

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05613

研究課題名(和文) 葉緑体Stromuleの細胞内3次元構造の構築と塩ストレス耐性との関連性の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the relationship between the formation of stromule and salinity tolerance by 3D reconstruction

研究代表者

山根 浩二 (YAMANE, Koji)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：50580859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアやペルオキシソームが細長いストロマを含む構造で葉緑体に取り囲まれる構造は、葉緑体ポケットとよばれている。葉緑体を作る細長い突起状の構造であるstromuleが関与すると予想される。そのため、3次元立体像を構築することで、stromuleとポケット構造の関係を調べた。TEMとFIB-SEMを用いて葉緑体ポケット構造を含む葉緑体の連続画像を取得し、3次元再構築法によって観察した。その結果、葉緑体が大きなシート構造を作り、それがポケット構造を作っていることが明らかとなった。また、ポケット構造で取り囲まれているオルガネラとして、ミトコンドリアとペルオキシソームが一番多く観察された。

研究成果の概要(英文)：The invagination structure of a chloroplast that surrounds organelles such as mitochondria and peroxisomes within a thin layer of chloroplast stroma is called a chloroplast pocket. Since it is expected that stromules, which are long tubules including stroma, might be involved in the formation, we constructed the three-dimensional architecture of chloroplast pockets by using serial images obtained by TEM and FIB-SEM. Three types of chloroplast pockets were observed by TEM: organelles were completely enclosed in a chloroplast pocket (enclosed type), a chloroplast pocket with a small gap in the middle part (gap type), and a chloroplast pocket with one side open (open type). Mitochondria and peroxisomes were often in contact with the chloroplast pockets. FIB-SEM revealed chloroplasts with a sheet structure partially surrounding peroxisomes. This fact suggests that chloroplasts might construct large sheet structures that would be related to the formation of chloroplast pockets.

研究分野：植物超微形態学

キーワード：イネ 塩ストレス 葉緑体 三次元再構築法 立体像

### 1. 研究開始当初の背景

プラスチドにおいて、しばしば stromule と呼ばれる細長い突起状の構造が観察される。植物がストレスに晒されると、stromule を持つプラスチドの数が増加することから (Gray et al. 2012, Plant J. 69: 387-398)、ストレス耐性に重要な役割を果たしていると考えられている。また、細長い突起状の構造を作ることで表面積を増加させ、他のオルガネラとの協調関係の強化に関与しているとも考えられている (Kwok and Hanson 2000, BMC Plant Biol. 4: 2)。しかし、stromule の役割は未だに解明されていない。

申請者らは、塩ストレス下で葉緑体がミトコンドリアやペルオキシソームを取り囲む葉緑体ポケット構造を観察してきた (図 1)。この構造は、弱光下で生育させたトウモロコシや極地で生育する植物の葉緑体で古くから観察されている (Montes and Bradbeer 1976, Plant Sci. Lett. 6: 35-41; Gielwanowska and Szczuka 2005, Polar Biol. 28: 951-955)。この構造を透過型電子顕微鏡 (TEM) で二次元的に観察すると、ストロマを含む細長い構造がミトコンドリアやペルオキシソームを取り囲んでいることから (図 1)、stromule が葉緑体ポケット構造の形成に関与していると予想される。

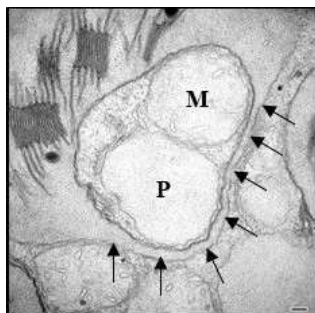


図 1. 塩ストレス下で観察される葉緑体ポケット構造。ストロマを含む細長い構造 (矢印) にミトコンドリア (M) とペルオキシソーム (M) が一緒に取り囲まれている。

