

植物細胞の成長に関与する細胞壁の応力緩和係数について  
—最小緩和時間の問題点—

帝塚山大学人間環境科学研究所 山本良一

要約

植物細胞の吸水成長は、浸透圧と細胞壁圧のバランスによって調節されている。植物ホルモンのオーキシンによって引き起こされる成長は細胞壁圧の減少によっている。細胞壁圧の変化は細胞壁の力学的性質で評価される。細胞壁の応力緩和によって測定した最小緩和時間はオーキシンによって減少し、弾性や粘性も減少する。今回の測定では最小緩和時間へのオーキシンの効果は有意には観察されなかった。一方、弾性と粘性へのオーキシンの効果は有意であった。緩和時間は粘性を弾性で除した値である。このために最小緩和時間へのオーキシンの効果はそれに対応する弾性と粘性に対する効果が相殺されて表れている可能性がある。

緒言

植物細胞の吸水成長は浸透圧による吸水力と、細胞壁が細胞質を押しえつめることによる吸水を抑える力とのバランスによって調節されている (Taiz 1984, Boyer 1985, Cosgrove D. J. 1986)。細胞壁が細胞質を押しえつめることによって細胞内に圧力が生じ、これを膨圧という。この力を生じさせる細胞壁の圧力を細胞壁圧という。細胞の吸水は細胞内外の浸透圧差から膨圧を引いたものとなる。膨圧が減少すると吸水が促進される (Virgin 1955)。実際には直ぐに吸水が起こり、膨圧低下が補償されて膨圧低下は観察されないか、特別な環境を作り出さないと測定が困難である。

植物ホルモンは植物細胞の吸水成長に影響を及ぼす。植物ホルモンのうちオーキシンは細胞の吸水成長を促進する。このホルモンは細胞壁の力学的な性質を変化させることによって吸水力を高めて成長を誘導や促進すると考えられている (Cleland 1967, Masuda 1969)。オーキシンによって引き起こされる吸水成長はオーキシンを与えてから10分から15分で開始する。これに対してオーキシンによる細胞壁の変化は5から10分で起こることが報告されている (Yamamoto & Masuda 1971)。このことからオーキシンは細胞壁の力学的性質を変えることで吸水成長を促進することを示している。

細胞壁の力学的な性質を測定する方法がいくつか考案されている。力学的な性質は力と伸びの関係として測定されている。正確には応力と変位であるが、ここでは力と伸びと表現する。力と伸びが両方とも変化しないと測定が成立しないので、どちらかを変化させてもう一方を測定する。試料におもりをぶら下げて伸びる長さを測ることが試みられ、オーキシンが細胞壁の力学的な性質を変化させることが見いだされた。また、測定

機器の導入によって力を直線的に増加させて変化する伸びを測定する方法が開発された。これらの測定は物理的な測定というよりは、オーキシンによって伸びに違いがあることを見いだしたにとどまっている (Heyn & Overbeek 1931, Olson et al. 1965, Cleland 1967, Masuda 1969, )。

そこで、誰が測定したとしても測定した結果を比較できる物理的に厳密な測定が求められた。力と伸びが両方変化すると数式的に処理することに困難があるので、力か伸びのどちらかを一定にする測定が行われた。力を一定にする方法は、重りをかけて伸びを測る方法と同じで、クリーブ測定という (Hager et al. 1971, Tanimoto et al. 2000)。また、伸びを一定にする方法は高速で試料を引っ張っておいて伸びをその後一定に保つと生じた力が減少することを測定する。これを応力緩和法という (Yamamoto et al. 1970, Cleland & Haughton 1971, Yamamoto et al. 1974, Jaccard & Pilet 1975, Sakurai et al. 1982, Yamamoto 1996)。

私たちは、幼植物の芽生えの茎をメタノールで固定して水に戻したものを細胞壁の試料として、応力緩和を測定する方法を開発した。細胞壁試料を引っ張り試験器に取り付けて高速で引っ張る。10g 程度のあらかじめ決めておいた荷重に達したときあるいは一定の伸びを与えたときにひっぱりを止めて、伸びをそのまま保っておくと生じた力が減少する。その力の減少を応力緩和とした (Yamamoto et al. 1970, Yamamoto et al. 1974, Sakurai et al. 1982)。

細胞壁の応力緩和を時間に対して数値微分するとほぼ直角双曲線すなわち逆数関係となることが分かった。微分すると逆数となる関数は対数であるから、時間の対数に直線性があると予想された。そこで、応力緩和を時間の対数の軸に対してプロットするとほぼ直線が得られ、さらなる考察によって細胞壁の緩和は次の式で表されることが分かった (Yamamoto et al. 1970, 1974)。

$$S = b \cdot \log\{(t + T_m)/(t + T_0)\} + c \quad (I)$$

ここで  $S$  は応力、 $t$  は時間である。 $b$ 、 $c$ 、 $T_0$ 、 $T_m$  は定数である。 $b$  は緩和の速さ、 $c$  は残留応力、 $T_0$  は最小緩和時間、 $T_m$  は最大緩和時間と名付けた。

