

日本木材学会  
組織と材質研究会 2010秋のシンポジウム  
－心材の形成－



2010年9月13-14日  
名古屋大学 東山キャンパス  
環境総合館レクチャーホール



# プログラム

日本木材学会 組織と材質研究会 2010 秋のシンポジウム ―心材の形成―

2010.9.13(月)

12 時半開場

・ 1300-1305 挨拶 森林総研関西 組織と材質研究会幹事 藤井 智之

イントロダクション

・ 1305-1330 心材の多様性と心材形成をめぐる謎 森林総研林育セ 中田 了五 . . . 1

第一部 心材形成の四要素

座長：東京農工大学 船田 良

I-1 1330-1430 放射柔細胞の細胞死 東京農工大学 半 智史 . . . 6

I-2 1430-1530 心材成分の堆積 名古屋大学 今井 貴規 . . . 13

休憩 1530-1545

I-3 1545-1645 水分状態の変化 九州大学 松村 順司 . . . 25

I-4 1645-1745 細胞壁の二次的な構造変化 北海道大学 佐野 雄三 . . . 27

18 時終了

1830-2030 懇親会 レストラン花の木

2005.9.14(火)

8 時半開場

第二部 心材形成に挑む多様な研究

座長：京都大学 高部 圭司

II-1 0900-0945 TOF-SIMS の心材形成研究への導入 名古屋大学 福島 和彦・齋藤 香織 . . . 32

II-2 0945-1030 Cryo-SEM と TOF-SIMS でみた心材形成 森林総研 黒田 克史 . . . 36

休憩 1030-1045

II-3 1045-1130 心材成分生成および心材形成に伴う遺伝子の発現 森林総研 吉田 和正 . . . 40

II-4 1130-1215 心材形成研究を発展させる新顕微鏡法 森林総研 松永 浩史 . . . 46

・ 1215-1220 クロージングリマーク 名古屋大学 山本 浩之

12 時半終了

表紙写真：スギ丸太木口面。辺材・移行材・心材の色調の違いがよくわかる。（撮影：中田了五）

日本木材学会 組織と材質研究会 2010 秋のシンポジウム ―心材の形成―

2010.9.13-14 @名古屋大学東山キャンパス環境総合館レクチャーホール

[http://www.jwrs.org/kenkyu/wa\\_wp/resources/2010symposium.html](http://www.jwrs.org/kenkyu/wa_wp/resources/2010symposium.html)

シンポジウム企画：

中田了五（森林総合研究所林木育種センター）

今井貴規（名古屋大学大学院生物圏資源学専攻循環資源学講座循環資源利用学研究分野）

要旨集

2010 年 9 月 13 日発行

編集 中田了五 発行 一般社団法人 日本木材学会 組織と材質研究会

## イントロダクション

### 心材の多様性と心材形成をめぐる謎

森林総合研究所林木育種センター

中田 了五

はじめに

植物界の中で「樹木」というグループの特徴はなんだろうか？ 筆者なら、「巨大性」「永年性」「死細胞」の三つを挙げる。樹木は長年生存と成長を続ける結果、巨大な植物体を持つことが可能になり、樹高 100m を超える個体も知られている。そして、巨大な植物体のかなりの部分が幹であり、幹のほとんどが木部からなっており、木部のほとんどは死細胞から構成されている。巨大な植物体を支える幹は、その機械的性能を十分発揮して、植物体そのものの自重を支えるのみならず、長年にわたって風や雪に対抗しなくてはならない。ほとんどが死細胞で構成されている幹の耐久性を増加させ、樹木の巨大性と永年性を保証するための仕組みのひとつが、心材の形成である。

生細胞からなる植物組織においては、病虫害から植物体を守るための防御機能は主として生細胞の病虫害に対する反応による。一方、樹木の心材はすべて死細胞から構成されているため、心材に対する病虫害の攻撃に備えあらかじめ防御性能を高めておく必要がある。樹木では、辺材が心材に変わるとき心材成分（心材物質）が生成され、木部への心材成分の堆積によって腐朽菌の侵入と増殖による心材の腐朽に対抗している。この心材の機能が低ければ、幹は腐朽して樹体の機械的性能は低下し、幹の損傷、ひいては植物体の死、が起きやすくなることになる。

「心材」は、「材の内方の層であって、その部分では樹木の生立時すでに生活細胞を失い、かつ生活細胞の内容物であった貯蔵物質（たとえば澱粉）は消滅するか心材物質に転化してしまっている。必ずしもはっきり区別できないけれども、一般に辺材より色が濃い。（後略）」と定義される（IAWA 1964、日本木材学会 1975）。本要旨の表紙写真（スギ）でみるように、通常、心材は色の違いで辺材と区別される。しかしながら、上記の定義に従えば、トドマツやモミのように、生細胞が存在しないが辺材と色の差が認められないものも心材である（淡色心材、図-1）。



図-1. モミの淡色心材。

#### 心材の多様性

本来は樹木の生存に関わるために発達したと考えられる心材形成は、木材をさまざまな形で利用している人類にとっては便利な現象である。天然の耐腐朽性ときれいな着色が（無料で）得られる心材を人類はうまく利用してきた。耐腐朽性の高いクリは鉄道の枕木や家の土台に、心材色が薄いモミは卒塔婆や棺桶に、心材が真っ黒なコクタンはピアノの黒鍵や彫刻に、といった木材の使用例は心材の

存在とその多様性なしには成り立たない。

このように、心材は木材の利用にとって非常に重要な性質のひとつである。よって、心材の樹種間や種内個体間の多様性 (図-2) については古くから関心が持たれてきた。いろいろな樹種の木材を紹介する事典・図鑑には必ず「心材色」という項がある (例えば貴島 1962)。心材の多様性をベースに木材利用が成り立っていて、木材の利用にとって心材の多様性は重要であり、この二つを切り離すことは難しい。



図-2. スギの心材色と心材量の丸太間の変動。

### 心材形成をめぐる謎

心材の形成がいかに行われているのか、という心材形成に関する研究は古くから行われてきた (例えば Hillis 1987)。しかし、心材の形成については十分わかっている訳ではない。逆に謎だらけなのである。いくつか心材形成をめぐる謎を挙げてみよう。

- ・ 心材の特徴は種間差が明らかで、樹種の特徴とできる。よって、心材の形成は遺伝的に制御されていると考えられるが、心材色や心材量は樹種によっては種内個体間差が大きい (例えば深沢 1967、森川ら 1996、図-2、図-3)。なぜか？

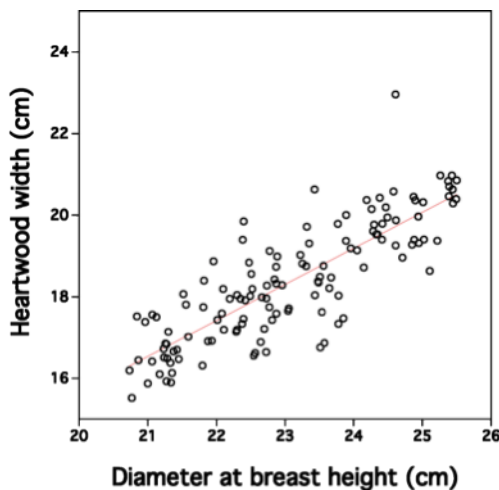


図-3. カラマツの胸高直径と心材幅の関係。

胸高直径約 20-26cm の間のみ表示。○は 1 個体を示す。同じ胸高直径でも心材の幅には個体間で 4cm 程度の差がある。すなわち、約 25% の直径の差。直径で 25% の差は、材積で考えると約 2 倍の差に相当する。同じ胸高直径でも心材材積は個体によって 2 倍程度違うということになる。もし心材の価値が極めて高い場合は、この材積差は林業経営上極めて大きな収益の差をもたらす。

- ・ 心材色や心材量は重要な材質指標である (平川 1997) が、これらの制御要因はなにか? (例えば Gartner 2002)
- ・ 針葉樹では辺材の水分通道の停止 (と乾燥化) と放射柔細胞の死がほぼ同時に起こっていることが知られている (例えば Nobuchi & Harada 1983)。しかし、柔細胞の死によって乾燥化が起こって水分通道が停止するのか、あるいは乾燥化のために柔細胞の死が引き起こされるのか、のどちらなのかについて答えは得られていない。
- ・ 心材形成は形成層からの距離で決まるのか? 年輪数 (柔細胞のエージング) で決まるのか? (例えば Nobuchi et al. 1987、Spicer & Gartner 2001、Spicer & Holbrook 2007)

- ・ 樹木のシュートの成長や形成層活動の季節性（フェノロジー）についてはよく知られている。たとえば、真冬には冬芽や形成層細胞は休眠状態にある。では、心材形成はいったいどの季節に生じている現象なのであろうか？（例えば平井 1951、Nelson 1978、Nobuchi et al. 1982、1984、Magel 2000、中田 2007）

ここに挙げた謎は実に基本的な事柄であり、心材形成のメカニズムの理解には不可欠なものであろう。心材形成のメカニズムの理解は、林業による育種・施業・木材生産による心材性質のプレプロダクションにおける制御につながる。その上、自然環境に依存した生産物である木材の利用にとって心材形成の理解は不可欠なものであり、木材のポストプロダクションにおける高度利用を図って行く上でも極めて重要である。心材形成の理解と制御は、木材の利用を高度化し、木材に付加価値をもたらす。すなわち、心材形成研究は、再生可能な資源である樹木・木材の持続的な利用に対する寄与が大きいと結論できる。

#### 心材形成の四要素

「木材」というものはどういうものか、という授業があった場合、心材と辺材の違いは最初の方ででてくる説明のひとつである。だいたいにおいて、生徒が最初に聞かされるのは「心材は辺材にくらべてその色が濃い」という話である。このように、我々が心材を認識するとき最初に考えるのは色である。辺材が心材に変化する時、すなわち心材形成において、肉眼レベルでわかるのは色の変化であるが、心材形成においては色の変化するのみならず、他にも様々な変化が樹体におこっている。

様々なテクニックを用いて心材形成に関する研究を行い、辺材と心材の違いをみると、心材形成は次の四つの要素からなっていることがわかる。1) 放射柔細胞の細胞死（例えば Nakaba et al. 2006、2008）、2) 心材成分の堆積（例えば Imai et al. 2005）、3) 水分状態の変化（例えば Matsumura et al. 2005）、4) 細胞壁の変化（例えば Sano & Nakada 1998）。今回のシンポジウムの第一部においては、この四つの要素についてそれぞれの分野の代表的な研究者に講演をお願いした。詳細は各々の講演および要旨に譲りたい。

本稿では以下の点を指摘する。

- ・ 心材形成の四要素はそれぞれ多様性に富んでいる。柔細胞の死は全ての心材形成で生じているが、その細胞死パターンは様々である；心材成分の堆積は淡色心材樹（モミ、ヤマナラシなど辺材と心材の色調がほとんど変わらない樹種）では起こらないまたはごくわずかである；水分状態の変化は必ずしも心材形成に伴っていない；心材形成に伴う細胞壁の変化が認められない場合もある。
- ・ よって、心材の多様性をもたらす要因は、心材形成の四要素それぞれの多様性と四要素の組合せの多様性であると考えられる。
- ・ 辺材と心材の間に、辺材とも心材とも異なる色調を呈する「移行材」がしばしば認められる（表紙写真）。色は多少なりとも白い場合が多く、我が国ではしばしば「白線帯」と呼ばれる。この移行材は、心材形成の舞台であり、心材形成の研究においては移行材とその近傍の辺材および心材に着目すべきである。

## 心材形成研究の発展にむけて

心材形成は樹木の生存戦略の理解と木材の利用の推進に重要な現象である。よって古くから研究が行われ様々な事象が報告されてきている。その割に、上述の通り心材形成に関しては解明すべき謎が多いことも事実である。

本シンポジウムの第二部では、心材形成の研究に大きく寄与すると考えられる比較的新規の研究手法とその心材形成研究への適用を紹介していただく。心材成分の物理化学的性質を利用して心材成分の樹体内での分布を見る；心材形成の四要素のうち二つ（心材成分の堆積と水分分布の変化）を同時に見る；心材形成に関する遺伝子を見る；心材形成を見るための武器としての顕微鏡法、という四つのテーマについて最新情報の講演をお願いした。

我が国において心材形成に関する研究（特に組織・材質分野において）は数回のブームがあったとすることができる。直近では1990年代のスギ黒心問題の集中的な研究が挙げられる（例えば平川1997）。それ以降の10数年で、本シンポジウム第二部で紹介いただくとおり、多くの学問領域で目覚ましい発展があった。心材形成をめぐる謎の解明のために、これらの科学の発展を心材形成研究に利用して、心材形成に関する謎にアプローチしていく必要がある。

心材形成のメカニズムの解明に引き続き、心材形成の人工的な制御を通して、次世代の木質材料を作り上げることを最終目標としたい。本シンポジウムが今後の心材形成研究の発展のための契機となることを願う。

## 引用文献

- 深沢和三 (1967) スギ樹幹内の材質変動に関する研究-産地を異にする林木樹幹の未成熟材などの区分とその材質特徴-. 岐阜大学農学部研究報告 25 47-128
- Gartner BL (2002) Sapwood and inner bark quantities in relation to leaf area and wood density in douglas-fir. IAWA Journal 23 267-285
- Hillis WE (1987) Heartwood and Tree Exudates. Springer-Verlag, Verlin, etc.
- 平井左門 (1951) 落葉松樹幹における心材部の増量の過程に就いて. 59 回日本林学会講演集 231-234
- 平川泰彦 編 (1997) 品質管理型林業のためのスギ黒心対策技術の開発. 研究成果 316 農林水産技術会議事務局
- IAWA (Committee on Nomenclature, Internatinal Association of Wood Anatomists) (1964) Multilingual Glossary of Terms Used in Wood Anatomy. Verlagsanstalt Buchdruckerei Konkordia Winterthur
- Imai T, Tanabe K, Kato T, Fukushima K (2005) Localization of ferruginol, a diterpene phenol, in *Cryptomeria japonica* heartwood by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. Planta 221 549-556
- 貴島恒夫 (1962) 原色木材大図鑑. 保育社, 東京
- Magel EA (2000) Biochemistry and physiology of heartwood formation. In Savidge RA, Barnett JR, Napier R eds, Cell and molecular biology of wood formation. BIOS Scientific Publishers,



Oxford, 363-376

- Matsumura J, Yamasaki Y, Oda K, Fujisawa Y (2005) Profile of bordered pit aspiration using confocal laser scanning microscopy. Pit aspiration and heartwood color. *Journal of Wood Science* 51 328-333
- 森川岳、小田一幸、松村順司、堤壽一 (1996) スギ樹幹における黒心材形成と灰分 (第 2 報) スギ 3 品種心材の性質. 九州大学農学部演習林報告 74 41-49
- Nakaba S, Sano Y, Kubo T, Funada R (2006) The positional distribution of cell death of ray parenchyma in a conifer, *Abies sachalinensis*. *Plant Cell Report* 25 1143-1148.
- Nakaba S, Kubo T, Funada R (2008) Differences in pattern of cell death between ray parenchyma cells and ray tracheids in the conifers *Pinus densiflora* and *Pinus rigida*. *Trees* 22 623-630
- 中田了五 (2007) スギの樹幹内水分分布の変異とその変動要因に関する研究. 林木育種センター研究報告 No 23 121-254
- Nelson ND (1978) Xylem ethylen, phenol-oxidizing enzymes, and nitrogen and heartwood formation in walnut and cherry. *Canadian Journal of Botany* 56 626-634
- 日本木材学会 (1975) 国際木材解剖用語集. 木材学会誌 21 A1-A21
- Nobuchi T, Kuroda K, Iwata R, Harada H (1982) Cytological study of the seasonal features of heartwood formation of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Mokuzai Gakkaishi* 28 669-676
- Nobuchi T, Harada H (1983) Physiological features of the "white zone" of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) - cytological structure and moisture content. *Mokuzai Gakkaishi* 29 824-832
- Nobuchi T, Sato T, Iwata R, Harada H (1984) Season of heartwood formation and the related cytological structure of ray parenchyma cells in *Robinia pseudoacacia* L. *Mokuzai Gakkaishi* 30 628-636
- Nobuchi T, Tokuchi N, Harada H (1987) Variability of heartwood formation and cytological features in broad-leaved trees. *Mokuzai Gakkaishi* 33 596-604
- 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
- Spicer R, Gartner BL (2001) The effects of cambial age and position within the stem on specific conductivity in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) sapwood. *Trees* 15 222-229
- Spicer R, Holbrook NM (2007) Parenchyma cell respiration and survival in secondary xylem; does metabolic activity decline with cell age? *Plant, Cell and Environment* 30 934-943

## 第一部 心材形成の四要素

### I-1 放射柔細胞の細胞死

東京農工大学  
半 智史

#### 樹木の二次木部における細胞死とその役割

木本植物は発達した維管束形成層（形成層）を持ち、長年に渡って肥大成長を続ける（船田 2008）。肥大成長は、発達した形成層における並層分裂により引き起こされ、形成層より外側に二次師部細胞を、内側に二次木部細胞を次々と生産する。我々が木材として利用する木部は、ほとんどがこの二次木部細胞から構成されている。

二次木部細胞は、拡大・伸長、二次壁の肥厚、壁孔やせん孔など細胞壁構造の修飾、木化という過程を経て最終的に細胞死に至る（Funada 2008）。様々な機能を持つ二次木部細胞において、分化のプロセスに大きな違いは存在しないが、細胞死のタイミングには大きな違いが存在する。仮道管や道管要素などの管状要素は、細胞壁を完成させた後、速やかに自己分解を起こすことで空洞化し、水分通道機能を獲得する。一方で、放射柔細胞は数年から長いものでは数十年以上生存し、管状要素のように速やかに細胞死を起こすことはない。その結果、養分の貯蔵機能や師部、形成層および木部を横断する放射方向への物質の輸送機能を持つ（Catesson 1990; Chaffey and Barlow 2001; Sauter 2000）。また、放射柔細胞は、細胞死を起こす前に二次代謝産物を生産することで樹幹に腐朽耐性を付与する心材形成に関わっている（Bamber and Fukazawa 1985; Hillis 1987; Magel 2000）。このように、細胞死と二次木部細胞の機能は密接に関わっており、樹幹の形成および維持において、細胞死は重要な働きをもつという。

#### 心材形成に伴う放射柔細胞の死

放射柔細胞は長年の間、物質の貯蔵や輸送の役割を果たすが、やがては自己分解によって細胞小器官を失い、細胞死を迎える。すべての細胞が死滅した木部を心材、それに対して外側の生きた細胞を含む木部を辺材と呼ぶ。また、辺材の最も内側で、色やその他一般的性質が辺材と心材の中間的な特徴を示す部位を移行材と呼ぶ。

