

ラッカセイ子葉における脂質の蓄積に関する微細構造的観察*

柏葉晃一・松田智明・長南信雄

(茨城大学農学部)

1996年5月30日受理

要旨 : 登熟中のラッカセイ子葉柔細胞における貯蔵物質蓄積の様相を、走査電子顕微鏡と透過電子顕微鏡によって観察するとともに、脂質体の構造保持のための試料前処理方法についての検討も行った。ラッカセイ子葉柔細胞における貯蔵物質の蓄積は、脂質体の形成によって開始された。脂質体の形成は登熟初期から認められ、登熟中期になると急速に数を増した。脂質体の形成に伴って、細胞質中には網目状の発達した粗面小胞体 (RER) が認められた。RER は互いに融合・連結し、立体的な網目状構造を形成した。また、網目状に発達した RER の一部には所々で袋状構造が認められた。袋状構造の大きさは $2\sim 4\times 1\sim 2\ \mu\text{m}$ であり、表面には小さな顆粒の形成が観察された。顆粒の形成は RER の末端部にも認められた。この顆粒は脂質体の形成とともに数量を増したことから、形成初期の脂質体であると推定された。タンパク質は登熟中期から液胞中に蓄積し、この液胞が分割した後にタンパク顆粒を形成した。ラッカセイで観察されたアミロプラストはソラマメに比べて小型であった。以上の観察結果から、ラッカセイ子葉柔細胞における貯蔵物質の蓄積は脂質体の形成による脂質の蓄積を中心に進行し、脂質体の形成には発達した RER が密接に関与することが明らかになった。脂質保存のための前処理には、固定液中への塩化カルシウムの添加が有効であった。

キーワード : 脂質体, 脂質の蓄積, 子葉柔細胞, 粗面小胞体, 微細構造, ラッカセイ。

Electron Microscopy of the Lipid Accumulation in the Developing Cotyledon of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) : Kouichi KASHIWABA, Toshiaki MATSUDA and Nobuo CHONAN (School of Agriculture, Ibaraki University, Ami-machi, Ibaraki 300-03, Japan)

Abstract : Fine structures in peanut cotyledons during development were observed using scanning and transmission electron microscopes. Lipids began to accumulate in the cotyledon at an early stage. The parenchyma cells contained large central vacuoles, small lipid bodies and rough endoplasmic reticulum (RER). In the middle stage, the small lipid bodies and RER rapidly appeared in cytoplasm and continued to increase until the final stage. Developed RER formed a three-dimensional network structure. In a part of the developed RER network, dilated structures developed with numerous small vesicles. The observed dilated structures had RER terminals on the surface area with an average diameter of about $2\sim 4\times 1\sim 2\ \mu\text{m}$. Between the middle stage to the final mature stage, the small vesicles developed directly from the RER terminals and grew into lipid bodies. In addition, these small vesicles were seen to increase as a result of lipid accumulation within the parenchyma cells; however, the number of vesicles decreased in the final mature stage. Additionally, reserve proteins were deposited in smaller vacuoles formed by the subdivision process of the central vacuole. In the final stage, smaller vacuoles became protein bodies through the packing of proteinaceous materials. Numerous plastids containing starch grains were apparent from the early stage. By the final last stage, the amyloplast diameters were smaller than those of a broad bean. From the observations by scanning and transmission electron microscopes, developed RER networks, RER terminals and numerous small vesicles seem to be involved in lipid accumulation. We believe that the formation of lipid bodies occurs from the developed RER. In addition, calcium chloride was utilized for the fixation of peanut cotyledon tissue in this electron microscopical study.

Key words : Cotyledon, Lipid accumulation, Lipid body, Peanut, Rough endoplasmic reticulum, Ultrastructure.

ラッカセイは脂質やタンパク質に富むことから、搾油作物および食用作物として栽培される。脂質は子葉の細胞内部にリピッドボディ^{1,13,14)} (以下脂質体と呼ぶことにする)、オイルボディ^{3,6,9)}、スフェロゾーム¹⁵⁾、脂肪粒または脂質体⁹⁾ などと呼ばれる直径約 $1\sim 2\ \mu\text{m}$ の顆粒状態で観察される。これまでも脂質の蓄積に関する研究はアマ⁹⁾・カボチャ¹¹⁾・ヒマワリ⁹⁾・ベニバナ⁹⁾・ナタネ³⁾・ダイズ^{1,5,12)} などの種子を材料として、脂質の生合成経路の解明

や蓄積形態に関する観察が行われてきた。その結果、脂質の主成分であるグリセロイドは細胞内部の粗面小胞体 (RER) の膜で多量に合成され、脂質体を形成することが判明した^{4,6,7)}。脂質体の形成過程については、RER から合成後間もないグリセロイドが細胞質中に小さな顆粒として放出され、脂質体となる「RER 関与説」²⁾ と、プラスチドから裸の状態では油滴が放出された後に脂質体を形成するとして「プラスチド関与説」^{3,13,15)} の2つの考え方が報告されている。また、形成初期の脂質体には限界膜は認められず、油滴の状態では細胞質中に存在したとの報

* 大要は第 195 回講演会 (1993 年 4 月) において発表。

告もあるが、詳細は明らかではない^{9,14)}。

脂質体の形成には RER とプラスチドの関与が指摘されたが、小器官のどの部位から放出されて顆粒状の脂質体を形成するのか、どのような経路をだとり成熟を迎えるのかなど詳細は明らかではない。これは脂質体が種子形成の一時期から急速に、かつ多量に形成されること。電子顕微鏡用の試料調製の際に変成を受けやすく、生体に近い状態での組織の固定が難しいためである。ラッカセイ子葉における脂質体の形態観察は、脂質の蓄積機構を理解する上で不可欠であるが、これまで SEM (走査電子顕微鏡) と TEM (透過電子顕微鏡) を併用した観察例は少ないようである。本研究では登熟期におけるラッカセイ子葉柔細胞の微細構造について、SEM と TEM を併用して観察を行い、脂質の蓄積と脂質体の形成、RER および他の細胞小器官の関与について検討した。また、脂質保存のための試料の前処理方法についても検討した。

材料と方法

1. 種子の採取

圃場で栽培した登熟中のラッカセイ品種(大千粒)の種子を供試した。試料の採取は開花後 25~80 日までとし、開花後 25~40 日までを登熟初期、開花後 40~65 日までを登熟中期、開花後 65~80 日までを登熟後期とした。観察試料は種子の中央部から 2~4 mm³ 組織片を切り出し、以下の試料調製を行った。

2. 固定液の調製

ラッカセイ子葉柔組織からの脂質の流失を迎えるために、SEM および TEM 用の固定液に添加剤を加えた。固定液は 3% グルタルアルデヒドと 2% パラホルムアルデヒド混合液 (0.05~0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.2) に 0.1 M シュクロース, 0.1% マラカイトグリーン, 0.2 mM 塩化カルシウム, および 0.25 mM 塩化マグネシウムをそれぞれ添加した。室温または 4°C で 4~12 時間の前固定を行い、後に 0.1~0.2 M カコジル酸緩衝液で洗浄した。

3. SEM 用の試料調製

SEM 用の試料調製には、前報と同様 O-D-O 法^{8,10)}を用いた。

試料は前固定後、1% オスミウム酸 (0.2 M カコジル酸緩衝液, pH 7.2) で 12 時間 (4°C) 固定を行った。固定後水洗し、15%, 25%, 50% DMSO に

