

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03018

研究課題名(和文) 樹皮型により異なる外樹皮組織のバリア機能発揮メカニズムの解明

研究課題名(英文) A study on mechanisms of barrier function in various types of outer bark of trees

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：走査電子顕微鏡による計21種の樹皮組織の観察から、樹木の外樹皮組織は生きた内部の組織への菌糸体の侵入をよく防いでいることが明らかであった。木材腐朽菌(カワラタケ)を用いて樹皮組織の抗菌活性を評価する手法を考案し、北海道産25種について試験した結果、ナナカマドの内樹皮組織が極めて強い菌糸成長抑制を示した。そのメカニズムを解析した結果、ナナカマドでは生きた組織・細胞の損傷に応じて発生するシアン化水素が大きく寄与していることが示された。また、樹皮組織には外傷に応じて傷害周皮が速やかに形成され、外界からの菌類の侵入を有効に遮断する様子を捉えることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹木の樹皮組織に関する研究は、産業的に多用される材組織に比べて、基礎・実用レベルのあらゆる面で研究が立ち遅れており、樹皮の構造、性質、機能に関する我々の理解は乏しい。本研究では、樹皮組織の基本構造、および樹皮が保護組織としての機能をどのように発揮しているのかについて、いくつかの新知見を得ることができた。植物学、森林保護学などの関連分野において意義深い成果と位置付けられる。とくに、ナナカマドという緑化樹として身近な樹木の樹皮組織が損傷を受けると、含有成分由来の猛毒ガスが生じることを示したことは、市民生活にも関わり、社会的にも意義深いことであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Scanning electron microscopic examination of bark tissues for a total of 21 species indicated that outer barks effectively prevent the invasion of living phloem by microorganisms. We devised a novel culture system to evaluate the antifungal activity of bark tissues using a wood decay fungus (*Trametes versicolor*). The inner bark of Nanakamado (*Sorbus commixta*) greatly inhibited the mycelial growth in the culture system. Additional experiments suggested that hydrogen cyanide, which was induced after injury of living phloem, is a causal substance to perform the high antifungal activity. We also analyzed wound responses in barks tissues and revealed that a barrier tissue called wound periderm effectively shut out the penetration of external microorganisms.

研究分野：木材解剖学

キーワード：樹皮 バリア機能 カワラタケ ナナカマド アミグダリン シアン発生植物 傷害周皮

## 1. 研究開始当初の背景

樹皮とは、樹木の維管束形成層よりも外側のすべての組織である。葉で生合成された同化産物の転流や貯蔵を担う通導・貯蔵組織であると同時に、樹体内部の生きた組織を様々な環境ストレスから守る保護組織でもある。これなくして、樹木は天然環境下にて長年月にわたって生存し続けることはできない。従って、樹皮組織のバリア機能発揮メカニズムは、生物学的に興味深い問題であるとともに、林木の育成や緑化樹のケアを適切かつ効果的に施すために理解しておくべき重要な問題でもある。しかしながら、その生物学的および実用的な重要性にも拘らず、その構造や性質、機能に関する研究は、主たる利用の対象である材組織に比べるとはるかに乏しく、樹皮組織の我々の理解が及んでいないことは多い。

樹皮組織のバリア機能に関する既往の研究として、外樹皮を構成する主要組織であるコルク組織の透水性、通気性に関する研究の報告例が散見され、その防水性や気体の不透過性を付与する要因となっているスペリンの化学構造や性質についても確かな知見が得られている。それら先達の研究により、脱水の抑止という保護組織としての物理的な仕組みの一端については解明が進んでいる。これに対して、樹皮組織が微生物の侵入をどのようにして防御し、内部の生活組織を健全に維持しているのか？樹皮組織のバリア機能の生物学的、化学的な発揮メカニズムについては、系統的な研究は見当たらず、ほとんど未解明である。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では樹皮組織のバリア機能発揮メカニズムについて詳しい知見を得ることを目的とし、期間内に以下の個別的課題について研究を進めた。第一に、外樹皮の遮断機能に着目し、コルク形成層が長寿命で、単層の薄いコルク組織で構成される平滑な外樹皮を有する樹種、コルク形成層が短寿命で、コルク組織と死滅した篩部組織が積層して構成されるリチドームの発達した厚い外樹皮組織を有する樹種を対象として、菌糸体をどれだけ有効に遮断しているのかについて比較した。第二に、樹皮組織の抗菌活性を簡便に評価するための手法の確立し、その手法により高い抗菌活性を有する樹種の選抜を試みた。第三に、前述の第二課題の検討において極めて強力な菌糸成長阻害を示したナナカマドを取り上げ、その抗菌活性発揮のメカニズムについて検討を行った。第四に、樹皮組織の傷害応答の一つとして、人為的に与えた単純な外傷に応じて形成される傷害周皮の構造を解析するとともに、菌糸体の分布も調べ、傷害周皮の遮断機能の有効性について評価した。

