

Acacia mangium の根における
境界様細胞の生成と役割

遠藤いず貴

Acacia mangium の根における
境界様細胞の生成と役割

博士論文

東京大学 大学院農学生命科学研究科 森林科学専攻

遠藤いず貴

2013

目次

I 章 序論.....	1
I-1 根冠と根端構造.....	1
I-2 境界細胞.....	1
I-3 根の二次代謝物.....	3
I-4 酸性土壌のアルミニウム毒性と耐性.....	3
I-5 木本植物根の強力なアルミニウム耐性.....	4
I-6 <i>Acacia mangium</i> の環境適性.....	5
I-7 本論文の目的と構成.....	5
II 章 <i>Acacia mangium</i> 根冠の鞘状に発達する境界様細胞の特性.....	7
II-1 緒言.....	7
II-2 材料と方法.....	9
II-2-1 <i>A. mangium</i> の鞘状組織の形成の解析.....	9
II-2-1-1 植物材料と栽培条件.....	9
II-2-1-2 処理と解析方法.....	9
II-2-2 <i>A. mangium</i> とダイズの根端における菌類の確認.....	10
II-2-2-1 植物材料と栽培条件.....	10
II-2-2-2 処理と解析方法.....	11
II-2-3 <i>A. mangium</i> の鞘状組織とダイズの境界細胞の形成部位と生活性の観察.....	11
II-2-3-1 植物材料と栽培条件.....	11
II-2-3-2 処理と解析方法.....	12
II-2-4 <i>A. mangium</i> とダイズの鞘状組織片および境界細胞の細胞数の計測..	13
II-2-4-1 植物材料と栽培条件	13
II-2-4-2 処理と解析方法	13
II-2-5 摩擦条件下での <i>A. mangium</i> とダイズの細胞離脱と根冠の組織学的解析.....	14
II-2-5-1 植物材料と栽培条件	14
II-2-5-2 処理と解析方法.....	15
II-3 結果.....	17
II-3-1 鞘状組織の形成	17
II-3-2 鞘状組織と菌類の関連	18

II-3-3	鞆状組織片の生成部位と生活性.....	18
II-3-4	鞆状組織片と境界細胞の生成量と離脱部位.....	19
II-3-5	鞆状組織片と境界細胞のムシゲル.....	20
II-3-6	摩擦条件下での鞆状組織片の剥離.....	20
II-4	考察.....	37
III章	<i>A. mangium</i> の境界細胞と境界様細胞へのプロアントシアニジン(PA)の集積とその放出特性.....	41
III-1	緒言.....	41
III-2	材料と方法.....	43
III-2-1	根端の PA 集積の組織学的解析.....	43
III-2-1-1	植物材料と栽培条件.....	43
III-2-1-2	処理と解析方法.....	43
III-2-2	境界様細胞と境界細胞の PA と生活性の染色.....	44
III-2-2-1	植物材料と栽培条件.....	44
III-2-2-2	処理と解析方法.....	44
III-2-3	摩擦条件下での境界様細胞と境界細胞の PA と生活性の染色.....	45
III-2-3-1	植物材料と栽培条件.....	45
III-2-3-2	処理と解析方法.....	45
III-3	結果.....	46
III-3-1	<i>A. mangium</i> の根端における PA の集積部位.....	46
III-3-2	境界様細胞と境界細胞の PA 集積と細胞生活性.....	47
III-3-3	摩擦条件下での PA の放出特性.....	48
III-4	考察.....	59
IV章	<i>A. mangium</i> のプロアントシアニジン(PA)を集積した境界様細胞の土壌ストレスに対する役割 –アルミニウムと病原性バクテリアを対象として–.....	63
IV-1	緒言.....	63
IV-2	材料と方法.....	65
IV-2-1	<i>A. mangium</i> とダイズの Al 処理.....	65
IV-2-1-1	植物材料と栽培条件.....	65
IV-2-1-2	処理と解析方法.....	65
IV-2-1-2-1	<i>A. mangium</i> の根の伸長量の測定.....	65
IV-2-1-2-2	<i>A. mangium</i> 根端の PA 集積と細胞系列の解析.....	65
IV-2-1-2-3	<i>A. mangium</i> とダイズの根端に集積した Al の組織化学的解析	

.....	66
IV-2-1-2-4 <i>A. mangium</i> の根に集積する Al の定量分析.....	66
IV-2-2 <i>A. mangium</i> とダイズの無菌植物体への <i>Rhizobium rhizogenes</i> 接種実験	66
IV-2-2-1 植物材料と栽培条件.....	66
IV-2-2-2 接種源の準備.....	67
IV-2-2-3 処理と解析方法.....	67
IV-3 結果.....	69
IV-3-1 Al 処理した <i>A. mangium</i> の根の伸長と境界様細胞の離脱.....	69
IV-3-2 <i>A. mangium</i> 根端の PA 集積と細胞系列の解析.....	69
IV-3-3 <i>A. mangium</i> とダイズの根に集積する Al の染色および定量解析.....	70
IV-3-4 <i>A. mangium</i> とダイズの根でのバクテリアの増殖評価.....	70
IV-4 考察.....	78
V章 総合考察 – <i>A. mangium</i> の根における境界様細胞の生成と役割 –	80
謝辞.....	83
引用文献.....	84

I 章 序論

I -1 根冠と根端構造

根冠は根端を鐘状に包む生細胞の集合体で、ほぼ全ての陸生植物に認められる。根冠は、根が土壌中を伸長するときに頂端分裂組織を物理的に保護するとともに、土壌との摩擦抵抗を低減させるという主要な役割を担っている(Bengough and McKenzie, 1997; 森田, 2000; Iijima et al., 2008)。また、根冠は重力の感知や植物ホルモンの生産、土壌中にムシゲルと呼ばれる粘液物質を分泌するという働きも持つ(森田, 2000; Barlow, 2002)。このように、根冠は植物全体の生育にとって必須の多くの生物的な機能の一端を担う重要な器官である。

根冠は、始原細胞の違いに基づき、中央部のコルメラと側方部の側根冠にそれぞれ区分される(Wenzel and Rost, 2001; Wenzel et al., 2001)。各細胞はそれぞれの始原細胞から同調して生産される(Dolan et al., 1993)。始原細胞から順次新しい細胞が生産されるにも関わらず、根冠がほぼ同じ大きさや鐘状構造を維持するのは、根冠の周辺部分を構成する細胞が順次脱落していくためであるとされている(森田, 2000)。

I -2 境界細胞

根冠周縁から離脱した細胞は、脱落時の結合様式に基づき、単体で分散する境界細胞(border cell)と緩やかな結合を保つ境界様細胞(border-like cell)に区別される(Hawes, 1990; Hawes et al., 1998; Vicré et al., 2005; Driouich et al., 2007)。離脱する境界細胞は生活性を有し、土壌中で1週間以上生活性を維持する場合もある(Vermeer and McCully, 1982; Hawes and Pueppke, 1986)。境界細胞の脱落は大多数の植物で認められるが、脱落

数は種や生育条件により大きく異なる(Hawes and Pueppke, 1986)。一般に、被子植物の根端分裂組織の構造は、静止中心近傍での皮層、表皮、根冠組織の相互判別性から大きく 3 タイプ (閉鎖型、開放型、中間型) に区分される(Groot et al., 2004; Rost, 2011)。閉鎖型から境界細胞がほとんど脱落しない一方、マメ科植物を含む開放型からは中間型や閉鎖型の植物種よりも比較的多数の境界細胞が脱落し、開放型から離脱する境界細胞数は植物の科レベルでおよそ 2 オーダーの幅で異なる(Hamamoto et al., 2006; Heimsch and Seago, 2008)。シロイヌナズナの根端は閉鎖型の分裂組織構造を有し、境界細胞の脱落をほとんど認めない(Wenzel and Rost, 2001; Hamamoto et al., 2006)。境界様細胞の生成はシロイヌナズナを含むアブラナ科植物と出根直後のイネにおいてのみ報告があり、シロイヌナズナでは根頂端との接合部を残す場合がある(川田ら, 1979; Vicré et al., 2005; Driouich et al., 2010)。

境界細胞は、離脱に伴い根端保護において種々の役割を果たすことが推定されている(Hawes et al., 2000)。境界細胞は根端を覆うように離脱し、堅密な土壌では根冠から脱落する細胞の数が増大することから、境界細胞が堅密土壌における物理抵抗に対して緩衝効果を示すことが示唆されている(Iijima et al., 2003)。また、根冠から離脱した細胞はムシゲルに交じって根圏に放出され、根と土壌微生物との相互作用にも影響を与えられられている(Hawes, 1990; Somasundaram et al., 2008)。境界細胞や境界様細胞が根圏微生物の集散や忌避に関与することは、多くの研究者によって報告されている(Hawes, 1990; Gochnauer et al., 1990; Hawes et al., 1998; Gunawardena and Hawes, 2002; Vicré et al., 2005; Cannesan et al., 2011)。一方、根冠から脱落した境界細胞は根冠と同じ機能を持つ細胞ではない可能性がある。エンドウマメの境界細胞で検出された 13 % のたんぱく質が根端で不検出であったことから(Brigham et al., 1995)、境界細胞や境界様細胞は根端から離脱後に新たな保護機能を有する可能性があり、境界細胞と根冠はそれぞれに異なる役割を持つことが示唆された。しかしながら、根表面や根圏における境界細胞や境界様細胞について、それらの動態や離脱元の機能との関連の理解は極めて限られている。その理由の一

部として、境界細胞や境界様細胞の根からの離脱容易性や単体や少数の細胞の動態捕捉の困難性が挙げられる。

I-3 根の二次代謝物

植物根はフェノール性物質や揮発性物質などの種々の二次代謝物を産生する(Guillon et al., 2006; Yamaguchi and Sharp, 2010)。トリテルペン類の avenacin はオートムギ根表皮に集積して病原感染防御に関与する(Osbourn, 1996; Trojanowska et al., 2000)。特定クラスのフラボノイドは、根におけるオーキシシン輸送や側根形成や病原感染応答に関与する(Brown et al., 2001; Grunewald et al., 2009; Wasson et al., 2009)。また、ヤグルマギク根からカテキンが放出されることが報告されており、他感作用の有無が議論されている(Blair et al., 2006; Perry et al., 2007; Duke et al., 2009)。カテキンやエピカテキンなどのフラバン-3-オール類の重合体であるプロアントシアニジン(PA)は、種皮や果皮、樹皮といった地上部表層組織に主に集積する(Xie and Dixon, 2005)。PAは細胞内の抗酸化、動物からの摂食抑制、病原菌の侵入防御などの応答に際して重要な役割を果たす(Xie and Dixon, 2005; Barbehenn and Constabel, 2011)。最近、根におけるPAやフラバン-3-オール類の集積が木本植物であるクスノキやバラ科の果樹などの網羅的な解析から報告されている(Osawa et al., 2011; Hoffmann et al., 2012)。しかしながら、根におけるPAの集積や放出特性の詳細や、それらを介した他の生物との相互作用については不明である。

I-4 酸性土壌のアルミニウム毒性と耐性

世界の耕作可能陸地のおよそ30%を占める酸性土壌は、熱帯・亜熱帯域に主に分布する。酸性土壌において植物の成長を制限する最大の因子の一つとしてアルミニウム(Al)過剰がある。低い土壌pHによって土壌中に溶出するAlイオン(Al^{3+})が根の伸長を短時間で阻害するため、長期的な生育低下や枯死をもたらす(Kinraide et al. 1992; Kochian, 1995)。一年生作物を用いた研究により、1-10 μM 程度の低濃度のAlイオンが根端の細胞伸長域に集積

して数時間以内に根伸長を阻害することが判明している(Ryan et al. 1993; Sivaguru and Horst, 1998)。これらの Al の大部分は表皮や外皮層に局在する(間藤ら、2010)。オクラ上胚軸では、主に表皮に Al が集積し、表皮細胞の伸長を阻害する(Ma et al., 1999)。イネの外皮欠失変異株の解析から、イネの Al 毒性への抵抗性を増大させる要因としての外皮や根端特異的な物理的障壁による機能的役割が示唆されている(Huang et al., 2009)。

低濃度の Al により短時間で生じる根の障害発現は植物種や品種、系統間で大きく異なり、それらの耐性差を規定する要因の一つは、根端から Al に応答して放出される有機酸である(Ryan et al., 2001)。クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸などのカルボン酸は主に根端から放出され、根伸長域の Al 集積を抑制する一方、根圏の Al イオンとキレート結合してその毒性を低める(Ma et al., 2001)。

根端分裂組織の最外層に位置する境界細胞は、毒性 Al イオンによる衝撃の最初の受容部位となる。これまでに、コムギ境界細胞による根の Al 侵入抑制への寄与(Zhu et al., 2003)や、サイインゲン境界細胞のムシゲル産生の増大(Miyasaka and Hawes, 2001)から Al 毒性を緩和する可能性が考慮されている。しかしながら、単体で脱落する特性やムシゲル自体が Al 耐性の増大に直接関与しないため、境界細胞による Al 耐性について不明な点が多い。

I-5 木本植物根の強力なアルミニウム耐性

木本植物の中には、一年生作物の根の伸長が阻害される Al 濃度の数十から数百倍以上の高濃度に対しても根伸長阻害の小さい種が存在する。マメ科樹木の *Paraserianthes falcataria* と比べて *Acacia mangium* は、極めて少ないクエン酸放出で同等以上の高い Al 耐性を示す(Osawa and Kojima, 2006)。同様に、フトモモ科樹木の *Melaleuca cajuputi* や *Eucalyptus camaldulensis* の高い Al 耐性は、根端から放出される有機酸量では説明できない(Tahara et al., 2005)。クスノキは根端からの少ない有機酸放出にも関わらず、プロアントシアニジン(PA)を集積する根端の表皮様の細胞層の関与を通じて、高濃度の Al 存在下で根の伸長を維持する(Osawa et al., 2011)。しかし、木本植物種におけるこれらの有機酸放

出非依存性の強力な Al 耐性と関連した根端の形態形成や生理特性の詳細は不明な点を多く残す。

I-6 *Acacia mangium* の環境適性

熱帯産マメ科樹木の *Acacia mangium* Willd. は、オーストラリアのクイーンズランド州北部に原生分布を有する一方、東南アジアを中心に熱帯地域でパルプ・紙生産や緑化目的に造林される主要樹種の一つである(熱帯植物研究会, 1984; Doran et al., 1997)。この樹種は早生樹としての成長特性を持ち、土壤の高温に対する耐性を有するとともに、貧栄養砂質土壤や強酸性土壤でも比較的良好な成長を示す(Duguma et al., 1994; 小島ら, 1998; Norisada et al., 2005; 毛塚, 2007)。熱帯地域では強度の乾湿の季節性、森林火災、車両等の林業機械による伐採作業などに起因した堅密土壤の障害が多数報告されている(Kozlowski, 1999)。一方、*A. mangium* 実生苗の成長は容積密度 1.6 g/cm^3 の極めて堅密な土壤に対しても比較的抑制されない(Jusoff, 1991)。これらの成長特性は *A. mangium* 根端が多重のストレス耐性を保持する可能性を支持するが、それらの耐性機構や機能についてほぼ未調査の状態にある。水耕栽培条件で行われたマメ科樹木種の Al 耐性比較の際、数ミリ程度のサイズを有する鞘状の組織が *A. mangium* の根端全体を覆った後に脱落する現象を繰り返すことが見出されている(Osawa ら, 未発表)。この鞘状の組織は、*A. mangium* の根の伸長域を含む領域から脱落し、根端保護にさまざまな役割を持つ境界細胞や境界様細胞との関連性が推測されることから、*A. mangium* のストレス耐性機構にかかわる特性である可能性がある。

I-7 本論文の目的と構成

本論文では、不適土壤環境における木本植物根の成長特性の解明を目的として、*A. mangium* の根端から離脱する細胞組織や集積物質の動態に着目した組織化学的・細胞学的解析を行った。さらに、これらの動態が病原微生物侵入や他感作用などの生物間相互作用

や、根端表層を標的とする短期間の AI ストレスへの作用に関与するかについて、境界様細胞と集積物質にそれぞれ対照となるマメ科草本との比較解析から評価した。その結果、*A. mangium* の根の伸長に伴い、新奇の境界様細胞が側根冠からシート状構造を維持して離脱することが鞘状の組織構造形成の原因であることを明らかにした(II章)。*A. mangium* の根では PA が側根冠細胞層全体を中心とした根端表層に集積する一方、境界様細胞の離脱に伴って PA が根成熟域の根圏へ散布され滞留することを発見した(III章)。さらに、非 PA 集積性でかつ境界様細胞を生成しないダイズとの比較解析から、PA 集積する側根冠細胞の多層性や境界様細胞としてのシート状の剥離が、*A. mangium* 根端における AI 排除型の高い AI 耐性への関与を示すデータを獲得した一方、病原性微生物に対する抗菌効果は明確にできなかった(IV章)。これらの結果に基づき、特徴的な境界様細胞の離脱とこれらを介した PA の根圏輸送が *A. mangium* の根の伸長特性や多重のストレス耐性への潜在機能にどのような影響を及ぼすかについて総合的に考察した(V章)。

II 章

Acacia mangium 根冠の鞘状に発達する境界様細胞の特性

II-1 緒言

境界細胞とは、植物の根冠から離脱する細胞を指し、水に接した根から細胞単体で速やかに分散する特性を持っている(Hawes and Pueppke, 1986; Hawes et al., 2002)。これらの細胞は、離脱時に生活性を有していることが明らかになっており(Hawes and Pueppke, 1986)、根圏環境への植物による積極的な関与が示唆されている。具体的には、土壌微生物の誘引や忌避、アルミニウム(Al)毒性の緩和、根冠と土壌との物理的抵抗を減らすことが報告されている(Hawes et al., 2000; 2002)。しかし、境界細胞は離脱しやすいため、細胞の由来組織や離脱形態の詳細は分かっていない(Hawes and Lin, 1990)。

近年、シロイヌナズナといくつかのアブラナ科植物の根端で、複数の細胞がシート状に結合して離脱する細胞が見出され、境界様細胞と名付けられた(Vicré et al., 2005; Driouich et al., 2007; Driouich et al., 2010)。これらの境界様細胞は境界細胞と同様に生活性を有したまま離脱する(Vicré et al., 2005)。しかしながら、境界様細胞の根表面や根圏における動態や離脱元の機能との関連について未だほとんど明らかになっていない。その理由として、境界様細胞は根頂端で結合を残す場合があるが、容易に離脱することや大きさが 500 μm 程度と 1 mm に満たないことから、その動態を捉えることが困難であることが挙げられる。

一方で、マメ科樹木の *Acacia mangium* の水耕苗では、シロイヌナズナの境界様細胞に類似するが、数ミリ程度の大きさの鞘状の組織が根端全体を覆うことが分かっている。木本植物の根における境界細胞ならびに境界様細胞についての知見はほとんどない。また、これまでに境界様細胞はアブラナ科の植物でのみ報告されており、これらは閉鎖型の根端分裂組織を持つ種である(Wenzel and Rost, 2001)。開放型のマメ科植物で境界様細胞はこ

れまで報告されていない。*A. mangium* のこの組織が境界様細胞であるのか、根のどの細胞に由来するのか、どのような機能を持っているのかは分かっていない。そこで本章では、*A. mangium* の鞘状組織を構成する一単位を「鞘状組織片」（鞘状組織片の集合体が鞘状組織）と呼び、*A. mangium* の鞘状組織片の離脱とその特徴について組織化学的な解析を行った。それらの結果をふまえて、*A. mangium* の鞘状組織がどの根端組織に由来するのかや境界様細胞であるか否かということについて議論を行った。

II-2 材料と方法

II-2-1 *A. mangium* の鞘状組織の形成の解析

II-2-1-1 植物材料と栽培条件

A. mangium (ブルネイ産および産地不明)の種子を用いた。産地不明の *A. mangium* 種子の発芽率と根の伸長速度は、ブルネイ産と同程度であることを確認している。

硬殻の種皮を破って吸水を開始させるために、*A. mangium* の種子を脱イオン水で洗浄後、100℃の熱水に1分間浸した(Doran, 1997)。種子を0.1% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウムに20分間浸して表面滅菌し、流水に一晩浸した。その後、種子はパーミキュライト土壌に播種して2~3ヵ月間、1/5強度のホーグランド溶液 (pH 4.5)で育成した。そして、同じ組成の培養液を用いて水耕苗を育成した。明期14時間/暗期10時間サイクルに設定した28℃ (明期、光量 150 μm^2 PPFD)、22℃ (暗期)の室内で栽培した。

根の長さが15 cm前後の苗を実験に供した。根端での鞘状組織片と境界細胞の生成過程を調べるために、実験前に水耕苗の根を湿らせた2枚の化学繊維濾紙(Grade T-240、Advantec Toyo、東京)の間に通して、根端に付着する鞘状組織片や境界細胞を人為的に取り除いた。以後の *A. mangium* の水耕下での実験には、0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)を培養液として用いた。

II-2-1-2 処理と解析方法

鞘状組織片を可視化するために、*A. mangium* の鞘状組織片を0.1% (w/v) サフラニンO溶液に10分間浸して染色した。染色後、0.5 mM 塩化カルシウム溶液で3回洗浄し、光学顕微鏡(BX51、オリンパス、東京)下で観察した。鞘状組織片の細胞間結合にリグニンなどの二次代謝物質が関与する可能性を調べるために、鞘状組織片の自家蛍光を330 nm と 385 nm の波長で励起させ、蛍光顕微鏡 (BX51、オリンパス、東京) 下で観察した。

鞘状組織片の剥離と根の伸長との関連を調べるため、生育温度を下げることによって根

の伸長を抑制する実験(低温処理)を行った。*A. mangium* の水耕苗を 18、21、25°C に設定した植物育成チャンバーで 24 時間水耕栽培した。根の長さは定規で測定した。また、根から剥がれて根端に集積する鞘状組織片の量を数値化するために、処理前後の根頂端から 1 cm 程度を切除し、根端を光学顕微鏡(BX51、オリンパス、東京)下で撮影した。顕微鏡画像を用いて、根頂端から 2 mm までの全投影面積と根本体の投影面積を画像解析ソフト WinRHIZO (RÉGENT Instruments Inc., Québec city, Canada)で測定した。全投影面積から根本体の投影面積を引いた値を、根端周囲に集積した鞘状組織片の面積とした。

鞘状組織片の剥離と根との付着部位を調べるために、根頂端から異なる長さを切除する実験(根端切除処理)を行った。*A. mangium* の水耕苗の根端から鞘状組織片を取り除いた後、実体顕微鏡(SZ-PT、オリンパス、東京)下で根頂端から 0.5、1.0、1.5 mm までを外科用メス(Futaba、東京)で切除した。未切除を対照として比較した。24 時間後と 48 時間後に、根の長さを定規で測定した後、根頂端から 5 mm までを実体顕微鏡下で撮影した(Coolpix 4500、Nikon、東京)。24 時間目と 48 時間目の根端周囲に集積した鞘状組織片の面積は、上記と同様の方法で求めた。

II-2-2 *A. mangium* とダイズの根端における菌類の確認

II-2-2-1 植物材料と栽培条件

「II-2-1-1」と同様の *A. mangium* と、ダイズ(品種：北海早生枝豆および早生白鳥枝豆)の種子を用いた。ダイズは境界細胞を生成する代表的な一年生マメ科作物である(Hawes and Pueppke, 1986)。

無菌の実生苗を育成するために、*A. mangium* の種子を脱イオン水で洗浄後、100°C の熱水に 1 分間浸し、吸水を開始させた。その後、種子を 0.1 % (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 20 分間浸し、滅菌水で 3 回洗った後、オートクレーブで滅菌した濾紙上に播いた。一方、ダイズの種子は脱イオン水ですすいだ後、70 % (v/v) エタノールに 1 分間浸した。その後、種子を 0.5 % (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 20 分間浸した後、滅菌水で種子を 3

回洗った。ダイズの種子が吸水する際に、急激な水の浸入により種子組織が物理的に破壊されるのを防ぐために、滅菌した 30 % (w/v) ポリエチレングリコール 6000(PEG)溶液に種子を一晩浸し、ゆっくりと吸水させた(中山ら, 2005)。その後、滅菌水で 3 回洗い、オートクレーブで滅菌した Agripot (キリンビール、東京)内のパーライトに播種した。両種とも 25°C に設定した暗黒下の室内で発芽させた。

II-2-2-2 処理と解析方法

播種後 4-5 日目の *A. mangium* と、播種後 2 日目のダイズを用いた。鞘状組織片の細胞間結合への菌類の関与を調べるために、*A. mangium* とダイズの幼根端、およびコツブタケを感染させたクロマツの菌根を含む根を Phillips and Hayman (1970)の方法を一部改変して、真菌を染色するラクトフェノールコットンブルー溶液(武藤化学、東京)で菌類の有無を確認した。前処理として、*A. mangium* とダイズの根端およびクロマツの菌根を、100°C の 10 % 水酸化カリウム水溶液で最長 20 分間加熱した後、純水で 3 回洗って透明化した。*A. mangium* の根端とクロマツの菌根をさらに漂白するために、10 % 過酸化水素水に浸漬して 100°C で最長 30 分間加熱した後、純水で 3 回洗った。漂白後、根端および菌根をラクトフェノールコットンブルー溶液に浸漬し、100°C で 10 分間加熱した後、ラクトグリセロール溶液(純水 : 乳酸 : グリセリン=1 : 1 : 1 v/v)で 2 回脱染色した。スライドガラス上に置いた根端にラクトグリセロール溶液を滴下し、カバーガラスをかけて光学顕微鏡(BX51、オリンパス、東京)下で観察した。

II-2-3 *A. mangium* の鞘状組織とダイズの境界細胞の形成部位と生活性の観察

II-2-3-1 植物材料と栽培条件

「II-2-1-1」および「II-2-2-1」と同様の *A. mangium* とダイズの種子を用いた。*A. mangium* の播種方法は、「II-2-1-1」と同様である。ダイズの種子を 30 % (w/v) PEG 溶液に 12 時間浸した後、種子の PEG 溶液を流水で十分に洗い流し、脱イオン水で湿らせた珪

砂に播種した。栽培条件は「II-2-1-1」と同様である。播種後 5 日目のダイズの実生苗を 0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)を用いて水耕栽培した。

II-2-3-2 処理と解析方法

根の伸長域を調べるために、*A. mangium* とダイズの根頂端から 5.0 mm 基部側までの表面に、根頂端から 0.5 mm 間隔で毛先の細い筆を用いてインディアンインクで印を付けた。0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)中で *A. mangium* を 24 時間、ダイズを 8 時間水耕栽培した。水耕栽培開始時と終了時に、印を付けた根端を実体顕微鏡下で撮影し(Coolpix 4500、Nikon、東京)、印間の長さを定規で測定した。処理開始時の各印間の長さを終了時の各印間の長さから引いて、処理中の各印間の伸長量とした。

根端の組織学的解析のため、*A. mangium* およびダイズの根頂端から 1 cm を切り取り、FAA 溶液(酢酸：ホルムアルデヒド水溶液：エタノール：純水=1：1：18：20 v/v)に 1 日以上浸して固定した。その後 50、70、90、99.5、100 % (v/v)のエタノール溶液に根端を順次浸して脱水した後、テクノビット 7100(Heraeus Kulzer、Hanau、Germany)で包埋した。包埋した根端を伸長方向と平行になるようにロータリーマイクロトーム(RM2145、Leica、Wetzlar、Germany)で 5 μm の厚さに薄切し、水面上で伸展させた後にスライドガラス上に載せ、50°Cのサーモプレート上で完全に乾燥させた。薄切片に 0.1% (w/v)トルイジンブルーO (TBO)溶液を滴下し、10 分間染色した後、染色液を純水で洗い流してから光学顕微鏡(BX51、オリンパス、東京)下で観察した。

