

水田雑草の越冬栄養生殖器官に見られる 低酸素応答特性とその初期成長の制御

原田 太郎*・大川原 竜人*・吉岡 俊人**・佐藤 茂**・石澤 公明*,***

Anaerobic responses and initial growth in overwintering organs
for vegetative reproduction of weeds in paddy fields

Taro Harada*, Ryuto Ookawara*, Toshihito Yoshioka**, Shigeru Satoh** and Kimiharu Ishizawa*

キーワード：エチレン，嫌気ストレス，水生植物，水田雑草，スクロース代謝

はじめに

水生植物の特性

植物の生育環境から見た日本の水田の特徴は、人為的な擾乱によって作り出される空間的、時間的な多様性にあることが論じられている（清水 1998；伊藤 2002）。水田への侵入に成功した水田雑草は、この水田環境で生活するための適応形質を備えていることになる。その水田雑草の適応形質を理解することは、雑草を防除する観点から重要であるばかりではなく、植物の環境適応機構を解明する上での優れた研究となることを約束している。

多年生水田雑草は、種子繁殖だけでなく、栄養生殖器官が越冬して繁殖することで、しばしば強害草となる場合がある。私達は、ヒルムシロ (*Potamogeton distinctus* A. Benn.) の殖芽 (turions)、ウリカワ (*Sagittaria pygmaea* Minq.) の塊茎 (tubers)、アギナシ (*Sagittaria aginashi* Makino) のムカゴ (bulbils) などの栄養生殖器官が、嫌気条件に著しい耐性を示すばかりではなく、嫌気条件で成長が促される性質を持つことを見出した。好気生物 (aerobes) である種子植物の中で、無酸素条件でも成長できる植物種を包括的に調べた研究はなく、現在まで報告されている種類は限られたものである。そこで最初に、水田雑草がこのような性質を持つことの意味を考えてみることにする。

水田雑草の多くは、水生植物としての適応形質を獲得している。しかし、水生植物とはどのような植物かを厳密に定義することは難しい (Sculthorpe 1967)。水中での物質拡散速度の極端な低下は、水生植物の生存に大きな影響を及ぼす環境要因である。即ち、酸素分子の拡散速度の低下は、水中や水飽和土壌での嫌气的環境の形成を促すことから、酸素の供給を如何に確保するかは、直接生存に関わる問題となるからである。水生植物に見られる嫌气的環境の回避には、次のようなものがある。

1) 通気組織の発達

水生植物は、著しく発達した通気組織を持ち (Sculthorpe 1967)、これが通気システムとして機能していると考えられている (Armstrong 1979)。そして、抽水植物 *Nuphar luteum* の葉柄にある通気組織で、気体が体積流となって移動していることが証明された (Dacey 1980)。陸生植物では、細胞死を伴って形成される破生通気組織が多く見られるが、水生植物では、これに加えて、細胞間隙が広がり細胞死を伴わないで形成される離生通気組織が発達していることが特徴である。

2) 光合成による酸素の供給

水生植物には、光合成による炭素固定様式に多様性が認められることが注目され、その多様性を生む原因に、水中での炭酸ガス濃度と酸素濃度の大きな日周変化があると言われる (Keeley 1987)。その光合成で生産された

* 東北大学大学院生命科学研究所 〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

Graduate School of Life Science, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan

** 東北大学大学院農学研究科

*** 連絡著者、現在：宮城教育大学教育学部理科教育 〒980-0845 仙台市青葉区荒巻字青葉 149

第1表 黄化ヒルムシロ殖芽細胞のアミロプラスト内のデンプン粒の大きさとデンプン含量に及ぼす3日間の好気培養と嫌気培養の効果

	培養前	好気培養 (3日間)	嫌気培養 (3日間)
デンプン粒の大きさ (μm)	6.04 \pm 0.06	5.31 \pm 0.05	4.59 \pm 0.08
デンプン含量 (mg gDW ⁻¹)	446 \pm 79	281 \pm 50	97 \pm 23

デンプン粒の最大幅をヒルムシロ殖芽の縦断面当たり100-300個測定した。培養前、好気培養、嫌気培養で測定した総デンプン粒数はそれぞれ972, 917, 352で、その平均値と標準誤差を示す。それぞれの値は、危険率1%で有意差がある。デンプン含量は3回の測定の平均値と標準誤差で示す。

