

## *Phanerochaete chrysosporium*における 菌糸の発達とペルオキシダーゼ活性の分布

高部 圭司・北條 健生・斉藤奈緒子・佐伯 浩・三宅 繁輝\*・深澤 和三\*

### Ultrastructural Changes and Peroxidase Localization with the Development of *Phanerochaete chrysosporium* Hyphae

Keiji TAKABE, Takeo HOJO, Naoko SAITO, Hiroshi SAIKI,  
Shigeki MIYAKE\* and Kazumi FUKAZAWA\*

#### 要 旨

白色腐朽菌である *Phanerochaete chrysosporium* の菌糸の発達過程とペルオキシダーゼ活性の局在を電子顕微鏡観察した。菌を液体培地で培養すると、2日目まではペルオキシダーゼがあまり分泌されなかったが3日目には活発に分泌されるようになった。酵素を分泌する前と分泌中の菌糸の微細構造を急速凍結置換固定 (RFS) 法で観察・比較すると、幾つかの構造上の変化が認められた。酵素分泌中の菌糸では、細胞壁が厚みを増し、内層部は水溶性多糖で充填されていた。細胞内では粗面小胞体や液胞が発達し、滑面小胞体や起源のわからない小胞、リング状の膜構造物が出現した。一方ペルオキシダーゼ活性は4日目の菌糸の細胞壁内層部、原形質膜、リング状の膜構造物に局在していた。菌糸細胞壁内層部に認められたペルオキシダーゼは水溶性多糖中に保持されているものと思われる。このことは実際に菌糸が木材細胞壁を腐朽していく時に、酵素によるリグニン分解を温和に進行させ、リグニン分解派生物の再重合を効果的に防止するものと考えられる。菌糸によるペルオキシダーゼの合成と分泌のメカニズムに関しても電子顕微鏡観察の結果をもとに考察した。

#### 1. 緒 言

白色腐朽菌は木材の主要構成成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンを分解する。木材からこれらの成分が除かれる比率やスピードは、菌の種類や菌の生育する環境によって大きく変化する。白色腐朽菌の中で *Phanerochaete chrysosporium* は極めて効率よくリグニンを分解できる腐朽菌の一つである。この菌を液体培養する際には極めて厳密な条件が必要であったが、Kirkら<sup>1)</sup>によって培養条件が確立されて以来、この菌によるリグニンの分解メカニズムの研究は飛躍的に進歩した<sup>2)</sup>。リグニンの分解に関与する酵素としてはリグニンペルオキシダーゼ<sup>3,4)</sup>とマンガンペルオキシダーゼ<sup>5)</sup>が見出されており、これら酵素は確かにリグニンのサブストラクチャーモデルやDHPなどの合成リグニンの分解を触媒するが、一方で高分子化も引き起こす<sup>6)</sup>。*P. chrysosporium* は天然にはこれらリグニン試料を低分子化していく訳であるから、リグニン分解酵素によって生成された分解派生物が高分子化されにくい条件下でリグニンの分解が進行して

\* 北海道大学農学部

いるものと思われる。したがってリグニン分解メカニズムの全容解明には、*P. chrysosporium*がどの様に酵素を分泌し、分泌された酵素はどのような条件下で木材細胞壁を分解していくのかを詳細に研究しなければならない。

生化学的方法によるリグニン分解のメカニズムに関する研究が進展する一方で、細胞化学的手法や免疫電顕法により *P. chrysosporium* による木材の腐朽様式やリグニン分解酵素の菌糸や分解木材中での局在を調べた研究例が幾つかある。Ruelら<sup>7)</sup>は過マンガン酸カリウムでリグニンに、PATAg法で多糖類にコントラストをつけ、グルコース含浸木材の腐朽状態を電子顕微鏡観察した。その結果、グルコースの存在下ではリグニンの分解が進行し、セルロースやヘミセルロースの分解は抑制されることが判明した。Srebotnicら<sup>8)</sup>はリグニンペルオキシダーゼのポリクロナール抗体を用いて、菌糸においては原形質膜上に、腐朽木材では菌糸が接している細胞壁近傍に酵素が分布していることを示した。Danielら<sup>9)</sup>もリグニンペルオキシダーゼのポリクロナール抗体を用いて、酵素が原形質膜や菌糸細胞壁、細胞外粘液物質、分解されつつある木材細胞壁に局在することを示した。さらにGoodellら<sup>10)</sup>はマンガンペルオキシダーゼのモノクロナール抗体を用いて腐朽木材と菌糸での酵素分布を調べ、ペルオキシダーゼは菌糸の原形質膜や菌糸の分泌する細胞外粘液に分布しているとともに、分解の進行している木材細胞壁にも分布していることを示した。これらの研究はリグニン分解酵素の菌糸内での分布と木材細胞壁への浸透などの解明に寄与したが、抗原性の保持のために細胞の微細構造の保存を犠牲にせざるをえなかった。そのため細胞小器官などの固定が悪く、菌糸が行なっているリグニン分解酵素の生成と分泌というダイナミックな活動は観察できなかった。