これまでの観察結果から、葉緑体は塩ストレス下で stromule を形成し、それを用いてミトコンドリアやペルオキシソームなどを取り囲む葉緑体ポケット構造を形成することで、他のオルガネラとの協調関係を強化している、という仮説が考えられる。しかし、これまでの TEM 観察は二次元的な観察であり、葉緑体ポケット構造と stromule との関係性を明らかにするためには、三次元的な観察が必要である。

### 2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では、電子顕微鏡レベルでポケット構造を持つ葉緑体の三次元構造を構築することで、stromule と葉緑体ポケット構造との関係を明らかにすることを試みた。さらに、耐塩性イネ品種の

Pokkali を用いて塩ストレス下の葉緑体ポケット数を測定し、非耐塩性イネ品種の日本晴と比較することで、葉緑体ポケット構造と耐塩性との関係を明らかにすることを試みた。

### 3. 研究の方法

イネ葉肉細胞やその中に含まれる葉緑体の三次元構造を構築するため、三次元再構築法を用いた。イネ品種日本晴と Pokkali を 3 週間人工気象室で生育させた後、100 mM の NaCl を含む水耕溶液を用いて 4 日間ストレスを与えた。対照区は、同様の水耕液で NaCl を含まないものとした。最上位展開葉 (第 5 葉) の中央部付近を切り出して TEM 固定を行った。葉の試料ブロックを高速加工観察分析装置 (FIB-SEM, MI-4000L, Hitachi) によって 50 nm 間隔で切削して観察を繰り返し、葉肉細胞と葉緑体の連続断面像を取得した。また、ウルトラマイクロトームを用いて 100 nm 間隔で切削し、50 枚程度の連続切片を取得した。これらの連続画像を用いて葉肉細胞と葉緑体を抽出し、Image-Pro Premier 3D software (Ver. 9.3, Media Cybernetics, USA) を用いて三次元像を構築した。

また、葉緑体ポケット数の測定は、FIB-SEM による切削と観察、およびウルトラマイクロトームを用いて 500 枚程度の連続切片を作製し、TEM で連続画像を撮影した。それらの画像を用いて、ポケット構造を有する葉緑体数を算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) イネ葉肉細胞の三次元像

FIB-SEM (MI-4000L, Hitachi) によるブロック表面観察像の階調反転によって、イネの葉肉細胞の細胞内微細構造を従来の TEM 観察と同様に把握することができた。葉肉細胞全体 (約 20  $\mu\text{m}$   $\times$  約 20  $\mu\text{m}$   $\times$  約 7  $\mu\text{m}$ ) を連続薄切 (50 nm) し、細胞内のすべての葉緑体の配置や形状を連続断面像群として網羅的に取得した。得られた連続断面像群をもとに三次元再構築像を作製した (図 2)。

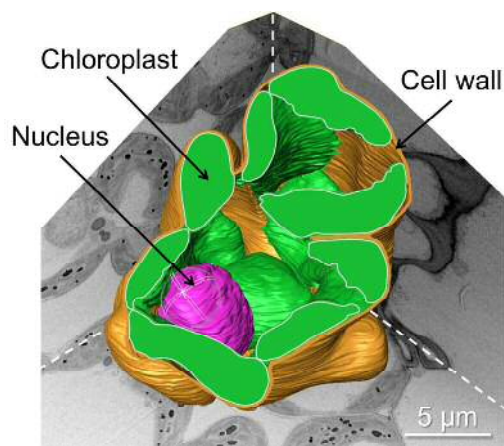


図 2. FIB-SEM による観察画像群 (約 300 枚) をもとに作成されたイネの葉肉細胞 (非スト

レス条件) の三次元再構築像。

葉肉細胞の各くびれには葉緑体が張り付くように存在し、細胞壁における細胞外空間との接触面の大部分が葉緑体によって覆われていることが示された。イネ葉肉細胞を三次元再構築することにより、イネ葉肉細胞の有腕構造の実態を三次元的に把握できるようになった。

さらに、塩ストレス下で栽培されたイネの葉肉細胞を観察したところ、対照条件下のもの比べて葉緑体が膨潤して丸い形に変形していた。葉緑体突起構造も頻繁に観察されたが、表面積は対照条件下で栽培したイネと比較して増加していなかった。

