

Populus euramericana の 引張あて材のゼラチン層の構造

原 田 浩 ・ 谷 口 麟 ・ 喜 志 暁 雄

Ultrastructure of the Gelatinous Layer in Tension Wood Fibers from
Populus euramericana

Hiroshi HARADA, Takashi TANIGUCHI and Akio KISHI

目 次

要 旨..... 221	3. 結果および考察..... 223
1. まえがき..... 221	引用文献..... 227
2. 試料および実験方法..... 222	Résumé 227

要 旨

木材の細胞膜構造についてより深い知見を得るための一つの課題として、*Populus euramericana* の引張あて材のゼラチン層（以下Gと略記）の微細構造を電子顕微鏡，X線回折法および赤外分光分析法を用いて研究した。

試料のゼラチン層は，Norberg と Meier の方法を用いて引張あて材から分離して得た。

引張あて材のゼラチン繊維の膜層構成は $P+S_1+S_2+G$ である。Gの解体試料を負染色して電子顕微鏡で観察した結果，Gのミクロフィブリルは長さの方向に非晶あるいは準結晶領域の存在を推定させるような周期構造は認められない。ミクロフィブリルの幅は $50\sim 70\text{\AA}$ である。反射法によるGのX線回折強度曲線から，Gの結晶幅は $37\text{\AA}$ ，結晶化度は60%の値が測定された。またGの赤外分光分析の結果，Gにはリグニンがほとんど存在しないこと，また結晶性の高いセルロースからなることがわかる。

1. ま え が き

木材の細胞膜は，セルロース，ヘミセルロースおよびリグニンという3種の化学成分を主体とする共重合体とみることができる。これらの化学成分のなかで，セルロースは細胞膜の骨かく物質といわれセルロース分子は集合していわゆるミセル（micell）またはミクロフィブリル（microfibril）を構成している。したがってこれまでになされた木材の細胞膜構造（ここでは化学的構造と区別して物理的構造—physical structure—または形態学的構造—morphological structure—を意味する）に関する多くの研究は，セルロース分子の集合体であるミセルまたはミクロフィブリルに対してその重点が集中されたのは当然である。ところがこれまでになされたセルロース分子の集合体に関する研究は，木化したすなわち三つの主要化学成分が存在したままの状態の試料に対してか，あるいは化学的に木

材からリグニンときにはヘミセルロースをも除去したものについて行なわれてきた。筆者らは、リグニンできればヘミセルロースすらが自然の状態で存在していない木材の細胞膜構造をしらべることができれば、細胞膜構造研究への一層のアプローチとして望ましいと考えた。

一般に、広葉樹の偏心生長した木部に見られる引張あて材 (tension wood) を構成するゼラチン繊維 (gelatinous fiber) には、その膜中にゼラチン層 (gelatinous layer, 以下 G と略記する) が存在する。いままでの研究¹⁾によると、 G にはリグニンがなくほとんどセルロースからできている。したがってもしゼラチン繊維から G のみを取り出すことができれば、上述の筆者らの希望を達成する可能性が与えられると考えた。そして、引張あて材からナイフで薄片を削りとりこれを水中で解体して G からの細片のみを集めることを試みた²⁾けれども、 G と他の1次膜 (以下 P と略記する) や2次膜各層 (以下外層を S_1 , 中層を S_2 , 内層を S_3 と略記する) との識別にはなお疑問点を残していた。さてこの時 Norberg と Meier³⁾ は、Aspen (*Populus tremula*) の生材の引張あて材部から約 20μ 厚の木口切片を切りとり、これをアルコール中で超音波処理することによって G のみをもとのゼラチン繊維膜から分離する方法を考え出した。この分離法を用いると、 G のみを集めてその構造をしらべることができることが明らかとなった。

この報告は、Norberg ら³⁾の方法を用いて引張あて材から G のみを集め、集めた G について、(1) 電子顕微鏡的観察によってミクロフィブリルの構造、(2) X線回折法によって結晶構造、さらに (3) 赤外分光分析法によって化学成分と結晶構造を研究したものである。