鞘状組織片と境界細胞の生細胞を可視化するために、Ishikawa and Wagatsuma (1998)の方法を一部改変して、*A. mangium* とダイズの根を二酢酸フルオレセイン(FDA)溶液で染色した。FDA は無蛍光であるが、細胞内のエステラーゼによって加水分解されると蛍光性のフルオレセインに変換されることから、生細胞染色に利用される物質である(Rotman and Papermaster, 1966; Persidsky and Baillie, 1977)。まず、FDA を 5 mg ml⁻¹になるようにアセトンに溶解し、沈殿を防ぐために、使用直前に FDA の最終濃度が 12.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ になる

ように 0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)で調製した(これを FDA 溶液とする)。 *A. mangium* とダイズの根を根頂端から約 3 cm 切り取り、FDA 溶液に 10 分間浸した後、0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)中で 1 分間洗い、蛍光顕微鏡(BX51、オリンパス、東京、ダイクロイックミラー：505 nm、励起フィルター：470-495 nm、吸収フィルター：510-550 nm)下で観察し、CCD カメラ(DP71、オリンパス、東京)で撮影した。また、鞘状組織片の根部位別の分布の詳細を調べるために、FDA 染色した *A. mangium* 根端の画像を用いて、根端から求頂的または求基的に剥離する鞘状組織片が根端と接する数を、根端から 1 mm 間隔で 4 mm 基部側まで数えた。

II-2-4 *A. mangium* とダイズの鞘状組織片および境界細胞の細胞数の計測

II-2-4-1 植物材料と栽培条件

「II-2-1-1」および「II-2-2-1」と同じ *A. mangium* とダイズの種子を用いた。*A. mangium* の種子を脱イオン水で洗浄後、100°Cの熱水に 1 分間浸した(Doran, 1997)。その後、種子を 0.1% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウムに 20 分間浸して表面滅菌し、流水に一晩浸した。ダイズの種子を 30 % (w/v) ポリエチレングリコール 6000(PEG)溶液に 12 時間浸した後、種子の PEG 溶液を流水で十分に洗い流した。*A. mangium* とダイズの種子をそれぞれ 0.5 % (w/v) 寒天培地に敷いた濾紙(No. 2、Advantec Toyo、東京)上に播き、25°Cの暗黒下で発芽させた。

II-2-4-2 処理と解析方法

根端の部位別に、鞘状組織片および境界細胞の細胞数と集合パターンを調べるために、*A. mangium* とダイズの幼根端から離脱する細胞を回収した(Hawes and Pueppke, 1986)。細胞を効率的に回収するために、*A. mangium* は播種後 4-5 日目、ダイズは播種後 2 日目の、根端が濾紙に接していない幼根を用いた。

根端から離脱する細胞を観察するために、スライドガラス上に置いた *A. mangium* また

はダイズの根端を光学顕微鏡下に設置し、0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)を滴下直後から連続撮影した。*A. mangium* の根端表面に付着した鞘状組織片を切り離すため、0.5 mM 塩化カルシウム溶液に根端を浸す前に、根頂端から 0-1 mm、1-3 mm をメスで切除し、スライドガラス上に置き、20 μ l の 0.5 mM 塩化カルシウム溶液を滴下した。ダイズの幼根も、*A. mangium* と同様の部位で切除し、切除根に 50 μ l の 0.5 mM 塩化カルシウム溶液を滴下した。両種の根端から細胞を落とすために、溶液をピペットマン(Gilson、Middleton、WI)で出し入れしながらかき混ぜた。*A. mangium* の根頂端から 0-1 mm およびダイズの 0-1 mm、1-3 mm から離脱した細胞を含む溶液のうち、5 μ l 中に含まれる細胞数を光学顕微鏡下で直接計測し、全溶液中に離脱した細胞数を概算した。このとき、*A. mangium* の 4 個以上連続した細胞を鞘状組織片とし、それ以外を境界細胞とした。区分した細胞が、それぞれの根端部位の全細胞数に占める割合を求めた。

A. mangium の根頂端 1-3 mm からは溶液中に完全に外れ落ちず、根表面に残る鞘状組織片が存在した。これらを根表面から剃刀で切り取り、光学顕微鏡下で観察し、撮影した。全ての鞘状組織片を根表面から切り取れなかったことから、観察できた一部の鞘状組織片のうち、顕微鏡画像から無作為に選んだ 20 個の細胞の長径と短径の長さを測定し、細胞の平均面積を求めた。そして、根表面一周から 1 層の鞘状組織片が剥離するとして、根頂端から 1-3 mm の根表面積を細胞の平均面積の値で割り、離脱する細胞数を算出した。同部位の細胞数は、計算によって求めた細胞数と離脱した細胞数の合計とした。

II-2-5 摩擦条件下での *A. mangium* とダイズの細胞離脱と根冠の組織学的解析

II-2-5-1 植物材料と栽培条件

A. mangium とダイズの水耕苗を用いた。播種および水耕栽培の方法は、「II-2-1-1」および「II-2-3-1」と同様である。根が伸長する際に摩擦抵抗のかかる条件下での、鞘状組織片の剥離および境界細胞の離脱を調べるため、*A. mangium* とダイズをバーミキュライト土壌(バーミキュライト区)、または湿らせた濾紙間に地下部をはさんで栽培した(濾紙区)。濾

紙間での栽培のために、透明のプラスチックケース(高さ 206 mm, 幅 144 mm, 奥行き 30 mm)に支持体および加湿用としてポリウレタンフォームを入れ、根箱栽培を行った(図 II-1 A-C)。ケース上面に穴を 2 つ開け、1 箱につき 2 本の苗が成長できるようにした。ケース底面にも穴を開け、水分の供給が行われるようにした。

II-2-5-2 処理と解析方法

濾紙区の根の伸長量は、プラスチックケースの上から定規で直接計測した。根冠の組織学的解析および根端の生活性の観察方法は、「II-2-3-2」と同様である。

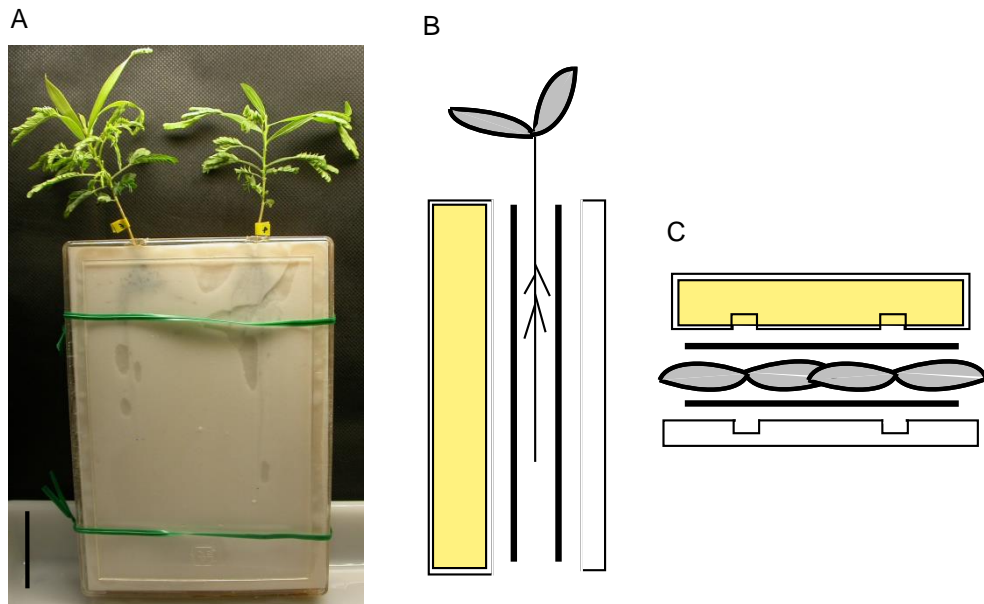


図 II-1 根箱の栽培

(A) 2本の *A. mangium* の実生苗をセットした根箱栽培。スケールバーは5 cmを示す。(B, C) 根箱栽培を模式化し、横からと上から見た図。植物体の地下部を挟む黒い太線はろ紙を、黄色い長方形は加湿用のポリウレタンフォームを表す。

II-3 結果

II-3-1 鞘状組織の形成

水耕条件下において、*A. mangium* の根端に最大 5 mm 程度基部側まで覆う鞘状組織が形成された(図 II-2A, B)。鞘状組織を外すと、1 日後に新たに生成された繊維状の鞘状組織片が剥がれ始めた(図 II-2C)。日数の増加とともに根端を覆う鞘状組織が大きくなり、7 日後には元の大きさの鞘状組織が形成された(図 II-2C)。一方、水耕条件下のダイズでは、7 日後も根端 0.1 mm 付近に限ってわずかな細胞群の付着が確認されただけだった(図 II-2D)。*A. mangium* の鞘状組織のサフラニン O 染色により、根端から 2 mm の部位から剥がれた鞘状組織片には、長軸が 100 μm より長い細胞が存在し、細胞はブロック塀状に配列していることが分かった(図 II-2E)。シート状の構造を示した鞘状組織片は、根の長軸と平行に裂けていた(図 II-2E)。鞘状組織片の細胞間、特に細胞の短軸で強い自家蛍光が観察された(図 II-2F)。

A. mangium の根端から鞘状組織を取り外し、24 時間の低温処理を行ったとき、根端に集積した鞘状組織片の投影面積は温度によって有意差はなかったが、25°C(対照)に比べ 21、18°Cでそれぞれ減少傾向を示した(図 II-3A, B)。さらに、根の伸長量は 21、18°Cでそれぞれ対照に比べ 42%、65%小さく、温度が低いほど有意に抑制された(図 II-3C)。根の伸長が遅いほど、根端での鞘状組織片の剥離が減少する傾向があった。

根端切除処理において、鞘状組織を取り外してから 24 時間後に、根端に集積した鞘状組織片の投影面積は、根頂端から 0.5、1.0 mm を切除しても対照と差がなかった(図 II-4A, B)。1.5 mm を切除すると対照に比べ 40%に抑制されたが、有意差はなかった(図 II-4A, B)。48 時間後の鞘状組織片の投影面積は、対照と根頂端から 0.5 mm の切除根で同程度だったが、1.0、1.5 mm の切除根でいずれも 20%以下であり、24 時間後よりも有意に小さかった(図 II-4A, B)。0-24 時間の根の伸長量は、対照と根頂端から 0.5 mm の切除根で同程度だったが、1.0、1.5 mm を切除すると、それぞれ対照の 68%と 25%に抑制された(図 II-4C)。そ

の後も、0.5 mm を切除した根の伸長量は対照と同程度だったが、1.0 、1.5 mm 切除した根は、48 時間までにいずれもほとんど伸長しなくなった(図 II -4C)。

II-3-2 鞘状組織と菌類の関連

クロマツの菌根をラクトフェノールコットンブルー溶液で染色すると、菌根表面に濃い青色に呈色した菌糸が認められた(図 II -5A-C)。無菌栽培した *A. mangium* の根端において、鞘状組織片が付着したが(図 II -5D)、ラクトフェノールコットンブルー溶液による染色で菌糸は認められなかった(図 II -5E, F)。同じく無菌栽培したダイズの根端で、鞘状組織片は認められず(図 II -5G)、菌糸も認められなかった(図 II -5H, I)。

II-3-3 鞘状組織片の生成部位と生活性

A. mangium の根の伸長域は、主に 0-2.5 mm の範囲で、1 mm 付近で伸長量が最も大きかった (図 II -6)。一方、ダイズの根の伸長域は 0.5-5.0 mm の範囲で、2.5 mm 付近で伸長量が最も大きかった(図 II -6)。

水耕栽培した *A. mangium* の根から鞘状組織を外した直後(0 時間、図 II -7A)と、48 時間後(図 II -7B)の根端を組織学的に調べた。0 時間に比べ、48 時間後に側根冠細胞表面の細胞層が、根伸長域の先端側と基部側の両方で剥離していた(図 II -7A, B)。側根冠細胞表面の細胞層はコルメラ先端部と接着していなかった(図 II -7B)。 *A. mangium* の根の表層部分に、TBO で青く染まる細胞層が常に複数層存在した (図 II -7A, B)。この呈色から細胞内にフェノール性物質が含まれることが考えられた。12 時間水耕栽培したダイズの側根冠細胞表面に、細胞層の集積は認められなかった(図 II -7C)。また、ダイズの根端に TBO 染色性の細胞層は認められなかった(図 II -7C)。 *A. mangium* の根頂端から 1 mm 部位の横断面の観察および 48 時間後の縦断面の観察により、側根冠細胞と鞘状組織片の呈色性が類似することが分かった (図 II -7B, 8A, B)。

FDA 染色により、鞘状組織を外して 6 時間後の *A. mangium* 根端で、生活性を持つ鞘状

組織片が剥離することが明らかになった(図 II-9A)。根端の投影面積は、蛍光下と明視野とで同程度だったことから、剥離した全ての鞘状組織片に生活性を持つ細胞が含まれることが分かった(図 II-9A)。生活性を持った鞘状組織片が、24 時間後も、6 時間後と同様に根端周囲に存在した(図 II-9A)。根端の明視野での投影面積は時間経過によって増加したが、蛍光下の投影面積は変らなかった(図 II-9A)。一方、ダイズにおいて、根周囲に付着した細胞を取り除いて 24 時間後に、生活性を持った細胞群が根頂端から 1 mm 領域に限って存在した(図 II-9A)。いずれの時間帯でも、ダイズの根端で鞘状組織片は確認されなかった(図 II-9A)。

A. mangium の鞘状組織片の剥離には、求基的と求頂的の 2 つのパターンが存在した(図 II-9B)。FDA 染色した *A. mangium* 根端の画像を用いて、それぞれの剥離パターンの鞘状組織片が根端と接する部位と数を調べた(図 II-9B)。求頂的な鞘状組織片は、鞘状組織を外してから 6 時間後と 24 時間後で根端から 4 mm までの領域で剥離した(図 II-9C)。一方、求基的な剥離は、根端から 1 mm に限られた(図 II-9D)。求基的に剥離した鞘状組織片の層数は、求頂的な剥離の 1/3 だった(図 II-9C, D)。

II-3-4 鞘状組織片と境界細胞の生成量と離脱部位

A. mangium の幼根端を塩化カルシウム溶液に浸して 90 秒後までに、根頂端から 1 mm 付近の根と接した繊維状の鞘状組織片が剥離した(図 II-10A-D)。一方、ダイズの根頂端 0-3 mm 部位で境界細胞が離脱し、鞘状組織片は剥離しなかった(図 II-10E-H)。

A. mangium の細胞の集合パターンの解析から、根頂端から 0-1 mm で境界細胞と鞘状組織片の両方がほぼ同数離脱したが、1-3 mm では鞘状組織片のみが剥離した(図 II-11A, D, E; 表 II-1)。ダイズでは境界細胞が離脱するとされるが(Hawes and Pueppke, 1986)、顕微鏡下で観察すると単体の境界細胞の他に(図 II-11C, G)、不定の接点で接した境界細胞も存在し、これらを集合細胞とした(図 II-11B, F)。ダイズの境界細胞または集合細胞は、根頂端 0-1 mm と 1-3 mm の両部位から離脱し(図 II-11B, C, F, G)、その比率は 0-1 mm (境界/集

合 ; 25/75 %)と 1-3 mm (境界/集合 ; 38/62 %)とで同程度であった(表 II-1)。

II-3-5 鞘状組織片と境界細胞のムシゲル

離脱細胞を覆うムシゲルを、インディアンインクを用いて可視化した。*A. mangium* の根頂端から 0-1 mm の境界細胞および鞘状組織片に比べ、根頂端から 1-3 mm の鞘状組織片のムシゲルは不明瞭だった(図 II-11H, K, L)。ダイズの境界細胞は、単体も集合体も同じようにムシゲルで覆われていた(図 II-11I, J, M, N)。

II-3-6 摩擦条件下での鞘状組織片の剥離

バーミキュライト区で 72 時間伸長した *A. mangium* 根端において、水耕条件下(水耕区)のように発達した鞘状組織は形成されなかった(図 II-12A)。バーミキュライト区または、濾紙区を 24 時間伸長した *A. mangium* の根端表面に、少なくとも 1 層の剥離した鞘状組織片が認められた(図 II-12B, C)。濾紙区における鞘状組織片の剥離形態は、水耕区と異なり(図 II-9B)、根頂端側から求根的に起こっていた(図 II-12C)。根での剥がれた鞘状組織片の存在パターンおよび数は、個々の根によって異なった(図 II-12D)。鞘状組織片には根頂端を覆って存在するもの、根の基部側に沿って存在するもの、根が貫通して基部側周囲を囲むように存在するものがあった(図 II-12D)。鞘状組織片の付着が弱い根では、根を水中に置いたときに鞘状組織片が遊離した(図 II-12D)。一方で、ダイズのいずれの根からも鞘状組織片は剥離しなかった(図 II-13A, B)。

鞘状組織片あるいは境界細胞の離脱形態の違いが、根の伸長と根端組織の発達に与える影響を調べるために、異なる栽培条件における根の伸長速度と、根冠のコルメラの長さと同側根冠細胞層の数を計測し、*A. mangium* とダイズにおいてそれぞれの栽培条件間で比較した。根の伸長速度は、*A. mangium* とダイズともに、濾紙区で水耕区よりも速かった(表 II-2)。水耕区に対する濾紙区での根の伸長速度の割合(増加率)は、*A. mangium* で 207 %、ダイズで 143 %だった(表 II-2)。側根冠細胞層の数は、*A. mangium* の静止中心から 0、1 mm に

において濾紙区より水耕区で有意に多かった(表Ⅱ-3)。また、静止中心から根頂端までのコルメラの長さは、水耕区($923\pm 54\ \mu\text{m}$)で濾紙区($724\pm 48\ \mu\text{m}$)よりも有意に長かった(表Ⅱ-3)。一方、ダイズの側根冠細胞層の数は、水耕区と濾紙区で同程度だった(表Ⅱ-3)。そして、コルメラの長さは、濾紙区($585\pm 22\ \mu\text{m}$)で水耕区($472\pm 40\ \mu\text{m}$)よりも有意に長かった(表Ⅱ-3)。*A. mangium*の側根冠細胞層の数は、濾紙区を伸長した根において、静止中心から0 mmの部位でダイズより多かったが、有意差はなかった(表Ⅱ-3)。どちらの栽培区においても、*A. mangium*のコルメラの長さはダイズより有意に長かった(表Ⅱ-3)。また、濾紙区の根の静止中心から1-3 mm部位の側根冠細胞層の数は、*A. mangium*(3.7 ± 0.6 から 1.3 ± 0.6)とダイズ(3.5 ± 0.5 から 1.3 ± 0.5)で同程度だった(表Ⅱ-3)。

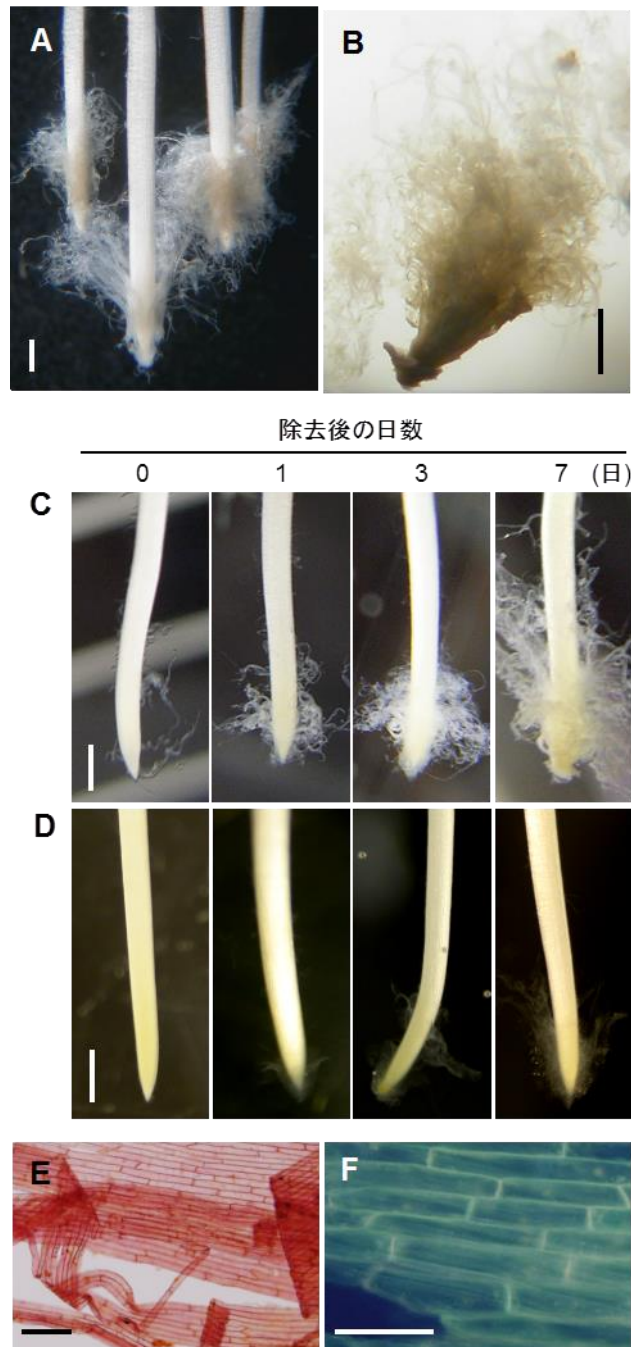


図 II -2 根端に集積する *Acacia mangium* の境界様細胞とダイズの境界細胞

(A) 鞘状組織に覆われた *A. mangium* の根端。0.5 mM 塩化カルシウム溶液中で、鞘状組織を外してから 7 日目の主根に発達した鞘状組織を示す。(B) 根端から外れ落ちた鞘状組織。(C, D) 鞘状に発達する境界様細胞の経時変化。始めに根端を覆う鞘状組織を取り除いてから 0, 1, 3, 7 日目の *A. mangium* (C) とダイズ(D) の根を示す。(E) 根頂端から 2 mm の部位から剥離した境界様細胞の明視野像。細胞はサフラニン O で染色した。(F) 根頂端から 2 mm の部位から剥離した境界様細胞の自家蛍光像。スケールバーは、1 mm(A-D); 100 μ m(E); 50 μ m(F) を表す。

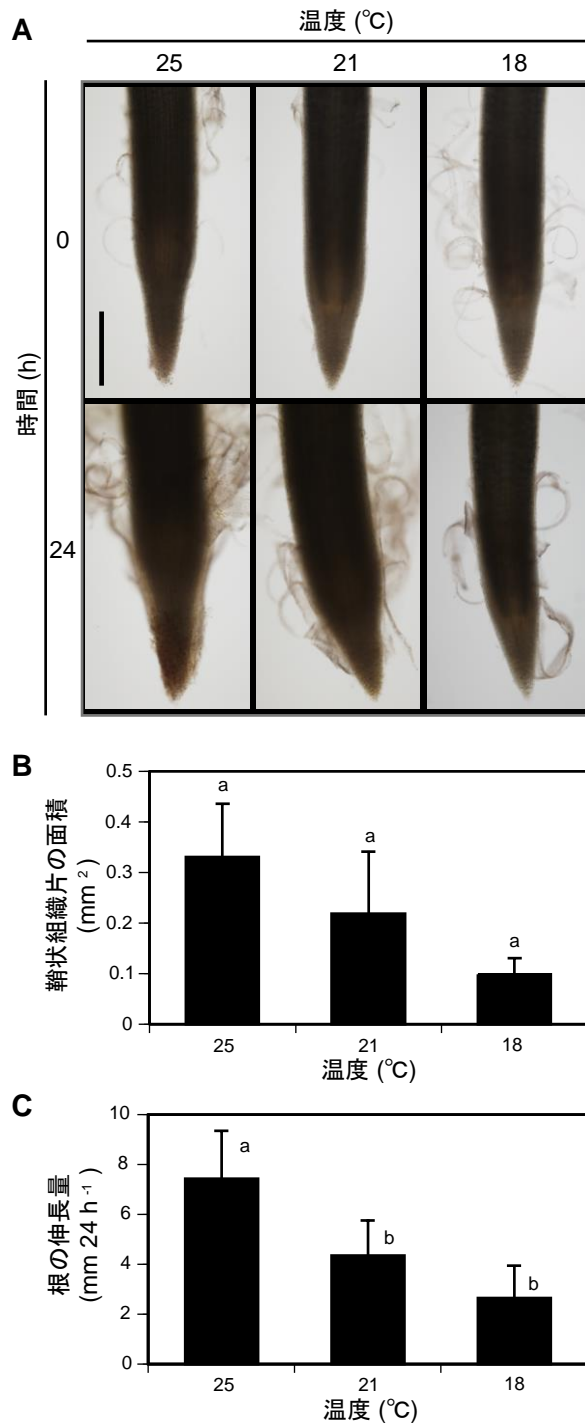


図 II-3 低温での栽培による *A. mangium* 根からの鞘状組織片の剥離の減少

(A) 25、21、18°Cにおいて、根を覆っていた鞘状組織を取り除いてから0時間(上段)、24時間(下段)後の根端から剥離した鞘状組織片の明視野像。スケールバーは500 μmを表す。(B) 低温処理の前後に明視野像の投影面積をWinRHIZOで測定し、処理中に増加した鞘状組織片の面積を示す。(C) 異なる温度において24時間での根の伸長量を示す。グラフの棒は平均値±標準偏差を表す(B; n=3, C; n=7)。異なるアルファベットは $P < 0.05$ で根の伸長量に有意差があることを示す(テューキーの方法)。

