

モイレ反応と顕微分光測光法による リグニンの多様性の検討

吉永 新・藤田 稔・佐伯 浩

Evaluation of the Varieties of lignins in Wood
and Bamboo Cell Walls by Mäule Color Reaction
coupled with Microscopic Spectrophotometry.

Arata YOSHINAGA, Minoru FUJITA and Hiroshi SAIKI

要 旨

針葉樹材と広葉樹材とを化学的に識別しうるモイレ反応を顕微分光測光法に取り入れることにより、木材および竹材の細胞壁におけるリグニンの多様性について検討した。針葉樹材1種（正常材，圧縮あて材），広葉樹材3種，およびモウソウチクより，木口切片を作製し，モイレ処理を行った。そして反応色を観察するとともに顕微分光光度計を用いて測光し，各種細胞種別間におけるリグニンのタイプの検出を試みた。

その結果，グアイアシルリグニンに富む針葉樹材の仮道管と広葉樹材の道管の二次壁においては，モイレ処理によって黄褐色を示し，その紫外—可視域吸収スペクトルにおいて280～300 nm付近の吸収以外に特定の吸収極大が認められなかった。一方，シリングルリグニンに富む広葉樹材の木部繊維二次壁は赤みを帯びた色を示し，短波長側の吸収に加えて510～520 nm付近に吸収が認められた。また各種細胞種（孔圏道管，周囲仮道管，晩材小径道管，繊維状仮道管など）ではそれぞれ色調がわずかに異なり，その吸収スペクトルにも少し差がみられた。さらに，*p*-ヒドロキシフェニルリグニンを有するモウソウチクと針葉樹圧縮あて材においては，これらと異なる特異な呈色（暗褐色から褐色）がみられ，その吸収スペクトルにおいては300～400 nmに顕著な吸収が認められた。

1. 緒 言

一般に，針葉樹リグニンはコニフェリルアルコールの脱水素重合体からなるグアイアシルリグニンであるが，広葉樹を中心とする被子植物のリグニンはグアイアシルリグニンの他にシナピルアルコールの脱水素重合体からなるシリングルリグニンをも含んでいる。また，被子植物中のイネ科植物のリグニンは，グアイアシルリグニン，シリングルリグニンの他に *p*-クマリルアルコールの脱水素重合体からなる *p*-ヒドロキシフェニルリグニンを含んでおり，これに *p*-クマール酸がエステル結合していることが明らかになっている¹⁾。このようにリグニンは植物の進化と関連して変化し，多様性を示す。一方，さらに木材組織中におけるリグニンの分布，特に細胞壁中におけるリグニン化学構造の不均一性については従来から指摘されてきた。Goring ら^{2), 3), 4)}

は紫外域顕微分光法を用いて、広葉樹材の木部構成要素各部におけるリグニンの分布について精力的に研究を行ってきた。彼らは birch 材の木部構成要素について紫外域吸収スペクトルを得たが、道管二次壁は $\lambda_{\max}$ 279 nm、木部繊維二次壁では $\lambda_{\max}$ 270 nm、細胞間層のコーナー部では $\lambda_{\max}$ 275 ~ 276 nm であった。一方、モデル化合物の紫外域吸収スペクトルのうちグアイアシル系化合物は $\lambda_{\max}$ 280 nm、シリングル系化合物は $\lambda_{\max}$ 270 nm であることから、道管二次壁はグアイアシルリグニン、木部繊維二次壁はシリングルリグニンからなり、細胞間層のコーナー部では両者が混在しているとした。

さらに、Saka ら⁹⁾は紫外域顕微分光法とブロム化したりグニンの EDXA 分析により、木部構成要素におけるグアイアシルリグニンとシリングルリグニンの構成比率を求めている。それによると、white birch 材について、グアイアシル:シリングルの比は道管二次壁では 88:12、木部繊維二次壁では 12:88、放射柔細胞二次壁では 49:51 であるとしている。

また、Fujii ら⁶⁾は蒸煮木材の酵素糖化率に関連して、紫外域顕微分光法により、広葉樹材の木部構成要素のリグニン分布を調べている。多くの樹種において道管二次壁はグアイアシルリグニン、木部繊維二次壁はシリングルリグニンからなるが、木部繊維二次壁は必ずしもシリングルリグニンからなるのではなく、樹種によってグアイアシルリグニンに富むものもあることを示している。

