

令和元年6月19日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07812

研究課題名(和文) 針葉樹仮道管分化におけるサイトカイニンの役割の解明

研究課題名(英文) The Role of cytokinins in differentiation of earlywood traced

研究代表者

雉子谷 佳男 (KIJIDANI, Yoshio)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：10295199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：晩材・早材形成中のスギの内生植物ホルモンの組織ごとの分布を調べた。晩材形成中では、オーキシシン(IAA)は形成層にピークがあり、活性型サイトカイニンのゼアチン(tZ)は、形成層と師部にわずかに存在し、tZ前駆体のゼアチンリボシド(tZR)は、木部に大きなピークが存在した。一方で早材形成中は、形成層のIAAピークは晩材形成中に比べて小さく、tZは大きなピークが木部に存在し、tZRは小さなピークが師部に存在した。スギ早材形成はtZ投与によって誘導され、IAA投与によって阻害されることをすでに報告した。IAAおよびtZの組織ごとの分布が仮道管分化に関与するのかもしれない。

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働きは、関連遺伝子の転写など間接的に評価されることが多く、植物ホルモン量を定量する研究は少ない。とくに、組織ごとの分布についての基礎データは少ない。この研究成果の学術的意義は、(1)煩雑な作業が少ないLC/MSを用いて、迅速な組織ごとの植物ホルモン分布解析を可能にしたこと、(2)サイトカイニンの組織ごとの分布を明らかにしたことである。また、木材の密度は、木材の力学性能や寸法安定性に大きな影響をおよぼす。この木材密度は早・晩材形成によって決まる。この研究の社会的意義は、木材密度の変動を理解する上で、新たな知見と今後の研究の方向を示したことである。

研究成果の概要(英文)：In this study, radial distributions of plant hormones from phloem to xylem were examined in Japanese cedar (sugi) stems with forming latewood and earlywood. During latewood formation, Auxin (IAA) had a peak in cambium, Zeatin (tZ), cytokinin having active effect on plant, had peaks in cambium and phloem, and Zeatin riboside (tZR), precursor of tZ, had a peak in xylem. However, during earlywood formation, IAA had a smaller peak in cambium, tZ had larger peak in xylem, and tZR had smaller peak in phloem in comparison with those during latewood formation. We already reported that application of tZ induced and application of IAA inhibited earlywood formation in sugi stem. Radial distribution patterns of IAA and tZ might affect tracheid differentiation.

研究分野：木材組織、木材形成

キーワード：サイトカイニン 早材形成 スギ オーキシシン 凍結連続切片

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

木材の力学的性質は木材密度と細胞壁セルロースマイクロフィブリル傾角 (MFA) によってほぼ決まるとされている。針葉樹では、晩材率が高い樹種ほど木材密度は大きい。したがって、針葉樹の早・晩材形成の解明は重要な研究課題である。早材形成から晩材形成への移行はオーキシシン (IAA) 量の減少によるとされた。しかし、IAA の働きを疑問視する研究例もあり、早・晩材形成のしくみは未だに不明な点が多い。28 年生の晩材形成中のスギ形成層にオーキシシン (IAA)、ジベレリン (GA3) およびサイトカイニン (tZ) を投与したところ、IAA による早材形成は認められず、tZ 投与のみで晩材形成中に早材が形成された。また、tZ の働きは IAA によって阻害された。投与実験の結果から、針葉樹の内生サイトカイニン・オーキシシン量と早・晩材形成との関係について、詳細な研究が必要であることは明白である。

### 2. 研究の目的

この研究では、針葉樹仮道管分化におけるサイトカイニンの役割を解明するために、晩材・早材形成中のスギの内生植物ホルモン量について基礎データを得る。土壤中水分量の変化に応じて、根ではサイトカイニンを合成し、形成層への情報伝達物質として、木部を移動すると推測される。したがって、外樹皮から師部、形成層、分化中木部、木部へと至る放射方向での組織ごとに、オーキシシン (IAA) および各種サイトカイニン (tZ、tZR、iP、iPR) の分布を明らかにできる分析方法を開発し、晩材・早材形成中のスギの内生植物ホルモン量の組織ごとの分布を調べる。土壤中水分の違いが苗木におよぼす影響を調べる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試験木および試料

