



|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | 紫外及び蛍光顕微鏡による腐朽材細胞壁劣化過程の観察   |
| Author(s)        | 深沢, 和三; FUKAZAWA, Kazumi; 今川, 一志 他  |
| Citation         | 北海道大學農學部 演習林研究報告, 33(1), 101-114  |
| Issue Date       | 1976-03   |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/20956">https://hdl.handle.net/2115/20956</a> |
| Type             | departmental bulletin paper   |
| File Information | 33(1)_P101-114.pdf  |



# 紫外及び蛍光顕微鏡による 腐朽材細胞壁劣化過程の観察\*

深沢和三\*\* 今川一志\*\* 土居修一\*\*\*

Histochemical Observation of Decayed Cell Wall using  
Ultraviolet and Fluorescence Microscopy

By

Kazumi FUKAZAWA\*\*, Hitoshi IMAGAWA\*\*  
and Shuichi DOI\*\*\*

## 目 次

|  |     |
|--|-----|
| 1. 緒 言 .....                                   | 101 |
| 2. 実験方法 .....                                  | 102 |
| 3. 結果と考察 .....                                 | 103 |
| 3.1 蛍光メタクロマジー .....                            | 103 |
| 3.2 カワラタケ腐朽材 .....                             | 105 |
| 3.3 オオウズラタケ腐朽材 .....                           | 107 |
| 3.4 軟腐朽 ( <i>Chaetomium globosum</i> ) 材 ..... | 109 |
| 3.5 土壌腐朽材 .....                                | 110 |
| 4. 結 論 .....                                   | 111 |
| 5. 摘 要 .....                                   | 111 |
| 文 献 .....                                      | 112 |
| Summary .....                                  | 113 |

## 1. 緒 言

COWLING<sup>1)</sup>は著書の中で、木材組織研究者の3大目的として、1) 木材構成要素の構造を直接見ること、2) 木材構造の化学組成や微細構造を決定すること、3) この構造がどのような機構で形成されたかを解明することを挙げている。そしてこのような研究に対し微生物とその分解酵素系の利用が、有効な手段となるかどうかについて論じている。その結果彼は、利点とし

\* 1975年6月30日受理

内容の一部を第25回日本木材学会大会(福岡, 1975)で発表した。

\*\* 北海道大学農学部林産学科 木材理学教室

Laboratory of Wood Physics, Dept. of Forest Products, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

\*\*\* 北海道立林産試験場

Hokkaido Forest Products Research Institute.

て酵素系の反応は非常に温和な条件でなされること及びそれぞれの酵素に選択特性があることを挙げ、不利な点としては、木材細胞壁の酵素の受け入れ易さの問題、目的にあった純粋な酵素の供給性のこと及び研究に特殊な手法を要することなどを挙げている。彼はまた細胞壁の分解酵素に関しては、微生物の代謝活性や酵素反応の機構に関しての知識が必要であり、組織研究者と微生物研究者などの協力を必要とすることを指摘している。

本報告の内容は、分解酵素系の研究を直接の目的としたものではない。細胞壁劣化について組織化学的に検討しようとしたものである。しかしながら COWLING の述べているとおり、細胞壁の分解の過程を知ることは木材組織の研究のうえで有効であり、特に細胞壁各層の化学成分、構成要素間の成分の違い、樹種間の違いなどを明らかにするうえで極めて効果的であると考えられる。

当木材理学教室では、近年紫外線顕微鏡 (UV 顕) を用いて木材組織内でのリグニンの形成及びその挙動に関することを研究している<sup>2)</sup>。それに加え、蛍光顕微鏡 (FL 顕) を用いて木材組織の蛍光メタクロマジー染色による観察が、木材成分の挙動に対して有効であるかどうかの検討にも着手したばかりである<sup>3)</sup>。これらの特殊な顕微鏡による観察手法が、上記の腐朽材の細胞壁劣化の観察に、どれだけ有効であるかを知らうとした。

蛍光染色に関する手法的なこと、微生物に関することなど、本報告で十分に検討されず残されたことも数多い。しかしながら細胞壁劣化に関する研究に対して、本研究で用いた手法の有効性、将来性について幾分なりとも示唆され得たと考えられる。今後本研究結果を第一歩として、染色方法や観察手段などの開発、またはそれに適合する研究目的を設定して検討することが必要となろう。

本研究の内容のうち UV 顕写真については、予報として既に発表した<sup>4)</sup>。したがって本報告ではその多くを省略する。また本報で用いた腐朽材の一般観察、特に土壌中の木材の腐朽については著者の一人土居を中心とした報告が、既になされている<sup>5)</sup>。本報では腐朽内容や腐朽機構についての検討はなされず、蛍光メタクロマジー法の効果及びその考え方について主に検討した。

本研究の一部は北海道立林産試験場の委託研究費によって行なわれた。腐朽材の観察について指示及び指導いただいた阿部豊場長及び布村昭夫化学部長に対し感謝の意を表す。研究の実施に当って石田茂雄教授から直接指導を得た。また当時の学生山田定和氏及び山下泰範氏から実験の助力を得た。セルロースなどの染色実験では、木材化学教室佐野嘉拓氏から試料の提供を受けた。記して感謝する。

## 2. 実験方法

ブナ心材及びエゾマツ心材をカワラタケ *Coriolus versicolor* (白色腐朽菌)、オオウズラタケ *Coriolellus palustris* (かっ色腐朽菌)、*Chaetomium globosum* (軟腐朽菌) 及び土壌腐朽菌に

よって実験室内で腐朽させた。培地及び土壌中での腐朽は北海道立林産試験場でなされたものであり、著者の一人土居らの報告<sup>5)</sup>と同一の方法でなされたものである。ここではその詳細については省略する。重量減少率5%から60%にいたる腐朽材の試料が準備された。これらの試料から2~3 mm角の小片を切り出し、アルコール系列で脱水後、常法によりエポン及びメタクリレート中に置換し、カプセル包埋を行なった。エポン包埋試片からは0.5  $\mu$ 切片を作り、石英のスライド及びカバーガラスにグリセリンで封入し、UV 顕の検鏡用とした。メタクリレート包埋試片からは1  $\mu$ 切片を作成、蛍光染色を行なって、FL 顕の観察に当たった。染色は、スライドガラスに切片を張り付けて乾燥したものを、0.2% アクリジンオレンジ (pH 6.0, リン酸・くえん酸緩衝液) 液中に3時間放置することにより行なった。その後十分水洗し乾燥したものを、キンレンで処理しオイキットで封入した。

