

## 植物の環境適応に関する生理, 生態学的研究

### V. カタクリ鱗茎における炭水化物含量と アミラーゼ活性の季節的变化

柴田 治・三井のり子<sup>1)</sup>・田悟敏弘<sup>2)</sup>

信州大学理学部生物学教室

(1991年7月5日 受理)

#### はじめに

山岳域の垂直的植生帯の形成は、海拔高度の増加につれて低下する環境温度が大きな要因と考えられている。このような温度環境は高海拔高度ほど植物の成長適温の期間を短くするので、高地の植物は低地よりも成長期間の短い生活史をもった種から構成されている。この場合、分布域の広い種であれば、高地に分布するものほど、成長期間は短くなる<sup>(1,9)</sup>。水平分布の場合には、寒冷域では冬枯れ型、温暖域では常緑型と、温度環境によって生活形が異なる種も報告されている<sup>(11)</sup>。このような植物種の形態は、垂直的には、低地よりも高地の方が大きい地下部現存量比として特徴づけられており<sup>(4)</sup>、花芽も、高地や寒冷地では、前年の秋からつくられているものが多い。

低地帯や山地帯のような低地でも、早春季植物の生活史や形態は高山性植物のこれらによく似ており、成長期間は短く、形態的にも地上部より地下部現存量比の方が著しく大きい。しかし、成長期間が短い原因は、早春季植物は光条件、高山性植物は温度条件と関係するとされており、同一現象であっても関係する環境条件は互いに異なっている。このような違いがあるとはいえ、幼芽形成を含む生活史はよく似ているので、形態形成の基礎的な物質である炭水化物の代謝特性には、類似性があると思われる。

このような観点から、ほとんど解明されていない高山性植物の生活史の生理的特性を知る手掛りをえるために、早春季植物における炭水化物代謝の温度特性を調べた。ここには、これらの結果を報告する。

#### 材料と方法

早春季植物として、長野県北安曇郡白馬村の海拔ほぼ800mの落葉樹林内に生育するカタクリを材料とした。このカタクリの生育過程に伴う鱗茎密度、鱗茎の主要成分である炭水化物量、炭水化物代謝にかかわるアミラーゼ活性、アミラーゼ・アイソザイム活性の変化を調べた。

**鱗茎密度**：生鱗茎を水に沈めた時の水の増加容積と鱗茎の乾重量とから求めた。

---

現住所

- 1) 東京都港区芝5-37-8 日電東芝情報システム K.K.
- 2) 東京都千代田区霞が関3-2-5 プリマハム K.K.

炭水化物量：炭水化物はデンプンと糖に分けて定量した。60°Cで乾燥，ま碎した鱗茎をひょう量後，80%エタノール30mlを加え，還流冷却器をつけて30分間沸騰浴をして糖を抽出した。この抽出液中のエタノールは温浴で気化させた後，遠心分離してえられた上澄液を全糖定量の試料とした。デンプンの定量には，全糖定量用試料の調整時にえられた沈殿物を用いた。この沈殿物に0.7% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を50ml加えて加水分解した後，NaOHで中和し，グルコース量を定量，これに0.9を乗じてデンプン量とした。全糖とグルコースは，フェノール硫酸法<sup>(6)</sup>で発色後に490nmにおける吸光度を測定し，これらの値と検量曲線とからそれぞれの量を求めた。なお，鱗茎から抽出された糖は，ペーパークロマトグラフで半定量的に分析した結果，マルトースも含まれていたが，ほとんどがグルコースであったので，グルコースの検量曲線からえた値を全糖量とした。

アミラーゼ活性：鱗茎をひょう量後，pH6.7の0.05M Tris-HCl緩衝液20ml中で5°Cでま碎し，3500r.p.m.で30分間遠心分離してえた上澄液を粗酵素液とした。この粗酵素液1mlに，1%の可溶性デンプンを含むpH4.8の0.02M CH<sub>3</sub>COONa緩衝液1mlを加え，さらにpH4.8の0.02M CH<sub>3</sub>COONa緩衝液で6mlとして，これを反応液とした。反応は定温で10分間行い，IM CH<sub>3</sub>COOH 2mlを加えて反応を停止させた後に，フェノール硫酸法で糖を定量した。この糖量を単位時間に換算してアミラーゼ活性とした。なお，アミラーゼ活性測定は，季節的に異なる土壤温度を考慮して，5°，15°，25°Cで行った。

