

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850097

研究課題名(和文) 樹木における負圧下での木部通水阻害からの回復機構の解明

研究課題名(英文) Embolism repair under tension in woody plants

研究代表者

種子田 春彦 (Taneda, Haruhiko)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：90403112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヤマグワを用いて、木部張力下でも再充填中の道管で陽圧を保つ仕組みの解明を試みた。ヤマグワでは、乾燥ストレス後に灌水した個体で茎の通水能力が回復した。壁孔内に気泡が入った状態を実験的に再現し、100 kPaの陽圧下でも気泡が維持できることを示した。さらに、この実験からは壁孔内の気泡が消える圧力は壁孔によって異なることが示された。このとき、再充填を完了させるためには、道管内腔へ水が流入する速度が隣接する道管へ水が流出する速度を上回る状態を作り再充填中の道管内の陽圧を維持する必要がある。しかし、両者の間には1000倍程度の差があり、新たな仮説の提唱が必須であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to reveal the mechanism of embolism repair under tension using Mulberry (*Morus australis*). The recovery of stem conductivity was found in the potted mulberry saplings by re-watering of water-stressed plants. The pit valve structures, which the air in the pit chamber isolates water in the refilling from the functional vessels, were experimentally made in the stem segment using the single vessel method, and found that the air in the pit valve was maintained even at 100 kPa, and that the air in pit valve was dissolved at different pressure among pits in the same vessel. This means that the water in the refilling vessel can be under a negative pressure before the refilling process completed. To maintain a positive pressure in the refilling vessel, the rate of inflow into the refilling vessel must be higher than that of outflow from it. However, the inflow rate was estimated to be 1/1000-fold of the outflow rate. Therefore, we need another new theory for embolism repair.

研究分野：植物生理生態学

キーワード：植物の水輸送 木部空洞化現象 壁孔 道管

1. 研究開始当初の背景

植物は、光合成を行うために気孔を開いて大気から二酸化炭素を体内に取り込むがその際に、体内からは、大量の水蒸気を大気に放出する。これを蒸散作用と呼ぶ。蒸散によって失った水は、土壌の水を根で吸収し維管束の道管を通して葉まで運ばれる。このとき、道管の水には張力がかかっており引っ張られるように輸送されており、蒸散中の植物の道管内の水には負圧がかかっている。このため、植物体内の水輸送は、道管内に気泡が侵入すると膨らんで内腔を詰めて通水障害を引き起こす「空洞化現象」による通水障害の危険と常に隣り合わせの状態にある。道管の空洞化現象は、隣り合う2つの道管間を繋ぐ壁孔内の壁孔膜を通して気泡が侵入することで木部内の道管に気泡が広がっていく (Brodersen et al. 2013)。特に水ストレスなどで道管内腔の水に強い負圧がかかった時には、木部内の多くの道管に気泡が広がって空洞化し、深刻な通水障害を引き起こす。

空洞化した道管が水輸送能力を回復させるためには、内腔を満たす気体に圧力をかけて周囲の水に溶かし込んで水に置き換える必要がある。こうした水の再充填過程 (vessel refilling) が、草本植物や、つる植物、一部の落葉樹では根圧によって起きることは古くから知られてきた。根圧は根で無機イオンなどが木部へ能動的に運ばれることで浸透的に水が移動し、これによって圧力が生じる現象である。葉を落としていた冬の間、道管内が空気で満たされている落葉樹では根圧による圧力で道管内を水で置き換えて輸送能力を回復させることが知られている。一方で、茎の柔組織で浸透的に圧力 (幹圧) が発生して、空洞化した道管が再充填させる現象も確認されている。こうした根圧に依らない再充填現象は、針葉樹で1970年代から示唆されてきた。1990年代になると、蒸散中の植物個体であっても、H⁺-ATPaseの活性化剤や阻

害剤で空洞化現象の起きた茎の通水能力が回復する速度が変化することや (Salleo et al. 1996)、低温走査電子顕微鏡を使った観察による空洞化した道管の直接的な観察によって日中に道管の空洞化と再充填が起きていることが確認された (Canny 1997)。こうした蒸散中の植物における短時間での通水能力の回復は、乾燥した植物に再灌水する実験や枝の通導度の日変化を測定する実験によって多くの植物種で確認されている (Hacke & Sperry 2003, Taneda & Sperry 2008, Ogasa et al. 2013他)。さらに近年、MRIやX線CTを用いた観察によって非破壊的に再充填現象が起きることがキュウリやブドウといった太い道管を持つ植物で確認されている

