

オオカナダモの葉における分裂葉緑体の観察 －高等学校生物基礎における活用にむけて－

谷 友和*・鳥羽 元**・小池 穰**・捨田利 謙**・小川 茂*

(平成29年8月31日受付；平成29年11月20日受理)

要 旨

「高等学校生物基礎」の授業で利用可能な細胞内共生説（共生説）に関する教材の開発に向け、教育現場に馴染みの深いオオカナダモを材料とし、シュート内の葉の細胞における分裂葉緑体の出現頻度と微細構造を調べた。分裂葉緑体は、シュートの上部の葉で頻度よく観察された。シュート上部の葉内においては、葉の基部で分裂葉緑体の出現頻度が最も高く、先端部に向かって低下する傾向がみられた。葉の基部では、葉緑体が小さく緑色も薄いため、分裂葉緑体の観察は難しかったが、葉の中央部では、分裂葉緑体の観察が比較的容易であった。また、シュート上部の葉では、高等学校の授業時間帯において、常に分裂葉緑体の出現頻度が高かった。括れが深く（括れの幅が250 nm以下）、亜鈴型となった分裂葉緑体では、括れ部に分裂装置と思われるリング状の構造が観察された。これらのことから、オオカナダモは「高等学校生物基礎」の共生説に関する授業の中で、教材として活用できることが示唆された。その活用例として、分裂葉緑体の観察実験を通じて、共生説と真核細胞の進化について理解を深めることをねらいとする授業を提案した。

KEY WORDS

Egeria densa オオカナダモ, endosymbiotic theory 細胞内共生説, dividing chloroplast 分裂葉緑体, high school basic biology 高等学校生物基礎, teaching material 教材

1 はじめに

光合成細胞小器官である葉緑体は、ミトコンドリアと共に、独自の遺伝情報とタンパク質合成系を持つ⁽¹⁾。Sagan⁽²⁾は、細胞内共生説（以下、共生説）を提唱し、これら細胞小器官は、外来の原核生物が細胞内で共生化したものであると考えた。この説は、その後の生化学的研究や系統学的研究により、学説としての妥当性が広く認められている。現在、葉緑体の起源に関しては、シアノバクテリアの細胞内共生によるものと考えられている⁽³⁾。

葉緑体が分裂で増え、細胞から細胞へと受け渡されることは、共生説が提唱されるより遙か以前の19世紀後半には知られていた^(1,4)。その後、葉緑体の分裂過程の詳細は、コケ植物や維管束植物などにおいて繰り返し報告されてきた。分裂を始めた葉緑体は、一般に、まずその中央部で括れて亜鈴形となり、やがて二つに分裂する⁽⁵⁻⁸⁾。電子顕微鏡を用いた観察により、亜鈴形になった分裂葉緑体の括れ部にリング状の分裂装置が出現することが、多くの植物で確認されている⁽⁷⁻¹²⁾。葉緑体分裂装置を構成するタンパク質に関する研究から、シアノバクテリア由来のタンパク質と宿主細胞由来のタンパク質が分裂装置を形成し、協働的に葉緑体の分裂に関与することが明らかにされている^(1,13)。

平成21年12月に作成された高等学校学習指導要領解説理科編理数編⁽¹⁴⁾では、「高等学校生物基礎」の内容のうち「細胞とエネルギー」の単元における呼吸と光合成の学習に関連して、『ミトコンドリアと葉緑体の起源にも触れること』と記されている。これを受けて、現在、「高等学校生物基礎」の多くの教科書では、共生説に関する比較的詳しい内容が取り上げられている。例えば、葉緑体はシアノバクテリア（ラン藻）に、ミトコンドリアは好気性細菌にそれぞれ起源することが記載されており、その根拠として、これら細胞小器官は独自のDNAを持つこと、分裂で増えることなどがあげられている⁽¹⁵⁻¹⁹⁾。

葉緑体分裂に関する初期の観察研究は、共生説の着想に深く関わったことが指摘されている^(4,13)。「高等学校生物基礎」の授業においても、生徒に共生説をより深く理解させるためには、葉緑体が分裂する様子を生徒に直接観察させることが重要であろう。一部の教科書⁽¹⁹⁾では、葉緑体が分裂する様子を観察する材料として、オオカナダモの葉を取り上げている。オオカナダモは、教材生物として広く学校現場で用いられており、葉緑体を容易に観察することができる。しかし、オオカナダモ植物体のどの部位の葉を用いれば、分裂中の葉緑体を確実に観察できるかについては記載されていない。そこで本研究は、「高等学校生物基礎」の授業で利用可能な、共生説に関する理解の深化を図る教

