

セルロースマイクロフィブリルの高次構造解析への 電子回折法の導入

藤田 稔・斎藤 幸恵・花岡 純・佐伯 浩

An electron diffraction method applied to the higher order structure
of cellulose microfibrils

Minoru FUJITA, Yukie SAITOH, Jun HANAOKA and Hiroshi SAIKI

要 旨

セルロースの結晶構造およびセルロースマイクロフィブリルの配向はこれまで詳しく研究されてきた。しかし両者の間を橋渡しするセルロースの高次構造については未だ不明の点が多い。そこで電子回折法をセルロースの高次構造解析に応用するために、試料作製と回折法の両面から改善を加え、その有効性を検討した。まず、バロニア、ラミー、仮道管壁のS₂層、ポプラのG層から、細胞壁本来の構造を維持するために薄層を剥離した。そして電子回折につきまとう試料の電子線損傷を軽減するために、無用な電子線照射を極力減らすことを工夫した。その結果、多数の回折スポットを持つ鮮明な回折パターンを得ることに成功し、セルロースの高次構造解明の端緒を得ることができた。さらに酢酸ウラニル染色することによりマイクロフィブリルの人為的移動を防止し、また間隙のコントラストを増大させ、その広角および小角領域の回折強度を解析することで、マイクロフィブリルの周期的分布などが評価できるようになった。

1. 緒 言

セルロースマイクロフィブリルは植物細胞壁の主要化学成分であると同時に、その骨格構造を構築する点で非常に重要である。とくに木材細胞壁においては、その存在は木材の物性に決定的な影響をおよぼしている。そこで、木材はもとより種々のセルロース試料を用いて、超ミクロレベルでは結晶系や単位格子定数、そして単位格子内での分子鎖の配列などが論議され、よりマクロなレベルでは、細胞壁におけるマイクロフィブリルの分布や傾角が研究対象となってきた。そしていくつかの結晶単位胞モデルや細胞壁の壁層モデルが提案されている¹⁾²⁾。

しかしながら植物細胞壁におけるセルロースマイクロフィブリルの実際の存在状態を考える場合には、これらのミクロモデルとマクロモデルの間の様々な問題、たとえばマイクロフィブリルの存在場所としてのラメラの構造、マイクロフィブリルの長軸における配向の乱れや相互の間隔、また横断面方向における寸法の均一性や面配向の有無など(これらを本報では高次構造と呼ぶことにする)、多くの問題をさらに詳しく研究する必要がある。細胞壁の形成過程では、ヘミセルロースやリグニンは細胞質中で合成が進み、細胞壁に供給されて堆積するが、セルロースマイクロフィブリルの場合には、細胞膜上で合成されるとただちに結晶化して細胞壁骨格に組み込まれる。それ故に、セルロースマイクロフィブリルのミクロな構造からマクロな構造にわたる様々の存在状態は相互に影響し合っているに違いない。そして、この分野における研究の進展は、たとえわずか

と言えども、マイクロフィブリルのすべての構造に関係するので非常に意義があると考えられる。

マイクロフィブリルの研究には、古くは偏光顕微鏡が、最近ではNMRなどの新鋭機器³⁾が利用されるようになったが、最も重要なものはX線回折法による結晶学的アプローチと電子顕微鏡によるマイクロフィブリルの直接的な観察であろう。X線回折法は、セルロース結晶の面間隔と個々の回折点の強度を中心として多くの情報をもたらすが、結晶構造の解明にはさらにいくつかの推定を必要とする。セルロース分子鎖の逆平行配列を想定した、Meyer-Mischの有名な単位胞モデルも、最近では批判の対象になり、平行鎖の単位胞モデルが有力となっているのはその例であろう⁴⁾⁵⁾。X線回折法では、結晶軸の方向、すなわちマイクロフィブリル傾角や面配向も解析できるはずである。しかし実際には、バロニアなどの巨大細胞壁の場合はともかく、木材の場合には細胞寸法に対するX線の照射面積が大きすぎるために、得られる結果は曖昧となる場合が多い。またマイクロフィブリルの高次構造の解析にはX線小角散乱(回折)法を導入した例もあるが^{6)~8)}、実際には多くの問題を抱えている。

一方電子顕微鏡、とくに透過電顕による高拡大画像観察では、マイクロフィブリルの配向が明瞭に観察される。さらにバロニアのようにマイクロフィブリルが非常に太い場合には、結晶格子の周期が直接観察できるようにすなった⁹⁾。しかし被写界深度の大きいのが特徴である電顕拡大画像でマイクロフィブリルを観察するには、マイクロフィブリルが重なり合うことなく比較的疎に分布することが必要であり、さらに一度に観察できる面積は非常に限定され、得られた結果は定性的とならざるを得ない。単結晶のような規則性の高い構造は別として、規則性の低い高次構造を調べる場合には、できるだけ広い領域を探索するとともに、多数のマイクロフィブリルを解析して、定量的な情報を得る必要があろう。このようにX線回折法と電子顕微鏡による画像拡大法は、各々優れた点もあるが、マイクロフィブリルの高次構造の解明法としては問題も多い。

電子回折法は上記の2方法の長所を連携できるので、高次構造解明に非常に有効な手段として期待される。すなわち電子回折法は、回折の対象となる領域を自由に設定できるので、細胞の寸法に対して適度な領域を選択して、価値の高い情報を引き出すことができる。また電子線はX線よりも散乱されやすいので、実験条件が整えば回折効率が良く、より鮮明な回折パターンが期待できる。

しかし電子回折法では、電子線照射による試料の損傷が伴う。セルロースのような有機質試料ではこの問題は非常に深刻である。それでもセルロースマイクロフィブリル研究の節目となるような重要な研究が報告されている。G. HonjoとM. Watanabeは、試料冷却装置を用いて、試料損傷を軽減し、バロニアで非常に明瞭な電子回折パターンを記録することに成功した¹⁰⁾。そしてX線回折とは異なる非対称の回折スポットを発見し、Meyer-Mischの2分子鎖単位胞モデルに対して、8分子鎖単位胞モデルを提案した。これは、海藻のセルロースマイクロフィブリルでは単斜晶と三斜晶が混在するという最近の報告¹¹⁾の端緒と言えるもので、電子回折法の有効性を示すものである。しかし試料冷却は実際には非常に困難な作業である。最近では、回折パターンの記録に際して、記録媒体の改良とともに、観察領域の選択や焦点合わせなどに要する電子線照射量を軽減する方法なども提案され、またこれらによって非常に明瞭な回折パターンが得られるようになったが^{12)~13)}、それでもなお電子回折法の実施には、試料作製および電子顕微鏡の操作の両面から高度の技術を必要とすることもあり、いまだ汎用的な方法とは言えない。

