

超薄切片処理法による道管壁中の リグニン分布

岸 恭二・原田 浩・佐伯 浩

The Distribution of Lignin in Vessel Walls after Treatments
on Ultrathin Sections

Kyoji KISHI, Hiroshi HARADA and Hiroshi SAIKI

要 旨

道管二次壁の層構成は3層構造, 1層構造および多層構造の三つのタイプがある。それぞれのタイプに属する樹種の道管壁中におけるリグニン分布をUV顕微鏡法および超薄切片にHF処理, NaClO₂処理, KMnO₄後染色を行ない電顕で観察する方法によって調べた。

道管のリグニン濃度は木繊維や周囲仮道管のそれよりも高く, また柔細胞のそれと比較しても一般にわずかに高いか同程度であった。三つのタイプの道管壁中におけるリグニン分布はほとんど同じであった。すなわち, 細胞間層でリグニン濃度が高く, 続いて一次壁, 二次壁とリグニン濃度は減少した。二次壁中ではリグニン濃度は均一であった。

1. は じ め に

道管壁の構造に関する多くの研究¹⁻³⁾からその標準的な層構成が明らかにされているが, 道管壁中のリグニン分布に関する報告は少ない。

Bentumら⁴⁾はフッ化水素酸によって調製したリグニンスケルトンの電顕観察から数種の道管で高いリグニン濃度をもつことを報告している。またFergusとGoring⁵⁾は紫外線顕微鏡によってリグニン濃度の定量化を行ない, *Betula papyrifera*の道管では複合細胞間層と二次壁はそれぞれ0.35—0.42 g/g, 0.22—0.27 g/gのリグニン量をもつことを明らかにした。しかしながら, 一次壁や二次壁各層を区別してリグニン分布を調べた研究はない。

ところで, すでに報告¹⁾したように道管二次壁の層構成は3つのタイプ(3層構造, 1層構造, 多層構造)に分類されるので, リグニン分布の研究はそれぞれのタイプの道管について行なう必要がある。

本研究の目的は道管壁の構造に関する研究の一環として壁中におけるリグニン分布を明らかにすることである。

なお, 研究全般にわたり援助していただいた木材構造学研究室の各位, ならびに紫外線顕微鏡の使用に際し便宜をはかっていただいた木材研究所木材生物学研究室の皆様深く感謝します。

この報告は第32回日本木材学会大会(昭和57年4月・福岡)において口頭発表した。

2. 試料と方法

試料は二次壁の層構成の分類¹⁾に従って日本木材加工技術協会発行の材鑑あるいは生木から採取した (Table 1)。

Table 1. Samples examined*

Three-layer structure	One-layer structure	Multilayer structure
Buna (<i>Fagus crenata</i> Blume)	Kuri (<i>Castanea crenata</i> Sieb. & Zucc.) early wood	Tabunoki (<i>Machilus thunbergii</i> Sieb. & Zucc.)
Itayakaede (<i>Acer mono</i> Maxim.)	Harunire (<i>Ulmus davidiana</i> Planch. var <i>japonica</i> (Rehd.) Nakai) early wood	Arakashi (<i>Quercus glauca</i> Thunb.)
Shinanoki (<i>Tilia japonica</i> (Miq.) Simk.)	Mizunara (<i>Quercus crispula</i> Blume) early wood	Yachidamo (<i>Fraxinus mandshurica</i> Rupr.) late wood
Doronoki (<i>Populus Maximowiczii</i> Henry)	Yamaguwa (<i>Morus bombycis</i> Koidz.) early wood	Sawagurumi (<i>Pterocarya rhoifolia</i> Sieb. & Zucc.)
		Aogiri (<i>Firmiana simplex</i> (Linn.) W.F. Wight) late wood

* Three types of standard layered structures of vessel secondary walls

まず、木材小片を常法により epon 812 および spurr 樹脂に包埋し、約100nm 厚の超薄切片を LKB 8800 超ミクロームで連続して切り出した。これらの超薄切片に次の化学処理および後染色を行なった。化学処理は脱包埋後、藤井ら⁶⁾の方法に従って 55%HF (48—72時間、室温) および NaClO₂ (4 時間) 処理した。なお、後者は電顕観察のために続いて Pt-Pd でシャドウイングした。一方、後染色は 1% KMnO₄ (1—2 時間) で行なった。これらを透過型電顕 (JEM 100C) により観察した。

