽出したのち、遠心分離を行い上清液をサンプルとした。水抽出液に含まれるALAの定量は、佐々木らの方法⁷⁴⁾に従いエーリッヒ比色法で測定し、各2サンプルの平均値を回収ALA量とした。

3. 3 実験結果

3. 3. 1 イネ幼苗の初期生育

A L A が植物の初期生育に与える効果を明らかにするために、イネ苗に対するA L Aの根部浸漬処理、土壌処理、茎葉処理を行った。

根部浸漬処理の結果を図2. 6に示す。また、根部浸漬処理、土壌処理、茎葉処理という処理方法の違いによるA L A効果の比較を表2. 3に示す。

根部浸漬処理では、A L A濃度が0. 01 ppmという極めて低い濃度から乾物重量の増加が認められ、0. 01～10 ppm試験区において乾物重量の増加が観察された。一方、草丈はやや増加する傾向を示すものの殆ど差が認められなかった。その最適濃度は0. 1 ppmであり、乾物重量は無処理区の114%を示した。また、10 ppm処理区ではその効果が減少する傾向を示した。100 ppm処理区では、イネ幼苗は明らかにA L Aにより障害を受け、草丈、乾物重量ともに大きく減少した。A L Aによる植物の生育抑制および障害の発生は、高濃度処理によるこれまでの研究報告と一致する⁷⁵⁾、⁷⁶⁾。

土壌処理では、10～100 g/10aの全試験区で生育促進作用が認められ、100 g/10a施用区において乾物重量152%、草丈121%と最も高い効果を示した。30 g/10a区は、10 g/10a区よりもやや低い値を示しているがこの結果については後に考察する。

茎葉処理においても10～300 ppmの全試験区で生育促進作用が認められた。本評価試験においても適正濃度域が観察され、最も高い効果を示した100 ppm処理区において乾燥重量150%、草丈103%の結果を得た。300 ppm区でも、A L Aの生理活性は認められたがその効果は、100 ppm区に比べ低下する傾向を示した。また、分けつ数は、無処理区に比べて増加した。

イネ幼苗へのA L Aの処理は、根部浸漬処理、土壌処理、茎葉処理のいずれにおいても生育を促進する結果を得た。適正な処理濃度は処理方法により異なり、おのおの0. 1～1 ppm、100 g/10a、30～100 ppm

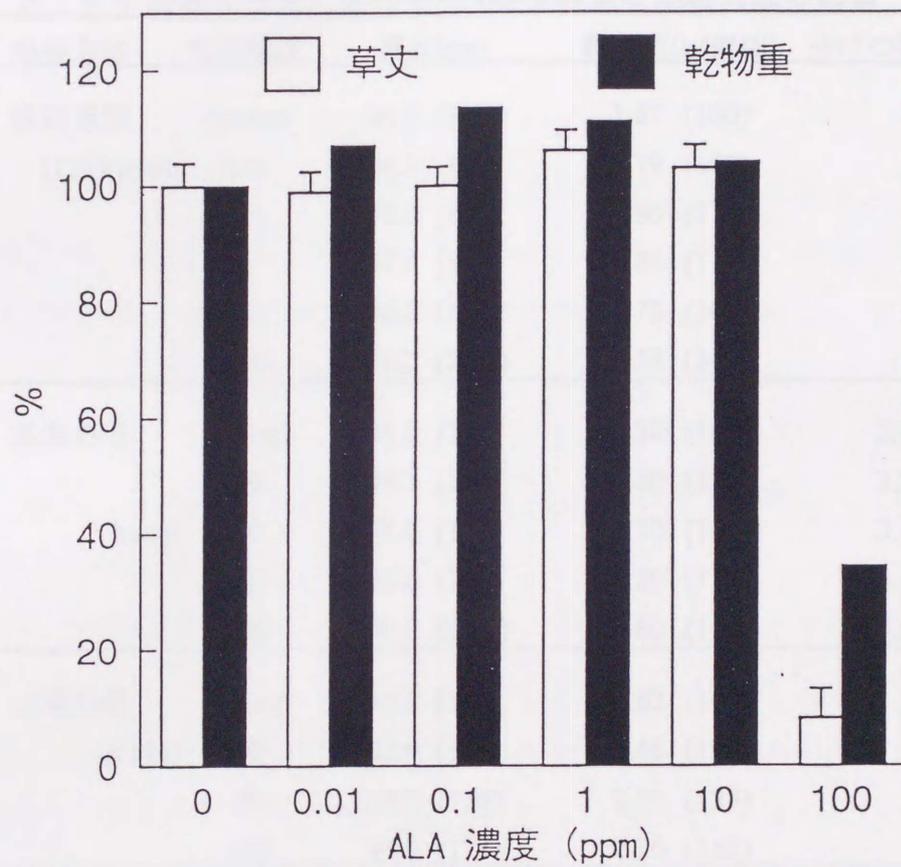


図 2. 6 イネ苗の生育に及ぼすALA濃度の影響
 (根部浸漬12時間処理)
 32個体の平均値、バーは標準偏差
 コントロール(水)に対する相対値(%)

表 2. 3 イネ幼苗の生育におけるALA処理濃度と処理方法の影響

実験	処理方法	処理濃度	草丈(cm)	乾物重(g/個体)	分けつ数(本/個体)
1	根部浸漬 (12h)(ppm)	control	35.2 (100)	1.67 (100)	
		0.01	34.8 (99)	1.79 (107)	
		0.1	35.0 (100)	1.90 (114)	
		1	37.1 (106)	1.84 (111)	
		10	36.2 (103)	1.73 (104)	
		100	8.2 (23.3)	0.58 (34.4)	
2	茎葉処理 (ppm)	control	49.3 (100)	12.20 (100)	2.9 (100)
		10	49.3 (100)	14.80 (121)	3.2 (110)
		30	51.0 (103)	17.30 (142)	3.4 (117)
		100	50.6 (103)	18.20 (150)	3.4 (117)
		300	49.9 (99.6)	13.60 (111)	3.0 (103)
		3	土壌処理 (g/10a)	control	34.2 (100)
10	38.6 (113)			2.46 (135)	
30	39.7 (116)			2.33 (128)	
100	41.5 (121)			2.76 (152)	

32個体の平均値

()内はコントロールに対する相対値(%)

であった。また、ALAによる生育促進作用が認められる試験区においては、草丈の増加よりも乾物重量が増加する結果を得ており、目視観察を含めて徒長を伴う生育は観察されなかった。

一方、根部浸漬処理100 ppm区のように過剰量のALA処理は、イネ幼苗の生育に対しても従来から報告されている高濃度処理と同様に明らかな生育抑制を示した。

3. 3. 2 ハツカダイコンの初期生育

ハツカダイコンの生育に対する茎葉処理濃度の検討結果を表2. 4に示す。本試験では、全ての試験区において可食部の乾物重量の増加が認められた。その増加傾向はイネ幼苗の茎葉処理の場合と極めて類似しており、30～100 ppm処理区で増加率が高く、300 ppm処理区ではやや低い値を示した。

さらに、適正濃度と考えられた100 ppm濃度での茎葉処理について、ALA処理後の生育の経時変化について検討した(図2. 7)。ALAの処理1週間後には全体重で113% (8. 29/7. 23)と生育量の増加が認められたが、地上部重115%、地下部重109%と地上部重の生育をより促進した。2週間後、3週間後の全重量は無処理区の112～113%であり、1週間後との間に無処理区に対する相対比率は変わらなかった。しかしながら、地上部と地下部の生育比は異なり、処理3週間後は地上部重が無処理区とほとんど差が無いことに対して、可食部重では132%という増加が観察された。

3. 3. 3 トウモロコシの初期生育

トウモロコシの生育に対するALA茎葉処理濃度の検討結果を表2. 5に示す。本試験においても草丈と地上部重量の測定を行ったが、イネ幼苗への茎葉処理の場合と同様の生育傾向を示し、草丈よりも地上部乾物重量が増加する傾向を示した。有効処理濃度の範囲はイネ幼苗の場合と大きな

表 2.4 ハツタアイコンの収量に及ぼすALA濃度の影響

茎葉処理濃度 (ppm)	可食部の乾物重 (g/個体)
control	0.97 (100)
1	1.04 (107)
10	1.17 (121)
30	1.36 (141)
100	1.34 (140)
300	1.26 (131)

16個体の平均値

()内はコントロールに対する相対値(%)

表 2.5 トウモロコシ幼苗の生育に及ぼすALA濃度の影響

濃度 (ppm)	草丈 (cm) (%)	地上部乾物重 (g/個体)(%)
control	43.6 (100)	2.9 (100)
3	43.8 (100)	2.9 (100)
10	47.5 (109)	3.8 (131)
30	45.6 (105)	3.7 (128)
100	45.4 (104)	3.4 (117)
300	46.2 (106)	3.1 (107)

茎葉処理 16個体の平均値

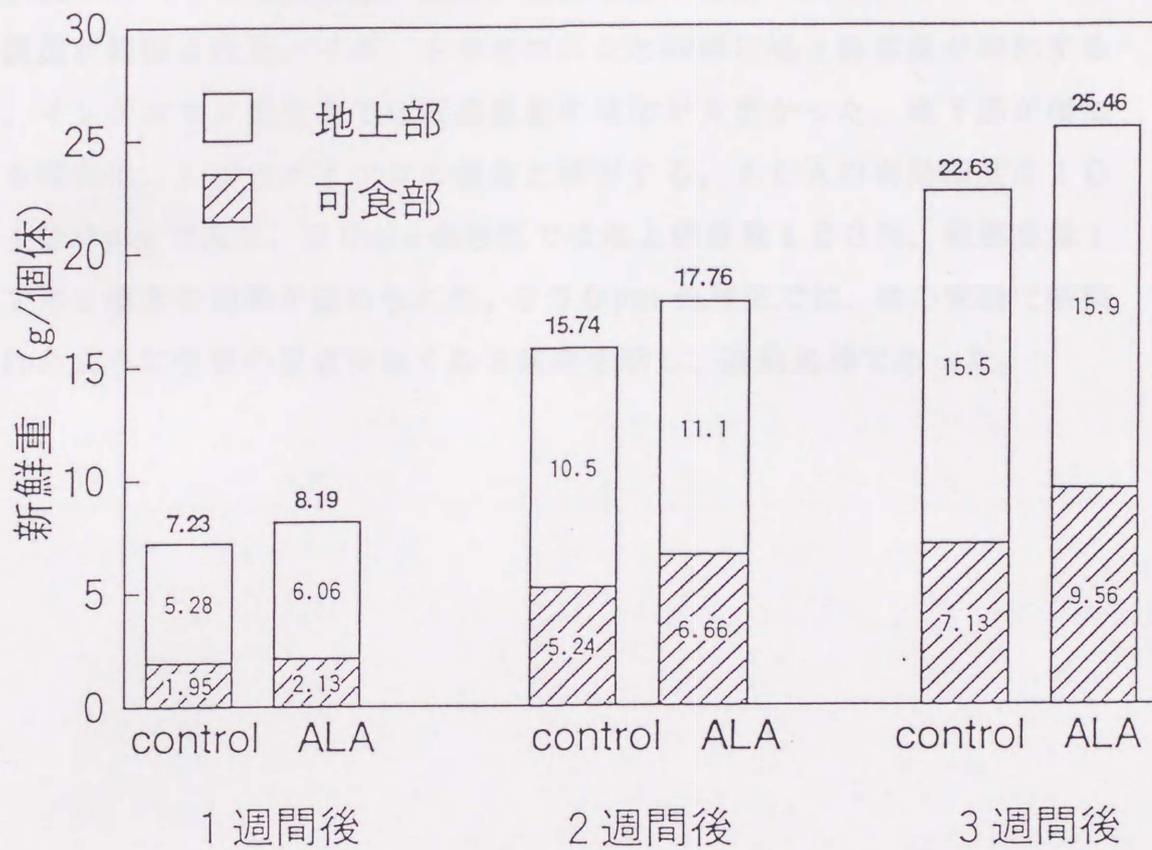


図 2. 7 ALA処理後のハツカダイコン生育量の経時変化
 (茎葉処理 ; ALA 100ppm)
 28個体の平均値

差は認められないが、至適濃度は10～30 ppmとやや低い側にあり、10 ppm 処理区において草丈109%，地上部乾物重量131%と増加した。

3. 3. 4 インゲンマメの初期生育

インゲンマメの生育に対するALA茎葉処理の結果を表2. 6に示す。本試験においても地上部重、葉数、根部重量の全ての測定項目において生育促進が観察された。イネ、トウモロコシと同様に地上部重量が増加するが、インゲンマメの生育では根部重量の増加が大きかった。地下部が増加する傾向は、ハツカダイコンの場合と類似する。ALAの有効濃度は10～100 ppmであり、30 ppm 処理区では地上部重量123%，根部重量197%と最大の効果が認められた。300 ppm 処理区では、他の実験で観察されたように生育の促進少なくなる傾向を示し、過剰処理であった。

表 2.6 インゲンマメ幼苗の生育に及ぼすALA濃度の影響

処理濃度 (ppm)	根の乾物量 (g/ポット) (%)	地上部新鮮重 (g/ポット) (%)	葉数 (枚/個体) (%)
control	3.3 (100)	22.4 (100)	7.3 (100)
3	3.5 (106)	26.8 (120)	7.4 (101)
10	5.0 (151)	26.8 (120)	8.4 (115)
30	6.5 (197)	27.6 (123)	8.3 (114)
100	5.7 (172)	27.4 (122)	8.3 (114)
300	4.8 (145)	24.8 (111)	7.8 (107)

茎葉処理 4ポットの平均値

3. 3. 5 A L Aの土壌中における生分解性の検討

A L A処理による生育評価試験において、A L A処理濃度が増加するに伴い生育促進作用が強く発現し、至適濃度を超えるとその効果が低下する傾向を示した。しかしながら、イネ幼苗土壌処理試験ではA L A濃度に依存しない傾向が認められた。A L Aが天然物質であり微生物分解を受けやすいことから、土壌中におけるA L Aの生分解の可能性について検討した(図2. 8)。

水溶性が非常に高いA L Aを土壌処理直後に水抽出した場合は、約70～80%のA L Aが回収されることから、本実験におけるA L Aの物理的な土壌初期吸着量は25%程度と考えられた。

加熱処理土壌の場合には、A L Aの回収率が緩やかな低下を示し、4日後でも約55%のA L Aが回収された。一方、非滅菌土壌においては、A L Aの回収率は急速に低下し2日後には殆ど回収されなかった。このことからA L Aは土壌中の微生物により速やかに分解・代謝されるものと考えられた。このことは、A L Aが土壌中で速やかに生分解されて土壌に残留せず、環境問題を生じないことを示唆するものであるが、積極的な土壌処理を行う場合のA L Aの使用量については、個別条件において十分な検討が必要となる。

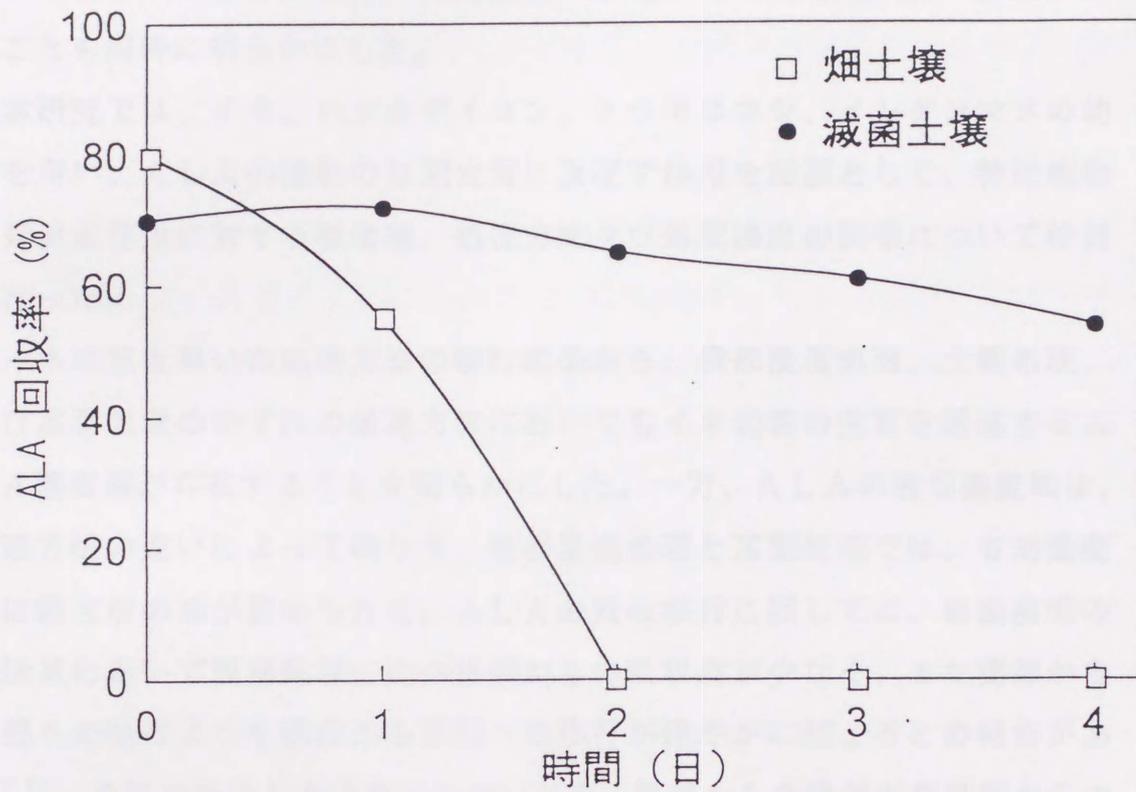


図 2. 8 畑土壤と滅菌土壤中におけるALAの分解速度
初期添加量を基準とした水抽出による回収率

3. 4 考 察

第2節ではALAを植物に処理した場合に、ALAが植物のCO₂固定能力の向上、暗呼吸の抑制、ならびにクロロフィル生合成の活性化等の生理活性を有することや植物成長促進効果を示す可能性を見出した。また、これらの植物成長調節活性が、処理濃度や栄養源の有無等の条件に影響されることも同時に明らかにした。

本研究では、イネ、ハツカダイコン、トウモロコシ、インゲンマメの幼苗を用い、ALAの植物の初期生育に及ぼす作用を指標として、特に植物成長促進作用に対する植物種、処理方法及び処理濃度の影響について検討を行った。

イネ幼苗を用いた処理方法の検討結果から、根部浸漬処理、土壌処理、及び茎葉処理のいずれの処理方法においてもイネ幼苗の生育を促進するALA濃度域が存在することを明らかにした。一方、ALAの有効濃度域は、処理方法の違いによって異なり、根部浸漬処理と茎葉処理では、有効濃度域に数百倍の差が認められた。ALAの吸収移行に関しては、高濃度域の実験系において根部吸収に比べ葉部からの吸収量が少なく、また葉部から根部への移行よりも根部から葉部への移行が速やかに起こるとの報告がある⁷⁷⁾。今回の評価した濃度域においても、根部からの吸収が茎葉部からの吸収に比べ効率的に行われていることが示唆された。

根部からの吸収を前提としたALA土壌処理では、ALAが水溶性の高い低分子化合物であり、土壌吸着性が低い性質を有するにもかかわらず、水溶液からの根部吸収よりも非常に多くのALA量を必要とした。また、イネ幼苗の評価結果にも明確な濃度依存性が認められなかった。この原因としては、栽培試験の誤差以外にALAの土壌中における微生物分解が容易であり、急速な生分解・代謝により消失することが主因であると推定された。

イネ、ハツカダイコン、トウモロコシ、インゲンマメの幼苗を用いた全ての実験系において、適正なALA処理が植物の初期生育を促進する作用

を持つことを明らかにした。同時に、ALAの過剰処理が生育を抑制するという過去の報告と同様の現象を、イネ幼苗の100 ppm 根部浸漬処理において確認した。

ALAの成長促進効果は、イネおよびトウモロコシにおいては、草丈に対する効果よりも乾物重量を増やす作用として強く現れた。ハツカダイコンおよびインゲンマメでは可食部や根部という地下部重量の増加率が地上部に対して大きいという特徴を示した。ALA処理後にハツカダイコンの生育経時変化を調査した結果、処理1週間後は地上部重を含めた全体重にその促進作用が認められ、3週間後には、地上部重に差がなく地下可食部重に生育促進効果が強く認められた。この現象は、シンクソースの関係を考えるとALA処理により光合成が増大し、蓄積した同化産物の転流が生じたことを示唆している。ALA処理による登熟歩合の向上や転流に関しては、第3章において述べる。

