

# イネ種子の電子顕微鏡的解析

## Electron Microscopic Analysis of Rice Seed

増村 威宏<sup>a, b</sup>, 佐生 愛<sup>a</sup>, 齋藤 雄飛<sup>a, c</sup>  
Takehiro Masumura, Ai Sasou and Yuhi Saito

<sup>a</sup>京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻

<sup>b</sup>京都府農林水産技術センター生物資源研究センター

<sup>c</sup>現：亀田製菓株式会社

**要旨** イネ完熟種子のオルガネラの観察は、これまで十分行われていなかった。それは、イネ完熟種子の電子顕微鏡観察が技術的に困難だったからである。著者らは、イネ種子の樹脂包埋方法の改良を試みた。改良した方法は、乾燥したイネ種子中において成熟した細胞内顆粒の TEM 観察を可能にした。イネ種子中のデンプン性胚乳の細胞内部の観察は、今後、イネの栽培者、育種家、消費者、食品加工者などの役に立つであろう。また本方法は、イネ以外の穀類の観察や種子形成の理解にも役立つ技術になるであろう。

**キーワード**：イネ種子, TEM, 貯蔵タンパク質, プロテインボディ

### 1. はじめに

イネは、世界の主要穀物の一種であり、生産の安定化と増取のため、様々な研究がなされてきた。近年、ゲノム解析が著しく進展したことから、単子葉植物のモデルとして扱われるようになり、農学はもちろん、植物生理学、分子生物学、生物情報学などの分野で研究が進んでいる<sup>1)</sup>。

筆者らは、イネ種子形成機構の解明を目指して、分子生物学的手法と細胞生物学的手法を組み合わせた基盤的な研究を進めている。得られた研究成果については、イネの育成者や栽培者へ、品質の良い米の生産に役立つよう情報提供してきた。本稿では、これまでのイネ種子の電子顕微鏡観察において困難だった点を改良することにより、最近、新しい電子顕微鏡観察画像を得ることに成功したので、電子顕微鏡を使用する研究者や、植物種子を材料とする研究者に対し、その結果を紹介したい。

### 2. 米（イネ完熟種子）の顕微鏡観察における問題点とその解決

米とは、植物であるイネの完熟種子から籾を外したもの（玄米）を指しており、主に胚乳組織と胚芽から構成されている。ところが米（イネ完熟種子）は、登熟過程後期に脱水が進み、水分含量が低下することで硬くてもろい組織となり、顕微鏡用の薄切片の作製が著しく困難な組織であった。最近、著者

らは骨などの硬い組織の薄切片の作製に有効な凍結フィルム法<sup>2)</sup>を改良し、イネの完熟種子を材料に薄切片を作製し、蛍光抗体法を用いて米粒中のタンパク質分布を解析する手法<sup>3)</sup>を開発した。イネ完熟種子より、凍結フィルム法を用いて米の縦断面の薄切片を調製し光学顕微鏡で観察したところ、完熟種子試料は、中心部から外周部まで組織の脱離がほとんど見られず、デンプン性胚乳組織（白米に相当する部分）が大部分を占めるが、その外周部にアリューロン層、種皮、果皮が取り巻く構造をしていた。また、胚乳組織の端には、次世代幼植物となる胚芽が観察された（図1）。

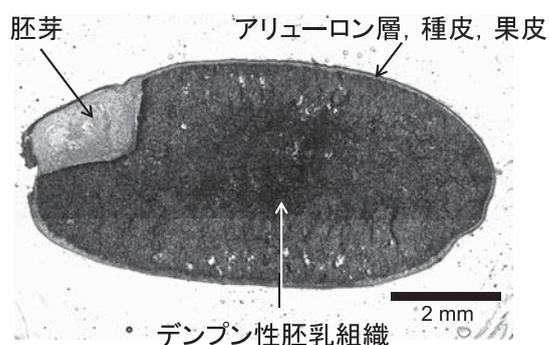


図1 完熟種子縦断面（凍結フィルム切片）

イネ（日本晴）種子の籾を除去した玄米部分を凍結フィルム法で縦断面の切片を作製し、組織染色せずに明視野像として光学顕微鏡（BX51；オリンパス）で観察した。デンプン性胚乳組織は、黒く観察され、その周囲を薄く外皮（アリューロン層、種皮、果皮など）が覆っている。また、左端上方には、胚芽が観察される。

