

■原 著■

C₄植物アオビユ黄化子葉光照射に伴う葉緑体の形態形成

柏木美由紀¹ 吉田顕二¹ 酒井美和子¹ 濱元千絵子^{2,3} 鈴木季直^{1,2,4}

Morphogenesis of Chloroplasts during the Illumination in Etiolated Cotyledons of a C₄ Plant *Amaranthus*

Miyuki Kashiwagi¹, Kenji Yoshida¹, Miwako Sakai¹, Chieko Hamamoto^{2,3}
and Suechika Suzuki^{1,2,4}

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

² Research Institute for Integral Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Application and Research Group, Electron Optics Division, JEOL Ltd., Akishima-City, Tokyo 196-8558, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: To investigate the development of plastids in various leaf tissues of a NAD-ME type C₄ plant, *Amaranthus patulus* Bertoloni, structural changes of etioplasts under continuous illumination were observed by means of an electron microscope. Before the illumination, all etioplasts in epidermal cells including guard cells, mesophyll cells, bundle sheath cells, and vascular parenchymatous cells were small and spherical in shape, and contained prolamellar bodies with extending single-thylakoids. After the illumination, the plastids elongated, and the disorganization of prolamellar bodies and the formation of primary grana occurred at first in epidermal plastids, secondary in mesophyll plastids, then in bundle sheath plastids, and finally in vascular parenchymatous plastids. This difference of start for plastid morphogenesis among leaf tissues may be reflected simply by those anatomical arrangement for light exposure. The function of peripheral reticulum found in mesophyll and bundle sheath chloroplasts and the crystalline inclusion in epidermal plastids was also discussed.

Keywords: *Amaranthus* cotyledon, chloroplast morphogenesis, etioplast metamorphosis, prolamellar body, crystalline inclusion

序論

サトウキビの光合成初期産物が C₄ ジカルボン酸であることが 1965 年に Kortschak ら¹⁾により発見され、新たな光合成系として C₄ ジカルボン酸経路が Hatch and Slack²⁾によって明らかにされて以来、多くの植物の光合成が研究され、現在では 8000 種以上の C₄ ジカルボン酸経路により光合成を行なう C₄ 植物が知られている³⁾。

光合成初期産物が 3 炭素化合物である C₃ 植物では、光合成は主に葉肉細胞で行なわれる。これに対して、C₄ 植物の光合成は、葉肉細胞と維管束鞘細胞の分業で行なわれており、二酸化炭素は葉肉細胞の C₄ 経路で同化され、C₄ 化合物として維管束鞘細胞に

輸送され、脱炭酸を経て、カルビン-ベンソン回路(C₃ 回路)に取込まれて再同化される。良く発達した維管束鞘細胞の存在は、C₄ 植物に特有な形態学的特徴であり、この二酸化炭素固定の分業は必然的に葉の細胞分化との相関を示し、機能と細胞分化との相関に関する多くの研究がなされている。最近では、それぞれの細胞に特異的な酵素の遺伝的発現が光と温度に影響を受けることや葉の組織の加齢に依存することが示唆されている⁴⁾が、その詳細は必ずしもまだ明確ではない。

C₄ 植物は、C₄ 経路の脱炭酸酵素が NADP-リンゴ酸酵素 (nicotinamide adenine dinucleotide

phosphate-malic enzyme)である NADP-ME 型、NAD-リンゴ酸酵素 (nicotinamide adenine dinucleotide-malic enzyme)である NAD-ME 型、PEP カルボキシキナーゼ phosphoenolpyruvate carboxykinase)である PCK 型の 3 つのサブタイプに分類されており、オキサロ酢酸から還元されるそれぞれの C₄化合物は NADP-ME 型ではリンゴ酸、NADP-ME 型と PCK 型ではアスパラギン酸であることが知られている⁵⁾。また、この分類は、維管束鞘細胞に含まれる葉緑体(以下、維管束鞘葉緑体または色素体)の内膜系の違いとも対応し、NADP-ME 型 C₄植物では、維管束鞘葉緑体は発達したグラナを欠き、良く発達したグラナを持つ葉肉細胞の葉緑体(以下、葉肉葉緑体または色素体)と典型的な二型性を示すが、NAD-ME 型および PCK 型の C₄植物では、維管束鞘葉緑体も良く発達したグラナを持ち、葉肉葉緑体と内膜系における二型性を示さないことが知られている⁶⁾。NADP-ME 型 C₄植物における二型性葉緑体の形態形成も葉肉細胞と維管束鞘細胞の光合成回路特異的酵素の違いと相関しており、この型の典型的植物であるサトウキビとトウモロコシでは、維管束鞘葉緑体のグラナは、葉の細胞分化と関連した葉緑体の発達過程で一旦形成されるが成熟化に伴って消失することが報告されている^{7,8)}。一方、葉緑体の二型性が顕著でない NAD-ME 型や PCK 型の C₄植物では、細胞分化に伴う色素体の形態形成についてはあまり研究されていない。暗所に置かれた植物では、内膜系の発達は抑制されて色素体内にプロラメラボディが形成されるが、光照射により短時間で内膜系の発達が促進されることが知られている⁹⁾。今回、筆者らは、NAD-ME 型における色素体の形態形成、特に内膜系の発達過程を明らかにするために、黄化処理した C₄植物アオビユに光を照射した後の葉の各細胞内に含まれる色素体の微細構造変化を透過型電子顕微鏡で観察した。

材料と方法

野外で自生していたアオビユ(ホソアオゲイトウ) *Amaranthus patulus* Bertoloni (図 1 A)から前年度に採集しておいた種子を滅菌シャーレ内の脱脂綿上に播種し、水を適度に含ませた後、容器全体を完全に遮光し、温室(30°C)内に置いて発芽成長させた。一週間後に 25°C に保たれた培養装置に移し、遮光を解除して $\sim 20 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光を照射した。光照射開始から 0、2、6、12、48 時間後のアオビユ(図 1. B-D)のそれぞれの子葉を摘出して $0.5 \times 2 \text{ mm}^2$ の小片に細切し、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.2)で希釈した 6%グルタルアルデヒド液に浸漬し、室

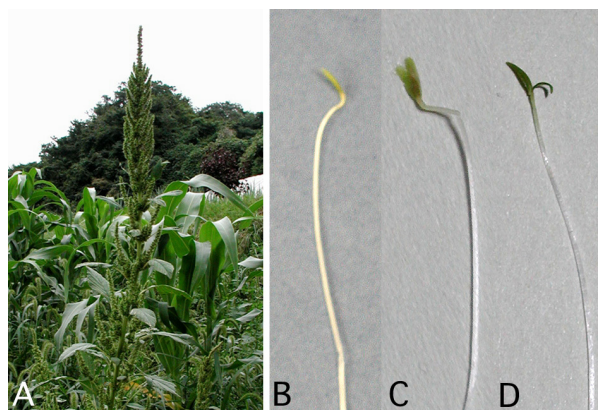


図 1. アオビユ(ホソアオゲイトウ). A. 野外自生の成長植物. B. 播種後暗所で1週間黄化処理された芽生え. C. 黄化処理に続く光照射 12 時間後の芽生え. D. 黄化処理に続く光照射 48 時間後の芽生え.