本研究では *P. chrysosporium* においてリグニン分解酵素がどのように生成され、菌体外へと分泌されるのか、そして分泌はどのような条件下で行なわれているのかを調べることにある。そのため酵素を分泌する前と分泌中の菌糸を用い、極めて生きていた状態に近い細胞を観察することが可能な急速凍結置換固定法<sup>11)</sup>で菌糸の微細構造の変化を観察した。さらにペルオキシダーゼ活性の局在を調べ、ペルオキシダーゼの生成と分泌に対しても考察した。

## 2. 試料と方法

### 2. 1 菌株

本研究に用いた白色腐朽菌は *Phanerochaete chrysosporium* (IFO No. 31249) である。菌株は2%ポテトデキストロース寒天 (DIFCO LABORATORIES 社製) 培地上で培養し、胞子が培地上全面に発生した時点で冷蔵庫中に保存した。

### 2. 2 菌の培養とリグニンペルオキシダーゼ活性の検出

菌の培養はKirkら<sup>1)</sup>の方法に従った。ただしミネラルはKirk培地の3.5倍量、ビタミンは同量加え、窒素源として硝酸ナトリウム0.6mM、L-アスパラギン0.6mM、炭素源としてグルコースを0.2%濃度になるように加えた。さらにリグニンペルオキシダーゼの分泌促進と活性維持のためベラトリルアルコールを1.5mM加えた。1000mlのエーレンマイヤーフラスコに培地を100cc加えて胞子を接種し、38°Cで静置培養した。培地中に分泌されるリグニンペルオキシダーゼ活性は、胞子を接種後24時間毎に同一のフラスコより300 $\mu$ lの培地を取り出しKurosakaら<sup>12)</sup>の方法に従って測定した。本研究では基質にベラトリルアルコールを用い、1分間に1 $\mu$ molのベラトリルアルデヒドを生成することができる酵素量を1 unitとした。

### 2. 3 急速凍結置換固定 (RFS) 法, 化学固定 (CF) 法による菌糸の固定・包埋

胞子を接種して2日目, 4日目, 7日目の菌糸を採取し, 急速凍結置換固定, 化学固定並びにペルオキシダーゼ活性の検出を行なった。

急速凍結置換固定 (RFS) には, 培地中に広がった菌糸をポリ塩化ビニリデンシート上に広げ, カミソリを用いて菌糸をシートごと  $2 \times 2$  mmの大きさに切り出した。菌糸をシートとともにピンセットでつまみ, 菌糸上の培地を濾紙で吸い取った後, 直ちに液体窒素で冷却した液体プロパン中に投入して急速凍結させた。試料は液体窒素中で一時的に保存した後,  $-80^{\circ}\text{C}$ に冷却した2%四酸化オスミウム・アセトン溶液に移し, 2日間凍結置換固定を行なった。その後試料を $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 室温でそれぞれ2時間放置し, つづいてアセトンで15分おきに3回洗浄, エタノールで15分おきに3回洗浄した後, プロピレンオキサイドに置換し, 常法にしたがってエポキシ樹脂に包埋した。

化学固定 (CF) は3%グルタルアルデヒド・リン酸緩衝液 ( $1/15\text{M}$ ,  $\text{pH}7.2$ ) を用い, 冷蔵庫中で一晩行なった後, リン酸緩衝液で洗浄した。試料の一部はペルオキシダーゼ活性の検出に用い, 残りは1%四酸化オスミウム・リン酸緩衝液で水冷しながら後固定を2時間行なった。リン酸緩衝液で洗浄後, エタノールシリーズで脱水し, プロピレンオキサイドに置換後, 常法にしたがってエポキシ樹脂包埋した。

### 2. 4 ペルオキシダーゼ活性の検出

グルタルアルデヒド固定された菌糸を用いて, ジアミノベンチジン (DAB) 反応とパラフェニレンジアミン・ピロカテコール (PPD・PC) 反応でペルオキシダーゼ活性の検出を行なった。DAB反応は0.02%過酸化水素を含む0.1%DAB・リン酸緩衝液 ( $1/15\text{M}$ ,  $\text{pH}5.5$ ) 中で1時間行なった。PPD・PC反応は0.1%過酸化水素を含む0.05% PPD・0.1% PC水溶液中で1時間行なった。コントロールは基質を含まない緩衝液で行なった。両反応を行なった試料, ならびにコントロール試料はリン酸緩衝液で洗浄し, 1%四酸化オスミウム・リン酸緩衝液で2時間反応させた後, 上述した方法でエポキシ樹脂包埋した。

### 2. 5 菌糸の電子顕微鏡観察

エポキシ樹脂包埋された試料は, ダイヤモンドナイフを装着したウルトラミクロトーム (Reichert-Jung社製, ULTRACUT E) で超薄切片を作製し, 酢酸ウラニル・クエン酸鉛で染色して, 電子顕微鏡 (日本電子社製, JEM-100C) 観察した。切片の一部はThiery<sup>13)</sup>の方法に従い多糖類を選択的に染色するPATAg反応を行なった。なおDAB反応させた試料は無染色で観察した。

