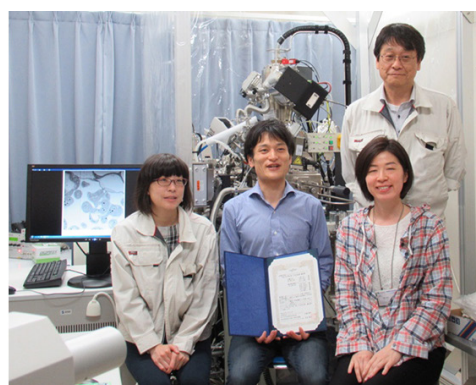


文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム平成 29 年度秀でた利用成果

塩ストレス下におけるイネ葉の葉緑体の三次元構造解析 ～ FIB-SEM 微細構造解析でイネ生育障害要因を探る～

近畿大学 農学部 山根 浩二氏に聞く



近大奈良キャンパスの山根氏（左），名大 FIB-SEM の前で大井氏を中央に中尾氏・榎本氏，後に荒井氏（右）

文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム（NPJ）事業は、最先端研究設備の利用機会を広く提供してイノベーションを促すことを目指している。微細構造解析、微細加工、分子・物質合成の3つのプラットフォーム（PF）から構成され、1,000を超える最先端のナノテクノロジー設備を提供し、産官学の連携、技術の融合により、革新的な研究成果が数多く生み出されてきた。利用件数は年間3,000件を超える。その中から、NPJは毎年、特に優れた成果を上げた数件の研究課題を「秀でた利用成果」として表彰してきた。平成29年度の6件の表彰[1]の一つに、「塩ストレス下におけるイネ葉の葉緑体の三次元構造解析」が選ばれた。ユーザーは、近畿大学農学部農業生産科学科 作物学研究室 山根 浩二氏および名古屋大学農学部／大学院生命農学研究科 植物生理形態学研究室の大井 崇生氏と谷口 光隆氏、支援機関担当者は、名古屋大学 微細構造解析プラットフォームの中尾 知代・榎本 早希子・中野 美恵子・荒井 重勇・山本 剛久の諸氏であった。作物学研究において、どのように微細構造解析 PF を利用して、どのような成果が挙げられたかを知るべく、近畿大学（近大）奈良キャンパスに、山根 浩二（やまね こうじ）氏を訪ねた。

1.1 名古屋大学 微細構造解析プラットフォーム [2]

名古屋大学（名大）は、ナノテクノロジープラットフォームの微細構造解析、微細加工、分子・物質合成の3つのプラットフォームのすべてに参画している。その中で、本利用成果は微細構造解析プラットフォームを利用して得られたものである。

名大 微細構造解析 PF は「高性能電子顕微鏡による反応科学・ナノ材料科学研究支援拠点」と呼称し、名大の超高圧電子顕微鏡施設で事業を行っている。百万ボルトの超高圧電子線により様々な環境下の試料を観察できる反応科学超高圧電子顕微鏡による支援を中心に、下表の高性能電子顕微鏡群（クラスター）を配置している。電子顕微鏡のクラスターは、4台の走査透過電子顕微鏡（STEM）、透過電子顕微鏡（TEM）と走査電子顕微鏡（SEM）の各1台で構成される。これに加えて、電子顕微鏡観察に用いる試料の作製装置を用意している。これらを総合して、極微小元素分析、三次元立体観察、ガス中その場観察、極低温観察を可能とし、支援項目の多様化による PF 利用拡大が可能となった。この PF の設備利用は、名大の電子顕微鏡グループが総合的に支援している。

1.2 活用した FIB-SEM 装置

電子顕微鏡群の装置は微細構造の観察の役割を担う。



1. 名古屋大学 微細構造解析プラットフォームの FIB-SEM 装置を活用

	電子顕微鏡	試料作製装置
装置名	反応科学超高压走査透過電子顕微鏡	高速加工観察分析装置 (FIB-SEM)
	高分解能電子状態計測走査透過型電子顕微鏡	集束イオンビーム加工機 (FIB)
	電界放出走査透過電子顕微鏡	アルゴンイオン研磨装置
	電子分光走査透過電子顕微鏡	クロスセクションポリッシャー
	電界放出型透過電子顕微鏡	低加速イオン研磨装置
	走査電子顕微鏡	ウルトラマイクロトーム
		その他 試料作製装置群