ALAの処理が、植物の生育抑制、障害ならびに枯死という植物の生育に対してマイナスの作用を示すという報告は数多い。これらの作用の中で障害や枯死に関しては、プロトポルフィリンIX等のテトラピロール化合物の高蓄積と一重項酸素の発生による細胞障害により説明されている⁴⁸⁾、⁴⁹⁾。また、ALAの殺草活性は、双子葉植物よりも単子葉植物の抵抗性が高い⁴⁶⁾、高いSuperoxide dismutase activityを有する植物の抵抗性が高い⁴⁸⁾、小麦の方がレタスより抵抗性が強い⁷⁸⁾、⁷⁹⁾等の報告があり、植物種に対して選択性を有するとされている。ALA処理による生育抑制については現象面からの報告はあるが、その作用機構は、殺草活性の機作との関連も含めて明確にはなっていない⁷⁵⁾。

初期生育に関する今回の実験では、イネ、トウモロコシ（単子葉植物）及びハツカダイコン、インゲンマメ（双子葉植物）の間にALA処理に対する植物種間の明確な差は認められなかった。ALAによるイネとハツカダイコンの生育促進効果の比較を図2. 9に示すが、適正なALA茎葉処理濃度はいずれも10～100 ppmの範囲にあると考えられる。これらの結果

は、植物に対するALAの作用点や作用機構が、ALAの処理濃度で異なることを示唆する。

ALAの成長促進作用に関する作用機構の詳細は明らかでないが、幼苗生育の特徴の一つに乾物重量の充実が観察されたことから、第2節にて報告したクロロフィル含量の増加や光合成作用の増大による同化産物の増加と、暗呼吸量の低下による同化産物の消費抑制に伴う植物機能の増大が考えられる。また、ALA処理による硝酸還元酵素活性の上昇が報告されており、窒素肥料の吸収効率を高めている可能性も考える必要がある^{66)、67)}。

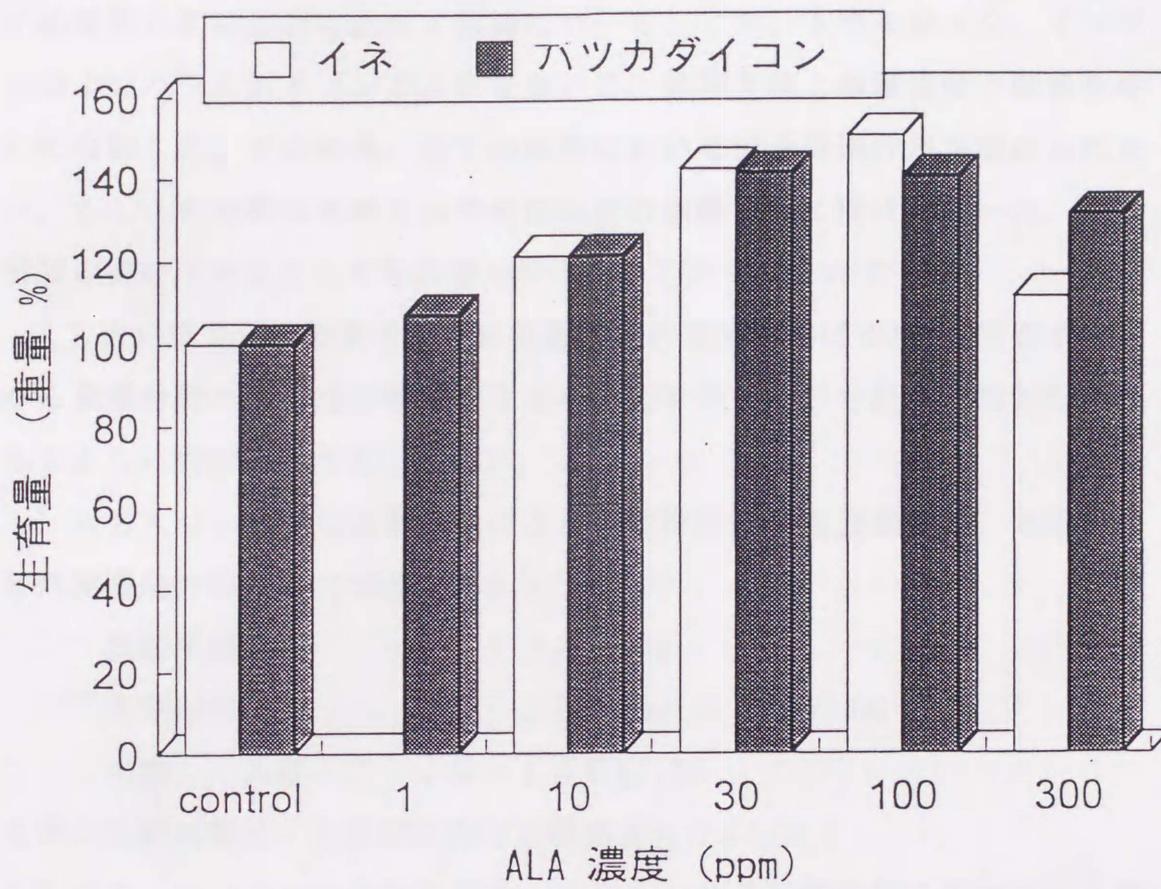


図 2. 9 イネ及びハツカダイコン幼苗に対するALAの成長促進効果の比較
 (イネ茎葉部乾物重とハツカダイコン可食部(地下部)乾物重)

3. 5 まとめ

第2節においてALAが、植物のCO₂固定能力の向上、暗呼吸の抑制、クロロフィル生合成の活性化等の生理活性を有することを明らかにし、その中で植物成長促進効果を示す可能性を見出した。

ALAの成長促進効果とその適正処理方法を明らかにするために、ALAが幼植物の初期生育に及ぼす影響について、イネ、トウモロコシ、インゲンおよびハツカダイコンの幼苗を用いて、処理方法と処理濃度の関係を中心に検討した。その結果、全ての植物において成長促進作用が認められたが、ALAの効果は処理方法や処理濃度の影響を強く受けた。一方、植物種間の違いはあまり大きな影響を受けないことも明らかにした。

ALAの成長促進効果の特徴に乾物重量の充実が挙げられ、健苗育成の面から農業分野への応用が期待できる可能性を示した。今後、実用的な面からもさらに検討を加えていきたい。

1) ALAは、適切な処理方法により幼植物の成長を促進した。処理方法と処理濃度の関係は次の通りであった。

根部浸漬処理	;	0.1 ~ 3 ppm
茎葉散布処理	;	10 ~ 300 ppm (200L/10a)
土壌処理	;	10 ~ 100 g/10a

また、過剰処理は、生育抑制作用が観察された。

2) イネ、トウモロコシ幼苗では、ALAの成長促進効果は草丈よりも乾物重の増加に特徴があった。

3) ハツカダイコン、インゲンマメの幼苗では、可食部又は根部という地下部の生育にALA処理の特徴が見られた。

4) ALAの成長促進作用は、単子葉、双子葉植物種間において類似した結果を示した。ALAの殺草作用が植物種間で異なるという報告とは、挙動が異なった。

5) ALAは、土壌微生物により、速やかに分解される可能性を示した。

第4節 イネ苗の耐冷性の向上効果

4.1 はじめに

植物は低温ストレスにより、種々の生化学的な応答を発現する。イネ、トウモロコシ、ダイズのような低温に感受性の高い植物における典型的な応答の一つは、低温条件においてクロロフィル含量の明らかな減少である⁸⁰⁾。トウモロコシにおいて、Hodginsらは、低温によって引き起こされる障害の一つとして、ALAの生合成が低下することを示している。また、28℃の温度条件で育てたトウモロコシを12℃の条件下におくと、クロロフィル生合成が直ちに障害を受けることも報告している⁸¹⁻⁸³⁾。

第2節では、ALAが植物のCO₂固定能力の向上、暗呼吸の抑制、クロロフィル生合成の活性化等の生理活性を有することを明らかにし、第3節では、ALAの適切な処理は幼苗の成長促進を示すことを明らかにした。

ALAがポルフィリン類の生合成における鍵前駆体であるだけでなく、クロロフィル生合成を促進し植物成長調節作用を有するという新規な知見に基づき、ALA処理がイネ苗の低温抵抗性を向上し、低温障害を低下させる可能性について検討を行った。なお、常温下におけるイネ幼苗の生育に対しては、ALAの茎葉処理、土壌処理ならびに根部浸漬処理のいずれにおいても成長促進効果を示すことを第3節で既に報告している。

また、低温ストレスに対して耐性を付与すると報告されている植物ホルモンとして、アブシジン酸 (ABA) 及びブラシノライド (BR) についてもALAと同時に試験を行い、それぞれの作用について比較・検討を行った⁸⁴⁾。

4. 2 材料および実験方法

4. 2. 1 植物材料

イネ（品種；アキニシキ）の種子を200倍希釈したベンレートT（有効成分；ベノミル、デュポン製）にて24時間処理して滅菌した。その後、これを水洗した。種子はプラスチック容器にて30℃、3日間インキュベートして発芽させた。発芽種子は、水田土壌を充填したポットに播種し、昼間27℃、夜間12℃に管理にて温室内で育苗した。

4. 2. 2 低温処理

3葉期のイネ苗について注意深く土壌を取り除き、洗浄した。その後、イネ苗の根は各試験溶液に24時間浸漬処理した。試験溶液には、水、0.1、1.0及び5.0 ppmのALA水溶液、0.001 ppmのBR水溶液ならびに1.0 ppmのABA水溶液を用いた。各試験溶液で処理した苗は、水田土壌を充填したポット（表面積；400 cm²）に定植した。イネ苗の低温処理は、130 μmol/m²/sの光条件下にて3 ± 1.5℃で2日間または4日間の処理を行った。その後、23 ± 3℃で5日間栽培した。イネ苗の低温障害は、3 ± 1.5℃での処理直後、ならびに23 ± 3℃で5日間栽培した後のリーフローリング（leaf rolling）の比率を目視により評価する方法で判定した。リーフローリング比率は、各葉身別に低温処理前後の巻き葉数を測定することで算出した。

別の実験として、イネ苗の低温処理を5 ± 1.5℃で1日間または5日間行った。また、その後、23 ± 3℃で30日間栽培した。リーフローリングに関しては、低温処理直後に上記の方法で評価した。23 ± 3℃での30日間の栽培によるイネ苗の回復成長は、生存率、苗当たりの葉数、苗地上部の乾燥重量により評価した。

4. 2. 3 低温処理した葉からの電解質の漏出

3葉期のイネ苗の根を上記の各試験水溶液に24時間浸漬した。その後、各イネ苗をポットに定植し、 $3 \pm 1.5^\circ\text{C}$ で1、3及び5日間低温処理を行った。低温処理後に各苗の葉身を1cmの長さに切断し、脱イオン水15mlを入れたプラスチック容器に各葉身の断片を6個入れ、暗条件下、 25°C で4時間ゆっくりと攪拌した。各試験溶液の電気伝導度は、電気伝導度計を用いて測定した。試験は各条件3反復とし、電解質の漏出割合は無処理の苗を -20°C から 25°C にて凍結融解した葉身から得られた電気伝導度を基準値として、それぞれ相対平均値にて算出した。

4. 3 実験結果

4. 3. 1 低温処理直後におけるイネ苗のリーフローリングの割合

イネ苗の低温抵抗性に対するALAの効果は、イネ苗のリーフローリングの割合にて評価した。イネ苗は各試験溶液に24時間浸漬したのち、 $3 \pm 1.5^\circ\text{C}$ で2又は4日間低温処理を行った。0.1または1.0 ppmのALAによる前処理は、低温処理直後の第一葉身のリーフローリング比率を減少させたが、5.0 ppmのALA前処理は、効果を示さなかった(表2.7)。 $3 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 、2日間の低温処理直後におけるイネ苗のリーフローリングの比率は、それぞれコントロールで50.0%、0.1 ppmALA処理で21.7%、1.0 ppmALA処理で23.3%を示した。同様に、4日間の低温処理直後におけるイネ苗のリーフローリングの比率は、それぞれコントロールで56.7%、0.1 ppmALA処理で35.0%、1.0 ppmALA処理で35.0%を示した。しかしながら、ALA処理は、第二、第三葉身のリーフローリングの比率に対しては、効果を示さなかった。

BR処理及びABA処理濃度は、これまでの研究例を参考にしてそれぞれ0.001 ppm及び1.0 ppmを用いた。

0.001 ppmのBR処理も $3 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 、2又は4日間の低温処理直後に第一葉身のリーフローリング比率を減少させた。その値はそれぞれ、15.0%及び31.7%であった。BRによる前処理においても、ALA処理と同様に第二、第三葉身のリーフローリングの比率に対しては、効果を示さなかった。

一方、1.0 ppmのABA処理は、第一、第二葉身のリーフローリングの比率を減少させた。 $3 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 、2日間の低温処理直後の第一、第二葉身での比率は、それぞれ31.7%と78.3%であった。また、4日間の低温処理直後の第一、第二葉身での比率は、それぞれ45.0%と81.7%であった。

低温処理条件を $5 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 、5日間に変更した条件においても、低温処理直後に葉身のリーフローリング比率について検討した。この場合の無処

表 2. 7 イネ苗における低温処理直後のリーフローリング比率

低温処理 (ppm)	3±1.5°C 2日間 リーフローリング(%)		3±1.5°C 4日間 リーフローリング(%)	
	第一葉身	第二葉身	第一葉身	第二葉身
	Control ---	50.0 ± 10.8	100	56.7 ± 8.5
ALA 0.1	21.7 ± 2.4	100	35.0 ± 4.1	100
1.0	23.3 ± 3.5	96.7 ± 4.7	35.0 ± 8.2	100
5.0	46.7 ± 6.2	100	60.0 ± 4.1	100
BR 0.001	15.0 ± 4.1	100	31.7 ± 13.1	100
ABA 1.0	31.7 ± 13.1	78.3 ± 6.2	45.0 ± 7.1	81.7 ± 2.4

32個体の平均値及び標準偏差

理区における第一、第二葉身のリーフローリングの比率は、それぞれ71.4%および96.4%であった。一方、0.1 ppmのALA、1.0 ppmのALAならびに0.001 ppmのBRで前処理した場合は、第一葉身のリーフローリングの比率は、それぞれ53.8%、50.0%及び48.0%と減少し、第二葉身のリーフローリングの比率は、それぞれ88.5%、44.2%及び84.0%と減少した。

4. 3. 2 低温処理後に5日間回復成長を行った後のリーフローリングの比率

イネ苗を各試験水溶液にて前処理を行い、 $3 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ で4日間の低温処理を行った後に、 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ で5日間の栽培を行った。その結果、イネ苗を温かい条件下に移すことにより、イネ苗のリーフローリングの比率は、表2. 7に示した結果よりも減少し、部分的な回復が認められた。すなわち、無処理区では第一葉身のリーフローリングの比率が56.7%から38.5%へ、第二葉身のリーフローリングの比率が100%から81.7%へ減少した。

0.1 ppmのALA、1.0 ppmのALAならびに0.001 ppmのBRで前処理したイネ苗では、第一葉身のリーフローリングの比率は、それぞれ11.7%、25.0%及び18.3%と減少し、第二葉身のリーフローリングの比率は、それぞれ65.0%、60.0%及び71.7%と減少したことから前処理の効果が認められた。しかしながら、5 ppmのALA前処理では、ほとんど効果が認められなかった(表2. 8)。

ABAの前処理による効果は、ALAやBRの効果とは明らかに異なる結果を示した。1 ppmのABAで処理したイネ苗の第一葉身は完全に萎調した。対照的にABA処理した場合は、第二、第三葉身のリーフローリング比率がそれぞれ28.3%及び30.0%に減少した。即ち低温処理に対するABAの効果は、古い葉よりも新しい葉に対してより顕著であった。

4. 3. 3 イネ苗からの電解質の漏出

電解質の漏出は、低温障害の指標として広く使用されている。イネ苗を低温処理する時間に対応して、電解質の漏出量は急速に増加した（図2. 10）。ALAによるイネ苗の前処理は、低温処理後の葉組織からの電解質の漏出を減少させている。しかしながら、電解質の漏出量の減少は、ALAの前処理濃度に依存しなかった。3℃、5日間の低温処理後の試験において、無処理区における電解質の漏出量はイネ苗を凍結融解した場合の59%の値を示した。0.1 ppm、1.0 ppm 及び5.0 ppm にてALAを前処理した場合は、電解質の漏出量がそれぞれ40%、41%及び51%であり、無処理区と比較して組織の傷害が減少する作用を示した。

ALA、BR、ABAにて前処理を行った場合の電解質漏出量の比較を図2. 11に示す。0.001 ppm のBRで処理した場合、電解質の漏出量は、いずれの条件においてもALAと同様の値を示し、3℃、5日間の低温処理後の試験においては44%であった。1.0 ppm のABA処理は、いずれの条件においても電解質の漏出量が最も少なく、3℃、5日間の低温処理後の試験においては24%であった。

4. 3. 4 低温処理後のイネ苗の回復成長

5±1.5℃で1日又は5日間の低温処理を行った後に、23±3℃にて30日間のイネ苗の栽培を行った場合に、その回復成長に及ぼすALA及びBRの前処理効果を評価した（表2. 9）。

5±1.5℃における5日間の低温処理を行ったイネ苗は、1日間の低温処理に比べてより大きな障害を受け、回復成長が遅れる傾向を示した。

低温処理が1日間の場合、1.0 ppm のALA処理を行ったイネ苗は、苗の生存率が90%であり、地上部の乾燥重量が279.9 mgであった。0.1 ppm 処理区では、生存率、葉数に差がないが、地上部の乾燥重量が少なくなった。なお、本条件下における無処理区の苗は、生存率が80%、地上部の乾燥重量が193.0 mgであった。

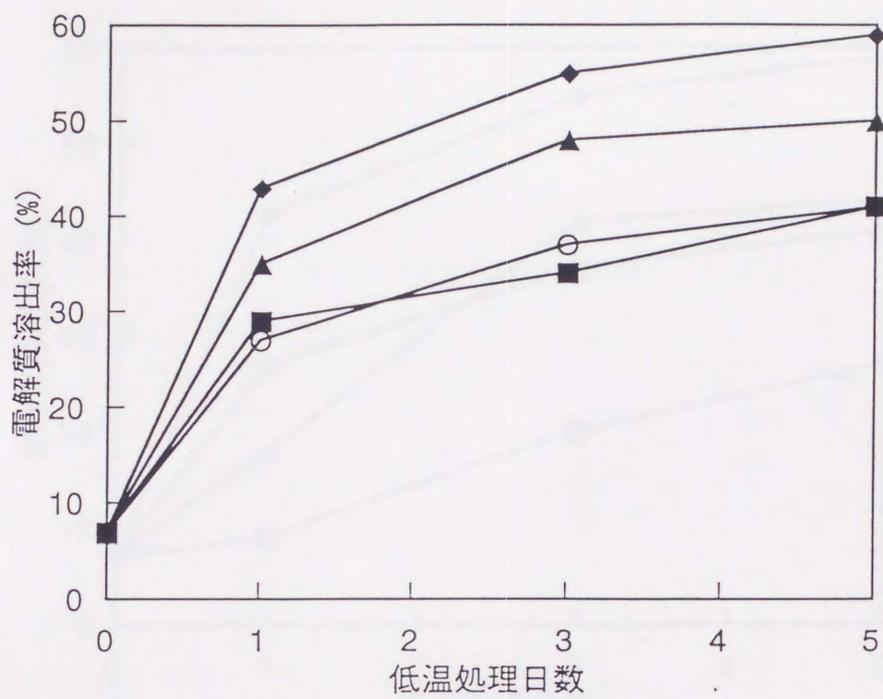


図 2. 10 低温処理後のイネ葉身からの電解質漏出に対するALAの抑制効果

- ◆ ; 水
- ; ALA 0.1 ppm
- ; ALA 1.0 ppm
- ▲ ; ALA 5.0 ppm

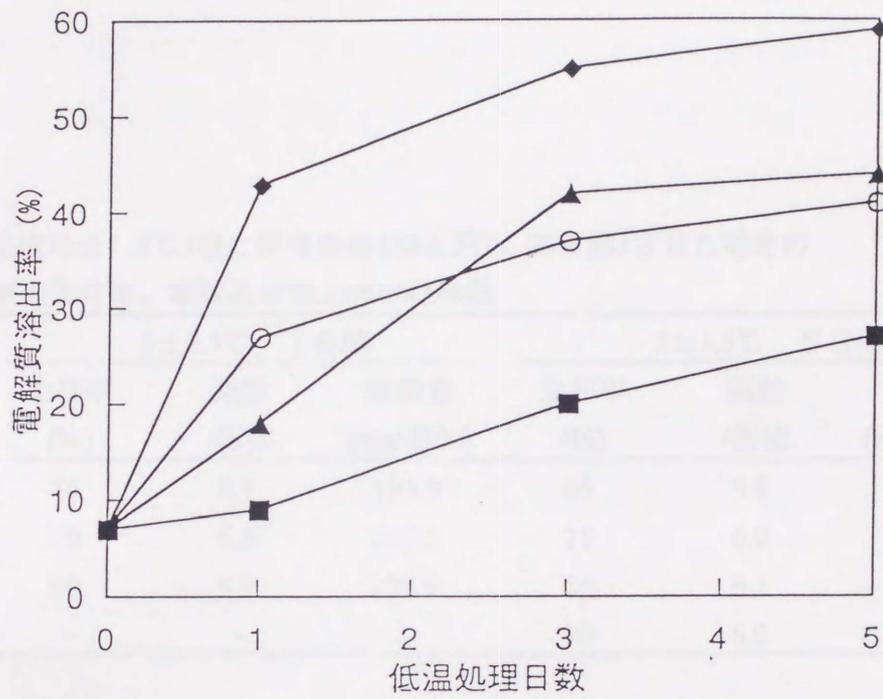


図 2.11 低温処理後のイネ葉身からの電解質漏出に対する
ALA、BR、ABAの抑制効果の比較

- ◆ ; 水
- ; ALA 0.1 ppm
- ▲ ; BR 0.01 ppm
- ; ABA 1.0 ppm

表 2. 9 低温処理(5±1.5°C)後に回復成長(23±3°C, 30日間)させた場合の
イネ苗の生存率, 葉数及び地上部の乾物重

低温処理 (ppm)	5±1.5°C 1日間			5±1.5°C 5日間		
	生存率 (%)	葉数 /個体	乾物重 (mg/個体)	生存率 (%)	葉数 /個体	乾物重 (mg/個体)
Control ---	85	6.7	193.0	65	5.9	65.0
ALA 0.1	90	6.9	243.2	75	6.0	81.9
1.0	90	6.9	279.9	85	6.1	111.8
BR 0.001	-	-	-	90	6.0	87.1