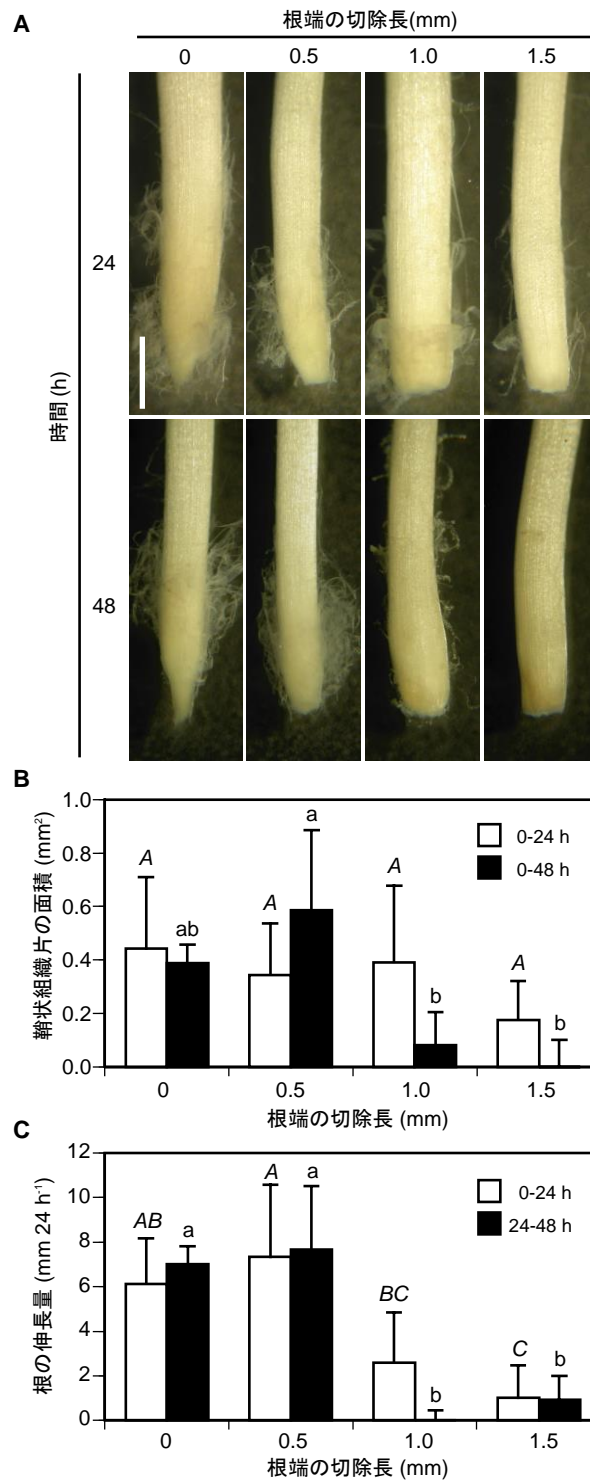
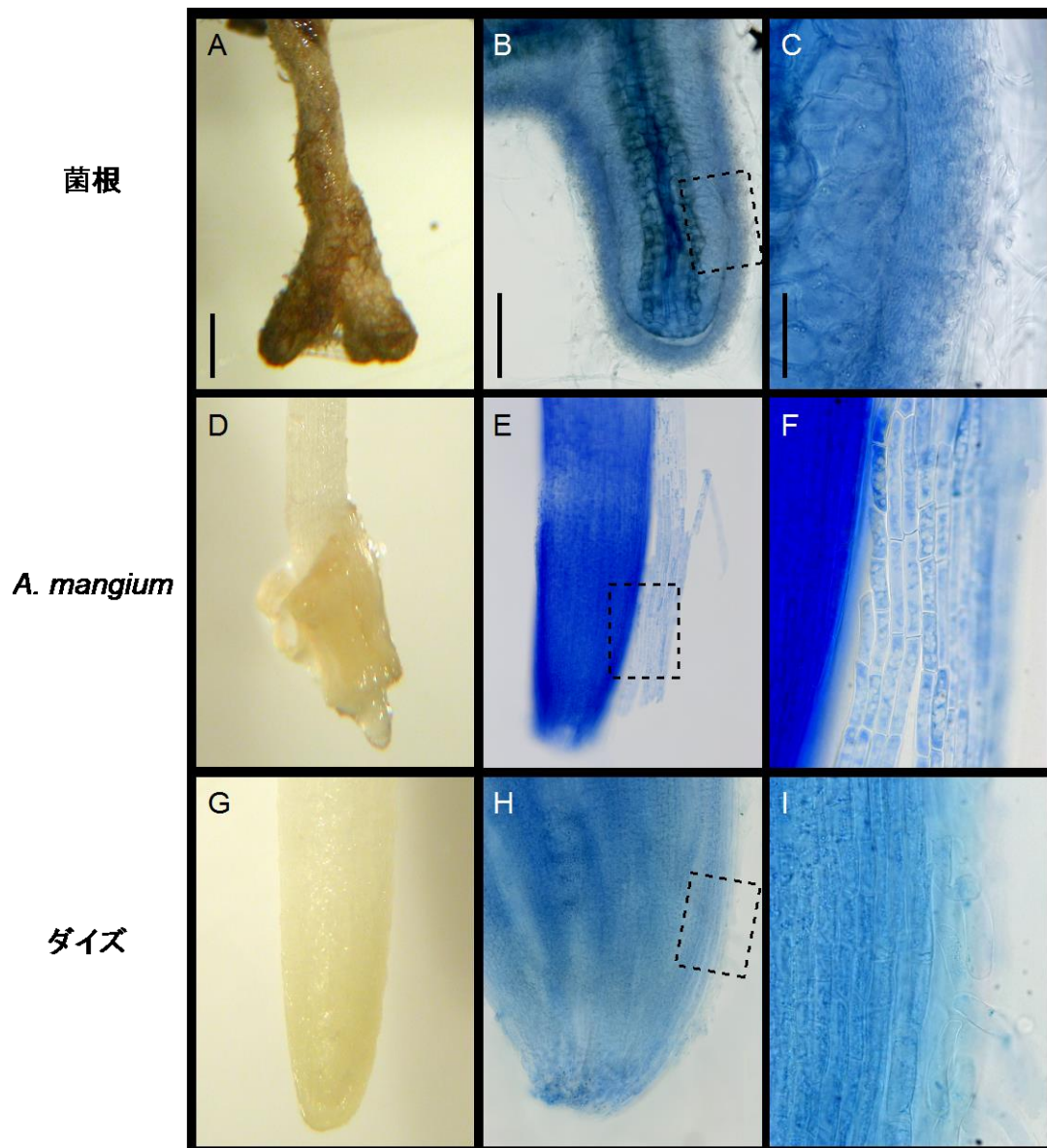


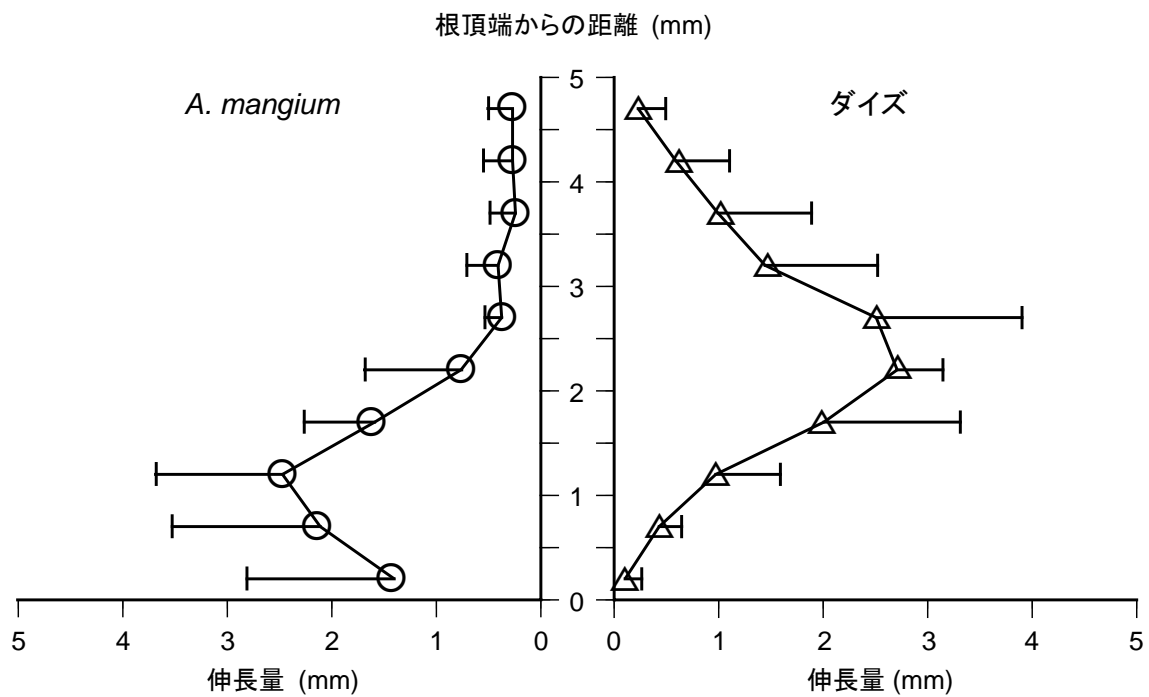
図 II-4 *A. mangium* の根端を除去したときの鞘状組織片の剥離と集積

(A) 根端から 0, 0.5, 1.0, 1.5 mm を切り取った後に剥離した鞘状組織片の根への集積状況。鞘状組織を取り除き、根端を切除して 24 時間後(上)と 48 時間後(下)の根の実体顕微鏡画像を示す。スケールバーは 1 mm を表す。(B) 剥離した鞘状組織片の根外の投影面積を定量した。根端切除期間中、実体顕微鏡画像内で 0-24 時間(白)と 0-48 時間(黒)に増加した面積を WinRHIZO で数値化した。(C) 根端切除後の根の伸長量。切除後 0-24 時間(白)と 24-48 時間(黒)の根長の増加量を示す。グラフの値は平均±標準偏差を表す(B; n=3, C; n=3-7)。異なるアルファベットは、 $P < 0.05$ で鞘状組織片の面積および根の伸長量に有意差があることを示す(テューキーの方法)。



図Ⅱ-5 ラクトフェノールコットンブルーによる菌糸の染色

Pisolithus tinctorius を接種したクロマツの菌根(A-C)、*A. mangium*(D-F)、ダイズ(G-I)を示す。各種の根端をラクトフェノールコットンブルー染色した光学顕微鏡像[100倍; B, E, H 100倍像内の破線部の拡大(400倍); C, F, I]。スケールバーは500 μm (A)、200 μm (B)、50 μm (C)を表す。



図Ⅱ-6 *A. mangium* とダイズの根伸長域

根端 0-5 mm までの根表面に、0.5 mm 幅にインディアンインクで付け、0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)中で *A. mangium* を 24 時間、ダイズを 8 時間水耕栽培したときの根の各部位の伸長量を表す。シンボルは平均値と、誤差棒は標準偏差を表す。(*A. mangium*; n=6-7, ダイズ; n=5)

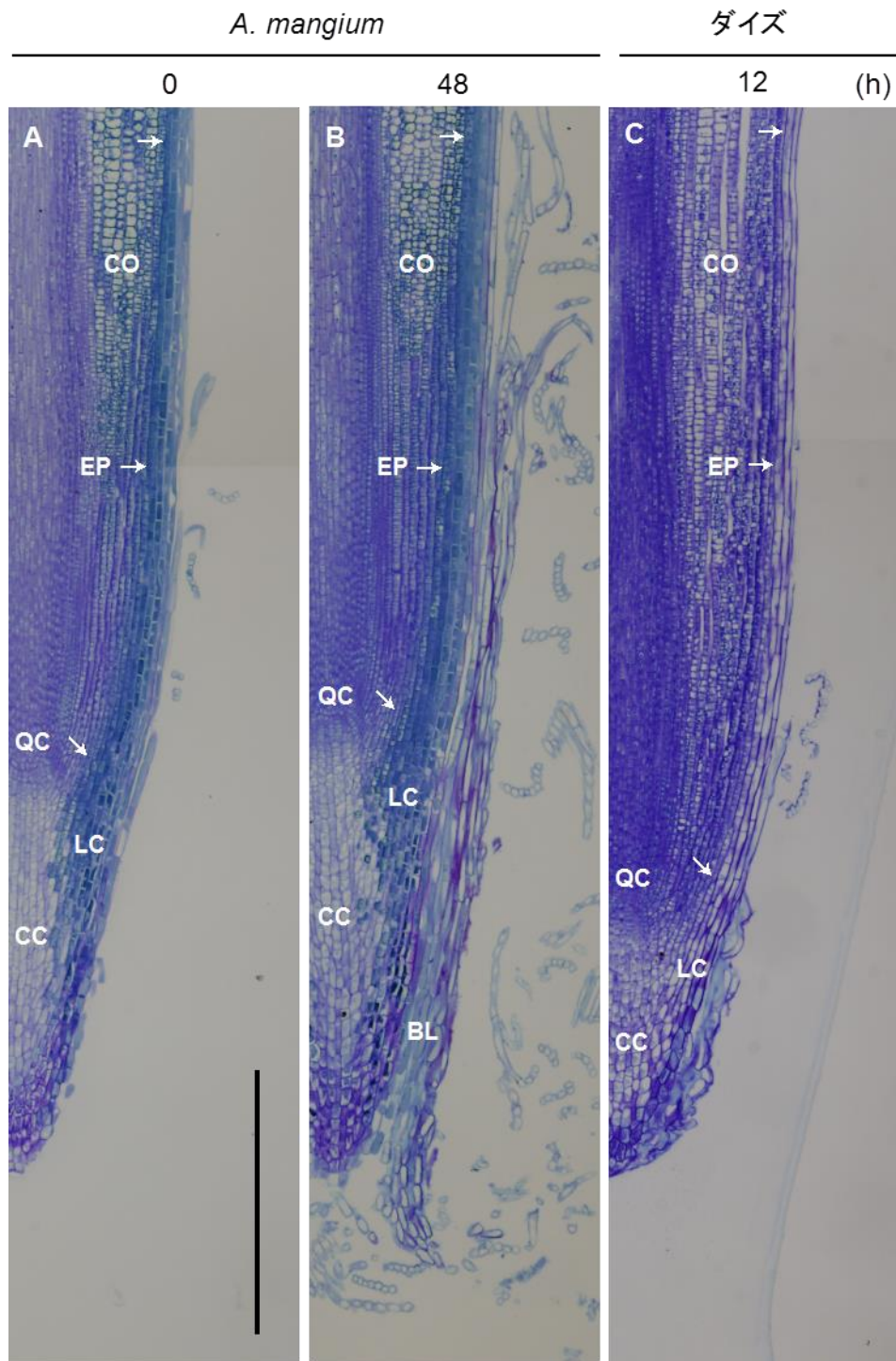
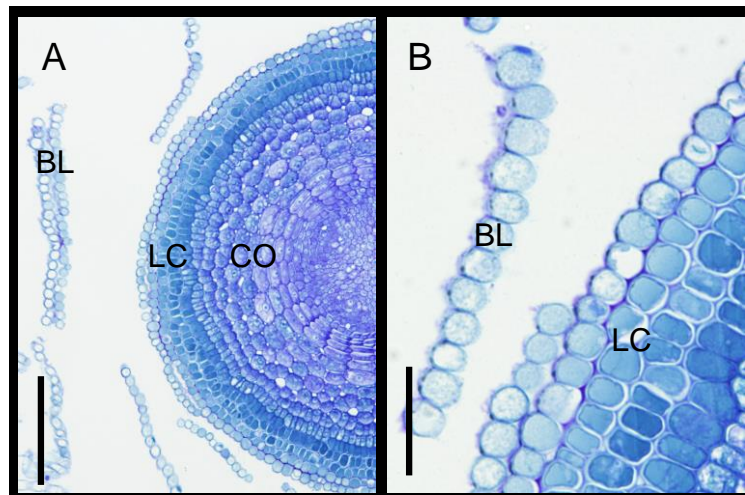


図 II-7 *A. mangium* の側根冠細胞における鞘状組織片の形成

(A-C) *A. mangium*(A, B)またはダイズ(C)の根の縦断面。 *A. mangium* の根を覆った鞘状組織を外した直後(A)、水耕栽培して 48 時間後(B)の根端。ダイズの根端に付着する境界細胞を除去し、水耕栽培して 12 時間後の根端(C)。切除根の縦断切片をトルイジンブルー-O で染色した。BL: 鞘状組織片、CC: コルメラ根冠、CO: 皮層、EP(矢印): 表皮細胞、LC: 側根冠細胞、QC: 静止中心 スケールバーは 500 μ m を表す。



図Ⅱ-8 *A. mangium* の根との付着部位の鞘状組織片と側根冠細胞に集積するフェノール性物質

(A, B) 根頂端から 1 mm 基部側の横断面。切片は 0.1 % (w/v) トルイジンブルー-O で染色した。BL: 鞘状組織片、CO: 皮層、LC: 側根冠細胞 スケールバーは (A) = 200 μm ; (B) = 50 μm を表す。

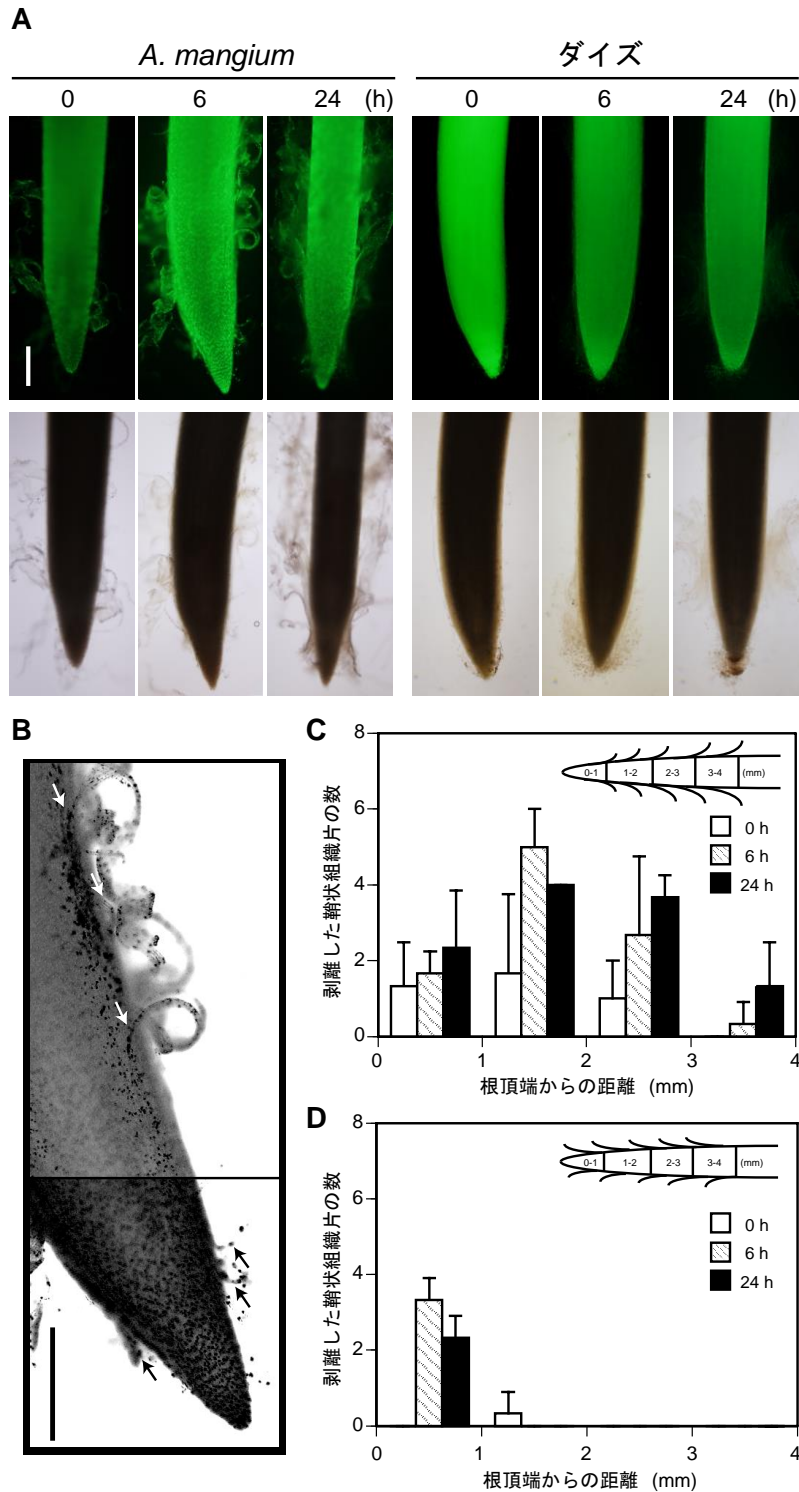


図 II -9 *A. mangium* の根の伸長域から剥離する側根冠細胞

(A) 根端から鞘状組織を取り除いた後の *A. mangium*(左列)とダイズ(右列)の根表面の経時変化。写真は、顕微鏡下の二酢酸フルオレセインで染色した根の蛍光像(上段)と明視野像(下段)を示す。(B) 根端から鞘状組織片の剥離を見やすくするために、*A. mangium* 根端の6時間後の蛍光像を白と黒の単色で図示し、拡大した。求頂的(白矢印)と求基的(黒矢印)に剥離する鞘状組織片と根表面との接点を示す。スケールバーは500 μm を表す。(C, D) *A. mangium* 根端から鞘を取り除いて0時間(白)、6時間(斜線)、24時間(黒)後の剥離した鞘状組織片と根表面の接点の空間分布。1 mm 間隔の区分内で剥離した求頂的(C)と求基的(D)な鞘状組織片の接点の数を、蛍光像をもとに数えた。棒グラフは平均値 \pm 標準偏差を表す($n=3$)。棒グラフのない時点は、各区分内のそれぞれの方向で剥離が起こっていなかったことを示す。

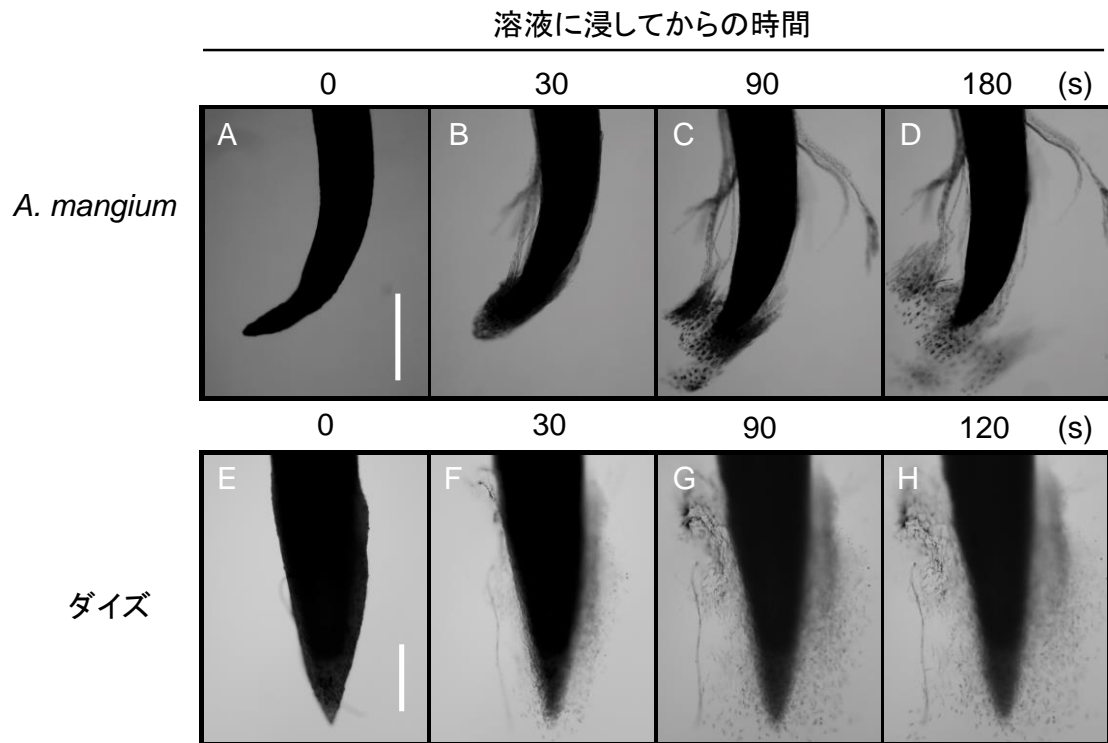


図 II-10 *A. mangium* とダイズの根端からの境界細胞と鞘状組織片の離脱

A. mangium(A-D)とダイズ(E-H)の根端から離脱する境界細胞と鞘状組織片の経時変化。播種後4日目の *A. mangium* と2日目のダイズの幼根を溶液に浸してから、それぞれに記した時間後の明視野像を示す。スケールバーは500 μm を表す。

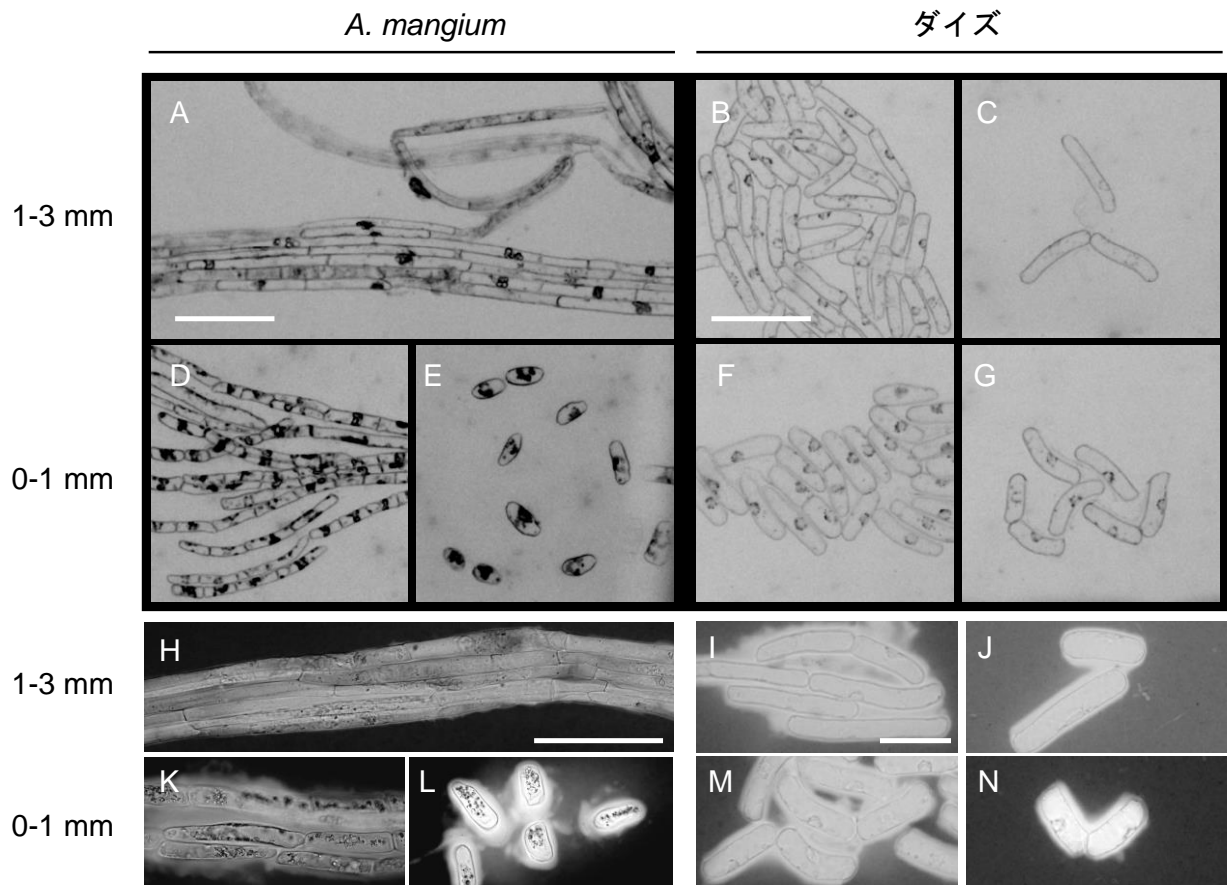


図 II-11 *A. mangium* とダイズの根端から脱落する細胞の集合状態

A. mangium とダイズの根端を溶液に浸した後に、根端から 1-3 mm または 0-1 mm から脱落した細胞(A-G)と、それらをインディアンインクを含む溶液で染色し、細胞を覆うムシゲルを可視化した明視野像(H-N)。*A. mangium* の鞘状組織片(A, D, H, K)と境界細胞(E, L)、ダイズの集合細胞(B, F, I, M)と境界細胞(C, G, J, N)を示す。スケールバーは 100 μ m を表す。