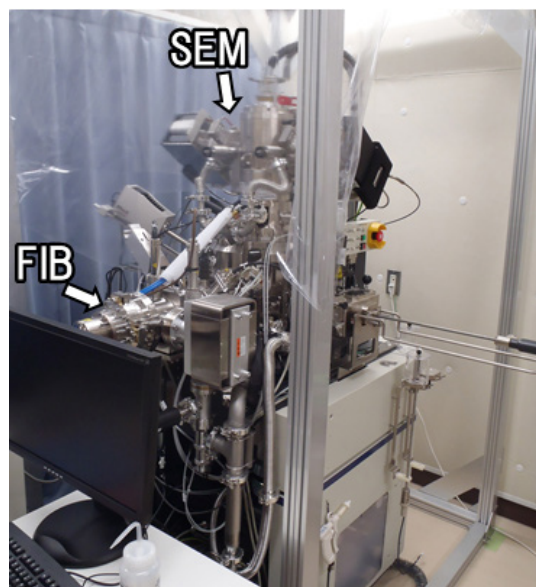


図1 名大 PF の FIB-SEM

これに対し、試料作製装置の多くは電子顕微鏡で観察できるよう試料を加工する装置である。その中で、高速加工観察分析装置 (FIB-SEM, 図1) は観察と加工の両機能を備え、真空中の試料台上に固定した試料表面を集束イオンビーム (FIB) で切削加工し、露出した表面を走査電子顕微鏡 (SEM) でその場観察することができる [3]。FIB は、イオンビーム照射によって試料表面から放出される二次電子を用いて試料表面を観察することもできるが、高分解能の観察は SEM の受け持ちである。FIB で数 nm ずつ削って、SEM で観察して得られた画像を集積して画像処理すれば、三次元画像を構成できる。

FIB-SEM 装置はイオンビームと電子ビームの二つの鏡筒を備え、二つのビームが交差するように配置される。従来機では、FIB 鏡筒は SEM 鏡筒に対して 50 ~ 55° の角度で設置されており、FIB によって斜めに切削された傾斜断面を SEM で観察していた [4]。これに対し、名大 PF の FIB-SEM は、FIB 鏡筒と SEM 鏡筒が直交するように配置されており、横から薄紙をはがすように FIB で試料表面を削り、新しい表面が作出されたら SEM で観察する。SEM に対して常に正対するので試料断面は傾斜せず、観察位置が画面内で変わることがないため、同じ観察領域

を切削しながら深度を変えて観察できる。また、加工表面のイオン照射による損傷が少ない。この特徴は、本利用成果のような植物細胞の観察には特に望ましいものであった (図7で記述)。

塩ストレス下におけるイネ葉の葉緑体の構造解析は、山根氏が名大の谷口 光隆氏をスーパーバイザーとし、同じ研究室の大井 崇生氏と共同で行ってきた研究である。大井氏が名大 PF の FIB-SEM を紹介するセミナーに出席したのが利用のきっかけになったという。名大 PF では、高度の装置の操作は PF のスタッフがを行い、利用者は立ち会って、共同で実験・観察を行う。本利用成果では、装置の操作を中尾 知代、橋本 早希子の両氏がを行い、荒井重勇氏がアドバイザーであった。



2. TEM を用いてイネの塩ストレス障害を探る

2.1 植物の塩害の発生

河口近くの水田に海水が混入すると、イネは葉色が薄くなり、葉の内巻き現象を生じて下位葉から枯死する。東日本大震災では、津波によって海水が流入し、水田土壌に高濃度の塩類が集積した。日本での土壌への塩類集積は、台風、津波などによって突発的に起こるが、世界に目を向けると、塩類集積土壌は中央アジアを中心に広く分布している。

イネが塩ストレスに曝されると、イネの葉の葉肉細胞内の葉緑体構造が崩壊し、光合成活性の低下をもたらす

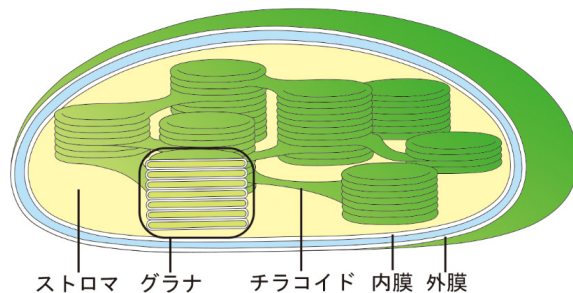


図2 種子植物の葉緑体の構造

とされるが、その障害発現機構は未だに解明されていない。種子植物の葉緑体は、図2のように二枚の包膜に囲まれ、さらに内部はストロマやチラコイド・グラナとよばれる内部構造から成り立っている。

図3に示すように、細胞周囲の塩分濃度が上がると、浸透圧によるストレスが生じるとともに、ナトリウムイオンが過剰になるのでイオンストレスが起こる。また、活性酸素が発生し、酸化ストレスを受ける。これらのストレスによって生理・形態変化が引き起こされ、最終的に障害が引き起こされる。山根氏らは、傷害観察とその要因を2003～2012年に調べ、葉緑体の内部にあって光エネルギーを吸収・利用する場所となっているチラコイドにおいて、その膜構造の膨潤という傷害と、その傷害には活性酸素が関与することを見出した[5]。2010年

