

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21327

研究課題名（和文）細胞老化の視点から切り拓く樹木の心材形成研究の新展開

研究課題名（英文）New developments in research on heartwood formation in trees from the perspective of senescence

研究代表者

半 智史（Nakaba, Satoshi）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：40627709

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究期間では、新型コロナウイルス感染拡大により、試料採取が2023年まで実施することができなかつたため、前半は解析の準備段階として、切片SEM観察法によるスギの辺材中での放射柔細胞の細胞小器官の放射方向における変化の解析を実施し、辺材中での細胞小器官の変化について明らかにした。2023年度は、肥大成長速度に着目して放射柔細胞の生存率を解析した結果、成長の悪い個体は成長の良い個体よりも辺材境界近くまで生存率やデンプン貯蔵機能を保つと考えられること、を明らかにした。放射柔細胞の老化に特徴的な変化を抽出するに至らなかつたが、放射柔細胞の細胞死制御機構について新たな知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生可能資源の中でも木質バイオマスは、カーボンニュートラルという優れた特性を有していることから、循環型炭素資源として期待されている。樹木特有の長命細胞である放射柔細胞の細胞死の制御機構を明らかにすることは、木質バイオマスの利用において重要な特性である心材の量や質の人為的なコントロールを可能とする。本研究の成果は、心材の特性を制御した高機能性樹木を創出する基盤技術の開発に向けて重要な知見を与え、化石資源に依存しない持続可能な循環型社会を構築する上で必要不可欠な木質バイオマスの高度有効利用の促進に貢献する。

研究成果の概要（英文）：In the first half of this research period, as a preparatory stage for the analysis, the changes in the radial direction of the organelles of ray parenchyma cells in the sapwood of a Sugi tree were analysed by the section SEM observation method, and the changes in the organelles in the sapwood were clarified. In 2023, the survival rate of ray parenchyma cells was analysed with a focus on the rate of radial growth. We found that relatively slower growing individuals might be retain their survival rate and starch storage function closer to the sapwood-heartwood boundary than faster growing individuals. Although we were unable to extract changes related with senescence in ray parenchyma cells, we obtained new insights into the regulatory mechanisms of cell death in ray parenchyma cells.

研究分野：樹木細胞生物学

キーワード：放射柔細胞 細胞老化 心材形成 スギ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生可能資源の中でも木質バイオマスは、カーボンニュートラルという優れた特性を有していることから、次世代型のクリーンエネルギー源および循環型炭素資源として期待されている。木質バイオマスの形成機構の理解は、木質バイオマスの高度有効利用の促進に繋がり、化石資源に依存しない持続可能な循環型社会の構築に大きく貢献する。

樹幹の横断面を観察すると、内方に着色した組織が認められる(図1)。このような組織は心材と呼ばれ、辺縁部に位置する組織(辺材)より腐朽耐性が高くすべての細胞が死滅している部位であり、超多年生植物である樹木の幹を長年維持することに役立つと考えられている。また、心材の量や耐久性、色、匂いは木質資源の利用上重要な特性であるため、古くから研究が進められてきた(Hillis 1987)。

心材形成のトリガーについては、古くから二つの考えがある。一つは、樹木特有の長命細胞である放射柔細胞が死を迎えることが引き金であり、それに伴って心材特有の抽出成分(心材成分)の生合成や水分状態および細胞構造の変化が起こるというもの。もう一つは、放射柔細胞を取り巻く水分環境が乾燥状態に変化することが引き金であり、心材成分の生合成や細胞構造の変化を伴いながら放射柔細胞が死に至るというものである。つまり言い換えると、心材形成の開始については、1)放射柔細胞の寿命が決めるという仮説と、2)放射柔細胞を取り巻く水分環境が決めるという仮説が存在しており、この議論はいわばニワトリが先か、卵が先か、という様相を呈している。

放射柔細胞の寿命については、加齢(aging)という視点から主に議論されてきた。放射柔細胞が細胞死を開始するまでの年数(辺材年輪数)は同一樹種内でさえばつくことから、心材形成の開始を決めるのは放射柔細胞の寿命ではないという主張がある(例えば、Spicer and Holbrook 2007)。ただし、近年の動植物における細胞の老化(senescence)に関する知見は、細胞の寿命に関わる老化の進行が細胞齢だけでは決まらないことを示している。したがって、加齢ではなく「老化」の視点からのアプローチによる新たな研究を展開することで、放射柔細胞の寿命の制御機構を明らかにし、心材形成のトリガーを解明できると考えた。

