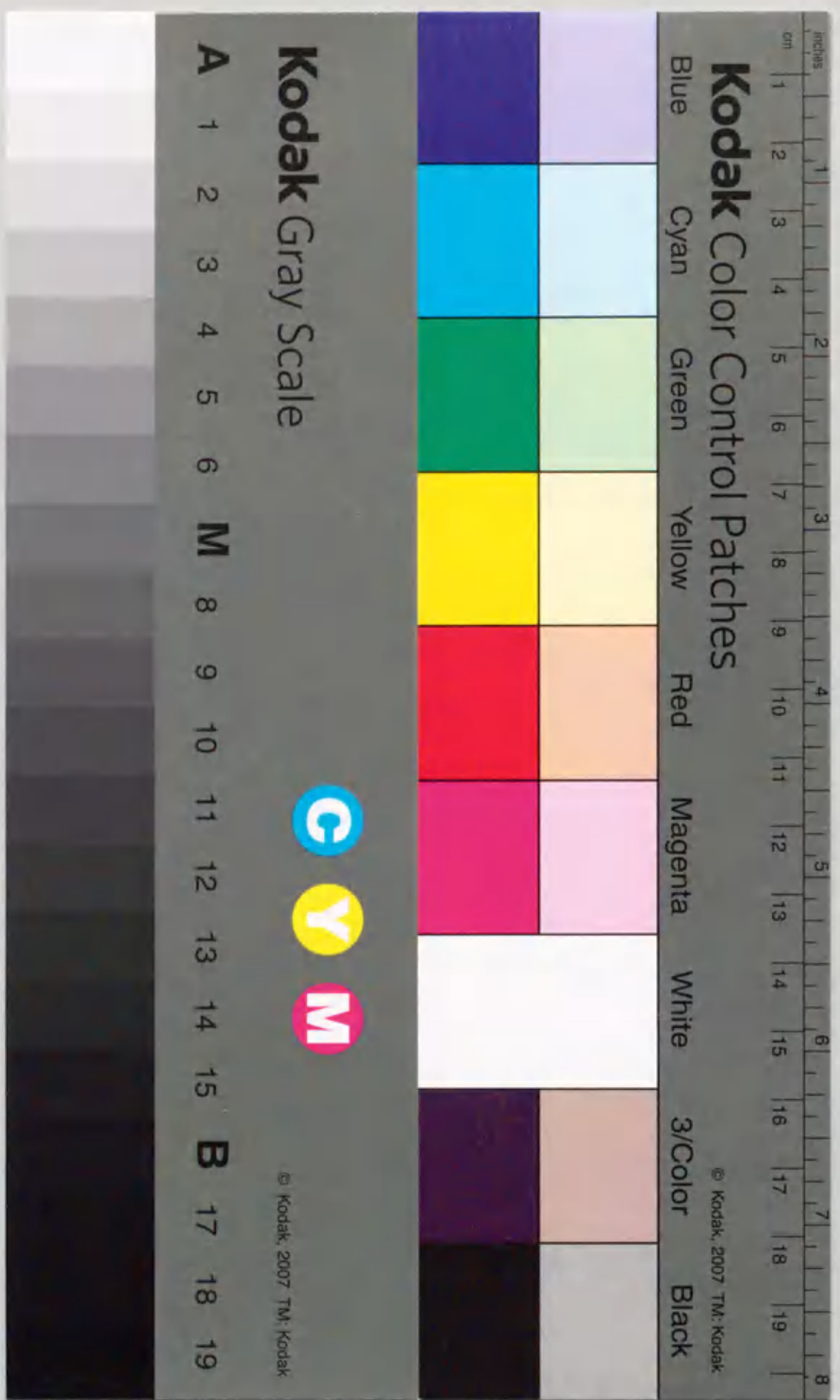


高等植物幼莖の伸長生長  
調節に関する研究

中 畑 清



報告番号 甲 第 2408 号

①

高等植物幼茎の伸長生長

調節に関する研究

中堀 清

高等植物幼茎の伸長生長調節に関する研究

目 次

序論	.....	p 1
I 章 浸透ストレスに対する生長調節機構の解析	.....	p 2
I-1 電気生理学的手法による生長解析	.....	p 3
実験材料と方法	.....	p 5
結果	.....	p 6
考察		
下胚軸くり抜き切片の電気生理学的性質について	.....	p 8
浸透ストレスに対する反応について	.....	p 9
イオンストレスに対する反応について	..	p 10
I-2 浸透ストレスに対する膨圧の反応	.....	p 13
実験材料と方法	.....	p 14
結果	.....	p 16
考察		
浸透ストレスに対する伸長生長回復の機構		p 17
II 章 細胞内圧プローブによる呼吸依存性膨圧成分の実測	.....	p 19
実験材料と方法	.....	p 20
結果	.....	p 23
考察		
メニスカスセンサーについて	.....	p 23
膨圧の呼吸依存性について	.....	p 24

III 章	オーキシンによる生長促進効果の解析	.....	p 26
	実験材料と方法	.....	p 28
	結果	.....	p 30
	考察	.....	
	加藤 - 古本のダイアグラムによる生長解析		p 32
IV 章	総合考察	.....	p 34
V	謝辞	.....	p 39
VI	引用文献	.....	p 40
VII	要旨	.....	p 47
VIII	図、表		

副論文および参考論文

## 序 論

多細胞からなる植物の形づくりには調和のとれた細胞分裂と細胞伸展が必要となる。軸性器官の細胞分裂後の細胞伸長に限っても、どの様にして細胞伸長が調節されているかは、興味深い問題である。浸透ストレスに対しての適応調節による伸長の回復現象、植物ホルモンオーキシンによる生長促進現象などが古くからよく知られ、解析の対象とされてきた。しかしながらこれらの現象を説明でき、批判に耐えうるような制御機構は提唱されていなかった。

本論文は豆科植物ミトリササゲ(*Vigna unguiculata*)の下胚軸について岡本らが明らかにした電気生理学的構造モデルと、加藤により提唱された Lockhart(1965) の生長連立方程式を理解、解析するためのダイアグラムとに立脚し、高等植物軸性器官の伸長生長調節機構を明らかにすることを目的としたものである。

そのために浸透ストレスに対する生長回復過程、植物ホルモンオーキシンによる生長促進過程を、電気生理学的手法、細胞内圧プローブによる膨圧の直接連続測定、導管圧ジャンプ法による細胞壁降伏過程の力学的パラメーターの決定に基づいて解析し、伸長生長調節機構の新たなモデルを提案しようとするものである。

... ..

# I 章 浸透ストレスに対する 生長調節機構の解析

... ..

## I 章 浸透ストレスに対する生長調節機構の解析

### I-1 電気生理学的手法による生長解析

ミトリササゲ下胚軸に関しては電気生理学的な解析が進んでおり、その構造模型が岡本らにより提出されている(Okamoto et al. 1978, 1979, 図1)。それによると下胚軸は通導組織によって貫かれた円盤状の柔組織シンプラストからなり(Katou 1978)、その細胞膜には絶縁構造により空間的に隔てられた起電活性をもつ2つのイオンポンプが存在する。器官表面に面した細胞膜にあるイオンポンプは水素イオン放出により細胞壁の展性を維持することに関与しており(Mizuno et al. 1980, Mizuno and Okamoto 1982)、木部側イオンポンプは養分、水吸収のための駆動力を生み出していると考えられた。

さらに、新たに開発された導管灌流法(Okamoto et al. 1984)は実験材料を自然の生育条件に近い好氣的条件に保ったまま、任意の溶液で導管内を灌流することを可能にした。それにより木部側起電力の機能解析が初めて可能となった。この導管灌流法を使い木部側イオンポンプが導管へ水素イオンを放出するプロトンポンプであり(Mizuno et al. 1985)、導管からのカリウムイオンの吸収における駆動力を作り出していることが示された(De Boer et al. 1985)。また導管からの糖やアミノ酸の吸収については Van Bel らによる報告がある(Van Bel and Hermans 1977, Van Bel and Van Erven



1979)。

Reinhold et al. (1984)は高等植物の浸透調節においてプロトンポンプが重要な役割を担っていることを実験的に指摘した。Katou and Furumoto(1986a, b)は、半透膜を介して溶質の運動と水の運動が共役する理論モデルとしてアポプラスト・カナルモデルを提案した。そこで実験的にプロトンポンプ活性と水吸収との相関を調べることの意義が大きくなった。導管灌流法では灌流圧と伸長生長速度の間には正の相関がみられること、灌流圧変化に反応して膜電位が変化することなどが明らかにされている(Okamoto et al. 1984)。しかし灌流速度と灌流圧とを独立に任意に変えることができないことなどにより、灌流溶液の交換操作にともなう灌流圧の微小変化が、溶液組成交換に対する伸長速度変化や、膜電位の反応の計測を妨げるおそれがある。そこで新たに下胚軸のくり抜き軸片をつくりその穴の中を任意の溶液で灌流する、くり抜き灌流法を開発した。この実験系は加圧しなくても灌流が可能で、灌流速度も任意に変えられるので溶液交換も容易であり、軸性器官の水吸収、浸透調節を調べるのに適した実験系と思われる。

この章ではくり抜いたことによる影響を、伸長域くり抜き切片で基本的な電気生理学的性質を調べることにより確認し、次いでくり抜き軸片の浸透ストレス、塩ストレスに対する反応を伸長生長速度と膜電位を指標として連続同時測定を行い、生長調節機構の解析を試みた。

## 実験材料と方法

### a. 実験材料

ミトリササゲ (*Vigna unguiculata*, アサヒ農園、愛知) の種子を水道水で約10時間吸水させた後、水道水でよく洗い、湿った砂を入れた素焼の植木鉢に植え、3日間28℃の暗所で生育させた。下胚軸の長さが約55mmになった芽生えを用い子葉節下5-6mmを上断面とするおもに伸長域よりなる長さ15mmの胚軸片を切りだした。その軸片を外径1.5mmあるいは2.1mmの鋭利な刃を持つステンレス管でくり抜いた(胚軸の直径は約3.2-3.6mm程度であり、中心柱の直径は約2mmであるので2.1mmの管を使ってくり抜いた場合はほぼ中心柱が除かれる。1.5mmの管でくり抜いた場合は中心柱の一部が除かれた状態と考えられる)。この中空の胚軸片を本章中の実験に用いた。

### b. 方法

#### b-1 くり抜き灌流装置

基本的構造は導管灌流装置(Okamoto et al. 1984)と同じであるが、一部改変して用いた。ペリスタポンプ(SJ-1211H; Atto Corp., 東京)を使い数100 $\mu$ l/hの速度で灌流した(図2)。

#### b-2 伸長生長測定

胚軸片の伸長生長測定はOkamoto et al. (1984)の方法に習いパーマロイの磁心針と差動トランス(DTD-3; 星電機製作所, 川崎)を用いた。

### b-3 電位測定系

膜電位の測定は微小電極法(Okamoto et al. 1978)により、表皮側膜電位( $V_{ps}$ )、くり抜いた穴側の膜電位( $V_{px'}$ )を胚軸片の長さと共に3チャンネル無位相差記録計(3056-40; 横河電機, 東京)に記録した(図2)。

## 結果

### 1. くり抜き胚軸片の電気生理学的性質

下胚軸の切断、くり抜き直後は両膜電位共に脱分極した状態にあるが、5-7時間たつと自然に復極し定常値に近づく。また、くり抜き軸片の伸長生長速度(約 $13\mu\text{m}/\text{h}$ )は加圧導管灌流系で測定された値(Okamoto et al. 1984)と比べるとかなり小さいが、非灌流系での測定値( $18\mu\text{m}/\text{h}$ ; Mizuno et al. 1980)と比べるとやや小さいもののそれほど大きな差はみられない。

くり抜きの径 $2.1\text{mm}$ で灌流液の $\text{KCl}$ 濃度を変化させた時の膜電位の反応例を図3に示す。灌流液の $\text{KCl}$ 濃度上昇に伴い、くり抜いた穴側の溶液に接している細胞の膜電位( $V_{px'}$ )が一過的に脱分極して回復するのに対し、表皮と細胞内との間の膜電位( $V_{ps}$ )は直ちに過分極を示した。またこの反応は $\text{K}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{K-MES}$ 、 $\text{NaCl}$ 等を用いた実験から陽イオンの効果であると考えられたが、 $\text{K}^+$ 特異的な反応ではない(図3)。 $\text{KCl}$ 濃度切り替え後反応が落ち着いたときの両膜電位の値をまとめたものを図4に示す。窒素気中での電位( $V$

( $N_2$ )と空気中の電位 ( $V(\text{air})$ ) の差が呼吸依存性成分と考えられるが、どちら側の膜においても  $KCl$  濃度上昇と共に同じように大きくなっていること、すなわちプロトンポンプの活性化が起きていることがわかる (図5)。くり抜きの径を変え、1.5mm とした場合の結果を図6に示す。 $KCl$  濃度変化に対する膜電位の反応は、空气中、窒素気中ともくり抜きの径が2.1mm の場合と基本的に同じ傾向を示すといえる。

## 2、浸透ストレス、イオンストレスに対するくり抜き胚軸片の反応

### 2-1 浸透圧変化に対する反応

灌流溶液にソルビトールを加えることにより、浸透ストレスをかけた。伸長域切片に 80mM ソルビトールを添加した溶液の灌流で浸透ストレスをかけると、くり抜き軸片は直ちに縮み始め、20-25 分ほどで縮みは止まり、再び伸長を始める。膜電位に関しては両膜電位とも浸透ストレスが加わってから 1-1.5分して、同時に過分極し始めた (図7)。ソルビトールを灌流液から除くと、伸長速度は直ちに一過的増大を示し、膜電位は表皮側、穴側共に 1-1.5分後から脱分極を始めた。

### 2-2 カリウムイオン濃度変化に対する反応

$KCl$  が完全に解離したと仮定し、計算量のソルビトールを加えることにより灌流液の浸透濃度を揃え、 $KCl$  濃度を変えた。確認のため浸透濃度は浸透圧計で測定した (表1)。

浸透濃度一定条件下での両膜電位と伸長生長速度の同時測定例を図8に示す。膜電位に関しては  $KCl$  濃度上昇にともない穴側膜電位

の一過的脱分極、回復と、表皮側膜電位の過分極が見られる。この間、一過的に伸長が停止する。逆に KCl 濃度を下げると膜電位は濃度を上げたときとは対称的に変化し、伸長が一過的に促進されるのが観測された。

## 考 察

下胚軸くり抜き切片の電気生理学的性質について

灌流溶液の KCl 濃度上昇に伴い中心の穴側の膜電位 ( $V_{px}$ ) の一過的脱分極と、表皮側膜電位 ( $V_{ps}$ ) の過分極が観測された。表皮側膜電位の示した過分極反応は電気生理学的常識に反する奇妙な反応である。しかし表皮側膜電位の呼吸依存性成分は穴側の膜電位の呼吸依存性成分の動きに連動していると考えれば一応の説明が可能である。穴側の膜電位の示した反応と同様な一過的反応については、Cheeseman and Pickard (1977) がトマトの葉で、Kojima et al. (1985) がジャガイモの塊茎で報告している。

KCl 濃度変化に対する両膜電位の反応を、導管灌流系で得られた結果 (Kojima et al. 1985) と比較することにより、くり抜き胚軸片は基本的な電気生理学的構造をインタクトな下胚軸と同様に保持していると考えられることができる。つまり両膜電位が KCl 濃度変化に対して独立に反応することから、細胞膜の直接の外部環境である表皮側と木部側のアポプラストを分けている絶縁構造が保持されていることがわかる。

浸透ストレスに対する反応について

高等植物の伸長生長機構の生物物理学的取扱は1965年にLockhartにより細胞生長の連立方程式として定式化されて後、始まったと言える。

$$\frac{1}{V} \frac{dV}{dt} = \Phi (P^i - Y) \quad \text{for } P^i > Y \quad (1)$$

$$\frac{1}{V} \frac{dV}{dt} = L (\Delta \pi - P^i) \quad (2)$$

$V$ , 細胞の体積;  $t$ , 時間;  $\Phi$ , 細胞壁の可塑的展性;  $P^i$ , 細胞内の静水圧;  $Y$ , 細胞壁の臨界降伏圧;  $L$ , 細胞の相対的水透過性;  $\Delta \pi$ , 細胞内外の浸透圧差.

定常的な生長は壁降伏を表す力学方程式(1)と、吸水を表す熱力学方程式(2)の連立解として与えられる。したがって生長機構を考える場合、両式を矛盾なく説明できなくてはならない。

さらに Ortega(1985) は過渡的变化を記述できるようにするため、(1)式の右辺に弾性項 $(1/\epsilon)dP^i/dt$ を付け加えた。

$$\frac{1}{V} \frac{dV}{dt} = \Phi (P^i - Y) + \frac{1}{\epsilon} \frac{dP^i}{dt} \quad \text{for } P^i > Y \quad (3)$$

$\epsilon$ , 細胞壁の弾性係数.

$P^i < Y$  の場合は (3) 式の右辺第1項は意味をなさず、弾性を表す第2項 $(1/\epsilon)dP^i/dt$ のみとなる。

非透過性溶質の灌流による浸透ストレスのために一過的に縮んだ

軸片の生長は一定時間後に再開するが、生長回復に先立って表皮側および穴側(中心柱側)のシンプラスト細胞膜に存在するプロトンポンプがともに活性化されることがわかった。浸透ストレスに対してすぐに表皮側プロトンポンプの活性化が起きていることから、細胞壁降伏の側から見ると細胞壁展性( $\Phi$ )は上昇しているものと考えられるため、一過的な軸片の縮みが起きている間は細胞壁展性が生長を律速しているとは考えられない。細胞壁展性以外の、細胞壁の弾性など可逆的な項が関与していると考えられる。

浸透ストレスに対する生長回復機構に関しては 1, 膨圧回復によるもの、2, 膨圧回復を伴わないもの、の2つの可能性が考えられるがここで得られた結果からだけではどちらとも言えない。

#### イオンストレスに対する反応について

カリウムイオンの濃度変化に対する反応について壁降伏に関しては、カリウムイオン濃度上昇時に表皮側の膜電位は過分極しており、伸長生長の一時停止期間中は、細胞壁展性が伸長を律速しているとは考えられない。水吸収の観点からは、浸透濃度が一定に保たれているのに  $K^+$  濃度上昇に伴って生長速度の一過的低下が起きることは、単純な浸透効果によるとは考えにくい。ただし以下に挙げる2条件を除く。

- 1、ソルビトールに対する細胞膜の反発係数が、カリウムイオンに対するものより小さい場合。
- 2、細胞壁アポプラスト中での  $KCl$  に対する拡散係数がソルビトールに対するものよりかなり大きい場合。

しかし1の可能性は非現実的である。2の可能性について、細胞

壁中での拡散係数に関する実験的データは少なく、他種の植物での例しか得られていないが (Tyree 1968, Guggino and Gutknecht 1982, Raven 1984)、マンニトールと KCl とは、ほぼ拡散係数が等しいとみなせる。

灌流液の浸透濃度変化がないにもかかわらず  $K^+$  濃度の上昇に伴って伸長が停止することは、 $K^+$  濃度上昇による穴側膜電位の脱分極に伴って細胞内外の浸透圧差  $\Delta\pi = (C^i - C^e)RT$  ( $C^i$ , シンプラスト内の浸透濃度;  $C^e$ , 細胞外の浸透濃度;  $R$ , 気体定数;  $T$ , 絶対温度) が減少し、そのことによって膨圧が減少すると考えざるを得ない。 $\Delta\pi$  が減少するためには  $C^i$  の減少あるいは  $C^e$  の増大が起きなくてはならないが、この短時間に起きる変化が体積の大きなシンプラスト内の浸透濃度変化によるとは考えにくい。では  $C^e$  が変化するのであろうか。この現象は Katou and Furumoto (1986a, b) によって提案されたカナルモデルに依れば説明可能となる。すなわち、 $C^e$  を灌流液そのものの溶質濃度と考えるのではなく、灌流液と接している側の狭い細胞壁アポプラスト中の溶質濃度と考えるわけである。膜電位依存性の溶質吸収機構の存在を仮定すれば、脱分極は当然アポプラストカナル中の溶質濃度上昇を引き起こすと考えられる。

実際に浸透圧調節に関与している溶質が何であるかは現在のところ不明であるが、 $K^+$  や糖などが有力候補である。

生長生理学では一般的に表皮細胞壁の降伏が伸長生長を律速していると考えられてきた。しかしながら浸透ストレスと等張条件下での塩ストレスに対する反応の違いを比較すると、これには疑問が生ずる。等張条件下で、しかも表皮細胞壁は十分緩んでいると考えら



時に生長が一時的に停止することは、生長調節における木部導管側の溶質吸収、水吸収の役割の重要性を示唆している。しかしながらこれだけでは間接的な証拠のみである。また浸透ストレスに対する生長回復には膨圧の回復が関与している可能性が示唆されたので、次に膨圧測定装置による膨圧の直接測定を試みた。

## I-2 浸透ストレスに対する生長回復過程における膨圧の変化

植物細胞の膨圧の直接測定は、1967年 Green によりマノメータ一法で *Nitella* の節間細胞を用いて測定されたのが初めである。その後70年代初頭にセミマイクロな圧力トランスデューサーを用いガラス細管プローブを細胞内に刺入して直接膨圧を測定する Pressure Probe が開発され (Steudle and Zimmermann 1971)、直径が数百  $\mu\text{m}$  ある巨大藻類細胞等に適用された。しかしながら高等植物においては、細胞が小さいため細胞内圧力プローブは適用できず、細胞内外の浸透ポテンシャル差から膨圧を求める間接的方法が一般的であった。その後、細胞の小さな高等植物に適用できるよう改良がなされた (Hüsken et al. 1978) が、数分以上の連続測定例は稀であった。その原因はプローブの刺入、メニスカス定位操作に伴う機械的振動により細胞膜とプローブとの間のシールが破れるためであろうと見当をつけ、その克服を試みた。連続的に測定することにより分単位あるいは時間単位で起こる膨圧変化を追うことを可能とすべく改良を試みた。

浸透ストレスに対する伸長生長の自発的回復現象は呼吸依存性であることが Kuzmanoff and Evans (1981) により報告されている。この自発的伸長回復が起こるときに膨圧の回復がみられない例は、コクズ幼根での Itoh et al. (1987) による報告がある。これに対し Thiel et al. (1988) は、Barley の葉で伸長回復は膨圧回復と同時に起きたと報告している。しかしながらこれらの実験は完全個体を用いているため、系が複雑すぎ、生長機構を探るにはあまり適して

いるとは言えない。そこでミトリササゲ下胚軸から切り出した伸長域のくり抜き切片を用い、浸透ストレスに対する伸長の回復に、細胞内圧がどの様に関与しているか、また回復はどの様な機構に基づいているかを調べることにし、そのために改良した連続測定用の細胞内圧プローブを用いて細胞内圧の連続測定を試みた。

## 実験材料と方法

### a. 実験材料

実験材料は前出のミトリササゲ下胚軸伸長域を1.5mmの径でくり抜いた軸片を用いた。

### b. 方法

連続測定用細胞内静水圧（膨圧）測定装置による膨圧測定

操作に伴う振動を低減し連続測定を可能にするため、具体的には細胞内圧カプローブの圧力容器の体積を調節するプランジャーの出し入れを直接型から油圧駆動を用いた遠隔操作型への改良を目指した。

#### b-1 油圧駆動装置

細胞内微小電極刺入用の微動ユニットとして、機械油を満たした一組の注射筒をビニール管で繋いだものが既に使われていた。しかし長期間の内に摺り合わせ部分から空気が混入し、遊び、ラグ(lag, 反応遅れ)の原因となることがあった。そこで今回は、マイクロメーターヘッドと1組の金属製（磷青銅）の蛇腹を金属管で繋ぎ密封

した系を試作し使用に耐え得るかテストを行った。

シリコンオイル(TSF-451-30, 東芝シリコン, 東京)を減圧脱気して封入した系は、遊びラグともに大きく実用的ではなかった。次にイソプロピルアルコールを封入しテストしたところ十分な性能が得られたので以下これを用いることとした。

#### b-2 細胞内圧プローブの組立て

圧力容器の体積はガラス細管内を含め $100\mu\text{l}$ 以下となるように設計した。圧力トランスデューサーは豊田工機製 PYS-3, 10H 型を用いた。圧力容器の組上げはシリコンオイル中に部品を沈め、減圧脱気し、オイル中で組み立てることにより、空気の混入を防いだ。ガラス管のシール及び固定用の板ゴムパッキンの径の決定等を経て実際に植物細胞の圧力測定が可能かどうかテストを行った(図9、図10)。

#### b-3 ガラス細管の先端研磨と連続測定に適切な先端直径

高等植物の膨圧測定用のガラス管先端直径は $1-3\mu\text{m}$  が用いられていた。そこで、微小電極製作器(PE-2, 成茂科学器械, 東京)で外径 $2\text{mm}$  のパイレックスガラス管を引き、先端をアーカンサスオイルストーンで研磨する装置を作製した。原理は先端径と電気抵抗との相関関係を利用し、ガラス細管内をKCl 溶液で満たし矩形波パルス入力により先端の電気抵抗を測定しながら研磨し、適切な先端径のガラス細管を作るものである。

その後ガラス細管の先端を顕微鏡視野の下で折り、適当な径のものを選択する簡便法でもよいことがわかり、以後は簡便法とした。

先端外径が  $1-2\ \mu\text{m}$  と小さいものは測定中に詰まりを起こし易く測定不能となることが多かった。逆に先端外径が  $10\ \mu\text{m}$  を越えると刺入後数秒間で圧力を失う場合が多かった。

## 結果

### 浸透濃度変化に対する既伸長域の膨圧変化

まず始めに胚軸既伸長域のくり抜き切片を用い、膨圧の連続測定が可能かどうかを浸透ストレスに対する膨圧の変化を測定することにより調べた。その結果、図 11 に示すようにプローブ先端のつまりが起きない場合、2 時間を越えて安定に測定できた。

### 浸透濃度変化に対する伸長域の膨圧変化

膨圧は浸透ストレスに対し理論値にほぼ相当するだけ低下し、生長回復時にも回復しないことが示された (図 12 a, b, 図 13)。浸透ストレスに対する膨圧低下が長時間ガラス細管を刺入されていることによる細胞の損傷によるものでないことは、逆に浸透ストレスを除いた時に膨圧が回復することによって確認した。

伸長の回復が起こった後、窒素通気により呼吸を阻害すると、軸片のわずかな縮みと膨圧低下が観測された。この結果は浸透ストレスに対する伸長生長の自発的回復は呼吸依存性であるという Kuzmanoff and Evans (1981) の報告を支持する。

## 考察

今回、試作製作した細胞内圧プローブは長時間安定に膨圧を測定することができた。メニスカス定位操作に伴う振動により細胞膜とガラス細管とのシールが破れ、測定が中断してしまうことはなかったが、膨圧の連続測定は偶発的なガラス管の先端の詰まりによって妨げられることが多い。このような先詰まりは細胞内に刺入したガラス微小電極で見られる鞘形成 (Walker 1955, Tomiyama et al. 1983) と基本的には同一な現象と思われる。先詰まりが起きていないか確認するため、適当な時間間隔でメニスカスを移動させては元に戻す操作を行った。先端外径については  $5\mu\text{m}$  前後のものが最も連続測定に適していた。

### 浸透ストレスに対する伸長生長回復の機構

Katou and Furumoto (1986a, b) によって提案された生長の連立方程式を理解、解析するためのダイアグラムすなわち方程式を平面上にプロットすることにより生長回復機構を考える。細胞壁の臨界降伏圧 ( $Y$ ) は、高等植物では一定で変化しないものと考えられてきた (Green and Cummins 1974, Cosgrove 1985)。また伸長生長の回復は細胞壁の展性増大により引き起こされると考えるのが一般的であった。図 14 の上図は従来通りの考えに基づき、今回得られた膨圧測定の結果を加え、生長回復を説明しようとしたものである。

一方、導管圧ジャンプ法の開発 (Okamoto et al. 1989b) により生長方程式 (1) (9 ページ参照) のパラメーターの内、細胞壁展性 ( $\Phi$ )

Figure 14: A graph showing the relationship between turgor pressure and cell wall yield point. The y-axis represents turgor pressure (P) and the x-axis represents cell wall yield point (Y). The curve shows that during growth recovery, the yield point (Y) changes, which is crucial for maintaining effective turgor pressure (P-Y).