(Scheenen et al. 2007, Brodersen et al. 2010)。また、圧力をかける機構についても、ポプラを用いた分子生物学的な研究により再充填が起きている時間帯に糖の輸送体やアクアポリンの遺伝子が木部発現することが分かっている (Secchi et al. 2011)。

2. 研究の目的

蒸散中の植物で空洞化した道管に水が再充填されるためには、蒸散中の植物の木部内の水には張力がかかっているにもかかわらず、再充填中の道管では気体を溶かすために道管内の圧力を維持されている必要がある。さらに、最終的に水輸送経路として機能するためには、道管内腔が水で満たされたあとには隣接する機能している道管と連絡しなければならない。これらを説明する仮説として pit valve説が提唱されている (図1, Holbrook & Zwieniecki 1999)。pit valve説では、壁孔 (pit) 内部の空間 (壁孔腔, pit chamber) に気泡が表面張力によってとどまることで隣接する道管の水と再充填が起きている道管内の水との接触が妨げられるとしている。この仮説が成立するためには、再充填中の道管内の圧力が壁孔腔内の空気が保持され

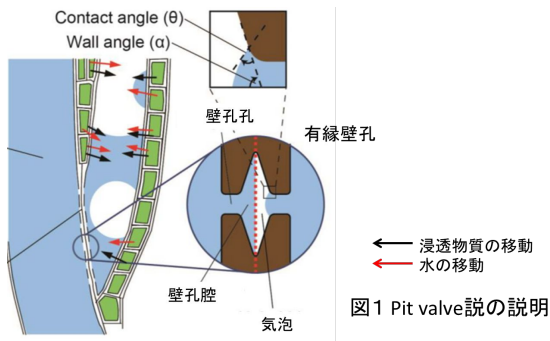


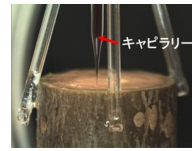
図1 Pit valve説の説明

る表面張力による圧力を越えないこと、道管内腔が水で満たされた後も、浸透物質の輸送によって内腔の圧力が上昇を続け、壁孔腔内の空気が水に溶けるまで内腔の圧力が維持されること、が起きていなければならない (Hacke & Sperry 2003, Brodersen et al. 2010)。では、一部の壁孔腔の空気が溶けると、再充填中の道管内の水は木部張力の掛かった隣接する道管へと引き込まれるため、残りの壁孔腔内にある空気が膨らんで、再度、壁孔内腔を空洞化させてしまう可能性がある。このため、すべての壁孔で同時に気泡が消えるか、再充填中の道管からの水の流出速度よりも流入速度が上回って陽圧が保たれる必要がある。Pit valve説は1999年に提唱されたが、pitという微小な構造で起きる現象であることによる解析の困難さから、これまで実験的な検証はなされてこなかった。

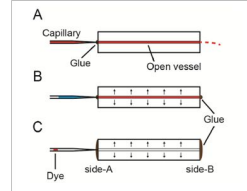
本研究では、単一道管還流法を用いることで単一道管レベルでの測定を可能にし、上記の2つの要件を実験的に確認し、pit valve仮説を検証した。以下の研究成果は、Ooeda et al. (2017) in *Plant Cell & Physiology*誌、およびOoeda et al. 投稿中 in *Tree Physiology*誌にまとめられている。

3. 研究の方法

すべての実験には、ヤマグワ (*Morus australis*) を用いた。本研究では、ヤマグワにおける再充填現象の確認(乾燥個体への再灌水実験により木部張力がかかった状態での再充填現象を確認した)、再充填中の道管内の圧力の推定と測定(ガラスキャピラリーをひとつの道管に挿入して固定し、一つ



● 道管-柔細胞の通水コンダクタンス、気体の拡散係数の測定方法



● Pit valve 構造の再現方法

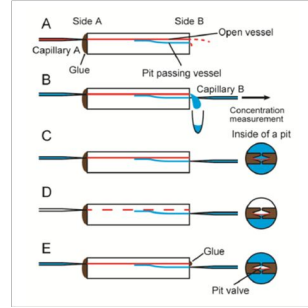


図2 単一道管還流法

の道管に液体や気体を流す「単一道管還流法 (single vessel method, Zwieniecki et al. 2001)」を応用して(図2)、単一道管における気体の消失速度(道管内腔から周囲の木部柔細胞への移動速度)、道管内腔と木部柔細胞との間の通水コンダクタンスの測定を行い、再充填中の道管内の圧力を推定した。さらに、pressure probe法を用いた再充填中の道管内腔の圧力の直接的な測定を試みた)、道管や壁孔形態の観察と複合道管の頻度及び気泡を保持する表面張力の推定、単一道管還流法を用いたpit valveの維持圧力の測定(図2)、最後に、隣接する道管と接続する際に再充填中の道管の内腔で圧力が維持される条件を考察、を行った。