<sup>1</sup> 〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町1-5

FAX: 075-703-5675

E-mail: masumura@kpu.ac.jp

2014年9月1日受付

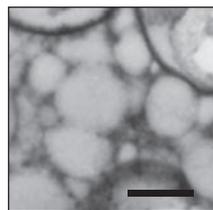
### 3. イネ完熟種子胚乳内の細胞内小器官の電子顕微鏡観察

上記で記載した様に、これまでではイネ完熟種子を材料に用いて透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察用の超薄切片を調製することは極めて難しかった。そのため、通常イネ種子の TEM 観察を行う際は、水分を多く含む登熟過程前半 (開花後 1 日目 ~ 14 日目) の種子が用いられてきた。しかし、水田や空調設備の無いガラス温室による栽培では、登熟過程の種子サンプルを得るためには限定された期間しか採取出来ず、採取したサンプルは超低温庫で凍結保存するか、直ぐに樹脂包埋しておく必要があった。著者らは、多くの研究者から各地域で栽培している多様な品種のイネ種子について TEM 観察を依頼されることが多かったが、登熟過程前半の保存状態の良い種子を得にくいなどの問題があり、実施例は少なかった。そのため、完熟種子を材料にした TEM 用試料調製法の開発要求が高まっていた。また、炊飯米や加工食品

として利用されている米は全て完熟種子であることから、米品質や加工特性との関連性を調べる上で完熟種子の解析を行うことが求められていた。そこで、著者らは完熟種子の全体像を観察する際に確立した凍結フィルム法を改良し、TEM 観察に使える超薄切片の作製方法を検討した。完熟種子は脱水が進んでおり、樹脂の浸透性が悪かったことから、先に減圧状態でリン酸バッファーを完熟米に浸透させてから包埋剤処理することで、厚さ 500 nm 以下の樹脂切片の作製が可能になった<sup>4)</sup>。本方法を用いて、完熟種子中に含まれる細胞内小器官を組織別に TEM により観察を行った結果を示す。胚乳組織は、重複受精により生じた胚乳母細胞から分化したアリューロン層とデンプン性胚乳から構成され、それぞれ異なる貯蔵物質を蓄積する細胞内小器官を有している。

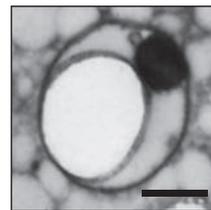
アリューロン層には、貯蔵脂質を蓄積するオイルボディ (図 2(a)) とアリューロン顆粒 (図 2(b)) が存在する。アリューロン顆粒は、フィチン酸 (ミネラルを吸着する機能が

#### アリューロン層



1 μm

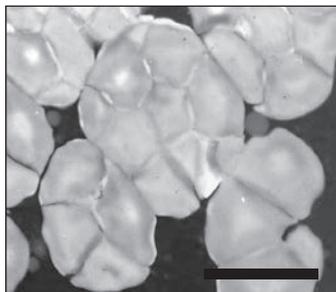
(a) オイルボディ



1 μm

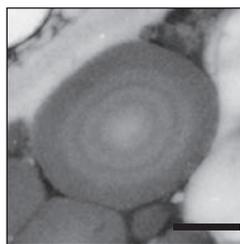
(b) アリューロン顆粒

#### デンプン性胚乳組織



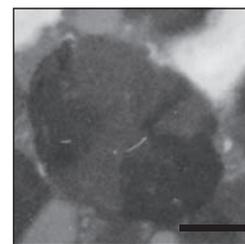
5 μm

(c) デンプン粒



1 μm

(d) I 型プロテインボディ (PB-I)



1 μm

(e) II 型プロテインボディ (PB-II)