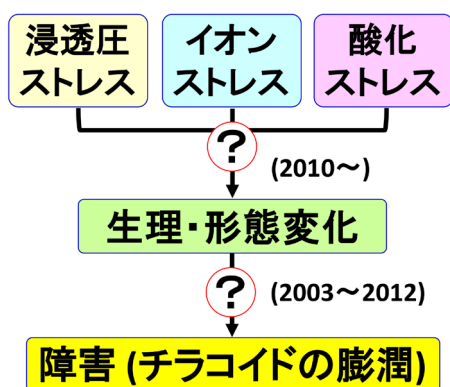


図3 塩ストレス障害発現機構

からは、塩ストレスによる障害発現が起こる前の生理・形態変化を探っており、塩ストレス下で形成される葉緑体突起構造に着目して研究を進めている。

2.2 TEM 観察によるイネの塩ストレス障害発現機構

山根氏らは、塩ストレス障害発現機構を解明しようと、塩ストレスを与えたイネ葉の葉緑体の微細構造をTEMで観察し、塩ストレスを与えていない対照区と比較した。名古屋大学生命農学研究科の資源植物環境学研究室（現、植物生理形態学研究室）に在籍していた当時は、研究室所有のTEMを自由に使うことができた。イネは、人工気象器の中で、光を当てた通常の生育条件で3週間育てる。イネの最上位展開葉は長さ30cm程度、葉内にある葉肉細胞一つは、直径が15～20μm程度の大きさになる。このイネ葉から試料片を切り出し、化学固定法によって細胞内構造を保持させ、樹脂に包埋する。従来のTEM観察では、二次元画像しか得られないが、連続的に切り出した薄片の二次元画像を積み上げることによって、三次元構造を構築することができる。

75mMのNaClを含む栄養液で14日間の塩ストレス処理をしたイネ葉を用いて、チラコイドの膨潤が生じる前の変化をTEMで観察したところ、葉肉細胞の葉緑体には短い突起構造[5]（図4b、矢印）や比較的長い突起構造（図4c、矢印）が形成されていた。比較的長い突起構造は、ミトコンドリアを取り囲むように伸びているものもあった（図4d、矢印）。

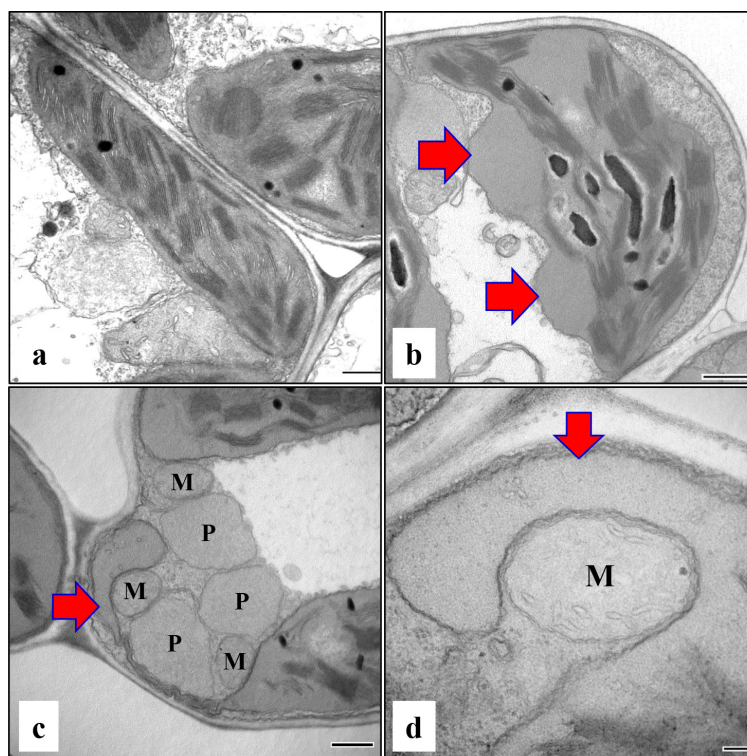


図4 葉緑体突起構造の形成。a：対照区，b～d：14日間の75mM NaCl処理区。
M：ミトコンドリア，P：ペルオキシソーム，Bar=0.5μm (a～c)，Bar=0.1μm (d)。

