植物における光合成産物の分配・利用過程

^{13}C トレーサー法による定量的解析

河内 宏

農林水産省
農業生物資源研究所

光合成による炭素の固定・同化は、植物の生命活動において最も基本的な作用である。葉で固定された炭素の一部は葉自身の生長・維持のために利用されるが、大部分は速やかに生長中の若い組織や子実などに転流して、生長の素材として、あるいは呼吸基質すなわちエネルギー源として利用される。また、固定された炭素の相当部分はデンプンなどの貯蔵形態となって各器官に蓄えられて後、転流・利用される。

植物の生長と生産の仕組みを理解するためには、これらの生理過程の基本的な構造と性質を認識しなければならないが、同時にこれら諸過程が絡み合って生長と生産に結び付いていくプロセスの全体像を把握することが必要になる。そのために有効な方法の一つは、光合成による炭素の固定・同化と、それにひき続く転流・蓄積・利用という一連のプロセスを、連続した炭素の流れとして、定量的に把握するということである。

植物器官間における光合成産物の分配についてはこれまで、 ^{14}C を用いた多くの研究が行われてきたが、その多くは、いわゆる新規固定炭素 (current photosynthate) の挙動を、各器官への ^{14}C 分布の割合として相対的に示すにとどまっている。植物の生長と生産は一般に長い時間的拡がりをもって営まれる現象であり、その時間的拡がりの中で、炭素の動態を光合成能および生長・生産と関連づけて理解するためには、今日まで十分な研究が行われてきたとはいえない。

筆者らは上述のような観点から、定比活性 $^{13}\text{CO}_2$ 同化法を用いて、ダイズ-根粒菌の共生系における炭素の流れの定量的解析を進めてきたが、ここではこの方法を用いてこれまでに得られた知見の一端を紹介する。

定比活性 $^{13}\text{CO}_2$ 同化

安定同位元素である ^{13}C は、広く普及している ^{14}C に比べればその測定にやや特殊な装置を必要とし、また検出感度も劣るという欠点があるが、以下に述べるような長時間にわたる大規模な標識実験では、安全上の問題から ^{14}C の使用にはきわめて強い制約が伴うため、 ^{13}C の利用がはるかに有利となる。

さて、一般に、植物体に標識 CO_2 を同化させる場合

図1 ■ 定比活性 $^{13}\text{CO}_2$ 同化システムと、地下部の呼吸による $^{13}\text{CO}_2$ 放出の測定⁽⁴⁾

同化室 (A) 中の空気をポンプ (P) で赤外線 $^{13}\text{CO}_2$ 分析計 (AN) に導き、その信号を利用して $^{12}\text{CO}_2$ 、 $^{13}\text{CO}_2$ ガス (B1, B2) の補給をマスフローコントローラー (M) で制御する。呼吸による $^{13}\text{CO}_2$ 放出は脱炭酸した空気を水耕液に送り、出口側の $^{13}\text{CO}_2$ を赤外線 $^{13}\text{CO}_2$ 分析計で測定する。

には密閉系を用いなければならないが、同化中に植物の呼吸によって放出される CO_2 は固定された CO_2 と同様に標識されているわけではないから、同化室内の標識 CO_2 は希釈され、その存在比は減少していく。そこで、1日あるいは数日にわたるような長時間の標識実験で、実験期間中に同化された炭素の挙動を、それ以前または以後に同化された（非標識）炭素との関連で厳密に定量的に解析するためには、同化空気中の標識炭素の存在比を常に一定に保つ必要が生ずる。このような定比活性同化は、小規模には $^{14}\text{CO}_2$ についても行なわれる⁽¹⁾が、 $^{13}\text{CO}_2$ の場合には赤外線 $^{13}\text{CO}_2$ 分析計を用いることによって、比較的容易に達成される。赤外線 $^{13}\text{CO}_2$ 分析計⁽²⁾は、 $^{12}\text{CO}_2$ と $^{13}\text{CO}_2$ の赤外部吸収のシフトを利用して各々の濃度を独立に測定するもので、質量分析計に比べるとやや精度は劣るものの、大気濃度レベルの希薄な CO_2 について測定が可能である。筆者らが用いたシステム^(3,4)の概要は図1に示すようで、同化室内の $^{12}\text{CO}_2$ 、 $^{13}\text{CO}_2$ の濃度をモニターし、この信号をフィードバックさせて $^{12}\text{CO}_2$ 、 $^{13}\text{CO}_2$ ガスの補給を自動制御することにより、長時間にわたって同化室内の CO_2 濃度と、 ^{13}C 比活性を正確に一定に保つことができる。