高部ら⁷⁾は、広葉樹木部構成要素の木化過程を検討するため、分化中の木部各部位における紫外域吸収スペクトルを段階を追って調べている。それによると、コブシの木部繊維二次壁では木化当初ではグアイアシル核に富み、木化の進行につれてシリングル核に富むものになるが、ポプラでは木化のはじめから終わりまで *p*-ヒドロキシフェニル核を含むリグニンであった。またコブシの道管二次壁では木化当初から終わりまでグアイアシル核に富むが、ポプラでは *p*-ヒドロキシフェニル核に富むものからグアイアシル核に富むものになるとしている。

しかしながら、紫外域顕微分光法のみから広葉樹木部要素間におけるリグニン中のグアイアシルリグニンとシリングルリグニンの構成比率を検討することには次のような問題点が残されている。すなわち、リグニンの紫外域吸収スペクトルにおいて、吸収極大波長や吸収係数がリグニンの側鎖構造の影響を受けて変化するということである。そこで木部構成要素間におけるリグニンの不均一な分布を検討するためには紫外域顕微分光法に加えて各種のリグニンの呈色反応を利用してリグニンの化学構造の多様性について総合的に判断することが重要となる。

リグニンの主要な呈色反応の一つとしてモイレ反応があげられる。試料を過マンガン酸カリウム、希塩酸、濃アンモニア水によって順次処理することにより、一般に針葉樹材では黄褐色から褐色、広葉樹材では赤紫色を呈する。Srivastava⁸⁾は 74 種の被子植物及び 22 種の裸子植物からの顕微鏡切片にこの反応を適用し、同様にリグニンの主要な呈色反応の 1 つである Wiesner 反応を適用した結果と併せて樹皮並びに木部の種々の細胞におけるリグニンの性質について詳細に報告している。

モイレ反応の呈色のメカニズムは過去に多くの研究がなされながら不明な点が多かったが、近年、飯塚ら^{9), 10), 11)}はその一連の研究によって、モイレ反応について広葉樹リグニン中のシリングル核に対する $\text{KMnO}_4\text{-HCl}$ の作用により生成した 3-メトキシカテコール構造が濃アンモニア水中で 3-メトキシ-*o*-キノン構造となり、赤色または赤紫色を示すことを明らかにした。

また最近になって Iiyama ら¹²⁾は、シリングルリグニンの過マンガン酸カリウム酸化による β -エーテル結合の開裂によって新しく生じた遊離のフェノール性水酸基がモイレ呈色に関与していることを示唆した。

そこで本研究では、木材及び竹の顕微鏡切片にモイレ処理を行い、顕微分光光度計を用いて分

光分析することにより各種細胞種別間におけるリグニン化学構造の違い（グアイアシル型，シリリングル型，*p*-ヒドロキシフェニル型）を検出することが可能かどうかについて検討を試みた。

2. 試料と実験方法

供試材の選定にあたっては、主としてグアイアシルリグニンよりなる針葉樹材の例としてヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* ENDLICHER) の正常材、Goring らによる birch 材の研究結果と対照するために広葉樹材の典型的な例としてのマカンバ (*Betula maximowicziana* REGEL)，そして木部繊維が繊維状仮道管であるといわれているブナ (*Fagus crenata* BLUME)，周囲仮道管をはじめとする各種の細胞を持つミズナラ (*Quercus crispula* BLUME) を選んだ。さらにグアイアシル核，シリリングル核の他に *p*-ヒドロキシフェニル核を含むとされている圧縮あて材とイネ科植物を供試材に付加した。前者にはヒノキを，後者には 12 月に採取したモウソウチク (*Phyllostachys pubescens* MAZEL) の当年稈を用いた。

これらの供試ブロックよりまず滑走式ミクロトームを用いて 20 μm 厚さの木口面切片を作製した。それらの切片を 1 % KMnO_4 水溶液に 5 分間浸したのち水洗し，3 % HCl に 1 分間浸した。水洗したのち濃アンモニア水に 1 分間浸し，通常のスライドガラス上にグリセリンと水の等量混液で封入し，通常の光学顕微鏡を用いて細胞壁の色調を観察した。