## 3. 結 果

### 3. 1 胞子接種後のリグニンペルオキシダーゼ活性の変化

胞子を液体培地に接種すると, 1日目にはすでに菌糸が培地中に伸びはじめ, 3日目には培地表面を全面にわたって菌糸が伸長してシートを形成し, その後は徐々にシートの厚さを増していった。この間の培養日数とリグニンペルオキシダーゼ活性の関係をFig.1に示す。活性は接種後2日目に認められ, 4日目には急増し, 5日目に最大となったのち減少した。

### 3. 2 RFS法とCF法による菌糸の微細構造の違い

Fig. 2はRFS法とCF法で調製した接種後4日目の菌糸の電子顕微鏡写真である。RFS

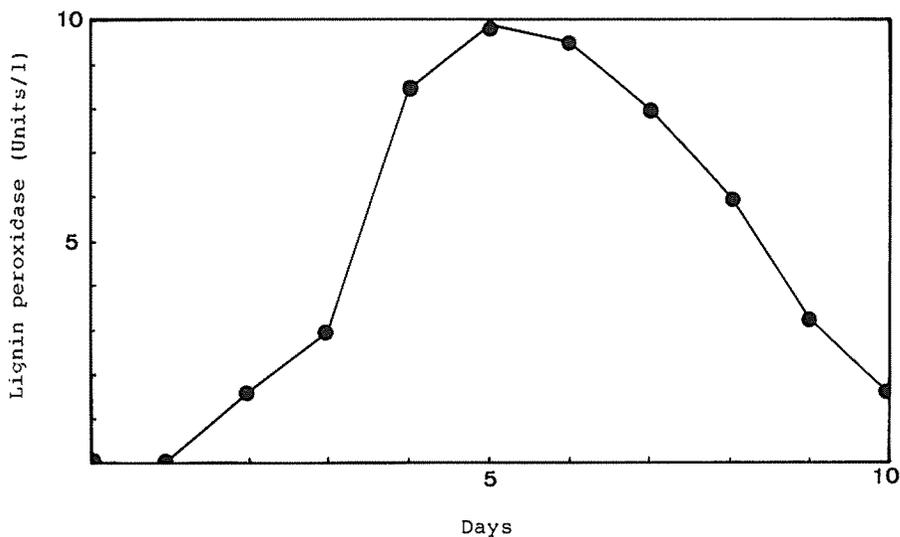


Fig. 1 Lignin peroxidase activity from day 1 to 10 cultures of *Phanerochaete chrysosporium*.

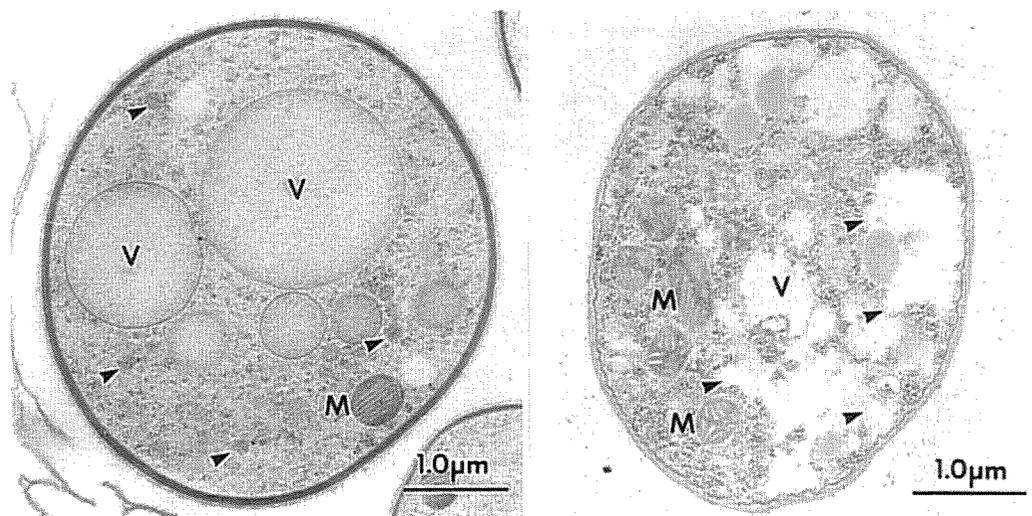


Fig. 2 Transmission electron micrographs of a hypha cultured for 4 days obtained by rapid freeze and freeze substitution (RFS) (left) and chemical fixation (CF) (right). RFS provides a greatly improved images of ultrastructure of a hypha in comparison with CF. Fungal cell wall is stained more darkly after RFS. Mitochondria and vacuoles show round and ovoid shapes after RFS, though they are distorted or partially destroyed after CF. Tonoplast (vacuole membrane) is destroyed after CF, causing dissolution of vacuole contents. Glycogen particles (arrow heads) are also preserved in the cell after RFS. They, however, are removed during CF, resulting in the formation of electron transparent regions (arrow heads). Plasma membrane is smooth and is pressed on the inner surface of cell wall after RFS, though it is undulated after CF. M: mitochondrion. V: vacuole.

