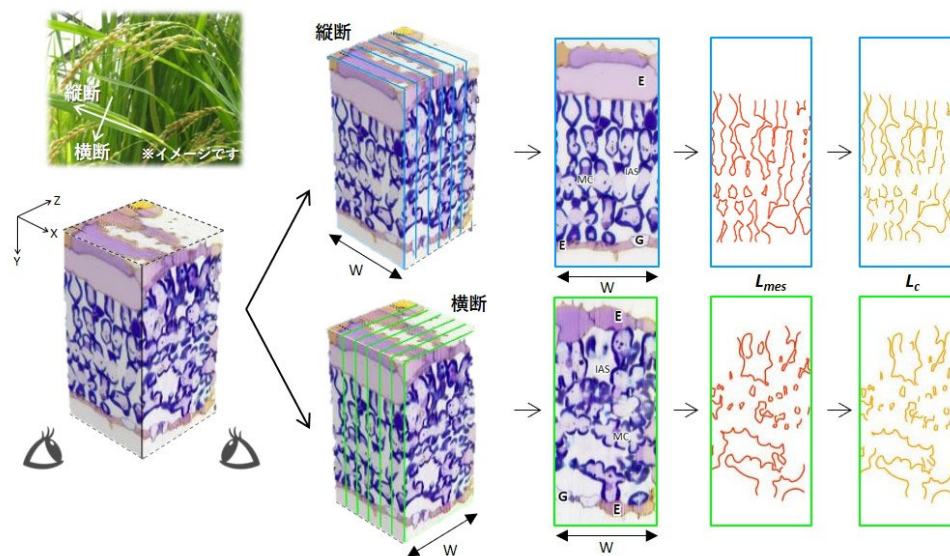




## 葉肉組織、横から見るか？ 縦から見るか？

～複雑な細胞形状をもつイネ葉構造の解析法を 3D 観察法で検証～

### 【本研究のポイント】

- ・主要作物であるイネの葉内組織構造を連続切片-光学顕微鏡法<sup>注1)</sup>で三次元再構築<sup>注2)</sup>することにより、葉緑体<sup>注3)</sup>が識別できる精度の 3D 観察を可能にした。
- ・取得した空間データを解析し、光合成のガス交換効率に関わる細胞間隙<sup>注4)</sup>に面する葉肉細胞<sup>注5)</sup>や葉緑体の表面積を実測することに成功した。
- ・空間データから横断・縦断の断面像を抽出し、二次元断面から各種表面積を算出する従来法の推定値と 3D 実測値を比較し、イネにおける適切な条件を提唱した。

### 【研究概要】

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院生命農学研究科のオウク・ラチャナ博士、大井 崇生 助教、杉浦 大輔 講師、谷口 光隆 教授による研究グループは、試料を一定間隔で切断して観察する連続切片法を用いて、イネの葉身の内部構造を三次元再構築して可視化し、3Dデータ解析を行うことで、光合成能力に深く関わる“細胞間隙に面する葉肉細胞や葉緑体の表面積”を精確に算出することに成功しました。

植物の光合成におけるガス交換能力を左右する一因に、葉組織内で空気の流れる細胞間隙に面した葉肉細胞や葉緑体の表面積の大きさが挙げられますが、その測定には、組織を薄く切断して撮影した二次元の平面像から推定する手法が用いられてきました。しかし、イネの葉組織は、維管束に対して横断方向では、海綿状に複雑にくびれた葉肉細胞の断面が見られ、縦断方向では、柵状に整列した葉肉細胞の断面が見られる特徴があり、どちらの断面を用いて、どのように表面積を推定すべきか、これまで明確な指標はありませんでした。

本研究では、イネの葉身の内部構造を連続切片-光学顕微鏡法で三次元再構築し、葉肉細胞や葉緑体の体積、細胞間隙に面する表面積を直接計測するとともに、得られた 3D データから葉組織の横断面や縦断面を作成し、従来法による推定値と比較して実測値との差が小さくなる条件を明らかにしました。これにより、迅速な推定方法の精度が向上し、作物の光合成能力を高める研究に役立つと期待されます。

