

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03051

研究課題名（和文）褐色腐朽で生ずる微弱なバイオフィトン現象の究明と木材保存を志向した利活用

研究課題名（英文）Ultra-weak photon emission due to fungal wood decay by brown rot fungi and the possible application aiming for wood preservation

研究代表者

西村 健（Takeshi, Nishimura）

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：10353799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

研究成果の概要（和文）：褐色腐朽菌の酸化的な糖分解機構として想定されているフェントン反応のモデル反応系を構築し、本系からの極微弱光の放出を確認する事で、本反応がバイオフィトンの発光源となる可能性を提唱した。さらに、ESRによるラジカル解析ならびに発光スペクトル解析を行い、その発光メカニズム（励起発光種の生成機構）を考察した。モデル反応系への痕跡量のフタル酸ヒドラジドの添加によって、劇的に強い光の放出を確認した。強制腐朽試験と野外杭試験に基づく腐朽試料を用いて発光データを蓄積し（併せて質量減少率、腐朽被害度等）、微弱発光検出はPCRとともに腐朽菌に対する極めて高い検出感度を持つ事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木材腐朽性担子菌による腐朽木部からのバイオフィトン（目視不能な微弱生物発光）についての知見は極めて少なく、先行研究のない褐色腐朽について新たな知見が得られた学術的意義は大きい。腐朽を早期に発見しこれに対処したメンテナンスを施すことは、木造建造物の保護と長寿命化、さらに木材はCO2固定材料である事から地球温暖化防止の観点から重要であり、木材腐朽の超高感度な検出手法の開発はこの点で大いに意義がある。本研究の内容は、令和3年6月15日に閣議決定された「森林・林業基本計画」に示される（3）都市等における木材利用の促進の中の公共建築物・民間非住宅・土木分野等への利用拡大に対応した取り組みでもある。

研究成果の概要（英文）：Extremely weak light emission, essentially chemiluminescence (CL) was observed from model reaction system of Fenton's reaction that oxidatively degrade carbohydrate, as well as from artificially prepared decayed wood specimens by a brown-rot fungus, *Fomitopsis palustris*. Fenton's reaction is suggested to be a source for extremely weak biophoton in brown-rot fungi. ESR analysis of the model reaction system revealed the presence of hydroxyl radical. Based on chemiluminescence spectra of decayed wood specimen and model reaction system, mechanism of light emission via reported oxidative pathways was considered. External addition of phthalhydrazide to the model reaction system was effective to gain much stronger light emission. Data on light emissions were collected using decayed field stakes of *Cryptomeria japonica* sapwood and decayed wood specimens. Detection sensitivity of CL to fungal wood decaying by *F. palustris* was found to be very high as well as PCR.

研究分野：木材化学、木材保存

キーワード：褐色腐朽菌 バイオフィトン 化学発光 フェントン反応 オオウズラタケ 発光メカニズム 木材腐朽の微弱発光検出 PCRによる腐朽菌の検出

## 1. 研究開始当初の背景

腐朽を早期に発見しこれに対処したメンテナンスを施すことは、木造建造物の保護と長寿命化、さらに木材は CO<sub>2</sub> 固定材料であることから地球温暖化防止の観点からも重要な課題である。腐朽菌の遺伝子検出に基づく PCR 法、抗原抗体反応法に基づく IWD 法等の精密診断手法が開発されている中、研究代表者は木材の腐朽に伴ってその初期段階から微弱発光が放出される現象を見出し、これを手掛かりにした腐朽検出の新しい手法を研究してきた(西村、2019)。これまでに扱った腐朽菌は JIS 標準菌のオオウズラタケ等 10 数株であり、強制腐朽試験を利用した室内試験データに基づき、白色腐朽菌と比較し褐色腐朽菌による発光強度は極端に微弱である事が判明している。その発光挙動・メカニズムについては多くが未解明である