順次浸漬した後に試料を凍結させ切断した (EIKO, TF-2)。切断した試料は 0.1% オスミウム酸で 48 時間 (20°C) 静置処理し、その後水洗した。水洗後試料の切断面の硬質化をはかるため 1% オスミウム酸で 2 時間 (20°C) 再固定した。その後水洗を行い、過剰なオスミウム酸を除去し、2% タンニン酸で 2 時間 (20°C) と 1% オスミウム酸で 30 分 (20°C) の導電染色を行った。固定液にマラカイトグリーンを添加した試料は 2% タンニン酸で 2 時間 (20°C) の浸漬をした。導電染色後、ふたたび水洗を行い、エタノール系例による脱水と t-ブタノール置換を行い、真空凍結乾燥 (EIKO, ID-2) した。乾燥した試料は試料台に接着した後に金蒸着を行い、加速電圧 10~15 Kv で SEM (JEM-T300) 観察した。

4. TEM 用の試料調製

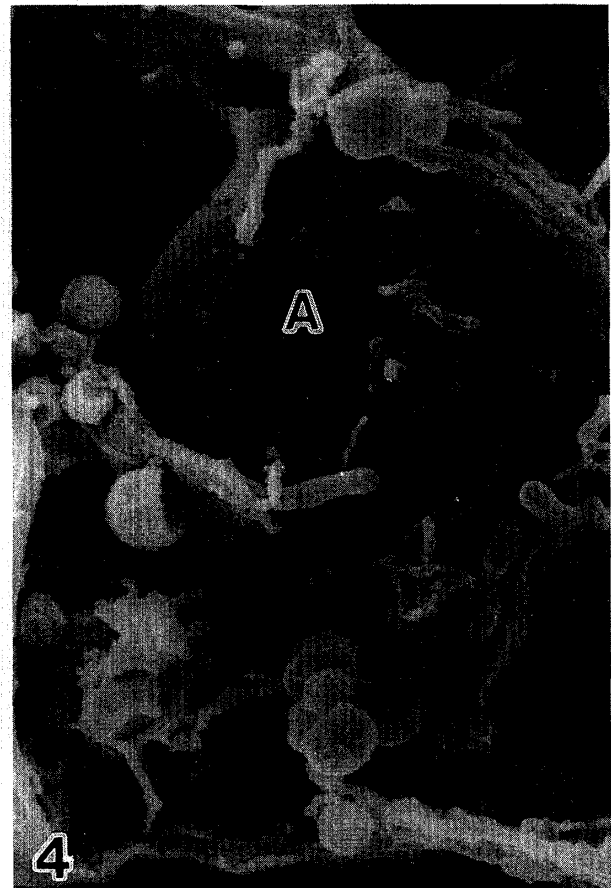
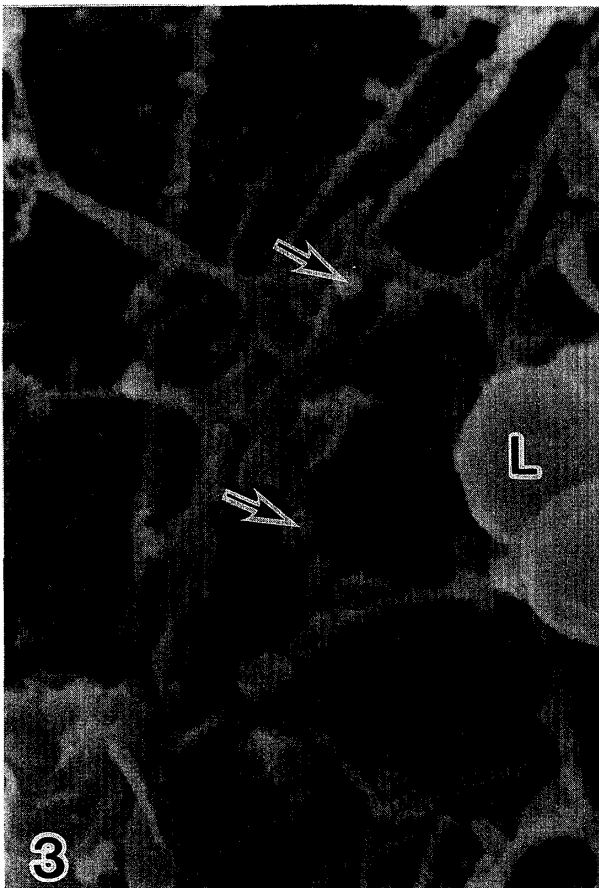
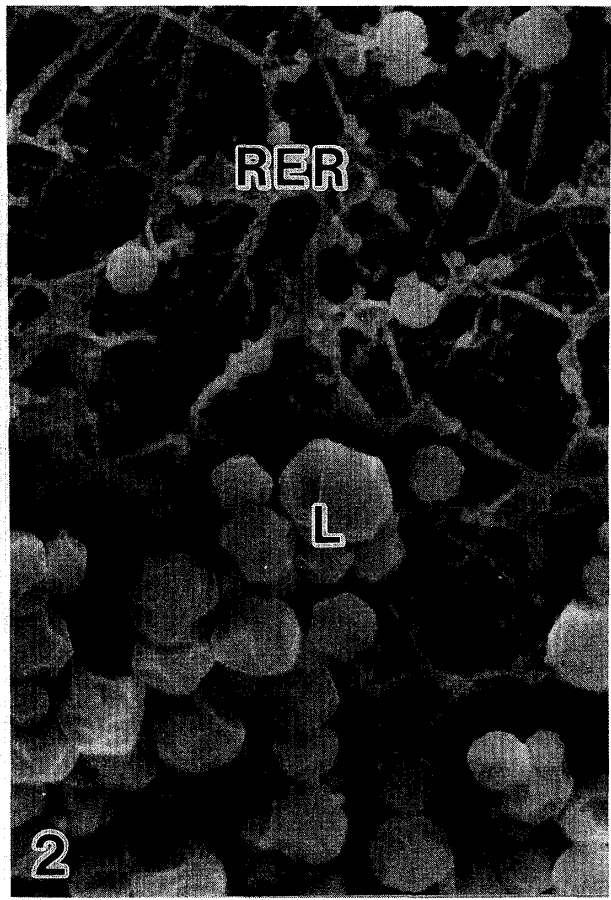
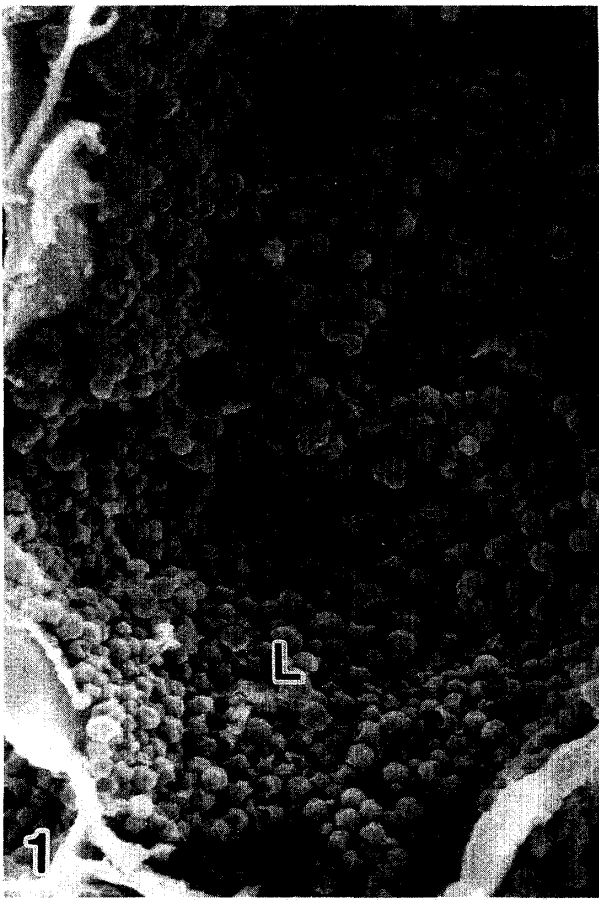
TEM 用の試料は前固定後、1% オスミウム酸で 12 時間 (4°C) の後固定を行った。その後、0.1 M カコジル酸緩衝液で洗浄した。洗浄した試料は、観察像の良好なコントラストを得るために 2% タンニン酸に 2 時間 (20°C) 浸漬し、水洗した。その後エタノール系例で脱水し、スパー樹脂またはエポン 812 樹脂で包埋し、超薄切片を作製した。超薄切片は 6% 酢酸ウランと鉛塩で電子染色を行い TEM (JEM-1010, 加速電圧 80~100 Kv) 観察した。

