

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18732

研究課題名(和文) 広葉樹形成層細胞の二次木部細胞への分化制御機構

研究課題名(英文) The mechanisms of differentiation of secondary xylem cells in hardwood species

研究代表者

工藤 佳世 (Kudo, Kayo)

秋田県立大学・木材高度加工研究所・客員研究員

研究者番号：10757983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：広葉樹の形成層帯付近における植物ホルモン量や分布パターンと二次木部細胞の形態や形成位置との関連性を明らかにすることを目的とした。まず、連続切片からの内生植物ホルモンの定量方法を確立した。次に、休眠期コナラ樹幹への局所的加温とNAA塗布の複合処理により通常と異なる道管配列パターンの誘導に成功し、高オーキシン条件は道管面積を減少させ道管数を増加させる効果があることが示唆された。また、自然環境下のハリエンジュにおける葉のフェノロジー、木部生産量および内生IAA量の季節変動を明らかにし、形成層活動や道管配列パターンは内生IAA量や量的変動のみで制御されているわけではないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内生植物ホルモンの量や分布に関する知見の不足は、広葉樹の二次木部細胞の分化制御機構の解明における大きな課題の一つであった。本研究課題の遂行により、自然条件下での二次木部分化と内生IAA量の変動に関する新規知見が得られた。また、今後、二次木部細胞の分化制御における植物ホルモンの役割を実験的に証明するために非常に有効な新たな定量解析方法や実験系を確立することができた。これらの知見や技術は、広葉樹における二次木部細胞分化制御機構の解明におけるブレイクスルーとなり、今後の研究を加速度的に進めることに貢献するものであり、広葉樹由来の木質バイオマスの生産・管理の科学的基盤となる。

研究成果の概要(英文)：The study was aimed to reveal the relationship between the level and the distribution of internal plant hormones and the morphology and the pattern of secondary xylem cells in hardwood species. We developed the methods to quantified the amount of plant hormones from thin sections. We tried to develop the new system to induce the different pattern of secondary xylem. We succeed in inducing many small vessels by the combination treatment of localized heating plus the application of NAA to the dormant stem of *Quercus serrata*. In addition, our monitoring of phenology of leaf, penology of xylem formation and seasonal change of internal IAA level in *Robinia pseudoacacia* suggested that cambial activity and patterning of vessels might not be controlled by only the level and the changes of the level of internal IAA.

研究分野：木材組織学

キーワード：広葉樹 道管 形成層活動 植物ホルモン 二次木部細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

広葉樹は我が国において森林面積の約5割、蓄積で約3割を占める重要な木質バイオマス資源である。広葉樹の年輪構造は容積密度など資源利用上重要な指標を決定するため、その形成機構を詳細に理解することが必要である。広葉樹の年輪構造は非常に複雑で多様である。これは広葉樹の形成層細胞からそれぞれ水の通り道となる道管要素や樹体を支える木繊維など、形も機能も異なる二次木部細胞が生み出されるためである。また、季節によっても生み出される二次木部細胞の種類や形が変化し、樹種に固有の年輪構造が形成される。しかしながら、なぜ広葉樹では複雑で多様な年輪構造が生まれるのか、形成層細胞から特定の種類の二次木部細胞への分化を制御する機構についてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、広葉樹の二次木部細胞の分化制御機構を解明することを最終目標とし、広葉樹の形成層帯付近における植物ホルモンの量的分布パターンや内生量の季節変動と二次木部細胞の形態や形成位置との関連性を明らかにすることを目的とした。そのために、(1)内生植物ホルモン量の定量法の検討および形成層帯付近における接線方向の分布解析、(2)人為的に特異な二次木部を形成させる新たな実験系の確立、(3)年輪形成と内生 IAA 量の季節変動との関連性の解明、以上3つの実験・解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 内生植物ホルモン量の定量法の検討および形成層帯付近における接線方向の分布解析

形成層帯付近における接線方向の内生植物ホルモン量の分布パターンを解析するために、凍結連続柾目面切片の作製法等の検討を行った。コナラ成木から形成層、木部、師部を含むブロック試料を採取した後、液体窒素を用いて凍結させた。凍結切片作製装置を用いて凍結柾目面切片を作製し、均一な厚さで切削可能な切片厚を検討した。また、各切片を内部標準を入れた抽出液に浸漬し、IAA, GA₁, GA₃, GA₄, GA₇, GA₉, ABA, tZ, tZR, iP, iPR を抽出し、カートリッジを用いて精製した。高速液体クロマトグラフィーを用いて各内生植物ホルモン量を定量し、ピーク強度を求め、切片から植物ホルモンが定量可能であるか検討を行った。