このようにして定比活性を維持した同化実験では、分析結果は relative specific activity (RSA, %) として、

$$\text{RSA} = \frac{\text{試料中の } ^{13}\text{C atom excess \%} \times 100}{\text{同化空気中の } ^{13}\text{C atom excess \%}}$$

によって表わされる⁽⁴⁾。この値は、同化期間中に新たに固定された炭素が全炭素に対して占める割合を示し、これと試料中の全炭素量から、同化期間中に固定された炭素の絶対量が決定される。すなわち、こうした方法によって、ある一定期間内の光合成量と、そのときに固定された炭素の分配や利用の過程が定量的に関係づけられる。

ダイズにおける新規固定炭素の流れ

このようにして日中10時間、開花直前的大豆に $^{13}\text{CO}_2$ を同化させ、その後48時間、標識炭素の挙動を追跡した⁽⁵⁾。各部位の RSA の推移を図2に示した。主たる光合成器官である成葉では、10時間の同化終了時におよそ20%が新規固定炭素で占められるが、ひき続く夜間に成葉の新規固定炭素は急速に他器官に転流し、翌日の明期開始時には RSA は10%以下となる。一方、生長

図2 ■日中10時間、定比活性 $^{13}\text{CO}_2$ を同化させた後のダイズ各部位の RSA の経時変化⁽⁵⁾

▲：成葉，△：新葉，□：茎，●：根，○：根粒．図上の黒い部分は暗期を示す．

中の若い葉や根、根粒、茎では、成葉からの標識炭素の転流によって翌日の昼ごろまで RSA は上昇し続ける。成葉からシンク器官への主な転流形態であるスクロースの RSA をみると（図3）、同化終了時に葉では87%、根、根粒では90%またはそれ以上の高い値を示す。根や根粒では、同化終了後の夜間にはスクロースの RSA はあまり低下せず、翌日の明期開始時にもなお80%強の RSA を示すが、その後は急速に低下して、同化後2日目には痕跡程度となる。これらの結果から、根や根粒に供給される炭素の大部分はいわゆる“初期光合成産物”に限られているということがわかる。実際、10時間の $^{13}\text{CO}_2$ 同化中に経時的に植物をサンプリングし、根と根粒中のスクロースの RSA を調べてみると、同化開始後6時間ですでに85%程度に達する⁽⁶⁾。

ダイズでは葉で固定された炭素の分配の方向は大きく分けて2つある。1つはスクロースとして他器官に転流するものであり、もう1つは主としてデンプンの形で葉身中に蓄積されるものである。スクロース中にも一部貯蔵態のものがあるが、デンプンに比べればはるかに小さなプールである。栄養生長期のダイズでは、この2つの方向に向かう固定炭素の流れはおおよそ1:1である^(5,7)。上に述べた10時間の $^{13}\text{CO}_2$ 同化実験では、同化中の地上部の呼吸による消費を除く全固定炭素量のうち、43%

図3 ■ 10時間の $^{13}\text{CO}_2$ 同化後の成葉(A), 根(B), 根粒(C)中のスクロース(○), デンプン(●)のRSAの変化⁽⁵⁾

がいったんデンプンの形で葉身に貯えられ、そのうちの70%はひき続く夜間に分解されて転流・利用され、翌日の夜間まで含めると85%ほどが消費される⁽⁵⁾。葉身のデンプンは、新たに合成されたものが優先的に分解・利用される結果、葉のデンプンのRSAは同化後の夜間に大きく低下し、一方根や根粒など、シンク器官のスクロースのRSAはほぼ一定に保たれる(図3)。このようにして、光合成器官からシンク器官に転流する炭素は、昼夜を通じてその日の光合成によって同化された炭素が大部分を占めることになる。