温下で 1 時間、更に 4°C 下で 23 時間前固定した。光照射 0 時間となる暗所対照試料の前固定は安全暗灯のみを点灯した暗室内で行なった。0.1 M リン酸緩衝液で洗浄した後、DW で希釈した 2%四酸化オスミウム液により室温下で 1 時間と 4°C 下で 23 時間後固定した。二重固定後に、試料をアセトン系列で脱水し、Epoxy 樹脂に包埋して熱重合させた。また、明所対照試料として、明所で発芽させたアオビユの一週間後の子葉と、鉢に移植してから約 2 ヶ月後の成長葉も同様に処理した。樹脂包埋試料からウルトラミクロトーム(Reichert Ultracut-N)で厚さ 70 nm の超薄切片をダイヤモンドナイフを用いて作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色して透過型電子顕微鏡(JEOL JEM2000EX)で観察した。

結果

成長植物緑葉組織細胞の観察

アオビユの緑葉は典型的なクランツ構造¹⁰⁾を示し、よく発達した維管束鞘細胞が維管束を取り囲んでいた(図 2)。維管束鞘細胞内では色素体も含めて殆どの細胞小器官は求心的に維管束側に向かって分布していたが、対照的に液胞は遠心的領域に分布していた(図 2、3B)。維管束鞘細胞を取り囲む細胞壁のうち、隣接する葉肉細胞との間の細胞壁は維管束鞘細胞間や維管束細胞との間の細胞壁より厚かった。葉肉細胞内では中心部に液胞が局在し、色素体は細胞膜に近接して分散分布していた(図 2、3A)。維管束鞘細胞は小さく、液胞も未発達であるため電子密度の高い細胞として観察された(図 2、3C)。一方、表皮系では、表皮細胞はかなり大きく、液胞も極度に発達して細胞中央部を占め、細胞質基質は細胞膜に沿って薄い層として観察された(図 2、3D)。孔辺細胞は表皮細胞より小さく、液胞も大きな領域を占めてい

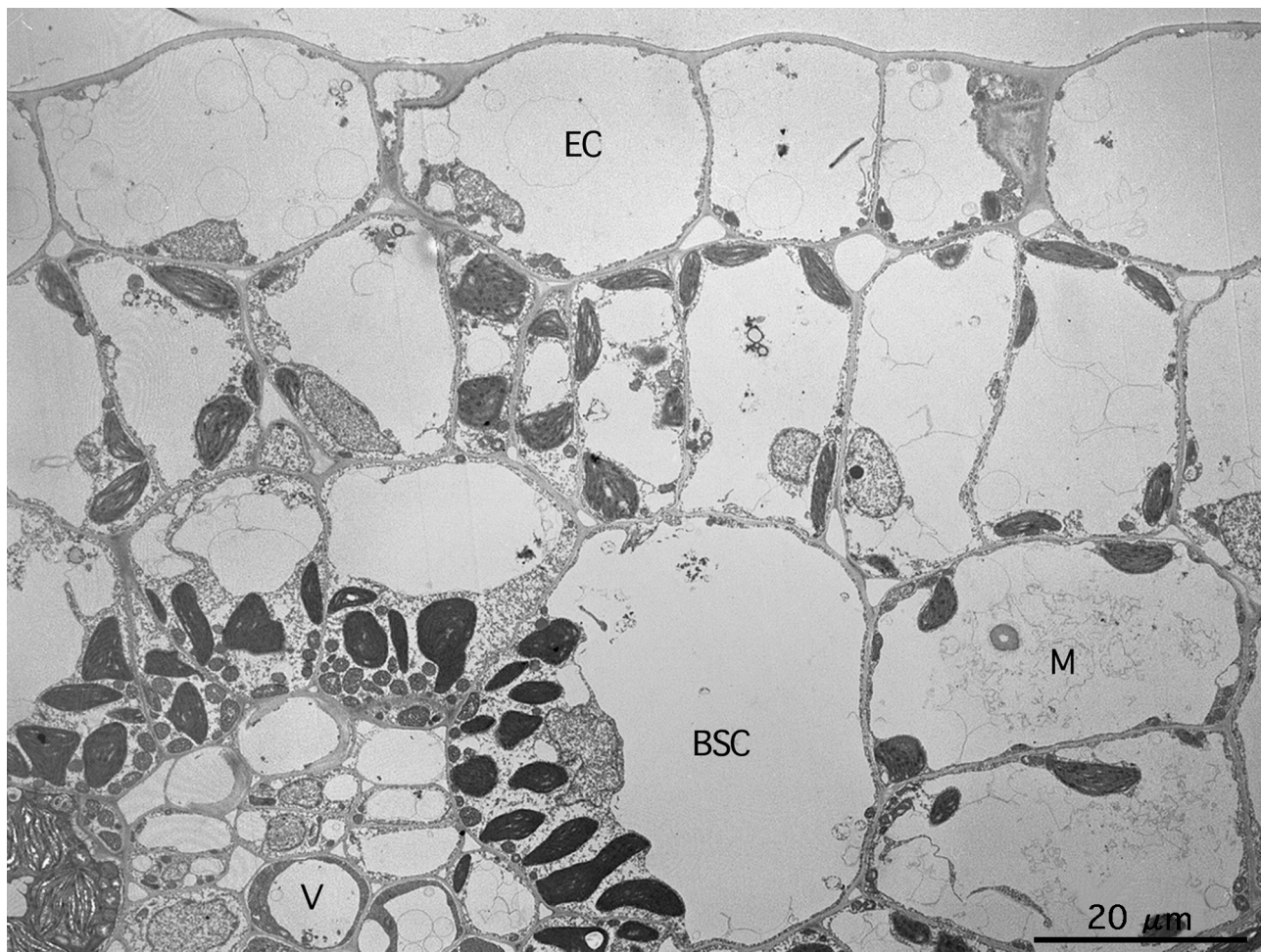


図 2. アオビユ緑葉の横断切片像. 維管束(V)を維管束鞘細胞(BSC)が取り囲み, それに隣接した葉肉細胞(MC)とその外側に表皮細胞(EC)層が見られる. 維管束鞘細胞内の色素体は求心的に配列.