(2) 人為的に特異な二次木部を形成させる新たな実験系の確立

①コナラ苗木に対する局所的加温と NAA 塗布の複合処理が道管配列パターンに与える影響
冬休眠中のコナラ苗木の樹幹に対し、局所的加温処理を行い、早期に形成層活動を再開させた。その後、加温部に NAA とラノリンを混合したペーストを樹幹に塗布した。無処理、局所的加温処理、局所的加温+NAA 塗布処理を行った個体の処理部から試料を採取し、化学固定を行った後、樹脂で包埋し、薄切片を作製した。光学および偏光顕微鏡を用いて、道管配列パターンの観察を行った。また、顕微鏡画像と画像解析ソフトを用いて、400 放射列あたりの道管数と道管内腔面積を測定し、処理間で違いが認められるかを統計的に解析した。

②ポプラ苗木に対するジベレリン合成阻害剤散布処理が木部形成に与える影響

春先にポプラ苗木に対しパクロブトラゾール水溶液を1回土壌に散布した。約3ヶ月間生育させた後、試料を採取し、化学固定を行い樹脂で包埋した後、薄切片を作製した。光学顕微鏡を用いて道管配列パターンや形成層細胞の様子、形成された二次木部の幅を観察した。

(3) 年輪形成と内生 IAA 量の季節変動との関連性

2016年3月～11月にかけて秋田県能代市に生育するハリエンジュ成木3個体から定期的形成層、木部、師部を含むブロック試料を採取した。試料は樹脂包埋し、薄切片を作製した。光学および偏光顕微鏡を用いて、形成層細胞の様子、道管配列パターンを観察し、形成層活動期間を特定した。また、顕微鏡画像と画像解析ソフトを用いて、当年の木部生産量(当年木部の幅+形成層帯の幅)を測定し、年輪形成過程を特定した。薄切片作製用試料の近傍の試料を内生 IAA の定量に用いた。IAA を抽出・精製し、各ブロックに含まれる IAA 量を定量し、検量線を用いて単位面積当たりの内生量 (ng/cm²) を算出し、内生 IAA 量の季節変動を特定した。試料採取と同時に、地上からとドローンを使って樹上から芽や葉の様子の写真を撮影し、葉のフェノロジーを特定した。これらの結果を同一時系列内で比較した。

4. 研究成果

(1) 内生植物ホルモン量の定量法の検討および形成層帯付近における接線方向の分布解析

コナラ成木試料では、連続的に均一な厚さの切片を作製できる切片の厚さは、30 μm であった。また、広放射組織が存在する場所では均一な厚さの切片を連続して作製することが非常に難しかった。30 μm 厚の柾目面切片から今回ターゲットにしたすべての植物ホルモンを検出することができた。これらの結果から、凍結連続切片を用いて接線方向の植物ホルモンの分布を解析することが可能であることが分かった。冬季のサンプルでは一部の植物ホルモンの検出が困難であった。この結果から、植物ホルモン量が季節変動しており、分布解析のためには内生量の季節変動を正確に理解する必要があることが示唆された。

(2) 人為的に特異な二次木部を形成させる新たな実験系の確立

①コナラ苗木に対する局所的加温と NAA 塗布の複合処理が道管配列パターンに与える影響

局所的加温+NAA 塗布処理では、小径道管が多数形成されており、無処理個体および局所的加温処理個体との間に有意な差が認められた (図 1)。このことから、人為的に孔圏道管の数やサイズを変化させることが可能であることが分かった。また、高濃度オーキシン条件は道管径を減少させ道管数を増加させる効果があることが示唆された。一方、いずれの条件においても道管は前年孔圏外道管が配列した列に近接した放射列において形成されていた。このことから、当年最初の道管の形成位置は、NAA 塗布処理では変化させることはできず、道管が形成される位置はあらかじめ決定されている可能性が示唆された。

