

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03042

研究課題名（和文）細胞壁形成の日周性が解き明かすセルロースマイクロフィブリル束形成の仕組みと物性発現

研究課題名（英文）Diurnal cell wall formation reveal the mechanism of cellulose microfibril bundle and mechanical properties generation

研究代表者

吉田 正人（Yoshida, Masato）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30242845

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞壁のセルロースは、セルロースマイクロフィブリルが集合した束の形態をとっている。昼が長い環境で形成された細胞壁ではセルロースマイクロフィブリル束の断面が極端に大きなものが散在した。一方、夜が長い環境で形成された細胞壁では束のサイズは小さなものが比較的均一に存在した。細胞壁の新生面に夜間に供給されるマトリックスがセルロースマイクロフィブリルの集合を抑制していると考えられる。夜長で作られた細胞壁の方が足サイズがより均一であるため力学性能は概して優れた結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞壁のセルロースマイクロフィブリルのサイズは、報告によって大きく異なり、10倍以上の違いがある。生育時の日照時間にセルロースマイクロフィブリルの集合が影響を受けることが本研究によって明らかになり、学術的な説明の一助をもたらした。また、細胞壁は日周性を持って形成される意義の一つを、セルロースマイクロフィブリル束の分布様式の点から説明し、細胞壁の力学性能を生育から制御する可能性を示唆できた。

研究成果の概要（英文）：Cellulose in the cell wall takes the form of bundles of cellulose microfibrils. In cell walls formed in environments with long daytime, cellulose microfibril bundles with extremely large cross sections were scattered throughout the cell wall. On the other hand, cell walls formed under long nighttime conditions had small bundles that were relatively uniform in size. It is thought that the matrix supplied at night to the nascent surface of the cell wall inhibits the assembly of cellulose microfibrils. Mechanical performance was generally better for cell walls formed at night length because of the more uniform foot size.

研究分野：木質科学

キーワード：セルロースマイクロフィブリル束 細胞壁力学性能 細胞壁形成 日周生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、細胞壁二次壁の形成には日周性があることを初めて明らかにした (Yoshida 2000)。形成中の二次壁の新生面を免疫電顕で調べると、昼間には堆積したばかりのセルロースマイクロフィブリルがはっきり見える。これに対して、夜間にはヘミセルロースとモノリグノールを含んだ無定形のマトリックスがセルロースの上を覆っている様子が見える。つまり、昼間にセルロースが堆積し、夜間にマトリックスが堆積するという日周性で二次壁は肥厚していく。そして、その日周性は細胞の膨圧変動と光変動に依存していた。

走査型プローブ顕微鏡によって細胞壁セルロースマイクロフィブリル束とマトリックス分布の可視化に成功し、昼が長い条件で形成された細胞壁では、セルロースマイクロフィブリルが集まったセルロースマイクロフィブリル束の断面サイズが大きくなっていることを見つけた。

以上のように、細胞壁は日周性をもって形成され、日周期が違えば細胞壁のセルロースマイクロフィブリル束サイズも違う。形成の日周性はセルロースマイクロフィブリル束の形成にどのように関わっているのだろうか。そして、セルロースマイクロフィブリル束の形成の違いは細胞壁の性質にどのように寄与しているのだろうか。本研究では、この疑問に答える研究を行う。

形成の日周性とセルロースマイクロフィブリル束形成の関係を理解する本研究は、細胞壁形成の日周性をもつ意義について、セルロースマイクロフィブリル束サイズの細胞壁における役割から迫る。本成果は、二次壁形成の新たな知を蓄積し、細胞壁形成と物性発現の理解を深める。

2. 研究の目的

本研究の目的は、二次壁肥厚の日周性がどのように細胞壁微細構造のセルロースマイクロフィブリル束の形成に寄与し、細胞壁の物性発現に関わっているかを解明することである。そのために次を行う。植物育成器で苗試料を調整し、

1. 日周性の明期長および光強度と形成されたマイクロフィブリル束の関係を明らかにする

2. 細胞壁マイクロフィブリル束サイズ・配置の様式と細胞壁物性の関係を明らかにする

申請者はプローブ顕微鏡でセルロースマイクロフィブリル束とマトリックスを分離して可視化する手法を確立し、精密なマイクロフィブリル束サイズの評価を可能にした。本研究は、この像に光・電子相関顕微鏡法(CLEM法)を組み合わせて相関解析を行い、細胞壁のマイクロフィブリル束・マトリックス情報と分子レベルの局在情報と微細構造を合わせて分析を行う。これにより、細胞壁のセルロースマイクロフィブリル束のサイズおよび配置様式の複数細胞にわたる広範囲解析を可能にする。マイクロフィブリル束と細胞壁性質の関係を調べて、形成の日周性から物性発現までの一連の理解を目指す。