最近筆者らはフーリエ変換画像処理を木材の形態解析に導入してきた^{14)~16)}。この回折、すなわちフラウンホーファ回折は、フーリエ変換画像処理の一種であるから、フーリエ変換のより一般的な画像処理理論を適用できる。フーリエ変換画像処理では、画像情報は、振幅(コントラスト)、位相(位置)、周期(寸法)の3要素で構成される空間的な波形として一括処理される。ここで

注目されることは、原画像→フーリエ変換→逆フーリエ変換→画像再生の過程では、上記3要素の情報は維持されるが、パワースペクトルパターン（回折パターン）だけを採取する場合、すなわち原画像→フーリエ変換→パワースペクトルパターンの過程では、位相情報だけは消去されることである。これは回折パターン撮影時には、試料は静止している必要がないことを意味する。また試料を通過する回折媒体が平行光束の場合（開口数の非常に小さい電子顕微鏡がこれに相当する）には、試料の光軸（ビーム）方向への移動も回折パターンに影響を与えない。すなわち焦点合わせも不要となる。これらは試料の静止と焦点合わせという、従来電顕像撮影に必須とされてきた過程を省略できることを意味する。そこでこれらの特性を活用すると、回折パターン採取時の無用の電子線照射を大幅に軽減できると期待される。

従来電子回折法では、極度に限定された領域、たとえば高分子単結晶などからの回折情報を引き出すことに研究の主眼がおかれてきた。しかし細胞壁のようにマイクロフィブリルの集合した材料では、電子線の照射領域（面積および厚さ方向を含めて）に含まれるマイクロフィブリル全体の情報を出力することになる。高次構造解析には、この領域を大きくして、定量的により価値のある情報を得ることが重要であろう。

一方、電子回折法の基本的方法とされている「制限視野法」では、実際には試料面への電子線の照射面積を制限しているのではないことを注意すべきである。すなわち視野制限絞りは、光源に対して試料の後ろ側に装着されているので、回折の対象面積は一見制限されているように見えても、電子線はその視野の周囲に広く照射され、無用の電子線損傷を引き起こしていることに留意しなければならない。また試料の作製法については、セルロースマイクロフィブリルの高次構造を定量的に解析するには、細胞壁本来の形態をできるだけ維持することが必要となろう。

これらの諸点を考慮して、今回電子回折法に若干の改良を加え、また高次構造の保持を目指して調製した種々のセルロース試料にこの方法を適用して、電子回折法の高次構造解析への有効性を検討した。

2. 試料と方法

2.1 試料の種類と調製法

本研究では、セルロース研究の標準試料ともいえるバロニア（オオバロニア: *Valonia ventricosa*）とラミー（カラムシ: *Bohmeria nivea*）、ポプラ（*Populus euramericana*）のG層、そして通常の本材細胞壁（ヒノキ: *Chamaecyparis obtusa*、スギ: *Cryptomeria japonica*）のS₂層を用いた。

バロニアは細胞壁に切れ目を入れて、1%NaOH水溶液で室温（2～3時間）および煮沸して水洗し、0.1N HClで室温（2～3時間）および煮沸して十分に水洗した。細胞壁を細切し、水中で超音波処理、あるいはアセトン-蒸留水の繰り返し浸漬で細胞壁を膨潤させたのち、実体顕微鏡下で、ピンセットを用いてモノレイヤーおよびバイレイヤーを剥離した。グリッドに、あるいはホルムバル支持膜を張ったグリッドに剥離片を載せて乾燥させた。また場合によっては、1%あるいは2%酢酸ウラニルの液にグリッドを10分間浮かべてマイクロフィブリル間にウラニルを浸透させ、濾紙で試料表面の液滴を除いて乾燥させた。

ラミー韌皮繊維と木材細胞は亜塩素酸ナトリウムで脱リグニンし、ピンセットでまず個々の繊維を分離し、その周囲の一次壁やS₁層を取り除いた。そして残りの二次壁から薄い壁層を剥ぎとってグリッドに載せた。

ポプラG層は、引張あて材から20μm厚さの板目切片を作製し、これを水浸して超音波処理し、

剥がれて水中に浮遊してきたものをグリッドに載せた。

2. 2 電子回折法

画像の拡大と電子回折にはJEM2000ESを用い、100kVの加速電圧で使用した。領域選定のための拡大倍率は2500～10000倍、電子回折パターン記録時のカメラ長は広角回折用には20cm、小角回折用には500cm、回折パターン撮影の露出時間は2秒程度とした。拡大画像と回折パターンの記録には三菱MEMフィルムを使用した。

今回の電子回折では、電子線損傷を軽減するために、透過電顕に通常装備されている制限視野回折法 (Fig.1A参照) と異なり、次のような手法を採用した。

I : 回折領域の限定

試料面における電子線の照射面積を、コンデンサーレンズの電流値を調整することで、試料面で約 $2 \sim 5 \mu\text{m} \phi$ に相当) にビーム径を絞り込むことで実行した (Fig.1B参照)。この方法では、ビーム照射領域以外では、試料の電子線損傷は生じない利点がある。照射ビーム全体を微小領域に絞り込むと、その部分での電流密度が過剰となるので、コンデンサー絞りを小さく ($50 \mu\text{m} \phi$) し、さらに照射電流量を微弱にすることで対処した。

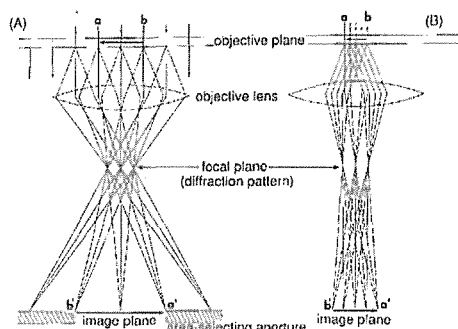


Fig. 1. Schematic diagrams of the ordinal selected area electron diffraction method (A) and the modified method (B)

II : 回折パターンの焦点合わせ

照射電子線が平行ビームの場合には、対物レンズの後焦点面に回折パターンが結像する。照射ビームを絞り込む本法では、回折パターンの結像位置は後焦点面から少し前にずれるが、これは回折パターンの照準電流を操作して補正した。具体的には、倍率、カメラ長などの条件を設定後に、光路を回折用に切り替え、試料を入力しない状態で、ビームを可能な限り微小な点に集束させた。なお試料を通過するビームが平行でなくとも、フラウンホーファ回折すなわちフーリエ変換は正確に実行される。

