チャ葉からの葉肉細胞、表皮組織 及び維管束組織の分離法

静岡大学農学部

久保井 徹・寺尾 玲子

(平成5年7月12日受理)

Isolation of Mesophyll Cells, Epidermis and Vascular Tissues from Tea Leaves

Toru KUBOI and Reiko TERAOKA

Faculty of Agriculture, Shizuoka University

A method for isolating palisade and spongy parenchyma, upper and lower epidermis, and vascular tissues from tea leaves was established. Leaf pieces were incubated with a hypertonic medium containing Macer-ozyme and Pectolyase at room temperature for 1 hr (young leaves) to 10 hr (old leaves). The leaf pieces were separated into upper and lower epidermis and vascular tissues. Mesophyll cells adhered to these tissues were released by soft brushing: Palisade and spongy cells were isolated from upper epidermis and the other two parts, respectively. Most of the isolated cells were morphologically intact. Based on 1 g of fresh leaf, mean number of cells contained in the fractions of upper and lower epidermis, and palisade and spongy cells were 10, 9, 5, 23 and 26 millions, respectively. Purity of the palisade and spongy fractions were 90 - 98 %. The epidermal fractions were practically pure. Concerning to the vascular fraction, bundle sheath cells could not be distinguished from mesophyll cells contaminated to this fraction. The estimated number of chloroplast containing cells in the vascular fraction was $8 \cdot 10^6/\text{g}$.

1. 緒 言

チャ (*Camellia sinensis* (L.) O. KUNTZE) 葉内における成分や酵素の局在性を調べることは、チャの品質を向上させ、また生理機能を理解する上で重要である。これまでに、組織化学的方法によって全カテキンやポリフェノールオキシダーゼの局在性が検討された例¹⁾はあるものの、カテキン類や各種アミノ酸などの葉組織内分布を分子種毎に測定することは不可能であった。

葉組織を葉肉細胞、表皮組織及び維管束組織に分離できれば、それぞれを分析することが可能になる。酵素的にさく状組織と海綿状組織の細胞を分離する方法はタバコ²⁾で報告

されて以来、いくつかの植物では行われているが、チャのように表皮をはがしにくい植物では極めて困難とされていた。しかしながら、適当な条件で細胞間に存在する多糖類の分解酵素を作用させることにより、組織の分離は行えるはずである。青木³⁾は葉を細断後、酵素的に葉肉細胞を単離してその光合成能を測定しており、また著者ら⁴⁾はチャのプロトプラストを得る過程で表皮組織を酵素処理によって除去しているからである。

そこで、チャ葉を構成する各組織を、酵素処理によって分離する方法を検討した。

2. 材 料 と 方 法

2. 1 植物材料

保温ガラス室内で水耕栽培⁵⁾した‘やぶきた’の若葉と成熟葉、および古葉を用いた。ここで‘若葉’は葉長4～5 cmの展開中の黄緑色の葉を、‘成熟葉’は展開を終了して緑色となった葉を、また‘古葉’は前回の萌芽期に展開した暗緑色の葉を言う。

2. 2 葉組織の分離方法

成熟葉からのプロトプラスト調製法⁴⁾を参考にして、以下の方法を標準的に用いた。酵素液 [1.5% (w/v) マセロザイム R 10 (ヤクルト), 0.1% ペクトリアーゼ Y S (盛進製薬), 0.5% デキストラン硫酸カリウム, 10 mM アスコルビン酸ナトリウム, 10 mM Mes-NaOH (pH 6.0) を含む 1.2 M ソルビトール] 10 ml に、中肋と縁を剃刀で除いた葉約 500 mg を浸した。減圧して酵素液を組織内に浸潤させた後、室温で1時間(若葉)～10時間(古葉)静置した。先の鋭いピンセットで上側と下側の表皮をはがし、さく状組織の細胞は上側表皮から、また海綿状組織の細胞は下側表皮と維管束組織から筆で静かに遊離させた。

これらの葉肉細胞は、1000 rpm で2分間遠心分離して沈降させ、これを洗浄液(マセロザイムとペクトリアーゼを含まない‘酵素液’)に懸濁させて再び遠心分離した。表皮組織と維管束組織も洗浄液ですすいで酵素を除いた。

2. 3 細胞数の計測と健全度の判定

葉肉細胞は、血球計算盤を用いて計数した。表皮細胞は、顕微鏡下で一定面積当りの数をかぞえた。酵素処理に供した葉片の新鮮物重量および葉面積から、単位重量または単位面積当りの数に換算した。

遊離葉肉細胞のうち、光学顕微鏡下で細胞壁が完全に残り、かつクロロプラストが均一に分布しているものを健全であると判定した。なお、さく状組織細胞は、その長径/短径比が平均3.2、標準偏差が0.6であり、海綿状組織細胞の値(1.3±0.2)とは全く異なっているため、両者は容易に区別できた。

