

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658005

研究課題名（和文）

作物細胞における過酸化水素の分布を観察する電顕レベル組織化学手法の確立

研究課題名（英文）

Histochemical electron microscopy to observe hydrogen peroxide distribution in the cells of crop plants.

研究代表者

三宅 博 (MIYAKE HIROSHI)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：60134798

研究成果の概要（和文）：CeCl<sub>3</sub>法およびDAB法を改良し電子顕微鏡レベルで細胞内の過酸化水素の分布を観察する方法を開発した。CeCl<sub>3</sub>法では、固定前の葉組織に5mM CeCl<sub>3</sub>をpH7.2で1時間処理した後、固定し包埋試料を作製する方法が有効であった。DAB法では2時間Karnovski液で固定した後10mMのDABをpH8.0で1時間処理し、オスミウム固定を行って包埋試料を作製する方法が有効であった。塩ストレス処理を行ったイネ葉緑体において、グラナチラコイドの周囲などに過酸化水素が検出された。

研究成果の概要（英文）：Histochemical methods were developed to observe distribution of hydrogen peroxide in the cells of crop plants. In the CeCl<sub>3</sub> method, leaf segments were incubated in 5 mM CeCl<sub>3</sub> at pH 7.2 for 1 h, fixed, dehydrated and embedded for electron microscopy. In the DAB method, leaf segments were fixed in Karnovski's fixative for 2 h and incubated in 10 mM DAB at pH 8.0 for 1 h. After incubation the segments were prepared for electron microscopy. Hydrogen peroxide was detected around the grana of chloroplasts in salinity-treated rice plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,800,000	360,000	3,160,000

研究分野：作物超微形態学

科研費の分科・細目：農学、作物学・雑草学

キーワード：塩ストレス、過酸化水素、活性酸素、作物、組織化学、電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

我々のこれまでの研究によって、作物の葉に塩ストレス障害が現れる場合は塩そのものの作用ではなく、葉緑体内に発生する活性酸素、特に過酸化水素によるものであることが明らかになりつつある。この推論は、塩ストレスによって葉組織の過酸化水素含量が増加すること、葉組織に過酸化水素を除去するアスコルビン酸などの抗酸化剤を与えると、葉緑体への障害が現れなくなることなど

から得られている。しかしこの推論を証明するためには、過酸化水素の細胞内分布を観察できる電子顕微鏡レベルの組織化学手法を確立し、塩ストレスを受けた葉の葉緑体内において過酸化水素が発生していることを証明する必要がある。

過酸化水素の組織化学的検出には cerium chloride (CeCl<sub>3</sub>)を用いる方法が広く利用されている。しかしこの方法は植物病原菌の感染過程などおもに細胞外(アポプラスト)にお

ける過酸化水素の発生を調べるのに用いられている。このことから  $\text{CeCl}_3$  は細胞内に浸透しにくく、葉緑体など細胞小器官における検出には不相当であるように思われる。しかし重金属の作用を見た文献では細胞内に反応生成物を検出しており、細胞膜に障害が加わると  $\text{CeCl}_3$  は細胞内に取り込まれると考えられる。したがって、塩ストレスを受けた植物など、細胞膜に障害を受けた場合には  $\text{CeCl}_3$  を用いて過酸化水素の細胞内分布を検出できると考えられる。

また光学顕微鏡レベルの研究では、過酸化水素の検出に diaminobenzidine (DAB) が用いられる。この方法は DAB が細胞のペルオキシダーゼの働きによって過酸化水素と不溶性の褐色沈殿物を生成することに基づいている。この不溶性物質は電顕でも黒色の沈殿物として観察できる。しかしこれまで電顕レベルの観察では、外から基質として過酸化水素を与え、細胞内のペルオキシダーゼ活性の局在を調べるのに用いられ、過酸化水素の分布を調べるのに用いた例は見られない。しかし葉緑体にはペルオキシダーゼ活性が存在するので、DAB を用いて葉緑体内での過酸化水素の発生を検出できると考えられる。

$\text{CeCl}_3$  法、DAB 法それぞれ一長一短あるが、両手法を比較しつつ実験条件を改良することによって、電顕レベルで細胞内の過酸化水素の分布を検出する最適な方法が開発できると考えた。

