

ヒメジョオンの葉を用いた葉緑体デンプンの観察法

A Simple Method for Observing Chloroplast Starch Granules in Leaves of *Erigeron annuus*

岩 井 草 介*・高 橋 勁 太*

Sosuke IWAI*, Keita TAKAHASHI*

要 旨

中学校の光合成の学習では、植物細胞内の葉緑体に蓄積した同化デンプン粒をヨウ素で染色してから顕微鏡で観察する実験がよく行われる。実験の材料としてはオオカナダモがよく用いられるが、水草であるため、気孔などのような典型的な陸上植物の葉の構造と一緒に観察することは難しい。そこで本研究では、陸生の草本植物であるヒメジョオンやハルジオンの葉を用いて、葉緑体デンプンの簡単な観察法を検討した。その結果、エタノールと酢酸を3:1の割合で混合した固定液で葉を1晩以上固定・脱色してからヨウ素で染色することによって、切片を作らなくても、気孔などの構造と一緒に細胞内の葉緑体デンプンを観察できることが分かった。また、ヒメジョオンの葉の一部を遮光することによって、葉緑体デンプンの蓄積に対する光の影響を調べることもできた。さらにヒメジョオンの葉肉細胞を単離することによって、生きた状態の葉緑体を観察できることも示した。

キーワード：植物 光合成 葉緑体 同化デンプン 教材

1. はじめに

植物の光合成において、二酸化炭素の有機物への固定は、カルビン-ベンソン回路（還元的ペントースリシン酸回路）と呼ばれる反応回路によって葉緑体のストロマで行われる。カルビン-ベンソン回路で固定された炭素は、葉では最終的に2つの異なる有機物に変換される¹⁾。1つは葉から他の器官に輸送するために細胞質で合成されるスクロースであり、もう1つはそのまま葉緑体で貯蔵するために合成されるデンプンである。光合成産物を葉から他の組織・器官に輸送（転流）する場合は、カルビン-ベンソン回路の中間産物である三炭糖リシン酸が細胞質に移動してからスクロース（ショ糖）などの水に溶けやすい物質に変換される。合成されたスクロースは師管を通って体の各部へ転流され、種子やイモなどの貯蔵組織で“貯蔵デンプン”に変換される。一方で光合成速度が大きく転流が間に合わない場合は、カルビン-ベンソン回路の中間産物であるフルクトース6-リシン酸がデンプン合成経

路に入り、そのまま葉緑体で“同化デンプン”として一時的に貯蔵される。この場合、夜には再分解され、スクロースに変換されてから転流される。多くの植物は日中の葉では光合成産物をデンプンの形で貯蔵するが、中にはスクロースの形で貯蔵するものもある。

中学校の理科では、光合成が細胞内の葉緑体で行われることを理解するために²⁾、葉緑体内に蓄積した同化デンプン粒（以降葉緑体デンプンと呼ぶ）をヨウ素デンプン反応で染色して顕微鏡で観察する実験がよく行われる。葉緑体デンプンを観察するための材料としては、オオカナダモがよく用いられている³⁾。オオカナダモ (*Egeria densa*) はトチカガミ科の沈水植物（水草の生育形の1つ）で、南アメリカ原産の帰化植物である⁴⁾。葉の大部分が2層の細胞からなるため、切片を作らなくても顕微鏡でそのまま葉の細胞内を観察できるという利点がある⁵⁾。ホームセンターなどで入手も容易であり、栽培も比較的容易である。一方では沈水植物であるため、葉に発達した表皮や気孔が存在せず⁴⁾、それまでに学習した典型的な陸上植物の葉の構造と関

*弘前大学教育学部理科教育講座

Department of Biology, Faculty of Education, Hirosaki University

連付けることは難しい。そのため、葉緑体デンプンの観察実験において、細胞内の葉緑体デンプンが比較的簡単に観察できて、しかも典型的な植物の葉の構造も同時に確認できる材料があれば有用と思われる。