アミラーゼ活性の測定は，季節的温度変化とアミラーゼ活性の関係を解析するために，定温で栽培した鱗茎についても行った。この場合は，鱗茎が休眠中の7月30日から鱗茎内幼芽の成長期間中の12月10日まで，1°Cと20°Cの定温で栽培し，9月20日と12月10日に，上記の方法によってアミラーゼ活性を測定した。

アミラーゼ・アイソザイム活性：2，3の酵素で，低温下でのみ活性化されるアイソザイムが報告されている<sup>(3,8,12)</sup>。カタクリ鱗茎のアミラーゼについてこの可能性を調べるために，異なる生育期におけるアミラーゼ・アイソザイムの相対的活性を等電点電気泳動によって検討した。

定重量の鱗茎をpH7.0の1/15Mリン酸緩衝液と共に0°Cでま碎し，これを7000r.p.m.で遠心分離した時の上澄液をアミラーゼ・アイソザイムの分析に用いた。アミラーゼを泳動させるポリアクリルアミド・ゲルのpH勾配は，アンホラインpH3.5~10で調整し，200Vで5時間泳動した。これらの染色は室温でTANAKAの方法<sup>(10)</sup>によって行い，アイソザイムの活性は相対的染色度から評価した。

## 結 果

Fig. 1-Aに示したように，同化器官の葉は4月から地上に現れ始め，6月の初めには消滅した。生殖器官の花蕾の出現は葉の出現期とほぼ同一であったが，結実期は葉が消滅した後もほぼ1カ月間続いた。鱗茎内に幼芽が分化したのは地上部の消滅からほぼ2カ月後で，花芽の分化はこれよりさらにほぼ1カ月後であった。

鱗茎密度の季節的变化(Fig. 1-B)は，葉の出現に先立つ急減，葉の出現に伴われた急増と同化期間中の高い値，結実期における減少として現れた。さらに，10月以降の減少は鱗茎内の幼芽の分化期に対応していた。このような鱗茎密度の変化に対して，4月中旬