## 2. 研究の目的

過酸化水素は、作物が塩ストレスなどのストレスを受けた際の作用物質として、あるいはシグナル伝達物質として機能する。したがって、電子顕微鏡レベルでの過酸化水素の発生部位を検出する方法を確立することは、作物ストレス生理学および植物生理学において重要である。本研究では、これまでアポプラストにおける過酸化水素の分布を観察するのに用いられてきた  $\text{CeCl}_3$  法と、過酸化水素を基質として外から与え、細胞内のペルオキシダーゼ活性の局在を調べるのに用いられてきた DAB 法を用い、両手法を比較検討しつつ実験条件を改良し、電子顕微鏡レベルで過酸化水素の分布を観察する手法を確立することを目的とする。

植物材料としてはイネとトウモロコシを用い、塩ストレス処理をおこなって葉緑体内の過酸化水素が増加することを確認する。またトウモロコシでは光化学系 II 活性が低く、活性酸素が生成しにくいと考えられる維管束鞘葉緑体と、光化学系 II が備わっている葉肉葉緑体を比較し、組織化学手法の妥当性を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物材料

イネと、維管束鞘葉緑体がグラナを欠損し光化学系 II 活性を消失している NADP-ME 型  $\text{C}_4$  植物のトウモロコシを用いた。

イネは水稻品種日本晴を用い、水耕栽培にて  $400\text{-}500 \mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$  の 14 時間日長、 $28/20^\circ\text{C}$  で 3 週間生育させた。その後  $100 \text{ mM NaCl}$  を水耕液に加え 14 日間処理し、最上位展開中央部を使用した。トウモロコシは、品種ハニーバンタムを園芸用培土で栽培した。 $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  の 12 h 日長、 $30/25^\circ\text{C}$  で第 4 葉展開まで生育させた後、 $3\% \text{ NaCl}$  水溶液を毎日 1 回 5 日間与えた。その後中肋を除いた第 4 葉中央部を実験に用いた。

### (2) $\text{CeCl}_3$ 法

予備実験の結果最適であった次の方法でおこなった。葉片 ( $1 \times 2 \text{ mm}$ ) を切り出し、 $50 \text{ mM Mops}$  緩衝液、 $\text{pH } 7.2$  で調整した  $5 \text{ mM CeCl}_3$  を真空浸潤した後、室温で 1 時間反応させた。その後同じ組成の緩衝液で調整した Karnovski 固定液で固定し、 $2\% \text{ オスミウム酸}$  で後固定し、アセトンとプロピレンオキシドで脱水した後、Spurr 樹脂に包埋した。

### (3) DAB 法

予備実験の結果最適であった次の方法でおこなった。葉片を切り出し、まず  $50 \text{ mM}$  リン酸緩衝液で調整した Karnovski 固定液で 2 時間固定し、 $50 \text{ mM propanediol}$  緩衝液 ( $\text{pH } 8.0$ ) で洗浄した後、 $50 \text{ mM propanediol}$  緩衝液で調整した  $10 \text{ mM DAB}$  に浸漬し  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。その後  $2\% \text{ オスミウム酸}$  で後固定し、アセトンとプロピレンオキシドで脱水した後、Spurr 樹脂に包埋した。

### (4) 電子顕微鏡観察

包埋試料よりダイヤモンドナイフで超薄切片を作製し、 $2\% \text{ 酢酸ウラニウム}$  で 20 分、電顕用鉛染色液で 5 分間染色した後、日立 H7500 透過型電子顕微鏡で加速電圧  $100 \text{ kV}$  で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) $\text{CeCl}_3$ 法によるイネ葉における過酸化水素の分布観察

塩処理をおこなっていない無処理区では葉緑体構造に異常は認められず、またセリウムと過酸化水素の反応産物である perhydroxide の沈殿物も観察されなかった (図 1. a)。一方、塩処理をおこなったものでは葉緑体に典型的な塩ストレス障害であるチラコイドの膨潤が観察された。またグラナの近くには過酸化水素と  $\text{CeCl}_3$  の反応産物と考えられる黒い沈殿物が観察され (図 1. b, c. 矢印)、塩ストレスによって葉緑体内に過酸化水素が発生していることが確認された。当初

