

日本木材学会・組織と材質研究会  
2000年度春期シンポジウム

「New microscopyによる可視化の試み」

日時：2000年4月5日（水）  
場所：京都大学農学部第4会場

日本木材学会・組織と材質研究会  
2000年度春期シンポジウムプログラム  
「New microscopyによる可視化の試み」

主催：日本木材学会・組織と材質研究会  
日時：2000年4月5日（水）  
場所：京都大学農学部第4会場（W324）

座長：森林総合研究所・藤井智之  
北海道大学大学院農学研究科・船田 良

講演内容：

- 1) Cryo-走査電子顕微鏡法による道管内の水分の存在状態と消失過程の可視化  
北海道大学大学院農学研究科・内海泰弘
- 2) フリーズフラクチャ・免疫電子顕微鏡法によるセルロース合成酵素の局在の可視化  
京都大学木質科学研究所・木村 聡
- 3) 免疫電子顕微鏡法によるヘミセルロースの局在の可視化  
京都大学大学院農学研究科・栗野達也
- 4) 原子間力顕微鏡法によるnever-dried木材セルロースマイクロフィブリルの可視化  
森林総合研究所・片岡 厚

総合討論

問い合わせ先：  
060-8589 札幌市北区北9条西9丁目  
北海道大学大学院農学研究科・船田 良  
Tel: 011-706-2516または011-706-2815  
Fax: 011-736-1791  
E-mail: funada@for.agr.hokudai.ac.jp

## 1. はじめに

木部内の細胞に含まれる水分を可視化する研究は 1900 年代のはじめより行われてきており, Sucoff は冬期に採取した *Pinus strobus* L. と *Pinus banksiana* Lambert において凍結切片を作製し, 氷点下の戸外で光学顕微鏡により観察したところ, 内こうに気泡を含む仮道管が観察されたと報告している<sup>1)</sup>. また, Zimmermann はドライアイスを用いて供試木を立木状態で凍結した後に切断し, 剃刀で平滑に仕上げた木部表面を実体顕微鏡で観察することにより, 大径の道管の内こうに氷の存在が確認できたことを報告している<sup>2)</sup>. しかし, 凍結切片を光学顕微鏡で観察する手法は樹種によっては試料作製が困難であると報告されており<sup>1)</sup>, 実体顕微鏡を用いた観察では小径の道管や木部繊維の内こうの水分の存在状態を把握することは難しい.

軟X線写真法は, 木部内の水分の局在を広い範囲にわたって観察できる方法である<sup>3-5)</sup>. しかし, 軟X線写真法では遮光紙の袋に入れたフィルム上に試料をのせて撮影を行い, このフィルムを引き延ばして印画紙に焼き付け観察を行うため, 細胞内こうの水分の存在状態が観察できる程度の十分な拡大倍率が得られない. また, この手法では数mm厚の薄材片を作製して観察を行うため, 試料作製時とくに大径の道管の内こうから水分が消失してしまう可能性がある.

これらの手法と比較して, Cryo-走査電子顕微鏡 (以下, Cryo-SEM) 法は生材試料を凍結固定した後に試料を凍結状態のまま観察する方法であることから, 試料中の水分を氷の状態を観察でき, 材中の水分の局在を電子顕微鏡レベルで可視化するのに適した方法である<sup>6-8)</sup>. しかし, Cryo-SEM 法を用いた観察においても試料の採取法および作製法を考慮しないと, 立木の水分状態を把握することが困難になる. 通常 Cryo-SEM による観察では試料を凍結状態で切断して観察する方法 (凍結切断法) が用いられている<sup>9)</sup> が, この手法ではとくに木口面の観察を行う場合に木材組織や氷晶の破片が切断面の大部分の領域を覆ってしまうことがある<sup>8)</sup>. これに対して, 佐野ら<sup>7)</sup> によって開発された凍結状態のままミクロトームを用いて試料の表面を切削する凍結切削法では, 木口面の観察においても細胞の輪郭やそれらの内こうの水分の状態を試料内の広い範囲にわたって判別できる<sup>4, 8)</sup>.

本研究では木部の細胞内こうの水分状態を広い範囲にわたって把握するための手法として, 試料作製に凍結切削法を用いた Cryo-SEM 法について検討した. また, 蒸散を行っている供試木より試料を採取する場合, 切断された通水系に周囲の空気が侵入して立木時の水分状態から変化してしまう可能性が指摘されており<sup>10)</sup>, 立木の木部水分分布からの変化の少ない試料採取法を検討した. ついで, 秋期から冬期にかけて最初に気温が零度を下回った後に透水度 (hydraulic conductivity) が著しく低下することが報告されている<sup>11)</sup> 環孔材樹木の樹幹を人工的に凍結させた後に再び融解させ, この過程における道管内こうの水分の存在状態と消失過程について, Cryo-SEM により可視化した.

## 2. 試料と方法

### 2. 1 供試木

北海道大学農学部附属中川地方演習林に植栽されていた樹高約 8m, 胸高直径約 8cm の 15 年生のヤ

1. liq. N<sub>2</sub> の凍結構造/速度  
樹木 5分. 大径 (φ15cm) 10分以内

2. 3つと型 liq. N<sub>2</sub> 層H皿の使い分け

(伊原)  
1. 樹木に在ったとき  
2. 樹木に在ったとき  
3. 樹木の周囲に在ったとき  
粘土

凍結処理 Vessel の 気泡の 周囲の 気泡は 何故?

中田 / 1. ~~凍結処理~~ 凍結処理 凍結処理 凍結処理  
凍結処理

2. 凍結処理 凍結処理 凍結処理

中田

凍結処理 凍結処理 凍結処理

凍結処理 凍結処理

凍結処理

凍結処理

中田

凍結処理 凍結処理 凍結処理

凍結処理

凍結処理 凍結処理 凍結処理

チダモ (*Fraxinus mandshurica* var. *japonica* Maxim.) および北海道大学農学部附属演習林苗畑 (札幌) に植栽されていた樹高約 2m, 地上高 80cm の部位での直径約 2cm の 4 年生のヤチダモを供試木として用いた。

## 2. 2 試料採取法の検討

15 年生の供試木を用いて以下の 3 種類の試料採取法を検討した。第一に、林地で前処理無しに供試木を伐採し、胸高部を含む 1m 長の丸太に分割して両切断面に防水処理をした。この丸太を約 6 時間後に冷凍室内 (-20℃) に入れ、丸太中の水分を凍結させ、保存した。これを低温室凍結法とした。第二に、低温室凍結法と同様に試料を伐採し、直ちに胸高部から約 2cm 厚の円盤を切り取り切断して、速やかに液体窒素 (-196℃) 中に入れて凍結させ、液体窒素温度で保存した。これを液体窒素凍結法とした。第三に、プラスチック製の漏斗による液溜を樹幹に取り付け、この液溜に液体窒素を注いで 10 分間樹幹が液体窒素と接触するようにして立木状態で凍結させた後、供試木の凍結部位から約 2cm 厚の円盤を切り取り切断し、速やかに液体窒素中で凍結させ、保存した。これを立木液体窒素凍結法とした<sup>12-14)</sup>。

## 2. 3 試料作製および観察法

液体窒素の入ったタンク内で保存していた試料を低温室 (-20℃) に移動し、一旦完全に -20℃ に温度平衡させた。ついで、試料を観察したい部位を含む約 5×5×5mm<sup>3</sup> のブロックに整形し、同じ低温室内でブロックの観察面 (木口面, 板目面, 柁目面) をスライディングマイクロトームを用いて平滑に仕上げた<sup>7, 8)</sup>。その後、作製したブロックを試料ホルダーに取り付けて低温室内で液体窒素の入った容器に入れ、フリーズ・エッチング装置付きの Cryo-SEM (JSM-840A クライオシステム; 日本電子) に移動した。フリーズエッチング装置内のコールドステージに試料ホルダーを取り付けて、 $1 \times 10^{-4}$  Pa, -110℃, 10 分の条件でエッチングを施した後、炭素・白金を真空蒸着した。Cryo-SEM の試料観察用コールドステージ (-160℃) に移し、加速電圧 5kV, ワーキングディスタンス 15mm ないし 25mm で検鏡および写真撮影を行った<sup>9, 12-14)</sup>。

## 2. 4 凍結・融解処理

ポットに植栽された 36 本の 4 年生の苗木を供試木として使用した。供試木がほとんど落葉し、当年の木部が氷点下の温度を経験していない 11 月に実験を行った。まず、苗畑にて 4 本の供試木の幹を立木液体窒素凍結法により採取しコントロールとした。ついでポットに植栽された 32 本の供試木を -20℃ の低温室に移動させ、30 分間凍結させた。低温室に供試木を移動させてから 30 分後に 4 本の供試木から低温室で液体窒素凍結法により試料を採取し、凍結試料とした。続いて、直ちに残りの 28 本の試料を低温室から +20℃ の部屋に移動させ、これ以降 1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 時間後に、それぞれ 4 本ずつの供試木から立木液体窒素凍結法により試料を採取した。

## 3. 結果

### 3. 1 試料採取および観察法

Fig. 1 は凍結切削法により作製したヤチダモの木口面の試料である。写真は当年の孔圏部の一部を

示しており、孔圏道管 (v) の一部、軸方向柔細胞 (ap)、放射柔細胞 (rp)、木部繊維 (f) の輪郭およびそれらの内こうが明確に観察される。孔圏道管の内こうは水分で満たされているが、木部繊維の内こうは水分で満たされているもの (f) と、水分が存在していないもの (アステリスク) がそれぞれ見られる。道管と木部繊維の内こうの水分は比較的平滑であり、エッチング処理により切削面よりも全体が窪んでいることがわかる。これに対して軸方向柔細胞と放射柔細胞の内こうの原形質には、エッチング処理後も切削面とほぼ同じ高さの部分 (矢印) と切削面より窪んでいる部分があることがわかる。以下、すべての試料を凍結切削法を用いて作製し観察した。

Cryo-SEM 観察のための試料の採取法として低温室凍結法、液体窒素凍結法、立木液体窒素凍結法の3手法を検討した。低温室凍結法を用いて作製した5月の試料について木口面観察を行ったところ、当年の木部に形成中の木部繊維、柔細胞、孔圏道管が観察された。形成中の木部繊維と柔細胞の内こうには原形質が見られた (Fig. 2)。当年の分化中の木部には氷晶析出による組織の変形や破壊がみられた (Fig. 2, アステリスク)。

液体窒素凍結法を用いて作製した8月の試料について木口面観察を行ったところ、当年の孔圏道管の内こうにはほとんど水分が見られなかった (Fig. 3, v)。また、当年の孔圏部の多くの木部繊維の内こうにも水分が見られなかった。放射柔細胞と軸方向柔細胞には原形質が存在していた。

立木液体窒素凍結法を用いて作製した8月の試料について木口面観察を行ったところ、液体窒素凍結法とは異なり当年の孔圏道管の内こうは水分で満たされていた (Fig. 4, v)。