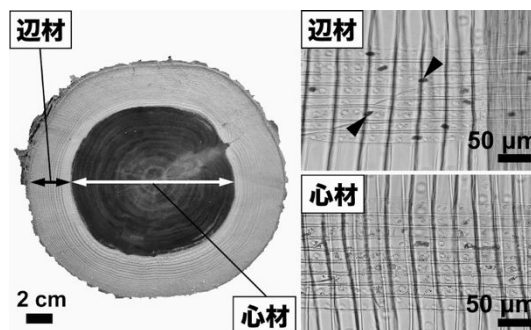


図1：スギ樹幹横断面写真(左) 縦断面切片写真(酢酸カーミン染色)(右)。放射柔細胞は辺材では核(矢頭)をもち生存しているが、心材では死滅している。

2. 研究の目的

本研究では、辺材年輪数が極端に異なるスギを用いる。樹齢が100年を超えるスギから試料を採取し、寿命が極端に異なる放射柔細胞について、分化開始から死に至るまでの期間を相対的に分割したものについて比較解析をそれぞれ行い、共通した変化を抽出することで放射柔細胞の老化に特徴的な変化を明らかにし、放射柔細胞の細胞死制御機構を解明することを最終目標とする。

本研究期間では、新型コロナウイルス感染拡大により、試料採取が2023年まで実施することができなかったため、前半は解析の準備段階として、光学顕微鏡での検出が難しい細胞小器官の微細構造の変化を明らかにすることを目的として、広範囲かつ高分解能での観察が可能である準超薄切片の電界放出形走査電子顕微鏡(FE-SEM)による観察方法(切片SEM観察法)を用いて、スギの辺材中における放射柔細胞の細胞小器官の放射方向における変化の観察を実施した。2023年度は、辺材年輪数が大きく異なるスギ試料を用いて、第一段階として放射柔細胞の生存率の推移について比較を行った。

3. 研究の方法

(1) 切片SEM観察法

2021年12月に森林総合研究所千代田苗畑に生育するスギ(*Cryptomeria japonica*)1個体より採取した試料を用いた。試料は直ちに2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定し、続けて、1%四酸化オスミウム溶液により後固定を行った。これらの試料はエポキシ樹脂で包埋し、準超薄切片作製用ダイヤモンドナイフ(SYM knife Histo)をセットしたウルトラミクロトームを用いて0.2~0.35 μm厚の柁目面切片を作製した。切片はシリコン基板(スーパースムースシリコンマウント)の上に載せ、電界放出形走査電子顕微鏡(FE-SEM, S-4800, 日立ハイテク)により観察を行った。加速電圧5kV下でYAG反射電子検出器により得られた像の色を反転させることにより画像を得た。

(2) 放射柔細胞の生存率の推移

供試木として、2023年5月19日に富山県立山町に自生するスギ(アシウスギ、芦生杉、地域名：タテヤマスギ)8個体の樹皮から心材に至るコアサンプルを採取し、直ちに2.5%グルタルアルデヒド溶液で化学固定を行った。成長の良い群、悪い群は直近5年の年輪幅の平均値から決定した。コアサンプルから、スライディングマイクロトームを用いて40 μ m厚の柎目面切片を作製した。核観察用切片は、酢酸カーミン染色を行い、デンプン観察用切片は、ヨウ素ヨウ化カリウム染色を行い、光学顕微鏡にて観察を行った。放射柔細胞の生存率は各年輪内で無作為に100個の放射柔細胞を選出し、核を保持する細胞を生細胞として、生細胞の数を百分率で表すことで算出した。

4. 研究成果

(1) 切片 SEM 観察法

FE-SEMでの反射電子による切片観察は、10,000倍を超えるような倍率での観察は難しいものの細胞小器官の変化を捉えるには十分であり、透過電子顕微鏡(TEM)と比べて広い範囲で複数の放射柔細胞を同時に観察することが可能であった(図2)。

形成層より4年輪目から6年輪目にかけて液胞中のタンパク質の量が、6年輪目から7年輪目にかけて小胞体付近の小胞の数が大きく減少し、その後はほとんど観察されなかった。このような小胞の減少は、物質の生合成や輸送に大きな変化が起こっていることを示しているかもしれない。さらに、辺材内層にて肉眼で接線方向に連続した白い帯状に見える白線帯が観察された7年輪目内層ではより大きな変化が認められ、特に細胞における液胞の占める割合が大きくなっていった。細胞内容物が細胞壁側に押し付けられるほど液胞が大きく拡大した部位も認められたものの、細胞によって、あるいは、同一細胞内においてもその程度が異なっているケースも観察された。形成層から8年輪目では細胞小器官は認められず、心材であると判断した。

以上の結果より、切片SEM観察法は辺材中での放射柔細胞における細胞内容物の変化を広範囲かつ高分解能で解析することが可能であり、放射柔細胞の細胞死過程を詳細に解析する上で有効な手法であるといえる。

