

植物の栄養獲得機構に関する実験実習

野 副 朋 子, 安 部 淳

1. はじめに

生物は生きていくために必要な栄養素を外界から取り入れている。植物は必須元素として炭素、水素、酸素、窒素、リン、カリウム、カルシウム、マグネシウム、イオウ、鉄、マンガン、銅、亜鉛、ホウ素、モリブデン、塩素、ニッケルの17種類を主に根を介して土壤中から吸収する (Marschner 1995)。我々人を含む動物は、食物を食べることで必須元素を獲得するが、この食物中の必須元素は、究極的には植物が根から吸収して可食部に蓄積したものに由来する。植物が必須元素を吸収して利用する仕組みを理解することで、植物生産の増大や栄養価の向上が成し遂げられてきた。

例えば、必須元素の一つである鉄は、植物だけでなく人間にとっても必要な必須微量元素である。鉄は生物の細胞内における呼吸の場であるミトコンドリアに欠かせない酵素や光合成の主要酵素が働く際になくてはならないため、鉄の欠乏は生物の生存を脅かす。人において鉄が欠乏すると、全身に酸素を十分に供給できなくなるために、深刻な鉄欠乏性貧血症を呈する。鉄欠乏の植物では、光合成の際に太陽の光を吸収する色素であるクロロフィルの合成が阻害され、葉が黄色い縞々模様となるクロロシス症状を呈して収量が激減する。植物の鉄獲得機構として、イネやトウモロコシなどの穀類が属するイネ科植物が持つキレート戦略と、イネ科植物以外の植物が持つ還元戦略が知ら

れている (Marschner 1995)。イネ科植物は鉄を必要とすると、根において、ムギネ酸類と呼ばれるアミノ酸を合成して、根から根圏へと分泌することで土壤中から鉄を吸収する (Takagi et al. 1984)。ムギネ酸類の生合成経路とそこで働く酵素の全容が解明され、酵素の働きを高めることによりムギネ酸類の合成や分泌も高まり、植物の鉄欠乏耐性能も向上することが示された (Ogo et al. 2011; Takahashi et al. 2001)。また、ムギネ酸類の輸送に関わる輸送体タンパク質も同定され、これらの輸送体の働きを高めることでも植物の鉄欠乏耐性能が向上することが示された (Inoue et al. 2009; Koike et al. 2004; Nozoye et al. 2011)。さらに、ムギネ酸類に関わる遺伝子の働きを強めることで、米中の鉄含量も高めることができることが示された (Ishimaru et al. 2010; Masuda et al. 2009)。

近年食の安全に関して注目が集まっている。食の安全を脅かすものとして、有害元素の存在が挙げられる。植物が吸収する有害元素の量を減らすことができれば、食の安全を担保できる。そこで、植物の有害元素の吸収・移行のメカニズムについても研究がなされてきた。日本では、カドミウムによる食の被害としてイタイイタイ病を経験した。イタイイタイ病は、富山県の神通川流域において1910～1970年代前半にかけて多発したが、発生当時は原因が全く不明であったことから風土病あるいは業病と呼ばれた。その後の研究により、

イタイイタイ病の原因はカドミウムを大量に蓄積した農作物を長期間にわたり食していたことであることが判明した。特に、神通川流域で栽培された米が高濃度のカドミウムを蓄積していたことが主要原因であるとされた。イネがカドミウムを吸収して米中に蓄積するメカニズムの解析が行われ、カドミウムは主に鉄を吸収する輸送体であるOsNRAMP5により吸収されて米中に蓄積することが示された (Ishikawa et al. 2012)。OsNRAMP5に自然変異が生じた突然変異体は、カドミウムで汚染された土壌で生育しても、全くカドミウムを吸収しなくなることが示された。現在、OsNRAMP5変異イネ品種の商品化が進められている。一方、日本では2011年3月に発生した東日本大震災を契機とする原子力発電所の事故により、放射性同位体による食の安全の危機も経験した。原子力発電所の事故により、セシウムやストロンチウムなどの放射性同位体が自然界に飛散した。近隣にあった農地では土壌中に放射性同位体が蓄積し、これを吸収した農作物から高濃度の放射能が検出された。その後の研究により、セシウムは必須元素であるカリウムの吸収に関わる輸送体により吸収されることが示された (Rai and Kawabata 2020)。さらに、土壌中に豊富にカリウムが存在すると、セシウムの吸収が抑えられることが示され、カリウムの施肥により、セシウムの吸収を抑える農法が導入されたことで、農作物中のセシウム濃度は問題のないレベルに抑えられるようになった。セシウムは土壌の地表に短期間で吸着し、深層には移動しないことが示され、土壌表面を入れ替えることで、農地からセシウムを除去することも可能となった。

以上のように、生物には必須元素、有害元素ともに体内に吸収して移行する機構が存在する。これらの機構を理解して活用することで、食の安全

を確保し、栄養価の高い健康に良い農作物を生産することができると考えられる。専門的な研究者だけでなく一般市民にとっても、植物のメカニズムに想像力を働かせて、よりよい農作物を選択することは重要である。明治学院大学では「生命科学方法論 A」の授業において、「植物の不思議を知る」と題して、野菜類や身近な植物を用いて、植物が必須元素や有害元素を吸収して可食部へと蓄積するメカニズムを調べる実験実習を行っている。本稿では、その取り組みについて紹介し、これまでに得られた成果を報告する。