第2表 黄化ウリカワ塊茎の苗条の空气中、1%酸素、窒素中での伸長成長に対するAVGの効果

処 理	2日後の伸長量 (mm)
Air	50 μM AVG - 4.6 \pm 0.8
	+ 2.2* \pm 0.4
1%O ₂	- 10.2 \pm 0.5
	+ 7.4* \pm 0.7
N ₂	- 10.5 \pm 0.8
	+ 9.1 \pm 0.8

データは異なる4回の実験での21-25個体の平均値と標準誤差で示されている。*印は、それぞれの酸素濃度でのAVG処理、非処理間での有意差 ($P < 0.05\%$) のあるものを示す。

第3表 黄化ウリカワ塊茎の苗条の空气中、1%酸素、窒素中での伸長成長に対するエチレン作用阻害剤(1-MCP)の効果

処 理	2日後の伸長量 (mm)
Air	1-MCP - 8.0 \pm 1.1
	+ 2.2* \pm 0.8
1%O ₂	- 12.0 \pm 1.3
	+ 7.7* \pm 0.8
N ₂	- 14.7 \pm 2.3
	+ 12.3 \pm 1.3

データは異なる2回の実験での6-19個体の平均値と標準誤差で示されている。*印は、それぞれの酸素濃度での1-MCP処理、非処理間での有意差 ($P < 0.05\%$) のあるものを示す。

酸素が、根に供給されて利用するシステムがあることが、海産水生植物のアマモ (*Zostera marina* L.) で報告されている (Smith *et al.* 1984)。

3) 体表面でのガスの交換

ウキイネは、急激な水位の上昇に伴って、その節間を成長させる。その水没した部分に酸素を供給するシステムとして、体表面に形成される薄い気相を通して、日中は炭酸ガスが、夜間には酸素が体積流となって供給されている (Raskin and Kende 1985)。植物によっては、体内だけではなく、体の表面でもガス交換を行うことを示すものである。

4) 急速な伸長加速

水中での幼葉鞘の伸長加速は有名であるが、この成長には低酸素分圧とエチレンそして二酸化炭素の三つの因子が関わっている (Ishizawa and Esashi 1984)。水面まで伸ばした幼葉鞘には、酸素を取りこむためのシュノーケルとしての役割を果たす意味があると説明されている。

水生植物の酸素を獲得する4つの戦略を紹介したが、水田雑草の栄養繁殖器官が示す無酸素中での急速な伸長成長は、強い還元的環境にある水田土壌内から、水面の好気的環境に到達するための戦略であると理解することが出来る。ヒルムシロの場合、11月に野外で採集した殖芽は、25°C暗所で酸素濃度の低下した条件で培養しても成長を開始しない。3月中旬頃まで4°C暗所で保存する

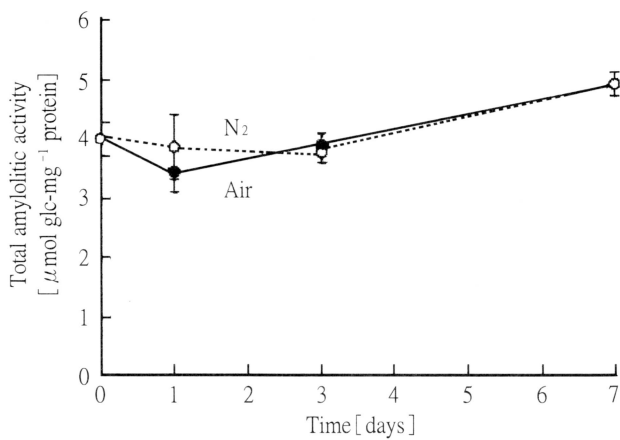
と、25°C暗所で酸素濃度が5%以下の場合に成長が誘導されるようになる (Ishizawa *et al.* 1999)。秋に殖芽は一種の休眠状態にあり、低温処理によりはじめて酸素応答性が現れるものと考えられる。このことは、日本の水田で決まった時期に繰り返される湛水が、ヒルムシロ殖芽に成長開始の適切な時期を知らせる役割を果たしていると思われることは面白いことである。