32個体の平均値

低温処理5日間の場合、1.0 ppmのALA処理を行ったイネ苗の回復は、苗の生存率が85%であり、地上部の乾燥重量が111.8 mgであり、低温処理1日間の場合に比べ回復成長が遅れた。なお、この条件下における無処理区の苗は、生存率が65%、地上部の乾燥重量が65.0 mgであり、0.1 ppmの処理区は中間的な回復を示した。

0.001 ppmのBR処理もイネ苗の生存率及び地上部の乾燥重量を増加させたが、それぞれ90%及び87.1 mgであり、地上部の乾燥重量は、1.0 ppmのALA前処理における回復値(111.8 mg)よりも少なかった。

4. 4 考察

幼苗期のイネは、早春期の野外において低温障害を受けることがある。この場合は、イネ苗の重大な生育の遅れを引き起こし、最終的に収穫量を大幅に減少させることがある。ALAが、クロロフィル合成を促進し植物成長調節作用を有するという新規な知見に基づき、ALA処理が、イネ幼苗の耐冷性に及ぼす影響について検討を行った。

ALA前処理を行ったイネ苗は、低温処理後のリーフローリングの比率が低下し（表2. 7及び8）、低温障害により生じる電解質の漏出量も減少させた（図2. 10）。これらの作用に対するALAの有効濃度については、リーフローリングの比率低減と電解質の漏出量低減において類似しており、至適濃度は、0.1 - 1.0 ppmの範囲と考えられた。また、より高濃度の5 ppmALA処理は、ALAの効果を低下させる傾向を示した。

イネ苗のリーフローリングの比率は、低温処理条件により異なった。3 ± 1.5 °Cでの2日間又は4日間の低温処理では、第二、第三葉身は完全に萎調した（表2. 7）。この苗は、23 ± 3 °Cの温暖な条件で5日間栽培を行っても、第三葉身の回復は認められなかった（表2. 8）。また、上記の低温処理を行った苗は、23 ± 3 °Cの条件で30日間の栽培を行う中で、正常な生育を示さなかった。3 ± 1.5 °Cという低温処理条件は、イネ幼苗に対して厳しい処理条件であると考えられる。

5 ± 1.5 °Cでの5日間の低温処理では、ALA処理は、イネ苗第二葉身のリーフローリング比率を減少させた。

低温処理後の回復成長に及ぼすALAの成長促進効果は、5 ± 1.5 °Cの低温処理条件を用いて評価したが、ALA処理は、23 ± 3 °Cにおける30日間の栽培で苗の成長を大きく助長した。特に苗の乾燥重量を無処理区の1.4 - 1.7倍に増加させた（表2. 9）。

リーフローリングの比率低減、電解質の漏出量低減、低温処理後の回復成長の結果から、イネ苗の耐冷性向上に対するALAの至適濃度は、根部浸漬処理では1 ppmであると考えられた。この結果は、ALAが常温条件下

においてイネ苗の成長を促進する有効濃度と一致する⁷³⁾ (第3節)。

これらの結果は、A L Aの作用が低温ストレスに対する直接的な抵抗性の向上よりも、低温障害を受けた後の回復成長に対して効果的であることを示唆する。

植物の生育に対するBRを含むブラシノステロイド類の促進効果は、いくつかの評価法により研究されている。しかしながら、ブラシノステロイド類の植物における耐ストレス効果については、殆ど研究されていない。Mandava は、ブラシノステロイド類が低温、高温、干ばつ、感染及び農業用化学物質により引き起こされるストレスに対する植物の抵抗力を高めることを示した⁸⁵⁾。また、ブラシノステロイド類で処理したイネは、低温条件において無処理よりも生育が良いとの報告がある⁸⁶⁾。その他、トウモロコシやキュウリ苗の低温処理後の回復成長についても研究報告がある⁸⁷⁾。

今回の評価においても、BRは、低温ストレスによる障害を軽減する方向で作用した。BRは、リーフローリング比率の減少ならびに電解質の漏出低減、低温処理後の回復成長のいずれにおいても、A L Aと類似した効果を示した。ただし、低温処理後のイネ苗の回復成長では、苗の乾燥重量がA L A処理の場合よりも少なかった(表2. 9)。

A B Aは、ストレスに関与するホルモンであり、ストレス環境下における植物の適応性と密接な関係があるとされている⁸⁸⁻⁹²⁾。A B Aの前処理は、イネ苗の低温障害を軽減することも知られている^{93)、94)}。さらに、A B A誘導体を用いて低温ストレスからイネを保護する試みも報告されている⁹⁵⁾。また、イネ苗を低温処理した場合に、A B Aの内生量は、低温抵抗性の品種のイネ苗が低温感受性の高い品種よりも多いことが報告されている^{96)、97)}。今回の試験でも、A B Aが苗のリーフローリング比率を低下し、電解質の漏出量を低減することを明らかにした。

リーフローリングの比率の低減に及ばず効果において、A B Aでは古い葉よりも新しい葉に効果を示し、A L AとBRでは逆に古い葉により効果を示すという現象が観察されたことは、低温ストレスに対して植物に抵抗

性を与える作用は、ABAとALA及びBRとの間では異なる可能性が示唆された。電解質の漏出量の低減効果についても、ABAの処理効果が大きく、ALAとBRは相対的に効果が小さく類似した結果を示した。

植物の低温抵抗性と植物の乾物重量比⁹⁸⁾、炭水化物含量⁹⁹⁾、リン脂質含量¹⁰⁰⁾、アミノ酸含量¹⁰¹⁾、膜脂質中の不飽和脂肪酸含量¹⁰²⁾ならびに熱安定性タンパク質重量¹⁰³⁾との関連について多くの研究がある。イネにおける低温障害の軽減に対するABA作用の一つとして、気孔の開閉制御による水分量の維持や、根の水ポテンシャルとの関連が提唱されている⁹³⁾、⁹⁶⁾、

¹⁰⁴⁾。イネ苗からの電解質漏出の低減に及ぼすABAの効果としては、ポリアミンの含有量が向上することによるとの報告もある⁹⁷⁾。また、リョクトウを用いた実験では、ABA誘導体による電解質の漏出低減効果は、水溶性の炭水化物や遊離のアミノ酸の漏出を低減する作用によると報告している¹⁰⁵⁾。

本検討では、ALAが低温ストレスによる障害を低減する作用を有することを示した。その効果の特徴は、低温処理後の回復成長における苗の乾燥重量の増加にあった。ALAによる作用機構の一つとしては、光合成の増加による同化産物量の増加が考えられる。共同研究者である葭田らと共に、ALAの処理により、ハウレンソウ¹⁰⁶⁾、¹⁰⁷⁾、チューリップ¹⁰⁸⁾、ラッキョウ¹⁰⁹⁾、ネギ¹¹⁰⁾、ニンニク¹¹¹⁾等の作物において植物中の糖含量、特に耐冷性との関連が考えられる非構造貯蔵多糖であるフルクタンの含量が高められることを明らかにしている。また、ALAがクロロフィル生合成を刺激することにより、低温処理におけるクロロフィル生合成の低下を改善している可能性もある。今回の評価は現象面から検討したため、植物の耐冷性向上に及ぼすALAの機作を十分に解析することは出来ない。植物に対するALAの多様な生理作用の解明、特に環境ストレスに対するALAの作用はさらに研究を進める必要がある。

4. 5 まとめ

A L Aが、クロロフィル生合成を促進し植物成長調節作用を有するという新規な知見に基づき、A L A処理が、イネ幼苗の耐冷性に及ぼす影響について検討を行った。植物は低温ストレスにより、種々の生化学的な応答を発現すが、低温感受性の高い植物における典型的な応答の一つは、A L Aの生合成の低下やクロロフィル含量の明らかな減少である。

本検討では、A L A、B R、A B Aの前処理がイネ苗の低温抵抗性向上に及ぼす評価を行った。

1) A L A前処理は、低温処理後のイネ苗のリーフローリング比率や電解質の漏出量を減少させた。A L Aの有効濃度については、根部浸漬処理において0.1 - 1.0 ppmの範囲と考えられ、より高濃度のA L A処理は、その効果を減少する傾向を示した。

2) 5 ± 1.5 °Cでの低温処理後におけるイネの回復成長において、A L A処理は、苗の成長を大きく助長した。特に苗の乾燥重量を無処理区の1.4 - 1.7倍に増加させた。

3) B Rも、低温ストレスによるイネ苗の障害を軽減した。B Rの効果は、A L Aと類似した効果を示した。しかしながら、低温処理後の回復成長において、イネ苗の乾燥重量の増加量はA L A処理よりも少なかった。

4) ストレスに關与するホルモンとして知られているA B Aは、苗のリーフローリング比率を低下し、電解質の漏出量の低減にはA L AやB Rよりも大きい作用を示した。

5) リーフローリング比率の低減に及ぼす効果が、A B Aでは古い葉よりも新しい葉に効果を示し、A L AとB Rでは逆に古い葉により効果を示すなど、植物に抵抗性を与える機構はA B AとA L A、B Rの間では異なる可能性が示唆された。

第3章 作物の収量増加及び登熟に及ぼすALAの作用

第1節 緒言

5-アミノレブリン酸 (ALA) は、クロロフィルやヘムのようなテトラピロール化合物の生合成系における鍵前駆体であり、ALA合成はこれらの化合物の生合成における律速段階とも考えられている³⁵⁾。ALAの生理活性に関しては、内在量よりもはるかに高い濃度で外生的に処理した場合に殺草作用や生育抑制を示すことが知られていた^{44-46)、56-60)}。

著者らは、植物内でALA生合成が厳密に制御され、内在のALA濃度は殺草作用を引き起こすよりも遥かに低い濃度にコントロールされている^{51)、52)} ことに着目し、殺草活性を引き起こすよりも低い濃度域におけるALA処理が、植物に及ぼす効果を検討してきた (第2章参照)。

その結果、ALAの基礎生理活性として以下の内容を明らかにしている。

- 1) 前駆物質の役割としてだけでなく、植物のクロロフィルの生合成を高める。
- 2) 光合成によるCO₂固定量を増加させる。この活性は、光照射と栄養源の共存する条件下において強く発現する。
- 3) 暗呼吸を抑制する。
- 4) 光存在条件において植物の生育を促進する。
- 5) 各々の作用を発現するALA濃度は、必ずしも一致しない。
- 6) 各々の作用はALA濃度に依存し、過剰処理では効果が低下する。

これらの知見に基づき、幼植物の生育を指標にALAの作用を検討した結果、以下の生理作用を明らかにした。

- 7) 適正なALA処理は幼植物の生育を促進する。
- 8) 成長促進効果の特徴に乾物重量の充実が挙げられる。
- 9) 成長促進作用を示す有効濃度域は、処理方法により異なる。

根部浸漬処理 ; 0.1 ~ 3 ppm

茎葉散布処理 ; 10 ~ 300 ppm (200L/10a)

土壌 処理 : 10~100g/10a

10) 殺草作用とは異なり、単子葉植物、双子葉植物のいずれにおいても類似の成長促進効果を示す。

11) 処理後の生育部位の経時調査から、同化産物の転流が示唆される。

12) イネ苗の耐冷性を向上させる。

これらの実験結果は、ALAが単にテトラピロール化合物群の生合成中間体という位置づけ以外に、植物内在の微量成分として植物の成長調節に関与していることを示唆している。すなわち、ALAは一種の植物ホルモン様物質であり、植物成長調節物質として農業分野への応用が考えられる。

本章では、農業生産に利用されている主要作物の収量向上と登熟向上を目的としてALAの処理条件について検討を行った。処理方法については、農業場面で適用性が高い茎葉処理を中心に検討した。

第2節 A L A処理による作物の収量向上

2. 1 はじめに

A L Aがクロロフィル合成を促進し、植物の光合成能力を高める作用を有するという新規な知見に基づき、A L A処理が幼植物の生育を促進して乾物重量を充実させることを明らかにした。この結果は、A L Aが植物成長調節作用を有することを示唆する。

植物成長調節物質は、農業生産性を向上させる手法として広く研究されており、ジベレリンを始めとする植物ホルモンや4-クロロフェノキシ酢酸等の有機合成生理活性物質が、実際の農業に利用されている^{71)、72)、112)、113)}。

A L Aの基礎生理活性は植物の光合成に関連する部分多く、光合成の促進作用が報告されているベンジルアデニンや塩化コリン等の植物成長調節物質と同様に、穀物や野菜の生育や収量を向上させる可能性が考えられる。

本研究では、インゲンマメ、ハウレンソウ、オオムギ、ジャガイモ、ニンニクを材料にA L A処理が収量に及ぼす効果について検討した¹¹⁴⁾。

また、処理時期が収量に及ぼす影響についても併せて検討した。

2. 2 材料および実験方法

2. 2. 1 インゲンマメの収量に及ぼすA L A処理時期の影響

元肥として化成肥料(N/P/K=8:8:8)をN換算でポット当たり0.4g施した畑土壌を充填した試験ポット(表面積400cm²)に、インゲンマメ(品種;キプロス)を5月9日に播種した。その後、温室内で通常の栽培管理を行った。

処理は、展着剤ネオエステリン(クミアイ化学製)を2,000倍希釈にて添加した100ppm濃度のA L A水溶液を生育ステージ別(第一本葉期、第一複葉期、第二複葉期、第三複葉期、第四複葉期、結実期)にポット当たり8ml茎葉処理した。収穫調査は、最終処理の15日後である7月3

日に実施した。

2. 2. 2 ホウレンソウの収量に及ぼすALAの効果

水稲用無肥料床土に元肥として化成肥料 (N/P/K=15:15:15) 10 g と土壌改良資材 (ピート、川砂、マグポロン) を適量に加え、1/5000 アール試験ポットを調製した。ホウレンソウ (品種; グローリー) を試験ポットに播種し、幼苗期にポット当たり3株となるよう間引きした後、ガラス室内 (無加温) で通常の栽培管理を行った。

処理は、展着剤アプローチBI (花王製) を1,000倍希釈にて添加した50、100、300 ppm 濃度のALA水溶液を収穫37日前 (11月11日) にポット当たり20 ml 茎葉処理した。対照区として水散布区をもうけ、各濃度4反復の試験とした。

収穫調査は、新鮮重収量、乾物率を測定した。また、植物体内の無機成分の分析を行い、窒素、リン、カリウム、カルシウム、マグネシウム、硝酸イオンを定法により定量した。

2. 2. 3 オオムギの収量に及ぼすALAの効果

元肥として化成肥料 (N/P/K=8:8:8) をN換算でポット当たり0.4 g 施した畑土壌を充填した試験ポット (表面積400 cm²) にオオムギ (品種; カシマムギ) を10月12日に播種した。その後、ガラス室内 (無加温) にて長日栽培条件 (夜8時まで電照、サンライトランプ; 東芝製、光照射量; 4.6 μmol /m²/s) にて栽培を行った。

処理は、展着剤ネオエステリン (クミアイ化学製) を2,000倍希釈にて添加した30及び100 ppm 濃度のALA水溶液を出穂後開花前と開花盛期、ならびに開花盛期と開花期終了後にポット当たり8 ml をそれぞれ2回茎葉処理した。収穫調査は、翌年の2月19日に実施した。

2. 2. 4 ジャガイモの収量に及ぼすALAの効果

元肥として化成肥料 (N/P/K=10:10:10) をN換算で m^2 当たり10g施した(株)コスモ総合研究所の試験圃場に、3月26日に種芋を植え付けた。その後、通常の栽培管理を行った後、塊茎形成期に、展着剤ネオエステリン(クミアイ化学製)を2,000倍希釈にて添加した100ppm濃度のALA水溶液を m^2 当たり200ml茎葉処理した。収穫調査は、7月23日に実施した。

2. 2. 5 ニンニクの収量に及ぼすALAの効果

元肥として化成肥料 (N/P/K=10:10:10) をN換算で m^2 当たり10g施した(株)コスモ総合研究所の試験圃場に、10月5日にニンニク(品種; 福地ホワイト)を植え付けた。その後、通常の栽培管理を行った後、5-7葉期(翌年の5月13日)に、展着剤ネオエステリン(クミアイ化学製)を2,000倍希釈にて添加した30及び100ppm濃度のALA水溶液を m^2 当たり200ml茎葉処理した。収穫調査は、6月5日に実施した。

第二の実験として青森県畑作園芸試験場に評価を依頼し、ニンニクに対する評価を検討した。試験区は、1区 $15m^2$ の2区制として露地(マルチ)栽培により実験を行った。元肥(N/P/K=2.5:2.5:2.5kg/アール)を施した試験区へ、10月5日に福地ホワイト(種子重10~11g)を植え付けた。翌年の5月17日(鱗片分化後19日目)に、展着剤アプローチBI(花王製)を1,000倍希釈にて添加した30、100、300ppm濃度のALA水溶液を10L/アールにて茎葉処理した。対照区として水散布区、塩化コリン1000ppm区をもうけた。

7月7日に収穫し、総収量、規格収量、平均球重、出荷規格別収量を測定した。

2. 2. 6 材料

実験に用いた植物は、次の通りである。

インゲンマメ（タキイ；品種キプロス）、オオムギ（品種カシマムギ）、ジャガイモ（品種ダンシャク）、ニンニク（品種福地ホワイト）以上の作物は、野原種苗より購入した。

試薬類は、次のものを使用した。

5-アミノレブリン酸塩酸塩（ALA・HCl、和光純薬）

ネオエステリン（展着剤、活性成分；非イオン系界面活性剤、クミアイ化学製）

アプローチBI（展着剤、活性成分；非イオン系界面活性剤、花王製）

記載外の試薬に関しては、全て試薬特級品を購入し、使用した。

2. 3 結果と考察

幼植物の生育に及ぼすALAの効果の検討において、処理方法の違いによりALAの有効濃度が異なることを明らかにした。すなわち、農業場面で適用性が高い茎葉処理は、根部吸収に比べALAに対する植物の感受性が低く、根部浸漬の数百倍の濃度で処理する必要があった。

