

ケナフにおける繊維形成過程の微視的解析

1. 茎頂細胞の細胞壁構築に関する電顕的研究

平成 13 年 3 月

分担研究代表者 鈴木 季直
神奈川大学理学部総合理学研究所
(応用生物科学科)

| | | |
|-------|------|-----------------|
| 研究協力者 | 釜野徳明 | 神奈川大学理学部総合理学研究所 |
| | 鈴木祥弘 | 神奈川大学理学部総合理学研究所 |
| | 梶 愛子 | 神奈川大学理学部応用生物科学科 |

序論

ケナフ *Hibiscus cannabinus* L. は、西アフリカ原産のアオイ科フヨウ属の一年生植物であるが、繊維素材や種子油が利用できることから、東南アジア、中国、ロシア、カリブ海沿岸およびアメリカ南部などでも古くから栽培されている。ケナフは、栽培が容易で、成長が極めて速く、高い光合成機能と紙素材として適した材質をもつことから、地球規模での二酸化炭素濃度上昇を低減し、気候変動の抑制に寄与する環境保全植物として注目されている。近年、ケナフの栽培研究¹⁻³⁾、種子油の成分研究⁴⁾やパルプ材としての成分研究^{5,7)}などが盛んに行われているが、光合成機能や微細構造に関する基礎的植物学研究はほとんどなされていない。現在、環境保全植物としてのケナフの特性を明らかにするために、ケナフの速い成長や高い光合成活性について微細構造学および植物生理学的立場から研究することが最も重要と考えられる。

一般に、植物の成長は茎頂部における細胞分裂とそれに続く細胞壁形成をともなう細胞伸長によって達成される。細胞壁はその骨格成分であるセルロースとマトリックスを構成するペクチンやヘミセルロースなどの多糖類によって形成されており⁸⁾、これらの多糖類は細胞内のゴルジ体で合成され、ゴルジ小胞により細胞外に輸送され細胞壁を構築することが知られている⁹⁾。ケナフの成長制御機構を明らかにするためには、まず、細胞壁成分の合成と分泌が活発に行われている茎頂部細胞のゴルジ体や細胞壁に関する微細構造学的知見を得ることが重要と考えられる。以上の観点から、本研究では、ケナフ茎頂部細胞の微細構造について超薄切片法による電子顕微鏡（以下電顕）観察を行った。

材料と方法

四月に植木鉢に播種し、屋外で栽培したアメリカ産ケナフ Everglades 41 を研究材料とした。発芽から4ヶ月後に、植物から茎先端部を切り取り、実体顕微鏡下で幼葉を切除し、長さ、およそ3 mmの茎頂部を摘出した。

摘出した茎頂部を植物個体毎に0.1 Mリン酸緩衝液（pH 7.2）で希釈した6%のグルタルアルデヒド液中に浸漬し、水流アスピレーターを用いて数分間脱気し、その後、4℃で24～48時間固定した。グルタルアルデヒドによる前固定後、液交換法で0.1 Mリン酸緩衝液で数回洗浄し、最後に洗浄液を蒸留水で溶かした2%四酸化オスミウム液と交換し、4℃で24～48時間後固定した。固定後、室温下でアセトン系列（50%、70%、90%、100% で各10分間、100%で30分間を2回）で脱水処理した。その後、1:1の比率で100%アセトンと樹脂（Quetol

812 を用いた Luft 変法) を混合した液により、4℃で 24 時間処理した。さらに、混合液を前述の Luft 変法で調整した樹脂と交換し、24 時間 4℃下に置き組織内に樹脂を浸潤させた。樹脂浸潤後、シリコン包埋板を用いて試料を包埋し、40℃および 60℃で各 24 時間加温し、樹脂を熱重合させた。

実体顕微鏡下で調整された試料包埋ブロックをトリミングし、茎中心部の縦断面を露出させ、ガラスナイフを装着した Reichert Ultracut N 型ウルトラミクロトームにより、光学顕微鏡（以下光顕）用の厚さ約 0.8 μm の縦断切片を作製した。ガラスナイフポート水面上に浮遊する切片をアイラッシュスティックでスライドガラス上に移動させ、加熱乾燥後にトルイジンブルーで染色し、茎頂部組織を光顕観察し、カラーフィルムに撮影した。光顕による組織観察にもとづき、茎頂部分裂組織部分を判定し、試料包埋ブロックをさらにトリミングし、前述のウルトラミクロトームにより電顕用の厚さ約 60 nm の超薄縦断切片を作製した。補強用にカーボン蒸着したコロジオン薄膜を貼った Cu-150 メッシュに超薄切片を載物し、40℃で加温乾燥した後、酢酸ウランの水飽和液で 60 分間（室温）、クエン酸鉛液で 10 分間（室温）電子染色し、洗浄後再度 40℃で加温乾燥させた。電子染色後の超薄切片を加速電圧 100 kV に設定した JEOL JEM2000EX 型透過電顕で観察し、電顕写真またはスキャナー取込みによるデジタル化像を対象に細胞および細胞小器官のディメンション測定などの微細構造解析を行なった。