2. 栄養素の吸収機構を解明するための疑似実験

植物は必須元素や有害元素を主に根を介して吸収する。その経路は一様ではなく、元素ごとに異なる経路で植物に吸収されることが示されつつある。植物の養分と水の通り道に関しては、「小学校学習指導要領」において、水の通り道を可視化する実験として、掘り取った植物の根を食用色素赤などで着色した色水に浸して、植物の水の通り道を調べる実験が扱われている。この実験により、色素が根から水とともに吸い上げられ、茎を通して植物の体全体に送られることを視覚的にとらえることを狙ったものである。しかし、色素分子は根の細胞膜を通過することはできないはずであり、この実験は根が掘り取られた際に傷ついた具合により結果が異なることが示されている (山田真子 et al. 2014)。一方で着色剤として切り花染色液を用いる方が実際の水の吸水過程をより正確に調べることが有効であるとの報告がある (井口智文 et al. 2016)。以上から、本実習では着色剤として絵具と切り花染色液を用いて植物の水や養分の通り道を調べる実験を行い、栄養分の吸収機構を疑似的に解明できるか検討した。

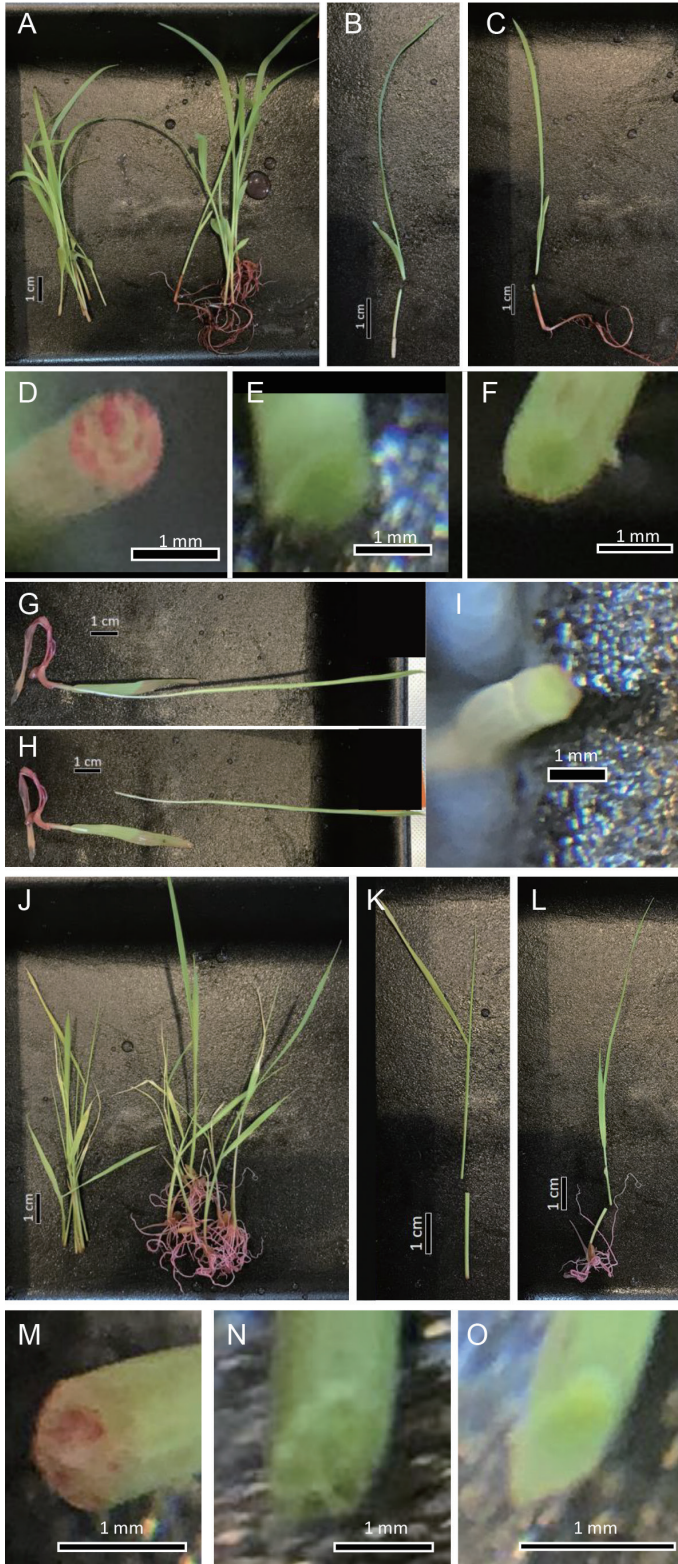


図1 絵具液の吸収実験

絵具液を吸水後24時間後のソルガム (A-F)、オオムギ (G-I)、イネ (J-O) の様子。(A, J) ソルガム、イネは、根を切り落として(左)あるいは根を切り落とさずに(右)絵具液に浸した。(G) オオムギは根を切り落とさずに絵具液に浸した。(B, D, E, K, M, N) 根を切り落として絵具液に浸した茎の断面 (D, M) 及び、色水に浸した部分から約2cmの部分 (B, K)を切断した断面 (E, N)。(C, F, H, I, L, O) 根を切り落とさずに絵具液を浸し、根元から約2cmの部分 (C, H, L)を切断した断面 (F, I, O)。スケールバーは1cm (A-C, G-H, J-K) もしくは1mm (D-F, I, M-O)。