ALAの茎葉処理有効濃度は、幼植物を用いた検討において300 ppm以下の濃度において葉に障害を与えず幼植物の成長を促進している。本研究では、高濃度処理が植物に対して除草剤的な作用や生育の抑制作用を引き起こすことことから、幼植物の成長促進に効果を示した茎葉処理濃度を用いて、作物の収量に対するALAの処理効果を検討した。

インゲンマメを用いて処理時期とALAの効果の関係について検討した。異なる6段階の生育ステージで100 ppm濃度のALAを茎葉処理し、通常の栽培管理を行った後の収量調査の結果を図3. 1に示す。第一本葉期、第一複葉期という生育初期のALA処理は、それぞれ無処理区と比較して収量を19及び30%増加させた。また、結実期の処理においても8%収量が増加した。

一方、開花期に相当する第三複葉期及び第四複葉期での茎葉処理は、収量を12-14%減少させた。

生育初期のALA処理は、第2章で示したようにインゲンマメの苗の根量、地上部重ともに充実する効果を示すことから、健苗な育成されることで最終的にマメ収量の向上に寄与したものと考えられた。また、結実期の処理では、ALA処理が光合成能力を高め、同化産物の蓄積量を増加させたものと考えている。

一方、開花期の処理による収量の減少は、インゲンマメの花（生殖器）がALAに対して葉よりも感受性が高く、100 ppmのALAで障害を受けたものと推定される。茶の花粉管伸長をシャーレ試験により評価した結果では、ppmオーダーのALAにより花粉管の伸長が抑制されるとの知見を得ている（データ非掲載）。

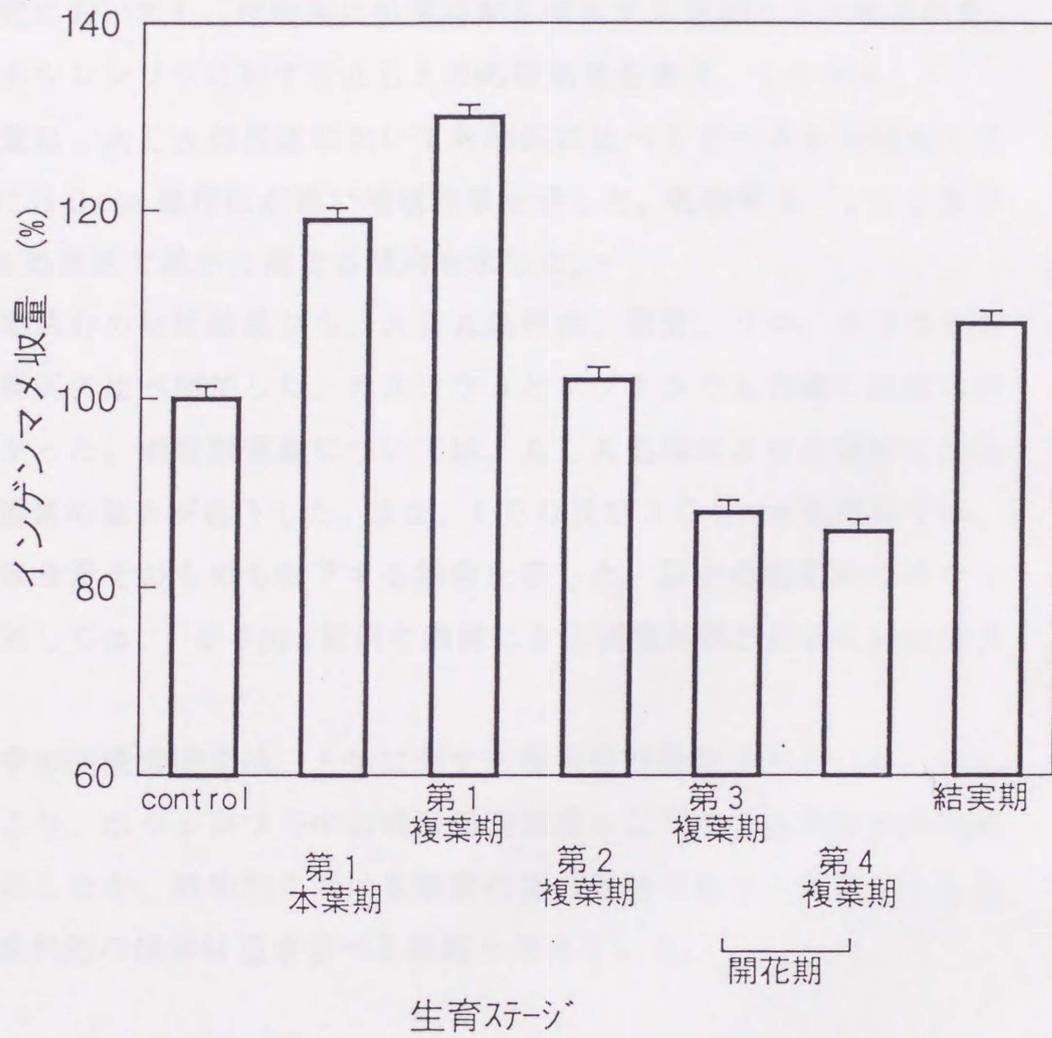


図 3. 1 インゲンマメ収量に及ぼすALA処理時期の影響
 (茎葉処理 ; ALA 100ppm)
 9個体の平均値、バーは標準偏差
 無処理区 (10.6g 乾物重/個体) に対する相対値 (%)

インゲンマメの結果は、ALAが作物の収量を増加させる効果を持つことを示すと同時に、収量向上効果の発現が処理時期に強く依存することを示している。植物成長調節物質の利用研究において、処理時期により植物成長調節物質の発現作用が異なるという事例は多く報告されている。ALAの応用研究においても、作物別に処理時期を検討する重要性が示唆された。

次に、ハウレンソウに対するALAの処理効果を表3. 1に示す。

新鮮重量は、ALA処理区において対照区に比べ20～35%増大しており、特に50 ppm処理区が高い増収効果を示した。乾物率は、100及び300 ppm処理区で僅かに高まる傾向を示した。

体内無機成分の分析結果から、ALA処理は、窒素、リン、カリウムの含量が対照区に比べ増加した。カルシウムとマグネシウム含量には変化が見られなかった。硝酸態窒素については、ALA処理により全窒素に占める硝酸態窒素の割合が低下した。また、100及び300 ppm処理区では、硝酸態窒素含量そのものも低下する傾向を示した。以上の結果からハウレンソウに対しては、100 ppm前後の濃度による茎葉処理が好ましいと考えられた。

植物体中の硝酸態窒素は、人体に対する有害性が懸念されている。ALA処理により、ハウレンソウ中の硝酸態窒素量を低下できる可能性を初めて明らかにしたが、植物内における窒素代謝は複雑であり、今後、ALA処理と窒素代謝の関係は追求すべき課題と考えている。

表 3. 1 ホウレンソウの生育に及ぼすALAの効果

品種：グローリー(秋作)
 処理：茎葉散布(収穫37日前)
 液量：100 L/10a

収量と乾物率

ALA処理濃度	収量 (g/ポット)	乾物率 (%)
0 (水)	146.8 ± 12.5 (100.0)	9.22
50 ppm	198.3 ± 4.0 (135.1)	8.84
100 ppm	179.6 ± 19.1 (122.3)	9.47
300 ppm	174.9 ± 19.7 (119.1)	9.55

無機成分内在量

ALA処理濃度	成分含量(%)				
	N	P	K	Ca	Mg
0 (水)	3.31	0.79	4.63	0.33	0.26
50 ppm	5.52	0.93	6.62	0.33	0.26
100 ppm	6.62	0.84	8.60	0.32	0.27
300 ppm	5.57	0.82	6.46	0.31	0.26

硝酸態窒素量

ALA処理濃度	硝酸態窒素 (mg/gDW)	硝酸態窒素 全窒素 × 100
0 (水)	4.83	14.59
50 ppm	5.00	9.06
100 ppm	4.20	6.71
300 ppm	3.57	6.41

オオムギの収量に与えるALAの作用を評価するために、光合成による同化産物の蓄積・転流が期待できる出穂後開花前から開花終了期にALA処理を行い、その効果について検討を行った。ALAを30及び100 ppm濃度にて出穂後開花前と開花盛期に2回茎葉処理したとき、ALA処理が収量に及ぼす効果を図3.2に示した。30及び100 ppm濃度のALA処理は、無処理区に比べそれぞれオオムギの収量を41及び22%増加させた。収量に及ぼすALAの効果は、穂当たりの稔実粒数が増加したことによった。これとは対照的に1000粒重に対しては影響を示さなかった。出穂後開花前の時期には既に穂数が決定していることから、ALA処理により光合成能力が高められ、同化産物の蓄積・供給が増大して穀粒の登熟が促進したものと考えられた。

開花盛期と開花終了後の茎葉処理においてもALA処理により収量の増加が観察されたが、その効果は20% (30 ppm) 及び10% (100 ppm) と減少したことから、ALAの処理時期の検討は重要である。オオムギの結果からは、開花期のALA処理濃度は、より低い濃度である30 ppmが好ましいと考えられた。

ジャガイモの試験においても、光合成による同化産物の蓄積が期待できる塊茎肥大期に100 ppmのALA処理を行った。収量調査の結果を図3.3に示す。ジャガイモの収量は無処理区に比べ63%増加したが、ALAの増収効果は、一塊茎当たりの塊茎重量の増加よりも、植物当たりの塊茎数の増加によるものと推定された。塊茎重量に関しては個々のバラツキが大きく、ALA効果が塊茎重量の増加に関与する可能性については、さらに検討が必要である。しかしながら、生育促進作用を有するジベレリンのジャガイモへの処理が、地上部の生育促進につながり塊茎収量を逆に減少させるとの報告¹¹⁵⁻¹¹⁸⁾と比較しても、茎葉処理により塊茎収量が増加するというALAの作用に興味もたれる。

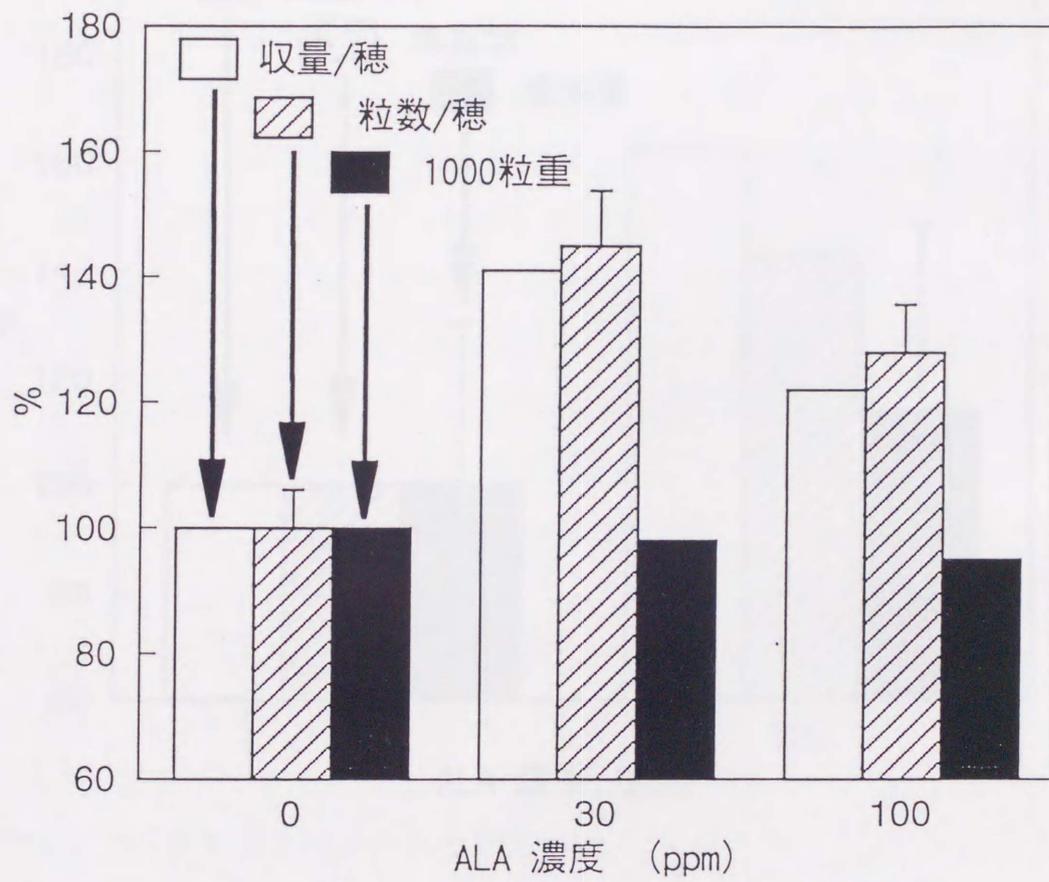


図 3. 2 オオムギ収量に対するALAの処理効果（茎葉処理）
 30穂の平均値、バーは標準偏差
 無処理区（0.41g 乾物重/個体、35.3g/1000粒重、11.8粒/穂）
 に対する相対値（%）

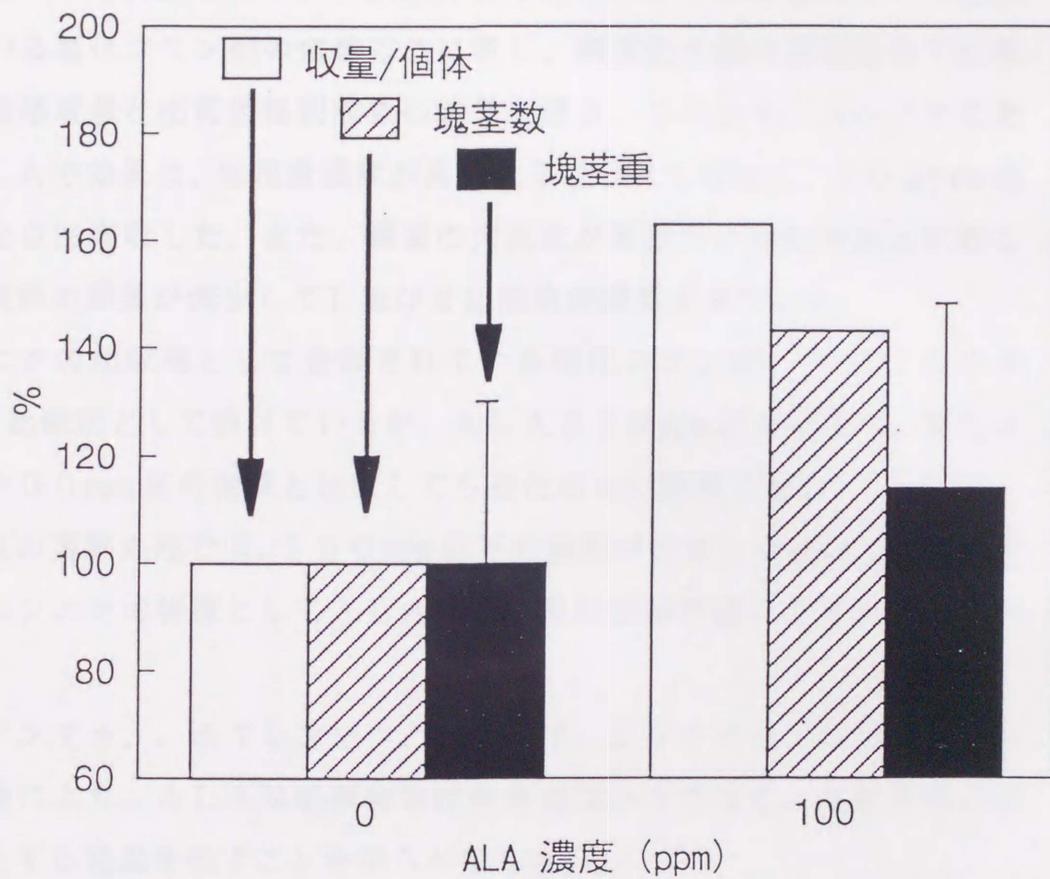


図 3. 3 ジャガイモ収量に対するALAの処理効果(茎葉処理)
 40個体の平均値、バーは標準偏差
 無処理区(新鮮塊茎重172g、塊基数4.8/個体、平均塊茎重35.6g)
 に対する相対値(%)

ニンニクの鱗茎肥大期に30及び100 ppmのALA処理を行った結果を図3.4に示す。200個体のニンニクの平均鱗茎重量は約40%増加しており、ALAによる鱗茎の肥大効果が予測された。

ニンニクに対するALAの効果をより明らかにするため、青森県畑作園芸試験場による評価を行った。実験方法は、ニンニクの増収剤として登録されている塩化コリン剤の処理方法に準じ、鱗茎肥大期の茎葉散布で比較した。規格収量と出荷規格別収量の結果を図3.5に示す。ニンニクに対するALAの効果は、処理量濃度が高くなるにつれて増加し、300 ppm処理区で20%増収した。また、鱗茎の大玉化が観察され無処理区と比較して、M規格の鱗茎が減少してL及び2L規格の鱗茎が増加した。

ニンニクの増収剤として登録されている塩化コリン剤¹¹⁹⁾の1000 ppm区を比較区として設けているが、ALA 300 ppm区の結果は、塩化コリン1000 ppm区の結果と比較しても遜色のない結果である。

ALAの茎葉処理では、100 ppm以下の濃度が好ましいという結果が多いが、ニンニクの特徴としてALAの茎葉吸収効率が悪いことが推察された。

インゲンマメ、ホウレンソウ、オオムギ、ジャガイモ、ニンニクを用いた実験により、ALAは幼植物の成長促進ばかりでなく、主要作物の収量を向上する効果を示すことを明らかにした。

ALAが作物の収量を向上するという作用は、ALA処理によりプロトクロロフィライド、プロトポルフィリンIX等のクロロフィル中間体を蓄積し、殺草作用を示すこととは全く逆の現象といえる。すなわち、ALAの殺草活性がクロロフィル中間体の光増感作用による一重項酸素の酸化作用より引き起こされるという機構からは、ALAの収量向上効果を説明することはできない。また、ALAの示す殺草作用が単子葉植物に比べて双子葉植物においてより敏感に現れるとの報告に対して、本研究で用いた全ての作物において類似した成長促進・増収効果を示している点も現象的に異なる。ALAによる作物の増収効果は、処理時期と効果の発現の関連から

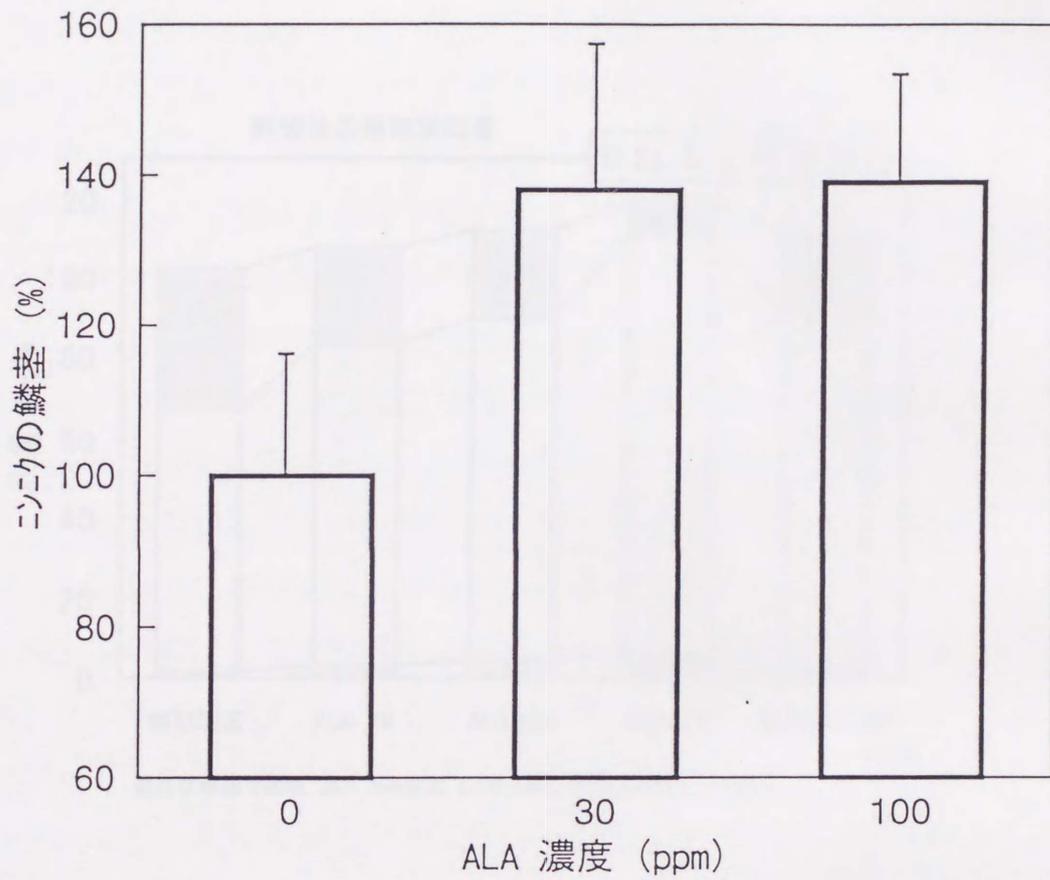


図 3. 4 ニンニク収量に対するALAの処理効果 (茎葉処理)
 200個体の平均値、バーは標準偏差
 無処理区 (新鮮鱗茎重 29.4g) に対する相対値 (%)