嫌気的環境での成長制御

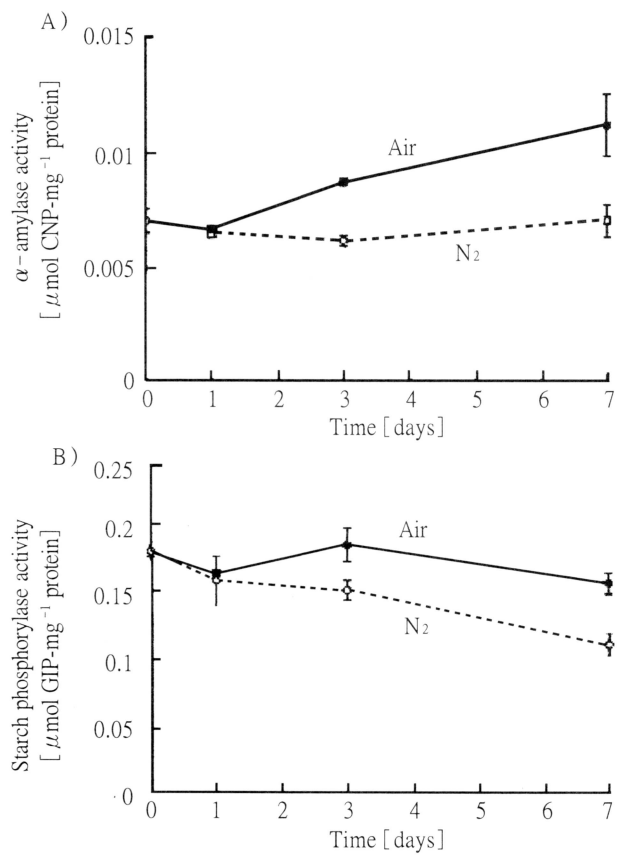
一般的に、嫌気的環境に対して強い耐性を持つ好気生物では、嫌気条件下での限られたエネルギーの使用を、生存に必須なことだけに制限する仕組みが獲得されているという (Hochachka *et al.* 1996)。とすると、ヒルムシロやウリカワなどエネルギーを消費して成長することで嫌気的環境から脱出する試みは、一か八かの勝負を賭けた、捨て身の戦法と言えそうである。今回、これらの植物が如何にしてエネルギーを生産し、その成長にはどのような特徴があるのか、最近私達が明らかにしたことを紹介することにする (Harada and Ishizawa 2003; Harada *et al.* in press; Ookawara *et al.* in press)。

1) エネルギー生産

ヒルムシロ殖芽とウリカワ塊茎は、一週間以上の無酸

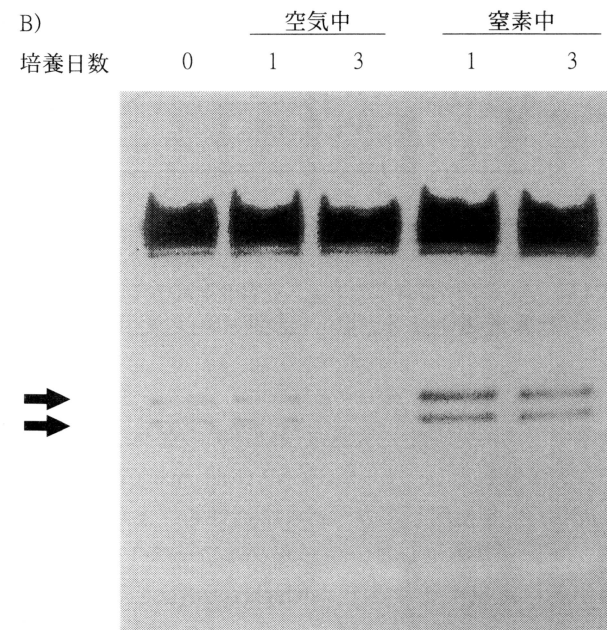
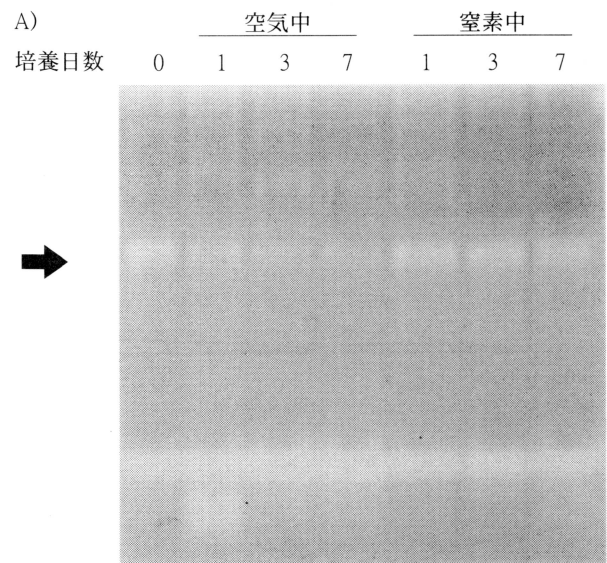