2-1. 絵具を用いた吸収実験

イネ、オオムギ、ソルガムを用いて、絵具の吸収実験を行った(図1)。湿らせたペーパータオル上で31日間発芽させた芽生えを用いた。根を根と茎の連結部から上部2cmのところまで切断したグループと切断しないグループを準備し、それぞれの根元から赤色の絵具を水で溶いた絵具液を吸収させた。絵具液を吸収させて10分後には何も変化が見られなかった(データは示さない)。24時間後においても、地上部では根を切断したグループと切断しなかったグループのいずれにおいても明確な変化は認められなかった(図1A, G, J)。一方、根を切断して茎の根元から絵具を吸収させたグループでは、絵具に浸した断面で赤い染色が観察された(図1D, M)。赤い染色はスポット状に観察され、維管束が染色されたと考えられた。しかし、茎の根元からさらに2cm上部を切断し(図1B, K)、染色を観察したところ、明確な染色は観察されなかった(図1E, N)。根がない状態でも、絵具液は茎の断面に吸着したのみで、それ以降は吸収されず、移行しなかったと考えられた。一方、根を切断せずに吸収させたグループでは、根の表面が赤色に染色される様子が観察された(図1C, H, L)。根と茎の連結部から上部2cmのところまで切断し、切断面における染色を観察したが、明確な染色は観察されなかった(図1F, I, O)。このことから、絵具液は根の表面には吸着したが、根の内部には吸収されず、地上部へも移行しなかったと考えられた。以上の結果は、イネ、オオムギ、ソルガムのいずれにおいても同様であった。植物は、必要なものを体内に吸収して移行する機構を備えている。絵具は、これらの機構によって吸収されない分子であると考えられた。さらに、茎の根元から絵具液を吸収させた場合でも絵具液は茎の上部に移行しなかったことから、この選別は根

だけではなく、茎においても生じていることが示唆された。

2-2. 切り花染色液(インク液)を用いた吸収実験

ホウレンソウ、セロリ、アスパラガス、ニンジン、ミツバ、ゴボウの野菜類と、明治学院大学横浜キャンパスで採取したヤツデを用いてインク液(導管染色液ファンタジーピンク, (株)UCHIDAS)の吸収実験を行った(図2)。各植物の根と茎の連結部の根元をカミソリで切断し、切断面をインク液に浸した。インク液を浸して5分後には、インク液が根元よりも上の部分に浸透している様子が観察された(データは示さない)。インク液に浸して20分後に、薄切切片を作成しインク液で染色された部位を光学顕微鏡を用いて観察した。ヤツデは茎において、中央部に円形に局在する維管束部が赤く染色されている様子が観察された(図2A)。葉では葉脈が赤く染色された(図2B, C)。葉の横断切片では維管束のうち、導管が強く染色されている様子が観察された(図2B)。ホウレンソウの茎では、維管束が染色された(図2D)。葉でも葉脈が染色された(図2E)。葉の横断切片を作成して観察すると、維管束の導管で強い染色が観察された(図2F)。セロリの茎の横断切片を作成して観察したところ、インク液の染色は維管束の導管で観察された(図2J)。維管束部を拡大して観察してみても、維管束の導管部のみが染色されている様子が確認された(図K, L)。アスパラガスの茎の横断切片においても、染色は維管束の導管部で観察された(図2M)。ニンジンの根の横断切片を観察すると、染色が赤いスポット状に観察された(図2N)。切片が歪んでいたため特定はできないが維管束が染色されたと考えられた。ミツバの茎においても、維管束部が赤く染色されていたが、他の植物に比べると染色が薄かった(図