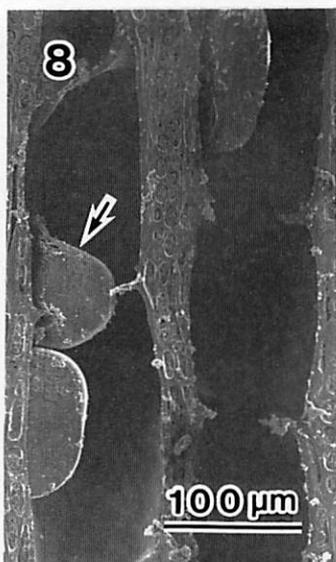
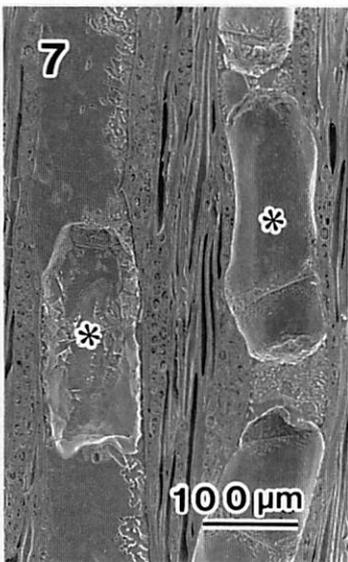
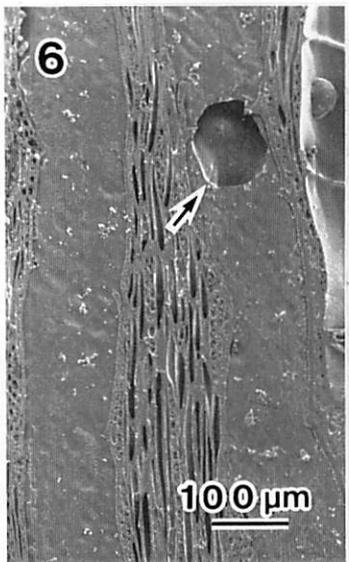
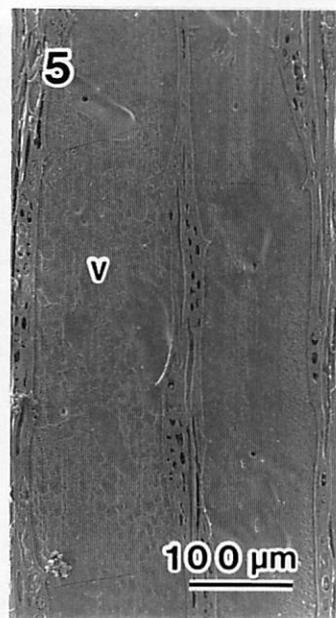
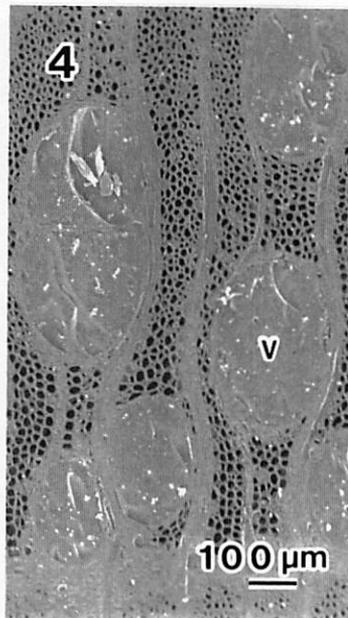
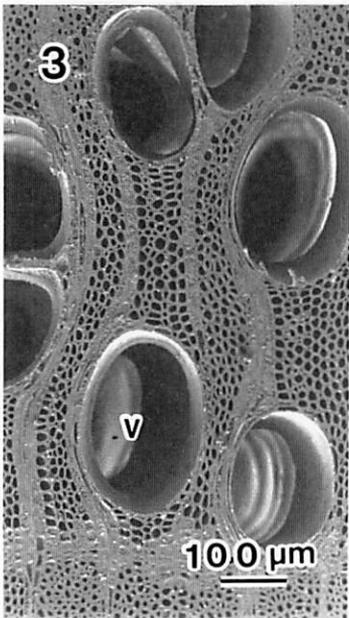
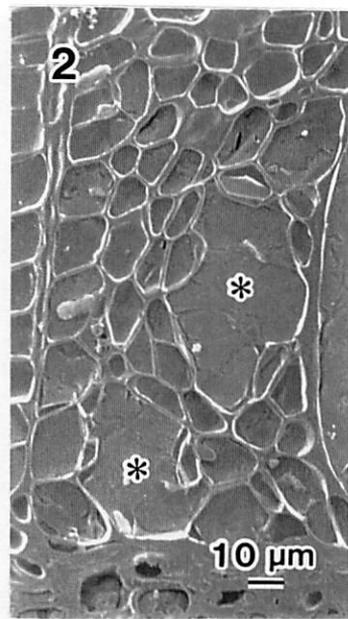
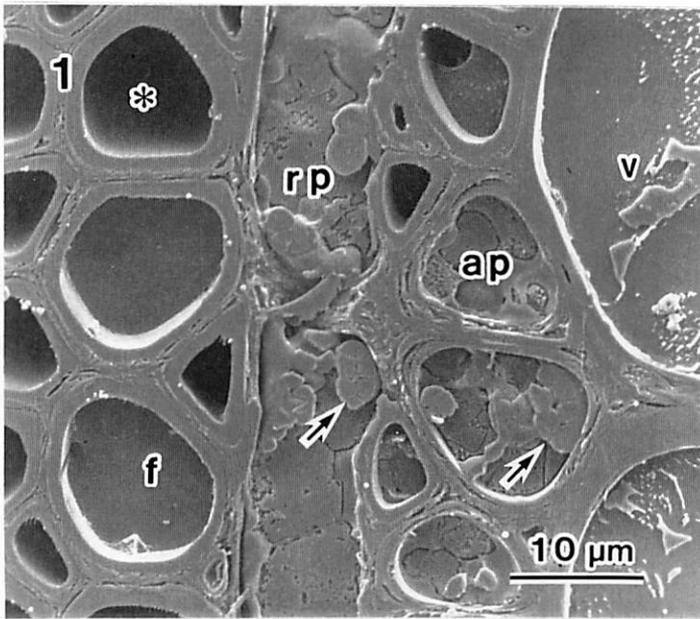
### 3. 2 凍結・融解過程での当年孔圏部の水分分布の変化

凍結処理を施す前に苗畑にて採取したコントロールの試料では、当年の孔圏道管の内こうが水分で満たされていた。また、凍結処理を施した試料においても同様に、当年のほとんどの孔圏道管の内こうは水分で満たされていた (Fig. 5, v)。

これに対して融解処理を施した試料では、融解時間が長くなるにつれて当年の孔圏道管の内こうから徐々に水分が消失していった。融解処理1時間後、当年の多くの孔圏道管の内こうは水分で満たされていたが、当年のいくつかの孔圏道管の内こうには水分が認められなかった。融解処理2時間後、いくつかの道管の内こうは水分で満たされていたが、そのほかの道管の内こうには空隙が存在した (Fig. 6, 矢印)。融解処理4時間後、内こうに水分がほとんど存在しない道管と内こうが水分で満たされている道管がそれぞれ観察され、板目面での観察においては道管の内こうに大きな空隙 (Fig. 7, アステリスク) が存在している様子が認められた。融解処理6時間後、内こうに水分がほとんど存在

---

Fig. 1-8. ヤチダモの Cryo-SEM 写真。Fig. 1. 当年の孔圏部。木口面。v は道管, ap は軸方向柔細胞, rp は放射柔細胞, f は水分が充満している木部繊維, アステリスクは水分が見られない木部繊維, 矢印は原形質を示す。Fig. 2. 低温室凍結法による5月の当年の木部。木口面。アステリスクは氷晶を示す。Fig. 3. 液体窒素凍結法による8月の当年の孔圏部。木口面。v は道管を示す。Fig. 4. 立木液体窒素凍結法による8月の当年の孔圏部。木口面。v は道管を示す。Fig. 5. 凍結30分後。当年の孔圏部。板目面。v は道管を示す。Fig. 6. 融解2時間後。当年の孔圏部。板目面。矢印は空隙を示す。Fig. 7. 融解4時間後。当年の孔圏部。板目面。アステリスクは空隙を示す。Fig. 8. 融解24時間後。当年の孔圏部。板目面。矢印は水分を示す。



しない道管と内こうに水分が存在する道管がそれぞれ観察された。融解処理 12 時間後、多くの孔圏道管の内こうにはほとんど水分が観察されなかったが、内こうが水分で満たされている道管も存在した。融解処理 18 時間後、多くの孔圏道管の内こうにはほとんど水分が見られなかった。融解処理 24 時間後、孔圏道管の内こうの一部に水分は観察されたが (Fig. 8, 矢印), 内こうが水分で満たされている道管は観察されなかった。

コントロール・凍結・融解処理試料の大部分の観察試料では、当年の多くの木部繊維の内こうには水分が見られなかったが、一部の木部繊維の内こうには水分が見られた。しかし、少数の観察試料では多くの木部繊維の内こうが水分で満たされている場合もあった。

## 4. 考察

### 4. 1 試料採取および観察法

試料採取法を検討するため 3 つの手法を用いて試料を凍結固定し Cryo-SEM による観察を行った。その結果、低温窒素凍結法では、分化中の木部や形成層帯の随所で氷晶析出により組織が変形あるいは破壊されることが明らかになった (Fig. 2)。これは試料を凍結する際に低温室内 (-20℃) で比較的ゆっくりと凍結させたため、氷晶析出が進行したものと思われる。液体窒素凍結法では、液体窒素 (-196℃) を用いて試料を凍結させたため、比較的速やかに凍結が進行するので、分化中の木部や形成層帯での氷晶析出は抑制され、形成中の木部の細胞、柔細胞、孔圏外道管の内こうの水分の存否の観察も可能であった。しかし、液体窒素凍結法により 8 月に採取した試料において、当年の孔圏道管の内こうにはほとんど水分が存在していなかった (Fig. 3)。これに対して、立木液体窒素凍結法を用いた試料では、同時期の当年の孔圏道管の内こうが水分で満たされていた (Fig. 4)。蒸散に起因する葉の水ポテンシャル低下が樹幹の道管の内こうの水ポテンシャル低下を引き起こし、道管が試料採取時に切断された際に、それらの道管の内こうに周囲の空気が侵入してしまう可能性がこれまでも示唆されている<sup>10)</sup>。液体窒素凍結法による試料で当年の孔圏道管の内こうに水分がほとんど存在していなかった原因としては、試料採取時に道管の内こうが負圧になっていたために切断面から空気が侵入したためと考えられる。蒸散を行っている供試木より試料を採取する際には立木液体窒素凍結法が立木時の水分状態からの変化が最も少ない採取法であることが明らかになった。

凍結切削法を用いた Cryo-SEM による観察から、横断面と縦断面のいずれにおいても細胞の輪郭やその内こうの水分の存否を試料内の広い範囲にわたって観察できた。この結果は、これまでに凍結切削法により行われた Cryo-SEM による観察の結果と一致する<sup>4, 7, 8)</sup>。放射柔細胞や軸方向柔細胞の内こうには原形質が観察され、道管や木部繊維の内こうには水分が観察された (Fig. 1)。放射柔細胞や軸方向柔細胞の内こうの原形質にはエッチング処理後も切削面とほぼ同じ高さの部分と切削面より大きく窪んでいる部分があるのに対して、道管と木部繊維の内こうの水分の観察面は比較的平滑であり、エッチング処理により試料の切削面より全体が窪んでいることで区別が可能である。凍結切削法を用いた Cryo-SEM 観察は、木部の構成細胞の内こうに存在している水分を細胞単位で正確に観察するのに有効な方法であることが明らかになった。

### 4. 2 凍結・融解過程での当年孔圏部の水分分布の変化

Cryo-SEM による観察から、凍結処理を施した試料ではコントロールの試料と同様に当年の孔圏道

管の内こうは水分で満たされており (Fig. 5), 融解処理試料では時間の経過とともに内こうに空隙が存在する道管の割合が増加することが明らかになった (Fig. 6-8). これまでに考えられている木部の凍結による通水要素内こうの水分中における空隙形成 (キャピテーション) の進行過程の仮説<sup>15)</sup>によると, 通水系内の水分に溶解していた気体は, 水分が氷になり気体の溶解度が低下することにより気泡として出現する<sup>1)</sup>. 続いて通水系内の氷が融解する時から融解した後に通水系に張力が働くとこれらの気泡が拡大してキャピテーションが起きると考えられている. 本研究ではヤチダモの当年の孔圏道管において凍結時にはキャピテーションは進行せず, 続いて起こる木部の融解時にキャピテーションが進行することを実験的に明らかにした<sup>14)</sup>.

当年の孔圏道管におけるキャピテーションは融解過程で進行し, 24 時間以内には大きな空隙がすべての道管の内こうに存在した (Fig. 8). 本研究で使ったヤチダモのような冬期に気温が氷点下を記録する地域に生育する環孔材樹木の木部では, 秋期から冬期にかけて最初に気温が零度を下回った後に透水度が著しく低下することが報告されている<sup>11)</sup>. これまでの報告では木部の凍結により環孔材樹木の通水系に水分導管機能障害が一斉に起きたことは示唆されていたが, 透水度が著しく低下した時点での道管の内こうの水分の量と存在領域については未解明であった. さらに, 道管の内こうから水分がほぼ完全に消失するのにどの程度の時間を要するかについては明らかではなかった. 本研究の結果から, 木部の凍結後の融解時に時間の経過とともに当年孔圏部の道管の内こうに空隙が拡大して, 短時間のうちにすべてのそれらの道管の内こうから水分がほとんど消失することが明らかになった.

## 文献

- 1) Sucoff, E.: *Physiol. Plant.* **22**, 424-431 (1969).
- 2) Zimmermann, M. H.: *Symposia of the society for experimental biology. The state and movement of water in living organisms.* Cambridge University Press, Cambridge, 1965, pp151-155.
- 3) 石田茂雄, 大谷 諄, 黒沢厚基, 今川一志: 北海道大学農学部演習林研究報告 **25**, 35-60 (1967).
- 4) Sano, Y., Fujikawa, S., Fukazawa, K.: *Trees* **9**, 261-268 (1995).
- 5) Nakada, R., Fujisawa, Y., Hirakawa, Y.: *J. Wood Sci.* **45**, 188-193 (1999).
- 6) Ohtani, J., Fujikawa, S.: *IAWA Bull. n. s.* **11**, 183-194 (1990).
- 7) 佐野雄三, 藤川清三, 深沢和三: 凍結および乾燥研究会会誌 **39**, 13-21 (1993).
- 8) 佐野雄三, 藤川清三: 日本木材学会北海道支部講演集 **27**, 47-50 (1995).
- 9) Fujikawa, S., Suzuki, T., Ishikawa, T., Sakurai, S., Hasegawa, Y.: *J. Electron Microsc.* **37**, 315-322 (1988).
- 10) Crafts, A. S.: *Science* **90**, 337-338 (1939).
- 11) Cochard, H., Tyree, M. T.: *Tree Physiol.* **6**, 393-407 (1990).
- 12) Utsumi, Y., Sano, Y., Ohtani, J., Fujikawa, S.: *IAWA J.* **17**, 113-124 (1996).
- 13) Utsumi, Y., Sano, Y., Fujikawa, S., Funada, R., Ohtani, J.: *Plant Physiol.* **117**, 1463-1471 (1998).
- 14) Utsumi, Y., Sano, Y., Funada, R., Fujikawa, S., Ohtani, J.: *Plant Physiol.* **121**, 897-904 (1999).
- 15) Tyree, M. T., Sperry, J. S.: *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 19-38 (1989).