*自然・生活教育学系 **上越教育大学（初等教育教員養成課程）

材開発を念頭に置き、その基礎資料の収集を目的とし、オオカナダモのシュート（葉と茎からなる植物体の基本単位）において分裂葉緑体を高い頻度で観察できる部位や時間帯、および葉緑体分裂装置の視認性について調査を行った。

2 材料と方法

2.1 材料

本研究は、熱帯魚店で購入したトチカガミ科の沈水性多年草オオカナダモ (*Egeria densa* Planch.) を室内においた水槽内で育成し、材料とした。水槽内の温度制御は行わなかったため、水温は室温の影響を受けて変化した。

2.2 葉緑体分裂指数

オオカナダモのシュート内において、葉緑体の分裂が高頻度で見られる葉の部位を調べるとともに、観察する時間による分裂頻度の変化を調べた。2016年7月中旬の計5日間、異なる個体から採集した5本のシュートを用い、シュートの下部、中部、上部から1枚ずつ葉を採取し、さらに各葉について基部、中央部、先端部のそれぞれの部域の表面付近の細胞を対象として、光学顕微鏡を用いて葉緑体の観察と撮影を各日の正午頃に行った。撮影像をもとに、各部域で輪郭が明瞭に認められる100個以上の葉緑体を調べ、中央部が括れていて分裂中と思われる葉緑体の数を計測した。本研究では、調べた葉緑体数に対する分裂中の葉緑体数の百分率を葉緑体分裂指数 (DCI: dividing-chloroplast index) と定義した。さらに、同調査日の午前9時から午後3時まで3時間間隔で、シュート上部の葉の中央部における葉緑体分裂指数の時間変化を計測した。葉の部域や観察時間帯による葉緑体分裂指数の変化の検出には、Kruskal-Wallis検定を用い、この検定法により有意水準5%で有意差が認められた場合は、事後検定としてWilcoxonの順位和検定をHolmの方法による補正をかけて行った。

2.3 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

オオカナダモの分裂中の葉緑体において、分裂装置の観察が可能であるかを調べるため、透過型電子顕微鏡 (日本電子 JEM-1010EX, 以下TEM) を用いて観察を行った。後述のように、分裂葉緑体の観察には、シュート上部の葉の中央部付近が適していたことから、この部域の葉を用いてTEM試料の作成を行った。当該部域の葉を約2mm角に切り出し、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈した2.0%グルタルアルデヒドで1時間、室温で前固定した。前固定した葉は、リン酸緩衝液で10分おきに5回洗浄した後、リン酸緩衝液で希釈した1.0%四酸化オスミウムで12時間、4℃で後固定した。後固定した葉は、リン酸緩衝液で10分おきに5回洗浄し、その後、エタノールシリーズ (30%, 50%, 70%, 90%で各10分間, 100%で4回, 各30分間) で脱水し、プロピレンオキシドで置換した後、低粘性エポキシ樹脂に包埋した。包埋した試料からダイヤモンドナイフを用いて厚さ約90 nmの超薄切片を切り出し、TIブルー (日新EM) で15分間染色をした後、TEMで観察した。

3 結果

3.1 シュート内の各位置と葉の各部域における葉緑体分裂指数の比較

オオカナダモのシュートの各位置から採取した葉について、葉の部域間で葉緑体分裂指数を比較した (図1)。この図より、シュート上部の葉は、中部と下部の葉に比べて、どの部域においても葉緑体分裂指数が大きいことが分かる。シュート各部の葉の中央部において光学顕微鏡で葉緑体を観察した様子 (図2) から、シュート上部の葉 (図2c) で分裂葉緑体が観察しやすいことが明らかとなった。

シュートの下部、中部、上部それぞれにおいて、葉の部域間で葉緑体分裂指数の平均値を比較したところ、どの位置においても部域間でKruskal-Wallis検定による有意差が検出された (上部 $p=0.014$; 中部 $p=0.049$; 下部 $p=0.046$)。しかし、個別の部域間で事後検定を行うと、シュート上部の基部と先端部の間でのみ有意差が検出され ($p=0.037$)、他の位置の各部域間には有意差が見られなかった (図1)。シュート上部の葉では、その基部で葉緑体分裂指数が最も高く、先端部に向かって低下する傾向にあることが分かった。

シュート上部の葉の各部域において、葉緑体の光学顕微鏡像を観察すると、葉の基部の葉緑体 (図3a) は、中央部 (図3b) と先端部 (図3c) の葉緑体に比べて小さく、緑色も薄いいため、分裂葉緑体の観察は難しかった。