アクリジンオレンジ (以下 AO と略す) は、メタクロマジー性 (後述) の代表的な蛍光色素である<sup>6)</sup>。木材の構成物質のメタクロマジー性発光を知るために予備的な実験を行なった。セルロース、ホロセルロース、MWL, BNL, LCC (以上いずれも当木材化学教室でエゾマツから調製されたもの)、ケルセチン、ナリンゲニン (この2者は市販品) の各少量をそれぞれスライドガラスに張り付けて、AO, コリフォスフィン O, ローダミン 6G などの蛍光色素で染色し、FL 顕で検鏡した。

観察は西独カール・ツァイス社の紫外線顕微鏡 MPM 01 型でなされた。UV 顕微鏡写真撮影は、リグニンの吸収波長である 280 m $\mu$  (波長帯幅 3 m $\mu$ ) で行なった。また細胞壁の一部について 0.63  $\mu\phi$  の視野で直接吸光度を各波長で測定し、吸収スペクトル曲線を作成した。また UV 顕写真のうち、カワラタケ及びオオウズラタケ腐朽材の幾つかのフィルムについて濃度別面積率の算出を、K.K. きもと製カラー画像解析装置フォスダック 1000 で行なった。蛍光観察は上述の UV 顕鏡基に落射照明装置 (水銀ランプ)、落射コンデンサー (FL 用)、FL ネオフルール対物鏡を装置したもので行なった。すなわち落射型 FL 顕であり、主に使用したフィルターは励起で BG 12, 吸収で 500 m $\mu$  である。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 蛍光メタクロマジー

組織標本を単一の色素で染めたとき、組織内の構成要素が色素溶液と異なる色調に染まることをメタクロマジーと言う。メタクロマジー性色素の代表的なものには、可視光下ではトルイジンブルー O があり<sup>3)</sup>、蛍光色素としては AO がある。AO は波長 450~500 m $\mu$  の光を吸収して、組織成分と色素との吸着の違いにより緑から赤に至る発色を示す。この染色で DNA が黄緑色、RNA が赤色の蛍光を発することはよく知られており、核酸の研究に広く用いられている<sup>6,7)</sup>。

木材及び腐朽材に対する AO による蛍光メタクロマジーの応用については、AUFSESS,

PECHMANN らの研究がある<sup>8-11)</sup>。AUFSESS は木化の程度を染色によって判定するための研究において<sup>8)</sup>、AO で染めた材は圧縮あて材細胞で明黄、また正常材の細胞壁を木化程度により3段階に分けて、高中度の木化のものでは黄だいたい、低いものではだいたいであり、木化していない引張あて材細胞で赤みのだいたいに発光すると報告している。また腐朽材について彼らは普通の光顕用切片(15 $\mu$ 前後の厚さ)で観察し、白色腐朽の初期でリグニン分解酵素に侵された部分は赤かっ色へ明瞭な色調変化を与え、これが細胞内こう側から外側へ広がっていく様子を見ることができると報告している<sup>9-11)</sup>。またこのような変化は、かっ色腐朽や軟腐朽では見られず、白色腐朽に特徴的なものであるとし、初期段階での腐朽の検出及び菌種の分別に極めて有効であると報告している。彼らはAOによる木材組織の赤の発色は木化程度の減少によるものと考えている。

本研究で、木材構成成分のAO蛍光染色の発光は次のように認められた。セルロース; 緑。ホロセルロース; 赤。リグニン; 黄緑。LCC(リグニン73%); 黄だいたい。LCC(リグニン4.2%); だいたい。ヘミセルロース(LCC, リグニン0%); 赤だいたい。ナリンゲニン; 赤。ケルセチン; だいたい。木材光顕切片では切片の厚さ、染色時間、辺・心材、早・晩材で若干の差が見られる。しかし基本的には普通の材で、複合細胞間層が黄~だいたい、2次壁は黄緑~緑に発色した。

高分子-AO複合体の緑と赤の発色についての基本的な事柄として次のことが報告されている<sup>6,7)</sup>。緑の蛍光( $\lambda_{\max}=533\text{ m}\mu$ )はモノマー型のAOの持つ吸収スペクトル( $\lambda_{\max}=490\text{ m}\mu$ )の励起結果である。この場合高分子-AO複合体における色素濃度は極めて低い。すなわち高分子の給合サイトに色素分子がモノマーで部分的に吸着している状態である。このような状態はスタッキングなしと言われている。スタッキング(スタックする)とは色素分子が高分子の結合サイトにランダムに分布しているか、ノンランダムであるかを表わす用語で、色素分子の分布がランダムでなく互いに相隣れる結合サイトを占めることをスタックすると言っている。色素分子がスタックして結合すると、その色素分子間に相互作用が働いて(ダイマーとして働く)、吸収バンドが変わってくる。吸収は短波長側に移動し、励起されて発光する蛍光は逆に長波長側に移動する。完全なスタッキングの状態(高分子の結合サイトがすべて色素で占められた場合)での吸収波長は450 $\text{ m}\mu$ 、発色は656 $\text{ m}\mu$ (赤)のピークを持つ。またスタッキングのし易さの尺度として、スタッキング係数( $k$ )と言われるものがあり、次のように表わされている。すなわち隣りのサイトが色素によって占められている確率 $P_{(1)}$ と隣りのサイトが空いている確率 $P_{(2)}$ との比を言う。 $k=P_{(1)}/P_{(2)}$ 、 $k$ は未変性DNAで1.25、RNAは3、多糖類の酸では800以上にも及ぶと報告されている<sup>6,7)</sup>。

高分子-AO複合体における以上のような基礎的な知見及び我々が得た前述の木材構成成分の発色傾向また木材成分に対する水分子などの吸着の性質(吸湿性)などをあわせ考えると、木材成分の発色機構について次のことが推察される。セルロースのAO吸着は結晶領域でなさ

