

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06273

研究課題名(和文) イネ科塩腺における分化過程での形態変化および塩ストレスに応じた分化シグナルの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the morphological changes in graminoid salt glands in the process of leaf development and the signals causing their differentiation in response to salinity stress

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) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネ科ヒゲシバ亜に属する耐塩性植物の葉表皮には、塩害耐性に寄与すると考えられる小毛と、食害抵抗に寄与すると考えられる大毛が分布している。小毛と大毛の数は、それぞれ塩ストレスや食害ストレスによって増減すると考えられているが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究では、未熟な葉において小毛と大毛が同じ部位に位置する未分化な細胞から分化していく過程の外形変化を走査型電子顕微鏡観察によって明らかにした。また、生育時の塩ストレス処理によって大毛数は変化せずに小毛数が有意に増加することを示した。しかし、このような現象はジャスモン酸、アブシジン酸、サイトカイニンの付与実験では再現されなかった。

研究成果の概要(英文)：Microhairs, which are considered to increase salt tolerance, and macrohairs, which are considered to increase insect resistance, are distributed on the leaf surface of salt-tolerant plants belonging to the subfamily Chloridoideae in the Poaceae. The numbers of microhairs and macrohairs are considered to increase or decrease by salt-stress or feeding damage. We have showed by scanning electron microscopy that both of the microhairs and macrohairs developed from undifferentiated cells in the same position of the leaves. We have also clarified that the salt-treatment increased the number of microhairs but did not affect that of macrohairs. The treatment of jasmonic acid, abscisic acid, and cytokinin did not cause such as phenomenon.

研究分野：作物生産科学

キーワード：植物 ストレス 生理学 形態学 毛状突起 走査型電子顕微鏡 透過型電子顕微鏡 FIB-SEM

1. 研究開始当初の背景

植物体を覆う表皮の一部は、毛状突起として外界に突出し、種々の機能を担っている。毛状突起はイネ科植物の茎葉においては、形態学的に3種に分けられる¹⁾(図1)。それ

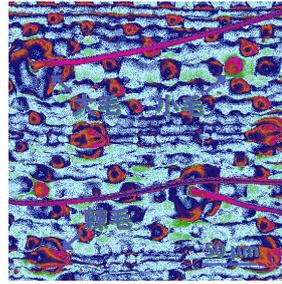


図1:イネ科植物における3種の毛状突起。ローズグラス, 葉身背軸側, SEM

らのうち、肉眼でも見える長さの毛である「大毛」、手で触れた際に引っかかる棘である「棘毛」は、虫や動物による食害を防ぐ物理的な抵抗として機能することが知られている。そして、それらより微小な二細胞性の「小毛」があるが、イネ科に共通する機能は不明で、多くの作物においては葉における存在意義が見出されていない。しかし、主にヒゲシバ亜科に属する一部の耐塩性植物では、葉の表面へ塩を排出することが知られており、小毛が塩腺として機能していると考えられている。

これまで我々は、ヒゲシバ亜科に属するイネ科牧草「ローズグラス(*Chloris gayana* Kunth)」を

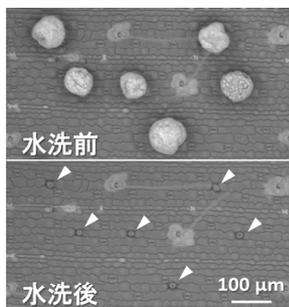


図2:ローズグラス葉表面上の塩排出液(上)および小毛(下)。葉の同一箇所を水洗前後に撮影。SEM 低真空モード。

供試し、微小な小毛(直径約15 μm)の真上に塩水溶液が排出されることを、生鮮試料の観察が可能な低真空条件下での走査型電子顕微鏡(SEM)観察で明らかにした²⁾

(図2)。この塩腺として働く小毛を構成する2つの細胞(頂部細胞および基部細胞)は、成熟した葉においても中央液胞が発達せず細胞質の密度が高く、多数のミトコンドリアを有することを透過型電子顕微鏡(TEM)観察で明らかにし¹⁾(図3)、小毛はエネルギー消費を伴う能動輸送によって塩を排出するという仮説を我々は示した。また、表面の微細構造観察に優れるクライオ

SEMにより、頂部細胞のクチクラには亀裂や孔はなく、表層ワックスが欠如していることを明らかにし、加えて実体顕微鏡での経時観察によって塩水溶液は継続的に排出されていることを確かめた。つまり、ローズグラスの小毛は、その表面を覆うクチクラを破らずに、ワックスが少なく浸水性の高い細胞壁・クチクラから、塩水溶液を滲み出させるようにして排出し続けることを明らかにした³⁾。

