様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　６ 月 １２ 日現在

機関番号：１３９０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｈ０４９５２

研究課題名（和文）スギ心材ノルリグナンのポスト生合成化学－心材の成熟という新規概念－

研究課題名（英文）Post-biosyntheses chemistry of norlignan in Cryptomeria japonica - A new concept: maturation of heartwood

研究代表者
今井　貴規（Imai, Takanori）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：２０２５２２８１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　13,000,000円

研究成果の概要（和文）：スギ材の価値(色調)を左右する心材(樹幹中央部の濃色部)は、スギ個体の成長に伴って辺材(心材周縁の淡色部)が、移行材を経て変化することにより形成される。スギ心材形成について、(1)どのような化合物が形成されるか、(2)どのような機構により形成されるか、(3)細胞レベルのどこで形成されるかを調べた。
(1)スギ心材から数種類の新規化合物を単離し構造決定することができた。これら化合物の含有量や心材内分布は、通常の赤色材と異常な黒色材とで異なることが分かった。(2)前述の化合物は移行材・心材での酵素反応により形成されることが示された。(3)酵素反応が移行材・心材放射柔細胞中で起こることが可視化された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　幼齢木の樹幹等の材部は、「辺材」と呼ばれる部分のみからなるが、しばしば加齢等と共に、より老いた組織である中心部から「心材」へと変化する。この変化過程は心材形成と呼ばれ、樹木に普遍的・特徴的な生理活動である。木材利用上注視される樹種特有の諸性質（色調・におい・耐久性等）は、心材の特性によって引き出される（主に化学物質による）ことが多い。心材・心材形成研究は、木材基礎科学ならびに木材利用・応用の両面から重要な領域となるが、心材形成の機構や意義が、完全に理解されているとは言い難い。
　本研究は「心材がどのように形成されるか」について新しい概念を提出することにより、学術的・社会的に貢献しようとする。

研究成果の概要（英文）：The commercial values (color tone) of Cryptomeria japonica wood are affected by characteristics of the heartwood (HW, dark part at the central part of the wood) which are formed from the sapwood (SW, pale part surrounding heartwood) via intermediate wood (IW) with growth of the trees. The change from SW to HW via IW are called HW formation. In the HW formation of C. japonica, (1) what sort of compounds were formed, (2) how the compounds were formed (formation mechanism), and (3) where the compounds were synthesized at cellular level (synthesis site), were studied.
(1) Several kinds of new compounds were successfully isolated and their chemical structures were elucidated. The contents and distribution of these compounds in normal red-HW were different from those in abnormal black-HW. (2) It was demonstrated that these compounds were formed by oxidase enzymatic reaction in the HW and IW. (3) It was visualized the enzymatic reaction occurred in the ray parenchyma cells in the HW and IW.

研究分野：樹木生理化学

キーワード：心材　心材形成　ノルリグナン　重合　スギ

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９、CK－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

心材形成の場は辺材から心材への変化中途ともなる移行材(図1)とされ、ここが心材形成機構の解明に向けて研究の対象とされてきた。心材形成の際には、①乾燥等の水分状態の変化、②柔細胞（辺材では生きている）の老化・全細胞の死滅、③化学物質すなわち心材成分の新生・堆積、④細胞壁の二次的な構造変化（心材成分の沈着等による)、が起こる[1]。移行材は多くの場合、いかに大径で心材割合の高い樹木であっても、その幅は１年未満から僅か数年（輪）分(図 1)でしかなく、上記①～④の現象の極めて複雑な積算といえる心材形成の全てを、この限られた移行材における生理活動のみに帰着させることは、十分ではないように思われる。

我々は 10 年来スギを対象とし、その主要心材成分である 2 種のノルリグナン(炭素数が17 個の二次代謝成分の分類総称)、アガサレジノールおよびセクイリン C（図 2）の生合成・蓄積に関する研究を進めた。まずは移行材の機能に着目し、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL; ノルリグナン生合成の上流で働く)およびアガサレジノール水酸化（AGTH）(図 2)の活性が移行材において高まることを示し、移行材を心材成分生合成の場として生化学的に特徴付けた。