CeCl<sub>3</sub> は細胞内に浸透しないと考えられたが、CeCl<sub>3</sub> を真空浸潤すること、十分な反応時間をおくことにより CeCl<sub>3</sub> は細胞内に浸透することが明らかになった。また暗条件で塩処理

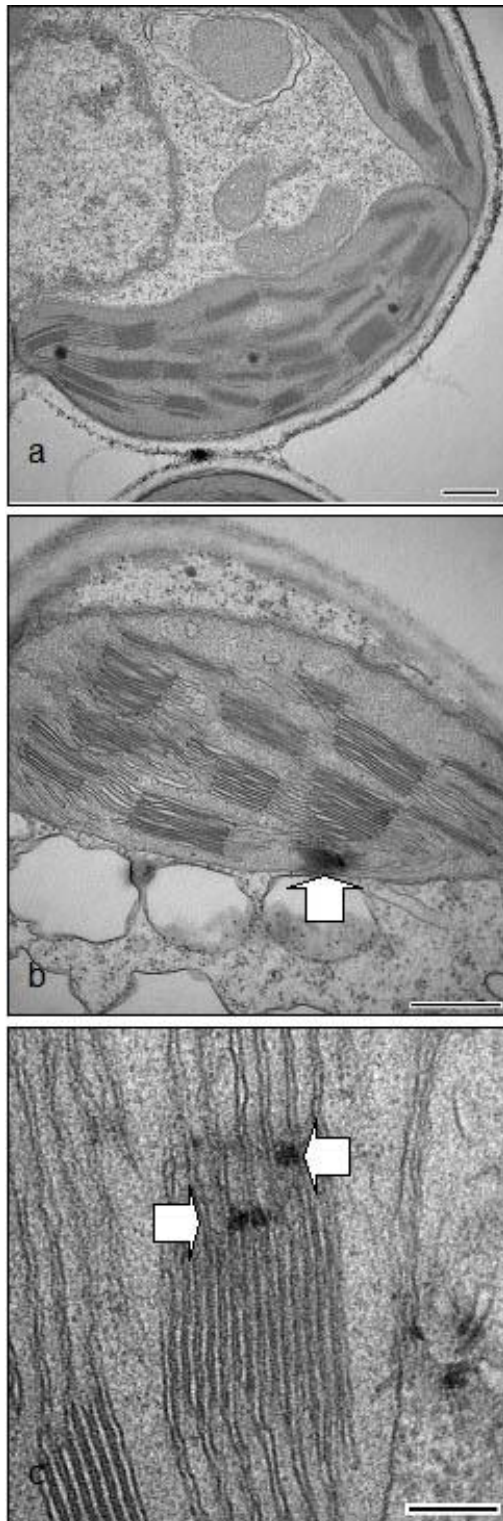


図1. CeCl<sub>3</sub>法によるイネ葉緑体における過酸化水素の検出。

a: 無処理区、b, c: 塩処理区。矢印: 反応産物。スケールは a, b は 0.5 μm、c は 0.1 μm。

をおこなった葉や、過酸化水素を除去するアスコルビン酸を処理した葉では沈殿物は観察されず、沈殿物が過酸化水素の反応産物であることが確認された。

さらに、塩ストレス処理をおこなった植物のミトコンドリア(図 2. a)やペルオキシソーム(図 2. b)にも反応産物が観察され、塩ストレスによってこれらのオルガネラにも過酸化水素が発生することが明らかになった。このほか、細胞壁の内側や、外側のアポプラストにも反応産物が観察された。細胞壁周辺で検出された過酸化水素反応物は暗条件下では検出されず、細胞壁周辺に出現した過酸化水素は葉緑体から拡散したもの、あるいは葉緑体から排出された還元力に基づき、細胞膜の NADP oxidase によって生成した活性酸素に由来するものと考えられた。

