

オオカナダモの葉の葉緑体運動の実験教材化

陣野 信孝

長崎大学教育学部生物学教室

(平成15年3月14日受理)

Experimental teaching materials on chloroplast movement in leaves of *Egeria densa*

Nobutaka JINNO

Biological Laboratory, Faculty of Education, Nagasaki University

Bunkyo-machi, Nagasaki, 852-8521

Japan (Received Mar. 14, 2003)

Abstract

Naturalized *Egeria densa* is submerged plant. As it is popular, obtainable, cultivable and available in all seasons, it is a good sample for science experiments.

Clustering and dispersal of chloroplast in *E. densa* have been known. The present work was planned for teaching materials on chloroplast movement in *E. densa* from energy metabolic viewpoints. Then, leaves were incubated in cold water at 2-4°C and in solutions of metabolic inhibitors to confirm the involvement of energy metabolism.

Metabolic inhibitors, DNP and NEM were applied. As DNP is designated as a dangerous chemical, it needs to be done with attention. Under the direction of teacher, these can be used at school science experiments.

Low temperature and the metabolic inhibitors inhibit both clustering and dispersal of chloroplasts.

From these data, the involvement of energy metabolism was suggested on both clustering and dispersal of chloroplasts.

Thus, experiments in *E. densa* may be available as teaching materials for the energy metabolism in biological science experiments.

Key words: *Egeria densa*, chloroplast movement, teaching materials, metabolic inhibitors.

Abbreviations: DNP, dinitrophenol ; NEM, N-ethylmaleimide.

はじめに

光合成を営む植物細胞の中には葉緑体がある。葉緑体は細胞にふりそそいでいる光の方向、強さ、色などを自ら感知して動いている。細胞の形や一つの細胞に含まれる葉緑体数、葉緑体の形などによりさまざまなタイプの運動が知られている（高木・西井、1999）。ウキクサ、フシナシミドロ、ヒザオリでは弱光下で葉緑体は光の入射方向に対して直角に定位し、強光下では並行に定位することが知られている（Haupt and Scheuerlein, 1990）。

また、沈水の水草であるオオカナダモ、コカナダモ、クロモでは、葉の葉緑体は暗所～弱光下で細胞全体に一樣に分散し、強光下では細胞の一ヶ所に団子状あるいは紐状に集合することが知られている（Witztum and Parthasarathy, 1985）。

この葉緑体の運動には、弱光下での光合成の効果を上げたり、強光による光障害を避けるという生理学的な意義があるとされている（高木・西井、1999）。

このような「光環境への応答」は植物が生きていく上で重要な生理的な適応反応といえる。ところで、高校の生物の教科書1Bでは、「植物の調節」という単元で「屈光性のしくみ」と「光周性」という教材があるが、これらの教材は実験結果が得られるまでに時間が長くなることなどから実験教材化は十分とはいえない。

そこで、オオカナダモを用いて「光環境への応答」の実験教材化を試みた。本研究では葉緑体の光環境への応答（集合と分散）をエネルギー代謝の視点で捉えることにした。

オオカナダモは、身近に自生していて入手しやすい、栽培が容易である、常緑であるため四季を通じて使用が可能である、顕微鏡があれば実験ができる、顕微鏡観察のためのプレパラート作製は生徒でも簡単にできる、他に大した実験器具は必要でない等、多くの利点がある。

1. 材料と方法

1. 材 料

(1) 植物

汲み上げた地下水を用水としている学内の池に生育しているオオカナダモ (*Egeria densa*) を用いた。汲み上げた地下水が水深約20cmで常時流下しているところに生育しているものを使用した。止水の池に生育するものに比べていろいろな付着物が少なく実験材料としては使いやすい。

(2) 代謝阻害剤

2, 4-ジニトロフェノール (DNP、酸化的リン酸化の脱共役剤の一つ) とN-エチルマレイミド (NEM, SH基試薬の一つ) を用いた。DNPは危険物に指定されているが、取り扱いに細心の注意を払えば学校の理科実験でも使用が可能ではないだろうか。以下の濃度で用いた。