シンク器官に輸送された光合成産物は、生長の素材として、また呼吸基質として利用され、一部は貯蔵プールにふりむけられる。また後述のように、少なくない部分がソース器官に再転流する。ある時期の光合成産物の呼吸による消費の様相を定量的に把握することは必ずしも容易ではないが、筆者らのシステムでは、図1に示すような方法で、同化中および同化後の根と根粒の呼吸による $^{13}\text{CO}_2$ の放出が測定された。結果の一例を図4に示す⁽⁴⁾。根粒の呼吸は新規固定炭素に依存する割合がきわめて大きく、10時間の同化終了時にはそのRSAは84%に達するが、一方根では56%ほどにすぎない。同化にひき続く夜間には、根・根粒とも呼吸による CO_2 中のRSAは一定に保たれるが、翌日の明期開始とともにおそらく葉身のデンプンの分解が停止するのに伴って、前日の同化炭素の消費は速やかに停止し、RSAは急減する。根粒の呼吸による CO_2 のRSAは根粒中のスクロースのそれよりもわずかに低く推移するが、根の呼吸のRSAはスクロースよりも大幅に低く、根に蓄積された貯蔵基質の寄与が相当に大きいことを示している。根

図4 ■ 根(●)および根粒(○)の呼吸により放出される CO_2 のRSA⁽⁴⁾

破線までの10時間、 $^{13}\text{CO}_2$ をfeedした。

粒では比較的大量に貯蔵されているデンプンが呼吸の一部を担っていることは、高濃度の共存窒素処理などによってデンプン含量を減少させると呼吸のRSAが90%以上にも高まることからわかる⁽⁴⁾。しかし、根の場合には、デンプン以外に大きな貯蔵基質のプールが存在するようである。

豆科植物では一般に、主として根粒から、固定された窒素の炭素骨格として大量の炭素が植物体地上部に再転流していると考えられている。たとえばPateら⁽⁸⁾が、子実肥大初期の白花ルーピンについて転流液の分析に基づいて計算した結果によると、葉から根粒に送られた炭素のうち34%が植物体地上部に再転流している。栄養生長期のダイズに $^{13}\text{CO}_2$ を同化させ、xylem sapを採取して転流物質のRSAを調べた筆者ら⁽⁹⁾の結果(図5)によれば、同化開始後2時間でxylem sapのRSAは17%になり、10時間の同化終了時には50%強に達する。固定窒素の主たる転流形態であるウレイド(アラン

図5 ■ $^{13}\text{CO}_2$ 同化中のダイズ茎基部から採取した xylem sap (○) およびその中のウレイド (●) の RSA の変化⁽⁹⁾ 同化室から植物を取り出し、直ちに茎基部で切断し、30 分間 xylem sap を採取した。

トイン(酸)の RSA は、これよりも相当に高く推移し、同化終了時には 80% 以上となる。通常、xylem sap 中に見いだされるウレイドはほとんどすべて根粒に由来すると考えられ、根粒を除去して同じ実験を行なうと、xylem sap の RSA は大幅に低下するから、根から地上部に再転流する物質(おもに有機酸と考えられる)は、呼吸における場合と同様に根に貯蔵された成分に由来する部分が多いということが出来る。10 時間の光合成期間中だけについて、固定された炭素の流れをみると、地下部に転流した新規固定炭素のうち全体として 32% が地上部に戻され、根粒だけについてみると固定窒素の炭素骨格として 35% が再転流しており、これは呼吸による消費量をも上回っている。このように、葉による固定同化後、短時間の一次分配だけをみても、地下部から地上部への再転流量は従来考えられていたよりもはるかに大きいようである。

