

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380105

研究課題名(和文) 組織化学と樹幹の振動現象による心材形成過程のモニタリング

研究課題名(英文) Monitoring of heartwood formation by histochemistry and tree-stem vibration property

研究代表者

中田 了五 (NAKADA, Ryogo)

独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター・課長

研究者番号：60370847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：樹木の心材の形成機構を解明するために、組織化学と樹幹の振動現象を利用して心材形成過程を的確かつ効率的にモニタリングするための技術開発をおこなった。我が国における代表的な林業樹種であるスギとカラマツを材料として、1)放射線細胞の細胞死における核の形態的・質的变化、2)カラマツ主要心材成分の堆積過程、3)力学的振動と交流電流による樹幹内水分量変化、4)心材形成に伴う細胞壁の形態的・質的变化、の四種類の心材形成過程について観察・測定法を開発し、心材形成について新規の知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study was a technical development for the monitoring of the process of heartwood formation in trees by means of histochemistry and vibrational property of tree trunk. Two species, *Cryptomeria japonica* and *Larix kaempferi*, were investigated because of their importance in Japanese forestry. The new and improved methods and new findings have been achieved for the observation and measurement of heartwood formation in minute details: morphological and histochemical change of nuclei in ray parenchyma during heartwood formation; in situ localization of major heartwood substances in *L. kaempferi*; estimation of the amount of water in tree trunk measured by mechanical vibration and electrical impedance; changes of cell wall with fine histochemical anatomy.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：木質科学 樹木 心材

## 1. 研究開始当初の背景

樹木の幹の横断面を観察すると、周縁部の「辺材」と中心部の「心材」の二つの部分が見分けられる。この二つの部分は材色などの様々な性質が異なっている。心材には「心材成分」または「心材物質」と呼ばれる特異的な抽出成分が存在し、このために心材は辺材に比べ濃色でかつ耐腐朽性が高い。心材の形成は、他の植物には認められない樹木特有の生理現象である。樹木は心材を形成することにより木部の耐腐朽性を高め、長期にわたる生存を有利にしている。心材は高い耐腐朽性を持ちその色により木材の装飾的価値を高めており、樹木の木部を木材として利用する際には心材の存在が木材を利用する動機の一つとなっている。

心材の様々な性質は樹種間および同一種内の遺伝的系統間で大きな多様性を示し、遺伝的な形質であると考えられている。木材の高度利用を図る上で、量、色、化学成分、含水率などの心材の性質を育種によって人為的に制御することが求められている。これまでに樹種ごとの心材色や樹幹内における心材の割合などについては情報が集積されてきたが、心材の形成機構については、ごく限られた樹種において、ごく限られた事柄しかわかっていない。

心材形成の制御のためには心材の形成機構の解明が不可欠である。心材形成の研究に関する最近の動向をまとめると、1) 心材の多様性に比べ心材形成機構については研究例が少なく未解明の問題が多い、2) 分析機器の進歩により、詳細な心材成分分析や生合成研究が発展してきた、3) 心材形成に関連する遺伝子研究や表面化学分析技術の応用が始まっている、とできる。分析機器や実験手法の発展により、これまで不可能だったことが可能になってきており、心材の形成機構の解明にむけて研究を飛躍させるための準備が整ったということができる。

## 2. 研究の目的

心材形成機構の解明のためには、心材形成において生じる様々な現象の総合的な研究が必要である。心材の形成に伴い木部に生じる様々な変化を四つの要素(柔細胞の細胞死・心材成分の堆積・水分状態の変化・細胞壁の変化)にわけることができるが、各要素は研究におけるテクニックや視点が異なり、心材形成研究の歴史の中でそれぞれ独立して発展してきた。本研究では、心材形成の四要素の相互関係を考慮しつつ、心材の形成過程を総合的にかつ詳細に解析することを目的とする。

心材の形成過程の解析には、ある程度成長したサイズの大きな樹幹を材料として、心材形成に関わる様々な現象を、非破壊または樹体のダメージの少ない方法によりインタクトな状態で、長期間にわたり経時的に解析することが必要である。さらに、心材形成の多