そこで本研究では、陸生の草本植物の葉で葉緑体デンプンを観察することをめざして、道ばたなどでもよく見かける雑草のヒメジョオンを材料として、葉緑体デンプンの簡単な観察法を検討した。ヒメジョオン (*Erigeron annuus*) はキク科の1～越年草であり、元は北アメリカ原産の帰化植物であるが現在では日本各地で見られるようになっている。茎葉は薄く縁に毛があり、花は6～10月に付ける⁶⁾。葉肉には柵状組織や海綿状組織、表皮には気孔といった構造も備えている⁷⁾。本研究でヒメジョオンや同属のハルジオン (*Erigeron philadelphicus*) の葉を用いて葉緑体デンプンの観察法を検討した結果、エタノールと酢酸を3：1の割合で混合した固定液で葉を1晩以上固定・脱色してからデンプンをヨウ素液で染色することによって、切片を作らなくても、顕微鏡で気孔などの構造と一緒に葉緑体デンプンを比較的簡単に観察できることができた。また発展実験として、野外に生えているヒメジョオンの葉の一部を遮光することによって、同化デンプンの蓄積に対する光の影響を調べることもできた。さらに、ヒメジョオンの葉肉細胞を単離することによって、脱色していない生きた状態の葉緑体を観察することも可能であった。以下では、それらの実験方法と結果について述べる。

2. 実験方法と結果

2-1 ヒメジョオンとハルジオンの葉の葉緑体デンプンの観察

切片を作らずにヒメジョオンやハルジオンの葉の葉緑体デンプンを顕微鏡で観察するために、まず葉を固定・脱色する方法を検討した。実験に用いた葉は全て大学キャンパス内で採集した。快晴の日に、草の上の方についている若くて柔らかい茎葉で、かつ太陽光がよく照射しているものを選んで採取し、その日のうちに固定処理を行った。固定の方法を検討した結果、エタノールと酢酸を3：1の割合で混合した固定液（ファーマー液）に葉を沈めて1晩以上室温で静置することによって、ヒメジョオン・ハルジオンとともに十分に脱色されることが分かった（図1A）。固定の時間がこれより長くなても後述の観察結果はほとんど変わらず、むしろ長いほどよく脱色されるようであった。

固定時の温度を室温にした場合と4°C（冷蔵庫）にした場合でも結果はほとんど変わらなかったが、長期間固定・保存する場合は冷蔵した方がよいかもしれない。

固定・脱色した葉を用いてヨウ素デンプン反応による染色を行った。まず余分な固定液を除くために、葉をミネラルウォーターに入れて洗った。洗った葉をシャーレなどに広げるように置いてから（後の作業がやりやすいようにこの時点で数mm程度の大きさに切ってもよい）、5%ヨウ素/10%ヨウ化カリウム水溶液（保存用）をミネラルウォーターで5～10倍に希釈した染色液を、葉が全て浸るように加えた（図1B）。ヨウ素を希釈しすぎると染色の効率が落ちたが、逆に濃すぎるとヨウ素液の色が試料に残りやすくなつた。適切な希釈率は試料によって異なるようだったので、実験の度に検討した方がよいかもしれない。染色液を加えて10分間置いたところ、葉の全体が肉眼でも十分確認できる程度に染色された（図1B）。染色後は余分な染色液を除くために、ミネラルウォーターに入れて10分間以上置いた（図1C）。なお固定・脱色の時間を短縮することを狙って、ヒメジョオンについては葉を同じ固定液に浸けて80°Cで10分間置く方法も試みたが、この場合は細胞全体が強く染色されて以下の葉緑体デンプンの観察は難しくなつた。

ヨウ素デンプン反応で染色した葉を顕微鏡で観察するために、洗った葉から解剖バサミで大きさ数mm程度の小片を切り取ってスライドガラスに載せた。ミネラルウォーターを数滴程度補ってから、上からそのままカバーガラスをかけてプレパラートを作成し（図1D）、生物顕微鏡（本研究はオリンパスのCH30を使