なかったが、細胞壁は他の細胞と比べて明確に肥厚していた(図 2、3E)。

葉肉細胞と維管束鞘細胞の色素体は良く発達した葉緑体で、10〜20 層にチラコイドが積み重なったグラナとグラナ間を連結するストロマチラコイドからなる内膜系を含んでおり、ストロマ内には多数の大きなデンプン粒とプラスト顆粒が観察された(図 4A、B)。色素体の内側包膜に沿って小管の連続からなる網状構造(peripheral reticulum; 周縁網状体)が葉肉葉緑体と維管束鞘葉緑体で共に観察されたが、その規模は葉肉葉緑体の方がより顕著であった。葉肉細胞と維管束鞘細胞の色素体が大きなものでは長径で 10 μm 以上に達するのに対して、維管束鞘細胞や表皮系の細胞に見られる色素体は長径でおよそ 3 μm であり、グラナとストロマチラコイドからなる内膜系も含まれるが、グラナの積み重なりは数層で少なく、貯蔵デンプンからなると思われるデンプン粒を含む未発達の色素体であった(図 4C-D)。これらの色素体のストロマ中にはしばしば高電子密度の結

晶様体が観察された(図 4E、F)。

黄化処理植物子葉組織細胞の観察

暗所で発芽成長させたアオビユの黄化子葉(図 1B)の各組織細胞の色素体を観察した。いずれの色素体も球状または楕円体状で、内部にプロラメラボディや貯蔵デンプン粒を含む典型的なエチオプラストの特徴を示していた(図 5)。葉肉細胞と維管束鞘細胞のエチオプラストはほぼ同じ大きさで、長径 3.5〜4.0 μm であり、プロラメラボディから多数の長い単一チラコイドが伸びていた(図 5A、B)。特に、葉肉細胞のエチオプラストでは、プロラメラボディから伸びた複数の単一チラコイドが包膜に沿って互いに平行に配列するパラレルチラコイドが観察された(図 5A)。一方、維管束鞘細胞と表皮系細胞内のエチオプラストは小さく、長径およそ 2.5 μm で、プロラメラボディから伸びる単一チラコイドの数や長さも、維管束鞘細胞ではかなり良く発達していたが、葉肉細胞や維管束鞘細胞のエチオプラストと比べる

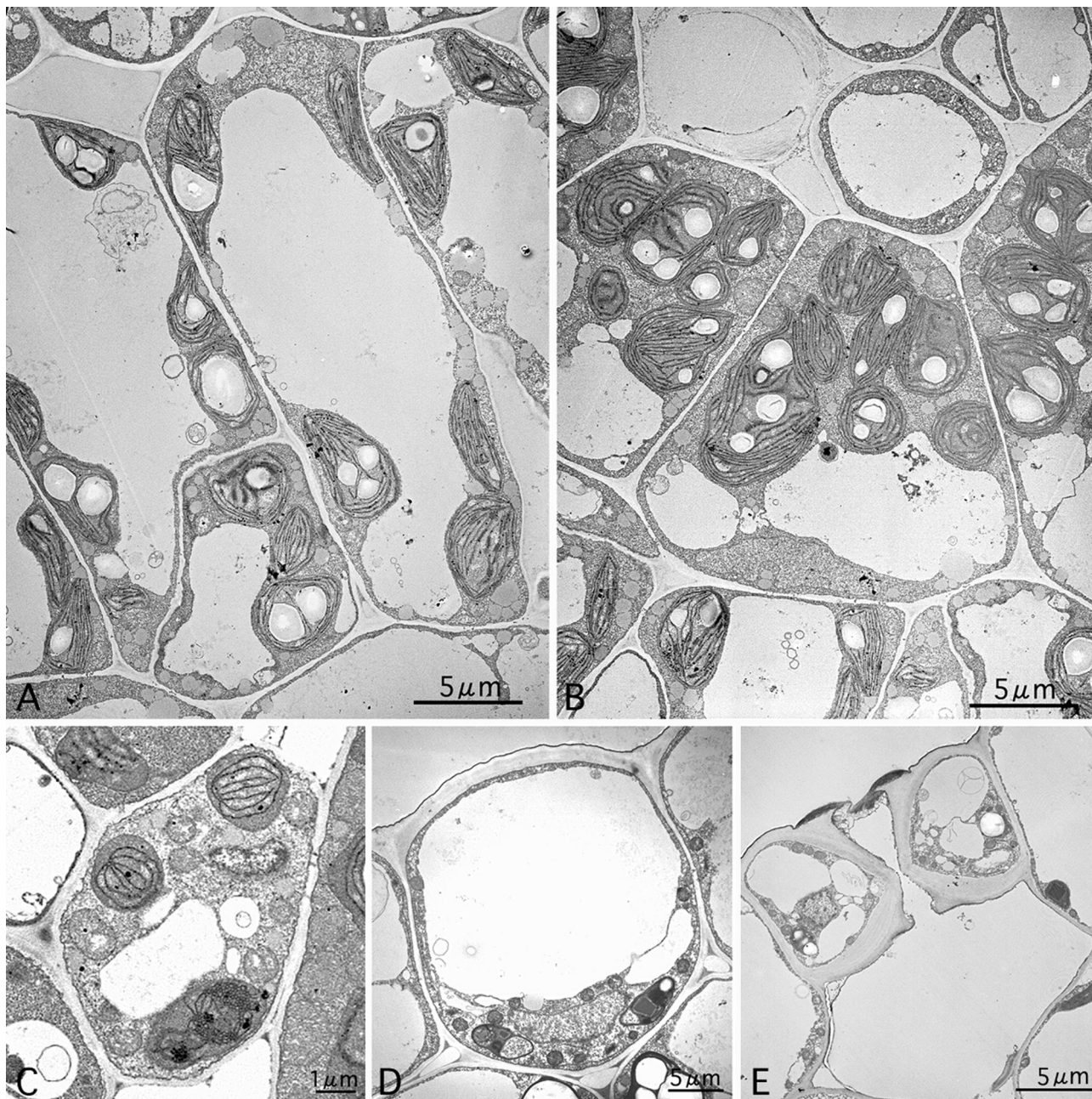


図3. 緑葉各組織の細胞. 葉肉細胞(A), 維管束鞘細胞(B), 維管束柔細胞(C), 表皮細胞(D), 孔辺細胞(D). 各細胞に含まれる色素体の大きさや内膜系発達の違いに注目. 葉肉細胞と維管束鞘細胞の色素体は良く発達した葉緑体で多数の澱粉粒が含まれている.