図 2 完熟種子中の貯蔵オルガネラの形態

イネ (日本晴) 種子の籾を除去した玄米を用い、筆者らが改良した TEM 観察用の超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡 (JEM-1220, 日本電子) で観察した。完熟種子のアリューロン層中に存在するオイルボディ (a) とアリューロン顆粒 (b) を上のパネルに示した。オイルボディは小型の顆粒が多数存在し、アリューロン顆粒の内部には、フィチングロブド (白色)、マトリックス (黒色) が観察された。デンプン性胚乳組織中に存在するデンプン粒 (c) とプロラミンが蓄積する PB-I (d)、グルテリンや  $\alpha$  グロブリンが蓄積する PB-II (e) を下のパネルに示した。イネ種子のデンプン粒は、小型のデンプン粒が集合した複粒構造を取ることが特徴である。PB-I (d) には年輪状の模様が観察されるが、内部に蓄積するプロラミンの分子種が複数あることと関連性があると考えられる。PB-II (e) は、グルテリンと  $\alpha$  グロブリンがブロック状に異なって集合していることが明らかになっている。

あり、TEMの試料調製時に脱離する場合が多い)とグロブリン(デンプン性胚乳の $\alpha$ グロブリンとは種類が異なる)の貯蔵部位である<sup>5)</sup>。

一方、デンプン性胚乳には米の主要成分を蓄積する貯蔵オルガネラが存在する。我々のエネルギー源であるデンプンを蓄積するデンプン粒(図2(c))、貯蔵タンパク質を蓄積する2種類プロテインボディが存在する。2種類のプロテインボディが存在するのは、穀類中においてイネ種子の特徴となっている。難消化性であるプロラミンを蓄積するI型プロテインボディ(PB-I)(図2(d))と、栄養源となるグルテリンおよび $\alpha$ -グロブリンを蓄積するII型プロテインボディ(PB-II)(図2(e))が存在する<sup>6)</sup>。

#### 4. 登熟過程におけるイネ種子胚乳組織の発達

イネ種子は、籾や種皮、果皮などの親の組織と、重複受精によって発生・分化する胚芽、胚乳などの子の組織から構成されている。ここでは、米として利用する胚乳組織に焦点を絞り、その形成過程についてTEM観察像を通して紹介したい。

イネの受精と開花は、ほぼ同時に行われることから、受精後の日数を開花後日数(Days after flowering; DAF)で表す場合が多い。イネ種子の形成過程について、受粉後の子房の外観および胚乳組織を中心に経時的にTEMで観察した。子房は開花後7日目までは縦方向に伸長し、その後貯蔵物質の蓄積に伴い、横方向へ肥大する。開花後20日目以降は脱水が進み、開花後30日目には完熟種子となる。ここでは、開花後5日目~35日目(完熟種子)の子房の外観を実体顕微鏡像で示した(図3(a))。また、TEM観察により、同じ時期の胚乳組織についてアリューロン層(電顕写真の上方)および隣接するデンプン性胚乳組織(電顕写真の下方)について、経時的な細胞内部のオルガネラの形態を示した(図3(b)-(f))。

アリューロン層(TEM像の上方側の細胞層)については、開花後5日目において細胞質と巨大な液胞が観察されるが、貯蔵物質の明確な蓄積は認められない(図3(b))。開花後8日目になると巨大な液胞は消失し、脂質を蓄積するリピッドボディが細胞内を埋めつつあるのが観察される(図3(c))。さらに開花後11日目になると、リピッドボディの他に、フィチン酸やグロブリンが蓄積するアリューロン顆粒の形成が観察される(図3(d))。その後、アリューロン層は発達が停止し、細胞質の面積が減り、オルガネラの蓄積が目立つようになる(図3(e)-(f))。

一方、デンプン性胚乳は、デンプン粒とプロテインボディが発達する。開花後5日目においては、細胞の中心に巨大な核があり、その周囲に液胞が発達している(図3(b))。開花後8日目になると巨大な核や液胞は縮小し始め、細胞質にはデンプン粒が複粒構造を作りながら発達しているのが観察される(図3(c))。さらに開花後11日目になると、核は更に縮小し、大きく発達したデンプン粒の間に、グルテリン、 $\alpha$ グロブリンを蓄積するPB-IIが発達する。この時期には、プロラミンを蓄積するPB-Iはまだ小型である。開花後14日目

