

農學博士熊沢喜久雄君の「発光分光分析法による¹⁵Nの超微量定量法の開発と植物の窒素栄養に関する生理化學的研究」に対する授賞審査要旨

世界人口の増加は耕地面積拡大の限界に直面し、農産物の單位面積當りの収量の増加は農業に於ける重要な目標となつた。その為には肥料の合理的使用が必要であり、特に化學肥料を合理的且つ經濟的に使用するためには作物が必要とする時期に過不足なく供給する事が前提となる。

そのためには、肥料要素、特に窒素、磷、カリウムの生理作用を明らかにすると共に是等に標識を付け、吸収↓移動↓同化↓蓄積の過程を追跡する事が必要である。上記三元素の内、磷の場合は放射性同位元素³²Pを使用することが出来、此の方面の研究は急激に進歩した。

然しNの場合は放射性同位元素¹³Nは半減期が極めて短かく生物の研究には利用困難であり、標識として非放射性同位元素¹⁵Nを用いざるを得ない。然しこの場合は、これまで測定に質量分析装置を用いているため、100%程度の存在量の場合にはその利用は殆んど不可能であつた。

熊沢君はこの点を克服するため、発光分光法による¹⁵N濃度の測定法に注目、これを用いて微量の¹⁵Nの測定の可能性を追及し、遂に数%程度の微量の¹⁵Nの測定を可能にする分析法の開発に成功し、作物の窒素代謝の研究、特に作物体中に存在する数%程度の有機窒素化合物中の窒素の追跡を可能ならしめたのである。例えばこの分野で重要視さ

れているアミノ酸、アמידの分離定量法であるシリカゲル薄層クロマトグラフィの場合に得られる試料の ^{15}N の量は数分の一乃至数 $\frac{1}{100}$ 程度であるので、従来の測定法では測定不可能とされていたものがこの方法により可能となったのである。

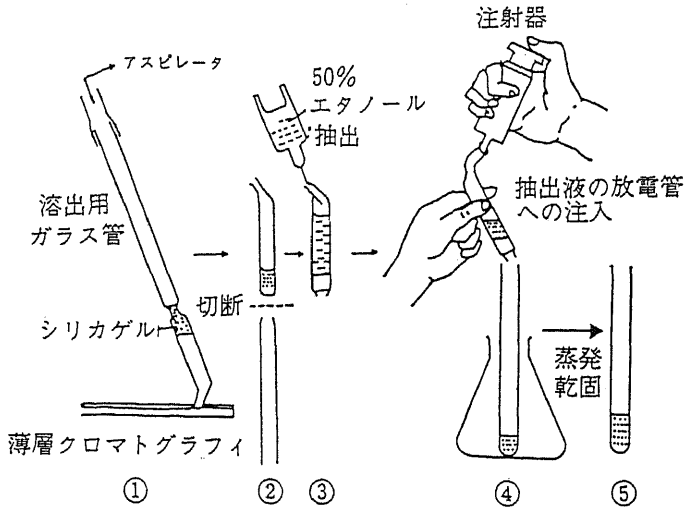
この方法の確立により、植物の窒素代謝の研究が急速に発展し、熊沢君の装置を使用した研究発表は既に二五カ国に及んでいる状態である。

熊沢君の微量 ^{15}N の測定法の特長は分析試料中の微量の窒素化合物、特にシリカゲル薄層クロマトグラフィにより分離された微量の試料をガス態となし、低圧状態でガラス管中に封入し放電管を作成し、高周波励起により発光させ、これをモノクロメーターにより各スペクトルに分離、その中より $^{14}\text{N}\cdot^{14}\text{N}$ 、 $^{14}\text{N}\cdot^{15}\text{N}$ 、 $^{15}\text{N}\cdot^{15}\text{N}$ に対応するスペクトルの強度を読みとり ^{15}N 濃度を算出する方法である。

