

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15823

研究課題名(和文) イネ科葉肉組織の葉緑体配置と二酸化炭素の関心の三次元形態観察による解明

研究課題名(英文) Three-dimensional anatomy of chloroplasts in mesophyll tissues related to carbon dioxide in leaf tissues of Grasses

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：C3植物イネとC4植物シコクビエの葉肉細胞とその葉緑体の細胞内配置について、連続切片・光学顕微鏡法および連続切片・卓上走査型電子顕微鏡(SEM)法によって三次元再構築像が初めて示された。また、細胞間隙の三次元再構築にも成功し、光合成に必要な二酸化炭素の取り込み能力に直結すると考えられている「細胞間隙に面する葉肉細胞の葉緑体の面積」を実測値で算出することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて連続切片・卓上SEM法による三次元再構築法が確立した。これにより、組織の内部構造を細胞・細胞内小器官のレベルで3D解析することが可能となった。本手法で使用する卓上機は大型で高額な電子顕微鏡よりも導入しやすく、操作方法も簡便であるため、学生やこれまで電子顕微鏡を使用したことのなかった初心者にも利用し易い利点もあり、今後の普及・展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：The three-dimensional reconstructed models of mesophyll cells and their chloroplasts of rice (C3 plant) and finger millet (C4 plant) were shown by serial-sectioning light microscopy and serial-sectioning electron microscopy (using desk-top scanning electron microscope). The intercellular airspaces were also analyzed three-dimensionally, and the surface area of mesophyll cells and chloroplasts facing intercellular airspaces were measured.

研究分野：植物形態

キーワード：イネ科作物 C4光合成 葉緑体 環境ストレス 三次元観察 卓上SEM マイクロX線CT

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

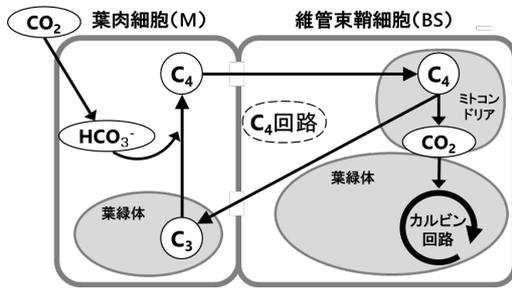


図1: C₄光合成回路(NAD-ME型の例)

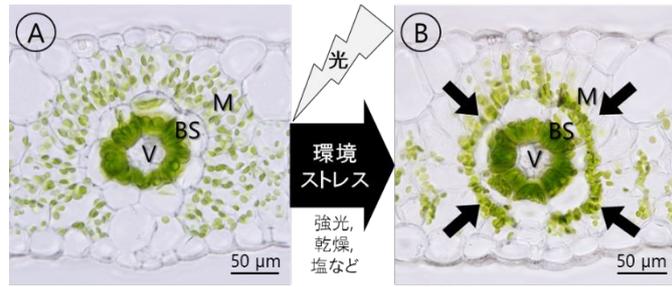


図2: C₄植物における葉肉葉緑体配置. シコクビエ(NAD-ME型C₄種)での例. 左: 分散配置, 右: 凝集配置. BS: 維管束鞘, M: 葉肉, V: 維管束.

イネやムギなどのC₃光合成植物において, 光合成の主役となる葉肉組織の葉緑体は通常, 細胞周縁に広がって配置している. しかし, 葉緑体は弱光下では光の入射方面に対して垂直に配列して受光率を高める集合運動を行い, 強光下では入射方向に対して平行に配列して過剰光による光障害を軽減する逃避運動を行うなど, 光に応じて葉緑体はその細胞内配置を変化させることが明らかにされており, その分子機構の解明が進められている (末次・和田 2013).

