

仮道管切開法による細胞壁構造の研究

奥村 正悟・原田 浩・佐伯 浩

Cell Wall Organization of Softwood Tracheids through the Microdissection Technique

Shogo OKUMURA, Hiroshi HARADA and Hiroshi SAIKI

目 次

要 旨.....	171	3. 結果と考察.....	173
1. はじめに.....	171	引用文献.....	175
2. 材料と方法.....	172	Résumé	175

要 旨

針葉樹仮道管を切開法によって平面に展開し、半径壁と接線壁を同一平面上で観察することを試みた。切開操作はマイクロマンピュレーターで行ない、切開仮道管は電顕的あるいは光顕的に観察した。この方法で完成した春材仮道管ばかりでなく、二次壁形成中の春材仮道管も切開することができた。春材仮道管の二次壁中層 (S_2) のマイクロフィブリル傾角を、この方法を適用して一仮道管内の半径壁と接線壁で比較した。その結果、仮道管中央部の膜孔のない半径壁とそれに隣接する接線壁との間には傾角の顕著な差は認められなかった。一方、半径壁に膜孔の存在する場合、特に先端寄りの部分では、その上下近辺で傾角が大きくなり、接線壁との差は主消光位で比較すると $15\sim 20^\circ$ に達した。

1. は じ め に

針葉樹仮道管の細胞壁構造を研究するためには従来から種々の方法が用いられてきている。その中で、細胞壁をその内腔表面から観察する方法には、電顕的（レプリカ法）にも光顕的にも木材の縦断切片を用いるのが普通である。しかしこの方法では、矩形断面を有する仮道管の一つの壁しか一度に観察することはできない。また、たとえ追桁の切片であっても、半径壁と接線壁とを同一平面上で同時に観察することは不可能である。

最近 DUNNING^{1,2)} はパルプ化した longleaf pine の夏材仮道管の壁層構造を内腔側から観察するために巧みな方法を開発した。それは仮道管をマイクロマンピュレーターを用いて切開し、仮道管の内腔表面を露出させる方法である（ここではこうした操作を“仮道管切開法”あるいは“切開法”と呼ぶことにする）。DUNNING はこうして内腔表面が露出した細胞壁を更に機械的に引っかき、種々の壁層を露呈させ、一段レプリカ法で電顕的に細胞壁構造を詳細に検討した。

ところでこうした切開法は、単にバルブ繊維のような解繊した単一仮道管や単繊維の内腔面を露出させるためだけでなく、注意深い操作によって円筒状の仮道管全体を平面に展開し、一仮道管の展開像を観察することにも利用出来る。そこで本実験では DUNNING の切開法を、針葉樹の解繊した春材仮道管、夏材仮道管、更に種々の分化段階にある春材仮道管に適用し、仮道管の中央部と先端付近、半径壁と接線壁との細胞壁構造の差を、光顕および電顕的に一仮道管内で検討することを試みた。

この研究の実施ととりまとめに協力していただいた木材構造学研究室の各位に心から感謝します。なお、本報告の概要は第22回日本木材学会大会 (1972. 4, 東京) で口頭発表した。

2. 材料と方法

1) 材料

アカマツ (*Pinus densiflora* SIEB. et ZUCC.), スギ (*Cryptomeria japonica* D. DON) の円盤から、いわゆる成熟材中の典型的春材部を使用した。また分化中の仮道管を得るために、京都大学農学部付属演習林上賀茂試験地に生育中のアカマツ (樹令約50年) の胸高部位から5月上旬～6月中旬にかけて分化帯を含むブロックを得、直ちに 0.8 M ショ糖液または FAA-I 固定液に浸漬した。この浸漬は分化中の仮道管の内表面から原形質を分離させるためであり、³⁾ FAA-I では新生した細胞壁の固定効果をも期待した。

更に、腐朽穿孔を観察するために、満州興安林西白塔ワールマンハ東陵の遺存木材であるコノテガシワ (*Thuja orientalis* L.) (木材構造学研究室所蔵) を用いた。

2) 方法

(1) 単一仮道管の調整

上記試料の希望部位からマッチ棒状の小片 (約 $1 \times 0.3 \times 10$ mm) を得、Jeffrey 氏液 (7.5% CrO_3 , 7.5% HNO_3 の当量混合液) で処理した。この方法で、二次壁外層 (S_1) 形成中の仮道管から完成した仮道管まで解繊することができる。処理時間は、解繊による仮道管の損傷を小さくするために必要最小限 (30°C で通常 6～8 時間) にとどめるようにした。