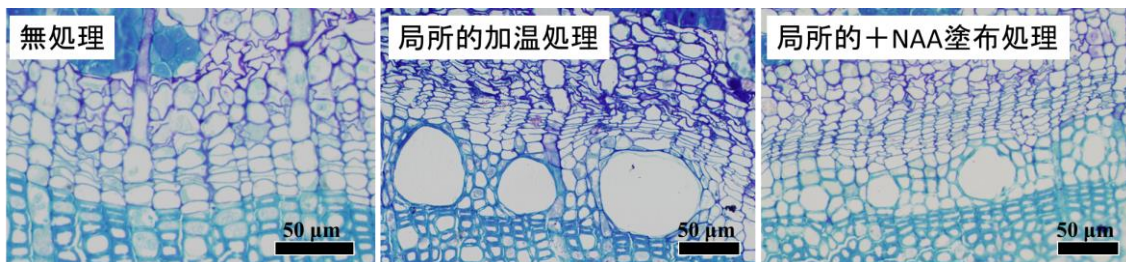


図 1 処理によって誘導された道管
加温処理開始 78 日目、NAA 塗布処理開始 38 日目 (2017 年 4 月 14 日)
木口面 光学顕微鏡写真 * : 道管要素

②ポプラ苗木に対するジベレリン生合成阻害剤散布処理が木部形成に与える影響

パクロブトラゾール散布処理個体では、形成層細胞の分裂および分化帯がほとんど認められず、無処理個体に比べ木部細胞数が少なかった。道管配列パターンには処理間での違いは認められなかった。これらの結果から、パクロブトラゾール土壌散布処理は形成層活動を阻害する効果を持ち、ジベレリン量が形成層活動の制御に関わっている可能性が示唆された。

以上の結果から、人為的に特異な二次木部を形成させることに成功したといえる。

(3) 年輪形成と内生 IAA 量の季節変動との関連性

秋田県能代市に生育するハリエンジュでは、4 月に開芽が認められ、8 月まで新葉の展開が認められた。8 月に初めて落葉が認められ、11 月でもわずかに着葉が認められた (図 2)。形成層活動は 3 月に再開し、11 月には休止していた。これらの結果から、ハリエンジュでは、開芽前に形成層活動が開始し、落葉完了前に形成層活動が休止するといえる。一列目の大径道管の形成が終了し、道管径が徐々に減少する 6 月~8 月において最も活発に木部の生産が行われていた。また、大径道管形成期において木部生産量は、個体間で差がほとんど認められなかったが、孔圏外部形成期の 6~8 月では木部生産量に個体間で著しい差が認められた。これらの結果から、この時期の形成層細胞の分裂頻度が当年年輪幅に影響を与えるといえる。内生 IAA 量は季節によって変動しており、孔圏外部形成期に年間の最大値を示していた。しなしながら、内生 IAA 量やその量的変動と木部の生産量や道管形成パターンとの間に明瞭な関連性は認められなかった。これらの結果から、ハリエンジュにおいて形成層活動や道管配列パターン形成は内生 IAA 量や IAA 量の変動だけで制御されているわけではないことが示唆された。

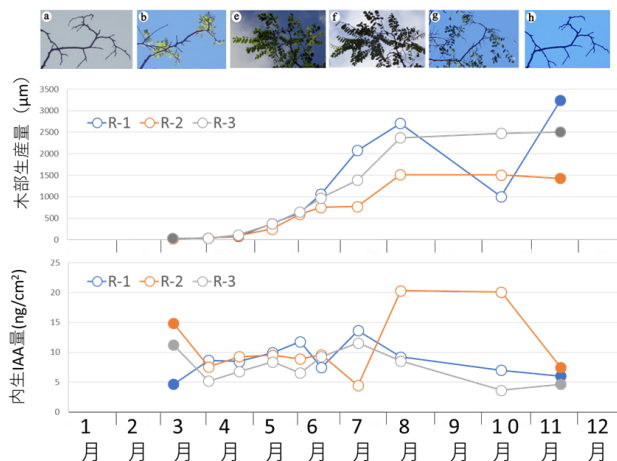


図 2 ハリエンジュにおける葉のフェノロジー、木部生産量の季節変動および内生 IAA 量の季節変動との関連性
● : 形成層細胞の分裂なし
○ : 形成層細胞の分裂あり

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Md Hasnat Rahman, Kayo Kudo, Shahanara Begum, Takahiro Muraishi, Yusuke Yamagishi, Satoshi Nakaba, Yuichiro Oribe, Chanhui Lee, Hyun-O Jin, Ryo Funada. Effects of auxin-transport-inhibitor and defoliation on wood formation in locally-heated *Abies Homolepis*. (2018) *IAWA Journal* 30:353-371. (査読あり)
- 2) Kayo Kudo, Yasuhiro Utsumi, Katsushi Kuroda, Yusuke Yamagishi, Eri Nabeshima, Satoshi

