

ダイズ根瘤の電顕観察

野津幹雄*

Mikio Nozu

Electron-Microscopical Studies
on Soybean Root Nodule

はじめに

マメ科植物の根瘤は窒素固定や根瘤菌群と植物体の共生の面から関心が持たれたようである。電子顕微鏡による研究では根瘤菌の植物への侵入や根瘤細胞における根瘤菌の存在様式についての報告があり、ダイズ根瘤についても根瘤中心部細胞の超薄切片像が報告されている^{1,2,3,4,5,6,7)}。筆者は微生物による植物肥大組織の共通点を電顕レベルで把握するための試料としてダイズ根瘤細胞やソラマメ根瘤細胞^{8,9)}を観察した。しかし微細構造の立場からの疑問点も多い。すなわち根瘤菌は根瘤細胞において根瘤菌包囲膜に包まれており植物の細胞質とは接触していない。超薄切片像ではこの包囲膜は個々に独立しているように見えるが、実際には相互に連絡しているかもしれない。また包囲膜と根瘤菌との間隙には構造物は存在しないか、あるいは根瘤の保護組織細胞の役割等に興味がある。根瘤菌による植物細胞の分裂や組織の肥大(根瘤形成)、根瘤菌の窒素固定因子を他の微生物に導入した場合、はたして包囲膜が形成されたり、共生関係を成立させることができるであろうか、などの問題を考えながら観察している。マメ科植物の根瘤は以前から研究されており、また根瘤がダイズの生産に関与していることは栽培経験者が認めるところである。しかし我国ではマメ科根瘤の電顕像の報告は少ない。本報では慣行栽培で自然着生したダイズ根瘤を走査電子顕微鏡で観察したので、それに対応する根瘤細胞の超薄切片像を加えて提示する。

観察に使用した走査電子顕微鏡(SEM)、透過電子顕微鏡(TEM)、その附属機器を設置された関係者各位に

* 植物病理学研究室

深謝の意を表する。

実験材料および方法

ダイズ(品種:奥原早生)は1980年4月29日播種し、6月23日、7月24日に採取、根瘤を固定した根瘤は主として直径約2mm、根瘤中心部(バクテロイド組織)が淡いピンク色を呈しているものを供試した。

SEM用試料はグルタルアルデヒドとオスミウム酸の二重固定を行い、さらにタンニン酸とオスミウム酸で導電染色し、水洗後エタノール系列で脱水、酢酸イソアミールに置換した。次いでL-CO₂を用いて臨界点乾燥(日立HCP-2)を行った。Auのスパッタ・コーティング(エイコー・エンジニアリングIB-3)を行い、日立・明石MSM 30型走査電子顕微鏡(15KV)で観察した。

TEM用試料はグルタルアルデヒドとオスミウム酸の二重固定を行い、エタノール系列で脱水後、プロピレンオキシドを通して包埋した。包埋用樹脂はEPON 812(47cc)、DDSA(24.7cc)、MNA(28.3cc)にDMP-30(1.5cc)を添加混合したものを用いた。ガラスナイフを用いPorter-Blum MT2-Bで超薄切片を作成した。超薄切片は酢酸ウラニウム飽和溶液で電子染色し、カーボンで補強して日立Hu-12A型電子顕微鏡(75KV)で観察した。

観察結果

SEM像: 図1は直径約2mmの根瘤の全体像である。根瘤表面を拡大すると表層細胞の残滓と思われるもの、土壌鉱物粒子、桿状細菌などの付着が観察される。根瘤表面には根毛や細胞の特別な突起は存在しなかった。図2はこのような根瘤の切断面である。根瘤周辺

部にはバクテロイド組織（根瘤菌がいる組織）を取り囲むように数層の細胞がある。根瘤の大部分はバクテロイド細胞で、バクテロイド細胞の細胞壁は保護組織細胞の細胞壁に比較して薄いことが推察できる。