III : 試料の装着と回折領域の選定

グリッドに載せたセルロース試料をあらかじめ光顕観察し、試料の分布を詳しくスケッチしておいた。そして非常に弱い照射電流密度下で、グリッド像を観察し、手際よく基準となる部分を定めて拡大した。この基準点を元にして、目的とする領域の場所に目星をつけた。回折パターン撮影の条件が整った光路で、コンデンサ絞りを横ずらしして、照射ビームを遮断した。そして目的とする領域を光路に移動させ、さらに写真フィルムを装着した。その後、露光シャッターが解放している時間に合わせて、コンデンサ絞りを本来の位置に戻して試料にビームを照射し、回折パターンを撮影した。回折パターンの撮影後に、必要に応じて光路を通常の画像拡大光路に切り替え、拡大画像を撮影した。

またビームは遮断せずに、シャッター解放時に試料を横にずらして、新しい領域を光路に入れる方法や、さらにシャッター解放中に試料を移動させ続けて回折パターンを記録する手法も用いた。

IV : 試料の傾斜

一部の試料では、セルロースマイクロフィブリルの面配向を検討するために、照射ビームに対し

て、マイクロフィブリルの長軸の回りに試料面を0~45度傾斜させて回折パターンを撮影した。

2. 3 回折パターンの解析

三菱MEMフィルムに記録された回折パターンは、目視でスポットの出現を検定し、また必要に応じて赤道線上と子午線上などの濃度分布をマイクロデンシトメータ (Sakura PDM 5) で解析した。

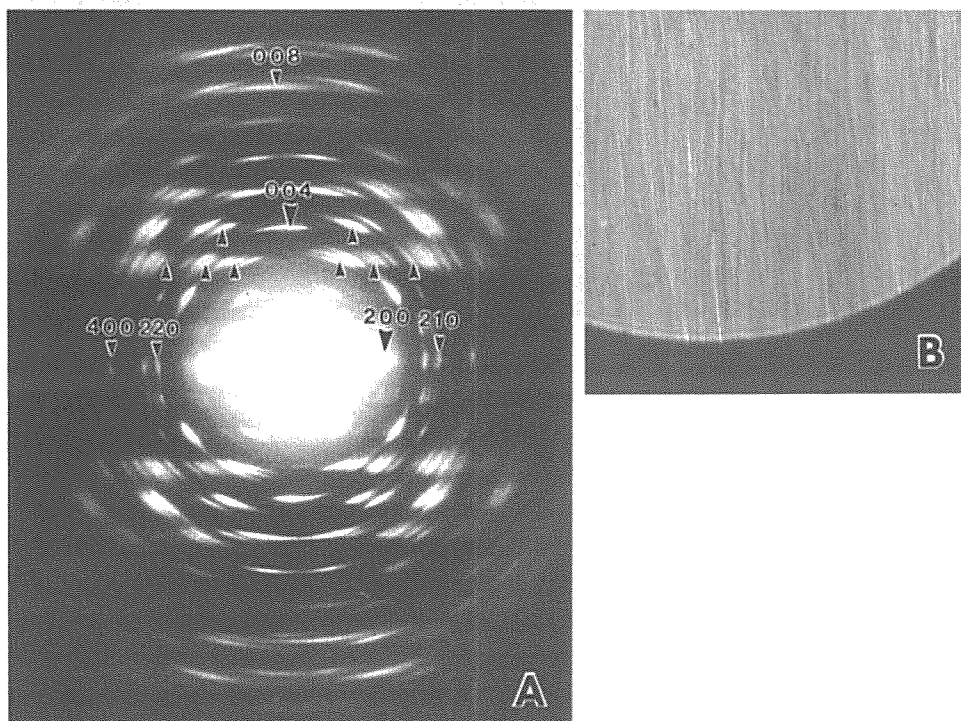


Fig. 2. Electron diffraction pattern of a *Valonia* monolayer (A) and an enlarged portion of the irradiated area with edge of a condenser diaphragm (B). Note that abundant diffraction spots were recorded on the pattern. Some of them (upward arrow heads) are asymmetric to the meridian.

3. 結果と考察

3. 1 集束照野制限法による電子回折パターンの記録

バロニアの剥離モノレイヤーを用いて、前述の電子回折法の効果を検定した。その結果、非常に明瞭な回折パターンを得ることに成功した (Figs. 2, 3)。この方法では、グリッド像の探査時における非常に微量の電子線照射を除くと、実質的にはビーム照射の最初から回折パターンが得られていることになる。電子線損傷は回折パターン記録に必要な照射期間中にも進行していると考えられるが、照射領域に含まれるマイクロフィブリルを数多くすることで (この場合には照射面積を数 μm ϕ 程度広げることで)、非常に短時間の照射量で回折パターンを記録することに成功

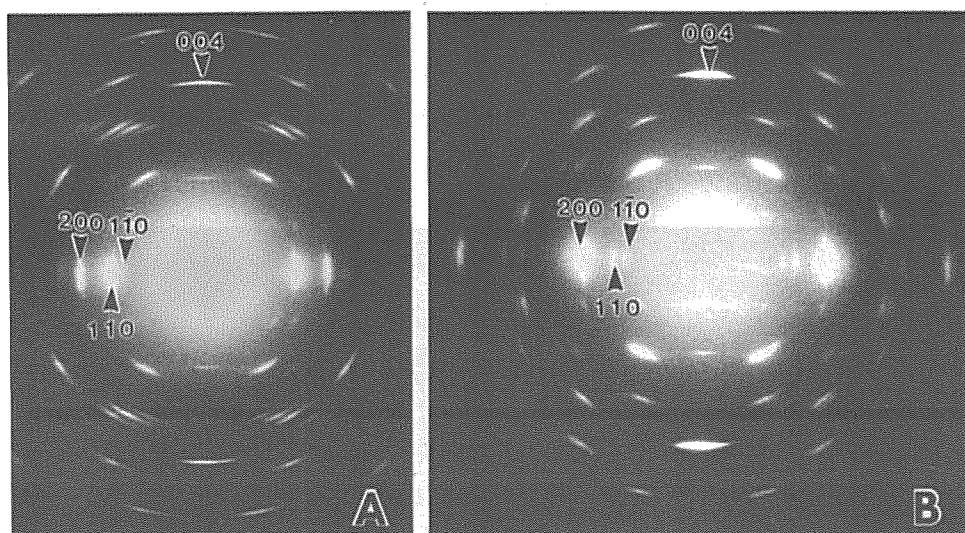


Fig. 3. Electron diffraction patterns. The beam was irradiated to the surface of *Valonia* monolayer (A) and tilted by 45° around the microfibrillar axis (B). In Fig. A, intensity of 110 plane is relatively stronger than those of 200 and $\bar{1}\bar{1}0$ planes. In Fig. B, spots of 200 plane become dominant, while those of 110 plane decrease to the same level of $\bar{1}\bar{1}0$ spots.