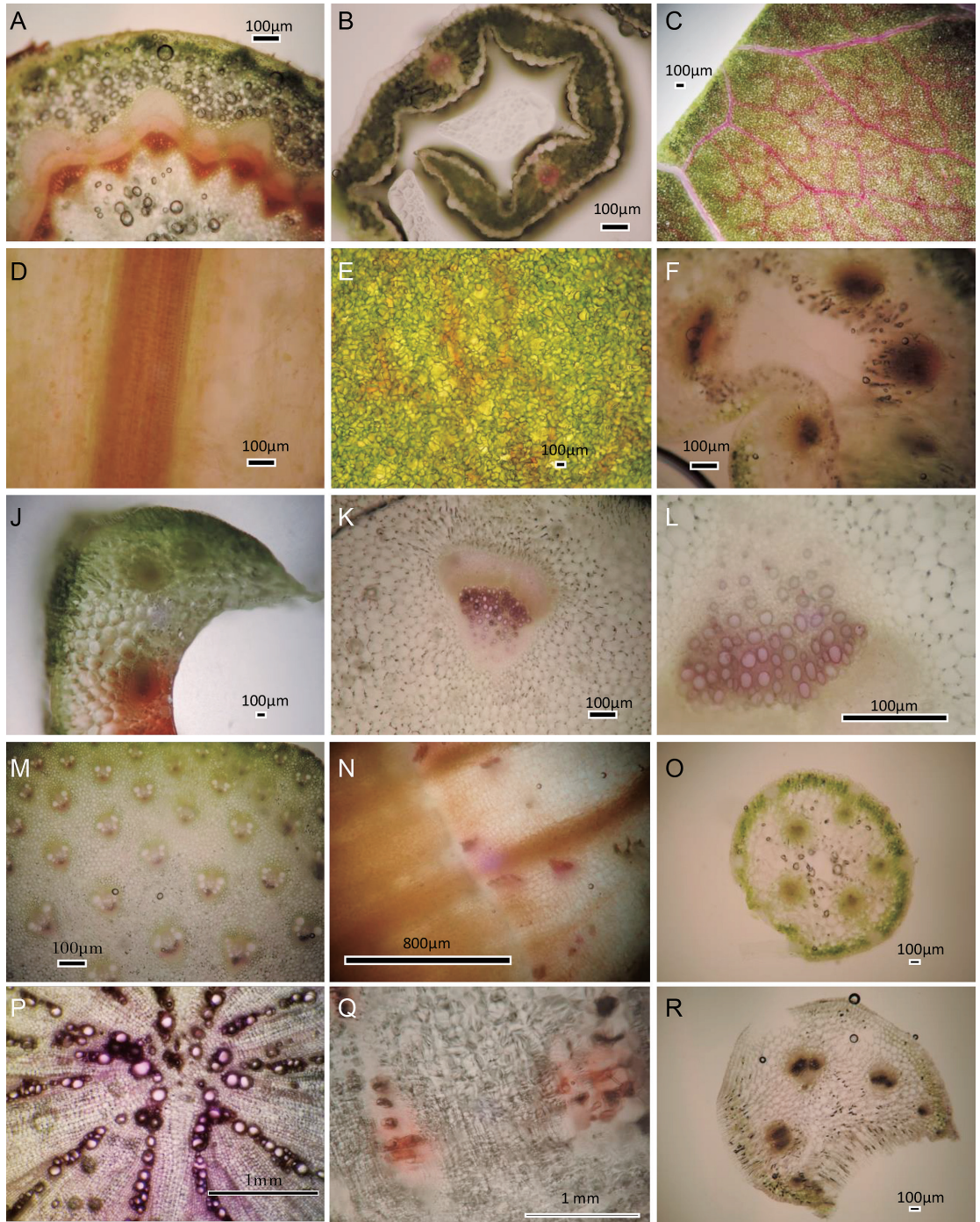


図2 インク液の吸収実験

ヤツデ (A-C), ホウレンソウ (D-F), セロリ (J-L), アスパラガス (M), ニンジン (N), ミツバ (O), ゴボウ (P), ダイコン (Q), ミズナ (R) の根元からインク液を吸収させ約 20 分後に観察した。茎の横断切片 (A, J, M, O, R), 茎の縦断切片 (D), 根の横断切片 (N, P, Q), 葉の横断切片 (B, F), 葉の葉脈 (C, E) の様子を示した。スケールバーは 100µm (A-M, O), 800µm (N), 1mm (P, Q)。

20)。ゴボウ、ダイコンの根においてもインク液の染色は導管で観察された(図2P, Q)。ミズナの茎においてもインク液の染色は維管束で観察された(図2R)。これらのことから、植物の種類に関わらず、インク液は茎の根元から維管束の導管を介して吸収され、地上部へと輸送されると考えられた。また、いずれも根元からインク液に浸して20分後には地上部での染色が観察されたことから、インク液の吸収速度には植物間で大きな差はないことが確認された。インク液を用いた実験では根がついたままの植物は用いなかったため、インク液が根からも吸収されるかは分からない。しかし、絵具液は根を切断した植物に24時間吸収させても染色が観察されなかったことを踏まえると、今回用いたインク液は植物が吸収しやすい状態に改良されていると考えられた。

3. 野菜における鉄局在の観察

植物は必須元素を主に根から吸収して葉や実など必要な部位へ輸送して利用している。これらの必須元素は私たち人が食べる可食部に蓄積するが、その蓄積は一様ではない。人が必須元素を効率的に摂取するためには、植物が可食部のどの部位に必須元素を蓄積するのか知ることが重要である。そこで、必須元素のうち鉄に着目して、野菜の可食部における鉄の局在を観察する実験を行った。

鉄のベルリン青染色により、キュウリ、オクラ、サヤエンドウ、ピーマン、プラム、キウイフルーツ、サプリ米(ハウス食品)における鉄局在を調べた(図3)。市販の野菜を水洗いした後、包丁あるいはカミソリで鉄局在を調べたい断面が現れるように切断した。サプリ米は切断せずにそのまま用いた。試料をシャーレに入れ、ベルリン青染