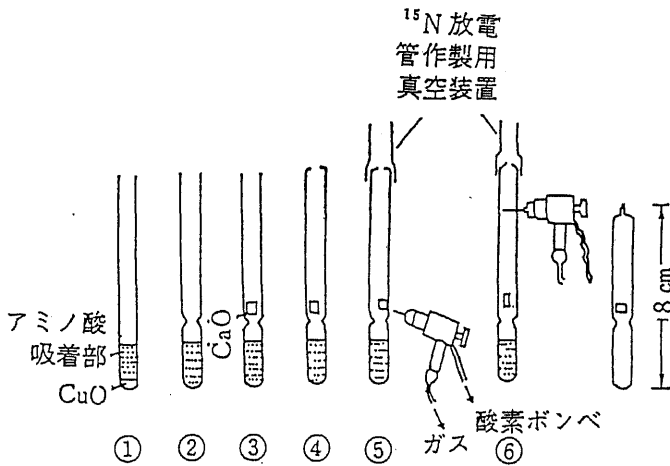
この方法は第一図に示す如く、シリカゲルと共にサンプルを吸い上げ、エタノールで抽出し、それを管に移し、蒸発乾固し、更にこれを第二図に示す如く、デューマ法に基づき第三図に示す装置に連結、真空管中で燃焼し、放電管を作成し、これを第四図に示す如く発光分光分析法により ^{15}N を測定する方法である。

熊沢君はこの方法を用い、第五図に示す如く、水稲が窒素源として吸収した NH_4^+ 及び NO_3^- の両者の茎葉部への移動の経路を明らかにした。これは既に多くの研究者により予想されていたのであるが、何れも間接的推論の域にたったものを実証することに成功したものである。

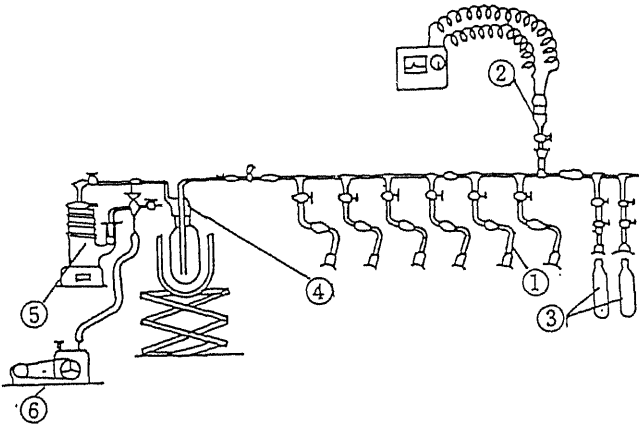
又、豆科植物は共存する根粒菌を通じ窒素を得ているが、それと根を通じ直接土壌中より吸収した窒素との関係が