このような生き物が肉眼では感知できない微弱な光を放出する現象はバイオフィトンと呼ばれる。発光性キノコ子実体からの目視可能な生物発光(バイオルミネッセンス)については多く研究されているのに対し、同じキノコの仲間でありながら木材腐朽菌による腐朽木部からのバイオフィトンについての知見は極めて少ない。白色腐朽菌についての先行報告があるものの(渡辺&白井、2001) 褐色腐朽については代表者の研究を除けば皆無に等しい。バイオフィトンの本質は基本的に化学発光であり、化学発光には通常酸化反応が関与する。褐色腐朽菌由来の木材分解と関連した何らかの酸化反応が微弱発光現象に関わる事が推測され、このような反応として、褐色腐朽菌に想定されている酸化性的な木材糖(セルロース等)分解機構としてのフェントン反応( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$ )を挙げる事ができる。フェントン反応の生成物であるヒドロキシラジカル( $\cdot OH$ )は糖から水素を引き抜き、生成したカーボンセンターラジカルが転移やフラグメント化を起こし、セルロースなどの多糖は激しく分解し、セルロースと同じく木材の主要構成成分であるリグニンも部分的な変性を受けると考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究では、世界的にも研究例の少ない木材腐朽性のバイオフィトンを木材保存学の立場から重要視する。特に針葉樹材の害菌としても重要な褐色腐朽菌を対象に フェントン反応を想定した発光メカニズムを究明し、ルミノール等の発光試薬の活用も視野に入れた高感度な微弱発光検出手段を検討する。この上で、木材腐朽と発光挙動の関係を白色腐朽菌も含め明らかにし、微弱発光を手掛かりとした木材腐朽検出に関する有用性を探る。

## 3. 研究の方法

フェントン反応を想定した発光メカニズムの究明

セロオリゴ糖を基質としたフェントン反応によるセルロース分解のモデル反応系を構築し、光子計数(count/10s)とスペクトル取得を行う。電子スピン共鳴(ESR)によるラジカル解析を行い、その結果も踏まえ、発光メカニズムならびに褐色腐朽菌が木材分解にフェントン反応を利用する可能性について考察する。なお、微弱発光測定には超高感度フォトマルチプライヤーを備えた現有ケミルミネッセンスアナライザーを用いた(東北電子 CLD-100FC)。

「極めて微弱」な光を「格段に強い光」に変える方策の検討

フェントン反応の構成要素である過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)依存的に発光するルミノールやヒドロキシラジカル( $\cdot OH$ )の化学発光検出試薬としての報告があるフタル酸ヒドラジドの活用を検討する。これら試薬のモデル反応系や腐朽試験体表面への添加効果を、上述の CLD-100FC ならびにダイナミックレンジの広いコンパクトタイプルミノメーター(プロメガ Glomax20/20、本科研予算にて初年度に新規導入)を用いた発光試験によって検討する。

微弱発光を手掛かりとした超高感度かつ斬新な腐朽検出技術の開発

強制腐朽試験(試験体寸法:2×2×1cm)と野外杭試験で得た腐朽サンプルを活用し、発光強度・スペクトル、質量減少率、腐朽被害度等のデータを蓄積し、腐朽の進行程度と発光量との相関を把握する。比較感度試験には PCR を用い、野外杭試料についてはメタゲノム解析による微生物集団の把握も行う。腐朽菌の動態や生活環(子実体形成等)との関連も予測されるそのユニークな発光特性を把握するための予備的な調査も実施する。

## 4. 研究成果

フェントン反応によるセロオリゴ糖のモデル分解系を確立し(4 mM セロテトラオース / 20 mM Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / 4.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 0.05% Tween20 / 1 ml H<sub>2</sub>O ; TLC によって 2 時間で基質のおよそ半分程度が分解する事を確認)、反応の進行に伴い本反応系からの最大 80cps(count per second)程度の極微弱光が放出される事を確認した(図 1)。基質としてセロビオースやグルコースを用いた条件ならびにフェントン剤単独条件では、さらに微弱な光の放出が観測された。次いで、上記のセロテトラオースを基質としたフェントン反応による糖分解のモデル反応系(以後、単にモデル反応系と記す)におけるヒドロキシラジカルの生成を、ヒドロキシラジカルのトラップ剤として DMPO を用い、その ESR 吸収によって確認した。また、ESR のシグナル強度は微弱であるもののオオウズラタケ腐朽木粉(スギ)におけるラジカルの存在も確認した。図 2 に褐

色腐朽菌オオズラタケによる腐朽試験体ならびにモデル反応系からの発光スペクトルを示す。化学発光には基本的に酸化反応が関与する (Vassil'Ev *et al.*, 1962)。発光メカニズムとして、フェントン反応で生成したラジカル中間体がさらに  $O_2$  と反応し、図中バーで示した酸化機構を経て光を放つ (励起発光種の生成) 可能性が考えられる。腐朽試験体とモデル反応のいずれも 410-680nm の波長域で多分散的なスペクトルを示し、フェントン反応が褐色腐朽で生ずる微弱なバイオフォンの発光源である妥当性を示唆するものかもしれない。

