

二次壁新生面への壁成分の供給と光・膨圧の関係

伊藤潤一・吉田正人・奥山 剛

スギ分化中仮道管の二次壁新生面において、昼間はセルロースマイクロフィブリルが明瞭に観察されるが、夜間はマトリックスが観察される。これらの結果は、二次壁の堆積時に供給される壁成分に昼夜の違いが存在する事を示している。本研究では、この切り替えに光と膨圧がどのように関わっているのかを検討した。水耕法で生育した試料においても、膨圧は明期に減少し暗期に増加している事を確認した。さらに水耕養液を加圧することで明期でも膨圧は増加し、加圧力を高めることで明期でも暗期に等しい膨圧の状態に生育する事ができた。水耕試料の明期において、膨圧が低い時はセルロースマイクロフィブリルが、養液を加圧することで膨圧を高めた時はマトリックスが観察された。二次壁新生面への壁成分の供給について、膨圧の影響を考えていく必要がある。

キーワード：細胞壁形成、膨圧、光周期、水耕法、二次壁新生面

緒言

木質細胞壁の主な構成要素は、セルロース、ヘミセルロース、リグニンである。セルロースは、細胞膜上に存在するターミナルコンプレックスと呼ばれるセルロース合成酵素集合体で合成され、セルロースマイクロフィブリルと呼ばれる繊維状の構造体となる。ヘミセルロースは、ゴルジ装置で合成されてゴルジ小胞によって細胞壁中に分泌される。リグニンは、前駆物質のモノリグノールが細胞質内で合成されて細胞壁中のヘミセルロース存在箇所に分泌された後、細胞壁の外側からモノリグノール同士の重合が開始されてリグニンとなる。細胞壁中に分泌されたばかりのヘミセルロースとモノリグノールは、集合体を形成してマトリックスと呼ばれる。これらの物質が新生面に堆積されて細胞壁が作られる。

スギ分化中仮道管の二次壁新生面を電界放出走査電子顕微鏡 (FE-SEM) で観察した結果、昼間はセルロースマイクロフィブリルが明瞭に観察されるが、夜間はセルロースマイクロフィブリルを覆う無定形物質が観察される (Yoshida *et al.* 2000)。この無定形物質はグルコマンナンを多く含んでいる事が免疫金標識法で示され、マトリックスと推察されている (Hosoo *et al.* 2002)。最近の研究で、無定形物質にキシランも含まれている事が明らかになった。この二次壁新生面での様相変化は、二次壁の肥厚時に堆積する壁成分に昼夜の違いが存在する事を示している。つまり、昼間はセルロースマイクロフィブリルが活発に、夜間はマトリックスが活発に供給されているという事である。

二次壁新生面に現れるこの日周期性は、気温や時刻によるものではなく光環境によって切り替わる事が示されている (Hosoo *et al.* 2003)。光環境の変化は分化中木部の膨圧変化を

もたらす事から、本研究では、二次壁新生面の変化と光・膨圧の変化との関わりを調べた。

植物細胞の膨圧は、昼間は減少し夜間は増加する。これは、昼間に蒸散が活発に行われるからである。そこで光環境と膨圧のそれぞれ単独の影響を調べるためには、両者を切り離す必要がある。昼間でも膨圧の減少が抑えられれば、あるいは夜間に膨圧を減少させられれば、2つの要因を分けることができると考えられる。本研究では、水耕で試料を生育し、養液を加圧する事で、前者のアイデアを実現できるか検討し、二次壁新生面への壁成分の供給への光と膨圧の関与を調べた。

試料と実験方法

3年生スギ苗 (*Cryptomeria japonica* D. Don) 2個体を用いた。幹の基部直径は1.1と1.2cmであった。ポットに土植えた試料2個体をまず、明期12時間・暗期12時間の植物育成室内 (MLR-350, SANYO) で温度25°Cにて生育した。2日後、試料の幹を地際から上10cmの所で水切りし、挿し木の状態にして水耕法による生育に切り替えた。

その4日後の試料を採取する日に、1個体は育成室の照明が点灯した直後から水耕養液を加圧して明期の膨圧低下を抑えた (図-1B)。加圧を続けて3時間後にSEM試料を採取した。もう1個体は水耕養液の加圧は行わずにコントロールとして採取した (図-1A)。試料採取までの期間中、内樹皮接線ひずみ法で膨圧変動を測定した (Okuyama *et al.* 1995)。

