

■原 著■

水ストレスで誘導されるアイスプラントの葉組織および細胞の微細構造変化

早津 学¹ 鈴木季直^{1,2}

Water Stress-induced Ultrastructural Changes of Leaf tissues and Cells in the Ice Plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L.

Manabu Hayatsu¹, and Suechika Suzuki^{1,2}

¹ Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: A facultative halophyte ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L., switches over from C₃ photosynthesis to Crassulacean acid metabolism (CAM) under environmental stress, such as water stress (osmotic stress or ionic stress). The ultrastructural changes of tissues and cells during the metabolic switch were examined in common ice plants cultured hydroponically with 400 mM NaCl. To define the stress-induced metabolic switch, the concentration of malate was measured in well expanded green leaves kept in the light and dark. The concentration was significantly higher in leaves kept in the dark than in the light, indicating CAM induction by water stress in the ice plant. The leaves of stress-induced CAM plants and unstressed plants were fixed chemically by conventional methods, and ultrathin sections were examined with a light microscope and an electron microscope. In contrast with those found in unstressed plants, in stress-induced CAM plants, epidermal bladder cells were well developed, mesophyll cells changed to small and round in shape, and the intercellular spaces became remarkably narrow. These changes may be caused directly by water stress. Furthermore, in mesophyll cells, the chloroplasts contained conspicuously swelled thylakoids and a few small starch grains. These structural changes in chloroplasts may reflect the metabolic switch induced by water stress.

Keywords: ice plant, water stress-induced ultrastructural change, Crassulacean acid metabolism, epidermal bladder cell, mesophyll cell

序論

植物は、高温の乾燥地や砂漠などでは、土壌が乾燥してくると土壌中の塩濃度が上昇し、浸透圧上昇により根からの水分吸収量が低下するため、植物全体への水分供給量が低下し、よく成長することができない。しかし、そのようなストレス下にあっても、その環境に適応して成長でき、かつ特殊な光合成経路を発達させた植物があり、それらは CAM (Crassulacean Acid Metabolism) 植物と呼ばれている。

一般的な CAM 植物は、気温が下がる夜間に気孔を開いて CO₂ を取り込んでリンゴ酸として固定し¹⁻³⁾、液胞内に蓄えておき、高温で乾燥した昼間に気孔を閉じて水分の蒸散を抑えながら、蓄えたリンゴ酸を脱炭酸して CO₂ にし、再度、カルビン-ベンソン回

路で固定し、糖やデンプンに合成する^{4,5)}。しかし、この光合成経路では、前段階で、リンゴ酸を液胞中に蓄えておくためにエネルギーを消費するので、同じ量の CO₂ を糖に変換する時、より多くのエネルギーを必要とし、その結果、水分が十分にある状況下でも、その成長速度は C₃ 植物に比べて遅くなる。この CAM 型光合成の欠点を回避し、幅広い環境変化に適応して C₃ 型光合成と CAM 型光合成の双方を使い分ける光合成経路を持つ植物があり、塩生植物のアイスプラント (common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L.) はその一つである。

アイスプラントは、水分が十分に供給されている間は C₃ 型光合成を行い、乾燥などの環境ストレスを受けると CAM 型光合成へと変換することが知られ

ている⁶⁾。このアイスプラントにおける光合成経路の変換に関連した酵素活性の変化や浸透圧調節に関する研究は数多くなされている^{7,8)}が、これに伴う微細構造変化を明らかにしようとする試みはあまりなされていない。本研究では、アイスプラントを高濃度の NaCl 溶液で水耕栽培することにより植物にストレスを与え、誘導される CAM 型光合成に伴う葉の組織変化と葉肉細胞の微細構造変化について、光学顕微鏡と電子顕微鏡による観察を行った。

