

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660132

研究課題名(和文) 分子間カプロープ顕微鏡技術を用いた細胞壁マイクロフィブリル傾角測定システムの開発

研究課題名(英文) Development of measurement system with atomic force microscope for cell wall microfibril angle

研究代表者

佐藤 敬一 (Sato, Keiichi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90178723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：分子間カプロープ顕微鏡のマイクロフィブリル傾角等の木材物性評価への応用可能性を検討するために、ヒノキ仮道管壁縦断面を観察した。長径150～600nm、短径100～300nm程度の楕円形の構造や直径100～300nmの円形の構造が認められた。マイクロフィブリルの束の横断面が円形であると仮定すると、断面形状は傾角により楕円形として観察される。したがって、この構造にはマイクロフィブリル傾角情報が含まれると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The atomic force microscope (AFM) was applied to observation of cell walls of hinoki (*Chamaecyparis obtuse*) with the aim of studies on ability of application of AFM to measurement of physical properties of wood materials such as microfibril angles. Oval shaped structures (150-600 nm longer radius, 100-300 nm minor radius) and round shape structures (100-300 nm radius) were observed on the section of tracheid cut with a sliding microtome. If a bundle of microfibrils has round shaped cross-section, the structure appears as oval shape with respect to the microfibril angle. Then, the structure of the oval shape or round shape contains information on microfibril angle.

研究分野：植物材料物性学

キーワード：分子間カプロープ顕微鏡 原子間力顕微鏡 セルロースマイクロフィブリル マイクロフィブリル傾角 ヒノキ仮道管

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーの進展に伴い、1981年に Binnig と Rohrer¹⁾により走査型トンネル顕微鏡が、1986年には Binnig と Quate²⁾によって原子間力顕微鏡が開発された。これらは走査型プローブ顕微鏡と呼ばれる。従来の顕微鏡と異なり、微小な探針が試料表面をなぞることで表面構造をナノメートルレベルで観察する。

走査型トンネル顕微鏡は探針と表面の間に流れるトンネル電流を利用するため、観察対象は導電物に限定されるが、表面を原子レベルの分解能で観察できる。Binnig³⁾らは、走査型トンネル顕微鏡を用いて Si 結晶表面の再構成表面の原子配列を捉えた。これによって長年に渡った表面構造に関する議論に終止符が打たれ、走査型トンネル顕微鏡の有用性があらわになった。

5年後の1986年に開発された原子間力顕微鏡では、探針と表面間に働く微弱な引力をカンチレバーの変位として検出する。カンチレバーの変位が一定となるよう試料の位置を上下に制御し、制御した信号をもとに画像を作成する。原子間力顕微鏡には、コンタクトモード、ダイナミックモード (FM 検出) 等、複数の走査モードがある。コンタクトモードでは、探針が常に試料と接触した状態で走査し、カンチレバーの変位から表面を検出する。ダイナミックモード (FM 検出) ではカンチレバーを一定の周波数で垂直方向に励振し、引力発生に伴う周波数変化から表面を検出する。ダイナミックモードは表面を非接触で観察可能なため、試料損傷のリスクが少なく、柔らかい試料の観察に適する。

原子間力顕微鏡は引力を利用するため、導電物、絶縁物を問わず広範な種類の試料をそのまま観察できる⁴⁾。電子顕微鏡のように試料に導電物をコーティングする必要がなく、試料をそのまま観察できる。

2000年代初頭にヒトゲノムの解読が完了

し、ポストゲノム時代に突入した。以降、ゲノム情報をもとに作られるタンパク質の構造や機能の解明が要求された。このような時代背景から、原子間力顕微鏡は改良が重ねられ、更に高性能な装置も開発されている⁵⁾。液中、大気圧中等自然に近い動作環境で生体分子の構造や動態を観察できるという特徴から、DNA、生体内タンパク質の構造や、その動態をとらえた観察事例が多数報告されている⁶⁾⁷⁾。

原子間力顕微鏡には摩擦力、磁気的性質、電気的性質、表面力等、表面の物性・機能を測定可能なものも存在する⁴⁾。材料の表面構造や物性の分子・原子レベルでの解析が要求される今日、原子間力顕微鏡の必要性はますます高まっている。原子間力顕微鏡は生体分子や材料の観察などに応用されているが、木材細胞壁での応用事例は少ない。

