

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

**Studies on intra- and extracellular calcium translocation  
during the gravitropic response of plant roots**

早津 学

Manabu Hayatsu

神奈川大学理学部生物科学科

## 目次

要旨	3
Abstract (英文要旨)	8
第一章 序論 - 植物の根の重力屈性と Ca の役割 -	9
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	14
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	20
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	26
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	35
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	43
第七章 総括	49
謝辞	51
引用文献	52
各章の表	
第四章	60
第五章	62
第六章	65
各章の図	
第二章	67
第三章	73
第四章	77
第五章	82
第六章	88
第七章	92

# 要旨

## 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

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、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。重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズ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に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。

### 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、液胞内腔で増加していた。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。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經由した 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。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 がアポプラストを經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經由した 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經由した 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。このことは Ca が根の外側のアポプラストを經由して移動し、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内腔で増加し、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經由した 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すべて徐々に減少し、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 はアポプラストを經由して組織・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。

## **Studies on intra- and extracellular calcium translocation during the gravitropic response of plant roots**

Manabu Hayatsu

It is well-known that calcium (Ca) plays a significant role in regulating the physiological phenomena of living organisms. The gravitropic response of plant roots is a typical tropism, and Ca ions are believed to be one of the influential messengers involved in graviperception in columella cells. However, the details of this linking process remain unknown. To examine the role of Ca in gravitropic response, the Ca distribution change in columella cell of soybean roots under the simulated microgravity was studied by Ca cytochemistry and a quantitative X-ray microanalysis of cryosections. Results showed that the release and uptake of Ca ions by vacuolar electron-dense structures is closely related to signal transmission in the gravitropic response and that Ca movement may occur in an opposite manner to that of K. Furthermore, since the extremely high Ca was detected in the vacuolar electron-dense structure under simulated microgravity, it has also been assumed that intracellular Ca ions are always supplied from the cell wall region (apoplast) in soybean roots. Then, furthermore experiments concerning the movement of Ca through the apoplast as a gravitropic response were studied by the same electron microscopic methods. The intra- and extracellular distribution and translocation of Ca in the elongation zone of soybean roots reoriented horizontally from their original vertical orientation and in columella cells of soybean roots after incubation with high-Ca medium were examined. Results showed that Ca moves apoplastically in the root cap region and the cortex region of soybean root, and that the vacuole plays a significant role in the regulation of Ca concentration in cytoplasmic matrices to avoid cytotoxic damage. In conclusion, Ca ions function as the intracellular regulator for the gravitropic response.

# 第一章

## 序論 - 植物の根の重力屈性と Ca の役割 -

### 1-1. 植物の根の重力屈性

植物は一見、受動的に生きていただけに見えるが、実際には、外部からの様々な刺激に対してかなり動的に対応している。これらの動的な対応の中でも最も顕著なものは重力刺激に対する重力屈性である。植物の根が重力方向に向かって伸長する重力屈性は、植物が根をしっかりと土壤に定着させ、本体を支え、生存に不可欠な水分や栄養塩を土壤から吸収するための重要な生理的機能である。この現象について最初にイギリスの Knight (1806) が報告してから、重力屈性がどのような仕組みによって引き起こされているかを明らかにしようとする試みは、多くの研究者によってなされてきた。その結果、現在ではこの重力屈性は、重力刺激の受容、シグナル伝達および細胞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 (Kiss, 2000)。第一段階の重力刺激の受容は、根の根冠の重力感受細胞であるコルメラ細胞に存在するデンプン粒を多く含む色素体であるアミロプラストが重力方向に沈降し、平衡石として機能すると考えるデンプン平衡石説で説明されている。この説は、1900 年に Němec および Haberlandt がそれぞれ独立に提唱した。彼らは、特定の根端細胞でアミロプラストが重力方向と一致するように細胞下部に偏在して多数局在することを見出し、この細胞小器官が重力に応答する平衡石となり、重力感受の受容体として働くことを示唆した。その後、アミロプラストが平衡石として機能することはアミロプラストが周りの基質よりも顕著に比重が大きい細胞内小器官であることを示したソラマメ *Vicia faba* L. を用いた実験 (Audus, 1962) によって支持され、アミロプラストからデンプン除去したガーデンクレス *Lepidium sativum* (Iversen, 1969)、根冠を除去したトウモロコシ *Zea mays* L. (Hillman and Wilkins, 1982) およびコルメラ細胞にアミロプラストを持たないシロイヌナズナ変異体 (Caspar *et al.*, 1985) 等がいずれも根の重力屈性を示さなくなることにより支持された。この他にもコルメラ細胞が重力感受細胞になり得ることは様々な植物で示されている (Juniper *et al.*, 1966; Konings, 1968; Juniper and French, 1973; Barlow, 1974)。

重力屈性第二段階のシグナル伝達は、平衡石としてのアミロプラストの細胞内移動の結果引き起こされるシグナル伝達過程である。この過程では、細胞内に存在する細胞骨格や

小胞体 (endoplasmic reticulum, 以下 ER)、またはカルシウム (Ca) などが関与すると考えられている。コルメラ細胞のアミロプラストと接触している細胞骨格のアクチンフィラメントもアミロプラストの移動によって生じるフィラメントにかかる張力の変化が、信号伝達の要素となっていると考えられている (Sievers *et al.*, 1991a, b; Baluška and Hasenstein, 1997)。また、ER については、Sievers and Volkmann (1972) によって報告されているように、根が受ける重力方向を変化させても移動することのない ER 複合体 (定位 ER 複合体) が根のコルメラ細胞に存在し、重力方向に移動するアミロプラストの下敷きになることで、重力を感受する秤として働いているとする考えがある。この場合、アミロプラストが ER 複合体に与える偏差圧力が重力受容の原因となる。また、アミロプラストが ER に接触することによって ER から Ca が放出され、その Ca が重力刺激の受容を伸長成長する細胞へと伝える重力刺激-反応系における伝達物質となることが示唆されている (Sievers *et al.*, 1984; Sievers and Busch, 1992; Merkys and Darginaviciene, 1997)。しかし、この第二段階についてのこれまでの様々な解釈は必ずしも十分なものではなく、植物の根の重力屈性機構の全貌を明らかにするためにはこの第二段階における伝達物質の特定とその作用機構の解明が必要となる。

第三段階の細胞の伸長成長は、受容された重力刺激が、根の伸長成長に関与する細胞である皮層細胞へと伝えられることにより生ずる。その主役を演ずるものは Cholodny (1927) と Went (1928) によって説明されている植物ホルモンのオーキシシンと考えられている。オーキシシンは、植物の葉や頂芽で合成され、維管束を通じて根端へと求基的な極性移動を示すと考えられている (Evans and Ishikawa, 1997)。根端で、オーキシシンは周辺組織に再配布されて、伸長成長に関与する皮層へと輸送される。このとき、垂直位で成長させた植物の根ではオーキシシンは均等に皮層へ輸送されて細胞の伸長成長を均等に生ぜしめるが、横に倒した植物ではオーキシシンの皮層への輸送は不等分配となり、皮層の上半分と下半分でオーキシシン濃度が不等になり、オーキシシン濃度が高い下側の皮層の細胞の伸長成長が阻害され、オーキシシン濃度が低い上側の皮層の細胞の伸長成長は促進される (Hasenstein and Evans, 1988; Young *et al.*, 1990)。その結果、水平に置かれた根は下方へ向けて屈曲する。一方、オーキシシン輸送の活性にコルメラ細胞の細胞壁領域のアポプラストに存在する Ca 濃度が関係していることも示唆されている (Lee *et al.*, 1984; Björkman and Cleland, 1991) が、その詳細についてはまだ明らかにされていない。

## 1-2. 重力屈性第二段階における伝達物質としての Ca

植物の重力屈性においては前述したように重力刺激-反応系の伝達物質として Ca が働いていることが示唆されている (Poovaiah and Reddy, 1993; Gilroy and Trewavas, 1994)。Ca は、生物の様々な生理機能を細胞レベルで調節する重要な役割を果たしている。動物では筋肉の収縮と弛緩が細胞内 Ca イオン濃度の増減で引き起こされていることはよく知られている (Ebashi and Endo, 1968)。これまでに、植物の根の重力屈性で Ca が第二段階における伝達物質として働くか否かを明らかにするために、Dauwalder ら (1985) や Belyavskaya (2001) は、電子顕微鏡的細胞化学により、コルメラ細胞内の Ca 局在や重力刺激後の分布変化を観察しているが、明確な結論は得られていない。アミロプラストの細胞内沈降が細胞膜に連結する細胞骨格に力学的に作用し、その結果細胞膜のイオンチャネルの開閉が制御されるとの考えも提案されている (Stahlin *et al.*, 2000; Perbal *et al.*, 2004) が、その検証はまだ十分になされていない。以上のように、重力屈性において伝達物質として Ca が関与していることは示唆されているが、明確な機序は未だ不明であり、このことを明らかにするためには Ca の細胞内外の分布や重力屈性反応に伴う動態についての詳細な知見が必要とされている。

## 1-3. 電子顕微鏡を用いた細胞内外 Ca の検出法

電子顕微鏡を用いて生体機能を研究できる種々の技法が、近年確立され、広く応用されている。ピロアンチモン酸 (potassium pyroantimonate; 以下 PA) 法は、組織内に浸透し、細胞内に流入したアンチモン (Sb) が Ca と結合し、沈澱を形成することによって Ca の動的变化を電子顕微鏡で観察できるようにする細胞化学的方法であり、これまで多くの平滑筋や骨格筋の収縮調節機構の研究に用いられ、その有効性が証明されている (Suzuki and Sugi, 1982)。一方、細胞内外で生ずる各種元素の動的变化を検出できる極めて有効な方法として凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシス (Shuman *et al.*, 1976; Suzuki *et al.*, 2004) がある。この方法は、従来の化学固定法に比べ、はるかに生きている状態に近い細胞状態で特に各種元素分布を保持して試料を物理固定できる急速高圧凍結法、凍結したままの試料から超薄切片を作製する凍結超薄切片法、それらの切片内元素をそのまま保持させるために切片中の水分を徐々に昇華して除去する凍結乾燥法を経て、X 線マイクロアナリシスにより凍結超薄切片の各種元素濃度を定量的に分析することができる。これらの方法は微細

構造学的に細胞の諸機能を解明するための研究には不可欠の技法となっている。

#### 1-4. 重力屈性反応時の細胞内外 Ca の分布変化や動態

植物の根の重力屈性において Ca は重力刺激-反応系の伝達物質として機能することが示唆されているが、重力屈性反応に伴うそれらの細胞内外の分布変化や動態については十分に明らかされていないため、重力屈性第二段階を説明する機序は明確にされていない。この点を明らかにするために、植物を重力下または疑似微小重力下で成長させ、根の Ca の分布変化を調べることで重力屈性における Ca の関与が明らかにできると考えられる。また、根の伸長帯の Ca 分布変化を調べることでコルメラ細胞からの Ca の移動の可能性についても明らかにすることができると考えられる。そこで本研究では、材料としてダイズを使用し、播種した種子を直交する 2 軸（公転軸と自転軸）で同時に回転させる装置に装填し、それによってもたらされる疑似微小重力下で発根、成長させ、重力下で成長させたダイズと比較することで Ca の動態を明らかにすることを試みた。さらに、重力下で成長させたダイズを横に倒した時の伸長帯の Ca 分布変化と高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの根の Ca 分布変化を調べることで Ca のコルメラ細胞から伸長帯への Ca 移動や細胞深部への Ca 移送などについて明らかにすることを試みた。

第二章では、ダイズは重力下または疑似微小重力下で成長させ、根のコルメラ細胞の微細構造を透過型電子顕微鏡で観察し、ダイズの根のコルメラ細胞で、アミロプラストが平衡石として機能するか否かを調べ、デンプン平衡石説の妥当性について検討した。第三章では、同じく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内 Ca の局在を PA 法で明らかにし、第四章では、コルメラ細胞内外の Ca 濃度を凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスで明らかにし、重力屈性反応に伴う細胞内外の Ca 分布変化を調べ、Ca 動態について解析した。さらに、ここまでの実験により、Ca はアポプラストを經由して移動する可能性とそれらの Ca がさらに細胞内へと流入する可能性が示されたことから、その可能性を検証するため、第五章では、重力下で成長させたダイズを水平に倒した時の根のコルメラ細胞と皮層細胞の微細構造を観察し、デンプン平衡石説について再確認すると同時に皮層細胞の基本構造を把握した。さらに伸長帯における Ca 分布変化を凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスで調べ、アポプラストを經由した Ca 移動について検討した。第六章では、重力下で成長させたダイズに高濃度の Ca 溶液を与

えて成長させたダイズの根のコルメラ細胞の微細構造を観察し、高濃度の Ca が与える影響について検討し、凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスで Ca 分布変化を調べ、根が外部から吸収した Ca がコルメラ細胞へと移動し、コルメラ細胞内へと流入するか否かについて検討した。

最終章となる第七章では、第二章から第六章までの研究で明らかにされたことがらを総括し、重力屈性に Ca が果たす役割について討論した。

## 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

植物の根の重力感受は根冠で起こると考えられ (Sack, 1991)、重力屈性反応では、根の重力感受細胞として知られる根冠のコルメラ細胞に存在するアミロプラストが平衡石として機能するデンプン平衡石説が広く支持されている。この説の妥当性についてはシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* (Blancaflor *et al.*, 1998; Tsugeki and Fedoroff, 1999) やトウモロコシ (Juniper *et al.*, 1966) を対象として解剖学的手法により根冠を除去する実験や、シロイヌナズナの根冠コルメラ細胞のアミロプラストに含まれるデンプンの合成を不能にさせた突然変異体を用いた実験 (Kiss and Sack, 1990) によりこの仮説を支持する結果が示されている。しかし、ダイズ *Glycine max* Merr. についてはその種の実験が示されていないことと、後述するように凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスにダイズの根が適していたこと、さらには根冠以外の組織でも重力の感受が行われている可能性が示唆されていた (Poff and Martin, 1989) ことから、ダイズの根を対象として、重力屈性に関する研究を進めることとした。本実験では、特定の方向に対する遠心力を与えないような速度で直交する 2 軸 (公転軸と自転軸) を回転させることで植物に疑似微小重力環境を与えることができるクリノスタットを用い、それによって生ずる疑似微小重力下と重力下で発根、成長させたダイズの根を比較観察した。それぞれの条件下におけるこれらのダイズの根の伸長成長の観察、根端の組織観察およびコルメラ細胞内のアミロプラストを中心とした微細構造観察によってダイズの根のデンプン平衡石説の妥当性を明らかにした。

#### 2-1. 方法

##### 2-1-1. 重力下および疑似微小重力下でのダイズの育成

直交する 2 軸 (公転軸と自転軸) に同時に回転を加えることによって種々の粉体や液体を効率良く攪拌、混合する装置として市販されている震盪器 (震盪器 YGG-1 型, YAYOI, Tokyo) を用いて、装置の試料装填部のアームの回転速度とシリンダーの回転速度の比率を 1.0 : 1.6 とし、クリノスタット (疑似微小重力発生装置, 図 1) とした。ダイズの種子は重力下または疑似微小重力下で発根、成長させるため、直径 90 mm のプラスチックシャーレの底に純水を含ませた濾紙を置き、その上に種子を並べ、純水を含ませた脱脂綿でその上を覆うことで、種子を物理的に固定した。このとき、重力下で成長させる種子は横一

列に並べ、シャーレ内で根が十分に伸長できるようにした (図 2a)。一方、疑似微小重力下で成長させる種子は種子の間を十分に離して分散するようにシャーレ内に並べた (図 2b)。シャーレに蓋をして密閉した後、重力下で成長させる場合はシャーレを縦に立てて低温恒温恒湿器 (LPH-200ECT, NK system, Osaka) の壁に立て掛けておき、重力負荷のかかる方向に根が十分に伸長できるようにした。疑似微小重力下で成長させる場合はシャーレをクリノスタットに装填した。ダイズの種子は 18°C の暗所で 3 日間成長させ、およそ 30 mm に成長した根を材料として使用した。