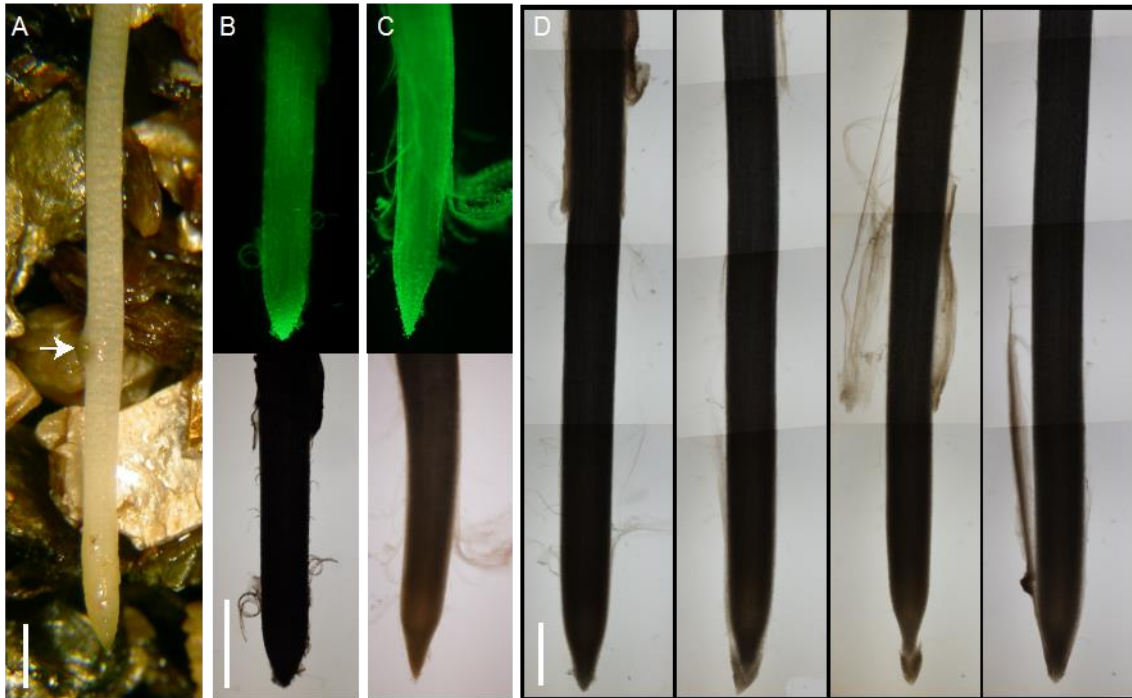


図 II-12 抵抗条件下での鞘状組織片の剥離

(A-D) バーミキュライト中(A, B)またはろ紙間(根箱栽培)(C, D)を伸長した *A. mangium* の根を示す。(A) 図中の矢印は、鞘状組織片の存在を示す。ろ紙間を 24 時間、またはバーミキュライト中を 72 時間伸長した根の鞘状組織片を、二酢酸フルオレセインで染色して可視化した。(B-C) 各条件下でのそれぞれ 4 本の観察から代表的な根の蛍光像(上段)と明視野像(下段)を示す。(D)ろ紙間を伸長した 4 本の根の明視野像を示す。スケールバーは全て 1 mm を表す。

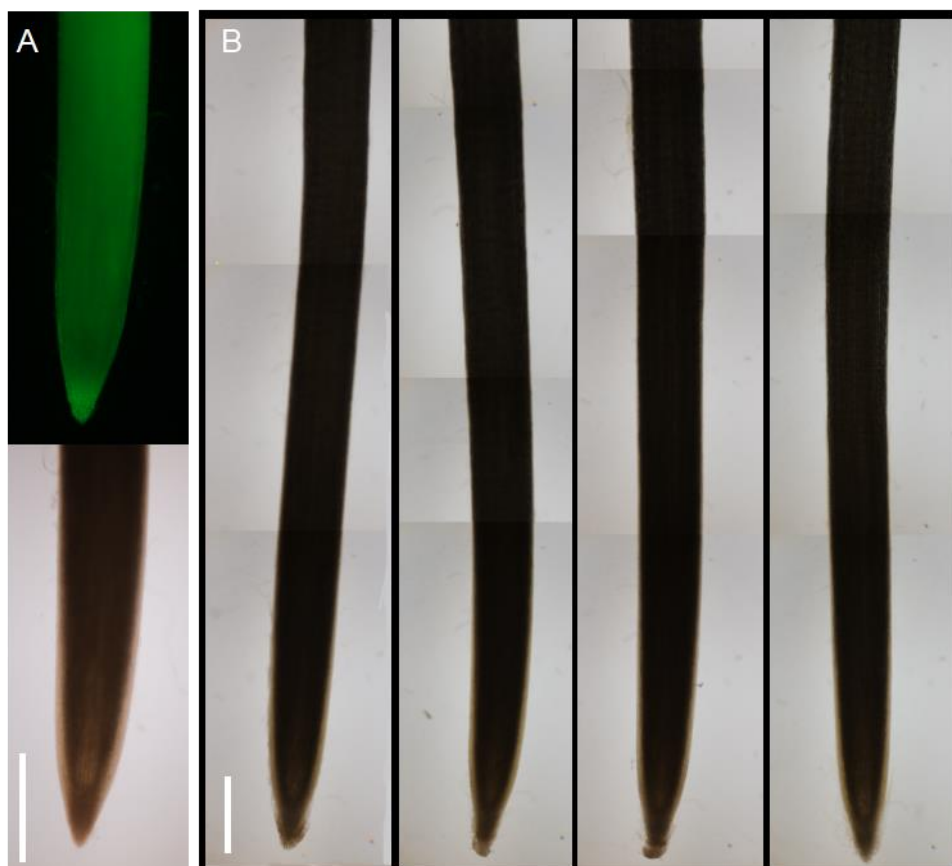


図 II-13 抵抗条件下のダイズの根端

(A, B) 根箱栽培でろ紙間を 24 時間伸長させたダイズの根を示す。(A) 4 本の根の観察から代表的な根の二酢酸フルオレセインで染色した蛍光像(上段)と明視野像(下段)を示す。(B) ろ紙間を伸長した 4 本の根の明視野像を示す。スケールバーは 1 mm を表す。

表 II-1 *A. mangium* とダイズの根端から離脱した細胞数

	根端部位	境界細胞		鞘状組織片	
	mm	n	(%)	n	(%)
<i>A. mangium</i>	0-1	3,390 ± 2,080	(53)	3,030 ± 2,710	(47)
	1-3	0 ± 0	(0)	2,380 ± 670	(100)

	根端部位	境界細胞		集合細胞	
	mm	n	(%)	n	(%)
ダイズ	0-1	940 ± 610	(25)	2,810 ± 1,480	(75)
	1-3	1,100 ± 680	(38)	2,640 ± 2,120	(62)

光学顕微鏡下での細胞の集合パターン解析により、*A. mangium* とダイズの離脱細胞を 2 つのグループに区分した。*A. mangium* の 4 個以上連続した細胞を鞘状組織片とし、ダイズの不定の接点で接した 4 個以上の細胞を集合細胞とした。それ以外を境界細胞とした。数字は平均値±標準偏差を表す(n=3-6)。根端部位は根頂端からの距離を表す。それぞれの根の部位における全離脱細胞数に対する各グループの離脱細胞の割合をカッコ内に示した。

表 II-2 栽培条件による根の伸長速度の違い

種	栽培区	根の伸長速度 (mm 24 h ⁻¹)
<i>A. mangium</i>	濾紙区	19.3 ± 1.6
	水耕区	9.3 ± 1.2
	増加率 (%)	207
ダイズ	濾紙区	65.2 ± 3.0
	水耕区	45.6 ± 4.2
	増加率 (%)	143

数字は平均値±標準偏差を表す(n=8)。増加率は、水耕区での根の伸長速度に対する濾紙区での根の伸長速度の割合を示す。

表 II-3 水耕区と濾紙区で伸長した根のコルメラの長さと同側根冠細胞層数

種	コルメラ長	側根冠細胞層の数				
		静止中心からのそれぞれの距離 (mm)				
		0	1	2	3	4
栽培区						
	μm					n
<i>A. mangium</i>						
濾紙区	724 ± 48	6.7 ± 0.6	3.7 ± 0.6	2.0 ± 1.0	1.3 ± 0.6	1.0 ± 0.0
水耕区	923 ± 54*	9.0 ± 1.7†	5.0 ± 0.0†	3.3 ± 0.6	2.0 ± 0.0	1.7 ± 0.6
ダイズ						
濾紙区	585 ± 22	5.7 ± 1.4	3.5 ± 0.5	2.2 ± 0.4	1.3 ± 0.5	0.8 ± 0.4
水耕区	472 ± 40*	6.7 ± 1.2	3.3 ± 0.6	1.7 ± 0.6	1.3 ± 0.6	0.7 ± 0.6

根端の縦断切片を用いて、水耕区と濾紙区それぞれの栽培区で 48 時間栽培した *A. mangium* とダイズの根頂端からコルメラ原基までの長さをコルメラ長とした。鞘状組織を取り除いた直後に、静止中心から 1, 2, 3, 4 mm 部位における側根冠細胞層の数を数えた。数字は平均値±標準偏差を表す(n=3)。*は P<0.05、†は 0.05<P<0.10 で濾紙区と水耕区の間のコルメラ長および側根冠細胞層数の間に有意差があることを示す(t-検定)。

II-4 考察

A. mangium の鞘状組織を構成する鞘状組織片を顕微鏡観察した結果 (図 II-2E)、複数の細胞がシート状の結合を維持して剥離する細胞群という境界様細胞の特徴と合致したことから、鞘状組織片は境界様細胞であることが分かった。

境界様細胞は根の長軸と平行に裂けていた (図 II-2E)。また、境界様細胞の細胞間、特に細胞の短軸で強い自家蛍光が観察された (図 II-2F)。リグニンやスベリンなどの物質は自家蛍光によって観察される (Brundrett et al., 1988; Morita et al., 1996; De Micco and Aronne, 2007)。このことから、細胞の長軸と比較して短軸において、これらの物質が細胞結合を強めている可能性がある。境界細胞の集合によるシート状組織の形成に真菌の関与が示唆されているが (Gunawardena and Hawes, 2002)、菌糸が存在しない状態でも *A. mangium* では境界様細胞が形成されたことから (図 II-5B, C)、シート状組織を形成しての細胞の離脱に菌類が関与していないことが分かった。

A. mangium の鞘状組織は、根の伸長域を含む領域で形成されることが、根の伸長域を解析した結果との対応から明らかになった (図 II-2A, C, 図 II-6)。根端切除実験で、根の伸長がほとんど認められなかった根頂端から 1.0 mm 切除区と 1.5 mm 切除区で、時間経過に伴って境界様細胞の集積が進まず、逆に減少したことは、時間経過に伴って境界様細胞の剥離が進み根端との付着を失い脱落したことを意味し、境界様細胞の根端との付着部位が根端から 1.0 mm の範囲にあることを示唆している (図 II-4A-C)。

根の縦断切片の観察と境界様細胞の剥離パターンの解析により、*A. mangium* の境界様細胞は、側根冠細胞表層の根伸長域の先端側と基部側の両側から剥がれることが分かった (図 II-7B, 9A-D)。そして、根頂端から 1 mm 部位の横断面の TBO 染色で、側根冠細胞と境界様細胞の呈色性が類似しており、類似したフェノール性物質の集積があることを示した (図 II-8A, B)。また、根端縦断面の TBO 染色から側根冠細胞表層にフェノール性物質が集積することが示された (図 II-7A, B)。境界様細胞の剥離部位が側根冠細胞の位置と対応すること

や、境界様細胞と側根冠細胞とが同様の物質を集積することが確認されたことから、境界様細胞は側根冠細胞由来であることが示唆された。さらに、FDA 染色によって、境界様細胞は根端から生活性を持ったまま恒常的に剥離し(図 II-9A)、細胞の失活後も根との付着が維持されることが分かった。

A. mangium の境界様細胞の離脱部位を詳細に解析したところ、根頂端から 0-1 mm と 1-3 mm で離脱を確認した(図 II-11A, D)。この時、境界細胞は根頂端 0-1 mm のみから離脱した(図 II-11E)。コルメラを含む根頂端 0-1 mm では、境界様細胞と境界細胞がほぼ 1 対 1 の割合で離脱していたが、コルメラを含まない側根冠細胞のみである 1-3 mm 部位では、境界様細胞のみが離脱した(表 II-1)。このことから、*A. mangium* の根の伸長域の側根冠細胞表層では、境界細胞の生成が抑制されていると言える。

これまでに、シロイヌナズナとイネで境界様細胞産生の報告がある。シロイヌナズナの境界様細胞は、基部側に開いた形でコルメラ先端部と付着しており(Vicré et al., 2005)、根伸長域に付着部位を持つ *A. mangium* の境界様細胞と異なっていた。また、イネの冠根において、伸長の初期段階で初生根冠と呼ばれる根冠の離脱が認められている(川田ら, 1979)。しかし、この組織は冠根が出根してから数日で消失し、それ以降産生されないことから、播種後数か月経った苗でも経常的に形成される *A. mangium* の境界様細胞とは異なる。以上のことから、*A. mangium* は、これまでに報告のない形成特性を持つ境界様細胞を産生することが明らかになった。

また、シロイヌナズナが境界様細胞のみを生成するのに対して(Vicré et al., 2005)、*A. mangium* は境界様細胞のみでなく、境界細胞もまた同時に生成する。境界細胞を生成することが分かっているダイズでは、根頂端 0-3 mm 全長から境界細胞のみが離脱した(図 II-11B, C, F, G)。ダイズの側根冠細胞のみが覆っている 1-3 mm の根表面部位で境界細胞が生成されることから、*A. mangium* とダイズの側根冠細胞の離脱パターンは異なることが分かった。エンドウマメの境界細胞の生成に、ペクチンメチルエステラーゼ活性によるペクチンの加水分解が関与していることが明らかになっている(Stephenson and Hawes, 1994)。

また、シロイヌナズナの境界様細胞の細胞間結合に、ペクチンを構成する多糖類のホモガラクトuronanの関与が示唆されている(Durand et al., 2009)。 *A. mangium* の境界様細胞の細胞間結合にリグニンの関与の可能性を示唆したが、ペクチンの関与も否定できない。 *A. mangium* の境界様細胞の細胞間結合に関与する物質の分析は今後の課題である。

濾紙区において、境界様細胞の剥離が根頂端側から求基的に起こることが観察された(図 II-12C)。このことから、土壌中で鞘状組織が確認されないのは、根の伸長時に受ける摩擦によって、根端部位で根表面と境界様細胞の結合が切られるためであることが推測される。濾紙区において、根端から剥離し、根周囲に留まった境界様細胞の分布および数は、個々の根によって様々であった(図 II-12D)。これは、濾紙と根との摩擦がそれぞれの根で異なることに起因すると考えられる。自然環境下において土壌と根との接触や、根の伸長速度などによって境界様細胞の剥離様式は異なることが推測される。

トウモロコシの境界細胞は根表面から削られ、土壌との境でムシゲルに覆われて存在する(Vermeer and McCully, 1982)。ムシゲルの存在が確認されているにもかかわらず、濾紙区ではダイズの境界細胞を検出できなかった(図 II-13B)。これは土壌と濾紙間で水分条件が異なるために検出できなかったと考えられる。一方、 *A. mangium* の境界様細胞は、ムシゲルが不明瞭であったにもかかわらず(図 II-11H)、濾紙区を伸長した根において、根端表面から離脱後でも根を取り囲むように存在することが確認できた(図 II-12D)。このことは、 *A. mangium* ではムシゲルと別の要因で根と付着していることが考えられた。

A. mangium の根の伸長速度と境界様細胞の剥離速度が比例していた(図 II-3A, C)。エンドウマメの境界細胞は、根表面からの除去によって生成が誘導されるが(Hawes and Lin, 1990; Hawes et al., 2000)、その生成は頂端分裂組織と独立しており(Hawes and Lin, 1990)、根の伸長とは無関係であることが示唆されている。 *A. mangium* の境界様細胞の生成と離脱は、ストレス誘導的でないという点で境界細胞と異なっていた。

以上本章では、*A. mangium* の根端に発達する鞘状組織が、根の伸長に伴って離脱する側根冠細胞に由来する境界様細胞であることを明らかにし、その形成や離脱の様式を明らかにした。

Ⅲ章

***A. mangium* の境界細胞と境界様細胞へのプロアントシアニジン(PA)の集積とその放出特性**

Ⅲ-1 緒言

離脱直後の境界細胞および境界様細胞は生活性を持っている(Ⅱ章、Hawes and Pueppke, 1986; Vické et al., 2005)。エンドウマメの離脱後の境界細胞内では、タンパク質などの物質が合成されて細胞外へ放出される(Brigham et al., 1995)。これら細胞から放出される物質の化学性が、土壤微生物に与える影響についても報告されている(Hawes, 1990; Hawes et al., 2000)。例えば、イソフラボノイドの一つでピサチンと呼ばれる抗菌物質は、エンドウマメの境界細胞で合成され、病原菌の感染によりその合成が促進される(Wu and Van Etten, 2004; Cannesan et al., 2011)。外来侵入性のヤグルマギク根から他感作用を有するカテキンの放出が確認されているが、土壤中でのカテキン濃度は常に低いためカテキンの根からの放出が、ヤグルマギクの侵入性に関わっているかは明らかでない(Blair et al., 2006; Perry et al., 2007; Duke et al., 2009)。プロアントシアニジン(PA)は、カテキンなどのフラバン 3-ol の重合体である。PA は別名縮合タンニンと呼ばれるフラボノイドの一種であり、フェノール性物質である。PA は種皮や果皮、樹皮など植物の表層組織に集積し、昆虫や草食動物による摂食や菌類の感染といった生物的なストレスから植物体を防御している(Barbehenn and Constabel, 2011)。松島(2010)は、多くの木本植物の根に PA が集積することを示している。網羅的な解析により、木本植物では 66 %(n=121)の種で根に PA が集積していたが、草本植物では 13 %(n=16)で、木本植物の方が根に PA を集積する種が多いことが明らかになっている(松島、2010)。PA が樹木根のストレス耐性に寄与していることが考えられるが、それぞれの木本種において、根における PA 集積の局在性などの詳細は明らか

かになっていない。既にⅡ章において、*A. mangium* の根伸長域の側根冠細胞層にフェノール性物質が集積することを示したことから、*A. mangium* の側根冠細胞層にも PA が集積する可能性がある。

Hoffmann et al. (2012)は、境界細胞内にフラバン 3-ol が集積することをバラ科植物で報告した。*A. mangium* の境界様細胞はフェノール性物質が含まれる側根冠細胞に由来することから(Ⅱ章)、境界様細胞が PA を集積した状態で離脱している可能性がある。細胞内に集積するフラバン 3-ol の機能の詳細は未だ明らかでないことから、境界細胞および境界様細胞の根圏における機能について新たな知見が得られる可能性がある。

本章では、*A. mangium* の根における PA 集積の詳細、並びに境界細胞と境界様細胞における PA の分布様式を組織化学的に明らかにすることを目的とした。

Ⅲ-2 材料と方法

Ⅲ-2-1 根端の PA 集積の組織学的解析

Ⅲ-2-1-1 植物材料と栽培条件

A. mangium とダイズの播種方法および栽培条件は、「Ⅱ-2-1-1」および「Ⅱ-2-3-1」と同様である。

Ⅲ-2-1-2 処理と解析方法

Ⅱ章(図Ⅱ-7A, B)で、*A. mangium* 根端の縦断切片をトルイジンブルーO(TBO)溶液で染色したところ、根端表層の細胞列にフェノール性物質の集積が認められたことから、その集積物質が PA であるかを確認するために、パラ-ジメチルアミノ桂皮酸アルデヒド(DMACA)溶液(和光純薬工業、大阪)を用いて染色した根を観察した。DMACA は、PA を特異的に染色することから、植物体に含まれる PA の定量(Li et al., 1996)や植物器官や細胞内での PA の局在性の可視化(Bogs et al., 2007; Osawa et al., 2011)に用いられていることから、DMACA 染色によって青色の呈色を示した物質を PA とみなした。等量の 3N 塩酸と 50%(v/v)メタノールに溶解させた 0.1%(w/v) DMACA 溶液に *A. mangium* の根と種子、またはダイズの根を 2 分間浸した後、0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)に浸し、余分な染色液を洗い落とした。根頂端から異なる距離の根内部の PA 集積部位を調べるために、水耕根を用いて、根頂端から 1 mm 間隔で 5 mm 基部側までの各部位を、剃刀の刃で薄く輪切りにした。DMACA 染色は未固定の生材料を使用するので、標本作製の技術的な面で縦断面の観察は困難である。そのため、横断面の材料での観察を行った。輪切りにした根の薄層切片をスライドガラス上へのせ、DMACA 溶液を滴下し、光学顕微鏡(BX51、オリンパス、東京)下で観察した。

根冠の位置を同定するために、根冠の細胞が有するアミロプラストのデンプン粒をルゴール染色した。*A. mangium* とダイズの根の縦断切片にルゴール溶液(ヨウ素 0.1 g、ヨウ化

カリウム 0.2 g、蒸留水 30 ml)を滴下して 3 分間染色した後、脱イオン水で 2 回洗い、光学顕微鏡(BX51、オリンパス、東京)下で観察した。根の縦断切片の作製と観察は、「II-2-3-2」と同様である。

III-2-2 境界様細胞と境界細胞の PA と生活性の染色

III-2-2-1 植物材料と栽培条件

A. mangium とダイズの播種方法は「II-2-4-1」と同様である。根端から離脱する細胞を効率的に回収するために、播種後 4-5 日目の *A. mangium* と播種後 2 日目のダイズの幼根を用いた。

III-2-2-2 処理と解析方法

PAは細胞の液胞内に集積するとされているが(Zhao et al., 2010)、その局在の詳細は明らかでない。PAの細胞内での局在性を明らかにするために、境界細胞と境界様細胞のPA集積の割合と、PAの集積パターンによって分けたそれぞれの細胞の割合を計測した。根端から離脱する細胞を回収し、それらに1.0 % (w/v) DMACA溶液を滴下し、2分後に光学顕微鏡下で観察した。根端から離脱する細胞の回収方法は「II-2-4-2」と同様である。PAの集積パターンとして以下の3つに分けた。細胞内にPAが粒子状に局在する細胞を「粒状」とし、それ以外で細胞内にPAが広がって不規則に集積する細胞を「斑状」とした。斑状を示す細胞内に粒子状のPAが混在する細胞も「斑状」とした。そして、PAを全く集積しない細胞を「なし」とした。

また、PA集積と細胞の生死との関連を理解するために、二酢酸フルオレセイン(FDA)で蛍光を発する細胞の割合を、境界細胞と境界様細胞でそれぞれ計測した。FDA染色は、「II-2-3-2」と同様に、Ishikawa and Wagatsuma(1998)の方法を一部改変して行った。

各染色について、*A. mangium* とダイズの根頂端から 0-1 mm、1-3 mm 部位からそれぞれ少なくとも 50 個の離脱細胞を観察した。このとき、4 個以上連続した細胞を境界様細胞(ダ

イズにおいては集合細胞)とし、それ以外を境界細胞とした。そして、根頂端から 0-1 mm、1-3 mm 部位で測定した全細胞数に占める境界細胞数あるいは境界様細胞数の割合を求め、3 回の実験の平均値を示した。

III-2-3 摩擦条件下での境界様細胞と境界細胞の PA と生活性の染色

III-2-3-1 植物材料と栽培条件

A. mangium とダイズの播種方法および栽培条件は、「III-2-1-1」と同様である。

III-2-3-2 処理と解析方法

濾紙間を伸長した根から離脱する境界細胞および境界様細胞の PA を DMACA 溶液で染色し、生細胞を FDA 溶液で染色して可視化した。*A. mangium* とダイズの根を摩擦条件下で栽培するため、「II-2-5-1」と同様に両種を水耕栽培から濾紙間に移し、根箱で栽培した(濾紙区)。濾紙区で *A. mangium* を 72 時間、ダイズを 36 時間栽培した。その後、根伸長跡の生細胞を検出するために、*A. mangium* とダイズの根が接した濾紙面に $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ FDA を含む 0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)を噴霧し、10 分後に濾紙を洗浄せずに蛍光顕微鏡下で観察し、撮影した。蛍光観察の方法は「II-2-3-2」と同様である。さらに、FDA 染色した同じ濾紙の PA を検出するために、1.0 % (w/v) DMACA 溶液を噴霧して 2 分後の濾紙を光学顕微鏡下で観察し、撮影した。また、根全体と接した濾紙面に DMACA 溶液を噴霧後、少なくとも 30 分間静置した染色面をスキャナー(Epson Expression 1680、セイコーエプソン、諏訪)で取り込んだ。DMACA 溶液の濃度は、*A. mangium* で 0.1 % (w/v)、ダイズで 1.0 % (w/v)とし、噴霧後の濾紙を洗浄せずに観察した。FDA 染色後と DMACA 染色後に撮影した画像を、画像解析ソフト DP Manager (ver. 3. 1. 1. 208、オリンパス、東京)で合成して細胞の生活性と PA の有無との対応を調べた。

Ⅲ-3 結果

Ⅲ-3-1 *A. mangium* の根端における PA の集積部位

播種後 2-3 ヶ月の水耕栽培した *A. mangium* の根を DMACA 染色したところ、根端から鞘状組織を取り外した状態で、PA が根端全体で確認された(図Ⅲ-1A)。ただし、根頂端のコルメラ部分に PA の集積は見られなかった(図Ⅲ-1B)。また、鞘状組織でも PA が確認され、呈色は鞘状組織の外側に比べ内側でより強かった(図Ⅲ-1C)。

ルゴール染色により、*A. mangium* とダイズの根冠(コルメラと側根冠)の位置を確認した(図Ⅲ-2A, B)。*A. mangium* の根頂端から 1 mm 部位でフェノール性物質を集積した細胞層は 10 層程度存在した(図Ⅲ-4)。また、根頂端から 1 mm 部位の横断面で、DMACA で青く染色した細胞層も 10 層程度存在したことから(図Ⅲ-3A)、TBO で青く呈色したフェノール性物質は PA であると考えられた。*A. mangium* の根端表層で PA が集積した細胞層と、アミロプラストを細胞内に持つ側根冠細胞層とが一致した(図Ⅲ-2A)。コルメラに PA は集積しなかった(図Ⅲ-2A)。ダイズの根冠のルゴール液による呈色は、*A. mangium* に比べ全体的に弱かったが、コルメラ部分の方が側根冠細胞よりも濃かった(図Ⅲ-2B)。ダイズの根端に PA は認められなかった(図Ⅲ-2B)。

根の横断面を DMACA 溶液で染色し、PA 集積部位を明らかにした。*A. mangium* の根頂端から 5 mm までの領域で、皮層を含む遠心側の組織(外皮、表皮細胞、側根冠細胞)に PA が集積していた(図Ⅲ-3A)。根頂端から 1-3 mm 部位で PA は細胞内で確認されたが、根頂端から 3-5 mm 部位では、細胞壁に PA が集積する傾向が見られた(図Ⅲ-3A)。呈色強度は基部側ほど弱かった(図Ⅲ-3A)。また、根頂端から 1-3 mm 部位において、PA 集積は外側から数層内側で最も多く見られた(図Ⅲ-3A)。ダイズの根内部は、根頂端から 1-5 mm の全ての領域で PA が集積しなかった(図Ⅲ-3B)。

A. mangium の根端の縦断面で、根端からの距離ごとに PA を集積した細胞層の数をより詳細に調べた。PA を集積した細胞層は、ルゴール液で呈色した側根冠細胞と、呈色しな

ったそれより内側の細胞からなり(図Ⅲ-2A)、根頂端から 1 mm 部位で 10 層程度存在した(図Ⅲ-4)。根頂端から 2 mm 部位で、5 層程度に減少し、4 mm 部位では 2 層程度だった(図Ⅲ-4)。根頂端から 3 mm までの部位において、根の中心側で細胞層の PA 集積程度は強かったが、外側に位置する細胞層や根頂端から 4 mm 部位の細胞層で PA 集積程度は弱かった(図Ⅲ-4)。

Ⅲ-3-2 境界様細胞と境界細胞の PA 集積と細胞生活性

発芽前後の *A. mangium* の種子および幼根の PA 集積の有無と、根の伸長初期における PA を集積する離脱細胞の有無を調べた。吸水させた種子胚と種皮、および播種後 2 日目の幼根は、PA を集積しなかった(図Ⅲ-5A, B)。播種後 3 日目の幼根において、根頂端から 250-650 μm の領域で PA が集積した(図Ⅲ-5C)。播種後 4 日目の幼根端から PA を集積した境界様細胞の離脱が確認された(図Ⅲ-5D)。日数の経過による根の伸長に応じて、PA は根の先端側だけでなく基部側にまで広がり、PA 集積程度は強くなった(図Ⅲ-5D, E)。根頂端から 1 mm より基部側表面で PA は斑点状に集積した(図Ⅲ-5E)。

