

■原 著■ 2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

植物の茎に亀裂が生じる動態の定量的解析

浅岡真理子¹ 西谷和彦^{1,2}

Visualization and Quantification of Mechanical Conflict on Plant Stem Organ

Mariko Asaoka¹ and Kazuhiko Nishitani^{1,2}

¹ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: nishitani@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The stem of vascular plants is a fundamental organ that sustains both aspects of vegetative and reproductive growth. Although the morphology itself and process of stem development have been extensively investigated, it remains unknown how mechanical forces and stem organogenesis are coordinated. Good examples to advance our understanding of the mechanical properties of the stem organ are the recently identified mutant lines of *Arabidopsis thaliana*, which display spontaneous cracks in the stem. In these mutant lines, the morphologies at certain fixed time-points are becoming clearer. However, morphologies at the time-point when the stem begins to crack, and those at the time of its extending process are still unclear. Accordingly, in this research, we set up a method to acquire timelapse images and succeeded in capturing the process of stem cracking from the beginning to extending stages. Using these methods, we revealed that the extension of stem cracks did not progress proportionally with time, but rather proceeded like a random wave of rapid and slow extending.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, inflorescent stem, mechanical forces, organ breakage, time lapse imaging.

序論

維管束植物の茎は、外側から表皮、皮層、内皮、維管束といった細胞群が整列されて構成される。モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は真正双子葉植物であり、道管、形成層、篩部細胞などから成る維管束は茎内で環状に並んで配置され、その束同士をつなぐように繊維細胞が複数層存在する。シロイヌナズナの成長過程は、ロゼット葉を展開する栄養成長期と、花序茎 (Inflorescence stem) を伸長させて花芽を形成する生殖成長期に分けられる。花序茎には初めに形成される主茎に加え、遅れて傍から形成される側茎があるが、それぞれの茎の基本的な構造は同一である。本研究では主茎を解析の対象としている。

維管束を構成する細胞である道管細胞と繊維細胞は、最外層の一次細胞壁の内側には二次細胞壁とよばれる強固な細胞壁が形成される。繊維細胞におけ

る二次細胞壁形成が抑制されると、茎は直立ができなくなることから、維管束は茎の姿勢の制御に重要であることがよく知られている¹⁾。一方でごく最近、私たちは維管束が茎の力学的な整合性維持にも重要な役割を担うことを証明した²⁾。茎の力学的な完全性というのは、言い換えると茎が形状を保って機能を発揮するための仕組みのことである。近年、茎に亀裂が生じるシロイヌナズナの変異体や形質転換系統がいくつか見出されており、これらの系統ではこの仕組みが破綻していることで、茎に亀裂が生じると考えられている²⁻⁵⁾。これらの系統に関して、なぜ亀裂が生じてしまうのか、その原因を探ることで、茎の力学的な完全性維持に必要な要素が明らかになってきている。そのうち *clavata3 de-etiolated3* 変異体系統では表皮細胞の細胞壁の力学的強度の減少が、*pNST:IDD9:SRDX* 系統では茎内部の細胞の過

度な肥大が、亀裂発生と関連することが示唆されてきている^{2,5)}。

しかし、なぜ亀裂が生じるかを解析する以前に、亀裂はどのようにして茎に生じるかといった情報は現段階で限定的である。これまでの解析では、亀裂が生じる前後の2つの時期で、茎の決まった箇所の組織切片の形態を解析するのが中心であったため、茎に亀裂が実際に生じる瞬間や、それらが広がる過程は捉えられていない。そのため、今後茎の力学的な完全性が保たれる機構の解明に向けた研究土台の拡大には、亀裂が生じるという現象自体の高解像度での理解が必要と考えた。

生物界の中で動き回る動物に比べ、基本的に固着性である植物は、動的な存在としてあまり捉えてられていない。しかし、屈性による比較的早い運動に加え、基本的な成長運動によって、植物は絶えず動き続けている。近年ではそれらの動きを高い分解能で再現性をもって捉える研究が進みつつある^{6,7)}。本研究では、まず亀裂が生じる過程をタイムラプスで捉え、器官の破綻がどのような過程で進行していくかを明らかにすることを目指した。