- ① 1mM DNP (pH6.53); 10mM DNPを蒸留水で10倍に希釈して用いた。10mM DNPは0.2Mの水酸化ナトリウム液にDNPを入れ加熱して溶かした後、希塩酸で中性にした。
- ② 1mM NEM (pH6.45); 10mM NEMを蒸留水で10倍に希釈して用いた。

2. 方法

1. サンプルの前処理

葉緑体の集合の実験には、実験前日にサンプルを茎ごと水の入ったビーカーに入れて恒温器内（30℃）内で一晚処理（暗処理）して用いた。冬の時期を除いて暗処理は黒い布を掛けたり、蓋のついた箱の中に入れてもよい。

葉緑体の分散実験には実験当日の朝サンプルを採取し、葉を蒸留水の入った擦り合わせのガラス蓋付きのビン（秤量ビン、3×3cm/cm）に入れた。この段階の処理では秤量ビンの代わりにビーカーを使用してもよい。これを水の入った大きめのシャーレに入れて、つまりウォーターバスにして白熱電球（レフランプ）（150W, Toshiba）を用い照度30klux、温度30℃下で約4時間処理（明処理）した。光源からの距離は約10cmではその熱線で温度が上昇してその影響がでてくる。そこで大きめのシャーレを水槽にセットして、ハンディクーラー（BD-12, Yamato）とハンディクーラー用温度調節器（BF-21, Yamato）を用いてシャーレの液温が30℃になるように温度調節を行った。

白熱電球の光源からの距離を約30センチに保つと照度は約10kluxで温度の影響は無視できる。また、白色あるいは昼白色蛍光ランプで処理するときは、20Wの蛍光管が2個取り付けられる器具を購入して使用するとよい。光源からの距離は約10cmに保つと照度は10kluxで特に温度調節は必要でない。

天候がよいときはサンプルを蒸留水の入ったビーカーに入れ直射日光の下で処理してもよい。

この暗処理によって葉緑体は細胞内で一様に分散し、明処理によって細胞内の一ヶ所に又は隣の細胞とクロスするように紐状に集まった。こうして前処理した葉を以下の実験に用いた。

2. 照射下での葉緑体集合の定量化

この実験の定量化は難しいがシャッタースピードがデジタルで表示される顕微鏡撮影装置があれば可能である。本実験ではシャッタースピードが百分の1秒まで表示される顕微鏡撮影装置（H-Ⅲ, Nikon）を用い、同一細胞内で葉緑体の集合の定量化を試みた。細胞内に一様に分散していた葉緑体が集合すると細胞を透過する光の量が増えて細胞が明るくなっていく。この明るさの測定値を葉緑体の集合の度合いとして応用することができる。時間の経過と共に葉緑体が集合し細胞が明るくなってシャッタースピードが短くなっていくが、右上がりのグラフで読めるようにその逆数を取った。その値を細胞の明るさ（葉緑体の集合の度合い）としグラフの縦軸にとり時間を横軸にとった。

総合倍率100倍で一定時間ごとにプレパラートを作製して同一サンプル、同じ面、ほぼ同じ場所のシャッタースピードを測定して、その経時的変化をみた。

また、24×36（mm/mm）のカバーガラスを用いて作製した一時プレパラートを顕微鏡にセットし、その光源（ハロゲンランプ12V-50W）9.5Vで連続照射した。総合倍率400倍で同一細胞を30分ごとに2時間、顕微鏡写真を撮った。葉緑体の集合が観察できる。

3. 葉緑体の集合と分散に及ぼす低温の影響

葉緑体の集合実験には、暗処理した葉を蒸留水の入った秤量ビンに入れて、これを氷の

入ったシャーレに入れレフランプで照射した。氷を時々補給して液温を2~4℃に保った。葉緑体の分散実験は、明処理した葉を容器に入れて冷蔵庫内(約4℃)で行った。一定時間後にカラープリント用フィルムで顕微鏡写真を撮った。

4. 葉緑体の集合と分散に及ぼす代謝阻害剤の影響

代謝阻害剤として、1mM DNPと1mM NEMを用いた。対照実験として、蒸留水を用いた。

葉緑体の集合の実験には、暗処理した葉を上記の液に入れて、明処理を行い一定時間後に顕微鏡写真を撮った。

葉緑体の分散の実験には、明処理した葉を上記の液に入れて、暗処理を行い一定時間後に顕微鏡写真を撮った。

2. 結 果

1. 照射下での葉緑体の集合

暗処理した葉のプレパラートを作り、同一サンプル、同じ面、ほぼ同一場所を総合倍率100倍でシャッタースピードを測定した。その結果、時間の経過とともに葉緑体が集合し視野のシャッタースピードは短くなり明るくなった(図1, 2)。