さらに、辺材中のどの部位においても、液胞中に細胞小器官の分解残渣のようなものが観察された。この観察結果からは、放射柔細胞においてオートファジーが起こっており、液胞にて細胞小器官が分解されている可能性が考えられる。以上のように、スギ放射柔細胞の放射方向における細胞小器官の変化について、今後の解析において重要な基礎知見を得ることができた。

(2) 放射柔細胞の生存率の推移

辺材年輪数が大きく異なるスギ試料を用いて、第一段階として放射柔細胞の生存率の推移について比較を行った。今回用いた辺材年輪数が大きく異なる試料は肥大成長速度(直近5年の年輪幅)も大きく異なっていた。形成層を0、心材1年輪目を100とした辺材内での相対距離による生存率推移のグラフを作成し、成長が良い群(辺材年輪数が22年から26年)と悪い群(辺材年輪数が45年から69年)で比較を行った結果、成長の良い群の方が生存率の低下が早く起こることが示された(図3)。また、成長の良い群と悪い

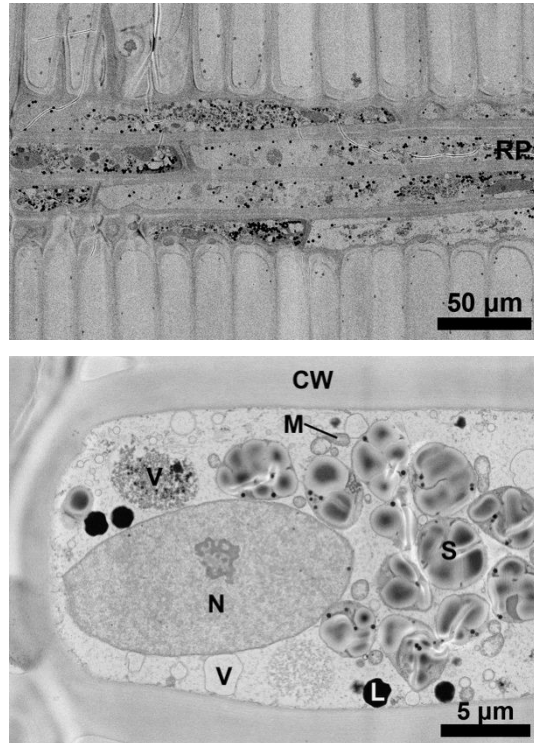


図2:スギ柎目面切片のFE-SEM画像(形成層から2年輪目)、上図:放射組織の全体像、下図:上図の一部を拡大したもの、CW:細胞壁、L:脂質粒、M:ミトコンドリア、N:核、RP:放射柔細胞、S:デンプン粒、V:液胞

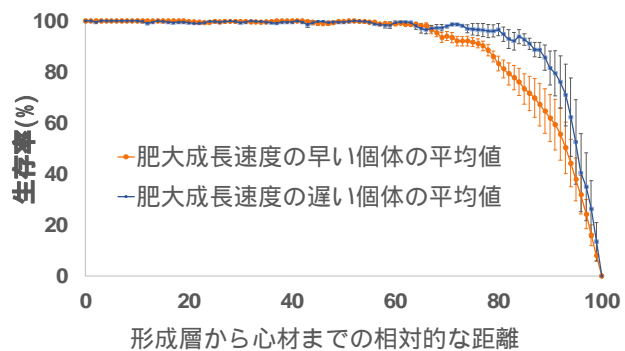


図3:形成層 辺材心材境界間の相対距離による放射柔細胞の生存率の推移

群それぞれの平均値によるグラフ比較を行った結果、成長の良い群は生存率の推移が緩やかに起こり、成長の悪い群はより急激に起こっていることが明らかになった。また、デンプン粒観察の結果、全サンプルで1年輪早材部から移行材まで多くのデンプンが観察された。相違点として、成長の良い群では移行材の前半部で生細胞中のデンプン量は減少しているのに対し、成長の悪い群では移行材前半で生細胞内のデンプン量は変わらず、辺心材境界の近くでデンプン粒の量が急速に減少した。以上の結果より、スギの成長の悪い個体は成長の良い個体よりも辺心材境界近くまで放射柔細胞の生存率やデンプン貯蔵機能を保つと考えられる。