フリーズフラクチャー・免疫電子顕微鏡法による  
セルロース合成酵素の局在の可視化

京都大学木質科学研究所 木村 聡

【はじめに】

植物をはじめ全てのセルロース生産生物は、ごく一部の例外を除いて細胞の原形質膜上でセルロースを合成・結晶化する。植物細胞をフリーズフラクチャーレプリカ法で観察すると原形質膜上に多数のセルロースマイクロフィブリルの押し型が観察されるが、しばしばマイクロフィブリルの押し型の末端に規則的な配列を示す膜顆粒の集合体が観察される。この膜構造がセルロース合成に関与すると考えられ、観察される様子からセルロース末端複合体 (Terminal complex=TC) と名付けられた(1)。現在でも TC はフリーズフラクチャーレプリカ法でのみ観察が可能な構造である。陸上植物の TC は6個の膜顆粒からなり、ロゼット TC と呼ばれている (図 1A)。ロゼット TC はセルロース合成酵素を含む膜チャンネルのようなもので、基質である UDP-グルコースからセルロースを合成しながら原形質膜上を移動すると考えられている (図 1B) (1-3)。これまでロゼット TC が高等植物のセルロース合成に関わることを示す数多くの報告がなされてきた。しかしごく最近までロゼット TC がセルロース合成酵素本体であるという直接的な証拠はなかった。

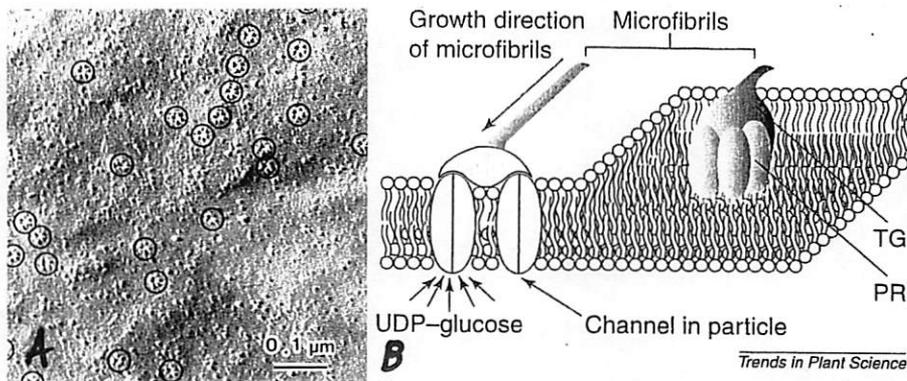


図 1 : (A)オオムギのロゼット TC のフリーズフラクチャー像 (黒丸で囲まれた構造)。 (B)ロゼットからセルロースマイクロフィブリルが合成される概念図 (文献 2 より)。

特異的な抗体を用いた免疫標識法は抗原とするタンパク質の局在を可視化するための優れた方法である。さらに機能がわかっているタンパク質に対する抗体を用いることにより、未知の構造物の機能を明らかにすることができる。すなわち TC をセルロース合成酵素に特異的な抗体が認識するならば、TC がセルロース合成酵素であることを直接証明できるはずである。しかしそれは困難を極めた。それは ; (1) 膜構造である TC はフリーズフラクチャーレプリカ法でのみ観察可能であるが、従来のフリーズフラクチャーレプリカ法では硫酸やブリーチでレプリカを洗浄するので免疫手法を適応することができないこと、(2) 高等植物のセルロース合成酵素の単離は未だに達成されていないので抗体作製は不可能である、という 2 つの大きな障害があった。

しかし 1995 年に藤本和博士により SDS-FRL 法という新しいフリーズフラクチャーレプリカの方法が開発された(4)。これはフリーズフラクチャーレプリカへの免疫標識を可能にするという画期的なものであった。さらに 1996 年の Pear らによるコットン cellulose synthase 遺伝子の発見から相次いで高等植物のセルロース合成酵素遺伝子が見つかったことにより、セルロース合成酵素に対する抗体の作製も可能となった(5-7)。ここでようやく TC がセルロース合成酵素であ



ることを実証することが現実味を帯びてきた。今回、植物細胞における SDS-FRL 法の実際および本手法を用いたロゼット TC のセルロース合成酵素の抗体による免疫ラベルについて(8)、そして現在進めている酢酸菌の TC の免疫ラベルについて報告したい。

### 【SDS-FRL 法の原理】

SDS-FRL は SDS(sodium dodecyl sulfate)-Freeze-fracture Replica Labeling の略であり、もともと動物細胞を対象に開発された手法である。そのため植物に応用するには SDS 処理の前に細胞壁を取り除く必要があった。これは市販のセルラーゼで細胞壁を消化することで解決できた。図 2 に SDS-FRL のアウトラインを示す。なお SDS-FRL 法の基本原理と実際に関する日本語の解説として文献 9-11 も参照していただきたい。

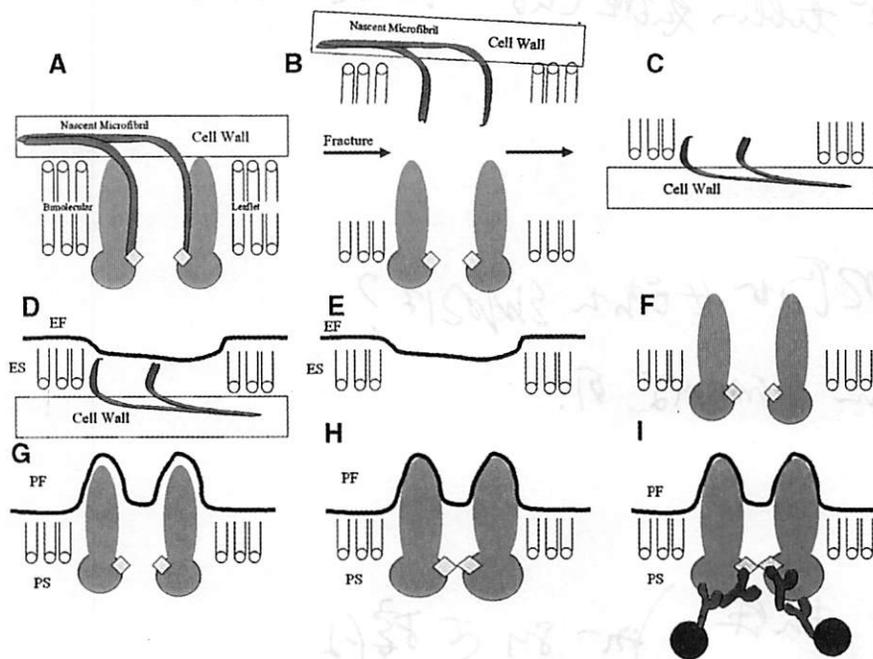


図 2：植物細胞における SDS-FRL の概要。(A) 切断前の原形質膜周辺の様子。凍結切断後(B)、EF-face(C)はシャドウイング(D)→セルラーゼによる細胞壁の除去および SDS による細胞質タンパク質の可溶化が行われる(E)。細胞側の切断面 (PF-face) も同様に細胞壁とタンパク質の可溶化が行われるが(F-H)、PF-face にはロゼットを構成するセルロース合成酵素が局在しているので CelA 抗体によって免疫標識される(I)。

植物細胞(図 2A) をフリーズフラクチャーすると原形質膜の疎水性部位で切断される(図 2B)。細胞壁と原形質膜外葉からなる切断面は Exoplasmic-fracture face (EF-face) (図 2C)、細胞質と原形質膜内葉からなる切断面は Protoplasmic-fracture face (PF-face) (図 2F) と呼ばれる。切断面は白金とカーボンで真空蒸着され切断面の鋳型が作製される(図 2D、G)。従来のフリーズフラクチャーレプリカ法は、ここで硫酸やブリーチで細胞を完全に溶解してレプリカを得るため、得られたレプリカは単なる金属膜でしかなかった。一方 SDS-FRL 法では、まずセルラーゼによる細胞壁の分解を行い(図 2E、H)、引き続き SDS で処理することで細胞質の可溶化を行う。するとレプリカ膜で被われている膜顆粒や原形質膜はレプリカ膜で物理的に固定されているためレプリカ上に残る(図 2E、H)。その後抗体でレプリカ膜を標識することで膜顆粒の成分を同定できる(図 2I)。

### 【抗体の作製】

高等植物由来のセルロース合成酵素に対する抗体 (CesA 抗体) は、ワタ繊維の cDNA ラ

1~4 金粒 / rosette

株 2 粒

20 2000 - microtubule の可視化でマーカーは何か?

↳ 2000 2000 tubulin 処理して可視化できた。

△ 2000

= 2000 2000 の細胞を 2000 2000?

liquid nitrogen の。

栗野

direct 抗体. ) 80 2000 2000  
frequency.

control 2000 2000 SEM 2000.

ブラリーからスクリーニングされた CesA 3 遺伝子のリコンビナントタンパク質を抗原として作製された(8)。サイクリック・ジ・グアニル酸結合タンパク質 (93kDa) の抗体の作製は文献 12 を参照。

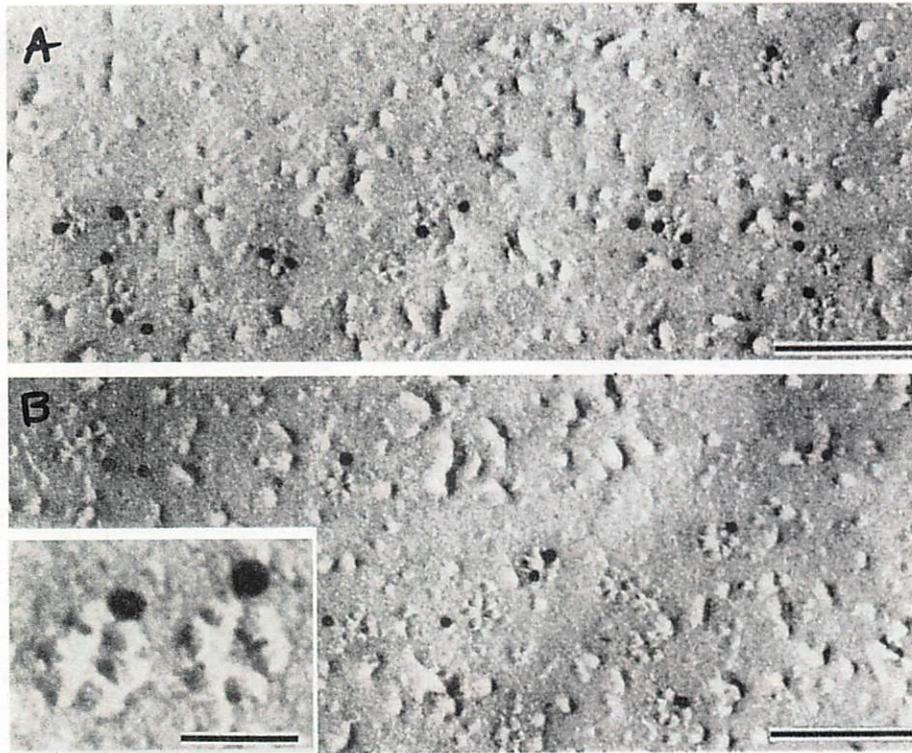


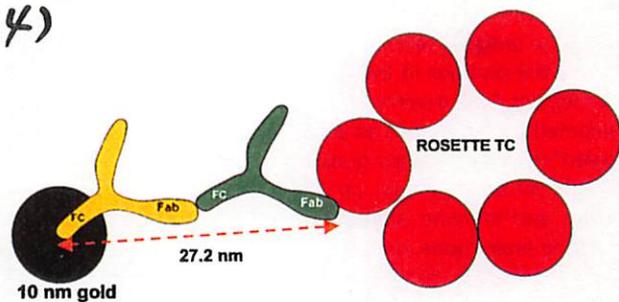
図 3: アズキ芽生え上胚軸のロゼット TC の CelA による免疫標識像。条件に左右されるものの、PF-face で観察される全ロゼットの約 80% が 1-4 個の金粒子で標識される。写真の A と B は異なる細胞の PF-face で挿入図は一部の拡大。スケール=0.1 $\mu$ m(A and B)、30nm(挿入図)。

