 総 説

[木材学会誌 Vol. 59, No. 2, p. 65-80 (2013)]

植物の進化に伴うリグニン超分子構造の多様化*1

寺島典二*2,3

Diversification of Lignin Supramolecular Structure during the Evolution of Plants*1

Noritsugu TERASHIMA*2,3

The 3D macromolecular structure (supramolecular structure, SMS) of lignin in different morphological regions of the cell wall is widely diverse in many respects: (1) type and frequency of monomer (*p*-hydroxyphenyl(H)-, guaiacyl(G)- and syringyl(S)-propane) units, (2) type and frequency of inter-unit bonds, (3) shape, size, and (4) linkages between lignin and polysaccharides. This diversity is found also in different kinds of cells of different plant species. The causes of the complicated heterogeneity of lignin SMS can be understood reasonably well from the viewpoints of evolutionary biology and polymer chemistry: "ontogenesis recapitulates phylogenesis", and growing of lignin SMS is controlled by the supply of monolignols and polymerization conditions provided by previously deposited polysaccharides. The first land plants emerged with lignified vascular tissue having excellent capabilities in conduction of aqueous material and mechanical support of the plant stem and branches. Lignin played a multifunctional role in making the tracheid wall hydrophobic and mechanically strong, and very defensive against biodegradative microbes by formation of structurally heterogeneous SMS. A cluster of globular HG lignin consisting of condensed oligolignols effectively protects weak β -O-4' bonds located inside the lignin SMS from biodegradation by exogenous enzymes or other active agents. For Pteridophyta and gymnosperms, the first dominant vascular plants with HG lignin, this resulted in longevity of huge plants and slow alternation of generations around the Carboniferous period. Changes of the environment on earth promoted the evolution of angiosperms in which multifunctional tracheids differentiated into conduction-specialized vessels and support-specialized fibers. The excessively strong defense function of HG lignin became moderate in less condensed SG lignin, and the weakened defense rendered cell walls of angiosperms biodegradable easily after plant death to provide space for growing of young plants and frequent alternation of generations. Lignin in Gramineae containing ester-bonded ferulic and *p*-coumaric acids is highly biodegradable. Thus, angiosperms with lignin of appropriate defense function evolved by the ready adaptability to environmental change on earth through frequent gene conversion. Additional factors promoting evolution of lignin structure are proposed.

Keywords: lignin supramolecule, condensed structure, cell wall layer, plant evolution, biodegradation.

植物細胞壁中のリグニンの三次元高分子構造は、壁中の場所、細胞の種類、植物の種類等によって異なり、不均一かつ多様である。この多様性は「細胞壁の構築は、植物の進化の過程を辿っ

*1 Received September 10, 2012; accepted November 7, 2012.

*2 名古屋大学 Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan

*3 Present address: 2-610 Uedayama, Tenpaku, Nagoya 468-0001, Japan

Corresponding author: N. Terashima (norteras@quartz.ocn.ne.jp)

て、多糖類の堆積、モノリグノールの供給と重合、多糖との複合により進む」との視点から体系的に理解できる。すなわち、約4億年前出現したシダ植物および裸子植物では、HG型リグニンによる仮道管壁の防水通道性と微生物等からの攻撃に対する防御性の付与、および力学的強度の付与によって繁栄した。しかし高防御機能の縮合型HGリグニンを含む仮道管は、個体の大型化と長寿命化による世代交代頻度の低下、地球環境の変化への遺伝的適応性の低下をもたらした。多機能の仮道管は、進化した被子植物では通道機能に特化した道管と支持機能に特化した木繊維とに分化し、リグニンもSGリグニンへと縮合度を低減し防御性能を適正化して地球環境の変化への遺伝的適応性を高めた。

1. 天然高分子物質としてのリグニンの特徴

1.1 高分子構造の多様性

植物細胞壁の主成分の一つであるリグニンは、地中の腐植物質や石炭などの主要な起源物質であることをも考慮すると、この地球上で最も大量に存在する有機物であり、炭素循環の大きなプールとなっている。これは、リグニンが多糖類や蛋白質など他の天然高分子物質と比べ、自然環境下で極めて分解され難い物質であるからである。この難分解性という特徴は、リグニンの三次元(3D)高分子化学構造(超分子構造)が不均一かつ多様で、不可逆のプロセスによって形成されるため、特定の化学構造を標的とする酵素や、より低分子量の化学種によっても分解され難いこと、およびセルロース、ヘミセルロースなどの多糖類と独特の3D複合体を形成していることなどに因る。

このリグニンの超分子構造の不均一・多様性は、次のような要因により生起する。

(1) 構成モノマーの多様性：主要なモノリグノールは

p-ヒドロキシ桂皮アルコール類 (Fig. 1, 1.1) であり、芳香核の種類に応じて

p-ヒドロキシフェニル(H)-プロパン (Fig. 1, 1.2a), グアヤシル(G)-プロパン (Fig. 1, 1.2b), およびシリンギル(S)-プロパン単位 (Fig. 1, 1.2c), それらが重合して生成したリグニンは、*p*-ヒドロキシフェニル・グアヤシル (HG) リグニン, シリンギル・グアヤシル (SG) リグニンなどと呼ばれ、多様となる^{1, 2)}。植物の種類や組織部位、細胞の種類によっては、*p*-ヒドロキシ桂皮酸類 (Fig. 1, 1.3) やアルデヒド類 (Fig. 1, 1.4), さらにこれらのC₃側鎖からC₂単位が脱離して生じる

p-ヒドロキシ安息香酸類 (Fig. 1, 1.5) も構成モノマーとなるため、さらに高分子構造は多様となる。

(2) 構成単位間結合の多様性：モノマーの重合に際してはまず、モノリグノールがラッカーゼまたはペルオキシダーゼによって数種のラジカル共鳴混成体を生成する¹⁾ (Fig. 2, a, b, c, d, e)。これらが重

合に関与するためその結合様式も多様となる (Fig. 3, 3.3~3.11)。また側鎖β位のラジカル (Fig. 2, e) が関与する結合の生成では、キノンメチド中間体を経て進行するのでβ位炭素と共にα位炭素も不斉炭素となり、その立体異性体をも考慮すると、可能な異性体の組み合わせは莫大な数になる^{3, 4)}。ただし芳香核3位と5位にメトキシル基を持つシナピルアルコール (Fig. 2, 2.3) では、該当するラジカル (Fig. 2, b, c) が関与して生成するフェニルクマラン構造 (Fig. 3, 3.8) や縮合型構造 (Fig. 3, 3.9, 3.10, 3.11) が生成されず、主にβ-O-4'結合 (重合の初期に一部β-β'結合, 中後期に一部β-1'結合) となる。

一方、*p*-クマリルアルコールでは芳香核3位と5位のラジカル (Fig. 2, b, c) の関与により、縮合型構造を生成する頻度が高い。この縮合型構造生成頻度の差異が、HGリグニンとSGリグニン高分子の高次構造、ひいては両者の物理的、化学的、生物学的性質に大きな差異をもたらす。

(3) 高分子内でのモノマーの種類および結合の分布の不均一性：生成供給されるモノマーの種類は細胞分裂からの時間(細胞の分化段階)に依って変わる。そのため細胞の壁層により、またリグニン堆積の時期によりモノマーの種類および結合様式が一樣でない⁵⁾。そしてラジカルに関与するこの高分子化は不可逆的である。

(4) 多糖との複合体形成の多様性：細胞壁中でリグニンが生成する場合はまず多糖類が堆積し、その親水性多糖類の存在下にモノリグノールの重合が進行して高分子リグニンへと成長する。その過程で多糖類とリグニンとの間に様々な結合⁶⁾が生じ、リグニン-多糖複合体の三次元構造も多様となる^{7, 8)}。最も頻度が高く重要なリグニンと多糖間の結合は、オリゴリグノールの成長末端にモノリグノールがβ-O-4'結合で付加成長する際、中間体のキノンメチド構造の側鎖α位に糖の水酸基またはカルボキシル基が付加して生じるエーテル結合およびエステル結合 (Fig. 3, 3.3b, Fig. 4, b, e) である。Sリグニン

