

樹木が木材を作る仕組みをミクロな視点から考える

信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点 細尾 佳宏

1 はじめに

樹木は形成層の分裂活動によって肥大成長を行い、樹幹や根が横方向に太る特徴を持つ。樹幹の大部分は、肥大成長により作られた木部細胞で構成され、木材の最も基本的な構成要素は木部細胞が形成する高度に分化した細胞壁である。

木材の細胞壁はその形成過程の違いから一次壁と二次壁に区別され、主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンの3成分から構成されている。一次壁は細胞が分裂してすぐにできる薄い壁で、二次壁は拡大成長が終わった細胞において一次壁の内側に形成される厚い壁である。二次壁はさらに、細胞軸に対するセルロースミクロフィブリルの配列角度の違いから外層(S₁層)、中層(S₂層)、内層(S₃層)に分けられる。木材の性質や機能を正確に把握し、木材を有効利用するためには、細胞壁についてより詳細に理解することが必要となる。

細胞壁は様々な遺伝子が協調して発現することによって形成される。植物の場合、動物以上に敏感で精密な環境応答機構を備えており、遺伝子の発現は周囲の環境に強く影響される。従って、細胞壁の構造や性質も環境によって大きく変化し、木材の性質に影響を与えることになる。植物は、光、水、温度、化学物質、あるいは物理的な力を環境シグナルとして受容する。そして、自然環境下ではそれらのシグナルは日周期的に変動している。そこで、樹木中で木材の細胞壁が形成される仕組みを明らかにするために、日周期性に着目して研究を行った。

2 研究方法

2.1 供試樹木

スギ(*Cryptomeria japonica*)の3年生のポット苗を、人工気象器(Koito Industries KG-50HLA)内で生育させた。人工気象器内の光条件は、14時間明期/10時間暗期に設定した。明期と暗期に苗木から樹幹を採取し、長さ約5cmに切り分けた。切り分けた試料を3%グルタルアルデヒド/リン酸緩衝液に浸漬し、4℃で一晩固定した。

2.2 細胞壁形成の日周期性の観察

固定した試料から、凍結マイクロトームを用いて厚さ約200μmのまさ目連続切片を作製した。切片を50%次亜塩素酸ナトリウム溶液で10分処理し、原形質を除去した。その後、2%四酸化オスミウムで2時間導電染色を行い、エタノール上昇系列により脱水した。脱水した切片をt-ブタノールに置換し、凍結乾燥を行った¹⁾。乾燥させた切片を試料台に載せ、イオンスプッター(日立E-1030)を用いて白金-パラジウムをコーティングした。そして、形成層から成熟木部に至る様々な分化段階の仮道管について、細胞壁の内表面(新生面)をFE-SEM(日立S-4500)で観察した。各分化段階は、細胞壁新生面におけるセルロースミクロフィブリル(CMFs)の配列角度から決定した。

2.3 免疫染色法による細胞壁形成の日周期の観察

凍結マイクロトームを用いて作製したまさ目切片を、抗グルコマンナン抗血清または抗キシラン抗血清に浸して37℃で2時間反応させた。次に、金コロイド標識二次抗体と切片を37℃で2時間反応させ、針葉樹の主要なヘミセルロース構成成分のグルコマンナンまたはキシランを選択的に標識した。標識した切片をエタノール上昇系列で脱水し、t-ブタノール凍結乾燥した。乾燥させた切片にオスミウムコーター(真空デバイス HPC-1S)を用いてオスミウムをコーティングし、分化中仮道

管の細胞壁新生面を FE-SEM で観察した。オスミウムコーティングは、金標識の高コントラストでの観察を可能にするため、SEM 観察での金標識の検出に適している²⁾。観察像をスキャナーでコンピューターに取り込み、画像解析ソフトウェア (Carl Zeiss KS400) を用いて単位面積当たりの金標識数を標識密度として計測した。

3 結果と考察

3.1 細胞壁新生面における日周期性 (明期と暗期の違い)

