

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05758

研究課題名(和文) 同位体イメージングによる樹木木部への炭素の移動と固定過程の解析

研究課題名(英文) Study of carbon supply and utilization in xylem by isotopic imaging

研究代表者

竹内 美由紀 (Takeuchi, Miyuki)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・主任研究員

研究者番号：20378912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：安定同位体標識した二酸化炭素を使用したラベリング法により、樹木が光合成によって吸収した炭素の樹体内での分布を調べた。葉、師部、木部における標識炭素の存在量を測定することにより、光合成後の時間の経過に伴う炭素の移動や細胞壁構成炭素と可溶性炭素への配分変化を追跡することができ、木部への炭素の供給や細胞壁形成の日周性について新たな知見が得られた。元素イメージングにより得られる詳細な標識炭素分布に、細胞壁成分の情報を合わせて細胞壁への炭素の取り込みを検討することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炭素の供給は樹木の木質形成に大きな影響を与える大きな要因のひとつであるが、これまで炭素の供給と細胞壁形成を数時間単位や細胞レベルで調べた例はほとんどなかった。本研究では光合成により吸収された炭素が木質細胞壁として堆積される過程について情報を得ることができた。また得られた知見は、木質バイオマス生産を制御する技術の確立や、高いCO₂固定能力をもつ等の優れた特性を有する樹木を設計する上でも有用であるといえる。

研究成果の概要(英文)：The distribution of carbon in trees after photosynthetic carbon assimilation was analyzed using stable isotopic labeling method. The isotopic tracer content of leaves, phloem and xylem was measured. Carbon transport in trees, and carbon distribution in different fractions such as cell wall and soluble organic carbon were analyzed. These results provided information on the carbon supply to xylem and the periodicity of cell wall formation in the tree. The detailed distribution of the isotopic tracer was observed by elemental imaging using a secondary ion mass spectrometer, and we analyzed the tracer distribution in combination with information on cell wall components.

研究分野：樹木細胞学

キーワード：木部形成 細胞壁 二次イオン質量分析法 同位体イメージング

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

光合成により樹木に取り込まれた炭素の一部は幹に送られ、二次木部細胞の細胞壁として樹管内に蓄積される。木部形成を二酸化炭素や水の吸収等、外界とのやりとりを含む樹木の活動の一部としてとらえる場合には、季節変動や年輪単位での木部成長や形成層活動の研究例が多く、細胞レベルでの細胞壁形成と樹木全体の活動の相関についての研究は多くない。しかし、リグニン生合成経路の遺伝子発現に日周期性が検出され(Harmer et al. 2000, *Science*, 290. 2110 など)、シロイヌナズナでは維管束特異的な概日リズムが存在する(Endo et al. 2014, *Nature*, 515. 419)など、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といえる。なかでも炭素の供給は細胞壁形成を制御する重要な要因であり (Vervbancic et al. 2017, *Mol. Plant*, 11. 75), 樹木による木質細胞壁形成について理解するためには、炭素の供給源である光合成や、炭素の移動を合わせて検討する必要があると考えられる。

樹体内の炭素の動きを調べようとするとき、安定同位体炭素(^{13}C)によるラベリングの方法が有効である。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の研究に活用されており、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。近年では、安定同位体トレーサーを質量分析法と組み合わせて追跡する手法が用いられることが多い。二次イオン質量分析装置 (Secondary ion mass spectrometry, SIMS) を用いた同位体イメージングでは同位体の細胞内分布を可視化することができる。先行実験では葉のデンプン粒内や、木部の細胞壁内のトレーサー ^{13}C を観察することができている(竹内 2014, *Plant Morphology*, 26.19)。

2. 研究の目的

本研究では、光合成によって吸収された炭素が樹幹に輸送され、木部細胞壁に固定されるまでの炭素の動きやその日周期性を調べることを目的とした。

根からの水や無機養分の吸収や移動が可視化を含む種々の手法で研究されてきたのに対し、光合成産物の樹体内での移動に関する情報は少ない。光合成産物は師部輸送を介して幹、根へと移動し、幹では師部から木部さらに木部内を放射方向に移動するが、実際にいつ木部に輸送されて、木質細胞壁に取り込まれるのかは明らかではない。そこで本研究では、 ^{13}C 標識を用いて樹体内での光合成産物の移動を追跡する。炭素の動態には、季節や気候、樹種や生長段階等、様々な要因が影響するが、本研究では一定の条件下で栽培したポプラ苗木を試料とし、木部に固定されるまでの炭素の移動と堆積について基礎的な知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