得られた単一仮道管は、(i) 乾燥に伴う細胞壁の collapse を防いで後の切開を容易にする、(ii) 乾燥に際しての細胞壁の収縮と、それによって引き起こされるミクロフィブリルの配向の変化を最小限にとどめるために、凍結乾燥法を用いて乾燥した。⁴⁾ 乾燥した試料はデンセータ中に保存し、適宜使用した。

(2) 仮道管の切開^{1,2)}

概ね DUNNING^{1,2)} の方法によったが、その概要を述べておく。切開時の仮道管の固定は DUNNING とは異なり、電顕用メッシュセメントを用いた。細胞壁の薄い春材仮道管のような場合には、この方法で十分である。Neoprene W (クロロプレンラバーの2%トルエン溶液) をスライドガラス上に滴下し、溶媒のトルエンを揮散させる。その上に乾燥した仮道管を横たえ、ガラス棒 (先端直径 30 μ 程度) で軽く押さえて固着する (Figure a.)。そして特製のナイフで上側の細胞壁を注意深く切り裂いていく (Figure b.)。適当に切り裂いたところで、そのナイフとガラス棒の先を利用して Neoprene W 上に押し広げ平面とする (Figure c.)。この操作を順次繰返し、仮道管の先端から先端までを切開する。ここで、ガラス棒とナイフの操作は双眼実体顕微鏡 (80倍) で観察しながらミクロマニピュレーター (Carl Zeiss Jena 社製) で行なった。

この切開法で最も重要なことは、DUNNING²⁾も指摘しているように、ナイフの作製である。特に刃先から 10~20 μ の間の切れ味が結果を左右する。本実験では刃の薄いことから両刃カミソリを選び、先端が鋭角になるように割った破片をナイフとして用いた。使用前に刃の反対側の面をエメリーペーパーで軽く研磨して先端を鋭くし、刃の反対側（下側）の面は滑らかになるようにした²⁾。こうして作製したナイフを特製の保持棒に装着して用いた。

(3) 検鏡

スライドガラス上に展開した仮道管は、そのスライドガラスを小さく割って走査型電顕 (JSM-U3; SEM) 用試料台に貼り付け、常法通り C-Au 蒸着して SEM 観察用試料とした。

そのままキシレンーバルサム封入をして光学顕微鏡（位相差，偏光）用試料とした。この場合 Neoprene W はキシレンに溶解してしまい観察の妨げとはならない。

また透過型電顕 (JEM-7A) でマイクロフィブリルの配向を観察するために、EMA を用いた二段レプリカ法を適用した。二段レプリカ法を用いたのは、仮道管を展開しても細胞壁が多少のうねりを有しており、これがモールドイングの際に伸展することを期待したからである。

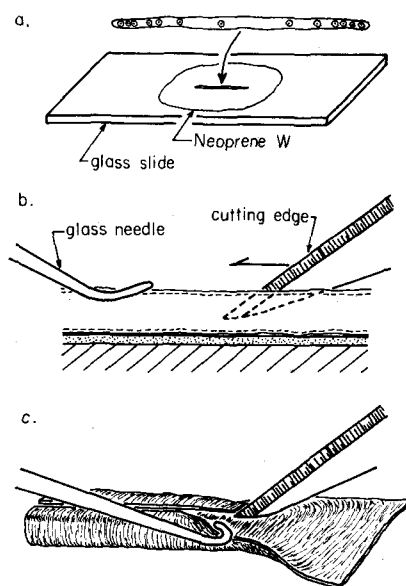


Figure Schematic outline of the microdissection procedure.

a. Neoprene W solution in toluene is dropped on a glass slide and dried adequately, and a single tracheid is pressed onto its surface.

b. Upper side of the tracheid wall is slit open with the knife, which has the cutting edge on its upper side. If necessary, the tracheid is hold with the glass needle.

c. After slitting, the tracheid is spread out flat with the knife edge and the glass needle.