オーキシンによって吸水成長が誘導や促進されるときに最小緩和時間が減少することを観察した。その後、このパラメタが細胞壁の変化を代表的に表すとして成長を評価してきた (Yamamoto et al. 1974)。

応力緩和は取り扱いが便利であるので、マクスウェルのモデルで表される。このモデルではマクスウェルの要素が並列にいくつかつながられている。式(I)を解析するために使われる細胞壁の力学的なモデルはマクスウェルの要素が個別的にはなく連続的に変化しているものを無限個数つなぎ合わせたものとして取り扱った (Yamamoto et al. 1974)。

マクスウェルの要素を無限個ではなくて有限数つなぎ合わせたモデルも有効であると考えられる。マクスウェルの要素が3つと弾性の要素が一つ並列につなぎ合わされたモデルの緩和は次のように表される (Yamamoto et al. 2007)。

$$S/\varepsilon = E_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + E_2 \cdot \exp(-t/\tau_2) + E_3 \cdot \exp(-t/\tau_3) + E_4 \quad (\text{II})$$

ここで、 $S$  は応力、 $t$  は時間である。 $\varepsilon$  は伸び (変位)、 $E_1$ 、 $E_2$ 、 $E_3$ 、 $E_4$  はマクスウェルの要素を構成している弾性成分の弾性係数である。 $\tau_1$ 、 $\tau_2$ 、 $\tau_3$  は各マクスウェルの要素の緩和時間である。それぞれ  $H_1/E_1$ 、 $H_2/E_2$ 、 $H_3/E_3$  に等しく、 $H_1$ 、 $H_2$ 、 $H_3$  は各マクスウェル要素を構成している粘性成分の粘性係数である。

オーキシンによって成長が促進されるときにそれぞれの係数がどのように変化するかは報告されている。式 (I) と式 (II) の関係についての報告はほとんど無い (Yamamoto et al. 2007)。オーキシンが成長を促進するときこれらの係数がどのように変化するかについて検討したので報告する。

## 方法

植物はオクラ (*Abelmoschus esculentus* Moench cv. Clemson Spineless) を用いた。オクラの種は水道水で一晩流して吸水させた。吸水した種は5日間摂氏25度で蛍光灯の連続光の下で育てた。光の強度は約  $15 \text{ W/m}^2$  である。長さが3から5センチになった下胚軸のから1cmの切片を切り出した。

切片はペトリ皿 (直径4cm) に4mlのMES (2[N-morpholino] ethanesulfonate) ナトリウム緩衝液 (10mM, pH6.0) に0.01mMのナフタレン酢酸 (naphthalene acetic acid) を加えたものと加えていないものに分けて浮かべて摂氏25度、光強度約  $15 \text{ W/m}^2$  で3時間処理し、切片の長さを測定した。

処理後、沸騰メタノールで5分処理して固定した。固定切片は冷蔵庫に保管して応力緩和測定を行った。測定は山電社 (Yamaden Co, Tokyo, Japan) の引っ張り試験器 (RE-33005) を用いた。引っ張り試験器とコンピュータはナショナルインストラメント社 (National Instruments, USA) のインターフェース器 (NI USB-6009) で結合して、応力の変化を記録した。

測定した応力緩和から式(I)と式(II)の係数を非線形の最小自乗法によって求めた。式の各係数の偏差を計算、推定し、値を修正した。繰り返しても係数が修正されなくなるまで繰り返し計算した。測定曲線と計算した係数で表される曲線のずれは0.1から0.2パーセントくらいとなった。

## 結果

莖切片の成長は、オーキシンを含まない処理では切片は約11mmに伸長し、オーキシンで処理した切片は20mmに伸長した。オーキシンによって莖切片の成長が促進されて

いる。誤差は対照では 0.2mm でオーキシン処理では 0.8mm であり、効果は高度に有意であった。誤差は平均値の差に注目するために標準誤差を用いた。以下も同じである。

表 1 細胞壁の最小緩和時間に対するオーキシンの影響

処理	最小緩和時間、秒
イニシャル	0.0142±0.004
マイナスオーキシン	0.0153±0.005
プラスオーキシン	0.0102±0.002

オクラ下胚軸切片を、オーキシンを含まない溶液で 3 時間処理した（マイナスオーキシン）とオーキシン含む溶液で 3 時間処理した（プラスオーキシン）。細胞壁の応力緩和をマクスウェルのモデルにシミュレートし、式 (I) の  $T_0$  を計算した。20 測定の平均値と標準誤差