本研究成果は、2022 年 12 月 22 日付国際学術雑誌「Annals of Botany」に掲載されました。

## 【研究背景と内容】

イネはコメとしてアジアを中心に主食とされる作物であり、人類の食糧供給に重要な植物です。その光合成能力は一般的な植物に比べて高いことが知られ、その一因として葉緑体を多く含む葉身の葉肉細胞が複雑にくびれた形をしていることが挙げられます。細胞壁が細胞内部に向けて陥入していると、細胞の比表面積（体積あたりの表面積）が大きくなり、二酸化炭素などのガスの交換効率が高まります。葉構造から光合成のガス交換能力を推定する際には、細胞間隙に接する葉肉細胞壁や、細胞間隙に面する葉緑体の表面積を単位葉面積当たりで表した「葉肉表面積（ $S_{mes}$ ）」や「葉緑体表面積（ $S_c$ ）」が重要なパラメータとなります。本来は三次元的な値である $S_{mes}$ や $S_c$ を二次元の断面から求める方法として断面における輪郭線から推定するための「曲率補正係数（ $F$ ）」を用いた理論が提唱され、双子葉植物の葉組織で実用化された手法が広く普及し、単子葉植物にも適用されてきました。しかし、複雑な凹凸を持つイネの葉肉細胞に用いるのが適切かどうかは、研究者の間で長年懸念が持たれていました。加えて、イネの葉肉細胞は、葉を維管束に対して垂直に切った横断切片では、複雑なくびれを多く示す一方で（図1下段）、維管束に対して平行に切った縦断切片では、長方形や楕円形のシンプルな形状を示すため（図1上段）、二次元の断面像から $S_{mes}$ や $S_c$ を推定する場合にはどちらの断面をどのように扱うべきか悩ましく、これまで明確な指標はありませんでした。