と有効膨圧 ( $P^i - Y$ ) を時間を追って求めることが可能になった

(Okamoto et al. 1989a, b, Liu et al. 1989)。そこで細胞内圧  
プローブと導管圧ジャンプ法によって得られた結果 (浸透ストレス  
に対し膨圧はほぼ理論的に予想されるだけ減少し、回復しないこと。  
有効膨圧は浸透ストレスの前と伸長生長回復後では、それほど大き  
く変化せず共に数 10 KPa といった値をとること。) を表したのが  
図 14 の下の図である。ここに示された結果は浸透ストレスに対す  
る生長回復時に細胞壁の臨界降伏値 (Y) が変化し、有効膨圧の保持  
に重要な役割を演じている可能性を強く示唆する。

心臓は高血圧による血管障害を予防し、心臓を保護する作用がある。心臓は、血圧が上昇すると、心臓の壁が厚くなる。これは、心臓が血圧の上昇に耐えるための反応である。心臓の壁が厚くなることで、心臓はより多くの血を押し出すことができる。これは、心臓の機能を維持するための重要なメカニズムである。

## II章 細胞内圧プローブによる呼吸依存性膨圧成分の実測

呼吸器系は、呼吸の過程で膨張と収縮を繰り返す。この膨張は、呼吸器の壁に膨圧を生じさせる。この膨圧は、呼吸器の機能を維持するために重要な役割を果たしている。呼吸器の膨張は、呼吸器の壁の弾力性に依存している。呼吸器の壁の弾力性が低下すると、呼吸器の膨張が難しくなる。これは、呼吸器の機能を低下させる原因となる。



## II章 細胞内圧プローブによる呼吸依存性膨圧成分の実測

Katou and Furumoto(1986a, b)は水吸収に関するアポプラスト・カナルモデルの中で伸長域細胞の膨圧の呼吸依存性を予言した。既伸長域では 35KPaの呼吸依存性膨圧成分の存在が間接法により実証された(Okamoto and Katou 1988)が、この方法は伸長域には適用できないため細胞内圧プローブによる直接測定が待たれていた。

浸透ストレスに適応して定常的に伸長生長している時の細胞内圧(膨圧)の値は、前章でのグラフ(図13)に示されるように灌流液の浸透濃度の変化に対してほぼ理論値通りに変化しているので、一見受動的である様に見える。しかし呼吸障害によって定常値を保っていた膨圧が僅かに減少するのが認められる(図12)。呼吸依存性の膨圧成分は小さいので正確に測定するためにはメニスカス位置の精密な検出と定位操作が求められる。そのため細胞内圧プローブのガラス細管内の細胞液/オイル界面(メニスカス)位置の検出をPCD(Plasma-Coupled-Device)-システムを用いる非接触の光学的な方法で行い、呼吸依存性の膨圧成分の精密測定を試みた。

### 実験材料と方法

#### a. 実験材料

実験材料は前章同様のミトリササゲ下胚軸のくり抜き切片(くり抜きの径=1.5mm)を用いた。

## b. 方法

### b-1 メニスカスセンサーの開発

膨圧誘導用のガラス細管内の細胞液/オイル界面(メニスカス)位置を、メニスカスの光学像を電気信号に変換して検出することを試みた。顕微鏡撮影装置(PM-6, オリンパス, 東京)の焦点面にリニアイメージセンサー(S2307-512Q, 浜松ホトニクス, 静岡)を固定し、メニスカス観測用の3眼水平顕微鏡に取り付けた(図15、図16)。対物10倍、撮影20倍の各レンズを用いたところ、焦点面倍率は $200 \times 3/8 = 75$ 倍であった。ガラス細管の軸とセンサーの軸を合わせたところ、メニスカス像はA/D変換回路とパーソナルコンピュータ(PC-9801 UV11, 日本電気, 東京)を介しCRTモニター上で電流出力の谷となって表れた(図17)。センサーの1チャンネルの幅は $50 \mu\text{m}$ であるため $0.7 \mu\text{m}$ のメニスカス変位が識別可能とわかった。この装置を用いて以下の実験を行った。

### b-2 無傷幼茎伸長域の浸透濃度、細胞内圧

軸片を用いた実験を行う場合、インタクトな植物がおかれている環境との違いを常に考えに入れなくてはならない。インタクトな幼茎の導管液の浸透濃度を、切断時に切断面から向頂的に噴き出す溶液の浸透濃度から求めようとしたが、得られる溶液が微量であることと、切断された細胞からの細胞液の混入の程度が不明のため、成功しなかった。そのため、細胞内浸透濃度と、細胞内圧とから、導管液の浸透濃度を見積ることとした。

通常の実験には湿った砂に植え3日間暗所で育てた芽生えを用い

るが、砂の水分含量を一定に保つのは難しい。そこで水耕栽培を試みた。湿った砂に植え2日間暗所で育てた後、傷をつけぬよう注意深く水耕用の容器に移す。水耕用の容器は、穴を開けたアクリル板をビーカーにかぶせ、根が水に浸かるようしてある。3日目（水耕に切り替えて少なくとも18時間たったもの）に比較的まっすぐに伸びているものを測定容器（図18）に固定し膨圧の測定を行った。組織の浸透濃度は子葉節下15-30mmの、伸長域を含む軸片を切り出し、押しつぶし法により溶液を集め、氷点降下法による浸透圧計（Model F2000, Roebbling Co. Germany）で測定した。

得られた結果は以下の通りである。

$$P^i = 541 \pm 40 \text{ KPa} \quad (n = 5)$$

$$C^i = 358 \pm 63 \text{ mOsm} \quad (n = 18)$$

細胞内と導管内との水ポテンシャル差は大きくても40KPaであり、導管圧はほぼ0KPaであるとする、導管液の浸透濃度は156 mOsmと見積られる。したがってインタクトな導管液の浸透濃度は、50mOsm溶液と200mOsm溶液の間にあると考えられる。そこで以下の実験条件としてはくり抜き灌流系で50mOsmと200mOsm条件を設定し、窒素通気により呼吸を阻害した。

## 結果

図19、20に示されるように呼吸障害に反応して軸片は伸長を停止あるいは僅かな収縮を起こす。この間の膨圧変化をPCDリニアイメージセンサーを装着した細胞内圧プローブにより連続測定した。50mOsm、200mOsm 灌流条件下での膨圧低下は表2に示すように平均値でそれぞれ43KPa、30KPaであった。

この伸長生長の呼吸障害に対する反応は可逆的であり、再通気により Emergent Growth(Parrish and Davies 1977) と呼ばれる一過的な伸長促進が見られる。この間、膨圧は一旦増加するが、再び減少する様な振動を示す。

## 考察

### メニスカスセンサーについて

PCD リニアイメージセンサーを用いることによりメニスカス位置は  $0.7\mu\text{m}$  の変位が検出可能であった。この解像度は Büchner et al. (1987)の報告に比べ約10倍優れている。しかし胚軸片の伸長により刺入しているガラス細管が曲げられることによりセンサーの軸とガラス細管の軸がずれると誤差を生ずる。したがって固定端のできるだけ近くにプローブを刺入することによって連続測定中に伸長が起こっても軸がずれないようにすることが必要となる。

メニスカスの手動による定位操作は熟練と、かなりの労力を必要

とする。そのため、既に自動化への試みは電気抵抗測定によるもの (Hüsken et al. 1978)、ビデオシステムを用いたもの (Cosgrove and Durachko 1986)、フォトトランジスターを用いたもの (Büchner et al. 1987) などの報告がある。今回、メニスカスの光学像を電気信号として取り出すことに成功したので、自動化により膨圧測定を高精度に長時間測定ができる装置の開発への端緒を開くことができた。

#### 膨圧の呼吸依存性について

膨圧の連続測定を可能にすることにより初めて伸長域細胞の膨圧の呼吸依存性成分を直接的かつ精密に実測することができた。伸長域で測定された30-40KPaという値は、カナルモデルで予想された値 (Katou and Furumoto 1986b) とよく一致した。

Lockhart の生長方程式 (Lockhart 1965, Katou and Furumoto 1986a, b) のうち、水吸収を表す方程式から、窒素通気時の膨圧の低下は細胞内外の浸透ポテンシャル差の減少によるものと考えざるをえない。しかし大きな体積を持つ細胞内浸透濃度が30分ほどの呼吸障害で10数mOsm減少するとは考えにくい (De Boer et al. 1985, Okamoto and Katou 1988)。細胞の直接の外部環境は木部側細胞壁アポプラストであり、したがって木部側  $H^+$  ポンプの活動の停止によって引き起こされる溶質吸収活性の低下がアポプラスト内の溶質濃度を上昇させ、その結果膨圧低下が起きたと考えられる。

また短時間の呼吸障害では細胞壁の展性は変化しないことが示されており (Okamoto et al. 1989b)、伸長の停止あるいはわずかな縮みの原因は、膨圧低下により有効膨圧が0になったことに依ると考

... (faint, illegible Japanese text) ...  
... (faint, illegible Japanese text) ...  
... (faint, illegible Japanese text) ...  
... (faint, illegible Japanese text) ...  
... (faint, illegible Japanese text) ...

えられる。このことは導管圧ジャンプ法により得られた有効膨圧の  
値が数10KPa であることから支持される。これらの事実は膨圧を  
数10KPa 調節することにより伸長生長速度を何倍にも調節するこ  
とが可能な呼吸依存性の機構の存在を示唆する。

この論文は、植物の生長に与える影響を調査するものである。特に、オーキシンという植物ホルモンの作用について詳しく説明している。実験の結果、オーキシンの存在が植物の生長を促進することを示している。また、オーキシンの濃度と生長速度との関係についても詳しく説明している。

### III 章 オーキシンによる生長 促進効果の解析

植物の生長に与える影響を調査する。特に、オーキシンという植物ホルモンの作用について詳しく説明している。実験の結果、オーキシンの存在が植物の生長を促進することを示している。また、オーキシンの濃度と生長速度との関係についても詳しく説明している。

植物の生長に与える影響を調査する。特に、オーキシンという植物ホルモンの作用について詳しく説明している。実験の結果、オーキシンの存在が植物の生長を促進することを示している。また、オーキシンの濃度と生長速度との関係についても詳しく説明している。

### III章 オーキシンによる生長促進効果の解析

高等植物幼茎の伸長生長が植物ホルモンの一種であるオーキシンにより調節を受けることは周知の事実である(Cleland 1986, Taiz 1984)。いろいろな植物について研究が進められているが、ミトリササゲ下胚軸では、オーキシン投与による伸長促進過程での表皮側、木部側膜電位と伸長生長速度の経時変化は、Mizuno et al. (1980) や Ikoma and Okamoto (1988) に詳しく報告されている。Mizuno et al. (1980) によると非灌流系という条件下での表皮側からの噴霧によるオーキシン投与では伸長生長促進に先だって表皮側膜電位のみが過分極を示す。これに対しIkoma and Okamoto (1988)の導管灌流法によるオーキシン投与では両膜電位が同時に過分極を示すことが報告されている(図21)。この過分極がプロトンポンプの活性化であることはすでに証明されている(Mizuno et al. 1980, 1985)。

従来より、オーキシンによる生長調節は細胞壁展性の制御によると考えられてきたが、この結論はパラメーター決定に使われた方法に依存するところが多い。新たに開発された導管圧ジャンプ法を用いることにより細胞壁展性( $\Phi$ )と有効膨圧( $P^{\pm} - Y$ )を時間を追って求めることが可能となった。膨圧( $P^{\pm}$ )は、改良型細胞内圧プローブにより連続測定できるようになった。よってLockhart(1965)によって定式化された2つの生長方程式の内、細胞壁降伏を表す力学方程式の全てのパラメーターを求めることが可能になった。そこで導管圧ジャンプ法と細胞内圧プローブ法の併用により、オーキシ



ンによる伸長生長促進過程におけるパラメーターの値の変化を経時的に解析し制御機構の再検討を試みた。

## 実験材料と方法

### a, 実験材料

3日間暗所で育てたミトリササゲ下胚軸の導管は子葉節に近づくとつれて未発達となり、灌流するのに抵抗が高くなる。基本灌流圧の10KPaで灌流速度が小さいものは溶液交換に時間がかかり、実際に新たな溶液とはじめて接触した時間を同定することが難しい。そのため伸長域胚軸から軸片を切り出す部位を僅かに下げ、子葉節下13-15mmを上端とする15mm長の軸片とした。基本灌流圧の10KPaで0.4ml/h以上灌流可能なものを選び以下の実験で用いた。

### b, 方法

導管圧ジャンプ法と細胞内圧プローブ法とを併用することにより、パラメーターを経時的に求め解析した。実験に用いた装置の概略を図22に示す。灌流条件としては50mOsmと200mOsmの2つの浸透圧条件下で行った。導管圧ジャンプ法の原理、方法は以下に述べる。

### 導管圧ジャンプ法

生長の力学方程式は通常

$$v = \Phi (P^{\pm} - Y) \quad \text{for } P^{\pm} > Y \quad (1)$$

で記述される (Lockhart 1965, 9ページ参照, ただし  $v$  は相対的伸長生長速度)。Katou and Furumoto(1896a)により吸水の熱力学方程式は導管圧の関与を考慮に入れ、高等植物の軸性器官に適用でき

るよう拡張された。

$$v = L (\Delta \pi - P^i + P^*) \quad (4)$$

(ただし  $P^*$  は導管圧)

加圧導管灌流を行った場合予想される胚軸内部の圧力分布を図23に示す。導管圧をわずかにジャンプさせることにより膨圧変化を起こさせる。新たな定常状態が得られれば、膨圧は一定になったとみなされ、そこで引き起こされた伸長速度変化( $\Delta v$ )は膨圧変化( $\Delta P^i$ )によるものと考えることができる(図24, 25)ので

$$\Delta v = \Phi \cdot \Delta P^i$$

と記述される。よって $\Delta v$ を $\Delta P^i$ で割れば、 $\Phi$ が与えられる。

$$\Phi = \Delta v / \Delta P^i$$

$\Phi$ が決まれば方程式(1)より有効膨圧( $P^i - Y$ )を求めることができる。

導管圧ジャンプに伴う膨圧の変化 $\Delta P^i$ は細胞内圧プローブで直接測定するのが望ましいが、 $\Delta P^i$ の代わりに導管圧変化 $\Delta P^*$ を用いて $\Phi$ を求めた。 $\Delta P^i$ の代わりに $\Delta P^*$ を用いた理由、それに起因する誤差は次項で評価する。

#### 誤差の評価

導管圧ジャンプに伴う胚軸片中での圧力分布および変化は図23, 24に示したようであると予想される。導管圧は胚軸片内では軸方向に均一であると予想された(Okamoto et al. 1989b)。導管圧ジャンプの幅は通常12KPaと小さく、細胞内圧プローブの測定限界に近いので誤差なく正確に測定することは難しい。またプローブのガラス管先端と、細胞液との僅かな摩擦が圧力トランスデューサーの出

力には数KPaの変位を及ぼす。また導管圧ジャンプに対し膨圧がほとんど変化しないもの、僅かにしか反応しないものもあり、問題がある。そのため膨圧変化 $\Delta P^{\dagger}$ の代わりに加圧した人工的な導管圧の変化量 $\Delta P^*$ を用いて $\Phi$ を求めた。 $\Delta v/\Delta P^*$ は $\Phi L/(\Phi+L)$ を与えるが、もし $L \gg \Phi$ ならば、 $\Phi$ の十分良い近似値を与える。エンドウでは胚軸の水透過性(L)はIAAにより影響を受けないことが報告されている(Dowler et al. 1974, Cosgrove and Cleland 1983)。また、水透過性は細胞壁展性( $\Phi$ )に比べかなり大きいことが報告されている。ミトリササゲ胚軸においても細胞内圧プローブによる測定から水透過性は大きく、エンドウで測定されている値( $2.0 \text{ M Pa}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; Cosgrove 1985)と、同じ桁にあると推定された。IAAにより生長が促進されたときの $\Phi$ の値の最大値は $0.19 \pm 0.05 \text{ M Pa}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であるので $\Phi/L$ の比はおよそ1/10となり、エンドウで報告されている値(1/9)に近い。従って $\Delta P^{\dagger}$ の代わりに $\Delta P^*$ を用いることによる $\Phi$ の過大評価、有効膨圧の過小評価は、最大10%と計算された。

## 結果

### 1、膨圧、伸長生長速度の時間経過

オーキシン投与における膨圧と伸長生長速度の連続測定例を、図26a, bに示す。伸長生長は $10^{-4} \text{ M}$  IAA溶液灌流後12-13分後から促進され始め、約30分後に最も生長速度が大となる。その後ゆるやかに生長速度は低下する。それに対し細胞内圧は50mOsm条件下

で、9例中4例は最大で50KPaの低下を示したが5例はほとんど変化しないか僅かに上昇するのがみられた(表3)。200mOsm条件下7例では変化がみられる場合でも50mOsm灌流条件下に比べ変化量は小さかった(表4)。しかしながら細胞内圧が減少する場合、ほとんど変化しない場合のどちらにおいても伸長速度変化と相関が見られるような膨圧変化は認められなかった。

## 2、生長の力学的パラメーターの時間経過

正の導管圧ジャンプ法を用いて生長パラメーターの経時的変化を調べた(図27、28)。胚軸片切断、灌流開始後3時間目より15分おきに導管圧ジャンプを行った。 $10^{-4}M$  オーキシシン投与により細胞壁展性、有効膨圧ともに増大するのが認められた。50mOsm条件下で生長速度はIAA投与前に比べ、最大7.1倍に増大したが、 $\Phi$ の増大は最大2.1倍に過ぎなかった。この隔たりは有効膨圧の増大を考慮することにより埋めることができる。200mOsm条件下でも $\Phi$ の変化単独では伸長生長速度の増大を説明することはできない(表5)。

## 3、軸片の細胞内浸透濃度に対するIAAの効果

IAA灌流により細胞内浸透濃度が影響を受けるかどうか調べた。切断後50mOsm溶液で灌流し4時間15分後にIAA  $10^{-4}M$ を灌流液に加えたものと加えなかった軸片の浸透濃度を、切断後5時間30分後に押しつぶし法で細胞液を採取し氷点降下法で決定した。IAAを加えなかったものの浸透濃度は $284 \pm 14$  mOsm ( $n = 7$ )、IAAを加えたものの浸透濃度は $279 \pm 30$  mOsm ( $n = 7$ )で有意な差は見

られなかった。これらの結果はアベナ子葉鞘で見られた結果 (Stevenson and Cleland 1981) や、エンドウの節間で見られた結果 (Cosgrove and Cleland 1983) と一致する。したがってミトリササゲ下胚軸片においても IAA による伸長生長促進時に膨圧、浸透濃度の変化が見られないことから、細胞内水ポテンシャルの変化なしに IAA は伸長生長を促進したというエンドウでの報告 (Cosgrove and Cleland 1983) がミトリササゲでも同様であることが確かめられた。

### 考 察

加藤 - 古本のダイアグラムによる生長解析 (図 29)

得られた結果から IAA は細胞壁展性( $\Phi$ )と有効膨圧( $P^{\pm} - Y$ )の両方を増大させるが、細胞内圧( $P^{\pm}$ )にはほとんど影響を与えないことがわかる。したがって有効膨圧の増大は細胞壁臨界降伏圧( $Y$ )の低下によるものと考えられる。表 5 に示した代表的な値を横軸に細胞内圧、縦軸に相対伸長生長速度をとったグラフ上で考える。線分 1 は壁降伏を表し、線分 2 は水吸収を表す。1 の線分の傾きは細胞壁展性( $\Phi$ )を x 軸切片は臨界降伏圧( $Y$ )を表す。2 の線分の傾きは相対的水透過性( $L$ )を、x 軸切片は  $\Delta\pi + P^*$  (ただし  $P^*$  は導管圧)を表す。よって  $\Phi$  の増大は 1 の線分の傾きの増大で、 $Y$  の減少は x 軸切片の左側への移動で表される。

従来、IAA による生長促進時に唯一変化が認められたのは細胞壁展性であり、したがって生長制御は細胞壁展性の調節によると考え

... (faint text) ...

... (faint text) ...

られてきた(Cosgrove 1985)。しかしながら導管圧ジャンプ法と細胞内圧プローブの併用による解析から、細胞壁展性のみならず細胞壁臨界降伏圧もIAAによって調節されていることが示された。

IAAによる伸長促進時に細胞内水ポテンシャルに変化がみられなかったことは、エンドウだけでなくミトリササゲにおいても何らかの能動的吸水機構の存在を考えざるを得ないことを示しており、アポプラスト・カナル模型(Katou and Furumoto 1986a, b)に有力な実験的根拠を提供したことになる。

... (faint text) ...

... (faint text) ...

#### IV 章 総合考察

... (faint text) ...

#### IV 章 総合考察

本研究は、浸透ストレスおよびイオンストレスに対する適応的生長制御反応の研究の段階を経て、加藤-古本(Katou and Furumoto 1986a, b)の生長の連立方程式を理解、解析するためのダイアグラムの指針のもとに、生長調節機構を実験的に明らかにすることを目指すことになった。この目標は生長の動作点( $P^i$ ,  $v$ ) (ただし  $v$  は相対伸長速度)を決定するために、改良型細胞内圧プローブの開発を促し、細胞壁降伏の力学的パラメーター決定のために新たに開発した導管圧ジャンプ法と組み合わせることによって、従来の生長生理学が予想し得なかった新しい成果を生み出した。

即ち、臨界降伏圧( $Y_{adj}$ )の増減により細胞壁降伏の駆動力である有効膨圧( $P^i - Y$ )を調節する生長調節様式の存在が明らかになった。始めにこの生長調節様式は浸透ストレス下における生長回復時に重要な意味を持つことが明らかになった(1章、Okamoto et al. 1989a, Liu et al. 1989)が、さらに、オーキシンによる生長促進時にも $Y_{adj}$ の調節は細胞壁展性の調節と共に重要な意味を持つことが示された(3章、Okamoto et al. 1990, Nakahori et al. 1991)。これらのことは高等植物の生長調節機構として従来から言われていた細胞壁展性( $\Phi$ )の調節機構に加え、 $Y_{adj}$ の調節機構が重要な意味を持つことを示している。

調節可能な細胞壁の臨界降伏圧( $Y_{adj}$ )の存在は初め車軸藻節間細胞で示された(Green et al. 1971)。しかしながら高等植物ではそ



の存在は否定されてきた (Green and Cummins 1974, Cosgrove 1985)。この理由は生長のパラメーター決定に使われた方法によるところが大きいと思われる。つまり従来の方法はパラメーター決定に要する時間が長過ぎたため、その間に植物体自身による生長調節が起きてしまっていた可能性が否定できない (Okamoto et al. 1989, Ortega et al. 1989)。多くの研究者が用いてきた浸透平衡法では、組織外液の浸透濃度を変えることによって膨圧というパラメーターを変えようとしているが、細胞の直接的な外部環境は複雑に入り組んだアポプラストのカナルであるため浸透平衡に到達するのにかなりの時間を要し、浸透濃度の変化をかなり大幅 (100KPa-200KPa 相当)にとらないと曖昧な結果しか得られない。導管圧ジャンプ法では膨圧の変化は静水力学的にアポプラスト内の圧力を変えることにより達せられる。圧力の変化は音速程度の速さで伝わるので、2-3分で $\Phi$  や  $P^{\pm}-Y$  を測定することができる。これに改良型細胞内圧プローブによる $P^{\pm}$ の連続測定法を組み合わせると、生長調節機構が発動しないうちに $Y$ そのものの迅速な変化を捉えることができる。また、非常にわずかな10KPa程度の幅で的確に膨圧を変化させることができるので、生長調節の引金になる擾乱を最小限に抑えることができる。

最近、菌類の一種ヒゲカビ (*Phycomyces*) の胞子囊柄でも細胞内圧プローブを用いた膨圧クランプ法により  $Y_{adj}$  の存在が示されている (Ortega et al. 1989)。

有効膨圧の値は異なる浸透圧条件下に置かれても数10KPa といった小さな値をとる。このことは  $Y_{adj}$  が細胞内圧からわずか数10KPa 低いところに調節されていることを示している。更に、Katou

and Furumoto(1986a, b)がアポプラストカナル模型から存在を予言していた呼吸依存性の膨圧成分は、定量的にも30-40KPaであることが実験的に証明されている(2章, Nakahori et al. 1990)。呼吸依存性の膨圧成分が有効膨圧の値とほぼ同じ値をとることは、植物の生長が代謝により調節しやすいように $Y_{adj}$ の値が調節されている可能性を示唆する。

浸透ストレス、植物ホルモンによる $Y_{adj}$ 調節に基づく生長制御は、エネルギー的に経済性が高いだけでなく鋭敏な調節方法であると考えられる(Wyn Jones and Pritchard 1989)ことから植物の生長生理学に新たな見地を与える。またオーキシンによる生長促進時に膨圧がほぼ一定に保たれることは代謝による膨圧のホメオスタティックな調節機構を反映しているのかもしれない。

### 今後の展望

現在までに、膨圧そのものと生長速度との間には相関がみられない例が数多く報告されている(Cosgrove 1985, Itoh et al. 1987, Pritchard et al. 1987)。本研究で得られた結果から $Y_{adj}$ 調節による生長調節機構の存在が明らかになったので、膨圧は一定に保たれたまま、 $Y_{adj}$ の調節によって有効膨圧を制御し生長が制御されている可能性が強く示唆される。細胞内圧プローブによる膨圧の直接測定と導管圧ジャンプ法の適用による生長パラメーターの連続測定により、根など茎以外の器官、組織においても $Y_{adj}$ が存在するか否かが、判明するものと期待される。

$Y_{adj}$  の値を調節している因子、調節機構が何かはたいへん興味深い問題であり、今後の課題として残される。しかしながら70年代始めに  $Y_{adj}$  の存在が証明された *Nitella* 節間細胞においてさえ、 $Y_{adj}$  調節の物理化学的な基盤は依然解明されていないのが現状である。また、車軸藻類では高等植物と異なりオーキシンが効かず研究手段として使えないという制約がある。高等植物は体制は複雑であるが、様々な植物ホルモンが 'tool' として利用できる利点がある。様々な実験条件、阻害剤などを用い導管圧ジャンプ法、細胞内圧プローブ法などを併用しつつ生長のパラメーターを測定、解析することによりこの問題解決への糸口がつかめるものと期待される。

## 謝 辞

本研究は、技術グループの支援とともに、理論グループ、実験グループの緊密な協力なしには遂行し得なかったと言えます。

くり抜き灌流用容器の作成、工作機械の使用法の指導を始め、改良型細胞内圧プローブの試作、開発に、ご援助ご協力をいただきました小泉和司氏、鳥居龍晴氏他、名古屋大学理学部装置開発室の皆様感謝いたします。

細胞内圧測定装置のメニスカスセンサーの共同開発にあたりましてご協力いただきました、浜松ホトニクス株式会社の増子正行博士、村松 悟氏、仲瀬重樹氏、東京工業大学工学部の大谷裕之博士に感謝いたします。

本研究を行うにあたって御指導、ご助言をいただきました名古屋大学理学部生物学教室の岡本 尚博士に感謝いたします。アポプラストカナルモデル、生長のダイアグラム等を通じ実験の指針と、結果の総括に理論的基盤を提供され、実験技術の面でも膜電位測定用の高入力抵抗増幅器の設計など種々のご助言とご協力をいただきました名古屋大学理学部生物学教室の加藤 潔博士に感謝いたします。

## 引用文献

- Büchner, K. -H., Wehner, G., Virsik, W. and Zimmermann, U. (1987) Automatic turgor pressure recording in plant cells. *Z. Naturforsch.* 42: 1143-1145.
- Cheeseman, J.M. and Pickard, B.G. (1977) Electrical characteristics of cells from leaves of *Lycopersicon*. *Can. J. Bot.* 55: 497-510.
- Cleland, R.E. (1986) The role of hormones in wall loosening and plant growth. *Aust. J. Plant. Physiol.* 13: 93-103.
- Cosgrove, D.J. (1985) Cell wall yield properties of growing tissue: evaluation by *in vivo* stress relaxation. *Plant Physiol.* 78: 347-356.
- Cosgrove, D.J. and Cleland, R.E. (1983) Osmotic properties of pea internodes in relation to growth and auxin action. *Plant Physiol.* 72: 332-338.
- Cosgrove, D.J. and Durachko, D.M. (1986) Automated pressure probe for measurement of water transport properties of higher plant cells. *Rev. Sci. Instrum.* 57: 2614-2619.
- De Boer, A.H., Katou, K., Mizuno, A., Kojima, H. and Okamoto, H. (1985) The role of electrogenic xylem pumps in  $K^+$  absorption from the xylem of *Vigna unguiculata*: the effect of auxin and fusaric acid. *Plant, Cell Environ.* 8: 579-586.
- Dowler, M.J., Rayle, D.L., Cande, W.Z., Ray, P.M., Durand, H. and Zenk, M.H. (1974) Auxin does not alter the permeability of pea segments to tritium-labeled water. *Plant Physiol.* 53: 229-232.
- Green, P.B. (1967) Turgor pressure: direct manometric measurement

- in single cells of *Nitella*. *Science* 155: 1675-1676.
- Green, P.B., Erickson, R.O. and Buggy, J. (1971) Metabolic and physical control of cell elongation rate: *in vivo* studies in *Nitella*. *Plant Physiol.* 47: 423-430.
- Green, P.B. and Cummins, W.R. (1974) Growth rate and turgor pressure: auxin effect studied with an automated apparatus for single coleoptiles. *Plant Physiol.* 54: 863-869.
- Guggino, S. and Gutknecht, J. (1982) Turgor regulation in *Valonia macrophysa* following acute osmotic shock. *J. Memb. Biol.* 67:155-164.
- Hüsken, D., Steudle, E. and Zimmermann, U. (1978) Pressure probe technique for measuring water relations of cells in higher plants. *Plant Physiol.* 61: 158-163.
- Ikoma, S. and Okamoto, H. (1988) The quantitative and chronological relationship between IAA-induced H<sup>+</sup> pump activation and elongation growth studied by means of xylem perfusion. *Plant Cell Physiol.* 29: 261-267.
- Itoh, K., Nakamura, Y., Kawata, H., Yamada, T., Ohta, E. and Sakata, M. (1987) Effect of osmotic stress on turgor pressure in mung bean root cells. *Plant Cell Physiol.* 28: 987-994.
- Katou, K. (1978) Distribution of electric potential and ion transport in the hypocotyl of *Vigna sesquipedalis*. V. Electrogenic activity of the parenchyma cells in hypocotyl segments. *Plant Cell Physiol.* 19: 523-535.
- Katou, K. and Furumoto, M. (1986a) A mechanism of respiration-dependent water uptake in higher plants. *Protoplasma* 130: 80-82.
- Katou, K. and Furumoto, M. (1986b) A mechanism of respiration-

dependent water uptake enhanced by auxin. *Protoplasma* 133: 174-185.

加藤 潔, 岡本 尚 (1985) 新しい植物生理学の開拓をめざして.  
科学 55: 560-568.

Kojima, H., Katou, K. and Okamoto, H. (1985) Homeostatic regulation of membrane potential by an electrogenic ion pump against change in the  $K^+$  concentration of the extra- and intra-organ perfusion solutions. *Plant Cell Physiol.* 26: 351-359.

Kuzmanoff, K.M. and Evans, M.L. (1981) Kinetics of adaptation to osmotic stress in lentil (*Lens culinaris* Med.) roots. *Plant Physiol.* 68: 244-247.

Liu, Q., Katou, K. and Okamoto, H. (1989) Regulation of elongation growth of excised segments of *Vigna* hypocotyl under osmotic stress in the absence or presence of absorbable solute. *Plant Cell Physiol.* 30: 1039-1046.

Lockhart, J.A. (1965) An analysis of irreversible plant cell elongation. *J. Theor. Biol.* 8: 264-275.

Mizuno, A., Katou, K. and Okamoto, H. (1980) Structure and function of the elongation sink in the stems of higher plants. I. Effects of anoxia and IAA on the growth rate and the spatially separate electrogenic ion pumps. *Plant Cell Physiol.* 21: 395-403.

Mizuno, A. and Okamoto, H. (1982) Structure and function of the elongation sink in the stems of higher plants. II. Effects of acids and anoxia on the growth rate and the spatially separate electrogenic ion pumps. *Plant Cell Environ.* 5: 131-135.

Mizuno, A., Kojima, H., Katou, K. and Okamoto, H. (1985) The

electrogenic proton pumping from parenchyma symplast into xylem: direct demonstration by xylem perfusion. *Plant Cell Environ.* 8: 525-529.

Nakahori, K., Katou, K. and Okamoto, H. (1987) The role of membrane potential for the control of elongation growth of *Vigna* hypocotyl: response of a hollow cylinder to osmotic and ionic stress. *Plant Cell Physiol.* 28: 901-910.

Nakahori, K., Koizumi, K., Muramatsu, S., Ohtani, H., Masuko, M., Nakase, S., Katou, K. and Okamoto, H. (1990) Measurement of the respiration-dependent component of intracellular pressure with an improved pressure probe. *Plant Cell Physiol.* 31: 859-864.

Nakahori, K., Katou, K. and Okamoto, H. (1991) Auxin changes both the extensibility and the yield threshold of the cell wall of *Vigna* hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 32: 121-129.

Okamoto, H., Ichino, K. and Katou, K. (1978) Radial electrogenic activity in the stems of *Vigna sesquipedalis*: involvement of spatially separate pumps. *Plant, Cell Environ.* 1: 279-284.

Okamoto, H., Katou, K. and Ichino, K. (1979) Distribution of electric potential and ion transport in the hypocotyl of *Vigna sesquipedalis*. VI. The dual structure of radial electrogenic activity. *Plant Cell Physiol.* 20: 103-114.

