

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05603

研究課題名(和文) 塩ストレス下におけるオルガネラの細胞内三次元配置変化と耐塩性との関連性の解明

研究課題名(英文) The correlation between the change of organelle localization and salt stress tolerance

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：異なる耐塩性を有するPokkaliと日本晴を用い、塩ストレス下における葉緑体(Chl)、ミトコンドリア(Mit)、ペルオキシソーム(Per)、それぞれのオルガネラ間の膜接触と耐塩性との関連性を調べた。品種によらず、膜接触面積は塩ストレス下において有意に増加していたが、Mitの形と大きさに品種間差があった。塩処理区におけるPokkaliのMitは、体積と表面積が有意に増加し、大きく伸び広がった一つのMitがChlやPerとの接触面積を増加させていた。このことから、塩ストレス下におけるMitの形状と、それに関連したオルガネラ間の協調強化が耐塩性に重要であ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

本研究における学術的意義は、膜接触に着目して三次元的にオルガネラ間の協調関係を定量評価できた点である。さらに、耐塩性にはオルガネラの形状変化を伴った膜接触面積の増加が必須であることを明らかにした点も、学術的意義があると考えられる。具体的には、耐塩性品種のPokkaliでは、ミトコンドリアの形状を大きく伸び広がった形に変化させ、葉緑体やペルオキシソームとの膜接触面積の割合を増加させていた。このことから、耐塩性の獲得には、ミトコンドリアの形状変化に伴う膜接触面積の増加が重要であることが示唆でき、学術的に新しい知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the importance of the interaction between chloroplast, mitochondria, and peroxisome in mesophyll cells of rice under salt stress. The organelle interaction was evaluated to calculate membrane contact area (MCA) between the organelles using the salt tolerant cultivar of Pokkali and salt sensitive cultivar of Nipponbare. The MCA between the three organelles in both cultivars increased under salt stress. However, the form of mitochondria was different in both cultivars. In Pokkali, the form was stretched or annular, and the surface area of the mitochondria significantly increased under salt stress compared with that in Nipponbare. In addition, the stretched mitochondria in Pokkali had larger MCA compared with that in Nipponbare under salt stress. These results suggest that it is important for salt tolerance to change the form of mitochondria leading to the increase in the surface area and MCA between chloroplasts and peroxisomes under salt stress.

研究分野：超微形態学

キーワード：イネ 三次元再構築 塩ストレス 葉緑体 ミトコンドリア ペルオキシソーム

## 1. 研究開始当初の背景

近年、オルガネラ同士の物理的な膜接触が、オルガネラ間の物質輸送の距離を縮めることで代謝を促進し、協調関係の強化やストレス耐性に重要であることが示唆されている (Bobik and Burch-Smith, 2015). 植物がストレスを受けると、葉緑体 (Chl)、ミトコンドリア (Mit)、ペルオキシソーム (Per)などのオルガネラが、お互いの膜を密着させることが透過型電子顕微鏡 (TEM)で二次元的に観察されている。しかし、環境変化に伴う膜接触領域の増減を三次元的に定量評価した試みはなく、ストレス耐性との関係も明らかにされていない。

これまで申請者は、イオンビームで試料の表面を削りながら SEM で細胞内微細構造を観察することで、連続画像から立体構造を構築できる電子顕微鏡である収束イオンビーム (Focused Ion Beam) SEM (FIB-SEM)を用いて、電顕レベルでの三次元構造解析の手法を確立してきた (Oi et al., 2020)。さらに、従来の電顕観察法を改良し、ウルトラミクロトームと TEM による途切れのない連続切片観察手法においても、定性的かつ定量的な三次元評価が可能となった。本研究では、これらの手法を用いて葉肉細胞内のオルガネラ配置変化を定量的に評価し、耐塩性との関連性を評価することを試みた。