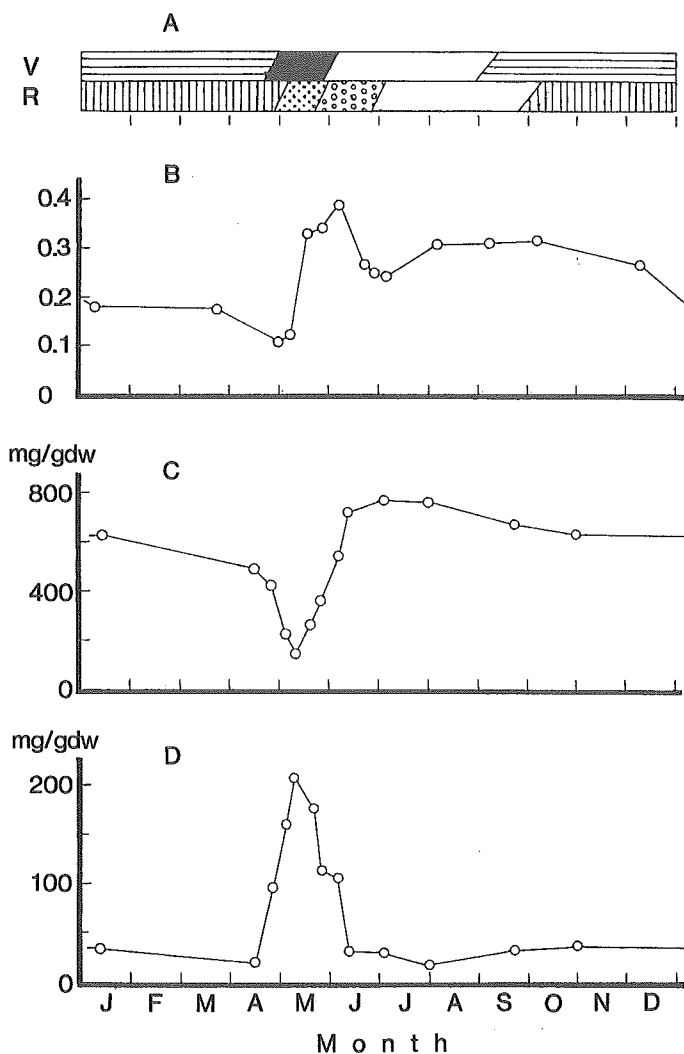


Fig. 1. Seasonal changes of density (B), starch content (C), and sugar content (D) in *Erythronium japonicum* Decaisne bulbs with the development of the vegetative (A-V) and reproductive (A-R) organs.  
 □; vegetative bud, ■; leaves, □; floral bud, ; flower, □; seeds.

から減少をはじめたデンプン量の季節的变化は、5月初めに最低値となった後に急増し、その後は次第に減少した (Fig. 1-C)。結実期における減少はみられなかったが、デンプン量の変化は全体として鱗茎の密度変化に似ていた。糖量は4月中旬から急増して5月初旬に最大値となった後、6月初旬まで減少して (Fig. 1-D)、デンプン量の変化と全く対照的であった。

アミラーゼ活性の季節的变化 (Fig. 2) は糖量の変化によく似ており、4月初旬から急

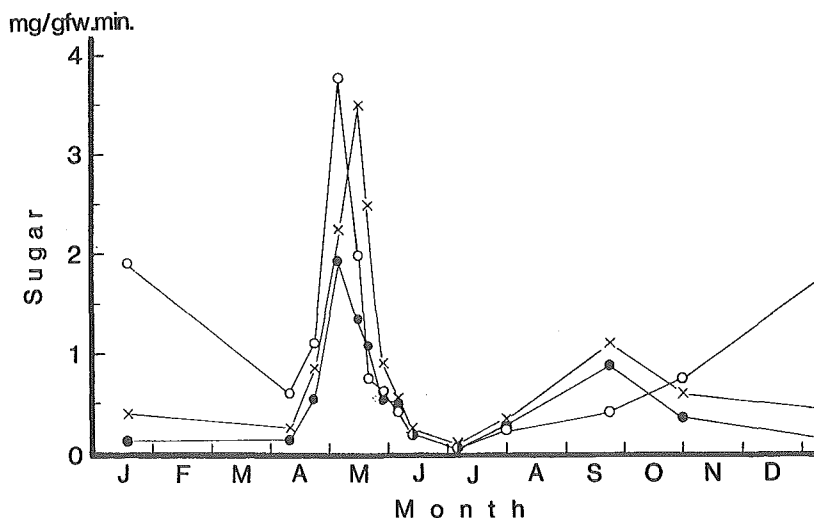


Fig. 2. Seasonal changes of temperature characteristics of amylase activity in *Erythronium japonicum* Decaisne bulbs. Amylase activity was shown as the amount of sugar produced.

○; 5°C, ×; 15°C, ●; 25°C.

増した活性は5月初旬から中旬にかけて最高となった後、5月末には急減して7月初めに最低となった。なお、鱗茎はこの時期に旧鱗茎から新鱗茎にか変わった。その後、アミラーゼ活性は次第に増加した。このようなアミラーゼの全体的な活性変化のなかで、活性適温は季節的に異なった。すなわち、11月から翌年5月初旬までは、15°C、25°Cよりも5°Cの方が活性は高く、他の期間では15°C、あるいは25°Cの方が高かった。ことに、12月から翌年3月までの5°Cにおける活性は、15°C、25°Cと比較して特異的に高かった。同化期間中に葉と茎のアミラーゼ活性も測定したが、これらのアミラーゼ活性は鱗茎の1/2~1/3と低く、また温度による違いはほとんどなかった。

