

## 根端内鞘における注目すべき二三の事実

鳥山 英雄

東京女子大学名誉教授

**要 旨:** 従来、植物細胞・組織の顕微鏡標本作製にあたって固定液として用いられたものとして FAA (formalin 5, acetic acid 5, abs. ethanol 60, water 30, in vol) がある。この固定液には酢酸が含まれているので、 $Ca^{++}$ は勿論  $Ca^{++}$ と結びついている原形質蛋白の大半は流出する。FAA による固定後、種々の染色法をほどこし、これを顕微鏡下で観察する時、われわれが目にするのは細胞壁を主体とする組織像なのである。生理作用の主役である原形質を観察することが不可能となるので、組織生理学的な研究には不十分である。Lillie's 緩衝中性ホルマリン固定、メチル・ブルー染色によるプレパラートにおいては、細胞壁はほとんど染まらないので、原形質の観察には非常に有効である。この手法をマメ科植物の根端に適用し、二三の新事実を見出した。アラスカエンドウ・ソラマメ・ぶんどまめの根端においては、初期分化の行われている一定の範囲 (アラスカエンドウでは、先端より 500~1500  $\mu m$ ) において、内鞘には染色性の強い細胞 ( $\alpha$ -細胞) と染色性の弱い細胞 ( $\beta$ -細胞) の分化が認められる。また、 $\beta$ -細胞中にはメチル・ブルーによく染まる、小さな球状の顆粒が認められる。これは分泌顆粒と推測されるが、その化学的同一性は極めて重要な課題である。筆者は、 $\alpha$ -細胞を中心とした染色性の強い組織を  $\alpha$ -zone と称し (この細胞群は  $Ach 10^{-4}M$  処理によって収縮する) 染色性の弱い細胞群を  $\beta$ -zone と称した。この両者は生理的にことなる機能をもつものと推測される。今後の重要な研究課題であると思われる。

**キーワード:**  $\alpha$ -細胞と  $\beta$ -細胞の分化, 根端, 内鞘, Lillie's 緩衝中性ホルマリン固定

**On the remarkable phenomena in the root tip of leguminous plants :** Hideo TORIYAMA (Prof. Emer. Tokyo Women's Christian University)

**Abstract:** The available data concerning the differentiation of the pericycle in the primary root of *Pisum sativum*, variety 'Alaska', may be summarized as follows. The root tips 3 to 4 day old seedlings germinated in a darkroom at 24°C were fixed with Lillie's buffered neutral formalin. By applying a combination of Lillie's formalin fixation together with methyl blue and/or Heidenkain's hematoxylin and safranin, the initial symptom of triarch xylary procambium appeared in a procambial cylinder in transverse section of 250  $\mu m$  from the apical initials. Deeply stainable protoplasts of several layer of the pericyclic cells which were localized outside of the xylary procambium show a separation from the thin cell wall. The author would like to designate as ' $\alpha$ -cells' these stainable pericyclic cells. The  $\alpha$ -cells were localized in the area 250  $\mu m$  to 2150  $\mu m$  from the apical initials. Three to six pericyclic cells in which the protoplasm scarcely stained with the dye solution should be designated as ' $\beta$ -cells'. The triarch  $\beta$ -cell zone was localized in a limited area, 550  $\mu m$  to 1750  $\mu m$  from the apical initials. Two or three sieve elements were observable inside of the  $\beta$ -cells. And then, small spherical granules take a deep blue stain in the cytoplasm of the  $\beta$ -cells. It is of paramount importance to determine the chemical nature of the granules. The root tip of *Vicia faba* L. from 4 to 5 days old seedling germinated in the soil were fixed in Lillie's buffered neutral formalin and stained with 0.5 percent methyl blue. Tetrarch xylary procambium was clearly visible in the transverse sections between 300  $\mu m$  to 550  $\mu m$  from the apical initials. At 1150  $\mu m$  from the apical initials, xylary procambium and several pericyclic cells wear deeply stained. The deeply stained pericyclic cells are designated as ' $\alpha$ -cells'. In the diurnal condition (11 to 12 AM), normal protoplasts of the  $\alpha$ -cells were observable; in the nocturnal condition (11 to 12 PM), the protoplasts of the  $\alpha$ -cells showed a contraction. Six to eight pericyclic cells in which the protoplasm scarcely stained with the dye should be designated as ' $\beta$ -cells'. The differentiation of  $\alpha$ -cells and  $\beta$ -cells in the pericycle was seen between 700  $\mu m$  to 2300  $\mu m$  from the apical initials.