れず、非晶領域でなされると思われ、発色は結晶度と関係があろう。リグニンではその疎水性の性質からみてAO吸着は少ないことが考えられる。これに反してヘミセルロースは、その親水性の性質からみてAOの吸着能力は大きいことが予想される。したがってこれら木材成分のスタッキング係数は、セルロース結晶領域<リグニン<<ヘミセルロースである種の抽出成分の順に並び、この成分比の違いにより緑から赤までの発色を表わすものと考えられる。しかしこのような高分子の結合サイトの数あるいは種類で示される単なる化学成分の差だけでなく、色素のもつ特性(濃度、pH、温度の依存性)もあり、また高分子の表面性質を変化させる物理的条件もあることが予想され、AO-高分子複合体の形成の問題はそう簡単ではない<sup>6,7)</sup>。本研究はそれらのことについて深く検討せず、ごく皮相的な成分の違いだけによる考察を行なった。それ以上については今後の研究にまきたい。

腐朽材のAO発色機構について考察すると次のとおりである。腐朽材で菌に侵された細胞壁の部分は、次節以下で各腐朽菌での観察結果がくわしく述べられているが、すべて黄緑の基本色から赤に変色した。この変化はどの腐朽菌でも共通に示されるものであり、AUFSESSらの述べているように白色腐朽菌だけの特徴とは考えられない。ただ後述するように白色腐朽菌に侵された材では、細胞壁中の侵された部分と、健全な部分が明瞭に対比識別されることによって他の腐朽型と区別できる。したがってこの白色腐朽菌での特徴は、AUFSESSらの考えているようにリグニン分解酵素の働きによる木化度の低下だけによるものでなく、単に分解酵素の細胞壁内への浸潤のしかた(酵素の浸潤速度など)が他の腐朽菌と違うことによるものとみ方が良いと考えられる。後述するようにUV顕写真及び吸光度の結果から、カワラタケに侵された細胞壁でのリグニン濃度は健全材と比べて低下していない。他方、白色及びかっ色腐朽菌による木材構成成分の変化について、LCC部分が大きな変化を受けることが報告されている<sup>12,13)</sup>。すなわちLCCのリグニンと炭水化物の結合部分が攻撃され、リグニンの遊離その他構造的変化が生ずること、またヘミセルロース部分の構成に著しい変化が生ずることが述べられている。したがって腐朽材細胞壁の赤変は次のように考えられる。健全材で黄緑に見えた細胞壁S2は、主にセルロース、リグニンのスタッキングに支配されて生じた発色であり、これが腐朽菌によって侵されると、その分解酵素により多糖類の非晶化(無定形化)及びLCC部のリグニンの遊離が生じて、そのためスタッキングが急激に増加することによるのであろう。このような変化は、腐朽菌の種類を問わず共通的なものと考えられる。ただ赤色化の速度及び範囲が、各腐朽菌により異なってくる。この違いは、各腐朽菌の分解酵素の性質及び量または攻撃を受ける材の樹種あるいは構成要素の差により生じて来たものであり、それぞれの特徴として示されてくるものであろう。以下の節で各腐朽菌のそれぞれの攻撃状況について述べる。

### 3.2 カワラタケ (*Coriolus versicolor*) 腐朽材

ブナ: UV顕写真をPhoto 1, FL顕写真をPhoto 9に示す。本報告でFL顕写真はカラーで示したが、露出の違いにより必ずしも正確な色を発現できなかったものもあった。また

枚数の都合上、多くの写真を省略し、本文の記述だけに頼った。木繊維における細胞壁の赤変は、最初細胞内こうに接して生じ、リング状となって細胞外側へ次第に広がっていく。それと共に細胞壁の分解が内側から生じ、壁は薄化 (thinning) していく。その後せん孔 (bore hole) の形成が見られた。この場合せん孔の周辺のみが赤変していた。Photo 9 はごく初期の段階の写真である。UV 顕の観察では、上記の赤変部位に相当する部分での吸光度の差異は認められず、健全材との区別は、薄化及びせん孔の形態的な面のみであった。Fig. 1 は、健全材と腐朽材の幾つかの細胞について、細胞壁 S2 の波長別吸光度を測定して平均し作成した吸収スペクトル曲線である。カワラタケ腐朽材では、その曲線の性質及び 280 m $\mu$  波長の吸光度からみて、リグニンの性質及び濃度に関し、健全材との違いは認められない。福田らはカワラタケ腐朽材の残存部分の化学的性質が、健全材とよく似ていることを報告している<sup>14,15)</sup>。

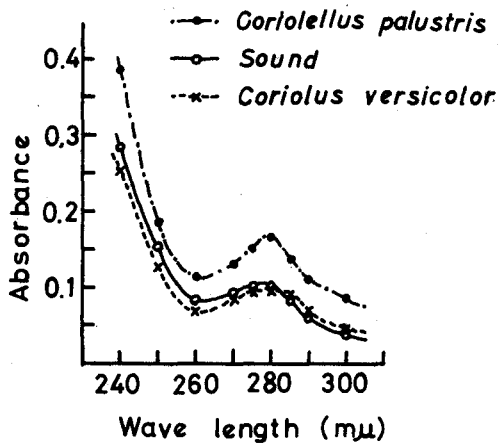


Fig. 1. UV spectral curves for the S2 of beech wood fibers in sound and decayed wood.

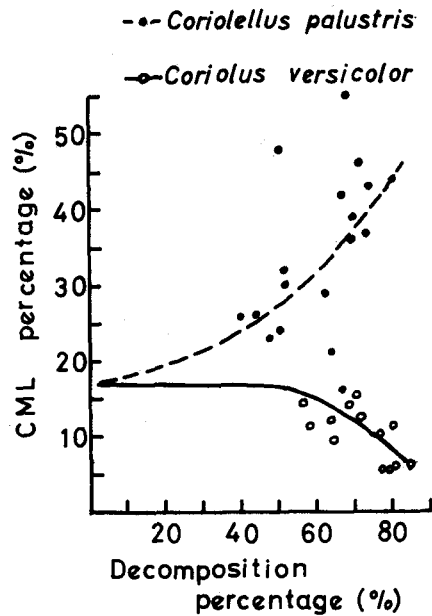


Fig. 2. Percentage of compound middle lamella (CML) of beech wood fibers in progressive stage of decay. Note. Both percentage based on area of cell wall.