鱗茎が1°C、あるいは20°Cの定温におかれても、幼芽は分化したが、これの成長は1°Cより20°Cの方が良好であった。この場合のアミラーゼ活性は、両栽培温度で、栽培期間の終りには野外のものと同様に増加した。しかし、野外におけるものとは異なって、5°Cにおけるアミラーゼ活性が他の温度より特異的に高くなることはなかった。

ここで検出されたアミラーゼ・アイソザイムの数は17であった (Fig. 3-A)。これらのうち、9アイソザイムの活性はきわめて微弱で季節的变化もみられなかったが、8アイソザイムは比較的高活性であった。ただし、これら8アイソザイムのうち、2アイソザイムは同一生育期でも個体によって現れないものがあって、すべての個体に常在した6アイソザイムについて、相対的活性の季節的変動を Fig. 3-B に示した。この図中で、5月13日の試料は調べたすべての温度でアミラーゼ活性がもっとも高い時期のもの、7月25日はもっとも低い時期のものであった。また、9月20日の試料は5°Cより15°C、25°Cの方がアミラーゼ活性が高い時期のものであり、12月10日は5°Cでのみ高活性を示した時期のものであった。

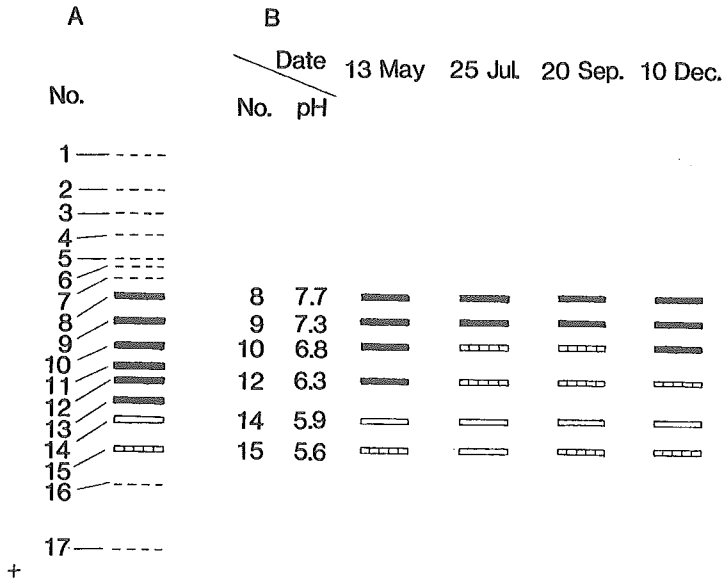


Fig. 3. Amylase isozymes in *Erythronium japonicum* Decaisne bulbs analyzed by isoelectrofocusing (A) and seasonal changes in activity of the main isozymes (B). Isozyme 11 and 13 were excepted from the main isozymes at present because their presence was variable among populations but not seasons. -----; very low activity, □; low activity, □□□; median activity, ■■■; high activity.

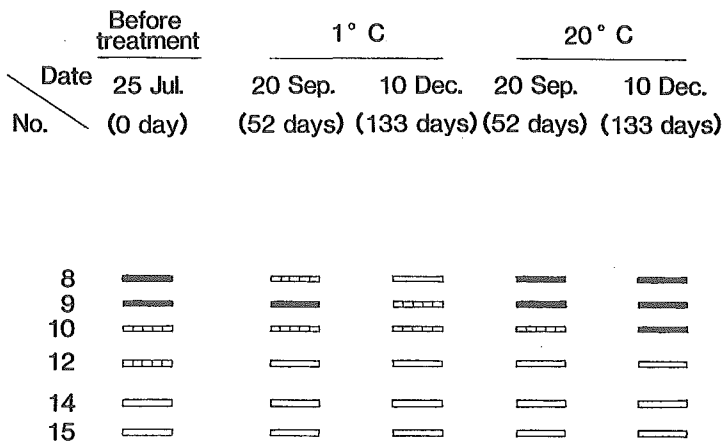


Fig. 4. Variations of the activities of main amylase isozymes in *Erythronium japonicum* Decaisne bulbs cultured at 1°C and 20°C since summer. See Fig. 3 for controls to 52 days and 133 days of temperature treatments. □; low activity, □□□; median activity, ■■■; high activity.