3. 結果と考察

1) 仮道管切開法

上記の方法によって、春材仮道管であれば比較的容易に切開することができ、しかも仮道管の全体を切開することができた。Photo. 1 はこうして得たスギ春材仮道管の一部である。また本実験では夏材仮道管や二次壁形成中の春材仮道管にもこの切開法を試みたが、夏材仮道管の場合には細胞壁が厚く、かたいので展開するのが難しい。無理に展開すると cell corner 付近で細胞壁が破壊してしまう。二次壁形成中の春材仮道管については、S₂ 層形成中の場合にはそれほど難しくはないが、S₁ 層形成中の仮道管は細胞壁が極めて薄く、横巻構造のフィブリルしか存在しないために、ナイフを進める時にフィブリルに沿った破れ目が入りやすい (Photo. 2)。

Photo. 3 はコノテガシワ春材仮道管で、軟腐菌にかなりおかされている。ここで下半分は切開した部分、上半分は未切開部分であるが、切開部分の腐朽穿孔（後述）から、S₂ 層におけるマイクロフィブリルの直線的走向がよく理解されるであろう。このように、細胞壁構造に関して断片的あるいは一つの断面として今まで得ていた情報を、切開法を使うことによって一つの平面上で検討することが可能になる。例えば後述の半径壁と接線壁とのフィブリル傾角の比較がある。ま

た、仮道管以外の構成要素であるアカマツの放射柔細胞には水平壁と放射壁との境界付近に肥厚部が存在することが超薄切片法等で確かめられているが、⁵⁾ 切開法によっても Photo. 4 の如く容易に確認することができる。

なお、この切開法には単一仮道管を得ることが前提となるが、化学処理以外の解繊法の開発や、化学処理による細胞壁中のマイクロフィブリルの挙動が明らかとなれば、セルロース結晶の面配向の問題解決等にもこの方法が利用できるであろう。

ところで、切開仮道管からのレプリカ作製にはもう少し技術的な工夫が必要の様である。すなわち長さが 4 mm 以上もある仮道管の全長を、透過型電顕で確実に把握していくのは非常に難しい。従って使用するメッシュの適切な選択と、レプリカ膜をメッシュ上に移す際の工夫がぜひとも必要である。しかし、SEM や光顕用試料の作成はこの方法で十分であり、有用な情報を得ることが出来る。

2) 半径壁と接線壁のフィブリル傾角

古くより種々の方法で測定された春材仮道管の二次壁中層 (S_2) のフィブリル傾角は、一般に半径壁 (R) の方が接線壁 (T) よりも大きく、その差は $2.0 \sim 10.5^\circ$ 程度と報告されている。^{6,7)} それに加えて半径壁には多数の有縁膜孔が存在し、その回りで S_2 層のマイクロフィブリルが迂回配列をなし、その結果膜孔のほとんど存在しない接線壁よりも半径壁の方がフィブリル傾角を更に大きくするとされている。^{8,9)}

こうしたことを踏まえて、ここでは切開法を用い、 S_2 層のフィブリル傾角を R 壁と T 壁について一つの仮道管内で比較検討してみた。

Photo. 5 は S_2 層形成中の春材仮道管のレプリカ写真である。中央の cell corner を介して R と T 壁が望まれる。ここでは両壁のマイクロフィブリル配向に顕著な差は見られず、R-T にかけて一様に走っているのがわかる。ところで既に指摘されているように、 S_2 層内においてもマイクロフィブリルは完全な平行配列はとらず、ある角度範囲内で種々の方向をとっている (いわゆる angular dispersion)。従って Photo. 5 のようなレプリカ像から S_2 層のフィブリル傾角を正確に決定することはできない。しかし R 壁に有縁膜孔がある場合には、膜孔の極近くのマイクロフィブリルは T 壁よりも傾角を大にして走向しているのが観察された。特に膜孔と膜孔とが近接している場合には、その間の R 壁全体が傾角を大にしていた (Photo. 6)。これは BAILEY and VESTAL⁸⁾ が模式的に示した膜孔周辺のミセル配向を、ある程度電顕的に確かめ、更に隣接する接線壁での配向との関係も明らかにしたものと考えられる。

次に、 S_2 層の表面像ではなく厚さ全体にわたる平均的なフィブリル傾角を評価するために、十字ニコル下で R と T 壁の主消光位を比較検討した。Photo. 7 はスギ春材仮道管の中央部付近を切開したものである。ここで、仮道管壁の主消光位は R、T にかかわらずほぼ一様であるが (Photo. 7(a))、有縁膜孔の上下近近の R 壁の部分では、かなり大きくなっていることがわかる (Photo. 7(b))。仮道管の先端へ進むと有縁膜孔の出現頻度が増大するが、そうしたところでは R 壁の主消光位が T 壁よりも大きくなる。その差はスギ、アカマツとも $15 \sim 20^\circ$ 程度であった。このように、 S_2 層のフィブリル傾角は R 壁の膜孔の上下近近では T 壁よりも大きな値をとることが推定できる。そしてその場合の両壁の差は $15 \sim 20^\circ$ にも達し、既に報告されている両壁の差よりもかなり大きな値である。^{6,7)}

