

木材細胞壁におけるセルロースミクロフィブリルと  
壁層の形成に関する動的解析

1999

片岡 厚

木材細胞壁におけるセルロースマイクロフィブリルと  
壁層の形成に関する動的解析

1999

片岡 厚

# — 目次 —

第1章 はじめに	項
1. 1. 木材細胞壁におけるセルロースマイクロフィブリルと壁層の形成を研究する必要性	1
1. 2. 従来の研究とその問題点	3
1. 2. 1. 針葉樹仮道管細胞壁のセルロース結晶構造	3
1. 2. 2. 針葉樹仮道管細胞壁におけるセルロースマイクロフィブリル堆積構造	8
1. 3. 本研究の目的	19
第2章 顕微 FT-IR 分光法によるセルロース高次構造の解析	
2. 1. 緒言	20
2. 2. 実験	22
2. 2. 1. 試料	22
2. 2. 2. 壁層を区分した顕微 FT-IR 分光法	26
2. 2. 3. 結晶形の解析	27
2. 2. 4. 結晶化度の解析	29
2. 2. 5. 分子鎖配向の解析	30
2. 3. 結果	31
2. 3. 1. セルロース結晶形の変化	31
2. 3. 2. セルロース結晶化度の変化	38
2. 3. 3. セルロース分子配向の変化	42
2. 4. 考察	45
2. 5. 要約	51
第3章 X線回折法によるセルロース結晶形の解析	
3. 1. 緒言	52
3. 2. 実験	53
3. 2. 1. 試料	53
3. 2. 2. X線ディフракトメトリー	53

3. 3. 結果と考察	55
3. 4. 針葉樹仮道管細胞壁のセルロース結晶化	59
第4章 液中モード原子間力顕微鏡によるマイクロフィブリル堆積構造の解析	
4. 1. 緒言	60
4. 2. 実験	63
4. 2. 1. 試料	63
4. 2. 2. 液中モードAFM解析	66
4. 3. 結果	70
4. 4. 考察	76
第5章 透過型電子顕微鏡によるマイクロフィブリル配向変化の解析	
5. 1. 緒言	80
5. 2. 実験	84
5. 2. 1. 試料	84
5. 2. 2. レプリカ法-TEM観察	84
5. 3. 結果	86
5. 3. 1. ミクロフィブリル配向変化の規則性	86
5. 3. 2. ミクロフィブリル配向変化とラメラの積み重なり	93
5. 4. 考察	98
5. 5. 針葉樹仮道管細胞壁のセルロースマイクロフィブリル堆積構造	100
第6章 セルロースマイクロフィブリルの形成から細胞壁骨格構築までのモデル	
101	
第7章 結論	104
文献	107
謝辞	117

## 第1章 はじめに

### 1. 1. 木材細胞壁におけるセルロースマイクロフィブリルと壁層の形成を研究する必要性

21世紀に求められるマテリアルの理想条件とは、生産・利用の過程において、環境に負荷を与えないこと、さらにこれらの過程において  $\text{CO}_2$  を放出しないことである。樹木は、環境に負荷なく生体内で多数の細胞を生産し、その細胞壁に  $\text{CO}_2$  を固定する。樹体内部の木部に蓄積された細胞壁は、木材として利用され、これは、燃焼・分解等による  $\text{CO}_2$  の遊離がなければ、長期にわたって  $\text{CO}_2$  を貯蔵できるマテリアルである。この合理的な生産・利用系を有効に活用するためには、木材の利用・リサイクルを推進するだけではなく、樹木生体内で環境に負荷なく細胞壁が生産されるメカニズムを解明することが必要となる。

樹木をはじめとする植物組織の基本骨格をなすものは細胞壁であり、細胞壁の主成分は20から60%を占めるセルロースである。セルロースは、細胞表面の原形質膜と細胞壁の間隙において結晶化し、マイクロフィブリルを形成して細胞壁に堆積する。つまり、マイクロフィブリルを構成するセルロースの高次構造とマイクロフィブリルの堆積構造が細胞壁の基本構造を決定する。細胞壁の骨格が構築されるメカニズムを解明するためには、これらの構造を解析し、その構造形成に影響を与える要因を明らかにしなければならない。さらに、樹木細胞壁の基本構造が明らかとなれば、木材の構造と物性、化学的性質などとの「構造-物性」相関が明確となり、上記のような木材有効利用システムのための基盤となる。

本研究は、針葉樹木部組織の大半を占める仮道管について、マイクロフィブリルを構成するセルロースの高次構造とマイクロフィブリルの堆積構造を解析することにより、細胞壁の骨格が構築されるメカニズムを探求する。仮道管の細胞壁は多

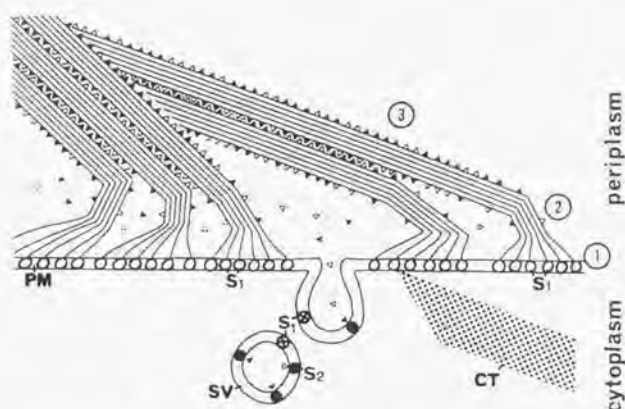
層構造を有し、大別して細胞の拡大生長期に形成される一次壁と、拡大停止後に形成される二次壁からなる。このことは、セルロースの結晶化とマイクロフィブリルの堆積が、一次壁と二次壁の形成時では異なる環境下で進行する可能性を示唆している。したがって、セルロースの高次構造とマイクロフィブリルの堆積構造に差異が認められれば、それをもとに構築メカニズムを探索することが可能となる。



## 1. 2. 従来の研究とその問題点

### 1. 2. 1. 針葉樹仮道管細胞壁のセルロース結晶構造

セルロースは原形質膜のセルロース合成酵素複合体 (TCs) により、 $\beta$ -グルカン鎖として生合成され (Brown and Montezinos, 1976; Mueller *et al.* 1976; Mueller and Brown, 1980)、結晶化してミクロフィブリルを形成し、さらに細胞壁に堆積してその骨格構造を成すと考えられている (例えば Fig. 1-1, Vian and Reis, 1991)。つまり、セルロースの結晶化は、細胞壁の骨格が構築される最初の段階であると考えられる。しかし、結晶化のメカニズムについては不明な点が多い。近年、天然セルロース (セルロース I) は単一の結晶相ではなく、2種の結晶相、 $I\alpha$ と  $I\beta$ が様々な比で存在する複合結晶体であることが判明した (VanderHart and Atalla, 1984; Atalla and VanderHart, 1984)。さらに、複合結晶体中の  $I\alpha$ と  $I\beta$ の組成比は、結晶化における物理的なストレスによって変化すると考えられている (Sugiyama *et al.* 1990; Sugiyama *et al.* 1991a; Yamamoto and Horii, 1994; Yamamoto *et al.* 1996)。このことは、セルロース結晶化のメカニズムを検討するためには、まず、細胞表面の原形質膜と細胞壁の間の物理化学的な効果を考える必要があることを示唆している。後述するように、本研究で対象とする針葉樹仮道管の細胞表面における物理的環境は、細胞壁形成中に変化すると考えられる。仮道管セルロースの結晶構造の解析はすでになされたものの、 $I\alpha$ と  $I\beta$ のいずれが主結晶相であるかについては、いまだ研究者によって意見が異なるところである (Tanahashi *et al.* 1989; Wada *et al.* 1994)。また、さらなる疑問は、セルロースの結晶構造が仮道管細胞壁中で均一であるのかあるいは変化するのかである。もし変化するならば、どのようなメカニズムにより生じるのであろうか。これらの疑問に答えるべく、本研究が出発している。以下に、セルロース結晶の研究史における2相 ( $I\alpha/I\beta$ ) モデルの位置づけと、仮道管セルロースの結晶構造解析における問題点を述べる。



Hypothetical scheme of the successive steps in the construction of the helicoidal cell wall. 1, polymerization; 2, fibrillogenesis; 3, helicoidal assembly;  $\Delta \nabla$ , pool of matrix subunits;  $\bullet$ , S1, inactivated cellulose synthetases located in the membrane of cytoplasmic secretory vesicles (SV);  $\circ$ , S1, activated cellulose synthetases located in the plasmalemma (PM);  $\bullet$ , S2, matrix synthetases located in the membrane of secretory vesicles (SV). Matrix subunits are excreted into the periplasm and associate with the glucan chains in the course of crystallization, giving rise to a coating which allows the helicoidal construction. The different aspects of wall helicoids may depend on the cellulose-matrix balance

**Figure 1-1** (Referred from Vian and Reis, 1991)

Hypothetical scheme of successive steps in the cell wall construction between the plasma membrane and cell wall. (see abbreviations above)



天然セルロース結晶構造の研究は、Nishikawa と Ono (1913) によるX線ラウエ写真の撮影を祖とし、Meyer と Misch (1937) による空間群  $P2_1$  単斜晶の単位胞モデルを構造解析の出発点とする。その後、X線回折、電子回折による空間群や格子定数についての検討、IR、ラマン、NMR によるセルロース分子のコンフォメーション解析がなされたが、1980年代に至るまで天然セルロースの結晶構造は単一相としてみなされていた。しかし、すでに1950年代後半、Marrinan と Mann (1956) は、重水素置換した天然セルロースについて IR スペクトルを解析し、OH 伸縮吸収バンドの相違からセルロースは2つのグループに区分できることを認めていた。X線回折、電子回折においても、Meyer と Misch モデルでは説明できない回折点 (super lattice 反射) を示したため (Honjo and Watanabe, 1958)、2つのセルロースグループは異なる結晶単位胞を有すると考えられた (Fisher and Mann, 1960; Mann *et al.* 1960)。このような研究結果にもかかわらず、1970年代に入っても天然セルロースは単一の結晶相として考えられていた。super lattice 反射を考慮した空間群  $P1$  の三斜晶モデル (Sarko and Muggli, 1974) と、これを考慮しない空間群  $P2_1$  の単斜晶モデル (Gardner and Blackwell, 1974) が提示されたものの、それぞれ単一相としての天然セルロースモデルを考慮していた。

1984年 Atalla と VanderHart (1984) は、海藻・バクテリアセルロースと高等植物のセルロースを固体 CP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMR により解析・比較し、グルコース残基の炭素原子 C1, C4, C6 の共鳴線が、両者の間で異なることを見いだした。この解析結果から、天然セルロースには2種の結晶相が様々な比で存在すること、特に主結晶形が、海藻・バクテリアセルロースとコットン・ラミー・木材パルプのセルロースとで異なることを発表し、前者の主結晶相を  $1\alpha$ 、後者のそれを  $1\beta$  と名付けた。これ以降、天然セルロースは単一相ではなく、 $1\alpha$  と  $1\beta$  からなる2相構造として解析されることとなった。

その後 Horii ら (1987) は、高温水蒸気処理により  $I\alpha$  が結晶性を損なうことなく、より安定な  $I\beta$  へ転移する物理化学現象を示した。また、Sugiyama ら (1990) は、super lattice 反射が  $I\alpha$  に由来することを突き止め、さらに微小部電子回折により、 $I\alpha$  と  $I\beta$  それぞれの回折像を得て、 $I\alpha$  が空間群  $P1$  であり、その中に1本の分子鎖を含む三斜晶であること、 $I\alpha$  が空間群  $P2_1$  であり、その中に2本の分子鎖を含む単斜晶であることを示した (Sugiyama *et al.* 1991b)。  $I\alpha$  が結晶化する理由については、セルロース分子鎖が結晶化するとき何らかの物理的なストレスを受けた結果である (stress-induced、以下「ストレス誘発型」という) と考えられており、いくつかの提案がなされている (Sugiyama *et al.* 1990; Sugiyama *et al.* 1991a; Yamamoto and Horii, 1994; Yamamoto *et al.* 1996)。一方、 $I\beta$  はこのようなストレスを受けずに結晶化した (stress-free、以下「ストレス解放型」という) と考えられている。

この2相 ( $I\alpha/I\beta$ ) モデルを考慮した場合、樹木のセルロースはどのように理解されているのであろうか。2相 ( $I\alpha/I\beta$ ) モデルによる天然セルロースの構造解析が進むなかで、樹木木部組織 (木材) の細胞壁セルロースについては、 $I\alpha$  に富む (Tanahashi *et al.* 1989)、あるいは  $I\beta$  を主体とする (Wada *et al.* 1994; 1995b) とする相反する報告があり、明確な解答は出ていない。Tanahashi ら (1989) は、固体 CP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMR により、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) とシラカンバ (*Betula platiphilla* var. *japonica*) について、Wada ら (1994) は、8種の針葉樹と15種の広葉樹について主として X 線回折により分析した。これらの分析においては、多層構造を有する木部組織の細胞壁内部で、セルロースの結晶構造が単一であるとされているが、この前提そのものに疑問が残る。例えば、コットン (*Gossypium hirsutum*) 綿毛の細胞壁も多層構造を有するが、一次壁と二次壁でセルロースの結晶構造が異なるとの報告がある (Chanzy *et al.* 1978)。セルロースが結晶化す

る際、何らかの物理的ストレスが  $I\alpha$  相の形成を引き起こすとの考えに基づけば (Sugiyama *et al.* 1990; Sugiyama *et al.* 1991a; Yamamoto and Horii, 1994; Yamamoto *et al.* 1996)、生体内の物理化学的な環境次第で、結晶化する ( $I\alpha/I\beta$ ) の量比は変化することになる。針葉樹仮道管は表面拡大生長しながら一次壁 (P) を形成し、細胞寸法が一定化した後に二次壁 (S1, S2, S3) を形成する。仮道管の拡大生長は、細胞軸方向にも 10~15% 程度生じるが、放射方向 (まさ目面に平行な方向) に顕著であり、早材の場合、400% 以上にも達すると報告されている (Bailey, 1920)。この間、セルロース分子は原形質膜のセルロース合成酵素複合体 (TCs) にて合成され (Brown and Montezinos, 1976; Mueller *et al.* 1976)、結晶化してマイクロフィブリルを形成し、細胞壁内表面に堆積すると考えられている (例えば Fig. 1-1、Vian and Reis, 1991)。一次壁形成時には、原形質膜表面が拡大し、細胞壁は引張ストレスを受けるため (例えば、Roelofsen, 1965)、両者の間隙において結晶化し、細胞壁を構築するセルロースには、二次壁形成時とは異なる物理的效果が作用する可能性がある。しかも結晶化メカニズムの変動は、結晶形のみならず、結晶化度、分子鎖の配向にも影響を与える可能性がある。上記の木材セルロースについての 2 説の矛盾を整理し、樹木木部組織の生長過程における細胞壁セルロースの結晶化メカニズムに関する知見を得るためには、針葉樹仮道管細胞壁の壁層別にセルロースの結晶形、結晶化度、分子鎖の配向を解析し、高次構造の変化を検討する必要がある。

## 1. 2. 2. 針葉樹仮道管細胞壁におけるセルロースミクロフィブリル堆積構造

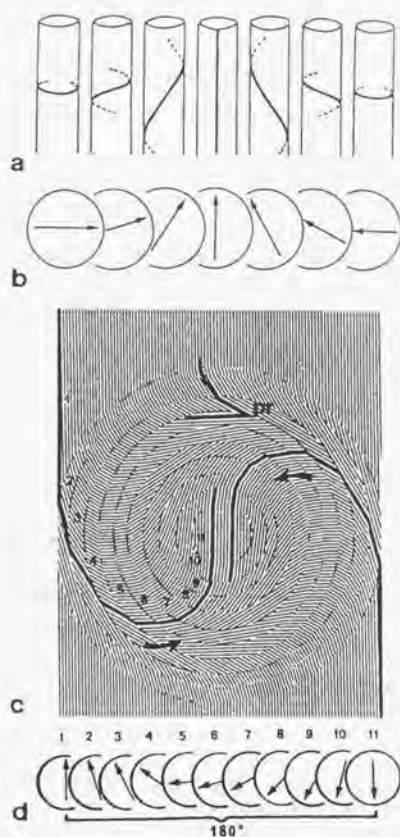
針葉樹仮道管（以下仮道管と略記）細胞壁の骨格構造は、結晶化したセルロースが、セルロースミクロフィブリル（以下 CMF と略記）と呼ばれる幅およそ 2 から 4 nm の（後藤ら、1972; Goto, 1976）繊維状の結晶性構造体として堆積することにより構築される。CMF が細胞壁内表面に堆積するときの集合状態、配向変化など 3 次元構造（CMF 堆積構造）の形成は、細胞壁骨格構築の最終段階として見なすことができる。セルロースの結晶化による CMF の形成とそれに引き続く CMF の堆積は、原形質膜と細胞壁内表面の間隙において一連の過程として進行するため、前者に対する物理化学的な効果があるとする、後者のようなより高次の構造形成にも影響する可能性がある。前節でも述べたように、仮道管一次壁と二次壁のセルロースは、物理化学的に異なる環境下で結晶化して CMF を形成し、細胞壁に堆積している可能性があるが、*in situ* 下における CMF 堆積構造は未だ観察されていない。これは、水分に富む細胞壁内表面を電子顕微鏡で観察することが極めて困難なためである。従来、仮道管 CMF の堆積構造は、主として凍結乾燥した細胞壁内表面において観察されてきたが、特に、薄層の一次壁については、乾燥による変形・破壊を受けていた可能性がある。

さらに、従来、CMF の配向は細胞質内の微小管により生体制御されると考えられていたため（例えば、Helper and Plalevitz, 1974; Gunning and Hardham, 1982）、上記のような原形質膜と細胞壁の間における物理化学的な効果はあまり考慮されなかった。近年、これに対し、植物細胞壁における CMF 配向の規則的な変化を、セルロースの液晶形成に帰する考え方が支持を集めつつある（例えば、Neville and Levy, 1984; Roland *et al.*, 1987; Vian and Reis, 1991; Revol *et al.*, 1992）。これは、中間相のセルロースあるいはセルロース結晶が、原形質膜と細胞壁の間において、自発的あるいは他の多糖類との相互作用によりネマティック配向層を形成し、さら



にその配向層を回転させて細胞壁に堆積するために、カイラルネマティック液晶類似の CMF 配向回転構造（ヘリコイド構造、Fig.1-2）が形成されるとする考え方である。ヘリコイド構造は、CMF 堆積時の原形質膜・細胞壁間における物理化学的な環境を反映すると考えられるが（Neville and Levy, 1984; Roland, *et al.* 1987; Roland, *et al.* 1993）、仮道管についてのヘリコイド構造は十分に解析されていない。以上のように、セルロースが結晶化するときの分子レベルでの物理化学的な効果が、CMF 堆積構造のようなより巨大な構造形成にも影響する可能性があるが、*in situ* 下における 3 次元構造が解析できないため、この観点からの研究はほとんど進められていない。以下に、仮道管細胞壁の CMF 堆積構造に関する研究史およびその問題点を述べる。

透過型電子顕微鏡（TEM）により観察される仮道管 CMF の幅は、およそ 2 から 4 nm（後藤ら、1972; Goto, 1976）と報告されている。これは、ホロセルロース処理したアカマツ（*Pinus densiflora*）CMF についての測定値であり、その大部分を占める仮道管二次壁の CMF 幅を示すと考えられる。一次壁の CMF 幅としては、ストロブマツ（*Pinus strobus*）の仮道管について、上記と同程度の値に加え、2 nm 以下の値も報告されている（Hanna and Côté, 1974）。一般に、高等植物一次壁の CMF は幅 2 nm 前後であり、ラミー（*Boehmeria nivea*）のような比較的幅の広い二次壁 CMF（約 5 nm、Heyn, 1969）に比べ、幅が狭い（CMF の断面積が小さい）ことが指摘されているが（Chanzy, 1990）、仮道管については、二次壁にも幅 2 nm 程度の CMF が数多く観察されており（後藤ら、1972; Goto, 1976）、一次壁 CMF とあまり差がないともいえる。後藤ら（1972）は、上記のアカマツホロセルロースとポプラ（*Populus euramericana*）木部繊維ゼラチン層の CMF について、TEM 観察による幅と、X 線回折法において Scherrer 式から得られる結晶幅がほぼ一致することを確かめ、このことから、仮道管の CMF は結晶化した



Schematic representation of the disposition of cellulose microfibrils. *a* Microfibrils as helices around the cell (each microfibrillar sheet is represented by a single helix). The helices have a variable pitch. *b* Hands of a clock mirroring the changes in direction of microfibrils with time. *c* Modelling made with 11 superimposed mobile discs. The angle between 2 successive sheets is here constant ( $18^\circ$ ). Each disc is seen along a narrow distance. The whole gives the illusion of arcs.

**Figure 1-2** (Referred from Roland *et al.*, 1987)

Schematic representation of the helicoidal pattern, which can be observed in oblique sections of multi-layered cell walls (see captions above)



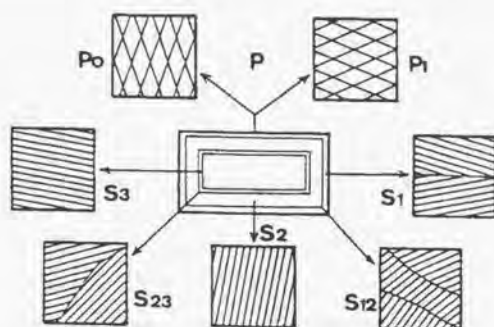
セルロースを核にすると結論づけた。Hanna と Côté (1974) は、ストローブマツ仮道管とポプラ (*Populus sp.*) 木部繊維の CMF について、後藤ら (1972) と同様の結果を得ている。さらに、Hanna と Côté (1974) は、一次壁 CMF の結晶性が二次壁よりも低い可能性を指摘したが、このことについては2章で述べるように、一次壁 CMF の結晶性を過小評価した可能性がある。このように、仮道管の CMF はセルロース結晶を核にするといえるが、ここで CMF が単結晶かどうかの疑問が生じる。海藻パロニア (*Valonia macrophysa*) の CMF については、Sugiyama ら (1985) が、すでに電子顕微鏡により結晶格子像を得て、CMF 横断面の全域に格子の乱れがなく、一つの結晶であることを示している。一方、仮道管の CMF 幅は、パロニア (約 20 nm) に比べて狭く、回折パターンに結晶表層 (準結晶?) の情報が大きく寄与するため、CMF 結晶相そのものの情報を得にくいと考えられる (Chanzy, 1990)。例えば、Goto (1976) は、上記のアカマツとポプラの CMF について、酸処理前後の幅、有効径の異なる電子染色剤を用いた時の幅を比較し、結晶の周りに準結晶 (Frey-Wyssling, 1954) ともいえる領域が存在すると報告している。一方、CMF の長さについては、仮道管の CMF に限らず測定が困難であるが、酸あるいは酵素処理された CMF の形状、電子染色性などから、CMF の長さ方向には、分子鎖配列が幾分乱れた領域が存在すると考えられている (Preston, 1952; Cowdrey and Preston, 1965; Mühlethaler, 1969; Chanzy, 1990)。さらに、前節で述べた2相 ( $I_{\alpha}/I_{\beta}$ ) モデルの出現以来、CMF の幅、長さ方向についての不均一性は、CMF 中における  $I_{\alpha}$  と  $I_{\beta}$  の局在に関わる問題であるとも考えられている (Sugiyama, 1991b; Hackney *et al.*, 1994; 和田, 1997; Hayashi *et al.*, 1998a; Hayashi *et al.*, 1998b)。

次に、結晶化したセルロースを核とする CMF がどのように細胞壁を構築するのであろうか。仮道管細胞壁内における CMF の配向に関する研究史は深く、初

期の特筆すべき研究は、Kerr と Bailey (1934) による偏光顕微鏡観察である。彼らは細胞壁横断面をクロスニコル下で観察し、CMF の配向の違いが、複屈折性の違いとして現れたことから、一次壁および細胞間層、二次壁外層 (S1)、二次壁中層 (S2)、二次壁内層 (S3) を区分し (Fig. 1-3)、S1, S2, S3 における CMF の配向が、それぞれ仮道管軸に対して垂直方向、軸方向、垂直方向であることを示した。その後、一次壁は、細胞が表面拡大生長を続ける間に形成される細胞壁層であり、二次壁 S1, S2, S3 は細胞寸法が一定化した後、細胞壁の内表面に堆積する壁層であると理解されている (例えば、Panshin and deZeeuw, 1980)。仮道管の拡大成長は、細胞軸方向にも 10~15% 程度生じるが、放射方向 (まさ目面に平行な方向) に顕著であり、早材の場合、400% 以上にも達すると報告されている (Bailey, 1920)。Kerr と Bailey (1934) による壁層区分の後、電子顕微鏡を中心とする研究が進展し、壁層の骨格構造が CMF により構築されることが判明した (原田ら, 1951; Wardrop, 1957; Wardrop and Daswell, 1957; 原田ら, 1958)。以来、現在に至るまで、細胞壁における CMF の配向、堆積構造を観察する手法は、電子顕微鏡技術の進歩とともに発展してきたのである。手法を分類すると、① レプリカ法—透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察、あるいは走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察により細胞壁の形成表面、あるいは裂開面に現れた CMF を観察する方法、② 細胞壁の横断超薄切片を傾斜させて TEM 観察し、いわゆるヘリコイドパターン (パウシェイブパターン、カイラルヘリックスともいう) から CMF 配向の変化を解析する方法、③ 細胞壁の横断超薄切片を傾斜させずに TEM 観察し、細胞壁の層構造を解析する方法の 3 つに分けられる。それぞれの手法には一長一短ある。例えば、細胞壁形成表面において CMF が堆積する構造を詳細に観察するには、① の表面観察が適しており、CMF 配向の変化を、ヘリコイドパターンからすばやく解析するには、② の傾斜超薄切片観察が適している。数多くの研究の結

果、CMF がどのように仮道管細胞壁の骨格構造を形成するかについて、いくつかのモデルが提案されてきた (Wardrop and Daswell, 1957; 原田ら, 1958; Liese, 1960; Wardrop, 1964; Wardrop and Harada, 1965; Dunning, 1968; Dunning, 1969; 今村ら, 1972a; 今村ら, 1972b; Scallan, 1974; Kerr and Goring, 1975; Hirakawa and Ishida, 1981; 原田, 1984; Harada and Côté, 1985; Roland et al. 1987; Abe et al. 1991, 佐伯, 1996)。Fig. 1-3 に、原田 (1984) のモデルを示す。このように研究は進められてきているが、以下に述べるように、現在においてもなお未解明の点、問題点は残されている。

仮道管一次壁における CMF の配向は、かつてはランダムあるいは曲線的な網目状であると理解されていた (Wardrop, 1958; Wardrop, 1964; Wardrop and Harada, 1965; 今村ら, 1972a)。これら初期の報告は、一次壁に堆積した CMF が、細胞の拡大生長に伴う延伸力によって再配向させられるという点で一致し、マルチネット成長説 (Roelofsen and Houwink, 1953; Roelofsen, 1958; Roelofsen, 1965) を支持するものであったが、CMF が堆積するとき、仮道管軸に対してどの方向に配向するかという点では見解が異なっていた。Wardrop (1964) は、ラジアータマツ (*Pinus radiata*) についての研究結果 (Wardrop, 1958) から、CMF が一次壁に堆積するとき、その配向はランダムであるものの仮道管軸に対して垂直方向に配向する傾向があること、さらに堆積した後は、仮道管の拡大によって配向のランダム化が進むことを指摘した。一方、アカマツ (*Pinus densiflora*) 仮道管一次壁を観察した今村ら (1972a) は、CMF 堆積時の配向がランダムであることは認めたが、拡大生長の初期においては仮道管軸方向に、拡大生長の後半期には軸垂直方向に堆積する傾向があるとした。その後、広葉樹柔細胞の一次壁についての観察結果 (Itoh, 1975a; Itoh, 1975b; 藤井, 1981) を考慮してこれらのモデルは変更され、仮道管についての観察による裏付けがないまま、新たに平行で直線的な



Schematic diagram of the microfibril orientation in the primary wall and different layers of the secondary wall from tracheids and fibers.

**Figure 1-3** (Referred from 原田, 1984)

Schematic diagram of the cellulose microfibril orientation in the tracheid and fiber cell walls.

**Legend:**  $P_0$  and  $P_1$ : the outer and the inner layer of the primary wall, respectively;  $S_1$ ,  $S_2$  and  $S_3$ : the outer, middle and inner layers of the secondary wall, respectively;  $S_{12}$  and  $S_{23}$ : transition layers between  $S_1$  and  $S_2$  and between  $S_2$  and  $S_3$ , respectively.



