

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580188

研究課題名（和文）クライオTOF-SIMSを用いた木部柔細胞の細胞齢による機能変化の解析

研究課題名（英文）The functional changes of xylem parenchyma cells with respect to cell age of parenchyma cells analyzed by cryo-TOF-SIMS.

研究代表者

黒田 克史（KURODA KATSUSHI）

独立行政法人森林総合研究所・木材特性研究領域・主任研究員

研究者番号：90399379

研究成果の概要（和文）：

立木における木部柔細胞の機能を明らかにする研究として、この課題では、木部柔細胞の細胞齢による成分蓄積特性を細胞レベルで解明することを目的とした。凍結させた試料の成分局在をそのまま可視化できるクライオTOF-SIMS、レーザーマイクロダイセクション法とガスクロマトグラフィー等を組み合わせた定性定量解析法を用いて成分の蓄積特性を解析した。その結果、柔細胞の成分は、辺材、移行材、心材で大きく異なる一方、同一齢でも個々の細胞間で異なる場合があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The goal of this study is to clarify the function of xylem parenchyma cells in living trees. In this project, we analyzed the properties of chemical accumulation by cellular level with respect to cell age of parenchyma cells. The properties were analyzed by the cryo-TOF-SIMS which was able to visualize chemical distributions in a frozen sample, and semi-quantity and qualitative analysis which was combination of laser micro dissection with gas chromatography etc. As a result, the properties were different among cells in same age, while it was clearly distinguished between sapwood, intermediate wood, and heartwood.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：組織構造、材形成、微量成分、柔細胞、辺材、心材、凍結、TOF-SIMS

## 1. 研究開始当初の背景

柔細胞は木部を構成する細胞のおよそ1～2割を占める。その役割は、転流物質の輸送と貯蔵、デンプンと糖との変換などの季節的な生理活動などにかかわると考えられてい

る。また、心材物質の合成と蓄積にも関係すると考えられており、様々な心材物質が抽出されその機能が *in vitro* で解析されている。しかしながら、これらの物質の多くは化学的な特徴は解明されているが、樹体内での機能

や合成部位は分かっていない。その理由として樹木の立木内で起きている現象を直接解析することが困難なこと、解析にはブロックの試料が用いられており細胞レベルの研究が少ないことに起因すると考える。研究分担者の今井らは、木部柔細胞の細胞死過程で合成される物質の蓄積部位を細胞レベルで解析する手法を報告しているが、生体内での挙動を明らかにするには至っていない。

応募者は今井らの手法を発展させることにより樹体内の成分の挙動を解明できると考え、試料の採取と調製方法および解析方法を工夫した研究として本課題を提案するに至った。

## 2. 研究の目的

樹木木部柔細胞に特異的に蓄積する成分の分布と量の細胞レベルの解析から、木部柔細胞の細胞齢による機能の変化を明らかにすることが目的である。立木の状態を解析するには、伐採や試料調製による成分変化等を防ぐことが重要である。すなわち、立木から水や成分の分布に変化を起こさせない方法で試料の採取と調製を行い、細胞に水分が含まれた状態で成分の分布と蓄積量を解析することが必要である。そこで、水を含んだ細胞の成分の分布と量の解析が細胞レベルで可能な「クライオ ToF-SIMS」を用いて木部柔細胞の細胞化学的な解析を行う。また、この装置と同等の結果を得るための解析手法を開発する。これらの手法を用い、樹木木部柔細胞に特異的に蓄積する成分の分布と量を明らかにする。

## 3. 研究の方法

樹木の伐採によるアーティファクトな成分蓄積部位の移動を防ぐため、伐採前に立木を凍結してから試料を採取する立木凍結法によりスギ木部を採取した。採取した試料は $-80^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で保存し、試料調製から解析終了まで立木時の水と成分の分布を保持する手法を用いた。乾燥試料を作製する場合は、凍結乾燥器を用いた。

解析の中心は、凍結試料をそのまま解析できるクライオ ToF-SIMS であり、水を含んだ試料の柔細胞について成分の分布と蓄積量を細胞レベルで解析する。一方、クライオ ToF-SIMS 解析によるデータを補うため、クライオ SEM と FE-SEM/EDX および ToF-SIMS を組み合わせ同一試料を解析する手法、および特定の細胞を切り出して成分を定量解析する手法を開発する。クライオ ToF-SIMS の解析の結果と検証し、これらの解析手法の高精度化を図る。

これらの手法を用い、細胞齢が異なる木部柔細胞の成分の蓄積特異性を解析し、細胞齢による木部柔細胞の機能変化を細胞化学的

特徴から明らかにする。

## 4. 研究成果

樹木木部柔細胞の樹体内での機能の解明を最終目標に、本課題では、木部柔細胞の細胞齢による機能の変化を細胞の成分蓄積特性の細胞レベルでの解析から明らかにすることを目的として行った。