放射柔細胞は細胞死を起こす前に細胞内の代謝が変化し、二次代謝産物を生産するようになる。これら心材特有の二次代謝産物（心材物質）が細胞死の際に細胞外に放出・拡散されることにより、心材は腐朽耐性を獲得する（Nobuchi and Harada 1985）。二次木部が樹体を支える構造材料であると考え、管状要素や木部繊維などの二次壁肥厚および木化によって骨組みが作られ、最終的に心材形成によって完成するともいえる（梅澤 2003）。また、心材は利用において重要であるため、その形成機構については古くから興味を持たれてきた。辺材から心材への移行において、放射柔細胞がどのような過程を辿って細胞死に至るのかを知ることは、その機構を理解する上で重要である。以降、長命な放射柔細胞の細胞死に焦点を当てたこれまでの研究を紹介したい。

## 核における変化

核は、細胞小器官の中で比較的大きく、その変化を捉えることが容易であることから、放射柔細胞における変化の指標として多くの観察例が存在する。核は、心材に近い移行材の放射柔細胞において、辺材外層の放射柔細胞と比べ小さく、核中の DNA 濃度が高い（樋口ら 1964）。また、一細胞中における DNA 含有量は、辺材外層から移行材にかけてほぼ一定か、移行材において若干増加する傾向にある（深沢と樋口 1965）。

核の放射方向における形態変化は、針葉樹と広葉樹で異なる様相を示す。針葉樹放射柔細胞に含まれる核は、形成層において球状であるが、細胞の伸長に伴い棒状ないし楕円状に変化し、辺心材境界において核凝縮を伴って消失するのに対して、広葉樹放射柔細胞に含まれる核は、形成層において球状であるが、分化の進行にしたがって紡錘形に変化し、再び球状にその形態を変えた後に、辺心材境界において核凝縮を伴って消失する（Frey-Wyssling and Bosshard 1959; 深沢と樋口 1965）。また、これらの形態変化を定量的に評価するため、nuclear slenderness ratio (Frey-Wyssling and Bosshard 1959; 深沢と樋口 1965)や nuclear irregularity index (Yang 1993)などが提案されてきた。

## その他の細胞小器官における変化

核以外の細胞小器官の放射方向における変化は、スギ (*Cryptomeria japonica*) など針葉樹を中心として、主に透過電子顕微鏡 (TEM) を用いた観察により明らかにされてきた。辺材の最外層においては、ミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体、プラスチド、リボソーム、アミロプラストなどの細胞小器官が豊富に存在することが報告されている (Hirakawa et al. 1979; Nobuchi and Harada 1968, 野淵ら 1976)。ミトコンドリアやリボソームは、成長期つまり呼吸やタンパク質の生合成など生理学的活性が高い時期において豊富に観察されている。辺材の内層においては、これらの細胞小器官の数は減少する。そして、移行材において、放射柔細胞は顕著に液胞化し、細胞小器官は細胞の辺縁部に押しつけられ、核は辺材で見られたように球形ではなくなる (Nobuchi and Harada 1968)。さらに、拡大した液胞中に老廃物と考えられる好オスミウム性の物質が蓄積することや細胞質基質が好オスミウム性を示すことが報告されている (Nobuchi and Harada 1985; Nobuchi et al. 1982)。加えて、Nobuchi and Harada (1985)は、スギ移行材において、液胞が自己分解に関与するオートファゴソーム (自食胞) として働いている可能性を示唆しており、放射柔細胞の細胞死過程において液胞が重要な働きを持っていると予想されている。最終的に、心材部における放射柔細胞においては、細胞小器官や細胞質基質の残渣がみられるものの、細胞小器官や貯蔵物質であるデンプンは存在しない。これらの観察結果から、放射柔細胞の細胞死は、オートファジーを伴い、効率の良い養分の回収機構が存在すると推測される。

細胞小器官の減少がみられることから、辺材外層から移行材に向かうにしたがって、放射柔細胞の活性が低下することが予想される。この予想は、細胞の代謝活性を反映する RNA 量 (Fukazawa and Higuchi 1966) および呼吸活性を反映するミトコンドリアの還元能力 (Frey-Wyssling and Bosshard 1959) が辺材外層で急激に減少することと一致する。ただし、呼吸活性 (酸素消費量) を測定した研究によると、移行材において呼吸活性が辺材外層と比べ減少するという報告 (Goodwin and Goddard

1940; Higuchi et al.1967; Pruyn et al. 2002a,b; Pruyn et al. 2003; Pruyn et al. 2005; Spicer and Holbrook 2007) がある一方で、呼吸活性は変化しない (Bowman et al. 2005; Spicer and Holbrook 2007) もしくは増加する (Shain and Mackay 1973; Bowman et al. 2005) という報告も存在することから、放射柔細胞の代謝活性の変化に関しては未だ不明な点が多い。

### 放射柔細胞の生存率の推移

辺材を構成する柔細胞群は、組織全体をみれば形成層から辺心材境界に至るまで生きているといえるが、すべての放射柔細胞が生存しているわけではなく、放射柔細胞の中でも、早期に細胞死を迎えるものが存在する (図 1)。スギ (*Cryptomeria japonica*)、ホオノキ (*Magnolia obovata*)、トドマツ (*Abies sachalinensis*) とアメリカヤマナラシ (*Populus tremuloides*) など

において放射組織の上下端の細胞が早く細胞死を起こすこと (深沢と樋口 1965; Nakaba et al. 2006; 野淵ら 1979; Nobuchi et al. 1982; Yang 1993) やベイマツ (*Pseudotsuga menziesii*)、ヨーロッパトウヒ (*Picea abies*)、アカマツ (*Pinus densiflora*) やバンクスマツ (*Pinus banksiana*) などにおいて、放射仮道管に接する放射柔細胞が早く細胞死を起こすこと (Gartner et al. 2000; Nakaba et al. 2008a; 野淵ら 1979; Spicer and Holbrook 2007; Yang 1993) が報告されている。また、早期に細胞死を起こす放射柔細胞は、二次壁肥厚や木化のタイミングが異なること (Nakaba et al. 2006, 2008a; 山本 1982) や貯蔵物質や心材物質の蓄積量が異なること (Nakaba et al. 2006, 2008a) が報告されている。

これら放射柔細胞における早期の細胞死が辺材中のどの位置において起こるのか、また早く細胞死を迎える放射柔細胞がどの程度の割合で存在するのかは樹種により異なるといわれている。このような違いを評価する上で、Ziegler (1968) によって示された放射柔細胞の生存率という考え方は非常に有効である。野淵ら (1979) は、針葉樹 20 種の辺材における放射柔細胞の生存率の放射方向における推移を算出した結果、柔細胞の減少には、3つのパターンが存在するとした。すなわち、タイプ 1: すべての柔細胞が形成層から辺心材境界まで生存する、タイプ 2: 辺材中層から柔細胞の減少が始まる、タイプ 3: 辺材外層から柔細胞の細胞死が始まり辺心材境界まで続くというものである。Nobuchi et al. (1987) は、広葉樹 26 種の辺材における放射柔細胞の生存率を算出した結果、ほとんどの樹種において、すべての放射柔細胞が形成層から辺心材境界まで生存しており、辺心材境界よりも外側で細胞死を起こす柔細胞を持つ樹種は稀であることを報告した (ただし、この生存率の算出には、直立細胞および方形細胞を除いた平伏細胞のみを用いていることを考慮に入れる必要がある)。これらの結果は、放射柔細胞の生存率の放射方向における推移には、樹種間における多様性が存在することを示している。

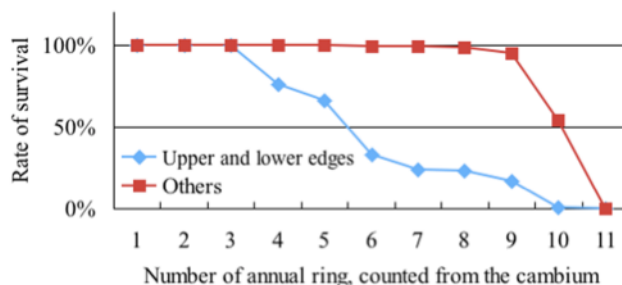


図 1: トドマツ放射柔細胞における年輪毎の生存率の推移  
トドマツ放射組織の上下端の細胞は、それ以外の細胞列の放射柔細胞に比べ、早く細胞死を起こす。

新たな視点からのアプローチ (管状要素におけるプログラム細胞死との比較)

これまで木部細胞の細胞死モデルとして、Fukuda and Komamine (1980)により開発されたヒヤクニチソウの葉肉細胞を単離し、管状要素に分化させる系における管状要素のプログラム細胞死について、多くの細胞学的、分子生物学的知見が蓄積されてきた (Fukuda 1997, 2004)。このプログラム細胞死は、時間依存性の細胞死であり、誘導開始から 72 時間後に、多くの管状要素が細胞死に至る。

管状要素とは異なり、放射柔細胞は、二次壁の肥厚および木化後の完了後も長年生存することから、放射柔細胞の細胞死発現機構は、管状要素の細胞死発現機構とは異なると考えられる。そこで、二次木部の管状要素である軸方向仮道管および放射仮道管と長年生存する放射柔細胞との細胞死出現パターンを比較した結果、これらの細胞死出現パターンは異なる特徴を持つことが明らかになった。

軸方向仮道管および放射仮道管の核は、髄側の細胞から順番に失われ、細胞死は形成層からの距離に依存して起こった (図 2: Nakaba et al. 2006, 2008a, b)。形成層からの距離は、分化開始からの時間を反映していることから、これら管状要素の細胞死は、時間依存性の細胞死であると考えられ、ヒヤクニチソウ培養系における管状要素のプログラム細胞死と類似した綿密なプログラムの存在が予想される。それに対して、放射柔細胞においては、同じ細胞列でも、必ずしも髄側から順番に細胞死を起こさず、細胞死を起こすまでの形成層からの距離は細胞ごとにばらついていた (図 3: Nakaba et al. 2006, 2008a)。ただし、完全にランダムに細胞死を起こすわけではなく、例えばトドマツにおいて、放射柔細胞の細胞死はその多くが樹皮から 10 年輪目に起こる。よって、放射柔細胞の細胞死は、管状要素における細胞死とは異なる特徴を持つといえる。この結果は、放射柔細胞の細胞死発現機構が、Fukuda (2004)により提案されてきた管状要素のプログラム細胞死の分子機構ですべて説明できるとは言えないことを示している。

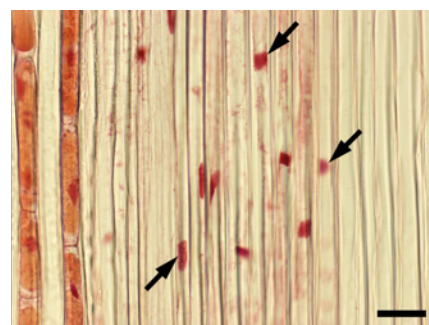


図 2: トドマツ 8 月採取 当年形成木部  
矢印: 酢酸カーミンで染色された核、Bar = 50 μm  
軸方向仮道管の細胞死は、髄側から順番に起こる。

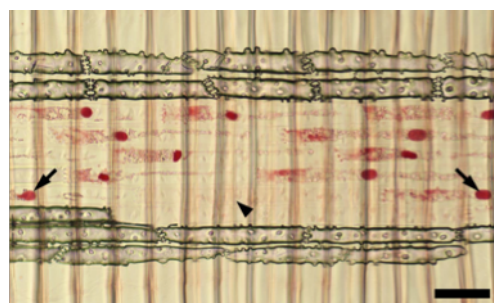


図 3: トドマツ 8 月採取 樹皮から 10 年輪目  
矢印: 酢酸カーミンで染色された核、  
矢頭: 核を失った放射柔細胞、Bar = 50 μm  
放射柔細胞の細胞死は、必ずしも髄側から順番に起こらず、細胞ごとにばらつきが存在する。

おわりに

ここまで述べてきたように、心材形成に伴う放射柔細胞の細胞死については、多くの細胞学的研究が行われてきた。その結果、辺材中において核の形態変化が起こること、その他の細胞小器官が辺材から移行材にかけて減少すること、放射柔細胞の生存率の推移には樹種間で違いが存在すること、放

射柔細胞の細胞死は、管状要素のプログラム細胞死とは異なる特徴を持つ細胞死であることが明らかにされてきた。しかしながら、その細胞死機構を明らかにするには至っておらず、未解明な点が多い。放射柔細胞の細胞死発現機構を理解する上では、細胞死過程における形態変化のみではなく、細胞死関連遺伝子の発現パターンの変化やその結果として生合成されるタンパク質の働きなど、その分子機構の解明が必須である。しかしながら、放射柔細胞における、細胞死に関わる遺伝子の発現に関する情報は非常に限られている（半ら 2010; Yang et al. 2004）。今後、分子生物学的研究と細胞学的研究を組み合わせることで、これまでに得られなかった新たな知見を導き出すことができると考える。

放射柔細胞の細胞死発現機構を明らかにすることは、いうまでもなく樹木特有の現象である心材形成機構を解明する上で重要である。さらには、長命な細胞である放射柔細胞の細胞死発現機構は、これまで管状要素など主に短命の細胞を中心に研究されてきた植物細胞の細胞死機構とは異なる機構を持つ可能性が十分あり、生物学的な側面からもその機構解明は意義深いといえる。

#### 謝辞

本発表に関わる研究を進めるにあたりご協力頂きました、東京農工大学・船田 良教授、久保隆文教授、吉田 誠特任准教授、北海道大学・藤川清三教授、佐野雄三助教に厚く御礼を申し上げます。

また、本発表に関わる研究の一部は、科学研究費補助金(課題番号: 19・9327, 20120010, 21380107)の助成を受けたものである。

#### 引用文献

- Bamber RK, Fukazawa K (1985) Sapwood and heartwood: a review. For Abstract 46: 567-580
- Bowman WP, Barbour MM, Turnbull MH, Tissue DT, Whitehead D, Griffin K (2005) Sap flow rates and sapwood density are critical factors in within- and between-tree variation in CO<sub>2</sub> efflux from stems of mature *Dacrydium cupressinum* trees. New Phytol 167: 815-828
- Catesson AM (1990) Cambial cytology and biochemistry. In: Iqbal M (ed) The vascular cambium. Research Studies Press, Taunton, pp 63-112
- Chaffey N, Barlow P (2001) The cytoskeleton facilitates a three-dimensional symplastic continuum in the long-lived ray and axial parenchyma cells of angiosperm trees. Planta 213: 811-823
- Frey-Wyssling A, Bosshard HH (1959) Cytology of the ray cells in sapwood and heartwood. Holzforschung 13: 129-137
- 深沢和三、樋口隆昌 (1965) 心材形成機構に関する研究 (第 2 報) 放射柔細胞核の消長と DNA 量について. 木材学会誌 11: 196-201
- Fukazawa K, Higuchi T (1966) Studies on the mechanism of heartwood formation. IV RNA content in the ray parenchyma cell. Mokuzai Gakkaishi 12: 221-226
- Fukuda H (1997) Tracheary element differentiation. Plant Cell 9: 1147-1156
- Fukuda H (2004) Signals that control plant vascular cell differentiation. Nature Rev Mol Cell Biol

5: 379-391

- Fukuda H, Komamine A (1980) Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol* 65: 57-60
- 船田 良 (2008) 樹木形成層活動の制御機構. *木材学会誌* 54: 1-10
- Funada R (2008) Microtubules and the control of wood formation. In: Nick P (ed) *Plant microtubules: Development and flexibility*. Springer, Heidelberg, pp 83-119
- Gartner BL, Baker DC, Spicer R (2000) Distribution and vitality of xylem rays in relation to tree leaf area in Douglas-fir. *IAWA J* 21: 389-401
- Goodwin RH, Goddard DR (1940) The oxygen consumption of isolated woody tissues. *American Journal of Botany* 27: 234-237
- 樋口隆昌、深沢和三、中島庄兵 (1964) 心材形成機構に関する研究 (第 1 報) 組織の細胞化学. *木材学会誌* 10: 235-241
- Higuchi T, Fukazawa K, Shimada M (1967) Biochemical aspects of heartwood formation. *Res Bull Exp Forest Hokkaido Univ* 25: 167-194
- Hillis WE (1987) *Heartwood and tree exudates*. Springer - Verlag, New York, pp 1 - 268
- Hirakawa Y, Ishida S, Ohtani J (1979) A SEM observation of organelles in the cambial and living xylem cells in Todomatsu (*Abies sachalinensis*). *Res Bull Exp Forest Hokkaido Univ* 36: 459-468
- Magel E (2000) Biochemistry and physiology of heartwood formation. In: Savidge R, Barnett J, Napier R (eds) *Molecular and cell biology of wood formation*, BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp 363-376
- Nakaba S, Sano Y, Kubo T, Funada R (2006) The positional distribution of cell death of ray parenchyma in a conifer, *Abies sachalinensis*. *Plant Cell Rep* 25: 1143-1148
- Nakaba S, Kubo T, Funada R (2008a) 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
- Nakaba S, Yoshimoto J, Kubo T, Funada R (2008b) Morphological changes in the cytoskeleton, nuclei, and vacuoles during cell death of short-lived ray tracheids in the conifer *Pinus densiflora*. *J Wood Sci* 54: 509-514
- 半 智史、吉田 誠、久保隆文、船田 良 (2010) ポプラ木部柔細胞における細胞死関連遺伝子の発現解析. 第 59 会日本木材学会大会 研究発表要旨集
- Nobuchi T, Harada H (1968) Electron microscopy of the cytological structure of the ray parenchyma cells associated with heartwood formation of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Mokuzai Gakkaishi* 14: 197-202
- Nobuchi T, Harada H (1985) Ultrastructural changes in parenchyma cells of sugi (*Cryptomeria*

- japonica* D. Don) associated with heartwood formation. Mokuzaï Gakkaishi 31: 965-973
- 野淵 正、神園泰比古、原田 浩 (1976) 心材化に伴う柔細胞内容物の変化過程—スギ・モミ・アカマツについて—。京都大学農学部演習林報告 48: 178-186
- 野淵 正、高原 繁、原田 浩 (1979) 針葉樹二次木部放射柔組織のエイジングに伴う細胞生存率の変化。京都大学農学部演習林報告 51: 239-246
- Nobuchi T, Tokuchi N, Harada H (1987) Variability of heartwood formation and cytological features in broad-leaved trees. Mokuzaï Gakkaishi 33: 596-604
- Nobuchi T, Kuroda K, Iwata R, Harada H (1982) Cytological study of the seasonal features of heartwood formation of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don). Mokuzaï Gakkaishi 28: 669-676
- Pruyn ML, Gartner BL, Harmon ME (2002a) Respiratory potential in sapwood of old versus young ponderosa pine trees in the Pacific Northwest. Tree Physiol 22: 105-116
- Pruyn ML, Gartner BL, Harmon ME (2002b) Within-stem variation of respiration in *Pseudotsuga menziesii* (Douglas-fir) trees. New Phytol 154: 359-372
- Pruyn ML, Harmon ME, Gartner BL (2003) Stem respiratory potential in six softwood and four hardwood tree species in the central cascades of Oregon. Oecologia 137: 10-21
- Pruyn ML, Gartner BL, Harmon ME (2005) Storage versus substrate limitation to bole respiratory potential in two coniferous tree species of contrasting sapwood width. J Exp Bot 56: 2637-2649
- Sauter JJ (2000) Photosynthate allocation to the vascular cambium: facts and problems. In: Savidge R, Barnett J, Napier R (eds) Molecular and cell biology of wood formation, BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp 71-83
- Shain L, Mackay JFG (1973) Seasonal fluctuation in respiration of aging xylem in relation to heartwood formation. Can J Bot 51: 737-741
- Spicer R, Holbrook NM (2007) Parenchyma cell respiration and survival in secondary xylem: does metabolic activity decline with cell age? Plant Cell Env 30: 934-943
- 梅澤俊明 (2003) “木質の形成” 福島和彦、船田良、杉山淳司、高部圭司、梅澤俊明、山本浩之 編集、海青社、pp. 305-307
- 山本幸一 (1982) マツ属放射柔細胞成熟の経年的・季節的経過。北海道大学農学部演習林研究報告 39: 245-296
- Yang J, Kamdem DP, Keathley DE, Han KH (2004) Seasonal changes in gene expression at the sapwood-heartwood transition zone of black locust (*Robinia pseudoacacia*) revealed by cDNA microarray analysis. Tree Physiol 24: 461-474
- Yang KC (1993) Survival rate and nuclear irregularity index of sapwood ray parenchyma cells in four tree species. Can J For Res 23: 673-679
- Ziegler H (1968) Biological aspects of heartwood formation. Holz als Roh- und Werkstoff 26: 61-68



