

イネ種子根における通気組織形成と細胞死の機構

1,2川合真紀・2,1内宮博文

(1日本原子力研究所・先端基礎研究センター、2東京大学・分子細胞生物学研究所)

はじめに

イネは水環境に良く適応した植物で、他の多くの植物種とは異なり冠水条件下でも発芽、生育が可能である。イネの体内には通気の為の空隙（通気組織、破生通気腔、エアースペース等と称される）が発達しており、低酸素抵抗性に関与していることが古くより報告されている。水中での発芽時には子葉鞘（コレオプチル）が盛んに伸長し空气中に到達する。すると子葉鞘内部に形成された通気組織を通して酸素が水中に運ばれ、根の伸長及び本葉の発育が可能となる。

近年、植物において自発的な死、すなわちプログラム細胞死と位置づけられる事象が多数報告されている。我々は、イネ種子根における破生通気腔が、ある特定の細胞が自ら崩壊する過程を経て形成されることを見出した（川合真紀ら 1996; Kawai et al., 1998; Samarajeeva et al., 1999）。本稿では、イネの根や子葉鞘に見られるプログラム細胞死と環境適応との関係について、特に通気組織の形成に焦点を絞り解説する。

1. 破生通気腔の生理的役割

通気組織は細胞間隙が連結して形成される空隙（porosity）で、植物の呼吸、同化作用、蒸散作用に必要な空気や水蒸気の通路になっている（Justin and Armstrong 1987）。これらは大別して、離生通気腔と破生通気腔の2タイプに分けられる。前者はスイレンの地下茎や根、ホテイソウの葉柄などに見られ、細胞伸長と肥大によって細胞間隙が拡大することにより、網状あるいは管状の空間を形成する。一方、破生通気腔は多くの場合、皮層組織内に形成され、細胞の崩壊、すなわち細胞死を介して空隙を拡大していく。両者ともその形成メカニズムは完全には解明されていないが、形態学、生理学的研究は古くから行われてきた。1950年代には各種作物の湿害に対する抵抗性は地上部から地下部へ酸素を補給する能力の強弱によって決定され、水生植物にはこの機能が顕著に発達していることが報告されている。

2. 通気組織形成のメカニズム

図1はイネの種子根の横断面と、その構造を模式的に示したものである。根の若い部分（図1B）では、皮層細胞の崩壊は観察されず、細胞が層状の構造を成している。外側から、表皮、外皮、厚壁細胞、皮層、内皮、そして維管束柱が認められる。皮層組織は種子根では通常約7層の細胞から構成されており、外側はリグニン化した厚壁組織、内側は内皮に接している。厚

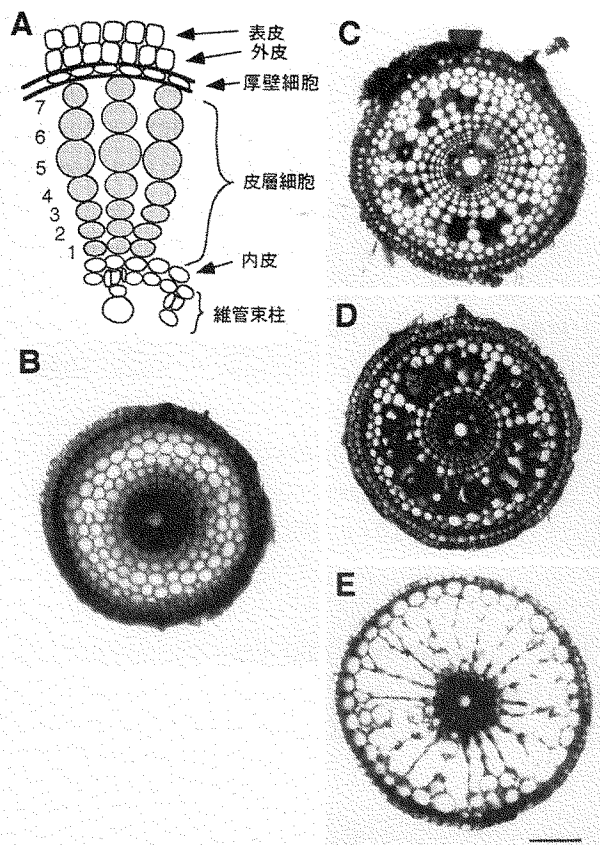


図1. イネの種子根における通気組織の発達  
イネの種子根 (A) において通気組織は皮層組織内に形成される。発芽1日目の種子根基部 (B) では、約7層の皮層細胞のcell file が形成されており、空隙は見出されない。発芽4日目 (C)、6日目 (D)、3週間目 (E) の種子根基部の切片では、空隙が皮層組織内に拡大している。細胞崩壊後の空隙には細胞壁が連なった構造が残される (E)。スケールは0.1mm。  
(Kawai et al., 1998 より改変)