地球の総バイオマスの大半を森林資源が占める。また、森林資源である木材は再生可能で、森林での CO₂ 吸収、木材利用での炭素貯蓄という点で、地球温暖化や化石資源枯渇に対して有効な解決策と考えられ、今日、木材利用に注目が集まる⁸⁾。

木材は厚さ数 μm 程度の細胞壁を持つ筒状の細胞が多数集合し形成される。広葉樹と針葉樹では組織構成が異なり、針葉樹の 90% 以上が仮道管である。

細胞壁の化学成分は主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンからなる。そのうち 50% がセルロースである。細胞壁中でセルロース分子鎖が凝集、結晶化しセルロース・マイクロフィブリルと呼ばれる微繊維を形成する。セルロース・マイクロフィブリルは結晶領域と非結晶領域に区分され、細胞壁の骨格として機能する⁹⁾。1本のセルロース・マイクロフィブリルの長さは不定で、断面の寸法は木材では 3-4nm 程度と報告されている¹⁰⁾。セルロース・マイクロフィブリルは細胞壁中で細胞軸に対しらせんを描くように配向し、ラメ

ラと呼ばれる薄層を形成する。ラメラが細胞壁の内側に向かって積層していくことで細胞壁が形成される。細胞壁は、その形成過程で1次壁(P層)と2次壁(S層)に大別される。2次壁はさらにS1層(外層)、S2層(中層)、S3層(内層)に区分される。細胞の長軸に対するセルロース・マイクロフィブリルの配向角をマイクロフィブリル傾角と呼ぶ。マイクロフィブリル傾角はほぼ全ての樹種で共通の傾向を示す。すなわち、S1層とS3層では70°~80°、S2層では10°程度に配向し、壁層ごとに異なる値をとる¹¹⁾。マイクロフィブリル傾角は、ヤング率、膨潤・収縮特性、音響特性等、細胞壁や木材全体の力学的・物理的性質に大いに寄与する¹²⁾。細胞壁の約7割がS2層のため、S2層のマイクロフィブリル傾角が木材全体の材質を決定する。木材の材質評価を行うにあたり、S2層マイクロフィブリル傾角の測定が重要となる。従来、マイクロフィブリル傾角は、電子顕微鏡法、ヨウ素沈着法、偏光顕微鏡法、X線回折法等の手法で測定された¹³⁾¹⁴⁾。電子顕微鏡法では細胞壁を剥離し、その上に導電物質をコーティングし、真空中で観察する必要がある。ヨウ素沈着法では個々のセルロース・マイクロフィブリル間の充填物質を除去し、生じた溝にヨウ素を沈着させる。X線回折法では、X線を照射した領域全体の平均的な測定値を得るため、微小領域での測定が困難であった。このように、従来の手法は試料調整が煩雑、動作環境に制限がある、測定精度が悪い等、それぞれに課題が見られた。現在、試料の調整が簡便で、測定精度のよいマイクロフィブリル傾角測定手法は存在しない。

2. 研究の目的

原子間力顕微鏡は表面構造をナノメートルレベルで観察可能である。また、真空中等、特別な動作環境を必要とせず、大気圧中、溶液中等、自然に近い条件で試料観察できる。

さらに、導電物、絶縁物を問わず観察可能なため、導電物のコーティング等試料表面への特別な処理を要せずそのまま観察できる。このような原子間力顕微鏡の特徴を見ると、電子顕微鏡法、ヨウ素沈着法等、従来のマイクロフィブリル傾角測定手法にはない利点が伺える。しかし、マイクロフィブリル傾角等の木材細胞壁の物性評価を目的とした木材細胞壁の原子間力顕微鏡観察事例はまだない。そこで、本研究では原子間力顕微鏡のマイクロフィブリル傾角等の木材細胞壁の物性評価への応用の可能性を検討するために、まず、原子間力顕微鏡を用いてヒノキ仮道管壁断面の観察を行った。

3. 研究の方法

(1) 供試材料

本学農学部附属フィールド・サイエンス・センター、フィールド・ミュージアム草木産のヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)を寸法10(L)×10(R)×10(T)mm程度の切削面作成用木片と、寸法15(L)×10(R)×40(T)mm程度の切片作成用木片に糸鋸で加工した。切削面作成用木片と切片作成用木片をそれぞれ飽水状態にした。

(2) 板目切削面および15°切削面

飽水状態の切片作成用木片を替刃式スライディング・マイクロトームの滑走台座に固定し、板目面を切削し、板目切削面を作った。また、柾目面から見たとき、板目面と切削面のなす角を θ と定義し、 $\theta = 15^\circ$ となるように板目面をスライディング・マイクロトームで切削し、切削面を作成した。