## I-2 心材成分の堆積

名古屋大学大学院生命農学研究科

今井 貴規

## 心材成分の多様性と樹種特異性

樹木・木材の主要な化学成分は、細胞壁構成成分すなわちセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンであるが、その他に副成分として水や有機溶媒に可溶性、いわゆる抽出成分が数%含まれる。主成分が樹種間において質的・量的に似通っているのに対し、抽出成分は種特有であり、またその種類は極めて多様である(表1)。抽出成分の多くはその化学構造炭素骨格に基づき、例えば2つの芳香核(炭素数6(C<sub>6</sub>)×2)とC<sub>3</sub>-C<sub>3</sub>側鎖から構成されるリグナン(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>、C<sub>18</sub>化合物)やC<sub>17</sub>(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)化合物であるノルリグナン、またC<sub>15</sub>(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)化合物であるフラボノイドなどに分類される。

化学成分の違いに基づく植物分類(=ケモタクソノミー)において、抽出成分がその分類の基準となる化合物(=指標成分)となることが多い。マツ属植物のスチルベノイド、マメ科植物のフラボノイドなどは、植物分類と指標成分の組み合わせ例である。

表1 本講演の主要な内容となる樹種と抽出成分

樹種	成分分類	化合物
スギ	ノルリグナン	アガサレジノール、セクイリンC
	イソプレノイド	フェルギノール
ヒノキ	リグナン	ヒノキニン
	ノルリグナン	ヒノキレジノール
	イソプレノイド	ヒノキオール、ヒノキオン
ベイスギ	リグナン	プリカチン酸
アカマツ	スチルベノイド	ピノシルビン、ピノシルビンモノエチルエーテル
ニセアカシア	フラボノイド	ロビネチン、フスチン

心材成分とは、心材の抽出成分すなわち低分子(二次代謝)物質を指すことが多いが、タンニンやアラビノガラクトンのような高分子物質、さらには低分子抽出成分が二次的に変化したものも、その中に含まれる。木材の性質、例えば色調、におい、耐久性などは心材成分と関連することが多く、その調査は木材利用の観点からも重要となる。また、ある種の(心材)抽出成分は様々な生理活性、例えば抗腫瘍性、抗酸化能などを有する。さらに心材成分の生成は、辺材から心材へと変化する過程すなわち心材形成時の最も顕著な生理活動の一つとして、樹木生理学の観点からも多くの研究がなされている。

## 心材成分の樹幹木部放射方向での分布

心材分量は辺材から心材への放射方向において、移行材から心材にかけて増加し、心材の移行材に近い側で最大となり、髄に向かって減少する傾向にある(Gardner and Barton, 1960; 松隈ら, 1965; Nagasaki et al., 2001; Takaku et al., 2001; Bergstrom, 2003; Saito et al., 2008a など)。この傾向は、多くの樹種、多種多様な心材成分にあってほぼ共通であると言え、心材中心部で心材(抽出)分量が少ないことに関しては、(1)蓄

積した心材成分が年月の経過と共に高分子化や酸化など二次的に変化したため、(2)樹木が幼齢時には心材成分生合成能力が低かったため、などと解釈されているが、明確な理由は分かっていない。

心材成分の堆積・分布は、心材成分生合成関連遺伝子の発現、酵素反応による心材成分生合成経路の誘起、心材成分の生合成場から蓄積場への移動、さらに蓄積場での二次的変化、といった一連の生理活動・現象の結果と言える。

### 心材成分生合成の場所

心材成分の生合成の場(組織)に関して、古くは生理的活性の高い葉や形成層で合成されたものが転流され、放射柔細胞中を移動し心材に蓄積すると想像されたこともあったが、現在では辺材が心材へと変化する段階において心材成分生合成が起こり、移行材がその主要な場であると結論されている。その証明のため古くには、 $^{14}\text{C}$  標識グルコース(Hillis and Hasegawa, 1963)や  $^{14}\text{C}$ -シュークロース(Hasegawa and Shiroya, 1966)を用いたラジオトレーサー実験が試みられた。Hasegawa and Shiroya(1966)はソメイヨシノ形成層に  $^{14}\text{C}$ -シュークロースを投与し、放射性物質が放射柔細胞中を心材に向かって移動すること(マイクロオートラジオグラフィーによる可視化)、また移行材エーテル抽出物中のナリンゲニン(フラボノイド、サクラ心材成分の一つ)ならびにシキミ酸・キナ酸(フラボノイド生合成中間体)が放射活性となることを示した。この実験により心材成分合成の場が移行材であることが示唆され、葉ではないことが証明されたが、形成層や辺材で  $^{14}\text{C}$ -シュークロースから合成された心材成分(フラボノイド)の放射方向での移動は否定されていない。この点に関して Higuchi et al. (1969)は、薄鉄片を辺材に差し込むことにより物質の放射方向での移動を抑制して  $^{14}\text{C}$ -メバロン酸あるいは  $^{14}\text{C}$ -フェニルアラニン(スギやコナラなどの樹幹木部に投与した場合、材の各場所、特に移行材中のイソプレノイド(スギオール;メバロン酸を生合成中間物質とする)やタンニン(フェニルアラニンを生合成中間物質とする)が放射活性となること示し、移行材が心材成分生合成の場であると結論した。しかしながら、これらの2つの実験では、化合物の分離・同定がペーパークロマトグラフィーによってなされており、分析機器類が発達した現代では、分離・同定に一層の確実性が望まれるかもしれない。

Ohashi et al. (1990, 1991)および Ohashi and Imai (1990)は、伐採後放置されたスギ丸太辺材の抽出物のガスクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィー分析により、辺材中に心材成分であるアガサレジノール(ノルリグナン)とフェルギノール(イソプレノイド)が蓄積することを示した。この辺材での心材成分の蓄積は、水を与えて材の乾燥を抑制した場合等には認められなかった(Ohashi et al., 1991)。これらの実験から、ある種の条件・環境が整った場合、辺材が心材成分合成能を発揮すると結論された。しかしながら、これらの実験においては丸太放置期間中の放射柔細胞を介した、物質の心材から辺材への移動は否定されていない。

Imai and Nomura (2005)は、スギ辺材小片を高湿度下において緩やかに乾燥させた場合、小片中にアガサレジノールが生成することを、ガスクロマトグラフィー-質量(GC-MS)分析により確認した。さらに  $^2\text{H}$ -フェニルアラニンや  $^{13}\text{C}$ -ケイ皮酸を与えた辺材小片を同様に処理した場合、安定同位体標識アガサレジノールが生成し(Imai et al., 2006a,b)、したがって辺材の心材成分合成能が明確に示された。急激な乾燥条件下ではこの生成は認められず、緩やかな乾燥=緩やかな細胞死が生成の「条件・環境」の一つであると考察された。

### 樹幹木部、特に移行材の生理的活性

「心材成分生合成に関わる組織の生理的活性は高いか？」について古くから検証がなされている。心材成分生合成(酵素反応)の誘起といった観点から樹幹木部の窒素量が測定され、移行材において特には増大しない(近藤, 1964; Higuchi et al., 1967a,b; Holl and Lenzian, 1973; Nelson, 1978; Ebermann and Stich, 1985; Magel et al., 1991)と報告される一方、増大する(Ziegler, 1968)とも報告されている。他にも、代謝に必要なエネルギーの獲得といった観点から樹幹木部の呼吸量が測定され、移行材において特には上昇しない(Higuchi et al., 1967a,b,c)と報告される一方、上昇する(Holl and Lenzian, 1973; Shain and Mackay, 1973)とも報告されている。興味深い実験として、ハゼノキにおいて呼吸系一次代謝を薬品処理により阻害するとその辺材中にフラボノイド生成が誘導されること(Hillis and Inoue, 1966)、ならびに化学構造の異なった位置が<sup>14</sup>C 標識されたグルコースを与えて発生する CO<sub>2</sub> の放射活性が一次代謝(呼吸)あるいは二次代謝(心材成分合成)のどちらにより消費されたかの判断指標となり、これに基づいてスギ、ヒノキ、ホオノキにおいて呼吸が形成層から移行材にかけて徐々に減少すること(Higuchi et al., 1967a,b)が報告されている。これらの結果から、心材成分生合成に関わる移行材の生理的状态に関して、呼吸は少ないものの二次代謝(心材成分生合成)が優勢となるように代謝が変動していると解釈されている。

### 樹幹木部、特に移行材の酵素活性

心材成分生合成(酵素反応)の誘起といった観点から、関連酵素活性の測定が試みられた。Higuchi and Fukazawa (1966)はスギ、ヒノキなどの移行材において PAL(フェニルアラニンアンモニアリアーゼ)活性は増大しないこと、Hillis and Ishikura (1970)はユーカリ移行材において PAL 活性は増大しないこと、Nelson (1978)はサクラ移行材においてペルオキシダーゼ活性は増大しないこと、を報告している。一方、松隈ら(1965)はスギ移行材においてフェノールオキシダーゼ活性が増大すること、Ebermann and Stich (1985)はオーク移行材においてペルオキシダーゼ活性が増大すること、を報告している。Magel et al.は一連の実験により、ニセアカシア移行材においてペントースリン酸経路(二次代謝の上流に位置する)関連酵素(グルコース-6-リン酸脱水素酵素、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素)の活性(Magel et al., 2001)、PAL 活性(Magel et al., 1991)およびカルコンシンターゼ活性(フラボノイド骨格形成酵素)(Magel et al., 1991)が増大することを報告している。このように、同一樹種や同一酵素が検討対象とされた場合でも、一致した結果が得られていないことがある。

樹幹木部では、細胞は強固な細胞壁に囲まれ、さらに細胞のほとんどは死滅し生活細胞は僅かであり、このような組織を酵素活性測定等の生化学実験の材料とすることは極めて不利である。加えて、過去の報告では試料の量や粉碎方法の記載が不明瞭であったり、酵素反応生成物の検出・定量(ペーパークロマトグラフィー呈色、吸光度測定、酸化に消費された酸素量測定、溶媒分画と放射活性測定)に関して、分析機器類が発達した現代では、一層の確実性が望まれるかもしれない。

Imai et al. (2005a)はスギ新鮮二次木部を凍結状態で粉碎し、得られる木粉(凍結木粉)を用いてタンパク質の抽出・硫酸沈殿、Bradford 法による定量、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動による分離、が可能であることを示した。また、<sup>2</sup>H-フェニルアラニンを基質としてスギ木部由来タンパク質抽出液を用いた酵素反応の結果、<sup>2</sup>H-ケイヒ皮酸の生成が GC-MS により確認された。特に、辺材、心材の場合と比較して移行材における PAL 活性が高いこと(<sup>2</sup>H-ケイヒ皮酸生成量が多い)が示された(Imai et al., 2005a)。さらに Imai et al. (2009)は、移行材



に酸化生成物の構造決定が試みられた(菱山と加藤, 2006)。

スギ心材色の決定要因として環境因子と遺伝因子が指摘されてきたが、最近では心材色のクローン間差が見出されている。ごく最近、スギ主要心材ノルリグナンであるアガサレジノールとセクイリン C の含有量ならびに組成[セクイリン C/(アガサレジノール+セクイリン C)]におけるクローン間差・品種間差が報告された(尾頭ら, 2009a,b)。心材ノルリグナン、特にセクイリン C がスギ心材黒色化と関連があるとされているので(高橋, 1996, 1998; Ishiguri et al., 2003; Takahashi and Mori, 2006)、心材色とセクイリン C 量等との関係が調査された(尾頭ら, 2010)。その結果、これらの間には相関は認められず、すなわちセクイリン C 量が多いクローンの心材色が暗くなるといった傾向や、セクイリン C 割合が高いクローンあるいはノルリグナン量が多いクローンの心材色が暗くなるといった傾向は見出されなかった。これらの結果は、量的・質的にノルリグナンが同等であっても心材色は多様である、言い換えれば心材色が同等であってもノルリグナンは量的・質的に多様であることを示している。したがって、スギ心材ノルリグナンの心材色への関与様式として、Higuchi et al. (1967a,c)が提唱するような単純な非酵素的自動酸化のみではなく、(心材)酵素による酸化もまた考慮する必要があると思われる。

### 心材成分の組織学的検討

組織中における心材成分を観察するために、様々な染色試薬が使用されてきた(表 2)。心材成分の生合成・移動・蓄積に関して、心材成分は放射柔細胞で生合成され、半縁壁孔を通じて近傍仮道管等に移動し、次いで仮道管等の細胞壁内腔側に沈着し、内腔側から細胞壁に浸透する、といった説が提唱されている。しかしながら、一般的な化学染色によって真に心材成分が観察されている確実な証拠はない。Nagasaki et al. (2001, 2002)は、心材成分アガサレジノールのスギ組織内分布を免疫顕微鏡法によって可視化し、前述の説を組織化学的に支持した。特に、好免疫染色性物質は辺材から心材への放射方向において、辺材放射柔細胞中には存在せず、移行材ならびに心材の放射柔細胞中に存在し、したがって移行材放射柔細胞がアガサレジノールの生合成場であることが組織化学的に示された。

表 2 本講演の主要な内容となる一般化学染色剤等と樹種

引用文献	試料樹種	染色剤・検出方法
Wardrop and Cronshaw (1962)	ユーカリ	KMnO <sub>4</sub>
Fengel (1970)	マツ	OsO <sub>4</sub>
Preusser et al. (1961)	ブナ	
Parameswaran and Bauch (1975)	トウヒ	OsO <sub>4</sub> , 顕微分光法
Nobuchi et al. (1982,1983,1985)	スギ	SudanIV, Nile blue, OsO <sub>4</sub>
Streit and Fengel (1994)	<i>Schinopsis balansae</i>	クエン酸鉛
Dehon et al. (2001)	クロクルミ	バニリン-塩酸
Zhang et al. (2004,2009)	<i>Acacia mangium</i> , ネムノキ	硫酸鉄
Koch et al. (2006), 宮本ら (1989)	<i>Azelia</i> spp., <i>Intsia</i> spp., スギ	顕微分光法

最近、飛行時間型二次イオン質量分析(ToF-SIMS)法が心材成分組織内分布の調査に適用された(Imai et al., 2005b; Kuroda et al., 2008; Saito et al., 2008a,b)。スギ心材から特徴的に発生する二次イオンの起源が心材成分フェルギノールと同定され(Imai et al., 2005b)、本イオン像はフェルギノール分布を示すことになる。ToF-SIMS 像解析結果、フェルギノールが心材仮道管や放射・軸方向柔細胞に均一に存在することが示され、この分布がアガサレジノール分布とは異なることから、柔細胞種類による心材成分合成能の違いが示唆された。

軸方向柔細胞と放射柔細胞の機能の違いは、スギを試料として透過型電子顕微鏡法(Nobuchi and Harada, 1985)や顕微分光法(Kuroda and Shimaji, 1983)によっても提唱されている。また移行材および心材の一年輪内では、フェルギノールは早材によく存在し晩材ではその量は少ないことが見出された(今井ら, 2005)。移行材および心材において、晩材での高い水分保持が報告されており(Kuroda et al., 2009)、水分減少・組織乾燥と心材成分生合成との関連が指摘された(今井ら, 2005; Kuroda et al., 2008)。

前述の“放射柔細胞での生合成→壁孔を通じた近傍仮道管等への移動→仮道管等細胞壁への内腔側からの浸透”といった心材成分堆積過程の説に対して、別の堆積様式も提唱されている(Preusser et al., 1961; Streit and Fengel, 1994; Zhang et al., 2004, 2009)。ブナ、*Schinopsis balansae*、*Acacia mangium*、ネムノキにおいて、放射柔細胞で生合成された心材成分は盲壁孔を通じて細胞間隙に移動し、次いで細胞間層へと浸透し、細胞間層側から細胞壁に浸透する。さらに細胞間隙三次元ネットワーク(見尾と松本, 1981)を介した、組織広範囲への拡散・移動も提唱されている(Zhang et al., 2004, 2009)。

### 心材成分生合成の組織化学

上述のように心材成分の存在場所・分布が顕微鏡観察されたが、生合成の場所が観察されたわけではない。生合成場・生合成状況の観察のためには、代謝が起こっている様子そのもの、あるいは生合成関連酵素や遺伝子を組織学的に検討する必要がある。山本(1982)はアカマツ等の移行材に<sup>3</sup>H-フェニルアラニンを投与し、放射活性が放射柔細胞に取り込まれることをマイクロラジオグラフィーによって可視化した。本実験により、放射柔細胞がフェニルプロパノイド系心材成分(おそらくスチルベン)の生合成場であることが示された。Dehon et al. (2001, 2002)は、クロクルミ移行材切片を過酸化水素の存在下に 3,3'-ジアミノベンジジンやグアイアコール(基質)と接触させることにより、*in situ* ペルオキシダーゼ活性染色を試みた。その結果、放射柔細胞の好染色性からペルオキシダーゼの組織内局在が示され、放射柔細胞が心材フェノール性物質の酵素酸化の場であることが示唆された。最近、リグナン生合成に関与する mRNA ならび 18s rRNA の植物組織における *in situ* hybridization が試みられた(Kwon et al., 2001; Kasahara et al., 2006; Patten et al., 2008)。その結果、ベイスギやテーダマツなどの辺材放射柔細胞におけるリグナン生合成関連遺伝子発現が確認され、放射柔細胞がその生合成場であることが示された。しかしながら、上記 RNA の移行材中での hybridization は達成されていないようである。