図 4: 抗体とロゼットのスケールモデル(文献 13 を参照)。

(4)

【CesA 抗体によるロゼット TC の免疫標識】

SDS-FRL 法を用いてアズキ芽生え上胚軸のフリーズフラクチャーレプリカを CesA 抗体で標識した電子顕微鏡像を図 3 にしめす。植物細胞においても、SDS-FRL 法で得られたレプリカはコンタ



ミネーションもなく、従来法で得られたレプリカと同様の像を示した。図 3 の A と B はそれぞれ異なる細胞の原形質膜の PF-face であるが、ロゼット TC と近接して金粒子 (写真では黒いドット状構造) が観察された。金粒子はロゼット TC に直接またはロゼットのごく周辺にのみ観察される。標識されたロゼット TC の拡大像が図 3B 左下の挿入図で、2 つロゼット TC にそれぞれ一つずつの金粒子が結合しているのがわかる。対照実験として免疫前血清による標識を行ったが、原形質膜面に金粒子は全く観察されないか、ごく低い頻度でランダムな分布で観察された。さらに EF-face 上の膜顆粒は CesA 抗体および免疫前血清で全く認識されなかった。

CesA 抗体によるロゼット TC の標識の特異性を検証するために統計処理を行った。図 4 はロゼット TC と一次抗体 (CesA 抗体)、金粒子と結合させた二次抗体 (抗ウサギ IgG 抗体) のスケールモデルである (抗体の大きさは文献 13 を参照)。これは金粒子とロゼット TC が接していなくても両者の距離が約 25nm 以内であれば抗体がロゼット TC を認識していることを示している。ロゼット TC の縁から金粒子の中心との距離を計測してプロットしたものが図 5 である。CesA 抗

体で標識した場合、計測した金粒子のうち74%がロゼット TC の縁からから 20nm 以内に局在しており、その平均は約 6.5nm であった (図 5A)。一方、免疫前血清による標識ではわずか 2%がロゼット TC から 20nm 以内に局在するのみで、結果として分布様式はランダムとなった (図 5B)。この結果は統計計算からも明らかに有意な差であることが支持された。

以上の結果、ロゼット TC を構成する膜顆粒にセルロース合成酵素が含まれていることが実証された。ここでロゼット TC の構造とその機能がようやく一致した。

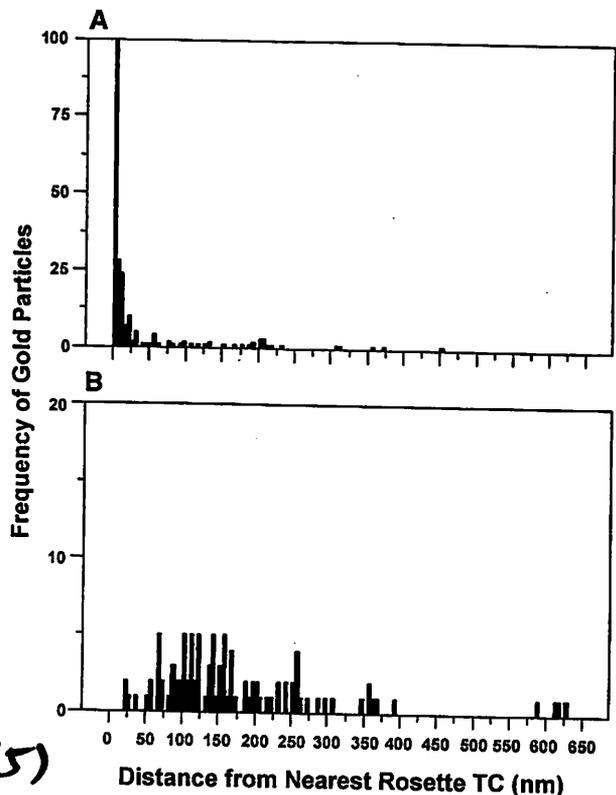
#### 【93kDa 抗体による酢酸菌 TC の免疫標識】

酢酸菌はセルロース生合成の研究におけるモデル生物として有名である。研究も最も進んでおり、膜画分から単離されたセル

ロース合成酵素による *in vitro* でのセルロース生合成、そしてセルロース生合成に関する 4 つの遺伝子からなるセルロース合成オペロンが明らかにされている (1-2)。酢酸菌のセルロース生合成には 2 つのタンパク質が必須であり、1 つはセルロース合成の触媒酵素である 83kDa タンパク質、もう一つはサイクリック・ジ・グアニル酸 (c-di-GMP) 存在下で触媒酵素をアロステリックに活性化する 93kDa タンパク質である。ここでは 93kDa タンパク質と酢酸菌 TC との関係に着目した。それは 93kDa タンパク質の局在を明らかにすることで、*in vivo* での 2 つのタンパク質の関係を明らかにできるからである。

酢酸菌はリポポリサッカライドからなる細胞壁、いわゆる LPS-layer で囲まれている。そこで SDS 処理に先立ってレプリカをリゾチームで前処理することで SDS-FRL を適用した。図 6A-D は酢酸菌を抗 93kDa 抗体で免疫標識したものである。酢酸菌の TC は顆粒が一系列に配列したリニア TC と呼ばれている。図 6A は典型的な酢酸菌の PF-face のフリーズフラクチャー像で、TC は細胞長軸に平行に配列しているのがわかる。そして TC の一端にはしばしば合成されたばかりのセルロースマイクロフィブリルのリボンが観察される (図 6A、矢印)。93kDa 抗体で免疫標識した結果、金粒子は酢酸菌の PF-face の TC に沿ってのみ観察された (図 6A、矢頭)。PF-face の TC の一部を拡大したものが図 6B で、金粒子は TC に沿ってその中心から 20nm 以内に局在していた。興味深いことに 93kDa 抗体によって標識される TC の多くは TC 顆粒がクリアーでなく、しばしば TC 上の顆粒がはぎ取られたような跡が観察された (図 6B、矢頭)。一方、図 6C のように大きく鮮明な顆粒で構成されている TC に 93kDa 抗体はほとんど反応しなかった。なお 93kDa 抗体は EF-face の TC 顆粒をいっさい認識しなかった (図 6D)。

以上の結果、c-di-GMP 結合タンパク質は酢酸菌 TC を構成する膜貫通タンパク質の一つであることが明らかとなった。そして *in vitro* 系と同様に TC 顆粒内でセルロース合成酵素の活



(5)

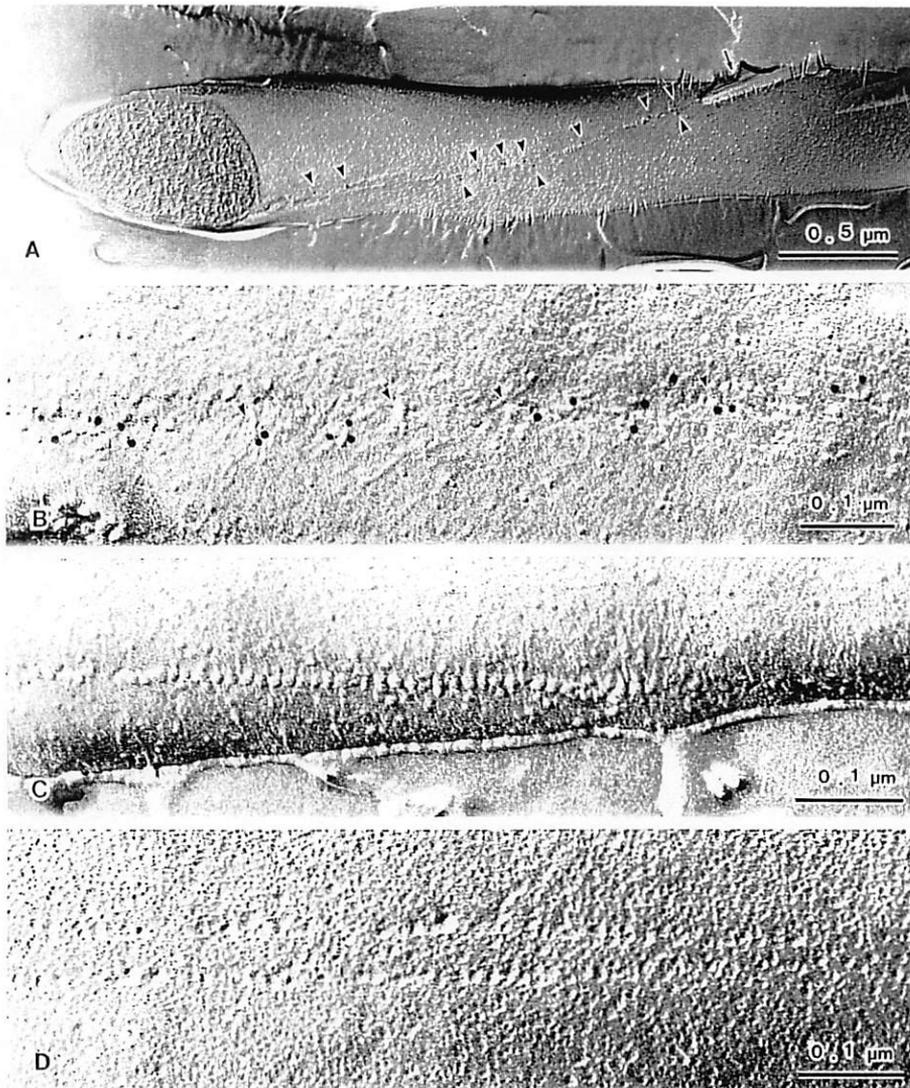


図 6 : 93kDa 抗体による酢酸菌 TC の免疫標識。(A)PF-face の低倍像。細胞を縦断するように配列する TC の一端に形成されたセルロースリボンが観察される(矢印)。93kDa 抗体の結合を示す金粒子を矢頭で示した。(B)免疫標識された PF-face の TC の拡大像。標識される TC は不鮮明な膜顆粒で構成されており、TC 上の所々に顆粒のはぎ取られたような跡が見られる(矢頭)。(C)大きく明瞭な顆粒から構成された PF-face の TC は、93kDa 抗体によって標識されない。(D)EF-face の TC はいかなる場合にも 93kDa 抗体で標識されない。

性を調節しているに違いない。さらに今回の実験では TC の見え方と抗体によるラベルが異なることが明らかとなった。すなわち今まで典型的な酢酸菌の TC とされてきた図 6C のような TC は 93kDa 抗体で全く認識されなかった。これを説明するために図 7 のモデルを提案した。酢酸菌のセルロース合成には生合成に関与する膜タンパク質 (83、93kDa) の他にセルロースの結晶化や細胞外への放出に関与するタンパク質の存在が示唆されている。そしてこれらのタンパク質は LPS-layer に局在していると考えられている (図 7A)。酢酸菌のフリーズフラクチャーはそのほとんどが LPS-layer で起こり、切断部位は一定していない。すなわち原形質膜近くで切断が起こる場合 (図 7B) と LPS-layer 外周部で起こる場合が考えられる (図 7E)。前者 (図 7B) の場合、膜貫通型である 93kDa タンパク質はレプリカ膜によって物理的に保持されるが (図 7C)、後者 (図 7E) では細胞外タンパク質が 93kDa タンパク質を被った状態でシャドウイングされてしまう (図 7F)。この場合、フリーズフラクチャー像における TC は図 6C のようにクリアーな大きな顆粒列として観察されるが、93kDa タンパク質はレプリカ膜で保持されていないので SDS 処理後に洗い流されてしまう (図 7G)。逆に図 7C の場合にはフラクチャー像としては不鮮明かつ細胞外タンパク質が引き抜かれたような像として観察されるが、93kDa タンパク質はレプリカ膜で保持されているために免疫ラベルが観察される (図 7D)。一方いずれの場合においても EF-face の TC 構造は 93kDa 抗体で認識されない。

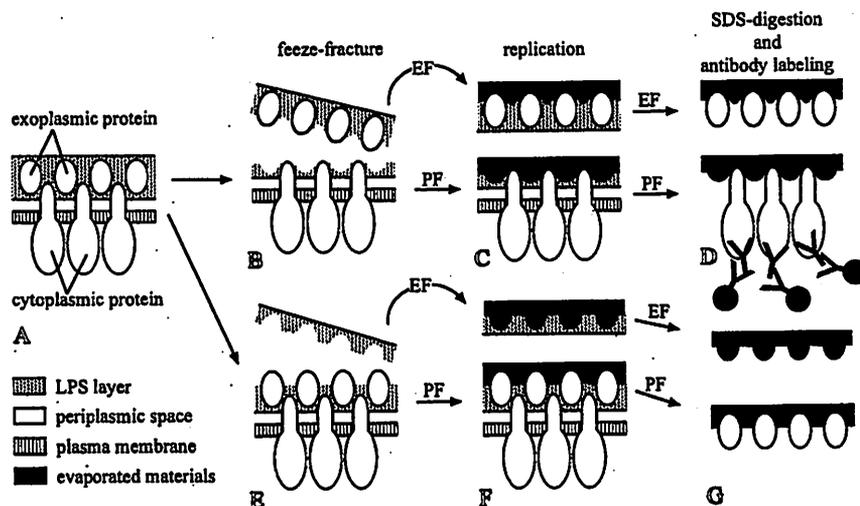


図7：酢酸菌における凍結割断面の違いと露出するTC顆粒の関係。切断部位が原形質膜から近い場合(B-D)と遠い場合(E-G)でレプリカ膜上に保持される顆粒が異なる。93kDa抗体は前者の切断タイプ(B-D)でPF-faceのTCのみを標識する(D)。