子実形成に対する生育時期別同化炭素の寄与

以上みてきたのは、同化後短時間の間に起こる、いわゆる“一次分配”の様相である。窒素の転流、利用に関しては、よく知られているように、老化した器官の蛋白質が分解して、生長中の若い組織に送られ、そこで再利用されるという“二次分配”が生長の重要な部分を担っている⁽¹⁰⁾。炭素の場合、一般には、そのような長い期間にわたっての二次分配の比重は窒素におけるほどには大

きくなく、したがって、植物の炭素経済の基本的な構造は、同化後数日以内に行なわれる一次分配の積み重ねによっておおそは説明されるものと考えられている。しかしながら、実際にある時期の光合成で固定された炭素の転流・利用過程を、長期間にわたって定量的に追跡した報告はきわめて少ない。

穀作物の子実生産に注目した場合、子実形成に利用される炭素の主体は、子実形成過程における光合成によって固定された炭素であろうと考えられるけれども、同時にそれ以前の光合成の寄与も決して少なくはない。たとえば、圃場に栽培されたコムギについて、生長解析と $^{14}\text{CO}_2$ ラベル実験の結果から、収穫時の子実炭素のうち 12% が開花前の光合成に由来するという試算が行なわれている⁽¹¹⁾。こうした栄養生長期に蓄積した炭素の寄与率は、植物の生育条件によって大きく変わるらしく、オオムギの場合、開花期前の光合成産物の子実生産に対する寄与は、乾燥年には 44%、湿潤年には 11% という推定がある⁽¹²⁾。多くの豆科植物では、開花以後に活発な栄養生長が重なっており、開花期までの生長量は小さいから、子実形成に寄与する炭素の大部分は開花期以後の光合成に由来すると考えられる。実際、Pate ら⁽¹³⁾ がルーピンを対象にして行なった実験によれば、開花前および開花中の光合成産物の子実生産に対する寄与はそれぞれ、2 および 3% にすぎない。彼らは、転流液の分析と、生長解析のデータに、12 回に分けて行なった $^{14}\text{CO}_2$ ラベル実験の結果をあわせて、時期別の同化炭素の寄与を計算したわけであるが、主として $^{14}\text{CO}_2$ パルスラベル実験の制約のために、時期別同化炭素の寄与の全生育期間にわたる積算によって、収穫時の子実炭素の 75% ほどしか説明できなかった。

長時間の定比活性 $^{13}\text{CO}_2$ 同化法は、1 日の光合成量と同化された炭素の分配・利用が直接関係づけられるので、上に述べたような時期別同化炭素の寄与の推定に当たっては有効な手法となる。また、転流過程を仔細に追跡し、これを積算することによって個体の生長と生産を再構成することができれば、炭素栄養の面からみた植物の生産の構造の理解を前進させることができると考えられる。そこで、開花期以後のダイズに、一定の間隔で繰り返し $^{13}\text{CO}_2$ をまる 1 日同化させ、その転流過程を収穫期まで追跡してみた⁽¹⁴⁾。播種後 31 日目(開花始期)から、71 日目(黄葉期)まで、ほぼ 1 週間おきに 7 回の

図6 ■開花以後のダイズに時期別に7回 $^{13}\text{CO}_2$ を同化させた際の植物体中の標識炭素量の推移⁽¹⁴⁾
 $^{13}\text{CO}_2$ 同化は日中 10 時間行なった。同化終了時の標識炭素量は1日の光合成による、同化中の呼吸による消費を除いた正味の固定量に相当する。

図7 ■開花以後、生育時期別に固定された炭素の子実への転流過程⁽¹⁴⁾

同化実験を行ない、その結果から各同化実験における全固定炭素量（同化中の呼吸による消費は除く）と、その減少経過をプロットすると、図6のようになる。各時期の全固定炭素量を曲線近似し（図6の破線）、31～71日目の間について積分すると（71日目以降の光合成量はほとんど無視できる）、開花以後の全固定炭素量として18.9gCという値が得られる。収穫時（85日目）に植物体中に残存していた開花以後の同化炭素量は、同様の積算によって10.8gと見積られ、したがって最終的な乾物生産量のうち、炭素換算で80%以上は開花以後の光合成によってもたらされたということがわかる。