## (2) 葉緑体ポケット構造の三次元像

イネ品種日本晴の対照区と塩処理区から3つの葉肉細胞全体を観察し、ポケット構造を有する葉緑体数を算出した。対照区では、3細胞内に合計44個の葉緑体が観察されたが、突起構造や葉緑体ポケット構造は観察されなかった。一方、塩ストレス下では3細胞内に葉緑体が37個含まれており、51.9%の葉緑体がポケット構造を有していた。その割合を対照区と比較したところ、塩処理によって有意に増加したことが確認できた。このことから、非耐塩性イネ品種では、塩ストレス下でポケット構造を有意に増加させ、オルガネラ間の協調関係の強化を行っていることが推察された。

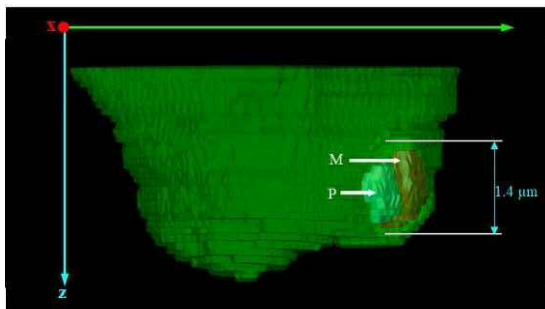


図 3. Close タイプの葉緑体ポケット構造。透明化処理を行い、ポケット内を可視化した。ミトコンドリア (M, 赤) とペルオキシソーム (P, 青) が完全に葉緑体に取り囲まれていた。ポケット部分のz軸方向の長さは1.4 μmであった。

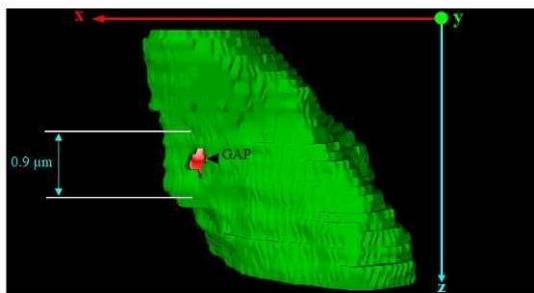


図 4. Gap タイプの葉緑体ポケット構造。ミトコンドリア (赤) が葉緑体に取り囲まれているが、その一部に隙間ができていた。ポケット部分のz軸方向の長さは0.9 μmであっ

た。

葉緑体ポケット構造をさらに詳しく調べたところ、以下の3つのパターンが観察された。(1) ポケット構造の両側が閉じられてオルガネラが完全に葉緑体に取り囲まれる型 (図 3, Close)、(2) ポケット構造の両端は閉じているが一部に隙間ができる型 (図 4, Gap)、(3) ポケット構造の片側が空いている型 (図 5, Open)。

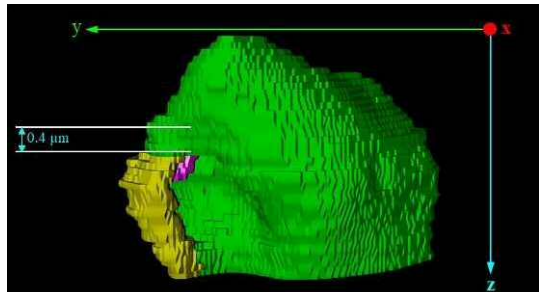


図 5. Open タイプの葉緑体ポケット構造。脂質 (紫) の一部が葉緑体に取り囲まれていた。ポケット部分のz軸方向の長さは0.4 μmであった。

さらに、FIB-SEM でポケット構造を持つ葉緑体全体を観察して立体像を構築したところ、葉緑体からシート構造が出現し、そのシート構造がペルオキシソームの一部を取り囲んでいる像が観察された (図 6)。