一方, トウモロコシやシバなど高温・乾燥地に適したC₄光合成植物においては, 葉肉細胞だけでなく維管束を取り囲む維管束鞘細胞でも葉緑体が発達し, CO₂を濃縮するC₄回路が機能している(図1). 両細胞の葉緑体配置は異なり, 葉肉葉緑体は細胞周縁に散在しているが (**分散配置**) (図2A), 維管束鞘葉緑体は維管束に対して求心的または遠心的に局在している. 維管束鞘葉緑体は外環境の影響を受けず植物種ごとに配置が定まっている一方, 葉肉葉緑体は強光・乾燥・塩などの環境ストレスに応答して分散配置から維管束鞘細胞側へ局在する**凝集配置** (図2B) へと変化することが報告されている (Maai *et al.* 2011). この現象はC₃植物やC₃-C₄中間植物では見られずC₄植物に広くみられることからC₄植物に共通した特性に由来していると考えられているが, その分子機構は未だ不明な点が多く, 凝集配置の生理的意義は明らかにされていない.

これに対し, 当研究グループは, 強光下であっても葉周辺のCO₂濃度が高ければ凝集程度が低下する, つまり分散配置を維持することをシコクビエ (葉肉細胞が大きい一方, 葉肉葉緑体の数が少なくその配置を観察し易い葉構造を有する) を用いた実験で見出した (Kato *et al.* under review). この結果は葉緑体の配置決定にCO₂が関わることを示唆する. 一般的に, 環境ストレスに晒されると植物は気孔を閉鎖するために葉内CO₂濃度は低下するが, C₄植物では維管束鞘細胞にCO₂を濃縮する機構を持つことや, 葉緑体が大きく発達してミトコンドリアも多いため呼吸活性が高いことから, 維管束側のCO₂濃度は細胞間隙に比べて相対的に高く維持されると考えられる. これらよりC₄植物では葉内CO₂濃度が適正值以上の際には葉肉葉緑体は細胞内に散らばって細胞間隙からのCO₂吸収に効率の良い分散配置をとり, 葉内CO₂濃度が低く維管束鞘細胞側でのCO₂発生が相対的に多い際には葉肉葉緑体は維管束側からの漏出CO₂の回収に効率の良い凝集配置をとると考えられる. 我々は, この分散-凝集のメカニズムを解明することで, これまでに示されてこなかった「葉肉葉緑体がCO₂濃度の高い方に移動する性質を持つ可能性」を実証できると考えた.

葉緑体配置とCO₂との関わりを評価するためには, 気孔からCO₂が流入してくる細胞間隙や, C₄回路によってCO₂が濃縮される維管束鞘細胞との位置関係の把握がカギとなる. しかし, 葉の内部構造を観察するためには組織を薄く切り出す必要がある, 特にC₄植物は維管束に対して同心円状に細胞が広がるため, これまでの研究では凝集運動の観察は主に横断切片に限られてきた. また, イネ科作物の葉肉細胞は細胞壁が複雑にくびれた有腕構造を持つため (長南 1970) (図3), その細胞内配置の意義を考えるには組織中における細胞の立体像を捉える必要がある.

2. 研究の目的

そこで本研究では、光合成タイプの異なる主要なイネ科作物を対象として以下の2つを目的とした。

ストレス条件下の**葉組織の構造を丸ごと三次元情報として取得し**、これまで評価が難しかった「**組織における細胞の位置**」「**各細胞の立体形状**」「**細胞内における葉緑体の配置**」の3点に着目して葉組織内の葉緑体の位置を網羅的に調査し、単に“細胞周縁に散らばっている”と記述されてきた“**分散配置**”を**立体的に記述して特徴ごとに分類し**、光合成特性との関連を見出す。