この切片をメタノールで固定して引っ張り試験器にかけて応力緩和を測定した。まず応力緩和を式(I)に合わせるとして最小緩和時間、 $T_0$  を計算した。表 1 に示すように、測定前の 0 時間（イニシャル）の試料の値は 0.0142 秒であり、オーキシンを含まない溶液で 3 時間処理した切片の細胞壁の最小緩和時間は 0.0153 秒であった。処理前の細胞壁の最小緩和時間と有意な違いは認められない。オーキシン処理したものでは 0.0102 秒で、オーキシンによってその値が減少する傾向にあったが、その差は  $t$  検定において 5% レベルで有意ではなかった。最小緩和時間に対するオーキシンの影響は有意な低下が報告されてきた (Yamamoto et al. 1970, Yamamoto et al. 1974) が、今回の実験ではオーキシンの効果は有意に検証されなかった。

表 2 細胞壁の弾性係数、粘性係数に対するオーキシンの影響

処理	$E_1$ 、 $10^5$ MPa	$H_1$ 、 $10^4$ MPa·s
イニシャル	6.3±0.4	8.7±0.16
マイナスオーキシン	5.4±0.1	5.5±0.01
プラスオーキシン	2.9±0.5	1.8±0.04

オクラ下胚軸切片を、オーキシンを含まない溶液で 3 時間処理した（マイナスオーキシン）とオーキシン含む溶液で 3 時間処理した（プラスオーキシン）。細胞壁の応力緩和をマクスウェルのモデルにシミュレートして、第一のマクスウェルの要素の成分に対するオーキシンの効果を示した。弾性係数  $E_1$  と粘性係

数  $H_1$  を示した。MPa と MPa $\cdot$ s はそれぞれメガパスカルとメガパスカル秒を表している。20 測定の平均値と標準誤差。

式 (II) の係数に対するオーキシンの効果は表 2 に示した。表 2 によると、オーキシンは弾性係数にも粘性係数にも有意な効果を持っている。特に粘性係数は高度に有意に低下することが分かる。最小緩和時間を計算した応力緩和曲線と同じ曲線を用いて、計算が異なる違いである。最小緩和時間にはオーキシンの効果があまり有意に現れていなかったが、弾性係数や粘性係数はオーキシンによって大きく低下することが分かった。

### 考察

オーキシンは植物の茎の吸水による成長を促進する。そのとき、オーキシン処理によって応力緩和の係数が影響を受ける (Yamamoto et al. 1970, Cleland & Houghton 1971, Yamamoto et al. 1974)。応力緩和は最小緩和時間、弾性や粘性で表される。本研究でもオーキシンは最小緩和時間を 0.0153 から 0.0102 秒へ減少させるが、効果は有意とは言いがたい。高度に有意に測定される成長の元となっている細胞壁の性質の変化を表す最小緩和時間の測定に問題が無いとはいえない結果となった。

オーキシンによる応力緩和の効果については最小緩和時間の減少で表してきた。オーキシンによる最小緩和時間の減少はオーキシンを与えてから 5 ないし 10 分で観測されることが報告されており、オーキシンによって誘導される成長の開始の 10 ないし 15 分よりも早いことで成長の原因となっている現象を表していることが強く示唆されている (Yamamoto & Masuda Y 1971)。

ところが、本研究における最小緩和時間の減少が必ずしも有意とはいえない結果が得られたその同じ緩和曲線を使って求めた弾性や粘性には有意な影響が観測された (表 1)。特に粘性は  $5.5 \times 10^4$  から  $1.8 \times 10^4$  MPa $\cdot$ s への大きな減少が観察された。この結果は成長とともに高度に有意である。これに対して弾性は  $5.4 \times 10^5$  から  $2.9 \times 10^5$  MPa へ減少し、減少は粘性に比較して小さい。

粘性を弾性で割った値は時間の単位を持っていて、緩和時間となる。本研究からも最小緩和時間、弾性、粘性ともにオーキシンによって減少することが分かる。最小緩和時間はここでの弾性と粘性の商としての緩和時間とは必ずしも同じ粘弾性モデルの値ではない。最小緩和時間はマクスウェルの要素が連続的に無限個並列に結合した連続モデルで、弾性と粘性を求めたモデルは弾性一つとマクスウェルの要素を 3 つ並列に結合したモデルを使っている。表 1 に示した弾性と粘性はこのマクスウェル要素のうち緩和時間の最も小さい要素の弾性と粘性の係数である。弾性と粘性がともにオーキシンで減少するときそれらを割り算にして得られる値は効果が相殺されている可能性があり、これを考察するには問題が残る。