炭素として ^{13}C を持つ二酸化炭素を樹木に短時間与えることにより、 ^{13}C 標識した試料を作製し樹体内および木部における標識 ^{13}C の分布を調べた。

1) ^{13}C 標識した植物試料の作製

試料にはポプラ (*Populus alba* × *P. grandidentata*) 若木を用いた。 $^{13}\text{CO}_2$ を 2 時間投与して、 ^{13}C ラベリングを行った。 $^{13}\text{CO}_2$ 投与開始から 2 時間後に試料を自然大気下に戻して生育させて 4-30 時間、あるいは 3 週間の栽培を行った後、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て使用した。

2) 投与した標識 ^{13}C の分布分析

2)-a. 安定同位体比質量分析計による ^{13}C 濃度測定

$^{13}\text{CO}_2$ 投与後、4-30 時間の間の 4 点で試料を採取し、直ちに液体窒素で凍結して凍結乾燥した。本実験では幹を切断して採取するため、 ^{13}C 比の経時変化を、同一個体で追跡することはできない。各条件につき 3 個体を用いて分析を行った。乾燥試料を粉碎し、安定同位体比質量分析計 (IR-MS) で ^{13}C 比を測定して、各組織における ^{13}C 量の変化を調べた。さらに粉碎試料から、細胞壁、デンプン、および可溶性成分を分画しそれぞれの画分について ^{13}C 比を測定し、 ^{13}C の配分を調べた。

また、 $^{13}\text{CO}_2$ 投与後 3 週間、生育した試料から木部を採取し、形成層側から髄方向に 30 μm 厚の板目面連続切片を作製した。この切片からセルロース、リグニンを調製して IR-MS 測定に供した。この方法では試料切片の木部内での位置を特定することが可能となり、それぞれの細胞壁成分への ^{13}C 取り込みと、それらの位置関係すなわち細胞壁の形成段階について検討した。

2)-b. 元素イメージングによる ^{13}C の分布解析

二次イオン質量分析法(SIMS)による元素イメージングでは、標識 ^{13}C の分布を細胞レベルで可視化することができる。試料は脱水されており、また平滑な表面である必要があるため、顕微鏡観察用の試料作製法に従って、採取した葉および幹を固定、脱水、樹脂包埋した。幹から採取した試料の一部は、可溶性成分の分布の保存を目指し、採取直後に液体窒素で凍結し、凍結乾燥後に樹脂を浸透させて包埋試料を作製した。樹脂包埋試料から薄切片を作製し、切片上で ^{13}C の細胞内分布を測定した。

$^{13}\text{CO}_2$ 投与後 3 週間の試料では、上記の方法に加え、木部組織形態を保存したままで脱成分処理を行って、主にセルロースのみからなる試料を作製した (Horikawa et al. 2020, J. Wood Sci., 66. 37)。このセルロースブロックについて樹脂包埋切片を作製して、SIMS による ^{13}C イメージングを行い、セルロースに取り込まれた ^{13}C の分布を調べた。

4. 研究成果

1) 木部における ^{13}C の分布解析と細胞壁成分の関係

SIMS による元素イメージングでは、 ^{13}C 分布の細胞内・細胞壁内分布を検出することができる。さらに本研究では、窒素を含む CN-イオンの像と走査型電子顕微鏡観察を使って、より高分解能で ^{13}C 分布を調べる方法を確立した。また次の 2 つの実験を行い、元素イメージングで得られた ^{13}C 分布に細胞壁成分の情報を付与することができた：①木部組織形態を保存したセルロースブロックを作製して SIMS 測定を行い、セルロースへの ^{13}C 取り込みを特定して分析することができた。②板目面連続切片を作製し、この切片から調製したセルロース、リグニンについて IR-MS 測定を行った。木部のどの位置で、どの成分に ^{13}C が取り込まれたのかを特定し、SIMS により得られた ^{13}C 分布と照合することができた。これらの結果から、木部細胞壁への炭素と細胞壁成分の堆積過程を詳細に示すことができた。また本研究で得られた知見を利用して、 ^{13}C ラベリングと元素イメージングの方法が様々な条件下での樹木の形成層活動や木部形成を研究する手段として応用することができると考えられる。

2) 光合成産物の木部への移行と細胞壁への取り込み

生育条件および $^{13}\text{CO}_2$ 濃度をコントロールした CO_2 チャンバー内で、ポプラに $^{13}\text{CO}_2$ を 2 時間投与して ^{13}C ラベリングを行い、 ^{13}C ラベルされた光合成産物の木部への移動と細胞壁への取り込み過程を追跡した。また $^{13}\text{CO}_2$ 投与を行う時間帯を朝あるいは夕方とし、ラベリングの時間帯の違いによる炭素の動きの変化を調べた。

