

# 植物の根の重力屈性反応に伴う細胞内外 Ca 動態に関する研究

神奈川大学理学部 特別助手 早津 学

## 第一章 序論 - 植物の根の重力屈性と Ca の役割 -

水分や栄養塩類を吸収するため、多くの陸上植物は重力に従って根を地中に伸ばす。この重力刺激に応じた根の成長反応は重力屈性と呼ばれ、その現象は重力刺激の受容、シグナルの伝達、重力刺激応答としての伸長成長の三つの段階を経て生じていると考えられている。第一段階の重力刺激の受容と第三段階の伸長成長は、それぞれ、Němec と Haberlandt (1900) によって提唱されたデンプン平衡石説と、Cholodny (1927) と Went (1928) によって確立された植物ホルモンのオーキシンによる成長制御で説明されている。しかし、根が受容した重力刺激を伸長成長する細胞へと伝える第二段階のシグナル伝達については、未だ明確な説明はない。伝達物質として関与が示唆されているカルシウム (Ca) は生物の様々な生理現象の調節物質として知られており、シグナル伝達を担う有力な候補であるが、そのことを関連づけて考察しうる重力屈性反応に伴う Ca の細胞内外の分布や動態についての知見は十分に得られていない。この点を明らかにすることを目的として、ダイズ *Glycine max* Merr. の根を材料にして本研究を行った。まず、重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の微細構造観察を行い、デンプン平衡石説の妥当性を検討した。次に、ピロアンチモン酸 (PA) を用いた Ca 細胞化学と凍結超薄切片を分析対象とした X 線マイクロアナリシスを行い、重力屈性反応に伴う細胞内外の Ca 分布を調べた。さらに、垂直から水平に倒した (再配向) 時の根の伸長帯における Ca 分布変化、および根に高濃度の Ca 溶液を与えて成長させた時のコルメラ細胞の Ca 分布変化を調べ、Ca 動態について検討した。

## 第二章 重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズ根の微細構造観察

デンプン平衡石説では、根の重力を感受する細胞である根冠のコルメラ細胞において、アミロプラストが平衡石として機能すると言われている。このことをダイズの根で確認するため、重力下またはクリノスタットを用いた疑似微小重力下で成長させた根のコルメラ細胞を透過型電子顕微鏡で観察した。重力下で成長させた根では、コルメラ細胞内のアミロプラストは、細胞下部に偏在し (図 1a)、一方、疑似微小重力下で成長させた根では、細胞内に分散して分布していた (図 1b)。重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズの根のコルメラ細胞を比較した時にアミロプラスト以外の細胞内小器官では細胞内局在の違いは生じていないことが認められたことから、ダイズの根のコルメラ細胞では、アミロプラストが平衡石として機能しており、デンプン平衡石説を支持する結果が得られた。さらに本研究では液胞内にこれまでは報告されていない高電子密度の構造 (液胞内高電子密度構造と命名) が観察された。この構造は後述するように Ca 動態に深く関係していることが示された。

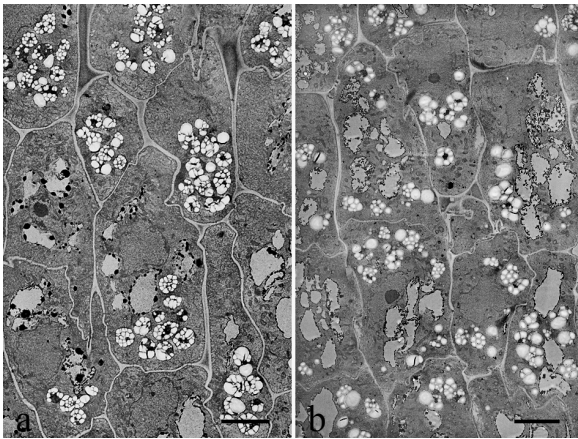


図1. ダイズ根のコルメラ細胞領域の電子顕微鏡像。a. 重力下で成長させたダイズ根のコルメラ細胞。b. 疑似微小重力下で成長させたダイズ根のコルメラ細胞。Bar: 5  $\mu$ m.