この研究の実施上、試料の提供と助言をいただいた東京大学農学部島地謙博士に、研究内容とくに G の化学成分について助言を与えられた農林省林業試験場林産化学部宮崎信博士に、とりまとめに助言をいただいた米国ニューヨーク州立大学林学部 W. A. Côté 教授および研究全般にわたり援助を与えられた本農学部木材構造学研究室の各位に心からお礼を申しあげる。なお、この報告の内容の大部分は第18回日本木材学会大会 (昭和43年4月) において口頭発表した。

2. 試料および実験方法

1) 試料:

樹種は *Populus euramericana* で、東京大学小石川植物園に植栽され同大学農学部森林植物学教室の実験木であるもののうちから、10年生の傾斜した幹の木部にある典型的な引張あて材を用いた。この試料は同大学農学部島地謙博士のご好意によって提供されたものである。

2) 実験方法:

a) 引張あて材から G を分離し集める方法。まず試料の生材円盤の木口面に塩化亜鉛ヨードの水溶液を塗布して引張あて材の存在を確かめる。次に Norberg ら³⁾の方法によって G を分離し集めるが、その要点を簡単に説明すると次のとおりである。まず生材のままで引張あて材部から厚さ約 40μ の木口切片を多数マイクロームで切りとり、エタノール (90%) 中で超音波処理 (1.6 kV, 240 mA, 10 KHz [Cycle/sec.], 30 minuts.) してシリンダー形の G をゼラチン繊維膜から分離する。次にメッシュスクリーン (100, 150 メッシュ) およびグラスフィルター (1 Gl, 100—120 μ) に順次おし G シリンダーのみを分別し、さらに遠心分離機で G を集め真空乾燥する。

b) 電子顕微鏡による観察法。ゼラチン繊維膜中における G の存在および他の層との区別を明らかにするためには、常法により引張あて材部からの小片をメタクリル樹脂包埋し超マイクロームで木口の超薄切片 (脱包埋・シャドウイング) を作製して観察するか、または超薄切片の二段レプリカをつくってしらべた。 G のミクロフィブリル構造を観察するためには次のように試料をつくる。まず a)

の方法で得られたGシリンダーを水に浸漬(水 250 cc に対して試料 1 gr. の割合)し、ミキサー(5000RPM)で約 30 hrs. かけて解体し懸濁液をつくる。次に負染色(negative staining)剤として2%のリンタングステン酸(PTA)水溶液をつくりPHを7.4とする、そして懸濁液となったGの解体試料と2% PTA とを1:1の割合で混合しよく攪拌する。最後にカーボン支持膜をはった電子顕微鏡用シートメッシュ上に懸濁液を滴下する、なお解体試料とカーボン支持膜との“ぬれ”をよくするためにシュクロースを加える場合もある。その後、真空ポンプあるいは恒温器で乾燥する。電子顕微鏡は JEM 7 型(日本電子KK製)を用い、電圧 80 kV で観察した。マイクロフィブル観察のためには、直接2~3万倍で撮影しネガを約5万倍に引伸しマイクロマツでしらべる。

c) X線回折法。a)の方法で集めたGシリンダーおよびこれと比較のため正常材からの同メッシュの木粉とを反射法でしらべる。X線分析装置は GX 3 型(島津製作所KK製)を用い、赤道線上の回折強度曲線を自記記録し、この曲線図から結晶幅は Scherr 式を用い、また結晶化度は Jayme 法⁴⁾を用いて算出する。

d) 赤外分光分析法。赤外吸収スペクトルは KBr 錠剤法による。錠剤の作製は KBr 粉末 100 mgr. に試料粉末(Gまたは正常材)2 mgr. の割合で均一分散が行なわれるように混合し、加圧成型する。分光光度計は日立製 EPI-G 型分光光度計である。