また、同様に作製した500nm厚の薄切片を紫外線微鏡 (Leitz MPV 2) によって280nmの波長で観察した。

3. 結果と考察

3.1. リグニン分布観察法としての超薄切片処理法

本研究で用いた超薄切片処理法は連続的に切り出した超薄切片に種々の処理を行なうことによって、同一細胞の壁でその処理効果を比較できるという利点をもつ。しかも、超薄切片の処理は比較的容易に行なうことができる。

HF 処理は一般的に80% 濃度のものが使用されているが、藤井ら⁶⁾は55%濃度の HF でもリグニンスケルトンの調製が可能であると指摘している。Fig.1 は55%HF 処理したイタヤカエデの横断切片である。細胞の変形や壁の膨潤は比較的少く、リグニンスケルトンもほとんど乱されることはない。従って、このリグニンスケルトンから壁中のマイクロフィブリル配列を推定することも可能である。道管では S₁ と S₃ のマイクロフィブリル配列は flat helix, S₂ のそれは steep helix であると推定される。しかし、この方法ではブロック処理において可能なリグニン残査の定量が

困難である。藤井⁷⁾は超薄切片に時間をかけて HF 処理を行ない、その処理効果から 8 時間の処理で脱多糖類処理が完了することを定性的に示している。しかし、藤井ら⁸⁾および Côté ら⁹⁾によって指摘されたようにリグニン分布に関する研究では各種の処理を比較検討することが望ましい。以上から本観察では HF 処理を NaClO_2 処理と KMnO_4 後染色と比較検討した。一方、 KMnO_4 染色は必ずしもリグニンの選択的な染色剤ではないけれども、木化やリグニン分布に関する研究で広く用いられている染色法である。ブロック染色が一般的であるが、それは包埋樹脂として広く用いられている epon 812 樹脂が KMnO_4 に染まりやすいことに起因しているであろう。一方、spurr 樹脂は KMnO_4 に対して比較的染まりにくいため、この樹脂を用いると超薄切片の後染色が可能である。また、後染色をすると、すでに報告したようなマイクロフィブリル配列パターンも観察できる¹⁾。

3.2. 道管壁中のリグニン分布

Fergus と Goring,⁵⁾ Bentum ら⁴⁾は道管が高いリグニン濃度をもつことを報告している。本研究で観察したほとんどの樹種においても程度の差はあるが、道管は木繊維や周囲仮道管よりも高いリグニン濃度をもつことが認められた (Fig. 1)。なお、柔細胞では道管よりもかなり低いリグニン濃度を示すものもあるが、多くは道管と同程度かわずかに低いリグニン濃度を示した (Fig. 1)。

3.2.1. 3層構造タイプの道管壁中におけるリグニン分布

ここでは3層構造タイプの典型的な例としてブナの道管壁中におけるリグニン分布について述べる。Fig. 1のイタヤカエデの道管も3層構造タイプに属し、壁中のリグニン分布はブナと同じ傾向をもつ。

Fig. 2はブナの横断切片を示す。HF 処理によって調製したリグニンスケルトン (b) では細胞コーナー部の複合細胞間層は二次壁より高いリグニン濃度をもつことが明らかである。複合細胞間層にはわずかにではあるがリグニン濃度の異なる2つの層を識別できる。これらは真の細胞間層 (I) と一次壁 (P) に相当すると考えられる。従って、一次壁は細胞間層よりも低いリグニン濃度をもつ。さらに二次壁に関しては各壁層ではほぼ同程度のリグニン濃度をもつことが明らかである。

この観察結果は NaClO_2 処理 (d) および UV 顕微鏡写真 (e) によって確かめられた。 NaClO_2 処理では細胞コーナー部の細胞間層に残留物はないが、一次壁には若干のホロセルロースの存在が認められる。従って、細胞間層はほとんどリグニンからなるのに対し、一次壁ではリグニン濃度が細胞間層のそれより低くなることが容易に推定される。一方、二次壁中ではホロセルロースはほぼ均一に分布している。これは二次壁中でリグニンが均一に分布していることを示すものである。また、UV 顕微鏡写真からも二次壁中でリグニン濃度が均一であることが認められた。