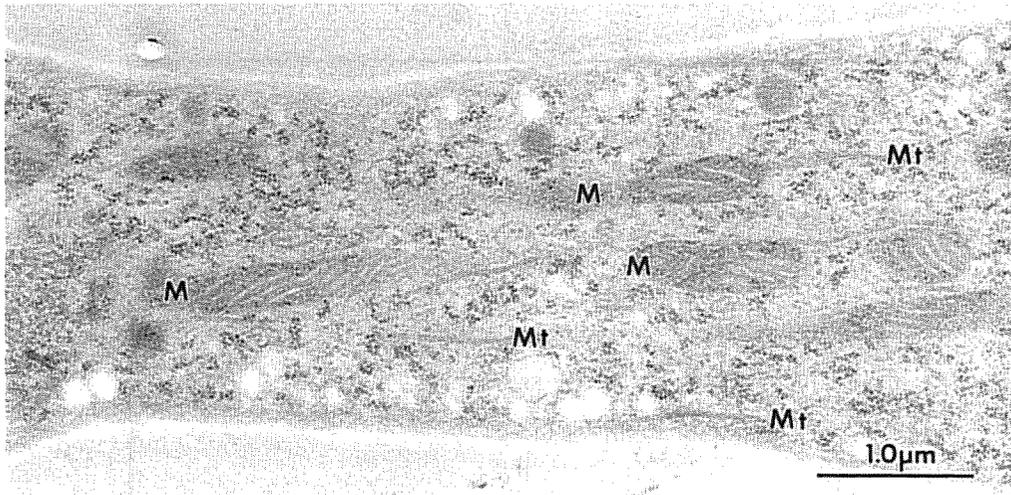


Fig. 3 Longitudinal section of a hypha cultured for 2 days. Specimen was prepared by RFS. Fungal cell has a thin cell wall and contains many mitochondria and polysomes. Microtubules are aligned parallel to the cell axis. Mt: microtubule.

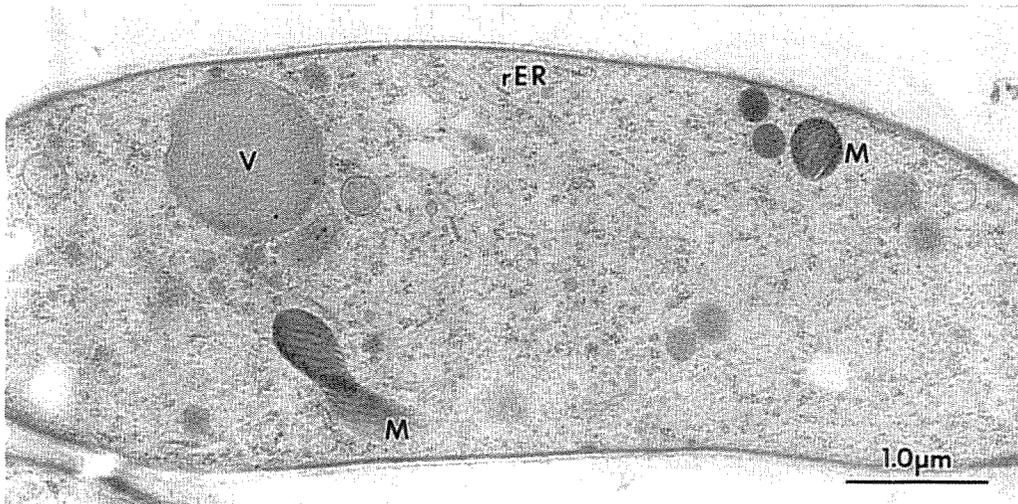


Fig. 4 Longitudinal section of a hypha cultured for 4 days. Specimen was prepared by RFS. An electron opaque material is deposited within the fungal cell wall. Rough endoplasmic reticula and many polysomes appear in the cytoplasm. rER: rough endoplasmic reticulum.

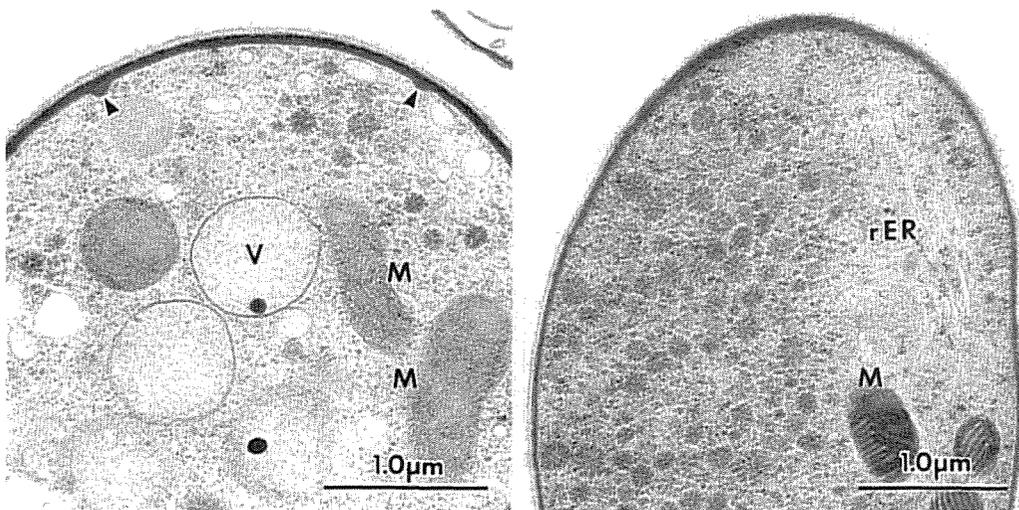


Fig. 5 (left) Transverse section of a hypha cultured for 4 days. Specimen was prepared by RFS. Outer layer of the fungal cell wall shows a fibrillar structure, and the inner layer shows heavy deposition of electron opaque amorphous materials. Electron opaque materials (arrow heads) are also observed between the cell wall and plasma membrane. Vacuoles showing a round shape contain electron opaque materials.