宮崎大学田野フィールドにおいて、スギ品種オビアカ、クモトオシの 2 品種から成長の平均的な試験木を選定し、軸方向：半径方向：接線方向=3 cm : 1 cm : 3 cm の形成層を含む試料を打ち抜き、木部形成の観察と植物ホルモンの定量に用いた。晩材形成中の試料として、2016 年 7 月 15 日にクモトオシ 4 本、2016 年 7 月 22 日にオビアカ 4 本をそれぞれ選び、各々の高さ 2 m、3.5 m、5 m の位置から試料を採取した (2 品種×4 本×3 か所=24 サンプル)。早材形成中の試料として、2017 年 4 月 19 日にオビアカ、クモトオシ各 2 本を選定し、それぞれ高さ 2 m、5 m の位置から試料を採取した (2 品種×2 本×2 か所=8 サンプル)。採取した試料は、低温で実験室へ持ち帰り、直ちに液体窒素で凍結した後、-80℃のフリーザーで保管した。また、木部形成観察用の試料も同時に採取した。

#### (2) 木部形成の観察

採取した試料を固定後、スパー樹脂で包埋し、ウルトラマイクロトームで 1~2 μm の準薄切片を作製して、光学顕微鏡で木部形成の様子を観察した。採取した試料の形成活動が早・晩材形成中のどちらであったかを判断した。

#### (3) 各種内生植物ホルモンの局在解析

##### 内生植物ホルモンの抽出

- 内部標準として標準量の重水素で認識した D-IAA (500 ng)、D-GA1 (100 ng)、D-GA3 (100 ng)、D-GA4 (100 ng)、D-GA7 (100 ng)、D-GA9 (100 ng)、D-ABA (100 ng)、D-tZ (100 ng)、D-iP (100 ng)、D-tZR (100 ng)、D-iPR (100 ng) を準備する。
- 重水素で認識した内部標準を含む 100 ml (メタノール：水：ギ酸=15 : 4 : 1) の抽出液を準備する。
- 抽出液 100 ml を、1 ml ずつ 100 個のチップに分ける。
- 液体窒素で凍結した試料を、軸方向：半径方向：接線方向=1.5 cm : 1.0 cm : 1.0 cm に整形する。
- -30℃の状態を保ちながら、クライオスタット (凍結マイクロトーム) で外樹皮から師部、形成層、分化中木部および完成した木部にかけて、厚さ 30 μm の連続接線面切片を約 100 枚作成し、抽出液 1 ml に対して切片を 1 枚ずつ入れる。
- 4℃ (冷蔵庫) で 1 日間、抽出する。

##### 内生植物ホルモンの精製

- 抽出後、1 ml ずつ約 100 個の抽出液を、外樹皮、内樹皮を含む師部、形成層、木部の 4 つの領域に分類する。外樹皮は全てまとめて 1 区分とし、師部、形成層、木部は 5 枚ごとに 1 区分として、精製を行う。
- C18 Sep-Pack cartridge (Waters) と Oasis®MCX (Waters) を用いて、酸性化合物と塩基性化合物に分離する。
- 濃縮して LC/MS で分析する。

#### (4) 土壤中水分の違いが苗木に及ぼす影響

2016 年 5 月にポットごと圃場に植え付けたスギ (品種名タノアカ) 苗木 10 本を、2017 年 6 月にビニールハウス内へ移動し、2017 年 8 月までの 2 ヶ月間、灌水量を調節して育てた。すなわち、5 本は毎日灌水し、残りの 5 本は 3 日 1 度灌水した。温度、湿度および土壤水分量を測定した。試験終了後に、試料を回収し、-80℃のフリーザーで保管した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 木部形成の光学顕微鏡観察

光学顕微鏡で木部形成の様子を観察した。2016年7月に採取した2つの試料は、晩材形成中であることが確認できた。2017年4月に採取した試料については、2つのうち1つは早材形成中であったが、もう1つは早材形成を終えて晩材形成に移行しつつある状態であることが分かった。

