

<第30回 山崎賞>

9. 水草の炭酸水素イオン利用の起源を探る

静岡県立静岡農業高等学校生物部研究班

1 研究の目的

私たち生物部研究班は、培養や実験に使用しているミネラルウォーター（以下 MW と記す）の BTB 溶液が、空気に触れて青色に変色する原因を追及し続け、それが脱炭酸によることを突き止めた。さらに、この結論を、植物を用いて確かめる実験において、オオカナダモがその光合成により、周囲の水を塩基性に変えるという確証をつかみ、研究を継続した。2012 年度は、なぜ塩基性に変化するのかしることを目的として研究を行い、得られた仮説を日本生態学会高校生ポスター部門に発表した。その結果、私たちの仮説が正しいことがわかり、その後は、どのような植物にその現象が見られるのかを調べ、その機能の起源を探ることを目的として研究を行った。なお、水草については、筑波実験植物園の田中教授より『一度陸上に進出したコケ植物、シダ植物、種子植物が、再び水中に進出したもの』との定義に従って、研究を進めた。

2 研究計画と実験方法

研究を行った項目は、「オオカナダモがその光合成により周囲の溶液を塩基性に変化させる原因」、「どのような光合成生物が、塩基性に変化させるのか」、の 2 つである。

いずれも、「光合成をしたか」、「塩基性に変化したか」については、BTB 溶液の変色により判断した。また、BTB 溶液には、MW と脱イオン水（以下 DW と記す）を用いた。イオンをほとんど含まない DW は、空気中の CO₂ が溶け込み BTB により黄色を示し、CO₂ が消費されれば緑色に変色する。MW はその成因から本来は塩基性であり、含まれる CO₂ 量によって酸性度が変化する。このため、BTB を加えて気体の CO₂ を封入すれば黄色を示し、CO₂ が消費されれば青色に変色する。この両者の性質を利用して各種の実験を行った。実験にあたっては、以下のことに注意した。

- ① 試料は、水道水及び DW でよく洗い、水中生活でないものは、洗浄後、70%エタノールをスプレーで散布して消毒した。
- ③ 試料は、BTB 溶液の色がわかる範囲で、できるだけたくさんの試料を入れるようにした。

3 実験結果と考察

(1) 水草の光合成による酸性度の変化

ア 昨年度の結果

オオカナダモに 2 種の BTB 溶液中で光合成を行わせた。BTB-MW 溶液のみ塩基性の青色を示すはずだが、実際に実験してみると、DW

も青色に変色してしまった（図 1）。他の水草でも実施した結果、イネ（抽水性）、ホザキノフサモ（沈水性）の 2 種では、光合成により、BTB-DW 溶液だけ中性の緑色を示す結果が得られた。このことから、オオカナダモは、光合成により水酸化物イオンを放出し、周囲を塩基性に変える特有の性質を持つと結論づけた。さらに、この現象は、試験管を BTB 溶液で満たして密封した状態でも確認された。息を吹き込まなかった溶液は、開始 1 時間後には青色に変色していた。

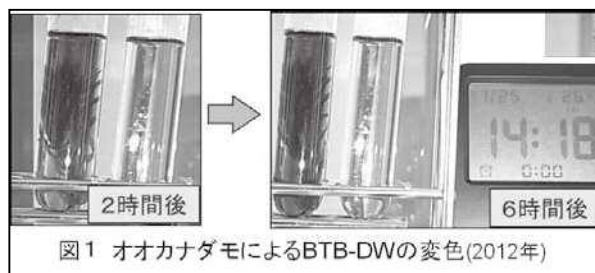


図1 オオカナダモによるBTB-DWの変色(2012年)

イ なぜ塩基性に变化するのかを調べる実験

まず、光合成がおきない環境での実験を考えた。BTB-DW 溶液に実験用のボンベから N_2 、 CO_2 、 O_2 の各気体を封入し、試料をいれたネジ付き試験管に各溶液をあふれるまで入れ、しっかり密封して光照射した。その結果、 CO_2 封入の BTB 溶液だけ黄色のままで、 N_2 、 O_2 と酸素封入の BTB 溶液は青色に変色した（図 2）。この結果は、 CO_2 が全くなくても、 OH^- を放出することを示している。そこで、以下の仮説を生態学会に発表し、これが正しいことがわかった。