1.1: Monolignols :

- a: $R = R' = H$: *p*-Coumaryl alcohol
 b: $R = OCH_3$, $R' = H$: Coniferyl alcohol
 c: $R = R' = OCH_3$: Sinapyl alcohol

1.3: *p*-Hydroxyphenylcinnamic acids

- a: $R = R' = H$, $R'' = COOH$: *p*-Coumaric acid
 b: $R = OCH_3$, $R' = H$, $R'' = COOH$: Ferulic acid
 c: $R = R' = OCH_3$, $R'' = COOH$: Sinapic acid
 d: $R = OH$, $R' = H$, $R'' = COOH$: Caffeic acid

1.4: *p*-Hydroxyphenylcinnamaldehydes

- a: $R = R' = H$, $R'' = CHO$: *p*-Coumaraldehyde
 b: $R = OCH_3$, $R' = H$, $R'' = CHO$: Ferulaldehyde
 c: $R = R' = OCH_3$, $R'' = CHO$: Sinapaldehyde

1.2: Major monomeric units in lignin

- a: $R = R' = H$: *p*-Hydroxyphenyl (H) propane
 b: $R = OCH_3$, $R' = H$: Guaiacyl (G) propane
 c: $R = R' = OCH_3$: Syringyl (S) propane

1.5: *p*-Hydroxybenzoic acids

- a: $R = R' = H$: *p*-Hydroxybenzoic acid
 b: $R = OCH_3$, $R' = H$: Vanillic acid
 c: $R = R' = OCH_3$: Syringic acid

Fig. 1. Monomer units in lignin.

Fig. 2. Resonance forms of monolignol radical.

は主に β -O-4' 結合によって成長するので、充分な多糖が存在するならば、糖との結合頻度は、H、G リグニンよりも高くなると考えられる。

(5) 進化に伴う高次構造の多様性：細胞の種類、組織中の場所、植物の種類、細胞壁形成の環境など多様な因子により、リグニンの堆積過程とリグニン-多糖複合体の高次構造に差異が生じる。これらの多様性の多くは、進化の過程でその種の生存環境に適応して獲得した形質である（後述）。

1.2 高分子リグニンの化学構造と性質の特徴、および研究上の問題点

細胞壁中でリグニンは多糖類との高分子複合体として存在し、その形成は不可逆的であるため、純粋なリグニンを高次構造を保ったまま単離して調べることができない。加えて高分子リグニンの化学構造は不均一かつ多様であるため、リグニンは特定の構造式では記述できない「構造未知」の物質であると言われることもある。そのため当該植物組織中のリ

Fig. 3. Major linkages in lignin.

グニンを、各種の分解的手法によって得られるリグニン構造の断片を精査総合して、平均的的化学構造模式図として表現することが多い。また簡単なモデル化合物やモノリグノール類の *in vitro* 脱水素重合物 (Dehydrogenation polymer: DHP) を用いる実験結果に基づいて、リグニンの化学的・生物学的挙動を理解し説明しようと試みられてきた。しかし、細胞壁中のリグニンの挙動を、その平均的的化学構造模式図やモデル実験の結果のみに基づいて理解することは困難である。リグニンの諸性質をより論理的に理解するためには、その不均一性・多様性を包含する

リグニン・多糖超分子複合体の3D構造の解明が、極めて重要である。この不均一性・多様性は本来はランダムな事象ではなく、植物の進化と共に一定の規則性をもって発展してきたものであるから、「個体発生（ここでは木化細胞の形成）は、系統発生を繰り返す、又は密接に関連する」（例、コケ植物の細胞の形成⁹⁾）という進化生物学的な視点と、「与えられた重合環境の下で、モノリグノールの供給、反応が進行し、リグニンの超分子が生成される」という高分子化学の視点とを組み合わせ、極めて複雑に見えるリグニン・多糖複合体の形成と構造の多

Fig. 4. Structures of folded oligolignols and their globular micells. R=H or OCH₃
 a: Conceptual structures of folded hexalignol with four β -O-4' and one β -5' bonds.
 b: Folded hexalignol with C α -carbohydrate bond. c: Conceptual illustration of globular micell of folded oligolignol. d: Another conceptual illustration of globular oligolignol micell (OLM) including a tetralignol linked at β - β' (5-5')- β - β' carbons (dotted circle) as an initiation point of polylignol formation. e: Globular OLM may be formed including pectin (Pec), xyloglucan (XG), and arabinoxylan associated with cellulose microfibril (CMF). Condensation of aromatic ring (dotted circle) occurs partly in an earliest stage of polymerization and mainly in a late stage at the contact boundary between globular micells. Condensation fixes the 3D cluster of OLM and makes it a chemical and physical barrier to diffusion of water or enzymes into the cluster of OLM. H lignol unit may condense frequently at the 3 and 5 positions (circled) to provide a strong waterproof barrier.
 R=H or OCH₃

様性、ひいてはその性質も統一して論理的に理解することができる筈である。このような見地から本稿では、高分子リグニンの不均一性・多様性が植物の進化に伴い、どのような要因が駆動力になって生じてきたかについて考察してみたい。

なお、不可逆的に構築されるリグニン・多糖超分子複合体の3D構造研究上の困難をのり超えるためには、完成した細胞壁中のリグニンの分解的手法¹⁰⁻¹²⁾による解析に加え、細胞壁形成過程で多糖分子とリグニンモノマーがどのように供給され、重

合と複合を繰り返して最終の3D複合体を構築するかを非破壊的に調べるのが必須である。多くの非破壊的方法のうち、特に紫外線顕微鏡、電子顕微鏡、核磁気共鳴分析法(NMR)などによる高分子リグニンの化学構造、形やサイズ、細胞壁への堆積状況などの観察¹³⁻¹⁶⁾が有用である。リグニンや多糖中の特定の元素や構造単位などを標識して可視化するマイクロオトラジオグラフィー¹⁷⁻²⁰⁾、免疫細胞化学法²¹⁾、¹³C-標識-非標識示差核磁気共鳴個体分析法²²⁾、などにより更に詳細な情報が非破壊的に得ら

れるようになってきた。

細胞壁中のリグニン・多糖複合体は植物種や細胞の種類により多様である。そのため異なる樹種や組織についての情報を総合しても、理論的に一貫した筋道を辿るには適さない。最も基本的なリグニン・多糖複合体の3D構造の形成メカニズムを非破壊的方法によって調べるのに適した植物として、筆者らはイチョウを実験に多用した。イチョウは「生きている化石」と言われるように、木部の主要部は進化初期の仮道管から成り、そのリグニンの化学構造が、マツやトウヒの正常材のリグニンと極めてよく似ている。それらの Milled Wood Lignin (MWL) の¹³C-NMR は相互に極めてよく似ており^{15, 23)}、リグニンの化学構造はその多糖との複合体の生成メカニズムに依存するから、マツやトウヒの正常材の細胞壁の形成メカニズムは、イチョウのそれとよく似ている、すなわち進化の過程で保持されてきたと言える。ただしイチョウがマツやトウヒのように典型的なあて材を形成しないという点では、さらなる進化を遂げた針葉樹類とは異なるので、マツやトウヒも実験に併用してきた。

2. 維管束植物の出現と維管束細胞の機能

約4.9~4.4億年前のオルドビス紀に緑藻類から陸上植物が進化したと考えられている^{24, 25)}。しかし組織分化が十分に発達しない非維管束植物である地衣類、蘚苔類、菌類では、リグニンは生成されない^{26, 27)}。約4.4~4.1億年前のシルル紀に初期の維管束植物が出現し、この時代に分化したシダ植物では、石炭紀(約3.6~2.9億年前)になってヒカゲノカズラ類やトクサ類の仲間からリンボク、フウインボク、ロボクなど巨大な植物が出現した。これらの植物が、世界各地で大森林を形成し、石炭の起源植物となった。その後、ソテツ目、イチョウ目、マツ目(針葉樹類)が広がった。このような初期維管束植物の繁栄を可能にしたのは、仮道管壁の優れた機能、すなわち不透水性壁の構築による通道組織としての機能、微生物や動物からの攻撃に対する防御壁としての機能、および大きく成長する樹体の支持機能である。これら仮道管壁の多様な機能はセルロース、ヘミセルロース、ペクチンなどの多糖類とリグニンとの超分子複合体を構築することにより達成された。