材料と方法

実験植物と生育条件

シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *pNST3:IDD9:SRDX* 系統²⁾の種子を、ハイポネックス溶液を加えたロックウール (Rockwool B.V., Grodan) に蒔き、22℃長日条件 (16時間明期、8時間暗期) 下 ($45 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で育生した。

タイムラプス撮影

茎が 12-3 cm 程度まで伸長したシロイヌナズナの、茎頂から数 cm 下を、ロックウールに刺した竹串と針金で固定し、22℃連続光に設定した人工気象器 (LPH-411SPC、日本医化器械) に移した。人工気象器内に、植物一頭あたりカメラ (WG-6、RICOH) を2台設置し、インターバル撮影モードで、茎の基部側を5分間隔で48時間の連続撮影を行なった。ImageJ (NIH) を用いて、撮影画像から亀裂のサイズを測定した。個体番号 (#1-10) は Figure を通して共通している。

結果

茎に生じる亀裂のタイムラプス撮影

シロイヌナズナの茎は、抽薹し始めは3-4日程度かけて2 cm 程度まで伸張すると、その後最大で1日3 cm 程度の伸長速度で伸長した後、20 cm を過ぎたあたりから伸長速度は徐々に緩やかになる。茎に亀裂

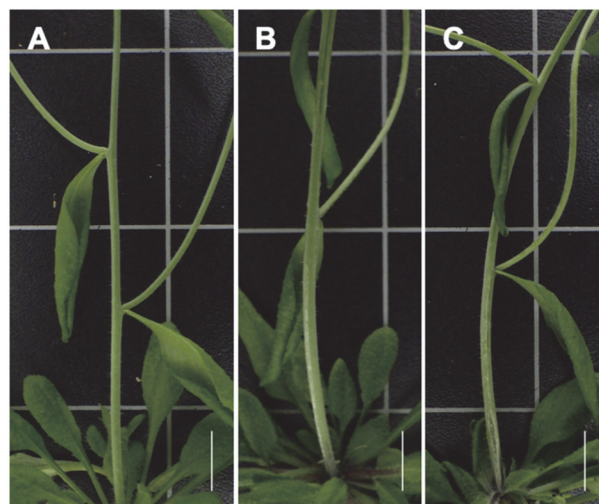


Fig. 1. 本研究対象の茎に亀裂が生じるシロイヌナズナの形質転換系統 (*pNST3:IDD9:SRDX*) の茎の様子の写真。(左) 野生型, (中央, 右) 形質転換系統. スケールバー = 1 cm.

が生じる *pNST3:IDD9:SRDX* 系統の主茎も、20 cm 程度になるまでは野生型とよく似たような伸長模様を示す。亀裂は主茎長が 15-20 cm あたりで主に第一節に生じることが確認されている²⁾ (Fig.1)。

これらの情報を参考に、今回の実験では、茎が 12-3 cm 以上に伸長した個体を用いて撮影を行なった。カメラを2方向からセットすることで、茎の周囲のおおよそ 270° の範囲の撮影を可能とした。撮影を継続的に繰り返し、10 個体について亀裂の生じる過程の撮影を行なうことができた。撮影した画像から Movie も作成しているが、紙面の都合で1時間ごとのコマ撮り写真を示す (Fig. 2A, B)。ごく小さな亀裂が生じた一例を除いて、亀裂は初めに生じた箇所から茎の頂端軸の両方向に広がっていく過程が観察された。

亀裂の連続画像から、最終的な亀裂の長さを計測し、亀裂発生時からその長さに至るまでにかかった時間を算出した (Fig. 3)。亀裂が広がる速度は、速い個体 (#9, #10) では約 0.1 mm/min で、3 時間程度で観察された最終的なサイズに至っていた。一方で 0.01 mm/min 以下の個体も3例 (#2, #3, #5) あった。これらの個体では、1 日以上をかけて亀裂が徐々に広がる様子を示した。