アミラーゼ活性の温度特性に関する上記のような変化のもとで、アイソザイム 8, 9, 14は、互いの活性に強弱の違いはあったが、すべての時期を通してほぼ等しい活性を示していた。しかし、アイソザイム10は、アミラーゼ活性の適温が5°Cであった5月と12月にのみ高活性となり、アイソザイム12は5月にのみ高くなった。また、アイソザイム15はアミラーゼ活性がもっとも低下した7月にのみ低活性であった。5月には、葉と茎についてもアミラーゼ・アイソザイムを分析したが、鱗茎と較べてアイソザイム組成は同じでも、活性はすべての成分で同程度で、低かった。

定温で栽培した時のアミラーゼ・アイソザイムの活性変化を Fig. 4に示した。1°Cの栽培期間が長くなっても、野外のように活性が高くなるアイソザイムはみられず、野外で高かったかあるいは高くなったアイソザイム活性は、むしろ次第に低くなる（アイソザイム 8, 9, 12）か、あるいは高くならなかった（アイソザイム10, 15）。しかし、20°Cの時には、アイソザイム12の活性が低下し、15は変化しなかったとはいえ、アイソザイム10は野外のものと同様に高活性化した。アイソザイム14の活性は、両温度のもとで野外のものと同程度で低かった。

## 考 察

生活史が特異な早春季植物のいくつかの種について、RIESSER and COTTAM<sup>(7)</sup>は、代謝的観点から、鱗茎内幼芽の分化、発達と糖代謝の関係について考察している。この早春季植物の1つであるわが国のカタクリについては、YOKOI<sup>(13)</sup>、KAWANOら<sup>(2)</sup>が生活史的観点から報告している。ここで得られた生活史と炭水化物の季節的変動に関する結果は、彼等の結果とよく一致している。しかし、生活史については多少の違いがみられる。

カタクリの生活史のなかで、葉の出現期間と鱗茎の休眠期間は、KAWANOら<sup>(2)</sup>の場合よりもここで得た結果の方がはるかに短い。早春季植物の葉の出現期間は、ゆう雪期、上層の樹種の開葉期、あるいは下層植生の構成種によって異なると思われる。しかし、鱗茎の休眠期間の長さの違いは、KAWANOらの場合は低地帯産であったが、ここでは山地帯産であったことから、生育高度に起因した環境温度の違いから生じたのであろう。球根植物の花芽を含む幼芽の分化には、ある程度の低温が必要であることはよく知られており、RIESSER and COTTAM<sup>(6)</sup>も、早春季植物の鱗茎内における幼芽の分化と発達には温度要因が関係している、としている。

地上部の出現期における鱗茎密度、炭水化物量の急激な変化に対応して、アミラーゼ活性が急変することは、前者の変化は後者の変化が直接的な原因であることを示すと思われる。このアミラーゼ活性の変化で興味をひかれるのは、11月から翌年5月初めまでは、活性適温が5°Cとかなり低い温度であったことである。ことに、12月から翌年3月までの5°Cにおける活性は、他の高い温度に較べて、相対的に著しく高い。カタクリ鱗茎の深さにおけるこの期間の土壤温度が1.5°Cから6°Cであったことから、アミラーゼ活性のこの低い適温は低い土壤温度に対応していると考えられる。土壤温度がほぼ14°Cからほぼ20°Cであった5月中旬から9月中旬までの期間には、アミラーゼ活性の適温が15°Cであったことから、この推測は可能であろう。