CMF 配向が提示された (Fig. 1-3, 原田, 1984; Harada and Côté, 1985)。これは、藤井 (1981) が、チリメンドロ (*Populus koreana*) 柔細胞の一次壁について提案したモデルに基づいている。このモデルでは、① 比較的平行な CMF 配列がごく薄い層 (ラメラ) を形成して細胞壁内表面に堆積する、② このとき CMF 配向は、細胞軸方向に対し約 45 度右回りあるいは左回りに傾斜して堆積する、③ ラメラが積み重なる時には、右回りと左回りの傾斜が交互に重なり交差構造を成す、④ 古いラメラほど細胞の拡大生長方向に伸展されて CMF 配向が拡大方向に傾くが、CMF の平行性は維持される。また、ラメラが特定の角度で堆積する点はオーダードフィブリル説 (Roland *et al.*, 1975) を、細胞の拡大に伴う延伸力によって再配向させられる点ではマルティネット成長説 (例えば、Roelofs, 1965) を考慮している。しかし最近、トドマツ (*Abies sachalinensis*) 仮道管の一次壁を SEM 観察した Abe ら (1995a; 1997) は、上記の今村ら (1972a) と同様の結果を得ており、平行で直線的な CMF 配向を認めるには至っていない。以上のように、一次壁 CMF が、仮道管の拡大による延伸力を受けて再配向する点では研究者の見解が一致するものの、堆積する時点での配向方向、状態については一致していない。一次壁の CMF 堆積構造に関するこれらの問題は、一次壁がきわめて薄く、電子顕微鏡観察の試料作成時に乾燥による変形・破壊を受けやすいことが原因であると考えられる。詳細な検討のためには、乾燥履歴のない試料を観察する工夫が必要である。言い換えると、CMF の堆積構造を *in situ* で観察する必要がある。

これに対し、仮道管二次壁の CMF に関しては、以下の点において多くの研究者の見解が一致している。これは、二次壁が一次壁よりも厚く頑強なため、試料作成時の乾燥による変形・破壊を受けにくいためであると考えられる。① 比較的平行な CMF 配列から成るラメラが積み重なって細胞壁を構築すること、② S1 と S3 においては、ラメラが交差する構造が観察されやすいこと、③ S2 におけ

る CMF は平行性高く配向していること、④ S1 と S2 および S2 と S3 の間には、移行層（それぞれ S12, S23）が存在し、CMF 配向が変化してラメラが交差構造をなすことである。しかし、S1 から S3 まで、CMF の配向がどの方向に変化するのかが明らかでない。近年、Abe ら（1991; 1992）は、トドマツ仮道管細胞壁の形成表面を観察し、原田のモデル（Fig. 1-3, 原田, 1984; Harada and Côté, 1985）と同様、S1 から S2 までは内こうから見て時計回り、S2 から S3 までは反時計回りであるとしたが、Roland ら（1987）は、傾斜超薄切片の観察結果をもとに、S1 から S3 まで一方向のみに CMF が回転するモデルを提示している。さらに、従来の報告では、二次壁 CMF の配向変化を定量的に解析していないため、CMF がどのような規則性をもって配向を変化させ、ラメラを積み重ねるのが明らかでない。これは、細胞壁内表面の観察において、3 次元的なラメラの積み重なりを解析するのが困難であること、また、傾斜超薄切片-TEM 法を用いても、仮道管の移行層（S12, S23）が薄いため、配向変化パターンの解析が困難となることなどが理由である。しかし、以下に述べるように、CMF 配向変化の規則性は、CMF 堆積時の物理化学的環境を反映する可能性があり、これを定量的に解析する必要がある。近年、植物細胞壁における CMF 配向制御について、微小管による生体制御（例えば、Helper and Plalevitz, 1974; Gunning and Hardham, 1982）だけではなく、セルロース分子あるいはセルロース結晶自らのカイラルネマティック（中間相）構造形成機能により、物理化学的に制御されとの考え方が示されている（例えば、Neville and Levy, 1984; Roland *et al.* 1993; Revol *et al.* 1992）。これは、各種植物の表皮細胞、厚角細胞、スクレレイド、道管要素などの細胞壁に、カイラルネマティック液晶類似の規則的な CMF 配向回転構造（ヘリコイド構造、Fig. 1-2）が存在するからである（例えば、Kishi *et al.* 1979; Nanko *et al.* 1978; Neville and Levy, 1984; Roland *et al.* 1987; Vian and Reis, 1991; Roland *et al.* 1993）。ヘリコイド構造は、



ほぼ同時期に形成された CMF が、比較的平行に並んでネマティック液晶類似のラメラ構造を形成し、それが細胞壁に積み重なるときに一定の角度で回転した構造ではないかと考えられている。当初は、セルロース誘導体の液晶構造をモデルとし、セルロース骨格に他の多糖類が側鎖となって機能するために、液晶類似の構造が形成されると考えられていた (Vian and Reis, 1991)。その後、セルロース分子のみならず、セルロース微結晶自身がカイラルネマティック液晶類似の中間相構造を形成できることが明らかとなっている (Revol *et al.*, 1992)。ヘリコイド構造は一般に、二次壁形成時においては安定であるものの、細胞の拡大生長中に形成される場合には、短命であるかあるいは不均一な形状となることから物理的ストレスには弱いと考えられる (Neville and Levy, 1984; Roland *et al.*, 1987; Roland *et al.*, 1993)。このようにヘリコイド構造は、CMF が堆積するときの物理化学的な効果を反映すると考えられるが、仮道管についてはその存在が明らかでない。Roland と Mosiniak (1983) は、シナノキ (*Tilia platyphyllos*) 木部繊維二次壁の傾斜超薄切片に、不完全ながらヘリコイドパターンを観察したとして、同様の細胞壁構造を有する針葉樹仮道管の移行層 (S12, S23) にもヘリコイド構造が存在すると考えた (Roland *et al.*, 1987)。しかし、移行層 (S12, S23) が極めて薄いため、彼らが得たパターンは不完全な「セミヘリコイド (Neville and Levy, 1984)」であり、CMF の配向変化とその規則性の解釈に疑問が残る。このように、仮道管二次壁における CMF 配向の変化が、カイラルネマティック液晶形成を示唆するほど規則的なヘリコイド構造であるのか否かは依然として不明である。このような状況において、二次壁 CMF 配向の回転角度・方向を定量的に明らかにすることは、さらに CMF が堆積するときの物理化学的な環境を推定する手がかりにもなるのである。

各壁層別の研究における問題点を述べてきたが、両壁に共通する問題は、CMF

堆積構造の3次元的な解析が不十分なことである。一般に電子顕微鏡による細胞壁内表面の観察においては、CMFの配向方向など表面に広がる構造は観察しやすいが、表面に対して垂直方向（高さ）の解析が困難である。例えば、ラメラは、比較的同時期に堆積されたCMF群が、同一方向に配列して薄層を形成したものであり、これが積み重なって細胞壁骨格を構築すると理解されているが、その厚さは明らかでなく、暫定的に1本のミクロフィブリル幅と同程度の厚さ（数nm）であるとされている（今村ら、1972; Scallan, 1974; Kerr and Goring, 1975; Hirakawa and Ishida, 1981）。さらに、二次壁内表面（形成面）においてCMF群が凝集し、束状となる様子がしばしば観察されているが（Liese, 1963; Abe *et al.* 1991; Abe *et al.* 1992）、3次元的な構造解析はなされていない。また、二次壁のラメラについては、CMFが密に配列するため隙間のない薄層として積み重なるとする説と（今村ら、1972b; Scallan, 1974）、CMFの凝集などにより、ラメラ中に隙間が生ずるとする説（Kerr and Goring, 1975; Abe *et al.* 1991）があり、意見が分かれている。CMFのラメラ形成、凝集などの堆積構造は、細胞壁構造の基本単位であり、しかもセルロースが自己集合・凝集するときに、どのような物理化学的效果を受けたのかを反映している可能性がある。したがって、CMF堆積構造を、可能な限り *in situ* に近い条件で3次元的に解析する必要がある。

### 1. 3. 本研究の目的

針葉樹仮道管の細胞壁の基本骨格をなすものはセルロースマイクロフィブリル (CMF) の堆積構造であり、さらにその構造の骨格は、セルロースの高次構造に依存する。セルロースは、原形質膜と細胞壁の間隙において結晶化し、CMFを形成して細胞壁に堆積するからである。本研究では、CMFを構成するセルロースの高次構造とCMFの堆積構造を、仮道管一次壁と二次壁各壁層の形成段階順に解析し、これらの構造形成に変化をもたらすメカニズムを探索する。

2章においては、細胞壁形成過程におけるセルロース高次構造の変化を解析するため、一次壁形成段階と二次壁形成の3段階を区分し、セルロースの結晶形、結晶化度、分子鎖配向の変化を顕微FT-IRにより解析した。さらに、その変化から一次壁と二次壁におけるCMF形成のメカニズムを提案した。

3章では、前章で示された一次壁から二次壁へのセルロース結晶形の変化を確認するためX線回折法を用いた。

4章では、一次壁から二次壁へのCMF堆積構造の変化を原子間力顕微鏡 (AFM) 解析するとともに、前章までの高次構造変化との関連を検討し、CMFの形成から細胞壁への堆積までのメカニズムを推定した。なお、AFM解析を可能な限り *in situ* 下とするために、未乾燥の細胞壁CMFを水中で観察した。

5章では、前章で示された二次壁におけるCMFの配向変化に注目し、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて定量的に解析した。さらに、配向変化の規則性から仮道管二次壁の壁層構造が形成されるメカニズムを推定した。

6章では、2～5章までの結果のまとめとして、針葉樹仮道管一次壁と二次壁それぞれにおける細胞壁骨格の構築メカニズムを再度検討し、植物細胞壁構築メカニズム解明の基盤となるような一つのモデルを提示した。

## 第2章 顕微 FT-IR 分光法によるセルロース高次構造の解析

### 2. 1. 緒言

VanderHart と Atalla (1984)、Atalla と VanderHart (1984) は、数種の天然セルロースを固体 CP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMR により解析し、天然セルロースが  $1\alpha$  と  $1\beta$  の2つの結晶相からなる複合結晶であることを示した。序論でも述べたように、 $1\alpha$  相の結晶化は、分子鎖に作用する何らかの物理的ストレスが引き起こすストレス誘発型 (stress-induced) であるとされる一方、 $1\beta$  相はこのようなストレスを受けずに結晶化するストレス解放型 (stress-free) と考えられているため (Sugiyama *et al.*, 1990; Sugiyama *et al.*, 1991a; Yamamoto and Horii, 1994; Yamamoto *et al.*, 1996)、この考えに基づけば、生体内の物理化学的な環境次第で、セルロースの結晶化は  $1\alpha$  にも  $1\beta$  にも進行することになる。針葉樹仮道管のセルロースの結晶化を考えた場合、細胞が拡大生長しながら一次壁 (P) を形成する時期と、拡大終了後の二次壁 (S1, S2, S3) 形成時とでは、細胞表面におけるセルロース結晶化のメカニズムが一樣であるとは限らない。しかも結晶化メカニズムの変動は、結晶形のみならず、結晶化度、分子鎖の配向にも影響を与える可能性がある。このように考えると、一次壁形成時と二次壁形成時を区別してセルロースの高次構造を研究する必要性が生じてくる。

しかし、これまでのセルロース結晶の構造研究において、仮道管細胞壁の壁層を区別した例はまれであり (Preston, 1952; Hanna and Côté, 1974)、特に、2相 ( $1\alpha$  /  $1\beta$ ) モデルに基づくものは皆無である。この理由として、X 線回折、NMR 分析に必要な量の試料を、壁層を区分して集めるのが困難なこと、電子回折においては、薄層で密度の低い一次壁が、電子線による損傷を受けやすいこと等があげられる。本章においては、まず、細胞壁形成の出発点として、セルロースの結晶

化をとりあげる。上記のように仮道管の一次壁・二次壁においては、それぞれ結晶化のメカニズムが異なる可能性があり、その場合、細胞壁層別にセルロースの結晶形が変化することになる。しかも結晶化メカニズムの変動は、結晶形のみならず、結晶化度、分子鎖の配向にも影響を与える可能性がある。そこで、試料に損傷を与えず、微量測定可能な顕微 FT-IR を用いた。これにより、これまでの手法の問題点を克服するとともに、個々の仮道管を分別できるため、木材を切片化して分化中（細胞壁形成中）の仮道管を選び、細胞壁が形成される段階別に解析することも同時に可能となった。細胞壁形成段階別のセルロース高次構造の解析としては、結晶形、結晶化度、分子鎖の配向の変化に着目した。得られた結果から、仮道管セルロースの結晶化メカニズムを推定した。



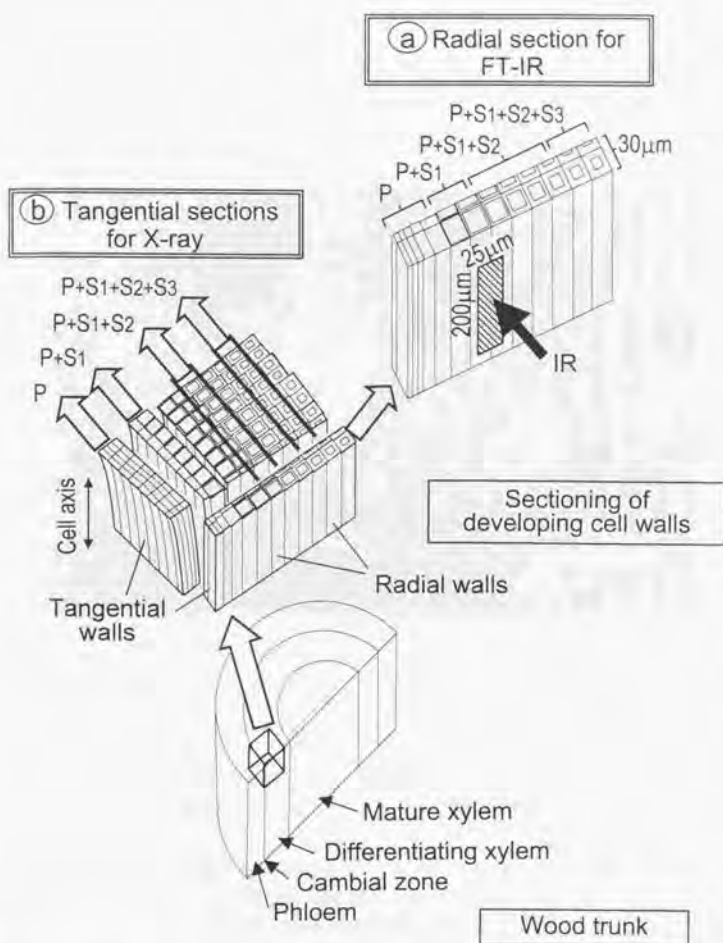
## 2. 2. 実験

### 2. 2. 1. 試料

早材を形成中の30年生および28年生のヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Endl.) および35年生のスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) から形成層帯を含む木部分化帯のまさ目切片を得て供試試料とした。ヒノキは、1995年5月29日、関東林木育種センター(水戸市)において、スギは、1994年5月30日、つくば市内で採取した。これらの地域における形成層活動の最盛期は5月上旬までであるが、最盛期においては分化中の細胞数が極端に多いため、分化帯から得た切片が軟弱であり、その取り扱いが困難となる。そこで、形成層活動がやや衰える上記の時期に試料を採取した。Fig. 2-1aに示すように、樹幹胸高部位から樹皮、形成層、木部分化帯および成熟木部を含む小ブロックを切り出し、ただちに3%グルタルアルデヒド(1/15 M リン酸緩衝液、pH 6.8)で固定して、細胞の生命活動をすみやかに停止させ、このブロックから、凍結マイクロトームを用いて厚さ30  $\mu$ mのまさ目切片を得た。木部分化帯のまさ目切片には、細胞壁形成中の仮道管が生長の段階順に並ぶことになるので、細胞壁形成の段階別にFT-IRによる構成セルロースの分析が可能となる(Fig. 2-2)。

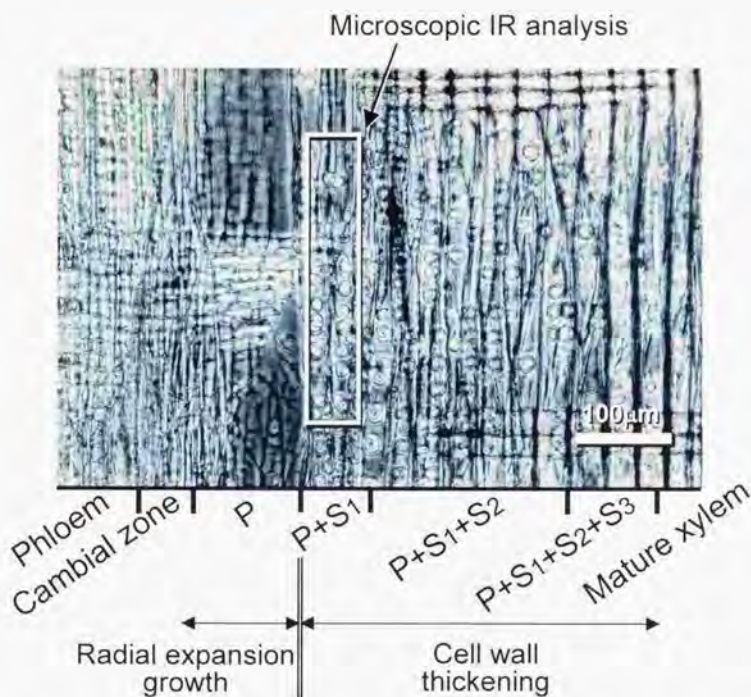
まさ目切片の仮道管セルロースの精製は、まず植物細胞壁の一次壁に適用される Chanzy ら(1979)の方法に従い、さらに木化した二次壁を有する細胞壁に適用される Wada ら(1994)の方法に従った。なお、試料固定の際に用いたグルタルアルデヒドはタンパク質と結合するが(Robards, 1970)、下記のように非セルロース成分は除去されており、精製処理に影響はないと考えられる。また、グルタルアルデヒドの一部がセルロースと結合する可能性については、固定処理を省略した試料と比較し、精製後のIRスペクトルに差異が認められなかったことが





**Figure 2-1** Schematic showing of sample preparation for FT-IR and X-ray measurements in order to examine the crystalline cellulose from each developmental stage of coniferous tracheid cell wall formation

**Legend:** P: the primary cell wall formation accompanied by cellular expanding growth in the radial direction; S1, S2 and S3: deposition of the outer, middle and inner layers of the secondary wall onto the pre-formed wall.



**Figure 2-2** A radial section of *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar) showing differentiating xylem and phloem. A radial row of developing axial tracheids from the cambial zone to mature xylem is displayed. The primary wall (P) was formed during radial expanding growth of tracheid cells. After expansion, the outer (S1), middle (S2) and inner (S3) layers of the secondary wall were successively deposited onto the inner surface of the pre-formed wall.

**Note:** The region outlined in white shows the area analyzed using the microscopic FT-IR attachment.

ら、以下のスペクトル解析にあたっては無視できると考えられる。まず、まき目切片をクロロホルム-エタノール (1:1 (V/V)) 中で 24 時間、さらにアセトン中で 24 時間、それぞれ室温で抽出処理した (脂質等の抽出)。ついで 90℃熱水中に 6 時間 (一部糖類など温水可溶成分の抽出)、0.5% シュウ酸アンモニウム溶液に 70℃で 6 時間 (ペクチンの抽出) 浸せきした後、0.3% ラウリル硫酸ナトリウム溶液に室温で 12 時間 (タンパク質の抽出)、50% 尿素溶液に室温で 12 時間 (脂質、炭化水素等の抽出) 浸せきした。さらに、pH 4.9 の酢酸緩衝液で緩衝した 0.3% 亜塩素酸ナトリウム溶液により 80℃で 2 時間 (リグニンの抽出)、5% 水酸化カリウム溶液により室温で一夜 (ヘミセルロースの抽出) 処理する操作を 6 回以上繰り返した。上記の処理はすべて、切片を溶液中で極めてゆるやかに振とうすることにより実施し、それぞれの処理後には、常に切片を蒸留水で洗浄した。以上のセルロース精製処理は、IR スペクトル上でセルロース以外の成分に帰属される吸収が、Ia、I $\beta$ タイプの標準物質であるバロニア (*Valonia ventricosa*)、ホヤ (*Halocynthia roretzi*) の微結晶 (2.5 N 塩酸により処理) の場合以下になるまで繰り返した (Fig. 2-4、33 ページ参照)。この際、特に注目した非セルロース成分の IR 吸収は、①1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ 、②1270-1250  $\text{cm}^{-1}$ 、③900-800  $\text{cm}^{-1}$  付近の吸収である (Liang, 1972; Faix, 1991; Séné *et al.*, 1994)。①には、ペクチン、ヘミセルロースなどのエステル基あるいは  $\text{COO}^-$  の吸収 (1750, 1600  $\text{cm}^{-1}$  など)、リグニンなど芳香族成分の  $\text{C}=\text{C}$  の吸収 (1600, 1500  $\text{cm}^{-1}$  など)、タンパク質の  $\text{CN}$ 、 $\text{NH}$  の吸収 (1650, 1550  $\text{cm}^{-1}$  など) が含まれる。②には、ペクチン、ヘミセルロースなどのエステル基あるいはリグニンなど芳香族成分の  $\text{C}=\text{O}$  による吸収、③には、ペクチン、ヘミセルロースのグルコシド結合あるいはリグニンなど芳香族成分の  $\text{CH}$  による吸収が含まれる。セルロースの精製過程において、これらの非セルロース成分による IR 吸収がほぼ消失し、セルロース I に帰属される吸収バンドが

明確化したこと、さらに精製の最終段階では、処理を繰り返してもスペクトルパターンが変化しなかったことから、ほとんどの非セルロース成分が除去されたと考えられる。Chanzy ら (1979) は、同様の方法で精製したバラ (*Rosa glauca*) 培養細胞の一次壁を糖分析し、その 96%以上がグルコースであることを確かめている。なお、以上の精製処理中に、ほとんどの切片が繊維化した。以下の測定に用いたのは、切片の形状、すなわち仮道管配列をかくろうじて保った切片である。精製した切片は、第三ブチルアルコールにより凍結乾燥し、デシケータに保存し、顕微 FT-IR 分析に供した。さらに IR 分析の後、切片を走査型電子顕微鏡 (白金-パラジウム蒸着、電子線加速 10KV) により観察し、IR 分析された細胞壁の形成段階を特定した。

## 2. 2. 2. 壁層を区分した顕微 FT-IR 分光法

木部分化帯のまさ目切片には細胞壁形成中の仮道管が生長の段階順に並ぶので、顕微装置を備えた FT-IR により細胞壁の形成段階別に測定した (Fig. 2-1a)。FT-IR 分光分析器と顕微装置の組合せは、Nicolet Magna 550 と Nicolet Nic Plan、あるいは Perkin-Elmer Spectrum 2000 と Perkin-Elmer Autoimage system を用いた。後者の組合せは、パーキンエルマー・ジャパン (株) の好意により借用した。使用顕微装置の試料台に精製したまさ目切片を置き、IR 光の透過面積を、仮道管軸方向  $300\ \mu\text{m} \times$  仮道管放射方向  $50\ \mu\text{m}$  (Nicolet)、あるいは同  $200\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$  (Perkin-Elmer) に絞り、Figs. 2-1a, 2-2 のように IR 光を透過させた。さらに試料の位置を移動することにより、細胞壁形成の各段階ごと (P, P + S1, P + S1 + S2, P + S1 + S2 + S3) にセルロースの IR スペクトルを得た。なお、まさ目切片上では、形成層付近 (Fig. 2-2 における cambial zone のほぼ中央、以下の図中では、boundary between xylem and phloem とした) から離れるほど細胞壁の形成が進むことになる。一次



壁 (P) については、仮道管の拡大生長の時期を区分せず、幅の狭い比較的若い仮道管 (Fig. 2-2 の cambial zone に近い部分) と幅が広がりつつある拡大後半期の仮道管 (Fig. 2-2 の P 中央付近) を合わせた領域からスペクトルを得た。拡大生長の段階を区分するには IR 透過面積をさらに絞る必要があるが、この場合、スペクトル強度が弱く、再現性のある結果が得られなかったからである。例外として、結晶化度解析に用いた切片については一次壁形成中の細胞数が多かったため、最も形成層よりの測定点で得たスペクトルには、拡大初期の仮道管の寄与が大きいと考えられる。Nicolet による IR 解析には、波数領域  $4000-600\text{ cm}^{-1}$  の MCT 検出器を用い、分解能  $4\text{ cm}^{-1}$ 、積算 64 回の条件で測定した。Perkin-Elmer については、波数領域  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  の MCT 検出器を用い、分解能  $2\text{ cm}^{-1}$ 、積算 32 回の条件とした。以下に述べる解析には、主として Nicolet を用いたが、結晶組成の定量解析には Perkin-Elmer を用いた。Perkin-Elmer の低波数側の測定限界 ( $400\text{ cm}^{-1}$ ) が、解析に用いた吸収バンドの波数 ( $750, 710\text{ cm}^{-1}$ ) から離れており、より感度の高い測定が可能となったと考えられる。なお、以下の解析に使用したのは、ベースラインの吸光度が 0.30 から 0.022 (透過率 50 から 95 %) のスペクトルである。あらかじめ IR 透過厚の異なるパロニアセルローズ (2.5 N 塩酸処理) フィルムを作成して分析し、この吸光度域のスペクトルであれば、試料の厚さが以下の解析に影響しないことを確認した。また、偏光 IR による解析を除き、IR スペクトルの強度が  $1050\text{ cm}^{-1}$  (CO 伸縮) で一定となるように標準化した。

### 2. 2. 3. 結晶形の解析

セルローズ Ia として帰属される IR 吸収バンドは  $3240$  と  $750\text{ cm}^{-1}$ 、Ib については  $3270$  と  $710\text{ cm}^{-1}$  に現れる (Sugiyama *et al.* 1991a)。まず、 $750$  及び  $710\text{ cm}^{-1}$  の吸収バンドに注目し、仮道管細胞壁の形成に伴う変化を検討した。この付近の

吸収は、 $\text{CH}_2$ の変角振動によると考えられているが (Liang and Marchessault, 1959b; Blackwell et al, 1970)、振動様式の詳細は未だ明らかでないとする意見もある (Sugiyama et al, 1991a)。一方、OHの伸縮振動に帰属される  $3240 (\text{I}\alpha)$  と  $3270 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{I}\beta$ ) の吸収バンドについては、非結晶領域の OH による吸収 (Liang and Marchessault, 1959a) と重なり不明瞭となるため、非結晶領域の OH を重水素化して結晶領域の吸収を顕在化した後、スペクトルを二次微分して、吸収バンドの存在を検討した。重水素化にあたっては、重水 (20 ml) の入った容器とまき目切片を、ベルジャー (3000 ml) 中で約 30 分間減圧した後、そのまま 2 日間静置した。

さらに、 $\text{I}\alpha/\text{I}\beta$ の組成比の変化を定量的に解析するため、 $750$  及び  $710 \text{ cm}^{-1}$  の吸収をガウス関数により波形分離し (Yamamoto et al, 1996; Kondo, 1997)、それぞれのバンド面積から  $\text{I}\alpha$ の分率を求め、その変化を検討した。通常、 $\text{I}\alpha$ の分率は、固体 CP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルのシグナルをピーク分離し、 $\text{I}\alpha$ と  $\text{I}\beta$ 成分を求めることにより計算されるが、以下のように IR スペクトルから  $\text{I}\alpha$ 分率の指標 (index) を求め、NMR 法による  $\text{I}\alpha$ 分率に換算することができる。Yamamoto ら (1996) によると、IR 法による  $\text{I}\alpha$ 分率の指標 ( $f_{\text{IR}}$ ) は、 $750 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{I}\alpha$ ) における IR 吸収バンドの面積 ( $A_{750}$ ) と、 $710 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{I}\beta$ ) におけるバンド面積 ( $A_{710}$ ) から以下のように計算される。

$$f_{\text{IR}} = A_{750} / (A_{750} + A_{710})$$

IR 吸光係数が吸収バンドごとに異なるため、指標 ( $f_{\text{IR}}$ ) の値そのものが  $\text{I}\alpha$ 分率を表わすわけではないが、NMR 法による  $\text{I}\alpha$ 分率 ( $f_{\text{NMR}}$ ) とは次の相関があることから、( $f_{\text{NMR}}$ ) を推定することが可能となる。

$$f_{\text{NMR}} = 2.55 \times f_{\text{IR}} - 0.32$$



Yamamoto ら (1996) は、パロニアおよびホヤセルロースについて、 $f_{\text{NMR}}$  と  $f_{\text{IR}}$  の良好な相関を確かめているが、バクテリア (*Acetobacter xylium*) セルロースの場合、 $I_{\alpha}$  分率 ( $f_{\text{NMR}}$ ) に換算する際に、数%の誤差が生じることを示している。なお、下記の結晶化度解析において、パロニアとコットンセルロースの結晶性を低下させたとき、750 および 710  $\text{cm}^{-1}$  付近の吸収強度が様に減少し、その比に変化がなかったことから、これらの吸収バンドが結晶相によるものであること、以上の  $I_{\alpha}/I_{\beta}$  組成解析が、非結晶領域の影響を受けないことを確かめた。