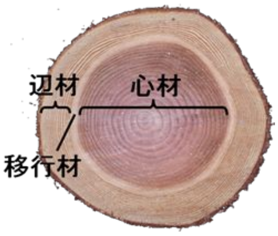

図１　スギ樹幹横断面

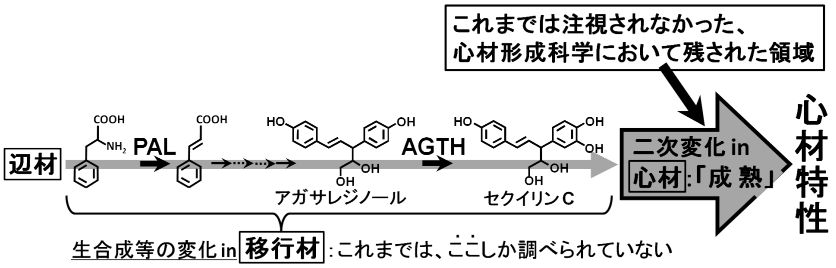

図２心材形成の過程（スギ心材成分を例として）

意外にも一連の酵素実験において、移行材に匹敵する AGTH 活性が心材に検出され、このことがそれまでの「移行材機能に関する研究」から、次から述べる心材の生理化学として“心材の成熟”に関する研究の展開の発端となった。

心材の成熟を評価するためには、我々が専門としてきたスギ心材ノルリグナンが、生合成後にどのように二次変化するかを解明することが有効なアプローチとなり得る。例えば、ノルリグナン量はスギ樹幹等放射方向において、心材外方から内方・髄に向かって求心的に減少する傾向にあり、これは心材形成に係る歴史的課題として広く知られる。この減少の理由の一つとして、樹木は樹皮直下にある形成層の活動により肥大成長し、したがって樹幹の中央部ほど形成された後、時間が経過した古い組織であるため、ノルリグナン生合成・蓄積後に二次的に変化していることが考えられる。

この仮説“二次変化”を証明するためには、「どのような化合物に変化しているのか」、「どのような機構(酵素的あるいは非酵素的)により変化するのか」等の課題にアプローチする必要があろう。

２．研究の目的

“心材の成熟”(前述)という新規概念を、エビデンスに基づいて提出することを最終目標とする。スギを材料とし、主要な心材成分であるノルリグナンが移行材(図 1)において生合成された後「どのように変化するか」を分析化学的、酵素・生化学的および組織化学的に明らかにすることを目的とする。

（１）ノルリグナンモデルオリゴマーの合成と高速液体クロマトグラフィー質量（HPLC–ESI–MS）分析

「どのような化合物に変化しているのか」を明らかにするため、ノルリグナンの重合を想定し、オリゴマーを試験管内にてモデル的に調製し、それらのHPLC–ESI–MS分析法ならびに本分析に向けたサンプル前処理(分画手法など)手順を確立する。

（２）スギ心材におけるノルリグナンオリゴマー量の放射方向変化の調査

「スギ心材中にどのようなオリゴマーが存在しているのか」を明らかにするため、上述（1）で確立された手順に従い、スギ心材ノルリグナンオリゴマーを検出する。さらに、オリゴマー量の心材放射方向

変化を明らかにするため、スギ心材を放射方向に分画し、各部位についてオリゴマーを定量する。

（３）スギ心材からのノルリグナンオリゴマーの単離・構造決定

「スギ心材中にどのようなオリゴマーが存在しているのか」を明らかにするため、新規オリゴマーの単離･構造決定に取り組む。

（４）スギ木部からの粗酵素液の調製およびフェノール酸化酵素(PO)活性の検出

「スギ心材ノルリグナンオリゴマーがどのように形成されるのか」を明らかにするため、その形成機構として酵素酸化を想定し、ノルリグナンの酸化重合に関わり得るPOの活性を調査する。

（５）スギ心材形成に関するモデルアプローチによる組織化学的検証

「細胞レベルにおいてノルリグナン重合はどこで起こるかか」を明らかにするため、スギ組織内 PO 活性ならびにスギ組織内因性 PO による組織切片内でのノルリグナン重合を組織化学的に調査する。