Okamoto, H., Mizuno, A., Katou, K., Ono, Y., Matsumura, Y. and Kojima, H. (1984) A new method in growth-electrophysiology: pressurized intra-organ perfusion. *Plant Cell Environ.* 7: 139-147.

Okamoto, H. and Katou, K. (1988) Demonstration of respiration-dependent water uptake and turgor generation in *Vigna*



- hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* 29: 509-515.
- Okamoto, H., Liu, Q., Nakahori, K. and Katou, K. (1989a) Control of elongation growth under osmotic stress and salt stress. In *Plant Water Relations and Growth under Stress*. Eds. Tazawa, M. et al. Myu Co., Tokyo, Japan. pp. 323-330.
- Okamoto, H., Liu, Q., Nakahori, K. and Katou, K. (1989b) Pressure jump method as a new tool in growth physiology: scanning physiological wall extensibility and effective turgor. *Plant Cell Physiol.* 30: 979-985.
- Okamoto, H., Miwa, C., Masuda, T., Nakahori, K. and Katou, K. (1990) Effects of auxin and anoxia on the cell wall yield threshold determined by negative pressure jumps in segments of cowpea hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* 31: 783-788.
- Ortega, J.K.E. (1985) Augmented growth equation for cell wall expansion. *Plant Physiol.* 79: 318-320.
- Ortega, J.K.E., Zehr, E.G. and Keanini, R.G. (1989) *In vivo* creep and stress relaxation experiments to determine the wall extensibility and yield threshold for the sporangiophores of *Phycomyces*. *Biophys. J.* 56: 465-475.
- Parrish, D. J. and Davies, P. J. (1977) Emergent growth: an auxin-mediated response. *Plant Physiol.* 59: 745-749.
- Pritchard, J., Tomos, A.D. and Wyn Jones, R.G. (1987) Control of wheat root elongation growth: I. Effect of ions on growth rate, wall rheology and cell water relations. *J. Exp. Bot.* 38: 948-959.
- Raven, J.A. (1984) *Energetics and Transport in Aquatic Plants*. p.481. Alan R. Liss, Inc. New York.

- Reinhold, L., Seiden, A. and Volokita, M. (1984) Is modulation of the rate of proton pumping a key event in osmoregulation? *Plant Physiol.* 75: 846-849.
- Steudle, E. and Zimmermann, U. (1971) Hydraulic conductivity of *Valonia utricularis*. *Z. Naturforsch.* 26: 1302-1311.
- Stevenson, T.T. and Cleland, R.E. (1981) Osmoregulation in the *Avena* coleoptile in relation to auxin and growth. *Plant Physiol.* 67: 749-753.
- Taiz, L. (1984) Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 585-657.
- Thiel, G., Lynch, J. and Läuchli (1988) Short-term effect of salinity stress on the turgor and elongation of growing barley leaves. *J. Plant Physiol.* 132: 38-44.
- Tomiyama, K., Okamoto, H. and Katou, K. (1983) Effect of infection by *Phytophthora infestans* on the membrane potential of potato cells. *Physiol. Plant Path.* 22: 233-243.
- Tyree, M.T. (1968) Determination of transport constants of isolated *Nitella* cell walls. *Can. J. Bot.* 46:317-327.
- Van Bel, A.J.E. and Hermans, H.P. (1977) pH dependency of the uptake of glutamine, alanine and glutamic acid in tomato internodes. *Z. Pflanzenphysiol.* 84: 413-418.
- Van Bel, A.J.E. and Van Erven, A.J. (1979) Potassium co-transport and antiport during the uptake of sucrose and glutamic acid from the xylem vessels. *Plant Sci. Lett.* 15: 285-291.
- Walker, N. A. (1955) Microelectrode experiments on *Nitella*. *Aust. J. Biol. Sci.* 8: 476-489.
- Wyn Jones, R.G. and Pritchard, J. (1989) Stress, membranes and cell wall. *In Plants Under Stress, Soc. Exp. Seminar series* 39.

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

edited by Jones, H.G. et al. pp. 95-114. Cambridge University Press, Cambridge.

### 要 旨

本論文は、*Phlox subulata* の下葉部について、*Phlox subulata* の葉部から抽出した葉部抽出液の組成を分析し、その成分を明らかにした。抽出液の組成は、*Phlox subulata* の葉部抽出液の組成を分析し、その成分を明らかにした。

### VII 要 旨

本論文は、*Phlox subulata* の下葉部について、*Phlox subulata* の葉部から抽出した葉部抽出液の組成を分析し、その成分を明らかにした。抽出液の組成は、*Phlox subulata* の葉部抽出液の組成を分析し、その成分を明らかにした。

まず始めに、*Phlox subulata* の下葉部について、*Phlox subulata* の葉部から抽出した葉部抽出液の組成を分析し、その成分を明らかにした。抽出液の組成は、*Phlox subulata* の葉部抽出液の組成を分析し、その成分を明らかにした。

## Ⅶ 要 旨

本論文は豆科植物芽生えの下胚軸について岡本らが明らかにした電気生理学的構造モデル(Okamoto et al. 1978, 1979)と、加藤により提唱された Lockhart(1965) の生長連立方程式を理解、解析するためのダイアグラム(Katou and Furumoto 1986a, b) とに立脚して、高等植物軸性器官の伸長生長調節機構を明らかにすることを目的としたものである。

高等植物幼茎の伸長生長が植物ホルモンであるオーキシンによって調節を受けることは周知の事実である。また茎の伸長は水ストレス、塩ストレスによって阻害を受けるが、ある程度までは耐性を示し適応回復する。この様な、幼茎の伸長生長の調節機構を、細胞内微小電極を用いた電気生理学的手法と、細胞内圧力プローブによる膨圧の直接測定法、細胞壁力学パラメーター決定のための導管圧ジャンプ法を併用することによって解析した。実験に用いた装置はすべて自作あるいは共同開発したが、なかでも膨圧測定装置は長時間連続測定を可能にするために特別の工夫を加えた。

まず始めに、電気生理学的に構造解析の進んでいるミトリササゲ下胚軸の軸片の中心柱をくりぬき、その中を任意の実験溶液で灌流するくり抜き灌流法を開発し、浸透ストレス、塩ストレスに対する軸片の反応を膜電位と伸長生長速度を指標として同時連続測定を行い両者の相関を解析した。その結果、ストレスによって一過的に縮んだ軸片の生長は一定時間後に再開するが、生長回復に先だって器

官表面側、および中心柱側のシンプラスト細胞膜に存在するプロトンポンプが活性化されることがわかった。同時に、生長調節といえば器官表面側の細胞壁展性の調節のみに注意が向きがちであったが、導管側の溶質吸収と水吸収の役割も重要であることを指し示す結果を得た。

浸透ストレスに対する生長の適応回復には膨圧の回復が寄与する可能性が示唆されてきた。そのため、ストレスに対し適応回復をしている軸片の細胞内にプローブを直接刺入して膨圧の連続測定を行った。従来の装置は膨圧を長時間安定に測定するのが困難であり、微小な圧変化を経時的に捉えるのが難しかったが、自作した装置は十分な性能を持つことがわかった。これによって浸透ストレスに対して生長が回復する時に膨圧は回復しないことが明らかになった。この場合の生長の回復は、新たに開発した導管圧ジャンプ法による細胞壁特性の解析から、細胞壁臨界降伏圧の迅速な低下による生長調節によることが明らかになった。従来、高等植物の臨界降伏圧は変化しないとされていたので、今回の発見は新知見である。さらに呼吸阻害実験における膨圧と伸長生長速度の同時連続測定およびその解析により、Katou and Furumoto (1986a, b) が予言した $H^+$ ポンプを力源とする能動的水吸収の存在を裏付ける数10kPa程度の呼吸依存性の膨圧成分の存在が初めて直接的に証明された。

オーキシンによる生長促進の機作についても、膨圧測定と導管圧ジャンプ法の併用により解析を行った。オーキシンによって生長速度が数倍に増大する際、膨圧はほとんど変化しないこと、その代わりに細胞壁の臨界降伏圧が減少し、有効膨圧が増大することを明らかにした。意外なことに有効膨圧の増大の方が従来常識とされていた

細胞壁の展性増大よりも大きく生長促進に寄与していることを発見した。このようにしてオーキシンによる高等植物の生長調節においても、細胞壁展性の調節以外に細胞壁の臨界降伏圧の調節が極めて重要な役割を担うことが明かとなった。この細胞壁の臨界降伏圧の制御機構の解明は今後の生長生理学の重要課題のひとつとなることは確実であると思われる。

以上のように茎伸長の調節の仕組みを、水吸収の制御と壁降伏の調節という二つの面から実験的に検討した。その中で呼吸依存性の能動的な膨圧調節の重要性と、細胞壁の臨界降伏圧調節の重要性がともに明白になった。

Very faint, illegible text on the left page, possibly bleed-through from the reverse side.

図、表



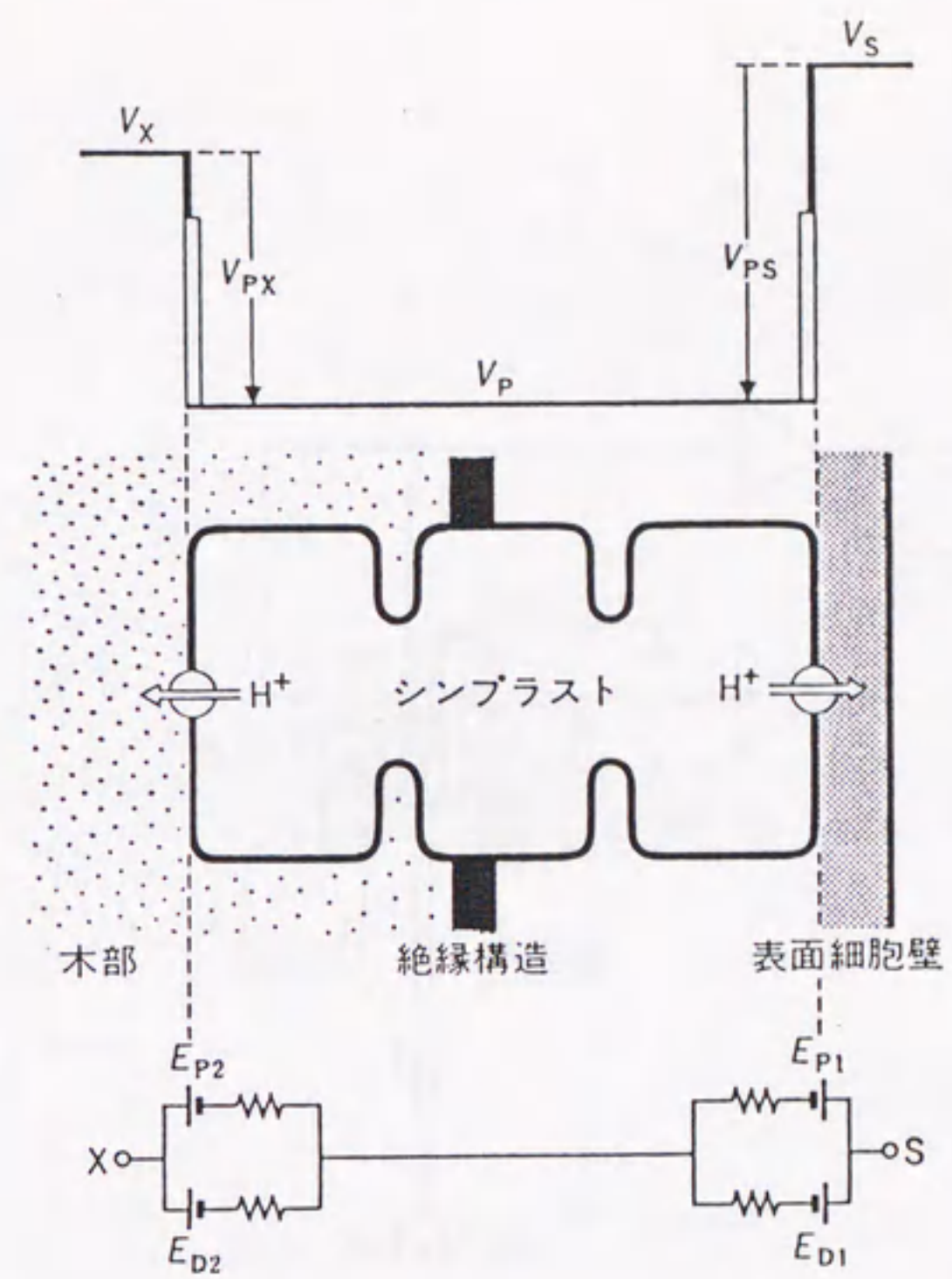


図 1. ミトリササゲ下胚軸の電気生理学的構造模型

$E_{P1}, E_{P2}$ : 呼吸依存性膜起電力、 $E_{D1}, E_{D2}$ : 拡散による膜起電力、 $V_{PS}, V_{PX}$  のうち黒く塗った部分は受動的拡散成分を、白抜き部分は呼吸依存性成分を表す。

(加藤・岡本 1985 原図)

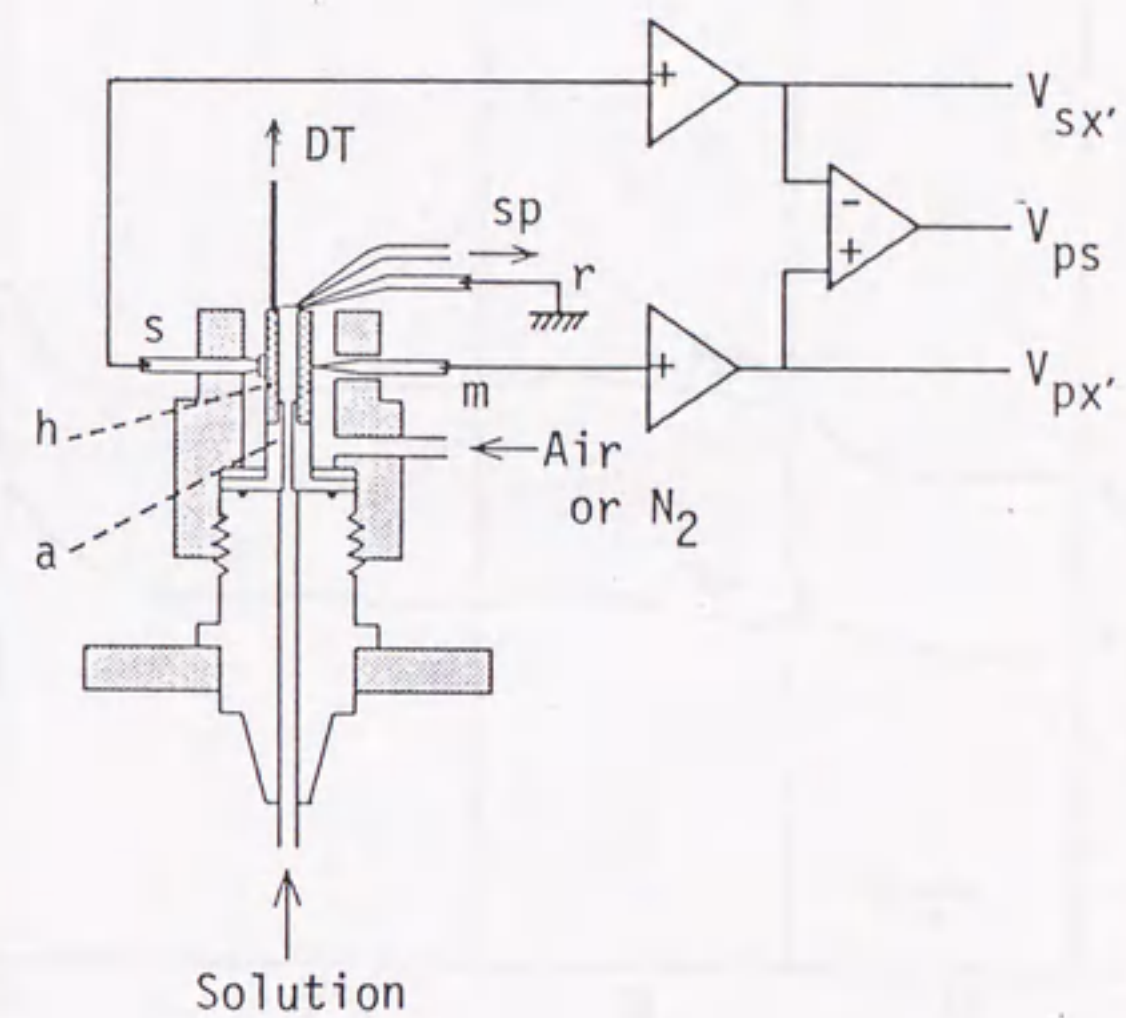


図 2. くり抜き灌流装置 (部分)

h; くり抜き切片、a; 導管灌流容器へのアダプター、s; 表面電極、m; 細胞内微小ガラス電極、r; 基準電極、DT; 高入力抵抗前置増幅器、↑DT; 差動トランスへ、 $V_{sx'}$ ; くり抜いた穴を灌流する溶液を基準とした表面電位、 $V_{ps}$ ; 表面側細胞膜電位、 $V_{px'}$ ; 内側膜電位。

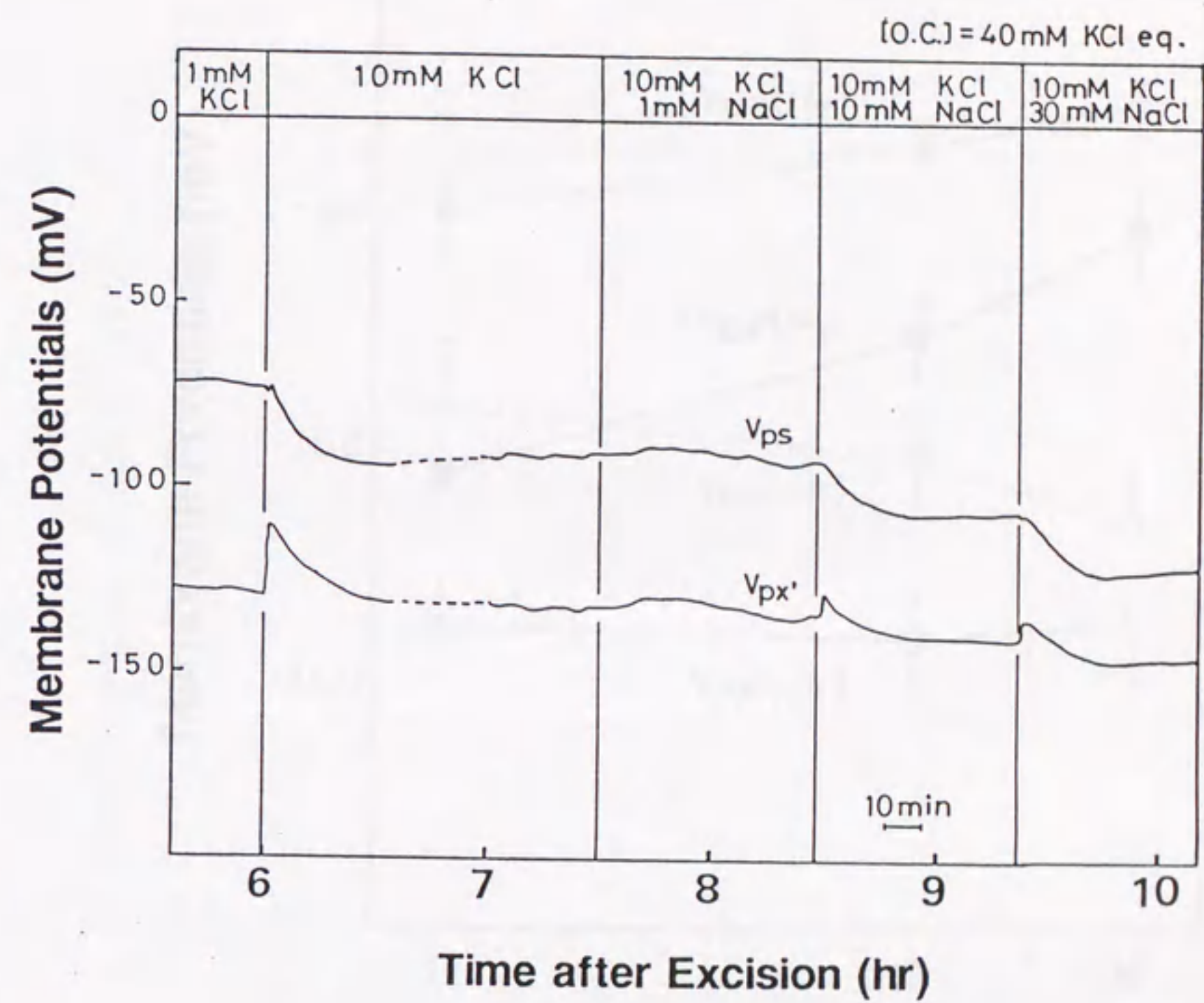


図3. KCl濃度変化、NaCl濃度変化に対する表皮側膜電位 ( $V_{ps}$ )、穴側膜電位 ( $V_{px'}$ )の経時的反応

灌流液は 1, 10mM KCl, 1-30mM NaCl, 0.1mM  $CaCl_2$  を含む。

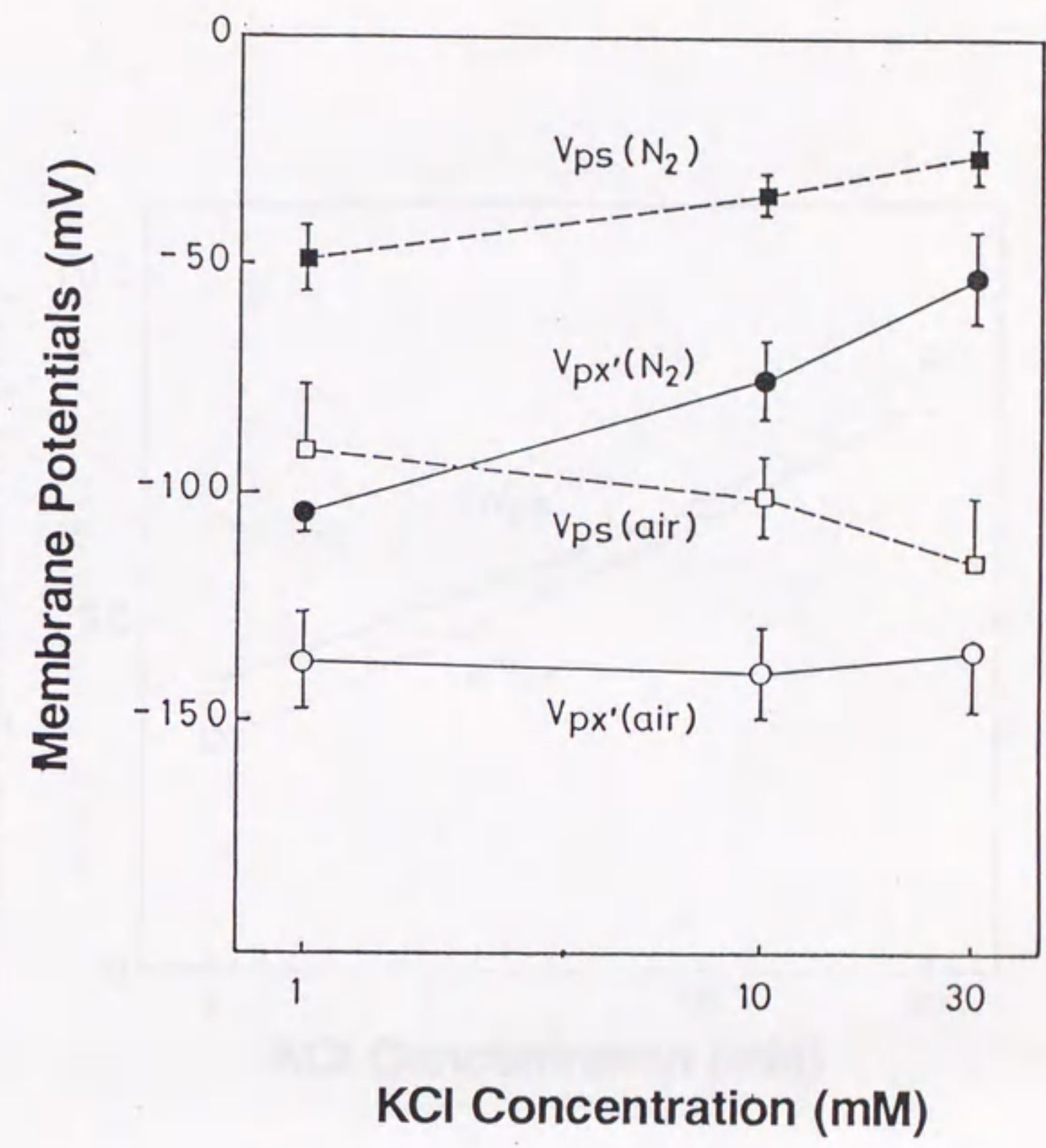
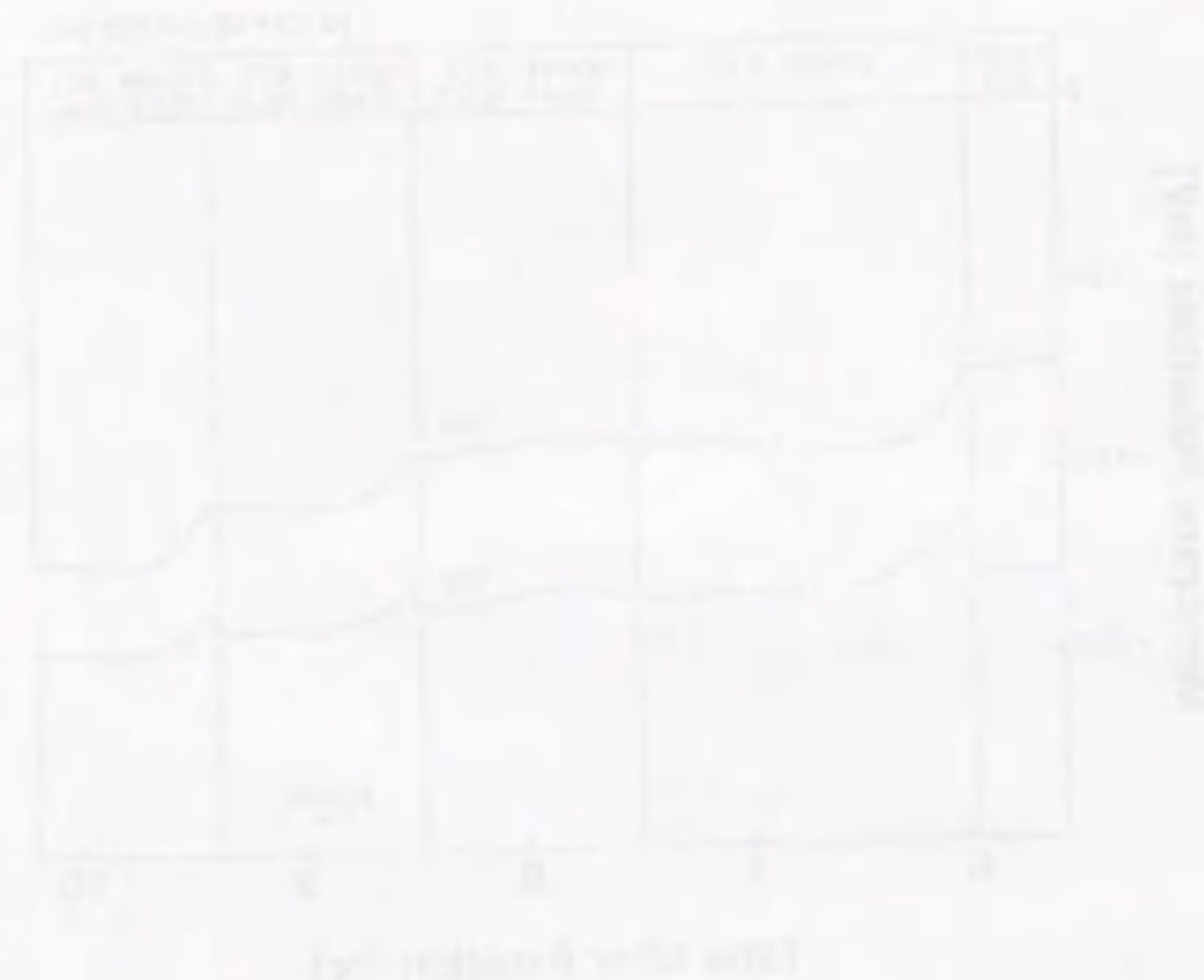


図4.  $V_{ps}$ 、 $V_{px}'$  の KCl 濃度依存性

くり抜きの径 = 2.1mm、灌流液の組成は 表1 参照  
 (air): 空気中での膜電位、(N<sub>2</sub>): 窒素気中での膜電位.  
 データ数:  $6 \leq n \leq 19$ , mean  $\pm$  S.D.