Fig. 6 (right) Transverse section of a hypha cultured for 4 days. Specimen was prepared by RFS. Several rough endoplasmic reticula aligned parallel and many glycogen particles appear in a fungal cell.

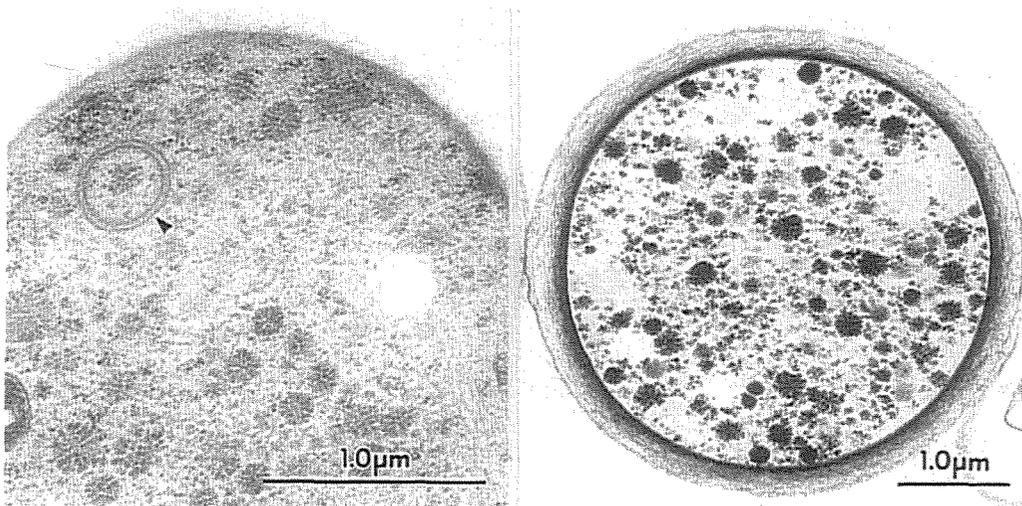


Fig. 7 (left) Transverse section of a hypha cultured for 4 days. Specimen was prepared by RFS. Membranes showing ring-like structure (arrow head) sometimes appear near the plasma membrane.

Fig. 8 (right) Transverse section of a hypha cultured for 4 days stained with PATAg. Specimen was prepared by RFS. Cell wall and glycogen particles are heavily stained.

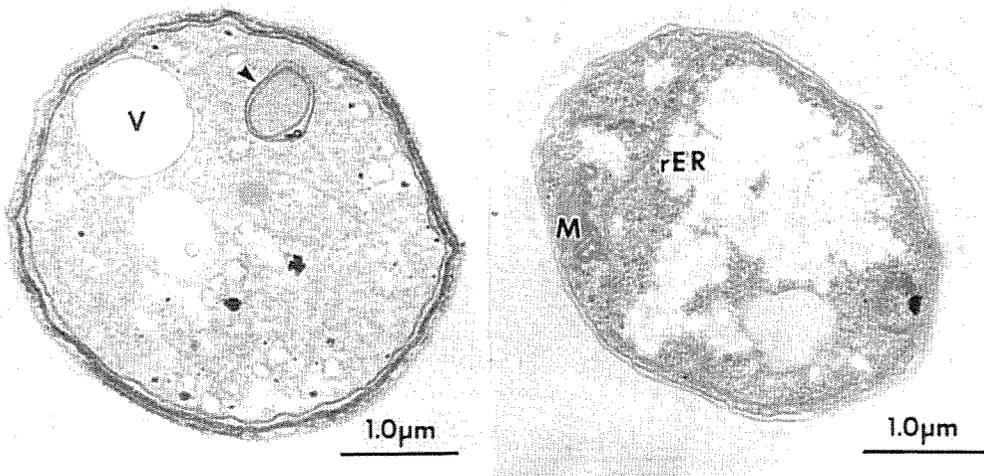


Fig. 9 Transmission electron micrographs showing localization of peroxidase activity (left) and control (right) in hyphae cultured for 4 days. Specimen was treated with *p*-phenylene diamine-pyrocatechol (PPD-PC) -  $H_2O_2$  - osmium tetroxide for detecting peroxidase. The activity is apparent in the inner layer of fungal cell wall, plasma membrane, and the membranes having a ring-like structure (arrow head).