３．研究の方法

（１）ノルリグナンモデルオリゴマーの合成と HPLC–ESI–MS 分析

スギ心材から溶媒抽出･シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより単離精製した、アガサレジノール ⑷ およびセクイリン C (S) を基質として、市販ペルオキシダーゼによる酸化を行った。生成した茶褐色沈殿をメタノール抽出した。メタノール可溶部について Sephadex LH–20 ゲルカラムクトマトグラフィーを行い、50、55、60、100%メタノール/水溶出画分に分画した。主に、55 および 60%メタノール/水溶出画分を、本科研費により設置された HPLC–ESI–MS により分析した。

（２）スギ心材におけるノルリグナンオリゴマー量の放射方向変化の調査

スギ赤心材、黒心材の心材を放射方向 3 部位に分画し、心材外方、中央、内方とした。メタノール抽出した。得られたメタノール抽出物を n–ヘキサンと酢酸エチルで逐次抽出した。この酢酸エチル可溶部を（１）の手順にしたがって分画し、55 および 60%メタノール/水溶出画分について HPLC–サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) および HPLC–ESI–MS 分析を行った。HPLC–ESI–MS 分析では主要なノルリグナンオリゴマーとして同定された化合物について、半定量(試料乾重あたりのピーク面積)を行った。

（３）スギ心材からのノルリグナンオリゴマーの単離・構造決定

⑴ のクロマトグラフィーにおいて(A)および ⑸より低移動度の化合物群を高極性画分として分取した。

①ノルリグナンオリゴマーの単離

高極性画分を LH–20 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、45%、55%、65%、100% メタノール/水溶出画分に分画した。この 55%および 65%メタノール/水溶出画分から本科研費により設置された逆相分取 HPLC により、ノルリグナン二量体および三量体を分取した。

②ノルリグナンオリゴマーの構造解析

単離したオリゴマーについて HPLC–ESI–MS 分析および ESI–飛行時間型(TOF)–MS 精密質量分析を行い、ノルリグナン単位構成様式を決定した。また、十分量得られた化合物については各種核磁気共鳴スペクトル(NMR)測定により、構造決定した。

（４）スギ木部からの粗酵素液の調製およびフェノール酸化酵素(PO)活性の検出

①スギ材からのタンパク質抽出

凍結スギ材を辺材外方部(当年輪、分化中木部を含む)、移行材、心材外方部の 3 部位に分画し、凍結状態にて粉砕･凍結木粉を調製した。これら凍結木粉を緩衝液抽出し、硫酸アンモニウム(硫安)塩析、沈殿回収により硫安 0–40%飽和画分および 40–70%飽和画分の 2 つの粗酵素画分を調製した。各粗酵素画分について、Bradford 法によりタンパク質の検出および定量を行った。

②カテキンを基質とするスギ材粗酵素の PO アッセイ

試験管内でカテキン(基質)、スギ材粗酵素、過酸化水素を混合し、室温で 60 分間反応させた。反応液の 437 nm における吸光度をスギ材粗酵素中の PO 活性として評価した。

③スギ材粗酵素によるノルリグナン重合および生成物の機器分析

移行材粗酵素および心材酵素を用いて(A)および(S)の試験管内共重合を試みた。生成した褐色の沈殿をメタノール抽出し、可溶部について HPLC–SEC、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)–TOF–MS、および HPLC–ESI–MS 分析を行った。

（５）スギ心材形成に関するモデルアプローチによる組織化学的検証

①スギ組織切片の光学顕微鏡観察およびフェノールオキシダーゼ(PO)の組織内染色

伐採直後に凍結、保存したスギ材から柾目面切片を作製し、心材、移行材、辺材の放射柔細胞中の褐色堆積物の有無を顕微鏡観察した。また、組織中の PO 活性を検出するため、切片の DAB 染色（基質：ジアミノベンジジン）を行った

②スギ材切片中におけるアガサレジノール(A)の重合

褐色物質堆積の機構のモデルとして、スギ辺材および移行材切片を(A)溶液に浸し、切片内因性の PO と反応させた。反応後切片中に形成された褐色物質について、ヘキサン、酢酸エチル、メタノール抽出における挙動を調べた。