第1図 空気中および窒素中で培養した黄化ヒルムシロ殖芽の全 amylase 活性の変化



第2図 空気中と窒素中で培養した黄化ヒルムシロ殖芽の α-amylase (A) と starch phosphorylase (B) の活性変動

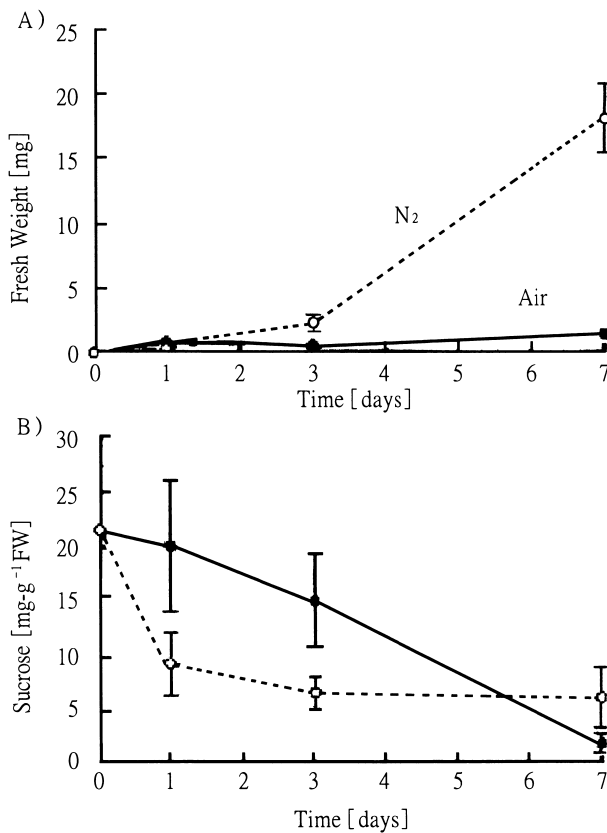
素条件下でも高いエネルギー充足率 (energy charge) を維持しており、これは ATP 生産量と消費量のバランスが保たれていることを示している (Ishizawa *et al.* 1999)。そのエネルギー生産は、主にアルコール発酵と乳酸発酵、そしてアラニン合成によると考えられ、そのエネルギー源が殖芽細胞に蓄えられているデンプンによることが明らかになった (佐藤ら 2002)。



第3図 amylase (A) と starch phosphorylase (B) のアイソザイム 空気中と窒素中で培養した黄化ヒルムシロ殖芽より抽出した酵素を native PAGE で分析後、活性染色した。それぞれの矢印は、窒素中で高い活性を示すアイソザイムを示す。

A) 貯蔵デンプンの分解

ヒルムシロ殖芽には大量のデンプンが、アミロプラストの中に蓄えられている。無酸素中での急速な伸長成長に伴って、アミロプラストの大きさとデンプン含量がどのように変化するかを調べた (第1表)。培養前の殖芽の細胞に含まれるデンプン粒の大きさは、無酸素中3日間の培養後に小さくなり、そして、殖芽のデンプン含有量が減少した。そこで、デンプン分解に関わる全 amylase 活性として、可溶性デンプンを基質にして遊離される還元糖量を測定した (第1図)。7日間の培養中に、空気、