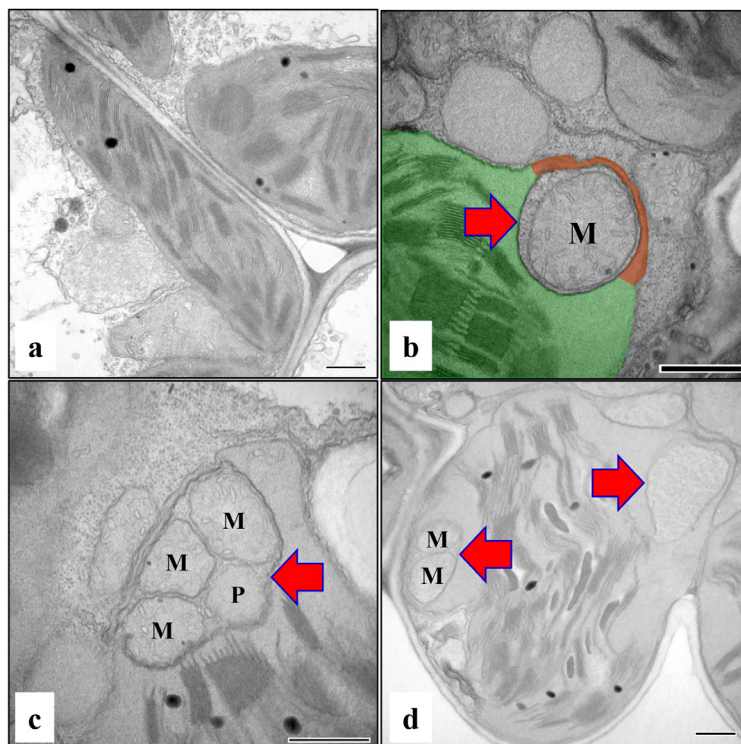


図5 葉緑体ポケット構造の形成. a: 対照区, b~c: 4日間の100mM NaCl処理区.
図b~d中の赤矢印はポケット構造を示し, 図bの緑と赤色部分は, それぞれ葉緑体本体と葉緑体から伸びたミトコンドリアを取り囲む細長い構造を示す. M: ミトコンドリア, P: ペルオキシソーム. Bar=0.5μm.

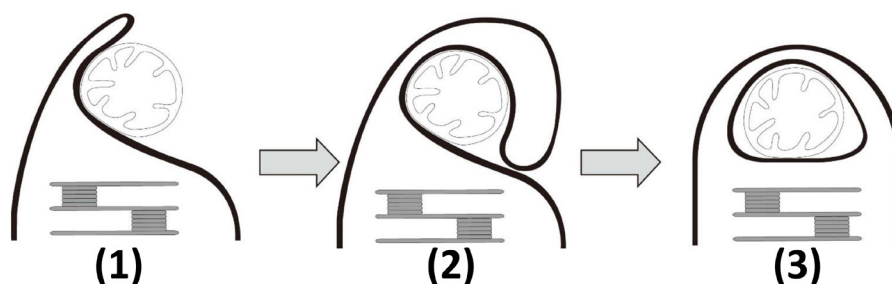


図6 葉緑体ポケット形成の仮説

さらに, 100mM の NaCl を含む栄養液で4日間の塩ストレス処理をした後に葉緑体構造を調べたところ, イネ葉の葉緑体にはポケット構造が形成されていた(図5b~d, 矢印). 葉緑体ポケット構造とは, 図5bの赤色部分で示されるような葉緑体から伸びている細長い構造に取り囲まれた領域を示し, ミトコンドリアやペルオキシソームなど他の細胞小器官が取り囲まれている場合が多い. 複数の細胞小器官が一つのポケット内に一緒に取り囲まれる場合や(図5c), 一つの葉緑体に複数のポケット構造が観察される場合もあった(図5d).

図4dで観察されたミトコンドリアを取り囲む細長い構造や, ポケットを構成する細長い構造(図5b, 赤色部分)を合わせて考慮すると, 葉緑体を作る細長いチューブ状の突起構造が, 他のオルガネラ(例えばミトコンドリア)を取り囲み, 最後には先端と本体がくっついて葉緑体ポケットが形成されるという, 図6のような仮説が考えられた.

この仮説を論文にして国際誌に投稿したところ, 採択されなかった. 不採択の理由は, とびとびの二次元画像の積み重ねでなく, 連続画像を用いた三次元構造解析で裏付けるべきだ, というものであった. 葉緑体の三次元構造解析が求められた.



3. 塩ストレス障害発現機構解明に向けたFIB-SEMによるイネ葉緑体三次元構造解析

3.1 FIB-SEMを用いたイネ葉の観察のための条件検討

論文が不採択された頃, 2014年6月に名古屋大学にFIB-SEMが導入され, その説明会に大井氏が参加した. FIB-SEMを用いれば三次元構造解析が可能となり, 論文採択の可能性が高まると, 山根氏らは考えた.