一方，供試材より小ブロック（約 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 7 mm）を作製し，メタクリレート樹脂包埋（メチル：ブチル＝3：1）し，ガラスナイフを取り付けた Sorvall JB-4 ミクロトームを用いて 6 μm ，4 μm ，1 μm 厚さの木口面薄切片を作製した。

6 μm と 4 μm 厚さの薄切片をアセトンで脱包埋し，1 % KMnO_4 水溶液に 15 分間浸したのち水洗し，3 % HCl に 3 分間浸した。水洗したのちに濃アンモニア水に 1 分間浸し石英スライドにのせ，グリセリンと水の等量混液で封入した。その後ただちに顕微分光光度計（Zeiss 社製 UMSP 80）を用いて紫外-可視域吸収スペクトルを得た。1 μm 直径の円形の測光スポット像を二次壁の中央部に合わせ，対物レンズウルトラフルアル 100 倍，コンデンサーの開口数 0.3 とし，バンド幅 10 nm，波長走査ステップ 5 nm，測定繰り返し数 10 回，測定波長範囲 250 nm～700 nm で測定した。1 μm 厚さの切片は上述のモイレ染色をせずに各部位における紫外域吸収スペクトルを測定し，上記の結果と比較検討した。このとき波長走査ステップ 2 nm，測定繰り返し数 20 回，測定波長範囲 250 nm～350 nm と変更した。ヒノキ，マカンバ，ブナについては早材部のみ，ミズナラでは早晚材ともに，モウソウチクでは髓こう近くを測定した。同一細胞種について 3～5 箇所を選んで測定し，各波長における吸光度の平均値をグラフ化した。

3. 結果と考察

3. 1 モイレ処理した切片の光学顕微鏡観察

上述のようにモイレ処理を行った 20 μm 厚の切片の光学顕微鏡写真を Fig. 1～Fig. 6 に示す。

まず，ヒノキ正常材（Fig. 1）では，モイレ処理により全体としてうすい黄褐色に染まっているが，仮道管二次壁（以後各種細胞についてとくにことわらない場合には二次壁における観察結果を示す）と細胞間層の間の呈色には大差が認められなかった。また，細胞壁が膨潤しているのが認められた。この膨潤は他の供試材についても同様であった。

マカンバ（Fig. 2）では，道管壁はヒノキ仮道管壁と同様に黄褐色を示したが，木部繊維壁は強い赤みを帯びているのが認められた。

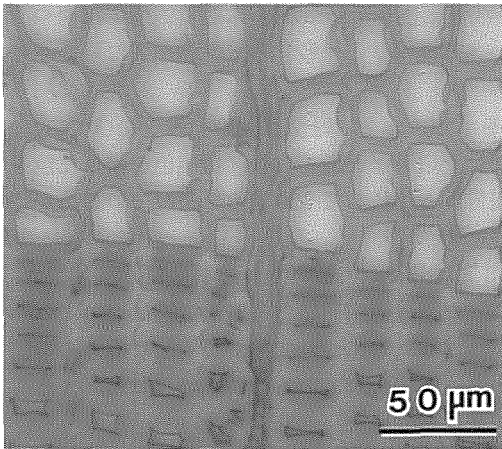


Fig. 1 HINOKI normal wood after Mäule treatment.

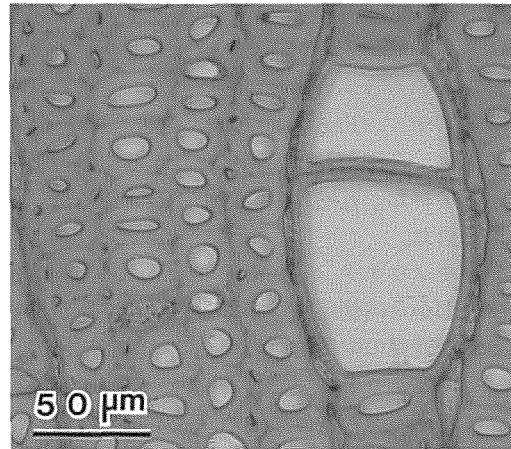


Fig. 2 MAKANBA after Mäule treatment.

