

# *Laminaria japonica* Areschoug の細胞壁の 微小繊維と $\alpha$ -セルロースの超微細構造

奥 田 弘 枝

## The Fine Structure of the Microfibril and $\alpha$ -Cellulose in the Cell Wall of *Laminaria japonica* Areschoug

Hiroe OKUDA

### Abstract

The methods to observe the microfibril and  $\alpha$ -cellulose of the cell wall by means of transparent electron microscope, using the dried *Laminaria japonica* Areschoug as materials, were studied. The results revealed that

1. The damage of the microfibril was mostly slight in the material which was extracted by hot water at 90°C for 60 minutes.
2. In the material which was extracted by ethanol some of the microfibrils are embedded in amorphous matrix of cell wall.
3. The damage of microfibrils were remarkable in the material which was extracted by hot water, ethanol and then alkali solution in order.
4. In the  $\alpha$ -cellulose which was treated with chlorinate after extraction described above 3, usual microfibrils were not observed but specific figure of the microfibril was noticed.

### I 緒 言

乾燥コンブを煮コンブや佃煮などに加工調理する際、風味づけと組織を柔軟にするため、各種の調味料や添加物を加えて煮熟味つけするが、調味成分の影響に関する研究は大石ら (1971) の報告があるにすぎない。筆者らは、各種の主要調味成分で構成したモデル調味液で煮熟した藻体の物性変化 (奥田ら 1987<sup>①</sup>) や形態学的変化 (奥田ら 1987<sup>②</sup>) について検討し、さらに、物性変化の機構を明らかにする目的で、アルギン酸の性状に及ぼす調味成分の影響 (奥田ら 1986) について研究してきた。これらの研究結果から、アルギン酸以外に細胞壁の構造自

体に変化が生じているのではないかと推察されることから、本報は細胞壁の構造変化を検索する目的で、細胞壁の微小繊維と  $\alpha$ -セルロースの超微細構造の形態学的観察方法を試みた。

## II 実 験 方 法

### 1. 材 料

本研究に用いた材料は、1985年8月、北海道で採取された、2年生の天然マコンブ (*Laminaria japonica* Areschoug) を天日乾燥させたもので、葉体の中帯部を  $2 \times 2$  cm に切り取って使用した。用いた葉体の平均値は重量 120 g, 葉長 280 cm, 葉幅 (最大) 17 cm, 中帯部 5~6 cm, 水分量は湿量基準で 9 %, 乾量基準で 15 % であった。

### 2. 実験方法

#### (1) 細胞壁からの $\alpha$ -セルロースの分離

マコンブの細胞壁からの  $\alpha$ -セルロースの分離は Fig. 1 の方法によった。 $2 \times 2$  cm に切り取った材料 15 g を  $90^\circ\text{C}$  ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) の蒸留水 (450ml) に投じ、60分間浸漬加熱後、凍結乾燥 ( $-40^\circ\text{C}$  で凍結,  $35^\circ\text{C}$  で乾燥) し、粉碎した。粉碎後、J. Cronshaw ら (1958) の方法に従って、沸騰エタノール (30ml) の中で30分間、数回洗滌し、さらにアセトン (20ml) で2回洗滌して、脂質や色素を除き、この残渣を出発物質とした。これを  $40^\circ\text{C}$  以下で減圧乾燥して、さらに細胞壁成分の分画を行った。蒸留水 (150ml) を湯せんで  $90^\circ\text{C}$  ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) に保った中で12時間加熱して、エタノール不溶性のフコイダンやアルギン酸の一部とその他の多糖類を除去した後、アセトンを加えて洗滌し、 $40^\circ\text{C}$  以下で減圧乾燥した。熱水による処理後、材料を三角フラスコに入れて、4 N 水酸化カリウム (60ml) を加え、フラスコ内の溶液上の空気を窒素ガスと置換し、密栓して  $25^\circ\text{C}$  を保ち、4時間の間、10分間隔で攪拌した。これを濾過し、残渣に 4 N 水酸化カリウム (15ml) と蒸留水 (150ml), および 2 N 酢酸 (15ml) を加えて洗滌し、ヘミセルロース、アルカリ可溶性セルロース、フコイダンやアルギン酸等を除去した。さらに、蒸留水、アセトンで洗って減圧乾燥した。 $\alpha$ -セルロースの分離は塩素化によった。すなわち、上記の処理を施した試料 (約 0.5 g) を蒸留水 (30ml) に入れ、氷酢酸一滴と亜塩素酸ナトリウム (0.15 g) を1時間の間隔で加えて、 $75 \sim 80^\circ\text{C}$  を保ちながら4時間処理し、たん白質や色素をほぼ完全に除去した。これを濾過し、蒸留水とアセトンで数回洗滌した後、減圧乾燥した。

