

樹木の生分解過程における微量金属元素の挙動 - 第3報 -

渡部久哉 小藤田久義 太田路一 世良耕一郎* ニツ川章二**

岩手大学農学部

020-8550 盛岡市上田 3-18-8

*岩手医科大学サイクロトロンセンター

020-0173 滝沢村留が森 348-58

**日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター

020-0173 滝沢村留が森 348-58

1 はじめに

担子菌を始めとする木材腐朽菌はセルロースやリグニンなどの樹木成分を分解することにより森林の木質性堆積物を土壌に還元する。このような樹木成分の生分解にはある種の特定元素が重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながらこのような微量金属の腐朽過程での量的変化や必要とされる元素の種類およびその量についての報告はあまり認められない。本研究では菌の種類や腐朽の程度と特定元素の蓄積量との関係を明らかにするため、数種の木材腐朽菌を用いて *in vivo* での木材腐朽試験を行い、その過程での微量元素の量的変動について検討を行ってきた。これまでに、おもにリグニン分解酵素に密接に関わるとされる Mn¹⁾、Fe¹⁾、Cu²⁾ など金属元素について腐朽組織における濃度変化を調べるとともに、金属を抽出除去した木粉を用いた培養を行い、金属欠乏の条件下での金属輸送能力について調査をおこなった。今回は同様の条件下で腐朽処理をさらに長期化した場合での金属元素の挙動変化について検討した。

2 実験方法

2.1 試料

岩手大学付属演習林において伐採したブナ (*Fagus crenate*) の辺材を粉碎し、40~100mesh に篩い分けしたものを腐朽試験に用いた。供試菌には白色腐朽菌として *Phanerochaete chrysosporium* ATCC34541、*Coriolus versicolor* K-2615 (カワラタケ)、*Pleurotus ostreatus* K-2965 (ヒラタケ)、褐色腐朽菌として *Lentinus lepideus* IF030750 (マツオオジ) を用いた。

白色腐朽菌は京都大学木質研究所、桑原正章教授より、また褐色腐朽菌は（財）発酵研究所よりそれぞれ分与された。各菌株はポテトデキストロース寒天斜面培地を用いて培養したのち4で保存した。

2.2 EDTA 処理による木粉の金属イオンの除去

200gの木粉に4lの0.5%EDTA・2Naを加え、60に加熱した後、内容物を攪拌しながら一晩放冷した。内容物をブフナー漏斗で吸引ろ過し、濾過後の残渣木粉を8lの純水で9回洗浄した後、37で乾燥したのち、含有金属量をPIXEにて測定した。ブナ木粉にEDTA処理を施すことにより、CaとAlを除く主要な金属についてはブナ材中に含まれる量の70%以上が抽出除去された。

2.3 培養による腐朽処理

培地中の微量元素が非生物的に木粉へ浸透・拡散することがないように、図1に示した培養装置を用い、木粉と培地の直接的な接触を避けて培養を行った。腐朽菌の接種は寒天斜面培地より掻き取った保存菌の菌糸を乳鉢を用いて断片化し、滅菌水に懸濁して培地に加えることにより行った。数日間培養後、寒天培地上に菌糸が蔓延してからガラスビーズと木粉3gの入った内管をクリーンベンチ内で置床し、温度25、湿度85%にて所定期間木粉の腐朽処理を行った。寒天培地にはKirkの標準培地³⁾を元に無機塩濃度をブナ材と同じになるように調節したものを、一試験管あたり12mlを分注した。