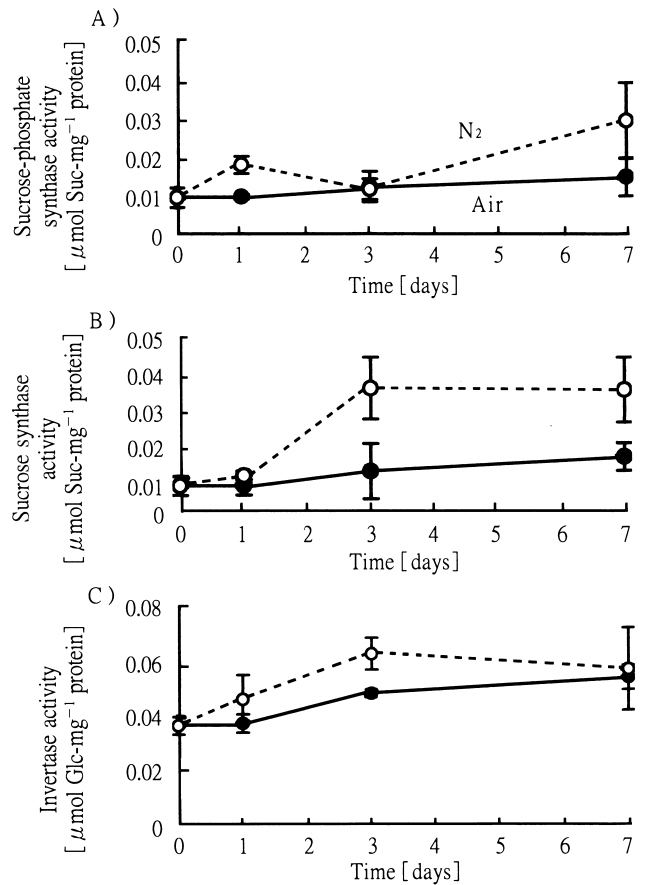


第4図 空気中と窒素中で培養した黄化ヒルムシロ殖芽の生重量 (A) とスクロース含量 (B) の変化

窒素中での活性変化に大きな差は認められなかった。そこで、人工基質として6-N₃G5CNP (Kikkoman Co., Tokutake *et al.* 1993) を使用して α -amylase活性を、また、可溶性デンプンを基質にして、生じたグルコース1-リン酸を酵素的に定量することで starch phosphorylase の活性の変化を調べたのが第2図である。タンパク質量当たりの比活性で比較すると、starch phosphorylase 活性が α -amylase 活性より高いことが分かる。しかし、驚いたことに、デンプン分解が活発におこる窒素処理中で、加水分解、加リン酸分解活性が低下することが明らかとなった。

これを説明する幾つかの仮説が考えられるが、amylase や starch phosphorylase の特定のアイソザイムの活性が変動している可能性を探ってみた。タンパク質を native PAGE で分離後、活性染色によりアイソザイムの分析を試みた (第3図)。amylase, starch phosphorylase の活性を示す各々のバンドで、空気中で減少するあるものがあった。このことは、アミロプラスト内でのデンプン分解には、特定のアイソザイムが関わる可能性を示唆している。アミロプラスト内での貯蔵デンプン分解過程は、現在のところ殆ど分かっておらず、ヒルムシロ殖芽はこの問題を解明する良い研究対象であると考えている。

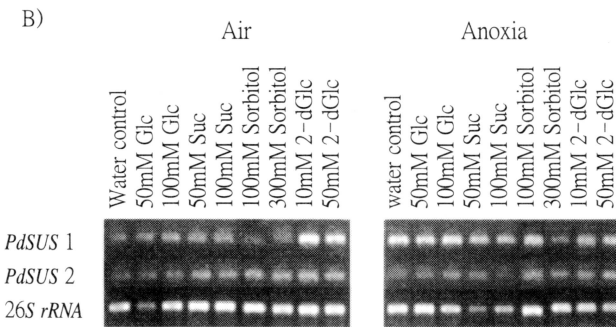
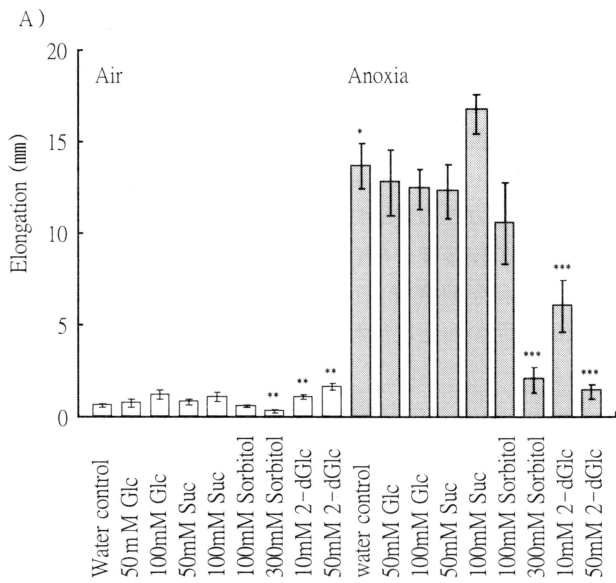
B) スクロース (Suc) の代謝



第5図 黄化ヒルムシロ殖芽の sucrose-phosphate synthase (A), sucrose synthase (B), acid invertase (C) の活性変動