The available information concerning the effects of acetylcholine upon the protoplasts of mung bean (*Phaseolus aureus*) root tip may be summarized as follows. On the transverse section of the central cylinder of 1000  $\mu m$  from the primary root apex, there are five to eight pericyclic cells in which the protoplast are stained deeply with methyl blue; these cells contracted with  $10^{-5}M$  and/or  $10^{-4}M$  Ach. In the same part of the root, there are five pericyclic cells in which protoplasts are barely stained with the same dye; these cells are not contracted by the Ach solution.

**Keywords:**  $\alpha$ -cell,  $\beta$ -cell, Lillie's buffered neutral formalin, pericycle, root tip

## 1. はじめに

筆者は1950年から1972年まで、オジギソウ (*Mimosa pudica* L.) の運動に関する細胞・組織生理について研究をすすめた(鳥山, 1973). 「生命現象の解明には、形態学的手法と生理学的手法を併用すべきである」という方法論は学生時代からの持論であったので、オジギソウの運動器官である主葉枕を、組織学・細胞学・原形質学・細胞化学・細胞生理学さらに生化学の各分野から立体的に追求した。その間、筆者は細胞・組織のプレパラートの作製にあたって、細胞質(原形質)の保存のために細心の注意を払うことの大切さを知った。

当時における植物組織の固定に一般的に広く用いられたものにFAA (formalin 5, acetic acid 5, abs. ethanol 60, water 30, in vol) がある。これを用いると原形質は固定液によって、損傷をうけ“すかさか”になってしまうのである。具体的に言えば、この固定液には酢酸が含まれているので、 $Ca^{++}$ は勿論、 $Ca^{++}$ と結びついている原形質蛋白の大半は流出してしまうのである。FAAによる固定の後、種々の染色法をほどこし、これを顕微鏡下で観察する時、われわれが目にするのは細胞壁を主体とする組織像なのである。生理の主役である原形質を損なう上述の手法は組織生理的な研究には不十分である。

## 2. 筆者が行なった固定・染色法

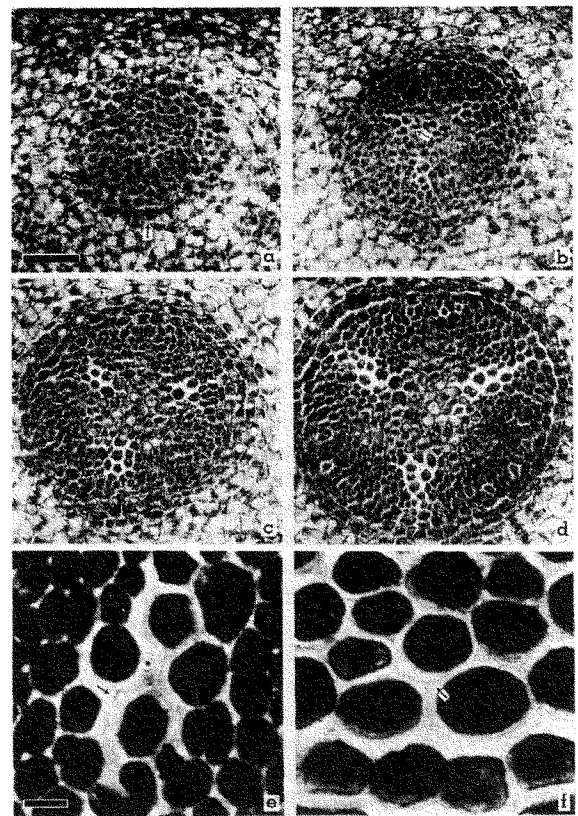
筆者は、当時入手することが出来た顕微鏡標本の作製に関する主要なる文献を検討した。Romeis(1932), Lillie(1948), Lison(1945) 等である。これらの先人達の古典から固定・染色に関する理論的側面を学んだ。