と小規模であった(図5C-E)。なお、表皮細胞内のエチオプラスト内には緑葉の表皮細胞色素体内で観察されたものと同様の結晶様体が含まれていた(図5D)。

光照射に伴う色素体内膜系変化の観察

暗所で発芽成長したアオビユを明所に移すと、黄化葉は徐々に緑化し、48時間後には明所で発芽成長させたものと殆ど同じ色あいの緑葉になった(図1D)。明所に移してから色素体で生ずる内膜系の変化には細胞間で経過の違いが認められたが、いずれの色素

体でもプロラメラボディの崩壊と消失に伴うグラナおよびストロマチラコイドの発達が見られた。

図6は、葉肉細胞における色素体内膜系の変化を示している。明所に移して2時間後には、プロラメラボディから伸びていたチラコイド間に局所的な接触が生じ、初期(一次)グラナが形成され始めていた。明所に移して6時間後にはプロラメラボディは完全に消失し、一方、最大で5層程度の重なりから成るグラナが多数形成されていた(図6B)。明所に移してから2時間後では色素体はまだ球状で、エチオプラストの特徴を維持していたが、6時間後には偏平化

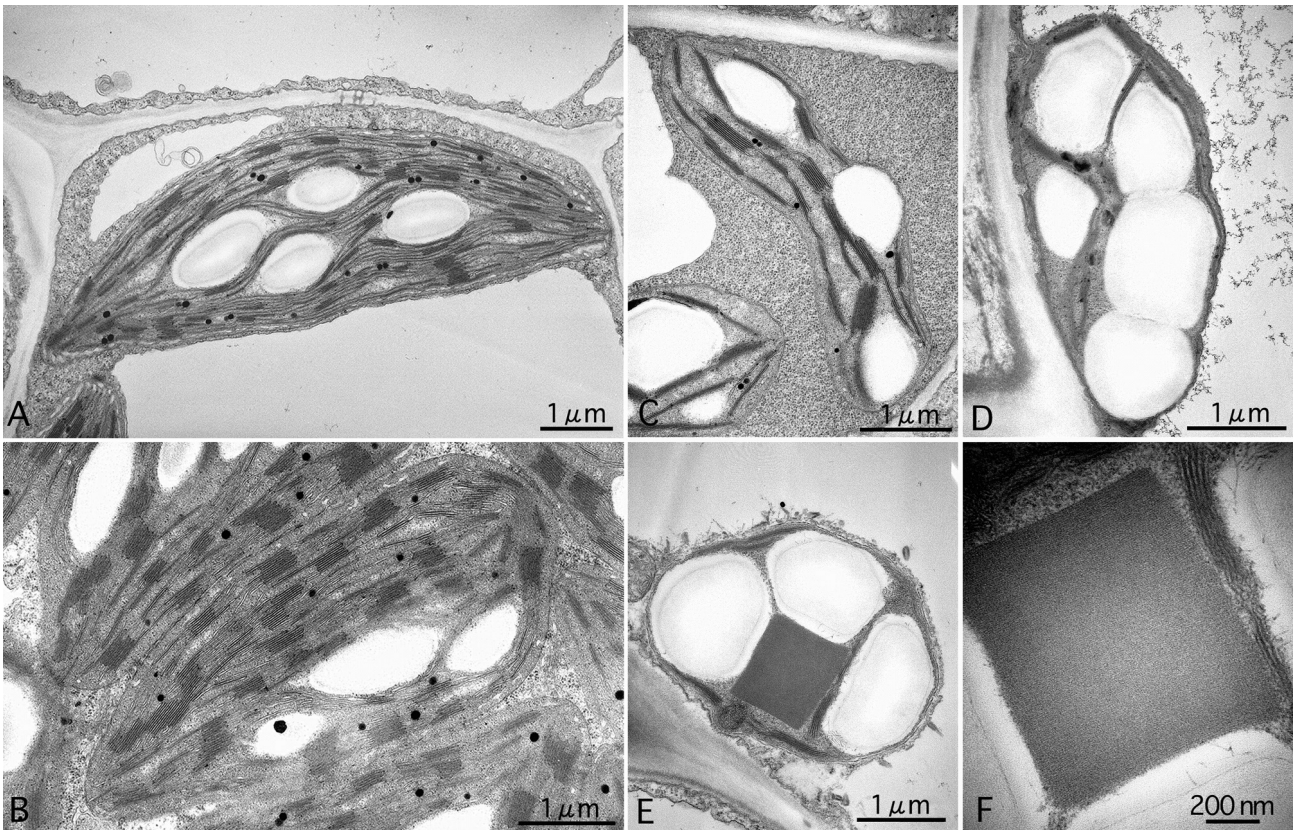


図 4. 緑葉各組織細胞の色素体. 葉肉細胞(A), 維管束鞘細胞(B), 維管束柔細胞(C), 孔辺細胞(D), 表皮細胞(E)の各色素体および表皮細胞色素体ストロマ中に見られる結晶様体(F).