ところで、スギ春材仮道管では、膜孔のない R 壁の部分と T 壁との間には主消光位に差が見られなかったが (Photo. 7(a))、アカマツの場合には若干の差を認めた。この差が針葉樹仮道管に本来備わっているものかどうかについては今後の検討が必要である。

なお Photo. 7(a) で cell corner 付近が強く輝いているが、これはこの部分に特異な細胞壁¹¹⁾構造があるのではなく、切開時に生じた corner 付近の細胞壁のうねりに起因するものと考えられる。¹⁴⁾

最後に、軟腐菌による腐朽穿孔から S_2 層のマイクロフィブリル配向を推定した。腐朽穿孔は主として S_2 層に生じ、その長軸は S_2 層のマイクロフィブリルに平行であることが明らかにされている。^{12,13)} Photo. 8 はコノテガシワ春材仮道管であるが、腐朽穿孔は R、T 壁にかかわらずまっすぐに走っている。ただし、R 壁の有縁膜孔の膜孔縁上あるいは膜孔の極近くで仮道管長軸に対する角度を大にしている。また放射組織との交差域でも角度を大きくしていることがわかる (Photo. 8(b))。従ってコノテガシワの場合にも、マイクロフィブリルは膜孔の近辺では傾角を大にしているが、その他のところでは R、T 壁にかかわらず同一傾角をもって走向しているのが窺われる。

以上の様に、一仮道管内で S_2 層のフィブリル傾角を R と T 壁で比較してみると、両壁の本質的な傾角の差の存否は別にして、R 壁にある有縁膜孔⁸⁾の近辺で傾角がかなり大きくなっていることがわかった。これは BAILEY and VESTAL⁹⁾、STAMM が指摘しているように、膜孔近くでのマイクロフィブリルの迂回配列によるものと考えてよいであろう。従って春材仮道管の場合には、フィブリル傾角の議論に際して半径壁の有縁膜孔の存在はますます無視できない要素となってくる。

引用文献

- 1) DUNNING, C. E.: Cell-wall morphology of longleaf pine latewood, *Wood Sci.*, **1**, 65-76, (1968)
- 2) DUNNING, C. E.: The structure of longleaf-pine latewood. I. Cell-wall morphology and the effect of alkaline extraction, *Tappi*, **52**, 1326-1335, (1969)
- 3) 今村祐嗣, 佐伯 浩, 原田 浩: 分化中の木部細胞膜内表面の電子顕微鏡観察法, 京大農演習林報告, **43**, 303-308, (1972)
- 4) 古川郁夫: 走査型電子顕微鏡の木材への応用, 木材工業, **23**, 10-15, (1973)
- 5) 林 善晴: アカマツの放射柔細胞膜の構造, 京大農課題研究論文, (1972)
- 6) 中戸莞二: 木材の収縮膨張に関する異方性の原因について(第9報), 木材学会誌, **4**, 134-141, (1955)
- 7) 佐伯 浩: 針葉樹材における構造の年輪内変移に関する研究, 京大学位论文, (1968)
- 8) BAILEY, I. W. and M. R. VESTAL: The orientation of cellulose in the secondary wall of tracheary cells, *J. Arnold Arbor.*, **18**, 185-195, (1937)
- 9) Stamm, A. J.: Surface properties of cellulosic material. In: *Wood Chemistry* (L. H. Wise, ed.), New York, pp 449-550, (1946)
- 10) WARDROP, A. B. and H. HARADA: The formation and structure of the cell wall in fibres and tracheids, *J. Exp. Botany*, **16**, 356-371, (1965)
- 11) EMERTON, H. W. and V. GOLDSMITH: The structure of the outer secondary wall of pine tracheid from kraft pulps, *Holzforschung*, **10**, 108-115, (1956)
- 12) 尾中文彦: 古墳その他古代の遺構より出土せる材片について, 日林誌, **18**, 588-602, (1936)
- 13) BAILEY, I. W. and M. R. VESTAL: The significance of certain Wood-destroying fungi in the study of the enzymatic hydrolysis of cellulose, *J. Arnold Arbor.*, **18**, 196-205, (1937)
- 14) Wardrop, A. B.: The organization and properties of the outer layer of the secondary wall in conifer tracheids, *Holzforschung*, **11**, 102-110, (1957)