第1図 薄層クロマトグラムよりのアミノ酸スポット抽出法

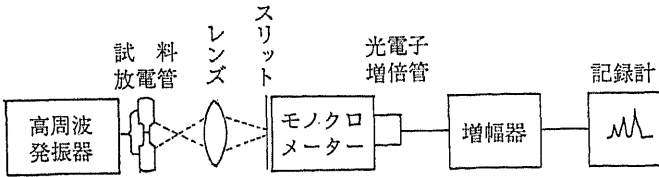


第2図 ¹⁵N放電管作製の手順
試料, CuO, CaO を真空中で燃焼し放電管を作製する

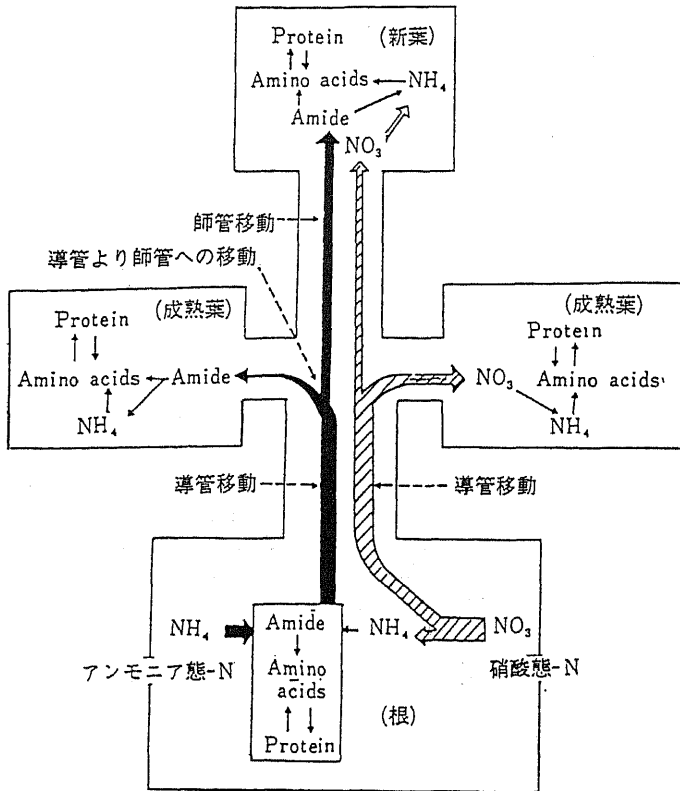


- ①試料放電管の接続部 ②ピラニー真空計 ③He, Xe ガスポンプ
 ④CO₂, H₂O トラップ ⑤油拡散ポンプ ⑥真空ポンプ

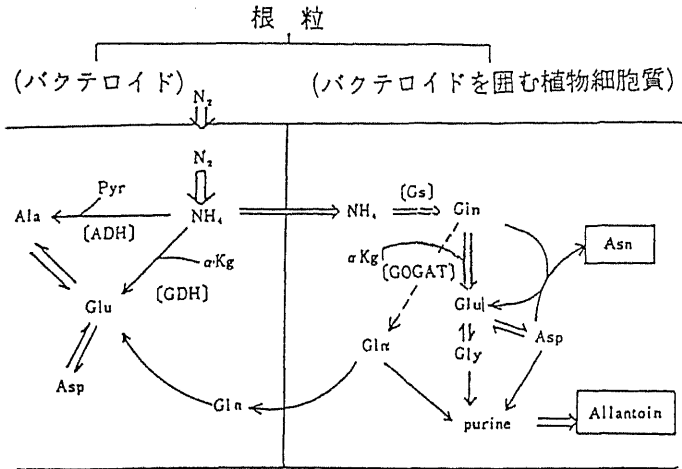
第3図 熊沢式 ¹⁵N 測定放電管制作用真空装置



第4図 発光分光分析法による ¹⁵N 測定ブロック・ダイアグラム



第5図 水稻根より吸収された窒素の茎葉部への移動



備考 Glu: Glutamic acid, Glu: Glutamine
 Asp: Aspartic acid, Asn: Asparagine
 Gly: Glycine, Ala: Alanine
 GS: Glutamine synthetase
 GOGAT: Glutamine synthase
 GDH: Glutamate dehydrogenase
 ADH: Alanine dehydrogenase

第6図 大豆根粒内における固定窒素の同化に関するモデル図

不明確であったのを直接追跡することに成功し、この研究を通じ窒素固定能力の強い菌種の発見に道を開き、そのうち幾つかは圃場応用の域に達するに到ったのである。

以上の如く、熊沢君の研究は、その分析法の確立により今日まで間接的推論の域にあった作物の窒素代謝の経路を直接、定量的に追跡することを可能とし、農業の研究の進展に多大の寄与をなすと共に、その研究法は多くの国々の研究者により採用されるに到り、極めて高く評価をわけてゐる研究である。

主要な論文目録

(邦文報告)

- 1) K. Kumazawa and J. A. Goleb: Optical emission spectrographic studies on the distribution and accumulation of nanogram amounts of ^{15}N in rice seedlings. *Plant & Cell Physiol.*, **10**, 725-731 (1969).
- 2) S. Muhammad and K. Kumazawa: Use of optical spectrographic ^{15}N -analyses to trace nitrogen applied at the heading stage of rice. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **18**, 143-146 (1972).
- 3) S. Muhammad, U. J. Kim and K. Kumazawa: The uptake, distribution, and accumulation of ^{15}N -labelled ammonium and nitrate nitrogen top-dressed at different growth stages of rice. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **20**, 279-286 (1974).
- 4) T. Yoneyama and K. Kumazawa: A kinetic study of the assimilation of ^{15}N -labelled ammonium in rice seedling roots. *Plant & Cell Physiol.*, **15**, 655-661 (1974).
- 5) S. Muhammad and K. Kumazawa: Assimilation and transport of nitrogen in rice I. ^{15}N -labelled