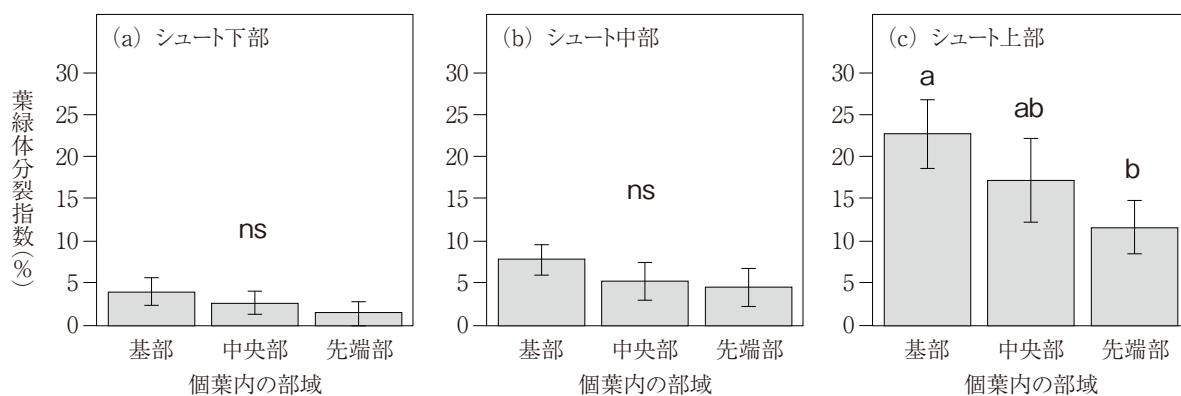


図1 オオカナダモのシュート内の各位置（下部，中部，上部）と葉の各部位（基部，中央部，先端部）における葉緑体分裂指数の比較

5本のシュートの観察結果を平均値と標準偏差で示す。異なる英字を付した部位間には5%水準で有意差があることを示す。nsはどの部位間にも有意差がないことを示す。

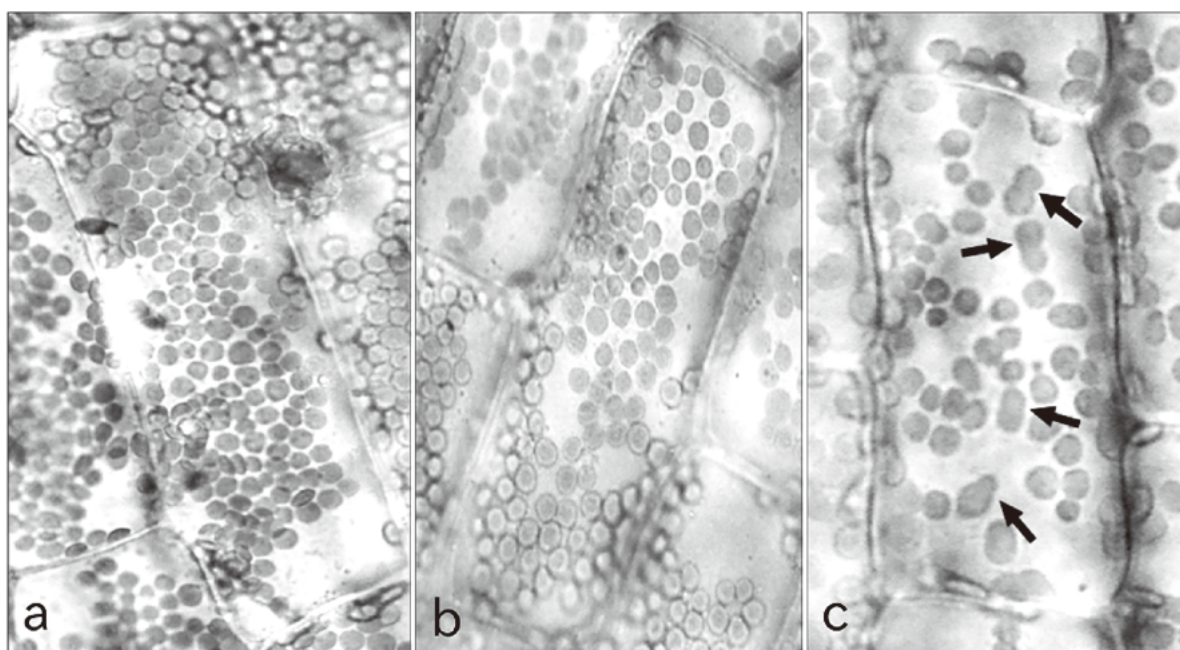


図2 オオカナダモのシュートの下部 (a)，中部 (b)，上部 (c) の葉の中央部の葉緑体の光学顕微鏡像
下部と中部の葉では，分裂葉緑体はほとんど観察されないが，上部の葉においては分裂葉緑体（矢印）が高頻度で観察できる。a, b, c は同倍率。

