

大豆植物体内における α -ケトグルタル酸 含量の変化

土屋敏夫・白倉徳明*

信州大学農学部 作物・育種学研究室

I 緒 言

大豆は子実内に多量の蛋白質、脂肪などを集積する重要な農作物の一つであり、これらの物質の生体内における合成過程を知ることは興味ある問題である。植物体内に検出される α -ケトグルタル酸は、これらの物質の合成に関与する代謝経路の一環であるTCA回路の一員として、重要な役割を果たしていることは周知の事実^{1,9)}である。この生体内における α -ケトグルタル酸の量的変動をとらえることにより、大豆植物体内における蛋白合成解明への手がかりを得る目的で本実験を行なった。ここでは大豆植物体の各部位における α -ケトグルタル酸含量の生育に伴う変化について報告する。

II 実験材料および方法

材料 1965年に圃場で栽培した大豆（品種“兄”）を供試植物とし、午前9時に10～20個体ずつ採取、子葉節以下は根部とし、それ以上を葉身、葉柄、莖、莢、子実に分け、凍結保存（-20°C）して分析の材料とした。

材料採取の時期および回数は、植物体各部の含量比較のために生育初期（7月17日）、開花期（8月10日）、結実期（9月6日）の3回とした。また、生育に伴う含量比較のために葉身、葉柄、主莖皮部については伸長期（7月29日）、開花期（8月11日）、結実期（9月4日）の3回、主莖木部については7月15日より10月4日に至る間に11回、子実および莢については開花日（40～50%開花日）後20～63日の間に8回とした。

分析法 凍結保存した組織5～10gを氷冷乳鉢中で少量の石英砂とともに充分摩砕し、5%メタ・リン酸溶液で除蛋白を行なったろ液を試料溶液とし以下の分析に供した。

生体内の α -ケトグルタル酸の微量定量法としては、2,4-ジニトロフェニールヒドラジン(DNPH)との反応により生成する α -ケト酸類の2,4-ジニトロフェニールヒドラゾンをクロマトグラフィーで分別、定量する方法^{2,3,4,6)}が一般的である。筆者らもこれらのうち2～3の方法について比較検討した結果、いずれの方法も分析精度に問題はあるが、分析条件を出来るだけそろえることにより、相対値として安定した結果が得られることがわかつたので、ここでは主として香川ら³⁾に従った。すなわち、試料溶液4mlに0.1%DNPHの2N塩酸溶液1mlを添加し、30°Cで30分間反応させてヒドラゾンを形成させ、これを酢酸エチル8ml

日本作物学会第141回講演会（1966）において一部発表

* 前信州大学農学部

で抽出，炭酸一炭酸水素ナトリウム溶液 2 ml に転溶し，6 N 塩酸 0.5 ml で微酸性として再び酢酸エチルで抽出，硫酸デシケター中で直ちに減圧乾固した。ついで，得られた 2,4-ジニトロフェニールヒドラゾンをアセトンで溶かし，あらかじめ 1 N 炭酸水素ナトリウム溶液に浸して乾燥したろ紙（東洋ろ紙 No. 50）に線状に定量的につけて，n-ブタノール：エタノール：0.1 N 炭酸水素ナトリウム溶液（4：1：2，v/v）で上昇法により展開した。得られたクロマトグラム上には，大豆のいずれの部位についても，ピルビン酸， α -ケトグルタル酸，微量のオキザロ酢酸などのケト酸類が確認されたが， α -ケトグルタル酸の分離は明確であつた。風乾した後 α -ケトグルタル酸のスポット (Rf 0.10~0.12) を切り取り，炭酸一炭酸水素ナトリウム溶液で溶出して波長 380 m μ で比色定量した。なお，以上すべての操作は出来るだけ暗条件のもとで行なつた。