材料と方法

水ストレスを与える実験には、ピートモス、バーミキュライト、パールライトからなる土壌で種子から発芽し、成長 4 週間後のアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) を用いた。1ℓの蒸留水に、0.606 g KNO₃、0.657 g Ca(NO₃)₂、0.115 g NH₄H₂PO₄、0.241 g MgSO₄·7H₂O、0.00286 g H₃BO₃、0.00181 g MnCl₂·4H₂O、0.00008 g CuSO₄·5H₂O、0.00022 g ZnSO₄·7H₂O、0.005 g FeCl₂ を完全に溶かし、その後、pH が 8.0 になるように 1N NaOH を加えてホーグランド液を調整した。この液を標準の培養液として水耕栽培した植物を対照群とした。一方、ホーグランド液にさらに NaCl を溶かし、400 mM にした高塩濃度溶液を調整し、この液で水耕栽培した植物を実験群とした。水耕栽培 7 日後に CAM 型光合成への変換を確認するためにそれぞれの植物をさらに二群に分け、一方を明所、他方を暗所に移し、12 時間後に葉を切り取り、蒸留水中でホモジェナイザーを用いて葉細胞を破碎し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で葉内リンゴ酸濃度を測定した。また、CAM 型光合成からの回復を確認するために、実験群の一部を標準培養液に移し、さらに 7 日間水耕栽培した。水耕栽培の期間中、溶液のエアレーションを行い、各溶液は 2 日に一回新しい溶液に交換した。

水耕栽培 7 日後の植物、および回復期間後の植物の葉を採取し、葉脈方向が長辺となる約 1×4 mm² の長方形葉片を切り取り、蒸留水を入れた試料ビンに入れ、水流アスピレーターを用いて脱気した。試料が液底に沈んだ後、蒸留水を抜き取り、0.1 M 燐酸緩衝液 (pH7.2) で希釈した 6% グルタルアルデヒド (以下 GA) 液に浸漬し、室温下で 1 時間、4℃ 下で 23 時間前固定した。GA 液で固定した後、0.1 M 燐酸緩衝液 (pH7.2) で洗浄し、蒸留水で希釈した 2% 四酸化オスミウム (以下 OsO₄) 液と交換し、室温下で 1 時間、4℃ 下で 23 時間、後固定した。固定試料は、アセトン系列で脱水し、更に Epoxy 樹脂に包埋し、40℃ 下で 24 時間、60℃ 下で 24 時間熱重合

した。樹脂包埋ブロックの試料まわりを剃刀でトリミングした後、ウルトラマイクロトーム (Reichert Ultracut-N) で組織観察のための厚さ 90 μm の切片を作製した。切片をスライドガラスに載せ、加温乾燥し、トルイジンブルーで加温染色した後、光学顕微鏡で観察した。一方、同じ樹脂包埋ブロックから、ウルトラマイクロトームで厚さ 70 nm の超薄切片を作製し、コロジオン膜を張った Cu-150 メッシュに載せ、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を行い、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM2000EX、JEOL JEM1230) で観察した。

結果

水ストレスで誘導される代謝変換と葉内リンゴ酸濃度変化

水耕栽培後、対照群植物は、茎は太く、葉も縦横に幅広く成長していた。一方、実験群植物は、対照群植物に比べて生長速度が遅く、茎は細く、葉面積も小さかった。しかし、葉や茎の表面は凹凸が顕著になり、水泡様の多数の突起が形成されていた。高塩濃度溶液で水耕栽培した植物が、ストレスにより CAM 型光合成へ変換されたか否かを確認するために対照群植物と実験群植物をそれぞれ二群に分け、明所と暗所に置いた後、葉のリンゴ酸濃度の測定を行った。その結果、対照群植物では、葉に含まれるリンゴ酸の濃度は、明所に置いた植物と暗所に置いた植物でほぼ同じであった (表 1)。一方、ストレスが加えられた実験群植物では、葉に含まれるリンゴ酸濃度は明暗で大きく異なり、暗所に置いた植物の濃度は明所に置いた植物の約 3 倍高い値を示し、光合成経路の変換が認められた。