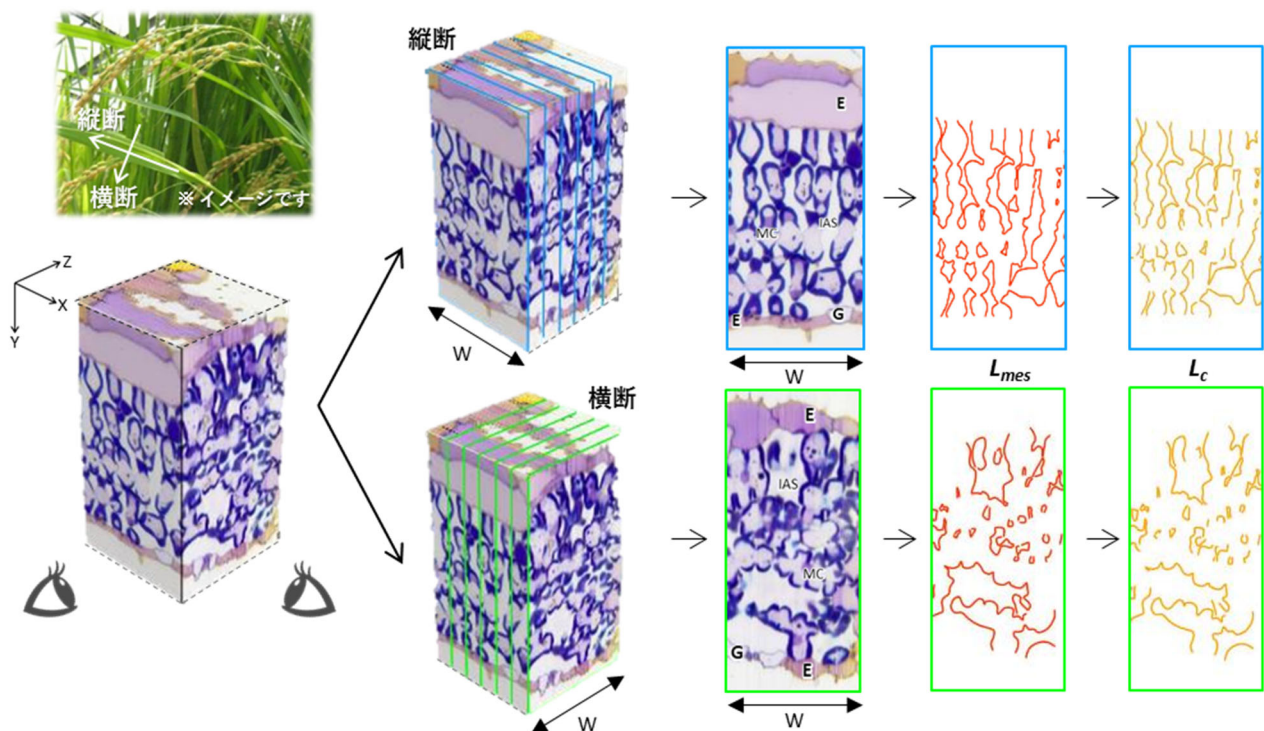


図1: イネ葉組織の連続切片-光学顕微鏡法による三次元再構築像と再抽出された二次元断面像。維管束に対して平行に切って見た縦断面と、垂直に切って見た横断面について横幅(W)を揃えて細胞間隙に面する葉肉細胞と葉緑体の輪郭線をそれぞれ例示した ( $L_{mes}$ ,  $L_c$ )。

そこで本研究では、イネの葉組織を0.5マイクロメートルの細かい間隔で100~200枚連続した切片にして、それぞれを光学顕微鏡で観察し、撮影した二次元の平面像を画像解析ソフトウェア上で積み上げて三次元の立体像を得る一連の手法を確立し、複雑にくびれた葉肉細胞や、その内部の葉緑体の実体像を解析しました。この連続切片-光学顕微鏡法による三次元再構築像に基づき、 $S_{mes}$ や $S_c$ を直接算出することが可能になりました( $S_{mes-3D}$ 、 $S_{c-3D}$ )。さらに、3D空間データを用いると、縦断面や横断面をソフトウェア上で再観察できるため(図1、図2A、B)、それぞれ数断面を抽出して、従来法による $S_{mes}$ と $S_c$ の推定値( $S_{mes-2D}$ 、 $S_{c-2D}$ )を算出して3D実測値と比較しました。2D断面から推定する際に、対象物を長球と扁球のどちらの立体像として仮定するかによって異なる曲率補正係数( $F_p$ 、 $F_o$ )の影響についても検証しました(図2C)。実測値である $S_{mes-3D}$ と $S_{c-3D}$ を推定値である $S_{mes-2D}$ と $S_{c-2D}$ と比較すると、推定値は切片方向と曲率補正係数に大きく影響され、3D実測値とは10-40%のずれが生じることが明らかとなりました(図2D、E)。これらの結果から、イネ葉組織において、2Dの切断面像から $S_{mes}$ と $S_c$ を推定する際に、平均値が最も3D実測値に近くなるのは、縦断切片を用いて葉肉細胞を扁球と仮定した場合であることが明らかとなりました。また、算出方法の違いに関わらず $S_c/S_{mes}$ は大きく変わらず、細胞間隙に接する葉肉細胞壁の表面積の約9割を葉緑体が占めていました(図2F)。イネの葉緑体は、複雑にくびれた細胞壁に沿って伸び広がるように配置し、細胞内で細胞間隙に面する大部分を覆うことで、ガス交換能力を高めていると考えられます。

