

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02175

研究課題名(和文) 維管束鞘細胞と維管束柔細胞によるNa<sup>+</sup>排出・蓄積能力と耐塩性との関連性の解明

研究課題名(英文) Role of xylem parenchyma and bundle sheath cells in rice under salt stress

研究代表者

山根 浩二 (Yamane, Koji)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：50580859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)： 塩感受性の日本晴と耐塩性品種であるPokkaliを用いて実験を行った。100 mMのNaClストレスを4日間処理した後、最上位展開葉を固定して150 nm間隔で1500枚程度の連続切片を作製し、維管束鞘細胞と維管束柔細胞を三次元的に解析した。塩ストレスを処理すると、維管束鞘細胞で顕著な差が観察された。Pokkaliでは対照区とストレス区で顕著な違いは観察されなかったが、日本晴ではミトコンドリアの数が3倍に増加して体積率が増加していた。日本晴では、維管束鞘細胞においてミトコンドリアで多量のエネルギーを作り出して、塩を蓄積させる機構が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでイネの維管束鞘細胞の役割は明確になっていなかったが、塩ストレス下で細胞内のミトコンドリアが増加していたことから、塩の流入を食い止める役割が示唆され、今後のイネ耐塩性向上に向けて新奇の方策を示唆できた点が学術的に大きいと考えられる。さらに、本研究において、ウルトラマイクロームと卓上走査型電子顕微鏡を用いた細胞内観察と取得した画像を用いた三次元解析が可能となった。これまで特殊な装置であるSerial Block Face-Scanning Electron Microscopeなどが用いられてきたが、汎用機器での解析が可能となったのは、今後の学術的意義として大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)： In this study, the salt-sensitive Nipponbare and salt-tolerant variety Pokkali were used to investigate salt adaptive mechanisms focused on bundle sheath cells and xylem parenchyma cells. After the treatment with 100 mM NaCl for 4 days, the uppermost expanded leaves were fixed, and then, around 1500 serial sections were cut at 150 nm intervals to three-dimensionally analyze the two cells. In Pokkali, the changes in the ultrastructure of organelles such as plastids and mitochondria were not observed. In Nipponbare, however, the number of mitochondria increased three-fold and the volume ratio of mitochondria in bundle sheath cells was increased. These results suggest that bundle sheath cells in Nipponbare could play an important role to stop sodium influx into mesophyll cells by producing ATP in mitochondria under salt stress.

研究分野：植物超微形態学

キーワード：イネ 塩ストレス 三次元再構築 維管束鞘細胞 維管束柔細胞

## 1. 研究開始当初の背景

作物における塩ストレス障害は、葉緑体内で発生する過剰な活性酸素が原因である。過剰活性酸素の生成は、細胞内への過剰なナトリウム ( $\text{Na}^+$ )の流入・蓄積ともなって引き起こされるため、耐塩性を有する植物は、体内への過剰な  $\text{Na}^+$ の流入を抑制したり、過剰な  $\text{Na}^+$ を液胞に隔離したりする機構をもっている (Munns and Tester, 2009, Annu. Rev. Plant Biol. 59: 651-681)。耐塩性植物であるローズグラスを用いた観察では、 $\text{Na}^+$ は維管束鞘細胞に多く蓄積されており、維管束周辺に  $\text{Na}^+$ を集積させ、葉肉細胞への  $\text{Na}^+$ の流入を抑制させることが、耐塩性に重要であると推察されている。

イネの葉においても同様の機構が存在すると考えられるが、維管束鞘細胞や維管束柔細胞が  $\text{Na}^+$ の流入抑制機能を持つという報告はない。しかし、維管束周辺の細胞には、葉緑体 (Chl)やミトコンドリア (Mit)のような ATP 生産能力を持つオルガネラが存在することから、これらの細胞内のオルガネラの挙動を調べることで、ATP 依存的に維管束鞘細胞や維管束柔細胞に  $\text{Na}^+$ を蓄積させたり、維管束に排出させたりするという、新たな耐塩性機構の解明が期待される。

古くから、電子顕微鏡を用いて細胞内におけるオルガネラの挙動が解析されてきたが、二次元的な観察では細胞の一部しか観察できない。そのため、三次元的な解析が必要となるが、維管束周辺の細胞は非常に大きいため、技術的な困難さのためにほとんど報告がない。そこで本研究では、汎用機器であるウルトラミクロトームと電子顕微鏡観察による三次元再構築法を用いて、塩感受性品種の日本晴と耐塩性品種の Pokkali の維管束鞘細胞や維管束柔細胞を三次元的に解析し、両細胞の特徴や塩ストレス応答を調べることで、塩ストレス下における細胞の役割を明らかにすることを目的とする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、塩感受性の異なる日本晴と Pokkali を用い、維管束鞘細胞と維管束柔細胞に細胞内の特徴や塩ストレス下におけるオルガネラの挙動を調べることで、維管束周辺における  $\text{Na}^+$ の流入抑制能力の有無を調査することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 植物材料