明期に採取した試料では、一次壁形成中、 S_1 層形成中、そして S_2 層形成中のどの分化段階においても、仮道管の細胞壁新生面に CMFs が明確に観察された (図-1A-C)。成熟した仮道管の内表面には、いぼ状層が観察された (図-1D)。暗期に採取した試料では、 S_2 層形成中仮道管の細胞壁新生面に CMFs を覆う無定形物質が観察された (図-1G)。一次壁形成中と S_1 層形成中の細胞壁新生面では、明期と同様に CMFs が観察された (図-1E, F)。成熟した仮道管ではいぼ状層が観察され、明期と違いは見られなかった (図-1H)。これらの結果は、分化中仮道管の細胞壁新生面における様相の明期と暗期の違いは S_2 層形成中のみ観察されることを示す。どの切片においても、 S_3 層形成中仮道管はほとんど見られなかった。

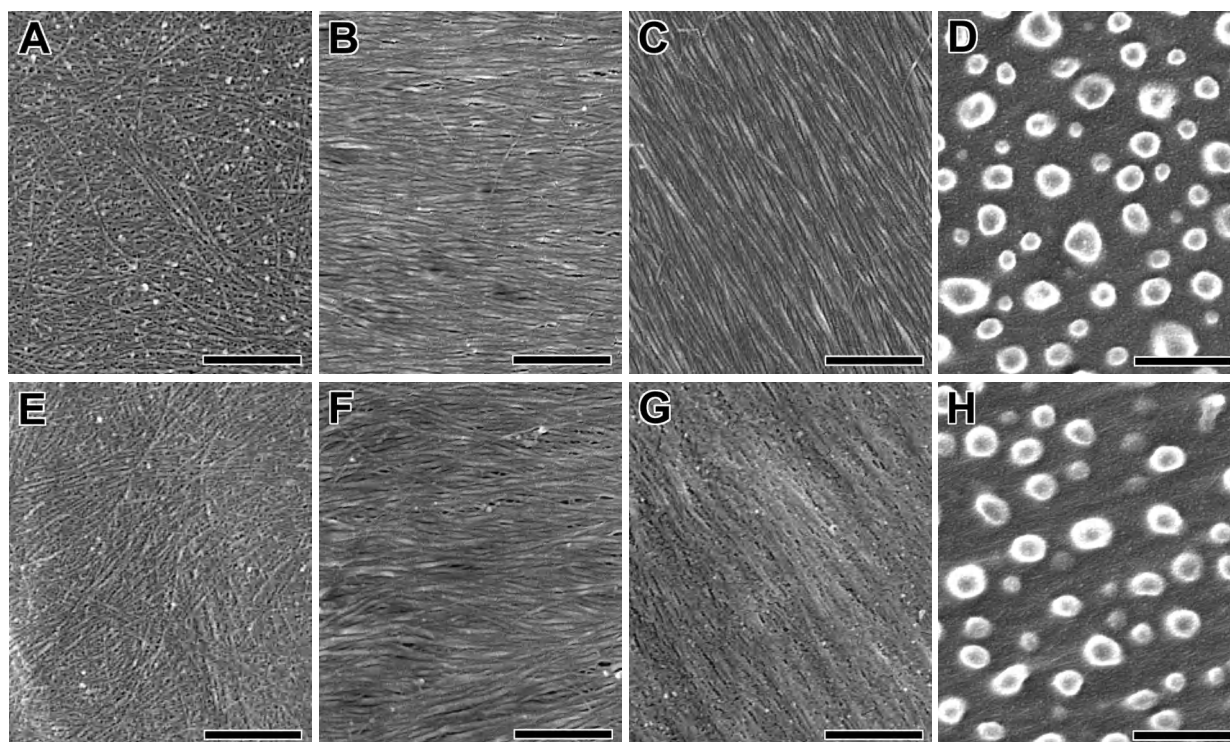


図-1. スギ仮道管の細胞壁新生面

A-D 明期に採取した試料、E-F 暗期に採取した試料、A,E 一次壁形成中、B,F S_1 層形成中、C,G S_2 層形成中、D,H 成熟仮道管、スケールバー=500nm