している。すなわち個々のマイクロフィブリルへの照射量は少なくとも、これらの微弱な回折電子線を集積することで非常に鮮明な回折パターンを得ることを可能にした。この方法での電子線損傷が非常に少ないことは、同じ領域で回折パターン記録を5回繰り返して検定したところ、最初の2回はほぼ同等の回折パターンが得られたことで証明できた (Fig. 4)。照射を繰り返すと、回折パターンは次第に不明瞭になったが、赤道線上の、とくに110面のスポットは長く残留している。これに対して、004などの子午線上のスポットはすぐに不明瞭となった。照射の影響はc軸方向により敏感なことを示している¹⁰⁾。Figs. 2-4などでは比較的高次の層線上の回折スポットを記録するために、照射時間を敢えて長くしているが、X線回折と同様に1次の回折スポットだけを対象にする場合には、照射時間を短くすることで損傷をさらに防止できる。また回折パターン記録のための操作も非常に単純で汎用性が高いこともこの方法の特徴である。とくにビームを照射中に、試料を意図的に連続的に移動させて回折パターンを記録しても、静止状態の場合と同等の回折パターンが得られた (Fig. 5)。これは回折パターンの記録時には位相情報が消去されることを立証しており、この特性を利用することで電子回折が非常に容易になる。そこでビーム照射法や回折パターン記録法を改良したこの電子回折法を「集束照野制限法」と呼ぶことにする。回折パターンには、最多のもので赤道線上で800面まで、また子午線上で16層線までの、数百もの非常に多数のスポットが記録されたが、この様な高次のスポットを記録する場合には $\bar{1}\bar{1}0$ 面、110面、200面などは低次のスポットがどうしても露出過多となる (Figs. 2, 6)。そこで通常は第6層線程度までの記録にとどめた (Fig. 3)。なお本報では、Sarkoの平行鎖単位胞モデルを用いて結晶面を表示することにする^{11,12)}。

スポットの一部には、子午線に対して非対称のものも認められた (Fig. 2)。これらはバロニア細胞壁での単斜晶と三斜晶の混在に起因するものであろう。しかし本研究はマイクロフィブリルの内部構造解明が主眼ではなく、マイクロフィブリルの高次構造の検討を目的としているので、個々

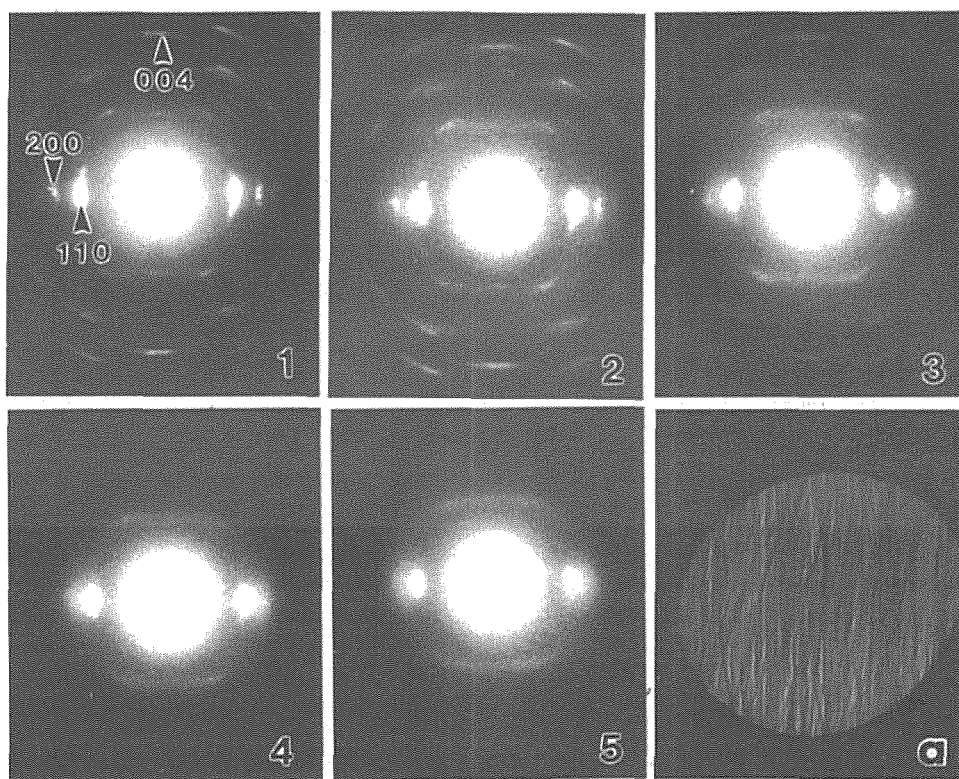


Fig. 4. Change of spot intensity by repeated (1-5) irradiation on the same area (a) of an uranyl-stained *Valonia* monolayer. The spots, especially on the equatorial, were well maintained, while 004 spot were damaged in the early irradiation.

のスポットの詳細は今回省略し、従来から論議の対象とされる主要な一次のスポット、すなわち赤道線上の $1\bar{1}0$ 面、 110 面、 200 面、そして子午線上の 004 面のスポットや、中心付近の小角回折領域など用いて検討した。また試料をビーム軸に対して傾斜させると、スポットの強度が変化するので (Figs.3B,6B), 面配向の状況を検討することにした。この様に電子回折法のわずかな改良で、非常に鮮明な回折パターンが容易に得られたことは興味深い。

バロニアのセルロースマイクロフィブリルは c 軸方向に非常に長く、他の多くのセルロース試料に比べて巾 (a, b 軸方向) も大きい (約20 nm) のが特徴である。配向性がよく、結晶性の高いマイクロフィブリルからの個々の回折スポットは点状になるはずである。そしてバロ

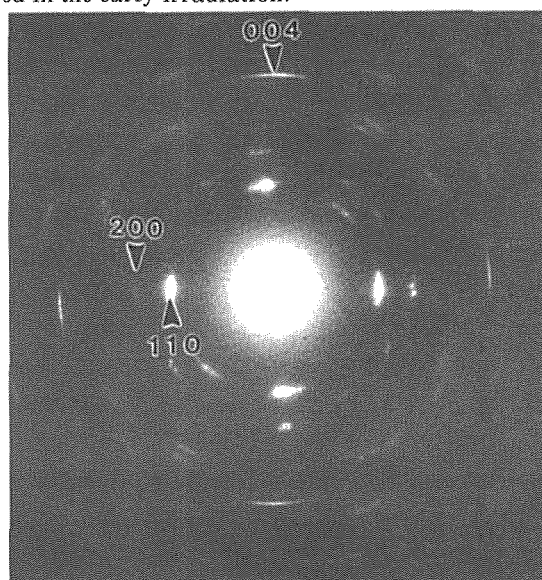


Fig. 5. Electron diffraction pattern when a *Valonia* monolayer was moved during the exposure. Since the diffracted electron beams from only new specimen are accumulated, the spots are very sharp.