### 心材形成の季節性

「心材形成は、形成層活動が止まっている時期に起こっている」と言われることが多い。この説は実験に基づくものではあるが(Shain and Hillis, 1973; Nelson, 1978; Nobuchi et al., 1982; 山本, 1982; Ebermann and Stich, 1985; Magel et al., 1991, 2001 など)、真実は分かってはいない。前述のような、移行材の生理的活性や酵素活性測定において結果が一致しない場合、特に移行材での呼吸量が少ないあるいは酵素活性が低い・検出されない場合、試料の採取時期の違い、特に春～夏に試料採取されたためなどと簡単に解釈されていることが多い。しかしながら、ラジアータマツ移行材において呼吸量が1年を通して辺材より多い傾向にあること(Shain and Mackay, 1973)、アカマツおよびバンクスマツ移行材においてペルオキシダーゼ活性が春～夏期に高いこと(山本, 1982)、が報告されている。Imai et al.の定同位体標識基質ならびに GC-MS を用いた、PAL

(2005a)ならびにアガサレジノールヒドロキシラーゼ(2009)活性測定では、酵素活性の季節変動は調査されていないが、春期(5月)採取スギ移行材における両酵素の高い活性が確認されている。ごく最近、カラマツ精英樹クローンを用いて、樹幹木部水分量、放射柔細胞核・デンプン粒の季節(1、4、7、10月)変動が調査されたが、心材形成の明確な季節性は示されなかった(中田, 2010)。心材形成の季節性は、次に述べる心材形成の分子生物学においては、重要な検討項目となっている。

### 心材形成(心材成分生合成)の分子生物学

近年、心材形成機構の解明に向けて、分子生物学的手法により、樹幹木部部位特異的に発現している遺伝子の機能解析や発現量の季節による差異が調査されつつある(Beritognolo et al., 2002; Magel et al., 2002; Yang et al., 2003, 2004; Yoshida et al., 2007; Huang et al., 2010; 吉田, 2010)。心材成分生合成遺伝子調査に関しては、他植物由来既知塩基配列をプローブとするクロクルミフラボノイド生合成関連酵素遺伝子のRNA ドットプロットおよび RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 発現解析が試みられ、これら酵素遺伝子発現が全般に夏～秋期に盛んであり、特に移行材において強いことが報告されている(Beritognolo et al., 2002)。ニセアカシア樹皮・形成層・辺材・移行材由来 cDNA を用いた一連のマイクロアレイ発現解析により、1873 移行材遺伝子のうち 15.6% のものが夏期(7月)に強く発現し 14.7% が冬期(11月)に強く発現すること、1873 遺伝子のうち 31 遺伝子が「二次代謝関連カテゴリー」に分類され、その半分以上 16 遺伝子(主にフラボノイド生合成関連酵素遺伝子)は夏期に強く発現し、冬期に発現が強くなるものは僅か 1 つであることが示されている(Yang et al., 2003, 2004)。最近では、アスペン cDNA マイクロアレイを用いたクロクルミ樹幹木部遺伝子の発現解析により、移行材において冬期に発現が強くなる遺伝子の数は夏期に強くなる数より少なく、また通年で発現している遺伝子数が最も多いことが示された(Huang et al., 2010)。以上のことから、心材形成の季節性に関しては一層の調査が望まれる。

現在のところ、上述の分子生物学的知見を総合した、心材形成機構・過程に関する統一的な解釈はなされていない。この“過程”を理解するためには、ある種の“時間軸”が必要となる。その一つとして季節が挙げられるが、上述のように心材形成の季節性に関しては検討の余地が残されている上に、季節毎に個体を違えての試料採取となるであろうから、“軸の連続性”が確保され難い。この点に関して演者らは、移行材が年輪等により分画された場合、その辺材側から心材側へと向かう変化が心材化の進行を表し、この樹幹放射方向での変化を心材形成に伴う変化と見なすことができるであろうと考えた。さらに心材形成の際、多種多様な変化が伴うことは間違いなく、この複雑な過程を理解するためには、これをある種の指標に基づいていくつかの段階に分け、各段階での変化を網羅的に調査し、全段階での変化を積算した結果を解釈することが有効なアプローチであると考えた。これまでに、スギ移行材においてノルリグナンの組成が変遷すること(辺材側:ノルリグナンはほとんど含まれない、中央部:アガサレジノールのみが含まれる、心材側:アガサレジノールとセクイリン C 両方が含まれる)が見出されていた(図 2、Imai et al., 2005a, 2009)ので、ノルリグナンの組成に基づいてスギ移行材を 3 部位に分画した。これら各部位に特異的に発現している遺伝子を、ディファレンシャルディスプレイ法によって特定し、その機能を解析した結果、移行材辺材側(心材形成初期)において発現していると思われるいくつかの遺伝子が乾燥等ストレスへの適応に関与するものであることが分かった(浅井ら, 2009, 中根ら, 2010)。今後、部位特異的発現遺伝子機能の網羅的解析により心材形成の進行に伴う生理現象が明らかにされ、分子生物学的見地から心材形成機構・過程に関する説が提唱できることを、演者らは望んでいる。

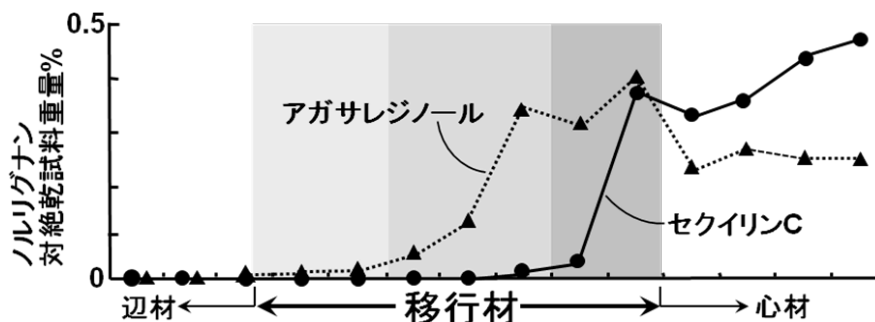


図2 スギ移行材におけるノリグナン量・組成の変化 Imai et al. (2005a)

### 引用文献

- 浅井賢介, 中根麻衣, 山下彩織, 吉田正人, 松下泰幸, 福島和彦, 今井貴規 (2009) スギ移行材で発現している遺伝子の調査 1. 第 59 回日本木材学会大会研究発表要旨集 **CD**
- Bergstrom B (2003) Chemical and structural changes during heartwood formation in *Pinus sylvestris*. *Forestry* **76**, 46-53
- Beritognolo I, Magel E, Abdel-Latif A, Charpentier J-P, Jay-Allemand C, Breton C (2002) Expression of genes encoding chalcone synthase, flavanone 3-hydroxylase and dihydroflavonol 4-reductase correlates with flavanol accumulation during heartwood formation in *Juglans nigra*. *Tree Physiol* **22**, 291-300
- 尾頭信昌, 中田了五, 武津英太郎, 福島和彦, 松下泰幸, 今井貴規 (2009a) 福島県産および高知県産 スギクローン間におけるノリグナン組成変異の探索. 第 59 回日本木材学会大会研究発表要旨集 **CD**
- 尾頭信昌, 福島和彦, 松下泰幸, 今井貴規 (2009b) スギ精英樹および在来種 35 品種のノリグナン組成について. 第 59 回日本木材学会大会研究発表要旨集 **CD**
- 尾頭信昌, 中田了五, 武津英太郎, 福島和彦, 松下泰幸, 今井貴規 (2010) スギの心材色に及ぼすノリグナン含有量・組成の影響の調査. 第 60 回日本木材学会大会研究発表要旨集 **CD**
- Dehon L, Macheix JJ, Durand M (2002) Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*. *J Exp Bot* **53**, 303-311
- Dehon L, Mondolot L, Durand M, Chalies C, Andary C, Macheix JJ (2001) Differential compartmentation of *o*-diphenols and peroxidase activity in the inner sapwood of the *Juglans nigra* tree. *Plant Physiol Biochem* **39**, 473-477
- Ebermann R, Stich K (1985) Distribution and seasonal variation of wood peroxidase activity in oak (*Quercus robur*). *Wood Fiber Sci* **17**, 391-396
- Gardner JAF, Barton GM (1960) The distribution of dihydroquercetin in Douglas-fir and western larch. *For Prod J* **10**, 171-173
- Fengel D (1970) Ultrastructural changes during aging of wood cells. *Wood Sci Technol* **4**, 176-188
- Hasegawa M, Shiroya M (1966) Translation and transformation of sucrose in the wood of *Prunus yedoensis*. *Bot Mag Tokyo* **79**, 595-601



- Higuchi T, Fukazawa K (1966) Study on the mechanism of heartwood formation III. On the role of phenylalanine deaminase. *Mokuzai Gakkaishi* **12**, 135-139
- Higuchi T, Fukazawa K, Shimada M (1967a) Biochemical studies on the heartwood formation. *Res Bull Coll Exp For* **22**, 167-193
- Higuchi T, Onda Y, Fujimoto Y (1969) Biochemical aspects of heartwood formation with special reference to the site of biogenesis of heartwood compounds. *Wood Res* **48**, 15-30
- Higuchi T, Shimada M, Watanabe K (1967b) Studies on the mechanism of heartwood formation V. Change in the pattern of glucose metabolism in heartwood formation. *Mokuzai Gakkaishi* **13**, 269-273
- Higuchi T, Shimada M, Watanabe K (1967c) Studies on the mechanism of heartwood formation VI. On the artificial heartwood of *Cryptomeria japonica* and *Pinus densiflora*. *Mokuzai Gakkaishi* **13**, 274-279
- Hillis WE, Hasegawa M (1963) The formation of polyphenols in trees I. Administration of <sup>14</sup>C glucose and subsequent distribution of radioactivity. *Phytochemistry* **2**, 195-199
- Hillis WE, Inoue T (1966) The formation of polyphenol in trees III. The effect of enzyme inhibitors. *Phytochemistry* **5**, 483-490
- Hillis WE, Ishikura N (1971) The biosynthesis of polyphenols in tissues with low phenylalanine ammonia lyase activity. *Phytochemistry* **9**, 1517-1528
- 菱山正二郎, 加藤 厚 (2006) スギ心材ノルリグナン類の脱水素重合. 第 56 回日本木材学会大会研究発表要旨集 CD
- Holl W, Lenzian K (1973) Respiration in the sapwood and heartwood of *Robinia pseudoacacia*. *Phytochemistry* **12**, 975-977
- Huang Z, Tsai C-J, Harding SA, Melian R, Woeste K (2010) A cross-species transcriptional profile analysis of heartwood formation in black walnut. *Plant Mol Biol Rep* **28**, 222-230
- Imai T, Asai K, Takino M, Fukushima K (2009) *In vitro* hydroxylation of a norlignan: from agatharesinol to sequirin C and metasequirin C with a microsomal preparation from *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry Letters* **2**, 196-200
- Imai T, Ito E, Fukushima K (2005a) Biochemical studies of matured xylem of *Cryptomeria japonica*: Attempts to detect the enzymes involved in the biosyntheses of the heartwood extractives. *Nagoya University Forest Science* **24**, 1-6
- Imai T, Nomura M (2005) Induction of the biosynthesis of agatharesinol, a norlignan, in sapwood sticks of *Cryptomeria japonica* under humidity-regulated circumstances. *J Wood Sci* **54**, 537-541
- Imai T, Nomura M, Matsushita Y, Fukushima K (2006a) Evidence for involvement of the phenylpropanoid pathway in the biosynthesis of the norlignan agatharesinol. *J Plant Physiol* **163**, 483-487
- Imai T, Nomura M, Matsushita Y, Fukushima K (2006b) Hinokiresinol is not a precursor of agatharesinol in the norlignan biosynthetic pathway in Japanese cedar. *J Plant Physiol* **163**, 1221-1228
- Imai T, Tanabe K, Kato T, Fukushima K (2005b) Localization of ferruginol, a diterpene phenol, in *Cryptomeria japonica* heartwood by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Planta* **221**, 549-556
- 今井貴規, 田辺絹子, 串 正祥, 加藤俊之, 福島和彦 (2005) TOF-SIMS 法によるスギ心材抽出成分の組

織内分布の可視化 3. 一年輪におけるフェルギノール量の変化. 第55回日本木材学会大会研究発表要旨集 p. 49

- Ishiguri F, Maruyama S, Takahashi K, Abe Z, Yokota S, Andoh M, Yoshizawa N (2003) Extractives relating to heartwood color changes in sugi (*Cryptomeria japonica*) by a combination of smoke-heating and UV radiation exposure. *J Wood Sci* **49**, 135-139
- Kai Y, Kuroda H, Teratani F (1972) On the phenolic constituents from *Cryptomeria japonica* D. DON. VI. Hydroxysugiresinol and coloration of heartwood. *Mokuzai Gakkaishi* **18**, 315-321
- 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
- Kasahara H, Jiao Y, Bedgar DL, Kim S-J, Patten AM, Xia Z-Q, Davin LB, Lewis NG (2006) *Pinus taeda* phenylpropanal double-bond reductase: Purification, cDNA cloning, heterologous expression in *Escherichia coli* and subcellular localization in *P. taeda*. *Phytochemistry* **67**, 1765-1780
- 近藤民雄 (1964) 木材酵素について. *木材学会誌* **10**, 43-48
- Kuroda K, Imai T, Saito K, Fukushima K (2008) Application of ToF-SIMS to the study on heartwood formation in *Cryptomeria japonica* trees. *Applied Surface Science* **255**, 1143-1147
- Kuroda K, Yamashita K, Fujiwara T (2009) Cellular level observation of water loss and the refilling of tracheids in the xylem of *Cryptomeria japonica* during heartwood formation. *Trees* **23**, 1163-1172
- Kuroda H, Shimaji K (1983) Distribution of coloring substances in Sugi heartwood. *Holzforschung* **37**, 225-230
- Kwon M, Davin LB, Lewis NG. (2001) In situ hybridization and immunolocalization of lignan reductases in woody tissues: implications for heartwood formation and other forms of vascular tissue preservation. *Phytochemistry* **57**, 899-914
- Magel EA, Drouet A, Claudot AC, Ziegler H (1991) Formation of heartwood substances in the stem of *Robinia pseudoacacia* L. I. Distribution of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase across the trunk. *Trees* **5**, 203-207
- Magel EA, Hillinger C, Wagner T, Holl W (2001) Oxidative pentose phosphate pathway and pyridine nucleotides in relation to heartwood formation in *Robinia pseudoacacia* L. *Phytochemistry* **57**, 1060-1068
- Magel E, Hauch S, Filippis LD (2002) Random amplification of polymorphic DNA and reverse transcription polymerase chain reaction of RNA in studies of sapwood and heartwood. In *Wood Formation in Trees - Cell and Molecular biology techniques*, Chaffey N ed Taylor & Francis pp 319-337
- 松隈紀二郎, 河野 大, 近藤民雄 (1965) スギ移行材(白線帯)の研究 ある種の生理的活性について. *木材学会誌* **11**, 227-231
- 見尾貞治, 松本昂 (1981) 広葉樹材の軸方向柔組織の細胞間げきについて *木材学会誌* **27**, 626-632
- 宮本卓郎, 藤田 稔, 佐伯 浩 (1989) 顕微分光測光法によるスギ心材形成過程の観察. *京都大学農学部演習林報告* **61**, 285-291
- Nagasaki T, Yasuda S, Imai T (2001) Preparation of antibody against agatharesinol, a norlignan, using a hapten-carrier conjugate. *Phytochemistry* **58**, 833-840

- Nagasaki T, Yasuda S, Imai T (2002) Immunohistochemical localization of agatharesinol, a heartwood norlignan, in *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* **60**, 461-466
- 中田了五, 武津英太郎 (2010) カラマツの心材形成の季節性. 第 60 回日本木材学会大会研究発表要旨集 **CD**
- 中根麻衣, 中野里美, 山下彩織, 吉田正人, 今井貴規 (2010) スギ移行材で発現している遺伝子の調査 2. 第 60 回日本木材学会大会研究発表要旨集 **CD**
- Nelson ND (1978) Xylem ethylene, phenol-oxidizing enzymes, and nitrogen and heartwood formation in walnut and cherry. *Can J Bot* **56**, 626-634
- Nobuchi T, Kuroda K, Iwata R, Harada H (1982) Cytological study of the seasonal features of heartwood formation of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Mokuzai Gakkaishi* **28**, 669-676 (1982)
- Nobuchi T, Harada H (1983) Physiological features of the “white zone” of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) – Cytological structure and moisture content. *Mokuzai Gakkaishi* **29**, 824-832
- Nobuchi, T, Harada H (1985) Ultrastructural changes in parenchyma cells of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) associated with heartwood formation. *Mokuzai Gakkaishi* **31**, 965-973
- Ogiyama K, Yasue M, Takahashi K (1983) Chemosystematic study on heartwood extractives of *Cryptomeria japonica* D. Don. *Proc Int Symp Wood Pulp Chem* **1**, 101-106
- Ohashi H, Imai T, Yoshida K, Yasue M (1990) Characterization of physiological functions of sapwood; Fluctuation of extractives in the withering process of Japanese cedar sapwood. *Holzforchung* **44**, 79-86
- Ohashi H, Imai T (1990) Characterization of physiological functions of sapwood; Synthesis and accumulation of heartwood extractives in the withering process of immature Japanese cedar trunk. *Holzforchung* **44**, 317-323
- Ohashi H, Kato N, Imai T, Kawai S (1991) Characterization of physiological functions of sapwood; Fluctuation of heartwood extractives in the withering process of Japanese cedar sapwood fed an inhibitor of phenylalanine ammonia-lyase. *Holzforchung* **45**, 245-252
- Parameswaran N, Bauch J (1975) On the origin of phenolic compounds in the wood rays of *Abies alba*. *Wood Sci Technol* **9**, 165-173
- Patten AM, Davin LB, Lewis NG (2008) Relationship of dirigent protein and 18s RNA transcript localization to heartwood formation in western red cedar. *Phytochemistry* **69**, 3032-3037
- Preusser VH-J, Dietrichs HH, Gottwald H (1961) Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ultradunnschnitten des Markstrahlparenchyms der Rotbuche – *Fagus sylvatica* L.. *Holzforchung* **15**, 65-75
- Saito K, Mitsutani T, Imai T, Matsushita Y, Fukushima K (2008a) Discriminating the indistinguishable sapwood from heartwood in discolored ancient wood by direct molecular mapping of specific extractives using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal Chem* **80**, 1552-1557
- Saito K, Mitsutani T, Imai T, Matsushita Y, Yamamoto A, Fukushima K (2008b) Chemical differences between sapwood and heartwood of *Chamaecyparis obtusa* detected by ToF-SIMS. *Appl Sur Sci* **255**, 1088-1091
- Shain L, Hillis WE (1973) Ethylene production in xylem of *Pinus radiata* in relation to heartwood formation. *Can J Bot* **51**, 1331-1335

