

# 数種の核菌綱および盤菌綱に属す子のう菌類による ブナ辺材, ロ紙, リグニンモデル化合物の分解

田中裕美・板倉修司・榎 章郎

近畿大学農学部農芸化学科

## Degradation of Japanese Beech Wood, Pure Cellulose, and Lignin-Related Compounds by Pyrenomycetes and Discomycetes

Hiromi TANAKA, Shuji ITAKURA, and Akio ENOKI

Department of Agricultural Chemistry, Kinki University, Nakamachi, Nara 631-8505,  
Japan

### Synopsis

The abilities of several Pyrenomycetes and Discomycetes fungi to degrade Japanese beech (*Fagus crenata* Blume) wood, to degrade microcrystalline cellulose, and to degrade lignin-related dimeric compounds were examined. Changes in the lignin component of the wood during decay were then measured. Phenol oxidase activity and one-electron oxidation activity which can be measured by ethylene generation from 2-keto-4-thiomethylbutyric acid were also examined. This one-electron oxidation activity is related to wood degradation by white-rot and brown-rot fungi. Some of the fungi examined caused large weight losses of beech wood. Generally they caused larger weight losses on Duncan's medium than on Kirk's medium. Most of the fungi examined expressed cellulolytic activity. The ratios of the percent lignin loss to the percent weight loss by several fungi were 0.4-0.6, while the values by some others were 0.2-0.3. The fungi which showed higher ratios of the percent lignin loss to the percent weight loss had usually phenol oxidase activity. However, their abilities to degrade lignin were lower than those of white-rot fungi. The activity of one-electron oxidation was not related to the fungi's ability to degrade wood.

### 緒 言

軟腐朽という語は1954年にSAVORY<sup>1)</sup>によって、子のう菌 *Chaetomium globosum* が木材表面を軟らかくし、木材細胞壁の二次壁中層に特徴的な空洞 (cavity) をつくる腐朽に対して用いられた。その後他の子のう菌や不完全菌によって類似の腐朽が起こることが見出され、担子菌以外のこれらの菌類によって起こる腐朽を一般に軟腐朽と称している。軟腐朽は担子菌の旺盛な生育が抑制されるような環境 (水分含量が高い, あるいは低い, 酸素濃度が低い) や防腐剤処理された木材などに起こる。軟腐朽の研究は、腐朽材を顕微鏡で観察すると木材細胞壁に特徴的な侵害様式を示すことから、細胞壁の形態観察についての報告が多い<sup>2)9)</sup>。軟腐朽では細胞内腔に到達した菌糸が二次壁 S<sub>2</sub> 層に侵

入し、そこでT字型に分岐して、それぞれマイクロフィブリルの配列方向にそってらせん状に伸長し、菌糸先端周辺部の物質を分解するので、ひし形または先端のとがった円筒状の空洞 (cavity) を次々に作っていく cavity 型と、内腔からえぐり取るように直接細胞壁を侵害する erosion 型とがある。Cavity 形成はリグニン含有率の高い木材, erosion は攻撃しやすい木材に対する侵害様式とする報告もあるが<sup>10)</sup>、このような侵害様式がどのような分解酵素の作用によって起こるのかについてはほとんどわかっていない。

*C. globosum*<sup>11-14)</sup> や他の子のう菌<sup>15)</sup>、不完全菌によって腐朽した木材の化学成分変化についていくつかの報告がある。これらの結果から軟腐朽菌は主に木材中の多糖類 (セルロース、ヘミセルロース) を分解し、リグニンを担子菌による褐色腐朽と同様あるいはそれよ

りやや多く分解することがわかった。一方大型の子実体をつくるクロサイワイタケ(マメザヤタケ)目に属す子のう菌は、広葉樹に対して白色腐朽を起こすことが知られている。クロサイワイタケ目に属す子のう菌による木材分解に関して、<sup>14</sup>Cで標識したリグノセルロースの代謝について SUTHERLAND ら<sup>16)</sup>、木材細胞壁の構成成分の化学組成変化と細胞壁の微細構造変化について NILSSON ら<sup>17)</sup> や MERRILL ら<sup>18)</sup> が、水分含量と木材分解の関係について ABE<sup>19)</sup> の報告がある。TANAKA ら<sup>20)</sup> は軟腐朽菌による木材分解機構を解明するために、子のう菌の *Chaetomium* sp. と *Xylaria* sp., 不完全菌の *Graphium* sp. を用いて、異なった培地条件下での木材分解を検討した。その結果、培地の選択は非常に重要であり、軟腐朽菌の中でも不完全菌と子のう菌は培地条件によって分解力が異なっていた。子のう菌の中でも *Chaetomium* sp. のような微小菌と、大型の子実体を作る *Xylaria* sp. とでは異なっていた。これらの菌類の針葉樹に対する分解力にも違いが認められた。さらに木材を分解できる数種の不完全菌について、担子菌のリグニン分解菌である白色腐朽菌が生産するフェノールオキシダーゼ活性と一電子酸化活性について検討した<sup>21)</sup>。一電子酸化活性は2-keto-4-thiomethylbutyric acid (KTBA) からのエチレン発生量を測定することによって測定でき<sup>22)</sup>、担子菌の白色腐朽菌と褐色腐朽菌の木材分解と一電子酸化活性は相関関係にあることを報告した<sup>23)</sup>。またこの一電子酸化活性は主に水酸化ラジカルが関与していることを明らかにした<sup>24-29)</sup>。その結果木材を分解できる不完全菌(軟腐朽菌)は、木材を分解する条件下でフェノールオキシダーゼ活性と一電子酸化活性を示すことを明らかにした。