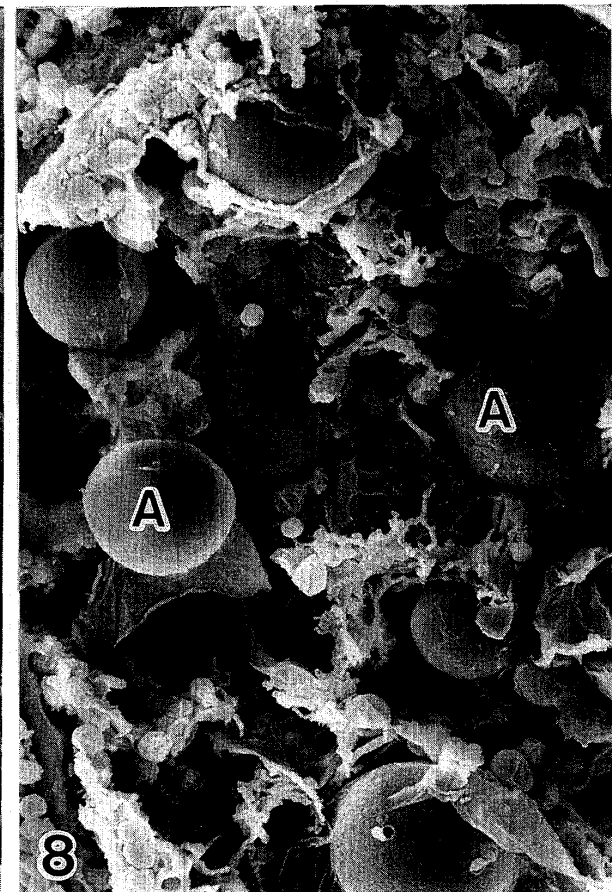
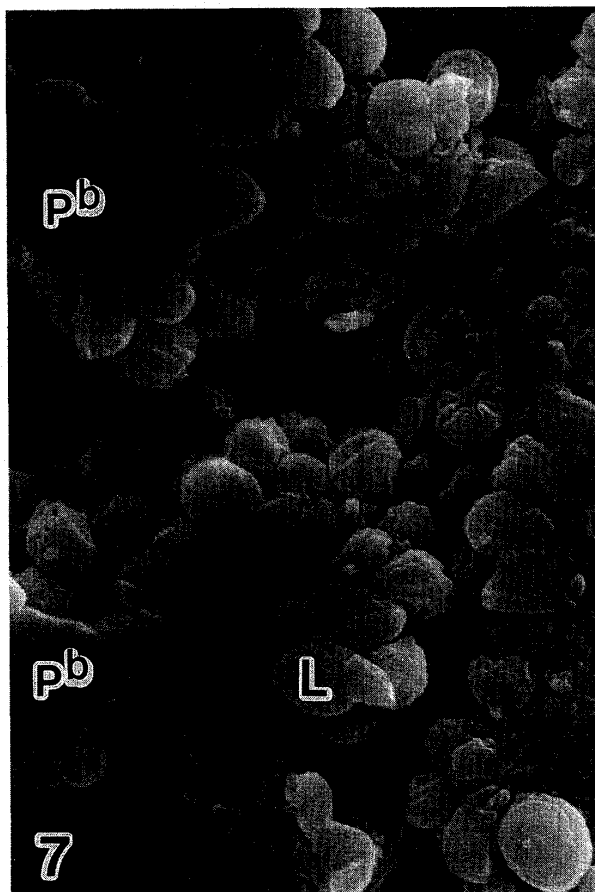
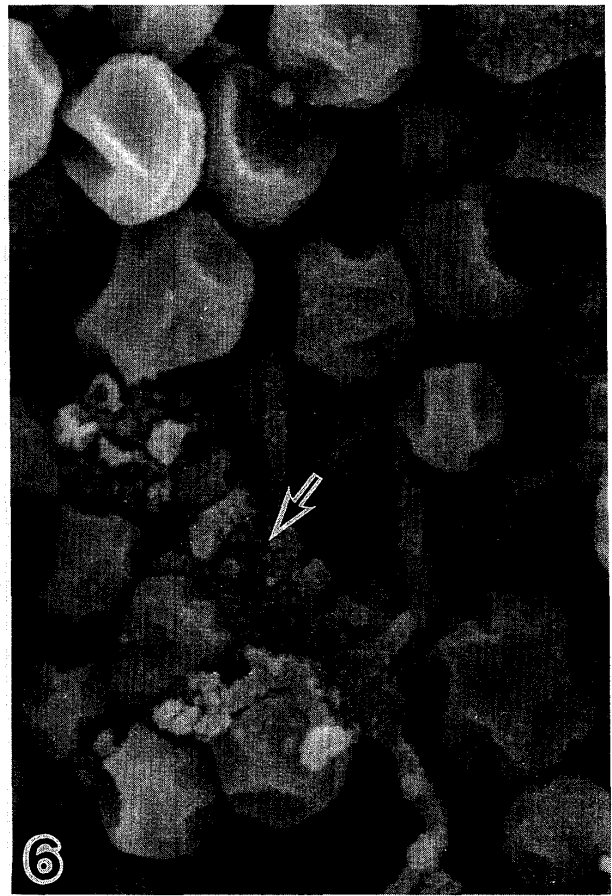
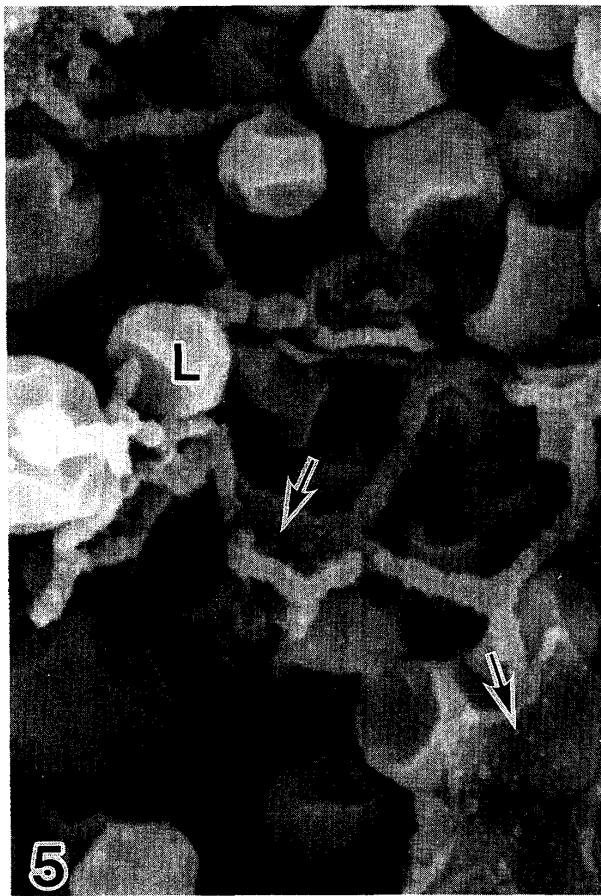
観察結果