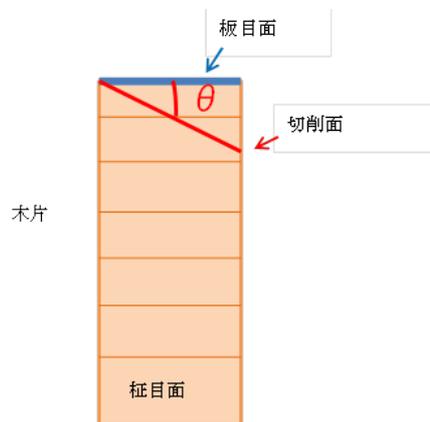


図3-1 異なる傾斜における切削角の定義(柾目面から見た図)

(3) 板目面切片、15°切片 30°切片の作成

飽水状態の切片作成用木片をスライディング・マイクロトムで厚さ 300 μm の板目面切片に切り出した。また、 $\theta = 15^\circ$ 、および、 $\theta = 30^\circ$ になるようにスライディング・マイクロトムの滑走台座に固定し、切片を複数作成した。以後、これを 15°切片、および、30°切片と呼ぶ。

(4) 原子間力顕微鏡

原子間力顕微鏡（生体分子計測研究所製 SXM-STANDARD）の装置構成は図 3-2 の通りで、試料ステージ、FM 検出ユニット、フィードバックユニット、高圧アンプユニット、オシロスコープ（IWATSU 製 DS-5102B）、中継ボックス、パソコンからなる。



図 3-2 原子間力顕微鏡の装置構成

図 3-3 に示す試料ステージの中央に観察試料を設置した。試料の上にカンチレバーがある。

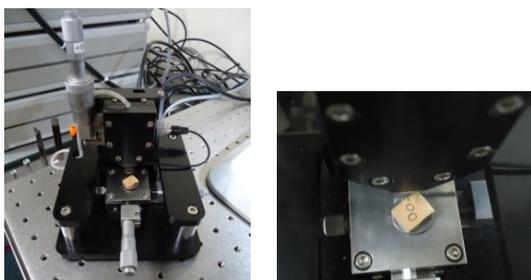


図 3-3 試料ステージ
（中央に試料を設置、その上にカンチレバーがある）

4. 研究成果

原子間力顕微鏡では、探針が試料表面を走査した結果として白黒の 2 次元画像をえる。それに加え、画像から Z 方向の高さの情報もえられる。Z 方向の高さは白と黒のコントラストで表現され、白いほど相対的に高い位置であることを、黒いほど相対的に低い位置であることを表す。図 4-2 は、図 4-1 の赤線箇所における XZ 面のプロファイルである。図 4-1 の観察領域は $2,000 \times 2,000$ nm で、図

4-2 の Z の範囲は 110 nm 程度である。XZ 面のプロファイルの X と Z の寸法を調整すると、図 4-3 のようになる。図 4-1、図 4-1 を見ると、表面は著しくでこぼこしていると錯覚するが、実際はほぼ平坦であることが図 4-3 から読み取れる。十数 nm 単位の非常に微小な凹凸が画像に反映されていたということが分かる。本研究で観察した他の視野もこれと同様である。