4. 研究成果

ヤマグワにおける再充填現象

鉢植えのヤマグワ個体の灌水を止めて、木部の水ポテンシャルを約-1.4 MPaまで乾燥させたのち、半数の個体では乾燥時の当年生枝で通導度を測定し、残りの個体は灌水を行い3時間後に収穫して通導度を測定した。このとき、木部の水ポテンシャルは、-0.39 MPaまで回復した。通水障害の程度を通水障害率 (PLC, percent loss of conductance, $100 \times (1 - \text{自然状態の枝の通導度} / \text{強制的に枝内の道管を水で満たしたときの枝の通導度})$) で評価すると、乾燥時には68%であった通水障害率は、灌水の3時間後には、42%まで有意に減少した (t -test, $P = 0.02$)。

再充填中の道管内の圧力の推定と測定

再充填中の道管では、浸透的に木部柔細胞から道管内腔へ輸送された水が、気相に圧力を加えることで気体を溶かし込む。溶かし込まれた気体は、放射組織や木部内の液体中を拡散して大気へと放出されると考えられる。そこで、木部柔細胞と道管内腔との通水コンダクタンス、木部内の気体の拡散速度を実測することで、の実験のように3時間で平均的な形態の道管（直径60 μm）が再充填されるときに圧力を計算することができる。単一道管還流法を用いて上記2つのパラメータを実測し（木部柔細胞と道管内腔との道管表面積あたりの通水コンダクタンス： $9.1 \times 10^{-8} \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ 、気体の拡散係数： $1.3 \times 10^{-5} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ ）、0.00464 MPaになることが予測された。

さらに、ガラスキャピラリーを道管に横から刺して内腔の圧力を測定する pressure probe法を用いて再充填中の道管内腔の圧力の測定を試みた。キャピラリーを枝に挿入し、道管にあると木部張力による負圧を検出することができる。その後、キャピラリー内から空気を道管内に入れて空洞化現象を人工的に発生させた。その後、圧力の測定を続けた。再充填が起きれば陽圧を検出されるはずだが、20回以上の試行回数の中で明確な陽圧が検出されたのはわずか2回であった。その2回ともに圧力が上がり続けるような状況であり、正確な測定である確証が得られず、断念した。

道管の形態と機能（連絡頻度、壁孔腔内の気泡保持圧力の推定）

ヤマグワの木部は2年目以降には明確な環孔性を示すが、当年生の枝の木部は散孔材様の道管の配置をもち、多様な直径の道管が存在した（図3）。木部には木部放射柔組織のほかに道管を取り囲むように随伴柔細胞が配していた。道管間が連絡して複合道管を作る頻度は大きな直径の道管で低い傾向が

あったが、つる植物のヤマブドウと同程度であったが、散孔材のウリハダカエデよりも太い道管でも大きな連絡頻度を持っていた。

道管相互壁孔では、二次壁がせり出して、壁孔孔が内部よりも狭い有縁壁孔の構造を持っていた（図3）。こうした壁孔では、壁孔腔内に気泡が保たれる圧力差は、次の式で記述できる。

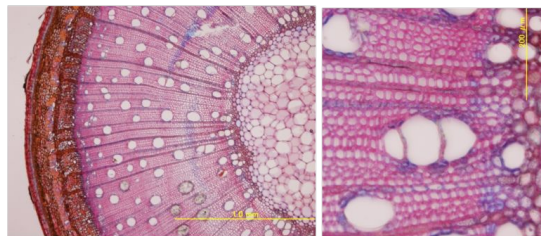
$$\Delta P_{\min} = \gamma G \cos(\alpha + \theta)$$

ここで、壁孔孔の周囲長（G, m）と壁孔腔の狭まる角度（ 2α ）、水の表面張力（ $\gamma = 0.072 \text{ N/m}$, 25℃）、細胞壁の接触角（ θ ）を示す。ヤマグワで得られた値と細胞壁の接触角の文献値（ $= 45^\circ \sim 55^\circ$, Zwieniecki et al. 2001）を用いて計算した結果、0.070 MPaから0.10 MPaとなった。形態と接触角の組み合わせから得られた最も低い圧力でも0.025 MPaであることが予測された。

pit valve が維持される圧力の測定

ヤマグワの5 cmのセグメントを切り、単一道管還流法を用いて壁孔を介して2つに分岐した道管を探し、気泡とKCl水溶液を出し入れすることで pit valve がある状態を実験的に再現した（図2）。壁孔腔に気泡が保持されているときには片側の道管から圧力をかけて水を流しても分岐した道管からは水が流れない。圧力を大きくしていくと壁孔腔か