そこでさらに肉眼的に観察できる子実体をつくる子のう菌きのこ数種を用いて、ブナ辺材、口紙、リグニンモデル化合物に対する分解力、KTBAからのエチレン発生量測定による一電子酸化活性、フェノールオキシダーゼ活性を測定し、その木材分解機構を検討した。

## 材料および方法

### 1. 供試菌株

供試菌を表Iに示した。核菌綱に属す菌株は農林水産省森林総合研究所阿部恭久氏(当時)より分譲を受けた。盤菌綱に属す菌株は財団法人発酵研究所より入手した。

Table 1. Ascomycetous fungi used in this study.

Ascomycotina	
Pyrenomycetes	
<i>Biscogniauxia nummularia</i>	WD 243, WD 480
<i>Daldinia concentrica</i>	WD 227, WD 349
<i>Graphostroma platystoma</i>	WD 348, WD 357
<i>Hypoxylon howeianum</i>	WD 451
<i>Hypoxylon multiforme</i>	WD 494
<i>Hypoxylon truncatum</i>	WD 434, WD 497
<i>Rosellinia aquila</i>	WD 353, WD 496
<i>Ustilina deusta</i>	WD 438, WD 488
Discomycetes	
<i>Choriactis geaster</i>	IFO 30658
<i>Urnula craterium</i>	IFO 30137

### 2. 培養条件

供試菌の培養は300 ml三角フラスコにDuncanの培地<sup>30)</sup>(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.0g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.0g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 6.0g, グルコース 2.5g, 蒸留水 1000 ml, pH 5.5)あるいはKirkの培地<sup>31)</sup>を50 ml(2%寒天)添加し用いた。ただしKirkの培地<sup>31)</sup>は炭素源としてグルコース 2.5g, 20 mMフタル酸緩衝液のかわりにコハク酸緩衝液 pH 4.5を使用し、窒素源としては1.2 mM酒石酸アンモニウムを用いた。

### 3. ブナ辺材の分解

供試材として2×2×0.5cmのブナ辺材(*Fagus crenata* Blume)を、アセトン抽出後、60℃で乾燥し恒量を求めた。木片は隣接する2個を1組とし、1方を腐朽用、残りを成分分析の対照とした。供試菌を前培養した後、コルクボーラーで接種片を切り出し、フラスコに2個ずつ設置し28℃で培養した。菌糸がフラスコの培地半分くらいに伸長した後、ガス滅菌した木片をフラスコあたり3個ずつ設置した。所定期間培養後、木片に付着している菌糸を取り除き洗浄した後、60℃で乾燥し恒量を求め、腐朽前後の恒量から質量減少率を算出した。

### 4. 腐朽材のリグニン定量

質量減少率を求めた後、数値の似通ったものを数枚ずつ選び出し、粉碎し80メッシュ通過のものを試料とした。対照用木片も同様の操作によって試料とした。アセトンで脱脂、風乾したのちクラウンリグニンをJIS P 8008-1976によって定量した。

### 5. リグニンモデル化合物の分解

供試したリグニンモデル化合物は4-ethoxy-3-methoxyphenylglycerol-β-guaiacyl ether(I)<sup>32)</sup>、1-(3,4'-

dimethoxyphenyl)-1,3-dihydroxy-2-(4"-methoxyphenyl) propane (II)<sup>32)</sup>で、前報に従って合成した。300 ml 三角フラスコに30 mlのDuncanあるいはKirkの培地を分注、2%寒天を加え殺菌し、固化させた後、それぞれの化合物を1 mg含んだ200 μlアセトン溶液を添加した。アセトンを蒸発させるため1日放置後、供試菌を接種した。28℃で所定期間培養後、酢酸エチル30 mlと内部標準として1mgの1-(3,4'-dimethoxyphenyl)-1-hydroxy-2-(4"-methoxyphenyl) ethane<sup>33)</sup>をN,N-dimethylformamide 100 μlに溶解し添加した。さらに酢酸エチル20 mlを2回添加することによって残存したリグニンモデル化合物を抽出し、50 mlの蒸留水で洗浄した。酢酸エチルを除去し、その残渣にピリジンとN,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (1:1)を加え、80℃で5分間加熱しTMSi誘導体とし、前報<sup>34)</sup>によりガスクロマトグラフィーによって定量した。

6. セルロースの分解

セルロース基質として口紙(ADVANTEC No.2, 直径7 cm)を用いた。口紙は使用前に蒸留水、アセトンで抽出後、60℃で乾燥させ恒量を測定した。所定期間培養後、付着した菌糸を取り除き、60℃で乾燥させ恒量を測定した。腐朽前後の恒量から質量減少率を求めた。

Table 2. Degradation of Japanese beech wood blocks by ascomycetous fungi in two media incubated at 28℃ for 1, 2, and 3 months.