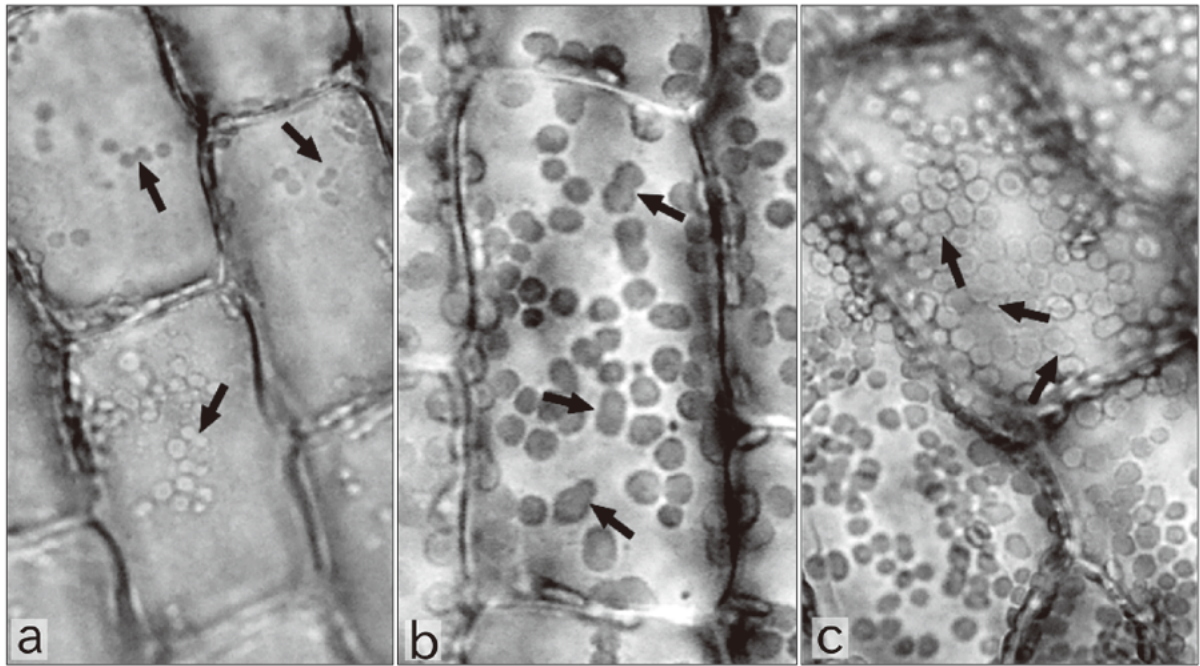


図3 オオカナダモのシュート上部の葉の基部 (a), 中央部 (b), 先端部 (c) における葉緑体の光学顕微鏡像。基部の分裂葉緑体 (矢印) は小型で緑色が薄いのが、中央部と先端部の分裂葉緑体 (矢印) は比較的大きく緑色が濃い。a, b, c は同倍率。

3. 2 葉緑体分裂指数と分裂過程の経時的変化

シュート上部の葉の中央部において、午前9時から午後3時まで3時間間隔で計測した葉緑体分裂指数を時間別に比較した (図4)。葉緑体分裂指数は、シュートによるばらつきがあるものの、平均値で見ると各時間の葉緑体分裂指数に有意差は見られなかった (Kruskal-Wallis検定, $p=0.125$)。

次に、葉緑体の分裂過程全体を光学顕微鏡で観察できるかを確かめるため、シュート上部の葉の中央部を対象として、細胞内の葉緑体を正午から20分間隔で経時的に観察した。葉緑体は、原形質流動によって短時間のうちに細胞内を大きく移動したため、分裂過程を継続的に観察することはできなかった。

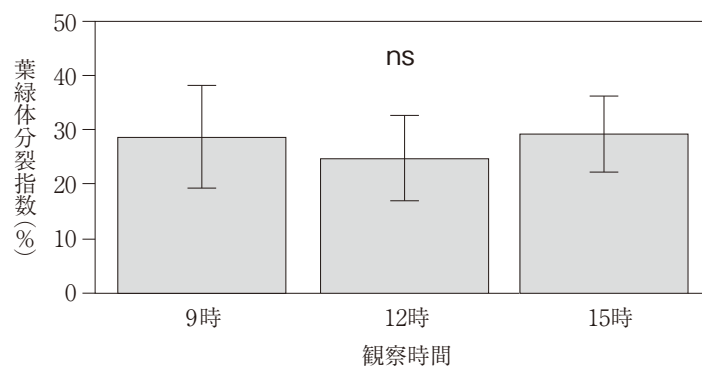


図4 オオカナダモのシュート上部の葉の中央部における葉緑体分裂指数の経時的変化。5本のシュートにおける9時、12時、15時の観察結果を平均値と標準偏差で示す。nsはどの群間にも5%の有意水準で差がないことを示す。