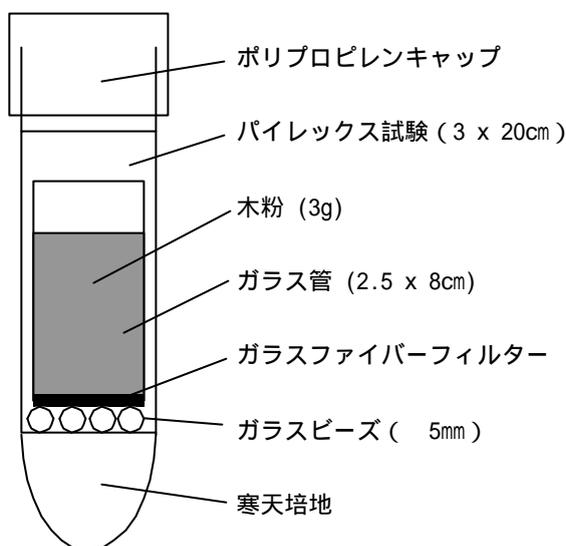


図1 腐朽試験用培養装置

2.4 分析

残存木粉量の測定は所定期間培養後に内管を取り出し、そのまま105にて乾燥、秤量することで行った。乾燥後の木粉300mgを磁性坩堝に採取し、電気炉を用いて600で6時間加熱して試料を灰化した。灰化試料を濃硝酸1.0mlに溶解し、内部標準としてIn100μgを添加してからマイラーフィルムに5μlを滴下乾燥してPIXE分析に供した。PIXE分析は日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンターにて行った。

3 結果

3.1 腐朽菌処理による木粉培地の重量減少

各菌株による腐朽処理により、未処理ブナ木粉では6ヶ月で20~30%程度の重量減少率を示した(図2)。これに対してEDTA処理木粉では、全菌株において腐朽の進行が抑制された。最も強くEDTA処理の影響を受けたのはP. chrysosporiumであった。次いでヒラタケに対する影響が

大きく、これら 2 種の白色腐朽菌は金属の除去によって木粉の生分解速度が大幅に低下したと考えられる。一方、同じ白色腐朽菌でもカワラタケは EDTA 処理の影響をあまり受けなかった。また、褐色腐朽菌のマツオオジでは EDTA 処理により重量減少量が半減し、*P. chrysosporium* やヒラタケほどではないが、ある程度の影響を受けていた。

腐朽菌の培養期間をさらに長期化し、15 ヶ月間腐朽処理したときの培地重量減少率を図 3 に示した。長期間の腐朽における EDTA 処理の影響は 6 ヶ月間の場合とは異なり、特に大きな影響があった白色腐朽菌 2 菌株のうち、ヒラタケでは依然として腐朽の進行が認められなかったのに対して、*P. chrysosporium* では重量減少速度が急激に回復した。対照的に 6 ヶ月間の腐朽処理においてあまり影響を受けなかったカワラタケにおける重量減少が頭打ちとなり、結果的には EDTA 処理木粉培地において *P. chrysosporium* とカワラタケは同程度の重量減少率を示した。褐色腐朽菌のオオウズラタケは培養の長期化にともない、EDTA 処理による影響はほとんど消失した。