様性の発現機構の解明には、多数の供試木から得た多数の試料に対して効率的な測定が不可欠である。研究の飛躍的發展のためには、心材形成過程を的確かつ効率的にモニタリングする新しい技術が必要である。

本研究では、次の四つの心材形成過程を的確かつ効率的にモニタリングする技術を開発することを目的とした。

(1) 柔細胞の細胞死の過程の組織化学的可視化(以下、細胞死)

心材形成に関する柔細胞の細胞死の過程は、これまで主として核の消滅と形状変化でその進行状況が評価されてきた。本研究では、さらに詳細な細胞死過程の解析を目的として、核DNA断片化などの「細胞の質的变化」を組織化学的に可視化する。

(2) 組織化学による心材成分の *in situ* localization(以下、心材成分)

樹幹内での心材成分分布の解析は、これまでである程度大きな試料の化学成分分析によるものがほとんどであった。本研究では、免疫染色などに比べ効率的な組織化学的手法を用いて心材成分の細胞レベル以下の解像度での局在をその場観察(*in situ* localization)する。

(3) 樹幹の振動現象による水分状態の変化の非破壊モニタリング(以下、水分状態変化)

水分状態変化は、樹幹の物理的変化(含水率変化による密度変化)を伴うため、非破壊モニタリングの可能性がある。本研究では、これまで不可能だとされてきた、高い精度と高い時間解像度をもつ完全非破壊心材形成過程モニタリングシステムを構築する。

(4) 細胞壁の変化における芳香族物質堆積過程の動的追跡(以下、細胞壁変化)

辺材と心材の細胞壁構造の静的な比較により、死細胞である仮道管相互壁孔壁上に堆積する芳香族物質が辺材と心材の物性に差をもたらしていると考えられているが、その輸送経路および輸送実態については未解明である。本研究では、心材形成に伴う芳香族物質の堆積を経時的に解析することにより、心材形成に伴う細胞壁の変化を動的に追跡する。

上記の新規技術に加えて従来法での心材形成過程のモニタリングと供試木の肉眼によるフェノロジー観察も並行して行い、我が国の林業上重要な針葉樹であるスギとカラマツについて、心材形成過程をインタクトな状態で総合的にかつ詳細に明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究で対象としたスギについてはこれまでも多くの心材形成に関する研究が行われてきたが、カラマツについては研究例が少ない。そこで、研究初年度にはカラマツ心材の様々な性質の把握(心材形成に伴う細胞死の様態、心材成分量の個体内変異、高解像度での水分分布観察、細胞壁の変化の高解像度観察)を行った。

研究2年目と3年目には、スギ及びカラマツ生立木について、開芽開葉など外観的な季節変化と樹幹内水分分布の非破壊計測を継続的に行った。これらの立木より伐採または成長錐により定期的に材料を採取して、液体窒素による凍結固定またはグルタルアルデヒドやエタノールによる化学固定を行って組織化学的調査を行った。

細胞死過程の観察には、主として40 $\mu$ m厚の放射面切片を用い、核の染色にヨウ化プロピジウム・酢酸カーミン等、デンプン粒にヨウ素ヨウ化カリウム、タンパク質にアミドブラック10B、脂質にSudan Blackをそれぞれ用いて、また心材形成に伴う着色物質の存在の観察のために無染色試料を用いた。これらの試料は光学顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いて観察した。

心材成分については、主としてカラマツの主要心材成分である、タキシホリンをターゲットとして研究を進めた。分割した木材試料を粉碎抽出し、GC-MS分析(ガスクロマトグラフィー質量分析)を行って、タキシホリン等の定量とその放射方向分布を調べた。次にDPBA(ジフェニルホウ酸2-アミノエチルエステル)処理によるタキシホリン等の蛍光観察法を確立するために、標品のメンブレン上への展開、標品の抽出済切片への展開、新鮮試料での検出をおこなった。

