光学・電子顕微鏡による クワの葉プラントオパールおよびその不均一分布の観察

坂本 玲¹・筒井音羽¹・菊地 環²・吉田鈴奈²・尾林舞香¹・山川冴子¹・半田 亨²

¹早稲田大学本庄学院（現在は、早稲田大学 ☎ 169-8050 東京都新宿区戸塚町 1-104）

²早稲田大学本庄高等学院 ☎ 367-0032 埼玉県本庄市栗崎 239-3

（2016 年 5 月 30 日受付；2016 年 8 月 29 日掲載決定）

Observation of Heterogeneous Distribution of Opal Phytoliths by Optical Microscopy and Scanning Electron Microscopy

Rei SAKAMOTO¹, Otoha TSUTSUI¹, Tamaki KIKUCHI², Reina YOSHIDA², Maika OBAYASHI¹,
Saeko YAMAKAWA¹ and Toru HANDA²

¹Waseda University Honjo Senior High School (Waseda University (at present), 1-104 Totsuka-cho, Shinjuku-ku,
Tokyo 169-8050)

²Waseda University Honjo Senior High School, 239-3 Kurisaki, Honjo, Saitama 367-0032

(Received May 30, 2016 ; Accepted August 29, 2016)

There are many biogenic mineral deposits of diameter 25-100 μm on the leaf of the *Morus* of “Ichinose”. Using a chemical mapping, we can determine these deposits as “opal phytoliths” which are composed of biogenic silica. We tried to observe precisely the distribution pattern in a leaf and the change of shape depending on the maturation of the leaf using an optical microscope. From the results of the observation, it was found that many phytoliths were in close proximity to the veins, and while phytoliths change their shapes depending on the maturation of the leaf, other new phytoliths appear continually.

KEYWORDS : microscopy, opal phytolith, *Mourus*, microfossil

1. はじめに

現在、「プラントオパール」もしくは「ガラスオパール」とも称される植物化石に関する議論は、植物中における生成過程とその役割にまで発展している¹⁻³⁾。植物化石の役割や詳細なメカニズムは不確かなままであり、特定の植物種に限定した追加研究が必要である。

本研究で対象とした一ノ瀬グワの葉は、養蚕業において蚕の重要な食糧源であり、珪酸体を豊富に生成することで知られているクワ科に属している⁴⁾。クワの葉における植物化石の研究では、特に Si, Ca と葉の成長に伴う変化について詳細に調べられている⁵⁾。一方で、植物化石の役割や詳細なメカニズムは不確かなままであり、

特定の植物種に限定した追加研究が必要である。植物化石は珪酸体の自然な蓄積物である。ここでは、温暖な環境で育った一ノ瀬グワにおけるその分布と成長過程の解明のために行った顕微鏡による観察結果を紹介する¹⁾。

2. 調査・実験の手法

2013 年と 2014 年の 9 月から 11 月にかけて計 160 枚の葉を埼玉県本庄市内の一ノ瀬グワ 8 本の木より無作為に選んだ 12 本の枝から採取した。また、2015 年 4 月から 10 月にかけて本庄市内の同一 1 本の木の同じ枝から定期的にランダムに 1 枚ずつ採取した。

採取した試料は、葉緑素を抜き光学顕微鏡による観察を容易にするために、無水エタノールと水を 10 : 1 の割合で混合した液に浸して脱色した後に乾燥させた。これらのうち 4 枚の葉を、600℃の電気炉で 4 時間かけ灰化

処理した。葉の構造物の観察は2種の光学顕微鏡 (GLB-S600MBIT, Shimazu; VHX-1000, Keyence) と走査型電子顕微鏡 (SEM; JSM-S600, JEOL) を用いて行った。また、化学組成を明らかにし構造物を特定するため、特性X線スペクトルマッピングを用いた。SEMはプラントオパール形状観察に大変有用な手段である^{6,7)}。SEMとエネルギー分散型X線 (EDX) 微量分析装置を組み合わせることにより、マッピングを行った。電子顕微鏡を用いた分析には、およそ5 mm²に切断した切片を使用した。EDXスペクトルは、φ1 μmで照射・分析した。単離した生体鉱物のSEM観察時には、試料に金の蒸着を施した。