KMnO_4 後染色した道管 (c) においても細胞間層と一次壁で電子密度の違いが認められた。しかし二次壁では HF 処理した像と異なり不均一な電子密度を示した。 S_2 は S_1 , S_3 よりも電子密度が低く、また S_3 は一次壁と同程度の電子密度をもつ。この染色像がリグニン分布を表わすものでないことは前述した結果から明らかである。また、無染色の超薄切片 (a) において KMnO_4 後染色した像と同じ傾向の不均一な電子密度が認められた。このことから KMnO_4 後染色像にみられる不均一な電子密度は切削の際に生じたもので壁中におけるリグニン分布とは関係しないことがさらに確かめられた。これについては多層構造の項で詳細に検討する。 KMnO_4 染色法はマイクロフィブリル配列パターンを観察するのに適した方法であるが、リグニン分布の研究では像の解釈に充分注意を払う必要がある。

3.2.2. 1層構造タイプの道管壁中におけるリグニン分布

1層構造タイプのクリの早材道管の横断切片を Fig. 3 に示す。HF 処理によるリグニンスケルトン(a)とKMnO₄後染色像(b)は同じリグニン分布を示した。すなわち、細胞間層が最も高いリグニン濃度をもち、一次壁がそれに続く。二次壁中ではリグニンの濃度は低いが一様に分布している。

一方、NaClO₂処理(c)は細胞間層から完全に壁構成成分を除去するが、一次壁にはホロセルロースが明らかに存在する。また、二次壁中ではホロセルロースは一様に分布する。この観察はHF処理およびKMnO₄後染色の結果をさらに確認したものと考えられる。

ところでFergusとGoring⁵⁾は道管の複合細胞間層は0.35—0.42 g/gのリグニン濃度をもつと報告している。この値は木繊維の細胞コーナー部の細胞間層におけるリグニン濃度(0.72—0.85 g/g)に比べて著しく低い。これはFig. 3 bに示されるように複合細胞間層では、真の細胞間層はきわめて薄く、一次壁がそれに比べてかなり厚いことと関連していると考えられる。複合細胞間層のリグニン濃度は近似的に一次壁のそれを表わしているだろう。

3. 2. 3. 多層構造タイプの道管壁中におけるリグニン分布

多層構造タイプに属するタブノキの横断切片を Fig. 4 に示した。HF 処理およびKMnO₄後染色した二次壁で多層構造が確認された。HF 処理(b)では細胞間層と一次壁のリグニン濃度の違いは明瞭ではないが、他の部位から得た写真では細胞間層の方が一次壁よりも高いリグニン濃度を示していた。また、二次壁中においてはほぼ均一なリグニン濃度が認められた。さらに、このことはUV顕微鏡写真(e)によって確認もされた。

一方、KMnO₄後染色では細胞間層と一次壁における濃度の違いが明瞭に認められた。しかし二次壁においては電子密度の高い帯と低い帯が交互に存在していた。前述したHF処理およびUV顕による観察、また、無染色切片(a)において同様の電子密度の異なった帯が認められることから、この染色像がリグニン分布を表わしていないことは明らかである。このような不均一な電子密度を示す壁を拡大してみると、電子密度の高い帯では棒状のパターンすなわちflat helixに配列したマイクロフィブリル、低い帯では点状のパターンすなわちsteep helixに配列したマイクロフィブリルをもつことが明らかであった。この観察は不均一な電子密度がマイクロフィブリル配列と関連して生じていることを示すものである。超薄切片作製の際、細胞壁の被削性はマイクロフィブリル配列に依存すると考えられる。そのため、マイクロフィブリル配列の変化の著しい多層構造では二次壁各層で被削性が異なり、それは二次壁において不均一な切削を導くであろう。電子密度の差は不均一な切削による超薄切片表面の性状の違いによるものと推定される。

