天然ゴム生産植物乳管細胞のバイオイメーjing

中 澤 慶 久

Bioimaging of the Lactiferous Cells in Rubber Production Plants

Yoshihisa NAKAZAWA (Hitz Collaborative Research Institute, Graduate School of Engineering Osaka University, 2-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan) nakazawa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Production of natural rubber is a kind of bio-industry which needs large scale plantation, a huge sum of money and assets/The more latex be produced from natural rubber plants with high polyisoprene content, the more advancement of production are needed to improve the cost-performance financially. Then, in order to improve the production of plantation, the process of selection breeding and cultivation has been continuing for over 150 years. Since the natural rubber industry depends on the bioresource of plants, the improvement of production will be an industrial theme forever.

Natural rubber tree has a special organ named lactiferous cell which synthesizes and accumulates hydrophobic compound. This report gained a bio imagine of lactiferous cell of two kinds of natural rubber plants by using articulate lactiferous cell localized in Para rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) of *cis*-polyisoprene and phloem localized as crystallized polymer in Hardy rubber trees (*Eucommia ulmoides* Oliver) of *trans*-polyisoprene. From this result, we introduce the sink and source relationship needed to improve the natural rubber plants production and research the morphological characters of lactiferous cell which stores polyisoprene, a kind of unproductive compound to plants.

(Received on March 7, 2018)

Key Words : Bioimaging, Lactiferous Cells, Hevea, Eucommia.

1. は じ め に

天然ゴムの生産には大規模なプランテーションが必要であり、巨額な資金と資産を必要とするバイオマス産業である。天然ゴム生産の資源植物の必要条件として、ポリイソプレレン (PI) の含有量が高く、ラテックスなどの産出量が多いほど優良系統とされる。すなわち、バイオマスとしてのコストパフォーマンス向上を目的とした生産量向上が経済的に求められている。そして、プランテーションにおける産出量を高めるために、パラゴムノキでは150年以上にわたり品種改良や栽培法の改良が現在でも続けられている。しかし、天然ゴム産業が植物バイオマスのシンクとソースに依存している限り産出量の増加は産業上永遠のテーマとなっている。

天然ゴム生産植物には乳管細胞というPIなどの毒性のある疎水系化合物を生合成および蓄積する異形化した特殊器官を有している。天然ゴム生合成のメカニズムを理解し、生産性の向上を図るには生合成器官である乳管細胞の構造の理解が課題である。すなわち、乳管細胞の発生数の多さと乳管細胞の発達程度が天然ゴムの生産量に直接関与している。

中澤 慶久：大阪大学大学院工学研究科Hitz協働研究所特任教授（〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-8 テクノアライアンス棟8階）所長、博士（農学）九州大1998年。1988年、九州東海大学大学院農学研究科遺伝育種専攻終了。1986年、日立造船株式会社材料事業推進室参事休職（2005年より大阪大）。専門は、木質科学 園芸科学 遺伝育種科学 細胞生物学 作物生産科学 天然資源系薬学 高分子・繊維材料 生物機能・バイオプロセス 社会学。中国ゴム協会杜仲ゴム研究会特別教授ほか。

本報告では、*Hevea brasiliensis* (パラゴムノキ) のラテックスに含まれるシス型PI (CPI) を産出する師部組織の有節乳管細胞について、発生から消滅するまでの形態学的な変化を紹介する。また、*Eucommia ulmoides* (トチュウ) に含有する結晶性ポリマーとして代謝されるトランス型PI (TPI) の師部組織を対象材料とした無節乳管細胞の発生からTPIの蓄積機序を紹介する。この2種類の天然ゴム生産植物に関わる師部組織の乳管細胞について、バイオイメーjingによる乳管細胞の発生から機能停止までの顕微化学的变化を取得した。この成果から、天然ゴム生産植物におけるPI含有量を高めるために必要なシンクとソースの関係を紹介し、植物にとって非生産的な化合物であるPIを貯蔵する乳管細胞の形態学的特徴について考察する。

2. パラゴムノキ乳管細胞のバイオイメーjing

同種は、年間1千万トン超のCPIを含む天然ゴムを生産する植物資源である。天然ゴム産業はタイヤ産業に代表される巨大企業が営む産業であり戦略物質でもある。同種は東南アジアにて150年以上前から天然ゴムの生産性を高める品種改良や生産技術開発を行っており、野生種よりはるかに生産性を高めてきた。しかし、未だに育種の途上にある。同種のラテックス生産性が高まれば農園のコストの改善となり、労働集約型の天然ゴム産業の全体の向上につながる。

