



Title	広葉樹辺材の道管相互壁孔に観察される被覆物に関する研究
Author(s)	山岸, 松平
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15303号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15303
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91546
Type	doctoral thesis
File Information	Yamagishi_Shohei.pdf



広葉樹辺材の道管相互壁孔に観察される 被覆物に関する研究

北海道大学 大学院農学院

農学専攻/環境フロンティアコース 博士後期課程

山岸 松平

目次

第1章 緒論

1.1 はじめに.....	2
1.2 広葉樹の道管相互壁孔.....	5
1.2.1 広葉樹の道管ネットワークと道管相互壁孔.....	5
1.2.2 道管相互壁孔の微細構造.....	6
1.2.3 道管相互壁孔の形成過程と壁孔壁の化学組成.....	9
1.3 道管相互壁孔の機能特性.....	12
1.3.1 通水抵抗性.....	12
1.3.2 キャビテーション抵抗性.....	14
1.4 道管相互壁孔の二次的変化と被覆物.....	19
1.5 本論文の目的と構成.....	22
図表.....	23

第2章 有機溶媒に溶出するシナノキ型被覆物

2.1 はじめに.....	27
2.2 シナノキ型被覆物が観察される樹種の探索.....	30
2.2.1 本節の目的と手段.....	30
2.2.2 材料および方法.....	30
2.2.2.1 植物材料.....	30
2.2.2.2 FE-SEM による観察.....	31
2.2.3 結果.....	32
2.2.4 考察.....	34
2.2.4.1 シナノキ型被覆物が観察される樹種の共通特性.....	34
2.2.4.2 シナノキ型被覆物の諸特性.....	36
2.3 シナノキ型被覆物の成分分析.....	39
2.3.1 本節の目的と手段.....	39
2.3.2 材料および方法.....	40
2.3.2.1 植物材料.....	40
2.3.2.2 ヘキサン抽出物の GC-MS 分析.....	40
2.3.2.3 TOF-SIMS.....	42

2.3.3	結果	42
2.3.3.1	GC-MS 分析	42
2.3.3.2	TOF-SIMS	44
2.3.4	考察	45
2.3.4.1	シナノキ型被覆物の成分	45
2.3.4.2	脂肪酸シグナルの遍在性について	47
2.4	凍結技法によるシナノキ型被覆物のインタクトな分布と堆積過程	48
2.4.1	本節の目的と手段	48
2.4.2	材料および方法	48
2.4.2.1	植物材料	48
2.4.2.2	Cryo-FE-SEM	49
2.4.2.3	Cryo-TOF-SIMS	50
2.4.3	結果	50
2.4.3.1	Cryo-FE-SEM による観察	50
2.4.3.2	Cryo-TOF-SIMS	51
2.4.4	考察	52
2.4.4.1	シナノキ型被覆物と脂肪酸の分布変化の一致	52
2.4.4.2	シナノキ型被覆物の堆積過程	53
2.5	総合考察	55
2.5.1	本章で得られたシナノキ型被覆物に関する知見	55
2.5.2	シナノキ型被覆物の機能特性に関する展望	55
2.5.3	試料調製中に生じるアーティファクトへの注意	57
	図表	59

第3章 季節に応じて堆積・消失するトネリコ型被覆物

3.1	はじめに	74
3.2	トネリコ型被覆物の構造と季節変化	82
3.2.1	本節の目的と手段	82
3.2.2	材料および方法	83
3.2.2.1	供試材料	83
3.2.2.2	FE-SEM による観察	83
3.2.2.3	Cryo-FE-SEM による観察	84

3.2.3	結果	85
3.2.3.1	道管相互壁孔に生じるトネリコ型被覆物の基本的な形態の観察	85
3.2.3.2	道管相互間壁孔に生じるトネリコ型被覆物の季節・部位ごとの観察	87
3.2.3.3	道管相互壁孔以外の壁面の観察	88
3.2.3.4	Cryo-FE-SEM によるトネリコ型被覆物の観察	89
3.2.4	考察	90
3.2.4.1	トネリコ型被覆物の孔圏・孔圏外における構造上の差異と層構造	90
3.2.4.2	トネリコ型被覆物の季節変化	93
3.2.4.3	道管相互壁孔以外で観察される被覆物や堆積物	96
3.2.4.4	インタクト試料で観察されたトネリコ型被覆物	98
3.3	組織染色によるトネリコ型被覆物の検出	100
3.3.1	本節の目的と手段	100
3.3.2	材料および方法	102
3.3.2.1	供試材料	102
3.3.2.2	樹脂包埋	102
3.3.2.3	光学顕微鏡による観察	103
3.3.2.4	電子顕微鏡による観察	105
3.3.3	結果	106
3.3.3.1	組織染色した薄切片の光学顕微鏡による観察	106
3.3.3.2	準超薄切片の電子顕微鏡による観察	108
3.3.4	考察	109
3.3.4.1	光学顕微鏡によるトネリコ型被覆物の検出	109
3.3.4.2	トネリコ型被覆物の成分と構造	111
3.4	トネリコ型被覆物の成分特定のための試み	114
3.4.1	本節の目的と手段	114
3.4.2	材料および方法	116
3.4.2.1	供試材料	116
3.4.2.2	樹脂包埋	116
3.4.2.3	酵素処理	117
3.4.2.4	免疫蛍光標識	118
3.4.2.5	紫外顕微分光分析	119

3.4.3	結果	120
3.4.3.1	酵素処理した試料の観察	120
3.4.3.2	免疫蛍光標識した切片の観察	121
3.4.3.3	紫外顕微分光分析	121
3.4.4	考察	122
3.4.4.1	トネリコ型被覆物に含まれる多糖類	122
3.4.4.2	トネリコ型被覆物に含まれるフェノール類	125
3.5	トネリコ属内におけるトネリコ型被覆物の存否	130
3.5.1	本節の目的と手段	130
3.5.2	材料および方法	130
3.5.2.1	供試材料	130
3.5.2.2	FE-SEM による観察	131
3.5.2.3	PAS 染色	131
3.5.3	結果	132
3.5.3.1	FE-SEM による被覆物の観察	132
3.5.3.2	光学顕微鏡によるシマトネリコの被覆物の検出	133
3.5.4	考察	133
3.5.4.1	トネリコ属内の被覆物の存否	133
3.5.4.2	シマトネリコの年輪間における被覆物の堆積頻度の差	135
3.6	総合考察	137
3.6.1	本章で得られたトネリコ型被覆物に関する知見	137
3.6.2	トネリコ型被覆物の機能に関する考察	138
3.6.3	トネリコ型被覆物の堆積・消失過程に関する考察	141
	図表	144
第4章 結論		
4.1	本研究の成果	167
4.2	本研究の応用について	169
4.2.1	様々な被覆物の成分特定	169
4.2.2	樹種特性の理解と一般事象への発展	170
	謝辞	172
	引用文献	174

第 1 章 緒論

1.1 はじめに

樹木の枝や幹、根の大部分を占める木部組織は、生きている樹木にとっては、根から吸収した水分やミネラルを樹冠へと長距離輸送する場として重要であり、またこれを木材として産業利用する我々人類にとっては、高い比強度や加工性とともな断熱性や音響特性などの様々な特性を有したマテリアルとして有用である。木部組織のほとんどは、分化の過程で死滅して内容物を失った中空の細胞(仮道管、道管要素、木部繊維)で構成されている。生体内では、これらの細胞の内腔を満たした水の連続体が、蒸散に由来する張力に引き上げられることによって効率的な水輸送が可能となっている。植物の生育には水が必須であり、植物がいかに木部の通水を制御し、乾燥や凍結などに起因する水ストレスに応答してそれを維持しているかを知ることは、植物水分生理学の主要なテーマの1つである。一方、産業的な木材利用において、耐朽性や強度の付与を目的に木材に薬剤や合成樹脂を注入することがあり、これには、木部細胞の内腔にいかに薬剤を浸透させられるかが重要な関心事になってくる。このような木部組織における水分の移動(水分通導)を理解するには、木部組織内を構成する各細胞がどのように連絡して水分の移動経路を構築しているのか、またその水分の移動がどのように制御されているのかといった基礎的な議論がなされる必要がある。

木部組織を構成する細胞のうち、とりわけ水分通導に大きく寄与するのは、管状要素と称される仮道管と道管要素である。仮道管は、細長い紡錘形をした細胞であり、その末端は閉じられている。道管要素は一般に仮道管よりも短く径が大きい細胞で、その決定的な特徴として末端の壁の一部またはほとんどが分解されたせん孔を有している。このせん孔により各道管要素が上下に隣接する道管要素と連なって、長くパイプ状に伸びた道管を形成する。道管はその大きな径と長さによって、仮道管よりもはるかに高い効率で水分を輸

送できる。これらの管状要素は、木化した二次細胞壁（二次壁）を発達させており、その壁面はほとんど水分を透過しない。一方、各細胞の細胞壁には、この不浸透性の二次壁が欠如した孔隙が盛んに形成されており、これらが隣接する細胞どうしで対となることで、細胞間での水分移動が可能となっている。この孔隙は“壁孔（pit）”と呼ばれ、その対を“壁孔対（pit pair）”と呼ぶ。とりわけ管状要素の壁孔は、二次壁が張り出していることで孔隙の口径が細胞の内側で狭まった“有縁壁孔（bordered pit）”を呈するため、管状要素相互間の壁孔対は、有縁壁孔対と呼ばれる。木部組織内で生じる水分移動は、ほとんどこの管状要素間の有縁壁孔対を介しておこなわれている。したがって、有縁壁孔対の構造や機能を知ることは、木部組織の水分通導を理解するうえで極めて重要である。

このような有縁壁孔対を介して連結した管状要素群によって構築された樹木の木部の通水構造は、裸子植物である針葉樹と被子植物である広葉樹で大きく様相が異なる。針葉樹の木部組織は、その体積の90%以上が仮道管で占められており、通水可能な木部全体で水分通導がおこなわれる。一方、被子植物である広葉樹では、樹種によっては仮道管を補助的な通水経路としながら、道管を主な水分通導の場としている。広葉樹の木部組織を木口面で見ると、密に配列した木部繊維を背景に、樹種ごとに特徴的な配列で径の大きな道管が散在していることがわかる。後に詳述するが、有縁壁孔対の構造も針葉樹と広葉樹で違いがある。このような異なる通水構造をもつ両者では、通水戦略にも異なる点が多く、それぞれの木部組織における水分通導を検討する際には、個別の理論体系を用いなければならない場合もある。

広葉樹の木部組織は、針葉樹の木部組織よりも多様性に富んでいる。仮道管がほとんどを占める針葉樹の木部組織に比べ、広葉樹の木部組織では、道管要素、仮道管、木部繊維、軸方向柔細胞、放射柔細胞といった様々な構成要素が、様々なサイズ、構成比率、連絡頻度で配列しており、樹種によってその様相は大きく異なる。またその種数も、500種程度

といわれる針葉樹に対して、広葉樹では 1 万種は下らない。広葉樹の木部組織は極めて多様性に富んでおり、ゆえに木部組織の水分通導に関しては、とりわけ広葉樹で未解明なことが山積している。

以上を踏まえて本研究では、広葉樹の木部組織の水分通導を対象に、その主要な通水経路である道管を相互につなぐ有縁壁孔対、すなわち道管相互壁孔に関する知見を深めることとした。本研究では、そのなかでも特に研究の進んでいない辺材領域の道管相互壁孔に二次的に発生する被覆物を対象とした分析に取り組む。

本章では緒論として、まず広葉樹の道管相互壁孔を中心に、管状要素間の有縁壁孔の基本的な構造や機能に関して、これまで得られている知見をまとめる（1.2～1.3 節）。さらに形成後の壁孔壁に生じる二次的な変化や被覆物に関する知見を概説したうえで（1.4 節）、本研究の目的を述べる（1.5 節）。

1.2 広葉樹の道管相互壁孔

1.2.1 広葉樹の道管ネットワークと道管相互壁孔

被子植物である広葉樹の木部組織は、仮道管が果たしていた水分通導機能と樹体支持機能が分化し、それぞれを道管と木部繊維に特殊化させるように進化したとされる (Bailey & Tupper 1918)。道管は、管状から筒状をした道管要素が、せん孔を介して連なってできた構造であり、直径は大きいものでは $200\text{ }\mu\text{m}$ 以上に及び (IAWA 1989)、長さは樹種や部位によっては数メートルにも及ぶ。その大きな管径と長さによって、道管は極めて高い通水効率を示す。広葉樹の木部組織の中で、道管は特に接線方向に蛇行や傾斜をしながら走行し、他の道管と盛んに連絡しながら、複雑な通水ネットワークを形成している (Fig. 1-1; Zimmermann & Brown 1971)。このような通水ネットワークの広がり、接線方向への水輸送を促すとともに、通水経路を分散させることで、一部の経路が機能不全に陥っても、他の経路がバイパスとなるような、通水の安全性を確保するための仕組みとなっている (Zimmermann 1983)。

このような広葉樹の通水ネットワークにおける道管どうしの連絡は、道管相互壁孔によってなされている。道管相互壁孔は光学顕微鏡で観察した場合には、幅 $3\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ 程度の（楕）円形または多角形の孔隙として観察され、道管が隣接して平行に並んでいる部分に集中的に形成されている (Fig. 1-2)。この領域は木口面からみると、複合した道管の共通壁として観察される部分である。広葉樹の道管の最も一般的な複合形態は、放射方向であるため (IAWA 1989)、道管相互壁孔は道管の接線壁に形成されていることが一般的といえる。ただし、道管が複合する方向によっては、接線壁や放射壁と接線壁の中間の壁面に形成されていることも少なくはない。

1.2.2 道管相互壁孔の微細構造

道管相互壁孔の断面構造を示した模式図を Fig. 1-3 に示す。道管相互壁孔は有縁壁孔であり、道管の内腔側の二次壁が壁孔の孔隙に張り出している。この二次壁が張り出している部分は、“壁孔縁 (pit border)” と呼ばれ、その外側にある孔隙が広まった部分を“壁孔室 (pit chamber)” と呼ぶ。有縁壁孔の孔隙が狭まった部分は“孔口 (pit aperture)” と呼ばれるが、壁孔縁が厚い場合にはこれが隧道状となるため、この狭まった孔隙自体を“壁孔道 (pit canal)” と呼び、その道管内腔側の開口部を“内孔口 (inner pit aperture)”、壁孔室側の開口部を“外孔口 (outer pit aperture)” と呼ぶ。また壁孔室や壁孔道といった壁孔の孔隙部分は、壁孔腔 (pit cavity) と総称される。このような有縁壁孔の構造は、壁孔縁で道管壁の強度を確保しながら、壁孔室の広い孔隙で通水性を高めることができる極めて合理的な構造と考えられている (Carquist 1988; Sperry & Hacke 2004)。また樹種によっては、壁孔縁の二次壁表面に突起をもつ壁層が形成されており、このような突起を“ベスチャー (vesture)”、ベスチャーが生じている壁孔を“ベスチャード壁孔 (vestured pit)” と呼ぶ (Bailey 1933)。道管相互壁孔の構造のなかでとりわけ強い関心が向けられているのは、壁孔室の孔隙を中央で隔てる“壁孔壁 (pit membrane)” である。壁孔壁は、隣接する細胞間に存在する一次細胞壁 (一次壁) と細胞間層に由来する壁面であり、木化した二次壁とは違って水の透過を可能としながら、細胞間の区画を維持している。

管状要素をつなぐ有縁壁孔対の壁孔壁 (Fig. 1-4) は、明らかに水分通導の抵抗となると考えられたため、木材保存剤等の注入機構に関する基礎知見として、その微細構造には古くより大きな関心が向けられてきた。その解析は、光学顕微鏡レベルでの詳細な観察に成功していた針葉樹早材の仮道管間の壁孔壁で先んじたため (Bailey 1913, 1916)、はじめにこちらの特徴を述べておく。針葉樹早材の仮道管間の壁孔壁には、中央に厚く肥厚した円盤形のトールスの領域があって、その外側には透過性の高いマルゴの領域がみられる

(原田ら 1957; Liese 1965)。このマルゴは、トールスから壁孔壁の周縁部まで放射状に伸びた無数のマイクロフィブリルの束で構成されており、その隙間がスリット状の空隙となっている (Bailey 1916; 原田ら 1957; Liese 1965)。壁孔壁の周縁部は密な環状の領域となっており、pit annulus (孔紋環) や rim などと呼ばれる (原田ら 1957; Liese 1965; Sano et al. 1999; 以降、本論文では pit annulus とする)。壁孔壁の片側に向けて強い圧力がかかった際には、壁孔壁が壁孔室の片側に押し付けられて (吸い付けられて) いき、トールスが孔口に蓋をする弁のように働く (Bailey 1916)。このような現象は pit aspiration と呼ばれる。

広葉樹の道管相互間の壁孔壁については、光学顕微鏡レベルの観察により、針葉樹の仮道管間の壁孔壁とは異なる様相を呈していることは理解されていたものの、その微細構造を把握するには、電子顕微鏡の登場を待たなければならなかった (原田ら 1957)。電子顕微鏡が木材科学分野へ導入されて間もなく、道管相互間の壁孔壁は、針葉樹の仮道管間の壁孔壁に見られるようなトールスの領域が存在せず、ランダムに配向したマイクロフィブリルによって形成された一様なシート状であることが明らかにされた (原田ら 1957; Côté 1958; Schmid 1965; Schmid & Machado 1968)。当初は、壁孔壁の表面に電子顕微鏡レベルで観察できるような空隙はないとされていたが、後にユリノキ (*Liriodendron tulipifera* L.; Bonner & Thomas 1972) やカエデ属 (Wheeler 1982; Sano 2005; Jansen et al. 2009)、ヤナギ属およびハコヤナギ属 (Sano 2005; Jansen et al. 2009)、エンジュ (*Sophora japonica* L.; Jansen et al. 2009) などで明らかな空隙構造が見られる樹種があることが示されている。この空隙のサイズは、走査電子顕微鏡像からの直接的な計測や (Choat et al. 2004; Jansen et al. 2009; Lens et al. 2011)、一定粒径のコロイドを流す方法 (Jarbeau et al. 1995; Choat et al. 2003) によって推定されているが、直径数十～数百ナノメートルの幅で樹種間差がみられる。また広葉樹の道管相互壁孔には存在しないと考えられていた

トールスも、ニレ科、ジンチョウゲ科、モクセイ科、バラ科などの一部の樹種では形成されていることが発見された (Ohtani & Ishida 1978; Wheeler 1983; Jansen et al. 2007; Dute 2015)。既報の限りでは、広葉樹の道管相互間の壁孔壁にトールスが存在する場合、そのマルゴの領域は、針葉樹の仮道管間の壁孔壁のような大きなスリット状の孔隙をもつものではなく、一般的な広葉樹の道管相互間の壁孔壁と同様に、空隙がそれほど目立たないシート状の見た目をしている。またニレ科やバラ科による解析では、トールスを持つ壁孔壁は、環孔材性の樹種の孔圏外の小道管に限って現れることが示唆されている (Jansen et al. 2004, 2007)。

走査電子顕微鏡による観察で、壁孔壁の表面の層が剥離して観察される場合があるため、道管相互間の壁孔壁は少なくとも2層以上の複数のラメラで構成されていることが示唆されている (Côté 1958; Schmid & Machard 1968; Sano 2005, 2016; Pesacrete et al. 2005)。最も外側のラメラでは、ミクロフィブリルがランダムな配向をしているが、より内側のラメラでは、同じ向きに平行に並んでいるように観察される。このラメラの数は、樹種によって異なることが明らかであり (Sano 2005, 2016)、大きく2層タイプのものと、3層以上のタイプのものに分けられるという見解がある (佐野 2009)。前者には、ヤナギ属やカエデ属、カバノキ属、後者には、マメ科やトネリコ属が挙げられている (佐野 2009, 2011)。このようなラメラ構造は、壁孔壁の由来となる一次壁と細胞間層のラメラ構造を反映していると考えられる。2層タイプと考えられるエゾヤマザクラ (*Prunus sargentii* Refder; 現在の学名は *Cerasus sargentii* (Rehder) H. Ohba var. *sargentii*) において、細胞間層に相当する壁層が欠如していることが示されている (佐野 2009; Sano 2016)。壁孔壁の厚さは、樹種によって大きく異なっており、ヤナギ属やトチノキ属といった薄い樹種では 100 nm を下回るのに対し、アカシア属のような厚い樹種では、1 μm を上回ることが報告されている (Jansen et al. 2009; Li et al. 2016)。これらの報告では、壁孔壁の厚さ

が壁孔壁の空隙の大きさと強い負の相関を示すことも報告している。このことは、厚い壁孔壁ほどより多くのラメラが重なって入り組んだ空隙構造をしているためであると想定されており、近年、この想定に基づいた壁孔壁の空隙構造のモデルが提案されている (Kaack et al. 2019; Zhang et al. 2020)。

1.2.3 道管相互壁孔の形成過程と壁孔壁の化学組成

道管相互壁孔は、道管要素の形成過程において局所的に生じた二次壁の未肥厚部と理解される。紡錘形始原細胞が拡大して生じた道管要素は、その細胞壁を強固とするために一次壁の内側に二次壁を堆積させ、さらにそこにリグニンを堆積させて木化を進めていくが、壁孔ならびにせん孔の形成部では、この過程が生じない。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) を用いた分子生物学的な解析では、このような壁孔形成が、Rho-like GTPase from plant (ROP) と呼ばれるタンパク質の局所的な活性化によって、いくつかの酵素が活性化され、セルロース合成酵素の移動レールとなる表層微小管が局所的に分解されることで生じるものと明らかにされている (Oda & Fukuda 2012, 2013; Sasaki et al. 2017)。二次壁肥厚と木化が進むと、形成中の道管要素はアポトーシスを起こし、種々の自己分解酵素を放出して自身の原形質を分解し始める。この過程の後期に壁孔の内部にある木化していない一次壁と細胞間層からヘミセルロースやペクチンといった非セルロース多糖類が分解される (O'Brien & Thimann 1967; O'Brien 1970; Kim & Daniel 2013; Herbette et al. 2015)。この過程により一次壁の網状に張り巡らされたセルロースマイクロフィブリルからマトリックス成分が取り除かれ、空隙のある壁孔壁が完成すると考えられている。

形成が完了した道管相互間の壁孔壁の化学組成について、壁孔壁形成に関する初期の研究の多くは、非セルロース多糖類の大部分が取り除かれ、おおむねセルロースマイクロフィブリルの網だけが残った状態にあると結論付けている (O'Brien & Thimann 1967;

O'Brien 1970) これに対し、仮道管間のトールス・マルゴを有する壁孔壁では、トールスがペクチンに富むこともあって (Bauch & Berndt 1973)、広葉樹の道管相互間の壁孔壁にもペクチンは残存しているとする見解も長らく存在してきた (Choat et al. 2008)。両者のどちらが妥当であるかは、未だ結論が出ていない。近年、ハコヤナギ属やヨーロッパナラ (*Quercus robur* L.) を対象に、モノクローナル抗体による免疫金標識を施した超薄切片を透過電子顕微鏡 (TEM) で観察する研究がおこなわれたが、これらは形成が完了した道管相互壁孔 (ヨーロッパナラでは道管・周囲仮道管間壁孔や仮道管間壁孔などの管状要素間壁孔) の pit annulus からはペクチンが豊富に検出されるものの、壁孔壁の本体からはほとんど検出されないことを報告している (Plavcová & Hacke 2011; Kim & Daniel 2013, 2016; Herbette et al. 2015)。一方、同様のモノクローナル抗体による免疫金標識を、壁孔壁の正面方向が露出するように面出ししたブドウ (*Vitis vinifera* L.) の木部ブロックに作用させ、走査電子顕微鏡でその表面を観察した研究では、壁孔壁の表面からペクチンが豊富に検出されたと報告している (Sun 2022)。また古くより行われているヒドロキシアミン・フェリックスクロライド反応を用いた組織化学的研究でも、9 樹種の形成完了後の壁孔壁からペクチン (メチルエステル化ホモガラクトナン) が検出されている (Catesson et al. 1979; Czaninski 1979; Catesson 1983; Gortan et al. 2011)。これらの結果は、調査樹種も手法も様々であるため、壁孔壁におけるペクチン分布の真偽を明らかにするには、樹種間の差や各手法の特性を整理しながら、さらに多くの知見を収集する必要がある。

ヘミセルロースについては、上述の免疫標識を用いた手法により、キシログルカン、キシラン、ヘテロマンナンが検出された例がある。Kim & Daniel (2013) は供試樹種の 1 つであるヨーロッパポプラ (*Populus tremula* L.) の道管相互間の壁孔壁より微量のキシログルカンを検出した。一方、彼らは、もう 1 つの供試樹種である交雑ポプラ (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.) ではこれが検出されなかったと報告している。これ

まで行われた他のハコヤナギ属を対象とした研究例でも、道管相互間の壁孔壁よりキシログルカンが検出されていない (Plavcová & Hacke 2011; Herbette et al. 2015)。Kim & Daniel (2013) は、このような違いに、使用した供試木の樹齢が関係する可能性があると考えしている。ヨーロッパナラでは、早材の管状要素間の壁孔壁でキシログルカンが検出され、さらに早晚材双方の管状要素間の壁孔壁からヘテロマンナンが検出されている (Kim & Daniel 2016)。また Sun (2022) のブドウを対象とした解析では、道管相互間の壁孔壁からキシログルカンとキシランが検出されている。

これらの多糖類に加えて、微量のリグニンあるいはフェノール類 (Herbette et al. 2015; Pereira et al. 2018)、タンパク質 (Harrak et al. 1999; Pereira et al. 2018) が道管相互間の壁孔壁に堆積していることを示唆する報告例もある。また近年、形成後の道管相互間の壁孔壁にリン脂質や糖タンパク質といった界面活性物質が堆積していることが示唆され、これに基づいた壁孔壁の機能特性に関する仮説が展開されている (Schenk et al. 2015, 2017)。

1.3 道管相互壁孔の機能特性

1.3.1 通水抵抗性

道管相互壁孔は通水経路の隘路となるため、広葉樹の水分通導の大きな抵抗となる。その抵抗性は、いくつかの推算や直接的な計測により木部の水分通導に生じる全抵抗の 18% から 86%であることが示されている (Sperry et al. 2005; Wheeler et al. 2005; Choat et al. 2006)。道管相互間の壁孔壁が分解されることで通水速度は上昇するため (Pérez-Donoso et al. 2010)、このような抵抗性は、壁孔壁の存在とその空隙の大きさに依存することが予想される。このことは、人為的な薬剤の注入にも影響を及ぼすことが示唆されている。例えば Singh et al. (1999) は、ハンノキ (*Alnus glutinosa* Gaertn.) とユーカリ (*Eucalyptus deglupta* Blume) の木材に保存剤を注入したときに、ハンノキ材では、木部繊維を含む全ての木部の細胞に薬剤が浸透していたが、ユーカリ材では薬剤の浸透が道管と放射組織に限られ、周囲仮道管には浸透しないことを報告した。Singh et al. (1999) は両者の構成要素間の壁孔壁を TEM で詳しく観察したうえで、ユーカリ材の管状要素間の壁孔壁がハンノキ材の道管相互間および木部繊維間の壁孔壁よりも厚く密であることが浸透性の違いを生じさせていると結論付けている。

このように壁孔壁が通水の物理的な障壁となっていることは明らかであるが、その通水抵抗性が壁孔壁の化学的性質に基づいて、特定の条件下で変化するという知見も存在する。植物の木部通水の研究分野では、枝の断片に水を流した時の流速を計測することで、木部の通水度（あるいはその逆数である通水抵抗）が計測されるが、その実験法が確立された当初より、流体に水道水や塩を含む水ではなく純水を用いると、通水度が大きく低下することが見出されていた (Zimmermann 1978; Sperry et al. 1988)。この現象について、van Ieperen et al. (2000) は、種々の塩水溶液 (KCl、K₂SO₄、NaCl、MgSO₄、CaCl₂) を通

液すると、脱イオン水を通液した場合に比べて通水度が 7~8%上昇することを示したうえで、これが同濃度以上の糖溶液（マンニトールやメレジトース）では一切生じないことを示した。すなわち当現象は浸透圧ではなく、電離イオンの存在によって生じることが示唆される。この現象について、それを初めて報告した Zimmermann (1978) は、道管相互間の壁孔壁の膨張・収縮が原因であるとの見解を述べていた。この見解は、Zwieniecki et al. (2001) が、道管 1 本単位にマイクロキャピラリーを挿入して通液をおこなう独自の手法により、壁孔を介さない開放道管では当現象が発生しないことを示したことで決定的なものとなった。Zwieniecki et al. (2001) は、この現象がカチオンの存否によって、壁孔壁のマトリックスにヒドロゲルとして存在するペクチンが収縮・膨潤することで生じると考察した。この現象は ionic effect（以降、イオン効果と称する）や hydrogel control（以降、ヒドロゲルコントロールと称する）などと呼ばれ、これまで固定的なパイプラインであると考えられていた植物の木部の通水構造が、弾力的に通水制御をしている可能性を示唆するものとして盛んな議論の的となった (Nardini et al. 2011)。イオン効果は、様々な分類群の多くの植物種で確認され、被子植物に一般的な現象であるとともにその影響が植物種やイオン濃度によって異なることが示されている (van Ieperen et al. 2000; Zwieniecki et al. 2003; López-Portillo et al. 2005; Nardini et al. 2011; Aasamaa & Sober 2010; Cochard et al. 2010; Jansen et al. 2011)。北米のカエデ属 4 種を用いた研究では、イオン効果による通水度の変化幅には樹種間差が見られ、それがその樹種のもつ光照射耐性あるいは乾燥耐性に関連する形質と相関することが示されている (Nardini et al. 2012)。一方、Zwieniecki (2001) が提唱したペクチンによるヒドロゲルコントロールのメカニズムについては、先述のように壁孔壁にペクチンが含まれていない可能性があるため (1.2.3 を参照)、その妥当性が疑われている。原子間力顕微鏡を用いた解析により、脱イオン水中と 50 mM KCl 水溶液中で、壁孔壁の物理的性質が明らかに変化したことが報告されてい

るため、壁孔壁におけるイオン効果の存在は間違いないと考えられる (Lee et al. 2012)。

この点に関して、van Doorn et al. (2011) は、負にチャージした高分子がカチオン存在下で発生させる拡散電気二重層が、細孔を通る流体の粘性を上昇させるとともに壁孔壁の空隙径を変化させることで、壁孔壁におけるイオン効果が発生するという仮説を提唱した。この仮説が正しい場合、ペクチンのようなヒドロゲルでなくとも、電解性をもつ高分子であれば、イオン効果の要因になりうる。その候補となる高分子には、種々のヘミセルロースやリグニンのほか、セルロースも該当する可能性があるという。

1.3.2 キャビテーション抵抗性

道管どうしを区画化する道管相互間の壁孔壁は、何らかの原因で生じたある道管の通水不全をその道管だけに封じ込めるための安全装置として働く。道管の通水不全の発端には、組織に生じた傷害や病原菌の感染など様々なものが想定されるが、その元凶が何であれ、通水不全の直接的な原因は、道管が水切れを起こし空洞化した状態になること（エンボリズム）である。樹木の木部は、日常的にこのエンボリズムの危険にさらされている。樹木を含む陸上植物の木部通水は、蒸散によって生じた大きな表面張力によって駆動されていることが広く受け入れられているが（凝集－張力仮説; Dixon & Joly, 1894）、これによって植物体の通水系内に生じている負圧は飽和水蒸気圧を大きく下回っており、植物体内を流れる液体の水は物理的に準安定状態にある。大きな水ストレスを受けた場合、木部の通水系内に発生する負圧は著しく大きくなり、内部に発生した一定サイズ以上の気泡が瞬時に膨張してエンボリズムが生じてしまう。このようなエンボリズムを起こした道管があったとしても、道管相互間の壁孔壁が存在することで気相の拡大が 1 つの道管に留められ、他の道管の通水性は維持される。陸上植物にとって、水ストレスは頻発する状況である。

そのようななかで、壁孔壁による区画化によって通水の回路がある程度確保されていることは、陸上植物の生存のためには必須の機構であるといえる。

道管相互間の壁孔壁は植物体内で生じる気液界面の進行を留める場であるが、それと同時に、植物体内で起こる気泡形成（キャビテーション）の最も主要な発生場所であるということも広く認知されている。道管や仮道管などの管状要素を満たす水中に、エンボリズムの原因となる気泡（空気核）が発生する要因については、準安定状態の水から確率論的に生じるとする均質核形成に基づくものから、疎水性の異物と水の界面で生じるとする不均質核形成に基づくものまで、様々な見解がみられていたが（Tyree & Zimmermann 2002）、最終的には隣接する空洞から引き込まれた空気核が主な要因であると合意されるに至った。このような周囲の空洞から空気核が供給される現象は、**air-seeding**（Zimmermann 1983）と呼ばれ、管状要素の細胞壁上にある最も大きな空隙で生じるとされる。そして、管状要素の細胞壁が無傷である限りは、そのような最大の空隙は管状要素間の壁孔壁にあると考えてよい。実際に気液界面を保持している管状要素間の壁孔壁で **air-seeding** が生じることを示唆する証拠もいくつか得られている（Crombie et al. 1985; Sperry & Tyree 1988; Jarbeau et al. 1995）。気液界面を保持している壁孔壁には、蒸散流によって負圧がかかっている液相側と空洞となって圧力から解放されている気相側に圧力差が発生している。この圧力差が小さい限りは、空気が壁孔壁を通過することはない。しかし、大きな水ストレスを受けた木部組織では、液相側にかかる負圧が大きくなるため、気相側から液相側に気泡が侵入する（Fig. 1-5）。

この管状要素間の壁孔壁を介した **air-seeding** の発生は、Young-Laplace の毛管平衡式に基づいてモデル的に扱うことができる。例えば、壁孔壁の空隙が真円形をしていると仮定した場合、その **air-seeding** の発生させる木部の負圧の大きさ（キャビテーション圧： ΔP ）は以下の式で表すことができる。

$$\Delta P = 4\gamma \cos \varphi / R_p \text{ (式 1)}$$

ここで、 γ は液体がもつ表面張力の値であり、一般に 20℃における純水の表面張力 (0.072 N m^{-1}) が適用される。 φ は壁孔壁に対する水の接触角であり、セルロースを主体とした壁孔壁は高い親水性をもつと想定されているため、一般に 0° と仮定されている（すなわち、計算上は無視される）。また R_p は壁孔壁の最大の空隙の直径である。なお近年では、壁孔壁の空隙が真円とは限らないことに留意し、無次元の形状補正係数 κ ($0 \leq \kappa \leq 1$) を乗じることが提案されている (Schenk et al. 2015; Li et al. 2016)。この κ は空隙が真円形であるほど 1 に近づき、例えば 0.5 であると、スリット状であることを示す。このような Young-Laplace の式に基づくモデルが示す重要な点は、壁孔壁の空隙の大きさが air-seeding の起こりやすさを決定づけるということである。すなわち、管状要素間の壁孔壁に大きな空隙を持つ樹種ほど、小規模な水ストレスでエンボリズムを起こすということが示唆される。ここで針葉樹早材の仮道管間の壁孔壁の場合は、マルゴが非常に多孔質であるが、圧力差がある程度多くなった段階で pit aspiration が生じ、極めて密な構造をしたトールスが壁孔の孔口を閉塞してしまう。最終的に圧力差の増大によって、トールスが仮道管の内腔側まで吸い込まれてマルゴが孔口にさらされるか、あるいは壁孔壁が破損するかで air-seeding が発生すると考えられているが (Hacke et al. 2004)、基本的に上記の air-seeding モデルを単純に適用することはできない。一方、均質なフィルター膜状をした広葉樹の道管相互間の壁孔壁は、上記のモデルを理論的に適用することができる。実際、広葉樹において樹種ごとに計測された壁孔壁の空隙サイズや、壁孔壁の空隙サイズと強い正の相関を示す壁孔壁の厚さは、各樹種が示すキャビテーション圧と高い正の相関を示す (Jansen et al. 2009; Jarbeau et al. 1995; Lens et al. 2011; Li et al. 2016)。このようなキャビテーションに対する抵抗性は、植物種によって差が見られ、その植物種の乾燥耐性に密接に関係すること

も示唆されている (Pockman & Sperry 2000; Tyree et al. 2003; Maherali et al. 2004; Choat et al. 2012)。さらに、交雑ポプラ (*Populus trichocarpa* Torr. et A.Gray ex Hook. × *deltoides* W.Bartram ex Marshall) を用いた実験では、異なる光照射環境で生育させた個体間でキャビテーション抵抗性に差が見られ、それに対応して壁孔壁の厚さにも明らかな差が生じていたことも報告されている (Plavcová et al. 2011)。これらのことは、壁孔壁の微細構造が、植物の生態的特性を決定づけていることを示唆しており、植物生理生態学における壁孔研究の重要性を示すものといえる。

一方、air-seeding モデルに、実際に計測されたキャビテーション圧を代入して得られる壁孔壁の空隙径の理論値は、電子顕微鏡観察や微粒子の灌流によって実測された値よりもはるかに大きく算出されることが指摘されている (Choat et al. 2003; Jansen et al. 2009)。このことは、air-seeding 理論の矛盾点として盛んに議論されてきた。これまで提示されている見解としては、air-seeding の否定論のほか (Choat et al. 2003)、pit aspiration による壁孔壁の空隙径の増大や壁孔壁の破損が関与しているという見解 (Choat et al. 2003, 2004; Sperry & Hacke 2004; Jansen et al. 2009)、また空隙径の大きな壁孔壁 (あるいは破損している壁孔壁) が容易には観測できないほど稀であるという rare pit 仮説などがある (Choat et al. 2003; Wheeler et al. 2005; Christman et al. 2009, 2012)。

近年、より微細なスケールの構造解釈や熱力学的現象に基づいて、従来の air-seeding 理論を補う新たな論説が展開されている。Schenk et al. (2015) は、セルロースマイクロフィブリルが折り重なった網目に相当する壁孔壁の空隙は、air-seeding モデルで仮定されているような円柱形ではなく、多数の狭窄部が存在するジグザグの孔隙になっていると指摘した。さらにそのような狭窄部を移動する気液界面では、気泡が容易に分離形成されることを指摘した。また、Schenk et al. (2017, 2018) は、両親媒性脂質が道管相互間の壁孔壁をはじめとする道管の壁面に堆積していることを示し、これらが壁孔壁の内部で頻発する気泡が容易

に膨張しないように働いているとも論じている。このことは、まさに air-seeding モデルによってキャビテーション圧を正確に計算できない理由を示しているといえる。この Schenk らによる論説は、気泡が頻発するような環境であっても植物の凝集－張力仮説に基づく水分通導が成立することを説明する非常に興味深い示唆を含んでおり、凝集－張力仮説をより強固なものとする知見として、今後の検証が期待される。

1.4 道管相互壁孔の二次的变化と被覆物

これまで記述したように、道管相互間の壁孔壁の機能特性には、壁孔壁の基本的な構造や化学的性質が大きく関わっており、さらにそれは樹種間で明確な差が見られる。これまで樹木水分生理学を中心におこなわれてきた多くの壁孔壁の機能特性に関する研究では、基本的に壁孔壁の構造や化学的性質が安定した状態を保っていることを前提に進められてきた。一方、道管相互間の壁孔壁が、その構造や化学的性質を部位や季節に応じて二次的に変化させていることを間接的、あるいは直接的に示す知見も見られており、これらを考慮した解析が重要性を帯びてきている。

最も典型的な事例として、一度水ストレスを受けてエンボリズムを起こした道管の道管相互間の壁孔壁が収縮・変形し、不可逆的にキャビテーションに対する抵抗性を低下させる樹種があることが示されている (Hacke et al. 2001; Hillabrand et al. 2016; Kotowska et al. 2020)。このことは、Hacke et al. (2001) が植物の木部で発生するエンボリズムとその再充填 (refilling) による木部の性質変化を調べるために行った実験によって明らかとなった。先に示した通り、植物は日常的に水ストレスによるエンボリズムの危険にさらされているが (1.3.2 を参照)、その一方で、エンボリズムを起こした道管に再び水を再充填する機構を持っている (例えば Tyree et al. 1986; Utsumi et al. 1998)。Hacke et al. (2001) は、広葉樹 6 種に対してこのようなエンボリズムと再充填を人為的に発生させ、うち 4 種で、キャビテーション抵抗性が大きく低下すること示した。またその原因がエンボリズムと再充填の過程で生じた道管相互間の壁孔壁の緩みや損傷であると考察した。このようなエンボリズムと再充填を起こした道管において道管相互間の壁孔壁が損傷していることを直接観察したような事例はない。しかし、生体内でエンボリズムを起こしていると判断される領域にある道管相互間の壁孔壁は、一度もエンボリズムを起こしていない

道管にある道管相互間の壁孔壁に比べて、薄く、空隙率が高いことが明らかにされている (Hillabrand et al. 2016; Kotowska et al. 2020)。

また先に述べたイオン効果について (1.3.1 を参照)、その通水度の変動率の大きさが試料を採取した季節によって異なることが報告されている (Gascó et al. 2007)。この現象は、Gascó et al. (2007) が調べた 3 樹種すべてで見られたが、とりわけゲッケイジュ (*Laure nobilis* L.) においては、夏に採取された試料で 20% 程度の変動率であったものが、冬の試料では 110% もの変動率を示したという。またこの通水度変動率の変化は、採取時期の最低気温の変化によく対応したと報告されている。イオン効果が道管相互間の壁孔壁に生じていることを鑑みると、この現象は、季節的に応じた生理学的な反応によって壁孔壁の化学的性質が変化していることを示唆するものといえる。

このような道管相互間の壁孔壁の二次的变化の中でも、とりわけ古くから認識されているながら、精力的な解析がおこなわれていないのが、顕微鏡的に観察される壁孔壁の被覆物 (pit incrustation, incrusting materials) の存在である。道管相互壁孔の壁孔壁を電子顕微鏡下で観察した諸研究では、壁孔壁の表面を覆うように堆積する様々な形態の物質が報告されている (Schmid & Machardo 1968; Kininmonth 1972; Thomas 1976; Wheeler 1981, 1982, 1983; Wheeler & Thomas 1981; Sano 2004, 2005; Pesacrete et al. 2005; Plavcová et al. 2011; Hillbrand et al. 2016)。これらの一部は、心材を観察したことが明記されており、柔細胞から拡散する心材成分が沈着した結果であると考えられる (Kininmonth 1972; Wheeler 1981, 1982, 1983; Wheeler & Thomas 1981)。このような心材において壁孔壁に堆積する被覆物の成分については、多くの針葉樹や (Bauch & Berndt 1973; Thomas 1975; Sano & Nakada 1998)、広葉樹であるヤチダモ (*Fraxinus mandshurica* Rupr.; Sano & Fukazawa 1994) において、フェノール成分を含んでいることが分かっている。一方、辺材において観察される種々の被覆物については、その堆積過

程や成分、分布など基本的な事がほとんど調べられていない。その形態や性質は、様々であり、エタノール処理で除去されるもの (Pesacrete et al. 2005; Sano 2004, 2005) や季節的に応じた存否変化がみられるもの (Wheeler et al. 1983)、粒状の表面性状をしたもの (Plavcová et al. 2011) などがある。これらは明らかに生立木において水分通導がおこなわれている辺材外層の領域でも確認されていることがあり、樹木の水分生理の理解に重要と考えられる。特に先に示したイオン効果 (1.3.1 を参照) の発生原理や air-seeding 理論の矛盾点 (1.3.2 を参照) といった未解明事項に対して、道管相互間の壁孔壁に堆積する被覆物に関する知見が有用な情報をもたらすことも期待される。また、マテリアルとしての木材において、心材成分を含まない辺材は一般に耐朽性能に劣っており、その利用に際した防腐剤等の薬剤注入は心材部よりも重要度が高い。このような薬剤注入に、壁孔に堆積する被覆物が影響することもかねてより指摘されている (Thomas 1976)。

1.5 本論文の目的と構成

以上の背景を受けて、本研究では、広葉樹の辺材部の道管相互間の壁孔壁に確認されている種々の被覆物に関する解析をおこなった。先に示した通り、これらの被覆物に関しては、ほとんど分析が進んでおらず、その成分、堆積過程、機能特性に至るまでほとんどことが未解明である。またそれぞれの被覆物がどのような樹種で発生するのかについても、植物生理生態学、植物分類学、さらには木材利用の観点からも重要であるが、まとまった知見が得られていない。

そこで、本研究では、広葉樹の辺材部の道管相互壁孔に発生する被覆物の実態を明らかにすることを目的とし、2種類の被覆物を対象に、その成分や堆積過程、それを有する樹種などの基礎知見を収集した。その分析には、電子顕微鏡的な構造観察とともに、組織染色や紫外顕微分光分析、飛行時間型二次イオン分析（Time-of-flight secondary ion mass spectrometry; TOF-SIMS）といった組織化学的解析手法を多く取り入れた。また凍結技法を併用することで、化学成分の分布を採取時点の状態で固定したインタクトな試料を解析することも、本研究において重要な役割を果たした。

本論文では、続く2章と3章において、本研究で取り扱った2種類の被覆物に関するそれぞれの解析結果を示す。第2章では、シナノキをはじめ、シラカンバ（Sano 2004）やオノエヤナギ（Sano 2005）などで観察されている有機溶媒に可溶な被覆物を「シナノキ型被覆物」と称し、その実態を明らかにする。第3章では、トネリコ属樹種で報告されている季節に応じて消長する被覆物を「トネリコ型被覆物」と称し、その構造や成分を解析する。最後に4章で本研究の成果を総括するとともに、今後の被覆物研究に関する展望を述べる。

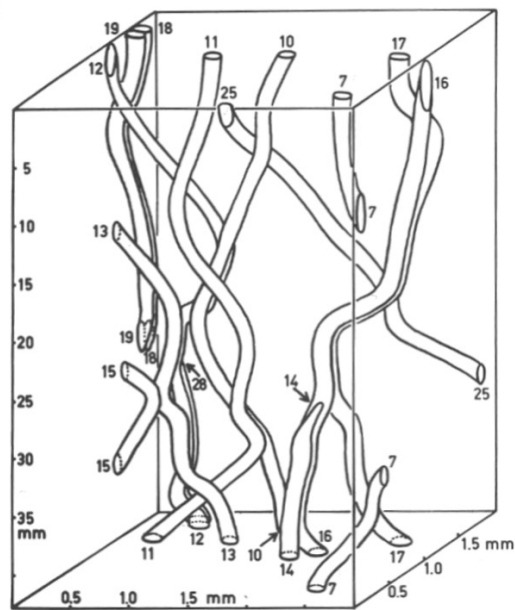


Fig. 1-1. Reconstructed vessel network of *Cedrela fissilis* Vell. Referred from Zimmermann & Brown (1971).

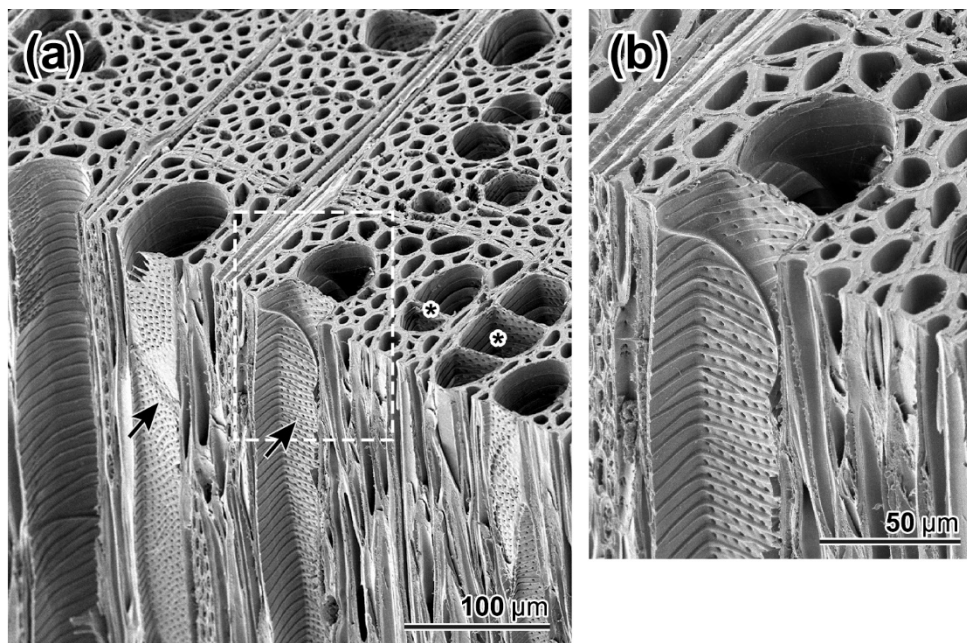


Fig. 1-2. SEM images of *Juglans mandshurica* Maxim. var. *sachalinensis* (Komatsu) Kitam. Asterisks, vessel multiples; arrows, intervessel pit areas. An intervessel pit area designated by a white box in image 'a' is enlarged in 'b'.

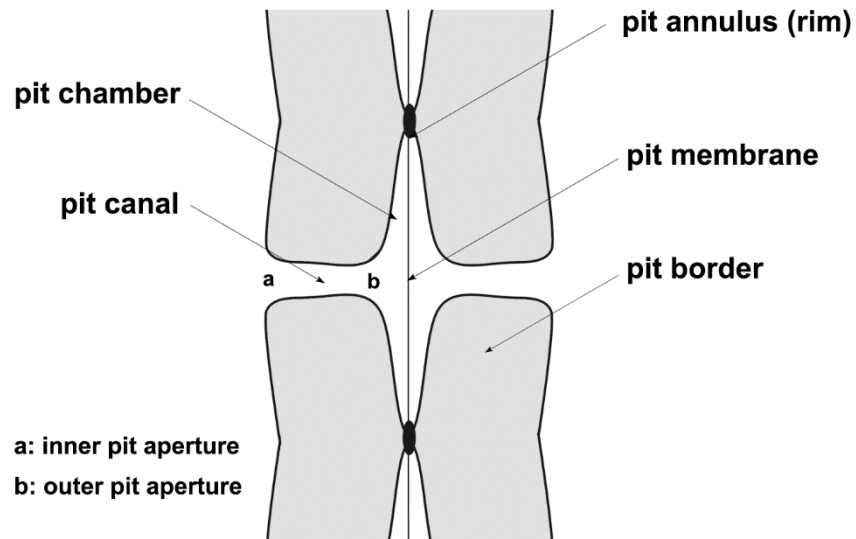


Fig. 1-3. Schematic image of an intervessel pit in the cross-sectional view.

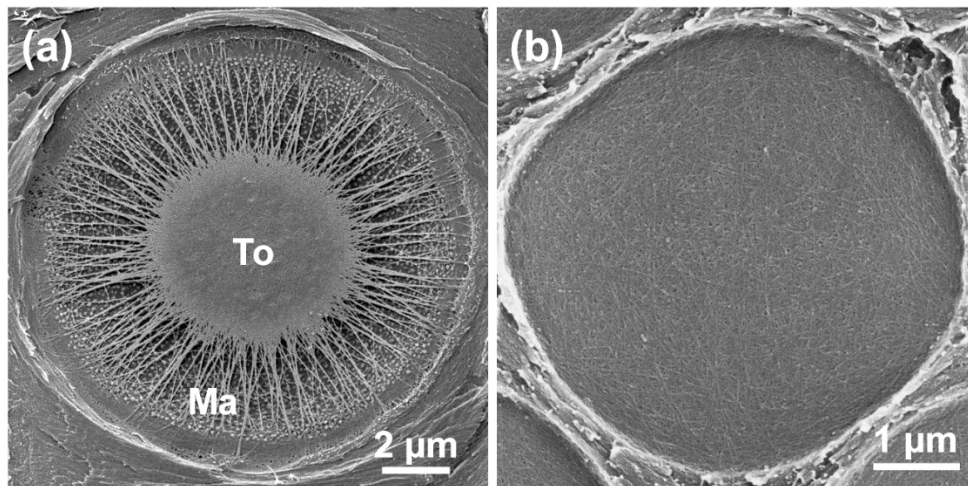


Fig. 1-4. SEM images of intertracheary pit membranes. (a) An intertracheid pit membrane of a conifer (*Cryptomeria japonica* (L.f.) D.Don). To, torus; Ma, margo. (b) An intervessel pit membrane of an angiosperm (*Fraxinus mandshurica* Rupr.). Provided from Prof. Sano.