水分分布については、X線およびcryo-SEM(低温走査型電子顕微鏡)法による伐採試料の詳細観察と、非破壊計測法の開発を行った。非破壊計測法として、力学的な振動と交流電流を用いた方法の開発を行った。力学的な振動解析では既存の手法である横打撃共振法の改良を目指し、野外での生立木へのアプリケーションに適した具体的実用的な手法および機器の開発をおこなった。電気的な方法については、生立木への適用に適した電極を開発し、電極間距離・電圧・周波数帯などを変えながら定期的に計測を行って条件設定を実施した。これらに加え、定期的に生立木から成長錐試料を採取し、辺材・心材別の水ポテンシャルとその変化をサイクロメーター法によりモニタリングした。

細胞壁の変化については、FE-SEM(電界放射型走査型電子顕微鏡)、UV(紫外線)顕微鏡、PAS(過ヨウ素酸-シッフ氏液)染色等の組織化学的手法を駆使して、心材形成に伴う二次的な細胞壁の変化について詳細な観察を行った。

#### 4. 研究成果

研究初年度に採取したカラマツ、研究2-3年目に採取したスギおよびカラマツを用いて以下の結果を得た。

図-1に、研究2-3年目に継続的に採取した供試材料の成育地(茨城県日立市)付近のアメダスデータによる日平均気温変化と供試木の外観的なフェノロジー、さらに組織化学的観察のための試料採取日を示す。これらの

材料について、樹幹内水分量の変化を非破壊的にモニタリングできる既存の手法である横打撃共振法で継続的に計測を実施した。横打撃共振法で得られる樹幹内水分量のパラメータである1/df(計測部直径と横打撃共振周波数の積の逆数)の両樹種の長期的変化傾向は、スギでの既報と同様に、夏に高く冬に低くなることが確認できた。一方、スギでは秋に1/dfの短期的増加が認められるのに対して、カラマツでは夏に1/dfの増加が認められ秋には低下するという樹種間での違いが認められた。

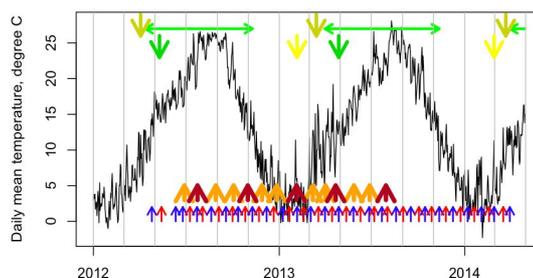


図-1 供試材料のフェノロジーと材料採取時期。黒実線:供試材料成育地付近のアメダス日平均気温、下向き矢印うぐいす色:カラマツ開花、水平両矢印:カラマツ開葉期間、下向き矢印黄色:スギ開花、下向き矢印緑:スギ開葉、上向き大矢印オレンジ:成長錐試料採取、上向き大矢印赤:伐採試料採取、上向き小矢印青:横打撃測定+水ポテンシャル測定、上向き小矢印赤:横打撃測定。

細胞死については、スギとカラマツの放射柔細胞の、核の形態と組織化学的性質の変化・貯蔵デンプンの消長・移行材および心材色の呈色との関係等について、辺材外側から心材にかけての広い範囲にわたって詳細に観察を行った。その結果、スギの早材部と晩材部では核の消失パターンに違いがあることや、スギとカラマツの心材色を呈色している最外部(心材最外層とする)においては放射柔細胞は核とアミロプラストを保持していること(図-2)などが明らかとなった。

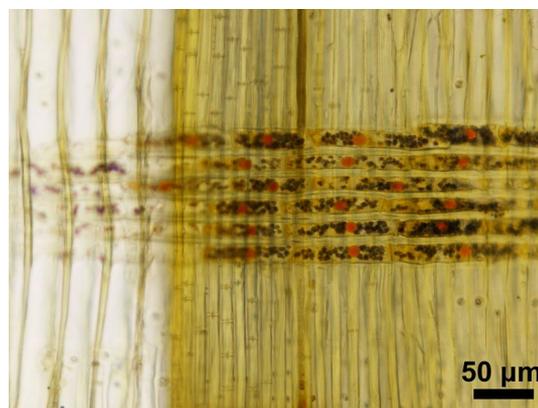


図-2 移行材と心材の間の薄い着色部(心材最外層)の晩材。酢酸カーミンとヨウ素ヨウ化カリウムによる核とアミロプラストの二重染色。

心材成分については、タキシホリンおよび関連するフラボノイドを組織化学的に効率的に観察するための手法を開発した。タキシホリン等の標品をメンブレン上に展開した試料、辺材と心材の新鮮試料と抽出試料さらに抽出試料に標品をしみ込ませたもの等を用いて、自家蛍光と DPSA 処理後の蛍光の観察を行い、タキシホリンの組織化学的検鏡法を確立した (図-3)。

