

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03843

研究課題名(和文)細胞壁ナノ周期性物性差は細胞壁形成の日周期性がつくるのか

研究課題名(英文)Effects of diurnal cell wall thickening on the nano periodic property in the secondary wall

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は二次壁にナノ周期をもつ物性差が存在することを走査型プローブ顕微鏡で見つけた。このナノ周期性物性差は細胞壁形成の日周期性に発現理由があると考え研究を行った。形状解析レーザー顕微鏡で観察すると反射レーザー強度の強弱が同心円状の細胞壁縞状構造を可視化できた。反射強度が生じる原因は、細胞壁中のセルロースやマトリクス成分の分布がもたらす干渉によって生じると考えられた。走査型プローブ顕微鏡では、夜長の生育条件で分化した細胞壁ほど、層状構造が明瞭であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで明らかにされてなかった細胞壁二次壁の超微細構造の一端を示して細胞壁の理解を深めた。細胞壁は優れた生物材料である。形成の機序と完成した細胞壁の構造との関係が明らかになったことは、生育条件によって細胞壁の構造を制御できる可能性を示したことを意味する。木質科学研究において形状解析レーザー顕微鏡、走査型プローブ顕微鏡、イオン液体電子顕微鏡を利用知識の蓄積に貢献した。

研究成果の概要(英文)：I have found that there is a nano-periodic differences in physical property in the secondary cell wall, using a scanning probe microscope. This nano-periodic property difference may be due to the diurnal cell wall formation. The 3D laser scanning confocal microscope visualized the concentric cell wall stripe structure with the strength of the reflected laser intensity. The reflection intensity can be involved by the interference caused distribution of cellulose microfibril and matrix components in cell wall. The scanning probe microscope revealed that the layered structure was clearer in the cell wall differentiated under the long-night condition.

研究分野：木質科学

キーワード：細胞壁形成 二次壁肥厚 微細構造

1. 研究開始当初の背景

二次壁細胞壁の形成には日周性がある。昼にセルロースの堆積、夜にマトリクスの堆積が繰り返されて細胞壁は肥厚する。研究代表者は近年、二次壁にナノ周期をもつ物性差が存在することを見つけた。このナノ周期物性差は、形成の日周性によって作られるのだろうか。本研究はこの課題に取り組む。細胞壁のナノ周期物性差の全容を明らかにし、細胞壁形成の日周性がナノ周期物性差に与える影響を解明する。そして、形成の日周性をもつ意義とナノ周期物性差の細胞壁における役割を初めて明らかにする。本成果で、細胞壁の形成と物性発現の理解を一段階前に進める。

2. 研究の目的

(1) 細胞壁ナノ周期物性差の全容を明らかにする。ナノ周期物性差は、細胞壁成分の物性値を手掛かりに、研究代表者が走査型プローブ顕微鏡で見出した。物性差は細胞壁微細構造とどのように関わるのかを解明する。

(2) 細胞壁形成の日周性とナノ周期との関係を明らかにする。ナノ周期物性差が昼夜の周期に応答して形成されているかを確認し、本研究課題の主目的である「細胞壁ナノ周期物性差は細胞壁形成の日周性がつくるのか」の答えを探る。

3. 研究の方法

細胞壁ナノ周期物性差の全容を解き、細胞壁形成の日周性との関係を明らかにするため、

(1) イオン液体走査電子顕微鏡法を適用する条件を探り、含水しインタクトな状態で細胞壁を高倍率観察する。形状解析レーザー顕微鏡を利用して非全乾状態で細胞壁を観察する。

(2) 人工気象室・植物育成室で昼夜の周期を人為的に制御し、昼長(16時間が昼)の生育環境と夜長(8時間が昼)の生育環境でヒノキ苗木を生育した。昼の温度は26度、夜の温度は20度、室内の照度は、およそ晴れた日の夕方程度である。走査型プローブ顕微鏡および形状解析レーザー顕微鏡で観察をおこなった。