私たちの仮説
オオカナダモは、溶存 CO_2 が全くない場合は、 HCO_3^- を光合成に利用し、葉緑体における CO_2 の吸収が次式で行われる。
$$\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{OH}^-$$

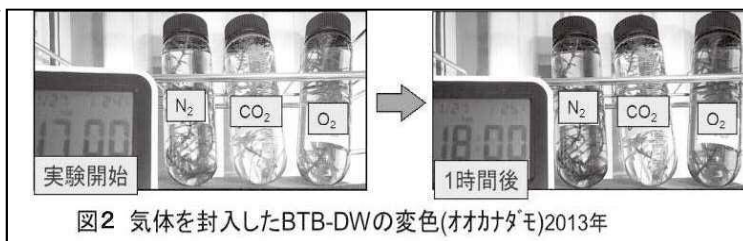


図2 気体を封入したBTB-DWの変色(オオカナダモ)2013年

その後、同じ性質が確認されたイシクラゲと、アオミドロでも、同じ結果が得られることが確かめられた。なお、実験した3種とも、光合成により試料が気泡を発生させながら浮いてくことや、BTB 溶液の色が時間とともにあせてしまうことが観察された。

(2) 炭酸水素イオン利用の有無を確かめる実験

ア 全体の概要

以後、水草に限らず、広く光合成生物を対象とし、どのような生物が炭酸水素イオンを利用しているかを確かめた。具体的な方法は以下の通り。

- ① 3本の試験管に試料を入れ、これを2セット用意する。
- ② 青色及び、黄色の BTB-MW 溶液、黄色の BTB-DW 溶液に漬け、栓で密封する。
(BTB 溶液の量は、水中生活者は完全に沈水するまで、それ以外は試料の半分程度)
- ③ 1セットは明条件、もう1セットは暗条件に置く。
(人工気象器内を用い、温度 25°C 、照度約 $15,000\text{Lux}$ に設定)
- ④ BTB 溶液が完全に変色したと判断されたら、明暗条件を入れ替える。

明条件で、MW、DW とも BTB 溶液が青色に変色したら炭酸水素イオンを利用、MW のみ青色に変色したら利用しない、と判断した。

実験に先立ち、『炭酸水素イオン利用の起源は、原核生物のシアノバクテリアにある。シダ植物以降では維管束系の発達しこの機能は失われたが、水中に進出した水草の一部では復活した』という仮説を設定した。この仮説に従い、緑藻類、コケ植物、原始的なシダ植物はこの機能を持つだろうと予測した。

放課後に実験を開始し、翌朝授業の前に変色の確認と撮影をする（15～16 時間後）。ここで変色が完了していた場合は、明暗条件を入れ替え、そうでなければそのまま続行して、放課後に入れ替えた。このため、い

表 光合成生物における、炭酸水素イオンの利用の有無

No	生物名	分類	科	生育場所	入手方法	利用
1	イシクラゲ	原核生物	ネンジュモ科	半水中	学校農場	○
2	アオミドロ	緑藻類	ホシミドロ科	水中	葵区の池	○
3	マリモ	緑藻類	シオグサ科	水中	購入	○
4	ウィローモス	コケ植物	カワゴケ科	湿地・水中	購入	○
5	ミズゴケ	コケ植物	ミズゴケ科	湿地	北海道	▲
6	ゼニゴケ	コケ植物	ゼニゴケ科	湿地	十二双川	×
7	スギゴケ	コケ植物	スギゴケ科	湿地	購入	×
8	トクサ	シダ植物	トクサ科	陸上	校庭	×
9	スギナ	シダ植物	トクサ科	陸上	校庭	×
10	ミクロソリウム	シダ植物	ウラボシ科	沈水性	購入	×
11	ボルビティス	シダ植物	ツルキジノオ科	沈水性	購入	○
12	オオカナダモ	高等植物	トチカガミ科	沈水性	学校培養	○
13	ホザキノフサモ	高等植物	アリノトウグサ科	沈水性	十二双川	×
14	ヤナギモ	高等植物	ヒルムシロ科	沈水性	十二双川	○
15	スイレン	高等植物	スイレン科	浮葉性	学校庭園	×
16	ブラジルチドメグサ	高等植物	ウコギ科	抽水性	十二双川	×
17	イネ	高等植物	イネ科	抽水性	学校栽培	×