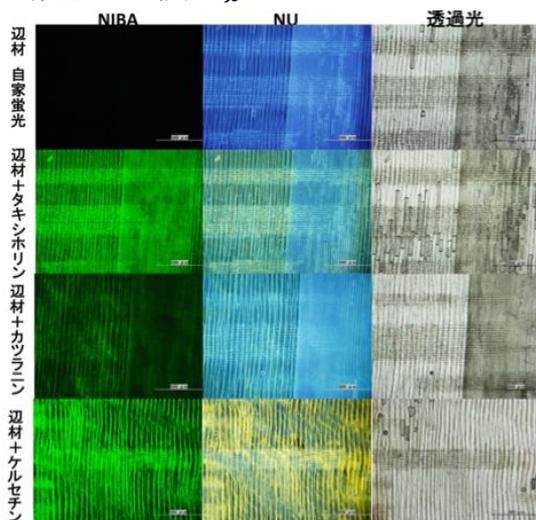


図-3 タキシホリンと関連するフラボノイドを辺材にしみこませて蛍光観察。上段は辺材新鮮試料の自家蛍光、下3段はそれぞれのフラボノイドでの結果、左と中列は別の蛍光フィルターブロックの結果、右列は透過光。

水分状態変化については、二種類の手法について検討した。力学的振動を用いる手法については、横打撃共振法を発展させて、樹幹放射方向の振動の共振周波数のみならず周波数応答関数を得て詳細な解析を可能とする装置を開発した。振動を高精度で測定できるシステムとしたが、樹幹のたわみ振動などと横打撃共振の分離、S/N 比の向上のための手法検討を行って現在も手法の改良を続けている。交流電流を用いた方法については、開発した電極を用いて継続的に計測を続け、計測条件の最適化ができた。図-4 に4月と7月のインピーダンスの測定例を示す。図のように、低周波側で季節性が確認された。また、サイクロメーター法による水ポテンシャルの測定では、辺材と心材の間に水ポテンシャルの差が存在し、季節によって逆転することがわかった。

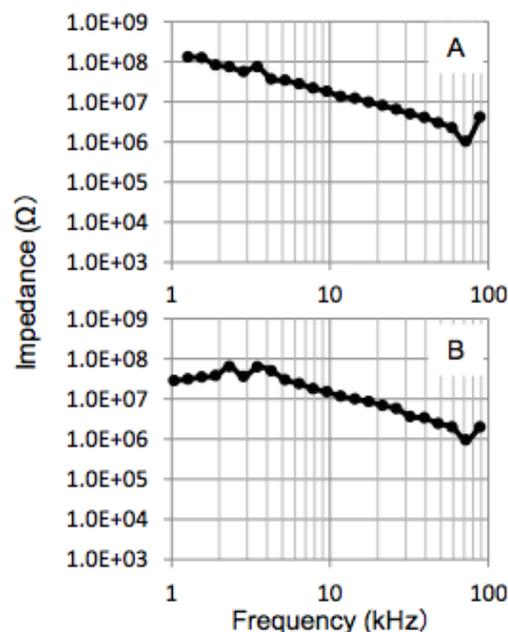


図-4 インピーダンス測定例。A:4月、B:7月。

細胞壁の変化については、FE-SEM 観察の結果、両樹種でこれまで報告例のない形状のものを含む不定形物質の二次的堆積が壁孔壁上、壁孔室内、仮道管内腔に観察された。カラマツでは仮道管内腔を埋め尽くすくらいの多量の堆積物が存在している場合もあった。組織化学的手法による観察の結果、二次的堆積物の形状によってその化学的組成が異なること、心材形成にともなって二次的堆積物の表面にさらに芳香族堆積物が堆積することによって糖が検出できなくなることなどが明らかとなった。