引用文献

- 1) K. KISHI, H. HARADA and H. SAIKI : An electron microscopic study of the layered structure of the secondary wall in vessels. *Mokuzai Gakkaishi*, 25, 521 (1979)
- 2) R. D. PRESTON : Wall structure and growth, 1. Spring vessels in some ring-porous dicotyledons. *Annals of Bot.*, 3, 507 (1939)
- 3) A. B. WARDROP : The structure and formation of the cell wall in xylem. In ZIMMERMANN, M. H. (ed.) *The formation of wood in forest trees*. Academic Press, p. 100 (1964)
- 4) A. L. K. BENTUM, W. A. CÔRÉ, Jr., A. C. DAY and T. E. TIMELL : Distribution of lignin in normal and tension wood. *Wood Science and Technology*, 3, 218 (1969)
- 5) B. J. FERGUS and D. A. I. GORING : The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy. *Holzforschung*, 24, 118 (1970)
- 6) T. FUJII, H. HARADA and H. SAIKI : Ultrastructure of "amorphous layer" in xylem parenchyma cell wall of angiosperm species. *Mokuzai Gakkaishi*, 27, 149 (1981)
- 7) 藤井智之 : 広葉樹の木部柔細胞壁の構造、京都大学学位論文(1981)
- 8) W. A. CÔRÉ, Jr., A. C. DAY and T. E. TIMELL : Distribution of lignin in normal and compression wood of tamarack. *Wood Science and Technology*, 2, 13 (1968)

Résumé

Three types of the layered structure are present in vessel secondary walls; i.e. three, one and multilayered structures. In this paper the lignin distribution across vessel walls was studied in each species of these three types by using an ultraviolet microscope, and examining by electron microscope of the ultrathin section treated with hydrofluoric acid, sodium chlorite, and post-stained with potassium permanganate.

The lignin concentration of vessels was higher than that of wood fibers, and was comparable or somewhat higher compared to that of parenchyma. The lignin distribution across vessel walls was much the same among three types. The lignin was highly concentrated in the intercellular layers and then decreased in the primary walls. The secondary walls showed low and uniform lignin distribution.

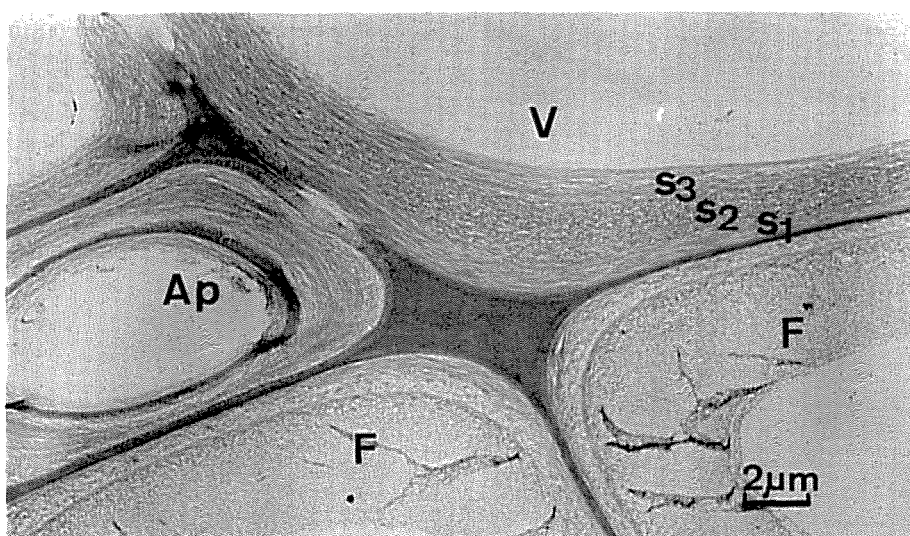


Fig. 1 *Acer mono* Maxim. Transverse section treated with 55% HF showing highly lignified vessel (V) and axial parenchyma (Ap). Note that microfibrillar orientations of S₁, S₂, and S₃ are flat, steep and flat helix, respectively. F: wood fiber