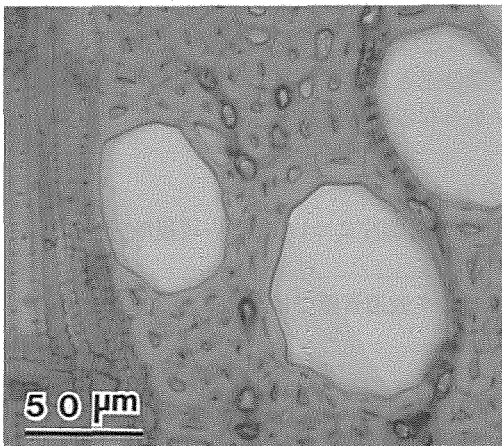


Fig. 3 BUNA after Mäule treatment.

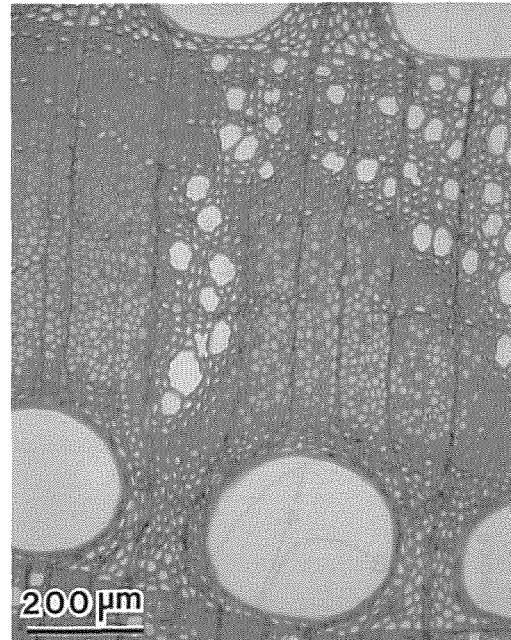


Fig. 4 MIZUNARA after Mäule treatment.

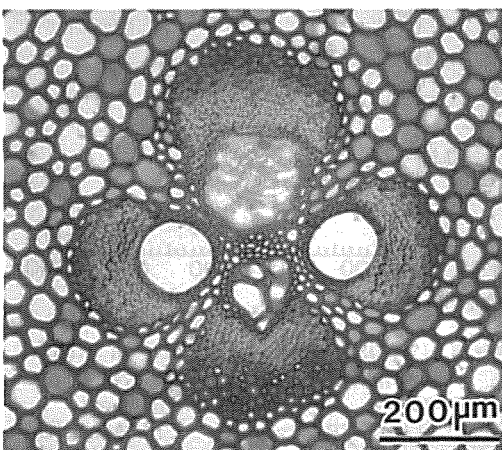


Fig. 5 MOUSOUCHIKU after Mäule treatment.

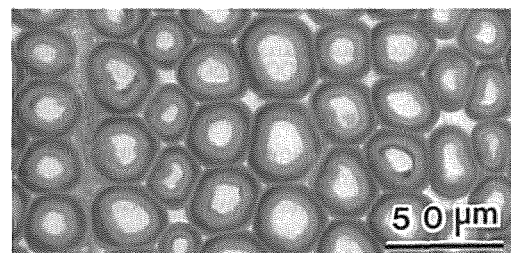


Fig. 6 HINOKI compression wood after Mäule treatment.

ブナ (Fig. 3) では、道管壁はやはり黄褐色～淡黄褐色を示したが、木部繊維壁ではやや赤みを帯びているのが認められた。しかし、マカンバ木部繊維壁と比較すると色調が異なっており、赤みがややうすい傾向がみられた。

ミズナラ (Fig. 4) では、孔圈道管壁は黄褐色を示し、木部繊維壁は強い赤みを帯びていた。さらに、孔圈道管の周囲に存在する周囲仮道管壁では、道管壁と似ており、黄褐色を帯びた色を示していた。孔圈外の晩材小径道管壁では、孔圈道管壁と比較してやや赤みを帯びているのが認められた。