## 2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では、塩ストレス下におけるイネ葉肉細胞内のオルガネラ配置変化を定性的かつ定量的に評価し、耐塩性との関連性を評価した。耐塩性品種の Pokkali と塩感受性品種の日本晴を用い、葉肉細胞内のオルガネラである Chl, Mit, Per に着目し、塩ストレス下におけるオルガネラ配置変化に伴う膜接触領域の定量評価することで、膜接触面積の増加程度と耐塩性との関連性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

イネの耐塩性品種である Pokkali と塩感受性品種の日本晴を用い、3週齢の植物に 100 mM の NaCl を含む培地で 2~4 日間栽培することで塩ストレス処理を行った (対照区は NaCl を含まない培地で栽培した)。対照区と塩処理区それぞれの最上位最大展開葉を用い、電顕固定を行った。固定後、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、TEM (H7500; Hitachi, Japan)を用いて葉肉細胞の連続画像を取得した。得られた画像から Chl, Mit, Per をトレースすることで、それぞれのオルガネラを抽出した。オルガネラ同士が接触している部分は、オルガネラの境界線を重ね合わせてトレースした。三次元像再構築ソフトを用いて線の重複部分を抽出し、抽出した部分を三次元構築することで膜接触面積を抽出した。葉肉細胞全体におけるそれぞれのオルガネラ間の膜接触面積を定量するとともに、膜接触面積を各オルガネラ全体の表面積で割ることで、オルガネラの表面積に対する膜接触面積の割合を算出した。

## 4. 研究成果

### (1) 葉肉細胞内の Chl, Mit, Per の配置と塩ストレス下における配置変化

対照環境下で 3 週間生育させたイネ葉の葉肉細胞内の Chl, Mit, Per の配置を、お互いの膜接触の有無によって分類した (図 1 と 2)。多くの Mit は、ペルオキシソームと膜接触をして集団を形成し (図 1, 赤色)、その集団は 2 つ以上の葉緑体の間に膜接触をともなって位置していた (図 1 では 1, 2, 3 番の葉緑体の間)。この配置を Cluster と名付けた。本研究で観察した葉肉細胞の Mit と Per のうち、Cluster に配置されていた割合はそれぞれ 93.3 と 100%であった。

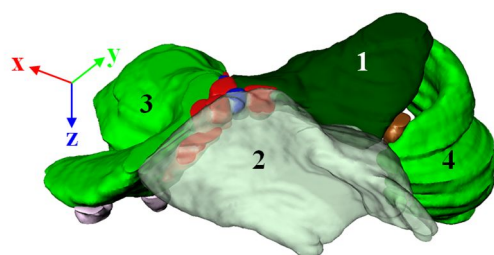


図1. イネ葉肉細胞内のChl, Mit, Perの3次元配置の一部。緑: Chl, 赤: ClusterのMit, 茶色: BridgeのMit, ピンク: One-to-oneのMit, 青: Cluster内のPer。隣合う葉緑体を識別できるように、緑の濃淡で示した。

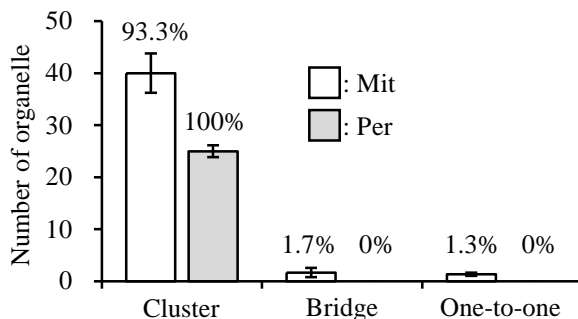


図2. イネ葉肉細胞内のChl, Mit, Perのポジション別のオルガネラ数。グラフは3細胞の平均値を示し、グラフ上の縦棒は標準誤差を示す。グラフの上の数字は、全体の数に対する割合を示す。

Mitにおいては、Perと膜接触せずにChlとだけ膜接触をしているものがあつた。図1に示した茶色のMitは、1と4番のChlの間に配置されていた。この配置をBridgeと名付けた。Bridgeに配置されていたMitの割合は、1.7%であった (図2)。さらに、1つのChlとだけ膜接触してい