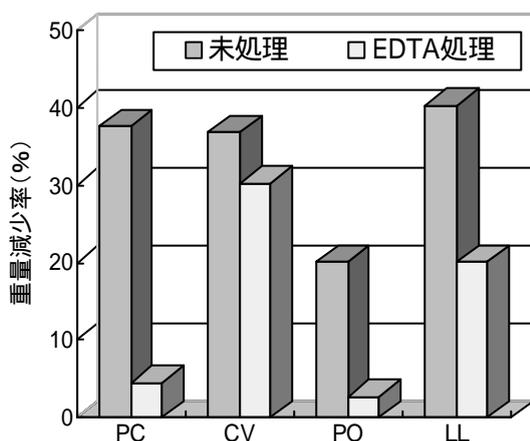


図 2 培養 6 ヶ月間の培地木粉減少率
PC: *P. chrysosporium*, CV: カワラタケ
PO: ヒラタケ, LL: マツオオジ

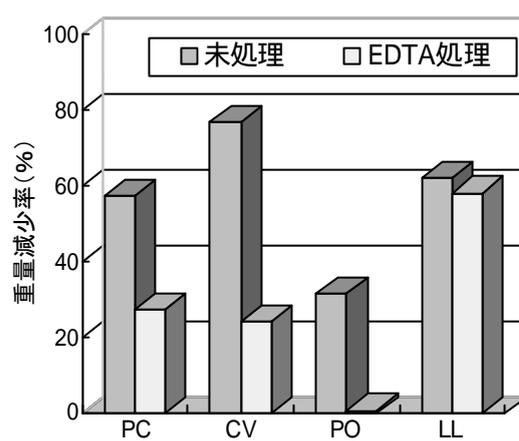


図 3 培養 15 ヶ月間の培地木粉減少率
PC: *P. chrysosporium*, CV: カワラタケ
PO: ヒラタケ, LL.: マツオオジ

3.2 木粉の腐朽過程における微量金属元素量の変化

6 および 15 ヶ月間培養した腐朽木粉中の主要金属含有量を表 1 に示す。まず、未処理のブナ木粉を用いて培養したときの微量金属元素量の変化について述べる。リグニン分解酵素に密接に関わるとされる 3 種の金属元素のうち、Mn はいずれの菌株においても特に大きな変化は認められなかった。Fe は 15 ヶ月目の *P. chrysosporium* の腐朽木粉中に培養開始時に対して 2 倍量の蓄積が認められたが、その他では腐朽後の顕著な蓄積は認められなかった。Cu では 3 種の白色腐朽菌いずれにおいても蓄積が認められ、培養開始時の量に対して、カワラタケでは 6 および 15 ヶ月間、その他の菌においては 15 ヶ月間の腐朽木粉において 3~4 倍量の Cu が蓄積されてい

た。その他の元素のなかではZnとAlが全ての菌株において蓄積が認められ、最も大量に蓄積されたカワラタケの培地ではいずれも培養開始時の10倍以上に達した。これらを除いた元素については、特に著しい何らかの傾向は認められなかった。

次いでEDTA処理木粉を用いて同様に腐朽させた培地における微量金属元素量の変化について述べる。本条件では多くの金属元素が欠乏状態となり、腐朽に関する代謝に必要な元素は寒天培地から菌糸を経由する輸送によってのみ補給される。15ヶ月間の培養を行なってEDTA処理木粉を腐朽させた場合のMn量は、菌株によって著しい違いが認められた。最も大量の蓄積が認められたのは*P. chrysosporium*であり、6ヶ月目以降急激に増加して15ヶ月目にはEDTA処理前の木粉を超える量の蓄積が観察された。これに続いてマツオオジ、カワラタケによるMn蓄積量が多かったが、ヒラタケでは培養開始時からの濃度変化は認められなかった。FeおよびCuについても*P. chrysosporium*では6ヶ月目以降に蓄積が急激に進行していることが観察され、他の菌株ではマツオオジによるCuの蓄積を除いて特に顕著な増加は認められなかった。その他の元素ではZn、AlおよびKがヒラタケを除く全菌株で蓄積されたが、CaおよびMgではむしろ減少傾向を示した。

表1 腐朽木粉の主要金属含有量 (µg/culture)