## 2. 2. 4. 結晶化度の解析

Nelson と O'Connor (1964b) に従い、IR 法によるセルロースの結晶化度 ( $CI_{\text{IR}}$ ) を、1427  $\text{cm}^{-1}$  の吸収強度 ( $I_{1427}$ ) と 895  $\text{cm}^{-1}$  の吸収強度 ( $I_{895}$ ) から次のように求め、仮道管細胞壁の形成にともなう変化を検討した。ここで吸収強度とは、スペクトルに引いた補助線からのピーク高さである。

$$CI_{\text{IR}} = I_{1427} / I_{895}$$

1427 と 895  $\text{cm}^{-1}$  の吸収バンドはそれぞれ、セルロースの C6 位における  $\text{CH}_2$  の面内はさみ変角振動と C1 位の CH 変角振動 (Liang and Marchessault, 1959b; Blackwell et al, 1970) に帰属されている。1427  $\text{cm}^{-1}$  の吸収は、C6 位 OH における水素結合の状態を反映すると考えられ、ミル処理等でセルロースの結晶性を低下させたとき、その強度が弱まるとともにピーク幅が広がる (Nelson and O'Connor, 1964a)。一方、895  $\text{cm}^{-1}$  の吸収は、 $\beta$ -グルコシド結合まわりの回転運動性を反映すると考えられ、その強度は結晶性の低下とともに高まる (Nelson and O'Connor, 1964a)。このため、両者の強度比である  $CI_{\text{IR}}$  は、セルロースの結晶性が高いほど大きくなる。 $CI_{\text{IR}}$  の値そのものが結晶領域量を表すわけではないが、X 線法

による結晶化度との間に相関があるため、換算することができる。Nelson と O'Connor (1964b) は、I $\beta$ 相を主体とするコットンセルローズについて IR、X 線両法による結晶化度の相関を求めたが、本研究ではコットン（東洋濾紙 Cellulose Powder C を 5% KOH により精製）に加えて I $\alpha$ 相に富むパロニアセルローズ（2.5 N 塩酸により精製）も標準試料とし、ロッドミル処理により結晶化度を变化させ、X 線法と IR 法による結晶化度の相関を求めた。X 線法による結晶化度の測定には、日本電子 (JEOL) JDE-8200 を用い、約 50 mg の試料を圧縮 (200 kg/cm<sup>2</sup>) して円盤状とし、電圧 50 kV、電流 120 mA の条件で反射法により得た回折曲線について、Knolle と Jayme (1965) の方法に従い、2 $\theta$ =10 から 18.5 度と 18.5 から 30 度の間に補助線を引き、結晶性と非結晶性の散乱を分離して、その面積比から結晶化度を計算した。

## 2. 2. 5. 分子鎖配向の解析

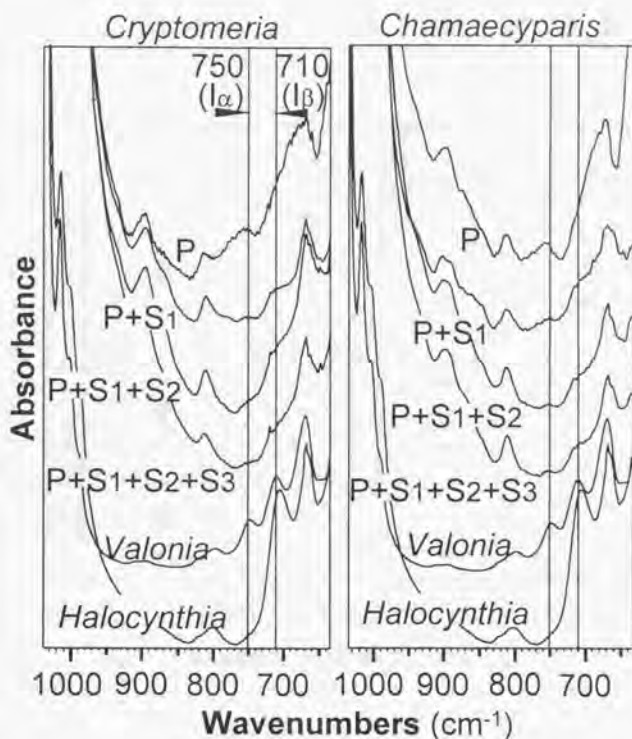
仮道管細胞壁におけるセルローズ分子の配向方向と配向の程度（配向度）を解析するために偏光 IR を用い、細胞壁の形成にともなう変化を検討した。セルローズ分子鎖方向に比較的平行な C-O-C 伸縮振動に帰属される 1160 cm<sup>-1</sup> の吸収バンド (Liang and Marchessault, 1959b) に着目し、偏光 IR の方向を仮道管軸方向 (0°) から軸垂直方向 (90°) まで 10 度ごとに回転させ、一次壁形成中の仮道管 (P) と同一切片上の二次壁を完成した仮道管 (P + S1 + S2 + S3) について吸収強度（ベースラインからの高さ）の変化を比較・検討した。なお、P のスペクトル強度は P + S1 + S2 + S3 よりも弱く、そのままでは比較が困難であったため、P についての最低強度（偏光 0°のとき）が、P + S1 + S2 + S3 についての最低強度（偏光 90°のとき）と等しくなるよう、P のスペクトル強度にはすべて一定の比率を乗じた。

## 2. 3. 結果

### 2. 3. 1. セルロース結晶形の変化

スギ、ヒノキの仮道管細胞壁の形成段階別に得たセルロースの IR スペクトルを Fig. 2-3 に示す。いずれの場合においても、 $I_{\alpha}$ に特異的な  $750\text{ cm}^{-1}$  の吸収バンドは、細胞壁形成初期の一次壁のみからなる仮道管のセルロース (P) に現れた。そしてこの吸収バンドは、その後の二次壁の堆積につれて ( $P+S_1 \rightarrow P+S_1+S_2 \rightarrow P+S_1+S_2+S_3$ ) 見かけ上減少した。Fig. 2-4 に示すように、一次壁セルロースの  $750\text{ cm}^{-1}$  における吸収バンドは、セルロースが精製されるほど明確に現れており、非セルロース成分による吸収でないことが確認できる。一方、 $I_{\beta}$ に特異的な  $710\text{ cm}^{-1}$  の吸収バンドは、一次壁形成時において明瞭ではないが、二次壁の堆積後にはショルダーとしてはっきりと認められた。さらに重水素化した試料についても、一次壁セルロースの二次微分スペクトル (Fig. 2-5) のみに  $I_{\alpha}$ に特異的な  $3240\text{ cm}^{-1}$  の吸収バンドが認められ、二次壁堆積後には、ほとんど認められなかった。これらの結果から、一次壁セルロースは二次壁セルロースよりも  $I_{\alpha}$ に富むといえる。Chanzy ら (1978; 1979) は、コットン (*Gossypium sp.*) あるいはバラ (*Rosa glauca*) 培養細胞の一次壁について、セルロース VI の存在を報告しているが、本章において、スギ、ヒノキから得た IR スペクトルはいずれもセルロース I の特徴 (Hayashi *et al.*, 1987) を示した。さらに、筆者らが調製したセルロース VI (Isogai *et al.*, 1989) のスペクトルには、 $750\text{ cm}^{-1}$  の吸収はなく、スギ、ヒノキ仮道管セルロースのスペクトルとは異なっていた。このことから、本研究結果がセルロース VI の存在によるものではないことは明らかである。

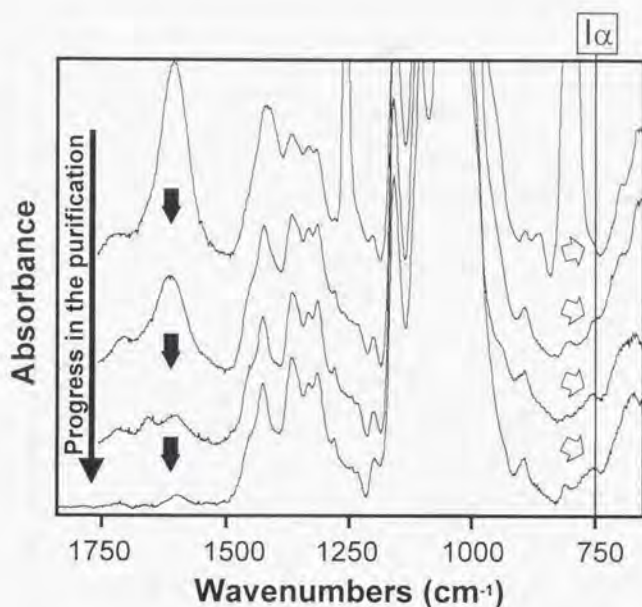
以上の結果から、スギ、ヒノキ仮道管の一次壁から二次壁へ、 $I_{\alpha}$ が減少することが示された。そこで、 $I_{\alpha}/I_{\beta}$ の組成比の変化を定量的に解析するため、Fig. 2-6



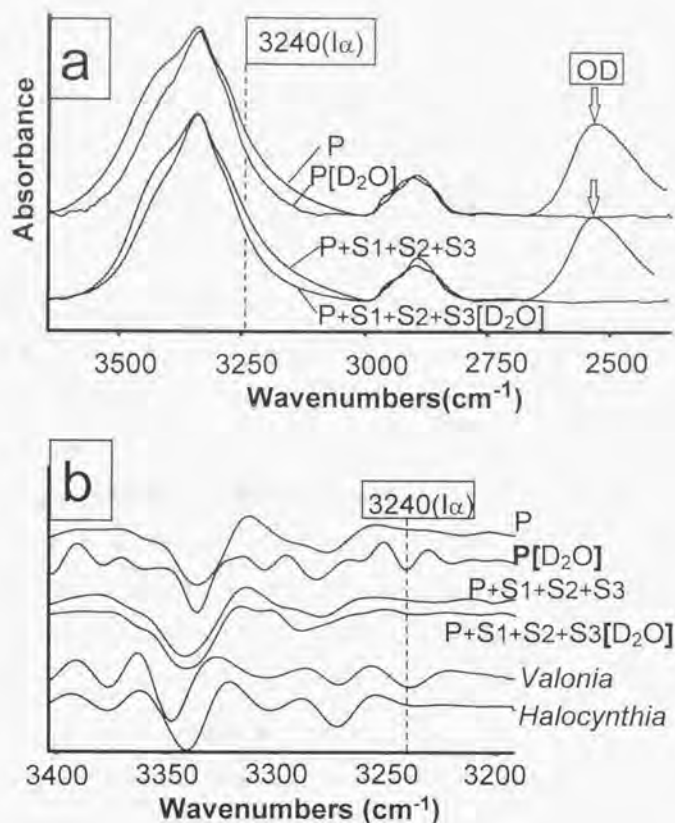
**Figure 2-3** FT-IR spectra of cellulose in the region from 1000 to 650  $\text{cm}^{-1}$  from developing *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar) and *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheid walls composed of P, P + S1, P + S1 + S2 and P + S1 + S2 + S3, compared with standard spectra of cellulose rich in the  $I_{\alpha}$  (*Valonia ventricosa*) and pure  $I_{\beta}$  (*Halocynthia roretzi*) allomorphs. IR absorption bands at 750  $\text{cm}^{-1}$  and at 710  $\text{cm}^{-1}$  are characteristic for the  $I_{\alpha}$  and  $I_{\beta}$  forms of cellulose, respectively.

**Legend:** P, S1, S2 and S3 : see abbreviations in Figure 2-1.





**Figure 2-4** Decreases of the IR bands due to non-cellulosic contaminants during sample purification process (from the top to the bottom) in the spectra for the primary wall cellulose of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress). The bands around 1600 cm<sup>-1</sup> (marked by black arrows) indicate the non-cellulosic contaminants, whereas white arrows indicate the typical position for cellulose I $\alpha$ .

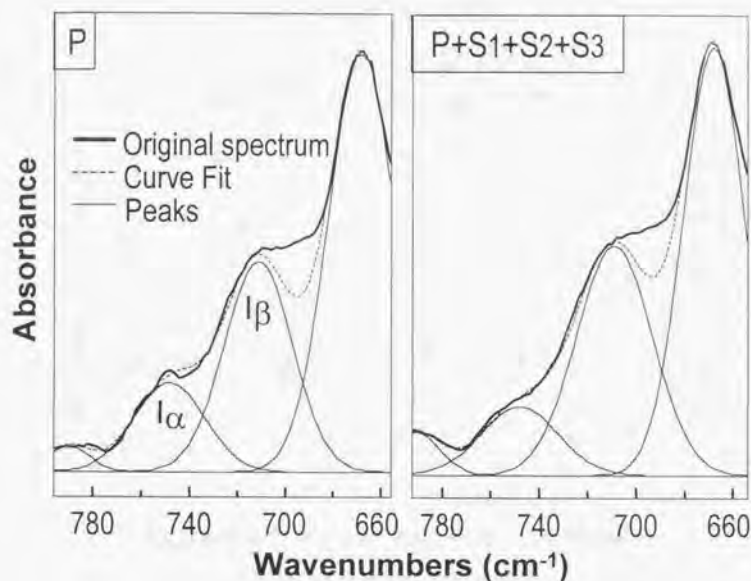


**Figure 2-5** Changes in FT-IR spectra for deuterated cellulose in the region from 3400 to 2800 cm<sup>-1</sup> (a) and their second derivatives (b) from *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheid walls composed of P and P + S<sub>1</sub> + S<sub>2</sub> + S<sub>3</sub>, compared with second derivative spectra of non-deuterated standard cellulose samples rich in the I<sub>α</sub> (*Valonia ventricosa*) and pure I<sub>β</sub> (*Halocynthia roretzi*) allomorphs. IR absorption bands at 3240 cm<sup>-1</sup> is characteristic for the I<sub>α</sub> form of cellulose.

**Legend:** P, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> and S<sub>3</sub>: see abbreviations in Figure 2-1.

に示すように、750 及び 710  $\text{cm}^{-1}$  の吸収バンドをガウス関数により波形分離し、それぞれのバンド面積から  $\text{I}\alpha$  分率の指標 ( $f_{\text{IR}}$ ) を求め、細胞壁形成過程における  $\text{I}\alpha$  形成量の変化を検討した。なお、実験の項に述べたように、前出の Fig. 2-3 とは異なり、Fig. 2-6 の測定には波数領域 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  の検出器を用いた。この検出器の低波数側限界 (400  $\text{cm}^{-1}$ ) が、注目した吸収バンドの波数 (750 および 710  $\text{cm}^{-1}$ ) から離れているため、より感度の高い測定ができたと考えられる。

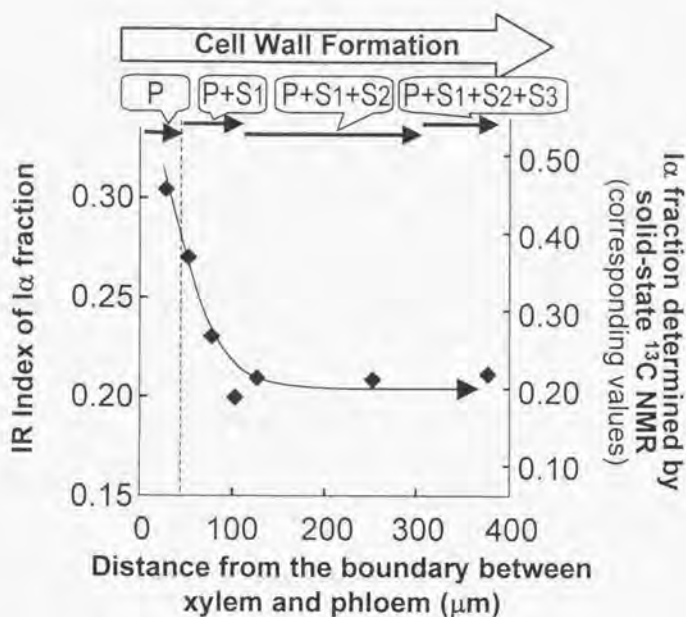
細胞壁形成過程における  $\text{I}\alpha$  分率の変化を Fig. 2-7 に示す。IR 法による  $\text{I}\alpha$  分率の指標 ( $f_{\text{IR}}$ ) (左軸) は、一次壁セルロース (P) の場合、約 0.3 であったが、二次壁各層の堆積とともに (P + S1  $\rightarrow$  P + S1 + S2  $\rightarrow$  P + S1 + S2 + S3) 低下し、約 0.2 に達して一定となった。この IR 法による指標 ( $f_{\text{IR}}$ ) を NMR 法  $\text{I}\alpha$  分率 ( $f_{\text{NMR}}$ ) (同図右軸) に換算すると、一次壁で、 $\text{I}\alpha : \text{I}\beta$  が約 50 : 50 であり、二次壁では、約 20 : 80 であった。このことは、一次壁セルロースが  $\text{I}\alpha$  に富み、二次壁セルロースが  $\text{I}\beta$  を主体とすることを示す。特筆すべきは、二次壁が厚層であるため、たとえ薄層の一次壁が  $\text{I}\alpha$  に富むとしても、細胞壁完成後 (P + S1 + S2 + S3) には、セルロース全体として  $\text{I}\beta$  が主体となると考えられることである。また、Fig. 2-7 において、二次壁 S1 層の形成中に  $\text{I}\alpha$  分率がほぼ一定となり、その後変化しなかったことから、二次壁各層 (S1, S2, S3) のセルロースが、ほぼ一定の  $\text{I}\alpha / \text{I}\beta$  組成 (20 / 80) を有することが示唆される。なお、細胞壁完成後の木材細胞壁を X 線 (Wada *et al.* 1994) および NMR (Wada *et al.* 1995b) により分析し、木材セルロースが  $\text{I}\beta$  に富むとした報告は、上記の結果と矛盾しない。逆に、 $\text{I}\alpha$  に富むとする報告 (Tanahashi *et al.* 1989) もあるが、一次壁と二次壁では異なるタイプの結晶を有するという本研究の結果からすれば、何らかの理由により一次壁セルロースに富む試料が解析されたとして理解できるものである。



**Figure 2-6** FT-IR spectra of cellulose in the region from 800 to 650  $\text{cm}^{-1}$  for developing *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheid walls composed only of P and P + S1 + S2 + S3, together with the deconvoluted absorption peaks attributed to the  $I_{\alpha}$  (750  $\text{cm}^{-1}$ ) and  $I_{\beta}$  (710  $\text{cm}^{-1}$ ) crystalline forms of cellulose.

**Legend:** P, S1, S2 and S3 : see abbreviations in Figure 2-1.





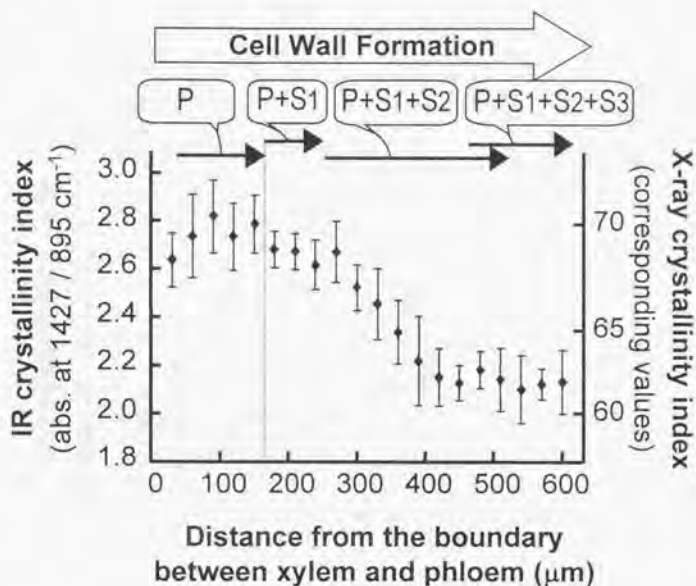
**Figure 2-7** Change in the IR index for the  $I_\alpha$  fraction ratio ( $I_\alpha / I_\alpha + I_\beta$ ) (left axis) and corresponding  $I_\alpha$  fraction determined by solid state CP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMR (right axis) during *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheid cell wall formation displayed from the boundary between xylem and phloem (the earliest stage of primary wall formation) to mature xylem.

**Legend:** P, S1, S2 and S3: see abbreviations in Figure 2-1; Distance from the boundary between xylem and phloem: see Figure 2-1.

結晶形の変化に関する以上の結果は、一次壁と二次壁のセルロースが、物理化学的に異なる効果のもとで結晶化することを示唆するものである。序論でも述べたように、I $\alpha$ の結晶化は、分子鎖に対する何らかの物理的ストレスによって引き起こされる一方（ストレス誘発型）、I $\beta$ はこのようなストレスを受けずに結晶化する（ストレス解放型）と考えられているため（Sugiyama *et al.* 1990; Sugiyama *et al.* 1991a; Yamamoto and Horii, 1994; Yamamoto *et al.* 1996）、一次壁セルロースが I $\alpha$ に富むという結果から、その結晶化の際に物理的ストレスを受けやすいと推定できる。そこで、ストレスの実体は依然として不明であるものの、その物理的作用は、結晶形のみならず、結晶化したセルロースの他の性状にも影響を与えていると考え、結晶化度、分子鎖配向についても仮道管細胞壁の形成段階別に解析した。

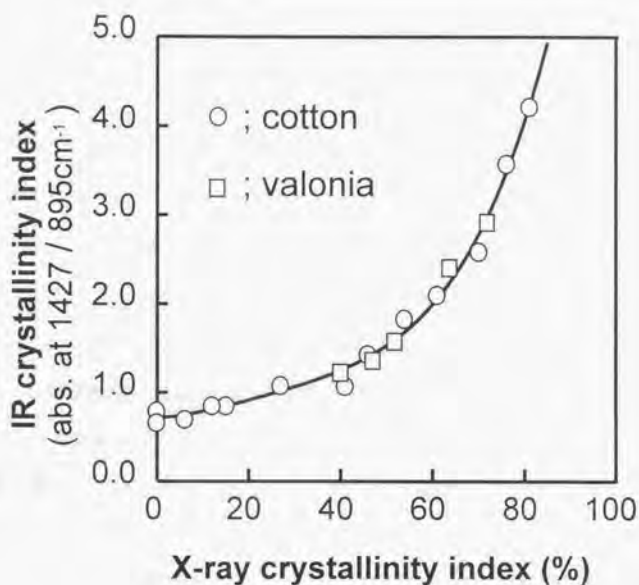
### 2. 3. 2. セルロース結晶化度の変化

細胞壁形成中のヒノキ仮道管について、セルロースの IR 法結晶化度を求めた結果を Fig. 2-8 に示す。また、Fig. 2-9 は、IR 法結晶化度を X 線法結晶化度と比較するために、ミル処理により結晶化度を变化させたコットンとパロニアのセルロースについて、両法による結晶化度の相関を求めた結果である。Fig. 2-8 において、セルロースの IR 法結晶化度（左軸）は一次壁形成中にわずかに上昇して 2.8 に達した後、二次壁堆積が開始すると減少し、約 2.1 で一定となった。X 線法に換算すると（右軸）、一次壁で約 70%、二次壁堆積後には約 60%である。前述したように、一次壁と二次壁ではセルロース結晶のタイプが異なるが、Fig. 2-9 において、I $\alpha$ に富むパロニアと I $\beta$ を主体とするコットンセルロースが同一曲線上にあり、この換算は両者のタイプについて有効であるといえる。したがって、上記の結果は、一次壁セルロースの方が二次壁セルロースに比べ結晶性が高いことを示唆している。



**Figure 2-8** Change of the IR crystallinity index of cellulose (left axis) and corresponding X-ray crystallinity index (right axis) calculated by their correlation (figure 2-9) during during cell wall formation of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheid cells. The results are averages of six areas analyzed at every 30 μm from the boundary between xylem and phloem (the earliest stage of primary wall formation) to mature xylem.

**Legend:** P, S1, S2 and S3: see abbreviations in Figure 2-1. Distance from the boundary between xylem and phloem: see Figure 2-1.



**Figure 2-9** Correlation between X-ray and IR crystallinity indices of cellulose for cotton (rich in  $I_{\beta}$ ) and *Valonia. ventricosa* (rich in  $I_{\alpha}$ ) with different degrees of crystallinity prepared by rod-milling.



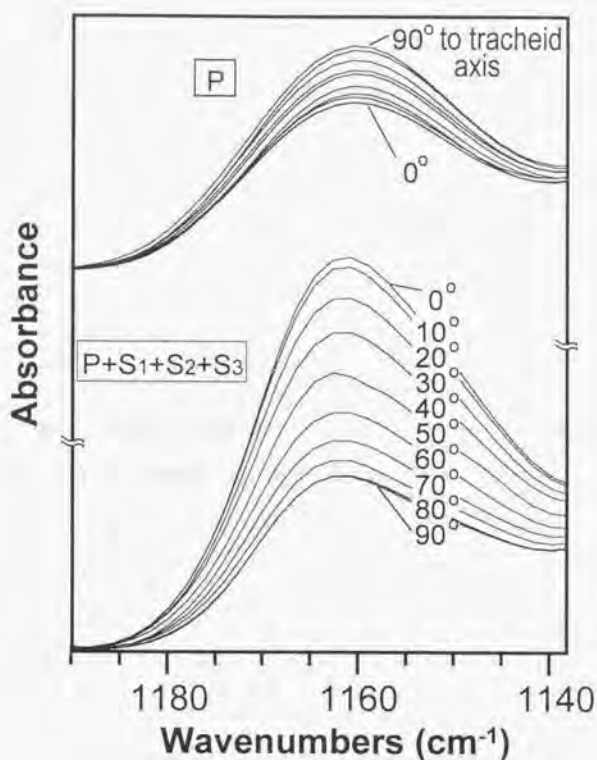
一次壁形成時においては、何らかの物理的ストレスにより、ストレス誘発型 (stress-induced) である熱理学的に準安定な三斜晶の  $1\alpha$  が結晶化するだけでなく、セルロースの結晶化度が二次壁よりも高まることが示された。同様の現象はポリエチレンゲルの延伸結晶化においても生ずる (Chanzy *et al.*, 1987)。このことは、一次壁セルロースの結晶化にも同様の延伸ストレスが作用する可能性を示す。一方、二次壁セルロースは、このようなストレスをあまり受けず、その結果、ストレス解放型 (stress-free) である単斜晶の  $1\beta$  が主として結晶化するとともに、結晶化度が一次壁よりも低くなると考えられる。

上記の結晶化度に関する結果は、既往の X 線回折あるいは電子回折による報告、すなわちポプラ (*Populus sp.*) (Hanna and Côté, 1974)、コットン (*Gossypium sp.*) (Nowak-Ossorio *et al.*, 1976; Hu and Hsieh, 1996; Chanzy *et al.*, 1978)、バラ (*Rosa glauca*) の培養細胞 (Chanzy *et al.*, 1979) について、一次壁よりも二次壁セルロースの方が高結晶性であるとした結果と一致しない。コットン、バラについては、生物種が異なることが理由かもしれないが、一次壁セルロースの結晶化度が過小評価されていた可能性もある。例えば、二次壁においてはセルロースマイクロフィブリル (CMF) が比較的密に配列しているが、一次壁では配列の目が粗いと考えられている (例えば、Harada and Côté, 1985)。X 線法で結晶化度を求める場合には、試料中の CMF の密度分布、配向が大きく影響するため (Nelson and Schultz, 1963; Jayme and Knolle, 1964; 渡辺ら, 1966)、一次壁セルロースの結晶化度が過小評価されてしまう可能性がある。逆に、このような密度、配向の影響を避けるため、ミル処理等の前処理を行った場合、二次壁に比べて著しく薄い一次壁が、より重大な損傷を受けてしまう可能性がある。さらに、試料作成時の乾燥過程において、薄い一次壁は部分的に破壊されやすく、CMF は配向を乱しやすい。また、上記の報告では、Chanzy ら (1978; 1979) を除き、試料がどの程度まで精製

されたかが明らかでない。二次壁に比べ非セルロース成分を多く含む一次壁においては (Edashige *et al.*, 1995)、精製が不完全な場合、セルロースの結晶化度が実際より低く判定される可能性がある。

### 2. 3. 3. セルロース分子配向の変化

仮道管セルロースの結晶形、結晶化度を細胞壁層別に解析した本研究の結果は、一次壁セルロースが結晶化する際に、物理的な延伸力を受ける可能性を示唆している。このような延伸効果が存在するならば、セルロース分子鎖の配向にも影響を及ぼすと考えられる。そこで、偏光 IR を用いてセルロース分子鎖の配向方向と配向度を検討した。グルコース環 COC の伸縮振動に帰属される IR 吸収バンドが、 $1160\text{ cm}^{-1}$  に出現し、しかもセルロース分子鎖に比較的平行な振動であると考えられるため (Liang and Marchessault, 1959b)、この吸収バンドの偏光 IR による変化に着目した。Fig. 2-10 に示すように、偏光の方向を仮道管軸方向 ( $0^\circ$ ) から軸垂直方向 ( $90^\circ$ ) まで  $10^\circ$  ごとくに回転させ、一次壁形成中の仮道管 (P) と二次壁を完成した仮道管 (P + S1 + S2 + S3) について吸収強度の変化を比較・検討した。なお、比較を容易にするため、それぞれの最低強度が (P の  $0^\circ$  および P + S1 + S2 + S3 の  $90^\circ$ ) 等しくなるよう、P のスペクトルにはすべて一定の比率を乗じている。一次壁形成中の仮道管 (P) については、軸垂直方向 ( $90^\circ$ ) で吸収強度が最も強いので、セルロース分子鎖の主たる配向方向が細胞軸に対して横方向であることが示唆された。一方、二次壁を完成した仮道管 (P + S1 + S2 + S3) については、セルロース分子鎖が仮道管軸方向 ( $0^\circ$ ) に配向することが示された。一次壁セルロース (P) の主配向方向、つまり軸垂直方向 ( $90^\circ$ ) は、一次壁形成中の仮道管が主として拡大する方向と一致する。これは一次壁において、セルロースマイクロフィブリル (CMF) が同方向に配向する (Wardrop, 1964; 今村ら, 1972a;



**Figure 2-10** Changes in FT-IR spectra with a rotation of IR polarizer from parallel (0 degree) to perpendicular (90 degree) to the tracheid cell axis at  $1160\text{ cm}^{-1}$  due to the C-O-C stretching mode for the primary (P) and mature (P + S<sub>1</sub> + S<sub>2</sub> + S<sub>3</sub>) walls of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheid.