ニアのモノレイヤー面では、マイクロフィブリルの長軸(c軸)が一定方向に整然と配向(軸配向性)しており、さらに110面が細胞壁表面に平行に並ぶ、いわゆる面配向性が従来から知られている。前者の軸配向性が厳密に満たされていると、個々のスポットはFigs. 2, 3のような円周方向への広がり(アーキング)を生じないはずである。

このアーキングが起こる原因として、マイクロフィブリル長軸の平行性には本来かなりの乱れを持っていることが考えられる。この乱れは高次構造を考えるうえで非常に重要である。そしてこれはアーキングの円周方向の濃度解析で定量的に検出できることになる。しかしこのアーキングにはいくつかのアーティファクト、すなわち(1)電子線の照射領域内で、試料の均一性がなく、異なったマイクロフィブリル方向からなる微小領域がモザイク状に混在している場合、(2)モノレイヤーの剥離と乾燥処理の間に平行性に乱れを生じた場合、(3)電子線を照射している間に、発生する熱でマイクロフィブリルが移動・回転して平行性を乱す場合、などが考えられる。パロニアモノレイヤーは広い面積で均一性を保つので(1)は考えられない。そこで(2)と(3)による乱れの発生を防止する必要がある。

マイクロフィブリルの面配向については、モノレイヤー面へのビーム照射角度と赤道線上のスポット強度の比較から検定できる。理想的に110面がモノレイヤー面に平行な場合には、Fig.3Aでは110面、Fig.3Bでは200面のスポットだけが現れるはずである。実際にはこれらのスポット強度は相対的に大きいので、面配向の存在は確認できよう。しかしその他の本来現われないはずのスポットもかなりの回折強度を示している。この原因についても上記の3段階の場合が想定され、とくに(2)と(3)の影響の除去が重要であろう。

そこで回折パターンの鮮明さは犠牲にしても、マイクロフィブリルの軸配向と面配向を検討するために次項の改良を加えた。

3. 2 酢酸ウラニル染色およびバイレイヤー法の効果

細胞壁をモノレイヤーまで剥離すると、マイクロフィブリルは非常にほぐれやすくなり、人為的乱れの原因となる。また試料のグリッド上での乾燥時にもマイクロフィブリルの移動を誘発しかねない。さらに電子線照射でモノレイヤーが破れて消失する場合もたびたびあった。そこでモノレイヤーを酢酸ウラニル染色して電子回折に供試したところ、意外に鮮明な、無染色の場合と同等な回折パターンを得ることができた(Fig.6)。電子回折では、対象とする試料以外の電子線散乱要因を極力除去するのが普通である。とくにウラニルのように電子線散乱能が高い成分は嫌われる。しかしこの処理は実用的には問題が無いように思われる。酢酸ウラニルはマイクロフィブリル相互を接着して安定化させる効果があるので、回折パターンの撮影能率が著しく向上した。またこの方法による回折パターンでは、スポットのアーキングが無染色のものに比べて小さいのが普通であった(Figs.3Aと6A参照)。さらに面配向もより明瞭に示された(Figs.3Bと6B参照)。

一方、パロニアの、隣接する2枚のモノレイヤー(バイレイヤー)では、交差したマイクロフィブリル相互が拘束しあう効果、すなわち前項に述べた(2)と(3)の効果が期待される。そこで酢酸ウラニル染色したバイレイヤーの回折パターンを得て(Fig.7)、モノレイヤーのそれら(Figs.3A,6A)と比較すると、110面のスポットはもとより、200面のそれがほとんど消失していることで、面配向性の保持効果が示された。同時にアーキングも減少し、軸配向性も向上していることがわかる。そこでマイクロフィブリルの高次構造を評価するには、試料作製においては過度に薄くすることを避けて、できるだけ細胞壁本来の状態を保つことが重要であることが示された。

また、セルロース試料を乾燥した場合には、本来面配向の認められない場合でも、乾燥によって人為的に面配向することがある¹⁵⁾。そこで面配向については(2)の影響は面配向を促進する方向に働くので、回折パターンに現われる面配向の乱れは(3)の電子線照射時に発生する熱による

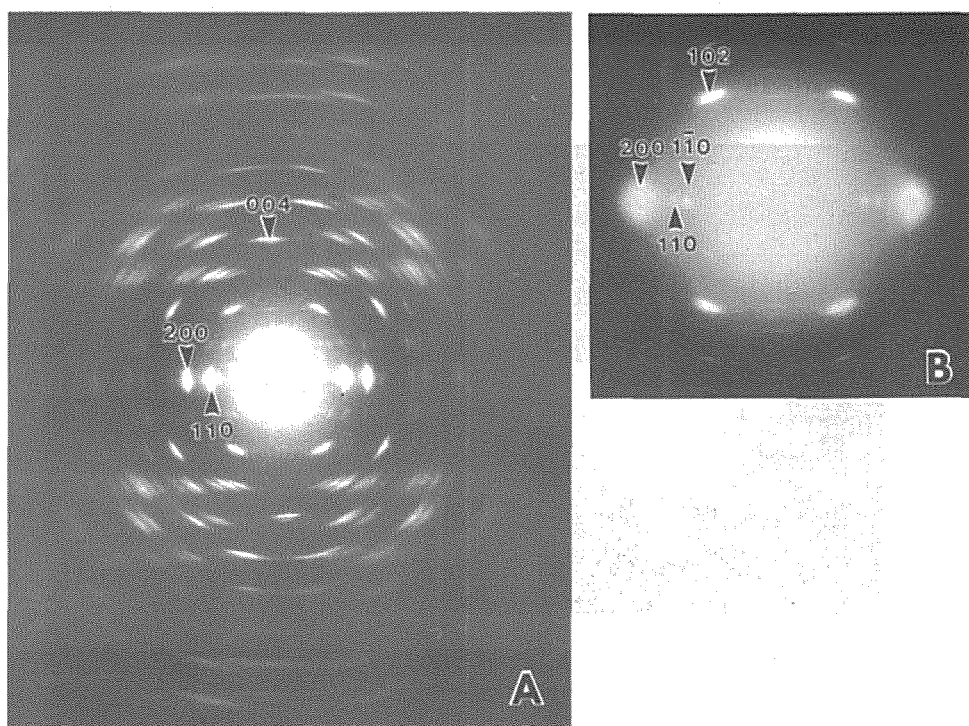


Fig. 6. Electron diffraction patterns of an uranyl-stained monolayer of *Valonia* (A), and that of tilted by 45° around the microfibrillar axis (B). Note that abundant spots (A) were recorded similar to those of non-stained ones (Figs. 2, 3). An uniplanar orientation of the microfibrils is reserved well, judging from very weak intensities of $1\bar{1}0$ and 110 planes in contrast to that of 200 plane (B).

