

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04930

研究課題名(和文) インタクト構造解析に基づく、有縁壁孔によるキャビテーション制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of cavitation at bordered pits as estimated by analyses of the structures

研究代表者

佐野 雄三 (Sano, Yuzou)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：90226043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,400,000円

研究成果の概要(和文)：樹木の水分通導機構を詳しく解明するのに不可欠な通水要素間の壁孔壁のインタクトな微細構造を調べるとともに、その構造が通水やキャビテーションの進行制御にどのように寄与しているのかを検討した。同壁孔壁の空隙構造は変化に富み、壁層構成や空隙構造、ゲル状被覆物の存否に種間差が認められた。また、本来の構造をより正確に明らかにするために有効な電子顕微鏡技法を明らかにした。これまでに研究例がほとんどない同壁孔壁のゲル状被覆物の化学的な性状を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹木の通水系において浄化フィルターや安全弁のような働きを担う壁孔の仕組みに関して、インタクトな微細構造とともに、当該分野でほとんど考慮されていなかったゲル状被覆物について多くの知見を得ることができた。また、古典的な電子顕微鏡技法から新規なマイクロ解析技術まで、いくつかの研究手法の有効性についても明らかにすることができた。本研究は、特に樹木生理学、植物解剖学など基礎的分野において大きな貢献を果たすものと信じる。

研究成果の概要(英文)：In an attempt to elucidate the regulation mechanisms of water flow and cavitation at bordered pits in trees, we revealed the fine structures of intervascular pit membranes and the presence or absence of gel-like incrustations on the pit membranes for a total of 28 species. The porosity of the pit membranes were largely varied among taxa. The gel-like incrustations were estimated as fatty acids. We also compared the sample preparation techniques for electron microscopy to find the intact structures of such delicate bordered pit membranes, and showed that a few traditional and novel methods were very useful for the purpose.

研究分野：木材機能解剖学

キーワード：有縁壁孔 キャビテーション 壁孔壁 道管相互壁孔 通水

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高さが 100m にも達する高木の内部をどのようなしくみで水が上昇するのか、という問題は樹木生理学の基本的な疑問のひとつであり、古くより様々な仮説が提案されてきた。1960 年代より "cohesion-tension theory" (凝集力説) を裏付ける実験事実が得られるに至り、現在では凝集力で大筋間違いないというのが専門家の一致した見解となっている<sup>1)</sup>。凝集力説によると、蒸散が活発な最中の通水組織の水には大きな負圧(張力)が作用する。従って、通導時の通水組織の水は、気泡・空洞形成(キャビテーション)を起こしやすい準安定状態にある。現代のこの研究領域では、1) この水の準安定状態が樹体内のどこで、何が契機になって損なわれ、キャビテーションが始まるのか、2) ある部位でキャビテーションが発生した後、どのようにして通水系全体に一気に進行してしまうのを防いでいるのか、3) キャビテーションを起こした通水組織には、どのようにして水が再充填され、通水機能を回復するのか、といったキャビテーションの発端や進行、回復のメカニズムを解明することが、重要な課題となっている。

キャビテーションの発端(上記 1)については、通水系内の疎水性異物説や宇宙由来の電離放射線説など提唱されたが、現在では外気あるいは隣接柔細胞由来のガス侵入が有力視されている。キャビテーションの進行制御(上記 2)については、30 年あまり前に Zimmermann<sup>2)</sup> によって提案された "air-seeding" が知られる。しかし、近年になって "air-seeding" では説明できない実験結果が示され、それを補完する代替モデルが提案される<sup>3)</sup> など、新たな展開が見られる。キャビテーションの回復(上記 3)に関しては、核磁気共鳴イメージング(MRI)などの非破壊で経時的に通水系内の水の挙動をモニタリングする新規手法が発達し<sup>4)</sup>、そのメカニズムに関する研究が活発になっている。

### 2. 研究の目的

キャビテーションの制御機構の解明を進めるうえでカギとなるのは、通水要素間に形成される有縁壁孔対のパーツの中でも、壁孔壁の空隙構造である。しかし、技術的な制約もあって、その構造への理解は進んでおらず、このことが樹木の通水制御機構解明のネックの一つとなっている<sup>5)</sup>。また、筆者<sup>6)</sup> は一部の広葉樹の道管相互間の壁孔壁に有機溶媒に可溶なゲル状の被覆物が存在することを報告したが、その化学組成とともに、その存在が通水やキャビテーションの進行制御にどのように関与しているのかも未解明なままであった。