### 【おわりに】

以上 SDS-FRL 法を用いた TC の免疫ラベルについて述べた。近年フリーズフラクチャーレプリカ法はもはや古い手法と考えられつつあったが、SDS-FRL 法の開発により再び脚光を浴びつつある。実際、動物細胞を用いた報告例が数多く紹介されている。植物細胞での応用例はまだ少ないが、SDS-FRL 法は植物細胞の膜タンパク質の分布や同定を高解像度で明らかにできる有力な手法である。

### 【謝辞】

本研究は京都大学木質科学研究所・伊東隆夫教授の推進するプロジェクトにより遂行されてきた。これまでのサポートとご指導に感謝いたします。抗体作製はテキサス大学の R. Malcolm Brown Jr. 教授との共同研究として遂行された。Brown 教授並びに Brown 研の Walairat Laosinchai 氏、He Ping Chen 博士、Xiaojiang Cui 氏、Inder M. Saxena 博士に感謝いたします。フリーズフラクチャーと統計処理をお手伝いいただいた京都大学木質科学研究所・菊地悟郎氏に感謝いたします。

### 【参考文献】

- (1) Brown, RM Jr (1996) J. Macromol. Sci. 10: 1345-1373.
- (2) Delmer, DP (1999) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 245-276.
- (3) Emons, AMC (2000) Trends Plant Sci. 5(1): 35-40.
- (4) Fujimoto, K (1995) J. Cell Sci. 108: 3443-3449.
- (5) Pear, JR et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12637-12642.
- (6) Arioli, T et al (1998) Science 279: 717-720.
- (7) Taylor, NG (1999) Plant Cell 11: 769-779.
- (8) Kimura, S et al (1999) Plant Cell 11: 2075-2085.
- (9) 藤本和 (1996) 電子顕微鏡 30: 274-280.
- (10) 藤本和 (1997) 電子顕微鏡 32: 48-51.
- (11) 藤本和 (1999) 電子顕微鏡 34: 184-187.
- (12) Chen, HP and Brown RM Jr (1996) Cellulose 3: 63-75.
- (13) Sarma, VR et al (1971) J. Biol. Chem. 216: 3753-3759.

Xylan → CMLC = 抗体結合用 抗原  
Controlは何か?

飯山 / P. wall は特異的に Xylan を捕捉の結果では?

↳ 抗体作製時の抗原の肉抜きを要す。

飯山 / CMLC Xylan 及び Arabinose 結合が多い。

ASID / sample preparation 法は?。

3% QA 固定。不可。(糖は影響を受けない)

D<sub>2</sub>O による脱糖質処理。

片岡 / SEM の内表面を撮る。

↳ 凍結 370K-4K = 乾燥法

片岡 / 凍結 370K-4K による凍結は?

↳ 氷晶による凍結。で氷晶の影響を減らすために乾燥させる。

安部

片岡 / Xylan 挿入機構の mechanism は?。

↳ cytological analysis は?。

↳ 2-3 週間 培養した細胞に抗体を作用させ、検出させる。

↳ 培養した細胞の血清中から、細胞組織に挿入された抗体を検出させる。

? / monoclonal 抗体 a try は?

↳ ELISA test - positive 反応を得られたか?

細胞には挿入された抗体を検出させる。

## 免疫電子顕微鏡法によるヘミセルロース局在の可視化

京都大学大学院農学研究科 栗野 達也

### 1. はじめに

ヘミセルロースは樹木細胞壁の20~30%を占める主要構成成分であるにもかかわらず、細胞壁内での局在に関する知見はほとんど得られていない。これは、ヘミセルロース分子に特徴的な物理的性質や化学的性質が乏しいために、組織化学的研究手法が発達しなかったためである。ヘミセルロースはセルロースのような結晶性を示すこともなく、リグニンのように他の細胞壁成分と明確に異なる吸光を示すこともない。顕微鏡下でヘミセルロースを可視化する方法は、PAS染色法やPATAg染色法などの過ヨウ素酸酸化による多糖類の選択的分解に基づく染色法に限られていた。

免疫標識法（免疫電子顕微鏡法を含む）は特定の分子の細胞内局在を非常に特異的かつ高感度で検出する方法として、分子細胞生物学的研究に広く用いられてきた。我々の研究グループでは、組織化学的研究が困難であったヘミセルロース局在の問題に関して、免疫標識法が威力を発揮するのではないかと考えその導入を試みてきた。

ここでは、広葉樹の主要ヘミセルロースであるキシランの細胞壁中での局在について得られた結果を中心に紹介する。

### 2. 抗体の調製と特異性の確認<sup>1)</sup>

免疫電子顕微鏡法は抗体が抗原と特異的に結合するという性質を利用している。従って、キシランの局在を調べるためには、キシランを抗原として動物に投与し、キシランと特異的に結合する抗体（抗キシラン抗体と呼ぶ）の産生を促す。動物

から血清を採取すると、抗キシラン抗体を含む血清（抗キシラン抗血清と呼ぶ）を得ることができる。抗血清中には抗キシラン抗体以外にも様々な抗体が含まれているので、免疫電子顕微鏡法に用いる際にはあらかじめ反応特異性を確認しておく必要がある。

抗キシラン抗血清の反応特異性を確認するために、競合阻害実験を行った。組織切片に抗血清を反応させる前にあらかじめ競合物質を混合しておく、もし競合物質と抗体が結合すれば組織切片上には標識は観察されないはずである。抗血清をそのまま樹木組織切片に反応させると、標識が多数観察された（Fig.1a）。一方、組織切片に反応させる前に競合物質としてキシランを抗血清に混合した場合、標識は観察されなかった（Fig.1b）。同様にキシロトリオース、キシロビオースを混合した場合も標識は観察されなかった。これに対して、グルコマンナン、キシログルカン、ペクチンを混合した場合はいずれも標識が観察された（Fig.1c）。このことから、抗体はキシラン及びキシロオリゴ糖と結合するが、グルコマンナンなど他の細胞壁多糖類とは結合しないことが明らかになった（Table 1）。

### 3. 透過型電子顕微鏡（TEM）による観察<sup>1)</sup>

以上のような特異性を持った抗血清を用いて、ブナ分化中木部組織におけるキシランの分布を調べた。まず、銀増感法により光学顕微鏡レベルでキシランの分布を調べた。キシランの標識は木部構成要素の二次壁に観察された。二次壁形成を開

始した組織から成熟木部にかけて観察され、成熟側に向かうにつれ標識は強くなっていた (Fig.2)。

次に、透過型電子顕微鏡を用いて成熟木部繊維におけるキシランの分布を調べた。免疫標識は一次壁及び細胞間層には存在せず、二次壁のみに観察された (Fig.3)。S<sub>1</sub>層の外側部分でやや標識の密度が低かったが、S<sub>2</sub>層内ではほぼ均一に標識は分布していた (Fig.3)。このことから、キシランは一次壁には存在せず、二次壁にほぼ均一に分布することが分かった。

光学顕微鏡による観察結果から、キシランの堆積は細胞壁形成の進行とともに増大することが示唆された。このことを詳細に調べるため、分化中木部繊維を形成層側から成熟木部側にかけて順に透過型電子顕微鏡で観察した。細胞拡大帯の細胞では標識は観察されなかった (Fig.4)。S<sub>1</sub>層形成中の木部繊維では標識密度が低いものの、標識は観察された (Fig.5)。S<sub>2</sub>層形成中の木部繊維ではS<sub>1</sub>層、S<sub>2</sub>層のいずれにも標識が観察され、S<sub>2</sub>層の方が標識密度が高かった (Fig.6)。S<sub>3</sub>層形成中の木部繊維でもS<sub>1</sub>層、S<sub>2</sub>層、S<sub>3</sub>層のいずれにおいても標識は観察された (Fig.7)。興味深いのは、成熟木部繊維 (細胞質が観察されない木部繊維を成熟木部繊維と見なした) では、S<sub>3</sub>層形成中木部繊維よりも標識密度が高かったことである (Fig.8)。

分化中木部繊維を細胞壁形成の段階によって、(1) S<sub>1</sub>層形成中木部繊維、(2) S<sub>2</sub>層形成中木部繊維、(3) S<sub>3</sub>層形成中木部繊維、(4) S<sub>3</sub>層完成直後木部繊維、(5) S<sub>3</sub>層完成木部繊維形成層側、(6) S<sub>3</sub>層完成木部繊維髓側、の6段階に分け、各段階について二次壁の各壁層における標識密度を測定した (Fig.9)。その結果、細胞壁形成が進行するとともに、二次壁の各壁層で標識密度が増大していることが明らかとなった。この

ことから、キシランの堆積は細胞壁内表面に付加的に起こるといよりも、細胞壁内部に挿入的に起こるといことが示唆された。

#### 4. 高分解能走査型電子顕微鏡 (HR-SEM) による観察<sup>2)</sup>

植物細胞壁の超微細構造はこれまでフリーズ・フラクチャー法やディープエッチング法などの金属レプリカ法を用いて観察されてきた。特に、ディープエッチング法は植物細胞壁の三次元超微細構造に関して分子レベルでの数多くの知見をもたらした。しかし、これらの金属レプリカ法を用いた研究では、“観察された構造がどのような分子から成り立っているのか?”ということが問題となっていた。Suzukiら<sup>3)</sup>は免疫金標識法をディープエッチング法と組み合わせることで、タバコ培養細胞の細胞壁におけるキシログルカンの分布を明らかにし、この問題を解決した。演者もこの方法を参考に、広葉樹木部繊維細胞壁中におけるキシランの分布を調べようと試みたが、レプリカ膜作製時に金標識をレプリカ膜に保持することができなかった<sup>4)</sup>。金標識の保持のためには蒸着膜を厚くする等の方法が考えられたが、像質の低下が予想された。

そこで、レプリカ法以外の細胞壁超微細構造の観察方法として高分解能走査型電子顕微鏡 (HR-SEM) による観察を試みた。Abeら<sup>5),6)</sup>の仮道管内表面におけるマイクロフィブリルの観察結果から、フィールドエミッション走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) は細胞壁の超微細構造を観察するのに十分な性能を持っていることが示されている。また、通常金標識に用いられる5~15nmの金コロイドを検出できる分解能を持っているので<sup>7)</sup>、免疫金標識法を適用することができる。

抗キシラン抗血清を用いて免疫金標識したブナ分化中木部柱目切片をFE-SEMで観察した。S<sub>1</sub>

層形成中木部繊維の細胞壁内表面では標識はマイクロフィブリル上に観察された (Fig.10)。S<sub>2</sub>層形成中木部繊維の細胞壁が剥離してS<sub>1</sub>層が表出した部分では多数の標識が観察され、明らかにS<sub>1</sub>層形成中木部繊維の細胞壁内表面よりも標識密度が高かった (Fig.11)。このことは細胞壁形成の進行とともにキシランの堆積が増大していることを示しており、前述の超薄切片での観察結果と一致している。

S<sub>2</sub>層形成中木部繊維の細胞壁内表面ではS<sub>1</sub>層形成中木部繊維の細胞壁内表面よりも多くの標識が観察された (Fig.12)。このことから、S<sub>1</sub>層形成段階からS<sub>2</sub>層形成段階に進むにつれ、キシランの堆積が増大することが分かる。

S<sub>2</sub>層形成中木部繊維の細胞壁断面では内表面よりも標識密度が高かった (Fig.12)。このことから、キシランは細胞壁内部へと挿入的に堆積することが示唆された。

## 5. キシランの堆積機構<sup>2)</sup>

これまでの観察結果から考察すると、キシランの細胞壁への堆積機構は次のように考えられる。

二次壁形成の開始と同時にキシランは細胞壁に堆積しはじめる。S<sub>1</sub>層形成中は比較的堆積量は少ない。S<sub>2</sub>層が形成し始めるとキシランの堆積量は増大する。また、キシランは細胞壁内に挿入的に堆積するため、S<sub>1</sub>層においても堆積量が増大する。細胞壁形成が進行してS<sub>3</sub>層が形成され始めるとキシランの堆積量は少なくなる。しかし、S<sub>3</sub>層が完成した後も細胞質がなくなるまでキシランは挿入的に堆積し続けるので、二次壁各層においてキシランの堆積量は増大する。