		Weight loss (%)					
		Duncan's medium			Kirk's medium		
		Months					
		1	2	3	1	2	3
<i>B. nummularia</i>	WD 243	34.1*	46.8	46.9	8.3	14.0	16.6
	WD 480	9.6	17.5	26.2	2.1	5.2	7.1
<i>D. concentrica</i>	WD 227	0.1	1.8	2.4	0.3	0.8	1.2
	WD 349	11.4	19.7	26.6	8.2	12.8	17.0
<i>G. platystoma</i>	WD 348	22.2†	32.2	41.5	0.6	5.7	7.7
	WD 357	0	0.2	0.3	0.5	1.0	1.2
<i>H. howeianum</i>	WD 451	1.4	4.1	11.1	2.0	2.7	3.0
<i>H. multifforme</i>	WD 494	0.3	0.5	0.8	0	0.3	1.3
<i>H. truncatum</i>	WD 434	7.3	15.1	18.2	2.7	8.9	17.2
	WD 497	6.9	9.9	10.4	10.1	12.9	14.3
<i>R. aquila</i>	WD 353	0	0	0	0.5	1.1	1.4
	WD 496	0.4	0.6	0.8	0.3	2.1	4.2
<i>U. deusta</i>	WD 438	18.0	30.7	36.5	12.8	19.6	21.8
	WD 488	16.4	29.6	35.5	15.3	23.3	25.2
<i>C. geaster</i>	IFO 30658	1.3	5.1	10.7	0.7	1.3	2.6
<i>U. craterium</i>	IFO 30137	4.1	11.8	12.5	3.3	9.7	10.7

\* Values represent means of six replicates except *G. platystoma* WD 348.

† Values represent means of three or four replicates.

7. フェノールオキシダーゼ反応

供試培地として、直径9 cmのシャーレに20 ml (2%寒天) Duncanの培地を分注固化し用いた。グルコース濃度は0.25%とし、木粉を添加する場合はブナ木粉2 gとした。フェノールオキシダーゼ活性測定のための基質としてグアイヤコールをエタノールに溶解し、最終濃度0.05%となるように培地に添加した。培地の着色を観察し、赤紫色に着色したものをフェノールオキシダーゼ反応陽性とした。

結果

2種の培地上での供試菌によるブナ辺材の質量減少率の結果を表2に示した。最大の質量減少は、Duncanの培地を用いて3ヶ月腐朽させたとき、*B. nummularia* WD 243によって46.9%であった。次いで*G. platystoma* WD 348によって41.5%、*U. deusta* WD 438によって36.5%、*U. deusta* WD 488によって35.5%、*D. concentrica* WD 349によって26.6%であった。Kirkの培地を用いた場合は*U. deusta* WD 488によって3ヶ月腐朽させたとき25.2%、次いで*U. deusta* WD 438によって21.8%、*H. truncatum* WD 434によって17.2%であった。供試菌の大部分はKirkの培地よりDuncanの培地の方がブナ辺材をよく分解した。*U. deusta* WD 438とWD 488はDuncanの培地で*B. nummularia* WD 243の次に大きな分解力を示し、*B. nummularia* WD 243がKirkの培地ではあまり分解力を

Table 3. Degradation of filter paper by ascomycetous fungi in two media incubated at 28℃ for 1, 2, and 3 months.

		Weight loss (%)					
		Duncan's medium			Kirk's medium		
		Months					
		1	2	3	1	2	3
<i>B. nummularia</i>	WD 243	37.7*	52.9	76.0	3.2	4.8	5.2
	WD 480	31.7	74.1	88.8	11.6	14.9	16.3
<i>D. concentrica</i>	WD 227	5.0	10.0	40.0	53.1	72.4	77.7
	WD 349	71.4	83.6	88.2	39.0	80.8	82.6
<i>G. platystoma</i>	WD 348	4.4	9.3	14.4	7.8	9.3	10.1
	WD 357	16.5	76.8	86.2	14.9	20.8	29.9
<i>H. howeianum</i>	WD 451	30.0	59.0	83.3	11.1	40.1	41.0
<i>H. multifforme</i>	WD 494	4.4	46.0	66.8	0.1	0.5	1.6
<i>H. truncatum</i>	WD 434	25.1	59.4	96.0	43.8	65.5	68.0
	WD 497	18.4	59.3	69.7	23.4	44.7	52.2
<i>R. aquila</i>	WD 353	0.1	0.7	1.2	0.7	4.7	18.5
	WD 496	0	0.1	0.2	0.5	2.8	3.1
<i>U. deusta</i>	WD 438	59.1	76.7	80.5	12.3	49.7	62.9
	WD 488	25.2	48.2	78.1	0.1	12.0	55.5
<i>C. geaster</i>	IFO 30658	18.2	67.8	88.7	28.2	54.2	79.7
<i>U. craterium</i>	IFO 30137	6.6	14.8	28.5	5.5	39.8	67.8

\* Values represent means of three replicates.