### 2-1-2. ダイズ根のコルメラ細胞の微細構造観察

成長させた根は先端から 10 mm の位置で切断し、1 mL 弱の純水を満たした 1.5 mL 容量のエピンドルフチューブ内に浸漬し、水流アスピレーターで脱気した後、純水を 0.1 M 燐酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈した 3% グルタルアルデヒド (glutaraldehyde, 以下 GA) 溶液に置換し、室温の条件にして重力下または疑似微小重力下で 2 時間固定した。さらに、3% GA 溶液を入れた 5 mL 容量の試料瓶に試料を移し替え、4°C で一晩固定した後、0.1 M 燐酸緩衝液 (pH 7.2) で 10 分間ずつ 2 回と純水で 10 分間洗浄し、2% 四酸化オスミウム (osmium tetroxide, 以下 OsO<sub>4</sub>) 溶液に置換し、4°C で一晩固定した。固定試料は、アセトン系列 (50、70、90、100% を 10 分間各 1 回、100% を 20 分間ずつ 2 回) で脱水した後、アセトンとエポキシ樹脂を 1:1 に混合したものと、100% エポキシ樹脂のそれぞれに一晩ずつ浸漬した。その後、試料は 100% エポキシ樹脂に包埋し、40°C と 60°C で各 24 時間熱重合させた。試料ブロックを剃刀でトリミングした後、根端全体の構造観察をするための切片は、ウルトラマイクロトーム (Ultracut-N, Reichert, Vienna, Austria) で厚さ ~0.9 μm に薄切し、1% トルイジンブルーで加温染色した後に光学顕微鏡 (BH-20, Olympus, Tokyo) で観察した。また、同様に微細構造を観察するための切片は、厚さ ~70 nm の超薄切片を作製し、支持膜としてコロジオン膜を張り、カーボン蒸着したニッケル (Ni) -150 グリッドに載物し、酢酸ウランとクエン酸鉛で各 10 分間電子染色をし、透過型電子顕微鏡 (JEM 1230, JEOL, Tokyo) で観察した。

## 2-2 結果

### 2-2-1. 重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズ根の伸長成長方向の観察

ダイズは、種子をシャーレに固定してから1日目で発根し、その根は3日目で30 mm程度にまで伸長した。根は先端からおよそ5 mm程の範囲がやや黄色みがかっており、それより上部は白く、胚軸に近い根の部分は薄い黄色から紫がかかった色をしていた。重力下で成長させたダイズの根はいずれも重力が作用している方向へほぼまっすぐ伸長していた(図 2a)。一方、疑似微小重力下で成長させた根は、円を描くように湾曲しながら伸長したり、途中で屈曲したりして、個体ごとにそれぞれが異なる方向に根を伸長していた(図 2b)。

### 2-2-2. ダイズ根の組織

根のコルメラ細胞を特定し、電子顕微鏡で観察するために、樹脂包埋された試料の縦断切片を光学顕微鏡で観察した(図 3a)。植物の根は、以下に記述する細胞の特徴に基づいて根冠、分裂する細胞を含む分裂組織、伸長成長する皮層細胞と表皮からなる伸長帯、伸長成長した皮層細胞からなる成熟帯および維管束に分けることができる。根の先端から0.5 mm程の領域は根冠であり、その上部が根端分裂組織で、さらにその上部が伸長帯をなす皮層組織となっており、その中心部には維管束が観察された。無染色の切片では根冠と分裂組織の区別は明確でなかったが、トルイジンブルーで染色すると根冠は薄い青色に染色された。その上部の根の先端から0.5~1.5 mmの領域には、濃く染色されている高密度の小さい細胞が多数観察された。この部分は分裂組織と判定された。根冠で見られる細胞内には多数のアミロプラストや液胞が観察された(図 3b)。重力下で成長させた根の根冠の中心部にある細胞では、アミロプラストは細胞下部に偏在しており(図 3b)、根冠の表皮に近い細胞は、液胞が発達していた。分裂組織から新生された細胞からなる皮層では、分裂組織に近い細胞では細胞内の液胞は未発達で、分裂組織からは遠ざかり上方に位置する細胞では、液胞は非常に良く発達していた。これらの皮層細胞の多くでは、液胞の一部は黒くなっていた。分裂組織の上部に見られる維管束は縦方向に伸長した細胞によって構成されていた。

### 2-2-3. ダイズ根のコルメラ細胞の微細構造

図 4a は重力下で成長したダイズの根の根冠コルメラ細胞の電子顕微鏡像である。細胞は円筒状の形状をしており、細胞内には、核や多数のミトコンドリア、ゴルジ体、アミロプラストが観察された。核やミトコンドリア、ゴルジ体は、その局在が重力下または疑似微小重力下で殆ど同じであったが、アミロプラストのみは、重力下で成長させた根において、細胞下部に偏在しており、それらが重力の働く方向へと沈降していることを示唆していた。一方、疑似微小重力下で成長させたダイズにおいてアミロプラストは、核やミトコンドリア、ゴルジ体と同様、細胞内に分散分布していた (図 4b)。細胞膜直下となる細胞周縁部には、多くの ER が観察されており、特に重力下で成長させたダイズの根では、沈降して集合しているアミロプラストの下部に ER が見られた (図 5a)。一方、疑似微小重力下では細胞周縁部にあるアミロプラストの近くにも ER が観察された (図 5c)。また、液胞では、液胞膜内表面に沿って複数の高電子密度の構造が観察された。この構造の形状は重力下では、球状のものが多く (図 5b)、疑似微小重力下では、液胞膜内面を覆うような扁平状のものが多く (図 5d)、重力刺激の違いで構造の形状を変化させているように思われた。これまでにダイズの根のコルメラ細胞の液胞内にこのような構造が見出されたという報告はなく、本研究においてはこの構造を液胞内高電子密度構造 (vacuolar electron-dense structure: Hayatsu *et al.*, 2012) と呼ぶことにした。

## 2-3. 考察

### 2-3-1. 疑似微小重力環境が植物の根の伸長成長に与える影響

重力下で成長させ、重力が働く方向へ根がまっすぐに成長していたダイズと比べ、クリノスタットで発根、成長させたダイズの根は重力方向と無関係に伸長していた。根の伸長方向は一定ではなく、個体ごとに異なっていた。この結果は、ダイズの根における重力方向の受容が攪乱されたことを示す。重力下または疑似微小重力下での根の伸長成長についてはこの実験と同じクリノスタットを用いたシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* (Monoi *et al.*, 2002) やトウモロコシ (Hayatsu *et al.*, 2009) でも、同様の結果が得られていることから、クリノスタットは適切な疑似微小重力環境をを作り出し、重力方向の攪乱に有効に機能したと考えられる。

### 2-3-2. 平衡石としてのアミロプラストの挙動

光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡によるダイズの根の根冠の観察は、コルメラ細胞内のアミロプラストが、重力下で成長させたダイズでは細胞下部に偏在し、疑似微小重力下で成長させたダイズでは特定部位に偏在することなく細胞内に分散分布していることを明らかにした。このアミロプラストの局在の違いは、明らかに植物に対する重力刺激の違いによって生じたものであり、クリノスタットにより重力方向が攪乱された植物は、特定方向への重力刺激を受けることなく、その結果、アミロプラストは細胞内で分散して分布することになったと考えられる。重力刺激を受けて、コルメラ細胞内のアミロプラストが重力の働く方向に一致して細胞下部に沈降する現象は、ナズナ、ソラマメ、トウモロコシなどの根で報告されており (Audus, 1962; Sievers and Volkmann, 1972; Belyavskaya, 1996; 2001; Monoi *et al.*, 2002; Hayatsu *et al.*, 2009)、今回の観察結果はそれらを確認するものであった。

重力屈性の第一段階である重力刺激の受容が、細胞内で重力が働く方向に移動しやすい細胞内小器官によってなされるとする考え (Audus, 1962) は極めて受け入れやすい考えであり、ストロマ内に多量の貯蔵デンプンを含むアミロプラストは質量が大きく、重力に対応する平衡石としての有力な候補である (Němec, 1900; Haberlandt, 1900)。しかし、重力屈性を示さないタマネギの根の細胞でもアミロプラストが沈降するという Moore (1985) の報告や、細胞内にアミロプラストを持たないミズニラ *Isoetes japonica* やイワヒバ *Selaginella kraussiana* A. Br. の根でも重力屈性が生ずるという Peterson ら (1979) と Grenville and Peterson (1981) の報告は、アミロプラストが細胞内の唯一の平衡石ではないことを示唆している。実際に、核やゴルジ体、ER、液胞などもその候補として提案されている (McNitt and Shen-Miller, 1978; Moore, 1985) が、確実な実験証拠は示されていない。本研究の結果では、重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズ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、少なくとも、ダイズの根冠コルメラ細胞では他の細胞小器官が平衡石として機能する可能性はなく、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。

### 2-3-3. ER からの Ca 放出の可能性

微細構造観察の結果、重力下で成長させたダイズの科尔メラ細胞下部に多数の ER が存在し、アミロプラストの包膜がしばしば ER に接触していることを示した (図 5a)。同様の観察は、ナズナ的一种であるカラシナ *Brassica juncea* の根で最初に報告され (Sievers and Volkmann, 1972)、その後も種々の植物の科尔メラ細胞で観察されている (Moore and Evans, 1986; Kordyum and Guikema, 2001)。これらの観察結果に基づいて、受容した重力刺激を伝達するため、沈降したアミロプラストが ER に接触することによってそこから Ca が放出される可能性があるとするという考えが提案されている (Sievers *et al.*, 1984; Wendt and Sievers, 1989)。本研究の結果はこの考えを支持しており、実験では次の第三章に述べる細胞内 Ca 動態を検出する方法によりこのことを明らかにすることを試みた。

### 2-3-4. ダイズ根の科尔メラ細胞に見られる液胞内高電子密度構造

ダイズの根の科尔メラ細胞を電子顕微鏡で観察することにより、液胞内高電子密度構造という構造を見出した。この構造は重力下で成長させたダイズでは、液胞内で球状であり (図 5b)、一方、疑似微小重力下で成長させたダイズでは、液胞膜内表面に沿って広がる扁平状の形をしていた (図 5d)。重力刺激の違いで形状が変化しており、重力刺激の受容に関わる構造体である可能性が考えられるが、目下、その機能は不明であるため、この構造を単に液胞内高電子密度構造と呼ぶことにした (Hayatsu *et al.*, 2012)。このような構造はシロイヌナズナやトウモロコシの根では観察されていない (Hayatsu *et al.*, 2009)。しかし、振動傾性反応を示すオジギソウ *Mimosa pudica* L. では、葉枕の運動細胞で似た構造が観察されており、タンニンを多く含むことからタンニン液胞と呼ばれている (Toriyama and Jaffe, 1972; Fleurat-Lessard *et al.*, 1997)。オジギソウのタンニン液胞と呼ばれる構造は、刺激応答に伴う運動細胞の膨圧変化を誘引する水移動の調節因子として Ca やカリウム (K) の遊離、または吸着を行うと考えられている (Fleurat-Lessard *et al.*, 1997; Aoki *et al.*, 2015)。形態およびその変化の特徴の類似性から、ダイズの根の液胞内高電子密度構造も重力屈性反応に関わる細胞内イオン動態に重要な働きをしている可能性があり、以下の章に述べられるように、さらにこの点を明らかにする実験を行った。

## 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、Ca の動態を明らかにするため、PA を用いた Ca 細胞化学を行った。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 PA 沈澱顆粒の局在の違いを透過型電子顕微鏡で観察し、それぞれの条件下におけるコルメラ細胞内の Ca 分布を明らかにした。また、この方法では細胞内に生じる PA 沈澱顆粒が確かに Ca との結合によって生じ、Ca の局在を示すものであることを明らかにするために、常法として行われている沈澱顆粒の X 線マイクロアナリシス (Suzuki and Sugi H, 1982) を行った。

#### 3-1. 方法

##### 3-1-1. 重力下または疑似微小重力下でのダイズの育成

材料のダイズの根の調整は第二章の 2-1-1 で述べたように行った。簡潔に述べるとダイズ種子は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発根させ、およそ 30 mm に成長した根を材料として使用した。

##### 3-1-2. ピロアンチモン酸カリウム溶液の作製

ピロアンチモン酸カリウム ( $K[Sb(OH)_6]$ ) 2.0 g を沸騰させた純水およそ 45 mL に突沸しないように加え、完全に溶かした後、溶液の温度が室温と同じになるまで待ち、溶液の全量が 50 mL になるように純水を加えることにより 4% の PA 溶液を作製した。さらに、pH 試験紙で測定しつつ、pH が 7.2 となるように、0.1 N 水酸化カリウム溶液または、0.01 N 酢酸を加えて調整した。細胞化学では、この溶液と 2%  $OsO_4$  溶液を 1 : 1 に混合し、固定液としての 2% の PA を含む 1% の  $OsO_4$  溶液 (以下 PAOs 液, pH 7.2) を作製した。

##### 3-1-3. ダイズ根のコルメラ細胞に対する Ca 細胞化学

細胞内 Ca の局在や移動を明らかにするために、PAOs 液で試料を固定した。根の先端から 10 mm の位置で切断して取り出した根端を純水入りのエッペンドルフチューブ (1.5 mL 容量) に入れ、水流アスピレーターで脱気した後、PAOs 液に置換し、室温において重力下または疑似微小重力下で 2 時間固定した。その後、PAOs 液を入れた 5 mL 容量の試料

瓶に試料を移し替え、さらに 4°Cで一晩固定した。以後の脱水、樹脂包埋および熱重合については第二章の 2-1-2 で述べている方法と同様にして行った。コントラストの増強と X 線量を十分に得るために、超薄切片の厚さは通常の観察用切片よりもやや厚め (~150 nm) とした。切片はコロジオン膜を張り、カーボン蒸着した Ni-150 グリッド上に載せ、微細構造観察用に一部の切片は電子染色を行い、X 線マイクロアナリシスでは、無染色の切片を用いた。

#### 3-1-4. PA 沈澱顆粒の X 線マイクロアナリシス

PA は Ca 以外の生体内に存在する陽イオンとも反応して沈澱を生ずることがあるため (Komnick and Komnick, 1963; Suzuki and Sugi, 1982)、観察された顆粒が Ca との結合によって生じた PA-Ca の沈澱であるか否か明らかにする必要がある。そこで、PA 沈澱顆粒の X 線マイクロアナリシスを行った。細胞化学法で固定した試料から作製した超薄切片は電子染色をせず、ベリリウム (Be) 製チップの試料ホルダーに装填し、エネルギー分散型 X 線検出器 (MiniCup / EX-14033JTP, JEOL, Tokyo, Japan) を装着した透過型電子顕微鏡で観察し、切片像で観察される PA 沈澱顆粒にビームを集束し (点分析)、元素分析した。このとき、切片の汚染を防止するために、予めコールドトラップに液体窒素を注入し、ポールピースの周りを冷却した。元素分析では、倍率を 15,000 倍とし、電子線を直径 0.1  $\mu\text{m}$  に集束し、試料を X 線検出器に向けて水平位から 15° 傾斜させた。分析対象領域に 200 秒間電子線を照射し、発生した X 線を検出器で分光し、得られた X 線スペクトルについて解析した。

### 3-2. 結果

#### 3-2-1. 重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズ根の観察

重力下で成長させたダイズは根が重力方向に伸長成長し、一方、疑似微小重力下で成長させたダイズは根が個々に異なる方向に成長しており、第二章の 2-2-1 と同様の結果が得られた。

#### 3-2-2. コルメラ細胞の PA 沈澱顆粒分布

図 6 は PAOs 液で固定した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

メラ細胞の透過型電子顕微鏡像を示している。重力下で成長させたダイズの根のコルメラ細胞では、電子密度の高い PA 沈澱顆粒が細胞質基質内に均一に分散分布して観察された (図 6a)。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でも、PA 沈澱顆粒は細胞質基質内に散在していたが、その数は少なかった。(図 6b)。各細胞小器官における PA 沈澱顆粒の局在について観察したところ、重力下で成長させたダイズでは、コルメラ細胞下部に偏在するアミロプラストとそれに近接する ER、および細胞膜上に PA 沈澱顆粒が観察された (図 7a)。これらの PA 沈澱顆粒のうち、細胞膜上のそれらは他の顆粒沈澱に比べ、極めて小さな沈澱顆粒であった。さらに PA 沈澱顆粒が液胞内腔にも少数観察されたが、液胞膜上には沈澱は観察されなかった (図 7b)。一方、疑似微小重力下で成長させたダイズのコルメラ細胞でも、アミロプラストや ER の膜上とその内部に、しばしば PA 沈澱が認められ、細胞膜上にも観察された (図 7c)。PA 沈澱顆粒は液胞膜上には殆ど観察されなかったが、液胞内腔には多数の小さな PA 沈澱顆粒が分散分布しているのが観察された (図 7d)。