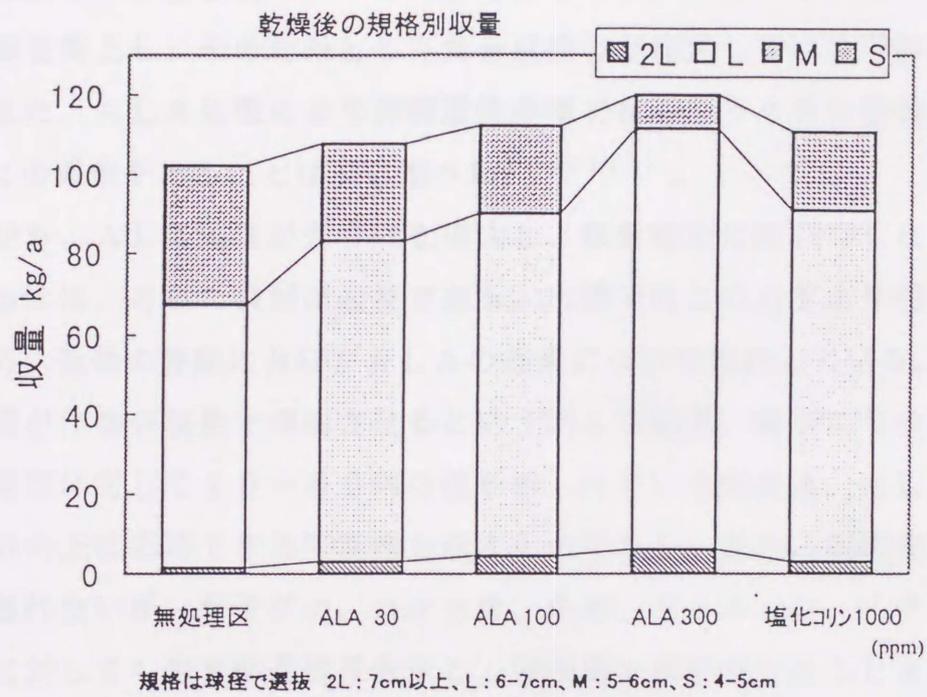


図 3.5 ニンニク収量に対するALAの効果

供試品種	福地ホワイト
作型	路地(マルチ)栽培
試験規模	1区15m ² ・2区制
散布時期	麟茎肥大期
散布方法	茎葉散布、10L/a、77 ⁰ ローチB1、0.1%

考えると光合成の増大による同化産物の蓄積と、暗呼吸の低下による消費の抑制という機作に伴う植物機能の増大の結果として誘導されたことが示唆される。

ハウレンソウの無機成分内在量の分析結果からは、窒素やカリウム成分をはじめとして肥料成分の取り込み量が増大している。また、窒素成分の中でも硝酸態窒素の存在比に変動が見られた⁶⁷⁾。これらの結果は、第2章の知見から推論したことを裏付けるものと考えられる。ALAの作用が肥料の吸収効率を向上し、その結果として光合成能力が増大している可能性も大きい。また、ALA処理により非構造性多糖であるフラクタンの含量が増加するとの報告があることは先に述べた¹⁰⁶⁻¹¹¹⁾。

しかしながら、ALA処理が光合成を増大し、収量増加に結びつくという結論を得るには、さらに検討が必要である。次節ではこの点をより明らかにするため、穀物の登熟に及ぼすALAの効果について検討している。

ALA処理が作物の収量を増加させるという新しい知見、並びにその効果が、無処理区に対して10-60%の値を示したという知見は、ALAを農業生産の向上に応用できる可能性を示すものである。また、本報告書では詳細に触れないが、サラダナ、コマツナ、ネギ、ラッキョウ、イチゴ等の作物類に対しても生育促進効果を示し、収穫量を増大させることを明らかにしている。また、根部吸収を利用した水耕栽培方式でもALA添加の有効性を確認している。

一方、ALAの効果は、他の植物成長調節物質と同様に処理濃度だけでなく処理時期にも大きく依存することも同時に明らかになった。

今回は、多くの作物に対するALAの有用性を評価することに主体をおいたため、評価結果について全てを統計処理により検定できていないことも考え合わせると、農業分野においてALAを実用面から効果的に利用していくためには、さらなる研究が必要であり重要であると考えられる。

2. 4 まとめ

A L Aが有する植物の光合成能力の増強効果、幼植物の成長促進効果等の生理作用は、光合成の促進作用が報告されているベンジルアデニンや塩化コリン等の植物成長調節物質と同様に、穀物や野菜の生育や収量を向上させる可能性が考えられた。

インゲンマメ、ホウレンソウ、オオムギ、ジャガイモ、ニンニクを材料にA L A処理が作物の収量に及ぼす効果について検討した結果、A L Aは適切な処理により、無処理区に対して10-60%の収量を増加させた。これらの知見は、A L Aを実際の農業生産力の向上に応用できる可能性を示すものである。

1) インゲンマメの試験から、A L A処理による作物増収の方法として健苗育成による収量増加と、同化産物の蓄積・転流時期に処理を行う収量増加の2つの可能性を見出した。

2) ホウレンソウの試験から、A L Aの作用として葉菜類の生育促進と肥料成分の取り込み促進効果を確認した。

3) オオムギの試験から、穀類の増収は稔実粒数の増加が主たる要因であり、1000粒重が殆ど変化しないことを明らかにした。

4) ジャガイモ、ニンニクの試験から、茎葉処理により塊茎や鱗茎という地下部の収量増加が可能であることを明らかにした。また、A L Aは、塊茎や鱗茎の肥大を促進した。

5) 収量向上に対するA L Aの効果は、他の植物成長調節剤と同様に処理時期にその効果がより大きく異なることを明らかにした。

6) A L Aの開花期処理からは、茎葉よりも花（生殖器官）においてA L Aの感受性が高い可能性を示唆した。

第3節 コムギ及びイネの収量と登熟に及ぼすALAの効果

3. 1 はじめに

植物に対するALAの新規な生理作用について、農業分野への応用を目的に検討している。これまでにALA処理によるイネ等の幼植物の成長促進、ハツカダイコン下胚軸の成長促進、インゲンの子実の増収、ホウレンソウの生育促進、ジャガイモの塊茎の増収、ニンニクの鱗茎の肥大と増収、ならびにオオムギの子実収量の増加など多くの植物で成長促進作用を示すことを明らかにしてきた(63)、73)、114)。

また、ALAは他の植物成長調節物質と同様に、処理時期や処理濃度によって、その効果が大きく異なることも明らかになった。

オオムギの試験において得られた子実収量の向上が、稔実粒数の増加に基づき、1000粒重に変化が認められなかったという知見から、コムギの成長と子実収量、ならびに寒天培地上で培養したコムギ小穂の登熟に及ぼすALAの作用について検討した¹²⁰⁾。なお、中国華中地方では、コムギは重要な作物の一つであり、子実収量の安定と増大が強く望まれている。

また、既に幼苗におけるALAの成長促進効果を確認しているイネについても、子実収量の向上と登熟に対するALAの作用について検討を行った(121)、122)。

3. 2 材料および実験方法

3. 2. 1 コムギの子実収量と登熟

コムギ品種としては華麦8号 (*Triticum aestivum* L. Huamai No. 8) を使用し、ALAは和光純薬社製の試薬5-アミノレブリン酸塩酸塩を蒸留水で希釈して用いた。ALAの試験濃度は表中に記した。

角形素焼きポット(25 cm × 25 cm)に畑土壌(粘土80%、有機物20%)を充填し、ポットの底部に基肥として化成肥料(N:P:K=15:15:10)をポット当たり10g使用した。ポット当たり30粒のコムギを播種して野外

にて適宜かん水しながら育成した。

なお、播種は1995年11月4日に行い、1996年1月4日にポット当たり10個体となるように間引いた。

ALAの処理は種子浸漬、生育期（分けつ期と茎の伸長期の2回処理、1995年12月27日と1996年2月7日）および開花期（開花4日前と開花2日後の2回処理、1996年4月15日と22日）の茎葉処理により行った。種子浸漬処理の場合は種子を流水に一晩浸漬した後、ALA水溶液に2.5時間浸漬し直ちに播種した。茎葉処理の場合は、水又はALAの水溶液にTween20を0.1%になるように加用して、生育期処理ではポット当たり40ml、開花期処理ではポット当たり60ml噴霧した。

調査は種子浸漬処理の場合、1月4日の間引きの際にポット当たりの生存個体数と地上部重を調べ、分けつ数を12月27日、1月24日、2月6日および3月7日に調査した。最終的に5月20日に収穫した穂について子実数、子実重量、登熟割合などを調査した。茎葉処理の場合も、種子浸漬の場合と同様に5月20日に収穫した穂について調査した。なお、実験は各条件について4反復で行い、合計40株に対する平均値と標準偏差を算出した。

上記とは別に、開花4日前と開花2日後に採取した若い穂の中位に位置する部位より、成長の揃った小穂を採り、70%エタノールにて消毒した。その後、100ml容のガラス瓶に準備した30mlのMurashige-Skoog寒天培地（sucrose 50g/lと各濃度のALAを含む、pH 5.5）に5個ずつ挿し、10,000lx、25℃で12時間、暗黒15℃で12時間の培養条件にて30日間培養した。培養後の穎果の登熟歩合、重量などについて調査した。なお、実験は各条件について7反復で行い、合計35個の小穂についての平均値と標準誤差を算出した。

3. 2. 2 イネの子実収量の向上と登熟

イネ品種としてはホシノヒカリ、アキニシキ、コシノヒカリを使用し、A

L Aは和光純薬社製の試薬5-アミノレブリン酸塩酸塩を用いた。

育苗箱にて育てたイネ幼苗（ホシノヒカリ、3葉期）を、元肥として化成肥料（ミツイ化成、N:P:K=8-8-8）をポット当たり10g施した水田土壌を充填した1/2000aの試験ポットに、5月20日に4本植えにて定植した。その後、水深3cmにて通常の管理を行った。7月23日に追肥として化成肥料をポット当たり10g施した。

A L Aは、幼穂形成期（7月26日）、開花盛期（8月22日）及び幼穂形成期と開花盛期の2回処理にて湛水処理を行った。処理量は、3、10、30、100及び300g/10aとし、各区3反復とした。

収穫調査は10月5日に行い、穂重の平均値を求めた。

また、育苗箱にて育てたイネ幼苗（アキニシキ、3葉期）を同様に、5月25日に4本植えにて定植し、水深3cmにて通常の管理を行った。

A L Aは、開花終了期（9月4日）に、10及び30g/10aの処理量、各区14反復にて湛水処理を行った。収穫調査は10月4日に行い、穂重の平均値を求めた。

上記試験とは別に、コシヒカリ栽培農家（富山県小矢部市赤倉）の実栽培水田の一部を用いて、登熟に及ぼすA L Aの効果試験を行った。試験区は、1区15m²、2反復とし、穂揃い期（8月5日）に、展着剤としてアプローチB I（花王製）を0.1%含む30ppmA L A水溶液を100L/10aの液量にて茎葉処理した。

収穫調査は、穂数が22-25本の平均穂数を有する株を選び、強勢穎果と弱勢穎果別に1,000粒重と登熟歩合を測定した。平均値は、各区100-130穂の平均として算出した。

3. 3 実験結果および考察

コムギの子実収量と登熟に及ぼすALAの作用について、種子処理、生育期2回処理、開花期2回処理と処理時期を変えて検討した。

種子を0.5～50ppmのALA水溶液に浸漬処理した場合、2ヶ月後の成苗数、地上部重量にはほとんど差が見られなかった(表3.2)。分けつ数は1月24日にはALA処理による増加が20%程度認められ、3月7日の調査でも15%程度多かった。

最終調査では穂数、株当たりの小穂、穎花数とも10%弱の増加傾向が見られたが、1000粒重にはほとんど変化がなく、子実収量も平均値で約5%の増加であった。種子処理は、苗の分けつ数に影響を与えられられるが、その後生育に対する環境因子の影響が大きく、子実収量の増加には直接結びつかないものと考えられた。

生育期処理試験の結果を表3.3に示す。3月7日における分けつ数において、いずれの濃度でも15%程度の増加が認められた。子実収量に関しては10、50ppm処理区でそれぞれ15%程度の増加が見られた。この時期の処理は、穂数と一穂粒数の形成に影響を与える可能性が大きい。最終調査では10ppm処理区において15%(44.1/38.1)の収量増加があった。収量の各構成要素を分析すると、いずれの構成要素にも効果が見られることから、各構成要素の相加的な効果により収量増加が得られたものと考えられる。

小穂の分化が終了した開花期にALA処理を行った結果を表3.4に示す。開花期には穂が既に形成されているため、ALA処理によっても株当たりの出穂数には差が見られなかった。着粒数および1000粒重が増加し10、50ppm処理区において5%程度の増収が得られた。開花期処理による収量増加は5%程度と生育期の10ppm処理に比べて小さかった。

種子処理や生育期処理では1000粒重に変化がないことに対して、開花期の処理では1000粒重の増加が認められた。本試験条件下では穂の分化が終了しているため、穂当たりの同化産物の移行量が増加して1000

表 3. 2 コムギの生育及び収量に対するALAの効果(種子処理)

		ALA (ppm)				
		0	0.5	5	20	50
苗生存率 (%)		81.7 (6.4)	84.2 (7.5)	81.7 (8.8)	85.8 (6.8)	85.0 (6.9)
分けつ数	12/27	2.0	2.1	2.0	2.2	2.3
	1/24	4.0 (0.5)	4.8 (0.7)	4.6 (0.4)	5.0 (0.6)	4.8 (0.8)
	2/6	7.2 (0.5)	8.1 (1.4)	8.0 (0.6)	8.1 (1.2)	8.0 (0.9)
	3/7	9.7 (0.8)	11.2 (1.1)	10.2 (1.0)	11.1 (1.2)	11.1 (1.3)
地上部乾物重*		0.86 (0.08)	0.88 (0.09)	0.86 (0.05)	0.90 (0.05)	0.88 (0.04)
穂数/個体		3.3 (0.2)	3.4 (0.3)	3.4 (0.5)	3.5 (0.4)	3.4 (0.3)
粒数/穂		31.6 (2.3)	33.5 (0.3)	33.4 (0.7)	33.9 (2.7)	32.2 (1.8)
1000粒重(g)		39.9 (2.6)	40.7 (1.8)	40.0 (2.9)	38.6 (2.1)	38.2 (1.5)
穎果重/個体 (g)		4.2 (0.2)	4.6 (0.4)	4.5 (0.3)	4.6 (0.5)	4.2 (0.3)
収量/ポット		38.1 (2.6)	40.0 (2.7)	39.4 (2.3)	40.3 (2.1)	39.0 (2.4)

(SE)

*1月4日における苗の乾物重(g)

表 3. 3 コムギの生育及び収量に対するALAの効果（生育期茎葉処理）

		ALA (ppm)			
		0	10	50	100
分けつ数	12/27	2.0 (0.3)	2.1 (0.4)	2.2 (0.3)	2.0 (0.2)
	2/7	7.2 (0.5)	7.6 (1.2)	7.3 (0.8)	7.3 (1.0)
	3/7	9.7 (0.8)	11.4 (1.1)	11.1 (1.2)	11.3 (1.4)
穂数/個体		3.3 (0.5)	3.5 (0.7)	3.5 (0.8)	3.4 (1.1)
粒数/穂		31.6 (2.3)	33.4 (1.6)	33.2 (2.2)	33.0 (2.4)
1000粒重(g)		39.9 (2.6)	41.4 (1.2)	41.0 (1.5)	39.1 (2.5)
穎果重/個体(g)		4.2 (0.3)	4.8 (0.3)	4.7 (0.3)	4.3 (0.4)
収量/ポット(g)		38.1 (2.7)	44.1 (2.3)	43.2 (3.2)	40.3 (2.9)

(SE)

処理時期 : 1995年12月27日と1996年2月7日の2回.

穂数の増加は、収量の増加に寄与する。また、穂数を増加させるには、開花期に適切なALA処理が必要である。本実験では、開花期にALAを処理した個体は、未処理個体と比較して、穂数の増加が認められた。また、穂数の増加は、収量の増加に寄与する。

表 3. 4 コムギの生育及び収量に及ぼすALAの効果（開花期、茎葉処理）

	ALA (ppm)			
	0	10	50	100
穂数/個体	3.3 (0.5)	3.2 (0.4)	3.4 (0.4)	3.4 (0.3)
粒数/穂	31.6 (2.3)	33.3 (3.3)	32.2 (1.7)	32.0 (1.4)
1000粒重(g)	39.9 (2.6)	41.8 (1.5)	42.9 (2.2)	40.8 (2.5)
穎果重/個体(g)	4.2 (0.3)	4.5 (0.4)	4.6 (0.5)	4.4 (0.5)
収量/ポット	38.1 (2.6)	40.6 (3.7)	40.9 (4.2)	40.1 (3.7)

(SE)

処理時期 : 1996年4月16日及び22日の2日

粒重が増大したものと考察された。

次に、開花前4日と開花後2日の小穂をALA含有寒天培地上で培養した結果を表3.5と図3.6に示す。

0.1、1、10 ppmのALA添加区では、平均登熟穎果数、登熟率、穎果重の全てが増加しており、登熟歩合の増大が認められた。その効果は、開花後2日の小穂を材料に培養した場合に大きかった。登熟率の増加は、特に第1～第3穎花で顕著であった。

また、開花2日後の小穂培養において、子実収量は、0.1～1 ppm処理により36～42%増加した。

表 3. 5 寒天培地を用いた、コムギの小穂培養における
穎果の登熟に及ぼすALAの効果

	ALA (ppm)			
	0	0.1	1	10
(開花4日前の小穂)				
試験小穂数	35	35	35	35
平均登熟穎果数/小穂	1.40	1.68	2.17	1.60
登熟率 (%)				
第一穎果	37.1	60.0	42.9	34.3
第二穎果	42.9	45.7	68.6	57.1
第三穎果	40.0	48.6	77.1	57.1
第四穎果	17.1	14.3	28.6	11.4
穎果重/小穂 (mg)	14.4	16.9	18.8	16.0
(%)	(100)	(117)	(131)	(111)
(開花2日後の小穂)				
試験小穂数	30	30	34	30
平均登熟穎果数/小穂	1.87	2.97	2.85	2.40
登熟率 (%)				
第一穎果	66.7	100.0	85.3	70.0
第二穎果	50.0	76.7	79.4	76.0
第三穎果	50.0	86.7	88.2	60.0
第四穎果	20.0	33.3	32.4	33.3
穎果重/小穂 (mg)	19.5	27.7	26.5	24.2
(%)	(100)	(142)	(136)	(124)