Ⅱ章(図Ⅱ-11、表Ⅱ-1)で、*A. mangium* の根頂端 0-1 mm から境界様細胞と境界細胞がほぼ同数離脱し、根頂端 1-3 mm から境界様細胞のみが離脱することを示した。そこで、根の部位別に離脱する細胞の PA 集積の割合と分布様式を DMACA 染色で調べた。*A. mangium* の根頂端 0-1 mm から離脱した境界様細胞のうち、PA が集積した細胞数の割合は 83 %で、根頂端 1-3 mm から離脱した境界様細胞で 93 %だった(図Ⅲ-6A)。これに対し、根頂端 0-1 mm から離脱した境界細胞では PA が集積した細胞数の割合は 40 %だった(図Ⅲ-6A)。離脱細胞内に集積した PA の分布様式は、粒状や袋状、および斑状のパターンを示した(図Ⅲ-6B-E)。粒状に PA が分布した細胞は、根頂端から 0-1 mm のみで認められた(図Ⅲ-6B-D)。境界様細胞の PA が斑状に分布した細胞の割合は、PA を集積した細胞のうち、根頂端から 0-1 mm で 64 %、1-3 mm で 100 %だった(図Ⅲ-6B, D, E)。斑状に PA が分布した細胞の中には、粒状の PA 分布も混在して観察された(図Ⅲ-6 E)。境界細胞において PA

が斑状に分布した細胞の割合は、PA を集積した細胞のうちの 23 %で、境界様細胞よりも低かった(図Ⅲ-6B, C)。ダイズの境界細胞は、単体でも集合体でも PA の集積が見られなかった(図Ⅲ-6F-I)。

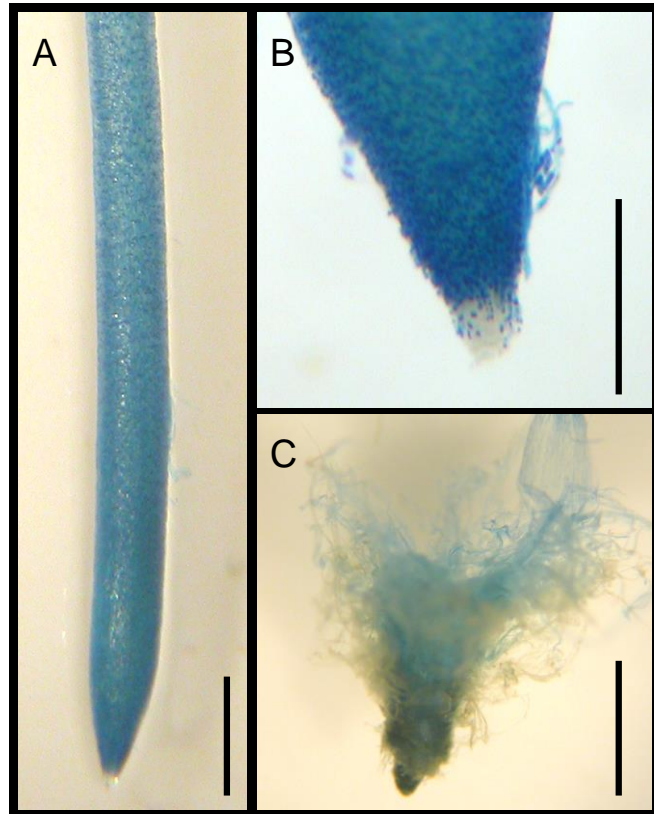
細胞内への PA 集積と細胞の生活性との関連を調べるために、根端から離脱した直後の細胞の生活性を FDA で可視化した。*A. mangium* の根頂端 0-1 mm の境界細胞と境界様細胞において、生細胞率は 84 %と 87 %で同程度だった(図Ⅲ-7A, C, D)。一方、根頂端から 1-3 mm の境界様細胞の生細胞率は 60 %で、根頂端側より生活性を有する細胞の割合が低かった(図Ⅲ-7A, E)。根頂端から 0-1 mm で、境界細胞に比べ境界様細胞で強い蛍光を示した細胞の割合は低かった(図Ⅲ-7B)。生活性を有した境界様細胞のうち、強い蛍光を示した細胞の割合は、根頂端 0-1 mm(59 %)に比べ 1-3 mm(21 %)で低かった(図Ⅲ-7B, D, E)。ダイズの境界細胞の生活性の割合は、根頂端から 0-1、1-3 mm で単体と集合体(図中の境界様細胞に相当)ともに 60 %程度だった(図Ⅲ-7A)。細胞内の蛍光は、細胞内全体または円形に局在して認められ、細胞の集合性や根の部位によって蛍光パターンに明瞭な違いは認められなかった(図Ⅲ-7F-I)。

Ⅲ-3-3 摩擦条件下での PA の放出特性

濾紙区で 72 時間伸長した *A. mangium* の根の跡に、PA が確認された(図Ⅲ-8A)。72 時間の間に出現した側根の伸長跡にも PA が確認された(図Ⅲ-8A 円内)。しかし、濾紙区に移したときにあった根が濾紙と接した部位と、根の伸長が起こらなかった部位(図Ⅲ-8A 三角印)のそれぞれの濾紙で PA は確認されなかった(図Ⅲ-8A)。一方、ダイズでは、濾紙区で 36 時間伸長した根の跡に PA は確認されなかった(図Ⅲ-8B)。

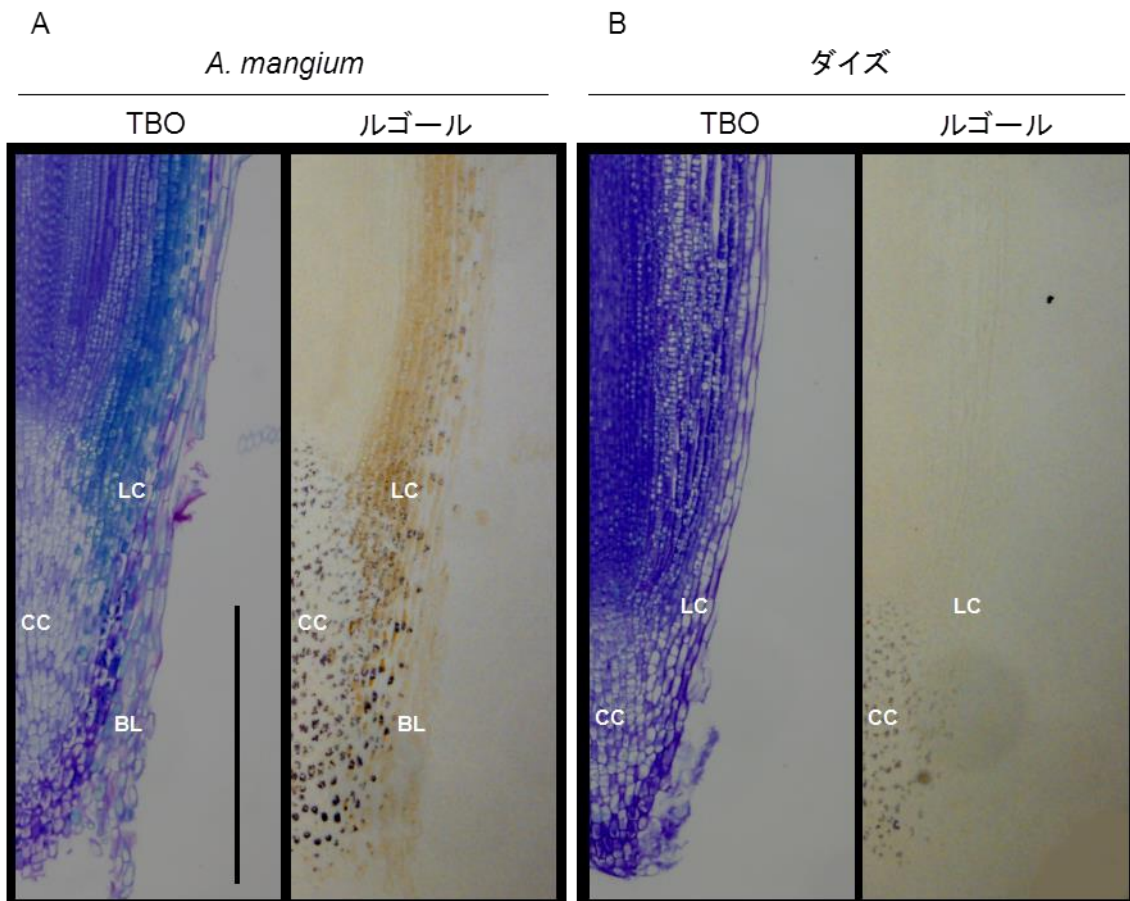
濾紙間で伸長した根の伸長跡に離脱した細胞の生活性と PA 集積を調べた。*A. mangium* の根頂端から基部側 11.1 (± 2.1) mm までの間で生細胞が認められた (n = 4, 図Ⅲ-9A)。これは、根の伸長跡の細胞分析時から 8.4 (± 1.6) 時間前までの伸長範囲に相当する。そして、同部位で PA が確認された(図Ⅲ-9A)。生細胞ならびに PA が確認された部位を高倍率で観察

すると、根頂端側の生細胞と PA の位置が一致した(図Ⅲ-9B)。また、根基部側で生活性がない細胞においても PA が認められた(図Ⅲ-9B)。



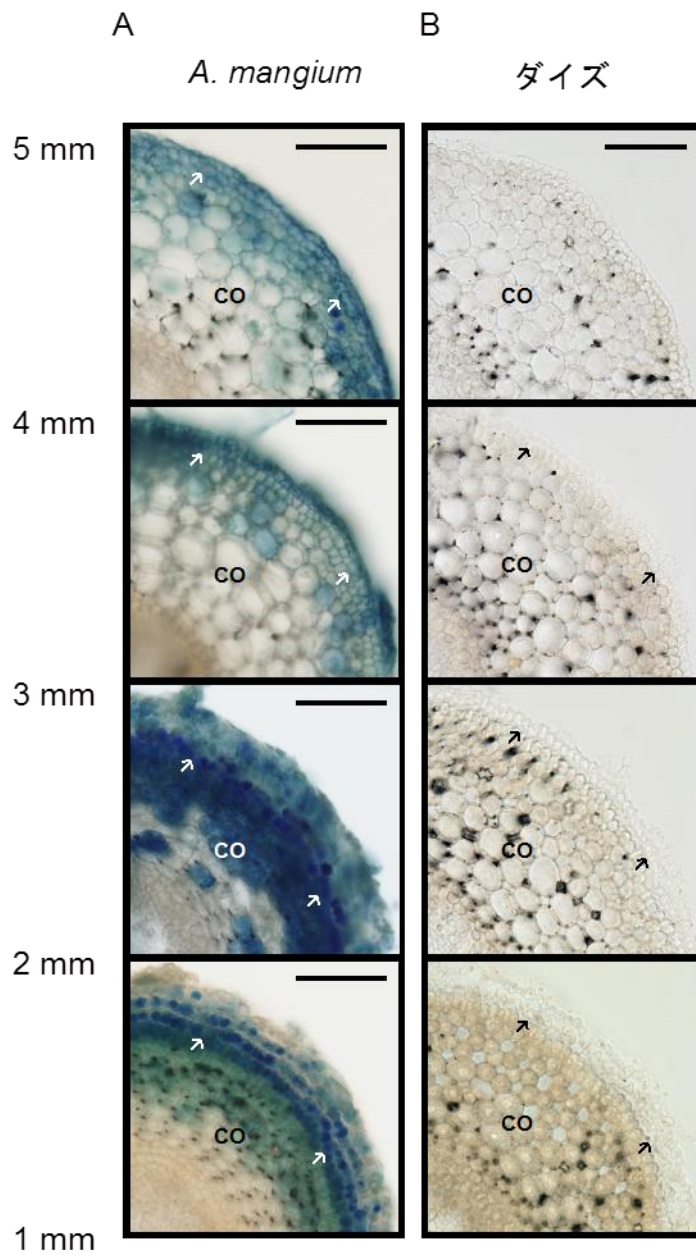
図Ⅲ-1 *A. mangium* の根と鞘状組織に集積する PA

A. mangium の根(A, B)および鞘状組織(C)の PA を、0.1 % (w/v) パラ-ジメチルアミノ桂皮酸アルデヒド(DMACA)溶液で 2 分間染色した。播種後 2-3 ヶ月の水耕苗の根(A)とその根頂端部分の拡大図(B)。スケールバーは 1 mm (A, C)と 0.5 mm (B)を表す。



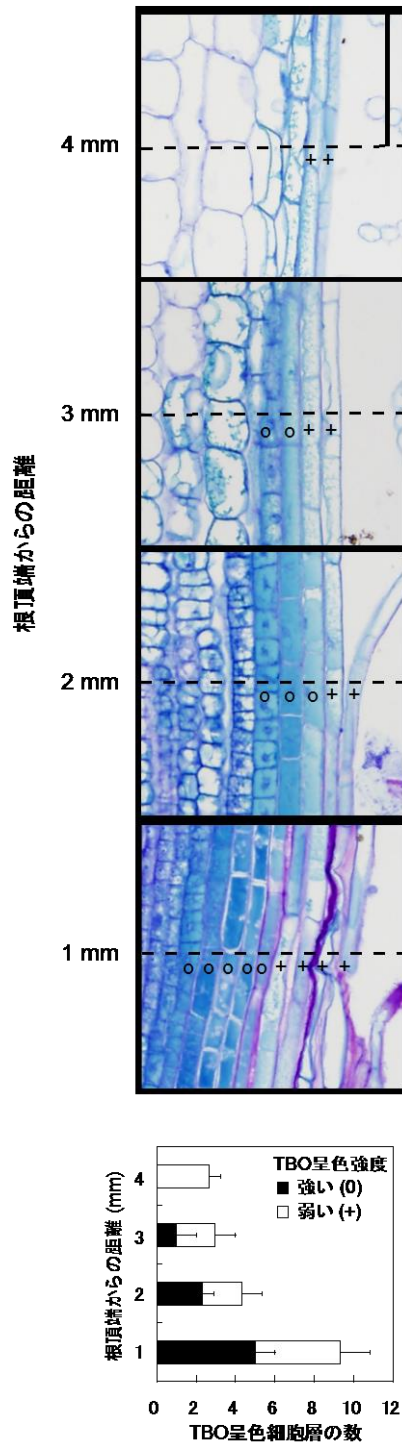
図Ⅲ-2 *A. mangium* とダイズの根冠のアミロプラストの染色

(A) *A. mangium* と(B) ダイズの水耕栽培した根端の縦断切片を示す。フェノール性物質を0.1% トルイジンブルーO (TBO)溶液で、根冠のアミロプラストに含まれるデンプン粒をルゴール液で染色した。*A. mangium* は鞘状組織を外してから24時間、ダイズは12時間水耕栽培した。CC:コルメラ細胞、LC:側根冠細胞、BL:境界様細胞 スケールバーは500 μmを表す。



図Ⅲ-3 *A. mangium* とダイズの根内部の PA

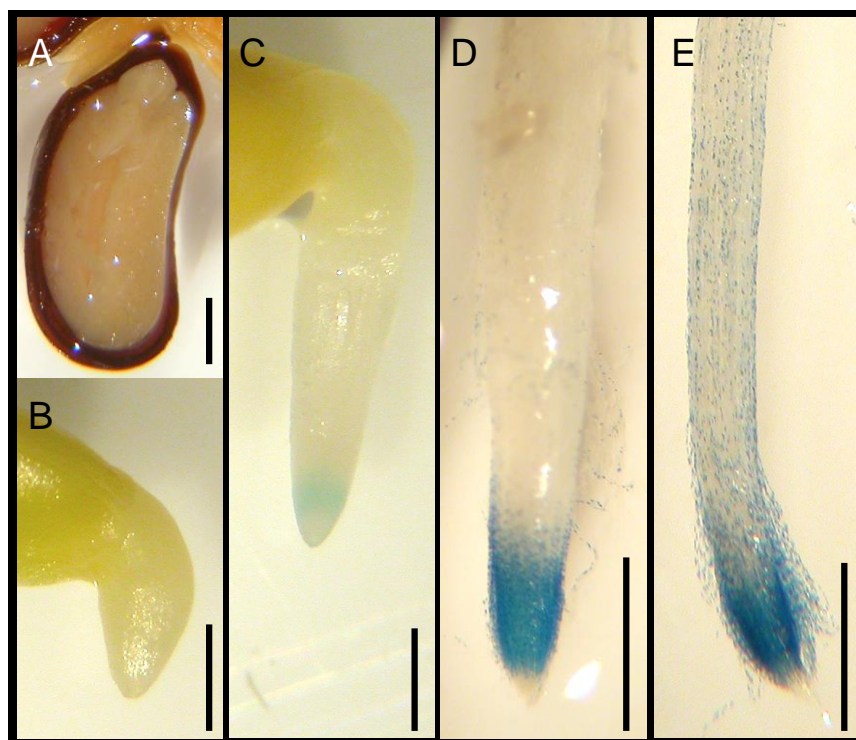
(A)*A. mangium* と(B)ダイズの水耕苗の根頂端から 1, 2, 3, 4, 5 mm 部位の横断切片を 0.1 % (w/v) DMACA 溶液で染色した光学顕微鏡像。CO: 皮層、矢印: 外側が側根冠細胞層
スケールバーは 100 μ m を示す。



図Ⅲ-4 *A. mangium* の側根冠細胞層の空間的な分布と PA の集積様式

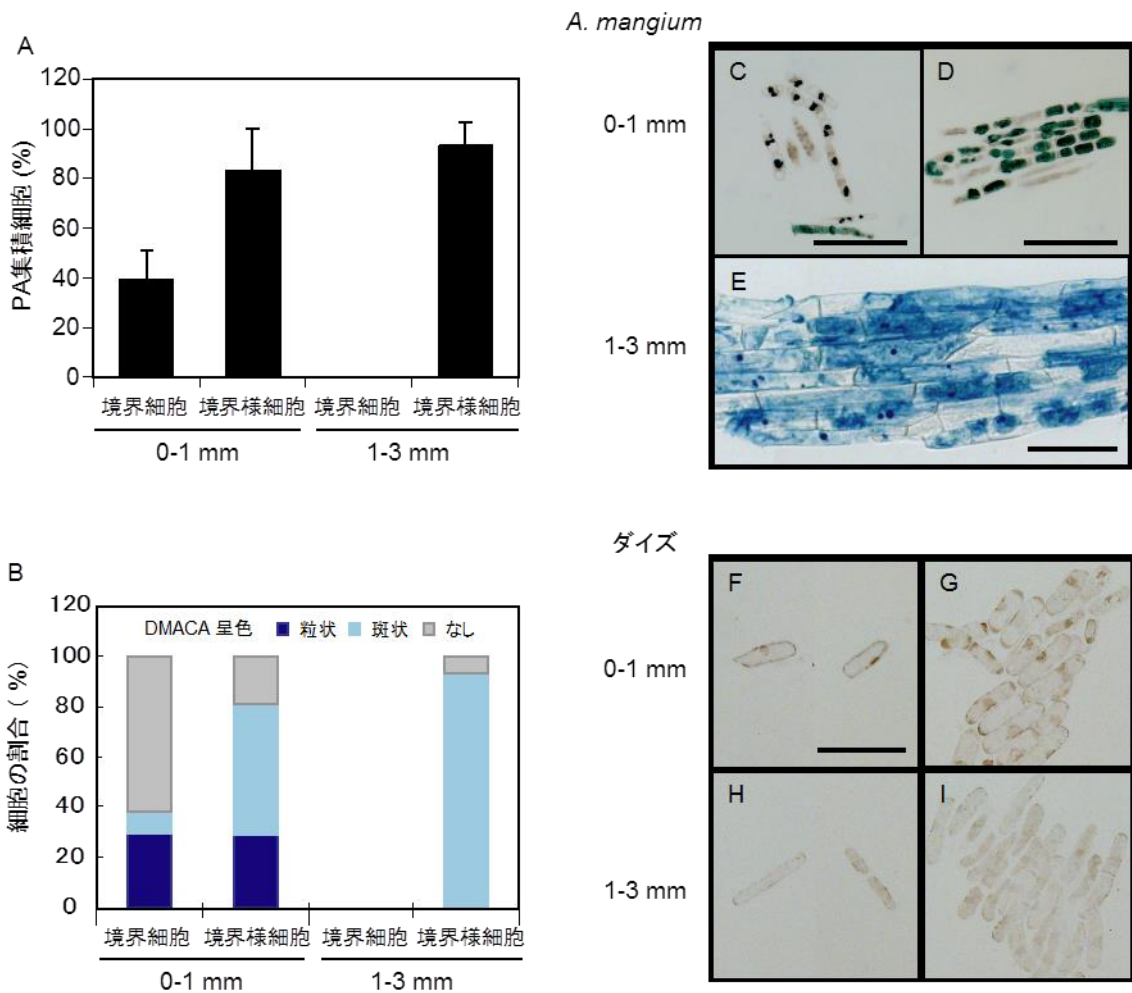
(写真) *A. mangium* の根端の縦断切片を 0.1 % (w/v) TBO で染色し、根頂端から 1, 2, 3, 4 mm 部位の光学顕微鏡像を示す。*A. mangium* の根は、根端から鞘状の境界様細胞を取り外して 48 時間水耕栽培した。写真中の印は TBO 呈色強度の強い細胞層 (○) と弱い細胞層 (+) を示す。スケールバーは 100 μm を表す。

(グラフ) *A. mangium* の根頂端からそれぞれの距離に存在する PA を集積した細胞層の数を示す。値は平均値 ± 標準偏差。(n=3)



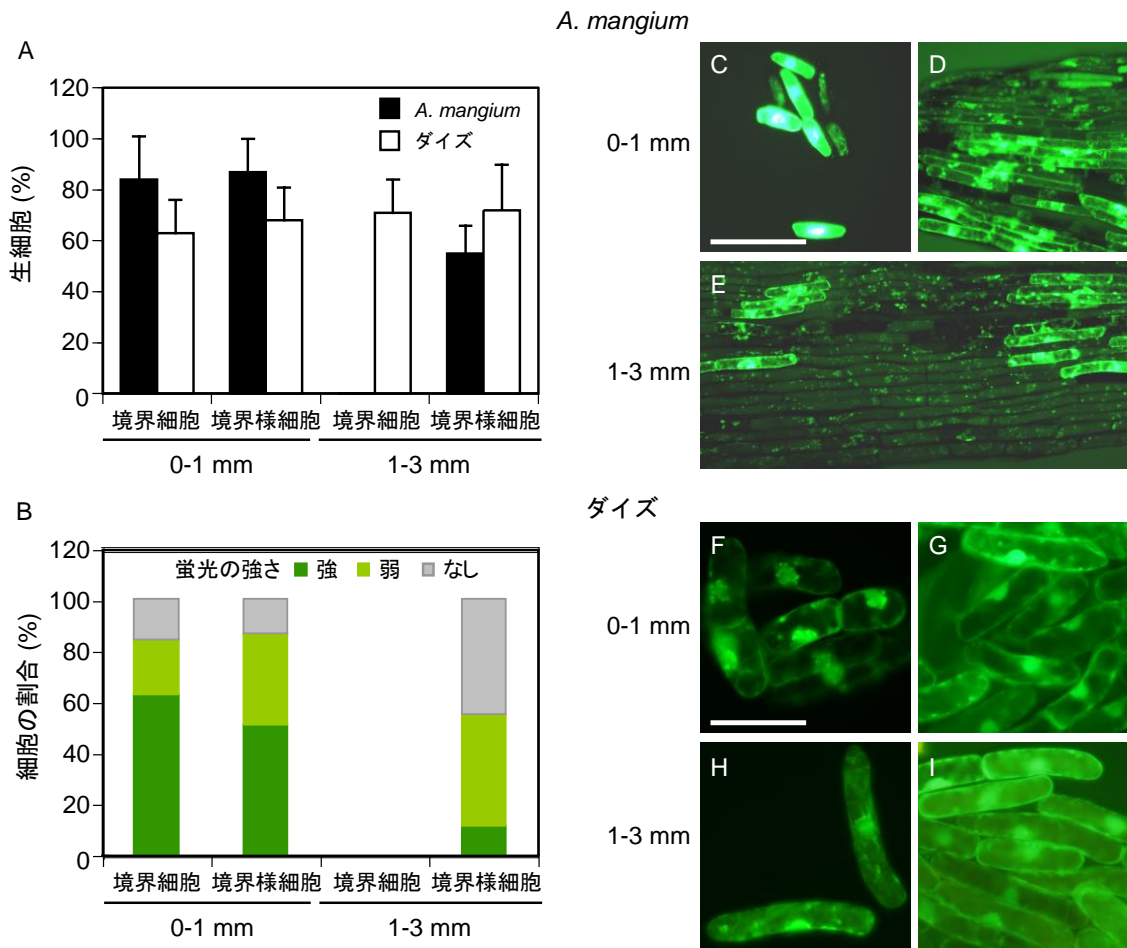
図Ⅲ-5 発達過程の *A. mangium* の根に集積する PA

A. mangium の種子(A)および根(B-E)の PA を、0.1 % (w/v) DMACA 溶液で 2 分間染色した。幼根の吸水後の日数は、2 日(B)、3 日(C)、4 日(D)、7 日(E)である。スケールバーは 1 mm を表す。



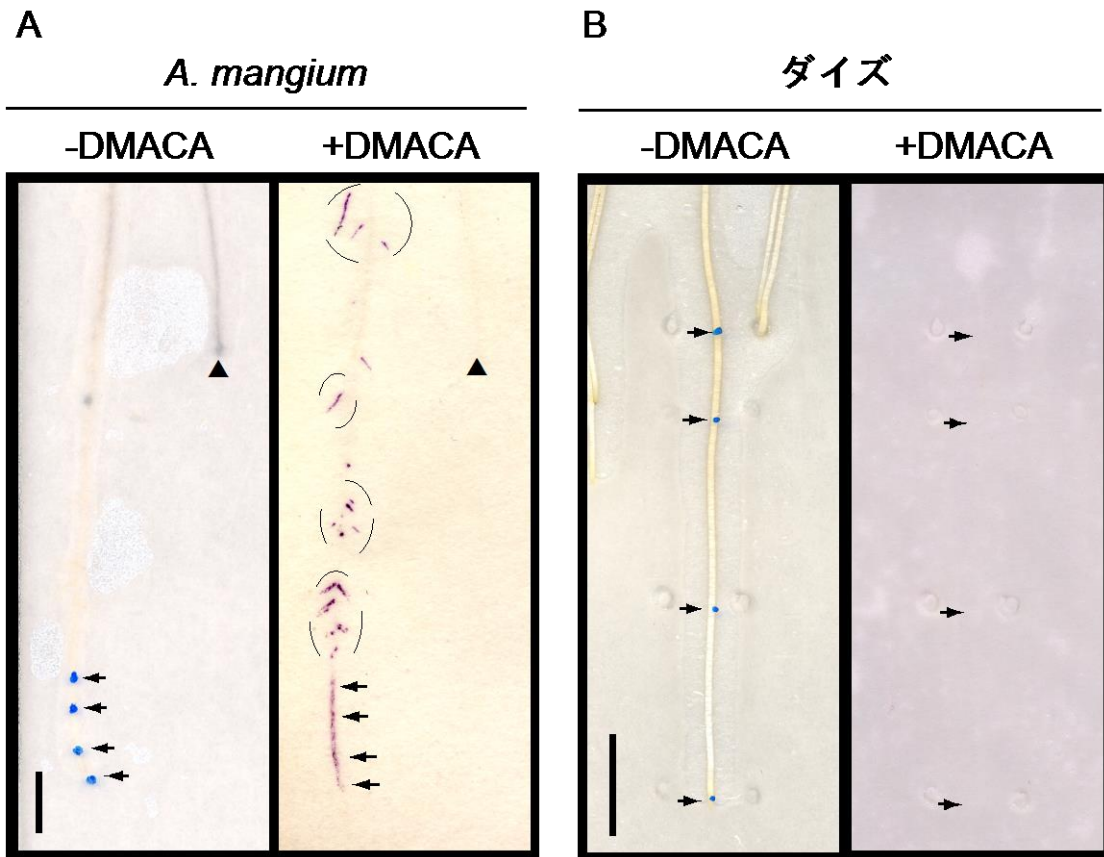
図Ⅲ-6 *A. mangium* 根端からの離脱細胞に集積する PA

(A) *A. mangium* の根端部位別に離脱した境界細胞と境界様細胞のうち、PA を集積する細胞の割合を示す。値は平均±標準偏差を示す(n = 3)。グラフ内の棒がない区分では、相当する細胞が存在しなかった。(B) 細胞内の PA 集積パターンの割合を示す。(C-E) *A. mangium* の根端から離脱した境界細胞(C)と境界様細胞(D, E)、または(F-H)ダイズの根端から離脱した境界細胞(F, H)と集合細胞(G, I)を、1.0 % (w/v) DMACA 溶液で染色した。スケールバーは 100 μm (C, D, F)と 50 μm (E)を示す。