生育時期別に同化された炭素の子実への転流経過をみると（図7）、全体として、同化中および同化後4日目までにみられる急速な転流と、それ以後収穫期まで続く緩慢な転流過程とに分けられる。いまこれらを一次分配、および二次分配と呼んで区別すると、31日目の同化では、まだ子実形成が開始されておらず、この時期の同化炭素の子実への転流はすべて二次分配によるものであり、子実形成始期（38日目）の同化炭素についてみても、二次分配が大部分を占めている。しかし、その後生育が進むにつれて、一次分配の比率が高まり、子実肥大盛期（57日目）以後、子実への同化炭素の転流はほとんど一次分配によって担われている。一次分配の主体をなすのは、同化葉から直接子実へ転流する新規固定炭素の速やかな流れであり、二次分配では葉、茎などの栄養器官や、あるいは莢に蓄積された炭素がゆるやかに転流す

るものと想定される。同化後4日目を境にして一次分配と二次分配を単純に区切るのはいささか乱暴で多分に便宜的だが、いま仮にこの方法に従って計算すると、収穫時の子実収量に対する開花後の同化炭素の寄与のうち、77%は一次分配によるものであり、23%が二次分配によったと考えられる。Pateら⁽¹⁵⁾がカウピーについて検討した結果では、子実収量の80%は葉からの直接の転流によっており、20%は茎を中心とする栄養器官に蓄積貯蔵されていた炭素のmobilizationによるものであった。二次分配による炭素の給源としては、いくつかの植物で茎の貯蔵炭水化物の意義が指摘されている^(12,16)。たとえばトウモロコシでは、登熟期間中にきわめて高濃度の糖を茎に蓄積するが、その大部分は完熟直前に子実へ転流する⁽¹⁷⁾。ダイズの場合、筆者らの実験結果によれば、茎よりもむしろ葉に貯蔵された炭素の寄与が大きいようである。

収穫時の子実の全炭素、および貯蔵蛋白質、脂質に対する生育時期別同化炭素の寄与率を、播種後日数に対してプロットすると図8のようになる。子実の全炭素についてみると、開花期の同化炭素の寄与は1日あたり0.3%にすぎないが、子実肥大盛期から後期にかけて最大4.0%に達する。また、貯蔵蛋白質の生産に対しては、開花後の比較的早い時期の光合成の寄与が大きい、脂質の生産に対してはむしろ子実肥大盛期以後に同化された炭素の寄与が大きいということがわかる。開花以後の全生育期間にわたって各時期の同化炭素の寄与率を積算すると、子実の全炭素について96.3%となり、子実の貯蔵成分ごとにみても90%を大きく上回っている。し

図8 ■開花以後、生育時期別に同化された炭素の子実生産(□), および子実中の貯蔵蛋白質(○), 脂質(●)の生産に対する寄与 (収穫時の子実中の全炭素に占める各生育時期の同化炭素の%)⁽¹⁴⁾

貯蔵蛋白質は、0.4MのNaClを含む0.5Mリン酸緩衝液で抽出し、酸性(pH 4.0)で低温下に沈澱してくる蛋白質である。

たがってダイズでは、開花以後の光合成によって同化された炭素で子実生産の大部分が説明され、開花前の光合成の寄与は高々数%にすぎないと考えてよいようである。しかしながら、開花以後の同化炭素の子実への蓄積のプロセスを子実成分別にみると、それらは決して一様ではない。子実肥大盛期に相当する播種後56日目を境にして開花後の全生育期間を前・後半に分けると、貯蔵蛋白質では前半の同化炭素の寄与が56%と大きい、脂質については後半の同化炭素の寄与が59%に達する。このことは、たんに全体としての子実収量だけでなく、その成分ごとの生産を問題にしていく上で重要、かつ興味あることである。

