

スギ放射柔細胞の細胞死過程における液胞の崩壊と核の形態変化

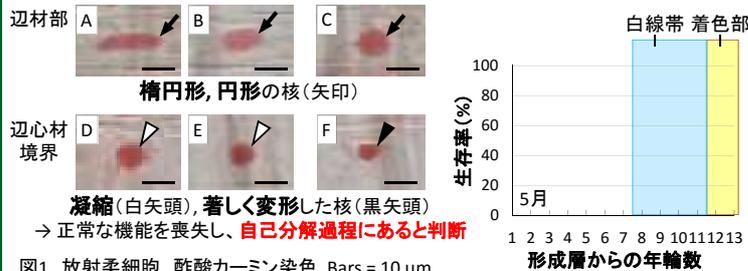
(農工大農)○荒川 泉、船田 良、半 智史

緒言

放射柔細胞は寿命が長く、樹幹における代謝や養分貯蔵などの機能を担い、細胞死過程においては二次代謝物質の生合成を行う。放射柔細胞の細胞死機構の解明は、木材の材質特性を制御する上で重要である。短命な管状要素のプログラム細胞死では、1つの巨大な液胞の崩壊がその他の細胞小器官の自己分解を引き起こすという報告 (Groover et al. 1997など)があり、液胞の崩壊は植物細胞の細胞死において重要な役割を果たすと考えられる。一方、放射柔細胞の液胞は辺材内部で拡大するという報告 (Nobuchi and Harada 1985)があるが、放射柔細胞の細胞死過程における液胞の崩壊のタイミングは明らかではない。そこで本研究では、放射柔細胞の辺心材境界における液胞の形態変化と崩壊のタイミングについて、細胞死の最終段階と考えられる核の形態変化との関連性に着目して解析した。

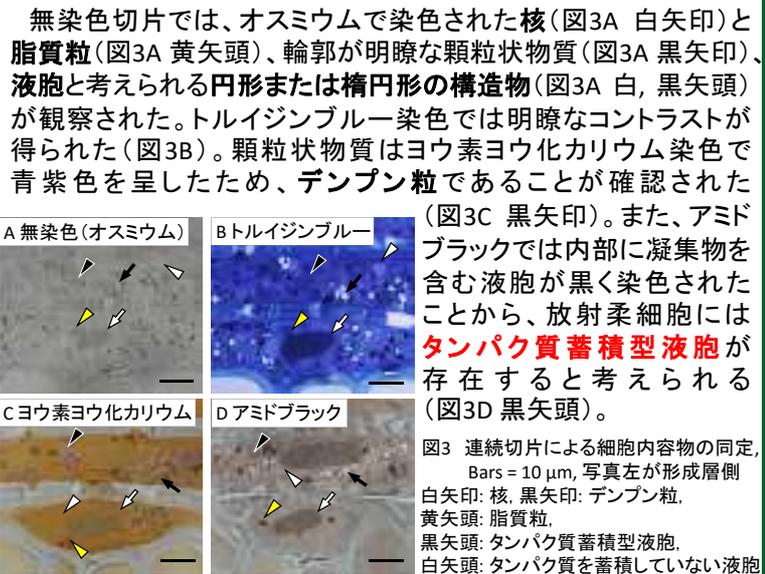
結果と考察

水分分布と着色範囲および核の形態観察



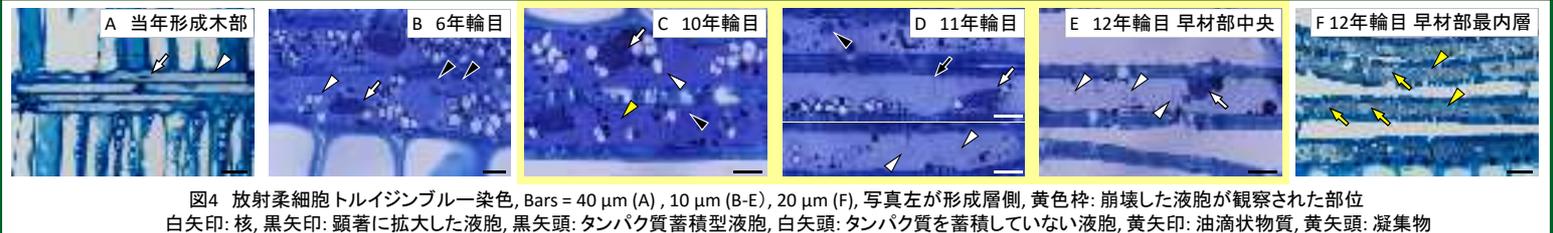
肉眼観察により、形成層から8年輪目から11年輪目までを白線帯と定義した。12年輪目から髄側には着色が認められた。当年形成木部から12年輪目の早材部外層にかけて楕円形または円形の核 (図1A-C)、12年輪目の早材部中央で凝縮または著しく変形した核 (図1D-F) が観察された。細胞死は7年輪目において開始し、白線帯中央にあたる9年輪目から髄側に向かって生存率が急激に低下した (図2)。12年輪目の早材部最内層で全ての核が消失した。