## 3. 研究の方法

### (1) 樹皮型の異なる外樹皮組織の遮断機能評価

様々な樹皮型をもつ広葉樹 21 樹種を対象とした。外樹皮が十分に発達した生立木より全樹皮を含む樹幹組織塊を採取し、ホルマリン液で固定後に水洗～30%エタノールに保存しておいた液浸標本を用いた。一辺 5 mm の角形の薄片にトリミングし、十分に水戻しの後、横断面または放射断面を凍結ミクロトームで平滑に仕上げた。導電性接着剤で試料台に接着し、臨界点乾燥・Au-Pd コーティングのうえ、走査電子顕微鏡 (SEM) で樹皮組織の解剖学的特徴と菌糸体の分布を観察した。

### (2) カワラタケを用いた組織培養系による樹皮組織の抗菌性評価

円形の蓋付きシャーレの PDA 培地に植菌したカワラタケの菌糸成長 (コロニーの拡大範囲) が、培地に樹皮片を共存させるか否かによって、どれだけ異なるかを計測することにより、抗菌活性を評価する培養実験系を考案した。この際、樹皮内に元々存在する微生物の影響を排除するため、培地内に共存させる樹皮片は事前にガンマ線で滅菌した (ラジエ工業株式会社に委託)。この培養実験系により、北海道産の計 25 種の針・広葉樹について、外樹皮、内樹皮、全樹皮 (内樹皮と外樹皮を分離せず) の抗菌活性を評価した。

### (3) ナナカマド樹皮組織における菌糸成長阻害活性の発揮メカニズムの解析

上述の抗菌活性評価により極めて強力な菌糸成長阻害を示したナナカマドでは、ウメをはじめとするバラ科植物の多くで知られる青酸化合物の発生が予想された。ナナカマドの場合、アミグダリンの分解過程でシアン化水素が発生することが想定されたため、その模擬試験として、アミグダリン (標品) と  $\beta$ -グルコシダーゼの共存下で上記 (2) の培養実験を実施した。また、ナナカマドの樹皮から実際にシアン化水素は発生することを確認するため、ピクリン酸との呈色反応に基づく検出も行った。さらに、内生菌の作用も無視できないため、樹皮組織の菌叢解析も行った。

### (4) 樹皮組織の傷害応答観察

針葉樹、広葉樹それぞれにつき、対照的な樹皮型を有する樹種 1 つずつを選定した。維管束形成層およびコルク形成層の活動期 (7 月) に、カスタムメイドのコア抜き器 (直径 6 mm) を使い、木部まで達するコア試料を各樹種 4 個ずつ採取した。これらのコア試料を使って正常組織の特徴を光学顕微鏡 (光顕)、蛍光顕微鏡 (蛍光顕)、SEM で観察するとともに、休眠期に入った 10 月にコア抜き痕およびその周辺組織を含むブロックを打ち抜き、傷害周皮の構造と菌糸体の分布

を正常組織の解析と同様に調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 樹皮型の異なる外樹皮組織の遮断機能評価

樹皮型に拘らず、材料とした 21 樹種すべてにおいて、内樹皮（生きた篩部組織）には菌糸体は認められなかった。一方、外樹皮における菌糸体の分布には、樹皮型による違いが認められた。コルク組織と死んだ篩部組織が積層し、厚く発達するリチドーム型の外樹皮では、菌糸体が内部のコルク組織を貫通し、内方深くまで分布している様子が観察された。なかには、最も内側の生きた篩部組織に接する周皮まで侵入しているケースも認められた。これに対して、外樹皮が単一の周皮で構成される樹種では、菌糸体は亀裂やコルク組織の部分的な剥離部から侵入しているのが観察されたが、無傷の健全部では 1~数細胞層までのごく表層にとどまっていた。

通気組織として細胞間隙に富む皮目では、潰れた細胞からなる糠状組織や closing layer と呼ばれる密な組織の破壊部を通して菌糸体が深くまで達している様子は確認された。しかし、さらに生きた篩部組織へ侵入しているケースは確認されなかった。これらのことから、外樹皮組織は皮目を含めた全域にわたって、外界の菌類の侵入を防ぐ障壁として有効に機能していると考えられる。

##### (2) カワラタケを用いた組織培養系による樹皮組織の抗菌性評価

実験に供試した 25 樹種のうち、ナナカマドに非常に強い活性が認められ、その内樹皮片との共存下では植菌後のカワラタケの菌糸はまったく成長しなかった。樹皮組織片とカワラタケを分断するスリット状の欠損部を培地中央に設けても、同様の活性が認められた。この結果から、ナナカマドの樹皮組織から、菌類の成長を強く阻害する揮発性物質が発生していることが示唆された。

このほかに、エゾマツとオオヤマザクラにも、ナナカマドほど強力ではなかったが、カワラタケ菌糸に対する明らかな成長阻害が認められた。ナナカマドとは異なり、これら 2 樹種では培地中央にスリット状の欠損部を設けるとその成長阻害活性が消失した。従って、両種の樹皮組織から生じる菌糸成長阻害は、培地内を拡散する非揮発性の物質が引き起こすものと推定された。