#### (2) 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察用試料の調整

TEM 観察用の試料は、次の5種類を用いた。

- ① 一定の大きさ ( $2 \times 2$  cm) の乾燥マコンブを  $90^\circ\text{C}$  ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) に加温した蒸留水に投じ、湯せんでこの温度を保ちながら60分間浸漬加熱後、常温乾燥 ( $25^\circ\text{C}$ ) した。
- ② 一定の大きさの乾燥マコンブを常温乾燥し、沸騰エタノールで30分間数回洗滌し、アセ

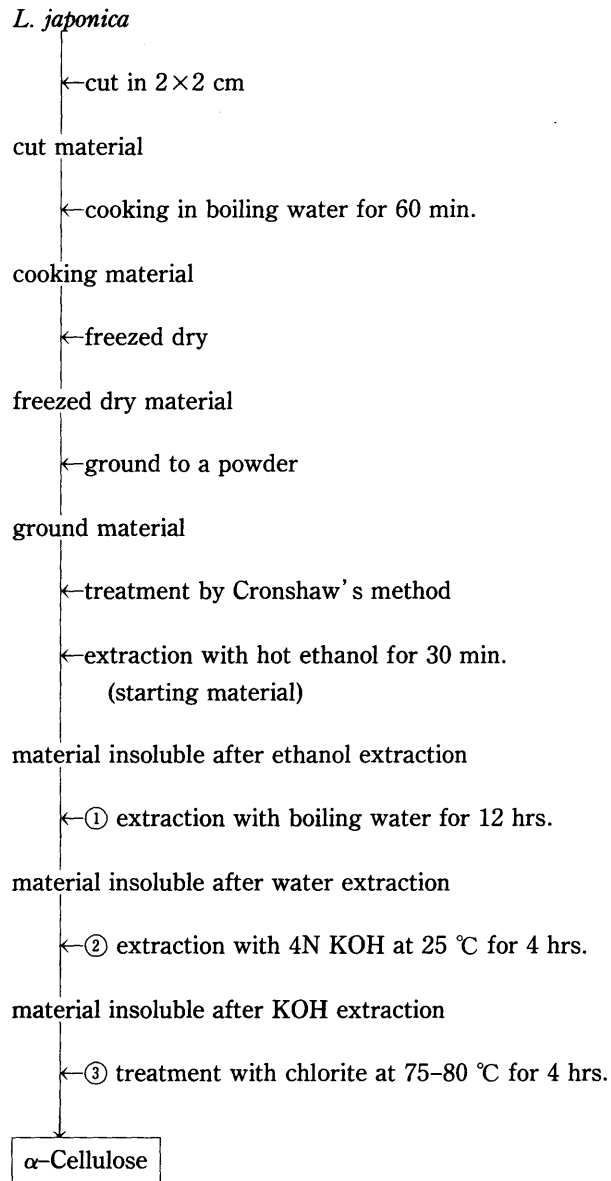


Fig. 1 Fractionation of  $\alpha$ -cellulose of tangle, *L. japonica*

トンで2回洗滌した。

© 上記の①の処理をした後、②と同様に沸騰エタノールで30分間数回洗滌し、アセトンで

Table 1. The size of the microfibrils of *L. japonica*

Species	Width in Å	Thickness in Å
Boiling water extraction (90°C, 60 min.)	100—200	30—50
Ethanol extraction (30min)	25—40	—
Boiling water extraction (90°C, 60min.) →Ethanol extraction (30min.)	10—200	5—80
Ethanol extraction (30min.) →Boiling water extraction ( 90°C, 12hrs.) →KOH extraction (4hrs.)	10—200	5—80
Ethanol extraction (30min.) →Boiling water extraction ( 90°C, 12hrs.) →KOH extraction (4hrs.) →Chlorite treatment (4hrs.)	10—660	20—80

2回洗滌した。

④ ⑥の処理をした後、90°C (±2°C) の蒸留水で12時間加熱し ( Fig. 1 の①), さらに4 N水酸化カリウム (25°C) で4時間処理した ( Fig. 1 の②)。