### 3-2-3. PA 沈澱顆粒の X 線マイクロアナリシス

図 8 は重力下で成長させたダイズのコルメラ細胞内に見られる PA 沈澱顆粒に電子線を集束照射して得られた X 線スペクトルである。エネルギー値 200、440、7,280 および 7,840 eV に観察されるスペクトルピークは、それぞれ C-K $\alpha$  線、O-K $\alpha$  線、Ni-L $\alpha$  線、Cu-L $\alpha$  線を示し、さらに 3,600 eV 付近にも顕著なスペクトルピークが見られる (図 8a)。これらのスペクトルピークのうち、炭素 (C) および酸素 (O) の X 線は細胞内有機化合物に由来し、Ni の X 線は切片を載物したグリッド、銅 (Cu) の X 線は試料ホルダーのグリッド支持部の素材に由来すると考えられる。図 8b は 8a 図の 3,600 eV 付近を拡大表示したものであり、エネルギー値 3,620、3,870、4,130 eV にスペクトルピークが観察された。Sb-L $\alpha$  線の理論的ピークエネルギー値は 3,600 eV であるが、ここで示されたスペクトルのピークエネルギー値は 3,620 eV で、理論値より 20 eV 高かった。このピークエネルギー値 3,620 eV で示されるスペクトルは、Suzuki and Sugi (1982) によれば、Sb-L $\alpha$  線 (3,600 eV) と Ca-K $\alpha$  線 (3,690 eV) が重なって生ずる合成スペクトルであると考えられ、従って、X 線マイクロアナリシスの結果は PA 沈澱顆粒が Ca を含むことを示した。また、ピークエネルギー値が 3,870 eV と 4,130 eV のスペクトルは、それぞれ Sb-Ca 複合スペクトルの Sb-L $\beta_1$  線と

Sb-L  $\beta_2$  線由来のものと考えられる。なお、X線マイクロアナリシスは、重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズの科尔メラ細胞内に観察された PA 沈澱顆粒を任意に選び、それぞれ 5 例ずつ行い、すべての例で同じ結果が得られた。

### 3-3. 考察

#### 3-3-1. ダイズ根の科尔メラ細胞の Ca 局在

PA は、細胞内の Ca の局在や動態を調べることでできる方法として、動物の、特に筋肉の研究において有効であることが知られている (Suzuki and Sugi, 1982)。植物においても振動傾性反応に伴うオジギソウの葉枕運動細胞での Ca 分布変化 (Aoki *et al.*, 2015) やオリーブ *Olea europaea* L. の雄蕊の発達に伴う Ca 分布変化 (Zienkiewicz *et al.*, 2011) を調べることにも用いられ、有効な結果が得られている。ダイズの根の科尔メラ細胞では、重力下または疑似微小重力下のいずれの条件のもとでも、PA 沈澱顆粒は細胞質基質中、ER と液胞の内腔および液胞膜上、細胞膜内表面などで観察された。このうち、細胞質基質は Ca の移動領域であり、それ自体が Ca の貯蔵構造としては機能し難いと考えられる。一方、他の膜性細胞構造は Ca の貯蔵構造として機能する可能性がある。筋肉の筋小胞体は主要な Ca 貯蔵構造であり、筋収縮を引き起こす時にはそこから Ca が遊離される (Ebashi and Endo, 1968)。同じ細胞内小器官であることから、植物細胞の ER が Ca を貯蔵し、その細胞のある機能に関わる時にそこから Ca を遊離させることは、十分にありうることである。植物の根から単離された ER 小胞が ATP 存在下で Ca を吸収し、内部に蓄積することが報告されており (Dieter and Marme, 1980)、Morita ら (2010) は、根の細胞では ER が Ca の貯蔵構造として機能し、重力刺激に対する応答時にはそこから Ca イオンが遊離されるという見解を示している。本研究の結果も、科尔メラ細胞内の ER が Ca 貯蔵構造として機能していることを示すものと考えられる。また、本章の 3-3-2 で述べるように、重力下と疑似微小重力下の ER 内 PA 沈澱顆粒の分布状況の違いから、ダイズの科尔メラ細胞内の ER は重力屈性に伴い細胞質基質中に Ca イオンを遊離していると考えられる。

一般に、ER の他の膜性細胞内小器官や細胞膜なども Ca 貯蔵構造として考えられている。Dauwalder ら (1985) は、PA 法による細胞化学を行い、重力刺激を加えたトウモロコシの根の皮層細胞では、ER の他に、細胞膜や液胞、色素体、ミトコンドリア、ゴルジ体などの膜に PA の沈澱顆粒が観察されたことを報告している。本研究では、ダイズの根の科尔

メラ細胞の液胞内に PA 沈澱顆粒が観察されており、液胞も Ca の貯蔵構造として機能していると考えられる。第四章で述べられるが、ダイズの根のコルメラ細胞の液胞内には Ca を強く結合する構造体（液胞内高電子密度構造）があり、Ca の結合やそこからの遊離は、重力屈性反応に重要な役割を果たしていると考えられる。

平滑筋では筋小胞体以外の Ca 貯蔵構造として筋形質膜内表面が良く知られており (Suzuki and Sugi, 1982)、ムラサキイガイ *Mytilus edulis* の前足糸牽引筋の形質膜分画からはこの筋に特異的な Ca-結合蛋白質が単離されている (Yamanobe and Sugi, 1993)。これらの知見は Ca が細胞膜に結合する可能性を示しており、PA 沈澱顆粒がダイズの根のコルメラ細胞の細胞膜に観察されたことは、そこに Ca-結合蛋白質が存在することを示唆する。しかし、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で細胞膜上の PA 沈澱顆粒の分布には大きな違いが認められなかったことから、重力屈性反応に関与している可能性は低いと考えられる。

### 3-3-2. ダイズ根の重力屈性反応と Ca 動態

重力下で成長させたダイズに比べ、疑似微小重力下で成長させたダイズのコルメラ細胞の PA 沈澱顆粒は、細胞質基質で少なく、液胞内腔で多いことが明らかにされた。細胞質基質についてのこの結果は、重力下では、重力刺激を受けると細胞質基質での Ca 濃度が増加するという Sievers ら (1984) の見解と一致する。疑似微小重力下では、アミロプラストと ER との接触が殆どないため、ER からの Ca の遊離も生じず、細胞質基質の Ca は減少すると考えられる。しかしながら、疑似微小重力下で成長させた根のコルメラ細胞でもアミロプラスト近傍には ER が観察されており、試料が回転させられることでアミロプラストも細胞内を回転移動し、重力下にある時より、むしろ ER との接触回数が増加する可能性もある。もし、そうであれば ER から細胞質基質への Ca 遊離が促進されるかもしれない。ここで強調したいことは、疑似微小重力下では、同時に液胞内の PA 沈澱顆粒の数が増加していることである。このことと、細胞質基質における PA 沈澱顆粒数の減少とは無関係ではなく、この環境下では、細胞質基質から液胞内へと Ca が移動すると考えることでも、この結果を説明することができる。細胞内の特に細胞質基質における著しい Ca 濃度増加は、シロイヌナズナのコルメラ細胞でも報告されている (Legué *et al*, 1997)。この増加は一時的なものとされているが、細胞質基質における Ca 濃度増加は細胞活性に対して

有害となることが知られており (Gilroy *et al.*, 1987; Belyavskaya, 1996)、Ca 濃度を速やかに元に戻すための Ca 膜透過制御蛋白質として  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase や  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体などが液胞膜に局在していることが知られている (Isayenkov *et al.*, 2010)。疑似微小重力下では、これらの膜透過に関与する蛋白質の作用により細胞質基質から液胞へと Ca が移動する可能性は強い。PA 法により、疑似微小重力下では、重力下とは異なる Ca の細胞内分布が生ずることが明らかになり、Ca は重力応答に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

## 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、より詳細な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、その凍結試料から作製したコルメラ細胞の凍結超薄切片のX線マイクロアナリシスを行い、細胞内のCaおよびその他の各種元素の分布変化を調べた。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、はるかに生きている状態を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。さらに、分析条件を厳密に定めて行うことにより、得られるX線スペクトルにおける連続X線カウントに対する特性X線カウントの比率に基づいて各種元素濃度を求めることができる。本章では、この定量分析を達成するために行った分析条件の決定に関する詳細についても触れる。

#### 4-1. 方法

##### 4-1-1. 定量のためのCaのウェイトファクター ( $W_{Ca}$ ) の決定

X線スペクトルをもとに各元素の定量を行うには、特性X線のピークスペクトルから半値幅を基準にしたX線強度 (P) と連続X線由来のバックグラウンドのX線強度 (B) の比の他にウェイトファクター ( $W_x$ ) が必要とされる (Shuman *et al.*, 1976; Somlyo *et al.*, 1981; Suzuki and Sugi, 1989; Suzuki *et al.*, 2005)。実験で用いる透過型電子顕微鏡とそれに装着されているエネルギー分散型X線検出器からなる分析電子顕微鏡システムにおける  $W_x$  を決定するため、新たに調整したCa標準液を用いて、Caのウェイトファクター ( $W_{Ca}$ ) を求めた。通常の生物試料に含まれる蛋白質要素に相当するものとしてウシ血清アルブミンを加えた超純水に塩化カルシウム ( $CaCl_2$ ) 溶液を加え、7種の異なる濃度のCa標準液を作製した。調整したCa標準液の実際のCa濃度を測定するために、Ca標準液を高周波誘導結合プラズマ (inductively coupled plasma, 以下ICP) 発光分光分析装置 (SPS3100, SII Nano Technology Inc., Tokyo) にかけて濃度測定した。支持膜としてカーボン膜を張ったNi-200グリッド上にCa標準液各5  $\mu$ Lを滴下し、乾燥させた後、Be製のクライオトランスファーホルダー (Model 626DH, Gatan, Tokyo, Japan) に装填し、分析電子顕微鏡システムに挿入

し、元素分析を行った。元素分析時には、クライオトランスファーホルダーに液体窒素を充填して-130°Cに冷却した。一方、試料汚染防止のため、電子顕微鏡本体に装備されているコールドトラップにも液体窒素を充填し、ポールピースの周りを超低温に冷却した。また、定量分析のため、分析条件を観察倍率が 15,000 倍、加速電圧が 80 keV、試料ホルダー傾斜角度が X 線検出器に向けて水平位から 15° になるように設定し、さらにビームのスポットサイズは 4 に設定して電子ビームを収束させて直径約 0.1  $\mu\text{m}$  にし、X 線の収集時間を 200 秒とすることにした。得られた X 線スペクトルの各ピーク値に基づいて、分析領域に含まれる元素の定性を行った。X 線スペクトル解析ソフト (NORAN System SIX, Thermo Electron Co., Middleton, WI, USA) を用いて、得られた X 線スペクトルから各ピークスペクトルの特性 X 線強度と 4.5~5.5 keV 範囲の連続 X 線強度 (Suzuki *et al.*, 2005) を測定し、その比、所謂 P/B 比を求め、 $W_{\text{Ca}}$  を求めた。 $W_{\text{Ca}}$  が決定されることにより、他の元素の  $W_x$  も物理定数として分析ソフトにより算出された。なお、これらの  $W_x$  を用いて行われたいくつかの研究が報告されている (Hayatsu *et al.*, 2012; 2014; Hayatsu and Suzuki, 2015)。

#### 4-1-2. 重力下または疑似微小重力下でのダイズの育成

材料のダイズの根の調整は第二章の 2-1-1 で述べたように行った。簡潔に述べるとダイズ種子は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発根させ、およそ 30 mm に成長した根を材料として使用した。

#### 4-1-3. ダイズ根の急速高圧凍結と凍結超薄切片の作製

根の先端から 1 mm の位置で切断した根をさらに中心軸に沿って縦断した後、縦断面が上になるように凍結用の試料キャリアーに入れ、液体窒素を冷却剤とし、圧力をおよそ 2000 bar、冷却速度をおよそ  $10^{-4}\text{C}/\text{sec}$  に設定した急速高圧凍結装置 (EM-PACT, Leica, Austria) で凍結した。凍結試料は凍結超薄切片作製までアルミ製の専用コンテナに収納し、液体窒素中に保存した。

急速凍結したダイズの根冠部からクライオウルトラミクロトーム (Ultracut UCT/EM FCS, Leica, Austria) で厚さ~200 nm の切片を作製し、凍結超薄切片作製チャンバー内で、カーボン支持膜を張った Ni-200 のグリッド上にアイラッシュスティックで載物した。この時、ナイフはガラスナイフを使用し、ナイフステージと試料ホルダーを含む凍結超薄切片作製

チャンバーは液体窒素で $-140^{\circ}\text{C}$ に冷却した。次にチャンバー内で切片を載物したグリッド上に、もう一枚のグリッドをカーボン膜どうしが向かい合うように重ねて置き、上から軽く圧を加えた後、手製の凍結乾燥用アルミ製コンテナに収納し、凍結乾燥装置 (VDF300S, Vacuum Device Inc., Mito, Japan) に装填した。凍結乾燥は、まず 3 時間かけて $-110^{\circ}\text{C}$ から $-80^{\circ}\text{C}$ まで温度を上げ、次に 1 時間、 $-80^{\circ}\text{C}$ 下に置き、さらに 6 時間かけて $+30^{\circ}\text{C}$ まで温度を上げることによって行い、切片中の水分が十分に昇華されてから装置から取り出した。凍結乾燥後、試料は元素分析する時まで室温でデシケーター内に保存した。

#### 4-1-4. 凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシス

Be 製のクライオトランスファーホルダー (Model 626DH, Gatan, Tokyo, Japan) に凍結乾燥後の凍結超薄切片を装填し、分析電子顕微鏡システムに挿入して切片観察および元素分析を行った。分析は 4-1-1 で述べたように行った。得られた X 線スペクトルから算出される P/B 比と各元素の  $W_x$  から濃度 ( $\text{mmol kg}^{-1}$  dry wt.) を計算した。

## 4-2. 結果

### 4-2-1. ウェイトファクター

調整した 7 種の濃度の異なる Ca 標準液の実際の Ca 濃度は、ICP 発光分析装置による測定で、それぞれ 0.00、23.13、48.11、53.95、121.58、245.38、467.45  $\text{mmol kg}^{-1}$  dry wt. であった。一方、これらの溶液を分析電子顕微鏡システムにより分析した時の P/B 比は、それぞれ 0.00、0.013、0.082、0.051、0.221、0.619、1.248 であった。縦軸を Ca 濃度 ( $\text{mmol kg}^{-1}$  dry wt.)、横軸を P/B 比とするグラフを描いた (図 9)。このグラフの傾きが実験で用いた分析電子顕微鏡システムの  $W_{Ca}$  であり、その値は 384.76 であった。 $W_{Ca}$  をもとに、K、マグネシウム (Mg)、リン (P) の  $W_x$  を算出した。それらの値はそれぞれ 388.61、407.85、569.44 であった。

### 4-2-2. 重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズ根の観察

重力下で成長させたダイズは根が重力方向に伸長成長し、一方、疑似微小重力下で成長させたダイズは根が個々に異なる方向へ成長しており、第二章の 2-2-1 と同様の結果が得られた。

#### 4-2-3. 凍結超薄切片で観察されるダイズ根のコルメラ細胞の微細構造

図 10 は、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根冠を急速高圧凍結して作製した凍結超薄切片の電子顕微鏡像である。凍結超薄切片の作製行程では一切水を使用せず、電子染色も行わないため、凍結超薄切片では樹脂包埋切片で観察されたほどには微細構造を明瞭に観察することはできなかった。しかし、核やアミロプラストおよび液胞などは確認でき、液胞については、その内部に樹脂包埋切片で観察された液胞内高電子密度構造も観察された。核はコルメラ細胞のほぼ中央部にあり、重力方向の攪乱によるアミロプラストの下部偏在から全体への分散という分布変化は、これら凍結超薄切片でも観察された。しかし、ER の確認は困難であった。樹脂包埋切片では、液胞内高電子密度構造は、重力下と疑似微小重力下とで形状が異なる傾向が見られたが、凍結超薄切片では、電子密度は低く、これらの構造の形状に重力下と疑似微小重力下とでの違いを確認することはできなかった。