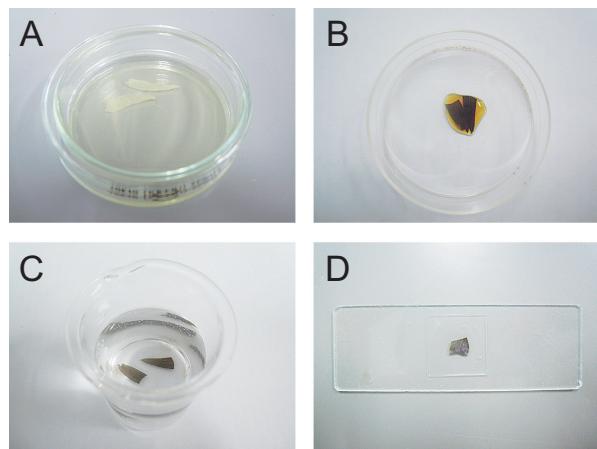


図1. ヒメジョオンの葉の固定・染色・標本作成操作。A, 葉の固定・脱色。写真は固定液に浸して2晩置いたもの。B, 固定した葉の染色。写真は10分間染色した後の葉。C, 染色した葉の洗浄。D, 染色した葉を用いて作成したプレパラート。

用)で観察した。ヒメジョオンの葉は、比較的薄いものの、オオカナダモとは異なり複数の組織が重なる構造をしている⁷⁾。そこで切片を作らずに葉の内部を観察するために、顕微鏡による細部の観察およびデジタルカメラによる写真撮影は、焦点の合う観察面の厚みがなるべく浅くなるように、ほとんどの場合コンデンサ絞り(開口絞り)を完全に開いた状態で行った⁸⁾。

染色したヒメジョオンの葉を40倍の対物レンズを用いて観察したところ、葉肉細胞内に紫色に染まったデンプン粒の存在が確認された(図2A)。他のさまざまな草本植物の細胞内における葉緑体デンプンの局在⁹⁾と同様、細胞周縁部の複数の領域が強く染色されていたことから、染色された領域は概ね葉緑体に相当すると考えられる。なお通常1つの葉緑体には複数のデンプン粒が存在するが、本研究の観察ではその判別は難しかった。観察領域を大きく変えなくても焦点の合う面を変えるだけで、複数の葉肉細胞の重なりや表皮を観察することができた。表皮細胞はジグソーパズルの

ような形をしており、孔辺細胞以外の表皮細胞には葉緑体デンプンは全く存在しないことが確認できた(図2B)。一方で気孔を囲む1対の孔辺細胞内には、葉緑体デンプンが観察された(図2C)。ハルジオンの葉についても同様に固定・染色を行ったところ、ヒメジョオン同様に気孔と一緒に葉緑体デンプンを観察することができた(図3)。いずれの植物も、光がよく当たっていなかった葉ではデンプンの染色が少ないとわかった。

2-2 同化デンプンの蓄積に対する光の影響

同化デンプンの蓄積に対する光の影響を調べるために、ヒメジョオンの葉の一部をしばらく暗条件に置いてから、葉を固定・染色して葉緑体デンプンの観察を行った。葉の一部だけを暗条件に置くために、大学のキャンパス内に生えているヒメジョオンの葉の先端側の半分にアルミニウム箔を巻きつけてゼムクリップで留めることによって、半分だけ遮光した。その状態で