Résumé

The microdissection technique for a single tracheid, originated by DUNNING (1968, 1969), was further developed in order to observe simultaneously both radial and tangential walls at an even level, along the length of an individual tracheid. Mature or partially differentiated earlywood tracheids were isolated by chemical treatment with Jeffrey's

solution and then freeze-dried. They were pressed onto the surface of dried rubber cement (Neoprene W) (Figure, a). The upper side of the tracheid wall was slit open with a knife, which was made in the same manner as described by DUNNING (1969). The slit tracheid was then spread out flat with the knife edge and a glass needle, exposing the lumen surface (Figure, b and c). The knife and glass needle were controlled with a micromanipulator. The flattened tracheids were either mounted, without further treatment, in Canada balsam for optical microscopy (Photos. 1 and 3); were coated with carbon and gold for scanning electron microscopy (Photo. 2); or were replicated with the two-step method (ethylmethacrylate-carbon, Pt-Pd shadowed) for direct observation of microfibril orientation.

Through this technique the microfibril orientation in the S_2 layer of radial walls and that of tangential walls were compared within an individual earlywood tracheid. From observations of replicas (Photos. 5 and 6), the major extinction position between crossed nicols (Photo. 7), and the cavities produced by soft-rot fungi (Photo. 8), it was found that in the central region of the tracheid there were few differences in the microfibril angle between the unpitted radial wall and the neighbouring tangential wall. On the other hand the pitted radial wall, particularly towards the cell tips, showed a greater angle than the adjacent tangential wall. The difference was estimated to be 15–20 degrees, based on the major extinction position (Photo. 7).

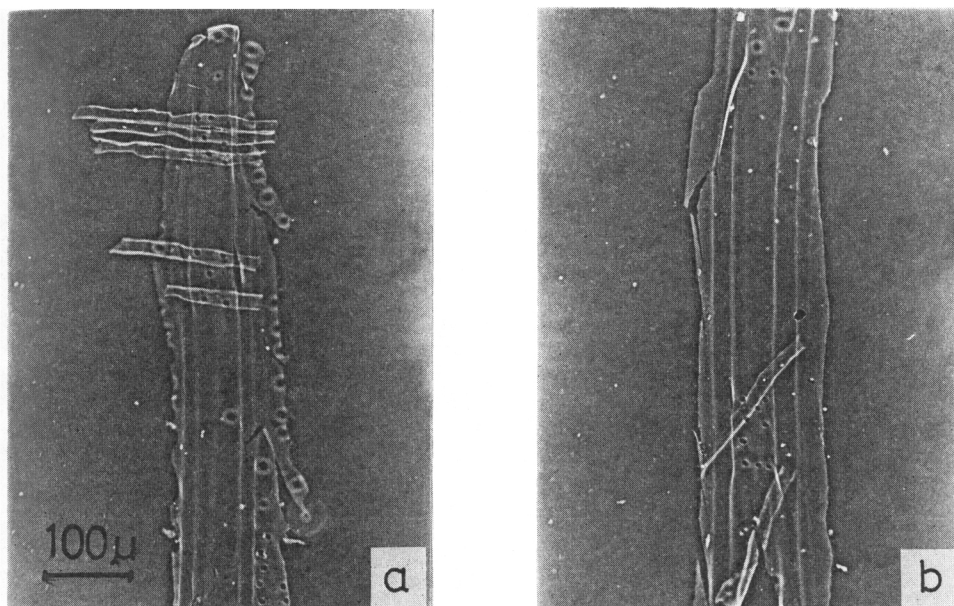


Photo. 1. An earlywood tracheid of *Cryptomeria japonica* D. DON, showing the flattened wall (a) in the region close to the tip, and (b) in the central region of the same tracheid. (phase contrast)