#### 4-2-4. 凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシス

重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズのコルメラ細胞の凍結試料から作製された凍結超薄切片で観察される細胞壁、細胞質基質、液胞内腔および液胞内高電子密度構造の点分析により、得られた X 線スペクトルを図 11 に示す。それぞれの X 線スペクトルは 1.00~5.00 keV のエネルギー範囲で示している。重力下で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の細胞壁で得られた X 線スペクトルには P-K  $\alpha$  線 (2,013 eV)、K-K  $\alpha$  線 (3,312 eV) および K-K  $\beta$  線 (3,589 eV) の明確なピークが見られた (図 11a)。同様のスペクトルピークは、細胞質基質 (図 11b) と液胞内腔 (図 11c) の X 線スペクトルでも見られた。また、液胞内高電子密度構造の X 線スペクトルでは P-K  $\alpha$  線、K-K  $\alpha$  線および K-K  $\beta$  線のスペクトルピークに加え、Mg-K  $\alpha$  線 (1,253 eV) の明確なスペクトルピークが見られた (図 11d)。K-K  $\beta$  線のスペクトルピークの右側が緩やか、かつ広範囲に傾斜していることからこれらのスペクトルピークに重複して Ca-K  $\alpha$  線 (3,690 eV) のスペクトルピークが存在していると考えられた。一方、疑似微小重力下で成長させたダイズのコルメラ細胞で観察された細胞壁 (図 11e) と細胞質基質 (図 11f) の X 線スペクトルでは、重力下のそれらとほぼ同じスペクトルピークが見られた。液胞内腔の X 線スペクトルでは、K-K  $\alpha$  線のスペクトルピークのみ明確に見られたが、P-K  $\alpha$  線と K-K  $\beta$  線については、スペクトルピークが非常に

低かった (図 11g)。液胞内高電子密度構造の X 線スペクトルでは、Mg-K $\alpha$  線、P-K $\alpha$  線、K-K $\alpha$  線が見られ、さらに Ca-K $\alpha$  線 (3,690 eV) と Ca-K $\beta$  線 (4,012 eV) の明確なスペクトルピークも見られた (図 11h)。この Ca-K $\alpha$  線のスペクトルピークは顕著に高く、大量の Ca が存在していることを示した。すべての X 線スペクトルにおいて、連続 X 線強度とそのスペクトル構成はほぼ同じパターンを示していることから、分析がいかなる条件においても順調に実行されたことを示した。

図 12 は、図 11 で示したような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各部位における X 線マイクロアナリシスで得られた Ca、K、Mg および P の濃度を示すグラフである。各元素濃度は、2 つの凍結試料から作製されたそれぞれ異なる 2 枚の凍結超薄切片の各領域から得た 10 例の平均値  $\pm$  標準誤差で示している。さらに、これらの濃度は部位毎に平均値  $\pm$  標準偏差でも示し、重力下と疑似微小重力下の間の有意の差を調べるため、有意水準を 0.05 あるいは 0.01 とした t 検定を行った (表 1)。

Ca 濃度 (図 12a, 表 1) は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細胞壁では、それぞれ 16.54 mmol kg $^{-1}$  dry wt.、18.39 mmol kg $^{-1}$  dry wt. であり、細胞質基質では、それぞれ 7.86 mmol kg $^{-1}$  dry wt.、7.48 mmol kg $^{-1}$  dry wt. であり、液胞内腔では、8.66 mmol kg $^{-1}$  dry wt.、5.34 mmol kg $^{-1}$  dry wt. であった。部位毎に行った t 検定の結果、いずれも有意水準  $P > 0.1$  で有意の差が認められず、ダイズの根の細胞壁、細胞質基質および液胞内腔では重力方向が攪乱されても Ca 濃度は変化しないことを示した。一方、重力下で成長させた根の液胞内高電子密度構造では、著しく高い濃度の Ca (45.43 mmol kg $^{-1}$  dry wt.) が検出された。さらに疑似微小重力下で成長させた根の液胞内高電子密度構造の Ca 濃度は 2012.34 mmol kg $^{-1}$  dry wt. であり、重力下で成長させた根の濃度と比べて 40 倍も高かった。重力下と疑似微小重力下での濃度の違いについて t 検定を行ったところ、有意水準  $P < 0.01$  であり、重力方向を攪乱することによりダイズの根のコルメラ細胞の液胞内高電子密度構造では Ca 濃度が増加することが明らかになった。

K 濃度 (図 12b, 表 1) は重力下で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の細胞壁で 374.23 mmol kg $^{-1}$  dry wt. あり、細胞質基質で 138.92 mmol kg $^{-1}$  dry wt.、液胞内腔で 130.99 mmol kg $^{-1}$  dry wt. であった。細胞壁の K 濃度は細胞質基質と液胞内腔のそれよりおよそ 2 倍以上高かった。液胞内高電子密度構造の K 濃度は 900.38 mmol kg $^{-1}$  dry wt. であり、顕著に高濃度であった。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では、細胞壁の K

濃度は  $645.37 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であり、重力下の濃度と比べるとおよそ 2 倍高かった。対照的に、液胞内腔の K 濃度は  $75.25 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であり、重力下の濃度のおよそ半分、液胞内高電子密度構造においても  $652.47 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であり、重力下の濃度のおよそ  $2/3$  であった。細胞質基質の K 濃度は  $136.68 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であり、重力下の濃度と殆ど同じであった。重力下と疑似微小重力下での濃度の違いについて t 検定を行ったところ、細胞壁と液胞内腔では、有意水準  $P < 0.01$  であり、液胞内高電子密度構造では  $P < 0.05$  であり、細胞質基質のみ  $P > 0.1$  であった。この結果は、重力方向を攪乱させたことによって K 濃度がダイズのコルメラ細胞の細胞質基質では変化しないが、細胞壁では増加し、液胞内腔と液胞内高電子密度構造で減少することを示した。

Mg 濃度 (図 12c, 表 1) は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、細胞質基質および液胞内腔で、それぞれ  $33.91$ 、 $24.08$  および  $21.46 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であった。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おける細胞壁、細胞質基質および液胞内腔の濃度は  $45.37$ 、 $19.21$  および  $26.44 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であり、重力下で成長させたダイズとほぼ同じ濃度であり、これら濃度の t 検定の結果では、有意水準  $P > 0.1$  であり、ダイズの根の細胞壁、細胞質基質および液胞内腔では重力方向が攪乱されても Mg 濃度は変化しないことを示した。一方、液胞内高電子密度構造については、両条件とも Mg 濃度は高く、濃度はそれぞれ  $206.07$ 、 $245.00 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であった。重力下と疑似微小重力下での濃度の違いについて t 検定を行ったところ、他の部位と同じ結果であった。

P 濃度 (図 12d, 表 1) は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、細胞質基質および液胞内腔でそれぞれ  $39.61$ 、 $117.59$  および  $23.28 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であった。一方、疑似微小重力下で成長させた根のこれら 3 つの領域における P 濃度は、それぞれ  $42.00$ 、 $82.68$  および  $16.35 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であり、これら濃度の t 検定では、いずれも有意水準  $P > 0.1$  であり、ダイズの根の細胞壁、細胞質基質および液胞内腔では重力方向が攪乱されても P 濃度は変化しないことを示した。これら 3 部位の P 濃度とは対照的に、ダイズの根のコルメラ細胞における液胞内高電子密度構造の P 濃度は顕著に高く、重力下の根では  $804.53 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であり、さらに疑似微小重力下の根ではその濃度よりおよそ 1.5 倍も高く、 $1462.84 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であった。重力下と疑似微小重力下での濃度の違いについて t 検定を行ったところ、有意水準  $P < 0.05$  であり、重力方向を攪乱させた

ことによってダイズの科尔メラ細胞の液胞内高電子密度構造で P 濃度は増加すると考えられる。

### 4-3. 考察

#### 4-3-1. 疑似微小重力下における科尔メラ細胞内外の Ca 動態

ダイズの根の科尔メラ細胞の凍結試料から得られた凍結超薄切片で観察された細胞壁、細胞質基質および液胞内腔の X 線マイクロアナリシスを行い、これらの部位では、重力方向の攪乱による Ca 濃度の変化は認められないことが明らかとなった。これらの部位で検出された Ca 濃度はトウモロコシの芽生えを横に倒して Ca 濃度変化を調べた時の根冠上半分で測定された濃度とほぼ同じであった (Moore *et al.*, 1987)。また、液胞内高電子密度構造では、重力下で成長させたダイズの Ca 濃度は細胞壁、細胞質基質および液胞内腔よりも 3~6 倍高く、 $45.43 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であった (図 12a, 表 1)。この高い Ca 濃度は前述した Moore ら (1987) の実験においてトウモロコシの根の根冠下半分やカサゴ *Sebastiscus marmoratus* のウキブクロ筋の筋小胞体内腔の Ca 濃度 (Suzuki *et al.*, 2004) よりわずかに低いか殆ど同じであった。横に倒したトウモロコシの根の根冠部下側や筋小胞体内腔で Ca が高濃度であることはそこで Ca が貯蔵又は蓄積されている状態を反映しており、液胞内高電子密度構造においても Ca はこの構造に結合し、蓄積されることを示している。なお、これらの濃度は一般的な動植物で見られる生理的範囲内の Ca 濃度であると考えられる。一方、疑似微小重力下で成長させたダイズ根の科尔メラ細胞の液胞内高電子密度構造の Ca 濃度は、 $2012.34 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$  であり (図 12a, 表 1)、重力下で成長させたダイズの場合よりはるかに高く、およそ 40 倍であった。これは、これまでに報告されたことのない全く新しい知見であり、この液胞内高電子密度構造の顕著な Ca 濃度増加は、重力方向の攪乱により、液胞内高電子密度構造以外の部分から Ca が移送され、そこにはるかに多くの Ca が結合した可能性を示している。第三章の PA を用いた細胞化学の結果では、重力方向の攪乱により、ダイズの根の科尔メラ細胞の細胞質基質で増加した Ca が液胞内へと移動する可能性を示した (図 6) が、このことと合わせて考えると疑似微小重力下で成長させたダイズの根の科尔メラ細胞では、細胞質基質で増加した Ca が液胞内に移動し、液胞からさらに液胞内高電子密度構造へと移動してそこに結合したと考えられる。この液胞内 Ca 流入は、液胞膜に存在すると考えられる  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase や  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  対向輸送体 ( $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$

exchanger) (Isayenkov *et al.*, 2010) によって行われている可能性がある。また、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液胞内高電子密度構造における Ca 濃度の顕著な増加は、組織・細胞間のアポプラストに存在する Ca の細胞内への流入を示唆する。アポプラストを経由する Ca 移動が様々な植物で生じることが一般的に認められており (Clarkson, 1984; White, 2001)、また、細胞膜には選択透過性の Ca チャネルが局在することも知られている (Kudla *et al.*, 2010)。細胞内の Ca が常にアポプラストを経由して供給されると仮定すると、重力方向が攪乱されたダイズでは、コルメラ細胞は細胞質基質の Ca 濃度増加によって誘発される細胞障害性損傷 (Gilroy *et al.*, 1987; Belyavskaya, 1996) を避けるため、順次、流入した Ca を液胞内へと移動させ、最終的には液胞内高電子密度構造に結合させている可能性がある。従って、本実験結果は、液胞が細胞質基質における Ca 濃度の調節に重要な役割を担っており (Tretyn *et al.*, 1996; Sinclair and Trewavas, 1997)、Ca が重力屈性反応における伝達物質としての機能を有する (Kudia *et al.*, 2010; Isayenkov *et al.*, 2010) という見方を支持する。

#### 4-3-2. 液胞内高電子密度構造における Ca と K の動態

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。また、K は液胞内腔でも顕著に減少しており、液胞外への K の流出が生じている可能性を示した。この可能性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での K 濃度の顕著な増加によっても示唆される。細胞質基質に濃度変化が認められないことから、液胞から細胞質基質へと流出した K はそのままそこに止まることなく、細胞外へと流出すると考えられる。植物において K は細胞質基質のイオン環境の安定化や成長制御の調節因子として重要な役割を果たしていると考えられている (Leigh and Wyn Jones, 1984)。植物の葉の孔辺細胞では K イオンと陰イオンがそこから流出することにより膨圧が減少し、結果として気孔が閉じると考えられている (Schroeder and Hagiwara, 1989; Pei *et al.*, 1997; Ache *et al.*, 2000; Hosy *et al.*, 2003)。また、オジギソウの葉枕においては、振動傾性反応に働く運動細胞は、K イオンの移動に伴う水の移動によって膨圧を制御していることが知られている (Tamiya *et al.*, 1988; Aoki *et al.*, 2015)。さらに K と水の移動には、液胞内の Ca 濃度の変化が関与していることが示唆されている (Toriyama *et al.*, 1972; Fleurat-Lessard *et*

*al.*, 1997; Aoki *et al.*, 2015)。これらの知見は本実験で示された液胞内高電子密度構造における Ca 濃度と K 濃度の逆相関的濃度変化との関係性を示すものであり、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 K は逆相関的な移動システムを持つことが示唆された。

#### 4-3-3. ダイズ根のコルメラ細胞における重力屈性反応に伴う Mg と P の動態

X線マイクロアナリシスの結果、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根のコルメラ細胞では Mg 濃度に殆ど違いがなく、Mg が重力屈性反応において重要な役割を果たすとは思われなかった。一方、P は疑似微小重力下において、液胞内高電子密度構造でのみ顕著に増加しており、その増加は Ca と同様に液胞内の P の結合によって生じたものと思われ、重力屈性反応への P の関わりも示唆されるが、その詳細については今後の課題として残された。

## 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。このことを明らかにするためにダイズの芽生えを垂直位から水平位に再配向して 0、30、60 および 120 分後の根を材料として透過型電子顕微鏡による微細構造観察とそれらを急速高圧凍結した凍結試料から作製した凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスを行った (Hayatsu and Suzuki, 2015)。

#### 5-1. 方法

##### 5-1-1. 垂直位から水平位に再配向したダイズ根の育成

直径 90 mm のプラスチックシャーレの底に敷いた純水を含ませた濾紙の上にダイズ種子を並べ、その上から純水を含ませた脱脂綿で覆い、物理的に固定した。このとき、シャーレ中の純水は全量で 5 mL とした。シャーレは、蓋をして密閉した後、縦向きにして低温恒温恒湿器の壁に立て掛けておき、18°C の暗所に 3 日間置いた。3 日後、重力屈性によりまっすぐ成長した根がおよそ 30 mm の長さに成長したダイズを 1.5% 寒天ブロックの上に根が水平になるように置き直した。このとき、根端が寒天ブロックの縁から突き出るように置いた (図 13)。ダイズを垂直から水平に再配向した後、暗所で湿度を保ちながらさらに成長させた。水平位に置き直してから 0、30、60 および 120 分後の根を微細構造観察と X 線マイクロアナリシスの材料とした。また、再配向後の根をデジタルカメラ (IOS Kiss 7xi, Cannon Inc., Tokyo, Japan) で撮影し、画像を対象として根の屈曲角度を測定した。

##### 5-1-2. 水平に再配向したダイズ根のコルメラ細胞と皮層細胞の微細構造観察

根を先端から 10 mm の位置で切断し、根の向きが変わらないように底部にシリコンラバーを充填した直径 60 mm のガラスシャーレに微小ピンで固定した。シャーレ内を純水で満たし、真空デシケーター内に置き、アスピレーター (EYEYA A-3S, RIKAKIKAI co., LTD, Tokyo) で減圧して脱気した。シャーレの純水を 0.1 M 燐酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈した 3% GA 溶液に置換し、2 時間固定し、さらに 3% GA 溶液を入れた 5 mL 容量の試料瓶に試

料を移し替え、4°Cで一晩固定した。0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) で10分間ずつ2回洗浄し、さらに純水で10分間洗浄した。根は縦断した後、先端から1 mmの位置で切断し、コムラ細胞観察用試料とし、先端から2、3 mmの位置で切断した根を皮層細胞観察用試料とした。さらに皮層細胞観察用試料は上半分と下半分に分けて以後の行程を進めた。これらを2% OsO<sub>4</sub>溶液で一晩、4°Cで固定した。これに続く、脱水、樹脂包埋、熱重合、試料ブロックからの超薄切片作製、電子染色および透過型電子顕微鏡での観察は、第二章の2-1-2で述べたように行った。

### 5-1-3. ダイズ根の伸長帯の急速高圧凍結と凍結超薄切片の作製

伸長帯の凍結超薄切片のX線マイクロアナリシスを行うため、急速高圧凍結した根から凍結超薄切片を作製した。水平に再配向した直後(0分)の根では、根を主軸に沿って縦断し、根の先端から2~3 mmの位置にある伸長帯を切り出した。再配向してから30、60および120分後の根では、屈曲点を含む1 mm巾の伸長帯を摘出し、主軸に沿って水平方向に縦断し、上半分と下半分に分けた。これらの試料は表皮側を上にして速やかに凍結用キャリアーに装填し、急速高圧凍結装置で凍結した。凍結時の条件については第四章の4-1-3で述べたように行った。凍結試料は凍結超薄切片の作製までアルミ製の専用容器に収納し、液体窒素中に保存した。