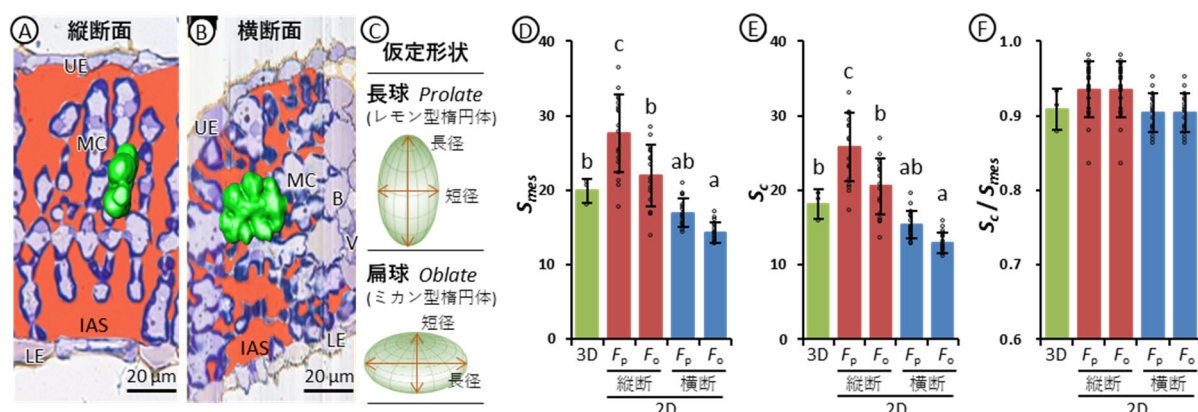


図2: イネ葉組織の縦断面 (A) と横断面 (B)。二次元断面像から曲率補正係数を用いて当てはめる際に仮定する形状 (C)。細胞間隙に面する葉肉細胞壁や葉緑体の表面積を、単位葉面積当たりで表した値である葉肉表面積 ( $S_{mes}$ ) (D) や葉緑体表面積 ( $S_c$ ) (E)、そして細胞間隙に面する葉肉細胞壁のうち葉緑体が覆う割合 ( $S_c/S_{mes}$ ) (F)。

### 【成果の意義】

イネのように葉肉細胞の形状が複雑であっても、適切な条件を用いれば従来から使用されてきた断面像からの推定法も実測値と比べて妥当であり、観察枚数(解析労力)に対して合理的な結果を得られることが確かめられました。このような数値を示すことで、解析手法の信頼性が高まり、迅速な推定方法の精度の向上など、作物の光合成能力を高める研究に役立つと期待されます。

なお、本研究はアジア先端農学・データサイエンス教育プログラム（AAAD program）および日本学術振興会（JSPS）科学研究費補助金の支援のもとで行われたものです。

### 【用語説明】

注1) 連続切片-光学顕微鏡法：

試料を一定間隔で薄く切り、スライドガラス上に連続して並べた切片を順々に光学顕微鏡で撮影する手法。連続画像を切削した厚さで積み上げて三次元再構築できる。

注2) 三次元再構築：

連続した断面像として撮影された二次元の平面像から三次元の立体像を得る手法。

注3) 葉緑体：

植物細胞にある細胞内小器官（オルガネラ）の1つで、光エネルギーを吸収する色素を蓄えた層状の膜構造を含み、二酸化炭素と水から糖と酸素を合成する光合成を行う。

注4) 細胞間隙：

細胞と細胞の間に生じた空隙。陸上植物の葉内では、気孔を介して外気と繋がっており、光合成で消費される二酸化炭素や排出される酸素などの通り道となっている。

注5) 葉肉細胞：

葉における柔組織を構成する細胞で、葉緑体を多く含み光合成の主要な場となる。

### 【論文情報】

雑誌名： Annals of Botany

論文題目：3-D reconstruction of rice leaf tissue for proper estimation of surface area of mesophyll cells and chloroplasts facing intercellular airspaces from 2-D section images

著者：Rachana Ouk, Takao Oi, Daisuke Sugiura, Mitsutaka Taniguchi (本学教員)

DOI：10.1093/aob/mcac133

URL：<https://doi.org/10.1093/aob/mcac133>