４．研究成果

（１）ノルリグナンモデルオリゴマーの調製と HPLC–ESI–MS 分析

(A)および(S)を混合基質とする市販ペルオキシダーゼ酸化生成物を HPLC-ESI-MS 分析では、想定される複数の *m/z* 値を採用した。例えば、(A、MW：286)と(S、MW:302)の共重合二量体(AS)の検出では、286+302(588)から 1 点での結合に伴う 2 水素原子を減じた MW 586 を想定し、ポジティブ検出では *m/z* 609：$[M+Na]^+$、*m/z* 625：$[M+K]^+$、ネガティブ検出では *m/z* 585：$[M-H]^-$、*m/z* 621：$[M+Cl]^-$を用いた結果、これらのイオンを同時に与える化合物が検出された。この手順により 12 種類の AA、12 種類の AS、7 種類の SS、11 種類の ASS および 4 種類の SSS を確認ができた。

（２）スギ心材におけるノルリグナンオリゴマー量の放射方向変化の調査

HPLC–SEC の結果、赤心材の場合と比較して、黒心材において速く移動する化合物が確認され、より高分子化合物が含まれることが示された。樹幹放射方向で比較すると、特に黒心材の場合、心材内方ほど高分子化合物の割合が増加する傾向にあった。

LH–20 ゲルカラムクロマトグラフィー各画分の SEC 分析の結果、分子量に基づいて分画されていることが分かった。すなわち 50%溶出部にはノルリグナン単量体、55%には単量体～二量体、60%には二～三量体、100%には六～十一量体に相当する分子量の化合物が検出された。

HPLC–ESI–MS では、4 つの二量体および 7 つの三量体を半定量することができた。赤心材の場合、各オリゴマーは概ね心材内方に向かって増大する傾向にあった。黒心材の場合、各オリゴマーは概ね心材中央で最大となり内方に向かって減少する傾向にあった。また、各オリゴマー量は、赤心材と比較して黒心材において含有量が少ない結果であった。

以上より、古くから知られる心材成分の放射方向含有量変化すなわち心材外方から内方に向けた減少)について、スギのノルリグナンを例として、単量体生合成後の重合等の二次変化として実験的に示すことができた。また、スギ黒心材ではノルリグナン二･三量体がさらに重合し、これがひいては色調の違いに関連していることが推察された。

（3）スギ心材からのノルリグナンオリゴマーの単離・構造決定

(A)および(S)の 10 種の二量体、8 つの三量体を単離した。全てについて、高分解能質量分析法により単量体構成を明らかにした。これらのうち 5 つの二量体および 2 つの三量体、合計 7 つのノルリグナンオリゴマーの化学構造を決定した。二量体のうち 2 つは単量体間の結合様式および立体配座は同じであり、1 つは SS もう 1 つは AS であった。他の二量体の 3 つは SS であり、互いに立体異性であった。三量体のうち 1 つは、単量体が炭素–炭素(C–C)結合およびエーテル結合した、七員環等を有する、ASS であった。もう 1 つは、単量体が C–C およびエーテル結合した、1,4−ベンゾジオキサン構造等を有する、ASS であった。

（4）スギ木部からの粗酵素液の調製および酸化酵素活性の検出

①スギ材からのタンパク質抽出

辺材外方部、移行材および心材外方部の硫安 0–40%飽和画分と 40–70%飽和画分の両方において、Bradford 法によりタンパク質が検出され、タンパク質定量することができた。特に全細胞が死滅している心材においてタンパク質が残存していることは興味深い。長年にわたり、“心材の酵素反応”について議論されてきたが、本件について明確に結論付けることができたといえる。

②カテキンを基質とするスギ材粗酵素の PO アッセイ

スギ辺材外方部(含分化中木部)、移行材、心材外方部のいずれの場合も、硫安 40–70%飽和画分に PO 活性が認められ、PO を分画濃縮できた。

辺材では過酸化水素が反応系に無い場合 PO 活性は減少するのに対し、移行材と心材ではその有無に関わらずそれほど変化しなかった。したがって、木部部位により機能の異なる PO が優勢となることが示された。