結論的に言えば原形質をよく保存する固定液はLillieの緩衝中性ホルマリン液 (Lillie's buffered neutral formalin: commercial formalin, 100ml; distilled water, 900ml;  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , 4g;  $Na_2HPO_4$ , 6.5g により調製する; Lillie 1948) である。固定後の水洗は4~5時間、脱水はJohansen(1937~1938)の第3ブチルアルコールのシリーズを用いる。パラフィン切片の厚さは9~10 $\mu m$  (植物細胞の原形質がすくないので10 $\mu m$  前後の厚さがよい)。染色は、0.5%メチル・ブルーで90分間、筆者の経験によると、Lillie緩衝中性ホルマリン固定とメチル・ブルー染色という手法は、細胞壁を殆ど染めないの、原形質の観察には非常に有効である。この手法を根端組織に適用し、二三の新事実を見出した。

## 3. 根端の初期分化

アラスカエンドウ (*Pisum sativum*, Alaska) の種子を24 $^{\circ}C$ の湿室内で、連続暗黒中で発芽させ、根が約40mmに伸長したものの先端4~5mmを固定液に入れた。根端の最先端から、2500 $\mu m$ までを連続切片とし、そのすべてについて検討した (Toriyama, 1978b)。

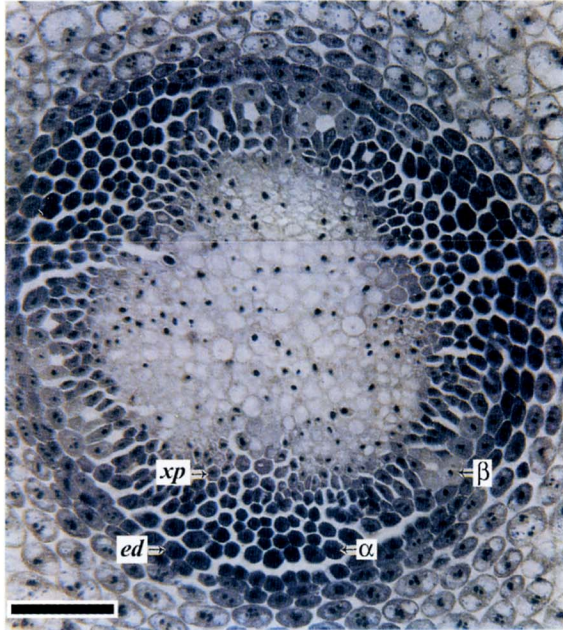
先端から150 $\mu m$ においては初期の中心柱があらわれ、その原形質は充実して居り、全体として青色を呈する(第1a図)。皮層の部分は細胞内の液胞が大きくなるので、組織はうすくそまる。先端より300~500 $\mu m$ においては、木部要素が三ヶ所にあらわれる。この部位はxylary procambiumであるが、原形質が細胞壁から離れ、一種の原形質分離を起しているのである。先端から320 $\mu m$ の部位では非常に薄い細胞壁もみとめられる(第1e図矢印)。この部位の原形質分離(原形質体の収縮)の程度は固定する時刻によって差異があらわれる。



第1図 アラスカエンドウの根の横断面。  
(Toriyama, 1978b).

Lillie緩衝中性ホルマリン固定・メチル・ブルー染色。a, 先端より150 $\mu m$ の部位。b, 同じく250 $\mu m$ 。c, 同じく320 $\mu m$ 。d, 同じく500 $\mu m$ 。a-d: barは50 $\mu m$ 。e, 先端より320 $\mu m$ のxylary procambium。f, 先端より320 $\mu m$ の内鞘。e, f: barは10 $\mu m$ 。矢印は細胞壁。





第2図 アラスカエンドウの根の横断面。  
(Toriyama, 1978b)

Lillie緩衝中性ホルマリン固定・Heidenhain's hematoxylin 染色. 先端より1000 $\mu$ mの部位. ed, 内皮.  $\alpha$ ,  $\alpha$ -細胞.  $\beta$ ,  $\beta$ -細胞. xp, xylary procambium. barは50 $\mu$ m.

