

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 OUK Rachana

論 文 題 目

Three-dimensional analysis on the internal structure of leaf tissue  
in rice

(イネ葉組織内部構造の三次元解析)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 谷口光隆

委 員 名古屋大学教授 近藤始彦

委 員 名古屋大学教授 江原 宏

委 員 名古屋大学教授 犬飼義明

委 員 名古屋大学准教授 三屋史朗

委 員 名古屋大学講師 杉浦大輔

委 員 名古屋大学助教 大井崇生

## 論文審査の結果の要旨

葉の葉肉組織の解剖学的特性の解析は、光合成能力や、潜在的な生産性、環境ストレスへの適応を理解する上で重要である。単子葉植物であるイネ (*Oryza sativa* L.) の葉肉には、他の作物種に比べてサイズが小さい葉肉細胞が含まれ、葉肉細胞の内周に沿って大型の葉緑体が配置されている。一般的に単子葉植物の葉肉には、双子葉植物で見られる柵状組織細胞や海綿状組織細胞のような形態の異なる 2 種の光合成細胞はなく、単一の葉肉細胞が含まれている。さらに、イネ葉組織の横断面と縦断面では葉肉細胞が異なる断面像として観察されるとともに、葉組織内の位置によっても葉肉細胞の形状は異なる。葉構造から光合成のガス交換能力を推定するにあたっては、*Smes* (葉肉表面積 : 細胞間隙に接する葉肉細胞壁の表面積を積算して単位葉面積あたりで表した値) や *Sc* (葉緑体表面積 : 葉緑体が細胞間隙に面する部分の面積を積算して単位葉面積あたりで表した値) が重要なパラメータとなる。葉切片画像から *Smes* と *Sc* を求める際には葉肉細胞の形状を単純化するための曲率補正係数が用いられるが、複雑な凹凸面を持つイネの葉肉細胞に適用する係数が適確かどうかについては疑問が残る。また、塩ストレス感受性植物であるイネでは、細胞や葉緑体の構造変化が塩ストレスによって引き起こされるが、葉組織全体に渡ってどのように変化が起こるかは明確になっていない。以上の点を踏まえて、イネの葉組織全体の構造を理解するためには、葉組織内の幅広い領域に渡って葉肉細胞構造を 3 次元 (3D) 的に把握することが必要であると考えられる。しかし、細胞内構造も含めた広範な領域の解析が可能な手法がないため、葉肉細胞構造の理解は未だ限定的なものに留まっている。そこで本博士論文では、イネの葉組織全体に渡る葉肉細胞構造を解明し、葉肉細胞の構造と機能の結び付きを明らかにすることを目的とした。そのため、光学顕微鏡観察による 3 次元再構築法を確立し、全葉組織内の葉肉細胞構造を可視化・定量比較した (第 1 章)。次に、この 3 次元再構築法を用いて、葉組織の異なる切断方向における葉肉細胞構造と解剖学的パラメータとの関連性を明らかにした (第 2 章)。最後に、3D 解析を利用して、葉組織内の異なる位置 (向軸側・中央部・背軸側) の葉肉細胞構造を明らかにし、塩ストレスによって各位置の葉肉細胞構造にどのような影響が及ぶかを調べた (第 3 章)。

第 1 章では、連続切片光学顕微鏡法 (ssLM) に続く 3D 画像再構築により、様々な角度での仮想断面像取得法を確立し、従来の光学顕微鏡観察の欠点を補うことが可能となった。イネ葉組織の厚さ 70~90  $\mu\text{m}$  に渡る広い領域を観察し、葉肉細胞構造や内部の葉緑体構造を解析できる 3D モデルの再構築を行った。また、細胞質周縁部における葉緑体の被覆率を定量的に評価できるようになり、塩ストレス下では葉緑体は体積を減らさずに形状を変化させることで被覆率を低下させており、葉肉細胞の形状や大きさは変化していないことが明らかとなった。光学顕微鏡の解像度は電子顕微鏡に劣るが、ssLM を用いた本手法は葉組織の広い範囲を細胞内構造と

## 論文審査の結果の要旨

ともに観察することができる点で優れていると考えられる。

第 2 章では、ssLM および 3D 再構築法をさらに発展させ、イネ葉組織内の細胞間隙、葉肉細胞、および葉肉細胞葉緑体を検出して各々の 3D 再構築を行った。得られた 3D モデルから、細胞間隙と葉肉細胞の体積は表皮を除くイネ葉組織の 30% と 70% を占め、葉緑体の体積は葉肉細胞の 44% を占めていることを示した。3D モデルから *Smes-3D* と *Sc-3D* を算出して 2 次元切片画像より得られる *Smes* と *Sc* と比較したところ、2 次元画像に基づく *Smes* と *Sc* の算出には切片方向と曲率補正係数が大きく影響し、3D モデルから得られる実際の *Smes*、*Sc* 値とは 10~38% のずれが生じることが明らかとなった。この結果から、イネ葉組織の 2 次元切片画像から *Smes* と *Sc* を推定する最も正確な方法は、縦断切片画像を使用し、葉肉細胞が扁平球体であると仮定して計算することであると結論づけた。

第 3 章では、イネ葉組織内の葉肉細胞および葉緑体を向軸側、中央部、背軸側に分割して 3D 再構築を行った。その結果、イネ葉組織内の葉肉細胞は多様な構造を示し、塩ストレスに対しても部位によって異なる構造変化を示すことを明らかにした。葉組織中央部の葉肉細胞は、細胞周辺に幾つかの突起をもつ楕円形の円盤のような形をとり、この形態は典型的なイネの葉肉細胞構造と一致するものであった。葉表面に近い向軸側および背軸側の葉肉細胞は、より多様な構造を有していた。また、向軸側の葉肉細胞は細胞周縁部に突起をもつ楕円形の台のような構造をなし、中央部や背軸側の葉肉細胞に比べて葉緑体の占める領域が大きかった。塩ストレスは、向軸側と背軸側に位置する葉肉細胞のサイズや細胞質周縁部における葉緑体の被覆率を減少させ。これらの結果から、表皮細胞に近い位置にある葉肉細胞の葉緑体は、塩ストレスによる障害を受けやすいことが示唆された。

以上のように本博士論文では、イネ葉肉細胞の複雑な形状を ssLM と 3D 再構築によって明らかにし、葉組織の 2 次元切片画像を元にした従来の構造特性解析に対する指針を提案している。また、イネ葉組織の葉肉組織全体の 3 次元再構築モデルにより、葉における位置による細胞形状の違いや塩ストレスに対する応答の違いを明らかにしており、光合成能力やストレス耐性を理解していく上で重要な知見を得ており、構造と機能の結び付きを解明するための優れた手法を開発した点が評価される。したがって、本委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。