以上のことから AO 染色 (蛍光) で赤変として認められる細胞壁構成成分の変化は、リグニン濃度の変化でなく、前述したように多糖類の分解及び LCC 部分のリグニンの遊離が主体であると考えた。細胞壁の局所的な赤変 (攻撃部位と健全部位の対比

が明瞭である) は、分解酵素の影響範囲が比較的限定されたものであることを示している。せん孔が大きくなり、細胞壁の分解が隣接する細胞間に連続して広がり、壁残存率がおよそ 50% になる頃になって、全体が均一に赤化するようになる。

いま UV 顕写真の濃度別面積率の解析から、細胞壁分解率とそのときの複合細胞間層 (CML) 比率との関係を作成した。オオウズラタケのものと同時に示したが、Fig. 2 のとおりである。これは道管を含まない木繊維の集中部位での面積比率であり、健全材では、空隙:S2:

CML=10:76:14, 細胞壁内での百分率に換算すると, S2:CML=84:16である。この数値を基準にして各腐朽段階での細胞壁分解率を算出した。CML率は細胞壁に対する比率(100-CML=S2率)である。

Fig.2から大体の傾向を推察すると, 細胞壁分解率50%までは, S2とCMLの比率は変わらないが, これ以上の分解では急速にCMLの比率が低くなるようである。カラタケ腐朽材の腐朽後期におけるリグニン量の減少は, リグニン濃度の高いCML率の低下と結果的に結びつくと思われた。

道管の場合にも細胞壁に対するせん孔の形成が認められたが, 木繊維のような著しい薄化は見られなかった。ただ局所的な凹凸が認められた。木繊維とは異なる腐朽経過を示すものと考えられるが, 詳細に検討していない。

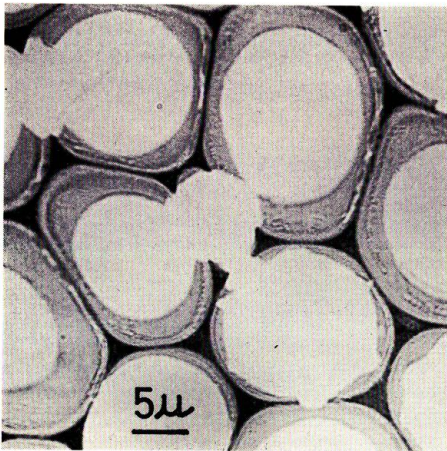


Photo 1. Beech wood fibers of decay by the white-rot fungus *Coriarius versicolor* (UV, 280 m $\mu$ ).

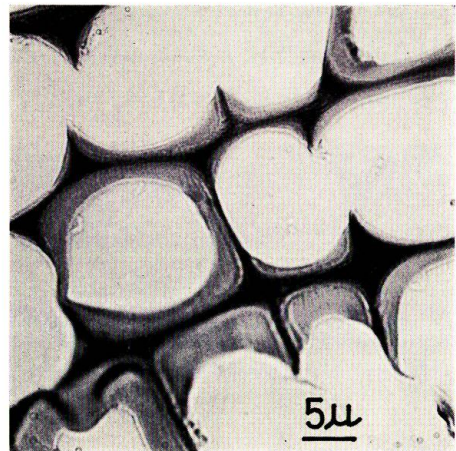


Photo 2. Spruce tracheids of decay by *Coriarius versicolor* (UV, 280 m $\mu$ ).

**エゾマツ:** UV顕写真をPhoto 2, FL顕写真は省略した。ブナと同様, 健全部と区別される赤変現象が, 仮道管細胞壁に初期段階で見られた。しかしこの区別は, 晩材とそれに近い厚壁の細胞で顕著に見られただけであり, 早材の薄細胞では初期段階でも赤変は壁全体にわたっており, 健全部との対比は見られなかった。晩材で, 赤変は接線壁で早く, 細胞コーナ部で最も遅いのが認められた。このようにエゾマツではブナ木繊維より, 分解酵素の浸潤が極めて早いことを示しているが, 一方細胞壁薄化は顕著に現われてこない。針広葉樹材の細胞壁成分の違いによると思われるが, 今後の検討が望ましい。

### 3.3 オオウズラタケ (*Coriolellus palustris*) 腐朽材

**ブナ:** UV顕写真をPhoto 3, FL顕写真をPhoto 10に示す。AO染色(蛍光)においてこの腐朽菌の攻撃のごく初期では, カラタケと同じく細胞内こう側に赤変が生じる。しかしながらカラタケと異なり, 赤変は細胞内側から外側へ徐々に広がるのではなく, S2全体に急

速に広がった。したがって健全部との対比はごく初期の段階でしか認められない。またS2全体が赤化した段階でも形態上の変化は見られない。細胞壁の分解(多糖類の非晶化及び除去)はS2全体でほぼ均一に行なわれる。その結果細胞壁の厚さの減少が認められた。この減少は細胞個々で異なっており、分解が個々の細胞単位で行なわれたことを示している。Fig.1にこの薄くなったS2部位のUV吸収スペクトル曲線を示した。これから認められるように、UV吸収度は健全材より高い。このことから細胞壁の厚さの減少は、多糖類の分解により残った網状構造のリグニンの収縮によるものであり、そのため見掛けのリグニン濃度の増加が見られたと考えられる。Fig.2に細胞壁分解率とCMLの比率との関係を示した。写真からもうかがえるように、カワラタケとは逆に、CML率は、S2の分解及び収縮に伴い増加していく。腐朽の最終段階になるとS2はほとんど消失し、CMLだけとなり、コラップスを生じて細胞の形状を失う。このように最終段階ではS2のリグニンは消失するが、CMLのリグニンは残っているように見える。両者のリグニンの性質の違いによるものか、あるいは単に見掛けのうえのことによるのか、検討が必要であろう。

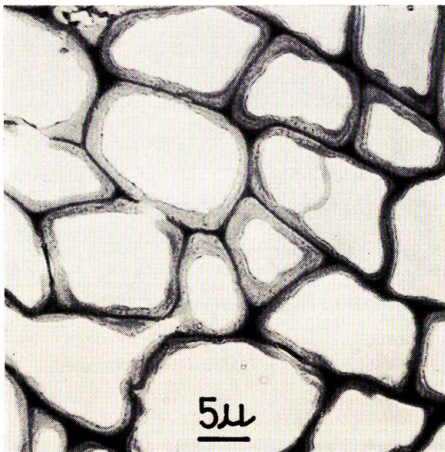


Photo 3. Beech wood fibers of decay by the brown-rot fungus *Corirolellus palustris* (UV, 280 m $\mu$ ).