#### 4. 内鞘の分化について

Lillie 緩衝中性ホルマリン固定したものをハイデンハイン・ヘマトキシリンで染色すると、細胞による染色性の強弱が非常に鮮明にあらわれる (第2図)。

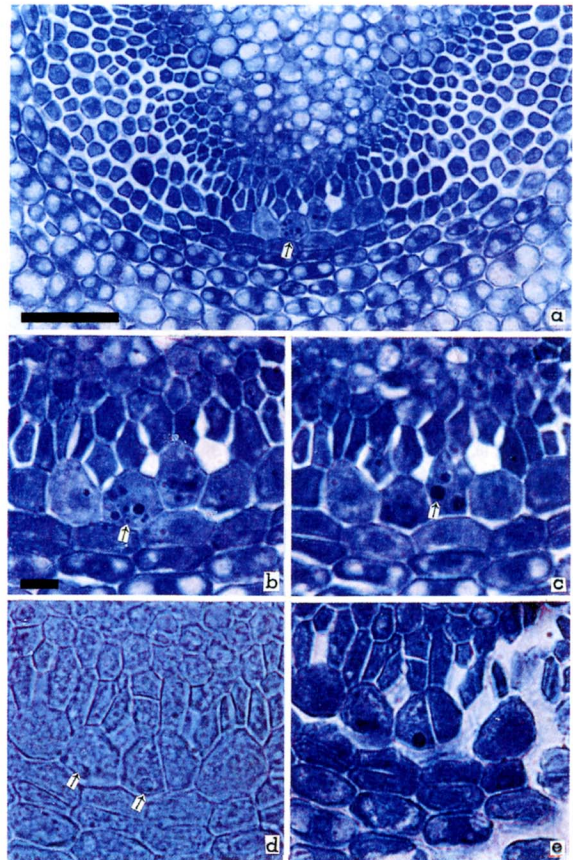
皮層細胞においては液胞化が進んでいるので、全体的にうすく染まる。内皮 (第2図 ed) には強くそまるものと染色性がやや弱いものがある。注目すべき現象が内鞘において認められる。それは、非常に強い染色性を示すもの ( $\alpha$ ) と染色性の弱いもの ( $\beta$ ) とが形態的に区別されることである。この  $\alpha$  と  $\beta$  との区別が明確に認められるのは、先端から 500~1500 $\mu$ m の範囲である (第4.a図)。つまり、アラスカエンドウの芽生えの根においては、先端のある一定範囲の内鞘には2種の細胞がみとめられるのである。筆者は染色性の強いものを  $\alpha$ -細胞、弱いものを  $\beta$ -細胞と称した (Toriyama, 1978b)。

#### 5. 内鞘の $\beta$ -細胞内の顆粒について

次にメチル・ブルー染色の標本による興味深い所見を述べたい。

先端から 1000 $\mu$ m の部位における組織 (第3.a図) において明らかなように、 $\beta$ -細胞中にメチル・ブルーに強く染まる球状の顆粒が認めら

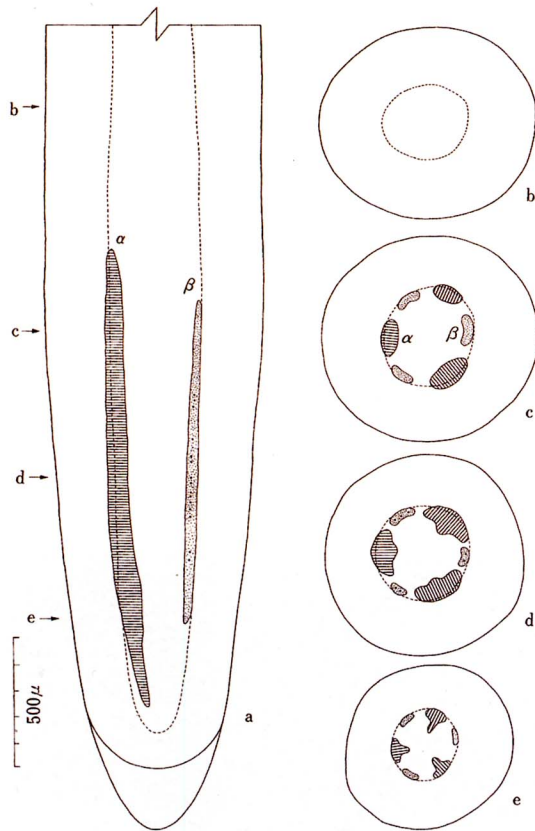
れる。この顆粒は非常に微小なものから、大きな球状のもの大きさはいろいろである (第3図 b,c)。この球状の顆粒は染色前の標本ではうすい青緑色を呈する (第3図 d)。その染色像は図 3.e である。また、 $\beta$ -細胞中の顆粒のあらわれる範囲は、根の先端から 700~1400 $\mu$ m の組織である (第4図 a)。この顆粒は固定する時刻によって消長が認められるので、分泌顆粒と推測される。さらに  $\beta$ -細胞の部位に初生篩部が位置することも興味ある事実である。またこの顆粒は球状を呈しているが、これはリポ蛋白を含むことを示唆している。筆者は、この分泌顆粒には生長ホルモン関係の初源物質が含まれる可能性があるとして推測している。今後、この顆粒組成の化学的同定は極めて重要な課題である。是非ともその解明が望まれる。



