

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：14303
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21580013
 研究課題名（和文） 同位体放出を利用した作物体における炭素窒素の動態解析
 研究課題名（英文） Analysis of Natural Abundance of Isotopes Emitted from Plants in Relation to Carbon and Nitrogen Utilization
 研究代表者
 巽 二郎（TATSUMI JIRO）
 京都工芸繊維大学・生物資源フィールド科学教育研究センター・教授
 研究者番号：00163486

研究成果の概要（和文）：水耕した水稻とトウモロコシについて暗呼吸により放出される CO₂ の炭素同位体組成（δ¹³C）を切断した器官別に調べた。水稻では器官間で有意に異なる呼吸 δ¹³C が認められた。すなわち呼吸 δ¹³C は根においてもっとも高く、その他の器官（栄養生長期では地上部、生殖生長期では成熟葉と穂）では有意に低かった。この傾向は窒素栄養により影響を受けなかった。いっぽうトウモロコシでは器官間の呼吸 δ¹³C に有意な差は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：The carbon isotope composition (d13C) of CO₂ respired by excised organs of rice and maize was measured under dark condition. In rice plants a significant difference in d13C signature of CO₂ was found; the d13C was higher in the roots than other organs (the shoot in vegetative stage and the mature leaves and ears in reproductive stage). In contrast maize showed no significant difference in d13C signature among organs in both vegetative and reproductive stages. These suggest that substrate pools utilized for respiration can be different among organs in rice plants as compared with maize.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：作物学、資源植物学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：植物、環境、ストレス、安定同位体、生理学

1. 研究開始当初の背景

作物の生産能力の向上をはかるには光合成速度の増加だけでなく光合成同化産物が効率よくシンク器官に移動・蓄積される必要がある。しかし光合成同化産物の約50%が呼吸により失われ、とくにイネでは収量形成に重要とされる生殖生長期において呼吸ロスの割合が高まることが知られている。呼吸ロス

の低減は生産性向上の重要なカギの一つである。呼吸に利用される基質は、器官や生育段階、栄養状態により変化し、また呼吸の性格（維持呼吸と生長呼吸）により異なるとされているが、その実態や生理的意義は十分解明されていない。筆者等は、イネの根の呼吸により放出される炭素の約50%が新規固定炭素由来であり、残りが貯蔵炭素由来である

ことを明らかにした。また根のエイジによりその割合が大きく変動することを認めた。いっぽう窒素は生長に最も必要な元素のひとつであり、その吸収・同化は生産性に大きく影響する。同化された窒素の一部は根圏から放出されるが、葉からアンモニアガスとして揮散する。これは光呼吸系のアンモニア代謝経路から漏れた窒素であると考えられている。同位体自然存在比：炭素と窒素の安定同位体である ^{13}C と ^{15}N の ^{12}C と ^{14}N に対するそれぞれの割合は自然存在比 (δ 値) として表される。最近、 ^{13}C と ^{15}N の δ 値を生理機能の指標として利用した、植物の栄養応答やストレス応答に関する研究が展開されはじめている。体内フラクションのC・Nの δ 値は、光合成、N吸収・固定により同化される際の、また同化後の物質代謝過程で生じる同位体分別を色濃く反映している。呼吸により各器官から放出される炭素の δ 値は呼吸基質フラクションに大きく依存していると考えられる。また植物体からアンモニアガスとして大気に放出される窒素も同様である。植物から放出される炭素と窒素の δ 値は、呼吸系・光呼吸系で生起する物質のダイナミクスの指標の一つと考えられる。しかしその意義は十分調べられていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、作物の生産性向上を最終目標とし、植物器官から放出される炭素と窒素の δ 値を解析することにより、呼吸代謝・光呼吸代謝系における炭素と窒素の由来と動態を明らかにし、その生理的意義を吟味することにある。

光合成による CO_2 同化の際に、葉における炭酸固定酵素と CO_2 拡散過程において同位体分別が強く作用し、体内の ^{13}C 自然存在比 ($\delta^{13}\text{C}$) が大きく影響されることが広く知られている。いっぽう植物体内における同化産物の代謝と転流によって器官間における $\delta^{13}\text{C}$ の変動が生じることや(Hubick and Gibson, 1993)、代謝産物の間での変異の存在が報告されている(Brugnoli et al., 1998)。ササゲにおいて、葉は種子と比較してより高い $\delta^{13}\text{C}$ 値を示す(Hall et al., 1990)。また大麦でも同様であり、この関係は水ストレスによる影響をほとんど受けない(Acevedo, 1993)。このような器官間での $\delta^{13}\text{C}$ の差異には、体内における再転流などの物質代謝や呼吸消費が関与していると考えられている。しかし $\delta^{13}\text{C}$ の差異におよぼす呼吸の影響や、呼吸により放出される炭素中の $\delta^{13}\text{C}$ に関する知見はまだ少ない。