示さなかったのに対し、これらの2種はKirkの培地でも大きな分解力を示した。分解力はあまり大きくないが、*H. truncatum* WD497はKirkの培地の方が、Duncanの培地でよりやや質量減少率が大きかった。*H. truncatum* WD 434と*U. craterium* IFO 30137は2種の培地で類似の質量減少率を示した。*B. nummlaria* WD243, WD 480と*U. deusta* WD 438, WD 488の2菌株とも2種の培地で大きな分解力を示したが、*D. concentrica* WD 227とWD 349と*G. platystoma* WD 348とWD 357は2菌株の間で異なった分解力を示した。*G. platystoma* WD 357, *H. multifforme* WD 494, *R. aquila* WD 353とWD 496は2種の培地ともにほとんど分解力を示さなかった。

2種の培地上での供試菌による口紙の質量減少率の結果を表3に示した。供試した子のう菌のほとんどは、2種あるいは1種の培地で口紙をよく分解した。最大の質量減少は、Duncanの培地を用いて3ヶ月*H. truncatum* WD 434によって分解させると96.0%、次いで*B. nummlaria* WD 480によって88.8%、*C. geaster* IFO 30658によって88.7%であった。Kirkの培地では*D. concentrica* WD 349によって82.6%、*C. geaster* IFO 30658によって79.7%、*D. concentrica* WD 227によって77.7%であった。供試菌の大部分はDuncan培地の方がKirk培地より分解力が大きい、ほとんど同じであった。*D. concentrica* WD 227と*U. craterium* IFO 30137は、Duncanの培地よりもKirk培地で分解力が高かった。*G. platystoma*は2菌株の間で分解力が異なり、ブナ辺材に対する分解力をほとんど示さなかった。*G. platystoma* WD 357の方が、*G. platystoma* WD 348よりも両方の培地で口紙に対する分解力が大きかった(表2と3)。*R. aquila* WD 353とWD 496はいずれの培地でも菌糸の伸長が充分でなく、ほとんど口紙を分解しなかった。

ブナ辺材に対する質量減少率と健全材と腐朽材のリグニン含量、リグニン減少率、質量減少率に対するリグニン減少率の割合を表4に示した。例えば*B. nummlaria* WD 243は14.5%の質量減少率のとき、リグニン減少率は3.0%である。そのとき質量減少率に対するリグニン減少率は3.0/14.5となり0.21となる。この値が1.0のとき、多糖類のセルロース、ヘミセルロースとともにリグニンもほぼ同じ割合で分解していることを示す。0.21という低い値の場合は主にリグニン以外の多糖類を分解している。*B. nummlaria* WD 243とWD 480は木材の分解が進むにつれて、質量減少率に対するリグニン減少率の割合は増加し、リグニ

Table 4. Percent weight losses of beech wood decayed by ascomycetous fungi, lignin content, and the percent loss of lignin.

	Months	Medium	Weight loss(%)	Lignin (%)	Lignin loss(%)	LL/WL*	
<i>B. nummlaria</i> WD 243	3	Kirk	S <sup>†</sup>	19.2			
			D <sup>‡</sup>	14.5	21.7	3.0	0.21
	1	Duncan	S		20.8		
			D	33.6	26.2	16.2	0.48
			S		20.8		
			D	45.7	28.6	25.4	0.56
2	Duncan	S		20.1			
		D	50.2	25.3	30.0	0.60	
		S		21.4			
		D	23.1	25.1	9.8	0.42	
3	Duncan	S		21.5			
		D	29.9	25.6	16.7	0.56	
		S		20.5			
		D	13.2	22.8	3.4	0.26	
<i>D. concentrica</i> WD 349	2	Duncan	S		19.8		
			D	23.5	24.0	7.1	0.30
	3	Duncan	S		20.2		
			D	32.7	27.4	8.6	0.26
			S		22.5		
			D	22.8	24.9	14.7	0.64
1	Duncan	S		23.4			
		D	41.4	30.7	23.1	0.56	
<i>G. platystoma</i> WD 348	2	Duncan	S		19.8		
			D	19.4	23.1	6.2	0.32
	3	Duncan	S		20.1		
			D	25.8	23.9	7.0	0.32
			S		21.3		
			D	15.1	23.2	7.5	0.50
<i>H. truncatum</i> WD 434	1	Duncan	S		21.0		
			D	21.7	23.6	12.0	0.55
	2	Duncan	S		20.9		
			D	25.1	23.9	14.4	0.57
			S		20.0		
			D	36.9	25.9	18.5	0.50
<i>U. deusta</i> WD 438	1	Duncan	S		22.0		
			D	19.2	24.8	9.1	0.47
	3	Kirk	S		20.2		
			D	27.6	24.8	11.0	0.40
			S		22.6		
			D	33.4	27.5	19.0	0.57
<i>U. craterium</i> IFO 30137	2	Duncan	S		20.5		
			D	12.2	22.8	2.4	0.20

\* LL: Lignin loss (%), WL: weight loss (%).