内樹皮接線ひずみ

樹幹の外樹皮を除去し、ひずみゲージ (KFG-2-120-C1,

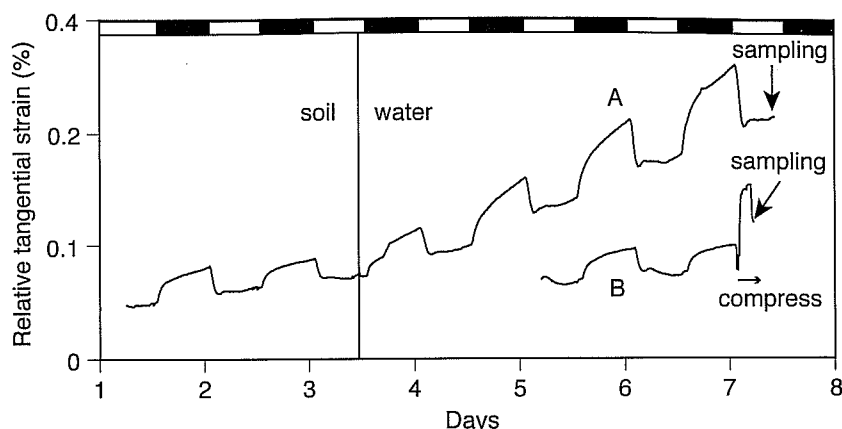


図-1. 内樹皮接線ひずみ変動

実験開始2日後に水耕生育にした。上の白バーは明期、黒バーは暗期。明期に、ひずみが減少した時にコントロールとして試料採取 (A)、養液を加圧することでひずみが増加した時に試料採取 (B)。

KYOWA)を内樹皮表面に接線方向に貼付した。ひずみゲージと内樹皮表面はワセリン、サランラップ、アルミホイルで覆い、水分の損失と直射日光を防いだ。ひずみはデータロガー (TDS-102, 東京測器研究所) を用いて10分間隔で測定した。

二次壁新生面 SEM 観察

樹幹から分化中木部を含む試料を採取した後、3%グルタルアルデヒドで固定した。凍結マイクロトームを用いて厚さ200 μm のまさ目面切片を作製した。その切片を次亜塩素酸ナトリウムで処理して原形質除去を行った。2%四酸化オスミウムで導電染色し、 t -ブタノール凍結乾燥 (VFD-21, 真空デバイス社) した。白金・パラジウムで厚さ数 nm のコーティングを施し、FE-SEM (S-4500, Hitachi) を用い、加速電圧 1.5kV で分化中仮道管二次壁新生面の放射壁を観察した。

結果と考察

内樹皮接線ひずみ

内樹皮接線ひずみの変動は膨圧変動と高い相関がある (吉田2003)。土植え時、接線ひずみは明期には減少し暗期には増加していた (図1)。これは従来の結果と同様で、照明点灯により蒸散が始まり樹幹の膨圧が低下すること、消灯により気孔が閉じて膨圧が回復・増加することを示している。2日後に試料を押し木状態にして、水耕法で生育を始めても、接線ひずみの日周期の変動は同じであった。日変動しながら接線ひずみが右上がりの増加傾向にあることから、水耕後も成長は続いていたと考えられる。

養液を加圧しないコントロール試料では、明期に接線ひずみは減少しているが (図-1A)、養液を加圧した試料では、明期でも接線ひずみは減少せずに逆に増加していた (図-1B)。相対ひずみ値から判断して、明期においてコントロール試料は日変動

する膨圧が低い時に、加圧した試料は膨圧が高い時に、それぞれ試料採取したと考えられる。養液の加圧を高めることで明期でも暗期に等しい、あるいはそれ以上の膨圧状態で生育する事ができた。これは、蒸散による植物体内の水分消失量以上に、圧力によって樹幹下部切り口から水を押し上げているからだと考えられる。

二次壁新生面 SEM 観察

コントロール試料では、明期に二次壁新生面においてセルロースマイクロフィブリルが明瞭に観察された (図-2A)。これは、従来の土植え試料での結果と同様である。一方、膨圧を人為的に高めた試料では、明期にもかかわらずマトリックスと思われる無定形物質が観察された (図-2B)。光環境と膨圧が連動していた従来の研究結果では、明期に無定形物質が観察されることは無かったが、本研究は明期でも膨圧の減少を抑えた場合、分化中木部の二次壁新生面にマトリックスが観察されることを示した。二次壁新生面の日周期性は光環境より膨圧変動に、より影響を受けている可能性がある。

マトリックス物質の主成分であるヘミセルロースの生合成には、ゴルジ装置が中心的な役割を果たしている。ヘミセルロースはゴルジ装置で最終的に合成され、ゴルジ小胞によって原形質膜へと運ばれ、エキソサイトーシスによって新生面へと分泌される (Park *et al.* 1987; Northcote *et al.* 1989; Samuels *et al.* 2002)。このエキソサイトーシスは、膨圧が高い時に活発になるとの報告がある (Thiel and Battey 1998; Fricke *et al.* 2000)。膨圧が低い時にはエキソサイトーシスが抑えられ、二次壁新生面では合成されたセルロースマイクロフィブリルが明瞭に観察される。そして、膨圧が高い時は、エキソサイトーシスが活発になって、昼間堆積したセルロースマイクロフィブリルの上にマトリックスが堆積するという仕組みになっていると予想できる。膨圧の変動が壁成分の供給を切り替えているかを今後明らかにしていく