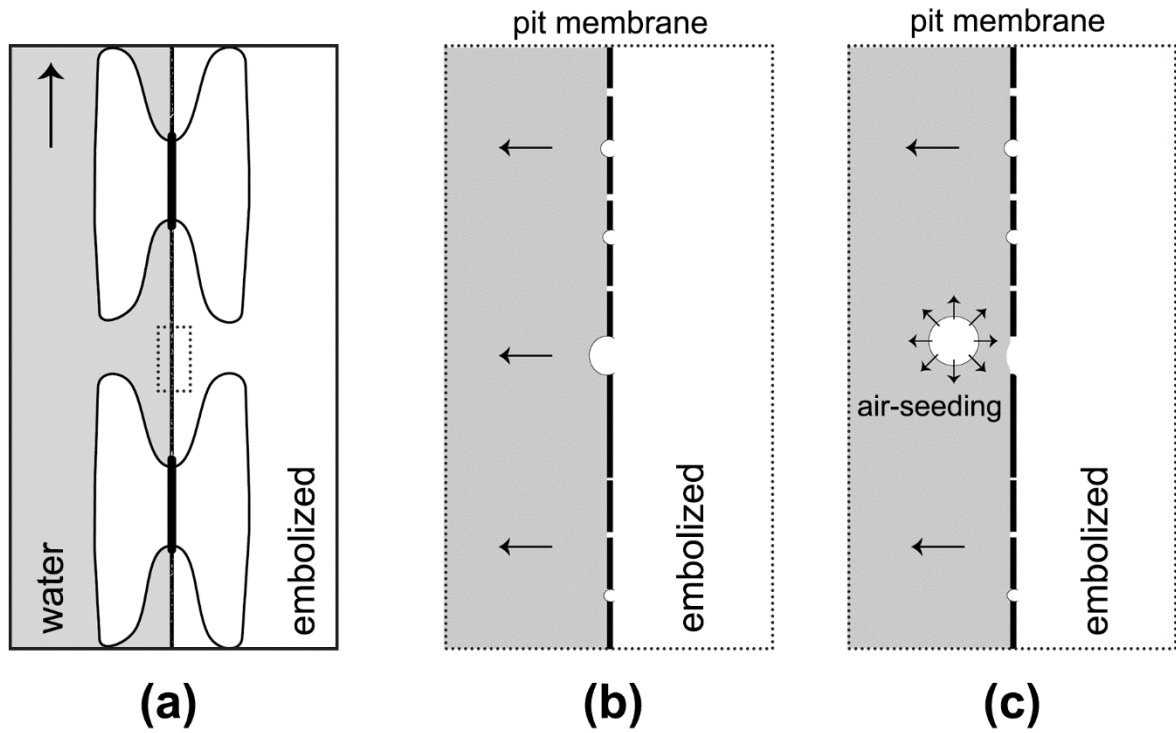


Fig. 1-5. Schematic images indicating mechanisms of typical air-seeding. (a) An intervessel pit between a water-conducting vessel and embolized one. (b) A part of pit membrane of 'a' in the case that the water tension increases to the threshold pressure. (c) A part of pit membrane of 'a' in the case that the water tension is lower than the threshold pressure, immediately after air-seeding occurred.

第 2 章 有機溶媒に溶出するシナノキ型被覆物

2.1 はじめに

Sano (2004, 2005) は、シラカンバ (*Betula platyphylla* Sukaczew var. *japonica* (Miq.) H. Hara) やオノエヤナギ (*Salix sachalinensis* F.Schmidt; 現在の学名は *S. udensis* Trautv. Et C.A.Mey.) の道管相互間の壁孔壁を電界放出形走査電子顕微鏡 (Field emission scanning electron microscope; FE-SEM) で観察した際に、有機溶媒を介さずに生材試料をそのまま凍結乾燥させた場合に限って、不定形の被覆物が生じていることを報告した。エタノールに溶媒置換してから気乾させた試料では観察されないことから、Sano (2004, 2005) は、この被覆物を ethanol-soluble material (エタノールに可溶な物質) と記載している。一方、同じく凍結乾燥させた試料であっても、ヤチダモ (*Fraxinus mandshurica* Rupr. var. *japonica* Maxim.; 現在の学名は *F. mandshurica*) やイタヤカエデ (*Acer mono* Maxim.; 現在の学名は *Acer pictum* Thumb. subsp. *mono* (Maxim.) H. Ohashi) では観察されないため、この被覆物は樹種に依存して生じることが示された (Sano 2005)。

その後、同類の被覆物に関する報告例は専門学術雑誌に見られないが、北海道大学農学部の卒業研究 (鵜野 2014) は、様々な分類群に属する広葉樹 14 種を対象に、凍結乾燥試料の道管相互壁孔を観察し、シラカンバやオノエヤナギのほか、ドロノキ (*Populus suaveolens* Fisch.)、シナノキ (*Tilia japonica* (Miq.) Simonk.) やオニグルミ (*Juglans mandshurica* Maxim. var. *sachalinensis* (Komatsu) Kitam.) の 5 樹種で同様の被覆物が存在することを明らかにしている。このなかで、シナノキは当該被覆物が顕著に堆積する樹種の 1 つであり、先行研究 (鵜野 2014) でもシナノキを中心に据えて種々の分析と議論が進められた。そのため報告の先行性に関係なく、本論文では当該被覆物をシナノキ型被覆物と称する。

シナノキ型被覆物が堆積していると、壁孔壁のフィルター膜状のテクスチャが不明瞭になり、堆積量が多い場合は全く観察できなくなる。壁孔道や孔口にも明らかな堆積がみられ、道管相互壁孔の孔隙に面した壁面全体を覆っている。またシナノキ型被覆物は、観察試料の作製中におこなう面出しによって新たに露出する壁孔周囲の道管細胞壁の破断面も明らかに覆っている (Sano 2004, 2005)。このことは壁孔内部にあった被覆物が、面出し後に露出した壁面に流れ出たことを示しており、シナノキ型被覆物が常温下で高い流動性をもつことを示す。加えて、シナノキ型被覆物と類似の性状をしたエタノールに可溶な被覆物が、道管の内腔側の壁面やせん孔板、放射柔細胞の内部や細胞壁でも観察されている (Sano 2004, 2005)。

シナノキ型被覆物が観察されるのは、有機溶媒への置換を全くおこなわず、含水状態からそのまま気乾、あるいは凍結乾燥させた試料である。エタノールやヘキサンで処理した試料では観察されないため (Sano 2004, 2005; 鶴野 2014)、シナノキ型被覆物は種々の有機溶媒に溶出する性質を持つことがわかる。一方、一度乾燥させた試料の観察面を念入りに水で洗浄しても堆積状態にほとんど変化がないため (鶴野 2014)、シナノキ型被覆物は、水には溶出しない疎水的な物質であることが予想される。このような疎水的な物質が道管相互間壁孔に存在することは、植物の水分通導において極めて不利な状態といえる。なぜならば、これらは明らかに通水の抵抗となると考えられるうえ、疎水性物質と水との界面では、容易にキャビテーションが発生しうるためである (Tyree & Zimmermann 2002)。しかしながら、シナノキ型被覆物が実際にどのような成分を含んでいるのか、また壁孔を通じた木部組織の水分通導に何らかの影響を及ぼすものなのかは明らかにされていない。

そこで、本章では、このシナノキ型被覆物の成分や実態を解明することを目的とした。

2.2 節では、広範な分類群から選んだ様々な広葉樹の道管相互壁孔を FE-SEM で観察す

ることシナノキ型被覆物を堆積させる樹種を探索し、それらに共通する特性を検討した。またここでは、シナノキ型被覆物の分布特性や溶媒への溶出性といったシナノキ型被覆物の基本的な性質についても調べた。2.3 節では、シナノキ型被覆物の成分を明らかにするためにおこなった化学分析の結果を示す。ここでは、はじめにガスクロマトグラフィ・質量分析 (Gas chromatography-mass spectrometry; GC-MS) による抽出物の成分分析から被覆物の成分を絞り込み、さらに飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) を用いて、道管相互壁孔における候補物質の分布を確かめた。最後に 2.4 節では、採取時から凍結を維持した試料を分析する凍結技法を用いて、シナノキ型被覆物のインタクトな分布を明らかにした。2.5 節では以上の結果を総括することでシナノキ型被覆物の実態に迫り、さらにその知見に関する今後の展開について述べる。

なお、本章の内容は、既に専門の学術雑誌で発表している (Yamagishi et al. 2021)

2.2 シナノキ型被覆物が観察される樹種の探索

2.2.1 本節の目的と手段

本節では、シナノキ型被覆物を観察される樹種を広範な被子植物系統において探索し、それらに共通する特性を明らかにすることを目的とする。シナノキ型被覆物の存否は、凍結乾燥させた試料とエタノール処理した試料を FE-SEM で比較観察することで調べた。本節では、シナノキ型被覆物が観察される樹種に共通する特性をより多くの事例から考察するために、同講座の卒業生らがおこなった未公表の先行研究（鵜野 2014, 佐野による未発表のデータ）の成果も明記した上でとりまとめて扱う。

2.2.2 材料および方法

2.2.2.1 植物材料

22 科 34 属 40 種の広葉樹について、2 年輪以上の木部を含む通直な枝または幹を、北海道を中心に日本国内各所で採取した (Table 2-1)。採取する樹種は、モクレン類からキク類まで被子植物の多様な分類群から選んだ。オニグルミ、シラカンバ、オノエヤナギ、トチノキ (*Aesculus turbinata* Blume)、シナノキでは、季節や採取地、採取部位を変えながら複数個体を採取した。採取した枝片や幹片は、乾燥を防ぐため、水で濡らしたペーパータオルとともにポリ袋に密封した状態で実験室に持ち帰った。すぐに処理しない場合は、最大 1 週間、冷蔵庫 (4℃) に保存した。またサンプルの一部を 30%エタノールに液浸保存し、エタノールで処理する試料に限り、1 週間以上の長期保存をしたこの液浸サンプルを用いる場合があった。

2.2.2.2 FE-SEM による観察

採取した各樹種の枝片・幹片を、乾燥や汚染を避けるために超純水（Milli-Q, Merck Millipore）で洗浄しながら、カミソリ刃等を用いてトリミングし、観察面（板目面または柾目面）が 5 mm 角程度となるような小ブロックとした。得られた小ブロックの一部は、液体窒素に浸漬して凍結させた後、成分を溶出させないように凍結乾燥装置（FDU-2200, Eyela）を用いて 5 時間程度乾燥させた（凍結乾燥試料）。残りの小ブロックは、エタノールシリーズ（30–50–70–90–100–100–100%）で脱水させた後、そのまま外気にさらして気乾させるか、臨界点乾燥装置（EM CPD300, Leica）の自動設定（CO₂ 注入速度 fast; 注入後ディレイ 120 秒; 置換速度 5; 置換回数 12; 臨界点への加熱速度 med.; ガス排出速度 med.）で臨界点乾燥させた（エタノール処理試料）。

各試料について、実体顕微鏡で木口面を観察し、形成層から 5 年輪目までの範囲で複合道管が特に多く含まれる位置を特定した。この位置にカミソリ刃を食い込ませ、刃を返して割り開くことで、道管相互間の壁孔壁が多く露出した観察面を得た。ミズナラ（*Quercus crispula* Blume）やカシワ（*Quercus dentata* Thunb.）、ノリウツギ（*Hydrangea paniculate* Siebold）、イワガラミ（*Schizophragma hydrangeoides* Siebold et Zucc.）、カンボク（*Viburnum opulus* L. var. *sargentii* (Koehne) Takeda）といった道管の孤立性が極めて高い樹種については道管近辺を狙って割り開き、道管・仮道管間の壁孔壁を露出させるようにした。環孔材の板目面を得る場合は、孔圏と孔圏外のそれぞれで観察面を出した。ここで、シナノキ型被覆物のヘキササン処理による変化を観察するため、シナノキとアメリカトチノキ（*Aesculus glabra* Willd.）について、観察面を露出させた凍結乾燥試料を、数日間ヘキササンに浸漬した状態で静置するか、30 分間超音波処理し、その後に外気にさらして再乾燥させた（ヘキササン処理試料）。

すべての試料は、割り開いてできた断面のペアを同時に観察できるように同じアルミニウム製 SEM 試料台に並べ、カーボンペースト (Colloidal Graphite, TED PELLA) で接着した。これに真空蒸着装置 (JEE-4X, JEOL) を用いて回転蒸着法による白金の真空蒸着を施し、FE-SEM (JSM-6301F, JEOL) を用いて、加速電圧 2.5 kV、作動距離 8～39 mm で観察した。

凍結乾燥試料で観察され、エタノール処理試料では観察されない不定形の物質による管状要素間壁孔（すなわち道管相互壁孔と道管・仮道管間壁孔）への被覆をシナノキ型被覆物と判断した。シナノキ型被覆物の堆積範囲を調べるために、管状要素間の壁孔壁だけでなく、道管や木部繊維の細胞壁内表面、せん孔板、放射組織や軸方向柔組織の内容物、道管・柔細胞間壁孔、細胞壁の破断面なども詳しく観察した。

2.2.3 結果

観察した樹種（22 科 34 属 40 種）におけるシナノキ型被覆物の存否を Table 2-1 に示した。また観察中に撮影した画像を Fig. 2-1～Fig. 2-3 に示した。クスノキ (*Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl, クスノキ科)、オニグルミ (クルミ科)、サワグルミ (*Pterocarya rhoifolia* Siebold et Zucc., クルミ科, Fig. 2-1a)、シラカンバ (カバノキ科)、ドロノキ (ヤナギ科)、交雑ポプラ (*Populus tremula* L. × *P. alba* L., ヤナギ科)、オノエヤナギ (ヤナギ科, Fig. 2-1b)、トチノキ (ムクロジ科)、アメリカトチノキ (ムクロジ科, Fig. 2-1g)、シナノキ (アオイ科, Fig. 2-2a)、カンボク (レンプクソウ科, Fig. 2-1c) の 11 樹種でシナノキ型被覆物が観察された (Table 2.1)。クルミ科とヤナギ科では、シナノキ型被覆物が観察したすべての樹種で確認された。一方、クスノキ科ではオオバクロモジ (*Lindera umbellata* Thunb. var. *membranacea* (Maxim.) Momiy.)、カバノキ科ではウダイカンバ (*Betula maximowicziana* Regel)、ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*

(Spach) Turcz.)、サワシバ (*Carpinus cordata* Blume)、アサダ (*Ostrya japonica* Sarg.)、ムクロジ科ではイタヤカエデなど、シナノキ型被覆物が観察された樹種の同科あるいは同属の樹種でシナノキ型被覆物が観察されない例も多くみられた。シナノキ型被覆物が観察された樹種では通常、すべての管状要素間の壁孔壁に被覆が見られたが、カンボクでは一部の壁孔壁に被覆が見られなかった。オニグルミ、シラカンバ、オノエヤナギ、トチノキ、シナノキの複数個体を比較した限りでは、シナノキ型被覆物の存否や見た目に季節、採取地、採取部位による明確な差は見られなかった (Table 2-1)。被覆物の見かけ上の堆積量は、観察試料ごとに差が見られたが、特にシナノキとアメリカトチノキでは、どの試料でも比較的厚い被覆が見られ、多量の被覆物が堆積していることが示唆された (Fig. 2-1g, Fig. 2-2a)。

先行研究 (Sano 2004, 2005) でも指摘があるように、シナノキ型被覆物は、試料作製時に観察面を割り開いたときにはじめて露出する細胞壁の破断面にも及んでおり、さらにその他の木部組織の細胞壁面にもエタノール処理で消失する類似した性状の不定形の被覆物が広がっていた。これらのシナノキ型被覆物に類似する不定形の被覆物は、道管や木部繊維の二次壁の破断面 (Fig. 2-3a,c,e)、柔細胞の破断面 (Fig. 2-3g) に認められ、さらに、シナノキ型被覆物が多量に堆積していたシナノキやアメリカトチノキでは、道管の内腔側の細胞壁面にも堆積していることが明らかであった (Fig. 2-3e)。またシナノキ型被覆物の存否に関わらず、すべての樹種で軸方向柔細胞ないし放射柔細胞の中に、エタノール処理試料では観察されない不定形の物質が観察された (Fig. 2-3h)。

シナノキとアメリカトチノキにおいて作製したヘキサン処理試料では、凍結乾燥試料よりもシナノキ型被覆物の量が明らかに少なかった (Fig. 2-2c,d)。凍結乾燥した試料をヘキサンに浸漬させただけの試料では、壁孔壁のセルロースマイクロフィブリルや、その周囲の細胞壁破断面にある微細繊維状の毛羽立ちが不明瞭であることから、被覆物が残

存していると判断された (Fig. 2-2c)。一方、ヘキサンの浸漬させた状態で超音波処理した試料では、エタノール処理試料と同様に道管相互間の壁孔壁のセルロースマイクロフィブリルや細胞壁破断面の毛羽立ちが明瞭に観察されたことから、シナノキ型被覆物の大部分が除去されていると判断された (Fig. 2-2d)。凍結乾燥試料において、道管相互間の壁孔壁以外の領域で観察されたシナノキ型被覆物に類似する不定形の被覆についても、ヘキサン処理試料では堆積量が減っているように見えた。一方、軸方向柔細胞および放射柔細胞の内容物として観察された不定形の被覆については、超音波処理した試料であっても明らかに残存していた (Fig. 2-3i,j)。

2.2.4 考察

2.2.4.1 シナノキ型被覆物が観察される樹種の共通特性

本研究においてシナノキ型被覆物が確認された樹種は、現行の APG 分類体系 (APG 2016) における 3 つの主要な分類群のいずれからも見出された。すなわちクスノキはモクレン類 (magnolids)、オニグルミ、サワグルミ、シラカンバ、ドロノキ、交雑ポプラ、オノエヤナギ、トチノキ、アメリカトチノキ、シナノキはバラ類 (rosids)、カンボクはキク類 (astelids) に該当する (Table 2-1)。一方、クスノキ科やカバノキ科、ムクロジ科では、同科あるいは同属の樹種で堆積物の存否が一致しなかった (Table 2-1)。特にシラカンバとウダイカンバは、同じカバノキ属で非常に近縁な樹種どうしであるにもかかわらず、シナノキ型被覆物の存否が異なった。このように被子植物の系統分類の広範囲にわたって該当樹種が見出されること、また、近縁な樹種であっても存否が一致するとは限らないことから、シナノキ型被覆物は植物の系統関係とは無関係に発生するものであることが示唆される。シナノキ型被覆物が観察された樹種では、個体や観察試料によって量の多少は見られるが、採取地や季節に関係なくおおむね一貫して被覆物が堆積

していた。したがって、シナノキ型被覆物は少なくとも種レベルの特徴として捉えることができると考えられる。

本研究においてシナノキ型被覆物が確認された 11 樹種には、主だった系統関係は見られなかったが、その生理学的な特性に 1 つの共通点が見られた。これらの 11 樹種の多くが、樹木生理学において古典的に提唱されていた *fat trees* と呼ばれる樹種群に該当したのである (Kramer & Kozlowski 1960)。*Fat trees* は、とりわけ冬季において木部柔細胞に多量の脂質を貯蔵する樹種群である。その対極に位置するものとしてデンプンを主な貯蔵物質にしているとされる *starch trees* がある。Sinnott (1918) は 300 種に及ぶ樹木について、Sudan III (脂質の染色) とヨウ素液 (デンプンの染色) を用いた組織化学的な分析をおこない、これらが *fat trees* であるか *starch trees* であるか、あるいはその中間的な性質をもつ *intermediate trees* であるかを判別した。その結果は、属レベルに集約されたリストにまとめられている (Sinnott 1918; Kramer & Kozlowski 1960)。この Sinnott のリストによれば、本研究においてシナノキ型被覆物が確認された樹種を含むトチノキ属 (*Aesculus*)、カバノキ属 (*Betula*)、クルミ属 (*Juglans*)、ハコヤナギ属 (*Populus*)、シナノキ属 (*Tilia*)、ガマズミ属 (*Viburnum*) は *fat trees*、ヤナギ属 (*Salix*) は *intermediate trees* に分類される。ただし、本研究でシナノキ型被覆物が認められたクスノキを含むクスノキ属 (*Cinnamomum*) とサワグルミを含むサワグルミ属 (*Pterocarya*) はリストアップされていなかった。また Sinnott (1918) は、同属の樹種であっても貯蔵物質の形態が一致しない場合があることも報告している。例えば、カバノキ属には *fat trees* に該当するものと *intermediate trees* に該当したものと記されている。この Sinnott (1918) が報告した貯蔵物質の属内差は、本研究のシナノキ型被覆物の存否について属内差がみられたことと一致する。一方、Sinnott (1918) のリストにおいて *fat trees* に該当しているキササゲ属 (*Catalpa*) と旧ウルシ属 (*Rhus*) につ

いて、本研究ではキササゲ (*C. ovata* G.Don) とアメリカキササゲ (*C. bignonioides* Walter)、ならびにヌルデ (*R. japonica* L. var. *chinensis* (Mill.) T. Yamaz.) を調べているが、これらではシナノキ型被覆物が確認されなかった。このことは、シナノキ型被覆物と fat trees が完全には対応しないことを示しているが、先述のように、同属であってもシナノキ型被覆物の存否が異なることあるため、これらの属の他の樹種をさらに調査すれば、シナノキ型被覆物を有する樹種が見つかる可能性はあるだろう。全体として、シナノキ型被覆物を発生させる樹種は、おおむね fat trees に該当する樹種と一致していると考えられる。

2.2.4.2 シナノキ型被覆物の諸特性

シナノキ型被覆物はヘキサン処理によって明らかに減少したことから (Fig. 2-2c,d)、ヘキサンに可溶であることが示唆される。鵜野 (2014) は、既にこのことをシナノキで示していたが、本研究では新たにアメリカトチノキにおいても同様であることを確認した。このことから、FE-SEM 下でシナノキ型被覆物として観察される物質は、共通してヘキサンに可溶な成分を多く含む可能性があると考えられる。また本研究では、鵜野 (2014) と同じく一度凍結乾燥させた試料をヘキサンに数日間浸す処理に加え、同様の試料をヘキサンに浸した状態で超音波処理するという、より強力な洗浄手順も試みた。その結果、前者では少なからず残存していたシナノキ型被覆物が (Fig. 2-2c)、後者ではエタノール処理試料と同様にほぼ完全に除去されており (Fig. 2-2d)、シナノキ型被覆物がヘキサンに可溶であることを明示できた。ここで、エタノール処理では浸漬だけで被覆物が除去されたのに対し、ヘキサン処理では浸漬だけではシナノキ型被覆物が除去しきれなかったのは、シナノキ型被覆物の各溶媒に対する溶解性の違いというよりも、各処理のプロセスの違いが影響していると考えられる。すなわち、エタノール処理では

一度も乾燥させずに水からエタノールに置換しているが、ヘキサン処理の場合は溶媒を処理する前に試料を一度凍結乾燥していた。このように事前に乾燥させたのは、ヘキサンと水が混和しないためであるが、この乾燥によって一度試料から水という溶媒が失われることは、試料中の化学成分の性質に何らかの変化を生じさせたと予想される。特に化学物質の分子内あるいは分子間結合の状態は、溶媒の種類や存否によって大きく変化するため、乾燥によって被覆物が細胞壁から除去されにくい状態になっていた可能性は十分に考えられる。実際、一度凍結乾燥させた試料に対する処理では、エタノールであっても浸漬だけではシナノキ型被覆物を除去できなかった（データ掲載せず）。したがって、本実験結果から、シナノキ型被覆物の各溶媒に対する溶解性の違いを議論することは避けたい。

シナノキ型被覆物が確認された樹種では、道管や木部繊維、柔細胞の破断面、あるいは道管の内腔側の細胞壁面で、シナノキ型被覆物と同様にエタノールやヘキサンによる処理で除去される不定形の被覆物が観察された（Fig. 2-3）。先行研究で既に示され（Sano 2004, 2005）、また本研究でも確認されたように、シナノキ型被覆物は、観察面を出すために試料を切断したときにはじめて露出する細胞壁の破断面に被覆が広がっている（Fig. 2-1g, Fig. 2-2a, Fig. 2-3a,c）。このことは、シナノキ型被覆物が常温下で高い流動性をもつことを示唆する。それゆえに、管状要素間の壁孔壁周辺以外に見られる不定形の被覆物についても、シナノキ型被覆物と成分や由来が同じものである可能性が高い。一方、このことは、本節の実験によってシナノキ型被覆物の本来の分布を示すことができていないことを意味する。シナノキ型被覆物の自然状態におけるインタクトな分布については、本章 2.4 節で詳しく検討する。

凍結乾燥試料で軸方向柔細胞や放射柔細胞の中に観察された不定形の物質については、他の部位で見られる不定形の被覆物と違って、超音波処理であってもヘキサン処理で除

去されなかった (Fig. 2-3i,j)。ゆえに柔細胞中にある不定形の物質には、シナノキ型被覆物とは異なる物質が含まれていると考えられる。

2.3 シナノキ型被覆物の成分分析

2.3.1 本節の目的と手段

本節では、シナノキ型被覆物の成分を明らかにすることを目的とする。シナノキ型被覆物の成分については、鵜野（2014）が組織染色や紫外顕微分光分析によるアプローチによって取り組んだ例があるが、明確な結論は得られなかったと報告している。そこで本研究では、まずシナノキ型被覆物が溶解するヘキサンによる抽出で得られる抽出物の成分分析と、TOF-SIMS による成分分布の解析を組み合わせることで、シナノキ型被覆物の構成成分を明らかにすることを試みた。

2.2 節の結果から、シナノキ型被覆物の存否や堆積量が異なる 3 樹種（シナノキ、オノエヤナギ、イタヤカエデ）を選択し、それぞれの辺材からヘキサン抽出物を得た。これを GC-MS で解析して、その結果を比較し、シナノキ型被覆物を有する樹種に特徴的な成分を絞り込んで、それをシナノキ型被覆物に含まれる成分の候補とした。

次にシナノキ型被覆物を多量に堆積させるシナノキを対象に、被覆物の候補となる成分の局在を TOF-SIMS で解析した。TOF-SIMS は、 Au_n^+ や Bi_n^+ といった金属一次イオンを試料に衝突させることで、試料表面に存在する成分から二次イオンを飛散させ、これを飛行時間で分離して質量分析をおこなう手法である。表面成分に由来する二次イオンは、試料表層の深さおよそ数 nm の範囲から高感度で得られるため、試料の表面成分の解析ができる。また飛行時間型分析器は、広範囲の分子量の二次イオンを同時に検出できるため、多様な無機・有機成分が混在している生物試料の分析に適する（青木ら 2016）。最大の特徴として、試料表面において、検出された二次イオンの位置情報を記録することができ、これによって関心のある二次イオンの局在を示すケミカルマップを作製することができる。その空間分解能は、数 μm 程度であるため、道管相互壁孔の分析

も十分に可能であるといえる。この TOF-SIMS による分析は、名古屋大学森林化学研究室との共同研究として実施した。

2.3.2 材料および方法

2.3.2.1 植物材料

ヘキサン抽出とその成分分析に供する材料として、北海道大学苫小牧研究林に生育するシナノキとイタヤカエデ、ならびに北海道大学札幌研究林に生育するオノエヤナギの成木を1個体ずつ採取した (Table 2-2)。2.2 節で示したように、FE-SEM による観察では、シナノキとオノエヤナギではシナノキ型被覆物が確認され、イタヤカエデでは確認されなかった。またシナノキは FE-SEM で観察した限り、特にシナノキ型被覆物が多量に堆積していた樹種の1つであった。それぞれの供試木を伐倒し、得られた丸太の節のない部分から厚さ約 10 cm の円板を数個切り出した。また TOF-SIMS に供する材料として、北海道大学苫小牧研究林に生育する別個体のシナノキの成木 (Table 2-2) から、同様の円板を採取した。これら全ての円板は、乾燥しないようにポリ袋に入れて実験室に運搬し、すぐに後の処理に供した。

2.3.2.2 ヘキサン抽出物の GC-MS 分析

シナノキ、イタヤカエデ、オノエヤナギの各樹種の円板を鉋で割り、心材部を取り除いた。残った辺材部はさらに細かく割り、断面が約2 cm角の角棒 (2×2×10 cm) に整形した。これらの角棒は室温下で重量変化がなくなるまで乾燥させた後、剪定ばさみでさらに細かなチップにしてから電動ミルにかけて木粉とした。収率計算に用いる含水率を測るため、得られた木粉のうち2 gを検体として量り取り、105℃のオーブンに一晩かけて絶乾させ、乾燥後の重さを秤量した。三角フラスコに入れた残りの木粉 (シナノキ

は463 g、イタヤカエデおよびオノエヤナギは20 g) はヘキサンに浸漬させ、超音波洗浄機による抽出処理を、1時間ごとに液を交換して計3時間おこなった。回収された抽出液はろ過してごみを取り除いてからロータリーエバポレーターで濃縮乾固させた。

各樹種から得られたヘキサン抽出物から1.0 mgを分取し、それぞれに*N,O*-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド1 mLを添加してサンプルをトリメチルシリル化(TMS化)させた。この溶液からマイクロシリンジで1 μ Lを分取し、キャピラリーカラム(TC-5, GL Sciences,; カラム長, 30 m; 内径 0.25 mm; 膜厚 0.25 μ m) を取り付けたGC-MSシステム(GC-2010/QP-2010 system, Shimadzu) に打ち込んで分析した。キャリアガスはヘリウムとした(1.09 mL/min)。インジェクションユニットは250°Cとし、カラムオーブンは70°Cから100°C(11.5°C/min)、100°Cから290°C(24.5°C/min)で推移させたのち、290°Cで12分維持した。マススペクトルは、70eVのイオン化エネルギーで*m/z* 40~600で記録した。トータルイオンカラムクロマトグラムで見られた顕著なピークに対して、そのマススペクトルにライブラリリサーチを実施し、該当する化合物を推定した。分析は少なくとも2回おこない、再現性を確かめた。

シナノキの抽出物について、グリセリドの存在を確かめるために、試料のメタノリシスをおこなった。抽出物 10 mg に対して、ナトリウムメトキシド 20 mg、メタノール 3 mL を加え、1 時間室温下で攪拌して反応させた。次にイオン交換樹脂を添加して中和させた後、酢酸を 20 mg 程度加えて酸性化させた。その後、綿栓ろ過をおこない、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した。乾燥させた試料に *N,O*-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド 1 mL を添加し、一晩静置してサンプルを TMS 化させた。このサンプルも同様に、1 μ L をマイクロシリンジで吸い取り、上記と同じ条件で GC-MS システムに打ち込んで分析した。ただし、部品更新のため、上記とは異なるキャピラ

リーカラムを用いた (BPX-5, Shimatzu GLC; カラム長 30.0 m; 内径 0.25 mm; 膜厚 1.00 μm)。

2.3.2.3 TOF-SIMS

採取した円板を割って条片としてから余分な材を取り除き、カミソリ刃でトリミングして6 mm角程度の辺材最外層の小ブロックを複数個得た。続いてこれらの小ブロックを液体窒素で予備凍結させ、凍結乾燥装置 (FDU-2200) で凍結乾燥させた。次にエタノールでよく洗浄したカミソリ刃で小ブロックを割り、板目面方向の分析面を露出させた。出来上がった試験体は、名古屋大学森林化学研究室に輸送し、TOF-SIMS (TRIFT III, Ulvac-PHI) で分析をおこなった。22 keVの Au_1^+ イオンを一次イオンとし、ネガティブイオンスペクトルを1.5 nAの電流値でパルス幅1.4 ns (スペクトル取得用) または8.4 ns (イメージング用) で取得した。二次イオンマススペクトルは、 m/z 0.5~1850の範囲で取得した。イメージの測定範囲は、 $300 \times 300 \mu\text{m}$ または $400 \times 400 \mu\text{m}$ とし、画像サイズは 256×256 pixelとした (空間分解能はそれぞれ1.17 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、1.56 $\mu\text{m}/\text{pixel}$) 測定後、試料の分析範囲をSEM (S-3400N, Hitachi) で観察し、道管相互間の壁孔壁の露出部やその他の組織構造の位置を特定した。一部の試料は測定前に、ソックスレー抽出器を用いてヘキサンで10時間抽出し、シナノキ型堆積物の除去を図った。得られたデータは、専用のソフトウェア (WinCadence 5.1.2.8, Ulvac-PHI) で解析した。

2.3.3 結果

2.3.3.1 GC-MS 分析

シナノキ、オノエヤナギ、イタヤカエデの各樹種の辺材のヘキサン抽出物をGC-MSで分析して得られたトータルイオンクロマトグラムをFig. 2-4に示した。各樹種から得られ

た抽出物の収率は、木粉の乾重量をベースにして、シナノキで1.88%、オノエヤナギで0.24%、イタヤカエデで0.06%であった。各樹種で得られたクロマトグラムでは、2つのピークの集団が認められた。ライブラリリサーチの結果、より短い保持時間の領域で現れたピーク群（保持時間9～12分）は、パルミチン酸やリノール酸といった脂肪酸類のピーク集団であり、より長い保持時間の領域で現れたピーク群（保持時間18～21.5分）は、スチグマステロールや β -シトステロールなどのステロール類のピーク集団であると推定された。イタヤカエデ（Fig. 2-4c）に比べると、シナノキ（Fig. 2-4a）やオノエヤナギ（Fig. 2-4b）では、ステロール類のピークは小さく、特にシナノキではほとんど検出されなかった。ステロール類は植物一般に含まれる成分であるため、このことは、シナノキやオノエヤナギではステロール類のピークが隠れるほどに脂肪酸類が豊富に検出されたことを意味する。収率から単純計算すると、シナノキは、イタヤカエデより少なくとも30倍の脂肪酸を含んでいることが分かる。このことから、シナノキ型被覆物を発生させる樹種（シナノキやオノエヤナギ）は発生させない樹種よりも脂肪酸を多く含むことが特徴であることが示された。

シナノキで検出された脂肪酸類について、上記の分析では、それが遊離した脂肪酸であるのか、グリセリドのようなエステル化脂肪酸であったのかが不明である。そこで、このことを確かめるために、シナノキ辺材から得られたヘキサン抽出物に、メタノール下でのアルカリ加水分解反応を起こし、グリセリドに由来する脂肪酸をメチルエステルとしたうえで、再度分析した。その結果得られたトータルイオンクロマトグラムをFig. 2-5に示す。クロマトグラムの脂肪酸に由来する顕著なピークとして、パルミチン酸のメチルエステル（保持時間 9.21 分）と TMS エステル（保持時間 9.69 分）、リノール酸のメチルエステル（保持時間 10.18 分）と TMS エステル（保持時間 10.80 分）が検出された。グリセリドのアルカリ加水分解に伴って生成するグリセロールは TMS エステル

の状態では保持時間 6.54 分に現れた。メチルエステルはグリセリド由来、TMS エステルは遊離脂肪酸に由来する。ここで、各成分の量比をピーク面積比（分析 2 回の平均値）から推定すると、リノール酸とパルミチン酸では、メチルエステルで 2.71、TMS エステルで 2.39 であり、リノール酸の方が多く含まれることが示唆された。また、各脂肪酸のメチルエステルと TMS エステルでは、パルミチン酸では 3.22、リノール酸では 3.65 でメチルエステルの方が多く含まれることが示唆された。したがって、シナノキのヘキサン抽出物の主成分は、リノール酸を多く含むグリセリドであることが示唆された。

2.3.3.2 TOF-SIMS

GC-MSの結果を踏まえて、シナノキを対象に、脂肪酸に関するTOF-SIMSによる分析をおこなった。得られたTOF-SIMSスペクトルとケミカルマップイメージをFig. 2-6に示した。道管相互間の壁孔壁が露出した壁面を含む分析面について、SIMSスペクトルを計測すると、 m/z 255のパルミチン酸 ($C_{16}H_{32}O_2$, 16:0)、 m/z 279のリノール酸 ($C_{18}H_{32}O_2$, 18:2)、 m/z 281のオレイン酸 ($C_{18}H_{34}O_2$, 18:1) といった脂肪酸 ($RCOO^-$) に由来すると推定されるネガティブイオンが明瞭に検出された (Fig. 2-6a)。各脂肪酸の量比を反映していると考えられるこれらのピークの大きさは、リノール酸が最も大きかった。ケミカルマップイメージを取得したところ、これらのシグナルは細胞の種類に関係なく、細胞壁全体に広がっていることがわかった (例えば、Fig. 2-6f,g)。これらの脂肪酸に由来するシグナルは、道管相互壁孔の壁孔壁や、壁孔室に面した壁孔縁の壁面からも検出されていた (Fig.2-6 i-k)。この道管相互壁孔の領域を、ROI (Region of interest) で指定してスペクトルを取得すると、分析面全体から得られたスペクトルと同様のパターンが得られた (Fig. 2-6b)。これらの脂肪酸に由来するシグナルに加えて、それらと同様の分布パターンを示す m/z 293のシグナルも確認された (Fig. 2-6h)。ヘキサンで処理した試

料では、 m/z 255、279、281の脂肪酸に由来するシグナルが低下した (Fig. 2-6c)。特にリノール酸に由来する m/z 279シグナルは大きく低下していた。また m/z 293のシグナルはヘキサンで処理した試料では、検出されなくなった。

2.3.4 考察

2.3.4.1 シナノキ型被覆物の成分

シナノキ型被覆物が観察されるシナノキおよびオノエヤナギと、観察されないイタヤカエデにおける辺材のヘキサン抽出物の成分を GC-MS で分析し、比較することで、シナノキ型被覆物を発生させる樹種の抽出物には、相対的に脂肪酸が豊富に含まれていることが示唆された (Fig. 2-4)。また、ともにシナノキ型被覆物を発生させるシナノキとオノエヤナギを比較したとき、抽出物の収量やクロマトグラムのパターンから明らかにシナノキの方が豊富に脂肪酸を含んでいることが分かった (Fig. 2-4a,b)。このことは、2.2節の観察の際に、シナノキにおける被覆物の堆積量が、他の樹種と比べると豊富であったことに対応すると考えられる。これらを総合的に判断すると、シナノキ型被覆物が脂肪酸を含んでいる可能性は高いと考えられた。

そこで、シナノキの道管相互間の壁孔壁に脂肪酸が分布しているかどうかを TOF-SIMS で調べた (Fig. 2-6)。TOF-SIMS 測定において、脂肪酸の標準物質が [分子量(M)-H]イオンとして高感度に検出できることは既に報告されており (Kleen et al. 2003)、その検出は問題なく可能であった。測定の結果、シナノキの道管相互間の壁孔壁から脂肪酸に由来するシグナルが豊富に検出された (Fig. 3-6a,b)。さらに、これらのシグナルはヘキサンで処理した試料では、明らかに低下したことから (Fig. 3-6c)、シナノキ型被覆物の性質と一致するといえる。これらの TOF-SIMS による測定結果は、シナノキ型被覆物の主成分として脂肪酸が含まれることを強く支持するものと判断される。

シナノキに含まれる脂肪酸の多くは、グリセリドの形態で存在していることが示された (Fig. 2-5)。この傾向は、同属のフユボダイジュ (*Tilia cordata* Mill.; Höll & Priebe, 1985)、カバノキ属のキハダカンバ (*Betula lutea* Michx.; Clermont, 1961) やオウシュウシラカンバ (*Betula pendula* Roth; Piispanen & Saranpää, 2004) のほか、多くの広葉樹でも報告されており、妥当であるといえる。また、GC-MS の結果も TOF-SIMS のスペクトルも、シナノキの脂肪酸の多くがリノール酸であることを示した (Fig. 2-4a, Fig. 2-5, Fig. 2-6a,b)。このことは、シナノキに含まれるグリセリドにリノール酸が多く含まれていることを示唆する。Fig. 2-5 のトータルイオンクロマトグラムで検出されているグリセリド由来の脂肪酸のピークは、ほとんどがリノール酸メチルエステルとパルミチン酸メチルエステルであったが、両者の量比をピーク面積から計算すると 2.71 であった。このことは、仮にグリセリドがすべてトリグリセリド (脂肪酸が 3 つ結合したグリセリド) と想定すると、トリリノレイン (リノール酸 3 つで構成されたトリグリセリド) が相当量存在していることを示す。グリセリドは構成する脂肪酸の不飽和度によって物性が異なり、一般に不飽和脂肪酸が多い方が粘性も凝固点も低い。不飽和脂肪酸であるリノール酸で構成されたトリリノレインは、常温で液体の物質であり、高い流動性をもつシナノキ型被覆物の性質と一致するといえる。

一方、TOF-SIMS では、 m/z 255、279、281 といった脂肪酸に由来するシグナルと同じ分布で、 m/z 293 の二次イオンも顕著に検出された。仮にこれが脂肪酸であるとする、組成式は $C_{19}H_{34}O_2$ となるが、炭素数が奇数となる脂肪酸は、原則として天然では存在しないため、これが脂肪酸である可能性は低い。有力な候補となる化合物としては、オキソオクタデカジエン酸やヒドロキシオクタデカジエン酸のような脂肪酸の酸化物が挙げられる ($C_{18}H_{30}O_3$)。実際、植物由来の成分に関する質量分析で m/z 293 に相当するものにこれらが挙げられている例がある (Ludovici et al. 2014; Jiménez-Sánchez et al.

2016)。このような脂肪酸の酸化物がグリセリドと混在していることは、十分にあり得ることであると考えられる。また可能性としては、 $C_{20}H_{38}O$ で表されるようなフィトール関連物質が挙げられるが、ヘキサン抽出物の GC-MS 分析でそのような物質は検出されていない。

以上をまとめると、シナノキ型被覆物は、リノール酸を構成要素に多く含むグリセリドを主成分に、脂肪酸の酸化物が混和しているような、脂質の混合物であることが示唆される。

2.3.4.2 脂肪酸シグナルの遍在性について

TOF-SIMSの結果に基づくと、シナノキ型被覆物の主成分と考えられる脂質に由来するシグナルは、道管相互間の壁孔壁だけではなく、道管や木部繊維の壁面や放射組織、試料調製の過程で露出した破断面など、分析した壁面全体から同じような組成で検出されていた (Fig. 2-6f-h)。このことは、2.2節のFE-SEM観察で確かめられたシナノキ型被覆物の分布と一致しており、両者が同じものであることを強く証拠づける。一方、両者が試料調製の過程で露出した破断面に分布していることは、これらが常温下での極めて高い流動性をもって、試料作製の過程で著しく本来の位置から分布を変化させていることを示唆する。シナノキ型被覆物と脂質を真に対応付け、その実態を解明するには、両者の本来の分布を明らかにする必要があると考えられた。

2.4 凍結技法によるシナノキ型被覆物のインタクトな分布と堆積過程

2.4.1 本節の目的と手段

2.2 節および 2.3 節でシナノキ型被覆物ならびにその主成分と考えられる脂質が常温下での分析のための試料作製過程で、その分布を本来の位置から大きく変化させていることが示唆された。これを受けて本節では、採取時から試料を凍結状態に保つことで、化学成分の位置を固定したインタクトな状態の観察・分析をおこなう凍結技法により、両者の本来の分布を特定することを目的とした。シナノキ型被覆物のインタクトな分布の観察には、冷却ステージによって低温状態での試料観察を可能とした低温電界放出形走査電子顕微鏡（Cryo-FE-SEM）を用いた。本観察にあたり、冷却状態でシナノキ型被覆物がどのように観察されるかを知る必要があったため、これまでの観察で確実に被覆物が堆積していることが分かっている常温下で作製した乾燥試料も、冷却したうえで同観察に供した。また、脂肪酸のインタクトな分布の解析には、同様に冷却ステージにおける低温下での分析が可能な Cryo-TOF-SIMS/SEM システムを用いた（Kuroda et al. 2013; Masumi et al. 2014）。こちらは、2.3 節の TOF-SIMS と同様、名古屋大学森林化学研究室との共同研究として実施した。

2.4.2 材料および方法

2.4.2.1 植物材料

2019年1月および6月に北海道大学札幌キャンパスに生育するシナノキ2個体から直径1～1.5 cmの枝を採取した。枝は速やかに軸長1 cm程度に切り分け、アルミホイルに包んで、液体窒素で凍結させ、ディープフリーザー（-80℃）で保存した。また、Cryo-FE-SEMで観察する乾燥試料として、2.3節のTOF-SIMS解析のために使用した凍結乾燥ブ

ロックの一部を供試した (2.3.2.3参照)。

2.4.2.2 Cryo-FE-SEM

採取後すぐに凍結させ、冷凍保存していたシナノキの枝片 (以下、インタクト試料) を、クライオスタット (CM 3050S, Leica) の -30°C に設定した冷却チャンバー内で凍結を維持したまま樹皮を剥がしてトリミングし、辺材の最外層を含む 4 mm 角程度の生材の小ブロックとした。この小ブロックを板目面が上になるようにして、専用の試料ホルダーに凍結包埋剤 (TissueTek® O.C.T.コンパウンド, Sakura Finetek Japan) で接着し、そのまま液体窒素に浸漬して固化させた。次に、冷却ユニット (ALTO2500, Gatan) を FE-SEM (JSM-6701F, JEOL) に取り付けた Cryo-FE-SEM システムの試料調製チャンバー (試料ステージ温度: $<-140^{\circ}\text{C}$) に試料を導入し、メス刃を側面にある木口面に食い込ませて凍結切断させた。続いて、チャンバーの試料ステージを -85°C まで昇温させて 30 分間のフリーズエッチングを施した。チャンバー内の圧力は 2.0×10^{-4} 未満で維持されていた。昇温を停止させた後、試料に Au・Pd によるスパッタコーティングを 3 分間施した。その後、試料を SEM の冷却試料ステージ ($<-140^{\circ}\text{C}$) に移動させ、加速電圧 2.5 kV、作動距離 8~15 mm で観察した。

また冷却状態におけるシナノキ型被覆物の形態を知るために、従来の常温下での FE-SEM 観察で、被覆物が堆積していることが確認されている凍結乾燥済みの試料 (以下、乾燥試料) を Cryo-FE-SEM の冷却状態で観察した。この観察には、2.3 節の TOF-SIMS 分析で用いた凍結乾燥ブロックの余剰物を用い、さらにそれらを 2 つのグループに分け、それぞれ異なる面出し手順で観察試料を調製した。1 つ目のグループは、常温下でブロックを割って、観察面を出してから液体窒素で冷却し、Cryo-FE-SEM システムに導入した。もう 1 つのグループは、先に冷却して Cryo-FE-SEM システムに導入してしま

い、試料調製チャンバー内で凍結切断することで面出しした。両グループの試料も先の凍結保存試料と同様に観察した（前段落を参照）。

2.4.2.3 Cryo-TOF-SIMS

凍結保存していたシナノキの枝片を、クライオスタット（CM 3050S, Leica）の冷却チャンバー内で凍結を維持したままトリミングした。およそ 6 mm 角の小ブロックとし、この状態で、ドライアイスで冷却を維持しながら、名古屋大学の森林化学研究室へ輸送した。輸送した小ブロックはまず、分析面である板目面が上になるようにして Cu 製のホルダーに氷包埋で固定した。次に試料を冷却室素雰囲気にあるグローブボックス（ -10°C ）に導入し、中に設置されたスライディングマイクロームで切削して分析面を出した。数分放置して表面の水を昇華させた後、試料を液体窒素温度に冷却してから、中間チャンバーを経て Cryo-TOF-SIMS（TRIFT III, Ulvac-PHI; 試料ステージ温度： $<-120^{\circ}\text{C}$ ）に導入した。ネガティブイオンによる SIMS スペクトルとケミカルマップイメージを、乾燥試料の TOF-SIMS 測定と同様の条件で取得した（2.3.2.3）。測定した試料は、中間チャンバーを経て Cryo-SEM システム（Gatan 社製 C1001 冷却ステージを取り付けた S-3400N）に導入し、分析範囲を観察した。

2.4.3 結果

2.4.3.1 Cryo-FE-SEM による観察

Cryo-FE-SEM で観察されたシナノキの道管相互間の壁孔壁の像を Fig.2-7 に示す。採取後すぐに凍結させたインタクト試料を観察すると、ほとんどの道管相互間の壁孔壁でセルロースマイクロフィブリルのテクスチャが確認され、シナノキ型被覆物と判断できるような堆積物は観察されなかった（Fig. 2-7a）。被覆物は道管や木部繊維の壁面において

も確認されず、不定形の物質は唯一、細胞質が密に詰まった柔細胞の内部でのみ確認された (Fig. 2-7e)。一方、乾燥試料においては、シナノキ型被覆物であると判断される不定形の物質がほとんどの道管相互壁孔で観察された (Fig. 2-7b-d)。この乾燥試料におけるシナノキ型被覆物の堆積範囲や外観は、試料調製過程の面出し手順によって異なっていた。凍結前に常温下で面出しした試料では、従来の常温下での FE-SEM による観察と同様に、道管相互間の壁孔壁やその周囲の二次壁破断面を覆う被覆物が観察された (Fig. 2-7b)。一方、冷却後に切断して表面を露出させたものでは、多くの場合、被覆物が壁孔壁の縁に集中的に堆積しており、壁孔壁の中央部ではセルロースミクロフィブリルのテクスチャが見られることも多かった (Fig. 2-7c)。壁孔縁の壁孔室側でも、周縁部に厚く被覆物が堆積しており (Fig. 2-7d)、面出し前には壁孔室の奥 (壁孔縁の基部から壁孔壁の周縁にかけての空間) に被覆物が液だまりを作っていたことが明らかであった。また、壁孔壁周囲の二次壁破断面に被覆物は堆積していなかった。このような乾燥試料においては、道管の内腔側の壁面にも不定形の堆積物が確認された (Fig. 2-7f)。

2.4.3.2 Cryo-TOF-SIMS

Cryo-TOF-SIMS の測定結果として得られた TOF-SIMS スペクトルとケミカルマップイメージを Fig. 2-8 に示した。分析面から得られた SIMS スペクトルは (Fig. 2-8a)、2.3 節で得た乾燥試料の TOF-SIMS 計測で得られたスペクトル (Fig. 2-6a) と概ね同様のパターンを示し、脂肪酸に由来すると推定される m/z 255 (パルミチン酸)、 m/z 279 (リノール酸)、 m/z 281 (オレイン酸) のシグナルも明瞭に検出された。また脂肪酸の酸化物と予想される m/z 293 のピークも同様に検出された。一方、ケミカルマップイメージを見ると、これらのシグナルが発生している部位は乾燥試料の結果と異なり、明らかな局在性が観察された (Fig. 2-8e-g)。分析面を Cryo-SEM で観察すると、それらの

シグナルは、ほとんどが放射組織と軸方向柔組織から生じていることが分かった (Fig. 2-8b,c,h)。稀に、それらの組織を構成する柔細胞に隣接した道管や木部繊維の壁面からシグナルが検出されている場合もあったが、これは試料調製中の切削により生じた人工産物であると考えられる。