3.2 免疫染色法による細胞壁形成の日周期の観察

S_2 層形成中仮道管の細胞壁新生面では、明期にはグルマンナンやキシランに対する標識は観察されたが、その数は少なかった (図-2C,3C)。暗期には、無定形物質上に多数のグルコマンナンの標識が球状の粒子として観察された (図-2G)。そして、無定形物質は抗キシラン抗血清によっても標識された (図-2G)。このことから、無定形物質はグルコマンナンを多く含み、キシランも含むことが分かり、ヘミセルロースを主体とするマトリックスであると考えられた。一次壁形成中と S_1 層形成中では、細胞壁新生面に観察される標識は、明期 (図-2A,B,3A,B) 暗期 (図-2E,F,3E,F) とともに少

なかった。成熟した仮道管では、いぼ状層に多くのグルコマンナン、キシランに対する標識が観察された(図-2D,H,3D,H)

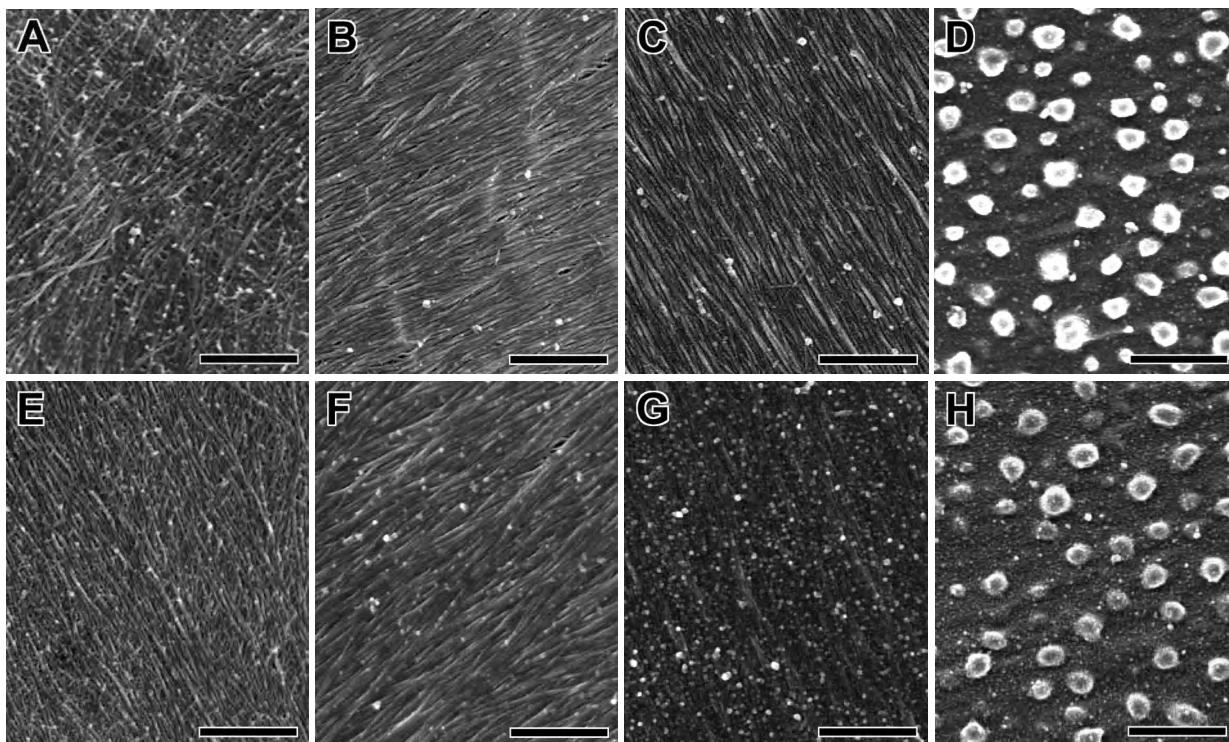


図-2. 免疫染色法によりグルコマンナンを標識したスギ仮道管の細胞壁新生面
A-D 明期に採取した試料、E-F 暗期に採取した試料、A,E 一次壁形成中、B,F S₁層形成中、
C,G S₂層形成中、D,H 成熟仮道管、スケールバー=500nm

