

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 Morphology and salt excretion mechanism of the salt glands in Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth)
(ローズグラスにおける塩腺の形態と塩排出機構)

氏名 大井崇生

論文内容の要旨

塩ストレスは作物の生長と収量を低下させる環境要因の一つである。これに対し、高塩濃度でも生育可能な耐塩性植物の一部において知られる「塩腺」は、体内の過剰な塩分を体外へ排出する葉表皮上構造であり、葉内のイオンバランスの調整に貢献していると考えられている。農業上重要な作物の多くが属するイネ科においても一部の種で塩腺の存在が知られ、その塩排出機構の解明は作物の耐塩性向上に役立つものと期待される。このイネ科における塩腺は、特殊な微細構造を有する二つの細胞から構成されていることが知られているが、それらの細胞内の塩排出の一連の流れを説明する定説は確立されていない。

イネ科ヒゲシバ亜科に属するローズグラス (*Chloris gayana* Kunth) は、耐塩性が高く、塩腺を有することが知られている。ローズグラスは世界的に広く栽培されている牧草であり、栽培や生育に関する知見も充実しており、近年その塩腺からの塩排出に関する生理的知見の蓄積が進んでいるため、イネ科の塩腺における研究モデルとなりうると考えられる。しかしながら、ローズグラスの塩腺の形態に関する詳細な報告はまだ行われていない。

そこで本論文では、まずローズグラスの塩腺の形態を電子顕微鏡レベルで明らかにし、その特殊な微細構造の把握に基づいて塩排出の生理現象が起きる一連の流れを解明することを目的とした。また、イネ科においては、塩腺であると考えられている細胞から塩が排出されることを明確に示した例はこれまでにないため、塩腺細胞上で塩排出が行われていることを示すと同時に、塩腺細胞の表面から体外へ排出される過程を詳細に調査した。

1. ローズグラスにおける塩腺の分布、外形および内部微細構造の解明

ローズグラスの葉を化学固定による一般的な試料作製法に基づき走査型電子顕微鏡

(SEM) で観察した。その結果、ローズガラスの塩腺は葉表面において維管束と並行な直線上に分布するといった特徴が見出されるとともに、個々の塩腺は二つの細胞（内側の basal cell および 外側の cap cell）から成ることを確認した。その内部微細構造を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察したところ、ローズガラスの塩腺を構成する両細胞は、発達した中央液胞や葉緑体を含まない一方で、細胞質密度が高く、ミトコンドリアを多数有し、未発達のプラスチドや小液胞を有するなど、他のイネ科植物において報告されてきた二細胞性塩腺と共通する特徴を示した。特に、basal cell では細胞内部に延び広がる二重の膜構造が確認され、これらは何層にも重なったシート状に存在することが明らかとなった。それぞれの膜構造はその内部がアポプラストに繋がっているため、その発達した形状によってアポプラストとシンプラストの接触面を拡大し、膜を介した能動輸送の効率を高めていることが示唆された。また、多数のミトコンドリアが存在することから、塩腺はエネルギー消費を伴う積極的な輸送によって塩を排出することが推定された。一方、cap cell 内部には特殊な膜構造は見られなかったが、細胞上部では細胞壁とクチクラが離れて間隙が生じていた。この間隙は塩腺に集められた塩水溶液が排出の最終過程で蓄積する場であると推定された。

2. 塩腺からの塩排出の低真空 SEM 観察による検証

前述のように、発達した形態を有する二つの細胞が塩排出を行っていると考えられるが、イネ科の二細胞性塩腺から塩排出が起きることを明確に示した報告はこれまでになかった。実体顕微鏡観察によって、塩が水溶液として排出されることは分かるが、分解能が低いためイネ科の微小な塩腺を認識することはできない。一方、通常の電子顕微鏡観察では葉表面の可溶物が固定・脱水・乾燥等の試料作製過程で流失してしまうため、排出された塩水溶液と塩腺との位置関係を示すことは困難である。そこで、通常の試料作製過程が不要な低真空モードでの SEM 観察を行い、ローズガラスの葉を生鮮葉に近い状態で調査した。葉を切取ってすぐに観察した際に見られる排出液の分布と、葉を流水で洗浄した直後に観察した際に見られる塩腺の分布を比較した結果、塩腺の真上に液が排出されていることが示された。加えて、低真空 SEM に搭載した元素分析装置により、NaCl 水溶液を与えて生育した個体における排出液には Na、Cl 元素が顕著に含まれることが示された。以上より、ローズガラスの葉は微小な二細胞性の塩腺から塩を排出することが明らかとなった。

3. 塩腺の表面微細構造および塩腺から外部への塩排出の過程の解明

従来の仮説では、cap cell 上部の細胞壁とクチクラの間隙に集められた塩水溶液は、表面のクチクラに亀裂や孔が生じることによって外部へ排出されると考えられてきた。しかし、前述の低真空 SEM による観察では、塩排出を行っていた葉のほとんどの塩腺において、cap cell 上部表面に亀裂や孔は見られなかった。したがって、二細胞性塩腺による塩排出はクチクラの微細構造の崩壊を伴わずに行われることが推定された。この仮説の真偽を検証するためには表面微細構造の高精度での観察が必要である

が、これまでに用いてきた通常の SEM 観察では脱水・乾燥等の試料作製過程においてクチクラの表面微細構造が障害を受けやすく、低真空 SEM では高解像度での観察ができないという欠点がある。そこで、試料を瞬時に凍結させて観察するクライオ SEM 法によって、ローズガラスの葉の表面微細構造を詳細に観察した。その結果、クライオ SEM による高倍率観察においても、cap cell 上のクチクラには亀裂や孔は見られなかった。また、他の表皮のクチクラ表層はワックスによる微小結晶で覆われていたが、cap cell のクチクラ表層ではそれらが欠如していた。ワックスは疎水性であり、体内からの水分損失を抑制する働きがあることから、cap cell 上のクチクラは他の表皮上のクチクラよりも水を浸透しやすいと考えられた。したがって、ローズガラス塩腺は、クチクラに亀裂や孔を生じずに塩を排出するという仮説が支持され、浸透性の高いクチクラから浸み出させるようにして塩水溶液を排出することが推定された。この排出方式ではクチクラの微細構造の崩壊を伴わないため、塩腺は一度排出を行った後も継続的に塩を排出することが可能であると考えられ、このことは実体顕微鏡による排出液の継時観察の結果とも合致した。以上より、ローズガラス塩腺は微細構造の崩壊を伴わずに、クチクラ表層ワックスの欠如した cap cell 表面から塩水溶液を染み出させるようにして、継続的に塩排出を行うことが明らかとなった。

本研究ではローズガラスの塩腺がイネ科塩腺に共通してみられる発達した細胞内構造を有する二細胞性塩腺であることを明らかにした。そして、イネ科における微小な二細胞性塩腺から塩排出が行われることを電子顕微鏡レベルで初めて明らかにすることに成功し、塩腺上部の表面微細構造の観察の成功と併せて、ローズガラスの二細胞性塩腺は微細構造の崩壊を伴わない継続的な塩排出を行うことを新たに示した。これは双子葉植物の塩腺とは異なるイネ科特有の塩排出メカニズムであり、本研究は塩腺機能の他のイネ科作物への応用に向けた基礎となると期待される。