植物における $\delta^{15}\text{N}$ 値は、基本的に外部のN源の $\delta^{15}\text{N}$ 値およびNの同化、転流、損失過程における同位体分別作用に依存する。通常、作物における $\delta^{15}\text{N}$ 値は栄養源の同位体

値に影響されるが、種間や品種間、環境条件によって変動することが知られている。野生オオムギの系統間において地上部の $\delta^{15}\text{N}$ 値が数%変動する(Handley et al., 1997)。塩濃度や水ストレスが地上部の $\delta^{15}\text{N}$ 値を低下させる(Robinson et al., 2000)。

$\delta^{15}\text{N}$ の器官間における差異が根粒とマメ科宿主植物との間においてもっとも顕著に認められる。根粒における $\delta^{15}\text{N}$ は高い値を示す。Wanek と Arndt (2002) はダイズの地上部と地下部の間に $\delta^{15}\text{N}$ の差を認め、この差が窒素固定能と密接な相関を示すことを明らかにした。いっぽう野生大麦において、地上部と地下部の間に $\delta^{15}\text{N}$ の差が認められ、これはN欠乏と高い相関を示した(Robinson, 2003)。筆者らはマメ科および非マメ科植物において、地上部と地下部間の $\delta^{15}\text{N}$ の差異が窒素固定能と高い相関を有することを明らかにした(Khadka and Tatsumi 2007)。このように $\delta^{15}\text{N}$ の体内分布が生理機能と密接に関連することを示す結果が得られている。

いっぽう葉からアンモニアガスが放出されることが知られている。その量は従来ごくわずかだと考えられていた。しかし富窒素栄養条件下では無視できない量であることが指摘されている。地上部からの窒素の放出は個体や各器官における窒素の同位体比に影響をおよぼす可能性があり、また光呼吸系のGSによる窒素の再同化活性の変動とも深く関連している。しかし葉から揮散する窒素の $\delta^{15}\text{N}$ の動態に関するデータは少ない。

植物の暗呼吸にともない放出される CO_2 の同位体組成についての報告は少なく、大部分が幼植物に関するものである。Baertsch(1953)は発芽中の豆の呼吸 CO_2 の同位体組成が植物全体のそれと同じであるとした。Park and Epstein (1961)はトマトにおいて呼吸 CO_2 の ^{13}C レベルが植物組織全体よりも約8%高いことを認めた。また彼らはAbelson and Hoering (1961)と同様に、脂質成分の ^{13}C レベルが他の成分よりも約7-8%程度低いことを認め、植物体のある成分、たとえば脂質などの同位体組成が低いということは同時に他の成分の ^{13}C レベルが高いということを指摘した。呼吸と脂質合成は生化学的に密接に関連しているので、呼吸中 $\delta^{13}\text{C}$ の上昇は脂質合成によるものだと考えられる。また彼らは、生化学的理論からBaertsch(1953)の種子の暗黒発芽実験では脂質合成は生じずに脂質の酸化が生じていることを示唆した。このために呼吸 CO_2 の同位体組成が種子(糖と脂質全体)と同じになったと考えられる。しかしもし低 $\delta^{13}\text{C}$ の脂質が酸化よりも合成されたなら、呼吸 CO_2 の ^{13}C 濃度は植物体よりも高くなったと考えられる。

同様な実験が後に各種の植物で行われた。その結果、暗呼吸 CO₂ が呼吸基質（種子、幼植物、葉、植物全体）と比較して 13C 富化（1-8‰）または欠乏（1-10‰）、あるいは種によりさまざまであることが示された。O' Leary (1981) は総説において少なくともこれらの 13C 変動の一部は CO₂ の呼吸基質の変動によるものであると示唆した。また呼吸 CO₂ の δ 13C の変動が暗呼吸過程において生じる同位体分別によるものであることも推察できる。