イネ葉の葉緑体の三次元構造解析は次のように行われた。前述の TEM 観察に用いた葉切片を固定・包埋した樹脂ブロックを 3mm 角に切り出し、図 7 に示したように FIB からのイオンビームと SEM からの電子ビームが直角に交わる領域に観察したい葉組織の断面が位置するように設置し、FIB で側方から削り取った新鮮な面を SEM で観察する [6]。この FIB 切削と SEM 観察を反復して、厚さ方向の二次元画像スタックを得る。FIB による切削厚さは 50nm としたので 15 ~ 20 μ m の葉肉細胞を観察するには、300 ~ 400 枚の写真を撮ることになる。この画像スタックから、三次元像構築ソフト (AVIZO) により三次元画像を構築する。

植物組織は細胞間隙や液胞に多く占められているので、FIB-SEM 観察を始めたところ、観察断面の大部分を占める樹脂によるチャージアップで輝度ムラが生じるなどの問題が起こった。また、試料表面のわずかな凹凸や樹脂と細胞の硬度の違いによっても FIB 加工で縦縞の切削ムラが生じる (図 8 左)。これらの問題に対し、名大 PF の支援者は鮮明な像を得ることが出来る加工・観察条件の検討を行い、鮮明な画像取得に成功した (図 8 右)。

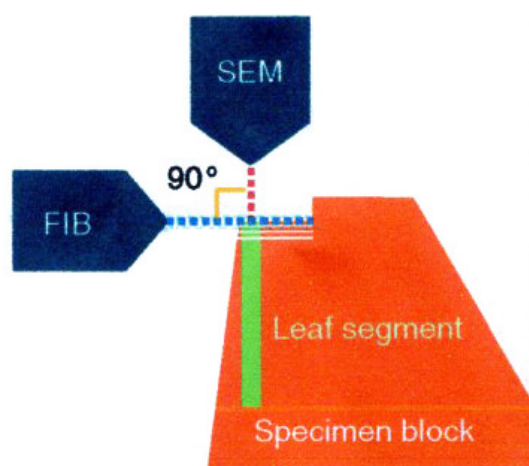


図 7 FIB-SEM による加工と観察

3.2 塩ストレスによる葉緑体ポケット構造の解明 [7]

植物細胞の FIB-SEM 観察条件が整ったので、塩ストレスによりポケットを持った葉緑体の立体構造の観察を行った (図 9)。図 9 (a) は、FIB-SEM による連続断面観察で得られた約 100 枚の写真の一部である。なお、試料を手動で切り出して観察を行う TEM の場合では、連続写真は 30 枚程度にとどまる。図 9 (a) で示した FIB-SEM によって得られた二次元画像のスタックから図 9 (b) の立体構造が構築された。図 9 (c) は塩ストレスを与えない対照区における葉緑体の三次元再構築像である。図中では、葉緑体を緑、今回見出されたシート構造を紫色、葉緑体近傍に存在し、ミトコンドリアとともに光呼吸の代謝を担っているペルオキシソームを橙色で示した。

図 9 (b) において、白文字で示された番号は FIB による切削 (セクション) 数を表し、図 9 (a) の番号に対応する。対照区における葉緑体の構造は平坦で、突起構造は観察されなかった (図 9 (c))。しかし、塩ストレスを与えた葉緑体では、突起したシート構造が観察された (図 9 (b)、紫色)。突起構造を持った葉緑体を図 9 (a) で追跡すると、紫色で塗られた突起構造はセクション 59 から現れた。セクション 77 では、橙色のペルオキシソームが突起構造の近くに現れ、突起構造とペルオキシソームは次第に近づき (セクション 90)、ペルオキシソームが突起構造に取り囲まれることで葉緑体ポケットが形成されていた (セクション 93)。これらの結果から、葉緑体ポケット構造は、シート状に突起した構造の一部がペルオキシソームを取り囲むことで形成されることが示された。

細長い突起構造が、他のオルガネラを取り囲むことでポケット構造が構築されるという二次元像から推測されたモデル (図 6) は誤りであり、実際には、葉緑体からシート状の突起構造が作られ、それが他のオルガネラを取り囲むことで葉緑体ポケット構造は構築されること (図 9) が示された。FIB-SEM によって得られた連続画像を用い