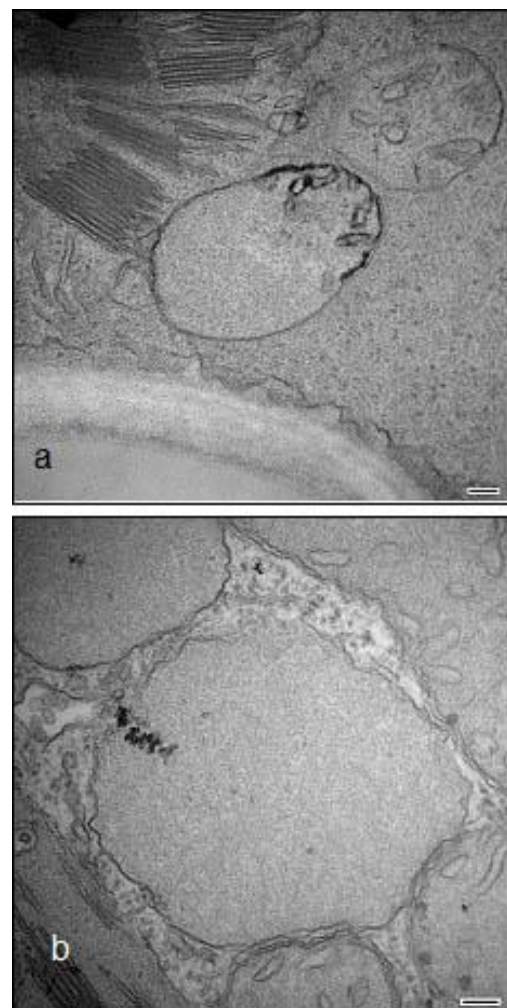


図2. CeCl<sub>3</sub>法によるイネ葉のミトコンドリア(a)およびペルオキシソーム(b)における過酸化水素の検出。

スケールは 0.1 μm。

(2) DAB 法によるイネ葉における過酸化水素の分布観察

DAB 法においても同様に、塩処理をおこ

なっていない無処理区では、DAB と過酸化水素の反応産物の沈殿は観察されなかったが(図 3. a)、塩処理をおこなった植物では葉緑体のグラナの周囲に反応産物の沈殿が観察された(図 3. c)。CeCl<sub>3</sub>による反応産物に比べ、反応産物は不定形で大きく、拡散する傾向があった。DAB の方が反応は強く現れるが反応産物が拡散するので、局在性の検出には CeCl<sub>3</sub> の方が優れていると考えられた。DAB と過酸化水素との反応産物の生成にはペルオキシダーゼ活性が必要であるが、葉組織全体のペルオキシダーゼ活性を測定したところ、無処理区と塩処理区で有意な差は認められなかった。

DAB 法では塩ストレス障害の特徴であるチラコイドの膨潤が CeCl<sub>3</sub>法の場合よりもより顕著に現れた(図 3. b)。これは DAB 法では最初に固定をおこなっているため、チラコイドの膨潤がそのまま保存され、一方 CeCl<sub>3</sub>法