- ammonium in rice seedling roots. *Plant & Cell Physiol.*, **15**, 747-758 (1974).
- 6) S. Muhammad and K. Kumazawa: Assimilation and transport of nitrogen in rice II. ^{15}N -labelled nitrate nitrogen. *Plant & Cell Physiol.*, **15**, 759-766 (1974).
 - 7) S. Muhammad and K. Kumazawa: The absorption, distribution, and redistribution of ^{15}N -labelled ammonium and nitrate nitrogen administered at different growth stages of rice. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **20**, 47-55 (1974).
 - 8) T. Yoneyama and K. Kumazawa: A kinetic study of the assimilation of ^{15}N -labelled nitrate in rice seedlings. *Plant & Cell Physiol.*, **16**, 21-26 (1975).
 - 9) T. Yoneyama, K. Komamura and K. Kumazawa: Nitrogen transport in intact corn roots. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **21**, 371-377 (1975).
 - 10) H. Kano, T. Yoneyama and K. Kumazawa: Emission spectrometric ^{15}N analysis of the amino acids and amides in plant tissues separated by thin layer chromatography. *Anal. Biochem.*, **67**, 327-331 (1975).
 - 11) O. Ito and K. Kumazawa: Nitrogen assimilation in sunflower leaves and upward and downward transport of nitrogen. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **22**, 181-189 (1976).
 - 12) S. Muhammad and K. Kumazawa: Nitrogen distribution studies by emission spectrometry in free amino acids and amides of developing panicle of rice. *Z. Pflanzenenerhr. Bodenk.*, 1976 529-436 (1976).
 - 13) T. Yoneyama, Y. Akiyama and K. Kumazawa: Nitrogen uptake and assimilation by corn roots. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **23**, 85-91 (1977).
 - 14) O. Ito and K. Kumazawa: Amino acid metabolism in plant leaf. I. Amino acids synthesis from

- $^{14}\text{CO}_2$ and $^{15}\text{NH}_4$ in detached sunflower leaves. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **23**, 365-372 (1977).
- 15) II. Effect of light on the incorporation of ^{15}N -labeled ammonium and nitrate into amino acids in sunflower leaf discs. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **24**, 299-303 (1978).
 - 16) III. The effect of light on the exchange of ^{15}N -labeled nitrogen among several amino acids in sunflower discs. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **24**, 327-336 (1978).
 - 17) IV. The effect of light on ammonium assimilation and glutamine metabolism in the cells isolated from spinach leaves. *Plant & Cell Physiol.*, **19**, 1109-1119 (1978).
 - 18) Y. Arima and K. Kumazawa: Evidence of ammonium assimilation via the glutamine synthetase-glutamate synthase system in rice seedling roots. *Plant & Cell Physiol.*, **18**, 1121-1129 (1977).
 - 19) C. Sano, T. Yoneyama and K. Kumazawa: Incorporation of ^{15}N into subcellular fractions and soluble proteins in rice seedlings. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **24**, 503-513 (1978).
 - 20) C. Sano, O. Ito, T. Yoneyama and K. Kumazawa: Incorporation of $^{14}\text{CO}_2$ and $^{15}\text{NH}_4$ into amino acids of the two subunits of Fraction 1 protein in spinach leaves. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **24**, 581-586 (1978).
 - 21) T. Ohyama and K. Kumazawa: Incorporation of ^{15}N into various nitrogenous compounds in intact soybean nodules after exposure to $^{15}\text{N}_2$ gas. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **24**, 525-535 (1978).
 - 22) T. Ohyama and K. Kumazawa: Assimilation and transport of nitrogenous compounds originated from $^{15}\text{N}_2$ fixation and $^{15}\text{NO}_3$ absorption. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **25**, 9-19 (1979).
 - 23) T. Ohyama and K. Kumazawa: Studies on the fate of fixed nitrogen in soybean plant with use of ^{15}N . *Mineral Nutrition of Plants. Proc. of the first international symposium on plant nutrition* (Varna, Bulgaria, September 24-29, 1979) Vol. 1, 267-285 (1979).