樹木の立木内における化学成分の分布特性を解明する手法として、水を含む木材試料のクライオ ToF-SIMS 測定を検討した。ドイツ・ユーリッヒの Walter Schroeder 博士の協力を得て、博士らが開発したクライオ TOF-SIMS 法により、スギ木部凍結試料のクライオ TOF-SIMS 測定を行った。その結果、木部の水分分布およびカリウム等の分布の可視化に成功した。一方で心材物質であるフェルギノール由来と考えられるマスペクトルの発現パターンが、水を含む試料では乾燥試料の場合と異なることを明らかにした。樹木組織でクライオ ToF-SIMS 測定を行った実験は世界でまだ報告が無く、得られた結果は、立木内における化学成分の分布特性を世界に先駆けて解明する可能性を示唆する重要な知見である。しかしながら、協力者の Schroeder 博士の異動により、ドイツにおける実験は中止となった。

そこで、連携研究者の名古屋大学福島教授らが開発中の新しいクライオ TOF-SIMS/SEM システムを用いた実験を検討した。この装置は福島教授が代表の科研費基盤 S (21228004) で開発中であり、本課題代表者は連携研究者として参画した。装置開発の一番の問題は、TOF-SIMS による解析中に、試料表面の水（氷晶）が昇華により失われることであつた。そこで、ほぼ 2 年かけて試料調整および TOF-SIMS 試料室の改良を行った。その結果、水を含むスギ木部を凍結させた試料でフェルギノールおよびカリウム等の成分の分布を水の分布と同時に可視化することに成功した。樹木細胞で水を含む生体高分子成分の可視化は世界で類を見ない成果である。この手法を用いた結果、フェルギノールは辺材では検出されず、移行材で心材との境界付近まで徐々に増加し、心材内で減少することを明らかにした。さらに、同一年輪において細胞ごとに、とくに早材と晩材の細胞ではフェルギノールの量が異なることを明らかにした。

一方、二次イオンが検出できない、あるいは他の成分由来のイオンと区別できないなどの理由から、TOF-SIMS では解析ができない成分が存在する。そのため、これらの成分の細胞レベルの蓄積特性を解明する手法の開発を目指した。手法として重要な点は微細領域における定量解析である。そこで光学顕微鏡観察をしながら目的部位を切り出し回収することができるレーザーマイクロダイセ

クシオン法を用いた試料回収法とガスクロマトグラフィー (GC) あるいは誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) による成分分析を組み合わせる手法を検討した。その結果、厚さ 80  $\mu\text{m}$  の切片から一辺数 10  $\mu\text{m}$  の範囲を切り出した場合、複数枚の連続切片の同一箇所から試料を回収することにより ICP-MS による元素解析が可能であることを明らかにした。一方で、GC によるフェルギノールの定量解析には ICP-MS のおよそ 5 倍の試料を回収することで可能であることを明らかにした。この手法を用いてスギ試料の成分の分布特性を調べた結果、フェルギノールは移行材の早材には晩材の 2 倍量蓄積することを明らかにした。この結果は TOF-SIMS を用いた解析結果と矛盾しておらず、スギ木部の成分蓄積特性を細胞レベルで定性かつ定量的に解析する手法を確立できた。

TOF-SIMS、Cryo-TOF-SIMS/SEM システム、FE-SEM/EDX による定性分析、レーザーマイクロダイセクション法と化学分析法を組み合わせた定性かつ定量解析を用いて得られた細胞レベルの成分蓄積特性の結果を総合的に検討した結果、辺材、移行材、心材の柔細胞で成分に違いがあることが明らかになった。一方、同一細胞齢でも個々の細胞間で成分に違いがある場合があることも明らかにした。このことは細胞齢により木部柔細胞の機能が変化すること、さらに、細胞齢が同一でも機能が異なる場合があることを示唆している。本課題では、同一細胞齢で異なる機能をもつ柔細胞が存在する点に関して、詳細な解析ができなかった。立木における樹木柔細胞の機能の全体的解明のため、今後解明すべき重要なテーマである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Katsushi Kuroda, Takeshi Fujiwara, Takanori Imai, Kaori Saito, Yasuyuki Matsushita, Kazuhiko Fukushima (2013) The cryo-TOF-SIMS/SEM system for the analysis of the chemical distribution in freeze-fixed *Cryptomeria japonica* wood, Surface and interface analysis, 45:215-219.  
DOI:10.1002/sia.4979

② Satoka Aoyagi, Katsushi Kuroda, Ruka Takama, Kazuhiko Fukushima, Isao Kayano, Seiichi Mochizuki, Akira Yano (2013) Evaluation of white radish sprouts growth influenced by magnetic fields using TOF-SIMS and MCR, Surface and interface

analysis, 45:264-267.  
DOI:10.1002/sia.4893

[学会発表] (計 15 件)

① Yuto Hanaya, Dan Aoki, Ruka Takama, Yasuyuki Matsushita, Katsushi Kuroda, Kazuhiko Fukushima (2013) Chemical mapping of plant biomolecules by the cryo-TOF-SIMS/SEM system, The Scientific International Symposium on SIMS and Related Techniques Based on Ion-Solid Interactions (SISS-15), Musashino.