$^{13}\text{CO}_2$ 投与のタイミングによって、炭素の木部への移動や木部細胞壁への取り込み過程が異なった。木部全体における ^{13}C 比の変化は、葉内の ^{13}C 比の減少の様子と対応が見られた。朝のラベリングでは吸収された ^{13}C が速やかに葉から幹に移動しており、投与開始から 6 時間後にはすでに細胞壁への固定が検出された。一方、夕方のラベリングでは、6 時間後に木部に検出された ^{13}C は朝の試料の 30%程度であったが、12 時間後には朝の試料とほぼ同程度であった。また、木部内での ^{13}C の配分は朝と夕方のラベリングにより異なり、夕方に投与した ^{13}C は多くが細胞壁に固定されずに可溶性の画分に検出される傾向があった。12 時間後では、朝の試料では ^{13}C の 50%が細胞壁に固定されていたのに対し、夕方の試料では細胞壁に固定された ^{13}C は 32%で、67%は可溶性の成分中に含まれていた。次に、細胞壁に固定された ^{13}C の量の変動に注目すると、両試料とも細胞壁に含まれる ^{13}C は明期に大きく増加し、暗期には ^{13}C 比の変化が小さかった。またこのとき、セルロースとリグニン中に含まれる ^{13}C 比もそれぞれ同じ傾向を示し、セルロースとリグニンとも主に明期に生産されると考えられた。これらのことから、ポプラでは細胞壁形成が明期に活発に進行すること、また光合成のタイミングにより、吸収された炭素の木部での利用には違いがあることが示された。

SIMS による同位体マッピングでは木部では主に細胞壁、葉ではデンプン粒内に固定された ^{13}C の分布の変化が観察され、IR-MS で測定した ^{13}C の変化と合わせて炭素の動態について検討することができた。朝に $^{13}\text{CO}_2$ の投与を行った場合、6 時間後の木部では ^{13}C は二次壁開始直後のごく若い木部細胞に検出され、時間が経つにつれ ^{13}C 標識が検出される領域が髄側に広がった。 ^{13}C 層状に細胞壁最内層部に分布しており、主にセルロースに含まれた ^{13}C の堆積が最初に検出されたと考えられる。二次壁形成時にセルロースは最内層に付加的に堆積するため局所的に ^{13}C 濃度が高くなり、検出されたと考えられた。また、このとき凍結乾燥試料を用いて可溶性の成分中の ^{13}C 検出したところ、形成層から約 800 μm 髄側の放射柔細胞内に ^{13}C が検出された。放射柔細胞を経由して炭素が速やかに輸送されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 竹内美由紀
2. 発表標題 ポプラ引張あて材形成開始時における木部形成
3. 学会等名 第72回木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田傑、齋藤継之、竹内美由紀、則定真利子、堀川祥生
2. 発表標題 13C02パルスラベリングと同位体分布解析によるポプラ引張あて材形成過程の研究
3. 学会等名 第71回 日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内美由紀, 則定真利子, 磯貝明
2. 発表標題 樹木木部細胞壁の形成を観察する
3. 学会等名 第132回 日本森林学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyuki Takeuchi, Mariko Norisada and Akira Isogai
2. 発表標題 Incorporation of tracer 13C to developing xylem of poplar
3. 学会等名 Cell wall meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内美由紀, 則定真利子, 磯貝明
2. 発表標題 ポプラ木部細胞壁形成における光合成産物の利用
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyuki Takeuchi, Mariko Norisada and Akira Isogai
2. 発表標題 Tracing photosynthetic carbon distribution during xylem formation
3. 学会等名 22th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS22) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内美由紀, 則定真利子, 磯貝明
2. 発表標題 ポプラ木部細胞壁形成における二酸化炭素と水の利用
3. 学会等名 第70回木材学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyuki Takeuchi, Mariko Norisada and Akira Isogai
2. 発表標題 Imaging mass spectrometry analysis of photosynthetic products in plants
3. 学会等名 SISS20 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内美由紀, 則定真利子, 磯貝明
2. 発表標題 同位体バルスラベリングを用いた樹木木部形成過程の解析
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyuki Takeuchi, Mariko Norisada and Akira Isogai
2. 発表標題 Tracing photosynthetic carbon in wood after 13C02 labelling
3. 学会等名 2018 Joint Convention SWST & JWRS (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内美由紀, 則定真利子, 磯貝明
2. 発表標題 13C02ラベリングを用いたポプラ木部における光合成産物の分布解析
3. 学会等名 第69回木材学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	則定 真利子 (Norisada Mariko) (00463886)	東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石田 傑 (Ishida Suguru)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関