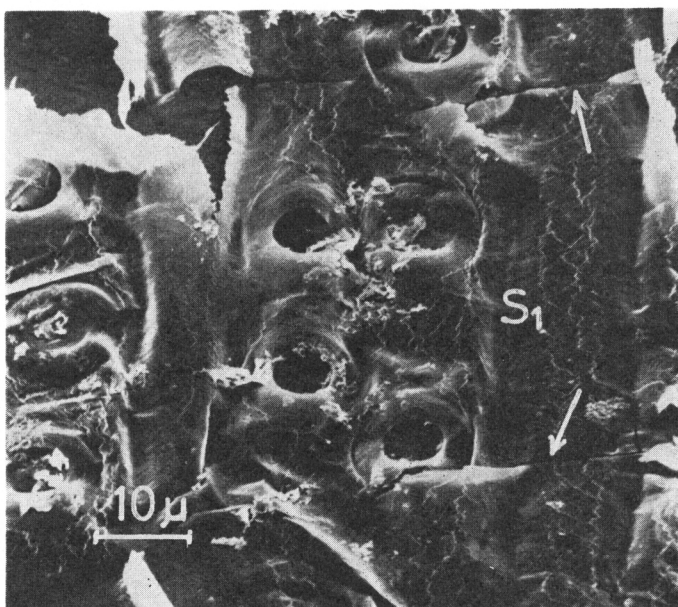


Photo. 2. Scanning electron micrograph of an earlywood tracheid of *Pinus densiflora* SIEB. et ZUCC. in the S₁ layer deposition. Note the pit aperture taking larger diameter than mature one, and the tears (arrows) perpendicular to tracheid axis.

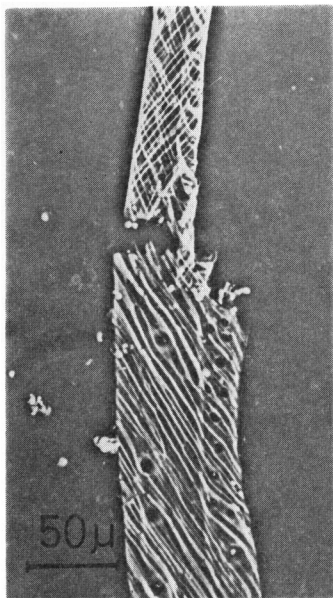


Photo. 3. An earlywood tracheid of *Thuja orientalis* L. decayed heavily with soft-rot fungi, showing the flattened wall as compared with the non-dissected part (upper half). (phase contrast)

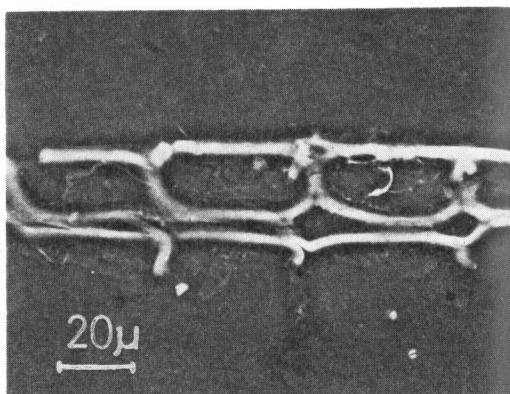


Photo. 4. A ray parenchyma cell of *Pinus densiflora* SIEB. et Zucc. showing the "window frame-like" thickening surrounding the window-like pit. (phase contrast)

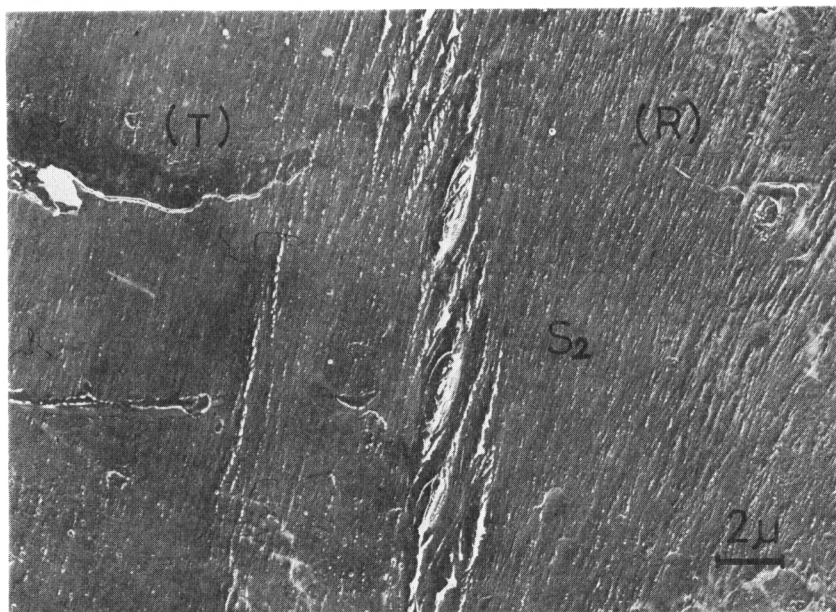


Photo. 5. Electron micrograph of the inner surface of an earlywood tracheid of *Pinus densiflora* SIEB. et Zucc. in the S_2 layer deposition, showing the unpitted radial wall (R) and the tangential wall (T). Note the uniform orientation of microfibrils throughout both the walls.

