

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850120

研究課題名(和文)イオン顕微鏡を用いた元素イメージングによる木質細胞壁形成過程の研究

研究課題名(英文)Study of xylem cell wall formation using isotopic imaging

研究代表者

竹内 美由紀 (Takeuchi, Miyuki)

東京大学・農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：20378912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では光合成により吸収された炭素が、木部細胞壁に取り込まれる過程を明らかにすることを目的とした。炭素の安定同位体で標識した二酸化炭素を樹木に短時間与えるパルスラベリングと、安定同位体比の測定および二次イオン質量分析法による同位体イメージングを組み合わせ、樹体内におけるこの炭素の挙動を追跡した。安定同位体投与後の時間経過に伴う、 $^{13}\text{C}$ の細胞壁内分布変化を細胞レベルで観察することができた。また光合成で取り込まれた炭素の一部がすみやかに木部に送られて細胞壁に取り込まれることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Stable isotopic labeling combined with isotopic imaging using SIMS was used in order to investigate process of carbon accumulation in wood. This study aimed to understand correlation between process of wood formation and carbon assimilation of photosynthesis.  $^{13}\text{C}$ -labelled carbon dioxide was applied to a poplar tree and distribution of the tracer  $^{13}\text{C}$  was analyzed. Time course of carbon accumulation to xylem cell wall was studied and it revealed change of  $^{13}\text{C}$  distribution in cell wall in subcellular scale. A part of carbon derived from  $\text{CO}_2$  was directly incorporated into xylem cell wall. Remarkable accumulation of the tracer  $^{13}\text{C}$  was detected in a narrow layer in the cell wall of the developing xylem.

研究分野：樹木細胞学

キーワード：細胞壁 安定同位体 二次イオン質量分析法 元素イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

樹木木部形成については、その形態的な形成過程をはじめ、構成成分の代謝経路や堆積挙動、細胞分化や細胞壁形成に関わる遺伝子など、様々な面から多くの研究が行われてきた。一方、二酸化炭素や水分といった外界とのやりとりを含む、樹木の活動の一部として木部形成を捉える場合には、季節変動や年輪単位の木部の生長や形成層の活動が注目されることが多く、細胞レベルでの細胞壁形成と樹木全体の活動の相関についての研究例は多くない。しかし、ヘミセルロース堆積に日周期性が報告されているなど、細胞壁形成にはそのときの外部環境や木部形成以外の樹木の活動が細かく反映されている。そのため細胞壁形成機構について理解するためには、外部環境および樹木全体の活動と合わせて、その動的な過程を解析する必要がある。光合成は樹木を含めた緑色植物に特徴的な活動であり、植物の活動に必要な炭素の供給源であることから、光合成による炭素の固定や炭素の転流と木部形成の関係を明らかにすることは木部形成機構を理解する上で重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、樹木木部の形成、すなわち形成層での細胞分裂によって木部の細胞が生じてから細胞壁が完成までの過程を、炭素の供給源となる光合成と関連づけ、光合成を開始点とした時間軸の上で木部細胞形成に要する時間や各細胞壁成分堆積のタイミングを明らかにすることを目標としている。炭素の安定同位体である  $^{13}\text{C}$  で標識した二酸化炭素を短時間植物に与えて光合成により取り込ませ、植物体に取り込まれた  $^{13}\text{C}$  標識を追跡することにより、特定の時期に光合成で取り込まれた炭素の分布を調べることができる。そこで本課題では樹木細胞壁を  $^{13}\text{C}$  で標識し、その  $^{13}\text{C}$  分布を細胞レベルで分析することにより、特定の細胞壁がいつの光合成産物に由来し、いつ堆積したのかわかることを目的とした。このとき、細胞壁形成過程を数時間の単位で経時的に追跡することを目指した。

## 3. 研究の方法

同位体トレーサー法は生物体内における物質移動や代謝を研究するうえで有効な方法である。細胞壁形成に関しては、放射性同位体標識物質によるオートラジオグラフィによる研究が非常に多くの知見をもたらした(Takabe et al. (1985) Mokuzai Gakkaishi, 31. 613など)。最近では、安定同位体トレーサーを検出する手法として、二次イオン質量分析法 (Secondary ion mass spectrometry, SIMS) が用いられ、木質科学分野を含めた様々な研究に成果をあげている(福島和彦、斎藤香織 (2007) 木材学会誌, 53. 291)。本課題で使った二次元高分解能SIMSでは標識  $^{13}\text{C}$  分布を細

胞レベルで解析することが可能である。そこで  $^{13}\text{C}$  を樹木に投与し、その樹体内および細胞内分布をSIMSおよび安定同位体分析による解析するという方法を、中心的な解析手法として使用した。