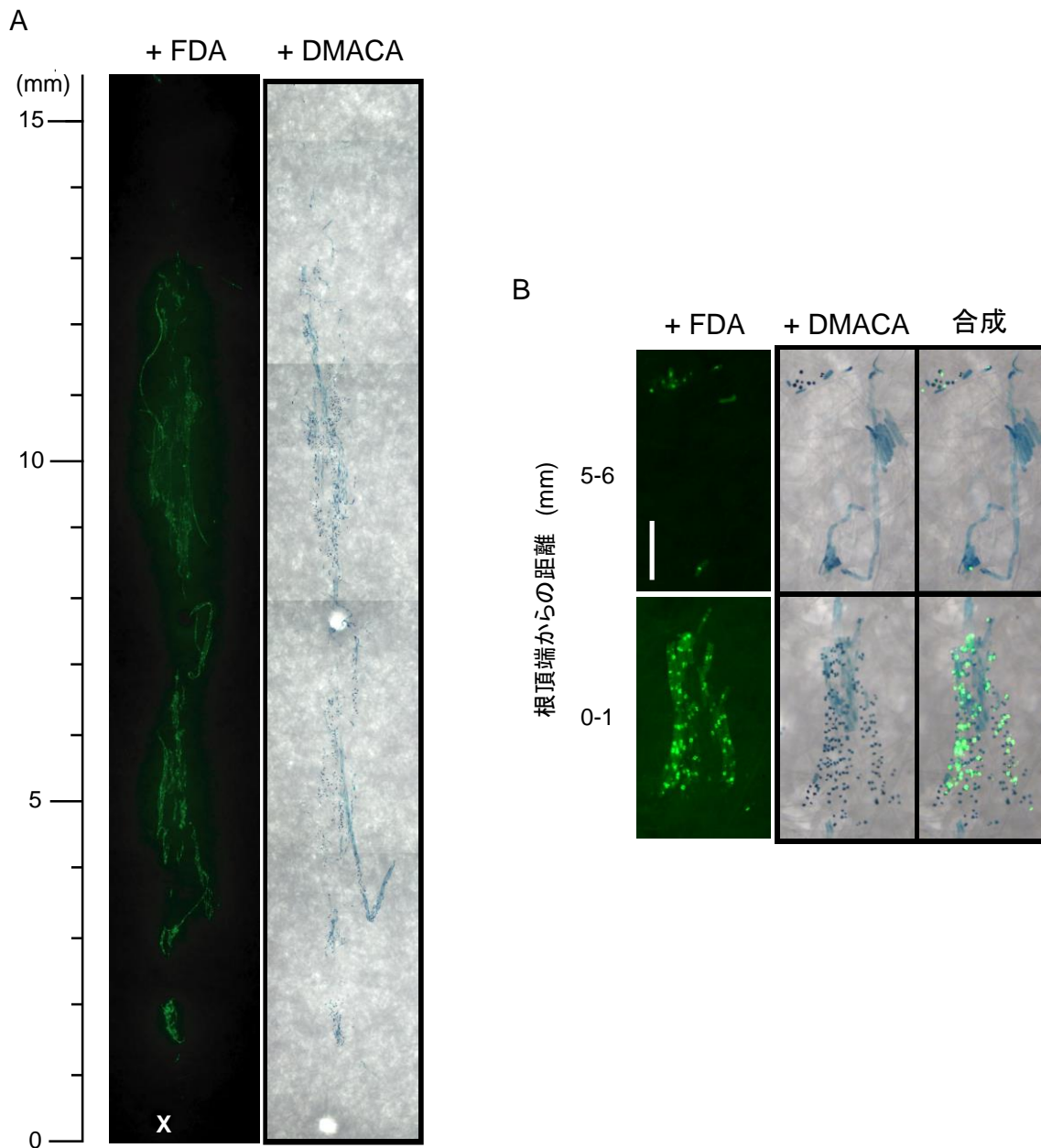
図Ⅲ-7 境界細胞と境界様細胞の生活性

(A) *A. mangium* とダイズの根端部位別に離脱した境界細胞と境界様細胞(ダイズは集合細胞)のうち、生活性を持った細胞の割合を示す。値は平均±標準偏差を示す (*A. mangium*; n = 3-6, ダイズ; n = 5) グラフ内の棒がない区分では、相当する細胞が存在しなかった。(B) *A. mangium* の境界細胞と境界様細胞で、蛍光が強い細胞(濃い緑)と弱い細胞(薄い緑)、蛍光が見られなかった細胞(灰色)の割合を示したグラフ。(C-E) *A. mangium* の境界細胞(C)と境界様細胞(D, E)、または(F-I)ダイズの境界細胞(F, H)と集合細胞(G, I)を二酢酸フルオレセインで10分間染色した蛍光像を示す。スケールバーは100 μm (C-E)と50 μm (F-I)を示す。



図Ⅲ-8 濾紙区を伸長した *A. mangium* とダイズの根伸長跡の PA

(A) *A. mangium* を 72 時間、(B)ダイズを 36 時間濾紙区で栽培した。根と接した濾紙に 0.1 % (*A. mangium*)または 1.0 % (ダイズ) (w/v) DMACA を噴霧した。図中の矢印は、最上部の処理開始時から下に 24 時間毎(*A. mangium*)または 12 時間毎(ダイズ)の根頂端の位置を示す。三角形は伸長停止した根端の位置、点線内は栽培期間中に新しく出現した側根を示す。スケールバーは 1 cm を表す。



図Ⅲ-9 *A. mangium* の離脱細胞に集積する PA と細胞生活性

(A) 濾紙区を伸長した *A. mangium* の根伸長跡を二酢酸フルオレセインで染色した蛍光像(+FDA)と、同じ濾紙を 1.0% (w/v) DMACA 溶液で染色した明視野像(+DMACA)を示す。+FDA の図中の X は、根頂端の位置を示す。(B) 根伸長跡の根頂端から 0-1 mm、または 5-6 mm 領域の蛍光像(+FDA)と明視野像(+DMACA)を示す。+FDA と+DMACA の画像を重ね合わせた画像(合成)。スケールバーは 200 μ m を表す。

Ⅲ-4 考察

Osawa et al. (2011)は、DMACA 溶液で染色することによって、クスノキの根端細胞に集積するフェノール性物質が PA であることを確認している。本研究でも同様の手法を用いて、Ⅱ章(図Ⅱ-7)でフェノール性物質の集積が認められた *A. mangium* の根端部分を DMACA 溶液で染色し、フェノール性物質が PA であることを確認した(図Ⅲ-1B)。根端の細胞層に集積する PA を詳細に調べる上で、未固定で根端縦断面切片を作製することが技術的に困難であったため、TBO 染色した根端縦断面切片と DMACA 染色した根端横断面切片の染色部位を比較した。フェノール性物質を集積した細胞層と PA を集積した細胞層の数や位置がおおよそ重なったため(図Ⅲ-3A、図Ⅲ-4)、細胞層に集積したフェノール性物質も PA であることを確認した。TBO 染色した結果とアミロプラストを含む根冠をルゴール染色した結果の比較から、PA は主に側根冠細胞に集積することが明らかになった(図Ⅲ-2A)。

PA は側根冠細胞の他に根の皮層、外皮、表皮を含む複数の細胞層に集積していた(図Ⅲ-3A)。境界様細胞および境界細胞にも PA は認められ(図Ⅲ-1C, 5D,E, 6C-E)、発芽後 4 日目という早い段階から離脱細胞内に集積することが分かった(図Ⅲ-5D)。根伸長域で、PA は側根冠細胞層の深部(あるいは、表皮)に最も多く集積した(図Ⅲ-4)。PA は根頂端から 1-3 mm 部位では細胞内で確認されたが、根頂端から 3-5 mm 部位では細胞壁付近に集積する傾向が見られた(図Ⅲ-3A)。また、呈色強度は基部側ほど弱かった(図Ⅲ-3A)。根の伸長にともなって皮層や表皮の PA が減少することは、*A. mangium* の根端部位における PA の役割が、根の先端部で発揮されることを示唆している。木本植物の根では、伸長域より基部側の表皮や外皮の細胞の原形質は消失しており、さらに基部側では皮層などの細胞壁にリグニンが集積し、木化が起こっている(荻住、2010)。木化することで根の物理的強度が上がる。さらに、根の成長に伴って肥大成長が起こり、根の表面をコルク層が覆うようになる。コルク層に含まれるスベリンは、不透水性で病原菌の侵入も防ぐ物質である。一方、根端は細胞の分化や伸長が活発に起こっている未発達な部位である。果皮等に含まれる PA は、昆虫

や草食動物による摂食や菌類の感染から防御する機能を持っているとされていることから (Barbehenn and Constabel, 2011)、根端に集積する PA の主な機能は、物理的な強度が弱い根伸長域を土壌生物による摂食や菌類の感染から防ぐものである可能性がある。木化やコルク層の発達により根の防御能力は高まるが、これらが未発達な根端部位では表皮等の PA により防御能力が高められていると考えられる。

クスノキの根では、根端の表皮細胞のすぐ外側に位置する 1 層の細胞層にのみ PA が集積していた (Osawa et al., 2011)。100 種以上の木本種の根で PA 集積を調べた結果から、木本種の根の PA 集積の空間分布は、大きく分けても根端の内側を含む根端全体、先端のみ、内皮より内側のみと複数のパターンを示すことが報告されている (松島、2010)。また、ツバキ科の木本 7 種で PA は内皮に集積している (池田、2010)。 *A. mangium* の根では主に根端に多く集積し、特に根の表層部分にその集積が多いことが分かった。

境界様細胞の PA 集積を調べたところ、細胞内に PA が集積することが明らかになった (図 III-6D, E)。PA 集積と細胞の生活性の関連を検討したところ、境界様細胞の生活性は根頂端から 0-1 mm に比べ基部側の 1-3 mm で低く (図 III-7A, B)、特に、FDA 染色したときに根頂端から 1-3 mm 部位で強い蛍光を発した細胞の割合が低かったことから、この部位で生活性の高い細胞が少ないことが考えられた (図 III-7B)。一方、生活性を持つ細胞割合の大小にかかわらず、PA はそれぞれの根端部位で同程度集積していた (図 III-6A)。このことから、 *A. mangium* の境界様細胞内の PA 集積は、細胞の生活性の高さに関係なく維持されることが示唆された。

境界細胞および境界様細胞に集積した PA は、根頂端から 0-1 mm で粒状と斑状に分布し、1-3 mm の境界様細胞で斑状にのみ分布することが分かった (図 III-6B)。 *A. mangium* の根頂端から 0-1 mm で境界細胞内の PA が粒状に集積していたことや、境界様細胞内の PA が袋状の細胞内小器官の中に集積していたことから (図 III-6C, D)、PA が細胞内で何らかの膜系細胞内小器官の中に存在していることが示唆された。シロイヌナズナの種皮を用いた研究

では、PAは液胞内で重合されることが報告されていることから(Zhao et al., 2010)、観察されたPA集積の細胞内小器官は液胞である可能性があるが、詳細は不明である。また、細胞の生活性が、根頂端から0.1 mmに比べ1.3 mmで低かったことを合わせて考えると(図III-7A, B)、細胞内のPAは細胞の失活にともなって分布様式が変化している可能性がある。細胞の分化や発達過程において、あるいは根の部位によってPAが細胞内で果たす役割が変化していく可能性が考えられるが、PAの細胞内における局在性の解明は今後の課題である。

このような細胞内のPAの分布様式の違いは、今後PAの細胞内における機能を解明する上で重要な情報となり得る。今後、細胞内のPAの分布様式の変化を検証する方法として、失活している細胞と生活性を維持している細胞とでPAの分布様式を詳細に比較することや、PAの局在をより明確にするために位相差顕微鏡を用いた細胞内の詳細な観察によって細胞内小器官とPAの集積との対応を調べる必要があると考える。

II章(図II-11)で、*A. mangium*の根端から0.1 mm部位のみで境界細胞が離脱したことから、境界細胞はコルメラから離脱すると仮説を立てていた。しかし、PAは境界細胞にも集積し、これらのPA集積率は40%だった(図III-6A)。根頂端から0.1 mmの部位にあるコルメラはPAを集積していないことから(図III-1B, 2A)、根頂端部位では側根冠細胞が細胞間結合を失って境界細胞としても離脱することが示唆された。他の植物において、境界細胞が根冠のどの部位の細胞に由来するかについてこれまで明瞭にされていない。細胞の離脱部位を推定する方法として、細胞の形態を基準とした方法や(Guinél and McCully, 1987)、免疫組織化学的な方法(Matsuyama et al., 1999)が挙げられるが、根冠のアミロプラストの染色と合わせて、PA集積の有無も組織化学的な指標とすることで、離脱細胞の由来を区分する方法に利用できると考える。

濾紙区での栽培実験から、*A. mangium*の根の伸長跡に離脱細胞が認められ、PAも認められた(図III-8A, 9A)。これらのPAは、離脱細胞内に存在し(図III-9B)、失活した細胞内に

保持されて根伸長跡に残ることが分かった。この結果は、PA が細胞の生活性と無関係に細胞内に維持される上述の結果(図III-6A, 7A)とも一致する。

PA は離脱、失活後に微生物等の細胞に対する作用により細胞外に漏出し、根圏でその効果を発揮する可能性がある。PA には抗菌性があり、コーヒーの葉に含まれる PA は、さび菌の夏胞子の発芽を抑制する(de Colmenares et al., 1998)。また、PA は Al との結合性があることも報告されており(Yoneda and Nakatsubo, 1998)、土壤中で Al と結合して存在する可能性もある。*A. mangium* の根で、PA が消失した根の基部側の周囲に、PA を集積した脱落細胞が分布することで、根本体への食害や病原菌の感染を直前で抑える効果が推測される。PA は境界細胞と境界様細胞に含まれて根外に放出された後に、*A. mangium* の根圏環境の形成に寄与していることが示唆される。

一方、植物が生成する化学物質の中には、これを生成する植物自身にとっても有害なものも含まれる。植物由来の化学物質(例えば、ラムノース、フェルラ酸、カフェイン、ピサチン等)は、短時間で根の伸長や境界細胞の生成に影響するという報告がある(Curlango-Rivera et al., 2010)。*A. mangium* の根で見られたような、PA を細胞内に保持したままの根圏への放出は、PA の毒性を細胞内に留めて離脱させ、根伸長域での PA の毒性を抑制する機構として有効である可能性がある。

以上本章で、*A. mangium* の根の PA は、根伸長域を含む側根冠細胞を中心に集積することを明らかにし、さらに境界細胞および境界様細胞が細胞内に PA を保持したまま根圏に離脱することを明らかにした。

IV章

***A. mangium* のプロアントシアニジン(PA)を集積した境界様細胞の土壤ストレスに対する役割 ーアルミニウムと病原性バクテリアを対象としてー**

IV-1 緒言

土壌中には植物の根の成長を妨げるさまざまな非生物的、生物的なストレス因子が存在する。非生物的なストレスの一つであるアルミニウムイオン(AI)は、酸性土壌において植物へ毒性を示し、最も特徴的な障害は根の伸長阻害である(Kochian 1995; 間藤ら, 2010)。AIは根の伸長域の表層細胞に集積し、主に細胞伸長を阻害する(Sivaguru and Horst, 1998)。AIストレスに対して、根端から有機酸を放出してAIを無毒化する耐性機構が、主に作物種で明らかにされている(Ryan et al., 2001)。本研究で用いた木本植物の *A. mangium* は、作物種に比べ根端からの有機酸放出が少ないにもかかわらず、高濃度のAI存在下でも根の伸長が阻害されにくい高AI耐性種である(Osawa and Kojima, 2006)。

境界細胞やそれらから放出されるムシゲルは、AIの根への付着を阻害することによってAIによる障害を緩和する効果が報告されている(Zhu et al., 2003; Miyasaka and Hawes, 2001)。また、III章で、*A. mangium* の根端や境界様細胞にプロアントシアニジン(PA)が含まれることを示した。PAは有害金属などの非生物的なストレスに対する耐性因子とも考えられている(Aron and Kennedy, 2008)。松島(2010)は、PAを根に集積する木本植物の中に、高いAI耐性を有する種が多く存在することを報告している。さらに、Osawa et al. (2011)は、クスノキの根でPAを集積した表皮様の側根冠細胞が、AIストレス下でその内側に位置する表皮細胞の伸長を維持し、根の伸長に関与することを示唆し、有機酸の放出に寄らない新奇なAI耐性機構の存在を示唆している。*A. mangium* の高AI耐性に根端に含まれ

る PA や、PA を含んで脱落する境界様細胞および境界細胞が関与している可能性があるが明らかにされていない。

根や境界細胞に含まれる化学物質や放出される化学物質には、土壌病原菌に対して植物を防御する役割があるとされている。例えば、境界細胞から放出される抗菌物質が根圏で線虫の動きを止めるという観察があり(Hawes et al., 2000)、ムラサキの根毛に含まれる物質は菌の増殖を抑制することが *in vitro* の実験から明らかになっている(Brigham et al., 1999)。果皮や樹皮で認められているように PA には抗菌効果があることから(Scalbert, 1991; Barbehenn and Constabel, 2011)、根端に含まれる PA は生物的なストレスからの保護に寄与している可能性があるが、これまで調べられていない。PA などの植物が産生する化学物質は微生物と直接接触することで抗菌効果を発揮する。PA を内部に集積している *A. mangium* の境界細胞や境界様細胞が(III章)、根圏の生物ストレス耐性に関わっているかは不明である。

本章では、劣悪な土壌条件でも旺盛な成長を示す *A. mangium* の根のストレス耐性において、土壌と根の接点である根端における境界細胞や境界様細胞の産生、あるいはそれらの細胞に集積している PA が関わっているのかどうかを明らかにすることを目的とした。まず PA を集積する境界細胞や境界様細胞が *A. mangium* の高 Al 耐性と関与するかを調べた。そのために、根端を覆う鞘状組織の有無による Al 存在下における根の伸長特性を調べる栽培実験と、根への Al 集積を知るための染色実験と定量解析を行った。また、土壌中の病原菌に対する PA を集積した境界様細胞および境界細胞の抗菌効果の発現機構に関わる研究の前段として、抗菌効果の可能性を知るために、根端に PA の集積が確認されている *A. mangium* と PA 集積のないダイズの根へバクテリア(*Rhizobium rhizogenes*)を接種し、根端での増殖数を比較する実験を試行した。

IV-2 材料と方法

IV-2-1 *A. mangium* とダイズの Al 処理

IV-2-1-1 植物材料と栽培条件

A. mangium とダイズの播種方法および栽培条件は、それぞれ「II-2-1-1」と「II-2-3-1」と同様である。Al 処理として、0 μM または 500 μM 塩化アルミニウム(III)六水和物を含む 0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)で *A. mangium* を 24 時間または 48 時間水耕栽培した。ダイズは 25 μM 塩化アルミニウム(III)六水和物を含む 0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)で 24 時間水耕栽培した。

IV-2-1-2 処理と解析方法

IV-2-1-2-1 *A. mangium* の根の伸長量の測定

A. mangium の根端を覆う鞘状組織が Al 耐性に関与しているかを調べるために、根端からピンセットで鞘状組織を取り外した根と、取り外さずにそのままの根を 48 時間 Al 処理した。Al 処理開始時と終了時の根の長さを定規で測定し、その差を根の伸長量として求めた。

IV-2-1-2-2 *A. mangium* 根端の PA 集積と細胞系列の解析

根端で PA を集積した細胞の分化の道筋をたどって細胞系列を調べるために、Al 処理した *A. mangium* の根を FAA で固定し、「II-2-3-2」と同様の方法で縦断切片を作製し、トルイジンブルーO(TBO)溶液で染色した。また、「III-2-1-2」と同様の方法で生根の横断切片を作製し、パラ-ジメチルアミノ桂皮酸アルデヒド(DMACA)溶液で PA を染色した。細胞系列の解析には、*A. mangium* の根の TBO 染色した縦断切片を光学顕微鏡下で撮影した画像を用いた。根の静止中心から基部側に 0.5 mm 間隔で 4 mm まで区分し、各区分の根頂端側から連続する表皮細胞と側根冠細胞の長径長を測定した。細胞数が多い場合には、区分の

先端側から 5 個の細胞を測定した。

根の縦断切片で TBO 溶液によって赤紫色を呈する物質は、多糖類を含むムシゲルとした。

IV-2-1-2-3 *A. mangium* とダイズの根端に集積した Al の組織化学的解析

24 時間 Al 処理した *A. mangium* とダイズの根を 0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5) で 3 回洗った後、0.1% (w/v) エリオクロームシアニン R (東京化成工業、東京)溶液に 10 分間浸し、根に集積する Al を染色した。染色後の根を 0.5 mM 塩化カルシウム溶液で 3 回洗い、実体顕微鏡下(SZ-PT、オリンパス、東京)で観察し、撮影した(Coolpix 4500、ニコン、東京)。また、染色後の *A. mangium* の根端から鞘状組織を実体顕微鏡下でピンセットを用いて取り除き、根伸長部位に相当する根頂端から 1-2 mm を剃刀の刃を用いて薄く輪切りにした。ダイズの根も、根伸長部位に相当する根頂端から 3-4 mm 領域を輪切りにした。これらの薄層切片を光学顕微鏡下(BX-51、オリンパス、東京)で観察し、撮影した(DP71、オリンパス、東京)。

IV-2-1-2-4 *A. mangium* の根に集積する Al の定量分析

根の Al 量を定量するために、24 時間 Al 処理した *A. mangium* の根頂端から 5 mm を切り取って 0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)で洗い、根端と鞘状組織に分けて、それぞれを 80°C で 24 時間以上乾燥させた。根端と鞘状組織に 60 % 硝酸を加えて 115°C に加熱した後、さらに 60 % 過塩素酸を加えて 140°C で加熱して湿式灰化した。各組織の Al 量をフレイムレス原子吸光光度計(SIMMA 6000、Perkin Elmer、Waltham、MA)で測定した。

IV-2-2 *A. mangium* とダイズの無菌植物体への *Rhizobium rhizogenes* 接種実験

IV-2-2-1 植物材料と栽培条件

A. mangium とダイズの無菌の実生苗の育成方法は、「II-2-2-1」と同様である。播種後 4-5 日目の *A. mangium* と播種後 2-3 日目のダイズの実生苗(根長約 1.5 cm)を用いた。

IV-2-2-2 接種源の準備

接種源として毛状根の形成を促進する *Rhizobium rhizogenes* (以下バクテリアとする、JCM no.20920 ; 理研バイオリソースセンターから提供された)(Veena and Taylor, 2007)を用いた。バクテリアを普通寒天培地 (栄研化学、東京)に撒き、25°C暗黒下で1週間培養した。無菌条件下で培地上の単一コロニーからバクテリアを白金耳でかき取り、5 ml 液体培地に移植した。液体培地は、純水に 5 mg ml⁻¹ ペプトン (ミクニ化学産業、東京)、3 mg ml⁻¹ 酵母エキス (Becton, Dickinson and Co., Franklin lakes, NJ)を加えて調製し、1 N 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.0 に調整した後、オートクレーブ(121°C、15 分間)で滅菌して用いた。バクテリアを移植した液体培地をロータリーシェーカー(タイテック、越谷)上で 100 rpm で振とうさせながら、25°C暗黒下で 48 時間培養した。根に接種する菌体数をそろえるために、48 時間後の菌培養液の濁度を分光光度計(U-2000、日立、東京)で測定し、菌体濃度の指標とした。波長 600 nm における吸光度は 1.4 前後だった。その後、菌培養液を PS buffer で 200 倍に希釈し、根への接種源とした。PS buffer は、1 mM PIPES(piperazine-1,4-bis (2-ethanesulfonic acid))、同仁化学研究所、熊本県益城町)と 20 mM ソルビトール(和光純薬工業、大阪)を含み、0.5 N 水酸化カリウムで pH 6.8 に調整した後オートクレーブ(121°C、15 分間)で滅菌して用いた。

IV-2-2-3 処理と解析方法

バクテリアを根に確実に接触させるために、減圧浸潤法(岩渕ら、2000)を改変して用いた。接種源の菌溶液、または対照として滅菌した PS buffer に *A. mangium* とダイズの幼根全体を浸し、減圧下(94 kPa)に 3 分間置いてバクテリアを接種した。根表面に残る余分な菌培養液を除くために根を滅菌水で 2 回洗い、湿らせた 2 枚の濾紙の間に根をはさみ、植物体が垂直になるようにして 25°Cの暗黒下で 48 時間栽培した。

バクテリア数を根の部位別に計測するために、接種後 0 時間目の根頂端から 1-3 mm の 2

mm 間(接種部位)、接種後 48 時間目の根頂端から 1-3 mm の 2 mm 間(伸長部位)と、伸長した部位を除いた 0 時間目の根頂端から 1-3 mm に相当する 2 mm 間(接種部位)をメスで切り取った。これら切り取った根片を 1.5 ml 容量のチューブに入れ、1.0 ml の滅菌水を加えて転倒混和した後、この溶液のうち 50 μ l を普通寒天培地上に撒き、25°C 暗黒下で 2 日間培養した。2 日目に培地上に形成したコロニー数を数えた。接種源を普通寒天培地に播いた時に形成されたコロニーの形態と比較することで、*R. rhizogenes* のコロニーであるかを判断した。0 時間目と 48 時間目の *A. mangium* とダイズの根の各部位のバクテリア数は、切り取った 1 本の根の単位表面積当たり(切断面の面積を除く)のコロニー形成ユニット(colony forming unit: CFU/mm²)として示した。根表面積は、根の顕微鏡画像から長さと同平均直径を測定し、円柱体と仮定して算出した。

IV-3 結果

IV-3-1 AI 処理した *A. mangium* の根の伸長と境界様細胞の離脱

A. mangium の根端を覆う鞘状組織が AI 耐性に関与しているかを調べるために、鞘状組織の有無で AI 処理による根の伸長抑制量を比較した。48 時間 AI 処理したとき、根端を鞘状組織が覆う場合と覆わない場合で、AI 無処理に比べて、AI 処理した根の伸長量はそれぞれ 28 %、32 %抑制され(図IV-1A)、鞘状組織の有無で AI 処理による根の伸長抑制に有意差はなかった(図IV-1A)。鞘状組織を取り除いた根端から AI 存在下においても根の伸長に伴って境界様細胞の離脱が起こった(図IV-1B)。

IV-3-2 *A. mangium* 根端の PA 集積と細胞系列の解析

主に境界様細胞として脱落する側根冠細胞の AI 耐性への関与を検討するために、根端の縦断面の細胞系列と PA 集積を調べた。AI 処理の有無に関わらず、*A. mangium* の側根冠細胞に PA が集積していた(図IV-2)。AI 処理によって、特に根頂端 0-1 mm 周囲に離脱する境界様細胞が減少する傾向が見られた(図IV-2)。また、AI 無処理の根頂端から 0-2 mm 部位で、境界様細胞や境界細胞の細胞間にムシゲルの TBO 染色による赤紫色の呈色が認められたが、AI 処理した根端ではコルメラ部分(根頂端から 0-1 mm 内)の表層に限って細胞間でムシゲルが認められた(図IV-2)。AI 処理した根端の根頂端から 0-1 mm 部位の側根冠細胞層の層数は、0 時間目に比べ増加する傾向が見られた(図IV-2)。AI 処理が側根冠細胞と表皮細胞の細胞伸長に与える影響を調べるために、それぞれの細胞長を根頂端からの距離による部位別に測定した。AI 処理の有無に関わらず、図 II-6 に示した細胞伸長前の細胞からなる根端範囲に含まれる、根頂端から 1-2 mm の部位に存在する表皮細胞と、その外側に近接する側根冠細胞(図IV-3A, B, 側根冠細胞 1, 2)の細胞長は同程度であり、2 mm より基部側で細胞長が長くなり(図IV-3A, B)、これらの細胞が同様の細胞分裂と伸長経過を示すことが分かった。AI 処理により、細胞長のばらつきが表皮細胞に比べ側根冠細胞で抑えられる傾向