その後進化した広葉樹では、多機能の仮道管は、通道機能に特化した道管と支持機能に特化した木繊維とに分化し、多糖・リグニン複合構造もその機能の分化に応じて進化したとみなすことができる(Fig.8 参照)。

3. 細胞壁中におけるリグニンの機能

上記の維管束細胞壁の各種の機能は、リグニンの次の機能に負うところが大きい。

3.1 太陽光中の短波長紫外線等から細胞原形質を保護する機能

リグニン中の芳香核が紫外線を吸収する性質をもつことに基づく機能である。

3.2 病傷害からの防御機能

リグニン本来の重要な機能の一つが防御であることは、植物病理学の研究からよく知られている²⁸⁾。すなわち元来木化しない植物細胞壁でも病傷害を受けると病傷害リグニンが形成される。サツマイモ、キュウリ、カボチャなどを切断した場合、あるいは切断面に黒斑病菌を接種した場合、進化の初期のリグニンに近いHGタイプの病傷害リグニンが形成される²⁹⁾。またダイコンに黒斑病菌、べと病菌などを感染させると、HGリグニンを生じるが、正常組織に見られるようなSGリグニンは生じない^{30, 31)}。トウヒの針葉細胞の懸濁培養組織に病原菌 *Rhizosphaera kalkhoffi* の培養液から調製したエリシターを加えると、複合中間層(CML)リグニンに近いH単位の多いリグニンが誘導生成される³²⁾。コムギの葉でも傷害リグニンを形成する³³⁾。またジャックパインの根から誘導したカルスに、共生菌根菌の産生するエリシターを加えると、リグニン生成が起こる³⁴⁾。また矮生ダイズの葉に壊死性病変を起こすタバコのネクロシスウイルス、モザイクウイルス、ダイズモザイクウイルスなどを感染させるとリグニンが形成される³⁵⁾。

リグニンと化学構造が近縁の成分であるリグナン³⁶⁾、フラボノイド³⁷⁾、タンニン³⁸⁾なども他の生物からの攻撃に対する防御物質である。フェルラ酸、ジフェルラ酸やモノリグノール類なども、元来の低分子抗生物質としての機能^{39, 40)}から発展してリグニン高分子の構成単位になった可能性が考えられ、リグニンの起源も最初はこのような低分子防御物質であったかも知れない。ただしリグニンの場合は、低分子抗生物質と異なり、その超分子構造の内部へ水分子や酵素の侵入を防ぐ障壁を設けて3D構造を強固に保護し⁴¹⁾、結果としてリグニン-多糖複合体からなる細胞壁の防御機能を発揮していると考えられる(後述)。

3.3 防水機能

仮道管の形成初期には薄壁でも高リグニン濃度の不透水性層を形成し、仮道管の防水・通道機能を発揮させる。上記の防御機能と同様に、HGリグニン

がその縮合型結合を通して不透水性の3Dブドウ房状クラスター構造の層を作ることに基づく機能である。圧縮あて材の形成においても重要な役割を果たすと考えられる(後述)。

3.4 接着機能(組織への強度付与・支持機能)

リグニンは、二次壁(SW)およびCMLにおけるリグニンの堆積と多糖-リグニン結合の形成→親水性多糖ゲルの疎水性化→脱水・収縮→構成高分子間の水素結合の増大とファンデルワールス力の発現→壁構成高分子相互の接着力発現(Fig.8参照)の機構によりSWの強度を高め、かつCMLでの細胞相互の接着により組織の強度を高めて植物が重力に逆らって成長し大型化することを可能にしている。細胞壁中にリグニンを生成する現象は、重力または加重と密接に関連している。すなわち人工的に遠心力を加えて過重力状態で植物を育てた場合、または人工衛星中での微小重力下で育てた場合、それぞれリグニン含量が増大⁽⁴²⁾または減少⁽⁴³⁾する。元来リグニンを形成しないとされる非維管束植物の蘚類(コケ)でも巨大なもの(約35-55 cm, *Dawsonia* sp. and *Dendroligotrichum* sp.)になると、リグニンまたは類似物質が生成して支持機能を持つようになる⁽⁴⁴⁾。

3.5 応力・衝撃力に対する緩和機能

細胞壁の強度(実質ヤング率)へのリグニン自体の貢献度は小さい。スギ材からセルロースおよびヘミセルロースを選択的に除いて、主にリグニンが残留するようにした試料片の引張ヤング率を測定すると、リグニン単独の強度は極めて低い⁽⁴⁵⁾。リグニンの細胞壁強度への貢献は、ペクチンやヘミセルロースを介して細胞間およびセルロースマイクロファイブリル(CMF)間を接着することにある。そのリグニンの超分子構造はFig.4に示したように、折りたたまれたオリゴリグノールが集合して球状または板状のミセルを形成し、その表面の成長末端で縮合した構造であると考えられる^(16, 41)。したがって接着剤としての折りたたみ構造のリグニン分子は、細胞間およびCMF間の接着層に柔軟性と弾力性を与え、結果として応力や衝撃力に対する緩和機能を与え、木化組織全体の物理的耐久強度を高めている。

3.6 排泄、無毒化機能

動物と異なり陸上の植物では生命活動の結果生じた不要の物質を環境中に排泄できない。リグニンの形成は、代謝後の不要排泄物の無毒化現象であるともみなすこともできる^(46, 47)。しかし水中植物でもリグニンを生成する例が知られており、排泄機能がリグニン形成を促した主要な進化の要因とは考え難い。

4. 細胞壁中におけるリグニン-多糖複合体の形成と機能の発現

上述のリグニンの多様な機能の発現は、リグニン-多糖複合体の特有の3D構造に基づいている。代表的なモノリグノールであるコニフェリルアルコール(Fig.3, 3.2b)が重合して、三次元の高分子を形成する場合、以下の4段階を経て高分子化が進行すると考えられる⁽⁴¹⁾。

第1段階; 重合の開始, 2量体の生成

コニフェリルアルコールのラジカル(Fig.2, a, b, d, e)がカップリングして、2量体(Fig.3, 3.3-3.11)を生成する。木化中の細胞壁のpHを4~6と想定して、DHP生成反応のごく初期の2量体の比率を測定すると、 β -O-4'型41~50%; β -5'型34~41%; β - β' 型11~14%; その他4~13%である⁽⁴⁸⁾。その他のフラクションとしては β - β' (5-5') β - β' のような4量体も少量生成される⁽⁴⁹⁾。

第2段階; モノリグノールの付加によるオリゴマーの生成

モノリグノールが2量体へ付加して成長する際、モノリグノールの供給が充分であれば、 β -O-4'結合と β -5'結合が、縮合型結合(5-5'結合や4-O-5'結合)よりも優先する⁽⁵⁰⁾ので枝分かれのない直鎖状に成長する。イチヨウのリグニンのNMRによる構造解析では、 β -O-4'結合70%; β -5'結合17%; β - β' 結合6%である⁽⁵¹⁾ことから、 β -O-4'結合と β -5'結合は、ほぼ4:1の割合で起こると考えられる。また、高分子リグニンが生成する際の重合開始点の数は、約17/100 C₆C₃と推定される⁽⁴¹⁾。以上のことから、開始点1つあたりの平均重合度は約6で、 β -O-4'結合が4つと β -5'結合が1つから成る直鎖オリゴリグノールが平均的な基本単位であると推定される⁽⁴¹⁾。