13 & 14 September, 2010 at Nagoya University

- Shain L, Mackay JFG (1973) Seasonal fluctuation in respiration of aging xylem in relation to heartwood formation in *Pinus radiata*. *Can J Bot* **54**, 737-736
- Stich VK, Ebermann R (1984) Peroxidase- und Polyphenoloxidaseisoenzyme im Splint- und Kernholz der Eiche. *Holzforschung* **38**, 239-242
- Streit W, Fengel D (1994) Heartwood formation in Quebracho colorado (*Schinopsis balansae* Engl.): Tannin distribution and penetration of extractives into the cell walls. *Holzforschung* **48**, 361-367
- Takaku N, Choi D-H, Mikame K, Okunishi T, Suzuki S, Ohashi H, Umezawa T, Shimada M (2001) Lignans of *Chamaecyparis obtusa*. *J Wood Sci*, **47**, 476-782
- 高橋光悦 (1996) スギ心材の黒色化現象とノルリグナン類(第1報) 部分黒色化心材について. *木材学会誌* **42**, 998-1005
- 高橋光悦 (1998) スギ心材の黒色化現象とノルリグナン類(第2報) 部分黒色化心材について. *木材学会誌* **44**, 125-133
- Takahashi K, Mori K (2006) Relationships between blackening phenomenon and norlignans of sugi (*Cryptomeria japonica*) heartwood III: coloration of norlignans with alkaline treatment. *J Wood Sci* **52**, 134-139
- Wardrop AB, Cronshaw J (1962) Formation of phenolic substances in the ray parenchyma of angiosperms. *Nature* **193**, 90-92
- 山本幸一 (1982) マツ属放射柔細胞成熟の経年的・季節的経過. *北海道大学農学部演習林研究報告* **39**, 245-296
- Yang J, Park S, Kamdem DP, Keathley DE, Retzel E, Paul C, Kapur V, Han K-H (2003) Novel gene expression profiles define the metabolic and physiological processes characteristic of wood and its extractive formation in a hardwood tree species, *Robinia pseudoacacia*. *Plant Mol Biol* **52**, 935-956
- Yang J, Kamdem DP, Keathley DE Han K-H (2004) Seasonal changes in gene expression at the sapwood –heartwood transition zone of black locust (*Robinia pseudoacacia*) revealed by cDNA microarray analysis. *Tree Physiol* **24**, 461-474
- Yoshida K, Nishiguchi M, Futamura N, Nanjo T (2007) Expressed sequence tags from *Cryptomeria japonica* sapwood during the drying process. *Tree Physiol* **27**, 1-9
- 吉田和正 (2010) 心材形成機構の解明に向けて –遺伝子解析からのアプローチ-. 第121回日本森林学会大会研究発表要旨集 p. 232
- Zhang C, Abe H, Sano Y, Fujiwara T, Fujita M, Takabe K (2009) Diffusion pathways for heartwood substances in *Acacia mangium*. *IWA J* **30**, 37-48
- Zhang C, Fujita M, Takabe K (2004) Extracellular diffusion pathway for heartwood substances in *Albizia julibrissin* Durazz. *Holzforschung* **58**, 485-500
- Ziegler H (1968) Biologische aspekte der kernholzbildung. *Holz als Roh- und Werkstoff*, **26**, 61-68

## I-3 水分状態の変化

九州大学大学院農学研究院

松村 順司

### はじめに

水を必要としない生物が存在しないように、樹木にとっても水は欠かせない。この意味で考えれば、木部の場合、辺材に水があれば済む話である。辺材は根で吸収した水を葉まで運ぶための移動経路であり、樹木が生き続けるために欠かすことができない役割を担っている。その辺材もやがては心材化の準備段階である移行材となり、水のある程度消失することになる。我々の身近なスギを例にとると、移行材は周りに比べて含水率が低いので、伐採直後は白い帯状となる。これは“白線帯”と呼ばれ、例外なくこの領域の含有水分は少ない。移行材を経て心材物質が生成されると一般に着色され、この領域を普通の人は心材と呼んでいる。この一連の変化は、木部細胞の最後の生き残りである柔細胞たちが、最後のミッション“耐久性の付与”を果たし、死んでいくドラマである。

筆者はかねてから、耐久性の付与が目的であれば心材で水が増える必要はないのでは？と考えている。実際、低含水率の心材の方が多く、理にかなっているが、中には含水率が再び上昇する心材もある。一般に、多湿心材、水喰い材、wetwood、高含水率心材などと言われるものである。どの用語が良いかはさておき、本講演では理解しやすい水が少なくなる話ではなく、水が増える話に焦点をあて、「なぜ心材の含水率が高くなるか？」を議論していただくための話題提供として、スギを例に話を進めたい。

### 辺材から心材への生材含水率の変動

「黒心材の生材含水率は高い！」。これは現象として古くから知られており、木材学に関わる人のほとんどは知っている事実である。しかし、「なぜ？」に対する答えは未だにわかっていない。

図に、低含水率心材を有する典型的な赤心（左図）と高含水率心材を有する典型的な黒心（右図）の生材含水率の推移を示す。両者とも辺材から白線帯へ至る生材含水率の変化に大差はない。すなわち、辺材では 200%を超える含水率であり、白線帯付近で急激に低下する。一方、心材では生材含水率の変動は大きく、放射方向変動として 3～5 パターン、樹高方向変動として 3～7 パターンあると言われている。研究目的によって変動パターンは細分化されるが、大局的に見れば 3 パターン、すなわち、白線帯で下がった含水率から大きく変化しないもの、明らかに含水率が増えるもの、どちらも言い難いものである。詳細な水分分布については、中田らの一連の研究（例えば、JWS 49 107-115, 2003）を参考にされたい。図は、低含水率心材と高含水率心材の典型例である。

赤心と黒心では、外観、心材物質の質・量、生材含水率が異なるだけでなく、灰分量に差がある。中でもカリウムの分布特性・量の違いは興味深い点である。また、心材の pH が違う。これらの間に相関関係があることは明らかであるが、因果関係は？という問いには完全に答えられていない。果たして生材含水率の増加が何の役割を果たしているのか？それとも無関係なのか？その辺のことを考える機会を提供できればと考えている。

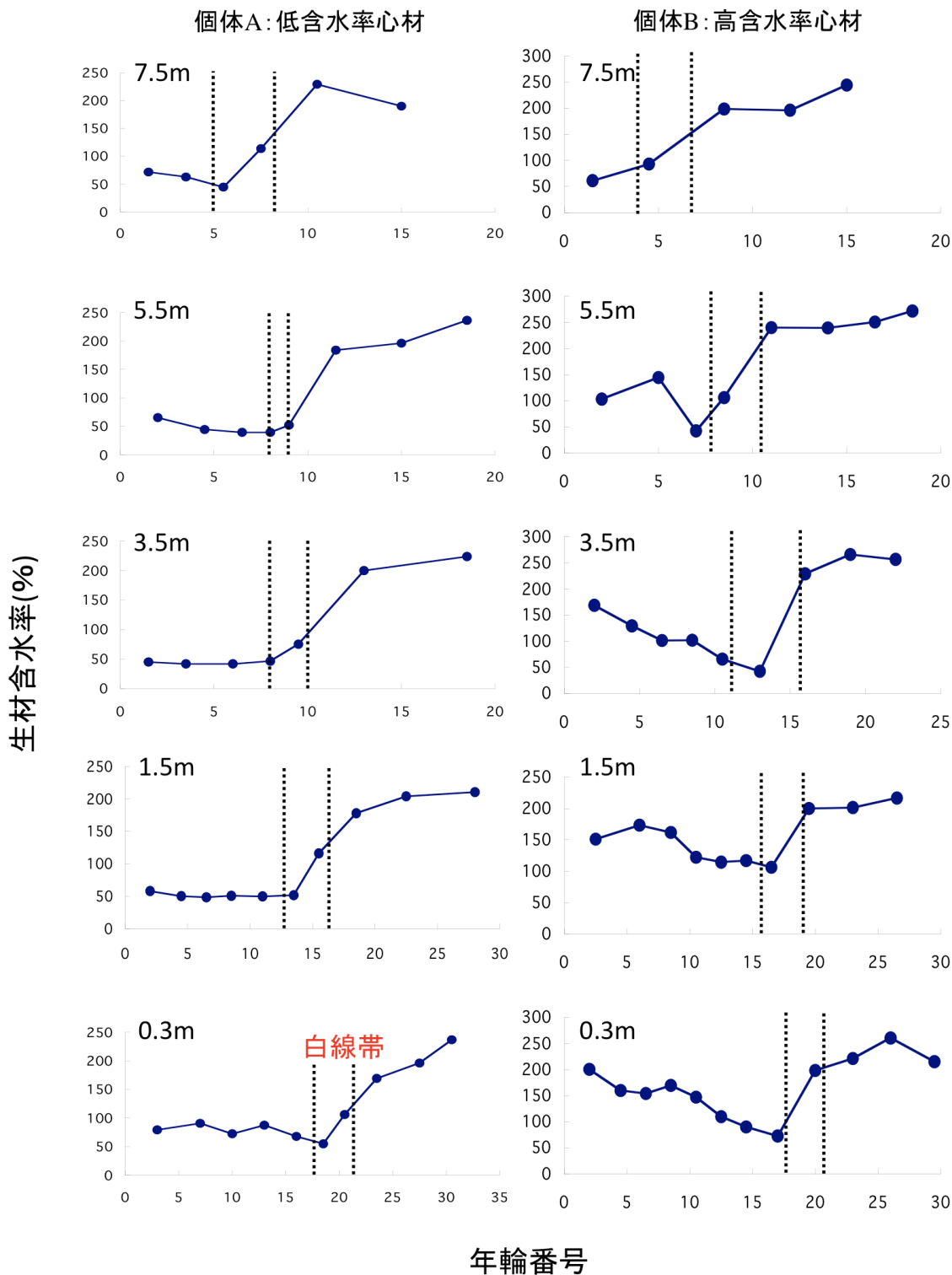


図 各地上高におけるスギの生材含水率の放射方向変動.

(富田智ら, 九州森林研究 57 289-292, 2004)

## I-4 細胞壁の二次的な構造変化

北海道大学大学院農学研究院

佐野 雄三

### 1. はじめに

心材の形成過程では、材の着色、含水率の変化、微視的な構造変化、心材物質と総称される化学成分の堆積・沈着など、様々な変化が引き起こされる。心材形成に伴うそれらの変化は、一般に樹種固有である。しかし、種毎に一定の変化を示すわけではなく、スギの黒心や高含水率心材のように、ときには同種の個体間でも著しく異なる変化を示すことがある。ここでは、それら心材形成に伴う多様な変化のうち、細胞壁に生じる構造的な変化に焦点を当て、話題提供としたい。

心材形成に関連して見られる変化は、一季節内程度の時間レベルで一斉に起こるわけではない。樹種によっては、最終的な心材化に先立って辺材とも心材とも一線を画する特徴を示す移行材あるいは白線帯と呼ばれる特異な材部が現れる。その幅は温帯産材で数年輪に達する場合もある。さらには、辺材部内でも細胞内貯蔵物質の量的変化、細胞壁の構造的変化、生化学的変化が徐々に進行する場合があることが明らかになっている (Balatinecz と Kennedy 1967、山本 1982、Nobuchi ら 1987、Spicer と Holbrook 2007、半 2009)。最終的に心材に移行するときに見られる変化は単に肉眼的に見ることができるだけであって、辺材部で少しずつ進行するそうした変化もまた広い意味で心材形成に含むべき一連の現象であるという見方もある。そこで、辺材部ですでに進行している心材化に類する二次的な構造変化についても含め、細胞壁に生じる様々な二次的な構造変化のなかでも、筆者が自身の研究活動で実際に扱ったことのある道管閉塞物と通水要素間の壁孔壁に関する問題を取り上げ、紹介してみたい。

### 2. 道管閉塞物

#### 2.1 チロース、ゴム質の形成

チロースやゴム質は、これまで何かと心材形成と関連づけて論じられることが多かった。しかし、これら道管閉塞物は辺材あるいは移行材の最内層で起こる心材形成の最終段階で一斉に形成されるわけではない。米国において商業的に重要な針・広葉樹計 139 樹種についてチロースの発生を調べた結果として、心材部にチロースが存在する広葉樹では辺材部にもチロースが常在することが、100 年近く前には発表されている (Gerry 1914)。ブナ科あるいは日本産広葉樹 50 種についての近年の研究でも、チロースやゴム質は辺材で普通に見られることが示されている (柴田 1984、Saitoh ら 1993)。さらに、散孔材や放射孔材では辺材のかなり内方で形成されるものが多いが、環孔材の孔圏道管では外から 2~5 年輪目、環孔材の孔圏外ではそれよりも数年輪内方でチロースやゴム質が現れ始める樹種が多いことなど、管孔性や道管の配列による傾向も明らかになっている (Saitoh ら 1993)。また、ハリエンジュでは最外年輪を除いてすべての道管がチロースで充填されているが、その形成のタイミングは成育地によって、あるいは同一の成育地でも年毎の気候によってズレが生じることが報告されて

いる (石田ら 1976、Fujita ら 1978)。ヤチダモでは地際近くと胸高部でチロースが形成され始める年輪がかなり異なることも報告されている (Sano と Fukazawa 1991)。

## 2.2 チロース、ゴム質の二次的な変化

多湿心材をもつハルニレとヤチダモでは、辺材の外層で形成され、辺材部では道管を閉塞していたチロースが、心材では潰れたり粉碎されたりして道管を閉塞した状態にはないことが明らかにされている (Ishida と Ohtani 1968、Sano と Fukazawa 1991) (図 1)。ハルニレの場合、道管内腔に自由水がない移行材において、心材の多湿化に先立ってチロースが潰れることが示されている (Ohtani と Fujikawa 1990)。ヤチダモの場合、チロースの崩壊は常に心材化に伴う材色の変化と一致して生じているのに対して、心材の多湿化がその材色の変化よりも遅れて起こるケースが観察されている (Sano と Fukazawa 1991)。これらのことから、ハルニレとヤチダモではチロースの崩壊が心材の多湿化の一要因になっている可能性が考えられている。また、同様な高含水率心材部でのチロースの崩壊は、ミズナラなど多湿心材を形成しない他の樹種でも確認されている (Sano ら 1995)。

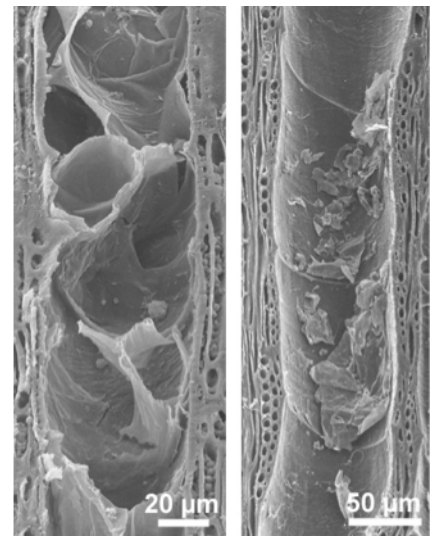


図 1. ヤチダモ辺材 (左) と心材 (右) のチロース。

これまでゴム質の化学組成については、ネムノキ心材のゴム質がマンノースとガラクトースを主成分とする多糖類であることを示した研究例がある (藤田ら 1977)。その二次的な変化に関しては、組織化学的方法により染色性を比較した研究により、辺・心材間で成分に違いがあることが示唆されている (Bonsen 1991)。このことから、辺材で道管内腔を閉塞したゴム質は、そのままの状態で永久的に残存するのではなく、心材化に伴ってリグニン様物質が沈着する可能性が考えられている。このゴム質の二次的な変化についてもチロースの崩壊とともに研究例が乏しく、詳しいことは明らかにされていないのが現状である。

## 3. 通水要素間壁孔に見られる二次的な構造変化

### 3.1 壁孔壁への成分堆積・沈着

木材の壁孔の構造は光学顕微鏡的に明確に捉えるには微細すぎるため、電子顕微鏡の開発以前にはトールス・マルゴからなる針葉樹仮道管の有縁壁孔対の壁孔壁の微細構造、あるいはベスチャード壁孔の微細突起の構造などについて、専門家の間で何かと論争が絶えなかった。電子顕微鏡の開発・普及とともに、壁孔の微細構造はそのかっこうの観察対象として木材細胞壁微細構造の研究者によりさっそく研究されるにいたり、米国や豪州、ドイツ、日本から相次いでその成果が発表された。針・広葉樹とも、通水機能を維持している辺材部に比べて、心材部では通水要素間の壁孔壁に被覆物が堆積し、マイクロフィブルのテクスチャーが見えなくなっていることは、それら電子顕微鏡が開発・普及して間もない頃には明らかにされていた (Côté 1958, Kraemer と Côté 1963, Bonner と Thomas 1972, Thomas 1976)。その後、この壁孔壁への二次的な堆積物はリグニンと同様な性質を備えてい



ることが明らかにされた (Bauch と Berndt 1973, Bauch ら 1974, Sano と Fukazawa 1994, Sano と Nakada 1998) (図 2)。その化学構造については、パルプ化処理により非壁孔領域のリグニンは除去されるのに対してこの壁孔壁のリグニン様物質は除去されないことから、リグニンとは相違があると考えられている (Gray ら 1983)。

### 3.2 そのほかの変化

通水要素間の壁孔壁の二次的な構造変化に関することとして、北米のホワイトアッシュ辺材で道管相互間の壁孔壁に冬期に限って被覆物が堆積することが報告されている

(Wheeler 1981)。北米の trembling aspen では、辺材の外層から内層に進むにつれて、道管相互間の壁孔壁に破壊を生じたものが増えることが報告されている (Sperry ら 1991)。しかし、筆者のヤマナラシについての観察ではそのような傾向は見られず、辺材の外層から内層にかけて被覆物の二次的な堆積が進み、むしろ道管相互間の壁孔壁が堅固に変化しているように見受けられた (未発表)。道管相互間の壁孔壁の微細構造に関する最近の報告では、通水の大きな支障になるのではないかとさえ思われる、驚くほど厚い壁孔壁を備えた樹種があることが報告されている (Jansen ら 2009)。こうした既往の報告の結果の中には、二次的な変化を起こしたものの構造を形成層～分化帯で完成したときの基本構造として扱っている場合もあるのではないかと考えられる。そうした混乱を整理していくためにも、心材化に伴って生じる細胞壁の構造変化およびそれに関連する辺材中で進行する細胞壁の構造変化について、丹念に明らかにしていく必要がある。

### 4. おわりに

心材への移行に伴って生じる細胞壁の構造変化、あるいはそれに関連して辺材部で顕在化せずに進行する細胞壁の構造変化の現象そのものに対する知識はまだ乏しい。その構造的な変化が材の機能や物理的性質に及ぼす影響に関する理解も浅い。例えば、心材は辺材よりも透過性が著しく低いが、針葉樹材の場合には仮道管間の有縁壁孔対の閉塞、広葉樹材の場合にはチロースやゴム質による道管の閉塞がその違いを決定づけている、という主旨の言説を耳にしたり目にするところがある。しかし、ここで紹介したような心材化に伴って生じるチロースの崩壊のように、必ずしもそう単純化できない事例が明らかになっている。最終的な心材への移行の際に起こる諸現象ばかりでなく、辺材のもっと外層の部位から少しずつ進行している関連現象も含めると、心材形成とは実に多様な変化を含む複雑な過程である。その一端を紹介した本稿が、こうした問題に関心をもつ人に参考になることがあれば幸甚である。

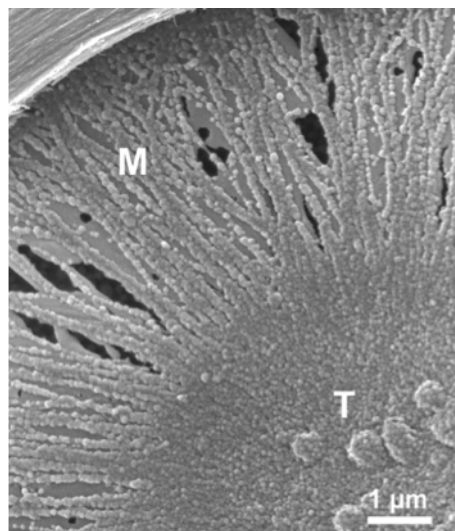


図 2. スギ移行材 (白線帯) の仮道管間の壁孔壁. 粒状物質が覆い、マルゴ微繊維間の空隙を薄膜状の物質がおおかた塞いでいる. T=トールス, M=マルゴ.