## 6. 免疫電子顕微鏡法における問題点

免疫電子顕微鏡法を用いることにより、キシランの局在に関して一定の成果を上げることができ

た。特定のヘミセルロースを選択的に染色することができるという点は、免疫標識法の非常に優れた特徴であるといえる。

しかし一方で、定量的な解析にはまだまだ乗り越えるべき課題が存在する。針葉樹仮道管壁におけるグルコマンナンの局在を免疫電子顕微鏡法で調べたところ、木化の進行とともに標識密度が減少するという結果になった<sup>8)</sup>。これは細胞壁中で抗原 (グルコマンナン) がリグニンに覆われてしまうために、抗体の反応が妨げられるためと考えられる。キシランの場合にも同様の現象が起こっていると考えられるので、細胞壁形成の進行とともに増大するキシランの堆積量は過小評価されていると言える。

また、細胞壁超微細構造の観察においては、抗体分子自体の大きさが観察される構造に比べて大き過ぎるため、分子レベルでの局在について議論することはできなかった (例えば、マイクロフィブリルは数nmの幅で観察されるのに対し、金標識を含む抗体の大きさは15nm以上である)。

以上のような問題点はあるものの、免疫電子顕微鏡法はヘミセルロース可視化のための強力なツールであることは間違いない。パルプ繊維中でのヘミセルロースの局在や、木材腐朽過程におけるヘミセルロースの検出など、様々な分野での応用が期待できる。

〒606-8502

京都大学大学院農学研究科森林科学専攻  
植物細胞構造学研究室 栗野達也

Tel : 075-753-6241

FAX : 075-753-6300

E-mail : awanot@kais.kyoto-u.ac.jp

【文献】

- 1) Awano, T., Takabe, K. and Fujita, M. (1998)  
*Protoplasma*, **202**, 213-222
- 2) Awano, T., Takabe, K. and Fujita, M. (2000)  
*Protoplasma*, *in press*
- 3) Suzuki, K., Baba, K., Itoh, T. and Sone, Y.  
(1998) *Plant Cell Physiol*, **39**, 1003-1009
- 4) 栗野達也、高部圭司、藤田稔：第48回日本木材学会大会研究発表要旨集、p.371 (1998)
- 5) Abe, H., Ohtani, J. and Fukazawa, K.  
(1991) *IAWA Bulletin n. s.*, **12**, 431-438
- 6) Abe, H., Ohtani, J. and Fukazawa, K.  
(1992) *IAWA Bulletin n. s.*, **13**, 411-417
- 7) Osumi, M., Yamada, N., Kobori, H. and Yaguchi, H. (1992) *J. Electron Microsc.* **41**, 392-396
- 8) 前田幸久、栗野達也、高部圭司、藤田稔：第50回日本木材学会大会研究発表要旨集、p.25 (2000)

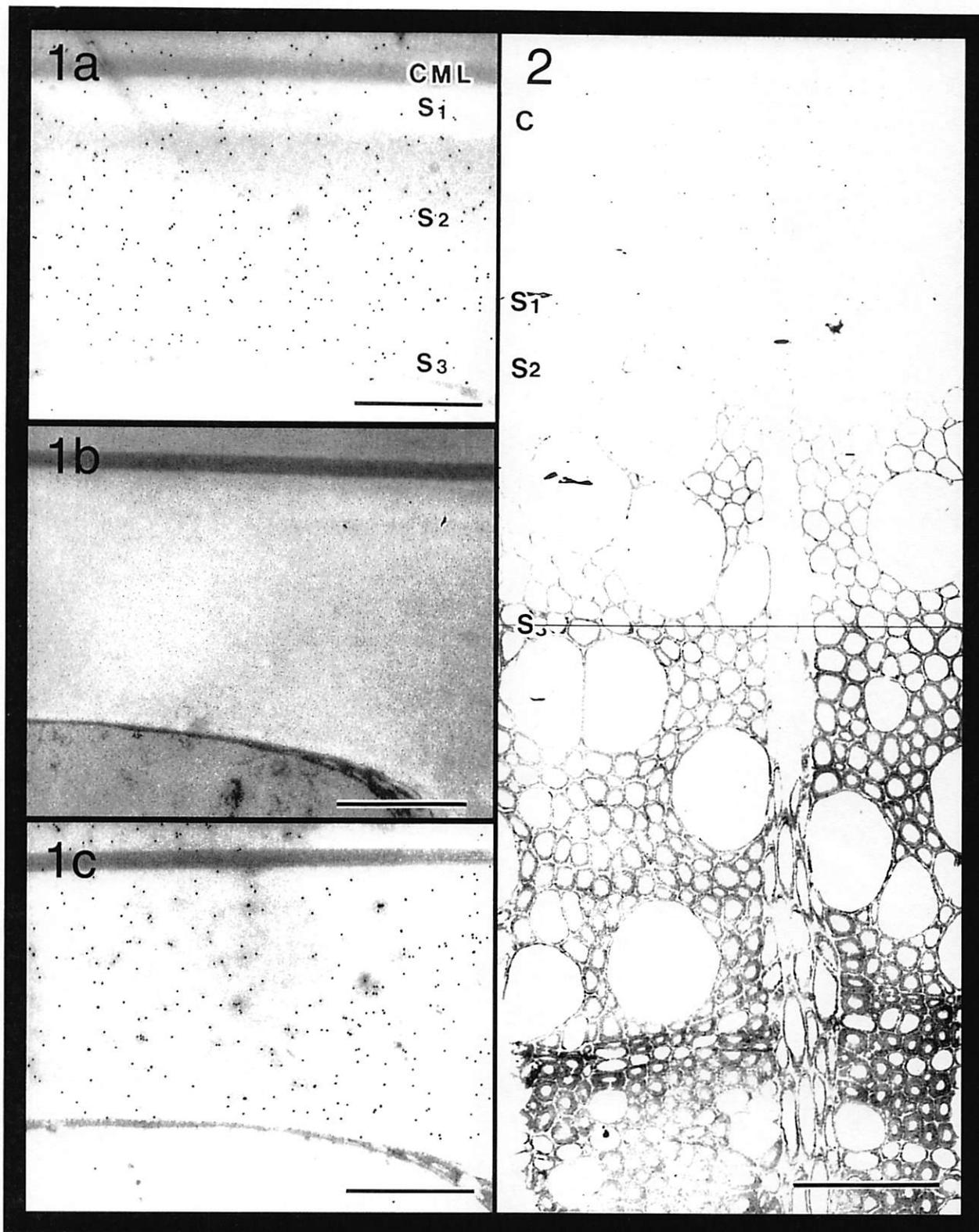


Fig.1 a-c. 連続超薄切片に次の抗血清を反応させた。a)抗キシラン抗血清、b)キシランを混合した抗キシラン抗血清、c)キシログルカンを混合した抗キシラン抗血清。キシランを混合した抗血清を反応させると、免疫標識は観察されなかった。これは抗体がキシランに反応したためと考えられる。キシログルカンを混合した場合は、何も混合しなかった場合と同じように観察され、抗体はキシログルカンには反応しないと考えられる。(Tableも参照) CML 複合細胞間層 S<sub>1</sub> 二次壁外層 S<sub>2</sub> 二次壁中層 S<sub>3</sub> 二次壁内層 bars: 1 μm

Fig.2 抗キシラン抗血清を反応させたブナ分化中木部を銀増感法により光学顕微鏡下で観察した。標識は二次壁形成の開始とともに観察され、細胞壁形成の進行とともに強くなっていた。C 形成層帯 S<sub>1</sub> 二次壁外層形成開始位置 S<sub>2</sub> 二次壁中層形成開始位置 S<sub>3</sub> 二次壁内層形成開始位置 bar: 100 μm

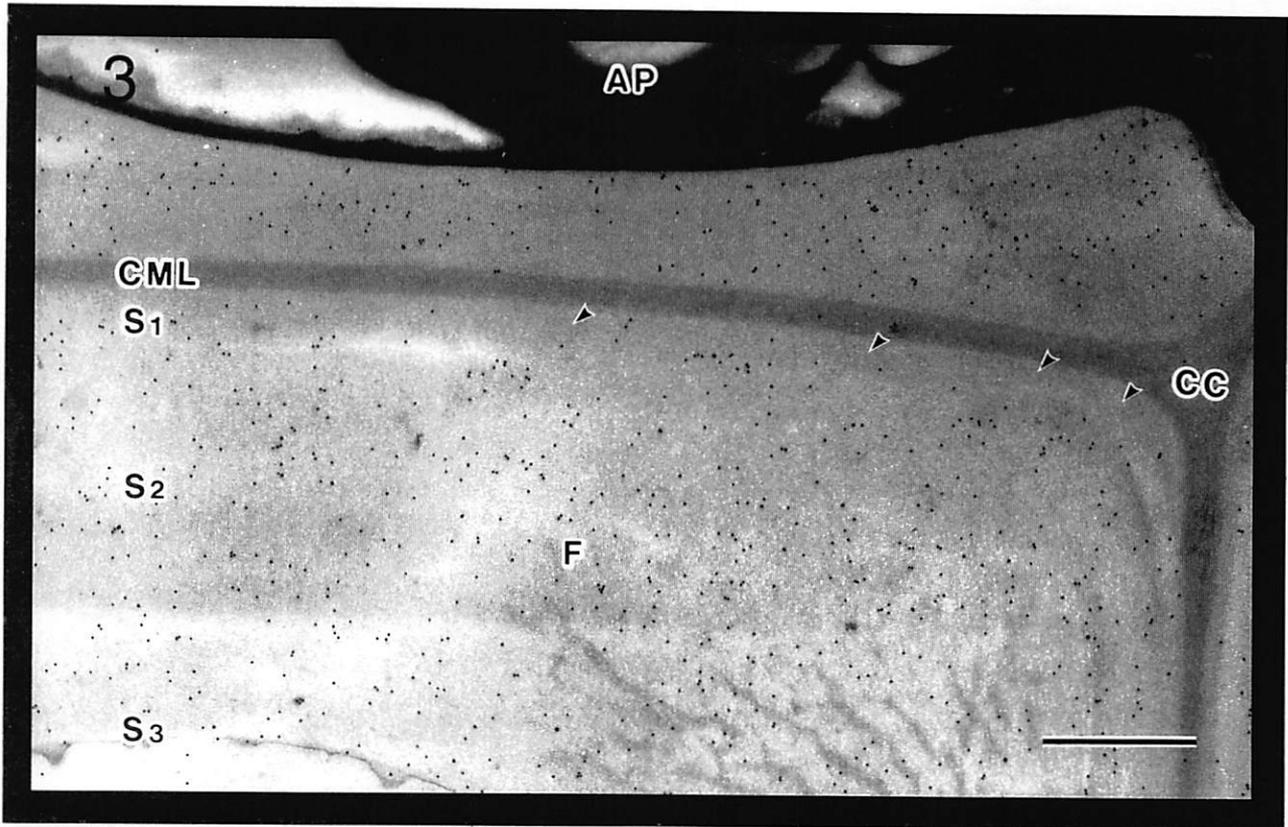


Fig.3 抗キシラン抗血清を用いて免疫金標識した成熟木部繊維。標識は二次壁のみに観察され、複合細胞間層には観察されなかった。S1層の外側部分でやや標識が少なかったが(矢頭)、二次壁全体にほぼ均一に分布していた。CML 複合細胞間層 CC コーナー部細胞間層 S1 二次壁外層 S2 二次壁中層 S3 二次壁内層 F 木部繊維 AP 軸方向柔細胞 bar: 1  $\mu\text{m}$

Table 1 競合阻害実験

競合物質	免疫標識	阻害
なし	++	
キシラン	-	完全に阻害
キシロトリオース	-	完全に阻害
キシロピオース	-	完全に阻害
キシロース	+	部分的に阻害
グルコマンナン	++	阻害しない
キシログルカン	++	阻害しない
ペクチン	++	阻害しない

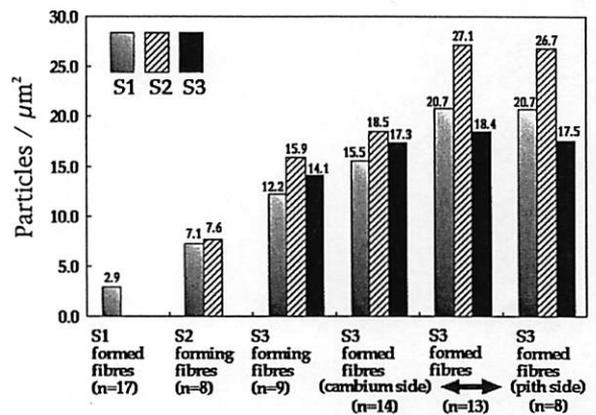


Fig.9 分化中木部繊維における標識密度を壁層ごとに測定した。S1, S2, S3の各壁層において細胞壁形成の進行とともに標識密度が増大していた。特に、S3が完成した後も標識密度が増えていることから、キシランは細胞壁内表面に付加的に堆積するというよりも、細胞壁内部に挿入的に堆積するものと考えられる。