2.4.4 考察

2.4.4.1 シナノキ型被覆物と脂肪酸の分布変化の一致

Cryo-FE-SEM による観察の結果、試料採取後すぐに凍結させ、その後一度も融解させなかったインタクト試料においては、シナノキ型被覆物が観察されないことが明らかとなった (Fig. 2-7a)。乾燥した試料であれば Cryo-FE-SEM の冷却環境下でもシナノキ型被覆物が観察されたことから (Fig. 2-7b-d)、低温が原因でシナノキ型被覆物が識別できなくなったわけではない。このことから、従来、乾燥させた試料の常温下での FE-SEM 観察で見られていたシナノキ型被覆物は、その試料採取から観察までの過程で人為的に発生した産物 (アーティファクト) であることが明らかである。一方、インタクト試料においてシナノキ型被覆物と同様な不定形の物質が観察されたのは、ほぼ柔細胞の内部でのみであった (Fig. 2-7e)。このことから、シナノキ型被覆物は、本来、柔細胞内に存在しているものであることが示唆される。これに対応するように、Cryo-TOF-SIMS で明らかとなったインタクト試料における脂質の分布も、柔細胞に局在しており、常温下での乾燥試料の解析において検出された道管相互壁孔やその他の壁面における脂質分布は、確認されなかった (Fig. 2-8e-g)。このようにインタクト試料と乾燥試料の双方におけるシナノキ型被覆物と脂質の分布が対応していたことは、シナノキ型被覆物が脂質を含んでいることを強く証拠づけたといえる。

2.4.4.2 シナノキ型被覆物の堆積過程

Cryo-FE-SEM と Cryo-TOF-SIMS によるインタクト試料の解析に基づくと、シナノキ型被覆物の由来は、柔細胞に貯蔵されていた脂質であると考えられる。すなわち、常温下で FE-SEM あるいは TOF-SIMS のための乾燥試料を作製する過程で、この貯蔵脂質が道管相互間の壁孔壁に堆積したことになる。Sano (2004, 2005) が報告し、本研究でも先に確認したが、シナノキ型被覆物は常温下で極めて流動性が高く、試料の観察・分析面を露出させた際に、その表面で拡がって、露出した細胞壁の破断面まで覆うことは明らかである。本節では、乾燥試料を Cryo-FE-SEM 観察した際に、試料を冷却した後に観察面を露出させた場合では、細胞壁の破断面に被覆がなかったが、試料を冷却する前に観察面を露出させた場合では、従来の観察通り細胞壁の破断面に被覆が及んでいたという結果が得た。このことは、試料の観察面出し時に被覆物が移動するという従来の考察が確かであることを裏付けるものである。また、本節でおこなった観察面出し後の乾燥試料の冷却は、面出し後速やかにおこなったが、それでも細胞壁破断面における被覆が十分に見られた。このことから、観察面を露出させた際に生じる被覆物の拡散は、非常に短時間で瞬間的に起こっていることが示唆される。面出し時に割り開かれた柔細胞から周囲の壁面へと脂質が流れ出る過程が容易に想像できる。

一方、この乾燥試料の Cryo-FE-SEM 観察では、面出し前に試料を冷却した場合であっても、道管相互間の壁孔壁にシナノキ型被覆物が見られた。このことから、試料の面出し前から既に道管相互壁孔に被覆物が堆積していたことも確かである。木材試料を乾燥させ、それを常温下で保存している間に、柔細胞から周囲の管孔へと脂質が拡散している過程が予想される。また、乾燥によって柔細胞の原形質膜が壊れ、内部の物質が拡散できるようになっていること、脂質の拡散はおそらく壁孔を通じて行われていること、また乾燥した管孔の壁面を疎水性の脂質が容易に流れていくことなどが予想される。

面出し前に冷却した試料におけるシナノキ型被覆物は、壁孔壁の周縁部に厚く堆積していたが、これは被覆物が道管および壁孔縁の内側の壁面を伝って道管相互壁孔に流れ込んでいることを示していると考えられる。

2.5 総合考察

2.5.1 本章で得られたシナノキ型被覆物に関する知見

本章 2.2 節では、広範な分類群から選んだ広葉樹の道管相互壁孔を FE-SEM で観察し、シナノキ型堆積物を有する樹種が柔組織に豊富な脂質を貯蔵することが知られる fat trees によく一致することを明らかにした。また 2.3 節では、抽出物の成分分析とその結果を受けた TOF-SIMS 解析により、シナノキ型被覆物が貯蔵物質として知られる脂質（グリセリド、脂肪酸エステル）を主成分とすることを明らかにした。さらに、2.4 節では採取後すぐに凍結固定したインタクト試料を Cryo-FE-SEM や Cryo-TOF-SIM で分析し、シナノキ型被覆物は、本来は柔細胞に局在していたはずの脂質が、試料の乾燥や常温下での保存、試料の面出しの過程で道管相互間の壁孔壁をはじめとする周囲の壁面に堆積したものであることを明らかにした。

以上をまとめると、従来の常温下での FE-SEM において観察されていたシナノキ型被覆物は、脂質貯蔵性の樹種の柔細胞に豊富に貯蔵されていた脂質が、乾燥や常温といった条件で周囲に拡散し堆積したものであり、立木のインタクトな木部組織のアポプラストには存在しないものと結論づけられる。

2.5.2 シナノキ型被覆物の機能特性に関する展望

本章では、インタクトな木部組織のアポプラストにおいてシナノキ型被覆物は存在しないと結論付けた。少なくともその発生には木部組織の乾燥が必要であると考えられ、インタクトな状態の辺材の木部組織に堆積していることはないと考えられる。したがって、シナノキ型被覆物が生立木の基本的な水分生理機能に影響を及ぼしている可能性は極めて低いと考えられる。一方、2.4 節の結果によれば、シナノキ型被覆物として観察さ

れる脂質の拡散は、柔細胞が割り開かれたときに初めて発生しているわけではなく、乾燥した木材の内部でも原形質膜が崩壊した柔細胞から流出し、徐々に進行するようである。ゆえに生立木の木部においても強く乾燥が生じているような部位では、柔細胞から脂質が拡散し、シナノキ型被覆物が堆積している可能性がある。とはいえ、そのような強く乾燥している部位は、基本的に正常材ではなく、生立木の中で部分的に生じた枯死部であると考えられる。部分的な枯死部で脂質が拡散し、道管相互壁孔にシナノキ型被覆物として堆積することは、例えば正常な道管から枯死部へと水分が漏出することや、枯死部から正常な道管へと気泡が侵入することを防ぐように働く可能性がある。また枯死部において疎水性の防御物質が拡散するための溶媒として働く可能性も考えられる。

枯死部以外に立木中の存在する乾燥部位として、辺材と心材の間の存在する移行材は材の含水率が低いことが知られている。例えばシナノキの全乾重量ベースの含水率は、辺材で 101.8%に対して移行材では 71.3%と報告されている (Yazawa & Ishida, 1965)。これは強い乾燥状態にあるといえるものではないが、このような移行材で部分的に柔細胞が乾燥して、脂質を放出し、何らかの機能を発現しているならば、シナノキ型被覆物は心材形成に関連する新たな知見となるかもしれない。脂質の放射方向での貯蔵量変化は、いくつかの樹種で調べられており、*Betula verrucosa* Ehrh.やフユボダイジュでは、より内側の年輪で増加していることが報告されている (Höll & Poschenrieder 1975; Höll & Priebe 1985)。一方、ニセアカシア (*Robinia pseudoacacia* L.) では、トリグリセリドの量がより内側の年輪に向かうほど少なくなっていくという報告があるものの (Hillinger et al., 1996)、辺材から心材の最外層の範囲では増加しているという例もある (Höll & Poschenrieder, 1975)。これらを踏まえると、脂質は心材の領域では内側に向かうほど減少していくが、辺材から移行材の範囲では増加傾向にある可能性が高い。

正常材の保護や心材形成に関連づけて、枯死部や移行材におけるシナノキ型被覆物の存否を確認してみる価値はあるものと思われる。

一方、シナノキ型被覆物は、脂質貯蔵性の樹種における基本的な特性として、木材の利用において重要な知見になりうる。fat trees と呼ばれる脂質貯蔵性の樹種群は古くより認識されており、実際に、starch trees と呼ばれる樹種群よりも高い脂質含有量があることが確かめられている (Kramer & Kozlowski 1960; Clermont 1961; Höll & Priebe 1985; Hoch et al. 2003; Piispanen & Sapanpää 2004)。その豊富な脂質に関する知見は、木材利用上ではパルプ化・抄紙工程におけるピッチトラブル（不溶性成分によって起こる様々な障害）に関連付けられることがある (Clermont 1961; Piispanen & Sapanpää 2004)。一方、本章で取り扱ったシナノキ型被覆物に関する知見によれば、fat trees の乾燥材では総じて、道管要素間の壁孔壁を含む木部組織の細胞壁に脂質が堆積している可能性がある。このことは、組織や細胞の構造を維持した木材の利用においても fat trees という樹種群を利用する場合に、考慮が必要であることを示唆する。例えば、乾燥材に対する薬液の浸透性が樹種や薬液の種類によって異なることや (基多村, 1982)、ユリア系樹脂によるシナノキ合板の接着不良 (平井, 1996) などに、シナノキ型被覆物の存在が関与している可能性がある。

2.5.3 試料調製中に生じるアーティファクトへの注意

従来観察されてきた広葉樹の道管相互壁孔に生じる被覆物が、観察試料の調製過程で生じたアーティファクトである場合があることを示すことができたのは、本章の大きな成果といえる。顕微鏡の試料作製の過程では、薬品処理や乾燥処理など、様々なアーティファクトの要因が潜んでおり、その結果の解釈には十分に注意が必要であることは、一般的によく認識されていることである。道管相互壁孔の構造観察においても、固定処

理の有無や薬剤処理、乾燥や長期の凍結保存などによって、その構造が著しく変化することが明らかとなってきた (Li et al. 2016, Kotowska et al. 2020)。本研究では、とりわけ広葉樹の木部組織における成分の分布変化がよく示された。このことは高感度な成分検出手法で分析された成分分布の解釈においても、大きな注意を払わなければならないことを意味する。例えば免疫標識でなされた壁孔壁の糖組成に関する知見や (Kim et al. 2013, 2016)、高感度の蛍光顕微鏡手法で検出された両親媒性成分に関する知見も (Schenk et al. 2017, 2018)、生体試料に対する基本的な化学固定はおこなっているが、それが必ずしも成分分布をまんべんなく固定しているかどうかは断定できない。本研究で用いた凍結技法は、成分の分布の固定に関して極めて高い効果を発揮すると考えられる。従来明らかにされてきた木材組織の成分分布についても、それが試料調製過程で変化する可能性があるものであれば、凍結技法を用いたインタクト解析によって今後再検証されていくべきであると考えられる。少なくとも、今後、本研究が取り扱っていく種々の被覆物については、凍結技法によってインタクト試料でも存在するかをあらかじめ明らかにすることが推奨されるだろう。

Table 2-1. Trees and shrubs sampled for FE-SEM observation in section 2.2.

Species	Family	PI ^a	Date	Site ^b	Position	Remarks
Magnolids						
<i>Magnolia obovata</i> Thunb.	Magnoliaceae	–	Aug 2017	Tomakomai	Branch	(Uno 2014)
<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J.Presl	Lauraceae	+	Oct 2010	Hitachi	Trunk	(Sano's unpublished data)
<i>Lindera umbellata</i> Thunb. var. <i>membranacea</i> (Maxim.) Momiy.	Lauraceae	–	Jun 2019	Sapporo-1	Branch	
Rosids						
<i>Maackia amurensis</i> Rupr. et Maxim.	Fabaceae	–	Nov 2017	Tomakomai	Trunk	
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Fabaceae	–	Oct 2012	Tomakomai	Trunk	(Uno 2014)
<i>Cerasus sargentii</i> (Rehder) H.Ohba	Rosaceae	–	Aug 2013	Tomakomai	Trunk	(Uno 2014)
<i>Sorbus commixta</i> Hedl.	Rosaceae	–	Oct 2012	Tomakomai	Trunk	(Uno 2014)
<i>Elaeagnus umbellata</i> Thunb.	Elaeagnaceae	–	May 2017	Ishikari	Branch	
<i>Rhamnus japonica</i> Maxim.	Rhamnaceae	–	Jul 2017	Ashoro	Trunk	
<i>Ulmus davidiana</i> Planch. var. <i>japonica</i> (Rehder) Nakai	Ulmaceae	–	Nov 2017	Tomakomai	Branch	
<i>Morus australis</i> Poir.	Moraceae	–	Jul 2017	Sapporo-3	Branch	
<i>Fagus crenata</i> Blume	Fagaceae	–	Dec 2018	Sapporo-4	Trunk	
<i>Quercus crispula</i> Blume	Fagaceae	–	Jun 2013	Tomakomai	Trunk	(Uno 2014)
<i>Quercus dentata</i> Thunb.	Fagaceae	–	May 2017	Ishikari	Trunk	
<i>Juglans mandshurica</i> Maxim. var. <i>sachalinensis</i> (Komatsu) Kitam.	1 Juglandaceae	+	Jun 2013	Sapporo-2	Trunk	(Uno 2014)
	2		Dec 2013	Sapporo-2	Trunk	(Uno 2014)
	3		Apr 2018	Sapporo-2	Branch	

(Table 2-1, 2/3)

Species	Family	PI ^a	Date	Site ^b	Position	
<i>Pterocarya rhoifolia</i> Siebold et Zucc.	Juglandaceae	+	Jun 2019	Sapporo-1	Branch	
<i>Alnus hirsuta</i> (Spach) Turcz.	Betulaceae	–	Aug 2017	Tomakomai	Branch	
<i>Betula maximowicziana</i> Regel	Betulaceae	–	Dec 2018	Sapporo-4	Trunk	
<i>Betula platyphylla</i> Sukaczew var. <i>japonica</i> (Miq.) H.Hara	Betulaceae	+	Jun 2013	Tomakomai	Trunk	(Uno 2014)
			Aug 2013	Tomakomai	Trunk	(Uno 2014)
			Apr 2018	Sapporo-2	Branch	
<i>Carpinus cordata</i> Blume	Betulaceae	–	Sep 2017	Tomakomai	Branch	
<i>Ostrya japonica</i> Sarg.	Betulaceae	–	Sep 2017	Tomakomai	Branch	
<i>Populus suaveolens</i> Fisch.	Salicaceae	+	Oct 2012	Tomakomai	Trunk	(Uno 2014)
<i>Populus tremula</i> L. × <i>P. alba</i> L.	Salicaceae	+	May 2019	Sapporo-3	Branch	
<i>Salix udensis</i> Trautv. et C.A.Mey.	Salicaceae	+	May 2017	Ishikari	Branch	
			Jul 2017	Sapporo-3	Branch	
<i>Rhus javanica</i> L. var. <i>chinensis</i> (Mill.) T.Yamaz.	Anacardiaceae	–	Jun 2019	Sapporo-1	Branch	
<i>Acer pictum</i> Thunb. subsp. <i>mono</i> (Maxim.) H.Ohashi	Sapindaceae	–	Aug 2017	Tomakomai	Trunk	
<i>Aesculus turbinata</i> Blume	Sapindaceae	+	Dec 2018	Sapporo-2	Branch	
			Dec 2018	Sapporo-4	Trunk	
<i>Aesculus glabra</i> Willd.	Sapindaceae	+	Jun 2019	Sapporo-1	Branch	
<i>Phellodendron amurense</i> Rupr.	Rutaceae	–	Nov 2017	Tomakomai	Branch	

(Table 2-1, 3/3)

Species		Family	PI ^a	Date	Site ^b	Position	
<i>Tilia japonica</i> (Miq.) Simonk.	1	Malvaceae	+	Jun 2013	Tomakomai	Trunk	(Uno 2014)
	2			Aug 2017	Tomakomai	Trunk	
	3			Dec 2018	Sapporo-2	Branch	
<i>Cercidiphyllum japonicum</i> Siebold et Zucc.		Cercidiphyllaceae	–	Oct 2012	Tomakomai	Trunk	(Uno 2014)
Asterids							
<i>Cornus controversa</i> Hemsl.		Cornaceae	–	Oct 2012	Tomakomai	Trunk	
<i>Hydrangea paniculata</i> Siebold		Hydrangeaceae	–	Nov 2017	Tomakomai	Trunk	
<i>Schizophragma hydrangeoides</i> Siebold et Zucc.		Hydrangeaceae	–	Jul 2018	Tomakomai	Trunk	
<i>Catalpa ovata</i> G.Don		Bignoniaceae	–	Jun 2019	Sapporo-1	Branch	
<i>Catalpa bignonioides</i> Walter		Bignoniaceae	–	Jun 2019	Sapporo-1	Trunk	
<i>Aralia elata</i> (Miq.) Seem.		Araliaceae	–	May 2017	Ishikari	Branch	
<i>Chengiopanax sciadophylloides</i> (Franch. et Sav.) C.B.Shang et J.Y.Huang		Araliaceae	–	Oct 2012	Tomakomai	Trunk	(Uno 2014)
<i>Kalopanax septemlobus</i> (Thunb.) Koidz.		Araliaceae	–	Jul 2018	Tomakomai	Branch	
<i>Viburnum opulus</i> L. var. <i>sargentii</i> (Koehne) Takeda		Adoxaceae	+*	Jun 2019	Sapporo-1	Branch	

^aIndicates whether the basswood-type pit incrustations (PI) were found (+) or not found (–) under field-emission scanning electron microscopy. PI deposition was limited in *V. opulus* var. *sargentii* (marked by an asterisk).

^bAshoro, Ashoro Research Forest of Kyushu University; Hitachi, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI); Ishikari, coastal forest of Ishikari city; Sapporo-1, Botanic Garden of Hokkaido University; Sapporo-2, Sapporo campus of Hokkaido University; Sapporo-3, Sapporo Experimental Forest of Hokkaido University; Sapporo-4, Hokkaido Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, FFPRI; Tomakomai, Tomakomai Experimental Forest of Hokkaido University.

Table 2-2. Trees sampled for chemical analyses in section 2.3.

Species	PI ^a	DBH ^b (cm)	Height (m)	Date	Site ^c	Usage
<i>Tilia japonica</i>	+	9.6	8.8	Aug 2017	Tomakomai	Extraction
		15.0	12.9	Jul 2018	Tomakomai	Dry-TOF-SIMS
<i>Salix udensis</i>	+	11.4	9.3	Sep 2017	Sapporo	Extraction
<i>Acer pictum</i> subsp. <i>mono</i>	–	14.0	11.2	Aug 2017	Tomakomai	Extraction

^aIndicates whether the basswood-type pit incrustations (PI) were found (+) or not found (–) under field-emission scanning electron microscopy.

^bDBH, diameter at breast height.

^cSapporo, Sapporo Experimental Forest of Hokkaido University; Tomakomai, Tomakomai Experimental Forest of Hokkaido University

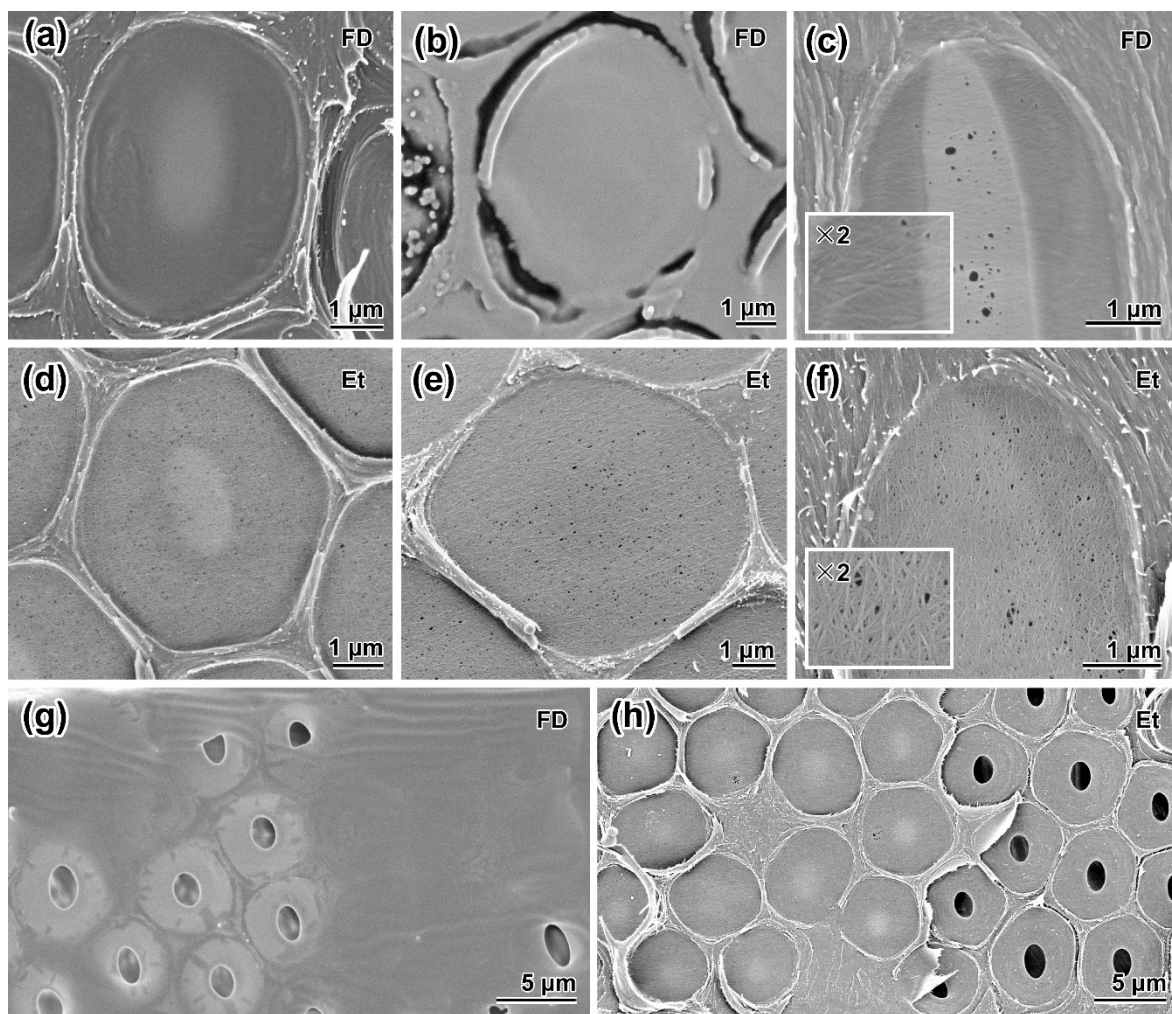


Fig. 2-1

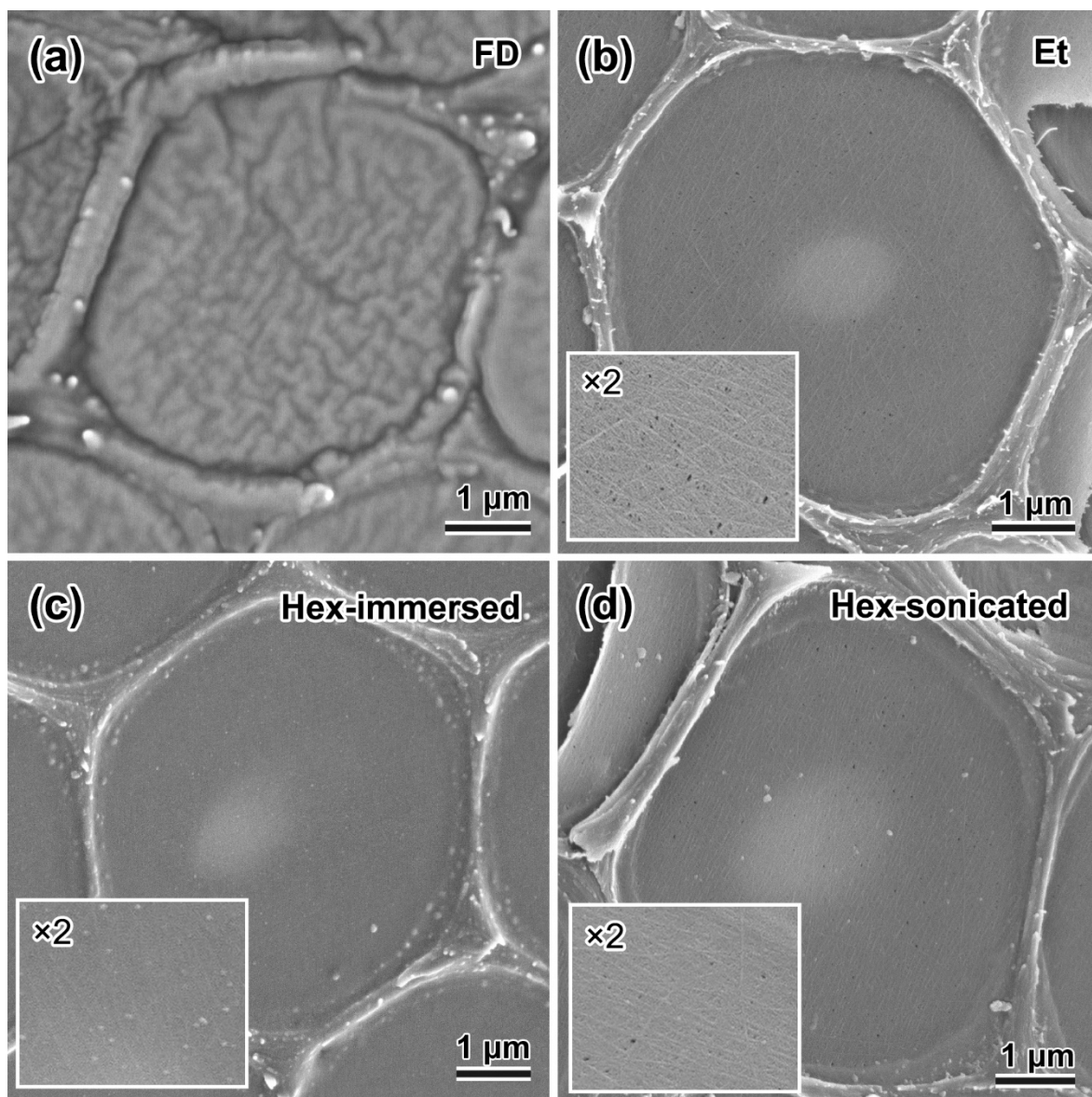


Fig. 2-2

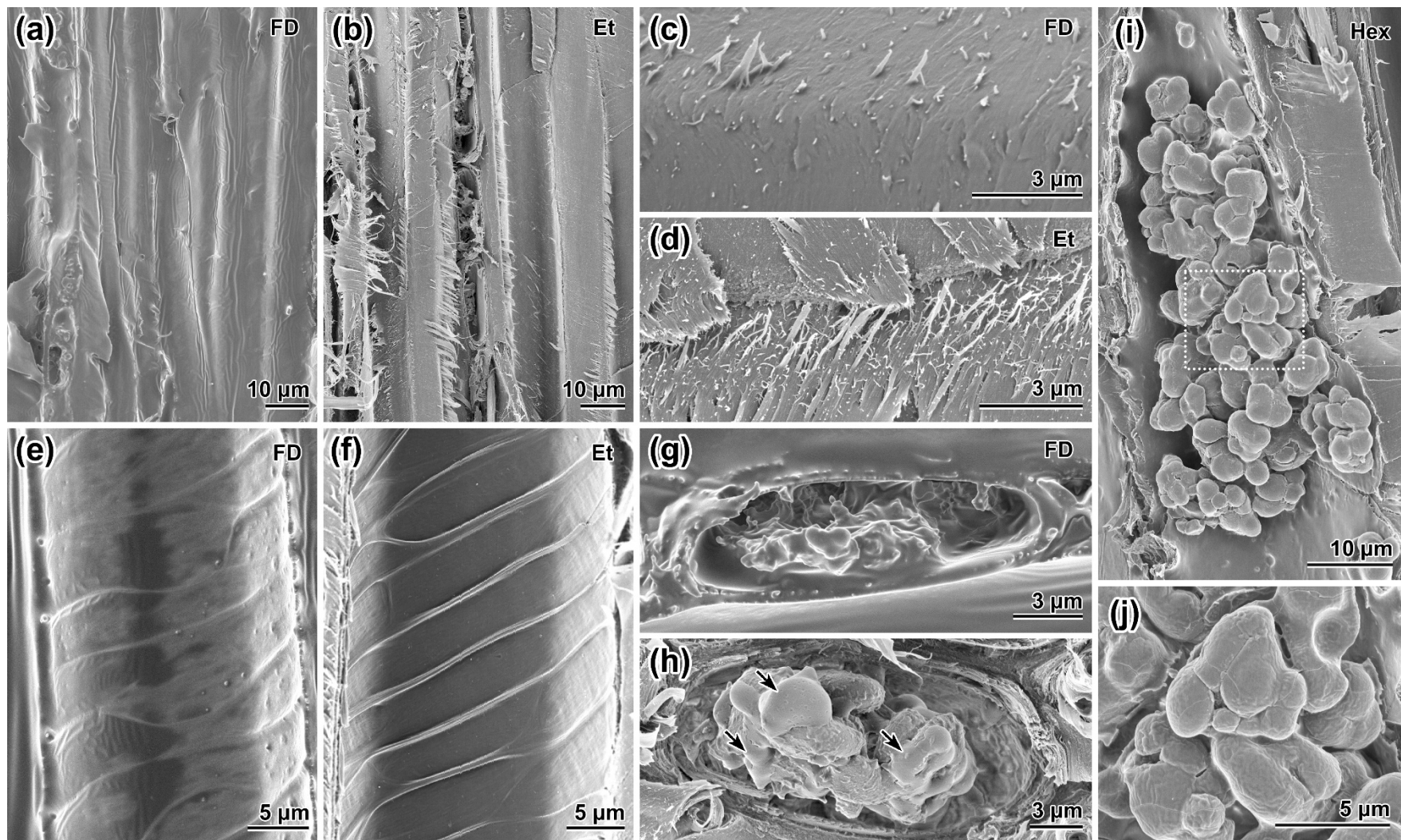


Fig. 2-3

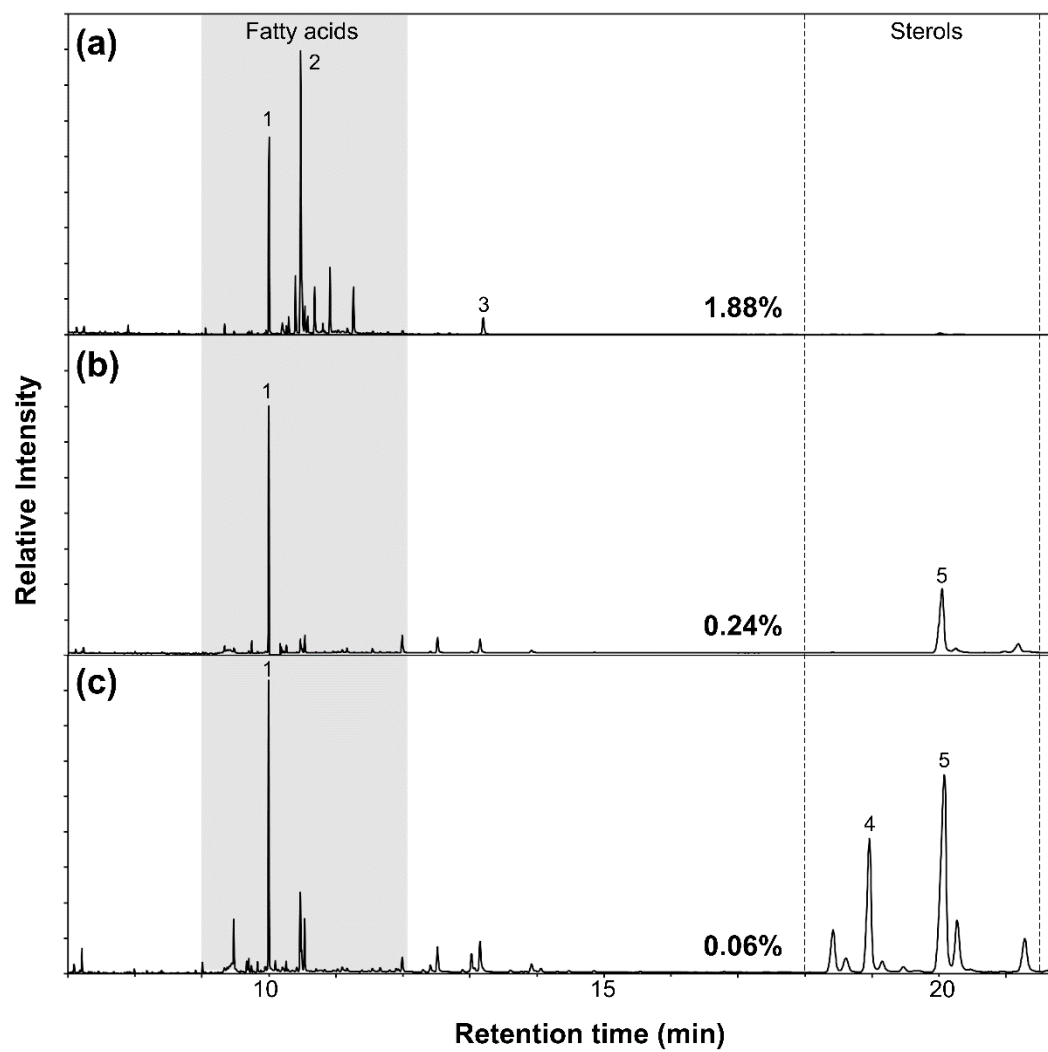


Fig. 2-4

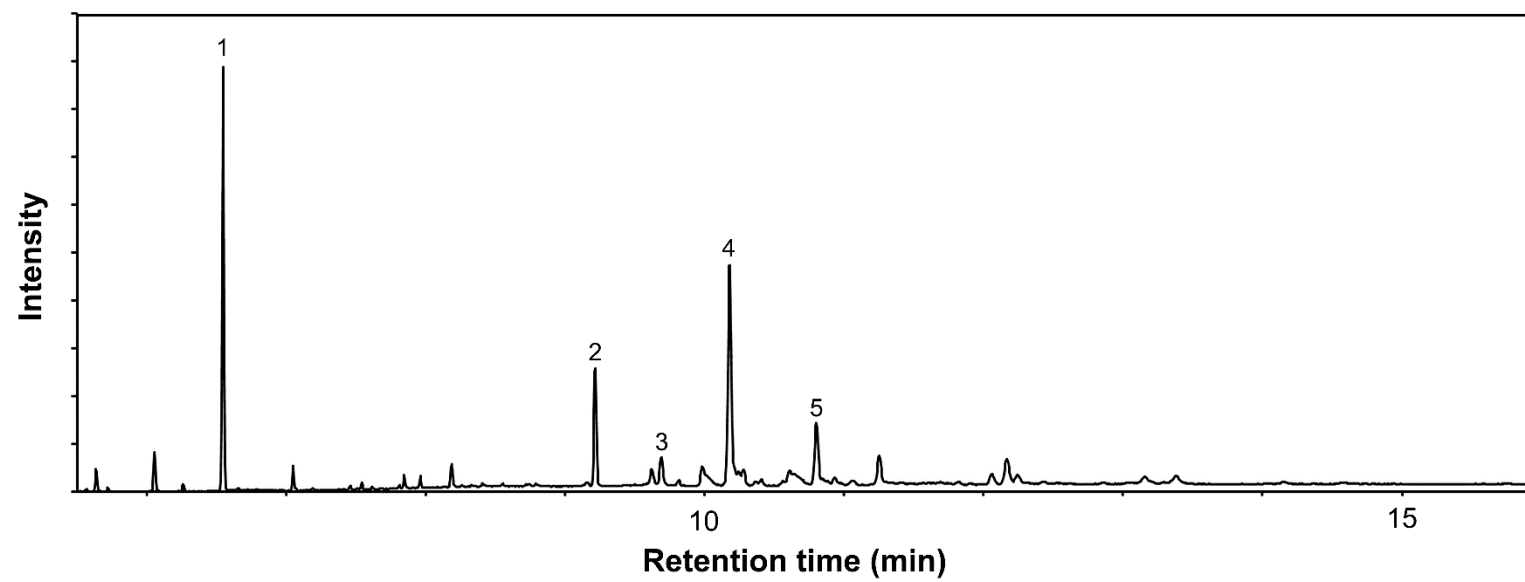


Fig. 2-5

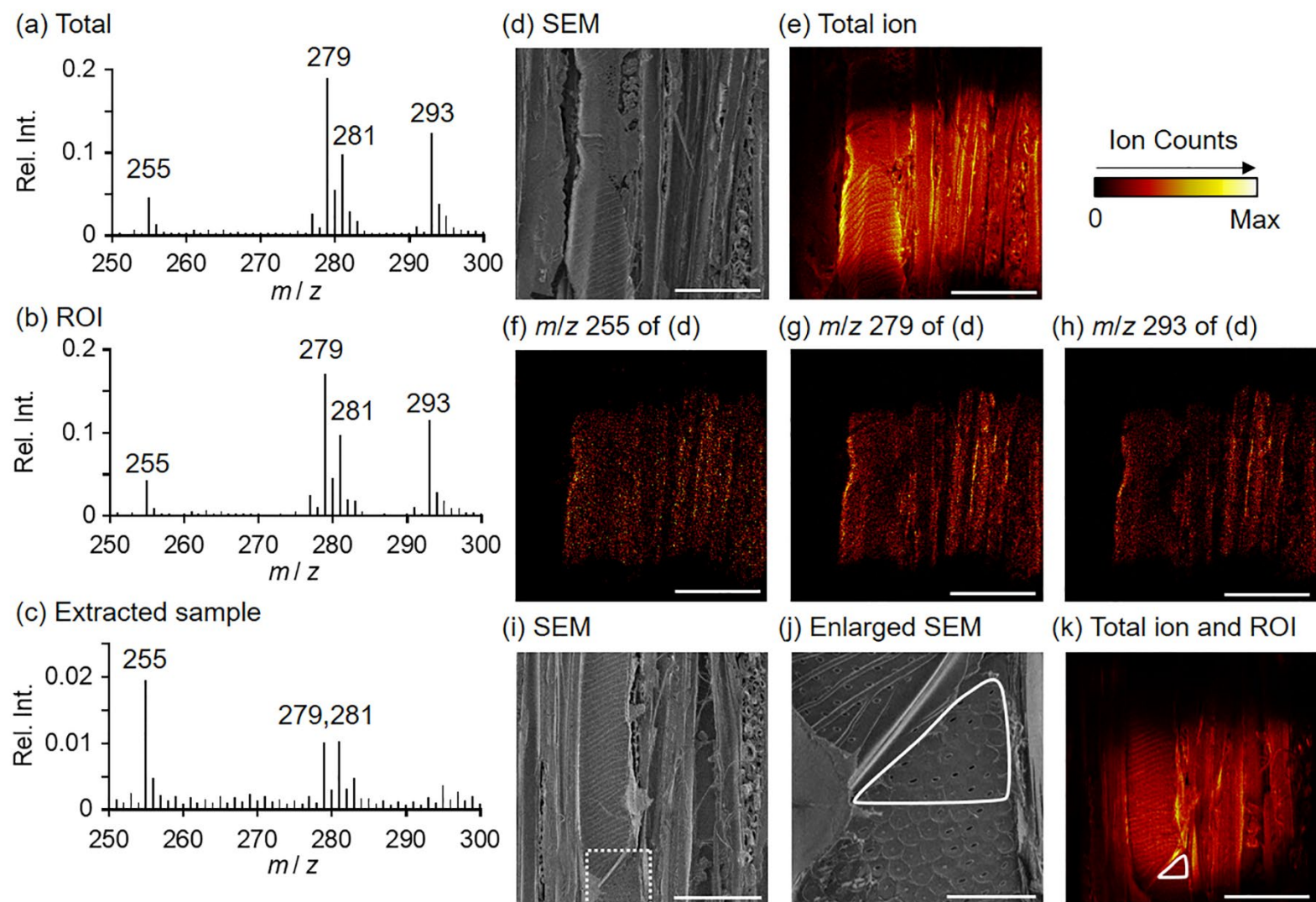


Fig. 2-6

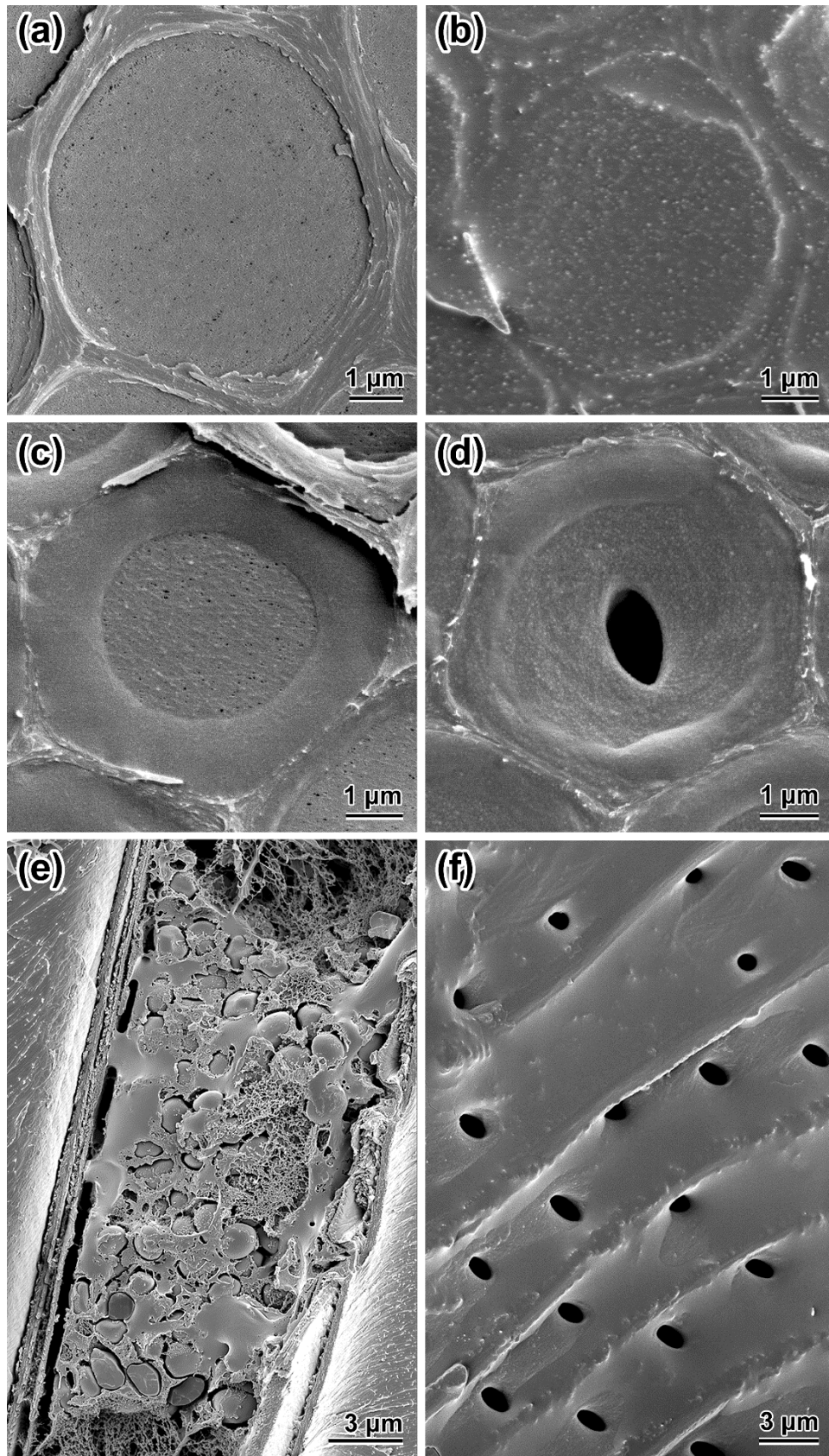


Fig. 2-7

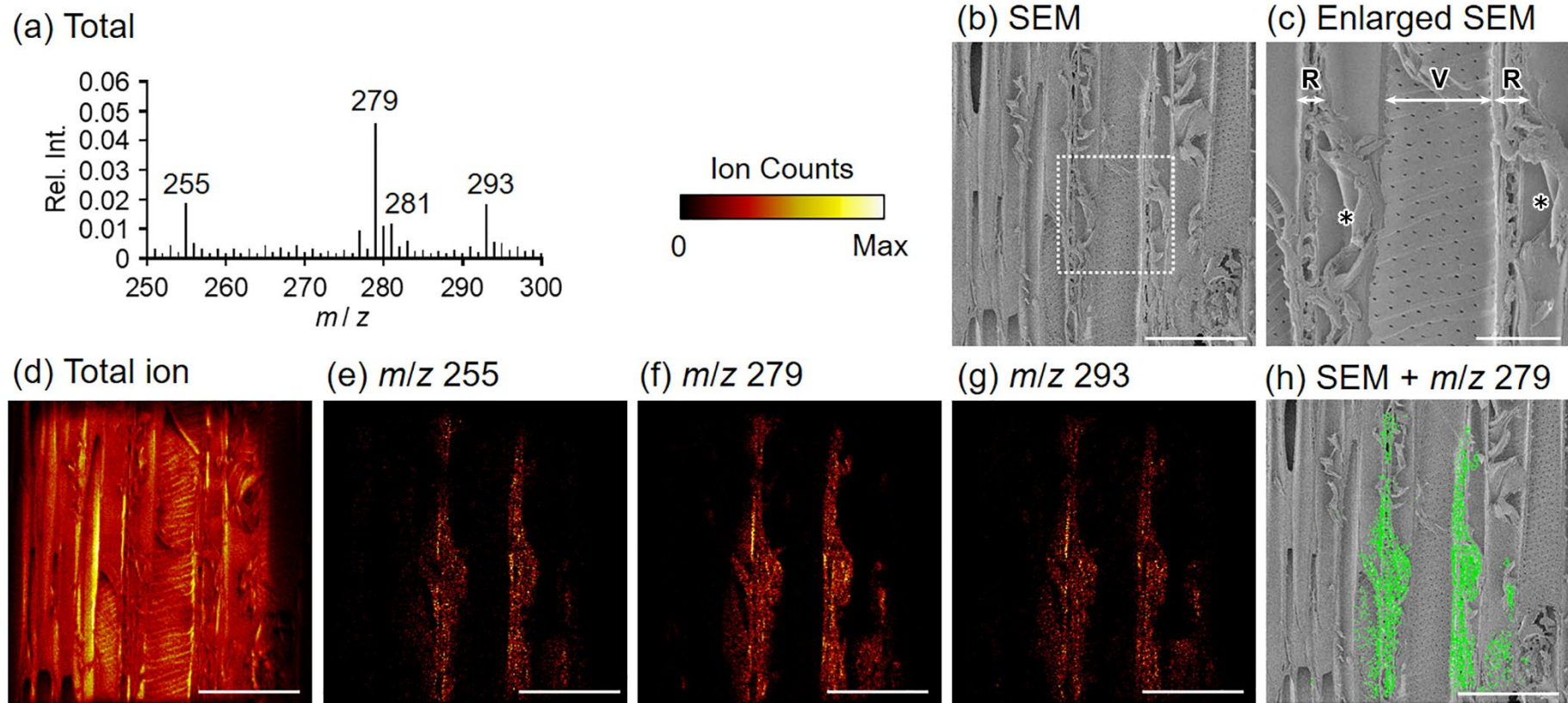


Fig. 2-8

Fig. 2-1. FE-SEM images of intervessel pit membranes in freeze-dried samples (FD; a-c, g), which were covered with incrustations, compared with ethanol-treated (Et; d-f, h) samples, from which incrustations were removed. (a,d) *Pterocarya rhoifolia*. (b,e) *Salix udensis*. (c, f) *Viburnum opulus* var. *sargentii*. (g, h) *Aesculus glabra*. The insets show $2\times$ magnifications of the pit membrane surface, indicating the cellulose microfibrillar texture.

Fig. 2-2. FE-SEM images of intervessel pit membranes of *Tilia japonica*. (a) Freeze-dried samples (FD), which were covered with incrustations. (b) Ethanol-treated samples. (c) Hexane-treated samples that were immersed in hexane. (d) Hexane-treated samples that were sonicated in hexane.

Fig. 2-3. FE-SEM images of tangential plane in freeze-dried samples (FD; a, c, e, g, h), ethanol-treated samples (Et; b, d, f), and hexane-treated samples (Hex; i, j) of *Tilia japonica* and other species. (a, b) Fracture planes of wood fibers and the ray parenchyma. (c, d) Fracture planes of wood fibers at higher magnification. (e, f) Inner surface of vessel walls with helical thickening. (g) A fractured ray parenchyma cell of *Aesculus glabra*, indicating heavy deposition of amorphous materials. (h) Parenchymatous amorphous materials (arrows) observed in *Maackia amurensis*. (i) A fractured axial parenchyma cell. The area surrounded by a dotted line is enlarged in j.

Fig. 2-4. GC-MS total ion chromatograms of hexane extract obtained from sapwood of *Tilia japonica* (a), *Salix udensis* (b), and *Acer pictum* subsp. *mono* (c). The numbered peaks were identified by similarity search of a mass spectrometry database (1, palmitic acid; 2, linoleic acid; 3, squalene; 4, stigmasterol; 5, β -sitosterol). The peak groups in the 9-12-min retention time range (shaded area) and the 18-21.5-min range (between dotted lines) consisted of fatty acids and sterols, respectively. The percentage values in the figure refer to the yields of each extract (based on dry wood weight).

Fig. 2-5. A GC-MS total ion chromatogram for glyceride detections from the hexane extract of *Tilia japonica* sapwood. The numbered peaks were determined by a similarity search of mass spectra. Substances detected included (1) trimethylsilyl (TMS) glycerol, (2) palmitic acid methyl ester, (3) TMS palmitic acid, (4) linoleic acid methyl ester, and (5) TMS linoleic acid.

Fig. 2-6. TOF-SIMS negative ion spectra and images of freeze-dried *Tilia japonica* wood. (a) The spectra were obtained from the full range of the scanned plane. (b) The spectra were obtained from a scan of the region of interest (ROI) in which intervessel pit membranes and the pit chamber-side of the pit border were exposed (corresponding with the area surrounded by white lines in j and k). (c) The spectra were obtained from a scan of a hexane-treated sample. The longitudinal axis (relative intensity, Rel. Int.) is defined as ion count per pixel per min. (d-i) SEM images and the corresponding ion images. From the tangential plane corresponding to the SEM image (d), ion images of total ions (e), palmitic acid at m/z 255 (f), linoleic acid at m/z 279 (g), and an unknown substance at m/z 293 (h) were simultaneously obtained. Another SEM image (i) shows intervessel pit membranes. The ROI spectrum (b) was obtained from the intervessel pit field surrounded by a solid line in the enlarged SEM image (j, corresponding with the dotted square in i) and the corresponding total ion image (k). Scale bars = 25 μm (j) and 100 μm (d-i, k).

Fig. 2-7. Cryo-FE-SEM images of *Tilia japonica*. (a) An intervessel pit membrane in Cryopreserved wet wood. (b) An intervessel pit membrane in dried wood that was exposed by splitting before freezing. (c, d) An intervessel pit in dried wood that was exposed after freezing. (e) A ray parenchyma cell in the Cryopreserved sample, showing a cytoplasm densely packed with amorphous materials. (f) The inner surface of a vessel wall in dried wood with heavy deposition of amorphous materials.

Fig. 2-8. Cryo-TOF-SIMS negative ion spectrum and images of Cryopreserved *Tilia japonica* wood. (a) The spectrum obtained from the full range of the scanned plane. The longitudinal axis (relative intensity, Rel. Int.) is defined as ion count per pixel per min. (b-h) Cryo-SEM images and the corresponding ion images. Cryo-SEM images (b) show the scanned tangential plane and an enlargement of the area surrounded by a dotted line (c). Ion images of total ions (d), palmitic acid at m/z 255 (e), linoleic acid at m/z 279 (f), and an unknown substance at m/z 293 (g) were simultaneously obtained from the plane corresponding with (b). The Cryo-SEM image (a) and binarized TOF-SIMS image at m/z 279 were overlaid with each other (h). Double arrows designated R and V represent ray parenchyma and vessels, respectively. Scale bars = 30 μm (c) and 100 μm (b,d-h).