3. 結 果

3.1 光学および電子顕微鏡による観察

Fig. 1a は一ノ瀬グワの光学顕微鏡写真である。生体鉱物は葉の向軸面観察箇所にくまなく分布していた。Fig. 1b は、拡大された生体鉱物であるが、大きさは約50 μmで、透明な球状構造物の中心部は直径20 μmであった。この生体鉱物の構造を細部まで把握するため、SEMを用いた (Fig. 2)。Fig. 2a は、灰化処理によって

Fig. 1. (color online). (a) Photomicrograph of transparent biogenic minerals in the leaf lamina of *Morus* of "Ichinose", (b) Higher-magnification image of transparent biogenic minerals.

Fig. 2. (a, b) SEM images of the biogenic minerals (a) separated from leaves of *Morus* of "Ichinose" by incineration, (b) in the leaf captured with electron energy of 15 KeV.

単離した生体鉱物の写真である。“Papilla (乳頭)”型の約50 μmの鉱物が観察され、その中心の構造物は約20 μmであった。Fig. 2bのように、同様の構造物が一切片上に複数存在することがわかった。

Fig. 2で観察された生体鉱物の化学組成を明らかにすべく、SEM-EDX分析でさらなる調査を行った^{8,9)}。Fig. 3は、構造物周辺5か所において観察したEDXスペクトルを表している。各部位は、1) 中心、2) 中心付近、3) 外縁、4) 隣接細胞の内側、5) 細胞壁である。EDXスペクトルのピークは、各元素における蛍光X線の強度と対応している。炭素 (C)、酸素 (O)、ナトリウム (Na)、マグネシウム (Mg)、ケイ素 (Si)、カリウム (K)、カルシウム (Ca) の7元素が同定された。部位1-3の範囲では、Siの突出したピークが観察された。構造物の部位1, 2においてOはSiの次に大きいピークを示し、他の部位の酸素含有量を超過している。この結果は、乳頭状構造物の中心部分が、ガラスでできていることを示唆している。部位3に着目すると、炭素量が酸素

Fig. 3. (color online). Energy-dispersive X-ray spectra of a microscopic region containing the biogenic minerals captured with electron energy of 15 keV.

量を上回っているものの、珪素量は依然高いままである。この比較は、乳頭状構造物の中心部分と外縁部分の構成元素が、異なる組成であることを示している。部位4, 5の隣接する部分におけるEDXスペクトルは、SiとOについて小さなピークを示したものの、Cのピークを下回っている。MgとCaの原子量はSiやC、Oの原子量と比較すると非常に小さい。一方、NaおよびKの原子量は、それらMg, Caと比較しても遥かに小さい。次に、生体鉱物上における各元素のより詳しい分布状況を探るため、EDXによるマッピングを行った (Fig. 4)。乳頭状構造物がSiとO元素のマッピングによって完全に描かれる結果となった。

NaとKのマップに基づくと、これらのアルカリ金属原子が、乳頭状構造物に優先的に分配されていると考えられる。Mgのマップについても、僅かながら構造物にMg原子の優先的な分配を見ることができる。図の濃淡に着目すると、CとCaマップにおける構造物は黒色を

Fig. 4. Topographic image and chemical maps from scanning electron microscopic observation of the biogenic minerals captured with electron energy of 15 keV.

Fig. 5. (color online). Optical microscopic images of a *Morus* leaf captured at the (a) base, (b) incision and (c) apex of the lamina.