凍結試料からの凍結超薄切片の作製と凍結乾燥の行程については第四章の4-1-3で述べたように行った。使用した装置についても同様である。

### 5-2-4. 凍結超薄切片のX線マイクロアナリシス

凍結超薄切片のX線マイクロアナリシスおよび各種元素濃度の算出については第四章の4-1-4に述べたように行った。

## 5-2. 結果

### 5-2-1. 水平に再配向したダイズ根の屈曲の観察

図13はダイズを垂直位から水平位に再配向してから0、30、60および120分後の根の屈曲の状態を示している。再配向した直後には水平方向にまっすぐ伸びていた根(図13a)が、時間の経過に伴い、重力が作用している下方へと屈曲し始め、その屈曲程度は次第に

大きくなった (図 13b-d)。再配向後、30、60 および 120 分の根の屈曲角度はそれぞれ 5 例の平均値  $\pm$  標準偏差で  $13.5 \pm 1.7^\circ$ 、 $21.2 \pm 1.1^\circ$  および  $47.4 \pm 1.9^\circ$ であった (表 2)。

### 5-2-2. 水平に再配向したダイズ根のコルメラ細胞の微細構造観察

コルメラ細胞内のアミロプラストの機能を再度検討するため、水平に再配向したダイズの根の微細構造観察を行った。コルメラ細胞は第二章の 2-2-3 で述べたように、細長い円筒状の形状をしており、その内部には核や ER、アミロプラスト、多数のミトコンドリア、ゴルジ体などが観察された (図 14)。また、液胞内には液胞内高電子密度構造も観察された。ダイズを水平に置き直したことによってこれらの細胞内小器官の構造は変化しなかった。また、殆どの細胞内小器官では、ダイズを水平に再配向してもその局在に変化は見られなかった。しかし、アミロプラストのみは、顕著にその局在を変化させていた。アミロプラストは根を水平に再配向してから 0 分後 (図 14a) では、垂直に置かれていた時の重力方向 (図の右側) となる細胞下部に偏在していたが、30 分後 (図 14b) には、細胞の側方 (図の右下) に局在していた。さらに 60 分後 (図 14c) や 120 分後 (図 14d) では、重力方向となる細胞側方 (図の下側) に偏在していた。この結果は、ダイズを垂直から水平に再配向した後は、時間経過に伴い、コルメラ細胞においてアミロプラストが重力方向へと徐々に移動することを示した。

### 5-2-3. 再配向したダイズ根の皮層細胞の微細構造観察

第四章の 4-2-3 で述べたように、X 線マイクロアナリシスで用いる凍結超薄切片で微細構造を観察することは困難であった。従って、詳細な微細構造観察には、通常の化学固定を施し、樹脂包埋した試料の超薄切片を用いた。図 15 は、水平に再配向してから 0 (a)、30 (b, c)、60 (d, e) および 120 分 (f, g) 後のダイズの根の皮層細胞の電子顕微鏡像である。再配向直後の図 (図 15a) 以外は、ダイズの根の上半分 (図 15b, d, f) と下半分 (図 15c, e, g) の皮層細胞をそれぞれ対にして示している。皮層細胞は液胞が非常に良く発達しており、液胞内にはコルメラ細胞で観察された液胞内高電子密度構造が多く観察された。それらの殆どは球形であり、液胞膜内表面に付着しているものが多かった。また、液胞と液胞の間に形成される原形質糸に似た構造も観察された。細胞内には、その他に核や多数のミトコンドリア、ER、アミロプラストが観察された。アミロプラストは細胞内に広く分

散分布しており、コルメラ細胞における偏在性の分布とは明らかに異なった。水平に再配向したダイズの根の皮層細胞の微細構造は上半分と下半分で殆ど同じであった。しかし、再配向後 120 分の根では、下半分の細胞より上半分の細胞の方が伸長成長している傾向が認められた (図 15f, g)。

#### 5-2-4. 凍結超薄切片で観察されるダイズ根の皮層細胞の微細構造

図 16 はダイズを水平に再配向してから 0 (a)、30 (b, c)、60 (d, e) および 120 分 (f, g) 後に根の伸長帯から作製した凍結超薄切片の電子顕微鏡像である。水平に再配向したダイズの根の上半分の皮層細胞を図 16b, d, f に、下半分の皮層細胞を図 16c, e, g に示している。樹脂包埋切片の観察 (第五章, 5-2-3) で述べたように、これらの細胞では液胞が非常に良く発達しており、そのことが細胞全体を観察できる切片の作製を困難にしたと考えられるが、液胞内に液胞内高電子密度構造を観察できる切片は得られなかった。得られた凍結超薄切片では、核や液胞、細胞質基質、細胞壁は明確に観察されたので、細胞壁、細胞質基質および液胞内腔を対象として Ca 分布変化を調べるための X 線マイクロアナリシスを行った。

#### 5-2-5. ダイズ根の伸長帯の皮層細胞各部の Ca 濃度とその濃度変化

図 17 は X 線マイクロアナリシスにより水平に再配向したダイズの根の伸長帯の皮層細胞における細胞壁、細胞質基質および液胞内腔を分析した結果をまとめたグラフである。それぞれの定量値は第四章で決定された Ca の  $W_{Ca}$  と X 線スペクトルから得られる P/B 比に基づいて計算された。分析は、それぞれ 2 つの凍結試料から作製した 2 つ以上の凍結超薄切片を対象として行い、細胞壁、細胞質基質および液胞内腔ごとに再配向直後の根ではそれぞれ 10 例ずつ、水平に再配向後、30、60、120 分の根ではそれぞれ 12 例ずつ分析し、定量値は平均値  $\pm$  標準誤差で示している (図 17)。さらに、これらの濃度は部位毎に平均値  $\pm$  標準偏差でも示し、垂直位と水平位に再配向したダイズとの比較による有意の差と水平に再配向したダイズの上半分と下半分の比較による有意の差を調べるため、有意水準を 0.05 あるいは 0.01 とした t 検定を行った (表 3)。

水平に再配向した直後、0 分で凍結したダイズの根の伸長帯皮層細胞の Ca 濃度は細胞壁で  $8.83 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$ 、細胞質基質で  $6.02 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry wt.}$ 、液胞内腔で  $3.23 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ dry}$

wt.であった（図 17a-c, 表 3）。一方、再配向から、30、60 および 120 分後に凍結した根の皮層細胞では、細胞壁の Ca 濃度は、上半分のそれぞれで 7.23、12.33 および 3.33 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt. であり、下半分のそれぞれで 12.20、22.09 および 36.19 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt. であった（図 17a, 表 3）。細胞質基質の Ca 濃度は上半分のそれぞれで 6.34、8.12 および 6.94 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt. であり、下半分でそれぞれ 8.73、8.72 および 6.19 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt. であった（図 17b, 表 3）。液胞内腔の Ca 濃度は上半分のそれぞれで 7.56、4.93 および 4.80 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt. であり、下半分のそれぞれで 5.33、5.86 および 5.55 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt. であった（図 17c, 表 3）。水平に再配向した直後（垂直位と等しい）と再配向後 30、60、120 分の根の皮層細胞各部の Ca 濃度間で t 検定を行ったところ、細胞質基質や液胞内腔では、有意水準  $P > 0.1$  であり、有意差が認められなかった。しかし、細胞壁では、有意水準  $P < 0.01$  であり、根の再配向後 120 分で Ca 濃度に大きな変化が生じたことを示した。再配向後 30、60、120 分の根については上半分と下半分の皮層細胞各部の Ca 濃度間の t 検定を行った。その結果、細胞質基質と液胞内腔では、上・下組織細胞間では、有意水準  $P > 0.1$  であり、有意差が認められなかった。一方、細胞壁では再配向後 60 分では有意水準  $P < 0.05$  であり、120 分では有意水準  $P < 0.01$  であり、再配向からの時間経過に伴い、上・下組織細胞間に顕著な Ca 濃度差が生じたことを示した。再配向後、細胞壁の Ca 濃度は、下半分では著しく増加する傾向を示し、下半分の Ca 濃度は再配向してから 30 分後までは上半分のおよそ 1.5 倍、60 分後には上半分のおよそ 2 倍、120 分後には上半分のおよそ 12 倍に増加していた。最終的に再配向から 120 分後の根の上半分における Ca 濃度はおよそ半分に減少し、対照的に根の下半分における Ca 濃度はおよそ 4 倍に増加していた。

### 5-3. 考察

#### 5-3-1. 水平に再配向した後の根の屈曲

ダイズ芽生えを垂直から水平になるよう横に倒し、成長させることで、根は時間の経過に伴い、根端が徐々に重力方向に屈曲することを確認した（図 13, 表 2）。測定された根の屈曲角度は既に報告されているトウモロコシの結果（Moore *et al.*, 1987）と良く一致していた。根の屈曲は光や水によっても引き起こされることが知られているが、本研究では、これらの要因による影響を回避するため、暗所の水分勾配のない温室で実験したので、観察された根の屈曲は重力屈性反応と考えられる。皮層細胞の微細構造観察で再配向から 30、

60 分後の根では、細胞形状に殆ど変化は見られなかったが、120 分後の根では、重力方向への根の屈曲を反映して上半分の皮層細胞のみが伸長成長している傾向が観察された。

### 5-3-2. 水平に再配向したダイズ根のアミロプラストの動態

デンプン平衡石説によれば、コルメラ細胞のアミロプラストは重力方向へと移動して平衡石として機能すると考えられている (Moore and Evans, 1986; Sievers *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1999)。第二章の 2-2-3 でも述べたように、ダイズの根でも重力下で成長させた場合には、コルメラ細胞のアミロプラストは細胞下部に偏在する (図 4a)。一方、疑似微小重力下で成長させた場合、重力方向が攪乱されているのでアミロプラストは定位置に偏在することなく、細胞内に分散分布しており (図 4b)、ダイズの根においてもデンプン平衡石説を支持する結果を得た。垂直位から水平に再配向したダイズの根のコルメラ細胞において、アミロプラストは再配向後 0 分 (垂直位に等しい) では、細胞内の根の先端となる側に偏在していたが、時間経過に伴い、その状態で重力が作用する方向へと移動し、細胞側方 (下部) に偏在することが明らかにされた (図 14)。このような重力方向の変化に伴う、細胞内での挙動変化はアミロプラスト以外の細胞内小器官には見られなかった。これらの結果もまた、ダイズのコルメラ細胞においてはアミロプラストが平衡石として機能していることを示す。これに対して、伸長帯の皮層細胞では、根が垂直に置かれてもアミロプラストは細胞内に分散分布しており、ダイズを垂直から水平に再配向しても分布状態に変化は生じなかった (図 15)。この結果は、ダイズの根の皮層細胞では、アミロプラストが重力屈性反応に関係していない可能性を示している。トウモロコシの子葉鞘 (Sack and Leopold, 1985) やシロイヌナズナの花茎の重力感受細胞 (Saito *et al.*, 2005) では、非常に良く発達した液胞が含まれ、原形質糸と呼ばれる構造を経由してアミロプラストが移動することが報告されている。原形質糸に似た構造がダイズの皮層細胞でも観察されたが、根の屈曲に伴う分布変化は観察されなかったことから、そのような構造を経由してアミロプラストの移動があるか否かは不明である (図 15)。恐らく、皮層細胞のアミロプラストはコルメラ細胞での場合とは異なり、重力に応じた平衡石として機能していないと思われる。

### 5-3-3. 水平に再配向したダイズ根の伸長帯のアポプラストを経由した Ca の移動

水平に再配向したダイズの根の凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスでは、細胞壁の

Ca 濃度が伸長帯上半分で減少、下半分で増加する傾向を示した (図 17)。これらの結果はタマネギ (Moore, 1985) やトウモロコシ (Lee *et al.*, 1983; Moore *et al.*, 1987) の結果と一致しており、水平に再配向した根の伸長帯では、重力屈性反応として上半分から下半分へ Ca の移動が生じた可能性がある。

水平に再配向した後の初期の Ca 濃度変化は再配向後 30 分の伸長帯の下半分の皮層細胞の細胞壁で生じており、それはもとの値の 1.5 倍の増加であった (図 17a, 表 3)。一方、この時上半分では殆ど Ca 濃度が変化していなかったことを説明することは難しい。それでもなお、図 13 で示すように、根元の屈曲は、その時すでに生じていた。この結果は、水平に再配向したダイズでは、再配向から短時間後に生じる根の屈曲に Ca が関与していないかもしれないということを示唆する。この屈曲を引き起こす主たる原因物質としては植物ホルモンのオーキシンが考えられる。葉や頂芽で合成されたオーキシンは維管束を經由して極性輸送でコルメラ細胞へと移動し (Young *et al.*, 1990; Band *et al.*, 2012)、コルメラ細胞で水平方向に均等に分配されることにより根が重力方向に向けてまっすぐ伸長すると考えられている。また、根では、高濃度のオーキシンは細胞の伸長成長を抑制し、低濃度のオーキシンはそれを促進することが知られている (Hasenstein and Evans, 1988; Young *et al.*, 1990)。これらのことから、再配向後のダイズでは、根の伸長帯の上半分では、オーキシンが低濃度となり、細胞の伸長成長が促進され、一方、下半分では、オーキシンが高濃度となり、細胞の伸長成長が抑制されることで根の屈曲が生じたと考えられる。しかしながら、再配向後、60、120 分のダイズの根の伸長帯では上半分と下半分で Ca 濃度の違いが生じ、この領域でのオーキシンの非対称な濃度分布と対応するような Ca 濃度の分布差が見られることから Ca 濃度差は重力屈性反応と関係して生じていると考えられる。

再配向後 60 分では、伸長帯の上半分で一時的な Ca 濃度増加が示されたが、下半分では、その濃度よりも有意に高い Ca 濃度の増加があり、再配向してから 120 分後では、さらに著しい上下間の Ca 濃度差が生じており (図 17a, 表 3)、上下間で Ca 濃度差が生ずることは最早明確な事実と考えられる。垂直から水平に再配向したトウモロコシの根端では、Ca がアポプラストを經由して上半分から下半分の領域へ移動することが示唆されており (Lee *et al.*, 1983a; Björkman and Cleland, 1991)、ダイズの根の伸長帯でも Ca はアポプラストを經由して上から下へと移動したと考えられる。この時の Ca 移動速度にトウモロコシとダイズでは違いがあることが示されたが、生物種ごとの違いではないかと思われる。高濃度の

Ca は細胞壁の堅さを増加させ、それに伴い細胞の伸長成長を阻害することが知られている (Bennet-Clark, 1956; Cooil and Bonner, 1957; Tagawa and Bonner 1957)。このことから、再配向したダイズの根の伸長帯において上半分と下半分の Ca 濃度が非対称に分布するようになることがこの領域での根の屈曲を促していると考えられる。このようにダイズの根を垂直から水平に再配向することで伸長帯では、その状態での上側となる上半分から重力が作用する方向の下側となる下半分へのアポプラストを経由した Ca 移動が起きることは明らかである。重力屈性反応の調節に関わっていると考えられる細胞内外での顕著な Ca 動態変化には、アポプラストを経由した Ca 移動が重要な役割を果たしていると考えられる。

## 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經由した Ca の移動が生じることを示す結果を得た。これらの結果から、根冠でもアポプラストを經由して Ca が移動すると考えられ、コルメラ細胞内へと流入した Ca は液胞内高電子密度構造へと移動し、蓄積されると考えられる。これらのことを明らかにするため、本章では、重力下で成長させたダイズに高濃度の Ca を含む溶液を与えて成長させた時の根のコルメラ細胞の Ca 分布変化を X 線マイクロアナリシスで調べた。

#### 6-1. 方法

##### 6-1-1. 純水および高濃度 Ca 溶液でのダイズの育成

直径 90 mm のプラスチックシャーレの底に純水を含ませた濾紙を置き、その上にダイズの種子を並べた後、純水を含ませた脱脂綿で覆った。このとき、シャーレ中の純水を全量 5 mL とした。シャーレの蓋をして密閉した後、縦向きに立てて低温恒温恒湿器の壁に立て掛けて置き、18°C の暗所で 3 日間成長させた。その後、根がおよそ 30 mm に成長したダイズの芽生えを 2 群に分け、1 群は、直径 90 mm のプラスチックシャーレの底に置いた純水を含ませた濾紙の上に並べ、脱脂綿で種子（胚）を覆い、さらに、純水を含ませた脱脂綿で根を覆った。もう 1 群は、直径 90 mm のプラスチックシャーレの底に置いた 50 mM  $\text{CaCl}_2$  溶液を含ませた濾紙の上に並べ、その上から純水を含ませた脱脂綿で種子の部分のみを覆い、さらに、50 mM  $\text{CaCl}_2$  溶液を含ませた脱脂綿で根を覆った。2 群ともシャーレに蓋をし、密閉した後、縦向きに立てて低温恒温恒湿器の壁に立て掛けておき、さらに 18°C の暗所で 1 日間成長させた。

