

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07505

研究課題名(和文) 同位体イメージングによる炭素の樹木内移動の可視化と木部形成過程の解明

研究課題名(英文) Study of xylem formation process by visualization of photosynthetic carbon in trees

研究代表者

竹内 美由紀 (Takeuchi, Miyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：20378912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、樹木木部における炭素の移動と固定の過程を明らかにすることを目的とした。炭素の安定同位体で標識した二酸化炭素を用いてラベリングを行い、安定同位体比測定および二次イオン質量分析法による同位体イメージングを組み合わせ、標識炭素の追跡を行った。樹体内における炭素の挙動と木部細胞壁への堆積過程を解析した結果から、木部への炭素堆積の過程や放射方向への移動の様子が可視化により示されたほか、木部細胞壁への炭素の取り込み量、すなわち細胞壁堆積活動に1日の中で変動があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the carbon accumulation process in wood, stable isotopic labeling and isotopic imaging by SIMS were used. ^{13}C -labeled carbon dioxide was applied to young poplar trees and the distribution of the tracer ^{13}C was analyzed on a subcellular scale. The amount of the tracer ^{13}C incorporated into the cell walls decreased during the dark period, suggesting that cell wall formation is more active in the light period. The SIMS images revealed the distribution of the tracer ^{13}C in the developing xylem. The tracer ^{13}C appeared first in the secondary cell walls of very young xylem, and then its distribution extended to more developed cells.

研究分野：樹木細胞学

キーワード：木部形成 細胞壁 同位体イメージング 二次イオン質量分析法

1. 研究開始当初の背景

樹木木部形成については、形態観察をはじめ、構成成分の代謝経路や堆積挙動、細胞分化や細胞壁形成に関わる分子機構など、様々な面から研究が行われてきた。一方、二酸化炭素や水分の吸収等、外界とのやりとりを含む樹木の活動の一部として木部形成を捉える場合には、季節変動や年輪単位での木部成長や形成層活動が注目されることが多く、細胞レベルでの細胞壁形成と木部形成以外の樹木の活動との相関についての研究例は多くない。しかし、シロイヌナズナやユーカリでモノリグノール生合成経路の遺伝子発現に日周期性があることや、スギ分化中仮道管での細胞壁堆積には光条件に応答した変動が示されているように、細胞壁形成には外部環境の変化や木部形成以外の樹木の活動が細かく反映されている。そのため細胞壁形成を含め木部の形成機構について理解するためには、環境因子への対応を含めた樹木全体の活動と合わせて、その動的な過程を解析する必要があると考えられた。

同位体トレーサー法は生物体内における物質移動や代謝を研究するうえで有効な方法である。細胞壁形成に関しては、放射性同位体標識物質を用いたオートラジオグラフィによる研究が非常に多くの知見をもたらした。その後、安定同位体標識を二次元高分解能の二次イオン質量分析装置(SIMS)で分析する手法が開発され、安定同位体標識の細胞内分布を分析することが可能となった。この手法を樹木木部形成に応用した先行研究では、樹木に投与した炭素の安定同位体(^{13}C)が木部細胞壁内の特定の細胞壁層に堆積やデンプン粒内における標識 ^{13}C 分布を観察することに成功した。

2. 研究の目的

本研究では、木部形成を光合成で吸収した炭素の堆積活動としてとらえ、炭素の移動と

固定を調べることにより木部形成過程について明らかにすることを目的とした。 ^{13}C 標識した二酸化炭素を短期間に樹木に投与し、木部への取り込み過程を調べた。また、 ^{13}C を投与する時間帯を変えることにより、木部への炭素堆積に日変動があるかどうかを調べた。

3. 研究の方法

^{13}C 標識した植物を作製し、標識 ^{13}C の樹体内および木部内での取り込みを経時的に調べた。研究方法は大きく以下の3つに分けられる: 1) ^{13}C 標識した植物試料の調製、2) ^{13}C 濃度のバルク分析による炭素の移動解析および細胞壁成分への代謝の分析、3) 元素イメージングによる細胞レベルでの ^{13}C の分布解析。これらの結果をもとに、光合成による炭素の吸収と木部への堆積過程について解析を行った。

1) ^{13}C 標識した植物試料の調製

試料にはポプラ (*Populus alba* × *P. grandidentata*) 若木を用いた。明期 14 時間、暗期 10 時間に設定した CO_2 チャンバー内で、明期開始から 1 時間後あるいは 11 時間後から 2 時間、 $^{13}\text{CO}_2$ を投与した。投与開始から 2 時間後にチャンバー内空気を自然大気に戻し、その 4, 10, 20, 30 時間後に葉、師部、木部を採取した。また $^{13}\text{CO}_2$ 処理前の個体をコントロールとした。

2) ^{13}C 濃度のバルク分析

^{13}C 標識ポプラから採取した葉、師部、木部は直ちに液体窒素で凍結し、凍結乾燥した。乾燥試料をボールミルで粉碎し、安定同位体比測定(IR-MS)に供した。また粉碎した木部から水可溶成分を除去し、細胞壁画分とした。この細胞壁画分からセルロースおよびリグニンを単離した。細胞壁画分をワイズ法により脱リグニンしてホロセルロースを調製し、

さらに 17.5% 水酸化ナトリウム水溶液で処理してセルロースを得た。またクラソン法によりリグニンを調製した。IR-MS により、細胞壁画分、ホロセルロース、セルロース、リグニンをそれぞれについて ^{13}C の取り込み量を調べた。