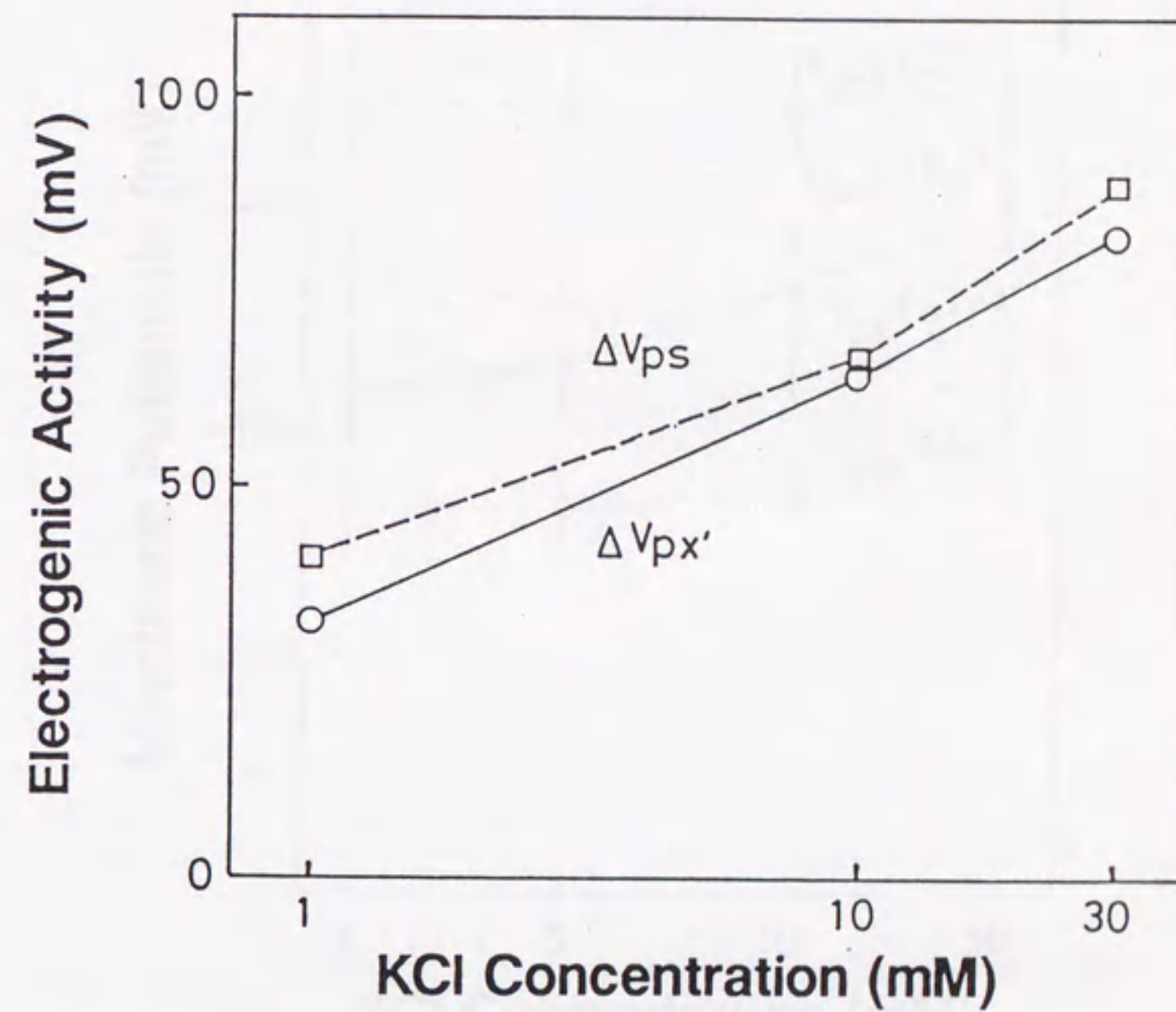
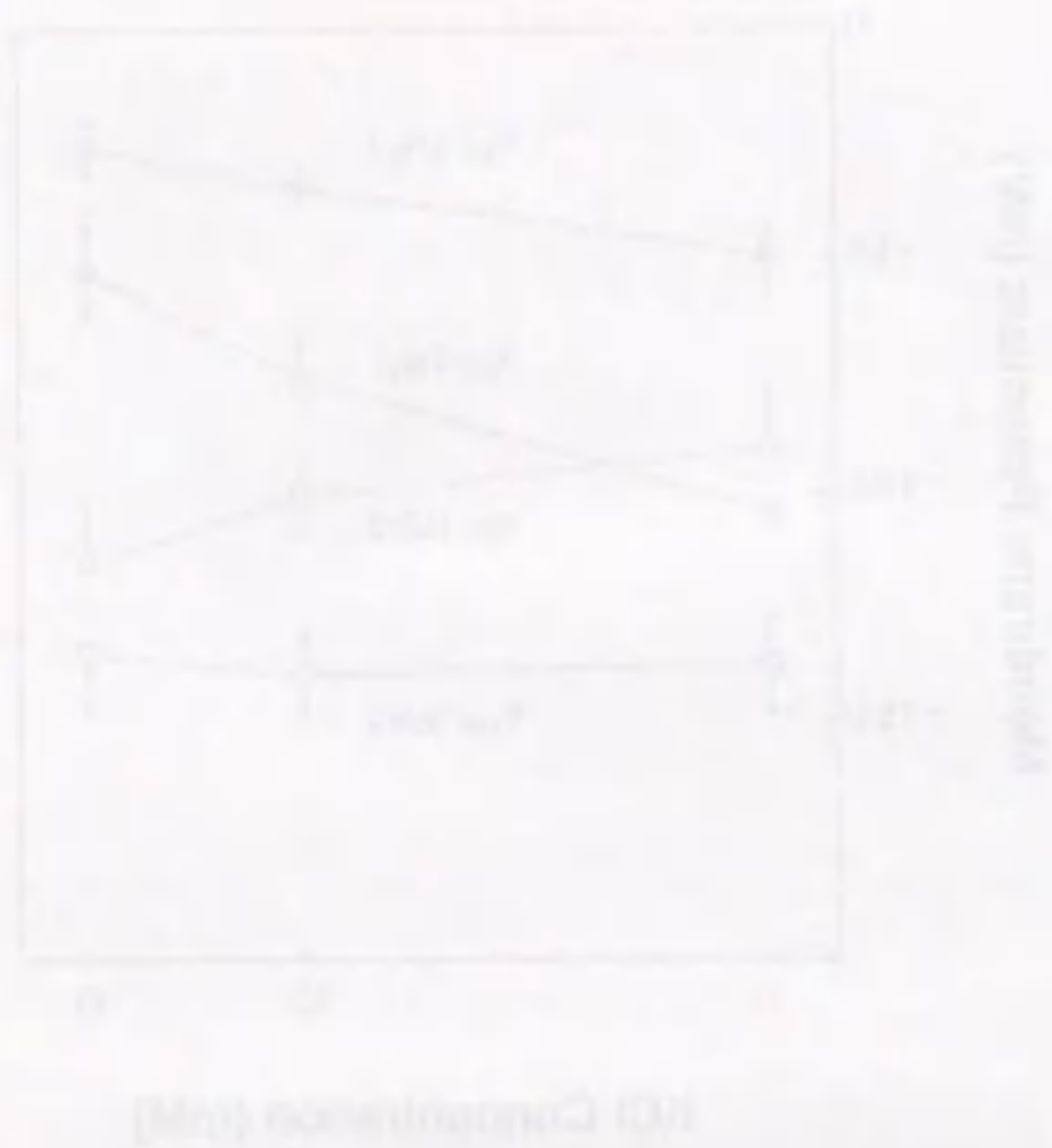


図5. 膜電位の呼吸依存性成分のKCl濃度依存性

図4から呼吸依存性成分だけを抜粋.

$$\Delta V_{ps} = V_{ps}(N_2) - V_{ps}(\text{air})$$

$$\Delta V_{px'} = V_{px'}(N_2) - V_{px'}(\text{air})$$



(KCl Concentration (mM))

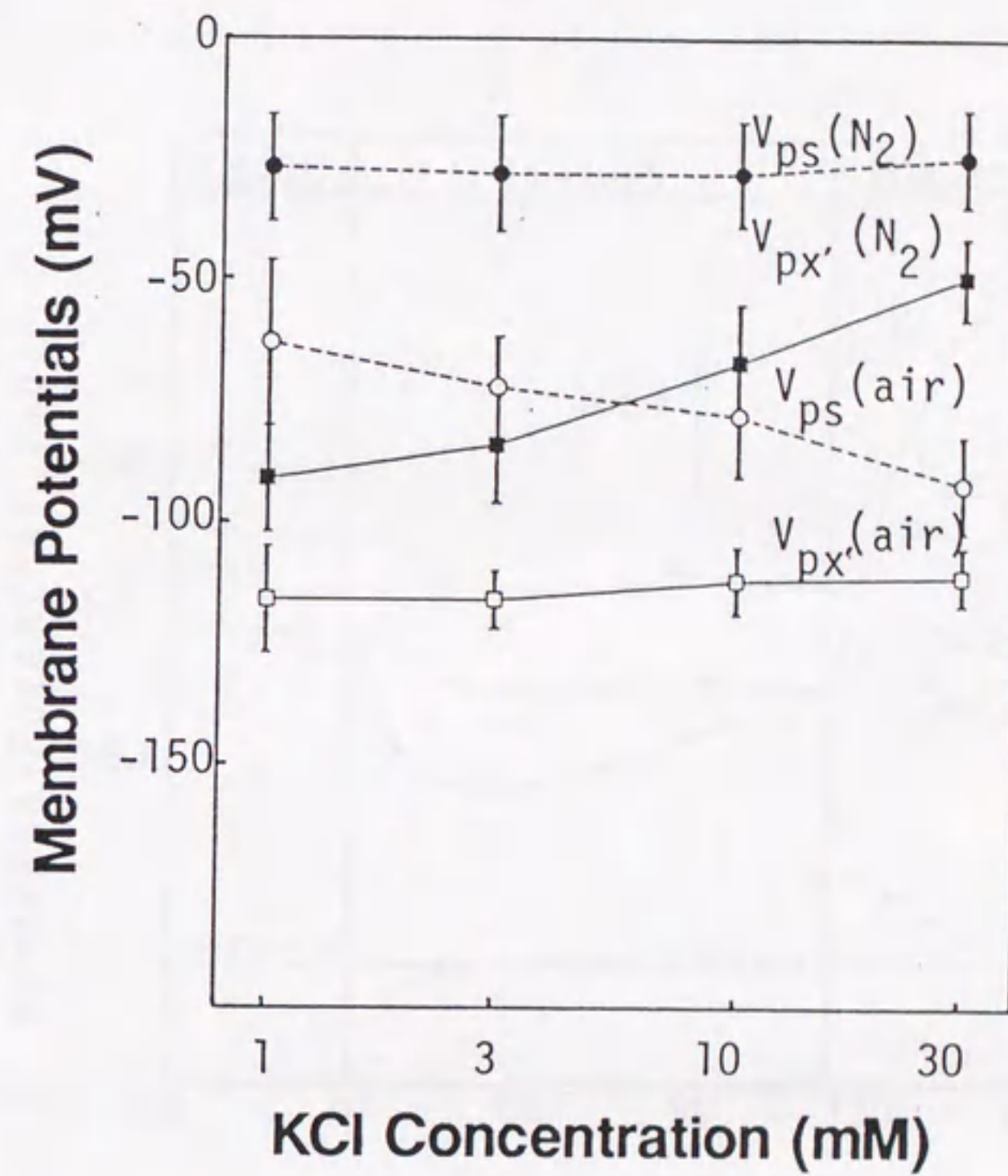


図6.  $V_{ps}$ 、 $V_{px'}$  の KCl 濃度依存性

くり抜きの径 = 1.5mm、灌流液の組成は表1参照。  
 (air): 空気中での膜電位、(N<sub>2</sub>): 窒素気中での膜電位。  
 データ数:  $5 \leq n \leq 8$ , mean  $\pm$  S.D.

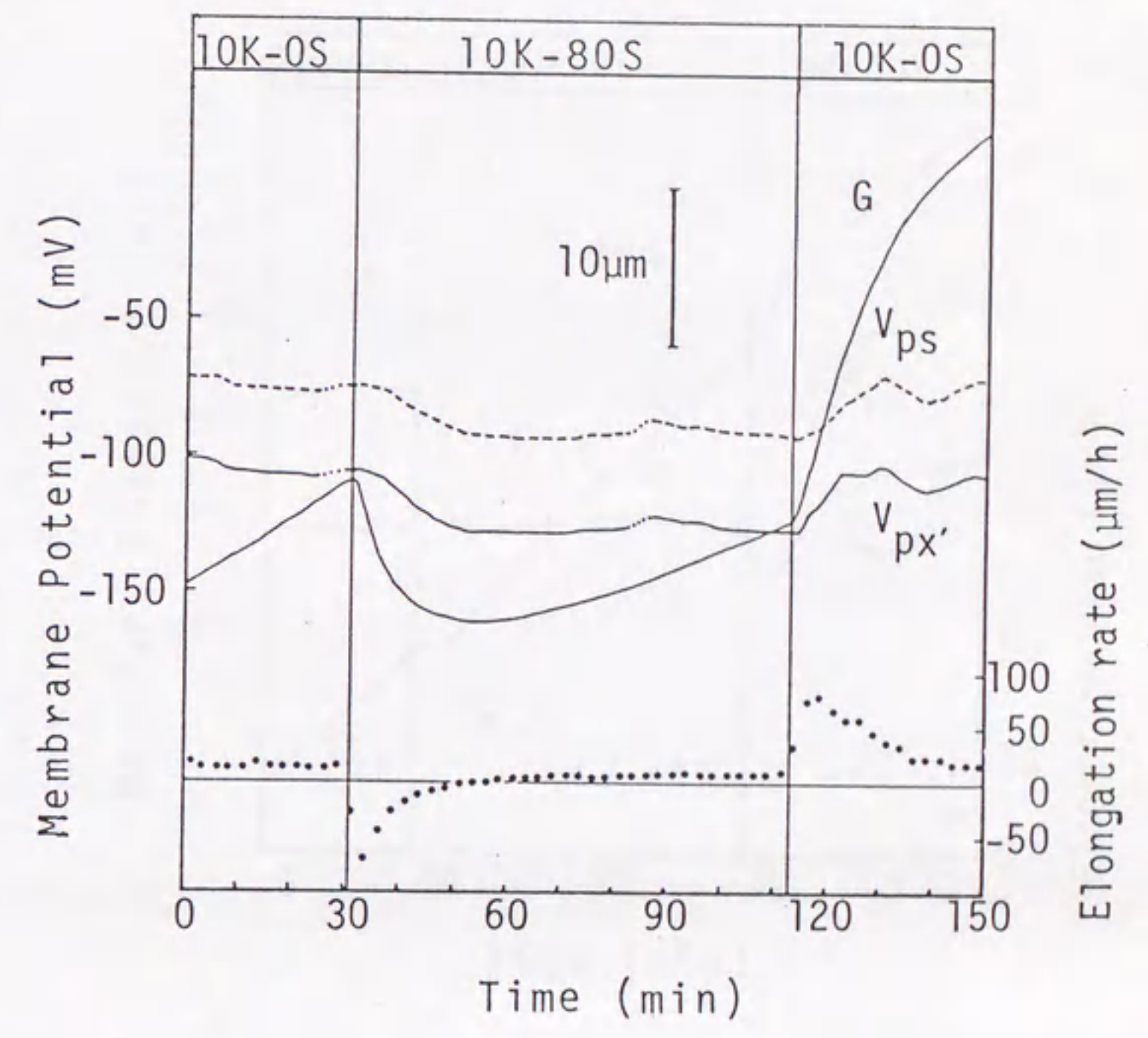


図7. 浸透ストレスに対する両膜電位、伸長生長の経時的反応の同時測定例

80mM Sorbitol 添加により浸透ストレスを加えたもの。  
 くり抜きの径 = 1.5mm、灌流液組成は表1参照。  
 G: 伸長生長、...: 伸長生長速度 (μm/h)。

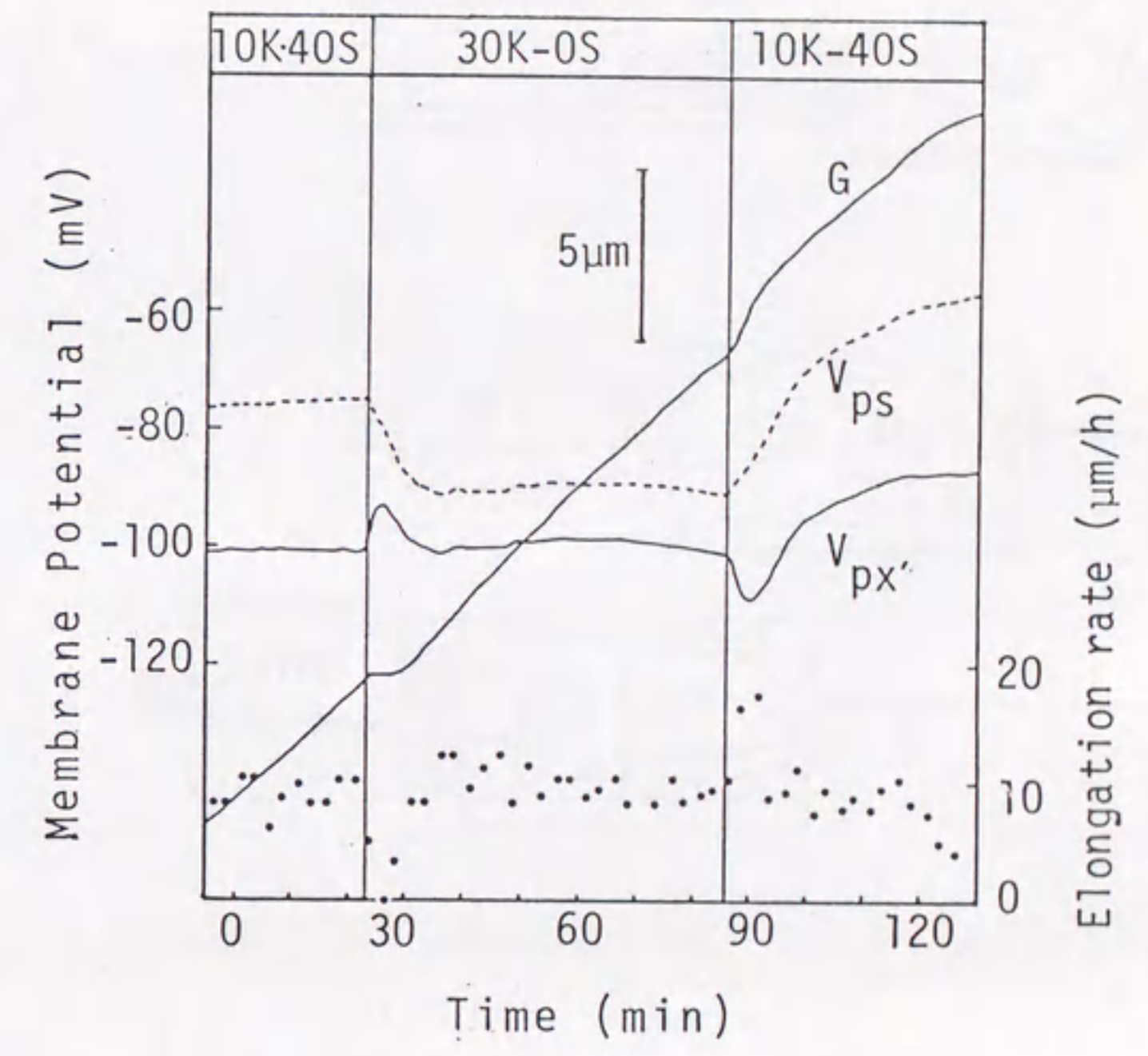


図8. イオンストレスに対する両膜電位、伸長生長の経時的反応の同時測定例

計算量の Sorbitol 添加により浸透濃度を揃えてある (灌流液組成は表1参照) くり抜きの径 = 1.5mm.  
 G: 伸長生長、...: 伸長生長速度 (μm/h).



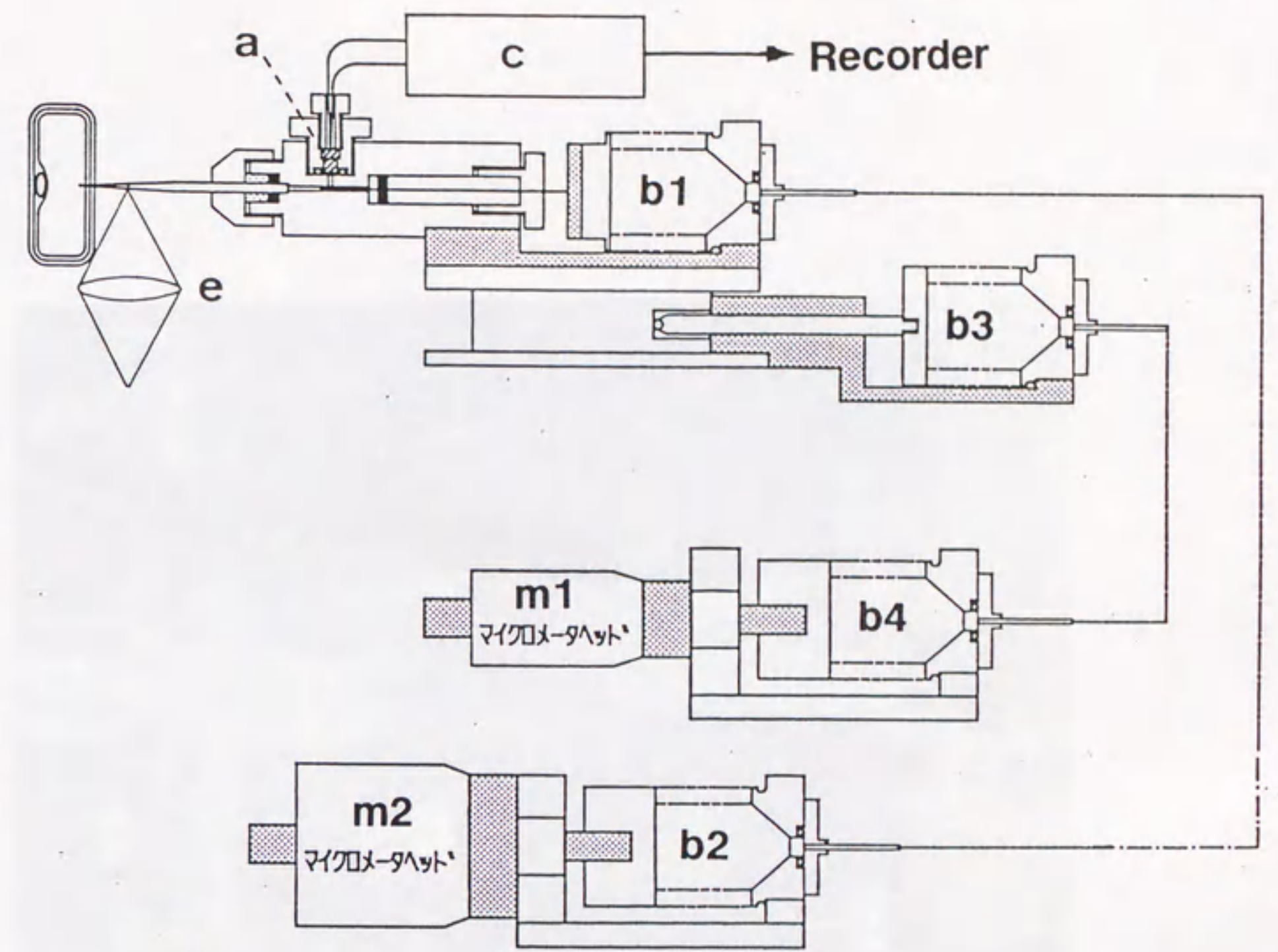


図9. 連続測定用細胞内圧プローブの模式図

a: 圧カトランスデューサー, b1 - b4: 磷青銅製の蛇腹, c: ブリッジ回路, e: 水平顕微鏡.



図 9. 細胞内圧プローブと測定用容器の中心部 (写真)

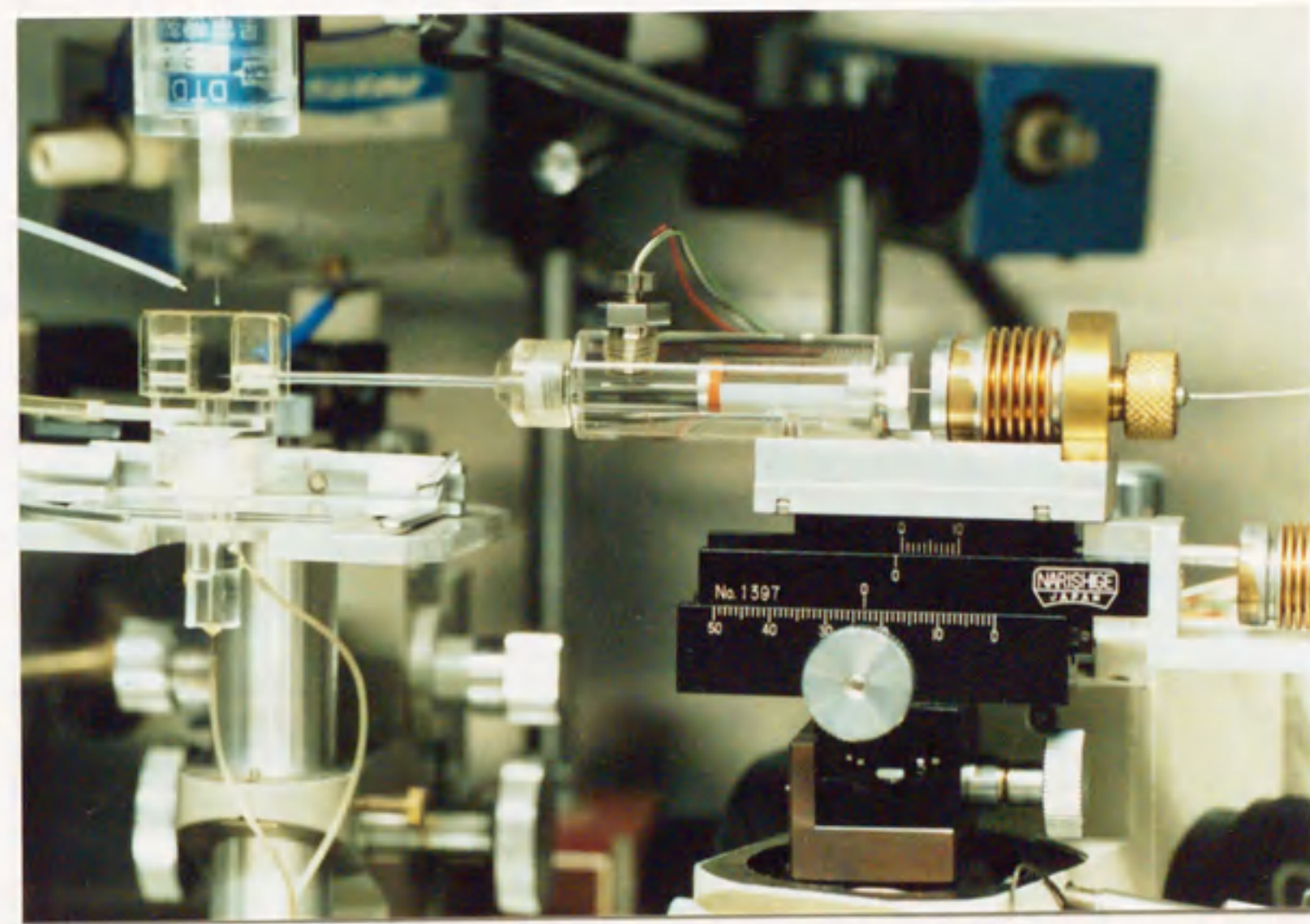


図 10. 細胞内圧プローブと測定用容器の中心部 (写真)

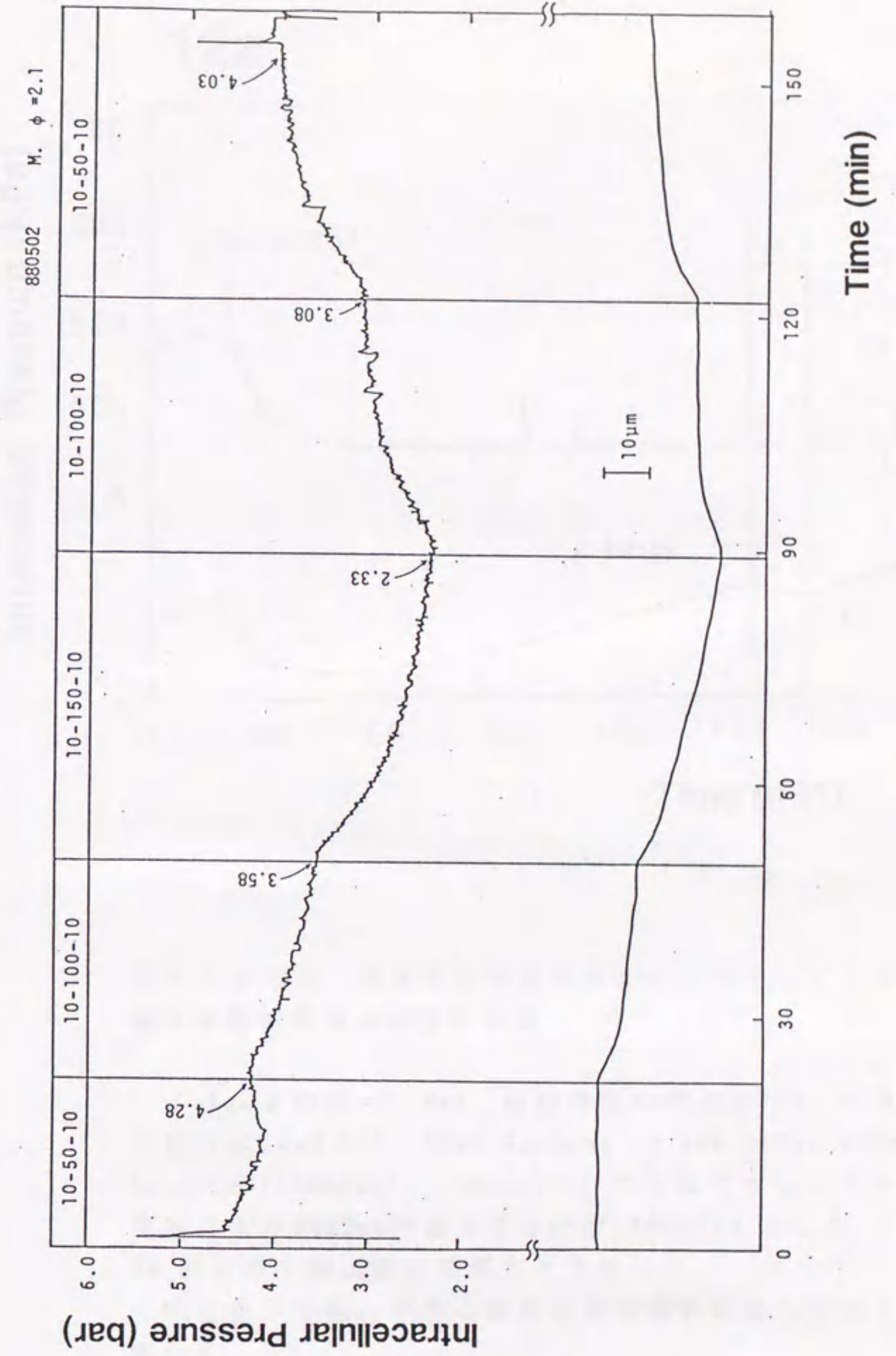


図 1 1. 灌流液の浸透濃度変化に対する既伸長域くり抜き軸片細胞の膨圧の反応

灌流液の組成は10mM KCl, 50-150mM Mannitol, 10mM Sucrose, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>. 細胞内圧(膨圧)の単位はbar. くり抜きの径 = 1.5mm