表 1. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるアイスプラント葉のリンゴ酸の測定結果

	対照群	実験群
明所	12 mM	6 mM
暗所	13 mM	17 mM

葉の組織と細胞の微細構造観察

図 1 は、光学顕微鏡による対照群と実験群の葉の横断切片像を示している。対照群植物の葉肉細胞は大きく、不定形であり、細胞内の殆どが液胞で占められており、細胞膜に沿って薄い層をなす細胞質基質内に多くの葉緑体が分布していた (図 1A)。また、細胞間には大きな間隙空間が認められた。一方、実験群植物の葉肉細胞は、液胞や葉緑体の細胞内分布で対照群と大きな差は示さなかったが、その殆どが対照群植物の葉肉細胞に比べて小さく、ほぼ楕円形

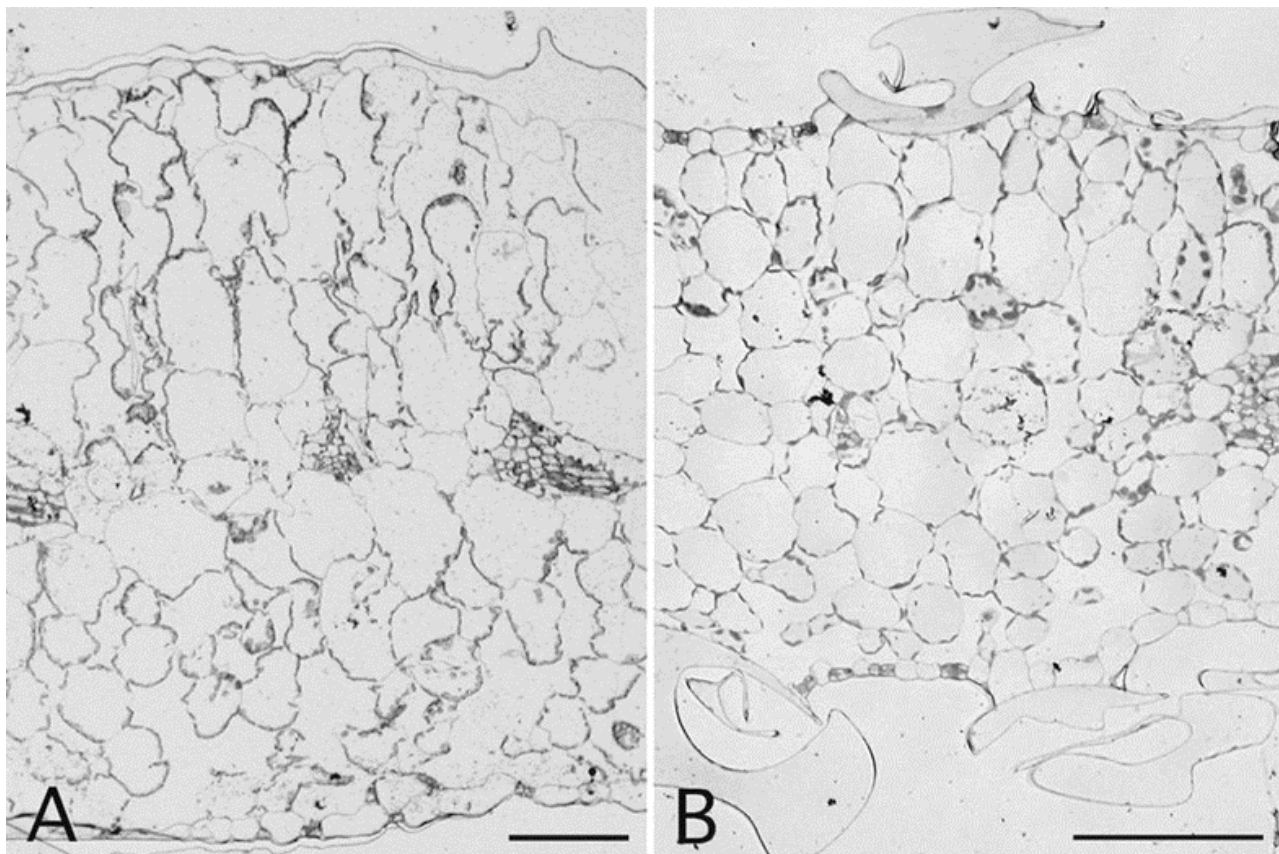


図 1. アイスプラント葉の横断切片光学顕微鏡像. 上部は向軸面、下部は背軸面. A. 標準ホーグランド液で 7 日間水耕栽培した対照群植物の葉肉組織. B. 400 mM NaCl を含む高塩濃度ホーグランド液で 7 日間水耕栽培した実験群植物の葉肉組織. Scale: 100 μ m.

であった (図 1B)。また、細胞間隙は著しく縮小されていた。この変化は、細胞の形と大きさの変化と共に、高塩濃度溶液による水耕栽培の影響によるものと思われる。

アイスプラントでは、その呼称の由来とされるブラッター細胞 (epidermal bladder cell) と呼ばれる塩嚢細胞が葉や茎の表皮系に存在することが知られている⁸⁾。対照群植物では、ブラッター細胞は扁平状の大きめの表皮細胞として認められるが(図 1A 右上部)、その数は少なかった。