

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 26 日現在

機関番号：32663
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2015
課題番号：25630056
研究課題名(和文)植物における水・物質循環機構の流体力学的解明

研究課題名(英文)Water Cycle of Plants

研究代表者

望月 修 (Mochizuki, Osamu)

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：50157830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞内流れ(細胞質流動)と成長に関わる物質輸送の関係解明を行うことを目的に研究を行ってきた。マイクロPIV可視化計測による細胞内流動計測および蛍光法を用いた葉脈の流れを可視化した。サブフローメータによる維管束内流量計測を通じ、植物における新たな非侵襲型流量計の開発の可能性を検討した。葉に穴を開け一部の葉脈をカットし、その影響について調べ葉脈の流れにおけるロバスト性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I focus on the network of leaf vein to understand the strong network system. I study the network structure to know the relation between damage on leaf and the strong network. Then, the influence of damage on leaf vein for the water absorption on the leaf was studied with the dye flow visualization. The result shows that the network type of vein on real leaf is the mesh type network. The mesh type network has the benefit to make a bypath when the vein has the damage. The result of dye flow visualization shows that the real leaf requires the single vein to make a bypath for damage region. The increasing of area on water absorbed relates the distance of water absorption. This means that number of vein is not dominant for the speed of water absorption. Therefore, the network of leaf vein has a high robustness from the damage of vein by the mesh type network.

研究分野：生物・生体流体力学

キーワード：葉脈 ネットワーク 吸水機構 可視化 フラクタル マイクロ流れ

1. 研究開始当初の背景

J.V.de Meentら(2010)はMRV(磁気共鳴速度計)を用いて、植物細胞における液胞内の流動の速度計測を行った。流動様式は明らかになってきたが、依然として、この流動が何のために、何によって流れ(移動)しているのかは解明されていない。植物の水の吸い上げに関して、いまだに諸説あるのは、植物内の水の流れを計測できていないからである。日野(2005)は光合成による炭水化物の濃度上昇によって浸透圧が根から吸い上げるための負圧を生じさせ、400m程度の高さまで水をあげられると結論づけている。しかし、細川の考察では、導管内を水が流れることを説明するには不十分であるとしている。

2. 研究の目的

植物内流動を計測することにより、植物の成長に関わる水・物質輸送に関するメカニズムを解明、植物細胞内流れ(細胞質流動)と成長に関わる物質輸送の関係の解明が目的である。この成果にもとづきメカニカルポンプを用いない血液検査用マイクロ流動システム開発に工学応用を検討する。

3. 研究の方法

マイクロPIV可視化計測によるオオカナダモの細胞内流動計測、モデル生物であるシロイヌナズナの維管束内流れのマイクロ流動システムへの応用、サップフローメータによる維管束内流量計測とシュリーレン法を用いた蒸散量の直接計測、新たな非侵襲型流量計の開発を行う。

4. 研究成果

植物細胞内流れ(細胞質流動)と成長に関わる物質輸送の関係解明するために、マイクロPIV可視化計測によるオオカナダモの細胞内流動計測を行った。マニピュレータに取り付けられたインジェクターで細胞内に可視化用ナノ蛍光粒子を注入し、その動きから本当に何らかの液体(細胞質基質)が流動しているのかということを確認した。その結果、蛍光粒子は通常の顕微鏡で観察される顆粒(細胞小器官)の動きと同じ動きをしていることが明らかになった。すなわち、細胞質基質に流動が認められるということである。まだ残る疑問は流動と顆粒との運動にどのような相関があるか、ということである。すなわち、顆粒の動きがその場の流動とどのような関係があるかということである。これらに関して研究を行ってきた。この成果は国際誌であるPlosOneにDiffusive Promotion by Velocity Gradient of Cytoplasmic Streaming (CPS) in *Nitella Internodal Cells*と題して2015年12月22日に掲載発行された。細胞質流動が細胞質で起こっていることを計測により明らかにした。