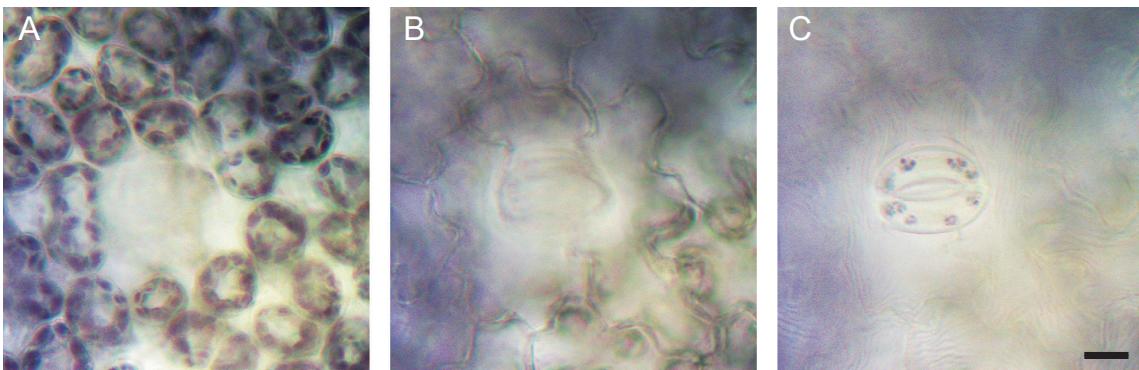


図2. ヒメジョオンの葉の葉緑体デンプンの顕微鏡観察。A, 葉肉細胞に焦点を合わせた場合。B, 表皮細胞に焦点を合わせた場合。C, 気孔(孔辺細胞)に焦点を合わせた場合。A, B, C間で水平方向の位置は変えず、光軸方向の位置のみ変更している。生物顕微鏡CH30(オリンパス)で40倍の対物レンズを用いて観察し、USBカメラWRAYCAM-G900(レイマー)で写真を撮影した(図3, 4, 5も同様)。画像をPCに取り込み、Photoshop Elements(Adobe)を用いて明るさとコントラストを調整した(図3, 5も同様)。スケールバーは10 μm。

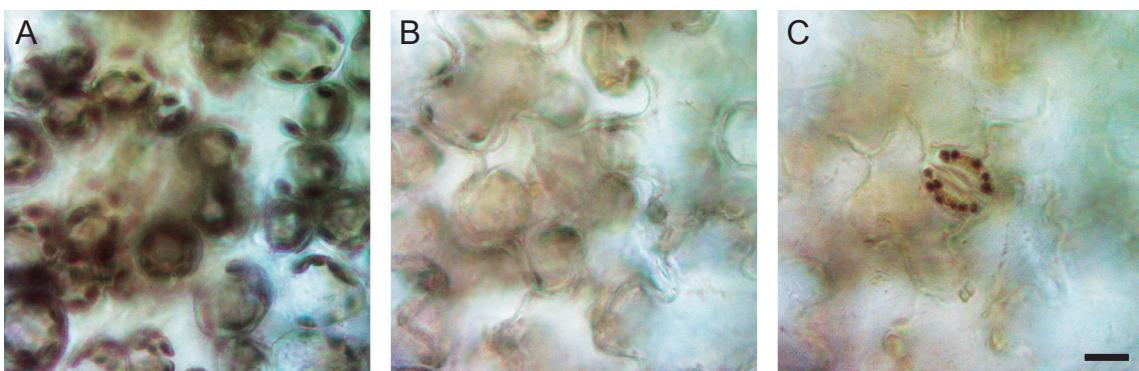


図3. ハルジオンの葉の葉緑体デンプンの顕微鏡観察。A, 葉肉細胞に焦点を合わせた場合。B, 表皮細胞に焦点を合わせた場合。C, 気孔(孔辺細胞)に焦点を合わせた場合。A, B, C間で水平方向の位置は変えず、光軸方向の位置のみ変更している。スケールバーは10 μm。

2日間晴天の日に放置することによってもう半分には確実に光が当たるようにしてから、葉を採取して前項と同様に固定・染色した。ヨウ素液による染色の結果、暗条件と光条件では染色の程度が異なることが肉眼でも十分に確認できた(図4A)。それぞれの領域を顕微鏡で観察したところ、暗条件と光条件では葉肉細胞内の葉緑体デンプンの量も大きく異なることが確かめられた(図4BとD)。暗条件の葉緑体は、デンプンの染色は弱かったものの、固定液によって脱色されているため緑色はほとんど失われていた。一方で気孔を囲む孔辺細胞では、2つの条件で葉緑体デンプンの量に大きな差はないようだった(図4CとE)。なお、葉をアルミニウム箔で覆って1日だけ晴天の日に置いた場合は、2日間覆った場合よりも暗条件で残存している葉緑体デンプンの量が多くなった。以上より、ヒメジョオンの葉の一部を遮光して2日間置くことによって、同化デンプンの蓄積に対する光の影響を明らかにできることが分かった。