② Kazuhiko Fukushima, Kaori Saito, Dan Aoki, Yasuyuki Matsushita, Katsushi Kuroda (2013) Direct mapping of morphological distribution of syringyl and guaiacyl lignin in the xylem of maple by TOF-SIMS and development of cryo-TOF-SIMS/SEM system, Carbo Summit 2013 (International workshop on current topics in cellulose science), Austria.

③ 黒田克史、藤原健、中田了五、佐野雄三 (2013) ヒノキ、カラマツ、トドマツ心材形成過程における木部の水分分布変化の Cryo-SEM 解析、第 63 回日本木材学会大会、盛岡。

④ 中田了五、岡田直紀、中井毅尚、黒田克史 (2013) 針葉樹の wetwood 形成時の心材への水分の再侵入における水移動の駆動力としての木部水ポテンシャル、第 63 回日本木材学会大会、盛岡。

⑤ 橋田光、田端雅進、黒田克史、久保智史、牧野礼、大塚祐一郎、久保島吉貴、外崎真理雄、大原誠資 (2013) ウルシ材フェノール成分の化学特性と樹幹内分布、第 63 回日本木材学会大会、盛岡。

⑥ 今井貴規 (2012) TOF-SIMS: 樹木抽出成分生合成・分布の可視化、日本木材学会組織と材質研究会 2012 秋季シンポジウム (招待講演)、府中。

⑦ Katsushi Kuroda, Takeshi Fujiwara, Takanori Imai, Ruka Takama, Kaori Saito, Yasuyuki Matsushita, Kazuhiko Fukushima (2012) New Approach of Chemical Distribution in a Frozen-Hydrated Wood Sample Using the Cryo-TOFSIMS/SEM System, IUFRO5, Portugal.

⑧ 黒田克史、伊藤優子、橋田光 (2012) 樹木木部柔細胞の機能解明に向けた木部成分の

細胞レベルの定性・定量解析手法の検討、第62回日本木材学会大会、札幌.

⑨ 白河 学、黒田克史、渡辺陽子、渡辺 誠、小池孝良、齋藤香織、松下泰幸、今井貴規、高間瑠佳、福島和彦 (2012) CryoTOF-SIMS/SEMシステムによる植物生体成分の分子マッピングの試み、第62回日本木材学会大会、札幌.

⑩ Kazuhiko Fukushima, Kaori Saito, Katsushi Kuroda (2012) Application of TOF-SIMS to the direct determination of plant components and introduction of Cryo TOF-SIMS/SEM system, The 12th International Symposium on Biomimetic Materials Processing, Nagoya.

⑪ Katsushi Kuroda, Takeshi Fujiwara, Takanori Imai, Kaori Saito, Yasuyuki Matsushita, Kazuhiko Fukushima (2011) Application of Cryo-TOF-SIMS/SEM complex apparatus to the analysis of chemical distribution in freeze-fixed *Cryptomeria japonica* xylem, The 18th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry, Italy.

⑫ Kazuhiko Fukushima, Kaori Saito, Katsushi Kuroda (2011) Application of TOF-SIMS to the direct determination of plant components and introduction of Cryo TOF-SIMS/SEM complex apparatus, The International Symposium on SIMS and Related Techniques Based on Ion-Solid Interactions, Nagakude.

⑬ 黒田克史、藤原健、齋藤香織、今井貴規、松下泰幸、福島和彦 (2011) 水を含む生体試料における成分分布可視化のためのTOF-SIMS生体試料前処理システムの開発、第61回日本木材学会大会、京都.

⑭ 黒田克史 (2010) Cryo-SEMとToF-SIMSでみた心材形成、日本木材学会組織と材質研究会2010秋のシンポジウム、名古屋.

⑮ Katsushi Kuroda, Takeshi Fujiwara, Takanori Imai, Kaori Saito, Kazuhiko Fukushima (2010) An analysis of the distribution of ferruginol in the heartwood-forming *Cryptomeria japonica* xylem using ToF-SIMS, The International Symposium on SIMS and Related Techniques Based on Ion-Solid Interactions at Seikei University (SISS-12), Musashino.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ffpri.affrc.go.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 克史 (KURODA KATSUSHI)

(独) 森林総合研究所・木材特性研究領域・主任研究員

研究者番号：90399379

### (2) 研究分担者

今井 貴規 (IMAI TAKANORI)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：20252281

### (3) 連携研究者

福島和彦 (FUKUSHIMA KAZUHIKO)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：80222256

伊藤 優子 (ITOH YUKO)

(独) 森林総合研究所・立地環境研究領域・主任研究員

研究者番号：60353588

橋田 光 (HASHIDA KOH)

(独) 森林総合研究所・バイオマス化学研究領域・主任研究員

研究者番号：40353809