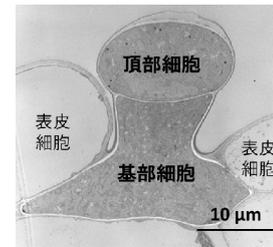


図3:ローズグラスにおける小毛の断面図(TEM)

以上のように、イネ科における塩腺(小毛)は、細胞構造の崩壊を伴わず継続的に塩水溶液を排出する方式であることが明らかになってきた。この排出方式は、双子葉植物において塩腺として知られる囊状毛(発達した液胞の中に塩分を集積して細胞を肥大化させ、最終的に破れて塩を排出する毛状突起)⁴⁾とは異なり、細胞構造を壊さずに塩排出を続けることが可能であるため、植物体にかかる負荷が少ないと考えられ、農学的応用が期待される。

2. 研究の目的

作物の耐塩性向上に向けて、塩腺として働く小毛を増加させる形態形成メカニズムの解明に取り組む。

ローズグラスの葉表皮において小毛と大毛は維管束に平行な同一の直線上に分布することが見出されており¹⁾、両者は同一の発生源から分化すると考えられる。また、動物による食害が起きた際に発生する植物ホルモンであるジャスモン酸を外部から投与すると、大毛が増加して小毛が減少することが近年報告されている⁵⁾。

そこで、(1)未発達な葉における小毛と大毛の分化過程の形態変化を電子顕微鏡レベルで解明し、(2)塩ストレスに応じて両者の数を制御する植物ホルモンを特定することで「小毛と大毛

は共通の起源から分化し、両者の数は植物ホルモンを介して互いに拮抗して増減する」という仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、我々がこれまでにイネ科における塩腺研究のモデルとして形態情報を得てきた牧草「ローズグラス」を供試した。ローズグラス(品種:カタンボラ)を人工気象室(明期:14 h, $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 28°C / 暗期:10 h, 20°C)内にて土耕栽培(培養土・水道水施与)で生育し、以下の実験に用いた。

(1) 小毛と大毛の分化過程の形態変化観察:

第1葉展開日を1日目とし、7日目の植物体において、葉を丁寧に剥ぎ取り、上位葉の葉鞘内で伸長中の第6葉を露出し、固定・脱水・乾燥等の試料作製を必要としない低真空SEM(TM3030, Hitachi)で未分化な表皮の形態観察を行った。また、主茎第6葉について、7日目(葉身が上位葉葉鞘から外に出始めている頃)、14日目(葉身が上位葉葉鞘から完全展開した直後)に葉身中央部から切り出し、樹脂包埋試料を作製して横断切片をTEM(H7500, Hitachi)で観察した¹⁾

(2) 小毛と大毛の増減の測定:

塩ストレス処理実験では第1葉展開から7日間の予備生育後、NaCl水溶液を14日間施与した。

植物ホルモン処理実験では、第1葉展開から10日間の生育後、各植物ホルモン溶液で湿らせた脱脂綿を葉鞘部に巻き付ける処理を3日間行い⁵⁾、その後8日間生育させた。

各処理区ともに第1葉展開から21日後に主茎第7葉葉身中央部をSEM(TM3030, Hitachi)で観察し、小毛および大毛の数を計測した。

各処理による葉面積の減少を考慮するため、小毛と大毛の存在する表皮細胞列を「毛状突起

列」として新たに定義し、その列上の表皮細胞100個あたりの数を算出することで両者の増減を評価した。

4. 研究成果

(1) 小毛と大毛の分化過程の形態変化:

SEM観察により、完全展開した葉身では小毛と大毛の外形はすでに完成しているが、伸長中の長さ1 cm未満の未熟な葉身では基部に近いほど大毛の長さが短くなり、基部から1 mm未満の部位で小毛・大毛とも同じ外形を示す未分化な段階であることが明らかとなった(図4)。この未分化な段階の葉についてTEMで観察し、細胞内微細構造の変化を解析することを試みたが、複雑な内部構造を有する小毛の発達過程を正確に把握するには、従来のTEMによる超薄切片の断面観察だけでなく、細胞全体を網羅する立体構造観察を要することが分かった。そこで、集束イオンビーム加工装置-走査型電子顕微鏡(FIB-SEM)を用いた三次元再構築法を植物の葉でも行えるように、まずイネの葉身の葉肉細胞を材料に手法を確立した(発表論文①)。しかし、研究期間内にローズグラスでの観察までには至らなかった。今後、本手法により、小毛を構成する2つの細胞内の微細構造の全容を解明する必要がある。

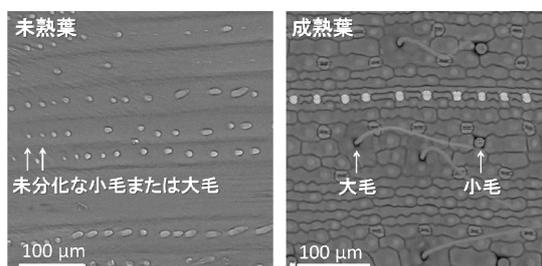


図4:ローズグラスにおける伸長中の第6葉葉身基部(左)と完全展開した第7葉葉身中央(右)の葉表面構造。SEM低真空モード。

(2) 小毛と大毛の増減:

塩ストレスとして、NaCl水溶液を与えて生育した処理区について、処理開始後に伸長した葉における小毛および大毛の数を計測し、塩ストレス強度(0-200 mM)が高まるに伴って小毛が

有意に増加することを明らかにした。

各種植物ホルモン溶液を生育途中の植物体に茎葉表面から付与した処理区について、伸長した葉における小毛および大毛の数を調査した。まず、先行研究⁵⁾のある食害ストレスに關与する「ジャスモン酸」の処理では、小毛数は有意に増減しないが、大毛数が増加することが確かめられた。一方、乾燥・塩ストレスに關与する「アブシジン酸」の処理では、塩ストレス実験より小毛の増加が予想されたが、小毛と大毛のどちらとも増減はみられなかった。細胞分裂に關与する「サイトカニン(ベンジルアデニン)」の処理では、小毛と大毛の両方の数が増加することが確かめられた。今後、塩ストレス時に見られたような小毛だけを増加させるシグナル因子を特定するため、更なる調査が必要である。

<引用文献>

- ① Oi T, Taniguchi M, Miyake H. 2012. Morphology and ultrastructure of the salt glands on the leaf surface of Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth). *International Journal of Plant Sciences* 173: 454-463.
- ② Oi T, Hirunagi K, Taniguchi M, Miyake H. 2013. Salt excretion from the salt glands in Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth) as evidenced by low-vacuum scanning electron microscopy. *Flora* 208: 52-57.
- ③ Oi T, Miyake H, Taniguchi M. 2014. Salt excretion through the cuticle without disintegration of fine structures in the salt glands of Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth). *Flora* 209: 185-190.
- ④ 内山泰孝, 杉村順夫. 1985. *Atriplex nummularia* のう状毛の形態と役割. 日本

作物学会紀事, 54: 39-46.

- ⑤ Kobayashi H, Yanaka M, Ikeda TM. 2010. Exogenous methyl jasmonate alters trichome density on leaf surfaces of Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth). *Journal of Plant Growth Regulation*, 29: 506-511.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Oi T, Enomoto S, Nakao T, Arai S, Yamane K, Taniguchi M. 2017. Three-dimensional intracellular structure of a whole rice mesophyll cell observed with FIB-SEM. *Annals of Botany* : 1-8, available online, doi:10.1093/aob/mcx036.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 大井崇生, 榎本早希子, 中尾知代, 谷口光隆, 山根浩二, 荒井重勇. FIB-SEM によるイネ葉肉細胞の三次元構造解析. 日本植物形態学会第27回総会・大会, 2015年9月5日 (新潟コンペディションセンター, 新潟)
- ② 大井崇生, 榎本早希子, 中尾知代, 山根浩二, 荒井重勇, 谷口光隆. FIB-SEM による次世代形態観察法: イネ葉肉細胞の三次元微細構造解析. 日本作物学会第241回講演会, 2016年3月28~29日 (茨木大学, 水戸)
- ③ 大井崇生, 榎本早希子, 中尾知代, 山根浩二, 荒井重勇, 谷口光隆. FIB-SEMによる植物試料観察: イネ葉肉細胞の三次元微細構造解析. 日本顕微鏡学会第72回学

術講演会, 2016年6月14～16日(仙台国際センター, 仙台)

④ 大井崇生, 小田昌宏, 森健策, 山根浩二, 谷口光隆. 三次元再構築法を用いた塩ストレスに伴うイネ葉肉細胞の微細構造変化の観察. 日本作物学会第242回講演会, 2016年9月10～11日(龍谷大学, 大津)

⑤ Oi T. Morphology and salt excretion of the salt glands in Rhodes grass. Univ of Western Australia & Nagoya Univ 2nd Research Workshop, 2016.12.7. (Perth, Australia)

⑥ 大井崇生, 榎本早希子, 中尾知代, 荒井重勇, 山根浩二, 谷口光隆. イネ葉肉細胞葉緑体の塩ストレスに伴う形態変化の三次元解析. 日本作物学会第243回講演会, 2017年3月29～30日(東京大学, 東京)

⑦ 花井宏彰, 大井崇生, 谷口光隆. 塩ストレスおよび植物ホルモンがローズグラス葉表面における毛状突起数の増減に及ぼす影響. 日本作物学会第243回講演会, 2017年3月29～30日(東京大学, 東京)

[その他]

ホームページ等

<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shigen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大井 崇生 (OI, Takao)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号: 60752219