引用文献

- Balatinecz JJ, Kennedy RV (1967) Ray parenchyma cells in pine. *For. Prod. J.* 17(10) 57-64
- Bauch J, Berndt H (1973) Variability of the chemical composition of pit membranes in bordered pits of gymnosperms. *Wood Sci. Technol.* 7 6-19
- Bauch J, Schweers W, Berndt H (1974) Lignification during heartwood formation: comparative study of rays and bordered pit membranes in coniferous woods. *Holzforschung* 28 86-91
- Bonner LD, Thomas R (1972) The ultrastructure of passageways in vessel of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera* L.), Part 1: vessel pitting. *Wood Sci. Technol.* 6 196-203
- Bonsen KJM (1991) Gefäßverschluss-Mechanismen in Laubbäumen. *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich* 136 13-50
- Côté Jr WA (1958) Electron microscope studies of pit membrane structure. *For. Prod. J.* 8 296-301
- 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. *京大演研報* 49 116-121
- Fujita M, Nakagawa K, Mori N, Harada H (1978) The season of tylosis development and changes in parenchyma cell structure in *Robinia pseudoacacia* L. *Bull. Kyoto Univ. For.* 50 183-190
- Gerry E (1914) Tyloses: their occurrence and practical significance in some american woods. *J. Agric. Res.* 186) 445-469
- Gray RL, Rickey RG, Hergert HL (1983) The influence of sapwood-heartwood conversion of bordered pit tori in western hemlock on bisulfite pulping. *Wood Fiber Sci.* 15 251-262
- Ishida S, Ohtani J (1968) Study of tyloses by the scanning electron microscopy. Report 1. Some preliminary observations of tyloses, mainly in *Harunire* (*Ulmus* sp.) *Res. Bull. Coll. Exp. For. Hokkaido University* 26 1-9
- 石田茂雄, 大谷諄, 川原田徹 (1976) 走査電子顕微鏡によるチロースの研究 (第2報) ハリエンジュのチロースの発達—その年次的・季節的観察—. *日本北支講* 8 6-9
- Jansen S, Choat B, Pletsers A (2009) Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *Am. J. Bot.* 96 409-419
- Krahmer RJ, Côté Jr WA (1963) Changes in coniferous wood cells associated with heartwood formation. *Tappi* 46 42-49
- 半智史 (2009) 樹木の二次木部における細胞死発現機構に関する細胞生物学的研究. 東京農工大学学位論文
- Nobuchi T, Tokuchi N, Harada H (1987) Variability of heartwood formation and cytological features in broad-leaved trees. *Mokuzai Gakkaishi* 33 596-604
- Ohtani J, Fujikawa S (1990) Cryo-SEM observations on vessel lumina of a living tree: *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *IAWA Bull. n. s.* 11 183-194
- Saitoh T, Ohtani J, Fukazawa K (1993) The occurrence and morphology of tyloses and gums in the vessels of Japanese hardwoods. *IAWA J.* 14 359-371

- Sano Y, Fukazawa K (1991) Structural differences of tyloses in *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* and *Kalopanax pictus*. IAWA Bull. n. s. 12 241-249
- Sano Y, Fukazawa K (1994) Structural variations and secondary changes in pit membranes in *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*. IAWA J. 15 283-291
- Sano Y, Fujikawa S, Fukazawa K (1995) Detection and features of wetwood in *Quercus mongolica* var. *japonica*. Trees 9 261-268
- Sano Y, Nakada R (1998) Time course of the secondary deposition of incrusting materials on bordered pit membranes in *Cryptomeria japonica*. IAWA J. 19 285-299
- 柴田直明 (1984) チロースの発達と構造に関する研究. 京都大学学位論文
- Sperry JS, Perry AH, Sullivan EM (1991) Pit membrane degradation and air-embolism formation in aging xylem vessels of *Populus tremuloides* Michx. J. Exp. Bot. 42 1399-1406
- Spicer R, Holbrook NM (2007) Parenchyma cell respiration and survival in secondary xylem: does metabolic activity decline with cell age? Plant Cell Environ. 30 934-943
- Thomas RJ (1976) Anatomical features affecting liquid penetrability in three hardwood species. Wood Fiber 7 256-263
- Wheeler EA (1981) Intervascular pitting in *Fraxinus americana*. IAWA Bull. n. s. 2 169-174
- 山本幸一 (1982) マツ属放射柔細胞成熟の経年的・季節的経過. 北大演研報 39 245-296

## 第二部 心材形成に挑む多様な研究

### II-1 TOF-SIMS の心材形成研究への導入

名古屋大学大学院生命農学研究科

福島 和彦・齋藤 香織

#### 1. 緒言

心材とは、樹木の幹の断面に見える、色の濃い中心部分であり、その外周部の色の薄い部分は辺材と呼ばれる。辺材から心材への移行は、放射柔細胞の死や抽出成分の蓄積を伴う<sup>1)</sup>。心材抽出成分は、木の色や臭い、抗菌性など、木材の特性に大きく影響するものであり、よって、心材形成の解明は、木の利用や特性を知る上でも重要である。

心材成分は、フラボノイド、テルペン、リグナンなどであり、心材に数%から数十%にわたって含まれ、辺材には一般的に存在しない。放射柔細胞によって心材成分が合成されると考えられているが、これら心材成分が、どのように蓄積、分布しているかは十分に解明されていない。

心材成分の組織レベルでの分布は、通常、顕微鏡により、着色物質を心材成分として観察されており、詳しい化学構造の同定は困難であったが、近年、免疫光学顕微鏡法によって特定成分の分布が報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら、これまで、直接的な手法で、簡便に特定の心材成分の分布を検出する方法は限定されていた。そこで我々は、辺材から移行材、心材へと推移する過程で心材成分の分子イオンがどのように蓄積・分布しているかを解明するため、飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) の手法を用いて、研究を進めてきた。

#### 2. TOF-SIMS の原理と特徴

TOF-SIMS は、金やビスマスなどの一次イオンの衝突によって、試料最表面 (1-2 nm) から放出される二次イオンを検出する表面分析である。試料の微細構造は、測定後も保持されており、電子顕微鏡など他の分析機器により再度試料を分析することができる。

TOF-SIMS の最も魅力的な機能は、これら二次イオンが発生した試料上の場所が分かることであり、イメージングと呼ばれる。検出された全ての二次イオンの発生場所が記録されることにより、試料の形状や微細構造が分かるだけでなく、ある特定イオンだけの分布を描く (イオンマッピング) ことにより、特定成分の分布可視化が可能である。イメージの空間分解能は約  $1\ \mu\text{m}$  である。

SIMS は従来、半導体の分野で広く使われてきたが、近年、生体分野に適用されるようになったが、いまだ、植物に適用した例は非常に少ない。これまでに、これまで、スギやヒノキの特定心材成分の検出に TOF-SIMS が適用された<sup>3,4)</sup>。

本稿では、TOF-SIMS を用いたヒノキ心材成分や無機イオンの組織内分布について、最近得

られた成果を中心に紹介する。

### 3. ヒノキ心材成分の分子イオンの同定

TOF-SIMS において、ターゲットとする特定成分のイメージングを行う場合、その成分の特徴的イオンを明確に同定する必要がある。まず、ヒノキに特有の心材成分であるヒノキニン(分子量 354)、ヒノキレジノール(分子量 252)について、抽出精製した純粋化合物から特徴的イオンを同定した。ヒノキニンは  $m/z$  353、ヒノキレジノールは  $m/z$  251 に、擬似分子イオン  $[M-H]^+$  が検出されることが分かった(図 1)<sup>4)</sup>。これらヒノキ心材成分の分子イオンの同定により、TOF-SIMS を用いることにより組織内での心材成分のマッピングへの可能性が示された。

次に、木材切片において、実際に、同定したヒノキニンとヒノキレジノールの分子イオンが検出されるかどうか確認した。心材と辺材それぞれから作製した厚さ約  $100\mu\text{m}$  の切片のスペクトルを比較したところ(図 2)、ヒノキニン  $m/z$  353 とヒノキレジノール  $m/z$  251 の分子イオン強度は、辺材に比べて心材では強度が非常に高く、顕著であることが示された。

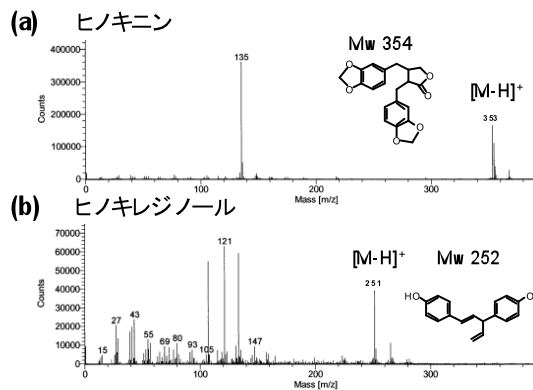


図 1. ヒノキニンとヒノキレジノールの正イオン TOF-SIMS スペクトル

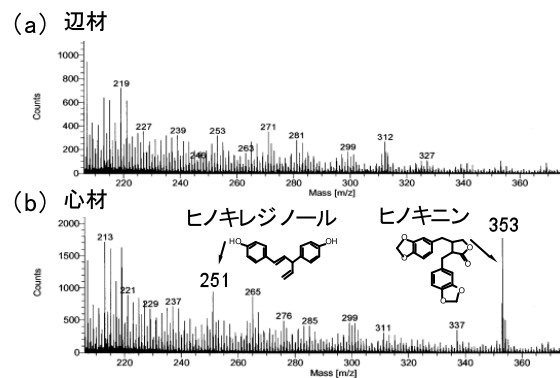


図 2. ヒノキにおける辺材と心材の TOF-SIMS スペクトル

### 4. 辺材から心材におけるヒノキ心材成分の分布

同定したヒノキニンとヒノキレジノールの分子イオン強度を辺材から心材にかけてプロットし、量的な分布が検出可能かどうか調べた<sup>4)</sup>。辺材から心材にかけての連続した年輪をひとつずつ測定した結果を図 3 に示す。分子イオンの強度は、検出された全てのイオンの総カウント数で割ることにより、標準化した。これにより、測定したスペクトル間で、より正確にイオン強度を比較することが可能となる。

ヒノキニンとヒノキレジノールの分子イオン強度は、辺材部分においては非常に微量であり、心材になる直前の年輪で急激に増加し、心材になると減少した(図 3)。しかし、減少はみられるものの、心材では、辺材よりは常

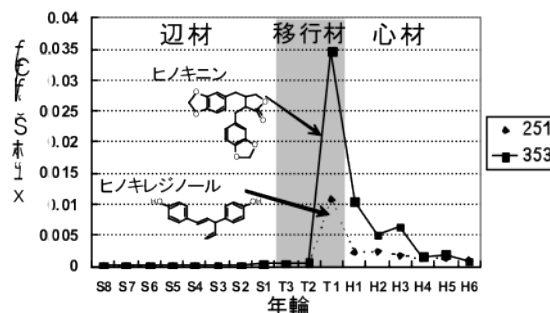


図 3. TOF-SIMS によるヒノキ辺材から心材にかけての心材成分の分子イオン強度分布

に高い強度である。ヒノキニンとヒノキレジノールが急激に増加した心材直前の部分は、移行材と呼ばれ、白っぽい色であることから肉眼で識別できる。移行材においては、心材成分合成に関する遺伝子や酵素などの活性化が多く報告されており、心材成分が合成される場所であるとされる<sup>1)</sup>。図3において、移行材よりも心材でヒノキニンとヒノキレジノールが減少しているが、このような心材内方部での減少は心材においては他にも報告がある<sup>1)</sup>。今回の心材での減少の理由として、これらの化合物が他の物質に変換した、または、重合したことなどが考えられるが、今のところ理由は分からない。TOF-SIMSにより得られたヒノキ心材成分の分布は、木材から溶媒抽出した成分を定量した以前の研究による分布の結果<sup>5)</sup>と、同様の傾向であった。

### 5. 辺材・移行材・心材におけるヒノキ心材成分の TOF-SIMS マッピング

図4に、凍結乾燥したヒノキ木口切片を用いた、辺材・移行材・心材におけるヒノキノンの分子マッピングを示す。図4aは辺材、図4bは心材になる直前の移行材、図4cは心材に入ってからすぐのイメージ像を表す。Total ion 像は検出された全てのイオン像を表しており、仮道管に加え、放射柔細胞を識別できる。ヒノキニンは、蓄積の始まる移行材において、放射柔細胞ではなく、放射柔細胞に隣接する仮道管に局在し、心材になると細胞

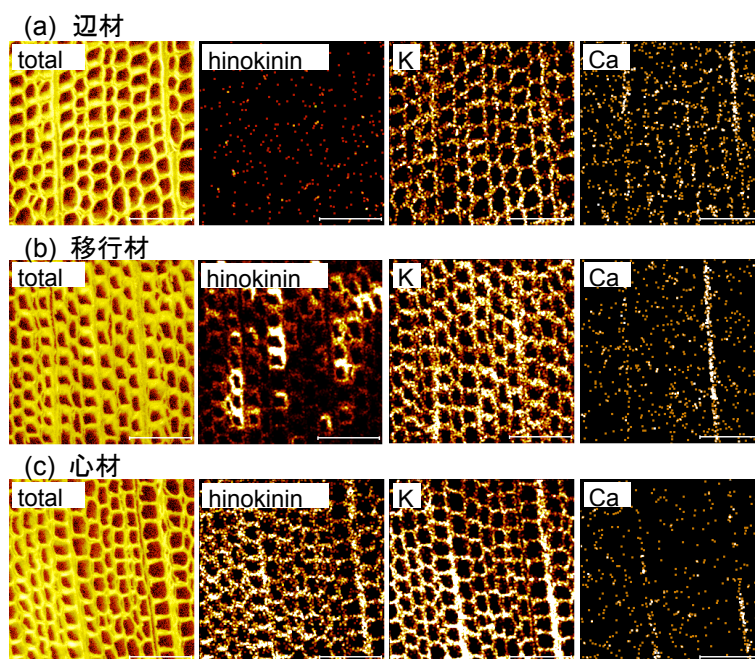


図4. ヒノキ辺材・移行材・心材におけるヒノキニンと無機イオン(K, Ca)の TOF-SIMS マッピング (scale bar, 100  $\mu$ m.)

壁全体に分布していた(図4)。ヒノキレジノールについても、ヒノキニンに比べて量は少ないものの、ヒノキニンと同様の分布が得られた。心材抽出成分の蓄積に関するこれまでの研究<sup>1)</sup>では、心材成分は放射柔細胞で形成され、さらに放射柔細胞に隣接する仮道管などの軸方向細胞に分泌され蓄積していくことが示唆されている。しかしながら今回の結果においては、ヒノキニンが蓄積し始める場所において、放射柔細胞での蓄積は観察されなかったことから、柔細胞で生成された心材成分が速やかに隣接細胞に移動していることが示唆された。

### 6. ヒノキ辺材・移行材・心材における無機イオンの分布

凍結乾燥したヒノキ木口切片における Total ion とカリウム K イオン、カルシウム Ca イオンの分布を図4に示す。Ca のイオンマッピングにおいて、辺材では組織全体に分布してい

る傾向があったが(図 4a)、移行材と心材においては、放射柔細胞に局在していた(図 4b, c)。K は、組織全体に分布していたが、辺材に比べ、移行材と心材では放射柔細胞における分布が増加していた。これらの結果から、これら無機イオンが心材化または心材成分合成に関与していると思われるが、心材成分蓄積と無機イオンの詳しい関連性を今後さらに詳しく調べる必要がある。

#### おわりに

以上、TOF-SIMS マッピングの手法を用いることにより、組織内でのヒノキ心材成分の分布可視化が可能であることが示された。また、辺材から心材において、ヒノキ心材成分やカルシウムイオン、マグネシウムイオンの組織内での量的変化を捉えることに成功した。今後、心材成分の蓄積・分布を詳しく調べることにより、心材形成の解明に貢献することを期待する。

#### 参考文献

- 1) Hillis, WE (1987) Heartwood and Tree Exudates, Ed. Timell, TE, Springer Series in Wood Science, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 2) Nagasaki, T, Yasuda, S, Imai T. (2002) Immunohistochemical localization of agatharesinol, a heartwood norlignan, in *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry*, 60, 461-466.
- 3) Imai, T, Tanabe, K, Kato, T and Fukushima, K (2005) Localization of ferruginol, a diterpene phenol, in *Cryptomeria japonica* heartwood by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Planta*, 221, 549-556.
- 4) Saito, K, Mitsutani, T, Imai, T, Matsushita, Y, Fukushima, K (2008) Discriminating the indistinguishable sapwood from heartwood in discolored ancient wood by direct molecular mapping of specific extractives using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 80, 1552-1557.
- 5) Takaku, N, Choi, DH, Mikame, K, Okunishi, T, Suzuki, S, Ohashi, H, Umezawa, T, Shimada, M (2001) Lignans of *Chamaecyparis obtusa*. *J. Wood Sci*, 47, 476-482.