### 12a

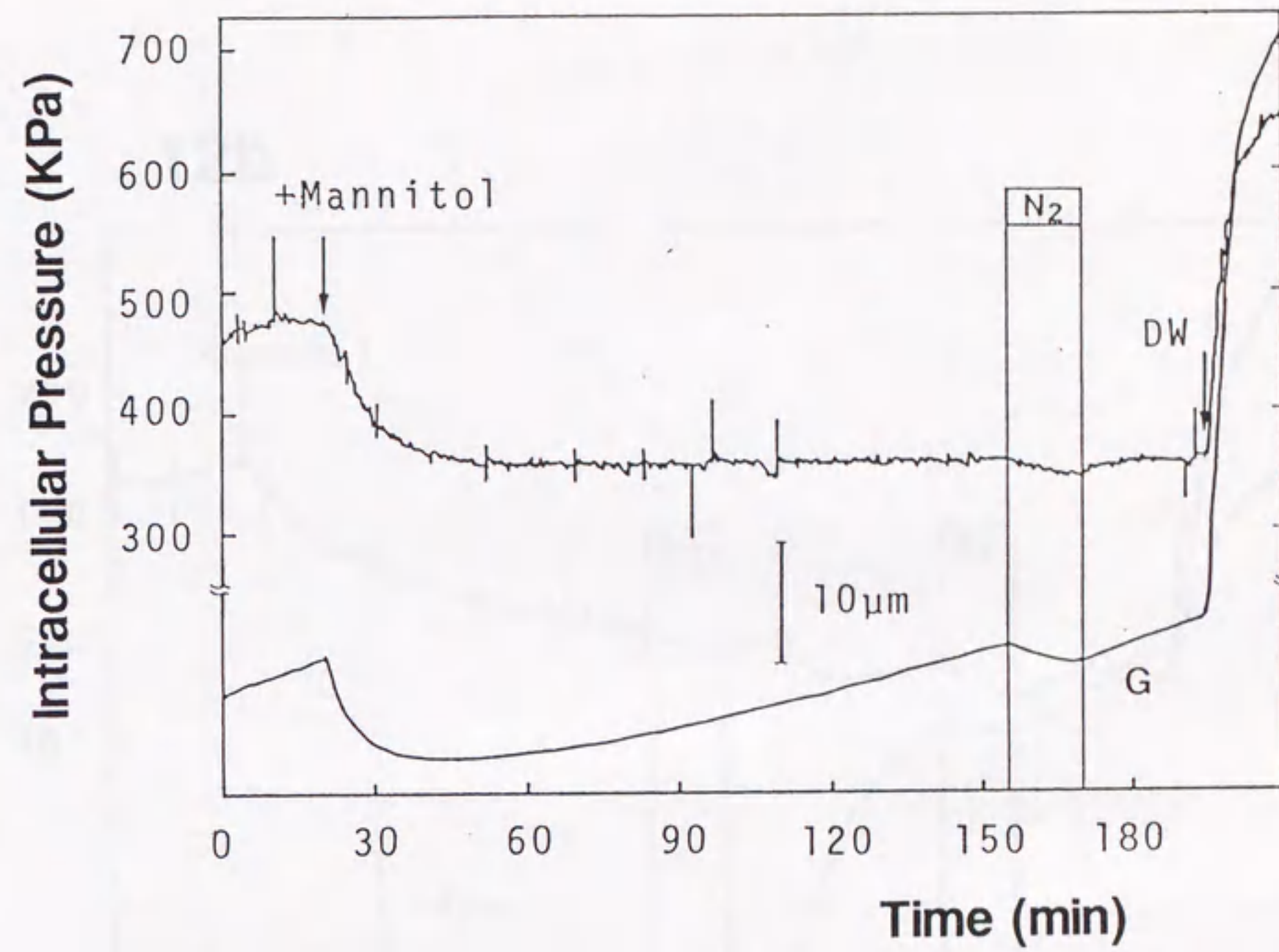
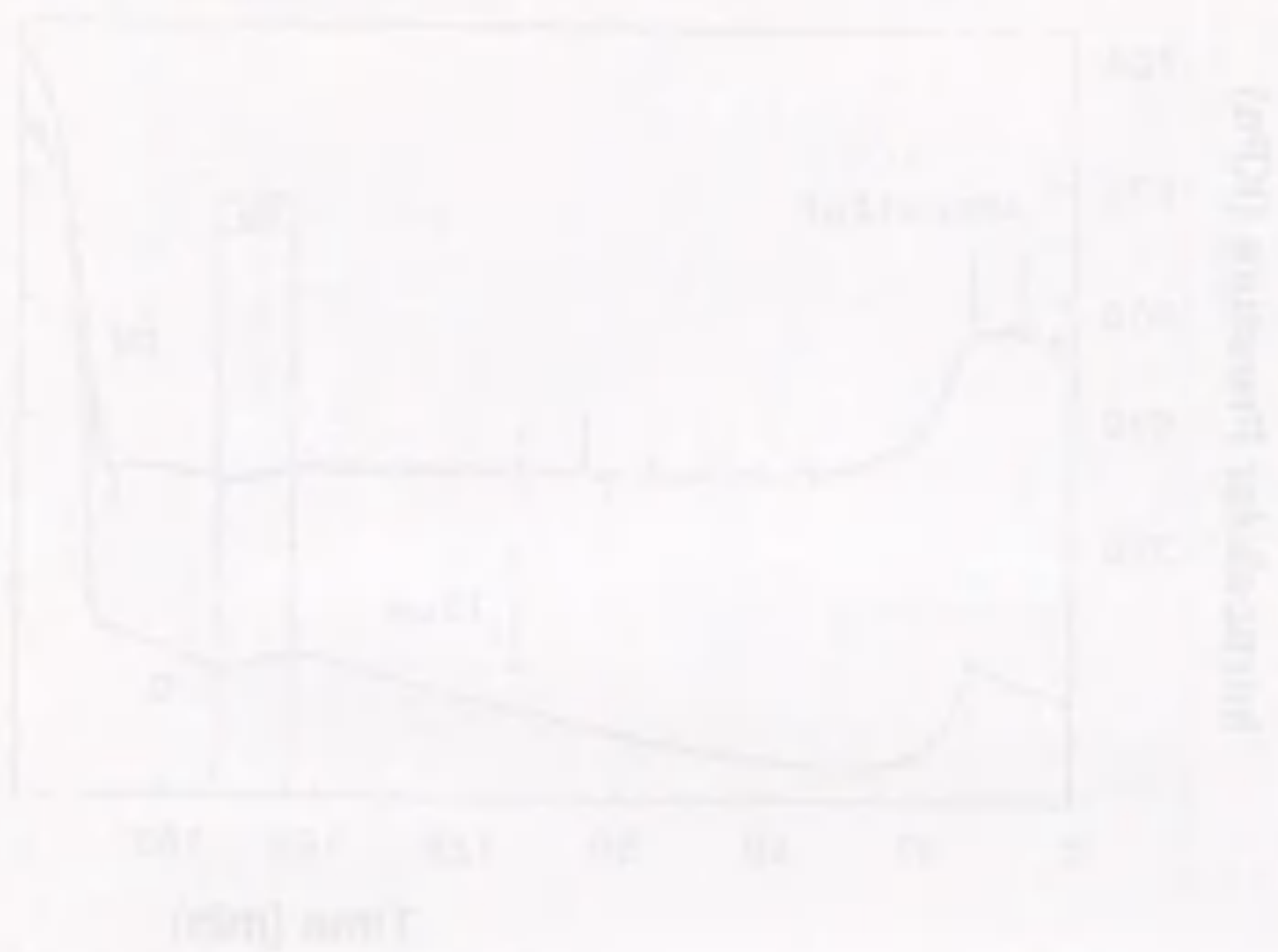


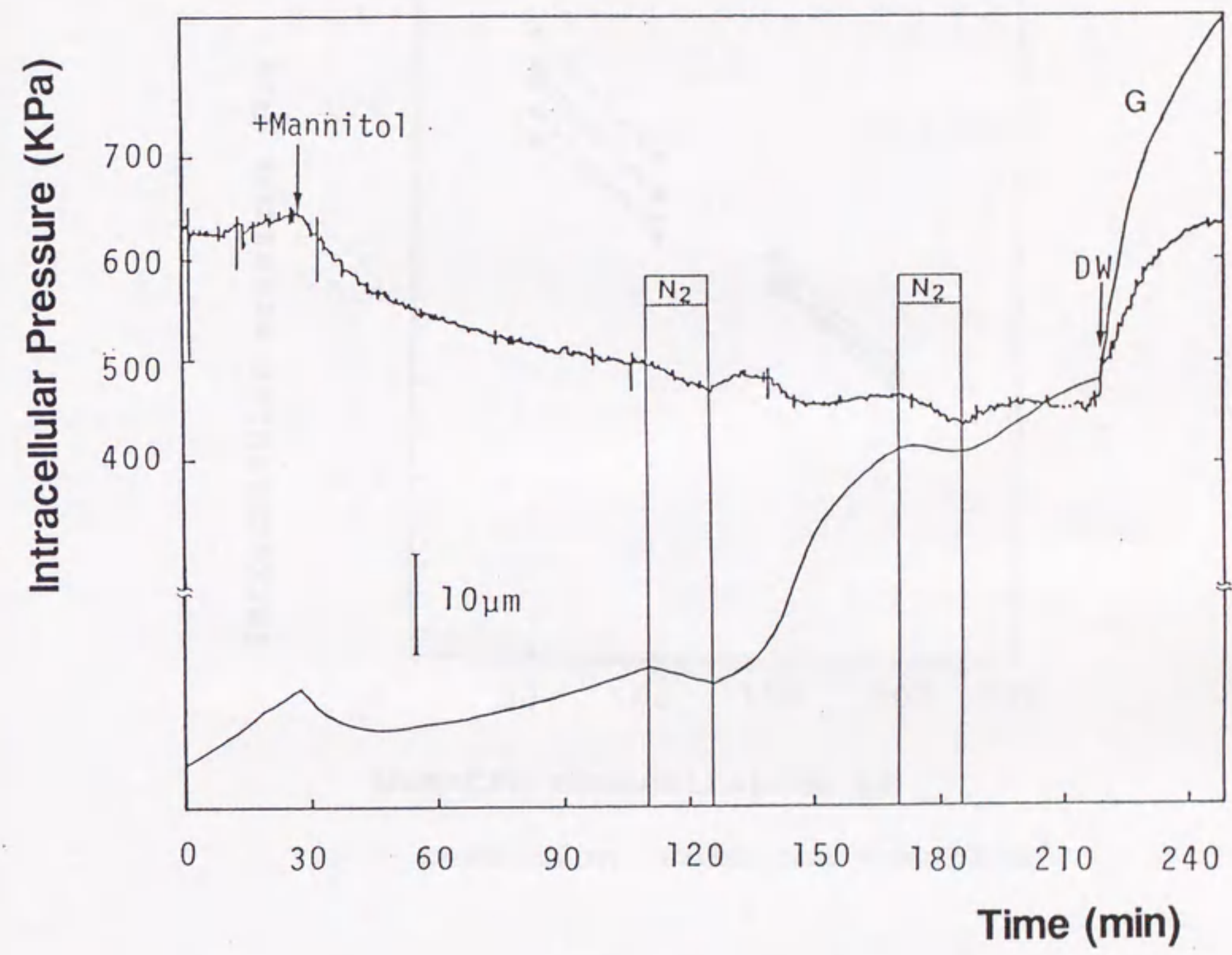
図 12 a, b. 灌流液の浸透濃度変化に対するくり抜き軸片伸長域細胞の膨圧の反応

くり抜きの径 = 1.5mm. 細胞内圧の単位はKPa. 灌流液の組成は10mM KCl, 30mM Sucrose, 0.1mM CaCl<sub>2</sub> 100mM Mannitol(150mOsm). +Mannitolの矢印でマンニトール添加により50mOsm浸透濃度を上げ200mOsmとした. DWの矢印で灌流液を蒸留水と交換した.

N<sub>2</sub>と書いて囲んである部分は窒素通気により呼吸を阻害した



12b



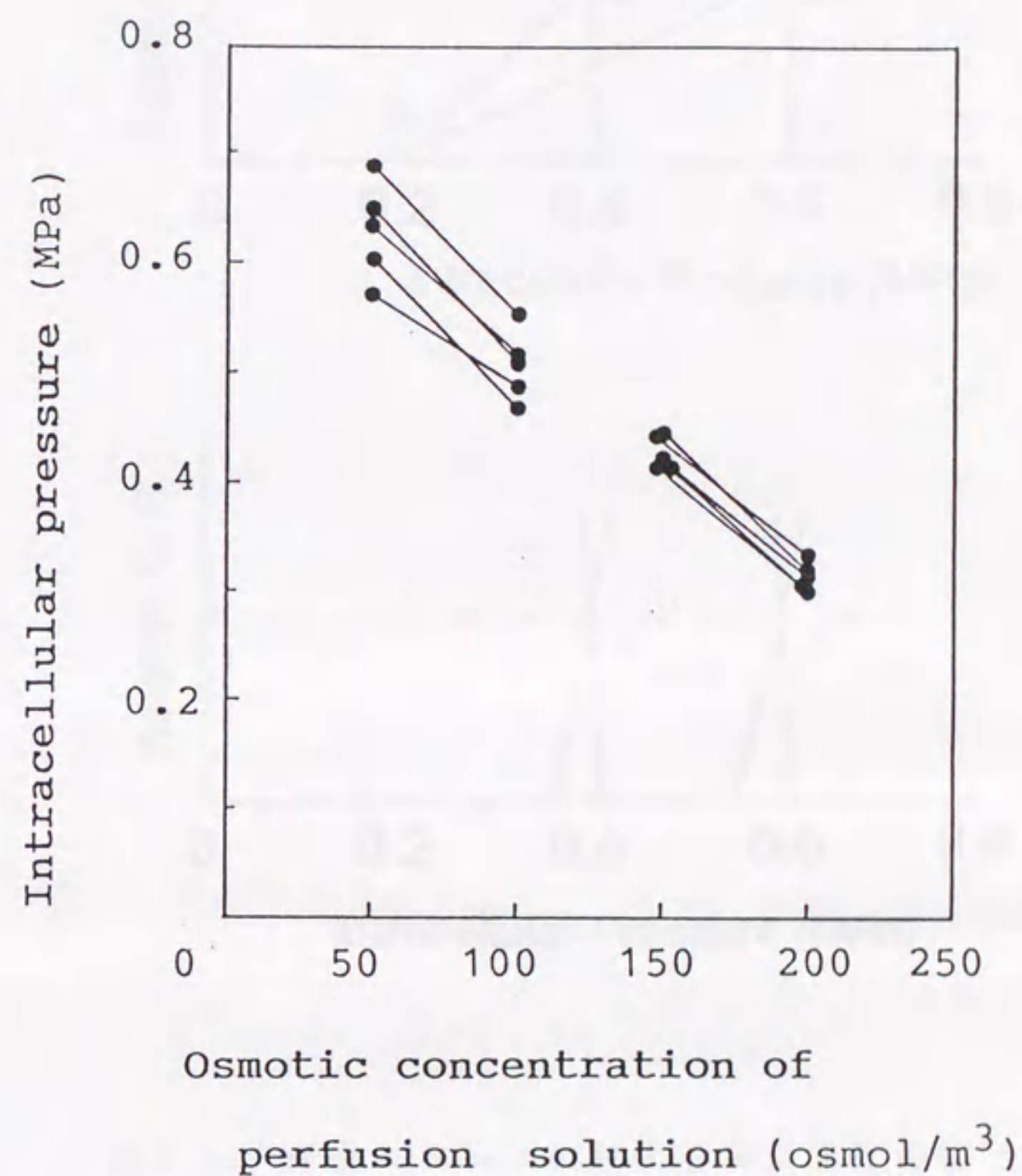
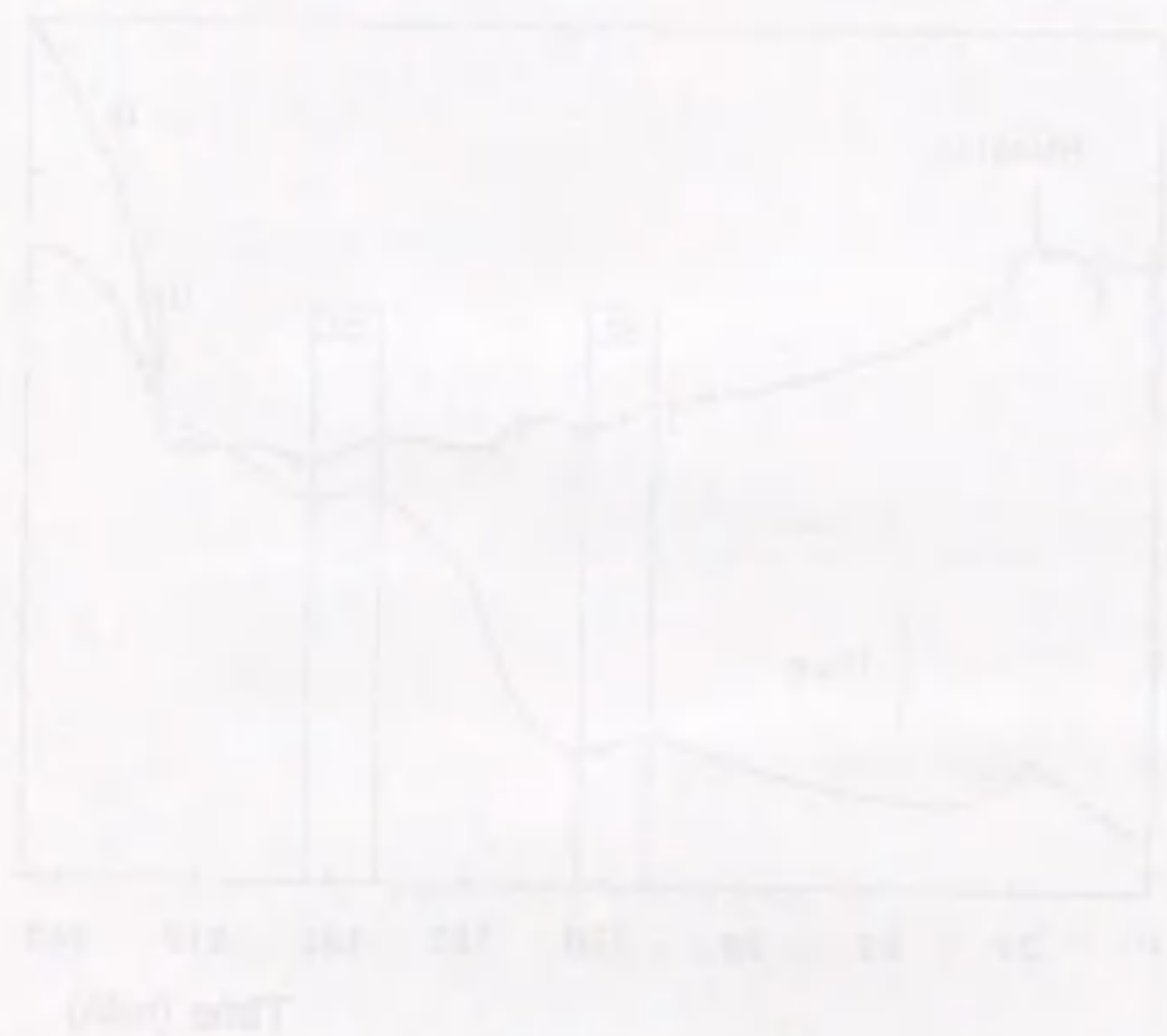


図 13. 細胞内圧の灌流液浸透濃度依存性

線で結んである点は同一材料で、浸透濃度を上げる前の値と、浸透濃度上昇後伸長が回復し定常になった時の値。灌流液組成は 10mM KCl, 30mM Sucrose, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 0-150mM Mannitol.

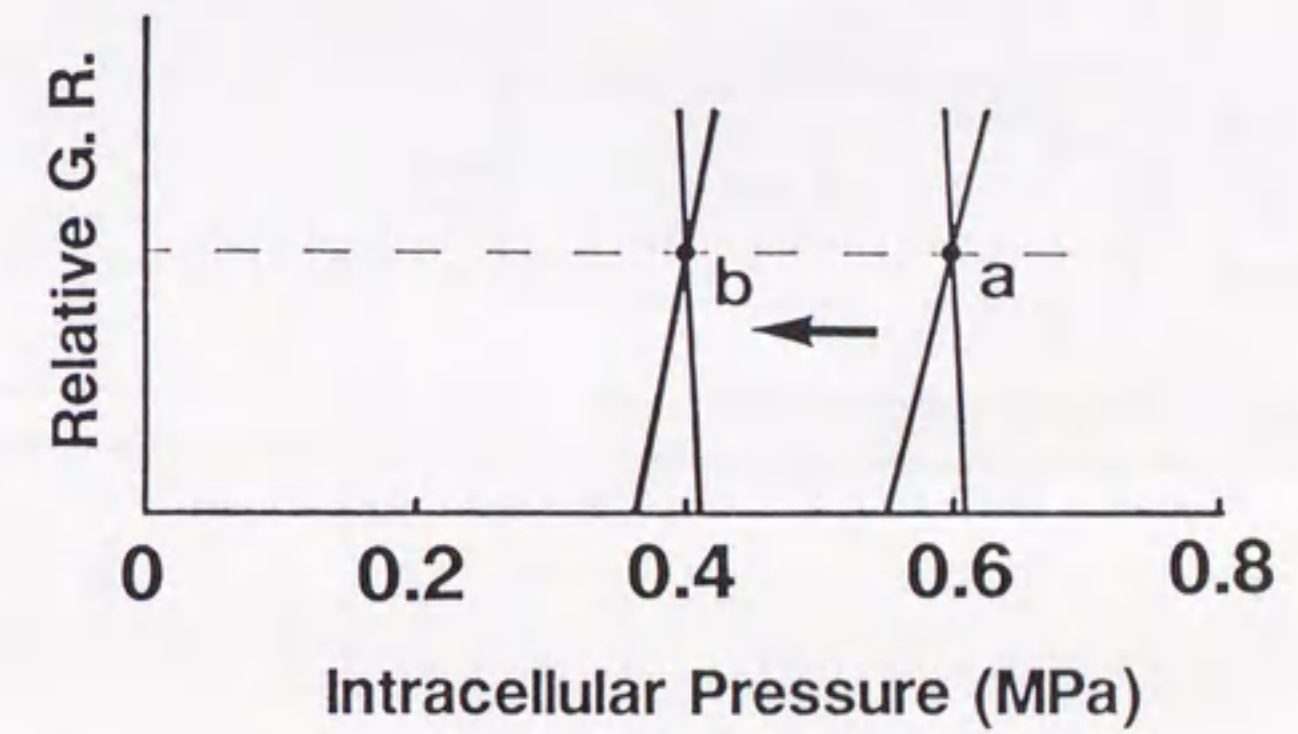
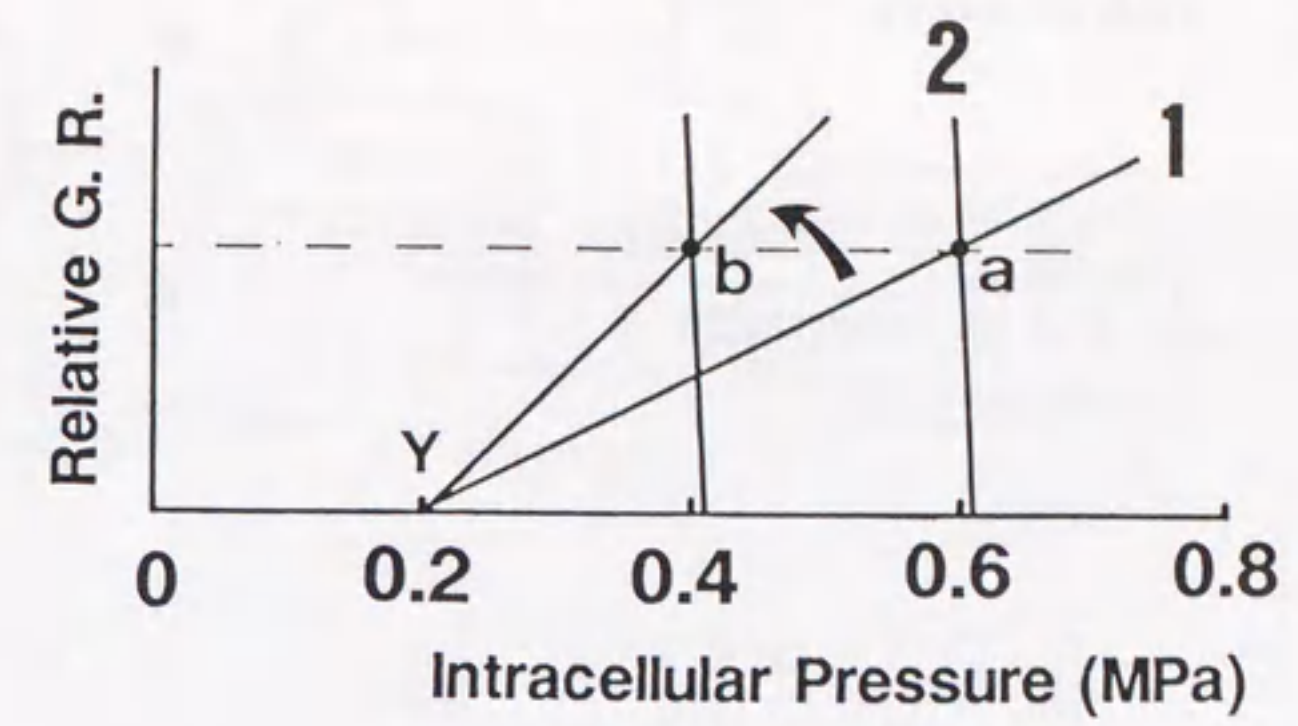


図 1 4. 浸透ストレスに対する伸長回復機構  
( $P^i - v$  平面上へのプロット)

線分 1、2 はそれぞれ細胞壁の降伏、水吸収を表す生長方程式に対応する。a、b は浸透ストレスを加える前と、浸透ストレス後、伸長の回復が起きた状態を表す。マンニトールを浸透圧を変えるための溶質として用いた灌流実験により細胞壁の臨界降伏圧は 0.2 MPa 付近にあることがわかっている。電位測定と膨圧測定の結果だけでは上図に示した可能性もある。しかし、導管圧ジャンプ法により得られた結果は、有効膨圧 ( $P^i - Y$ ) の値は数 10 KPa であることを示している。したがって下図に示されたように伸長生長の回復が起きているものと結論される。



図14. 細胞内圧プロブの特性曲線

細胞内圧プロブの特性曲線は、図14に示す通りである。このグラフは、細胞内圧プロブの出力電圧と細胞内圧との関係を示している。図14の上のグラフは、細胞内圧が0.0から1.0まで変化するとき、出力電圧も0から1.0までほぼ直線的に変化する様子を示している。これは、細胞内圧プロブが細胞内圧を正確に測定できることを示している。一方、図14の下のグラフは、細胞内圧が0.0から1.0まで変化するとき、出力電圧が0から1.0まで変化しない様子を示している。これは、細胞内圧プロブが細胞内圧を正確に測定できないことを示している。

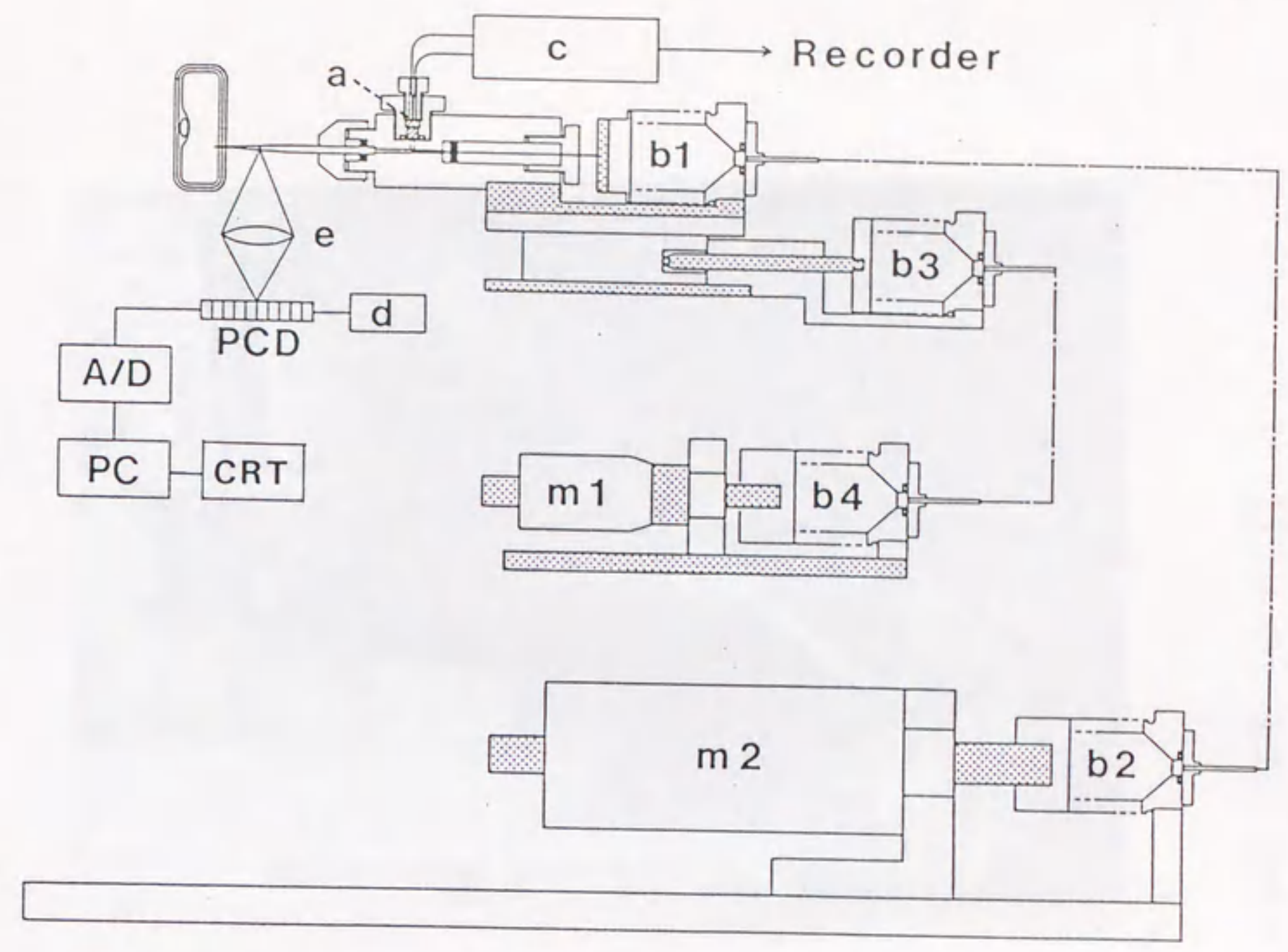


図15. メニスカスセンサーを備えた細胞内圧プロブの模式図

a: 圧力トランスデューサー, b1 - b4: 磷青銅製の蛇腹, c: ブリッジ回路, d: 電源回路, e: 顕微鏡撮影装置, m1, m2: マイクロメーターヘッド, A/D: A/D変換器, CRT: CRTモニター, PC: パーソナルコンピューター, PCD: Plasma-coupled device リニアイメージセンサー。





システム全体の構成図を示す。この図は、システムの主要な構成要素とその相互接続を示している。図には、中央処理装置、記憶装置、入力装置、出力装置、および制御装置などが描かれている。各要素は機能別に分類され、それらがどのように連携して動作するかを示している。