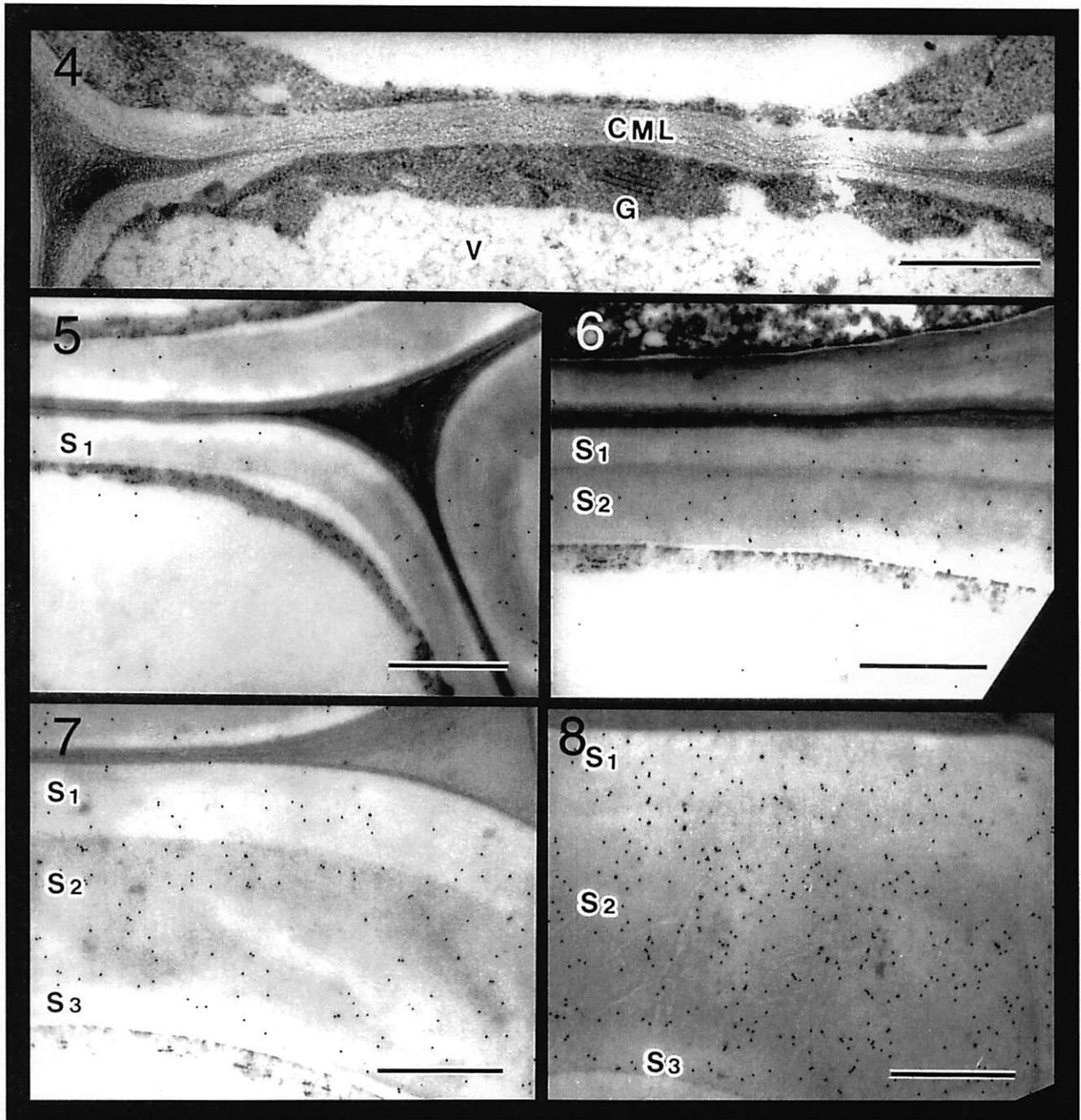


Fig.4-8 抗キシラン抗血清を用いて免疫金標識した分化中木部繊維。形成層帯の細胞では標識は観察されなかった(4)。S<sub>1</sub>層形成中の木部繊維では標識密度は低いものの標識は観察された(5)。S<sub>2</sub>層形成中の木部繊維ではS<sub>1</sub>層、S<sub>2</sub>層のいずれにも標識が観察され、S<sub>2</sub>層の方が標識密度が高かった(6)。S<sub>3</sub>層形成中の木部繊維では二次壁のいずれの壁層においても標識が観察された(7)。興味深いことに、成熟木部繊維(8)ではS<sub>3</sub>層形成中の木部繊維よりも標識密度が高かった。G ゴルジ体 V 液胞 CML 複合細胞間層 S<sub>1</sub> 二次壁外層 S<sub>2</sub> 二次壁中層 S<sub>3</sub> 二次壁内層 bars: 0.5 μm

Fig.9 6ページ

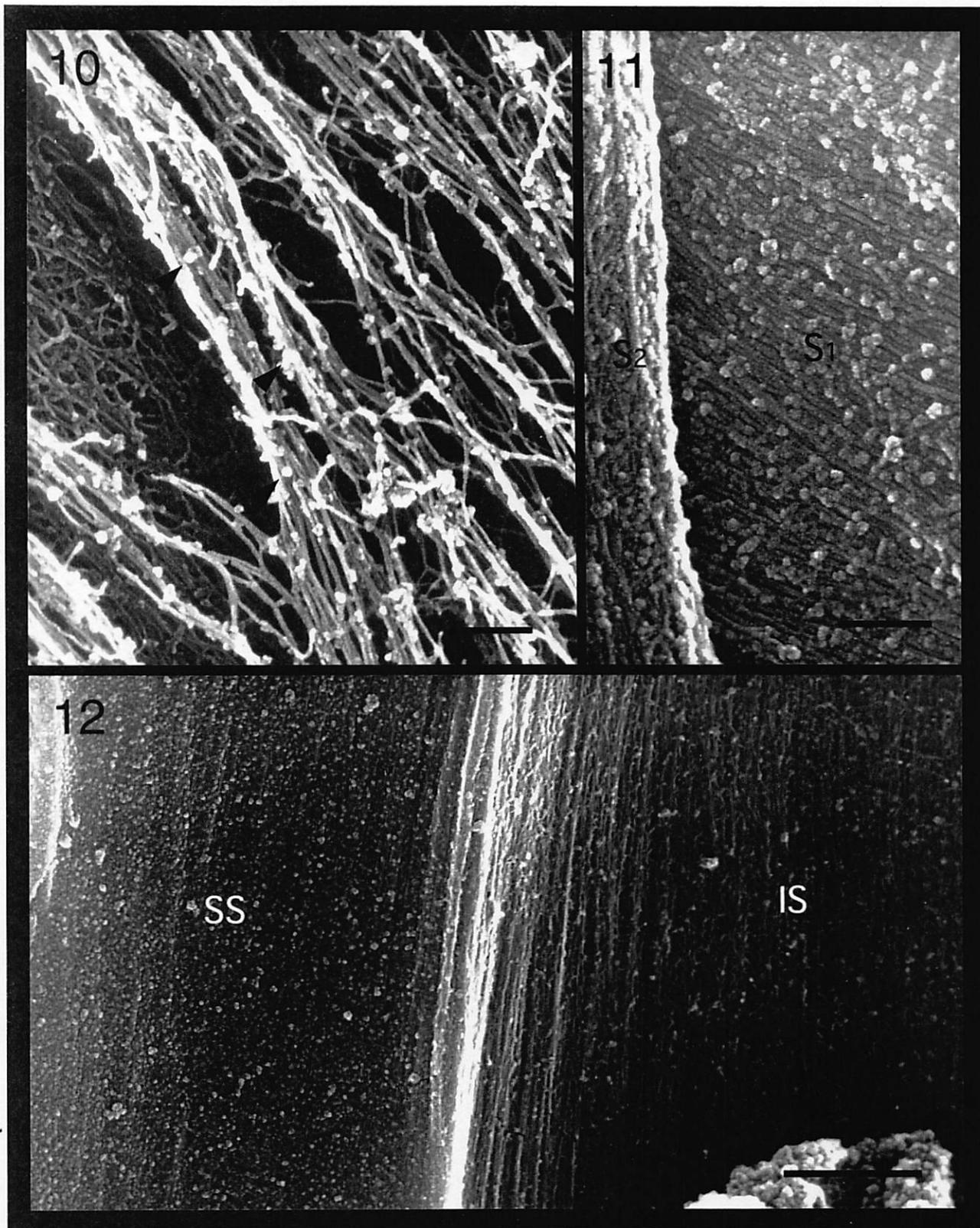


Fig.10-12 抗キシラン抗血清を用いて免疫金標識した分化中木部繊維をフィールドエミッション走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) で観察した。抗体による標識は直径約17nmの粒子として観察された (矢頭)。S<sub>1</sub>層形成中木部繊維の細胞壁内表面では標識はミクロフィブリル上に観察された (10)。S<sub>2</sub>層形成中木部繊維の細胞壁が剥離してS<sub>1</sub>層が表出した部分では多数の標識が観察され、明らかにS<sub>1</sub>層形成中木部繊維の細胞壁内表面よりも標識密度が高かった (11)。このことは細胞壁形成の進行とともにキシランの堆積が増大していることを示している。S<sub>2</sub>層形成中木部繊維の細胞壁内表面 (12, IS) ではS<sub>1</sub>層形成中木部繊維の細胞壁内表面 (10) よりも多くの標識が観察された。このことから、S<sub>1</sub>層形成段階からS<sub>2</sub>層形成段階に進むにつれ、キシランの堆積が増大することが分かる。S<sub>2</sub>層形成中木部繊維の細胞壁断面 (12, SS) では内表面よりも標識密度が高かった。S<sub>1</sub> 二次壁外層 S<sub>2</sub> 二次壁中層 bars : 200 nm, bar for 12: 1 μm



## 長計

1. 原子 (2+ lead)
2. XYZ, 3方向の測距
3. 金属の-700-不要
4. 液中 mode. — 柔軟な材料
5. 接点の測定なし (摩擦, 特異性 or mapping)

## 短計

1. 材料の变形 圧力, 3方向  
約  $10 \text{ nN}$ .  $\approx \text{MPa order}$

Tapping mode. Area  $5 \times 5 \sim 2 \times 2 \mu\text{m}^2$

rate  $8 \sim 15 \mu\text{m/s}$ .

2. 探針の形状効果
3. 凹凸面の幅  $10 \text{ nm}$  以下.
4. Scanning の時間を要する.

# 原子間力顕微鏡 (AFM) 法による never-dried 木材セルロースマイクロフィブリルの可視化

森林総合研究所 片岡 厚

1. はじめに 原子間力顕微鏡(AFM)を植物細胞壁の構造研究に用いた例は数多くあり<sup>1)</sup>、すでに細胞壁の多層構造、セルロースマイクロフィブリル(以下、CMF)の配列構造などが観察されている。しかし、従来の研究においては、AFM の利点であるはずの水中観察モードが十分に活用されなかったため、never-dried な細胞壁は観察されていない。この理由を説明するため、まず、AFM の原理と利点を簡略に述べる(Fig.1)。一般的な観察モードである「力一定モード」では、AFM 探針(tip)と試料表面の間に作用する原子間力が一定となるよう、両者の距離(z 方向)を制御しつつ、試料(または探針)を平面(x, y)方向に走査することにより、Åからμm レベルまでの構造を3次元的に画像化する<sup>2)</sup>。この際、試料は試料台に固着されている必要があるが、他の顕微鏡手法と異なり、化学固定、染色、金属コーティングなどの前処理を必要としない。さらに、試料と探針を水中に浸せきすれば(水中観察モード)、水分に富む生物試料を未乾燥のまま観察することができる。しかし、細胞壁を観察する場合、未乾燥の試料を水中で固着させることが困難であり<sup>1)</sup>、このような *in situ* に近い条件下での観察は、従来行われていなかった。

一方、演者らの観察対象である針葉樹仮道管の細胞壁は、幸いにも水中観察に適していたのである。Fig.2 に示すように、細胞壁形成中の仮道管は分化中木部から小片を切り出すことにより得られる<sup>3)</sup>。このようなブロック形状の試料は、未乾燥のままでも試料台へ固着させることが容易であり、水中観察が可能であった。そこで、スギおよびヒノキの仮道管細胞壁の内表面(新生面)において、CMF の堆積構造を未乾燥のまま観察した<sup>4)</sup>。

## 2. 仮道管細胞壁内表面における never-dried CMF の観察

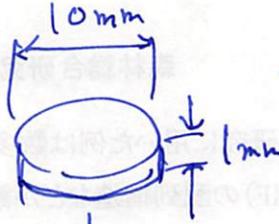
2.1. 方法 スギおよびヒノキの分化中木部の小片を得て、まさ目面を切り出し、仮道管の内こう面を露出させた後、脱イオン水中で緩やかに振とうし、細胞質が部分的に離脱した壁内表面を選んで水中 AFM 観察した(Fig. 3)。なお、試料作成中の乾燥を防ぐため、試料には常に水分を与えた。一部の試料については、3%グルタルアルデヒド固定後、有効塩素濃度 2%の NaClO 水溶液中で原形質を除去し(Fig. 4)、さらに、0.05M CDTA、0.05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> および 1M KOH による多糖類抽出処理の後、CMF 配列形態の変化を観察した(Fig. 5)。

なお、以下の AFM 像は、液中コンタクトあるいは液中タッピングモードにより得た高さ像(左)とエラーシグナル像(右)のペア像である。高さ像では、色の明るい箇所が相対的に高い位置にあるが、高さの絶対値については、その下の断面プロファイルに示される。一方、エラーシグナル像は、表面の勾配が急変する箇所(この場合、CMF のエッジ等)でのコントラストを強めるために用いており<sup>1)</sup>、この像からは正確な高さ情報を得られないことに注意を要する。

本村 / SDS-FRL の膜の調製は可能か?