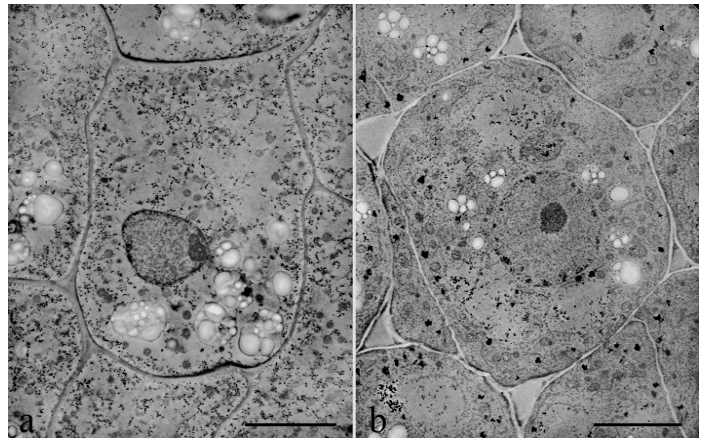


図2. PA法で固定したダイズ根のコルメラ細胞の電子顕微鏡像。a. 重力下で成長させたダイズ根のコルメラ細胞。b. 疑似微小重力下で成長させたダイズ根のコルメラ細胞。Bar: 5  $\mu$ m.

### 第三章 細胞化学法による疑似微小重力下のダイズ根の Ca 動態解析

ダイズの根の重力屈性反応に伴うコルメラ細胞の Ca 分布変化を調べるため、重力下または疑似微小重力下で成長させた根を、細胞内 Ca 動態検出に有効な PA 法に基づき固定し、透過型電子顕微鏡で観察した。疑似微小重力下で成長させた根のコルメラ細胞内に形成された Ca を含む PA 沈澱顆粒の数は、重力下で成長させた根よりも細胞質基質で減少し、液胞で増加していた (図2)。また、Ca の貯蔵構造として機能する可能性がある ER において重力下と疑似微小重力下では、PA 沈澱顆粒の分布状況に違いが生じていた。これら結果は、重力方向の攪乱に伴い、細胞内 Ca が細胞質基質から液胞へと移動したことを示唆しており、Ca は重力屈性反応に強く関わっていることが示された。

### 第四章 X線マイクロアナリシスによる疑似微小重力下のダイズ根の Ca 動態解析

前章では、重力屈性反応に Ca が関与する可能性が示されたので、重力屈性反応に伴うダイズの根のコルメラ細胞におけるより詳細な Ca 動態を明らかにするため、重力下または疑似微小重力下で成長させた根を急速高圧凍結して作製した凍結超薄切片 (図3) の X 線マイクロアナリシスを行った。凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスは、従来の化学固定法よりも、生きている状態をはるかに良く反映させてその生体内元素の分布を検出できる方法である。疑似微小重力下で成長させた根のコルメラ細胞の Ca 濃度は、重力下で成長させた根と比べ、細胞

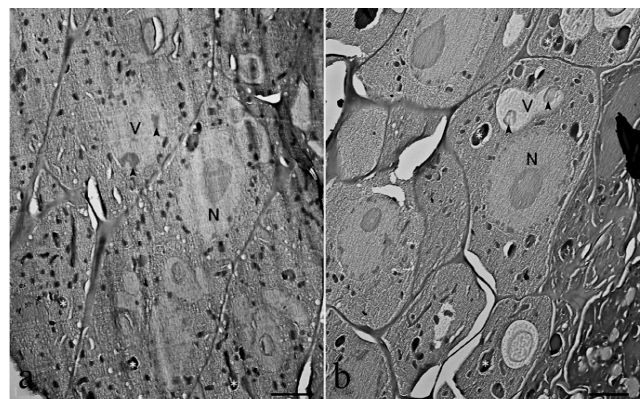


図3. 重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズ根を急速高圧凍結して得られたコルメラ細胞領域の凍結超薄切片像。a. 重力下で成長させたダイズのコルメラ細胞。b. 疑似微小重力下で成長させたダイズのコルメラ細胞。両図 (a, b) とも細胞のほぼ中心に核 (N) が見られる。アミロプラスト (白い\*) は重力下では細胞下部に、疑似微小重力下では細胞内に分散分布している。V; 液胞, 矢頭; 液胞内高電子密度構造。Bar: 2  $\mu$ m.