† S: Sound wood, ‡ D: decayed wood.

ンは徐々に分解された。他の子のう菌では分解が進んでもこの値はほとんど変わらなかった。*B. nummlaria* WD 243とWD 480, *G. platystoma* WD 348, *U. deusta* WD 438とWD 488は0.4~0.6であり、*D. concentrica* WD 349, *H. truncatum* WD 434, *U. craterium* IFO 30137は0.2~0.3であった。

供試した子のう菌数種によるリグニンモデル化合物IとIIに対する分解率を表5に示した。*B. nummlaria* WD 243, *D. concentrica* WD 349, および*G. platystoma* WD 348はDuncanの培地での方が分解力が大きかった。*U. deusta* WD 438はDuncanの培地、Kirkの培地の両方で化合物IとIIを分解したが、化合物IIをよりよく分解した。*U. craterium* IFO 30137はDuncanの培

Table 5. Degradation of lignin-related compound I and II by ascomycetous fungi.

		Compound I						Compound II					
		Duncan			Kirk			Duncan			Kirk		
		15	30	45	15	30	45	15	30	45	15	30	45
<i>B. nummularia</i>	WD 243	+*	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>D. concentrica</i>	WD 349	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>G. platystoma</i>	WD 348	+	+	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	WD 357	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. aquila</i>	WD 496	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>U. deusta</i>	WD 438	-	+	++	-	+	+	++	++	++	++	++	++
<i>U. craterium</i>	IFO 30137	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	++

\* Percent substrate degradation after indicated incubation days.

Incubation days were 20, 30, and 40 days.

I: 4-Ethoxy-3-methoxyphenylglycerol-β-guaiacyl ether.

II: 1-(3',4'-dimethoxyphenyl)-1,3-dihydroxy-2-(4"-methoxyphenyl) propane.

-: 0-20 %, +: 21-40 %, ++: 41-60 %.

Table 6. Phenol oxidase reaction by ascomycetous fungi in Duncan's medium containing glucose or glucose and sawdust.

		Glucose	Glucose + sawdust
<i>B. nummularia</i>	WD 243	+ <sup>†</sup> weak	+ weak
	WD 480	-	-
<i>D. concentrica</i>	WD 349	-	-
<i>G. platystoma</i>	WD 348	+	+
<i>H. truncatum</i>	WD 434	-	-
	WD 497	-	-
<i>U. deusta</i>	WD 438	+	+
	WD 488	+	+
<i>C. geaster</i>	IFO 30658	+	+
<i>U. craterium</i>	IFO 30137	+	+

<sup>†</sup> +: Positive reaction, -: negative reaction.

Glucose concentration was 0.25%. (for glucose or glucose and sawdust medium).

地ではいずれの化合物も分解しなかったが、Kirkの培地では化合物IIを分解した。*G. platystoma* WD 357と*R. aquila* WD 496はブナ辺材に対する分解力が小さかったことから、2種のモデル化合物に対する分解力はほとんど認められなかった。

グルコース (0.25%) のみとグルコースとブナ木粉を添加した培地でのフェノールオキシダーゼ反応の結果を表6に示した。*B. nummularia* WD 243はわずかに着色した。*G. platystoma* WD 348, *U. deusta* WD 438とWD 488, *C. geaster* IFO 30658, *U. craterium* IFO 30137は着色し、フェノールオキシダーゼ活性が認められた。*B. nummularia* WD 480, *D. concentrica* WD 349, *H. truncatum* WD 434とWD 497はいずれの培地でも活性を示さなかった。

### 考察

種々な軟腐朽菌の木材分解力を評価するために、担子菌に対して用いられてきた培養基は適さないことが

報告された<sup>35)</sup>。そこでDUNCANは*Chaetomium* sp.を含む子のう菌や*Graphium* sp.を含む不完全菌など数種の軟腐朽菌を用いて、窒素源やグルコース濃度を検討した<sup>30)</sup>。それ以後、その培地が主に子のう菌や不完全菌による軟腐朽菌に対してDuncanの培地として用いられてきた<sup>20, 36)</sup>。また強力なリグニン分解菌である担子菌の白色腐朽菌*Phanerochaete chrysosporium*を用いて、リグニンモデル化合物の二酸化炭素への代謝を調べるために培養条件が検討された<sup>31)</sup>。これはKirkの培地として、それ以後担子菌の白色腐朽菌や褐色腐朽菌のリグニン分解機構を解明するために用いられてきた<sup>34, 37)</sup>。TANAKAら<sup>20)</sup>は子のう菌の*Chaetomium* sp.と*Xylaria* sp., 不完全菌の*Graphium* sp.を用いて種々の条件下で軟腐朽機構を検討した。その結果、クロサイワイタケ目の*Xylaria* sp.はKirkの培地でもある程度の分解力を示したが、*Chaetomium* sp.と*Graphium* sp.はDuncanの培地で分解力が大きかった。これらのことから白色腐朽を起こすといわれるクロサイワイタケ目に属する子のう菌は、担子菌の白色腐朽菌に適した培地でもある程度木材を分解できるものと思われる。しかし他の子のう菌や不完全菌はKirkの培地では木材をあまり分解せず、Duncanの培地を用いて調べる必要がある。

