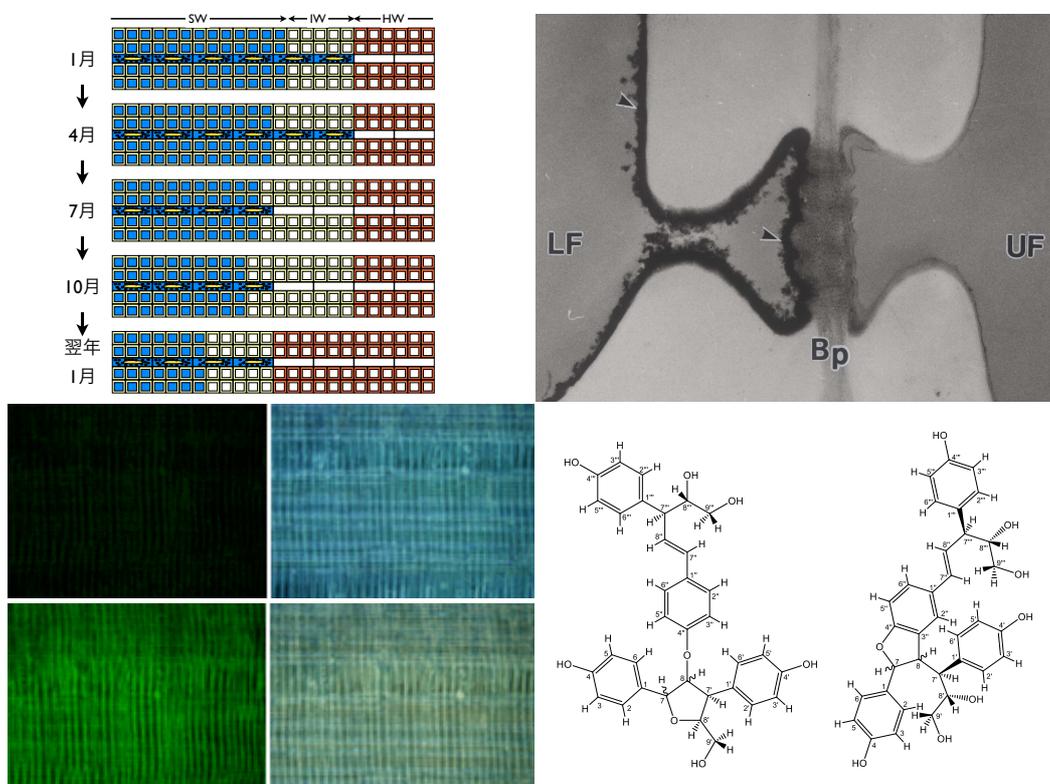


日本木材学会 組織と材質研究会・抽出成分利用研究会  
合同シンポジウム 2016

# 心材成分のダイナミクス

要旨 web 版



第 66 回日本木材学会大会 (名古屋)

2016 年 3 月 29 日 (火) 13:30-17:00  
名古屋大学 全学教育棟 C13 講義室 (大会第 1 会場)

## 心材成分のダイナミクス

日時：2016年3月29日（火）13:30-17:00

場所：名古屋大学全学教育棟 第1会場(C13 講義室)

心材の形成は樹木に特有の現象であり、樹木の長命性を実現するために進化したと考えられる。心材の色や耐朽性といった心材の特徴は木材の利用における樹種選択に深く関わっている一方、乾燥や薬液注入においては心材の存在が欠点となる場合もあって、心材の諸性質は木材の利用において考慮すべき極めて重要な因子である。

樹木の樹幹では辺材が水分通道と養分貯蔵という大きな役割を担っているが、形成層で形成されたのち年月を経た辺材は心材に変化する。柔細胞の死・水分状態の変化・細胞壁の変化を伴って心材が形成される時、心材成分と呼ばれる心材に特有な抽出成分が合成される。この心材成分の存在によって、心材の特徴そのものである色や耐朽性が賦与されることから、心材成分の出現と木材中への定着こそがまさに心材形成の主役であるということも可能である。

本シンポジウムでは「心材成分のダイナミクス」をテーマとする。放射柔細胞の死と並行して放射柔細胞において心材成分が生合成される。心材成分は放射組織を出て仮道管や道管や木繊維に拡散して細胞壁に堆積し、さらに変化する。心材成分は水分通道と養分貯蔵という樹木の生存に不可欠な役目を終え生細胞が死んだ後に老廃物として残ったものではない。本シンポジウムでは、樹木の生存と木材の利用にとって重要な役割を果たす、アクティブな心材形成における「心材成分の動態」について議論したい。

オーガナイザー：今井貴規（名古屋大学）・中田了五（森林総合研究所北海道育種場）

### スケジュール

13:30 司会 中田了五（森林総研北海道育種場）

13:30 開会挨拶 組織と材質研究会代表幹事 松村順司（九州大学）

（座長）安部久（森林総研）

13:35-14:15 中田了五（森林総研北海道育種場）

「心材成分ができるとき -心材形成を巡る謎と新しいアプローチ」

14:15-14:55 張春花（森林総研）

「広葉樹における心材成分の移動とその経路」

14:55-15:10 休憩

（座長）今井貴規（名古屋大学）

15:10-15:50 河西優衣（元名古屋大学）

「カラマツ組織における心材成分の堆積様式および分布の可視化」

15:50-16:30 築瀬優（元名古屋大学）

「スギ心材成分ノルリグナンの二次変化」

16:30 閉会挨拶 抽出成分利用研究会代表幹事 伊藤和貴（愛媛大学）

-17:00 終了

※一部未発表の図があることなどから、会場で配布した要旨とは別バージョンを web で公開します。  
要旨集 web：中田了五・今井貴規編 日本木材学会組織と材質研究会・抽出成分利用研究会発行 2016年3月29日

Cover pictures are courtesy of Ryogo Nakada, Chunhua Zhang, Yui Kawanishi, Yu Yanase

[http://www.jwrs.org/kenkyu/wa\\_wp/resources/2016spring\\_symposium.html](http://www.jwrs.org/kenkyu/wa_wp/resources/2016spring_symposium.html)

# 心材成分ができるとき –心材形成を巡る謎と新しいアプローチ–

森林総合研究所林木育種センター北海道育種場 中田了五

## はじめに

2010年9月13-14日、名古屋大学において、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」が開催された(中田2010)。このシンポジウムのオーガナイザーであった筆者は、イントロダクションとして「心材の多様性と心材形成をめぐる謎」と題する講演をおこなった。その中で筆者が呼びかけたマントラが「2010年代を心材形成のdecadeに！」である。2010年代も半ばをすぎたが、はたして心材形成のdecadeになるのであろうか？その答えをだすにはまだ気が早い、2016年春の本シンポジウムでは、2010年代前半の心材形成研究の進歩と今後の方向性を議論したい。

## 心材形成に関する研究トレンド

図1はCABデータベースによる、タイトルに「heartwood」を含む1973年から2015年までの「Journal article」の数の変遷である。1970年代の終わりや1980年代半ばに10件程度と落ち込むことがあったが、1970年代から1990年代後半までは年20件程度の報告があり、ここ10年ほどはそれに比べ概ね倍増した年40件強の報告がある。

タイトルに「heartwood」を含む2010年代の248論文について(2016年はデータベースにアクセスした2月末現在まで)、その内容をタイトルで判断して分類したものが表1である。同時に二つ以上の目的で行なわれている研究もあると考えられるが重複はないように分類した。この中で心材形成を主目的にしたものが15編あったが、このうち5編は日本の研究グループによるものであった(Nakada & Fukatsu 2012, Nagai & Utsumi 2012, Okada et al. 2012, Nakaba et al. 2012a, Kuroda et al. 2014)。実に世界の1/3である！

さて、この事実をもって日本における2010年代は心材形成のdecadeといえるだろうか？いや、まったくいえない。たったの5編である。もちろん、筆者の適当な分類に基づいたデータで、タイトルしかみていないし、タイトルに心材と入ってなくても心材形成を扱った論文は多い。タイトルではなく「topic」で検索するとはるかに多い数の論文がヒットする(2010-2016で955件)。また、分類上「心材量」あるいは「材質」とした論文についても心材形成に関わる重要な論文もある。ちなみに、図1で増えているように見える心材論文であるが、これは主として1990年代後半から科学界においてはじまった「たくさん論文を出す」トレンドによるものと分析する方が正しいだろう。同じCABデータベースでタイトルに「wood」を含むものは2010年代の平均で年1817.2編あり、1973-1995年の年平均から概ね倍増している。そして、2010年代の「heartwood」を含む論文は「wood」の論文に対してたったの2.3%であった。

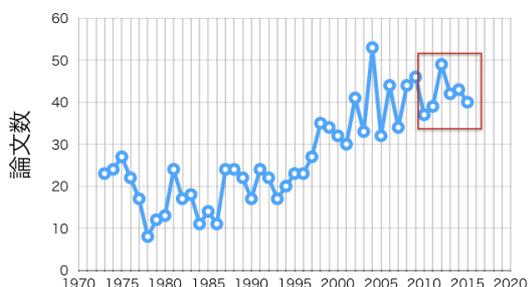


図1. CABデータベースによるタイトルに「heartwood」を含む論文数の年次変動

表1. CABデータベースによる2010年代のタイトルに「heartwood」を含む論文全248論文の内容分類

| 形成 | 心材量 | 材質 | 耐腐朽生 | 抽出成分 | 成分利用 | 他  |
|----|-----|----|------|------|------|----|
| 15 | 16  | 43 | 24   | 58   | 61   | 31 |

すなわち、データベースでの検索上の問題はあるとはいえ、木材の利用上極めて重要なはずの心材に関する研究は実にマイナーな分野であり、昔から細々と続けられてきたにすぎない、ということがいえる。逆に考えると、心材形成に関する謎はほとんど解決されておらず、未開拓な分野であり、新しい技術や方法を適用すれば大きな進歩をとげる可能性が高い、ということができる。

本シンポジウムでは、心材成分がどのようにできて、どのように心材中に拡散し、どのように広がって、どのように変化するか、をみることをテーマとして企画した。そのイントロとして筆者の発表では、心材形