**Legend:** P, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> and S<sub>3</sub> : see abbreviations in Figure 2-1.

Abe *et al.*, 1995a) 傾向があることによると考えられる。このことから以下のような仮説を考察した。一次壁の形成は細胞の拡大生長と同時に進行するため、細胞表面で生合成された $\beta$ グルカン鎖が結晶化して CMF となる過程において、分子鎖に物理的延伸力が作用する。その結果、ストレスに引き起こされた  $1\alpha$  相に富む CMF となり、かつ細胞の拡大方向に配向させられるという考え方である。細胞の拡大生長による CMF の延伸に関しては、マルティネット成長説 (Roelofsen and Houwink, 1953; Roelofsen, 1958; Roelofsen, 1965) により、一次壁に堆積した CMF が延伸され、再配向する現象が指摘されている。しかし、本研究で注目しているのは、セルロースが CMF として堆積する以前に、すでに延伸されているのではないかという点である。この考えについては次の考察の項で詳細に述べる。一方、二次壁形成後の分子鎖配向が細胞軸方向と一致していたのは、壁層の中でも最も厚い S2 層の CMF が、細胞軸に近い角度で配向するためと考えられる (5 章参照)。

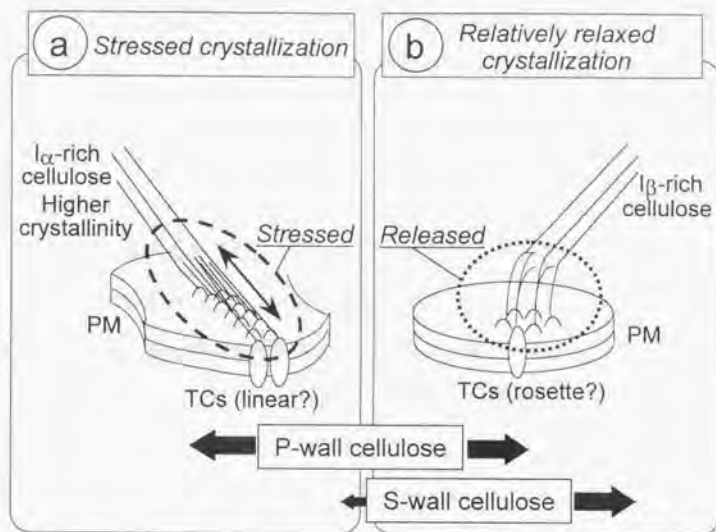
以上のように、偏光 IR を用いた解析により、一次壁と二次壁におけるセルロース分子鎖の主配向方向が示されたが、その配向度を比較することは困難であった。Fig. 2-10 に示されるように、一次壁セルロース (P) の偏光 IR 吸収強度は垂直 (仮道管軸方向、 $0^\circ$ ) と水平 (軸垂直方向、 $90^\circ$ ) にあまり差がない一方、二次壁セルロース (P + S1 + S2 + S3) では大きな差がある。この結果からすると、一次壁セルロースは二次壁セルロースよりも配向性が低いことになる。しかし前節でも述べたように、一次壁セルロースの配向度が、試料作成時の乾燥により低下した可能性があるため、未乾燥の試料でさらに検討する必要がある。実際、4 章の原子間力顕微鏡 (AFM) 解析では、未乾燥の一次壁 CMF が高い配向性を有することが観察され、上記の仮説、すなわち一次壁形成時の延伸ストレスの存在を支持する結果となった。



## 2. 4. 考察

仮道管セルロースの結晶形、結晶化度が一次壁から二次壁へと変化しており、細胞壁において均一でないことが明らかとなった。一次壁セルロースは、ストレス誘発型 (stress-induced) である熱力学的に準安定な三斜晶の  $I\alpha$  に富み、二次壁セルロースよりも結晶化度が高い一方、二次壁セルロースにおいては、ストレス解放型 (stress-free) である安定な単斜晶の  $I\beta$  が主体となること、さらに、一次壁セルロースの結晶組成は、 $I\alpha/I\beta$  (50/50) であり、二次壁では、 $I\alpha/I\beta$  (20/80) であることを顕微 FT-IR による分光的手法により解析した。加えて、CMF を構成するセルロース分子鎖の主配向が、一次壁では細胞拡大の方向である細胞軸垂直方向であり、二次壁では軸方向であることも確認された。

特に、セルロースの結晶形と結晶化度が、一次壁から二次壁へと同時に変化したことから、セルロースの結晶化メカニズムが両壁の間で異なることが示唆される。筆者らは、仮道管一次壁のセルロース結晶化においては分子鎖方向に延伸力が作用するため、結晶化度が高まるとともに、ストレス誘発型 (stress-induced) である熱力学的に準安定な三斜晶の  $I\alpha$  が結晶化しやすいとの考えを提案する (Fig. 2-11a)。ここで想定するのは、高分子ゲルの延伸結晶化挙動である。ポリエチレンゲルを延伸結晶化させたときにも、その複合結晶体に、ストレス誘発型である準安定な三斜晶が現れることが報告されている (Chanzy *et al.*, 1987)。一方、二次壁のセルロースは、このようなストレスを受ける機会が少ないため (Fig. 2-11b)、ストレス解放型 (stress-free) である安定な単斜晶の  $I\beta$  が主体となると考えられる。それでは、一次壁セルロースに対する延伸力の起源は何であろうか。現在のセルロース生合成及び細胞壁形成のモデルによれば (例えば、Vian and Reis, 1991)、セルロース分子は細胞膜上のセルロース合成酵素複合体 (TCs) で生合成され、原形質膜と細胞壁の間において中間相状態 (液晶?) から結晶化して、



**Figure 2-11** Schematic representations for stressed (a) and relatively relaxed (b) crystallization forms for  $I_{\alpha}$  and  $I_{\beta}$  of tracheid cellulose, respectively, which may occur between the terminal enzyme complexes (TCs) on the plasma membrane (PM) and the cell wall. The primary (P) cell wall cellulose may be stressed (a) and relaxed (b) repeatedly during crystallization, whereas the secondary (S) wall cellulose may mainly be crystallized in a relatively relaxed environment (b).

セルロースマイクロフィブリル (CMF) を形成し、細胞壁に堆積する。Figs. 2-11a,b に示すように、結晶化の過程にあるセルロース分子鎖の両端は、原形質膜上の TCs と、すでに結晶化して細胞壁の一部となった CMF にそれぞれ連結しているため、中間相のセルロース分子はストレスを受けやすいと考えられる。特に、一次壁の形成時には、細胞が拡大生長するため原形質膜中にひずみが生じ、同時に細胞壁は強く引張されており、膜・壁の間で中間相のセルロースが延伸力を受ける可能性がある。なお、仮道管の拡大生長は、軸方向よりも軸垂直方向で著しく、早材の場合、放射方向に 400%にも達する (Bailey, 1920)。このような拡大生長に伴い、細胞表面には様々な物理的ストレスが発生すると考えられるが、セルロースの結晶形、結晶化度を同時に変化させうる原因としては、高分子ゲルの延伸結晶化と同様の延伸効果が想定される。最近、バクテリアセルロースについても、中間相のセルロースに対する延伸効果が、I $\alpha$ 相の結晶化を引き起こすのではないかとして提案されている (Yamamoto *et al.*, 1996)。本研究で提示した仮説は、一次壁セルロースが結晶化する際に、細胞の拡大による延伸力を受けるとする考えに基づいたものである。なお、セルロースの結晶化時ではなく、CMF として一次壁に堆積した後、細胞の拡大による延伸力を受けることについては、従来からマルチネット成長説 (例えば、Roelofsen, 1965) が指摘している。一次壁セルロース分子鎖の配向が細胞軸の垂直方向であったことは、仮道管の拡大による延伸力の効果を示唆しているが、本研究ではこの効果として、堆積後の CMF を延伸するだけではなく、堆積前のセルロース高次構造形成にも影響を与えるのではないかと考えている。

I $\alpha$ 結晶化の原因となるストレスは、I $\alpha$ の結晶化によって吸収され、あるいは原形質膜および細胞表面付近が流動性を有するために、やがて緩和されるであろうから、次のストレスが I $\alpha$ 結晶化に必要なエネルギーを上回るまでは、I $\beta$ としてセ

ルロースが結晶化すると考えられる。このように断続的な (on and off) ストレスの結果として、一次壁セルロース結晶が、 $I\alpha/I\beta$  (50/50) の組成を有することになるのではないかと考えられる。この考えに基づけば、 $I\alpha$ に富むある種の海藻のセルロース微結晶において、 $I\alpha$ と  $I\beta$ が結晶の長さ方向に交互に分布する (Sugiyama *et al.*, 1991b) ことも理解できる。一方、二次壁については、 $I\alpha/I\beta$  (20/80) の組成比であったことから、結晶化時に常にストレスを受けないわけではなく、連続か不連続かは不明であるが、一時的に約 20 % の  $I\alpha$ が結晶化する程度のストレスが二次壁形成時に作用したのではないかと推定できる。なお、一次壁セルロースが  $I\alpha/I\beta$  (50/50) の組成を有することについては、最近、他の植物にも報告されつつある。リシゴ (*Malus domestica*) の果実、キャベツ (*Brassica oleracea*) の葉、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の葉 (以上、双子葉類) あるいはタマネギ (*Allium cepa*) の球根、イタリアンライグラス (*Lolium multiflorum*)、パイナップル (*Ananas comosus*) の実 (以上、単子葉類) の一次壁セルロースが CP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMR 分析され、それぞれ  $I\alpha/I\beta$  (50/50) の組成比が報告されている (Smith *et al.*, 1998)。

筆者ら提案する延伸効果の他にも、仮道管セルロースの結晶化に影響を与えうる効果として、細胞膜上の TCs の配列様式 (Sugiyama *et al.*, 1990; Atalla and VanderHart, 1989; Wada *et al.*, 1995a)、他の多糖類とセルロースとの相互作用 (例えば、Vian and Reis, 1991; Atalla *et al.*, 1993) があげられる。しかしこれらの効果のうち、分子鎖の配列と集合をコントロールし、結晶形と結晶化度を同時に変えるという現象を引き起こせるものとして延伸効果を考えるのは妥当なところである。結晶化の際のストレスが、TCs の配列様式により生み出されるとする説 (Sugiyama *et al.*, 1990) については、もし TCs の配列様式が  $I\alpha$ と  $I\beta$ で異なるとすれば、逆に、結晶化の際のストレスがその配列を決定すると考えられないであらう。



うか。針葉樹仮道管の一次壁について、未だ TCs は観察されていないが、ストレス誘発型 (stress-induced) である Ia が結晶化する間、中間相のセルロースに発生したストレスは、分子鎖を通じて TCs 配列に影響する可能性がある。多糖類との相互作用については、セルロースの結晶化に何らかの影響を与える可能性があるものの、一次壁のような Ia に富むセルロースを結晶化させうるのかどうかについては疑問がある。一次壁において、セルロースとの親和性が高い多糖類はキシログルカン (XG) であると考えられている (例えば、林, 1994)。一方、XG やカルボキシメチルセルロースをバクテリアセルロースの培地に混入すると、生成する Ia の分率が減少することが報告されており (Yamamoto and Horii, 1994; Yamamoto *et al.*, 1996)、このようなセルロースと親和性のある多糖類の効果としては、むしろ結晶化中のセルロースにストレスが発生するのを防ぐ傾向がある。バクテリアセルロースに対する XG の効果は、生物種の異なる仮道管セルロースには当てはまらないかもしれないが、いずれにせよ、現時点では、一次壁セルロースが Ia に富む理由を、XG との相互作用によって説明することは困難である。なお、一次壁の多糖類成分については、細胞壁に堆積した後、その一部が分解あるいは離脱し、その後再び細胞壁成分となるとするターンオーバーのメカニズムが考えられている (例えば、Brett and Waldron, 1990)。この影響があるとしても、分解した多糖類が、Ia 分率を高めうるのかどうかについては、上記と同様に説明が難しい。あるいは、ターンオーバーによって、セルロース結晶の一部が分解される可能性を考えたとしても、その残さは、逆に Ip 相に富む結果と (Hayashi *et al.*, 1998a) ならないであろうか。セルロースと親和性のある多糖類の効果としては、二次壁セルロースが Ip として結晶化するのを促進する可能性があげられる。二次壁セルロースが、細胞拡大生長後の比較的ストレスを欠く環境下で結晶化するとき、さらにヘミセルロースがストレスの発生を抑制するとしても、本研究の結

果および提示した仮説と矛盾しない。なお、従来、仮道管二次壁へのヘミセルロース沈着は、CMF 堆積後に起こると考えられていたが、最近の研究により、セルロースが結晶化して CMF を形成する時点で、すでにその周囲にヘミセルロースが存在する可能性が示されている (Inomata *et al.*, 1992; 高部, 1994)。一方、リグニンの沈着については、CMF の堆積よりもかなりおくれて開始するため (例えば、福島, 1994)、セルロースの結晶化に直接影響を与える可能性は低いと考えられる。

この章においては、顕微 FT-IR を用い、仮道管細胞壁におけるセルロースの高次構造を解析し、一次壁から二次壁への変化を見いだした。次章では結晶形の変化について、X 線回折による確認を試みる。本章で提案した仮道管セルロースの結晶化モデルは、CMF の堆積構造に関する知見を 4 章と 5 章で得た後に、CMF の形成から堆積まで一連の構造形成を説明するモデルへと発展することになる。

## 2. 5. 要約

本章において、仮道管細胞壁の壁層形成段階を区分した FT-IR 分光法により、セルロースの結晶形、結晶化度、CMF を構成するセルロース分子鎖の配向が、一次壁と二次壁の間で異なることを明らかにした。結晶形については、一次壁セルロースが準安定な三斜晶の  $I\alpha$  に富む一方、二次壁セルロースは安定な単斜晶の  $I\beta$  を主体とし、結晶化度は一次壁セルロースの方が高かった。さらに、一次壁 CMF を構成するセルロース分子は、主として仮道管の拡大生長方向に配向していた。序論において、細胞が拡大生長しながら一次壁を形成する時期と拡大終了後の二次壁形成時とでは、細胞表面で進行するセルロース結晶化のメカニズムが一樣ではない可能性があると考えた。本章の結果は、一次壁と二次壁のセルロースが物理化学的に異なる環境下で結晶化することを示唆しており、この考えを支持するものであった。これらの結果から、一次壁と二次壁セルロースの相違の原因は、セルロースの結晶化が細胞の拡大生長と同時に進行するか否かに起因すると考え、一次壁のセルロースが結晶化するときには細胞拡大に伴う物理的ストレスを受ける結果、 $I\alpha$  に富み、結晶化度が高まる一方、二次壁のセルロースは比較的ストレスを受けずに結晶化するため、主として  $I\beta$  が形成されるとするモデルを提示した。

### 第3章 X線回折法によるセルロース結晶形の解析

#### 3. 1. 緒言

木材セルロースの2相 ( $I\alpha/I\beta$ ) モデルに基づくX線解析は、Wadaら(1994; 1995b)によって精力的になされ、一次壁と二次壁を含めた細胞壁全体としては $I\beta$ 相が主体であると報告されているが、壁層別の解析はなされていない。本章では、2章でおこなった顕微FT-IR分析により、仮道管の一次壁はセルロース  $I\alpha$  に富み、二次壁は  $I\beta$  が主体であるとの結果を得たため、これをX線回折によって確認することを目的とした。さらに、X線回折法により、IR分析では不明であった仮道管細胞壁の接線壁(板目面)におけるセルロースの結晶形についても知見が得られると予想される。顕微FT-IR分析においては、まさ目切片に垂直にIR光を透過させた結果、光路に平行な接線壁は厚すぎて透過光として検出されず、接線壁に関する情報は得られなかった(Fig. 2-1)。本章のX線解析においては、細胞壁の形成段階ごとに数多くの切片を集めて回折を得たため、結果としては接線壁・放射壁の区別なくセルロースの結晶形を解析できると考えられる。X線回折法では、IR法に比べて多量の試料が必要なため、本章では、ヒノキの形成層付近から成熟木部まで多数の板目切片を切り取って解析に供した。他の天然セルロースに比べ結晶の小さい木材セルロースからは、2相 ( $I\alpha/I\beta$ ) 構造を解析するのに十分なX線繊維図が得られない。そこで、Wadaら(1993)が報告したようにX線ディフракトメトリーにより結晶の面間隔を求め、その変化を解析した。



### 3. 2. 実験

#### 3. 2. 1. 試料

早材形成中の28年生ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Endl.; 1995年5月29日、関東林木育種センターで採取) から、2章と同様に形成層帯を含む木部分化帯の小ブロックを得て、形成層付近から成熟木部にかけて厚さ 60  $\mu\text{m}$  の板目切片を切り出した (Fig. 2-1b)。これらの板目切片における細胞壁形成段階 (P, P+S1, P+S1+S2, P+S1+S2+S3) を同定するため、板目切片を切る度に、木口あるいはまさ目切片を得て偏光顕微鏡または走査型電子顕微鏡によりセルロースの配向方向を観察した。このように収集した板目切片を、細胞壁の形成段階順に6つのフラクション、すなわち No. 1 (P)、No. 2 (P+S1)、No. 3 (P+S1)、No. 4 (P+S1+S2)、No. 5 (P+S1+S2) および No. 6 (P+S1+S2+S3) に区別した。これらフラクションの形成層付近からの平均距離は、それぞれ 30、90、150、210、300、500  $\mu\text{m}$  である。これらの板目切片は、2章と同様の方法でセルロースを精製した後、凍結乾燥してX線解析に供した。

#### 3. 2. 2. X線ディフракトメトリー

仮道管細胞壁の形成段階別に、約 0.7 mg の精製した板目切片を収集し、X線試料ホルダーの径 2 mm、厚さ 2 mm の穴の中に切片の方向がランダムになるように押し込み軽く圧縮した。X線ディフракトメトリーは、RIGAKU RINT 2500Fにより行い、電圧 40 kV、電流 100 mA で Cu-K $\alpha$ 線 ( $\lambda = 0.1542 \text{ nm}$ ) を発生させ、Ni フィルターで単色化した。走査は、 $2\theta = 10 \sim 40$  度の範囲で行い、ステップ幅 0.10 度ごとに 40 秒間積算した。得られた回折曲線の  $2\theta = 10 \sim 25$  度にある、 $d_1$  から  $d_4$  のピークについて、シュード・ボイト関数 (ガウス関数とロー

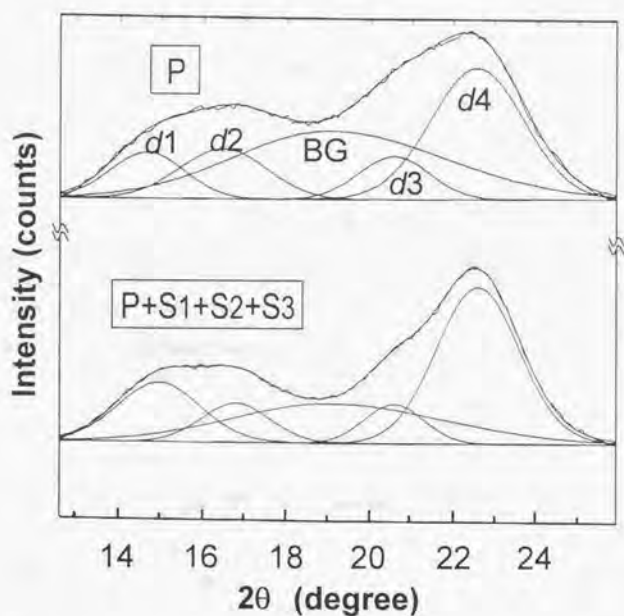
レンツ関数の複合関数)によりピーク分離した(和田, 1997)。なお、 $d1$  は、 $I\alpha$  の  $(100)$  面と  $I\beta$  の  $(1\bar{1}0)$  面からのディフラクションの混成、 $d2$  は、 $I\alpha$  の  $(010)$  面と  $I\beta$  の  $(110)$  面からのディフラクションの混成、 $d3$  は、 $I\alpha$  の  $(\bar{1}\bar{1}2)$  面と  $I\beta$  の  $(012)$  および  $(102)$  面からのディフラクションの混成、 $d4$  は、 $I\alpha$  の  $(110)$  面と  $I\beta$  の  $(200)$  面からのディフラクションの混成であり、2 相 ( $I\alpha/I\beta$ ) の組成比を反映する(Wada *et al.*, 1993)。ピーク分離にあたっては、再現性を保つため、①まず、バックグラウンド (BG) のピーク位置を  $2\theta = 19.0$  度 (Okano and Koyanagi, 1986)、ピーク高さを 19 度における回折曲線高さの 90% として固定した(和田, 1997)。②次に、 $d1$ ,  $d2$ ,  $d3$ ,  $d4$  のピーク位置に一定の初期値 ( $I\alpha$  に富むタイプと、 $I\beta$  に富むタイプの中間の値)を与える一方、これらのピーク高さを変動要素として計算した。③さらに、 $d3$ ,  $d4$  のピーク位置も変動要素に加えて再計算、④次いで  $d1$  のピーク位置も変動要素に加えて再計算し、⑤最後に  $d2$  のピーク位置も変動要素とし、BG 以外のピーク位置・高さをすべて変動要素とした状態で最終的なピーク分離を行った。再現性のある結果を得るためには、このように段階的に変動要素を増やす必要があった。和田 (1997) は、 $d1$  と  $d2$  の面間隔によって、2 相 ( $I\alpha/I\beta$ ) 構造を解析したが、本実験では、簡便法として  $d1$  の面間隔に着目した。

### 3. 3. 結果と考察

Fig. 3-1 に、一次壁を形成中の仮道管 (P) および二次壁が完成した仮道管 (P + S1 + S2 + S3) から得た X 線回折曲線とピーク分離の結果を示す。ピーク  $d1$ 、 $d2$  は、 $I\alpha$  と  $I\beta$  の面間隔の違いに起因する 2 つのディフラクションの混成であるから、それぞれ両相の比率を反映しており、2 相 ( $I\alpha/I\beta$ ) 構造を解析するのに適している (Wada *et al.*, 1993; 1997)。和田 (1997) は、木材を含む数多くの天然セルロースを解析した結果をもとに、 $d1$ 、 $d2$  を用いて、 $I\alpha$  に富むタイプと  $I\beta$  に富むタイプを判別する以下の数式を提案した。次式において、 $Z > 0$  ならば  $I\alpha$  に富むタイプ、 $Z < 0$  ならば  $I\beta$  に富むタイプとされている。

$$Z = 1693 d1 - 902 d2 - 549$$

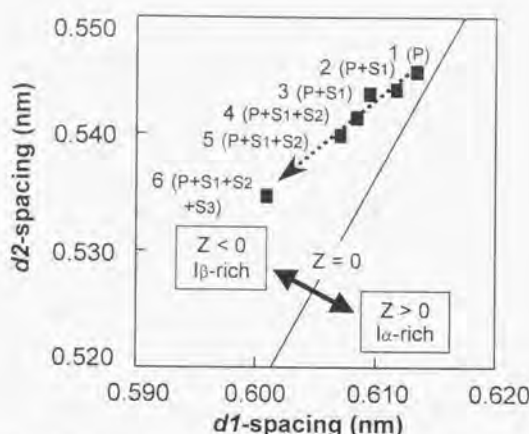
ヒノキ仮道管の細胞壁形成の段階別に得た  $d1$ 、 $d2$  を上式に代入したのが、Fig. 3-2 である。一次壁セルロース (P) については  $Z = 0$  の境界付近にあるが、二次壁の形成が進行するにつれて (P + S1  $\rightarrow$  P + S1 + S2  $\rightarrow$  P + S1 + S2 + S3)、 $Z$  値が減少し、明確な  $I\beta$  タイプを示す領域に移動している。これは、IR で得られた結果、すなわち一次壁セルロースの組成が、 $I\alpha/I\beta$  (50/50) であること、二次壁形成中に  $I\beta$  の増加に反して  $I\alpha$  が相対的に減少し  $I\alpha/I\beta$  (20/80) となることを支持している。しかし、 $d1$  と  $d2$  それぞれの変化を見ると両者とも減少しており、 $d1$  か  $d2$  のいずれかの値に問題があることがわかる。つまり、 $d1$ 、 $d2$  は、 $I\alpha$  ( $d1 = 0.613$  nm,  $d2 = 0.529$  nm) と  $I\beta$  ( $d1 = 0.603$  nm,  $d2 = 0.535$  nm) の混成ディフラクションであるから (Wada *et al.*, 1997)、 $I\beta$  成分が増えれば  $d1$  が減少して  $d2$  は増加し、逆に  $I\alpha$  成分が増えれば  $d1$  が増加して  $d2$  は減少するはずである。Fig. 3-2 において両者が減少したのは、 $d2$  の問題であると推定される。この理由は、回折曲線に大きなバックグラウンド (BG) が含まれており (Fig. 3-1)、ピーク分



**Figure 3-1** X-ray diffraction curves for the primary (P) and mature cell wall (P + S<sub>1</sub> + S<sub>2</sub> + S<sub>3</sub>) cellulose of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheid cells from 12 to 26 degrees in the 2θ angle. The four typical diffraction peaks from d1 to d4 in this region were corrected for background scattering (BG).

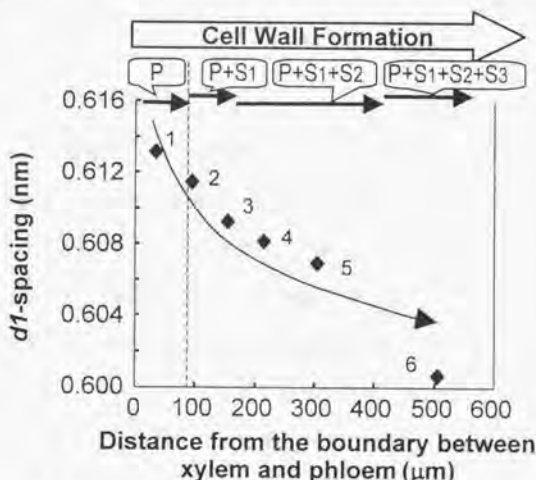
**Legend:** P, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> and S<sub>3</sub> : see abbreviations in Figure 2-1.





**Figure 3-2** Change of  $d1$ - and  $d2$ -spacing of cellulose as Z-plot (Wada, 1997; see text) during cell wall formation of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheid cells.

**Legend:** 1 to 6 : sample fraction numbers (see text); P, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> and S<sub>3</sub> : see abbreviations in Figure 2-1.



**Figure 3-3** Change in the  $d1$ -spacing of cellulose during cell wall formation of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheid cells.

**Legend:** 1 to 6 : sample fraction numbers (see text); P, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> and S<sub>3</sub> : see abbreviations in Figure 2-1. Distance from the boundary between xylem and phloem: see Figure 2-1.