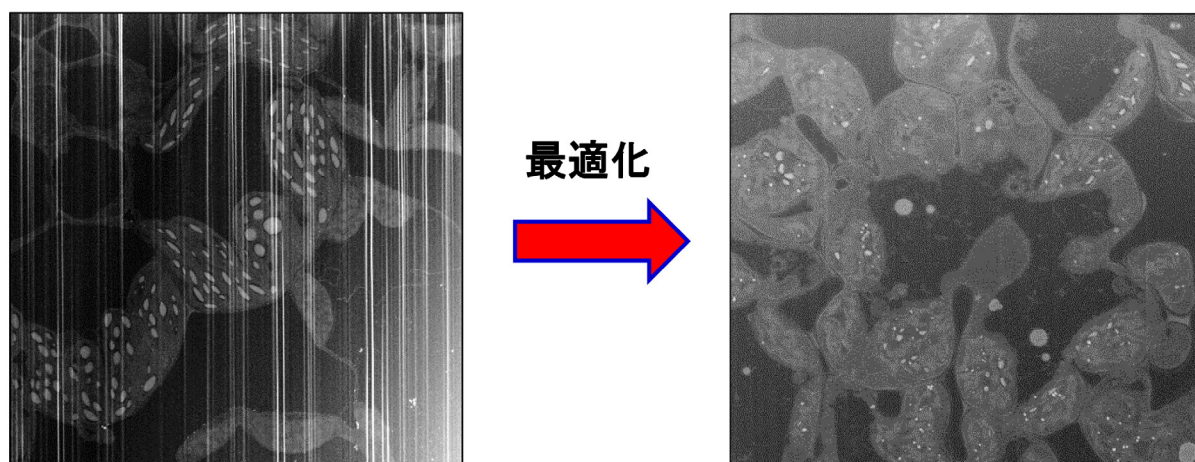
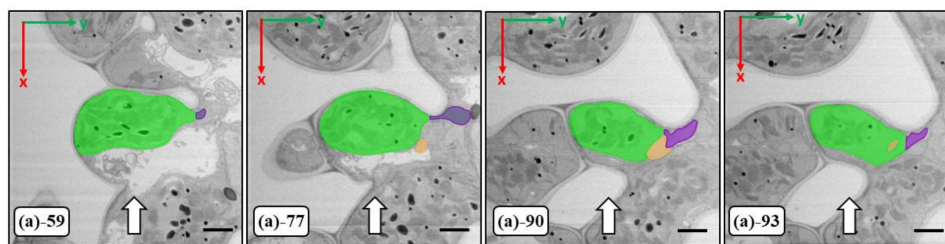
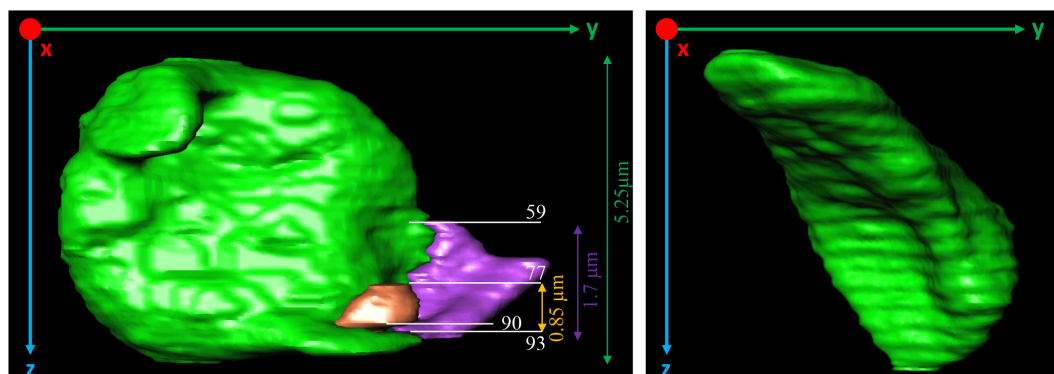


図 8 植物細胞の FIB-SEM 観察における観察条件の最適化



(a) 塩ストレスによりポケット構造を持った葉緑体の連続画像 (Bar = 1.0 μ m)



(b) 塩ストレスを受け、ポケットを形成した葉緑体の立体像。立体像は、図 9 (a) 中の白矢印で示した方向から観察したものである。

(c) 対照区葉緑体の立体像

図 9 FIB-SEM による葉緑体の三次元構造解析

て立体像を構築することでポケット構造を追跡し、不採択された論文のモデルを検証したことになる。

FIB-SEM を用いて三次元構造解析を行うことにより、塩ストレスを与えると、シート状の構造が葉緑体に形成されてペルオキシソームを取り囲んでいることがわかった。葉緑体が非常に大きいシート構造を作ることとは、世界で初の観察結果であり、三次元構造解析を行ったことによって、初めて発見が可能となったものである。

また、塩ストレス下で葉緑体は他のオルガネラを取り囲み、協調関係を強化していることが推測された。このことは、シート構造を有する葉緑体が細胞内に多くあれば、植物の耐塩性向上に貢献できることを示唆し、耐塩性品種開発の一つの指針となることが期待された。

3.3 イネ葉肉細胞の三次元構造解析 [6]

個々の葉緑体のみではなく、イネ葉肉細胞全体の三次元構造解析にも挑戦した。イネの葉肉細胞の厚さは 15 ~ 20 μ m あり、50nm ずつ切削して観察するので、数百枚の写真の撮ることになり、1 回の FIB-SEM 観察は 24 時間以上にも及ぶ。この長時間観察は、名大 PF による長時間の使用容認により可能となった。また、長期間の使用容認によって、複数の葉肉細胞を観察して反復を得ることが可能となった。