第3図 アラスカエンドウの根の横断面。  
(Toriyama, 1978b)

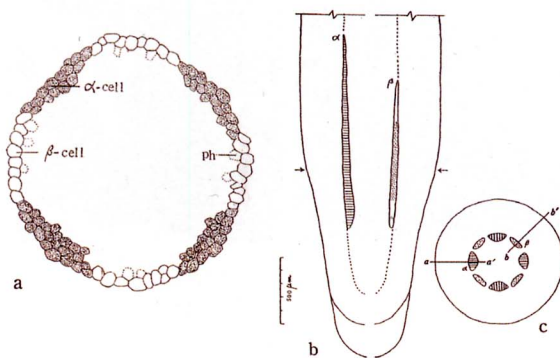
Lillie緩衝中性ホルマリン固定・メチル・ブルー染色. a, 先端より1000 $\mu$ mの部位. 矢印は顆粒をもつ内鞘の $\beta$ -細胞. barは50 $\mu$ m. b, c, 内鞘の $\beta$ -細胞. 矢印は分泌顆粒. d, 内鞘の $\beta$ -細胞 (染色前). 矢印は分泌顆粒. eは同じ部位を染色したもの. b-e: barは10 $\mu$ m.





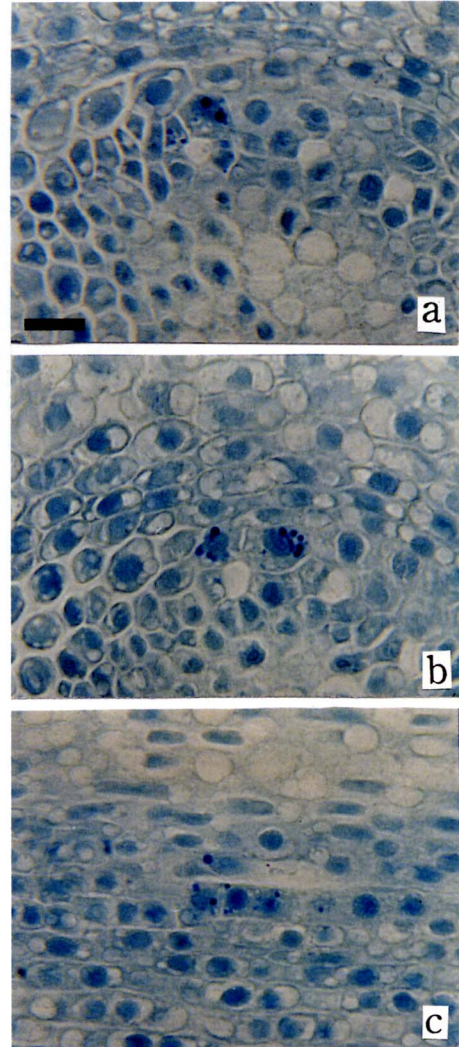
第4図 アラスカエンドウの根の模式図。  
(Toriyama, 1978b)

a, 縦断. b-e, 横断. それぞれ先端より2500  $\mu\text{m}$ , 1660  $\mu\text{m}$ , 1100  $\mu\text{m}$ , 580  $\mu\text{m}$ , の部位.  $\alpha$ ,  $\alpha$ -zone (染色性の強い内鞘を含む染色性の強い組織).  $\beta$ ,  $\beta$ -zone (染色性の弱い内鞘組織).