Nakaba, Koh Yasue, Katsuhiko Takata, Ryo Funada. Formation of new networks of earlywood vessels in seedlings of the deciduous ring-porous hardwood *Quercus serrata* in springtime. (2017) *Trees* 32:725-734. (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

- 1) Kayo Kudo, Yasuhiro Utsumi, Eri Nabeshima, Katsuhiko Kuroda, Yusuke Yamagishi, Satoshi Nakaba, Koh Yasue, Ryo Funada, Katsuhiko Takata. The formation of earlywood vessels in deciduous ring-porous hardwoods in earlyspring. 4th Xylem International Meeting, Padova, September 2019 (受付済み)
- 2) 工藤佳世、雉子谷佳男、織部雄一郎、佐々木賢二、山岸祐介、半 智史、船田 良、高田克彦 「落葉広葉樹における形成層活動と木部形成の季節性」 第 69 回日本木材学会大会 函館 2019 年 3 月
- 3) 工藤佳世、内海泰弘、黒田克史、山岸祐介、半 智史、鍋嶋絵里、安江 恒、船田 良、高田克彦 「落葉広葉樹環孔材コナラにおける孔圏道管の形成過程」 第 130 回日本森林学会大会 新潟 2019 年 3 月
- 4) 工藤佳世、佐々木賢二、佐藤博文、高田克彦 「落葉広葉樹における形成層活動および木部形成の季節変化」 樹木年輪研究会 つくば 2018 年 12 月
- 5) Kayo Kudo, Yasuhiro Utsumi, Eri Nabeshima, Katsushi Kuroda, Yusuke Yamagishi, Satoshi Nakaba, Yoshihiro Hosoo, Koh Yasue, Ryo Funada, Katsuhiko Takata. Formation of networks of earlywood vessels in a deciduous ring-porous hardwood, *Quercus serrata*. 2018 SWST/JWRS International Convention, Nagoya, November 2018
- 6) 工藤佳世、織部雄一郎、Md Hasnat Rahman、山岸祐介、半 智史、船田 良、高田克彦 「休眠期コナラ苗木樹幹に対する局所的加温と NAA 塗布の複合処理が木部形成に与える影響」 第 68 回日本木材学会大会 京都 2018 年 3 月
- 7) 工藤佳世、織部雄一郎、鍋嶋絵里、Shahanara Begum、山岸祐介、半 智史、安江 恒、高田克彦、船田 良 「休眠期コナラ樹幹に対する局所的加温処理が孔圏道管形成に与える影響」 樹木年輪研究会 名古屋 2017 年 11 月
- 8) Kayo Kudo, Yuichiro Oribe, Shahanara Begum, Yusuke Yamagishi, Eri Nabeshima, Md Hasnat Rahman, Satoshi Nakaba, Katsuhiko Takata, Ryo Funada. The pattern of location of the first earlywood vessels in the current year's xylem in a ring-porous hardwood, *Quercus serrata*. 9th PRWAC 2017, Bali, September 2017
- 9) Kayo Kudo, Eri Nabeshima, Yasuhiro Utsumi, Shahanara Begum, Yuichiro Oribe, Yusuke Yamagishi, Satoshi Nakaba, Md Hasnat Rahman, Katsushi Kuroda, Koh Yasue, Katsuhiko Takata, Ryo Funada. Relationship between formation of earlywood vessels and growth of buds and shoots in a deciduous ring-porous hardwood, *Quercus serrata*. IUFRO 2017 division5 Conference, Vancouver, June 2017
- 10) 工藤佳世、織部雄一郎、佐藤博文、山岸祐介、半 智史、船田 良、高田克彦 「広葉樹環孔材および散孔材における形成層活動および二次木部形成の季節性」 第 67 回日本木材学会大会 福岡 2017 年 3 月
- 11) 工藤佳世、山下大地、内海泰弘、佐々木賢二、高部圭司、高田克彦 「広葉樹環孔材における水分通道ネットワークの三次元的可視化」 第 67 回日本木材学会大会 福岡 2017 年 3 月

[その他]

- 1) 2017 年 9th PRWAC best presenter award

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：工藤 佳世

ローマ字氏名：(KUDO, kayo)

所属研究機関名：秋田県立大学

部局名：木材高度加工研究所

職名：助教、客員研究員

研究者番号（8桁）：10757983

(2)研究協力者

研究協力者氏名：雉子谷 佳男

ローマ字氏名：(KIJIDANI, yoshio)

研究協力者氏名：高田 克彦

ローマ字氏名：(TAKATA, katsuhiko)

研究協力者氏名：船田 良

ローマ字氏名：(FUNADA, ryo)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。