色液(4%塩酸, 4%ヘキサシアノ鉄酸塩を等量混ぜたもの)を加えて約20分間静置した後、超純水で洗浄し、光学顕微鏡で観察した。キュウリ、オクラ、ピーマン、プラム、キウイフルーツ、サプリ米は、染色前(図3A, B, J-L)に比べ、染色後(図3D, E, M-O)に青い染色が沈着しているのが観察された。キュウリの実では、青い染色は種子の周りに濃く観察された(図3A)。しかしながら、この濃い染色は1つのサンプルでのみで観察され、他のサンプルでは染色前と比べて明確な変化は観察されなかった。オクラの実では、青い染色が実全体で一様に観察された(図3E)。ピーマンの実では、細胞と細胞の間隙で青い染色が観察された(図3M)。プラムの実では、一部の細胞の内部において一様に染色が観察された(図3N)。キウイフルーツの実においては、青い染色は数個の細胞で観察された(図3O)。サヤエンドウでは、明確な染色は観察されなかった(図3C, F)。サプリ米では、青い染色が染色後約5分で観察され(図3P)、約30分後には種子の表面が真っ青になるほど強く観察された(図3Q, R)。鉄は植物内において一様ではなく局在していることが示されている。例えばイネの種子中では、鉄は胚乳に比べてぬかやアリューロン層に多く局在しているため、白米より玄米の方が鉄濃度は高い(Ishimaru et al. 2010)。今回調べたキュウリ、オクラ、ピーマン、プラム、キウイフルーツにおいても、鉄は局在していると考えられたが、染色パターンに再現性がなく、傾向はつかめなかった。一方で、サプリ米は、人工的に鉄を表面に添加してあるため、種子表面で強い染色が見られた。キュウリ、オクラ、ピーマン、プラム、キウイフルーツにおける局所的な鉄の濃度はサプリ米で添加された鉄濃度よりも低かったため検出が安定しなかったと考えられた。鉄のベルリン青染色の検出限界

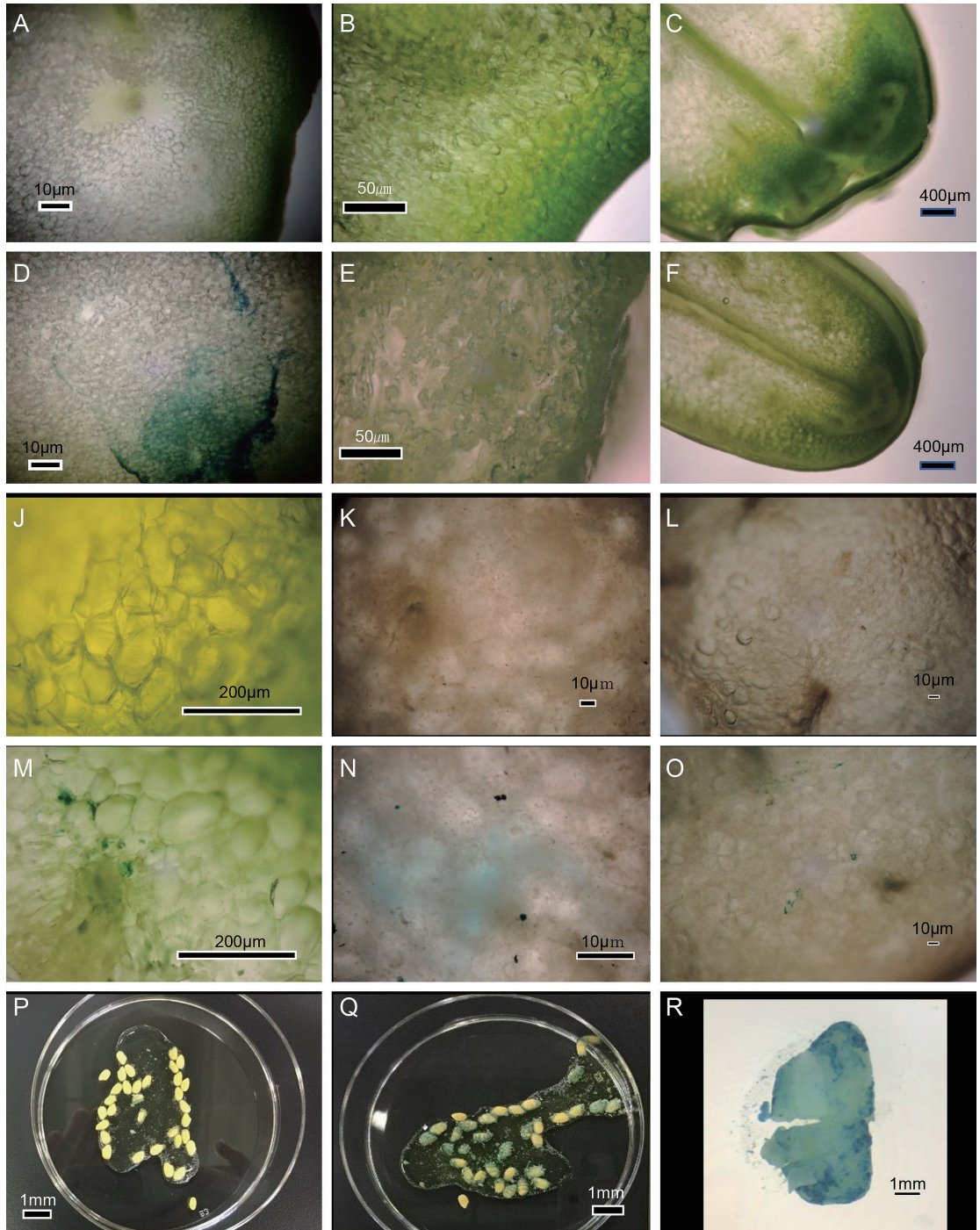


図3 鉄染色実験

キュウリ (A, D), オクラ (B, E), サヤエンドウ (C, F), ピーマン (J, M), プラム (K, N), キウイフルーツ (L, O), サプリ米 (ハウス食品; P-R) を用いて鉄染色実験を行った。(A-C, J-L) 鉄染色を行う前の野菜の組織。(D-F, M-R) 鉄染色液に浸して約5分後 (P), 約30分後 (D-F, M-O, Q-R) の組織。スケールバーは10 μ m (A, D, K, L, N, O), 50 μ m (B, E), 200 μ m (J, M), 400 μ m (C, F), 1mm (P-R)。