2-3 ヒメジョオンの葉肉細胞の単離と観察

前項の結果から、いったん葉を固定・脱色すると、

緑色の葉緑体を観察することは難しいことが分かった。切片を作らずに生きた状態の葉緑体を観察するために、まずヒメジョオンの生葉をそのまま顕微鏡で観察することを試みたが、細胞内の葉緑体を観察することは難しかった。そこで、正元らがヒヤクニチソウの葉の細胞を単離した方法¹⁰⁾を参考に、ヒメジョオンの葉から葉肉細胞を単離することを検討した。採集した生葉より5mm角程度の小片を切り取ってマイクロチューブに入れ、ミネラルウォーターを50μL加えてから液が緑色に着色するまでマイクロピペット用のチップの先で押しつぶして、細胞懸濁液を調製した。懸濁液をスライドガラスに滴下してからカバーガラスをかけて観察したところ、単離された葉肉細胞が多数観察された(図5A)。葉肉細胞内には、緑色の葉緑体を確認することができた。葉緑体は、1つの細胞に数十個以上あり、細胞質全体に分布しているようだった。さらに細胞懸濁液に2-1項と同様のヨウ素液を加えてから観察したところ、葉緑体デンプンがよく染色された(図5B)。

単離した葉肉細胞の核を観察するために、酢酸オルセインによる染色を行った。2-1項の方法で固定・脱

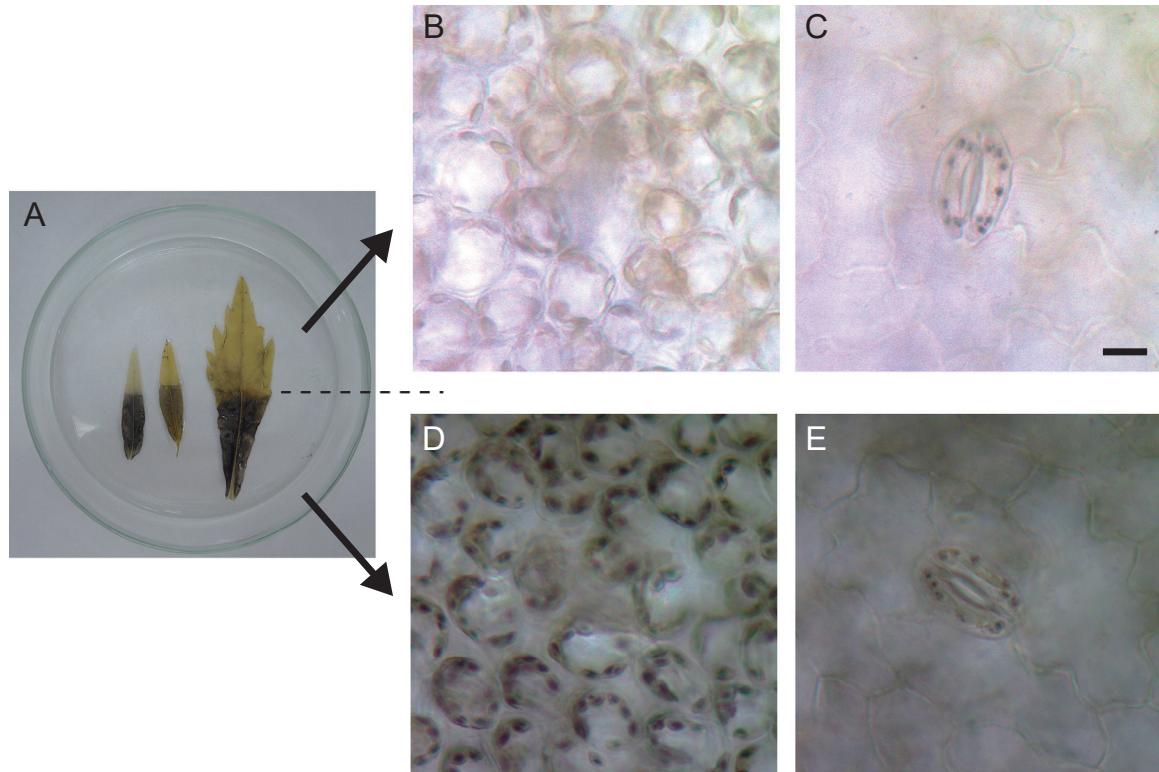


図4. 半分をアルミニウム箔で覆ったヒメジョオンの葉の葉緑体デンプンの顕微鏡観察(顕微鏡写真はB～E)。A、先端側半分をアルミニウム箔で覆ったヒメジョオンの葉の染色。B、覆った領域の葉肉細胞。C、覆った領域の孔辺細胞。D、覆わなかった領域の葉肉細胞。E、覆わなかつた領域の孔辺細胞。この図の顕微鏡写真については、全て同一のハロゲンランプ光強度・コンデンサ絞り・カメラ設定の条件で撮影し、画像処理は行っていない。D, Eの背景が暗いのは、焦点面以外のデンプン染色の情報も入り込んでいることによる。顕微鏡写真のスケールバーは10 μm。