## II-2 Cryo-SEM と TOF-SIMS でみた心材形成

森林総合研究所  
黒田 克史

### 1. はじめに

心材形成は樹木特有の現象である。心材は樹木の中央部に位置し、心材物質と総称される特有の物質を蓄積する。心材の形成は、樹木の腐れを防ぎ、樹木が長寿命を保つために必要であるとともに、木材として利用するときの耐久性にも重要な役割を果たすと考えられている。1918年の藤岡と高橋のスギ心材色黒変に関する研究<sup>1)</sup>をはじめ、樹木の心材の様々な特徴は古くから調べられてきた。その結果、心材の幹内での割合、色、成分、含水率などは樹種、あるいは同一樹種でも品種間で様々であることが明らかになっている。しかしながら、特徴の一部は明らかになったものの心材形成機構全体の解明には至っていない。

発表者は、心材形成機構の解明を目標に、水の分布と心材成分の蓄積について、とくに立木内の細胞レベルの現象に着目して研究を行っている。本シンポジウムでは、立木凍結法により凍結させた樹幹から採取した試料について、試料内の水を氷として可視化できる低温走査電子顕微鏡法（Cryo-SEM法）を用いて解析した木部の細胞レベルの水分布の研究と、試料表面の化学物質分布を細胞レベルで解析できる飛行時間型二次イオン質量分析装置（ToF-SIMS）を用いて解析した心材物質分布の研究の成果について発表する。

### 2. 細胞レベルの水分布

スギの心材含水率は品種あるいは個体により多様であることが知られている。高含水率心材は乾燥に時間とコストがかかることなどから一般に心材含水率が低いスギが好まれる。この研究では心材含水率が異なるスギの細胞レベルの水分布特性をCryo-SEMを用いて調べ、水分布特性と高含水率心材発生のメカニズムおよび心材形成機構との関係について検討した。

材料は心材含水率が高いスギと低いスギを数個体ずつ用いた。樹幹内の水分布が伐採により変化することを防ぐために、試料の採取は立木内の水を凍結させてから伐採する立木凍結法<sup>2)</sup>を用いた（図1）。心材の形成段階が異なる木部における水分布を解析するために、同一個体で樹幹の高さの異なるいくつかの部位から試料を採取し、超低温槽（-80℃）で保存した。凍結



図-1 立木凍結法の実際  
樹幹に取り付けた漏斗に液体窒素を注ぎ樹幹を凍結させ、凍結後に伐採する。



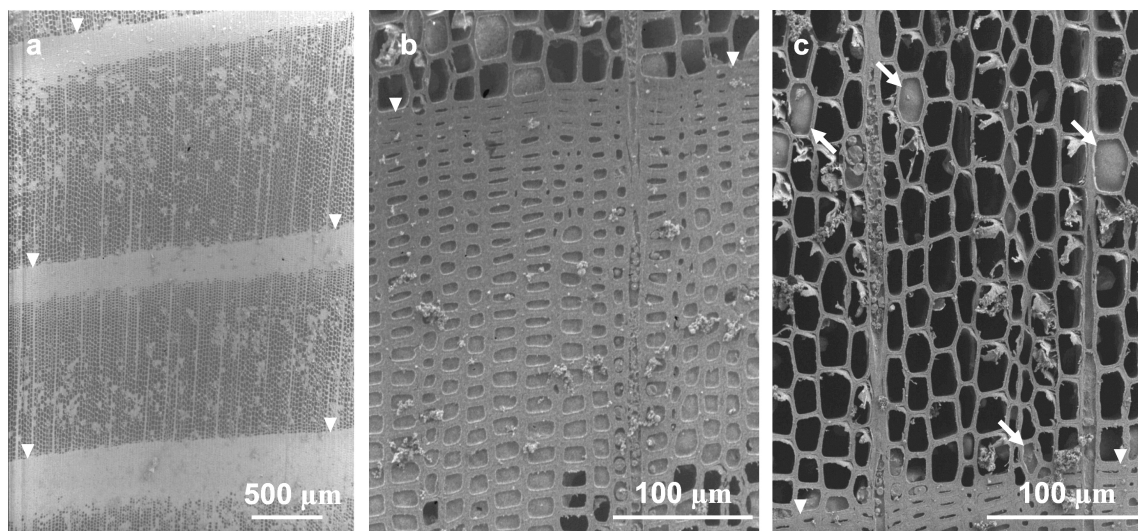


図-2 スギ移行材の Cryo-SEM 像

晩材の仮道管の内腔は水で満たされており、早材の仮道管の多くは空洞である。一部の仮道管は空洞の仮道管に囲まれても水を保持している（矢印）。▽は年輪境界を示す。

試料から表面をクリオスタットで平滑にした 3-5mm 角の凍結ブロックを作製し、Cryo-SEM による水分分布の観察に用いた。

Cryo-SEM で観察すると仮道管内腔の水の有無を容易に識別できる。辺材ではすべての試料のほとんどの仮道管内腔は水で満たされていた（表 1）。移行材（白線帯）では早材の多くの仮道管が空洞だったのに対し、晩材のほとんどすべての仮道管内腔は水で満たされていた（図 2）。心材では、晩材のほぼすべての仮道管は水で満たされている一方、早材では水で満たされた仮道管の割合は心材含水率の高い試料で多く、低い試料で少なかった。内腔が水で満たされた仮道管の割合は木部の含水率の高低とおおよそ一致しており、木部の含水率は個々の仮道管の水の有無によって決まると考えられる。

次に、同一個体内で心材の形成段階が異なる部位について水の分布を調べた。心材が形成されていない木部部位では、辺材のみから成る木部ではほとんどすべての仮道管内腔は水で満たされているのに対し、辺材と移行材で構成される木部では移行材の早材の仮道管の多くは空洞だった（表 1）。この結果は、辺材から移行材になる時に多くの早材の仮道管が水を消失することを示唆している。また、含水率が高い心材では多くの早材仮道管の内腔が水で満たされていることから、これらの仮道管では、移行材から心材になる時に内腔に水が再集積したと考えられる。このように、心材形成段階の違いにより木部の水分分布の違いが起きるという結果は、スギの心材形成に木部の細胞レベルでの水分分布の変化が関与することを示している<sup>2)</sup>。

表-1 内腔が水で満たされた仮道管の割合

		辺材	移行材	心材
辺材のみ	晩材	100 ± 0		
	早材	100 ± 1		
辺材と移行材	晩材	100 ± 0	100 ± 1	
	早材	98 ± 4	12 ± 6	
心材形成 (低)	晩材	99 ± 9	100 ± 1	98 ± 4
	早材	95 ± 7	10 ± 5	8 ± 13
心材形成 (高)	晩材	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	早材	99 ± 2	7 ± 3	*64 ± 43

数値 (%) は Cryo-SEM 観察の結果から得た。心材形成 (低), (高) はそれぞれ心材含水率が低い個体, 高い個体の心材形成部位を示す。

\* 試料部位により 4-100%の値を示した。

### 3. 細胞レベルの心材物質分布

心材形成過程の木部には、様々な心材物質が蓄積することが知られている。これらの心材物質は柔細胞で合成され木部全体に蓄積されると考えられているがその詳細は分かっていない。この研究では、スギの主要な心材物質であるフェルギノールの分布特性を ToF-SIMS を用いて解析し、心材形成過程における心材物質の蓄積特性について検討した。

材料は水分分布の解析のために立木凍結法により伐採し - 80℃で保存したスギ試料のうち、心材が形成されている部位を用いた。凍結試料からおおよそ 100μm 厚の切片、あるいは表面をクリオスタットで平滑にしたおおよそ 3-5mm 角の凍結ブロックを作製し、凍結乾燥させた後、ToF-SIMS の解析を行った。

ToF-SIMS を用いて解析すると、フェルギノールは質量電荷比 ( $m/z$ ) 285 イオンとして検出できる<sup>3)</sup>。 $m/z$ 285 イオンのカウント数を全イオンのカウント数で除した値をフェルギノール蓄積量の相対値として、測定部位ごとのフェルギノールの蓄積量を比較したところ、フェルギノールは移行材の中ほどから心材に

かけて蓄積することが明らかとなった (図 3)。蓄積の最大は移行材と心材の境界付近であり、蓄積が見られる部位のなかでは、晩材で少なく早材で多い傾向が見られた。

そこでマッピング解析を行い  $m/z$ 285 イオンの分布を可視化したところ、フェルギノールの蓄積は移行材から心材外側のすべての年輪で早材で多く、晩材で少ないことが明らかになった (図 4)。しかしながら心材内側では早材と晩材の違いはほとんど見られなかった。これらの結果から、フェルギノールは晩材よりも早材で多く合成される、あるいは晩材には蓄積しにくいことが示唆される。心材物質の合成と水との関連については、材が乾燥する過程で合成が促進されるという報告がある<sup>4)</sup>。また、水分分布の項で示したように、移行材ではほとんどの晩材仮道管は水で満たされているのに対し早材仮道管には水が少ない。これらのことから、心材形成過程における心材物質の蓄積には木部の水分分布の変化が影響する可能性が考えられる。

### 4. おわりに

これまでの心材に関する研究で、含水率や心材物質蓄積の変化は最も多く行われている研究である。

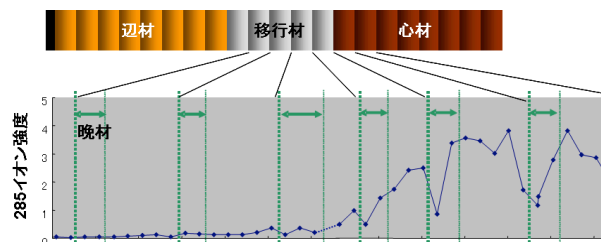


図-3 スギ木部のフェルギノール蓄積量の変化  
フェルギノール蓄積量の変化を  $m/z$ 285 イオン強度比で表した。移行材から心材でフェルギノールの量が多い。また晩材部では早材部に比べて少ない。矢印の範囲は晩材部を示す。

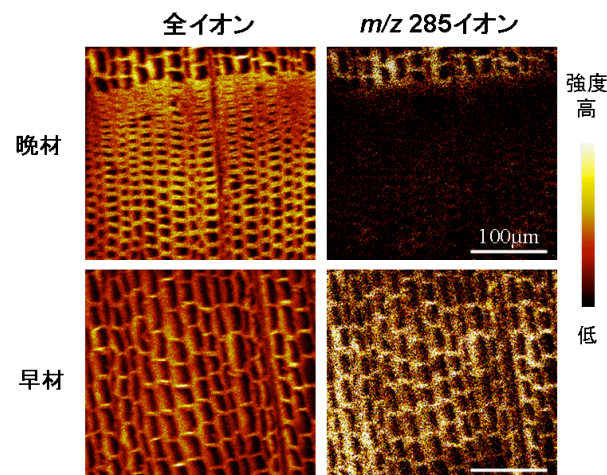


図-4 心材に隣接する移行材の ToF-SIMS イメージ像  
フェルギノールを示す  $m/z$ 285 イオン量は晩材部では少ないが、早材部では多い。

しかしながらこれらの研究が心材形成機構の解明に結びつかなかった問題は、樹木の立木内で起きている心材形成過程を直接解析することが困難なこと、同様の部位で起きるこれらの現象が別々に研究されてきたことに起因すると考える。そこで、発表者は立木中の水や成分の分布を変化させず採取した試料を用い、心材物質の蓄積過程を木部の水分分布と関連させて細胞レベルで解析することに主眼を置いて研究を進めている。その一つの策が、水分分布と心材物質分布を同一部位で比較する方法である。本シンポジウムでは、Cryo-SEMによる水分分布の観察後に凍結乾燥させた試料をToF-SIMSで解析し、水分分布と心材成分の局在を直接対応させた結果についても発表する予定である。また、凍結した試料を融解させずに水分分布と心材物質分布の解析を行うCryo-ToF-SIMS<sup>5)</sup>を用いた方法についても報告する。今後このような新しい手法を取り入れながら、心材形成機構の解明を目指したい。

## 謝辞

本研究は、藤原健，山下香菜，平川泰彦（以上森林総合研究所），今井貴規，斎藤香織，福島和彦（以上名古屋大学）の各氏との共同研究により行った。藤川清三，伊藤利章，佐野雄三（以上北海道大学），星比呂志，生方正俊，中田了五（以上森林総合研究所林木育種センター）の各氏にはCryo-SEM使用にあたり大変お世話になった。本研究の一部は科研費補助金（17780143，22580188，21228004）により行われた。

## 引用文献

- 1) 藤岡と高橋 (1918) すぎ心材色黒変に関する研究. 林業試験報告, 16: 1-78.
- 2) Kuroda K. et al. (2009) Cellular level observation of water loss and the refilling of tracheids in the xylem of *Cryptomeria japonica* during heartwood formation. *Trees*, 23: 1163–1172.
- 3) Imai T. et al. (2005) Localization of ferruginol, a diterpene phenol, in *Cryptomeria japonica* heartwood by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Planta*, 221: 549-556.
- 4) Yoshida K. et al. (2006) Generation and alteration of norlignans in a transition zone during the drying of *Cryptomeria japonica* log. *Journal of Wood Science*, 52: 372-375.
- 5) Metzner R. et al. (2008) Imaging nutrient distributions in plant tissue using time-of-flight secondary ion mass spectrometry and scanning electron microscopy. *Plant Physiology*, 147: 1774-1787.

## II-3 心材成分生成および心材形成に伴う遺伝子の発現

森林総合研究所

吉田 和正

### はじめに

樹木はある程度の年数生育すると、幹や枝の木部の内部に心材を形成する。心材は死細胞だけで構成され、しばしば特有の色調や成分をもち、含水率が異なる点で、その周囲を取り巻く辺材とは区別される。心材形成の機構は古くから研究対象とされ、組織学的、細胞学的、生化学的見地から調べられてきた。しかし、心材が何をきっかけとしてどのように形成されるかは未だに明らかにはなっていない。心材の特徴の一つは抽出成分の量が辺材に比べて多く、その種類も異なることである。スギの心材にはノルリグナンと呼ばれる一群の抽出成分が含まれるが、その生合成経路は不明であった。そこでノルリグナンの生合成をスギの心材形成の一つの要素と捉え、生合成に関わる酵素遺伝子の探索を試みた。次に、心材形成の場である移行材で働いている遺伝子の概要を把握することが心材形成の理解に役立つと考え、心材形成が進行していると想定される冬季（11月）の移行材で発現している遺伝子を収集し、遺伝子の構成や発現様式の解明に取り組んだ。

### 材料と方法

15年生のスギを5月に伐採し、幹から丸太を切り出して室内に静置した。伐採当日、10日、20日、41日および70日後にそれぞれ6cmの厚さの円盤を切り取り辺材を採取した。各試料に含まれるノルリグナンを高速液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ質量分析法で同定した。伐採当日と41日後の辺材からRNAを抽出し、cDNAサブトラクション法により41日後の辺材で特徴的に発現している遺伝子のcDNAを調製し、塩基配列を決定した。また、心材形成が進行していると考えられる11月に19年生のスギから移行材を採取し、発現遺伝子の塩基配列情報を収集した。代表的な遺伝子について、同一のスギ個体から採取した様々な器官での遺伝子の発現量をリアルタイムRT-PCR法によって調べた。

### 結果および考察

#### 1. 丸太辺材で心材成分生成時に発現する酵素遺伝子

伐採直後のスギ辺材にはノルリグナンは見出されなかったが、20日後から41日後にかけて、本来は心材に含まれるアガサレジノールが顕著に増加しており、この間にアガサレジノールが合成されていることがわかった（図1）。このとき（41日後）、辺材の含水率（81%）は伐採時の移行材の含水率（71%）と同程度まで低下していた（図2a）。

スギの移行材の含水率は辺材よりも低いこと（Nobuchi & Harada 1983）や、心材形成に先立って辺材の道管や仮道管へ空気が進入すること（Thomas 2000）が知られている。しかし、どの程度まで含水率が低下すると心材形成が始まるかは不明である。別の実験においても、アガサレジノールの含

有量が最大となった 40 日後に、辺材の含水率は伐採時の移行材の含水率 (87%) と同程度にまで低下していた (図 2 b)。これらの結果から、含水率がおよそ 100%を下回ることが、スギ木部でのノルリグナンの生成と関係があり、この丸太での含水率の変化は立木での辺材から移行材への変化を再現していると想定される。

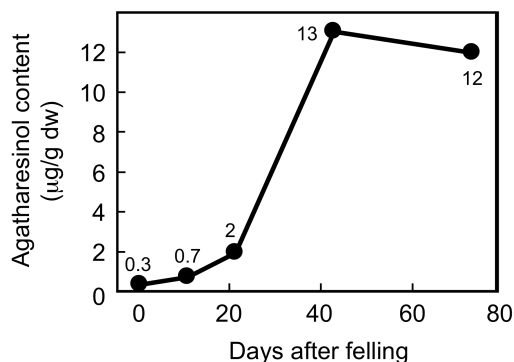


図1 乾燥過程におけるスギ丸太辺材中のアガサレジノール含有量の変化

添字は含有量を示す。(Yoshida et al. 2004)

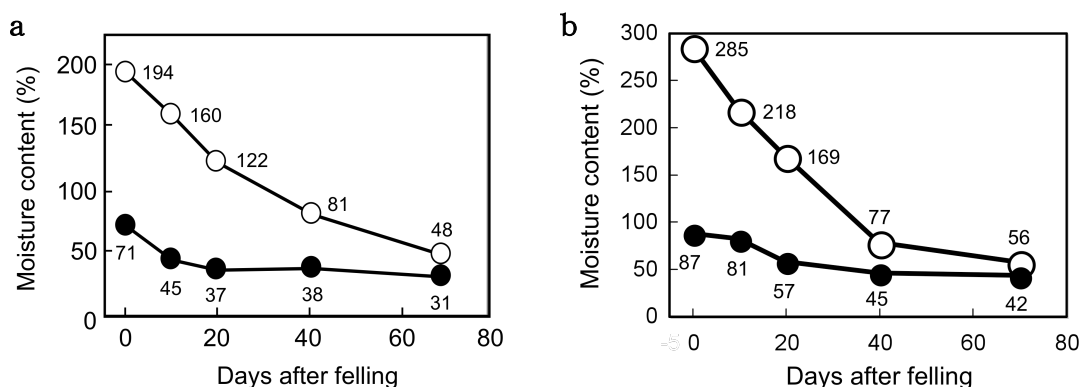


図2 乾燥過程におけるスギ丸太の移行材および辺材中の含水率の変化

●: 移行材、○: 辺材、添字は含水率を示す。(Yoshida et al. 2004, 2006)

41 日後の辺材で特徴的に発現している遺伝子を調べ、二次代謝に関わると推定される酵素をコードする遺伝子を 16 種類見出した。それらの遺伝子について、伐採後の経過日数別および器官別の発現様式を解析した結果 (図 3)、5 種の酵素遺伝子 (推定酵素名: チロシン 3-モノオキシゲナーゼ、ケイ皮酸 4-モノオキシゲナーゼ、フラボノイド 3'-モノオキシゲナーゼ、シトクロム P450 (CYP82C)、1,4-ベンゾキノンレダクターゼ) が 11 月の移行材で発現しており、アガサレジノールの生合成に関わる可能性があると推定された (図 4)。