このようなアミラーゼ活性の適温の変化は、RIESSER and COTTAM<sup>(7)</sup>と同様に、冬の低

温に対する適応の1つと考えることができる。しかし、鱗茎が休眠中で、地温がほぼ20°Cの夏から以後、1°Cあるいは20°Cの定温で栽培しても、野外と同様に鱗茎内で幼芽が分化、成長して、アミラーゼ活性も高まっている。これは、秋から冬への糖代謝の高まりが、必ずしも環境温度の低下のみによるものではないことを示すと思われる。また、定温で栽培した時には、20°Cの方が1°Cよりも幼芽の成長は良く、野外の鱗茎でみられたような、アミラーゼの活性適温の低温域への特異的な移行がみられない。これらの結果からは、カタクリ鱗茎の糖代謝の変動と、これに伴われた幼芽の分化、成長が温度に依存している<sup>(6)</sup>とはいえ、基本的には、年周期的変化として遺伝的に制御されている可能性がある。これと同時に、幼芽の成長のための基礎的代謝にかかわるアミラーゼの活性変化には、次第に低下する環境温度が直接的な刺激として関係しているのかも知れない。

酵素活性が季節的に変化することはよく知られているが、ここでアミラーゼ・アイソザイムに関して得られた結果は、アミラーゼの活性変化の機構を示しているように思われる。それは、アミラーゼ活性の季節的变化は特定アイソザイムの活性変化によるもので、このようなアイソザイムが特異な温度特性をもつ可能性である。ことに、秋から翌春にかけてみられた5°Cにおけるアミラーゼの高活性は、アイソザイム10の活性化と関係していると思われる。しかし、20°Cの定温で栽培した時にも、初冬の時期にはこれが高活性化することから、アイソザイム10の活性化は温度の直接的効果ではなく、遺伝的な年周期性による可能性がある。アイソザイム15もアイソザイム10と同様の季節的变化をするが、これの活性はアイソザイム10よりも早い9月から高くなり、この時期は鱗茎における幼芽の分化が始まる時期に相当する。これら2つのアイソザイムは低温期に活性化されて、冬期の鱗茎内における幼芽の分化、発達に関係しているのであろう。アイソザイム12は同化期の5月にのみ高活性となることから、同時期におけるアミラーゼ活性の急増、急減の主な原因と思われる。

このように、季節的な低温期に特異的に活性化されるアイソザイムを、KELLEY and ADAMS<sup>(9)</sup>は *Juniperus* の過酸化酵素で報告しているが、これの機能として耐凍性との関係を推測している。実験的低温下では、グルコース-6-リン酸酵素<sup>(8)</sup>、チトクローム過酸化酵素<sup>(12)</sup>でも、特異的に活性化されるアイソザイムが報告されている。しかし、これらの生理的意義や特性についてはよくわかっていない。

カタクリ鱗茎におけるその他の主要アイソザイム8, 9, 14と活性が微弱なアイソザイム群は、全生活期間を通じて活性変化をしないことから、カタクリの基本的な生活を維持するための炭水化物代謝にかかわっている、と思われる。

## 摘 要

1. カタクリの鱗茎密度、炭水化物含量、アミラーゼ・アイソザイム活性の季節的変動を調べた。
2. 鱗茎密度とデンプン量は地上部の出現に先立って減少した後、同化期に増加した。糖量はこれと全く対照的な変動をした。
3. アミラーゼ活性は同化期に高くなった後、休眠期の夏に最低となり、その後は次第に高くなった。この活性変化の過程で、アミラーゼ活性の適温が変化した。

4. 土壤の低温期に、アミラーゼの活性適温は低温に移り、アイソザイムのあるものが活性化してきた。実験的低温下でも、このような活性変化をするものがあった。
5. カタクリ鱗茎内の炭水化物量の変動は、特定のアミラーゼ・アイソザイムの活性化が原因であろう。アイソザイムのこの活性変化は、遺伝的な年周期性と季節的な環境温度の変化によると思われる。