4. 研究成果

(1) エチル (2-ヒドロキシエチル) ジメチルアンモニウムメタンスルホナート (イオン対の組成式 $C_7H_{19}NO_4S$) ($[N_{2,1,1,2}OH][CH_3SO_3]$) とジメチル(ヘキシル(i-プロピル))アンモニウムビス((トリフルオロメチル)スルホニル)イミド (イオン対の組成式 $C_{13}H_{26}F_6N_2O_4S_2$, FW 452.47) ($[Nip_{6,1,1}][TFSI]$) を用いた。

$[N_{2,1,1,2}OH][CH_3SO_3]$ は両親媒性のイオン液体であり蒸留水で希釈した溶液を使用した。蒸留水でイオン液体を希釈してイオン液体水溶液を作製した。希釈したイオン液体を 40 μ l 滴下し、10 分経過してから、試料に残留しているイオン液体をエアブローで除去してから観察を行った。イオン液体濃度は 12.2% (w/w) で良い観察像が得られると分かった。

$[Nip_{6,1,1}][TFSI]$ は 100% エタノールでイオン液体を 8% (V/V) に薄めた溶液、10% (V/V) に薄めた溶液、12.5% (V/V) に薄めた溶液の 3 種類の溶液を作製した。希釈したイオン液体を 40 μ l 滴下し、10 分経過してから、試料に残留しているイオン液体をエアブローで除去してから観察を行った。疎水性イオン液体が残留し良好な観察像は得られなかった。

両親媒性の浸漬時間が短いとチャージアップが生じ正常な観察像が得られない場合は、浸漬時間を長くすると観察像は改善するが、残留イオン液体が観察表面を覆ったままという問題が生じることが分かった。

本研究で使用した両親媒性イオン液体の細胞壁への影響を検討したとこと、イオン液体浸漬前と後では重量減少は 0.58% で、非乾燥でインタクトな細胞壁を観察できる利点の方がはるかに大きいと言える。

形状解析レーザー顕微鏡で細胞壁を観察すると、反射レーザー強度の強弱による同心円状の縞状構造が観察された。この縞状構造がナノ物性差がもたらすものであれば、試料調整に時間と技術を要し、狭い領域しか観察できない走査型プローブ顕微鏡に代わり、迅速で広範囲な観察が可能にもなる。形状解析レーザー顕微鏡像での細胞壁縞状構造の原因として、レーザーの干渉、試料表面形状、試料成分の 3 つを検討した。干渉を生じる試料を調整して観察すると、光量の増減に伴い高さ情報も上下し、正確な高さ情報を得られていないことが判明した。同一成分で高さが異なる試料を調整して観察したところ、試料表面の高低と光量は連動しないことが分

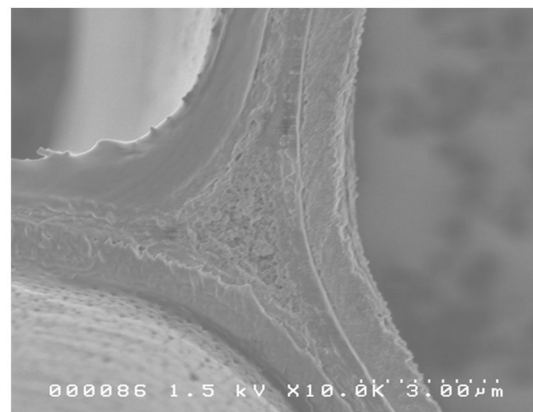


図1 イオン液体 FE-SEM 手法による良好な細胞壁コーナー部
両親媒性 12.2% w/w 水溶液に 10 分浸漬

形状解析レーザー顕微鏡で細胞壁を観察すると、反射レーザー強度の強弱による同心円状の縞状構造が観察された。この縞状構造がナノ物性差がもたらすものであれば、試料調整に時間と技術を要し、狭い領域しか観察できない走査型プローブ顕微鏡に代わり、迅速で広範囲な観察が可能にもなる。形状解析レーザー顕微鏡像での細胞壁縞状構造の原因として、レーザーの干渉、試料表面形状、試料成分の 3 つを検討した。干渉を生じる試料を調整して観察すると、光量の増減に伴い高さ情報も上下し、正確な高さ情報を得られていないことが判明した。同一成分で高さが異なる試料を調整して観察したところ、試料表面の高低と光量は連動しないことが分

