

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19175

研究課題名(和文) X線マイクロCT法を活用したイネ鱗被の形態と穎花の開閉メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the morphology of rice lodicules and the mechanism of spikelet opening and closing using X-ray micro-CT

研究代表者

大井 崇生(Oi, Takao)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：60752219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：イネ穎花の開閉という動的な現象の作用機序を解明するため、微小な鱗被の立体像を非破壊・迅速・簡便な三次元解析が可能なX線マイクロCT(コンピュータ断層撮影)法を用いて解析した。まず、電子顕微鏡観察用の試料作製法に準じて固定・脱水・臨界点乾燥を施し、X線CTによって高解像度スキャン撮影して3D解析し、鱗被の組織形状および構成する細胞のサイズやその数を開花前後で定量比較できた。また、穂を生け花状に差してX線CT装置内で生きた状態のまま経時スキャンするライブイメージングにも取り組み、1分という短時間で穎花の組織形状の3Dデータを取得し、開花から閉花までの鱗被と内外穎の形態と空間配置の変化を解明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果の概要に示したように、X線マイクロCTを活用し、未知であったイネ鱗被の形態変化を組織・細胞レベルで捉え、イネ穎花の開閉メカニズムの解明に一定の寄与ができた。また、開発してきた観察法は今後のイネ研究だけでなく、広く植物の研究に貢献できる汎用性のある技術体系となると期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of the dynamic action of opening and closing of rice spikelets, we analyzed the three-dimensional(3D) images of minute lodicules using X-ray micro-CT (computed tomography), which allows non-destructive, rapid, and simple 3D analysis. First, the specimens were fixed, dehydrated, and dried in accordance with the method for preparations for electron microscopy, and then scanned at high resolution using X-ray CT for 3D analysis, allowing quantitative comparison of the tissue shape of the lodicules and the size and number of the cells that compose them before and after anthesis. We also performed live imaging, in which the panicles were placed in a flower arrangement and scanned in the X-ray CT over time, obtaining 3D data of the tissue shape of the spikelets in as little as one minute, and elucidating the changes in the morphology and spatial arrangement of the lodicules and glumes from opening to closing of spikelets.

研究分野：作物生産科学関連

キーワード：イネ 開花 3D形態解析 コンピュータトモグラフィー X線顕微鏡

### 1 . 研究開始当初の背景

イネ穎花は内穎と外穎が固く鉤合して開かない状態に出穂し、午前中の決まった時刻の前後 1, 2 時間の間だけ鉤合が開いて開花した後、再び閉じて固く鉤合し、以降開くことなく登熟する。その開閉機構の理解は開花時刻の制御による高温障害の回避や、閉花受粉による系統・遺伝子組換え体の保持など、多くの課題解決に繋がる重要事項である。外穎の基部の内側には、

花弁に相当する白色透明の小さな鱗被が 2 個 1 対存在し、「鱗被が膨張して外穎を押し倒すことで鉤合が開く」と言われているが (星川 1975 解剖図説 イネの生長) (図 1), 鱗被のどの部分がどのように膨らみ押ししているのか詳しい作用機構は未解明であった。鱗被が開花時に急速に吸水して体積を増加させることは多数報告されており、開花中の鱗被は水風船状に図示されることが多いが、全方位へ均等に膨らむのでは固い鉤合を開くのに必要な力を得られず、間にある雄蕊などを押し潰しかねない。また、閉花に関しては「膨らんでいた鱗被が萎むので閉じる」という認識に留まっていた。

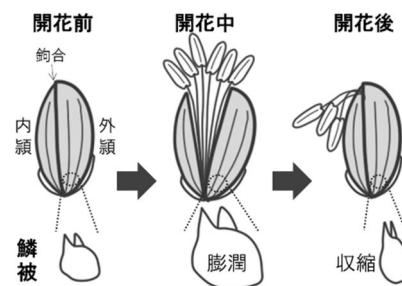


図1: イネの開花と鱗被の時系列変化。

### 2 . 研究の目的

本研究では、イネの開花および閉花を司る作用点を、鱗被という花器官の単位から、その組織・細胞レベルにまで深めて力学的作用機構を理解することを目指した。イネの鱗被の組織断面はこれまでも報告があり、液胞の発達した不定形の柔細胞が積層していることは示されていたが、部位ごとの特徴は見出されていなかった。そこで、高分解能X線マイクロCT (コンピュータ・断層撮影) 法を用い、鱗被の端から端までを周囲の組織との位置関係とともに、細胞を識別できる解像度で3D解析し、非破壊観察を活かした開閉の動的変化を経時的に観察するライブイメージングの実験系の確立まで取り組んだ。