L-CO₂ 臨界点乾燥した根瘤にカミソリで切れ目をつけ、ピンセットで引きちぎるようにして切断した面のSEM像（図3）では、根瘤保護組織は大小10個前後の細胞の層からできている。また保護組織細胞はバクテロイド細胞に接した細胞やそれに近い細胞は小さく、5層目位の細胞から急に大きく直径が2～3倍になっている。根瘤の最外層は死んだ細胞の細胞壁があるように思われる（図3の左部分）。根瘤をピンセットで切断した際、バクテロイド細胞の細胞壁が剥ぎ取られることがある。したがってバクテロイド細胞のプロトプラストが見える。この部分のバクテロイド細胞は根瘤中心より放射方向に長く、ほぼ楕円体である（図3）。このようなバクテロイド細胞のプロトプラストの表面には小さな穴が見え、そこに根瘤菌が観察できる（図4A）。図4は低・高倍像同時表示ユニット（Dual Mag.）を使用した写真で、スケールは図4Aの倍率を示し、図4Aの枠内の5倍が図4Bとして同時撮影できる。図4Aの枠内はおそらく切断時に一部が破損した結果であろう。図4Bでは根瘤菌は細胞質のくぼみに入っているように見える。図5はバクテロイド細胞のプロトプラストが切断された状態であるが、バクテロイド細胞は根瘤菌が充満しており、根瘤菌の塊りのように見える。ここでも根瘤菌は植物細胞の細胞質部分のくぼみに埋没している状態がうかがえる。図6はかなり老化したバクテロイド細胞であろう。根瘤菌の他に植物細胞の細胞質はほとんど観察されない。ダイズ根瘤菌は桿状で、L字型、Y字型のものは存在しなかった。しかし根瘤菌は長径、短径、彎曲など電顕レベルでは相互に異なった形を示す（図6B）。

TEM 像： 根瘤保護組織の細胞はバクテロイド細胞に隣接していても、根瘤菌は認められない（図7・8）。また保護組織の細胞間隙にも根瘤菌は存在しない。保護組織細胞はバクテロイド細胞に比較して大きなアミロプラストが存在し（図8）、細胞質部分に脂質球が認められる（図7・9）。バクテロイド細胞に隣接した保護組織の細胞には中央液胞の他にも液胞があるが（図7）、バクテロイド細胞から離れた保護組織細胞は大きく、中央液胞が発達し、細胞質部分は細胞壁に沿って薄い層として存在する（図9）。

図10・11・12は根瘤のバクテロイド細胞の一般像を示したものである。バクテロイド細胞には多数の根瘤菌が存在するにもかかわらず、バクテロイド細胞の核（N）

には根瘤菌は存在しない。また核膜の損傷も認められない。バクテロイド細胞では中央液胞に相当するものではなく、核は細胞のほぼ中心部にあり、細胞質が豊富である。プラスチッドやミトコンドリア等の細胞内器官は細胞の周縁部に多い（図10・11）。バクテロイド組織の細胞間隙にはほとんど根瘤菌は見当たらない。図11・12の矢印で示される細胞壁の中層に根瘤菌が認められるが、これは感染溝の一部と思われる。図13では根瘤菌が細胞壁中層部で増殖しながら侵入する状態を示す。ここでは細胞壁は変性し、陥入され、図13の矢印方向に進むに従って、細胞壁が消失している。

図10・12・13に示されるように根瘤菌と細胞質の間には間隙がある。モデルになりそうな根瘤菌1個を拡大した像が図14である。すなわち根瘤菌（図14のR）は1枚の単位膜（EM）に包まれており、細胞質とは直接接していない。筆者はこの膜を根瘤菌包膜と呼んでいるが、⁸⁾ 根瘤菌と根瘤菌包膜の間隙には現在まで構造物は観察されない。また包膜膜にリボゾームの結合を推定するような像は得られない。

考 察

根瘤には根と連絡している維管束組織、皮層組織、表皮に相当する組織、バクテロイド組織がある。整然と分化しているようにも思われるが、これらはそれぞれ別の働きをしながら相互に関係を持ち、さらに植物の個体と深く関係しており、複雑な機能を持つ組織であろう。ここではダイズ根瘤をバクテロイド組織とそれを取り囲む細胞層を根瘤保護組織として取り扱った。