表 1. 重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズの根のコルメラ細胞における細胞壁、細胞質基質、液胞内腔および液胞内高電子密度構造の各種元素濃度

分析部位	育成条件	Ca	K	Mg	P
細胞壁	重力下	16.54±15.39	374.23±75.93	33.91±22.10	39.61±16.93
	疑似微小重力下	18.39±16.19 * <sup>1</sup>	645.37±131.40 * <sup>4</sup>	45.37±24.13 * <sup>1</sup>	42.00±30.85 * <sup>1</sup>
細胞質基質	重力下	7.86±6.37	138.92±45.46	24.08±12.34	117.59±37.75
	疑似微小重力下	7.48±6.50 * <sup>1</sup>	136.68±20.17 * <sup>1</sup>	19.21±16.39 * <sup>1</sup>	82.68±42.40 * <sup>2</sup>
液胞内腔	重力下	8.66±8.09	130.99±35.21	21.46±11.99	23.28±8.56
	疑似微小重力下	5.34±5.35 * <sup>1</sup>	75.25±32.25 * <sup>4</sup>	26.44±16.50 * <sup>1</sup>	16.35±10.65 * <sup>1</sup>
液胞内	重力下	45.43±45.05	900.38±434.20	206.07±108.17	804.53±392.34
高電子密度構造	疑似微小重力下	2012.34±651.54 * <sup>4</sup>	652.47±238.08 * <sup>3</sup>	245.00±185.58 * <sup>1</sup>	1462.84±516.38 * <sup>3</sup>

値は元素濃度 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt. (平均値±標準偏差, N = 10) を示す. \*<sup>1</sup>, \*<sup>2</sup>, \*<sup>3</sup>, \*<sup>4</sup> は重力下で成長させたダイズと疑似微小重力下で成長させたダイズの濃度を比較した時の有意水準を示す; \*<sup>1</sup>  $P > 0.1$ , \*<sup>2</sup>  $P < 0.1$ , \*<sup>3</sup>  $P < 0.05$ , \*<sup>4</sup>  $P < 0.01$ .

壁、細胞質基質および液胞内腔では、有意な変化が見られなかったが、液胞内高電子密度構造では、顕著に増加していた（表 1）。この Ca 濃度変化は、重力方向の攪乱により、液胞内高電子密度構造以外の部位から Ca が移動した結果と考えられ、PA 法の結果と同様に、Ca は細胞質基質から液胞へと移動し、液胞内高電子密度構造へと蓄積された可能性が示唆された。また、Ca 濃度の増加は液胞内高電子密度構造のみで見られたので、Ca が細胞外から供給され、細胞質基質を経て液胞内に移動し、この構造に蓄積された可能性が示された。一方、疑似微小重力下で成長させたダイズの根のコルメラ細胞に見られる液胞内高電子密度構造では、前述したような Ca 濃度の増加とは対照的な K 濃度の減少が観察された。この結果からダイズの根のコルメラ細胞では、重力刺激に対する応答において液胞内高電子密度構造で Ca とカリウム (K) は逆相関的な移動システムを持つことが示唆された。

## 第五章 水平に再配向したダイズ根の伸長帯の Ca 分布変化

前章で述べた研究により、ダイズの根のコルメラ細胞に見られる液胞内高電子密度構造による Ca の結合や遊離が重力屈性反応における信号伝達に関係していることが示され、さらに、そのことから細胞内 Ca は常に細胞壁領域、すなわちアポプラストから供給されている可能性があることが示された。この重力屈性反応に伴う組織・細胞間のアポプラストを経由した Ca の移動についてダイズの根の伸長成長に最も関与する伸長帯で検討するため、ダイズを垂直位から水平位に再配向した後、それらの根のコルメラ細胞と皮層細胞の微細構造観察を行い、さらに伸長帯については凍結超薄切片を作製し、X 線マイクロアナリシスを行った。再配向後、根は徐々に重力方向に屈曲しており、時間の経過に伴ってコルメラ細胞のアミロプ

表 2. 垂直から水平に再配向して成長させたダイズ根の伸長成長帯皮層細胞の細胞壁、細胞質基質および液胞内腔の Ca 濃度

再配向後経過時間	分析部位	細胞壁	細胞質基質	液胞内腔
0 分 (垂直)		8.83±6.27	6.02±9.23	3.23±2.34
30 分	上半分	7.23±6.24 * <sup>1</sup>	6.34±7.38 * <sup>1</sup>	7.56±6.77 * <sup>2</sup>
	下半分	12.20±8.30 * <sup>1#1</sup>	8.73±7.18 * <sup>1#1</sup>	5.33±3.93 * <sup>1#1</sup>
60 分	上半分	12.33±10.45 * <sup>1</sup>	8.12±6.18 * <sup>1</sup>	4.93±5.25 * <sup>1</sup>
	下半分	22.09±9.26 * <sup>4#3</sup>	8.72±10.11 * <sup>1#1</sup>	5.86±5.03 * <sup>1#1</sup>
120 分	上半分	3.33±5.00 * <sup>3</sup>	6.94±9.78 * <sup>1</sup>	4.80±4.26 * <sup>1</sup>
	下半分	36.17±19.35 * <sup>4#4</sup>	6.19±4.88 * <sup>1#1</sup>	5.55±4.56 * <sup>1#1</sup>