離する際に、BG に隣接する  $d_2$  の分離に正確さを欠いたためと考えられる。なお、一次壁セルロースの BG が特に大きく、低結晶性であるように見えるが (Hanna and Côte, 1974)、2 章で述べたように、一次壁における CMF 配列密度の低さや、試料作成時に生じる配列の乱れなどによる影響が無視できないため、回折強度を直ちに結晶性に結びつけることはできない。本研究では、これらの影響を除去することは困難であると考え、2 章における IR 法によって結晶性を評価した。

上記の理由から、 $d_1$  と  $d_2$  の相対変化ではなく、 $d_1$  のみの変化に着目することとした。細胞壁の形成過程における  $d_1$  面間隔の変化を、Fig. 3-3 に示す。 $I_\alpha$  及び  $I_\beta$  の  $d_1$  計算値はそれぞれ、(100) 面の 0.613 nm 及び  $(1\bar{1}0)$  面の 0.603 nm である (Wada *et al.*, 1997)。一次壁セルロース (P) について  $d_1$  は 0.610 nm を越えていたが、二次壁の堆積が進むにつれて  $(P+S_1) \rightarrow P+S_1+S_2 \rightarrow P+S_1+S_2+S_3$  減少し、0.605 nm 以下となった。この変化は、IR 解析における  $I_\alpha$  分率の減少傾向とおおよそ一致しており、一次壁から二次壁への  $I_\beta$  の増加に伴う  $I_\alpha$  の相対的な減少を示していると理解できる。

さらにこの結果から、IR 解析においては不明であった仮道管細胞壁の接線壁 (板目面) についても、放射壁 (まさ目) と同様にセルロースの結晶組成が変化していることが示唆された。前章の IR 解析においては、まさ目面に垂直な IR 光を検出したため、接線壁についての情報は得ることができなかった (Fig. 2-1a)。一方、本章の X 線解析においては、接線壁・放射壁の区別なく回折を得ることができ (Fig. 2-1b)、しかも IR 解析結果が支持されたことから、接線壁・放射壁ともに一次壁では  $I_\alpha$  に富み、二次壁では  $I_\beta$  に富むことが示された。

### 3. 4. 針葉樹仮道管細胞壁のセルロース結晶化

2章と3章において、FT-IR 分光法およびX線回折法により、仮道管細胞壁のセルロース高次構造を解析し、一次壁と二次壁の間に著しい相違があることを明らかにした。この結果は、一次壁と二次壁のセルロースが物理化学的に異なる環境下で結晶化し、CMFを形成することを強く示唆する。この相違の原因は、セルロースの結晶化が細胞の拡大生長と同時に進行するか否かに起因すると考え、細胞拡大に伴う物理的作用が結晶化の相違を引き起こすとするモデルを2章において提示した。この仮説に関しては6章で詳細に述べることとし、次章では、セルロースの結晶化における物理化学的環境の相違が、結晶化により形成されたCMFの堆積構造にも影響するか否かを検討する。

#### 第4章 液中モード原子間力顕微鏡によるミクロフィブリル堆積構造の解析

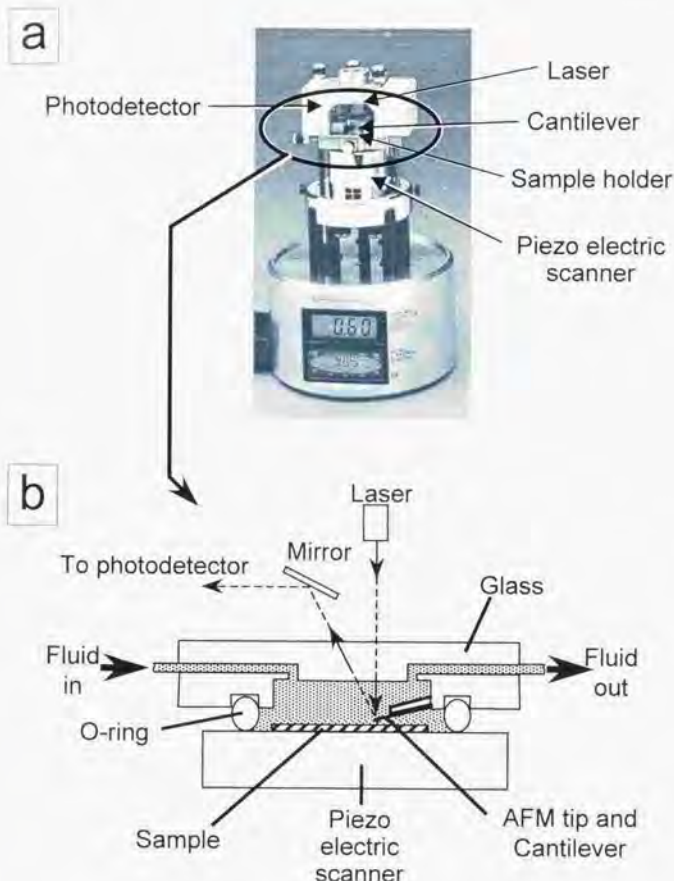
##### 4. 1. 緒言

仮道管細胞壁の骨格構造は、結晶化したセルロースが、セルロースミクロフィブリル (CMF) と呼ばれる繊維状の結晶性構造体として堆積することにより構築される。セルロースの結晶化による CMF の形成とそれに引き続く CMF の堆積は、原形質膜と細胞壁内表面の間隙において、一連の過程として進行するため、結晶化に対する物理化学的な効果があれば、CMF が堆積する際の構造形成にも影響を与える可能性がある。前章までに、一次壁セルロースが、ストレスの発生時に結晶化するとされる (ストレス誘発型) の Ia に富み、結晶性も高いことが判明し、その原因として分子鎖方向に延伸のストレスを受けて結晶化するのではないかとこの仮説を提案した。この仮説は、中間相状態のセルロースが、仮道管の拡大生長にともなって原形質膜と細胞壁の間で延伸効果を受けるとの考えに基づいている (Fig. 2-10a)。このような物理的ストレスがあれば、細胞壁内表面における CMF の堆積構造にも影響を与えるはずである。しかし、従来の電子顕微鏡研究においては、CMF 堆積構造を *in situ* 下で観察することが困難であったため、この観点における検討はなされていない。これは、試料作成時の乾燥により構造の変形・破壊が生じやすいためであり、特に影響を受けやすい一次壁についての知見が不足していることは、1章にも述べたとおりである。さらに、細胞壁内表面を電子顕微鏡観察する場合、内表面に対して垂直方向 (高さ方向) の解析は困難であった。

そこで本章では、乾燥による構造の変形・破壊を避け、可能な限り *in situ* 下に近い状態で CMF 堆積構造を解析するため、液中モードの原子間力顕微鏡 (AFM) を使用した。液中モード AFM は、物質の表面構造を3次元解析するのに優れ、



しかも液中での測定が可能のため、試料を未乾燥の状態で観察できる (Fig. 4-1)。  
本章では、この液中モード AFM により、仮道管細胞壁の内表面における CMF  
堆積構造を未乾燥のまま水中で3次元観察し、一次壁から二次壁への CMF 凝集  
状態、配向などの変化を解析した。最後に、得られた結果と前章までの結果から、  
セルロースの結晶化に影響した物理的ストレスが、さらに CMF の細胞壁への堆  
積過程においても影響を及ぼすとするモデルを提案した。



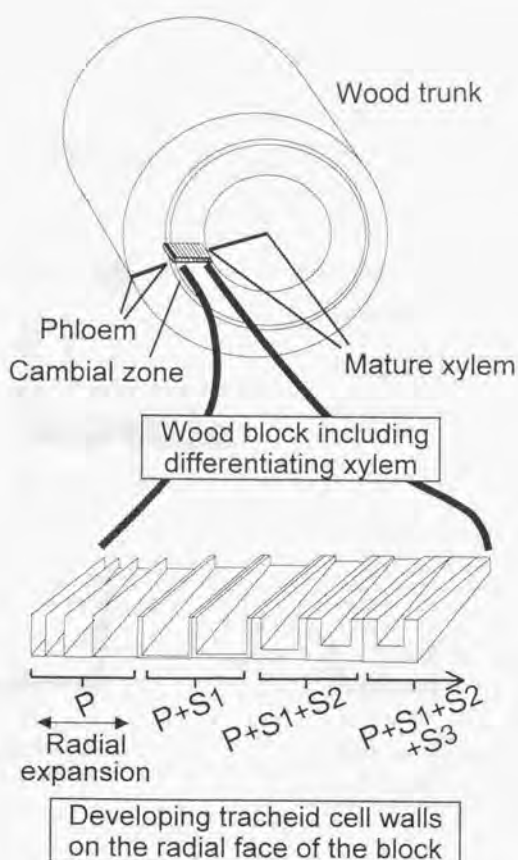
**Figure 4-1** A photograph of an AFM (Nanoscope IIIa) (a) equipped with a cell designed to observe samples in liquid (b).

**Note:** Contact mode AFM observation was achieved by the scanning of the piezo electric scanner whose motion was synchronized with that of the cantilever and the AFM tip. The motion of the cantilever, which depends on the atomic force between the AFM tip and the sample surface, was monitored by the laser detector.

## 4. 2. 実験

### 4. 2. 1. 試料

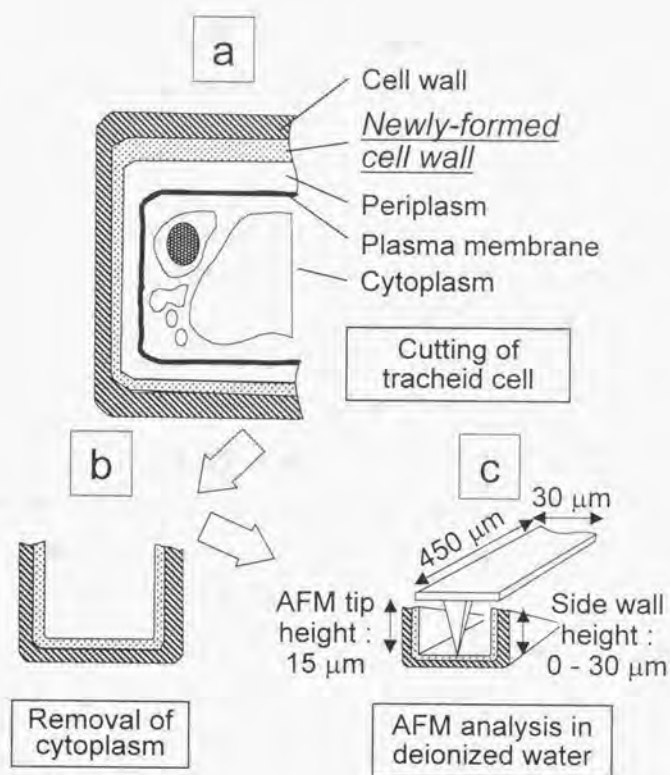
早材を形成中のヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Endl.; 28 年生, 1995 年 5 月 29 日 関東林木育種センター(水戸市) で採取) から、これまでの試料と同様に形成層帯を含む木部分化帯の小ブロックを得て、3%グルタルアルデヒド (1/15 M リン酸緩衝液, pH 6.8) で固定し、このブロックをナイフでさらに小片とした。グルタルアルデヒドは、細胞の生命活動をすみやかに停止させ、タンパク質と反応してその形状を固定すると考えられているが (Robards, 1970)、CMF と反応する可能性も否定できない。このような場合、特に CMF の凝集状態に対する影響が懸念されるため、上記の固定処理を省略した試料と比較し、グルタルアルデヒドが CMF の凝集状態を大きく変化させないことを確かめた。この小片の表面からミクロトームを用いてまさ目切片を切り出し、Fig. 4-2 のようにまさ目面を露出させた。さらに仮道管細胞壁の内表面 (形成面) を覆う原形質を取り除くため、この小片を有効塩素濃度約 2% の次亜塩素酸ナトリウム溶液に室温で約 5 分間浸漬して内表面の CMF を露出させ (Figs. 4-3a, b)、脱イオン水で洗浄した。なお、次亜塩素酸処理を省略した場合でも、原形質が物理的に離脱することがあり、このときの細胞壁内表面を観察した結果、次亜塩素酸処理が CMF の堆積構造を変化させないことが示唆された。多糖類、タンパク質など細胞壁成分の一部が流出した可能性は否定できないが、さらに乾燥処理を必要とした従来の観察法に比べ、より *in situ* に近い状態の細胞壁内表面が観察できたといえる。なお、従来、仮道管二次壁のヘミセルロース堆積は、セルロースが CMF として堆積した後に起こると考えられていたが、最近の研究により、セルロースが原形質膜と細胞壁の間で CMF を形成する時点で、その周囲には、ヘミセルロースが存在する可能性が示されている (Inomata *et al.*, 1992; 高部, 1994)。一方、リグニンについては、CMF



**Figure 4-2** Schematic detailing the sampling method used for aqueous mode AFM analysis to observe nascent CMFs for each stage of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheid cell wall formation.

**Legend:** P, S1, S2 and S3 : see abbreviations in Figure 2-1.





**Figure 4-3** Schematic of the AFM tip approaching never-dried CMFs on the developing tracheid cell wall surface in deionized water.

の堆積よりかなり後に沈着するため（例えば、福島、1994）、CMF 堆積時の構造形成に関与する可能性は低いと考えられる。上記のヒノキ小片のまさ目表面を上に向け、脱イオン水を満たした AFM の液中観察用セルに装着した（Fig. 4-3c）。以上の処理において、細胞壁内表面を常に未乾燥の状態に保った。

#### 4. 2. 2. 液中モード AFM 解析

AFM 解析は、Digital Instruments 社の Nanoscope IIIa と液中モード観察用セルにより（Fig. 4-1）、脱イオン水中でおこなった。AFM チップの走査を、力一定のコンタクトモードで制御し、AFM 高さ像とエラーシグナル像を得た。力一定のコンタクトモードでは、AFM チップと試料間に作用する原子間力（斥力）が一定となるよう、チップ-試料間の距離をフィードバック制御しながら走査し、試料の表面構造をイメージ化する（AFM 高さ像）。走査中のチップが凹凸構造に出会うと、一瞬、チップ-試料間の距離が変化するが、このときのエラー信号により、直ちにフィードバック制御が果たされる。このエラー信号をイメージ化したものがエラーシグナル像である。したがって、凹凸の高低が急激に変化する場合、例えその高低差がわずかであっても、エラーシグナル像に現われやすい（但し、高低差を定量することはできない）。一方、緩やかな凹凸については、高低差が大きくても現われにくい。一般に、AFM 高さ像では、凹凸の高低差が強調されるため、細かな構造がかき消されることがある。この場合、エラーシグナル像が有用となる。なお、凹凸に富む表面で走査速度を上げすぎた場合、フィードバックが間に合わず、チップが試料表面を削り取るように強く接触することがある。逆に走査速度が遅すぎると、測定環境中の振動、温度変化による試料の変形などの影響が大きくなる。本研究では、走査範囲  $10 \times 10$  から  $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}^2$ （主として  $2.5 \times 2.5$  または  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ）に対し、走査速度は 1 から 10 Hz（主として 1.5 Hz）

の間とし、安定して高分解能像を得られる条件とした。なお、コンタクトモードは他の AFM モードに比べて高い分解能を有するが、大気中で用いる際にはチップ-試料間に吸着水層が生じるため、メノスカス力によって試料に引き寄せられたチップが、表面構造を変形・破壊するおそれがある。柔らかな生物試料の場合、特にこの影響を受けやすい。この問題を避けるためには、高真空中で用いるか、本研究のように水中で観察するなどの方法が必要となる。測定に用いた AFM チップは、半径 5 から 15 nm (公称値)、先端角度 35 度、高さ 15  $\mu\text{m}$  の単結晶シリコンである。これを搭載するカンチレバーは、長さ 450  $\mu\text{m}$ 、幅 30  $\mu\text{m}$ 、バネ定数 0.13  $\text{Nm}^{-1}$  の細長い形状のタイプとした。観察にあたっては、Fig. 4-3c に示すように、AFM チップを仮道管細胞壁の内表面 (形成面) に着地させた。このとき、まさ目表面に垂直に立つ接線壁とカンチレバーが接触すると、着地失敗となるか走査の制御が困難となる。しかし、まさ目表面はわずかに傾斜して切削されているため、接線壁の高さは部位によって異なり、(Fig. 4-3c)、正常に着地し、走査できる部分を選ぶことができた。なお、本研究では、通常コンタクトモードで用いられる V 字型のカンチレバー (V-shaped (or triangular) configuration) よりも、上記の細長い形状の (single beam (or rectangular) configuration) カンチレバーが適していた。これは、V 字型のカンチレバーでは、仮道管内こうに対して幅が広すぎるうえに、AFM チップの高さが細長い形状のものより低く、正常に着地することが困難だからである。反面、通常のコンタクトモードよりもやや分解能が劣る結果となった。細胞壁内表面の走査は、まず、仮道管軸方向に行い、ついで軸垂直方向に行った。なお、仮道管拡大初期と後半期とでは、一次壁内表面における CMF 配向が異なるとする報告があるが (今村ら、1972a; Abe *et al.*, 1995a)、本章の AFM 観察においては、拡大初期の幅の細い仮道管に AFM チップを着地させることが困難であったため、拡大生長の後半期 (幅 20~30  $\mu\text{m}$ ) にある仮道

管を観察した。また、二次壁形成の最終段階である S3 層については、表面がほぼ状層により覆われている場合があり、CMF 構造の解析が困難であった。観察は、一次壁 (P)、二次壁 S1、S12 (S1 と S2 の移行層)、S2 層の形成表面において、それぞれ 3 箇所以上で行った。

CMF 堆積構造の高さについては、Nanoscope に付属の断面プロファイル解析ソフトを使用して計測した。幅については、AFM チップ先端の回り込み効果 (Hanley *et al.* 1992; Hanley and Gray, 1994) により実際より大きく計測されるため、Fig. 4-4 に示すように、チップ先端の曲率半径 (R) と対象物の高さ (H) から過剰分 ( $E = E1 + E2$ ) を差し引いて、以下のように、実際の幅 (W) を推定した。

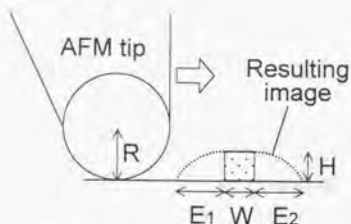
$$E = 2(2RH - H^2)^{1/2} \quad (R > H \text{ のとき}) \text{ または、}$$

$$E = 2R + (H - R) \tan A \quad (R \leq H \text{ のとき})$$

なお、本章においては、計算を単純にするために、 $R = 10 \text{ nm}$  とした。

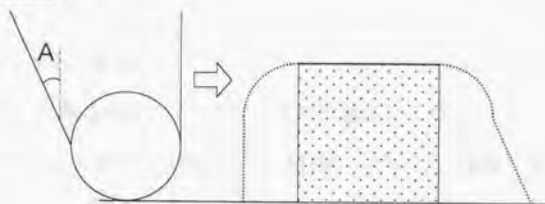


**a** ( $R > H$ )



$$E = E_1 + E_2 = 2\sqrt{RH - H^2}$$

**b** ( $R \leq H$ )



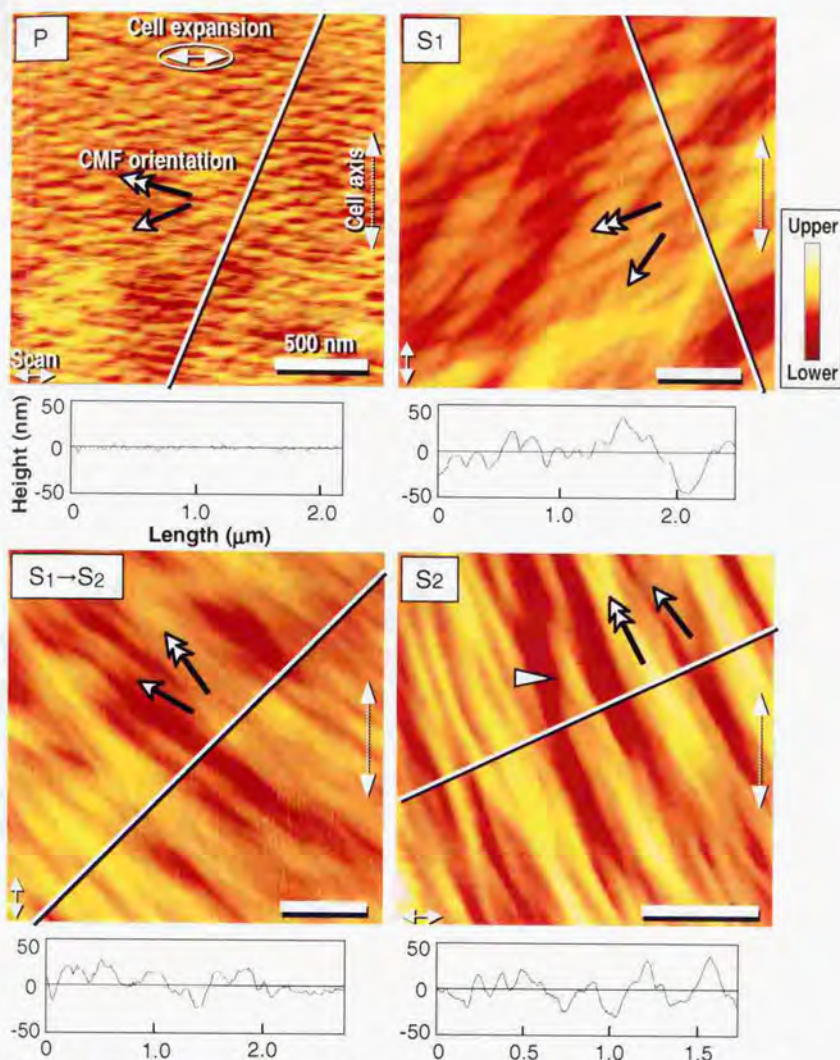
$$E = 2R + (H - R)\tan A$$

**Figure 4-4** Artificial enhancement ( $E$ ) to the real CMF width ( $W$ ) caused by the geometrical effects from the AFM tip radius ( $R$ ) and cone angle ( $A$ ) depending on the CMF height ( $H$ ).

#### 4. 3. 結果

仮道管一次壁 (P) および二次壁 S<sub>1</sub>, S<sub>12</sub> (S<sub>1</sub> から S<sub>2</sub> への移行層)、S<sub>2</sub> について、未乾燥の状態で得た CMF 堆積構造の AFM 高さ像を Fig. 4-5 に示す。色の明るい部分ほど相対的な位置が高いことを表すが、正確な高低については、図中の実線に沿った断面プロファイルを各像の下に示した。なお、高低 (height) のスケールが、平面方向の長さ (length) よりも強調されている。さらに、P と S<sub>2</sub> については、Fig. 4-6 に、高さ像に加えてエラースIGNAL像を示した。Fig. 4-6 左側の P, S<sub>2</sub> は、それぞれ Fig. 4-5 の P, S<sub>2</sub> と同一の仮道管であるが、その倍率が異なる。実験の項で述べたように、エラースIGNAL像では正確な高低を判断できないが、微小な凹凸が現れやすいため、CMF 配列を確認することが容易となる。

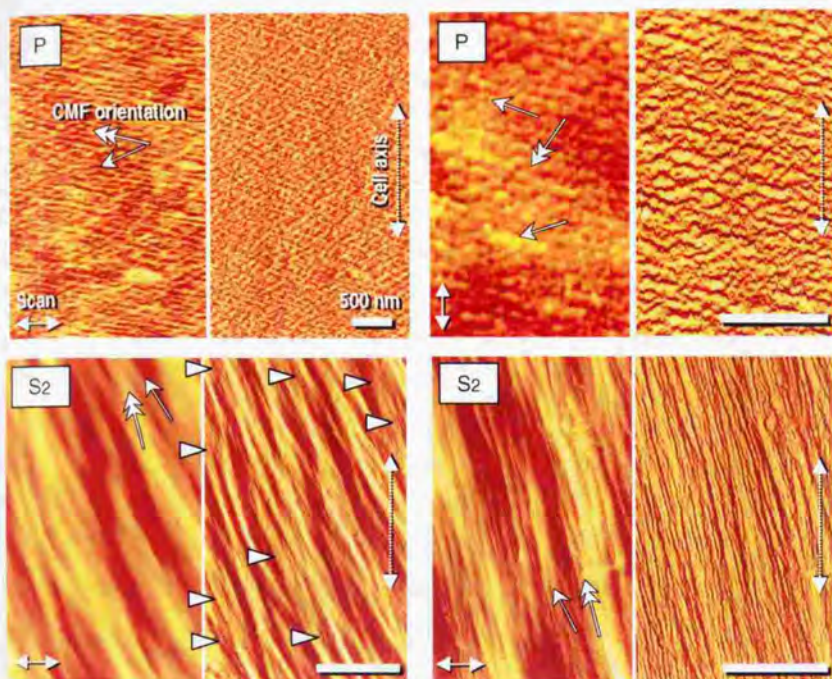
細胞壁内表面 (形成面) における CMF の 3 次元構造は、一次壁と二次壁とで大きく異なっていた。Fig. 4-5 の断面プロファイルが示すように、一次壁内表面 (P) は、二次壁内表面 (S<sub>1</sub>, S<sub>12</sub>, S<sub>2</sub>) に比べて極めて平坦である。内表面に現れている繊維状の構造物は、その形状・配向状態から、CMF であるといえる。細胞壁内表面では、CMF が比較的平行に堆積してラメラ (薄層) を形成し、ラメラが積み重なって壁層を形成すると考えられるため、まず、一次壁と二次壁におけるラメラ形成様式の違いを比較・検討した。一次壁の CMF は細いストライプ形状を有し、およそ 40 から 80 nm の間隔をあけて、直線的で平行に配列し、ラメラを形成していた (Figs. 4-5, 4-6)。二頭矢印 (double-headed arrow) に平行なラメラは 単頭矢印 (single-headed arrow) のラメラの上に (より内表面に)、交差するように積み重なったと考えられる。さらに、ラメラは交差構造を示しながら、主として細胞の拡大方向である放射方向に配向していた。Fig. 4-6 右上の P については、3 方向交差の可能性があるが、下 2 層 (単頭矢印) の上下関係は不明である。なお、この像 (Fig. 4-6 右上) については、CMF 配向に対し垂直方向



**Figure 4-5** Aqueous mode AFM height images of freshly-formed CMFs on the tracheid cell wall surface together with profile curves (traced along solid lines) showing the change in the CMF morphology from the primary (P) to the secondary wall layers (S1, the transitional layer S1→S2 and S2).

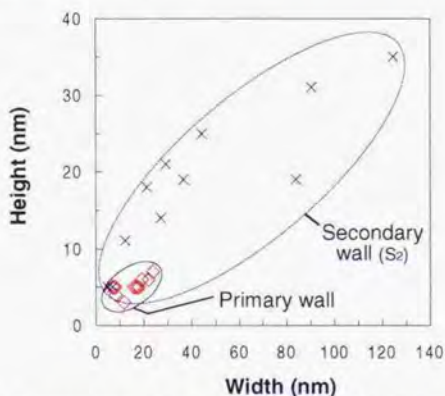
**Note:** Relatively upper positions in the images are represented by brighter color. The cell axis and the scanning direction are shown on the right side and the bottom left of each image, respectively; double-headed arrows indicate newly-formed CMFs overlying the preformed ones noted by single-headed arrows; the circled arrow in P and the large arrow head in S2 show the main direction of cellular expanding growth during P wall formation and the twist-like CMF structure, respectively; bar = 500 nm.





**Figure 4-6** Aqueous mode AFM height images (left) and corresponding error signal images (right) of freshly-formed CMFs on the P and S2 surfaces.