一旦茎に生じた亀裂は、不規則的な速さで拡大した

さらに観察をすすめると、亀裂が拡大する様子は一定ではないことが分かった。亀裂の様子撮影 10 例のうち、亀裂が拡大する期間と、変化がない期間が目立って観察された個体に関して、亀裂の拡大動態が変化した複数の時点での亀裂の大きさを計測した

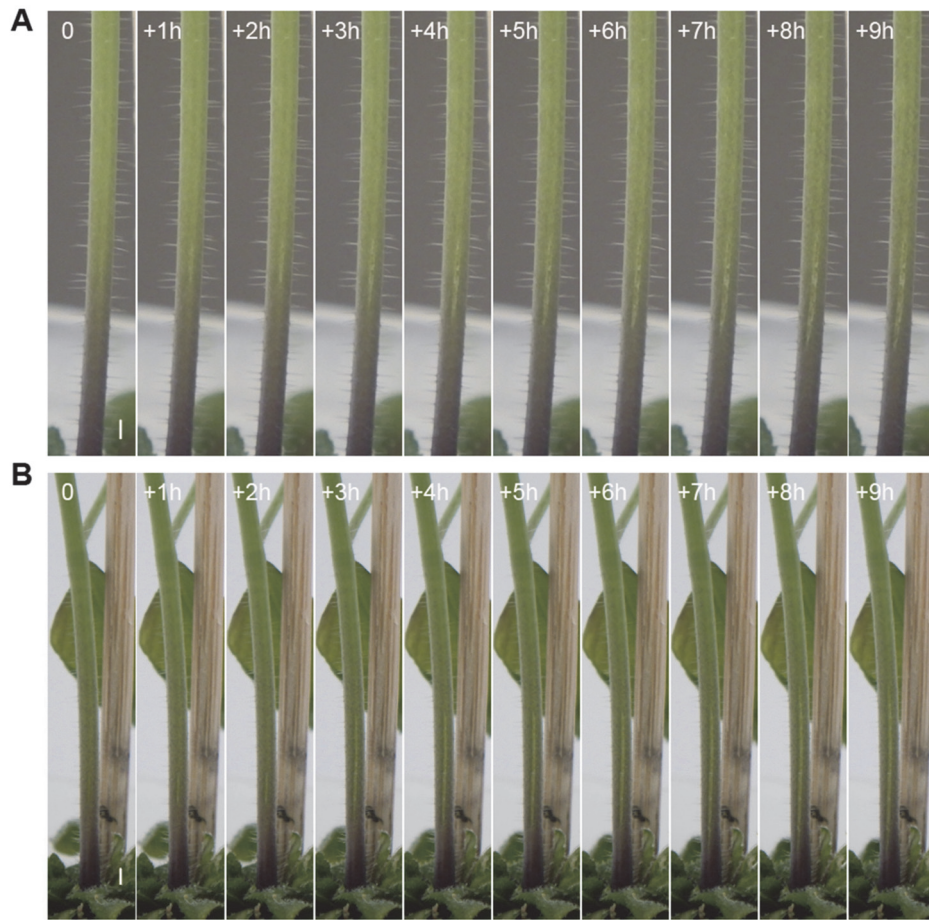


Fig. 2. 亀裂が生じる過程を捉えた同一茎の連続画像 (A, 個体#3, B, 個体#8). 写真は主茎の第一節を 5 分おきに撮影した画像の中から、亀裂が生じる直前を起点として 1 時間ごとの写真を選択して左から右に示している. スケールバー = 1 mm.

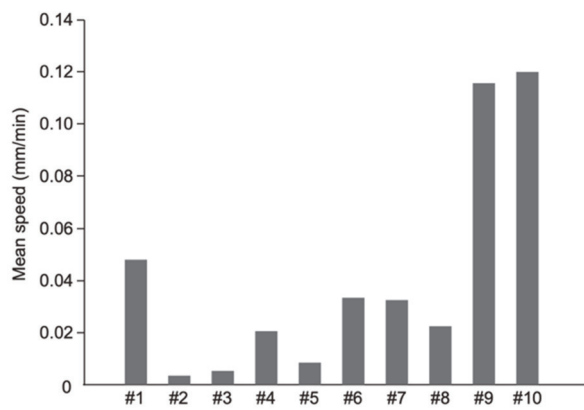


Fig. 3. 亀裂が拡大速度の平均値を示している. 最終的な亀裂の大きさ (茎の軸と平行方向の亀裂の長さ) を、亀裂が生じ始めたタイミングから拡大が終了した時間で割ることによって算出している.