しかし、実験群植物では、葉の表裏両面で、大きく膨れ、表面から大きく突出した多数のブラッター細胞が観察された。これらのブラッター細胞は、固定前の生試料では、風船のように膨らんでいるのが光学顕微鏡下で確認できたが、固定後の試料では、図 1B のように不定形を示した。

維管束組織の細胞については、対照群および実験群の植物間に大きな違いは観察されなかった。

図 2 は、対照群と実験群のアイスプラント葉の超薄切片像を示している。光学顕微鏡による観察結果と同様に、どちらの植物の葉肉細胞も細胞内の殆どが液胞に占められており、細胞壁に沿って薄い層と

して存在する細胞質基質内に多数の葉緑体が観察された。対照群では葉緑体内に大きなデンプン粒が多数含まれていたが(図 2C)、実験群ではその数と大きさは著しく減少しており、しばしばデンプン粒を含まない葉緑体も見られた(図 2D)。葉緑体内膜系の変形としてチラコイドの膨潤が認められた。高塩濃度培養液から再度標準培養液に移して水耕栽培した植物では、葉肉細胞内の葉緑体は図 2C と同様のチラコイドが膨潤していない内膜系を示し、多数の大きなデンプン粒を含んでいた。このことから、高塩濃度培養液で水耕栽培した植物の葉肉細胞に見られる葉緑体の構造変化は水ストレスが要因となって引き起こされたものと考えられる。

細胞質基質内にはミトコンドリアや核などの細胞内小器官も観察されたが、これらの細胞内小器官には水ストレスによる構造変化は見られなかった。

図 3 は、高塩濃度美容液で水耕栽培した実験群植物の葉の表皮系に見られるブラッター細胞の超薄切片像を示している。基底部や隣接する表皮細胞間には細胞壁が認められるが(図 3B)、外気に面した表面には細胞壁のような顕著な細胞膜外物質による蓄積構造は認められなかった。細胞内は殆ど液胞で占め