モウソウチク (Fig. 5) では、まず柔細胞壁が3層に分かれて観察され、外側部が濃褐色で、中央部から内側部へいくにしたがって色がうすくなった。維管束鞘にある繊維細胞についてみると、維管束の中央付近の細胞では淡黄褐色で、外側へはなれるにつれて色が濃くなり最外の細胞では、細胞壁の外側では濃褐色、内側では淡褐色の2層に分かれているのが認められた。また、原生木部の道管壁は淡褐色、後生木部のそれは褐色を示していた。

ヒノキ圧縮あて材 (Fig. 6) では、圧縮あて材の典型的な特徴とされている S_2 層外側部では濃褐色、その他の部分では淡褐色を示していた。

モイレ処理を行った細胞壁における赤みの呈色は、リグニン中のシリングル核に由来すると考えられる。また、上記の結果と、紫外域顕微分光法などによるこれまでの様々な知見^{2), 3), 4), 5)}とを対比すると、モイレ処理により黄褐色を示す細胞壁は主としてグアイアシルリグニンからなり、赤みを帯びた細胞壁は主としてシリングルリグニンからなると結論できる。

3. 2 モイレ処理した薄切片の紫外-可視域分光分析

前述のようにモイレ処理を行った $6\mu\text{m}$ と $4\mu\text{m}$ 厚さの薄切片について紫外-可視域分光分析を行った結果を Fig. 7～Fig. 12 に示す。

まず、グアイアシルリグニンからなると思われるヒノキ仮道管壁では、 $280\sim 300\text{ nm}$ 付近の吸収以外に明瞭な吸収は認められなかった。(Fig. 7)。

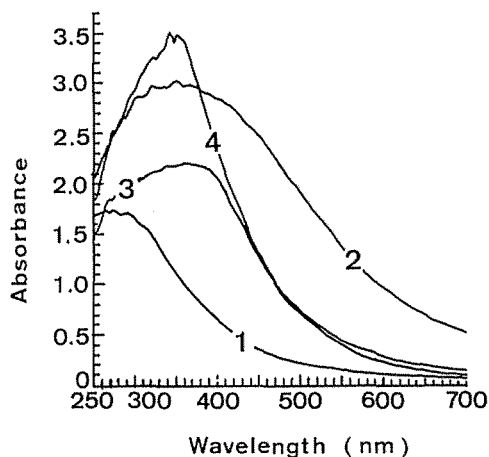


Fig. 7 UV-VIS absorption spectra on normal and compression woods in HINOKI after Maule treatment. 1: secondary wall of normal wood tracheids, 2, 3 and 4: outer S_2 , inner S_2 and cell corners of compression wood tracheids, respectively.

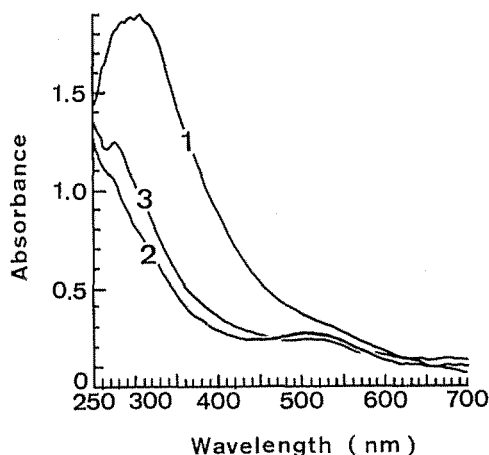


Fig. 8 UV-VIS absorption spectra on various secondary walls in MAKANBA and BUNA after Maule treatment. 1: MAKANBA vessels, 2: MAKANBA wood fibers, 3: BUNA fiber-tracheids.

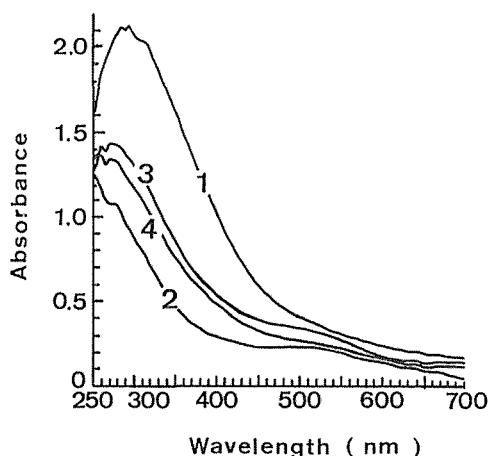


Fig. 9 UV-VIS absorption spectra on various secondary walls in MIZUNARA after Mäule treatment. 1: earlywood vessels, 2: wood fibers, 3: latewood vessels, 4: vasicentric tracheids.