本研究の結果として、オーキシンによって粘性は弾性よりも大きく減少している。マクスウェル要素の弾性と粘性の商としての緩和時間はオーキシンによって 10.2 秒から 6.0 秒に約 40%減少している。これに対して粘性はオーキシン処理によって  $5.5 \times 10^4$  から  $1.8 \times 10^4$  MPa・s に約 70%減の値となっていて、弾性は約 50%減少する。オーキシン処理によって緩和時間が減少することは、粘性が弾性よりも大きく減少することによっていると思われる。しかし、粘性を弾性で除した値としての緩和時間に対するオーキシンの効果は粘性と弾性がともに減少するので効果が相殺されているといえる。連続マクスウェルのモデルでもこれと同様のことが考えられて、粘性が大きく減少するものの弾性も減少するので除することによって緩和時間に出る効果が小さく表れると考えられる。時において測定に有意性が表れないこととなるのであろう。

最小緩和時間は緩和曲線を対数時間軸にプロットしたときに表れる係数である。緩和曲線を吟味するには重要な係数である。応力緩和に対する植物ホルモンオーキシンの作用を考察するときには緩和時間よりも粘性や弾性といった係数で考察する方が明確な議論ができるのではないだろうか。特に粘性は細胞壁の構成成分が細胞壁内で移動して位置を変化させることに由来しているのであろう。粘性が低下するのはその変化が速いか数や量が低下すると考えられる。粘性の低下は、それに当たっている分子あるいは分子の部分の分子量あるいは存在量が低下することによるのではないかと推定される。弾性は張力を生じる鎖状の分子に由来するのかもしれない。これらのことからオーキシンによって植物細胞の成長が誘導されあるいは促進されるときに起こる細胞壁の変化との対応を検討することが必要である。

#### 引用文献

- Boyer J.S. (1985) Water transport. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 473-516.
- Cleland R. (1967) Auxin and the mechanical properties of the cell wall. *Proc. N.Y. Acad. Sci.* 144: 3-8
- Cleland R., Houghton P.M. (1971) The effect of auxin on stress-relaxation in isolated *Avena* coleoptiles. *Plant Physiol.* 47: 812-815.
- Cosgrove D.J. (1986) Biophysical control of plant cell growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 377-405.
- Hager A., Menzel H., Krauss, A. (1971) Versuche und Hypothese des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta* 100: 47-75
- Heyn A.N.J., van Overbeek J. (1931) Weiteres Versuchsmaterial zur plastischen und elastischen Dehnbarkeit der Zellmembrane. *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam* 34: 1190-1195
- Jaccard M., Pilet P.E. (1975) Extensibility and rheology of collenchyma: I. Creep relaxation and viscoelasticity of young and senescent cells. *Plant & Cell Physiol.* 16: 113-120
- Masuda Y. (1969) Auxin-induced expansion in relation to cell wall extensibility. *Plant & Cell*

- Physiol. 10: 1-9
- Olson A.C., Bonner J., Morre D.J. (1965) Force extension analysis of *Avena* coleoptile cell wall. *Planta* 66: 126-134.
- Sakurai N., Fujihara S., Yamamoto R. and Masuda Y. (1982) A stress-relaxation parameter  $b$  of the oat coleoptile cell wall and its implication in cell wall loosening. *Journal of Plant Growth Regulation* 1: 75-83.
- Taiz L. 1984. Plant cell expansion: Regulation of cell wall mechanical properties. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 585-657.
- Tanimoto E., Fujii S., Yamamoto R., Inanaga S. (2000) Measurement of viscoelastic properties of root cell walls affects by low pH in lateral roots of *Pisum sativum* L. *Plant and Soil* 226: 21-28.
- Yamamoto R., Shinozaki K, Masuda Y. (1970) Stress-relaxation properties of plant cell walls with special reference to auxin action. *Plant and Cell Physiol.* 11: 947-956.
- Yamamoto R. and Masuda Y (1971) Stress-relaxation properties of the *Avena* coleoptiles cellwall. *Physiol. Plant.* 25:330-335
- Yamamoto R., Fujihara S., Masuda Y. (1974) Measurment of stress-relaxation properties of plant cell walls. In "Plant Growth Substances, 1973", Hirokawa Pub, Tokyo, p.788-795.
- Yamamoto, R (1996) Stress relaxation property of the cell wall and auxin-induced cell elongation. *Journal of Plant Research* 109: 75-84
- Yamamoto R., Nakayama S. and Fujii S. (2007) The mechanical property of the cell wall and auxin-induced growth with reference to germanium action. *Trends Agricultural Engineering, Prague 2007*