成を巡る謎とそれに迫るためのいくつかのアプローチをレビューする。

筆者は心材成分の生成についてしばしば、「放射柔細胞が死ぬときの断末魔の雄叫びとして心材成分を合成する」などという表現を使ってきた。しかし、心材成分は放射柔細胞の屍として放射柔細胞が死んだらそこに残されるものなのであるだろうか？本シンポジウムの他の講演では、心材成分ができて移動し変化することについて、心材形成におけるアクティブな「心材成分の動態」についての研究を紹介いただく。本稿におけるレビューを、心材の形成を構成する「心材成分のダイナミクス」へのイントロダクションとしたい。

## 心材形成研究の特徴

心材形成は樹幹奥深くでひっそりで行われる現象で、すでに心材ができているのかどうか、心材の量がどのくらいあるのか、心材形成とはどの季節に起こっている現象なのか、などごくごく基本的な事柄すら樹幹の外からいくら眺めてもさっぱりわからない。

心材形成は樹木特有の現象であり、樹木以外を材料に研究することはできない。一方、心材の形成は樹木あるいは木材の特徴であり、特に心材の美しい色と高い耐腐朽性は木材利用にとって極めて重要な考慮すべき特性である。心材の特徴・性質は種特異的であり、心材の性質は木材利用における樹種選択に深く関わっている。また、心材の量や質に種内個体変異が大きい場合、より多くの、より美しい、より耐腐朽性の高い個体が求められるため、施業や育種による心材の性質の改良が望まれている。

心材形成とはどのような現象であるかについて考察すると、複合的に、かつおそらく相互に関係しながら、大きく四つのことが起こっている。第一に細胞死がある。道管や仮道管は形成層で分裂してまもなく死を迎えるが、放射柔細胞は分裂後数年から数十年生き延び辺材の機能のひとつである養分貯蔵・供給という役割を担っている。心材の定義は生きている細胞がない部分であり、辺材が心材に変化する時放射柔細胞は死を迎える。あるいは放射柔細胞が死ぬときに辺材が心材に変化する。次に心材成分の堆積が挙げられる。放射柔細胞が死を迎えるときに心材成分と呼ばれる心材に特異的な抽出成分が生合成され細胞壁に堆積・沈着する。この心材成分こそが心材に特徴的な色や耐腐朽性をもたらしている。三番目に細胞壁の変化がある。一部の広葉樹では道管にチロースが形成され、針葉樹では仮道管相互壁孔が閉塞し、根から葉への水分通道機能を失う。それだけではなく、マツ属の樹種では心材化により放射柔細胞に二次壁が堆積し、厚壁となることが知られている。最後に水分状態の変化が挙げられる。辺材と心材では含水率で表される水分状態が大きく異なることが多く、しかもその変化は急激である。これらを筆者は心材形成の四要素と呼んでいる。

多くの樹種、特に針葉樹で、辺材と心材の間に肉眼で移行材が認められる。移行材を肉眼で容易に識別できる理由は、移行材は心材色を呈しておらずかつ辺材に比べて水分量がかなり少ないことである。このため移行材は辺材と心材の間に白い層となって認められるため、しばしば白線帯と呼ばれる。移行材を詳しく調べると心材形成の四要素に関わる様々なことが移行材でほぼ同時に生じており、移行材こそが心材形成の舞台であるということが出来る。

重要な事象であるため心材形成や心材の特徴については古くから研究が行われてきている。しかし、その研究活動は比較的小規模にとどまり、心材形成を巡る謎は長年謎のままである。逆に考えると新規アプローチにおける大きな発展の余地が残されており、画期的発見があれば林業・林産業に対して大きな貢献が可能である、ということもできる。

## 心材形成を巡る謎

心材形成を巡る謎をいくつか挙げてみる。

### 1) 心材形成はなぜ起きる？

特に針葉樹について、心材形成において放射柔細胞の死と周囲の仮道管内腔からの自由水の消失は移行材においてほぼ同時並行的に起こっていることがよく知られている。周囲の乾燥が原因で放射柔細胞が死を迎える、放射柔細胞の死によって周囲の仮道管がキャビテーションを起こす、両方の説明が可能でどちらなのかについて古くから議論がある。

### 2) 心材はいつできる？

シュートの伸長も、形成層活動も冬季は停止する。樹木の生理的活動の多くは冬季は停止するか夏季に比べて極めて緩慢に進行するようになる。心材の形成すなわち心材の範囲の拡大がどの季節に進行しているのかについては、様々な証拠から成長が停止する秋から冬にかけて心材形成が進行していると考えられているものの、明らかであるとはいえず、さらなる研究が必要である。

3) 心材の水はどこからどうやって来た？

針葉樹では心材形成に伴って、豊富な自由水を保持していた辺材が自由水のほとんどを失って移行材となる。ところがスギなどのいくつかの樹種では心材形成の最終段階に新しくできた心材に自由水が再び侵入して **wetwood** (高含水率心材) が形成されることがある。この水はいったいどこからどういう経路をたどってやってきてものなのか不明である。

4) 心材成分はどうやって拡散する？

心材成分は放射組織にとどまっているわけではなく、周囲の組織に拡散して仮道管や道管や木繊維の細胞壁に堆積・沈着する。心材成分の生合成の舞台は自由水の少ない移行材であると考えられているが、水もないのにどうやって心材成分は拡散するのであろうか。さらに、水に不溶性の心材成分の移動はどのようなメカニズムによるものであろうか。

5) 心材成分はなぜ減る？

心材成分の分析を行うといろいろな成分があることがわかる。同定された心材成分の心材内での分布をみると、心材最外層で多量に存在するのにもかかわらず、髄に向けて漸減するという報告が多い。心材成分が心材内側に向けて減っていくのはなぜだろうか。

### 2010 年代前半の心材形成に関わる研究ミニレビュー

半ら (Nakaba et al. 2011, 2012a, b, 2013, 2015, 2016) は、2010 年代以前より心材形成のみにとどまらない、二次木部における「細胞死」をキーワードに各種顕微鏡法を駆使して研究を続けている。これら一連の研究は、放射柔細胞が死んで心材が形成されるときになにがおこっているか、心材形成に関係ない(と考えらる)二次木部での細胞死とどう違うか、心材成分の合成と細胞が死に至る過程での細胞の変化の関係性、を細胞学的に詳細に明らかにしているが、これらのことは心材形成メカニズム研究にとって極めて重要である。心材成分の生成と変化のダイナミクスを議論する際に、心材成分が合成される舞台である放射柔細胞の詳細変化の情報は必要不可欠である。

通常「木材」を扱う人にとって、心材とは心材色を呈している部分である。例えばスギやカラマツは肉眼レベルでは着色で判断した心材と辺材の境界が明確である。ところが顕微鏡レベルで、この細胞から心材、あるいは心材色がついた細胞はこれ、ということをお断言することは通常困難である。また、心材成分の多くは単離してみるとしばしば無色であり、無色のものをみることはなかなか難しい。そこで、例えば Nakada & Fukatsu (2012) では肉眼で決定した辺材/心材境界をマーキングしてから細胞学的検討を行うための顕微鏡切片を作成しているし、今井らのスギノルリグナン分布の研究(たとえば今井 2012)では肉眼で決定した移行材を細かく分割して化学分析を行うことによって心材成分の分布変化を追っている。

木材利用にとって実用的な心材の特徴である色と耐腐朽性は心材成分によってもたらされている。いわば心材成分は心材形成の主役である。主役たる心材成分を高い解像度で目に見えるようにすることすなわち可視化の重要性は高い。Kuroda et al. (2014) はスギ心材成分のひとつフェルギノールを SEM レベルの解像度で TOF-SIMS により可視化するにとどまらず、Cryo-SEM との併用によって心材成分分布と水分分布の関係を細胞レベルの解像度で明らかにした。河西ら (2015) はカラマツの主要心材成分フラボノイドを光学顕微鏡レベルで可視化した。この詳細については本シンポジウムで詳細に報告される(河西 2016)。心材成分は放射柔細胞で作られて他の細胞に拡散して細胞壁に沈着すると考えられているが、その拡散過程の情報は心材成分の可視化によってこそもたらされる。この点については 2010 年代に先行して張らによって発展し、本シンポジウムで詳細に報告される(張 2016)。

心材の謎の項ですでに述べたが、心材成分量の樹木個体内分布を調べると、心材最外層で多く心材内方にむけて減っていくものが多い。この原因については、元々の生産量に対する年齢効果、経時的な分解、経時的な重合などが考えられていたが、Yanase et al. (2015) はスギの主要心材成分であるアガサレジノールとセクイリン C が実際に二次的に重合して存在していることについての直接的な証拠を得た。この点については本シンポジウムで詳細に報告される(築瀬 2016)が、築瀬らによる研究は生細胞のない心材の内方で心材成分が大きく変化するという、まさしく心材成分のダイナミクスを物語る成果である。

心材は木材の重要な特徴であるため、木材利用にとって有利な心材の特徴を遺伝的に改良する需要が高い。これまでにもスギなどで心材色や心材量のクローンあるいは家系間差が調べられているが、Bito et al. (2011) はスギの主要心材成分であるアガサレジノールとセクイリン C の量のクローン間変異を調べた。このことは心材成分の質と量について育種が可能なことのみならず、心材成分の重合についても多くの示唆を与える成

果である。

アカマツなどマツ属の *Pinus* 亜属（いわゆる二葉松類、hard pine）では、辺材で薄壁だった放射柔細胞が心材形成にともなって二次壁を肥厚することが知られている。Zheng et al. (2014a, b) はアカマツ放射柔細胞の二次壁肥厚について、GC-MS による抽出成分、偏光顕微鏡による細胞壁の壁層構成、UV 顕微鏡・アセチルブロマイド法・TOF-SIMS によるリグニン、さらにマイクロダイセクションによって得た微小試料のさらなる化学分析を組み合わせ、この事象の詳細を解剖学的かつ化学的に明らかにした。この研究は新旧の技術を組み合わせる事象を詳細に検討することによってその事象についての深い理解が可能になることの好例であり、今後の心材形成研究のひとつの方向性を示すものではないかと考えている。