には、核は見つからなくなり、大型に発達したデンプン粒の隙間をPB-I、PB-IIが埋め尽くすようになる(図3(d))。完熟種子では、更に大型化したデンプン粒とPB-I、PB-IIが観察され、貯蔵物質の蓄積は開花後14日目以降も継続していることが明らかになった(図3(f))。

イネ種子では、貯蔵物質が合成・蓄積された後、開花後20日目以降に胚乳組織では中心部から外周部へ脱水が進むことが明らかになっている。その際、デンプン性胚乳組織に存在していたミネラル成分がアリューロン層に含まれるフィチン酸(アリューロン顆粒)に取り込まれる。この過程でデンプン性胚乳は細胞死を起し死滅するが、アリューロン層は発芽まで休眠状態に入る。デンプン性胚乳では、脱水に伴う水分含量が低下することと、デンプン粒とプロテインボディが細胞質から隔離されることで、貯蔵中の分解を防いでいると考えられる。

#### 5. 登熟過程におけるイネ種子胚芽の発達

イネ種子形成期には、次世代のイネとなる幼植物体として胚芽が形成される(図4(a))。これまで、登熟過程の胚芽のTEM観察像が掲載された例は少なかった。そこで、本稿に開花後14日目の胚芽の観察像を示した。胚芽には、胚乳組織のアリューロン層と類似した機能を持つ胚盤が発達する。胚盤は、発芽時に貯蔵物質を分解・利用するための分解酵素(アミラーゼやプロテアーゼなど)を生成する組織であり、オイルボディとアリューロン顆粒を蓄積している(図4(b))。一方、胚芽の中心部分には、幼植物体となる子葉、幼根などが形成される(図4(c)-(d))。これらの組織は、胚乳組織と同様に脱水し、発芽の時期まで休眠状態になる。

イネに施肥されたリンのほとんどは種子へ蓄積され、その多くはリン酸化合物であるフィチン酸として存在する。フィチン酸は、アリューロン顆粒のフィチングロポイドに蓄積されることが知られている(図2(b)、図4(b))。フィチン酸は、ミオーイノシトール1リン酸を出発物質として、連続的にリン酸化を受けて合成され、最終的にはミオーイノシトール6リン酸エステルとして蓄積される<sup>5)</sup>。フィチン酸は、登熟過程の後期になると、ミネラル成分(カリウム、マグネシウム、など)を吸着する役割を担っている<sup>7)</sup>。アリューロン顆粒がアリューロン層と胚盤に多く存在するため、カリウム、マグネシウム、リンなどの成分が精白米よりも玄米に多く存在する理由となる。また、アリューロン顆粒には、デンプン性胚乳組織とは異なる貯蔵タンパク質として、アルブミンやグロブリンが蓄積する<sup>8)</sup>。アリューロン層内部で合成されたアルブミン、グロブリンは、アリューロン顆粒内のマトリックス部位に蓄積する。これらは、TEM観察により、電子密度の違いから区別される(図2(b))。しかしながら、アリューロン顆粒の形成機構の詳細は不明な点が多く、細胞生物学的アプローチと共に、分子生物学的アプローチによる解析が待たれる。