③スギ材粗酵素によるノルリグナン重合および生成物の機器分析

移行材および心材粗酵素による(A)および(S)の重合を試みた。酵素反応生成物の HPLC–SEC において単量体である(A)および(S)より速く移動する化合物が確認され、高分子化合物の生成・存在が示された。酵素反応生成物の MALDI–TOF–MS では、(A)および(S)から構成される二〜五量体に相当するイオン群が検出された。さらに酵素反応生成物の HPLC–ESI–MS により、(A)および(S)から構成される二・三量体と予想される化合物が検出された。

以上より、ノルリグナン重合に酵素が関わり得ることが示唆された。

（5）スギ心材形成に関するモデルアプローチによる組織化学的検証

①スギ組織切片の光学顕微鏡観察およびフェノールオキシダーゼ(PO)の組織内染色

移行材の心材側 1〜2 年において放射組織の褐色化が観察され、これらは辺材や移行材の辺材側 7〜8 年には観察されず、その着色は心材で顕著であった。移行材放射方向(心材化段階)において、顕微鏡観察による褐色物質の堆積と、機器分析によるアガサレジノールの含有量変化がよく符合した。

DAB 法により、辺材および移行材の辺材側では放射柔細胞全列が褐色に染色され、PO 活性が確認された。移行材の心材側 4 年において放射組織の上下端での活性が確認できず、中央列で確認された。空間的に機能が異なることが示された。DAB 法では心材部の PO 活性は検出されなかった。

②スギ材切片中におけるアガサレジノール(A)の重合

スギ生材切片(内因性酵素)をによる(A)の組織内反応により、褐色の着色が放射組織に確認された。予め熱処理した切片を用いた場合には褐色化は観察されなかった。この褐色物質はヘキサンでは抽出されず、酢酸エチルで大半が抽出され、メタノールでほぼ全てが抽出された。これらの溶出挙動は、本褐色物質が(A)の酸化酵素反応物(オリゴマー等)であることを支持する。以上から、心材化における放射組織の褐色化にアガサレジノールの酵素酸化が関与していることをモデル的に証明できた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１件）

①Radial distribution of monomeric, dimeric and trimeric norlignans and their polymerization in *Cryptomeria japonica* heartwood. Y. Shimizu, T. Iki, T. Imai, *Holzforschung*, **71**, 705–712(2017).
査読有

〔学会発表〕（計８件）

第 69 回日本木材学会大会（函館大会)、2019 年 3 月（２件）

①スギ木部におけるフェノールオキシダーゼ活性－心材物質形成との関わり－
（名大院生命農）○河嶋優里、今井貴規

②スギ心材中のノルリグナンオリゴマーの単離・構造決定
（名大院生命農）○加藤哲明、簗瀬　優、今井貴規

第 68 回日本木材学会大会（京都大会)、2018 年 3 月（２件）

③スギ心材成分ノルリグナンの二次変化に関する組織化学的検討
（名大院生命農）○杉浦宏樹、今井貴規

④スギ心材におけるノルリグナン－炭水化物複合体形成のモデル的検証
（名大院生命農）○石田沙智子、今井貴規

樹木抽出成分討論会（シンポジウム）（秋田）東北森林科学会と共催･合同企画、2018 年 9 月（１件）

⑤新規樹種鑑定法の開発に向けた樹木･木材リアルタイム直接(Direct Analysis in Real Time)質量分析(DRAT–MS)スペクトルの集積
（名大院生命農）○今井貴規、八木貴大

The 61th Society of Wood Science and Technology (Nagoya), International Convention, November 2018（１件）

⑥Phenol oxidase involved in polymerization of the extractives during heartwood formation of *Cryptomeria japonica*
(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University) Yuuri Kawashima, Takanori Imai

第 67 回日本木材学会大会（福岡大会)、2017 年 3 月（２件）

⑦カラマツ心材成分の二次変化（重合）と心材色特性の発現との関連性
（名大院生命農）○奥田梨紗子、（森林総研林育セ北育）中田了五、（名大院生命農）今井貴規

⑧スギ心材ノルリグナンオリゴマーの形成と構造
（名大院生命農）○今井貴規、小林瑞貴、（名大農）河嶋優里

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~junriyo/

６．研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。