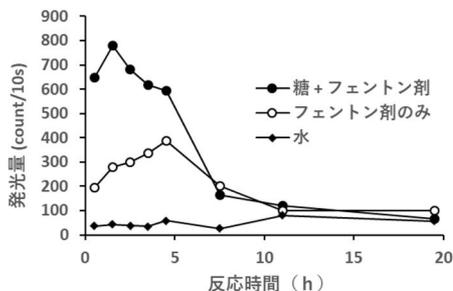


図1 フェントン系からの微弱化学発光

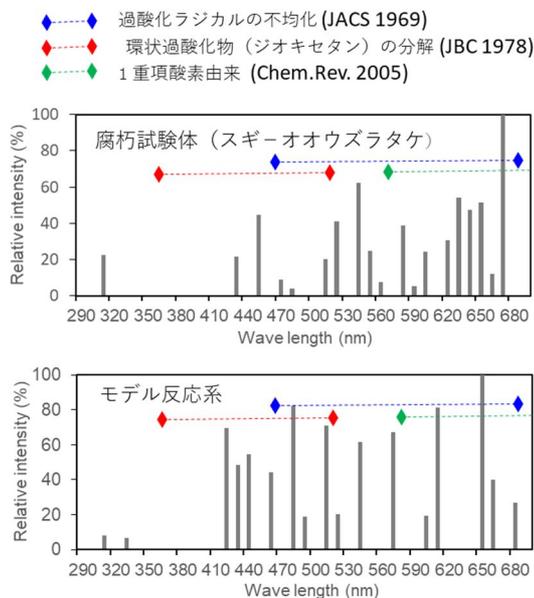


図2 発光スペクトル

**ルミノールの添加効果:** ルミノールの添加効果は、モデル反応系と褐色腐朽菌オオズラタケによる腐朽試験体表面(スギ)の双方に対して認められなかった。モデル反応を用いてルミノール添加時に反応剤や基質が発光強度に及ぼす影響について検討した結果、 $Fe_2SO_4$  を欠き  $H_2O_2$  が存在する系において顕著な発光が確認され、セロテラオースならびに Tween の存在はその発光強度を高める効果が認められた。フェントン反応における  $H_2O_2$  は 2 価鉄 ( $Fe_2SO_4$ ) との反応によって直ちに消失し、 $H_2O_2$  依存的なルミノールに基づく発光を阻害すると考えられる。**フタル酸ヒドラジドの添加効果:** モデル反応系を用いて検討した結果、反応液中 (1ml) に予め痕跡量のフタル酸ヒドラジド (0.1mg) を添加しておく事で、およそ 1 万倍の発光強度の光の放出が確認された (図3右下、さらに+B液でおよそ 10 万倍となる)。なお、発光試験は反応液 100  $\mu$ l に A 液 1 ml (+B液 100  $\mu$ l) を加え、ルミノメーター (Glomax20/20 プロメガ) を用いて行った。しかしながら、オオズラタケ腐朽試験体表面へのフタル酸ヒドラジドの添加効果は確認できず、ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) を生成するフェントン反応が褐色腐朽菌に本当に発現されているのか、その実在性や発現時期についての新たな課題が残された。