### 3 . 研究の方法

#### (1). 電子染色による細胞の識別も可能な Whole Organ Imaging

マイクロCTは一般的に組織や器官の外形やその内部の空隙を捉える用途が主であり、細胞までは認識できていない事例が多い。しかし、装置としての空間分解能は 1 μm以下にも達するため、成熟した植物組織における細胞レベルの観察も原理的には可能である。本研究では、電子顕微鏡観察の試料作製法を応用し、重金属のオスミウムで染色し、臨界点乾燥機で微細構造を損なわずに脱水することでX線投影像のコントラストを高めてこれを実現した。まず、開花前、開花中、開花後の3時点で採取した初の下部を、マイクロCT装置の中でも光学レンズによる拡大系を備えたX線顕微鏡 (SKYSCAN1172, Bruker) を用いて高解像度CTスキャンを行い、xy, xz, yzの3方向からの仮想断面像を取得し、さらに内穎や外穎、雌蕊などとの空間配置とともに、鱗被全体の空間見取り図となる3D再構築像を作製した。特に鱗被に対してはセグメンテーション (画像領域識別) を行い、組織構造としての3D解析だけでなく代表的な断面において個々の細胞を識別してその数やサイズを計測する比較解析も行った。

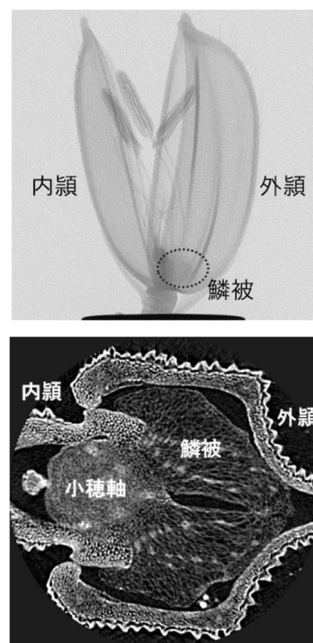


図2: オスミウム染色・臨界点乾燥した開花中イネ穎花のX線投影像(上)とCTスキャンからの再構築断面像(下)。

#### (2). 無固定・無乾燥の Live Organ Imaging

X線CT法の強みは非破壊観察にあり、特に生物分野では対象を生かしたまま経時観察が可能な点にある。ただし、水分を含んだままの無染色の試料ではX線投影像のコントラストが弱く、個々の細胞の

認識はできない。先述の (1) の手法では解像度と引き換えに試料を固定して殺してしまっていたが、内部構造の全容を一度掴めていれば解像度が落ちてでも外形から内部を推察しながら理解できる。

そこで、次段階として、細胞までの識別は求めず、装置内で同一の生鮮試料を経時観察し、イネ穎花の開閉という動的な作用機構を、顕微鏡を要するサイズである鱗被のライブイメージングによって三次元の立体像に時間軸を加えた四次元で捉えて理解することを目指した。X線CT装置 (ScanXmate-L090T, コムスキャンテク) 内で穂を生け花状に保持する実験系を確立し、1 分間の短時間のスキャンで穎花の開閉状況と鱗被の外観を捉える撮影条件を検討した。

#### 4. 研究成果

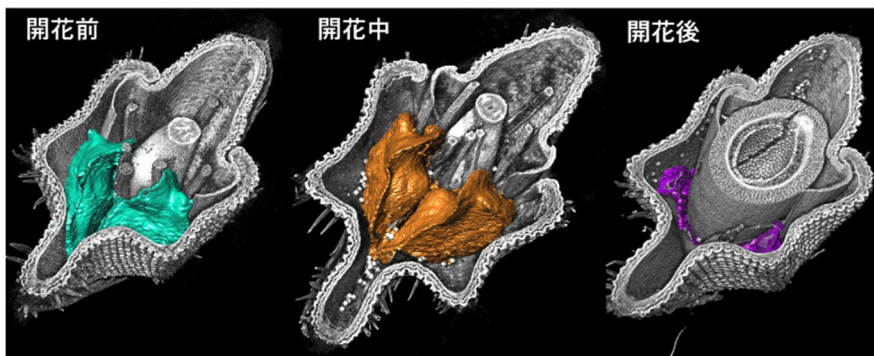


図3: イネ小花下部の高解像度X線CTスキャンによる三次元再構築像。断層像から鱗被を領域分け (セグメンテーション) してカラー表示した。

電子染色試料を対象にした高分解能 X 線顕微鏡を用いた CT スキャンによってイネ小花を形成する外穎、内穎、雌蕊、雄蕊、鱗被の組織形状と空間配置を、精確に把握することが可能になった。試料は開花前、開花中、開花後にそれぞれ採取・固定した異なる小花ではあったが、三次元再構築像によって内外穎に対して鱗被のどの部位が開花中に密着しており、開花前と比べてどれくらい膨らんでいるかを捉えられるようになった (図 3)。さらに、細胞断面積の測定により、開花中の鱗被では中央部の細胞が特に膨張していることが示された (図 4A, B)。