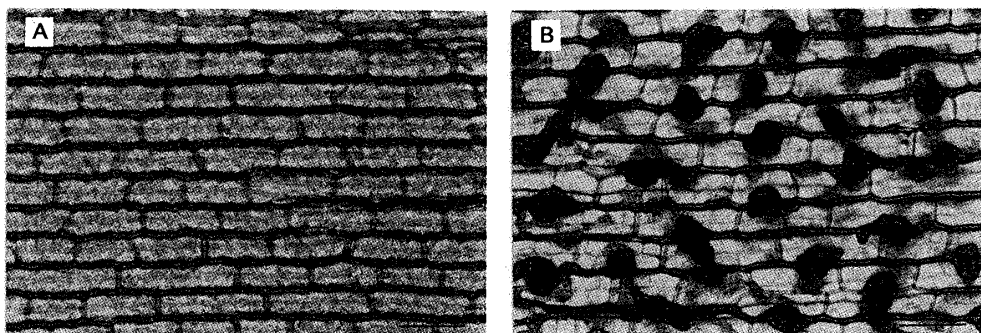


Fig.1 Photographs showing the dispersal(A) in darkness and clustering(B) in bright light of chloroplasts. The scale bars indicate 0.1mm.

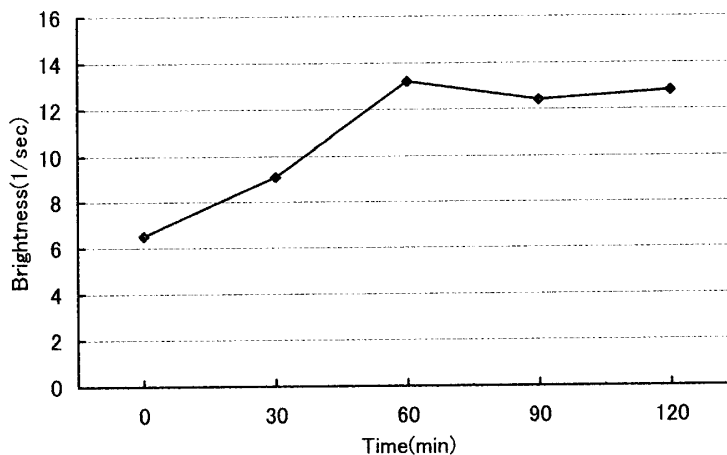


Fig.2 The change in brightness with passage of time under the light at 10klux.

同一細胞を総合倍率400倍でその表面にピントを合わせ、一定時間ごとに顕微鏡写真を撮った。オオカナダモの葉は表・裏の二つの細胞層からなっており、表・裏いずれの細胞でも暗処理後では葉緑体は葉の表面（表皮側）に移動して一様に分散した（図3-A）。葉緑体の周りにはしばしば細く伸びた糸状の原形質が観察された。明処理下、時間の経過と共に葉緑体は原形質流動をしながら移動するのが観察された。2時間後には葉緑体は細胞内の一箇所に密に集まって団子状を、あるいは隣り合った二つの細胞にまたがり紐状を呈した（図3-B～D）。これは暗処理下で細胞の表面に分散していた葉緑体が明処理下では細胞の中の方に移動し核を中心に集合したともと思われる。

