

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05760

研究課題名（和文）光・電子相関顕微鏡法による木材細胞壁多糖類の網羅的局在解析

研究課題名（英文）Localization of non-cellulosic polysaccharides in wood cell walls by high-throughput correlative light and electron microscopy

研究代表者

栗野 達也（Awano, Tatsuya）

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：非セルロース性多糖類の木材細胞壁中での分布を明らかにするため、172種類の抗体を用いて効率よく免疫標識を行うための方法を検討した。印刷スライドガラスとバーチャルスライドスキャナの利用により、2日以内で画像取得ができた。条件付き敵対的生成ネットワークにより細胞壁染色像から免疫標識画像を生成できるようになったが、出現頻度が低い細胞種での再現性には改善が必要であった。ポプラ木部繊維では、側鎖置換への許容度が低い抗キシラン抗体の標識は切削方向の影響を受けるのに対し、側鎖置換への許容度が高い抗体の標識は切削方向の影響を受けないことが明らかとなった。これはスギ仮道管においても同様の傾向が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木材細胞壁における非セルロース性多糖類の分布を172種類の抗体を用いて短時間に観察する方法を開発した。同一細胞での多糖類分布を比較するため、生成AIにより細胞壁画像から多糖類分布像を生成した。抗体が標識する非セルロース性多糖類の分子構造により組織切片の切削方向の影響を受けるものと受けないものがあり、細胞壁内での非セルロース性多糖類の存在様式を反映していると考えられる。このことは、細胞壁中での非セルロース性多糖類の役割を知る手掛かりとなる。

研究成果の概要（英文）：An experimental method of high-throughput immunolabeling using 172 different antibodies was investigated to determine the distribution of non-cellulosic polysaccharides in wood cell walls. The use of printed glass slides and a virtual slide scanner enabled image acquisition in less than 2 days. A conditional generative adversarial networks enabled the generation of immunolabeled images from cell wall stained images, but improvement was needed in precision in case of cell types that appeared infrequently in cross sections. In poplar xylem fibers, the labeling of anti-xylan antibodies with low tolerance for side-chain substitution was affected by the direction of cutting, whereas the labeling of antibodies with high tolerance for side-chain substitution was not affected by the direction of cutting. The same trend was observed in tracheids of Japanese cedar.

研究分野：樹木細胞生物学

キーワード：木部繊維 仮道管 非セルロース性多糖類 キシラン 条件付き敵対的生成ネットワーク バーチャル
免疫標識 ポプラ スギ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非セルロース性多糖類は木材細胞壁の主要成分の一つであり、キシラン、グルコマンナン、キシログルカン、ガラクトタン、アラビナンなどのヘミセルロースと、ホモガラクトツロナン、ラムノガラクトツロナンなどのペクチン性多糖類が含まれる。一般に、植物細胞壁の成分組成および成分の局在は細胞の種類により異なり、細胞が果たす役割に合わせて細胞壁を構成していると考えられる。木材細胞壁中での非セルロース性多糖類の役割について、セルロースの結晶化やリグニンの重合に影響を与えることなどが考えられるが、細胞の機能と非セルロース性多糖類の局在の関係性を明らかにすることでより非セルロース性多糖類の機能を明確にすることが期待できる。

広葉樹材の木部繊維は形態的・機能的な多様性が見られる。ポプラにおいては二次壁の最内部に網状層を形成する木部繊維と形成しない木部繊維が存在し、前者は道管周囲に分布し、後者は道管から距離を置いて分布する。これらの木部繊維の細胞壁組成は明らかではない。また、放射柔細胞は木部繊維と異なる機能を持ち、その細胞壁の壁層構成も木部繊維とは異なるが、非セルロース性多糖類の分布については情報が無い。

非セルロース性多糖類は個々の多糖類に特有の分光学的特徴がないため、局在を調べるのが困難であった。免疫標識法は抗体が抗原分子を正確に認識して特異的に結合する能力を利用して組織中の特定の分子の局在を可視化する方法であり、非セルロース性多糖類の検出に有効である。植物の細胞壁多糖類に対する抗体は 200 種類以上が作製されているが、木材細胞壁成分の組織化学についてのこれまでの報告の多くはごく少数の抗体を用いたものに限定されている。また、同一の切片に同一種の動物から作製された複数の抗体を同時に反応させることは原理的に不可能であり、同一細胞における抗体間の標識を相互に比較することは厳密にはできない。

2. 研究の目的

非セルロース性多糖類の木材細胞壁中での役割は何かを明らかにするため、木材細胞の機能と非セルロース性多糖類分布との関係を明らかにする。そのため、木部繊維について免疫標識法により非セルロース性多糖類の局在を調べる。その際、150 種類を超える抗体を用いて効率よく免疫標識を行い蛍光顕微鏡および電子顕微鏡で観察するための実験手法を検討する。また、同一細胞における抗体間の標識を相互に比較するため、生成 AI 技術を用いたバーチャル免疫標識技術の導入を試みる。