● 当年生枝の木部（柔細胞がアストラブルーによって青く染まっていた）



● ヤマグワの道管相互壁孔と壁孔膜

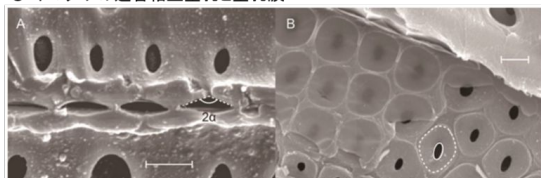


図3 ヤマグワの道管と壁孔の形態

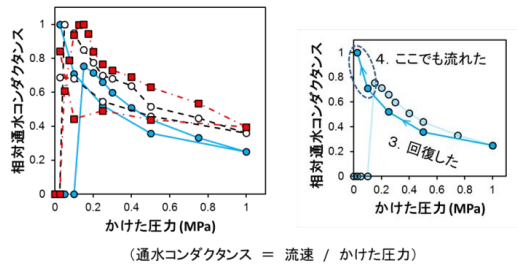


図4 Pit valveの維持される圧力

ら気泡が消えて水が流れる．4本の枝で実験を行った結果，3本の枝で0.025 MPaまで，1本の枝で0.1 MPaまで壁孔腔の気泡が保持されていることが示された（図4）．こうした圧力は，接触角から予測された値と等しい範囲にあった．これらの結果からは，壁孔には表面張力によって気泡が保持され，理論的に予測される再充填に必要な内腔の圧力（0.005 MPa）よりもはるかに大きな値まで気泡が保持されることが示された．

この実験では，壁孔腔の気泡が「同時」ではなく，徐々に溶けてなくなることが明らかになった．pit valveの空気が解けて2つの道管間を水が流れているときには，水流の原動力である圧力を変えた瞬間に流速も変わった．しかし，壁孔腔内の気泡が解けてなくなる圧力では，流速の変化は徐々に起こり5分以上かけて流れが定常状態になった（図5）．これは気泡が解けるために起きる現象であると考えられる．さらに，流速が徐々に増加していくことから，気泡が溶けやすい壁孔から順に気泡が消えて水を通していている過程が示唆された．壁孔腔内の気泡溶解が同時に起こらない理由は，壁孔の形態に大きな多様性があり生じる表面張力の大きさもばらつく

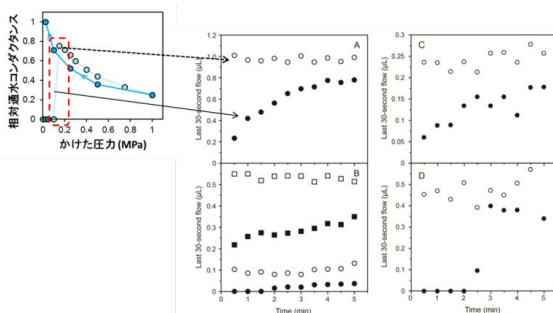


図5 圧力変化と流速の時間変化

ためである．

再充填完了時における陽圧維持の条件

壁孔腔内の気泡がすべて同時に消えない時に，道管内腔で圧力が保たれるためには，流入速度が流出速度を上回る必要がある．ヤマグワの道管の形態に則して，道管内腔での流入速度と流出速度を推定した．10 cmの茎のセグメントを仮定し，実測された道管相互壁孔の通水抵抗（ 279 MPa s m^{-1} ），道管長さあたりの壁孔膜の専有面積（ $14.2 \text{ mm}^2 \text{ m}^{-1}$ ）を使って測定された流出方向の通水コンダクタンスは， $5.1 \text{ mm}^3 \text{ MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と推定された．一方で，流入方向の通水コンダクタンスは，実測された木部柔細胞と道管内腔との道管表面積あたりの通水コンダクタンス（ $9.1 \times 10^{-8} \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ）と道管柔細胞相互壁孔の面積の割合 $172 \text{ mm}^2 \text{ m}^{-1}$ から， $1.6 \times 10^{-3} \text{ mm}^3 \text{ MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と推定された．流入方向の通水コンダクタンスは流出方向に比べてオーダーにして3ケタも低いと推定されたが，これは流入方向の経路に細胞膜が含まれることが原因であると考えられる．流出側では壁孔膜が圧力差によって偏り壁孔を閉鎖することで通水コンダクタンスが1/10まで低下する可能性があるほか，アクアポリンの発現によって流入側の通水コンダクタンスが増加する可能性がある（Secchi et al. 2011）．しかし，こうしたことが起きたとしても依然として10倍程度も流出方向の通水コンダクタンスは大きく，再充填が完了する前に，解け残った壁孔腔の気泡が膨らんで空洞化の状態に戻る危険は大きいことがわかる．

