

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580187
 研究課題名（和文） FE-SEM 抗体法で細胞壁肥厚の物理機構を時系列解析
 研究課題名（英文） Sequential analysis of physical mechanism for cell wall formation by immunoelectron microscopy
 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：30242845

研究成果の概要：形成層で分裂した細胞は、膨圧の力によって体積を拡大させる。その後の強固な細胞壁の堆積にも膨圧は関わっていることを研究代表者は明らかにしてきた。本研究は、日変動する膨圧と細胞壁堆積を時系列で解析することを目指し、次の成果を得た。従来法に比べて、より無傷に細胞壁の新生面を観察する方法を確立した。膨圧を人為的に変動させながら生育する方法を確立した。生育時の光と膨圧が細胞壁成分堆積に及ぼす影響を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学 木質科学

キーワード：組織構造・材形成 物性発現

1. 研究開始当初の背景

樹木の木部細胞二次壁は、壁成分が最内層へと堆積して肥厚することで形成される。この形成の機構には、

- (1) 細胞内での壁成分の生合成、
- (2) それら成分の細胞壁への輸送、
- (3) 細胞壁における重合、

の3つの過程がある。従来、これらの過程は生物学的、化学的アプローチで研究されてきた。

近年、応募者の研究によって上記(2)の成分輸送の過程において、ヘミセルロースとリグニン前駆物質の原形質から細胞壁への輸送に

は、原形質の内圧が作用していることが示唆された(伊藤ら2004, Hosoo et al. 2006)。

さらに、原形質内圧は樹木の蒸散作用によって日変動するため、細胞壁形成の理解には時系列を考慮した物理的なアプローチが必要であると確信した(Yoshida et al. 2000)。

本研究は、(2)の壁成分輸送の過程における原形質内圧の作用と、(3)における細胞壁重合の際のパッキング機構を時系列解析し、細胞壁形成の物理機構の解明を目指す。

樹木の木部繊維細胞壁がその分化過程において肥厚することは、木本植物の草本植物に対する主要な独自性の一つであり、草本のモ

デル植物を対象研究できない(Taylor 2002)。それが、植物研究において二次壁研究が少ない理由である(Chaffey 2002)。

しかし、二次壁は細胞壁中で大部分を占め、セルロースマイクロフィブリルが整然と密に並んで細胞壁の物性を決定している重要な部分である。したがって、バイオマス資源蓄積量の9割を占める樹木の二次壁は、木質バイオマスの本質であり、これを研究することは、植物科学における樹木科学の独自性であるとともに、持続的な利用を目指した循環型社会の構築へとつながる極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

(1) 原形質内圧の壁成分輸送への作用の解明

二次壁肥厚において、細胞壁成分の堆積には原形質内圧が密接に関連していることを示唆してきた。ヘミセルロース特異抗体を用いたFE-SEM抗体法によって、原形質内圧によるヘミセルロースの堆積を観察し、二次壁肥厚時における細胞壁成分輸送への原形質内圧の作用を時系列で解明する。

(2) 細胞壁重合におけるパッキング機構の解明

堆積した壁成分は、ターミナルコンプレックスから合成されたセルロースマイクロフィブリルを含め、互いに結びつきながら重合して強固な細胞壁が形成される。この際、化学的な力だけでなく、原形質内圧による力学的な圧縮力が細胞壁をパッキングする作用をしていると推察される結果を得ている(Yoshida et al. 2000, Yoshida et al. 2003)。分化中の原形質内圧と分化後の細胞壁の強度を解析し、細胞壁重合の過程における物理的パッキング機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 原形質内圧の細胞壁成分輸送への作用を解明

intactな二次壁新生面における壁成分堆積をFE-SEMと抗体法を組み合わせ、原形質内圧の変動を考慮した時系列解析を行う。

① 無傷な二次壁新生面を得る

二次壁新生面を解析するために、柔らかい分化中木部の繊維細胞を放射面で切削しなければならない。凍結ステージを備えたマイクロトームが一般に使用されるが、凍結の影響で組織破壊が起きる。本研究では、二次壁新生面上のヘミセルロース・モノリグノールからなる細胞壁マトリクスの堆積を時系列で解析するため、試料調整の段階での凍結によるマトリクスの損失は可能な限り抑えたい。