### (1) $^{13}\text{C}$ 標識試料の作製

炭素の安定同位体である  $^{13}\text{C}$  で標識した二酸化炭素を短時間樹木に投与して光合成により取り込ませた。試料はポプラ若木を使用し、その葉全体を覆って  $^{13}\text{C}$  標識二酸化炭素を与えた。投与時間は2時間とし、その後の代謝時間を変えて試料を採取した。標識試料は組織ごとに分画し、安定同位体質量分析およびSIMSによる同位体イメージングに供した。

### (2) $^{13}\text{C}$ イメージング

$^{13}\text{C}$  標識したポプラ試料から透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察試料の調製方法に従って固定・樹脂包埋して  $^{13}\text{C}$  イメージング用の試料を作製した。固定には以下のいずれかの方法を用いた。3% グルタルアルデヒド・リン酸緩衝液による化学固定、加圧凍結とグルタルアルデヒドアセトン溶液中での凍結置換固定。

包埋試料から、厚さ約300nmの切片を作製し、シリコンウエハにのせて金コーティングをしたのちに、SIMSによる元素イメージングを行い、 $^{13}\text{C}$  の分布を調べた。

### (3) 安定同位体質量分析 (IR-MS) による $^{13}\text{C}$ 取り込み量の評価

ポプラ試料の各組織の一部は凍結乾燥し、ボールミルで粉末にした後、IR-MS により  $^{13}\text{C}$  量を測定した。

木部試料は、木粉を水で抽出して得られる可溶性画分、脱リグニン、脱ヘミセルロース処理後画分に分けて  $^{13}\text{C}$  量を測定し、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの各細胞壁成分への分配について検討した。

## 4. 研究成果

樹木木部の形成過程を光合成による炭素の供給と関連づけて明らかにすることを最終目標とし、本課題では光合成により取り込まれた炭素が代謝されて細胞壁に堆積するのに要する時間、およびその堆積過程を、標識  $^{13}\text{C}$  の分布から解析した。

### (1) $^{13}\text{C}$ 標識した二酸化炭素投与後の経過時間による $^{13}\text{C}$ 取り込み量の変化

$^{13}\text{C}$  標識二酸化炭素投与から 5 日後のポプラ木部の木繊維細胞では、細胞壁内に顕著に  $^{13}\text{C}$  濃度が増加した層が形成されており、さらにその内側に  $^{13}\text{C}$  濃度が低い層が形成されていた。これらの層の分布状態から、木部細胞の細胞壁への標識  $^{13}\text{C}$  の顕著な取り込みは、 $^{13}\text{C}$  標識二酸化炭素投与後 1 日程度で起こる

と推測された。そこで、 $^{13}\text{C}$  標識二酸化炭素投与後 6 時間、10 時間および 24 時間代謝させた試料を作製した。IR-MS により  $^{13}\text{C}$  濃度を測定して標識  $^{13}\text{C}$  の取り込みを確認した。 $^{13}\text{C}$  標識二酸化炭素を与えないコントロール試料では  $^{13}\text{C}$  濃度は 1.07% であり、葉、木部、師部で差は見られなかったのに対し、投与直後の葉の  $^{13}\text{C}$  濃度は 2-3% であった。葉内の  $^{13}\text{C}$  濃度にはばらつきが見られたが、共通して経過時間と共に葉内の  $^{13}\text{C}$  濃度は減少した。木部では、投与から 6 時間後にはすでに  $^{13}\text{C}$  濃度が上昇しており、経過時間に伴い上昇した。一方、師部では幹内での位置によって  $^{13}\text{C}$  濃度の変動パターンが異なる結果が得られた。これらの差は、木部が主に炭素を蓄積するのに対し、師部は光合成産物の輸送経路であると同時に、師部自体もその細胞壁やデンプン粒内に炭素を貯蔵することに由来すると考えられた。

木部に含まれる  $^{13}\text{C}$  は、10 時間後の試料ではほとんどが可溶性画分に由来した。同時にセルロース、ヘミセルロース、リグニンそれぞれにごくわずかながら  $^{13}\text{C}$  濃度の増加が見られた。24 時間後には 10 時間後と比べて木粉全体の  $^{13}\text{C}$  濃度が増加しており、可溶性画分および細胞壁の各成分について増加が見られた。下記(2)で示す  $^{13}\text{C}$  イメージングでは、24 時間後でも細胞内では顕著な  $^{13}\text{C}$  濃度増加は見られなかった。今回、可溶性画分に得られた標識  $^{13}\text{C}$  がどのような分子に含まれているのかは不明であり、今後分析が必要である。