この結果、イネ葉肉細胞の全体像を世界で初めて三次元的に観察することに成功した。図 10 は、対照区の連続画像群より作成したイネ葉肉細胞の三次元再構築像であ

る。これにより、葉緑体が細胞壁のくびれに沿って全体を内側から覆い、効率的な CO₂ 吸収を可能にしていることが分かった。

次に、塩ストレスのイネ葉肉細胞への影響を調べた。二次元観察では、葉緑体の断面積が塩ストレス処理区の方で増加したように見える (図 11)。ところが、FIB-SEM で切削・観察し、三次元構築をして葉緑体の総体積を比較すると (図 12)、塩処理したイネ葉肉細胞の体積は、対照区と比較して有意な差は無かった。個々の葉緑体は色を変えて示しているが、塩ストレス下では、多くの葉

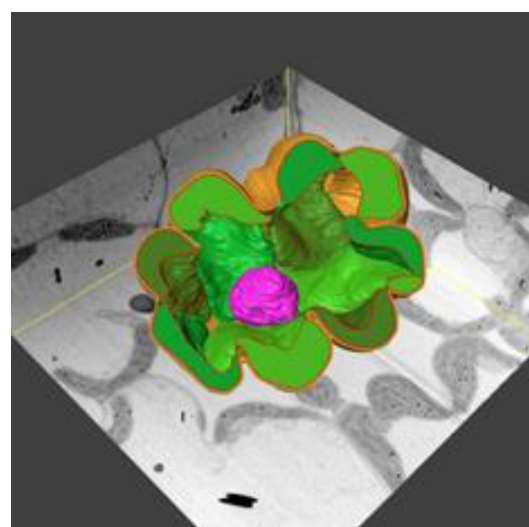
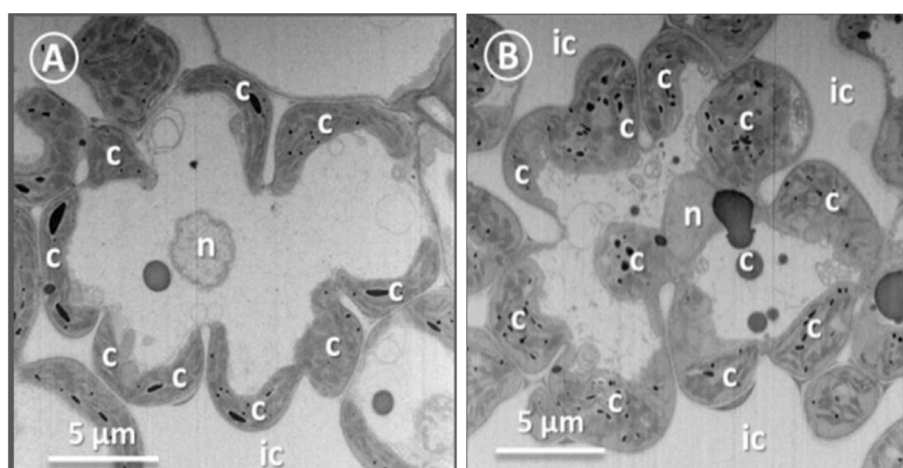


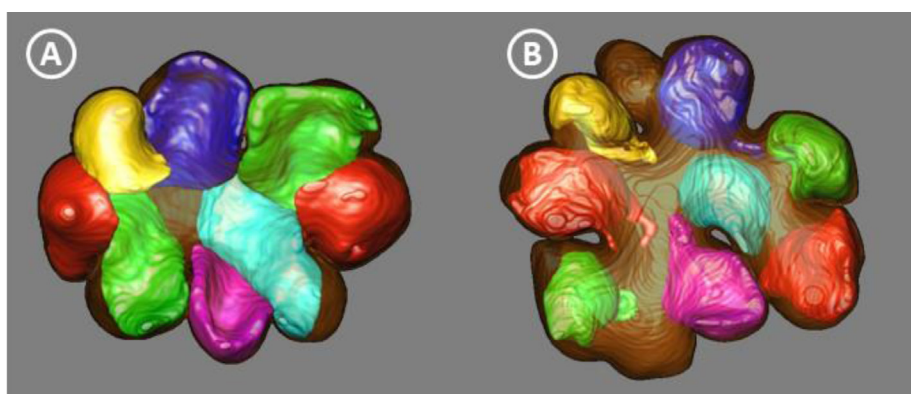
図 10 イネ葉肉細胞の立体像
緑：葉緑体、紫：核、黄：細胞壁



対照区

100 mM NaCl, 4日間処理

図 11 塩処理したイネ葉肉細胞の二次元的観察 (c: 葉緑体, ic: 細胞間膜, n: 核)