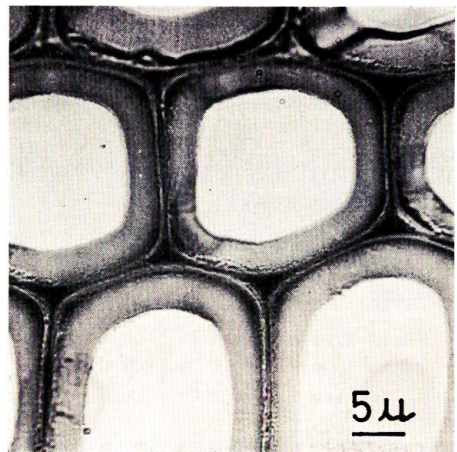


Photo 4. Spruce tracheids of decay by *Corirolellus palustris* (UV, 280 m $\mu$ ).

**エゾマツ：** UV顕写真をPhoto 4, FL顕写真をPhoto 11に示す。腐朽初期における細胞壁内の赤変の開始と進行の過程はつかまえられず、早い時期でも既に細胞壁全体が赤変していた。カワラタケ腐朽の場合でも早材部では全体の赤変は非常に早かった。このことからみても、エゾマツでは酵素の浸潤は極めて早いと言うことができる。ただ縦断面切片の観察から、放射柔細胞壁に局所的な赤変現象が見られた。仮道管と放射柔細胞とでは酵素の浸潤に違いがあるのかもしれない。仮道管細胞壁では腐朽の進行と共に、ブナ木繊維で生じたような収縮現象は見られなかった。このような形態的变化のないこと、また早期に生じた赤変の色はその後変らないこと、及びUV吸収度も変化しないことから、その後の腐朽の進行をUV及びFL顕

で見ることが出来なかった。しかし偏光顕微鏡下では、複屈折の欠如が明らかに認められた(写真省略)。細胞壁セルロース結晶領域の分解が、S2全体にわたって均一に進行していることを示している。エゾマツの場合、このように細胞壁の形態を腐朽の比較的後期まで保っているのは、リグニンの構造の強固なためと考えられよう。

### 3.4 軟腐朽 (*Chaetomium globosum*) 材

**ブナ:** UV 顕写真を Photo 5 に示す。初期腐朽の試片が得られず、かなり分解の進んだ試料のため十分な観察ではなかった。FL 顕写真は省略する。限られた観察であるが、細胞壁の分解に非常に局所的なものがあることがうかがえた。すなわち細胞壁に空どう (cavity) を作り、その穴の周辺のみ赤変し、健全な緑の壁と対比できるものが見られた。この場合、分解酵素は菌糸のごく表面だけの影響範囲しか示さないと考えられる。その他細胞壁の分解生成物であろうか、UV 吸収の強いまた FL 顕では赤色に見える物質が細胞内こうを埋めていくのが観察された。



Photo 5. Beech wood fibers of decay by the soft-rot fungus *Chaetomium globosum* (UV, 280 m $\mu$ ).

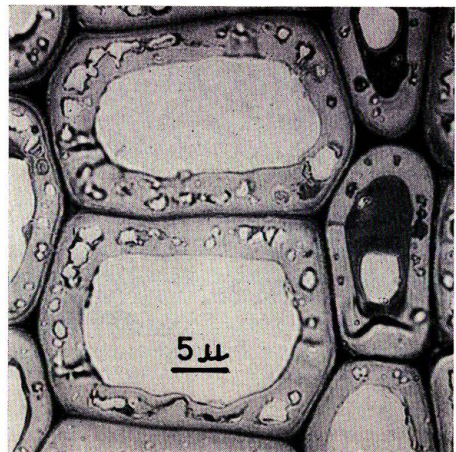


Photo 6. Spruce tracheids of decay by *Chaetomium globosum* (UV, 280 m $\mu$ ).

**エゾマツ:** UV 顕写真を Photo 6, FL 顕写真を Photo 12 に示す。仮道管の長軸方向に沿って、細胞内こう側に溝あるいは S2 内に空どうが生じ、その周辺部のみ赤変しているのが見られた。溝は、菌糸が内壁に付着し、それから分泌する酵素でえぐられることにより生じたものであろう。これはほぼマイクロフィブリルの方向に沿って形成されていた。また S2 内の空どうは、菌糸の先端から分泌する酵素により形成されたものであろう。いずれにしる分解酵素の影響範囲は限られたものであり、担子菌のように細胞壁全体にわたる赤変は見られず、細胞壁中への浸潤がないことを示している。酵素の分子量にそう大きな差異はないとすると、量的な差異に基づくものかもしれない。空どうの数が多くなると、赤変した領域は互いに連結して範囲を広げ、次第に壁全体に及んでいくのが見られた。またブナと同様に細胞壁の分解生成物