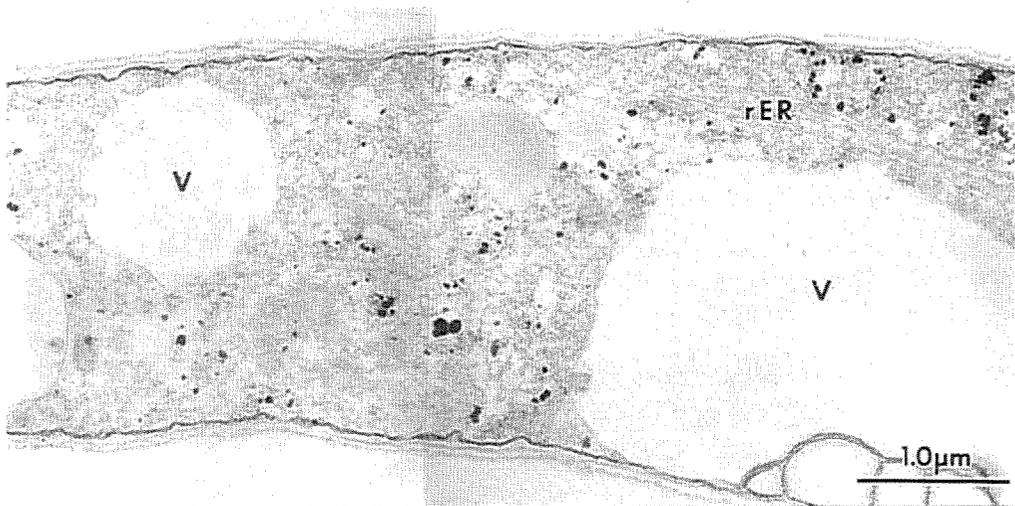


Fig. 10 Transmission electron micrograph showing localization of peroxidase activity in a hypha cultured for 4 days. Pronounced electron opaque material produced by PPD-PC reaction is observed at the plasma membrane.

法では菌糸断面は円形で”張り”のある構造をしているのに対し、CF法では部分的に収縮していた。細胞壁はRFS法ではキチンと思われるフィブリル状構造物が外側ではほぐれるように、内側ではパッキングされた構造をとり、内側はアモルファスで電子不透過性の物質が存在していた。一方CF法ではフィブリル状構造物は観察されたがアモルファスで電子不透過性の物質は観察されなかった。原形質膜はRFS法では細胞壁の内表面に密着して極めてなめらかな構造をしているのに対し、CF法では明らかに波打っていた。細胞基質中に存在するグリコーゲン顆粒はRFS法ではきれいに固定されていたが、CF法では固定が不十分で細胞基質中に分散もしくは固定包埋中に溶出してしまい、グリコーゲン顆粒が存在していた部位は電子透過性となっていた。ミトコンドリアはRFS法ではきれいな球形あるいは楕円形で基質が電子不透過性であるのに対し、CF法では部分的に膨潤あるいは収縮していた。液胞はRFS法では球形あるいは楕円形でトノプラストの保存もよく、液胞中の物質はほぼ均一に分散していたが、CF法では形がいびつで、トノプラストも所々で破壊され、液胞中の物質は流出していた。

### 3. 3 RFS法で観察した菌糸の発達過程

胞子接種後2日目の菌糸をFig. 3に示す。菌糸の細胞壁は極めて薄く、外層は電子透過性の、内層は電子不透過性の物質で構成されていた。細胞内は遊離のリボソームとミトコンドリアに富み、マイクロチュービュールが菌糸の伸長方向に配列し、ミトコンドリアの周囲に分布していた。

胞子接種後4日目の菌糸をFigs. 4-8に示す。菌糸の細胞壁は電子不透過性の細胞壁層がさらに形成され、厚みを増した。細胞壁と原形質膜の間には、所々で電子不透過性の物質が存在していた(Fig. 5)。このような物質は接種後2日目の菌糸には観察されなかった。細胞内ではシスターネが数層ある発達した粗面小胞体が観察され(Fig. 6)、滑面小胞体と思われるチュービュール状の構造物も出現した。さらにリング状の膜構造物(Fig. 7)や起源のわからない小胞も観察された。液胞の発達も顕著で、その中にはしばしば電子不透過性の物質が貯えられていた(Fig. 5)。この物質はまれに多量に蓄積され格子状構造をとった。PATAg反応を行なうと、菌糸細胞壁はよく染色され、グリコーゲン顆粒もよく染色された(Fig. 8)。

胞子接種後7日目になると、4日目と同様な構造をしめす菌糸や、自己分解して細胞壁のみになった菌糸、液胞化が顕著に進行した菌糸などが観察された。

### 3. 4 菌糸におけるペルオキシダーゼ活性の分布

Figs. 9,10にPPD-PC反応させた接種後4日目の菌糸を示した。ペルオキシダーゼ活性は原形質膜と細胞壁内側部分に認められ、細胞内に存在するリング状の膜構造物にも認められた。このような活性は接種後2日目の菌糸には観察されなかった。細胞内に現われた電子不透過性の顆粒はコントロール試料にも観察されたことから、ペルオキシダーゼ活性を示すものではないと考えられる。DAB反応でも同じような結果が得られた。なお、RFS法で固定された試料に対しDAB反応、PPD-PC反応を試みたが、活性の検出には至らなかった。