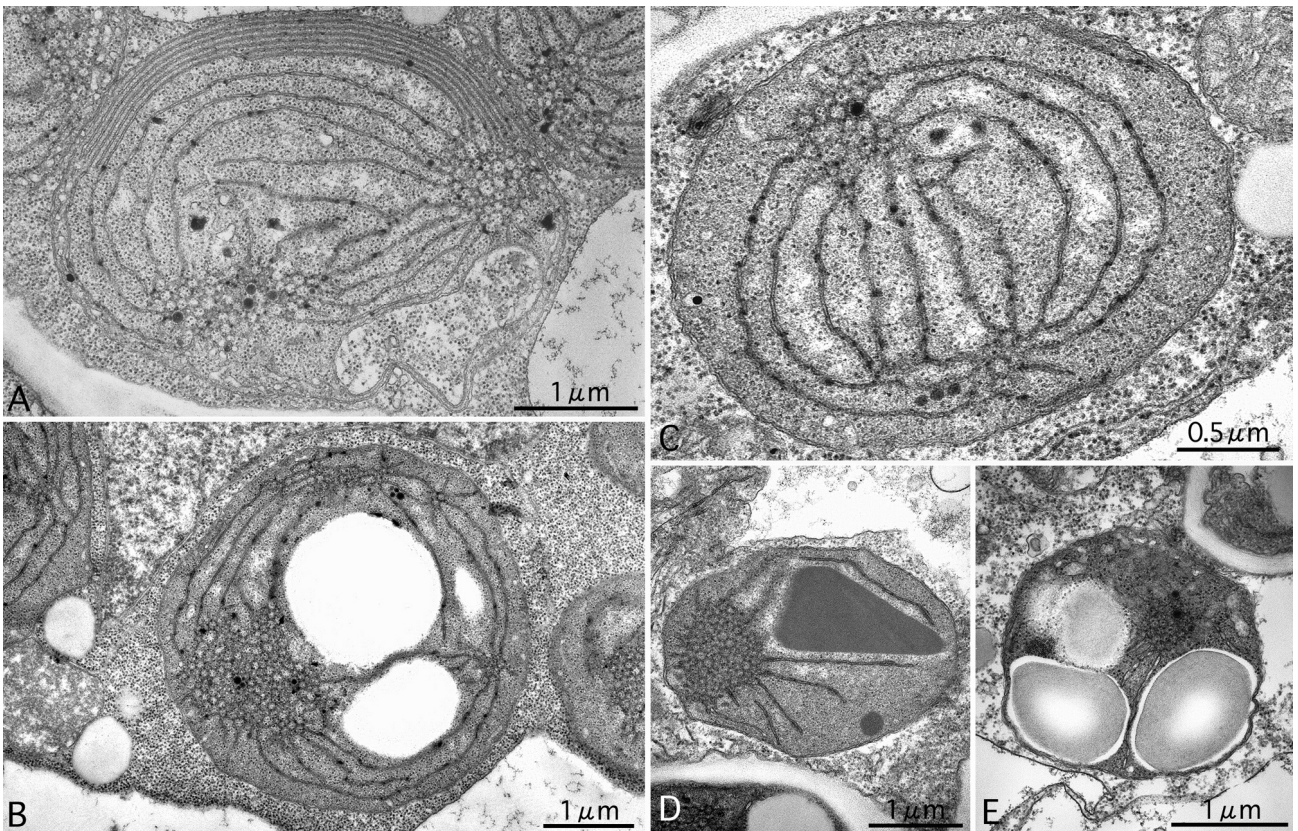


図 5. 黄化子葉各組織細胞の色素体. 葉肉細胞(A), 維管束鞘細胞(B), 維管束柔細胞(C), 表皮細胞(D), 孔辺細胞(E)の色素体. 各色素体はプロラメラボディを含み, 葉肉細胞の色素体ではパラレルチラコイドが顕著. 表皮細胞の色素体には結晶様体が見られる.

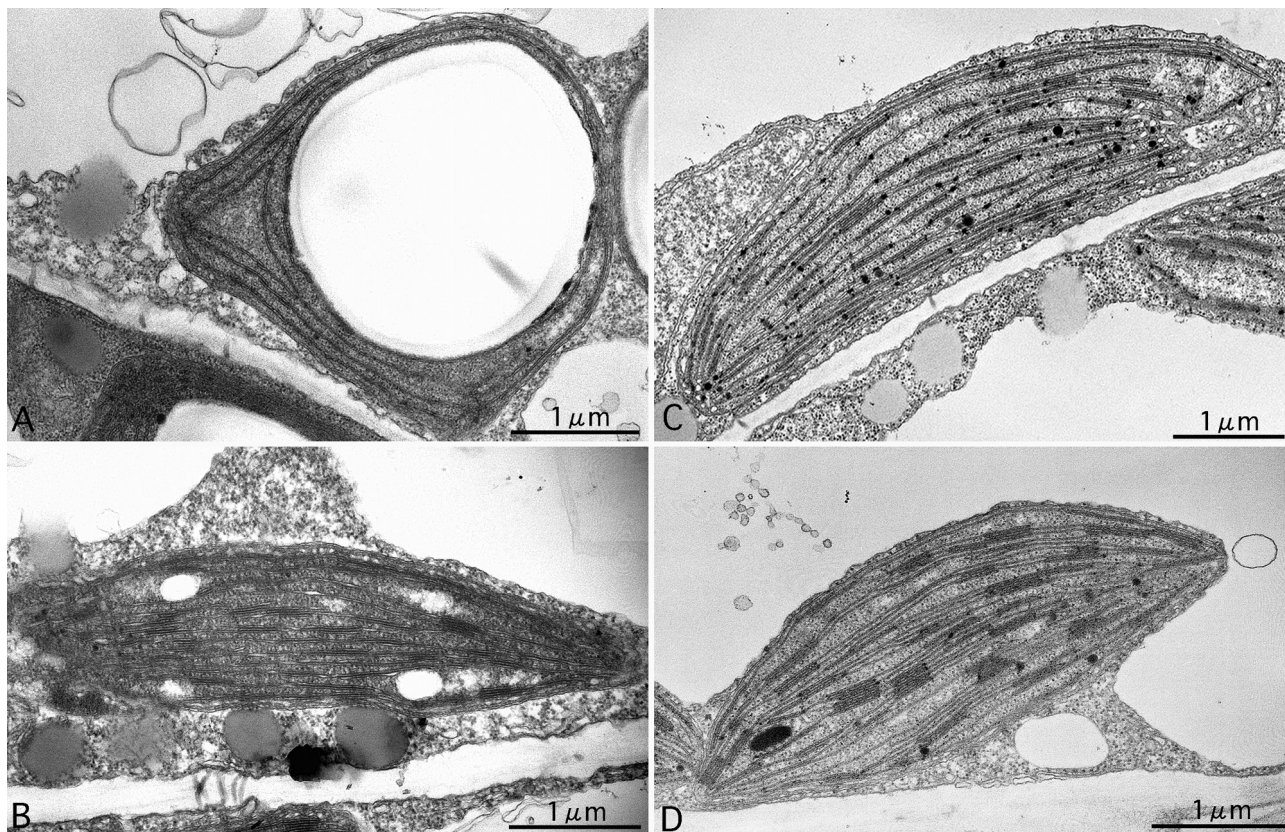


図 6. 黄化植物光照射後の葉肉細胞色素体の発達. 明所に移してから 2 時間後(A), 6 時間後(B), 12 時間後(C), 48 時間後(D)の色素体. 2 時間後にはプロラメラボディはほぼ消失し、痕跡構造が残されている. 光照射時間が長くなるにつれてグラナの積み重なりは増加し、形状も球状からレンズ状へと変化している.