とみられるものが生じ、仮道管に多く詰まっているのが見られた。空どうの形成は、厚壁の晩材に数多く認められた。

### 3.5 土壌腐朽材

**ブナ：** UV 顕写真を Photo 7, FL 顕写真を Photo 13, 14 に示す。細胞壁の分解過程で2通りの様式が見られた。1つは白色腐朽材と同様の、細胞内こうから外側へ進むもの(赤変の拡大)であり、他は軟腐朽材と同様のS2内の空どう形成によるものである。両者のうち、後者の空どう形成の進行の方が、全体に対して影響が大きい。そしてこの空どう化はエゾマツの軟腐朽で見られたものと異なり、細胞長軸に対して約50度の傾斜で、断面はダイヤモンド型でかなり大きい。またこの穴の周辺部の赤変は全く見られない。もしこの空どうが、菌糸のせん孔の結果生じたものであるとすると、分解は菌糸の先端からのみ分泌する酵素によるもので、側面からはなされていないことを示していると考えられる。腐朽後期ではS3を残し、S2が大きく分解消失している細胞が多く見られた。またUV吸収の強い物質が生じ、細胞内こうを埋めていくのも多く観察される。

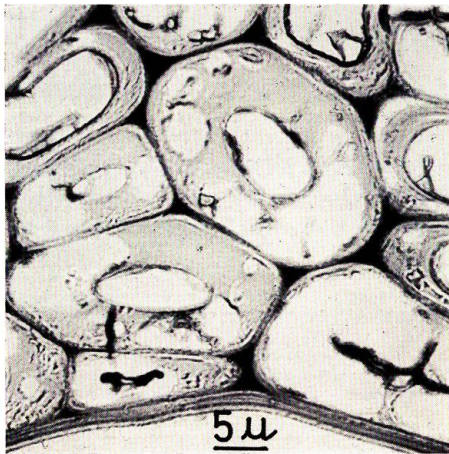


Photo 7. Beech wood fibers of the humus decay (UV, 280 m $\mu$ ).

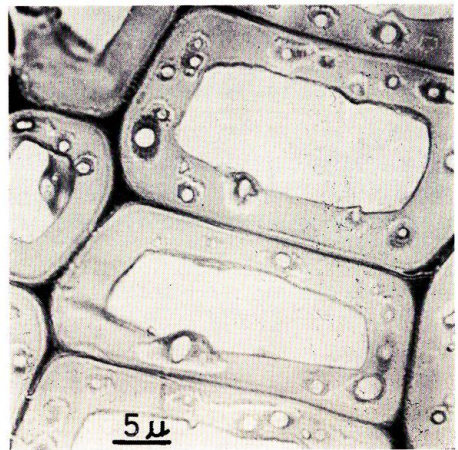
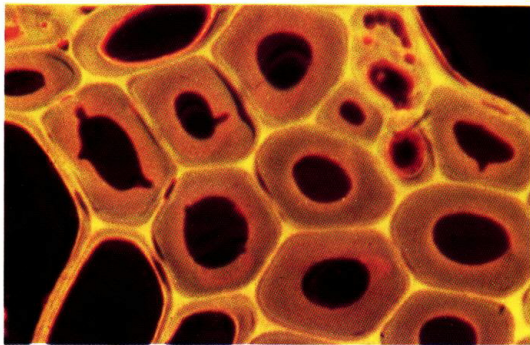


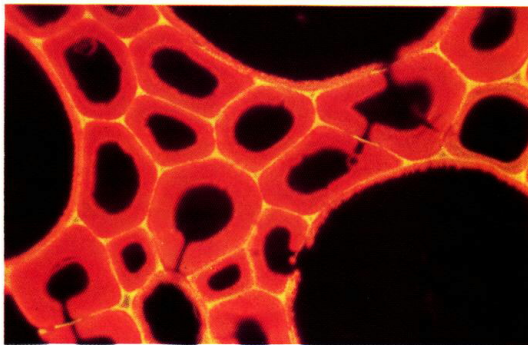
Photo 8. Spruce tracheids of the humus decay (UV, 280 m $\mu$ ).

**エゾマツ：** UV 顕写真を Photo 8, FL 顕写真は省略する。小さな空どう形成が、軟腐朽材と全く同じように認められた。しかしながら前述の軟腐朽材と異なり、この小さな空どうのほかに、大きな局所的分解が生じ、それが細胞壁全体に急速に広がっていくのが見られた。これは細胞壁の赤変を伴わない分解で、軟腐朽で見られた小さな空どうの周囲の赤変の拡大という現象ではない。ブナで見られたダイヤモンド状の大きな空どうは認められなかった。空どうの形及び寸法は、菌の種類、攻撃される材の樹種及び攻撃時のふんい気によって大きな差異が

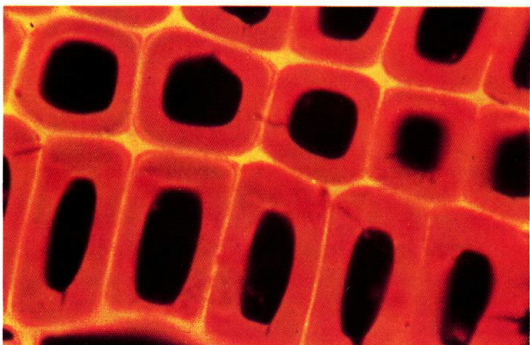
Photos 9~14. The microphotographs in fluorescence microscopy by fluorochrome with acridine orange.



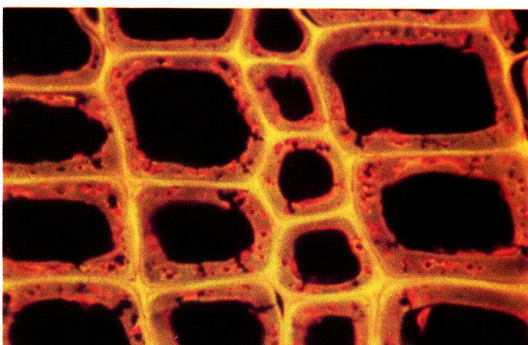
**Photo 9.** Beech wood fibers in an early stage of decay by *Coriolus versicolor*.



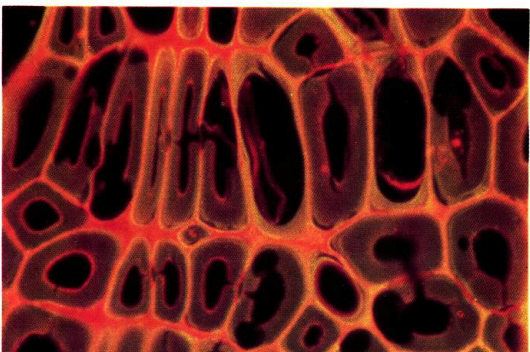
**Photo 10.** Beech wood fibers in an early stage of decay by *Corirolellus palustris*.