心材に水分が集積する現象である wetwood（中田 2014）の形成メカニズムの研究に関して、2010 年代前半に重要な成果がいくつか得られた。スギやトマツでは心材中のカリウム量と心材の含水率（すなわち心材形成に伴う自由水の再侵入）の間に関係があることが知られている。Okada et al. (2011, 2012) は辺材に人工的に注入したルビジウムについて、Kuroda et al. (2013) は東日本大震災によって福島第一原子力発電所から拡散した放射性セシウムについて、それらのスギ心材中での分布、さらに辺材から心材への移動を検討している。ルビジウムとセシウムはカリウムと化学的性質が似ているが、カリウムと異なり樹幹中の天然での存在は極めて少ない。これらの結果から、ルビジウムおよびセシウム、そしておそらくカリウムも、辺材から心材に拡散現象としてではなく、選択的、能動的に取り込まれていると考えられた（黒田 2015）。

自由水がほとんど存在しない移行材という障壁を越えて心材形成に伴う自由水の再侵入が生じる際の水分通道路の候補として、放射柔細胞および放射仮道管の内腔と、放射組織の細胞間隙を挙げることができる。Nagai & Utsumi (2012) は Cryo-SEM 観察によりスギの移行材では放射柔細胞と放射組織の細胞間隙には水がないことを報告し、Barnard et al. (2013) はいくつかの針葉樹で辺材についても放射組織は水分の放射方向移動にはほとんど関わっていないことを報告している。これらの結果は放射組織が水の通路としては役立っていないことを意味しており、心材形成に伴う水分の再侵入についての謎が一層深まった。

樹木の樹幹の最も重要な機能の一つが根から葉への水分通道であり、この機能なしでは樹木の生存はありえない。樹木水分生理は、樹木全体の生存、樹木の樹体の成長、果樹における果実の生産性に大きく影響するため、農学・植物学において重要な学問分野である。特に針葉樹において直径と心材量に密接な関係があること、つまり辺材量はほぼ一定にメンテナンスされているようにみえることから、心材形成と水分環境の関係についても関心が向けられている。気候変動による水分環境の変化に伴う植物の適応に関心が高まっている（Choat et al. 2012）こともあり、近年樹木水分生理学について、特に樹液流動についての測定手法とその適用が発展してきているが（Steppe et al 2010, Hao et al. 2013）、心材形成に及ぼす水環境の影響に関して 2010 年代に報告されている（Reyes-Garcia et al. 2012, Beauchamp et al. 2013, Chan et al. 2013）。心材形成に伴う水分状態の変化の季節性を把握することを目的として、筆者は現在辺材水分量や樹液流量について高い時間分解能 (<1h) で長期間連続的 (>1yr) にモニタリングを行うことを試みており、今回の木材学会でも発表を行った。

細胞死、心材成分合成、心材形成に伴う放射柔細胞の二次壁形成、カリウムの辺材から心材への能動的輸送には、心材の完成間際まで活動している放射柔細胞での遺伝子発現とタンパク質合成が必要である。これに関して Huang et al. (2010) や Yoshida et al. (2012) や Nakaba et al. (2015) のような成果がでてきているものの、近年の遺伝子研究の興盛の中において心材形成関連遺伝子研究は進歩が遅い。樹幹の奥深くで進行し、いつなにかおこっているかよくわからない心材形成研究の特異性がこの原因と考えられる。

上に挙げた研究のうちいくつかは心材形成の四要素の相互関係を検討しているが、時間経過にそって四要素が生じる順番を知ることができれば心材形成メカニズムに迫ることができるだろう。Nakada & Fukatsu (2012) はカラマツを材料として四季ごとに材料を伐採して研究を行い、細胞死、心材成分の堆積、水分変化を同時にモニタリングして、心材形成の要素によってその生じる季節が違ふというモデルを提唱した。このモデルでは心材色と水分分布によって移行材の範囲を定義し、観察された事実とその時期を組み合わせることで考察した結果、細胞死、移行材の形成、心材色の呈色それぞれが生じている季節を特定した。この研究では心材色と水分分布で決定した移行材の幅の変化を軸として考察を行い、心材形成の要素ごとの季節性を議論している。今井 (2012) は心材形成機構・過程の理解に「時間軸」が必要であるとし、スギでノルリグナンの量を時間軸とした心材形成研究について議論している。今井らは移行材から小片を連続的に採取して化学分析を行っているが、顕微鏡レベルでの細胞死を検討するなど心材形成の四要素相互の関係性を検討する場

合に時間軸として心材成分を利用するとすれば、心材成分の可視化は不可欠であり、この点からも張 (2016) や河西 (2016) のような心材成分の可視化が極めて重要になる。

## おわりに

上のミニレビューをざっと眺めると、心材形成の謎に挙げた 5 つのうち下 4 つについてなんとなく解決の糸口ができたような感がある。もちろん真の解決に向けてはその道のりが長いことは間違いないものの、2010 年代当初に比べれば飛躍的な進歩を遂げたのではないかと感じている。一番重要な「心材形成はなぜ起きる」については、そのほかの 4 つの謎の解決と、四要素の相互関係を時間軸にそって考察することにより迫ることができるのではないだろうか。心材形成はなぜ起きる、すなわち心材形成メカニズムの解明は、心材の質と量をコントロールすることによって林業・林産業に貢献するのみならず、木材・木質をより広い分野で材料として一層活用することによる資源循環型社会の確立に役立つと考える。本シンポジウムにより、現在マイナーな分野である心材研究へ多くの人々が参入し、心材形成の謎がひとつひとつ解決されることを期待したい。まだ 2010 年代は 4 年ほどあり 2010 年代を心材の decade にすることは可能だし、2020 年代が心材の decade になることになっても筆者はまったく構わない。

## 文献

- Barnard DM, Lachenbruch B, McCulloh KA, Kitin P, Meinzer FC (2013) Do ray cells provide a pathway for radial water movement in the stem of conifer trees? *American Journal of Botany* 100 322-331
- Beauchamp, K.; Mencuccini, M.; Perks, M.; Gardiner, B. (2013) The regulation of sapwood area, water transport and heartwood formation in Sitka spruce. *Plant Ecology & Diversity* 6 45-56
- Bito N, Nakada R, Fukatsu E, Matsushita Y, Fukushima K, Imai T (2011) Clonal variation in heartwood norlignans of *Cryptomeria japonica*: evidence for independent control of agathareginol and sequirin C biosynthesis. *Annals of Forest Science* 68 1049-1056
- Chan, J. M.; Raymond, C. A.; Walker, J. C. F. (2013) Development of heartwood in response to water stress for radiata pine in Southern New South Wales, Australia. *Trees: Structure and Function* 27 607-617
- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Bucci SJ, Feild TS, Gleason SM, Hacke U, Jacobse AL, Lens F, Maherali H, Martínez-Vilalta J, Mayr S, Mencuccini M, Mitchell PJ, Nardini A, Pittermann J, Pratt RB, Sperry JS, Westoby M, Wright IJ, Zanne AE (2012) Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* 491 752-755
- Hao GY, Wheeler JK, Holbrook NM, Goldstein G (2013) Investigating xylem embolism formation, refilling and water storage in tree trunks using frequency domain reflectometry. *Journal of Experimental Botany* 64 2321-2332
- Huang Z, Tsai CJ, Harding SA, Meilan R, Woeste K (2010) A cross-species transcriptional profile analysis of heartwood formation in black walnut. *Plant Molecular Biology Reporter* 28 222-230
- 今井貴規 (2012) 心材形成の化学. *木材学会誌* 28 669-676
- 河西優衣, 尾頭信昌, 中田了五, 今井貴規 (2015) 蛍光顕微鏡法によるカラマツ心材成分の組織内分布の可視化. *木材学会誌* 61 297-307
- 河西優衣 (2016) カラマツ組織における心材成分の堆積様式および分布の可視化. 中田・今井編「日本木材学会組織と材質研究会・抽出成分利用研究会合同シンポジウム 2016 心材成分のダイナミクス」日本木材学会組織と材質研究会・抽出成分利用研究会  
<[http://www.jwrs.org/kenkyu/wa\\_wp/resources/2016spring/abstract.pdf](http://www.jwrs.org/kenkyu/wa_wp/resources/2016spring/abstract.pdf)>
- Kuroda K, Kagawa A, Tonosaki M (2013) Radiocesium concentrations in the bark, sapwood and heartwood of three tree species collected at Fukushima forests half a year after the Fukushima Dai-ichi nuclear accident. *Journal of Environmental Radioactivity* 122 37-42
- Kuroda K, Fujiwara T, Hashida K, Imai T, Kushi M, Saitoh K, Fukushima K (2014) The accumulation pattern of ferruginol in the heartwood-forming *Cryptomeria japonica* xylem as determined by time-of-flight secondary ion mass spectrometry and quantity analysis. *Annals of Botany* 113 1029-1036
- 黒田克史 (2015) 木部における柔細胞の役割、物質移動と心材形成. *木材学会誌* 61 131-135