呼吸 CO₂ 同位体組成の大きな変化が幼植物期、エイジング、暗期継続中に報告されている。さらにジャガイモ塊茎切片において呼吸 CO₂ 同位体組成が時間と共に変化する (Jacobson et al., 1970) ことが示された。この変化はおそらく呼吸に利用される基質の転換または呼吸過程での同位体分別に起因すると思われる。いっぽう Lin and Ehleringer (1997) は *in vitro* の分離プロトプラスト暗呼吸においてみかけの同位体分別が認められないことを報告している。この結果は呼吸過程における真の分別が生じないことを示唆している。

いっぽう Duranceau et al. (1999) は対照区と萎凋区のインゲンマメにおいて暗呼吸 CO₂ は葉齢と葉水分含量にかかわらず葉スクロースよりも δ 13C が約 6‰ 高いことを示した。Ghashghaie et al (2001) は水を十分与えたタバコでは呼吸 CO₂ が葉スクロースと比較して δ 13C が約 3‰ 富化し、ヒマワリでは 2-6‰ 富化することを示した。オンラインガス交換測定法により Duranceau et al. (2001) は、タバコにおいて Ghashghaie et al (2001) とほぼ近いみかけの分別値を、CO₂ フリー閉鎖系で観察した。このことは CO₂ フリーが暗呼吸 CO₂ の同位体組成に影響しないことを示している。彼らは①暗呼吸過程における炭素同位体分別は C₃ 植物に広く認められること、②このみかけの分別率は一定ではなく、種間で変化すること。また乾燥条件でも変化するが、この応答は種間で異なること（対照区と比較して萎凋区ではインゲンでは変化しないがタバコでは増加しヒマワリで減少する）を指摘した。

暗呼吸においてみかけの同位体分別が生じる原因は次の 2 つであると考えられている。①ヘキソース分子内における C が位置的に不均一な 13C 分布をしていること、②ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) 反応における同位体分別が存在すること (De Niro and Epstein 1977, Jordan et al., 1978, Melzer and Schmidt 1987)。グルコース分子の C-3 と C-4 の炭素は 13C に富んでいる。解糖系においてグルコースからピルビン酸が生じこれが PDH により脱炭酸されてアセチル CoA が生成する。この際グルコース由来の C-3 お

よび C-4 炭素が CO₂ として放出される。その結果、呼吸 CO₂ の 13C 富化とアセチル CoA の 13C 欠乏さらにこれを素材に合成される脂質での 13C 欠乏をもたらす。いっぽうアセチル CoA はグルコース経路で生成するだけでなく脂質からも生成する。もし呼吸基質がグルコースから脂質へと転換したならば、ピルビン酸を経由する PDH による 13C 富化 CO₂ の生成が低下し、クレブス回路による 13C 欠乏 CO₂ の生成のみとなるだろう。

Tcherkez et al. (2003) は呼吸 CO₂ の同位体組成と RQ を、暗期中にいた種々の温度のインゲン葉において同時に測定した。その結果両者のパラメータ間に正の相関が認められた。RQ が 1 に近い炭水化物では呼吸 CO₂ の 13C 含量が高く、低い RQ (脂肪酸では 0.6) では低い 13C 含量となる。

Tcherkez et al. (2003) は主として 2 つの代謝的 CO₂ 源があると提案した：ひとつはピルビン酸脱炭酸によって生じる高 13C の CO₂、他の一つはクレブス回路を経由したアセチル CoA の代謝物により生じる低 13C の CO₂ である。この 2 つの炭素源のバランスにより全体の呼吸 CO₂ の 13C 濃度が決まるであろう。実際、炭水化物が分解し (RQ が約 1) アセチル CoA (軽い炭素) が合成的経路 (例えば脂質合成) に利用された場合、呼吸 CO₂ の同位体組成はグルコース分子の C-3 と C-4 の平均値に近く (重く) なる。反対に脂質が分解し (RQ 約 0.6) アセチル CoA が脂肪酸の酸化により生成すると、呼吸 CO₂ の同位体組成はグルコース分子の C-1, C-2, C-5, C-6 の平均値である約 6‰ となり C-3, C-4 よりも低い値となる。総合的な同位体分別効果はこれらの代謝過程の相対的な活性により変化すると考えられる。