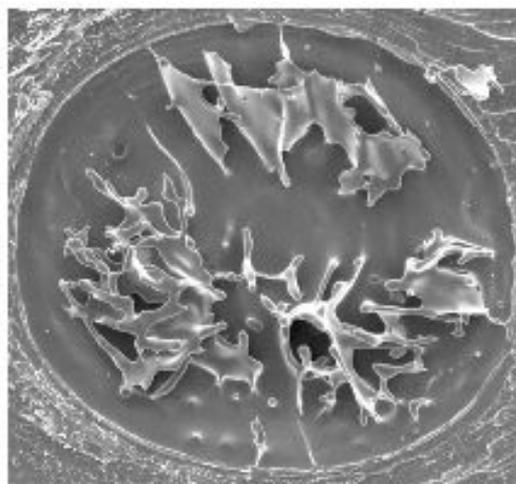


図-5 カラマツ移行材内側の仮道管相互壁孔に付加的に堆積した不定形物質。

以上のとおり、本研究によって多くの新規知見を得ることができ、心材形成の四つの要素それぞれについて新しいモニタリング技術を開発することができた。また、季節性の検討のための試料採取については、制限はあ

るものの成長錐の採取とそれに引き続く液体窒素やエタノールを用いた簡易な採取・固定法の有効性が明らかとなった。本研究で開発されたモニタリング技術の多くは、これまで別々に研究が進められてきた心材形成の四つの要素を、本研究の開始によって総合的に捉えることにより開発が可能になったものである。本研究ではスギとカラマツを研究対象としたが、心材形成過程を解明するにはいたっていない。今後本研究で開発した手法を多数の供試木に適用して心材形成過程を解明し、心材形成の人為的制御に向けた研究を推進する必要がある。また、心材の様々な性質は種特異的であり、多様な種の多様な心材形成について、今後も本研究のようなアプローチで研究を進めていく必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1) Katsushi Kuroda, Takeshi Fujiwara, Koh Hashida, Takanori Imai, Masayoshi Kushi, Kaori Saito, Kazuhiko Fukushima: 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 (2014) doi: 10.1093/aob/mcu028 (査読有)

2) 中田了五: 樹木の wetwood: 現象と定義. *木材学会誌* 60 63-79 (2014) doi:10.2488/jwrs.60.63 (査読有)

3) Satoshi Nakaba, Yuzo Sano, Ryo Funada: Disappearance of microtubules, nuclei and starch during cell death of ray parenchyma in *Abies sachalinensis*. *IAWA Journal* 34 135-146 (2013) doi:10.1163/22941932-00000012 (査読有)

4) Katsushi Kuroda, Takeshi Fujiwara, Takanori Imai, Ruka Takama, Kaori Saito, Yasuyuki Matsushita, Kazuhiko Fukushima: The cryo-TOF-SIMS/SEM system for the analysis of the chemical distribution in freeze-fixed *Cryptomeria japonica* wood. *Surface and Interface Analysis* 45 215-219 (2013) doi:10.1002/sia.4979 (査読有)

5) Ryogo Nakada, Eitaro Fukatsu: Seasonal variation of heartwood formation in *Larix kaempferi*. *Tree Physiology* 32 1497-1508 (2012) doi:10.1093/treephys/tps108 (査読有)

〔学会発表〕(計 15 件)

1) 河西優衣, 尾頭信昌, 中田了五, 今井貴規: 蛍光顕微鏡法によるカラマツ心材成分の組織化学的検討. 第63回日本木材学会大会, 2014年3月13日-15日, 愛媛大学(松山)

2) 荒川泉, 森本光, 中田了五, 船田良, 半智史: スギの心材形成に伴う放射柔細胞の細胞死過程における細胞内容物の変化. 第6

3回日本木材学会大会, 2014年3月13日-15日, 愛媛大学(松山)

3) 森本光, 荒川泉, 半智史, 中田了五, 船田良: スギの傷害心材形成時の脱水範囲および放射柔細胞の内容物の変化に関する研究. 第63回日本木材学会大会, 2014年3月13日-15日, 愛媛大学(松山)