パラゴムノキの乳管細胞の局在する師部組織の構造は、1912年にMeunier¹⁾により光学顕微鏡で最初に観察された。その後、Vischer (1923)²⁾、RichesとGooding (1952)³⁾、Nicole et al. (1986)⁴⁾らによりスケッチによる三次元構造の模式図を示しているが、これらは実体像を示すものではなく、詳細な乳管細胞のネットワーク構造は不明瞭であった。産業上重要な植物でありながら、成熟産業となっているなどの理由から、ラテックス生産器官の乳管細胞を手掛ける研究例が少なくなっていた。そこで、既報告 (Sando et al. 2009)⁵⁾した顕微化学にアレンジを加えて再考した乳管細胞のバイオイメーjingについて紹介する。

2.1 材料および方法

供試したパラゴムノキはブリダストン(株)のプランテーションPTPN VIII (Cikumpay, Purwakarta, West Java, Indonesia) で栽培された10年生の優良系統 (Clone RRIM600) より採取した直径約60 mmの幹とラテックスを組織観察に供した。組織観察用サンプルは、パラゴムノキ幹をサンプリング後、現地にて表皮、師部組織、形成層と少量の木部を含む約5 mm角のブロックを作製した。その後、ブロックをTissue-Tek[®] OCT compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) に包埋し、液体窒素を用いて瞬間凍結させた。組織切片の作製は、刃LEICA818 (Leica, Germany) を装着したクライオスタットCM-1850 (Leica)

を用いて、凍結ブロックより-20℃で生組織切片を作製した。横断面、縦断面の組織観察には40 μm厚とした。接線断面方向の乳管細胞の観察には横断面の切片を作製し、乳管細胞を確認後ブロックの方向を変え、表皮から形成層方向に60 μm厚の連続切片を作製した。組織切片の染色は、前述の方法にて作製した切片をスライドガラス上に移動させ、蒸留水を用いてOCT compoundを除去した。50 μg/ml Nile red (Molecular Probes, Eugene, OR) in 50% ethanolを用いて5秒間染色後、蒸留水を用いて水洗した。対比染色として1 mg/ml Fluorescent Brightener 28 (FB28) (Sigma-Aldrich) in distilled waterを用いて10秒間染色することにより細胞壁を染色した。耐蛍光封入剤 VECTA-SHIELD[®] Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) により封入した。標準品のラテックスは乾燥後、Nile red (Molecular Probes) にて染色した。

2.2 イメーjing画像の取得

スペクトル共焦点レーザー顕微鏡 (SCLSM) DIGITAL ECLIPSE C1si (Nikon, Tokyo, Japan) を使用した。対物レンズCFI Plan Apo10×, 20×, 40×, VC 100×H, ソフトウェアEZ-C1 3.40 software (Nikon) を用いて染色後の切片の観察を行った。蛍光観察の際の励起には405 nmのダイオードレーザ (17 mW), 488 nmの固体レーザ (20 mW) を使用し、レーザパワーは1.0 - 5.0%に設定した。32マルチチャンネルにて画像を取得し、波長分解能10 nmで423 - 743 nmの波長領域の蛍光検出を行った。1024×1024ピクセルで画像を取得し、S/N比向上のため3回の画像を取得してノイズ等の平均化を行った。画像解析に使用する解析用の三次元像の構築に使用する画像は512×512ピクセルで、2回の画像を取得した。

CPIなど目的化合物のリファレンススペクトルデータ (RSD) の取得は、細胞構成物、細胞内容物をしめす関心領域 (ROIs) を指定し、領域内の蛍光スペクトルを取得した。単染色した切片もしくはラテックスを使用し、高解像度 (1024×1024ピクセル, 10回スキャン, 波長分解能5 nm) で取得した画像上の30箇所領域の蛍光スペクトルを平均化することにより、後の蛍光分離に使用するRSDを取得した。