(3) まとめ

本研究期間では、新型コロナウイルス感染拡大により、試料採取が2023年まで実施することができなかつたため、前半は解析の準備段階として、光学顕微鏡での検出が難しい細胞小器官の微細構造の変化を明らかにすることを目的として、切片SEM観察法によるスギの辺材中での放射柔細胞の細胞小器官の放射方向における変化の解析を実施し、細胞小器官の変化について明らかにすることができた。2023年度は、辺材年輪数が大きく異なるスギ試料を用いて、第一段階として放射柔細胞の生存率の推移について比較を行った結果、辺材年輪数が大きく異なる試料では年輪幅から判断される肥大成長速度も大きく異なること、成長の悪い個体は成長の良い個体よりも辺心材境界近くまで放射柔細胞の生存率やデンプン貯蔵機能を保つと考えられること、を明らかにした。二つの実験を通じて当初目的としていた放射柔細胞の老化に特徴的な変化を抽出するまでに至らなかつたが、放射柔細胞の細胞死制御機構について新たな知見を得ることにつながった。

<引用文献>

Hillis WE (1987) Heartwood and tree exudates. Springer-Verlag, New York, pp 1-268
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

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohse Megumi, Irohara Rika, Iizuka Etsushi, Arakawa Izumi, Kitin Peter, Funada Ryo, Nakaba Satoshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Sequent periderm formation and changes in the cellular contents of phloem parenchyma during rhytidome development in <i>Cryptomeria japonica</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Wood Science	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s10086-022-02027-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Satoshi Nakaba
2. 発表標題 Cell death of long-lived xylem ray parenchyma cells during heartwood formation
3. 学会等名 The First International Mini-symposium on Wood Science（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 半 智史、荒川 泉、山根 健一、黒田 克史、波多野 友博、船田 良
2. 発表標題 電界放出形走査電子顕微鏡（FE-SEM）によるスギ放射柔細胞の辺材中における細胞内容物の変化の解析
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会（京都）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松原 諒汰、安江 恒、加藤 輝隆、半 智史、船田 良
2. 発表標題 生育速度の異なるスギにおける放射柔細胞の生存率およびデンプン貯蔵量の放射方向での推移
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会（京都）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 糸田川 千畝、深見 泰河、中田 了五、高田 直樹、粟野 達也、半 智史、船田 良
2. 発表標題 ドロノキ放射柔細胞におけるプロテアーゼRD21の組織内局在の季節変動
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会（福岡）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山野邊 真多、渡辺 誠、安江 恒、船田 良、半 智史
2. 発表標題 カラマツとスギの樹幹における非構造的炭水化物量の放射方向および季節変動に関する研究
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会（福岡）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荒川 泉、津本 宗哉、Rahman Md Hasnat、工藤 佳世、高田 克彦、船田 良、半 智史
2. 発表標題 イチヨウ二次木部における分野壁孔の形態学的特徴と軸方向要素の細胞死
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会（福岡）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴山 凧、牧野 礼、橋田 光、児嶋 美穂、安部 久、安江 恒、小林 真、吉田 俊也、高橋 直樹、堀川 祥生、船田 良、半 智史
2. 発表標題 フェノール性成分がオニグルミの心材色発現に与える影響
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会（福岡）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原野 陽平、山根 健一、黒田 克史、船田 良、半 智史
2. 発表標題 ニセアカシア樹幹放射方向における細胞レベルの水分布の解析
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会（福岡）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 深見 泰河、粟野 達也、中田 了五、船田 良、半 智史
2. 発表標題 交雑ポプラ放射組織の接触細胞と隔離細胞における内容物の違い
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会（名古屋・岐阜）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒川 泉、太田 萌、香川 真穂、原野 陽平、堀川 祥生、船田 良、半 智史
2. 発表標題 ニセアカシア心材成分の沈着過程に関する蛍光スペクトル解析
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会（名古屋・岐阜）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 半 智史、住田 愛、飯塚 悦司、荒川 泉、波多野 友博、堀川 祥生、粟野 達也、船田 良
2. 発表標題 スギ内樹皮放射組織の細胞間隙における結晶と多糖類に関する解析
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会（名古屋・岐阜）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深見 泰河、中田 了五、船田 良、半 智史
2. 発表標題 交雑ポプラ放射柔細胞の細胞死過程における内容物の変化
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会（東京）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香川 真穂、太田 萌、飯塚 悦司、船田 良、半 智史
2. 発表標題 ニセアカシアの心材形成過程における放射柔細胞の細胞死および心材成分の沈着の観察
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会（東京）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 住田 愛、飯塚 悦司、荒川 泉、船田 良、半 智史
2. 発表標題 スギ内樹皮放射組織の細胞間隙における結晶と多糖類の分布
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会（東京）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京農工大学 農学部 環境資源科学科 木質資源特性科学研究室
<http://web.tuat.ac.jp/~tokusei/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	安江 恒 (Yasue Koh) (00324236)	信州大学・学術研究院農学系・准教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
インドネシア	Universitas Gadjah Mada			
韓国	Chonnam National University			