3. 結果および考察

1) 引張あて材のゼラチン繊維の膜層構成

Populus euramericana の正常材の木部繊維ならびに引張あて材のゼラチン繊維の横断切片の電子顕微鏡写真を Figs. 1, 2 および 3 に示す。正常材の木部繊維膜は P , S_1 , S_2 および S_3 から構成されているのにくらべて、引張あて材では P , S_1 , S_2 および G からできている。また正常材では S_2 が膜中の最厚層であるのに対して、引張あて材では最内側にある G が最厚層である。さらに引張あて材では S_1 と S_2 の厚さはあまりちがいが無い。Wardrop と Dadswell⁵⁾ は、引張あて材のゼラチン繊維の膜層構成を詳しくしらべ2次膜のなかで G が S_1 , S_2 および S_3 とどのような関係をもって存在するかについて、三つのタイプがあることを明らかにした。ここに示された引張あて材では $P+S_1+S_2+G$ のタイプに属するということができる。また Fig. 3 では G が S_2 から分離していることがわかる。これは生材の引張あて材が、乾燥によっておこる G の収縮および切片作製の結果もたらされたものとみられ、 G と S_2 との結合が S_1 と S_2 との結合にくらべて弱いことを意味すると理解できる。この点から考えても Norberg ら³⁾ の G の分離法は当をえたものといえる。また Fig. 3 の G で *mf* と記したのは、もとは写真の面に垂直方向にならんでいたマイクロフィブルが切片作製の際引抜かれてその姿をあらわしたものと推定される。なお、Fig. 4 は引張あて材のゼラチン繊維の横断面のレプリカ写真で I , S_1 , S_2 および G を区別できる。今迄繊維の横断面のレプリカでは膜層構成をしらべるのが困難であったが、超薄切片のレプリカを得ることによって容易になったことを付言する。

2) 電子顕微鏡によるマイクロフィブルの観察

G を解体して PTA で染色して得たマイクロフィブルの電子顕微鏡写真の例を Fig. 5 に示す。マイクロフィブルはかなり均齊にならんでいる所がみられるが、長さの方向には負染色によって周期的に他の部分と染分けされた領域は識別できない。このことから、マイクロフィブルは長さの方向に明瞭に区別できる非晶あるいは準結晶といわれる領域の存在を推定することができない。マイクロフィブルの幅を次の点に注意して測定した。まずもとの G の構造が解体処理によって変化を受けていな

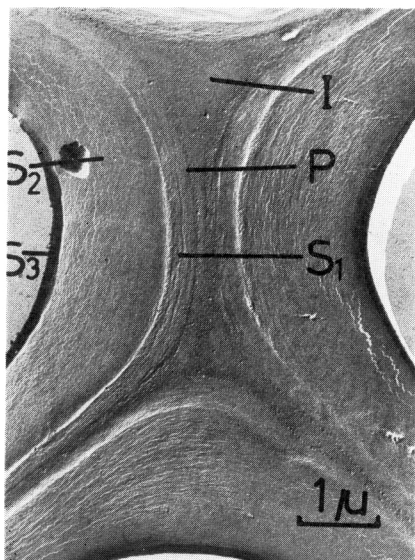


Fig. 1. Electron micrograph of a transverse section in normal wood showing the intercellular layer (*I*), the primary wall (*P*) and the layers (*S*₁, *S*₂ and *S*₃) of the secondary wall in wood fibers.

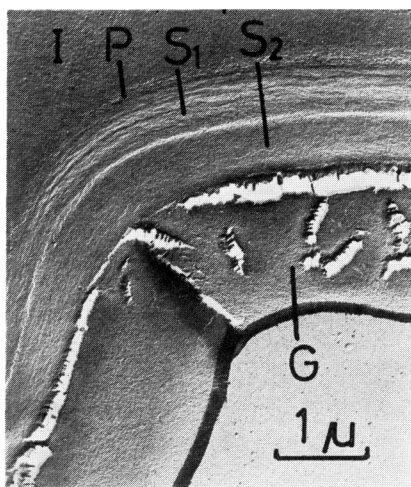


Fig. 2. Electron micrograph of a transverse section in tension wood showing *I*, *P*, *S*₁, *S*₂ and the gelatinous layer (*G*) in a fiber.