蛍光分離と三次元構築は、取得した画像に対し、EZ-C1 3.40 software (Nikon Instruments) を用いて蛍光分離を行った。蛍光分離には上記の方法で取得したRSDを使用した (Nile red スペクトル [最大蛍光波長547 nm, 575 nm], FB 28 スペクトル [最大蛍光波長444 nm])。三次元画像の構築はScan Range 20 - 50 μm, Step Size 0.35 - 1.00 μmの条件で連続的に取得した40 - 150枚の画像を蛍光分離後、ボリュームレンダリングすることにより作製した (spin 0 deg. tumble 0 deg. method maximum)。

画像解析は、NIS-Elements AR software (Nikon) を用

いて行った。測定は同一切片上で無作為に選択した8箇所に対し層別に行った。乳管細胞の穿孔数を層別に計測する画像測定機能を用いて、画像上の乳管細胞の長さや穿孔数を測定した。乳管細胞とそれ以外の組織の面積比率を計測するために、まず上記の方法で構築した三次元画像より、乳管細胞のみを抽出し、グレースケールに変換した。Object Count機能を用いて、輝度値50 - 255における乳管細胞とそれ以外組織の面積を層別に測定した。同様の方法で、乳管細胞に囲まれている放射細胞の面積を100区画層別に測定した。

2.3 結果および考察

2.3.1 バイオイメージングの取得

当該研究に用いたSCLSM C1siは、蛍光の波長情報を取得でき、重複したスペクトルを分離できる。ラテックスの蛍光特性を調べるため、Nile redで染色した乾燥ラテックスと師部組織の接線断面切片を作製した。また、細胞壁のセルロース特異的蛍光プローブであるFB28で染色した接線断面切片を作製した。SCLSMを用い、ラテックス、細胞内の粒子状脂溶性物質、細胞壁のそれぞれを関心領域 (ROI) 指定し、RSDを取得した (図1A)。それぞれの最大蛍光波長は、ラテックス: 547 nm (Nile red), 粒子状脂溶性物質: 567 nm (Nile red), 細胞壁: 442 nm (FB28) であった。Nile red染色したラテックスと粒子状脂溶性物質の蛍光スペクトル間において、20 nmの最大蛍光波長の差と波形が異なることが認められた。SCLSMを用い、Nile redのラテックス特異的な蛍光を分離できることが判明した (図1A)。師部組織の横断面切片を作製し、Nile redお

よびFB28で二重染色して、SCLSMを用いて蛍光スペクトルを取得した。取得したRSDを用い、ラテックスのスペクトルを赤色、粒子状脂溶性物質のスペクトルを青色、細胞壁のスペクトルを緑色に指定し、蛍光分離処理によるバイオイメージング画像を得た (図1B)。それぞれの蛍光スペクトルの抽出により、ラテックス (赤色)、粒子状脂溶性物質 (青色)、細胞壁 (緑色) を分離できた (図1C-E)。Nile red染色した師部組織において、SCLSMを用い蛍光分離することにより乳管細胞の画像を抽出し、詳細な構造解析が可能となった。

2.3.2 パラゴムノキ乳管細胞の形態

De Barry (1884)⁶⁾ は、乳管細胞を無節乳管細胞と有節乳管細胞の二つの主なタイプに分類している。そして、Fahn (1979)⁷⁾ は無節乳管細胞は、分裂組織内に一つの細胞として現われ、速やかに伸長し、その先端は周囲の細胞間を縫って成長し、分枝して植物体のすべての組織に及ぶとされる。一方、有節乳管細胞は、分裂組織内に細胞の縦列としてあらわれ、発生の初期に、それらの細胞間の隔壁の一部または全部が消失して管状と定義している。Xiu-Qian (1987)⁸⁾ は、パラゴムノキには無節乳管細胞と有節乳管細胞の両方が存在し、前者は子葉、葉、花、果実、根、茎に存在し、後者は樹皮の二次師部内に存在することを報告している。

今回取得したバイオイメージング画像は、図2Aの乳管細胞相互の横の連絡としての穿孔が形成され、網状の構造であり、既知報告と同様に、師部組織に有節乳管細胞の局在がみられた。さらに、接線断面切片の蛍光分離画像から

図1 パラゴムノキ師部組織のバイオイメージング

A: 蛍光分離ROI指定

B: 蛍光分離画像: 赤色, 粒子状脂溶性物質: 青色, 細胞壁: 緑色

C: ラテックス抽出画像, D: 粒子状脂溶性物質抽出画像, E: 細胞壁抽出画像

Reprinted with permission from *Planta* 230, 215, (2009). Copyright 2009 Springer International Publishing AG.