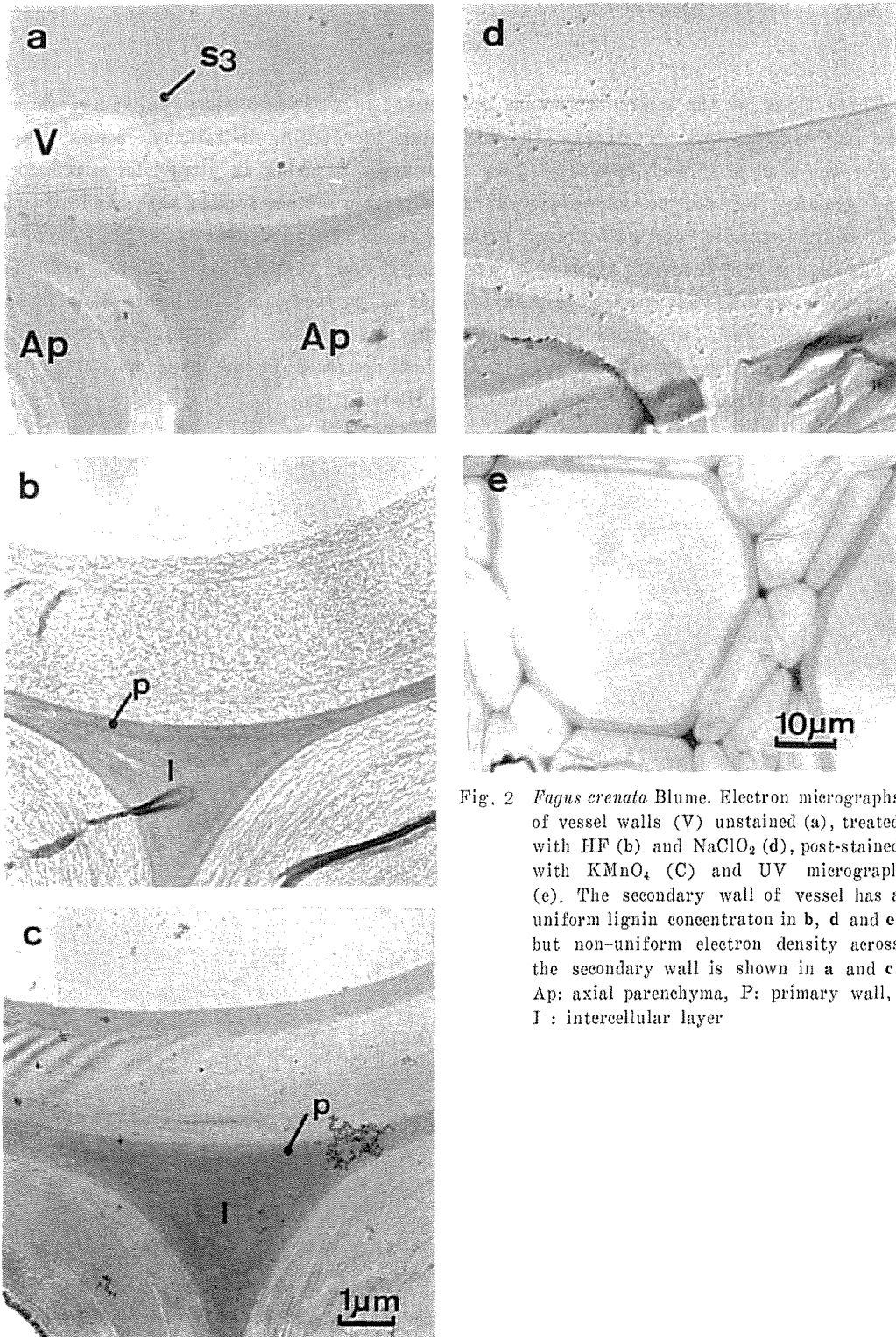


Fig. 2 *Fagus crenata* Blume. Electron micrographs of vessel walls (V) unstained (a), treated with HF (b) and NaClO_2 (d), post-stained with KMnO_4 (c) and UV micrograph (e). The secondary wall of vessel has a uniform lignin concentration in b, d and e, but non-uniform electron density across the secondary wall is shown in a and c. Ap: axial parenchyma, P: primary wall, I: intercellular layer