第5図 ソラマメの幼根の模式図。  
(Toriyama, 1990)

a, c, 横断面. b, 縦断面. bのスケールは500  $\mu\text{m}$ .



第6図 ソラマメの幼根の内鞘 $\beta$ -細胞.

Lillie緩衝中性ホルマリン固定・メチル・ブルー染色. a, b, 横断面. c, 縦断面. barは20  $\mu\text{m}$ .

## 6. ソラマメの根端の内鞘

ソラマメ (*Vicia faba* L.) の種子を戸外の畑に蒔き, 自然光のもとで発芽した芽ばえの根が40 mmに伸長したものの先端(4-5 mm)をLillie緩衝中性ホルマリンで固定, 0.5%メチル・ブルーで染色する. 内鞘においては, アラスカエンドウの場合と同じように, 強く染色される $\alpha$ -細胞と染色性の弱い $\beta$ -細胞が分化している(第5図a). そのような分化が認められるのは, 先端から600-1600  $\mu\text{m}$ の範囲である(第5図b).  $\beta$ -細胞中にはメチル・ブルーによく染まる球状の顆粒がみとめられる(第6図a,b,c).

次に $\alpha$ -細胞群における注目すべき現象について述べてみたい. すでに述べたように, 材料に用いたのは戸外の畑に蒔いたものであるが, 午前11~12時に固定したものと, 深夜12時に

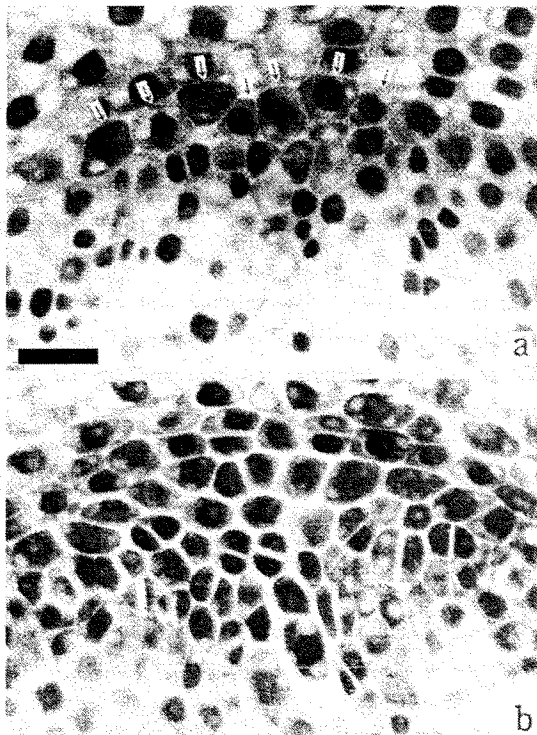
固定したものには差異がみとめられる。後者においては  $\alpha$ -細胞群に、原形質体の収縮が認められる(第7図b)。これは内鞘を含む中心柱内の組織の生理作用が日周性と何らかのかかわりのあることを暗示するもので、今後における説明が期待される。

### 7. ブドウウマメの内鞘について

ブドウウマメ (*Phaseolus aureus* L.) の芽生についての二三の所見について述べる。24°Cの温室中で連続暗所に保ち、根が40mmに伸長したものを材料とした。根の先端の4~5mmに切ったものをアセチルコリン (Ach) <sup>註1)</sup> の  $10^{-4}$ Mの溶液中に4分間ひたし、直ちに Lillies 緩衝ホルマリンで固定する。対照区として、無処理のものを同様に固定する。

ブドウウマメの根端の概要は第8.a,b,c 図に示す通りであり、先端から1000  $\mu$ mの部位では、内鞘の  $\alpha$ -細胞と  $\beta$ -細胞の分化は明らかにみとめられる(第8図c)。

無処理の材料においては内鞘の  $\alpha$ -細胞群が強く染色される(第9図a, pe- $\alpha$ )。  $\beta$ -細胞は明らかに染色性が弱い(第9図a, pe- $\beta$ )。 Ach



