

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292095

研究課題名(和文)細胞壁形成の日周性は細胞壁の「構造」と「性質」にどのように影響するのか

研究課題名(英文)How does the diurnal cell wall thickening make the structure and properties of wood cell walls?

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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：ナノオーダーで形状と性質を同時に観察できる走査型プローブ顕微鏡を用いて、樹木細胞壁を調べた。位相差の違いをもとに、細胞壁を構成する成分であるセルロースとその他の成分であるリグニン・セミセルロースを区別する手法を確立した。細胞壁中で、セルロースは集合体として存在し、横断面におけるそのサイズは中央値15nmから20nmであった。

繰り返し幅が約60nmの層状構造が細胞壁横断面に存在することを発見した。このナノ周期構造はセルロース集合体の複数層からなると思われる。細胞壁は日周性で形成されるため、このナノ周期構造との関係を追求していく必要性が示された。

研究成果の概要(英文)：Scanning Probe Microscope, which can detect both geometry and properties, was used for observation on wood cell walls. The phase difference on the surface was able to tell the cellulose from matrix in a cell wall. Cellulose aggregated into a microfibril, the size of which was 15 to 20 nm, in a cell wall.

Layered nanostructure was seen on transverse cell wall. That structure seemed to consist of several microfibrils. Cell wall thickening diurnally, the nanostructure must be focused.

研究分野：木質細胞壁科学

キーワード：細胞壁構造 走査型プローブ顕微鏡 セルロースマイクロフィブリル マトリックス

1. 研究開始当初の背景

樹木の細胞壁は発達した二次壁を持つ。この二次壁の形成には日周性があることを代表者は初めて明らかにした (Yoshida 2000 Holzforschung)。形成途中の二次壁を免疫電子顕微鏡法で調べたところ、昼間にはセルロースマイクロフィブリルが明瞭に観察される。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マトリックスがマイクロフィブリルの上を覆っている様子が観察される (Hosoo&Yoshida 2002 Planta)。セルロースとヘミセルロース、リグニンからなる細胞壁は、昼間にセルロースを堆積し、夜間にはヘミセルロース・リグニンが堆積するという日周性で作られる。

二次壁形成の日周性の発見は組織学や生化学の研究に波及し、試料採取の時刻を考慮する必要があることが認識されるようになった。

同じころ、セルロース合成に関わる遺伝子の発現量に日周性があることがモデル植物であるシロイヌナズナで発見された (Science 2000)。夜明けから朝方にかけて、セルロース遺伝子の発現が最も多くなる。形成途中の細胞は、夜間の水膨れによってその体積を拡大させる。形成途中の細胞壁はこの時に隙間が大きくなるので、セルロースがそこを埋めるために、セルロースの合成を活発にしていると解釈できる。代表者が示した「昼間にセルロースが堆積」とも矛盾なく合致する。代表者は、樹木においてセルロース遺伝子の日周性を見だしつつあり、さらにリグニン合成に関わる遺伝子発現量の日周性を調べている。

以上のように、細胞壁の形成には日周性がある。では、その日周性はでき上がった細胞壁の「構造」と「性質」にどのように影響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。細胞壁形成の日周性と細胞壁の構造・性質との関係を調べて、日周性が寄与する細胞壁形成を明らかにする。

2. 研究の目的

次世代複合型顕微鏡 SPM (走査型プローブ顕微鏡 Scanning Probe Microscope) を導入して、細胞壁形成の日周性が細胞壁の構造と性質にどのように影響するかを調べる。SPM はナノオーダーの形状観察に加えて、吸着力や粘弾性ほか様々な物性の複合観察が可能である。

SPM による構造観察では、細胞壁の真の姿に近いこれまでにない観察が期待できる。従来のナノオーダー観察は電子顕微鏡によって行われてきた。この観察手法では、試料に固定・包埋・導電といった処理が加わることで真の細胞壁構造はそれらに埋もれて得られていない。SPM ではこれら処理が不要でさらに液中観察も可能なため、乾燥による細胞壁の変化もないという利点が期待できる。

SPM による性質観察では、各種物性分布像

が得られるため、セルロースやリグニンの物性値の差を手がかりに、形状だけでは判断が難しかった細胞壁構成成分の分布を可視化できると考えられる。

本研究が目指すのは、

- (1) 細胞壁研究における走査型プローブ顕微鏡 SPM の利用法の確立、
 - (2) 細胞壁形成の日周性が細胞壁の構造と性質に与える影響の解明、
 - (3) 細胞壁形成の日周性について、その意義の思索、
- である。