3) 元素イメージングによる ^{13}C の分布解析

^{13}C 標識ポプラから採取した木部を細切し、3% グルタルアルデヒド/リン酸緩衝液で固定した。固定した試料はエタノールシリズで脱水した後、Spurr 樹脂に包埋した。樹脂ブロックから厚さ 0.5-1 μm の切片を作製し、7mm 角のシリコンウエハ上に乗せて導電コーティングを施した後、SIMS (Cameca 社製 NanoSIMS 50L)を用いて元素イメージングを行い、標識 ^{13}C の分布を調べた。

4. 研究成果

試料内の炭素の全量に対する ^{13}C の存在比は、 $^{13}\text{CO}_2$ を投与しない、コントロール試料では 1.08%であった。 $^{13}\text{CO}_2$ 投与後の葉や幹における ^{13}C 比の変化には、投与のタイミングによる差が見られた。明期前半・後半のどちらにおいても、投与終了後 30 時間生育した個体の木部における ^{13}C 比は 1.5%程度になった。明期前半に $^{13}\text{CO}_2$ を投与した場合には、木部全体への取り込み量、および細胞壁への固定量ともに投与後 10 時間までに大きく増加し、木部中の標識 ^{13}C の約 50%が細胞壁に固定されていた。一方、明期後半の投与では、投与後 10 時間から 20 時間にかけて細胞壁に固定された標識 ^{13}C 量は顕著に増加した。このとき 10 時間後に木部に存在した標識 ^{13}C の多くは、可溶性の成分として検出された。これらの結果より、光合成産物は速やかに樹体に輸送され、細胞壁の各構成成分に代謝されて木部細胞壁に固定されるが、木部に輸送された炭素の配分や細胞壁への固定量には 1 日の中で変動があることが示唆された。一方、

セルロース、リグニン、およびヘミセルロースを主とする残りの細胞壁成分への標識 ^{13}C の取り込みについてもそれぞれ調べたところ、それぞれの成分間での明らかな違いは検出されなかった。

SIMS による ^{13}C イメージングでは、木部に取り込まれた標識 ^{13}C について、形成層から成熟木部にいたる分化中木部における分布を調べた。明期前半の $^{13}\text{CO}_2$ 投与では、投与後 4 時間の二次壁形成中木部細胞に明らかな標識 ^{13}C の堆積が認められた。 ^{13}C の取り込みは二次壁形成開始直後と見られる細胞壁で顕著であったが、取り込みは形成層から 300 μm 程度離れた木部でも検出された。生育時間が長くなるにつれて ^{13}C 比および標識 ^{13}C が検出される領域が増加し、20 時間後には形成層から 600 μm 程度の細胞まで取り込みが見られた。また、細胞壁形成の進行の程度により ^{13}C の細胞内分布は異なり、二次壁では最内層への細胞壁成分の付加的の堆積と肥厚した細胞壁全体への挿入的な堆積によるものとみられる分布が観察された。

本研究では、光合成による取り込み後の短期間における炭素の木部への移行と木部細胞壁への堆積過程について基礎的な知見を得ることができた。より生長した大きな樹木では、今回使用した若い苗との違いはあることが予想されるが、樹木における炭素分配について理解する上で有用な情報となるであろう。また、 $^{13}\text{CO}_2$ の投与から 1 日以内に木部に明瞭な ^{13}C による標識が残されることが明らかになり、今後 $^{13}\text{CO}_2$ による標識法が木部形成を研究する上で非常に有用なツールとして利用可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

竹内 美由紀、則定 真利子、磯貝 明、
炭素の固定から見た木部細胞壁形成、第
68 回木材学会大会 2018 年 3 月 16 日、
京都府立大学下鴨キャンパス (京都府・
京都市)

竹内 美由紀、則定 真利子、磯貝 明、
同位体イメージングによる木部細胞壁形
成過程の追跡、日本植物学会第 81 回大会、
2017 年 9 月 9 日、東京理科大学 野田キ
ャンパス (千葉県・野田市)

Miyuki Takeuchi, Mariko Norisada and
Akira Isogai, Imaging mass spectrometry
analysis of woody cell wall using ¹³CO₂
pulse labeling. 253rd American Chemical
Society National meeting & exposition, 2017
年 4 月 6 日, Moscone center (San Francisco,
USA)

Miyuki Takeuchi, Mariko Norisada and
Akira Isogai, Imaging mass spectrometry
analysis of photosynthetic products in poplar.
The 2nd East-Asia Microscopy Conference,
2015 年 11 月 24 日 The Himeji Chamber of
Commerce and Industry (Himeji, Hyogo)

竹内 美由紀、則定 真利子、磯貝 明、
樹木木部細胞壁形成における光合成産物
分配の解析、日本植物学会第 79 回大会、
2015 年 9 月 8 日、朱鷺メッセ：新潟コン
ベンションセンター (新潟県・新潟市)

Miyuki Takeuchi, Mariko Norisada and
Akira Isogai, Study of carbon accumulation
process during woody cell wall formation,
SIMS XX, 2015 年 9 月 17 日, Westin Seattle
(Seattle WA)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 美由紀 (TAKEUCHI, Miyuki)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特
任助教
研究者番号：20378912

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

則定 真利子 (NORISADA, Mariko)
東京大学・アジア生物資源環境研究センタ
ー・准教授
研究者番号：00463886

(4) 研究協力者