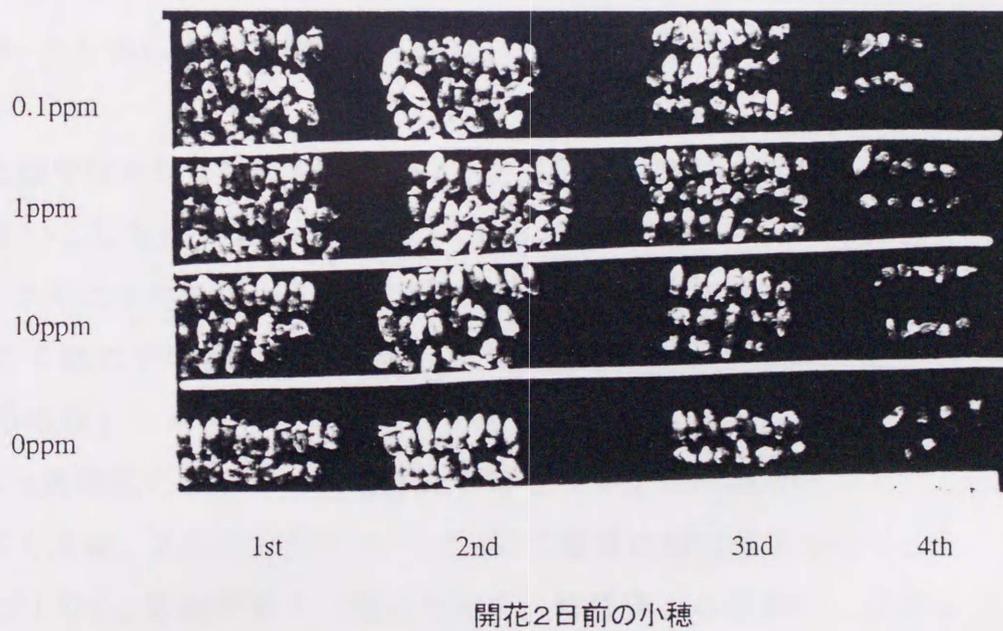
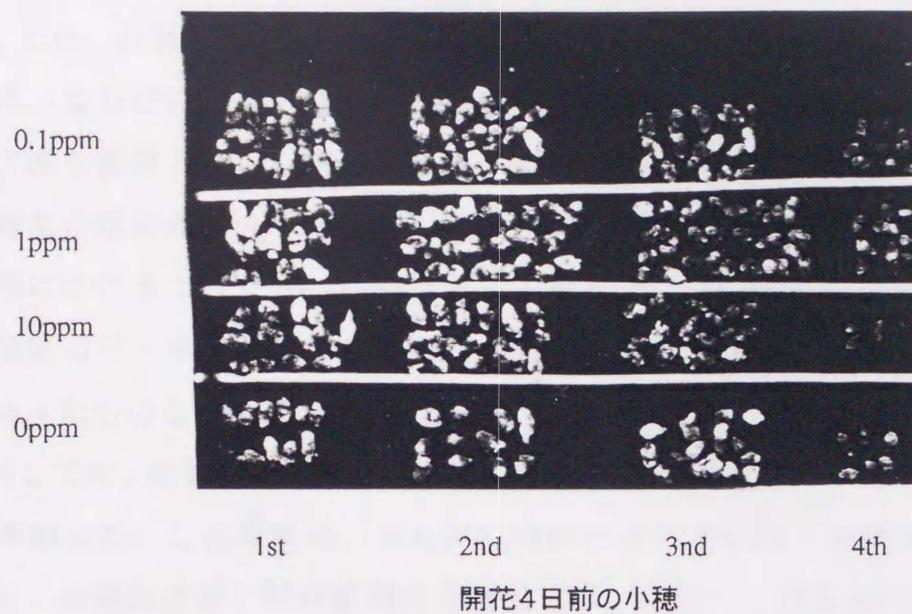


図 3.6 寒天培地を用いたコムギの小穂培養における穎果の登熟に及ぼすALAの効果

次にイネの収量（ホシノヒカリ及びアキニシキの穂重）に及ぼすALAの効果を、表3. 7に示す。

ホシノヒカリでは、幼穂形成期（最高分けつ期）、開花盛期（分けつ終了後）の1回処理、ならびに幼穂形成期と開花盛期との2回処理という3種類の湛水処理方法を検討した。いずれの処理区においても、102-111%の穂重の増加が認められ、ALA処理の有用性が観察された。なお、開花盛期1回処理における10g/10a処理区にて穂重が16%低下しているが、他の試験区のデータから推察してALA処理による減少ではなく栽培上の問題があったものと考えられる。

処理時期に関しては、幼穂形成期1回処理が、開花盛期1回処理よりもやや平均穂重が増加した。この現象は、コムギにおけるALAの作用と類似している。また、幼穂形成期と開花盛期の2回処理は、30-100g/10a処理区において1回処理に比べて平均穂重が増加する傾向を示した。

このことは、ALAによる収量向上に複数回の体系処理が有効であることを示唆する。

ALAは土壌中における生分解性が高く、土壌処理の場合には結果にバラツキが出やすいことを既に報告している（第2章参照）。

このため、アキニシキを用いた湛水処理検討では、試験ポット数を14反復とし約200穂の平均穂重により評価した。処理時期は、稔実期である開花終了後の処理とした。アキニシキの平均穂重は、表3. 7に示すように10g/10a処理区において、無処理区に対して21%増加した。

処理量に関しては、3及び300g/10aにて穂重の増加量が少なく、10-100g/10aに至適があると推定される。収量向上の結果は、必ずしもALA処理濃度と一致しておらず、ALAの湛水処理に関しては、さらに検討が必要である。

表 3. 7 イネ穂重に及ぼすALAの効果

処理時期	ALA(g/10a)					
	0	3	10	30	100	300
品種 ; ホシノヒカリ						
幼穂形成期 一回処理	100	104	108	105	108	101
幼穂形成期 一回処理 (2.12g)		102	84	103	107	104
幼穂形成期 +		102	103	109	111	104
開花盛期 二回処理						
品種 ; アキニシキ						
開花終了期 一回処理	100	—	121	105	—	—
	(1.35g)					

ALA処理方法 ; 湛水处理

表 3. 8 コシヒカリの強勢穎果と弱勢穎果の1,000粒重並びに登熟歩合に及ぼすALAの効果

ALA濃度 (ppm)	1,000粒重 (g)		登熟歩合 (%)	
	強勢穎果	弱勢穎果	強勢穎果	弱勢穎果
試験 1.				
0	23.1±0.51	21.2±0.60	89.7±5.0	72.0±5.4
30	23.3±0.51	21.1±0.32	93.1±1.5	73.2±7.0
試験 2.				
0	23.7±0.51	22.1±0.40	90.1±2.9	71.6±8.6
30	23.6±0.61	21.7±0.50	92.7±1.5	76.8±11.8

ALA処理方法 ; 茎葉処理

A L Aは、オオムギやコムギと同様に主要穀物であるイネの収量を向上させた。しかしながら、イネの湛水処理の試験結果はA L A処理濃度との関係が明確でなく、A L Aの微生物分解の影響も示唆された。このため、A L Aによるイネの収量向上に対する登熟促進の検討は、茎葉処理を用いて検討した。

実験は、農家のコシヒカリ圃場の一部を区画し試験区とした。

A L A処理は、30 ppm A L A水溶液を穂揃い期に茎葉散布処理し、収穫調査は、穂数が22 - 25本の平均穂数を有する株を選び、強勢穎果と弱勢穎果別に1000粒重と登熟歩合を測定した。平均値は、各区100 - 130穂の平均として算出した。結果を表3. 8に示す。

1000粒重はの値は強勢穎果と弱勢穎果で異なるが、いずれもA L A処理と無処理区で差が認められなかった。一方、登熟歩合は、A L A処理により強勢穎果と弱勢穎果ともに、登熟率が数%の向上する作用を示した。

前節においてオオムギに対するA L Aの増収効果を報告し、その効果が1000粒重の変化ではなく、稔実粒数の増加によることを明らかにした。今回、コムギ及びイネにおけるA L A処理について検討した結果、オオムギの場合と同様に収量の向上作用を見出した。また、その効果は、オオムギと同様に登熟歩合の向上に伴う子実収量の向上と考えられた。殆どの評価試験で1000粒重に変化はないが、コムギの開花期処理では、数%であるが1000粒重の増加が観察されており、A L Aの処理時期と収量構成要素へとの関係は、さらに検討すべき課題であろう。

植物成長調節物質によるイネの増収については、塩化コリン¹²³⁾、トリアコンタノール¹²⁴⁾、アブシジン酸¹²⁵⁾、ブラシノライド¹²⁶⁾等の報告があり、いずれも登熟歩合の向上による収量増加としている。また、その機作の多くは、光合成または葉身のクロロフィル量の増加と関連づけて考察されている。トリアコンタノールの研究では、同化産物量の増加や転流量の増大、穀類への窒素転流抑制についても報告されている。

A L Aの成長促進効果の作用機構としては光合成活性の上昇と暗呼吸の抑制を明らかにしているが⁶³⁾、¹¹⁴⁾、¹²⁷⁾、これは光合成による同化産物蓄積量を増加させることを示唆する。穀類に対するA L Aの増収効果は、穎果への炭水化物の移行促進と蓄積量の増加が関与したことが示唆される。

共同研究者である葎田らと共に、A L Aの処理が、ハウレンソウ、チューリップ、ラッキョウ、ネギ、ニンニク等の作物において植物中の糖含量、特に非構造貯蔵多糖であるフルクタンの含量を高めること¹⁰⁶⁻¹¹¹⁾を明らかにした。また、ユーグレナにおいて蓄積多糖であるパラミロンの生成と分解にA L Aが関与するという仮説も提出されている¹²⁸⁾。最近、A L A処理は、植物の気孔開度を増大するとの報告（私信；吉田茂男ら、理化学研究所）もあり、A L Aが光合成能力を増大させる作用を示すことを支持する研究も増えている。

オオムギ、コムギ及びイネで観察された登熟歩合の向上は、A L Aが糖の蓄積や転流、多糖類の生成にも関与している可能性を強く示唆するものと考えている。

以上、コムギでは生育期にA L Aを10～50 ppm濃度で茎葉処理することにより、約15%の収量増加が観察され、イネにおいても処理時期と処理量を検討することにより、最大20%の収量増加が観察された。また、A L Aの効果は、登熟歩合の向上による収量増加と考えられた。

光合成産物の蓄積器官である穂の形成促進に有効な生育期と、穎果への同化産物の蓄積・転流が期待される登熟期の体系的な処理、ならびに施肥とA L A処理の関係をさらに検討しながら統計的な解析を進めることにより、主要穀類の増収に対してA L Aの実用場面での応用が期待できると考えられる。

3. 4 まとめ

主要穀物であるコムギ及びイネの収量と登熟に及ぼすALA処理の効果を評価した。

ALAの処理により、コムギの収量は最大15%の収量増加が観察された。また、イネの収量では、最大20%の収量向上があった。ALAの処理効果は、前節で明らかにしたオオムギの収量向上作用と同様に登熟歩合の向上による収量増加と考えられた。

1) コムギの収量に対するALAの効果、種子処理、生育期2回処理、開花期2回処理を用いて検討した結果、生育期2回処理が最も収量を増加した。種子処理は、その後の生育環境因子の影響を受けALAの効果が明瞭でなかった。開花期処理は、穂の分化が終了しているため1000粒重を増加する傾向を示した。

2) 開花前4日と開花後2日の小穂をALA添加寒天培地上で培養した結果、ALA添加区で穎果の登熟歩合が増加した。その作用は、特に第1～第3穎花で顕著であった。また、ALAの添加効果は、開花後2日の小穂を材料にした場合に大きかった。

3) ホシノヒカリでは、幼穂形成期（最高分けつ期）、開花盛期（分けつ終了後）の1回処理と比較し、幼穂形成期と開花盛期の2回処理において、穂重の増大作用が大きかった。

4) アキニシキでは稔実期である開花終了後に10g/10a処理し、無処理区と比較して平均穂重で21%の増収が観察された。

5) コシヒカリ圃場を用いて穂揃い期に30ppmALA水溶液を茎葉処理した結果、1000粒重は変化がなく、登熟歩合は強勢穎果と弱勢穎果ともに数%の向上が認められた。

6) 穀類に対するALAの増収効果は、登熟促進という作用が大きいと考えられた。

第4節 コウシュンシバとベントグラスの生育と緑化

4. 1 はじめに

ALAは、植物体内においてクロロフィル等のテトラピロール化合物の重要な前駆体である。これまでにALAを植物に処理した場合に、植物成長促進作用を示すことを明らかにした。ALAは、第2節で述べたように成長促進作用以外に、クロロフィル生合成の刺激や光合成能力の増大作用を有すると考えられる。

芝草に関しては、ゴルフ場グリーンにおけるベントグラスの高温期の衰弱に対する改善、コウシュンシバの冬季、早春季の緑化改善などの課題もある。

本研究では、多様な生理作用を示すALA処理が、芝草の生育や緑化に及ぼす影響について検討したので報告する¹²⁷⁾。

4. 2 材料及び実験方法

4. 2. 1 コウシュンシバのランナー生育に及ぼす影響

細砂以下の含量を20%程度に調整した土壤に、ゼオライト5kg/m²、ピートモス4kg/m²、元肥として化成肥料(10-10-10)150g/m²、高度燐酸(42%)50g/m²、微量元素70g/m²を加え、1/5,000aのポットに充填した。10月3日に4節を持つ揃ったコウシュンシバのランナーをポットあたり2本植栽した。10月16日及び11月22日の2回、展着剤を含む0、30、100、300ppmの各ALA塩酸塩水溶液を200ml/m²散布し、翌年5月29日に生育調査を行った。なお試験区は、各区5反復とした。

4. 2. 2 ベントグラスの生育に及ぼす影響

細砂以下の含量を15%程度に調整した土壤を1/5,000aのポットに充填し、これに厚さ2cmのペンクロスベントグラス(*Agrostis palustris* Huds. cv. Penncross)のソッドを1993年9月3日に植栽した。9月9日に0、1、5、10、20、40ppmの各ALA塩酸塩水溶液を1,000ml/m²散布した。試験期間に施

肥は行わなかった。調査は9月29日に地上部重、地下部重を測定した。なお試験区は、各区3反復とした。

4. 2. 3 コウシュンシバの冬季緑色保持及び春季早期緑化に対する作用

宇都宮大学の芝生圃場にて生育した植付け10年目のコウシュンシバを50×50cmの区画に分け、区画境界のランナー及び根を切断して2反復の試験区を設定した。10月1日にN換算で10kg/10a(ミツイ8-8-8)の施肥を行い、3日後に展着剤を含む0、10、30、100、300ppmの各ALA塩酸塩水溶液を200L/10aの割合で茎葉処理した。

その後、冬季緑色保持効果は12月7日、12月17日、12月25日、1月9日に芝草の緑色の程度を目視観察により比較した。翌春季も4月1日、4月7日、4月14日、4月21日および4月28日に芝草の緑色の程度を目視観察して比較した。

4. 3 結果及び考察

A L Aが、コウシュンシバの光合成能力を増大し、暗呼吸を抑制する効果を示すことは、既に第2章で報告した。この結果は、先に報告した作物の場合と同様に、A L Aが芝草の生育を促進する可能性を示している。そこで、コウシュンシバランナーの生育に及ぼすA L A処理の影響を評価した。結果を表3. 9に示す。

30及び100 ppm区ではランナー葉部及び根部の生育が増大し、全体重としても生育量が増加した。300 ppm区では、イネやハツカダイコンの幼植物にA L Aを処理した場合と同様に⁷³⁾、若干の生育抑制が観察された。すなわち適正濃度のA L A処理は、コウシュンシバランナーの生育に対しても促進作用を有することが示唆された。なお本試験は、休眠期に入る前の秋季試験であったが、A L Aの効果が大きく現れている。

同時に実施したベントグラスの評価試験では、コウシュンシバで促進作用が認められた100 ppm区においても生育抑制が観察された（データ非掲載）。このため、A L Aに対するベントグラスの感受性がコウシュンシバに比較して高いためと考え、より低い濃度域のA L A処理を用いてベントグラスの生育評価試験を実施した。結果を表3. 10に示す。

A L Aのベントグラスの生育に対する促進効果は、5 - 10 ppm区において観察されたが、特に根量の増大が顕著であった。1 ppm区ではA L Aによる生育促進効果は認められなかった。40 ppm区において無処理区との差が認められないことは、A L A処理量が多すぎたため、生育抑制の傾向が出始めたものと考えられた。

芝草での生育評価を行うにあたり、実験方法について有益なアドバイスを戴いた東日本グリーン研究所の故角田三郎前所長に心より感謝いたします。

表 3. 9 コウシュンシバランナーの生育に及ぼすALAの影響

乾燥重 (g)	試験区 (ALA濃度 ppm)			
	0	30	100	300
葉部	0.50	0.88	0.75	0.50
茎部	0.50	0.63	0.50	0.38
根部	0.25	0.38	0.38	0.25
全重量	1.25	1.88	1.63	1.13

表 3. 10 ペンクロスベントグラスの生育に及ぼすALAの影響

乾燥重 (g/ポット)	試験区 (ALA濃度 ppm)					
	0	1	5	10	20	40
地上部	0.54	0.55	0.68	0.55	0.47	0.51
地下部	0.30	0.29	0.61	0.64	0.41	0.47
全重量	0.84	0.84	1.29	1.19	0.89	0.98
(%)	(100)	(100)	(154)	(142)	(106)	(116)

次にALAが芝草の光合成機能を高め、生育を促進するとの知見に基づき、冬季の緑化保持と春季の緑化に対するALAの作用について検討を行った。冬季緑化保持の評価結果を表3. 11に、春季早期緑化の評価結果を表3. 12に示す。

コウシュンシバは気温の低下に伴い急速に退色するが、ALA処理区では無処理区に比べ明らかに遅くまで緑色を保持した。特に100ppm区では12月25日まで無処理区との差が認められた。

春季の緑化においても、ALA処理区は早期に緑化する傾向を示した。30-100ppm区では20日程度早く緑化を開始し、4月下旬に無処理区の緑色が追いつくまで優位であった。早春の緑化開始時期を早める効果は、秋期にコウシュンシバが同化産物の蓄積量を高めたことによると推測される

なお、300ppm区では、100ppm区に比べ冬季緑色保持、春季緑化ともにALAの効果が低下しており、生育促進と同様に適正濃度域の存在が示唆された。

ALAの植物に対する生理作用として、クロロフィル含量の増加⁶³⁾、光合成の増加^{63)、114)、127)}、暗呼吸の抑制^{114)、127)}、窒素成分の吸収向上⁶⁷⁾、穀物の収量向上と登熟歩合の増加¹²⁰⁻¹²²⁾、耐寒性や越冬性に深く関わるフラクタン含量の増加¹⁰⁶⁻¹¹¹⁾を明らかにして来た。芝草に対するALAの効果は、他の作物と同様にALA処理により芝草の光合成能力が増大し、同化産物の蓄積に伴う芝草の生理機能の増大によるものと推察されが、作用機構の詳細な解明には今後さらなる検討が必要であろう。

適切な濃度のALA処理は、コウシュンシバの光合成機能を高め、コウシュンシバ、ベントグラス両芝草の生育を促進し、緑色の保持にも有効であることを示した。一方、両芝草におけるALAの適正濃度が異なり、過剰量の処理は生育抑制を示すという実用化への課題も明らかになった。今後、圃場における周年にわたる評価やゴルフ場グリーンへの適用など実用的な評価に加え、ベントグラスの高温期の衰弱に対する改善作用について検討も進めていきたい。

表 3. 12 コウシュンシバの春季の緑色に及ぼすALAの影響

ALA処理濃度 (ppm)	緑化程度 (目視観察)					
	4/1	4/7	4/14	4/19	4/21	4/28
0	-	-	+	+++	+++	++++
10	-	-	++	++++	+++++	+++++
30	+	++	+++	++++	+++++	+++++
100	+	++	+++	++++	+++++	+++++
300	-	-	-++	+++	++++	+++++

- : 緑色無し

+ : 極わずかに緑色

++ : わずかに緑色

+++ : ほぼ緑色

++++ : 緑色

+++++ : 濃緑色

4. 4 まとめ

芝草に対するALAの効果は、他の作物と同様にALA処理によりコウシュンシバの光合成機能を高め、コウシュンシバ、ベントグラス両芝草の生育を促進し、緑色の保持にも有効であることを示した。一方、両芝草におけるALAの適正濃度が異なり、過剰量の処理は生育抑制を示すという実用化への課題も明らかになった。

1) コウシュンシバへのALAの茎葉処理は、30-100ppmの濃度範囲で生育促進や冬季緑色保持及び春季の緑化促進について効果が認められた。

2) ベントグラスにおいても生育促進が観察されたが、ALAに対してコウシュンシバよりも感受性が高く、適正濃度は5-10ppmとコウシュンシバよりも低かった。

3) 芝草生育に対するALAの効果は、これまでに報告した他の作物の場合と同様に、処理濃度により異なる結果が得られた。

4) ALAの効果は、芝草の光合成能力が増大し、同化産物の蓄積に伴う芝草の生理機能の増大によるものと推察される。

5) ゴルフ場のグリーンでは芝草が数mmに刈り込まれ、光合成を行う部位が極端に少ない状況での栽培管理が行われる。ALAの実用場面での利用には、さらなる検討が必要であると考えられる。

