

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### Ecophysiological studies on refilling of the cavitated vessel surrounded by functional vessels under negative pressure

(陰圧下にある道管に隣接する空洞化した道管の再充填現象に関する生理生態学的研究)

氏名 大條 弘貴

#### 【 序論 】

植物の水輸送は、水輸送組織である道管の内部にある水（道管液）に負の静水圧（陰圧）がかかることで駆動される。道管は内腔が中空な死細胞からなり、こうした細胞が植物の軸方向にパイプ状に繋がるだけでなく、細胞の側壁にある壁孔と呼ばれる小孔を通して隣接する道管の細胞とも横方向に繋がることで、植物体内に複雑な水輸送ネットワークを形成している。壁孔は、内側に壁孔内腔という空間を持ち、隣接する道管とは一次壁からなる壁孔膜という構造によって隔られている。壁孔膜は、水の輸送に対しては大きな抵抗となるが、隣接する道管が気泡で満たされている場合には、細胞壁の細かい隙間にかかる表面張力によって気泡の侵入を防ぐことができる。しかし、植物が強い乾燥ストレスにさらされると道管液にかかる陰圧は大きくなり、やがて気泡は壁孔膜を通して侵入する。そして、その気泡が道管内を満たすことで、道管を通る水輸送が妨げられてしまう（空洞化現象）。空洞化した道管の水輸送能力を回復させるためには、気泡を陽圧で周囲に溶かし込み、道管内を再び水で満たす必要がある。

近年、隣接した道管内の水には陰圧がかかっている状況でも、空洞化した道管に水が再充填されて、水輸送能力が回復することが多くの植物種で明らかになってきた (Brodersen *et al.* 2013)。陰圧下で道管内へ水が再充填されるためには、隣接する道管の水にかかっている陰圧の影響を排除して、再充填中の道管内で陽圧が維持される必要がある。周囲の道管液にかかる陰圧の影響を排除するメカニズムについて、これまでに2つの仮説が提唱されている。ひとつは半透膜説 (Hacke & Sperry 2003) である。この説では、道管周囲の木部柔細胞が壁孔膜を透過できない高分子量の糖を道管内に輸送し、周囲の陰圧よりも高い浸透圧を作るとしている。このことにより、再充填

中の道管の気泡には陽圧がかかり、周囲の道管から水を引き込むこともできる。もう一つは、pit valve 説 (Holbrook & Zwieniecki 1999)である。この説では、壁孔内に空気が入りこむ pit valve という構造が、再充填中の道管の液を陰圧下にある周囲の道管液から隔離するとしている。

本研究ではこれらの仮説を検証し、道管の再充填メカニズムを明らかにすることを目的とした。半透膜説に関しては、どの程度の大きさの分子に対してであれば、壁孔膜が半透性をもつのかを明らかにするために、異なる分子量の分子に対する壁孔膜の反発係数を測定した。Pit valve 説に関しては、pit valve が維持される条件を実験的に明らかにするために、壁孔の形態的特徴から壁孔内腔にメニスカスが維持される圧力を理論的に推定するとともに、実験的に pit valve を作り出すことで pit valve が維持される圧力を実測した。さらに、壁孔の通水コンダクタンスと道管と木部柔細胞間の通水コンダクタンスを評価することにより、一部の pit valve が崩れた場合にも再充填中の道管内への正味の水の流入量が正になり、道管の再充填が完了する可能性を検討した。実験には、ヤマグワ (*Morus australis* Poir.) と、先行研究で陰圧下での再充填が確認されているゲッケイジュ (*Laurus nobilis* L.) の当年生枝を用いた。

## 【 結果と考察 】

### 1. 再充填現象の確認

木部にかかる陰圧が $-1.99$  MPa になるまで乾燥ストレスを与えたヤマグワの鉢植え個体を灌水し、灌水処理前と3時間後で通水障害率 PLC を測定した。3時間の灌水処理により、木部にかかる陰圧は $-0.400$  MPa となった。それに伴い、PLC は 69.8%から 43.4%まで回復した。このように、ヤマグワにおいて、木部が陰圧下にあっても水輸送能力が回復することが確認できた。

### 2. 半透膜説の検証

ヤマグワの当年生枝の小片中で、壁孔膜を介して2つに枝分かれした道管にキャピラリーを挿して溶液を流し、溶質に対する壁孔膜の反発係数を測定した(図1)。流した溶液は、ショ糖溶液、ポリエチレングリコール (PEG) 溶液4種(平均分子量 3400, 8000, 20,000, 500,000)である。壁孔膜を透過したショ糖溶液の濃度は高くなり、計算上、反発係数は負の値であった。また、分子量が2万までの PEG 溶液を流した時には、流した溶液と回収した溶液に濃度差はなく、反発係数は0であった。分子量が50万の PEG を流した時には壁孔膜を通過した溶液の流速が顕著に低下し、測定に必要な量を回収できなかった。