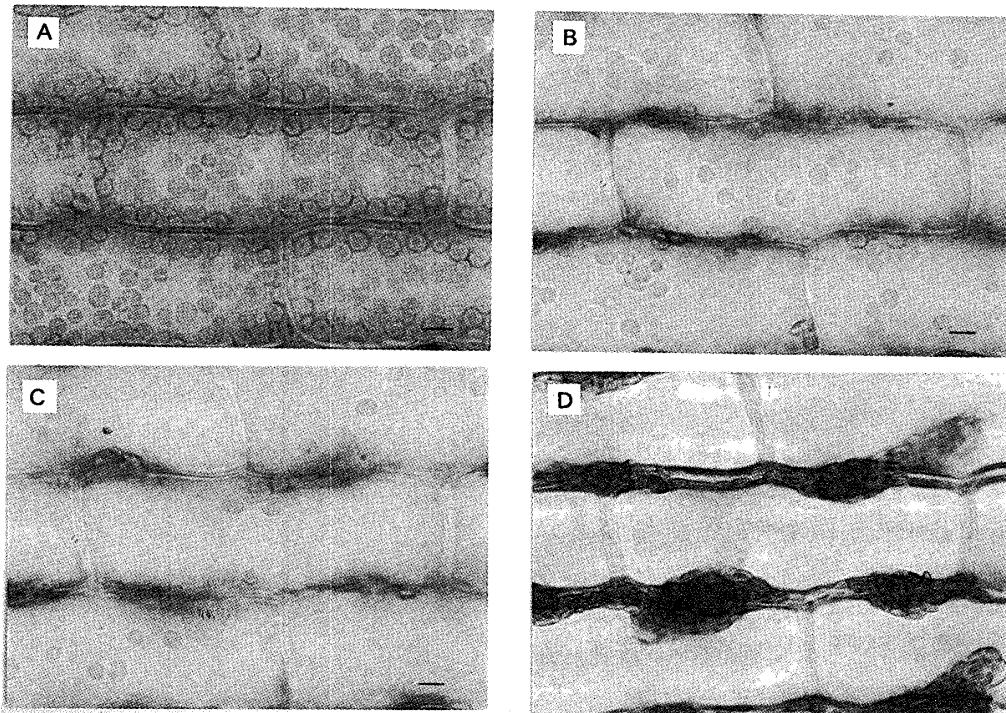


Fig.3 Photographs showing the clustering of chloroplasts in the light. Dispersing chloroplasts under darkness(A) clustered with passage of time; after 30 min(B), 1h(C) and 2h(D). The scale bars indicate $10\ \mu\text{m}$.

2. 葉緑体の集合と分散に及ぼす低温の影響

低温（ $2\sim 4^{\circ}\text{C}$ ）下では、葉緑体の集合と分散は抑制された。つまり、分散した葉緑体は明所下2時間後でも集合せず（図4-A）、集合したものは暗所下2時間後、でも分散しなかった（図4-B）。

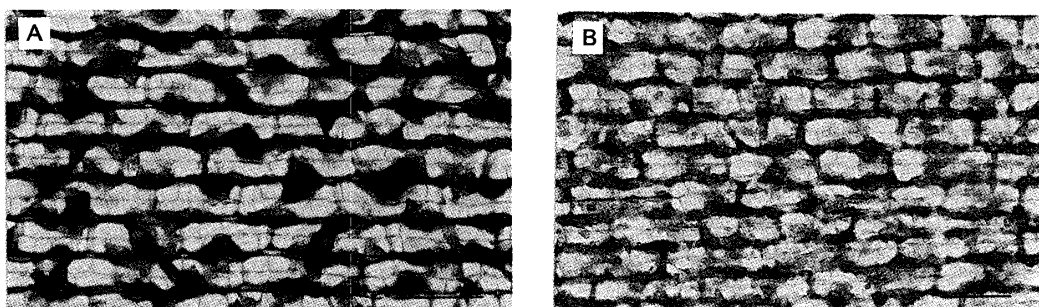


Fig.4 Photographs showing inhibition of dispersal and clustering at low temperature. Clustered chloroplasts did not dispersed at 4°C under darkness(A) and dispersed chloroplasts did not clustered at $2\sim 4^{\circ}\text{C}$ under light of 10 klux(B). The scale bars indicate 0.1mm.