- Nagai S, Utsumi Y (2012) The function of intercellular spaces along the ray parenchyma in sapwood, intermediate wood and heartwood of *Cryptomeria japonica* (Cupressaceae). *American Journal of Botany* 99 1553-1561
- Nakaba S, Kubo T, Funada R (2011) Nuclear DNA fragmentation during cell death of short-lived ray tracheids in the conifer *Pinus densiflora*. *Journal of Plant Research* 124: 379-384
- Nakaba S, Yamagishi Y, Sano Y, Funada R (2012a) Temporally and spatially controlled death of parenchyma cells is involved in heartwood formation in pith regions of branches of *Robinia pseudoacacia* var. *inermis*. *Journal of Wood Science* 58: 69-76
- Nakaba S, Begum S, Yamagishi Y, Jin HO, Kubo T, Funada R (2012b) Differences in the timing of cell death, differentiation and function among three different types of ray parenchyma cells in the hardwood *Populus sieboldii* x *P. grandidentata*. *Trees-Structure and Function* 26: 743-750
- Nakaba S, Sano Y, Funada R (2013) Disappearance of microtubules, nuclei and starch during cell death of ray parenchyma in *Abies sachalinensis*, *IWA Journal* 34: 135-146
- Nakaba S, Takata N, Yoshida M, Funada R (2015) Continuous expression of genes for xylem cysteine peptidases in long-lived ray parenchyma cells in *Populus*. *Plant Biotechnology* 32: 21-29
- Nakaba S, Arakawa I, Morimoto H, Nakada R, Bito N, Imai T, Funada R (2016) Agatharesinol biosynthesis-related changes of ray parenchyma in sapwood sticks of *Cryptomeria japonica* during cell death. *Planta Online* First DOI: 10.1007/s00425-016-2473-y
- 中田了五 (2010) 日本木材学会秋のシンポジウム 2010-心材の形成-. 日本木材学会組織と材質研究会 <[http://www.jwrs.org/kenkyu/wa\\_wp/resources/2010abstract.pdf](http://www.jwrs.org/kenkyu/wa_wp/resources/2010abstract.pdf)>
- Nakada R, Fukatsu E (2012) Seasonal variation of heartwood formation in *Larix kaempferi*. *Tree Physiology* 32 1497-1508
- 中田了五 (2014) 樹木の wetwood 現象と定義. *木材学会誌* 60 63-79
- Okada N, Hirakawa Y, Katayama (2011) Application of activable tracers to investigate radial movement of minerals in the stem of Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*) *Journal of Wood Science* 57 421-428
- Okada N, Hirakawa Y, Katayama (2012) Radial movement of sapwood-injected rubidium into heartwood of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) in the growing period. *Journal of Wood Science* 58 1-8
- Reyes-Garcia, C.; Andrade, J. L.; Sima, J. L.; Us-Santamaria, R.; Jackson, P. C. (2012) Sapwood to heartwood ratio affects whole-tree water use in dry forest legume and non-legume trees. *Trees: Structure and Function* 26 1317-1330
- Steppe K, De Pauw DJW, Doody TM, Teskey RO (2010) A comparison of sap flux density using thermal dissipation, heat pulse velocity and heat field deformation methods. *Agricultural and Forest Meteorology* 150 1046-1056
- Yanase Y, Sakamoto K, Imai T (2015) Isolation and structural elucidation of norlignan polymers from the heartwood of *Cryptomeria japonica*, *Holzforshung* 69 281-296
- 築瀬優 (2016) スギ心材成分ノルリグナンの二次変化. 中田・今井編「日本木材学会組織と材質研究会・抽出成分利用研究会合同シンポジウム 2016 心材成分のダイナミクス」 日本木材学会組織と材質研究会・抽出成分利用研究会 <[http://www.jwrs.org/kenkyu/wa\\_wp/resources/2016spring/abstract.pdf](http://www.jwrs.org/kenkyu/wa_wp/resources/2016spring/abstract.pdf)>
- Yoshida K, Futamura N, Nishiguchi M (2012) Collection of expressed genes from the transition zone of *Cryptomeria japonica* in the dormant season. *Journal of Wood Science* 58 89-103
- 張春花 (2016) 広葉樹における心材成分の移動とその経路. 中田・今井編「日本木材学会組織と材質研究会・抽出成分利用研究会合同シンポジウム 2016 心材成分のダイナミクス」 日本木材学会組織と材質研究会・抽出成分利用研究会 <[http://www.jwrs.org/kenkyu/wa\\_wp/resources/2016spring/abstract.pdf](http://www.jwrs.org/kenkyu/wa_wp/resources/2016spring/abstract.pdf)>
- Zheng P, Aoki D, Yoshida M, Matsushita Y, Imai T, Fukushima K (2014a) Lignification of ray parenchyma cells in the xylem of *Pinus densiflora*. Part I: Microscopic investigation by POM, UV microscopy, and TOF-SIMS. *Holzforshung* 68 897-906
- Zheng P, Aoki D, Matsushita Y, Yagami S, Fukushima K (2014b) Lignification of ray parenchyma cells in the xylem of *Pinus densiflora*. Part II: Microchemical analysis by laser microdissection and thioacidolysis. *Holzforshung* 68 907-914

# 広葉樹における心材成分の移動とその経路

森林総合研究所・組織材質研究室 張 春花

## はじめに

放射組織は養分の貯蔵・分配をつかさどる組織であり、心材成分の供給源でもあることから、木部における放射組織と軸方向要素との接触は、重要な意味を持つと考えられてきた。しかし、広葉樹形成層の板目面で細胞配列を観察すると、樹種によっては多くの紡錘形始原細胞が放射組織と接触点を持たないことに気づく。これらの紡錘形始原細胞は分化の過程で上下に伸長し、放射組織と接触点を新生する場合もあるだろう。そこで詳細に調べた結果、成熟木部においても相当な数の木部繊維が、放射組織と接触していない事実が判明した (Zhang *et al.* 2003)。

針葉樹においては、心材成分は主に放射柔細胞で合成され、半縁壁孔対を通じて隣接している仮道管内に放出され、次第に仮道管内表面を伝って拡散し、その後細胞壁に浸透していくと報告されている。もし、広葉樹においても上記と同様なプロセスで心材成分の合成・移動が行われるのであれば、1)放射組織と接触していない木部繊維に心材成分が堆積することは可能であろうか？また、2)可能であれば、どのような経路によって心材成分が移動するのか？という疑問が生ずる。

本講演では、上記の疑問を検証するため、辺・心材境界が明瞭であり、心材色も比較的濃厚なともにマメ科の樹種、ネムノキ (*Albizia julibrissin*) とアカシアマンギウム (*Acacia mangium*) を供試木として行った研究を紹介する。

## 心材成分の分布

### —光学顕微鏡観察—

着色心材を有する両供試木の辺材、辺・心材境界部 (移行材) および心材を含む木口切片を、無染色のまま光学顕微鏡で観察すると、辺材部では見られない着色が、移行材から心材部に向かって濃厚になっていく様子が見られた。この着色は「着色心材成分」に由来するものであり、着色の濃淡は着色心材成分の「堆積量の多少」を表していると考えられる。

また、心材部において着色むらが観察されたことは、細胞壁や細胞内腔などに堆積している着色心材成分の量に部分的な差異があることを示唆し、心材成分の分布が心材全体にわたって均一ではないことを意味すると考えられる。

さらに、移行材では辺材側から心材側に向かうにしたがって、着色心材成分が観察できる面積 (細胞の数) が徐々に増えていく様子が観察されたため、この現象は移行材における「心材化の進行」を表していると考えられる。アカシアマンギウム移行材の最外側 (最も辺材に近い部分) においては、放射柔細胞にはまだ現れていなかった着色が、軸方向柔細胞の細胞壁や細胞間隙などで先に認められた。このことは、着色心材成分が従来考えられて来た放射柔細胞だけでなく、軸方向柔細胞でも合成されていることを示唆する (Zhang *et al.* 2009)。

### —透過型電子顕微鏡観察—

硫酸鉄染色した超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察すると、フェノール類を主とする心材成分が沈着している部位は電子密度が高く、濃く（黒く）写ることが報告されている（Kuo *et al.* 1980）。

本研究では、上記の方法を用いて供試木における心材成分の堆積・分布を可視化した。その結果、放射組織と接していながら、心材成分の堆積が見られない木部繊維が存在する一方、放射組織と離れていても、心材成分が堆積している木部繊維が観察された。また、心材成分は細胞内腔や壁孔といった細胞内スペースのみならず、細胞外スペースである細胞間隙にも堆積していた（図1）。この中には、放射柔細胞で合成された心材成分が、細胞間壁孔対あるいは盲壁孔を通じて、隣接する細胞あるいは細胞間隙に放出されると思われる場面（図1 a）、心材成分が木部繊維間の有縁壁孔対を通じて移動したと思われる場面（図1 b）、心材成分が壁孔膜に遮られ、隣接する木部繊維に拡散できない場面（図1 c）などが観察された。

以上の電顕観察からも、心材成分の堆積・分布は均一ではないことが明らかとなった。しかしながら、木部繊維における心材成分の堆積の有無と、木部繊維と放射組織との接触の有無との間に関係を見出すには至らなかった。一方、放射柔細胞で合成される心材成分は、細胞間の壁孔対を通じて細胞から細胞へと移動しながら、放射組織から離れた木部繊維にも拡散・堆積すると考えられる。また、心材成分が通過できない壁孔対（図1 c）の存在が心材成分の不均一な分布の一因である可能性も示された（Zhang *et al.* 2004）。

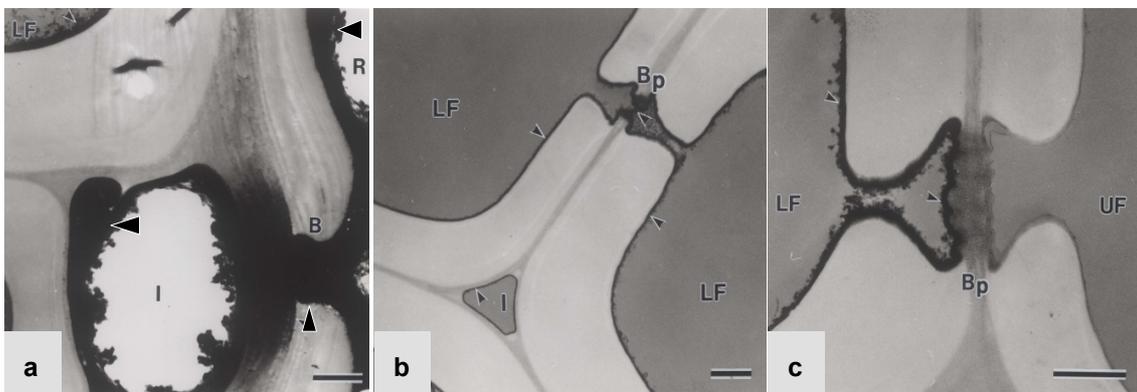


図1 硫酸鉄染色したネムノキ心材の超薄木口切片像

矢頭、心材成分； R, 放射柔細胞； B, 盲壁孔； I, 細胞間隙； Bp, 有縁壁孔対； Bars = 1 $\mu$ m

LF, 細胞内腔表面に心材成分が沈着している木部繊維； UF, 細胞内腔表面に心材成分が沈着していない木部繊維

### 心材成分の移動経路

#### —細胞間壁孔対—

心材成分の移動経路として機能している壁孔対と機能していない壁孔対の違いを調べるため、Sano & Nakada (1998) の方法を用いて供試木の辺材ブロックを放射面で割断し、双方の割断面に露出する木部繊維間有縁壁孔対を、電界放射走査型電子顕微鏡（FE-SEM）により観察した。