Ⅲ 実験結果

1 植物体の各部位における含量の比較

葉身，葉柄，茎，根，莢，子実の各部位における α -ケトグルタル酸の含量を生育の初期，開花期，結実期について示したのが第1表である。まず，各部位の含量の平均は乾物 100 g 中 0.73 m eq であり，この値を 100 とした比数は葉身 222，莢 221 と高く，葉柄 64，茎 57，根 26，子実 10 と低い値を示し，体内の α -ケトグルタル酸含量は部位の相違によつて著しく異なることがわかつた。次に時期的な含量変動を各部位についてみると，いずれの部位も生育初期には含量が高いが，開花期から結実期にかけて減退する。しかし葉身では他の部位にくらべて変動は少ない。

第1表 植物体各部位における α -ケトグルタル酸含量

	生育初期 (7月17日)	開花期 (8月10日)	結実期 (9月6日)	平均
葉身	2.60	1.53	1.31	1.63 (222)
葉柄	.83	.42	.16	.47 (64)
茎	.88	.32	.07	.42 (57)
根	.28	.26	.04	.19 (26)
莢	—	—	.93	1.62* (221)
子実	—	—	.06	.07* (10)
				.73** (100)
植物全体	1.20 (138)	.84 (97)	.57 (65)	.87 (100)

単位：m eq/乾物100 g，*：成熟経過中8回の平均（第1図より），**：植物体各部位の平均，（ ）：平均値を100とした場合の比数

2 葉の着生順位（葉齢）による含量の変化

主茎葉について，子葉節より2節ごとに頂端に向つてⅠ～Ⅷに区分し，さらにそれぞれを葉身と葉柄に分け，着生順位すなわち葉齢による α -ケトグルタル酸含量の比較を行ない，そ

第2表 葉身の着生順位(主茎)による α -ケトグルタル酸含量の変化

		伸 長 期 (7月29日)	開 花 期 (8月11日)	結 実 期 (9月4日)
根 基 ↓ 頂 端	I	3.80 (229)	—	—
	II	3.23 (194)	4.26 (266)	—
	III	1.78 (107)	2.92 (182)	—
	IV	.91 (55)	1.88 (104)	1.49 (102)
	V	.34 (25)	1.10 (69)	1.71 (109)
	VI	—	.61 (38)	1.39 (95)
	VII	—	.12 (12)	1.37 (94)
葉身全体		1.66 (100)	1.60 (100)	1.47 (100)

単位: m eq/乾物100 g, (): 葉身全体の値を 100 とした場合の比数

第3表 葉柄の着生順位(主茎)による α -ケトグルタル酸含量の変化

		伸 長 期 (7月29日)	開 花 期 (8月11日)	結 実 期 (9月4日)
根 基 ↓ 頂 端	I	.96 (133)	—	—
	II	.86 (119)	.33 (80)	—
	III	.78 (110)	.45 (110)	—
	IV	.50 (69)	.49 (120)	.24 (109)
	V	.83 (115)	.33 (80)	.24 (109)
	VI	—	.29 (71)	.24 (109)
	VII	—	.56 (137)	.19 (86)
葉柄全体		.72 (100)	.41 (100)	.22 (100)

単位: m eq/乾物100 g, (): 葉柄全体の値を 100 とした場合の比数

の結果を第2,3表に示す。葉身の場合全葉の値では生育に伴いわずかながら低下の傾向さえみえるが、各葉では上位の幼葉における含量は比較的低く、下位へと着生順位の早い老葉になるにしたがい著しく高まる。しかしながら結実期にはこのような葉齢による差はほとんどみられなくなり、各葉とも高い含量を示すに至る。また、葉柄についてみると第3表のように、着生順位による含量の差はあまり著しくないが、生育経過に伴って低下する傾向がある。

3 主茎の節位による含量の変化

主茎を前記の葉の場合と同様に2節ごとにI～VIIIに区分し、さらに皮部と木部に分け、節位間の含量の比較を行なった。第4表は主茎皮部についてしらべたものである。皮部は一般に木部に比べて含量値は1/2以下であり、開花期に至るまでは上位の若い部分において比較的高い値を示し、その他の各節ではほとんど差がみられない。