結果

図 1 はケナフ茎頂部の光顕縦断切片像である。数個の葉原基に囲まれ、軸中心部の半球状に突出している部分が茎の頂端分裂組織と思われる。茎頂付近における細胞分裂には植物体表面に対して垂直方向に分裂面ができる垂層分裂と平行方向に分裂面ができる並層分裂がある。図は、茎頂部が、並層分裂の生ずる中心部の内体と軸先端方向で内体上面を被う垂層分裂が生ずる外衣とからなることを示している。茎頂部でトルイジンブルーにより濃く染色された領域が認められるが、この領域の細胞は細胞質密度が高く、従って、活発に細胞分裂を繰り返している領域であることを示している。この領域の細胞について電顕による微細構造観察を行なった。

図 2 は茎頂部内体中心部の電顕写真である。内体中心部の細胞は径およそ 5 μm 、断面積はおよそ 43.8 μm^2 （表 1）と小さく、細胞質は密で細胞断面積あたりで核が占める割合は大きい。ミトコンドリアや色素体は数多く見られるが、ともに径 \sim 1 μm と小さく、内膜系も未発達である。とくに色素体はプロブ



図1. ケナフ茎頂の光顕縦断切片像. 枠部分は電顕切片用トリミング領域を示す. L: 葉原基.

ラスチドの段階にあると思われる。液胞も数は少なく、未発達で、細胞全体で占める割合(細胞断面積あたりの割合)はおよそ 8.9%であった(表1)。細胞をとり囲む細胞壁の厚さは $0.20 \pm 0.06 \mu\text{m}$ (mean \pm SD, $n=60$) (表1) で、細胞壁中層ではセルロースの繊維走行が認められた(図3)。図2の矢印で示した細胞壁部分は著しく薄く、その厚さは $0.09 \pm 0.03 \mu\text{m}$ (mean \pm SD, $n=60$) であった。他の細胞壁で測定された厚さとの間で t 検定を行ったところ、その結果は $P < 0.001$ で、両者に有意の差が認められた。この薄い細胞壁の存在はこれを挟んだ二つの細胞が分裂してからあまり時間を経っていないことを示唆している。図4はこの領域の細胞にみられる典型的なゴルジ体の電顕像を示している。直

表1. 茎頂部内体細胞のディメンション

| | 中心部細胞 | 周辺部細胞 |
|---------|---|---|
| 細胞断面積 | $\sim 43.8 \mu\text{m}^2$ | $\sim 79.5 \mu\text{m}^2$ |
| 液胞の割合 | $\sim 8.9\%$ | $\sim 63.4\%$ |
| 細胞壁の厚さ | $0.20 \pm 0.06 \mu\text{m}$ (mean \pm SD, $n=60$) | $0.22 \pm 0.09 \mu\text{m}$ (mean \pm SD, $n=60$) |
| ゴルジ体の比率 | 1.2/cell ($n=30$) | 0.3/cell ($n=30$) |