値は元素濃度 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt. (平均値±標準偏差) を示す. \*<sup>1</sup>, \*<sup>2</sup>, \*<sup>3</sup>, \*<sup>4</sup> は再配向後 0 分 (垂直位) のダイズと再配向後 30, 60, 120 分のダイズの Ca 濃度をそれぞれ比較した時の有意水準を示す; \*<sup>1</sup>  $P > 0.1$ , \*<sup>2</sup>  $P < 0.1$ , \*<sup>3</sup>  $P < 0.05$ , \*<sup>4</sup>  $P < 0.01$ . #1, #2, #3, #4 は再配向後 30, 60, 120 分のダイズの上半分と下半分の Ca 濃度を比較した時の有意水準を示す; #<sup>1</sup>  $P > 0.1$ , #<sup>2</sup>  $P < 0.1$ , #<sup>3</sup>  $P < 0.05$ , #<sup>4</sup>  $P < 0.01$ .

ラストは重力方向に移動したことから、この実験においてもダイズの根のコルメラ細胞におけるデンプン平衡石説を支持する結果を示した。一方、皮層細胞では、アミロプラストの時間経過に伴う細胞内分布変化は観察されず、平衡石のように挙動していないことを明らかにした。細胞壁の Ca 濃度は、再配向後、時間経過に伴って伸長帯の上半分で減少し、下半分で増加した (表 2)。生じた非対称な Ca 分布はこの領域での根の屈曲を促していると考えられるが、同時に、重力屈性反応に伴い、Ca がアポプラストを経由して組織間を移動した可能性も示した。

## 第六章 高濃度の Ca 溶液で成長させた時のダイズ根のコルメラ細胞の Ca 分布変化

第四章では、ダイズの根のコルメラ細胞で細胞壁領域から細胞内へと Ca が流入し、液胞内高電子密度構造へと蓄積されたことを示す結果が得られ、前章では細胞外領域での Ca 移動について調べた結果、ダイズの根の皮層細胞では細胞壁すなわちアポプラストを経由した Ca の移動が生じることを示唆する結果を得た。そこで、さらに根冠での重力屈性反応に伴うアポプラストを経由した Ca の移動および細胞内 Ca 動態における液胞内高電子密度構造の役割を検討するため、50 mM の Ca を含む溶液を含ませた脱脂綿上で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の微細構造の観察と凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスを行った。コルメラ細胞の液胞内高電子密度構造は数と大きさが増加した。Ca 濃度は細胞壁、細胞質基質、液胞内腔および液胞内高電子密度構造の全ての分析部位で増加していた (表 3)。このことは Ca が根の外側のアポプラストを経由して移動し、コルメラ細胞内へと流入したことを示し、流入した Ca はさらに液胞内に流入してそこで液胞内高電子密度構造へと蓄積されていく可能性が示された。一方、K 濃度は、細胞壁、細胞質基質および液胞で増加し、液胞内高電子密度構造で減少していた。液胞内高電子密度構造における濃度

表 3. 純水または高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズ根のコルメラ細胞における細胞壁、細胞質基質、液胞および液胞内高電子密度構造の各種元素濃度

分析部位	育成条件	Ca	K	Mg	P
細胞壁	純水	20.37±9.30	205.00±132.29	20.10±8.81	12.23±13.82
	高濃度 Ca 溶液	112.83±53.66 <sup>*4</sup>	308.42±116.90 <sup>*3</sup>	19.23±17.92 <sup>*1</sup>	36.51±27.18 <sup>*4</sup>
細胞質基質	純水	4.55±7.02	63.46±21.02	12.95±8.20	48.48±34.68
	高濃度 Ca 溶液	37.61±35.98 <sup>*4</sup>	225.61±94.82 <sup>*4</sup>	27.93±9.95 <sup>*4</sup>	115.55±47.42 <sup>*4</sup>
液胞内腔	純水	4.84±4.78	74.45±24.08	7.93±7.77	5.20±5.13
	高濃度 Ca 溶液	12.76±9.64 <sup>*3</sup>	146.74±92.40 <sup>*3</sup>	11.95±14.94 <sup>*1</sup>	27.60±22.74 <sup>*4</sup>
液胞内 高電子密度 構造	純水	35.33±31.66	446.76±256.24	113.28±80.50	353.87±308.99
	高濃度 Ca 溶液	259.84±64.05 <sup>*4</sup>	159.22±131.52 <sup>*4</sup>	46.65±50.55 <sup>*3</sup>	213.01±69.52 <sup>*2</sup>

値は元素濃度 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt. (平均値±標準偏差) を示す。\*1, \*2, \*3, \*4 は純水で成長させたダイズと高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの各種元素濃度を比較した時の有意水準を示す; \*1  $P > 0.1$ , \*2  $P < 0.1$ , \*3  $P < 0.05$ , \*4  $P < 0.01$ .