図2 パラゴムノキ接線面の有節乳管細胞の形態
A：有節乳管細胞間に形成される穿孔（ラテックス：赤色，細胞壁：緑色）
B：横断面の蛍光分離画像（ラテックス：赤色，細胞壁：緑色）
a - e：接線断面層別の乳管細胞の構造
蛍光分離後に三次元構築した画像
（形成層側より：a層，b層，c層，d層，e層），
Ra：放射組織，St：石細胞

Reprinted with permission from *Planta* 230, 215, (2009). Copyright 2009 Springer International Publishing AG.

師部の繊維組織近傍に，無節乳管細胞が同調して多数存在していることを観察した（図2B）。また，師部の縦断面切片の蛍光分離画像より，放射組織の分裂生長，および樹皮側に近い師部の石細胞の形成により，乳管細胞や師部の縦方向の連続性の崩壊を観察した。一般にパラゴムノキのタッピング断面において，ラテックスは形成層側の断面から大量に流出し，師部中央部から樹皮側には流出が見られない（外皮側から少量流出）。これは今回の結果と同じく，樹皮側に向かい乳管細胞の構造的な崩壊がラテックスの産出量に直接影響していると考察する。

形成層より同調して分裂する乳管細胞の構造変化について，Hebant (1981)⁹⁾ は，樹皮内の乳管組織の電子顕微鏡による観察で，隣接した乳管細胞間において穿孔の存在を報告している。また，Frey-Wyssling (1930)¹⁰⁾ は，ラテックス低産生の木において，乳管細胞は連続せず，多くの管が袋小路状である。ラテックス高産生の木では乳管細胞が連続すると報告している。しかし，これまでパラゴムノキにおいて同調に分裂した乳管細胞の構造に着目した観察例はなかった。そこで，層別の乳管細胞の構造変化を明らかにするために，乳管細胞の接線断面切片を作製した。バイオイメーjingの取得は上述と同じで三次元画像を構築した（図2B, a - e）。

形成層から2～3層目の乳管細胞が位置する領域は，師

管が明瞭に観察でき，師部組織が機能している（図2Ba）。この領域をConducting phloemと呼ぶ。Conducting phloem内の乳管細胞は，幅が狭く，他の乳管細胞の層に比べて隣接した乳管細胞間の間隙が大きいこと，円錐状の乳管細胞の末端構造が多数存在することが明らかとなった（図2Ba）。また，これらの有節乳管細胞の末端構造は，次の層において，複数の穿孔により癒着し，ネットワーク構造の一部になることを確認した（図2A）。乳管細胞を分裂層別に観察した結果，形成層から樹皮に向かい乳管細胞間の穿孔数が増加する傾向が観察された（図2Ba - e）。画像解析から隣接した乳管細胞間に形成される穿孔数を層別に求めた結果を，図3Aに示した。Conducting phloem内の乳管細胞（a）は，乳管細胞間の穿孔数が少なく，形成層から樹皮側に向かい，乳管細胞間の穿孔数の有意な増加を確認した。ラテックス高産生クローンほど，乳管細胞の末端構造の消失と穿孔数の増加が顕著となり，ネットワーク構造が発達していると考察した。

乳管細胞の機能停止は，これは形成層から樹皮側への放射組織の分裂生長により乳管細胞のネットワークにおける放射組織発達に由来する（図2Bc - e）。乳管細胞は，分裂生長しないため，パラゴムノキの生長（放射組織の分裂生長と横方向の張力）により最終的に崩壊する。

この証明のため蛍光分離により乳管細胞の画像を抽出し，乳管細胞とそれ以外の組織が占める面積比率を層別に計算した結果を図3Bに示した。乳管細胞は，Conducting phloem内から次層にかけて増加するが，形成層から樹皮側に向かい面積が減少した。対照的に，乳管細胞以外の組織は樹皮側に向かい面積が増加した。

Hebant (1980)¹¹⁾ は，乳管細胞における天然ゴム合成に必要な代謝物の供給に放射組織が重要な働きを報告している。しかし，今回の観察では放射組織の分裂生長が原因となり，乳管細胞の穿孔，すなわち横方向のネットワーク構

図3 パラゴムノキ乳管細胞の穿孔数および乳管細胞面積の変化
A：形成層分裂組織から発生した層毎の有節乳管細胞1 mmあたりの穿孔数

**はaに対して5%レベルで有意差あり e, fは乳管細胞崩壊のため測定不能

B：層毎の乳管細胞と放射組織の面積変化

Reprinted with permission from *Planta* 230, 215, (2009). Copyright 2009 Springer International Publishing AG.