を高める手法も考案されている (Roschztardtz et al. 2009) が、授業時間の 90 分以内で実験を終えることは難しく、効果的に鉄染色実験を行うためにはさらなる工夫が必要である。

4. 植物の細胞の観察

植物だけではなく、地球上に存在する全ての生き物は細胞からなる。植物は動物と異なり動けないため、環境の変化に適応するための構造や機能を備えている。細胞の内部には原形質流動と呼ばれる動きがあり、細胞内での物質の輸送に重要な役割をしている。また、細胞内部を満たす溶液濃度が光合成などにより変化すると、細胞の大きさが変化する原形質分離が生じ、これにより植物全体の水分調整が行われていると考えられている。植物細胞の観察を通して、植物の機能を体験する実験実習を行った。

4-1. 植物細胞の核染色実験

タマネギの表皮細胞及び、トウモロコシの根細胞を酢酸カーミン溶液で染色し、観察した (図4)。タマネギ、トウモロコシともに縦長の細胞の中に一つずつある丸型の構造が赤く染色され、これが核であると考えられた。タマネギの表皮細胞においては、核の中が一様に染色され、染色体は確認できなかった (図4A)。一方、トウモロコシでは、一部の核の中で染色体様構造が観察された (図4B)。トウモロコシの根の根端の分裂域を観察したため、細胞分裂過程の細胞が含まれていたためと考えられた。

4-2. 植物細胞における原形質流動の観察

水草の一種であるクロモの葉とタマネギの表皮細胞を光学顕微鏡で観察し原形質流動を確認した

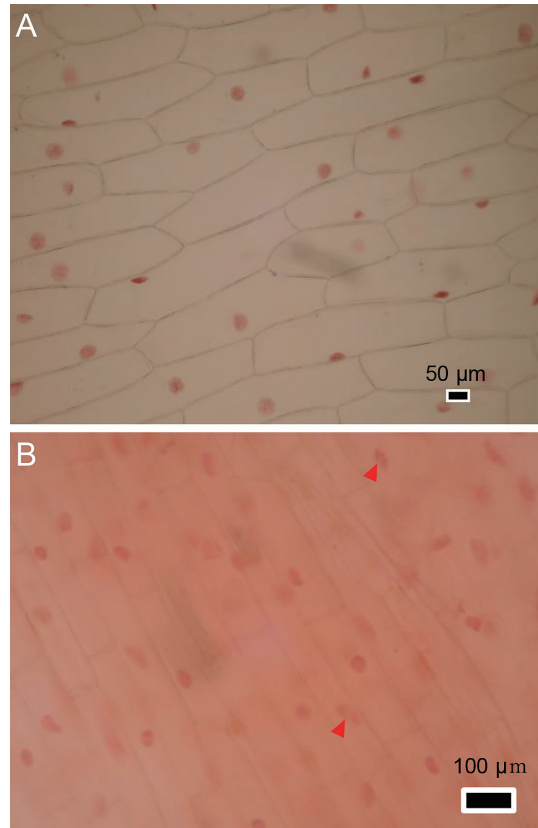
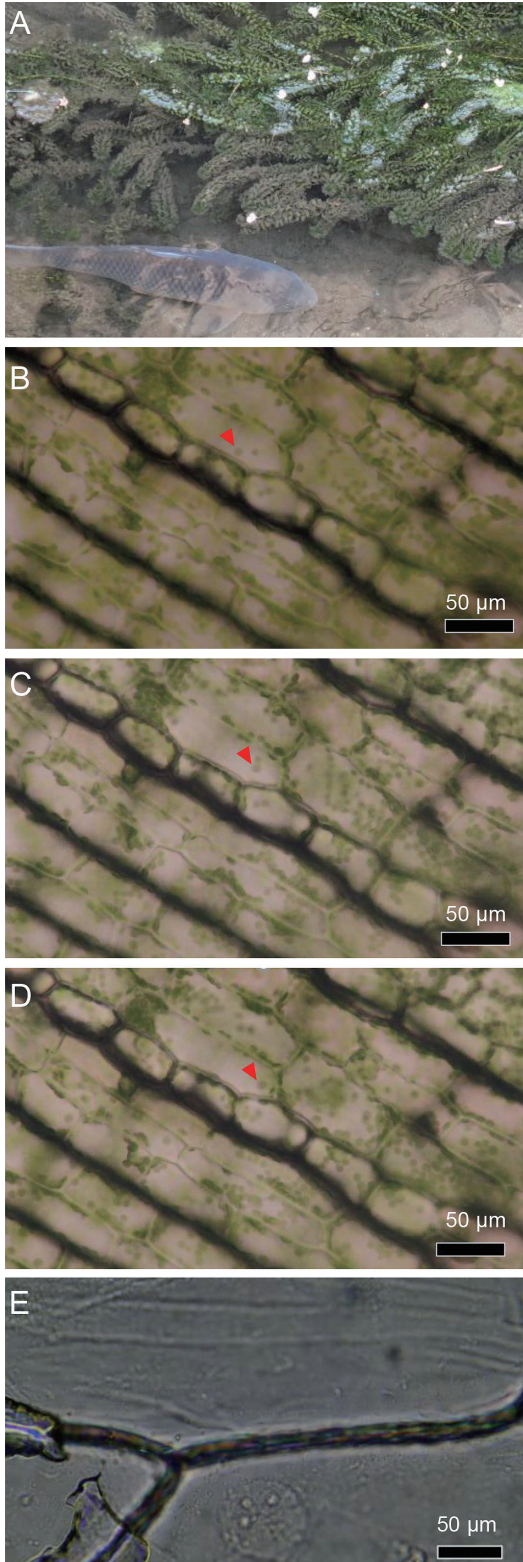