主茎木部について7月15日から10月4日までの含量の変化を示したのが第5表である。木部全体では生育経過に伴い含量は漸減し、とくに結実期に入るとその程度は著しくなる。節位による含量変化の様相には8月10日前後の開花期に至るまでと、それ以後の結実期では大

第4表 主茎皮部の節位による α -ケトグルタル酸含量の変化

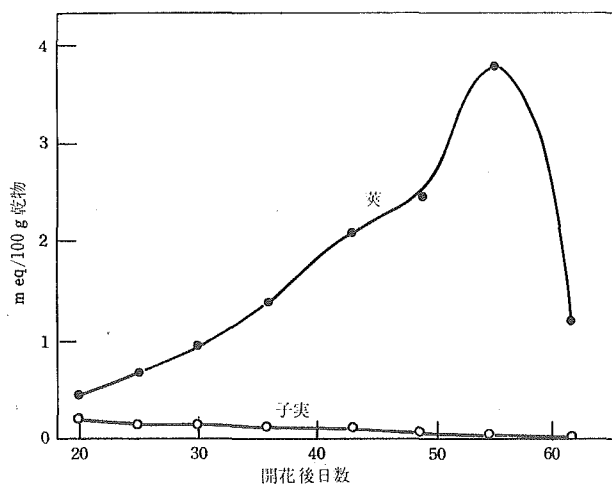
	伸 長 期 (7月29日)	開 花 期 (8月11日)	結 実 期 (9月4日)
根 基 I	.21 (81)	.19 (112)	.10 (125)
II	.15 (58)	.13 (76)	.09 (109)
III	.24 (92)	.12 (71)	.09 (109)
IV	.26 (100)	.12 (71)	.08 (100)
V	.57 (219)	.18 (106)	.08 (100)
VI	—	.13 (76)	.06 (75)
VII	—	.48 (282)	.06 (75)
頂 端 VIII	—	—	.06 (75)
主茎皮部全体	.26 (100)	.17 (100)	.08 (100)

単位: m eq/乾物100 g, (): 主茎皮部全体の値を100とした場合の比数

第5表 主茎木部の節位による α -ケトグルタル酸含量の変化

	(月) (日)	15	7 22	29	5	11	8 18	25	4	9 12	22	10 4
根基	I	.78	.62	.52	.37	.25	.10	.08	.05	.03	.03	.03
<div>↓</div>	II	.76	.69	.77	.54	.36	.19	.10	.05	.03	.02	.03
	III	2.13	.58	.79	.70	.51	.23	.19	.07	.05	.03	.03
	IV		1.96	.45	.59	.45	.38	.29	.07	.06	.03	.03
	V			2.21	.40	.28	.27	.32	.07	.07	.06	.04
	VI				1.65	.24	.21	.21	.05	.06	.09	.07
	VII					1.65	.19	.12	.04	.04	.16	.08
	頂端	VIII					.16	.08	.04	.03	.16	.15
主茎木部全体		.95	.72	.72	.55	.35	.20	.15	.05	.05	.05	.05

単位: m eq/乾物100 g

第1図 英ならびに子実の成熟に伴う α -ケトグルタル酸含量の変化

きな差がみられる。すなわち、茎の伸長の盛んな栄養生長期には茎の頂端の若い部分における含量が高く、その他の下位では低い値を示し、節位による差はほとんどみられない。しかし開花期以後の生殖生長期になると、いずれの節位とも著しく含量が低下したが、ただ茎の中間位にやや高い値が保持される。このように、主茎木部内の α -ケトグルタル酸の分布は栄養生長期と生殖生長期で大きく異なることがわかった。

4 莢および子実内含量の熟成に伴う変化

開花日後20日から成熟に至るまでの結実期間中に、8回にわたって採取した莢と子実の含量変化をみると、第1図のように莢と子実では変化の様相が著しく異なる。すなわち、子実においては成熟に伴う含量変化は少なく、わずかに低下し、成熟期になるとほとんど検出されなくなる。一方、莢においては発育に伴い含量が漸増し、特に莢の黄変期ごろ（開花日後50～55日）の増加が顕著であり、その後子実の完熟する所に急減することがわかる。