##### (2) 凍結連続切片の組織内位置の決定

抽出後の凍結連続接線面切片を観察し、各切片が外樹皮、師部、形成層、分化中木部および木部のどれであるのかを判別した。師部と木部の判別は、師孔および有縁壁孔に注目し、主に細胞壁の違いによっておこなった。師部柔細胞には隔壁がみられ、師部を見分ける特徴の一つといえるが、木部にも軸方向柔細胞が存在するため、

注意が必要である。また、針葉樹のマツ科を除く全てに、師部繊維（じん皮繊維）が認められ、スギにも存在する。一般に師部の細胞では、細胞壁に肥厚はみられないが、師部繊維を接線面切片で観察した場合、細胞壁に木部晩材のような肥厚がみられることがあった。

各種内生植物ホルモンの定量に用いた試料の切片作成範囲を、図-1に示す。また、クライオスタットで切削した外樹皮、師部、木部の長さ、植物ホルモン定量時の接線面切片番号による区分について、まとめたものが表-1である。表に示すように、連続切片作成前後の試料および各切片の組織観察から、各切片の組織内での位置を特定できることが明らかとなった。

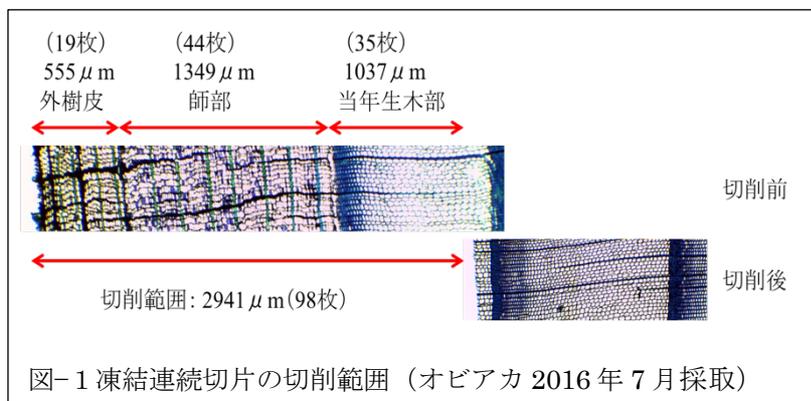


図-1 凍結連続切片の切削範囲（オビアカ 2016年7月採取）

表-1 切削範囲の測定と精製・分析時の枚数区分（オビアカ 2016年7月採取）

組織	測定値 (μm)	計算した枚数 (枚)	観察からの枚数 (枚)	切片番号	区分	枚数
外樹皮	555	19	19	1-19	1	19
師部	1349	44	40	20-24	2	5
				25-29	3	5
				30-34	4	5
				35-39	5	5
				40-44	6	5
				45-49	7	5
				50-54	8	5
55-59	9	5				
形成層	92	3	5	60-64	10	5
木部	945	32	34	65-69	11	5
				70-74	12	5
				75-79	13	5
				80-84	14	5
				85-89	15	5
				90-94	16	5
				95-98	17	4
合計	2941	98	98	1-98	17	98

##### (3) 凍結連続切片ごとの植物ホルモン分析方法の検討

LC/MSでの分析条件を検討した。すなわち、カラム、移動相、イオン化条件を検討し感度を高めた。また、再現性がある分析として最適な切片の枚数を検討した。IAAの内生植物ホルモンの組織内分布を、図-2に示す。本研究を通して実験方法を検討した結果、30 μm厚切片5枚ごと（150 μmごと）で各種植物ホルモンの組織内分布を精度よく示すことが可能であった。

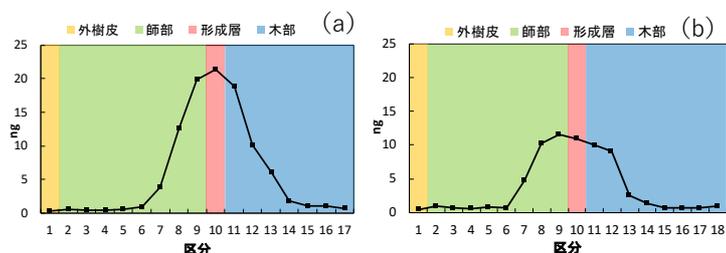


図-2 IAAの組織ごとの分布 (a) 晩材形成中 (b) 早材形成中

##### (5) 各種植物ホルモンの組織内分布

上述の方法を用いて、各種植物ホルモンの組織内分布を早・晩材形成中試料と比較した。本研究では、特にオーキシシンとサイトカイニンに注目し、植物ホルモン量の組織内分布を早・晩材形成中試料と比較したところ、以下の結果が得られた。オーキシシン量は形成層にピークがあり、師部・木部側に離れるにつれて減少した(図-2)。晩材形成中でピークが大きく(図-2 (a))、早材形成中の試料でピークが小さく幅が広い傾向を示した(図-2 (b))。