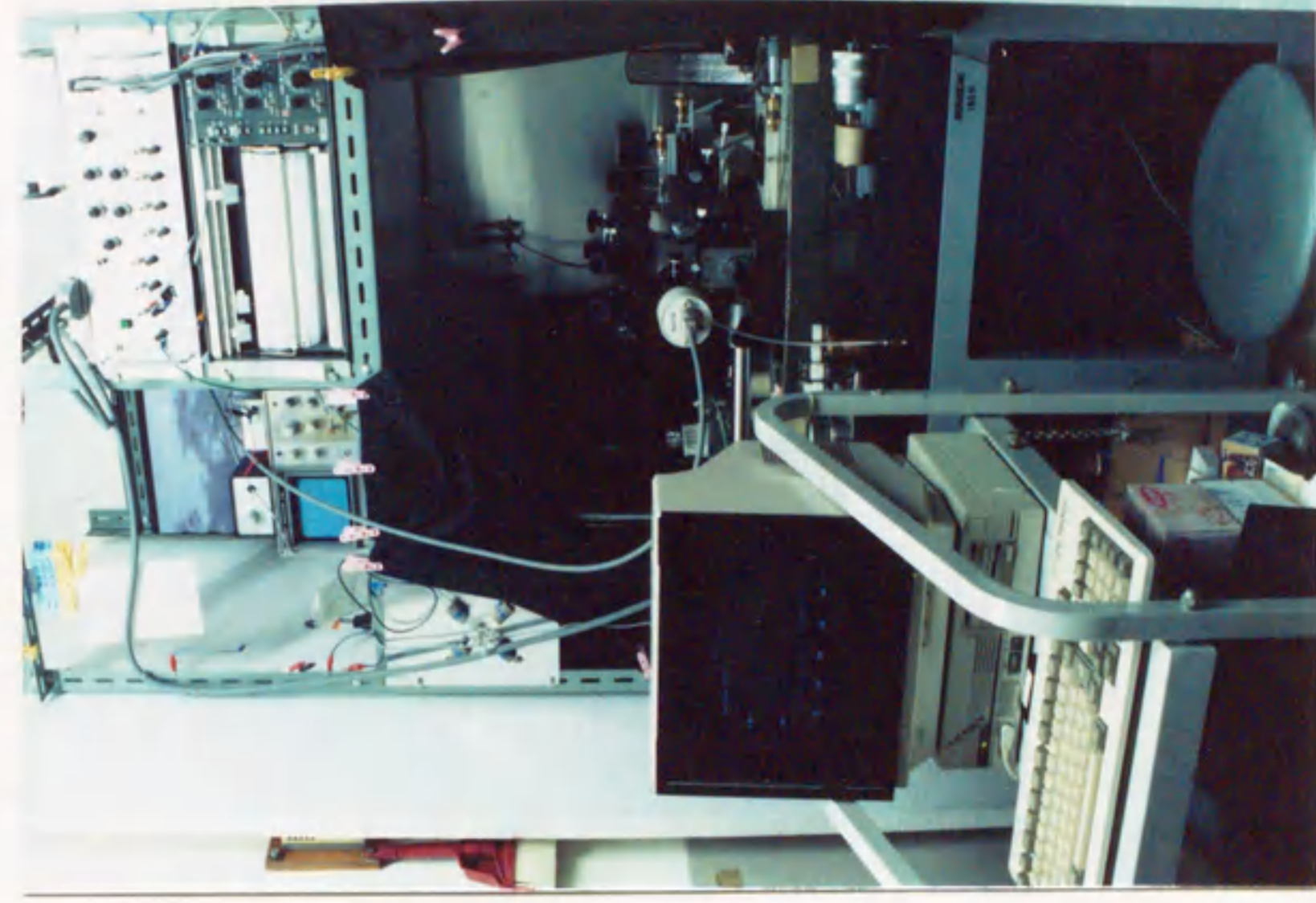
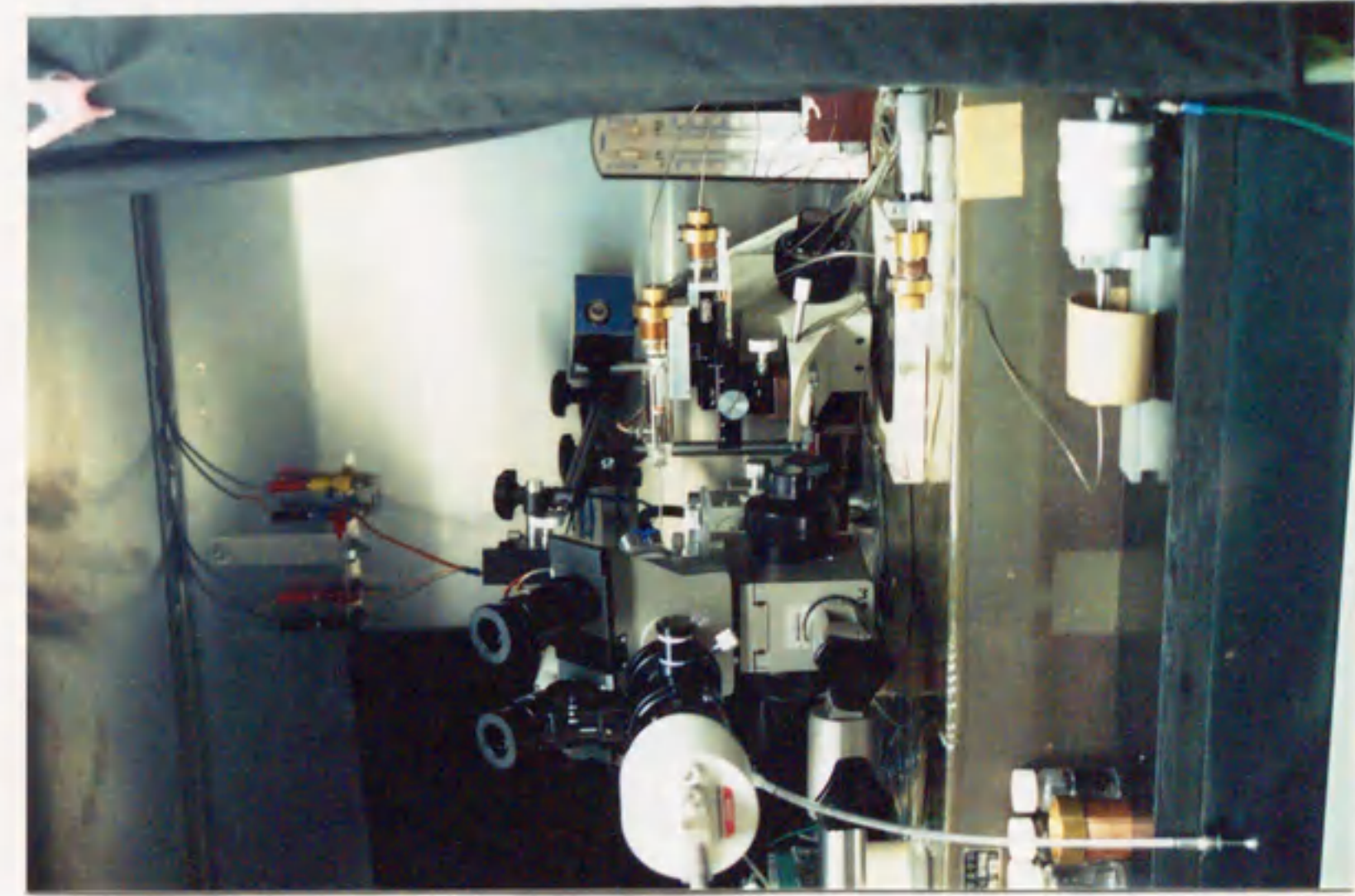
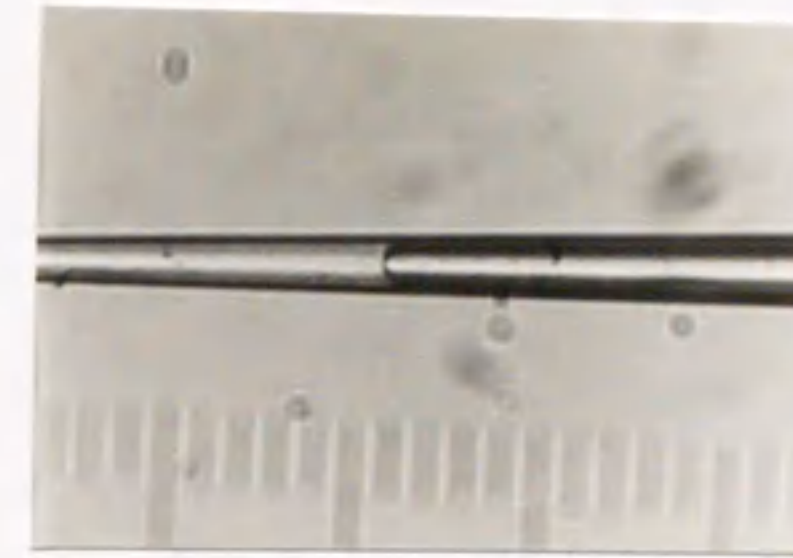


図16a, b. システム全体図(写真)



100 $\mu$ m

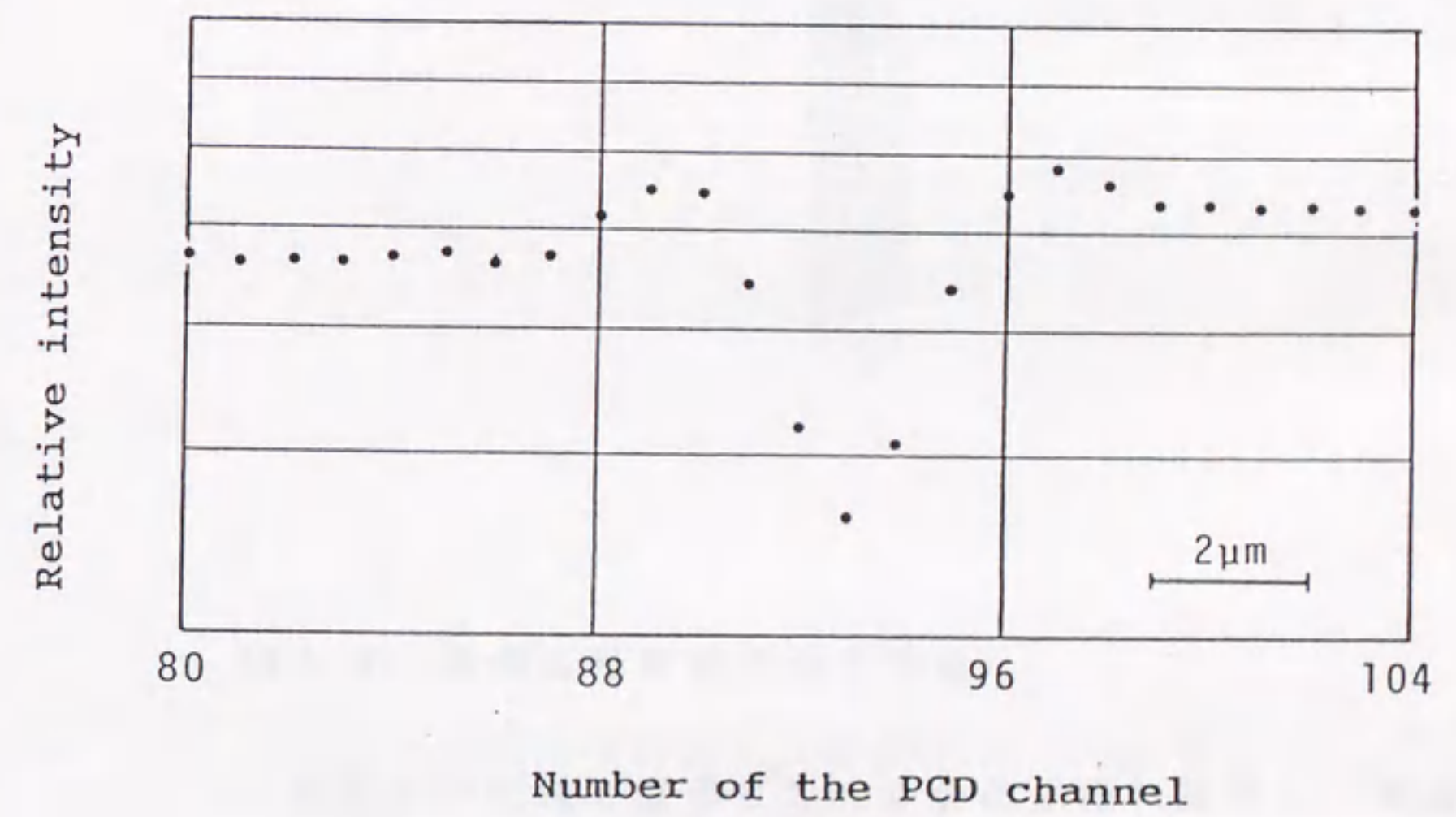


図 17. ガラス細管内のメニスカス像（写真）と出力例

縦軸は相対的光電流出力の対数表示、横軸はセンサーのチャンネル番号、それぞれの点は各チャンネルからの出力を表す。図中の2 $\mu$ mはガラス細管上での相当する長さ。

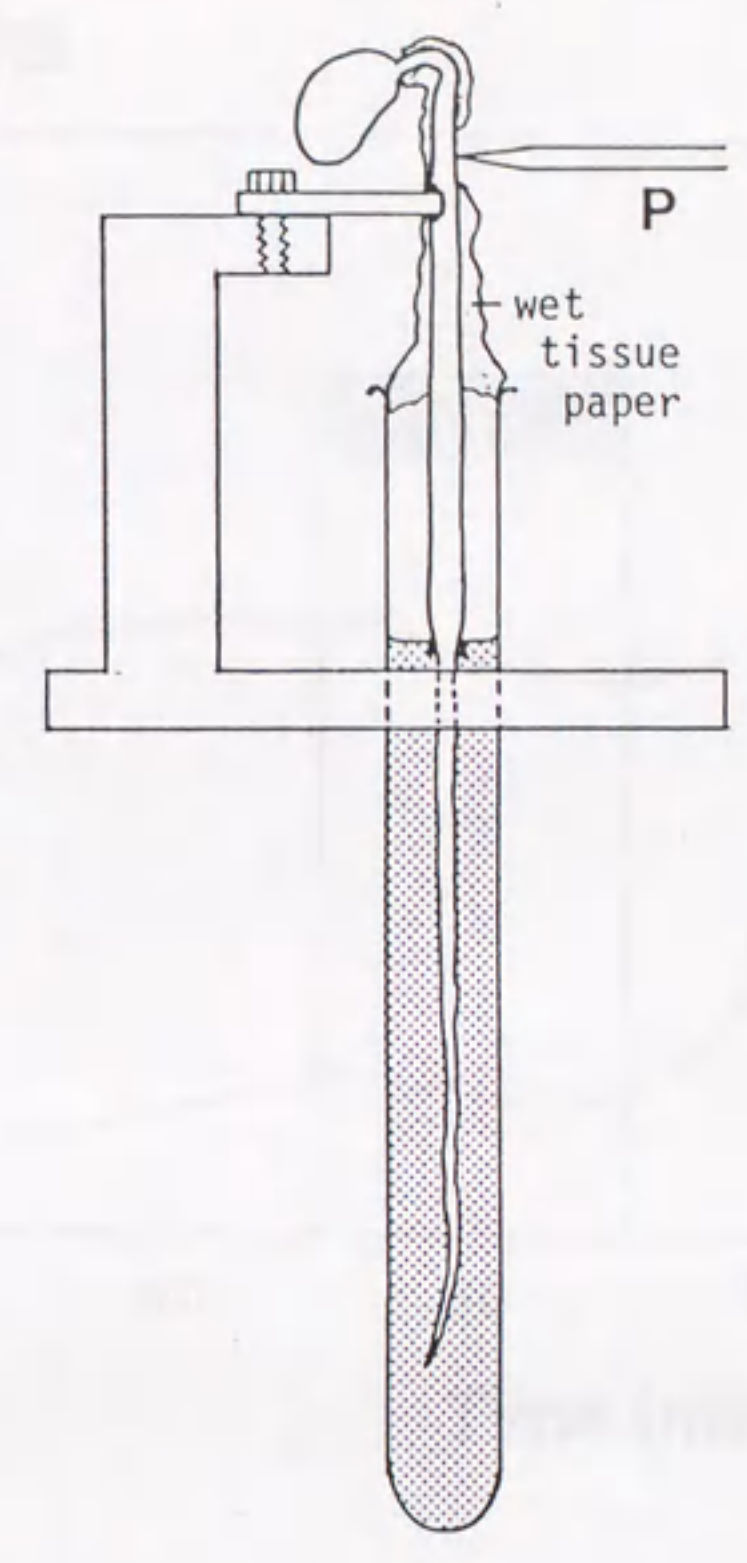


図 18. 無傷胚軸用膨圧測定容器

幼茎は伸長域で塩化ビニール製の小板に接着し、接着面と反対側から細胞内圧プローブを刺入する。蒸散を抑えるために湿ったティッシュペーパーで胚軸を覆っている。 P:細胞内圧プローブのガラス細管。

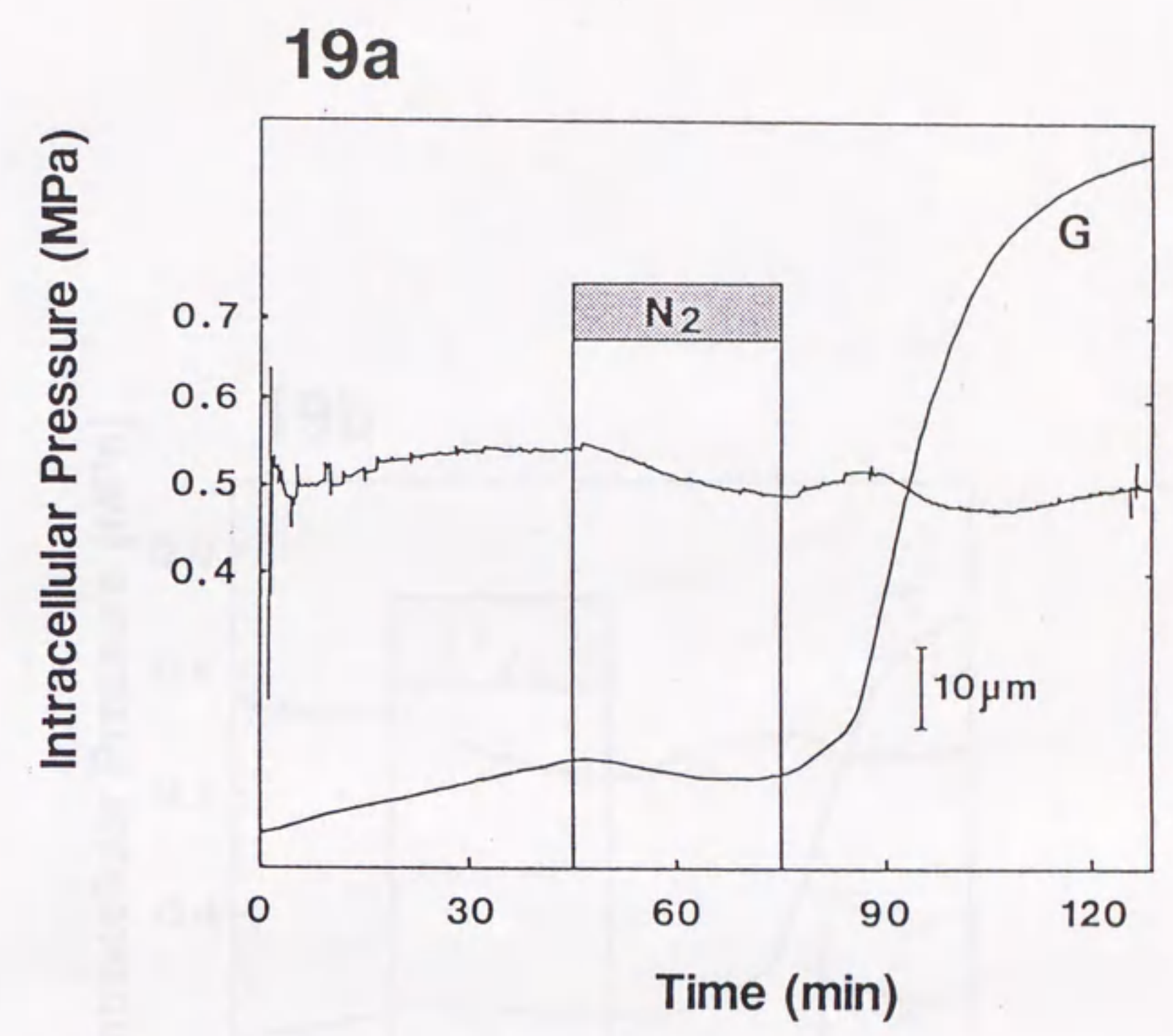
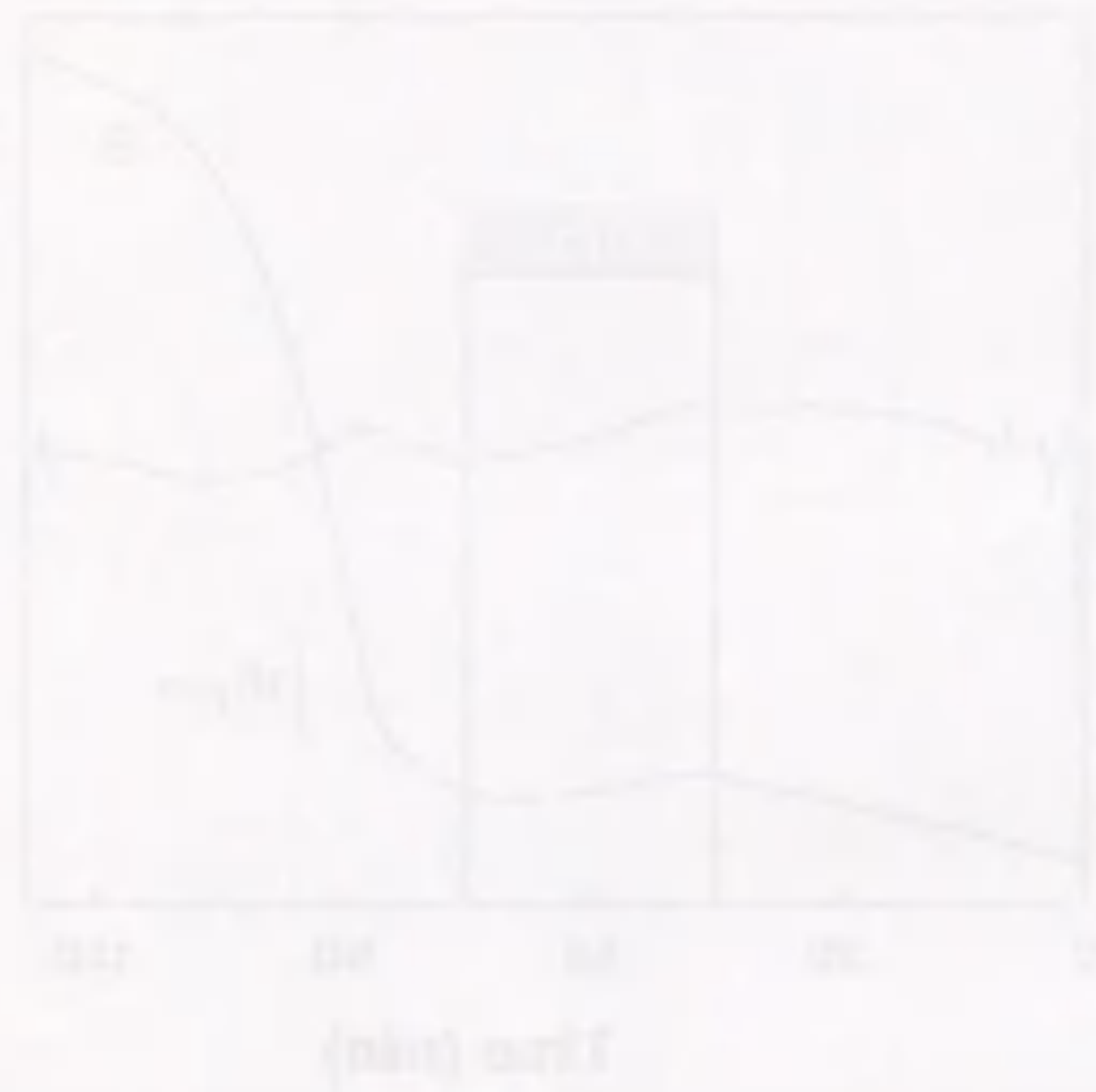


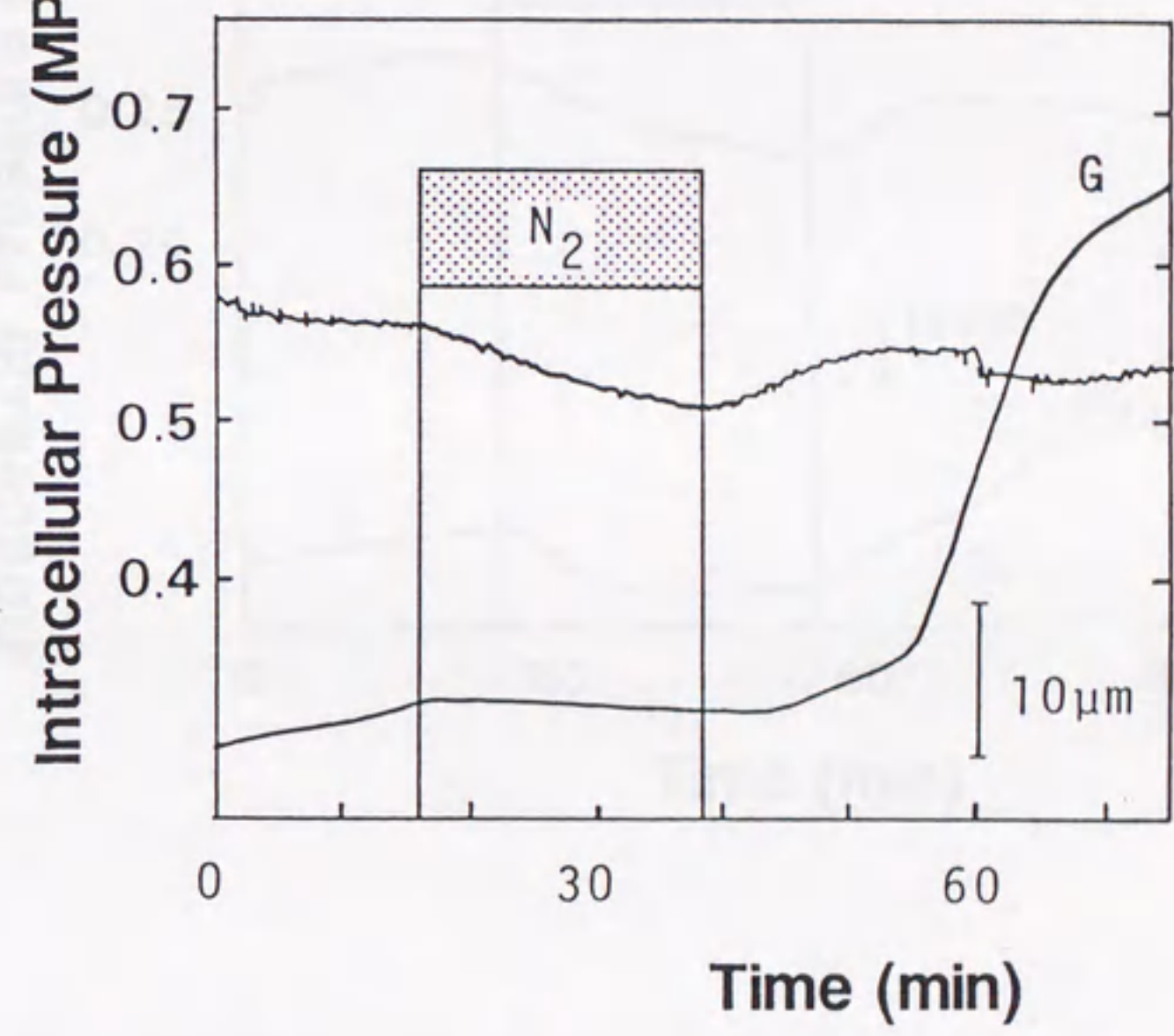
図 19 a、 b. 細胞内圧と伸長生長の無酸素化に対する反応

50mOsm 溶液灌流条件下での測定例 灌流液の組成は 10mM KCl, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 30mM Sucrose.