第3段階; オリゴリグノールの自己凝集による球状ミセルの形成, および球状ミセルのブドウ房状クラスターの形成

β -O-4'結合が4つと β -5'結合が1つから成るヘキサリグノールは、 β -O-4'結合で自由回転できるフレキシブルな疎水性直鎖分子であるから、親水性ヘミセルロースゲル上では疎水性効果により自己凝集して、 β -O-4'結合部で折りたたまれた状態となり、その形はFig.4, a, bに例示した短い棒状あるいは煉瓦状であろう。このようなオリゴリグノールは、親水性環境ではさらに集合して、Fig.4, cのように成長末端のフェノール性水酸基を外側に向けた球状のオリゴリグノールのミセル(OLMと略)

を形成する。CML やセルコーナー (CC) のリグニン堆積初期には、 β - β' 型 2 量体が 5-5' 結合した 4 量体 (Fig. 4, d 破線楕円) が形成され⁴⁹⁾、これを起点としてリグノール鎖が成長する場合、Fig. 4, d のような大きい球状の OLM ができるであろう。更にこれら球状 OLM は自動的に Fig. 5, b のような集合体 (クラスター) を形成すると考えられる。この 3D クラスターの形とサイズは、予め堆積している多糖類の枠組みにより規定されるスペースの形と広さ、多糖との結合と会合などによって決まる。CC, CML のように多糖の粗い網目構造 (Fig. 5, d) 中に堆積する場合は厚い 3D 層が堆積するが、SW

では厚い 3D 構造は取り得ない¹⁶⁾ (Figs. 6, 7 参照)。

Fig. 5, a に示したように、分化初期のイチヨウやマツの CC-CML 部を電子顕微鏡で観察すると、直径約 6~10 nm の球状 OLM がブドウ房状に 3D クラスターを形成するのが観察される^{41, 52, 53)}。ヒヤクニチソウの懸濁培養葉肉細胞から分化した管状要素が木化するときも、CMF の間に球状のリグニンが堆積する⁵⁴⁾。

第 4 段階：球状 OLM クラスター内における縮合型結合の生成

球状 OLM が集合して 3D クラスターを形成すると、ミセル表面へのモノリグノールの供給付加によ

Fig. 5. FE-SEM images of cross sections before (a) and after mild delignification (c) of ginkgo tracheids at cell corner (CC) and middle lamella (ML) regions. Bar: 500 nm

a: A grape-shaped cluster of globular material that is supposed to be oligolignol micelles (OLMs) is formed into the random network of polysaccharides in an early stage of deposition of lignin. b: Conceptual illustration of assembly of the 3D cluster of globular OLM and pectin, xyloglucan and CMF. OLMs are fixed to rigid clusters by condensed unit bonds between them, and polysaccharide-PLM bonds. c: A random coarse network consisting of polysaccharides is observed after mild selective removal of lignin with sodium chlorite in acetate buffer. Small globules are assumed to be pectin that became free from Ca^{++} cross-bridge during delignification followed by self-shrinkage to globules under freeze drying and vacuum conditions. (Reproduced from reference 52.) d: Conceptual illustration of coarse network consisting of pectin, xyloglucan and CMFs before deposition of lignin. Pectin molecules are supposed to be in an extended state in aqueous media and connected by a Ca^{++} cross-bridge and a diferulic acid cross-bridge in the native state. All polysaccharides are also bound by hydrogen bonding and van der Waals attractive forces.

Fig. 6. FE-SEM cross sectional view of the S_2 layer of ginkgo a tracheid. Bar: 200 nm.

Honeycomb structure of cut ends of CMFs are observed in untreated S_2 layer (a). The distance between CMFs is slightly decreased after mild selective delignification by treatment with sodium chlorite in acetate buffer, but the honeycomb structure is retained by hemicelluloses which connect CMFs (b). After removal of both lignin and hemicelluloses, CMFs form large aggregates (c). After selective removal of most polysaccharides by treatment with periodate followed by hydrolysis, residual periodate lignin retains honeycomb structure with holes of removed CMFs (d).

る成長が空間的に制限されるので、オリゴリグノールの成長末端のG核5位やH核3, 5位のラジカル及びフェノキシラジカル (Fig. 2, 2.1a, 2.1b, 2.1c, 2.2a, 2.2b.) が相互に結合して、オリゴマー間で縮合型結合 (Fig. 3, 3.9, 3.10, 3.11) が生じ、クラスターの3D構造は固定される (Fig. 4, e および Fig. 5, b)。

H単位は芳香核3位と5位で縮合型構造を生成し得るので、HGリグニンはGリグニンよりも隣接するOLMとの間で縮合型構造の生成頻度が高くなる (例えば Fig. 4, e 実線楕円部)。このことは、リグニン前駆物質である *p*-グルコクマリルアルコール (Fig. 3, 3.1a) またはコニフェリン (Fig. 3, 3.1b) の芳香核2位または5位の水素を ^3H で標識してリグニン形成中のクロマツやイチヨウに投与すると、縮合型構造の生成に伴い5位の ^3H は脱離するが、2位の ^3H は脱離しないので、その差をマイクロオートラジオグラフィーで可視化することによって、知ることができる。CMLリグニンでは、SWリグニンよりもH単位が多く、かつ縮合型構造の頻度も高い⁵⁵⁻⁵⁷⁾。

一方、芳香核3位と5位にメトキシル基を持つS

Fig. 7. Simplified concept of assembly of CMF, mannan, xylan and lignin in the S_2 layer of a gymnosperm tracheid. Folded oligolignols deposit in narrow space between CMFs which are connected by xylan and mannan. Condensed units are formed between growing ends of oligolignols. Lignin-polysaccharide linkages are mainly formed at Ca of $\beta\text{-O-}4'$ bonded oligolignol and xylan, and mannan. (Modified from a figure in reference 16.)

単位は、縮合型構造を生成し得ないため、SGリグニンはGリグニンよりも縮合型構造の頻度が低くなる。純粋にS単位のみから成る天然のリグニンは知られていない。おそらく純S-オリゴリグノールのミセルは、集合してクラスターを形成しても3D構造を固定し得ないので、リグニンとしての機能を発揮できる高分子にはなり得ないのであろう。

5. CMLとSWにおけるリグニン超分子構造と機能発現の差異

5.1 CMLリグニン

分化中の仮道管では、まずCMLおよびCCに、ペクチン、キシログルカン、ランダムに交差するCMFから成る多糖類の粗い網目構造が生成される (Fig. 5, c, d), その多糖のゲル上に球状OLMの厚いクラスター層が形成される (Fig. 5, a, b)。こ

れら球状 OLM どうしの接触面に縮合型結合が形成され、クラスター構造は三次元的に固定される。さらにこの 3D クラスターは網目構造の多糖との化学結合や物理的な貫入により補強されて膨潤も制限されるため、水や酵素その他の分解活性分子はミセル内部の鎖状オリゴリグノールの隙間への侵入が強く制限される。このように、縮合型のジフェニルエテルやビフェニル構造 (Fig. 4, e, 点線楕円部) は、それら自体が β -O-4' 結合構造よりも化学的に安定かつ疎水性であると同時に、少量でも効果的に CML リグニンの 3D 超分子構造を水のような低分子に対しても不透過性にし、CML リグニンに防水機能と同時に微生物などの酵素による攻撃や菌糸の侵入に対する防御機能をも付与する鍵構造となっている。

CML 部の最終リグニン含量はイチヨウでは 60~70%⁵³⁾、トウヒの CC では 85%⁵⁸⁾ にも達する。正常材仮道管の全リグニン中、H 単位の含量は 2-5% に過ぎないが、CML のリグニンに限ると H 含量は約 40% を占める⁵⁹⁾。したがって CML では球状 OLM 間の縮合型結合の比率が高くなり、3D クラスター層の不透過性と同時に 3D 構造の力学的強度をも増していると想定される (Fig. 4, e 参照)。

厚い SW を形成しないポプラ組織培養カルスのリグニン、あるいはトウヒ組織の懸濁培養の液中に放出されるリグニンは、CML リグニンに近い性質を持つと見なされ、正常材中のリグニンよりも H 単位が多く、縮合型構造に富む⁶⁰⁻⁶²⁾。このことも、細胞壁の木化にはまず H 単位が供給され、縮合型結合を増加させて不透水層を形成することを示唆している。