対照区

100 mM NaCl, 4日間処理

図 12 対照区と塩処理区のイネ葉肉細胞の三次元構造解析による比較

緑体がシート構造や突起構造などを形成するため、二次元的観察では面積が広がって見えることが明らかとなった。

3.4 オルガネラの細胞内配置解明から作物生産性向上へ

秀でた利用成果の「塩ストレス下におけるイネ葉の葉緑体の三次元構造解析」において、葉緑体ポケット構造、さらに葉肉細胞全体の構造を世界で初めて三次元的に明らかにできた。この成果を記述する2報の投稿論文が国際誌に採択され [6][7]、学会発表では4件の優秀発表賞を受賞した。

今後の新たな展開としては、オルガネラの細胞内配置を三次元的に明らかにし、その配置を可能にしている要因を明らかにすることである。細胞内のオルガネラ配置は、効率的な代謝に重要であることが予想され、作物生産にも大きな影響を及ぼすと考えられている。しかし、細胞内のオルガネラ配置を三次元的に解析した研究例は無い。さらに、ストレスなどの環境変化に伴って配置変化することが予想されているが、どのような配置変化が

起こるのか、三次元的な解析例は無い。今後は、様々な細胞や環境下におけるオルガネラの配置変化を三次元的に明らかにし、代謝効率との関係性を明らかにすることで、作物の環境ストレス耐性や生産力の向上につながる研究を行っていかようとしている。



4. おわりに

かつて米の作況は日本の景気を左右し、現在は世界人口増大に伴う食糧不足が懸念される中、農作物の生産性向上が求められている。そのための農学の研究は、旧来の育種・改良に加え、育成あるいは育成阻害過程の分析・解明をもとに、新たな展開を図るようになってきた。このため、工業分野で開発・活用されてきた解析・評価装置が農学を含むライフサイエンス分野で重用されるようになってきている。ナノテクノロジープラットフォームと類似の米国ナノテクノロジー共用施設ネットワーク (NNCI) において、ユーザーが増加している分野は、これまでマイクロ/ナノ設備を使ってこなかったライフ、環境、地

球科学であるという [8]。本利用成果は、このような農学の流れに応える山根氏らの研究意欲が、名古屋大学微細構造解析プラットフォームの設備や手厚い支援と結びつくことによって得られた。ナノテクノロジープラットフォーム供用設備の利用分野が拡大し、新たな利用分野の研究が新しい発展を遂げることを期待したい。



参考文献

- [1] NanotechJapan 利用成果セレクション 秀でた利用成果 (nano tech 2018 展示) <http://nanonet.mext.go.jp/selection/>
 - [2] 高性能電子顕微鏡による反応科学・ナノ材料科学研究支援拠点
<http://nanonet.mext.go.jp/insti/nagoya-u/nc/>
<http://nanoplat.nagoya-microscopy.jp>
 - [3] 高速加工観察分析装置
<http://nanoplat.nagoya-microscopy.jp/equipment10.html>
 - [4] 日立ハイテクノロジーズ集束イオンビーム (FIB/FIB-SEM) <https://www.hitachi-hightech.com/jp/science/products/microscopes/focused-ion-beam-systems/nx9000.html>
 - [5] Koji Yamane, Shiro Mitsuya, Mitsutaka Taniguchi and Hiroshi Miyake, "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. Vol. 35, Issue 9, pp. 1663-1671 (2012)
 - [6] Takao Oi, Sakiko Enomoto, Tomoyo Nakao, Shigeo Arai, Koji Yamane and Mitsutaka Taniguchi, "Three-dimensional intracellular structure of a whole rice mesophyll cell observed with FIB-SEM", Annals of Botany, Vol. 120, Issue 1, pp. 21-28 (2017)
 - [7] Koji Yamane, Takao Oi, Sakiko Enomoto, Hiroshi Miyake, and Mitsutaka Taniguchi, "Three-dimensional ultrastructure of chloroplast pockets formed under salinity stress", Plant Cell and Environment, Vol. 41, Issue 3, pp. 563-575 (2018).
 - [8] 第 16 回ナノテクノロジー総合シンポジウム (JAPAN NANO 2018) 開催報告 http://nanonet.mext.go.jp/ntjb_pdf/v11n2_JAPANNANO2018.pdf
- (図はすべて山根氏と大井氏から提供された)
- (古寺 博)



nanoplat

【お問い合わせ】

微細構造解析プラットフォーム

名古屋大学

☎ 052-789-3632

E-mail nanoplat@nagoya-microscopy.jp

ホームページ

<http://nanoplat.nagoya-microscopy.jp/>