が認められたが、両細胞層ともに根端からの距離と細胞長との関係に不連続性は認められなかった(図IV-3A, B)。また、AI 処理した根で根頂端から 1 mm 部位の側根冠細胞層の数は 9 層で、AI 無処理の 6 層よりも多く(図IV-3A, B)、AI 処理による境界様細胞の離脱抑制が考えられた。一方で、ダイズの側根冠細胞の伸長は、表皮細胞の細胞伸長が始まる部位よりも先端ですでに起こっていた(図IV-3C, D)。また、根頂端から基部側のダイズの表皮細胞伸長は、AI 無処理で連続的な増加を示したのに対して、AI 処理で根頂端から 5 mm 付近で不連続だったことから(図IV-3C, D)、AI 処理によって表皮の細胞伸長が抑えられたことを示していた。以上のことから、高濃度の AI 存在下において、*A. mangium* の根の伸長域で PA を集積する側根冠細胞がその内側に位置する表皮細胞の伸長維持に関与している可能性が考えられた。

IV-3-3 *A. mangium* とダイズの根に集積する AI の染色および定量解析

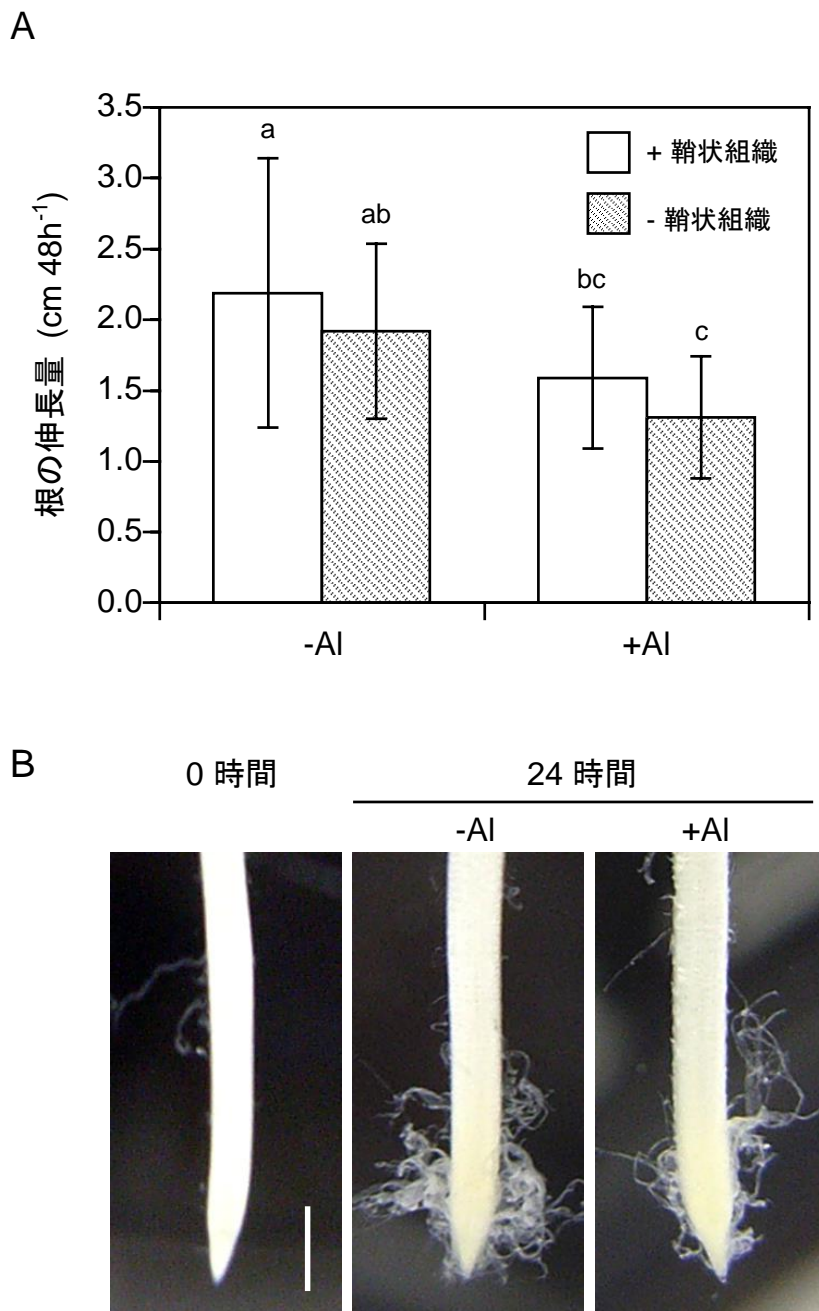
根の伸長域に集積する AI が根の伸長を阻害することから、*A. mangium* とダイズの根の伸長域に集積する AI をエリオクロームシアニン R で染色した。*A. mangium* の根伸長域に含まれる部位(根頂端から 1-2 mm)において、AI は側根冠細胞の表層に薄く集積していた(図IV-4A,B)。一方、ダイズの根伸長域に含まれる部位(根頂端から 3-4 mm)において、AI は *A. mangium* に比べて濃く集積していた(図IV-4C,D)。

また、*A. mangium* の AI 処理した根で、AI は根表面に比べて根端を覆った鞘状組織に集積していた(図IV-5A)。鞘状組織を取り外した根の呈色は一様に弱く、根表面に AI を集積した境界様細胞が不規則に付着した(図IV-5A)。鞘状組織が付着した根端の AI 濃度は、鞘状組織を取り除いた根端の 3.9 倍だった(図IV-5B)。AI 処理したダイズの根で AI は濃く集積し、根表面に亀裂が生じた(図IV-5C)。また、AI は根端に存在した境界細胞にも集積した(図IV-5C)。

IV-3-4 *A. mangium* とダイズの根でのバクテリアの増殖評価

A. mangium とダイズの根にバクテリアを接種した直後に、根頂端から 1-3 mm 部位(接種部位)で計測された根表面積あたりのバクテリア数に有意差はなかった(図IV-6)。バクテリアを接種して 48 時間後のバクテリア数は、両種とも接種時よりも増えており、バクテリアは根表面に定着していたと考えられる。48 時間後の *A. mangium* の接種部位で計測されたバクテリア数は、ダイズの同部位に比べて有意に少なかった(図IV-6)。また、48 時間後の伸長部位のバクテリア数も、*A. mangium* でダイズに比べて有意に少なかった(図IV-6)。接種部位におけるバクテリア数の 48 時間後の増殖率(接種直後の接種部位のバクテリア数の平均値に対する 48 時間後の伸長部位のバクテリア数の比率)の平均値±標準偏差は、*A. mangium* とダイズでそれぞれ 23 ± 19 倍と 47 ± 24 倍であり、データのばらつきが大きかったが *A. mangium* の増殖率はダイズの約 1/2 だった(t-検定, $P=0.096$, $n=5-6$)。

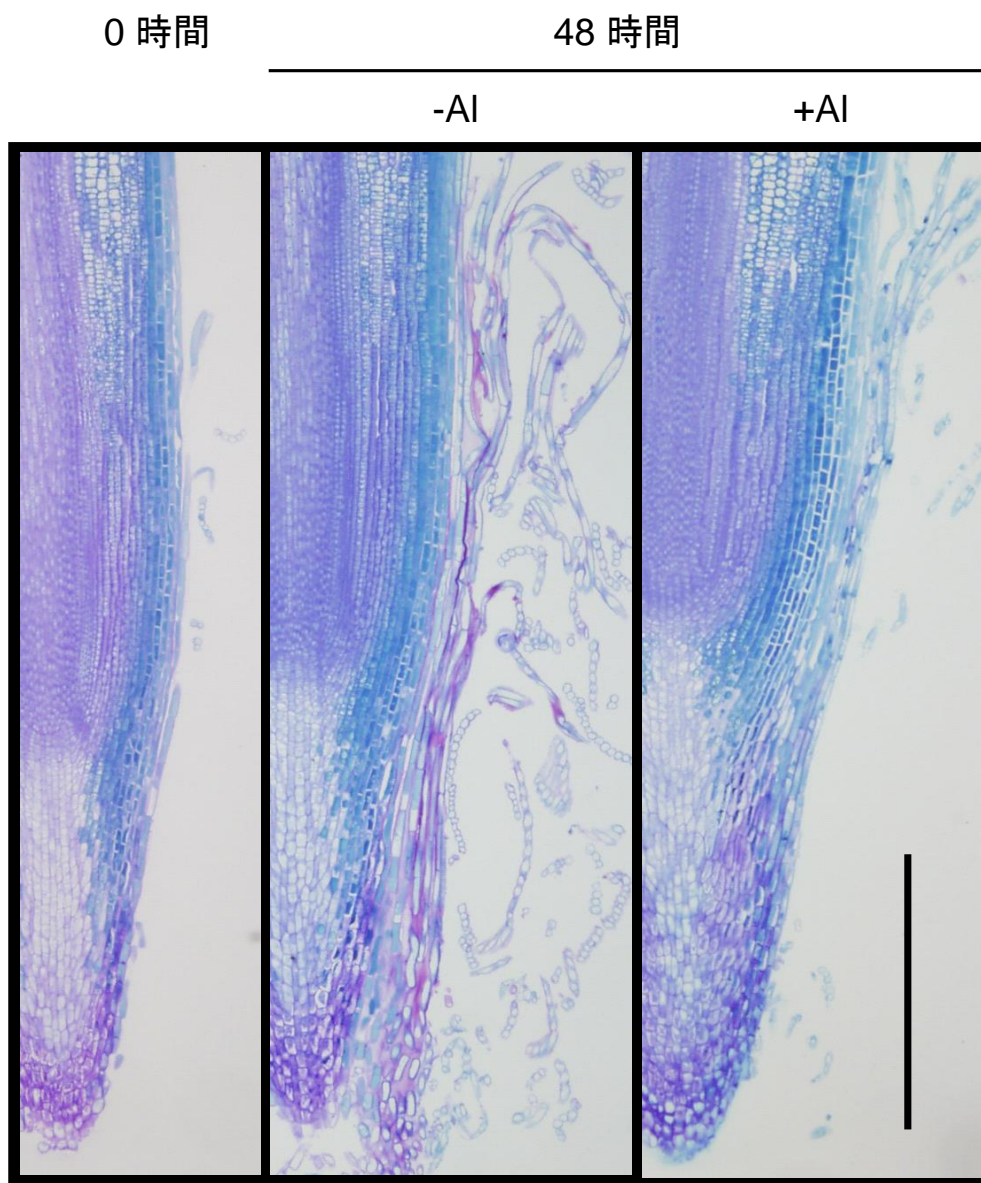
バクテリアを接種した根の 48 時間あたりの伸長量は、*A. mangium* で 1.1 ± 0.2 cm、ダイズで 5.2 ± 1.7 cm で、*A. mangium* の根の伸長速度はダイズの約 1/5 だった($n=6-8$)。また、バクテリアを接種しない根の 48 時間あたりの伸長量は、*A. mangium* で 1.0 ± 0.2 cm、ダイズで 4.4 ± 1.0 cm で、バクテリア接種した根との差はなかった(t 検定, $n=6-8$)。



図IV-1 AI 処理下の *A. mangium* の根の伸長と境界様細胞の剥離

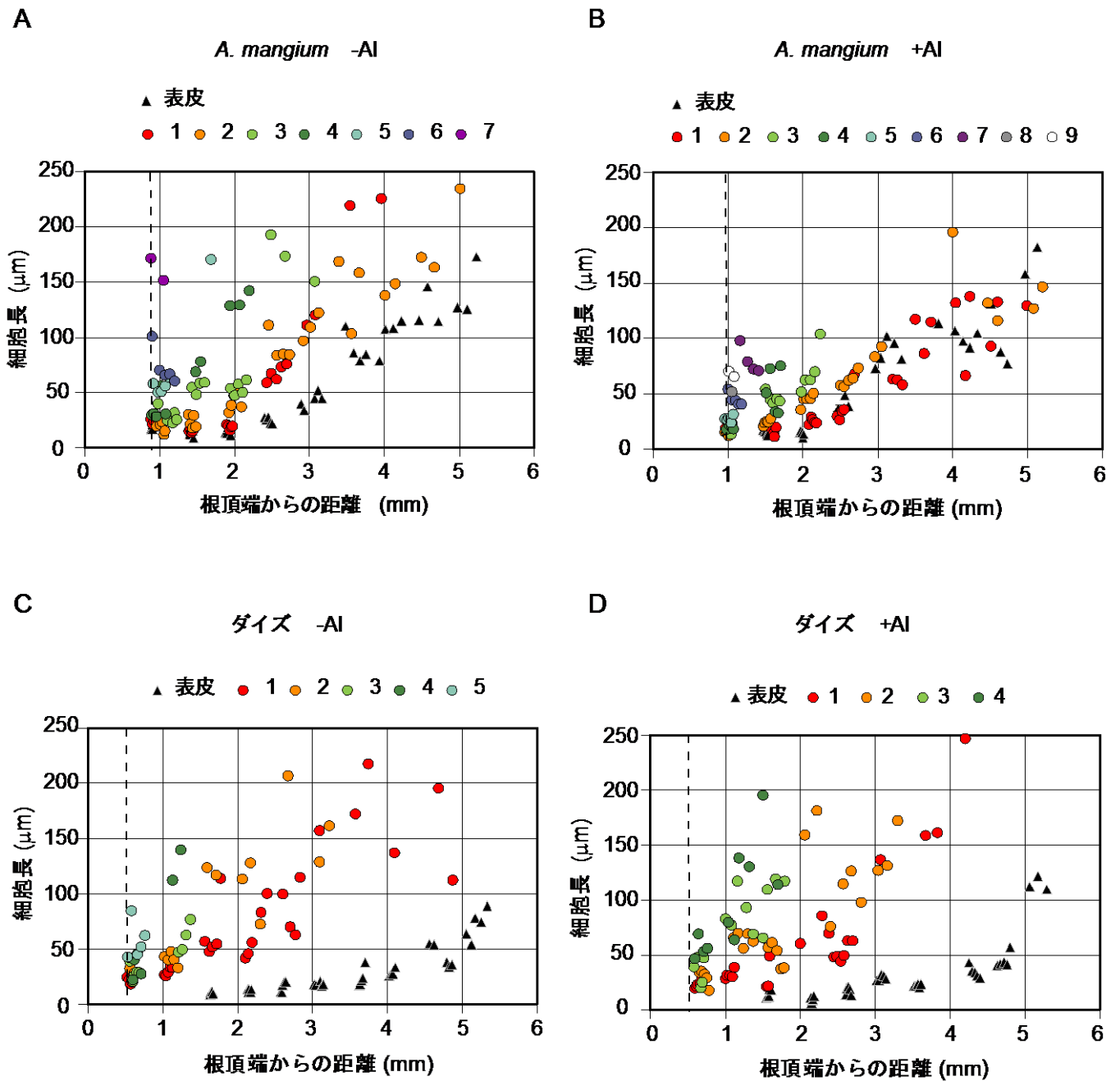
(A) *A. mangium* の根端を鞅状組織が覆った根と、根端から鞅状組織を取り外した根を、0 または 500 μM の AI を含む 0.5 mM 塩化カルシウム溶液(pH 4.5)で 48 時間 AI 処理したときの根の伸長量を表す。値は平均 \pm 標準偏差(n=16-20)。異なるアルファベットは $P < 0.05$ で AI 処理の有無の間に有意差があることを示す(テューキーの方法)。

(B) AI 処理前および 24 時間 AI 処理した後の *A. mangium* 根端の実体顕微鏡像。スケールバーは 1 mm を表す。



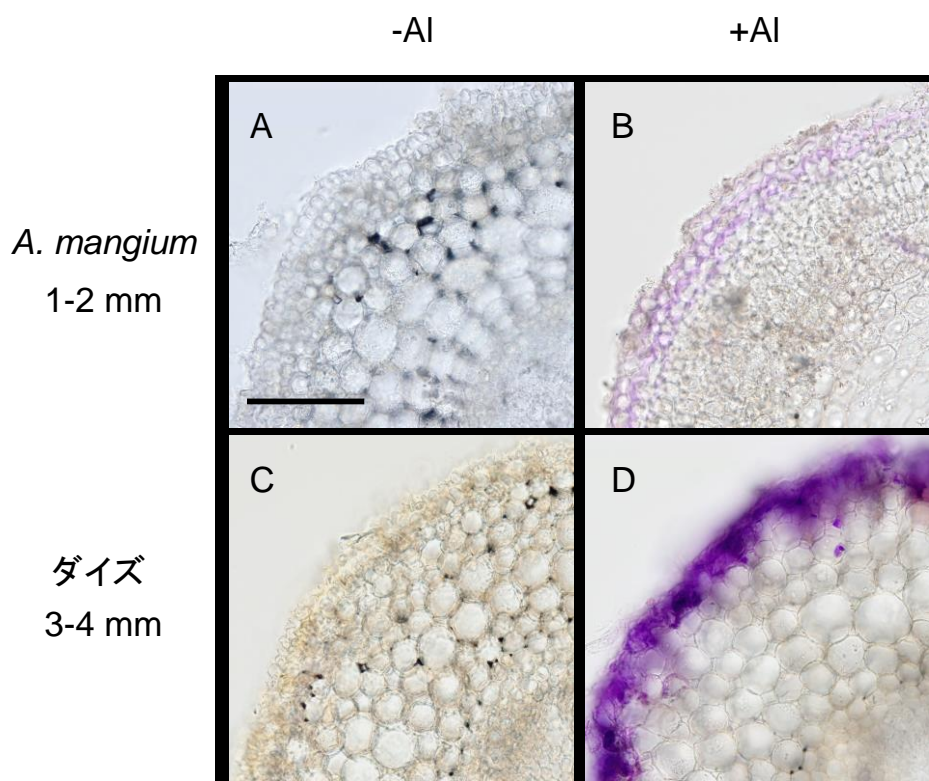
図IV-2 Al 処理した *A. mangium* の根端の PA 集積

A. mangium の根端から鞘状組織を取り外した直後と、0.5 mM 塩化カルシウム溶液に 0 μ M または 500 μ M の Al を含む溶液 (pH 4.5) で 48 時間 Al 処理した根端の縦断切片を、0.1 % (w/v) トルイジンブルー-O で染色した光学顕微鏡像。スケールバーは 0.5 mm を表す。



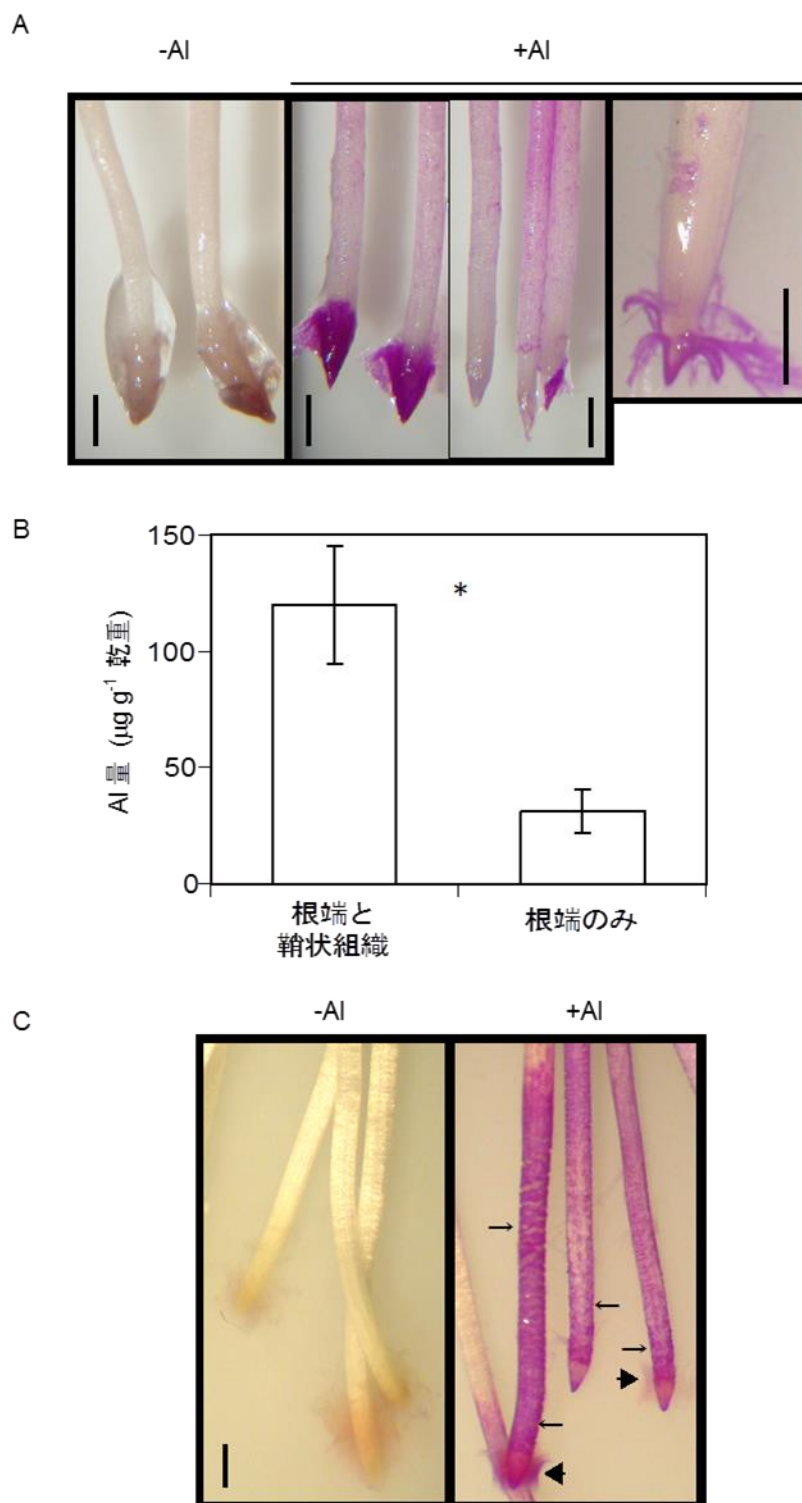
図IV-3 *A. mangium* とダイズの側根冠細胞と表皮細胞の細胞系列

A. mangium を 0 μM (A) または 500 μM (B) の Al を含む塩化カルシウム溶液(pH 4.5)で 48 時間、ダイズを 0 μM (C) または 25 μM (D) の Al を含む塩化カルシウム溶液(pH 4.5)で 6 時間それぞれ水耕栽培し、根頂端から 6 mm までの表皮細胞(▲)と側根冠細胞(○)の細胞長を測定した。表皮細胞を「0」としたとき、その外側に近接する側根冠細胞層を「1」とし、内側から外側に順に番号を付けた。破線は静止中心の位置を示す。



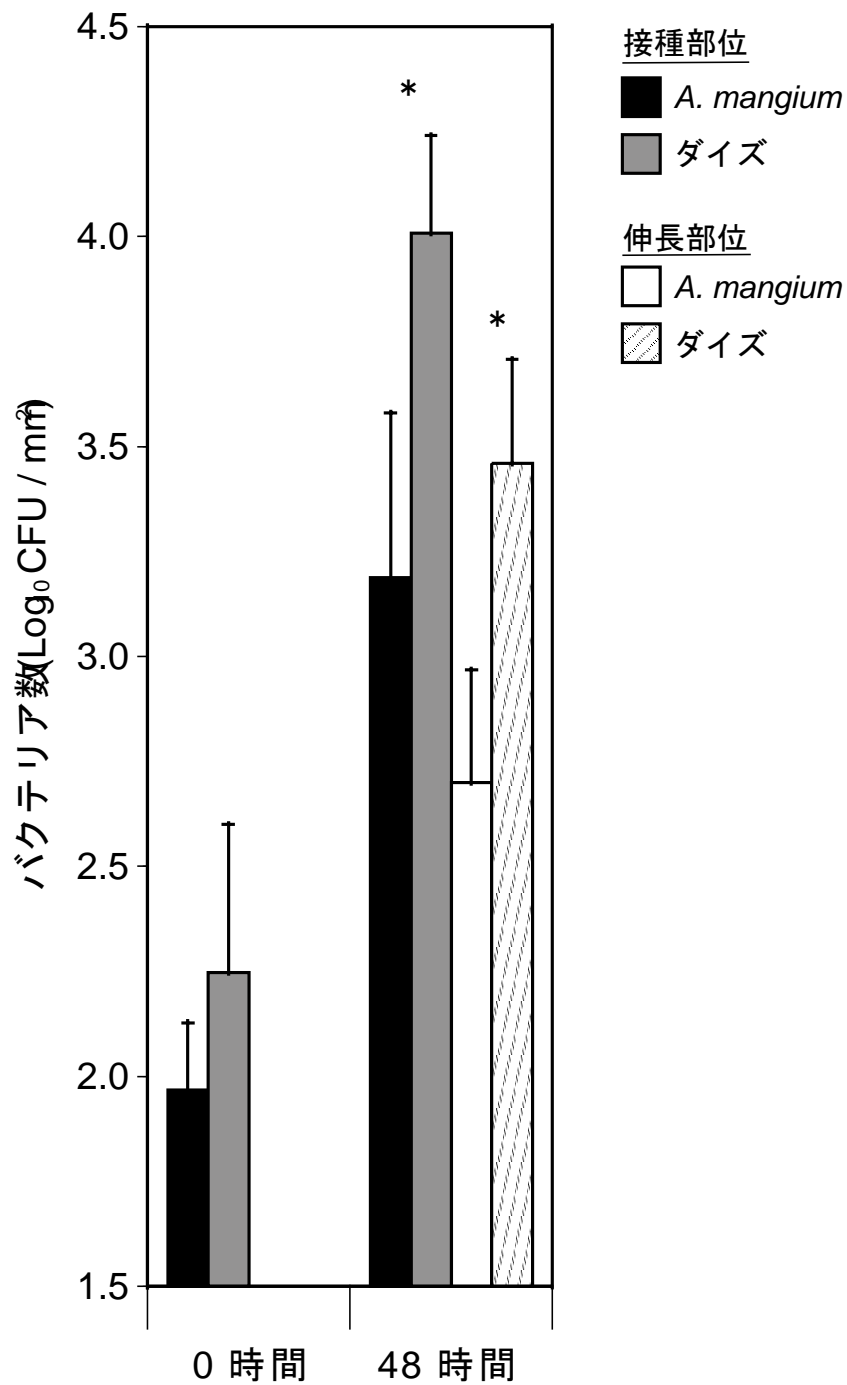
図IV-4 *A. mangium* とダイズの根伸長域に集積する Al

A. mangium(A, B)とダイズ(C, D)の根伸長域に相当する根頂端からの部位の Al を、0.1 % (w/v)エリオクロームシアニン R 溶液で染色した横断面の明視野像を示す。Al 処理は、*A. mangium*で 0 μM または 500 μM 、ダイズで 0 μM または 25 μM の Al を含む塩化カルシウム溶液(pH 4.5)で 24 時間行った。スケールバーは 100 μm を表す。