SG リグニンから成る広葉樹リグニンは、HG リグニンから成る針葉樹リグニンよりも白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* により生分解され易く⁶³⁾、またパルプ化などの化学的処理においても分解され易い⁶⁴⁾。アスペンのクローンのクラフト法パルプ化試験でも、S/G の比の高い試料は β -O-4'/芳香核の比も大で縮合型構造が少なく、パルプ化し易い⁶⁵⁾。これは SG リグニンでは、球状 OLM の表面に開いている鎖状オリゴリグノール間隙のチャネルの入り口を閉鎖する縮合型結合の頻度が低く分解試薬が接近し易いためと考ええるとよく説明できる。ただし広葉樹では、SG リグニンの多くは、SW に存在し、その超分子構造は CML のそれとは異なる (後述) ことも、大きな要因であろう。

縮合型結合の頻度が、そのリグニンの生分解され易さを決定する重要な因子であることは、高いリグ

ニン分解能を持つ前記 *P. chrysosporium* が、リグニン中の縮合型構造によく似た化学構造を持つ環境汚染物質 (ダイオキシン類など) の分解能も高い⁶⁶⁾ ことから理解できよう。この HG リグニンと SG リグニンの縮合型結合形成頻度の差が、細胞壁の被生分解性の差をもたらし、植物の進化に伴うリグニンの構造の多様化を促した要因の一つと考えられる (後述)。

5.2 SW リグニン

正常材の仮道管では、CML へのリグニン堆積が進行しながら、幅の狭い S₁ 層、広い S₂ 層にヘミセルロースで被覆連結された太い CMF が堆積する。そのヘミセルロースのゲル層に G オリゴリグノールが形成される。これら主成分の組み立ては、選択的に各成分を緩徐に除去した試料の電顕観察から推定できる⁵³⁾ (Fig. 6 および Fig. 7)。イチヨウの S₂ 層の場合、CMF の間隔、ヘミセルロース量などから推定されるリグニン-ヘミセルロース複合体の占める空間は、約 6~8 nm の厚さである¹⁶⁾。CML に堆積する OLM の推定サイズは約 6~10 nm であり、SW では CML と異なってリグニンは厚い 3D クラスター層を形成し得ず、CMF を取り巻く 2D クラスターとなる^{16, 41, 52, 53)} (Fig. 6, a~d および Fig. 7 参照)。リグニンは側鎖 α 位で主にヘミセルロースとの化学結合、ならびにオリゴリグノール間の縮合型結合を通じて CMF 相互を接着し、SW に強度を与えている (Fig. 7)。S₂ 層へのリグニンの堆積が進むと、親水性の多糖ゲルは疎水性となり、水を排除して収縮する⁶⁷⁾。この脱水収縮には、分化中の細胞に見られる膨圧の日周期変動^{68, 69)} も寄与していると考えられる。脱水に伴い、リグニンとヘミセルロース、および CMF との間隔が相互に接近して強いファンデルワールス力が働くようになり、また水分子の薄層の介在あるいは不介在下に水素結合を通じて、主成分相互の強い会合が起こるものと想定される (Fig. 8 参照)。

広葉樹木繊維の SW では、SG リグニンが主となり、縮合型構造が減少しても、主に β -O-4' 結合から成る折りたたみ構造の S リグニンが C α -多糖結合およびファンデルワールス力によって CMF 間を接着して木繊維に必要な強度を付与している。

5.3 S₃ 層のリグニン

S₃ 層のリグニンの構造については未解明のことが多いが、リグニン濃度は高く⁷⁰⁾、また免疫電顕法で高頻度に縮合型ジベンゾジオキソシン構造 (Fig. 3, 3.11) が検出されている⁷¹⁾。多糖類によるリグニンの堆積スペースの制約が緩やかで、CML

Fig. 8. A conceptual illustration of relationship between evolution of plant and diversification of lignin structure from HG lignin to SG lignin and Gramineae type lignin that causes weakening of defense function of the cell wall.

Cell wall layers are formed successively in the order of CML, S₁, S₂, and S₃. Monolignols deposit in the order of H, G and S. The HG lignin formed in an early stage of tracheid wall differentiation in CML is highly condensed 3D supramolecule which provides effective waterproof and strongly defensive layer against biodegradative microbes. G lignin is formed in a later stage in SW as a thin tubular complex with hemi-celluloses which surround CMFs, and behaves as elastic and hydrophobic adhesives of CMFs to make SW a mechanically strong layer. The excessively strong defense function of HG lignin in gymnosperms caused slow change of generation and poor adaptability to environmental change on earth. In angiosperms, less condensed, weakly defensive SG lignin rendered cell walls easily biodegradable after the plant death to provide space for growing of young plants and more frequent alternation of generation. In Gramineae, major cell walls contain ferulic and *p*-coumaric acids which are incorporated in early and late stages respectively of cell wall differentiation. The Gramineae lignin containing ester-bonded acids is highly biodegradable. Thus, angiosperms with lignin of appropriate defense function have greater adaptability to environmental change on the earth through the frequent gene conversion.

リグニンに近い不透水性 3D 超構造をなしていると考えられる。

5.4 圧縮あて材細胞壁のリグニン

マツやヒノキなど典型的な圧縮あて材形成の際には、あて材細胞壁の特性の発現とリグニン含量の増加は密接に関連する^{72, 73)}。仮道管 S₂ 層の外側にリ

グニンが高濃度に堆積する⁷⁴⁾ こと、またこのあて材リグニンが H 単位に富むリグニンであることもよく知られている。あて材細胞の形成時、夜間に特に高くなる膨圧と容積の増大^{68, 69)} に耐えるには、H の多い（縮合度の高い）リグニンの厚い不透水層を S₂ 層の外側部分に形成することが最も力学的に効

果の高い機構なのであろう。正常材においても、枝の保持、僅かな傾斜、風や光による不等方成長などに対して姿勢や樹形を制御するため、あて材の形成と同じようにCMLリグニンの不透水性と膨圧の日周期変動が深く関わっており、成長応力の発生に到ると思われる。

6. リグニンの防水・防御機能の変遷；S-リグニン進化を促す原動力

6.1 リグニン-多糖複合構造の変遷

Fig. 8 に示したように、肥大成長中の樹木木部の形成層においては、まず細胞板により1つの細胞が2つに分割され、それぞれの内側に順次、一次壁(PW)、SWの外層、中層、内層(S₁, S₂, S₃)が形成される。細胞板は細胞壁の中間層(intercellular layer: I)となる。なお中間層を介して隣接する細胞の一次壁を合わせて複合中間層(compound middle lamella: CML = PW + I + PW)と呼ぶ。これらの壁層ごとに異なる比率で多糖類が堆積し、その親水性多糖類の存在する環境下に異なる比率で供給されるモノリグノール類の重合が進行する^{5, 7, 75)}。その過程で多糖類とリグニンとの間に様々な結合が生じ、リグニン-多糖複合体の3D構造も壁層ごとに異なり、植物の進化とともに多様化する。では植物の進化に伴い、何故HGリグニンからGリグニンへ、さらにSGリグニンへと構造の進化が起こったのであろうか。この問題に関連して、G核5位への水酸基の導入とそのメチル化によるS核への転換に関与する酵素レベルおよび遺伝子レベルでの詳細な研究が進められてきた^{27, 76-78)}。またシナピルアルコールの重合に関与するペルオキシダーゼの存在も調べられている^{79, 80)}が、これら遺伝子や酵素の違い自体はリグニン構造の多様化を促した原動力ではない。リグニンの超分子構造の多様化を促す外圧によって、その種の生存に有利である方向に分子構造が進化したと考えられる。その要因として、以下のことが挙げられよう。