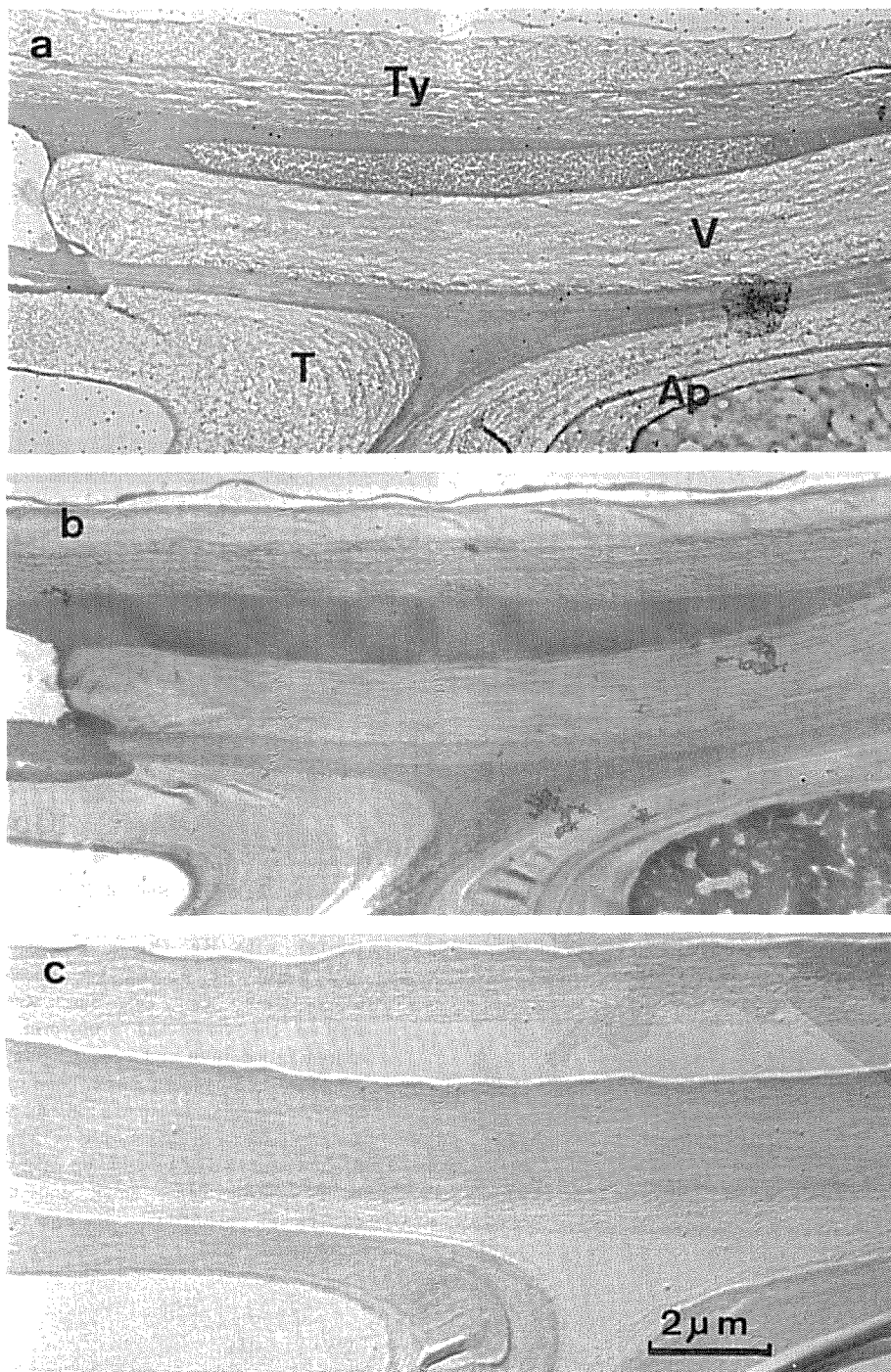


Fig. 3 *Casanea crenata* Sieb. & Zucc. Electron micrographs of vessels treated with HF (a), and NaClO_2 (c), and post-stained with KMnO_4 (b). Note that the lignin concentration across the vessel wall is similar to Fig. 2. Ty : tylosis, T: vasicentric tracheid, Ap : axial parenchyma, P : primary wall, I : intercellular layer