**Legend:** P, S2, arrows on the right side and the bottom left : see Figure 4-5; arrowheads: see text ; Bar: 500 nm.





にチップを走査させたため、表面の凹凸構造が Fig. 4-5 の P に比べて鮮明に見えるが、断面プロファイル上での凹凸の高低差はほぼ同じであり、いずれも二次壁に比べて極めて平坦な内表面であった。また、CMF の幅が、部分的に膨れたように見える箇所があるが (Fig. 4-6 右上の P、特に中央付近の明るい部分)、これについては、観察前の化学処理が極めて弱いため、特に非セルロース成分を多く含む一次壁の場合、その一部が残留した可能性がある。上記のように、一次壁のラメラは、直線的で平行に配列した CMF から成り、細胞の拡大方向に配向する傾向があった。仮道管一次壁の CMF が、直線的で平行な配列を有することについては、従来からその提案はあったものの (原田, 1984)、これまで観察されていなかった。本研究では未乾燥の CMF を観察したことにより、乾燥による変形・破壊のない、より *in situ* の状態に近い堆積構造が観察できたと考えられる。さらに、プロファイル分析により 3 次元解析した結果 (Fig. 4-7)、一次壁 CMF の細いストライプ形状は、幅 5 から 25 nm、高さ (内表面に垂直方向) は 3 から 7 nm を示すものであった。この結果は、一次壁が、厚さ数 nm 程度の薄いラメラの積み重なりによって構築されることを示唆する。一本の CMF 幅が、仮道管について約 2 から 4 nm と報告されていることから (後藤ら, 1972; Hanna and Côté, 1974)、上記のストライプ形状は、単独、あるいはごく数本の CMF が凝集したものであると考えられる。これは、後述する二次壁 CMF の凝集と比べてごくわずかな凝集の程度である。一次壁 CMF についての以上の結果は、考察で詳しく述べるが、2 章で提案したセルロース結晶化に対する物理的ストレスが、CMF 堆積構造にも影響を与え、平行な配向を促すとともに凝集を妨げた可能性を示唆している。

一方、二次壁の CMF は、一次壁に比べて巨大な凝集体を構成し、細胞壁内表面ははるかに凹凸に富んでいた。Fig. 4-5 の S1, S12, S2 に示すように、二次壁の CMF は集合して太い束状となり、細胞壁内表面に凹凸に富んだ厚いラメラを形

成していた。この束状の凝集構造は、幅 5 から 140 nm、高さ 5 から 30 nm 以上にも及んでいた (Fig. 4-7)。Fig. 4-6 右下の S2 には、詳細な構造が現れており、CMF 凝集体が複数の CMF から成ることを示している。さらに、Fig. 4-5 の S2 についても、そのエレーシングナル像 (Fig. 4-6 左下) との比較により、凝集体に複数の CMF が存在することを確認できる (arrow heads, Fig. 4-6 左下)。従来、仮道管の二次壁は、厚さ数 nm (1 本の CMF 幅に相当) のラメラが積み重なって構成すると考えられてきたが (今村ら, 1972b; Scallan, 1974; Hirakawa and Ishida, 1981)、水中 AFM 観察の結果、二次壁のラメラは CMF の凝集状態の違いのために、一次壁のラメラよりも厚いことが明らかとなった。CMF 凝集体の内部で CMF が強く凝集しているのか、緩やかな集合体であるのかについては、実験の項に記した AFM チップ回り込み効果のため解析が困難であるが、上記のように、観察時の分解能が必ずしも一定ではなかったこと、また、走査速度を変えたときに像にゆらぎを生じやすかったことから、CMF 凝集体はかなり柔らかい可能性がある。さらに、CMF の束がねじれるように見える箇所も観察された (arrow head, Fig. 4-5 S2)。前章までに、二次壁のセルロースが、比較的ストレスを欠く環境下において、主として Ip として結晶化するとのモデルを提示したが、本章の観察結果は、同様の環境で CMF が自由に凝集する可能性を示唆している。凝集体が CMF の自己凝集のみによって形成されたのか、CMF と親和性のあるヘミセルロースが関与したのかについては定かでないが、いずれにせよ、拡大生長後の比較的ストレスを欠く時期には CMF が凝集しやすい環境下であり、一次壁に比べて大きな柔らかい堆積構造が形成されるとして理解することができる。

二次壁内表面のラメラ構造を詳細に見ると (Fig. 4-5)、最内層のラメラ (二頭矢印)、その直下のラメラ (単頭矢印) とともに、CMF 凝集体の間に隙間が認められる。従来、仮道管二次壁のラメラについては、CMF が密に堆積するため隙間

のない薄層になるとする説と（今村ら、1972b; Scallan, 1974）、ラメラに隙間が残るとする説（Kerr and Goring, 1975; Abe *et al.*, 1991）があるが、上記の観察結果は、古いラメラに隙間が残されたまま、新たなラメラが積み重なることを示唆している。したがって、仮道管の二次壁の骨格構造は、CMF 凝集体の間に隙間を残した厚いラメラの積み重なりとして構築される可能性がある。このラメラ構造については、次章の TEM 観察でさらに検討する。なお、二次壁のラメラ厚は、従来想定されていた数 nm よりもかなり厚いといえるが、細胞壁完成後（他成分の沈着後）の最終的な厚さについては定かでない。これは、CMF 凝集体が、他成分との相互作用、あるいは脱水により、変形・収縮する可能性があるからである。

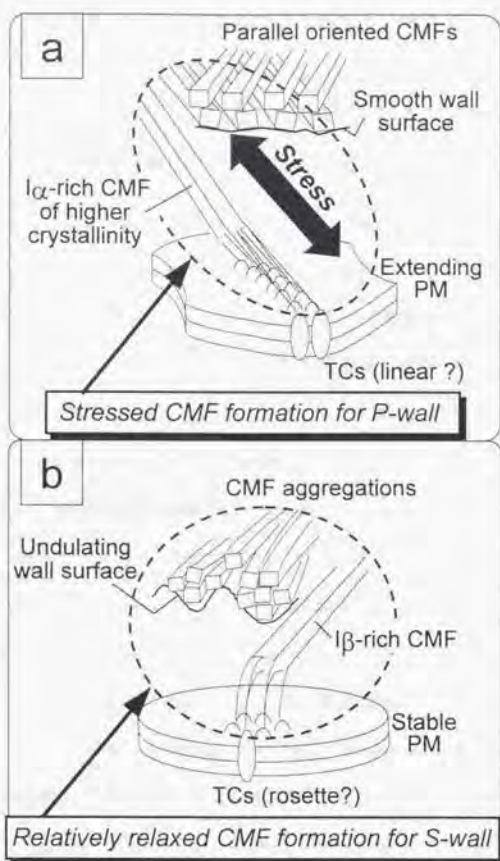
以上のように、二次壁の CMF が、比較的ストレスを欠く環境下で自由に凝集化する可能性が示されたが、このような環境は、CMF の配向変化にも効果を与える可能性がある。1 章で述べたように、植物細胞壁における規則的な CMF の配向変化については、従来の微小管制御説だけでなく、カイラルネマティック液晶類似の配向回転構造として、これを物理化学的に捉える説が提示されている。仮道管二次壁についても、CMF が比較的ストレスを欠く環境下で自由に凝集し、このような規則的な配向回転構造を形成する可能性がある。そこで、本章においてその解析を試みた。Fig. 4-5 の S1、S12、S2 において、凝集した束状の CMF がラメラを成し（二頭矢印）、以前に形成された表面（単頭矢印）の上に、異なる角度で積み重なる様子が現れている。これは、S1 → S12 → S2 と、CMF 配向が仮道管内こうから見て右回りに変化する過程が、交差構造として現れたと考えられる。本章では、これ以上回転の規則的を解析するには至らなかった。CMF 配向の変化を解析するには多数の測定点が必要であるが、実験の項に記したように、AFM ではそれが困難だからである。そこで、次章の透過型電子顕微鏡（TEM）観察により、二次壁 CMF の配向変化を詳細に検討することとした。

#### 4. 4. 考察

未乾燥の一次壁形成表面における CMF は、ほとんど凝集せず、直線的で平行に配列し、主として細胞壁の拡大方向に配向していた。さらに、CMF 同士の凝集はわずかであった。一方、二次壁の CMF は凝集して太い束状となり、その堆積構造は凹凸に富んでいた。2 章において、一次壁セルロースは、二次壁セルロースよりも結晶化度が高く、ストレス誘発型である熱力学的に準安定な三斜晶の  $I\alpha$  に富むことを明らかにした。この要因として提案したのは、一次壁セルロースの結晶化と細胞の拡大生長とが同時に進行するため、分子鎖方向に延伸ストレスが発生し、それが結晶化に作用するとの考えである。本章の結果は、この考えを支持するとともに、延伸ストレスが、結晶化 ( $\text{\AA}$  オーダー) のみでなく結晶化により形成された CMF の堆積構造 (nm オーダー) にも影響を及ぼす可能性を示唆している。そこで、2 章で提案したセルロース結晶化のモデル (Figs. 2-11a, b) に、本章で得た CMF 堆積構造についての知見を加え、新たに修正モデルとして Figs. 4-8a, b に示し、メカニズムを考えた。このメカニズムにおいて、一次壁セルロースは (Fig. 4-8a)、結晶化から細胞壁への堆積までの過程を通し、細胞拡大にともなう分子鎖方向の延伸ストレスを受けやすいため、ストレスに引き起こされた結晶構造となるだけでなく、結晶化した CMF が直線的で平行に配向させられ、かつ CMF 同士の凝集が妨げられて構築されるとした。

一方、二次壁の CMF がより巨大な凝集体を形成していたことから、二次壁 CMF の堆積時には物理的ストレスがあまり作用せず、CMF が自己凝集しやすい環境下にあると仮定した。そこで二次壁セルロースについても、2 章で提案したモデルを修正し、次のようなメカニズムを提案する。二次壁セルロースについては (Fig. 4-8b)、比較的ストレスを欠く環境下にあるため、結晶化から細胞壁への堆積までの過程を通し、ストレスの影響を受けない結晶構造をとるだけでなく、形成し





**Figure 4-8** Schematic representations of stressed (a) and relatively relaxed (b) formation models for the tracheid primary (P) and the secondary (S) wall CMFs, respectively, which may occur between the cellulose-synthesizing terminal enzyme complexes (TCs) on the plasma membrane (PM) and cell wall to determine not only the crystalline structure but also the morphology of CMFs.



た CMF が自由に凝集して巨大な凝集構造を形成し、細胞壁を構築していくとした。二次壁表面の形成メカニズムとしては、二次壁が一次壁に比べ巨大な CMF 凝集体から構成されるために、一次壁よりも厚いラメラが形成され、さらに配向の異なる次のラメラが積み重なり、細胞壁を構築していくと考えた。

以上の結果は、従来の電子顕微鏡による CMF 観察結果をどのように説明するのであろうか。一次壁 CMF が直線的で平行に配列してラメラを形成し、交差していたことは、原田 (1984) のモデル (Fig. 1-3) を実証する結果である。また、一次壁 CMF が堆積するとき、その配向が仮道管軸の垂直方向に傾いていたことも、Wardrop (1958) の結果と一致する。一方、今村ら (1972a) および Abe ら (1995a) は、仮道管拡大生長の初期段階においては、CMF が仮道管のやや軸方向よりに堆積し、拡大生長 (放射方向) が進むにつれて、軸垂直方向に堆積する傾向があると報告している。本章の AFM 観察においては、拡大初期の幅の細い仮道管に AFM チップを着地させることが困難であったため、拡大生長の後半期にある仮道管を観察しており、今村ら (1972a) および Abe ら (1995a) の結果と矛盾しない。なお、彼らが報告したのは、形成直後の CMF が堆積するときの配向であり、マルチネット成長説 (例えば、Roelofsen, 1965) が指摘する CMF 堆積後の配向変化とは異なることに注意を要する。後者は、堆積後の CMF が細胞の拡大による延伸力を受け、徐々に再配向させられることを意味する。一方、Abe ら (1995a) は、CMF 堆積時の配向に関する上記の観察結果について、次のように説明している。拡大生長の後半期に、CMF が仮道管の軸垂直方向に堆積することにより、放射方向 (軸垂直方向) への拡大に歯止めがかかり、やがて拡大生長が終了に向かうとする考え方である。これは、細胞が膨圧によって拡大生長するとき、CMF がどの方向に堆積するかということが、拡大方向を左右するとする考えに基づいている (例えば、Green, 1980)。実際には、仮道管の放射方

向への拡大生長は、CMF が軸垂直方向に堆積した後も継続し、二次壁 S<sub>1</sub> 形成のごく初期まで終了しないため (Abe *et al.*, 1997)、特に拡大生長の後半期に形成される CMF については、それが一次壁に堆積した後に延伸されるだけでなく、CMF として形成される時点で、すでに細胞拡大のストレスを受ける可能性がある。また、拡大生長の初期段階においても、CMF 配向が完全な軸方向ではなく、かなり傾いて堆積するため (今村ら, 1972a; Abe *et al.*, 1995a)、同様のストレスが発生しうることを否定できない。このように考えると、2 章において明らかにしたように、一次壁形成中にセルロースの結晶化度が一旦増加したことと、上記の今村ら (1972a) および Abe ら (1995a) の観察結果との相関の可能性が示唆される。仮道管拡大生長の初期段階においては、一次壁セルロースに対する延伸効果が比較的弱く、拡大生長が進行するにつれてその効果が高まる可能性がある。

一方、二次壁 CMF の配向変化とその規則性については、不明な点が残った。特に、二次壁構築時には、セルロースの結晶化による CMF 形成とその堆積が、比較的物理的ストレスを欠く環境下で進行すると考えられるため、二次壁 CMF が自由に集合し (Revol *et al.*, 1992)、カイラルネマティックな回転構造 (例えば、Roland *et al.*, 1993; Revol *et al.*, 1992) を構築する可能性についての疑問である。そこで、次章の TEM 観察においては、二次壁における CMF 配向変化の規則性を詳細に解析する。

5. 1. 緒言

近年、植物細胞壁の形成過程におけるセルロースミクロフィブリル (CMF) 配向の変化を、微小管による生体制御 (例えば, Helper and Plalevitz, 1974; Gunning and Hardham, 1982) だけでなく、セルロース自身の液晶形成に帰する考え方 (例えば, Roland *et al.*, 1987; Vian and Reis, 1991; Revol *et al.*, 1992) が示されている。両説は、形成直後の CMF 群が配列して薄層 (ラメラ) を形成し、これが積み重なって細胞壁骨格を構築するという点で一致しているが、ラメラが積み重なるときに CMF の配向が変化する理由を異にしている。微小管制御説の根拠は、原形質膜のすぐ内側に存在する表層微小管と、CMF の配向がよく一致すること (例えば, Helper and Plalevitz, 1974; Gunning and Hardham, 1982; Seagull, 1989)、そしてコルヒチン処理で微小管の重合を阻害すると CMF の配向に乱れを生じたり、一方向だけに配向が偏る現象を生ずることである (Pickett-Heaps, 1967; Helper and Plalevitz, 1974; Itoh, 1976; Takeda and Shibaoka, 1981; Seagull, 1989)。針葉樹仮道管についても、CMF と微小管の配向の一致を示す多くの研究結果がある (Fujita *et al.*, 1974; Hirakawa, 1984; 伊東, 1986; Inomata *et al.*, 1992; Abe *et al.*, 1995a; Abe *et al.*, 1995b)。その一方で、様々な植物の表皮細胞 (epidermal cell)、柔細胞 (parenchyma cell)、石細胞 (stone cell)、厚角細胞 (collenchymatous cell)、スクレレイド (sclereid)、道管要素 (vessel element) などの細胞壁には、カイラルネマティック液晶類似的な規則的な CMF 配向回転構造 (ヘリコイド構造, Fig. 1-2) が存在することが示されてきた (例えば, Kishi *et al.*, 1979; Nanko *et al.*, 1978; Neville and Levy, 1984; Roland *et al.*, 1987; Vian and Reis, 1991; Roland *et al.*, 1993)。ヘリコイド構造は、ほぼ同時期に形成された CMF がラメラとして細胞壁に積み重なるときに、一定の角度で配向を回転させるカイラルネマティック液晶類似的な構造である。当初は、セルロ

ース骨格に他の多糖類が側鎖となって機能する結果、液晶類似の構造が形成され  
ると考えられていたが (Vian and Reis, 1991)、セルロース結晶自身が、このカイ  
ラルネマティック液晶類似の構造を形成できることが明らかとなっている (Revol  
*et al.*, 1992)。針葉樹仮道管あるいは仮道管と同様の二次壁構造を有する広葉樹木  
部繊維についても、厚層3層 (S1, S2, S3) 間の移行層 (S12, S23) に、不完全な  
がらヘリコイド構造が存在するとの報告がある (Roland and Mosiniak, 1983; 原田、  
1984)。

現在のところ、CMF の配向が生体制御されているのか、あるいは物理化学的  
な液晶形成同様のメカニズムで規則的に変化するのかについては、針葉樹仮道管  
を含めて混沌としている。生体制御に関わる微小管の運動には、細胞質の骨格た  
るアクチンフィラメントや中間繊維が関与するとの考え方が提示されているが  
(Seagull, 1991)、ヘリコイドのような CMF 配向変化を制御できる系であるかど  
うかは不明である。一方、自発的なカイラルネマティック構造形成を支持する現  
象として、コルヒチンによって微小管の重合を阻害したときに、ヘリコイド構造  
の回転周期は変化するものの、ヘリコイド構造自体は形成されるとの報告 (Vian *et al.*  
1982) がある。さらに、セルロース結晶自身のカイラルネマティック構造形  
成能 (Revol *et al.*, 1992) を考慮すると、上記の表皮細胞など CMF の規則的な配  
向回転構造が連綿と引き続く細胞壁について、配向変化の推進力 (driving force)  
がカイラルネマティック構造形成能である可能性を否定できない。上記の Roland  
と Mosiniak (1983) は、広葉樹木部繊維の二次壁移行層 (S12, S23) における CMF  
の配向変化を、カイラルネマティック構造の形成として捉え、厚層3層 (S1, S2,  
S3) については、何らかの理由により CMF 配向が変化しないと考えた。本章で  
は、現時点におけるカイラルネマティック構造形成説と微小管制御説それぞれの  
妥当性を踏まえ、針葉樹仮道管二次壁における CMF 配向変化の制御について、



Roland と Mosiniak (1983) の提案を一部変更して、次のように仮定する。まず、移行層 (S12, S23) における CMF 配向の変化は、カイラルネマティック構造の形成である可能性が高いとする。これは上記の理由に加え、前章に述べたように、二次壁 CMF が物理的ストレスを欠く環境下で、自由に構造形成できると推定できるからである。次に、厚層 3 層 (S1, S2, S3) において CMF 配向があまり変化しない原因を、微小管による制御ではないかとする。この考えの妥当性をはかるために、まず、移行層 (S12, S23) における CMF 配向変化の詳細を明らかにし、カイラルネマティック液晶を示唆するほどの規則的な回転構造であるか否かを確かめる必要がある。

仮道管二次壁の移行層 (S12, S23) における CMF 配向の変化については、仮道管内こうから見て常に時計回りに変化する説と (Roland *et al.* 1987)、S12 と S23 では回転の方向が異なり、S2 を境に反転するとする説 (例えば、Abe *et al.* 1991; 1992) の相反する 2 説がある。しかし、いずれの説においても、CMF 配向の回転周期あるいは角度変化の規則性については不明な点が残されている。一方回転型モデルは、Roland と Mosiniak (1983) が、広葉樹木部繊維の二次壁移行層 (S12, S23) に観察した不完全なヘリコイドパターン、すなわち「セミヘリコイド (Neville and Levy 1984)」パターンの解釈から導かれたものであり、CMF 配向が徐々に変化することは確かであるが、一定の角度で回転するのか否かが定かでなく、回転方向の解釈についても疑問が残ることは、1 章にも述べたとおりである。一方、S2 を境に CMF 配向の回転が反転するとの説は、TEM または SEM により、細胞壁の内表面 (形成面) や壊裂面などに現れた CMF を観察した例に多い。この手法でヘリコイド構造のようなラメラの積み重なりを解析するためには、細胞壁の形成に伴う CMF の配向変化を定量的に解析し、3 次元の積み重なりを再構築する必要があるが、従来このような定量解析は行われていない。以上



のように、確固とした解答が得られていない状況で、二次壁の CMF 配向の変化とその規則性を定量的に明らかにすることは、現象解明としての意義はもちろん、加えて二次壁 CMF が堆積する際の物理化学的環境を推定するという意味においても、すでに2～4章で行った提案を確認するために重要である。

そこで本章では、レプリカー-TEM 法を用い、二次壁の形成段階を正確に区分して、CMF 配向角度（マイクロフィブリル傾角）の頻度分布、配向が変化する際の回転角度、回転方向を定量的に解析することにより、CMF がどのように配向を変化させ、ラメラが積み重なるのかを解析した。

## 5. 2. 実験

### 5. 2. 1. 試料

早材を形成中の 33 年生ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Endl.), 35 年生スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don), 33 年生アカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. and Zucc.) から、2 章と同様に木部分化帯のまさ目切片 (厚さ 60  $\mu\text{m}$ ) を、さらに 3 章と同様に細胞壁形成段階別の板目切片 (厚さ 60  $\mu\text{m}$ 、ヒノキのみ) を切り出して供試試料とした。なお、ヒノキは、1988 年 6 月 23 日、スギおよびアカマツは、1990 年 6 月 22 日に、京都大学演習林 (京都市) において採取した。これらの切片を 4 章と同様に有効塩素濃度約 3% の次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理し、仮道管細胞壁の内表面 (形成面) を露出させた。さらに蒸留水で洗浄後、第三ブチルアルコールにより凍結乾燥し、デシケータに保存した。

### 5. 2. 2. レプリカ法-TEM 観察

木部切片上の仮道管細胞壁の内表面に、白金パラジウムを 60 度の角度で仮道管軸方向から蒸着し、さらに回転試料台でカーボンを均一に蒸着して、レプリカ膜を作成し、レプリカ膜の上からポリスチレンで補強した。これを 62% 硫酸とジェフレー氏液に交互に浸せきして、木材成分を完全に溶解させた後 (今村ら, 1972a)、レプリカ膜が上になるようにトルエン液の表面に浮かべ、ポリスチレンを溶解させた。レプリカ膜を液面に浮かべたのは、膜の表裏を見誤らないためである。トルエン液表面に浮かぶレプリカ膜を銅メッシュにすくい、透過型電子顕微鏡 (TEM: 日本電子製 JEM-100C) を用いて、加速電圧 100 kV で観察した。CMF 配向の細胞軸に対する角度 (ミクロフィブリル傾角) の測定には、8000 から 20000 倍の TEM 写真を用い、ヒノキ放射壁 (まさ目) について TEM 写真 92 枚の 233

箇所、ヒノキ接線壁（板目）について TEM 写真 48 枚の 106 箇所、スギ放射壁について TEM 写真 96 枚の 233 箇所、アカマツ放射壁について TEM 写真 98 枚の 221 箇所それぞれおこなった。ミクロフィブリル傾角の測定は、仮道管内表面に観察された CMF のうち、約 4 度以下のばらつきで比較的平行に並ぶ CMF 群（ラメラ）ごとに平均の角度を測定した。ラメラの重なるの上下関係については、上層ラメラの存在により下層ラメラのシャドウイングが妨げられることから判断した。ヒノキ放射壁の TEM 写真 86 枚の各々を 4 つの等面積のブロックに区切り、傾角（配向）が異なるラメラ間の上下関係を、各ブロックにつき以下のように測定した。例えば、傾角 A、B を有するラメラについて、B の上に A が重なっていると判断できる箇所があれば、1 つのブロック内で同じ上下関係が何箇所認められても、B から A への重なりとして 1 回のみ数え、同ブロックに逆順の重なりが認められれば、同様に A から B を 1 回のみ数えた。なお、ヒノキまさ目切片の一部は、金蒸着した後、走査型電子顕微鏡（日本電子製 JEM-T330）を用いて観察し、仮道管の細胞壁形成段階を特定するのに利用した。

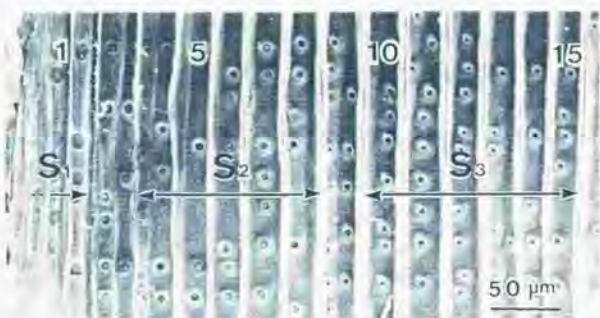
### 5. 3. 結果

#### 5. 3. 1. ミクロフィブリル配向変化の規則性

仮道管二次壁における CMF 配向変化の規則性を解析するため、まず、二次壁形成段階別に CMF 配向の頻度分布を調べ、変化の傾向を解析した。Fig. 5-1 に示すように、ヒノキまさ目切片上において、仮道管細胞壁は壁形成の段階順に一列に配列していた。そこで、SEM 観察において、最初に S1 の堆積が認められる仮道管を No.1 として、壁形成が進行する順に No.15 まで、仮道管列に番号付けした。これは、以下の CMF 配向の解析において、壁形成段階を明らかにするためである。列 Nos.1~2 の仮道管は、S1 を堆積中、No.3 の仮道管は S1<sub>2</sub>、Nos.4~8 の仮道管は S2、No.9 の仮道管は S2<sub>3</sub>、Nos.13~15 の仮道管は S3 あるいはほぼ状態層を堆積していた。同一ブロックから得た他のまさ目切片についても同様に観察し、仮道管列と二次壁形成段階の関係が、ほぼ同じであることを確認した。

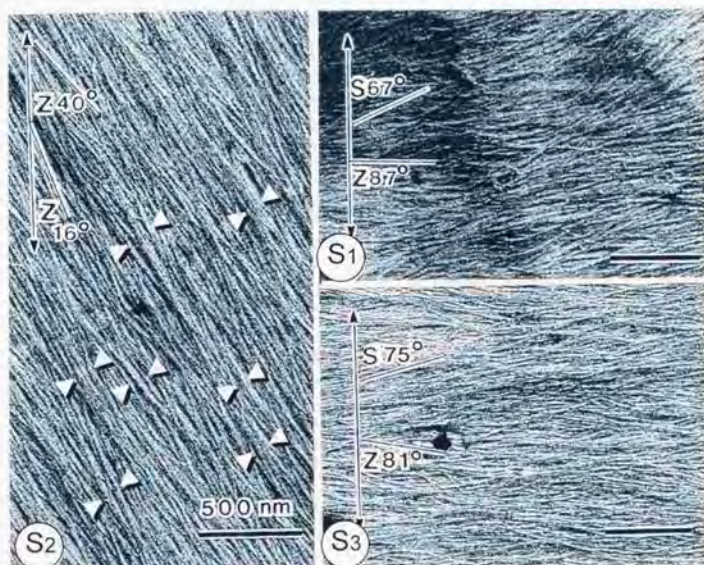
Fig. 5-2 に、ヒノキ仮道管の二次壁内表面（形成面）の TEM 像を示す。前章の AFM 像に比べ、より詳細な構造が現れているように見えるが、これは、シャドウイング効果によって細かな凹凸構造のエッジが強調されているためである。このため、個々の CMF 配向が明瞭となる反面、AFM で観察されたような大きな凝集構造は不明瞭となる。しかし詳細に見ると、同図中に矢印の頭（arrow head）で示したように、CMF が集合して束状化している様子を随所に認めることができた。Fig. 5-2 において、S1、S2、S3 いずれの内表面でも、比較的平行な CMF 配列が 2 方向にラメラを形成し、交差構造を呈していた。ラメラの交差構造は、CMF が配向を変化させた結果であるから、二次壁における CMF 配向の変化の規則性を考えるにあたっては、この構造を定量的に解析することが必要である。なお、従来の報告では、S2 に交差構造はないとされてきたが、本観察においては、





**Figure 5-1** A radial section of differentiating xylem of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress). Developing tracheid cells forming the outer (S1), middle (S2) and inner (S3) layers of the secondary wall are displayed.

**Legend:** 1 to 15: the tracheid numbers mentioned in the text.



**Figure 5-2** Replica-TEM images of newly-formed CMFs on the S1, S2 and S3 surfaces of developing *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheid cell walls.

**Legend:** Arrows with S, Z-helix: tracheid axis and CMF angle; Arrow heads: CMF bundles; S1, S2 and S3: see Figure 5-1.

Fig. 5-2 のように、二次壁すべての壁層に2方向あるいは3方向の交差構造が認められた。交差角度は、Table 5-1 に示すように、S2 以外の壁層について約 20 から 30 度、S2 では約 10 から 15 度であった。このように、二次壁の全壁層に交差構造が存在していることは、言い換えれば、CMF が常に配向を変化（仮道管軸に対して回転）させていることになる。そこで、配向変化の傾向を解析するために、配向の回転方向と、回転角度を以下のように解析した。ヒノキ仮道管の二次壁内表面（形成面）で観察された CMF について、仮道管軸に対する配向角度（ミクロフィブリル傾角）を計測した結果を、Fig. 5-3 の頻度分布図に示す。横軸は、仮道管軸方向を 0 度、軸垂直方向を 90 度とし、回転方向については S/Z らせん の角度であらわした。同図右には、S/Z らせん表記法を示す。上段は S1 から S12 形成中の比較的若い仮道管からの測定結果、中段は S2 形成中、下段は、S23 から S3 形成中の仮道管からのものである。この図において、配向角度の測定値は、アルファベット (A-M) で印したように集団化している。この理由としては、CMF 配向が回転する時に、上記のように 20 から 30 度の角度変化として起こるため、つまり連続的ではなく段階的な角度変化をするため、その角度変化の足取りが、集団化として頻度分布上に現れたと考えられる。A から M の配向角度群（angle group）それぞれの平均角度を Table 5-2 に示す。隣接する配向角度群（例えば、AB 間）の角度差が、S2 を示す G, H, I 間について 12 度前後と小さく、その他の壁層については約 20 から 30 度であり、Table 5-1 の交差角とよく一致することから、上記の考え方が妥当であることが示される。そこで、これらの配向角度群が、二次壁形成のどの時期にどの順で現れたかということが、CMF 配向の変化傾向を表すと考え、詳細に調査した結果を Table 5-3 に示した。この表は、より形成層に近い仮道管（仮道管 No.1）から ABC の配向角度が測定され、それよりも一列成熟側にある仮道管（No.2）からは D を加えた ABCD の角度が、さらに成熟

**Table 5-1** Crossing angles of CMFs observed on the newly-formed cell wall surfaces

Species	Crossing angles [averages, degrees]				
	S1	S12	S2	S23	S3
<i>Chamaecyparis obtusa</i> [R]	23-26 (4-6)	23-25 (4)	13-16 (2-4)	25 (6)	20-21 (3-4)
<i>Chamaecyparis obtusa</i> [T]	18-26	22-24	11-14	23	22
<i>Pinus densiflora</i> [R]	22-23	23	12-14	20-22	23
<i>Cryptomeria japonica</i> [R]	19	19-20	10-12	22	20-21

**Legend:** R: radial wall; T: tangential wall; S1, S2 and S3: see Figure 5-1; S12 and S23: transitional layers from S1 to S2 and from S2 to S3; ( ): standard deviation.