このために、振動刃マイクロトームを導入する。電動でナイフのフィーディングを行いながら、振動刃が試料を切削することで、凍結前処理なしに生体試料を調整できるこの機器で、二次壁新生面の試料を凍結せずに調整する。さらに、この際に試料を冷却した緩衝液内に浸液することで、マトリクス破壊を防ぎ、抗原性を維持することが期待できる。



② 抗体法の抗血清を調整

抗グルコマンナン抗血清と抗キシラン抗血清をウサギにより調整する。過去の研究で調整しており、手法は検討済みである。微量なマトリクス中の抗原も検出するよう、高い活性をもった抗血清の調整を目指す。使用するウサギの個体差で免疫性が異なるため、調整済みの抗血清も含めて、最適な抗血清を研究に使用する。

③ 原形質内圧の変動を計測

原形質の内圧は、形成層で分裂した細胞がその体積を拡大させる原動力であり、細胞の膨圧である。これを直接測定することは可能であるが、それには試料の破壊を伴う。本研究は、1個体の膨圧を連続的に非破壊で測定するために、膨圧と直線関係で変動する木部ポテンシャルに着目する。木部ポテンシャルは、樹幹のポテンシャルで、その変動は樹幹直径の変動として現れる。樹幹直径の変動を内樹皮接線ひずみ法(山本ら2003)で測定することで、原形質内圧の変動を計測する。

④ FE-SEM抗体法で二次壁の形成を解析

原形質内圧の変動に対応して採取した二次壁新生面に堆積しているヘミセルロースを調製した抗血清で検出し、電界放出型走査電子顕微鏡(FE-SEM)で観察することで、原形質内圧と堆積するマトリクスの関係を時系列で解析する。

(2)細胞壁重合のパッキング機構を解明

堆積した壁成分は互いに絡み合い重合して強固な細胞壁が形成されていく。この際に原形質内圧が細胞壁を押し固めるパッキング作用の解明を目指す。

⑤原形質内圧を制御する手法を確立

分化終了した細胞壁の力学的特性と分化中に受けた原形質内圧の履歴を調べて、細胞壁へのパッキング作用を解明する。このために、原形質内圧の大小を人為的に制御する手法を確立する必要がある。

樹木苗を水耕で生育し、その水耕液に圧力を加えることで樹木苗は多量の液を含ませて、原形質内圧を高め、逆に水耕液を減圧することで、原形質内圧を低めることを目指す。この場合、樹木苗を水耕で生育した場合の特徴を認識しておく必要があるため、水耕液を加減圧しない試料を対照実験として解析する。



気孔開閉に係る植物ホルモンを利用し、原形質内圧の制御を目指す。開孔用にはアブジン酸、サイトカイニン、オーキシシン、エチレンを利用する。閉孔用にはフクコクシン、vanadate、DCMUを利用する。薬剤の適正濃度溶液を決めて、界面活性剤と一緒に樹木葉に噴霧する。

⑥細胞壁の物理的特性と原形質内圧の関係を解析

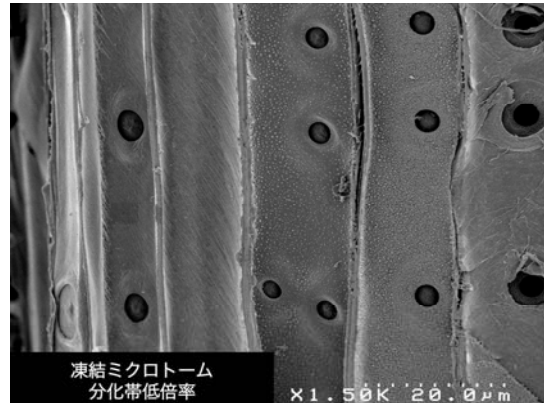
分化過程に原形質内圧が高い状態で成熟した細胞壁と原形質内圧が低い状態で成熟した細胞壁の力学特性を解析する。セルロースミクロフィブリルの配向性、セルロースの結晶性、リグニン濃度、細胞壁の力学性質、密度等を計測する。