## 4. 考 察

Fig. 2の結果は菌糸の微細構造観察においてRFS法がCF法に較べ極めて優れていることを示している。最も興味深いことは、菌糸細胞壁の構造がRFS法とCF法で異なったように見えることである。すなわちRFS法においては細胞壁は電子不透過性の物質がキチンと思われるフィブリル状構造物の間を充填しているがCF法では溶出してしまうこと、この物質が

PATAg 反応で染色されること (Fig. 8) から、培養 4 日目の菌糸においてはグルタルアルデヒドでは固定できない水溶性多糖類が細胞壁内側部分に存在しているものと考えられる。Joseleau と Ruel<sup>10)</sup> は *P. chrysosporium* が菌体外に  $\beta$  1,3-グルカンや  $\beta$  1,6-グルカンを分泌していることを示唆しており、これらの多糖がキチンの間を充填しているものと考えられる。細胞内に存在するグリコーゲン顆粒も RFS 法でよく保存された。このことも RFS 法が水溶性多糖をその場に固定できることを示した良い例であろう。RFS 法は固定する際に浸透圧調節が不要なため、菌糸の断面は円形に近い“張り”のある構造で、ミトコンドリアや液胞などの細胞小器官も円形や楕円形で膨潤や収縮などが認められなかった。ミトコンドリアは極めて電子不透過性で、液胞内は電子不透過性の物質が均一に分布しており、RFS 法によってこれら小器官に存在する酵素や保存物質が抽出されることなくその場に保存されたためと考えられる。RFS 法は膜系の保存も極めて優れ、原形質膜はなめらかで波打ちはなく、トノプラストも破壊されなかった。このように RFS 法は CF 法がもたらすアーティファクトが極めて少なく、生きた状態に極めて近い細胞を観察することが可能である。しかしながらこの方法ではペルオキシダーゼ活性を検出できなかったことから、酵素の合成と分泌を考察する上では RFS 法で観察された細胞像とペルオキシダーゼ活性検出部位を比較照合する必要があるだろう。

Fig. 1 の結果は Kurosaka<sup>12)</sup> の結果を支持するものであり、菌糸が伸長中にはリグニンペルオキシダーゼを菌体外に分泌せず、伸長停止とともに分泌し始めることを示している。この結果は PPD-PC 反応や DAB 反応で、2 日目の菌糸ではペルオキシダーゼ活性が検出されず、4 日目で検出されたことと一致する。

RFS 法で観察した伸長中と伸長停止後の菌糸、すなわちリグニンペルオキシダーゼを分泌していない菌糸と分泌中の菌糸を比較すると、幾つかの構造上の変化があった。伸長を停止した菌糸では、粗面小胞体や液胞が発達し (Fig. 6)、滑面小胞体や起源のわからない小胞、リング状の膜構造物 (Fig. 7) が出現した。菌糸細胞壁は明らかに厚みを増し、フィブリル状構造物の間に水溶性多糖が充填されていた (Figs. 4, 5)。一方、PPD-PC 反応や DAB 反応で調べたペルオキシダーゼ活性は、菌糸細胞壁内層部、原形質膜、細胞内のリング状の膜構造物 (Figs. 9, 10) に局在していた。以上のような観察結果を比較・総合すると、ペルオキシダーゼ活性は水溶性多糖が充填された菌糸細胞壁内層部、原形質膜、細胞内のリング状の膜構造物に局在すると言えよう。Tween80 などの界面活性剤を培地に加えると酵素の収率が上がることが示されており<sup>12)</sup>、これは界面活性剤により細胞壁中に保持された酵素が容易に培地中へ溶出してくる結果と思われる。ペルオキシダーゼが水溶性多糖中に保持されていることは、実際に *P. chrysosporium* が木材細胞壁をアタックしていく時に、酵素の細胞壁への接触を容易にし、リグニン分解が温和にかつ持続的に進行する結果となるだろう。このような多糖類の存在はリグニン分解派生物の再重合を阻害する上でも効果的と考えられる。

さて、近年リグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼのキャラクタリゼーションに関する研究<sup>15, 16, 17, 18)</sup> が進展し、前者は分子量約 42,000、後者は約 46,000 の糖タンパク質で、いずれも N 末端側に疎水性のシグナルペプチドを持っていることが示されている。これらの結果は、酵素が明らかに分泌タンパク質の性質を持ち、粗面小胞体で合成されゴルジ装置でグリコシレーションを受け、ゴルジ小胞のエクソサイトーシスにより、菌体外に分泌されることを示唆している。しかしながら本研究では、発達した粗面小胞体 (Fig. 6) は観察されたものの、ゴルジ装置は菌糸が出芽してから分解をおこすまでの間、観察されなかった。このことは高等植物など真核生物に一般的に存在するゴルジ装置が、この菌においては未発達なためなのかもしれない。ペルオキシダーゼの分泌メカニズムは今後の研究に負うところが大きい、① 粗面小胞体でタ