	Mn	Fe	Cu	Zn	Ca	Mg	Al	K
未処理ブナ木粉	166.1	38.0	4.7	7.7	3453.1	927.9	7.0	1565.9
培養6ヶ月								
<i>P. chrysosporium</i>	255.2	29.4	7.1	40.1	2580.8	418.7	36.0	1788.1
カワラタケ	227.9	53.7	16.3	34.6	5349.7	808.0	26.9	3931.5
ヒラタケ	104.4	26.2	5.0	14.1	2334.6	460.1	35.4	2168.6
マツオオジ	135.2	26.7	6.0	39.5	2649.8	375.2	10.5	1519.2
培養15ヶ月								
<i>P. chrysosporium</i>	189.6	96.0	14.5	85.7	2466.0	528.7	119.6	1612.8
カワラタケ	140.0	35.5	16.5	28.3	2151.4	1053.1	81.2	1826.8
ヒラタケ	141.5	27.5	19.1	35.0	3377.5	892.9	42.6	2501.7
マツオオジ	139.0	52.1	8.3	24.8	2495.7	361.1	50.9	1191.2
EDTA処理木粉	0.5	10.7	0.4	0.4	1049.2	197.6	8.0	127.0
培養6ヶ月								
<i>P. chrysosporium</i>	10.8	13.7	1.0	35.4	744.1	136.6	25.3	498.0
カワラタケ	1.7	12.8	5.8	11.3	820.5	99.3	27.6	652.0
ヒラタケ	1.0	11.9	2.0	7.7	875.0	112.3	14.5	691.2
マツオオジ	5.8	14.3	4.4	12.5	855.7	103.7	31.2	337.9
培養15ヶ月								
<i>P. chrysosporium</i>	175.3	36.8	8.4	81.0	783.7	247.0	92.8	690.6
カワラタケ	28.7	8.6	4.1	11.9	837.8	157.9	17.4	606.9
ヒラタケ	0.8	19.2	0.6	3.1	959.8	166.1	5.7	280.2
マツオオジ	48.0	18.5	15.3	9.9	863.0	104.2	18.9	222.8

4 考察

本研究では白色腐朽菌および褐色腐朽菌に分類される木材腐朽菌を用いて腐朽試験を行い、培地木粉および培地木粉中のリグニン重量の変化と微量金属元素の動態変化を調べた。

長期間の培養後に得られた腐朽木粉のPIXE分析の結果、全菌株においてZnおよびAlの著しい蓄積が認められた。Znはいくつかの酵素や蛋白質の補欠分子族となり、DNAの複製に関わる必須元素としても重要である⁴⁾。今回培地木粉中に大量のZn蓄積が認められたことは、菌体の増殖およびエネルギー生産のために本来ブナ材に含まれているZn量では不足であり、寒天培地からのZnの輸送が必要になったと考えられる。Alの蓄積については、その生理学的意義は定かではないが、腐朽菌の代謝において何らかの役割を果たしている可能性がある。

白色腐朽菌によるリグニンの生分解に大きく関与する3種の元素、すなわちMn、FeおよびCuの動態変化についてみると、Mn量にはほとんど変化がなく、Feは*P. chrysosporium*においてのみ未処理木粉の2倍量となり、Cuは最終的に白色腐朽菌3菌株において未処理木粉の3~4倍量の蓄積が認められた。リグニン分解酵素の一つであるラッカーゼはその構造中にCuを含むことが知られているが、ブナ木粉中ではCuの含有量が比較的少ないので、不足分を補うために寒天培地から積極的な輸送が行われたものと思われる。

EDTA処理木粉を用いた金属欠乏の条件下でのMn、Fe、Cuの輸送に関しては、いずれの元素についても*P. chrysosporium*の培地において6ヶ月以降に著しい蓄積が認められた。本条件下での*P. chrysosporium*における木粉重量減少率も、同様に6ヶ月以降に著しい上昇を示したことから、本菌株は腐朽の過程である種のシグナルによりこれら必須元素の輸送を開始し、その後急速に木材成分の分解酵素系が活性化するものと考えられる。一方、EDTA処理により最も腐朽が抑制されたヒラタケはMnおよびCuの輸送能力が乏しく、これら金属元素が不足したことにより生分解能力も低下したものと思われる。

5 参考文献

- 1) M.H.Gold, K. Wariishi and K. Valli: Biocatalysis in agricultural Biotechnology, American Chemical Society, p128-140 (1989)
- 2) R. Blauch and K. Esser: Arch. Microbiol., 103, 271-277 (1975)
- 3) T. K. Kirk, E. Shultz, W. J. Connors, L. F. Lorenz and J. G. Zeikus: Arch. Microbiol., 117, 227-285 (1978)
- 4) S. J. Lippard and J. M. Berg: 生物無機化学(松本和子監訳) 東京化学同人、東京(1977)