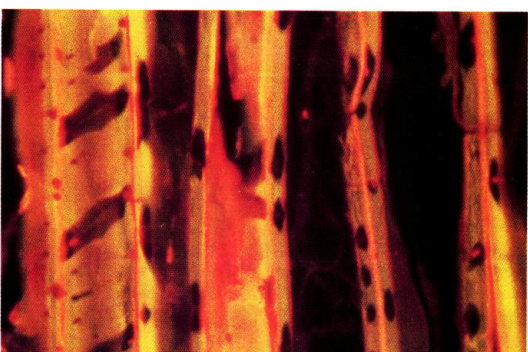
**Photo 11.** Spruce tracheids of decay by *Corirolellus palustris*.



**Photo 12.** Spruce tracheids of decay by *Chaetomium globosum*.



**Photo 13.** Beech wood fibers in an early stage of the humus decay.



**Photo 14.** Longitudinal section of wood fibers of beech of the humus decay.

見られるという報告がある<sup>16,17)</sup>。土壤腐朽の場合は、2種以上の菌あるいはバクテリアの影響もあり、それだけ複雑であろう。

#### 4. 結 論

腐朽材細胞壁の形態的研究は数多く報告されている<sup>16,17)</sup>。本報告の結果も、形態的な内容の限りではいままでの報告と大差ない。しかしながら組織化学的な研究報告は比較的少なく、特に分解酵素の影響範囲について直接示したり言及しているものはほとんど見当たらない。本報告でFL頭で観察したAOのメタクロマジー染色は、細胞壁の分解脱落のさきぶれとなる構成成分の変化する範囲を、色彩の明瞭な変化で示すことができた。そしてこの色彩の変化範囲を分解酵素の影響域としてつかまえることにより、酵素の浸潤速度の違いあるいはその質または量の違いとして推測することができよう。UV頭、偏光頭の併用から、この色彩の変化範囲で示され得る化学成分の変化は、多糖類部の非晶化(無定形化)あるいはLCC部のリグニンの遊離が主なものと考えられ、リグニン量の変化によるものではない。

白色腐朽菌(カワラタケ)では、酵素は細胞内こうから細胞壁内へ徐々に浸潤することにより、健全部と明瞭に区別できる。これに反し、かつ色腐朽菌(オオウズラタケ)では酵素は細胞壁全体に急速に浸潤する。したがってごく初期以外は健全部と区別することができない。軟腐朽菌及び土壤腐朽菌では、酵素の影響範囲は極めて限られた局部的なものであり、その結果空どう形成による細胞壁分解をたどることが示された。

このように蛍光染色は鋭敏な反応を示すことから腐朽初期の材での組織化学的研究には極めて有効である。しかしながら蛍光色素の選択、染色法は目的に応じて設定されるものであり、今後の検討が必要であろう。

また電頭と同じ包埋試料から1 $\mu$ 前後の薄切片を作成、組織化学的に染色して、高倍率の光頭で検鏡することは、その解像力の点、視野の広さなどの点から、今後の研究上、非常に大きな利益が認められた。ただ蛍光染色の場合、このような薄切片(1 $\mu$ 前後)と普通の光頭用切片(15~20 $\mu$ )とでは吸着する色素の量により、ある成分にとっては違った色彩効果を示すこともあり、注意する必要がある。

#### 5. 摘 要

カワラタケ(白色腐朽)、オオウズラタケ(かつ色腐朽)、*Chaetomium globosum*(軟腐朽)の培地及び土壤中にブナ及びエゾマツの心材を放置して実験室的に腐朽させたものを、紫外線及び蛍光顕微鏡により組織化学的に観察した。方法及び結果を要約すると次のとおりである。

1) エポン包埋0.5 $\mu$ 切片を紫外線顕微鏡光度計で観察した。280 m $\mu$ 波長での写真及び紫外線吸収スペクトルの測定は、リグニンの量及び性質についての知識を与えた。

2) メタクリレート包埋1 $\mu$ 切片をアクリジンオレンジで染色し蛍光顕微鏡で観察した。

アクリジンオレンジは蛍光メタクロマジーを示す。セルロースは緑、リグニンは黄緑、ホロセルロース及びある種の抽出成分系は赤、切片で細胞壁の細胞間層は黄～だいたい、2次壁は黄緑～緑に発光した。

3) 腐朽材で腐朽菌の攻撃部位は、赤に変色した。健全部の緑と対比される。この赤変は、リグニン量に関係するものでなく、主に多糖類部分の非晶化(無定形化)及びLCC部のリグニンの遊離によるものと考えられた。

4) 赤変の広がりかたは、腐朽菌の種類及び樹種により大きな差異が認められた。分解酵素の質及び量の差、または細胞壁構造の違いによるその浸潤速度の差という問題で考察された。

5) カワラタケ腐朽では、酵素は細胞内側から外側へ徐々に浸潤し、薄化を伴った。オオウズラタケ腐朽では、酵素は細胞壁全体に急速に浸潤し、均一の分解を示した。軟腐朽及び土壌腐朽では、酵素の影響は局所的であり、空どう形成による分解を示した。