IV 考 察

植物体内に存在する α -ケトグルタル酸はごく微量であるため、定量的な資料はほとんどない。筆者らは大豆植物について2,4-ジニトロフェニールヒドラジン法により相対的に安定した値を得ることができ、また、 α -ケトグルタル酸と同時にオキサロ酢酸、ピルビン酸なども検出することが出来た。このことから α -ケトグルタル酸の量的変化は、生体内における α -ケトグルタル酸の代謝の一端を現わし、さらにアミノ酸合成にも関連を示すものと考えられる。

大豆植物各部位間の α -ケトグルタル酸含量には著しい相違があり、葉身、莢では高く、葉柄、茎、根、子実では低い。また、各部位の含量は生育の進むにつれそれぞれ漸減する。しかし葉身では変動は少なく、莢では漸増する逆の変化をすることがわかった。このような生体の部位による α -ケトグルタル酸含量の差についてはほかにも報告例²⁾がある。根、子実などの含量が生育の全期を通じほかの部位より低いのは、根、子実はいずれもアミノ酸、蛋白の合成が盛んに行なわれている部位であり、代謝中間生成物である α -ケトグルタル酸が多量に消費されることが一因と考えられる。根部では根りゆう菌で固定された窒素からグルタミン酸が多量に合成され、子実における諸物質の合成、蓄積にも寄与しているであろう。窒素の同化に際し植物体内に存在するグルタミン酸脱水素酵素は、 α -ケトグルタル酸 + NH_3 + 還元NAD \rightleftharpoons グルタミン酸 + NAD の反応を促進し、 α -ケトグルタル酸は呼吸の中間生成物として生ずることがわかっているが、体内含量からはこの代謝機構を推論することはできず、今後の問題としたい。しかし、子実の場合、成熟に至るまでグルタミン酸脱水素酵素の活性があり、グルタミン酸形成への反応が認められている³⁾ことを考えると、さきの含量の低い一因に対する推論もある程度肯定されよう。

葉齢と含量の変化についてみると、 α -ケトグルタル酸の含量は幼葉では低く老葉となるほど高まるが、しかし結実期に至るとこのような葉の着生順位による含量の差がなくなる。このことは結実期における各葉の化学成分、光合成、呼吸などに関する報告^{5,7)}より考えて、各葉がほぼ同一な生理的葉齢にあるためとえみられる。幼葉では葉身自体の形成、充実のために呼吸、蛋白合成が盛んで、 α -ケトグルタル酸の消費も多いことが、含量の低い一因をな

すものと考えられる。しかし老化の進むに伴い呼吸の減退,あるいは葉内蛋白の分解こう進により, α -ケトグルタル酸の含量が著しく高まったものであろう。これは葉の老化に伴う葉内代謝生理の問題として注目に値する。

葉柄,茎でみた節位間の α -ケトグルタル酸含量にはそれぞれ特異的な変動が認められたが,この結果から生体内での動的な転流関係について推論することは出来ない。しかし茎木部で開花期以後含量の急減をみたことは,莢,子実形成のための転流移行と考えられる。さらに莢内の α -ケトグルタル酸含量の高いことは α -ケトグルタル酸が子実内の諸物質の形成に寄与しているためであろうが,生育につれ漸増するのは茎葉よりの α -ケトグルタル酸の転流こう進によるのか,莢自体における代謝の停滞を意味するのかは,今後の研究によらねばならない。

以上,大豆植物体内各部における α -ケトグルタル酸の定量結果について考察を行なつたが,かかる代謝中間生成物の静的な把握からでは,体内における代謝およびアミノ酸合成への関連を推論するためには残された問題が多い。しかし植物体各部位ならびに生育にともなう含量の変動は,少なくとも各部位における α -ケトグルタル酸代謝の変化を示唆し,アミノ酸合成に関連する機能の時期的変動の一端について知ることが出来よう。