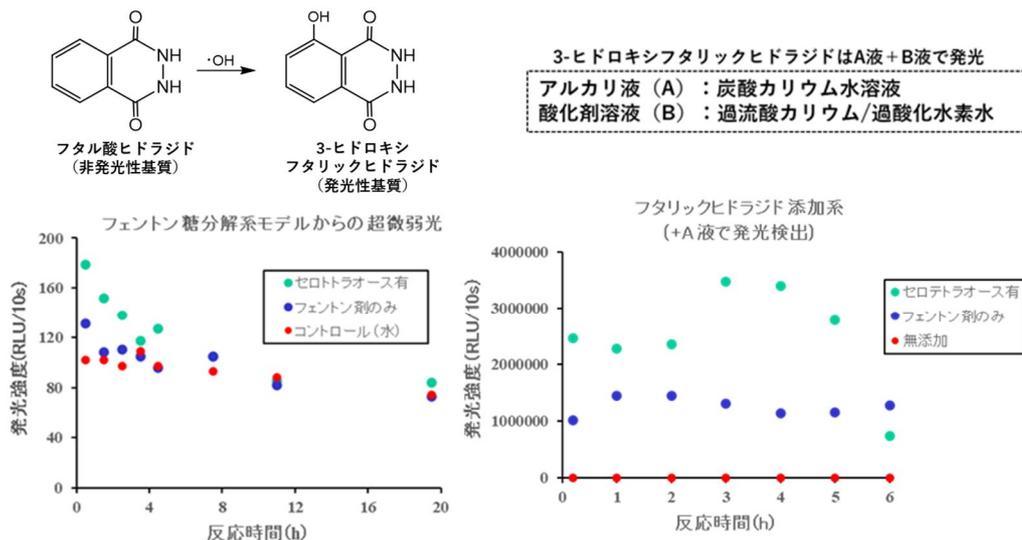


図3 フタル酸ヒドラジドの添加効果

**オオズラタケをモデル菌に用いた褐色腐朽の検出感度調査:** 質量減少率 (=腐朽の進行段階) の様々なオオズラタケ腐朽試験体を作製し、質量減少率 発光量の相関を調べた結果を図4に示す。全体的な傾向として発光量はブナよりもスギで高く、少なくともスギにおいては質量減少率 40%を超えない範囲で腐朽の極初期段階から微弱光の放出が有意に確認された。重度の腐朽試験体ならびにブナ腐朽試験体においては発光を示さないケース (健全材試験体と同レベル) も見られた。他方、PCR によって、腐朽の進行段階が 2 段階 (極初期の  $ML < 5\%$  と重度の  $ML > 30\%$ ) のオオズラタケ腐朽試験体 (スギ辺材) の粉末化試料から同菌の DNA を抽出し

た。さらに、様々な割合のオオウズラタケ菌体とスギ木粉の混合系試料を DNA 抽出材料に用いたところ、木粉に対する菌糸体粉末重量が 0.001% でも PCR によって検出可能であった (図 5 の 6)。DNA の抽出元となった腐朽試験体からの微弱発光も併せて確認しており、自然光 (バイオフォトン) を手がかりとする微弱発光検出と PCR 双方の高い検出感度が明らかとなった。

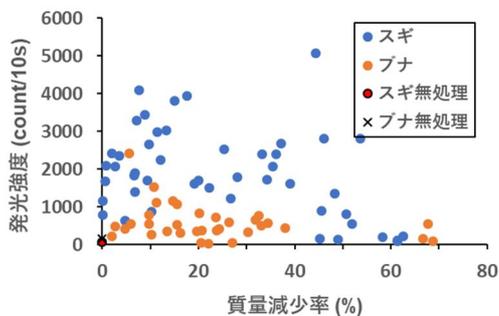


図4 オオウズラタケ腐朽試験体からの発光

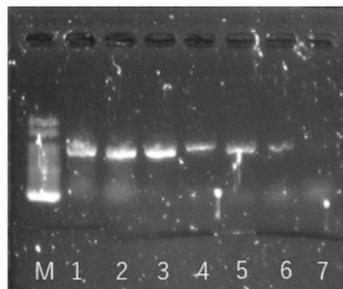


図5 ITS領域のPCR増幅産物の電気泳動像、1: 50%, 2: 10%, 3: 1% 4: 0.1%, 5: 0.01%, 6: 0.0001%, 7: 0% (primer ITS1-F/ ITS4-B)

野外杭を活用した木材腐朽の微弱発光検出：初年度末 (令和3年3月) に森林総合研究所第2樹木園に設置したスギ辺材杭 (6本) を腐朽の進んだものから順次引き抜き (令和4年6月に1本、11月に2本、令和5年11月に3本) 杭の地際～底部を5分割して供試した。結果の1部を表1に示す。発光強度の比較的高い腐朽部位からの分離菌が、PCRによって文献上リグニン分解力の強い白色腐朽菌と推察されるニクカワタケと同定されるなど、図6に示した室内試験に基づく褐色 (白色) 腐朽菌の発光特性の妥当性を支持する結果が得られつつある。ただし、同部のメタゲノム解析の結果、ニクカワタケではなく、優占種としてのアカカゴタケの他子囊菌が各種検出された事から、PCRならびにメタゲノム解析による腐朽菌の検出について新たな問いも浮上した。

図6 室内試験に基づく発光強度

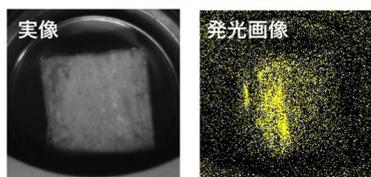
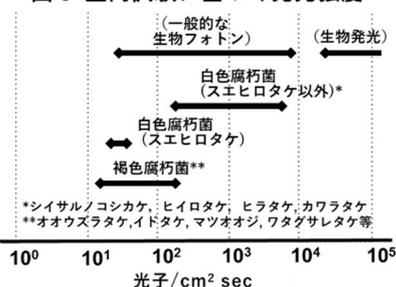