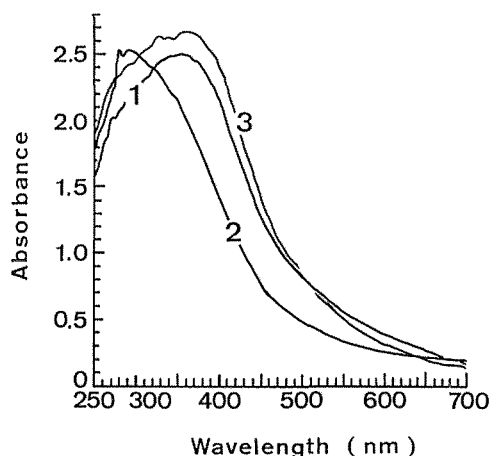


Fig. 10 UV-VIS absorption spectra on various secondary walls in MOUSOUCHIKU after Mäule treatment. 1: vessels in metaxylem, 2: fibers of bundle sheath, 3: parenchyma cells.

次に、マカンバ道管壁では、ヒノキ仮道管壁における結果とよく似たスペクトルが得られた。従って、道管壁は主としてグアイアシルリグニンよりなるといえる。それに対し、木部繊維壁では510 nm付近に吸収が認められた (Fig. 8)。これは、木部繊維壁が赤みを帯びていることによるもので、木部繊維壁は主としてシリングリグニンよりなるといえる。これらの結果はGoringらの一連の研究成果を裏付けているように思われる。

一方、ブナ木部繊維壁において510 nm付近に少し吸収が認められたが、この吸収はマカンバ木部繊維壁と比較すると弱い (Fig. 8)。このことから、ブナ木部繊維ではマカンバ木部繊維と比較してシリングリグニンの割合が少し少ないと推定される。

木部繊維壁でこのように呈色に差異があるのは興味深い、これは樹種による差異に加えて細胞の進化に関係しているのかもしれない。広葉樹材の木部繊維には形態的特徴から真正木繊維と繊維状仮道管が含まれるが、これら両者の区別は必ずしも明解ではない。そしてブナの木部繊維は繊維状仮道管からなるという指摘もある。そこでミズナラ1種内でこの関係を見ると、通導組織としてもっとも発達している孔圏道管壁では、ヒノキ仮道管壁や、マカンバ道管壁と似たスペクトルが得られた。それに対し、木部繊維のうち、強度支持組織として発達している晩材部の非常に厚壁の、真正木繊維と思われる細胞の壁では510 nm付近にマカンバ木部繊維壁と同程度の吸収が認められた。一方、晩材の小径道管壁と孔圏道管に付随する周囲仮道管壁では510 nm付近の吸収がわずかに認められた (Fig. 9)。これらのことから、細胞の機能が通導から強度支持へと変化するにつれてシリングリグニンの割合が増加しているかに見え興味深い。しかしながらこの点については今後さらに詳しく追跡する必要がある。

一方、ヒノキ圧縮あて材において、リグニンを特に多く含むS₂層外側部では510 nm付近には吸収が認められず、300～400 nmにかけて大きな吸収を示した (Fig. 7)。圧縮あて材のリグニンは

-ヒドロキシフェニル核を含み、縮合型構造が多いという特徴を持つとされているが^{[13], [11]}、このようなことにより、上記の結果が得られたのかも知れない。

また、モウソウチクでは、細胞の種類が非常に複雑であり、それぞれの吸収スペクトルも一様ではないが、いずれの場合にも510 nm付近に吸収極大は認められず、ヒノキ圧縮あて材と同様