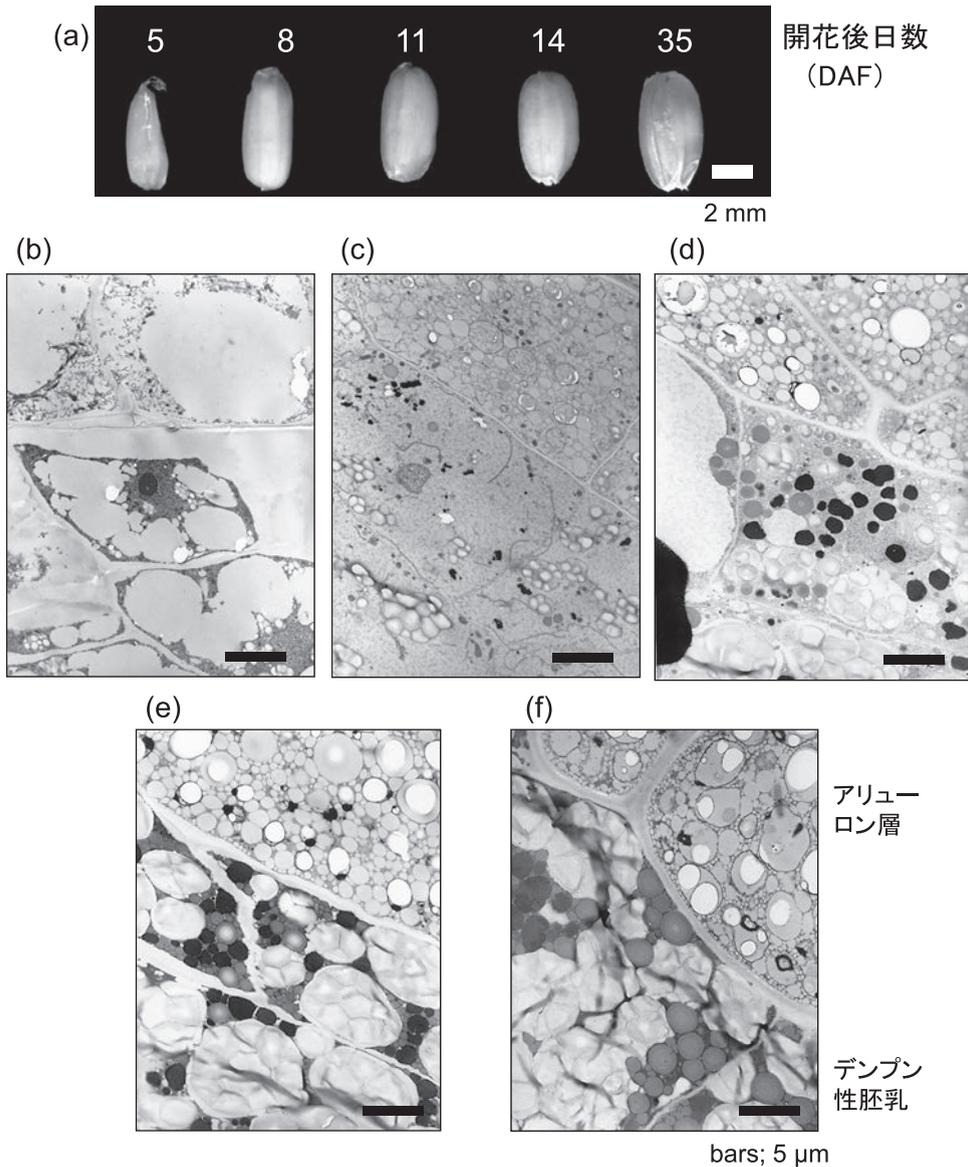


図3 イネ種子登熟過程における顕微鏡観察像

デンプン性胚乳組織の発達過程を透過型電子顕微鏡により観察を行った。種子の外観が判るように実体顕微鏡でそれぞれのステージの種子を示した (a)。登熟過程の経時変化は開花後日数 (Days after flowering; DAF) で示した。5 DAF (b), 8 DAF (b), 11 DAF (c), 14 DAF (d) と完熟種子に相当する 35 DAF (f) の観察結果を示した。それぞれの TEM 画像の上側はアリュエロン層を、下側はデンプン性胚乳を示している。ステージが進むにつれ、アリュエロン層では、オイルボディとアリュエロン顆粒が発達する状態が、デンプン性胚乳では、デンプン粒とタンパク質顆粒が発達する様子が観察された。