供試した子のう菌の大部分は、Duncanの培地とKirkの培地の両方、あるいはいずれかでブナ辺材をよく、あるいはある程度分解した。ただし実験に用いたいずれの培地上でも生育が悪かった*R. aquila* WD 353とWD 496は、ブナ辺材をわずかししか分解できなかった。*D. concentrica* WD 227, *G. platystoma* WD 357は培地上で生育し、口紙はよく分解したが、ブナ辺材をほとんど分解できなかった。しかしABE<sup>19)</sup>は木片の大きさや培養条件は異なるが、*D. concentrica* WD 227と

*R. aquila* WD 496を用いて、ブナなどの広葉樹材に6ヶ月間で約50%の質量減少が起こることを報告した。*G. platystoma* WD 348はDuncanの培地でブナ辺材をよく分解したが、質量減少を全く示さない木片もあった。一般に軟腐朽菌は担子菌より水分含量の高い条件下で木材を分解するとされているが、ABE<sup>19)</sup>の実験によるとクロサイワイタケ科とシトネタケ科に属する子の菌の菌糸伸長は、*Trametes versicolor*などの白色腐朽菌より低水ポテンシャルに耐性であった。さらに木材の含水率を26~28% (低), 38~44% (中), 61~86% (高) とし分解させたところ、大部分の子の菌類が低含水率の材で最大の質量減少を起こした。*T. versicolor*は中程度の含水率の材で最大の質量減少を起こした。このことからある程度の水分があれば、供試菌は木材を分解できるものと思われる。この実験では培地の表面半分くらいを菌糸がおおった後、まだ培地が見えた状態のとき木片を設置したので、培地の水分を木片が吸収し、ある程度の含水率に達したため木材が分解されたものと考えられる。

セルロース基質である口紙は供試したほとんどの菌が両方の培地あるいはいずれかの培地でよく分解した。*R. aquila* WD 496は両方の培地で、*R. aquila* WD 353はDuncanの培地でほとんど分解せず、また*G. platystoma* WD 348は両方の培地で10%前後と他の菌にくらべ質量減少が低かった。*R. aquila* WD 353とWD 496については培養条件が適当でなかったものと考えられる

リグニン分解に関しては質量減少率(WL)に対するリグニン減少率(LL)の値が白色腐朽菌のように1.0になるものではなく、一番高いもので*B. nummularia* WD 243のWL 50.2%のとき、LLが30.0%でLL/WLは0.6であった。WD 243はWLが14.5%のときはLLが3.0%で0.21、その後腐朽が進むにこの値がつれて高くなり、リグニンが分解されていることが示された。*D. concentrica* WD 347はWLが13.2%から32.7%へと増加してもLL/WLの値はほとんど変わらず0.26~0.30であり、リグニンに対する分解力は低かった。*G. platystoma* WD 348はDuncanの培地で微生物にとって難分解性の $\beta$ -O-4結合をもつIの方をよく分解した。このことはWD 348はLL/WLが他の菌にくらべ高く、木材中のリグニン分解が高かったことと一致する。しかもこの菌は2種の培地上での口紙に対する質量減少率が10%前後と低く、選択的にリグニンを分解する白色腐朽菌の*Poria subacida*に類似していた<sup>27)</sup>。以上のことから供試菌はセルロースをよく分解し、リグ

ニンもある程度あるいはかなり分解することがわかった。LL/WLは以前報告した子の菌の*Xylaria* sp.よりも低く、不完全菌の*Graphium* sp.より高く、軟腐朽菌の代表とされる*Chaetomium* sp.に近い値であった。ABE<sup>19)</sup>は数種のクロサイワイタケ目に属する子の菌を用いた実験から、それらの菌類は白色腐朽、褐色腐朽、軟腐朽のどのパターンにも適合せず、リグニン分解力はこれらの中間であるとしている。NILSSONら<sup>17)</sup>はやはりクロサイワイタケ科の子の菌を用いた実験から、パインの仮道管を侵食できないこと、カバのミドルメラを分解できないことから白色腐朽とは異なるとし、パインやカバの細胞壁にcavityをつくることから典型的な軟腐朽であるとした。しかし多糖類をよく分解し、リグニンも分解する点では白色腐朽に類似するとした。そしてシリギルリグニンをグアイアシルリグニンよりよく分解し、cavity形成菌のみがグアイアシルリグニンを分解できるとしたが、このようなリグニンの分解に関与する酵素系については報告されていない。