塩感受性の日本晴と耐塩性の Pokkali を用い、100 mM の塩処理を 4 日間行った (対照区は NaCl を含まない培地で栽培した)。この濃度と日数は、耐塩性品種は気孔が閉じて光合成は抑制されるが障害はほとんど生じず、塩感受性品種では最初に観察される障害である葉緑体チラコイドの膨潤が生じる直前であることが、予備実験で判明している。

### 3-2. 電顕固定、切片の作製と観察

塩ストレス処理後、両品種の最上位展開葉を用いて電顕固定を行った。固定後、ウルトラミクロトーム (UC7, Leica)を用いて 150 nm 間隔で連続切片を作製した。連続切片は、幅 × 長さ × 厚さ = 9 × 32 × 0.3 mm にカットしたガラス板に回収した。1 枚のガラス板に 200~300 枚の連続切片を回収し、それを 5~6 枚のガラス板に分けることで、1500 枚程度 (150~225  $\mu\text{m}$ )を回収した。ガラス板に切片を回収後、酢酸ウランに代わる電子染色剤である EM ステイナー (日新 EM)と酢酸鉛で二重染色した。電子顕微鏡観察時のチャージアップを避けるため、カーボンコート (CADE, メイワフォーシス)を用いてコーティングした。回収した切片は、卓上走査型電子顕微鏡 (TM4000 Plus II, Hitachi)で観察した。維管束鞘細胞は約 5,000 倍、維管束柔細胞は 8,000~10,000 倍の倍率で観察し、細胞全体の連続画像を取得した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 維管束周辺の全体像

維管束周辺の連続画像を 1600 枚 (250  $\mu\text{m}$ )撮影して直交断面像を観察したところ、イネの維管束鞘細胞は、z 軸方向におよそ 40~50  $\mu\text{m}$  程度で 150 nm 間隔で連続切片を作ると 300 枚程度の画像で収まることがわかった (図 1)。維管束の中の道管、篩管、および柔細胞は、維管束小細胞よりも z 軸方向に長い細胞であった。とくに、維管束柔細胞は、z 軸方向に 50  $\mu\text{m}$  以上ある細胞も多く、細長い管上の細胞となっていた。

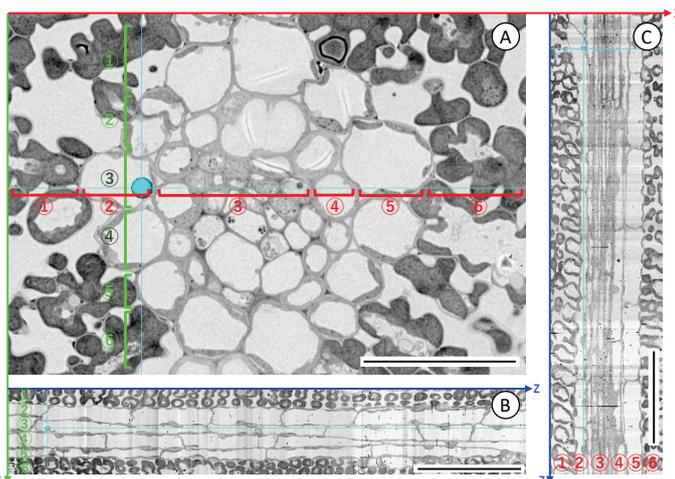


図1. イネ日本晴の維管束付近の電顕像と連続画像を用いた直交断面像。(A) 実際に撮影したxy面の像。(B, C) 連続画像を約1,671枚積み重ねたxzとyzの直交断面像。Aの図中のバーは25  $\mu\text{m}$ を示し、BとCの図中のバーは50  $\mu\text{m}$ を示す。

#### 4-2. 維管束柔細胞の構造

NaClを含む塩類は、主に、道管を経由して流入してくるため、道管に隣接する細胞に着目して観察を進めた。道管に隣接する維管束柔細胞は、道管との間に二次壁が発達して肥厚していたが(図2・上段)、道管との間に部分的にしか二次壁が肥厚していない細胞も観察された(図2・下段)。道管との間に部分的に二次壁の肥厚が見られない柔細胞は、細胞質が密で液胞が小さく、多くのミトコンドリアが含まれる特徴を有していた(図2・下段)。道管は、維管束柔細胞と維管束鞘細胞に隣接していたが、この細胞質が密である柔細胞との間にだけ二次壁が部分的に肥厚していないことから、水や無機塩類の通過に対して重要な役割を担っている細胞である可能性が示唆された。