呈しており、ほとんどのCとCa原子が細胞周辺にあるといえる。この結果は、乳頭状構造物がアルカリ金属やアルカリ土類金属原子の陽イオンと会合している珪素で構成されていることを示している (Fig. 3; 部位1と2)。よって、プラントオパール命名法の国際基準に従い「乳頭状型の」(papillae) プラントオパールとして、生体鉱物を分類することができる⁷⁾。アルカリ原子やアルカリ土類金属原子において、水が陽イオンの溶剤として知られている¹⁰⁾。これらの陽イオンは土壌から溶解された状態で吸収されたと考えられる。

3.2 向軸面全体における分布

次に、一ノ瀬グワ葉身におけるプラントオパールの分布に着目した。

Fig. 5は葉身の3部位を撮影したものである。矢印のとおり、(a) 基部、(b) 欠刻付近の外縁、そして(c) 葉の先端について表皮を子細に観察したが、プラントオパールは不均一分布していることが確認された。欠刻付近の外縁部や先端部といった局所的部位にはプラントオパールが高密度に分布している。対する葉身の外縁部分ではプラントオパールの分布は低密度であった。また、

Fig. 6. (color online). (a, b) Images of the abaxial surface (a) and adaxial surface (b) of a sample leaf. The image in (a) is laterally reversed to be comparable with the image in (b). (c) Higher-magnification image from (b). Locations of the two incisions are indicated by arrows.

葉身基部においては主脈付近にプラントオパールは見られなかった。

葉の向軸面全体におけるプラントオパールの分布を調査するために、プラントオパールが大きく、視覚的な観察が可能な葉を選んだ。**Fig. 6** はそのような試料の写真である。**Fig. 6a** の写真は **Fig. 6b** との比較を容易にするために反転した。向軸面においては、特定の部位に小さく白い鉱物が濃く密集している (**Fig. 6b**)。 **Fig. 6a** と比較すると、これらの部位が網状葉脈と関連していることは明らかである。高倍率の写真 (**Fig. 6c**) は、白色の密集領域と、黒色の点在領域があることを示している。そのうえ、黒色の部分は葉の外縁部分を含んでおり、これは光学顕微鏡による葉の観察結果 (**Fig. 5**) と一致している。光学顕微鏡写真は、プラントパールが大きく豊富に存在する白色領域 (**Fig. 7a**) と、プラントオパール数の少ない黒色領域 (**Fig. 7b**) とを示している。

Fig. 6 からいえるように、プラントオパールは側脈 (**Fig. 7c**) に沿って大きく、そして高密度に分布することが明らかになった。

3.3 プラントオパールの形状変化

2015 年 4 月下旬から 9 月下旬にかけて同一の樹木から採取した葉で、プラントオパールの形状の変化を観察した。観察途中で気が付いたことがあり、この場を借りて紹介する。形状に違いがあることがわかり、区別の便宜上プラントオパールの変化の過程を表すと考えられる以下四つの段階に分類した。

Fig. 7. (color online). Optical microscopic images of a *Morus* leaf shown in **Fig. 7** in (a) a region of high phytolith density, (b) a region of low phytolith density, and (c) a vein.

第 1 段階：乳頭形状の突起部分のみ (**Fig. 8-1**)

第 2 段階：乳頭形状突起部分の周囲に放射状の線刻が見える (**Fig. 8-2**)

第 3 段階：その後乳頭形状の突起部分の周囲が乳房状に盛り上がり周囲に放射状線刻が残っている (**Fig. 8-3**)

第 4 段階：そして全体的に凹凸がわかりにくくなった状態 (**Fig. 8-4**)

Fig. 8 は葉の表面の凹凸を水絆創膏やマニキュアのトップコートで写し取ったものを観察する、SUMP 法を用いて光学顕微鏡で撮影したものである。

葉の成長に伴ってこの 4 段階の分布がどう変化するかを観察した。最初に発生したプラントオパールの初期段階がそのまま、葉の成長に伴い段階 2・3・4 と変化していくのではないかと仮説のもとで観察を行った。同じ個所の変化を追跡することができず、異なる葉の任意の位置のサンプルを観察しているので、結果は参考程度である。観察結果の一つが **Fig. 9** である。3.2 節の考察を受け、1 枚の葉の側脈近辺の横 1.2 mm × 縦 1.1 mm の範囲をランダムに選び SUMP 法を用いて光学顕微鏡で撮影し、すべてのプラントオパールの数を目視で数えた。横軸は葉を採取した日時である。