3. 研究の方法

(1) 細胞壁研究における走査型プローブ顕微鏡 SPM の利用法の確立に向けて、まずは試料調整方法を検討した。

標準試料として、写真用紙クリスピー (エプソン) を選択した。無機物からなる標準試料より、樹木細胞壁を含む紙の方が本研究には標準試料として適していると判断したからである。試料台にはシリコンウェハを用いた。ダイヤモンドカッターで 10 mm 四方に整形して用いた。標準試料は両面テープで試料台と接着した。

樹木の細胞壁用試料には 19 年生スギの辺材を用いた。3%グルタルアルデヒドで前固定し 1%四酸化オウムムムで後固定したのち、エポキシ樹脂で包埋した。トリミング用ナイフ DiATOME T739, Trim45 で R 方 1 mm、接線方向 0.5 mm の横断面領域にトリミングし、切削用ダイヤモンドナイフ スミナイフ SK1045 で厚さ 1 μm の切片を得た。切削方向は髄側から樹皮側に、放射方向に行った。切削はロータリーマイクロトームを用いた。ナイフポート内の水に浮かんだ切片をシリコンウェハ上に載せて 100°C のホットプレートで一晩乾燥させた。

次に、走査型プローブ顕微鏡で得る画像情報には形状像と位相像、粘弾性像を選択した。形状像と位相像は SPM の DFM モードで取得し、粘弾性像は VE-AFM モードで取得した。DFM は Dynamic Force Microscope、VE-AFM は Viscoelastic Atomic Force Microscope である。前者で使用した探針は Micro Cantilever SI-DF 20P2 K-W10200459、後者は Micro Cantilever SI-AF01 K-A102001560 である。

(2) 細胞壁形成の日周性が細胞壁の構造と背室に与える影響の解明に向けて、苗木試料を準備した。

4 年生スギ苗木を 2 台の気象器内で生育した。2 台は明暗周期のみが異なる条件で設定した。一方は明期が 16 時間、暗期が 8 時間で、他方は明期が 8 時間、暗期が 16 時間である。明期には庫内温度を 26 度、暗期は 20 度とした。苗木は 1 成長期を通して気象器内で生育させた。

成長が休止した後に幹を採取し、化学固定と包埋を行った。この試料を SPM 解析に用いた。

(3)細胞壁形成の日周生について、その意義の思索を行なうため、既往研究と本研究の結果を考察した。

4. 研究成果

(1) 細胞壁研究における走査型プローブ顕微鏡 SPM の利用法の確立に向けて

標準試料を観察して、画像情報の取得とその解釈を確立した。

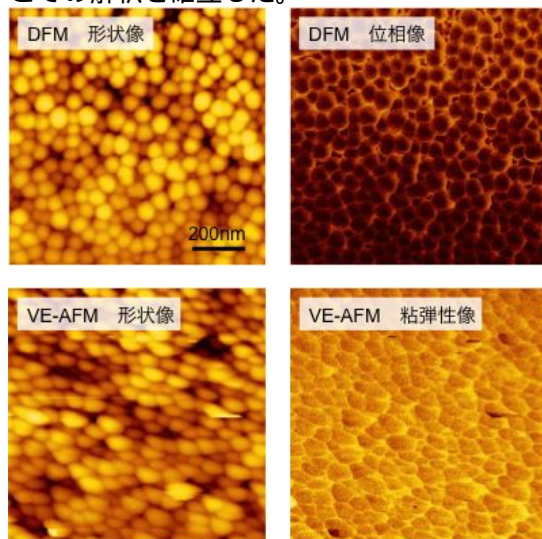


図1 情報取得モードと画像情報 標準試料

DFMで取得した画像にくらべて、VE-AFMでは粒子が右方向へ流れている。探針はDFMは試料表面に触れないが、VE-AFMでは設定した接触荷重で触れながら走査するためである。既定値の接触荷重では、試料面に傷をつけることが分かり、細胞壁観察においては、たわみ量を既定値からマイナス側に調整すると良い。

サイズ測定における誤差の把握を行った。人為的誤差と機械的誤差を検討するため、級内相関係数 ICC(interclass correlation coefficient)と標準誤差 SEM(standard error of measurement)で評価した。