一連の実験を進めつつ、抗菌活性評価実験系の前処理（滅菌）条件の検証も行った。当初、液体窒素処理、オートクレーブ処理、ガンマ線滅菌（15 kGy）を試みた。その結果、液体窒素では滅菌が不完全、オートクレーブ処理では活性成分の流出または変質による活性の消失という問題があったのに対して、ガンマ線滅菌が目的に合った適切な手段であることが明らかになった。さらに、含有成分の変質や破壊をなるべく防ぐため線量は必要最小限にとどめることが望ましいので、16 樹種の樹皮片を使って 3 kGy 刻みの設定で照射試験を行った。その結果、多くの樹種では 9 kGy 程度、より高い線量が必要な樹種でも 15 kGy の線量で完全に滅菌できることが明らかになった。この検証試験により、当初は委託先の技術者に相談して設定した 15 kGy という線量は妥当であることを確認した。

##### (3) ナナカマド樹皮組織における菌糸成長阻害活性の発揮メカニズムの解析

上記(2)の培養実験系において、アミグダリン(標品)と  $\beta$ -グルコシダーゼとの共存下では、カワラタケの菌糸成長はナナカマドの樹皮組織片と同様に強く阻害された。さらに、プラスチックチューブ内に樹皮片とピクリン酸を浸潤させた試験紙を密封し、経過を観察した結果、試験紙は呈色(赤変)し、ナナカマドの樹皮組織からシアン化水素が実際に発生することを確認できた。一方、菌叢解析では内樹皮に菌類は検出されなかった。以上の結果から、ナナカマドの樹皮組織の菌糸成長阻害活性は共生する内生菌によるものではなく、植物体のインタクトな組織/細胞が損傷した際に生成される含有成分由来のシアン化水素であると結論された。

##### (4) 樹皮組織の傷害応答観察

樹皮型に拘らず、形成層帯から本来の正常な外樹皮組織までの全域にわたって、コア抜き痕の表層付近に傷害周皮が形成されていた。傷害周皮を境にして、コア抜き痕側では多数の菌糸体が見られたが、生きた篩部側には菌糸体が見られなかった。調べた 4 樹種のうち特にホオノキでは、無傷の正常な樹皮部では外樹皮は薄い単層の周皮で構成されるが、コア抜き痕の修復部では部分的に傷害周皮と死滅した篩部組織が複数積層して、リチドーム状の構造を呈していた。この場合、リチドーム状の傷害性外樹皮内には菌糸体が認められたが、さらに生きた篩部組織へと菌糸体が侵入している様子は認められなかった。これらの結果から、樹皮組織の傷害応答として形成される傷害周皮は、高い遮断機能を有し、菌糸体の侵入を防ぐのに極めて有効な物理的バリアになっているといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小山正登、玉井裕、重富顕吾、佐野雄三
2. 発表標題 ナナカマド樹皮組織の内生菌叢解析
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関野一喜、山岸祐介、佐野雄三
2. 発表標題 広葉樹皮目における組織構造と菌糸体のSEM 観察
3. 学会等名 第52回日本木材学会北海道支部研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山正登、玉井裕、重富顕吾、佐野雄三
2. 発表標題 カワラタケを用いた培養系による樹皮の化学的な恒常的防御機能評価の試み
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 関野一喜、山岸祐介、伊藤利章、佐野雄三
2. 発表標題 広葉樹21 種の外樹皮組織の解剖学的特徴
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 合田爽馬, 山岸松平, 佐野雄三
2. 発表標題 モクセイ科樹木の師部組織に含まれる特徴的な無機結晶の分布と成長過程
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 小山正登, 重富顕吾, 玉井裕, 佐野雄三
2. 発表標題 ナナカマド樹皮の化学的防御機構の検討と樹皮に高い抗菌活性を有する樹種の探索
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北村 遥, 山岸 松平, 佐野 雄三
2. 発表標題 成長期の穿孔により生じる樹皮組織の解剖学的変化
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 合田 爽馬, 宮下 佳恵, 渡部 敏裕, 佐野 雄三
2. 発表標題 北海道産樹木108種の樹皮組織に含まれる無機成分の一斉分析
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小池孝良ほか(編)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 280
3. 書名 木本植物の被食防衛	

1. 著者名 日本木材学会(編)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 海青社	5. 総ページ数 268
3. 書名 木材学 基礎編	

〔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	玉井 裕  (Tamai Yutaka)  (50281796)	北海道大学・農学研究院・教授   (10101)	
研究分担者	重富 顕吾  (Shigetomi Kengo)  (20547202)	北海道大学・農学研究院・講師   (10101)	

	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	小山 正登  (Koyama Masato)		

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	山岸 松平  (Yamagishi Shohei)		
研究協力者	関野 一喜  (Sekino Kazuyoshi)		
研究協力者	合田 爽馬  (Goda Soma)		
研究協力者	北村 遥  (Kitamura Haruka)		

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