3. 3 TEM観察

光学顕微鏡による観察から、オオカナダモではシュート上部の葉の中央部付近が分裂葉緑体の観察に適することが分かったため、この地域の葉緑体において分裂装置が観察できるかをTEMによって調べた。その結果、この地域の葉の細胞内には、光学顕微鏡で観察されたように、括れをもった分裂葉緑体が観察できた (図5)。分裂葉緑体に

は、括れの比較的浅いものと深いものとが混在していた。まず、括れの浅い葉緑体をTEMで観察したところ、括れ部に分裂装置と思われる構造は認められなかった(図6)。次に、括れの幅が250 nm以下の、括れが深く亜鈴形をした葉緑体を観察したところ、括れ部に電子密度の高い線状の構造が確認された(図7a)。この構造物は括れ部のほぼ中央に、分裂方向と垂直に現れ、その太さは約40 nmであった。また、その断面を観察すると、この構造物は葉緑体の外包膜の細胞質側に付着していることが分かった(図7b)。

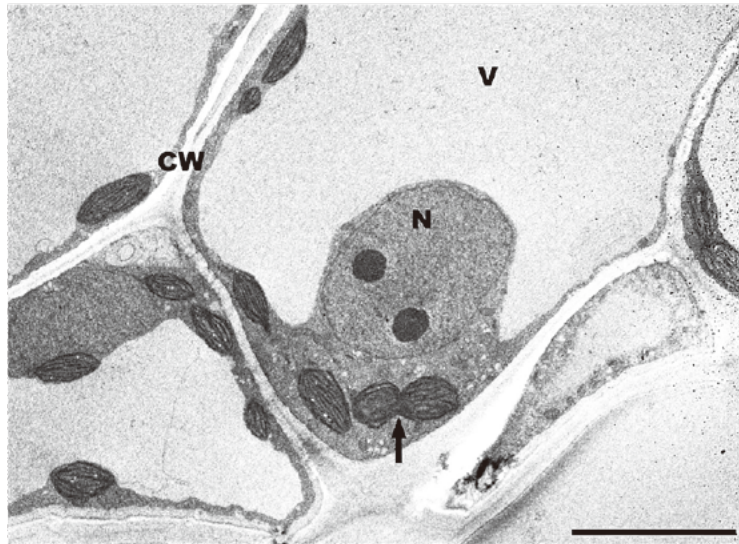


図5 オオカナダモのシュート上部の葉の中央部付近の細胞の透過電子顕微鏡像

分裂葉緑体(矢印)が観察できる。細胞壁(CW)、核(N)、液胞(V)。右下のスケールバーは10 μ mを示す。

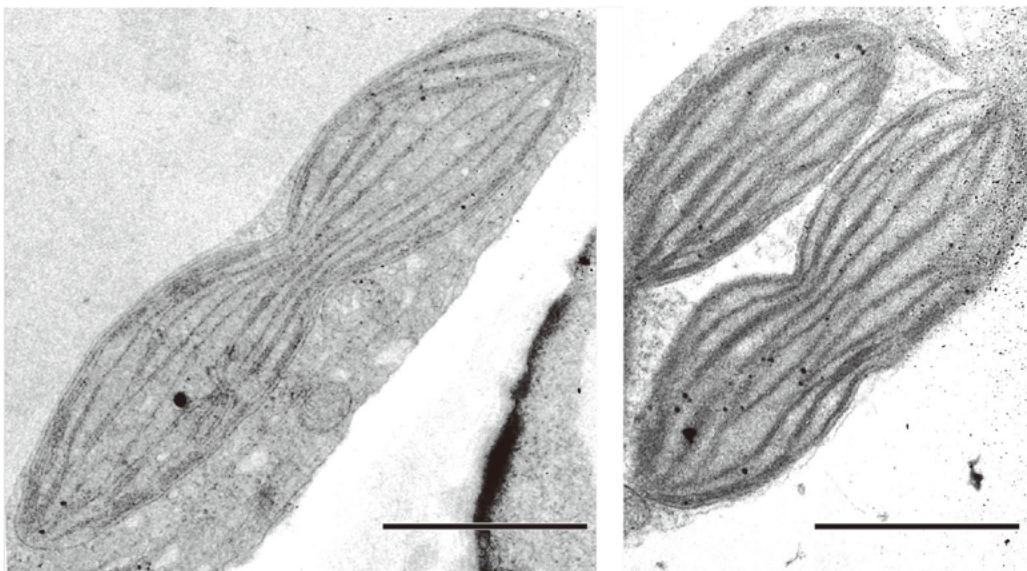


図6 オオカナダモの分裂葉緑体の電子顕微鏡像 — 括れが比較的浅い分裂葉緑体
括れ部に分裂装置と思われる構造は観察できない。右下のスケールバーは2 μ mを示す。