6.2 リグニンの3D超構造の進化を促した要因

要因の1：防御性能の適正化による生育環境の変化への適応性の向上

進化の初期に現れた維管束植物は、仮道管のCMLにHGリグニンに富む多糖との複合体を構築することにより高い防水・防御機能をまず達成し、ついでSWにCMF-ヘミセルロース-リグニン複合体を構築して優れた強度機能を獲得した。高いリグニン分解能力を持つ木材腐朽菌は、石炭紀を含む古生代(Paleozoic)にはまだ存在しないか稀であっ

た⁸¹⁾。そのため、大森林を形成した植物の落枝落葉や枯体は生分解を受けることなく大量に堆積し、HGリグニンを主とする芳香族物質と多糖との複合体が地中で圧力と温度を数百〜数千万年もの間加えられて石炭になったと考えられる。このように難分解性のHGリグニンで過剰に防御された石炭紀の植物は大型化、長寿命化した。落枝落葉や枯死植物体の堆積が種子からの次世代の生育を阻害し世代交代の頻度が低下した。萌芽による更新は遺伝子の改変を伴わないので、大陸移動などに伴う地球環境の変化に適切に対応できなかったであろう。その後、より優れた適応性を持つ被子植物が進化し、難分解性のHGリグニンで過剰に保護された仮道管は、通道機能に特化した道管と支持機能に特化した木繊維とに分化した(Fig. 8)。この進化の過程で、難分解性縮合型構造を多く含むHGリグニンから、縮合型構造の少ない易分解性のSGリグニンへと、リグニンの防御機能は低下した。木材腐朽菌の進化と相まって易分解性リグニンへの進化は、その種の頻繁な世代交代による遺伝子の改変速度を早め、変化する地球環境への速やかな適応を可能にした。現代でも、大型長寿命の針葉樹として知られるセコイアは、アメリカ合衆国西海岸の湿潤な特定の環境でのみ生存し得ている。その森では、ブナなどの広葉樹林に比べて世代交代の速度は遅く、有機物の分解も遅いので他の動植物の種の多様性も低い。一方、イネなどの1年生植物では、枯死植物体が速やかに分解されて次世代の生育を妨げず、世代交代による環境の変化への適応が早い。これには、イネ科植物特有の組織構造およびリグニンの超分子構造が大きく関わっている。すなわち原生木部細胞など一部の組織では樹木リグニンに似た構造のリグニンが残るが、他の組織の細胞壁では、多糖にエステル結合したフェルラ酸やジフェルラ酸がリグニン高分子形成初期の出発点となり⁸²⁾、リグニン堆積の後期には p -クマール酸がチロシンから生合成されてエステル結合し⁸³⁻⁸⁶⁾、生分解され易い構造をとっている(Fig. 8)。またボブラ類のリグニンでは、この p -クマール酸の側鎖からC₂が脱離して生成した⁸⁷⁾ p -ヒドロキシ安息香酸がエステル結合しており⁸⁸⁾、これらの材の易分解性に関わっている。

要因の2：高分子機能の合目的化

ヴァニラ豆の種皮のリグニンにはコーヒー酸(Fig. 1, 1.3d)やそのアルコールがとり込まれ、剛直なベンゾジオキサン構造と同時に易分解性のエステル構造が組込まれている^{89, 90)}。種子の皮殻中のリグニンの防水・防御機能と接着機能は、生命活動の

停止中や発芽中の温度、水など周囲の環境に応じて適切でなければならず、超分子構造中に剛直性と易分解性とを合わせ持たせているのであろう。

要因の3：エネルギー効率

前述のように、圧縮あて材の形成には、夜間の高い膨圧に耐えるための高縮合度の不透水性HGリグニンを要したが、広葉樹では低縮合度の易分解性SGリグニンへと化学構造の進化をしたため、樹体の姿勢の制御に針葉樹と同じメカニズムを適用し得ない。代わって広葉樹ではSWのCMFとその周辺を覆うヘミセルロースゲル層の脱水収縮により軸方向に引張応力を発生して⁵⁾ 樹体の姿勢制御をしていると考えられる。引張あて材を形成するユリノキでは樹幹の傾斜に伴い細胞壁S₂層のリグニン含量は減少し、上側の膨圧の日周期変動が大きくなる⁹¹⁾。これは、分化中の幹上側細胞の細胞壁内表面に日中堆積した多量のCMFとその周辺を覆うヘミセルロースゲルが夜間の膨圧の増大^{68, 69)}により圧縮されることによってCMF間隙を埋めるヘミセルロースゲルが収縮し、高分子相互の接近に伴い新しく発生する水素結合およびファンデルワールス力によって軸方向に引張応力を発生していると考えられる^{5, 92)}。延伸性のある折りたたみ構造のSリグニンは、系の疎水性化・脱水に寄与するが、多量には介在しない方がより高い引張力を発生するので、引張あて材組織の細胞ではリグニン含量は少なくなり、究極の形としてゼラチン層の形成へと進化するものもあるであろう。おそらく広葉樹正常材の本繊維においても類似のメカニズム^{5, 92)}によって、針葉樹よりも少ないSGリグニンを介在させて必要な強度ならびに、弾性と柔軟性とを獲得しており、成長応力として観測されることが考えられる。このように、広葉樹が少ないSGリグニンと多量のCMFおよびヘミセルロースを用いて樹体の支持と姿勢の制御が可能になったことには有利な点が考えられる。すなわち植物にとっては、光合成によって生成したグルコースから長い転換経路を経て生合成するリグニンに比べ、CMFとヘミセルロースは短い経路で生合成できるため、転換のためのエネルギー消費が少ないという大きな利点がある。

7. リグニンの構造の収斂進化；S-リグニン進化のもう一つの可能性

最近、紅藻 *Calliarthron cheilosporioides* の genicula 細胞の壁（特にPW）が樹木に似た肥厚をし、含量は極めて低いHGSリグニンを生成することが見いだされた⁹³⁾。この genicula 細胞は、海中で

波とともに揺れ動く際の屈曲部にある膝の役目をしていると考えられ、折りたたみ構造のリグニンとヘミセルロースとの複合構造を介してCMF相互を接着し、かつ壁に柔軟性と弾力性を与えているのであろう。陸上植物の起源とされる緑藻よりも、進化の上流で分枝した紅藻がリグニンを形成する事実は、収斂進化の結果とされている。少量ながらイチョウのリグニンでもS単位を含んでいることを考慮すると、モノリグノール類のH単位→G単位→S単位への生合成系自体は、植物が陸生となった初期にすでに完成していたと考えられる。

8. リグニンの構造の進化からみた今後の課題

仮道管のCMLとSWにおけるリグニン-多糖複合体の超構造と機能の違い、その後のangiospermへの進化に伴う変化、紅藻に見られる収斂進化、あるいは種皮リグニンの構造の合目的性などをも考慮すると、「リグニンとは、一次代謝系のフェニアラニンおよびチロシンから脱アミノ基反応により誘導され派生する多様な二次代謝系フェノール類が、脱水素酵素によるラジカルの生成を経てランダムに重合した高分子物質であり、当該組織や細胞壁層が必要とする機能に対応して、随時その場で適合した構造の高分子リグニン-多糖複合体として形成される。要求される細胞壁の機能は植物の進化、組織構造の多様化と共に多様化し、高等植物にとって必須の重要な成分である。」と認識できよう。したがって実験植物として重用されるニチニチソウやシロイヌナズナにおけるリグニン生合成の研究は、極めて有用で新しい知見を与えつつあるが、これらの草本類における超分子構造の形成では、樹木リグニンの形成条件と同じではない場合もあることに注意が必要である。これまでの伝統的な有機化学の視点からの構造研究に加えて、トポ化学的視点からの研究⁹⁴⁾、さらには本稿で扱ったようなトポ生物科学的視点からの研究や、あて材形成とリグニン生合成に関与する遺伝子の研究⁹⁵⁾など樹木を対象とし、少なくともgymnosperm, angiosperm, gramineaeなど主要植物の構成細胞の壁層ごとに、リグニン-多糖複合体の3D高次構造を明らかにする必要がある。この目標に至るための様々な手法、例えば、TEM-tomography⁹⁶⁾、3D-NMR⁹⁷⁾、その他多くの新しい手法⁹⁸⁾が開発されつつある。