第3章 季節に応じて堆積・消失するトネリコ型被覆物

3.1 はじめに

Wheeler (1981) は北米産のホワイトアッシュ (*Fraxinus americana* L.) の道管相互壁孔について 2 つの重要な観察結果を報告した。その 1 つは、当該樹種の一部の道管相互壁孔に、光学顕微鏡下では識別困難な微小なベスチャーが存在することであった。これは、トネリコ属におけるベスチャーの初報告であるとともに、Bailey (1933) が述べていた「ある樹種の有縁壁孔ベスチャーが見られた場合、その樹種のすべての有縁壁孔にベスチャーが存在する」という原則に例外があることを示す重要な知見であった。そして、もう 1 つの重要な発見が、当該樹種の道管相互間の壁孔壁に季節に応じて堆積・消失する被覆物が存在することであった。Wheeler (1981) は、ホワイトアッシュの同一個体から春 (4 月・開葉時)、夏 (6 月下旬)、秋 (10 月・落葉開始直後)、冬 (1 月)、翌春 (4 月・開葉時) の各時期に木部のコアを抜き取り、その最外 2 年輪における道管相互壁孔の季節変化を透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、春や夏に採取した試料の壁孔壁では、セルロースミクロフィブリルのテクスチャがはっきりと認められたが、秋に採取した試料では付着物が発生しており、冬に採取した試料では被覆物が完全に覆っていた。さらに、翌春に採取した試料の形成層から 2 番目の年輪、すなわち冬の試料においては最外年輪であった部分では、壁孔壁のセルロースミクロフィブリルのテクスチャが明瞭な状態になっており、冬の間堆積していた被覆物が翌春までに分解されることが示唆された。

このホワイトアッシュで観察された道管相互壁孔の被覆物と同様のものは、日本に生育するヤチダモ (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) でも確認された (Sano et al. 1998)。ヤチダモに生じる被覆物もホワイトアッシュと同様に季節的な消長を示し、落葉した晩秋に堆積し、早春の開芽前まで確認されていた被覆物が、晩春の開芽直後には消えていた。

Wheeler (1981) が記述していなかった新たな特徴として、Sano et al. (1998) は、道管・

周囲柔細胞間の壁孔壁の道管側に同様の被覆物が形成されていることに加え、春に生じる被覆物の消失が、晩材の小径の道管（孔圏外道管）でのみ見られる現象で、早材の大径の道管（孔圏道管）では起こらないことを示した。すなわち、形成層から2年輪目より内側に存在する孔圏道管では通常、道管に面した壁孔壁の壁面が被覆物によって覆われている状態にあることが明らかにされた。

上記のホワイトアッシュとヤチダモの2例から、このような冬に向けて辺材部に堆積し、翌春には消失する壁孔の被覆物は、トネリコ属内で共通して発生するものと予想される。そこで本稿では、この種の被覆物を“トネリコ型被覆物”と称する。

トネリコ型被覆物に関する最も大きな関心事の一つは、それが樹木の生存に対して何らかの有益な生理的機能をもつかどうかである。秋から春先の限られた期間にだけ堆積し、その後消失するという季節に応じた挙動は極めて制御的に進んでいるように思われ、植物体の生存に関わる重要な生理機能を発揮していることが推測される。木部の主要な通水経路となる道管に堆積することから、トネリコ型被覆物はこれを堆積させる樹種の水分生理に関わっていると考えるのが自然である。Wheeler (1981) はトネリコ型被覆物の機能として、土壌から水の獲得が難しい冬の間の水移動を抑えることで、樹体内の水分を保持することに寄与するのではないかと考察している。一方、このようなトネリコ型被覆物と樹体の水分保持との関係を正確に議論するには、冬の間の道管の水分分布に関する知見を合わせて考える必要があるように思われる。ホワイトアッシュやヤチダモのような環孔材をもつ樹種の多くでは、形成された年の成長期が終わると、孔圏道管は水分通導機能を失うことが知られている (Zimmermann 1983; Ellmore & Ewerts 1986)。その直接的な原因は、道管が水を失って空洞化することであり、孔圏道管の水は成長期が終わった後、気温の低下に応じてキャビテーションを起こすものと考えられている (Zimmermann 1983)。ヤチダモでは、樹幹凍結法とクライオ走査電子顕微鏡 (Cryo-SEM) を組み合わせた手法

によって、この孔圏道管の水の消失が直接的に観察されている (Utsumi et al. 1996, 1999)。

このことは、孔圏道管に堆積するトネリコ型被覆物は、冬の間の道管の水分保持に必ずしも寄与していないことを示している。一方、孔圏外道管については、一般に数年にわたってその通水機能が維持されることが知られており (Umebayashi et al. 2008)、ヤチダモにおいては、数年にわたって冬の間その水分分布が維持されることが確かめられている (Utsumi et al. 1996)。トネリコ型被覆物に Wheeler (1981) の述べたような水分保持機能があるとすれば、それは孔圏外道管で有効に働いているものと予想される。

このようなトネリコ型被覆物の水分保持に関わる生理的機能を実証することは極めて難しいが、適切な対照実験を通じて、被覆物の性質や役割を明らかにすることで、絞り込んでいくことはできるはずである。道管の水分保持に関する性質を明らかにするためならば、例えば被覆物がいかに水の移動を阻害する性質をもつのかということを明らかにすることは重要である。このような通水抵抗性を直接的に評価する方法としては、被覆物の存否が異なる試料に水を流し、その流速を試料間で比較することなどが考えられる。ここでトネリコ型被覆物の場合、この比較は、被覆物の存否が異なる夏の試料と冬の試料でおこなうことになるが、一般に、夏の試料と冬の試料では、主に道管のエンボリズムを原因として木部組織全体の通水性がそもそも大きく異なることが知られているため (Sperry et al. 1988; Cochard & Tyree 1990; Hacke & Sauter 1996)、これらの木部組織全体に水を流して得られた数値を単純比較することは避けなければならない。これを克服する手段としては、マイクロガラスキャピラリーを道管に挿入して流体を流すことで道管一本単位の通水性を調べられる単一道管灌流法 (single vessel method; Zwieniecki et al. 2001) を応用することが挙げられる。本手法を用いれば、通水経路上に道管相互壁孔がある複合道管と、それがない開放道管の計測値の差をとることで、壁孔部の作用だけを抽出することができる (Zwieniecki et al. 2001; Choat et al. 2006)。しかしながら、本手法をトネリコ型被覆

物の解析に適用する場合、ヤチダモの孔圏外道管については、あまりに小径（直径 20～50 μm ）であるためにガラスキャピラリーの挿入が極めて困難であると考えられる。ゆえに技術的に本手法で計測できるのは、直径 100～400 μm に及ぶ孔圏道管に堆積する被覆物の通水抵抗性だけであり、被覆物の水分保持機能が発揮されていると推測される孔圏外道管に堆積する被覆物の通水抵抗性については、孔圏道管で得られた結果から推測して論じる必要がある。この推測のためには、孔圏道管に堆積する被覆物と孔圏外道管に堆積する被覆物で互いに一致する特徴、あるいは異なる特徴が明らかにされている必要がある。ここでいう特徴とは、被覆物が壁孔壁のどれほどの範囲を、どれほどの厚みで覆っているかという構造的な特徴や、被覆物がどのような性質をもつ成分をどれほど含んでいるかといった化学的な特徴である。このような被覆物の構造や成分に関する情報をそれぞれを丹念に分析するだけでも、被覆物の通水特性をある程度明らかにできるものと考えられる。今のところ、このようなトネリコ型被覆物の基本的な性質に関して明らかにされていることはほとんどない。特に被覆物の成分に関してはほとんど未知の状態である。トネリコ型被覆物の生理的機能を十分に議論するには、まずこれらの被覆物の基本的な特徴が明確に理解されている必要がある。

このような被覆物の基本的な特徴に関する知見は、トネリコ型被覆物の堆積と消失がどのように制御されているのか、という疑問の解明にも寄与するものと考えられる。被覆物が発生する道管は、形成後すぐに内容物を失って死細胞となった道管要素から成るため、それ自身では生理的な活動をおこなっていない。ゆえに形成完了後の道管で起こる変化は、菌感染や傷害などの生物的・非生物的な外的作用や経年的な劣化を除けば、周囲の柔細胞がアポプラスト液を介して制御しているものと考えるのが妥当である。道管と壁孔を介して連絡している放射柔細胞や軸方向柔細胞は、接触細胞（contact cells; Braum 1967）あるいは vessel-associated cells (Czaninski 1977) と呼ばれており、隔離細胞 (isolate cells)

あるいは vessel-distant cells と呼ばれる道管と直接連絡しない柔細胞群と協調しながら、物質・水分貯蔵、水輸送、チロースやガム質の形成、浸透圧調整といった様々な役割を果たしていることが知られている (Morris et al. 2018)。とりわけ被覆物が堆積するような冬季に起こる現象に限れば、カエデ属やカバノキ属、クルミ属ではスクロースのような可溶性糖の濃度がアポプラスト液で高まることが知られている (Sauter et al. 1973; Kallio & Ahtonen 1987; Améglio et al. 2002, 2004)。このような接触細胞から分泌された物質によって被覆物の堆積や消失が制御されていることは容易に想像できる。しかし、この過程を理解するための実験は容易に実施できるものではなく、そのために多くの疑問が山積している。被覆物の堆積は壁孔壁だけに生じているのか。また分泌された物質はいかにして道管相互壁孔に到達しているのか。被覆物の消失には、どのような因子が関わっているのか。酵素による分解反応か pH 変化か、あるいは接触細胞に由来する物質に関わるようなものではなく、単に蒸散流などの物理的な因子によって除去されているのか。これらの疑問の全てを解明するには多くの試みが必要であるが、被覆物の構造や構成成分、基本的な性質を明らかにするだけでも、その理解は格段に進むと考えられる。

加えて、第 1 章でも述べた通り、様々な樹種における被覆物の存否を確かめていくことは、被覆物の生理生態的な機能の理解だけでなく、樹種ごとの木材特性の理解において極めて重要である。しかし、トネリコ型被覆物の存在が報告されている樹種は、ホワイトアッシュとヤチダモの 2 種のみであり、トネリコ型被覆物がすべてのトネリコ属で見られるのか、あるいはトネリコ属以外の樹種でも見られるのかといった樹種ごとの存否に関する知見は不足している。トネリコ属 (*Fraxinus*) は、モクセイ科 (*Oleaceae*) に属しており、木本植物のみで構成されている。温帯から亜熱帯にかけて分布するトネリコ属樹種は、ほとんどが落葉樹であるが、亜熱帯に生育する数種は常緑樹である。従来からの形態分類により、花序が当年枝の頂芽または腋芽に出るか、前年枝の腋芽より出るかで、トネリコ節

(頂生花序類; Sect. *Ornus*) とシオジ節 (側生花序類; Sect. *Fraxinuster*) に分けられるが (村田 1989)、近年の分子系統分類においてはシオジ節に相当するものが細分化され、合計 6 つの節で構成されることも提唱されている (Wallinder 2008, 2012)。トネリコ型被覆物が確認されているヤチダモとホワイトアッシュは、この中のシオジ節に属するものである。またこのような系統分類と必ずしも一致するわけではないが、トネリコ属の構成樹種の木材組織構造、とりわけ道管のサイズや配列については多様性がある。ヤチダモやホワイトアッシュは、極めて大きな孔圏道管をもつ環孔材であるが、例えばトネリコ節に属するトネリコやアオダモは環孔材であるものの、孔圏道管の径が前 2 種と比べると小さい傾向にある。また半環孔材や散孔材をもつ樹種もあり、例えば日本国内でも、沖縄に自生し、本州でも庭木として植栽されているシマトネリコは散孔材を持つことが知られている。つまりトネリコ型被覆物の存在は、トネリコ属シオジ節におけるとりわけ環孔性の強い木材をもつ樹種でしか確認できていないこととなる。トネリコ属以外の樹種に関して、Wheeler (1981) は、レッドオーク (*Quercus falcata* Michx.) の冬に採取した辺材部の試料においてトネリコ型被覆物に類するものは見られず、夏に採取された試料 (Wheeler & Thomas 1981) と同様の見た目であったと報告した。このことから、少なくともコナラ属 (*Quercus*) はトネリコ型被覆物を堆積させないと考えられ、樹種によって存否が異なることが示唆されている。一方、Wheeler (1981) は、Thomas (1976) がヒッコリー (*Carya tomentosa* Nutt.) の辺材で観察した道管相互壁孔の被覆物がトネリコ型被覆物に類するものであるとの見解を述べている。Thomas (1976) の報文では、観察したヒッコリーの採取時期が示されておらず、また消失過程の有無についても言及されていないため、この見解はあくまで憶測に過ぎない。しかし、文献を読む限り、おそらく Thomas (1976) はヒッコリーの辺材のほぼすべての道管に被覆物が堆積していたことを報告しており、そのような状況が通水の盛んな夏の状態であるとは考えにくい。彼が観察したヒッコリーは、

通水が行われていない冬の状態のものであり、翌春には被覆物の消失も生じているだろうという Wheeler (1981) の考えは妥当のように思われる。そもそも水分通導と関連付けて解析されることが多い道管相互壁孔は、冬の試料での状態が観察されている例が極めて少ない。ゆえに様々な樹種の冬の試料を丹念に調べていくことで、トネリコ型被覆物がトネリコ属以外の様々な樹種で見出される可能性は十分にあるといえる。

一方、様々な樹種におけるトネリコ型被覆物の存否を、従来の電子顕微鏡法によって明らかにすることは、大きな労力を要することになる。電子顕微鏡で観察する試料の作製には、乾燥、面出し、導電性付与といったそれぞれに時間と精密さを要する工程を踏む必要があり、試料採取から観察までに少なくとも 1 週間程度の時間を要する。また観察範囲も狭いため、再現性を得るために多くの試料を作る必要があり、またそれらを逐一観察しなければならない。さらには、電子顕微鏡そのものが高価な設備であり、また試料作製にも特殊な機器が必要であることから、研究そのものを実施できる場所や機会も限られる。このようなことから、被覆物の存否の調査を試料作製にかかる時間が比較的短く、試料の量産が容易で、かつ機器導入も簡単な光学顕微鏡でおこなえれば、効率的である。例えば Jansen et al. (2004) は、電子顕微鏡で発見されたトールスを有する道管相互間の壁孔壁に関して、そのニレ科内での存否を網羅的に調べる際に、同構造がサフラニン・アルシアンブルー二重染色した切片の光学顕微鏡観察で検出できることを明らかにしたうえで、この方法を活用していた。このような研究例に従って、被覆物の存否を光学顕微鏡レベルで容易に検出できる方法を明らかにすることも重要な課題といえる。

以上を踏まえて、本章ではトネリコ型被覆物の機能や堆積・消失過程を分析するためにも重要な、被覆物の構造と化学成分に関する基礎的な知見を得ることを目的とする。またトネリコ型被覆物を光学顕微鏡レベルで検出できる方法を検討しながら、手始めにトネリコ属内での被覆物の存否を明らかにする。そこで 3.2 節では、電界放出形走査電子顕微鏡

(FE-SEM) による観察を通じてヤチダモにおけるトネリコ型被覆物の構造や季節変化を改めて精査した結果を示す。また本節では、前章で明らかとなった、被覆物が試料作製中に生じるアーティファクトである可能性にも留意して、2.4 節でも使用した凍結技法に基づいて、トネリコ型被覆物が生材中でも存在するかを Cryo-FE-SEM で確認する。3.3 節では、種々の染色法を施したヤチダモの木部組織切片の観察によって、トネリコ型被覆物の成分と、光学顕微鏡レベルでの被覆物の検出法を探る。一般的な光学顕微鏡による観察に加えて、蛍光顕微鏡も活用し、さらには 3.2 節で調べたトネリコ型被覆物の構造と成分の関係を詳しく調べるために、電子顕微鏡による詳しい観察もおこなっている。3.4 節では、酵素処理や免疫標識、紫外顕微分光分析といった、3.3 節よりさらに高度な分析法を用いて、トネリコ型被覆物の成分同定を試みる。3.5 節では、ヤチダモを含むトネリコ属 5 種における被覆物の存否を調べた結果を示す。最後に 3.6 節では、以上の各節で示したトネリコ型被覆物の構造や成分に関する知見をもとに、トネリコ型被覆物の機能や堆積・消失過程に関する総合的な考察をおこなう。

なお、本章では一貫して「トネリコ型被覆物」あるいは「被覆物」という語を、道管相互壁孔あるいは道管・周囲柔細胞間壁孔の壁孔壁に堆積するものに対して用いる。

3.2 トネリコ型被覆物の構造と季節変化

3.2.1 本節の目的と手段

本節では、ヤチダモを対象とした FE-SEM 観察を通じて、トネリコ型被覆物の基本的な構造を明らかにするとともに、トネリコ型被覆物の存否や構造が、季節ごとにどのように変化するかを明らかにする。特に本研究においては、年輪ごとに孔圏と孔圏外を個別に観察し、各領域で被覆物の構造に違いがあるかも明らかにする。トネリコ型被覆物の観察は、試料作製が比較的容易な板目の割断面（壁孔壁の正面が出る壁面）による観察を基本としたうえで、被覆物の断面構造を調べるために、柱目の切削面も観察した。なお、Sano et al. (1998) は、トネリコ型被覆物は道管相互間の壁孔壁だけでなく、道管・周囲柔細胞間の壁孔壁の道管側の壁面にも堆積していることを明らかにしているが、本節では、主に道管相互間の壁孔壁に堆積するものを詳細に分析する。そのうえで、道管・周囲柔細胞間壁孔の被覆物や、壁孔壁以外の壁面で生じる変化についても観察を進め、その特徴を明らかにする。

また本論文の第 2 章で明らかになったように、従来観察されてきた被覆物が、顕微鏡観察のための試料作製の過程で発生したアーティファクトの可能性もある。そこで本節では、2.4 節の手法に従って、採取後すぐに凍結固定した試料を一度も融解させずに Cryo-FE-SEM で観察し、試料作製から観察までのすべての工程を常温下でおこなった試料で観察されるトネリコ型被覆物がアーティファクトであるか否かも明らかにする。

3.2.2 材料および方法

3.2.2.1 供試材料

北海道大学札幌研究林の札幌試験地に植栽された健全なヤチダモの成木 2 個体 (1 号木：胸高直径 20.2 cm、2 号木：胸高直径 17.3 cm) から、形成層から 2～3 年輪目までを含む木部のブロックまたはコアを、1 年を通して定期的に採取した。採取は 2020 年 4 月 10 日 (開葉前)、5 月 13 日 (開葉直後)、6 月 5 日、8 月 31 日、9 月 17 日、10 月 9 日 (黄葉開始時)、11 月 10 日 (落葉開始時)、12 月 11 日 (落葉後) におこなった。採取したブロックやコアは、乾燥を防ぐため、水で濡らしたペーパータオルとともにポリ袋に密封した状態で速やかに実験室に持ち帰り、30%エタノールに浸漬させて保存した。また 12 月 11 日に採取したブロックの一部は、採取後すぐにアルミホイルに包んで液体窒素で凍結させ、ディープフリーザー (−80℃) で保存した。

3.2.2.2 FE-SEM による観察

道管相互壁孔を正面方向から観察するための試料作製は、2.2 節と同様の手順でおこなった (詳細は 2.2.2.2 を参照)。ただし、乾燥法は基本的に臨界点乾燥とした。各時期に採取したそれぞれのサンプルについて、各年輪の孔圏および孔圏外ごとに観察試料を作製した。

道管相互壁孔の断面を観察するため、9 月 17 日と 12 月 11 日に採取したブロックまたはコアの当年輪から前年輪の部分を超純水 (Milli-Q, Merck Millipore) で洗浄しながらカミソリ刃等でトリミングし、2～3 mm 角の小ブロックとした。これらの試料は、エタノールシリーズ (30–50–70–90–99.5–99.5–99.5%) で溶媒置換脱水させた。次にメタクリレート樹脂で包埋するため、試料の浸漬液を包埋剤に置換した。包埋剤はメタクリル酸ブチルとメタクリル酸メチルの 2 : 3 の混合液に、重合促進剤である過酸化ベンゾイルを

1% w/v の濃度となるように添加して調製した。はじめに浸漬液をエタノールと包埋剤の等量混合液に交換して 3 時間静置し、続いて 100%の包埋剤に交換した。その後、浸漬液はフレッシュな包埋剤に 3 時間以上の間隔をあけて 3 回交換した。包埋剤を浸透させた試料は、木口面または柾目面を下に向けてゼラチンカプセルに入れた。カプセルを包埋剤で満たし、蓋をしてから 65℃のオーブンで 24 時間熱して、硬化させた。得られた包埋試料はカッターの刃でトリミングし、ガラスナイフを取り付けたウルトラミクロトームで切削した。粗く削って複合管孔が表面に現れた後、切削厚を 1 μm 未満に設定し、ガラスナイフのフレッシュかつ良質な部分で 3~4 回切削することで、道管相互壁孔の断面を含む平滑な面を得た。次に試料を脱包埋するため、切削面を傷つけないように余剰の樹脂を切り取り、アセトンに浸漬させた。半日~一日の間隔でアセトン液を 10 回ほど交換し、試料から樹脂を完全に取り除いた。その後、試料は気乾させ、アルミニウム製 SEM 試料台にカーボンペースト (Colloidal Graphite, Ted Pella) で接着し、オスミウムコーター (HPC-20, Vacuum Device または Neoc-Pro, Meiwafoysis) でオスミウムをコーティングした (HPC-20 では 5 秒、Neoc-Pro では 5 mA 10 秒)。SEM 試料は孔圏と孔圏外のものをそれぞれ作製し、FE-SEM (JSM-6301F, JEOL または S-4800, Hitachi) で観察した。加速電圧は JSM-6301F では 2.5 kV とし、S-4800 では 1.0 kV とした。また作動距離は JSM-6301F では 8~39 mm とし、S-4800 では 5~8 mm とした。観察された構造の寸法は、撮影したデジタル画像を用いて、ソフトウェア上 (ImageJ 1.53) で測定した。

3.2.2.3 Cryo-FE-SEM による観察

12 月 11 日に採取して凍結保存したブロックを、クライオスタット (CM 3050S, Leica) の冷却雰囲気下 (-30°C) に入れて温度を平衡させたのち、同装置チャンバー内で十分に冷やしたカミソリ刃やカッター刃でトリミングした。形成層から 3 年輪までの領域で道管

が集中している位置に木口面からカミソリ刃を食い込ませ、割り開いて板目面の観察面を出した。以降、試料ホルダーへの試料接着から観察までの操作や条件は、2.4 節でおこなったものと同様である（2.4.2.2 を参照）。

3.2.3 結果

3.2.3.1 道管相互壁孔に生じるトネリコ型被覆物の基本的な形態の観察

はじめに、冬（11～12 月）に採取した試料において観察された、道管相互間の壁孔壁を厚く覆ったトネリコ型被覆物の典型的な形態を Fig. 3-1 に示した。この形態をトネリコ型被覆物の基本的な形態と判断し、以下にその特徴を記述する。

板目面から道管相互間の壁孔壁が露出した部分を観察したとき、被覆物は観察されたほぼすべての壁面ですべての壁孔壁を覆っていた（Fig. 3-1a,b）。たいていの場合、被覆物は道管相互間の壁孔壁の全体を覆い、壁孔壁のセルロースミクロフィブリルのテクスチャは完全に覆い隠されていた。特に孔圏外道管で観察された被覆物は、常に壁孔壁の全体を完全に覆っていた（Fig. 3-1c,d）。一方、孔圏道管で観察されたものは、壁孔壁の全体を覆っている場合が多かったが（Fig. 3-1e）、壁孔壁の周縁部の堆積が薄く、代わりに放射状に伸びた微繊維が確認できるものも高い頻度で観察された（Fig. 3-1f）。被覆物が厚く堆積している部分の表面の形態は、孔圏道管で観察されたものと、孔圏外道管で観察されたものとは大きく異なっていた。孔圏道管では、被覆物の表面は平滑であり、中央部にわずかな突起が見られることもあった（Fig. 3-1e）。一方、孔圏外道管では、被覆物の表面が粒状の凹凸に富んでおり、ほとんどの場合、その中央部から長径 1 μm 程度の楕円形や卵形、ないしはこれらが歪んだような形状の断面を持つ突起が存在していた（Fig. 3-1c）。この突起の基部は網状に連なった比較的大きな隆起に取り囲まれており、これは突起から離れるにしたがって次第に低くなっていた。被覆物が観察された壁面の片割れとなる壁面を観察す

ると、孔圏外道管の被覆物の表面におけるこのような突起や隆起は、壁孔壁が面している壁孔縁側の形態をかたどっていることが明らかであった (Fig. 3-1c')。すなわち、被覆物中央部の突起は、ちょうど被覆物が面していた外孔口やその先にある壁孔道の孔隙の形態やサイズに一致しており、また突起基部の網状の隆起内にある凹部は、ちょうど外孔口周囲に存在するベスチャーの凸部と対応していた。孔圏外道管の被覆物における中央の突起は、しばしば存在しない場合があった (Fig. 3-1d)。この場合にその片割れとなる壁面を観察すると、ほとんどの場合、壁孔道の孔隙が閉塞されていた (Fig. 3-1d')。これは本来壁孔道にあった被覆物の突起が、試料調製の過程で被覆物の本体より脱離し、壁孔道に残留している様子を示した状況を捉えたものと解釈できる。

被覆物の立体構造をより詳しく把握するために、柱目面の切削面よりトネリコ型被覆物の断面を観察した結果を Fig. 3-2 に示す。はじめに被覆物の存在しない夏の試料 (9 月) の道管相互壁孔を観察すると、壁孔腔の中は空洞となっており、その中央に壁孔壁が存在していた (Fig. 3-2a)。観察された壁孔壁は非常に薄く、画像から判断するに厚さは $0.1\ \mu\text{m}$ を下回っており、その縁にある pit annulus の領域と明らかに厚みが違っていた。次に、被覆物が堆積している冬の試料 (12 月) を観察すると、孔圏道管の道管相互壁孔については、夏の試料と同様に、壁孔腔が空洞になっていて、その中央に壁孔壁が存在する様子が観察された (Fig. 3-2b)。しかし、壁孔壁の厚さは少なくとも $0.3\ \mu\text{m}$ を上回って、pit annulus と壁孔壁の厚みの差が識別できなくなっていることから、被覆物が壁孔壁の両面に堆積していることは明らかであった。9 月の試料で計測した壁孔壁の厚みを差し引けば、被覆物の厚さは $0.1\sim 0.2\ \mu\text{m}$ 程度と推定される。一方、孔圏外道管については、夏の試料と大きく様子が異なり、壁孔室から壁孔道の途中にかけて、被覆物が壁孔腔を満たしていた (Fig. 3-2c)。孔圏道管のものと比べると、被覆物は非常に厚く、壁孔の中央部から壁孔道に至る部分でおよそ $2\ \mu\text{m}$ の厚みがあった。孔圏外道管の被覆物の断面では、明らかに

表面の性状の異なる2つの層があることが明らかであった (Fig. 3-2c)。このうち壁孔壁に近い層 (以降、I-1 層と表記) は明らかな不定形で、滑らかな表面性状を持っていたのに対し、壁孔縁・壁孔道側の層 (以降、I-2 層と表記) は表面に粒状のテクスチャが目立っていた。I-1 層では、壁孔壁が存在することが予想される中央部が、凹んでいるように観察された。この被覆物の二層構造は、よく観察すると孔圏道管の被覆物においても認められた (Fig. 3-2d)。

3.2.3.2 道管相互間壁孔に生じるトネリコ型被覆物の季節・部位ごとの観察

採取時期および各年輪の孔圏・孔圏外ごとに観察された道管相互間の壁孔壁の様子を Fig. 3-3 および Fig. 3-4 に示した。本論文では以降、観察試料の年輪について、採取した年の成長期に形成が進んだものを当年輪とし、その1つ内側の年輪を前年輪、さらにもう1つ内側の年輪を前々年輪と表記する。すなわち、当年の木部形成が開始していない4月に採取した試料の最外年輪は前年輪に相当する。

はじめに当年輪における季節変化について記述する (Fig. 3-3)。当年輪は5月の時点で形成が始まっていたが、年輪幅が狭く、試料作製が困難であったため観察を断念した。6月の試料では孔圏外がほとんど形成されていなかったため、孔圏道管のみを観察した。この時期の孔圏道管の道管相互壁孔では、壁孔壁にセルロースミクロフィブリルが疎に堆積して空隙が目立ち、加えて直径およそ 50~200 nm の粒状の物質が多数付着していた (Fig. 3-3a)。8月および9月の試料を観察すると、孔圏道管と孔圏外道管の双方で、道管相互間の壁孔壁にそのような粒状の物質は認められず、ミクロフィブリルのテクスチャがはっきりと表れていた (Fig. 3-3b, e)。なお、孔圏道管の道管相互間の壁孔壁の表面には、湾曲する繊維状の物質が存在していた (Fig. 3-3b)。10月になると、孔圏道管では壁孔壁に多量の粒状の付着物が観察されたものの、被覆物の形態は明確には認められなかったが (Fig.

3-3c)、多くの孔圏外道管では明らかにトネリコ型被覆物が生じていた (Fig. 3-3f)。ただし、その形状はやや不完全であり、中央部の突起や隆起は見られなかった。11 月および 12 月の試料では、孔圏・孔圏外ともに典型的な形態をしたトネリコ型被覆物が観察された (Fig. 3-3d,g)。

前年輪と前々年輪では、どの時期に採取した試料でも、孔圏の道管相互間の壁孔壁は被覆物に覆われていた。一方、孔圏外の道管相互間の壁孔壁については、被覆物の堆積状況が採取時期と年輪によって異なった (Fig. 3-4)。4 月の試料の前年輪では、孔圏外の道管相互間の壁孔壁が、典型的な形態のトネリコ型被覆物に覆われていた (Fig. 3-4a)。一方、同月の前々年輪では、壁孔壁の中央部分を中心に粒状の物質が同心円状に付着している様子が観察されたものの、被覆物は観察されなかった (Fig. 3-4d)。5 月、6 月、8 月、9 月の試料では、前年輪・前々年輪ともに、被覆物や付着物は観察されず、道管相互間の壁孔壁のセルロースミクロフィブリルの形態は明瞭に認められた。ただし、壁孔壁の縁に被覆物が残留したものと考えられる付着物が観察されることがあった (Fig. 3-4b,e)。10 月の試料の前年輪と前々年輪では、セルロースミクロフィブリルが観察されるものの、壁孔壁の中央部を中心に被覆物が堆積し始めている様子が確認された (Fig. 3-4c,f)。11 月と 12 月の試料では、すべての道管で典型的な形態のトネリコ型被覆物が観察された。以上に記述したヤチダモにおける時期、年輪、孔圏・孔圏外ごとのトネリコ型被覆物あるいは付着物の存否を、Table 3-1 にまとめた。なお、本結果については観察した 2 個体の両方で同様の傾向が観察されている。

3.2.3.3 道管相互壁孔以外の壁面の観察

道管相互壁孔にトネリコ型被覆物が堆積している時期には、道管・周囲柔細胞間の壁孔壁の道管側にも被覆物が発生していた。Fig. 3-5 に、観察された道管・周囲柔細胞間の壁

孔壁の被覆物の像を示した。これらが道管側の壁面であることは、壁孔壁の背面に単壁孔様の孔口が観察されることから判断できる (Fig. 3-5a,b)。道管・周囲柔細胞間壁孔に堆積していた被覆物の形態は、道管相互壁孔に堆積する被覆物と同様に、孔圏外道管と孔圏道管で異なっていた。孔圏外道管のものは、表面に起伏があり、中央部に突起が見られた (Fig. 3-5c)。一方、孔圏道管のものは、表面が平滑で、壁孔壁の全面が覆われていないものも散見された (Fig. 3-5d)。道管相互壁孔に被覆物が存在しない領域では、道管・周囲柔細胞間の壁孔においても被覆物は堆積しておらず、壁孔壁のフィブリル様のテクスチャが識別できた (Fig. 3-5e)。

また孔圏外道管に限り、トネリコ型被覆物の堆積している時期に、道管の内腔側の壁面に液滴状の堆積物が多数付着していることが観察された (Fig.3-6)。この液滴状の堆積物は、道管要素の境界に相当する単せん孔のせん孔縁に集中的に付着し、その隆起の頂部にある一次壁の露出部を覆うように輪状に連なっていた。

3.2.3.4 Cryo-FE-SEM によるトネリコ型被覆物の観察

トネリコ型被覆物が堆積している 12 月の試料を採取後すぐに凍結固定し、一度も融解させずに Cryo-FE-SEM で観察した際に得られた像を Fig 3-7 に示す。乾燥試料の FE-SEM 観察と同様に被覆物が道管相互間の壁孔壁を覆っていることが確認された。孔圏道管の被覆物は、乾燥試料で観察されたものと同様の形態であった (Fig. 3-7a)。壁孔壁の中央を覆う被覆物の表面は平滑であり、壁孔壁の辺縁部における被覆が不十分な部分には、放射状に伸びる細紐状の物質が認められた。一方、孔圏外道管の被覆物も乾燥試料で見られたもののおおむね同じ形態をしていたが、表面がやや滑らかで、中央部は盛り上がっているものの突起や網状の隆起は明瞭な形では確認できなかった (Fig. 3-7b)。孔圏外に

において、壁孔室に面している壁孔縁の壁面を観察すると、壁孔道が被覆物の一部が脱離したと思われる物質に閉塞されていた (Fig. 3-7b, 矢印)。

3.2.4 考察

3.2.4.1 トネリコ型被覆物の孔圏・孔圏外における構造上の差異と層構造

冬に採取した試料について、年輪ごとに孔圏と孔圏外で試料を分け、それぞれに堆積する典型的なトネリコ型被覆物の形態を FE-SEM で詳しく観察することで、孔圏道管に堆積する被覆物と、孔圏外道管に堆積する被覆物の間に、明確な構造上の違いがあることが明らかとなった。板目面の壁孔壁の正面方向から見たとき、孔圏外道管は、表面に突起や隆起があるうえに粒状の起伏に富んでおり、常に壁孔壁の全体を覆っていた (Fig. 3-1c,d)。一方、孔圏道管の被覆物は表面が滑らかで、壁孔壁の周縁部を完全に覆っていない場合も散見された (Fig. 3-1e,f)。この孔圏外道管の被覆物の表面に様々な凹凸が見られる理由は、被覆物が壁孔室から壁孔道にかけての領域を満たすように存在しており (Fig.3-2c)、壁孔室に面した壁孔縁の表面形状をかたどっているためであると考えられる。被覆物の表面形状とそれが対面している壁孔縁側の壁面の形態を比較すると (Fig. 3-1)、壁孔道の孔隙やベスチャーを含む、壁孔室に面した壁孔縁の表面形状に対応して、被覆物の表面に複雑な突起や隆起が現れていることがわかる (Fig. 3-1 c,c',d,d')。一方、孔圏道管の被覆物は、壁孔壁を薄く覆うのみで、それに対面する壁孔縁の壁面に接していないため、板目面より観察すると平滑な表面を示すものと考えられる (Fig. 3-1e,e', Fig.3-2b)。

このように孔圏道管と孔圏外道管では被覆物の厚みは大きく違っていたが、壁孔の大きさを考慮すると、実は壁孔 1 つあたりに堆積している被覆物の量には両者で大差がない可能性がある。Fig. 3-1 や Fig. 3-2 で比較すると明らかなように、道管相互壁孔のサイズは、孔圏道管のほうが孔圏外道管よりも明らかに大きい。壁孔壁の径は孔圏道管ではおよそ

5.5 μm 、孔圏外道管ではおよそ 3.5 μm と計測され、おおむね 1.5 倍の差があった。壁孔壁が真円形であると仮定すると、壁孔壁の面積は孔圏道管では 23.75 μm^2 、孔圏外道管では 9.62 μm^2 と算出され、2.5 倍の差となる。この場合、仮に同量の被覆物が堆積したら、孔圏外道管の壁孔の方が厚くなってしまうことは自明である。参考までに、各壁孔に堆積している被覆物の量がどれくらいかを、壁孔壁の体積を無視して概算してみる。まず孔圏道管については、壁孔壁と同じ面積で被覆物が厚みの分だけ積層していると仮定する。Fig3-2b より計測すると、孔圏道管の被覆物の厚さは 0.3~0.4 μm であった。これに壁孔壁の面積をかけると、7.1~9.5 μm^3 という値が得られる。次に孔圏外道管について、まず被覆物に満たされている壁孔室の容積を、壁孔室が壁孔壁の部分を最大径とする円盤形をしていると仮定して算出する。このときの壁孔室の体積は、x 切片が壁孔室の深さ、y 切片が壁孔壁の半径であるような二次関数の回転体の体積として概算できる。Fig. 3-2 より、壁孔室の深さはおよそ 0.6 μm と計測された。壁孔壁の半径を、先に計測した直径の半値である 1.75 μm として計算すると、最終的に壁孔室の容積は 6.2 μm^3 と計算された。被覆物の体積は、この壁孔室の容積に壁孔道に侵入した突起部分の体積を加えたものとなる。突起部分を楕円柱に見立てて体積を求めると、Fig. 3-1 より外孔口ないし壁孔道の断面の長径はおよそ 1.2 μm 、短径はおよそ 0.6 μm と計測され、また Fig. 3-2b より壁孔道に堆積している被覆物の全長がおよそ 1.5 μm であったため、2 面分を合わせた突起部分の体積は 1.7 μm^3 と計算された。合計すると、孔圏外道管の被覆物の堆積は 7.9 μm^3 であると求められる。これらの値は概算によって導かれたため、あくまで参考値であるが、少なくとも孔圏道管における被覆物の堆積量（およそ 7.1~9.5 μm^3 ）と孔圏外道管における被覆物の堆積量（およそ 7.9 μm^3 ）にそれほど差がないことを示すには十分のものと思われる。被覆物の厚さの違いや、壁孔の孔隙内における充填性の違いは、被覆物の堆積量ではなく、道管相互壁孔のサイズに起因することが示唆される。

孔圏道管と孔圏外道管における被覆物の構造的な違いは、被覆物の働きにも違いを生むと考えられる。壁孔壁全体が厚く覆う孔圏外道管の被覆物は、道管相互壁孔の透過性を著しく失わせているように思われるが、壁孔壁を薄く覆い、しばしば辺縁部では堆積が不十分な孔圏道管の被覆物は、道管相互壁孔の物質透過を多少なりとも許しているように思われる。3.1 節で述べたように、トネリコ型被覆物には冬季の樹体の水分保持に関する機能があることが予想されているものの (Wheeler 1981)、ヤチダモの道管の水分分布を季節別に観察した研究では、孔圏道管についてはそのような効果を示す現象は認められないことが明らかであった (Utsumi et al. 1996)。その一因として、被覆物による壁孔の閉塞が不十分であることが関わっているのかもしれない。しかし、冬季の道管の水分保持については、熱力学的な確率論により道管の寸法なども深く関わってくるため、簡単には結論を出せない。冬季における道管の水分保持と被覆物の機能に関しては、後に 3.7 節でさらに議論する。

孔圏道管の被覆物に特有のものとして、被覆物の辺縁部に放射状に伸びる細紐状の物質が見られたことが特筆される (Fig. 3-1f)。被覆物の本体と結合していること、また被覆物のない時期に観察されることはないことから、この細紐状の物質はトネリコ型被覆物の一部と考えられる。紐状に堆積していることより、この物質は例えばセルロースやアミロースなどの直鎖状の高分子であることが示唆される。ゆえに孔圏道管のトネリコ型被覆物においては、これに該当するような成分が含まれる可能性がある。一方、微繊維が孔圏外道管の被覆物で観察されなかったことは、孔圏道管の被覆物と孔圏外道管の被覆物に異なる成分が含まれていることを示唆しているのかもしれない。とはいえ、SEM で観察された未知の微細構造物の形態をもとに成分を特定することは、原則的に不可能である。この細紐状の物質について、本稿では FE-SEM 観察の際にトネリコ型被覆物の部分構造としてしばしば現れる特徴、と記述するにとどめる。

孔圏道管の被覆物と孔圏外道管の被覆物の双方ともに、その断面観察において、明確に性状が異なる 2 つの層が存在することが確認された (Fig. 3-2c,d)。被覆物の壁孔壁に近い I-1 層は、表面が滑らかで明らかな不定形をしており、ゲル状を呈しているようにも見える (Fig. 3-2 白矢印)。一方、壁孔縁・壁孔道側の I-2 層は表面に粒状の起伏が認められ、幾分か結晶性があるように見える (Fig. 3-2 黒矢印)。このような明らかな性状の違いから、各層は異なる成分を含んでいる可能性があると考えられる。この層構造については、次節 (3.3 節) において準超薄切片を電子顕微鏡観察した結果を示してから、改めて議論する。

3.2.4.2 トネリコ型被覆物の季節変化

道管相互間の壁孔壁における季節ごと、年輪ごと、孔圏・孔圏外ごとのトネリコ型被覆物および堆積物の存否の変化は、Fig. 3-3、Fig. 3-4 ならびに Table 3.1 に示した通りである。次年には当年輪が前年輪、前年輪が前々年輪になることを踏まえると、Table 3.1 からは、当年に形成された道管の 3 年間にわたるトネリコ型被覆物の堆積状況の変化を読み取ることができる。その変化の過程を大まかに捉えようと、被覆物は 10 月中 (黄葉開始時) に堆積が進み、孔圏外道管のものについては 4 月 (開葉前) から 5 月 (開葉直後) の間に消失する。またこの孔圏外の被覆物の消長は、少なくとも 2 年間は繰り返されることが示唆される。このことはすでに先行研究 (Sano et al. 1998) で示されており、その再現性が示されたといえる。ここで、被覆物の存否が切り替わる時期 (4 月あるいは 10 月) に発生している種々の付着物 (Fig. 3-3c, Fig 3-4c,d,f) は、状況からみて堆積途上あるいは消失途上にある被覆物の一部を捉えたものと考えるのが妥当と思われる。これらの堆積・消失途上の被覆物が観察されたことにより、当該時期にまさに被覆物の堆積・消失が進行していることが示され、被覆物の消長過程がより克明に示されたといえる。一方、6 月の当年輪の孔圏道管で認められた道管相互間の壁孔壁における疎に堆積したセルロースミクロ

フィブリルや粒状の堆積物 (Fig. 3-3a) は、トネリコ型被覆物の堆積・消失とは無関係に生じていた。6 月の孔圏道管は形成されてからそれほど時間はたっていないものであるため、これらの堆積物は、道管あるいは道管相互壁孔の形成に際して生じた自己分解過程の名残である可能性がある。道管や道管相互壁孔の形成過程で生じた分解産物がどれほどのタイムスケールで除去されているのかについては、調べた限り確かな知見がない。今回観察した 6 月の孔圏道管は、形成されてから 1~2 か月程度は経っていると考えられる。その期間中、このようなデブリが壁孔壁上に堆積しているのならば、形成当初の道管道後壁孔の通水性は、月単位の長い時間をかけながら徐々に変化しているものと考えられる。このことは、植物の成長期初期の水分生理を理解するうえで興味深いことであるが、その詳細を明らかにするにはさらなる検討を要する。なお、8 月および 9 月の孔圏道管における道管相互間の壁孔壁に、湾曲する繊維状の物質が認められたが (Fig. 3-3b)、これについては Sano (2004) がヤチダモの孔圏道管の道管相互壁孔で常に観察される *fine curly fibril* として既に報告しており、被覆物とは無関係であると考えられる。

被覆物の堆積の進行が、孔圏と孔圏外、あるいは年輪ごとに異なっていたことは (Table 3-1)、被覆物の堆積過程やその制御機構を考えるうえで興味深い。10 月の当年輪においては、孔圏外道管では被覆物の堆積が明らかであったが (Fig. 3-3f)、孔圏道管では粒状の堆積物が発生していたもののミクロフィブリルのテクスチャも確認でき、明確な被覆物の様相は示していなかった (Fig. 3-3c)。このような違いが現れるメカニズムについては、先の議論 (3.2.4.1 を参照) のように、壁孔のサイズと堆積物の厚さの関係が影響している可能性が大いにある。すなわち、たとえ同じタイミングに堆積が始まり、同じ速度で堆積しても、よりサイズの大きい孔圏道管の道管相互壁孔では、被覆物の厚さ方向の堆積に時間がかかるために、薄く堆積しているように見える。一方、孔圏外道管の年輪間での被覆物の堆積状況を比較してみると、10 月の堆積が当年輪よりも前年輪や前々年輪で遅れているこ

とが明らかであった (Fig3-3f vs Fig. 3-4c,f)。また、4 月の開芽前の試料について、前年輪では完全な形態の被覆物が見られたにもかかわらず (Fig. 3-4a)、前々年輪では被覆物の消失が始まっていた (Fig. 3-4d)。同じ孔圏外道管どうしを見比べているため、この違いは壁孔のサイズなどの組織構造の違いによるものでないことは明らかである。被覆物の堆積や消失の開始タイミング、あるいはその進行速度が年輪間で異なることが示唆される。被覆物の堆積や消失の進行に年輪間で違いが生じるメカニズムは定かではない。しかし、結果として現れている状態だけを見れば、最外年輪では、その内側にある年輪よりも被覆物の堆積開始が早く、消失開始が遅いということになる。仮にトネリコ型被覆物に越冬に有用な保護機能があるとするならば、この状況は、最外年輪の道管を他の道管よりも優先して保護していることを示していると考えられる。維管束形成層に最も近い最外年輪の通水経路を手厚く保護することは、樹木の生存戦略としては理にかなっている。年輪間で被覆物の堆積状況が異なるのは、限られたリソースのなかで最大限の機能を発揮するように適応が進んだ結果なのかもしれない。

加えて、4 月の開芽前の試料の前々年輪で被覆物の消失が始まっていたこと (Fig. 3-4d) は、被覆物の消失が蒸散流の発生とは無関係であることを示唆する重要な知見である。落葉樹であるヤチダモでは、被覆物が見られる 10 月から 4 月の時期は、樹木の葉が黄葉し、落葉している時期に相当する。この時期のヤチダモの樹幹では、緑葉のついた 5 月から 9 月とは違って蒸散流がほとんどあるいはまったく発生していないため、被覆物の堆積が蒸散流による圧力によって制御されていると考えることもできる。この推測に基づくと、被覆物が除去される主因が蒸散流による物理的な力である可能性も想定される。しかしながら、今回、前々年輪で被覆物の消失が始まっていた 4 月の採取日は、芽吹きより少なくとも 3 週間は前に当たり、この時点で樹幹内に蒸散流はほとんど発生していなかったと判断される。ゆえに、被覆物は少なくとも蒸散流の負圧によって除去されているわけではない

と推察される。一方、このような春先においては、木部内に陽圧が発生している可能性はある。カエデ属、ブナ属、クルミ属、カバノキ属、アサダ属、ブドウ属などでは、春先の開芽前の時期に樹液の滲出が示されるが、これは木部内に陽圧が発生することによって生じるものである（Kramer & Kozolowski 1960; Schenk et al. 2021）。現状の議論では、このような春先に発生する陽圧は、樹種に依存して生じるものであり、空洞化した道管の再充填のような関連する現象が起きていないことからヤチダモのような環孔材の樹種では生じていないと想定されている（Hacke & Sauter 1994; Schenk et al. 2021）。今のところ、被覆物の消失は道管内に発生する物理的な力よりも、酵素分解などの化学的な反応が大きく寄与して生じていると考えるのが妥当に思われる。

3.2.4.3 道管相互壁孔以外で観察される被覆物や堆積物

Sano et al. (1998) が報告した通り、トネリコ型被覆物は、道管・柔細胞間の壁孔壁の道管側にも観察された（Fig. 3-5a-d）。その形態は、道管相互壁孔に堆積する被覆物と同様であり、孔圏外道管では表面に起伏が激しく、中央部に突起がみられていた一方で（Fig. 3-5c）、孔圏道管では表面が平滑で、壁孔壁の全面が必ずしも覆われていなかった（Fig. 3-5d）。孔圏・孔圏外においてこのような形態差が生じている理由については、道管相互壁孔の被覆物と同様であると考えられる。すなわち、孔圏道管の被覆物は壁面を覆うのみであるが、孔圏外道管の被覆物は、壁孔室から壁孔道までを充填しているものと考えられる。

トネリコ型被覆物が堆積している時期の試料の孔圏外道管では、道管の内腔側の壁面に液滴状の堆積物が付着していた（Fig. 3-6a,b）。トネリコ型被覆物の発生と同調して道管の孔隙に発生していること、また少なくともエタノールによる処理では除去されないことから、この堆積物はトネリコ型被覆物と、成分や由来が同じものであると考えられる。すなわち、トネリコ型被覆物は、少なくとも壁孔において局所的に発達する構造物ではなく、

道管の内腔に分泌された物質が道管の壁面に堆積したものの一部を捉えたものであるというのが正しい解釈といえそうである。このトネリコ型被覆物や道管壁の堆積物の由来となる物質は、おそらく周囲柔細胞から道管に分泌されていると考えられるが、道管の壁面に液滴状のクラスターを作っておよそランダムな位置に付着していることから、道管の壁面を伝って広がっているというよりも、一度道管液中に放出されたものが壁面に吸い寄せられることで広がっているのではないかと推測される。

ここで特筆すべき点として、道管壁面に見られた液滴状の堆積物が、せん孔縁の隆起の頂部に集中していたことが挙げられる (Fig. 3-6b)。堆積物の由来となる物質が周囲柔細胞から道管液に放出されて広がる過程を前提とした場合、このことは、道管液中を漂う堆積物の由来となる物質が、せん孔縁の当該部位に優先的に引き寄せられていることを示すものである。このような優先的な付着の原因は、せん孔縁の当該部位が周囲の二次壁よりも、堆積物の由来となる物質と親和性が高い化学的性質をもつためであると予想される。せん孔縁の隆起の頂部には、せん孔の形成過程において分解された複合細胞間層の縁が露出する (Fig. 3-6c; Ohtani et al. 1989)。調べた限りその化学組成に関する報告例は見当たらなかったが、一般的なサフラニンやトルイジンブルーO などによる呈色性が、周囲の二次壁とは異なることから、せん孔縁の当該部位と周囲の二次壁が異なる化学組成をもつことは十分に想定される。またトネリコ型被覆物が堆積する壁孔壁も、複合細胞間層から主に非セルロース多糖が分解・除去されて形成された壁面であり、その化学組成は、周囲の二次壁とは大きく異なって、リグニンを含まず、少なくともセルロースを中心とした多糖類が主成分となっていることは、1 章で述べた通りである (1.2.2 を参照)。ゆえに、道管相互間および道管・周囲柔細胞間の壁孔壁も、せん孔縁と同様に、道管中に漂う分泌物を化学的に引き付けることで、トネリコ型被覆物を厚く堆積させているという仮説が立てられる。この仮説の裏を返せば、トネリコ型被覆物を堆積させることを主目的に、壁孔壁に

親和性のある物質が道管に分泌されていることまで想定できる。そうであるならば、トネリコ型被覆物に何らかの重要な機能がある可能性は高くなるだろう。具体的にどのような壁成分が被覆物と親和性があるのかを明らかにするには、被覆物の成分が明らかにされる必要がある。

3.2.4.4 インタクト試料で観察されたトネリコ型被覆物

採取直後に凍結させて、その後一度も融解させなかった試料を Cryo-FE-SEM で観察した場合でも、乾燥試料の FE-SEM 観察と同様にトネリコ型被覆物が道管相互間の壁孔壁に堆積していることが確認された。凍結を維持している限り、試料内部の化学成分の分布や質、量はほとんど変化しないため、この結果はトネリコ型被覆物が常温下でおこなった試料調製過程によって発生したアーティファクトでないことの強力な証拠となる。