細胞壁二次壁の発達は樹木細胞壁の大きな特徴の1つである。本研究は、二次壁形成の日周性が微細構造にどのように寄与し、細胞壁の物性に関わっているかを明らかにする。この研究を通じて、細胞壁形成の日周性をもつ意義について、セルロースマイクロフィブリル束形成の細胞壁における役割から迫る。マイクロフィブリル束の断面サイズは数 nm から数十 nm と報告者によって大きく違う。この違いは、形成の日周性もたらすマイクロフィブリルの集合の違いに因るかもしれない。

セルロースマイクロフィブリル束は細胞壁の性質に大きく関わる。マイクロフィブリルの量と配向から木材の力学的性質はおおよそ説明されるが、外れ値やばらつきはある。外れ値やばらつきの原因はマイクロフィブリル束のサイズにあるかもしれない。フィブリル束のサイズを考慮すれば、より正しい理解につながるのではないか。本研究は、セルロースマイクロフィブリル束が作られる仕組みを明らかにして二次壁形成の新たな知を蓄積する。本成果で細胞壁形成と物性発現の理解を前へ進める。

3. 研究の方法

共焦点レーザー顕微鏡(CLM: Confocal Laser Microscope)

共焦点レーザー顕微鏡は、光源にレーザー光を使用していること、また共焦点光学系であることを特徴とする光学顕微鏡(OM: Optical Microscope)である。一般的なOMでは光を試料全面に均一に照射するのに対し、CLMでは、スポット径の小さいレーザー光を試料表面上で走査させることで試料全面の情報を得ている。したがって、表面に傾斜や凹凸があり、焦点距離が場所によって異なる試料であっても、試料全面に焦点の合った画像を得ることができる。また、共焦点光学系では、検出器に反射光が入射する前の結像位置に、ピンホールと呼ばれる小さな穴を設けることで、ピンボケの原因となる焦点以外からの反射光を排除している。これにより、CLMでは、他のOMに比べてよりコントラストの良い画像を得ることができる。

CLMでは、試料表面における反射光量と形状の2種類の情報を得ることができる。試料表面の形状が測定できる顕微鏡には、CLMの他に走査型電子顕微鏡(SEM: Scanning Electron Microscope)や走査型プローブ顕微鏡(SPM: Scanning Probe Microscope)などがある。SEMはCLMより高い分解能で測定が可能であるが、木材を観察する際試料に金属蒸着を施す必要があ

り、試料表面をそのままの状態を観察することができない。また形状画像は得られるが、高さの具体的な数値を得ることはできない。SPM は CLM より高い分解能で測定が可能であるが、プローブ(探針)を試料に接触させる必要があるため、凹凸の大きい試料の観察には適さず、またプローブと試料の接触により試料を傷つける恐れがある。SEM や SPM にこのような欠点があるのに対し、CLM は

- 凹凸のある試料でも観察できるため、広範囲の測定が可能
 - 試料に前処理が不要なため試料表面をより実物に近い状態で観察可能 - 非接触で測定できるため試料が損傷する恐れがない
 - 高さの具体的な数値を得ることができる
- などの特徴を有しており、形状測定において利便性が高い顕微鏡である。

走査型プローブ顕微鏡(SPM: Scanning Probe Microscope)

走査型プローブ顕微鏡は、プローブ(探針)と試料間に作用するさまざまな物理量を検出し、微小領域の表面形状や物性を測定する顕微鏡の総称である。SPM の種類には走査型トンネル顕微鏡(STM: Scanning Tunneling Microscope)や原子間力顕微鏡(AFM: Atomic Force Microscope)などがある。

SPM の特徴として

- - 分解能が高い(垂直空間分解能:0.01 nm、水平空間分解能:0.2 nm)
- - 形状測定に加え、粘性や弾性などの物理特性を観察できる
- - 高さや物性の具体的な数値を得ることができる
- - 試料に前処理が不要なため試料表面をより実物に近い状態で観察できる
- - 大気中、水中、真空下等様々な環境条件下での観察が可能