(a) の縦軸は全体のプラントオパールの中でのその段階の割合である。葉の成長に伴って段階 1~4 の割合が変化する傾向が明瞭であるわけではないが 1・2 が減り 3・4 が増えていることから、仮説はある程度妥当といえそうである。(b) で見る限り、サンプルによりプラントオパールの総個数が大きく異なることの問題はあるが、4 月から 6 月の頃は第 1、第 2 段階が多く、6 月後半から第 3 段階、第 4 段階が増えていく傾向が見られ

Fig. 8. (color online). (1) Phase 1 (“cap” of Papilla), (2) Phase 2 (“cap” and spoke like carving), (3) Phase 3 (breastlike papilla with spoke like carving), (4) Phase 4 (weatherd papilla with spoke like carving).

Fig. 9. (color online). (a) Temporal variation of the number of opal phytoliths of the phase 1-4. Broken lines are the fitted linear functions to trace the tendency. (b) Temporal variation of the ratio of opal phytoliths of the phase 1-4. Broken lines are the fitted linear functions to trace the tendency.

る。4月から9月まで第1, 第2段階が常に見られることにより, プラントオパールが同じ位置で成長していく一方で, 常に別の場所に新しいものが生まれていることが予想される。

4. 考 察

一ノ瀬グワにおける透明な生体鉱物は, SEMによる分析から珪酸体であることが明らかになった。SEMにより分析された乳頭状珪酸体は, プラントオパールと呼ばれる非晶質含水珪酸として分類された^{11~13, 16~19}。また, SEM-EDX スペクトルを用いた調査から, 乳頭状珪酸体の中心部と外縁部とで化学組成の違いが明確化された。この調査では各成分の含有量が明らかになった。植物における蛍光 X 線分析 (EDX) は, 複雑な吸収や錯乱が原因となり化学量論を正確に評価することができないが, 構成成分のピーク (Fig. 3) に見られる相対強度の明白な違いは, 珪酸体の化学組成が部位間で異なることを明示している。

Fig. 4 に見られる Si の分布図は, プラントオパールと細胞壁ネットワークとの関係性を示唆する。つまり, プラントオパールの主な構成要素である Si 原子の移動が, 細胞壁のネットワークを経由して生じることを示している。したがって, 細胞壁のネットワークから移動した Si 原子は珪酸体部位に蓄積されることが推測できる。地下水として植物に吸収された単珪素酸分子である $\text{Si}(\text{OH})_4$ が, 珪酸分子の重合を経て細胞内や組織的な部位に非晶質含水珪酸体として蓄積することは既知の事実である^{2, 6, 14, 15}。

SEM を用いた試料表面の形態観察は, 珪酸体が表皮

もしくは柵状組織に形成されることを示した。クワの葉の表皮層には異形細胞と呼ばれる特殊な細胞が分布し, 葉の断面におけるこの細胞の Si および Ca の分布の詳細な様子が既に報告されている⁵⁾。クワ科における珪酸体の形状に関する報告がいくつかなされてきたが, クワの葉における珪酸体は, 上記の議論のように, 珪化された表皮細胞の一つであると見なされている。

Fig. 5-7 より, 「珪酸分子である化学種はまずクワの葉の主脈を輸送され, 次にその化合物は網状葉脈へと輸送され, 葉身へ分散し, その後プラントオパールの生成に至る」と考えられる。Fig. 5-7 に例示するように, 側脈の拡張範囲は葉の形状に影響を受けるものであり, 主脈と葉端の間が狭くなっている欠刻部分ではその影響が特に強い。欠刻部分のプラントオパールは比較的高密度に分布している。また, Fig. 8-9 より葉の成長に伴う, プラントオパールの形状変化の様子がわかった。第1段階として発生したものが第2, 第3, 第4段階へ形状変化する一方で, 常に新しいものが生まれている状況も確認された。珪酸体が蓄積される場所は必ずしも最初に固定されるわけではないということである。