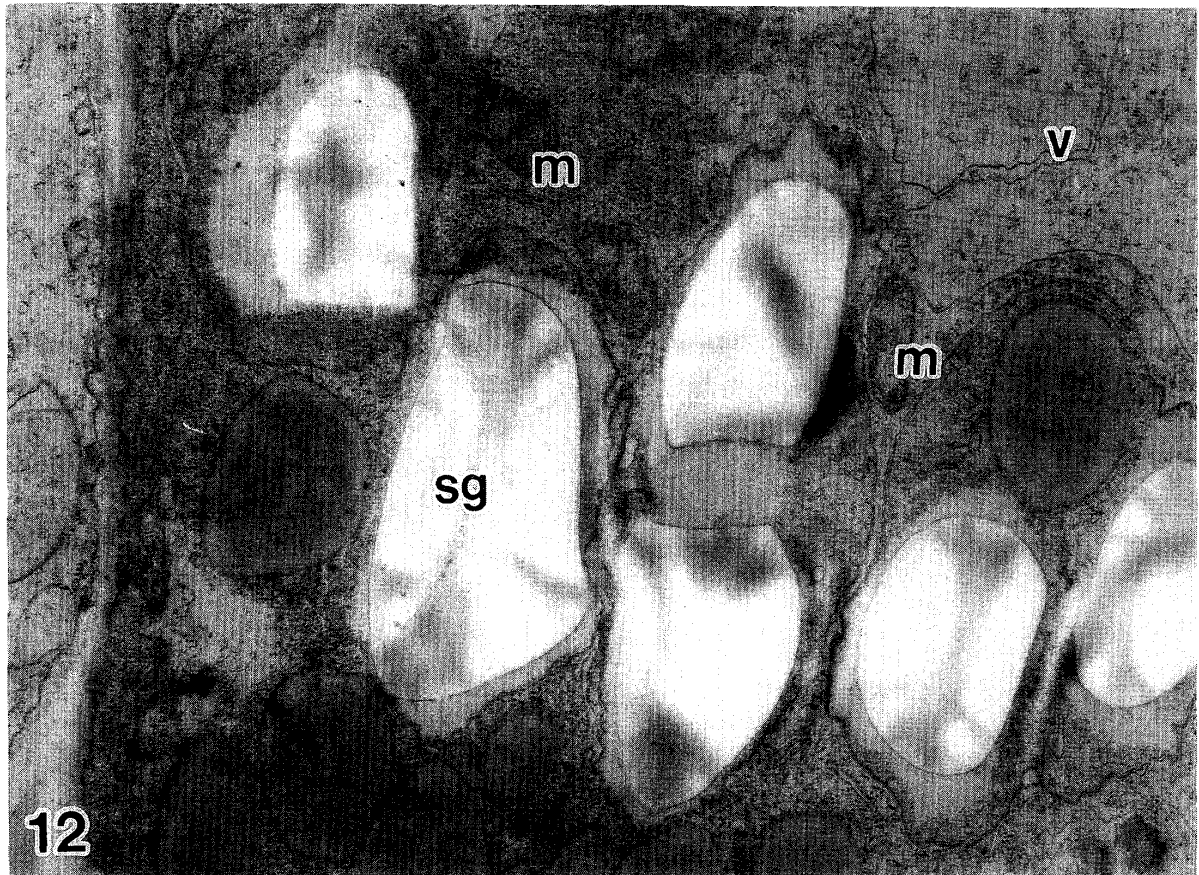
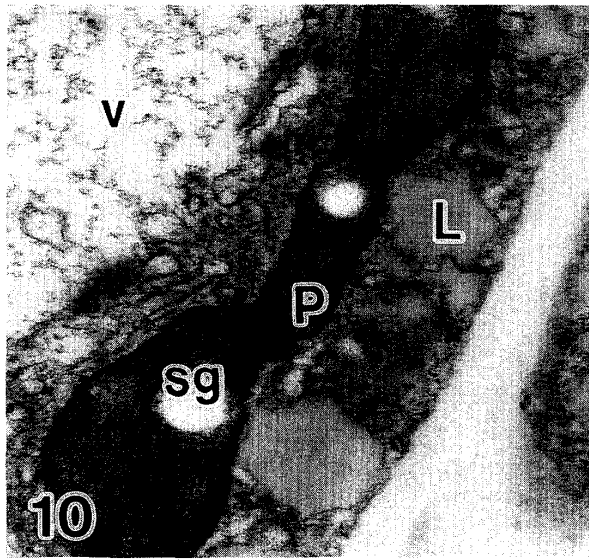
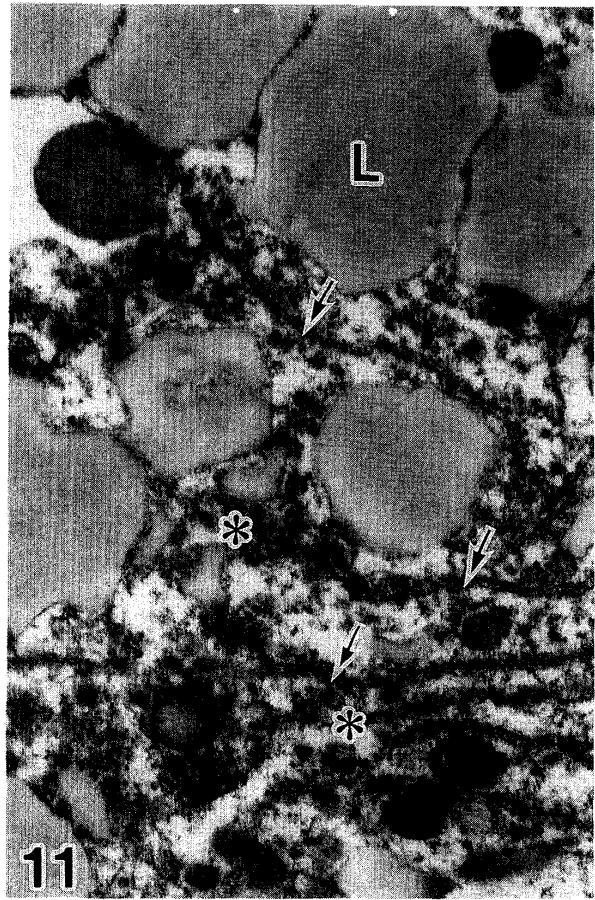
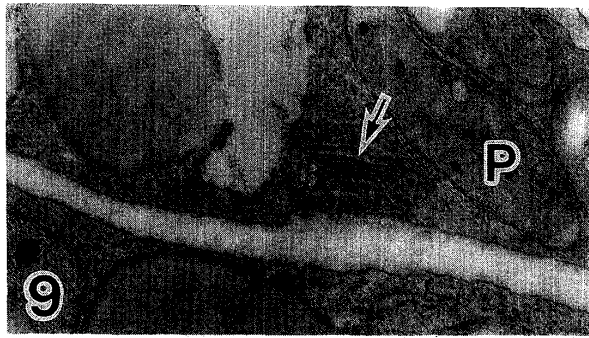
1. SEM 観察