ンパクの合成とグリコシル化が行なわれ、ペルオキシダーゼを含む小胞体起源の小胞が直接原形質膜に融合して酵素を細胞外へ分泌する、② リング状の膜構造物 (Fig. 8) がゴルジ装置の働きをしている、などの可能性が考えられる。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、菌の培養法や酵素活性の測定法などのご指導を賜りました京都大学木質科学研究所教授・島田幹夫博士、同助手・服部武文博士に厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W. J., Lorenz, L. J. and Zeikus, J. G. (1978) Influence of Culture Parameters on Lignin Metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 117. 277 - 285.
- 2) Higuchi, T. (1990) Lignin Biochemistry: Biosynthesis and Biodegradation. Wood Sci. Technol., 24. 23-63.
- 3) Tien, M. and Kirk, T. K. (1983) Lignin-degrading Enzyme from the Hyphomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Science, 221. 661 - 663.
- 4) Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M. and Gold, M. H. (1983) An Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring Enzyme Preparation Involved in Lignin Biodegradation by the White-rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 114. 1077 - 1083.
- 5) Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. and Gold, M. H. (1984) Separation and Characterization of Two Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent Oxidases from Lignolytic Culture of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett., 169. 247-250.
- 6) 梅澤俊明. (1991) リグニンペルオキシダーゼによるリグニン分解の化学. 木材研究・資料. 27. 1 - 11.
- 7) Ruel, K. and Barnoud, F. (1984) Ultrastructural Aspects of Wood Degradation by *Sporotrichum pulverulentum*. Holzforschung, 38. 61 - 68.
- 8) Srebotnic, E., Messner, K., Foisner, R. and Pettersson, B. (1988) Ultrastructural Localization of Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* by Immunogold Labeling. Curr. Microbiol., 16. 221 - 227.
- 9) Daniel, G., Nilsson, T. and Pettersson, B. (1989) Intra- and Extracellular Localization of Lignin Peroxidase during the Degradation of Solid Wood and Wood Fragments by *Phanerochaete chrysosporium* by Using Transmission Electron Microscopy and Immuno-Gold Labeling. Appl. Environ. Microbiol., 55. 871-881.
- 10) Goodell, B., Jellson, J. and Daniel, G. (1989) Probing Peroxidase Activity in *Phanerochaete chrysosporium* Degraded Birch Wood. Proc. IV Intern. Conf. Biotechnol. Pulp Paper Indust. 125-126.
- 11) 高部圭司. (1990) 急速凍結置換固定法の樹木細胞学への応用, 電子顕微鏡, 25. 118-122.
- 12) Kurosaka, H., Uzura, K., Hattori, T., Shimada, M. and Higuchi, T. (1989) The C $\alpha$ -C $\beta$  Bond Cleavage of the Secondary Metabolite Veratrylglycerol Catalyzed by A New Modified "Ligninase" Preparation from *Phanerochaete chrysosporium*. Wood Res., 76. 17-28.
- 13) Thiéry, J. P. (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscopie, 6. 987 - 1018.
- 14) Joseleau, J.-P. and Ruel, K. (1989) Enzyme Excretion During Wood Cell Wall Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. In "Plant Cell Wall Polymers", Lewis, N. G. and Paice, M. G. ed., ACS Symposium Series 399. p.443-453.

- 15) Tien, M. and Tu, C.-P. D. (1987) Cloning and Sequencing of a cDNA for a Ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Nature*, 326. 520-523.
- 16) de Boer, H. A. Zhang, Y. Z., Collins, C. and Reddy, C. A. (1987) Analysis of Nucleotide Sequences of Two Ligninase cDNAs from a White-rot Filamentous Fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene*, 60. 93-102.
- 17) Pribnow, D., Mayfield, M. B., Nipper, V. J., Brown, J. A. and Gold, M. H. (1989) Characterization of a cDNA Encoding a Manganese Peroxidase, from the Lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, 264. 5036-5040.
- 18) Pease, E. A., Andrawis, A. and Tien, M. (1989) Manganese-dependent Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, 264. 13531-13535.

### Résumé

Ultrastructural changes of hyphae in white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* were observed after rapid freeze and freeze substitution (RFS). Localization of peroxidase in the hyphae was also observed.

Peroxidase activity in the extracellular fluid showed a dramatic increase on 3<sup>rd</sup> day followed by gradual decrease after 5<sup>th</sup> day. Ultrastructure of the hyphae on 4<sup>th</sup> day was quite different from that on 2<sup>nd</sup> day. The hyphae on 4<sup>th</sup> day have thick cell wall composed of outer layer showing fibrillar structure and inner one containing amorphous water-soluble polysaccharide. Rough-endoplasmic reticula and large vacuoles containing electron opaque material appeared in the hyphae on 4<sup>th</sup> day. Smooth endoplasmic reticula, many vesicles and the membranes showing ring-like structure were also observed. Peroxidase activity in the hyphae on 4<sup>th</sup> day was localized at inner layer of fungal cell wall, plasma membrane and the membrane showing ring-like structure. The enzyme localized at the inner layer may be retained within the amorphous water-soluble polysaccharide. The polysaccharide may immobilize the enzyme on the wood cell walls, when the enzyme is secreted extracellularly. In addition, the presence of the amorphous polysaccharide in the reaction site causes the mild degradation of lignin and prevents the re-polymerization of degraded lignin fragments. Cell organelles involved in biosynthesis and secretion of the enzyme were also discussed.