⑥ Fig. 1 の方法に従って、細胞壁から  $\alpha$ -セルロースを分離した。

④～⑥の試料の細胞壁、および、⑥の試料の  $\alpha$ -セルロースの超微細構造の観察はレプリカ法 (replication) を用いた。これらの試料を3×3 mmに切断し、試料台に接着剤で固定して、蒸着装置 JFD-7000 で白金 (Pt) と carbon を蒸着し、酢酸メチル (methylacetate) で2回洗滌して、接着剤を除去した。ついで70%硫酸に一晩浸漬して試料を溶解後、レプリカ膜をすくい取って、蒸留水で洗滌し、グリッドメッシュ (grid mesh) に載せた。観察は JEM-1200EX 型 TEM を用い、加速電圧は 100 KV で行った。

### Ⅲ 実験結果および考察

乾燥マコンブの最外層の細胞壁、表層、皮層の細胞壁、および、髓層の篩管の細胞壁はいずれも微小繊維で形成されている (奥田1982, 1983, 1984)。連続性のある微小繊維が不規則に分散しており、方向性は見られなかった (Fig. 2)。緑藻類ジュズモ属のケートモルファ・メ

ラゴニウム (*Chaetomorpha melagonium*) の微小繊維には方向性があり、互いに90度の角度で二方向に配列し、第三の方向の繊維は、それらの繊維に45度の角度で配列していることが報告されているが (Mackie *et al.* 1974), マコンブの微小繊維はこれとは全く所見を異にしていた。微小繊維の幅は約100~200 Å, 厚さは約30~50 Åであった (Table 1)。藻類の細胞壁を構成する物質は、Fig. 2 のように微細な繊維状の結晶構造を示すものと (粗繊維), これらを埋める非繊維性の粘質多糖からなる。これらの化学組成は高等植物と異なり、極めて変化に富み、複雑である。粗繊維成分は、高等植物ではセルロース (cellulose) が主で、他にリグニン (lignin) やヘミセルロース (hemicellulose) を含有している。藻類では、紅藻カモガシラノリ (*Dermonema pulvinatum*) (入来ら1972) とアオカワモズク (*Batrachospermum virgatum*) は粗繊維がセルロースとキシラン (xylan) からなり、紅藻オゴノリ (*Gracilaria verrucosa*) と緑藻アオミドロ (*Hydrodictyon reticulatum*) はセルロースとマンナン (mannan) が、ヒトエグサ (*Monostroma nitidum*) にラムナン硫酸が存在することが報告されている (入来ら1960)。また、Iriki ら (1960) や Maeda ら (1966) は、同じ緑藻のクダモ目 (*Siphonales*) のハゴロモ科 (*Udoteaceae*), イワツタ科 (*Caulerpaceae*), ハネモ科 (*Bryopsidaceae*) およびチョウチンミドロ科 (*Dichotomosiphonaceae*) に属するものから  $\beta$ -1, 3-キシランを、ミル科 (*Codiaceae*) およびカサノリ目 (*Dasycladales*) のカサノリ科 (*Dasycladaceae*) に属するものから  $\beta$ -1, 4-マンナンの存在を明らかにしている。また、紅藻アマノリ属 (*Porphyra*) にはセルロースはなく、細胞壁外層から  $\beta$ -1, 3-キシランが検出されている (Frei *et al.* 1964, Miwa *et al.* 1940)。このようにかなりの種類の藻類からセルロースの他にマンナン, キシランからなるヘミセルロースの存在が証明されている。セルロースの含有量は、*Laminaria* 種の葉状部では乾量で3~6%, 茎状部で6~10%である。セルロースの型は X 線回折図で結晶部のよく発達したセルロース I 型に属する (前田ら1974)。

乾燥コンブをエタノールとアセトンで数回洗滌して、乾物中に約1.4%含有される脂質や色素 (chlorophyll a, c,  $\beta$ -carotene, fucoxanthin, neofucoxanthin A, neofucoxanthin B, violaxanthin, flavoxanthin, neoxanthin) を除去した場合 (Fig. 3), 組織の表面にわずかに浮き出た、不規則に分布する微小繊維が観察された。Fig. 2 のように緻密な状態の繊維ではなく、アモルファス (amorphous) な物質の中に繊維が半ば埋まっており、微小繊維の幅は約25~40 Åであったが、厚さの測定は不可能であった。繊維を埋めているアモルファスな物質は粘質多糖と考えられ、フコイダン (fucoidin) やアルギン酸 (alginic acid) の存在が認められている (Fischer *et al.* 1955a, 1955b, 殖田ら1967, 前田ら1974, 西沢1983)。これらの粘質多糖は他の藻門には見られない多糖類であるが、例外として一部の紅藻 (*Serraticardia maxima*) にはアルギン酸の存在が認められている (Okazaki *et al.* 1982)。フコイダンは、乾燥コンブを水に