上に述べたような子実生産における時期別の同化炭素の寄与率に対して、従来むしろよく問題にされてきたのは、時期別の光合成産物の子実生産に対する効率である。この場合、効率というのはある時期の全同化炭素量のうち、どれほどが子実生産に利用されたかによって表現される。筆者らの実験結果から計算すると、開花期の同化炭素の子実生産効率はおよそ6%と小さいが、子実肥大盛期から後期にかけては50%ほどになり、開花以後の全生育期間についてみると33%となった。さきに述べたように、各生育時期の同化炭素量は¹³C標識期間中の呼吸による消費を含んでいないので、いま仮にこれを真の光合成量の最大10%^(4,5,7)としても、開花以後の全光合成量のうち、およそ30%は、収穫時の子実成分

として回収されたことになる。この数字はルービン⁽¹⁸⁾, カウピー⁽¹⁹⁾など他の豆科植物について推定された数字よりもかなり高い。このように、ダイズの子実生産が開花以後の炭素経済の面からは高効率である理由は明らかでないが、莢への光合成産物の分配量が他の豆科植物に比べて小さいということはその一つの理由であろう。

*

以上、定比活性¹⁸CO₂同化という手法を用いて行なってきた研究の一端を紹介した。現在までに得られた結果はきわめて初歩的なものにすぎないけれども、我々はこの方法を展開することによって、植物の生長と生産の過程に対する理解を深め、耕種的・育種的手段による植物生産の向上のために役立てることができないかと考えている。

なお、本稿で紹介した実験結果の大部分は、米山忠克氏(農水省農業研究センター)との共同研究であり、また一部は山県真人(四国農試), 赤尾勝一郎(東北農試, 現在農業生物資源研究所), 樋口利彦(東京学芸大学)の各氏の協力によって行なわれたものであることを付記する。

文献

- 1) D. R. Geiger & B. R. Fondy: *Plant Physiol.*, **64**, 361 (1979).
- 2) 国分信彦, 柳沢 啓:「ライフサイエンスのための安定同位体利用技術」, 日本アイソトープ協会, 1983, p. 61.
- 3) H. Kouchi & T. Yoneyama: *Ann. Bot.*, **53**, 875 (1984).
- 4) H. Kouchi, S. Akao & T. Yoneyama: *J. Exp. Bot.*, **37**, 985 (1986).
- 5) H. Kouchi, K. Nakaji, T. Yoneyama & J. Ishizuka: *Ann. Bot.*, **56**, 333 (1985).
- 6) H. Kouchi & T. Yoneyama: *Physiol. Plant.*, **68**, 238 (1986).
- 7) H. Kouchi, T. Yoneyama & S. Akao: *Exp. Bot.*, **37**, 994 (1986).
- 8) J. S. Pate, D. B. Layzell & D. L. McNeil: *Plant Physiol.*, **63**, 730 (1979).
- 9) 河内 宏, 樋口利彦: 日作紀, **56**, 別号 1, 112 (1987).
- 10) 加藤泰正: 農業及び園芸, **57**, 1115, 1225 (1982).
- 11) F. Bidinger, R. B. Musgrave & R. A. Fisher: *Nature*, **270**, 431 (1977).
- 12) R. B. Austin, C. L. Morgan, M. A. Ford & R. D. Blackwell: *Ann. Bot.*, **45**, 309 (1980).
- 13) J. S. Pate, C. A. Atkins & M. W. Perry: *Aust. J. Plant Physiol.*, **7**, 283 (1980).
- 14) M. Yamagata, H. Kouchi & T. Yoneyama: *J. Exp. Bot.*, **38**, 1247 (1987).
- 15) J. S. Pate, M. B. Peoples & C. A. Atkins: *J. Exp. Bot.*, **34**, 544 (1983).
- 16) H. M. Rawson & L. T. Evans: *Aust. J. Agric. Res.*, **22**, 851 (1971).
- 17) T. L. Setter & V. H. Meller: *Plant Physiol.*, **75**, 617 (1984).
- 18) J. S. Pate & D. F. Herridge: *J. Exp. Bot.*, **29**, 401 (1978).
- 19) J. S. Pate & A. M. Flinn: *J. Exp. Bot.*, **24**, 1090 (1973).