3. 緑体の集合と分散に及ぼす代謝阻害剤の影響

DNP および NEM で処理すると、葉緑体の集合と分散は共に抑制された。つまり、分散した葉緑体は明所下でも集合せず (図 5-A, B)、集合したものは暗所下 2 時間後でも分散しなかった (図 5-C, D)。

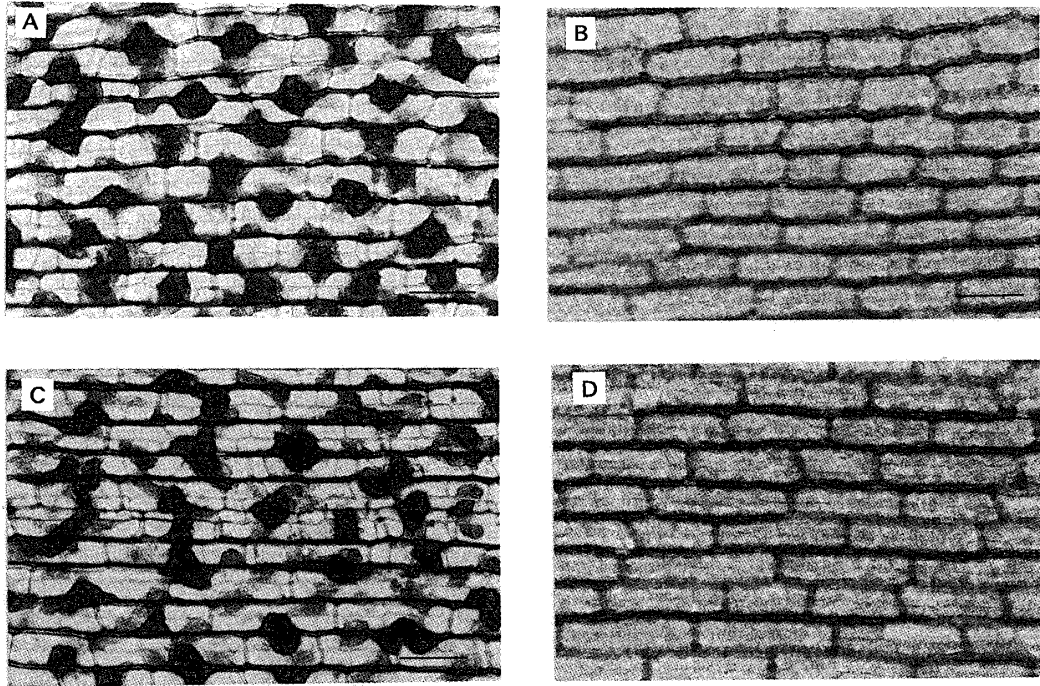


Fig.5 Photographs showing effects of inhibitors on the chloroplast movement. DNP inhibited the dispersal of clustered chloroplasts under darkness(A) and the clustering of chloroplasts under bright light(B). NEM did also the same effect(C, D). Photograph after 2h treatment were shown. The scale bars indicate 0.1mm.

3. 考 察

低温処理で、葉緑体の運動 (集合と分散) が抑制されたことから、葉緑体の運動にはエネルギー代謝が関与していることが示唆された。このことは、低温下では物質代謝が低下し ATP の生成が低下したためと考えられる。

DNP は酸化的リン酸化の脱共役剤の一つで、ATP 生成の準備段階である高エネルギー状態を解消する。つまり、DNP で処理すると ATP の生成が抑制される。この DNP の処理で葉緑体の集合・分散が抑えられたのは、運動のエネルギー源である ATP の生成が抑えられたためと示唆される。つまり、葉緑体の運動はエネルギーを使う過程であることを示唆している。ウキクサ (*Lemma*) の葉緑体の運動の主なエネルギー源は酸化的リン酸化による ATP とされている (Haupt, 1982)。

SH 基試薬の一つである PCMB はヒョウタンゴケ (*Funaria*) の葉緑体の定位運動を抑えることが知られている (Schönbohm, 1972)。また、NEM は緑藻類の一種 (*Mougeotia*) の葉緑体の運動を阻害しマイクロフィラメントであるミオシンのはたらきに影響するとされ

ている (Wanger, Klein and Rossbacher, 1978)。また微小繊維の重合を阻害するサイトカラシン B はそれを阻害し、一方微小管形成を阻害するコルヒチンはそれを阻害しないことから、葉緑体の運動にはマイクロフィラメントが関与しているとしている (Haupt and Scheurlein, 1990)。オオカナダモ (Witztum and Parthasaraty, 1985) とセキシヨウモ (Dong, Nagai and Takagi, 1998) の葉緑体の集合と分散がサイトカラシンで阻害されるが、コルヒチンでは阻害されないことが知られている。サイトカラシン-B とコルヒチンの葉緑体の運動に及ぼす影響については、著者も同じ結果を確認している。