光学顕微鏡を使用して生きたオオカナダモの内部を観察すると、小胞と呼ばれる細胞

小器官やその他細胞の断片組織が、細胞質内で運動している原形質流動を見ることができた。オオカナダモは、一つの細胞の長さが数cmとなる節間細胞であり、多くの核を持つ多核体である。またその原形質とは、細胞質とオルガネラを含む細胞内膜内部全体のことを指している。細胞内中心は液胞があり、液胞と細胞壁との間で流動が観察された。小胞(ベシクル)の運動を追従することは、光学顕微鏡から容易であるものの、細胞質と屈折率がほぼ同一であるオルガネラの運動と細胞質の流動を観察することは困難である。オルガネラの観察には、通常は固定後(生きていない)の染色された細胞での観察が行われる。本実験では、フラスコモの細胞を固定することなく生きたまま原形質流動を観察し、その細胞内におけるオルガネラの運動とオルガネラ周りの流れの可視化を行い、速度分布計測を行った。オルガネラは前述の通り細胞質とはほぼ屈折率が同じであるため、光学顕微鏡での区別は困難である。細胞壁と細胞内膜の浸透性を利用し、細胞質のみに蛍光剤(ウラニン)を含有させた。オルガネラ周りのみ発光させることによってオルガネラの影絵を可視化し、その速度計測を行った。細胞質内に直径500nm蛍光トレーサ粒子(Molecular Probes: F8813 Yellow-Green)をマイクロインジェクションで注入することで、オルガネラ周りの流れの可視化を行い、速度分布の計測を行った。細胞内の観察には、倒立顕微鏡に高速共焦点スキャナを取り付けた共焦点蛍光顕微鏡を用いて蛍光観察を行った。光源にはArイオンレーザ(LASOS Laser: 500mW、488nm)、光学フィルターには、nmハイパスフィルター、撮影には冷却CCDカメラ(Olympus: DP70、680×512pixel、12bit×RGB color、15fps)を用いた。対物レンズは40倍油浸高NAレンズ(Olympus: UPLanFLN、NA=1.30)を使用し、共焦点スキャナによって得られる光学スライス厚さ(Optical Slice Thickness)は約2.8μmであった。取得した映像から画像解析ソフト(Library CO.LTD.: Cosmos)を使用してオルガネラを追跡し、速度計測を行った。

この実験の結果、円柱状の細長いフラスコモ細胞のほぼ中央付近を観察領域とし、細胞質に蛍光剤を含ませオルガネラを影絵のように可視化した。フラスコモの細胞の直径は約150μm程であった。細胞壁近傍に分布する680nm程(赤色)の蛍光波長をもつ整列した10μm程の細粒は、細胞壁表面に付着している葉緑体である。葉緑体より内側に520nm程(黄緑色)の蛍光波長を示す蛍光剤を含んだ細胞質が観察された。また、その細胞質内のオルガネラは染色されず、黒く球形で観察された。オルガネラは、液胞内部を除く細胞質全体に広く分布していた。

もう一つの研究は、樹木における水の流れを解明することである。根から吸い上げた水

が最終的に葉から蒸散するものとする、その末端の葉における流れを観察することで吸い上げる機構を明らかに出来るのではない、という観点から研究を行った。ナンテンの葉を用いて、葉脈の流れを可視化計測した。蛍光溶液を吸わせることによって、その付け根から葉脈網に行き渡る様子を観察した。水の吸い上げの機構として、気孔からの蒸散、細管の毛細管現象、細胞間の浸透圧、等がある。これらの内どれか一つが正解であるということはないと思われるので、それぞれの吸い上げに及ぼす寄与度を調べた。それには、葉の気孔を口で潰したものの、細胞を取り去ったもの、穴を開けて葉脈を分断したもの、を用い、それらの結果から連立方程式を解く形で、寄与度を調べた。その結果、吸い上げに蒸散がほぼ60%寄与していることが分かった。

葉脈のネットワーク構造については、これまで葉脈ネットワークのループ構造に着目した解析や、葉の面積と葉脈密度の関係を調べるために様々な評価手法が用いられてきた。これにより、構造が解明されつつある。しかし、これらの多くは損傷のない葉脈を対象としたものであり、損傷した葉脈のネットワーク性については詳しくわかっていない。本研究では葉に人工的な損傷をさせたモデルを作成することで葉脈のネットワーク構造の理解を工学的な観点から行い、葉脈ネットワークの損傷に対する評価を行った。また、実際に損傷を与えた葉に蛍光色素を吸わせることで損傷した葉脈における流れを調べた。損傷による葉脈の構造的変化と吸水の関係を元に、葉脈ネットワークの頑強性について調べた。この成果は機械学会論文集 Vol. 82, No. 833 (2016) に葉脈のネットワーク構造と題して掲載されている。

葉脈ネットワークにおける損傷の影響を評価するため、葉における葉脈のネットワーク構造について考える。本実験で使用したナンテンの葉から葉脈のみを抜き出した。葉脈のみを抽出するため、コンピュータに取り込んだ画像データにおいて緑色の成分を抜き出し背景差分を行っている。主脈と側脈に着目すると、主脈から側脈へと分岐・側脈からさらに分岐を繰り返すことで葉全体へ張り巡らされている。また、分岐した葉脈同士が合流する複雑なネットワークを形成していることがわかる。このネットワークの幾何学的特徴を調べるためにフラクタル次元を調べた葉脈の全体のフラクタル次元を測定したところ、 $D=1.61$ であった。また、主脈が含まれない側脈部を切り出して測定を行ったところ、それぞれ $D=1.58$ 、 1.54 であった。このことから、葉脈は個体内でのネットワーク密度に差が大きいことがわかった。

葉のネットワークにおける個体差を調べるために5枚の葉について同様の解析を行い、葉のネットワークの再現性を調べた。それぞれの葉脈から、主脈を含むネットワーク1か

所、含まないネットワークを2箇所抽出し、フラクタル次元を測定した。その結果、ナンテンの葉においては、フラクタル次数の平均値は主脈を含む場合で $D=1.61$ (標準偏差 0.07)、含まない場合は $D=1.58$ (標準偏差 0.04) となり個体差が少なく再現性の高いネットワークが葉脈により構築されていることが分かった。