観察された被覆物の形態は、乾燥試料を FE-SEM 観察したときにみられたものと同様であった。孔圏道管の被覆物は、特に乾燥試料のものと同様の形態を示した。辺縁部の堆積が薄い場合に見られる放射状に伸びた細紐状の物質も観察され、このような部分構造も乾燥等によるアーティファクトでないことが分かった (Fig. 3-7a)。孔圏外道管についても、やや不明瞭ながら、中央部の盛り上がりや表面にある程度の起伏が見られ、乾燥試料で観察されたものと基本的な構造に違いがないことが示された (Fig. 3-7b)。このような孔圏外道管の被覆物における表面の凹凸は、被覆物の向かいにあった壁孔室に面した壁孔縁の壁面をかたどったものであることは、先に議論した通りである (3.2.4.1 を参照)。この被覆物の凹凸が観察されたことにより、凍結試料においても被覆物が試料の面出し前から道管相互壁孔の孔隙内を満たすように存在していたことが示される。すなわち、被覆物は面出し後におこなった水の昇華に伴って道管液から析出したものではないと判断される。被覆物は想定されるあらゆるアーティファクトと無縁であり、生立木および生材の道

管相互間壁孔に確実に存在していることが示唆される。一方、被覆物が凍結試料において被覆物の凹凸が不明瞭であったことについては、被覆物の周囲に氷晶が付着していた可能性があるほか、含水状態の膨張した被覆物を捉えた可能性があると考えられる。

3.3 組織染色によるトネリコ型被覆物の検出

3.3.1 本節の目的と手段

本節では、様々な組織染色に対するトネリコ型被覆物の染色性を明らかにする。その過程で、従来電子顕微鏡でしか観察されていなかったトネリコ型被覆物を、光学顕微鏡レベルでより簡便かつ広範囲に検出する手法を検討するとともに、被覆物の成分を明らかにすることを目指した。本節では、はじめに光学顕微鏡レベルの染色法として、トルイジンブルーO 染色、サフラニン・アルシアンブルー二重染色、過ヨウ素酸・シッフ試薬 (Periodic acid-Schiff reagent; PAS) 染色、KMnO₄ 染色を試験した。さらにより高い倍率で染色性を確認するために、過ヨウ素酸・チオカルボヒドラジド・プロテイン銀 (Periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate; PATAg) 染色と KMnO₄ 染色を供したヤチダモの木材組織切片を、電子顕微鏡で観察した。

トルイジンブルーO は、酸性の組織に結合する塩基性色素である。染色手順が容易であり、動物組織と植物組織の両方で汎用される。異調染色性 (メタクロマジー) を示すことが知られており、植物試料においては、木化壁や未木化壁、柔細胞などで呈色が異なることが示されている (O'Brien et al. 1964)。特定の成分に対する特異性はないが、色調をもとに組織ごとの成分の異質性を明らかにすることができる。サフラニン・アルシアンブルー二重染色は木材切片に対して汎用される染色法であり、主に木化壁 (サフラニンに呈色) と未木化壁を識別する際に用いられる。染色手順は容易であり、特異性は低いものの、サフラニンによるフェノール類の検出やアルシアンブルーによる酸性多糖類の検出が期待される (Jansen et al. 2004)。PAS 染色および PATAg 染色は、多糖類を特異的に標識できる。原理は明解であり、過ヨウ素酸によるグリコール基の選択的な酸化により、多糖類から特異的にアルデヒドを生成させ、これをシッフ試薬またはチオカルボヒドラジドを

介して反応させたプロテイン銀によって検出する。PAS 染色については緑色付近の光に励起される自家蛍光を示すことが知られており、動物組織でも植物組織でも応用例が見られる (Angeles et al. 2004; Li et al. 2006)。蛍光による観察は、高コントラストで明瞭な像が得られるため、本節では、これがトネリコ型被覆物の検出に有効であるかを調べるために蛍光顕微鏡観察も試みた。 KMnO_4 は、生体組織の固定能とともに導電性を持つため、透過電子顕微鏡観察試料の前処理に使われているが (朴 1992)、フェノール類を強く標識することが明らかにされており (Bland et al. 1971)、電子染色手法として木材試料ではリグニンやポリフェノールの検出によく応用される (Donaldson 1992; Watanabe et al. 2006; Watanabe & Ohno 2020; Kim et al. 2016)。一般に電子顕微鏡観察で用いられることが多いが、光学顕微鏡レベルでもフェノール類に特異的な染色が確認できる (Nakaba et al. 2008)。

電子顕微鏡による切片観察では、電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) の反射電子検出により像を得た (切片 SEM 法: 豊岡 2016; 久住ら 2020)。一般に電子顕微鏡による断面観察では、透過電子顕微鏡 (TEM) が利用される。しかし、TEM 法では、厚さ 100 nm 未満の超薄切片を作製する必要があるうえ、グリッドの細かな操作も必要で、技術的に難易度が高い。これに比べて、本手法は厚さ 1 μm 以上の準超薄切片も適用でき、より簡便な手順で試料を作製できる。またグリッドによる視野の制限もないため、得られた切片の全体を観察することができる。TEM 法と同様により質量の大きい原子が存在し、電子密度が高い位置が際立つため、切片 SEM 法では、TEM による切片観察と同様の情報はるかに簡便に取得できる。

3.3.2 材料および方法

3.3.2.1 供試材料

3.2 節と同じく、北海道大学札幌研究林の札幌試験地に植栽されたヤチダモ 2 個体 (Table 3-1) より一年を通じて定期的に採取した辺材最外層の木部のブロックまたはコアを用いた (詳細は 3.2.1.1 を参照)。本節では、2020 年 4 月 10 日、6 月 5 日、8 月 31 日、9 月 17 日、10 月 9 日、11 月 10 日、12 月 11 日に採取し、30%エタノールに液浸保存したサンプルを供試した。また、同 1 号木より、2021 年 11 月 16 日および 2022 年 6 月 24 日に同様のブロックを追加で採取した。これらの一部は、当年輪から前年輪にかけての領域を小片にして 4% w/v グルタルアルデヒド水溶液で固定した後、30%エタノールに液浸保存した。残りのブロックはそのまま 30%エタノールに浸漬させて保存した。

3.3.2.2 樹脂包埋

準超薄切片を作製するために、2021 年 11 月 16 日と 2022 年 6 月 24 日に採取してグルタルアルデヒドで固定した試料を、当年輪から前年輪の孔圏外を含む 1~2 mm 角程度の小ブロックにトリミングし、エタノールシリーズ (30–50–70–90–99.5–99.5–99.5%) で脱水した。試料の浸漬液をエタノールと LR White 樹脂 (Hard グレード, London Resin) の等量混合液に交換し、一昼夜ローテーターでゆっくりと回転させた。続いて、浸漬液を 100%の LR White 樹脂に交換し、デシケーターで減圧浸透させてから、3 時間以上ローテーターでゆっくりと回転させた。再び浸漬液をフレッシュな LR White 樹脂に交換し、同様の操作をおこなった後、試料をフレッシュな LR White 樹脂で一度濯いでから、木口面を下に向けてポリプロピレン製の平底カプセル (Taab Laboratories Equipment) に入れた。カプセルを LR White 樹脂で満たして蓋をし、65°Cのオーブンで 24 時間熱して、硬化させた。

3.3.2.3 光学顕微鏡による観察

各時期に採取して 30%エタノールで保存していたブロックやコアを、超純水で洗浄しながらカミソリ刃等でトリミングし、木口面が 2×5 mm 程度となるような小ブロックとした。この小ブロックを滑走式マイクロームに取り付けて、ステンレス製ブレード (S35, Feather) で薄切し、厚さ 2.5~5 µm の木口面の薄切片を作製した。

また、より精細な観察をするために、LR White 樹脂で包埋した試料からも木口面の切片を作製した。包埋試料の木口面を、複合管孔が 1~2 個含まれる範囲にカッターナイフでトリミングし、ウルトラマイクローム (OmU3, Reichert) で切削した。はじめにタングステン製デルタナイフ (J4805, EM Japan) で面出しし、続いてナイフをダイヤモンドナイフ (Ultra 45°, DiaTOME) に交換して、厚さ 0.5~1.0 µm の準超薄切片を得た。これらの準超薄切片は染色の前に、タングステン製ループを使ってスライドガラスに載せ、ホットプレート上で加熱して乾燥させた。

作製した薄切片および準超薄切片は、以下に述べる染色処理に供した。特に断りがない場合、各染色処理は、薄切片ではシャーレに入れた染色液等に浮かべて、準超薄切片ではスライドガラス上に染色液等を滴下しておこなった。

A) トルイジンブルーO 染色

切片を 0.1%トルイジンブルーO 水溶液で 3 分間処理した。水洗の後、薄切片はエタノールシリーズで脱水し、ヘモディー® (Falma) に置換してからスライドガラスに載せた。またスライドガラスに載せた準超薄切片は、ホットプレートで加熱して乾燥させた。スライドガラスに載せたすべての切片は、ビオライト (Okenshoji) で封入して永久プレパラートとした。

B) サフラニン・アルシアンブルー二重染色

本染色は、薄切片のみ試験した。切片に対して、0.5%サフラニン水溶液と 0.5%アルシアンブルー水溶液の双方を順番にそれぞれ 5 分間ずつ、あるいは混合液として 5 分間処理した。水洗の後、切片をエタノールシリーズで脱水し、ヘモディー®に置換してからスライドガラスに載せ、ビオライトで封入して永久プレパラートとした。

C) PAS 染色

切片を 0.5%過ヨウ素酸水溶液で 10 分間処理して水洗した後、シッフ試薬を 20 分間処理して再び水洗した。その後、共染防止のために亜硫酸水を 10 分間処理したが、本処理を省いても特に得られる結果に違いはなかったため、省略する場合もあった。薄切片はエタノールシリーズで脱水し、ヘモディー®に置換してからスライドガラスに載せた。また本染色の処理をスライドガラス上に載せた準超薄切片におこなうと、切片がスライドガラスから高頻度で脱離したため、PAS 染色では準超薄切片もシャーレに入れた試薬に浮かべて染色した。切片をループで移動させながら各工程を進めていき、最後の水洗後にスライドガラスに載せて、ホットプレート上で加熱して乾燥させた。スライドガラスに載せたすべての切片は、ビオライトで封入して永久プレパラートとした。

D) KMnO_4 染色

切片を 0.1%クエン酸ナトリウム水溶液に溶かした 1% KMnO_4 溶液で 3 分間処理した。水洗の後、薄切片はエタノールシリーズで脱水し、ヘモディー®に置換してからスライドガラスに載せた。またスライドガラスに載せた準超薄切片は、ホットプレートで加熱しながら乾燥させた。スライドガラスに載せたすべての切片は、ビオライトで封入して永久プレパラートとした。

作製したプレパラートは、光学顕微鏡 (Axio Imager A2, Zeiss または Eclipse E600W, Nikon) で観察し、デジタルカメラ (DS-Fi1 または DS-Fi2, Nikon) で撮影した。また PAS 染色した薄切片については蛍光を観察するために、LED 光源 (X-Cite XLED1, Excelitas) を取り付けた落射型蛍光顕微鏡システム (BX41, Olympus) で観察した。蛍光ミラーユニットには、WIG (励起フィルター : BP530~550 nm、吸収フィルター : BA590 nm) ならびに WIB (励起フィルター : BP460~495 nm、吸収フィルター : BA510 nm) を用い、デジタルカメラ (DP73, Olympus) で撮影した。なお、この設定において試料から検出される自家蛍光は微弱であった。これらの観察では、道管相互壁孔における被覆物が壁孔室に充填されていて識別が容易であると考えられた孔圏外道管を中心に観察した。特に道管相互壁孔などの壁孔対の詳細な観察する際には、100 倍油浸レンズも用いた。

3.3.2.4 電子顕微鏡による観察

LR White 樹脂で包埋した試料の木口面を、複合管孔が 1~2 個を含まれる範囲になるようにカッターナイフでトリミングしてからウルトラミクロトーム (OmU3) で切削した。はじめにタングステン製デルタナイフで面出しし、続いてナイフをダイヤモンドナイフに交換して厚さ 0.5~1.0 μm の準超薄切片を得た。得られた準超薄切片は、シャーレ等にいった試薬に浮かべて以下に述べる染色処理に供した。

A) PATAg 染色

1%過ヨウ素酸で 1 時間処理した後、超純水で洗浄し (3 分×4 回)、続いて 0.2% チオカルボヒドラジド・20%酢酸溶液で 4 時間処理した。次に、20%酢酸 (5 分×3 回)、10%酢酸 (3 分×4 回)、5%酢酸 (3 分×1 回)、2.5%酢酸 (3 分×1 回)、超純水 (3 分×4 回)、超純水 (1 時間) を順番に処理することで切片を洗浄して水になじ

ませた。最後に、暗黒下で 1% プロテイン銀を 30 分間処理し、超純水で水洗した（1 分×1 回、3 分×3 回）。

B) KMnO_4 染色

1% KMnO_4 の 0.1% クエン酸ナトリウム溶液で 3 分間処理し、その後超純水で洗浄した（1 分×3 回）。

染色した準超薄切片は、オスミウムコーティングした 1 cm 四方のガラス板に載せ、ホットプレート上で加熱して乾燥させた。このガラス板は、厚さ 0.8~1.0 mm のスライドガラス（S1111, Matsunami）をガラスカッターで割り切った後、オスミウムコーター（Neoc-Pro）を用いて電流値 5 mA で 10 秒の処理をして作製した。切片を載せたガラス板は 15 mm 径の SEM 試料台に導電性カーボン両面テープ（Nisshin EM）で接着し、FE-SEM（S4800）で観察した。検出器にはイットリウム・アルミニウム・ガーネット（Yttrium-Aluminum-Garnet; YAG）反射電子検出器を用い、プローブ電流値を最大（プローブ電流設定：High、第一コンデンサレンズ設定：1）としたうえで、加速電圧 5.0 kV、作動距離 8 mm で観察した。得られた像は、TEM によって得られる慣習的な像とは階調が逆であるため、白黒を反転させた。

3.3.3 結果

3.3.3.1 組織染色した薄切片の光学顕微鏡による観察

各染色を施した切片を光学顕微鏡で観察した結果を Fig. 3-8~Fig. 3-10 に示した。孔圏道管については、色調が識別困難な場合も多かったため、ここでは孔圏外道管の結果のみを示す。木部のブロックから樹脂包埋をせずに作製した薄切片を観察したところ、トネリコ型被覆物が堆積していない時期の試料（6 月、8 月、9 月）と比較して、トネリコ型被覆物が堆積している時期の試料（4 月、10 月、11 月、12 月）では、道管相互壁孔の壁孔腔

が、トルイジンブルーO 染色（青緑色, Fig.3-8a）、PAS 染色（赤紫色, Fig.3-9a）、KMnO₄ 染色（褐色, Fig. 3-10b）によって染色された。同壁孔腔は、サフラニン・アルシアンブルー二重染色においても染色されたが、試料によってサフラニンに由来する赤色が認められる場合とアルシアンブルーに由来する青色が認められる場合もあり、一貫した結果は得られなかった（Fig. 3-8d,e）。一方、被覆物が堆積していない時期の試料（6 月、8 月、9 月）では、各染色によって道管相互間の壁孔腔は染色されていなかった。これらの薄切片に対する各染色において、道管相互間の壁孔腔が染色されているかどうかについては、100 倍の油浸レンズによる高倍率観察をおこなわなければ、確かな識別ができなかった。また各染色で明瞭に染色されていたのは、壁孔腔の一部分に限られており、トルイジンブルーO 染色、サフラニン・アルシアンブルー二重染色、PAS 染色では、壁孔室の孔隙中央部（Fig. 3-8a,d,e, Fig 3-9a）、KMnO₄ 染色では、逆に壁孔壁の存在する中央部を除く壁孔室の内部であった（Fig. 3-10b,e）。どの染色法でも、3.2 節で示したような孔圏外道管で見られる壁孔室から壁孔道までを充填するような被覆物の断面形態（Fig. 3-2c）は示されなかった。

より精細な観察のために、LR White 樹脂で包埋した試料からダイヤモンドナイフで準超薄切片を得て、これを染色して観察した。試験したトルイジンブルーO 染色、PAS 染色、KMnO₄ 染色のすべてで、被覆物が堆積している時期の試料における道管相互壁孔の壁孔腔の内部が染色されており、またその色彩が現れている領域の輪郭は、明らかに被覆物の断面形態と一致していた（Fig. 3-8b、Fig. 3-9b、Fig. 3-10c,f）。ただし、被覆物の中央の壁孔壁に沿った部分に染色が認められない空隙部があった。

PAS 染色した切片を緑色光または青色光で励起して蛍光顕微鏡で観察したところ、PAS 染色の反応部に由来する赤色または赤橙色の蛍光が示された（Fig. 3-9c,d）。この蛍光は、トネリコ型被覆物が堆積している時期の道管相互壁孔の壁孔腔から強く認められた。またその蛍光発色域の輪郭は、樹脂包埋していない試料から得た薄切片を観察した場合であっ

でも、被覆物の断面形態を示していた (Fig. 3-9c)。この PAS 染色をした試料の道管相互壁孔内での蛍光は、20～40 倍の対物レンズでも十分に識別できるほど強いものであった。

さらに、透過像の観察において、壁孔腔に PAS 染色による赤紫色が現れているかが不明瞭な場合であっても (例えば Fig.3-9c)、これを蛍光像で観察すると明瞭に発色の有無が判断できた。一方、トネリコ型被覆物が堆積していない時期の試料では、壁孔腔からの蛍光は微弱であった (Fig. 3-9d)。

各染色で処理した切片を観察したとき、被覆物が堆積している時期の試料の孔圏外道管においては、道管・周囲柔細胞間壁孔の壁孔道でも、各染色が陽性であることを示す色調あるいは蛍光が観察された (Fig. 3-9b,c, Fig. 3-10b,c の黒矢尻)。また道管の内腔側の壁面に付着している液滴状の堆積物も同様に、各染色に陽性であった (Fig. 3-8b, Fig. 3-9b,c, Fig. 3-10b,c の白矢頭)。

3.3.3.2 準超薄切片の電子顕微鏡による観察

PATAg 染色 (多糖類の検出) と KMnO_4 染色 (フェノール類の検出) を施した準超薄切片における道管相互壁孔を FE-SEM の反射電子検出で観察した結果を Fig. 3-11 に示した。被覆物が堆積していない時期 (6 月) の試料を観察すると、孔圏道管および孔圏外道管に関係なく、両染色で道管相互間の壁孔壁は電子密度の低い領域として示された (Fig. 3-11a)。この時の壁孔壁の厚みは、これと連続する pit annulus および複合細胞間層の厚みと同程度であった。被覆物が堆積している時期 (11 月) の試料を観察したとき、どちらの染色においても、トネリコ型被覆物の存在が電子密度の高い領域として示されていた (Fig. 3-11b-e)。トネリコ型被覆物における両染色の標識位置はどちらもおおむね同様であり、孔圏道管では壁孔壁の表面を中心に、孔圏外道管では壁孔室から壁孔道にかけての領域が埋め尽くされるように電子密度が高まっていた。また孔圏道管と孔圏外道管の両方

で、被覆物が堆積している壁孔壁の中央部には、どちらの染色法でも標識されない切れ目のような領域が存在していた。孔圏外道管の道管相互壁孔では、両染色でベスチャーが明らかに識別されたほか、被覆物において前項で見られた I-1 層と I-2 層に相当する電子密度が異なる 2 層が識別された (Fig. 3-11d,e)。I-1 層は、それが連続している pit annulus および複合細胞間層とおおむね同じ厚みを持っていた。この電子密度が異なる 2 層に生じているコントラストは、KMnO₄ 染色を施した試料でより明瞭であり、I-2 層がより電子密度の高い領域として示されていた (Fig. 3-11e)。一方、PATAg 染色の場合は I-1 層が I-2 層より僅かに電子密度の高い領域として示された (Fig. 3-11d)。

3.3.4 考察

3.3.4.1 光学顕微鏡によるトネリコ型被覆物の検出

樹脂包埋をしていない試料から得た薄切片の観察において、トネリコ型被覆物が堆積している時期の試料では、道管相互壁孔の壁孔腔がトルイジンブルーO 染色、サフラニン・アルシアンブルー二重染色、PAS 染色、KMnO₄ 染色によって染色された (Fig. 3-8、Fig. 3-9、Fig. 3-10)。これらの染色は、被覆物が堆積していない時期の試料の孔圏外道管においては見られなかったことから、被覆物の存在を検出しているものと判断される。ただし、これらの薄切片の観察では、その色調の有無が 100 倍油浸レンズによる高倍率の観察と試料の比較によって何とか判断できるものであり、また色彩が現れている領域の輪郭は、3.2 節で明らかにしたような被覆物の断面形態と一致していなかった。ゆえに例えば被覆物の存在が未知の樹種や領域に対して、被覆物の存否や形態を分析する際には、誤った判断を下してしまう可能性があると考えられた。

一方、試料を樹脂包埋し、そこから得た準超薄切片を観察した場合、40 倍の対物レンズでも各染色において色彩が現れる領域が明瞭に観察できるようになった。また被覆物の断

面形態がはっきりと識別できるようになり、被覆物が各染色法によって染色されていることが明確となった (Fig. 3-8b、Fig. 3-9b、Fig. 3-10b)。また 100 倍の対物油浸レンズで観察すると、被覆物の中央部に染色のみられない空間があるなどのより詳細な形態も観察できた。ゆえに本手法は、被覆物の存否や形態を光学顕微鏡レベルで簡便に観察できる有用な手段であると考えられる。ただし、樹脂包埋した試料より準超薄切片を得る場合、大断面の切片を得ることが難しいため、1 つの切片における観察範囲が狭くなる点、また切片が薄すぎると発色が弱くなってしまう点が、難点として挙げられる。

PAS 染色については蛍光顕微鏡で観察することで、樹脂包埋していない試料から得た薄切片の観察であっても、被覆物の存否や形態が明確に示されることが分かった (Fig. 3-9c,d)。本研究では、緑色光および青色光の励起フィルターに対して、吸収フィルターがロングパスフィルターである蛍光ミラーユニットで試験したが (緑色励起: WIG、青色励起: WIB)、その双方で、PAS 反応部に由来すると考えられる蛍光が示された。PAS に由来する蛍光を得るには、緑色の励起光を用いて赤色の蛍光を得ることが一般的のようであるが (Angeles et al. 2004; Li et al. 2006)、今回、青色の励起光を用いてみると、PAS に由来すると考えられる赤橙色の蛍光と、木化壁に由来すると考えられる緑色の蛍光がコントラストとなって、PAS 反応部が極めて明瞭となった。この PAS 染色切片の蛍光顕微鏡手法では、蛍光がにじむために準超薄切片ほどの詳細な形態観察はできなかったが、比較的大きな切片も使用できるため観察範囲は広く、一度に多くの道管における被覆物の存否を確かめられた。

以上のことを踏まえながら、トネリコ型被覆物を光学顕微鏡レベルで簡便に検出する方法を論じてみる。まず被覆物に安定して反応したトルイジンブルーO 染色、PAS 染色、 KMnO_4 染色は、どれも簡便な検出法として有効といえる。なかでもトルイジンブルーO は、水溶液につけるだけで染色できるうえ、扱う試薬も毒性が低いため推奨される。ただ

し、これら染色法によって道管相互壁孔の壁孔腔が染色されているかを正確に判断するには、試料を樹脂包埋して薄い切片を得るか、100 倍の対物油浸レンズを用いた高倍率観察が必要がある。一方、もし蛍光顕微鏡の設備があるならば、PAS 染色した切片を緑色あるいは青色の光で励起したときの蛍光を観察するのが、本研究で検討したプロトコルの中では、最も確実かつ簡便に被覆物の存否を識別できる手法である。この手法では、染色にやや手間がかかるが、樹脂包埋をする必要がないため、大断面の切片で正確な解析ができる。この時、発色の識別が容易になるため、励起光は青色光にすることが推奨される。

3.3.4.2 トネリコ型被覆物の成分と構造

光学顕微鏡による観察において、PAS 染色および KMnO_4 染色によって染色されたことから、トネリコ型被覆物は多糖類とフェノール類の双方を含むことが示唆された。包埋試料から得た準超薄切片でより詳細に観察すると、両染色による呈色は被覆物の同じ位置から示されており、孔圏道管の道管相互壁孔では壁孔壁表面のごく近傍が、孔圏外道管の道管相互壁孔では壁孔室から壁孔道の途中までを満たす範囲が染色されていた。ただし、孔圏外道管の場合、壁孔壁に沿った部分に染色されない領域が観察された (Fig. 3-9b、Fig. 3-10b)。この壁孔壁に沿った部分に染色されない領域があることは、3.2 節の被覆物の構造観察によって明らかになった被覆物の層構造、すなわち、I-1 層と I-2 層において、染色性が異なることを示唆しているものと考えられた。

そこで、各染色が反応した領域と被覆物の構造がどのように対応しているかを詳しく明らかにするために、準超薄切片の電子顕微鏡による高倍率の観察で、多糖類とフェノール類の局在を調べることにした。多糖類の局在については、PAS 染色と同じ原理であるが、その標識法を電子顕微鏡観察に対応させた PATAg 染色を適用した。結論として、光学顕微鏡下で観察された壁孔壁周囲の染色がなされない領域は、被覆物上の領域ではないと判

断された。順を追って説明すると、まず FE-SEM の反射電子検出器で観察した準超薄切片では、PATAg 染色と KMnO_4 染色のどちらの染色法でも、被覆物が電子密度の高い領域として標識されていた (Fig. 3-11b-e)。これは、PAS 染色と KMnO_4 染色した切片を光学顕微鏡で観察した結果と同様である。PAS および PATAg 染色と KMnO_4 染色で被覆物が標識された領域は一致しており、このことから、被覆物中で多糖類とフェノール類は、基本的に共局在していることが示唆された。FE-SEM 下で観察した孔圏外道管の被覆物では、PATAg 染色を施した切片でも KMnO_4 染色を施した切片でも、電子密度の違いによって生じたコントラストによって、3.2 節で明らかにした被覆物断面の層構造が示されていた (Fig. 3-11d,e)。I-1 層と I-2 層のどちらも、PATAg 染色および KMnO_4 染色によって電子密な領域として示されていることから、両層は同様に少なくとも多糖類とフェノール類を含んでいることが示唆される。一方、このような被覆物の標識された領域とは別に、壁孔壁に沿った各染色の標識が見られないスリット状の領域が存在していた。これは、光学顕微鏡下で観察された壁孔壁周囲の染色の見られない領域に対応する。既に被覆物の I-1 層と I-2 層は、標識された領域として識別されたため、このスリット状の標識のない領域は、3.2 節で観察された被覆物の層構造の一部ではないと判断される。一方、被覆物の堆積していない時期の道管相互間の壁孔壁と比較することで、被覆物の層構造や標識が示されない領域の実態が明らかとなった。被覆物が堆積していない状態の壁孔壁は、PATAg 染色や KMnO_4 染色によって多少はコントラストがついており、またそれが連続する pit annulus や複合細胞間層とおおむね同様の厚みを持っていた (Fig. 3-11a)。被覆物が堆積している道管相互間の壁孔壁を観察すると、このように pit annulus と連続し、それとおおむね同程度の厚みを持っていたのは、I-1 層であった (Fig. 3-11d,e)。すなわち、I-1 層は壁孔壁に被覆物が浸透している領域と判断するのが妥当である。その中央にある標識のない領域は、壁孔壁が剥離してできた空隙であると考えられる。ヤチダモの壁孔壁は、そ

の中間層で剥離しやすい性質があり（例えば Fig. 3-5a の VV の壁面はそのような中間層で剥離した部分）、このように準超薄切片の観察において、壁孔壁の中間層が剥離していても不思議ではない。

ここで、各染色において被覆物の各層にコントラストが生じていることから、両層で多糖類とフェノール類の成分比が異なるのではないかと考えられる。しかしながら、I-1 層が壁孔壁の存在する層であることを考慮すると、このようなコントラストは、必ずしも各層で被覆物の成分が異なることを示してはいないことも理解できる。被覆物の I-1 層は多糖類で構成された壁孔壁が存在する分だけ、I-2 層よりも多糖類の濃度は高くなり、その他の化合物の濃度は低くなると考えられる。実際、I-1 層は、多糖類を標識する PATAg 染色では I-2 層よりも僅かに電子密度が高く (Fig. 3-11d)、フェノール類を標識する KMnO_4 染色では I-2 層よりも明らかに電子密度が低かった (Fig. 3-11e)。したがって、いまのところ被覆物の各層でその成分比が大きく異なることはないと考えるのが妥当と考えられる。

冬の試料の孔圏外道管においては、道管相互間の壁孔壁における被覆物と同様の染色性が、道管・周囲柔細胞間壁孔の壁孔道や (Fig. 3-9b,c, Fig. 3-10b,c の黒矢尻)、道管の内腔側の壁面に付着している液滴状の堆積物でもみられた (Fig. 3-8b, Fig. 3-9b,c, Fig. 3-10b,c の白矢尻)。このことは、3.2 節で観察された道管・周囲柔細胞間壁孔に堆積する被覆物 (Fig. 3-5) や道管内腔側の壁面における液滴状の堆積物 (Fig. 3-6) が、道管相互壁孔の被覆物と同じ化学組成と由来をもつことを示唆する。

3.4 トネリコ型被覆物の成分特定のための試み

3.4.1 本節の目的と手段

本節では、トネリコ型被覆物の成分を明らかにすることを目的とする。前 3.3 節の結果、トネリコ型被覆物には、多糖類とフェノール類の両方が含まれていることが明らかとなった。これを受けて、本節ではそれぞれの化学種について、構成成分をさらに絞り込むことを目指した。

多糖類成分を絞り込むため、本研究ではまず種々の糖類に対する加水分解酵素による処理を試した。基質特異的な酵素をトネリコ型被覆物が堆積している時期の試料に処理し、被覆物が除去されるかを確かめた。使用する酵素としては、まず一般的な細胞壁構成多糖類を含んでいるかを調べるために、プロトプラストの作製のために用いられる Yakult 社製のセルラーゼと協和化成社製のペクトリアーゼを選択した。これらは複数の酵素の混合物であるが、セルラーゼは主にセルロース、ペクトリアーゼはペクチンに強く作用するとされる。またヘミセルロースを対象としたより特異的な酵素として、キシラナーゼとキシログルカナーゼも試験した。これらの細胞壁構成多糖類に対する加水分解酵素に加え、クルミやカエデで秋から冬にかけての期間にスクロースが柔細胞から道管へ分泌されるという報告 (Améglie et al. 2002, 2004) があることを受けて、スクロースの構成糖であるグルコースとフルクトースを主鎖とする多糖、すなわちグルカンとフルクタンも調査対象とした。ここで、グルカンに対する加水分解酵素としては、デンプンなどの α -1,3 グルカンの連続ユニットを基質とする α -アミラーゼを、またフルクタンに対する加水分解酵素としては、 β -フルクタンを分解するフルクタナーゼを試験した。デンプンは多くの植物における主要な貯蔵物質として知られ、気温の低下に伴って柔細胞に蓄積されることが知られている。フルクタンは、一部の高等植物ではデンプンに代わる貯蔵物質として知られてお

り (吉田ら 2003)、耐寒性や耐乾燥性に関連して合成されることも示唆されている (Pilon-Smith et al. 1995; Livingston & Henson 1998)。

さらに、多糖類成分の同定のために免疫標識も試みた。植物の細胞壁を構成する種々の多糖類に特異的なモノクローナル抗体は、Leeds 大学の Knox らが生産・提供している LM シリーズや JIM シリーズを筆頭に、豊富なラインナップがそろっている。これらは、植物細胞壁の組織化学的な研究に盛んに取り入れられており、木材を対象にした研究例も数多い。道管相互間の壁孔壁の化学組成を調べる際にも、このような免疫標識的手法が用いられたことは、1 章で述べたとおりである。これらは一次抗体であり、その局在を検出するために、何らかの標識を結合させた二次抗体をさらに処理する。組織化学的な応用例では、ナノスケールの金コロイドを標識として電子顕微鏡で観察するか、蛍光色素を標識として蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡で観察するのが一般的である。本研究では、手法の簡便さから蛍光色素で標識したものを蛍光顕微鏡によって検出した。

フェノール類の成分については、紫外顕微分光分析によって被覆物の紫外線吸収を確認とともに、紫外線吸光スペクトルを取得することでさらなる解析とした。紫外顕微分光分析では、照射した紫外線の透過像（紫外線顕微鏡像）を取得することで、切片上で紫外線を吸収する物質の局在を明らかにすることができる。紫外域に吸収極大を持つ物質の多くは、それほど大きくない共役系をもつ芳香族化合物である。とりわけ植物組織では、ポリフェノール類やリグニンがおおむね波長 280 nm 付近の紫外線をよく吸収することが知られており、その吸収が検出されることは、これらの成分の存在を示すものとなる。木材科学分野ではこの波長 280 nm 付近の紫外線によって紫外線顕微鏡像を取得し、リグニンの堆積過程や (Takabe et al. 1981)、ポリフェノール類の局在解析が行われている。また紫外顕微分光分析では、試料に照射する光を直径 0.5～数 μm の視野絞りで制限して分光分析をおこなうことで、微細領域の紫外線吸収スペクトルを取得することができる。そのス

ペクトルパターンは、含有成分に依存するため、被覆物を構成するフェノール類を絞り込む際の有用な情報となることが期待される。

3.4.2 材料および方法

3.4.2.1 供試材料

3.2 節と 3.3 節で使用したのと同じ植物材料を用いた。すなわち、北海道大学札幌研究林の札幌試験地に植栽されたヤチダモ 2 個体より採取した辺材最外層の木部のブロックまたはコアを用いた（詳細は 3.2.1.1 を参照）。本節の酵素処理には、2020 年 11 月 10 日および 12 月 11 日に採取し、30%エタノールに液浸保存したサンプルを供試した。また免疫標識と紫外線顕微分光分析のために、1 番木より 2021 年 11 月 16 日および 2022 年 6 月 24 日に追加で採取し、4% w/v グルタルアルデヒド水溶液で固定してから 30%エタノールで保存したのを用いた（詳細は 3.3.2.1 を参照）。

3.4.2.2 樹脂包埋

免疫標識と紫外線顕微分光分析に用いる準超薄切片を作製するために、グルタルアルデヒドで固定した試料を LR White 樹脂 (Hard グレード) またはエポキシ樹脂で包埋した。LR White 樹脂包埋については、3.3.2.2 と同様の手順でおこない、当年輪から前年輪の孔圏外を含む 1~2 mm 角程度のブロックを包埋した。

エポキシ樹脂包埋のため、試料を当年輪から前年輪の孔圏外を含む 1~2 mm 角程度のブロックにトリミングした。エタノールシリーズ (30–50–70–90–99.5–99.5–99.5%) で脱水した後、エタノールを QY-1® (Nisshin EM) に置換し、さらに包埋剤への置換をおこなった。包埋剤は Epon 812® (Taab Laboratories Equipment) : DDSA (ドデセニルコハク酸無水物) : MNA (メチル-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボン酸無水物) : DMP-30® (Taab

Laboratories Equipment) を 41 : 19 : 9 : 1 (Luft 法における A 液 : B 液 = 1 : 1) の組成となるように混合して調製した。包埋剤への置換に当たっては、まず QY-1[®]と包埋剤の等量混合液に試料をいれてローテーターで 2.5 時間ゆっくりと回転させた後、100%の包埋剤に液を交換してさらに 3 時間以上、ローテーターでゆっくりと回転させた。樹脂置換後、包埋板に試料をいれて包埋剤で満たしてオープンに入れ、35℃、45℃の順に一昼夜静置した後、60℃に昇温して 5 日以上かけて硬化させた。

3.4.2.3 酵素処理

2020 年 11 月 10 日および 12 月 11 日に採取したヤチダモの液浸保存サンプルから 2.2 節ならびに 3.2 節と同様の手順で FE-SEM 観察用の乾燥ブロックを作製し、当年輪あるいは前年輪の孔圏外から板目面の割断面を出した (2.2.2.2 ならびに 3.2.2.2 を参照)。割断面を出した一対のブロック片は、その逆側の面に鉛筆で同じ印をつけ、それらが対であることと、どちらの面が観察面であるかが分かるようにした。このような対となるブロック片試料を複数作製し、2~3 対を 1 つのセットとして、セットごとに種々の糖加水分解酵素で処理した。処理に用いたセルラーゼ (セルラーゼオノヅカ RS[®], Yakult)、ペクトリアーゼ (ペクトリアーゼ Y-23[®], Kyowa kasei)、 α -アミラーゼ (Fujifilm Wako)、キシラナーゼ (X2753, Sigma-Aldrich)、フルクタナーゼ (E-FRMXLQ, Megazyme)、キシログルカナーゼ (E-XEGP, Megazyme) は、酢酸バッファー (pH 5.0, 100 mM) に溶解させて酵素液とした。酵素液の濃度について、 α -アミラーゼ、ペクトリアーゼ、セルラーゼは 0.1% w/v とし、キシラナーゼは 0.06% w/v とした。不凍液に懸濁されていたフルクタナーゼとキシログルカナーゼは、それぞれ 50 U/mL となるようにバッファーで希釈した。処理試料は超純水に一晩浸漬させてから、試料セット 1 つに対して 2 mL の酵素液で処理した。酵素液に浸漬させた状態の各試料は 40℃ に保温しながら、ゆっくりと振とうさせながら 3~72

時間処理した。酵素液は 24 時間ごとに交換した。またコントロールとして、同様の処理を、酵素を含んでいないバッファーでおこなった。

処理後のすべての試料は、超純水でよく洗浄してから、ろ紙にはさみ、液体窒素で凍結させて凍結乾燥機（FDU-2200, Eyela）で乾燥させた。試料は対となる観察面を単一のアルミニウム製 SEM 試料台に並べるようにして、カーボンペースト（Colloidal Graphite, Ted Pella）で接着した。以後の金属コーティングと観察は、3.2 節の実験と同様の条件でおこなった（3.2.2.2 を参照）。

3.4.2.4 免疫蛍光標識

LR White 樹脂で包埋した試料の木口面を、複合管孔が 1~2 個に含まれる範囲になるようにカッターナイフでトリミングしてからウルトラミクロトームで切削した。はじめにタングステン製デルタナイフで面出しし、続いてナイフをダイヤモンドナイフに交換して厚さ 0.5~1.0 μm の準超薄切片を得た。得られた切片は、ループを用いて MAS コーティングが施されたスライドガラス（S9215, Matsunami）に載せ、ホットプレート上で熱して乾燥させた。

スライドガラスに載せた切片は、ブロッキングバッファー（Blocking one®, Nacal Tesque; 20 倍希釈して使用）で、30 分間室温で処理した後、室温で一晩、一次抗体で処理した。一次抗体には、モノクローナル抗体である LM11（PlantProbe; 抗キシラン）、LM15（PlantProbe; 抗キシログルカン）、LM21（PlantProbe; 抗ヘテロマンナン）をそれぞれブロッキングバッファーで 20 倍に希釈して使用した。ブロッキングバッファーで 15 分間×3 回の洗浄をした後、蛍光色素（Alexa Fluor® 488）を結合させた抗ラット IgG 二次抗体（Molecular Probe）で、35°C に保温しながら 1 時間処理した。再びブロッキングバッファーで 15 分間×3 回の洗浄をし、さらに超純水でさらに 15 分間×3 回の洗浄をした後、

切片は無蛍光グリセリンに封入して一時プレパラートとした。色素の褪色を避けるため、二次抗体による処理後は切片をできるだけ暗所に置くようにした。また上記の操作について、一次抗体による処理をブロッキングバッファー処理に変更したコントロール用のプレパラートも同時に処理して作製した。

プレパラートは LED 光源を取り付けた落射型蛍光顕微鏡システムで観察した。蛍光ミラーユニットには、NIBA（励起フィルター：BP470~495 nm、吸収フィルター：BA510~550 nm）を用い、デジタルカメラで撮影した。コントロールのプレパラートを観察したときにカメラにちょうど光が検出されなくなる露光時間に設定し、各抗体で標識した切片の蛍光像を撮影した。

3.4.2.5 紫外顕微分光分析

エポキシ樹脂で包埋した試料の木口面または柾目面を、道管相互壁孔が含まれるようにカッターナイフでトリミングした。次に試料をウルトラミクロトームに取り付け、ボートを取り付けたガラスナイフで薄切して厚さ 1 μm の準超薄切片を作製した。得られた切片は、ループを用いて石英製のスライドガラスに載せ、無蛍光グリセリンを垂らした上から石英製のカバーガラスを載せて封入した。

プレパラートは、紫外線顕微鏡（UMSP-80, Zeiss）で観察し、100 倍油浸対物レンズを通して、バンド幅 5 nm、波長 280 nm の紫外線の透過像をフィルムカメラで撮影した。また、11 月に採取した試料の孔圏外道管において道管相互壁孔の孔隙を満たしているトネリコ型被覆物に対して、波長 250~400 nm の範囲の紫外線吸光スペクトルを測定した。スポットサイズは 0.5 μm とした。リファレンスとして、道管の二次壁や複合細胞間層のスペクトルも測定した。

3.4.3 結果

3.4.3.1 酵素処理した試料の観察

それぞれの糖加水分解酵素で処理した試料におけるトネリコ型被覆物の状態を Fig. 3-12 に示した。はじめに酵素液に用いたバッファの影響を確かめたが、3 日以上処理をしても、従来観察されてきたもの（例えば Fig. 3-1c, Fig. 3-3g）と同様の形状が観察された（Fig. 3-12a）。これをコントロールとしたとき、キシラナーゼ（Fig. 3-12b）、フルクタンナーゼ（Fig. 3-12c）で処理した試料では、被覆物の外見にはほとんど変化が見られなかった。ペクトリアーゼで処理した試料でも、被覆物の形態に変化は見られなかったが（Fig. 3-12d）、道管相互間の壁孔壁の周縁部が分解されている様子が目立ち、おそらくそのことが原因で、被覆物がそのままの形態で本来の位置から脱離している様子が観察された（Fig. 3-12g）。 α -アミラーゼで処理した試料では、被覆物の表面が粒状に変化しているように観察されたが、コントロールと比較して、被覆物の嵩が変化しているようには見えなかった（Fig. 3-12e）。セルラーゼで処理した試料では、他の酵素と同様に被覆物の分解が認められない場合もあった一方で、明らかに被覆物の嵩が減少し、被覆物の不定形の要素が分解されて、粒状の要素が目立つように観察される場合もあった（Fig. 3-12f）。このようなセルラーゼによる被覆物の形状変化は、およそ 6 時間程度の処理でも生じていたが、24 時間にわたる処理を行った場合でも、壁孔壁の表面から粒状の要素が消えることはなかった。またキシログルカナーゼで処理した試料では、壁孔壁の表面を含む観察面の全体に粒状ないし塊状の付着物が多量に発生しており、被覆物が分解されているかどうかを確認できなかった（Fig. 3-12h）。ただし、少なくとも被覆物の突起部が残存していることは明らかであった。

3.4.3.2 免疫蛍光標識した切片の観察

各抗体で標識した切片について、孔圏外道管の道管相互壁孔を蛍光顕微鏡で観察して撮影した像を Fig 3-13 に示した。LM11（抗キシラン）で標識した切片では、各種細胞の二次壁より強い蛍光が発せられていたが、道管相互壁孔の壁孔腔からは蛍光が発せられなかった（Fig. 3-13a, a'）。LM15（抗キシログルカン）で標識した切片では、各種細胞の複合細胞間層より強い蛍光が発せられた。また道管相互壁孔の壁孔腔からも複合細胞間層と同様の強度の蛍光が発せられ、その輪郭は壁孔室から壁孔道を埋め尽くす被覆物の形態と同様であった（Fig. 3-13b, b'）。LM21（抗ヘテロマンナン）で標識した切片では、木部繊維の二次壁から強い蛍光が発せられていた（Fig. 3-13c）。道管や柔細胞の二次壁からほとんど蛍光が発せられなかったが、一次壁、複合細胞間層からは比較的弱い蛍光が発せられており、道管相互壁孔の壁孔腔からも同様の強度の蛍光が認められた（Fig. 3-13 c, c'）。

3.4.3.3 紫外顕微分光分析

被覆物が堆積している時期の試料の木口面または柾目面より道管相互壁孔の断面に波長 280 nm の紫外線を照射して得られた紫外線顕微鏡像と、切片上で選んだ様々なスポットにおける紫外線の吸光スペクトルを Fig. 3-14 に示した。紫外線顕微鏡像では、孔圏外道管の被覆物（Fig 3-14a）と孔圏道管の被覆物（Fig 3-14b）の両方で、波長 280 nm の紫外線の吸収が示された。紫外線吸収スペクトル（Fig. 3-14c）について、二次壁（×）や複合細胞間層（+）では、波長 260～280 nm の領域に極大をもつ 1 つまたは複数の顕著なピークが示された。一方、孔圏外道管の道管相互壁孔を満たしている被覆物について紫外線吸光スペクトルを測定したところ、道管や細胞間層と同じく波長 250～280 nm の領域に示されるピークに加えて、いくつかのケースでは、より長波長側にも吸光ピークが示

された (■,◆)。この長波長側の吸光ピークは、計測する壁孔によってばらつきが生じたが、おおむね波長 340~370 nm の範囲に極大をもつブロードなピークであった。

3.4.4 考察

3.4.4.1 トネリコ型被覆物に含まれる多糖類

酵素それぞれに特徴的な反応は見られたが、基本的にトネリコ型被覆物は、ペクトリアーゼ、キシラナーゼ、 α -アミラーゼ、フルクタナーゼによる処理では分解されなかったと判断される (Fig. 3-12b-e)。ペクトリアーゼによる処理では、道管相互間の壁孔壁の周縁部が分解されているように観察されたが (Fig. 3-12d,g)、これは、道管相互壁孔の pit annulus に多量に存在すると報告されているペクチンが (Plavcová & Hacke 2011; Kim & Daniel 2013, 2016; Herbette et al. 2015)、ペクトリアーゼによって分解されたことが原因と考えられる。このことから、被覆物は各酵素の分解対象であるペクチンやキシラン、デンプン、フルクタンを含んでいないことが示唆される。一方、セルラーゼによる処理では、必ずしも再現はされなかったが、被覆物の不定形の要素が明らかに分解されている場合があった (Fig. 3-12f)。使用したセルラーゼは、セルロースや種々のヘミセルロースの分解酵素が混合したものであるため、この結果から多糖類の種類を同定することはできないが、セルラーゼが分解するような何らかの細胞壁構成多糖がトネリコ型被覆物に含まれている可能性がある。また粒状に変化した多量の残留物が見られたことから、セルラーゼでは分解できない要素が存在することは明らかである。このことは被覆物に多糖類だけでなくフェノール類も含まれていることを踏まえると妥当な結果といえる。このようなセルラーゼが分解する可能性のある細胞壁構成多糖類には、セルロースと同じ β -1,4-グルカンのキシログルカンも含まれる (矢追 2014)。一方、キシログルカンを基質とするキシログルカナーゼによる処理では、試料表面に大量の付着物が発生して、道管相互間の壁孔壁の

状況を明らかにできなかった (Fig. 3-12h)。この付着物の実態は不明であるが、バッファーによる念入りの洗浄や、熱水処理などでは、取り除くことができなかった。一方、孔圏外道管のトネリコ型被覆物に特徴的な突起が観察されたため (Fig. 3-12h、矢印)、少なくともキシログルカナーゼ処理によって被覆物が完全に除去されていないことは確かである。ただし、セルラーゼ処理で被覆物の分解が見られた場合でも、突起構造は残存していたため (Fig. 3-12f)、この突起の残存が直ちにキシログルカナーゼで被覆物が分解されないことの証拠にはならない。

植物細胞壁を構成するいくつかの一般的な多糖に対する免疫標識をおこなったところ、トネリコ型被覆物からは、キシランに特異的な LM11 の標識が全く示されなかったが (Fig. 3-13a,a')、キシログルカンに特異的な LM15 の標識が明らかに示され (Fig. 3-13b,b')、ヘテロマンナンに特異的な LM21 の標識が僅かに示された (Fig. 3-13c,c')。これらの結果から、トネリコ型被覆物にはキシランは含まれていないが、少なくともキシログルカンと比較的少量のヘテロマンナンが含まれていることが示唆された。キシランとキシログルカンに関する存否確認は、免疫標識と先の酵素処理の両方で行ったことになる。キシランが存在しないことは両手法で一致する結果となった。一方、キシログルカンに関しては、酵素処理の結果が不明瞭であったため、免疫標識によって初めてその存在が明示されたといえる。

以上をまとめると、トネリコ型被覆物には、キシログルカンとヘテロマンナンが含まれており、ペクチンやキシラン、デンプン、フルクタンは含まれていないと結論づけられる。トネリコ型被覆物に含まれていたキシログルカンやヘテロマンナンは、細胞壁成分として普遍的に見られる糖類であるが、道管内腔などのアポプラストへの分泌物としては、調べた限り報告が見当たらない。トネリコ型被覆物は、おそらく柔細胞から道管内に供給された分泌物であると考えられることから、間接的ではあるが、これらのヘミセルロースがア

ポプラストへと分泌されるという、これまで知られていなかった事例を示したことになる。一方、これらの糖類は奇しくもこれまでの報告で道管相互間の壁孔壁で検出されたことのあるヘミセルロースと一致する (Kim & Daniel 2013, 2016)。ここで気になるのは、2 種のハコヤナギ属樹木の一方にのみキシログルカンが検出されたことを示した Kim & Daniel (2013) の報告である。この原因については、樹種間差、個体間差をはじめ様々なことが考えられるが、それ以前にこれらのヘミセルロースが形成完了時の壁孔壁に存在する基本要素であるのか、それとも形成完了後の壁孔壁に二次的に堆積したものなのかが疑問に浮かぶ。もし二次的な堆積物であるならば、キシログルカンやマンナンといったヘミセルロースが、何らかの条件によって道管内に分泌され、道管相互間の壁孔壁に堆積するという現象が多かれ少なかれ被子植物で一般的に生じている可能性も想定される。Kim & Daniel (2013) が調べた 2 種の供試木は、それぞれ温室で育てられた交雑ポプラ (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.) と天然生のヨーロッパポプラ (*Populus tremula* L.) であった。キシログルカンが検出されたのは後者であり、よりストレスの多い環境で生育していたはずである。この点から、環境ストレスに応じて、キシログルカンの分泌・堆積が生じたことも想定される。このようなストレス応答として壁孔壁に二次的にヘミセルロースが堆積するという仮説を検証するには、道管相互間の壁孔壁におけるヘミセルロースの分布を、多くの樹種や個体を対象として詳細に分析する必要がある。

本節においても、道管の壁面に液滴状に付着する堆積物とトネリコ型被覆物の性状はおおむね一致していたことから、トネリコ型被覆物と道管の壁面に付着する堆積物は同類の物質であることが示唆される。これらが多糖質を含むこと、そして道管の壁面に付着していることから判断すると、トネリコ型被覆物は一般的にゴム質 (gum) と呼ばれるものの 1 種とみなすことができる。道管の機能不全が生じたとき、道管内にチロースが形成されることがよく知られるが、道管・周囲柔細胞間壁孔の口径が小さい樹種 (例えばサクラ属、

シナノキ属、キハダ属) では、チロースが形成されず、代わりに多糖類を主成分としたゴム質が道管内に堆積することが知られている (Chattaway 1949; Bonsen 1990; Saitoh et al. 1993)。このような道管の内腔に生成されるゴム質は、一般的にペクチンが含まれているという報告が多い (藤田ら 1977; Rioux 1998)。このことは、組織染色によって調べられている例がほとんどであるが、例えば藤田ら (1977) は、ネムノキの道管に発生したゴム質を取り出して、ガスクロマトグラフィーでアラビノースやラムノース、ガラクトースといったペクチンの構成糖が検出されることを確かめている。一方、本研究の結果によれば、トネリコ型被覆物にはペクチンは含まれていなかった。このことから、トネリコ型被覆物は、道管閉塞物として発生する一般的なゴム質とは、成分的に異なるものである可能性がある。