造が崩壊し、ラテックス生合成機能が消失すると推測された。

2.4 パラゴムノキ乳管細胞の考察

Nile redとSCLSMを組み合わせた乳管細胞のバイオイメーシングの開発により、パラゴムノキにおけるラテックス生産乳管細胞の構造を把握することに成功した。ラテックスを高効率で生産する乳管細胞とは、有節乳管組織となり形成層にて層別に同調した乳管細胞が連続的に形成され、乳管細胞の同調数の増加がラテックス高収量につながる因子であることが判明した。また、連結乳管組織の結合部数なども立体的に複雑な乳管ネットワークの存在が判明している。現在、ラテックス収量と乳管細胞構造の相関について調査しており、ラテックス多収量品種選抜の計測手段のひとつである。この手法は、天然ゴム産生能の高いパラゴムノキをはじめとするラテックス高生産個体のスクリーニングや、プランテーションの生産能力増強に関わる有用な評価技術である。

人類は約150年の時間を費やして、ラテックス生産を高める品種改良を進めてきた。この求めてきた生物学的な結論として、パラゴムノキをはじめとするラテックス生産植物の有節乳管細胞の穿孔数の多さと同調分裂数の増加が重要であり、師部組織内における充実した乳管細胞ネットワーク構造を構築していることだと考察する。

3. トチュウ乳管細胞のバイオイメーシング

Eucommia ulmoides (トチュウ) は、温帯圏荒地の未利用地にて生育可能な植物種であり、生薬原料以外に全草のL2層にTPIを生産する植物として知られている。トチュウに含まれるTPIは結晶性ポリマーであり、その分子量は100万超の高分子である。樹皮や種子の無節乳管細胞に蓄積され、L2層の組織を引き裂くと糸状のTPIを観察することができる。糸状に見えるのは単乳管細胞に蓄積されたTPIであり、乳管細胞のレプリカとして目視観察できることがトチュウの特徴である。

トチュウ由来のTPIは国内企業や中国ゴム協会を市場供給する目的で事業を行っている。ナフサ起源とするTPIに比較すると分子量分布領域がシャープであり中間体が存在しないという特徴がバイオ由来でも利用価値に値すると考えられる。

著者ら (2012)¹²⁾ は、トチュウのTPIに関わる生合成遺伝子の解析に取り組み、TPIを合成する遺伝子群を発見しTIDSと名付けた。この遺伝子は既知のファルネシル2リン酸合成酵素の一部にアミノ酸の変異が生じたもので、基質を重合して疎水系のTPIに重合させる炭化水素重合遺伝子として注目されている。この酵素の発現については別の機会に紹介したい。

パラゴムノキと同様にトチュウにおいてもTPI増量に関

する品種改良が重要となっている。現在、品種改良は著者や中国林業科学院により野生種からの選抜育種がなされているが、TPI量産化を図るためには、トチュウの乳管細胞に関する詳細な観察方法が必要であった。本項では、トチュウの無節乳管細胞に関するバイオイメーシングについて既知 (著者ら2013)¹³⁾ 情報を再編して紹介する。

3.1 実験材料および方法

トチュウの当年枝は広島県尾道市因島中庄内町より9月に採取した。当年枝には、二次組織が発達する前の直径5 mm程度の柔らかい幼茎と、二次組織が形成された直径20 mm程度の硬い茎を用いた。RFDのTPIは生薬用杜仲樹皮を用い、中国四川省生薬市場にて入手した。

実験方法は、SCLSM組織観察は2.1の項目に準じ、トチュウ乳管細胞のバイオイメーシングを取得した。Nile red染色されたTPI、粒子状脂溶性物質およびFB28染色された細胞壁をROI指定し、それぞれ10箇所より取得した蛍光スペクトルを平均した。乳管細胞内のTPI観察は、ウルトラミクロトーム (LKB8800 [LKB]) で超薄切片 (厚さ80 ~ 90 nm) を作製し、透過型電子顕微鏡 (JOEL JE-M1200EX加圧電流 80 kV) を用いて、トチュウ当年枝の師部組織に分布する無節乳管細胞内のTPIの局在状況を観察した。

