

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07511

研究課題名(和文) 引張あて材形成における非セルロース性多糖類の役割

研究課題名(英文) Role of non-cellulosic polysaccharides in tension wood formation

研究代表者

栗野 達也 (Tatsuya, Awano)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：40324660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：広葉樹引張あて材においては、木部繊維のG層形成の有無に関わらず、グルクロノキシランやグルコマンナンなどの二次壁性ヘミセルロースが減少し、ラムノガラクトuronan I、アラビノガラクトン、アラビノガラクトタンパク質などの一次壁性の多糖類が増加した。また、オポジット材は引張あて材の比較対象として扱われることもあったが、非セルロース性多糖類の免疫局在が正常材とは異なることから、正常材の代用とするのは適当ではない。凍結切断・電界放出型走査電子顕微鏡法は、細胞の全体像と局所の超微細構造を同時に観察できるメリットがあり、あて材細胞壁形成過程での細胞壁微細構造の変化を観察するために有効な手段である。

研究成果の概要(英文)：In tension wood of hardwood species, glucuronoxylan and glucomannan, which are typically found in secondary wall, decreased during the formation of fiber cell wall. On the other hand, pectic polysaccharides such as rhamnogalacturonan I, arabinogalactan and arabinogalactan protein increased. It is not appropriate to use opposite wood as control to tension wood, because immunolocalization of non-cellulosic polysaccharides were different between opposite wood and normal wood. Freeze-fracture field emission scanning electron microscopy reveals the morphology of wood fiber in whole scale and at the same time the ultrastructure of cell wall in nano-scale. Therefore, the method is useful to observe the changes in ultrastructure during the cell wall formation of tension wood.

研究分野：樹木細胞学

キーワード：引張あて材 ヘミセルロース ペクチン 免疫局在 オポジット材

1. 研究開始当初の背景

樹木の幹に形成されるあて材は樹木の姿勢制御に関わっており、あて材部に発生する成長応力により幹を曲げ、重力や光環境の変化に対応している。広葉樹のあて材は組織構造が多様であるが、木部繊維壁にG層を有するタイプのものについてよく研究されている。

広葉樹のモデル植物であるポプラのあて材では、繊維の壁層は S_1+S_2+G の3層タイプであり、 S_1 および S_2 層はリグニンを含むが、G層はリグニンをほとんど含まない。G層のセルロース含量非常に高く、他に少量のペクチンとヘミセルロースを含む(後述)。正常材およびあて材木部繊維 S_2 層のセルロースマイクロフィブリル(以下、CMF)の幅は約2~3nmであるのに対し、G層のCMFの幅は約6nmと太い。G層のCMFは細胞長軸にほぼ平行に配置している。また、G層はメソポア構造(2~50nm)からなる多孔性に富む構造であることが報告されている。

木材の形成に伴う応力の発生は成長応力として知られており、形成層から細胞が分裂し拡大する過程で寸法変化が生じようとするが、木部組織中ではそれが拘束されるために細胞壁に残留応力が生じる。あて材では特に大きな応力を生じる。

成長応力発生の仮説として、リグニン膨張仮説とセルロース引張応力仮説が提唱されている。前者はリグニンなどのマトリックス高分子がCMF間に継続的に堆積すると、マトリックスは膨張しようとするが周囲のCMFに拘束され、結果として細胞壁はCMF配向と垂直な方向に膨張しようとするというものである。後者は細胞壁形成時にマトリックスの膨張ではなくCMF自身に繊維軸方向引張応力が生じるとするものである。

G層を形成する広葉樹の引張あて材ではG層のリグニン量が少ないため、引張応力の発生にリグニンが関与するとは考えにくい。近年、G層中のCMFには実際に引張応力が発生していることが確認されたが、何がCMF中に引張応力を生じさせたかは依然として明らかではない。NorbergとMeier(1966)は、ポプラ引張あて材から単離したG層を分析し、G層はグルコース98.5%とキシロース1.5%からなることを報告した。そのため、長らくG層は“ほぼセルロースからなる”と考えられてきた。申請者らが中性糖および糖結合分析を行ったところ、グルコース88.6%、キシロース5.6%、ガラクトース1.1%、フコース1.3%を検出し、セルロース以外にキシログルカン(XG)が含まれることを明らかになった(Nishikubo et al 2007)。また、G層中にはXG糖転移酵素/加水分解酵素(XTH)が存在しており、G層中でXGの修飾が起こっていることを明らかにした。この研究をもとに、Mellerowicz(2008)はCMF間にXGが架橋した状態でCMF同士の結晶化が起こる際にCMF自身に引張応力が生じるという

matrix entrapmentモデルを提唱した。

その後、免疫組織化学法により、モミジバフウのG層にはXG以外にもラムノガラクトナンI(RG-I)、アラビノガラクトナンI(AGP)、-1,4-ガラクトナンなどの非セルロース性多糖類が存在することが報告された(BowlingとVaughn 2008)。また、ポプラのG層では S_2/G 層境界とG層最内部にガラクトナンが存在することが報告された(Arend 2008)。しかし、これらの報告は完成したあて材でのものであり、あて材形成過程での分布には触れていない。申請者らは、ポプラの形成中組織におけるガラクトナンについて調べたところ、G層形成初期にはG層全体に分布するが、形成後期にはArend(2008)と同様に S_2/G 層境界とG層最内部に分布することが分かった(Yoshiura et al 2013)。また、分布変化と同時に壁厚が減少していた。これはガラクトナンは一旦G層全体に堆積するが後に分解され(成分分析で確認済)、それと同時に細胞壁の微細構造に大きな変化が生じて壁厚が減少していることを示している。同様のガラクトナン分布はユーカリ(S_1+G 層タイプ)の形成中あて材においても観察された。