6) 蛍光染色の鋭敏な反応と、薄切片での高倍率観察は、目的に応じて非常に有効と考えられた。

#### 文 献

- 1) COWLING, E. B.: Microorganism and microbial enzyme systems as selective tools in wood anatomy. in "Cellular ultrastructure of woody plants" (W. A. CÔTÉ, Jr. Ed.), Syracuse Univ. Press; 341-368 (1965).
- 2) 深沢和三: 紫外線顕微鏡観察によるトドマツ圧縮あて材及び側方材細胞壁のリグニン分布. 北大農演報, 31 (1); 87-114 (1974).
- 3) 深沢和三・重沢立郎: 蛍光メタクロマジー法によるトドマツ苗条構造の観察(予報). 日本林学会北海道支部講演集, 23; 71-73 (1974).
- 4) 今川一志・大谷 醇・深沢和三・布村昭夫・土居修一: 紫外線顕微鏡による腐朽材細胞膜の観察(予報). 日本木材学会北海道支部講演集, 5; 1-4 (1973).
- 5) 土居修一・布村昭夫・今川一志・大谷 醇: 土壌中での木材の腐朽(1). 北海道立林産試月報, 274; 1-6 (1974).
- 6) WEST, S. S.: Fluorescence microspectrophotometry of supravitaly stained cells. in "Physical techniques in biological research. vol. IIIC" (A. W. POLLISTER Ed.), Academic Press; 253-317 (1969).
- 7) 伊藤 隆・藤田 斉・市村幸子・座間光雄: Photodynamic 作用—核酸と色素との相互作用を中心として—。蛋白質, 核酸, 酵素, 12 (7); 555-578 (1967).
- 8) v. AUFSESS, H.: Mikroskopische Darstellung des Verholzungsgrades durch Färbemethoden. Holz Roh-Werkstoff, 31 (1); 24-33 (1973).
- 9) v. AUFSESS, H., PECHMANN, H. v., GRASSLE, E.: Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an pilzbefallenem Holz. Holz Roh-Werkstoff, 26 (2); 50-61 (1968).
- 10) v. AUFSESS, H.: Einige licht- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an rotfaulem Fichtenholz. Forstw. Cbl. 91; 98-105 (1972).
- 11) v. PECHMANN, H.: Das mikroskopische Bild einiger Holzfehler. Holz Roh-Werkstoff, 30 (2); 62-66 (1972).
- 12) 諸星紀幸・天野 光・原口隆英: オオウズラタケおよびカワラタケによるMWL, LCCの分解. 東農工大演報, 11; 21-38 (1974).

- 13) 土居修一・諸星紀幸・原口隆英: 腐朽木材中のリグニンの性質. 木材誌, **20** (5); 230-237 (1974).
- 14) 福田清春・原口隆英: かつ色腐朽材と白色腐朽材の差異について I. 木材工業, **28** (11); 266-268 (1973).
- 15) 福田清春・原口隆英: 同上 II. 東農工大演報, **11**; 25-29 (1974).
- 16) WILCOX, W. W.: Anatomical changes in wood cell walls attacked by fungi and bacteria. *Botanical Rev.*, **36** (1); 1-27 (1970).
- 17) LIESE, W.: Ultrastructural aspects of woody tissue disintegration. in "Annual review of pathology, vol. 8" (J. G. HORSFALL Ed.): 231-255 (1970).

### Summary

The morphological features of wood cell walls attacked by fungi have been described by various authors for a long time. The great development of optical instruments such as electron microscope and the improvement of research techniques were helpful in elucidating these problems.

In the present study, we used the ultraviolet (UV) and fluorescence (FL) microscopes, and tried to solve these problems histochemically. The ultraviolet microscope is a most profitable instrument to study the distribution of lignin in wood cell wall in the present day. And the fluorescence microscope have been highly estimated among researchers in histochemical study because of sharp stain with fluorochromes. Especially, acridin orange (AO), a kind of fluorochrome, attracted the attention of many researchers because it was a metachromatic dye. It was said that AO fluoresces with red light in instances when its cations exist as dimers or polymers, while as monomers it fluoresces with a green light.

### Samples

Small pieces of beech (*Fagus crenata* BLUME) and spruce (*Picea jezoensis* CARR.) were decomposed in culture media of *Coriulus versicolor* (one of the white rot fungi), *Corioloellus palustris* (one of the brown rot fungi), *Chaetomium globosum* (one of the soft rot fungi) and in the humus soil. Thin epon sections ( $0.5 \mu$ ) were used for the UV microscopy. And thin metacrylate sections ( $1 \mu$ ) which were stained with 0.2% solution of the AO in citrate-phosphate buffer of pH 6.0 for 3 hours were used for FL microscopy. The UV microscope photometer (Carl Zeiss/West Germany, Type MPM 01) and the incident fluorescence microscope equipped with excitation filter BG 12 and barrier filter 50 (Carl Zeiss/West Germany, Universal Type) were employed in this study.

### Fluorescence metachromasis of woods

Each of the chemical compositions of cell wall which was extracted from spruce wood fluoresced with different colours by AO stain in a following manner. Cellulose; green or yellowish green. Holocellulose; red. Lignin; yellow green or greenish yellow. Extractive constituents; red in general. Whereas, the secondary wall of raw wood coloured of green or yellow green and the compound middle lamella coloured of yellow or orange in the sound thin sections. When the wood decayed, the secondary walls varied fundamentally in colour from green or yellow green to red, irrespective of fungus species. It was considered that these colour changes did not resulted in the decrease of lignin content of the secondary wall because there was no

change in UV absorption of the attacked cell walls by *Coriolus versicolor*. From the facts described above and an interesting contents of another report in which the carbohydrate component of LCC (lignin carbohydrate complex) was preferentially attacked by those fungi, we may concluded that this discoloration into red was due to the result of decomposition of polysaccharide or release of lignin from LCC component, and was not due to the decrease of lignin content.

#### **The differences of attacking way among rot fungi or wood species**

The red discoloration zone of cell wall was originated by the attack of fungi, as stated before, and signified directly the infiltrative regions of wood-deteriolating enzymes. In the appearance and the extent, they varied with the fungi and the trees. This variation revealed qualitative or quantitative differences between the fungi, and structural or chemical differences between the woods. The attack of *Coriollus versicolor* (white rot fungi) begun at the lumen and progressed gradually outward toward the middle lamella. Then, the colour contrast between the attacking zone (red) and sound zone (green) was remarkable. In *Coriolelus palustris* (brown rot fungi), the speed of red discoloration was so high, namely, the infiltration of enzyme through the wall was so quick that the distinction between sound walls and decayed walls was difficult to see even in early stage of decay. In *Chaetomium globosum*, the limited region around the cavity which formed in the secondary wall only discolored. In the decay of humus soil, there was no discoloration around the cavity which formed similarly. Secretions of the enzyme would be confined within narrow limited area at hyphal tip or lateral surface of the hyphae in the case of soft and humus decay.