ミクロフィブリルの回転が主要な原因であろう。酢酸ウラニルはミクロフィブリルの周囲を取り巻いて、乾燥時におけるミクロフィブリルの人為的集合、とくに面配向の人為的発生を防止する効果と、電子線照射時の発熱によるミクロフィブリルの回転を防止することの、2方面からの効果が期待される。支持膜を使用した場合にはミクロフィブリルを膜に貼付ける接着剤の効果もあるだろう。結果的には、酢酸ウラニル染色はミクロフィブリルの高次構造保持に非常に有効であると考えられる。もちろん過剰の酢酸ウラニルは散乱電子線を増大させ、貴重な回折スポットをバックグラウンドに埋めてしまうので避けるべきである。試みに、バックグラウンドをデンストメトリーで調べ、無処理のものと比較すると、その影響は小さいことが示された。これらの点から、酢酸ウラニルの悪影響は予想外に小さいと考えられ、この染色法は研究目的によっては大変有用であることが解った。

3. 3 酢酸ウラニル染色によるミクロフィブリルの横断面方向分布の検索

酢酸ウラニル染色したバイレイヤーの回折パターンを中心付近（小角散乱域）で、赤道方向に伸びた鋭い回折のストリークを認めることができた (Fig. 8)。これらストリークの出現はミクロフィブリルの内部構造に起因するのではなく、その横断方向におけるよりマクロな構造から生じるコントラスト（電子線散乱能）の変動が原因である。無処理の場合にはミクロフィブリルと空隙との間のコントラストの差異は小さい。しかし密集したミクロフィブリル相互の間隙を酢酸

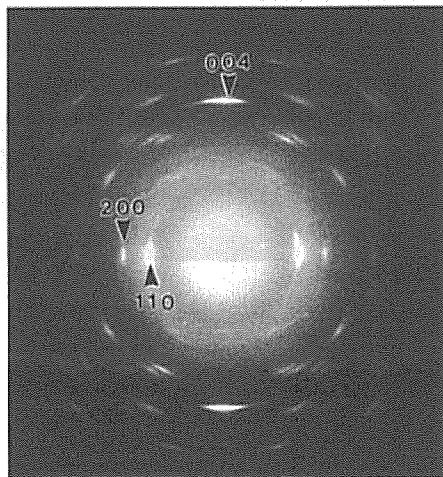


Fig. 7. Electron diffraction pattern of an uranyl-stained bilayer of *Valonia*. The higher order structure of the microfibrils is well maintained, since arcing of the spots is very limited, and the intensity of 110 plane is really dominant in contrast to that of 200 plane.

ウラニルで充填した場合には、間隙のコントラストはマイクロフィブリルよりも著しく高くなっていると推定される。そしてコントラスト変動の周期はマイクロフィブリルの間隙相互の距離、言い換えればマイクロフィブリルの中心間の距離に対応することになる。このような空間波形が、結晶の場合ほどには厳密ではなくても、ある程度周期性を持っていれば、これをフーリエ変換すると、回折パターンの中心付近に頻度分布的にパワーを出力されることが知られている。電子回折は3次元のフーリエ変換に相当するが上記の関係はそのまま適用できるので、もしマイクロフィブリルの中心間の距離が均一であれば、これらストリークの上に、その距離の逆数に対応するスポットが現われるはずである。しかしストリークを目視してもそのようなスポットを見いだせなかった。

そこでの中心付近の濃度をストリーク

クに沿って、また対照としてストリークをはずして放射状にデンスリトメータートレースし、両者を相殺したところFig.9に示すように、いくつかのピークを持つパワースペクトルが得られた。これらのピークはブロードであるが倍数的であり、その周波数から逆算すると、元の試料中には26nm程度の周期が存在することになる。この値はバロニアマイクロフィブリルの幅(20nm)よりも6nm程度大きいことが注目される。すなわちこの値はマイクロフィブリル間の空隙に相当することになる。これらの結果は、酢酸ウラニル染色と小角回折領域の探査でマイクロフィブリル相互の中心間距離を定量的に評価できるという上記の推定を実証するものであろう。この実験過程と結果の誘導過程にはさらに検討すべき点もあるが、マイクロフィブリルの横断方向での分布状態がこの様な方法ではじめて論議できるようになったことは大変重要な進歩であると考ええる。

3. 4 剥離法による各種細胞壁からの回折パターン

従来電子回折法では非常に薄い試料が必要とされてきた。しかしマイクロフィブリルの高次構造解明には、(1)マイクロフィブリルの存在状態が細胞壁本来の状態できるだけ維持されていること、(2)回折の対象領域に多数のマイクロフィブリルが含有されていること、の2点が重要となる。電顕観察の常道である超薄切片法は大変優れた方法ではあるが、樹脂包埋と薄切の操作でマイクロフィブリル分布が影響される場合もあろう。また前述のように集束照野制限電子回折法を採用すると、意外と厚い試料でも明瞭な回折パターンが得られる可能性がある。そこで本研究では、バロニアの壁層剥離法を参考にして、各種の細胞壁から機械的に薄片を取り出し、電子回折に供試してみた。まずポプラのG層と、ラミー繊維壁の電子回折パターンをFig.10に示す。両者共に、

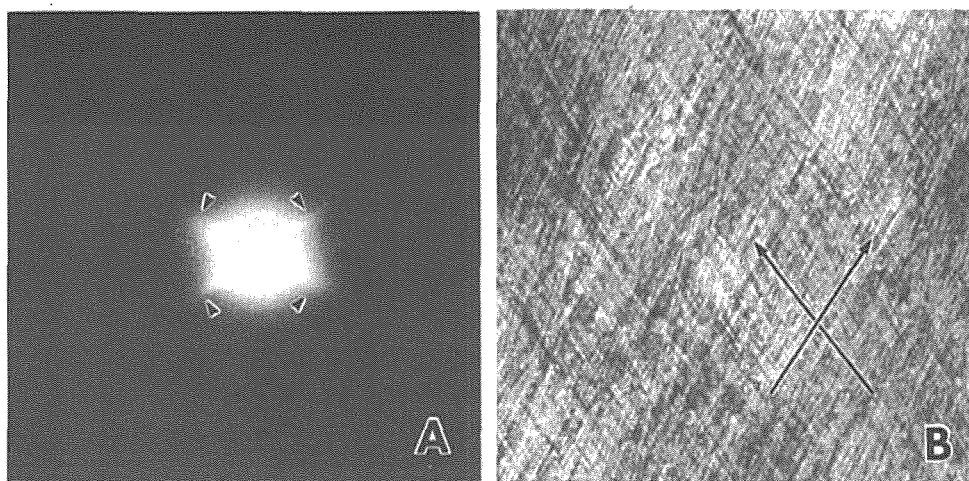


Fig. 8. Electron diffraction pattern (A) in small angle region of uranyl-stained bilayer of *Valonia*, and its enlarged view (B). In Fig. A, the sharp streaks can be clearly discerned (arrow heads), perpendicular to microfibril orientation (arrows) in Fig. B.