Intracellular Pressure (MPa)

**19b**



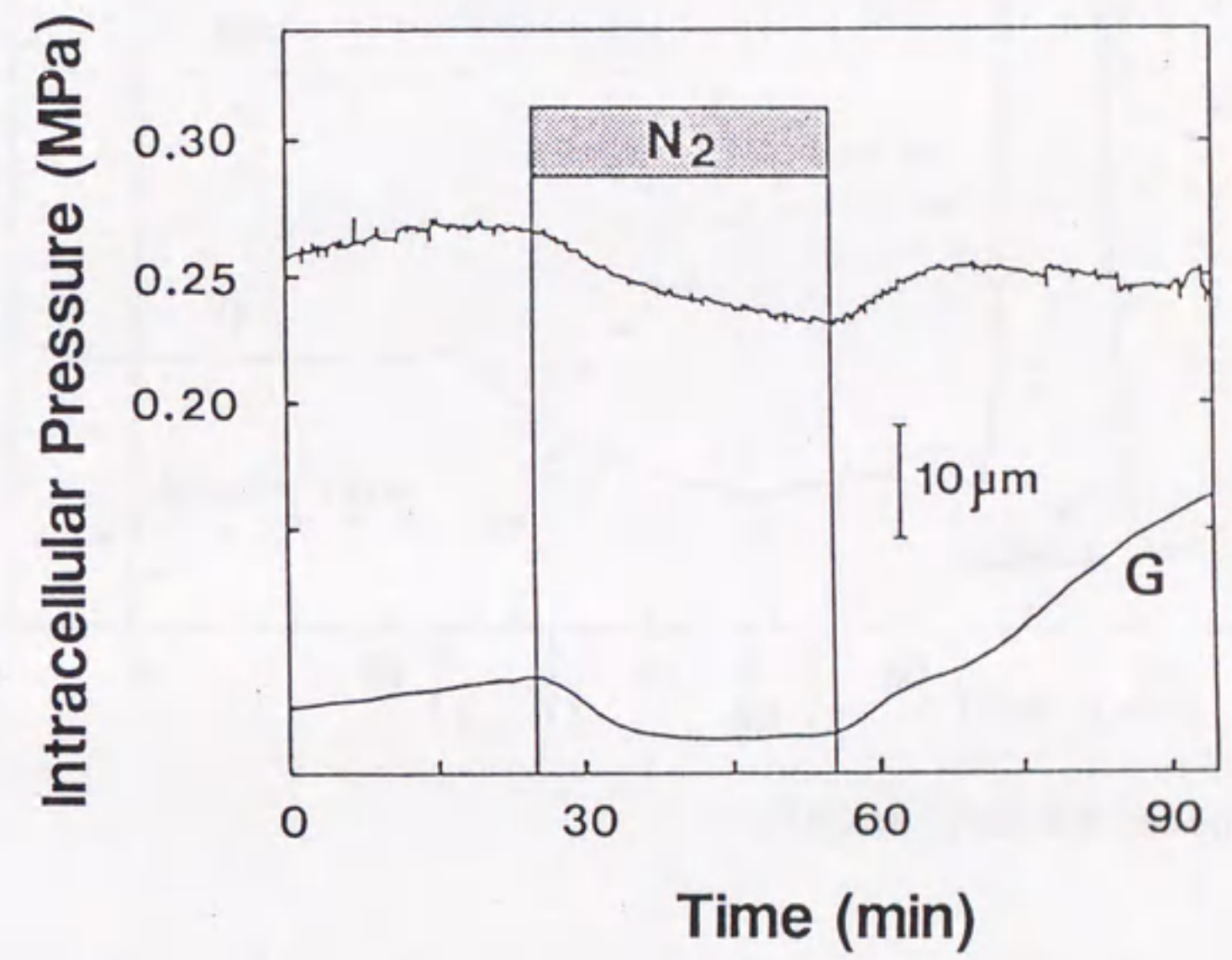
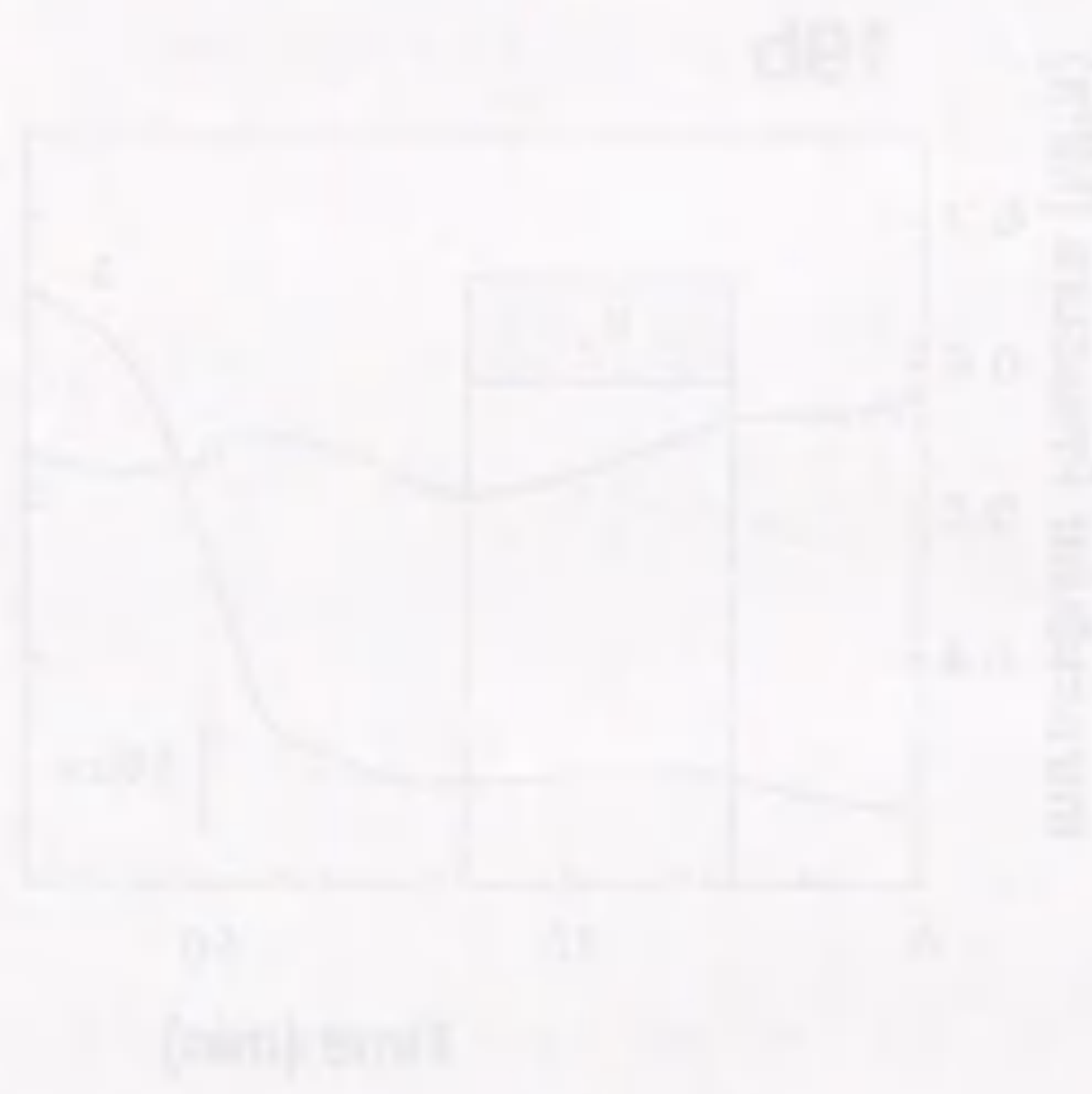
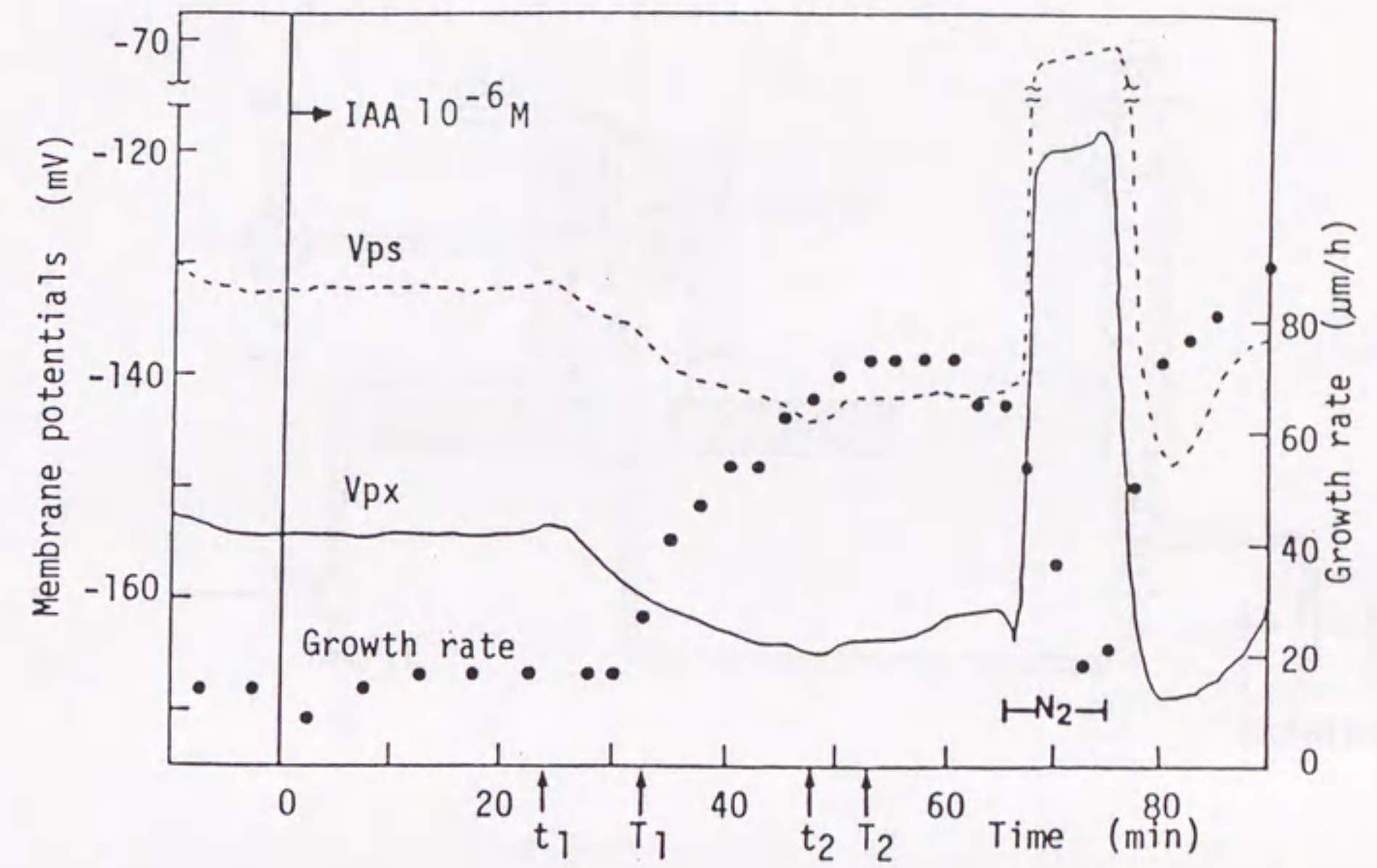


図 20. 細胞内圧と伸長生長の無酸素化に対する反応  
 150mOsm 溶液灌流条件下での測定例 灌流液の組成は  
 10mM KCl, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 30mM Sucrose,  
 100mM Mannitol.



(Ikoma and Okamoto 1988)

図 2 1. オーキシンの膜電位と伸長生長に対する反応の連続測定例 (引用)

導管灌流により IAA 10<sup>-6</sup> Mを与えたもの

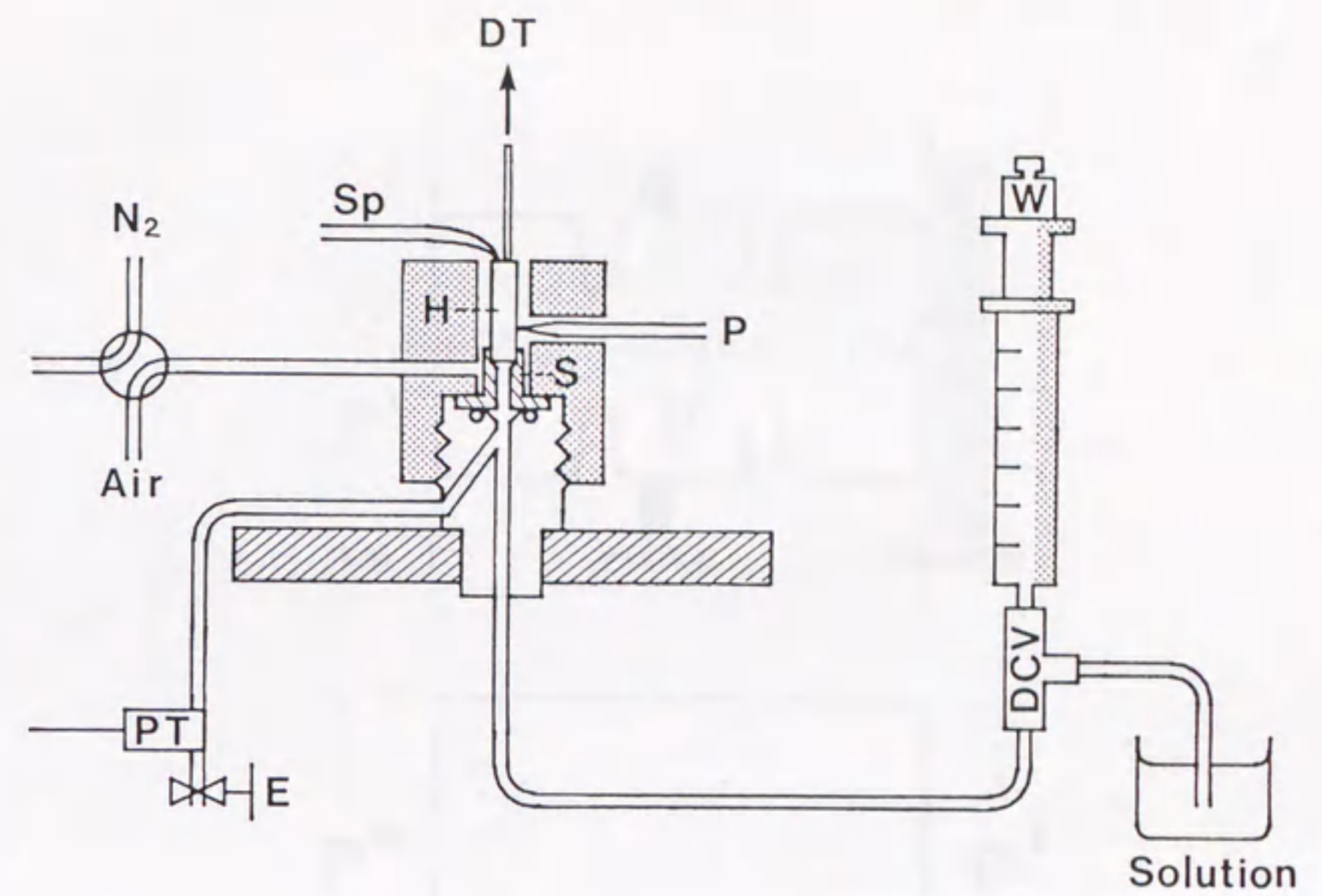
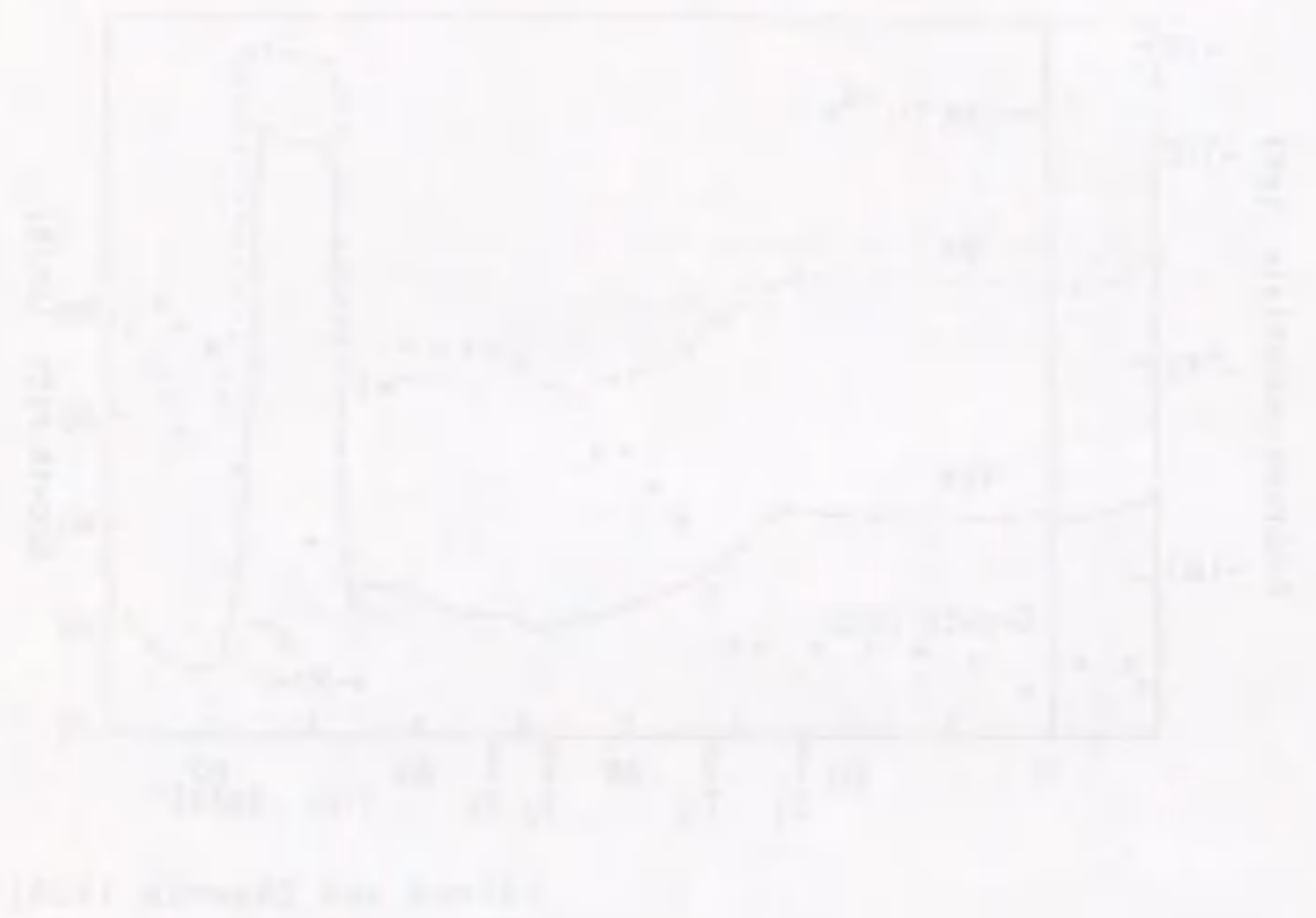


図 2 2. 膨圧測定と導管圧ジャンプ用測定系の模式図

測定容器内は窒素通気により呼吸阻害ができるようにしてある。DCV: dual check valve, DT: 生長測定用差動トランスデューサー, E: 排出バルブ, H: 胚軸片, P: 細胞内圧プローブ, PT: 導管圧測定用圧カトランスデューサー, S: 胚軸固定用受け口, Sp: 浸出液吸取りピペット, W: 灌流圧調節用の重り。





植物の水分と無機塩素の輸送は、根から葉まで、  
 導管を通じて行われる。この輸送は、根の吸水力と、  
 葉の蒸散作用による吸水力との差によって生じる。  
 この輸送は、根の吸水力と、葉の蒸散作用による吸水力との差によって生じる。

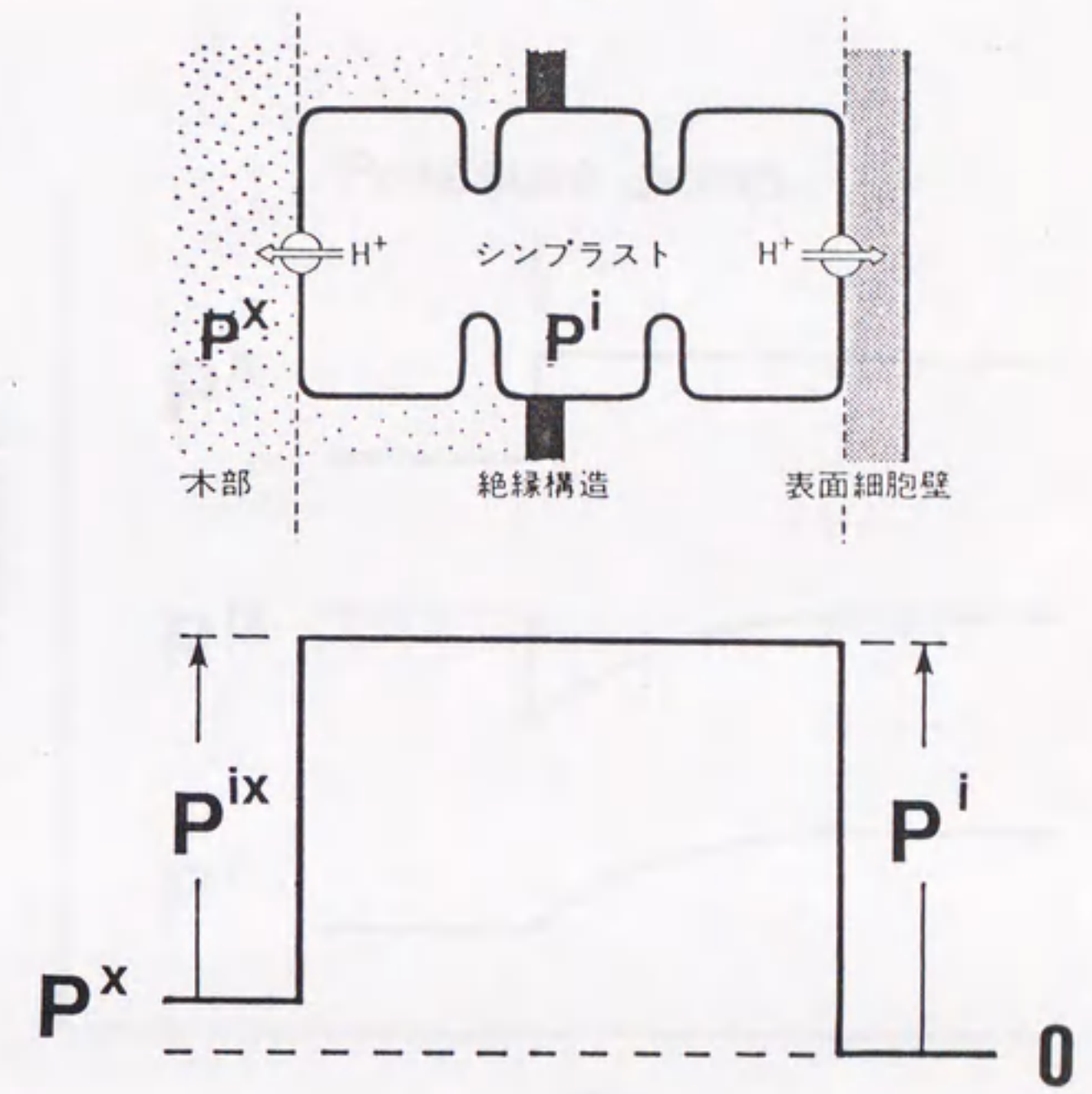


図 2 3. 胚軸片内での圧力予想図

$P^i$ : 大気圧を基準とした細胞内圧,  $P^x$ : 大気圧を基準とした導管圧,  $P^{ix}$ : 木部側細胞膜を介して、導管圧を基準とした細胞内圧. 従って表皮側と木部側では細胞膜を介しての圧力差が異なることに注意.

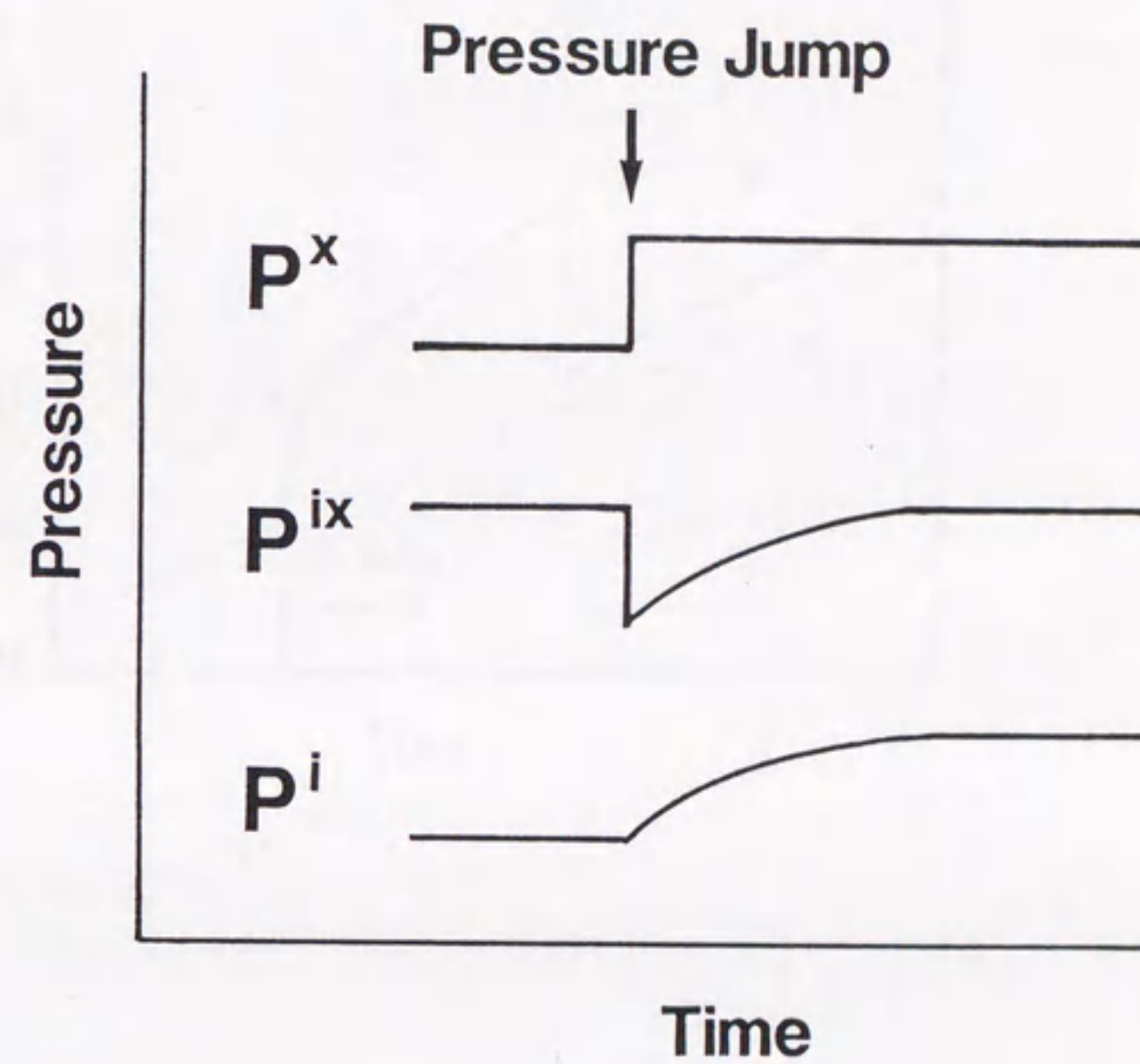


図 2 4. 導管圧ジャンプに対する圧力変化予想図

$P^{ix}$ 、 $P^i$ の過渡的变化は、弾性的性質によると考えられる (Okamoto and Katou 1988).

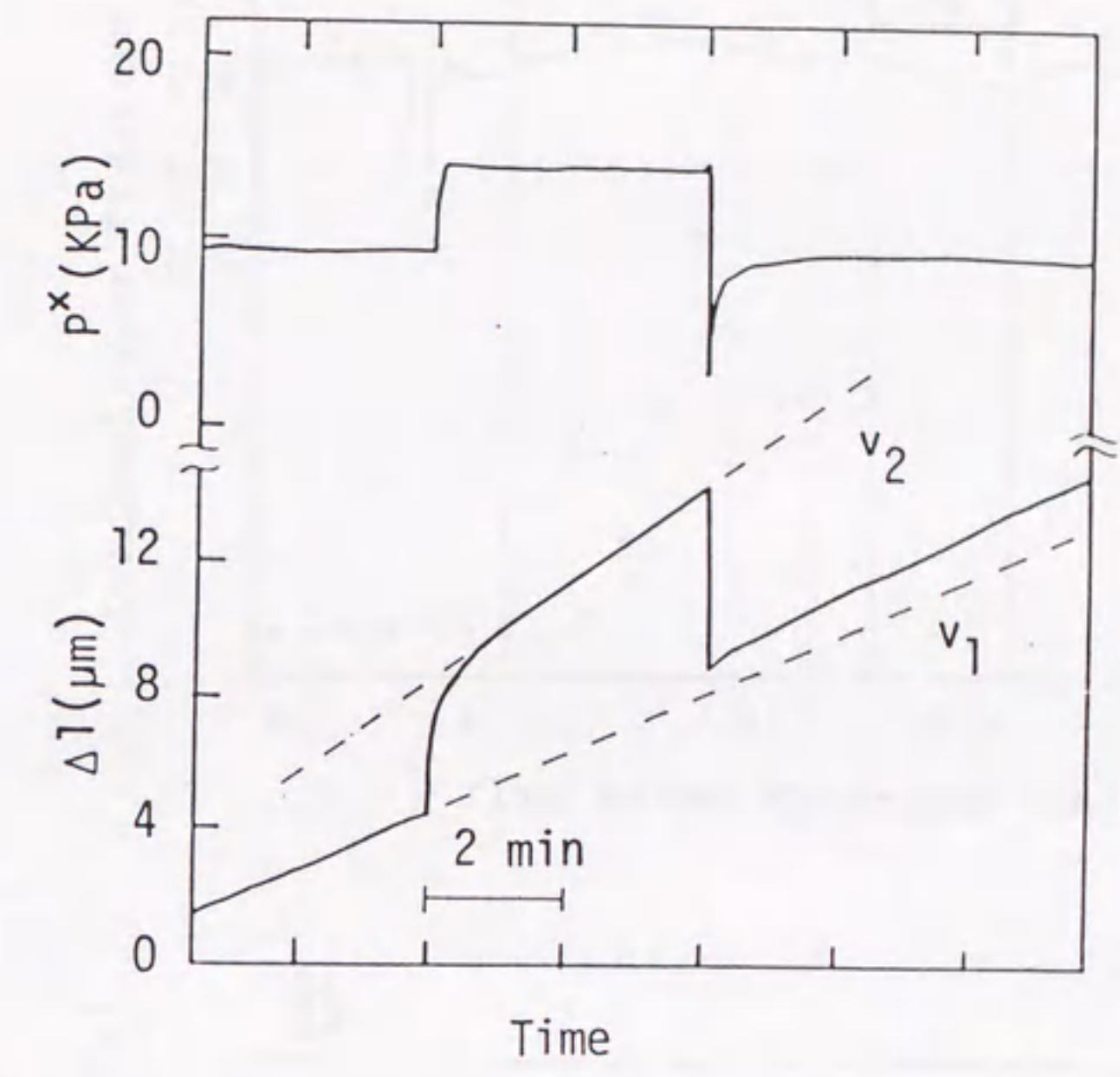
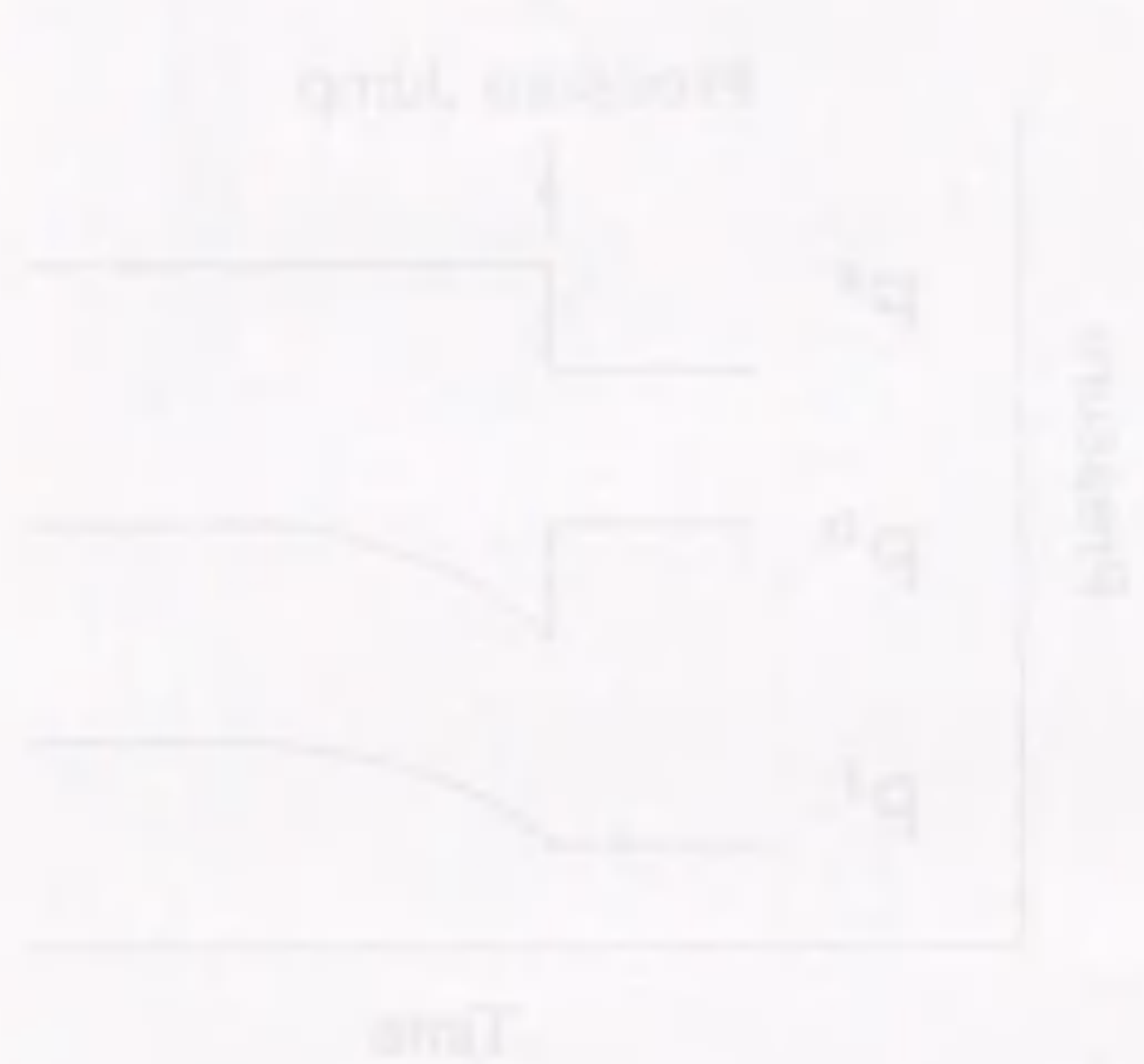


図 25. 導管圧ジャンプに対する伸長生長の反応例

導管圧変化(上図)とそれにより引き起こされる胚軸の生長速度変化(下図)のトレース.  $\Delta v = v_2 - v_1$  が導管圧ジャンプによって引き起こされる実際の生長速度変化.