2. 研究の目的

XG以外の非セルロース性多糖類(ガラクトナン、RG-I、AGP)の引張あて材形成における役割は不明であるが、ペクチン性多糖類はゲル化能を有するため水分を吸収して膨潤することができる。G層はメソポア構造(2~50nmの空隙)を有し、正常材二次壁より多孔性に富むが、ペクチン性多糖類のゲル化能が空隙形成に関与している可能性がある。従って、これらの非セルロース性多糖類もMellerowiczのmatrix entrapment仮説のように引張応力発生に関与している可能性があると考えられる。

本研究では、G層形成過程で堆積する各多糖類の相互関係を明らかにするとともに、それらと細胞壁微細構造(特に、CMFの集合状態や多孔性)との関係を明らかにする。さらに、これらの多糖類の生合成、分解、修飾に関与する遺伝子を同定する。また、G層を形成しないユキノキ、ホオノキなどのあて材においてもこれらの多糖類が関与するかどうかについて明らかにする。

引張あて材において複数の非セルロース性多糖類が存在することが報告されているが、多くの研究は完成したあて材を対象としており、不思議な事に形成過程を詳細に観察していない。本研究はあて材形成過程に注目して観察を行う。また、G層を形成しないあて材に関しては非セルロース性多糖類の分布や機能についてはほとんど研究例がない。G層を形成しないあて材にも引張応力が発生しており、これらの樹種での非セルロース性多糖類の分布をG層を形成する樹種のそれと比較することにより、どの多糖類が引張応

力の発生に寄与しているかを推定できる。

本研究によりあて材における引張応力発生分子メカニズムを明らかにできると期待される。

3. 研究の方法

あて材形成中組織における、非セルロース性多糖類の免疫組織化学

京都大学フィールド科学教育研究センター北白川試験地に生育する5年生のポプラおよび3年生のユリノキを人工的にロープで約45度傾斜させて約2ヶ月間固定し、引張あて材形成を誘導した。

直立木の正常材(NW)、傾斜木の引張あて材(TW)およびオボジット材(OW)における成長応力解放ひずみを、ひずみゲージ法により測定した。

NW、TW、OWより分化中木部を含む小片を採取し、アルデヒド固定後、LR White樹脂に包埋した。

ウルトラミクロトームを用いて1 μ m厚木口切片を作製し、3%スキムミルク・TBS溶液を用い室温で30分間ブロッキングした。続いて一次抗体として非セルロース性多糖類に対するモノクローナル抗体(36種類)と4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させ、Alexa Fluor 568標識二次抗体、もしくはDylight 550標識二次抗体と34 $^{\circ}$ Cで3時間反応させて蛍光顕微鏡で観察した。

また、上述の包埋ブロックから木口面超薄切片を作製し、Niグリッドにマウント後、1%BSA・0.1%NaN₃・TBS溶液を用い室温で30分間ブロッキングした。続いて一次抗体と4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させ、15nm金コロイド標識二次抗体と34 $^{\circ}$ Cで4時間反応させた。EMステイナーで10分間、クエン酸鉛で1分間電子染色を行い、透過型電子顕微鏡で観察した。

凍結割断・電界放出型走査電子顕微鏡法(FE-SEM法)による細胞壁微細構造の観察

TW形成部より採取した分化中木部ブロックより、100 μ m厚の連続板目切片を形成層側から順に作製した。各切片を小片に分割し、一部をFE-SEM法に使用した。残りはLR White樹脂に包埋し、前述の方法で免疫標識を行なった。

板目切片を高圧凍結装置を用いて高圧凍結した。その後、凍結割断装置を用いて、高真空、-150 $^{\circ}$ C以下で細胞長軸に平行に凍結割断を行った。液体窒素で冷却した真鍮ブロックに割断した切片を保持し、真空蒸着装置中で凍結乾燥した。乾燥後、イオンスパッタを用いて白金コーティングを行い、電界放出型走査電子顕微鏡(FESEM)で断面を観察した。

4. 研究成果

ポプラ分化中TW木部繊維における非セルロース性多糖類の局在

木部繊維(G繊維)のG層形成初期では β -1,4-ガラクトンの標識がG層全体に、ホモガラクトツロナンの標識がG層の一部に見られた。G層形成後期では β -1,4-ガラクトンの標識はS₂層とG層の境界部に限定され、ホモガラクトツロナンの標識は消失した。またRG-IおよびAGPの標識がG層全体に見られた。これらの結果はRG-Iを含むペクチン性多糖類がG層形成初期に堆積し、S₂層とG層の境界を除いてG層形成後期に消失する、またはG層形成過程でRG-Iの構造が変化していることが考えられる。