歴史的にみると、リグニンは化学パルプの製造にとって実に扱い難い不要物であったため、リグニン化学は脱リグニン法開発の視点が重視され発展してきた。現在のバイオマスの有効利用や遺伝子工学の

応用研究でも基本的な視点は似ている。しかし、リグニンが高等植物にとって必須の機能を果たしていることを分子レベルで理解するという視点に立つならば、木質化細胞壁の多様な挙動の理解、あるいは素材やバイオマスとしての利用研究でも、統一した理論体系に基づいて新しい展開が期待できるかも知れない。本仮説の異なる視点からの検証や反証・修正などを期待している。またリグニンに関する全く新しい未知の断面の情報入手も期待される。地球上最多の有機物であるリグニンは、巨大な山脈のごとく麓からの観察、登山者の体験、航空写真など視点によって異なる断面を見せるが、これらを総合して初めて実体に迫り得るからである。

謝 辞

電子顕微鏡写真の撮影をして下さった名古屋大学大学院生命農学研究科、吉田正人准教授、ならびに実験に便宜をはかって下さった山本浩之教授に感謝します。

文 献

- Freudenberg, K.: *Science* **148**, 595-600 (1964).
- 近藤民雄: “リグニンの化学－基礎と応用－増補改訂版第1章序論”, 中野準三編, ユニ出版, 東京, 1982, pp. 1-15.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph, S. A., Christensen, J. H., Boerjan W.: *Phytochemistry Reviews* **3**, 29-60 (2004).
- Ralph, J., Schatz, P. F., Lu, F., Kim, H., Akiyama, T., Nelaen, S. F.: “Quinone methides”, Rokita, S. E. ed., John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 2009, pp. 385-420.
- 寺島典二: 木材学会誌 **33**, 615-622 (1987).
- Koshijima, T., Watanabe, T.: “Association between lignin and carbohydrate in wood and other plant tissues”, Springer-verlag, Berlin, 2003, pp. 77-130.
- Terashima, N., Fukushima, K., He, L-F., Takabe, K.: “Forage Cell Wall Structure and Digestibility”, Jung, H. G., Buxton, D. R., Hatfield, R. D., Ralph, J. eds., Am. Soc. Agronomy, Madison, 1993, pp. 247-270.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A.: “Plant Cell Walls”, Garland Science, N.Y., 2011, pp. 203-272.
- 嶋村正樹: 生命誌年間号2008, 134-141 (2008).
- 榊原 彰: “リグニンの化学－基礎と応用－増補改訂版第6章分解反応”, 中野準三編, ユニ出版, 東京, 1982, pp. 98-130, 417-420.
- “Methods in lignin chemistry”, Lin, S. Y., Dence, C. W. eds., Springer-Verlag, Berlin, 1992, pp. 287-404.
- Lapierre, C.: “Lignin and lignans, advances in chemistry”, Heitner, C., Dimmel, R. D., Schmidt, J. A. eds., CRC Press, N. Y., 2010, pp. 11-48.
- “Methods in lignin chemistry”. Lin, S. Y., Dence, C. W. eds., Springer-Verlag, Berlin, 1992, pp. 110-160.
- 寺島典二: “リグニンの化学－基礎と応用－増補改訂版第8章物理的性質”, 中野準三編, ユニ出版, 東京, 1982, pp. 169-210, 435-446.
- Terashima, N.: *International J. Plant Developmental Biology* **1**, 170-177 (2007).
- Terashima, N., Kitano, K., Kojima, M., Yoshida, M., Yamamoto, H., Westermark, U.: *J. Wood Sci.* **55**, 409-416 (2009).
- Fujita, M., Harada, H.: *Mokuzai Gakkaishi* **25**, 89-94 (1979).
- Takabe, K., Fujita, M., Harada, H.: *Mokuzai Gakkaishi* **31**, 613-619 (1985).
- Terashima, N., Fukushima, K.: “ACS Symposium Series, 399”, Lewis, N. G., Paice, M. G. eds., Am. Chem. Soc., Washington, DC., 1989, pp. 160-168.
- Imai, T., Terashima, N.: *Mokuzai Gakkaishi* **38**, 475-481, 693-699 (1992).
- 高部圭司: 木材学会誌 **50**, 63-72 (2004).
- Terashima, N., Hafrén, J., Westermark, U., VanderHart, D. L.: *Holzforschung* **56**, 43-50 (2002).
- Landucci, L. L.: *J. Wood Chem. and Technology* **20**, 243-264 (2000).
- Gifford, E. M., Foster, A. S.: “維管束植物の形態と進化”, 長谷部光泰, 鈴木 武, 植田邦彦監訳, 文一総合出版, 東京, 2002, pp. 11-31, 83-97.
- 長谷部光泰, 有川智己, 西山智明: “進化学事典”, 日本進化学会編, 共立出版, 東京, 2012, pp. 96-106, 150-153.
- Sarkanen, K. V., Hergert, H. L.: “Lignins, Occurrence, Formation and Reactions. Chapter 3, Classification and Distribution”,

- Sarkanen, K. V., Ludwig, C. H. eds., Wiley-Interscience, N. Y., 1971, pp. 43-94.
- 27) 横田信三: “木質の形成, 4.1植物の進化とリグニンの構造”, 福島和彦, 船田 良, 杉山淳司, 高部圭司, 梅沢俊明, 山本浩之編, 海青社, 大津, 2011, pp. 275-304.
- 28) Vance, C. P., Kirk, T. K., Sherwood, R. T.: *Ann. Rev. Phytopathol.* **18**, 259-288 (1980).
- 29) 瓜谷郁三, 寺島典二, 小島峯雄: 第20回リグニン討論会要旨, 名古屋, 1975, pp. 65-68.
- 30) 浅田泰次, 大口富三, 松本 勳: 第20回リグニン討論会要旨, 名古屋, 1975, pp. 69-72.
- 31) Asada, Y., Matsumoto, I.: *Physiol. Plant Pathol.* **1**, 377-383 (1971).
- 32) Lange, B. M., Lapierre, C., Sanderman, Jr. H.: *Plant Physiol.* **108**, 1277-1287 (1995).
- 33) Ride, J. P.: *Physiol. Plant Pathol.* **5**, 125-134 (1975).
- 34) Campbell, M. M., Ellis, B. E.: *Planta* **186**, 409-417 (1992).
- 35) Kimmins, W. C., Wuddah, D.: *Phytopathology* **67**, 1012-1016 (1977).
- 36) MacRae, W. D., Towers, G. H. N.: *Phytochemistry* **23**, 1207-1220 (1984).
- 37) Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J.: *International J. Antimicrobial Agents* **26**, 343-356 (2005).
- 38) Swain, T.: *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**, 479-501 (1977).
- 39) Sarma, B. K., Singh, U. P.: *World J. Microbiology and Biotechnology* **19**, 123-127 (2003).
- 40) Hartley, R. D., Ford, C. W.: “ACS Symposium Series 399”, Lewis, N. G., Paice, M.G. eds., Am. Chem. Soc., Washington, DC., 1989, pp. 137-145.
- 41) Terashima, N., Yoshida, M., Hafrén, J., Fukushima, K., Westermarck, U.: *Holzforschung* **66**, 907-915 (2012).
- 42) Tamaoki, D., Karahara, I., Schreiber, L., Wakasugi, T., Yamada, K., Kamisaka, S.: *J. Plant Res.* **119**, 79-84 (2006).
- 43) Cowles, J. R., Scheld, H. W., Lemay, R., Peterson, C.: *Ann. Bot.* **54**, 33-48 (1984).
- 44) Siegel, S. M.: *Amer. J. Bot.* **56**, 175-179 (1969).
- 45) Takeichi, Y., Yoshida, M., Kitano, K., Terashima, N., Yamamoto, H.: *J. Wood Sci.* (2012) DOI 10.1007/s10086-012-1315-1
- 46) Stewart, C. M.: *Nature* **186**, 374-375 (1960).
- 47) Stewart, C. M.: *Science* **153**, 1068-1074 (1966).
- 48) Terashima, N., Atalla, R. H.: Proceedings of 8th ISWPC, Helsinki, Finland, 1995, Vol. 1, pp. 69-76.
- 49) Freudenberg, K., Sakakibara, A.: *Ann. Chem.* **623**, 129-137 (1959).
- 50) Brunow, G., Kilpiläinen, L., Sipilä, J., Syrjänen, K., Karuhnen, P., Setälä, H., Rummakko, P.: “ACS Symposium Series 697”, Lewis, N.G., Sarkanen, S. eds., Am. Chem. Soc., Washington, DC, 1998, pp. 131-147.
- 51) Terashima, N., Akiyama, T., Ralph, S., Evtuguin, D., Pascoal Neto, C., Parkäs, J., Paulsson, M., Westermarck, U., Ralph, J.: *Holzforchung* **63**, 379-384 (2009).
- 52) Terashima, N., Awano, T., Takabe, T., Yoshida, M.: *Comptes rendus Biologie* **327**, 903-910 (2004).
- 53) Terashima, N., Yoshida, M.: Proceedings of 13th ISWFPC, Auckland, New Zealand, 2005, Vol. 2, pp. 423-426.
- 54) Nakashima, J., Mizuno, T., Takabe, K., Fujita, M., Saiki, H.: *Plant Cell Physiol.* **38**, 818-827 (1997).
- 55) Terashima, N., Fukushima, K.: *Wood Sci. Technol.* **22**, 259-270 (1988).
- 56) Fukushima, K., Terashima, N.: *Holzforchung* **45**, 87-94 (1991).
- 57) Fukushima, K., Terashima, N.: *Wood Sci. Technol.* **25**, 371-381 (1991).
- 58) Fergus, B. J., Procter, A. R., Scott, J. A. N., Goring, D. A. I.: *Wood Sci. Technol.* **3**, 117-138 (1969).
- 59) Whiting, P., Goring, D. A. I.: *Wood Sci. Technol.* **16**, 261-267 (1982).
- 60) 福田忠徳, 太田路子, 寺島典二, 神田 孝: 木材学会誌 **21**, 157-163 (1975).
- 61) Brunow, G., Ede, R. M., Simola, L. K., Lemmetyinen, J.: *Phytochemistry* **29**, 2535-2538 (1990).
- 62) Brunow, G., Kilpeläinen, L., Lapierre, C., Lundquist, K., Simola, L. K., Lemmetyinen, J.: *Phytochemistry* **32**, 845-850 (1993).
- 63) Faix, O., Mozuch, M. D., Kirk, T. K.: *Holzforchung* **39**, 203-208 (1985).