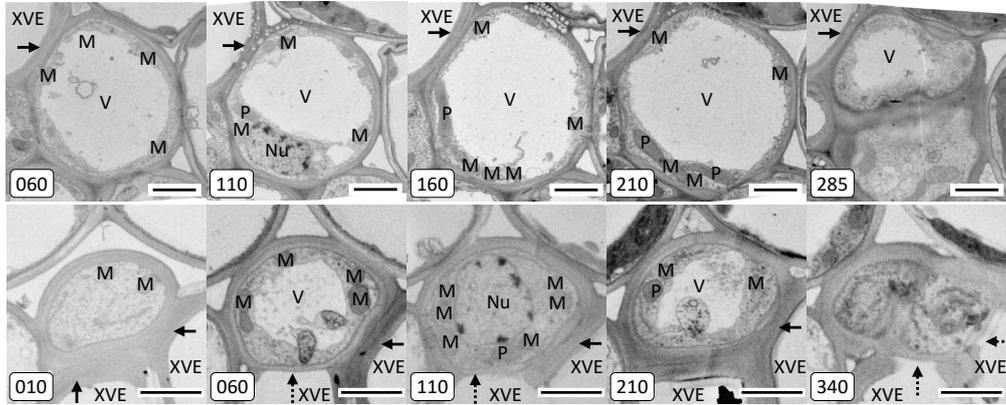


図2. 道管に隣接する2種類の維管束柔細胞の連続画像。(上段)液胞が大きく、道管との間に二次壁が発達しており、二次壁の途切れは無い(実線矢印)。(下段)液胞が小さく、細胞質が密でMitが多く含まれている。道管との間に二次壁が発達している部分もあるが(実線矢印)、二次壁が無い部分(点線矢印)もある。M: Mitochondria, Nu: Nucleus, P: Plastid, V: Vacuole

この二つの特徴の異なる維管束柔細胞を三次元的に解析したところ(図3)、道管との間に二次壁の肥厚が発達している柔細胞では、細胞体積のうち約60%が液胞でミトコンドリアの体積率は約3%であったのに対して、道管との間に部分的に二次壁の肥厚が見られない細胞では、液胞の占める割合は30%でミトコンドリアの体積率は約8%であった。8%というミトコンドリアの体積率は、葉肉細胞よりも高い値であった(葉肉細胞では約5%)。そのため、ミトコンドリアで多量のエネルギーを作り出し、物質の出入りに密接に関与する細胞であることが推察された。しかし、塩ストレス処理では大きな変化は観察されず、さらに品種間による差も検出されなかった。