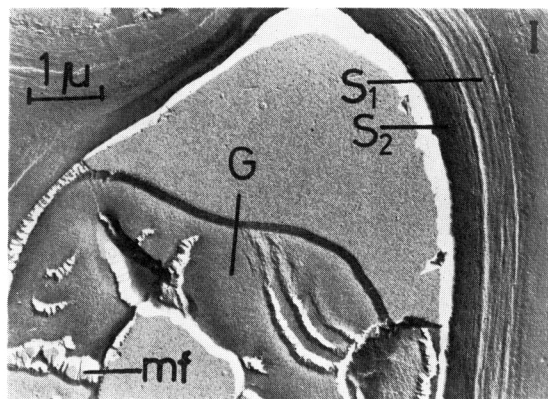


Fig. 3. As in Fig. 2. but showing the isolation of *G* from *S*₂.

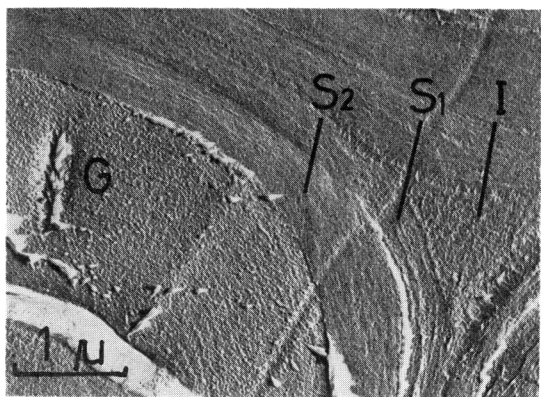


Fig. 4. As in Fig. 2. but showing the micrograph of replica.

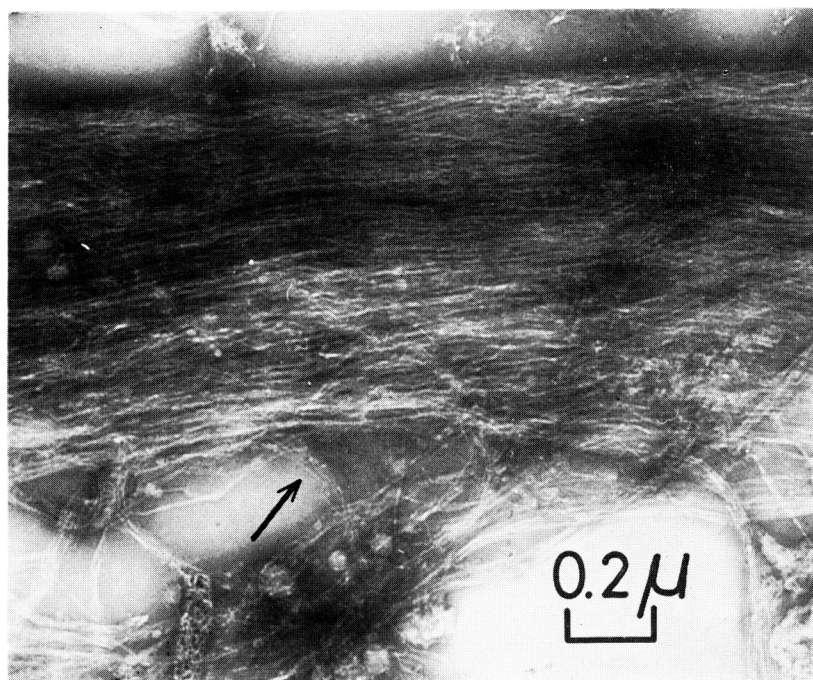


Fig. 5. Cellulose microfibrils of G stained negatively with PTA.

いものをえらぶためにマイクロフィブリルが互にできるだけ平行にならんでいる部位を探す。次に負染色でバックグラウンドの黒すぎるところを避けできるだけ淡く染まっているところを選ぶ、これは黒すぎるところは負染色剤がマイクロフィブリルを部分的におおってしまう可能性がありその幅は真の幅よりも過小になると考えられるからである。さらにマイクロフィブリルが2本以上集合しているものを避けるために、できるだけ均質な幅のものをえらぶ。10枚の写真についてそれぞれ30個ずつ測定してみると $50\sim 70\text{\AA}$ となった。この引張あて材のGには自然の状態で幅 $50\sim 70\text{\AA}$ のマイクロフィブリルが存在する。しかしながら後述のX線回折法や赤外分光分析法による実験の結果、さらには古屋・高橋・宮崎⁶⁾の報告を総合して考えると、このマイクロフィブリル幅にはセルロース分子の結晶芯のまわりにある非晶または準結晶のセルロースやヘミセルロースの分子が含まれているものと推定される。このことについては今後の研究にまたねばならない。