##### 6-1-2. 純水および高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズ根のコルメラ細胞の微細構造観察

根を先端から 10 mm の位置で切断し、純水を入れた 1.5 mL 容量のエッペンドルフチューブに入れ、水流アスピレーターで脱気した後、0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈した

3% GA 溶液に置換し、重力下、常温で 2 時間固定した。その後、3% GA 溶液を入れた 5 mL 容量の試料瓶に試料を移し替え、さらに 4°C で一晚固定した後、0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) で 10 分間 2 回洗浄した後、純水で 10 分間洗浄し、2% OsO<sub>4</sub> 溶液に置換し、4°C で一晚固定した。これに続く、脱水、樹脂包埋、熱重合、試料ブロックからの超薄切片作製、電子染色および透過型電子顕微鏡での観察は、第二章の 2-1-2 で述べたように行った。

### 6-1-3. ダイズ根のコルメラ細胞の急速高圧凍結と凍結超薄切片の作製

根の急速高圧凍結、凍結した試料からの凍結超薄切片作製、凍結超薄切片の凍結乾燥は第四章の 4-1-3 で述べたように行った。使用した装置も同様である。

### 6-1-4. 凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシス

凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスおよび各種元素濃度の算出は第四章の 4-1-4 で述べたように行った。

## 6-2. 結果

### 6-2-1. 高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズ根のコルメラ細胞の微細構造観察

ダイズは、第二章から第四章までの実験で用いたダイズよりも高濃度の Ca 溶液で成長させた期間が加わり、一日長く成長させているが、コルメラ細胞の基本的な構造に違いは見られなかった (図 18)。第二章の 2-2-3 でも述べたようにコルメラ細胞の形状は円筒状であり、細胞内には核や液胞と共に多数のアミロプラスト、ミトコンドリア、ゴルジ体が観察された。アミロプラストは重力が働く方向となる細胞下部に偏在していた。また、これまでの結果と同様にコルメラ細胞内の液胞は液胞内高電子密度構造を含んでいた。しかし、純水で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の液胞内高電子密度構造はやや未発達であった (図 18a)。一方、高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の細胞内小器官 (核、液胞、アミロプラスト、ミトコンドリア、ゴルジ体) の分布や数と大きさでは、純水で成長させたダイズのそれらと比べ、顕著な違いが見られなかったが、液胞内高電子密度構造は、数と大きさが増加していた (図 18b)。

### 6-2-2. 凍結超薄切片に観察されるダイズ根のコルメラ細胞の微細構造

既述したように、凍結超薄切片での微細構造の詳細な観察は難しいが、コルメラ細胞内の核、ミトコンドリア、アミロプラスト、液胞は明確に観察でき、液胞内には液胞内高電子密度構造も観察された（図 19）。純水で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の液胞内高電子密度構造はこれまでに述べた諸条件下のコルメラ細胞で観察されたものと殆ど同じ特徴を示した（図 19a）。しかし、高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの根の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、電子密度も高かった（図 19b）。

### 6-2-3. 凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシス

図 20 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根の凍結超薄切片で観察されるコルメラ細胞の細胞壁、細胞質基質、液胞内腔および液胞内高電子密度構造を分析して得られた Ca、K、Mg および P の濃度を示している。分析は凍結試料（2 例）から得た 2 枚以上の凍結超薄切片で行った。X 線スペクトル数は、純水で成長させたダイズでは各部位とも 12 例ずつ、高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズでは細胞壁が 16 例、細胞質基質が 11 例、液胞内腔が 12 例、液胞内高電子密度構造が 16 例であり、元素濃度は平均値 ± 標準誤差で示した。さらに、これらの濃度は部位毎に平均値 ± 標準偏差でも示し、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との各種元素濃度の有意の差を調べるため、有意水準を 0.05 あるいは 0.01 とした t 検定を行った（表 4）。

Ca 濃度（図 20a, 表 4）は、純水または高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の細胞壁でそれぞれ、20.37、112.83 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.、細胞質基質でそれぞれ、4.55、37.61 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.、液胞内腔でそれぞれ、4.84、12.76 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.、液胞内高電子密度構造でそれぞれ、35.33、259.84 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.であった。これらの Ca 濃度間の有意差の有無について調べるため、t 検定を行った。細胞壁、細胞質基質、液胞内高電子密度構造では、有意水準  $P < 0.01$  であり、液胞内腔では、有意水準  $P < 0.05$  であった。高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズのコルメラ細胞では、おおむね全部位で Ca 濃度の増加が生じた。

K 濃度（図 20b, 表 4）は、純水または高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の細胞壁でそれぞれ、205.00、308.42 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.、細胞質基質でそれぞれ、63.46、225.61 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.、液胞内腔でそれぞれ、74.45、146.74 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.、液

胞内高電子密度構造でそれぞれ、446.76、159.22 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.であった。これらの K 濃度間の有意差の有無を調べるため行った t 検定では、細胞壁と液胞内腔では、有意水準  $P < 0.05$  であり、細胞質基質と液胞内高電子密度構造で有意水準  $P < 0.01$  であり、純水で成長させたダイズに比べて高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の K 濃度は、細胞壁、細胞質基質、液胞内腔では増加していたが、液胞内高電子密度構造では、著しく減少していた。

Mg 濃度 (図 20c, 表 4) は、純水または高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の細胞壁でそれぞれ、20.11、19.23 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.、細胞質基質でそれぞれ、12.95、27.93 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.、液胞内腔でそれぞれ、7.93、11.95 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.、液胞内高電子密度構造でそれぞれ、113.28、46.65 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.であった。これら Mg 濃度間の有意差の有無を調べるため行った t 検定では、細胞壁と液胞内腔では、有意水準  $P > 0.1$  であった。一方、液胞内高電子密度構造で  $P < 0.05$  であり、細胞質基質で  $P < 0.01$  であった。外液の Ca 濃度を増加しても Mg 濃度は細胞壁と液胞内腔では、殆ど変化していなかったが、細胞質基質でやや増加し、液胞内高電子密度構造では減少していた。

P 濃度 (図 20d, 表 4) は、純水または高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の細胞壁でそれぞれ、12.23、36.51 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.、細胞質基質でそれぞれ、48.48、115.55 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.、液胞内腔でそれぞれ、5.20、27.60 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.であり、液胞内高電子密度構造でそれぞれ、353.87、213.01 mmol kg<sup>-1</sup> dry wt.であった。これら P 濃度間の有意差の有無を調べるために行った t 検定では、液胞内高電子密度構造では有意水準  $P < 0.1$  であった。一方、細胞壁、細胞質基質、液胞内腔では、有意水準  $P < 0.01$  であり、外液の Ca 濃度が増加されても P 濃度は、液胞内高電子密度構造で殆ど変化しないが、細胞壁、細胞質基質、液胞内腔では増加した。

## 6-3. 考察

### 6-3-1. ダイズ根のコルメラ細胞の液胞内高電子密度構造の形状変化

高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの根の微細構造観察では、純水で成長させたダイズの根と比べて、殆どの細胞内小器官に大きな違いは認められなかったが、液胞内高電子密度構造のみは、その数と大きさが増加していた。同様の結果は凍結超薄切片の観察でも得られた。第二章では、ダイズを疑似微小重力下で成長させるとコルメラ細胞の液胞内高

電子密度構造は、球形から扁平状にその形状を変化させることを述べた。そして、第四章では、これらの構造における Ca 濃度が疑似微小重力下では顕著に増加することを明らかにしている。また、オジギソウの葉枕の運動細胞では、振動傾性反応時、Ca の遊離と K の吸着、または Ca の吸着と K の遊離に関連してタンニン液胞は形状を変化させることが知られている (Toriyama *et al.*, 1972; Aoki *et al.*, 2015)。これらのことから、高濃度の Ca を与えた時のダイズの根のコルメラ細胞に含まれる液胞内高電子密度構造の数と大きさの増加は、外液の Ca 濃度の増大に起因するものと考えられる。

### 6-3-2. ダイズ根の根冠での Ca の動態

凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスの結果は、純水で成長させたダイズと比べ、高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの根ではコルメラ細胞の測定全部位で Ca 濃度が増加することを示した (図 20a, 表 4)。細胞壁の Ca 濃度増加は、根から水と共に吸収された Ca がアポプラストを経由し、コルメラ細胞まで輸送された結果を反映したものと考えられる。Ca のアポプラストを経由した移動については第 5 章でも述べたように、トウモロコシの根端でも示されている (Lee *et al.*, 1983; Björkman and Cleland, 1991)。一方、細胞内各部の Ca 濃度増加は、細胞外 Ca の増加に起因するものと考えられる。細胞の最も深部にある液胞内高電子密度構造に著しい量の Ca が蓄積されることから、第四章で仮想されたように細胞外から細胞質基質を経て液胞内へと向かう一連の Ca 移送機構が存在していることが考えられる。この移送過程では、Ca は細胞膜と液胞膜を透過しなければならない。これまでに、細胞膜には  $\text{Ca}^{2+}$  透過性チャネルが存在していることが示唆されており (Kudla *et al.*, 2010)、液胞膜には  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase や  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  対向輸送体が存在していることが報告されている (Isayenkov *et al.*, 2010)。細胞外から最終的には液胞内高電子密度構造に結合するまでの Ca の移送には、これらの膜透過機構の関与が考えられる。なお、第四章でも述べたように細胞質基質から液胞内への Ca の流入は高濃度の Ca で引き起こされる機能障害からの回避と考えられるが、細胞外で増加する Ca を何故植物が積極的に細胞内へと取り込むかについては目下不明である。第五章で述べたように細胞壁の領域における Ca 濃度増加は細胞の伸長成長を抑制することがあり、それも一つの機能障害とすれば、積極的に過剰な Ca を細胞内に取り込み、液胞内高電子密度構造に結合させることにより、細胞壁領域の Ca 濃度を減じて安定させている可能性が考えられる。

### 6-3-3. ダイズ根の根冠での Ca と K の関係

高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの根のコルメラ細胞の K 濃度は、細胞壁、細胞質基質および液胞内腔で増加し、液胞内高電子密度構造で減少していた (図 20b, 表 4)。これらの結果のうち、細胞壁と液胞内高電子密度構造における濃度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。また、第四章では、液胞内高電子密度構造から細胞壁へと移動する K の移動を明示できなかったが、本章の結果は、液胞内高電子密度構造から遊離した K イオンが、細胞質基質および細胞壁と順次移送されている可能性を示しているのかもしれない。

### 6-3-4. 高濃度 Ca 溶液で成長させたダイズ根のコルメラ細胞の Mg と P 分布変化

Mg と P に関しては、第四章でも述べているように重力屈性反応との関連性が低いと考えられる。高濃度の Ca 溶液で成長させたダイズの根では、液胞内高電子密度構造において Mg が減少し、細胞質基質で増加していた (図 20c, 表 4)。トウモロコシの根の細胞から単離された液胞膜小胞では、 $Mg^{2+}/H^{+}$  対向輸送体が液胞膜に存在することが報告されており (Pfeiffer and Hager, 1993)、ダイズの根では液胞内高電子密度構造から遊離した Mg が液胞内腔を経て細胞質基質へ移動しているかもしれない。一方、P は、液胞内高電子密度構造で減少し、他の部位では増加していた (図 20d, 表 4)。K や Mg と同じような濃度変化であり、同様の逆輸送系があるかもしれないが、目下議論できる有効な証拠はなく、今後明らかにされるべき課題として残された。

## 第七章

### 総括

植物の根の重力屈性における Ca の役割を検討するために行った重力屈性反応に伴う Ca の細胞内外の分布変化や動態に関する諸実験で以下のことが明らかにされた。ダイズの根のコルメラ細胞で、アミロプラストが平衡石として機能するか否かを調べるため、重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズの根のコルメラ細胞について透過型電子顕微鏡による観察を行った第二章では、ダイズの根でもアミロプラストは確かに平衡石として機能していることを明らかにした。また、コルメラ細胞の液胞内にはこれまで報告例がない高電子密度の構造があり、それらが液胞膜内表面に沿って局在することを見出した。第四章、第六章では、この液胞内高電子密度構造が Ca を結合したり、そこから遊離することにより、細胞内外の Ca 濃度の調節に非常に重要な役割を果たしていることを示した。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細胞内外の Ca 局在を調べ、重力屈性に伴う Ca 動態を明らかにしようと試みた第三章の PA を用いた Ca 細胞化学では、重力方向が攪乱されたことによってコルメラ細胞の細胞質基質の Ca が液胞へと移動することを示し、重力屈性反応に Ca が関与している可能性を明らかにした。さらに第四章の重力下または疑似微小重力下で成長させたダイズの根を急速高压凍結した試料から作製した凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスでは、重力下で成長させたダイズに比べ、疑似微小重力下で成長させたダイズのコルメラ細胞の液胞内高電子密度構造から極めて高い濃度の Ca が検出されることを明らかにした。この結果は、第三章の結果と合わせて考えると、重力方向が攪乱されたダイズの根のコルメラ細胞では、細胞壁や細胞質基質で一時的に増加したと考えられる Ca が液胞へ移送され、最終的に液胞内高電子密度構造に結合され、そこに蓄積されるようなシステムがあることを示唆するものと思われる。なお、液胞内高電子密度構造では、濃度の増減において Ca と K は逆相関的に変化していることが明らかにされた。第四章では、また、Ca がアポプラストを經由して移動する可能性を示した。このことを確認するために行った第五章の凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスの実験では、重力下で成長させたダイズを水平に再配向した後の根の伸長帯の上半分から下半分へとアポプラストを經由する Ca 移動があることを明らかにした。また、水平に再配向した根で生ずる屈曲は、屈曲部の下部で増加した Ca が伸長帯の皮層細胞の伸長成長を抑制することによることを再確認した。第四章では、細胞壁から細胞内への Ca 流入の可能性も示唆

されたが、このことを明らかにするために、第六章では高濃度の Ca 溶液で成長させた時の根のコルメラ細胞各部の Ca 濃度を凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスで調べた。その結果、根の先端や表皮系からアポプラストを経由して Ca がコルメラ細胞内へと流入し、最終的に液胞内高電子密度構造に蓄積されることが明らかにされた。

図 21 は、本研究の結果に基づいて重力屈性に伴うダイズの根の根端部における Ca 動態についてまとめたものである。重力屈性における第一段階の重力刺激の受容は、ダイズの根では、第二章で示したようにコルメラ細胞に存在するアミロプラストが細胞内で重力方向に一致する下方に移動することによって起こる。下方に移動したアミロプラストは第二章と第三章で観察された ER に接触し、第三章と第四章の結果により推測されるようにその接触刺激は ER から Ca を放出させ、その結果、細胞質基質の Ca 濃度は増加する。細胞質基質中の Ca の一部は第五章と第六章で述べたように細胞外へ流出し、アポプラストを経由して移動し、根の伸長帯の皮層細胞へと運ばれる。また、細胞質基質の Ca の一部は、液胞内に流入し、液胞内高電子密度構造に結合する。コルメラ細胞の細胞質基質の Ca 濃度が何らかの原因により異常に高くなった場合には、それによってもたらされる細胞性障害を避けるためにもこの経路によって Ca は液胞内に移送されると考えられる。本研究での疑似微小重力下や高濃度の Ca 溶液環境におかれたダイズでは、この経路が機能したと考えられる。この経路の活性化には K イオンの動態が関与しているかもしれない。そのことは、第四章、第五章で述べた液胞内高電子密度構造における Ca と K の濃度増減の逆相関的な関係から示唆された。また、第五章で述べたように細胞壁の高濃度の Ca は皮層細胞の伸長成長を抑制することから、植物ホルモンのオーキシンにより制御されている皮層細胞の伸長成長は、コルメラ細胞から移動してくる Ca によっても影響されると考えられる。

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。

## 謝辞

研究全般ならびに本論文の作成において、多くのご指導ご鞭撻を賜りました神奈川県理学部生物科学科 鈴木季直教授に心より感謝申し上げます。鈴木季直教授には、神奈川県理学部在学中から長きにわたり、個体レベルから細胞レベルにおよぶ植物の形態や生理機能についての知識や、電子顕微鏡に関する様々な知識をご教授賜りました。また、多くの電子顕微鏡技法についても丁寧に理解しやすくご教授賜りましたことを重ねて感謝申し上げます。