分解能は劣るものの試料室の大きなX線CT装置を用いたライブイメージングでは、1 分という短時間のスキャンによって組織形状の概観を把握できる条件を見出し、開花開始の 30 分前から 330 分後にかけて 2~30 分おきの小花の形態の経時変化を捉えることに成功した。代表的な結果としては、横断面では開花前から最大角度での開花に向けて中央部が膨張することで鱗被が外向きに回転し、周縁部が外穎側にせり出す様子が示された (図 4A, B)。縦断面では開花前から最大開花において斜め下に傾くことにより鱗被の下方部がせり出す様子が示された (図 4C, D)。これらから、鱗被は開花時に大きく膨張した中央部同士の反発によって外向きに回転し、押し出された周縁部が外穎の幅を広げて鉤合を外し、中央部と雌蕊の反発で押された鱗被の下方部が外穎を回転軸方向に押し倒している可能性が示された。

以上のように、イネ穎花の開閉メカニズムについて形態学的新規知見が数多く得られた。本研究で用いられた X 線 CT による観察法は今後のイネ研究に限らず、広く植物研究に貢献できる汎用性のある技術体系になると期待される。

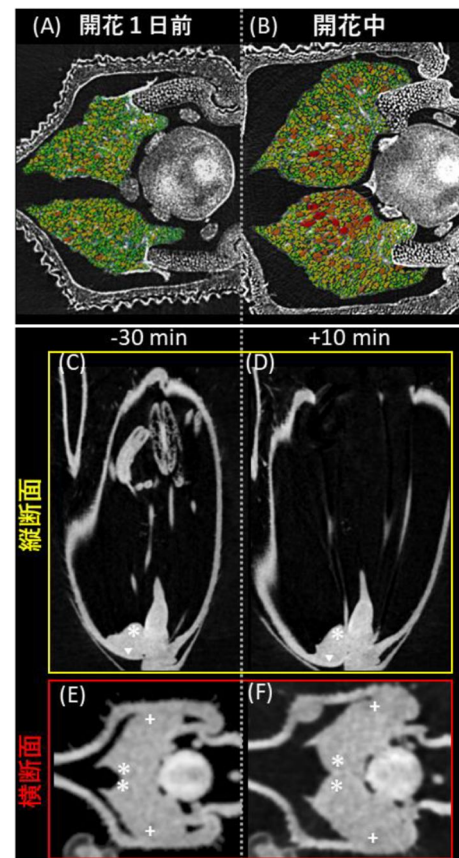


図4: イネ小花のX線CTによる断面像。高解像度スキャン結果に基づく開花1日前 (A) と開花中 (B) の細胞断面積の分布。断面積は赤に近いほど大きく、青に近いほど小さい。低解像度ライブイメージングスキャンに基づく、開花30分前 (C, E) と開花開始10分後 (D, F) の小花の縦断面 (C, D) と横断面 (E, F)。: 鱗被の下方部, \*: 鱗被の中央部, +: 鱗被の周縁部を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大井崇生	4. 巻 93
2. 論文標題 ミニレビュー企画「お手軽形態観察法：迅速・簡便・多量の観察撮影」の連載を開始するに際して.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日本作物学会紀事	6. 最初と最後の頁 78-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤詩織, 大井崇生
2. 発表標題 X線マイクロCTを用いたイネ小花の開閉を駆動する鱗被形態の経時解析.
3. 学会等名 日本作物学会第257回講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大井崇生
2. 発表標題 イネ組織形態学の再興 3D解析法の真価 .
3. 学会等名 遺伝研究集会「イネ分子遺伝学の再興」 発生学研究の真価 （招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤詩織, 河合恭甫, 上口(田中)美弥子, 大井崇生
2. 発表標題 X線マイクロCTを用いたイネの開花前後の鱗被の形態解析.
3. 学会等名 日本植物形態学会第34回総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大井 崇生
2. 発表標題 日本植物形態学会奨励賞受賞講演：植物の組織・細胞における内部微細構造の三次元解析.
3. 学会等名 日本植物形態学会第34回総会・大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上口 美弥子 (田中美弥子)  (Ueguchi-Tanaka Miyako)  (70377795)	名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授   (13901)	令和5年3月31日付での名古屋大学からの定年退職に伴い、研究期間2年目からは山内卓樹准教授に分担課題が引き継がれた。
研究分担者	山内 卓樹  (Yamauchi Takaki)  (50726966)	名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授   (13901)	令和5年4月1日付で上口美弥子教授より分担課題が引き継がれた。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------