壁孔膜は不定形物質によって被覆されている場合とそうでない場合があり、その被覆の程度や壁孔膜の構造などには、壁孔毎の変異が大きかった（図2）。また、壁孔膜が大きく欠落し、中央部に

大きな開口が存在する壁孔対 (図 2-a, b の矢印) も観察されたが、その出現頻度はネムノキに比べてアカシアマンギウムではごく少ないなど、樹種間での差異も顕著であった。さらに、被覆物が壁孔膜全面にわたり厚く堆積し、貫通する空隙が存在しない壁孔対 (図 2-c, d の矢頭) や、被覆物が部分堆積し、貫通する小さな空隙が一つあるいは多数存在する壁孔対 (図 2-a, b の星印) など様々な形態の壁孔対が存在した。したがって、このような壁孔膜の状態の違いが物質の通過性に大きく関与し、心材成分の不均一な分布の一因になっていると思われる。なお、壁孔の直径はネムノキで  $0.6\sim 4\mu\text{m}$ 、アカシアマンギウムで  $0.4\sim 2.3\mu\text{m}$  と変異が大きく、壁孔口の形も円形のものからスリット状のものまで、形態的な変異も大きかった (図 3)。壁孔対が物質の移動経路として機能する際、このような壁孔の形態的な変異がその通過性に影響を及ぼす可能性も考えられる。

以上の観察は、壁孔対における物質の通過性は壁孔膜の構造に依存し、その結果心材成分の細胞内移動経路として機能している壁孔対と、機能していない壁孔対両方が存在することを明らかにした (Zhang *et al.* 2009)。

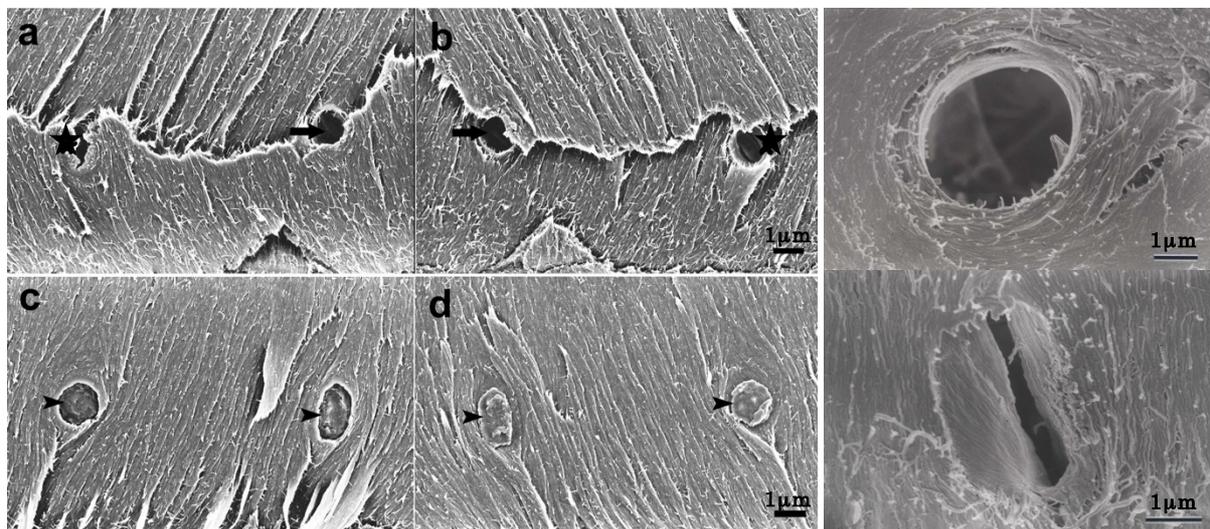


図 2 ネムノキ (a, b) とアカシアマンギウム (c, d) の辺材部木部繊維間壁孔対

図 3 ネムノキ辺材部木部繊維の壁孔口

### —盲壁孔と細胞間隙ネットワーク—

これまでの観察より、供試木の放射柔細胞間および軸方向要素間に大きさの異なる細胞間隙が多く存在していることが判明し、その細胞間隙の立体構造を調べるため樹脂鑄型法 (Fujii 1993) を用いて観察を行った。

放射柔細胞間細胞間隙と軸方向要素間細胞間隙は、放射面において互いに交差し合って (図 4 a, d の矢印) 細胞間隙ネットワークを構築していた。また、軸方向要素の末端部のところで、細胞間隙が分岐あるいは合流しながら互いに連絡し合っている様子 (図 4 b, c, d の星印) が、放射面と板目面両方から観察され、これにより軸方向要素間細胞間隙の横方向 (放射方向と接戦方向) への繋がりが立証された。

さらに、放射柔細胞壁には、おびただしい数の盲壁孔が隣接する細胞間隙に沿って縦列していた (図 4 a, d の矢頭)。放射柔細胞で合成される心材成分は、これらの盲壁孔を通じて迅速且つ大量に

隣接する細胞間隙に移動できると思われ、盲壁孔と細胞間隙ネットワークともに心材成分の細胞外移動経路であると結論できる (Zhang *et al.* 2004, 2009)。

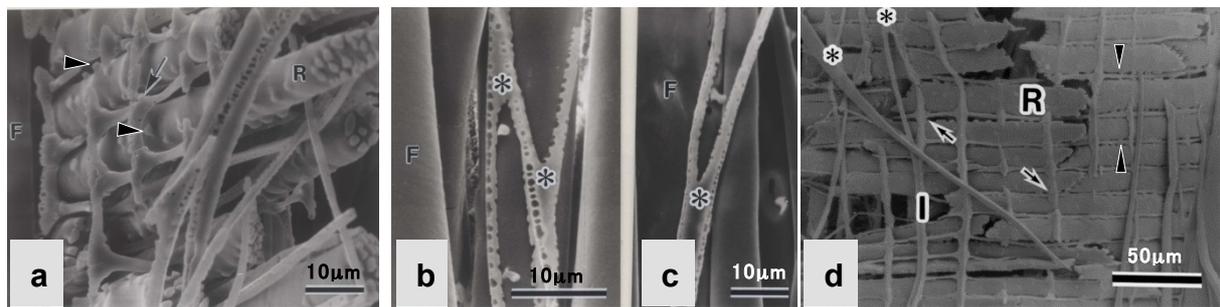


図4 ネムノキ (a, b, c) とアカシアマンギウム (d) の辺材部樹脂铸型 (resin-cast replica)

細糸状铸型 (I), 細胞間隙; 小突起, 壁孔; 矢頭, 盲壁孔; R, 放射柔細胞; F, 木部繊維

矢印, 放射柔細胞間細胞間隙と軸方向要素間細胞間隙の交差点; 星印, 細胞間隙の分岐点 (合流点)

## まとめ

ネムノキとアカシアマンギウムにおいて心材成分は放射柔細胞および軸方向柔細胞で合成され、細胞内移動経路と細胞外移動経路により周辺細胞や細胞間隙に拡散する。細胞内移動経路：放射柔細胞で合成される心材成分は、半縁壁孔対を通じて隣接する木部繊維や道管要素などの軸方向要素に移動し、軸方向要素間壁孔対を通じて細胞から細胞へと移動しながら、放射組織と接していない木部繊維にも拡散・堆積する。しかし、壁孔対によっては移動経路として機能しない場合もあるため、心材成分は心材全体にわたって不均一に堆積・分布すると考えられる。細胞外移動経路：放射柔細胞で合成される心材成分は、放射柔細胞壁に存在するおびただしい数の盲壁孔を通じて、迅速且つ大量に隣接する細胞間隙に放出され、次第に細胞間隙ネットワークによって拡散する。

## おわりに

針葉樹に比べて広葉樹木部の構造はより複雑で、樹種間での違いも大きい。したがって、心材成分の移動経路において樹種間で違いが存在してもおかしくない。しかし、本研究で調べた樹種はわずか2樹種に限られているため、今後より多くの樹種を調べる必要がある。

## 謝辞

本研究を進めるにあたりご指導下さいました、京都大学・藤田稔名誉教授と高部圭司教授に御礼申し上げます。

また、本研究の一部は、北海道大学・佐野雄三教授、森林総合研究所・藤原健博士と安部久博士との共同研究であり、「日本学術振興会・研究費」により行われたものである。

## 引用および関連文献

福島和彦・船田良・杉山淳司・高部圭司・梅澤俊明・山本浩之 (2003) 木質の形成. 海青社  
古野毅・澤辺攻 (1996) 組織と材質. 海青社

- Fujii, T. 1993. Application of a resin casting method to wood anatomy of some Japanese Fagaceae species. IAWA J. 14(3), 273-288.
- Kuo, M.L. and D.G Arganbright. 1980. Cellular distribution of extractives in redwood and incense cedar. Part II. Microscopic observation of the location of cell wall and cell cavity extractives. Holzforschung 34, 41-47.
- Sano, Y. & R. Nakada. 1998. The course of the secondary deposition of incrusting materials on bordered pit membranes in *cryptomeria japonica*. IAWA J. 19 (3), 285-299.
- Zhang, C., M. Fujita and K. Takabe. 2003. Contact and non-contact proportions between axial elements and rays. IAWA J. 24 (3), 247-255.
- Zhang, C., M. Fujita and K. Takabe. 2004. Extracellular diffusion pathway for heartwood substances in *Albizia julibrissin* Durazz. Holzforschung 58, 495-500.
- Zhang, C., H. Abe, Y. Sano, T. Fujiwara, M. Fujita and K. Takabe. 2009. Diffusion pathways for heartwood substances in *Acacia mangium*. IAWA J. 30 (1), 37-48.