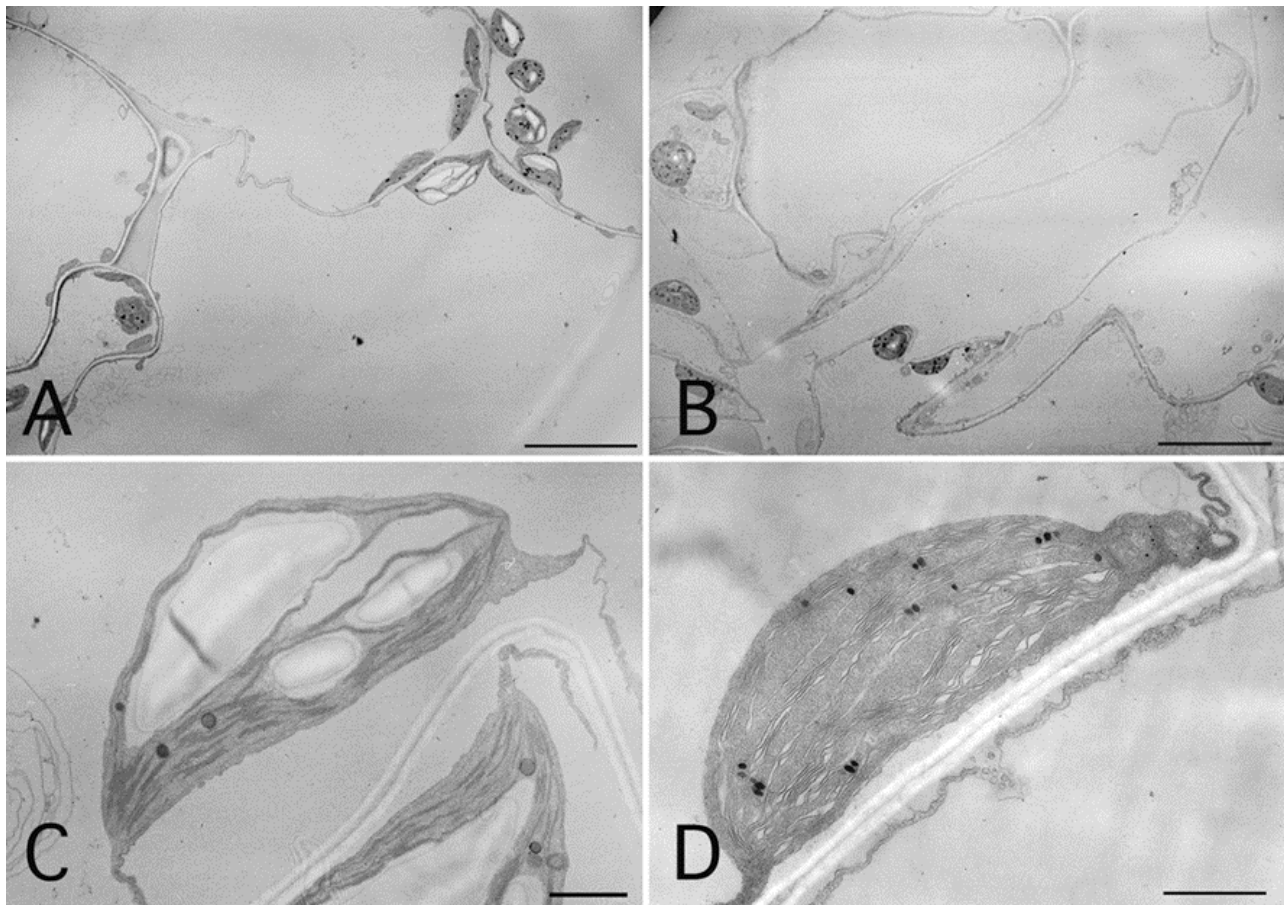


図2. アイスプラント葉の超薄切片像. 標準ホーグランド液で7日間水耕栽培した対照群植物の葉肉細胞(A)と葉緑体(C). 400 mM NaClを含むホーグランド液で7日間水耕栽培した実験群植物の葉肉細胞(B)と葉緑体(D). Scale: 10 μ m (A, B); 1 μ m (C, D).