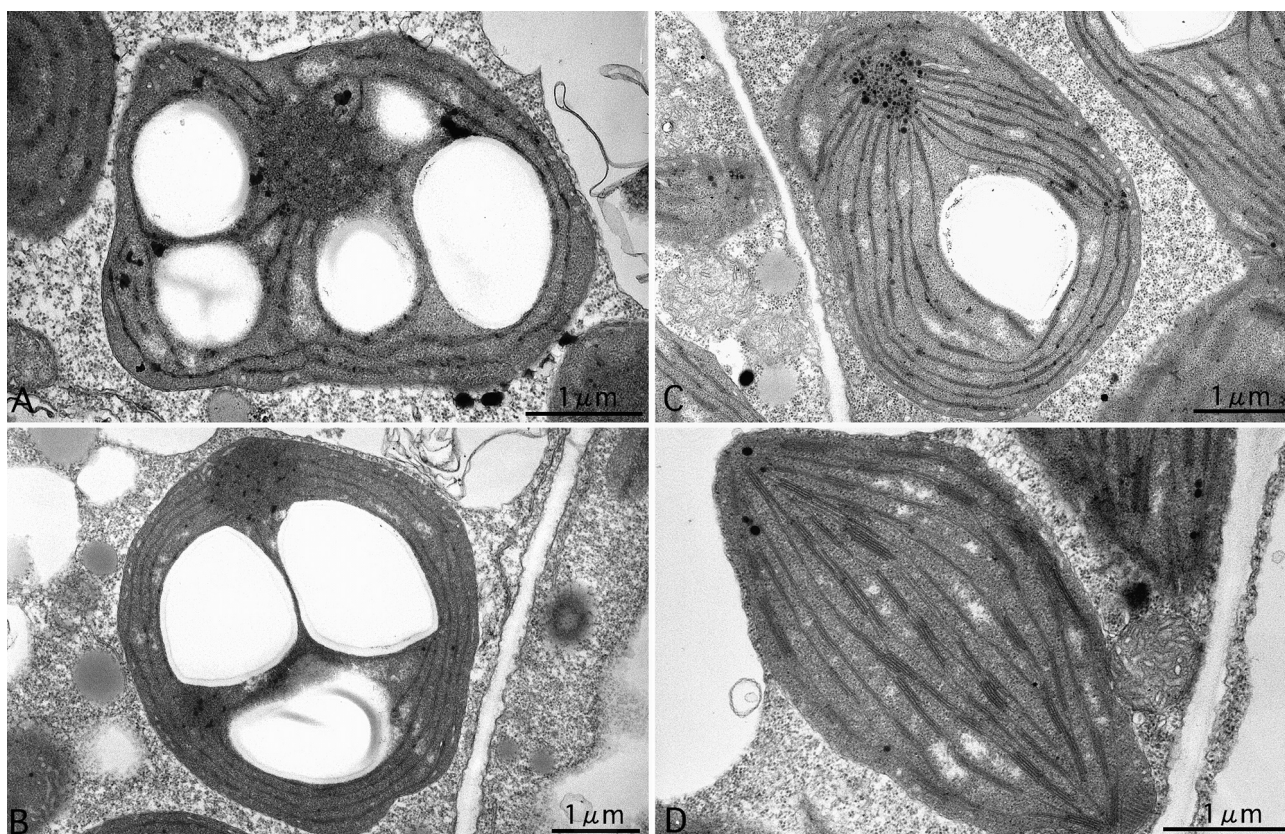


図 7. 黄化植物光照射後の維管束鞘細胞色素体の発達. 明所に移してから 2 時間後(A), 6 時間後(B), 12 時間後(C), 48 時間後(D)の色素体. 12 時間後にも痕跡的プロラメラボディが見られ、葉緑体の特徴が明確なものは 48 時間後の色素体である.

して細長い楕円体となり、ストロマチラコイドはその長軸に平行に配列されていた。明所に移して 12 時間後には、色素体の形状はレンズ状に変化し、グラナの積み重なりも 5 層以上のものが出現し、包膜直下には周縁網状体小胞も観察された(図 6C)。明所に移して 48 時間後には色素体内のグラナの積み重なりは更に増え、最大で 10 層のものも見られた。グラナの規模は成熟緑葉の葉肉細胞葉緑体で観察されたものにまで達していないが、十分に発達した葉緑体であった(図 6D)。

図 7 は、維管束鞘細胞における色素体内膜系の変化を示している。維管束鞘細胞の色素体では植物を明所に移してから 12 時間後でもなおストロマ内に痕跡的なプロラメラボディが観察された(図 7A-C)。色素体の形状も 12 時間後までほぼ球状で、エチオプラストの特徴を残しており、貯蔵デンプン由来のデンプン粒もかなり残されていて葉肉細胞の色素体より変化はかなり遅延されていた。色素体の内膜系では、明所に移してから 6 時間後に辛うじて初期グラナが見られたが(図 7B)、グラナとストロマチラコイドのみからなる内膜系を持つ葉緑体は 48 時間後に始めて観察された(図 7D)。

図 8 は、黄化植物を明所に移してから 12 時間および 48 時間後のアオビユ子葉の維管束鞘細胞に見られる色素体を示している。12 時間後でもなお痕跡的なプロラメラボディが残っており、48 時間後の内膜系もグラナの積み重なりは最大でも 7 層程であり、重なり範囲(グラナ円盤の直径)も小さかった。色素体は球状からやや楕円体に変形していたが、大きさは長径で 3 μm 程度で、色素体の発達は抑制されていた(図 8 B)。