不完全菌の*Trichoderma*のような菌類は結晶性セルロースを分解できる完全なセルラーゼ系(エンド型 $\beta$ -1,4-グルカナーゼ, エキシ型 $\beta$ -1,4-グルカナーゼ, 別名セロビオヒドロラーゼ,  $\beta$ -グルコシダーゼ)をもっているにもかかわらず木材を分解できない。木材中のセルロースにセルラーゼ系が接近し加水分解を行うためには、セルロースマイクロフィブリルをおおっているリグニンをあらかじめ変質・除去することが必要である。我々の研究室での種々の白色腐朽菌と褐色腐朽菌を用いた現在までの研究結果から、一般に白色腐朽菌ではセルロースは完全なセルラーゼ系で分解・代謝され、リグニンは水酸化ラジカルと少なくとも一種類のフェノールオキシダーゼの協同作用で分解されると考えられる<sup>25, 28, 29)</sup>。一方、褐色腐朽菌は木材が存在すると木材細胞壁で多量の水酸化ラジカルを生成し、この水酸化ラジカルとエンド型 $\beta$ -1,4-グルカナーゼで木材細胞壁中のセルロースを分解・代謝する<sup>24, 26, 27)</sup>。

供試菌の一電子酸化活性はグルコース培地の方が木粉添加培地より高く(結果は示さず)、白色腐朽菌や褐色腐朽菌、軟腐朽を起こす不完全菌で認められた一電子酸化活性と木材分解に相関関係は認められなかった。供試菌が木材のセルロースを分解するためには何らかのリグニン分解系が存在していることが必須で、実際数種の供試菌はリグニンをかなり分解していた。そこで供試した菌はフェノールオキシダーゼ系の

酵素を分泌するものと考えられた。フェノールオキシダーゼ活性は培地にフェノール性基質を混入した場合、*Chaetomium* sp. と *Xylaria* sp. は陽性であり、陰性であった *Graphium* sp. より LL/WL が高かった<sup>20)</sup>。しかし *Graphium* sp. も木片を添加して培養後フェノール性基質溶液を添加して反応させるとフェノールオキシダーゼ活性が検出された<sup>21)</sup>。また子のう菌や不完全菌の場合、白色腐朽菌の場合よりも培地に混入する基質の濃度を高くしないと陽性を示さない場合もあった<sup>38)</sup>。したがって今回の供試菌の中で陰性を示したのもも検出方法を検討すると陽性になるものと考えられる。事実 ABE<sup>19)</sup> によると、*B. nummularia* WD 480, *D. concentrica* WD 349, *H. truncatum* WD 434, WD 497 はいくつかの基質に対しては反応陽性であり今回の結果とは異なっていた。HALE と EATON<sup>7)</sup> は電顕観察によって細胞内腔から細胞壁へ侵入する細い菌糸の先端周辺部は、酢酸ウラニル染色などによって電子密度が高い部分がハローのように存在し、この部分でリグニンに作用する系が働いているとしている。しかしどのような物質が作用するかは明らかにされていない。

軟腐朽を起こす不完全菌は木材が存在すると一電子酸化活性が高いこと、質量減少率に対するリグニン減少率が低いことから褐色腐朽に類似する。ただし木材が存在するとフェノールオキシダーゼ活性を示す。大型の子実体をつくる子のう菌きのこは質量減少率に対するリグニン減少率が白色腐朽菌に比べて低いが、褐色腐朽菌や軟腐朽を起こす不完全菌よりは高く、木材の存在に関わらずフェノールオキシダーゼ活性が認められる点からは白色腐朽に類似する。しかし多数の報告にみられるように不完全菌、子のう菌ともに細胞壁に特徴的な cavity を形成し、木材を分解するときはフェノールオキシダーゼ活性を示すことから担子菌以外によって起こる腐朽ということで軟腐朽とするのが適当であろう。分解されやすい樹種では白色腐朽のような erosion 型の腐朽もみられるが、侵入菌糸のごく近傍が分解されることから、一電子酸化活性を示す水酸化ラジカルも多量に必要とせず、フェノールオキシダーゼ活性も白色腐朽菌に比べて低く、また拡散性なども低いのかも知れない。軟腐朽を起こす不完全菌 *Graphium* sp. を、木片添加培地で培養したときのフェノールオキシダーゼ活性は主にラッカーゼによるものであった<sup>39)</sup>。現在その酵素を分離・精製し、その化学的・物理的諸性質を検討中である。今後、大型の子実体をつくる子のう菌きのこからもフェノールオキシダーゼ活性を示す酵素を分離・精製し、白色腐朽菌の

酵素との比較検討によって、軟腐朽機構をさらに解明する予定である。

## 要約

数種の核菌綱と盤菌綱に属する子のう菌を用いてブナ木片、口紙、リグニンモデル化合物に対する分解力を検討した。さらにブナ木片中のリグニンに対する分解、リグニン分解酵素であるフェノールオキシダーゼ活性、担子菌の木材分解と相関関係にある一電子酸化活性を測定した。供試菌の大部分はブナ木片に対して3ヶ月間で10%～47%、口紙に対して60%～90%の質量減少率を示した。ブナ木片中の質量減少率に対するリグニン減少率の割合は白色腐朽菌に比べて低く、高いものでも0.6であった。この割合の高いものはリグニンモデル化合物をよく分解し、フェノールオキシダーゼ活性も高かった。一電子酸化活性は担子菌や軟腐朽を起こす不完全菌の木材分解と相関関係が認められるが、供試菌では認められなかった。