3.2 結果と考察

3.2.1 バイオイメーシングの取得

生薬用のトチュウ樹皮からTPI繊維状物質をNile redで染色し、SCLSMで蛍光スペクトルのROIを測定 (最大蛍光波長: 545 nm) しRFDとした (図4A)。師部組織の横断面切片を作製しSCLMSにより蛍光分離処理を行い、450 nmのピークを青色、545 nmのピークを黄色、575 nmのピークを赤紫色に指定し、蛍光分離画像を得た (図4B)。それぞれの蛍光スペクトルの抽出により、TPI: 黄色、粒子状脂溶性物質: 赤紫色、細胞壁: 青色を分離できた (図4C-E)。Nile red染色した組織において、SCLSMを用い蛍光分離することによりTPIの画像を抽出し、詳細な画像解析が可能となった。

3.2.2 トチュウ乳管細胞の形態

樹皮師部横断面のバイオイメーシングを取得した。黄色のシグナルで示されるTPIは皮層と師部の組織間に存在した (図5A)。これはWeissら (1892)¹⁴⁾ の観察結果と一致している。さらに、拡大像を観察したところ、形成層近傍の若い二次師部には、顆粒状のTPIの蓄積が見られた (図5C)。一方で、形成層から表皮側へと移行した古い二次師部では、繊維状のTPIの切断面を観察した (図5B)。

天然ゴム産出植物は化学構造の幾何異性体 (CPI, TPI) に関係なく、ラテックスと称す乳液状のPIを産出するKewick (2001)¹⁵⁾。ラテックスは乳管細胞にラバーパーティクル (RP) として細胞質に分散したエマルジョンを形成し

図4 トチュウ師部組織のバイオイメーjing

A：蛍光分離ROI指定,

B：蛍光分離画像；TPI：黄色，粒子状脂溶性物質：赤紫色，細胞壁：青色

C：TPI抽出画像，D：粒子状脂溶性物質抽出画像，E：細胞壁抽出画像

Reprinted with permission from *Planta* 238, 549, (2013). Copyright 2013 Springer International Publishing AG.

A, B, C: SCLSM 画像 (横断面)

図5 トチュウ師部の横断面のTPI局在

A：形成層から表皮まで師部横断面全体の蛍光分離画像TPIが皮層および師部組織に局在

B：形成層から表皮側へと移行した二次師部の蛍光分離画像形成層から離れた二次師部でTPIが均一な固形状物質として存在

C：形成層近傍の二次師部の蛍光分離画像形成層近傍の師部で顆粒状のTPIが存在

Xy：木部，Ca：形成層，Ra：放射柔組織，Ph：師部，Co：皮層，

St：師管，TPI：黄色，粒子状脂溶性物質：赤紫色，細胞壁：青色

Reprinted with permission from *Planta* 238, 549, (2013). Copyright 2013 Springer International Publishing AG.

た液体である。トチュウのTPIについて，形成層近傍の乳管細胞では，生合成初期の顆粒状TPIとして局在（図5 C）が観察された。この点でラテックスのRPとの類似性を示した。

二次師部の接線面観察は，横断面と同様に形成層近傍の若い二次師部では顆粒状TPIの局在が観察された（図6 A – C）。一方，表皮側へと移行した古い二次師部では繊維状のTPIに変化することが観察された（図6D）。これらの観察結果から，形成層近傍で顆粒状のTPIが産生され蓄積し，表皮側へと移行するとともに顆粒TPIが融合し，最終的に繊維状のTPIが形成され乳管細胞内を満たしていると考察した。また，トチュウ由来TPIはDe Barry (1884)⁶⁾の報告と同じく無節乳管細胞に蓄積することが観察された。

この観察結果から，形成層から表皮側へと移行するとともに乳管細胞は細胞間隙を伸張して生長し，やがて乳管細胞の原形質はTPIに満たされ飽和する。その際に，TPI生合成機能や乳管細胞自体の成長能力を消失していると考えられる。これらの観察結果はWeissら (1892)¹⁴⁾の報告と一致している。また，WeissとTianらが報告しているように (Weissら 1892)¹⁴⁾；Tianら (1990)¹⁶⁾，発生直後の乳管細胞の伸長速度が著しく速いために，本研究では乳管細胞の始原細胞の確認は困難であった。また，形成層から乳管細胞を発生させるトリガーも不明である。