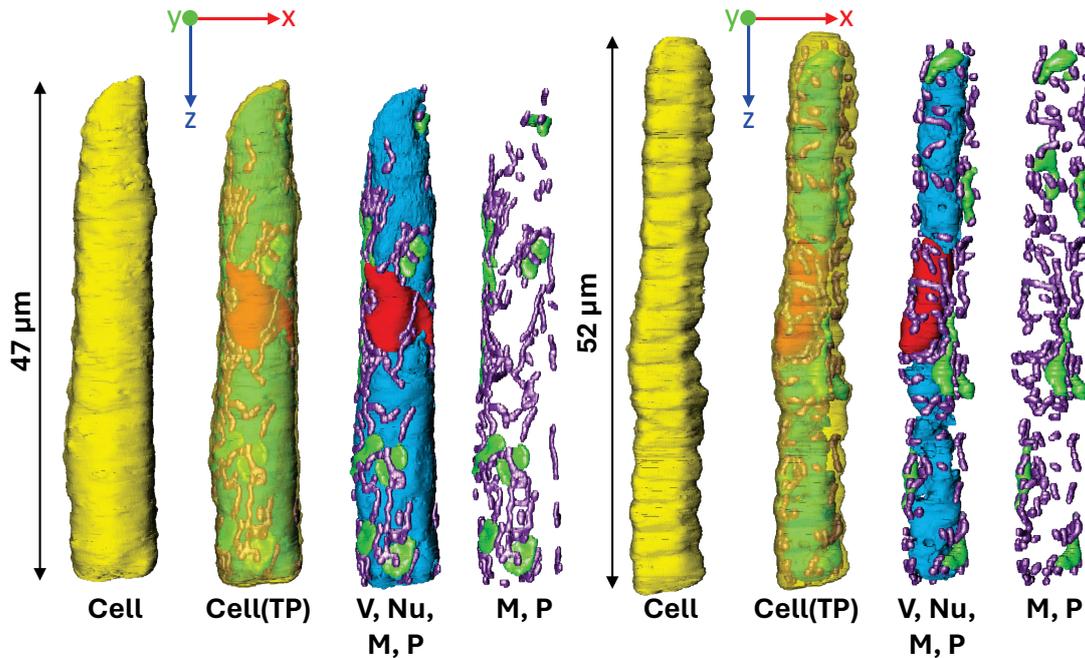


図3. 日本晴の対照区における道管に隣接する2種類の維管束柔細胞の三次元像。(左)液胞が大きく、道管との間に二次壁の肥厚がある細胞。(右)液胞が小さく、道管との間に二次壁の肥厚が部分的に無い細胞。M: Mitochondria, Nu: Nucleus, P: Plastid, V: Vacuole. TPは、Transparencyの略で細胞壁部分を透明化処理して内部を観察できるように処理したことを示す。黄: 細胞壁, 水色: 液胞, 紫: 核, 赤: ミトコンドリア, 緑: 色素体。

### 4-3. 維管束鞘細胞の構造

維管束鞘細胞は 50  $\mu\text{m}$  前後ある大きな管状の構造をしており、品種による大きさの差は見られなかった。葉緑体は内部に発達したグラナ構造を持ち、葉肉細胞側の細胞壁に沿って細胞間隙に接するように配置されていた。これまで維管束鞘細胞の葉緑体は小型で積極的に光合成を行っていないと考えられてきたが、本研究の三次元解析より、細胞間隙から積極的に二酸化炭素を吸収して光合成を行っていることが示唆された。ミトコンドリアは、葉肉細胞と同様に葉緑体の近傍に配置されていたが、維管束側にも細胞壁に沿って多数配置されていた。対照区におけるこの特徴は Pokkali でも同様に観察することができた。塩処理を行うと、Pokkali では顕著な変化は観察されなかったが、日本晴の維管束鞘細胞内では、ミトコンドリアの数が 3 倍に増加していた (図 4)。Pokkali では  $\text{Na}^+$  の地上部への移行を根で抑制する機構が存在するが、日本晴のような塩感受性品種では  $\text{Na}^+$  などの塩を地上部に過剰に蓄積してしまうため、地上部に移行した塩を葉肉細胞など感受性の強い細胞に蓄積させないようにするため、維管束鞘細胞においてミトコンドリアで多量のエネルギーを作り出して、塩を蓄積させる機構が存在することが示唆された。

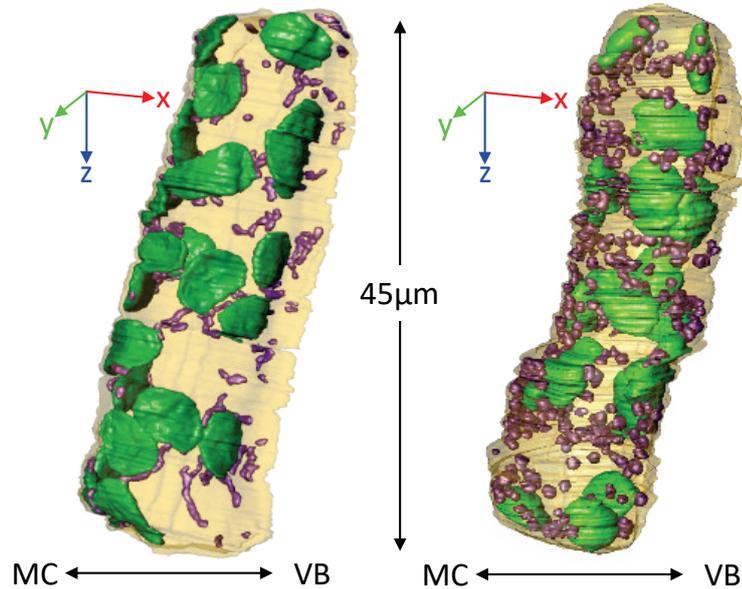


図4. 日本晴の対照区(左)と塩処理区(右)における維管束鞘細胞の三次元像. 黄: 細胞壁, 紫: ミトコンドリア, 緑: 葉緑体. MC: Mesophyll cell, VB: Vascular bundle

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yamane Koji, Oi Takao, Taniguchi Mitsutaka	4. 巻 259
2. 論文標題 Evaluation of the validity of large-scale serial sectioning TEM for three-dimensional reconstruction of rice mesophyll cells and chloroplasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protoplasma	6. 最初と最後の頁 1219-1231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00709-021-01728-9	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山根 浩二, 大井 崇生, 谷口 光隆
2. 発表標題 塩ストレス下におけるイネ葉肉細胞内のオルガネラ間の協調関係と耐塩性との関係
3. 学会等名 第253回日本作物学会講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山内 靖雄, 須藤 修, 和田 哲夫, 日本バイオスティミュラント協議会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 500
3. 書名 バイオスティミュラントハンドブック	

〔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	大井 崇生  (Oi Takao)  (60752219)	名古屋大学・生命農学研究科・助教    (13901)	

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