人為的誤差は、同じ画像を10回繰り返し測定してばらつきを求めた。ICCは0.999、SEMは0.151と信頼性が非常に高い測定手法を確立できた。機械的誤差は、試料の同じ箇所を10回繰り返し測定してばらつきを求めた。ICCは0.999、SEMは0.260と非常に高く、本研究において手法が正しく、十分信頼できる測定ができると確認できた。

細胞壁成分が示す情報を確定するために単離した細胞壁成分であるアルファセルロースとクラウンリグニンの包埋切片を観察した。

位相像から得られる情報が両者を最も区別できた。アルファセルロースは位相のずれが小さく、クラウンリグニンは位相のずれが大きい。偏光顕微鏡下での直交ニコル観察像と位相像を比較したところ、複屈折が強い

領域も弱い領域も同程度の位相ずれを示したため、セルロースの配向はこの位相情報に影響してないと分かった。

細胞壁における画像情報の解釈を行った。細胞壁横断面を観察したところ、形状像では数十nmサイズの無数の突起状構造が一面に存在していた。突起構造は、位相像では位相ずれが小さく、その周りを位相ずれが大きい領域が囲んでいた。粘弾性像では、突起構造は柔らかく、周りは硬いと解釈できる画像が得られた。アルファセルロースは位相ずれが小さいことから、突起状構造はセルロースマイクロフィブリル束であろうと思われる。セルロースマイクロフィブリルは吸着性が小さく(位相像から)、探針のたわみ振動は小さい(粘弾性像から)と解釈できる。

試料の切削方法の影響を調査するため、様々な条件での試料調整を行った。無包埋の乾燥試料をガラスナイフで切削した場合は、表面凹凸がSPMの測定許容をオーバーして、調整方法としては採用できなかった。

飽水試料を滑走式マイクロトームで切削した場合は、切削方向に沿って試料が変形している様子が観察された。

飽水試料を凍結マイクロトームで切削した場合は、包埋切片と同等の像が得られた。セルロースマイクロフィブリル束のサイズが包埋切片より大きい傾向があった。またサイズのばらつきも大きかった。包埋切片でのセルロースマイクロフィブリル束サイズと形状が揃っていることから、樹脂包埋切片がSPMには適していると結論した。

形状像におけるセルロースマイクロフィブリル束のサイズは中央値18.5nmで、位相像では15.3nmであった。同一マイクロフィブリル束を比べても、位相像の方がその領域が小さくなっていった。形状像では成分の違いを区別していなく、セルロースマイクロフィブリル束の周りにあるマトリクス領域も含めてのサイズを評価していると考えられる。一方、位相像では突起構造には影響されず、位相のずれが小さい領域のサイズを評価し、セルロースマイクロフィブリル束だけを示していると考えられる。

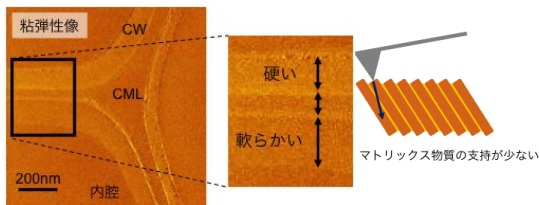
同一細胞壁の横断面位相像を用いて、放射壁と接線壁のサイズを検討した。切削時に順目となった放射壁と接線壁は同様のサイズであったが、切削時に逆目となった放射壁では2倍から3倍のサイズが測定された。試料調整がサイズに大きく影響することが示された。既往研究でのサイズもこの影響を受けている可能性がある。

縦断面位相像では、順目と逆目の影響はなく、どちらも同様のサイズが測定された。セルロースマイクロフィブリルの長軸に沿う方向の切削では順目と逆目の影響は小さいことが明らかになった。

粘弾性画像情報におけるマイクロフィブリル傾斜の影響

19年生辺材試料では、同一細胞の粘弾性画像は二次壁において放射方向も接線方向も同様であったが、4年生試料では画像の上側にくる細胞壁が常に柔らかいという結果が得られた。放射壁や接線壁、切削時の順目や逆目に依存せず、画像の上側にくる壁が柔らかい値を示していた。