図IV-5 *A. mangium* とダイズの根への Al 集積

(A) $0 \mu\text{M}$ または $500 \mu\text{M}$ の Al を含む 0.5 mM 塩化カルシウム溶液中($\text{pH } 4.5$)で 24 時間 Al 処理した *A. mangium* の根を、 0.1% (w/v)エリオクロームシアニン R 溶液で染色した時の根端を示す。スケールバーは 1 mm を表す。(B) 24 時間 Al 処理した *A. mangium* の根で、鞘状組織が覆った根端と鞘状組織を取り外した根端の Al 量を示したグラフ。値は平均 \pm 標準偏差 ($n = 6$)。*は、 $P < 0.05$ で根端と鞘状組織、根端のみの間に有意差があることを示す(t 検定)。(C) $0 \mu\text{M}$ または、 $25 \mu\text{M}$ Al を含む 0.5 mM 塩化カルシウム溶液中($\text{pH } 4.5$)で 24 時間 Al 処理したダイズの根を、 0.1% (w/v)エリオクロームシアニン R 溶液で染色した根端を示す。図中の矢印(→)は亀裂の入った部位を示し、三角印(▼)はエリオクロームシアニン R で呈色した境界細胞を示す。スケールバーは 1 mm を表す。



図IV-6 *A. mangium* とダイズの根での細菌の増殖数

A. mangium とダイズの根に細菌 (*Rhizobium rhizogenes*) を接種後、0 時間目と 48 時間目の接種部位と伸長部位における細菌数をコロニー形成ユニット (CFU) として示す。値は平均±標準偏差 (n=5-6)。* は $P < 0.05$ で細菌数に有意差があることを示す (t-検定)。

IV-4 考察

A. mangium の境界様細胞が高 Al 耐性に寄与しているかを検討した結果、Al は *A. mangium* の根表面に比べ、根端を覆った鞘状組織により多く集積したが(図IV-3 A,B、図IV-5B)、鞘状組織の有無で Al 処理下の根の伸長量に違いはなく(図IV-1)、境界様細胞が根伸長部を覆うことの Al 耐性への寄与は明瞭でなかった。

ダイズの根の伸長は、50 μ M Al で12時間水耕栽培すると完全に抑制される(Osawa et al., 2011)。Al 処理したダイズの根伸長域では、Al が濃く集積し(図IV-4D)、根の表面構造が損傷した(図IV-5C)。Al はオクラの胚軸の表皮細胞に集積し、細胞伸長を阻害するという報告がある(Ma et al., 1999)。Al がダイズの根の表皮細胞に直接作用した可能性が考えられる。

500 μ M の Al 処理したとき、*A. mangium* の側根冠細胞で覆われた根伸長域表層に Al の呈色が認められるが、表皮細胞には Al の集積は認められず(図IV-4 B)、根端表層に比べ根端を覆った鞘状組織により多く Al が集積していた(図IV-5A, B)。また、側根冠細胞には PA が集積しており、Al 処理の有無で PA 集積に顕著な違いは認められなかった(図IV-2)。クスノキの根端で PA を集積した表皮様の細胞層が、Al 存在下において細胞の伸長維持に関与し、その内側にある表皮細胞や皮層細胞の細胞伸長が維持されることが指摘されている(Osawa et al., 2011)。高濃度の Al 存在下においても *A. mangium* の根の伸長が維持されるのは、クスノキと同様に、根の伸長域において、PA を集積する側根冠細胞がその内側に位置する表皮細胞への Al 集積を抑制し、伸長維持に関与している可能性がある。

500 μ M Al 処理下での *A. mangium* の根の伸長は、30 %程度の阻害であり(図IV-1)、境界様細胞の離脱に Al 処理と無処理で大きな違いは認められなかった(図IV-1B)。Al 存在下でも境界様細胞が根の伸長に伴って離脱していたことから、側根冠細胞に集積した Al が境界様細胞の形成にともない、境界様細胞とともに離脱している可能性があり、*A. mangium* の根端への Al の更なる集積を抑制している可能性がある。

バクテリア接種実験では、バクテリア接種後 48 時間目に計測されたバクテリア数を *A. mangium* とダイズで比較したところ、根の接種部位と伸長部位ともに *A. mangium* で有意に少なかった(図IV-6)。しかし増殖率では、データのばらつきが大きく、*A. mangium* 根端で増殖しにくいことを明確には示せなかった。しかし、*A. mangium* の増殖率はダイズの約 1/2 であり、PA が集積した境界様細胞による抗菌効果の可能性については否定されなかった。

PA を集積した境界様細胞の産生がバクテリアの増殖を抑制する機構としては、PA の抗菌効果 (Dixon et al., 2005; Scalbert, 1991)の他に、境界様細胞が面的に剥がれることによる除去効果も考えられる。例えば、根などの物の表面に付着した物質を取り除くことを考えたとき、その下の層ごと面的に剥がすことによって根表面の付着物質を一度に取り除くことができる。一方で、根表面がばらばらに剥がれることによっても付着物質を取り除くことはできるが、面的に剥がれる方が付着物質の除去効果は高いと考えられる。このことから、境界細胞のみのダイズに比べて、境界様細胞も存在する *A. mangium* で根表面に付着したバクテリアが効果的に除去されるのではないかと推測する。エンドウマメでは、根端に子のう菌の *Nectria haematococca* を接種することによって境界細胞と菌糸によるマント状の構造体が形成されるが、その構造体の下にある根は感染を受けていないことが報告されている(Gunawardena and Hawes, 2002)。マント状の構造体を取り除くことで、*N. haematococca* による更なる感染が抑えられていることが示唆される。

今後、今回の実験結果を踏まえて、境界様細胞や PA と病原菌との関連を明らかにするための更なる実験が必要であると考え。植物の根端における PA や境界様細胞の有無、接種する病原微生物の種や数などとの組み合わせを考慮した実験系の構築が必要と考える。

以上本章では、境界様細胞が恒常的に生成され、離脱すること、同時に PA が側根冠細胞と境界様細胞および境界様細胞に集積することが、根端への AI の集積抑制に貢献することを示唆し、*A. mangium* の根のストレス耐性に境界様細胞産生が関与することを示唆した。

V章

総合考察

— *A. mangium* の根における境界様細胞の生成と役割 —

本章では、II-IV章の結果を踏まえて、*A. mangium* の根における境界様細胞の生成と根の成長に果たす役割を論じる。

II章では、*A. mangium* の水耕栽培時の根端に鞘状組織が形成され、それを外しても再形成されることを明らかにした。そして、この鞘状組織は複数の細胞がシート状に結合して離脱する境界様細胞であることを示した。境界様細胞は側根冠細胞由来であること、境界様細胞は根の伸長域の側根冠細胞との結合を維持していること、境界様細胞の離脱速度は根の伸長速度と連動していることを明らかにした。このことから、*A. mangium* の境界様細胞の生成と離脱はストレス誘導的でなく、常に行われていることが分かった。さらに、この境界様細胞は離脱時に生活性を維持していることを示した。また、根頂端から0-1 mm部位では境界様細胞に加え境界細胞も生成され、境界細胞の周囲をムシゲルが覆うことを示した。濾紙間や土壌中などの摩擦抵抗のかかる中を伸長した根表面にも、根端から離脱した境界様細胞が付着していることが確認した。

III章では、根端の組織化学的な観察によって、*A. mangium* の根端および大部分の境界様細胞内にプロアントシアニジン(PA)が集積することを明らかにした。*A. mangium* の根冠では、PAは主に側根冠細胞に集積し、コルメラには集積せず、同じ個体の根冠において、部位によって物質生成が異なることが分かった。濾紙間で根を伸長させた実験では、根の伸長跡にPAを集積している細胞が認められた。PAは境界様細胞および一部の境界細胞内に

保持されたまま根圏に放出され、根の伸長跡に残ることが示唆された。

A. mangium の境界様細胞は細胞間結合を維持し、境界細胞やシロイヌナズナの境界様細胞(Vicré et al., 2005) に比べて大きな塊として離脱する特性を持っていた。そのため、本研究ではこれまでの研究では解明できなかった根冠由来の細胞の離脱後の動態を明らかにすることができた。*A. mangium* の境界様細胞は、土壌中を伸長する根の頂端側の表面から生活性を有したままシート状に結合して剥がれていく。剥がれた境界様細胞は周囲の土壌などによって押しえられてその場に留まるが、根はその内側を伸び続けていくために、見かけ上、境界様細胞を基部側に残しながら根が伸長することになる。境界様細胞は根の伸長に伴って形成されるため、根の伸長が続く限り境界様細胞は剥がれ続け、根基部側のさまざまな部位に残る。境界様細胞に集積されている PA は、失活後も保持されるため、境界様細胞とともに根周囲に PA も存在することになる。これまでに境界細胞がアルミニウム耐性(Hawes et al., 2000; 松本, 2003)や根圏環境の形成(Hawes, 1990; Hawes et al., 2002)に関わっていることが明らかになっているが、これらの知見は境界細胞が放出される根端部位に限られていた。大きな塊として土壌中に放出される *A. mangium* の境界様細胞を研究材料とすることで、土壌環境ストレス耐性や根圏環境形成への根端からの離脱細胞の関わりについて、その全体像を調べるのが可能になると考えられる。

IV章では、*A. mangium* の多重ストレス耐性への潜在機能として、高濃度の Al とバクテリア接種に対する境界様細胞と PA の役割について検討を試みた。根における PA の存在は知られ始めたばかりである。松島(2010)による網羅的な解析により、草本植物に比べ多くの木本植物の根で PA の集積が認められている。また、PA を根に集積する木本種の方が、*A. mangium* と同様に、500 μM という高濃度の Al 存在下でも根の伸長が阻害されにくい種が多く存在するが、PA を集積する木本種でも Al 耐性の低い種も存在することが報告されている(松島, 2010)。Osawa et al. (2011)は、根端に集積する PA がクスノキの Al 耐性に寄

与していることを示唆している。本研究でも、PA が集積する側根冠細胞層より内側に Al の進入がないことを確認し、根端に集積する PA と *A. mangium* の Al 耐性の関わりを指摘した(図Ⅲ-3A, 図Ⅳ-4B)。PA を集積した境界様細胞の離脱と Al 耐性の関わりについては明確にできなかったが、根端に集積する PA の化学性や局在性と Al 耐性の関係を解析することで、有機酸の分泌(Ryan et al., 2001)によらない新奇の Al 耐性機構を明らかにできる可能性がある。バクテリア接種実験は、PA を根端の最表層の細胞に集積する *A. mangium* の方がダイズの根端に比べ増殖率が抑えられるという仮説を設けて実施した。データのばらつきが大きかったために、仮説を明確に支持する結果は示せなかったが、仮説が完全に否定される結果ではなかった。PA を集積した側根冠細胞が根端最表層を覆い、根の伸長に伴って境界様細胞としてシート状に離脱していくことが、土壌病原菌に対する抵抗性に参与しているどうかは今後の課題である。

以上本研究では、*A. mangium* を研究材料として使うことで、根冠から離脱する境界様細胞の生成および離脱後の動態の詳細を明らかにした。*A. mangium* の境界様細胞が細胞の大きな塊として離脱する特性を有することから、離脱後も根の周辺に存在し続けることを確認でき、根端から離脱する細胞の根圏環境形成における役割の一端を明らかにすることができた。特に、PA が集積した境界様細胞については、本研究が初めての報告である。PA は Al 耐性や抗菌効果などの作用を有することが知られており、*A. mangium* の高いストレス耐性との関連が示唆される。

根での PA を含む植物化学物質の生成の有無とその役割、離脱細胞の根圏における役割など、境界細胞や境界様細胞に関わる研究において、今後解明すべきことがまだ多く残っている。本研究で明らかになった結果をもとに、境界様細胞を始めとする根圏と直接接する根端の細胞や、PA などの植物化学物質の生成、代謝およびその機能を広く樹木の根において調べることで、土壌環境ストレス条件に生育する木本植物の耐性機構を知ることにつながると確信する。本研究はその一端を担えた研究と考える。

謝辞

本研究を行うにあたって、終始ご指導して下さった東京大学大学院農学生命科学研究科造林学研究室教授の丹下健博士、同じく造林学研究室助教の大澤裕樹博士に深く感謝するとともに、厚く御礼申し上げます。

同じく造林学研究室講師の益守眞也博士、東京大学アジア生物資源環境研究センター樹木生理学・熱帯造林学研究室教授の小島克己博士、同じく樹木生理学・熱帯造林学研究室の則定真利子博士、山ノ下卓博士には、本研究に関して多くのご助言をいただきました。また、論文執筆を進める上で、造林学研究室の大澤由樹子博士、田中一生博士、常田雅子さんには、多くの貴重なご意見をいただきました。これらの方々に深く感謝するとともに心から御礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、クロマツとコツブタケの共生苗を提供していただいた東京大学大学院農学生命科学研究科森林植物学研究室の呉炳雲博士、寺本宗正博士、そして *Rhizobium rhizogenes* を提供していただいた理研バイオリソースセンターに御礼申し上げます。また、ご協力とご助言をいただいた造林学研究室および樹木生理学・熱帯造林学研究室の諸氏に感謝いたします。農学系教務課の今林有里さんには、論文提出の手続きの際に大変お世話になりました。

最後に、博士課程での研究の機会を与えてくれ、感謝しきれないほど多くの支援と協力をしてくれた両親と、支えてくれた伯母、姉、弟ら家族と友人らに深く感謝いたします。

引用文献

- Aron PM, Kennedy JA** (2008) Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research* 52: 79-104
- Barbehenn RV, Constabel CP** (2011) Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* 72: 1551-1565
- Barlow PW** (2002) The root cap: Cell dynamics, cell differentiation and cap function. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 261-286
- Bengough AG, McKenzie BM** (1997) Sloughing of root cap cells decreases the frictional resistance to maize (*Zea mays* L) root growth. *Journal of Experimental Botany* 48: 885-893
- Blair AC, Nissen SJ, Brunk GR, Hufbauer RA** (2006) A lack of evidence for an ecological role of the putative allelochemical (+/-)-catechin in spotted knapweed invasion success. *Journal of Chemical Ecology* 32: 2327-2331
- Bogs J, Jaffe FW, Takos AM, Walker AR, Robinson SP** (2007) The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiology* 143: 1347-1361.
- Brigham LA, Michaels PJ, Flores HE** (1999) Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiology* 119: 417-428
- Brigham LA, Woo HH, Nicoll SM, Hawes MC** (1995) Differential expression of proteins and messenger-RNAs from border cells and root-tips of pea. *Plant Physiology* 109: 457-463

- Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Munday GK** (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 524-535
- Brundrett MC, Enstone DE, Peterson CA** (1988) A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant-tissue. *Protoplasma* 146: 133-142
- Cannesan MA, Gangneux C, Lanoue A, Giron D, Laval K, Hawes M, Driouich A, Vicré-Gibouin M** (2011) Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*. *Annals of Botany* 108: 459-469
- Curlango-Rivera G, Duclos DV, Ebolo JJ, Hawes MC** (2010) Transient exposure of root tips to primary and secondary metabolites: Impact on root growth and production of border cells. *Plant and Soil* 332: 267-275
- de Colmenares NG, Ramirez-Martinez JR, Aldana JO, Ramos-Nino ME, Clifford MN, Pekerar S, Mendez B** (1998) Isolation, characterisation and determination of biological activity of coffee proanthocyanidins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 368-372
- De Micco V, Aronne G** (2007) Combined histochemistry and autofluorescence for identifying lignin distribution in cell walls. *Biotechnic and Histochemistry* 82: 209-216
- Dixon RA, Xie DY, Sharma SB** (2005) Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* 165: 9-28
- Doran JC** (1997) Chapter 4; Seed, nursery practice and establishment. In Doran JC and Turnbull JW, eds, *Australian trees and shrubs: Species for land rehabilitation and farm planting in the Tropics*. ACIAR, Canberra, Australia. 1-29pp.
- Doran JC, Turnbull JW, Martensz PN, Thomson LAJ, Hall N** (1997) Chapter 5;

Introduction to the species' digests. In JC Doran and JW Turnbull, eds, Australian trees and shrubs: Species for land rehabilitation and farm planting in the tropics. ACIAR, Canberra, Australia. 11pp.

Driouich A, Durand C, Cannesan MA, Percoco G, Vitré-Gibouin M (2010) Border cells versus border-like cells: Are they alike? *Journal of Experimental Botany* 61: 3827-3831

Driouich A, Durand C, Vitré-Gibouin M (2007) Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science* 12: 14-19

Duguma B, Tonye J, Kanmegne J, Manga T, Enoch T (1994) Growth of 10 multipurpose tree species on acid soils in Sangmelima, Cameroon. *Agroforestry Systems* 27: 107-119

Duke SO, Blair AC, Dayan FE, Johnson RD, Meepagala KM, Cook D, Bajsa J (2009) Is (-)-catechin a novel weapon of spotted knapweed (*Centaurea stoebe*)? *Journal of Chemical Ecology* 35: 141-153

Durand C, Vitré-Gibouin M, Follet-Gueye ML, Duponchel L, Moreau M, Lerouge P, Driouich A (2009) The organization pattern of root border-like cells of *Arabidopsis* is dependent on cell wall homogalacturonan. *Plant Physiology* 150: 1411-1421

Gochnauer MB, Sealey LJ, McCully ME (1990) Do detached root-cap cells influence bacteria associated with maize roots? *Plant Cell and Environment* 13: 793-801

Groot EP, Doyle JA, Nichol SA, Rost TL (2004) Phylogenetic distribution and evolution of root apical meristem organization in dicotyledonous angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 165: 97-105

Grunewald W, van Noorden G, van Isterdael G, Beeckman T, Gheysen G, Mathesius U (2009) Manipulation of auxin transport in plant roots during rhizobium symbiosis and nematode parasitism. *Plant Cell* 21: 2553-2562

- Guillon S, Tremouillaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P** (2006) Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends in Biotechnology* 24: 403-409
- Guinel FC, McCully ME** (1987) The cells shed by the root cap of *Zea* - their origin and some structural and physiological properties. *Plant Cell and Environment* 10: 565-578
- Gunawardena U, Hawes MC** (2002) Tissue specific localization of root infection by fungal pathogens: Role of root border cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 1128-1136
- Hamamoto L, Hawes MC, Rost TL** (2006) The production and release of living root cap border cells is a function of root apical meristem type in dicotyledonous angiosperm plants. *Annals of Botany* 97: 917-923
- Hawes MC** (1990) Living plant-cells released from the root cap - a regulator of microbial-populations in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129: 19-27
- Hawes MC, Bengough G, Cassab G, Ponce G** (2002) Root caps and rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 352-367
- Hawes MC, Brigham LA, Wen F, Woo HH, Zhu Z** (1998) Function of root border cells in plant health: Pioneers in the rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology* 36: 311-327
- Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao XW** (2000) The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science* 5: 128-133
- Hawes MC, Lin HJ** (1990) Correlation of pectolytic enzyme-activity with the programmed release of cells from root caps of pea (*Pisum-Sativum*). *Plant Physiology* 94: 1855-1859
- Hawes MC, Pueppke SG** (1986) Sloughed peripheral root cap cells - yield from different species and callus formation from single cells. *American Journal of Botany* 73:

1466-1473

- Heimsch C, Seago JL, Jr.** (2008) Organization of the root apical meristem in angiosperms. *American Journal of Botany* 95: 1-21
- Hoffmann T, Friedlhuber R, Steinhauser C, Tittel I, Skowranek K, Schwab W, Fischer TC** (2012) Histochemical screening, metabolite profiling and expression analysis reveal Rosaceae roots as the site of flavan-3-ol biosynthesis. *Plant Biology* 14: 33-40
- Huang C-F, Yamaji N, Nishimura M, Tajima S, Ma JF** (2009) A rice mutant sensitive to Al toxicity is defective in the specification of root outer cell layers. *Plant and Cell Physiology* 50: 976-985
- Iijima M, Sako Y, Rao TP** (2003) A new approach for the quantification of root-cap mucilage exudation in the soil. *Plant and Soil* 255
- Iijima M, Morita S, Barlow PW** (2008) Structure and function of the root cap. *Plant Production Science* 11: 17-27
- 池田信輔** (2010) ツバキ科種の地上器官のアルミニウム集積を分ける輸送要因の解析. 東京大学 修士学位論文
- Ishikawa S, Wagatsuma T** (1998) Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species. *Plant and Cell Physiology* 39: 516-525
- 岩渕雅樹, 岡田清孝, 島本功 (編)** (2000) IV. トランスジェニック植物をつくる (モデル植物ラボマニュアル: 分子遺伝学・分子生物学的実験 Springer lab manual. シュプリンガー・フェアラーク東京. 東京, 2000) p.99-109
- Jusoff K** (1991) Effect of compaction of soils on growth of *Acacia mangium* Willd. under glasshouse conditions. *New Forests* 5: 61-66
- 苜住昇** (2010) 2章 根の組織 (最新樹木根系図説 総論. 誠文堂新光社. 東京) pp. 188-230

- 川田信一郎, 鈴木茂, 山崎耕宇 (1979) 水耕冠根における“初生根冠”の離脱過程. 日本作物
學會紀事, 48 (2), 303-310.
- 毛塚由佳理 (2007) 高温による熱帯樹木の根の通水性の低下. 東京大学 修士学位論文
- Kinraide TB, Ryan PR, Kochian LV** (1992) Interactive effects of Al^{3+} , H^+ , and other
cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential.
Plant Physiology 99: 1461-1468
- Kochian LV** (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants.
Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 46: 237-260
- 小島克己, 丹下健, 益守眞也, 甲斐健太郎, 櫃間岳, 松根健二, 橋本徹, 山ノ下卓, 大沢裕樹,
則定真利子, 八木久義, 佐々木恵彦 (1998) 熱帯荒廃地の環境ストレスと樹木の反応.
地球環境 3: 55-62
- Kozlowski TT** (1999) Soil compaction and growth of woody plants. Scandinavian
Journal of Forest Research 14: 596-619
- Li Y-G, Tanner G, Larkin P** (1996) The DMACA-HCl protocol and the threshold
proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. Journal of the Science of
Food and Agriculture 70: 89-101.
- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E** (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing
role of organic acids. Trends in Plant Science 6: 273-278
- Ma JF, Yamamoto R, Nevins DJ, Matsumoto H, Brown PH** (1999) Al binding in the
epidermis cell wall inhibits cell elongation of okra hypocotyl. Plant and Cell
Physiology 40: 549-556
- 間藤徹, 馬健鋒, 藤原徹 (編) (2010) 第4章 不良土壌に対する植物の応答 (植物栄養
学 第2版. 文永堂出版. 東京) pp. 199-234
- 松本英明 (2003) 酸性土壌とアルミニウムストレス. 根の研究 (Root Research), 12(4),
149-162

- 松島雄紀 (2010) 木本植物根におけるプロアントシアニジン集積とアルミニウム耐性の網羅解析. 東京大学 修士学位論文
- Matsuyama T, Satoh H, Yamada Y, Hashimoto T** (1999) A maize glycine-rich protein is synthesized in the lateral root cap and accumulates in the mucilage. *Plant Physiology* 120: 665-674
- Miyasaka SC, Hawes MC** (2001) Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. *Plant Physiology* 125: 1978-1987
- 森田茂紀 (2000) 第 2 章 根の構造と組織形成 (根の発育学. 東京大学出版会, 東京) pp. 11-42
- Morita S, Lux A, Enstone DE, Peterson CA, Abe J** (1996) Reexamination of rice seminal root ontogeny using fluorescence microscopy (蛍光顕微鏡を利用したイネ種子根の構造の再検討). 日本作物學會紀事, 65(別号 2), 37-38
- 中山則和, 島田信二, 高橋幹, 金榮厚, 有原文二 (2005) ダイズ種子の吸水速度調節が冠水障害の発生に与える影響(作物生理・細胞工学). 日本作物學會紀事, 74 (3), 325-329.
- 熱帯植物研究会編 (1984) 熱帯植物要覧. 養賢堂, 東京. 734 pp.
- Norisada M, Hitsuma G, Kuroda K, Yamanoshita T, Masumori M, Tange T, Yagi H, Nuyim T, Sasaki S, Kojima K** (2005) *Acacia mangium*, a nurse tree candidate for reforestation on degraded sandy soils in the Malay Peninsula. *Forest Science* 51: 498-510
- Osawa H, Endo I, Hara Y, Matsushima Y, Tange T** (2011) Transient proliferation of proanthocyanidin-accumulating cells on the epidermal apex contributes to highly aluminum-resistant root elongation in camphor tree. *Plant Physiology* 155: 433-446
- Osawa H, Kojima K** (2006) Citrate-release-mediated aluminum resistance is coupled to the inducible expression of mitochondrial citrate synthase gene in *Paraserianthes falcataria*. *Tree Physiology* 26: 565-574

- Osbourn AE** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831
- Perry LG, Thelen GC, Ridenour WM, Callaway RM, Paschke MW, Vivanco JM** (2007) Concentrations of the allelochemical (+/-)-catechin in *Centaurea maculosa* soils. *Journal of Chemical Ecology* 33: 2337-2344
- Persidsky MD, Baillie GS** (1977) Fluorometric test of cell-membrane integrity. *Cryobiology* 14: 322-331
- Phillips JM, Hayman DS** (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161
- Rost TL** (2011) The organization of roots of dicotyledonous plants and the positions of control points. *Annals of Botany* 107: 1213-1222
- Rotman B, Papermaster BW** (1966) Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55: 134-141
- Ryan PR, Ditomaso JM, Kochian LV** (1993) Aluminum toxicity in roots - an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal of Experimental Botany* 44: 437-446
- Ryan PR, Delhaize E, Jones DL** (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 527-560
- Scalbert A** (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875-3883
- Sivaguru M, Horst WJ** (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology* 116: 155-163
- Somasundaram S, Bonkowski M, Iijima M** (2008) Functional role of mucilage-border

- cells: A complex facilitating protozoan effects on plant growth. *Plant Production Science* 11: 344-351
- Stephenson MB, Hawes MC** (1994) Correlation of pectin methylesterase activity in root caps of pea with root border cell-separation. *Plant Physiology* 106: 739-745
- Tahara K, Norisada M, Hogetsu T, Kojima K** (2005) Aluminum tolerance and aluminum-induced deposition of callose and lignin in the root tips of *Melaleuca* and *Eucalyptus* species. *Journal of Forest Research* 10: 325-333
- Trojanowska MR, Osbourn AE, Daniels MJ, Threlfall DR** (2000) Biosynthesis of avenacins and phytosterols in roots of *Avena sativa* cv. Image. *Phytochemistry* 54: 153-164
- Veena V, Taylor CG** (2007) *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43: 383-403
- Vermeer J, McCully ME** (1982) The rhizosphere in zea - new insight into its structure and development. *Planta* 156: 45-61
- Vicré M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A** (2005) Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiology* 138: 998-1008
- Wasson AP, Ramsay K, Jones MGK, Mathesius U** (2009) Differing requirements for flavonoids during the formation of lateral roots, nodules and root knot nematode galls in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 183: 167-179
- Wenzel CL, Rost TL** (2001) Cell division patterns of the protoderm and root cap in the "closed" root apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 218: 203-213
- Wenzel CL, Tong KL, Rost TL** (2001) Modular construction of the protoderm and peripheral root cap in the "open" root apical meristem of *Trifolium repens* cv. Ladino.

Protoplasma 218: 214-224

Wu QD, VanEtten HD (2004) Introduction of plant and fungal genes into pea (*Pisum sativum* L.) hairy roots reduces their ability to produce pisatin and affects their response to a fungal pathogen. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 798-804

Xie DY, Dixon RA (2005) Proanthocyanidin biosynthesis - still more questions than answers? *Phytochemistry* 66: 2127-2144

Yamaguchi M, Sharp RE (2010) Complexity and coordination of root growth at low water potentials: recent advances from transcriptomic and proteomic analyses. *Plant Cell and Environment* 33: 590-603

Yoneda S, Nakatsubo F (1998) Effects of the hydroxylation patterns and degrees of polymerization of condensed tannins on their metal-chelating capacity. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 18: 193-205

Zhao J, Pang Y, Dixon RA (2010) The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant Physiology* 153: 437-443

Zhu MY, Ahn S, Matsumoto H (2003) Inhibition of growth and development of root border cells in wheat by Al. *Physiologia Plantarum* 117: 359-367