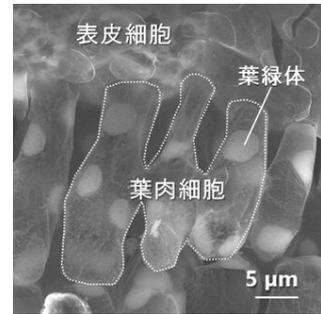


図3: イネ科葉肉細胞の有腕構造の列走査電子顕微鏡, シコクビエ, 縦断面。

光の強弱とCO₂濃度の2つの環境要因を制御して葉緑体の位置の変化を調査し, 葉緑体配置には光だけでなくCO₂も関与することをシコクビエ以外のC₄植物でも確かめ, さらにC₃植物を対象を広げ凝集運動のような現象の有無を様々な方向から観察して再検証する。

3. 研究の方法

当初の計画では、**高精度X線マイクロCT(コンピュータ・トモグラフィー)法**を用い、細胞壁と葉緑体を迅速簡便に3D解析し、イネ (C₃・温帯型)、コムギ (C₃・寒冷型)、ソルガム (C₄・NADP-ME型)、シコクビエ (C₄・NAD-ME型)、ローズグラス (C₄・PCK型) など多種の多様な葉組織を比較する予定であった。大学間研究協力協定の締結された西オーストラリア大学のサブミクロンレベルでの分解能を有するX線マイクロCT (Xradia 520 Versa, Zeiss) を用い、ローズグラス・シコクビエを対象に条件検討を行い(図4)、有効な手段であることは確かめられたが、初年度末に新型コロナウイルス(COVID19)の世界的感染が拡大して海外渡航が制限され、装置利用の目的が立たなくなった。

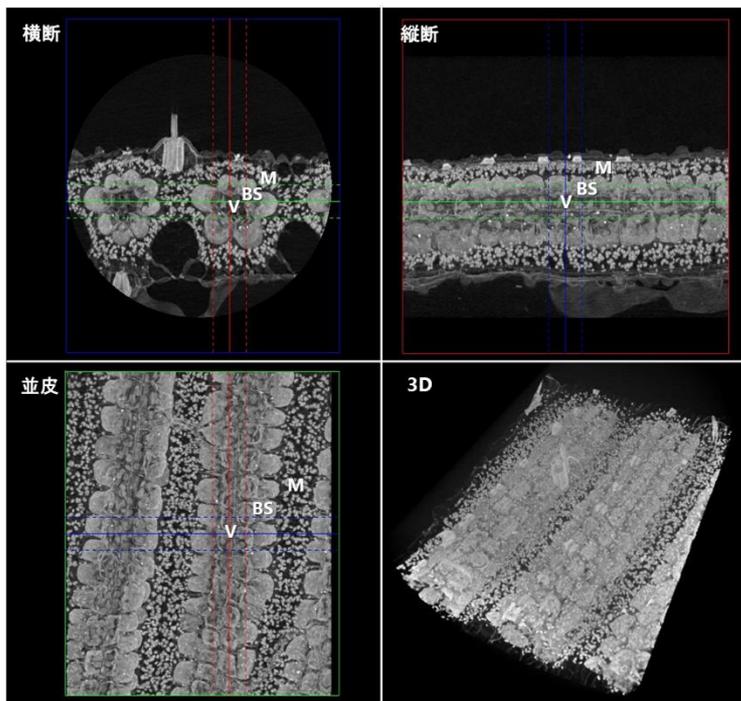


図4:
高分解能X線マイクロCTによる葉組織の三次元形態観察。
ローズグラス(PCK型C₄種)。
葉緑体(白粒)に表示焦点を合わせた。
ストレス条件下でサンプリングしたもので、葉肉葉緑体は分散配置を示している。
BS: 維管束鞘細胞,
M: 葉肉細胞,
V: 維管束。

そこで、観察手法の主軸を**ウルトラマイクロームによる連続切片の三次元(3D)再構築**に切り替えて研究を進めた。微細構造の保持に適した電子顕微鏡観察用の手法を用いて葉組織試料ブロックを作製し、厚さ0.5μm厚の精確な切片を100~300枚連続で切り出し、それらをまとめてスライドガラスに回収して光学顕微鏡で連続撮影を行い、画像解析ソフト(Image-Pro)上で3D再構築を行った。