高等植物における珪酸体蓄積過程は, 完全な受動過程ではないと見なされているが, 同時に生体的機能調節とも関連していると考えられている^{3, 15}。これまでの研究結果は受動的説によって説明することができる。地下水より, 珪酸が他の元素とともに非選択的に取りこまれて蒸散流を通り, 珪酸体が形成される⁹⁾。生体鉱物形成の主要な原動力は, 蒸発または水損失であると考えられる。すなわち, 活発に蒸発が起こる細胞では過飽和状態の珪素複合溶液が表皮に現れ, 珪酸体の蓄積が起こる。

そして水分蒸発は上位の葉ほど起こりやすい。この議論は、クワの葉の太陽に向いている向軸側のみで植物化石が観察されたという事実と一致している (Fig. 5-7)。より一層の生化学調査により、植物化石の成長場所が特定の生体分子と関連することが明らかになりうる³⁾。

謝 辞

本研究は、東京大学物性研究所 松田巖氏、浜根大輔氏のご支援を受けて行った。

ご指導、ご協力、ご支援いただいたすべての関係者に深く感謝の意を表する。

文 献

- 1) O. Tsutsui, R. Sakamoto, M. Obayashi, S. Yamakawa, T. Handa, D. Nishio-Hamane and I. Matsuda : *Flora* **218**, 44 (2016).
- 2) P. Bauer, R. Elbaum and I.M. Weiss : *Plant Sci.* **180**, 746 (2011).
- 3) C. Law and C. Exley : *BMC Plant Biol.* **11**, 112 (2011).
- 4) L. Kealhofer and D.R. Piperno : "Opal phytoliths in Southeast Asian flora, Smithsonian Contributions to Botany 88" (Smithsonian Institution Press, Washington DC, 1998).
- 5) Y. Sugimura, T. Mori, I. Nitta, E. Kotani, T. Furusawa, M. Tatsumi, S. Kusakari, M. Wada and Y. Morita : *Annals of Botany* **83**, 543 (1999).
- 6) C. Exley : "Biosilica in Evolution, Morphogenesis and Nano-biotechnology" ed. by W.E.G. Muller and M.A. Grachev (Springer, 2009) p. 173.
- 7) M. Madella, A. Alexandre and T. Ball : *Ann. Bot.* **96**, 253 (2005).
- 8) J. Goldstein, D.E. Newbury, D.C. Joy, C.E. Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, L. Sawyer and J.R. Michael : "Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis" (Springer, Berlin-Heidelberg, 2003).
- 9) W.S. Sakai and M. Thom : *Ann. Bot.* **44**, 245 (1979).
- 10) G.K. Schweitzer and L.L. Pesterfield : "The Aqueous Chemistry of the Elements" (Oxford University Press, 2010).
- 11) D.M. Pearsall : *Am. Anthropol.* **84**, 862 (1982).
- 12) I. Rovner : *Quat. Res.* **1**, 343 (1971).
- 13) I. Rovner : *Geoarchaeology* **3**, 155 (1988).
- 14) D.R. Piperno : "Phytoliths : A Comprehensive Guide for Archaeologists and Paleoecologists" (AltaMira Press, Lanham, MD, 2006).
- 15) C.C. Zhang, L.J. Wang, W.X. Zhang and F.S. Zhang : *Plant Soil* **372**, 137 (2013).
- 16) E. Katayama, I. Kawakami and T. Okumura : 49th Conference of Radioisotope and Radiation Study (2012) Abstract Book 59.
- 17) R. Kondo, K. Tsutsuki, M. Tani and R. Maruyama : *Pedologist* **46**, 32 (2002).
- 18) D.R. Piperno : "Phytoliths Analysis : An Archaeological and Geological Perspective" (Academic Press, London, 1988).
- 19) 近藤錬三 : "プラント・オパール図譜—走査型電子顕微鏡による植物ケイ酸体学入門" (北海道大学出版会, 2010).