V 摘 要

大豆植物体内における蛋白代謝を知る手がかりとして, α -ケトグルタル酸代謝の知見を得るため,植物体各部の α -ケトグルタル酸含量の生育に伴う変化をしらべた。定量法は2,4-ジニトロフェニールヒドラジン法によつた。

1) 体内含量の平均値は0.73m eq(乾物100g中)であり,この値を100として部位別に含量を比数でみると,葉身222,莢221,葉柄64,茎57,根26,子実10と部位により著しい相違があつた。

2) 葉身内含量は葉の着生順位による幼葉から老葉へと顕著に増加する。主茎の木部における含量は頂端の若い部分のみが高いが,開花期以後は急減し,ただその中間節位で比較的高い含量が保持された。

3) 体内含量は生育に伴い各部位とも漸減するが,葉身ではこの変化は少ない。成熟経過に伴い子実ではわずかに低下するが,莢では漸増しはなはだ高い含量を示した。

以上の結果は大豆植物体内における α -ケトグルタル酸代謝の変化を示唆し,各部位の蛋白合成などに関与する役割,機能についての一端を示しているものと思われる。

文 献

1. BURRIS, R. H. 1953. Organic acid in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 4: 91-114.
2. CAVALLIN, D. and N. FRONTALI 1954. Quantitative determination of keto-acids by paper partition chromatography. *Biochem. Biophys. Acta* 13: 439-445.
3. 香川裕彦・金行広雄 1958. α -ケトグルタル酸. 関根隆光他編, 光電比色法各論(2). 南江堂, 東京. 99-120.

4. KOEPESELL, H. J. and E. S. SHARPE 1952. Microdetermination of pyruvic and α -ketoglutaric acids, Arch Biochem. Biophys. 38 : 443-449.
5. 玖村敦彦・浪花勲 1965. 大豆の物質生産に関する研究 I. 生育に伴う光合成能ならびに呼吸能の推移. 日作紀 33 : 467-472.
6. MEISTER, A. and P. A. ABENDSCHEIN 1956. Chromatography of alpha-keto acid, 2,4-dinitro-phenylhydrazones and their hydrogenation products, Anal. Chem. 28 : 171-173.
7. 大泉久一・西入恵二・柱勇 1962. 大豆葉の機能に関する研究 I. 各葉における乾物重, 窒素, 磷酸, 加里, 炭水化物含量の消長. 日作紀30 : 253-256.
8. 土屋敏夫・白倉徳明1967. 大豆子実の登熟に伴う脱水素酵素活性の変化. 日作紀 36 : 273.
9. WEBSTER, G. C. 1959. Nitrogen Metabolism in Plants. Row, Peterson Co., New York. 6-33.

Change of α -ketoglutaric Acid Content in Soybean Plants

By Toshio TSUCHIYA and Noriaki SHIRAKURA

Laboratory of Crop Science and Plant Breeding, Fac. Agric., Shinshu University

Summary

In order to know the α -ketoglutaric acid metabolism in soybean plants, quantitative analysis was carried out on the change of the content of α -ketoglutaric acid in the plant throughout its growing period using the 2,4-dinitrophenylhydrazine method.

The results obtained are summarized as follows

1) Remarkable differences of the content of α -ketoglutaric acid are observed among the parts of the plant and as the index of 100 indicates the average value of 0.73m eq. containing in 100 g dry matter, the index varies 222 in leaf blade, 221 in pod, 64 in petiole, 57 in stem, 26 in root and 10 in seed respectively.

2) The content in the leaf blade increases progressively from lower to upper leaves according to their node number. The content in the xylem of main stem is high in degree only at young portion of apex, though it decreases suddenly after florescence and at the middle portion of main stem, it keeps comparatively high degree.

3) The content of α -ketoglutaric acid in the plant decreases gradually at various parts as growing advances. And it decreases slightly in seed as ripening progresses, while the content on pod increases gradually in considerably high degree.

From these results, it may be suggested that the change of the content in each portion somewhat relates to metabolic process of α -ketoglutaric acid in soybean plants.