

学位論文題名

Three-dimensional analysis of cambium and
differentiating xylem cells
in the ring-porous hardwood *Kalopanax pictus*

（環孔広葉樹材ハリギリにおける形成層
および分化中木部細胞の三次元的解析）

学位論文内容の要旨

木材は、材料やエネルギー源として古代から利用されており、将来においても再生可能な生物資源として重要である。木材の材質は、木材を生産する樹木の遺伝的性質や生育環境により大きく異なる。従って、材質を育林技術や細胞工学的な手法で改良し、さらに木材を有効利用するためには、木材の形成機構を十分に理解することが重要である。木材は、樹幹を環状に包む形成層の分裂活動（肥大成長）により形成される。形成層細胞は、道管要素、仮道管、木部繊維、柔細胞など異なる機能をもつ木部細胞に分化する。木材の形成機構を明らかにするために、形成層細胞の分裂機構や木部細胞の分化機構に関してこれまでも研究が行われてきたが、知見は不十分である。その理由として、形成層細胞および分化中細胞は柔らかく壊れやすいため試料の調整中にダメージを受け易いこと、また細胞の形態や配列が複雑であること、などがあげられる。本研究では、1) 形成層細胞や分化中木部細胞、特に広葉樹の水分通導にとって重要な役割をもつ道管要素などを、三次元的に解析できる新しい解剖学的手法の確立を検討し、2) これらの手法により、細胞の形態や配列の変化、細胞壁の微細構造、核の存在状態などについて詳細に解析した。供試木は、形成層細胞が非層階状配列をし、年輪の初めに形成される孔圏道管要素の直径が大きい環孔広葉樹材ハリギリ (*Kalopanax pictus*) を用いた。得られた結果は、以下のようにまとめられる。

1) 形成層細胞や分化中木部細胞の形態や配列の観察に共焦点レーザ走査顕微鏡法（以下 CLSM と略する）の導入を試みた。CLSM により得られる光学切片像は、焦点が合わない情報が取り除かれているため通常の光学顕微鏡像に比べ高い分解能とコントラストをもち、形成層細胞の形態や核の存在状態に関する詳細な情報をもたらした。また、比較的厚い試料から Z 軸方向（試料の厚さ方向）の連続的な光学切片 (optical section) 像を得ることが出来た。これらの連続光学切片像は Z 軸方向の三次元情報を含んでおり、画像解析ソフトウェアを用いて形成層細胞や分化中木部細胞の三次元画像が容易に構築出来た。得られた画像は、樹脂包埋試料から既存の方法により連続的に作成した薄切片像と同様な高い分解能をもっていた。これらの結果は、CLSM が形成層の様な壊れやすい組織の立体画像を、機械的なダメージを与えることなく容易にかつ迅速に構築する強力な手法であることを示している。さらに、Z 軸方向の連続的な光学切片像は複雑に入り組んだ細胞の末端や重なり具合を特定する上でも有効であり、細胞の正確な長さの迅速な測定に利用出来る。

樹脂鑄型法を形成層細胞や分化中木部細胞の形態や細胞壁構造の解析に初めて応用した。

試料をポリスチレンで包埋し、酸や酵素処理で細胞壁を取り除くことにより細胞の鑄型を作成した。鑄型は、高分解能走査電子顕微鏡で観察した。ポリスチレンは細胞内に良く浸透しており、また重合したポリスチレンは酸や酵素処理に対して安定であった。鑄型は、分化中木部細胞の細胞壁の内表面の構造を正確に反映しており、壁孔やせん孔など複雑な構造物の形成過程の詳細な観察を可能にした。道管要素は細胞の拡大の速度が早いため、その分化過程を追跡することは困難であった。しかしながら、樹脂鑄型法と走査電子顕微鏡法を組み合わせた方法は、形成層細胞の三次元的な配列や分化中木部細胞の形態変化を大きな視野で低倍率から高倍率まで連続的に観察することが出来る点で優れており、道管要素の分化過程に関する新しい多くの情報を提供可能にした。