この結果から、主脈は葉において分岐をしていないため分岐回数0回、側脈は主脈から1度分岐しているため分岐回数1回として、葉脈の分岐回数を元にネットワーク構造を考える。葉におけるネットワークの概念図から主脈は分岐をしていないため0と示され、側脈を1の様に分岐回数を図中の葉脈に相当する部分で示している。この葉脈の分岐部分がネットワークを構成する1つの節点 (node) とする。主脈から側脈の分岐部分を「0-1 node」のように表す。また 0-1 node・1-2 node で構成された1つの環状のネットワークを1層目、0-1 node・1-2 node・2-3 node で構成された環状部分を2層目、0-1 node・1-2 node・2-3 node・3-4 node で構成された環状部分を3層目のネットワークとした。このことから、1層目は太い葉脈により構成されたものである。それに対して3層目は細い脈により形成されるネットワークである。隣り合う環状部分との境界を明らかにするために色を塗り分けて区別した。これから1つの1層目の環状部は、15個の2層目の環状構造で構成されていることがわかった。また、2層目の環状部も4個の3層目の環状部位により構成されていることがわかった。本実験で使用したナンテンの葉全体では、1層目が23個・2層目が384個・3層目が1028個の環状部位で構成されていた。このように葉脈の分岐を節点として、各層のネットワークは接続されている。これは葉脈の分岐部位を要素とするとメッシュ型ネットワークのようになっていると考えることができる。このメッシュ型ネットワークは情報通信分野において、ツリー型などと比較し信頼度の高いネットワーク形態として知られている。

メッシュ型のネットワーク構造は局所的に接続が寸断された場合であっても、他の接続を經由し損傷箇所を迂回することができる。葉脈はこのようなメッシュ型の構造を有している。そのため、害虫などによる外部からの刺激により損傷が発生しても損傷部を迂回することができる。これにより頑強なネットワーク構造を実現していることを明らかにした。

吸水の時間的な変化について、吸水された部位の面積に着目し画像処理により求めた。吸水面積の時間的な変化において、時間の経過とともに蛍光面積が増加していくことを観察した。コントロールとなる損傷の無い葉の結果から、実験開始から4時間で約44%の範囲に葉脈を經由し水が供給されている

ことがわかった。また吸水開始から約 1 時間 30 分にグラフの傾きが大きくなっていることから、吸水面積の増加率大きくなっていることがわかった。これは側脈からの分岐を繰り返すことにより葉の広い範囲において水が供給され始めていることを示唆している。また損傷を受けている葉と比較すると、実験開始 2 時間までは吸水面積に大きな違いは見られない。しかし、2 時間経過後を境に吸水面積に違いが表れている。実験開始 4 時間後には、交互の切り込みによる損傷で約 8%、葉の根元に損傷が集中しているものは約 23%、葉の中央部に損傷が集中しているものは約 19%の範囲に水が供給されている。左右の切り込みによる損傷では、損傷部位の迂回を繰り返しながら進まなくてはならない。しかし他の 2 つは損傷部位に集中しているが、迂回を繰り返す必要は無く給水の経路は短くなる。そのため吸水実験の可視化結果から、稼働率が高い左右の切り込みによる損傷の方が吸水の経路が長くなるため葉が全体的に暗くなってくることを観察した。さらに主脈に欠損の無い場合には、葉の全体へと速く水を供給することを実現していることがコントロールとの比較から明らかである。これは葉脈の径の変化で最適化された物質輸送のネットワークであることが考えられる。すなわち、葉は葉脈の分岐を要素とした葉脈の太さに基づいた 3 層構造のメッシュ型のネットワークを形成している。ネットワークの要素間を 1 本の葉脈でも接続されていれば、最終的に葉の全体へと水を供給することが可能である。主脈から吸水することで、葉全体に素早く水を供給できる。このことより、葉脈の径の変化に基づいたネットワークを構成することで、災害時など外部からの刺激に対して頑強且つ平常時は最適な情報交換を行うことが出来るネットワークを実現できると考えられる。

3 年計画で植物における水・物質循環機構の解明を行うという全体目標に対してほぼ達成されたと考えている。しかし、サップフローメータを用いての計測はまだ十分とは言えないので、今後継続して研究を行っていく予定である。

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 1 件)

佐藤慧拓、窪田佳寛、望月修、葉脈のネットワーク構造、日本機械学会論文集、査読有、vol.82, No. 833(2016), pp. 1-10. DOI:10.1299/transjsme.15-00386.

〔学会発表〕(計 1 件)

佐藤慧拓、窪田佳寛、望月修、葉脈のネットワークの可視化、可視情報全国講演会、2015

年 10 月 10 日~10 月 11 日、京都工芸繊維大学(京都)

〔図書〕(計 1 件)

望月修、コロナ社、物理の眼で見る生き物の世界-バイオミメティクス皆伝-、2016、180

〔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

望月 修 (MOCHIZUKI, Osamu)
東洋大学・理工学部・教授
研究者番号：50157830

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：