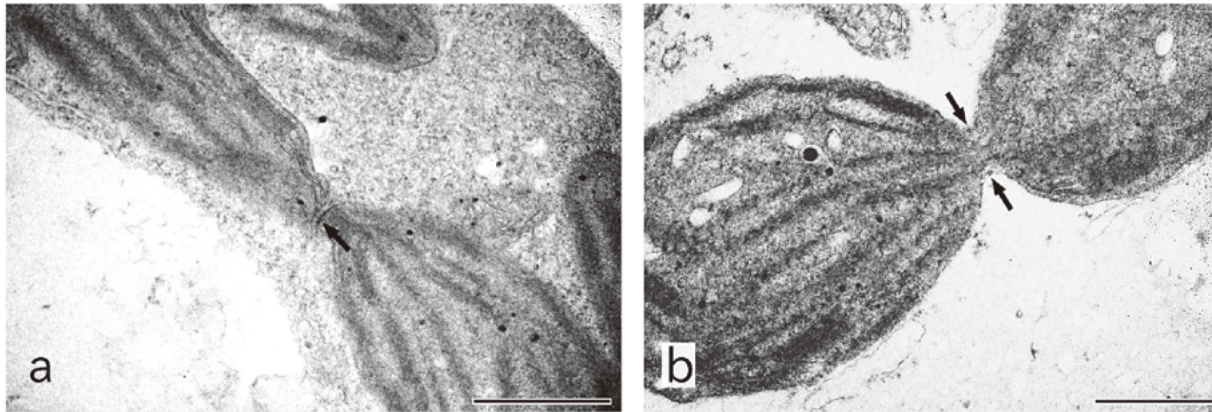


図7 オオカナダモの分裂葉緑体の電子顕微鏡像 — 括れが深い分裂葉緑体

括れ部に電子密度の高い分裂装置と思われる線状の構造が見られる(矢印)。括れ周辺部縦断面(a), 括れ中央部縦断面(b)。右下のスケールバーは1 μm を示す。

4 考察

4. 1 分裂葉緑体を観察しやすい部位と介在成長の影響

オオカナダモのシュート上部の葉において葉緑体分裂指数を比較したところ、基部、中央部、先端部の順で高い値を示した(図1)。しかしながら、シュート上部の葉の基部の細胞にみられる葉緑体は小型で緑色が薄く、分裂中の葉緑体かどうかを判別するためには、注意深い観察を必要とした(図3)。よって、葉緑体分裂指数に加え、観察の容易さも考慮した場合、シュート上部の葉の中央部から先端部にかけての細胞が観察に適していると考えられる。

オオカナダモが属する単子葉類では、一般に、葉の基部に介在分裂組織があり、葉の伸長はこの組織の分裂・成長による“介在成長”によって行われる⁽²⁰⁾。従って、シュート上部の比較的若い葉の基部において葉緑体分裂指数が高かった原因や、その部域において小型で色が薄い葉緑体が見られた原因は、葉の介在成長と関係している可能性が高い。同じ単子葉類のイネ科エンバク (*Avena sativa* L.) においても、第一葉の基部の介在分裂組織付近の細胞で、分裂葉緑体が頻度よく観察されることが報告されている⁽⁷⁾。シュート上部の葉に比べて、中部と下部の葉では、葉緑体分裂指数は低い値を示し、葉の部域間で有意差は見られなかった(図1)。これら中部と下部の葉の基部では、すでに介在成長がほとんど停止していることが考えられる。