細胞の長さや形態を正確に解析するためには、細胞を酸などで解離し、直接観察する方法 (maceration) が有効である。しかしながら、形成層細胞を酸で処理するとダメージを受けたり膨潤・収縮する可能性が高いため、形成層細胞の解離像は過去の報告では示されていない。そこで本研究では、酵素 (pectinase) を用いて形成層細胞のみを単離する方法を確立し、形成層細胞の解離像を初めて示した。また、分離後の構造を走査電子顕微鏡法で観察することにより、分離した細胞が形成層および分化中の細胞であることを確認出来た。

2) 形成層細胞の形態を、解離法、CLSMによる連続光学切片像および走査電子顕微鏡法により詳細に解析した。軸方向に細長い紡錘形形成層細胞の20%以上は典型的な紡錘形を示さず、多角形やフォーク状に分岐した形態を示した。これらの細胞は、特に放射組織形成層細胞の周辺で認められた。以上の結果から、紡錘形形成層細胞を形態による違いにより、典型的な紡錘形形成層細胞と非典型的な紡錘形形成層細胞の2つに区分できることを提唱した。

紡錘形形成層細胞と道管要素の長さをCLSMおよび解離法により測定し、両者の関係を統計的に解析した。紡錘形形成層細胞と道管要素の長さには同一試料内や試料採取時期で大きな変動性が認められた。樹脂鑄型法による観察結果も、隣接した道管要素間で著しい長さの違いを示した。細胞の長さの平均値や分布に関して、休眠中の紡錘形形成層細胞と孔圏道管要素の間には有為な違いが認められなかった。これらの結果は、孔圏道管要素への分化中に横方向への著しい拡大は起こるが長さ方向への変化は起こらないことを示し、孔圏道管要素の長さは、分裂開始前の紡錘形形成層細胞の長さを推定する上で最適な指標であることを示した。

軸方向に非常に細長い紡錘形形成層細胞が複数の核をもつ可能性が古くから議論されている。形成層細胞を含む切片を作成し光学顕微鏡により観察したところ、紡錘形形成層細胞内に明らかに複数の核が存在することが確認できた。しかしながら、CLSMにより連続光学切片像を作成したところ、通常の光学顕微鏡法では複数の紡錘形形成層細胞がZ軸方向に重なった像を観察しているため、同一細胞内に複数の核が存在しているように見えることが明らかになった。紡錘形形成層細胞をZ軸方向に分離した結果、紡錘形形成層細胞は単一の核のみをもつことが証明された。また、分化中道管要素においても常に単一の核のみが認められた。

樹幹胸高部位に最初に形成される孔圏道管要素は芽吹きの数週間前に拡大し始め、二次壁を形成中の孔圏道管要素は芽吹き時期に観察された。分化中の木部細胞を樹脂鑄型法で連続的に観察したところ、道管要素の分化初期段階は壁孔領域周囲への細胞壁成分の堆積により特徴づけられた。さらに分化中の道管要素では、壁孔こうやせん孔縁の形成が段階的に進行することが明らかになった。

以上の解析から、形成層細胞や分化中木部細胞の形態や配列などを三次元的に解析できる手法が確立でき、これにより紡錘形形成層細胞から道管要素への分化過程の詳細などが明らかになった。これらの結果は、木材の形成機構を解明する上で重要な知見と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 川 清 三
副 査 教 授 寺 澤 實
副 査 教 授 平 井 卓 郎
副 査 助 教 授 船 田 良

学 位 論 文 題 名

Three-dimensional analysis of cambium and differentiating xylem cells in the ring-porous hardwood *Kalopanax pictus*

(環孔広葉樹材ハリギリにおける形成層
および分化中木部細胞の三次元的解析)

木材は、材料やエネルギー源として古代から利用されており、将来においても再生可能な生物資源として重要である。木材の形成機構を明らかにするために、形成層細胞の分裂機構や木部細胞の分化機構に関してこれまでに多くの研究が行われてきたが、形成層細胞および分化中細胞は柔らかく壊れやすいため試料の調整中にダメージを受け易いこと、また細胞の形態や配列が複雑であることなどにより、その知見は不十分であった。本研究は 1) 形成層細胞や分化中木部細胞、特に広葉樹の水分通導にとって重要な役割をもつ道管要素などを三次元的に解析できる新しい解剖学的手法の確立を検討し、2) これらの手法により、環孔広葉樹材ハリギリ (*Kalopanax pictus*) を用い、形成層細胞や分化中の木部細胞の形態や配列の変化、細胞壁の微細構造、核の存在状態などについて詳細に解析している。