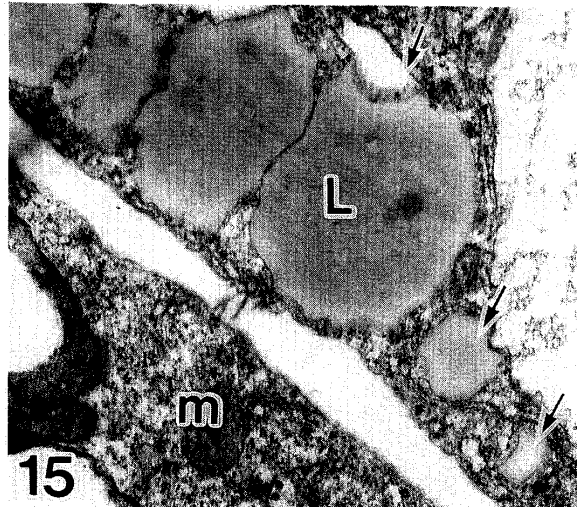
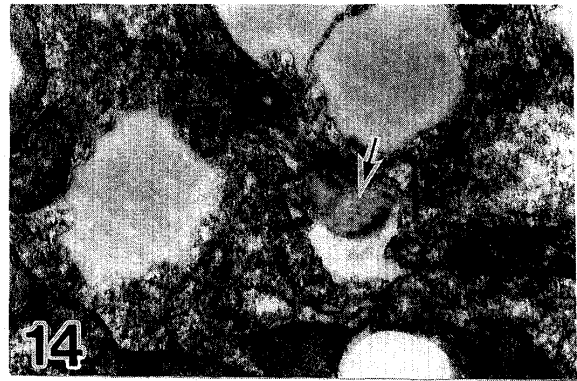
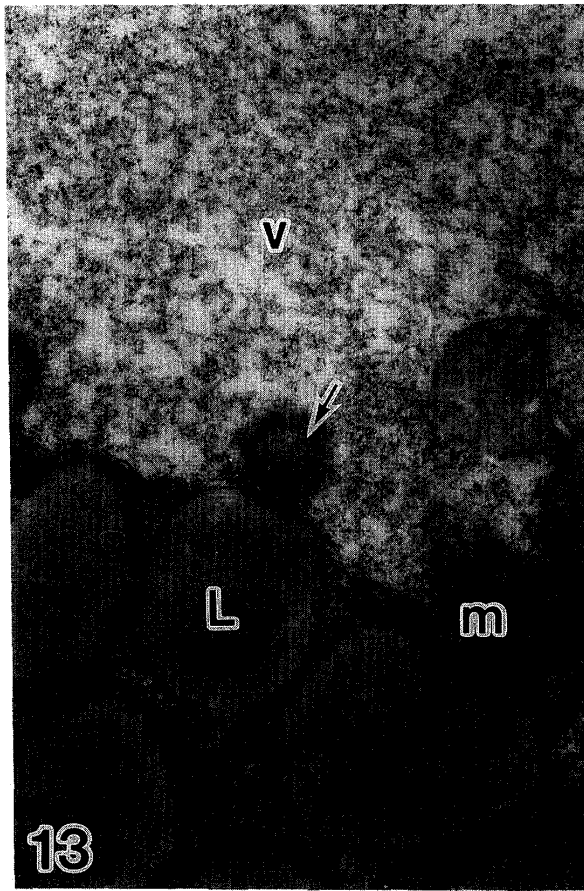
登熟初期のラッカセイ子葉柔細胞では、他の貯蔵物質に先行して脂質の蓄積が認められた。子葉柔細胞内部はソラマメ⁸⁾と同様に直径 40~60 μm におよぶ大型の液胞で満たされていた。大型の液胞と細胞壁の間の細胞質には直径 0.5~1 μm の脂質体が多数認められた (第 1 図, 矢印)。子葉組織の表層部と中心部では、中心部付近の細胞の方が脂質の蓄積がより進行していた。また、脂質の蓄積は中心部付近の細胞とあわせて維管束周辺部の細胞でも顕著であった。

登熟初期から登熟中期にかけての子葉柔細胞では、脂質の蓄積が急速に進行した。脂質体の大きさはほとんどが直径 2 μm で変異は少なかった。脂質の蓄積の開始とほぼ同時に RER の発達も認められた。RER の発達はとくに脂質体の周囲で顕著であり (第 2 図), 所々で網目状に発達した「RER ネットワーク」⁸⁾を形成した。RER が互いに連結した









RER ネットワーク上には直径 $0.1\sim 0.3\ \mu\text{m}$ の小さな顆粒状の構造物が認められた (第 3, 5 図の矢印). 小さな顆粒状の構造物は, RER の末端部あるいは RER と RER の連結部にも認められた (第 5 図の矢印). これら RER ネットワークの発達と RER 上の小さな顆粒状の構造物は脂質の蓄積が盛んな細胞でとくに顕著であった. ラッカセイの RER はソラマメ⁹⁾ で観察された RER と比べると, その表面に微細な突起物や付着物などがあまり認められなかった (第 4 図).

アミロプラストは登熟中期から肥大が急速に開始され, 直径 $5\sim 15\ \mu\text{m}$ にまで達した (第 4 図). アミロプラストの形状はほぼ球形に近く, 突起物などは認められずその表面は滑らかであった.

登熟中期から登熟後期にかけての子葉柔細胞では脂質体の増加が観察された. しかし, 脂質体の大きさは直径約 $2\ \mu\text{m}$ と変わらず, 種子の登熟に伴う脂質体の形態的な変異は認められなかった. 脂質体の量的な増加とともに細胞質では RER の発達がより顕著になった. 発達した RER は所々で互いに融合し, 袋状構造が認められた (第 5~6 図, 矢印). RER の袋状構造は $2\sim 4\ \mu\text{m}\times 1\sim 2\ \mu\text{m}$ で縦長の形

状であった. これまで, この様な RER の袋状構造についての報告例は認められず, 本観察において最初に確認された RER の発達形態であった. 本報では, この RER の袋状構造を「RER ターミナル」と呼ぶことにする. RER ターミナルの表面上には RER ネットワークで認められたのと同様な直径 $0.1\sim 0.3\ \mu\text{m}$ の小さな顆粒状の構造物が観察された. また, RER の一部には末端部が膨らみを帯びた様相も観察された (第 6 図, 矢印).

登熟後期の子葉柔細胞ではデンプンとタンパク質の蓄積が同時に進行した. アミロプラストは最大直径 $20\ \mu\text{m}$ まで肥大し, 子葉柔細胞全体に広く点在した (第 8 図, A). 観察されたアミロプラストは登熟期を通してほぼ球形で形態的な変異は少なかった. 登熟後期になると, 大型の液胞に代わって直径 $10\sim 15\ \mu\text{m}$ の小型の液胞が出現した. 小型の液胞の内部にはタンパク質の蓄積が認められ, 次第に蓄積の密度を高めた. タンパク質の蓄積に伴い液胞は直径 $3\sim 6\ \mu\text{m}$ となり, さらに後に直径 $3\ \mu\text{m}$ の顆粒を形成した (第 7 図の pb). この顆粒はこれまでの観察報告から⁹⁾, タンパク質を多量に蓄積したタンパク顆粒であった. 登熟後期のラッカセイの柔細

Abbreviations used in figures :

A : amyloplasts, L : lipid body, m : mitochondrion, P : plastid, pb : protein body, sg : starch grain, RER : rough endoplasmic reticulum, v : vacuole.

Explanation of figures

Fig. 1-8. Scanning electron microphotographs of cotyledon parenchyma cells.