しかし、光学顕微鏡像では凝集配置など密集している場合には個々の葉緑体を識別することが困難であった。そこで、当初の計画にはなかったが、スライドガラスに回収した切片に電子顕微鏡用の重金属染色を行い、走査型電子顕微鏡(SEM)で組織像を撮影する手法の導入に踏み切った。

この「連続切片 (serial section) -SEM (ssSEM) 法」そのものが近年普及してきた新しい手法であり、その撮影には高分解能の大型・高額なSEMが必要とされていたが、「コロナ禍」における行動範囲内に利用できる装置はなかったため、分解能が落ちるものの小型の卓上SEM (TM3000 / TM4000, Hitachi) を使用する観察系の確立から新規に取り組んだ。

4. 研究の成果

まず、光学顕微鏡を用いた連続切片-再構築法によって、イネ (C_3 ・温帯型) とシコクビエ (C_4 ・NAD-ME型) の葉肉細胞とその葉緑体の細胞内配置について表皮や維管束組織も含めた広域で3D解析が可能となった (Ouk *et al.* 2020)。これにより、一見葉の表裏で差異が見られないとされる単子葉イネにおける葉肉細胞の外形が、葉組織内の位置 (向軸側・背軸側・その中間) で異なっていることを見出した。さらに、細胞の形状に加えて細胞間隙の3D再構築に成功し、光合成に必要な CO_2 の取り込み能力に直結すると考えられている S_{mes} (細胞間隙に面する葉肉細胞の表面積) や、 S_c (細胞間隙に面する葉肉細胞の葉緑体の面積) の実測値での算出を可能にした。 S_{mes} や S_c は、二次元の横断面や縦断面の形状から計算式で推定する手法 (Evans *et al.* 1994) が多くの研究者に用いられてきたが、本研究では、3D再構築像の実測値だけでなく、その空間情報に基づいて横断・縦断面を再抽出して従来法による推定値も算出し、両者の比較も行った。その結果、イネの葉組織においては葉肉細胞が複雑にくびれた形状を示す横断切片より、双子葉植物の柵上組織のような形状を示す縦断切片に基づいて算出する方が、実測値により近い S_{mes} ・ S_c 値が得られる可能性を示した (Ouk *et al.* under review)。

さらに、連続切片-再構築法を卓上SEMによる撮影・観察系に発展させた。上述の光学顕微鏡用に作製したスライドガラス上の切片であっても、重金属染色と帯電軽減用コーティングを行えば、卓上SEMであっても組織・細胞・細胞内微細構造の観察が可能となった (図5)。一般的な透過型の電子顕微鏡に比べて低倍率から観察を始められる利点があり、光学顕微鏡のような広い視野での組織レベルの構造把握にも優れていた (図5A)。また、卓上SEMは分解能が低いとされているが、撮影条件の検討によって細胞壁の厚みや核、葉緑体、そしてミトコンドリアなども識別可能となった (図5B)。