3. 研究の方法

木部組織の樹脂包埋

ポプラおよびスギの辺材から小片を作製し、グルタルアルデヒド固定液で固定した。エタノールシリーズで脱水した後、LR White 樹脂 (Hard Grade ; London Resin) で包埋した。

免疫蛍光標識

ダイヤモンドナイフを装着したウルトラミクロトームを用いて、樹脂包埋ブロックより 0.5 μ m 厚の木口切片およびまさ目切片を作製した。作製した切片は剥離防止コーティング済みスライドガラス (MSA コートスライド MAS-01 ; 松浪硝子工業) または高撥水性印刷スライドガラス (TF1205M ; 松浪硝子工業) に貼付した。1%BSA・TBS 溶液でブロッキングした後、希釈した抗非セルロース性多糖類モノクローナル抗体 (172 種) Alexa Fluor 568 標識二次抗体を順次反応させ、褪色防止封入剤で封入した。一部の切片については、抗体反応後、オーラミン 0 染色液で細胞壁全般を染色した。カラー CCD カメラ (DP74 ; オリンパス) または sCMOS モノクロカメラ (ORCA-Flash 4.0 V3 ; 浜松ホトニクス) を装着した落射型蛍光顕微鏡 (BX51 ; オリンパス) あるいはバーチャルスライドスキャナ (VS200 ; Evident) を用いて蛍光顕微鏡像を撮影した。

バーチャル免疫標識

抗キシラン抗体 3 種について、同一切片から細胞壁像 (オーラミン 0 染色像) と免疫蛍光標識像のセットを撮影した。これらを教師画像として pix2pix と呼ばれる条件付き敵対的生成ネットワーク (cGAN) を構築し、細胞壁像から各抗体標識を生成するモデルを作成した。

免疫金標識

免疫蛍光標識においてポプラ木部繊維に標識が見られた抗キシラン抗体について、免疫金標識による透過電子顕微鏡観察を行った。ダイヤモンドナイフを装着したウルトラミクロトームを用いて、樹脂包埋ブロックより木口超薄切片を作製し、ニッケルグリッドに貼付した。1%BSA・TBS 溶液でブロッキングした後、希釈した抗キシランモノクローナル抗体、Nanogold 標識二次抗体を順次反応させ、金増感を行った。酢酸ウラニルで染色した後、透過電子顕微鏡 (JEM-1400 ; 日本電子) で観察した。

4. 研究成果

網羅的免疫蛍光標識

高撥水性印刷スライドガラス (TF1205M; 松浪硝子工業) を用いることにより、172 種の抗非セルロース性多糖類抗体を用いた免疫蛍光標識を 2 日以内 (切片作製 1 日、抗体反応 1 日) に完了することができた。また、バーチャルスライドスキャナの使用により、約 1 時間程度で全ての蛍光標識像の撮影を自動で完了することができた。

バーチャル免疫標識

ポプラについて、細胞壁染色像から抗キシラン標識画像を生成するモデルを作成した (図 1)。全ての木部繊維に標識が見られる抗体 2 種については実際の木部繊維の免疫標識パターンをよく反映した画像が生成されたが、一部の木部繊維に見られる網状層のみを標識する抗体については、実際の標識よりも標識強度が弱い画像が得られた。放射柔細胞については実際の標識を再現することができなかった。切片中の出現頻度が高い構造については免疫標識パターンを良好に再現できるが、出現頻度が低い構造については再現できないことが分かった。

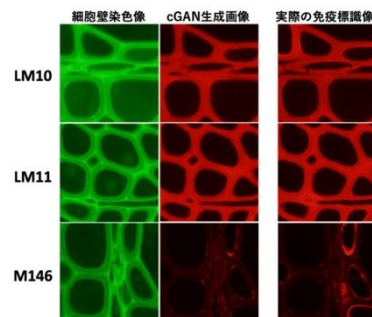


図 1 バーチャル免疫標識

ポプラにおける非セルロース性多糖類の局在

ポプラについて、172 種類の抗糖鎖モノクローナル抗体を用いた網羅的な免疫標識を行い、非セルロース性多糖類の違いをもとに網状層を持つ木部繊維と持たない木部繊維の違いを免疫組織化学的観点から検討した。使用した 172 種類の一次抗体のうち、木部繊維に対する標識が確認できたものは 56 種類であった。これらの抗体はペクチン、キシログルカン、キシラン、マンナンに特異性をもつが、組織全体に標識が見られる抗体や、網状層をもつ木部繊維のみに標識が見られる抗体が存在した。また木部繊維に対する標識が確認できなかった抗体の中には、組織全体に標識が確認されなかったものや放射組織のみに標識があるもの等が見られた。網状層を標識する抗体にはペクチン (ラムノガラクトナン 1) に対する抗体も含まれるが、多くはキシランに特異性を持ち、特にグルクロン酸側鎖を含む構造を認識する抗体が多かった。このことから、網状層はグルクロン酸側鎖に富むキシランを主成分とすると考えられる。網状層をもつ木部繊維と持たない木部繊維では二次壁に対する一部の抗キシラン抗体の反応性が異なり、二次壁を構成するヘミセルロースの組成や構造が異なることが示された。