色した葉から一部を切り取り、酢酸オルセイン溶液に浸して染色してから前述のように細胞を単離した。単離細胞を観察したところ、核以外に葉緑体も酢酸オルセインによって染色される傾向があったため、核を識別することは難しかった（図5C）。そこで、ヒメジョオンの葉肉細胞内における核や葉緑体の位置を確定するために、細胞懸濁液に終濃度5 μMになるようにDAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）を加えて核DNAを蛍光標識してから、蛍光顕微鏡（オリンパス；BX51+落射蛍光システム）で観察した。核のDAPI蛍光および葉緑体クロロフィルの自家蛍光をそれぞれ観察したところ、細胞の中央部に1個の核、周縁部に多数の葉緑体があることが確かめられた（図6）。この項をまとめると、ヒメジョオンの葉肉細胞を単離することによって、緑色を保持した葉緑体を観察することができた。また、ヨウ素液によって葉緑体デンプンを染色することもできた。ただし酢酸オルセインによる核の染色と観察は、葉緑体もオルセインによって染色される傾向があるため難しいことが分かった。

3. 考察

本研究では、陸生の草本植物であるヒメジョオンやハルジオンを用いて、葉緑体に蓄積された同化デンプン粒を観察する方法を検討した。その結果、エタノールと酢酸を3：1の割合で混合した固定液（ファーマー液）でこれらの葉を1晩以上脱色・固定してからヨウ素液で染色することにより、切片を作らなくても細胞内の葉緑体デンプンを顕微鏡で観察することができた。さらに、顕微鏡の焦点の合う面を変えることによって、葉肉細胞外にも、表皮や、気孔を囲む孔辺細胞とその葉緑体デンプンも観察することができた。葉は晴天の日に採集する必要はあるが、一度そのような日に採集して固定しておけば、観察実験はいつでも行うことができる。以上より、ヒメジョオンやハルジオンは、葉緑体デンプンを観察するための材料の一つとして有用であると言える。なお脱色の時間を短縮するために高温で固定する方法も試みたが、この場合は細胞内全体が強く染色されて葉緑体デンプンの観察は難