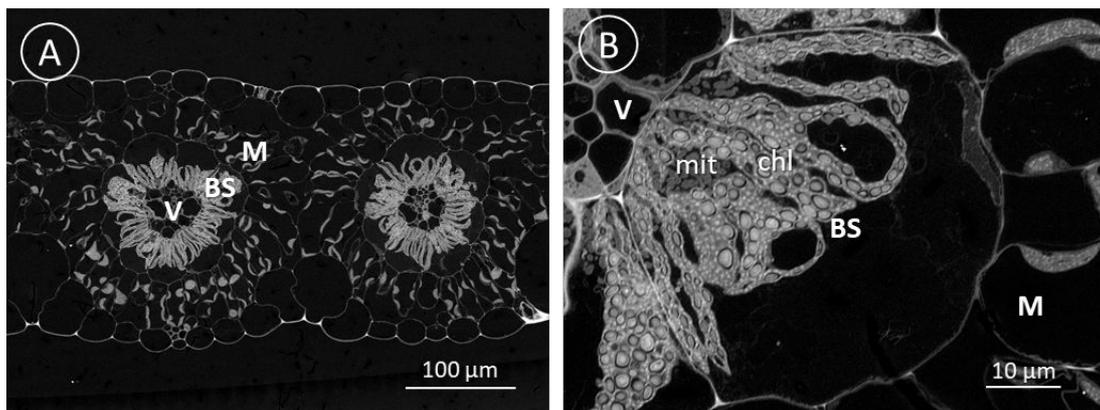


図5: 卓上SEMによる葉組織の切片観察像。シコクビエ (NAD-ME型 C_4 種)。光学顕微鏡用のスライドガラスに回収した連続切片を重金属 (酢酸ウランおよび酢酸鉛/クエン酸鉛) で染色し、反射電子像を撮影した。非ストレス条件下でサンプリングしたもので、葉肉葉緑体は分散配置を示している。BS: 維管束鞘細胞, M: 葉肉細胞, V: 維管束, chl: 葉緑体, mit: ミトコンドリア。

この切片-卓上SEM法を用いてシコクビエの葉組織を $0.5 \mu\text{m}$ 厚で 100 ± 40 枚の連続切片にして葉肉細胞とその葉緑体の領域を識別して画像解析ソフト上で積み上げることによって3D再構築像を作製した (図6)。これにより、葉肉細胞の複雑にくびれた外形と、その内部に配置する葉緑体の1つ1つをその形状を捉えながら細胞内における位置関係を理解することが可能となった。そこで、光の強弱と CO_2 濃度を制御して葉肉葉緑体に凝集運動を誘導する処理 (葉を空気から遮断した状態で強い青色光を4時間照射) を施し、その前後での葉肉細胞を3D解析した。その結果、細胞

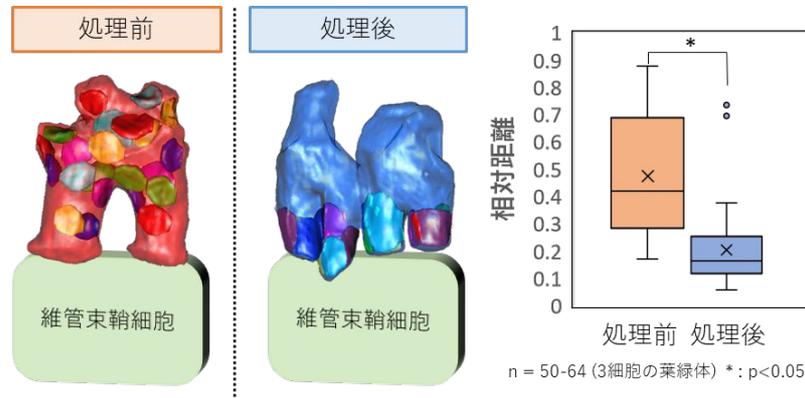


図6: シコクビエ (NAD-ME型C₄種)の葉肉細胞とその葉緑体の連続切片-卓上SEM法による三次元再構築像と葉肉葉緑体の維管束鞘細胞からの相対距離。凝集運動を誘導するストレス処理の前後で比較した。

の体積や表面積に有意な差はなかった一方で、個々の葉緑体の体積にはストレス処理で有意な減少が見られ、特に葉の背軸側に位置する細胞では葉緑体の形状が扁平に変化することなどが示された。また、維管束鞘細胞から葉肉細胞内の個々の葉緑体までの三次元空間における距離を直接算出することが可能となり、ストレス処理によって維管束側に葉緑体が集まる実態をより正確に捉えることが可能となった。

