

菌根共生における元素輸送：細胞学的研究と表面分析

Elemental Movements in Mycorrhizal Symbioses:
Cell Biological Approaches and Surface Analyses

久 我 ゆかり

Yukari Kuga

広島大学大学院総合科学研究科

要 旨 菌根は糸状菌（菌根菌）が植物の根の表面、細胞間あるいは細胞内に定着して形成する共生器官である。菌根菌は土壌から生体に必要な元素を吸収して宿主植物に渡し、一方植物から炭素化合物を受け取る。本共生における物質輸送は、大きく、土壌中菌糸（外生菌糸）と根内菌糸（内生菌糸）の間の長距離輸送、菌根内における菌糸と植物の間の交換、植物における葉と根の間の長距離輸送の3つの区分に分けられる。真核生物間の共生であり、定着のタイミング・部位・量・プロセスなど変動要因があるため、菌根における物質輸送を理解するためには共生体・組織・細胞・細胞小器官の各階層での解剖学的アプローチが必要である。菌根共生における物質輸送を樹脂包埋法と表面分析法を組み合わせて細胞レベルでのイメージング解析した例として、カドミウムのマイクロ蛍光 X 線分析 (μ XRF) および生体元素の安定同位体を用いた二次イオン質量分析 (SIMS) について紹介する。

キーワード：菌根共生、元素輸送、 μ XRF、SIMS、細胞内局在

1. はじめに

菌根は糸状菌が植物の根の表面、細胞間あるいは細胞内に定着して形成する共生器官である¹⁾。菌根共生では、一般に、根から土壌に伸びた菌糸（外生菌糸）が土壌由来のリン (P)、窒素 (N) 等元素を吸収し、菌根内の菌糸（内生菌糸）を通じて宿主に渡し、一方宿主からは炭素化合物を受け取る（図 1）。最も古い陸上植物化石にすでに菌根様構造が存在し²⁾、また現生陸上植物のほとんどすべての種がなんらかの菌根を形成することなどから、植物は菌根菌と共進化したと考えられている。植物にとって菌根菌は養分吸収器官である根の延長であり、一方菌根菌にとっては炭素化合物を植物から直接受け取ることで他の土壌環境に生息する従属栄養生物との競争を避けることができる。さらに菌糸から土壌への有機炭素の供給の役割は大きく、一次生産を支える土壌生態系の主要な構成要員となっている。菌根には形態の特徴から7つの型があるが、根の表皮の外側と細胞の間に定着し、細胞の中に菌糸は入らない型（外生菌根）、細胞の中に入り込む型（内生菌根：アーバスキュラー菌根、ラン型菌根、ツツジ型菌根）および両者の特徴を併せ持つ型（内外生菌根、アプトイド型、ジャクジョウソウ型）に大別することができる³⁾。植物細胞内の菌糸構造は非常に細かく分枝した樹のような形（樹枝状）や、コイル型、ペッグ型などあるが、いずれも宿主の細胞膜由来の膜に囲まれており、真の意味で細

胞内共生ではない（図 2）。

2つの真核生物が関わる菌根における物質輸送は、植物および共生菌が単独で環境から獲得した元素の化合物を菌根まで輸送する長距離輸送と、菌根内で起きる植物と菌との間の元素の受け渡しの比較的短距離の輸送に分けられる。前者は、植物が固定した炭素化合物の葉から根への輸送および土壌中に伸びた菌糸（外生菌糸）から植物の組織の中の菌糸（内生菌糸）への輸送である。後者は、内生菌根の場合、植物の細胞内の菌糸構造は宿主の細胞膜と、また細胞間菌糸は植物細胞壁と接しており、菌の細胞壁と細胞膜を介して物質の受け渡しが行われる（図 1）。菌根における物質輸送には生体元素以外の有害物質も関わるため、菌根菌の役割を理解することは重要な課題となっているが、両共生体はともに細胞膜や細胞内小器官をもつ多細胞真核生物であり、内生菌根の場合は特に定着の時期・部位の特定が困難であり、また細胞内菌糸構造は形成から崩壊まで比較的短時間で推移する。さらに、菌根菌の定着は環境因子に影響を受ける。以上のように、複雑系である菌根共生における物質輸送を理解するためには細胞・組織等の特徴を把握したうえで解析を行う必要があり、表面分析法の面分析は有力な手法である。

本稿では、菌根共生における共生体間・細胞内の物質輸送を細胞学的に可視化した2つの研究、1) アーバスキュラー菌根におけるカドミウム (Cd) のマイクロ蛍光 X 線分析 (μ XRF) によるイメージング解析⁴⁾、2) ランの共生プロトコームにおける炭素 (C) と N の二次イオン質量分析 (SIMS) によるイメージング解析⁵⁾、について紹介する。

〒739-8521 広島県東広島市鏡山 1-7-1
2016年1月20日受付

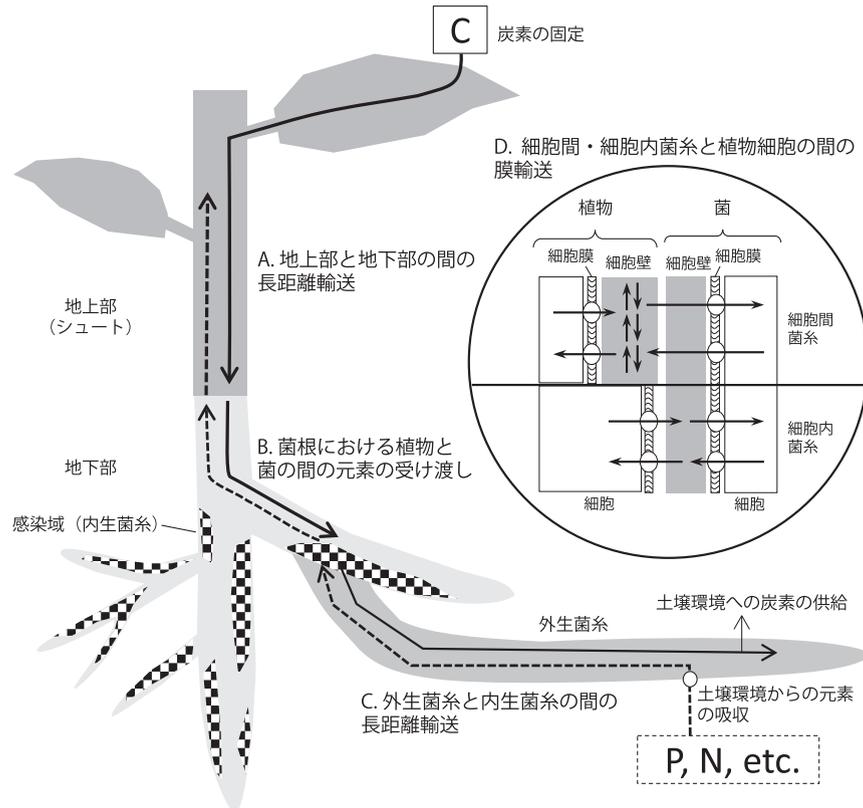


図1 菌根共生における輸送の3つの区分と膜輸送の模式図。A. 植物のシュート（茎と葉）と地下部の長距離輸送；B. 菌根における植物と菌の間の元素の受け渡し；C. 外生菌糸と内生菌糸の間の長距離輸送；D. 細胞間および細胞内菌糸と植物細胞の間の膜輸送。

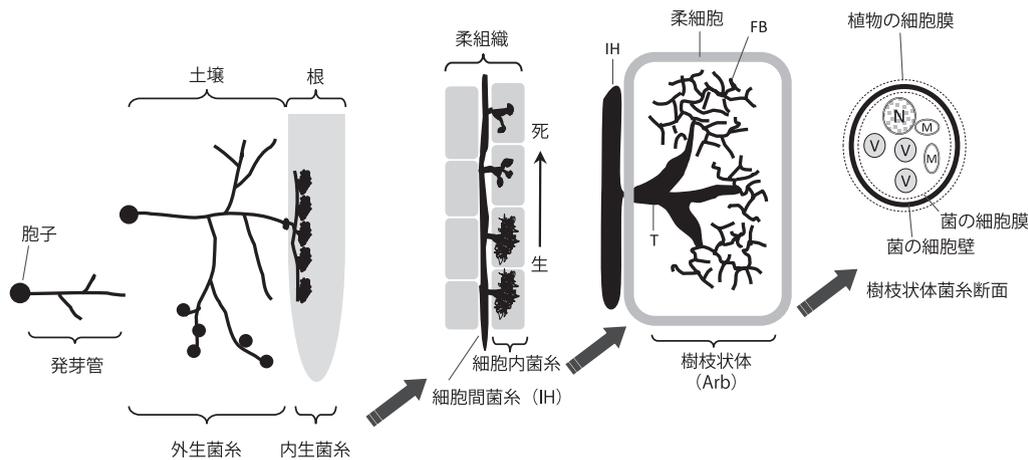


図2 アーバスキュラー菌根における細胞間および細胞内菌糸（樹枝状体）の模式図。根における定着場所はランダムであり、定着量は土壌リン酸濃度など外的環境により影響を受ける。組織における樹枝状体の形成と崩壊過程は細胞ごとに進む。樹枝状体は細胞に侵入した太い菌糸（trunk hyphae, T）と細かく枝分かれした菌糸（fine branch, FB）で構成されるが、これらはすべて宿主の細胞膜由来の膜に覆われており、厳密には細胞外である。

2. アーバスキュラー菌根におけるPおよびCdの輸送

真菌の液胞は管状と嚢状からなる動的な構造であり⁶⁾、アーバスキュラー菌根菌ではとくに発達している⁷⁾（図3a）。菌根菌による植物へのPの供給効果は重要であるが、菌が土壌から吸収したリン酸は液胞に輸送され、ポリリン酸として

集積することが明らかとなっている⁸⁾（図3b）。液胞内容物の輸送の有無／機作は不明であるが、宿主に渡されるリン酸源として重要であると考えられている。一方、生物は環境中から生体に有害なCd、ヒ素等の元素を吸収し、ある程度集積する。植物においては安全な食料生産、あるいは土壌汚染物質の除去への利用の側面から重要であり、Cdの集積における菌

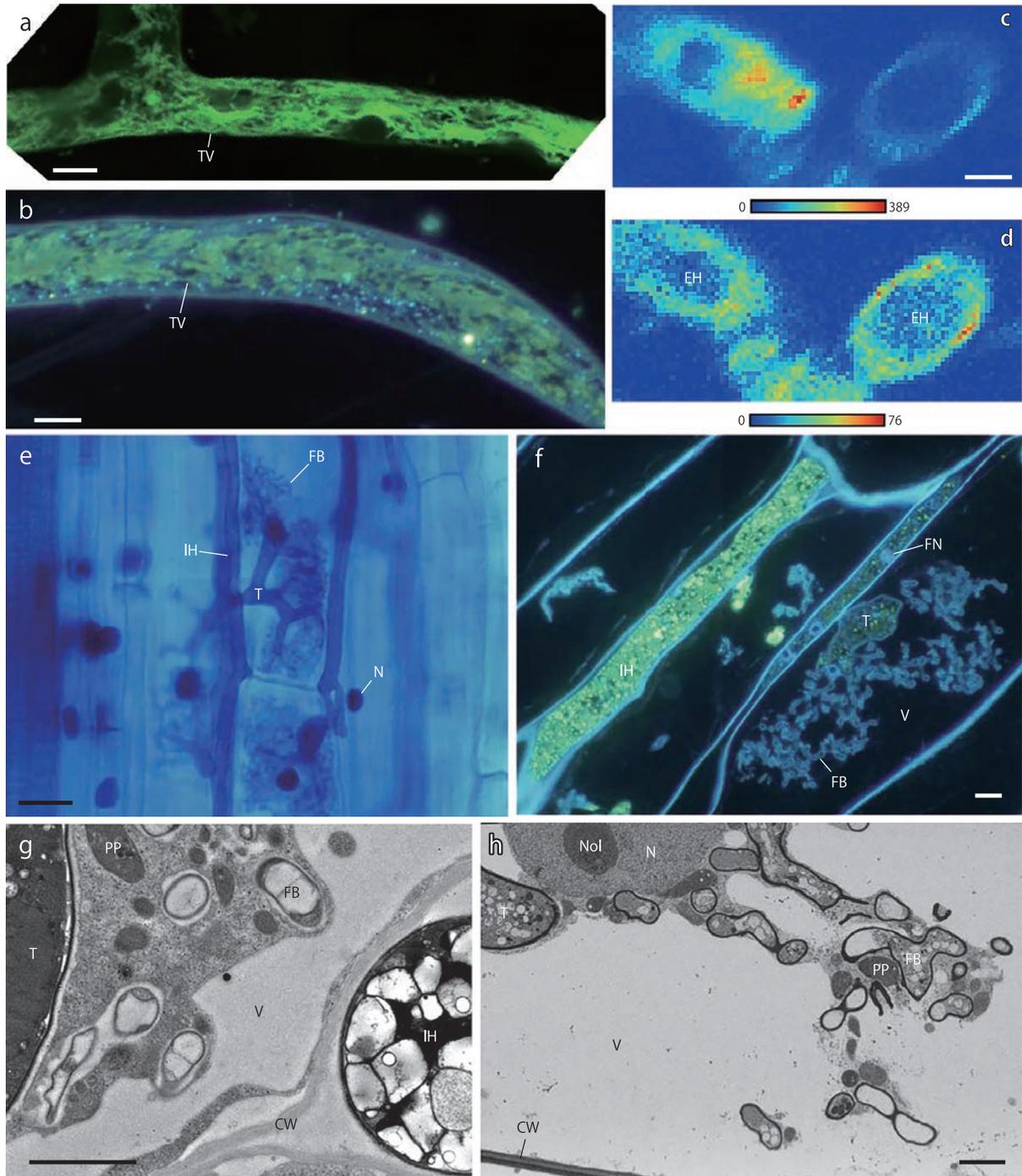


図3 アーバスキュラー菌根菌の発芽管 (a & b, *Gigaspora margarita*), 外生菌糸 (c & d, *G. margarita*, EH) および菌根 (e-h, タマネギー-*G. margarita*; h, ミヤコグサ-*Rhizophagus irregularis*). a. DFFDA で生体染色した発芽管の共焦点レーザー顕微鏡像。管状液胞 (TV, 緑) が発達している。Bar, 5 μm 。 b. 浸漬凍結-凍結置換した発芽管の準超薄切片を DAPI 染色した落射蛍光顕微鏡像。TV 中にポリリン酸 (黄緑色) が一様に存在している。細胞中の青色の小点は内生細菌を示す。Bar, 5 μm 。 c & d. SPring-8 BL37XU によるカドミウム (Cd) を添加した EH (浸漬凍結-凍結置換-樹脂切片) の Cd (c) および亜鉛 (Zn) (d) の μ 蛍光 X 線イメージング。Cd は菌糸の細胞壁、細胞質および液胞で検出されるが、液胞に集積している (左の菌糸断面)。一方、土壌由来の Zn は細胞壁に多く、Cd と異なる局在を示す。Bar, 5 μm 。 e. 菌根全体を固定-アルカリ処理透明化-トリパンブルー染色した光学顕微鏡像。細胞間菌糸 (IH) と細胞内に侵入して形成している樹枝状体を構成する trunk hypha (T) と fine branch (FB)。N, 植物の核。Bar, 20 μm 。 f. DAPI 染色した菌根樹脂切片の落射蛍光顕微鏡像 (化学固定後浸漬凍結-凍結置換-樹脂包埋)。黄緑の蛍光を発するポリリン酸は内生菌糸の IH に多く、FB に少ない。FN, 菌糸の核。Bar, 5 μm 。 g & h. IH と樹枝状体 (T & FB) の微細構造。T および FB は宿主の細胞膜に囲まれている。g. パラフォルムアルデヒド- OsO₄ 二重固定-エタノール脱水-樹脂包埋超薄切片の透過型電子顕微鏡像。h. 集束イオンビーム-走査型電子顕微鏡により得た菌根の樹脂ブロック断面の低加速電圧によるインレンズエネルギー-選択後方散乱検出器像 (加圧凍結-凍結置換-樹脂包埋)。CW, 細胞壁; N, 核; Nol, 核小体; PP, 前色素体; V, 液胞。Bar, 2 μm 。

根の役割について報告されている⁹⁾。菌根菌の植物へのCd輸送の有無を明らかにするため、根箱法や区画法を用いてCdを菌根全体あるいは外生菌糸にのみ与えた試料を樹脂切片とし、Cdの局在を μ 蛍光X線分析(Spring-8, BL37XU)で観察し、輸送を解析した⁴⁾。

試料の固定・脱水は、外生菌糸は液化プロパンを用いた急速凍結-凍結置換、根は加圧凍結-凍結置換を用い、低粘性エポキシ樹脂(Spur)に包埋した。試料は準超薄切片をDAPI染色し、蛍光顕微鏡観察(UV励起, LP)により、形態および黄色蛍光を発するポリリン酸の集積を指標に健全な菌糸断面を選択した。次いで、連続した厚切り切片をポリプロピレン膜に熱展着し、① μ 蛍光X線によるイメージング(図3c, d)、②EDX-SEMによるPのマッピング、③DAPI染色によるポリリン酸の順に分析・観察を行った。

外生菌糸の μ 蛍光X線解析においてCdは細胞壁、細胞質、および液胞で検出されたが、特に液胞でポリリン酸とともに集積することが明らかになった。菌根の解析では、菌根全体処理の場合、Cdは植物の細胞壁、菌糸構造等に観察されたが、外生菌糸にのみ与えた場合は細胞間菌糸および樹枝状体等の内生菌糸構造(図3e-h)のみに局在していた。以上のことから、菌根菌の外生菌糸が土壌環境から吸収したCdは液胞等に集積しながら内生菌糸まで運ばれるが、Pのように積極的に宿主植物に渡されていないことが示唆された。

3. 安定同位体を用いた生体元素輸送の細胞小器官レベルの可視化⁵⁾

SIMS法は真空下で一次イオンビームを固体表面に照射し、叩き出された二次イオンの質量分析を行う技術である。SIMSには照射電流密度が大きく基本的に元素を検出するDynamic SIMSおよび同密度が小さく有機分子の同定が可能なStatic SIMSがあり、また二次イオン像取得法としてはそれぞれ走査型あるいは結像型があるが、いずれも全元素を検出可能で、高感度、かつ高い空間分解能を有し、同位体の局在を細胞小器官レベルで画像化することができる^{10,11)}。

ラン科植物の種子は胚と種皮のみからなるため、発芽には胚が成長して葉および根を形成するまでの期間があり、この間の生長をプロトコーム期と呼ぶ。自然界ではこの生長に必要なすべての栄養を共生菌に依存しており、これを共生発芽と呼ぶ。共生プロトコームの共生構造は菌根と相同で、菌糸が細胞内でコイル状になるが(菌毬)、一定時間を経過したあと崩壊する¹²⁾。ラン科の共生において、宿主の養分獲得機構が、菌毬が生きている間に起こるのか、消化の過程なのかは長い間議論されてきた。この対立する仮説に答えを出すため、菌根の最も重要な機能であるCおよびNの輸送について、安定同位体をトレーサーとしてSIMSで可視化することにより細胞学的に解析した⁵⁾。

共生プロトコームから伸長している菌糸のみに¹³C-グルコースおよび¹⁵N-硝酸アンモニウムを添加し、定法に従い樹脂包埋した。本研究では、真菌の炭素の貯蔵形態が脂質で

あるため、凍結置換法による溶出を避けるため化学固定を用いた。準超薄切片のTBO染色(図4a)あるいは超薄切片(図4b)により形態構造情報を取得し、連続する厚切り切片に金蒸着後、¹²C, ¹³C, ¹²C¹⁴N, ¹²C¹⁵Nの各画像を得た。次にImageJを用い、¹²C/¹³C(r13C), ¹²C¹⁴N/¹²C¹⁵N(r15N)の同位体比の画像を作成し、CおよびNの天然の安定同位体比(r13C, 約0.0108およびr15N, 約0.0037)より大きいことを指標として、添加した¹³Cあるいは¹⁵Nの輸送を解析した。細胞構造に着目したROI分析の例を図4I-pに示す。ROI分析の結果、生きている菌毬とそれを含む宿主細胞の同位体比との間に正の相関があり、この関係は組織内の場所に影響を受けないことが明らかとなった。一方、衰退過程の菌毬では急激な同位体比の上昇が観察されるとともに、宿主細胞の同位体比の上昇が観察された。以上のことから、菌毬の形成から成熟期および衰退期ともに宿主細胞に元素が輸送されるが、量的には後者においてもっとも多いことが明らかになった。また植物細胞では、非感染細胞の宿主細胞壁領域で安定同位体比の上昇が観察されたが、感染細胞では見られなかった。これらのことは、隣り合っている、感染の有無により各細胞の代謝および輸送が大きく異なることを示唆している。また、崩壊した菌糸塊の周囲に¹³Cのみの同位体比の上昇が観察され(図4c-j)、免疫電顕により宿主細胞壁成分が同部位に検出された研究の結果が支持された¹³⁾。本研究では、菌糸に同時に添加された13Cと15Nは菌糸中を運ばれ、植物細胞に渡された後、細胞内および細胞間で局在が異なることが示された。すなわち、生体成分の細胞内での同化・異化、細胞内輸送、膜輸送などの一端が、形態・解剖学的アプローチにより示されることが明らかとなった。

4. おわりに

元素を検出する表面分析法は多くが真空系であり、また表面の立体性が影響を与える場合があることなどから、樹脂包埋切片がこれに適している。樹脂包埋した試料は、連続切片の利用によりほぼ同じ構造で複数の分析が可能であり、微細構造観察により分析対象を確認することができる。一方、試料調整法が目的および目的物質の局在に影響を与えないことが重要である。例えば、液胞中のポリリン酸の存在形態は凍結法では一様であるが(図2b, f)、エタノール脱水により結晶化する。本研究では急速凍結-凍結置換-樹脂包埋法を用いたが、植物-菌共生体に与えたCdは両者に、一方菌糸のみに与えたCdは菌糸の中に局在していたことから、処理によるCdの組織内移動はなかったと考えられた。試料作製におけるアーティファクトを最小にすることが期待される方法として凍結法があるが、複雑な組織への適用が難しいことに加え、細胞構造情報の取得に弱点がある。生細胞の観察など現在有効な様々な手法を用い、各方法がもつ弱点を補いながら研究することが重要である。

本研究では、組織を摩砕し、抽出を行う方法では失われる元素の挙動を検出することができた。特に安定同位体のマッ

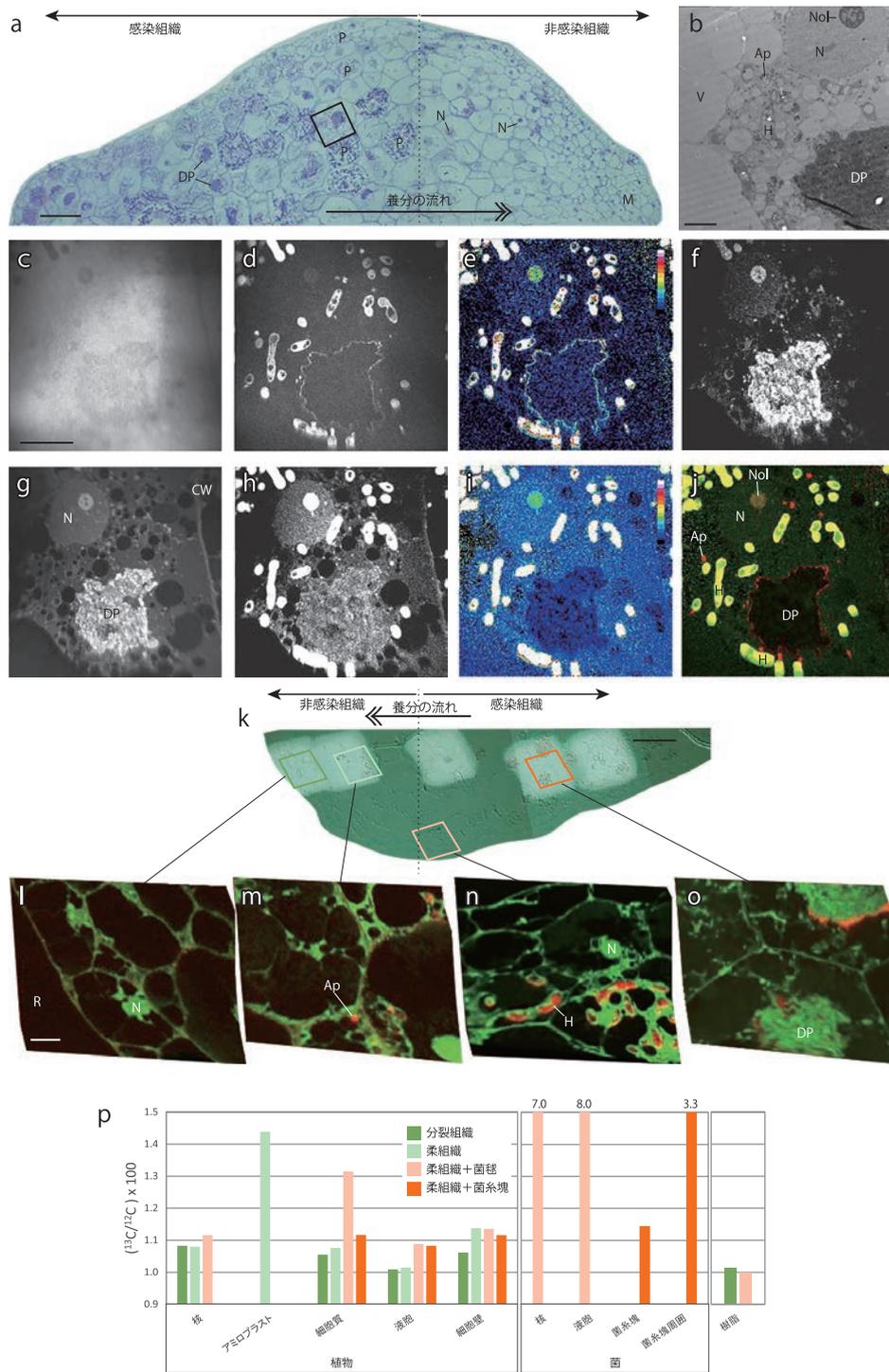


図4 SIMSによるラン共生発芽プロトコーム（ネジバナ—*Ceratobasidium* sp.）におけるCとNの輸送解析. a. プロトコーム（ラベル1日目）の樹脂切片のTBO染色像. 四角は同位体分析を行った場所をさす. Bar, 100 μ m. b. aの四角で囲った部位の透過電子顕微鏡像. Bar, 10 μ m. c-j. 同位体解析画像. 菌糸形成過程の細胞. ^{12}C (c), ^{13}C (d), $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ (r13C) (e), ^{32}S (f), $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ (g), $^{12}\text{C}^{15}\text{N}$ (h), $^{12}\text{C}^{14}\text{N}/^{12}\text{C}^{15}\text{N}$ (r15N) (i), r13C (赤)とr15N (緑)の重ね合わせ像 (j). アミロプラストおよび崩壊した菌糸の周囲でr13Cのみが上昇している. 核小体ではr13Cおよびr15Nともに特異的な上昇が観察される. Bar, 20 μ m. k-p. 外生菌糸に ^{13}C -グルコースを添加した共生プロトコーム（ラベル4日目）の同位体ROI分析. k. 分析後の樹脂切片の微分干渉顕微鏡像（例）. Bar, 100 μ m. l-o. k中に示されたエリア内のr13C (赤)とr15N (緑)の重ね合わせ像. l. 分裂組織, m. 菌の感染していない柔組織細胞, n. 形成中の菌糸を含む柔細胞, o. 崩壊した菌糸を含む柔細胞. p. l-oにおける植物と菌の構造のr13CのROI分析. 菌の感染していない分裂組織でr13Cが上昇しており, ^{13}C が輸送されている. r13Cは植物細胞構造では菌糸が感染していない細胞のアミロプラストで最も高く, 次いで形成中の菌糸を含む柔細胞の細胞質で高い. また崩壊した菌糸の周囲でr13Cが顕著に高い. l. Bar, 10 μ m. Ap, アミロプラスト; CW, 細胞壁; DP, 崩壊したコイル状菌糸（菌糸）; M, 分裂組織; N, 核; P, 菌糸, Nol, 核小体.

ピング解析では、今後、トレーサー化合物の設計や分子種を推定できる飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) などの組み合わせや、標識化合物に安定同位体ラベルを組みこむことにより、代謝に関わる分子・元素の挙動を細胞レベルで解析できる可能性があり、新規細胞解析法として期待される¹²⁾。

謝 辞

本研究は、名雪圭一郎氏 (現日本電子 (株))、陳保冬博士 (中国科学院)、大友量博士 (農研機構北海道農業研究センター)、坂本尚義博士、坂本直哉博士 (北海道大学)、斎藤雅典博士 (東北大学)、早川慎二郎博士 (広島大学)、寺田靖子博士 (JASRI)、長坂征治博士 (現東洋大学)、田邊栄司博士 (広島県立総合技術研究所)、Dr. A. Schertel (Carl Zeiss, Germany) および Dr. François Hillion (Cameca, France) の協力を得て行った。本研究は JSPS 科研費 22380045, (財) 鉄鋼業環境保全技術開発基金 2008-09SR2-304, JASRI ナノテクノロジー総合支援プロジェクト (2008A1695/BL37XU, 2008B1798/BL37XU, 2009B1746/BL37XU) により行った。

文 献

1) Smith, S.E. and Read, D.J.: Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn. Aca-

- demic Press, Cambridge (2008)
- 2) Taylor, T.N., Remy, W., Hass, H. and Kerp, H.: *Mycologia*, **87**, 560–573 (1995)
 - 3) Peterson, R.L., Massicotte, H.B. and Melville, L.H.: *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. CABI Publishing, Wallingford, UK (2004)
 - 4) Nayuki, K., Chen, B.D., Ohtomo, R. and Kuga, Y.: *Microbes Environ.*, **29**, 60–66 (2014)
 - 5) Kuga, Y., Sakamoto, N. and Yurimoto, H.: *New Phytol.*, **202**, 594–605 (2014)
 - 6) Ashford, A.E. and Allaway, W.G.: *Plant Soil*, **244**, 177–187 (2002)
 - 7) Uetake, Y., Kojima, T. and Saito, M.: *New Phytol.*, **154**, 761–768 (2002)
 - 8) Kuga, Y., Saito, K., Nayuki, K., Peterson, R.L. and Saito, M.: *New Phytol.*, **178**, 189–200 (2008)
 - 9) Chen, B.D., Liu, Y., Shen, H., Li, X.L. and Christie, P.: *Mycorrhiza*, **14**, 347–354 (2004)
 - 10) 日本表面科学会, 二次イオン質量分析法, 195, 丸善, 東京 (1999)
 - 11) 坂本尚義: 顕微鏡, **41**, 134 (2006)
 - 12) Uetake, Y., Kobayashi, K. and Ogoshi, A.: *Mycol. Res.*, **96**, 199–209 (1992)
 - 13) Peterson, R.L., Bonfante, P., Faccio, A. and Uetake, Y.: *Can. J. Bot.*, **74**, 1861–1870 (1996)
 - 12) 久我ゆかり: 大熊盛也, 野田悟子 (編), 難培養微生物研究の最新技術Ⅲ—微生物の生きざまに迫り課題解決へ—, シーエムシー出版, 東京, 61–69 (2015)