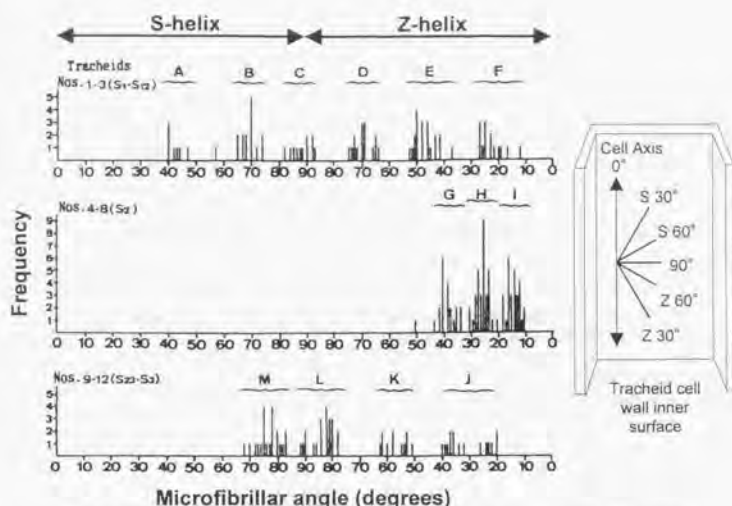
**Note:** Averages are calculated for each tracheid in which the layers from S1 to S3 appeared.

**Table 5-2** Angle groups of CMF orientation observed on the newly-formed radial cell wall surfaces

Angle groups	Helix / CMF angles [averages, degrees]		
	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	<i>Pinus densiflora</i>	<i>Cryptomeria japonica</i>
A	S42 (1.6)	S70	S24
B	S69 (2.6)	Z84	S48
C	S88 (3.4)	Z56	S60
D	Z70 (3.3)	Z33	S83
E	Z47 (4.2)	*Z35	S81
F	Z23 (4.2)	*Z24	Z64
G	*Z38 (2.7)	*Z11	Z42
H	*Z26 (2.1)	Z35	*Z25
I	*Z14 (2.3)	Z55	*Z14
J	Z31 (7.2)	Z77	*Z6
K	Z57 (4.0)	S79	*S4
L	Z84 (4.1)		Z36
M	S77 (4.0)		Z57
N			Z85
O			S73

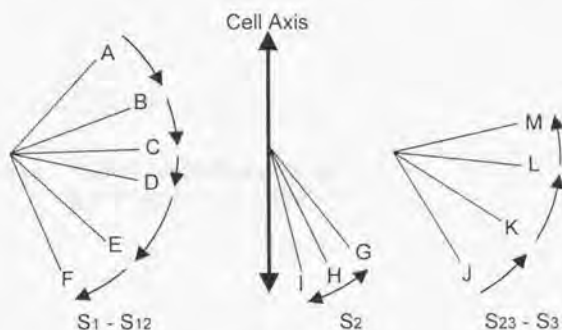
**Legend:** A to O: see text and Fig. 5-3; S: S-helix; Z: Z-helix (see Figure 5-3); \*: observed for S2; ( ): standard deviation.





**Figure 5-3** Frequency distributions of CMF orientation angles for *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheid cell walls (Left) together with a schematic showing of the S- and Z-helix expression (Right).

**Note:** CMF angle groups marked by alphabet letters (A to M) typically appeared in an alphabetical order during cell wall development (see table 5-3).



**Figure 5-4** Schematic showing of CMF rotation observed on the developing tracheid wall surface of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress).

**Legend :** A to M : angle groups (see Fig. 5-3 and text); S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> and S<sub>3</sub>: see Figure 5-1; S<sub>12</sub> and S<sub>23</sub>: transitional layers from S<sub>1</sub> to S<sub>2</sub> and from S<sub>2</sub> to S<sub>3</sub>.



**Table 5-3** Tracheid numbers and angle groups of CMF orientation found on the tracheid of each number.

Tracheid numbers	Angle groups found on radial walls		
	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	<i>Pinus densiflora</i>	<i>Cryptomeria japonica</i>
1	A ~ C	A, B	A ~ E
2	A ~ D	A, B	A ~ E
3	C ~ F	B ~ D	D ~ G
4	G ~ I	E ~ G	H ~ J
5	G ~ I	E ~ G	H ~ J
6	G ~ I	E ~ G	H ~ J
7	G ~ I	E ~ G	H ~ K
8	G ~ I	E ~ G	H ~ K
9	J ~ L	E ~ G	H ~ K
10	L, M	E ~ G	H ~ K
11	L, M	E ~ G	H ~ K
12	L, M	E ~ G	L ~ N
13		E ~ G	N, O
14		H ~ J	N, O
15		I ~ K	
16		J, K	

**Legend:** Tracheid numbers: see text and Fig. 5-1 ; A to O : angle groups in Fig. 5-3 and Table 5-2.

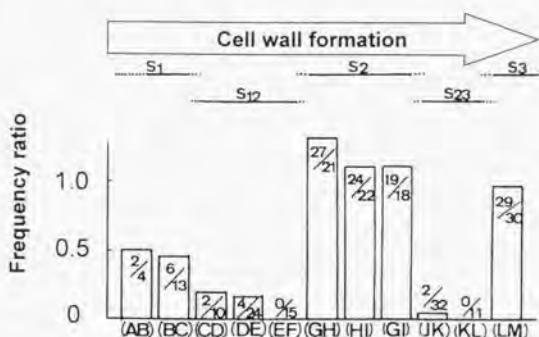
側 (No.3) では AB の角度はもはや測定されず、CDEF の角度が測定されたことを意味する。このことから、CMF 配向が変化する方向は、A から M へとアルファベット順に回転する方向であることが示唆される。この変化を模式的に表したのが Fig.5-4 である。① 仮道管二次壁の CMF 配向は S らせん 40 度付近を起点として、仮道管内こうからみて時計回りに回転を始め (A → B → C: S<sub>1</sub> 形成期)、② 軸垂直方向 (90 度) を超え (C → D: S<sub>1</sub> 形成期)、③ Z らせんとなって軸方向 (0 度) に近づき (D → E → F: S<sub>12</sub> 形成期)、④ Z 25 度付近に達した後 (G → H → I: S<sub>2</sub> 形成期)、⑤ 逆回りに回転し (J → K: S<sub>23</sub> 形成期)、⑥ 軸垂直方向 (90 度) 付近で停止する (L → M: S<sub>3</sub> 形成期)。すなわち、二次壁における CMF の配向挙動として、S らせんの S<sub>1</sub> から、まず内こうから見て時計回りに回転し、Z らせんの S<sub>2</sub> に達した後は反時計回りに回転して軸垂直方向付近の S<sub>3</sub> に達するという変化を示す結果となった。これは、S<sub>2</sub> を境に CMF 配向の変化が反転するとする説を支持するものである。もし、Roland ら (1987) が提案するように CMF 配向が一方向のみに回転するのであれば、上記④の後、時計回りに回転を続ける CMF 配向が、0 度から S 40 度の間に現れるはずである。しかし、そのような配向挙動は見つからなかった。ここで、本実験においては仮道管細胞壁の形成段階別に統計的な解析をしており、現象の偶然性は考慮されにくいことを述べておく。

上述したように、CMF 配向が変化するときの角度が、かなり一定であることは、Table 5-1 と Fig. 5-3 の頻度分布図に現れている。これらの結果は、CMF 配向が、配向変化の折り返し点である S<sub>2</sub> 形成時を除けば、20 から 30 度の角度で段階的に (不連続に) 変化することを示している。つまり、CMF 配向が S<sub>1</sub> から S<sub>2</sub> へ変化するとき、および S<sub>2</sub> から S<sub>3</sub> へ変化するとき、一定の角度で規則正しく回転することになる。この規則性は、仮道管二次壁の移行層における CMF 配向

変化を、カイラルネマティック構造の形成であるとする説 (Neville and Levy, 1984; Roland *et al.*, 1987; Vian and Reis, 1991; Revol *et al.*, 1992) を支持するものである。なお、以上の結果は、ヒノキ仮道管の放射壁(まさ目)だけでなく、接線壁(板目)についてもほぼ同様であった。さらに、スギ、アカマツの放射壁についても同様の結果となった。

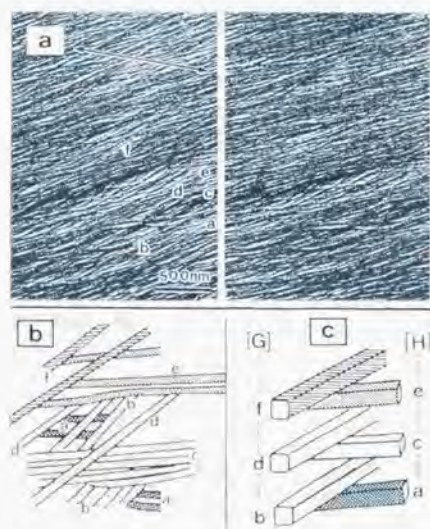
### 5. 3. 2. ミクロフィブリル配向変化とラメラの積み重なり

上記のように、ラメラの交差構造が二次壁全壁層に認められたことから、二次壁の骨格構造は、CMF 配向の異なるラメラが、次々と積み重なることによって構築されると考えられる。しかし、CMF 配向が S1 から S2 へ変化するとき、および S2 から S3 へ変化するとき、それぞれ時計回りおよび反時計回りに回転するだけでは、厚層 3 層 (S1, S2, S3) がどのようにして肥厚するのかを説明できない。CMF 配向は常に変化しながらもラメラを堆積させ、壁を肥厚させている。これを矛盾なく説明する一つの考えとして、CMF 配向の逆回転を考えることが挙げられる。つまり、二次壁全体を通じての CMF 配向回転の規則性は上記解析のとおりであるが、厚みを持つ S1 (配向角度群の ABC 間)、S2 (同 GHI 間)、S3 (同 LM 間) を肥厚するときは、正・逆反復の回転が生じることにより、壁層の厚みを増すのではないかという考えである。そこで、交差構造を示す 2 方向の CMF の上下関係を調べ、配向角度群 (Fig. 5-3) のアルファベット順に上に積み重なっていれば規則通りの正回転、反対ならば逆回転として解析した。結果を Fig. 5-5 に示す。縦軸は、アルファベット順に回転する頻度に対するその逆方向への回転頻度の比率を示す。例えば、横軸 AB におけるグラフ内の数字 2/4、頻度比 0.5 とは、A から B への正回転頻度 4 に対し、B から A への逆回転頻度が 2 であり、逆回転頻度比が 0.5 であることを示す。この解析により、移行層 S12 (CD, DE, EF)



**Figure 5-5** Frequency ratio of reverse CMF rotation to regular (alphabetical) one measured for each pair of adjacent angle groups (parenthesized) of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) tracheids.

**Legend:** Numerals in the figure: (frequencies of the reverse rotation) / (those for the regular one); A to M are: see text and Fig. 5-3.



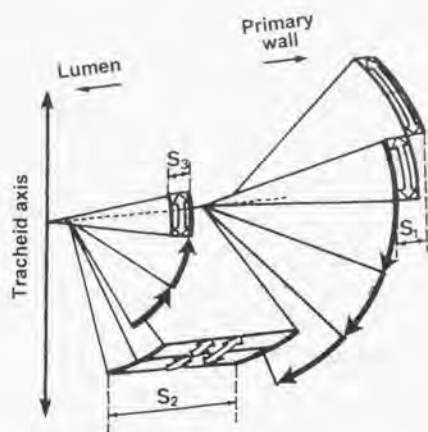
**Figure 5-6** [a] : Stereo pair of replica pictures (reversed); [b] : schematic view of superimposed CMFs from a to f in [a]; [c] : repeated rotation between angle group G and H observed in [a].

**Legend** : Arrow in [a]: the tracheid axis; G and H: see text and Fig. 5-3.



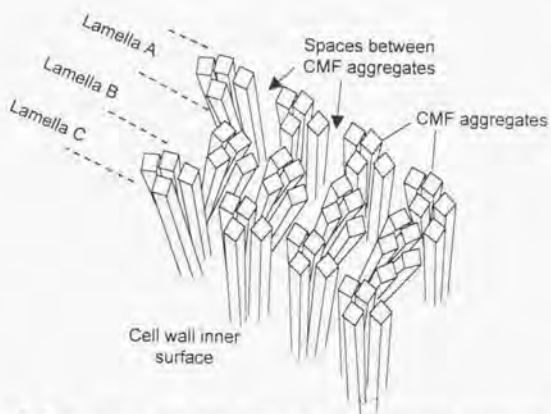
と S23 (JK, KL) においては、逆回転がほとんど起こらないのに対し、S1 (AB, BC)、S2 (GH, HI, GI)、S3 (LM) の厚層 3 層を堆積する間には CMF の正・逆反復回転を頻発することが明らかとなった。さらに、この現象を確認するため、ヒノキ仮道管 S2 の堆積面をステレオ観察した。Fig. 5-6a はステレオ像、同図 b は CMF 積み重なるのスケッチ、同図 c は正・逆回転による堆積の模式図である。CMF は、配向角度群の H に属する角度と G に属する角度の間で、反転を繰り返して積み重なっていく (Fig. 5-6c の a → f) ことが確認された。以上の結果をまとめて、仮道管二次壁における CMF 配向回転とそのラメラ積み重なりについてのモデルを Fig. 5-7 に提示した。おうぎ形の黒矢印は一方向の回転、白抜き矢印は配向の反復を示す。① 仮道管二次壁の CMF 配向は、約 20~30 の角度 (S2 以外) をおいて段階的に規則正しく変化する。② CMF 配向の回転方向は S1 層から S2 層までは、内こうからみて時計回り、S2 層から S3 層までは反時計回り。③ ただし、S1、S2、S3 の 3 層を堆積する間は、配向が振動するように反復して壁層の厚みを増す。

仮道管二次壁のラメラについては、CMF が同一方向に密に並んで堆積するため、隙間のない薄層として形成されるとする説と (今村ら、1972b; Scallan, 1974)、ラメラには隙間が残るとする説 (Kerr and Goring, 1975; Abe *et al.*, 1991) があるが、本章の観察結果は前章と同様、ラメラに隙間が残ることを強く示唆している。この理由は、二次壁内表面において、ラメラが常に 2 方向あるいは 3 方向に交差していたことによる。もし、今村ら (1972b) が提案したように、同一方向の CMF が堆積を続け、最終的にラメラに隙間を残さないのであれば、最内層 (表層) ラメラが下層ラメラに完全に覆い被さった状態、すなわち交差構造を示さない状態が観察されるはずであり、もとより 3 方向の交差構造は観察されないはずである。したがって、ラメラが積み重なるときには、古いラメラに隙間を残したまま、配



**Figure 5-7** Schematic representation of CMF rotation in the tracheid secondary wall.

**Note :** Black arrows on sectors show unidirectional CMF rotation which occurs stepwise by 20 to 30 degrees, whereas white arrows represent repeating changes between adjacent two angles which occur by 20 to 30 degrees (S1, S2 and S3) or smaller degrees (S2) to thicken the typical three layers.



**Figure 5-8** A model for the superimposed lamella structure in tracheid secondary wall. There are certain spaces remained between CMF aggregates in each lamella (A-C).

**Note:** CMF aggregates are expressed as a bunch of four or five CMFs for simplicity in drawing.

向の異なる新たなラメラが積み重なると考えられる。前章の AFM 観察結果を考慮すると、二次壁の骨格構造は、Fig. 5-8 のような CMF 凝集体の間に隙間のある厚いラメラが、Fig. 5-7 のように常に配向を変化させながら積み重なることによって構築されと考えられる。前章に記したように、ラメラの厚さについては、なお不明であるが、少なくとも従来想定されていた数 nm の厚さ（1 本の CMF 幅に相当）よりもかなり厚いと考えられる。さらに、このようなラメラ中の隙間には、他の壁成分（リグニン、ヘミセルロース）が沈着するのではないかと推定される。

#### 5. 4. 考察

本章では、仮道管二次壁における CMF 配向とその変化の規則性を明らかにするため、ヒノキ、スギ、アカマツの二次壁内表面（形成面）をレプリカー-TEM 法で観察し、CMF 配向の頻度分布、回転角度、回転方向を定量的に解析した。CMF の配向は、ほぼ一定の角度（20～30 度）で段階的に変化し、S<sub>1</sub> から S<sub>2</sub> までは仮道管内こうからみて時計回りに、S<sub>2</sub> から S<sub>3</sub> までは反時計回りに回転していた。一方、厚層 3 層（S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>）においては、CMF 配向が変化を続けながらも一方方向に大きく回転せず、振動ともいえる反転（S<sub>2</sub> を除き 20～30 度）を繰り返していた。移行層（S<sub>12</sub>, S<sub>23</sub>）における CMF 配向の変化は、カイラルネマティック液晶類似の構造が形成されたことを示唆する規則的な配向回転であった。これは、前章にも述べたように、二次壁の形成が物理的ストレスを比較的欠く環境下で進行するため、CMF のカイラルネマティック構造形成能が、物理的に阻害されないとする考え方を支持する結果である。一方、このような CMF の配向変化が、微小管により制御された可能性も否定できない。しかし、緒言の項に記したように、現時点においてはカイラルネマティック構造形成説、微小管制御説それぞれの妥当性を踏まえ、規則的な CMF 配向変化を示した移行層（S<sub>12</sub>, S<sub>23</sub>）については前者の観点から、厚層 3 層（S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>）における配向制御は後者の観点からとらえることを提案したい。なお、厚層 3 層についても、カイラルネマティック構造形成中に、CMF 配向の回転方向を左右するような何らかの因子（pH、電解質濃度等）に変化があったとして理解することが可能であるが、S<sub>2</sub> を境に回転が反転した理由は不明である。

植物細胞壁における CMF の配向変化を、ヘリコイドパターンから分析した研究は数多いが、回転角度を詳細に測定した例はわずかである。緑藻類のマガタモ（*Boergesenia forbesii*）の場合、主たる CMF 配向は直交する 2 方向であるが、



その間に、配向が約 30 度づつ回転する移行層の存在が認められている (Mizuta and Wada, 1981)。また、Neville と Levy (1984) は、既往の研究に示されたヘリコイドパターンの写真から、CMF 配向変化の角度を計算し (但し、1 枚のラメラ厚を 10 nm と仮定した)、*Oocystis* (クロレラ目)、*Cymodocea rotundata* (イバラモ目)、*Equisetum hyemale* (トクサ目) についてそれぞれ 20 度、22 度、40 度の値を得ている。仮道管二次壁も含めてほとんどの場合、約 20 から 30 度の回転角度であったことは非常に興味深い。今後、異なる生物種、細胞種間で、回転角度の共通性が見いだされれば、細胞壁 CMF の配向制御とセルロース液晶構造との関わり、液晶形成説の妥当性についてもさらなる知見が得られ、分子レベルから細胞壁構造まで構造形成のメカニズム解明の一助になると考えられる。

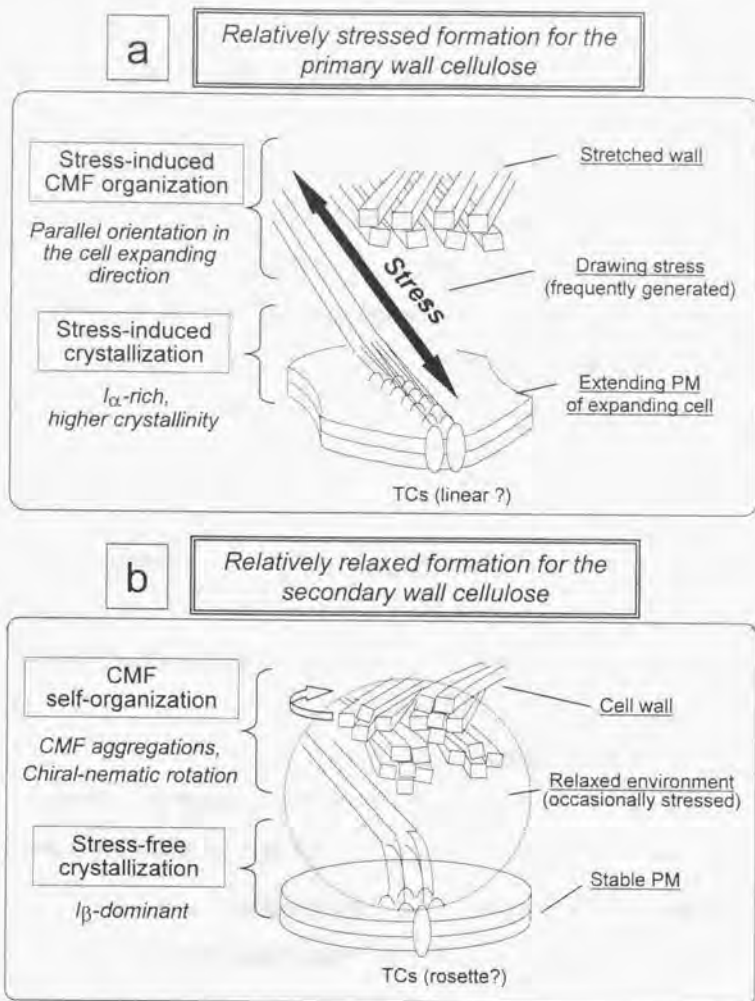
## 5. 5. 針葉樹仮道管細胞壁のセルロースミクロフィブリル堆積構造

4章と5章においては、液中モード AFM および TEM 解析により、仮道管の細胞壁骨格としてのセルロースミクロフィブリル (CMF) 堆積構造が、一次壁と二次壁の間で著しく異なることが明らかとなり、2・3章で述べたセルロース結晶化に対する物理的作用が、より高次の CMF の堆積構造にも影響しうることが示唆された。一次壁の CMF はあまり凝集せず、主として細胞の拡大方向に配列して、細胞壁の内表面に薄いラメラを形成していた。一方、二次壁の CMF は凝集して厚いラメラを形成すること、およびその配向変化挙動に規則性があることを見いだした。この CMF 堆積構造の相違から、一次壁形成に伴う細胞の拡大生長に起因する物理的作用が、セルロースの結晶化のみならず、結晶化により形成された CMF の凝集・ラメラ形成など堆積構造に対しても影響を及ぼす可能性が示唆されたため、さらにメカニズムのモデル化を図った。次章においては、2から5章までの結果をまとめ、セルロースの結晶化から CMF の堆積に至るまで細胞壁骨格の構築メカニズムを考察する。

## 第6章 セルロースミクロフィブリルの形成から細胞壁骨格構築までのモデル

前章までの結果から、仮道管の一次壁から二次壁へ、CMFの骨格であるセルロースの高次構造と細胞壁の骨格であるCMFの堆積構造が同時に変化することが判明した。一次壁セルロースは、二次壁セルロースよりも結晶化度が高く、ストレスの発生によって結晶化すると考えられるI $\alpha$ に富み、さらに結晶化したCMFがほとんど凝集せず、主として細胞の拡大方向に平行に並んで堆積し、一次壁を構築していた。一方、二次壁セルロースは、ストレスのない状態で結晶化するとされるI $\beta$ を主体とし、さらに結晶化したCMFが一次壁に比べ巨大な凝集体として束をなし、規則的に配向を回転させながら堆積して二次壁を構築していた。これらの結果は、一次壁セルロースが結晶化しCMFとして堆積する過程が、細胞の拡大生長と同時に進行するため、その細胞拡大に伴って発生した延伸力によって、ストレス誘発型(stress-induced)の高次構造形成が引き起こされたとする仮説を導いた。一方、二次壁については、比較的ストレスを欠く環境下で、セルロースの結晶化、CMF形成、壁への堆積が生じ、ストレス解放型(stress-free)の高次構造形成をするという仮説が導かれた。これらの結果をまとめ、仮道管のみならず、植物細胞壁の構築に適用することが可能な一つのモデルとして、セルロースの結晶化によるCMF形成そしてその堆積による細胞壁形成のメカニズムを、以下のように提案する(Figs. 6-1a, b)

セルロースが $\beta$ グルカンとして生合成され、中間相を経て結晶化し、CMFとして堆積するまでの間、分子鎖の両端は、原形質膜上のTCsと、すでに結晶化して細胞壁の一部となったCMFにそれぞれ連結するため、分子鎖方向にストレスを受けやすい。特に、一次壁の形成時には(Fig. 6-1a)、細胞が放射方向に拡大生長するため、原形質膜が伸展する一方、細胞壁は強く引張されており、膜・壁の間で生合成直後のセルロースが延伸ストレスを受けやすい。その結果、高分子



**Figure 6-1** Models of stressed (a) and relatively relaxed (b) cellulose organization forms for the tracheid primary and the secondary walls, respectively, which may occur between the cellulose-synthesizing terminal enzyme complexes (TCs) on the plasma membrane (PM) and cell wall to determine not only the crystalline structure but also the CMF organization. The primary wall cellulose (a) may be stressed and relaxed repeatedly, whereas the secondary wall cellulose mainly crystallizes in a relatively relaxed environment (b).