4. 2 葉緑体分裂装置の観察

オオカナダモのシュート上部の葉の中央部付近の細胞をTEMで観察したところ、括れ部の幅が250 nm以下である分裂葉緑体において、括れ部に分裂方向と垂直に電子密度の高い幅約40 nmの線状構造物が観察された(図7a)。さらなる観察により、この線状構造物は、葉緑体外包膜の細胞質側でリング状を成していることが示唆された(図7b)。分裂葉緑体の括れ部にリング状の構造が出現することは、コケ植物や維管束植物において、度々報告されている^(7,8,11,12)。例えば、Hashimoto⁽⁷⁾は、エンバクの分裂葉緑体において、括れ部の幅が160 nm以下になると分裂装置が観察されることを、Duckett and Ligrone⁽¹¹⁾は、シダ植物において、括れ部の幅が概ね250 nm以下になると分裂装置が出現することを、それぞれ報告している。今回、オオカナダモの分裂葉緑体で観察されたリング状または線状の構造体は、出現位置と出現時期、微細構造的特徴が、先行研究における葉緑体分裂装置の特徴とよく一致しており、本研究においてオオカナダモの葉緑体分裂装置の観察に成功した可能性が高いと考えられる。

Hashimoto⁽⁷⁾は、エンバクの葉緑体分裂装置が、葉緑体の外包膜の細胞質側と内包膜のストロマ側に一つずつリングを有する、同心円状の二重リング構造であることを見出した。同様に、分裂装置が二重リング構造を取ることがシダ植物において明らかとなっている⁽¹¹⁾。しかし、オオカナダモを用いた今回の観察では、分裂装置と思われるリング状構造を葉緑体外包膜の細胞質側に見いだせたものの、内包膜のストロマ側でリングの存在を確認することはできなかった。今回、我々は90 nmの切片を用いてTEMでの観察を行ったが、Hashimoto⁽⁷⁾は、60 nmほどの厚さと思われる灰白色の超薄切片を用いて葉緑体分裂装置を観察している。オオカナダモの葉緑体分裂装置が二重リング構造であるかどうかは、今回よりもさらに薄い切片を作成して、より詳細な観察を行う必要がある。

4. 3 教材としての活用

既に述べたように、葉緑体分裂に関する初期の観察研究が、その後の共生説の着想に深く関わったことが指摘されている^(4,13)。従って、「高等学校生物基礎」の共生説に関する授業において、生徒に分裂葉緑体を実際に観察させることで、共生説について実感を伴った理解ができると考えられる。

高等学校の授業において分裂葉緑体の観察を行うことを想定した場合、授業時間帯の午前9時から夕方4時頃までのいずれの時間においても分裂葉緑体を観察できることが望まれる。本研究では、7月中旬にシュート上部の葉の中央部において、葉緑体分裂指数の時間変化を調べたところ、その値は観察時間によらずほぼ一定であることを確認した(図4)。よって、夏季にこの観察実験を行うのであれば、時間帯を選ばずに分裂葉緑体を容易に観察可能であると考えられる。一方、葉緑体は原形質流動によって細胞内を移動するため、一つの葉緑体の全分裂過程を継続して観察することはできなかった。そのため、シュート上部の葉の中央付近など、分裂葉緑体になるべく多くみられる箇所を選んで観察し、各葉緑体の括れの程度の違いから分裂過程の全体像を把握する必要がある。

「高等学校生物基礎」の2コマ連続(1コマ50分程度)の授業を想定し、分裂葉緑体の観察を通じて、共生説と真核細胞の進化について理解を深めることをねらいとする授業展開案を次のように構想した。

- (1) 共生説について説明をする(15分)。
- (2) 共生説の着想に葉緑体の分裂に関する研究が重要であったことを説明する(10分)。
- (3) オオカナダモの葉の分裂葉緑体を生徒に観察させる(50分)。
- (4) 葉緑体の分裂には分裂装置が関与することを、画像等を用いて示し、その分裂にはシアノバクテリアの細胞分裂と相同性の高い機構が働いていることを説明する(25分)。

この展開案では、分裂葉緑体の観察実験を授業の中心に据え、その前後の時間に共生説の説明や、葉緑体とシアノバクテリアの分裂機構の類似性などの説明を配置した。この授業を通じて、葉緑体が異生物に由来するという共生説に関して、生徒が実感を伴った理解をすることができると考えられる。

5 おわりに

葉緑体が他の生物の細胞内共生によって誕生したとする共生説(細胞内共生説)は、真核細胞の進化を理解するための重要な学習事項である。「高等学校生物基礎」の一部の教科書⁽¹⁹⁾では、共生説の根拠の一つとして、オオカナダモの葉緑体が独立して分裂することを観察する実験が取り上げられている。この実験に関して本研究では、シュート先端部(上部)の葉の中央部から先端にかけての細胞を観察することにより、分裂葉緑体を高頻度で観察可能であることを明らかにした。また、夏季の日中であれば、時間帯を選ばずに分裂葉緑体が容易に観察できることも明らかとなった。加えて、TEMが使用できる環境であれば、シュート上部の葉の中央部付近の細胞において、葉緑体分裂装置とみられる構造が観察可能であることも判明した。これらのことから、オオカナダモは、「高等学校生物基礎」において共生説を学ぶための教材として有効性が高いと判断できる。今後は、本研究の成果を活かし、「オオカナダモを用いて共生説への理解を深めるための教材」として授業実践を行い、実践結果を踏まえてさらに改善を加え、教材としての完成度を高めていきたい。