る Mit も観察できた。図1のピンクで示した Mit は、3番の Chl とだけ膜接触しており、他の Chl や Per とは膜接触していなかった。この配置を One-to-one と名付けた。One-to-one に配置されていた Mit の割合は 1.3%であった。本研究で観察した葉肉細胞内において、Bridge と One-to-one に配置されていた Per は観察されなかったが、今後、さらに多くの葉肉細胞を観察する必要がある。

## (2) 塩ストレス下におけるオルガネラ形状と配置変化

日本晴において、塩ストレス下で Mit と Per の数が有意に増加していた (図3と4A, E)。しかし、一つのオルガネラの体積や表面積は、対照区と比較して塩処理区で同等であった (data not shown)。Pokkali では、塩処理によって Per の数は増加する傾向にあったが、有意ではなかった (図3と4E)。また、一つの Per の体積や表面積も対照区と比較して同等であった (data not shown)。Pokkali の塩処理下における Mit の数は、対照区と比較して有意ではないが、減少する傾向にあった (図4A)。一つの Mit の体積と表面積は、対照区と比較して有意に増加しており (data not shown)、大きく伸び広がった形状をしていた (図3)。

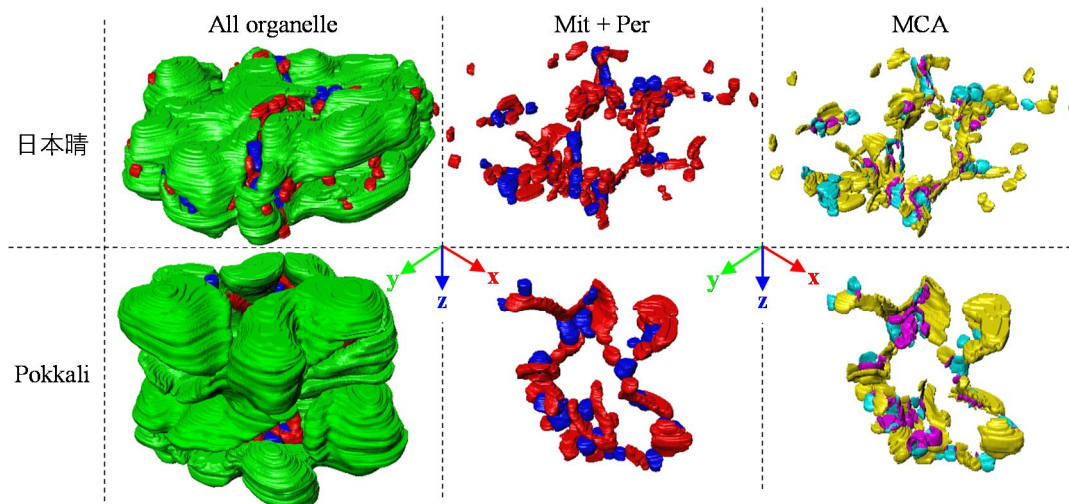


図3. 日本晴とPokkaliにおける塩ストレス下における葉肉細胞内のオルガネラ三次元構造。緑: Chl, 赤: Mit, 青: Per, 黄: ChlとMitのMCA, 水色: ChlとPerのMCA, マゼンタ: MitとPerのMCA. 赤, 緑, 青の矢印は、それぞれx, y, z軸を示す。

図2で示した配置を元に、Pokkaliと日本晴の塩ストレス下における Mit と Per の配置変化を調べた。日本晴では、塩処理区において、すべての配置の Mit が増加していた。とくに、Cluster と One-to-one に位置する Mit が有意に増加していた (図4BとD)。一方、Pokkali では Mit の数が減少する傾向にあり、ほとんどの Mit が Cluster に位置していた (図4B)。日本晴の Per は有意に増加しており、とくに Cluster に位置する Per が有意に増加していた (図4F)。Pokkali では、Per は増加する傾向にあったが、その増加は有意ではなかった。塩ストレス下における Pokkali の Per は、すべて Cluster に位置していた。