## 文 献

1. CLAUSEN, J., KECK, D. D. and HIESEY, W. M. (1940) Experimental studies on the nature of species. I. Effect of varied environments on western north american plants. *Carnegie Inst. Wash. Pub.* No. 520, Washington D. C.
2. KAWANO, S., HIRATSUKA, A. and HAYASHI, K. (1982) The productive and reproductive biology of flowering plants. V. Life history characteristics and survivorship of *Erythronium japonicum*. *Oikos*, **38**, 129-149.
3. KELLEY, W. A. and ADAMS, R. P. (1977) Seasonal variation of isozymes in *Juniperus scopulorum*: Systematic significance. *Amer. J. Bot.*, **64**, 1092-1096.
4. KÖRNER, Ch. and RENHARDT, U. (1987) Dry matter partitioning and root length area ratios in herbaceous perennial plants with diverse altitudinal distribution. *Oecologia*, **72**, 279-283.
5. 日本化学会 (1978) 新実験化学講座 **20**, 生物学 (II), 637-1270, 丸善, 東京.
6. RIESSER, P. G. and COTTAM, G. (1967) Influence of temperature on the dormancy of some spring ephemerals. *Ecology*, **48**, 500-503.
7. RIESSER, P. G. and COTTAM, G. (1968) Carbohydrate cycles in bulbs of some spring ephemerals. *Bull. Torrey Bot. Club*, **95**, 359-368.
8. SADAKANE, H. and HATANO, S. (1982) Isoenzyme of glucose-6-phosphate dehydrogenase in relation to plant hardiness of *Chlorella ellipsoidea*: In *Plant cold hardiness and freezing stress*. 157-167. (ed. P. H. Li and A. SAKAI). Academic Press.
9. 塩沢比奈子, 柴田 治, (未発表) 異なる海拔高度の間で相互移植したイタダリの形態的変異.
10. TANAKA, Y. 1970. Enzymatic mechanism of starch breakdown in germinating rice seed. *Plant Physiol.*, **46**, 650-654.
11. 山西弘恭, 福永典之, (1983) 日本列島におけるオオバコ *Plantago asiatica* L. の生態型分化, 日生態誌, **33**, 473-480.
12. YAMANISHI, H. and SHIBATA, O. (1987) Physiological and ecological studies in environmental adaptation of plants. III. Altitudinal variation in some characters of cytochrome oxidase isozymes in *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. *J. Fac. Sci. Shinshu Univ.*, **22**, 75-82.
13. YOKOI, Y. (1976) Growth and reproduction in higher plants. II. Analytical study of growth and reproduction of *Erythronium japonicum*. *Bot. Mag. Tokyo*, **89**, 15-31.



## Physiological and Ecological Studies in Environmental Adaptation of Plants

### V. Seasonal Changes of Carbohydrate Content and Temperature Characteristic of Amylase Activity in *Erythronium japonicum* Decaisne Bulbs

By OSAMU SHIBATA, NORIKO MITSUI, and TOSHIHIRO TAGO

Department of Biology, Faculty of Science, Shinshu University

(Received July 5, 1991)

#### Summary

*Erythronium japonicum* Decaisne bulbs were used to investigate the seasonal changes of their density, starch and sugar contents, and amylase and amylase isozymes activities.

The density and the starch content were gradually decreased from early autumn in the previous year to just before the appearance of aboveground part in early spring, and were rapidly increased with its appearance. Then, the density alone decreased its value during the period of seed maturity. The seasonal change of the sugar content was in quite contrast with that of the starch. The bulb began to develop a new bud in it in early autumn during which soil temperature became to a low level.

The seasonal change of amylase activity in the bulb was similar to that of sugar content. During the seasonal change, its optimum temperature showed two different levels: from 15°C to 25°C in the period from summer to middle autumn while 5°C in the period from late autumn to late spring in the following year. When the bulbs were cultured respectively at the constant temperature of 1°C and 20°C from summer to early winter, however, amylase's high activity at 5°C, which was shown during a cold season in the field, was not observed at the end of the culture period although the bulbs cultured in both the constant temperatures had developed their new buds like the bulbs in the field.

Some of amylase isozymes were found to rise to a high activity during the period from autumn to spring in the following year. When the bulbs were cultured at a constant temperature since summer, however, the isozymes which decreased their activity were found among such isozymes, especially at 1°C rather than 20°C cultures.

The seasonal change of carbohydrate metabolic activity in *E. japonicum* seems to be caused by specific amylase isozymes which changed their activities seasonally between both periods of high soil-temperature and low soil-temperature, and the activity change seems to originate from a biological annual-periodicity and seasonal temperature stimulus.