木部繊維に標識が確認できた 56 種のうち、二次壁に標識が見られた抗キシラン抗体に着目し、分化中木部繊維における免疫局在を詳細に検討した (図 2)。木口面では、抗体のキシラン主鎖に結合する側鎖置換基への許容度によって標識に違いが見られた。側鎖置換基への許容度が高い抗体では、二次壁形成初期から標識が現れ、S2 層の肥厚と共に標識が強くなり、二次壁形成後期まで細胞壁全体にほぼ均一な標識が見られた。一方で、側鎖置換基への許容度が低い抗体では、S2 層形成開始時は細胞壁に均一な強い標識が見られるが、形成が進行すると S2 層と思われる二次壁中間部の標識が弱くなることが確認された。S3 層形成が開始されてからは、さらに中間部の標識が弱くなった。S2 層には側鎖置換度の低いキシランが存在しないのかどうかを確認するため、縦断切片でも同様に免疫標識をおこなった。その結果、側鎖置換基への許容度が低い抗体でも、壁形成の段階に関わらず S2 層にも標識が見られた。側鎖置換基への許容度が高い抗体では、壁形成の段階に関わらず S2 層に標識が見られた。このことから、側鎖置換基への許容度が比較的低い抗体の標識は切削方向の影響を受けるのに対し、側鎖置換基への許容度が高い抗体の標識は切削方向の影響を受けないことが明らかとなった。このことから、木部繊維 S2 層では側鎖置換度が低いキシランと側鎖置換度が高いキシランのあり方が異なり、S2 層形成初期では側鎖置換度が低いキシランも側鎖置換度が高いキシランもセルロースマイクロフィブリル (CMF) 配向の影響を受けないが、S2 層形成の進行とともに側鎖置換度が低いキシランは CMF 配向の影響を受けることが示唆された。

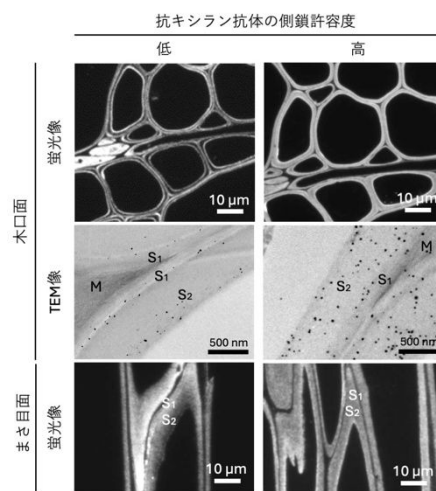


図 2 抗キシラン抗体の側鎖置換に対する許容度と標識パターン

スギにおけるキシランの局在

抗キシラン抗体の標識が切削方向の影響を受ける現象が針葉樹材においても観察されるかどうか確認するため、抗キシラン抗体 31 種について早材仮道管および晩材仮道管での標識パターンを木口面とまき目面切片で確認した。その結果、早材晩材を問わず、S2 層において側鎖置換度が高いキシランの標識はセルロースマイクロフィブリル (CMF) 配向の影響を受けないが、側鎖置換度が低いキシランは CMF 配向の影響を受けることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 土本茉央、粟野達也、陳碩也、吉永新、杉山淳司
2. 発表標題 ポプラ木部繊維の免疫組織化学的プロファイリング
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土本茉央、粟野達也、陳碩也、杉山淳司
2. 発表標題 非セルロース性多糖類に対するバーチャル免疫標識
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村尚敬、粟野達也、吉永新、杉山淳司
2. 発表標題 ポプラ放射組織の接触細胞と隔離細胞の細胞壁構造と成分分布
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mahiro Tsuchimoto, Tatsuya Awano, Arata Yoshinaga, Junji Sugiyama
2. 発表標題 Immunohistochemical profiling of poplar wood fiber using monoclonal antibodies directed to non cellulosic polysaccharides
3. 学会等名 The 5th International Cellulose Conference [ICC 2022+1](国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土本 茉央、粟野 達也、吉永 新、杉山 淳司
2. 発表標題 ポブラ分化中木部繊維に堆積するキシランの分子構造の多様性とその空間分布
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会京都大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大村 麗奈、粟野 達也、吉永 新、杉山 淳司
2. 発表標題 免疫標識を用いたスギ仮道管におけるキシランの構造と配向
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会京都大会
4. 発表年 2024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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------