保護組織は10個ばかりの細胞層からできており（図3）、それぞれの細胞の細胞質部分（細胞膜とトノプラストの間）には大きなアミロプラストや脂質球が存在するのが特徴のようである（図7・8・9）。根瘤には根毛やそれに類似の構造もなく、生細胞の周辺には表層細胞の残滓が付着しているように思われる。すなわち根瘤保護組織全体像としては根瘤の‘でんぶん貯蔵庫’のように思われる（図7のS）。根瘤の老化にともないアミロプラストにも変化があるが、根瘤におけるアミロプラストの役割についての証明はないようである。根瘤菌は植物の細胞壁に変化を与える能力があるが、保護組織細胞には1個の根瘤菌を認めることもできない。保護組織には外部から根瘤菌が侵入してもよさそうであるが、ダイズ根瘤ではこのような侵入場面には遭遇できない。根瘤菌が植物との関係を持つ門戸は根毛であると云われている。ダイズ根瘤菌はある系統を除けばダイズにしか侵入せず、自然状態では主として根毛から侵入することを

合めて興味ある点である。

SEM 像で示されるように、バクテロイド細胞は根瘤菌が充滿した状態で、根瘤菌の塊りのように見える。ダイズ根瘤菌は桿菌で、そのバクテロイドでは時には分枝^{8,9)}状になることが記載されているが、今までの電顕観察、今回の SEM 観察では、ソラマメ根瘤内の *R. leguminosarium* のような分枝した菌体は観察できなかった。しかし SEM 下の根瘤内のダイズ根瘤菌は大きさ、外觀は相互に異なっていることが明確で (図5・6)、1細胞中と云うほぼ同一の条件であっても形に違いが生ずる。また老化程度の異なった細菌の集りとも考えられる。

根瘤を切断してバクテロイド細胞のプロトプラストが観察できたが (図3・4・5)、これは臨界点乾燥時にバクテロイド細胞の収縮とバクテロイド細胞壁は薄く、破れやすいことの結果であろう。バクテロイドのプロトプラスト表面の穴 (図4A 矢印) は感染溝 (図11・12 矢印, 図13) に対応する部分で、植物細胞の細胞膜が陥入された場所であろう。図10・11に示すように、根瘤菌は植物細胞の核 (N) には侵入していない。また根瘤菌は植物細胞の細胞質には接触していない (図10-14)。ここに植物細胞と根瘤菌群が同時に生存できる (共生関係) 構造的しくみがあると考えられる。

前報⁹⁾にも述べたが、根瘤菌は増殖しながら植物の細胞壁を変性・陥入させると共に植物細胞の細胞膜も陥入させる (図13)。根瘤菌は老化すると菌体の両端から液胞化するので、図13の矢印の方向へ陥入すると推定した。このような状態が感染溝と呼ばれるもので、感染溝の先端から根瘤菌 (図13, R) は植物細胞に遊離・分散するような状態になる。しかし実際には根瘤菌は植物の細胞膜を貫通することができず、個々の根瘤菌 (R) は単位膜 (EM) で包囲されている (図14)。根瘤菌が、植物細胞膜起源の膜を破らない限り、根瘤菌は本質的には植物細胞には入っていないと考える。なおこの根瘤菌を包んでいる膜はバクテロイド細胞の細胞質が消失するまで残存する⁸⁾。微生物が植物に入らないのに植物組織や細胞に変化が生ずることに關しては *Agrobacterium tumefaciens* によるしゅう組織¹²⁾¹³⁾があり、根瘤と共に微細構造の面から検討中である。微生物と植物の關係に關しては細胞内器官レベルの切断や細胞化学的手法を考慮しながら観察を続けたい。