* ミズゴケは呼吸も確認できなかった

つ変色したかは測定していない。

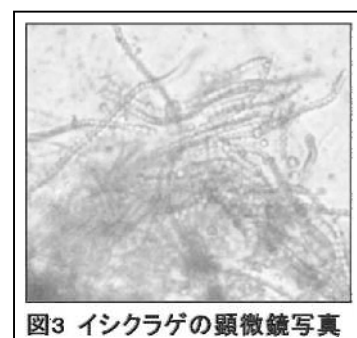
実験の結果、この機能を持つのは、完全に水中で生活できる生物に限られることがわかった。表に示したように、緑藻類はこの機能を有していたが、コケ、シダ植物でこの機能を持つのはごく限られ、いずれもアクアリウムショップで販売されていたものであった。水草については、まだヤナギモ 1 種類しかこの機能が確認できていない。ホザキノフサモと、ヤナギモは同じ川から採取されており、同じ生育環境に生きる植物でも、異なる結果となった。

イ 個別の実験結果

ここでは、炭酸水素イオンの放出が確認されたうちの 5 種について、結果を報告する。なお、暗条件に置いた青色の BTB-MW 溶液はすべて呼吸により黄色く変色した。

(ア) イシクラゲ (原核生物)

光合成をする原核生物のネンジュモの一種で、本校では農場の周辺などにごく普通に見られる。細胞が一行につながった細長い糸状体をなしている (図 3)。水中生活者ではないが、完全に沈水しても平気である。一つの細胞の大きさは、オオカナダモの葉緑体と同じぐらいである。実験の結果、炭酸水素イオンを利用することが確かめられた。開始 8 時間後に MW、DW とも青色に変色した。同じ MW を使った先輩たちの結果では、1 時間程度で完全に青色に変色した。このときは、試験管に溶液を一杯に満たさないで実験しており、空洞に含まれる CO₂ を利用し光合成が早く進行したためと考えられる。

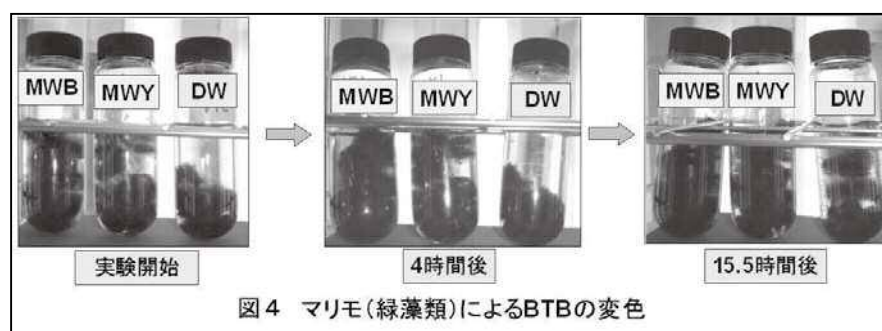


(イ) マリモ (緑藻類)

アオミドロと同様糸状体の緑藻類で、さらにそれが集まり、毬のように丸くなっている。CO₂ が溶けにくい深い水中に生息するため、炭酸水素イオンの利用が強く期待された。実験に用いたのは、外国産で毬の直径が 10 cm 近くある巨大なマリモであった。