Fig. 1. Cotyledon parenchyma cell at early maturation stage. Lipid bodies (about $1\mu\text{m}$ in diameter) are observed in cotyledon parenchyma cells. ($\times 2,200$)

Fig. 2. Developed RER network and lipid bodies. ($\times 7,500$)

Fig. 3. Small bodies (dart) on developed RER network. Small bodies were about $0.1\mu\text{m}$ in diameter. ($\times 22,000$)

Fig. 4. Cotyledon parenchyma cell at the beginning of storage starch accumulation. Note RER, lipid bodies and amyloplast (about $8\mu\text{m}$ in diameter) are observed. ($\times 7,500$)

Fig. 5. Lipid bodies and developed RER. Note RER forming to three dimensional network (dart). ($\times 12,000$)

Fig. 6. A part of developed RER having dilated structures (dart). Note dilated structure are forming a part of developed RER networks, and small bodies (dart) on the dilated structure. ($\times 7,500$)

Fig. 7. Fine structure of the cotyledon parenchyma cell at the maturation stage. Note the mature lipid bodies and protein bodies (about $3\mu\text{m}$ in diameter). ($\times 7,500$)

Fig. 8. The cotyledon parenchyma cell at the mature stage. There are observed with lipid bodies and amyloplasts (about $15\mu\text{m}$ in diameter). ($\times 5,200$)

Fig. 9-15. Transmission electron microphotographs of lipid body, plastid, RER in cotyledon parenchyma cells.

Fig. 9. Fine structure of the cotyledon parenchyma cell at early maturation stage. Lipid bodies, developed RER and Golgi body (dart) are observed near the central vacuole in cotyledon cell. ($\times 25,000$)

Fig. 10. Small lipid bodies (about $0.4\mu\text{m}$ in diameter), RER and dividing plastid. ($\times 29,000$)

Fig. 11. The mature lipid bodies, small lipid bodies and developed RER (dart). The asterisk indicated the end of developed RER with small dilated structure. ($\times 20,000$)

Fig. 12. Lipid bodies (about $2\mu\text{m}$ in diameter), vacuole and amyloplasts. Amyloplasts (about $4\mu\text{m}$ in diameter) contained with voluminous starch grains. ($\times 12,000$)

Fig. 13. Fine structure of the cotyledon parenchyma cell during middle maturation stage. Note the protein accumulation (dart) within the subdivided vacuole. ($\times 22,000$)

Fig. 14. Forming small lipid body (dart), mature lipid bodies and long developed mitochondrions. ($\times 16,000$)

Fig. 15. Developing lipid bodies (dart), RER and mitochondrion. The developing lipid bodies are about $0.2\sim 1\mu\text{m}$ in diameter ($\times 16,000$)

胞中には直径 $1\sim 2\mu\text{m}$ の顆粒と直径 $3\sim 4\mu\text{m}$ の顆粒が混在していたが、大きさの違いにより、脂質体とタンパク顆粒であることが明瞭に区別された (第7図の L と pb)。

2. TEM 観察

形成初期の脂質体は細胞壁付近の細胞質に集中し、直径 $0.2\sim 0.8\mu\text{m}$ の球体、もしくは楕円体であった (第9~10図)。脂質体の一部には内部が中空な脂質体も認められた。脂質体の形成とともに脂質体の周辺の細胞質には RER が増加した。RER の発達は細胞壁付近に認められ、第2図の SEM 観察の結果とよく一致した (第11図、矢印)。柔細胞内部にはプラスチドも認められ、大きさは長径

$0.5\sim 1\mu\text{m}$ で、ミトコンドリアよりやや大きく内膜系は未発達であった。プラスチドの一部にはアメーバ状に伸長し、くびれを生じている増殖中のプラスチドも認められた (第10図)。また、プラスチド内部には直径 $0.3\sim 0.5\mu\text{m}$ のデンプン粒が認められ、プラスチド内部へのデンプン蓄積も開始された (第10図、sg)。デンプン粒はプラスチド中央部付近のストロマ中に形成され、単粒で存在した。

登熟中期の維管束周辺部の柔細胞には直径 $0.8\sim 2\mu\text{m}$ の脂質体と直径 $3\sim 5\mu\text{m}$ の単粒のデンプン粒 (sg) を含むプラスチドが数多く観察された (第12図)。登熟中期には柔細胞の大部分を占めていた長径 $40\sim 60\mu\text{m}$ の大型の液胞は、長径 $10\sim 30$

μm の小型の液胞に分割された。分割した小型の液胞内部には微細な不定形、もしくは繊維状のタンパク質が観察された (第 13 図)。登熟が進行すると微細な繊維状のタンパク質はレンズ状もしくは球状に凝集した (第 13 図, 矢印)。レンズ状または球状のタンパク質は液胞内部で直径 $1\sim 3\ \mu\text{m}$ の顆粒状となり、後に液胞が再分割し、小型化してタンパク顆粒を形成した。液胞を中心としたタンパク顆粒の形成過程はソラマメ⁸⁾ で認められた過程とほぼ同じであった。

脂質の蓄積とタンパク質の蓄積が盛んな登熟中期の柔細胞は、ミトコンドリアを多数含み細胞基質は濃厚であった (第 13, 15 図)。登熟中期に観察されたミトコンドリアの一部には、長径 $2\sim 3\ \mu\text{m}$ に達した細長いものも認められた。この細長いミトコンドリアは脂質の蓄積が盛んな登熟中期の柔細胞およびアミロプラスト周辺の細胞質に認められ、とくに維管束周辺の柔細胞内においては多数のミトコンドリアが観察された。

脂質の蓄積と脂質体の形成は、子葉の表層細胞と中心部付近の細胞の間でとくに違いは認められなかったが、中心部付近の細胞の方が早期に脂質の蓄積を終了した。脂質体の大きさは登熟後期においても登熟前期と同様に直径 $1\sim 2\ \mu\text{m}$ のままであり、時間の経過による大きさの変化は TEM 観察でも認められなかった。脂質体周辺の細胞基質が濃厚な部分を TEM 観察すると、RER とミトコンドリア、直径 $0.1\sim 0.4\ \mu\text{m}$ の形成初期の脂質体が観察された (第 14, 15 図)。微小な脂質体は RER の末端部に集中していた。登熟後期になると RER の末端部に集中した形成初期の脂質体は次第に消失し、登熟後期以降にはほとんど見い出せなかった。ゴルジ体は登熟初期から登熟後期まで認められ、とくに登熟中期に最も数多く認められた (第 9 図, 矢印)。

3. 脂質体の固定方法の検討

第 1~15 図は前固定液に、 $0.1\ \text{M}$ シュクロース (第 1~3, 8 図), $0.2\ \text{mM}$ 塩化カルシウム (第 4~6, 9, 12, 13 図), 0.1% マラカイトグリーン (第 7 図), $0.25\ \text{mM}$ 塩化マグネシウム (第 10, 11, 14, 15 図) をそれぞれ添加した。

脂質が多量に含まれる組織を 2 重固定すると、脂質体の一部に収縮が発生した。第 4~6 図は細胞内の膜系を良好に保持するために、塩化カルシウムを添加したものである。RER および RER ネットワークが、シュクロースを添加した固定に比べ良好に

固定された。固定液にマラカイトグリーンを加えると脂質体表面の収縮の発生が抑えられ、球体に近く滑らかな表面の脂質体が観察された (第 7 図)。前固定液に塩化カルシウムおよび塩化マグネシウムを添加した試料を TEM 観察すると、液胞膜と RER が通常の固定液に比べて良好に保持されていた。塩化マグネシウムは細胞小器官などには優れた効果を示したが、シュクロースを添加した試料と比べると脂質体の収縮が大きかった (第 14, 15 図)。