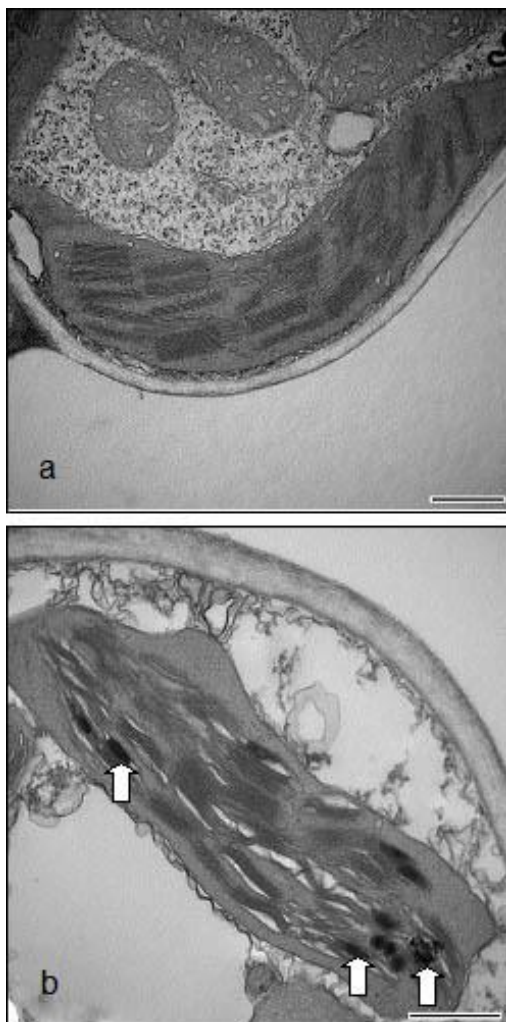


図 3. DAB 法によるイネ葉緑体における過酸化水素の検出。

a: 無処理区、b: 塩処理区。矢印: 反応産物。スケールは 0.5 μm。

では固定前に CeCl<sub>3</sub> を処理しているため、処理期間中にチラコイドの膨潤が回復したと考えられる。

### (3) CeCl<sub>3</sub> 法によるトウモロコシ葉における過酸化水素の分布観察

CeCl<sub>3</sub> 法の有効性をさらに検証するために、塩ストレスをおこなったトウモロコシの葉組織を CeCl<sub>3</sub> 法で観察した(図 4)。トウモロコシには葉肉葉緑体と維管束鞘葉緑体の 2 種類の葉緑体が存在し、維管束鞘葉緑体にはグラナがほとんど形成されず、光化学系 II の活性が低いことが知られている。過酸化水素などの活性酸素の発生には光化学系 I と光化学系 II の両方の活性が必要なので、維管束鞘葉緑体では過酸化水素がほとんど発生せず、塩ストレス障害が現れにくいと考えられる。

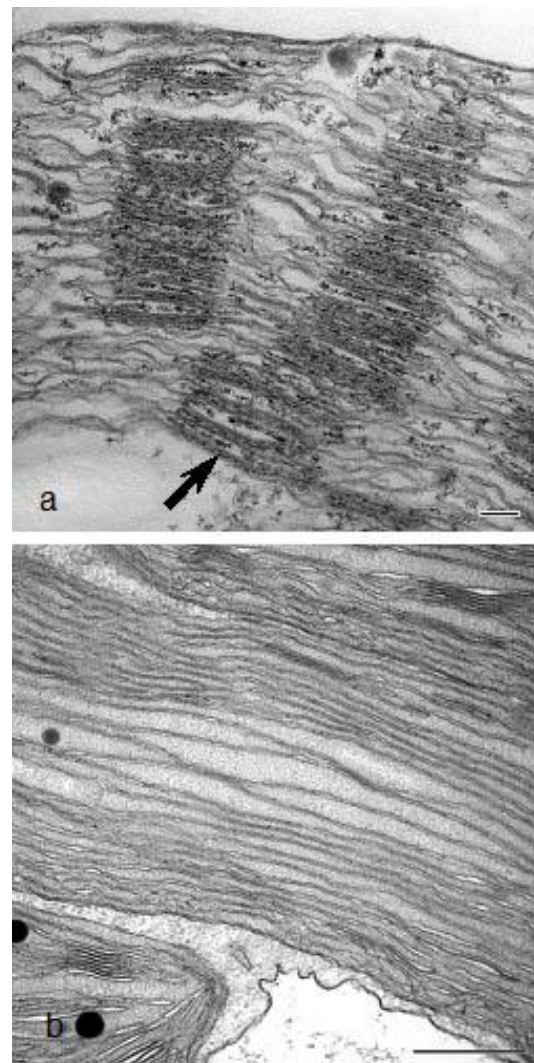


図 4. CeCl<sub>3</sub> 法による塩処理をおこなったトウモロコシ葉緑体の観察。

a: 葉肉葉緑体、b: 維管束鞘葉緑体。矢印: 反応産物。スケールは a は 0.1 μm、b は 0.5 μm。

実際、トウモロコシでは塩ストレスによって葉肉葉緑体には顕著な障害が現れるが、維管束鞘葉緑体にはほとんど障害が現れないことが我々のこれまでの研究で明らかになっている。

そこで塩ストレスをおこなったトウモロコシ葉に  $\text{CeCl}_3$  を処理して電顕で観察したところ、葉肉葉緑体にはチラコイドの膨潤、チラコイド配列の乱れなどの障害が現れるとともに、グラナチラコイドの周辺に多量の反応産物が観察された(図 4. a, 矢印)。一方、維管束鞘葉緑体にはほとんど障害は現れず、また  $\text{CeCl}_3$  と過酸化水素の反応産物も観察されなかった。維管束鞘葉緑体にも未発達グラナが存在するが、これらのグラナ周辺にも反応産物は観察されなかった。したがって、葉肉葉緑体の障害には過酸化水素が関与していること、維管束鞘葉緑体は過酸化水素の発生が少ないために障害が現れにくいことが確認された。またこのことによって、過酸化水素検出における  $\text{CeCl}_3$  法の有効性も確認された。