- 24) T. Ohyama and K. Kumazawa: Assimilation and transport of nitrogenous compounds originating from $^{15}\text{N}_2$ fixation and $^{15}\text{NO}_3$ absorption. Stable isotopes: Proceedings of the Third International Conference (E. Roseland Klein and Peter D. Klein ed.), pp. 327-335, Academic Press (1979).
- 25) R. K. Rabie, Y. Arima and K. Kumazawa: Growth, nodule activity and yield of soybeans as affected by the form and application method of combined nitrogen. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **25**, 417-424 (1979).
- 26) R. K. Rabie and K. Kumazawa: Effect of nitrate application and shade treatment on the nitrogen fixation and yield of soybean plant. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **25**, 467-476 (1979).
- 27) R. K. Rabie, Y. Arima and K. Kumazawa: Effect of combined nitrogen on the distribution pattern of photosynthetic assimilates in nodulated soybean plant as revealed by ^{14}C . *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26**, 79-86 (1980).
- 28) R. K. Rabie, Y. Arima and K. Kumazawa: Uptake and distribution of combined nitrogen and its incorporation into seeds of nodulated soybean plants as revealed by ^{15}N studies. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26**, 427-436 (1980).
- 29) T. Ohyama and K. Kumazawa: Nitrogen assimilation in soybean nodules. I. The role of GS/GOGAT system in the assimilation of ammonia produced by N_2 -fixation. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26**, 109-115 (1980).
- 30) II. $^{15}\text{N}_2$ assimilation in bacteroid and cytosol fractions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26**, 205-213 (1980).
- 31) III. Effects of rhizosphere PO_4 on the assimilation of $^{15}\text{N}_2$ in nodules attached to intact plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **26**, 321-324 (1980).
- 32) T. Ohyama, N. Owa, Y. Fujishima and K. Kumazawa: Nitrogen assimilation in soybean nodules.

- IV. Allantoin formation and transport in relation to supply with various forms of combined nitrogen. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **27**, 55-64 (1981).
- 33) T. Ohyama and K. Kumazawa: Nitrogen assimilation in soybean nodules. V. Possible pathway of allantoin synthesis in soybean nodules. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **27**, 55-64 (1981).
- 34) R. K. Rabie, Y. Arima and K. Kumazawa: Effect of application time of labeled combined nitrogen on its absorption and assimilation by nodulated soybeans. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **27**, 225-235 (1981).
- 35) T. Ohyama and K. Kumazawa: A simple method for the preparation, purification and storage of $^{15}\text{N}_2$ gas for biological nitrogen fixation studies. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **27**, 263-265 (1981).
- 36) K. Minamisawa, Y. Arima and K. Kumazawa: Rapid turnover of aspartic acid in soybean nodules formed with H_2 -uptake positive *Rhizobium japonicum* strains. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **27**, 387-391 (1981).
- 37) K. Minamisawa, Y. Arima and K. Kumazawa: Transport of fixed nitrogen from soybean nodules inoculated with H_2 -uptake positive and negative *Rhizobium japonicum* strains. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **29**, 85-92 (1983).
- 38) K. Minamisawa, Y. Arima and K. Kumazawa: Unidentified compound specifically accumulated in soybean nodules formed with H_2 -uptake negative *Rhizobium japonicum* strains. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **30**, 435-444 (1984).
- 39) K. Kumazawa: Use of ^{15}N in the field of agricultural science in Japan. Synthesis and applications of isotopically labeled compounds 1985 (R. R. Muccino *et al.*, ed.), pp. 21-26, Elsevier (1986).
- 40) K. Kumazawa: Advance in analytical method of heavy nitrogen in Japan. *JARQ*, **20**, 92-99 (1986).

- 41) K. Kumazawa: Emission spectroscopic determination of heavy nitrogen ^{15}N in trace amounts of sample. *Proc. Japan Acad.*, **63**, Ser. B, 215-218 (1987).
- 42) K. Kumazawa, T. Yoneyama, Y. Arima and S. M. Shah: Assimilation of nitrogen by rice plant as revealed with ^{15}N . *Proc. Japan Acad.*, **63**, Ser. B, 219-222 (1987).
- 43) K. Kumazawa, Y. Arima, T. Ohyama and K. Minamisawa: Assimilation and transport of fixed nitrogen in soybean nodule as revealed with ^{15}N . *Proc. Japan Acad.*, **63**, Ser. B, 223-224 (1987).