実験の結果、炭酸水素イオンを利用することが確かめられた。実験開始 4 時間後に BTB-MW 溶液の青色に変化し、15.5 時間後には BTB-DW 溶液も青色に変色した (図 4)。それだけではなく、試料を BTB-DW 溶液に入れた瞬間に青色に変色してしまい、黄色い BTB 溶液から実験を開始するのが困難であった。3 日間暗条件で呼吸だけさせ、BTB が黄色になることを確かめて実験を行った。毬状の集合体内部に、塩基性の溶液がたまること、深い場所での生活に適応し、炭酸水素イオン利用の力が強いことの 2 つが、その原因として考えられる。

培養中に光が当たっていると、ビンの中で浮いたり沈んだりしており、浮いているときには光合成によって発生する気泡が見られる。この現象は、上述したとおり、イシクラゲ、アオミドロの 2 種でも確認された。



(ウ) ウィローモス (沈水性のコケ類)

野生の沈水性コケ類が見当たらなかったため、アクアリウムショップで採した。南米産と表記されており、湿地に生息するものを水中に沈めて培養したものとのことだった。沈水性で、しかもコケ類であるので、炭酸水素イオンを利用するだろうと予想した。

実験の結果、炭酸水素イオンを利用することが確認された。実験開始 16 時間後には、すべての BTB 溶液が青色に変色していた（図 5）。

コケ類で、炭酸水素イオンの利用が確かめられたのは、本種だけであった。培養瓶の中では植物体は浮いているが、マリモのように沈むことはない。光が当たると、盛んに気泡を発生するのが観察される。

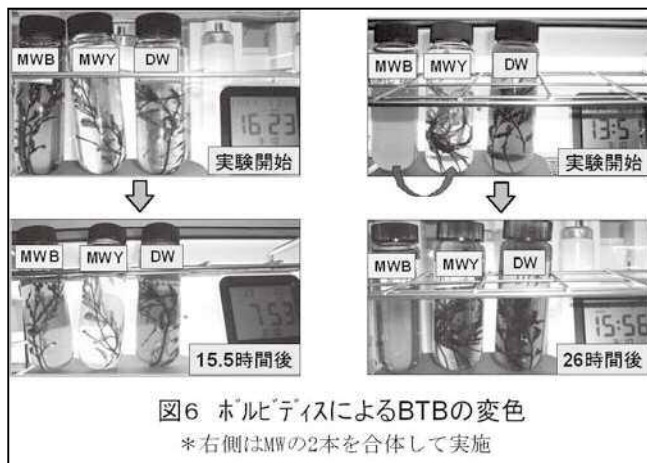


図5 ウィローモス(沈水性)によるBTBの変色

(エ) ボルビディス（沈水性のシダ類）

アクアリウムショップで炭酸ガスの添加が必要な種として売られていたので、炭酸水素イオンの利用はしないだろうと予想した。

実験の結果、意外なことに炭酸水素イオンの利用が確認された。このときは、試験管内に BTB 溶液を満たし、CO₂ をボンベで封入した MW を用いてしまった。最初の実験では、開始 15.5 時間後に BTB-DW 溶液のみ青色に変色し、MW は緑色に変色した（図 6 左）。この時点では、葉量が少ないことが原因と考え、MW の試験管 2 本の試料を合体して、2 倍に増やして実施した。その結果、開始 26 時間後に、BTB-MW 溶液もようやく青色に変色した（図 6 右）。結果的には MW も変色したが、CO₂ をボンベから封入した MW で管内を満たしたことは、大きな失敗であった。つまり、(1) -イの実験と同じ条件であり、変色しない可能性があった。変色に時間を要した理由は、溶液中の CO₂ が多量にあることに加え、管内に空洞がなく、光合成で発生する O₂ が排出しにくかったためと考えられる。



(オ) ヤナギモ（沈水性の被子植物）

十二双川の昨年ホザキノフサモを採取した場所で、違う種類の水草があるのを発見し、実験に使用した。昨年、ホザキノフサモは炭酸水素イオンを利用しない結果が出ていたので、この種もしないと予想した。