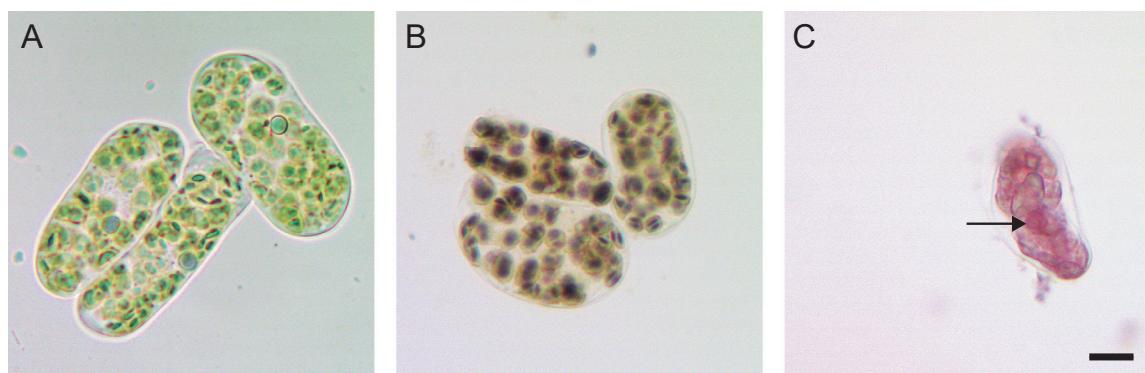


図5. 単離葉肉細胞の明視野顕微鏡観察。A, 無染色試料。B, ヨウ素染色試料。C, 酢酸オルセイン染色試料。Cの矢印は核と思われる構造を示す。スケールバーは10 μm。

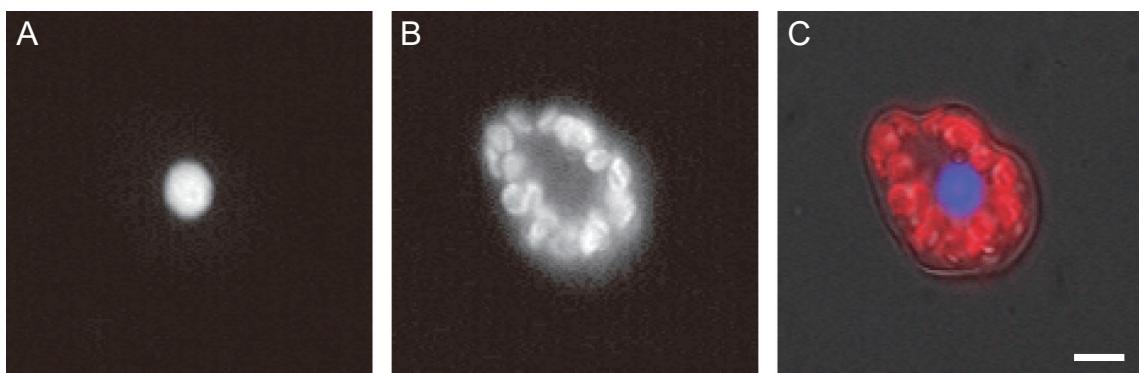


図6. 単離葉肉細胞の蛍光顕微鏡観察。A, 核を示すDAPI染色像。B, 葉緑体を示すクロロフィルの自家蛍光像。C, AとBにさらに明視野像を合成した画像。ImageJ (<https://imagej.net/ij/>) を用いて、DAPI染色像を青色、クロロフィル像を赤色、明視野像を灰色でそれぞれ擬似カラー表示してから合成した。蛍光顕微鏡（オリンパス；BX51+落射蛍光システム）で40倍の対物レンズを用いて観察し、モノクロCCDカメラWAT-120N+（ワテック）で写真を撮影した。スケールバーは10 μm。

しくなった。熱によって葉緑体膜が破壊されて同化デンプンが細胞全体に拡散してしまったのかもしれない。この結果から、少なくともヒメジョオンでは、高温での固定・脱色は肉眼で同化デンプンを確認する実験にのみ用いるべきであることが分かった。

発展的な実験として、野外のヒメジョオンの葉の半分をアルミニウム箔で遮光し、晴天の日に2日間置いてから採集して葉緑体デンプンを観察することによって、葉肉細胞の葉緑体デンプンの量が光の条件によって異なることを確かめることができた。葉の一部を遮光することによって同化デンプンの量の違いを確認する実験は多くあるが、それらは肉眼によるものがほとんどである。本研究ではヒメジョオンを用いることによって、それを葉緑体デンプンの量の違いとして顕微鏡観察で確かめることができた。一方で孔辺細胞については、光の条件によって葉緑体デンプンの量にはほとんど差が見られなかった。一般に孔辺細胞の葉緑体は、葉肉細胞の葉緑体とは異なる独自の代謝バランスを維持しており、暗条件でデンプンを蓄積して光が当たると分解することが知られている¹¹⁾。ヒメジョオンの葉の孔辺細胞もそのような特性を示したのかもしれない。