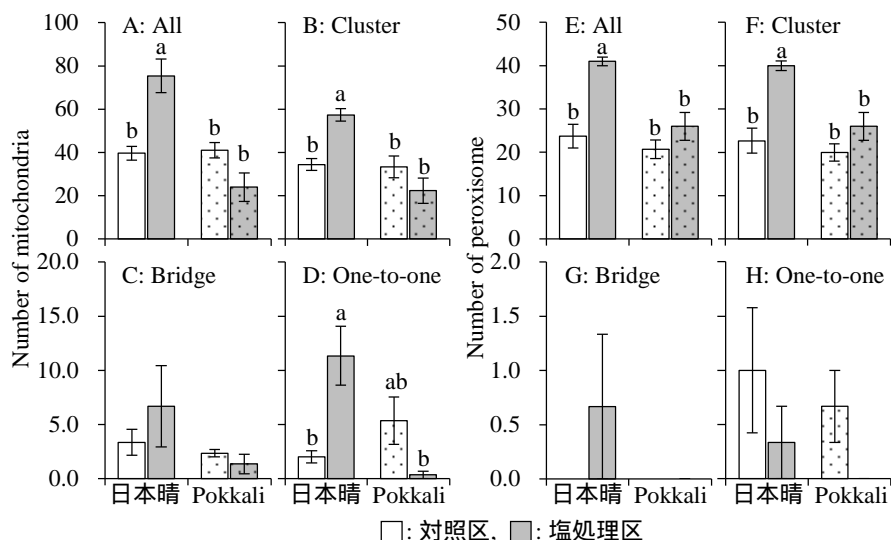


図4. Pokkaliと日本晴における塩ストレス下におけるオルガネラ配置変化。グラフは3細胞の平均値を示し、グラフ上の縦棒は標準誤差を示す。二元配置の分散分析を行い、交互作用が有意であった場合にTukey法による多重比較検定を行った。異なる文字間は5%水準で有意差があることを示す。

### (3) 塩ストレス下における膜接触面積の変化

Chl, Mit, Per それぞれの間の膜接触面を抽出し (図 3), 定量評価した。塩ストレス下では, 品種によらず, 葉肉細胞内でのそれぞれのオルガネラ間の膜接触面積は増加した (図 5A~C)。しかし, 耐塩性品種の Pokkali において, 一つの Mit の表面積に対する Chl や Per との膜接触面積の割合は, 対照区と比較して有意に増加していた (図 5D, E)。さらに, Pokkali において, 一つの Per の表面積に対する Mit との膜接触面積の割合は, 対照区と比較して有意に増加していた。このことから, Pokkali では, Mit や Per の単位表面積あたりの膜接触面積の割合を増加させることで, オルガネラ間の協調関係が強化されていた。