なお塩ストレス処理をおこなった植物体より葉肉葉緑体と維管束鞘葉緑体を単離し、ペルオキシダーゼ活性を測定したところ、いずれも無処理区よりも高くなったが、維管束鞘葉緑体の活性は葉肉葉緑体よりも4倍ほど高く、維管束鞘葉緑体では光化学系 II 活性が低いこととともに、ペルオキシダーゼ活性が上昇して過酸化水素が除去されたことが、過酸化水素が検出されなかったことの原因と考えられる。

#### (4) 総括

本研究によって検討された  $\text{CeCl}_3$  法および DAB 法は、電子顕微鏡レベルでの過酸化水素の細胞内分布検出に有効であることが明らかになった。両手法によって、塩ストレスを受けた葉緑体に過酸化水素が発生していることが確認された。両手法の結果はほぼ同様で、いずれも葉緑体グラナの周辺に過酸化水素が生成していることが明らかになり、両手法の信頼性は高いと考えられる。両手法を比較すると、 $\text{CeCl}_3$  法の方が反応産物が小さく局在性が明確であり、電子顕微鏡レベルでの組織化学に適していると考えられる。

当初  $\text{CeCl}_3$  は細胞内に浸透しないと考えられたが、真空浸潤することによって細胞内に入る事が明らかになった。しかし塩ストレスによって細胞膜の透過性が増加して  $\text{CeCl}_3$  が取り込まれるようになった可能性も否定できない。今回の実験では DAB 法でも無処理区で過酸化水素が検出されなかったため、無処理区では組織化学的に検出できる量の過酸化水素が生成していないことは明らかである。

一方、DAB 法では過酸化水素の検出にペ

ルオキシダーゼの活性が必要である。葉緑体にはペルオキシダーゼが存在するので過酸化水素の検出が可能であったが、ペルオキシダーゼ活性の存在が不明な部位での検出には  $\text{CeCl}_3$  法によらなければならない。現時点では、残念ながら1つの手法で常に過酸化水素を検出できる方法は開発できなかった。

したがって現状では、植物細胞内での過酸化水素の検出には、 $\text{CeCl}_3$  法と DAB 法を併用することが必要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Yamane K, Taniguchi M, Miyake H (2012) Salinity-induced subcellular accumulation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in leaves of rice. *Protoplasma* 249: 301-308.  
DOI: 10.1007/s00709-011-0280-7
- ② Omoto E, Taniguchi M, Miyake H (2012) Adaptation responses in  $\text{C}_4$  photosynthesis of maize under salinity. *Journal of Plant Physiology* 169: 469-477.  
DOI: 10.1016/j.jplph.2011.11.009
- ③ Yamane K, Mitsuya S, Taniguchi M, Miyake H (2012) Salt-induced chloroplast protrusion is the process of exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts into cytoplasm in leaves of rice. *Plant, Cell and Environment* (in press).  
DOI: 10.1111/j.1365-3040.2012.02516.x.

[学会発表] (計4件)

- ① 大元英司・長尾日統・谷口光隆・三宅博 : 塩ストレスによるトウモロコシの葉肉葉緑体と維管束鞘葉緑体における活性酸素種の分布と抗酸化酵素活性の変化. 日本作物学会第233回講演会, 2012年3月(府中)
- ② 山根浩二・谷口光隆・三宅博 : 塩ストレス下におけるイネ葉緑体内の過酸化水素の局在. 日本作物学会第233回講演会, 2012年3月(府中)
- ③ 大元英司・谷口光隆・三宅博 : 塩ストレス下におけるトウモロコシの  $\text{C}_4$  光合成機能の生理解析. 日本作物学会第231回講演会, 2011年3月(厚木) ※震災のため中止(誌上開催)
- ④ Ferdose J, Yamane K, Taniguchi M, Miyake H : Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in roots of rice plants exposed to salinity. 日本作物学会第230回講演会, 2010年9月(札幌)

[その他]  
ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shigen/academic.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三宅 博 (MIYAKE HIROSHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：60134798

### (2) 研究分担者

山根 浩二 (YAMANE KOJI)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：50580859