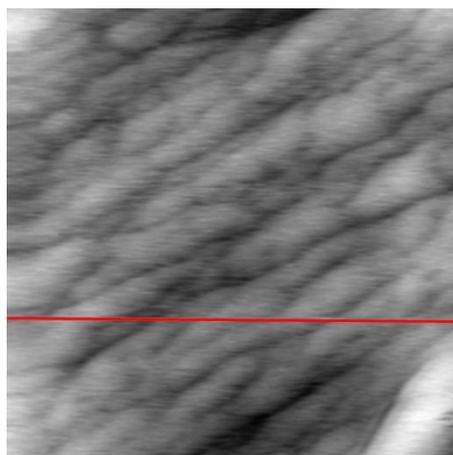


図 4-1 仮道管壁断面の観察結果

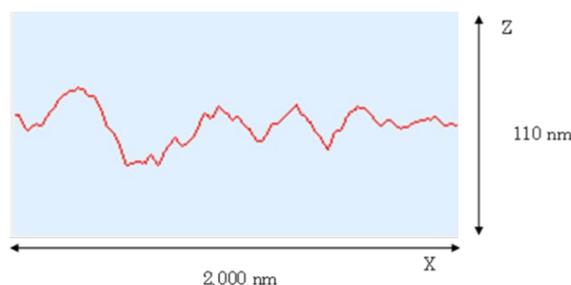


図 4-2 XZ 面のプロファイル
（赤い曲線は図 4-1 の赤線部分における表面の凹凸を表現）



図 4-3 XZ 面のプロファイル
（図 4-2 の XZ 面のプロファイルの寸法を調整した。表面の凹凸は微小であることが図から読み取れる）

原子間力顕微鏡を用いて板目切削面、15°切削面、板目切片、15°切片、30°切片の 5 条件の試料から計 41 視野において仮道管壁断面を観察した。壁断面に楕円形や円形の構造が認められる視野が存在した。表 4-1 に各資料において楕円形や円形の構造が認められた視野数をまとめた。

1 回目の観察後に試料を任意の角度で回転し、異なる走査方向で再び観察を行った。ナ

ノメートルレベルでの観察である都合上、厳密には試料回転前と全く同じ箇所を観察できたとは言えないが、同一仮道管の似たような箇所を観察した結果なので、1視野として計数した。

楕円形や円形の構造が壁断面一面に多く認められ、かつ構造の寸法がある程度揃っているものをそれぞれの構造が認められる視野数に計数した。しかし、楕円形や円形の構造がところどころに認められたが、分布がまばらなものは楕円形や円形が認められた視野数に加えなかった。

表 4-1 . 楕円や円形の構造が認められた視野数

試料	全視野数	楕円形が認められた視野数	円形が認められた視野数
板目切削面	6	2	0
15°切削面	9	3	1
板目切片	6	2	1
15°切片	6	1	0
30°切片	14	1	3

表 4-1 では、楕円形の構造は各条件で認められ、板目切削面、15°切削面、板目切片では、楕円形の構造が認められた視野数は複数あった。楕円形の構造は、長径が 150~600 nm、短径が 100-300 nm と、観察した視野によってばらつきがあったが、長径と短径の比は 2:1~3:1 のものが多かった。円形の構造は 15°切削面では 1 視野、板目切片では 1 視野、30°切片では 3 視野認められた。円形の構造の直径は 200~300 nm 程度のものであったが、15°切削面では直径 600~750 nm 程度のもも認められた。楕円形、円形の構造の表面を 100×100 nm の狭視野まで観察したが、さらに細かい構造は認められなかった。Côté ら¹⁶⁾による脱多糖類処理を施したベイマツの仮道管壁断面の電子顕微鏡写真では、S1、S2、S3 層の各層が明瞭に区分された。セルロース等、脱多糖類処理で取り除かれた部分は白く見え、S1、S3 層では円形に、S2 層では縦長になっており、その寸法を写真から推測すると、直径 100 nm 程度であった。マイクロフィブリル 1 本の幅は 3-4 nm であるが、公表された写真から、数多くのマイクロフィブリルが集合して百 nm オーダーの束で存在すると考えられる。

ダブルウォールは 2 つの仮道管壁で構成されているが、それぞれの仮道管で形態の異なる視野が板目切削面、15°切削面においてそれぞれ 1 視野ずつ認められた。これらの視野では、一方の壁断面は広視野では平滑に見え、狭視野にすると楕円形の構造が現れた。他方は広視野でも壁断面に凹凸が目立った。細胞壁中でのマイクロフィブリルのらせん配向は、ヒノキでは Z らせんである。このため、板目

面ではスライディング・マイクロトームの切削方向に対し、マイクロフィブリルの配向は一方では順目、他方では逆目となる。これによって両方の仮道管の S2 層の形態に差が認められたと考えられる。

切削面と切片の作成に使用したスライディング・マイクロトームは、電子顕微鏡観察等で用いるスーパーマイクロトームより切削面が荒い。スライディング・マイクロトームで切削されれば個々のマイクロフィブリルの断面がささくれのように表出し、マイクロフィブリルの束が強調されるとも考えられる。また、原子間力顕微鏡では探針の曲率半径より幅の小さい表面を正確に検出できない。幅が 3-4 nm のマイクロフィブリルが一様に分布している場合は、切削面も平滑で、曲率半径 15 nm 程度の探針に走査されても 1 本 1 本のマイクロフィブリルを識別できず、特徴のある構造は認められないであろう。しかし、百 nm オーダーの楕円形や円形の構造が一面に現れるのは、マイクロフィブリルが束となっているからと考えられる。また、飽水処理と乾燥処理による非結晶領域内の水溶性成分の除去や細胞壁の膨潤・収縮によってこれらの構造の存在がさらに強調された可能性も考えられる。