変化は第四章で示した結果と類似しており、Ca と K との逆相関的な移動が生じるとする見解を支持する結果と考えられる。

## 第七章 総括

ダイズの根のコルメラ細胞では、アミロプラストが平衡石として機能しており、デンプン平衡石説を支持した。コルメラ細胞の液胞内にこれまで報告されていない液胞内高電子密度構造が存在することを新たに見いだした。生体内 Ca を検出する PA 法による実験では、重力方向の攪乱により、コルメラ細胞内の Ca 分布が変化することから、重力屈性反応に Ca が関与していることは明らかである。凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスは、重力方向を攪乱したダイズの根のコルメラ細胞で、液胞内に存在する液胞内高電子密度構造に Ca が高濃度に蓄積されることを示した。この蓄積増加は重力方向の攪乱に伴い、液胞内高電子密度構造以外の部位から Ca が移動した結果によるものと考えられ、PA 法の結果は細胞質基質から Ca が移動した可能性を示した。また、Ca 濃度の増加は液胞内高電子密度構造のみであることから、その Ca は順次、細胞外（細胞壁領域）から供給され、細胞質基質を経て液胞内に移送され、液胞内高電子密度構造に蓄積されていくと考えられる。この考えを検証するためには細胞壁領域のアポプラストを経由した Ca 移動の実態を明らかにすることが重要であり、この目的で、本研究では水平に再配向したダイズの根や高濃度の Ca を含む溶液を与えて成長させたダイズの根の Ca 分布に関する X 線マイクロアナリシスを行った。水平に再配向した根では、細胞壁の Ca 濃度が伸長帯の上半分で徐々に減少し、下半分で増加した。また、高濃度の Ca で成長させた根のコルメラ細胞では、全ての測定部位で Ca が増加した。これらのことから Ca

はアポプラストを経由して組織・細胞間を自由に移動し、コルメラ細胞でも重力方向攪乱時には細胞壁領域から細胞内へと Ca が流入するという考えが支持された。さらに、再配向した根では、Ca 濃度が増加した下側の皮層細胞の伸長成長が抑制されたことから、高濃度の Ca が細胞壁の堅さを増加させることにより伸長成長を抑制する可能性を示した。以上の結果から、ダイズの根では、重力方向を攪乱することや垂直位から水平位へ再配向することによる重力刺激の変化に応じて Ca は動的な細胞内外移動を行い、そのことがまた、植物の根の重力応答としての根の伸長成長を引き起こす大きな要因として作用していると考えられる。

## 引用文献

- Cholodny N (1927) Wuchshormone und Tropismen bei den Pflanzen. *Biol. Zentralbl.* **47**: 604-626.
- Haberlandt G (1900) Über die Perzeption des geotropischen Reizes. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **18**: 261-272.
- Němec B (1900) Über die Art der Wahrnehmung des Schwerkraftes bei den Pflanzen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **18**: 241-245.
- Went FW (1928) Wuchsstoff und Wachstum. *Recl. Trav. Bot. Neerl.* **25**: 1-116.

## 発表論文

- Hayatsu M, Ono M, Hamamoto C and Suzuki S (2012) Cytochemical and electron probe X-ray microanalysis studies on the distribution change of intracellular calcium in columella cells of soybean roots under simulated microgravity. *J. Electron Microsc.* **61**: 57-69.
- Hayatsu M, Suzuki S, Hasegawa A, Tsuchiya S and Sasamoto H (2014) Effect of NaCl on ionic content and distribution in suspension-cultured cells of the halophyte *Sonneratia alba* versus the glycophyte *Oryza sativa*. *J. Plant Physiol.* **171**: 1385-1391.
- Hayatsu M and Suzuki S (2015) Electron probe X-ray microanalysis studies on the distribution change of intra- and extracellular calcium in the elongation zone of horizontally reoriented soybean roots. *Microscopy*: *in press*.