本研究は、先ず、形成層細胞や分化中木部細胞の形態や配列の観察に共焦点レーザー走査顕微鏡法 (CLSM) の導入を試みている。CLSM により得られる光学切片像は、焦点が合わない情報が取り除かれているため通常の光学顕微鏡像に比べ高い分解能とコントラストをもち、形成層細胞の形態や核の存在状態に関する詳細な情報をもたらす。また、比較的厚い試料から Z 軸方向 (試料の厚さ方向) の連続的な光学切片像を得ることが出来る。このため、CLSM は形成層の様な壊れやすい組織の立体画像を機械的なダメージを与えることなく容易にかつ迅速に構築することができ、さらに、Z 軸方向の連続的な光学切片像により複雑に入り組んだ細胞の末端や重なり具合を特定することができ、細胞の正確な長さ

の迅速な測定に利用出来た。

次いで本研究では、樹脂鑄型法を形成層細胞や分化中木部細胞の形態や細胞壁構造の解析のために初めて応用している。試料をポリスチレンで包埋し、酸や酵素処理で細胞壁を取り除くことにより細胞の鑄型を作成し、高分解能走査電子顕微鏡で観察した。鑄型は分化中木部細胞の細胞壁の内表面の構造を正確に反映しており、壁孔やせん孔など複雑な構造物の形成過程の詳細な観察を可能にしている。

さらに本研究では、酵素 (pectinase) を用いて形成層細胞のみを単離する方法を確立し形成層細胞の解繊像を初めて示した。これまでに、細胞の長さや形態を正確に解析するために細胞を酸などで解離し、直接観察する方法 (maceration) が有効であることが知られていたが、形成層細胞を酸で処理するとダメージを受けたり膨潤・収縮する可能性が高いため、形成層細胞の解繊像は過去の報告では示されていなかった。また、本研究では分離後の構造を走査電子顕微鏡法で観察することにより、分離した細胞が形成層および分化中の細胞であることを確認している。

以上の手法により本研究では、1) 紡錘形形成層細胞の形態について、その20%以上は典型的な紡錘形を示さず多角形やフォーク状に分岐した形態を示すこと、また、これらの細胞は特に放射組織形成層細胞の周辺で認められることを明らかにした。これらの結果から紡錘形形成層細胞を形態による違いにより、典型的な紡錘形形成層細胞と非典型的な紡錘形形成層細胞の2つに区分できることを提唱している。2) 紡錘形形成層細胞と道管要素の長さを測定し、両者の関係を統計的に解析した。紡錘形形成層細胞と道管要素の長さに同一試料内や試料採取時期で大きな変動性を認めた。一方、細胞の長さの平均値や分布に関して、休眠中の紡錘形形成層細胞と孔圏道管要素の間には有為な違いが認められなかった。これらの結果は、孔圏道管要素への分化中に横方向への著しい拡大は起こるが長さ方向への変化は起こらないことを示している。3) 軸方向に非常に細長い紡錘形形成層細胞が複数の核をもつ可能性が古くから議論されているが、紡錘形形成層細胞は単一の核のみをもつこと証明した。4) 分化中の木部細胞において、道管要素の分化初期段階は壁孔領域周囲への細胞壁成分の堆積により特徴づけられた。さらに分化中の道管要素では、壁孔こうやせん孔縁の形成が段階的に進行することが明らかにしている。

以上の解析から、形成層細胞や分化中木部細胞の形態や配列などを三次元的に解析できる手法が確立でき、これにより紡錘形形成層細胞から道管要素への分化過程の詳細などが明らかになった。これらの結果は、木材の形成機構を解明する上で重要な知見と考えられる。よって審査員一同は、Peter Borissov Kitin が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。