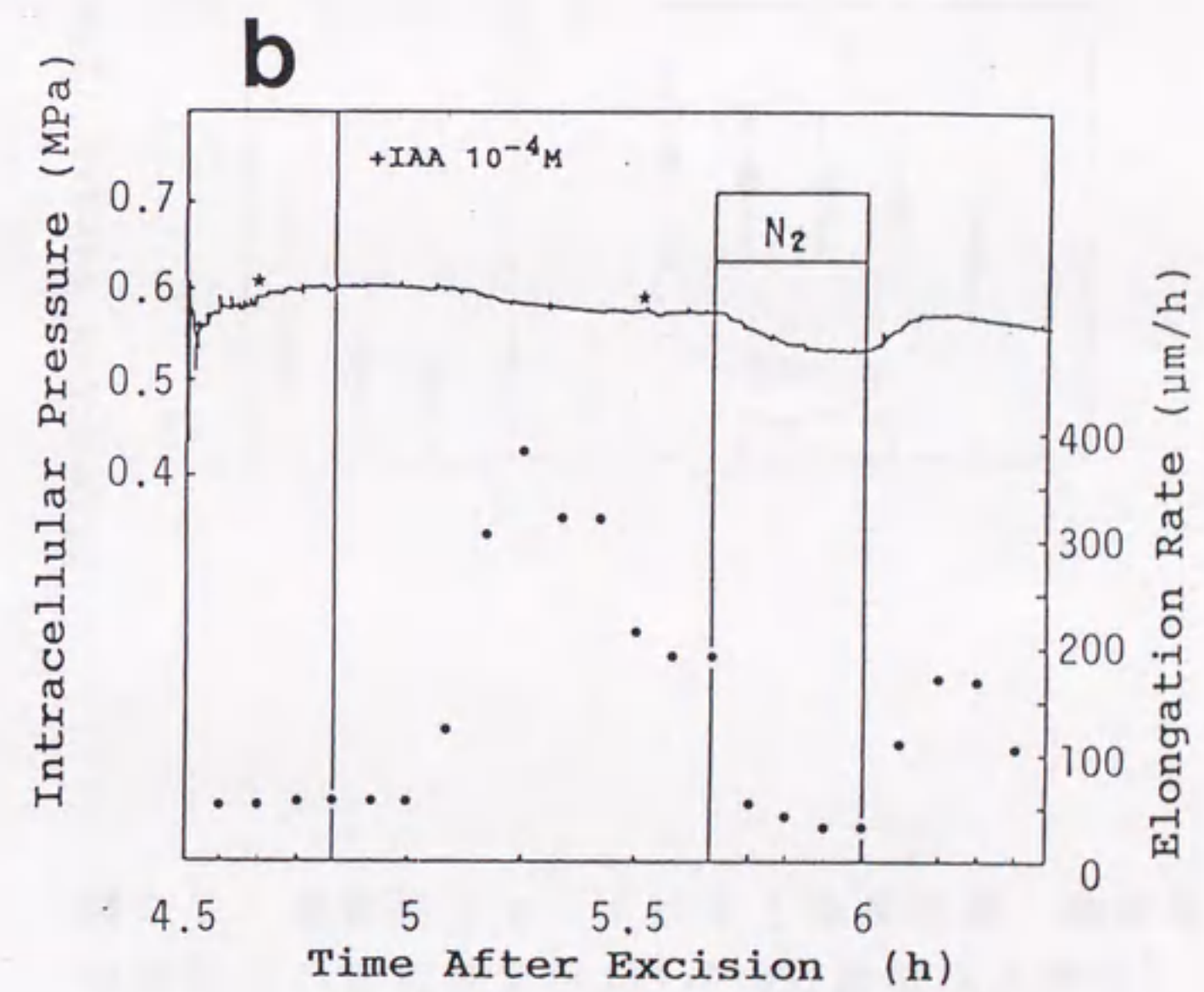
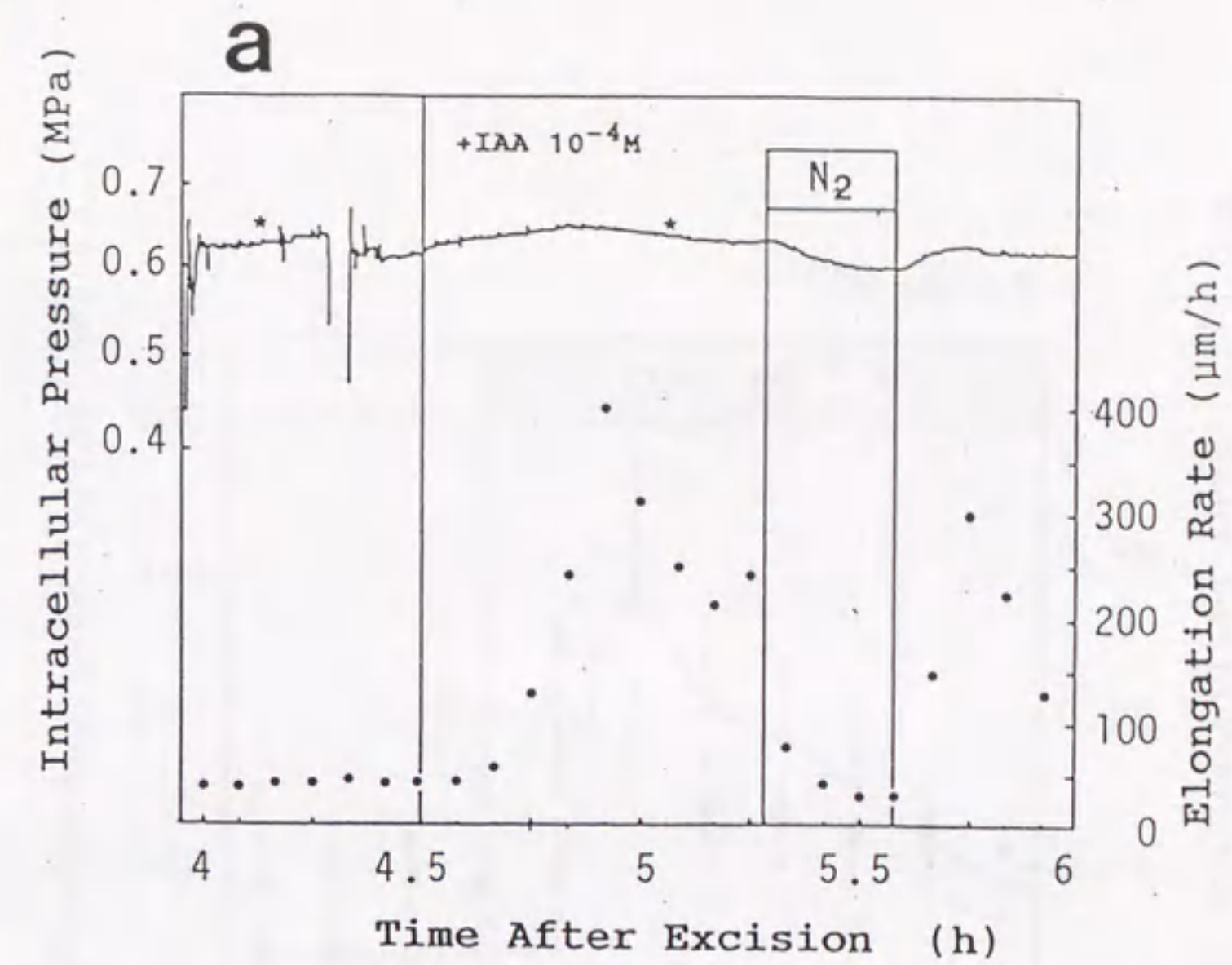


図26 a, b. オーキシンに対する膨圧と伸長生長の反応の連続測定例

この例ではオーキシン添加前と後(\*印の時間)に導管圧ジャンプを1回づつ行っている。得られた結果は以下の通り。 a)  $v$ :  $40 \rightarrow 248 (\mu\text{m}/\text{h})$ ,  $\Phi$ :  $0.10 \rightarrow 0.22 (\text{MPa}^{-1}\text{h}^{-1})$ ,  $P^i - Y$ :  $29 \rightarrow 85 (\text{KPa})$ . b)  $v$ :  $55 \rightarrow 215 (\mu\text{m}/\text{h})$ ,  $\Phi$ :  $0.14 \rightarrow 0.22 (\text{MPa}^{-1}\text{h}^{-1})$ ,  $P^i - Y$ :  $28 \rightarrow 71 (\text{KPa})$ . N<sub>2</sub>と書いて囲んである部分は窒素通気による呼吸阻害。呼吸依存性のP<sup>i</sup>成分はaで33KPa、bで41KPa。

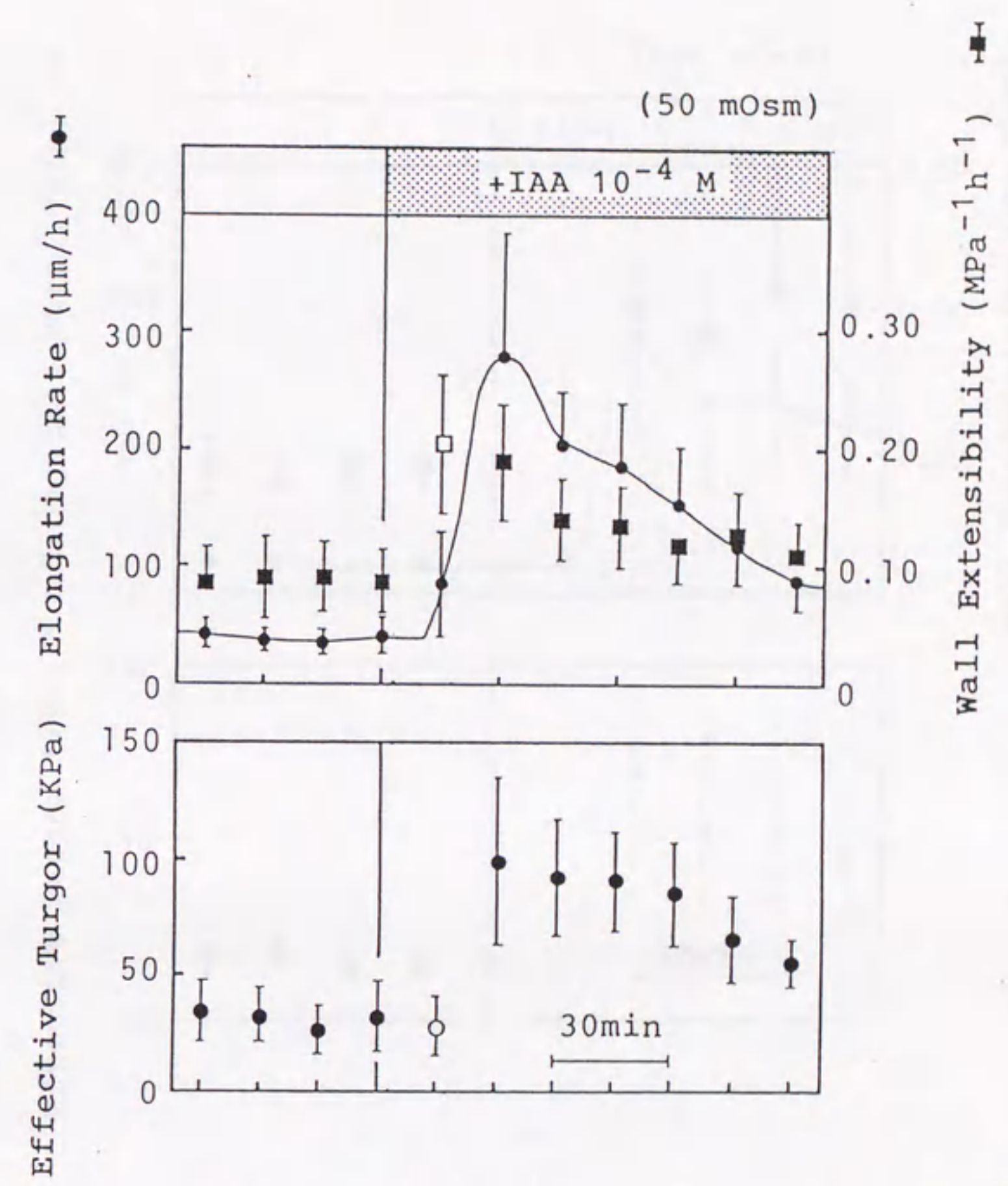


図27. 導管圧ジャンプによる伸長速度、細胞壁展性、有効膨圧の連続測定例(50mOsm溶液灌流条件下)

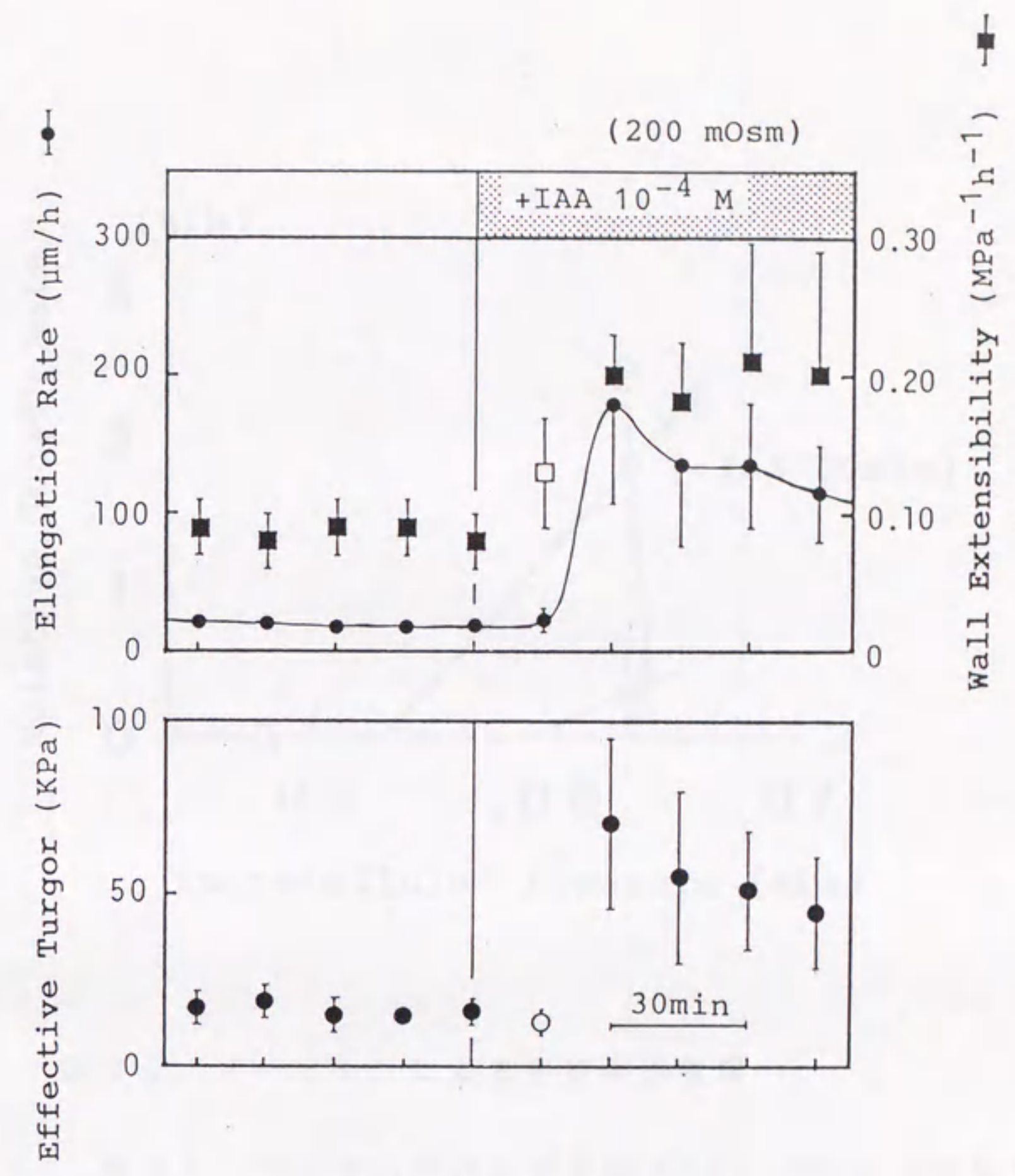


図 28. 導管圧ジャンプによる伸長速度、細胞壁展性、有効膨圧の連続測定例(200mOsm溶液灌流条件下)

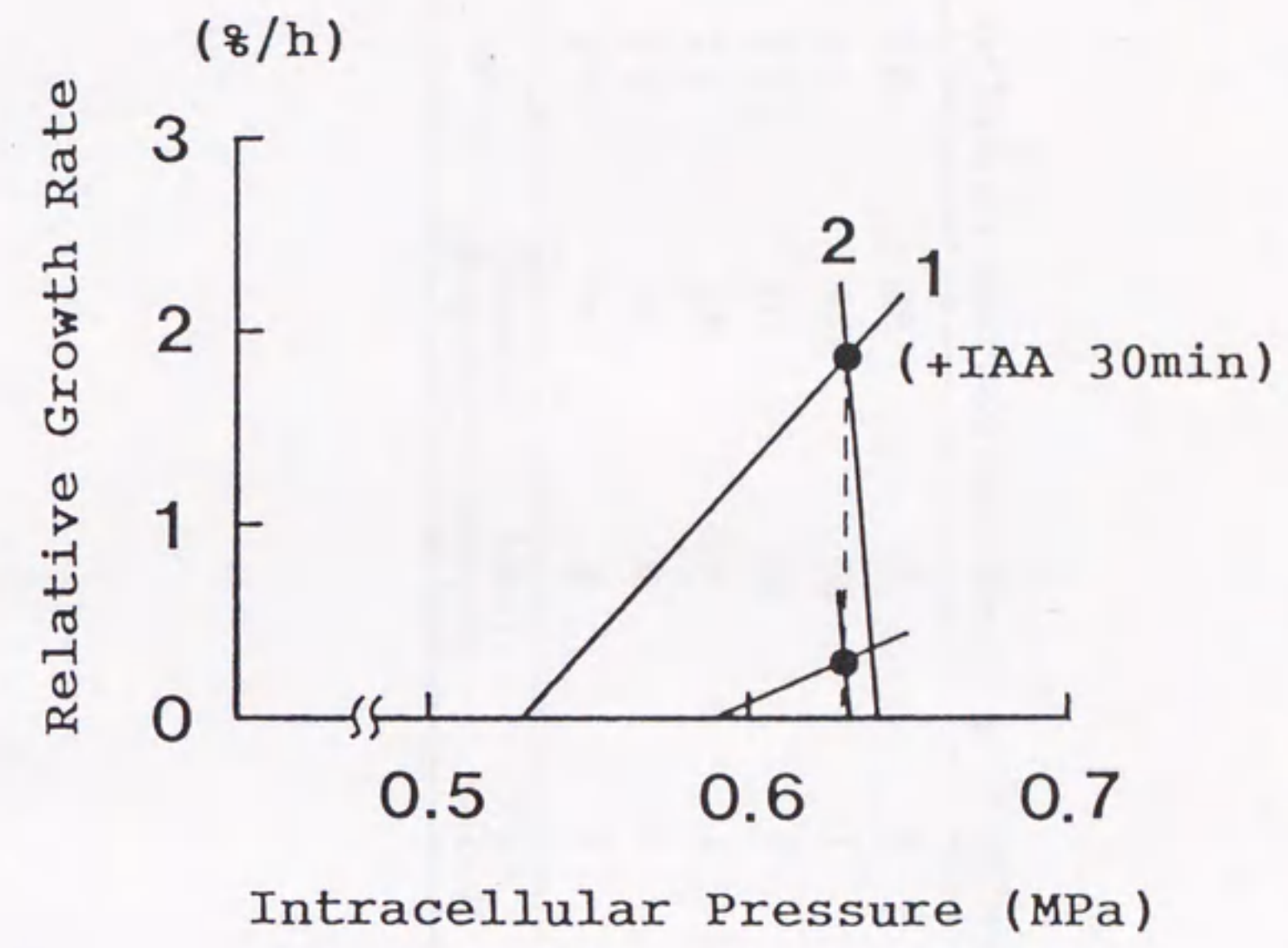
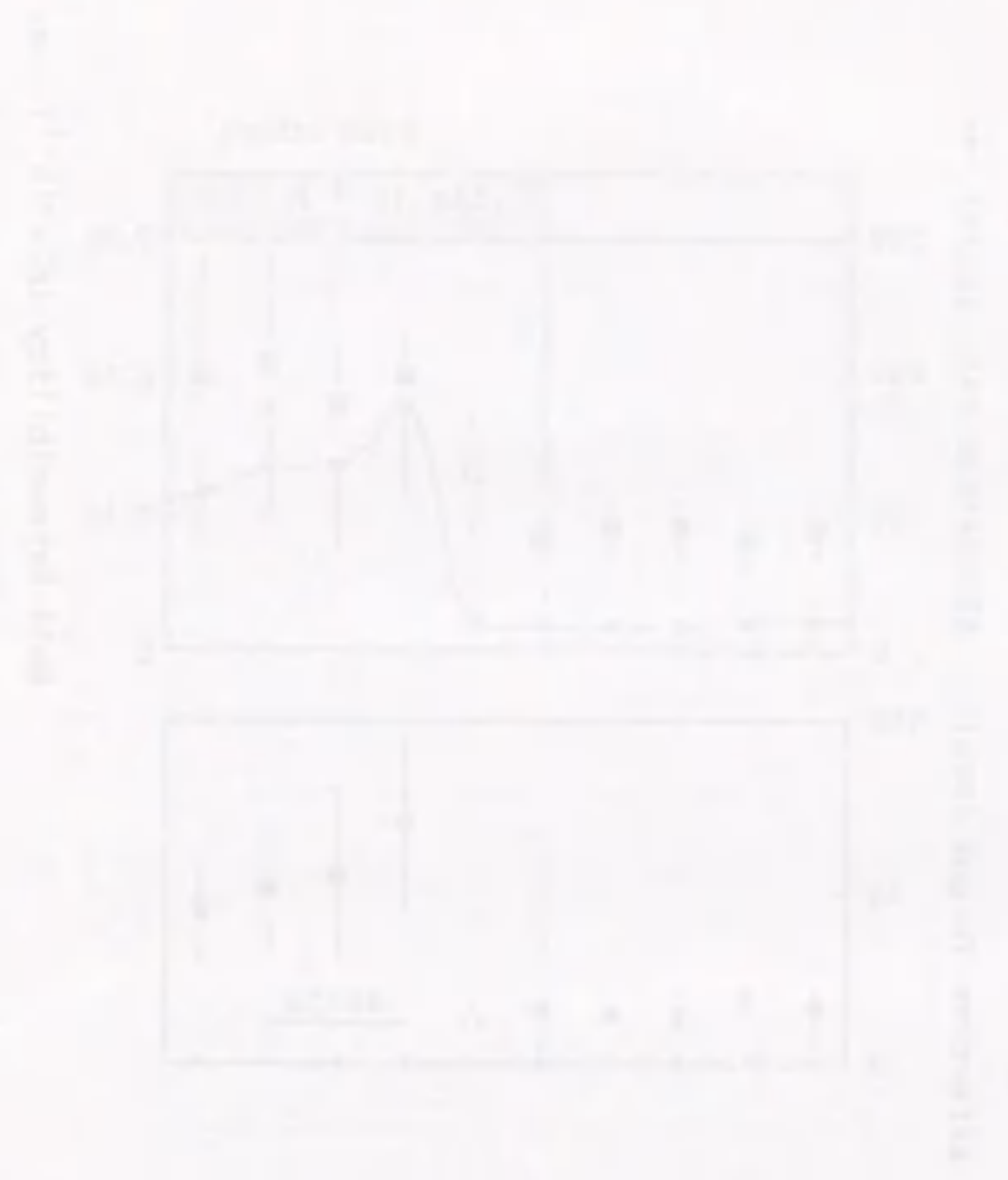


図 29. オーキシシンによる生長促進機構

線分 1、2 はそれぞれ生長方程式 (1)、(2) に対応する。表 5 にまとめられた結果の  $P^i - v$  平面上へのプロット。膨圧は有意な変化がみられないため一定であるとした。

表 1. くり抜き抜き灌流に用いた灌流液組成表

Table 1 Composition of the perfusion solutions

Solution	KCl (mM)	CaCl <sub>2</sub> (mM)	Malate (mM)	Sucrose (%)	Sorbitol (mM)	Osmolarity (mosmol)	pH
1K-0S	1	0.1	1	1	0	—	5.3
3K-0S	3	0.1	1	1	0	—	5.2
10K-0S	10	0.1	1	1	0	47	5.2
10K-40S	10	0.1	1	1	40	90	5.2
10K-80S	10	0.1	1	1	80	124	5.2
30K-0S	30	0.1	1	1	0	88	5.2

The pH values of the solutions were adjusted to 5.2 with NaOH, so all the solutions contained 1.8 mEq Na<sup>+</sup>.  
—: not measured.



表 2. 呼吸阻害に対する細胞内圧と生長の反応

Table 2 Responses of intracellular pressure ( $P^i$ ) and growth to anoxia

$C^o$ (osmol/m <sup>3</sup> )	$P^i$ (in air) (kPa)	$P^i$ (in N <sub>2</sub> ) (kPa)	$\Delta P^{i,b}$ (kPa)	Growth Rate <sup>c</sup> ( $\mu\text{m}/\text{h}$ )	Shrinkage <sup>d</sup> ( $\mu\text{m}$ )
50	540 $\pm$ 17	499 $\pm$ 16	41 $\pm$ 6	10-16	1-4
200	279 $\pm$ 25	248 $\pm$ 24	30 $\pm$ 4	5-10	4-5

Values are means  $\pm$  S.D. or ranges for 7 replicates.

<sup>a</sup>  $C^o$  is the osmotic concentration of the perfusion solution, which was perfused continuously after the preparation of a hollow cylinder of tissue.

<sup>b</sup>  $\Delta P^i = P^i$  (in air) -  $P^i$  (in N<sub>2</sub>)

<sup>c</sup> The rate of elongation growth just before anoxia.

<sup>d</sup> Shrank length under anoxic conditions.

表3. オーキシン投与の細胞内圧に対する効果  
(50mOsm溶液灌流条件下)

Table 3 Effect of IAA ( $1 \times 10^{-4}$  M) on intracellular pressure ( $P_i$ ) with perfusion by a solution of 50 mOsm

No.	$P_i$		$\Delta P_i$ (kPa)	Depth of probe ( $\mu\text{m}$ )
	- IAA (kPa)	+ IAA (30 min) (kPa)		
1	574	524	-50	—
2	628	628	0	—
3	649	658	+9	—
4	637	642	+5	340
5	665	615	-50	260
6	640	618	-22	590
7	627	635	+8	170
8	602	575	-27	330
9	624	635	+9	170
mean	627	614	-13.1	
SD	25	39	23.4	
(n=9)				

The values of  $P_i$  just before and 30 min after application of IAA are listed in this Table. The position of the probe was defined after completion of measurements of  $P_i$ . —, Not detected.

表4. オーキシン投与の細胞内圧に対する効果  
(200mOsm溶液灌流条件下)

Table 4 Effect of IAA ( $1 \times 10^{-4}$  M) on intracellular pressure ( $P^i$ ) with perfusion by a solution of 200 mOsm

No.	$P^i$		$\Delta P^i$ (kPa)	Depth of probe ( $\mu\text{m}$ )
	-IAA (kPa)	+IAA (30 min) (kPa)		
1	337	327	-10	155
2	311	307	-4	120
3	334	331	-3	120
4	293	291	-2	230
5	317	323	+6	—
6	355	339	-16	50
7	339	331	-8	100
mean	327	321	-5.3	
SD	19	15	6.4	
(n=7)				

The values of  $P^i$  just before and 30 min after application of IAA are listed in this Table. The position of the probe was defined after completion of the measurements of  $P^i$ . —, Not detected.

表 5. オーキシンの生長パラメーターに対する効果  
(50 mOsm 溶液灌流条件下)

**Table 5** Effects of IAA on the growth parameters with perfusion by a solution of 50 mOsm

Parameter	-IAA	+IAA $1 \times 10^{-4}$ M, 30 min
$v$ ( $\mu\text{m} \cdot \text{h}^{-1} \cdot (15 \text{ mm segment})^{-1}$ ) (n=12) (%/h) (n=12)	39.1 $\pm$ 14.8 0.26	279.3 $\pm$ 107.5 ( $\times 7.1$ ) 1.9
$\phi$ (MPa $^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) (n=12)	0.09 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.05 ( $\times 2.1$ )
$P^i - Y$ (kPa) (n=12)	32 $\pm$ 15	99 $\pm$ 36 ( $\times 3.1$ )
$P^i$ (kPa) (n=9)	627 $\pm$ 25	614 $\pm$ 39 ( $-13 \pm 23$ )

Typical values just before and 30 min after the application of IAA are summarized from Fig. 28 and Table 4 in this Table. Means and SD are shown.