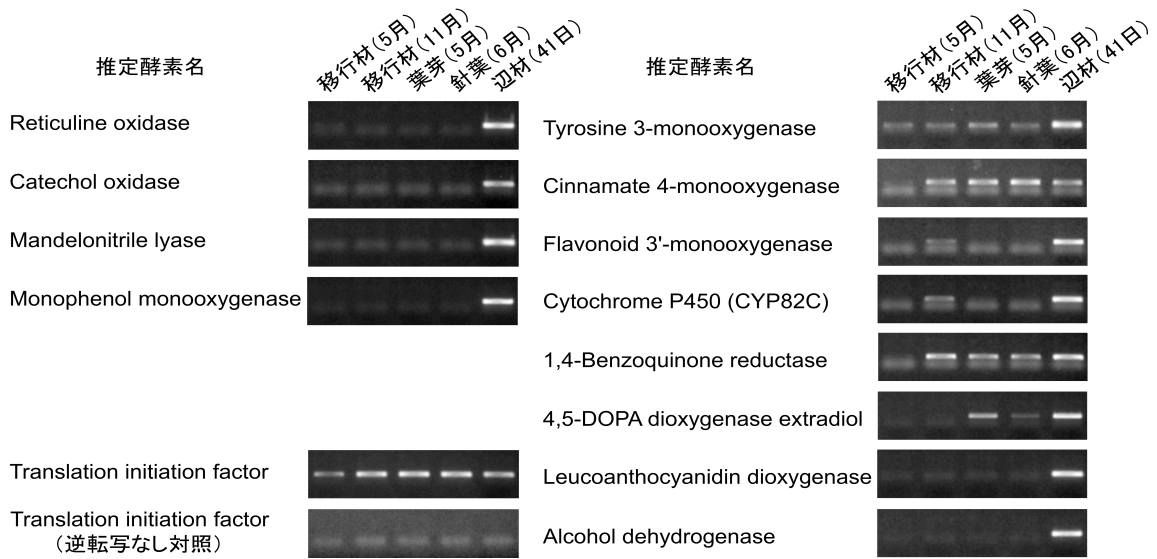


図3 スギの各種器官での二次代謝関連酵素遺伝子の発現

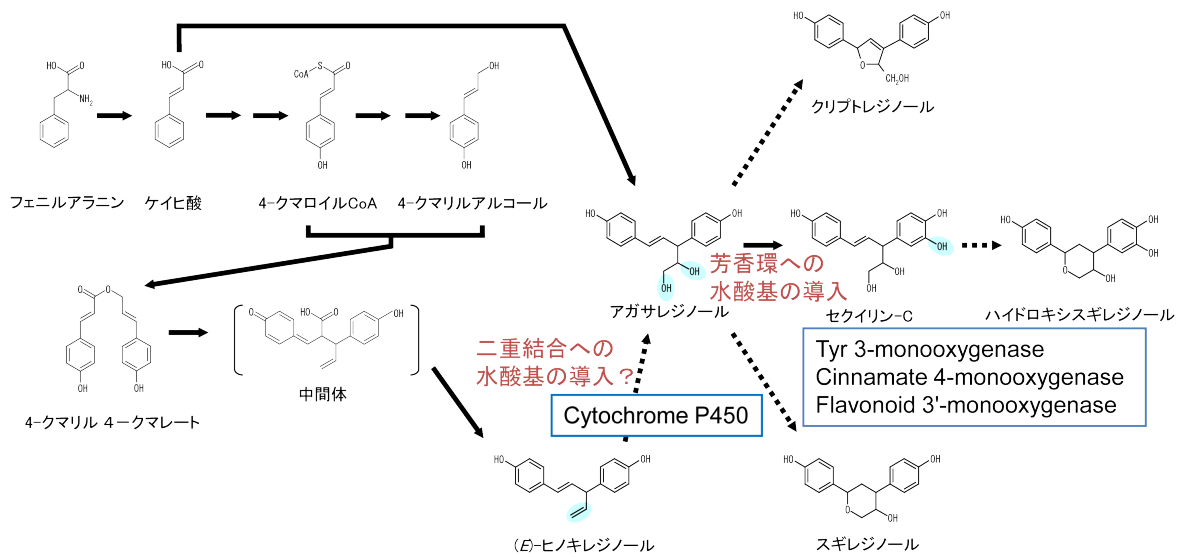


図4 スギにおけるノルリグナンの推定生合成経路と候補酵素遺伝子がかかわる可能性

実線はトレーサー実験または酵素遺伝子の単離による根拠のある経路

破線は推定経路 (高橋&荻山 1986、Suzuki et al. 2001, 2002, 2004, 2007、Imai et al. 2006a, b, 2009 を参考にして作成)

## 2. 心材形成時期に移行材で発現している遺伝子

心材形成が進行していると考えられる 11 月のスギ移行材から発現遺伝子を集め、重複のない 676 個の塩基配列を得た。これらの配列をもとに、真核生物 DNA 配列分類データベースの一つである KOG (eukaryotic orthologous groups) を検索した結果、291 個の配列は 21 の機能カテゴリーに分類された (図 5)。最大のカテゴリーである「タンパク質の翻訳後修飾・代謝」と 2 番目の「タンパク質の翻訳」に含まれる配列が、機能の推定された配列の 35% を占めていた。

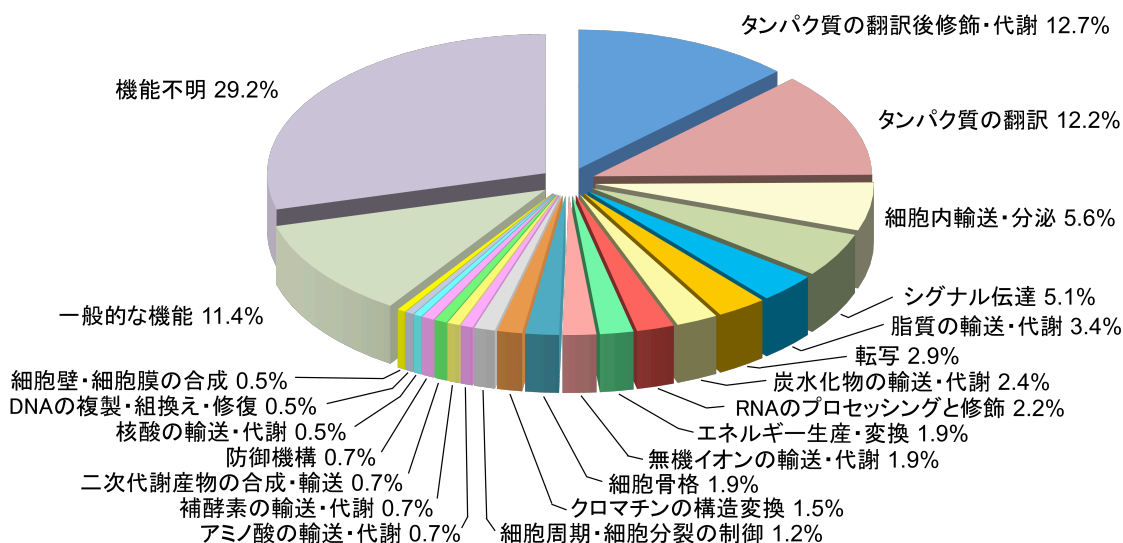


図5 11月のスギ移行材で発現している遺伝子の機能分類

収集した遺伝子の中から、心材形成時に活性が変化することが報告されている酵素をコードする遺伝子 12 種と、出現頻度の高い遺伝子 3 種（オレオシン、脂質輸送タンパク質、デヒドリン）の発現様式を、移行材、辺材、内樹皮、針葉、雄花、雌花、球果等の器官レベルで調べた。移行材での 6 月と 11 月の遺伝子発現量に着目すると、8 種の遺伝子の発現量が、心材形成停止時期（6 月）よりも心材形成時期（11 月）で多かった（表）。

スクロースは  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ（インベルターゼ）によってグルコースとフルクトースに分解され、さらにグルコースが解糖系およびクエン酸回路において変換される過程で ATP や他の代謝経路への分岐点となる中間代謝物質を生じる。この過程にかかわるいくつかの酵素遺伝子の発現量が 11 月で多いことから、エネルギー生産あるいは他の代謝活動が活発であると推定された。メチオニンアデノシルトランスフェラーゼは S-アデノシルメチオニン（SAM）の合成を触媒する。SAM はメチル基供与体であるとともにエチレンの前駆体であり、ラジアータパイン（*Pinus radiata*）の移行材で冬にエチレンの生成量が増大するという報告（Shain & Hillis 1972）と合致する。グルタチオントランスフェラーゼはグルタチオンを生体異物に付加して無毒化する酵素で、ストレスや代謝の変化に伴う有害物質の処理にかかわっている可能性がある。デヒドリンと脂質輸送タンパク質はどちらも環境ストレスに応答して作られることが知られており、冬の寒さや移行材の含水率の低下に対応するためにこれら遺伝子が発現しているのではないかと考えられる。

これらのことから、11 月の移行材において、心材形成との関連が想定される生理活性が高まっていることが推察された。

表 6月と11月の移行材での遺伝子発現量の比較

タンパク質名	機能	発現量
オレオシン	オイルボディの構成	6月 > 11月
脂質輸送タンパク質		6月 < 11月
デヒドリン		6月 < 11月
-フルクトフラノシダーゼ	シヨ糖分解	6月 < 11月
スクロースリン酸シンターゼ	シヨ糖合成	6月 > 11月
グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ	ペントースリン酸回路	6月 > 11月
フルクトースビスリン酸アルドラーゼ	解糖系	6月 > 11月
グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ	解糖系	6月 < 11月
ホスホグリセリン酸ムターゼ	解糖系	6月 < 11月
ピルビン酸デヒドロゲナーゼ	クエン酸回路	6月 < 11月
ヒドロキシメチルグルタリル CoAレダクターゼ	メバロン酸合成	6月 ≒ 11月
GDSLモチーフリパーゼ	脂肪酸遊離	6月 ≒ 11月
メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ	S-アデノシルメチオニン合成	6月 < 11月
グルタチオントランスフェラーゼ	グルタチオン転位	6月 < 11月
システインプロテアーゼ	タンパク質分解	6月 > 11月

#### 今後の展望

スギでの心材成分生合成と心材形成の機構解明に発現遺伝子の解析を通じて迫ろうと試みた。ヒノキ科（スギ科を含む）樹木に特徴的な心材成分であるノルリグナンには、心材色や生体防御（抗菌）にかかわる分子種があり、その生合成酵素や生合成経路の解明は、学術的知見の集積だけでなく、心材の利用を考える上でも役立つものである。本研究で得た酵素遺伝子がノルリグナンの生合成に関与しているかどうかは、酵素特性の解析等により明らかにしなければならない。もし、それらの酵素遺伝子がノルリグナンの生合成とかわりかかった場合でも、乾燥過程のスギ丸太の辺材や移行材でノルリグナンが生成する実験系を利用し、試料を採取する時期を変えることで生合成酵素遺伝子を単離できると考えている。

スギを含むいくつかの樹種について、組織学、細胞学、生化学的な研究から、心材形成は主に夏の後半から始まり、冬季まで続くと考えられている (Nobuchi et al. 1982、総説 Taylor 2002)。この知見をもとに本研究では11月を心材形成が進行している時期とし、心材形成の場である移行材で発現している遺伝子を収集した。また、6月を心材形成が停止している時期と考え、いくつかの遺伝子の両月での発現量を比較した。近年、心材形成はプログラム細胞死と捉えられている。そうであるとすれば、心材形成を示唆する細胞学的・生化学的な変化が検知できるよりも早い時期（月）に心材形成、すなわち移行材または辺材内層部における柔細胞の死が始まっている可能性がある。したがって心材形成機構の解明に遺伝子の解析からアプローチするには、1年の様々な時期の移行材での発現遺伝子を収集する必要がある。さらに、収集した遺伝子の発現量の変動を効率よく調べるため、スギの木部での遺伝子の発現量を測ることのできるマイクロアレイ（DNAチップ）の作製が望まれる。



引用文献

- Imai T, Nomura M, Fukushima K (2006a) Evidence for involvement of the phenylpropanoid pathway in the biosynthesis of the norlignan agatharesinol. *J Plant Physiol* 163:483-48
- Imai T, Nomura M, Matsushita Y, Fukushima K (2006b) Hinokiresinol is not a precursor of agatharesinol in the norlignan biosynthetic pathway in Japanese cedar. *J Plant Physiol* 163: 1221-1228
- Imai T, Asai K, Takino M, Fukushima K (2009) In vitro hydroxylation of a norlignan: from agatharesinol to sequirin C and metasequirin C with a microsomal preparation from *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry Letters* 2:196-200
- Nobuchi T, Kuroda K, Iwata R, Harada H (1982) Cytological study of the seasonal features of heartwood formation of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Mokuzai Gakkaishi* 28:669-676
- Nobuchi T, Harada H (1983) Physiological features of the “white zone” of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) - cytological structure and moisture content. *Mokuzai Gakkaishi* 29:824-832
- Shain L, Hillis WE (1972) Ethylene production in xylem of *Pinus radiata* in relation to heartwood formation. *Can J Bot* 51:1331-1335
- Suzuki S, Umezawa T, Shimada M (2001) Norlignan biosynthesis in *Asparagus officinalis* L.: the norlignan originates from two non-identical phenylpropane units. *J Chem Soc Perkin Trans I* 3252-3257
- Suzuki S, Nakatsubo T, Umezawa T, Shimada M (2002) First in vitro norlignan formation with *Asparagus officinalis* enzyme preparation. *Chem Commun* 1088-1089
- Suzuki S, Yamamura M, Shimada M, Umezawa T (2004) A heartwood norlignan, (*E*)-hinokiresinol, is formed from 4-coumaryl 4-coumarate by a *Cryptomeria japonica* enzyme preparation. *Chem Commun* 2838-2839
- Suzuki S, Yamamura M, Hattori T, Nakatsubo T, Umezawa T (2007) The subunit composition of hinokiresinol synthase controls geometrical selectivity in norlignan formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:21008-21013
- 高橋孝悦, 荻山紘一 (1986) スギ傷害材のフェノール性成分 (第 4 報) 九州産さし木品種アヤスギの norlignan 類について. *木材学会誌* 32:457-461
- Taylor AM, Gartner BL, Morrell JJ (2002) Heartwood formation and natural durability – a review. *Wood Fiber Sci* 34:587-611
- Thomas P (2000) *Trees: Their Natural History*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 242-244
- Yoshida K, Hiraide M, Nishiguchi M, Hishiyama S, Kato A (2004) A heartwood norlignan, agatharesinol, was generated in sapwood during withering of a Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) log. *Bull For Prod Res Inst* 3:25-28
- Yoshida K, Nishiguchi M, Hishiyama S, Kato A, Takahashi K (2006) Generation and alteration of norlignans in a transition zone during the drying of a *Cryptomeria japonica* log. *J Wood Sci* 52:372-375

## II-4 心材形成研究を発展させる新顕微鏡法

(独) 森林総合研究所 木材改質研究領域  
木材保存研究室 松永 浩史

### 0. エクスキューズ

本講演の発表内容は、近年北米で急速に市場を拡大している Micronized 保存処理材を対象に、最新の電顕技法を駆使して薬剤分布の解析を行ったものである。したがって、シンポジウムのメインテーマと直接の結びつきはない。シンポジウムに先立ち、世話役の中田氏より上記のお題で講演を依頼されて以来、その内容をメインテーマとどのようにすり合わせるかとても悩んだ。苦慮した結果、案の定、力不足で申し訳ないが、筆者らの研究成果を示しながら、各種電顕技法の木材試料への適用を紹介する形をとらせて頂くことでご容赦願いたい。そして本講演の話題提供を通じて、これらの手法が今後の心材形成研究に使えるかも?、と一人でも感じて頂ければ幸いと考えている（個人的には木質形成研究には寄与すると思っているが…）。

今回紹介する主な電顕技法をキーワードで並べると、次の通りである。

FIB (Focused Ion Beam) : 集束イオンビーム

イオンミリング(ion milling)

マイクロマニピュレーション

STEM (Scanning Transmission Electron Microscope) : 走査型透過電子顕微鏡

Cs-corrected STEM : 球面収差補正付き走査型透過電子顕微鏡

HAADF (High-Angle Annular Dark-Field) : 高角環状暗視野

HR-TEM (FE-TEM) : 高分解能透過電子顕微鏡

lattice image analysis : 格子像解析

各項目の多くは、木材分野ではおそらく初出のものと考えられる。特に、Cs-corrected HAADF-STEM の結果は、サンプルが木材であっても単原子観測が可能であることを示唆しており、一対一対応で機能・機作が議論出来ることを示している。今後木材研究の様々な分野での適用・発展を期待している。

以下に講演内容の概略を記すが、詳しくは末尾の文献を参照して頂きたい。

### 1. 話題提供

2006年5月、米国で販売開発されたMicronized保存剤（微粒子化した炭酸銅を含有する水系の銅系木材保存剤）は、2008年には北米における銅系保存剤の75%のシェアを占めるに至り、早晩我が国にも導入される可能性がある。Micronized保存処理材の利点は、処理木材からの銅溶出量が少なく金属腐食性が低いこととされているが、防腐効力については国際学会で二分しており、いま

だに混迷した状況が続いている。これはひとえに、細胞壁内部における保存剤の分布と性状が防腐効力を最終的に決定づけるにも拘わらず、Micronized保存剤中のナノ銅粒子の壁内分布に関する基本的な情報が不足しているためである。

したがって、ナノ銅粒子による性能発現のメカニズムを理解し、制御するためにはまず、「ポアサイズが 10nm 未満の細胞壁内部にナノ銅粒子はどのように浸透・分布しているのか？」という本質的な問いに答えなければならない。

幸いにもナノ銅粒子は結晶性を有しているため、仮に細胞壁にナノ銅粒子が存在していれば、HR-TEMを使って電子線回折もしくは格子像をフーリエ変換して構造決定すれば、存在の有無を確認できる。あるいは何らかの原因（講演の中で触れる）により、細胞壁にナノ粒子としてではなく単原子、ダイマー、クラスター等として存在しているとすれば、単原子観測が可能な分解能を有するCs-corrected HAADF-STEM（あるいは超高压電顕）を用いて解析すればよいことになる。

しかしここで厄介なのは、TEMやSTEMでナノor単原子オーダーの解析をするということは、試料厚さを10nm程度まで極薄膜化しなければならないことを意味する。

そこで筆者らは、FIBを有機材料である木材組織に初めて導入し、Micronized保存処理材（サザンパイン辺材）を無包埋のままダイレクトカッティングで最薄10nmまで薄切化し、上記の高分解能電子顕微鏡を駆使して、ナノ銅粒子の細胞壁内への浸透可能性を検討してきた。

これまでに得られた成果を列挙すると、

- ① 木材でも、FIBで削ってマイクロサンプリングが出来る。
- ② FIBを使うと、~10nmまで薄膜化出来る。（イオンミリングによる仕上げ加工が必要）
- ③ HR-TEMによる格子像解析から、径2.5nmのナノ銅粒子は、放射柔細胞壁に浸透し得る。
- ④ ナノ銅粒子は、仮道管壁中に浸透出来ない。
- ⑤ 仮道管二次壁および複合細胞間層中から検出された銅（by EDX）は、Cs-corrected HAADF-STEM像から、単原子（イオン）もしくはクラスターとして存在している。

などである。

講演ではデータを示しながら、それぞれのツールが心材形成研究にどのように役立つ可能性を秘めているのか、といった観点からみなさんと議論していきたいと考えています。

## 文献

1. 松永浩史, 片岡厚, 木口実, P. Evans: Micronized保存剤で処理されたサザンパイン材におけるナノ銅粒子-ナノ銅粒子は細胞壁中に浸透し得るか?, (社)日本木材保存協会第26回年次大会論文集, 22-27 (2010).
2. 松永浩史: 微粒子型銅系保存剤 (MCQ, MCA) について, 木材保存, 36 (4), 144-149 (2010).
3. Matsunaga, H., Kataoka, Y., Kiguchi, M. and Evans, P.D.: Copper nanoparticles in southern pine wood treated with a micronised preservative: Can nanoparticles penetrate the cell walls of tracheids and ray parenchyma?, IRG Document IRG/WP 10-30547 (2010).