図 9 は、黄化植物を明所に移してから 12 および 48 時間後のアオビユ子葉の表皮系細胞に見られる色素体を示している。表皮系では、明所に移してから 2 時間後に既にプロラメラボディは消失して初期グラナが形成されており、12 時間後には成熟緑葉で見られる色素体のそれにほぼ匹敵するグラナの積み重なりを示し、葉の組織の中では最も速やかに変化が進行した。しかし、顕著な形状変化は見られず、最終的なサイズも長径でおよそ 3 μm 程度であった。なお、表皮細胞の色素体は、明所に移した後のどの段階でも高頻度でストロマ中に結晶様体を含んでいた。

討論

NAD-ME 型 C₄ 植物アオビユにおける色素体内膜系の発達過程を明らかにするために、黄化植物に光を照射した後の子葉各組織細胞内に含まれる色素体の

微細構造変化を観察した。黄化植物子葉各組織細胞内の色素体はすべてストロマ中にプロラメラボディを含んでおり、植物を明所に移すと、これらのプロラメラボディは徐々に小さくなり、チラコイドが伸展し、随所でグラナが形成された。この内膜系の変化(発達)過程の概略は組織細胞間で差違はなかったが、時間経過において異なっていた。プロラメラボディが崩壊し始め、初期グラナが形成される段階は、表皮系色素体で最も早く生じ、葉肉色素体、維管束鞘色素体の順で起こり、維管束鞘細胞の色素体では最も遅く生じた。組織間で色素体の発達にずれが生じていることの最も単純な解釈は、入射する光の方向に沿った表面から深部への組織分布状態の反映とすることである。一方、典型的な NADP-ME 型 C₄ 植物のトウモロコシでは、色素体内膜系のこの変化は葉肉色素体より維管束鞘色素体の方が早く生ずることが報告されており¹¹⁾、今回の結果と一致しない。しかし、トウモロコシやサトウキビでは維管束鞘色素体は発達初期に一旦グラナを形成し、その後グラナを欠く成熟葉緑体へと変化することが知られている^{7, 8)}。これらの植物に見られる維管束鞘色素体の発達段階は他の色素体より多くの段階を経ることが必要であり、そのことが維管束鞘色素体の発達進行を加速しているものと思われる。NAD-ME 型のアオビユでは、維管束鞘葉緑体と葉肉葉緑体とで内膜系の違いはなく、光照射後に組織間で色素体の発達にずれが生ずることを組織分布に起因したものと解釈することは妥当と思われる。

NADP-ME 型 C₄ 植物では葉肉葉緑体と維管束鞘葉緑体とでグラナの有無による二型性が認められるが、NAD-ME 型 C₄ 植物ではグラナの有無において両者に違いはなく二型性は成立しない⁶⁾。しかし、今回の観察でも、例えば、緑葉では維管束鞘葉緑体の方が葉肉葉緑体より大きく、細胞内で求心的に配列するなど、葉のクランツ構造に由来すると思われる微細構造学的特徴の違いが認められた。色素体包膜内膜の陥入と分岐により形成されると思われる周縁網状体 *peripheral reticulum* も、例外はあるが^{12, 13)}、殆どが C₄ 植物の葉緑体で観察されている特徴的な構造である¹⁴⁾。アオビユではこの構造は葉肉葉緑体でより顕著であり、この結果はこれまでの報告^{8, 14)}と良く一致していた。

緑葉、黄化葉および黄化植物光照射後のどの段階でも表皮細胞の色素体内には、ストロマのかなりの領域を占める結晶様体が観察された。アオビユの成長した緑葉では、表皮細胞や維管束鞘細胞の色素体中に結晶様体が観察されることは既に報告されており、内膜系が未発達で、専ら光合成活性が低いと思

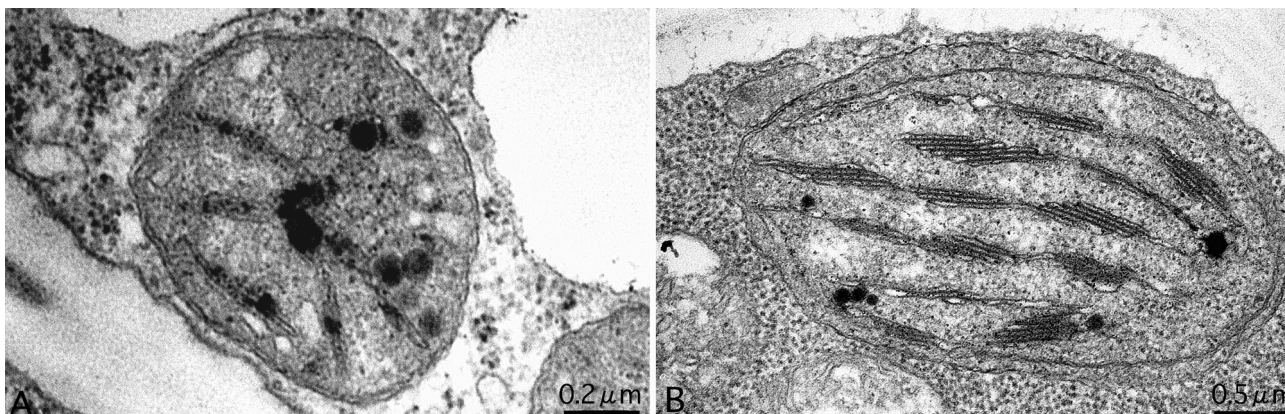


図 8. 黄化植物照射後の維管束柔細胞色素体の発達. 明所に移してから 12 時間後(A)および 48 時間後(B)の色素体. 48 時間後でも色素体は小さく、グラナの積み重なりも少ない.