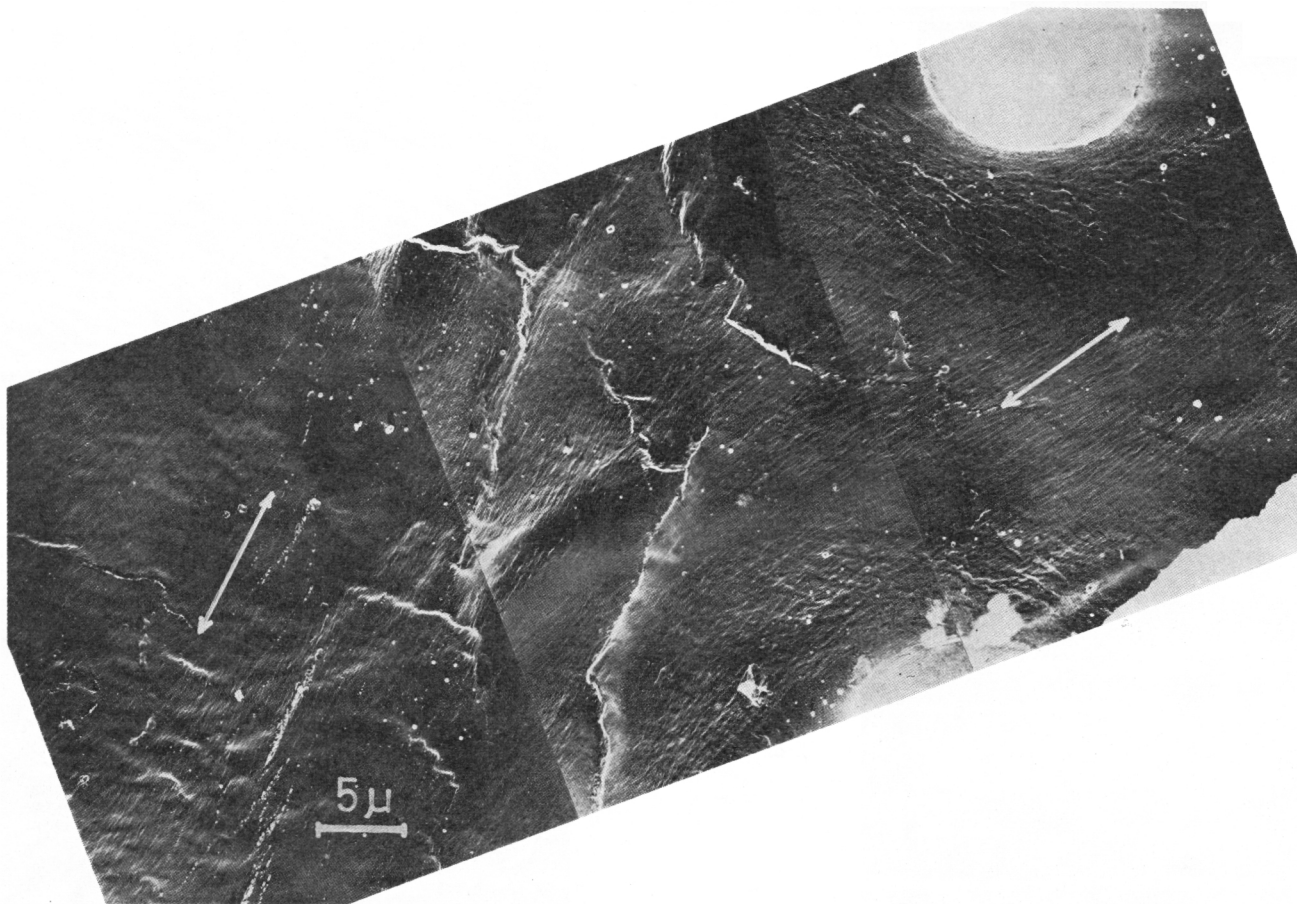


Photo. 6. Similar to Photo. 5, but showing the pitted radial and the tangential wall. Compare the two arrows which indicate the major direction of microfibrils on each part. *Pinus densiflora* STEB. et ZUCC.