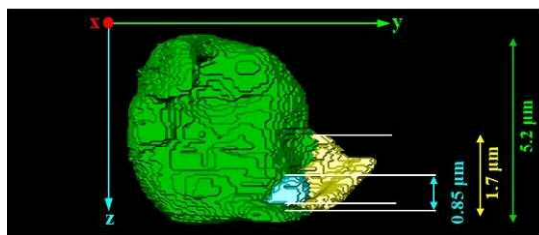


図 6. FIB-SEM による葉緑体ポケット構造の観察。葉緑体からシート構造を作り (黄色)、それがペルオキシソーム (青) の一部を取り囲んでいた。

これらの結果から、葉緑体ポケット構造は、stromule によって形成されるのではなく、葉緑体からシート構造が出現し、それが他のオルガネラを取り囲むことで構築されることが示唆された。さらに、Gap や Open タイプのポケット構造は、シート構造がオルガネラを取り囲む途中の像、または閉じたポケット構造が再び開いた像であることが予想された。

塩処理をしたイネ品種日本晴の葉肉細胞から、ポケット構造を有する葉緑体を TEM による連続切片法で70個観察した (表 1)。タイプ別に分けると、Close タイプは35個、Gap タイプは21個、Open タイプは14個であった。

葉緑体ポケットに取り囲まれている主要なオルガネラは、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、細胞質基質であった (全体の約9割)。その数を算出すると、ミトコンドリアが取り

囲まれているポケットは35個 (Close: 16個、Gap: 14個、Open: 5個)であり、取り囲まれるオルガネラとしては一番多く観察された。細胞質基質は11個 (Close: 9個、Gap: 1個、Open: 1個)、ペルオキシソームは8個 (Close: 3個、Gap: 3個、Open: 2個)であった。さらに、ミトコンドリアとペルオキシソームが一緒に取り囲まれているポケットが8個 (Close: 4個、Gap: 1個、Open: 3個)観察された。

70個のポケットのz軸方向の長さの平均は、1.05  $\mu\text{m}$ であった。そのうち39個が1.0  $\mu\text{m}$ 以上の長さであった。そのうち4個のポケットは、2.0  $\mu\text{m}$ を超える大きなものであった。

表 1. 塩ストレス下で観察された葉緑体ポケット構造のカテゴリー分け。

| Type         | Inclusion                  | Size in z-axis direction of chloroplast pockets ( $\mu\text{m}$ ) |             |             |             |       | Total<br>(No. pocket) |
|--------------|----------------------------|---|-------------|-------------|-------------|-------|-----------------------|
|              |                            | 0 - 0.499   | 0.5 - 0.999 | 1.0 - 1.499 | 1.5 - 1.999 | 2.0 - |                       |
| Enclosed     | Cytosol                    | -   | 3           | 3           | 3           | -     | 9                     |
|              | Lipid body (LB)            | -   | 1           | 1           | -           | -     | 2                     |
|              | Transparent structure (TS) | -   | -           | -           | -           | -     | 0                     |
|              | LB + TS                    | -   | -           | -           | 1           | -     | 1                     |
|              | Mitochondrion              | -   | 9           | 7           | -           | -     | 16                    |
|              | Peroxisome                 | -   | -           | 2           | -           | 1     | 3                     |
|              | M+P                        | -   | -           | 1           | 2           | 1     | 4                     |
| Total        | 0                          | 13  | 14          | 6           | 2           | 35    |                       |
| Gap          | Cytosol                    | -   | 1           | -           | -           | -     | 1                     |
|              | Lipid body (LB)            | -   | -           | 1           | -           | -     | 1                     |
|              | Transparent structure (TS) | -   | -           | -           | -           | -     | 0                     |
|              | LB + TS                    | -   | -           | -           | -           | 1     | 1                     |
|              | Mitochondrion              | -   | 6           | 8           | -           | -     | 14                    |
|              | Peroxisome                 | -   | 1           | 2           | -           | -     | 3                     |
|              | M+P                        | -   | -           | -           | -           | 1     | 1                     |
| Total        | 0                          | 8   | 11          | 0           | 2           | 21    |                       |
| Open         | Cytosol                    | -   | -           | 1           | -           | -     | 1                     |
|              | Lipid body (LB)            | 1   | -           | -           | -           | -     | 1                     |
|              | Transparent structure (TS) | 2   | -           | -           | -           | -     | 2                     |
|              | LB + TS                    | -   | -           | -           | -           | -     | 0                     |
|              | Mitochondrion              | 2   | 1           | 2           | -           | -     | 5                     |
|              | Peroxisome                 | -   | 2           | -           | -           | -     | 2                     |
|              | M+P                        | 1   | 1           | 1           | -           | -     | 3                     |
| Total        | 6                          | 4   | 4           | 0           | 0           | 14    |                       |
| Total (Size) |                            | 6   | 25          | 29          | 6           | 4     | 70                    |