以上の通り、連続切片-卓上SEM法の確立によって葉組織の内部構造を細胞・細胞内小器官のレベルで3D解析することが可能となった。本手法で使用する卓上機は大型で高額な電子顕微鏡よりも導入し易く、操作方法も簡便であるため、学生やこれまで電子顕微鏡を使用したことのない初心者にも利用し易い利点もあり、今後の普及・展開が期待される。一方で、この手法を用いても葉内構造の3D解析を行うには多数の連続切片を作製・撮影する必要があるため、高分解能X線マイクロCTによる試料の非破壊観察に比べて桁違いに時間を要してしまう (CTスキャンであれば数時間で完了する撮影に、連続切片-卓上SEM法では数日を要する)。そのため、本研究期間中には、多数の植物種での比較を実施できず、葉緑体配置へのCO₂の関与を明確にするに至れなかったが、確立した観察系を活かして引き続き観察数を着実に増やし、これを達成したい。

【参考文献】

- 長南信雄 (1970). 禾穀類の葉における同化組織に関する研究: 第5報 葉肉構造の作物間の比較. 日本作物学会紀事, 39: 418-425.
- Evans J.R., von Caemmerer S., Setchel B.A., & Hudson G.S. (1994). The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21: 475-495.
- Kato Y., Kikutani R., Oi T., & Taniguchi M. (under review). Aggregative movement of C₄ mesophyll chloroplasts is promoted by the reduction of CO₂ concentration within leaf tissue.
- Maai E, Shimada S, Yamada M, Sugiyama T, Miyake H, & Taniguchi M. (2011). The avoidance and aggregative movements of mesophyll chloroplasts in C₄ monocots in response to blue light and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 62: 3213-3221.
- Ouk R., Oi T., & Taniguchi M. (2020). Three-dimensional anatomy of mesophyll cells in rice leaf tissue by serial section light microscopy. *Plant Production Science*, 23: 149-159.
- Ouk R., Oi T., Sugiura D., & Taniguchi M. (under review). 3D modeling of rice leaf tissue for proper estimation of surface area of mesophyll cells and chloroplasts facing intercellular airspaces from 2D section images.
- 末次憲之, 和田正三 (2013). 陸上植物の光応答戦略: 陸上植物における葉緑体の運動メカニズムの新機軸. 植物科学最前線, 4: 45-60.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 大井崇生, 山根浩二, 谷口光隆	4. 巻 31(1)
2. 論文標題 イネ葉肉細胞における葉緑体の細胞内配置と立体構造に塩ストレスが与える影響.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 光合成研究	6. 最初と最後の頁 4-13
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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 大井崇生	4. 巻 4(7)
2. 論文標題 連続切片 - 光学顕微鏡法によるイネ葉肉細胞と葉緑体の三次元形態解析.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 564-568
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 -
1. 著者名 大井崇生, 山根浩二, 谷口光隆	4. 巻 32(1)
2. 論文標題 FIB-SEMを用いた三次元再構築法によるイネ葉肉細胞と葉緑体の形態解析.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Morphology	6. 最初と最後の頁 19-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5685/plmorphol.32.19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Oi T, Enomoto S, Nakao T, Arai S, Yamane K, Taniguchi M.	4. 巻 125(5)
2. 論文標題 Three-dimensional ultrastructural change of chloroplasts in rice mesophyll cells responding to salt stress.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Botany	6. 最初と最後の頁 833-840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/aob/mcz192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ouk R, Oi T, Taniguchi M.	4. 巻 23(2)
2. 論文標題 Three-dimensional anatomy of mesophyll cells in rice leaf tissue by serial section light microscopy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Production Science	6. 最初と最後の頁 149-159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1343943X.2019.1702470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計28件(うち招待講演 5件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ouk R, Oi T, Taniguchi M.