トチュウの乳管細胞発生初期に存在する顆粒状TPIについてTEMによる観察を行った。顆粒状TPIは，電子密度

図6 トチュウ師部の接線面のTPI局在

A：形成層近傍の乳管細胞接線面の蛍光分離画像顆粒状TPIが無節乳管周辺部より発生した状況

B：形成層近傍より表皮側に若干移行した二次師部接線面の蛍光分離画像顆粒状TPIが無節乳管細胞の膜周辺部から内部へ充填されている状況

C：形成層近傍より更に表皮側に移行した二次師部接線面の蛍光分離画像顆粒状TPIが無節乳管細胞内で飽和している状況

D：表皮側の二次師部接線面の蛍光分離画像無節乳管細胞内にTPIが融合して繊維状で充満された状況

Xy：木部，Ca：形成層，Ra：放射柔組織，Ph：師部，Co：皮層，St：師管，TPI：黄色，粒子状脂溶性物質：赤紫色，細胞壁：青色

Reprinted with permission from *Planta* 238, 549, (2013). Copyright 2013 Springer International Publishing AG.

が高く電子顕微鏡下で黒く観察されることから、一層の膜構造で覆われていることを示した（図7A, B）。

Cornishら（1999）¹⁷⁾ は、TEM解析とスピラベル法により、*Euphorbia lactiflua*, *Ficus elastica*, *Parthenium argentatum*, *Hevea brasiliensis* の4種のラテックス生産植物におけるRPの物理的特性について、一層のリン脂質膜に覆われていると報告している。トチュウのTEM観察結果はCornishらの報告と同じく、顆粒状TPIはRPと同様の構造と考えられる。また、Cornishら（1999）¹⁷⁾ は、ラテックス中のCPIのRPは表面が負に帯電し癒着を防止していると考察している。しかし、トチュウのTPIは疎水性であるため顆粒状TPIは、油滴の融合と同じく連続的に融合するこ

とで肥大化すると考察された。接合部分の膜構造はこの時に消失されると考察した（図7B）。

3.2.3 トチュウTPIの産生・蓄積機構

遺伝子解析（著者ら2012）¹²⁾ SCLSMおよびTEM（著者ら2013）¹³⁾ の結果から、TPIの産生・蓄積機構の推定モデルを図7に示した。発生部位は頂端分裂組織および形成層のL2層からTPI生合成能を有する無節乳管細胞が不規則に発生し細胞間隙の間を伸長する（図8A Stage 1）。続いて、無節乳管細胞の細胞壁面から顆粒状TPIの生成がみられ、TPIの蓄積が開始される（図8A Stage 2）。最終的に、無節乳管細胞内に顆粒状TPIが融合を繰り返し、接合面の膜構造が消失する（図7B）。この段階で、疎水系のTPIは化学的に融合が促進すると考察される。そして、細胞間隙の

図7 無節乳管細胞内の顆粒状TPI横断面のTEM画像

A：顆粒状TPIの無節乳管細胞全体像（5K倍）

B：顆粒状TPIの融合状況（20K倍）

TPI接合部位（点線で囲んだ部位）の膜構造は消失

Tp：TPI，Cw：細胞壁，La：無節乳管細胞（横断面）

Reprinted with permission from *Planta* 238, 549, (2013). Copyright 2013 Springer International Publishing AG.

図8 トチュウの無節乳管に生産するTPIの蓄積機序（推定モデル）

A：無節乳管の伸長とTPIの蓄積（Stage1～3）

B：TIDSの局在と顆粒状TPIの生成と癒合状況

Reprinted with permission from *Planta* 238, 549, (2013). Copyright 2013 Springer International Publishing AG.