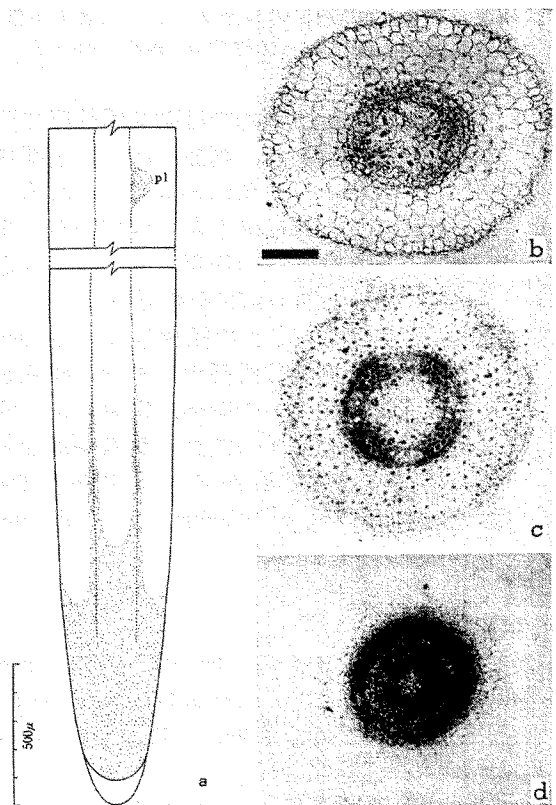
第7図 ソラマメ幼根の内鞘の  $\alpha$ -細胞群。  
(Toriyama, 1990)

Lillie緩衝中性ホルマリン固定・メチル・ブルー染色。a, 午前11-12時に固定。矢印,  $\alpha$ -細胞。b, 深夜12時に固定。

処理の場合において、  $\alpha$ -細胞群において著しい原形質分離(原形質体 protoplast の収縮)がみとめられる。これは  $\alpha$ -細胞の生理的特性とすべきものである (Toriyama, 1978a)。