サイトカイニンは、晩材形成中試料において tZR および iPR (ともに不活性型サイトカイニン) のピークが木部で認められた。早材形成中試料では tZ および iP (ともに活性型サイトカイニン) の大きなピークが形成層に近い木部で認められた(図-3、図-4)。晩材形成中のスギ樹幹に投与した tZ が早材形成を誘導することを考え合わせると、分化中木部の周辺に活性型サイトカイニンが局在することと早材形成との間には密接な関係があるのかもしれない。

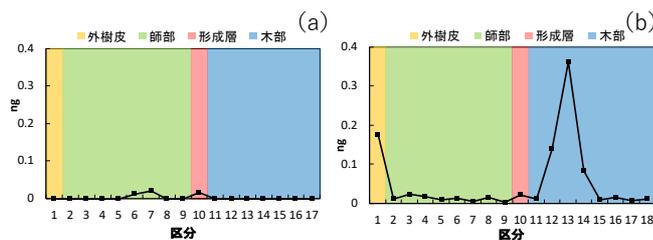


図-3 tZの組織ごとの分布 (a) 晩材形成中 (b) 早材形成中

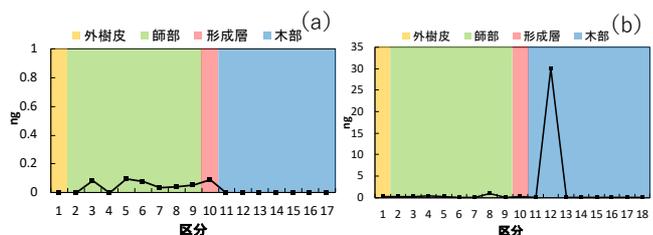


図-4 iPの組織ごとの分布 (a) 晩材形成中 (b) 早材形成中

#### (6) 土壤中水分の違いが苗木におよぼす影響

3日1度の灌水苗木は、白く太い根を形成しており、毎日灌水の苗木は、細く褐色の根を形成していた。内生植物ホルモンの分析は、研究期間内に実施することができなかつたので、今後、葉、茎および根の植物ホルモン量への影響を報告する。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kijidani Y., Nagai T., Suwashita T., Tsuyama T., Seasonal variations of tracheid formation and amount of auxin (IAA) and gibberellin A4 (GA4) in cambial-region tissues of mature sugi (*Cryptomeria japonica*) cultivar grown in a Nelder plot with different tree densities. *Journal of Wood Science*, 査読有, 63(4), 2017, 315-321
- ② Kijidani Y., Koga S. Sakagami H., Matsunaga H., Effects of application of trans-zeatin on tracheid differentiation in mature sugi (*Cryptomeria japonica*) trees, *Journal of Wood Science*, 査読有, 62(4), 2016, 370-376

[学会発表] (計 4 件)

- ① 富家梓、雉子谷佳男、エチレン前駆物質ACCの分析方法と屈曲処理2週間後のスタジイにおける内生植物ホルモンの組織ごとの分布について、第25回日本木材学会九州支部大会(福岡)、2018
- ② 富家梓、津山濯、雉子谷佳男、樹幹傾斜による引張あて材形成と内生植物ホルモンの偏差分布について、第68回日本木材学会大会(京都)、2018
- ③ 中村菜里、雉子谷佳男、連続凍結切片を用いた植物ホルモンの組織内分布、第67回日本木材学会大会(福岡)、2017
- ④ 持増知美、時田勝広、雉子谷佳男、形成層に含まれる内生サイトカイニン量の季節変動、第66回日本木材学会大会(名古屋)、2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：中村菜里(大学院生)

ローマ字氏名：Nakamura Nari

※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。