70個の葉緑体を連続切片で観察し、タイプ、取り込まれたオルガネラ、大きさ別に分けた。

### (3) 葉緑体ポケット構造の品種間差

耐塩性イネ品種である Pokkali を用いて100mMのNaCl処理を4日間行い、ウルトラミクロトームを用いて500枚程度の連続切片を作製し、複数の葉肉細胞の全体像を取得した。葉緑体ポケット構造の数を調べたところ、Pokkali ではポケット構造は観察できなかった。このことから、ポケット構造の形成が耐塩性に直接的に関与する可能性は低いことが示唆された。

### (4) 葉緑体ポケット構造の形成要因

植物に対する塩ストレスの影響は、イオンストレスと浸透圧ストレスの複合である。そこで、ポリエチレングリコール (PEG)を用いて、これまで葉緑体ポケット構造が観察された塩濃度 (100 mM NaCl)と同程度の浸透圧ストレスをイネに処理した。その結果、PEGによる浸透圧ストレスだけでもポケット構造

が観察されたことから、塩ストレスによる葉緑体ポケット構造の形成は、浸透圧の影響が強いことが示唆された。

クロロフィル蛍光測定装置を用いて様々な値を示す部位をTEM固定し、ウルトラミクロトームで連続切片を作製して葉緑体を観察した。申請者らの先行研究において (Yamane et al., 2008, Plant Prod. Sci. 11: 139-145)、最大量子収率 ( $F_v/F_m$ )の値と葉緑体微細構造変化の間に関係性があったことから、 $F_v/F_m$ 値と葉緑体ポケット構造形成との間に関係性があるかを調べた。 $F_v/F_m$ 値が低下するほど葉緑体突起構造が大きくなる傾向にあったが、葉緑体ポケット構造の形成数が増える傾向は観察されなかった。今後、他のクロロフィル蛍光のパラメータと葉緑体ポケット構造の形成との間の関係性を調べる必要がある。

### 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2件)

① Yamane K., Oi T., Enomoto S., Nakao T., Arai S., Miyake H. and Taniguchi M. 2018. Three-dimensional ultrastructure of chloroplast pockets formed under salinity stress. Plant, Cell and Environment, 41: 563-575. doi: 10.1111/pce.13115. 査読有.

② Oi T., Enomoto S., Nakao T., Arai S., Yamane K., Taniguchi M. 2018. Three-dimensional intracellular structure of a whole rice mesophyll cell observed with FIB-SEM. Annals of Botany, 120: 21-28. doi: 10.1093/aob/mcx036. 査読有.

[学会発表] (計6件)

①大井崇生・山根浩二・谷口光隆  
イネ科植物における維管束鞘葉緑体の細胞内配置と形状の三次元解析。  
第245回日本作物学会, 2018年3月29日, 宇都宮大学.

②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。  
第243回日本作物学会, 2017年3月29日, 東京大学.

③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.

第242回日本作物学会, 2016年9月10日, 龍谷大学瀬田キャンパス.

④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日, 東北大学.

⑤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.

第241回日本作物学会 2016年3月28日, 茨城大学水戸キャンパス.

⑥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, 朱鷺メッセ: 新潟コンベンションセンター.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山根 浩二 (YAMANE, Koji)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号: 50580859

### (2) 研究協力者

谷口 光隆 (TANIGUCHI, Mitsutaka)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号: 40231419

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