考 察

1. 脂質体の形成と脂質の蓄積

SEM と TEM による観察結果から、登熟期におけるラッカセイ子葉柔細胞の脂質を中心とした貯蔵物質の蓄積は、以下のように進行したと考えられた。

脂質の蓄積はタンパク質やデンプンの蓄積に先行し、登熟の極く初期から開始された。脂質体は登熟期を通してほぼ円形の形状を保ち、大きさは直径 $0.5\sim 2\ \mu\text{m}$ であった。脂質の蓄積は直径 $1\sim 2\ \mu\text{m}$ の脂質体の数が増加することによって進行した。また、脂質体の形成過程においてはくびれや分裂像は認められず、常に個々の脂質体が分離独立した状態で子葉柔細胞中に存在した。脂質体は最初に柔細胞内部の細胞壁付近に形成が認められ、細胞壁付近の細胞質を TEM 観察すると RER と直径 $0.1\sim 0.3\ \mu\text{m}$ の脂質体と推定される微細な顆粒、および中空な顆粒が認められた。この微細な顆粒はスイカ¹³⁾、ナタネ³⁾、ダイズ¹⁾ の登熟中の子葉柔細胞においても同様な報告があることから、形成初期の脂質体あるいは脂質を蓄積する容器の形成像であると考えられた。このような形成初期の脂質体には内部に脂質の蓄積が認められた顆粒と脂質の蓄積が認められない中空な顆粒が認められた。それぞれの顆粒は同じ柔細胞内部に混在し、中空な顆粒は直径 $0.1\sim 0.3\ \mu\text{m}$ の顆粒に多く、RER の周辺部あるいは末端部に集中して観察された。また、形成初期の脂質体の形状は、楕円形もしくは歪んだ円形のものも多く、形状の変異に富むものであった。成熟したラッカセイ種子を観察した Yatsu ら¹⁵⁾ により、脂質体の境界膜は電子顕微鏡の試料調製の際に残存しやすく、境界膜のみを残して中空の脂質体が観察されやすいことが指摘され、同時に脂質体の境界膜の存在が示唆された。また、脂質体は境界膜を有しながら成熟するとした。本報の TEM 観察においても Yatsu

ら¹⁵⁾の報告と同様な境界膜だけが残存した脂質体が観察されたこと、境界膜の残存は成熟した脂質体以外の形成初期の脂質体にも認められたことなどから、登熟期のラッカセイで認められた形成初期の脂質体、および成熟した脂質体には共に境界膜が存在することが確認された。また、Yatsuら¹⁵⁾は脂質体の形成と境界膜の供給、そして脂質の蓄積にはRERが深く関与することも示唆している。

形成初期の脂質体は登熟初期から登熟中期まで継続して観察され、登熟後期以降の細胞質には認められなかった。これは細胞内に蓄積した脂質の蓄積量を調べた結果⁵⁾とよく一致した。脂質体の形成は1細胞当たりの観察数が登熟中期に最大数百個に達したことから、脂質の蓄積は個々の脂質体の容積の拡大によって蓄積を進行したのではなく、登熟中期からの脂質体の形成数による量的な増加によって行われたことが明らかになった。脂質体の量的な増大は種子の登熟中期の短期間に集中して行われ、タンパク質の蓄積⁸⁾、およびデンプンの蓄積過程と比較するとより急速に進行した。急速な脂質体の増大は脂質体の形成数によるものであるが、その由来と形成については、これまでプラスチドから由来する「プラスチド説」²⁾とRERから由来する「RER説」^{3,13,15)}の2説が指摘されてきた。

脂質体の由来と成熟過程については、これまでにニンジン⁹⁾の培養細胞、スイカ¹³⁾、ヒマ⁹⁾、ナタネ³⁾などの種子を対象とした報告がある。脂質体をTEM観察すると内部は登熟期を通して電子密度がうすく均一であり、タンパク質を蓄積したタンパク顆粒の像とは明瞭に異なる。Bergfeldら³⁾は登熟中のナタネの種子を用いてプラスチド付近に近接する形成初期の脂質体をTEM観察した。形成初期の脂質体はプラスチドに極く近い細胞質に出現し、均一で境界膜らしき構造が認められず裸の状態と推定された。その後、脂質体はRERの内側に取り込まれ境界膜を有しながら成熟を迎えるとした「プラスチド説」²⁾を報告した。ラッカセイにおいて脂質体の形成にプラスチドが関与した場合、脂質の蓄積に先行してプラスチドの成熟が行われるはずである。登熟初期のラッカセイ子葉ではプラスチドは直径0.5~1 μm と小さく内膜系も未発達な状態であるため、脂質体の形成に寄与しているとは考えにくい。また、脂質体の形成が登熟の極く初期から先行したこと、プラスチドの増殖が登熟中期~登熟後期に集中したこと、分裂間もないプラスチド内部にデ

ンプン粒の形成が認められ間もなくアミロプラスト化したこと、Bergfeld³⁾らが報告した電子密度の高い小胞がプラスチドの周辺に認められないことなどから、ラッカセイの子葉柔細胞における脂質体の形成はBergfeld³⁾らが提唱したプラスチド説の可能性は低いと考えられた。このため、ラッカセイにおける脂質体の形成にはプラスチド以外の細胞小器官の関与が有力であり、脂質体の量的増加とRERの量的な増加が同時進行したことから、RERが脂質体の形成に密接に関与するRER説の可能性が高いと考えられた。

2. RERと脂質蓄積の関係

脂質の蓄積および脂質体の形成にRERが関与する可能性はこれまでも報告がある^{1,3,13)}。本報ではさらに、登熟初期~登熟中期までのRERの発達様相についていくつかの知見を得た。RERは最初に大型の液胞の周囲および細胞壁付近で認められた。脂質の蓄積の進行とともにRERは急速に発達し、細胞壁に沿うようにしてRERネットワークを形成した。RERネットワークの形成は脂質体周辺にも認められ、RERが脂質体の間を網目状に密に走行している様相が確認された。このようなRERの発達と脂質体の増加は同時進行し、とくにRERネットワークが認められた細胞では急速に脂質の蓄積が進行した。発達したRERネットワークの一部をSEM観察すると、直径0.1~0.3 μm の微細な脂質体が付着している様相が観察された。微細な脂質体は成熟した脂質体が直径1~2 μm であることから推定して、形成初期の段階にあると考えられた。登熟初期から中期になると形成初期の脂質体はRER、RERとRERの連結部、およびRERターミナルに認められ、種子の登熟に従って形成初期の脂質体が増加した。

登熟中期になると形成初期の脂質体はRERターミナルに集中して認められた。RERターミナルの周囲には直径0.3~2 μm の脂質体が観察された。脂質体の形成に関しては、RERの末端部から極く小さい顆粒状の容器が形成され、内部に脂質を蓄積することで脂質体が成熟するとしたRER由来の可能性が有力であった。ラッカセイ種子においてもヒマ⁹⁾、ナタネ³⁾種子と同様に脂質体の形成はRER由来の可能性が示唆されるが、ひとつの柔細胞あたりに数百個の脂質体が集積すること、脂質体の形成が短期間に急速に行われるなどを考慮すると、Wannerら^{13,14)}が提唱したように全ての脂質体が

RERの末端部から形成されたとは考えにくい。RERの末端部以外から脂質体の形成の可能性としては登熟中期から認められるRERターミナルが考えられた。これはRERターミナルの形成と脂質体の形成が時期的にほぼ同時進行したことなどから、RERターミナルと脂質体の形成には密接な関係が推定された。すなわちRERターミナルはRERで生合成された脂質の供給を得て脂質体を形成、あるいは脂質を蓄積する容器の供給の「場」として機能していると推定され、RERターミナルは脂質の蓄積に関与するRERの発達形態であると考えられた。