横浜国立大学 名誉教授ならびに神奈川県理学部総合理学研究所 客員教授の笹本浜子教授には、学会発表等を通じて本論文で述べた凍結超薄切片の X 線マイクロアナリシスに関して早くから興味を持ってくださり、この電子顕微鏡技法の有効性が新たな分野で活かせることをご教示賜り、その後共同で進めた研究をまとめることにおいても多くのご助言とご指導を賜りましたことを心より感謝申し上げます。また、本論文をまとめるにあたって暖かい激励とご指導を賜りましたことを重ねて感謝申し上げます。

ウェイトファクターの決定にあたり、神奈川県理学部化学科 西本右子教授には、ご指導ご協力を賜りましたこと心から感謝申し上げます。

元富山大学の井上弘教授には、別課題についての共同研究を進める過程で本研究についてもご助言賜りました。心から感謝致します。

神奈川県理学部生物科学科の全ての教職員の皆様には、多くのご助言、ご指導を賜りました。また、神奈川県事務職員の皆様、鈴木季直研究室の研究員、学生の皆様には、多くの励ましの言葉を賜りました。神奈川大学の皆様々に心より感謝申し上げます。

最後に、これまで温かく見守って頂いた両親と、どのような状況においても辛抱強く支援し、応援してくれた素晴らしい妻に心から感謝致します。

## 引用文献

- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR and Hedrich R (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *FEBS Lett.* **486**: 93-98.
- Aoki Y, Marumo S, Nishikata H, Kozuka M, Fukada M, Koura N, Hayatsu M and Suzuki S (2015) Ultrastructural changes and intracellular ion movements in tertiary pulvinus cells during the seismonastic response of *Mimosa pudica* L. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 53-69.
- Audus LJ (1962) The mechanism of the perception of gravity in plants. *Symp. Soc. Exp.* **16**: 197-226.
- Baluska F, Vitha S, Barlow PW and Volkmann D (1997) Rearrangements of F-actin arrays in growing cells of intact maize root apex tissues: a major developmental switch occurs in the postmitotic transition region. *Eur. J. Cell Biol.* **72**: 113-121.
- Band LR, Wells DM, Larrieu A, Sun J, Middleton AM, French AP, Brunoud G, Sato EM, Wilson MH, Péret B, Oliva M, Swarup R, Sairanen I, Parry G, Ljung K, Beeckman T, Garibaldi JM, Estelle M, Owen MR, Vissenberg K, Hodgman TC, Pridmore TP, King JR, Vernoux T and Bennett MJ (2012) Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: 4668-4673.
- Barlow PW (1974) Recovery of geotropism after removal of the root cap. *J. Exp. Bot.* **25**: 1137-1146.
- Belyavskaya NA (1996) Free and membrane-bound calcium in microgravity and microgravity effects at the membrane level. *Adv. Space Res.* **17**: 169-177.
- Belyavskaya NA (2001) Ultrastructure and calcium balance in meristem cells of pea roots exposed to extremely low magnetic fields. *Adv. Space Res.* **28**: 645-650.
- Bennet-Clark TA (1956) Salt accumulation and mode of action of auxin. A preliminary hypothesis. In: *Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances*. Wain RL and Wightman F, eds., Butterworths Scientific Publications, London. pp. 284-291.

- Björkman T and Cleland R (1991) The role of extracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  gradients in gravitropic signaling in maize roots. *Planta* **185**: 379-384.
- Blancaflor EB, Fasano JM and Gilroy S (1998) Mapping the functional roles of cap cells in the response of *Arabidopsis* primary roots to gravity. *Plant Physiol.* **115**: 213-222.
- Caspar T, Huber SC and Somerville C (1985) Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol.* **79**: 11-17.
- Chen R, Rosen E and Masson PH (1999) Gravitropism in higher plants. *Plant Physiol.* **120**: 343-350.
- Cholodny N (1927) Wuchshormone und Tropismen bei den Pflanzen. *Biol. Zentralbl.* **47**: 604-626.
- Clarkson DT (1984) Calcium-transport between tissues and its distribution in the plant. *Plant Cell Environ.* **7**:449-456.
- Cooil B and Bonner J (1957) Effects of calcium and potassium ions on the auxin-induced growth of *Avena* coleoptile sections. *Planta* **48**: 696-723.
- Dauwalder M, Roux SJ and Rabenberg LK (1985) Cellular and subcellular localization of calcium in gravistimulated corn roots. *Protoplasma* **129**: 137-148.
- Dieter P and Marme D (1980) Calmodulin activation of plant microsomal  $\text{Ca}^{2+}$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7311-7314.
- Ebashi S and Endo M (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **18**: 123-183.
- Evans ML and Ishikawa H (1997) Cellular specificity of the gravitropic motor response in roots. *Planta Suppl.* **203**: S115-S122.
- Fleurat-Lessard P, Bouche-Pillon S, Leloup C and Bonnemain JL (1996) Distribution and activity of the plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase in *Mimosa pudica* L. in relation to ionic fluxes and leaf movements. *Plant Physiol.* **113**: 747-754.
- Gilroy S, Blowers DP and Trewavas AJ (1987) Calcium: a regulation system emerges in plant cells. *Development* **100**: 181-184.
- Gilroy S and Trewavas AJ (1994) A decade of plant signals. *BioEssays* **16**: 677-682
- Grenville DJ and Peterson RL (1981) Structure of Aerial and Subterranean Roots of *Selaginella*

- kraussiana* A. Br. *Bot. Gaz.* **142**: 73-81.
- Haberlandt G (1900) Über die Perzeption des geotropischen Reizes. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **18**:261-272.
- Hasenstein KH and Evans ML (1988) Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **86**: 890-894.
- Hayatsu M, Ono M, Izukawa T, Horikawa N, Hotta M, Sasamoto H and Suzuki S (2009) Analyses of the Ca ion movement in root-tips during the gravitropic response of *Zea mays* L. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **20**: 57-64.
- 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*.
- Hillman SK and Wilkins MB (1982) Gravity perception in decapped roots of *Zea mays*. *Planta* **155**: 267-271.
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Porée F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very AA, Simonneau T, Thibaud JB and Sentenac H (2003) The *Arabidopsis* outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 5549-5554.
- Isayenkov S, Isner JC, and Maathuis FJ (2010) Vacuolar ion channels: Roles in plant nutrition and signalling. *FEBS Lett.* **584**: 1982-1988.
- Iversen TH (1969) Elimination of geotropic responsiveness in roots of cress (*Lepidium sativum*) by removal of statolith starch. *Physiol. Plant* **22**: 1251-1262.
- Juniper BE, Groves S, Landau-Schacher B and Audus LJ (1966) Root cap and the perception of gravity. *Nature* **209**: 93-94.

- Juniper BE and French A (1973) The distribution and redistribution of endoplasmic reticulum (ER) in geoperceptive cells. *Planta* **109**: 211-224.
- Kiss JZ and Sack FD (1990) Severely reduced gravitropism in dark-grown hypocotyls of a starch-deficient mutant of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol.* **94**: 1867-1873.
- Kiss JZ (2000) Mechanisms of the early phases of plant gravitropism. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**:551-573.
- Knight TA (1806) On the direction of the radicle and germen during the vegetation of seeds. *Phil. Trans. Roy. Soc. B Biol. Sci.* **99**:108-120.
- Komnick H and Komnick U (1963) Elektronen mikroskopische Untersuchungen zur funktionellen Morphologie des Ionen-transportes in der Salzdrüse von *Larus argentatus*. *Z Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **60**: 163-208.
- Konings H (1968) The significance of the root cap for geotropism. *Acta Bot. Neerl.* **17**: 203-211.
- Kordyum E and Guikema J (2001) An active role of the amyloplasts and nuclei of root statocytes in graviperception. *Adv. Space Res.* **27**: 951-956.
- Kudla J, Batistic O and Hashimoto K (2010) Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* **22**: 541-563.
- Lee JS, Mulkey TJ and Evans ML (1984) Inhibition of polar calcium movement and gravitropism in roots treated with auxin transport inhibitors. *Planta* **160**: 536-543.
- Legué V, Blancaflor E, Wymer C, Perbal G, Fantin D, and Gilroy S (1997) Cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> in *Arabidopsis* roots changes in response to touch but not gravity. *Plant Physiol.* **114**: 789-800.
- Leigh RA and Wyn Jones RG (1984) A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytol.* **97**:1-13.
- McNitt R and Shen-Miller J (1978) Quantitative assessment of ultrastructural changes in primary roots of corn (*Zea mays* L.) after geotropic stimulation. *Plant Physiol.* **61**: 644-648.
- Merkys A and Darginaviciene J (1997) Plant gravitropic response. *Adv. Space Biol. Med.* **6**: 213-230.
- Monoi M, Hotta M and Suzuki S (2002) Performance evaluation of an apparatus for producing

- simulated microgravity by electron microscope observation of *Arabidopsis* roots. *J. Plant Res.* **115** Suppl.: 77.
- Moore R (1985) Calcium movement, graviresponsiveness and the structure of columella cells and columella tissues in roots of *Allium cepa* L. *Ann. Bot.* **56**: 173-187.
- Moore R and Evans ML (1986) How roots perceive and respond to gravity. *Amer. J. Bot.* **73**: 574-587.
- Moore R, Cameron IL, Hunter KE, Olmos D and Smith NKR (1987) The locations and amounts of endogenous ions and elements in the cap and elongating zone of horizontally oriented roots of *Zea mays* L.: An electron-probe EDS study. *Ann. Bot.* **59**: 667-677.
- Morita MT (2010) Directional gravity sensing in gravitropism. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 705-720.
- Nemec B (1900) Über die Art der Wahrnehmung des Schwerkraftes bei den Pflanzen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **18**: 241-245.
- Pei ZM, Kuchitsu K, Ward JM, Schwarz M and Schroeder JI (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell* **9**: 409-423.
- Perbal G, Lefranc A, Jeune B and Driss-Ecole D (2004) Mechanotransduction in root gravity sensing cells. *Physiol. Plant* **120**: 303-311.
- Peterson RL, Scott MG and Kott R (1979) Root cap structure in *Isoetes macrospora* Dur. *Ann. Bot.* **44**: 730-744.
- Pfeiffer W and Hager A (1993) A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and a  $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^{+}$ - antiporter are present on tonoplast membranes from roots of *Zea mays* L. *Planta* **191**: 377-385.
- Poff KL and Martin HV (1989) Site of graviperception in roots: a re-examination. *Physiol. Plant* **76**: 451-455.
- Poovaliah BW and Reddy ASN (1993) Calcium and signal transduction in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **12**: 185-211.
- Sack FD and Leopold AC (1985) Cytoplasmic streaming affects gravity-induced amyloplast sedimentation in maize coleoptile. *Planta* **164**: 56-62.
- Sack FD (1991) Plant gravity sensing. *Int. Rev. Cytol.* **127**:193-252.
- Saito C, Morita MT, Kato T and Tasaka M (2005) Amyloplasts and vacuolar membrane dynamics

- in the living graviperceptive cell of the *Arabidopsis* inflorescence stem. *Plant Cell* **17**: 548-558.
- Schroeder JI and Hagiwara S (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**: 427-430.
- Shuman H, Somlyo AV and Somlyo AP (1976) Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: methods and validity. *Ultramicroscopy* **1**: 317-339.
- Sievers A and Volkmann D (1972) Verursacht differentieller Druck der Amyloplasten auf ein komplexes Endomembransystem die Geoperzeption in Wurzeln? *Planta* **102**: 160-172.
- Sievers A, Behrens HM, Buckhout TJ and Gradmann D (1984) Can a Ca<sup>2+</sup> pump in the endoplasmic reticulum of the *Lepidium* root be the trigger for rapid changes in membrane potential after gravistimulation? *Z. Pflanzenphysiol.* **114**: 195-200.
- Sievers A, Buchen B, Volkmann D and Hejnowicz Z (1991a) Role of the cytoskeleton in gravity perception. In: *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. Lloyd CW, ed., Academic Press, London. pp.169-182.
- Sievers A, Kramer-Fischer M, Braun M and Buchen B (1991b) The polar organization of the growing *Chara* rhizoid and the transport of statoliths are actin-dependent. *Bot. Acta* **104**: 103-109.
- Sievers A and Busch MB (1992) An inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPases in the sarcoplasmic and endoplasmic reticula inhibits transduction of the gravity stimulus in cress roots. *Planta* **188**: 619-622.
- Sinclair W and Trewavas A (1997) Calcium in gravitropism. A re-examination. *Planta* **203**: 85-90.
- Somlyo AV, Gonzalez-Serratos HG, Shuman H, McClellan G and Somlyo AP (1981) Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: an electron-probe study. *J. Cell Biol.* **90**: 577-594.
- Staehelin LA, Zheng HQ, Yoder TL, Smith JD and Todd P (2000) Columella cells revisited: Novel structures, novel properties, and a novel gravisensing model. *Gravit. Space Biol. Bull.* **13**: 95-100.
- Suzuki S and Sugi H (1982) Mechanisms of intracellular calcium translocation in muscle. In: *The Role of Calcium in Biological Systems, Vol. I*. Anghileri LJ and Tuffet-Anghileri AM,

- eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.
- Suzuki S and Sugi H (1989) Evaluation of the pyroantimonate method for detecting intracellular calcium localization in smooth muscle fibers by the X-ray microanalysis of cryosections. *Histochemistry* **92**: 95-101.
- Suzuki S, Hino N and Sugi H (2004) Intracellular calcium translocation during the contraction-relaxation cycle in scorpionfish swimbladder muscle. *J. Exp. Biol.* **207**: 1093-1099.
- Suzuki S, Hamamoto C and Shibata R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the inner surface of plasma membranes in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **16**: 9-17.
- Tagawa T and Bonner J (1957) Mechanical properties of the *Avena* coleoptile as related to auxin and to ionic interactions. *Plant Physiol.* **32**: 207-212.
- Tamiya T, Miyazaki T, Ishikawa H, Iriguchi N, Maki T, Matsumoto JJ and Tsuchiya T (1988) Movement of water in conjunction with plant movement visualized by NMR imaging. *J. Biochem.* **104**: 5-8.
- Toriyama H and Jaffe MJ (1972) Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cell of *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol.* **49**: 72-81.
- Tretyn A, Grolig F, Magdowski G and Wagner G (1996) Selective binding of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  by the physodes of the green alga *Mougeotia scalaris*. *Folia Histochem. Cytobiol.* **34**: 103-108.
- Tsugeki R and Federoff NV (1999) Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 12941-12946.
- Wendt M and Sievers A (1989) The polarity of statocytes and the gravisensitivity of roots are dependent on the concentration of calcium in statocytes. *Plant Cell Physiol.* **30**: 929-932.
- Went FW (1928) Wuchsstoff und Wachstum. *Recl. Trav. Bot. Neerl.* **25**: 1-116.
- White PJ (2001) The pathways of calcium movement to the xylem. *J. Exp. Bot.* **52**: 891-899.
- Yamanobe T and Sugi H (1993) Purification and characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding 450-kDa protein (MCBP-450) in the plasma membrane-enriched fraction from a molluscan

smooth muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1149**: 166-174.

Young LM, Evans M and Hertel R (1990) Correlations between gravitropic curvature and auxin movement across gravistimulated roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **92**: 792-796.

Zienkiewicz K, Rejón JD, Suárez C, Castro AJ, de Dios Alché J and Rodríguez García MI (2011) Whole-organ analysis of calcium behaviour in the developing pistil of olive (*Olea europaea* L.) as a tool for the determination of key events in sexual plant reproduction. *BMC Plant Biol.* **11**: 150.

## 第四章の表

表 1. 重力下または疑似微小重力下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 高電子密度構造	重力下	45.43±45.05	900.38±434.20	206.07±108.17	804.53±392.34
	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. \*1, \*2, \*3, \*4 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  $P < 0.01$ .

## 第五章の表

表 2. 垂直から水平に再配向したダイズ根の時間経過に伴う屈曲角度

経過時間	0 分	30 分	60 分	120 分
屈曲角度	0°	13.5±1.7°	21.2±1.1°	47.4±1.9°

値は水平に再配向した直後 (0 分) の根を 0°とした時の根の屈曲角度 (平均値±標準偏差) を示す. N = 5.