# カラマツ組織における心材成分の堆積様式および分布の可視化

元名古屋大学 河西優衣

## はじめに

カラマツ (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière) 材は耐腐朽性に優れ<sup>i, iii)</sup>、また経年変化により飴色と呼ばれる美しい色調を呈するため公共建築の内装材などとして利用されている。カラマツ材利用において重要となるこれらの形質は、その心材の性質に関連し、特に心材に含まれる抽出成分すなわち心材成分に起因すると考えられている<sup>i, iii)</sup>。

カラマツの主要な心材成分はフラボノイドであり、このうちタキシホリンおよびジヒドロケンフェロールが主成分であることが知られている<sup>iii, iv)</sup>。これらの放射方向での含有量変化について、辺材から辺・心材の境界にかけて増大し、髄へ向かって減少傾向を示すことが報告されている<sup>viii, v)</sup>。一方、材組織・細胞レベルにおいては、どのように心材成分が堆積し、組織中に分布・存在しているかについて不明な点が多く残されている<sup>ri)</sup>。これらを明らかにすることは、心材形成機構の解明といった樹木生理基礎学問上ひいては樹種特性の理解や木材利用の上で重要となる。

心材成分の生合成・移動・堆積に関して、心材成分は放射柔細胞で生合成され、分野壁孔を通過して近傍軸方向要素に移動し、軸方向要素の細胞壁内腔に沈着し、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<sup>vi)</sup>。一方、一般的な化学染色等によって真に心材成分が観察されている確証はない。

カラマツ心材成分の大部分を占めるフラボノイドは自家蛍光を持ち、加えてその蛍光がフラボン試薬 (2-アミノエチルジフェニルボリナート、2-APB, DPBA) 処理により強められることが知られている<sup>viii-ix)</sup>。そのため、フラボン試薬-蛍光顕微鏡法が種々植物組織中のフラボノイド分布の組織化学的観察手段として使用されている報告がある<sup>x-xiv)</sup>。しかしながら、その蛍光の起源となる化合物について詳細に検討・確認した例や、各種フラボノイドについて、それらの蛍光特性を合わせて検討した例は多くない。

そこで、本研究では、カラマツ主要心材成分であるフラボノイドの材組織内分布の観察を目的とし、DPBA とフラボノイドの蛍光特性に基づき、カラマツにおける心材成分 (フラボノイド) の組織化学的調査を試みた。

## 実験

### 1. カラマツ心材成分の単離同定・蛍光顕微鏡観察

カラマツの心材部酢酸エチル抽出物についてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、さらに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて化合物を精製した。得られた化合物について核磁気共鳴 (NMR) 分析および質量スペクトル分析を行った。

### 2. カラマツ材組織の組織化学的観察

#### 2.1. カラマツ材組織の蛍光顕微鏡観察

滑走式マイクロトームを用いてカラマツ心材および辺材切片 (40  $\mu\text{m}$  厚) を作製した。これらについて DPBA 試薬処理前 (自家蛍光) および 1 時間処理後について蛍光顕微鏡観察を行った。(装置: OLYMPUS BX51, 対物レンズ: 10 $\times$ /0.30, 10 $\times$ /0.50, 光源: キセノンランプ、蛍光キューブ (励起法): NIBA (励起フィルター: BP470~490 nm, 吸収フィルター: BA510~550 nm), NU (BP360~370 nm, BA455 nm))

#### 2.2. 共焦点レーザースキャン顕微鏡 (CLSM) を用いたスペクトルイメージング

滑走式マイクロトームを用いて、カラマツ心材、移行材および辺材の柁目および木口組織薄片 (40  $\mu\text{m}$  厚) を作製し、1 時間 DPBA 試薬処理後、CLSM を用いて観察した。取得した画像について、レファレンススペクトルを用いて分離画像を作製した。(装置: LSM780-DUO-NLO; Zeiss, 対物レンズ: Plan-Apochromat 20 $\times$ /0.8 M27; Zeiss, 励起波長: アルゴンレーザー 488 nm, 蛍光波長: 500~700 nm (8.8 nm ステップ))

#### 2.3. バニリン-塩酸試験

カラマツ心材、移行材および辺材組織切片 (40  $\mu\text{m}$  厚) を、バニリン溶液 (4% (w/v), メタノール) に十分浸した後、スライドガラス上ですぐに濃塩酸を添加し、光学顕微鏡観察した。

### 3. カラマツ材組織における心材成分分布の季節変動調査

#### 3.1. カラマツ材組織中心材成分の定量分析

2011 年 7 月 24 日、10 月 31 日、2012 年 2 月 4 日、4 月 22 日、7 月 30 日に伐採されたカラマツ材より酢酸エチル抽出物を調製し、これについてタキシホリンおよびジヒドロケンフェロールの HPLC 定量分析を行った。

#### 3.2. カラマツ材組織の蛍光顕微鏡観察

2.1.におけるフラボン試薬-蛍光顕微鏡法を用いて、3.1.に記した個体の辺材、移行材、心材を観察した。

## 結果および考察

### 1. カラマツ心材成分の単離同定・蛍光顕微鏡観察

カラマツ心材より6つの心材成分(タキシホリン、ジヒドロケンフェロール、ナリングニン、タキシホリン配糖体、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド、*p*-クマリルアルデヒド)を単離同定した(Fig.1)。カラマツ心材成分標品の自家蛍光とこれらのフラボン試薬処理後の蛍光を比較すると、処理後に蛍光が強まること、またフラボノイドの種類によって蛍光色調・強度(Fig.2A, B、例えば、タキシホリンとジヒドロケンフェロール)が特徴的であることが分かった。フラボノイド以外の物質では、その蛍光が強まることはなかった。したがって、フラボン試薬処理によってフラボノイドを選択的に蛍光顕微鏡で観察できることが分かった。

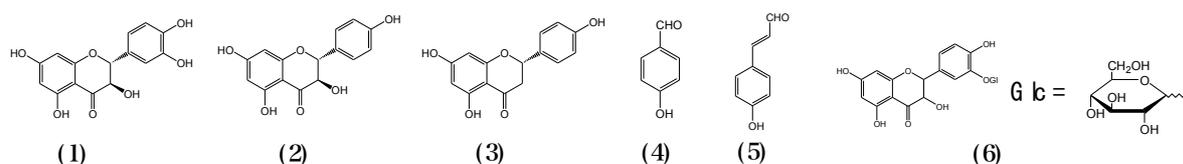


Fig.1. Chemical structures of the compounds isolated from the heartwood of Japanese larch in this study.

Notes : (1) (2*R*, 3*R*)-taxifolin, (2) (2*R*, 3*R*)-dihydrokaempferol, (3) (2*S*)-naringenin, (4) 4-hydroxybenzaldehyde, (5) *p*-coumaryl aldehyde, (6) taxifolin 3'-*O*-glucoside.

### 2. カラマツ材組織の組織化学的観察

#### 2.1. カラマツ材組織の蛍光顕微鏡観察

フラボン試薬処理後-蛍光顕微鏡観察では、心材は明瞭な蛍光を呈し、これと比較して辺材の蛍光は極めて弱いものであった(Fig.3)。移行材では放射柔細胞が特徴的に蛍光を呈した。透過光下において一部心材放射柔細胞中に褐色部位が観察されたが、これら褐色部位は蛍光を呈さなかった(後述 2.3)。

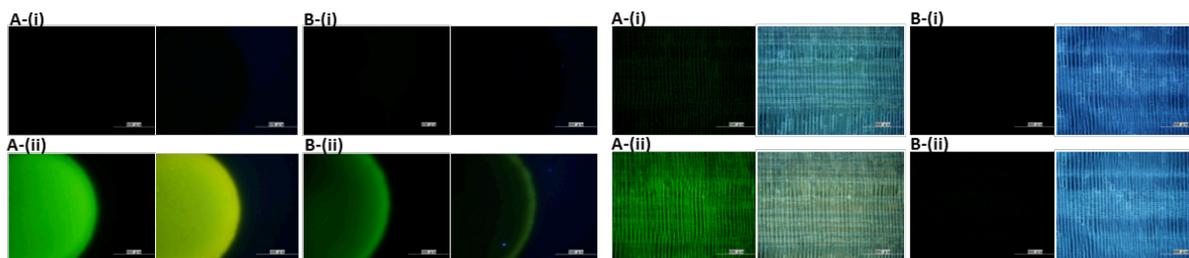


Fig.2. Fluorescence microscope images of membrane tests. (A) dihydrokaempferol, (B) taxifolin. (i) autofluorescence, (ii) stained with 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB, DPBA). Each block left: NIBA, right: NU. Bar: 500  $\mu$ m.

Fig.3. Fluorescence microscope images of larch wood. (radial section) (A) heartwood, (B) sapwood, (i) autofluorescence, (ii) stained with 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB, DPBA). Each block left: NIBA, right: NU. Bar: 500  $\mu$ m.

#### 2.2 共焦点レーザースキャン顕微鏡観察

先ず上述 1.の各種フラボノイドを浸みこませた辺材薄片のフラボン試薬処理後の蛍光スペクトルを測定・登録し、レファレンススペクトルとした。DPBA 処理後のカラマツ組織薄片の波長情報を取得し、レファレンススペクトルを用いて分離処理した。フラボン試薬処理後の心材ではフラボノイド標品と一致するスペクトル画像が得られた。同一条件を用いた場合、辺材ではほとんど検出されなかったが、放射柔細胞内に微弱な蛍光を呈する物質が存在していた。移行材では放射柔細胞が特徴的に蛍光を呈した。以上結果は蛍光顕微鏡観察の結果を

支持し、蛍光の起源をスペクトルレベルで同定することができた。

### 2.3. バニリン-塩酸試験

上述 2.1.の一部心材放射柔細胞中に観察された褐色の堆積物が、フラボノイドからさらに重合が進んだプロアントシアニジン<sup>xv)</sup> (PA, フラボノイド重合体) である可能性を考え、PAの呈色法であるバニリン-塩酸試験<sup>xvi-xix)</sup>を行った。その結果、放射柔細胞内の、特に心材最外部の晩材の放射柔細胞は濃赤色を呈し、PAが堆積している様子が観察された。一方で、心材放射柔細胞内の褐色物質はほとんど呈色しなかった。また、辺材および移行材部晩材の放射柔細胞では呈色が見られなかった。

カラマツ組織中のデンプン含有量は辺材の最内部で最大となり、心材ではほとんど存在しないことが報告されている<sup>vi, xx)</sup>。また、ダグラスファーの心材色の原因についてタキシホリンが変化したプロアントシアニジンである可能性<sup>xxi)</sup>や、さらにプロアントシアニジンが褐色物質へと変化することが報告されている<sup>xxii, xxiii)</sup>。今回の観察結果および先行研究から、カラマツの放射柔細胞において、辺材に蓄積されたデンプンが辺材部心材側および移行材で心材成分フラボノイドへ（無色～淡黄色）と変化し、心材化に伴い、プロアントシアニジン（無色）を経てさらに褐色物質へと変化することが推察された。