図7 ニクカワタケの分離された杭6腐朽部位のイメージング (東北電子来社測定 CLA-IMG)

表1 令和4年度引き抜き杭 (うち2本) の調査結果

杭	部位	被害度 (目視)	発光強度* (光子/cm²sec)	推定腐朽型**
5	地際	4	11.4	褐色
	中1	3~4	69.1	
	中2	3~4	15.3	
	中3	3~4	30.5	
	底部	4	11.1	
6	地際	3	185.7	白色
	中1	3~4	234.3	
	中2	3~4	236.3	
	中3	3~4	227.3	
	底部	4	359.3	

\*ケミルミアナライザー CLD-100FC (東北電子)

\*\*室内試験で得た発光特性データに基づく

腐朽菌の動態や生活環との関連も予想されるユニークな発光特性の把握：PDA培地上の培養菌系 (オオウズラタケとカワラタケ使用、木質系基質を含まず) はコロニー系が増大する一時期のみ微弱光を放出し、少なくともカワラタケにおいてはそのスペクトルは腐朽試験体からのものとは明らかに異なり、発光強度も相対的に微弱である事が判明した。子実体形成期における発光挙動についてはヒラタケ等をモデルに検討中である。

## 5. 今後の展望

褐色腐朽菌で想定されているフェントン反応が微弱なバイオフォトンの発光源となる可能性がモデル反応での検証結果から示唆されたが、実際の木材腐朽におけるその実在性や発現時期を明らかにするための生化学的検証が今後必要となる。微弱発光検出 (+既往手段のPCR) を超高感度な腐朽の検出手段と位置付けるためにはさらなる実証研究が必要であり、研究用試料として野外杭は有用であると考えられた。オオウズラタケ腐朽試験体系の調査によって本菌の樹種依存的な発光特性も示唆され、今後は微弱発光現象と木材腐朽菌の木材分解特性や基質としての樹種嗜好性とを関連付ける研究も有意義であると考えられる。

### <引用文献>

西村健 (2019), 木材保存, 45: 163-175.

Watanabe et al. (2001), Eur. J. Biochem. 268: 6114-6122.

Vassil'EV et al. (1962), Nature 194: 1276-1277.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 西村健	4. 巻 48(3)
2. 論文標題 第72回日本木材学会大会(名古屋・岐阜大会)保存部門の口頭発表に参加して	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 木材保存	6. 最初と最後の頁 153-155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 西村健、白井申明（滋賀県工技術セン）、渡辺隆司（京都大学生存圏研究所）
2. 発表標題 オオウズラタケ腐朽試験体からの極微弱化学発光ならびにフェントン反応関与の可能性について
3. 学会等名 第72回日本木材学会年次大会講演要旨集
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村健、砂川政英
2. 発表標題 ヒラタケ原基に含まれる幾つかの脂溶性成分の分離とそれらの同菌に対する子実体誘導活性について
3. 学会等名 第72回日本木材学会年次大会講演要旨集
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村健、砂川政英
2. 発表標題 ヒラタケ栄養菌系に含まれる幾つかの脂溶性成分の分離とそれらの同菌に対する子実体誘導活性について
3. 学会等名 第73回日本木材学会年次大会講演要旨集
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nishimura Takeshi、Sunagawa Masahide
2. 発表標題 A glycochemical approach toward an active substance for fruit-body induction in Pleurotus ostreatus
3. 学会等名 Eurocarb 21 (第21回欧州糖質シンポジウム) 講演要旨集 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村健、砂川政英
2. 発表標題 ヒラタケ菌体からの子実体誘導物質の単離の試み
3. 学会等名 日本きのこ学会講演要旨集
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 NISHIMURA Takeshi (西村健)、SHIRAI Nobuaki (白井伸明、滋賀県工技総合セン)、WATANABE Takashi (渡邊隆司、京大生存圏)、HATTORI Tsutomu (服部力)、OHTA Yuko (太田祐子、日大生物資源科学)
2. 発表標題 Chemiluminescence phenomenon associated with fungal wood decaying and the possible application for detecting wood-rotting fungi (木材腐朽に伴う微弱発光現象と腐朽菌検出にむけたその利活用)
3. 学会等名 AMC2023 (2023年アジア菌学会) 講演要旨集 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	太田 祐子	日本大学・生物資源科学部・教授	
	(Ohta Yuko)		
	(60343802)	(32665)	

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
---------	---------