連続切片による細胞内容物の同定



無染色切片では、オスミウムで染色された核 (図3A 白矢印) と脂質粒 (図3A 黄矢頭)、輪郭が明瞭な顆粒状物質 (図3A 黒矢印)、液胞と考えられる円形または楕円形の構造物 (図3A 白, 黒矢頭) が観察された。トルイジンブルー染色では明瞭なコントラストが得られた (図3B)。顆粒状物質はヨウ素ヨウ化カリウム染色で青紫色を呈したため、デンプン粒であることが確認された (図3C 黒矢印)。また、アミドブラックでは内部に凝集物を含む液胞が黒く染色されたことから、放射柔細胞にはタンパク質蓄積型液胞が存在すると考えられる (図3D 黒矢頭)。

5月採取試料における液胞の崩壊と核の形態変化



当年形成木部には巨大な液胞 (図4A 白矢頭) が、形成層から6年輪目には小さなタンパク質蓄積型液胞が多数存在した (図4B 黒矢頭)。白線帯中央の10年輪目で初めて著しく変形した液胞が認められ、11-12年輪目では著しく変形した液胞の数が増加した (図4C-E 白矢頭)。このことから、3年輪目にわたり液胞の崩壊が起きたと考えられる。また、11年輪目では一部の液胞が顕著に拡大した (図4D 黒矢印)。12年輪目の早材部中央では全ての液胞が崩壊し、凝縮した核のみが観察された (図4E)。最内層では核も液胞も観察されなかった (図4F)。したがって、液胞は白線帯中央から数年輪目にわたり徐々に崩壊し、核の形態変化は細胞死の最終段階で起きると考えられる。

結論

当年形成木部 → 辺材部中央 → 白線帯中央 → 白線帯内層 → 辺心材境界

図5 トルイジンブルー染色による核と液胞の観察結果の模式図

●: 核 ●: タンパク質蓄積型液胞 ○: タンパク質を蓄積していない液胞 ◻: 著しく変形した液胞 ●: 油滴状物質 ●: 凝集物 ■: 液胞が崩壊した部位

本研究により、放射柔細胞における液胞の崩壊は白線帯中央から辺心材境界にかけて徐々に進行し、細胞死の最終段階で核の形態変化が起きることが明らかとなった。したがって、放射柔細胞は短命な管状要素とは液胞の数や大きさ、崩壊から核の形態変化および分解までに要する時間などが異なる細胞死機構をもつと考えられる。

材料と方法

【供試木】 東京農工大学FM多摩丘陵 (東京都八王子市) に生育する約40年生のスギ (Cryptomeria japonica) 4個体	【試料採取と固定】 ・2015年2月と5月にコアサンプルを採取 (直径約5 mm, 形成層~心材) ・直ちに4%グルタルアルデヒド溶液で固定 試料の一部は2%四酸化オスミウム溶液で脂質の後固定を行い、エポキシ樹脂で包埋	【切片作製と染色】 ・40 μ m厚の柾目面切片を作製 酢酸カーミンにより染色 ・1 μ m厚の柾目面切片を作製 トルイジンブルー、ヨウ素ヨウ化カリウム、アミドブラックにより染色	【観察項目】 ・肉眼観察: 試料の水分分布と着色 ・光学顕微鏡: 核, 液胞, デンプン粒, 脂質粒 【生存率の算出】 各年輪の早材部中央における約100細胞の生死判別を行い、放射柔細胞の生存率を算出
--	--	---	--

【謝辞】 試料をご提供いただいた東京農工大学農学部 松田和秀准教授とFM多摩丘陵の職員の方々に心から御礼申し上げます。本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費助成事業 (No.15K07508) の助成を受けた。
【引用文献】 Groover et al. (1997) Protoplasma 196: 197-211. Nobuchi & Harada (1985) Mokuzai Gakkaishi 31: 965-973.