これまでの報告でもRER末端部において形成初期の脂質体が認められたが、いずれもTEM観察によるものであった。このため2次元的な観察像では脂質体形成の詳細な部位の特定はできず不明な点が多かった。本報で認められたRERターミナルの発達様相の観察は、TEM観察とSEM観察を併用した成果でありO-D-O^{8,10)}法が脂質を多量に蓄積した植物細胞にも有効であることが示された。

以上のように登熟期の脂質の蓄積は脂質体の量的な増加に伴うもので、ラッカセイにおける脂質体の形成にはRERの発達とRERターミナルの密接な関与が明らかになった。ラッカセイの子葉柔細胞においてもソラマメ子葉柔細胞⁹⁾と同様に、RERが貯蔵物質の合成と蓄積に重要な役割を担うことが明らかになった。なお、脂質がRERの膜の間に蓄積したのか、RERの内側に蓄積したのかは明らかではないが、本報のTEM観察により得られた観察像はWannerら^{13,14)}とYatsuら¹⁵⁾の結果とほぼ同様であった。このため脂質はRERの膜の間に蓄積したものと推定されたが、詳細な蓄積過程についてはさらに検討が必要である。

3. デンプンとタンパク質の蓄積

登熟中期から後期になると脂質体の新たな形成はあまり認められず、脂質の蓄積はほぼ完了したと推定された。細胞質では脂質体の形成に代わって液胞中へのタンパク質の蓄積とプラスチド中でのデンプン粒の肥大が開始された。

ラッカセイにおけるプラスチドの発達は、登熟初期にプラスチドの増殖が優先的に行われることで開始された。登熟初期には脂質体の形成とともに、プラスチドの分裂および増殖が盛んに行われた。登熟中期以降になるとプラスチドの分裂および増殖は認められず、デンプン粒が急速に肥大した。デンプン

粒の肥大にともないプラスチドの周辺にはミトコンドリアが数多く隣接していた。ミトコンドリアの形状は通常よりも細長く伸張り内膜系も発達していた。登熟中期以降のデンプン粒の速やかな肥大はプラスチドからアミロプラストへの移行過程が連続的、かつ短期間に進行したことを示していた。また、細長く発達したミトコンドリアがプラスチドからアミロプラストへの移行過程で集中的に観察されたことから、同化産物の輸送と変換に不可欠なATPを短期間のうちにプラスチドに供給するためにミトコンドリアが発達したと考えられた。

登熟中期以降のラッカセイ子葉におけるタンパク質は、液胞に蓄積しタンパク顆粒を形成した。登熟初期の子葉柔細胞の液胞は大型で内容物が少なく、希薄な繊維状の物質が浮遊した状態で認められた。その後、登熟中期に大型の液胞は小型の液胞へと分割・小型化した。液胞内部の状態は希薄なままであった。液胞へのタンパク質の蓄積は登熟中期から後期に急速に開始され、登熟後期に直径4~5 μm のタンパク顆粒が形成された。タンパク顆粒は細胞の切断面当たり10~20個認められた。タンパク顆粒は小型の液胞の消失とほぼ同時に見出された。タンパク顆粒の形成と液胞の消失が時期的に重なることは、ソラマメ⁹⁾のタンパク顆粒の形成と同様に、ラッカセイにおいても、タンパク顆粒の形成が液胞に由来すると考えられた。登熟後期の細胞質には直径0.2~0.3 μm の微細な電子密度の高い小胞が観察された。この電子密度の高い小胞は内部にタンパク質を蓄積したタンパク小胞⁹⁾の一部と推定され、ソラマメと同様にタンパク質の細胞内輸送に関与していると考えられるが、小胞の形成由来についての詳細は明らかでない。これはラッカセイの細胞質が濃厚で電子密度が高くなりやすく、良好な観察像が得にくいためである。ゴルジ体は登熟中期から柔細胞の内部において広範囲に認められた。ゴルジ体の観察数とタンパク質の蓄積が重なることから、ゴルジ体が液胞内部へのタンパク質の輸送に関与する可能性が示唆された。

4. 脂質体の保存に及ぼす添加剤の効果

通常の実験を行うと、脂質体の表面にしわが多く発生した。これは脂質体から細胞質中に脂質が流失したためと推定された。このため、脂質体の良好な観察像を得るためには脂質の流失を極力防ぐことが不可欠と考えられる。本観察においてはマカライトグリーン、塩化カルシウムを添加することで良

好な観察像を得ることができた。とくにマラカイトグリーンを固定液に添加することによって脂質体がほぼ球形に近い状態で観察され、凍結切断で得られる切断構造も良好であった。しかし、RERターミナルなどの微細な細胞小器官の構造観察には不向きであった。これはマラカイトグリーンを添加することにより細胞質が硬化したためと考えられた。マラカイトグリーンを添加した試料は、スパー樹脂で包埋すると重合不良を起こしやすかった。観察試料の調製の容易さも考えあわせると、液胞膜、RERなどの細胞小器官の膜系の保持にも優れた塩化カルシウムの添加が実用的であると判断された。

引用文献

1. Adams, C.A., S.W. Norby and R.W. Rine 1983. Ontogeny of lipid bodies in developing soybean seeds. *Crop Sci.* 23: 757-759.
2. Akazawa, T. and I. Nishimura 1985. Topographic aspects of biosynthesis, extracellular secretion, and intracellular storage of proteins in plant cells. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 441-473.
3. Bergfeld, R., T. Kuhl and P. Schopfer 1980. Formation of protein storage bodies during embryogenesis in cotyledons of *Sinapis alba* L. *Planta* 148: 146-156.
4. Bewley, J.D. and M. Black 1994. *Seeds Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York. 35-115.
5. Herman, E.M. and L.M. Shannon 1985. Accumulation and subcellular localization of α -galactosidase in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 77: 886-890.
6. Herman, E.M. 1987. Immunogold-localization and synthesis of an oil-body membrane protein in developing soybean seeds. *Planta* 172: 336-345.
7. Herman, E.M. and M.J. Chrispeels 1980. Characteristics and subcellular localization of phospholipase-D and phosphatase in mung bean cotyledons. *Plant Physiol.* 66: 1001-1017.
8. 柏葉晃一・松田智明・長南信雄 1988. ソラマメ子葉における貯蔵タンパク質の蓄積に関する微細構造的観察. *日作紀* 64: 717-725.
9. 茅野充男 1991. 物質の輸送と貯蔵. 朝倉書店, 174-180.
10. 松田智明・原 弘道・柏葉晃一・長南信雄 1995. 基質が濃厚な貯蔵細胞の走査電子顕微鏡観察—オスミウス消化法の植物細胞への適用法—. *日作紀* 64: 336-337.
11. 西村いくこ 1987. プロテインボディの形成機構. *蛋核酵* 30: 408-419.
12. Tanchak, M.A. and L.C. Fowke 1987. The morphology of multivesicular bodies in soybean protoplasts and their role in endocytosis. *Protoplasma* 138: 173-182.
13. Wanner, G., H. Formanek and R.R. Theimer 1981. The ontogeny of lipid bodies (spherosomes) in plant cells. *Planta* 151: 109-124.
14. Wanner, G., E. L. Vigil and R.R. Theimer 1982. Ontogeny of microbodies (glyoxysomes) in cotyledons of dark grown watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) seedlings. *Planta* 156: 314-325.
15. Yatsu, L.Y. and T.J. Jacks 1972. Spherosome membranes. *Plant Physiol.* 49: 937-943.