第4章 総括

本論文は、5-アミノレブリン酸 (ALA) の植物に対する生理作用を明らかにし、農業分野への応用を目的として検討を行ったものである。

植物分野における5-アミノレブリン酸 (ALA) に関する研究は、1970年代まではALA生合成の解明やクロロフィル生合成あるいは代謝に関連するものが大部分を占めており、ALAの生理作用に関しては全く報告されていない。

1980年代になると、植物の内在量に比べて高い濃度域のALA処理が殺草作用を示すことが報告され、植物内在の物質がこのような生理作用を有することを解明する研究が多くなった。ALAによる殺草作用の発現が、光照射において植物の白化現象を引き起こすことから、ジフェニルエーテル系除草剤等の光要求型除草剤とも関連して、ALAの殺草機構の研究が進められた。現在、ALAの殺草機構は、次のように説明されている。ALA処理により、プロトポルフィリン IXやプロトクロロフィライドというクロロフィル生合成中間体が組織内に異常蓄積する。光増感物質であるこれらの中間体は、光エネルギーにより一重項酸素を生成させる。生成した一重項酸素は細胞膜の主成分である脂質と反応し、過酸化物を生成することにより細胞膜系を破壊し、殺草作用を示すと推定される。ALAの殺草作用については、生分解性の高い除草剤の開発への期待から進められてきたが、除草活性が市販の化学合成農薬に劣ることや安価な工業的製法が確立していなかったことから、今日においても実用化されるに至っていない。また、殺草作用の研究から、植物に対するALAの生育抑制作用についても明らかにされている。

しかしながら、これらの一連の研究は、植物に内在するALA濃度と比べて大過剰のALAを処理した場合の生理作用を検討したものである。

近年のクロロフィル生合成及び代謝研究の進展により、ALAはテトラピロール化合物群の生合成における鍵中間体であり、ALA生合成段階が最初の律速段階であることが明らかにされた。同時に植物に内在するAL

A量も極低濃度に厳密に制御されていることも明らかにされている。

本研究は、ALAが光合成色素であるクロロフィルの前駆体であり、かつ光合成や呼吸に深く関与するチトクロム類の前駆体でもあることに着目し、殺草作用を示さない濃度域におけるALA処理が、植物体に及ぼす作用について検討を行ったものである。内在ALA量に見合うALA処理が、植物に及ぼす生理作用についてはこれまで殆ど研究報告がない。

4. 1 ALAの植物に対する基礎生理活性

本章は、殺草作用を示さない濃度域におけるALA処理が、植物体に及ぼす基礎生理活性について検討を行ったものである。

4. 1. 1 クロロフィル生合成および光合成に及ぼす影響

ALAが植物において単に生合成中間体として存在するだけでなく、植物のクロロフィル合成、光合成、暗呼吸、及び生育に対して生理作用を示すことを明らかにした。また、適切なALAの処理はこれらの作用を増大させるが、過剰処理は、その作用を減少させた。

1) 植物に対するALA処理は、光存在下の特定の濃度域で植物の成長を促進した。一方、暗条件下では、植物の成長を促進する濃度域が認められなかった。

2) 植物の組織培養培地へのALA添加は、クロロフィル生合成及び増殖量に影響を与えた。ALAの作用は、クロロフィル濃度上昇と増殖促進に対して異なる至適濃度が存在すると考えられた。

3) ALAは、クロロフィル生合成を単独で促進する作用を示した。光合成の増大はALA単独処理では観察されず、光と栄養の存在する条件でのALA処理により見出された。

4) 双子葉、単子葉植物にかかわらず、ALA処理は肥料存在条件下での植物の光合成能力を高めた。また、暗条件下では暗呼吸の抑制作用が観察された。

ALA処理後の活性発現期間がハツカダイコンとシバで異なる結果を示した点は、さらに検討する必要がある。

5) A L Aの植物に対する成長促進作用は、光合成の促進と暗呼吸の抑制による同化産物の蓄積量の増大によることが示唆された。

6) 植物に対するA L Aの根部吸収処理及び茎葉処理が類似の生理作用を示すことは、A L Aの成長促進作用を実際の植物栽培や農業に広く応用できる可能性を示した。

4. 1. 2 幼植物の生育に及ぼす影響

A L Aの成長促進効果とその適正処理方法を明らかにするために、A L Aが幼植物の初期生育に及ぼす影響について、イネ、トウモロコシ、インゲンおよびハツカダイコンの幼苗を用いて、処理方法と処理濃度の関係を中心に検討した。その結果、全ての植物において成長促進作用が認められたが、A L Aの効果は処理方法や処理濃度の影響を強く受けた。一方、植物種間の違いはあまり大きな影響を受けないことも明らかにした。

A L Aの成長促進効果の特徴に乾物重量の充実が挙げられ、健苗育成の面から農業分野への応用が期待できる可能性を示した。

1) A L Aは、適切な処理方法により幼植物の成長を促進した。処理方法と処理濃度の関係は次の通りであった。

根部浸漬処理	;	0. 1 ~ 3	ppm	
茎葉散布処理	;	1 0 ~ 3 0 0	ppm	(200L/10a)
土壌 処理	;	1 0 ~ 1 0 0	g/10a	

また、過剰処理は、生育抑制作用が観察された。

2) イネ、トウモロコシ幼苗では、A L Aの成長促進効果は草丈よりも乾物重の増加に特徴があった。

3) ハツカダイコン、インゲンマメの幼苗では、可食部又は根部という地下部の生育にA L A処理の特徴が見られた。

4) A L Aの成長促進作用は、単子葉、双子葉植物種間において類似した結果を示した。A L Aの殺草作用が植物種間で異なるという報告とは、挙動が異なった。

5) A L Aは、土壌微生物により、速やかに分解される可能性を示した。

4. 1. 3 イネ苗の耐冷性の向上効果

A L Aが、クロロフィル合成を促進し植物成長調節作用を有するという新規な知見に基づき、A L A処理が、イネ幼苗の耐冷性に及ぼす影響について検討を行った。植物は低温ストレスにより、種々の生化学的な応答を発現すが、低温感受性の高い植物における典型的な応答の一つは、A L Aの生合成の低下やクロロフィル含量の明らかな減少である。

本検討では、耐冷性向上作用が既に報告されているブラシノライド (B R)、アブシジン酸 (A B A) との比較評価も行った。

1) A L A前処理は、低温処理後のイネ苗のリーフローリング比率や電解質の漏出量を減少させた。A L Aの有効濃度については、根部浸漬処理において0.1 - 1.0 ppmの範囲と考えられ、より高濃度のA L A処理は、その効果を減少する傾向を示した。

2) 5 ± 1.5 °Cでの低温処理後におけるイネの回復成長において、A L A処理は、苗の成長を大きく助長した。特に苗の乾燥重量を無処理区の1.4 - 1.7倍に増加させた。

3) B Rも、低温ストレスによるイネ苗の障害を軽減した。B Rの効果は、A L Aと類似した効果を示した。しかしながら、低温処理後の回復成長において、イネ苗の乾燥重量の増加量はA L A処理よりも少なかった。

4) ストレスに関与する植物ホルモンとして知られているA B Aは、苗のリーフローリング比率を低下し、電解質の漏出量の低減にはA L AやB Rよりも大きい作用を示した。

5) リーフローリング比率の低減に及ぼす効果が、A B Aでは古い葉よりも新しい葉に効果を示し、A L AとB Rでは逆に古い葉により効果を示すなど、植物に抵抗性を与える機構はA B AとA L A、B Rの間では異なる可能性が示唆された。

6) A L A処理による植物の抵抗性の向上については、耐塩性向上作用も最近明らかにしている^{129), 130)}。

4. 2 作物の収量増加及び登熟に及ぼすALAの作用

ALAの基礎生理活性を明らかにする中で、ALAが植物の成長調節に関与していることを示した。すなわち、ALAは一種の植物ホルモン様物質であり、植物成長調節物質として農業分野への応用が考えられる。

本章では、農業生産に利用されている主要作物の収量向上と登熟向上を目的としてALAの処理条件について検討を行った。なお処理方法については、農業場面で適用性が高い茎葉処理を中心に検討した。

4. 2. 1 ALA処理による作物の収量向上

ALAが有する植物の光合成能力の増強効果、幼植物の成長促進効果等の生理作用は、光合成の促進作用が報告されているベンジルアデニンや塩化コリン等の植物成長調節物質と同様に、穀物や野菜の生育や収量を向上させる可能性が考えられた。

インゲンマメ、ハウレンソウ、オオムギ、ジャガイモ、ニンニクを材料にALA処理が作物の収量に及ぼす効果について検討した結果、ALAは適切な処理により、無処理区に対して10-60%の収量を増加させた。

1) インゲンマメの試験から、ALA処理による作物増収の方法として健苗育成による収量増加と、同化産物の蓄積・転流時期に処理を行う収量増加の2つの可能性を見出した。

2) ハウレンソウの試験から、ALAの作用として葉菜類の生育促進と肥料成分の取り込み促進効果を確認した。

3) オオムギの試験から、穀類の増収は稔実粒数の増加が主たる要因であり、1000粒重が殆ど変化しないことを明らかにした。

4) ジャガイモ、ニンニクの試験から、茎葉処理により塊茎や鱗茎という地下部の収量増加が可能であることを明らかにした。また、ALAは、塊茎や鱗茎の肥大を促進した。

5) 収量向上に対するALAの効果は、他の植物成長調節剤と同様に処理時期にその効果がより大きく異なることを明らかにした。

6) ALAの開花期処理からは、茎葉よりも花（生殖器官）においてAL

Aの感受性が高い可能性を示唆した。

4. 2. 2 A L A処理によるコムギ及びイネの収量向上と登熟

主要穀物であるコムギ及びイネの収量と登熟に及ぼすA L A処理の効果を評価した。

A L Aの処理により、コムギの収量は最大15%の収量増加が観察された。また、イネの収量では、最大20%の収量向上があった。A L Aの処理効果は、前節で明らかにしたオオムギの収量向上作用と同様に登熟歩合の向上による収量増加と考えられた。

1) コムギの収量に対するA L Aの効果を、種子処理、生育期2回処理、開花期2回処理を用いて検討した結果、生育期2回処理が最も収量を増加した。種子処理は、その後の生育環境因子の影響を受けA L Aの効果が明瞭でなかった。開花期処理は、穂の分化が終了しているため1000粒重を増加する傾向を示した。

2) 開花前4日と開花後2日の小穂をA L A添加寒天培地上で培養した結果、A L A添加区で穎果の登熟歩合が増加した。その作用は、特に第1～第3穎花で顕著であった。また、A L Aの添加効果は、開花後2日の小穂を材料にした場合に大きかった。

3) ホシノヒカリでは、幼穂形成期（最高分げつ期）、開花盛期（分げつ終了後）の1回処理と比較し、幼穂形成期と開花盛期の2回処理において、穂重の増大作用が大きかった。

4) アキニシキでは稔実期である開花終了後に10g/10a処理し、無処理区と比較して平均穂重で21%の増収が観察された。

5) コシヒカリ圃場を用いて穂揃い期に30ppmA L A水溶液を茎葉処理した結果、1000粒重は変化がなく、登熟歩合は強勢穎果と弱勢穎果ともに数%の向上が認められた。

6) 穀類に対するA L Aの増収効果は、登熟促進という作用が大きいと考えられた。

4. 2. 3 コウシュンシバとベントグラスの生育と緑化

芝草に対するALAの効果は、他の作物と同様にALA処理によりコウシュンシバの光合成機能を高め、コウシュンシバ、ベントグラス両芝草の生育を促進し、緑色の保持にも有効であることを示した。一方、両芝草におけるALAの適正濃度が異なり、過剰量の処理は生育抑制を示すという実用化への課題も明らかになった。

1) コウシュンシバへのALAの茎葉処理は、30-100ppmの濃度範囲で生育促進や冬季緑色保持及び春季の緑化促進について効果が認められた。

2) ベントグラスにおいても生育促進が観察されたが、ALAに対してコウシュンシバよりも感受性が高く、適正濃度は5-10ppmとコウシュンシバよりも低かった。

3) 芝草生育に対するALAの効果は、これまでに報告した他の作物の場合と同様に、処理濃度により異なる結果が得られた。

4) ALAの効果は、芝草の光合成能力が増大し、同化産物の蓄積に伴う芝草の生理機能の増大によるものと推察される。

5) ゴルフ場のグリーンでは芝草が数mmに刈り込まれ、光合成を行う部位が極端に少ない状況での栽培管理が行われる。ALAの実用場面での利用には、さらなる検討が必要であると考えられた。

4. 3 まとめ及び総合考察

ALAの植物に及ぼす作用を検討した結果、適正な処理は、これまでに報告されている殺草作用や生育抑制作用とは全く逆の成長促進作用を示し、健苗育成、幼植物の成長促進、主要作物の収量向上、穀類の登熟率の向上、緑化維持という農業分野で有用な生理作用を示すことを明らかにした(図4.1)。

これらの結果は、ALAが植物において単なるクロロフィルの前駆体ではなく、多様な植物成長調節作用を有する物質としての生理活性を持つことを明らかにした最初の報告である。

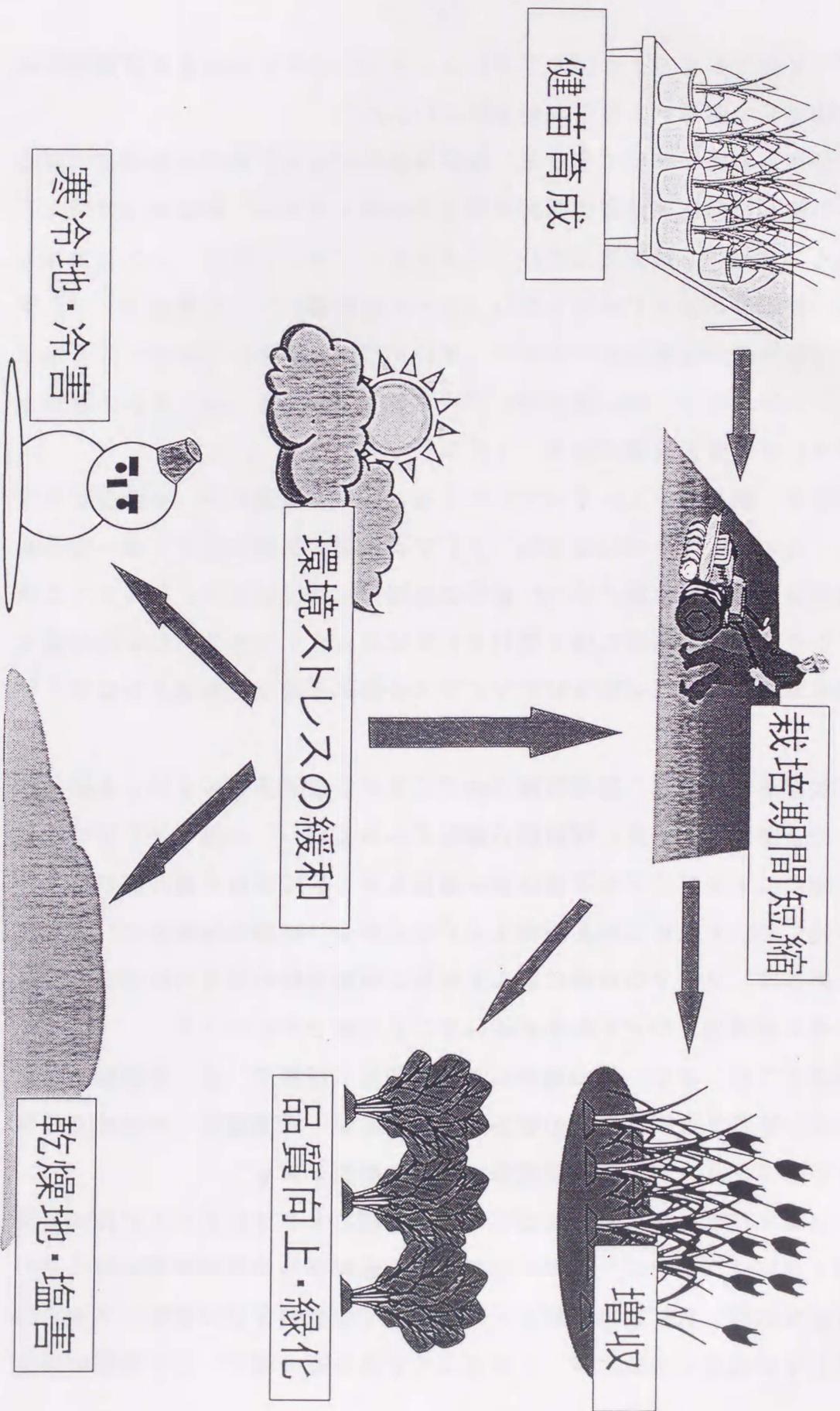


図 4.1.5-アミノレブリン酸の農業利用

A L Aの応用生理作用は、クロロフィル生合成の増大、光合成能の増強、暗呼吸の抑制、気孔開度の拡大というA L Aの基礎活性の発現によるものと考えられた。さらに、窒素に代表される肥料成分の吸収促進作用についても示唆された。これらの基礎活性は、環境ストレスに対しても植物の抵抗性を向上させ、耐冷性や耐塩性の向上が観察された。

一方、A L Aの生理活性の発現は、処理方法、処理濃度、処理時期により異なること、また、他の植物成長調節物質と同様に、光、栄養源、温度等の他の環境因子からも影響を受けることが明らかになった。

本論文は、A L Aの植物に対する新規な生理活性の発見だけでなく、農業分野における応用方法を提唱するものである。今回の実験系は、多種類の作物に対するA L Aの生理作用を検討することに主体を置いたため、個々の実験規模が小さく統計的な解析も十分でない。今後、A L Aの実用的な利用を目指して、圃場試験を中心にさらに研究を進めて行く予定である。

光合成能の増大に代表されるA L Aの多様な生理活性が明らかになったことから、光合成機能に深く関わりとされるサイトカイニンの生理活性との類似性を最後に考察したい。最近の研究に代表的なサイトカイニンであるベンジルアデニンの作用点が、A L A生合成の促進にあるとの一連の報告がある。報告されているベンジルアデニンの生理活性と、今回明らかにしたA L Aの生理活性を表4. 1にまとめた。

ベンジルアデニンの生理活性における最大の特徴は、オーキシン共存下での細胞分裂の促進作用であるが、A L Aはオーキシンと併用しても非常に弱い細胞分裂作用しか示さない（データ非掲載）。この事実は、A L Aがサイトカイニン様物質でないことを示す。しかしながら、ベンジルアデニンの細胞分裂促進作用は組織培養では明確であるが、植物体では必ずしもその作用が証明されておらず、細胞分裂促進作用と光合成促進等の他の生理作用との関連も十分に解明されていない。

A L Aが、表4. 1に示すようにサイトカイニンと類似する生理活性を

発現することは、ベンジルアデニンがALAの生合成を促進する点を考慮すると非常に興味深い現象である。

ALAが多様な生理作用を示すことを明らかにしたことは、サイトカイン類の多様な生理作用を解析する上でも意義深いと考える。

本研究に対して、専門分野の諸氏からご批判をいただくと共に、ALAの今後の研究に対してご助言、ご指導をを賜れば幸いである。

表 4. 1 サイトカイニンと5-アミノレブリン酸
生理作用の類似性

類似した作用	サイトカイニン*	ALA 低濃度処理
葉の緑化促進	クロロフィル蓄積促進	同 左
葉の老化防止	退色阻止	同 左
塊茎の形成	促進的	同 左
転 流	促進的	同 左?
気孔の開孔	拡 大	同 左
環境ストレス	緩和作用	同 左
光合成活性	上 昇	同 左
組織の呼吸	抑制的	同 左?
<hr/>		
一致しない作用	サイトカイニン*	ALA 低濃度処理
細胞分裂促進 (オキソジンの共存)	強い	弱い(促進的)
根の成長	阻害的	促進的
果実の成熟	促進的	変化なし (リンゴ)

サイトカイニン処理は、ALA の生合成促進を促進する。

*「植物ホルモン・ハンドブック」 高橋信孝、増田芳雄より抜粋

サイトカイニンのその他生理作用；種子の発芽（阻害条件の緩和）、芽の休眠打破（促進的）、芽の成長（頂芽優勢、茎の肥大成長）、葉の成長（細胞拡大）、花芽誘導（促進的）と比較は、未検討

引用文献

- 1) 佐々茂：血液尿化学検査 免疫学的検査 第3版、pp.690-697、日本臨床社、大阪 (1989).
- 2) J. C. Kennedy, R. H. Pottier and D. C. Pross : *J. Photochem. Photobiol.*, 6, 143-148 (1990).
- 3) J. Leveckis, J. L. Burn, N. J. Brown and M. W. Reed : *J. Urol.*, 152, 550-553 (1994).
- 4) S. Iinuma, S. S. Farshi, B. Ortel and T. Hasan : *Br. J. Cancer*, 70, 21-28 (1994).
- 5) W. E. Grant, P. M. Speight, A. J. MacRobert, C. Hopper and S. G. Brown : *Br. J. Cancer*, 70, 72-78 (1994).
- 6) C. A. Rebeiz, J. K. Juvik and C. C. Rebeiz : *Pesti. Biochem. Physiol.*, 30, 11-27 (1988).
- 7) T. Imai, H. Globerman, J. M. Gertner, N. Kagawa and M. R. Waterman : *J. Biol. Chem.*, 268, 19681-19689 (1993).
- 8) F. S. MacDonald : *Can. J. Cem.*, 52, 3257-3258 (1974).
- 9) A. Pfaltz and S. Anwar : *Tetrahedron Lett.*, 25, 2977-2980 (1984).
- 10) C. Herdeis and A. Dimmerling : *Arch. Pharm.*, 317, 304-306 (1984).
- 11) H. Kawakami, T. Ebata and H. Matsushita : *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1687-1688 (1991).
- 12) J. Lie, O. Brathwaite, D. S. Cosloy and S. C. Russell : *J. Bacteriol.*, 171, 2547-2552 (1989).
- 13) 永井史郎、西尾尚道：公開特許公報、特開平 1-148193 (1989).
- 14) A. S. Koesnander and S. Nagai : *Biotechnol. Lett.*, 11, 567-572 (1989).
- 15) S. I. Beale : *Plant Physiol.*, 45, 504-506 (1970).
- 16) K. Sasaki, M. Hayashi and S. Nagai : *J. Ferment. Technol.*, 56, 200-206 (1987).
- 17) T. Tanaka, K. Watanabe, Y. Hotta, D. Lin, K. Sasaki and S. Nagai : *Biotechnol. Lett.*, 13, 589-594 (1991).
- 18) 佐々木健、田中徹、堀田康司、西尾尚道、永井史郎：生物工学会誌、71, 428-431 (1993).
- 19) 田中徹、渡辺圭太郎、西川誠司、堀田康司、佐々木健、室岡義勝、永井史郎：生物工学会誌、72, 461-467 (1994).
- 20) 佐々木健、田中徹、堀田康司：水処理技術、36, 135-145 (1995).