壁細胞は物質の透過を妨げる鏡の役目をしており、内皮はカスバリー線に相当する。根の伸長に伴い皮層細胞は崩壊し(図1 C, D)、最終的には図1 Eで示されるように、細胞壁が連結した板状の構造を残すのみとなる。この時、維管束柱から生じる側根の周辺皮層細胞は崩壊を免れたり、皮層最内層、最外層は崩壊せず残ることが多い。すなわち、皮層細胞の崩壊は単純に拡大するのではなく、厳密なコントロールの下にあると考えられる。

皮層組織を構成する7層の細胞で一番最初に崩壊する細胞の位置を調べると、70%は内側から5番目の皮層細胞から崩壊が開始した。また、それに隣接する第4、第6細胞からの開始が残り30%を占めており、それ以外の位置からは細胞崩壊が始まらないことが明らかとなった。これら、皮層細胞の形態的特徴を調べてみると、細胞崩壊を初期におこす皮層中央部位の細胞は、その周辺細胞より縦方向に短く、直径の大きな細胞であった。また、細胞の崩壊が起きる部位は既に細胞伸長の時期を過ぎていた。これは、細胞崩壊が細胞伸長によって物理的に引きさかれる現象ではないことを示している。また、酸性部位を染色する事から成熟した液胞のマーカとして使用されるニュートラルレッドによって根の組織片を処理すると、やはり皮層組織中央部が最も早く染色されることがわかった(図2 A)。このように、皮層細胞の伸長、成熟は均一に起こるのではなく、位置特異的に支配されていることが明らかとなった。

続いて、細胞崩壊以前の状態を検出するため、エバンスブルーを用いて死細胞の染色を試みた。エバンスブルーは細胞質膜の機能を失った細胞、即ち死細胞を青く染色する。最も早くエバンスブルー染色性を示す細胞の位置を調べると、第5細胞をピークとする結果が得られた(図2 B)。さらに、形成された空隙の周囲では放射軸方向にエバンスブルー染色性の細胞が見られ、細胞死が一定の方向へ連続して起きていることが示唆された。そこで、皮層組織内の細胞間の物質輸送の方向性をマイクロインジェクション法によって調べた。植物細胞間の物質輸送は原形質連絡

(plasmodesm)を通して行われる。分子量の大きな物質(FITC - 19.6又は39 kDa -デキストラン)を第5皮層細胞へインジェクションした場合、周辺細胞への蛍光物質の移動は見出されなかった。一方、分子量の小さいルシファーイエロー(457 Da)、FITC - 4.4又は9.9 kDa-デキストランを皮層細胞の第5細胞にインジェクションしたとき、蛍光物質は隣接した周囲の細胞へ移動した。また、物質の移動する方向を調べると、ルシファーイエロー、FITC - 4.4 kDa-デキストランをインジェクションした場合、周囲の細胞へほぼ均等に輸送されたが、FITC - 9.6 kDa-デキストランをインジェクションした時、67%は細胞死が進むのと同方向へ特異的に輸送された。即ち、皮層細胞間の連絡は、あるサイズの分子に対して特異的な輸送様式を持つ可能性が示された。これまでの細胞間連絡に関する研究は主に葉肉細胞で行われており、輸送可能分子サイズは通常1 kDa以下と非常に小