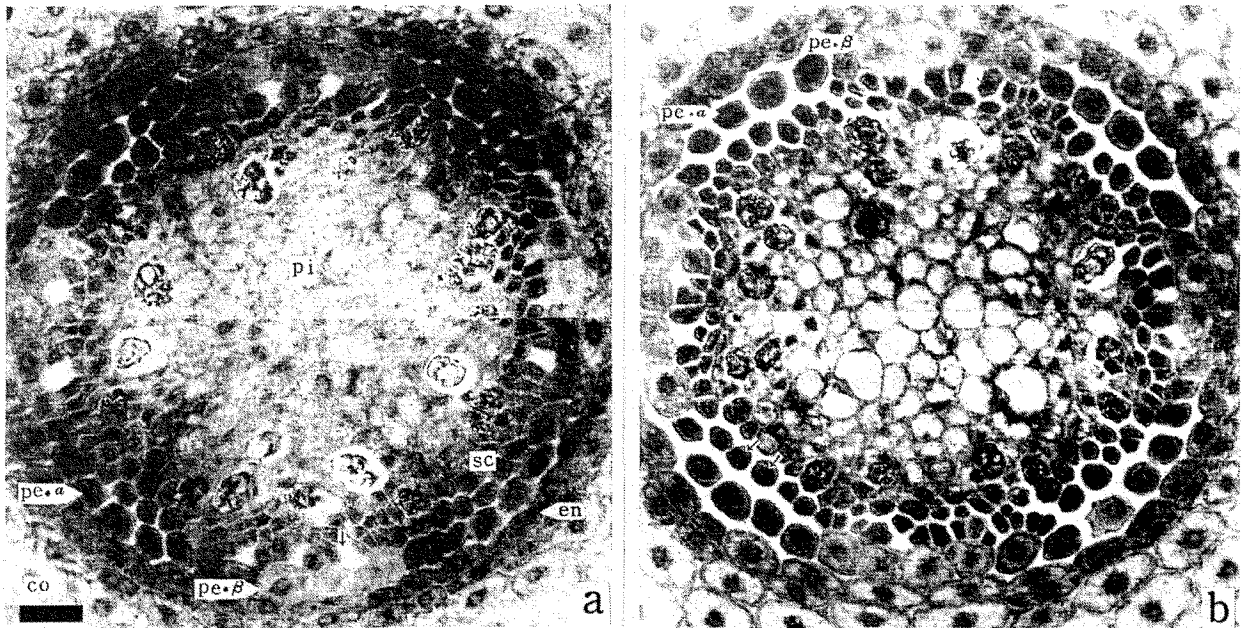
### 8. 今後の問題

マメ科植物の幼根(主根)の先端のある一定の範囲において、上述したように内鞘組織は  $\alpha$ -細胞と  $\beta$ -細胞に分化している。  $\alpha$ -細胞の外側に位置する内皮の細胞は染色性が強い。  $\alpha$ -細胞を中心とした染色性の強い組織を、筆者は  $\alpha$ -zone と称し、それに対して染色性の弱い  $\beta$ -細胞群を  $\beta$ -zone と称した (Toriyama, 1978b)。  $\alpha$ -zone と  $\beta$ -zone は生理的にことなる機能をもつものと推測される。これらの問題は今後の重要な研究課題であると思われる。かなり以前に Erwin Bünning <sup>註2)</sup> が「根端組織は他の部位と比較すると特別な内容をもつ特殊性があると思う」と述べているが、今後、根端の組織生理に関する再検討が必要であると思われる。



第8図 ブドウウマメの模式図(縦断面)と横断。  
(Toriyama, 1978a)

b, 先端より1800  $\mu$ mの部位。c, 同じく1000  $\mu$ mの部位。d, 同じく500  $\mu$ mの部位。Lillie緩衝中性ホルマリン固定・メチル・ブルー染色。b-d: barは20  $\mu$ m。



第9図 ブンドウマメの幼根の中心柱.

(Toriyama, 1978a)

先端より1000 $\mu$ mの部位の横断面. Lillie緩衝中性ホルマリン固定・メチル・ブルー染色. a, 無処理. b, Ach $10^{-4}$ Mで4分間処理. pe $\cdot\alpha$ , 内鞘の $\alpha$ -細胞. pe $\cdot\beta$ , 内鞘の $\beta$ -細胞. en, 内皮. co, 皮層. barは20 $\mu$ m.

注1: acetylcholine は動物では副交感神経や運動神経の末端から、刺激に応じて遊離される。植物では麦角に多量に含まれる。一般に芽生えの組織も含まれている。またフィトクロームの作用と関係も追求されている。Jaffe (1970)を参照。

注2: 1906年生れのドイツの植物学者。Tübingen 大学教授。植物の成長ホルモンの研究を続け、電気屈生との関係、電場による成長物質の移動、光の波長と刺激関係などの多くの研究がある。[主著] Die Physiologie des Wachstums und der Bewegungen, 1939.

#### 引用文献

- Jaffe, M. J. 1970. Evidence for the regulation of phytochrome-mediated process in bean roots by the neurohumor, acetylcholin. *Plant Physiol.* 46:768-777.
- Lillie, R. D. 1948. *Histopathologic technique*, Philadelphia, Blakiston.

- Lison, L. 1940. *Histochimie et cytochimie animales, principe et méthodes*, Paris, Gauthier-Villas.
- Romeis, B. 1932. *Taschenbuch der mikroskopischen Technik*. Verlag von R. Oldenbourg.
- 鳥山英雄 1973. 植物における運動機能と要素-オジギソウの運動細胞を中心として-. *化学の領域増刊* 101:75-86.
- Toriyama, H. 1978a. Observational and experimental studies of the meristem of Leguminous plants, I. Effects of acetylcholine, red light and far-red light upon the protoplast of root tip meristem. *Cytologia.* 43:325-337.
- Toriyama, H. 1978b. Observational and experimental studies of the meristem of Leguminous plants, II. Differentiation of the pericycle in the root tips of *Pisum sativum*. *Cytologia.* 43:705-716.
- Toriyama, H. 1990. Two types of pericyclic cells in the root tips of *Vicia faba* L. *Asian Jour. Pl. Sci.* 2:1-8.