間に形成された無節乳管細胞の形態に合わせたレプリカとして繊維状TPIとして目視できると推定される（図8A Stage 3）。

著者ら（2012）¹²⁾の報告したTIDSは顆粒状TPIの表面上に局在し、TPI生合成に関与する推定モデルを図8Bに示した。顆粒状TPIの表面に形成された脂質一重膜にTIDSは局在していると考えられる。顆粒状TPIの融合が進行し、繊維状TPIの形成は生合成というより、無節乳管細胞内での化学反応であると考えられる。繊維状TPIが細胞内に充填されると、脂質膜の消失によりTIDSの活性は失いTPIの生合成は自動的に停止すると示唆された。

3.3 トチュウ乳管細胞の考察

トチュウにおける無節乳管細胞へのTPI蓄積機序について、バイオイメーjingにより繊維状TPI形成の全容を解析に成功した。今回は、師部組織のTPI蓄積機序について述べたが、トチュウの場合、重要な器官は師部組織ではなく、種子の果皮部に極端に多くTPIを含有する無節乳管細胞の発生が重要である。これは種子保護を兼ねた防御のひとつとも考えられるが、種子の乾燥重量の約2割を締める量となる。このように産業的に成立する器官の乳管細胞の発生とTPIの蓄積機序の解析は、バイオマス産業において重要なテーマである。

4. 乳管細胞のバイオイメーjing

本手法はパラゴムノキやトチュウに限るものではなく（参考例：グアユール（著者ら2017）¹⁸⁾）、植物の組織内に多量に蓄積するオイルボディや樹脂等、天然ゴム以外の脂溶性物質の局在解析にも応用できる技術である。また、乳管細胞は疎水系化合物を植物に生育障害を起こすことなく蓄積できる重要な器官の役割を果たしていることも注目できることから、天然ゴム、樹脂、エラストマーなどバイオマスを使った産業強化に資する技術のひとつとして普及したい。

謝辞

本研究はNEDO補助事業にて推進した結果である。研究を推進した林達史氏（現在積水化学㈱）、武田強氏（現在帝人㈱）、山東智紀博士（当時ブリヂストン㈱）、渡辺信江氏（ブリヂストン㈱）、日立造船㈱の各位、大阪大学名誉教授小林昭雄博士をはじめとする多くの方に感謝申し上げます。

Reference

- 1) Meunier, A. *L'appareil Laticifère des Caoutchoutiers*, Imprimerie Ind. et Fin., Bruxelles, 1912.
- 2) Vischer W. *Verh. Naturforsch. Ges. Basel* **1923**, 35, 174.
- 3) Riches J.P., Gooding E.G.B, *New Phytol.* **1952**, 51, 1.
- 4) Nicole M, Geiger JP, Nandris D. *J. Phytopathology*, **1986** 116, 259.
- 5) Sando T.; Hayashi T.; Takeda T.; Akiyama Y.; Nakazawa Y.; Fukusaki E.; Kobayashi A, *Planta*, **2009** 230, 215
- 6) De Barry A.; *Vergleichende Anatomie der Vegetationsorgane der Phanerogamen und Farne*. W. Engelmann, Leipzig, 1884.
- 7) Fahn A.; Laticifers. In *Secretory tissues in plants*. Academic press, London, 1979, pp223.
- 8) Xiu-Qian Z. *J. Nat. Rubb. Res.* **1987**, 2, 94
- 9) Hebant C. *Can. J. Bot.* **1981**, 59, 974. In France.
- 10) Frey-Wyssling, A. *Arch. v. d. Rubbercult. Nederlandsch-Indie* **1930**, 74, 135.
- 11) Hebant C.; Fay E. Z. *Pflanzenphysiol*, **1980**, 97, 391.
- 12) Suzuki N.; Uefuji H.; Nishikawa T.; Mukai Y.; Yamashita A.; Hattori M.; Ogasawara N.; Bamba T.; Fukusaki E.; Kobayashi A.; Ogata y.; Sakurai N.; Suzuki H.; Shibata D.; Nakazawa Y. *Planta*, **2012**, 236, 1405.
- 13) Nakazawa Y.; Takeda T.; Suzuki N.; Hayashi T.; Harada Y.; Bamba T. *Planta*, **2013**, 238, 549.
- 14) Weiss, F. E., *Linnean Soc. London 2nd ser. Botany*, **1892**, 2, 3, 243
- 15) Kekwick R. G.; Latex and laticifers. *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley, 2002.
- 16) Tan, B. L.; Sarafis, V.; Beattie, G. A. C.; White, R.; Darley, E. M. *J. Experim. Botany*, **2005**, 56, 420, 2755.
- 17) Cornish K.; Wood D. F.; Windle J. J. *Planta*, **1999**, 210, 1, 85.
- 18) Kajiura H., Suzuki N., Mouri H., Watanabe N., Nakazawa Y., *Planta*, **2017**, 247, 513.

*

*

*

*

*