## 3. カラマツ材組織における心材成分分布の季節変動

### 3.1. カラマツ材組織中心材成分の定量分析

タキシホリンおよびジヒドロケンフェロールは、辺材には存在せず、移行材にかけて増加した。さらに、心材最外年輪にかけて増加し、髄2年輪にかけて減少した。先行研究<sup>v)</sup>のように部位間に差はみられたが、季節間での有意な心材成分含有量の変動は確認されなかった。

### 3.2. カラマツ材組織の蛍光顕微鏡観察

移行材早材部の放射柔細胞では4月に比べ7月と10月にフラボノイドの蛍光が強くなる傾向が見られた。また、7月と10月では軸方向仮道管の細胞壁においても蛍光が観察され、蛍光強度は7月から10月にかけて強くなった。心材では、特に心材最外部早材において4月に比べ7月から10月にかけて蛍光が強くなり、2月に弱まる傾向がみられた<sup>xxiv)</sup>。

また、心材成分の分布および堆積様式の季節変動として、春から移行材早材部の放射柔細胞でフラボノイドが堆積し始め、晩夏から秋にかけて放射柔細胞から周辺の軸方向要素への拡散が促進されることが予想された。心材では、秋から冬にかけてフラボノイドが重合などにより、蛍光を発しない物質に変化した可能性が考えられた。以上、組織・細胞レベルにおいて、抽出成分の生合成・堆積・二次変化などの挙動の季節変動が示された。

### まとめ

本研究ではフラボン試薬-蛍光顕微鏡法および共焦点レーザー顕微鏡のスペクトルイメージング法によって、カラマツ心材組織中の心材成分フラボノイドを可視化できることを示し、さらに分布・体積様式を観察することができた。また、バニリン塩酸試験からはカラマツ心材放射柔細胞内にプロアントシアニジンが堆積することが分かった。

本研究を基盤に今後さらに心材形成と心材成分の体積・分布に関する知見が深まることを期待している。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導、ご教示を賜りました名古屋大学大学院生命農学研究科の今井貴規准教授に心より御礼申し上げます。また、同研究科の谷口光隆教授、吉田正人准教授、大井崇生助教、三屋史朗助教、東京農工大農学研究院の半智史助教、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所の佐藤良勝チーフコーディネーター、森林総合研究所林木育種センター北海道育種場の中田了五博士には多大なるご助力を賜りました。この場をお借りし、感謝申し上げます。

本研究の一部は名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所(ITbM)の支援により実施されました。

## 引用文献

---

- i) Gierlinger, N., Jacques, D., Schwanninger, M., Wimmer, R., Paques, L. E. : Heartwood extractives and lignin content of different larch species (*Larix* sp.) and relationships to brown-rot decay-resistance. *Trees*. **18**(2), 230-236 (2004).
- ii) Gierlinger, N., Jacques, D., Grabner, M., Wimmer, R., Schwanninger, M., Rozenberg, P., Paques, L. E. : Colour of larch heartwood and relationships to extractives and brown-rot decay resistance. *Trees*. **18**(1), 102-108 (2004).
- iii) Sasaya, T., Demachi, S., Terazawa, M. : Studies on the extractives of Larch report 11 : Determination of flavonoids in *Larix leptolepis*. 北海道大学農学部演習林研究報告. **27**(2), 429-443 (1970).
- iv) 竹原太賀司, 笹谷宜志 : カラマツの抽出成分に関する研究 : 辺材のフェノール成分. 北海道大学農学部演習林研究報告. **36**(3), 681-693 (1979).
- v) 笹谷宜志 : 樹幹内における抽出成分の分布と堆積 (第II報) : カラマツ樹幹のフェノール成分. 北海道大学農学部演習林 研究報告. **44**(4), 1417-1434 (1987).
- vi) Nakada, R., Fukatsu, E. : Seasonal variation of heartwood formation in *Larix kaempferi*. *Tree Physiol.* **32**(12), 1497-1508 (2012).
- vii) Agati, G., Stefano, G., Biricolti, S., Tattini, M. : Mesophyll distribution of 'antioxidant' flavonoid glycosides in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance. *Ann. Bot.* **104**(5), 853-861 (2009).
- viii) Matteini, P., Agati, G., Pinelli, P., Goti, A. : Modes of complexation of rutin with the flavonoid reagent diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester. *Mon. Chem.* **142**(9), 885-893 (2011).
- ix) Buer, C. S., Imin, N., Djordjevic, M. A. : Flavonoids: New roles for old molecules. *J Integr Plant Biol.* **52**(1), 98-111 (2010).
- x) Peer, W. A., Brown, D. E., Tague, B. W., Muday, G. K., Taiz, L., Murphy, A. S. : Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**(2), 536-548 (2001).
- xi) Kasuga, J., Hashidoko, Y., Nishioka, A., Yoshiba, M., Arakawa, K., Fujikawa, S. : Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high

---

anti-ice nucleation activity. *Plant Cell Environ.* **31**(9), 1335-1348 (2008).

xii) Morkunas, I., Narożna, D., Nowak, W., Samardakiewicz, S., Remlein-Starosta, D.: Cross-talk interactions of sucrose and *Fusarium oxysporum* in the phenylpropanoid pathway and the accumulation and localization of flavonoids in embryo axes of yellow lupine. *Plant Physiol.* **168**(5), 424-433 (2011).

xiii) Mukai, R., Shirai, Y., Saito, N., Yoshida, K., Ashida, H. : Subcellular localization of flavonol aglycone in hepatocytes visualized by confocal laser scanning fluorescence microscope. *Cytotechnology.* **59**(3), 177-182 (2009).

xiv) Kitin, P., Voelker, S. L., Meinzer, F. C., Beeckman, H., Strauss, S. H., Lachenbruch, B. : Tyloses and phenolic deposits in xylem vessels impede water transport in low-lignin transgenic poplars: a study by cryo-fluorescence microscopy. *Plant Physiol.* **154**(2), 887-898 (2010).

xv) Hammerbacher, A., Paetz, C., Wright, P. L., Fischer, C. T., Bohlmann, J., Davis, J. A., Fenning, M. T., Gershenzon, J., Schmidt, A. : Flavan-3-ols in Norway Spruce: Biosynthesis, Accumulation, and Function in Response to Attack by the Bark Beetle-Associated Fungus *Ceratocystis polonica*. *American Society of Plant Biologists*, **164**(4), 2107-2122 (2014).

xvi) Nakamura, Y., Tsuji, S., Tonogai, Y. : Analysis of Proanthocyanidins in Grape Seed Extracts, Health Foods and Grape Seed Oils. *Journal of Health Science.* **49**(1), 45-54 (2003).

xvii) Mitsunaga, T., Doi, T., Kondo, Y., Abe, I. : Color development of proanthocyanidins in vanillin-hydrochloric acid reaction. *J Wood Sci.* **44**, 125-130 (1998).

xviii) Liu, Y., Gao, L., Xia, T., Zhao, L. : Investigation of the Site-Specific Accumulation of Catechins in the Tea Plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) via Vanillin-HCl Staining. *J. Agric Fod Chem.* **52**(21), 10371-10376 (2009).

xix) Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N.: Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology.* **91**, 21-40 (2001).

xx) Islam, M. A., Begum, S., Nakaba, S., Funada, R. : Distribution and pattern of availability of starch and cell death of ray parenchyma cells of a conifer tree (*Larix kaempferi*). *Res J Recent Sci.* **1**(5), 28-37 (2012).

xxi) Dellus, V., Scalbert, A., Janin, G. : Polyphenols and colour of Douglas Fir heartwood. *Holzforschung.* **51**(4), 291-295 (1997).

xxii) Walker, J. R. L., Ferrar, P. H. : Diphenol oxidases, enzymecatalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **15**, 457-498 (1998).

xxiii) Pourcel, L., Routaboul, J. M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., Debeaujon, I. : *TRANSPARENT TESTA10* encodes a laccaselike enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell.* **17**(11), 2966-2980 (2005).

xxiv) 奥田梨紗子、河西優衣、中田了五、今井貴規：カラマツ心材形成に伴う抽出成分の堆積様式の季節変化. 第66回日本木材学会大会研究発表要旨集. A28-P-23, (2016).

## スギ心材成分ノルリグナンの二次変化

元名古屋大学 築瀬 優

### はじめに

ノルリグナンはC6-C5-C6炭素骨格をもつ二次代謝物質であり、いくつかの針葉樹や単子葉植物に存在する。スギ (*Cryptomeria japonica*) 心材にはノルリグナンが含まれ、特にアガサレジノールとセクイリンCが主成分である (図-1)。これらノルリグナンは心材の色調 (Takahashi 1981、高橋 1996、Takahashi & Mori 2006) や耐久性 (有原ら 2004、狩野ら 2004、大谷ら 2009) などの木材諸性質の発現に関連していると考えられている。

心材成分は移行材と呼ばれる辺材と心材に挟まれた幅狭い木部組織で生合成されと考えられている (図-2)。今井らはスギ中のノルリグナン量が移行材の中で、辺材側から心材側に向けて増加する事を報告した (今井 2012、Imai et al. 2005、Nagasaki et al. 2002)。さらにノルリグナン生合成に関する酵素活性 (フェニルアラニンアンモニアーゼ、アガサレジノールヒドロキシラーゼ) が移行材で増加する事を報告した (Imai et al. 2005、2009)。

スギノルリグナンを含め、心材分量は一般に、辺材から髄への木部放射方向において、移行材で増加し始め、心材外側から内側に向けて減少する傾向が報告されている (Lukmandaru et al. 2009、松隈ら 1965、Nagasaki et al. 2002、Nault 1988、Saito et al. 2008)。この「減少」について次のような解釈がなされている。1) 酸化や重合などの心材成分の二次変化、2) 樹木の幼齢時における未発達な心材成分生合成能、3) 心材内側から心材外側への心材成分の輸送・拡散、などである。

純粋なノルリグナンは淡色である一方で、酵素的または非酵素的酸化やアルカリ処理により変色しやすく、心材色の発現を導きうることから、心材成分の二次変化が広く提唱されている (樋口ら 1967、Kai et al. 1972、Takahashi & Mori 2006)。二次変化の一つとして重合が想定されるが、これまでスギ心材からノルリグナン重合物の単離や構造解析は報告されていない。演者はスギ心材におけるノルリグナン重合物の存在の証明、それらの単離・構造決定を目指した。