- 64) Terashima, N., Tsuchiya, S., Kimura, T.: Proceedings of 2nd ISWPC, Tsukuba, Japan, 1983, Vol. 2, pp. 150-154.
- 65) Stewart, J. J., Kadla, J. F., Mansfield, S. D.: *Holzforschung* **60**, 111-122 (2006).
- 66) Bumps, J. A., Tien, M., Wright, D., Aust, S. T.: *Science* **228**, 1434-1437 (1985).
- 67) Terashima, N.: *J. Pulp Paper Sci.*, **16**, J150-J155 (1990).
- 68) Yoshida, M., Hosoo, Y., Okuyama, T.: *Holz-forschung* **54**, 469-473 (2000).
- 69) Yoshida, M., Yamamoto, O., Okuyama, T.: *Holz-forschung* **54**, 664-668 (2000).
- 70) Donaldson, L. A.: *Phytochemistry* **57**, 859-873 (2001).
- 71) Kukkola, E. M., Koutaniemi, S., Pöllänen, E., Gustafsson, M., Karhunen, P., Lundell, T. K., Saranpää, P., Kilpeläinen, I., Teerri, T. H., Fagerstedt, K. V.: *Planta* **218**, 497-500 (2004).
- 72) Yamamoto, H., Okuyama, T., Yoshida, M., Sugiyama, K.: *Mokuzai Gakkaishi* **37**, 94-100 (1991).
- 73) 山本浩之: “木質の形成”, 福島和彦, 船田 良, 杉山淳司, 高部圭司, 梅沢俊明, 山本浩之編, 海青社, 大津, 2011, pp. 508-522.
- 74) Okuyama, T., Takeda, H., Yamamoto, H., Yoshida, M.: *J. Wood Sci.* **44**, 83-89 (1998).
- 75) Terashima, N., Nakashima, J., Takabe, K.: “ACS Symposium Series 697”, Lewis, N., Sarkanen, S. eds., Am. Chem. Soc., Washington, DC., 1998, pp. 181-193.
- 76) Higuchi, T.: “Biochemistry and Molecular Biology of Wood”, Springer-Verlag, Berlin, 1997, pp. 154-180.
- 77) Umezawa, T.: *Phytochemistry Reviews* **9**, 1-17 (2010).
- 78) Peter, G., Neale, D.: *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 737-742 (2004).
- 79) Sasaki, S., Nishida, T., Tsutsumi, Y., Kondo, R.: *FEBS Letters* **562**, 197-201 (2004).
- 80) Gómez Ros, L. V., Aznar-Asensio, G. J., Hernández, J. A., Bernal, M. A., Núñez-Flores, M. J. L., Cuello, J., Ros Barceló, A.: *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4131-4138 (2007).
- 81) Robinson, J. M.: *Geology* **15**, 607-610 (1990).
- 82) Ralph, J., Helm, R. F.: “Forage Cell Wall Structure and Digestibility”, Jung, H. G., Buxton, D. R., Hatfield, R. D., Ralph, J. eds., Am. Soc. Agronomy, Madison, 1993, pp. 201-241.
- 83) Neish, A. C.: *Phytochemistry* **1**, 1-24 (1961).
- 84) Higuchi, T., Ito, Y., Kawamura, I.: *Phytochemistry* **6**, 875-881 (1967).
- 85) He, L-F., Terashima, N.: *Mokuzai Gakkaishi* **35**, 123-129 (1989).
- 86) He, L-F., Terashima, N.: *Holzforschung* **45**, 191-198 (1991).
- 87) Terashima, N., Mori, I., Kanda, T.: *Phytochemistry* **14**, 1991-1992 (1975).
- 88) 中野準三, 石津 敦, 右田伸彦: 木材学会誌 **4**, 1-4 (1958).
- 89) Tobimatsu, Y., Elumalai, S., Grabber, J. H., Davidson, C. L., Pan, X., Ralph, J.: *ChemSusChem* **5**, 676-686 (2012).
- 90) Chen, F., Tobimatsu, Y., Havkin-Frenkel, D., Dixon, R. A., Ralph, J.: *PNAS* **109**, 1772-1777 (2012).
- 91) Yoshida, M., Ohta, H., Yamamoto, H., Okuyama, T.: *Trees* **16**, 457-464 (2002).
- 92) 奥山 剛: 木材学会誌 **39**, 747-756 (1993).
- 93) Martone, P. T., Estevez, J. M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M. W., Somerville, C., Ralph, J.: *Current Biology* **19**, 169-175 (2009).
- 94) Goring, D. A. I.: “ACS Symposium Series 397”, Am. Chem. Soc., Washington, DC., 1989, Chapter 1, pp. 2-10.
- 95) 平出秀人, 吉田正人, 大木島敬幸, 早川真央, 山本浩之: 第62回木材学会大会発表要旨, 札幌, 2012, A16-02-1045 (CD-ROM).
- 96) Xu, P., Donaldson, L. A., Gergely, Z. R., Stachelin, L. A.: *Wood Sci. Technol.* **41**, 101-116 (2007).
- 97) Dick-Pérez, M., Zhang, Y., Hayes, J., Salazar, A., Zabolina, O. A., Hong, M.: *Biochemistry* **20**, 989-1000 (2011).
- 98) 柴田大輔, 小林 優, 今井友也, 梅沢俊明, 菊池淳, 石川一彦: 第164回京大生存圏研究所シンポジウム, 京都, 2011, pp. 1-12.