などが挙げられる。特に、高分解能で形状と物性を同時に測定できるという点で利便性が高いため、金属、半導体、有機物など幅広い分野で使われ始めている。

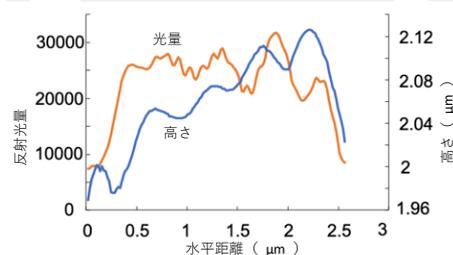
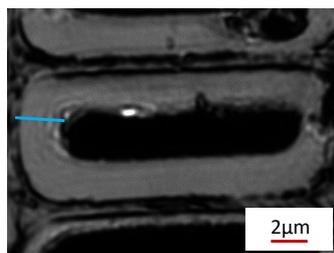
SPM には複数測定モードが存在し、得られる観察画像は測定モードによって異なる。本研究では、DFM(Dynamic Force Microscope)モードを用いて測定を行なった。DFM モードは、カンチレバーを共振させた状態でレバーの振動振幅が一定になるように探針と試料間の距離を制御しながら表面形状を測定するモードであり、形状像と位相像が得られる。形状像はカンチレバーのZ軸方向の変位を検出し作成される。形状像において、高さの高い部分は明るく、低い部分は暗く示される。位相像は、探針への入力信号と、試料に触れて返ってくる探針からの出力信号との間の位相のずれ(位相差)を基に作成される。位相差は試料表面の硬さや吸着性に起因し、吸着性が小さい、または硬い試料の場合には位相差が小さくなり、吸着性が大きい、または軟らかい試料の場合には位相差が大きくなる。位相像において、位相差が大きい部分は明るく、小さい部分は暗く示される。

4. 研究成果

ヒノキ正常材の細胞壁を CLM で観察して得られた反射光量画像と、反射光量画像上の青い直線上でプロファイルを行なった結果を図に示した。直線は左から右に引いた。これを見ると、反射光量の増減に伴って、高さが変動していた。

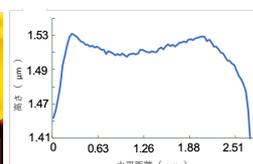
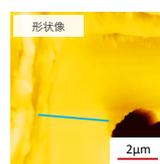
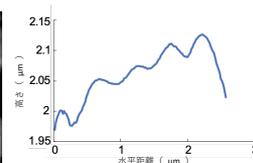
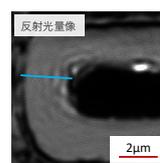
細胞壁における細胞

壁構造に沿った同心円上の縞模様が、試料表面の凹凸、光の干渉、試料表面の成分差のどれが原因で起こっているのか検討する。細胞壁では、プロファイル結果において高さと反射光量が伴って変動していることが分かった。



細胞壁の観察結果と同様高さと反射

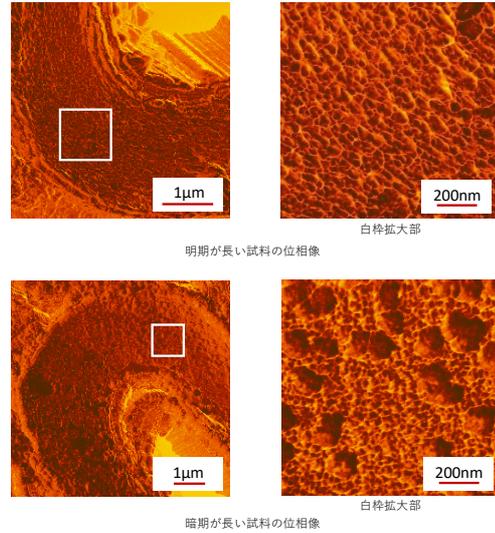
光量が伴って変動していたのは、凹凸のある試料と干渉を起こす試料であり、このうち干渉を起こす試料では高さが正確に測定できていなかった。したがって、細胞壁において、高さが正確に測定されている場合は凹凸による反射光量の増減、高さが正確に測定できていない場合は干渉による干渉縞が観察されていると考えられる。しかし、図に示した細胞壁のプロファイル結果だけでは、高さが正確に測定できているか判断できない。