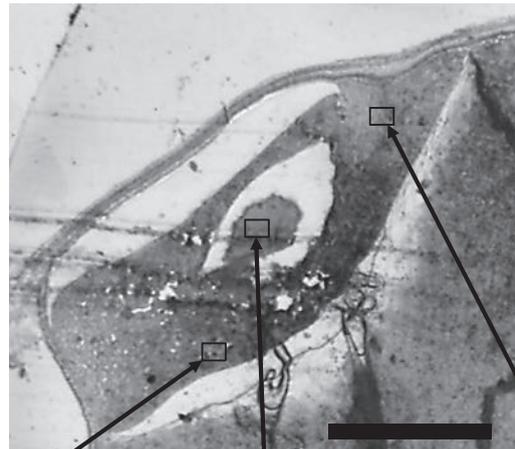
## 6. おわりに

本稿では、米 (イネ種子) の電子顕微鏡観察について、これまで困難だった完熟種子の TEM 用切片作製方法による細胞内貯蔵オルガネラの詳細な観察、開花後の経時的な胚乳組織の形成過程の観察、これまでに観察例が少ない胚芽における細胞内小器官 (顆粒) の観察などについて、最近の知見を交えながら紹介した。以前はサンプル調製が困難だからと敬遠されてきた米 (完熟種子) の TEM 観察が身近なものとなり、ようやく様々なイネ品種の細胞内構造の違いが明らかになりつつある。また、本方法は他の穀類種子 (コムギ、トウモロ

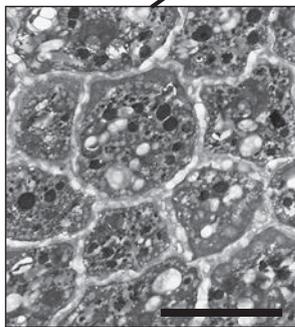
コシ、ソルガム、など) にも適用可能であることが判っている。今後、それらの観察結果から、品種による炊飯米の食味の違い、各種の穀類加工食品に対しても、その処理方法への波及効果などが出てくるものと予想される。

イネ種子においては、デンプン粒の複粒化、アリュエロン顆粒の形成機構などについて、未だに不明な点が多く、今後の課題として残されている。最近、米をエネルギー源とだけ見なすのではなく、デンプンやタンパク質の機能性、微量有用成分の活用などに着目した研究について、電子顕微鏡観察以外の様々なアプローチによる解析が行われている。近い将来、電子顕微鏡観察がそれら米成分の有効利用に関す

(a) 14DAF 胚(樹脂切片 ナイルブルー染色)

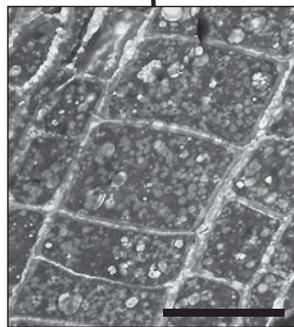


0.5 mm

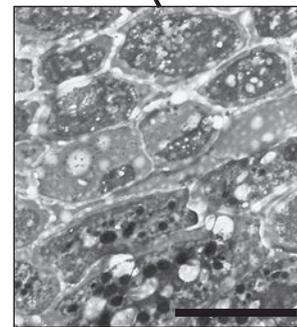


10 μm

(b) 胚盤



(c) 子葉



(d) 鞘葉と胚盤の境目

図4 登熟過程のイネ胚芽の観察像

開花後14日目の胚芽を透過型電子顕微鏡で観察した。各組織の位置が判るように、広い視野で観察した光学顕微鏡像を示した(a)。貯蔵組織の機能を持つ胚盤には、オイルボディとアリュuron顆粒が観察された(b)。次世代イネの子葉に相当する部分には、規則正しく並んだ細胞が観察された(c)。組織の境界部分では、形態が異なる細胞が観察された(d)。

る研究と結びつき、米の利用に関する開発が尚一層進むことを期待したい。

#### 文 献

- 1) Sasaki, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 2027–2028 (1998)
- 2) Kawamoto, T. and Shimizu, M.: *Histochem. Cell Biol.*, **113**, 331–339 (2000)
- 3) Saito, Y., Nakatsuka, N., Shigemitsu, T., Tanaka, K., Morita, S., Satoh, S. and Masumura, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2779–2781 (2008)
- 4) Saito, Y., Shigemitsu, T., Tanaka, K., Morita, S., Satoh, S. and Masumura, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1485–1487 (2010)
- 5) 田中 國介, 葛西善三郎, 小川雅広: 松尾考嶺(編), 稲学大成・第二巻(生理編), 農文協, 東京, 55–74 (1990)
- 6) 増村威宏: 原田久也(監修), 種子生理生化学研究会(編), 種子の科学とバイオテクノロジー, 学会出版センター, 東京, 56–62 (2009)
- 7) 田中 國介: *ぶんせき*, **10**, 729–733 (1981)
- 8) 田中 國介, 増村威宏: *化学と生物*, **26**, 543–550 (1988)