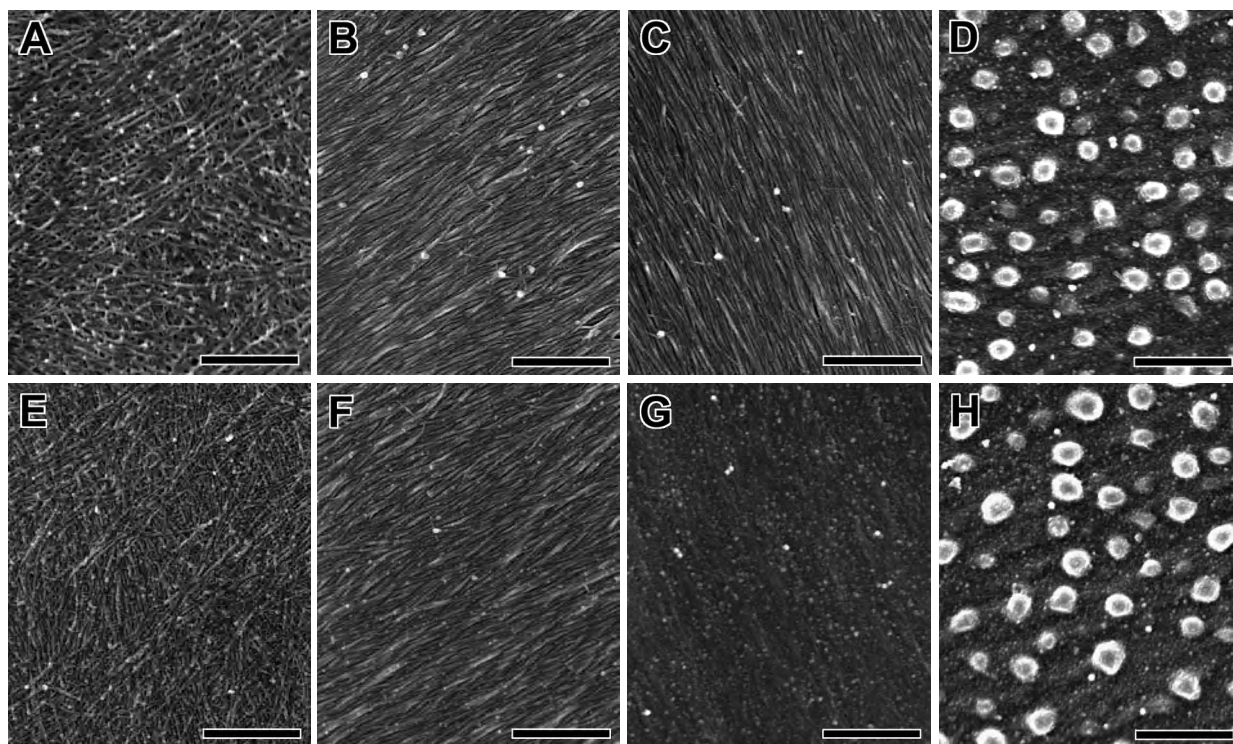


図-3. 免疫染色法によりキシランを標識したスギ仮道管の細胞壁新生面
A-D 明期に採取した試料、E-F 暗期に採取した試料 A,E 一次壁形成中、B,F S₁層形成中、
C,G S₂層形成中、D,H 成熟仮道管 スケールバー=500nm

分化中仮道管の細胞壁新生面における標識密度の変化を、図-4に示す。グルコマンナンの標識密度は、明期には細胞壁の形成が進行するにつれて徐々に増加した。暗期には、一次壁形成中からS₁層形成中にかけて少し増加し、S₂層形成中に大きく増加した。一次壁形成中では、明期と暗期で標識密度に違いはなかった。S₁層形成中とS₂層形成中では、暗期の方が明期よりも標識密度が有意に高かった。