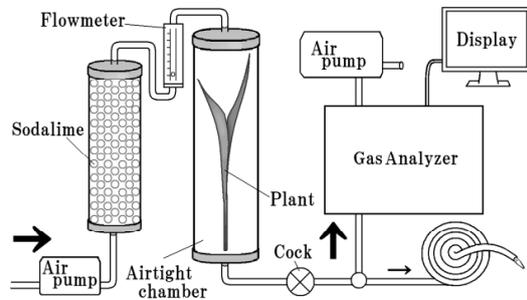
C₃ 植物と C₄ 植物との間に暗呼吸コストに関して基本的な差異は存在しないと考えられている (Byrd et al 1992)。最近 Zhu (2011) は数種類の C₃ 植物と C₄ 植物の根圏から放出される呼吸 CO₂ の δ 13C を調べ、全体的に根圏呼吸 CO₂ の δ 13C が根のそれよりもやや低い、C₃ 植物では呼吸 CO₂ の δ 13C が根のそれよりも 0.9~1.7‰ 低く、C₄ 植物では 3.7~7.0‰ 低いことを示した。筆者らの予備実験によれば、イネとトウモロコシの間では根の呼吸に消費される新規固定炭素と貯蔵炭素の比率が異なっていることが示唆された。もし新規固定炭素と貯蔵炭素における δ 13C 値が異なっておれば、両種間で呼吸にともなう同位体分別が同じであっても、呼吸 CO₂ における δ 13C 値の差異が生じる。いっぽう地上部と比較してシンク器官である地下部や生殖器官では呼吸基質や代謝活性が異なると考えられ、これらにより呼吸 CO₂ の δ 13C 値に器官間で変動が生じる可能性がある。しかしこれらに関する研究結果

は非常に少ない。

3. 研究の方法

実験材料として水耕栽培したイネ (C3 植物) とトウモロコシ (C4 植物) の栄養生長期および生殖成長期のもを用いた。処理として培養液のレベルを変化させた。採取した植物体を器官別に切り分け、ただちに暗呼吸測定用のチャンバに入れ、CO₂ フリー空気を導入し、排気の CO₂ の一部を採取した。実験 1 では排気中の CO₂ ガス濃度を赤外線アナライザー (LI-7000, Licor) で測定した後、真空ラインへ導入し不純物を除去後ガラス封管に CO₂ を回収し、同位体質量分析計 (Finnigan MAT delta-S) を用いて $\delta^{13}\text{C}$ を測定した。実験 2 では呼吸チャンバの排気の一部を CRDS 同位体分析計 (G210-i, Picarro, 実験 2) に導入し、オンラインにて暗呼吸 CO₂ の濃度と $\delta^{13}\text{C}$ を測定した (Fig. 1)。

Fig. 1 実験 2 における測定系



4. 研究成果

実験 1 : 水稲 (品種日本晴) を 2 段階の窒素レベル (1/2, 高N区および 1/10, 低N区 Hoagland Solution) で水耕栽培した。出穂 10 日後の葉, 根, 穂のそれぞれの暗呼吸中の $\delta^{13}\text{C}$ を求めた。葉, 根, 穂の各器官の平均において高N区の $\delta^{13}\text{C}$ 値は低N区とほぼ同じ値を示し, 窒素栄養の影響が認められなかった (Table 1)。

処理区	根	成熟葉	穂
高N区	-24.10 ± 1.21	-26.84 ± 0.34	-26.36 ± 0.24
低N区	-23.71 ± 0.79	-27.16 ± 0.57	-25.96 ± 0.63
大気	-9.11‰		

器官別にみると, $\delta^{13}\text{C}$ 値は高N区では根 > 穂 = 成熟葉の順であり, 低N区でも同様に根で最も高く, 成熟葉と穂が相対的に低かった。以上から呼吸により放出される $\delta^{13}\text{C}$ 値は窒素栄養によりほとんど変動しないことが示唆された, これに対して器官間での変動が認められ, 根が他の器官よりも有意に高かった。呼吸中の $\delta^{13}\text{C}$ 値が窒素レベルにかかわらず強いシンク器官である穂においてソース器官の葉とほぼ同じ値を示し, いっぽう穂よりも弱いシンクである根では高くなった。

実験 2 : 水耕栽培した水稲 (品種日本晴)

とトウモロコシ (品種ポップコーン) を用い, 栄養生長期と生殖成長期に実験を行った。

根と地上部の呼吸速度は, 栄養生長期・生殖生長期の両方においてトウモロコシの方が水稲より有意に高かった。また全ての部位からの呼吸で放出された CO₂ の $\delta^{13}\text{C}$ は, 常に水稲よりトウモロコシのほうが高かった。これは C4 植物と C3 植物間の光合成システムの違いを反映している。トウモロコシにおいて呼吸中の $\delta^{13}\text{C}$ は, 栄養生長期と生殖生長期の両方で地上部, 葉, 穂, 根の間で有意な差が見られなかった (Fig. 3)。いっぽう水稲