観察には、CLM よりも高い分解能で形状を正確に測定することができる SPM を用いた。CLM と SPM による同じ細

胞壁の観察結果を図に示した。SPM による観察画像は形状画像で、高い部分を明るく、低い部分を暗く表している。それぞれ画像上の青い直線上で行なった高さのプロファイル結果を共に示している。これによると、SPM による観察では、CLM による観察で見られたような細胞壁における高さの凹凸は見られなかった。したがって、CLM では高さを正しく測定できていなかったと考えられる。よって、細胞壁における反射光量の増減は、光の干渉が原因で起こっていると考察できる。

明期の長い条件(明期 18 時間、暗期 6 時間)と暗期の長い条件(明期 6 時間、暗期 18 時間)の 2 つの条件下で試料を生育させ、それぞれ細胞壁木口面を SPM で観察した。すると、2 つの試料間では微細構造に変化が見られ、明期の長い試料の細胞壁では、CMF が部分的に大きく凝集した斑状の構造をとるのに対し、暗期の長い試料の細胞壁では、CMF の大きな凝集は見られず、規則的に配列した層状の構造をとることが分かった。以上より、生育条件の明暗周期が異なることによって、細胞壁微細構造が変化するという細胞壁形成、細胞壁微細構造に関する新しい知見が得られた。



明期 12 時間、暗期 12 時間で生育させた試料の木口面細胞壁を SPM で観察して得られた位相像を、図 3.5.2.1.1 に示した。これによると、明期 12 時間、暗期 12 時間で生育させた試料の位相像において、CMF の大きな凝集は見られず、細胞壁構造に沿って同心円状に層状構造をとっている様子が確認された。CMFB 直径のドットプロットを図 3.5.2.1.2 に示した。プロット数は 150 とした。CMFB 直径は細胞壁全体でほぼ均一であり、平均は約 28.9nm、中央値は約 28.0nm であった。

明期 24 時間、暗期 24 時間で生育させた試料の木口面細胞壁を SPM で観察して得られた位相像を、図 3.5.2.2.1 に示した。これによると、明期 24 時間、暗期 24 時間で生育させた試料の位相像において、CMF の大きな凝集は見られなかったが、細胞壁構造に沿った同心円状の層状構造は確認されなかった。CMFB 直径のドットプロットを図 3.5.2.2.2 に示した。プロット数は 150 とした。CMFB 直径は細胞壁全体でほぼ均一であり、平均は約 38.4nm、中央値は約 34.4nm であった。

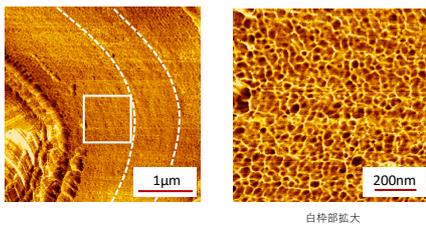


図 3.5.2.1.1 明期 12h 暗期 12h 試料 (ヒノキ) の位相像

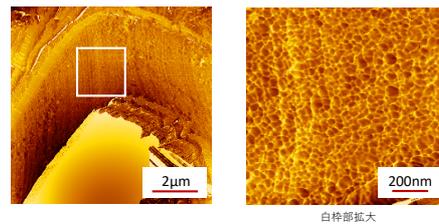


図 3.5.2.2.1 明期 24h 暗期 24h 試料 (ヒノキ) の位相像

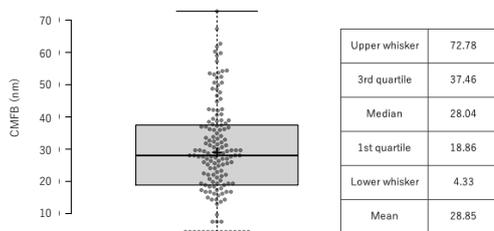


図 3.5.2.1.2 明期 12h 暗期 12h 試料 (ヒノキ) の CMFB 直径

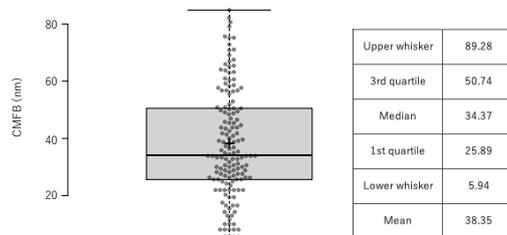


図 3.5.2.2.2 明期 24h 暗期 24h 試料 (ヒノキ) の CMFB 直径

		明12h 暗12h	明24h 暗24h	明18h 暗6h	明6h 暗18h
CLM観察	層状構造	あり	あり	あり	あり
	層の数	5	5	4	4
	層の幅(μm)	0.46	0.50	0.61	0.54
SPM観察	層状構造	あり	なし	あり	なし
	CMFB直径平均(nm)	27.9	38.9	小 36.1 大 156.5	39.6