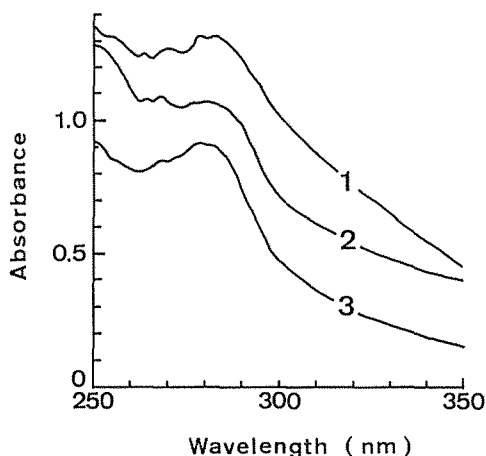


Fig. 11 UV absorption spectra on compression wood tracheids in HINOKI without Mäule treatment. 1: outer S_2 , 2: inner S_2 , 3: cell corners.

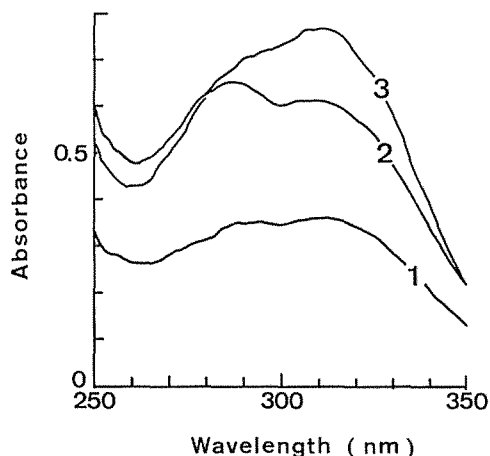


Fig. 12 UV absorption spectra on various secondary walls in MOUSOUCHIKU without Mäule treatment. 1: vessels in metaxylem, 2: fibers of bundle sheath, 3: parenchyma cells.

に 300 ~ 400 nm にかけて大きな吸収を示した (Fig. 10)。

3. 3 無染色の切片の紫外域吸収スペクトル

上記のように、圧縮あて材仮道管と、モウソウチクではモイレ反応で褐色～濃褐色を示し、その吸収スペクトルでは 300 ~ 400 nm に特異な吸収極大を持っていた。そこで、これらの細胞について、1 μ m 厚さの無染色切片でさらに検討した。

圧縮あて材仮道管では、 S_2 層外側部と内側部、コーナー部細胞間層のいずれにおいても 280 nm 付近に吸収極大を持ち、正常材と比べて大差がみられなかった (Fig. 11)。圧縮あて材のリグニンも、その大部分は正常材と変わらず、一部の特異な構造がモイレ染色によって検出されたのかもしれない。

一方、モウソウチクでは、後生木部網紋道管、繊維細胞、柔細胞においていずれも 280 ~ 320 nm 付近に吸収極大がみられたが、細胞種により、吸収スペクトルに差がみられた (Fig. 12)。このようなスペクトルとモイレ染色の結果を考えると、イネ科植物に含まれているとされている *p*-ヒドロキシフェニル核あるいはリグニンの γ 位にエステル結合しているとされている *p*-クマール酸の量はかなりのものであり、しかも細胞種別間で異なることを示すものであろう。現在の段階では、あて材およびモウソウチクの各種細胞壁におけるスペクトルの特異性を指摘できるのみであるが、これらのスペクトルをより詳しく解析し、それぞれの細胞におけるリグニンの特徴を明らかにすることが今後の課題であろう。

引用文献

- 1) SHIMADA, M., FUKUZUKA, T. and HIGUCHI, T.: Ester linkage of *p*-coumaric acid in bamboo and grass lignins. *Tappi*. 54 (1), 72-78, 1971
- 2) FERGUS, B. J. and GORING, D. A. I.: The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. *Holzforschung*. 24, 113-117, 1970
- 3) FERGUS, B. J. and GORING, D. A. I.: The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy. *Holzforschung*. 24, 118-124, 1970