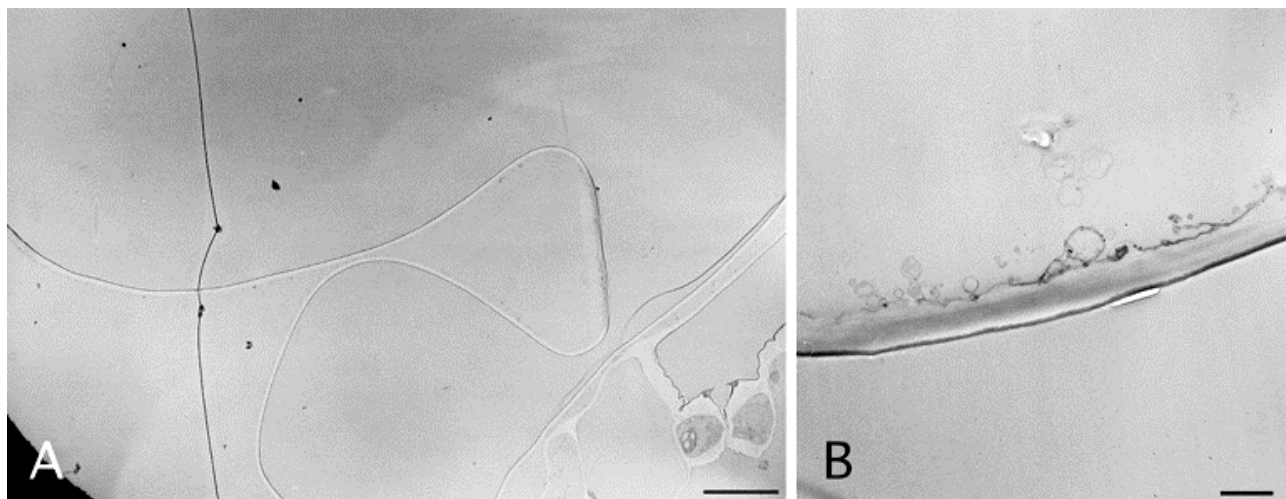


図3. 400 mM NaClを含むホーグランド液で7日間水耕栽培した実験群植物のブラッター細胞(A)と細胞壁(B)の超薄切片像. Scale: 10 μ m (A); 1 μ m (B).

られており、液胞内は均質で、顕著な沈殿物は見られなかった。

討論

アイスプラントは乾燥などの環境ストレスで光合成経路が C_3 型から CAM型へと変換することが知られ

ている⁶⁾が、本研究では、アイスプラントに 400 mM NaCl を含む高塩濃度培養液で水耕栽培し、水ストレスを7日間与えることで C_3 型から CAM型光合成への変換誘導を試みた。ストレスを与えていない植物では明所および暗所で葉に含まれるリンゴ酸濃度が殆ど違いがないのに対し、ストレスを与えた植物

では、明所に比し、暗所でおよそ3倍の高いリンゴ酸濃度を示した(表1)。このことは、水ストレスによりアイスプラントが光合成経路を変換し、暗所でCO₂を吸収してリンゴ酸内に固定し、V-ATPaseによるH⁺ pumpとmalate²⁻の電気勾配で液胞内に蓄積し、明所でデンプン合成に向いリンゴ酸を脱炭酸し、これを消費した^{4, 5)}結果を反映したものと思われる。

水ストレスを与えた実験群植物の葉や茎の表面には大きく膨潤したブラッター細胞が観察された。ブラッター細胞は、根から吸収した塩を溜め込んで丸く膨らむことが知られており⁹⁾、周りの細胞から塩を隔離する役割を果たしていると考えられている。これらの細胞の大部分を占める液胞の内部は均質で、顕著な沈殿物が観察されなかったことから、イオン化したNa⁺とCl⁻のみを特異的に高濃度で蓄積している可能性がある。超薄切片像でブラッター細胞の形が不定形に変形していたのは、高濃度の塩蓄積で他の細胞より異常に高くなった浸透圧が固定液の浸透圧と一致しなかったためと考えられる。