一方、二次壁性多糖類であるキシランの標識はG層では観察されず、マンナンの標識はG層の最内層に限定されていた。

これらのことから、ポプラの引張あて材においては二次壁性多糖類(キシラン、グルコマンナン)が減少し、ペクチン性多糖類(RG-I)およびAGPが増加することが明らかとなった。

ユリノキのTW形成と分化中木部(NW、TW、OW)における非セルロース性多糖類の局在

成長応力解放ひずみ測定の結果、傾斜木の傾斜上側で-0.20%から-0.18%のひずみが観測されたことから、傾斜上側に大きな引張応力が生じていたことがわかった。しかし、その値はG層を形成する樹種(ポプラなど)で報告されている値よりも低かった。

TWの木部繊維ではNWに比べてマンナン、ガラクトマンナン、アセチル化グルコマンナン、アセチル化ガラクトマンナンなどのマンナン系多糖類の標識が顕著に減少し、キシランの標識も減少していた。これらの多糖類の局在は二次壁の外側に限定され、二次壁の内側は標識されなかった。また、RG-IおよびAGPの標識が分化後期段階の木部繊維のS₂層内側で見られ、NWよりも増加していた。道管においてもマンナン系多糖類の標識が減少していた一方、放射組織ではマンナン、アセチル化マンナンの標識が増加していた。

OWではNWに比べて全体的にアラビノガラクトン、AGPの標識が顕著に減少していた。また木部繊維、道管ともにマンナン、ガラクトマンナンの標識がNWに比べて増加していた。

ユリノキTWではガラクトンの標識は分化後期段階の木部繊維二次壁でわずかに現れたのみであり、ポプラTWとは異なっていた。一方、グルコマンナン、キシランの標識はNWに比べ減少し、ポプラTWと同様の傾向を示した。

またOWはTWの比較対象(コントロール)として扱われることもあったが、ユリノキにおいて、非セルロース性多糖類の免疫局在にNWとは異なる特徴が見られたことから、コントロールとして用いるのは適当ではないと考えられる。

広葉樹引張あて材における非セルロース性

多糖類の局在と引張応力発生への関与

G層を有するポプラとG層を形成しないユリノキとの比較から、引張あて材の細胞壁形成において、グルクロノキシランやグルコマンナンなどの二次壁性ヘミセルロースが減少し、RG-I、AG、AGPなどの一次壁性の多糖類が増加することが共通して生じていると言える。

従って、二次壁性ヘミセルロース(キシラン、グルコマンナン)の減少とペクチン性多糖類(RG-I)および糖タンパク質(AGP)の増加が引張応力の発生に関与している可能性がある。

一方、ガラクトタンはG層を形成する樹種に特徴的で、これらの樹種で付加的な応力発生に関与している可能性がある。

凍結割断・電界放出型走査電子顕微鏡法(FE-SESEM法)により観察した形成中G層の微細構造

G層の外表面と中央に近い位置ではマイクロフィブリルの太さに違いが見られた。またG層形成初期と形成後期でもマイクロフィブリルの太さに違いが見られた。これはマイクロフィブリルに付着する多糖類の分布が変化するためであると考えられる。

FE-SESEM法は従来の凍結割断・レプリカ・TEM法と比べると、細胞の全体像と局所の超微細構造を同時に観察できるメリットがあることが確認された。G層形成過程での微細構造の変化を観察するために有効な手段であると考えられる。

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 件)

〔学会発表〕(計 4件)

1. 横山誠人、粟野達也、児嶋美穂、高部圭司、凍結割断・FESEM法によるポプラ引張あて材G層形成過程の観察、第68回日本木材学会大会、2018年3月14日、京都府立大学(京都府・京都市)
2. 米川翼、粟野達也、児嶋美穂、高部圭司、ユリノキの正常材、引張あて材、オボジツ材における非セルロース性多糖類の分布とその堆積過程、第68回日本木材学会大会、2018年3月14日、京都府立大学(京都府・京都市)
3. Tatsuya Awano, Masato Yokoyama, Tsubasa Yonekawa, Miho Kojima, Keiji Takabe, Localization of non-cellulosic polysaccharides in developing tension wood of poplar and yellow poplar, 9th Pacific Regional Wood Anatomy Conference (9th PRWAC), 2017年9月29日, Bali (Indonesia)
4. Masato Yokoyama, Tatsuya Awano, Keiji Takabe, Ultrastructure of G-layer of

differentiating tension wood fibers as revealed by freeze-fracture field emission scanning electron microscopy, 9th Pacific Regional Wood Anatomy Conference (9th PRWAC), 2017年9月26日, Bali (Indonesia)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

粟野 達也 (AWANO, Tatsuya)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号: 40324660

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

高部 圭司 (TAKABE, Keiji)
児嶋 美穂 (KOJIMA, Miho)
横山 誠人 (YOKOYAMA, Masato)
米川 翼 (YONEKAWA, Tsubasa)