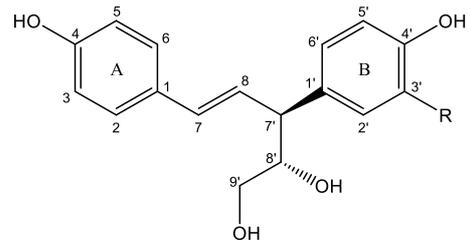


図-1 ノルリグナン骨格 (R=H;アガサレジノール、R=OH;セクイリンC)

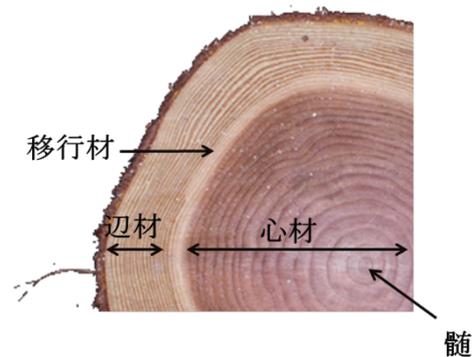


図-2 スギ横断面

### ノルリグナンモデル重合物の調製

ノルリグナンの二次変化機構として酵素的または非酵素的酸化が考えられる(今井 2012)。坂本らはスギ心材中にフェノール酵素酸化活性を検出し、スギ木部から分離した酵素により、アガサレジノールとセクイリン C の変性ならびに着色を確認した(坂本 2011)。この結果を受けて、演者はノルリグナンの二次変化機構として酵素的酸化を想定し、市販ペルオキシダーゼによるスギノルリグナン変化物、すなわちアガサレジノール変化物、セクイリン C 変化物ならびにアガサレジノール・セクイリン C 共変化物の 3 種類を調製した。それらの MALDI-TOF-MS 分析を行った結果、アガサレジノール (MW:286)、セクイリン C (MW:302) の重合を示す、それぞれ  $m/z$  284、 $m/z$  300 周期のイオンピーク群が検出された。したがって、これら画分中にノルリグナン骨格 (C6-C5-C6) を保持した重合物の存在が確認され、各種変化物がノルリグナン重合物であることが証明された(Yanase et al. 2014)。

### スギ心材メタノール抽出物から天然ノルリグナン重合物画分(天然重合物)の抽出

一般的にノルリグナンはスギ心材メタノール抽出物酢酸エチル可溶部より分離される。ノルリグナン重合物はノルリグナン単量体より高極性と考えられる。そこでスギ心材メタノール抽出物酢酸エチル可溶部のシリカゲルカラムクロマトグラフィにおいて、ノルリグナン単量体溶出後の低移動度の画分(高極性画分)に着目し、これを高極性溶媒(メタノール)により溶出させ回収した。この画分について MALDI-TOF-MS 分析の結果、上述のノルリグナンモデル重合物の分析結果と酷似した、ノルリグナンの重合を示すイオンピーク群が検出され、この画分にノルリグナン重合物の存在が確認された。特に、セクイリン C を重合単位に含み、理論分子量(ノルリグナン骨格を維持したまま結合した場合の分子量)より 2 あるいは 4 少ないイオンピークが多数確認された。このことから、天然ノルリグナン重合物はセクイリン C を主要構成要素とするアガサレジノールとセクイリン C の共重合物であり、セクイリン C 単位ではキノン構造の形成あるいは分子内結合が起きている事が示唆された(Yanase et al. 2014)。

### アガサレジノールモデル二量体の単離・構造解析

これまでノルリグナンオリゴマーの構造解析の報告例はほとんどない(菱山と加藤 2006)。ノルリグナンオリゴマー構造の情報を得るため、アガサレジノールモデル二量体の単離・構造解析を試みた。アガサレジノールモデル重合物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィおよび分取 HPLC を用いて精製し、5 種アガサレジノール二量体を得た。これらについて NMR による構造決定を達成し(図-3、Yanase et al. 2014)、天然ノルリグナン重合物の部分構造として提案した。

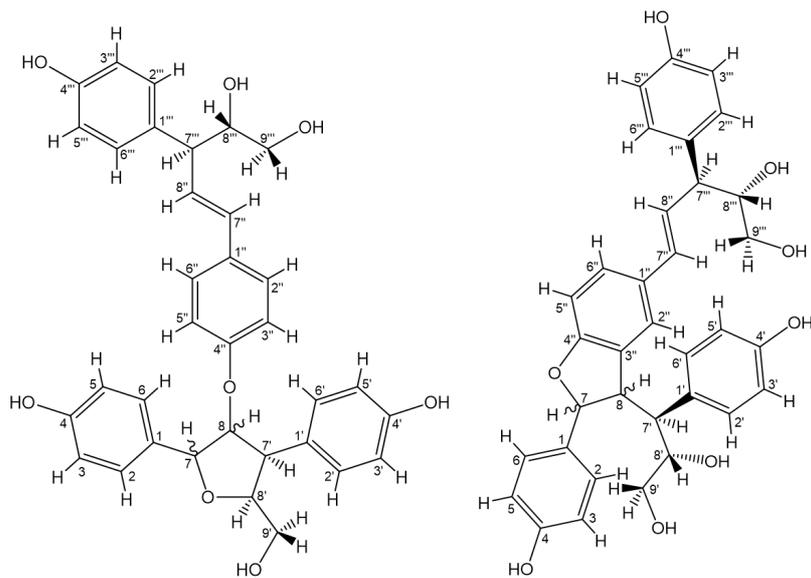


図-3 アガサレジノールモデル二量体の構造

### 天然ノルリグナンオリゴマーの単位・構造解析

上述の天然重合体画分を Sephadex LH-20 ゲルカラムクロマトグラフィで分画し、粗ノルリグナンオリゴマー画分を調製した。それらの LC-ESI-MS 分析の結果、天然重合体の MALDI-TOF-MS 分析結果と同様に、構成要素にセクイリン C を含み、理論分子量より 2 あるいは 4 少ない分子量を持つノルリグナン二量体および三量体に相当する化合物が多数検出された。これらのうち、主要化合物の分取 HPLC による単離・精製および NMR 分析により、2 種の化合物について構造解析をすることができた。それらは、ノルリグナン間のエーテル結合、芳香環炭素-炭素結合あるいは分子内環化を持つ、ノルリグナンオリゴマー（二量体 1 種、三量体 1 種）であることが確認され、スギ心材中にノルリグナン重合体の存在が証明された。

### 終わりに

ノルリグナン生合成後の挙動の一つとして、二次変化（重合）を証明する事が出来た（図-4）。今後は二次変化が生じる時期、部位、要因を明らかにしていく事が課題である。

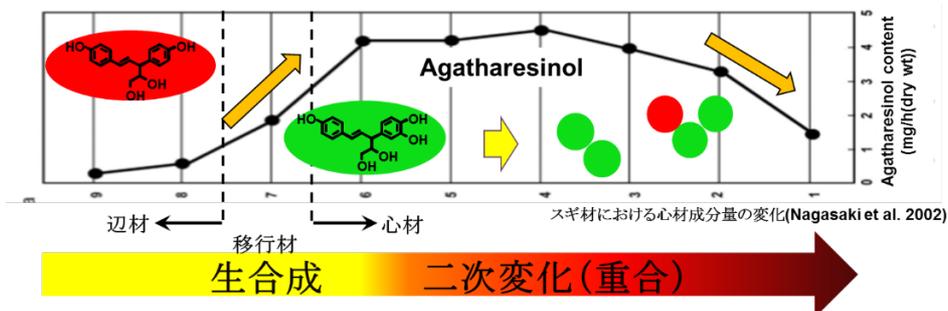


図-4 ノルリグナン生合成後の二次変化モデル

## 引用文献

- 在原重信ら (2004) スギ(*Cryptomeria japonica*)黒心材の殺蟻成分 木材学会誌 50: 413-421.
- 樋口隆昌ら (1967) 心材形成機構に関する研究(第6報) スギおよびアカマツ人工心材について 木材学会誌 13: 274-279.
- 菱山正二郎と加藤厚 (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: PP012.
- 今井貴規 (2012) 心材形成の化学 木材学会誌 58: 11-22.
- 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. (2005) Biochemical studies of matured xylem of *Cryptomeria japonica*. Attempts to detect the enzymes involved in the biosyntheses of the heartwood extractives. *Nagoya Univ. For. Sci.* 24: 1-6.
- 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.
- 狩野仁美ら (2004) スギ心材の抗蟻性におよぼす高温乾燥の影響 木材学会誌 50: 91-98.
- Lukmandaru, G., Takahashi, K. (2009) Radial distribution of quinones in plantation teak (*Tectona grandis* L.f.). *Ann. For. Sci.* 66: 605p1-605p5.
- 松隈紀二郎ら (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.
- Nagasaki, T., Yasuda, S., Imai, T. (2002) Immunohistochemical localization of agatharesinol, a heartwood norlignan, in *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* 60: 461-466.
- Nault, J. (1988) Radial distribution of thujaplicins in old growth and second growth western red cedar (*Thuja plicata* Donn). *Wood Sci. Technol.* 22: 73-80.
- 大谷慶人ら (2009) スギ根株腐朽病と心材ノルリグナン組成との関係 木材学会誌 55: 92-100.
- 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.
- 坂本和之 (2012) スギ心材ノルリグナンの生合成後二次変化の機構および変化物化学構造の解析 名古屋大学大学院生命農学研究科 修士論文
- Takahashi, K. (1981) Heartwood phenols and their significance to color in *Cryptomeria japonica* D. Don. *Mokuzai Gakkaishi* 27: 654-657.
- 高橋孝悦 (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.
- Takahashi, K., Mori, K. (2006) Relations between blacking phenomenon and norlignans of sugi (*Cryptomeria japonica*) heartwood III: coloration of norlignans with alkaline treatment. *J. Wood. Sci.* 52: 134-139.
- Yanase, Y., Sakamoto, K., Imai, T. (2014) Isolation and structural elucidation of norlignan polymers from the heartwood of *Cryptomeria japonica*. *Holzforschung* 69: 281-296.