3) X線回折法による結晶構造

引張あて材のGと正常材の木粉（この場合は道管・仮道管・木部繊維・柔細胞などすべての細胞を含む）について反射法を用いて得た赤道線上

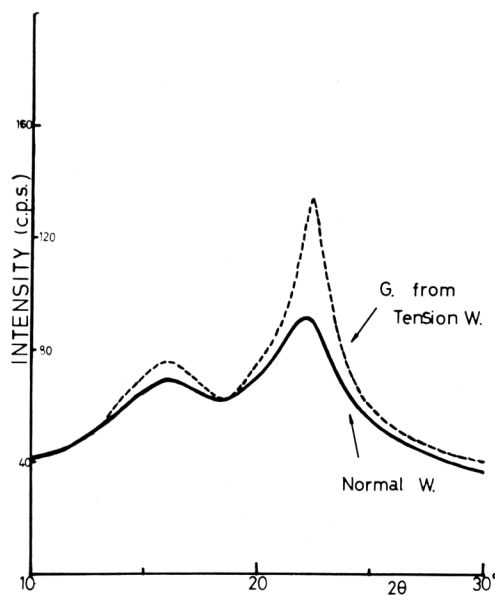


Fig. 6. X-ray diffraction curves of G in tension wood (dot line) and normal wood (solid line).

Table Micell size (width of cellulose crystallite) and crystallinity of cellulose in the gelatinous layer of tension wood and normal wood (*Populus euramericana*) measured by reflection method of X-ray diffraction.

Specimen	Line Breadth (Rad.) (Micell Size: Å)	Crystallinity(%)
G Layer from Tension Wood	0.038 (37)	60
Normal Wood	0.052 (27)	50

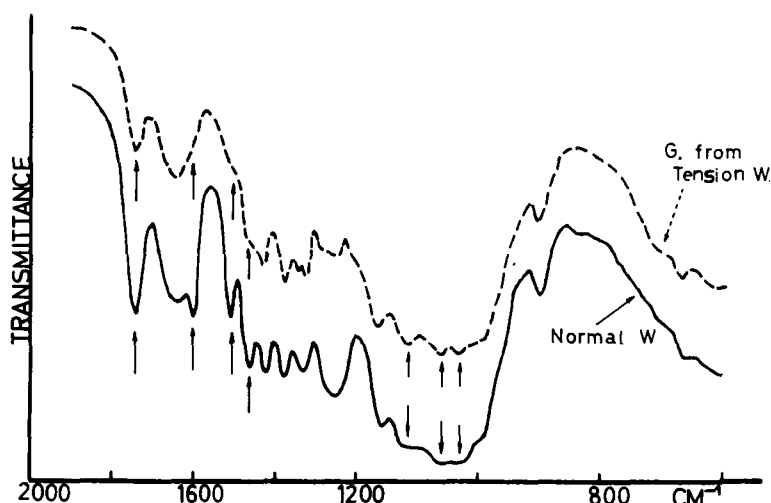


Fig. 7. Infrared spectra of G in tension wood (dot line) and normal wood (solid line).

との赤外吸収スペクトルを示してある。Gの吸収スペクトルは正常材と比較して 1720 cm^{-1} , 1590 , 1500 , 1460 cm^{-1} , 1110 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} および 1040 cm^{-1} に顕著な変化がみられる。 1720 cm^{-1} の吸収は正常材にくらべてGで吸収が少ない。この吸収はキシランによるとされ、針葉樹材よりも広葉樹材の方が大とされている⁷⁾。したがってGにはキシランは存在するが、正常材にくらべその量が少ないものと考えられる。またGのスペクトルでは 1590 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} および 1460 cm^{-1} の吸収が消失する。これらの吸収帯はリグニンにもとづくものとされている⁸⁾ から、Gにはリグニンが存在しないと考えられる。さらに 1110 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} および 1040 cm^{-1} の吸収は正常材に比してシャープになる。これらの吸収帯はセルロースの結晶性に関連すると報告されている⁹⁾ が、このことからGが正常材に比して高い結晶性をもつセルロースからなることが明らかとなり、上述のX線回折の結果を裏付ける。古屋ら⁹⁾ はこの樹種の引張あて材のGには、セルロース、ヘミセルロース、ペクチンが含まれているがリグニンがないと報告しているが、これは本実験の結果と一致する。