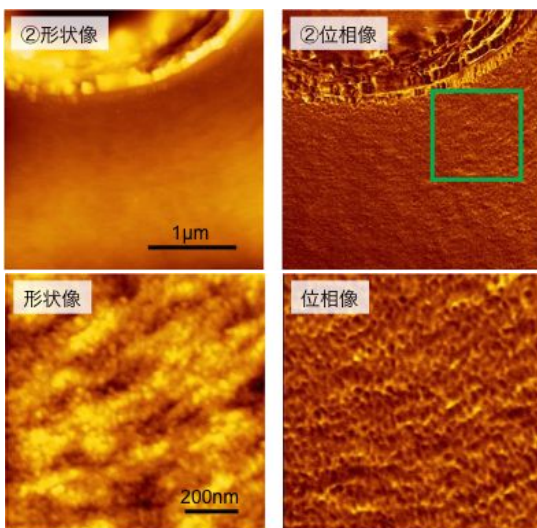
二次壁のセルロースマイクロフィブリルが深いZらせん構造をとることが原因である。SPMの探針は画面右側から覆いかぶさるように、画面左上から右下へ走査をしている。Zらせん構造をとる細胞壁では、上側の壁において、探針のチップが向きとセルロースマイクロフィブリル軸方向とがより平行に近くなる。これによりセルロースの隙間に探針チップが潜りやすくなる。



ただ、この現象はアルファセルロースの配向を変えた試料では再現できない。すなわちセルロースの隙間にあるマトリクスの支持が弱く潜り込む場合に粘弾性像で柔らかいと示されると予想できる。

(2) 細胞壁形成の日周生が細胞壁の構造と背室に与える影響の解明に向けて

オスミウム酸化処理を施した試料において、細胞壁に層状構造が観察されることが分かった。この処理は透過電顕の後固定兼電子密度調整のために用いられ、細胞壁成分ではマトリクス物質への付着性が高いと思われる。細胞壁内に存在するマトリクス分布の粗密を白金族元素の一つであるオスミウムの粗密を利用して、検出できたのではなからうか。



層状構造の繰り返しは約60 nm間隔であった。この層状構造は細胞壁形成の日周性がもたらしたのか。明期が長い試料と暗期が長い試料で調査をおこなった。

早材においてセルロースマイクロフィブリルの断面サイズは、明期が長い試料より暗期が長い試料の方がわずかに数nm大きい傾向があったが、統計的な有意な差ではなかった。晩材においても同様な傾向があった。

(3) 細胞壁形成の日周性について、その意義の思索

既往研究に、細胞壁に層状の構造は透過電顕で観られている(Fahlén&Salmén 2002)がある。この層状構造の繰り返しは約350 nmであった。本研究のそれは60 nmであった。二次壁の肥厚は約2週間要すると試算されている。試料から判断して、二次壁の横断面における幅を3000 nmとすると1日あたり200 nm程度肥厚する。60 nmのナノ周期構造は日周性がもたらしたのか、全く新しい構造を発見したのか、次の展開が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Yamashita M, Yoshida M, Matsuo M, Sato, S, Yamamoto H (2016) Observations of wood cell walls with a scanning probe microscope. *Materials Sciences and Applications*, 7: 644-653、査読有り
DOI: 10.4236/msa.2016.710052

〔学会発表〕(計5件)

山下真奈見, 吉田正人, 松尾美幸, 佐藤彩織, 山本浩之 (2017/3/17-19) 走査型プローブ顕微鏡による細胞壁微細構造の観察, 日本木材学会, 福岡

山下真奈見, 吉田正人, 松尾美幸, 佐藤彩織, 山本浩之 (2016/10/27) 走査型プローブ顕微鏡による細胞壁構成要素の観察, 日本木材学会中部支部大会, 金沢

山下真奈見, 吉田正人, 松尾美幸, 佐藤彩織, 山本浩之 (2016/3/27-29) 走査型プローブ顕微鏡による細胞壁観察, 日本木材学会, 名古屋

山下真奈見, 吉田正人, 佐藤彩織, 松尾美幸, 山本浩之 (2015/10/30) 走査型プローブ顕微鏡による細胞壁内物性分布の可視化, 日本木材学会中部支部大会, 高山

山下真奈見, 吉田正人, 佐藤彩織, 松尾美幸, 山本浩之 (2015/8/10) 走査型プローブ顕微鏡による細胞壁観察, 名古屋大学若手女性研究者サイエンスフォーラム, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 正人 (YOSHIDA Masato)
名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：3 0 2 4 2 8 4 5

(4)研究協力者
山下 真奈美 (YAMASHITA Manami)