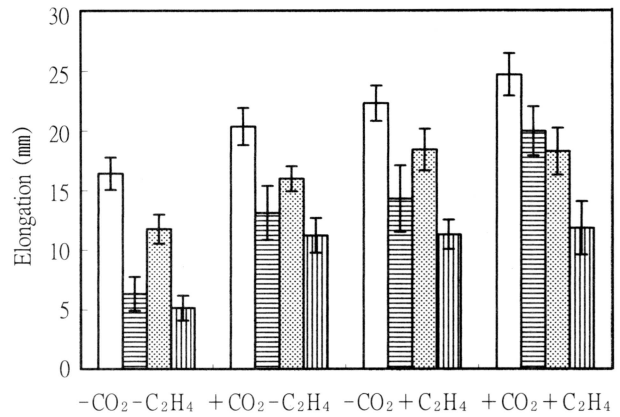
ヒルムシロ殖芽が無酸素中でどのような糖代謝を行っているかを知るために、¹⁴C-グルコース (¹⁴C-Glc) を投与した場合のトレサー実験を行い、Suc への¹⁴C-Glc の取り込みから、無酸素中での活発な Suc 合成が明らかとなった (Sato *et al.* 2002)。Suc 含量を調べてみると (第4図)、Suc 含量は、窒素中の成長に伴って急速に減少することが分かった。これは Suc の合成に関わる sucrose-phosphate synthase 活性の上昇 (第5図 A) と一致した。また、Suc の分解に関わる sucrose synthase (SuSy) と acid invertase の活性 (第5図 B, C) も窒素中で上昇することから、無酸素中ではデンプン分解の活性化により生じた糖が、一度 Suc に合成された後に使用されている可能性を示唆した。このような合成と分解の繰り返しは、Suc 代謝の futile cycle (無益回路) の構成要素として、UDPGlc, Glc1P, Glc6P, Fru6P, Fru, Glc, Suc などの代謝産物のプールサイズを一定に保つ重要な役割をしていると考えられている (Nguyen-Quoc and Foyer 2001)。

SuSy は、嫌気処理されたトウモロコシの根で誘導される嫌気タンパク質 (anaerobic polypeptides) の一である (Sachs *et al.* 1996)。SuSy による Suc の分解は、インベルターゼによる分解よりは経済的に優位であるとの見解が



第6図 ヒルムシロ殖芽を暗所で3日間、空气中又は窒素中で培養したときの伸長成長量 (A) と sucrose synthase をコードする遺伝子 (*PdSUC 1* と *PdSUC 2*) の mRNA レベル変化 (B) 抽出した RNA を鋳型にして RT-PCR 法で増幅後、アガロース電気泳動で分析し、エチジウムブロマドで染色した。* 印と ** 印は空气中の water control に対して、*** 印は窒素中 water control に対して、伸長量に有意差 ($P < 0.05$) があるものを示す。

Glc : グルコース, Suc : スクロース,
2-dGlc : 2-デオキシグルコース



第7図 空气中、1%酸素中で2日間培養した黄化ウリカワ塊茎苗条の成長に対する5%炭酸ガス、 $5\mu\text{l liter}^{-1}$ エチレン及びアルコール脱水素酵素阻害剤 1 mM pyrazol の効果
空气中 (無地, 横縞), 1%酸素 (斑点, 縦縞), pyrazol 無処理 (無地, 斑点), pyrazol 処理 (横縞, 縦縞)

産物が増大するが、*PdSUC 2* のレベルは大きな影響を受けなかった。また、*PdSUC 1* の空气中、窒素中の転写レベルは、外部から投与した Glc や Suc により影響されないことから、窒素中での転写産物量の増大は、細胞内の糖濃度の変化により誘導される可能性は低いと考えている。一方、植物には代謝できない Glc のアナログである 2-deoxyglucose (2-dGlc) は、空气中伸長促進を示し、*PdSUC 1* の mRNA レベルも増大させるが、窒素中ではそれらを抑制した。このことは、嫌気ストレス刺激応答は、糖代謝と何らかの結びつきがあることを示すのかもしれない。また、sorbitol により水ストレスを与えて成長を阻害すると、*PdSUC 1* の mRNA レベルも低下した。これらの結果は、*PdSUC 1* の mRNA レベル量と成長に、ある程度の相関があることを示している。以上から、ヒルムシロ殖芽の無酸素中での成長では、*PdSUC 1* が関与する Suc の合成と分解が重要な役割をしていることが示唆された。