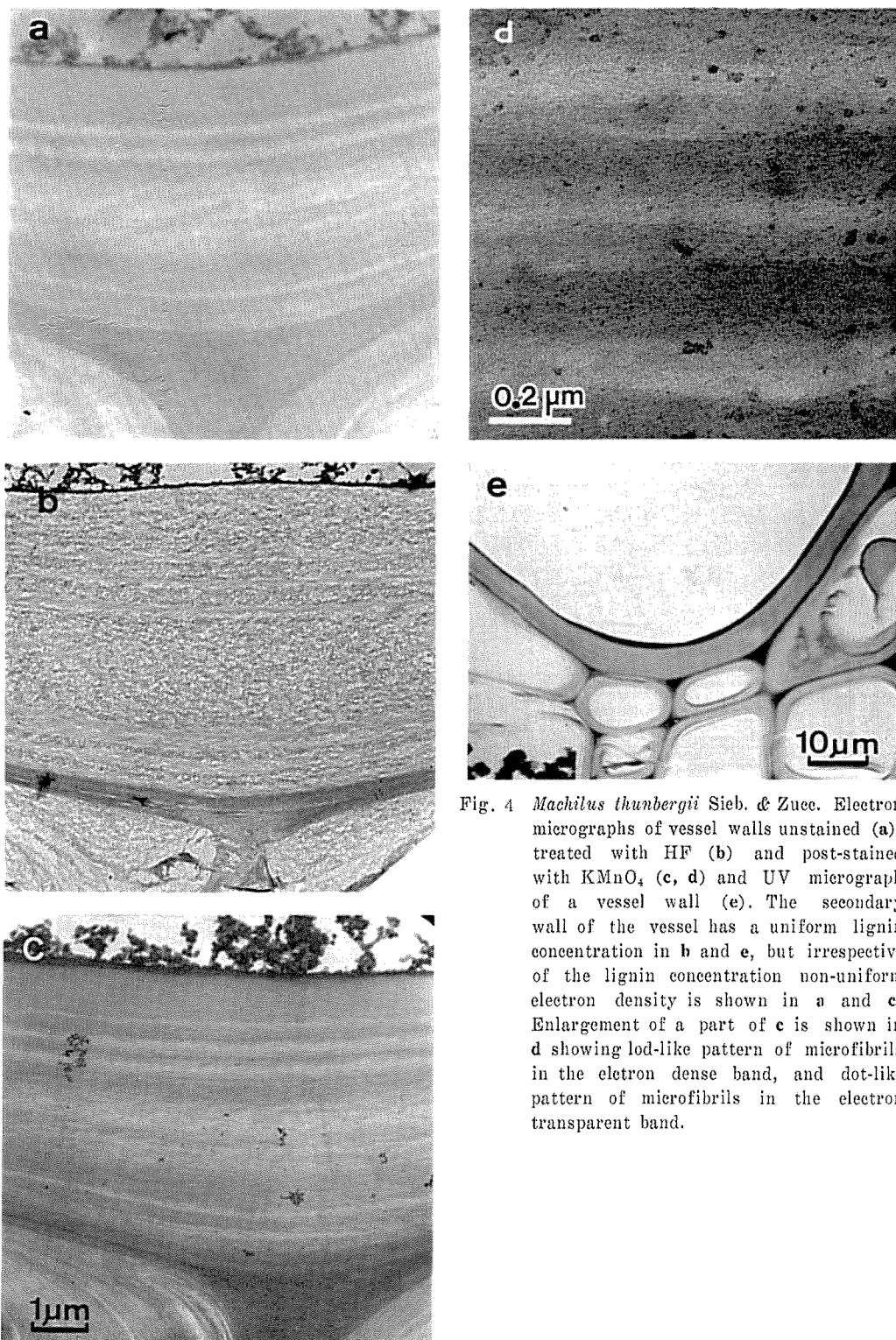


Fig. 4 *Machilus thunbergii* Sieb. & Zucc. Electron micrographs of vessel walls unstained (a), treated with HF (b) and post-stained with KMnO_4 (c, d) and UV micrograph of a vessel wall (e). The secondary wall of the vessel has a uniform lignin concentration in b and e, but irrespective of the lignin concentration non-uniform electron density is shown in a and c. Enlargement of a part of c is shown in d showing lod-like pattern of microfibrils in the electron dense band, and dot-like pattern of microfibrils in the electron transparent band.