表 3.6 CLM と SPM による明暗周期が異なる試料の観察結果まとめ

CLM 観察で木材細胞壁木口面を観察した際に見られる細胞壁構造に沿った同心円状の縞模様は、光の干渉によるものであると分かった。細胞壁において光の干渉が起こる原因として、細胞壁表面の形状と成分差が考えられるが、今回の実験だけではどちらが原因であるか断定することはできなかった。明らかにするためには、形状のみあるいは成分状態のみ変化させる処理を施した細胞壁を観察し、処理前と縞模様がどう変化するか調べる必要がある。また、試料の形状と成分差のどちらかだけではなく、両方が原因で縞模様が観察されている可能性もある。

CLM と SPM による生育の明暗周期が異なる試料の観察では、CLM 観察では全ての試料で層状構造が観察されたが、SPM では暗期の長い試料と明期 12h 暗期 12h の試料でしか層状構造が観察されなかった。このように異なる観察結果が得られる理由として、CLM 観察では試料内部の構造も観察結果に影響しており、純粋な試料表面の成分分布を示していないためであると考えた。

SPM 観察で、暗期の長い試料と明期 12h 暗期 12h

の試料でしか層状構造が観察されなかったことについて、明期に CMF、暗期にマトリックス物質が堆積するという報告から、以下のように考察した。暗期が長い試料では、豊富な量のマトリックス物質が CMF を十分に覆うため、CMF 同士の凝集が抑制された状態で配列し、層状の構造をとったと考えられる。明期 12h 暗期 12h 試料でも、マトリックス物質が CMF の凝集を抑えたために、層状構造が見られたと考えられる。明期が長い試料では、マトリックス物質の堆積が少なくなり CMF を覆うことができず、CMF 同士の凝集が促進され、層状構造が観察されなかったと考えられる。明期 24h 暗期 24h 試料では、明暗の割合が明期 12h 暗期 12h 試料と変わらないにも関わらず、層状構造が見られなかった。この理由として、長い明期の間に大量の CMF が細胞壁新生面に堆積されるため、明期 12h 暗期 12h 試料に比べてマトリックス物質が CMF を十分に覆うことができず、層状構造をとらなかったと考えられる。以上の細胞壁肥厚過程と微細構造の形成を今後の研究によって解き明かす必要がある。

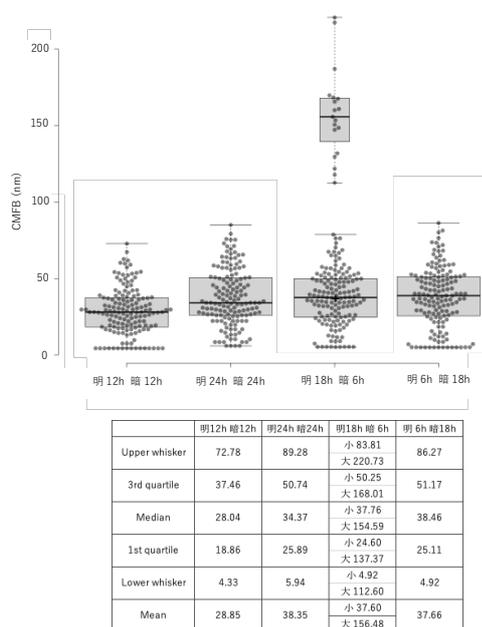


図 3.6.2 SPM 観察によって測定した CMFB 直径

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅沼佳歩, 吉田正人, 山本浩之
2. 発表標題 木材細胞壁の力学物性におけるセルロースマイクロフィブリル束の影響
3. 学会等名 日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅沼佳歩, 吉田正人, 山本浩之
2. 発表標題 細胞壁の力学物性におけるセルロースマイクロフィブリル束の影響
3. 学会等名 日本木材学会中部支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新郷彩音, 吉田正人, 松尾美幸, 山本浩之
2. 発表標題 生育の明暗周期がもたらす細胞壁微細構造
3. 学会等名 日本木材学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------