3.4.4.2 トネリコ型被覆物に含まれるフェノール類

紫外顕微分光分析により、トネリコ型被覆物は波長 260~280 nm の領域に加えて、波長 340~370 nm の領域に紫外線の吸収極大を示すことが分かった (Fig. 3-14c、■,◆)。長波長側の紫外線吸収極大は、二次壁や細胞間層からは示されなかったため (Fig. 3-14c、×,+), トネリコ型被覆物には木化に関連するリグニンやフェニルプロパノイドとは異なる化合物が含まれていることが示唆される。

このような紫外線吸収波長を示す典型的なフェノール類として、フラボノイドが筆頭に挙げられる。フラボノイドの紫外線吸収スペクトルは、シナモイル系に関連するバンド (300-380 nm) とベンゾイル系に関連するバンド (240-280 nm) において主要な吸収ピークを示すことが知られている (Mabry et al. 1970)。アフゼリア (*Afzelia* spp.) やメルバウ (*Intsia* spp.) に生じる材変色に関する研究では、その原因となる堆積物がそれぞれフラボノイドであるケンフェロール-3-ラムノシド (kaempferol-3-rhamnoside) とロビネチ

ン (robinetin) であると同定されたが、この堆積物を紫外顕微分光法で分析した際には、典型的な 2 つの主要なピークを持った紫外線吸収スペクトルが測定されている (Koch et al. 2006)。トネリコ属から見出されているフラボノイドとして、フラボン類のルテオリン (luteolin) やアピゲニン (apigenin)、アカセチン (acacetin) の配糖体や、フラボノール類のケルセチン (quercetin) やケンフェロール (kaempferol) の各種配糖体などが報告されている (Fitzgerald & Reines 1969; Black-Schaefer & Beckmann 1989; Lee et al. 2012; Kasmi et al. 2021)。このうち前者のフラボン類は、おおむね Wallander (2008, 2012) に基づく Melioides 節 (ホワイトアッシュ *F. americana* が含まれる) で特異的に出現すると報告されており、ヤチダモ (*F. mandshurica*) では検出されていない (Lee et al. 2012)。一方、後者のフラボノール類はトネリコ属に広く出現することが示唆されている (Lee et al. 2012)。これらのフラボノール類のとりわけケルセチンの配糖体であるルチン (rutin) や、ケンフェロールの各種配糖体のメタノール下での紫外線吸収スペクトルは (Mabry et al. 1970)、トネリコ型被覆物から示されたスペクトルと類似するパターンを示している。当然、これらのメタノール溶液でおこなった計測と本研究で行った切片上での計測では測定環境が大きく異なるため、同様のパターンが得られるとは限らない。ただし、少なくとも、本研究と同様に木材切片に対して紫外顕微分光分析をおこなった Koch et al. (2006) が、ケンフェロール配糖体に由来するものとして得たスペクトルは、メタノール溶媒中の標準物質から得られたスペクトルと大きくかけ離れたものではないように見える。

このように、トネリコ属から見出されているフラボノイドとトネリコ型被覆物から得られた紫外線吸収スペクトルに類似性がありそうであるが、実は、トネリコ属のフラボノイドは葉から抽出された事例がほとんどであり (例えば Fitzgerald & Reines 1969; Black-Schaefer & Beckmann 1989; Lee et al. 2012)、木部や樹皮から得た抽出物からは、基本的に報告されていない (嶋田 1940, 1952a-e; Terazawa & Sasaya 1968, 1970, 1971; 宮地

ら 1987; Sanz et al. 2012)。ホソバトネリコ (*F. angustifolia* Vahl) に関する最新の研究では、葉と樹皮の両方からエタノール抽出物を得て HPLC/DAD/MS で分析した際に、葉抽出物から検出されるフラボノイドが、樹皮抽出物からは全く検出されなかったことが示されている (Kasmi et al. 2021)。一方、調べた限りでは、トネリコ属樹木の樹皮または木部からフラボノイドが検出された可能性がある事例が 1 例のみ見つかった (Si et al. 2016)。この事例では、中国の天津市に植栽されたベルベットアッシュ (*F. velutina* Torr.) から 11 月に採取した枝よりエタノール抽出物を得て、そこから分光分析によって 9 種類の化合物を推定している。その中には、これまでトネリコ属で報告されていたルチンに加えて、(-)-エピガロカテキン ((-)-epigallocatechin)、ナリンゲニン (naringenin)、タキシフォリン (taxifolin)、アピゲニンの配糖体の計 5 種類のフラボノイドが含まれていた。当該文献では、これまで樹皮や木部の抽出物から検出されていなかったフラボノイドが本事例で検出された理由を特に論じていないが、筆者は 2 つの可能性があると考えている。1 つ目は、文献には記載がないものの、枝の頂端部の冬芽と一緒に抽出していた可能性である。冬芽では、マツ科やヤナギ科をはじめ様々な樹種で、フラボノイドの存在が報告されており (Greenaway et al. 1989; Lee et al. 2014; Turrini et al. 2020)、トネリコ属でもセイヨウトネリコ (*F. excelsior* L.) でいくつかのフラボノールが含まれていることが報告されている (Turrini et al. 2020)。また 2 つ目に、枝の木部や樹皮に季節的に蓄積されたフラボノイドが検出された可能性があると考えられる。本事例では 11 月に試料を得ているが、実はその他の事例において、抽出材料が冬に採取されていることを記載しているものはない。ゆえに本事例はおそらく唯一、冬に採取された試料を分析しているものであり、フラボノイドが季節的に木部や師部に蓄積されるのであれば、本事例でのみフラボノイドが検出されたことに説明がつく。そもそもフラボノイドは、UV 照射や、乾燥などの様々なストレスに応答して植物が蓄積する成分であることが知られている (Petrussa et al. 2013)。低

温に関連して蓄積することも知られており、例えばモモ (*Prunus persica* Batch. cv. Okubo) やリンゴ (*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji) のシュートでは、氷点下の低温処理によってフラボノイドの1種であるアントシアニンの濃度が上昇することが報告されている (Leng et al. 2000)。またドイツトウヒ (*Picea abies* L. (Karst)) では、低温馴化によって葉や茎頂に各種フラボノイドの蓄積量が増加することが示唆されている (Rummukainen et al. 2007; Lee et al. 2014)。低温に応じたフラボノイド蓄積が木部に生じたことを明確に報告した例は調べた限り見つからなかったが、カツラ (*Cercidiphyllum japonicum* Sieb. et Zucc.) では、越冬のための木部柔細胞の深過冷却機構において、柔細胞内に蓄積されたフラボノイドが過冷却促進物質として有効な機能していることが示されている (Kasuga et al. 2008)。これらを踏まえると、冬に限定してトネリコ属の木部にフラボノイドが蓄積されていてもおかしくはない。その場合、フラボノイドの蓄積とトネリコ型被覆物の堆積時期が一致することになるため、両者の関係性はより強まる。いずれにせよ、現時点で得られた証拠だけではトネリコ型被覆物がフラボノイドを含むかどうかを判断することは難しい。しかし、その候補物質としてフラボノイドを提示することはできると考えられる。

フラボノイド以外のフェノール類として、トネリコ属樹木からはクマリン類、セコイリドイド、リグナンも見つかっている (Kostova & Iossifova 2007; Sanz et al 2012)。ヤチダモにおけるフェノール類については、寺沢らの内樹皮や辺材部の抽出物に関する一連の報告が特筆される。これらでは、クマリン類としてフラキシノール (fraxinol) およびその配糖体であるマンドシュリン (mandshurin) や、フラキセチン (fraxetin) およびその配糖であるフラキシン (fraxin)、セコイリドイドとしてリグストロシド (ligustroside) やオレウロペイン (oleuropein)、リグナンとしてシリンガレジノール (sylingaresinol)、ピノレジノール (pinoressinol)、オリビール (olivil) が報告されている (Terazawa & Sasaya

1968, 1970, 1971, 1986; Terazawa 1986)。その中で辺材から得た抽出物からは、クマリン類のフラキシノールや、リグナンのシリンガレジノールとオリビールが同定されている。とりわけオリビールは辺材でのみ検出され、内樹皮や心材からは見つからなかったことが報告されている (Terazawa & Sasaya 1986)。トネリコ属から検出された心材成分や樹皮成分、葉成分の紫外線吸収極大の値が網羅的に示されている文献によれば、セコイリドイドやリグナンの多くは、水やアルコール中での紫外線吸収スペクトルにおいて、280 nm よりも長波長側に吸収極大を示していなかった (Sanz et al 2012; Kasmi et al. 2021)。一方、クマリン類については、250～280 nm の領域には吸収極大を持たず、基本的に 330～340 nm の領域に吸収極大を持つことが示されている (Kasmi et al. 2021)。寺沢らが同定した各成分の計測結果も同様の傾向を示していた (Terazawa & Sasaya 1968, 1970, 1971, 1986; Terazawa 1986)。これらのことからセコイリドイド、リグナン、クマリン類が示す紫外吸収スペクトルでは、それぞれ単独ではトネリコ型被覆物が示した 2 つの領域にわたる紫外線吸収極大を説明できないといえる。したがって、これらがトネリコ型被覆物に含まれている可能性は十分に考えられるものの、少なくともそれぞれが単独で存在している可能性は低いと結論付けられる。

3.5 トネリコ属内におけるトネリコ型被覆物の存否

3.5.1 本節の目的と手段

本節では、トネリコ型被覆物がこれまで報告されてきたホワイトアッシュやヤチダモ以外のトネリコ属においても観察されるかを明らかにすることを目的とする。ヤチダモと同じシオジ節に属するシオジ (*Fraxinus platipoda* Oliv.) のほか、トネリコ節に属するマルバオダモ (*F. sieboldiana* Blume)、チョウセントネリコ (*F. chinensis* Roxb. subsp. *rhynchophylla* (Hance) E.Murray)、さらに散孔材をもつシマトネリコ (*F. griffithii* C.B.Clarke) を調査した。またこれまで被覆物の堆積が確認されていたヤチダモは、先行研究を含め、北海道産のものばかりであったので、他地域産のヤチダモでも被覆物が同様に確認されるのかも調査した。本研究では、FE-SEM による観察で、冬の試料に被覆物が堆積しているか、また夏の試料の前年輪より内側で被覆物が消失しているかを調べた。加えて、3.3 節で示された光学顕微鏡レベルで観察手法を用いて、シマトネリコの個体内での被覆物の分布を解析した。

3.5.2 材料および方法

3.5.2.1 供試材料

国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所の構内（茨城県つくば市）に植栽されたヤチダモ、シオジ、マルバオダモ、チョウセントネリコ、ならびに茨城県つくば市内の住宅地に植栽されたシマトネリコの成木各 1 個体より、直径 6 cm 以上の枝または幹をノコギリで採取した (Table 3.2)。採取は 2022 年の 1 月中旬と 9 月初旬におこなった。ただしヤチダモについては、被覆物が堆積することのみ確認できればよいと判断し、9 月には採取しなかった。1 月の採取時期では、常緑性であるシマトネリコ以外は、すべ

て落葉していた。9月の採取時期では、どの樹種でも黄葉は始まっていなかった。採取した枝や細幹は、乾燥を防ぐため、水で濡らしたペーパータオルとともにポリ袋に密封した状態で速やかに実験室に持ち帰り、FAA 固定液（ホルマリン液：酢酸：50%エタノール＝1：1：38）または 30%エタノールに浸漬させて保存した。

3.5.2.2 FE-SEM による観察

3.2 節でおこなった板目面の観察（3.2.2.2 を参照）と同様の方法で、試料のトリミング、乾燥、形成層から最大 10 年輪までにおける面出し、並びに SEM 試料台への接着をおこなった。ただし、乾燥については臨界点乾燥をおこなわず、エタノールシリーズによる脱水をおこなったあとに、そのまま 5 時間以上気乾させた。SEM 試料には、オスミウムコーター（Neoc-Pro）でオスミウムをコーティングし（5 mA 10 秒）、FE-SEM（S-4800）で観察した。加速電圧は 1.0 kV、作動距離は 5～8 mm とした。観察は、道管相互間の壁孔壁を主な対象とし、1 月に採取した冬の試料で被覆物が堆積しているかどうか、また 9 月に採取した夏の試料の前年輪より内側で被覆物が消失しているかどうかを確認した。

3.5.2.3 PAS 染色

シマトネリコについて、各時期に採取して 30%エタノールで保存していたブロックやコアを、超純水ですすぎながらカミソリ刃等でトリミングし、木口面が 2×5 mm 程度となるような小ブロックとした。この小ブロックを滑走式マイクロームに取り付けて、ステンレス製ブレードで薄切し、厚さ 2.5～5 μm の木口面の薄切片を作製した。切片は、3.3 節に示した手順に倣って PAS で染色した（3.3.2.3 を参照）。染色した切片は、エタノールシリーズで脱水してからヘモディー®に置換し、ビオライトで封入して永久プレパラートと

した。作製したプレパラートは、光学顕微鏡（Eclipse E600W）で観察し、デジタルカメラ（DS-Fi2）で撮影した。

3.5.3 結果

3.5.3.1 FE-SEM による被覆物の観察

各樹種の供試木から 1 月と 9 月に採取した試料の前年輪より内側の領域で観察された道管相互間の壁孔壁の様子を Fig. 3-15 に示した。1 月に採取した試料では、観察したすべてのトネリコ属樹種において、被覆物が堆積していることが確認された（Fig. 3-15 a,c,e,g, ヤチダモのデータは示さず）。しかし、その形態は、樹種によって様々であり、例えばシオジでは、中央の突起の基部にある起伏が少なく（Fig. 3-15 a）、逆にチョウセントネリコでは、突起の基部の起伏が大きく発達していた（Fig. 3-15 e）。シマトネリコでは、平滑な部分と起伏のある部分が入り混じった表面形状をしており、ヤチダモにおける孔圏道管の被覆物と孔圏外道管の被覆物の中間的な形状を呈していた（Fig. 3-15g）。茨城県産のヤチダモ、シオジ、マルバアオダモ、チョウセントネリコでは、従来の北海道産のヤチダモでの観察結果と同様にすべての道管相互間の壁孔壁に被覆物が見られた。一方、シマトネリコでは被覆物が堆積していない道管が散見された。年輪ごとに分けて分析すると、前々年輪（形成層から 2 年輪目）より外側の領域では、ほとんどの道管相互間の壁孔壁に被覆物が堆積していたが、それより内側の領域では、被覆物の堆積していない壁孔壁が頻繁に現れるようになった。特に形成層から 6 年輪目以内では、被覆物が堆積している道管相互壁孔の割合が著しく低くなり、例えば 10 年輪目を観察したところ、ほとんどの道管相互壁孔で被覆物が観察されなかった。

9 月に採取した試料の前年輪（形成層より 2 年輪目）よりも内側では、シオジ、マルバアオダモ、チョウセントネリコの孔圏外道管、ならびにシマトネリコのすべての道管にお

いて道管相互間の壁孔壁に被覆物が堆積していなかった (Fig. 3-15 b,d,f,h)。このことから、すべての観察樹種で、1 月時点で堆積していた被覆物が消失していたことが確認された。

3.5.3.2 光学顕微鏡によるシマトネリコの被覆物の検出

FE-SEM 観察の結果、シマトネリコでは年輪間で被覆物の堆積頻度が異なるようであったので、シマトネリコの個体内での被覆物の分布を、PAS 染色を施した組織切片の光学顕微鏡観察で解析した。1 月に採取したシマトネリコについて、辺材最外層および辺材内層から得た木口面切片を観察した一例を Fig. 3-16 に示す。まず、3~4 年輪を含むそれぞれの木口面切片において、PAS による染色性が明らかに異なる道管相互壁孔が認められ、被覆物の存否が、切片上に存在する道管ごとに異なることが示された (Fig. 3-16a,b)。染色された道管相互壁孔の頻度は、明らかに辺材内層の切片よりも辺材最外層の切片の方が多かった (Fig. 3-16c,d)。また辺材最外層の切片においては、形成層から 1~2 年輪目までは、ほとんどの道管相互壁孔が染色されていたが、3~5 年輪目以内では、染色されない道管相互壁孔の割合が増加していることが明らかであった (Fig. 3-16c)。

3.5.4 考察

3.5.4.1 トネリコ属内の被覆物の存否

従来、トネリコ型被覆物が確認されていたヤチダモに加え、シオジ、マルバアオダモ、チョウセントネリコ、シマトネリコといった他のトネリコ属樹木においても、冬に堆積し、翌成長期には消失するトネリコ型被覆物が存在することが確認された。これらの樹種のうち、ヤチダモとシオジは、シオジ節に属し、マルバアオダモ、チョウセントネリコ、シマトネリコは、トネリコ節に属する。またシマトネリコは、落葉性で環孔材を持つ他の樹種

とは違い、常緑性で散孔材を有する樹種である。すなわち、トネリコ型被覆物は、属内の系統や管孔性、落葉・常緑性に関係なく、トネリコ属に共通して発生するものであることが明らかとなった。被覆物の形態には、樹種間で差が見られたが、これは被覆物が充填されている各樹種の道管相互壁孔の壁孔腔の形態（壁孔室のサイズやベスチャーの形態など）を反映している可能性がある。本研究では各樹種1個体ずつしか観察しなかったため詳しい解析はおこなわなかったが、トネリコ属の木材における樹種識別のための有用な情報になるかもしれない。

常緑性で散孔材をもつシマトネリコで被覆物が確認されたことは、進化発生学的な観点から重要な知見かもしれない。二次木部の道管要素は、おおよその傾向として仮道管から特殊化して比較的細く長いものが生じ、徐々に太く短いものへと進化していくと考えられている（Bailey trend; Bailey 1944）。この Bailey trend は、化石を用いた古植物の調査でもおおむね支持され、一般的に受け入れられている。この点を踏まえると、より径の大きい道管を発達させる環孔材は、散孔材から進化したものであると考えられる。このことは、環孔材が基本的に、樹木が季節変化に適応するために獲得した落葉性に関連して発達した形質であり、完全に常緑性の樹種で見られることが稀である（Baura & De Franceschi 2007）という事実からも支持される。被子植物系統において無道管広葉樹が発生していることを考慮すると、Bailey trend はしばしば逆行することもあるようだが、一度、落葉性・環孔材性に至った系統が、常緑性・散孔材性の系統に戻るのは、種分化の過程においてそれほど頻発することではないと考えられる。このような散孔材から環孔材への進化を前提とすると、トネリコ属のように環孔材を持つ樹種と、散孔材を持つ樹種が混在する分類群では、その共通祖先は散孔材を持っているものではないかと考えられる。ここで、散孔材であるシマトネリコにおいてトネリコ型被覆物が観察されたという事実に立ち返ってみる。系統進化の過程は一般に、ある形質が獲得される回数が最も少なくなる

ように進行すると想定される（最大節約原理）。これに基づいて、トネリコ属系統がトネリコ型被覆物の形質を獲得する機会が1回しかなかったと仮定すると、そのタイミングは、散孔材の樹種から環孔材の樹種が現れる以前に存在したと考えるのが妥当ということになる。この予想は、トネリコ型被覆物の機能を検討するうえで重要な仮説になると思われるため、3.6節の総合考察において改めて議論する。

3.5.4.2 シマトネリコの年輪間における被覆物の堆積頻度の差

FE-SEMによる1月に採取したシマトネリコの観察において、トネリコ型被覆物が堆積していない道管相互壁孔が観察された。また年輪間の比較により、それは形成層より3年輪目よりも内側の領域で増加していることが示唆された。このことは、より広範囲を同時に調べられるPAS染色した切片の光学顕微鏡観察によっても、確認することができた(Fig. 3-16c,d)。調べた限りでは、シマトネリコにおけるトネリコ型被覆物の堆積頻度は、形成層から1~2年輪目では非常に高いが、3年輪目以内では、徐々に堆積の見られない道管が現れ、少なくとも10年輪目より内側の辺材内層の領域では、著しく低くなっていた。

このことに関する解釈は、シマトネリコにおいて被覆物が堆積していなかった道管が、空洞化した道管であったのか、それとも水が分布する通水機能を維持した道管であったのかによって大きく変わる。前者の場合、より内側の年輪ほど、空洞化して機能不全を起こしている道管が多く、そこでは物質拡散の拠り所となる水がないために、被覆物が堆積できないと考えられる。一方、後者の場合、通水機能を維持している道管のなかで、形成層に近い若い道管に、優先して被覆物を堆積させる何らかの制御がなされている可能性がある。その制御の仕組みが能動的なものか受動的なものは定かではないが、これが正しければ、ヤチダモの被覆物の堆積が最外年輪で優先されていることが示唆された3.2節の結果と関連する現象であると考えられる。シマトネリコ木部の道管の水分布は調べておらず、

また過去の報告も調べた限り見つからなかった。34種の常緑広葉樹の通水年輪を明らかにした研究（Umebayashi et al. 2010）によれば、散孔材性の常緑樹は基本的に形成層から数年輪目までの通水機能を維持しているものの、その年輪数は樹種によって様々であった。ゆえに、シマトネリコの形成層より3年輪目以内の年輪で多くの道管がエンボリズムを起こしている可能性も、それほど起こしていない可能性も、十分にあり得るだろう。しかしながら、仮に前者が正しく、冬の間にも空洞化していない道管すべてに被覆物が堆積しているとする、これは、冬の間にも葉を生残させなければならない常緑樹のシマトネリコにとっては不都合があるように思われる。一方、シマトネリコが通水可能な道管のうち、辺材最外層の年輪に含まれている道管の水分布を被覆物によって優先的に保持しているというのならば、外側の新しく形成層に近い道管を、翌年の成長期の水分通導のために優先的に保護し、冬期間の葉への水供給を内側の年輪で担っているという、組織レベルでの精巧な生存戦略も垣間見えてくる。いずれにしても、このことを正しく解釈するには、シマトネリコの一年を通じた水分布が把握されることが必須である。

3.6 総合考察

3.6.1 本章で得られたトネリコ型被覆物に関する知見

はじめに、3.1 節で提示した目的に対応させながら、本章で得られた知見をまとめる。

3.2 節においては、ヤチダモのトネリコ型被覆物の構造と分布に関する知見が得られた。

孔圏道管の被覆物と孔圏外道管の被覆物を比較すると、両者の形態に明らかな違いが見られた。孔圏道管の被覆物は、壁孔壁の表面を比較的薄く覆っており、壁孔壁の全体を覆っていない場合も観察された。一方、孔圏外道管の被覆物は、壁孔壁全体に厚く堆積し、壁孔室から壁孔道の一部を満たしていた。この孔圏と孔圏外における堆積の厚さの違いは、本質的には壁孔のサイズによるものであると考察された。被覆物の断面を観察すると、孔圏道管の被覆物にも孔圏外道管の被覆物にも、性状の異なる2つの層が識別された。これらは3.3 節でおこなった準超薄切片による解析によって壁孔壁に被覆物が浸透している部分と、壁孔壁の上に堆積している部分を示しているということが明らかとなった。またこの被覆物の構造観察の過程で、従来の報告通り、ヤチダモの被覆物が落葉前の10月頃に堆積し、孔圏外道管のものは4～5月の開芽前後に消失することを確認したが、さらにこれらの開始タイミングあるいは進行速度が、少なくとも最外年輪とそれより内側の年輪によって異なることを明らかにした。加えて、孔圏外道管においては、道管相互壁孔および道管・周囲柔細胞間壁孔にトネリコ型被覆物が堆積している時期に、道管の内腔側の壁面に液滴状の堆積物が存在していることを明らかにした。この堆積物が、せん孔縁の隆起の頂部にある複合細胞間層が露出した部分に集中的に堆積している様子も確認された。この堆積物は、3.3 節と3.4 節における組織化学的な分析によって、トネリコ型被覆物と同一の成分を含むことが示され、被覆物と由来が同じものであることが示唆された。あわせて

3.2 節では、採取後すぐに凍結固定した試料を一度も融解させずに Cryo-FE-SEM で観察し、トネリコ型被覆物は生立木や生材中でも堆積しているものであることを示した。

3.3 節と 3.4 節では、トネリコ型被覆物の化学成分に関する知見が得られた。3.3 節では、被覆物の成分に多糖類とフェノール類の双方が含まれていることを明らかにした。さらに 3.4 節におけるより特異的な分析により、多糖類については、少なくともキシログルカンとヘテロマンナンを含んでおり、ペクチン、キシラン、デンプン、フルクタンは含んでいない可能性が高いことを示した。フェノール類については、紫外顕微分光分析の結果、340～370 nm の吸収極大が見られたことから、フラボノイドかクマリン類を含んでいる可能性がある。その成分を反映して、3.3 節で示したようにトネリコ型被覆物の存否はトルイジンブルーO 染色、PAS 染色、KMnO₄ 染色によって光学顕微鏡レベルで判別できた。特に PAS 染色を施したうえで、青色や緑色の励起光によって生じる蛍光を蛍光顕微鏡で観察すると、極めて簡便に被覆物の存否を調べられることがわかった。

3.5 節では、FE-SEM 観察により、トネリコ型被覆物はシオジ、マルバアオダモ、チョウセントネリコ、シマトネリコといったヤチダモ以外のトネリコ属でも観察されることを明らかにした。シマトネリコについては、光学顕微鏡による検出法により形成層から 3～5 年輪目より内側の年輪で被覆物の堆積頻度が著しく低くなることを明らかにした。

これらの知見を踏まえたうえで、以下の各項ではトネリコ型被覆物の機能や堆積過程、分析法に関して総合的な考察をおこなう。

3.6.2 トネリコ型被覆物の機能に関する考察

生立木の成長期が終わり、本格的な冬に入る前に堆積するトネリコ型被覆物は、土壌から水の獲得が難しい冬の間に樹体内の水分を保持する機能があることが予想されている (Wheeler 1981)。トネリコ型被覆物の成分には、少なくともある種の糖類とフェノール

類が含まれていたが (3.4 節)、このうちフェノール類の成分は比較的高い疎水性を示すと考えられ、少なくとも被覆物が水分の拡散を妨げる性質があると考えられる。また被覆物の存在は、冬季に生じる道管のエンボリズムの発生因子の 1 つである木部の負圧から道管を切り離す効果があるように思われる。冬季に生じる道管のエンボリズムは、氷点下以下の気温によって道管内腔の水が凍結した際に、溶存気体が気泡として析出し、これが日中の気温上昇によって融解した際に、木部に負圧によって気泡が膨張することで生じるとされている (凍結・融解によるエンボリズム: Zimmermann 1983; Sperry and Sullivan 1992)。したがって道管内腔の水が凍結しても、道管が木部の負圧から解放されていれば、エンボリズムに至ることはない。したがって理論上、トネリコ型被覆物は冬季の道管における水分の維持に極めて有効に働くと考えられる。

一方、Utsumi et al. (1996) によるヤチダモの水分分布の観察が示しているように、冬の間、水分が保持されているのは、孔圏外道管の水だけであり、孔圏道管の水は当年の被覆物堆積後の 12 月ごろには空洞化してしまう。このことから、トネリコ型被覆物に道管の水分保持機能があったとしても、孔圏道管では機能していないことは明らかである。この点に関しては、3.2 節で示した孔圏道管の被覆物と孔圏外道管の被覆物の形態の違いが関与している可能性があると考えられる。道管相互壁孔と道管・周囲柔細胞間壁孔のどちらにおいても、孔圏外道管の被覆物は厚く、壁孔壁の全体を覆っていたが、孔圏道管の被覆物は薄く、壁孔壁の周縁部の堆積が不十分であることが見受けられた (Fig. 3-1)。このような不完全な被覆により、孔圏道管の壁孔に堆積している被覆物は、水分の移動の阻害や木部負圧の遮蔽を十分に達成できていない可能性がある。また、Utsumi et al. (1996) は、ヤチダモの孔圏道管の水が失われる 12 月において、それまで空洞であった道管周囲の木部繊維に水が分布している様子をとらえており、ヤチダモの孔圏道管から失われた水が、周囲の木部繊維へと移動していることを示唆した。ヤチダモは周囲柔細胞を発達させ

ており、道管と木部繊維を直接連絡する壁孔が極めて稀であることから (Sano & Fukazawa 1994)、道管から木部繊維への水の移動は、道管・周囲柔細胞間壁孔を介して生じていると考えられる。このことを踏まえると、道管・周囲柔細胞間壁孔に堆積する被覆物も道管の水分保持に重要な役割を果たしている可能性がある。道管・周囲柔細胞間壁孔の被覆物については、本研究では詳しい解析をおこなわなかったが、今後の機能解析のためにその構造や分布を改めて解析する必要があると考えられる。

ヤチダモの孔圏外道管では、数年以上にわたって水が充満し続けるため、その冬季の水分保持にトネリコ型被覆物が貢献している可能性はある。しかし、実際にその貢献度合が大きいかどうかは首肯しがたい面がある。先に説明した凍結・融解によるエンボリズムは、実は径の小さな管孔では発生しにくいことが分かっている。これは、管孔径が小さいほど、その中で発生する気泡のサイズが制限され、木部にかかる負圧よりも気泡の表面張力に基づく圧縮圧が上回るためだといわれている (Zimmermann 1983)。ヤチダモの孔圏外道管は極めてサイズが小さく、被覆物の存在がなくともヤチダモの孔圏外道管は、冬季のエンボリズムに耐性を持つといえる。被覆物の存在がその耐性を向上させている可能性はあるが、その効果は限定的であると考えられる。このように被覆物が仮に冬季のエンボリズム耐性に寄与したとしても、その貢献が限定的であることは、他の環孔材をもつトネリコ属樹種においても同様であると考えられる。

しかしながら、このことからトネリコ型被覆物が越冬において意義のないものであると結論付けるのは早計である。3.5 節の結果、散孔材をもつシマトネリコにおいてもトネリコ型被覆物が堆積することが分かった。シマトネリコの道管径は、光学顕微鏡下で計測してみたところ、接線径で 50~100 μm 程度であった。同じようなサイズの道管をもつシラカンバでは、冬季に多くの道管がエンボリズムを起こしていることが可視化されており (Utsumi et al. 1998)、シマトネリコの道管は、物理的には凍結・融解に起因するキャビ

テーションが頻発するサイズであるといえる。シマトネリコは、亜熱帯から暖温帯に自生する樹種であり、様々な生理的特性がその環境に適応した樹種であるため、日常的に冬の気温が氷点下を下回る環境に耐性があるわけではない。しかし、冬季に氷点下を下回ることがある地域にも、旺盛に成長する庭木として導入されており、その生理学的背景に、トネリコ型被覆物による冬季の水分保持機能が貢献している可能性はある。また 3.5 節で議論したように、散孔材性のシマトネリコに被覆物が見られることから、トネリコ属の系統進化の過程で被覆物が得られたのは、散孔材性の樹種から環孔材性の樹種が生じてくる前であった可能性がある。このことは、トネリコ型被覆物のもたらすメリットが、トネリコ属の系統が散孔材性であった時点で重要であったことを示唆する。常緑性で散孔材性であったトネリコ属の祖先が水ストレスのある寒冷地や乾燥地に進出するために、トネリコ型被覆物による道管の水分保護機能が有効に働いていた可能性もある。ゆえに、トネリコ型被覆物の機能を検討するうえでは、環孔材性のトネリコ属ではなく、シマトネリコのような散孔材性のトネリコ属の特性を調べる方が有意義である可能性がある。差し当たっては、シマトネリコにおける秋から春先にかけての道管内の水分布を明らかにし、被覆物が形成される道管と対応付けることで、被覆物が道管の水分維持に寄与するかを明らかにすることが求められる。また、シマトネリコの道管は大きいものだと 100 μm 以上の直径があるため、3.1 節で記したような単一道管灌流法による被覆物の水透過性の計測も不可能ではなく、様々な解析の展開が期待される。

3.6.3 トネリコ型被覆物の堆積・消失過程に関する考察

3.1 節で論じたように、トネリコ型被覆物は、周囲柔細胞から分泌された物質が壁孔壁上に堆積したものと考えられる。この堆積過程は、孔圏外道管においてトネリコ型被覆物と成分が同じ液滴状の堆積物が見られたことから、よりイメージしやすくなった。液滴

状の堆積物が基本的に道管壁面のランダムな位置に付着していることを鑑みると、被覆物および堆積物の由来となる分泌物は、一度道管液中に放出されてから、壁面に吸い寄せられているのではないかと考えられる。また、この堆積物は、せん孔縁の複合細胞間層が露出した壁面に集中しており、さらにトネリコ型被覆物として観察される道管相互壁孔および道管・周囲柔細胞間壁孔の壁孔壁にも盛んに堆積していた。このことから、被覆物や堆積物に含まれる物質は、壁孔壁を含む複合細胞間層に由来する壁面と高い親和性があり、優先的に堆積していることが推察される。被覆物の成分に含まれているキシログルカン、セルロースと同じ β -1,4 グルカンであるため、少なくとも壁孔壁の主成分であるセルロースとの親和性は高い。せん孔縁の化学組成は、調べた限りこれまで明らかにされていないが、未木化の一次壁の成分がそのまま壁面に晒されているならば、キシログルカンをはじめとするヘミセルロースは親和性が高そうである。

3.5 節で、トネリコ型被覆物は成分が特殊であるかもしれないが、道管閉塞物として分泌されるゴム質の 1 種とみなせるのではないかと考察した。トネリコ型被覆物が堆積した道管は必ずしも空洞化するわけではないため、典型的なゴム質と比べると、成分だけでなく性質も異なるものと考えられるが、トネリコ型被覆物の堆積過程を検討する上で、ゴム質で得られている知見を整理することは重要であるかもしれない。ゴム質は、チロースとともに、菌の感染や傷害、乾燥、木部の老化（心材化）などによって道管に分泌される (Hillis 1987; Rioux et al. 1998; De Micco et al. 2016)。確たる証拠が得られているわけではないが、ゴム質はエンボリズムの発生に際して前駆的に発生する何らかの因子を感知して分泌されていると考えられている (De Micco et al. 2016)。ゴム質にはフェノール類が含まれているという報告があるが (Gagnon 1967; Rioux et al. 1989; Bonsen 1991)、いくつかの組織化学的な研究では、初めは多糖類が主体であったゴム質にフェノール類（バニリン酸など）のような芳香族化合物が二次的に堆積することも報告されている (Bonsen 1991;

Zheng et al. 2017)。トネリコ型被覆物も季節に応じて堆積するため、気温や日照時間の低下に起因する何らかのシグナルを受容して分泌されている可能性がある。またトネリコ型被覆物は、多糖類とともに、フェノール類を含んでいることが明らかであったが、ゴム質の知見に従えば、先に堆積した多糖類にフェノール類が付加的に堆積した可能性がある。

3.3 節において、サフラニン・アルシアンブルー二重染色をおこなった際に試料によって呈色性が異なったが (Fig. 3-8d,e)、これは被覆物の経時的な成分変化を捉えたものだったのかもしれない。とはいえ、トネリコ型被覆物におけるフェノール類は、被覆物の堆積開始後ひと月ほどの 11 月の時点で、既に十分に検出されていた。このことから、トネリコ型被覆物の多糖類とフェノール類が二段階に堆積したものであったとしても、それは極めて短い時間間隔で生じていると考えられる。

トネリコ型被覆物の消失については、トネリコ型被覆物の重要な特性であるものの、本研究において明らかにできた点は少ない。最初の年で空洞化してしまう孔圏道管では被覆物が消失しないため、その過程には道管内腔に水が存在していることが必須であると考えられる。3.2 節で明らかになったように、被覆物の消失は、開芽前の蒸散流が発生していない木部でも生じていた。ゆえに被覆物は水流によって物理的に消失するというよりも、化学的な因子によって分解されていると考えられる。本研究の過程で調べた限りでは、トネリコ型被覆物は、希酸や塩溶液によってほとんど変化が見られない。したがって、樹液の pH や塩濃度の変化だけでこれを完全に分解することは困難であると考えられ、被覆物の除去には、酵素による触媒反応が関与しているように思われる。このことを明らかにするためには、季節ごとの道管内の樹液成分を調べ、被覆物の消失時期に多く検出されるであろう分解性もしくは修飾性の酵素を明らかにするなどのアプローチも必要となるだろう。

Table 3-1 Seasonal changes in the presence or absence of the ash-type incrustation and the related depositing materials, observed in *Fraxinus mandshurica*

Annual ring ^{a)}	Apr	May	Jun	Sep ^{b)}	Oct	Nov	Dec
0y-LW				-	+	+	+
0y-EW			(+)*	-	(+)	+	+
1y-LW	+	-	-	-	(+)	+	+
1y-EW	+	+	+	+	+	+	+
2y-LW	(+)	-	-	-	(+)	+	+
2y-EW	+	+	+	+	+	+	+

+, incrustations were present; -, incrustations were absent; (+), deposits were present;

*, unrelated to the incrustation.

a) Indicates the annual ring formed in current year (0y), in last year (1y), and in two years ago (2y). LW, latewood; EW, earlywood.

b) Including collecting date in August and September.

Table 3-2 The sample tree of *Fraxinus* species used in section 3.5.

Species name	Height (m)	DBH (cm) ^{a)}
<i>F. platipoda</i>	10.7	14
<i>F. sieboldiana</i>	6.6	8.0
<i>F. chinensis</i> subsp. <i>rhynchophylla</i>	13.4	15.5
<i>F. griffithii</i>	4.5	5.5
<i>F. mandshurica</i>	12.7	16