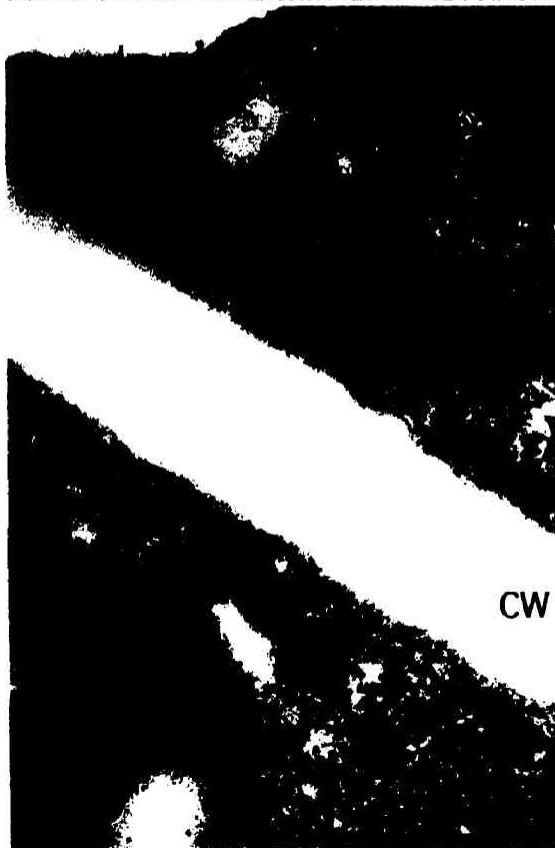
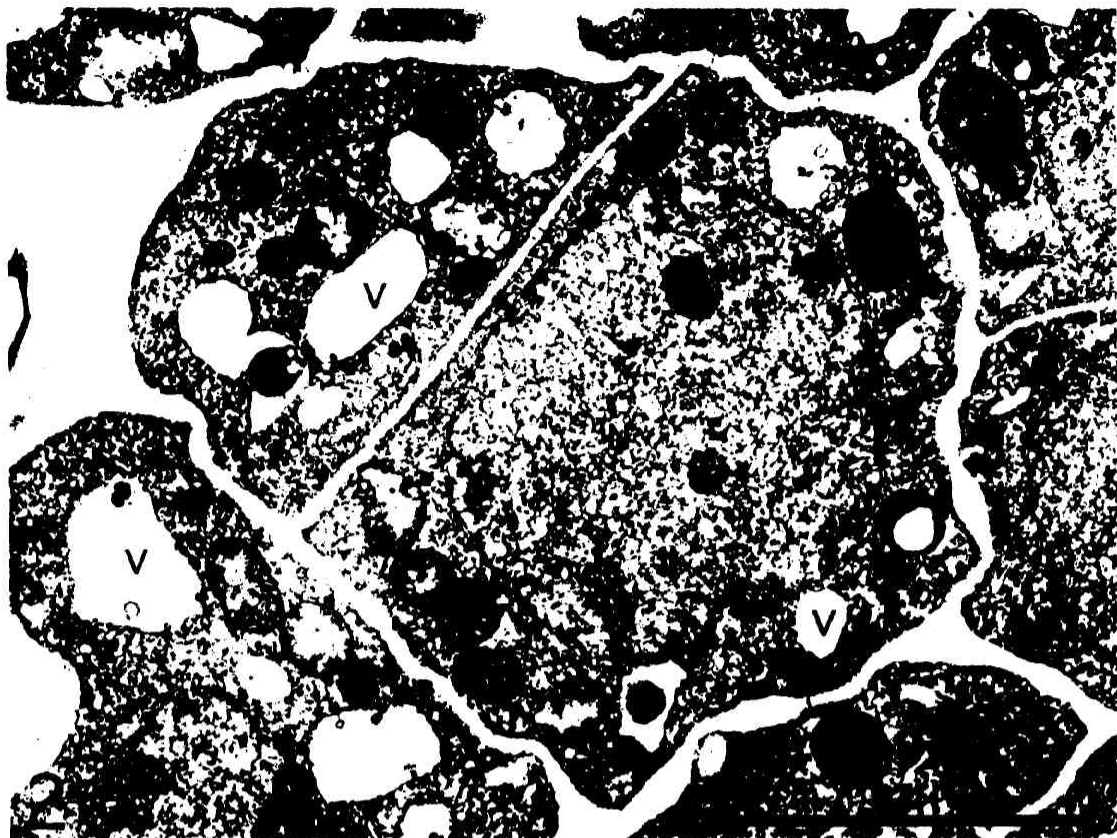




図5. 茎頂部内体周辺部の細胞の電顕像. 液胞 (V) の発達が顕著である. N: 核、M: ミトコンドリア、P: 色素体、S: デンプン粒.

径はおよそ $0.6 \mu\text{m}$ で、5～6 枚のゴルジ槽が認められる。細胞質が密で、ミトコンドリアや色素体などの代表的な細胞小器官が未発達であるのに対して、これらの細胞では頻りにゴルジ体が観察され、その出現頻度は細胞あたり 1.2 であった (表 1)。植物細胞の切片観察ではゴルジ体の検出は容易ではなく、出現頻度は低いのが一般的であるのに対し、この組織では、どの細胞でも必ず 1 個以上観察され、さらに、その多くは細胞膜に近接して見い出されることから、これらの細胞では細胞壁物質の合成と分泌が極めて活発に行なわれていることが示唆される。

一方、茎頂部内体周辺部の細胞 (図 5) は、細胞小器官の微細構造やそれらのディメンションにおいて、中心部の細胞とは対照的な特徴を示した。細胞の断

図2. 茎頂部内体中心部の細胞の電顕像. N: 核、M: ミトコンドリア、Mb: マイクログラディ、P: 色素体、V: 液胞. 矢印で示した細胞壁は他の部分の細胞壁より著しく薄い. 図3. 細胞壁部分の拡大像. 細胞壁 (CW) の中央にはセルロースのフィラメント断面が認められる. 図4. ゴルジ体の電顕像. 細胞膜に近接して局在.