これらの結果は、分子量が少なくとも2万以上の極めて大きな分子でなければ、半透性を確保できないことを示唆した。そして、半透膜説が正しいとすると、陰圧下での道管の再充填には巨大な分子量の高分子が必要であり、莫大なエネルギーコストがかかる。したがって、半透膜説によって提唱されたメカニズムは現実的でないことが強く示唆された。

### 3. Pit valve 説の検証

走査型電子顕微鏡を用いた壁孔の観察により、pit valve が維持される溶液にかかる最大の圧力  $P$  を毛管圧の式から推定した。また、単一道管レベルの実験により、pit valve を人工的に形成し、pit valve が維持される圧力を実測した(図2)。

実測に基づく pit valve が維持される圧力は、理論値と近い値を示し、実際に pit valve が表面張力で維持されることも示唆された。一方で、本研究から pit valve が消失する圧力は均一ではないことも明らかになった。これは、道管の再充填時に一部の pit valve のみが消失した状態ができてしまうことを意味する。この場合、再充填中の道管液が隣接する道管側に引き込まれてしまい、道管の再充填が失敗してしまう可能性がある。このような状況でも、再充填中の道管内の圧力を維持して再充填を完了するためには、隣接する道管へ引き込まれる水よりも木部柔細胞から再充填中の道管内へ入る水の量が多くなる必要がある。

#### 4. 再充填中の道管内の水収支

一部の pit valve が崩れたとしても、再充填中の道管への正味の流入量が正になり、再充填が完了する可能性を検討した。Pit valve が消失したときの隣接する道管への水の流出速度は、図2の実験系を用いて測定した壁孔を通る経路の通水コンダクタンスの最大値から推定した。また、木部柔組織から再充填中の道管内への水の流入速度は、単一道管から圧力をかけて木部柔組織に KCl 溶液を流し込んだときに測定された道管-木部柔組織間の通水コンダクタンスから推定した。

再充填中の道管と、隣接する道管、木部柔組織との水ポテンシャル勾配がそれぞれ同じであると仮定すると、流出しやすさは流入しやすさの、ヤマグワでは 480 倍、ゲッケイジュでは 47 倍となった。

再充填中の道管と機能している道管の間の圧力差により壁孔膜が機能している道管の側の壁孔の有縁部に押し付けられると、水は壁孔の開口部だけで流れることになる。走査電顕像から開口部の断面積と壁孔膜の面積の測定結果から、流路面積の減少によって流出しやすさは両種ともに 14 分の 1 程度になることが推定される。加えて、再充填時におけるアクアポリンの新規の発現により (Secchi & Zwieniecki 2011) 道管-木部柔組織間の通水性が上昇する可能性もある。これらにより、隣接する道管への流出速度が 14 分の 1 に抑えられ、道管-木部柔組織間の通水性が 4 倍程度上昇すれば、少なくともゲッケイジュでは一部の pit valve が崩れた場合にも正味の流入量が正になり、陰圧下での再充填が可能だろう。しかし、ヤマグワではそれでもなお、流入速度と流出速度の間には 6.8 倍の差が存在することになる。

#### 【 まとめ 】

本研究から、壁孔膜の半透性は低く、半透膜説は陰圧下での道管の再充填現象を説明するには不十分であることが強く示唆された。また、pit valve は理論的に予想される圧力程度まで安定して機能することを確認した。しかし、pit valve が消える圧力には壁孔間でばらつきが存在するため、再充填の途中で一部の pit valve が消失し、再充填中の道管液が隣接する道管側に引き込まれる可能性がある。陰圧下での道管の再充填を説明するには、壁孔膜の弾性的な形状の変化による流出量を低下や、アクアポリンの活性化による流入量の増加などのメカニズムが必要である。

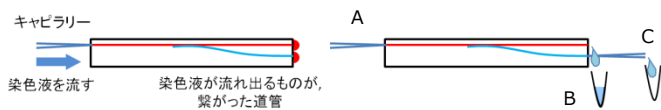


図1 壁孔膜の反発係数の測定方法

- ① 一本の道管 (open vessel, 赤) と, この道管から壁孔膜を介して分岐した道管 (青) を探した.
- ② 枝分かれしている側の道管にキャピラリー (C) を挿した.
- ③ はじめに挿したキャピラリー (A) から既知の濃度の溶液を流し, 流れ出てくる溶液を回収した.
- ④ A に流した溶液と B, C で回収した溶液で濃度を比較した.

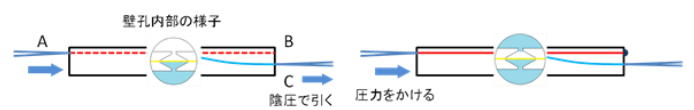


図2 Pit valveの再現方法

- ① A から 20 mM KCl 溶液を流し, 2 本の道管を水で満たした.
- ② A から圧力をかけて空気を流し込むとともに, C から陰圧をかけて分岐した道管内のみが水で満たされた状態にした.
- ③ 再度 A から弱い圧力で溶液を流し, open vessel を満たした.