a) DBH, Diameter at the breast height

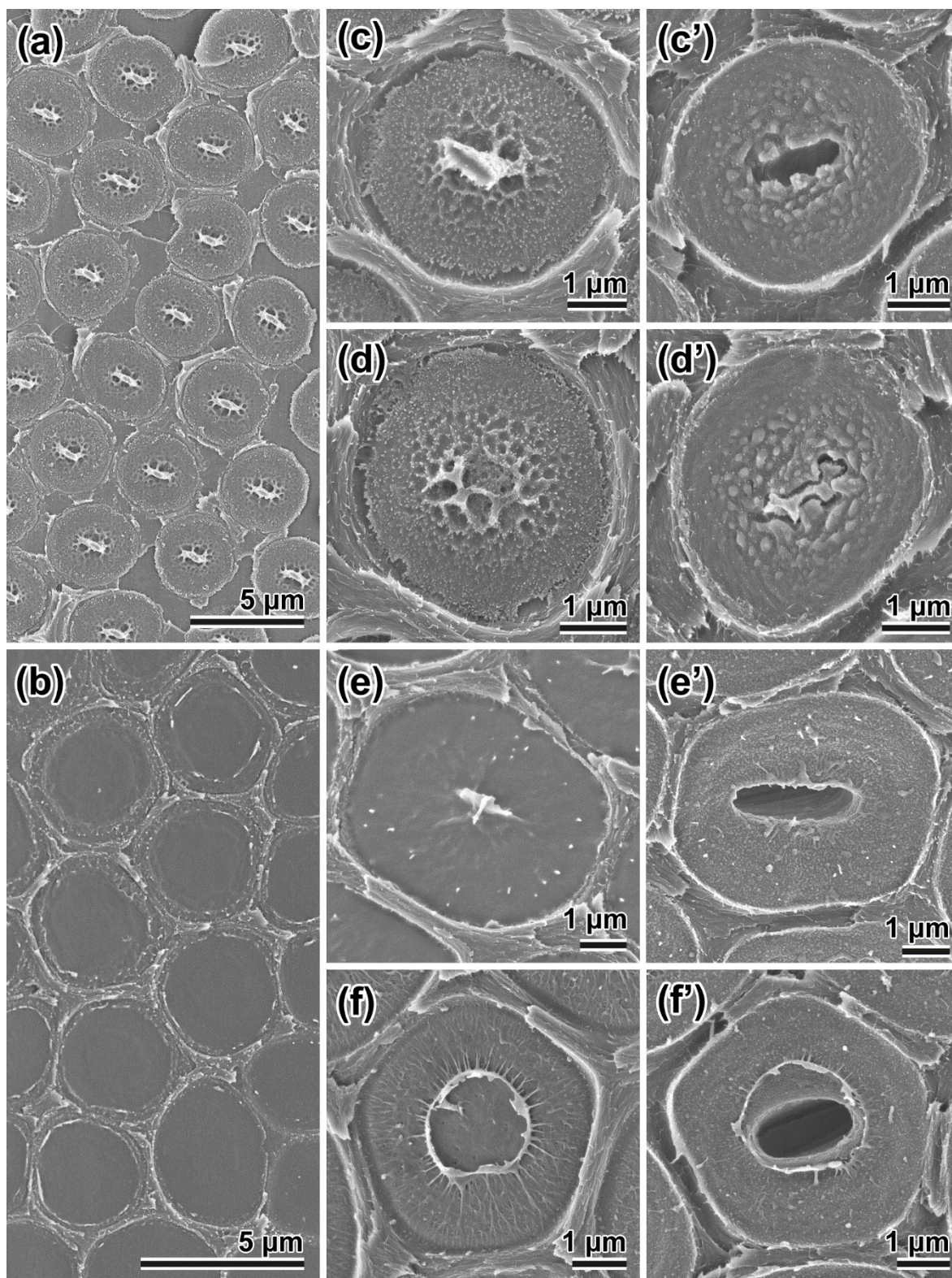


Fig. 3-1

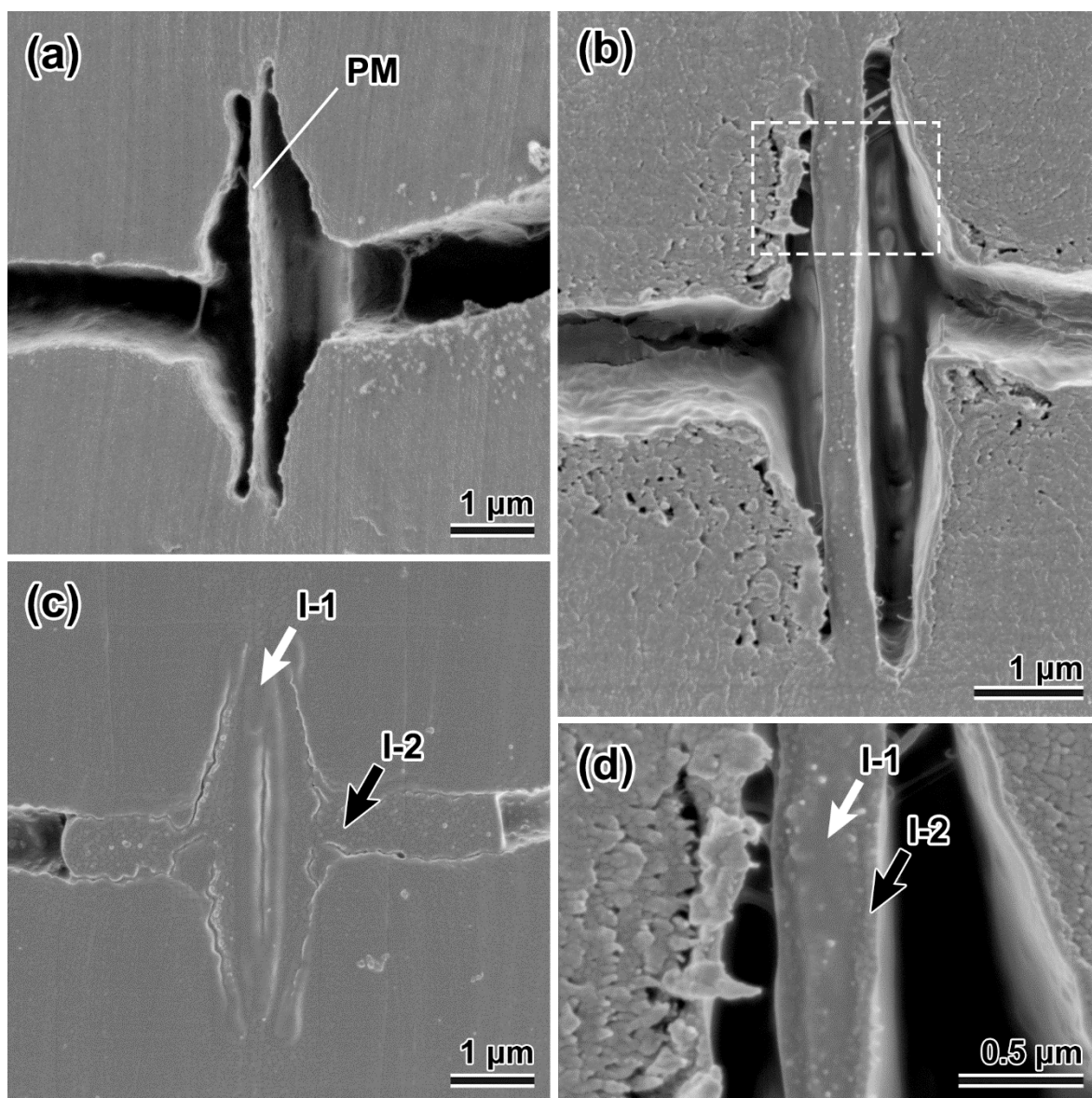


Fig. 3-2

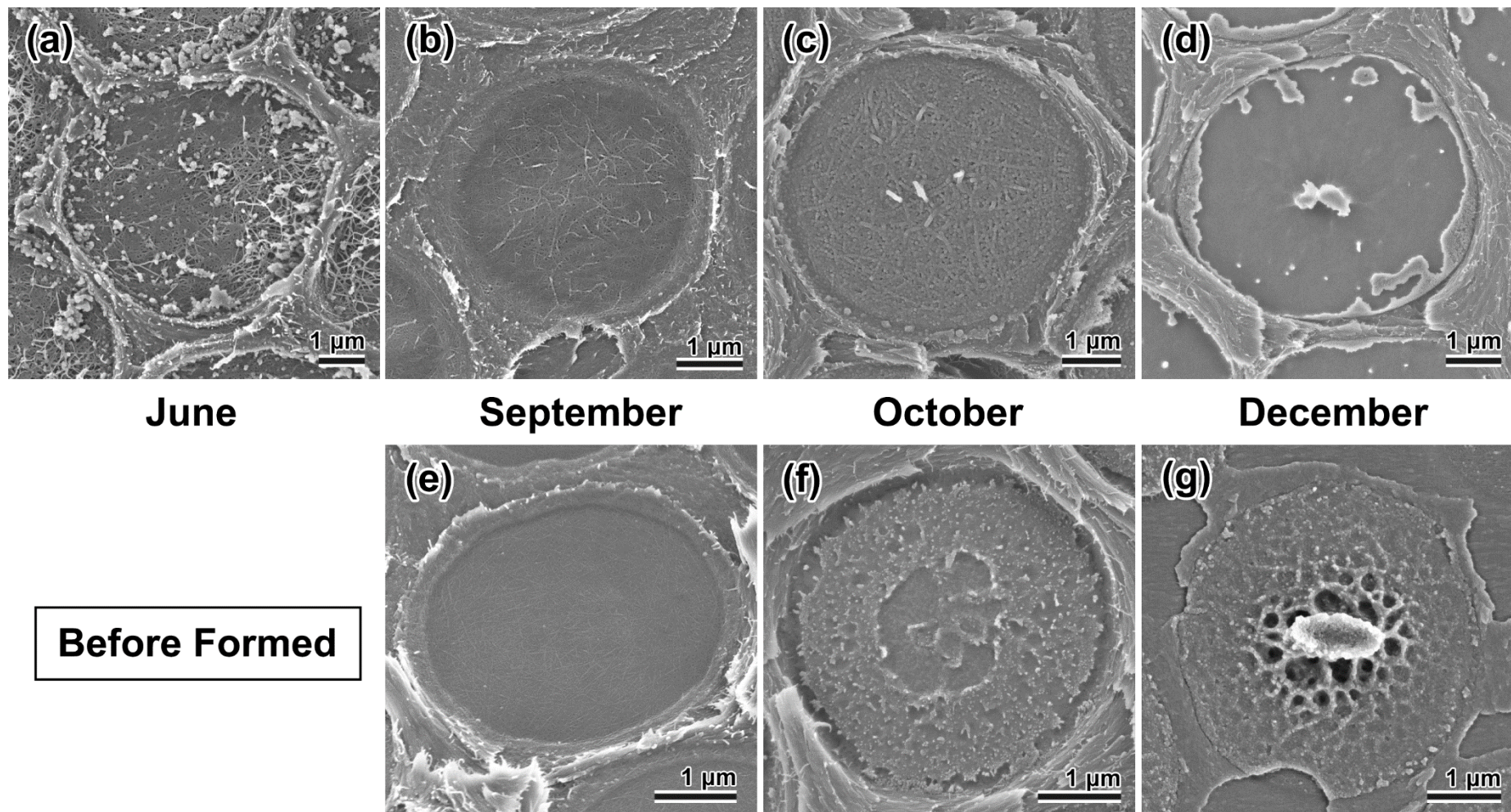


Fig. 3-3

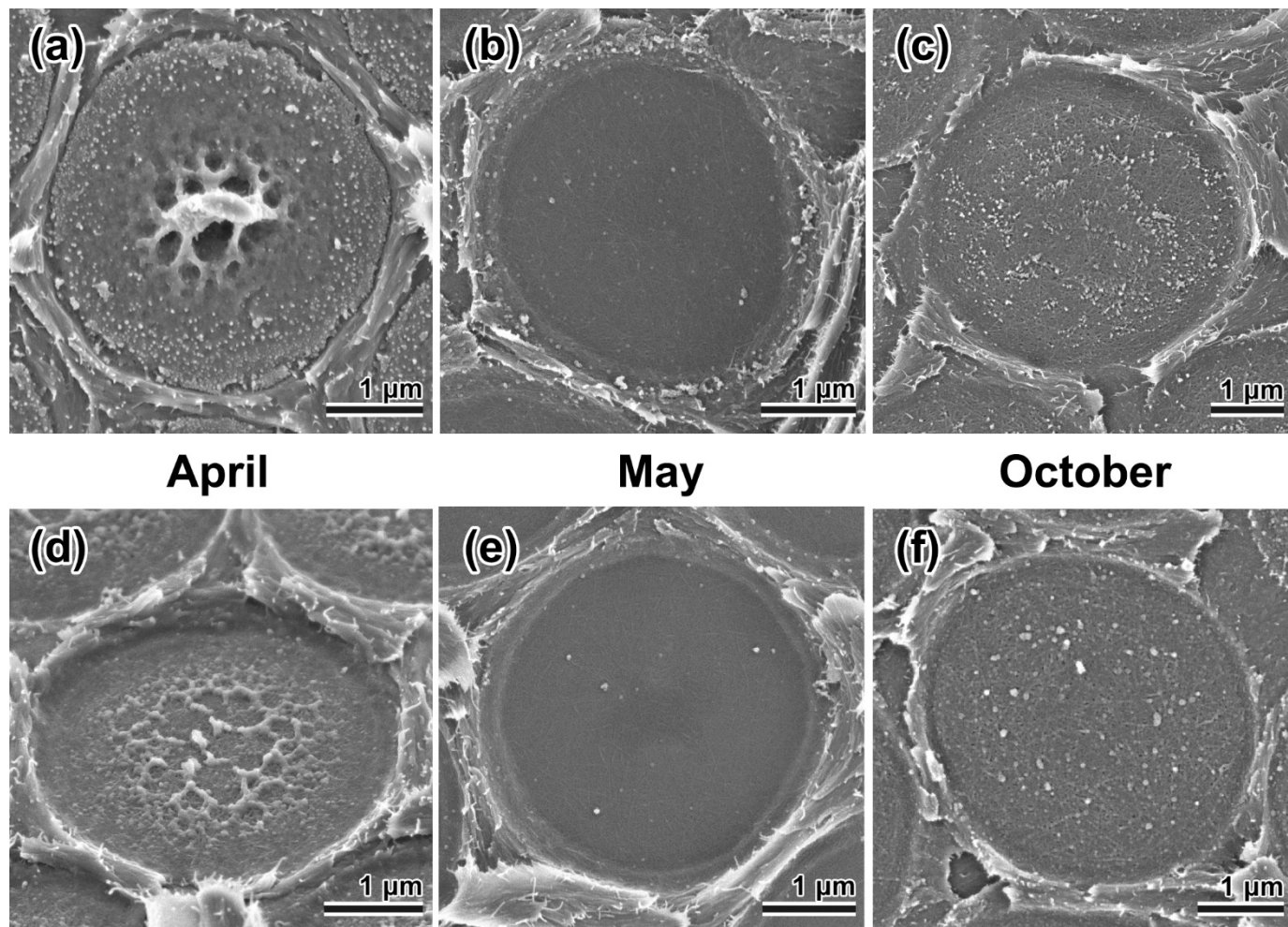


Fig. 3-4

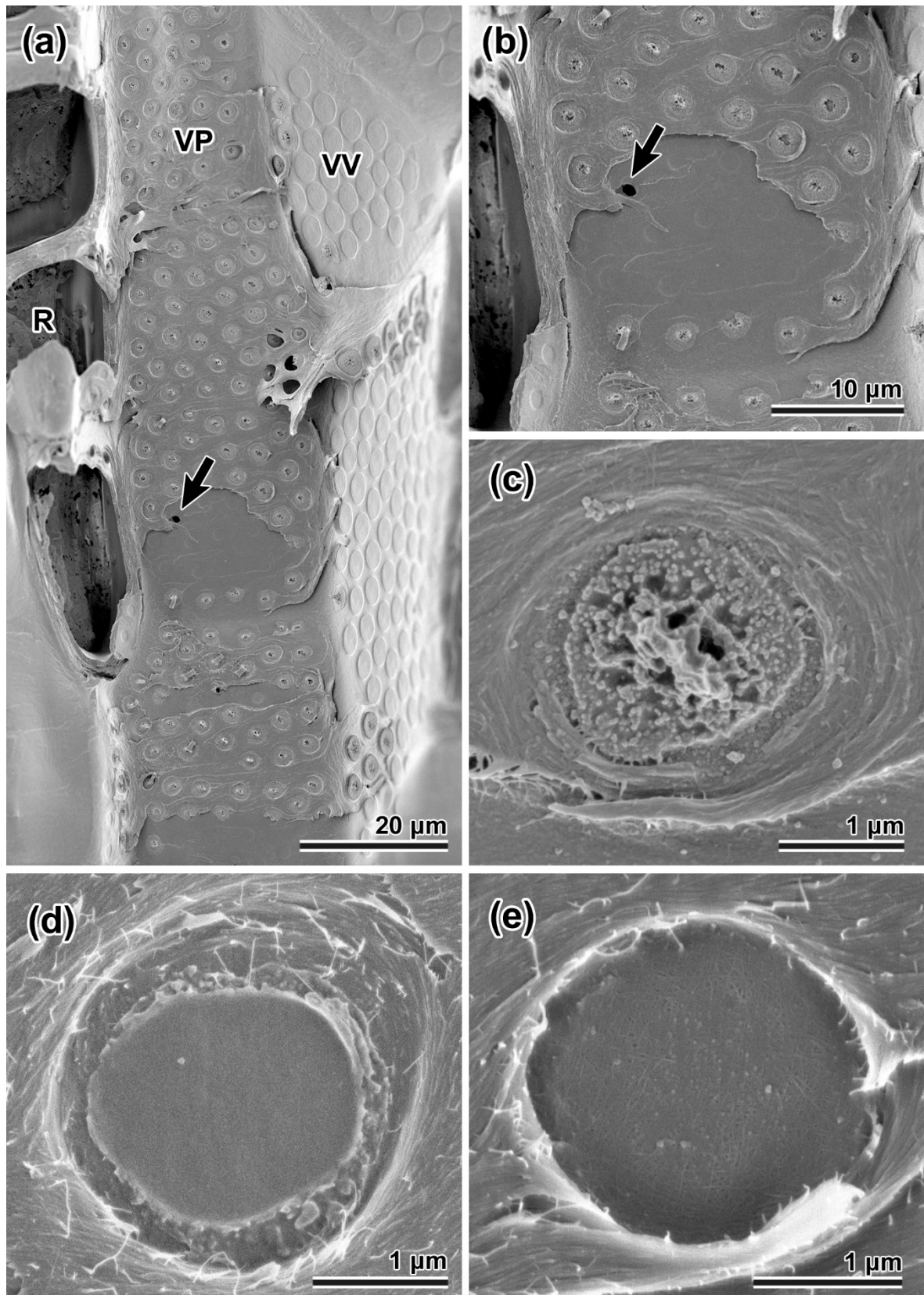


Fig 3-5

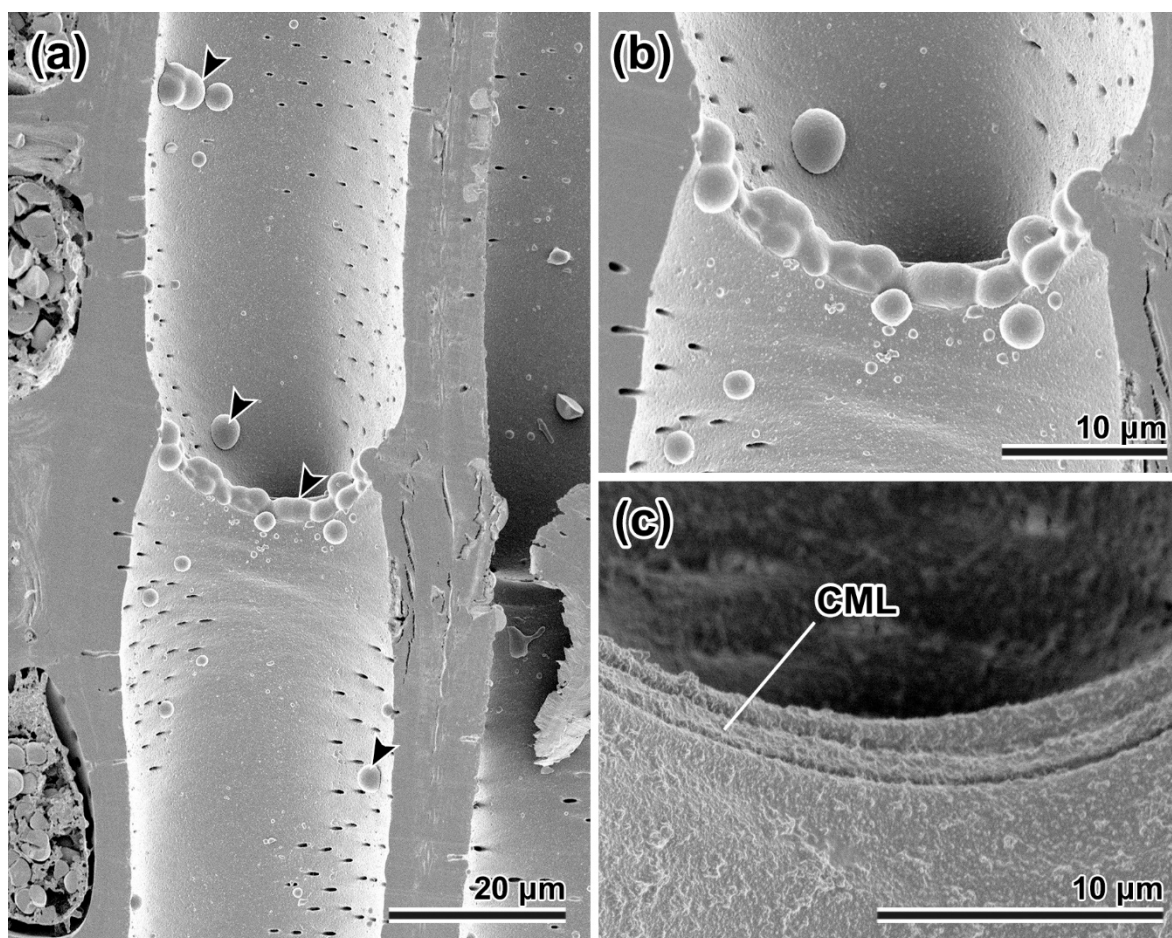


Fig. 3-6

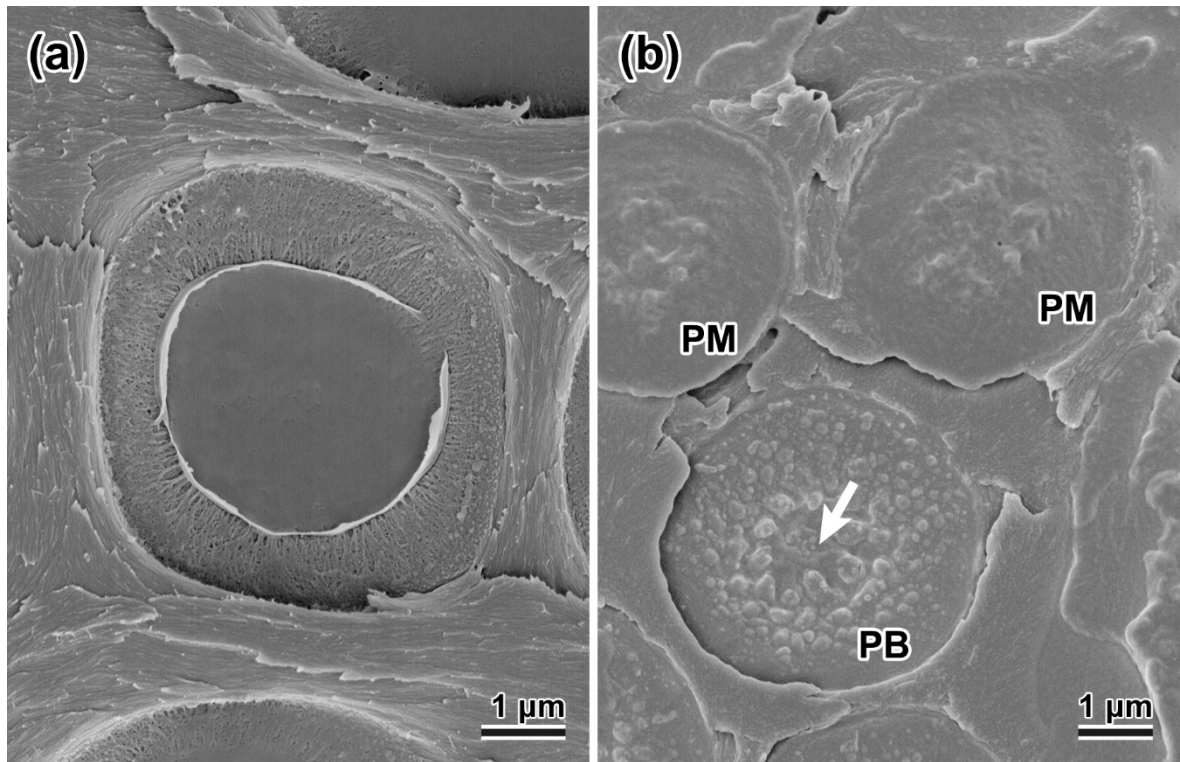


Fig. 3-7

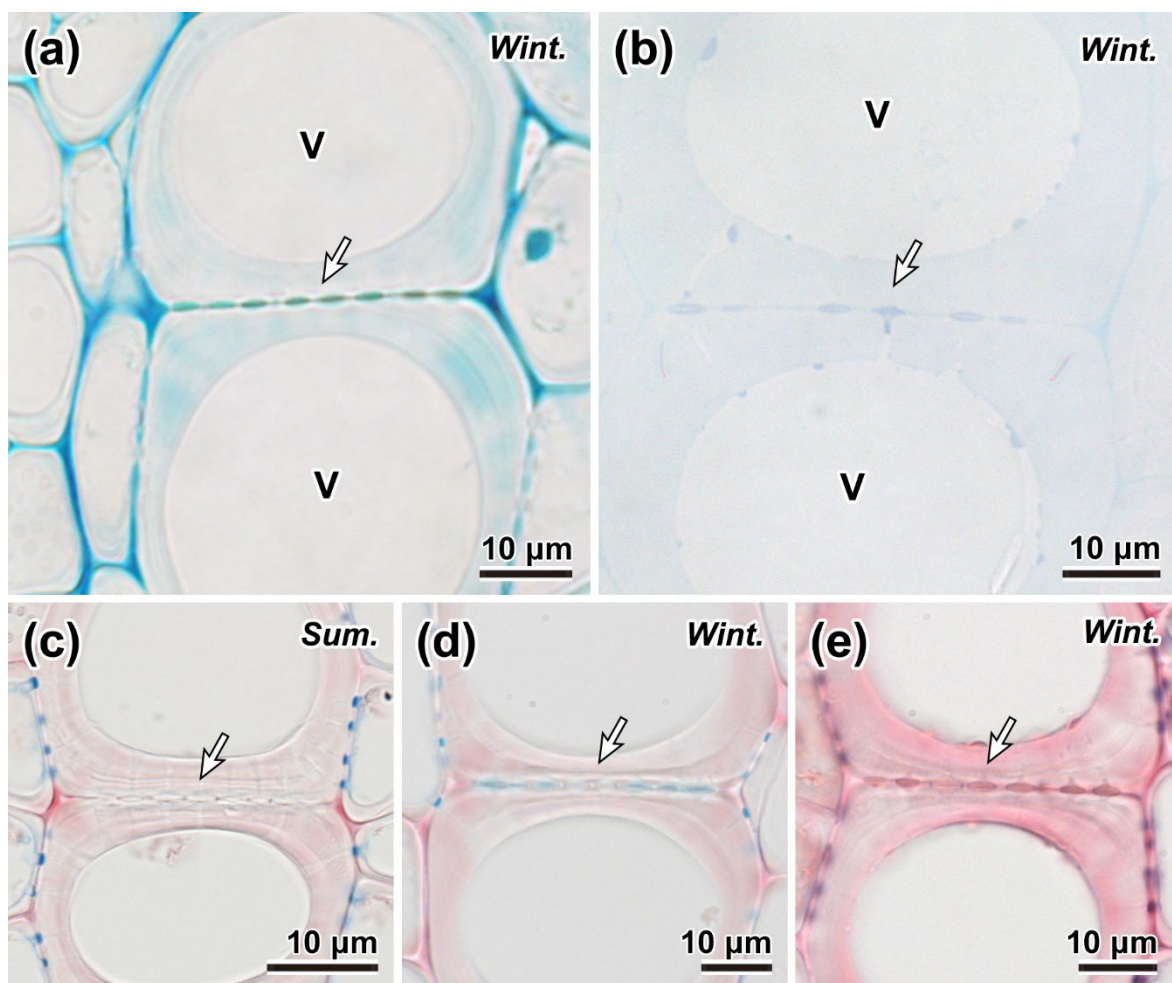


Fig. 3-8

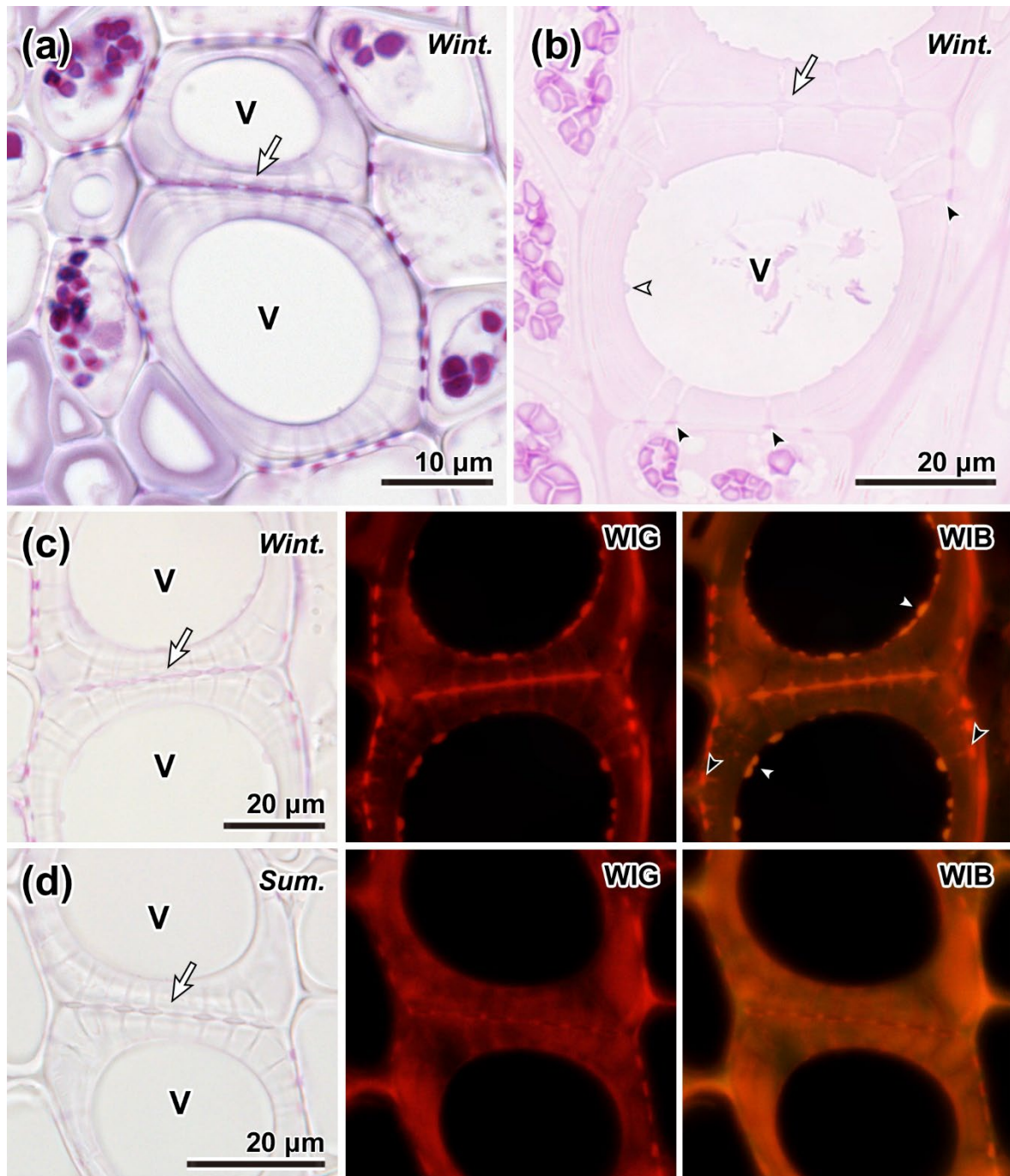


Fig 3-9

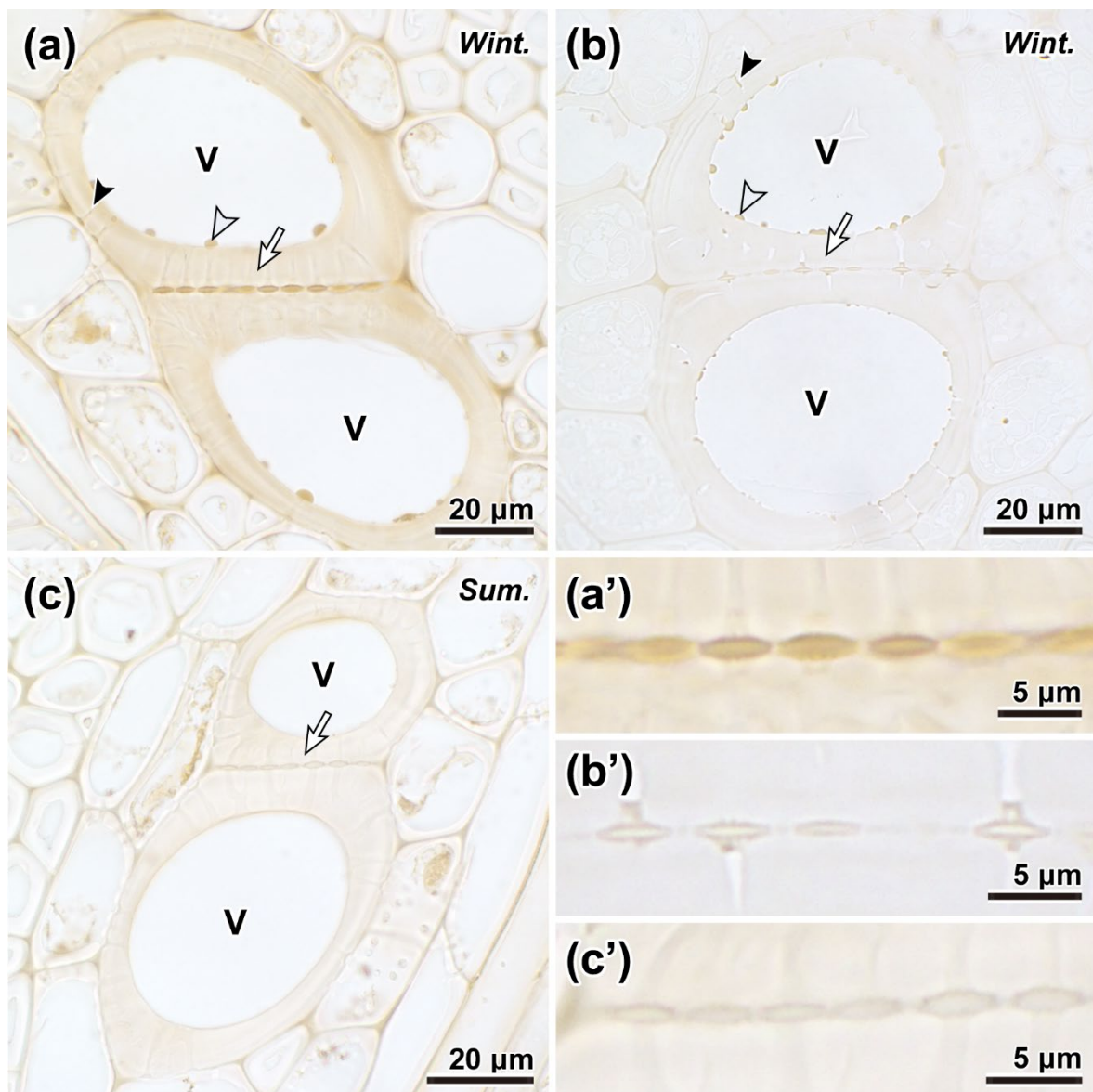


Fig. 3-10

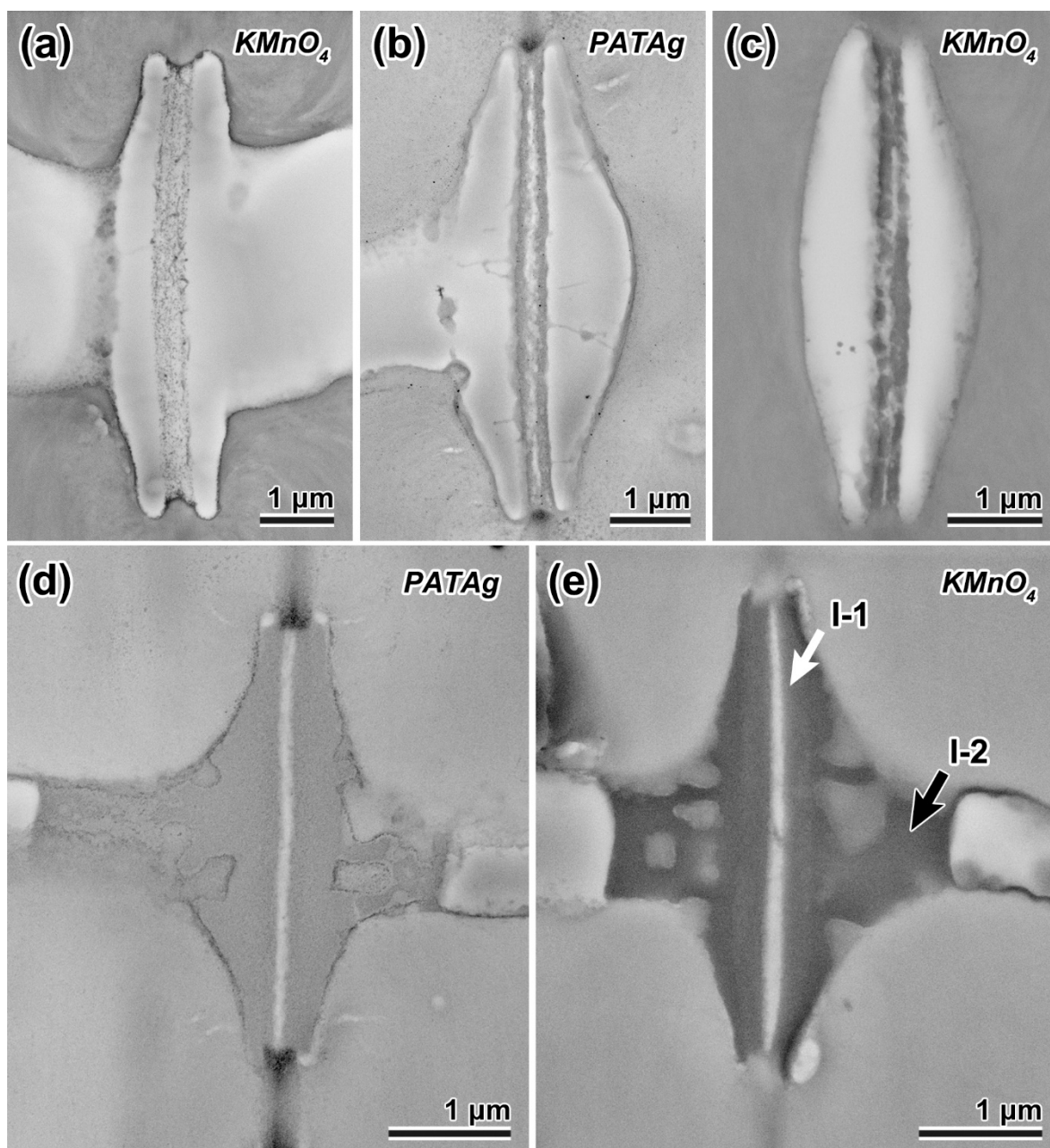


Fig. 3-11

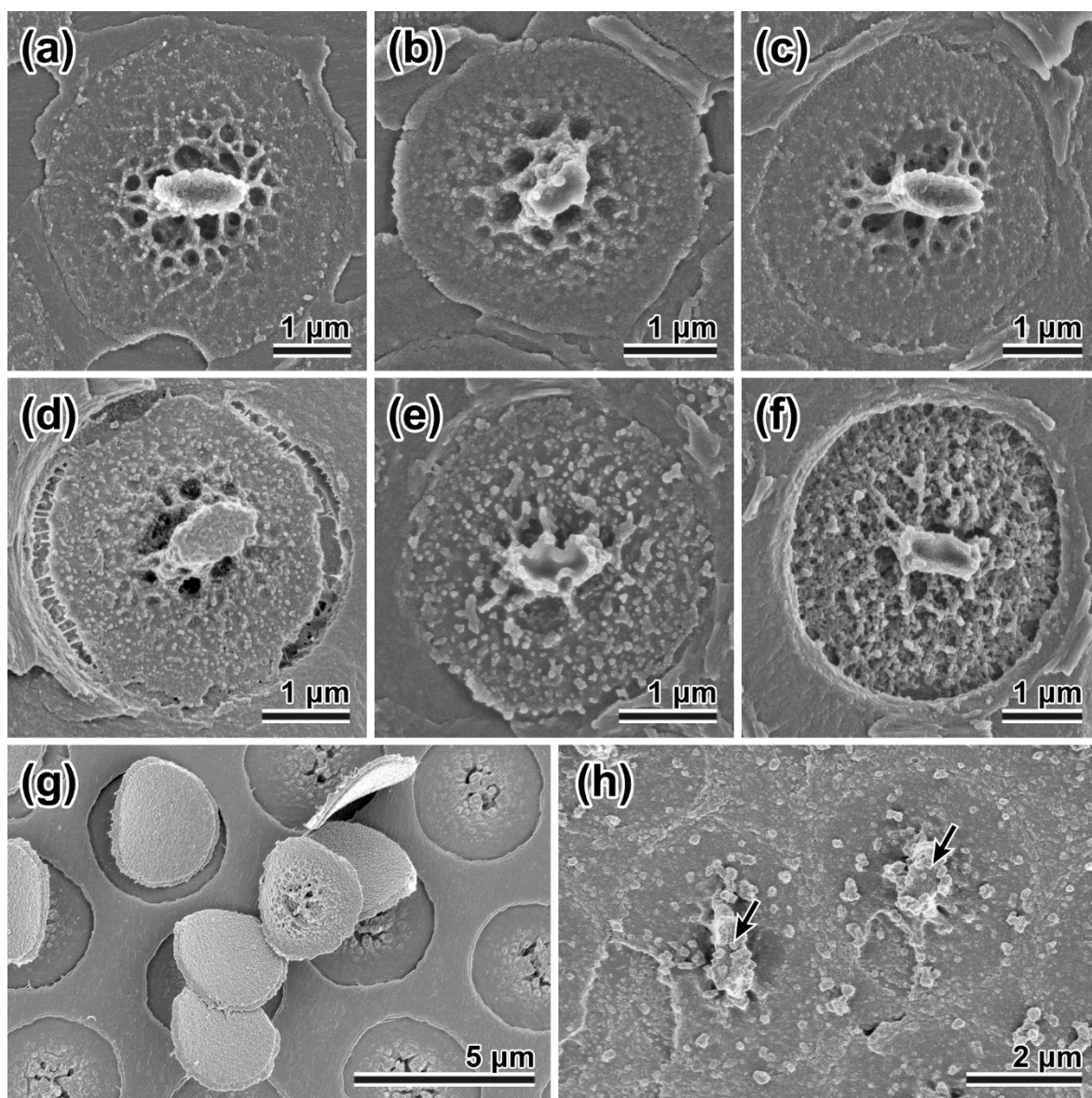


Fig. 3-12

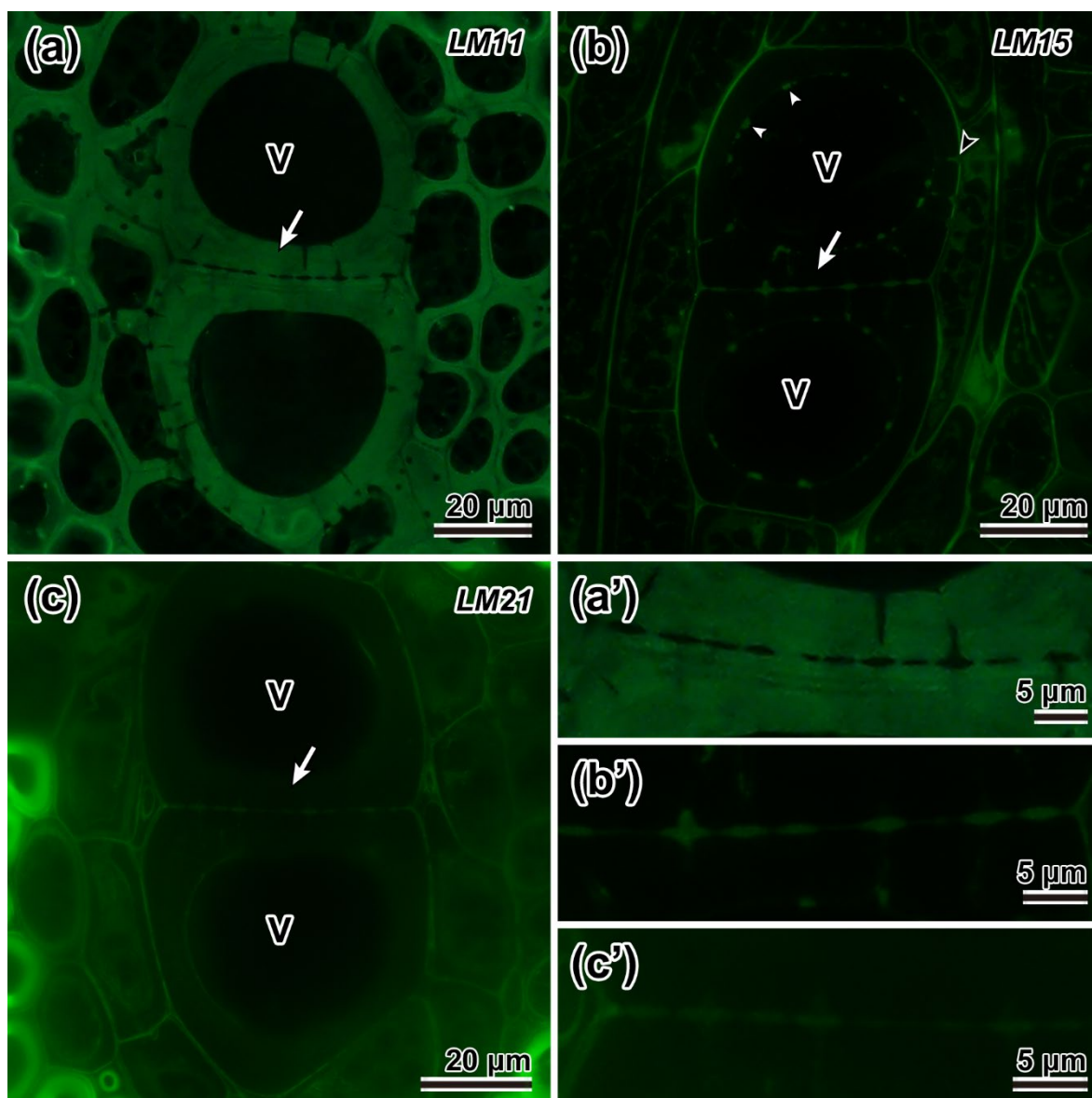


Fig. 3-13

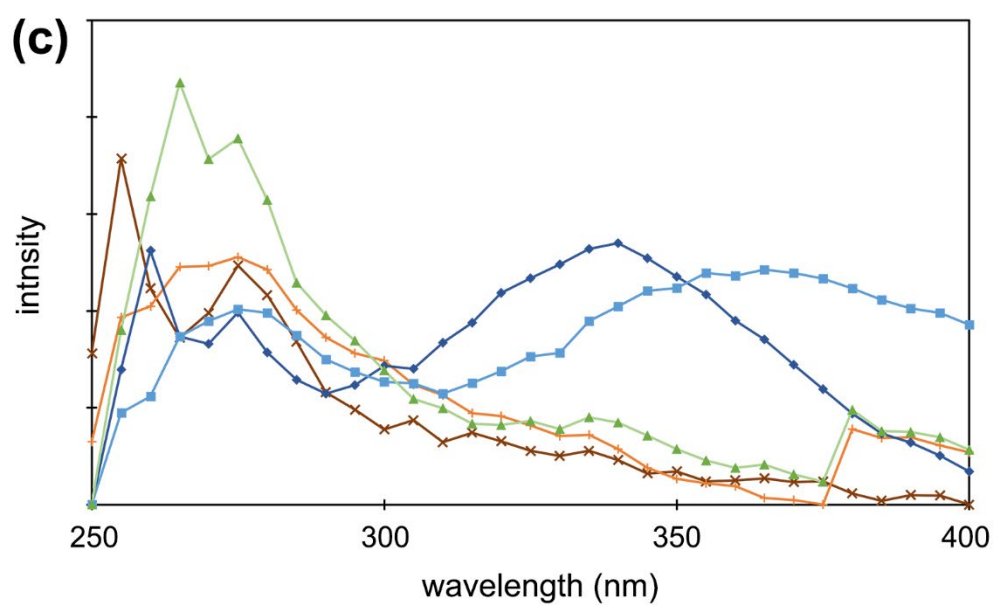
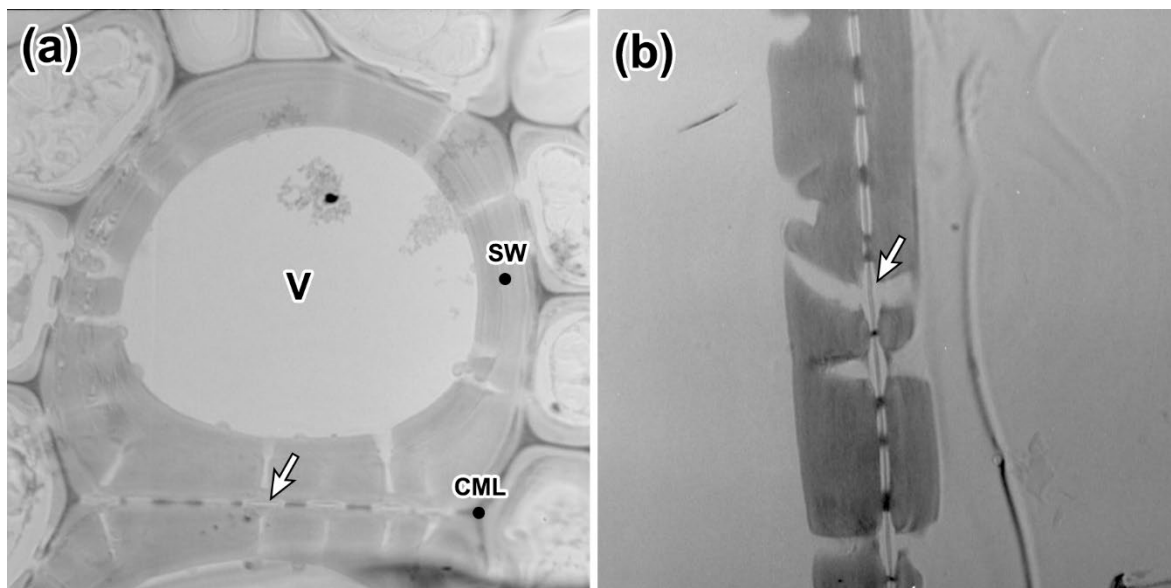


Fig.3-14

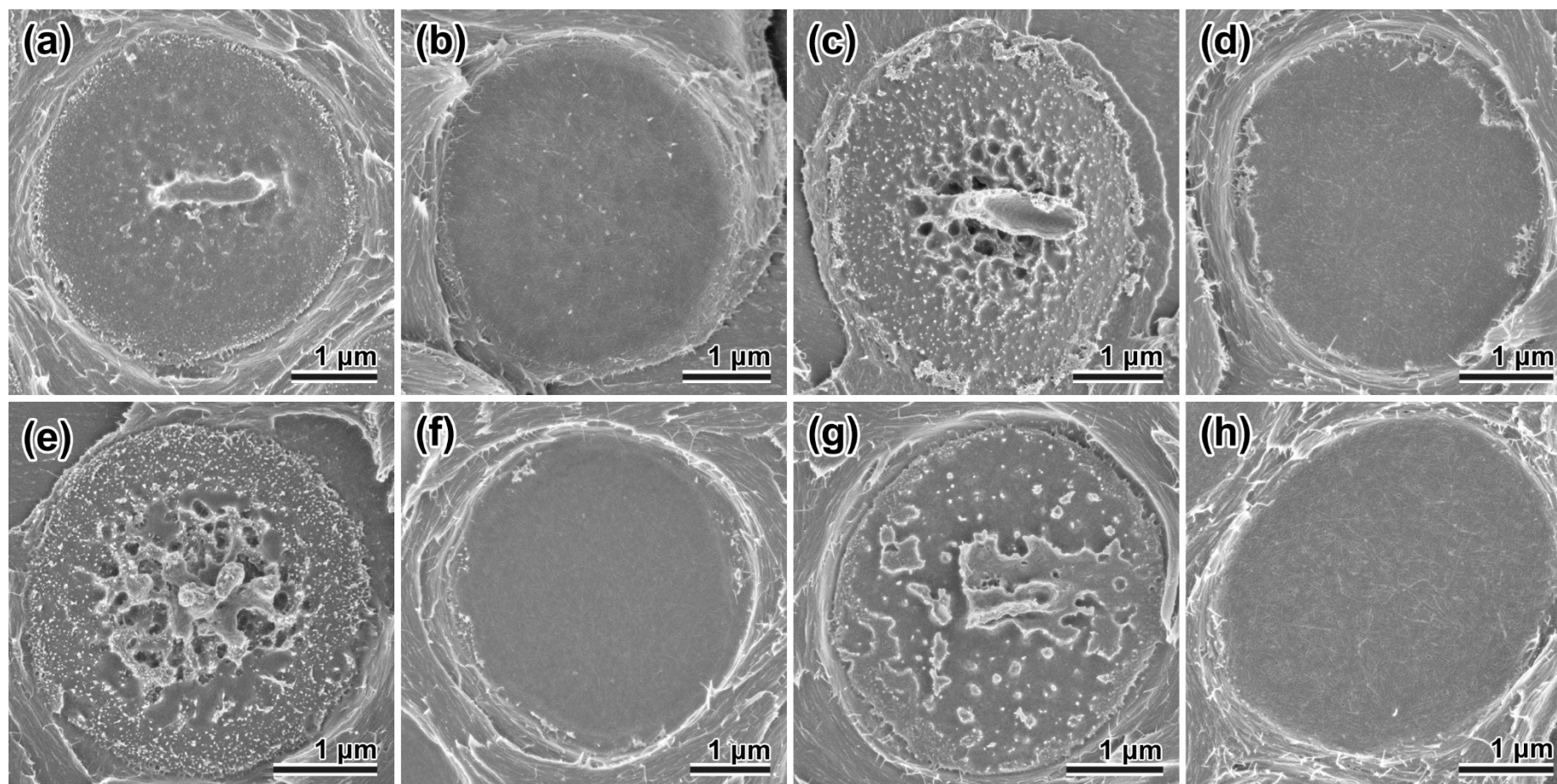
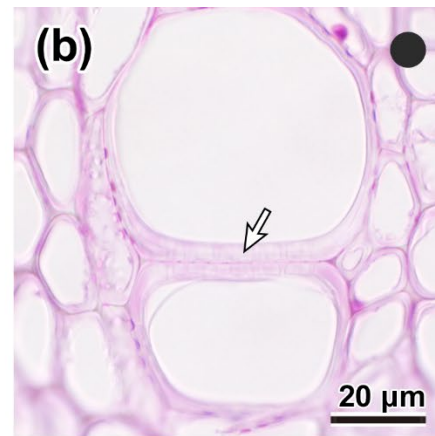
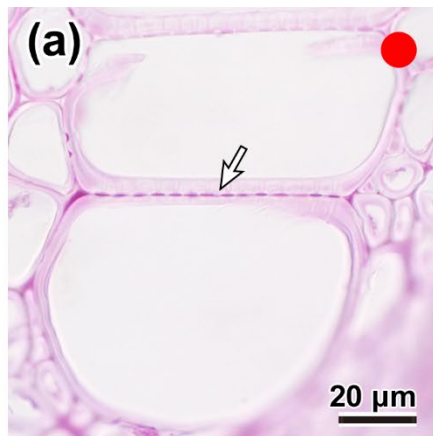
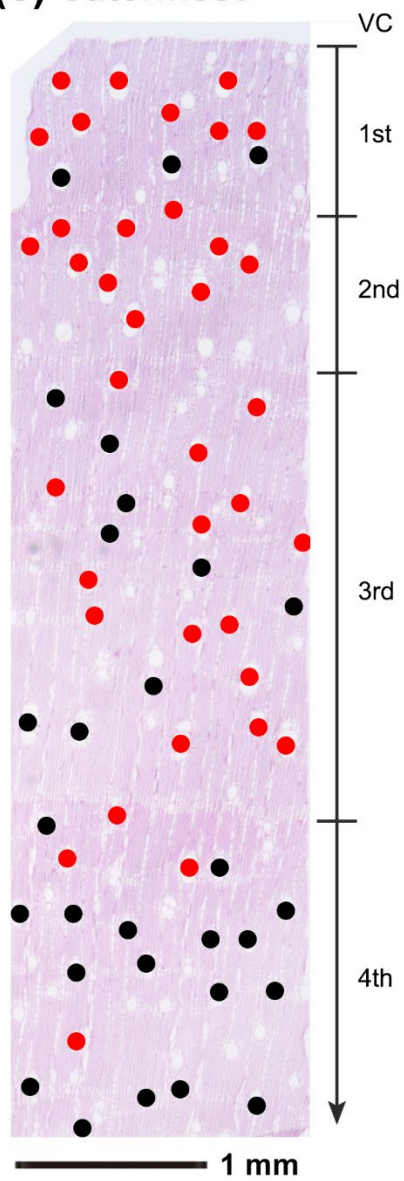


Fig. 3-15



(c) outermost



(d) inner

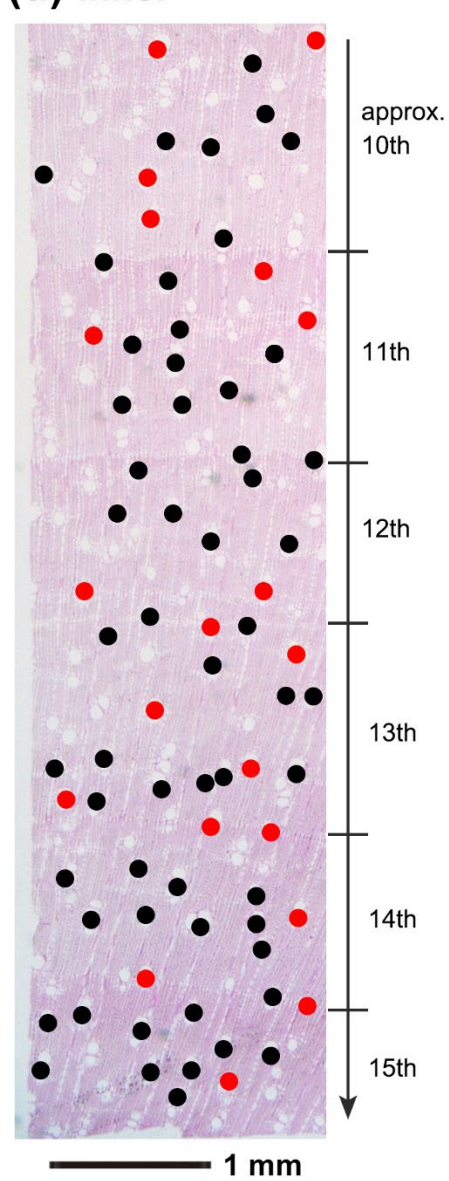


Fig. 3-16

Fig. 3-1 FE-SEM images of the typical structure of ash-type incrustations in the intervessel pits of *Fraxinus mandshurica*. The observation was performed for both the latewood (a, c-f) and the earlywood (b, g-j), and the author observed both the incrustated pit membranes (c-f) and the pit border walls facing to them (c'-f'). (a) Overview of the incrustated intervessel pit membrane in the latewood. (b) Overview of the incrustated intervessel pit membrane in the earlywood. (c-c') The most typical latewood incrustation with protruding central part. (d-d') The latewood incrusting material, of which central part is not protruding and the facing pit aperture is plugged. (e-e') The typical earlywood incrusting material. (f-f') The earlywood incrusting material with radially-oriented strings in the peripheral part.

Fig. 3-2 FE-SEM images of the cross-sectional view of ash-type incrustations on the intervessel pit membranes in *Fraxinus mandshurica*. (a) An intervessel pit without the incrustation in the latewood in September. (b) An incrustated intervessel pit in the earlywood on December. (c) An incrustated intervessel pit in the latewood on December, representing a layered structure composed of two layers, i.e. I-1 layer with amorphous appearance and I-2 layer with granulous appearance. (d) An enlarged image of the area designated by dotted square in 'b', showing the layered structure of the incrustation. White and black arrows indicate I-1 layers and I-2 layers of the incrustations, respectively. PM; pit membrane.

Fig. 3-3. Seasonal changes of the appearance of intervessel pit membranes, observed in the current-year xylem of *Fraxinus mandshurica* under FE-SEM. Upper images (a-d) show the pit membranes in the earlywood, and lower images (e-g) show those in the latewood.

Fig. 3-4. Seasonal changes of the appearance of intervessel pit membranes, observed in the latewood of *Fraxinus mandshurica* under FE-SEM. Upper images (a-c) show the pit membranes formed last year, and lower images (d-f) show the pit membranes formed two years before.

Fig. 3-5. FE-SEM images of the vessel-side of vessel-parenchyma pit membranes in *Fraxinus mandshurica*. (a, b) Overview of vessel side of vessel-parenchyma pit area (VP). The simple pit appearing behind the pit membranes (arrows) is an indication that this plane is vessel-side. VV, intervessel pit area; R, ray parenchyma cell. (c) A pit membrane with an ash-type incrustation observed in latewood. (d) A pit membrane coated by an ash-type incrustation observed in earlywood. (e) A pit membrane without an incrustation observed in latewood of summer sample.

Fig. 3-6. FE-SEM images of droplet-like deposits on inner surface of the vessel wall in the latewood of *Fraxinus mandshurica*, radial plane. (a) Overview of the inner surface of the vessel wall in a sample collected in December. Arrowhead, droplet-like deposits. (b) The enlarged image of 'a', showing the accumulation of deposits on perforation rim. (c) The perforation rim without deposits in a sample collected in September. The edge of compound middle lamella (CML) is exposing.

Fig. 3-7. Cryo-FE-SEM images of the incrustations on intervessel pit membranes in *Fraxinus mandshurica*. The samples were collected in December and kept frozen from the collections to the observations. (a) The incrustation in the earlywood. (b) The incrustations in the latewood. PM, pit membrane covered by the incrustation; PB, pit border (pit chamber side). Arrow, plugged pit aperture.

Fig. 3-8. Light micrographs of intervessel pits in the latewood of *Fraxinus mandshurica* stained with toluidine blue O and safranin / alcian blue, transverse sections. (a) Thin section of winter sample cut from non-embedded specimen, stained with toluidine blue O. (b) Semi-thin section of winter sample cut from embedded specimen, stained with toluidine blue O. (c) Thin section of summer sample, stained with safranin / alcian blue. (d) Thin section of winter sample, stained with safranin / alcian blue. The chamber of intervessel pits slightly stained in blue. (e) Thin section of winter sample, stained with safranin / alcian blue. The chamber of intervessel pits stained in red. V, vessel lumen; white arrows, intervessel walls with intervessel pits.

Fig. 3-9. Light micrographs and fluorescent micrographs of intervessel pits in the latewood of *Fraxinus mandshurica* stained with PAS, transverse sections. (a) Thin section of winter sample cut from non-embedded specimen. (b) Semi-thin section of

winter sample cut from embedded specimen. (c) Thin section of winter sample. Left to right: images of visible transmitted light, fluorescence with WIG, fluorescence with WIB. (d) Thin section of summer sample. Left to right: images of visible transmitted light, fluorescence with WIG, fluorescence with WIB. V, vessel lumen; white arrows, intervessel walls with intervessel pits; black arrowheads, the vessel-parenchyma pit; white arrowheads, droplet-like deposits.

Fig. 3-10. Light micrographs of intervessel pits in the latewood of *Fraxinus mandshurica* stained with KMnO_4 , transverse sections. (a) Thin section of winter sample cut from non-embedded specimen. (b) Semi-thin section of winter sample cut from embedded specimen. (c) Thin section of summer sample. (a', b', c') Enlarged image of intervessel pits in a, b, c, respectively. V, vessel lumen; white arrows, intervessel walls with intervessel pits; black arrowheads, vessel-parenchyma pit of which pit chambers are stained; white arrowheads, droplet-like deposits.

Fig. 3-11. FE-SEM backscattered electron images of intervessel pits in *Fraxinus mandshurica*, transverse semi-thin sections. (a) The earlywood of summer sample, stained with KMnO_4 . (b) The earlywood of winter sample, stained with PATAg. (c) The earlywood of winter sample, stained with KMnO_4 . (d) The latewood of winter sample, stained with PATAg. (e) The latewood of winter sample, stained with KMnO_4 .