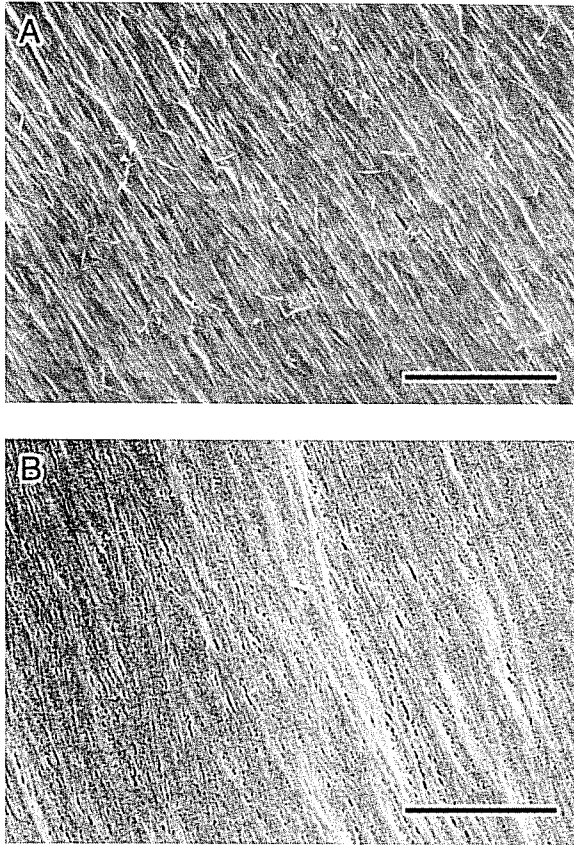


図-2. 二次壁新生面 SEM 写真

A はコントロール試料, B は養液を加圧した試料. 細胞軸は縦. スケールバーは 1 μ m.

ためには, 光環境一定で膨圧を変動させたり, 膨圧一定で光環境を変動させたり, という研究が必要である. また, 養液の加圧による二次壁新生面への影響も検討していかなければならない。

引用文献

- Fricke W, Jarvis M.C. and Brett C.T. (2000) Turgor pressure, membrane tension and the control of exocytosis in higher plants. *Plant Cell Environ.* 23: 999-1003.
- Hosoo Y, Yoshida M., Imai T. and Okuyama T. (2002) Diurnal difference in the amount of immunogold-labeled glucomannans detected with field emission scanning electron microscopy at the innermost surface of developing secondary walls of differentiating conifer tracheids. *Planta* 215: 1006-1012.
- Hosoo Y, Yoshida M., Imai T. and Okuyama T. (2003) Diurnal differences in the innermost surface of the S₂ layer in differentiating

tracheids of *Cryptomeria japonica* corresponding to a light-dark cycle. *Holzforschung* 57: 567-573.

Northcote D.H., Davey R. and Lay J. (1989) Use of antisera to localize callose, xylan and arabinogalactan in the cell-plate, primary and secondary walls of plant cells. *Planta* 178: 353-366.

Okuyama T, Yoshida M. and Yamamoto M. (1995) An estimation of the turgor pressure change as one of the factors of growth stress generation in cell walls. *Mokuzai Gakkaishi* 41: 1070-1078.

Park P, Ohno T, Kato-Kikuchi and Miki H. (1987) Alkaline bismuth stain as a tracer for Golgi vesicles of plant cells. *Stain Technol.* 62: 253-256.

Samuels A.L., Rensing K.H., Douglas C.J., Mansfield S.D., Dharmawardhana D.P. and Ellis B.E. (2002) Cellular machinery of wood production; differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var *latifolia*. *Planta* 216: 72-82.

Thiel G. and Battey N. (1998) Exocytosis in plants. *Plant Mol. Biol.* 38: 111-125.

Yoshida M., Hosoo Y. and Okuyama T. (2000) Periodicity as a factor in the generation of isotropic compressive growth stress between microfibrils in cell wall formation during a twenty-four hour period. *Holzforschung* 54: 469-473.

吉田正人 (2003) 木質の形成 (福島和彦・船田 良・杉山淳司・高部圭司・梅沢俊明・山本浩之編). pp.325-332. 海青社, 滋賀.

Relation between the supply of cell wall components to the innermost surface of developing secondary wall and light-turgor pressure

Jun'ichi ITO, Masato YOSHIDA and Takashi OKUYAMA

In the innermost surface of developing secondary wall, cellulose microfibrils are observed clearly in the daytime and matrix is observed at night. The result shows diurnal periodicity of the supply of cell wall components in developing cell wall. In this study, we examined the effect of turgor pressure on the diurnal periodicity of cell wall thickening. The turgor pressure of hydroponic sample increased when the light was on and decreased when the light was off. Though the light was on, the turgor pressure increased when the hydroponic water was compressed. In hydroponic sample, cellulose microfibrils were observed in the innermost surface of developing secondary wall when its turgor pressure was low, and matrix was evident when the turgor pressure was high. We must consider the effect of turgor pressure on the supply of cell wall components in the developing secondary wall.

Keywords: cell wall formation, hydroponics, innermost surface of developing secondary wall, photoperiod, turgor pressure