2) 細胞成長

ヒルムシロ殖芽とウリカワ塊茎の苗条の成長は嫌気条件で著しく促進されるが、その成長はエチレンと炭酸ガスによっても促進されることが知られている (Suge and Kusanagi 1975)。更に、ウリカワ苗条の嫌気条件での成長促進は、細胞分裂ではなく細胞伸長によることが分かっている (Tamura *et al.* 2000)。そこで、嫌気条件下での成長と、エチレンや炭酸ガスによる成長促進効果がどのように関係しているかをウリカワ塊茎の苗条を使って解析した。

第7図は、ウリカワ苗条のエチレンと炭酸ガスによる成長促進を、空气中と1%酸素中で比較したものである。空气中でも1%酸素中でも、炭酸ガス、エチレンの促進

ある (Koch 2004)。更に、SuSy は細胞壁のセルロース合成に Glc 単位を供給する役割も果たしている (Koch 2004)。そこで、ヒルムシロ殖芽の無酸素中での成長に関わる SuSy をもう少し詳しく調べてみた。

C) スクロース合成酵素 (SuSy) 遺伝子の発現

ヒルムシロから異なるアミノ酸配列をもつ2つの cDNA (*PdSUC 1*; accession No. AJ012080 と *PdSUC 2*; accession No. AJ001071) を単離した。嫌気処理と数種の糖を投与した時に、この二つの遺伝子の mRNA 量にどのような影響を与えるかを、PCR により増幅される cDNA 量から解析したのが第6図である。窒素処理で、*PdSUC 1* の転写

効果が認められる。空気中では、エチレンと炭酸ガスを同時に与えると、単独処理より大きな促進効果が認められた。1%酸素中ではその相乗効果は認められないが、最も大きな促進効果は、1%酸素、エチレンそして炭酸ガスの同時処理の場合であった。これらの関係は、イネ幼葉鞘の場合 (Ishizawa and Esashi 1984) と極めて良く似ていることが分かった。

嫌気条件での成長に必要なエネルギーの多くがアルコール発酵によると考えられることから、alcohol dehydrogenase の阻害剤として知られている pyrazol の作用を調べて見た。第7図に示すように、空気中では pyrazol のエチレン、炭酸ガス単独の促進効果に対しては影響を与えないが、1%酸素では、エチレンや炭酸ガスの存在の如何に関わらず成長を部分的に阻害した。これらの結果は、1%酸素での成長にアルコール発酵が関与していることを示すものと考えられる。

ウキイネの水中での節間成長促進にも、嫌気条件、エチレンそして炭酸ガスが関与する (Raskin and Kende 1984)。それは、水中に置かれた節間が嫌気状態に陥ると、エチレン生成が促進され、そのエチレンが組織内に蓄積することで、急速な伸長成長の促進を誘導すると説明されている。ウリカワ塊茎の嫌気条件での成長にエチレンが関与するのかわかると、エチレンの合成阻害剤である aminoethoxyvinylglycine (AVG) と、エチレン作用の阻害剤として知られている 1-methylcyclopropene (1-MCP) を使って調べて見た。AVG (第2表) と 1-MCP (第3表) は共に、1%酸素中でのウリカワ苗条の成長を部分的に阻害するのに対して、窒素中の伸長促進効果には有意な阻害効果を示さなかった。このことは、1%酸素でのウリカワ苗条の伸長促進効果には、エチレンによる促進効果が含まれていると考えられるが、無酸素中では、エチレンとは独立した伸長促進作用が働いていることを示唆した。

今後の展望

人工的に管理された水田の中で雑草として生活している植物は、自然環境に適応進化したものの中から、水田環境にうまくあったものを、長年人の手により選別したものである。このことが、水田雑草に大変面白い性質を持ったものが見つかる理由ではなかろうか。また、野生植物を研究材料とする場合、材料を集めることが常に問題となる。その点、水田雑草は比較的簡単に入手できることは、大変魅力がある。面白い形質を持った水田雑草を使い、植物の生理とその適応進化の普遍的問題に新たな視点を導入することを私達は目指している。

謝 辞

6-N₃G5CNP を分与頂いた東北大学大学院農学研究科の中島佑教授、1-MCP を分与頂いたローム・アンド・ハース・ジャパン株式会社の三井萬丈氏、そしてヒルムシロとウリカワの栽培にご助力頂いた、東北大学理学部生物学科の佐藤健一技官に感謝いたします。この研究の一部は、科学研究費 (14658165, 研究代表者佐藤茂) の財政的援助のもとに行われた。