かった。細胞壁においては、光量と高さ情報は連動していた。また、走査型プローブ顕微鏡では形状解析レーザー顕微鏡で計測される高さ変動が現れないことから、細胞壁におけるレーザー顕微鏡の光量と高さ変動は干渉の影響を受けていることが分かった。

細胞壁からマトリクス成分であるリグニンを穏やかに除去しながら、形状解析レーザー顕微鏡で縞状構造を観察していくと、リグニンの除去につれて縞状構造は不明瞭になっていった。このことから、縞状構造は細胞壁成分がもたらす干渉によって生じている可能性が最も高いと判断した。形状解析レーザー顕微鏡で細胞壁に生じる同心円状の縞状構造は、細胞壁の成分分布に起因する干渉に因ると考えられる。

(2) 夜長の試料では同心円状の縞状構造が明瞭である一方、昼長では不明瞭であった。走査型プローブ顕微鏡の位相差像によりセルロース領域とマトリクス領域を区別して観察したところ、昼長の試料ではセルロースマイクロフィブリル束の断面サイズが大きい傾向にあった。マイクロフィブリル束サイズが昼夜環境に影響を受ける可能性があり、新たな発見で今後の研究に有益な情報である。

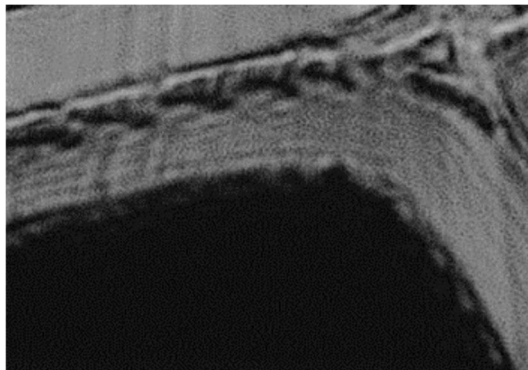


図2 形状解析レーザー顕微鏡による細胞壁反射光量像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshida M, Sato S, Kawamoto T, Kawamoto K, Saigusa D, Uruno A, Saito R, Matsuo-Ueda M, Yamamoto H	4. 巻 8
2. 論文標題 Cryosection preparation for histological study, gene expression analysis and imaging mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Plant Biology Research	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村松瞬, 吉田正人, 松尾美幸, 山本浩之
2. 発表標題 生育の明暗周期が木部細胞壁の微細構造に与える影響
3. 学会等名 日本木材学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shun Muramatsu, Miyuki Matsuo-Ueda, Masato Yoshida, and Hiroyuki Yamamoto
2. 発表標題 Effect of the photoperiod on the microstructure of xylem cell walls
3. 学会等名 2018 SWST/JWRS International Convention, Nagoya, Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山晋平、吉田正人、青木 弾、松尾美幸、山本浩之
2. 発表標題 含水状態での細胞壁微細構造観察を目指した‘イオン液体 FE-SEM 法’の検討
3. 学会等名 日本木材学会中部支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新郷綾音, 吉田正人, 松尾美幸, 山本浩之
2. 発表標題 形状解析レーザー顕微鏡による木材細胞壁の観察
3. 学会等名 日本木材学会大会
4. 発表年 2020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
研究協力者	村松 瞬 (Muramatsu Shun)		
研究協力者	西山 晋平 (Nishiyama Shinpei)		
研究協力者	新郷 彩音 (Shingou Ayane)		