表 3. 垂直から水平に再配向して成長させたダイズ根の伸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</sup> # <sup>1</sup>	8.73±7.18 * <sup>1</sup> # <sup>1</sup>	5.33±3.93 * <sup>1</sup> # <sup>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</sup> # <sup>3</sup>	8.72±10.11 * <sup>1</sup> # <sup>1</sup>	5.86±5.03 * <sup>1</sup> # <sup>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	36.19±19.35 * <sup>4</sup> # <sup>4</sup>	6.19±4.88 * <sup>1</sup> # <sup>1</sup>	5.55±4.56 * <sup>1</sup> # <sup>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>  $P < 0.01$ . #<sup>1</sup>, #<sup>2</sup>, #<sup>3</sup>, #<sup>4</sup> 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>  $P < 0.01$ .

## 第六章の表

表 4. 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	純水	20.37±9.30	205.00±132.29	20.11±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  $P < 0.01$ .

## 第二章の図



図1. クリノスタット (疑似微小重力装置: YAYOI振盪器 YGG-1型改). 種子を播いたシャーレを回転部に取り付け, 直交する2軸 (公転軸と自転軸) の公転: 自転比を1.0:1.6で回転させることで植物に疑似微小重力環境を与えながら成長させることができる.

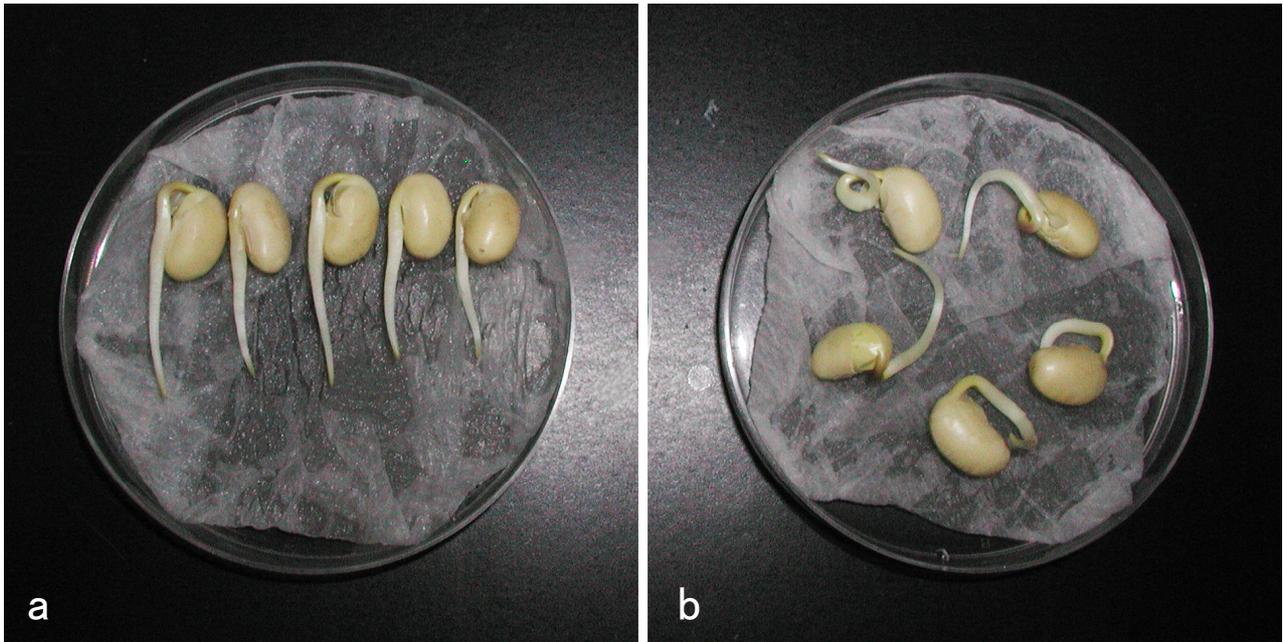


図2. シャーレに播種し、3日間成長させたダイズ. a. 重力下で成長させたダイズ. 根は重力の方向にほぼまっすぐ伸長している. b. 疑似微小重力下で成長させたダイズ. 根は個体毎に異なる方向へと伸長している.

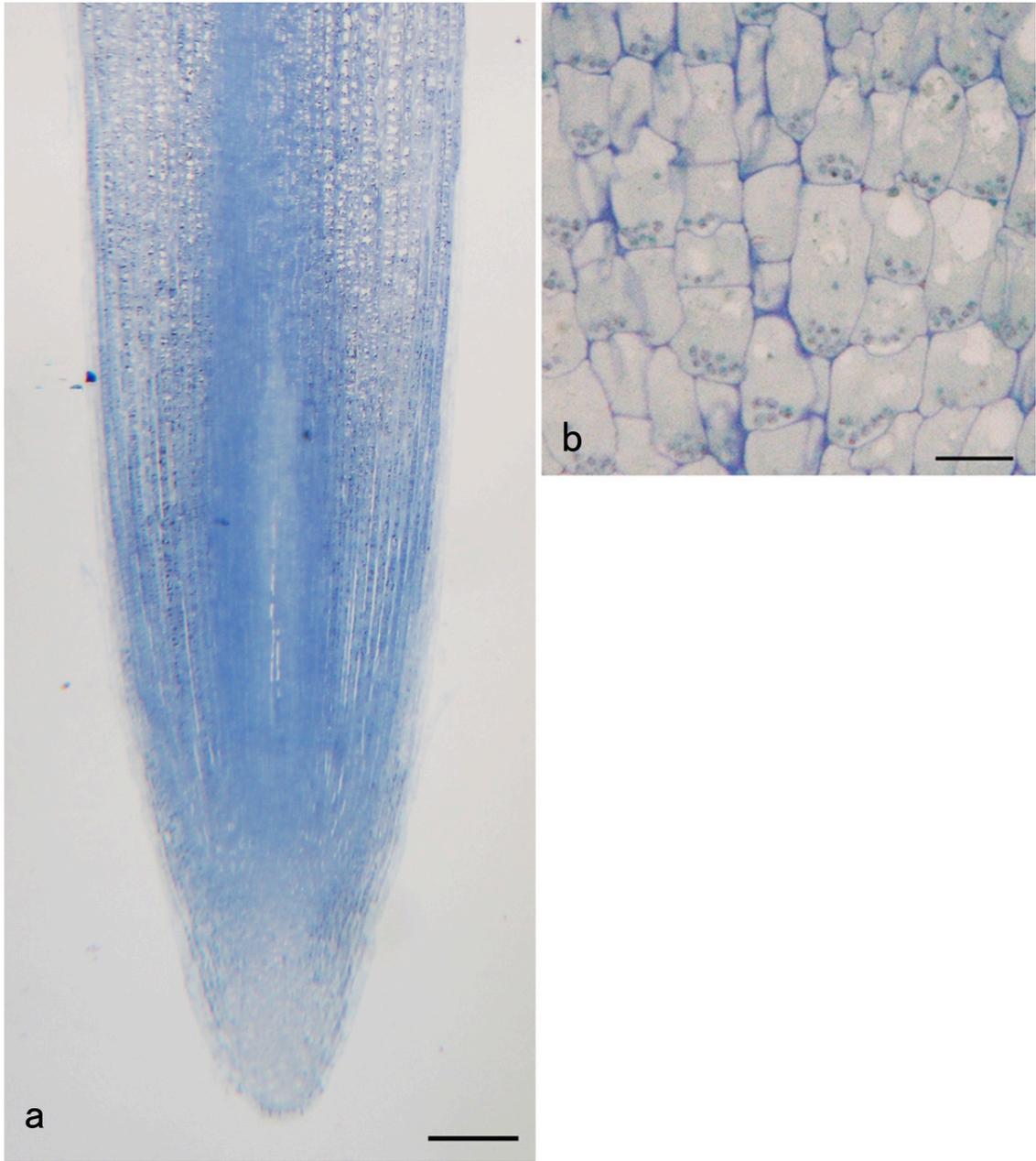


図 3. 重力下で成長させたダイズ根の縦断切片の光学顕微鏡像. a. 根冠から成熟帯までを含む根の縦断像. b. コルメラ細胞領域の拡大像. Bar: 0.2 mm (a), 20  $\mu$ m (b).

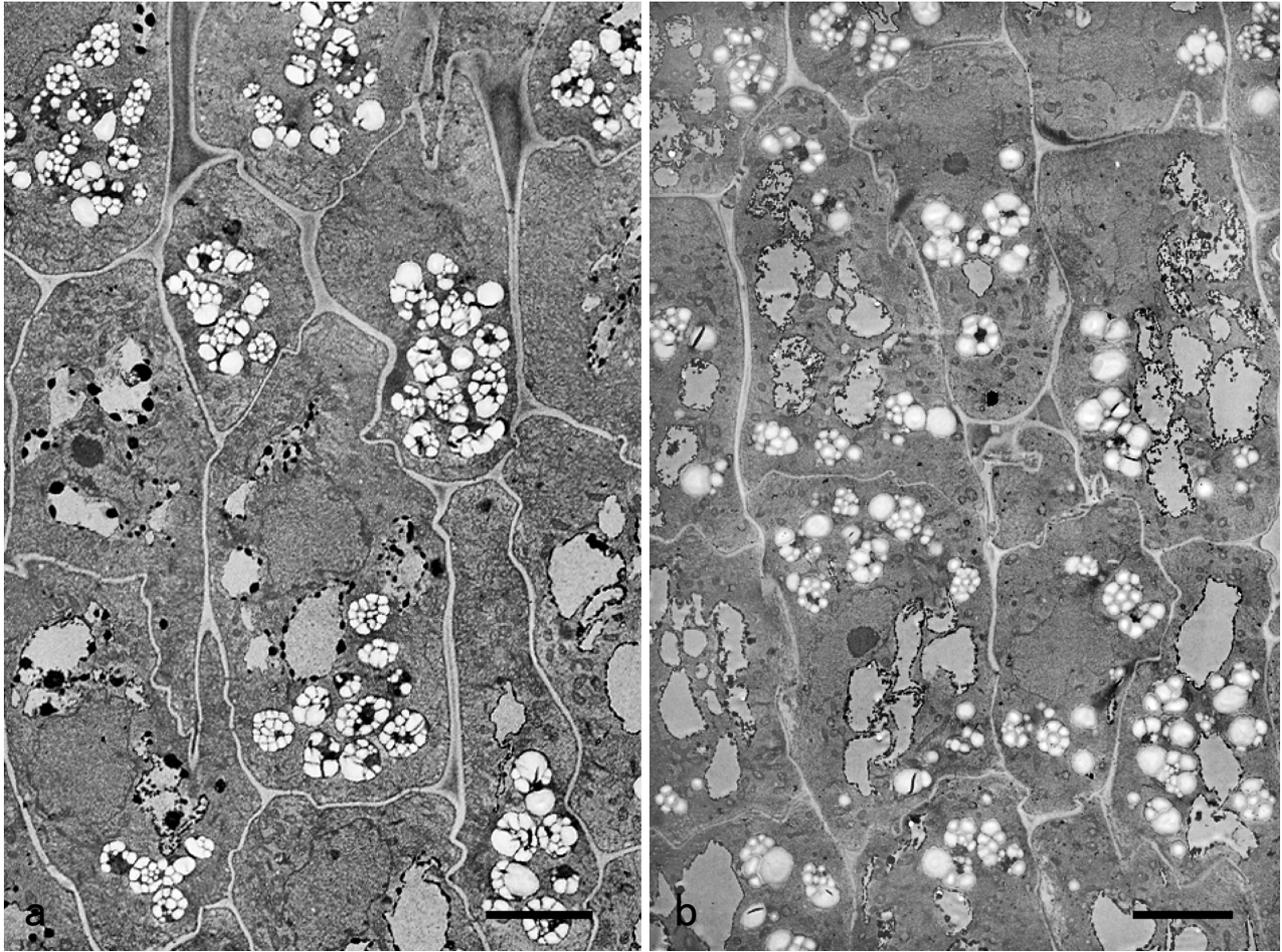


図4. ダイズ根のコルメラ細胞領域の電子顕微鏡像. a. 重力下で成長させたダイズ根のコルメラ細胞. アミロプラストは細胞下部に偏在している. b. 疑似微小重力下で成長させたダイズ根のコルメラ細胞. アミロプラストは細胞全体に分散分布している. Bar: 5  $\mu\text{m}$ .

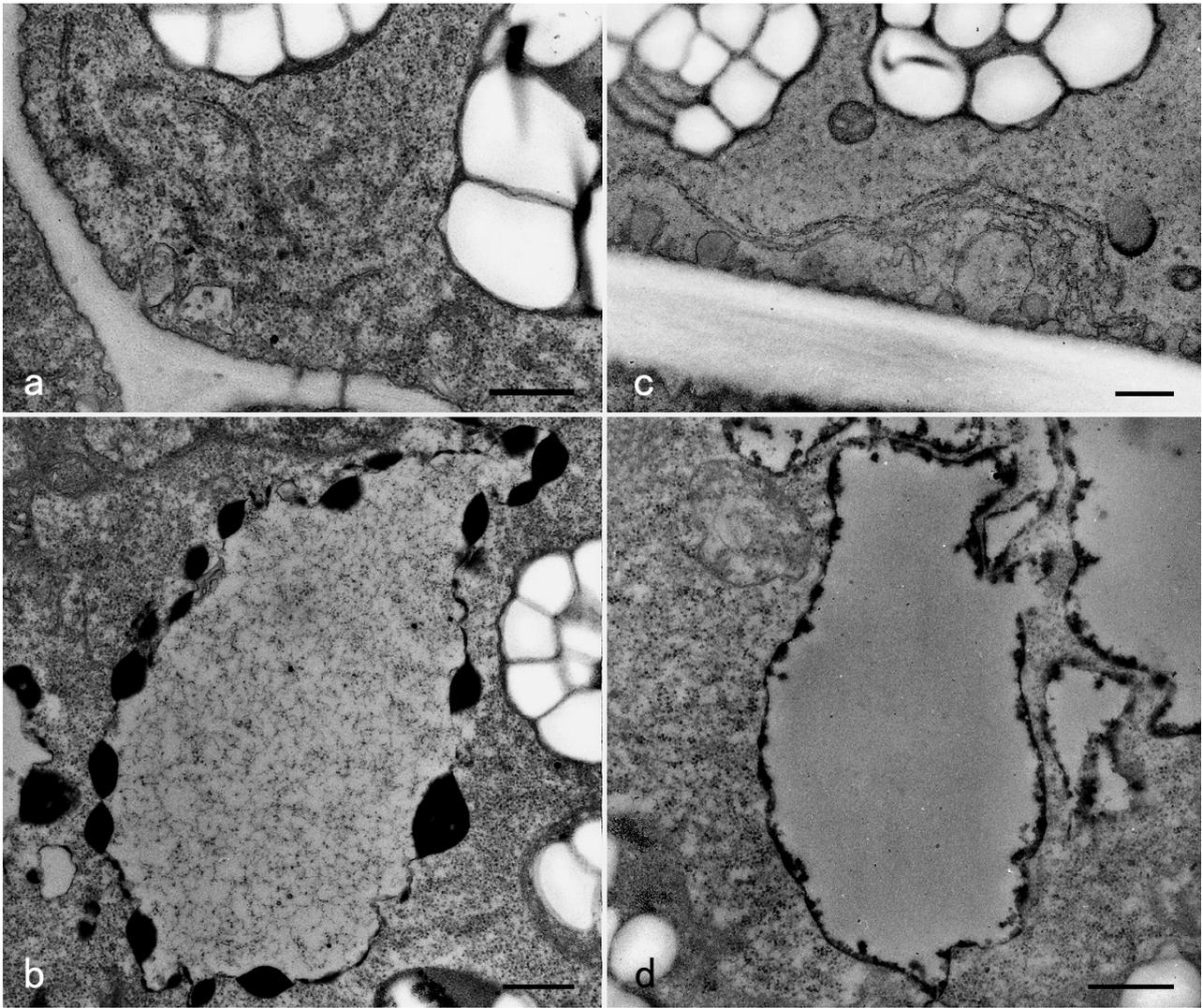


図 5. ダイズ根のコルメラ細胞で観察される細胞内小器官とその微細構造. a, b. 重力下で成長させたダイズ根のコルメラ細胞内の ER (a) と液胞 (b). 液胞内の高電子密度構造は球状で、液胞膜内表面に沿って局在している. c, d. 疑似微小重力下で成長させたダイズ根のコルメラ細胞内の ER (c) と液胞 (d). 液胞内高電子密度構造は扁平状で、液胞膜内表面に沿って局在している. Bar: 0.5  $\mu\text{m}$ .