摘 要

ダイズ根瘤を走査電子顕微鏡と透過電子顕微鏡で観察した。根瘤保護組織は10細胞前後の細胞層からなり、バ

クテロイド組織に近いほぼ5細胞層の細胞は小さく、その他の細胞は2~3倍の直径で、液胞が発達している。保護組織細胞の細胞質部分には脂質球と発達したアミロプラストが存在する。表層細胞は整然とした配列はなく、根毛やそれに類似の細胞突起はない。根瘤表面には根瘤細胞の残滓が附着しているように思われる。L-CO₂ 臨界点乾燥後根瘤を切断するとバクテロイド細胞のプロトプラストが観察できる。このプロトプラスト表面の小さな穴は感染溝であろう。1個のバクテロイド細胞内は根瘤菌にとってほぼ同一の条件のように思われるが、根瘤は短径・長径が異なっている。バクテロイド細胞には液胞はなく、細胞質が豊富で、核は細胞の中心部にありプラステッドやミトコンドリアなどは細胞壁に近い場所にある。根瘤菌がバクテロイド細胞に充滿した状態になっても、その細胞の核には根瘤菌は認められない。バクテロイド細胞における根瘤菌は単位膜に包まれており、根瘤菌と単位膜との間隙には構造が認められない。

引 用 文 献

1. BERGERSEN, F. J. and MARGARET J. B. : J. gen. Microbiol. **19** : 482-490, 1958.
2. DART, P. J. and MERCER, F. V. : J. Bacteriol. **85** : 951-952, 1963.
3. JORDAN, D. C., GRINYER, I. and COULTER, W. H. : J. Bacteriol. **86** : 125-137, 1963.
4. MOSSE, B. : J. gen. Microbiol. **36** : 49-66, 1964.
5. DART, P. J. and MERCER, F. V. : J. Bacteriol. **91** : 1314-1319, 1966.
6. GOODCHILD, D. J. and BERGERSEN, F. J. : J. Bacteriol. : **92** : 204-213, 1966.
7. BASSETT, R. N., GOODMAN, R. N. and NOVACHY, A. : Can. J. Microbiol. **23** : 573-582, 1977.
8. 野津幹雄 : 日作紀**36** : 472-480, 1967.
9. 野津幹雄・城野洋一郎・糸井節美 : 細胞 **10** : 534-542, 1978.
10. 野津幹雄 : 島根大農研報 **1** : 38-42, 1967.
11. 小西亀太郎 : 緑肥と根瘤の研究 朝倉書店 東京 1947.
12. 城野洋一郎・野津幹雄・糸井節美 : 日植病報**45** : 275-278, 1979.
13. 野津幹雄・城野洋一郎・糸井節美 : 島根大農研報**13** : 163-166, 1979.

図の説明

SEM 像 (図 1-6)

- 図1. 根瘤の全体像 ×50
 図2. 根瘤切断面 ×50
 図3. 根瘤切断面の1部 ×250
 図4A. バクテロイド細胞 ×2000
 図4B. 図4A枠内の拡大 ×10000
 図5. バクテロイド細胞の切断面 ×6500
 図6A. バクテロイド細胞の切断面 ×2700
 図6B. バクテロイド細胞内の根瘤菌 ×13500

TEM 像 (図 7-14)

- 図7. バクテロイド細胞と保護組織細胞 ×1800
 図8. 保護組織細胞 ×5900
 図9. 保護組織細胞 ×3800
 図10. バクテロイド細胞 ×3800
 図11. バクテロイド細胞 ×3800
 図12. バクテロイド細胞 ×4000
 図13. 感染溝 ×19000
 図14. 根瘤菌と根瘤菌包囲膜 ×89000

図中の記号

CW: 細胞壁, EM: 包囲膜, N: 核, R: 根瘤菌,
 S: でんぷん粒, V: 液胞

Summary

Root nodules of *Glycine max* infected with *Rhizobium japonicum* were investigated by means of scanning electron microscope and transmission electron microscope.

The surface of the nodule was not flat, and root hair like structure was not observed. In the protoplasts of bacteroidal tissues obtained by critical point drying treatment, numerous bacteria were observed. Most nodule bacteria were rod-shaped, however, varied in size. The cells of protective tissue in the nodule contained developed amyloplasts and lipid droplets. Bacteroidal bodies were not recognized in the nuclei of the bacteroidal cells. The plastids and mitochondria in the bacteroidal cells were mainly located abutting on the cell wall. Host cell wall infected by *Rhizobium japonicum* were thicker than those of healthy cell walls. The bacteria released from the infection thread were surrounded by an unit membrane which might be derived from the host cell membrane. It is likely that the bacteria are not contacted directly with cytoplasm of host cell, because they are enclosed by those membranes.