散漫散乱の少ない明瞭な回折パターンと言える。供試した薄片の正確な厚さは計測できなかったが、薄片のある部分とない部分の電顕画像でのコントラストの差異から判断して、少なくとも $0.3\mu\text{m}$ 以上はあろう。この様に厚い試料でも明瞭な回折パターンが得られたことは、セルロース試料では多重散乱の影響がそれほど深刻でないことを示す。また004面のスポットも健在であり、Fig.4におけるその早期の消失と比較して電子線損傷の影響が小さいと考えられる。これは電子回折法が細胞壁構造研究に今後さらに活用できることを意味する。

供試されたG層とラミー二次壁はほとんどセルロースからなり、マイクロフィブリル幅も通常の木材細胞壁のそれ(約3nm)より少し大きい(約5nm程度)とされる。またマイクロフィブリルが細胞長軸にほぼ平行に配向している点でも共通している。両者の回折パターンを目視すると、110面、 $\bar{1}10$ 面、200面のスポットの放射方向での広がり、バロニアの場合よりも明らかに大きい(Figs. 2, 3 参照)。これはマイクロフィブリル幅がバロニアのそれ(約20nm)よりずっと小さいことによる。一方面配向の兆候は認められなかった。

木材細胞壁S₂層を薄く剥ぐのは容易ではなく、電子回折に供試されたものは剥離された厚いS₂層の、主としてエッジ部分であった(Fig.11)。木材のマイクロフィブリルの幅が非常に小さい

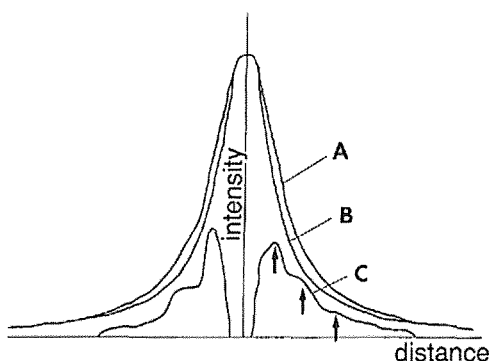


Fig. 9. Densitometer trace (A) along a striation of Fig.8A, its control (B) and the counter-balanced diagram (C) between A and B. Three peaks (arrows) are identified on both sides.

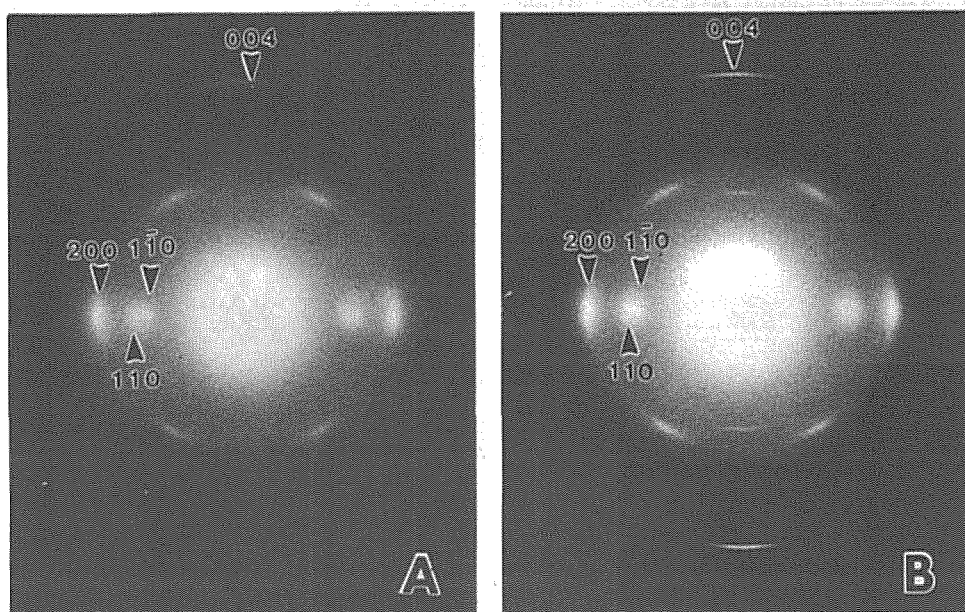


Fig.10. Electron diffraction patterns of a thin layer of ramie (A) and G layer (B)

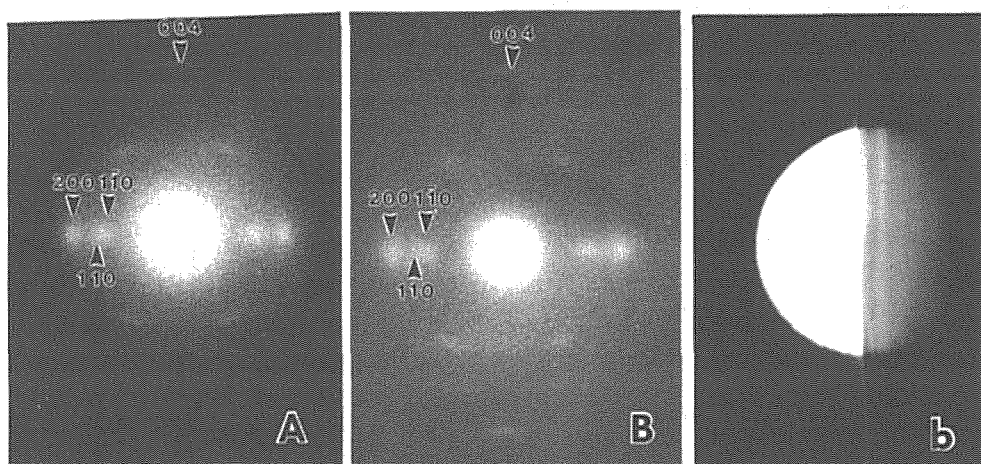


Fig.11. Electron diffraction patterns of a thin S₂ layer of Japanese cypress (A) and *Cryptomeria* (B), and the irradiated area (b) of the Fig.B.