- 21) 田中徹：広島大学博士論文、「光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* による5-アミノレブリン酸の生産とその応用」(1995).
- 22) 宮地伸也、渡辺圭太郎、西川誠司、田中徹、堀田康司、室岡義勝：平成9年度日本生物工学会大会 講演要旨集、pp. 106 (1997).
- 23) H. Takeya, H. Ueki, S. Miyanari, T. Shimizu and M. Kojima : *J. Photochem. Photobiol. A : Chem.*, 94, 167-171 (1996).
- 24) ポルフィリン研究会編：ポルフィリン・ヘムの生命科学、現代化学、増刊 27、東京化学同人、東京(1995).
- 25) P. M. Jordan and D. Shemin : *Enzyme*, 2, 239 (1972).
- 26) 坪井昭三：化学と生物、10, 770-778 (1972).
- 27) E. L. Neidle and S. Kaplan : *J. Bacteriol.*, 175, 2292-2303 (1993).
- 28) E. L. Neidle and S. Kaplan, : *J. Bacteriol.*, 175, 2304-2313 (1993).
- 29) S. I. Beale and P. A. Castelfranco : *Plant Physiol.*, 53, 297-303 (1974).
- 30) S. I. Beale, S. P. Gough and S. Granick, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* : 72, 2719-2723 (1975).
- 31) J. D. Weinstein and S. I. Beale : *Arch. Biochem. Biophys.*, 239, 87-93 (1985).
- 32) S. M. Mayer and S. I. Beale : *Plant Physiol.*, 94, 1365-1375 (1990).
- 33) 松本宏：ポルフィリン研究会編、ポルフィリン・ヘムの生命科学、現代化学、増刊 27、pp.237-245, 東京化学同人、東京(1995)
- 34) 林典夫：ポルフィリン研究会編、ポルフィリン・ヘムの生命科学、現代化学、増刊 27、pp.22-32, 東京化学同人、東京(1995)
- 35) S. I. Beale and J. D. Weinstein : In H. A. Dailey, ed., *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls*, McGraw-Hill, New York, pp.287-391(1990).
- 36) J. D. Weinstein, R. W. Howell, R. D. Leverette, S. Y. Grooms, P. S. Brignola, S. M. Mayer, and S. I. Beale : *Plant Physiol.*, 101, 657-665 (1993).
- 37) S. M. Mayer and S. I. Beale : *Plant Physiol.*, 94, 1365-1375 (1990).
- 38) T. Masuda, H. Ohta, Y. Shioi and K. Takamiya : *Plant Physiol. Biochem.*, 34, 11-16 (1996).
- 39) S. I. Beale and P. A. Castelfranco : *Plant Physiol.*, 53, 291-296 (1974).
- 40) T. Ushimaru, M. Shibasaka and H. Tsuji : *Plant Cell Physiol.*, 33, 771-778 (1992).
- 41) M. Dei : *Physiol. Plant*, 64, 153-160 (1985).

- 4 2) T. Matuda, R. Tanaka, Y. Shioi, K. Takamiya, C. G. Kannangara, and H. Tsuji : *Plant Cell Physiol.*, 35, 183-188 (1994).
- 4 3) T. Masuda, H. Ohta, Y. Shioi, H. Tsuji, and K. Takamiya : *Plant Cell Physiol.*, 36, 1237-1243 (1995).
- 4 4) S. Granick : *Plant Physiol.*, 34, XVIII (1959).
- 4 5) P. A. Castelfranco, P. M. Rich, and S. I. Beale : *Plant Physiol.*, 53, 615-618 (1974).
- 4 6) C. A. Rebeiz, A. Montazer-Zouhour, H. J. Jopen, and S. M. Wu : *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 390-401 (1984).
- 4 7) H. Matumoto, Y. Tanida and K. Ishizuka : *Pestic. Biochem. Physiol.*, 48, 214-221 (1994).
- 4 8) Y. Askira, B. Rubin, and H. D. Rabinowitch : *Free Rad. Res. Comms.*, 12-13, 837-843 (1991).
- 4 9) N. Chakraborty and B. C. Tripathy : *Plant Physiol.*, 98, 7-11 (1992).
- 5 0) C. A. Rebeiz, A. Montazer-Zouhour, J. M. Mayasich, B. C. Tripathy, S. M. Wu and C. C. Rebeiz : *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 6, 385-434 (1988).
- 5 1) K. Naito, T. Takahashi, Y. Endo and S. Shimizu : *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 97.S., 309-316 (1980).
- 5 2) A. K. Stobart and I. Ameen-Bukhari : *Biochem. J.*, 222, 419-426 (1984).
- 5 3) G. C. Kannangara, S. P. Gough, J. K. Hooper, A. Kahn, and D. von Wettstein : *Trends Biochem. Sci.*, 13, 139-143 (1988).
- 5 4) S. I. Beale : *Plant Physiol.*, 93, 1273-1279 (1990).
- 5 5) M. A. Schneergurt and S. I. Beale : *Plant Physiol.*, 81, 965-972 (1986).
- 5 6) E. C. Sisler and W. H. Klein : *Physiol. Plant*, 16, 315-322 (1963).
- 5 7) C. Sundqvist : *Physiol. Plant*, 22, 147-156 (1969).
- 5 8) K. Nadler and S. Granick, *Plant Physiol.* : 46, 240-246 (1970).
- 5 9) C. A. Rebeiz, K. N. Reddy, U. B. Nandihalli, and J. Velu : *Photochem. Photobiol.*, 52, 1099-1117 (1990).
- 6 0) U. Kittsteiner, A. Mostowska, and W. Rudinger : *Physiol. Plant*, 81, 139-147 (1991).
- 6 1) Y. Tanaka, A. Tanaka, and H. Tsuji : *Plant Physiol. Biochem.*, 30, 365-370 (1992).

- 62) K. Sasaki, F. J. Marquez, N. Nishio, and S. Nagai : *J. Ferment. Bioeng.*, 79, 453-457 (1995).
- 63) Y. Hotta, T. Tanaka, H. Takaoka, Y. Takeuchi and M. Konnai : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 2025-2028 (1997).
- 64) L. L. Llag, A. M. Kumar, and D. Soll : *The Plant Cell*, 6, 265-275 (1994).
- 65) 吉田達、阿部知子、竹内安智、吉田茂男：植物化学調節学会 第29回大会 研究発表記録集、pp.153-154 (1994).
- 66) S. N. Mishra and H. S. Srivastava : *Experientia*, 39,1118-1120 (1983).
- 67) 葭田隆治、田中徹、堀田康司：植物化学調節学会 第28回大会 研究発表記録集、pp.92-93 (1993).
- 68) J. D. Weinstein and S. I. Beale : *Arch. Biochem. Biophys.*, 237, 454-464 (1985).
- 69) B. M. Chereskin and P. A. Castelfranco : *Plant Physiol.*, 69, 112-116 (1982).
- 70) R. A. Fletcher and D. McCullagh : *Planta*, 101, 88-90 (1971).
- 71) 高橋信孝、増田芳雄編：植物ホルモンハンドブック 上、培風館、東京 (1994).
- 72) 高橋信孝、増田芳雄編：植物ホルモンハンドブック 下、培風館、東京 (1994).
- 73) 堀田康司、渡辺圭太郎、田中徹、竹内安智、近内誠登：日本農薬学会誌、22, 102-107 (1997).
- 74) K. Sasaki, S. Ikeda, Y. Nishizawa and M. Hayashi : *J. Ferment. Technol.*, 65, 511-515 (1987).
- 75) N. G. Averina and E. B. Yaronskaya : *Photosynthetica*, 25, 27-31 (1991).
- 76) 北条雅章、野間豊、石塚皓造：雑草研究、31, 別号 第25回講演要旨集、pp.91-92 (1986).
- 77) 北条雅章・野間豊・石塚皓造：雑草研究、31, 別号 第25回講演要旨集、pp.93-94 (1986).
- 78) H. Hartel, G. Walter and T. Hanke : *J. Plant Physiol.*, 142, 230-236 (1993).
- 79) H. Hartel, R. F. Haseloff, G. Walter and B. Rank : *J. Plant Physiol.*, 142, 237-243 (1993).
- 80) T. Alberta : *Act Bot. Neerl.*, 18, 39-49 (1969).

- 8 1) R. R. Hodgins and R. B. van Huystee : *Can. J. Bot.*, 63, 711-715 (1985).
- 8 2) R. R. Hodgins and R. B. van Huystee : *J. Plant Physiol.*, 125, 325-336 (1986).
- 8 3) R. R. Hodgins and R. B. van Huystee : *J. Plant Physiol.*, 126, 257-268 (1986).
- 8 4) Y. Hotta, T. Tanaka, H. Takaoka, L. Bingshan, Y. Takeuchi and M. Konnai : *J. Pesti. Sci.*, 23, 29-33 (1998).
- 8 5) N. B. Mandava : *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39, 23-52 (1988).
- 8 6) Y. Kamuro and S. Takatsuto : "Brassinosteroids : Chemistry, Bioactivity and Applications," ACS Symposium, Ser. 474, ed. by H. G. Cutler, T. Yokota and G. Adam, American Chemical Society, Washington, DC. pp. 292-297 (1991).
- 8 7) R. Y. He, G. J. Wang and X. S. Wang : "Brassinosteroids : Chemistry, Bioactivity and Applications," ACS Symposium, Ser. 474, ed. by H. G. Cutler, T. Yokota and G. Adam, American Chemical Society, Washington, DC. pp. 220-230 (1991).
- 8 8) A. Rikin, M. Maldman, A. E. Richmond and A. Dovrat : *J. Expt. Bot.*, 26, 175-183 (1975).
- 8 9) C. N. Keith and B. D. Mackersie : *Plant Physiol.*, 80, 766-770 (1986).
- 9 0) A. J. Robertson and L. B. Gusta : *Can. J. Bot.*, 64, 2758-2763 (1986).
- 9 1) A. J. D. Zeevaart and R. A. Creelman : *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39, 439-473 (1988).
- 9 2) A. M. Hetherington and R. S. Quatrano : *New Phytol.*, 119, 9-32 (1991).
- 9 3) N. Kabaki and K. Tajima : *Japan. J. Crop. Sci.*, 50, 489-494 (1981).
- 9 4) A. A. Flores-Nimedez, K. Dorffling and B. S. Vergara : *IRRN.*, 15 : 2, 19 (1990).
- 9 5) A. A. Flores-Nimedez, K. Dorffling and B. S. Vergara : *J. Plant Growth Regul.*, 12, 27-34 (1993).
- 9 6) T. M. Lee, H. S. Lur and C. Chu : *Plant, Cell Environ.*, 16, 481-490 (1993).
- 9 7) T. M. Lee, H. S. Lur and C. Chu : *Crop Sci.*, 35, 502-508 (1995).
- 9 8) A. L. Brule-Babel and D. B. Fowler : *Can. J. Plant Sci.*, 69, 355-366 (1989).
- 9 9) D. P. Livingston, C. R. Olien and R. D. Freed : *Crop Sci.*, 29, 1266-1270 (1989).

- 100) E. J. Kendall and B. D. McKersie : *Physiol. Plant* 76, 86-94 (1989).
- 101) R. M. M. Crawford : "Studies in Ecology," Vol.2, Blackwell Scientific, Palo Alto, California, pp.22-31 (1989).
- 102) I. Nishizawa and N. Murata : *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 541-586 (1995).
- 103) T. J. Close, A. A. Kortt and P. M. Chandler : *Plant Mol. Biol.*, 13, 95-108 (1989).
- 104) D. Emaus, R. Fenton and J. M. Wilson : *J. Exp. Botany.*, 34, 434-441 (1983).
- 105) Y. Y. Chen and C. H. Lin : *J. Plant Growth Regul.*, 12, 51-55 (1993).
- 106) 葎田隆治、田中陽子、田中徹、堀田康司 : 日本作物学会紀事、64, 別号1、第199回講演要旨・資料集、pp.140-141 (1995).
- 107) R. Yoshida, T. Tanaka and Y. Hotta : *Abs. of 15th International Conference on Plant Growth Substances, Mineapolis, USA.* pp. 417 (1995).
- 108) 葎田隆治、田中徹、堀田康司 : 植物化学調節学会 第30回大会研究発表記録集、pp.69-70 (1995).
- 109) R. Yoshida, T. Tanaka and Y. Hotta : *Proc. of the 3^d Joint PGRSA-JSCPR Meeting, Calgary, Canada* pp. 177-182 (1996).
- 110) 葎田隆治、百島孝紀、堀田康司、田中徹 : 日本作物学会紀事、66, 別号1、第203回講演要旨・資料集、pp.272-273 (1995).
- 111) 葎田隆治、山川崇、大角明弘、堀田康司、田中徹 : 植物化学調節学会 第32回大会 研究発表記録集、pp.121-122 (1997).
- 112) 岡田齊夫、坂齊、玉木佳男、本吉総男編 : バイオ農薬・生育調節剤開発利用マニュアル、エル・アイ・シー、東京 (1987).
- 113) 高橋信孝、広瀬和栄、佐藤幹夫、斉藤隆、上本俊平 : 植物調整物質の園芸的利用、誠文堂新光社、東京 (1973).
- 114) Y. Hotta, T. Tanaka, H. Takaoka, Y. Takeuchi and M. Konnai : *Plant Growth Regul.*, 22, 109-114 (1997).
- 115) P. H. Lovell and A. Booth : *New Phytol.*, 66, 525-537 (1967).
- 116) D. Kumar and P. F. Wareing : *New Phytol.*, 73, 833-840 (1974).
- 117) D. J. Mares, H. Marschner and A. Krauss : *Physiol. Planta.*, 52, 267-274 (1981).
- 118) C. Engels, J. Schwenkel, L. E. Bedewy and B. Sattelmacher : *J. Agri. Sci. Cambridge*, 124, 213-218 (1995).
- 119) 豊川幸穂 : 植調、28, 292-299 (1994).

- 120) L. Bingshan, Y. Hotta, Q. Yinglan, Zhao Jinsong, T. Tanaka, Y. Takeuchi and M. Konnai : " Effects of 5-Aminolevulinic Acid on The Growth and Ripening of Wheat" *J. Pesti. Sci.* 投稿中
- 121) Y. Hotta, T. Tanaka, R. Yoshida, Y. Takeuchi and M. Konnai : *Proc. of the 2nd Asian Crop Sciece Conference, Fukui, Japan*, pp.524-525 (1996).
- 122) 堀田康司、田中徹、葭田隆治、竹内安智、近内誠登：植物化学調節学会 第30回大会 研究発表記録集、pp.71-72 (1995).
- 123) 横山昌雄、村岡哲郎、小林美香：植調、28, 247-250 (1994).
- 124) 名越時秀、川島栄：日作紀、65, 437-444 (1996).
- 125) G. S. Seo, J. Y. Less, S. Y. Kim and Y. Ota : *J. Crop Sci.*, 28, 189-194 (1983).
- 126) 藤井清一、坂齊、平井康市：日本作物学会紀事、60, 別号 2、第192回講演要旨・資料集、pp.147-148 (1991).
- 127) 堀田康司、田中徹、近内誠登、竹内安智：「5-アミノレブリン酸のコムシバとベントグラスの生育に及ぼす影響」芝草研究 投稿中
- 128) 北岡正三郎編：ユーグレナ 生理と生化学、pp.23-30 学会出版センター、東京 (1989)
- 129) 倉持仁志、渡辺圭太郎、田中徹、堀田康司、竹内安智、近内誠登：植物化学調節学会 第31回大会 研究発表記録集、pp.88-89 (1996).
- 130) 倉持仁志、渡辺圭太郎、田中徹、堀田康司、竹内安智、近内誠登：植物化学調節学会 第32回大会 研究発表記録集、pp.117-118 (1997).

謝辞

本研究を進める上で研究開始時から本論文作成まで、終始ご指導ご鞭撻を賜りました宇都宮大学 近内誠登名誉教授、宇都宮大学雑草科学研究センター 竹内安智教授、米山弘一教授 倉持仁志講師に謹んで感謝の意を表します。また、本論文の作成にご指導、ご助言を賜りました東京農工大学 安部 浩教授、茨城大学 児玉 治教授、河野芳樹教授、宇都宮大学 関本 均助教授に深謝いたします。植物生理活性の評価における共同研究者として、共に研究を進めながらご指導を戴きました岩手大学 横田 清教授、富山県立大学短期大学部 葭田隆治助教授に厚くお礼申し上げます。また、本研究に関して理化学研究所 吉田茂男主任研究員、千葉大学 三位正洋教授を始めとして多くの方々よりご助言を戴きましたことにお礼申し上げます。

本研究の実施基盤である微生物を用いたALAの工業的製造法の開発にご指導を戴きました広島大学 永井史郎名誉教授、大阪大学 室岡義勝教授、広島電機大学 佐々木健教授に感謝いたします。

本研究を進めること、また、本論文の発表を許可いただきました株式会社コスモ総合研究所に深謝いたします。特に、研究を温かく見守り、かつ適切にご指導を賜りました高岡日出男顧問、上山宏輝常務取締役には大変お世話になりました。実験を実施するにあたり、環境技術2グループの 田中 徹博士、西川誠司博士、渡辺圭太郎研究員、宮地伸也研究員を始めとするグループ員の皆様にもお世話になりました。その他、研究開発部 安井喜昭主管研究員、コスモ・バイオ(株) 高橋 潔氏を始めとして研究開発部、研究推進室、分析研究室等の関連部署の皆様にも心よりお礼申し上げます。

最後に、日々、私を支えてくれました妻ひろみや家族に感謝します。