引用文献

- (1) Pyke K (2009) *Plastid biology*, Cambridge University Press, 203pp.
- (2) Sagan L (1967) On the origin of mitosing cells. *J Theoret Biol* **14**, 225-274.
- (3) Archibald JM (2009) The puzzle of plastid evolution. *Curr Biol* **19**, R81-R88.
- (4) 佐藤七郎 (1988) 「細胞進化論」, 東京大学出版会, pp.3-20.
- (5) Ueda R, Tominaga S, Tanuma T (1970) Cinematographic observations on the chloroplast division in *Mnium* leaf cells. *Sci Rep Tokyo Kyoiku Daigaku* **B 14**, 129-137.
- (6) Possingham JV, Lawrence ME (1983) Controls to plastid division. *Int Rev Cytol* **84**, 1-56.
- (7) Hashimoto H (1986) Double ring structure around the constricting neck of dividing plastids of *Avena sativa*. *Protoplasma* **135**, 166-172.
- (8) Moller SG (2004) Plastid division in higher plants. *Annu Plant Rev* **13**, 126-156.
- (9) Suzuki K, Ueda R (1975) Electron microscope observations on plastid division in root meristematic cells of *Pisum sativum* L. *Bot Mag Tokyo* **88**, 319-321.

- (10) Mita T, Kanbe T, Tanaka K, Kuroiwa T (1986) A ring structure around the dividing plane of the *Cyanidium caldarium* chloroplast. *Protoplasma* **130**, 211-213.
- (11) Duckett JG, Ligrone R (1993) Plastid-dividing rings in ferns. *Ann Bot* **72**, 619-627.
- (12) Robertson EJ, Rutherford SM, Leech RM (1996) Characterization of chloroplast division using the Arabidopsis mutant arc5. *Plant Physiol* **112**, 149-159.
- (13) 宮城島進也 (2011) 葉緑体分裂増殖の制御機構とその進化. *Plant Morphology* **23**, 61-70.
- (14) 文部科学省 (2009) 「高等学校学習指導要領解説理科編理数編」, 実教出版, pp.75-76.
- (15) 馬場昭次ほか9名 (2012) 「高校生物基礎」, 実教出版, pp.30-31.
- (16) 本川達雄ほか17名 (2011) 「生物基礎」, 啓林館, p.50.
- (17) 嶋田正和ほか11名 (2012) 「生物基礎」, 数研出版, pp.50-51.
- (18) 吉里勝利ほか17名 (2012) 「高等学校生物基礎」, 第一学習社, pp.60-63.
- (19) 浅島誠ほか20名 (2012) 「生物基礎」, 東京書籍, pp.28-29, pp.32-33.
- (20) 原襄 (1994) 「植物形態学」, 朝倉書店, p. 146.

Observations of Dividing Chloroplasts in Leaves of *Egeria densa* Planch.

As a Teaching Material in High School “Basic Biology”

Tomokazu TANI* · Hajime TOBA** · Yutaka KOIKE** · Yuzuru SHATARI** ·
Shigeru OGAWA*

ABSTRACT

Early investigations into the chloroplast division have played a pivotal role in leading to the conception of the endosymbiotic theory. With the aim to adopt the observation of dividing chloroplasts in a class concerning the endosymbiotic theory, we studied the division of chloroplasts in leaves of *Egeria densa* Planch., which were used as teaching materials, by light and electron microscopy. The value of the dividing-chloroplast index (DCI: frequency of chloroplast division) was higher in apical leaves than middle and basal plant leaves. In the middle part of each apical leaf, the dividing chloroplasts could readily be found. The values of DCI in apical leaves were consistently high during daytime. These results indicate that the apical leaves of *E. densa* are appropriate materials to observe dividing chloroplasts during school hours. Electron microscopy revealed the appearance of plastid-dividing ring structure in the isthmus of dividing chloroplast. From these light and electron microscope observations, it is suggested that the plant apical leaves of *E. densa* may be suitable as materials to teach students the significance of the endosymbiotic theory and to understand the evolution of eukaryotic cells. Possible classroom content concerning the endosymbiotic theory in high school “basic biology” will be proposed.

* Natural and Living Science ** Joetsu University of Education (College of Education)