図4 植物細胞の核染色実験

タマネギの表皮細胞 (A)、トウモロコシの根細胞 (B) を酢酸オルセイン溶液で染色して観察した。染色体様構造 (矢印) が観察された。スケールバーは 50 μ m。

(図5)。クロモは神奈川県で採取したものをを用いた (図5A)。クロモの葉では、葉緑体が細胞壁に沿って動く様子が観察された (図5B-D)。葉によって活発に動いているときとあまり動きが見られない場合があり、茎の先端に位置する若い葉では活発に動く様子が確認された。タマネギの表皮細胞では、透明の顆粒が細胞の流れに沿って動く様子が観察された (図5E)。表皮により原形質流動が全く観察されない場合があり、細胞の状態が原形質流動に影響を与えていると考えられた。



4-3. 植物細胞における原形質分離

キュウリ、ナス、クロモ、タマネギにおける原形質分離を観察した(図6)。キュウリの実(図6A, B)、ナスの実(図6C, D)、クロモの葉(図6E)、タマネギの表皮細胞(図6F)に細胞内部を満たす溶液よりも高張な飽和食塩水を与え、光学顕微鏡を用いて観察した。いずれの植物細胞においても、飽和食塩水を与える前より細胞の大きさが小さくなり、原形質が細胞壁から離れて間隙が生じ、原形質が分離している様子が観察された。飽和食塩水に浸したのち、蒸留水に浸すことにより、細胞の大きさが元に戻る原形質復帰が観察できるか試みたが、いずれの植物細胞においても、原形質は分離したままで細胞の大きさは元に戻らなかった(データは示さない)。飽和食塩水は細胞内の溶液と極端に濃度が異なるため、細胞の機能が破壊された可能性が考えられた。

図5 植物細胞における原形質流動の観察

実験に用いたクロモ(A)。クロモの葉(B-D)とタマネギ(E)で観察された原形質流動。観察はじめ(B)、11秒後(C)、30秒後(D)の様子。葉緑体(赤矢印)が細胞内を動く様子が見られた。スケールバーは50 μ m。