## (2) 元素イメージングによる $^{13}\text{C}$ の分布解析

葉、幹における標識  $^{13}\text{C}$  の分布を SIMS による元素イメージングで調べた。

$^{13}\text{C}$  標識二酸化炭素投与から 5 日後のポプラ木部の木繊維細胞では、細胞壁内に  $^{13}\text{C}$  濃度が高い層が形成される、特徴的な分布が観察された。これは光合成により取り込まれた二酸化炭素の一部はすみやかに木部に送られて細胞壁成分として取り込まれていることを示す。投与から 6 時間後には、二次壁形成中の木繊維の細胞壁最内層で  $^{13}\text{C}$  濃度がわずかながら増加しており、 $^{13}\text{C}$  濃度の高い層が形成されていた。24 時間後にも同様の分布が検出された。この層内の  $^{13}\text{C}$  濃度は約 5% であり、6 時間後の試料に比べて大きく増加していた。また二次壁全体でも  $^{13}\text{C}$  濃度の上昇が見られた。これらの分布の結果から、 $^{13}\text{C}$  標識された細胞壁成分が二酸化炭素投与後 6 時間から 24 時間の間に活発に合成され、細胞壁へ輸送されると考えられ、これは IR-MS の結果とも一致する。細胞内で合成あるいは輸送の過程にある標識  $^{13}\text{C}$  を検出することを目的に、投与後 10 時間に試料の採取を行い、分析を行った。これまで同様に細胞壁への顕著な分布が観察されたが、細胞質の  $^{13}\text{C}$  濃度上昇はごくわずかであった。IR-MS で可溶性画分に検出される  $^{13}\text{C}$  解析と合わせて細胞内での分布評価は今後の重要な研究課題であ

る。さらに二酸化炭素投与のタイミングによって木部での  $^{13}\text{C}$  分布が変化する結果を得ており、標識の条件について検討が必要である。

葉ではデンプン粒内に顕著な  $^{13}\text{C}$  の増加が見られた。 $^{13}\text{C}$  標識二酸化炭素投与後 2 時間から 24 時間の試料では、デンプン粒の外周部に顕著な  $^{13}\text{C}$  濃度の増加が見られた。一方、5 日後にはデンプン粒全体あるいは中央部に  $^{13}\text{C}$  濃度の増加が見られた。これは 1 日後から 5 日後までの間に一度デンプン粒が消失したのち、再びデンプン粒が形成され、このとき葉内で代謝された標識  $^{13}\text{C}$  が使われたことを示唆する。木部での  $^{13}\text{C}$  濃度の変動には、投与後速やかに木部に送られて堆積するに加えて、光合成からの経過時間が長い場合には葉内での長期間の貯蔵や代謝の後に送られる炭素があることを考慮する必要があるだろう。

今回の結果からは、細胞壁内における特定の時期の光合成に由来する炭素の分布など新しい知見が得られ、同位体パルスラベリングと同位体イメージングの方法が樹木内での炭素の動態や木部形成機構を研究する上で有効な方法であることが示された。今後はさらに細胞壁あるいは細胞壁成分の堆積における日変動などに研究を進める予定である。

## 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 1 件)

竹内美由紀, 二次元高分解能二次イオン質量分析装置(NanoSIMS)を用いた生物試料の元素イメージング (2014), Plant Morphology, 26, 19-23 (査読無)

[学会発表](計 7 件)

Miyuki Takeuchi, Mariko Norisada, Akira Isogai (2015 年 3 月 15 日) Isotopic imaging of carbon accumulation during xylem cell wall formation using  $^{13}\text{CO}_2$  pulse labeling, IAWPS2015 International Symposium on Wood Science and Technology, タワーホール船堀(東京)

竹内美由紀, 磯貝明 (2014 年 11 月 12 日) SIMS を用いた植物体内における炭素移動の観察、平成 26 年度 生理学研究所研究会 電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用、自然科学研究機構(岡崎)(招待講演)

竹内美由紀, 磯貝明 (2014 年 9 月 12 日) 同位体イメージングによる植物細胞壁への光合成産物堆積過程の解析、日本植物学会第 78 回大会、明治大学(川崎)

Miyuki Takeuchi, Akira Isogai (2014年6月19日) Visualizing accumulation of photosynthetic products in plant using isotopic labeling and SIMS, The Scientific International Symposium on SIMS and Related Techniques Based on Ion-Solid Interactions (SISS-16), 北海道大学(札幌)

竹内美由紀、磯貝明(2014年3月14日) SIMSを用いた同位体イメージングによる光合成産物の木部細胞壁への堆積過程の解析、第64回木材学会大会、愛媛大学(松山)

Miyuki Takeuchi, Akira Isogai (2013年10月2日) Imaging of carbon incorporation in tree using  $^{13}\text{CO}_2$  pulse labeling NanoSIMS 50L, 19th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry, Jeju (Korea)

竹内美由紀、磯貝明(2013年9月14日) 二次イオン質量分析法による樹木内炭素移動の可視化、日本植物学会第77回大会、北海道大学(札幌)(招待講演)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内美由紀(TAKEUCHI, Miyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号: 20378912