4. 研究成果

(1)原形質内圧の細胞壁成分輸送への作用を解明に向けて、従来に行われている試料調整方法よりも、より無傷な二時壁新生面をFE-SEM抗体法で観察する方法を検討し、その方法として次の成果を得た。

定法では試料採取後、グルタルアルデヒド化学固定を行うことで、タンパク質に架橋構造を構築し、試料の切削時に柔軟な分化中細胞の形態が損なわれないようにしている。しかし、新生面に堆積するし無定形な多糖類はこの操作によって多数が消失していることが分かった。また、柔らかい分化帯は試料切削時にその形が変形してしまうことを抑えるため、試料を凍結して切削するのが定法であるが、無定形な多糖類は凍結と融解によって多数が消失していることが分かった。

これらの結果から、壁成分輸送を解明するための試料調整方法を確立した。それは試料を採取した後直ちに非凍結で緩衝液を用いて湿らせながら切削することである。



(2)堆積した細胞壁成分は互いに絡み合い重合して強固な細胞壁が形成される。細胞壁が強固になるのは、日変動する原形質内圧が形成中の細胞壁を押し固めていることが大きく

関与していると予想している。このパッキング作用を調べるため、成育中の樹木苗の原形質内圧を人為的に制御する方法を検討し、以下の結果を得た。

樹木苗を水耕法で生育し、水耕液は密封した容器に入れ、水耕液にコンプレッサーで圧力を加えることで樹木苗に水耕液を過分に吸水させることできた。加圧力を特注した微量調整弁で調整することで、木部ポテンシャルとして計測される内樹皮接線ひずみを人為制御できるようになった。これにより、原形質内圧によるパッキング作用の解明に向けての実験方法の1つを確立した。

(3) 原形質内圧が細胞壁成分輸送へどのように作用しているかを解明するために、より無傷な二次壁新生面における壁成分堆積をFE-SEMと抗体法を組み合わせる時系列解析を試みる研究目的において、以下の成果を得た。

原形質内圧の日変動を推定するために、内樹皮における接線ひずみ法による木部ポテンシャル測定に加えて、葉を試料とした水ポテンシャル測定を試み、時系列パラメータの増加を目指した。接線ひずみの変動と水ポテンシャルの変動は合致し、両者の変動に位相差がないことが確認できた。この結果、自動連続測定において有利であり、さらに比較的安価な測定ができることから、接線ひずみ法が原形質内圧の測定に最適であると結論した。

二次壁新生面の壁成分堆積と原形質内圧との関係を調べるため、樹木試料の生育照度を幾種類準備し、光強度変動とひずみ変動と二次壁新生面の関係を調べた。強光度から低光度までを4段階に設定し、それらの組み合わせ6通りの生育条件で試料を生育した結果、二次壁新生面において、強光度ほどセルロースマイクロフィブリルの堆積が明瞭に観察された。また、低光度ほどリグニンとヘミセルロースからなるマトリックスの堆積が明瞭に観察された。さらに、強光度と低光度の差がわずかであっても接線ひずみ変動は測定され、二次壁新生面の様相も差があることが分かった。

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)

[学会発表] (計 1件)

① 細尾佳宏、吉田正人、山本浩之

スギの二次壁新生面への成分堆積周期に与える光強度の影響、日本木材学会、2009年3月17日、松本

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：30242845

(2) 研究分担者

山本 浩之 (YAMAMOTO HIROYUKI) 2007年度
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：50210555
今井 貴則 (IMAI TAKANORI) 2007年度
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：20252281

(3) 連携研究者

山本 浩之 (YAMAMOTO HIROYUKI) 2008年度
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：50210555
今井 貴則 (IMAI TAKANORI) 2008年度
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：20252281