キシランの標識密度は、明期、暗期ともに二次壁形成中に増加した。S₂層形成中仮道管の細胞壁新生面において、暗期の方が明期よりも標識密度が有意に高かった。その他の分化段階では、明期と暗期で標識密度に違いはなかった。

一次壁形成中の仮道管では、細胞壁新生面に存在するマトリックスの量は少ないと考えられる。S₁層形成中では、暗期の方が明期よりも細胞壁新生面にグルコマンナンが多く存在することが分かった。しかし、この分化段階では暗期でも無定形物質はほとんど観察されなかった。これらのことから、S₁層形成中は、暗期に細胞壁新生面へマトリックスは供給されるが、その量が少ないために無定形物質が観察されないものと思われる。そして、S₂層形成中になると、暗期にマトリックスの細胞壁新生面への供給が活発になり、無定形物質が観察されるようになるものと予想される。

成熟仮道管では、明期と暗期で標識密度に違いは見られなかった。細胞壁形成が完了すると、木部細胞はプログラム細胞死により核、細胞質などの細胞内容物が消失する³⁾。成熟した細胞壁の内表面には細胞壁成分が供給されないために、日周期性が見られないものと考えられる。

4 まとめ

仮道管の細胞壁新生面における日周期性は、S₁層形成中とS₂層形成中に観察され、特にS₂層形成中で顕著に観察された。明期にはS₁層形成中とS₂層形成中の細胞壁新生面(二次壁新生面)にCMFsが観察され、暗期にはヘミセルロースを含むマトリックスが存在することが分かった。以上のことから、木材を構成する細胞壁の形成過程において、二次壁新生面への細胞壁成分の供給に日周期性が存在することが示唆された。

<引用文献>

- 1) Inoue T, Osatake H (1988) A new drying method of biological specimens of scanning electron microscopy: The t-butyl alcohol freeze-drying method. Arch Histol Cytol 51: 53-59
- 2) Osawa T, Nozaka Y (1998) Scanning electron microscopic observation of the epidermal basement membrane with osmium conductive metal coating. J Electron Microsc 47: 273-276
- 3) Plomion C, Leprovost G, Stokes A (2001) Wood formation in trees. Plant Physiol 127: 1513-1523

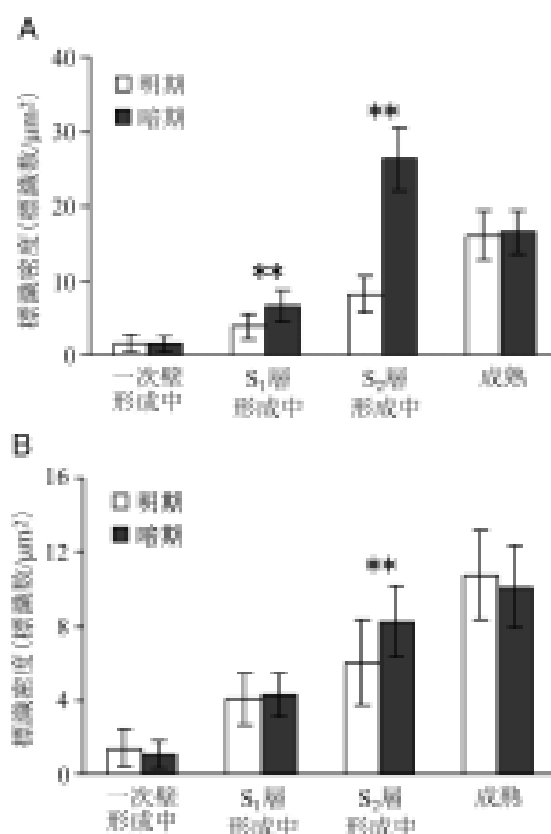


図-4. 免疫染色した切片の仮道管細胞壁新生面における標識密度
約 20 ヶ所の平均値 ± 標準偏差、A グルコマンナンの標識密度、B キシランの標識密度、**は t-検定による 1%水準の有意差 (P<0.01) を示す