オオカナダモにはミオシンの存在も確認されている (Ohsuka and Inoue, 1979)。非筋肉性と細胞性のミオシンは ATP-アーゼ活性を示し、アクチンと結合するとその活性は増大することが知られている (香川ほか, 1980)。ATP アーゼ活性をもつミオシンによって ATP が分解され、その遊離エネルギーで葉緑体がアクチン繊維の上を滑って移動すると考えられる。つまり、葉緑体の運動は能動的な過程であることが示唆される。

このように、オオカナダモの葉緑体の運動には、アクチン-ミオシン-ATP 系の関与が示唆される。

オオカナダモの葉の葉緑体が明所下で集合し暗所下で分散する機構は不明であるが、「光環境への適応」の実験教材として使用できるのではないだろうか。本学部の学生の「生物学実験」でこのオオカナダモの葉緑体の運動に関する実験を実施したところ、受講生は興味関心を示し「光環境への適応」の実験教材として有効であることが分かった。

代謝阻害剤の使用については問題があるが、低温処理実験だけでも葉緑体の運動が能動的な過程であること理解させるのによい実験教材といえる。

4. 摘 要

1. 帰化植物の一種であるオオカナダモを材料として用いた。
2. これは、身近、栽培が簡単、四季を通じて使用可能であるなど利点をもっている。また、顕微鏡観察のためのプレパラート作製は児童・生徒でも簡単にできる。
3. 葉の葉緑体は強光下では集合し、弱光～暗所下では分散する性質があり、つまり葉緑体は「光環境への適応」して運動する。
4. この葉緑体の運動をエネルギー代謝の視点で実験教材化を試みた。
5. 低温と代謝阻害剤の処理が葉緑体の運動に及ぼす影響を調べた。代謝阻害剤として酸化的リン酸化の脱共役剤である 2, 4-ジニトロフェノールと SH 基試薬である N-エチルマレイミドを用いた。
6. 低温とこれら代謝阻害剤処理で、葉緑体の集合と分散が共に阻害された。
7. オオカナダモの葉緑体の運動は、エネルギーを使う能動的な過程であることが示唆された。
8. 本学部の「生物学実験」で実践したところ、「光環境への適応」とそれがエネルギーを使う能動的な過程であることを理解する教材として有用であることが分かった。
9. 1～2 時間で実験結果が得られるので、教育現場における植物の「光環境への適応」の実験教材として使用を期待したい。

引用文献

- Dong, X-J., Nagai, R. and Takagi, S. (1998) Microfilaments anchor chloroplasts along the outer periclinal wall in *Vallisneria* epidermal cells through cooperation of PFR and photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **39**(12):1299-1306.
- Haupt, W. (1982) Light-mediated movement of chloroplasts. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **33**:205-233.
- Haupt, W and Scheuerlein, R. (1990) Chloroplast movement. *Plant Cell and Environment.* **13**:595-614.
- 香川靖雄、今堀数友、丸山工作、斎藤信彦：『生命とエネルギー』（培風館、1980）152頁。
- 高木慎吾、西井一郎：『植物の環境応答（植物細胞工学シリーズ11）』（秀潤社、1999）18頁。
- Ohsuka, K. and Inoue A. (1979) Identification of myosin in a flowering plant *Egeria densa*. *J. Biochem.* **85**:375-378.
- Schönbohm, E. (1969) Die Hemmung der lichtinduzierten Bewegung des *Mougeotia*-Chloroplasten durch p-Chloromercuribenzoat. *Zeitschrift für Pflanzphysiologie* **61**:250-260.
- Wanger, G., Klein, K. and Rossbacher, R. (1978) Strukturelle und physiologische Grundlagen der lichtorientierten Chloroplastenbewegung bei der Grünalge *Mougeotia spec.* *Cytobiologie* **18**:198.
- Witztum, A. and Parthasarathy, M. V. (1985) Role of actin in chloroplast clustering and banding in leaves of *Egeria*, *Elodea* and *Hydrilla*. *Eur. J. Cell Biol.* **39**, 21-26.