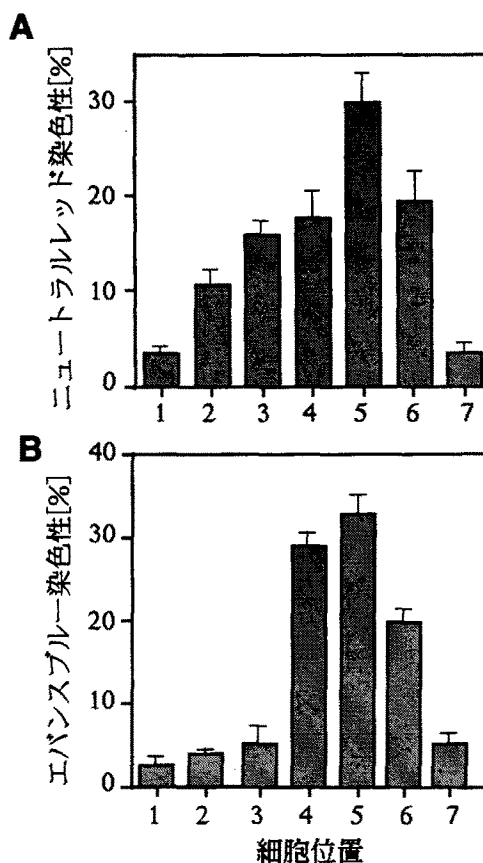


図2.皮層細胞のニュートラルレッド染色性(A)及びエバンスブルー染色性(B)。通気組織形成時に皮層細胞列中で一番最初にニュートラルレッド、エバンスブルーによって染色される細胞位置をプロットし、割り合いで示した。(Kawai et al., 1998より改変)

さいことが知られている。それが、ウイルスが感染した時に何らかの修飾を受けて、より大きな分子の輸送を可能とする(Lucas 1995)。また、植物の根における細胞間連絡がストレス条件下で変化することも報告されている。これらの機構と細胞死の関連性について、さらなる研究が必要である。

### 3. 細胞死を誘導する因子

電子顕微鏡レベルの解析から、通気組織形成時に見出される第一の細胞内変化は液胞の崩壊であることが知られている。この現象を引き起こす因子こそが「細胞死のシグナル」である、と考えられるが、現時点ではその正体は明らかではない。

畑作物であるトウモロコシは本来通気組織があまり発達しない植物種である。しかし、5%酸素条件で処理すると、根の皮層細胞の崩壊が認められる(Konings 1982)。また、エチレンを加えても皮層の崩壊が促進される。すなわちトウモロコシの根では低酸素状態により生じたエチレンが皮層細胞崩壊の引き金になっていると考えられる(Jackson et al., 1985)。エチレンの合成阻害剤である塩化コバルト( $10^{-5}$  M)又は AOA (aminooxy acetic acid,  $10^{-5}$  M)で処理したトウモロコシの根における通気組織の形成は抑制されており、この時、内生エチレン量は低下していた。また、エチレン合成は阻害しないが、エチレンの機能を阻害する硝酸銀によっても通気組織の形成は阻害された。HeとDrew (1996)らは複数の阻害剤を用いた実験により、トウモロコシにおけるエチレンを介した通気組織形成がタンパク質のリン酸化及び、カルシウムを介した系によって制御されていることを示している。

### 4. 根で発現する遺伝子の解析

細胞死による通気組織形成の分子メカニズムを明らかにするためには、皮層細胞で発現する遺伝子群の解析が重要な課題となる。我々は、イネの種子根において破生通気腔が形成される過程で発現量に変化する遺伝子を単離する事を目的に、ディファレンシャルディスプレイ法を試みた。発芽4日目の約2 cmの種子根を下から5 mmごとのセクションI-IVに分け、各々からmRNAを精製したのち、数十種のオリゴプライマーを用いてPCRを行った。各セクションで異なった発現量を示す遺伝子断片を単離し、既知の遺伝子データベースとのホモロジー検索を行った。さらにノーザンブロット解析による発現パターン確認を行った結果、位置特異的な発現を示す遺伝子、数十が単離された。その中には液胞が発達し、第1番目の細胞死を開始する部分で強い発現を示すMIP遺伝子(アクアポリン、水チャネルプロテイン)、アンモニウムイオンチャンネル遺伝子等が含まれていた。これまでの解析では、細胞死の第一段階が細胞の肥大化と液胞の成熟(酸性化)の後に起きることが想定されており、これらの因子の通気組織形成における役割が注目される。また、現時点では相同性を示す遺伝子が見出されないことから、機能の推定が不可能な遺伝子断片が数十単離されている。これらの因子の発現場所と、機能の解析が待たれる。