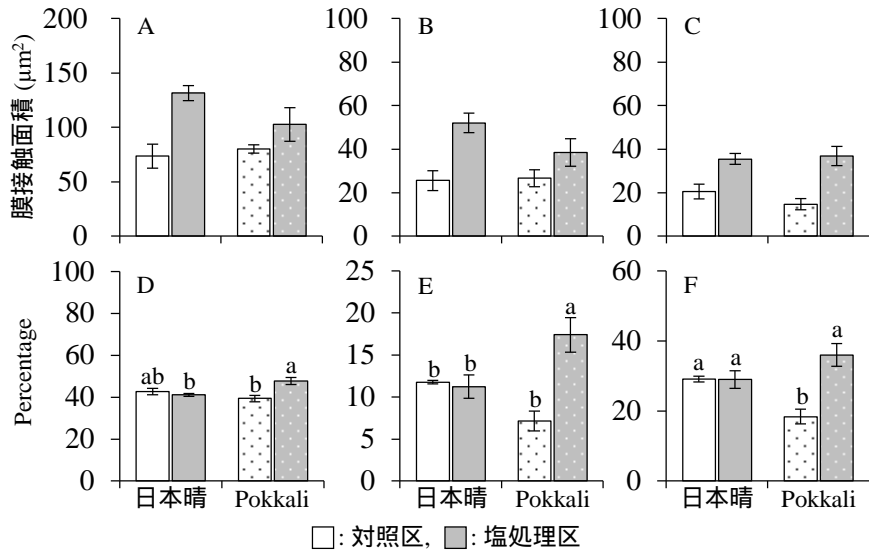


図5. Chl, Mit, Per それぞれの間の膜接触面積 (上図) と Mit や Per の表面積に対する MCA の割合 (下図). (A) Chl と Mit の間の膜接触面積. (B) Chl と Per の間の膜接触面積. (C) Mit と Per の間の膜接触面積. (D) Mit の表面積に対する Chl との間の膜接触面の割合. (E) Mit の表面積に対する Per との間の膜接触面の割合. (F) Per の表面積に対する Mit との間の膜接触面の割合. グラフは 3 細胞の平均値を示し, グラフ上の縦棒は標準誤差を示す. 二元配置の分散分析を行い, 交互作用が有意であった場合, Tukey 法による多重比較検定を行った. 異なる文字間は 5% 水準で有意差があることを示す.

### (4) 考察

以上の結果から, 塩ストレス下において, 耐塩性品種の Pokkali では Mit が伸び広がる形状に変化しており, その伸び広がった Mit が, Chl や Per と接触する面積の割合を増加させていた。動物細胞では, ストレス下では小型の Mit が多くなり活性酸素除去に関与し, 呼吸が活発な細胞では伸び広がった形状をしていることが観察されている (Picard et al., 2013)。塩ストレス耐性には, 光呼吸などの代謝が深く関与していることから, 耐塩性品種の Pokkali では, 塩処理下でも代謝活動を維持し, 活性酸素を発生させない機構が働いていることが, Mit の形状や膜接触面積の定量評価から推察された。

### 5. 引用文献

- Bobik, K., Burch-Smith, T. (2015) Chloroplast signaling within, between and beyond cells. *Front. Plant Sci.* 6: 781. doi: 10.3389/fpls.2015.00781
- Oi, T., Enomoto, S., Nakao, T., Arai, S., Yamane, K., Taniguchi, M. (2020) Three-dimensional ultrastructural change of chloroplasts in rice mesophyll cells responding to salt stress. *Ann. Bot.* 125: 833-840. doi: 10.1093/aob/mcz192
- Picard, M., Shirihai, O.S., Gentil, B.J., Burrelle, Y. (2013) Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304: R393-R406. doi:10.1152/ajpregu.00584.2012.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oi T., Enomoto S., Nakao T., Arai S., Yamane K., Taniguchi M.	4. 巻 125
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 Yamane K., Oi, T., Taniguchi, M.	4. 巻 23
2. 論文標題 Three-dimensional analysis of chloroplast protrusion formed under osmotic stress by polyethylene glycol in rice leaves	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Production Science	6. 最初と最後の頁 160 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1343943X.2	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 Takao, Yamane Koji, Taniguchi Mitsutaka	4. 巻 32
2. 論文標題 Anatomy of rice mesophyll cells and their chloroplasts based on the three-dimensional reconstruction method using FIB-SEM	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2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 連続切片TEM法を用いたイネ葉肉細胞内のオルガネラの3D解析
3. 学会等名 第10回植物電顕若手ワークショップ (招待講演)
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
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019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 山根浩二・大井崇生・谷口光隆
2. 発表標題 ストレスに伴う葉緑体形態変化の生理的意義
3. 学会等名 第247回日本作物学会
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 光合成細胞内オルガネラの立体配置
3. 学会等名 第247回日本作物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山根浩二
2. 発表標題 The relationship between the formation of chloroplast pocket and the localization of the organelles such as mitochondria and peroxisomes in mesophyll cells of rice
3. 学会等名 Biomacromolecular RIKEN Seminar (招待講演)
4. 発表年 2020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
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  (13901)	
研究協力者	大井 崇生  (Oi Takao)	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
---------	---------