ことや、ヘミセルロースなどを多量に含むことから、これらパターンはバロニアやラミー、G層のものと比較すると鮮明さにおいて劣ることは当然である。また面配向の兆候も認められなかった。しかし従来の木材試料のX線回折パターンや、超薄切片の電子回折パターン¹⁰⁾と比較すると、アーキングが非常に小さいのが注目され、剥離されたS₂における軸配向性の乱れが少ないことがわかる。

またFig.11AとBは剥離S₂層のエッジから得られたものである(Fig.11b参照)。電子線の多重散乱の影響が大きいと、試料側へ回折した電子線を吸収し、この方向のパターンが不明瞭となるはずであるが、実際には試料側と解放側がパターンは均等であり、この問題はそれほど深刻では無いと考えられる。

3. 5 電子回折法によるマイクロフィブリルの高次構造解析の今後の課題

今回電子回折法の改良で非常に容易に回折パターンを得ることができるようになった。また従来考えられてきたよりも、広い面積と厚い試料の探査が可能となった。これは高次構造解析に今後電子回折法が活用できることを意味する。また細胞壁本来の骨格構造を維持するために、剥離法がバロニア以外にも試みられて各々の回折パターンが得られた。さらに酢酸ウラニル染色法の、高次構造維持と増コントラストにおける有効性も示された。後者は小角回折領域の検索によるマクロな構造の周期性検出の可能性を示唆するもので、高次構造解析の糸口となろう。

しかしながら本研究では、写真フィルムに記録された回折パターンを印画紙に再度転写しているので、この過程で多くの情報が消失しているのが残念である。フィルム自体には、本報で示した回折パターンよりもずっと鮮明なものが得られており、そこには定量的情報が含まれているのに、本報では定性的評価にとどまっている。今後はスポットの濃度解析から定量的情報を導くことが重要となろう。また今回は剥離法を試み、また電子回折に伴う種々の問題を検討することができたが、本来電顕法の中心となる超薄切片法も併用して、セルロースマイクロフィブリルの高次構造解析を目指す必要があろう。

7) 引用文献

- 1) 岡村圭造(1989) セルロースの構造. 木材学会誌. 35. 589~594
- 2) 島地謙・須藤彰司・原田浩(1976) 木材の組織. 森北出版. 東京. pp47~101
- 3) YAMAMOTO, H., HORII, F. and ODANI, H. (1989) Structural change of native cellulose crystals induced by annealing in aqueous alkaline and acidic solutions at high temperatures, *Macromolecules*, 22, 4130~4132
- 4) SARKO, A. and MUGGLI, R. (1974) Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides III. *Valonia* cellulose and cellulose II, *Macromolecules*, 7, 486~494
- 5) GARDNER, K. H. and BLACKWELL, J. (1974) The structure of native cellulose, *Biopolymers*, 13, 1975~2001
- 6) WARDROP, A. B. (1952) The low-angle scattering of X-rays by conifer tracheids, *Textile Research Journal*, 22, 288~291
- 7) NOMURA, T. and YAMADA, T. (1976) Small angle X-ray scattering of woody plants, *Wood Research*, 59/60, 7~18
- 8) 野村隆哉(1992) 木竹材のX線小角散乱(第1報) 木竹材の微細構造とX線小角散乱像の関連性, 木材学会誌, 38, 533~542
- 9) SUGIYAMA, J., HARADA, H., FUJIYOSHI, Y. and UYEDA, N. (1985) Lattice images from ultrathin sections of cellulose microfibrils in the cell wall of *Valonia macrophysa* Kütz., *Planta*, 166, 161~168
- 10) HONJO, G. and WATANABE, M. (1958) Examination of cellulose fibre by the low-temperature specimen method of electron diffraction and electron microscopy, *Nature*, 181, 326~328
- 11) SUGIYAMA, J., VUONG, R. and CHANZY, H. (1991) Electron diffraction study on the two crystalline phases occurring in native cellulose from an algal cell wall, *Macromolecules*, 24, 4168~4175
- 12) SUGIYAMA, J. and OKANO, T. (1989) Crystal deformation of cellulose due to electron irradiation, "Cellulose, structural and functional aspects", KENNEDY, J. F., PHILIPS, G. O.

and WILLIAMS, P. A. Eds, Ellis Horwood, Chichester, pp75~80

- 13) 杉山淳司(1992) 微小部電子回折による天然セルロースの結晶構造. 電子顕微鏡. 27. 24~29
- 14) 畑茂樹・藤田稔・佐伯浩(1989) 木材の周期構造解析Ⅱ 放射組織配列の二次元的解析. 材料. 38. 733~739
- 15) FUJITA, M., HATA, S., SAIKI, H. (1991) Periodic analysis of wood structure. IV. Characteristics of the power spectral pattern of wood sections and application of non-microscopic wood pictures, Mem. Coll. Agric., Kyoto Univ., 138, 11~23
- 16) 前川知之・藤田稔・佐伯浩(1993) パワースペクトルパターンの極座標解析による細胞配列の樹種の特徴抽出. 材料. 42. 126~131
- 17) 高井光男(1992) 酢酸菌によるセルロースの生産と利用. 遺伝. 46. 55~59
- 18) REVOL, J.-F., GANCET, C. and GORING, D. A. I. (1982) Orientation of cellulose crystallites in the S₂ layer of spruce and birch wood cell walls, Wood Science, 14, 120~126

Résumé

The cellulose microfibrils are generally recognized to influence both physical and chemical properties of plant cell walls, constituting their framework. Although the crystal structure of cellulose in molecular level and its angular distribution in macrolevel have been investigated, the intermediate higher structure between two dimensions still remains to be exploited. The electron diffraction method, which has been widely applied to the ultimately selected area to obtain crystallographic data, was modified to evaluate the higher order structure with some precautions in specimen preparations.

In order to reduce unavoidable electron damages, the irradiation area was adjusted by a condenser lens to $2.5 \mu\text{m} \phi$, and the diffraction patterns were recorded only from a fresh area without the focussing process. When this modified method was applied to thin layers stripped from *Valonia*, ramie, and S₂ and G layer of some woods, the diffraction patterns with a large number of diffraction spots were obtained.

The uranyl-acetate staining was introduced to maintain the original higher order structure of the microfibrils, as well as to enhance the contrast between intermicrofibrillar space and the microfibrils. In the former an artificial movements of the microfibrils were well prevented. Periodicity of microfibril distribution in their cross section was able to be precisely evaluated with small angle scattering pattern.