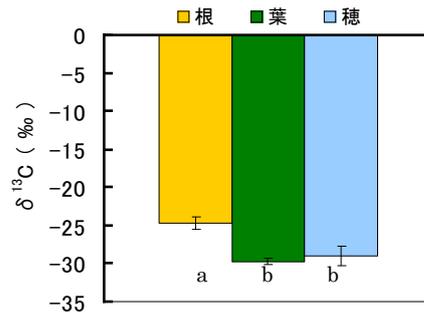


Fig. 2 生殖生長期の水稲における呼吸 $\delta^{13}\text{C}$ (‰) の器官別比較 (実験 2, n=6)

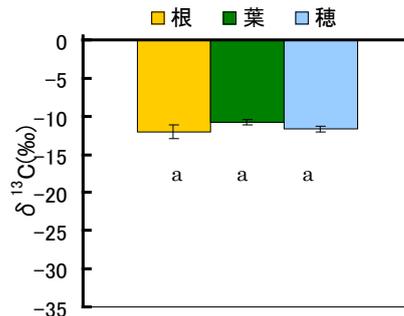


Fig. 3 生殖生長期のトウモロコシにおける呼吸 $\delta^{13}\text{C}$ (‰) の器官別比較 (実験 2, n=5)

において根の呼吸中の $\delta^{13}\text{C}$ は地上部より有意に高く (栄養生長期), 同様に葉と穂よりも高かった (生殖生長期, Fig. 2)。グルコースを消費する呼吸にともない放出される CO₂ は基質よりも ¹³C 濃度が高く, 脂質などの貯蔵態 C を消費する呼吸では ¹³C が低くなると指摘されている (Ghashghaie et al, 2003)。水稲の根は地上部と比較して物質貯蔵機能が乏しく, 地上部から供給される糖プールを基質とした呼吸に大部分を依存していると考えられる。いっぽう地上部器官では脂質やタンパク質などの貯蔵物質プールが大きく, これを基質とした呼吸の割合が比較的大きく, そのため器官全体として見た場合に呼吸 $\delta^{13}\text{C}$ が根よりも低くなったと推察される。またトウモロコシの根は水稲と比較して太

く、貯蔵機能が高いと考えられ、そのためにトウモロコシでは器官間の差異が認められなかったのかも知れない。しかし、トウモロコシにおいて新規光合成同化産物のシンクへの供給速度とシンクの呼吸で放出される $\delta^{13}\text{C}$ の関係を調べた結果、同化産物の供給が増加すると呼吸中 $\delta^{13}\text{C}$ が富化することが報告されている(Werth and Kuzyakov, 2006)。組織内の物質プールの $\delta^{13}\text{C}$ の動態などさらに詳細な解析により明らかにされる必要がある。

炭素代謝における様々なプロセスを経ることで植物体から放出される $\delta^{13}\text{C}$ 値に変動が生じる。(同位体分別)が、これは特にC3植物で変動が大きいとされる(米山ら2002)。しかしこれに関する知見は少ない。いっぽう根圏から呼吸により放出される CO_2 の $\delta^{13}\text{C}$ は母根組織の値と比較してC4植物の方がC3植物のよりも低下度合いが大きいことが報告されている(Zhu 2011)。つまりC4植物の根の呼吸においてC3植物よりも大きな同位体分別が生じている可能性を示している。C3植物とC4植物間で維持呼吸速度に大きな差異はなく呼吸コストにも差はないとも考えられている(Byrd et al 1992)。これらの結果も含めて今後さらなる究明が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計3件)

1. 巽 二郎 作物生産科学への提言—根研究30年から(招待講演), 第1回作物生産科学コロキウム, 2012年3月18日, 大阪府立大学
2. Kuribayashi, A. and Tatsumi, J. Variation of ^{13}C natural abundance in CO_2 released from the roots of rice and maize plants. JSRR's 20th Anniversary Symposim: The Latest Frontiers of Root Research in Asia, 2011.11.6, University of Tokyo, Tokyo.

[図書] (計1件)

1. 巽 二郎 (分担執筆), 作物学用語事典, 養賢堂, 2010年, pp288-293.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巽 二郎 (TATSUMI JIRO)

京都工芸繊維大学・生物資源フィールド科学教育研究センター・教授

研究者番号: 00163486

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: