

根の電気生理研究法

—ラボラトリーからフィールドへ—

岡本 尚・正木伸之

Electro-physiological Study of Tree Root System —From Laboratory into the Field—

Hisashi OKAMOTO* and Nobuyuki MASAKI**

* Mori Laboratory of Plant Physiology, 443-5 Enden,
 Mori-machi, Shizuoka, 437-0221 Japan

** Masaki Laboratory of Arboriculture, 729-2 Higashihara,
 Toyoda-cho, Shizuoka, 438-0802 Japan

Abstract

Theoretical back-ground and principle of electro-physiological method for the study of root physiology were reviewed. The applicability of a model of electro-physiological structure to the root system in the field was experimentally examined and discussed. A convenient system via a perfect liquid junction was developed for long term measurement of trans-root electric potential (TRP) in field trees. The electro-radicogram of a *kaki* tree (*Diospyros kaki*) showed a regular diurnal changes. The seasonal change in the potential level and in the amplitude of oscillation was observed, and discussed in relation to the root activity and the environment.

Key words : Electro-physiology of root system, Trans-root electric potential of a *kaki* tree, Electro-radicogram

序 論

筆者 (H.O.) は永年研究室内で主として高等植物の胚軸を材料にして、伸長成長機構の解明の手段として電気生理学的方法を開発し、常用してきた。根の硝酸吸収機構の解析を行った事もあるが、経験は少ない。定年になる数年前から両筆者の共同研究によって、野外の木本植物の樹勢診断の一つの手段として根の生理活性を非破壊的に計測する方法の開発を志してきた。

様々な制約から実験室内で開発された方法がそのままの形で野外で使えるとは限らない。例えば細胞膜電位そのものを直接計測するには、根の研究したい部位を切り出して適当な実験液中に置き、しっかりした力学的基礎のうえに固定された精密なマイクロマニピュレータを用いて、先端径が1 μ m程度の細胞内微小電極を細胞内に刺

入しなくてはならない。根の一部を切り出す事自体、すでに非破壊的計測ではなくなっている。しかしそのような精密且つ徹底した方法によって得られた理論的帰結、本文で紹介する電気生理学的構造の理論は、細胞内微小電極法の直接には使えない野外の樹木の問題を考える場合の仮説として、実験的研究を進めるための指針とすることはできる。この小論では実験室内での研究の概略とそこから得られた経験と理論に基づいて、電気生理学的実験にとっては制約の多い野外での非破壊計測法を開発してきたプロセスを紹介する。

1. 室内での研究

室内実験の有利な点は細胞内微小電極法が適用出来ることである。但し強固な細胞壁に囲まれた微小な植物細胞に電極を入れるには、動物細胞によく用いられる手動

* 森植物生理研究室 〒437-0221 静岡県森町円田 443-5

** 正木樹芸研究所 〒438-0802 静岡県豊田町東原 729-2

キーワード: 根系の電気生理, カキの木導管電位, 根電図

式のマニピュレータを安易に用いることは避けたほうが良い。我々は空気中で垂直に置かれた胚軸の導管灌流法 (Okamoto *et al.* 1984) による研究には、上下動のために顕微鏡のメカニカルフレームを土台とし、その上に在来型のマニピュレータの前後左右動ユニットを取り付け、細胞内に電極を刺す最終段は水圧駆動ユニット (一次元) を用いた。根に刺し入れるには材料を水平に置き、顕微鏡の微粗動ユニットのみを用いた。この様な工夫によって長時間、安定した測定結果が得られる。

これらの研究によると植物軸性器官の電気生理学的構造の基本は図-1 に示される。その特徴は

- (1) 柔組織細胞は導管を取り巻くディスク状のシンプラスト構造を形成している (Katou 1978)。
- (2) シンプラスト間には絶縁構造 (根の場合はカスパーリ線) があり、直接の外部環境であるアポプラストを導管側と器官表面側とに分ける。したがってそれぞれの側の膜電位は値が通常異なる (Okamoto *et al.* 1978, 79)。
- (3) それぞれの側のシンプラスト膜には呼吸依存性の外向き起電性プロトンポンプが存在し、膜電位の約半分はこの活動によって保たれている (Okamoto *et al.* 1978, 79, Mizuno *et al.* 1985, Katou and Okamoto 1992)。

図-2 にこのような系の anoxia (材料を閉じこめた空間に、99.998% の N_2 を流して一気に呼吸を止めること) に対する反応を示す。伸長帯では V_{px} の起電性成分の大きさが V_{ps} のそれと同程度あり、しかも両者の反応に時間差があるために、 $V_s = V_{px} - V_{ps}$ の反応に著しい二相性が生じる。

このような構造はオオバコ (*Plantago sp.*) の根系にも存在することがオランダの研究グループによって後に確認された。細胞内微小電極を用いない彼らの実験系では説明のつかなかった Trans-root potential (図-4 の V_x) の anoxia に対する二相性反応 (図 2-B の V_s の反応に相当する) が我々のモデルで完全に説明できることに気づいたからである (De Boer *et al.* 1983, De Boer and Prins 1985)。

この機構モデルが野外の樹木の根系にも適用出来るか否かを見極める前段階として、われわれはマツ苗の水耕系でモデル実験を行い、あわせてマツノサイセンチュウの感染の TRP に対する影響を研究した (Okamoto *et al.* 1994, 図-3, 4)。

2. 野外における実験

野外の樹木の根を対象とした非破壊的計測には今のところ細胞内微小電極法の応用は困難である (水耕栽培系

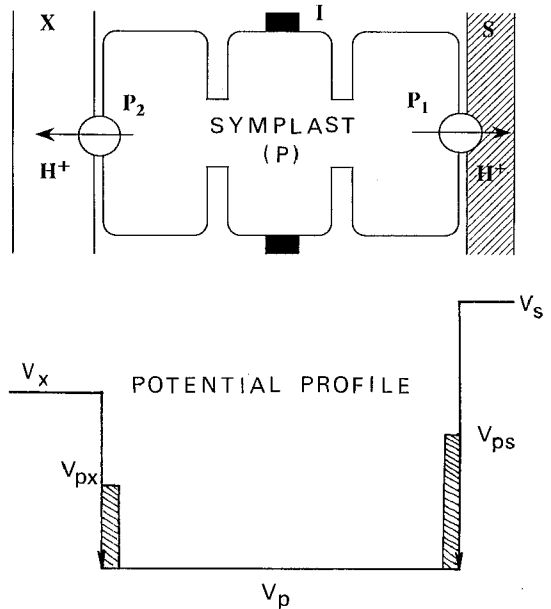


図-1 植物軸性器官の電気生理学的構造モデル: P, 原形質連絡でつながって形成されたシンプラスト; S, 器官表面側細胞壁; X, 導管; I, イオンと水に対する絶縁構造 (根の場合はカスパーリ線); P₁, 器官表面側プロトンポンプ; P₂, 導管側プロトンポンプ; V_x, 導管の電位; V_p, シンプラスト内の電位; V_s, 表面側細胞壁の電位; V_{px}, 導管側膜電位差 (斜線部分はプロトンポンプ活性で維持される起電性成分, anoxia で消滅する); V_{ps}, 器官表面側膜電位差 (斜線部分は同上)

Fig. 1 Electro-physiological model of plant axial organs: P, symplast; S, cell wall phase of organ surface; X, xylem vessel; I, insulating structure against movement of ions and water (e.g. Casparian strip in root); P₁, proton pump in the cell membrane of the organ surface; P₂, proton pump in the cell membrane of the xylem/symplast interface; V_x, electric potential of the xylem; V_p, electric potential in the symplast; V_s, that of the cell wall on the organ surface; V_{px}, membrane potential across xylem/symplast interface; V_{ps}, membrane potential across organ surface. Shadow parts mean the electrogenic activity which is reversibly extinguished by anoxia.

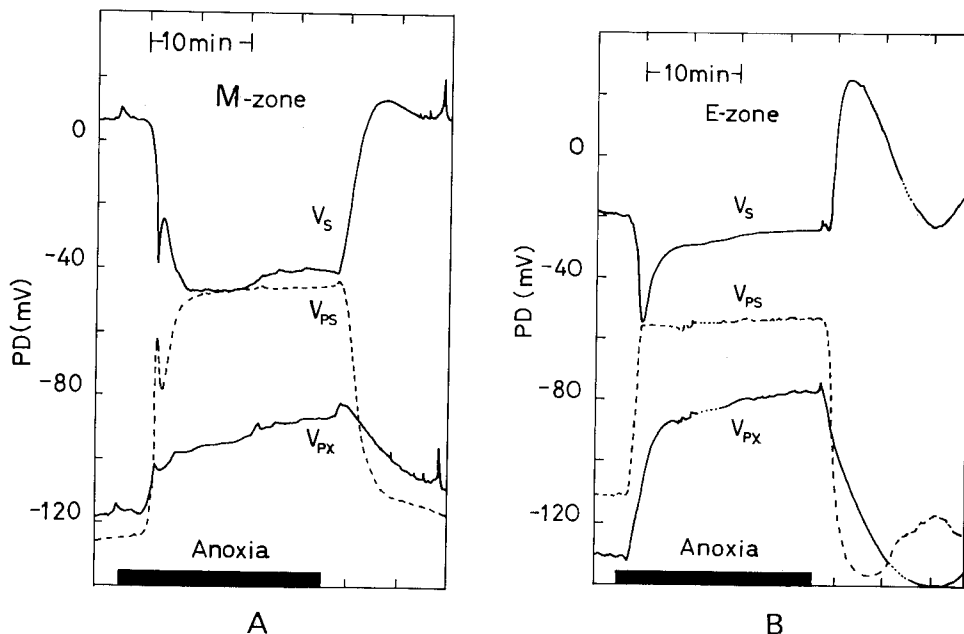


図-2 電位プロファイルを形成する3成分の anoxia に対する反応：A (M-zone), 既伸長帯；B (E-zone), 伸長帯 (Okamoto *et al.* 1978 より改変)。電位測定は $V_x (=0)$ を基準にしている。

Fig. 2 Anoxia reaction of the three components of the potential profile. A, mature zone; B, elongation zone of the *Vigna* hypocotyl in which bi-phasic reaction of V_s is observed because the V_{px} value is comparable with that of V_{ps} , but reacts slower than the latter.

から一本の根をマイクロコンピュータ下に出して測ることは可能かも知れない)。ここでは樹木根系の生理活性を地上から非破壊的に探る一つの試みとして導管電位 (Trans-root electric potential, TRP) を野外で長期連続測定できる実験系を開発した結果を報告する (図-5)。野外の現場での使用を考え、可能な限り簡単化した、正確な測定のために次の要件は守られている。

1. 植物体と計測器との接続は、分極による非生物的な電位差の発生を避けるために、完全な液絡系 (10 m mol/l KCl 液を満たしたチューブに注射針をつなぐ) と非分極性電極を介して行わねばならない。もちろんアース側も溶液アースとする (図-5 参照。素焼円筒の壁の微小孔を通して、10 mmol/l KCl 液が絶えず地中に浸出している。円筒内に入れた非分極性電極はインピーダンス変換器の電源の 0 電位点に接続されている)。
2. 測定対象の抵抗は時として数 MΩ に達することがあるので、インピーダンス変換器として入力抵抗が 10^{12} Ω 程度あるオペアンプ、例えば AD 515 (Analog Devices 社) を間に入れる (増幅率は 1 に定め、増幅は記録計に任せればよい)。エレクトロニクスを用いる計測の基本的常識であるが、測定器の

入力側から見た内部抵抗が、測定対象の抵抗より充分高くないと直流電圧誤差を生じる。100 倍で誤差約 1%、1,000 倍で誤差約 0.1% になる。

記録には横河電機製 $\mu R 1000$ 打点式 6 チャンネル記録計を主に用いた (記録紙送り速度 1 mm/h が可能)。またノイズ計測等、より速い連続的計測の必要な場合には同じく 2 チャンネル・ペンレコーダ (横河電機 3057 型) を用いた。野外移動用には Data Logger が適当である。例えば Datamark LS 2000 (白山工業) で野外記録を取り、コントロールソフト SR 2000 でコンピューターに入力、プリントアウトさせる。

導管電位の誘導には、図-1, 4 の「電気生理学的構造モデル」(岡本 1991, Katou and Okamoto 1992) が樹木に適用できることを前提にすると、マイクロな針を直接導管そのものに刺し入れる必要は無い。この前提はマツ苗を材料とした室内実験その他で次第に確かめられて来ている。マクロな注射針を絶縁構造を通過して木部に刺し入れ、生きた細胞があるとすればその何個かを破壊して、導管部アポプラストと液絡を取る事ができる。この方法の妥当性を示す実験結果を図-6 に示した。

10 mmol/l KCl 溶液を満たした注射針を導管部に刺すと必ず瞬間的に -140 mV を超える大きな負の電位が

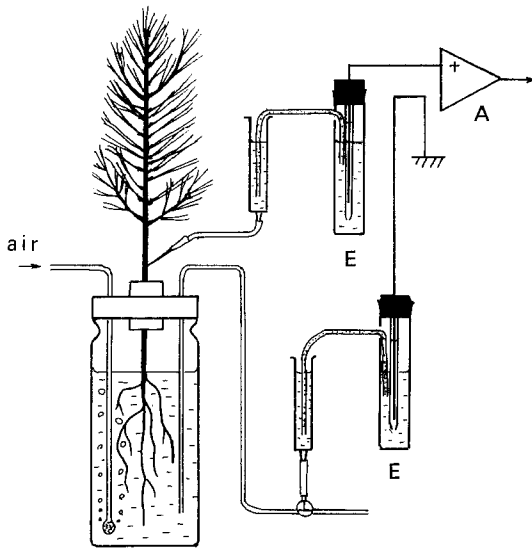


図-3 マツ苗の導管電位 (V_x , Trans-root potential) を計測する完全液絡系: E, 非分極性電極と, それを容れた容器

Fig. 3 An indoor system for the measurement of trans-root electric potential (TRP) of young pine plants with unpolarizable electrodes (E) and perfect liquid junctions.

観測されるが, この大きな TRP は最初急速に, ついでゆっくりと小さくなり, 何時間後にはほぼ一定のレベルに落ち着く。刺入の深さが深いほど時間がかかるが, 最終的に落ち着くレベルはほぼ同じである (図-6)。この現象は図-4 に示した電気生理学的構造モデルから容易に説明される。即ち刺入の刺激によって, 導管/シンプラスト界面の膜電位差が瞬間的に脱分極し, ついで次第に回復して行くと考えると合理的に理解出来る。この解釈が正しければ, 我々はこの現象を通じて本来は細胞内微小電極を用いなくとも直接測ることの出来ない二つの膜電位差について, その最小値をかきまみることが出来るのである (V_{px} が脱分極して一瞬 0 になれば, TRP は一時的にであるが V_{ps} に等しくなる)。

図-5 の方法による TRP の測定の安定度と, 外部環境の擾乱がどの程度のノイズを与えるかを図-7 に示す (豪雨の影響は恐らく根の周囲のイオン濃度の低下によるものであろう。強風は測定系, 材料双方に加わる機械的振動に起因すると想像する)。

また応用例として, 幹直径が 28 cm, 樹齢約 50 年の次郎柿の木 (写真) を対象とした, 2 年間の連続計測結果を下に示した。

1. TRP は四季をつうじて規則正しい日周期的振動

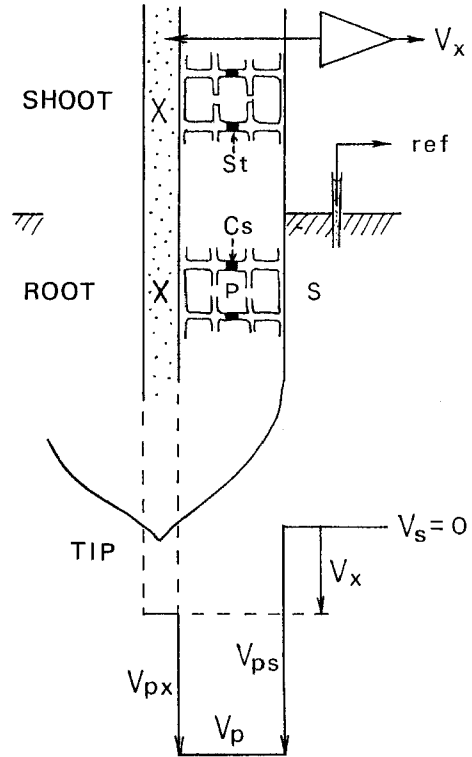


図-4 根の電気生理学的構造と導管電位 (TRP) の測定系 (模式図, Okamoto *et al.* 1994) 電位測定の基準は図-2 の場合とちがって $V_s (=0)$ におかれている。

Fig. 4 A scheme of the measuring system for the trans-root potential: P, symplast; Cs, Casparian strip; St, starch sheath; S, bulk water phase surrounding the root; ref., reference electrode (liquid earth in Fig. 5); V_x , electric potential in xylem apoplast with respect to S, = TRP; The other notations are identical with those in Fig. 1.

を示す (図-8)。このような図を根電図 (electro-radiogram または ERG) と呼ぶ。

2. その平均のレベルは, 根の成長が最少になる真冬と真夏に -70 mV の極小値を, 成長が最大になる春と秋に -30 mV の極大値を示す (図-9)。

3. ERG の振幅は, 今までカキでは 3 月頃とされてきた根の活動開始時期 (福井 1997) より早い節分の頃から大きくなる。早春, 開葉直前に最大 70 mV となり, 葉が完全に展開し, 蒸散の盛んな真夏から初秋にかけて最小 10 mV となる (図-10)。(95-96 年度の結果を 96-97 年度のそれと比較したとき, 落葉期の傾向はよく一致す

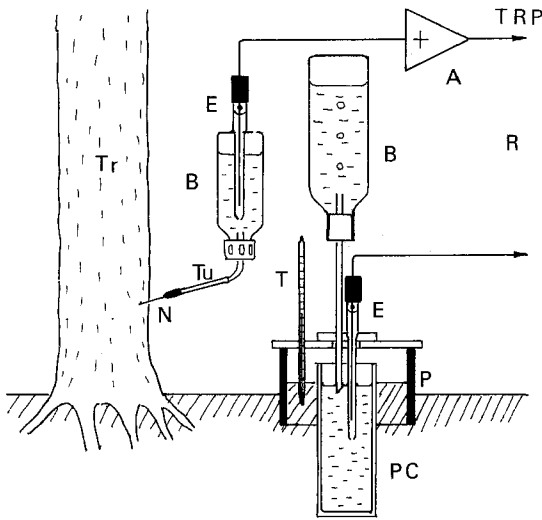


図-5 野外の樹木根系の導管電位 (TRP) の測定系: Tr, 幹; N, 注射針; Tu, フレキシブルな管; B, プラスチック容器; E, 非分極性電極 (pH メータ用比較電極, 2470-A10T 堀場-日立, 京都); T, 温度計; PC, 素焼円筒 (厚さ 5mm, 小平市津田, 岡本窯製); P, 硬質ビニール製円筒; A, インピーダンス変換器 (増幅率×1, 入力抵抗 $10^{12} \Omega$, オペアンプ AD-515 JH 使用); R, レコーダの入力端へ (Okamoto *et al.* JPR 1999 より)

Fig. 5 A measuring system for the TRP in a field tree; N, injection needle (0.6 mm); Tu, flexible tube; B, plastic bottle; E, unipolarizable electrode; PC, unglazed ceramic porous cylinder; A, impedance convertor

るが開葉期のそれにはかなりの差が認められる。これは 96-97 年度の春から夏にかけて著しく降雨が多かった為に、両年度の月平均振幅の差と月間降雨量の差との間には高い相関がある。図-11 参照)。

この方法の限界は言うまでもなく細胞内微小電極法と違って膜電位そのものではなく、特別な瞬間を除いて二つの膜電位の差しか測れない事である。しかし様々な考察から、これらの TRP の変化は起電性プロトンポンプの活動と水の能動的向頂輸送との関係を示唆するものと考えられる。

電気生理学的構造の項で述べた内外二つのプロトンポンプのうち、導管側プロトンポンプの役割は導管柔組織細胞から導管側アポプラストへのプロトンの放出と、それによって発生する膜電位差、もしくはプロトン駆動力を原動力とする溶質の取り込みであると考えられ、ササ

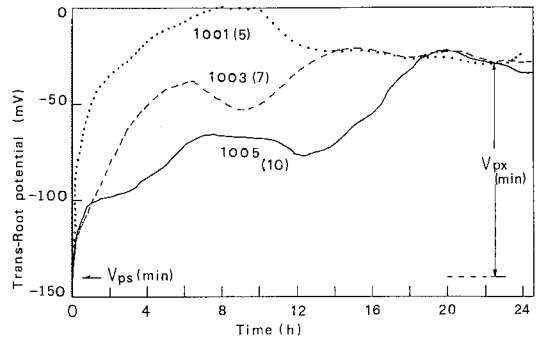


図-6 注射針刺入直後の TRP の変化とその後の経過: 95 年 10 月 1, 3, 5 日, () 内は刺入の深さ (mm), その他は本文参照。(Okamoto *et al.* JPR 1999 より)

Fig. 6 Transient change in the TRP after sticking the needle: (), depth of the tip in mm

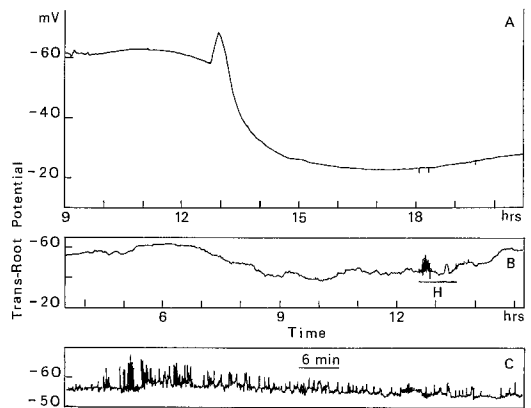


図-7 計測と記録の安定性: A, 静穏な日の ERG (97 年 2 月 23 日); B, 豪雨 (H, 97 年 8 月 8 日) に伴うノイズ; C, 強風によるノイズ (20 m/秒, 95 年 12 月 30 日。Okamoto *et al.* JPR 1999 より)

Fig. 7 Stability of the measurement and the noise from the environment: A, ERG in a calm day; B, an example of noise with a heavy rain; C, an example of noise with a strong wind (20 m/sec)

ゲ胚軸の場合このような機構でのカリウムの取り込みが導管灌流法 (Okamoto *et al.* 1984) によって実証されている (De Boer *et al.* 1985)。空気中で成長する胚軸とは異なり、根の表面側プロトンポンプにも当然溶質吸収の駆動力を発生する役割がある。加藤らはこれらの一次的、二次的溶質能動輸送系に縁どられたアポプラスト・



写真 野外実験に用いられたカキの木：地上15cmにおける幹直径約28cm，樹齢約50年。樹下のテント内に測定系が格納されている。

Photo. Persimmon tree used in the experiment (*Diospyros kaki* cultivar. *jiro*). 28 cm in the trunk diameter, age: ca. 50 years.

カナルが、三次的には水の能動的輸送を可能にする共役の場になり得ることに着目して建設したカナル・モデル (Katou and Furumoto 1986a, b) を根にも適用し、計算機実験によって根による水の能動的向上輸送における起電性プロトンポンプの役割を提示した (Katou *et al.* 1989, Taura *et al.* 1988)。

これらの知見をバックグラウンドとして野外のカキの木で得られた ERG の年変化の意味を考察して見る。

1. 広葉樹では根の発達の最大は春と秋に、最少は夏と冬に来ると言われる (秦野, 佐々木 1991)。これに対して TRP の最も浅くなる (絶対値が最小になる) のは春と秋、最も深くなる (絶対値が最大になる) のは夏と冬である (図-9)。TRP が最も浅くなると言うことは、導管側の膜電位、したがって導管側プロトンポンプの活性が表面側のそれと比較して相対的に最大であることを意味する (図-4 参照)。

2. 戦前東大小石川植物園で長期にわたって行われた

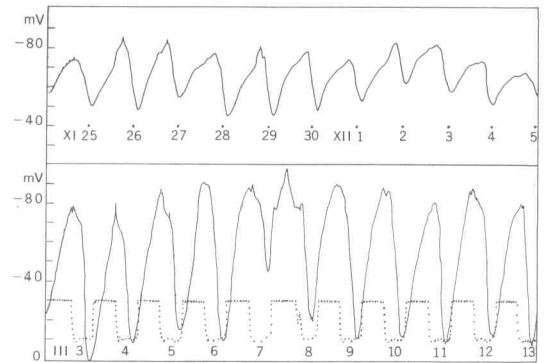


図-8A 落葉相における ERG

上, 1995年11月25日-12月5日

落葉直後；点は正午を示す。

下, 1996年3月3日-3月13日

開葉の3週間前；点線は照度，下ほど高い。

Fig. 8A An example of ERG in defoliate phase: upper, just after defoliation, each dot means noon; lower, 3 weeks before leaf sprouting. Dotted line means the relative light intensity (the lower the stronger).

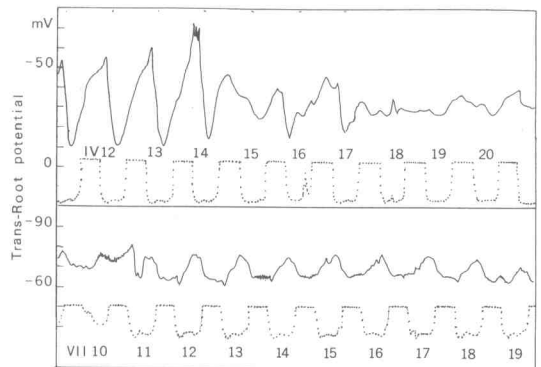


図-8B 開葉相における ERG

上, 1996年4月12日-4月20日

開葉直後；途中から蒸散の盛んな相への移行が見られる。

下, 1996年7月10日-7月19日

葉が完全に展開した時期の ERG (Okamoto *et al.* JPR 1999 より)

Fig. 8B An example of ERG in foliate phase: upper, just after foliation; lower, ERG after complete development of the leaves.

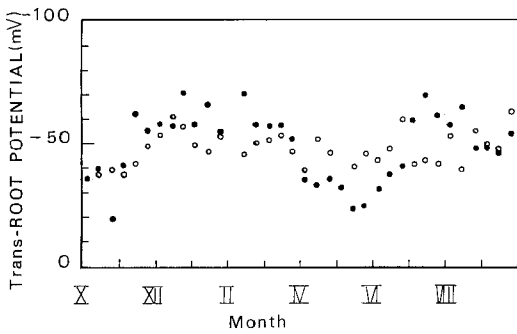


図-9 TRP の旬間平均水準の季節変化：
黒丸：1995年10月-1996年9月
白丸：1996年10月-1997年9月
(Okamoto *et al.* JPR 1999 より)

Fig. 9 Annual changes in the TRP on the average for each ten days: closed circle, 1995-1996; open circle, 1996-1997

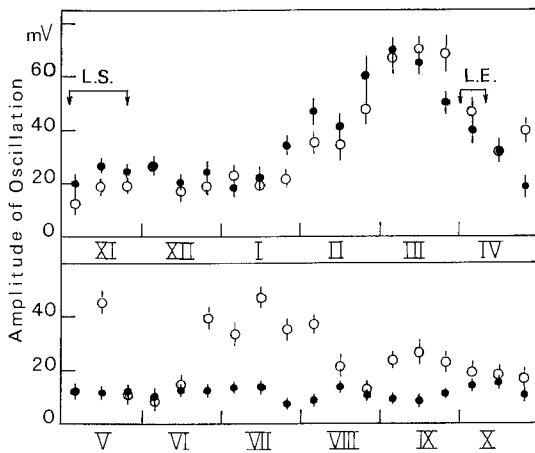


図-10 ERG 振幅旬間平均の季節変化：
黒丸：1995年11月-1996年10月
白丸：1996年11月-1997年10月
L.S., 落葉; L.E., 開葉
(Okamoto *et al.* JPR 1999 より)

Fig. 10 Annual changes in the amplitude of ERG on the average for each ten days: closed circle, 1995-1996; open circle, 1996-1997

ミズキの幹の導管液圧の自動計測によると、液圧は春先、葉の展開の始まる直前、または直後に最大となり、その後一過性の急落が起こってから徐々に減少して行くことが報告されている(中野1937)。このことはERG 振幅の最大が開葉直前に観測される事とよく対応してお

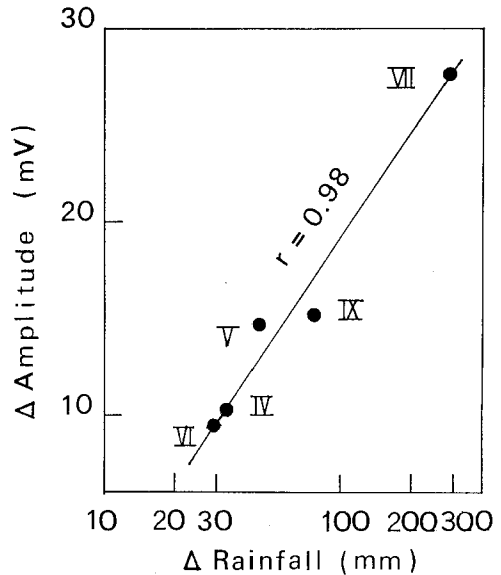


図-11 1996年と1997年の開葉期におけるERG 振幅の月間平均の差と月間平均降雨量の差との相関 (Okamoto *et al.* JPR 1999 より)

Fig. 11 The relationship of the difference between 1996 and 1997 in the total monthly precipitation with that in the amplitude of ERG on the average per each month in the foliate phase

り、起電性プロトンポンプの働きと水の能動的向上輸送との関連を示唆している。

この可能性をさらに探っていくために導管液の圧力を同時計測出来る装置を開発し、シンポジウムで報告したが、紙数の関係でこの紙上では割愛する。

引用文献

- De Boer, A.H., Katou, K., Mizuno, A., Kojima, H. and Okamoto, H. (1985): The role of electric xylem pumps in K^+ absorption from the xylem of *Vigna unguiculata*: the effect of auxin and fusicoccin. *Plant Cell Environ.*, 8: 579-586.
- De Boer, A.H. and Prins, H.B.A. (1985): Xylem perfusion of tap root segments of *Plantago maritima*: the physiological significance of electrogenic xylem pumps. *Plant Cell Environ.*, 8: 587-591.
- De Boer, A.H., Prins, H.B.A. and Zanstra, P.E. (1983): Bi-phasic composition of trans-root electric potential in roots of *Plantago* species: involvement of spatially separated electrogenic pumps.

- Planta, **157** : 259-266.
- 福井博一 (1997) : カキの根の生育と養分吸収. 現代農業, **76** (5) : 286-290.
- Hammel, H.T. (1968) : Measurement of turgor pressure and its gradient in the phloem of oak. Plant Physiol., **43** : 1042-1048.
- 畑野健一・佐々木恵彦 (1991) : 樹木の成長と環境, p. 179, 養賢堂, 東京.
- 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** : 525-535.
- 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.
- Katou, K. and Okamoto, H. (1992) : Symplast as a functional unit in plant growth. Intern. Rev. Cytology, **142** : 263-304.
- Katou, K., Taura, T. and Furumoto, M. (1989) : A biophysical model for water movement in roots : Root exudation and root pressure. B.C. Loughman *et al.* (Eds.) Structural and Functional Aspects of Transport in Roots, p.147-150. Kluwer Academic Publ., Dordrecht.
- 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.
- Nakano, H. (1937) : Über den wechsel des Blutungsdrucks von *Cornus contraversa* Hemsl. J. Fac. Sci., Imper, Univ. Tokyo, Sect. III Botany V., part II : 75-193.
- 岡本 尚 (1991) : 植物の知られざる生命力, 科学全書, 40 : p. 41-100. 大月書店, 東京.
- Okamoto, H., Hasuike, S., Masaki, N. and Shinobe, T. (1994) : Long term measurement of the xylem potential by unpolarizable electrodes via liquid junction. J. Plant Res., **107** : 177-180.
- Okamoto, H., Ichino, K. and Katou, K. (1978) : Radial electrogenic activity in the stem of *V. 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 electric activity. Plant Cell Physiol., **20** : 103-114.
- Okamoto, H. and Masaki, N. (1999) : Long term measurement of the trans-root electric potential in a persimmon tree in the field. J. Plant Res., **112** : 123-130.
- Okamoto, H., Mizuno, A., Katou, K., Ono, Y., Matsumura, Y. and Kojima, H. (1984) : A new method in growth-electrophysiology : Pressurized intraorgan perfusion. Plant, Cell Environ., **7** : 139-147.
- Taura, T., Iwaikawa, Y., Furumoto, M. and Katou, K. (1988) : A model for radial water transport across plant roots. Protoplasma, **144** : 170-179.

受稿年月日 : 1999年1月4日
 受理年月日 : 1999年5月10日