(Fig. 4). その結果、亀裂が一気に拡大した後に、その後も徐々に広がる様子や (#6, #9, #10)、反対に小さい亀裂が生じた後にしばらく変化はないが、数時間後にさらに一気に亀裂が拡大する様子も観察された (#7, #8). 亀裂の急激な拡大はなくとも、時間をかけて徐々に広がる様子も観察された (#2).

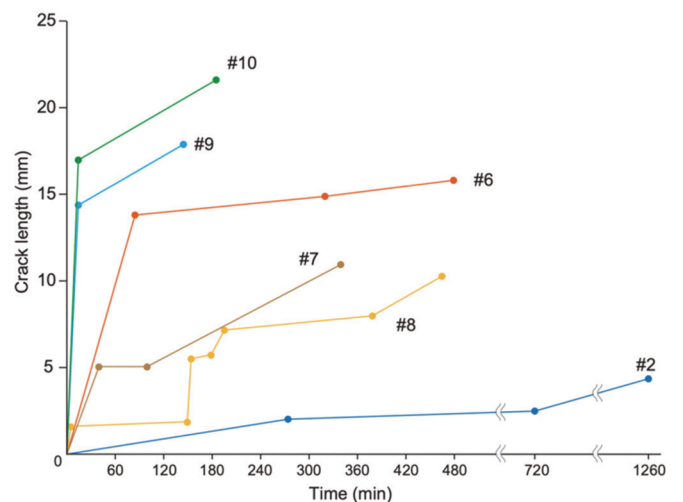


Fig. 4. 亀裂の拡大の経過観察結果. 亀裂が生じる過程の連続画像の中から、亀裂の拡大の様子に変化がみられた (拡大, または一時休止) 時点における亀裂の長さをプロットした.

討論

亀裂が生じる過程のタイムラプス撮影の結果、亀裂が広がる速度や過程にはパターンがいくつかあることがわかった。これらに関する規則性を見出すには、

さらに多くの観察例が必要であるといえるが、今回の研究で、茎の亀裂が生じる過程を捉えることができたのは大きな成果である。観察例を増やすとともに、今回は亀裂が生じる過程で顕著な変化がみられた点を中心に数値の定量化を行なったが、今後の解析では撮影した全点において解析することで、より細かな波についても理解が可能となることが期待される。一見単調にみえる亀裂の拡大過程においても、変化がある可能性も考えられる。また、本研究では一個体の撮影時間 48 時間のうち、撮影開始後、比較的早期に亀裂が生じ始めたものもあれば、撮影期間の後半（特に #9, #10）から亀裂が生じ始めたものがあった。それらの個体に関して、撮影期間内の亀裂の拡大の終息は確認したが、終息後、しばらくした後に個体 #8 のように再度亀裂が広がる可能性も考え得る。48 時間以上の撮影に関してはカメラのバッテリーの限度に加え、茎へのピントのずれが大きくなることが問題であるが、亀裂が生じてからの十分な時間の観察ができるようにするために、これらは今後改善を検討したい。

茎に亀裂が生じる過程は、一定の速度ではなく、最終的な亀裂の大きさの大部分は 10-20 分程度で生じ、その後徐々に両側の裾が広がっていく様子がみられた。今回解析対象とした茎の基部側は、伸長成長はすでに完了している時期と想定される。そのため、茎の亀裂は内部の成長に外側組織が耐えきれなくなることによって生じたと考えると、亀裂が生じることで内部組織から外側組織にかかる過剰な力の大部分は解消されれば、その後亀裂はそれ以上に広がらないといえる。しかし、本研究で観察されたように亀裂の拡大が持続したことは、亀裂付近の細胞がまだ成長をしていることを示唆している。もしくは遠位の細胞の伸長が伝播している可能性も考えられる。実際に切り離れた植物組織は、周囲からの干渉がなくなることによって拡大することが古くから知られている⁸⁾。