のX線回折強度曲線を示すと Fig. 6 のとおりである。Fig. 6 から結晶幅と結晶化度を求め Table にかかげた。この表からわかるように、Gでは結晶幅も結晶化度もともに正常材より大である。このような結果はかつて *Eucalyptus gonioalax* の引張あて材について研究された Wardrop ら⁵⁾ の結果と一致する。とくにここで引張あて材からGのみを分離して得た表の値は注目していいであろう。しかしながら、表の値の結晶幅 37 Å と 2) で得たマイクロフィブリル幅 $50\sim 70\text{ Å}$ の値との関係を結晶芯と準結晶領域とのかかわりあいとして論ずるにはなお検討の余地がある。

4) 赤外分光分析法による検討

Fig. 7 にGと正常材

引用文献

- 1) Côté, W. A. Jr. and Day A. C.: Anatomy and ultrastructure of reaction wood. In "Cellular Ultrastructure of Woody Plants", (Syracuse Univ. Press) 391~418 (1965)
- 2) 原田 浩・谷口 麟・喜志暁雄: 引張あて材のマイクロフィブリル, 第17回日本木材学会大会研究発表要旨集, 91, (1967)
- 3) Norberg, P. H. and Meier, H.: Physical and chemical properties of the gelatinous layer in tension wood fibers of Aspen. *Holzforschung*, **20**, 6, 174~178 (1966)
- 4) Jayme, G. und Knolle, H.: Beitrag zu empirischen röntgengraphischen Bestimmung des Kristallinitätsgrades Cellulosehaltiger Stoffe. *Papier*, **18**, 249~255 (1964)
- 5) Wardrop, A. B. and Dadswell, H. E.: The nature of reaction wood. *Aust. J. Bot.*, **3**, 2, 177~189 (1955)
- 6) 古屋信子・高橋 敏・宮崎 信: *populus euramericana* 引張りあてゼラチン層の化学成分, 木材学会誌, **16**, 1, 26~30, (1970)
- 7) Liang, C. Y., Bassett, K. H., Mc Ginnes, E. A. and Marchessault, R. H.: Infrared spectra of crystalline polysaccharides. *Tappi*, **43**, 12, 1017~1024 (1960)
- 8) Marchessault, R. H.: Application of infrared spectroscopy to cellulose and wood polysaccharides. In "Proceeding of Wood Chemistry Symposium" (Butterworths) 107~129 (1961)
- 9) 谷口 麟・原田 浩・中戸莞二: 薄膜法による木材の赤外吸収スペクトルの測定と結晶性バンドについて, 木材学会誌, **11**, 4, 142~146, (1965)

Résumé

Ultrastructure of the gelatinous layer of tension wood fibers in *Populus euramericana* has been investigated using the techniques of electron microscopy, *X*-ray diffraction and infrared spectroscopy. The experimental specimens of gelatinous layers have been isolated from fibers using the methods reported by Norberg and Meier³⁾.

In the tension wood fibers examined, the inner thick "gelatinous" layer exists instead of the inner layer (*S*₃) of the normal three-layered structure of the secondary wall (Figs. 1~4). It has been shown from electron microscopic observation of cellulose microfibrils of the gelatinous layer which were negatively stained that no paracrystalline regions are present in the longitudinal direction of the microfibrils and that the width of microfibrils is measured to be ca. 50~70Å (Fig. 5). It has been also estimated from the line broadening of *X*-ray diffraction that the breadth of the crystalline regions (micelles) is 37Å and that the degree of crystallinity of cellulose is 60% (Fig. 6 and Table). Evidence that the gelatinous layer has little lignin and is composed of cellulose of high degree of crystallinity, has been obtained by means of infrared spectroscopic studies (Fig. 7).