葉を固定・脱色してから観察する実験の欠点として、生きた緑色の葉緑体を観察することはほとんど不可能になる。そこでヒメジョオンの葉緑体を生きた状態で観察するために、正元ら¹⁰⁾を参考に葉から葉肉細胞を単離したところ、単離した細胞ではクロロフィルの緑色を保持した葉緑体を観察することができた。さらにその葉緑体は、ヨウ素液で容易にデンプンを染色することができた。葉肉細胞を単離する実験方法は、葉の内部構造を観察することはできないものの、緑色の葉緑体を観察してから葉緑体デンプンを確認するという通常の実験方針に対しては有効と考えられる。単離した細胞の核を酢酸オルセインで染色することも試みたが、葉緑体も染色されてしまうため、核の観察は難しかった。葉緑体が染色されたのは、オルセインによってデンプン粒もある程度染色されるためかもしれない¹²⁾。蛍光顕微鏡を用いた観察によって、ヒメジョオンの葉肉細胞内では核の周りを多数の葉緑体が取り囲んでいることが確かめられた。そのため、オルセインによって葉緑体も染色されると核の観察は難しくなると言える。

注

- 1) 東京大学光合成教育研究会（編）（2007）『光合成の科学』（東京大学出版会）；日本光合成学会（編）（2021）『光合成』（朝倉書店）など
- 2) 文部科学省（2018）『中学校学習指導要領（平成29年告示）解説 理科編』p.87–88.
- 3) 正元和盛、武市稜子、坂田孝久、西田成一（2015）「葉緑体デンプン観察のためのオオカナダモ葉・ヒヤクニチソウ葉細胞の素材開発と理科教員実技研修での活用」『熊本大学教育実践研究』32: 39–49; 渡邊りな、山下修一（2016）「オオカナダモによる光合成でのデンプン検出実験の改善」『千葉大学教育学部研究紀要』64: 205–208; 佐野（熊谷）史、西澤太勝（2019）「オオカナダモの同化デンプン検出における前処理の効果について」『群馬大学教育学部紀要 自然科学編』67: 49–53など
- 4) 角野康郎（2014）『ネイチャーガイド 日本の水草』（文一総合出版）
- 5) 今堀宏三・山極隆・山田卓三（編）（1985）『生物観察実験ハンドブック』（朝倉書店）
- 6) 門田裕一（他）（2015）「キク科」『改訂新版 日本の野生植物5』（大橋広好他編）（平凡社）
- 7) Dani, M., Molnar, P., Skribanek, A. (2021) The sensitivity of herbaceous plants to light pollution. *Acta Universitatis de Carolo Eszterházy Nominatae. Sectio Biologiae. Tom. XLVI.* pp. 173–181.
- 8) 上村慎治（1998）「第1章 光学顕微鏡入門－虫眼鏡から超顕微鏡へ」『バイオイメージング』（曾我部正博・白倉治郎編）（共立出版）
- 9) Ichikawa, S., Sakata, M., Oba, T., Kodama, Y. (2024) Fluorescein staining of chloroplast starch granules in living plants. *Plant Physiol.* 194(2): 662–672.
- 10) 正元和盛、松茂良美穂、竹市稜子（2015）「葉緑体デンプン観察のためのオオカナダモの代用としての陸上草本植物葉細胞」『熊本大学教育学部紀要』64: 317–322.
- 11) 桐原淳太郎、小畠智暉、宋普錫（2021）「気孔細胞に存在する葉緑体の成り立ちとその機能」『植物科学最前線』12: 38–44.
- 12) Molero, M.L., Castillo, P.D., Stockert, J.C. (1986) Fluorescence reactions of orcein: new applications for an old stain. *J. Microscopy* 144(1): 45–53.

謝辞

本研究を行うにあたり実験に協力いただいた一戸愛加氏・佐藤龍心氏・鈴木大生氏（当時弘前大学教育学部）に感謝します。

（2024. 8.30 受理）