実験の結果、予想に反し、炭酸水素イオンを利用することが確認された。黄色の BTB-MW 溶液では開始後すぐに葉の周辺から青くなったので、DW も青く変色しそうな予感を抱いた。結局、かなり時間がかかったものの、実験開始 20 時間後には、BTB-DW 溶液も青色に変色した。

4 炭酸水素イオン利用の起源に関する総合的考察

(1) 炭酸水素イオン利用の起源について

炭酸水素イオンを利用する生物はすべて、完全に水中で生活しているものであった。この結果から、この機能の起源は私たちの仮説のとおり、シアノバクテリアにあると推測される。水草は、陸上に進出した植物が再び水中の生活にもどったグループである。文献によれば、世界中に分布している水草は、植物の系統分類とは全く無関係で、陸上から水中への再進出は、植物の進化の

中で複数回にわたって起きている。別々に分かれたいくつもの種が、それぞれ葉緑体の起源であるシアノバクテリアと同じ機能を持つようになったとは考えにくい。かつて持っていた機能が復活したと考える方が、ごく自然ではないか。また、維管束系が発達しないコケ類で、ウィローモス以外でこの機能が確認されなかったことから、この機能が失われたのは、コケ類が陸上に進出してすぐの段階であると考えられる。

この機能が、多くの水草に見られるということは、復活もまた簡単であるのではないか。水草の種により、この機能の有無が見られる理由として、pH などの生育環境の違いによることが考えられる。しかし、今年度はこれを支持する結果は得られていない。もう一つ考えられることは、気孔の有無など葉の構造である。オオカナダモは表裏 2 層の細胞層しかないため葉が非常に薄く、水中生活にとってもよく適応している。いずれにしろ、今後の課題である。

5 研究のまとめ

BTB の変色を利用して、光合成生物の炭酸水素イオンの利用について、以下のことがわかった。

- ① 炭酸水素イオンを利用することができるのは、完全に水中で生活できる生物である。
- ② まず溶存 CO₂ の利用を優先し、これがなくなると炭酸水素イオンを利用する。
- ③ この機能の起源はシアノバクテリアにあるようだ。
- ④ この機能は、維管束系の有無に関係なく、陸上に進出してすぐに失われたようだ。
- ⑤ この機能は、多くの水草も持つことから復活も簡単なようだ。

この結果は、水草の進化の過程をよく説明できるものである。結論として、私たちの仮説はおおむね正しかったが、修正が必要であった。現在のところ、以下のように考えている。

『この機能は、シアノバクテリア（原核生物）の段階ですでに持っていた。

陸上に進出したコケ 植物以降では、この機能は失われた。

陸上から水中にもどった植物の中に、この機能を復活させたものが現れた。』

6 今後の課題

今後の課題として、特に以下の 2 点が重要であると考えている。

- ① ミドリムシなどの原生生物や、シアノバクテリアと今回実験した緑藻類の間をつなぐクロレラなど単細胞の緑藻類で、炭酸水素イオン利用の有無を確かめる。
- ② 炭酸水素イオンを利用する水草と、利用しない水草の違いは何なのか、『生育環境の違い』、『葉の構造の違い』、などの観点から調べる。

7 謝辞

本研究は公益財団法人山崎自然科学教育振興会の本年度研究助成を受けて行った。また、以下の方々に大変お世話になった。ここに謹んでお礼申し上げる。（敬称略）

高知大学大学院	山ノ内崇志
筑波大学附属植物園教授	田中法生
北海道大学農学部教授	井上 京
本校職員	乗松朋代、岩崎俊子、久富恵世、長谷川和恵

8 参考文献

1. 静岡農業高等学校生物部. いろいろな光合成生物の光合成と呼吸, 2010
2. 静岡農業高等学校生物部. 脱炭酸によるミネラルウォーターの pH 変化, 2012
3. 田中法生. 水草を科学する, ベレ出版, 2012
4. 山ノ内崇志, 石川愼吾. 水生・湿性植物の沈水状態における光合成炭素源, 2013