2. 発表標題 Three-dimensional analysis on the internal structure of rice leaf tissue and the intracellular structure of mesophyll cells.
3. 学会等名 The 10th Asian Crop Science Association Conference (ACSAC 10) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤優太, 大井崇生, 谷口光隆.
2. 発表標題 C02によるC4植物の葉肉葉緑体における凝集配置の制御.
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大井崇生, 松永隼, 前田芽依奈, 菊谷里美, 谷口光隆.
2. 発表標題 卓上SEMによる連続切片-三次元再構築法を用いた葉緑体の形状と細胞内配置の解析.
3. 学会等名 日本植物形態学会第33回総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永隼, 菊谷里美, 谷口光隆, 大井崇生.
2. 発表標題 連続切片-走査型電子顕微鏡法によるシコクビエ葉肉細胞の三次元形態解析.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第64回シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田芽依奈, 松永隼, 菊谷里美, 谷口光隆, 大井崇生.
2. 発表標題 C4植物シコクビエの葉肉細胞と維管束鞘細胞の三次元構造解析.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第64回シンポジウム
4. 発表年 2021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と開花中の鱗被の形態解析.
3. 学会等名 日本作物学会第253回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鬼頭朋己, 谷口光隆, 大井崇生.
2. 発表標題 C4植物シコクビエにおける凝集後の葉肉葉緑体の分散に光および大気条件が与える影響.
3. 学会等名 日本作物学会第253回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢田斉, 大井崇生, 谷口光隆.
2. 発表標題 C3植物の葉肉細胞で新たに見出された葉緑体の偏在配置.
3. 学会等名 日本作物学会第253回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 O I T.
2. 発表標題 Three-dimensional ultrastructural change of chloroplasts in rice mesophyll cells responding to salt stress observed with FIB-SEM.
3. 学会等名 Biomacromolecular RIKEN Seminar (hosted by Biomacromolecules Research Team) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大井崇生, 谷口光隆
2. 発表標題 卓上走査型電子顕微鏡の科学教育・研究への新たな活用：オンライン観察と組織内部構造観察.
3. 学会等名 日本作物学会第250回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大井崇生
2. 発表標題 SEMの活用が生物電顕観察の発展・普及の切り札になる！：FIB-SEMによる高精度三次元再構築と卓上SEMによる簡便な切片観察.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第45回関東支部講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大井崇生, 加藤優太, オーク ラチャナ, 濱頭葵, 杉浦和彦
2. 発表標題 切片 - 走査型電子顕微鏡法による斑点米カメムシ抵抗性品種の籾殻における組織・細胞の構造解析.
3. 学会等名 日本作物学会第251回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤優太, 大井崇生, 谷口光隆
2. 発表標題 C4植物黄化実生の葉肉細胞における黄色体の凝集配置.
3. 学会等名 日本作物学会第251回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ouk R, Oi T, Sugiura D, Taniguchi M.
2. 発表標題 Comparison of methods for calculating mesophyll and chloroplast surface areas facing to intercellular airspaces based on 3D reconstruction models and 2D section images.
3. 学会等名 日本作物学会第251回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大井崇生, 谷口光隆, 榎本早希子, 中尾知代, 荒井重勇, 小田昌宏, 森健策, 山根浩二.
2. 発表標題 連続切片法による植物細胞の内部微細構造の三次元観察と3Dモデルによる立体像把握.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第75回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大井崇生, 山根浩二, 谷口光隆.
2. 発表標題 連続切片法で広がる光学・電子顕微鏡観察の可能性: 葉組織・細胞の三次元解析の例. シンポジウム: 最先端可視化技術による植物解析～見る顕微鏡から捉える顕微鏡へ～.
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ouk R, Oi T, Taniguchi M.
2. 発表標題 Three-dimensional anatomy of the mesophyll cells at different positions in rice leaf tissue.
3. 学会等名 日本作物学会第248回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口光隆, 山村莉穂, 大井崇生.
2. 発表標題 C3植物からC4植物への進化にともなう葉肉葉緑体凝集運動の獲得.
3. 学会等名 日本作物学会第248回講演会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------