2. 4 クロロフィル量の測定

1枚の葉を四分し、上下の各1/4の組織を分離した。各分離組織と、残り1/2の未分離葉組織をメタノール中で磨砕し、遠心上清の吸光度⁶⁾からクロロフィルの全量およびa/b比を求めた。

3. 結 果

3. 1 分離条件の検討

組織の分離は2.2項に述べたように高浸透圧下で行う必要があり、浸透圧調節物質を添加しない場合には酵素液中に多数のクロロプラストが認められた。浸透圧調節物質はソルビトールのほかにグリセロールでも代替可能であった。実験は葉内の浸透圧が高まる12月～1月に主として行ったため1.2 Mが適当であったが、その後の検討により、4～5月には0.8 Mでも良好な結果が得られた。室温で静置して酵素反応を行わせるかわりに30°Cで振とうすると、反応時間を大幅に短縮できる反面、葉の状態に応じた最適の時間を厳密に調整しないと酵素液が褐変し、青臭さを生じた。

3. 2 分離組織の純度

成熟葉から分離したさく状組織細胞の画分(写真1A)には細長い細胞が多く、海綿状組織細胞の画分(写真1B)には不定形の細胞が圧倒的に多かった。顕微鏡観察により、大多数の細胞は健全と判断した。上側表皮(写真1C)と下側表皮(写真1D)には、表皮細胞数の0.4～1.0%に相当する葉肉細胞が付着していた。維管束組織を構成する維管束鞘細胞と葉肉細胞を区別することはできなかったため、この画分への葉肉細胞の混入率は不明である(写真1E)。有機酸塩と思われる結晶を含有する細胞は、維管束組織画分に多かった。

3枚の成熟葉から分離を行った結果(表1)、さく状組織細胞画分への海綿状組織細胞の、また海綿状組織細胞画分へのさく状組織細胞の混入率は2～10%であることが判明し

た。若葉では、両葉肉細胞画分への異細胞混入率が20~30%程度と高く、また組織が軟弱であるために手間がかかった。

次に分離した各組織の特徴をクロロフィル含有量の面から検討した(表2)。未処理葉のクロロフィル量 (mg/g) は、さく状および海

綿状組織細胞画分中の量の合計値とほぼ一致したが、表皮組織と維管束組織にもクロロフィルは検出された。上側表皮組織の細胞にはクロロプラストが存在しないため、葉肉細胞がわずかに付着していることを示している。ただし、表皮組織抽出液の可視部スペク

写真1 チャの成熟葉から得たさく状組織細胞(A)、海綿状組織細胞(B)、上側表皮(C)、下側表皮(D)及び維管束組織(E)

表1 分離したさく状細胞と海綿状細胞画分への他の細胞の混入率

実 験	異細胞混入率 (%)	
	さ く 状 細胞 画 分	海 綿 状 細胞 画 分
1	6.2	3.6
2	9.5	2.3
3	4.3	3.3
平均値	6.7	3.1
標準偏差	2.2	0.6

表2 各分離組織のクロロフィルの含有量 (mg/g)

組 織	古 葉	成熟葉	若葉
さく状組織細胞	2.09±0.18*	0.93±0.29	2.59**
海綿状組織細胞	1.74±0.31	1.05±0.01	—
上側表皮	0.11±0.06	0.12±0.03	0.04
下側表皮	0.04±0.01	0.12±0.03	0.11
維管束	0.30±0.06	0.32±0.17	n.d.
合 計	4.26±0.12	2.54±0.11	2.73
未処理葉	3.64±0.14	2.02±0.60	3.03

* : 平均値±偏差 (2 連)

** : 葉肉細胞 (さく状組織細胞と海綿状組織細胞)

n.d. : 測定せず

表3 分離葉肉細胞のクロロフィル a/b 比

組 織	古 葉	成熟葉	若葉
さく状組織細胞	0.355±0.002*	0.300±0.012	0.320**
海綿状組織細胞	0.364±0.006	0.367±0.005	—
未処理葉	0.314±0.006	0.325±0.000	0.315

*, **: 表2を参照

トルは典型的なクロロフィルのものと異なっており、測定値の信頼性には疑問が残る。維管束組織画分に含まれる柔細胞数は、クロロフィル量から平均 $8.1 \cdot 10^6$ 個/g と推定した。

クロロフィル a/b 比 (表3) は古葉、成熟葉ともにさく状組織細胞の方が海綿状組織細胞より小さく、細胞の形態だけでなくクロロフィル組成の面からも葉肉細胞を2種に分離できていることを示している。さく状組織細胞にクロロフィルbが多いことは、光の利用効率と関連していると考えられる。