水ストレスを与えた実験群植物の葉肉細胞内の葉緑体は、対照群植物のそれらに比べ、デンプン粒の減少とチラコイド膜の膨潤を示した。前述したように、CAM植物は、リンゴ酸を液胞中に蓄えておくためにエネルギーを消費するので、デンプン合成の効率は低下していると考えられる。チラコイド膜の膨潤は、水ストレスから解放された植物では見られないことから、単なる化学固定によるアーティファクトではなく、CAM型光合成への変換に伴う構造変化である可能性が高い。しかし、ブラッター細胞のみならず、水ストレスにより、植物全体の細胞の浸透圧が高くなっている可能性もあることから、これを明確にするためには、固定液の浸透圧調節を考慮する必要のない急速凍結などによる物理固定により詳細に調べる必要があると考えられる。

水ストレスを与えたアイスプラントでは成長の遅れが見られた。これは環境ストレスでCAM型光合成が誘起されたアイスプラントは成長が遅くなるという報告¹⁰⁾や高濃度のNaCl存在下でアイスプラント培養細胞の成長速度が減少するという報告¹¹⁾と良く一致する。水ストレスを受け、CAM型光合成に変換された植物は、ブラッター細胞内へのNaClの蓄積や液胞内へのリンゴ酸の蓄積にエネルギーの多くを費やすため、成長が遅くなるものと思われる。

謝辞

本研究を行うにあたり、研究材料のアイスプラントの種子をご提供下さいました独立行政法人 農業生物資源研究所生理研究グループ物質代謝研究チーム 上野 修博士、高速液体クロマトグラフィーによるリンゴ酸の測定に御指導賜りました農業総合研究所経営情報部 吉田 誠博士に深く感謝致します。

文献

- 1) Kluge M and Ting IP (1978) Crassulacean acid metabolism: analysis of ecological adaptation. *Ecological Studies Series*. **30**:595-622.
- 2) Neales TF (1975) The gas exchange patterns of CAM plants. In: *Environmental and Biological Control of Photosynthesis*. Marcelle R ed., W Junk The Hague. pp. 299-310.
- 3) Osmond CB (1978) Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 379-414.
- 4) Luttge U, Smith JAC, Marigo G and Osmond CB (1981) Energetics of malate accumulation in the vacuoles of *Kalanchoe tubiflora* cells. *FEBS Lett.* **126**: 81-84.
- 5) Ting IP (1985) Crassulacean acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**:595-622.
- 6) Winter K and von Willert DJ (1972) NaCl-induzierter Crassulaceen-Saurestoffwechsel bei *Mesembryanthemum crystallinum*. *Z. Pflanzenphysiol.* **67**: 166-170.
- 7) Winter K (1985) Crassulacean acid metabolism. In: *Photosynthetic Mechanisms and the Environment*. Barbar J and Baker NR. eds., Elsevier, Amsterdam. pp.329-387.
- 8) Bohnert HJ, Ostrem JA, Cushman JC, Michalowski CB, Rickers J, Weyer R, De Rocher EJ, Vernon DM, Krueger M, Vasquez-Moreno L, Velten J, Hofner R and Schmitt JM (1988) *Mesembryanthemum crystallinum*, a higher plant model for the study of environmental induced changes in gene expression. *Plant Mol. Biol. Rep.* **6**: 10-28.
- 9) Adams P, Nelson DE, Yamada S, Chmara W, Jenson RG, Bohnert HJ and Griffiths H (1998) Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *New Phytol.* **138**: 171-190.
- 10) Cushman JC, Michalowski CB and Bohnert HJ (1990) Developmental control of Crassulacean acid metabolism inducibility by salt stress in the common ice plant. *Plant Physiol.* **94**: 1137-1142.
- 11) Thomas JC, De Armond RL and Bohnert HJ (1992) Influence of NaCl on growth, proline and phosphoenolpyruvate carboxylase levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. *Plant Physiol.* **98**: 626-631.