そこで本研究では、第一に通水要素間の壁孔壁のインタクトな(自然下でのありのままの)微細構造を解明することを目的として、通水要素間の壁孔壁の空隙構造や被覆物の性状を調べた。第二に、それら壁孔壁の微細空隙や被覆物が通水やキャビテーションの進行制御にどのように寄与しているのかを明らかにすることを目的として、通水性を実測した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 道管相互間の壁孔壁の空隙構造

北海道産の落葉広葉樹 19 種から試料を採取し、様々な試料作製技法で調製したサンプルの電子顕微鏡観察を行い、インタクト構造解析に適する研究手法を検討すると同時に、壁孔壁の空隙構造やゲル状被覆物の存否を丹念に調べた。また、小笠原諸島の乾性低木林という夏季の高温・少雨により著しい乾燥ストレスを受けることで成立する特異な樹木群落から 9 種の貴重な生材サンプルを入手する機会があったので、強い乾燥ストレスと道管相互間の壁孔壁の構造との関連について知見を得るため、これについても同様な電子顕微鏡観察を実施した。

#### (2) 道管相互間の壁孔壁を覆うゲル状被覆物の性状

ゲル状の被覆物が存在することが明らかなシナノキを対象として、ヘキサン抽出物より候補物質の単離、精製を進め、構造決定を行った。候補物質が壁孔壁のゲル状被覆物であることを確認するため、候補物質と同類の物質の標識マーカーを用いた光学顕微鏡による可視化、および飛行時間型二次イオン質量分析法(TOF-SIMS)での表面分析によるマッピングを試みた。

#### (3) キャビテーションの制御機構

道管相互間の壁孔壁を覆うゲル状被覆物がキャビテーションの制御にどのように寄与するのかを検討することにして、カスタムメイドの透湿度測定装置を用いて透水性やキャビテーション耐性の実測を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) 北海道産樹木 19 種における道管相互間の壁孔壁の微細構造とゲル状被覆物の存否

壁孔壁の空隙構造は変化に富み、壁層構成や空隙構造、ゲル状被覆物の存否に種間差が認められた。空隙構造に関しては、最近の報告でもその存在がインタクトか、それともアーティファクト(試料作製過程における人為産物)なのかについて議論が絶えない "extra-porous zone" という壁孔壁縁辺部に散発するとりわけ大きな孔隙が、試料作製法に拘わらず、また被覆物の存否に拘わらず存在する樹種には必ず認められることから、インタクトな構造物であるものと結論された。また、ゲル状被覆物の存在は原始的なグループから後発的に分岐したグループまで、被子植物の広範な分類群で確認されたのと同時に、同じ科内でも樹種によって存否に違いがあることが明らかになった。

#### (2) 小笠原諸島乾性低木林構成種の道管相互間の壁孔壁の微細構造

調べた9樹種とも、道管相互間の壁孔壁は3層構造をもち、電子顕微鏡的に認め得る貫通孔は認められなかった。このような壁孔壁の密な構造は乾燥ストレスに起因する通水障害に対する耐性の向上に大きく寄与すると考えられ、この形質は小笠原の乾性低木林構成種が夏の強い水ストレスを克服するための要因の一つになるものと結論された。

#### (3) インタクト構造解析のための試料作製法

試料作製法の検討の結果、臨界点乾燥法が本来の空隙構造をより忠実に可視化するのに有効であることが示された。また、Diatome社のウルトラソニックという超音波振動機構を備えたダイヤモンドナイフによる超薄切片法により、針葉樹の仮道管間の有縁壁孔対の極薄の切片作製を試み、透過電子顕微鏡観察を行った。この技術により30 nm厚までの極薄の超薄切片を作製できること、通常の超薄切片では切削の際にナイフの進行方向に10~15%程度の収縮が生じることを示唆する知見が得られ、超薄切片上での精密な寸法計測には留意すべきアーティファクトであることが明らかになった。