## 引用文献

- 1) J. G. SAVORY: *Ann. Appl. Biol.*, 41, 336-347 (1954)
- 2) N. H. CORBETT: *J. Inst. Wood Sci.*, 14, 18-29 (1965)
- 3) J. F. LEVY: *Mater. Org. Suppl. Holz und Organismen*, 1, 55-60 (1966)
- 4) W. LIESE: *Ann. Rev. Phytopathol.*, 8, 231-258 (1970)
- 5) F. CASAGRAN and G. B. OUELLETTE: *Can. J. Bot.*, 49, 155-159 (1971)
- 6) M. D. HALE and R. A. EATON: *Trans. Br. mycol. Soc.*, 84, 227-288 (1985)
- 7) M. D. HALE and R. A. EATON: *Mycologia*, 77, 447-463 (1985)
- 8) M. D. HALE and R. A. EATON: *Mycologia*, 77, 594-605 (1985)
- 9) F. W. M. R. SCHWARZE, D. LOSSDALE, and C. MATTHECK: *Eur. J. For. Path.*, 25, 327-341 (1995)
- 10) T. NILSSON: *Studia Forestalia Suecica*, No. 117, pp. 18-22 (1974)
- 11) J. G. SAVORY and L. C. PINION: *Holzforschung*, 12, 99-103 (1958)
- 12) M. P. LEVI and R. D. PRESTON: *Holzforschung*, 19, 183-190 (1965)
- 13) M. P. LEVI: *Mater. Org.*, 1, 119-126 (1965)

- 14) K. SEIFERT: *Holz als Roh-und Werkstoff*, 24, 185-189 (1966)
- 15) W. E. ESLYN, T. K. KIRK, and M. J. EFFLAND: *Phytopathology*, 65, 473-476 (1975)
- 16) J. B. SUTHERLAND and D. L. GRAWFORD: *Trans. Br. mycol. Soc.*, 76, 335-337 (1989)
- 17) T. NILSSON, G. DANIEL, T. K. KIRK, and J. R. OBST: *Holzforschung*, 43, 11-18 (1989)
- 18) W. MERRILL, D. W. FRENCH, and F. A. WOOD: *Phytopathology*, 54, 56-58 (1964)
- 19) Y. ABE: *Trans. Mycol. Soc., Japan*, 30, 169-181 (1989)
- 20) H. TANAKA, G. FUSE, and A. ENOKI: *Mater. Org.*, 27, 157-170 (1992)
- 21) H. TANAKA, S. ITAKURA, and A. ENOKI: *Holzforschung*, 54, 463-468 (2000)
- 22) R. L. KELLY and C. A. REDDY: *Biochem. J.*, 206, 423-425 (1982)
- 23) H. TANAKA, A. ENOKI, and G. FUSE: *Mokuzai Gakkaishi*, 32, 125-135 (1986)
- 24) A. ENOKI, H. TANAKA, and G. FUSE: *Wood Sci., Technol.*, 23, 1-12 (1989)
- 25) H. TANAKA, G. FUSE, and A. ENOKI: *Mokuzai Gakkaishi*, 37, 986-988 (1991)
- 26) A. ENOKI, T. HIRANO, and H. TANAKA: *Mater. Org.*, 27, 247-261 (1992)
- 27) T. HIRANO, H. TANAKA, and A. ENOKI: *Mokuzai Gakkaishi*, 41, 334-341 (1995)
- 28) H. TANAKA, S. ITAKURA, T. HIRANO, and A. ENOKI: *Holzforschung*, 50, 541-548 (1996)
- 29) H. TANAKA, S. ITAKURA, and A. ENOKI: *J. Biotechnol.*, 75, 57-70 (1999)
- 30) C. G. DUNCAN: U. S. Dept. Agriculture, Forest Service. *Research Paper FPL 48*, 12pp. (1965)
- 31) T. K. KIRK, E. SCHULTZ, W. J. CONNORS, L. F. LORENZ, and J. G. ZEIKUS: *Arch. Microbiol.*, 117, 277-285 (1978)
- 32) A. ENOKI, G. P. GOLSBY, and M. H. GOLD: *Arch. Microbiol.*, 125, 227-232 (1980)
- 33) A. ENOKI and M. H. GOLD: *Arch. Microbiol.*, 132, 123-130 (1982)
- 34) A. ENOKI, H. TANAKA, and G. FUSE: *Mokuzai Gakkaishi*, 31, 397-408 (1985)
- 35) C. G. DUNCAN: U. S. Dept. Agriculture, Forest Service, Forest Product Laboratory. *Research Paper No.* 2173, 28pp. (1960)
- 36) H. LUNDSTRÖM: Royal College of Forestry, Stockholm, Dept. Forest Products, *Research Note R. 87*, 23pp. (1973)
- 37) A. ENOKI, H. TANAKA, and G. FUSE: *Holzforschung*, 42, 85-93 (1988)
- 38) 田中裕美、板倉修司、榎 章郎：第48回日本木材学会大会研究発表要旨集 p.436 (1998)
- 39) H. TANAKA, S. ITAKURA, and A. ENOKI: *Biocontrol Science*, 5, 39-46 (2000)