- 4) MUSA, Y. and GORING, D.A.I.: Distribution of syringyl and guaiacyl moieties in hardwoods as indicated by ultraviolet microscopy. *Wood Sci. Technol.* **9**, 45-58, 1975
- 5) SAKA, S. and GORING, D.A.I.: The distribution of lignin in white birch wood as determined by bromination with TEM-EDXA. *Holzforschung*. **42**(3), 149-153, 1988
- 6) FUJII, T., SHIMIZU, K. and YAMAGUCHI, A.: Enzymatic saccharification on ultrathin sections and ultraviolet spectra of Japanese hardwoods and softwoods. *Mokuzai Gakkaishi*. **33**, 400-407, 1987
- 7) 高部圭司・深沢和三・寺島典二・福島和彦: 紫外線顕微分光法による広葉樹木部構成要素の木化過程の検討. 第32回リグニン討論会要旨集. 福岡. pp 1-4, 1987
- 8) SRIVASTAVA, L.M.: Histochemical studies on lignin. *Tappi*. **41**(4), 173-183, 1966
- 9) 飯塚堯介・中野準三: リグニンの呈色反応機構に関する研究 (第11報) Mäule 反応の呈色機構 (7). *木材学会誌*. **23**(5), 232-236, 1977
- 10) 飯塚堯介・中野準三: リグニンの呈色反応機構に関する研究 (第12報) Mäule 反応の呈色機構 (8). *木材学会誌*. **24**(8), 563-568, 1978
- 11) MESHITSUKA, G. and NAKANO, J.: Studies on the mechanism of lignin color reaction (XIII). Mäule color reaction (9). *Mokuzai Gakkaishi*. **27**(2), 111-115, 1981
- 12) IRYAMA, K. and PANT, R.: The mechanism of Mäule colour reaction. Introduction of methylated syringyl nuclei into softwood lignin. *Wood Sci. Technol.* **22**, 167-175, 1988
- 13) 諸星紀幸・榊原 彰: アテ材リグニンの化学構造について (第1報). *木材学会誌*. **17**(9), 393-399, 1971
- 14) 諸星紀幸・榊原 彰: アテ材リグニンの化学構造について (第2報). *木材学会誌*. **17**(9), 400-404, 1971

Résumé

In order to investigate the varieties of lignin structure in wood and bamboo cell walls, Mäule color reaction was applied to microscopic spectrophotometry.

The specimens studied were HINOKI (*Chamaecyparis obtusa*), MAKANBA (*Betula maximowicziana*), BUNA (*Fagus crenata*), MIZUNARA (*Quercus crispula*), HINOKI compression wood and bamboo MOUSOUCHIKU (*Phyllostachys pubescens*). HINOKI and MAKANBA were selected as the typical softwood and hardwood, respectively. BUNA is characteristic of fiber-tracheids while MIZUNARA is possessing various types of tracheids and libriform wood fibers. In addition, HINOKI compression wood and MOUSOUCHIKU contain *p*-hydroxyphenylpropane unit were studied.

With the section of 20 μ m stained by Mäule color reaction, various types of cell walls were studied (Figs. 1-6), while UV-VIS absorption was examined with using 6 and 4 μ m sections after the staining (Figs. 7-10). For 1 μ m sections, however, the staining was not applied for studying in the UV range (Fig. 11, Fig. 12).

Fiber walls of MAKANBA and MIZUNARA rich in syringyl lignin moiety were stained red showing clear absorption at 510-520 nm, whereas walls of MAKANBA vessels, MIZUNARA earlywood vessels and HINOKI tracheids rich in guaiacyl lignin moiety were stained yellow brown without showing any clear absorption at 510-520 nm. Absorption in the range 510-520 nm is thus due to the presence of the syringyl propane unit. As a result, richness of the syringyl lignin in the cell walls was found to decrease in the following order;

fiber > fiber-tracheid > tracheid $\approx$ vessel

The fiber is known to act as a mechanical or physical support while the vessel or earlywood tracheid plays an important role in water conduction. Thus, from a cell

evolution viewpoint, overall results suggest that the cell type being rich in syringyl lignin acts as mechanical or physical support rather than water conduction.

Cell walls of the compression wood tracheids and some cells of the bamboo were stained dark brown and showed peculiar absorption around 300–400 nm after the staining. Also in the untreated sections, absorption at 280–320 nm were detected in bamboo cells. These results are due perhaps to the presence of *p*-hydroxyphenyl propane unit and *p*-coumaric acid in these cell walls.