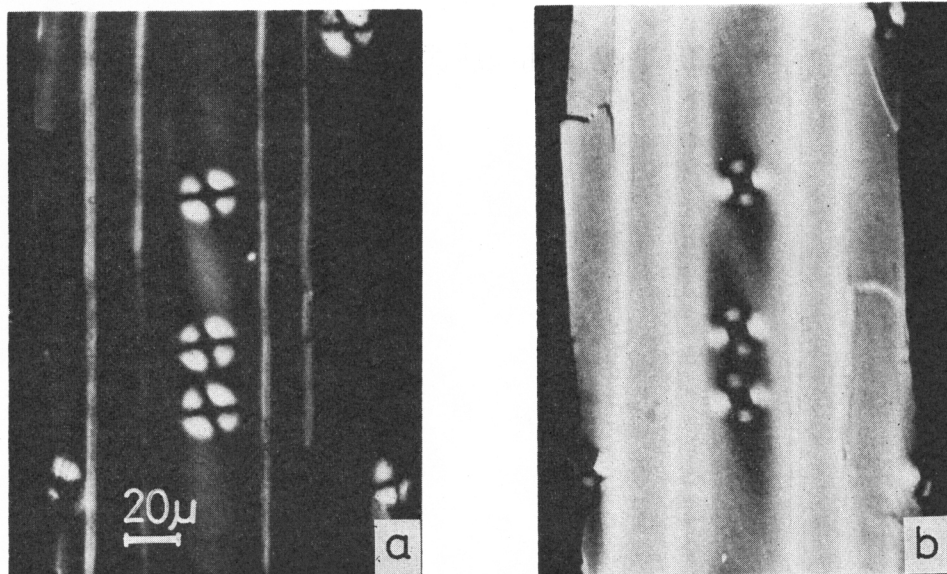


Photo. 7. An earlywood tracheid of *Cryptomeria japonica* D. Don photographed between crossed nicols.

(a) Polalizer 11.0° to tracheid axis. All walls except the pitted radial wall are in extinction.

(b) Polalizer 28.3° to tracheid axis. The radial wall in the vicinity of the bordered pit is in extinction.

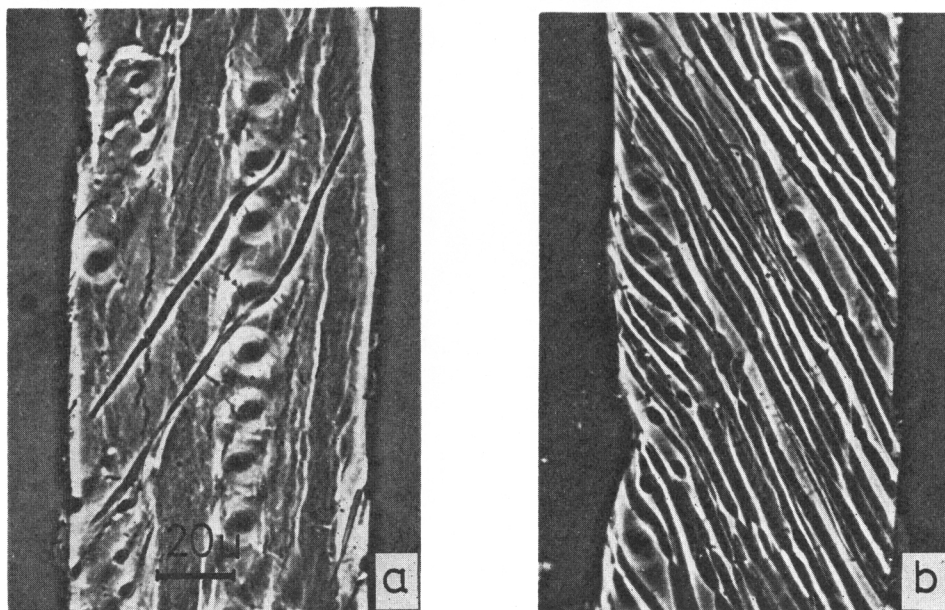


Photo. 8. An earlywood tracheid of *Thuja orientalis* L. decayed (a) lightly, (b) heavily by soft-rot fungi. Note that the produced cavities deviate more from tracheid axis near bordered pits.