以上の解析から，pit valve説の2つの成立要件のうち，一つ目の再充填中には壁孔腔の気泡を解けないことは支持されたが，もう一つの要件に関しては，道管内腔の水の充填が終わった後に壁孔腔の気泡の消失が同時には消えないこと，そして水収支を考慮してもこうした状況では圧力が最後まで保たれることは難しいことが示唆された．ブドウの茎における再充填過程をX線CTによって詳細

に観察した Brodersen ら(2010)の研究では、再充填が完了する前に空洞化の状態に逆戻りする道管がまれに観察されている。しかし、今回の見積みでは pit valve 説では高い確率での再充填の完了することを説明することは難しく、今後の研究の中で、新たな仮説の提唱が必要であることが示唆された。

< 引用文献 >

Ooeda H., et al. (2017) Plant Cell & Physiol. 58: 354-364.

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 5 件)

Hiroki Ooeda, Ichiro Terashima, Haruhiko Taneda. Structures of bordered pits potentially contributing to isolation of a refilled vessel from negative xylem pressure in stems of *Morus australis* Poir.: Testing of the pit membrane osmosis and pit valve hypotheses. Plant Cell & Physiology (査読有) 58巻2号 p354-364. 2017年

Haruhiko Taneda, Dhan R. Kandel, Atsushi Ishida, and Hiroshi Ikeda. Altitudinal changes in leaf hydraulic conductance across five *Rhododendron* species in eastern Nepal. Tree Physiology (査読有) 36 巻 10 号 p1272-1282. 2016 年

小林剛, 種子田春彦. 高等植物の道管流・師管流の測定技術と生態学における研究展開. 日本生態学会誌 (査読有) 66 巻 2 号 p439-446. 2016 年

種子田春彦, 大條弘貴, 大塚晃弘. 根, 茎, 葉の水の流れやすさを測る 測定手法とそこからわかること. 日本生態学会誌 (査読有) 66 巻 2 号 p447-464. 2016 年

檀浦正子, 種子田春彦, 小林剛. 炭素安定同位体パルスラベリングを用いて樹木の師液流を測定する. 日本生態学会誌 (査読有) 66 巻 2 号 p501-513. 2016 年

〔学会発表〕(計 5 件)

種子田春彦, 小笠真由美, 矢崎健一, 丸田恵美子, 大條弘貴, 大塚晃弘. 亜高山帯針葉樹における枝の水輸送の維持機構 口頭発表. 日本生態学会第 64 回大会. 2017 年 3 月 15 日, 早稲田大学 (東京都・新宿区)

Haruhiko Taneda, Hiroki Ooeda, Akihiro Ohtsuka, Mayumi Ogasa, Kenichi Yazaki, Emiko Maruta. Vulnerability to freeze-thaw-induced embolism is dependent on branch age in subalpine conifer, *Abies veitchii*. ポスター発表. Gordon Research Conference. 2016 年 6 月 30 日 (Hotel Sunday River · United States).

Haruhiko Taneda, Akihiro Ohtsuka. Leaf traits for determining leaf hydraulic conductance for deciduous and evergreen woody species. 口頭発表, German-Japanese Symposium, Plant trait workshop. 2016 年 5 月 10 日 (Technische Universität Dresden, Germany).

種子田春彦, 大塚晃弘, 野口航, 寺島一郎. 広葉樹の葉の通水能力は、解剖学的特徴と光応答性で決まる. 口頭発表, 日本森林学会第 127 回大会. 2016 年 3 月 29 日, 日本大学 (神奈川県・藤沢市).

大條弘貴, 大塚晃弘, 寺島一郎, 種子田春彦, ヒマワリの葉における水輸送能力の維持機構 道管でのキャピテーションの発生と水の再充填. ポスター発表, 日本森林学会第 126 回大会, 2015 年 3 月 28 日, 北海道大学 (北海道・札幌市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/seitaip/personal/taneda.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

種子田 春彦 (Taneda, Haruhiko)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 90403112