Fig. 3-12. FE-SEM images of incrusted intervessel pit membrane in latewood of *Fraxinus mandshurica* treated with polysaccharide hydrolases. (a) Treated with the control buffer (100 mM acetate buffer, pH 5.0). (b) Treated with xylanase. (c) Treated with fructanase, (d) Treated with pectin-lyase. (e) Treated with α -amylase. (f) Treated with cellulase. (g) Treated with pectin-lyase, showing detached pit membranes. (h) Treated with xyloglucanase. Black arrows, central protruding of the incrustation.

Fig. 3-13. Fluorescent micrographs of intervessel pits in *Fraxinus mandshurica* labelled with monoclonal antibodies, transverse sections. (a) Labelled with anti-xylan LM11. (b) Labelled with anti-xyloglucan LM15. (c) Labelled with anti-heteromannan LM21. (a', b', c') Enlarged image of intervessel pits in a, b, and c, respectively. V, vessel lumen; white arrows, intervessel walls with intervessel pits; black arrowheads, the vessel-

parenchyma pit chambers with fluorescence; white arrowheads, droplet-like deposits with fluorescence.

Fig. 3-14. Ultraviolet (UV) micrographs of intervessel pits and UV absorption spectra of various portions of vessels and around them in *Fraxinus mandshurica*. (a) An UV micrograph in the latewood vessel, transverse section. (b) An UV micrograph in earlywood vessel, radial section. (c) UV absorption spectra measured at the secondary wall (+, cf. SW in image a), the compound middle lamella (+, cf. CML in image a), and the intervessel pit incrustations in latewood (■, ◆, △). V, vessel lumen; white arrow, intervessel pit.

Fig. 3-15. FE-SEM images of intervessel pit membrane in *Fraxinus* species, in winter (January; a, c, e, g) and summer (August or September; b, d, f, h). (a, b) *F. platipoda*, latewood. (c, d) *F. sieboldiana*, latewood. (e, f) *F. chinensis* subsp. *rhynchophylla*, latewood. (g, h) *F. griffithii*.

Fig. 3-16. Light micrographs of *Fraxinus griffithii* collected in January, transverse section stained with PAS, showing the intra-individual differences in the frequency of intervessel pit with the incrustations. (a) An example of the intervessel pits with incrustations. (b) An example of the intervessel pits without incrustations. Arrows, intervessel walls with intervessel pits. (c) Section including 1st to 4th growth rings from vascular cambium (VC). (d) Section approximately 10th to 14th growth rings from VC. Presence or absence of the intervessel pit incrustations in each vessel multiple is representing by red or black circles, respectively.

第 4 章 結論

4.1 本研究の成果

本研究では、様々な広葉樹の辺材部において、電子顕微鏡的に観察されていた道管相互間の壁孔壁の被覆物の実態を明らかにするために研究をおこなった。本研究では、既報のある 2 種類の被覆物を対象に、それを有する樹種や成分、堆積過程などに関する知見を収集した。

2 章では、「シナノキ型被覆物」と称した有機溶媒に可溶な被覆物について解析をおこなった。シナノキ型被覆物は、既にシラカンバ (Sano 2004) やオノエヤナギ (Sano 2005)、シナノキ (鵜野 2014) などで報告があった。本研究では、新たに 26 樹種の広葉樹でその存否を調べ、既報と合わせた 40 樹種のうち 11 樹種にシナノキ型被覆物が観察されることを明らかにした。これらの樹種は様々な分類群に属しており、特定の系統がシナノキ型被覆物を堆積させるわけではないことが分かった。一方、これらの樹種は、木部の柔細胞に脂質を貯蔵する *fat trees* (Sinnott 1918) と呼ばれる樹种群とよく一致することが分かった。これに対応するように、シナノキ型被覆物の主成分が脂質であることが、TOF-SIMS 等を用いた解析によって推定された。また、採取後すぐに液体窒素で凍結させた試料を凍結したまま分析する各種の凍結技法 (Cryo-FE-SEM、Cryo-TOF-SIMS) を用いることで、シナノキ型被覆物は生材では存在しないものであることを明らかにした。これらを総合的に判断することで、本研究では、シナノキ型被覆物が、特定の樹種において豊富に貯蔵されている柔細胞の脂質が電子顕微鏡観察のための常温下での試料作製の過程で拡散し、道管相互壁間の壁孔壁を覆ったアーティファクトであることを示した。試料の乾燥が必須である電子顕微鏡においては、試料に様々なアーティファクトが発生している可能性があり、被覆物に関する研究においても、その可能性に十分留意する必要があることが明らかになった。

3章では、「トネリコ型被覆物」と称した季節に応じて消長がみられる被覆物について解析をおこなった。トネリコ型被覆物は、ホワイトアッシュとヤチダモの2種のトネリコ属で確認されていたが、本研究では節レベルでの系統や木部組織の構造が異なる他4種のトネリコ属（シオジ、マルバアオダモ、チョウセントネリコ、シマトネリコ）においてもこれが堆積することを確認した。このことから、トネリコ型被覆物が少なくともトネリコ属においては共通して存在するものであることが強く証拠づけられたといえる。2章の成果から、被覆物がアーティファクトである可能性もあることが示されたが、凍結技法によって、トネリコ型被覆物については立木中にも存在するものであることが示された。トネリコ型被覆物の成分については、組織染色、免疫標識、紫外顕微分光分析といった組織化学的な分析法を駆使することで、キシログルカンやヘテロマンナンを含む多糖類と、フラボノイドやクマリン類のようなフェノール類の混合物であることを示した。この成分分析の副産物として、トネリコ型被覆物の存否やある程度の構造を光学顕微鏡レベルで検出する手段が確立された。また、既報で示されていた季節変化に関する知見を再現しながら、被覆物の構造や、堆積・消失の開始タイミングあるいは進行速度が、孔圏・孔圏外や年輪ごとに異なることを明らかにした。これらの得られた知見をまとめることで、トネリコ型被覆物の生理学的な機能特性や堆積・消失過程に関して、進化発生学的な観点やゴム質との関連を軸にしながら、考察を深めることができたと考えられる。

4.2 本研究の応用について

4.2.1 様々な被覆物の成分特定

これまで多くの顕微鏡的手法によって、道管相互間の壁孔壁に堆積する被覆物が数多く見出されており、本研究が対象としたシナノキ型被覆物とトネリコ型被覆物はその一部に過ぎない。これらの種々の被覆物がどのような化学成分を含むものであるのかは、基本的に明らかにされていない。被覆物の成分を明らかにすることができれば、その被覆物の性質や機能特性、由来、合成過程や堆積過程まで予測することができる。したがって、被覆物の成分特定は、被覆物研究における重要な第一歩と考えられる。

本研究では、2種類の被覆物の化学成分を、様々な組織化学的な手法を駆使することで明らかにすることができた。2章のシナノキ型被覆物は、その成分が脂質であることが明らかとなったが、その特定には、組織染色が有効ではなく（鵜野 2014）、抽出物の成分分析と TOF-SIMS によるアプローチが大きく貢献した。一方、3章のトネリコ型被覆物は、組織染色によってその成分に多糖類とフェノール類が含まれることが明らかとなり、そこに免疫標識や紫外顕微分光分析といったより特異性の高い手法を用いることでさらに詳細な被覆物の成分を示すことができた。本研究が取り組んだこの2つの事例が象徴するように、被覆物の成分はその種類によって大きく異なっており、それを明らかにできる分析手法も大きく異なる。すなわち、被覆物の成分特定には、対象ごとに地道に方法を検討して進めていかなければならないものであり、本研究で用いた手法が、他の被覆物の成分を調べる際に必ずしも有効であるとは限らない。しかし、そうであるとしても、本研究を1つのモデルケースとして、その過程で得られたいくつかの知見や示唆が、今後の被覆物の成分特定の際に用いるアプローチ選択の参考になると考えられる。

第一に、その構造観察に電子顕微鏡による高い分解能を要する被覆物であっても、その成分検出は、適切に対照実験を設定した光学顕微鏡レベルのアプローチで十分達成できるということである。とりわけ本研究の3章では、トネリコ型被覆物の形態まで光学顕微鏡で識別できる場合があることを明らかにした。このとき、樹脂包埋や蛍光観察などの方法を交えると、より明確に被覆物の成分を検出できた。このように光学顕微鏡レベルでの検出法を応用できることは、広い観察範囲から被覆物の存否を解析できるという点でも有効である。実際に、第3章では、シマトネリコにおけるトネリコ型被覆物の個体内での分布の偏りを、光学顕微鏡レベルの検出手法で明らかにすることができた。

第二に、被覆物が必ずしも生材状態で存在しているわけではないという知見はより重要である。本研究の2章で解析したシナノキ型被覆物は、最終的に生材状態では存在しないものであるという結論に至った。このことは、鵜野（2014）が生材から得た切片の組織染色によって同被覆物の成分に関する情報を得られなかった最大の原因といえるだろう。今後の被覆物に関する研究においては、その被覆物が生材状態で存在するかどうかを、あらかじめ凍結技法によって確かめることが求められる。

4.2.2 樹種特性の理解と一般事象への発展

本研究では、2種類の被覆物の構造や成分、堆積過程などに関する知見を得ることに成功し、それをもとに、これらの被覆物の性質や機能特性に関する考察を深めることができたと考えられる。本研究においては、このような機能特性の実証には至っていないが、被覆物研究をより応用性の高い知見に昇華するために、今後、精力的に取り組まなければならない部分であることは間違いない。このような被覆物の機能特性を明らかにすることができれば、それぞれの被覆物を有する樹種における、既知あるいは未知の水分生理特性や水分通導特性などの理解に大きく貢献すると考えられる。

最後に、本論文では、本研究で扱った各被覆物が、植物一般に共通する事象が過剰に発現したものである可能性があることも提示しておきたい。シナノキ型被覆物は脂質貯蔵性の樹種 (fat trees) で明らかに確認されるものであるが、脂質自体はあらゆる植物に存在し、柔細胞内に少なからず貯蔵されている物質である (Kramer & Kozolowski 1980)。したがって、シナノキ型被覆物として観察される乾燥材における脂質の拡散現象や、そこから予想されるシナノキ型被覆物の機能特性は、あらゆる樹種の本部組織で少なからず生じていることかもしれない。またトネリコ型被覆物については、トネリコ属に共通して見られることが本研究で確かめられたが、その成分であるキシログルカンやヘテロマンナンは、他の樹種の道管相互間の壁孔壁においても検出されている例がある (Kim et al. 2013, 2016)。季節変化や外的なストレスに応じて道管に多糖類やフェノール類が分泌され、それが道管相互間の壁孔壁に堆積・消失するような現象が、多くの樹種で起こっている可能性は十分に想定される。もしこれが正しければ、近年報告の見られる、道管相互間の壁孔壁におけるイオン効果の季節変化 (Nardinii et al. 2016) を説明するような知見になるかもしれない (1.4 節を参照)。被覆物の個別事象のそれぞれを地道に分析し、その成分や機能特性、根底となる堆積メカニズムに関する知見を収集していくことで、広葉樹で一般に見られるような未解明の現象の実態を明らかにするブレークスルーになっていく可能性があると考えられる。

謝辞

本研究を遂行し、本論文をまとめるまでに、多くの方々にご支援いただきました。

主査である指導教官の北海道大学大学院農学研究院 佐野雄三教授には、6年間にわたって多大なるご支援をいただくとともに、顕微鏡技法だけでなく、文章の書き方から研究者としての姿勢に至るまで、数多くのご指導を賜りましたこと、深く感謝の意を表します。副査を引き受けてくださった北海道大学大学院農学研究院の玉井裕教授と荒川圭太准教授には、論文への的確なご助言をいただきましたことに厚く御礼申し上げます。荒川准教授にはさらに、試料提供をいただくとともに、本研究の分析に関して多くのご助言とご支援を賜り、また日頃より温かな激励をいただきましたことに、重ねて感謝申し上げます。

名古屋大学大学院生命農学研究科の福島和彦教授と青木弾講師には、TOF-SIMS を利用した共同研究をご快諾いただくとともに、データの解釈や作図方法などに関して丁寧なご指導をいただきましたこと、厚く御礼申し上げます。北海道大学大学院農学研究院の重富顕吾講師、山岸祐介助教には、それぞれ化学分析と蛍光顕微鏡法について細やかな実験指導をしていただき、また的確なご助言をいただきましたことに、厚く御礼申し上げます。北海道大学大学院農学研究院の技術職員である伊藤利章氏、安井雅範博士には、電子顕微鏡観察に際して手厚いサポートを賜りましたこと、厚く御礼申し上げます。また本研究で使用了試料を提供いただきました北海道大学研究林、北海道大学植物園に厚く御礼申し上げます。

国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所、組織材質研究室の安部久博士、黒田克史博士、山下香菜博士、香川聡博士、児嶋美穂博士、大橋伸太博士、平野優博士、鈴木春香博士、山根健一氏、遠藤双葉氏、高橋佳苗氏、安藤梢氏には、日頃より温かなお

心遣いをいただき、また研究に関する数々のご支援やご助言を賜りましたこと、心より感謝申し上げます。とくに安部博士には、森林総合研究所入所後の生活・研究における多方面のサポートを賜りましたこと、黒田博士と山根氏には、電子顕微鏡観察に関する助言と機器操作のご指導をいただきましたこと、児嶋博士には免疫染色法に関するご指導をいただきましたこと、高橋氏にはシマトネリコの試料を提供いただきましたこと、重ねて御礼申し上げます。

北海道大学樹木生物学研究室で共に過ごした博士研究員の皆様、また先輩方や後輩の皆様とは、いつも楽しい時間を過ごさせていただき、また時に実験のサポートを快く買っ出てくださったこと、心より感謝申し上げます。とくに渡邊陽子博士には、日頃から温かな言葉をかけていただき、ゼミなどでのご助言をいただきましたこと、梅林利弘博士には、樹木の通水性に関する基礎をご指導いただきましたこと、また斎藤拓哉氏には、共に実験に骨を折ってくださったこと、厚く御礼申し上げます。また研究室担当の事務員である北海道大学農学部事務局第六分室の佐藤優実氏、磯田理絵氏には、研究の遂行に関わる事務手続きを手厚くサポートしてくださいましたこと、厚く御礼申し上げます。

最後に、これまでの研究生活を陰ながら支えてくれ、博士後期課程への進学を後押ししてくれた両親・家族に深く感謝の意を表します。

引用文献

- Aasamaa K, Sober A. 2010.** Sensitivity of stem and petiole hydraulic conductance of deciduous trees to xylem sap ionic concentration. *Biologia Plantarum* **54**: 299–307.
- Améglio T, Bodet C, Lacointe A, Cochard H. 2002.** Winter embolism, mechanisms of xylem hydraulic conductivity recovery and springtime growth patterns in walnut and peach trees. *Tree Physiology* **22**: 1211–1220.
- Améglio T, Decourteix M, Alves G, Valentin V, Sakr S, Julien J-L, et al. 2004.** Temperature effects on xylem sap osmolarity in walnut trees: evidence for a vitalistic model of winter embolism repair. *Tree Physiology* **24**: 785–793.
- Angeles G, Owens SA, Ewers FW. 2004.** Fluorescence shell: a novel view of sclereid morphology with the Confocal Laser Scanning Microscope. *Microscopy Research and Technique* **63**: 282–288.
- 青木弾, 松下泰幸, 福島和彦. 2016.** Cryo-TOF-SIMSによる植物試料のケミカルイメージング. *表面化学* **37**: 599–603.
- APG. 2016.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 1–20.
- Bailey IW. 1913.** The preservative treatment of wood. II. The structure of the pit membranes in the tracheids of conifers and their relation to the penetration of gases, liquids, and finely divided solids into green and seasoned wood. *Forest Quarterly* **11**: 12–20.
- Bailey IW. 1916.** The structure of the bordered pits of conifers and its bearing upon the tension hypothesis of the ascent of sap in plants. *Botanical Gazette* **62**: 133–142.

- Bailey IW. 1933.** The cambium and its derivative tissues No. VIII. Structure, distribution, and diagnostic significance of vestured pits in dicotyledons. *Journal of Arnold Arboretum* **4**: 259–273.
- Bailey IW. 1944.** The development of vessels in angiosperms and its significance in morphological research. *American Journal of Botany* **31**: 421–428.
- Bailey IW, Tupper WW. 1918.** Size variation in tracheary cells: I. A comparison between the secondary xylems of vascular cryptogams, gymnosperms, and angiosperms. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* **54**: 149–204.
- Bauch J, Brendt H. 1973.** Variability of the chemical composition of pit membranes in bordered pits of gymnosperms. *Wood Science and Technology* **7**: 6–19.
- Black-Schaefer CL, Beckmann RL. 1989.** Foliar flavonoids and the determination of ploidy and gender in *Fraxinus americana* and *F. pennsylvanica* (Oleaceae). *Castanea* **54**: 115–118.
- Bland DE, Foster RC, Logan AF. 1971.** The mechanism of permanganate and osmium tetroxide fixation and the distribution of lignin in the cell wall of *Pinus radiata*. *Holzforschung* **25**: 137–143.
- Bonner LD, Thomas RJ. 1972.** The ultrastructure of intercellular passageways in vessels of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera* L.). Part I: vessel pitting. *Wood Science and Technology* **6**: 196–203.
- Bonsen KJ. 1991.** Gefäßverschluss-mechanismen in laubbäumen. vierteljahrsschrift der naturforschenden *Gesellschaft in Zürich* **136**: 13–50.
- Bonsen KJ, Kučera LJ. 1990.** Vessel occlusions in plants: Morphological, functional and evolutionary aspects. *IAWA Journal* **11**: 393–399.

- Boura A, De Franceschi D. 2007.** Is porous wood structure exclusive of deciduous trees? *Comptes Rendus Palevol* **6**: 385–391.
- Braun HJ. 1967.** Development and structure of wood rays in view of contact-isolation-differentiation to hydrosystem. *Holzforschung* **21**: 33–37.
- Carlquist S. 1988.** *Comparative wood anatomy*. Springer-Verlag. Berlin, Germany.
- Catesson AM. 1983.** A cytochemical investigation of the lateral walls of *Dianthus* vessels. Differentiation and pit membrane formation. *IAWA Bulletin* **4**: 89–101.
- Catesson AM, Czaninski Y, Moreau M, Peresse M. 1979.** Conséquences d'une infection vasculaire sur la maturation des vaisseaux. *Revue de Mycologie* **43**: 239–243.
- Chattaway MM. 1949.** The development of tyloses and secretion of gum in heartwood formation. *Australian Journal of Biological Science* **2**: 227–240.
- Choat B, Ball M, Luly J, Holtum J. 2003.** Pit membrane porosity and water stress-induced cavitation in four co-existing dry rainforest tree species. *Plant Physiology* **131**: 41–48.
- Choat B, Brodie TW, Cobb AR, Zwieniecki MA, Holbrook NM. 2006.** Direct measurements of intervessel pit membrane hydraulic resistance in two angiosperm tree species. *American Journal of Botany* **93**: 993–1000.
- Choat B, Cobb AR, Jansen S. 2008.** Structure and function of bordered pits: New discoveries and impacts on whole-plant hydraulic function. *New Phytologist* **177**: 608–626.
- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Bucci SJ, Feild TS, Gleason SM, Hacke UG, et al. 2012.** Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* **491**: 752–755.

- Choat B, Jansen S, Zwieniecki MA, Smets E, Holbrook NM. 2004.** Changes in pit membrane porosity due to deflection and stretching: The role of vested pits. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1569–1575.
- Christman MA, Sperry JS, Adler FR. 2009.** Testing the ‘rare pit’ hypothesis for xylem cavitation resistance in three species of *Acer*. *New Phytologist* **182**: 664–674.
- Christman MA, Sperry JS, Smith DD. 2012.** Rare pits, large vessels and extreme vulnerability to cavitation in a ring-porous tree species. *New Phytologist* **193**: 713–720.
- Clermont LP. 1961.** The fatty acid of aspen poplar, basswood, yellow birch and white birch. *Pulp and Paper Magazine of Canada*: T511–T514.
- Cochard H, Herbette S, Hernández E, Hölttä T, Menuccini M. 2010.** The effects of sap ionic composition on xylem vulnerability to cavitation. *Journal of Experimental Botany* **61**: 275–285.
- Cochard H, Tyree MT. 1990.** Xylem dysfunction in *Quercus*: vessel size, tyloses, cavitation and seasonal changes in embolism. *Tree Physiology* **6**: 393–407.
- Côte WA. 1958.** Electron microscope studies of pit membrane structure, implications in seasoning and preservation of wood. *Forest Products Journal* **8**: 296–301.
- Crombie D, Milburn J, Hipkins M. 1985.** Maximum sustainable xylem sap tensions in *Rhododendron* and other species. *Planta* **163**: 27–33.
- Czaninski Y. 1977.** Vessel-associated cells. *IAWA Bullentin* **1977/3**: 51–55.
- Czaninski Y. 1979.** Cytochimie ultrastructurel des parois du xylème secondaire. *Biologie Cellulaire* **35**: 97–102.

- Dixon HH, Joly J. 1894.** On the ascent of sap. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **186**: 563–576.
- De Micco V, Balzano A, Wheeler EA, Baas P. 2016.** Tylose and gums: a review of structure, function and occurrence of vessel occlusions. *IAWA Journal* **37**: 186–205.
- Donaldson LA. 1992.** Lignin distribution during latewood formation in *Pinus radiata* D. Don. *IAWA Journal* **13**: 381–387.
- Dute RR. 2015.** Development, structure, and function of torus-margo pits in conifers, Ginkgo and dicots. In: Hacke UG (ed.), *Functional and ecological xylem anatomy* Springer, Cham, Switzerland: 77–102.
- van Doorn WG, Hiemstra T, Fanourakis D. 2011.** Hydrogel regulation of xylem water flow: an alternative hypothesis. *Plant Physiology* **157**: 1642–1649.
- Ellmore GS, Ewers FW. 1986.** Fluid flow in the outermost xylem increment of a ring-porous tree, *Ulmus americana*. *American Journal of Botany*: 1771–1774.
- Fitzgerald CH, Reines M. A 1969.** Comparative study of the flavonoid content of *Fraxinus americana* and *Fraxinus pennsylvanica*. *Castanea* **34**: 192–194.
- 藤田稔, 小路嘉明, 原田浩. 1977.** ネムノキとヤマザクラの道管のゴム状物質による閉そく. *京都大学農学部演習林報告* **49**: 116–121.
- Gagnon C. 1967.** Histochemical studies on the alteration of lignin and pectic substances in white elm infected by *Ceratocystis ulmi*. *Canadian Journal of Botany* **45**: 1619–1623.
- Gascó A, Salleo S, Gortan E, Nardini A. 2007.** Seasonal changes in the ion-mediated increase of xylem hydraulic conductivity in stems of three evergreens: any functional role? *Physiologia Plantarum* **129**: 597–606.

- Gortan E, Nardini A, Salleo S, Jansen S. 2011.** Pit membrane chemistry influences the magnitude of ion-mediated enhancement of xylem hydraulic conductivity in four Lauraceae. *Tree Physiology* **31**: 48–58.
- Greenaway W, English S, Wollenweber E, Whatley FR. 1989.** Series of novel flavanones identified by gas chromatography-mass spectrometry in bud exudate of *Populus fremontii* and *Populus maximowiczii*. *Journal of Chromatography A* **481**: 352–357.
- Hacke UG, Sauter JJ. 1996.** Xylem dysfunction during winter and recovery of hydraulic conductivity in diffuse-porous and ring-porous trees. *Oecologia* **105**: 435–439.
- Hacke UG, Sperry JS, Pittermann J. 2004.** Analysis of circular bordered pit function II. Gymnosperm tracheids with torus-margo pit membranes. *American Journal of Botany* **91**: 386–400.
- Hacke UG, Stiller V, Sperry JS, Pittermann J, McCulloh KA. 2001.** Cavitation fatigue. Embolism and refilling cycles can weaken the cavitation resistance of xylem. *Plant Physiology* **125**: 779–786.
- 原田浩, 宮崎幸男, 若島妙子. 1957.** 木材の細胞膜構造の電子顕微鏡的研究. *林業試験場研究報告* **104**: 3–115.
- Harra H, Chamberland H, Plante M, Bellemare G, Lafontaine JG, Tabaeizadeh Z. 1999.** A proline-, threonine-, and glycine-rich protein down-regulated by drought is localized in the cell wall of xylem elements. *Plant Physiology* **121**: 557–564.
- Herbette S, Bouchet B, Brunel N, Bonnin E, Cochard H, Guillon F. 2015.** Immunolabelling of intervessel pits for polysaccharides and lignin helps in understanding their hydraulic properties in *Populus tremula* × *alba*. *Annals of Botany* **115**: 187–199.

- Hillabrand RM, Hacke UG, Lieffers VJ. 2016. Drought-induced xylem pit membrane damage in aspen and balsam poplar. *Plant, Cell and Environment* **39**: 2210–2220.
- Hillinger C, Höll W, Ziedler H. 1996. Lipids and lipolytic enzymes in the trunkwood of *Robinia pseudoacacia* L. during heartwood formation. *Trees* **10**: 366–375.
- Hillis WE. 1987. *Heartwood and tree exudates*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Hoch G, Richter A, Körner C. 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant, Cell and Environment* **26**: 1067–1081.
- Höll W, Poschenrieder G. 1975. Radial distribution and partial characterization of lipids in the trunk of three hardwoods. *Holzforschung* **29**: 118–123.
- Höll W, Priebe S. 1985. Storage lipids in the trunk- and rootwood of *Tilia cordata* Mill. from the dormant to the growing period. *Holzforschung* **39**: 7–10.
- 平井信二. 1996. 『木の大百科』 朝倉書店, 東京, 日本.
- IAWA Comittiee. 1989. IAWA list of microscopic features for hardwood identification with an Appendix on non-anatomical information. *IAWA Bulletin n.s.* **10**: 221–332.
- van Ieperen W, van Meeteren U, van Gelder H. 2000. Fluid ionic composition influences hydraulic conductance of xylem conduits. *Journal of Experimental Botany* **51**: 769–776.
- Jansen S, Choat B, Pletsers A. 2009. Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *American Journal of Botany* **96**: 409–419.
- Jansen S, Choat B, Vinckier S, Lens F, Schols P, Smets E. 2004. Intervascular pit membranes with a torus in the wood of *Ulmus* (Ulmaceae) and related genera. *New Phytologist* **163**: 51–59.

- Jansen S, Gortan E, Lens F, Lo Gullo MA, Salleo S, Scholz A, Stein A, TrifilòP, Nardini A. 2011.** Do quantitative vessel and pit characters account for ion-mediated changes in the hydraulic conductance of angiosperm xylem? *New Phytologist* **189**: 218–228.
- Jansen S, Sano Y, Choat B, Rabaey D, Lens F, Dute RR. 2007.** Pit membranes in tracheary elements of Rosaceae and related families: New records of tori and pseudotori. *American Journal of Botany* **94**: 503–514.
- Jarbeau JA, Ewers FW, Davis SD. 1995.** The mechanism of water - stress - induced embolism in two species of chaparral shrubs. *Plant, Cell & Environment* **18**: 189–196.
- Jiménez-Sánchez C, Lozano-Sánchez J, Rodríguez-Pérez C, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2016.** Comprehensive, untargeted, and qualitative RP-HPLC-ESI-QTOF/MS2 metabolite profiling of green asparagus (*Asparagus officinalis*). *Journal of Food Composition and Analysis* **46**: 78–87.
- Kaack L, Altaner CM, Carmesin C, Diaz A, Holler M, Kranz C, et al. 2019.** Function and three-dimensional structure of intervessel pit membranes in angiosperms: a review. *IAWA Journal* **40**: 673–702.
- Kallio H, Ahtonen S. 1987.** Seasonal variations of the sugars in birch sap. *Food Chemistry* **25**: 293–304.
- Kasmi S, Hamdi A, Atmani-Kilani D, Debbache-Benaida N, Jaramillo-Carmona S, Rodríguez-Arcos R, et al. 2021.** Characterization of phenolic compounds isolated from the *Fraxinus angustifolia* plant and several associated bioactivities. *Journal of Herbal Medicine* **29**. DOI: 10.1016/j.hermed.2021.100485
- Kasuga J, Hashidoko Y, Nishioka A, Yoshiba M, Arakawa K, Fujikawa S. 2008.** Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*)

- contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity. *Plant, Cell and Environment* **31**: 1335–1348.
- Kim JS, Daniel G. 2013.** Developmental localization of homogalacturonan and xyloglucan epitopes in pit membranes varies between pit types in two poplar species. *IAWA journal* **34**: 245–262.
- Kim JS, Daniel G. 2016.** Distribution of phenolic compounds, pectins and hemicelluloses in mature pit membranes and its variation between pit types and in English oak xylem (*Quercus rober*). *IAWA Journal* **37**: 402–419.
- Kininmouth JA. 1972.** Permeability and fine structure of certain hardwoods and effects on drying II. Differences in fine structure of *Nothofagus fusca* sapwood and heartwood. *Holzforschung* **26**: 32–38.
- 基太村洋子. 1982.** 酸性染料の木材内部への浸透(第 1 報) 木材浸透性染料の選定. 林産試験場研究報告 **319**: 47–68.
- Kleen M, Kangas H, Laine C. 2003.** Chemical characterization of mechanical pulp fines and fiber surface layers. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* **18**: 361–368.
- Koch G, Richter H-G, Schmitt U. 2006.** Topochemical investigation on phenolic deposits in the vessels of afzelia (*Afzelia* spp.) and merbau (*Intsia* spp.) heartwood. *Holzforschung* **60**: 583–588.
- Kostova I, Iossifova T. 2007.** Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia* **78**: 85–106.
- Kotowska MM, Thom R, Zhang Y, Schenk HJ, Jansen S. 2020.** Within-tree variability and sample storage effects of bordered pit membranes in xylem of *Acer pseudoplatanus*. *Trees* **34**: 61–71.

- Kramer PJ, Kozlowski TT. 1960.** *Physiology of trees*. McGraw-Hill BOOK. New York, USA.
- Kuroda K, Fujiwara T, Imai T, Takama R, Saito K, Matsushita Y, Fukushima K. 2013.** The cryo-TOF-SIMS/SEM system for the analysis of the chemical distribution in freeze-fixed *Cryptomeria japonica* wood. *Surface and Interface Analysis* **45**: 215–219.
- 久住聡, 甲賀大輔, 柴田昌宏, 渡部剛. 2020.** 切片 SEM 法と連続切片 SEM 法. *顕微鏡* **55**: 18–22.
- Lee HS, Park SH, Wallander E, Chang C-S. 2012.** A flavonoid survey of *Fraxinus* (Oleaceae) in eastern Asia, and the overlooked species *Fraxinus hopeiensis* T. Tang in northern China. *Biochemical Systematics and Ecology* **41**: 150–156.
- Lee J, Holbrook NM, Zwieniecki MA. 2012.** Ion induced changes in the structure of bordered pit membranes. *Frontiers in Plant Science* **3**. DOI: 10.3389/fpls.2012.00055.
- Lee YK, Alexander D, Wulff J, Olsen JE. 2014.** Changes in metabolite profiles in Norway spruce shoot tips during short-day induced winter bud development and long-day induced bud flush. *Metabolomics* **10**: 842–858.
- Leng P, Itamura H, Yamamura H, Deng XM. 2000.** Anthocyanin accumulation in apple and peach shoots during cold acclimation. *Scientia Horticulturae* **83**: 43–50.
- Lens F, Sperry JS, Christman MA, Choat B, Rabaey D, Jansen S. 2011.** Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New Phytologist* **190**: 709–723.
- Li S, Lens F, Espino S, Karimi Z, Klepsch M, Schenk HJ, Schmitt M, Schuldt B, Jansen S. 2016.** Intervessel pit membrane thickness as a key determinant of embolism resistance in angiosperm xylem. *IAWA journal* **37**: 152–171.

- Li Z, Ohno N, Terada N, Daoyuan Z, Yoshimura A, Ohno S. 2006.** Application of periodic acid-Schiff fluorescence emission for immunohistochemistry of living mouse renal glomeruli by an “in vivo cryotechnique.” *Archives of Histology and Cytology* **69**: 147–161.
- Liese W. 1965.** The fine structure of bordered pits in softwood. In: Côte WA (ed.). *Cellular ultrastructure of woody plants*. Syracuse University Press, New York, USA: 271–290.
- Livingston DP, Henson CA. 1998.** Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiology* **116**: 403–408.
- López-Portillo J, Ewers F, Angeles G. 2005.** Sap salinity effects on xylem conductivity in two mangrove species. *Plant, Cell and Environment* **28**: 1285–1292.
- Ludovici M, Ialongo C, Reverberi M, Beccaccioli M, Scarpari M, Scala V. 2014.** Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis of *Fusarium verticillioides* and maize kernels. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **31**: 2026–2033.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. 1970.** The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. In: Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB, editors. *The systematic identification of flavonoids*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg: 41–164.
- Maherali H, Pockman WT, Jackson RB. 2004.** Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology* **85**: 2184–2199.
- Masumi T, Matsushita Y, Aoki D, Takama R, Saito K, Kuroda K, Fukushima K. 2014.** Adsorption behavior of poly(dimethyl-diallylammonium chloride) on pulp fiber studied by cryo-time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cryo-scanning electron microscopy. *Applied Surface Science* **289**: 155–159.

- 宮地洋, 真鍋明義, 徳森恒雄, 隅田葉子, 吉田隆志, 西部三省ほか. 1987. 超臨界流体抽出の生薬, 植物成分への応用 (第2報) クマリン, リグナン及びプレニルフラボノイドについて. *薬学雑誌* **107**: 435–439.
- 村田源. 1989. モクセイ科. 佐竹義輔, 原寛, 亙理俊次, 富成忠夫 (編). 『日本の野生植物: 木本Ⅱ』 平凡社, 東京, 日本: 175–183.
- Morris H, Plavcová L, Gorai M, Klepsch MM, Kotowska M, Jochen Schenk H, et al. 2018. Vessel-associated cells in angiosperm xylem: Highly specialized living cells at the symplast-apoplast boundary. *American Journal of Botany* **105**: 151–160.
- Nakaba S, Kubo T, Funada R. 2008. Differences in patterns of cell death between ray parenchyma cells and ray tracheids in the conifers *Pinus densiflora* and *Pinus rigida*. *Trees* **22**: 623–630.
- Nardini A, Salleo S, Jansen S. 2011. More than just a vulnerable pipeline: xylem physiology in the light of ion-mediated regulation of plant water transport. *Journal of Experimental Botany* **62**: 4701–4718.
- Nardini A, Dimasi F, Klepsch M, Jansen S. 2012. Ion-mediated enhancement of xylem hydraulic conductivity in four *Acer* species: relationships with ecological and anatomical features. *Tree Physiology* **32**: 1434–1441.
- O'Brien TP. 1970. Further observations on hydrolysis of the cell wall in the xylem. *Protoplasma* **69**: 1–14.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373.

- O'Brien TP, Thimann KV. 1967.** Observations on the fine structure of the oat coleoptile. III. Correlated light and electron microscopy of the vascular tissues. *Protoplasma* **63**: 443–478.
- Oda Y, Fukuda H. 2012.** Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. *Science* **337**: 1333–1336.
- Ohtani J, Ishida S. 1978.** Pit membrane with torus in dicotyledonous woods. *Mokuzai Gakkaishi* **24**: 673–675.
- Ohtani J, Jing W, Fukazawa K, Qun XS. 1989.** Multiple perforation plates in *Gmelina arborea* Roxb. (Verbenaceae). *IAWA Journal* **10**: 35–41.
- 朴杓允 1992.** 植物細胞の試料作製法. 医学・生物学電子顕微鏡技術研究会（編）.『よくわかる電子顕微鏡技術』朝倉書店: 37–45.
- Pereira L, Flores-Borges DNA, Bittencourt PRL, Mayer JLS, Kiyota E, Araújo P, et al. 2018.** Infrared nanospectroscopy reveals the chemical nature of pit membranes in water-conducting cells of the plant xylem. *Plant Physiology* **177**: 1629–1638.
- Pérez-Donoso AG, Sun Q, Roper MC, Greve LC, Kirkpatrick B, Labavitch JM. 2010.** Cell wall-degrading enzymes enlarge the pore size of intervessel pit membranes in healthy and *Xylella fastidiosa*-infected grapevines. *Plant Physiology* **152**: 1748–1759.
- Pesacreta TC, Groom LH, Rials TG. 2005.** Atomic force microscopy of the intervessel pit membrane in the stem of *Sapium sebiferum* (Euphorbiaceae). *IAWA journal* **26**: 397–426.
- Petrussa E, Braidot E, Zancani M, Peresson C, Bertolini A, Patui S, et al. 2013.** Plant flavonoids--biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 14950–14973.

- Piispanen R, Saranpää P. 2004.** Seasonal and within-stem variations of neutral lipids in silver birch (*Betula pendula*) wood. *Tree Physiology* **24**: 991–999.
- Pilon-Smits E, Ebskamp M, Paul MJ, Jeuken M, Weisbeek PJ, Smeekens S. 1995.** Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology* **107**: 125–130.
- Plavcová L, Hacke UG. 2011.** Heterogeneous distribution of pectin epitopes and calcium in different pit types of four angiosperm species. *New Phytologist* **192**: 885–897.
- Plavcová L, Hacke UG, Sperry JS. 2011.** Linking irradiance-induced changes in pit membrane ultrastructure with xylem vulnerability to cavitation. *Plant, Cell and Environment* **34**: 501–513.
- Pockman WT, Sperry JS. 2000.** Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of Sonoran desert vegetation. *American Journal of Botany* **87**: 1287–1299.
- Rioux D, Nicole M, Simard M, Ouellette GB. 1998.** Immunocytochemical evidence that secretion of pectin occurs during gel (gum) and tylosis formation in trees. *Phytopathology* **88**: 494–505.
- Rummukainen A, Julkunen-Tiitto R, Räisänen M, Lehto T. 2007.** Phenolic compounds in Norway spruce as affected by boron nutrition at the end of the growing season. *Plant Soil* **292**: 13–23.
- Saitoh T, Ohtani J, Fukazawa K. 1993.** The occurrence and morphology of tyloses and gums in the vessels of Japanese hardwoods. *IAWA Journal* **14**: 359–371.
- Sano Y. 2004.** Intervascular pitting across the annual ring boundary in *Betula platyphylla* var. *japonica* and *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*. *IAWA journal* **25**: 129–140.

- Sano Y. 2005.** Inter- and intraspecific structural variations among intervacular pit membranes, as revealed by field-emission scanning electron microscopy. *American Journal of Botany* **92**: 1077–1084.
- 佐野雄三. 2009.** 広葉樹材における管状要素間壁孔の構造と機能. *木材学会誌* **55**: 119–128.
- 佐野雄三. 2011.** 壁孔と修飾構造. 日本木材学会（編）『木質の構造』. 文永堂出版: 96–107.
- Sano Y. 2016.** Bordered pit structure and cavitation resistance in woody plants. In: Kim YS, Funada R, Singh AP (eds.). *Secondary Xylem Biology*. Elsevier, Cambridge, USA: 113–130.
- Sano Y, Fukazawa K. 1994.** Structural variations and secondary changes in pit membranes in *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*. *IAWA Journal* **15**: 283–291.
- Sano Y, Kawakami Y, Ohtani J. 1999.** Variation in the structure of intertracheary pit membranes in *Abies sacalinensis*, as observed by field-emission scanning electron microscopy. *IAWA Journal* **20**: 375–88.
- Sano Y, Nakada R. 1998.** Time course of the secondary deposition of incrusting materials on bordered pit membranes in *Cryptomeria japonica*. *IAWA Journal* **19**: 285–299.
- Sano Y, Utsumi Y, Ohtani J. 1998.** Seasonal changes in the structure of intervessel and vessel-parenchyma pit membranes in *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*. *IAWA Journal* **19**: 477.
- Sanz M, de Simón BF, Cadahía E, Esteruelas E, Muñoz AM, Hernández T, et al. 2012.** LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. *Journal of Mass Spectrometry* **47**: 905–918.

- Sasaki T, Fukuda H, Oda Y. 2017. CORTICAL MICROTUBULE DISORDERING1 is required for secondary cell wall patterning in xylem vessels. *The Plant Cell* **29**: 3123–3139.
- Sauter JJ, Iten W, Zimmermann MH. 1973. Studies on the release of sugar into the vessels of sugar maple (*Acer saccharum*). *Canadian Journal of Botany* **51**: 1–8.
- Schenk HJ, Espino S, Rich-Cavazos SM, Jansen S. 2018. From the sap's perspective: The nature of vessel surfaces in angiosperm xylem. *American Journal of Botany* **105**: 172–185.
- Schenk HJ, Espino S, Romo DM, Nima N, Do AYT, Michaud JM, Papahadjopoulos-Sternberg B, Yang J, Zuo YY, Steppe K, et al. 2017. Xylem surfactants introduce a new element to the cohesion-tension theory. *Plant Physiology* **173**: 1177–1196.
- Schenk HJ, Jansen S, Hölttä T. 2021. Positive pressure in xylem and its role in hydraulic function. *New Phytologist* **230**: 27–45.
- Schenk HJ, Steppe K, Jansen S. 2015. Nanobubbles: A new paradigm for air-seeding in xylem. *Trends in Plant Science* **20**: 199–205.
- Schmid R. 1965. The fine structure of pits in hardwood. In: Côte WA (ed.). *Cellular ultrastructure of woody plants*. Syracuse University Press, New York, USA: 291–304.
- Schmid R, Machado RD. 1968. Pit membranes in hardwoods—fine structure and development. *Protoplasma* **66**: 185–204.
- Si CL, Xu GH, Huang XF, Du ZG, Wu L, Hu WC. 2016. Phytochemical investigation of hydroalcoholic extractives from branches of *Fraxinus velutina*. *Chemistry of Natural Compounds* **52**: 132–133.
- 嶋田玄彌. 1940. トネリコ属植物樹皮の成分. *薬学雑誌* **60**: 508–510.

- 嶋田玄彌. 1952a. トネリコ属植物樹皮成分の研究（第3報）デワトネリコ, ナガミトネリコ, ホソバアオダモ, カントウトネリコの樹皮成分. *薬学雑誌* 72: 63–65.
- 嶋田玄彌. 1952b. トネリコ属植物樹皮成分の研究（第4報）ヤチダモ, オクエゾヤチダモの樹皮成分. *薬学雑誌* 72: 65–67.
- 嶋田玄彌. 1952c. トネリコ属植物樹皮成分の研究（第5報）コバチの樹皮成分. *薬学雑誌* 72: 67–69.
- 嶋田玄彌. 1952d. トネリコ属植物樹皮成分の研究（第6報）オオトネリコ, ヤマトアオダモ, アラゲアオダモ, ビロウドアオダモの樹皮成分. *薬学雑誌* 72: 498–500.
- 嶋田玄彌. 1952e. トネリコ属植物樹皮成分の研究（第7報）シオジの樹皮成分. *薬学雑誌* 72: 501–504.
- Singh A, Dawson B, Franich R, Cowan F, Warnes J. 1999. The relationship between pit membrane ultrastructure and chemical impregnability of wood. *Holzforschung* 53: 341–346.
- Sinnott EW. 1918. Factors determining character and distribution of food reserve in woody plants. *Botanical Gazette* 66: 162–175.
- Sperry JS, Donnely JR, Tyree MT. 1988. A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell and Environment* 11: 35–40.
- Sperry JS, Hacke UG. 2004. Analysis of circular bordered pit function I. Angiosperm vessels with homogenous pit membranes. *American Journal of Botany* 91: 369–385.
- Sperry JS, Hacke UG, Wheeler JK. 2005. Comparative analysis of end wall resistivity in xylem conduits. *Plant, Cell and Environment* 28: 456–465.

- Sperry JS, Sullivan JE. 1992.** Xylem embolism in response to freeze-thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous, and conifer species. *Plant Physiology* **100**: 605–613.
- Sperry JS, Tyree MT. 1988.** Mechanism of water stress-induced xylem embolism. *Plant physiology* **88**: 581–587.
- Sun Q. 2022.** Structural variation and spatial polysaccharide profiling of intervessel pit membranes in grapevine. *Annals of Botany* **130**: 595–609.
- Takabe K, Fujita M, Harada H, Saiki H. 1981.** Lignification process of Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) tracheids. *Mokuzai Gakkaishi* **36**: 424–428.
- Terazawa M. 1986.** Phenolic compounds in living tissues of woods VII. (+)-Pinoresinol monoglucoside in *Fraxinus mandshurica* Rupr. var. *japonica* Maxim. (Oleaceae). *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University* **62**: 415–428.
- 寺沢実, 笹谷宜志. 1968.** ヤチダモの抽出成分に関する研究（第 1 報）：樹皮におけるクマリン誘導体およびその他の化合物について. 北海道大学農学部演習林研究報告 **26**:171–202.
- Terazawa M, Sasaya T. 1970.** Studies on the extractives of Yachidamo, *Fraxinus Mandshurica* Rupr. var. *japonica* Maxim. II. Glucosides in bark. *Mokuzai Gakkaishi* **16**: 192–199.
- Terazawa M, Sasaya T. 1971.** Extractives of Yachidamo, *Fraxinus mandshurica* Rupr. var. *japonica* Maxim. III. Extractives of wood; phenolic compounds in sapwood. *Mokuzai Gakkaishi* **17**: 167–173.
- Terazawa M, Sasaya T. 1986.** Phenolic compounds in living tissues of woods VIII. Olivil from the sapwood of yachidamo, *Fraxinus mandshurica* Rupr. var. *japonica* Maxim. *Research Bulletins of the College Experiment Forests* **43**: 803–814.

- Thomas RJ. 1975.** The effect of polyphenol extraction on enzyme degradation of bordered pit tori. *Wood and Fiber Science* **7**: 207–215.
- Thomas RJ. 1976.** Anatomical features affecting liquid penetrability in three hardwood species. *Wood and Fiber Science* **7**: 256–263.
- Turrini F, Donno D, Beccaro GL, Pittaluga A, Grilli M, Zunin P, et al. 2020.** Bud-derivatives, a novel source of polyphenols and how different extraction processes affect their composition. *Foods* **9**. DOI: 10.3390/foods9101343.
- 豊岡公德. 2016.** 光一電子相関顕微鏡法：蛍光タンパク質標識した細胞小器官を走査電子顕微鏡で捉える. *Plant morphology* **28**: 15–21.
- Tyree MT, Engelbrecht BMJ, Vargas G, Kursar TA. 2003.** Desiccation tolerance of five tropical seedlings in Panama. Relationship to a field assessment of drought performance. *Plant Physiology* **132**: 1439–1447.
- Tyree MT, Fiscus EL, Wulschleger SD, Dixon MA. 1986.** Detection of xylem cavitation in corn under field conditions. *Plant Physiology* **82**: 597–599.
- Tyree MT, Zimmermann MH. 2002.** *Xylem structure and the ascent of Sap*. 2nd edition. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Umebayashi T, Utsumi Y, Koga S, Inoue S, Fujikawa S, Arakawa K, et al. 2008.** Conducting pathways in north temperate deciduous broadleaved trees. *IAWA Journal* **29**: 247–263.
- Umebayashi T, Utsumi Y, Koga S, Inoue S, Matsumura J, Oda K, et al. 2010.** Xylem water-conducting patterns of 34 broadleaved evergreen trees in southern Japan. *Trees* **24**: 571–583.
- 鵜野哲郎. 2014.** 一部広葉樹において走査電子顕微鏡で存否を確認できる抽出成分に関する研究. 北海道大学農学部森林科学科 樹木生物学研究室 平成 25 年度卒業論文.

- Utsumi Y, Sano Y, Fujikawa S, Funada R, Ohtani J. 1998.** Visualization of cavitated vessels in winter and refilled vessels in spring in diffuse-porous trees by cryo-scanning electron microscopy. *Plant Physiology* **117**: 1463–1471.
- Utsumi Y, Sano Y, Funada R, Fujikawa S, Ohtani J. 1999.** The progression of cavitation in earlywood vessels of *Fraxinus mandshurica* var *japonica* during freezing and thawing. *Plant Physiology* **121**: 897–904.
- Utsumi Y, Sano Y, Ohtani J, Fujikawa S. 1996.** Seasonal changes in the distribution of water in the outer growth rings of *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*: A study by cryo-scanning electron microscopy. *IAWA Journal* **17**: 113–124.
- Wallander E. 2008.** Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution* **273**: 25–49.
- Wallander E. 2012** Systematics and floral evolution in *Fraxinus* (Oleaceae). *Belgische Dendrologie Belge 2012*: 39–58.
- Watanabe Y, Ohno Y. 2020.** Severe insect defoliation at different timing affects cell wall formation of tracheids in secondary xylem of *Larix kaempferi*. *Trees* ;**34**: 931–941.
- Watanabe Y, Sano Y, Asada T, Funada R. 2006.** Histochemical study of the chemical composition of vestured pits in two species of *Eucalyptus*. *IAWA Journal* **27**: 33–43.
- Wheeler EA. 1981.** Intervascular pitting in *Fraxinus americana* L. *IAWA Bulletin n.s.* **2**: 169–174.
- Wheeler EA. 1982.** Ultrastructural characteristics of red maple (*Acer Rubrum* L.) wood. *Wood and Fiber Science* **14**: 43–53.
- Wheeler EA. 1983.** Intervascular pit membranes in *Ulmus* and *Celtis* native to the United States. *IAWA Bullentin n.s.* **4**: 79–88.

- Wheeler EA, Thomas RJ. 1981.** Ultrastructural characteristics of mature wood of southern red oak (*Quercus falcata* Michx.) and white oak (*Quercus Alba* L.). *Wood and Fiber Science* **13**: 169–181.
- Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG, Hoang N. 2005.** Inter-vessel pitting and cavitation in woody Rosaceae and other vessel led plants: A basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant, Cell and Environment* **28**: 800–812.
- 矢追克郎. 2014.** キシログルカン分解酵素に関する研究. *応用糖質科学* **4**: 32–38.
- Yamagishi S, Shigetomi K, Fujiyasu S, Aoki D, Uno T, Fukushima K, et al. 2021.** Artifactual lipid coatings on intervessel pit membranes in dried xylem tissues of some angiosperms. *IAWA Journal* **42**: 365–383.
- Yazawa K, Ishida S. 1965.** On the existence of the intermediate wood in some broad-leaved trees grown in Hokkaido, Japan. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University* **54**: 137–150.
- 吉田みどり, 上野敬司, 川上顕, 塩見徳夫. 2003.** 植物フルクタン研究とその代謝遺伝子利用. *化学と生物* **41**: 787–795.
- Zhang Y, Carmesin C, Kaack L, Klepsch MM, Kotowska M, et al. 2020.** High porosity with tiny pore constrictions and unbending pathways characterize the 3D structure of intervessel pit membranes in angiosperm xylem. *Plant, Cell and Environment* **43**: 116–130.
- Zheng P, Yagami S, Aoki D, Yoshida M, Sano Y, Matsushita Y, et al. 2017.** The composition and chemical alteration of gums in the vessels of *Phellodendron amurense*. *Holzforschung* **71**: 969–976.

- Zimmermann MH. 1983.** *Xylem structure and the ascent of sap*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Zimmermann MH, Brown CL. 1971.** *Trees: structure and function*. Springer-Verlag, New York, USA.
- Zimmermann MH. 1978.** Hydraulic architecture of some diffuse-porous trees. *Canadian Journal of Botany* **56**: 2286–2295.
- Zwieniecki MA, Melcher PJ, Michele N. 2001.** Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. *Science* **9**: 1059–1062.
- Zwieniecki MA, Orians CM, Melcher PJ, Holbrook NM. 2003.** Ionic control of the lateral exchange of water between vascular bundles in tomato. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1399–1405.