引用文献

- Armstrong, W. 1979. Aeration in higher plants. *Adv. Bot. Res.* 7 : 225 - 332.
- Dacey, J. W. H. 1980. Internal winds in water lilies: an adaptation for life in anaerobic sediments. *Science* 210 : 1017 - 1019.
- Harada, T. and K. Ishizawa 2003. Starch degradation and sucrose metabolism during anaerobic growth of pondweed (*Potamogeton distinctus* A. Benn.) turions. *Plant & Soil* 253 : 125 - 135.
- Harada, T., S. Satoh, T. Yoshioka and K. Ishizawa Sucrose synthase (SuSy) genes expressed during anoxic elongation of pondweed (*Potamogeton distinctus* A. Benn.) turions. *Ann. Bot.* (in press)
- Hochachka, P. W., L. T. Buck, C. J. Doll and S. C. Land 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular / metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 : 9493 - 9498.
- Ishizawa, K. and Y. Esashi 1984. Gaseous factors involved in the enhanced elongation of rice coleoptiles under water. *Plant Cell Environ.* 7 : 239 - 245.
- Ishizawa, K. S. Murakami, Y. Kwakami and K. Kuramochi 1999. Growth and energy status of arrowhead tubers, pondweed turions and rice seedlings under anoxic conditions. *Plant Cell Environ.* 22 : 505 - 514.
- 伊藤一幸 2002. 水田雑草とは何か - 植物の水田環境への適応の視点から - 東北の雑草 2 : 1 - 5.
- Keeley, J. E. The adaptive radiation of photosynthetic modes in the genus *Isoetes* (Isoetaceae). Edited by Crawford R. M. M. *Plant Life in Aquatic and Amphibious Habitats*. Blackwell Scientific Pub. Oxford, UK. pp.113 - 128.
- Koch, K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 : 235 - 246.
- Nguyen-Quoc, B. and C. H. Foyer 2001. A role of 'futile cycle' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *J. Exp. Bot.* 52 : 881 - 889.

- Ookawara, R., S. Satoh, T. Yoshioka, K. Ishizawa Expression of α -expansin and xyloglucan endotransglucosylase / hydrolase genes associated with shoot elongation enhanced by anoxic conditions, ethylene and carbon dioxide in arrowhead (*Sagittaria pygmaea* Miq.) tubers. Ann. Bot. (in press)
- Raskin I, Kende H. 1984. Regulation of growth in stem sections of deep-water rice. Planta 160 : 66 - 72.
- Raskin, I., and H. Kende 1985. Mechanism of aeration in rice. Science 228 : 327 - 329.
- Sachs, M. M., C. C. Subbaiah, and I. N. Saab. 1996. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. J. Exp. Bot. 47 : 1 - 15.
- 佐藤竜久・原田太郎・佐藤健一・石澤公明 2002. 嫌気的環境に適応したヒルムシロ (*Potamogeton distinctus* A. Benn.) 殖芽の成長と代謝. 東北の雑草 2 : 24 - 33.
- Sato, T., T. Harada and K. Ishizawa 2002. Stimulation of glycolysis in anaerobic elongation of pondweed (*Potamogeton distinctus*) turions. J. Exp. Bot. 53 : 1847 - 1856.
- Sculthorpe C. D. 1967. The Biology of Aquatic Vascular Plants. Edward Arnold Ltd. London, UK. (Reprinted in 1985 by Koeltz Scientific Books, Königstein Germany).
- 清水矩宏 1998. 水田生態系における植物の多様性とは何か. 農林水産省農業環境技術研究所編, 水田生態系における生物多様性. 養賢堂, pp. 82 - 126.
- Smith, R. D., W. C. Dennison and R. S. Alberte 1984. Role of seagrass photosynthesis in root aerobic processes. Plant Physiol. 74 : 1055 - 1058.
- Suge, H. and T. Kusanagi 1975. Ethylene and carbon dioxide: Regulation of growth in two perennial aquatic plants, arrowhead and pondweed. Plant Cell Physiol. 16 : 65 - 72.
- Tamura, S., H. Kuramochi and K. Ishizawa 2000. Involvement of calcium ion in the stimulated shoot elongation of arrowhead tubers under anaerobic conditions. Plant Cell Physiol. 42 : 717 - 722.
- Tokutake, S., R. Uchida, K. Kotani, K. Saito and N. Yamaji. 1993. Synthesis of barley seed α - glucosidase in starch degradation. Arch. Biochem. Biophys. 284 : 109 - 133.

(2005年3月3日受理)