#### (4) 道管相互間の壁孔壁を多うゲル状被覆物の性状

当初の分析では、壁孔抽出成分の有力候補としてオレイン酸とパルミチン酸が同定された。しかしながら、TOF-SIMSではこれらの脂肪酸とともに、リノール酸と推定される物質も多量に検出された。そのため残りの保存サンプルについて再分析を行ったところ、TOF-SIMSと矛盾なくリノール酸も豊富に混在することが明らかになった。これら脂肪酸の局在は、マーカー標識による光学顕微鏡での組織化学的手法では再現性のある明確な結果が得られなかった。一方、TOF-SIMSによるマッピングでは道管相互間の壁孔壁に限らず組織内全域に均等に散在する様子が捉えられた。これがアーティファクトであるか否かを確認するため、低温走査電子顕微鏡cryo-SEMを行った結果、常温下と完全凍結下では局在性が異なることが明らかになり、脂質類の常温下での流動性を考慮した結果解釈が必要であることが示唆された。

#### (5) ゲル状被覆物のキャピテーション制御への寄与

キャピテーション耐性を計測する前段階として、カスタムメイドの通水性測定システムにより、まず塩化カリウム水溶液で測定し、続いて壁孔抽出成分を除去するためエタノールを灌流させた後に再び塩化カリウム水溶液に戻すという一連の手順で通水性への影響を評価することを試みた。しかし、エタノール処理後に壁孔抽出成分が残存して透水性が低下するという予想外の結果が得られた。処理前後に抽出した小片をSEM観察したところ、溶媒処理後の試料の壁孔域から被覆物が除去されていないことが明らかになった。この可能性として、柔組織に貯蔵されている細胞内脂質類の流出~壁孔への二次的堆積が有力視された。

#### <引用文献>

- 1) 例えば Raven P.H. et al.: "Biology of plant (8th ed.)". Freeman (2013)
- 2) Zimmermann M.H.: "Xylem structure and the ascent of sap". Springer (1983)
- 3) Schenk H.J. et al.: Trends in Plant Science 20: 199-205 (2015)
- 4) 例えば Fukuda K. et al.: Plant, Cell & Environment 38: 2508-2518 (2015)
- 5) Rockwell F.E. et al.: Plant Physiology 164: 1649-1660 (2014)
- 6) Sano Y.: American journal of Botany 92: 1077-1084 (2005)

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) 山岸松平, 山岸祐介, 重富顕吾, 佐野雄三, 青木弾, 福島和彦: 一部広葉樹の道管相互壁孔に見られる有機溶媒可溶性堆積物の局在と構成成分. 第69回日本木材学会大会(2019)
- 2) 佐野雄三, 石垣絵梨果, 村上了, 佐藤真由美, 大崎久司, 渡辺誠二: アカエゾマツ造林木における内部割れの発生実態と組織学的特徴. 第69回日本木材学会大会(2019)
- 3) 山岸松平, 重富顕吾, 山岸祐介, 佐野雄三: 一部広葉樹の辺材で道管相互壁孔に堆積する抽出成分に関する研究. 第68回日本木材学会大会(2018)
- 4) 上田幹朗, 山岸祐介, 佐野雄三: 針葉樹の心材形成過程で見られる脱水現象に関する研究. 第68回日本木材学会大会(2018)
- 5) Sano Y., Saiki S., Ishida A.: Structure of intervacular pit membranes in xerophytic trees growing in Bonin Islands. 9th Pacific Regional Wood Anatomy Conference (2017)
- 6) 上田幹朗, 山岸祐介, 佐野雄三: 心材培養実験下カラマツ材組織に誘発される脱水過程のcryo-SEM観察. 第67回日本木材学会大会(2017)
- 7) 佐野雄三: 父島の乾性低木林構成種における通水要素間壁孔の微細構造. 平成28年度京都大学生態学研究センター公募ワークショップ「樹木の乾燥枯死・樹病枯死メカニズムの解明と温暖化等による乾燥影響評価」(2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：重富 顕吾  
ローマ字氏名：Shigetomi Kengo  
所属研究機関名：北海道大学  
部局名：農学研究院  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：20547202

### (2)研究分担者

研究分担者氏名：山岸 祐介  
ローマ字氏名：Yamagishi Yusuke  
所属研究機関名：北海道大学  
部局名：農学研究院  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：80770247

### (3)研究協力者

研究協力者氏名：山岸 松平  
ローマ字氏名：Yamagishi Shohei

### (4)研究協力者

研究協力者氏名：梅林 利弘  
ローマ字氏名：Umebayashi Toshihiro

### (5)研究協力者

研究協力者氏名：青木 弾  
ローマ字氏名：Aoki Dan

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。