4) 中田了五: カラマツ生立木樹幹内水分量の12年間の変化. 第63回日本木材学会大会, 2014年3月13日-15日, 愛媛大学(松山)

5) 佐野雄三, 黒田克史, 今井貴規, 中田了五: カラマツの心材形成過程における心材物質の堆積と水分分布. 第63回日本木材学会大会, 2014年3月13日-15日, 愛媛大学(松山)

6) 黒田克史, 鈴木養樹, 中田了五: 心材形成過程の解析を目指したインピーダンス法によるカラマツ木部の水分分布季節変化の非破壊計測. 第63回日本木材学会大会, 2014年3月13日-15日, 愛媛大学(松山)

7) Satoshi Nakaba, Yuzo Sano, Ryo Funada: Disappearance of organelles during cell death of ray parenchyma in *Abies sachalinensis*. 8th Pacific Regional Wood Anatomy Conference & Annual meeting of International Academy of Wood Science, 2013年10月17日-20日, Nanjing, China

8) 森本光, 半智史, 中田了五, 船田良: スギの傷害心材形成過程に伴う木部柔細胞の細胞死過程に関する研究. 第63回日本木材学会大会, 2013年03月27日-29日, 岩手大学(盛岡)

9) 半智史, 森本光, 中田了五, 今井貴規, 船田良: 細胞死誘導系を用いたスギおよびカラマツ放射柔細胞の細胞死過程の経時的解析. 第63回日本木材学会大会, 2013年03月27日-29日, 岩手大学(盛岡)

10) 中田了五, 岡田直紀, 中井毅尚, 黒田克史: 針葉樹のwetwood 形成時の心材への水分の再侵入における水移動の駆動力としての木部水ポテンシャル. 第63回日本木材学会大会, 2013年03月27日-29日, 岩手大学(盛岡)

11) 黒田克史, 藤原健, 中田了五, 佐野雄三: ヒノキ、カラマツ、トドマツ心材形成過程における木部の水分分布変化のCryo-SEM解析. 第63回日本木材学会大会, 2013年03月27日-29日, 岩手大学(盛岡)

12) Ryogo Nakada: Characterising *Larix kaempferi* among conifers in heartwood property. *Larix 2012 Larch in a warm climate*, 2012年09月11日-13日, Hallormsstadaskogur National Forest, Iceland

13) Katsushi Kuroda, Takeshi Fujiwara, Takanori Imai, Ruka Takama, Kaori Saito, Yasuyuki Matsushita, Kazuhiko Fukushima: New Approach of Chemical Distribution in

a Frozen-Hydrated Wood Sample Using the Cryo-TOF- SIMS/SEM System. 012 IUFRO All-Division 5 Conference, 2012年07月08日-13日, Estoril, Portugal

14) 中田了五: スギ生立木樹幹内水分量の10年間の变化. 第62回日本木材学会大会, 2012年3月16日, 北海道大学(札幌)

15) Md. Azharul Islam, Satoshi Nakaba, Yusuke Yamagishi, Shahanara Begum, Ryogo Nakada, Ryo Funada: Histochemical changes in ray parenchyma cells of Larix kaempferi during transition from sapwood to heartwood. 第62回日本木材学会大会, 2012年3月15日, 北海道大学(札幌)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中田 了五 (NAKADA, Ryogo)  
独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター・課長  
研究者番号: 60370847

### (2) 研究分担者

佐野 雄三 (SANO, Yuzo)  
北海道大学・農学研究科・教授  
研究者番号: 90226043

黒田 克史 (KURODA, Katsushi)  
独立行政法人森林総合研究所・木材特性研究領域・主任研究員  
研究者番号: 90399379

船田 良 (FUNADA, Ryo)  
東京農工大学・農学研究科・教授  
研究者番号: 20192734

半 智史 (NAKABA, Satoshi)  
東京農工大学・農学研究科・助教  
研究者番号: 40627709

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

### (3) 連携研究者

鈴木 養樹 (SUZUKI, Youki)  
独立行政法人森林総合研究所・木材特性研究領域・室長  
研究者番号: 90353739