3. 3 各分離組織に含まれる細胞数

成熟葉の供試片 (主脈と葉縁を除く) 1 g 当りに含まれる細胞数を分離組織ごとに計測した (表4)。10枚の葉片について得た値 (表皮は4枚) から、さく状組織細胞と海綿状組織細胞は $2 \cdot 10^7$ 個/g 強、両側の表皮には $1 \cdot 10^7$ 個/g 前後存在することがわかった。葉 1 cm² 当りのさく状、海綿状組織細胞、上下表皮の平均細胞数は、それぞれ 3.5, 4.2, 1.8, 1.7 · 10⁶ 個と計算された。

表4 成熟葉から分離した組織の細胞数

(10⁷個/g)

実 験	さく状組織細胞	海綿状組織細胞	上側表皮	下側表皮
1	1.55	1.63	1.03	1.16
2	2.05	2.50	0.91	0.88
3	1.87	2.89	1.14	0.93
4	2.28	n.d.	0.97	0.82
5	3.25	3.22	n.d.	n.d.
6	2.28	3.37	n.d.	n.d.
7	2.37	2.45	n.d.	n.d.
8	3.46	2.91	n.d.	n.d.
9	1.54	1.80	n.d.	n.d.
10	2.58	2.94	n.d.	n.d.
平均値	2.32	2.63	1.01	0.95
標準偏差	0.61	0.57	0.08	0.13

n.d. : 測定せず

4. 考 察

今回の実験に用いたチャは水耕栽培を行っており、野外に栽培されているチャに比べて葉が薄く、葉面積が大きい。それゆえ、面積当りの葉肉細胞数は野外栽培のものより少なく、さく状組織細胞と海綿状組織細胞との構成比も野外のものと異なっていると思われる。形態観察とクロロフィル含有量から、分離組織 (細胞) はかなり完全な状態で得られていると考えられるが、生理的状態について

はさらに検討を要する。

葉を構成する各組織の分離は、C₄型光合成植物における維管束鞘細胞の役割⁷⁾などの有用な情報を提供してきた。チャ葉組織間でカフェインやカテキン、アミノ酸、糖などの成分がどのように分布しているかを明らかにできれば、高品質の茶を生産するための栽培や育種、および製茶工程の改善に役立つと思われる。著者らは、エピガロカテキンとエピカテキンガレートが特に上側表皮に多いこと、アルギニンは維管束に、テアニンはさく状組織細胞に多いことなどの予備的分析結果も得ている。充分な検討を行った上で、これら成分の測定結果を報告する予定である。

5. 摘 要

チャの葉組織を構成する上下の表皮、さく状組織細胞、海綿状組織細胞と維管束とを以下の手順で分離した：1) 葉片をマセロザウムやペクトリアーゼ等を含む分離液に1～10時間(若い葉ほど、短時間)浸漬、2) 上下の表皮をピンセットではがす、3) さく状組織細胞は上側表皮から筆で遊離させる、4) 同様に、海綿状組織細胞は下側表皮と維管束から遊離させる。単離した組織(細胞)は形態的に健全であった。上下の表皮、さく状および海綿状組織細胞は、それぞれ1gの葉片あたり平均10, 9.5, 23, 26×10⁶個含まれていた。両葉肉細胞画分への異細胞混入率は2～10%だった。表皮組織には葉肉細胞はほとんど付着していなかった。維管束組織画分に

は平均8×10⁶個/gの柔細胞が含まれると推定した。

6. 引 用 文 献

- 1) Sanderson, G. W. (1972): The chemistry of tea and tea manufacturing. In: Recent Adv. Phytochem., No. 5, ed. by V. C. Runeckles and T. C. Tso, Acad. Press, 247-316.
- 2) Takebe, I., Otsuki, Y. and Aoki, S. (1968): Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant Cell Physiol., 9, 115-124
- 3) 青木 智(1979): 茶葉からの細胞単離とその光合成特性, 日作紀, 48, 343-349
- 4) 久保井徹・須田ます代・寺尾玲子・小西茂毅(1991): チャ葉プロトプラストの効率的調製法, 茶研報, No. 74, 15-23
- 5) 小西茂毅・宮本倉文(1984): 茶樹の生育に対するアルミニウムの促進効果とそのリン酸吸収特性, 土肥誌, 55, 29-35
- 6) Vishnic, W. (1957): Methods for study of the Hill reaction. In: Methods in Enzymol., 4, 342-355
- 7) Edwards, G. E. and C. C. Black, Jr. (1971): Isolation of mesophyll cells and bundle sheath cells from *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. leaves and a scanning microscopy study of the internal leaf cell morphology. Plant Physiol., 47, 149-156