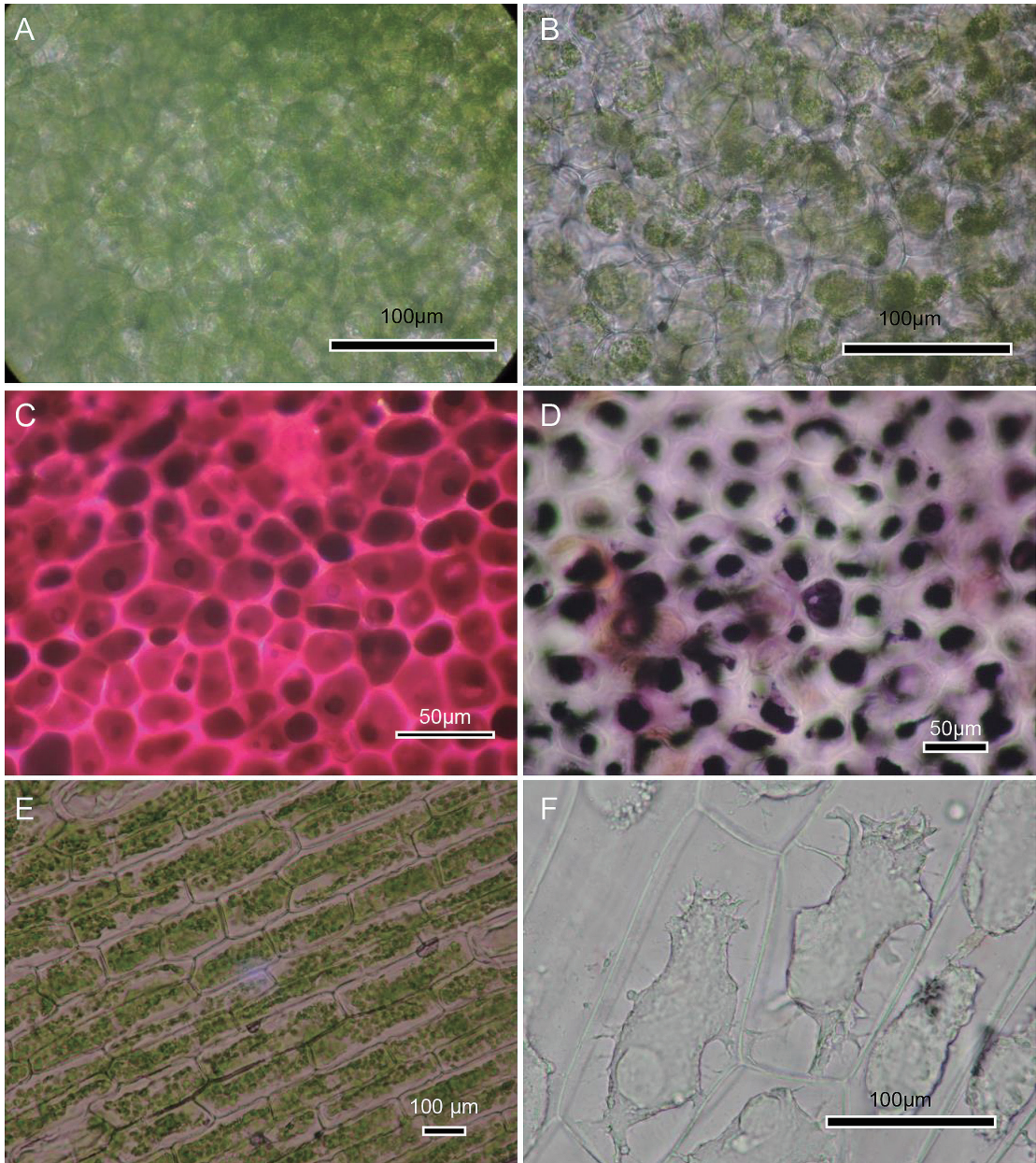


図6 植物細胞における原形質分離

飽和食塩水に浸す前のキュウリ (A) とナス (C) の細胞。飽和食塩水に浸して5分後のキュウリ (B), ナス (D), クロモ (E), タマネギ (F) の様子。原形質が収縮し、細胞壁との間に隙間ができている様子が観察された。スケールバーは100 μ m (A,B), 100 μ m (C,D)。

7. 終わりに

明治学院大学において行った、植物の栄養獲得や機能に関わる仕組みを調べる実験実習について報告した。実験内容は簡便なものであったが、いずれも目的に応じた結果を得ることができた。ただ、学生が実験を行う際に、「これが正解ですか？」や「失敗か成功か？」で結果をとらえる視点が多かったことが気がかった。科学的なアプローチとは、自分が持った謎を、実験を介して明らかにするものであり、社会で通説的に言われていることも正しいとは限らない。新しい実験により修正される可能性があるものである。そのため、通説を信じるのではなく、自らが観察したこと、実験を通して得られた結果から、物事を考える視点が非常に重要である。今後の実習において、この科学的思考をできるような工夫をしていきたい。

引用文献

- Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, Takahashi M, Kakei Y, Suzuki K, Nakazono M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2009) Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron (III) -deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *J Biol Chem* 284 (6):3470-3479. doi:10.1074/jbc.M806042200
- Ishikawa S, Ishimaru Y, Igura M, Kuramata M, Abe T, Senoura T, Hase Y, Arao T, Nishizawa NK, Nakanishi H (2012) Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(47):19166-19171. doi:10.1073/pnas.1211132109
- Ishimaru Y, Masuda H, Bashir K, Inoue H, Tsukamoto T, Takahashi M, Nakanishi H, Aoki N, Hirose T, Ohsugi R, Nishizawa NK (2010) Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the long-distance transport of iron and manganese. *Plant J* 62(3):379-390. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04158.x
- Koike S, Inoue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J* 39 (3):415-424. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02146.x
- Marschner H (1995) *Functions of Mineral Nutrients-8: Macronutrients*.
- Masuda H, Usuda K, Kobayashi T, Ishimaru Y, Kakei Y, Takahashi M, Higuchi K, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2009) Overexpression of the barley nicotianamine synthase gene HvNAS1 increases iron and zinc concentrations in rice grains. *Rice* 2(4):155-166
- Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, Takahashi M, Sato Y, Sato Y, Uozumi N, Nakanishi H, Nishizawa NK (2011) Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *J Biol Chem* 286(7):5446-5454. doi:10.1074/jbc.M110.180026
- Ogo Y, Itai RN, Kobayashi T, Aung MS, Nakanishi H, Nishizawa NK (2011) OsIRO2 is responsible for iron utilization in rice and improves growth and yield in calcareous soil. *Plant molecular biology* 75 (6):593-605
- Rai H, Kawabata M (2020) The Dynamics of Radio-Cesium in Soils and Mechanism of Cesium Uptake Into Higher Plants: Newly Elucidated Mechanism of Cesium Uptake Into Rice Plants. *Frontiers in Plant Science* 11:528
- Roschztardt H, Conéjéro G, Curie C, Mari S (2009) Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the Arabidopsis embryo. *Plant physiology* 151 (3):1329-1338
- Takagi S, Nomoto K, Takemoto T (1984) Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *Journal of Plant Nutrition* 7(1-5):469-477
- Takahashi M, Nakanishi H, Kawasaki S, Nishizawa NK, Mori S (2001) Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature biotechnology* 19(5):466-469
- 井口智文, 山本千晶, 五十嵐友里 (2016) 植物の水の通り道を調べる実験の改良. 宇都宮大学教育学部研究紀要 第2部(66):1-11
- 山田真子, 渡邊重義, 日詰雅博 (2014) 小学校理科における植物の水の通り道を調べる実験に関する研究. *生物教育* 54 (2):84-93