↳ 可能ではない。

本村 /



Sample 高 5mm 程度。

magnet 固定

伊藤 /

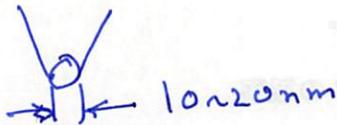
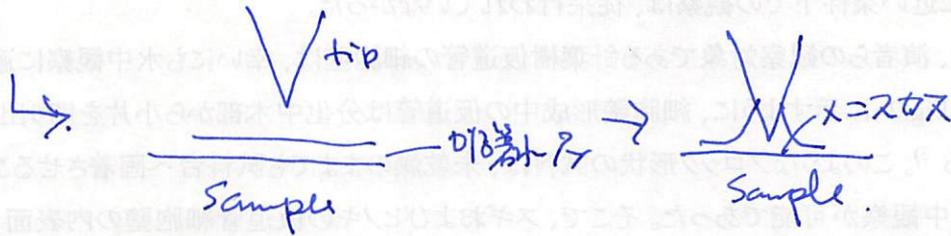
Valonia の cellulose micro fibril と同じに 木片法で cellulose  
を比較して何が違うか? ... 測定の精度検査  
↳ 固定は可能か。

本村 /

Sample 物理的に固定 ex. single fiber mesh  
など。

本村 /

測定時 sample 固定?



測定器 250000bit/set digital instrument.  
Seiko の quartz 1000MHz.

中田 /

測定条件の再認識

**2. 2. CMFの堆積構造** Fig.3において、化学処理なしに未乾燥のまま観察された一次壁(P)および二次壁(S<sub>2</sub>)の内表面には、フィブリル状物質の配列構造(矢印)が認められる。このフィブリル状物質は、細胞質の残さあるいは何らかの細胞外分泌物により部分的に覆われていたものの、その配列様式、さらに化学処理後に明瞭化した形状(Figs 4,5)を考慮して、堆積直後のCMFが*in situ*に近い状態で可視化されたものであると解釈できる。一次壁におけるCMFの走行が直線的で、ほとんど凝集が認められないのに対し、二次壁のCMFは緩やかにうねりながら、著しい凝集体を形成していた。この理由として、両壁のCMFが形成される際の物理化学的環境の違いが想定されるが<sup>5)</sup>、これについては、別の機会に説明したい。なお、種々の細胞壁について、CMF間を架橋するような多糖類の構造体が、フリーズ・エッチング-TEM法により観察されているが<sup>6)</sup>、今回、そのような架橋構造を直接確認することはできなかった。しかし、多糖類抽出処理後(Fig. 5)、特に、一次壁CMFの形状が明瞭化し、さらにCMFの凝集化や曲線化が生じたことから、CMFを被覆するような多糖類の存在が示唆される。また、二次壁CMFについても、多糖類抽出後に若干の形態変化を起こすことがあった。今後、AFM観察条件の設定を再検討し、分解能を向上させれば、CMF-多糖類間の構造形成に関するより詳細な解析が可能となるかもしれない。

**3. おわりに** 細胞壁を含め、生物試料の観察にあたっては、可能な限りアーティファクトを避けることが望ましい。水中 AFM 観察法は、試料乾燥によるアーティファクトがないという点、さらに物体の「高さ」を正確に測定できるという点で、今後、強力な観察手法となることが期待される。

**参考文献** 1) 例えば, Kirby et al, *Biophys J* 70,1138-43(1996). 2) 例えば, CMF の表面で分子鎖像が得られている(本大会要旨集 p672 参照). 3) Kataoka et al, *Mokuzai Gakkaishi* 38,327-35(1992). 4) Kataoka and Kondo (投稿準備中); 片岡, 近藤, 第 6 回セルロース学会要旨集,103-104 (1999). 5) Kataoka and Kondo, *Macromolecules* 29,6356-8 (1996); *Macromolecules* 31,760-4(1998); *Int J Biol Macromol* 24,37-41(1999). 6) 例えば, MacCann et al, *J Cell Sci* 96,323-34(1990).

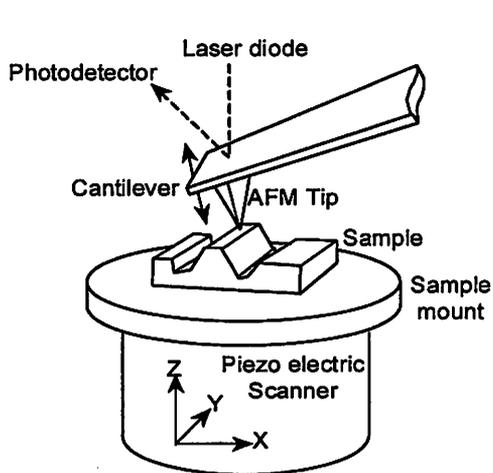


Fig.1 Schematic showing of AFM

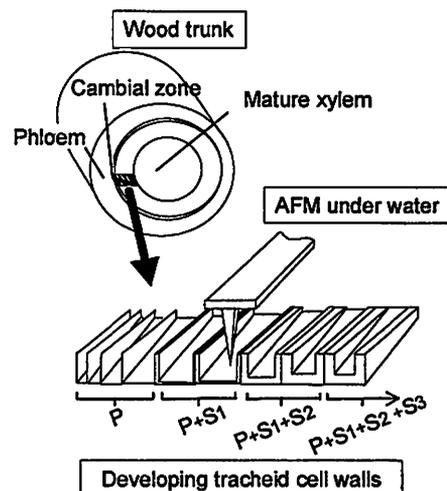
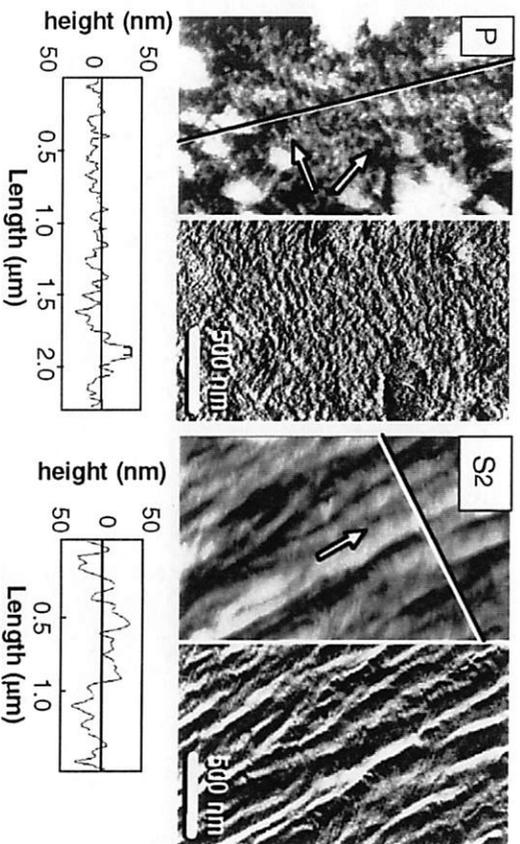
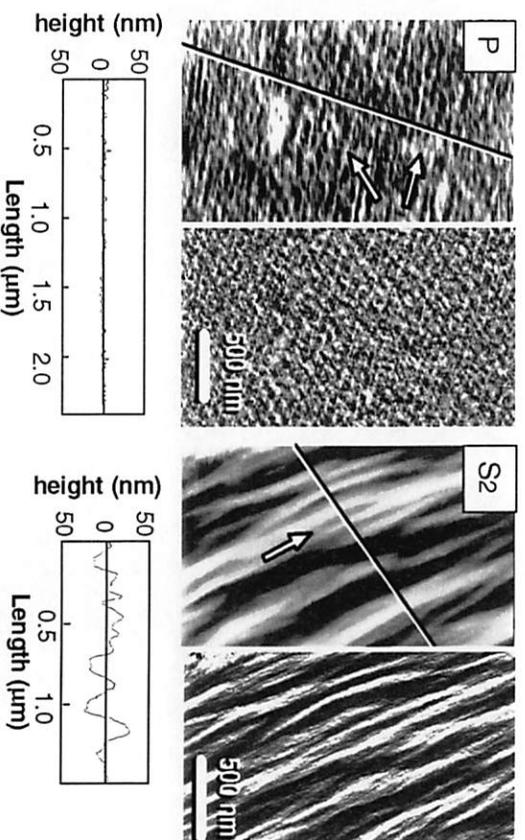


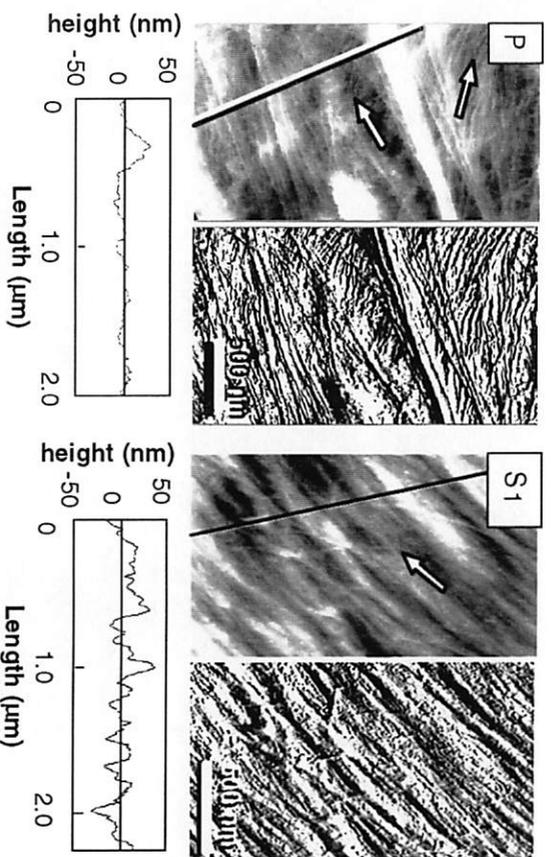
Fig.2 Schematic detailing the sampling method used for aqueous mode AFM analysis to observe nascent CMFs for each developmental stage of tracheid cell wall formation.



**Fig. 3** Aqueous mode AFM height (left) and error signal (right) images of CMFs (arrows) freshly formed on the inner surface of developing *Cryptomeria japonica* (Sugi) tracheid cell walls, together with profile curves traced along solid lines. P: primary wall, S2: the middle layer of the secondary wall. The cell axis is parallel to the long side of this page. The images were acquired by tapping mode. Bar=500 nm



**Fig. 4** Aqueous mode AFM images of CMFs (arrows) on the inner surface of *Chamaecyparis obtusa* (Hinoki) tracheid cell walls treated with glutaraldehyde and NaClO, together with profile curves. P: primary wall, S2: the middle layer of the secondary wall. The cell axis is parallel to the long side of this page. The images were acquired by contact mode. Bar=500 nm



**Fig. 5** Aqueous mode AFM images of CMFs (arrows) on the inner surface of *Cryptomeria japonica* (Sugi) tracheid cell walls after extraction with 0.05M CDTA, 0.05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 1M KOH, together with profile curves. P: primary wall, S1: the outer layer of the secondary wall. The cell axis is parallel to the long side of this page. The images were acquired by tapping mode. Bar=500 nm

追加 車大 岡本 哲明

AFM 2.110667° 観察 (低倍率観察) 1-200um.



FE-SEM.

WD. 3mm inlense & semi-inlense FE-SEM.

冷庫 1-day

S-4500 \ D E (1F 除去) 2.2.

magnesium-ion sputter. 2-3nm厚.

3.0keV at 80K.

蒸着粒子が析出.

1.5um厚  
2-t

1.5keV at 80K

2. 見出し image.

Au fibril 100nm 2.2 fibril

4. 2.2 / 2.2 2.2 2.2 2.2

↳ 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2 2.2