ゲルの延伸結晶化と同様に、結晶化度が高まるとともにストレスの存在下で  $I\alpha$  相が結晶化する。さらに、結晶化した後も延伸されるため、CMF は自己凝集できず、直線的に配向させられて堆積する。しかし、原形質膜および細胞表層付近の流動性により、ストレスはやがて緩和されるため、次のストレスが、 $I\alpha$  の結晶化に必要なエネルギーに達するまでは、一次壁においても  $I\beta$  として結晶化する。その結果、一次壁セルロースの結晶組成は、 $I\alpha : I\beta$  の混合相となる。興味深いことに、本研究では、その組成が約 50 : 50 となり、この組成比は、他の植物種の一次壁についての報告値と一致する。これは、細胞の生長様式とセルロース結晶化との関わりについて、何らかの意義を持つ値ではないかということが示唆される。

一方、二次壁のセルロース (Fig. 6-1b) は、このような物理的ストレスを受ける機会が少ないため、主として  $I\beta$  として結晶化する。その結果、二次壁セルロースの結晶は、 $I\beta$  に富む組成を示すようになる。本研究では、 $I\alpha : I\beta$  比として約 20 : 80 を示した。さらに、このような比較的ストレスを欠く環境下においては、セルロース結晶化により形成された CMF が自由に凝集するとともに、そのカイラルネマティック構造形成能が物理的に阻害されないため、規則正しい CMF 配向回転構造を構築することができる。

以上のメカニズムは、針葉樹仮道管についての解析結果をもとに、提案したものであるが、他の植物細胞壁の構築についても、少なくともその一部は適用されるものと考ええる。この観点から、他の植物種についての検討が今後必要とされる。

## 第7章 結論

針葉樹仮道管細胞壁のセルロース高次構造とそのミクロフィブリルの堆積構造を細胞壁形成の段階別に解析することにより、これらの構造が一次壁から二次壁へ同時に変化することを明らかにした。さらにその結果から、一次壁セルロースが高次構造を構築する際には、物理的なストレスを受けると考え、セルロースにストレスを与えるメカニズムを細胞拡大によるセルロース延伸によるものとして、分子レベルの結晶化からマクロな細胞壁骨格の形成に至るメカニズムをモデル化した。

1. セルロースの結晶形、結晶化度、分子配向が、次のように変化することを、顕微 FT-IR 法により明らかにした。さらにこれらの結果から、一次壁セルロースの結晶化が、細胞の拡大生長にともなう延伸結晶化として理解できることを示した。

① 一次壁セルロースが、ストレスの発生によって結晶化するとされる  $I_{\alpha}$  相に富み、 $I_{\alpha} : I_{\beta}$  が約 50 : 50 であるのに対し、二次壁セルロースでは  $I_{\beta}$  相を主体とし、その比は、約 20 : 80 であった。

② 一次壁セルロースの結晶化度が二次壁セルロースよりも高く、約 70 % であるのに対し、二次壁セルロースでは約 60 % であった。

③ 一次壁セルロース分子が、仮道管軸に対して垂直方向（細胞の拡大方向）に配向するのにに対し、二次壁セルロースは軸方向に配向していた。

2. 一次壁から二次壁へ  $I_{\beta}$  に比べ  $I_{\alpha}$  が相対的に減少することが、X 線回折法によっても支持された。また、この現象は仮道管の放射壁と接線壁ともに認められた。

3. セルロースミクロフィブリル (CMF) の堆積構造を、未乾燥のまま原子間

力顕微鏡で観察し、一次壁 CMF に対する延伸ストレスを示唆する結果を得た。これは、一次壁の CMF が凝集せず、主として細胞の拡大方向に平行に配列して薄いラメラを形成していたことによる。一方、二次壁の CMF は、一次壁に比べ巨大な凝集体を形成して束となり、厚いラメラを積み重ねることを明らかにした。

4. 二次壁 CMF の配向が規則正しく変化してカイラルネマティック液晶類似の構造を成すことを、透過型電子顕微鏡観察によって明らかにした。この結果、二次壁 CMF の堆積が、比較的ストレスを欠く環境下で進行する可能性が示唆された。

5. 以上の結果をもとに、仮道管細胞壁構築のメカニズムをまとめ、植物細胞壁構築メカニズム解明の基盤となるようなモデルを提案した。一次壁セルロースが、細胞拡大による延伸ストレスを受け、ストレスに引き起こされた結晶構造である  $I\alpha$  相に富む CMF を形成することに始まる壁層形成モデルと、ストレスをあまり受けずに自発的に  $I\beta$  相を結晶化することから始まる二次壁形成のモデルを提示した。

本研究は、仮道管セルロースの高次構造を解析し、その変化をもたらすメカニズムを探索することから出発した。一般に生体系におけるメカニズムは複雑であることが多い。しかし、細胞壁セルロースの高次構造形成、さらにそのミクロフィブリルとしての構造形成に関しては、物理化学現象として理解できる点が多いと考えられる。その理由は、セルロースが水素結合や液晶形成など自らの力 (driving force) によってより高次な構造を形成できるからである。本研究では、中間相のセルロースに対し細胞拡大による延伸ストレスが生じた場合、セルロー

スが自発的に結晶化する場合とは異なる構造が形成されると考えた。提案したモデルを支持する興味深い事実として、拡大生長を続けるタイプの海藻のセルロースが  $I\alpha$  に富む一方、拡大生長終了後に二次壁を肥厚する高等植物のセルロースが  $I\beta$  を主体とすることが、Atalla と VanderHart (1984) によっても指摘されている。さらに、高等植物のセルロースであつても、細胞の拡大成長中に形成される一次壁セルロースについては  $I\alpha$  に富むことが、本研究以外でも報告されている (Smith *et al.*, 1998)。したがって、コットンやラミーなど、拡大生長後に二次壁を形成する他の細胞壁セルロースについて、その高次構造の変化を研究する必要性が高まったといえる。様々な細胞壁セルロースの高次構造が研究・比較されれば、その構築メカニズムに対する理解が深まり、そのメカニズムを利用したセルロース構造の人工的な制御も可能になると期待できる。本研究で得た知見も、*in vitro* な系で実証し、かつ利用に結びつけることが求められよう。



- Abe H, Ohtani J, Fukazawa K (1991) FE-SEM observations on the microfibrillar orientation in the secondary wall of tracheids. *LWA Bull. n. s.* 12: 431-438
- Abe H, Ohtani J, Fukazawa K (1992) Microfibrillar orientation of the innermost surface of conifer tracheid walls. *LWA Bull. n. s.* 13: 411-417
- Abe H, Funada R, Ohtani J, Fukazawa K (1995a) Changes in the arrangement of microtubules and microfibrils in differentiating conifer tracheids during expansion of cells. *Annals of Bot.* 75: 305-310
- Abe H, Funada R, Imaizumi H, Ohtani J, Fukazawa K (1995b) Dynamic changes in the arrangement of cortical microtubules in conifer tracheids during differentiation. *Planta* 197: 418-421
- Abe H, Funada R, Ohtani J, Fukazawa K (1997) Changes in the arrangement of cellulose microfibrils associated with the cessation of cell expansion in tracheids. *Trees* 11: 328-332
- Atalla RH, VanderHart DL (1984) Native cellulose. A composite of two distinct crystalline forms. *Science* 223: 283-285
- Atalla RH, VanderHart DL (1989) Studies on the structure of cellulose using raman spectroscopy and solid state  $^{13}\text{C}$  NMR. In: Schuerch C (ed) *Cellulose and Wood: Chemistry and Technology*. Wiley Interscience, New York, pp 169-188.
- Atalla RH, Hackney JM, Uhin I, Thompson NS (1993) Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* 15: 109
- Bailey IW (1920) The cambium and its derivative tissues 2. Size variations of cambial initials in gymnosperms and angiosperms. *Amer. J. Bot.* 7: 355-367
- Blackwell J, Vasko PD, Koenig JL (1970) Infrared and raman spectra of the cellulose from the cell wall of *Valonia ventricosa*. *J. Appl. Physics* 41: 4375-4379
- Brett C, Waldron K (1990) *Physiology and biochemistry of plant cell wall*. Unwin Hyman, London, pp89-113
- Brown RM Jr, Motezinos D (1976) Cellulose microfibrils: Visualization of biosynthetic and orienting complexes in association with the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 143-147
- Chanzy H, Imada K, Vuong R (1978) Electron diffraction from the primary wall of cotton fibers. *Protoplasma* 94: 299-306

Chanzy H, Imada K, Mollar R, Vuong R, Barnoud F (1979) Crystallographic aspects of sub-elementary cellulose fibrils occurring in the wall of rose cells cultured *in vitro*. *Protoplasma* 100: 303-316

Chanzy H, Smith P, Revol J-F, Manley, RStJ (1987) High-resolution electron microscopy of ultradrawn gels of high molecular weight polyethylene. *Polymer Communications* 28: 133-136

Chanzy H (1990) Aspects of cellulose structure. In: Kennedy JF, Phillips GO, Williams PA (eds) *Cellulose sources and exploitation: Industrial utilization, biotechnology and physicochemical properties*. Ellis Horwood Ltd, West Sussex, UK, pp 3-12

Cowdrey DR, Preston RD (1965) The mechanical properties of plant cell walls: helical structure and Young's modulus of air dried xylem in *Picea sitchensis*. In: Côté WA Jr. (ed) *Cellular ultrastructure of woody plants*. Syracuse Univ. Press, New York, pp 473-492

Dunning CE (1968) Cell-wall morphology of longleaf pine latewood. *Wood Sci.* 1: 65-76

Dunning CE (1969) The structure of longleaf pine latewood. I. Cell wall morphology and the effect of alkaline extraction. *Tappi* 52: 1326-1335

Edasige Y, Ishii T, Hiroi T, Fujii T (1995) Structural analysis of polysaccharides of primary walls from xylem differentiating zones of *Cryptomeria japonica* D. Don. *Holzforschung* 49: 197-202

Faix O (1991) Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforschung* 45: 21-27

Fisher DG, Mann J (1960) Crystalline modifications of cellulose. part VI. Unit cell and molecular symmetry of cellulose I. *J. Polym. Sci.* 42: 189-194

Frey-Wyssling A (1954) The fine structure of cellulose microfibrils. *Science* 119: 80-82

藤井智之 (1981) 広葉樹の木部柔細胞壁の構造. 京都大学学位論文

Fujita M, Saiki H, Harada H (1974) Electron microscopy of microtubules and cellulose microfibrils in secondary wall of poplar tension wood fibers. *Mokuzai Gakkaishi* 20: 147-156

Gardner KH, Blackwell J (1974) The structure of native cellulose. *Biopolymers* 13: 1975-2001

後藤俊幸、原田浩、佐伯浩 (1972) 標準セルロース粉末と木材のミクロファイブリルの構造. 京都大学農学部演習林報告 44, 176-182

Goto T (1976) Studies on the structure of cellulose microfibrils. PhD Thesis, Kyoto University.

- Green PB (1980) Organogenesis — A biophysical view. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 51-82
- Gunning BES, Hardham RH (1982) Microtubules. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 651-698
- Hackney JM, Atalla RH, VanderHart DL (1994) Modification of crystallinity and crystalline structure of *Acetobacter xylinum* cellulose in the presence of water-soluble  $\beta$ -1, 4-linked polysaccharides:  $^{13}\text{C}$ -NMR evidence. *Int. J. Biol. Macromol.* 16: 215-218
- Hanley SJ, Giasson J, Revol J-F, Gray DG (1992) Atomic force microscopy of cellulose microfibrils: Comparison with transmission electron microscopy. *Polymer* 33: 4639-4642
- Hanley SJ, Gray DG (1994) Atomic force microscope images of black spruce wood sections and pulp fibres. *Holzforschung* 48: 29-34
- Hanna RB, Côté WA Jr (1974) The sub-elementary fibril of plant cell wall cellulose. *Cytobiologie* 10: 102-116
- 原田浩、貴島恒夫、梶田茂 (1951) 針葉樹仮道管第二次膜のミセル配列。その 2。木材研究 6: 34-42
- 原田浩 (1984) 木部細胞壁の構造。木材学会誌 30: 513-521
- 原田浩、宮崎幸男、若島妙子 (1958) 木材の細胞膜構造の電子顕微鏡的研究。林試研報 104: 1-115
- Harada H, Côté WA Jr (1985) Structure of wood. In: Higuchi T (ed) Biosynthesis and biodegradation of wood components, Academic press, Orlando, pp 1-42
- Hayashi J, Kon H, Takai M, Hatano M, Nozawa T (1987) Possible cause of structural irreversibility between cellulose I and cellulose II families. In: Atalla RH (ed) The structure of cellulose. ACS symposium series 340, American Chemical Society, Washington DC, pp 135-150
- Hayashi N, Sugiyama J, Okano T, Ishihara M (1998a) Selective degradation of the cellulose I $\alpha$  component in *Cladophora* cellulose with *Trichoderma viride* cellulase. *Carbohydrate Res.* 305: 109-116
- Hayashi N, Sugiyama J, Okano T, Ishihara M (1998b) The enzymatic susceptibility of cellulose microfibrils of the algal-bacterial type and the cotton-ramie type. *Carbohydrate Res.* 305: 261-269
- 林隆久 (1994) 木質細胞壁の生合成とこれに関与する酵素の生成・制御。樋口隆昌 (編) 木質分子生物学。文永堂出版。pp 87-101
- Heppler PK, Palevitz BA (1974) Microtubules and microfilaments. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 309-362



Heyn ANJ (1969) The elementary fibril and supermolecular structure of cellulose in soft wood fiber. *J. Ultrastructure Res.* 26: 52-68

Hirakawa Y, Ishida S (1981) A SEM study on the layer structure of secondary wall of differentiating tracheids in conifer. *Res. Bull. Coll. Exp. For. Hokkaido Univ.* 37: 55-72

Hirakawa Y (1984) A SEM observation of microtubules in xylem cells forming secondary walls of trees. *Res. Bull. Coll. Exp. For. Hokkaido Univ.* 41: 535-550

Honjo G, Watanabe M (1958) Examination of cellulose fiber by the low-temperature specimen method of electron diffraction and electron microscopy. *Nature* 181: 326-328

Horii F, Yamamoto H, Kitamaru R, Tanahashi M, Higuchi T (1987) Transformation of native cellulose crystals induced by saturated steam at high temperatures. *Macromolecules* 20: 2946-2949

Hu X-P, Hsieh Y-L (1996) Crystalline structure of developing cotton fibres. *J. Polymer Sci. Part B* 34: 1451-1459

福島和彦 (1994) 木部細胞壁へのリグニンの堆積. 樋口隆昌 (編) 木質分子生物学. 文永堂出版, pp 74-83

今村祐嗣, 佐伯浩, 原田浩 (1972a) 分化中の木部細胞膜内表面の電子顕微鏡観察法. 京大演習林報告 43: 303-308

今村祐嗣, 佐伯浩, 原田浩 (1972b) 針葉樹仮道管膜の形成と構造、二次膜の交差・移行構造. 京大演習林報告 44: 183-193

Inomata F, Takabe K, Saiki H (1992) Cell wall formation of conifer tracheid as revealed by rapid-freeze and substitution method. *J. Electron Microsc.* 41: 369-374

Isogai A, Usuda M, Kato T, Uryu T, Attalla RH (1989) Solid-State CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR Study of Cellulose Polymorphs. *Macromolecules* 22: 3168-3172

Itoh T (1975a) Fine structure of the plasmalemma surface of poplar parenchyma cells observed by the freeze etching technique. *Bot. Mag. Tokyo* 88: 131-143

Itoh T (1975b) Cell Wall Organization of Cortical Parenchyma of Angiosperms Observed by the Freeze-Etching Technique. *Bot. Mag. Tokyo* 88: 145-156

Itoh T (1976) Microfibrillar orientation of radially enlarged cells of coumarin and colchicine-treated pine seedlings. *Plant and Cell Physiol.* 17: 385-398

伊東隆夫 (1986) セルロースマイクロフィブリルの形成. 電子顕微鏡 21: 121-128

Jayme G, Knolle H (1964) Beitrag zur empirischen röntgenographischen Bestimmung des Kristallinitätsgrades cellulosehaltiger Stoffe. *Das Papier* 18: 249-255



Kerr AJ, Goring DAI (1975) The ultrastructural arrangement of the wood cell wall. *Cellulose Chem. Technol.* 9: 563-573 (1975).

Kerr T, Bailey IW (1934) The cambium and its derivative tissues. No. X. Structure, optical properties and chemical composition of the so-called middle lamella. *J. Arnold Arboretum* 15: 327-349

Kishi K, Harada H, Saiki H (1979) An electron microscopic study of the layered structure of secondary wall in vessel. *Mokuzai Gakkaishi* 25: 521-527

Kondo T (1997) The assignment of IR absorption bands due to free hydroxyl groups in cellulose. *Cellulose* 4: 281-292

Knolle H, Jayme G (1964) Über ein digitales Verfahren zur empirischen Bestimmung der Röntgenkristallinität cellulosehaltiger Stoff und seine Anwendung. *Das Papier* 19: 106-110

Liang CY, Marchessault RH (1959a) Infrared spectra of crystalline polysaccharides. I. Hydrogen bonds in native celluloses. *J. Polym. Sci.* 37: 385-395

Liang CY, Marchessault RH (1959b) Infrared spectra of crystalline polysaccharides. II. Native celluloses in the region from 640 to 1700  $\text{cm}^{-1}$ . *J. Polym. Sci.* 39: 269-278

Liang CY (1972) Infrared spectroscopy and physical properties of cellulose. In: O'Connor RT (ed) Instrumental analysis of cotton cellulose and modified cotton cellulose. Marcel Dekker, New York, pp 59-91

Liese W (1960) Die Struktur der Tertiärwand in Tracheiden und Holzfasern. *Holz als Roh- und Werkstoff* 18: 296-303

Liese W (1963) Tertiary wall and warty layer in wood cells. *J. Polymer Sci. Part C2*: 213-229

Marrinan HJ, Mann J (1956) Infrared spectra of the crystalline cellulose. *J. Polym. Sci.* 21: 301-311

Mann J, Roldan-G L, Wellard HJ (1960) Crystalline modifications of cellulose. Part IV. Determination of X-ray intensity data. *J. Polym. Sci.* 42: 165-171

Meyer KH, Misch L (1937) Position des atomes dans le nouveau modele spatial de la cellulose. Sur la constitution de la partie cristallisee de la cellulose IV. *Helv. Chim. Acta.* 20: 232-244

Mizuta S, Wada S (1981) Microfibrillar structure of growing cell wall in a coenocytic green alga *Boergesenia forbesii*. *Bot. Mag. Tokyo*, 94, 343-353

Mühlethaler K (1969) The structure of natural polysaccharide systems. *J. Polym. Sci. Part*

Mueller SC, Brown RM Jr, Scott TK (1976) Cellulose microfibrils: Nascent stages of synthesis in a higher plant cell. *Science* 194: 949-951

Mueller SC, Brown RM Jr (1980) Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *J. Cell Biol.* 84: 315-326

Nanko H, Saiki H, Harada H (1978) Cell wall structure of the sclereids in secondary phloem of *Populus euramericana*. *Mokuzai Gakkaishi* 24: 362-368

Nelson ML, Schultz EF Jr (1963) X-ray diffractograms of cotton: Effect of sample weight and other variables. *Textile Res. J.* 33: 515-514

Nelson ML, O'Connor RT (1964a) Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. part I. Spectra of lattice types I, II, III and amorphous cellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* 8: 1311-1324

Nelson ML, O'Connor RT (1964b) Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. *J. Appl. Polym. Sci.* 8: 1325-1341

Neville AC, Levy S (1984) Helicoidal orientation of cellulose microfibrils in *Nitella opaca* internode cells: ultrastructure and computed theoretical effects of strain reorientation during wall growth. *Planta* 162: 370-384

Nishikawa S, Ono S (1913) Transmission of X-rays through fibrous, lamellar and granular substances. *Tokyo Su. But. Kw. K.*, Ser. 2, 7: 131-138

Nowak-Ossorio M, Gruber E, Schurz J (1976) Untersuchungen zur Cellulosebildung in Baumwollsamern. *Protoplasma* 88: 255-263

Okano T, Koyanagi A (1986) Structural variation of native celluloses related to its source. *Biopolymers* 25: 851-861

Panshin AJ, deZeeuw C (1980) Textbook of wood technology (4th ed). McGraw Hill, New York

Pickett-Heaps JD (1967) The effect of colchicine on the ultra-structure of dividing plant cells, xylem wall differentiation and distribution of cytoplasmic microtubules. *Devel. Biol.* 15: 206-236

Preston RD (1952) The molecular architecture of plant cell walls. Chapman and Hall, London, pp 31-70; 170-181

Preston RD, Cronshaw J (1958) Constitution of the fibrillar and non-fibrillar components

of the walls of *Valonia ventricosa*. *Nature* 181: 248-250

Revol J-F, Bradford H, Giasson J, Marchessault RM, Gray DG (1992) Helicoidal self-ordering of cellulose microfibrils in aqueous suspension. *Int J Biol Macromol* 14: 170-172

Robards AW (1970) Electron microscopy and plant ultrastructure. McGraw-Hill, London. pp36-57

Roelofsen PA, Houwink AL (1953) Architecture and growth of primary cell wall in some plant hairs and in the *Phycomyces sporangiophore*. *Acta Bot. Neerl.* 2: 218-225

Roelofsen PA (1958) Cell-wall structure as related to surface growth: Some supplementary remarks on multinet growth. *Acta Bot. Neerl.* 7: 77-89

Roelofsen PA (1965) Ultrastructure of the wall in growing cells and its relation to the direction of the growth. In: Preston RD (ed.) *Advances in botanical research* 2. Acad. Press, London. pp 69-149.

Roland JC, Vian B, Reis D (1975) Observations with cytochemistry and ultracytometry on the fine structure of the expanding walls in actively elongating plant cells. *J. Cell Sci.* 19: 239-259.

Roland JC, Mosiniak M (1983) On the twisting pattern, texture and layering of the secondary cell walls of lime wood. Proposal of a unifying model. *IAWA Bull. n.s.* 4: 15-26

Roland JC, Reis D, Vian B, Satiat-Jeunemaitre B, Mosiniak M (1987) Morphogenesis of plant cell walls at the supermolecular level: Internal geometry and versatility of helicoidal expression. *Protoplasma* 140: 75-91

Roland JC, Reis D, Vian B (1993) The cholesteric type cell wall: nucleation of defects in the structural order and its relation to spherical cell shape. *Acta Bot Neerl* 42: 105-117

佐伯浩 (1996) 木材細胞二次壁の構造. 電子顕微鏡 31: 3-9

Sarko A, Muggli R (1974) Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides III. *Valonia* cellulose and cellulose II. *Macromolecules* 7: 486-494

Scallan AM (1974) The structure of the cell wall of wood. A consequence of anisotropic inter-microfibrillar bonding? *Wood Sci.* 6: 266-271

Seagull RW (1989) The role of the cytoskeleton during oriented microfibril deposition. 2. Microfibril deposition in cells with disrupted cytoskeletons. In: Schuerch C (ed) *Cellulose and wood: Chemistry and technology*. John Wiley & Sons, New York, pp 811-825

Seagull RW (1992) A quantitative electron microscopic study of changes in microtubule



arrays and wall microfibril orientation during in vitro cotton fiber development. *J. Cell Sci.* 101: 561-577

Séné CFB, McCann MC, Wilson RH, Grinter R (1994) Fourier-transform raman and fourier-transform infrared spectroscopy. An investigation of five higher plant cell walls and their components. *Plant Physiol.* 106: 1623-1631

Smith BG, Harris PJ, Melton LD, Newman RH (1998) Crystalline cellulose in hydrated primary cell walls of three monocotyledons and one dicotyledon. *Plant Cell Physiol.* 39: 711-720

Sugiyama J, Harada H, Fujiyoshi Y, Uyeda N (1985) Lattice images from ultra thin sections of cellulose microfibrils in the cell wall of *Valonia macrophisa* Kütz. *Planta* 166: 161-168

Sugiyama J, Okano T, Yamamoto H, and Horii F (1990) Transformation of *Valonia* cellulose crystals by an alkaline hydrothermal treatment. *Macromolecules* 23: 3196-3198

Sugiyama J, Persson J, and Chanzy H (1991a) Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses. *Macromolecules* 24: 2461-2466

Sugiyama J, Vuong R, and Chanzy H (1991b) Electron diffraction study of the two crystalline phases occurring in native celluloses from an algal cell wall. *Macromolecules* 24: 4168-4175

高部圭司 (1994) 木部細胞壁への多糖とリグニンの堆積. 樋口隆昌 (編) 木質分子生物学. 文永堂出版. pp 70-74

Takeda K, Shibaoka H (1981) Effects of gibberellin and colchicine on microfibril arrangement in epidermal cell walls of *Vigna angularis* Ohwi et Ohashi epicotyls. *Planta* 151: 393-398

Tanahashi M, Goto T, Horii F, Hirai A, Higuchi T (1989) Characterization of steam-exploded wood III. Transformation of cellulose crystals and changes of crystallinity. *Mokuzai Gakkaishi* 35: 654-662

VanderHart DL, Atalla RH (1984) Studies of microstructure in native celluloses using solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR. *Macromolecules* 17: 1465-1472

Vian B, Mosiniak M, Reis D, Roland JC (1982) Dissipative process and experimental retardation of the twisting in the growing plant cell wall. Effect of ethylene-generating agent and colchicine: a morphogenetic reevaluation. *Biol. Cell* 46: 301-310

Vian B, Reis D (1991) Relationship of cellulose and other cell wall components: supramolecular organization. In: Haigler CH, Weimer PJ (eds) Biosynthesis and biodegradation of cellulose. Marcel Dekker, New York, pp 25-50



Wada M, Okano T, Sugiyama J, Horii H (1995) Characterization of tension and normally lignified wood cellulose in *populus maximowiczii*. *Cellulose* 2: 223-233

Wada M, Sugiyama J, Okano T (1993) Native Celluloses on the basis of two crystalline phase (Ia/I $\beta$ ) system. *J. Appl. Polym. Sci.* 49: 1491-1496

Wada M, Sugiyama J, Okano T (1994) The monoclinic phase is dominant in wood cellulose. *Mokuzai Gakkaishi* 40: 50-56

Wada M, Sugiyama J, Okano T (1995a) Two crystalline phase (Ia/I $\beta$ ) system of native celluloses in relation to plant phylogenesis. *Mokuzai Gakkaishi* 41: 186-192

Wada M, Okano T, Sugiyama J, Horii F (1995b) Characterization of tension and normally lignified wood cellulose in *Populus maximowiczii*. *Cellulose* 2: 223-233.

Wada M, Okano T (1997) Synchrotron-radiated X-ray and neutron diffraction study of native cellulose. *Cellulose* 4: 221-232

和田昌久 (1997) 2相モデルに基づく天然セルロースの解析. 東京大学学位論文

Wardrop AB (1957) The organization and properties of the outer layer of the secondary wall in conifer tracheids. *Holzforschung* 11: 102-110

Wardrop AB, Daswell HE (1957) Variations in the cell organization of tracheids and fibres. *Holzforschung* 11: 33-46

Wardrop AB (1958) The organization of the primary wall in differentiating conifer tracheids. *Aust. J. Bot.* 6: 299-305

Wardrop AB (1964) The structure and formation of the cell wall in xylem. In: Zimmermann MH (ed) *The Formation of wood in forest trees*. Academic Press, London, pp 87-134

Wardrop AB, Harada H (1965) The formation and structure of the cell wall in fibres and tracheids. *J. Exp. Bot.* 16: 356-371

渡辺貞良, 赤堀忠義, 松原弘明 (1966) X線法によるセルロース繊維の結晶領域の測定. 北海道大学工学部研究報告 43: 111-129

Yamamoto H, Horii F (1994) *In situ* crystallization of bacterial cellulose. I. Influence of polymeric additives, stirring and temperature on the formation celluloses Ia and I $\beta$  as revealed by cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS)  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Cellulose* 1: 57-66

Yamatomo H, Horii F, Hirai A (1996) *In situ* crystallization of bacterial cellulose. II. Influence of different polymeric additives on the formation of cellulose Ia and I $\beta$  at the early stage of incubation. *Cellulose* 3: 229-242

## 本研究に関する報告

本研究は、1990 年から 1998 年までの研究内容を総括したものである。

Kataoka Y, Saiki H, Fujita M (1992) Arrangement and superimposition of cellulose microfibrils in the secondary walls of coniferous tracheids. *Mokuzai Gakkaishi* 38: 327-335

Kataoka Y, Kondo T (1996) Changing cellulose crystalline structure in forming wood cell walls. *Macromolecules* 29: 6356-6358

Kataoka Y, Kondo T (1998) FT-IR microscopic analysis of changing cellulose crystalline structure during wood cell wall formation. *Macromolecules* 31: 760-764

Kondo T, Kataoka Y, Hishikawa Y (1998) Novel approaches using FTIR spectroscopy to study the structure of crystalline and noncrystalline cellulose. In: Heinze TJ, Glasser WG (eds) Cellulose derivatives modification, characterization and nanostructures. ACS symposium series 688, American Chemical Society, Washington DC, pp 173-183

Kataoka Y, Kondo T (1999) Quantitative Analysis for the cellulose Ia crystalline phase in developing wood cell walls. *Int. J. Biol. Macromol.* 24: 37-41

## 謝辞

本研究の遂行と論文の取りまとめにあたり、東京大学教授 岡野 健 先生の懇切なご指導を仰ぎ、ご教示とご助言を賜ったことに厚くお礼申し上げます。また、仮道管細胞壁のマイクロフィブリル構造解析を進めるにあたって、京都大学名誉教授 佐伯 浩 先生から、懇切なご指導、ご教示を賜ったことを心からお礼申し上げます。そして、セルロースの結晶構造解析をはじめとし、研究全体の遂行についてご指導、ご助言くださった、農林水産省森林総合研究所 近藤 哲男 博士に深謝いたします。

細胞壁試料作成・顕微鏡観察法をご指導いただいた京都大学 藤田 稔 教授、野淵 正 助教授、高部 圭司 助教授、セルロース研究の基礎をご教示くださった、京都大学 岡村 圭造 名誉教授、湊 和也 助教授に感謝いたします。そして、貴重なご教示とご助言を賜った、東京大学 有馬 孝禮 教授、飯塚 堯介 教授、空閑 重則 助教授、磯貝 明 助教授、X 線回折法についてご指導いただいた、東京大学 和田 昌久 助手の皆様に厚くお礼申し上げます。

針葉樹試料の採取にあたり便宜を図ってくださった、對馬 英治 氏、東京大学 梶 幹男 教授、齋藤 登 氏、林野庁林木育種センター 中田 了五 氏、顕微 FT-IR 装置の使用をお許しくださった、パーキンエルマー・ジャパン（株）の皆様に感謝いたします。

細胞壁およびセルロースの構造に関し、貴重なご助言をくださった、森林総合研究所 平川 泰彦 博士、藤井 智之 博士、安部 久 博士、林 徳子 博士、野尻 昌信 氏、菱川 裕香子 氏、戸川 英二 氏、AFM に関する情報をご提供くださった、東京大学 博士課程 岡本 哲明 氏の皆様に心からお礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行にあたり、様々なご協力、ご助言をいただいた、森林総合研究所 志水 一允 木材化工部長、林 良興 材質改良科長、大越 誠 耐候処理研究室長、木口 実 博士、杉山 真樹 氏、渡辺 喜美子 氏に感謝いたします。