面積はおよそ $79.5 \mu\text{m}^2$ で、中心部の細胞と比べて約2倍大きく、液胞は著しく発達しており、細胞全体で占める割合(細胞断面積あたりの割合)はおよそ63.4%であった(表1)。ミトコンドリアは中心部の細胞と発達程度においてほとんど差異は認められなかったが、色素体はおよそ径 $2 \mu\text{m}$ と大きく、内膜系では数層のチラコイドからなる初期のグラナが認められ、ストロマ内にはデンプン粒もしばしば観察された。細胞をとり囲む細胞壁の厚さは $0.22 \pm 0.09 \mu\text{m}$ (mean \pm SD, $n=60$) であった(表1)。茎頂部内体中心部と周辺部の細胞をとり囲む細胞壁の厚さの測定値に関してt検定を行ったところ、その結果は $P > 0.1$ で、両者に有意の差は認められなかった。ゴルジ体の微細構造は中心部の細胞で見られたものと違いは認められなかったが、その出現頻度は低く、観察された細胞あたりの数は0.3であった(表1)。

考察

ケナフ茎頂部内体の中心部と周辺部の細胞に関する微細構造観察の結果、細胞の大きさは、中心部と周辺部では著しく異なることが明らかにされ、中心部から周辺部に向けて細胞の著しい成長あるいは伸張が進行していることが示唆された。細胞の成長にともなう細胞表面積の増大は細胞壁の伸展を促進するものと思われる。しかし、細胞壁の厚さに関する測定結果では、中心部と周辺部とで有意の差は認められなかった(表1)。このことは、細胞の成長(伸長)にみあう速度で細胞内で細胞壁構成成分が合成され、細胞外に分泌され、細胞壁が構築されていることを意味する。この解釈は、中心部の細胞でゴルジ体が数多く観察され、ゴルジ体自体も細胞膜に近接して局在するという事実によって支持される。すなわち、細胞サイズが小さく、細胞質が密で、核と細胞膜間の距離が短い状況は細胞内の内膜輸送系にとって著しく効率が良く、速い速度での細胞壁形成を達成できると考えられるからである。

今回の電顕観察により、ケナフ茎頂部での細胞成長にともなう細胞壁形成過程を研究するための基礎的データが得られた。今後、免疫電顕法などを応用することによりこの過程を分子レベルで明らかにすることができる。また、今回は、ケナフの一栽培種のみを観察の対象にしたが、多種の栽培種間では成長速度が著しく異なるものがあり、これらを比較観察し検討することも今後の課題として重要である。さらに、ケナフの細胞壁形成速度を定量的に把握するためには経時的变化を観察できる試料対象が必要であり、組織培養細胞やプロトプラストなどを用いて研究することも有効である。これらの試みにより研究が継続、発展されれば、近い将来に環境保全植物としてのケナフの特性は明確とな

り、その有用性がより強く裏づけされるものと確信する。

謝辞

本研究は平成 12 年度神奈川大学共同研究奨励助成の援助を受けて行われた。

文献

- 1) Webber III, CL and Bkedsoe, RE (1993) Kenaf: Production, harvesting, processing, and products. In: New Crops, J Janick and JE Simon, Eds, John Wiley and Sons, New York, pp.416-421.
- 2) Webber, CL (1993) Yield components of five kenaf cultivars. *Agronomy J.* 85: 533-535.
- 3) Lawrence, GW, Webber III, CL and McLean, KS (1994) Response of four kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) plant introductions to *Meloidogyne incognita* race3. *Nematropica* 24: 95-101.
- 4) Mohamed, A, Bhardwaj, H, Hamama, A and Webber III (1995) Chemical composition of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil. *Industrial Crops and Products* 4: 157-165.
- 5) Sabharwal, HS, Akhtar, M, Blanchette, RA and Young RA (1994) Biochemical pulping of kenaf. *Tappi J.* 77: 105-112.
- 6) Meyers, GC and Bagby, MO (1994) Suitability of kenaf CTMP for linerboard. *Tappi. J.* 77:113-118.
- 7) 釜野徳明、小竹文乃、高野 智他 (1997) 新パルプ資源ケナフの栽培と栽培ケナフの抽出・分配ならびに植物化学的考察. 神奈川大学総合理学研究所、年報 '97: 15-28.
- 8) Gibeaut, DM and Carpita, NC (1994) Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB J.* 8: 904-915.
- 9) Staehelin, LA and Moore, I (1995) The plant Golgi apparatus: Structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 261-288.