図 4-4 は、マイクロフィブリルの束の断面形状が円形であるという仮定の下、異なる傾角におけるマイクロフィブリルの束の断面形状の違いを図示したものである。

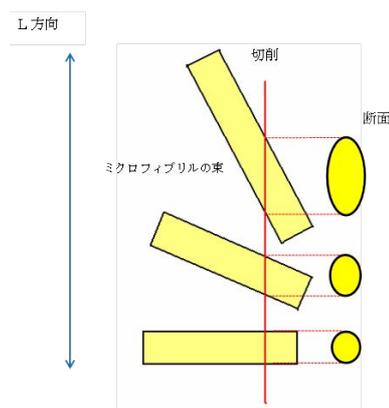


図 4-4 異なる傾角におけるマイクロフィブリルの束の断面形状の違い

マイクロフィブリルの束の断面形状は、傾角が小さいほど楕円形に、傾角が大きいくほど円形に近くなる。本研究で観察された楕円形、円形の構造の構造がマイクロフィブリルの束の断面に由来するならば、その形状の違いに傾角等の情報が含まれると考えられる。そして、断面形状の違いからマイクロフィブリル傾

角を算出する等、ミクロフィブリル傾角測定法の検討の可能性が期待される。

どの条件でも、楕円形や円形の構造を全ての視野では認められなかった。今後、乾燥条件や切削条件等、これらの構造をより安定的に得られる条件の検討が必要である。

参考文献

1. Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E.: Phys. Rev. Lett., 49, p57 (1982)
2. Binnig, G.; Quate, C.; F. and Gerber, Ch.: Phys. Rev. Lett., 56, p930 (1986)
3. Bining, G.; Rohrer, H.; Gerber, Ch.; Weibel, E.: Phys. Rev. Lett., 50 (1983)
4. 奥村公平: 原子間力顕微鏡とその応用、豊田中央研究所 R&D レビュー、vol.31 No.2 (1996)
5. 福間剛士: 原子間力顕微鏡を用いた固液界面の原子スケール観察、金沢大学フロンティアサイエンス機構、(2010)
6. Suzuki, Y.; Higuchi, Y.; Hizume, K.; Yokokawa, M.; Hoshimura, S.; Yoshikawa, K.; Takeyasu, K.: Molecular dynamics of DNA and nucleosomes in solution studied by fast-scanning atomic force microscopy, Ultramicrosc., 110, 682 (2010)
7. Igarashi, K.; Koivula, A.; Wada, M.; Kimura, S.; Penttila, M.; Samejima M.: High speed atomic force microscopy visualizes processive movement of Trichoderma reesei cellobiohydrolase I on crystalline cellulose, J. Biol. Chem., 284, 36186 (2009)
8. 林野庁: 平成 25 年度版 森林、林業白書、p167 (2014)
9. 原田浩: 木材学会誌、16、8、375 (1970)
10. Frey-Wyssling, A.; Muhlethaler, K.: Ultrastructural Plant Cytology, Elsevier, New York, p. 34-40 (1965)
11. Saiki, H.: Influence of wood structure on radial variation in some physical properties within an annual ring of conifers, Memories College Agri. Kyoto Univ. No.96, 47 (1970)
12. 伏谷賢美: 木材の物理、文永堂、(1985)
13. 佐伯浩、徐永吉、藤田稔: スギ幼齡材仮道管壁のフィブリル配向とその傾斜角の顕微鏡的測定、木材学会誌 Vol.35、No.9、p786-792 (1989)

14. 太田章介、畑茂樹、藤田稔、佐伯浩: スギ成熟材部のフィブリル傾角の測定 剥離切片偏光顕微鏡法と圧縮切片 X 線回折法、京都大学農学部演習林報告 (1992)
15. 木材工業編集委員会: 日本の木材、1、日本木材加工技術協会 (1966)
16. Côté, W. A. JR: Wood Ultrastructure, An Atlas of Electron Micrographs, Univ. Washinton Press (1967)

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

松田菜央、佐藤敬一、分子間力プローブ顕微鏡を用いたヒノキ仮道管細胞壁の物性評価の検討、第 64 回日本木材学会大会、2014 年 3 月 14 日「愛媛大学(愛媛県・松山市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 敬一 (SATO, Keiichi)
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 90178723