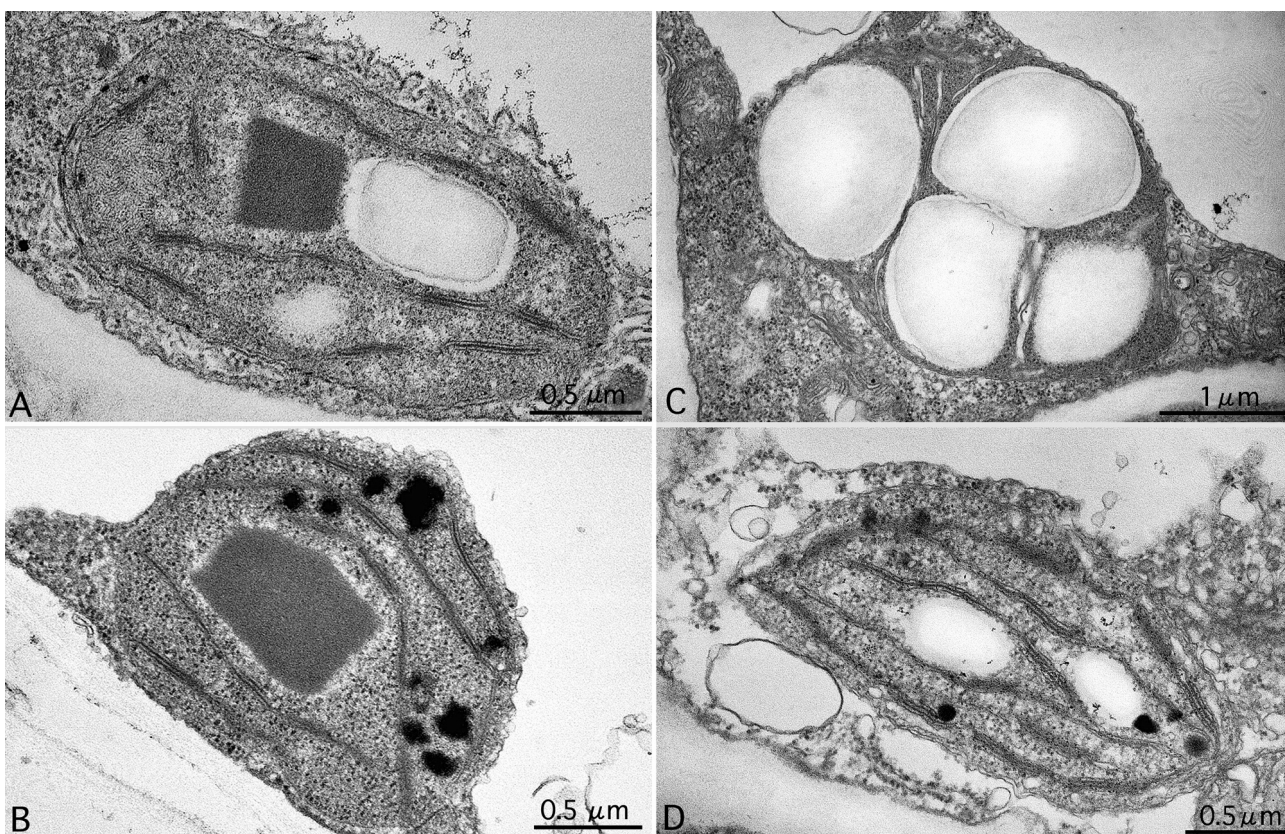


図 9. 黄化植物照射後の表皮系細胞色素体の発達. 明所に移してから 12 時間後(A)および 48 時間後(B)の表皮細胞色素体と 12 時間後(C)および 48 時間後(D)の孔辺細胞色素体. 48 時間後でも色素体は小さく、グラナの積み重なりも少ない.

われる色素体内に見られることから、過剰蓄積された Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) である可能性が指摘されていた¹⁵⁾。実際に、抗 Rubisco 抗体を用いた免疫電顕法による観察では抗体が表皮細胞の色素体内結晶様体に良く結合する結果が得られている(Suzuki 他、未発表)。今回、照射後の黄化色素体の発達過程を観察したが、表皮細胞色素体内の結晶様体がこの照射に伴って

量と質において変化している徴候は得られなかった。これらの色素体では早期にグラナ形成や色素体成長が抑制されると思われるので、継続的な光合成酵素群の合成は起こらず、結晶様体の成長増大や顕著な形状変化が見られないのかも知れない。

文献

- 1) Kortschak HP, Hartt CE and Burr GO (1965) Carbon dioxide fixation in sugar cane leaves. *Plant Physiol.*

- 40:209-213.
- 2) Hatch MD and Slack CR (1966) Photosynthesis by sugar cane leaves: A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochem. J.* 101:103-111.
 - 3) Sage RF and Monson RK (1999) Preface. In: *C₄ Plant Biology*. Sage RF and Monson RK, eds., Academic Press, San Diego. pp. xiii-xv.
 - 4) Dengler NG and Nelson T (1999) Leaf structure and development in C₄ plants. In: *C₄ Plant Biology*. Sage RF and Monson RK, eds., Academic Press, San Diego. pp. 133-172. pp. 116-137.
 - 5) Hatch MD, Kagawa T and Craig C (1975) Subdivision of C₄-pathway species base on differing C₄ dicarboxylating features. *Aust. J. Plant Physiol.* 2:111-128.
 - 6) Kanai R and Edwards GE. (1999) The biochemistry of C₄ photosynthesis. In: *C₄ Plant Biology*. Sage RF and Monson RK, eds., Academic Press, San Diego. pp. 49-87.
 - 7) Laetch WM and Price I (1969) Development of dimorphic chloroplast of sugar cane. *Amer. J. Bot.* 56: 77-87.
 - 8) Suzuki S and Ueda R (1974) Electron microscope studies on the morphogenesis of plastids in C₄-plants. I. The relationship between development of plastids and leaf cell differentiation during germination in *Zea mays* L.. *Sci Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku* 15:237-354.
 - 9) Kirk TO and Tilney-Basset RAE (1967) *The Plastids. Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*. WH Freeman and Co., London.
 - 10) Haberlandt G (1882) Vergleichende Anatomie des Assimilatorischen Gewebesystems der Pflanzen. *Jahrb. Wiss. Bot.* 13:74-188.
 - 11) Suzuki S (1974) Electron microscope studies on the morphogenesis of plastids in C₄-plants. II. Development of etioplasts under illumination in *Zea mays* L.. *Sci Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku* 15 : 255-263.
 - 12) Pallas JE and Mollenhauer HH (1972) Physiological implication of *Vicia faba* and *Nicotiana tabacum* guard cell ultrastructure. *Amer. J. Bot.* 59:504-514.
 - 13) Taylor AO and Craig AS (1971) Plant under climatic stress. II. Low temperature high light on chloroplast ultrastructure. *Plant Physiol.* 47:719-725.
 - 14) Laetsch WM (1971) Chloroplast structural relationships in leaves of C₄ plants. In: *Photosynthesis and Photorespiration*. Hatch MD, Osmond CB and Slatyer RO, eds., Wiley-Interscience, New York. Pp323-349.
 - 15) Suzuki S (1978) Crystalline inclusion in epidermal and vascular plastids of the mature *Amaranthus* leaf. *J. Electron Microsc.* 27:141-143.