### 5. 子葉鞘にみられる細胞死

子葉鞘は単子葉植物の中でも特にイネ科植物に発達した器官であり、胚盤起源、あるいは双子葉植物の子葉に相当する器官であるとする諸説がある。生理的な役割としては、第一葉及び本葉を物理的なダメージから保護していると考えられている。発芽後、第1葉の伸長に伴い子葉鞘はセネセンス(老化)し、枯死する。この様な老化は第1葉(シンク)への栄養物の供給器官(ソース)として機能的意味があると推定される。

イネは完全な冠水状態にあっても発芽が可能であるが、このとき幼苗では根は発達せず、子葉鞘が著しく伸長する。子葉鞘の内部は中空で第1葉の発達もみられない。丁度、シュノーケルの様に円筒上のパイプを水中から大気へ向かってのばしていることになる。やがてこのパイプが空气中に到達すると、内部の通気組織を通して酸素が運ばれ、根や第1葉の発達が開始される。完全な冠水条件下で1週間置いたイネ芽生えの子葉鞘を詳細に観察したところ、この時点では内部に死細胞はみられず、通気組織や老化細胞も存在していなかった。この芽生えを好気条件に移すと、6時間後

に子葉鞘の特異的な場所に死細胞が検出され、裂開が開始された。この時点では内部は中空であるが、やがて第一葉が伸長し、24時間後には裂開部より出現した。すなわち、子葉鞘の裂開部は第1葉の生長による物理的圧力によって裂けるのではなく、特定部位の細胞の自律的崩壊によることが初めて示された。次に、破生通気腔の形成が2日後に観察され、さらに5日後には子葉鞘の褐変化を伴った老化が認められた。このように、冠水条件から好気条件へイネ芽生えを移すことによって、少なくとも3つの細胞死（裂開、通気組織形成、老化）が順に起きることを確認した（川合ら未発表データ）。

## 6. 今後の展望

動物のアポトーシス研究においては、初期段階の形態的指標として核DNAの断片化や、クロマチン凝縮が挙げられる。しかしながら根の通気組織形成時の細胞死においては細胞核の消失は後期に起こる。すなわち、皮層細胞がエバンスブルーで染色される時期を経過し、細胞崩壊を開始した段階にあっても、内部に細胞核を含有する顕微鏡像が得られており、形態的なアポトーシス様の変化を見出すことはできなかった。一方、老化子葉鞘では断片化したDNAの存在が認められている（川合ら未発表データ）。すなわち、これらの細胞死現象には複数の異なった経路が存在することが予想される。

プログラムされた細胞死は植物の生育過程で基本的、且つ重要な部分を占めている。特に、通気組織形成や、子葉鞘の裂開はイネが水環境に適応するために獲得した戦略的細胞死とも言える。また、葉の老化制御は作物生産上、重要な課題である。植物細胞死の制御機構については依然として不明な点が多いが、今後遺伝子レベルの詳細な解析を行うことにより明らかとなっていくであろう。

## 引用文献

- He CJ, Morgan PW, Drew MC (1996) Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiol.* 112: 463-472.
- Jackson MB, Fenning TM, Drew MC, Saker LR (1985) Stimulation of ethylene production and gas-space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. by small partial pressures of oxygen. *Planta* 165: 486-4923.
- Justin SHFW, Armstrong W. (1987) The anatomical characterization of roots and plant response to soil flooding. *New Phytology* 106: 465-495.
- 川合真紀, 内宮博文 (1996) 細胞死による通気組織形成の機構, *組織培養* 22: 8-12.
- Kawai M, Samarajeeva PK, Barrero RA, Nishiguchi M, Uchimiya H. (1998) Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. *Planta* 204: 277-287.
- Konings H (1982) Ethylene-promoted formation of aerenchyma in seedling roots of *Zea mays* L. under aerated and non-aerated conditions. *Physiol. Plant.* 54: 119-124.
- Lucas WJ (1995) Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7: 673-680.
- Samarajeeva PK, Barrero RA, Umeda-Hara C, Kawai M, Uchimiya H. (1999) Cortical cell death, cell proliferation, macromolecular movements and rTip1 expression pattern in roots of rice (*Oryza sativa* L.) under NaCl stress. *Planta* 207: 354-361.

Molecular characterization of aerenchyma formation and cell death in rice plant.  
Maki KAWAI and Hirofumi UCHIMIYA