1. 亀裂が生じることで亀裂付近の細胞が制限から解放されて伸長する、
2. それによりさらに亀裂が拡大する、

とすると、この 1. 2 の過程が局所的に続くことで、亀裂の拡大が持続することが考えられる。これらはわずかに数十分～数時間に起きている現象であることから、全体的な伸長が完了している器官でも、細胞は即時にさらに伸長するポテンシャルを秘めていることが推測される。

本研究では茎に亀裂が生じる瞬間を撮影することができたが、今回撮影した亀裂の様子は、これまで筆者らがこの系統の研究に携わる中で、別の生育環境で観察してきた亀裂とは様子が異なる。今回は茎

の表面に少し傷が入るような亀裂が多くみられたが、他の研究においては、fig. 1C の基部側のような、いわゆる完全に裂けてしまったような（90 度以上に広がる）亀裂も多くみられていた。これまでにこの亀裂の様子の違いは定量性をもって調べられていないが、経験的には直感に反して茎が太いほど亀裂が小さい傾向がみられている。一般的にシロイヌナズナでは茎の太さは栄養成長期の長さと同比例する傾向があり、生育に不適と判断すると早く次世代を残そうと生殖成長への切り替えが早くなるが、生育に好都合の環境では栄養成長期間が長くなり、その結果形成される茎も肥大する傾向にある。実験室内でごく近くで生育させている個体でも、室内の空気の流れの違いからか生育程度が異なることも多い。今後は、このような環境のゆらぎも理解して生育環境を整備することで、茎の亀裂が生じる現象の自在な制御につなげていきたい。

謝辞

本研究で用いたシロイヌナズナの系統は、東京学芸大学 Ferjani 研究室を主体とした研究において見出されたものです。本研究にあたり、種子の使用をお認めいただき感謝申し上げます。本研究の一部は 2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202207) を受けて行われました。

文献

- 1) Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, Shinozaki K and Ohme-Takagi M (2007) NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 270-280.
- 2) Asaoka M, Sakamoto S, Gunji S, Mitsuda N, Tsukaya H, Sawa S, Hamant O and Ferjani A (2023) Contribution of vasculature to stem integrity in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **150**: dev201156.
- 3) Hentrich M, Sánchez-Parra B, Alonso M-M P, Loba VC, Carrillo L, Vicente-Carabajosa J, Medina J and Pollmann S (2013) YUCCA8 and YUCCA9 overexpression reveals a link between auxin signaling and lignification through the induction of ethylene biosynthesis. *Plant Signal Behav.* **8**: e26363.
- 4) Maeda S, Gunji S, Hanai K, Hirano T, Kazama Y, Ohbayashi I, Abe T, Sawa S, Tsukaya H and Ferjani, A. (2014) The conflict between cell proliferation and expansion primarily affects stem organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **55**: 1994-2007.
- 5) Asaoka M, Ooe M, Gunji S, Milani P, Runel G, Horiguchi G, Hamant O, Sawa S, Tsukaya H and Ferjani A (2021) Stem integrity in *Arabidopsis thaliana* requires a load-bearing epidermis. *Development* **148**: dev198028.
- 6) Kunita I, Morita MT, Toda M and Higaki T (2021) A three-dimensional scanning system for digital archiving and quantitative evaluation of Arabidopsis

- plant architectures. *Plant Cell Physiol.* **62**: 1975-198.
- 7) Yokoyama T, Watanabe A, Asaoka M and Nishitani K (2023) Germinating seedlings and mature shoots of *Cuscuta campestris* respond differently to light stimuli during parasitism but not during circumnutation. *Plant Cell Environ.* <https://doi.org/10.1111/pce.14575>.
- 8) Niklas KJ (1992) Plant biomechanics. An engineering approach to plant form and function. The University of Chicago Press, Chicago, London.