浸漬しておく、非常に粘重な物質として抽出されてくる水溶液の多糖類である。その含有量は季節や生育場所の深さによっても異なるが、1～2% (乾量) 存在する。フコース (fucose) の他に中性糖のガラクトース (galactose)、マンノース (mannose)、キシロース (xylose)、少量のグルクロン酸 (glucuronic acid) を含む。さらにエステル型硫酸を含むのが特徴である (西沢 1979, mian *et al.* 1973)。硫酸多糖は細胞間にマトリックスを形成して存在し、非常に吸湿性をもつ特性があり、藻体が長時間、乾燥状態に置かれても、脱水状態になるのを防ぐため、アルギン酸などとともに藻体表面に分泌される粘質物の小滴を形成すると考えられる (前田 1974, 奥田 1982)。アルギン酸は、褐藻類の細胞膜の外層部を構成する主要な成分である。筆者らの実験によると (奥田 1986)、乾燥マコンブ中に 14.4% (乾量) 含有されていたが、生育場所、季節、藻体の部位などによって含有量が異なり、一般に 9 月～10 月に最高となり、3 月～4 月に最低となると言われている。水には不溶の酸性多糖で、熱水 (90℃±2℃) で 60 分加熱後の溶出量は約 1% であった。中川は、加熱温度が高くなるに従い、溶出量が増加することを認めている。希アルカリで処理すると抽出されてくるが、酸には不溶性である。構成成分は、D-マンヌロン酸 (M) と L-グルロン酸 (G) の 2 種類のウロン酸から成り、M のみから成る M ブロックと、G のみから成る G ブロックと、M と G の混合ブロックがあり、M と G との量比は藻の種類、産地 (日本産のコンブは M が多い)、藻体の部分、成長段階などによって異なっているが (西沢 1979, 1983)、アルギン酸分子は著しく不均一なものと考えられる。生体内における主な働きは、藻体を構築する材料になることと、イオン交換の役割をもつと言われている (Chapman 1979)。

Fig. 3 の微小繊維は、アモルファスな細胞壁基質の中に半ば埋まった状態であるのに対して、Fig. 2 は、微小繊維の形態を明瞭に観察することが出来る。これらの形態上の違いは、乾燥マコンブを熱水で 60 分間加熱することによって (Fig. 2)、細胞壁基質を構成する粘液多糖のフコイダンと少量のアルギン酸が溶出する他に、水に可溶性成分が溶出したため、微小繊維自体が浮き出た様相を呈しているためではないかと考えられる。筆者の実験によると (奥田 1984)、熱水で 60 分間加熱することにより、水溶性成分であるアミノ態窒素 (乾量中 2089 mg %) は約 90%、Cl (乾量中 6697 mg %) は約 90%、Ca (乾量中 278 mg %) は 42%、K (乾量中 4899 mg %) は約 70% 溶出した。その他 P, Fe, I, Mg, Si, Br や微量のビタミン類 (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, ニコチン酸) の溶出、および、熱水に可溶性貯蔵多糖類のラミナラン (成熟期で乾量中 20～30%) やマンニトール (乾量中 9～30%) の溶出が推察される。セルロース繊維は、約 70% の結晶領域と無定形な非結晶領域からなり、両者の間には明確な境界はなく、一本の長いセルロース分子は結晶、および、非結晶領域にまたがっている。熱水で 60 分加熱することによって、セルロースの結晶部分が部分的に崩れていることが推察される。エタノールやアセトンで洗滌

したものは (Fig. 3), 脂質や色素等は除去されるが, これらの溶剤に不溶性の物質や, 細胞壁基質を構成するアモルファスな物質は除去されないため, 微小繊維の細部にわたる形態観察は困難であった。

熱水で60分間加熱して, エタノールとアセトンで数回洗滌したものは (Fig. 4), 細胞間基質の水溶性成分や脂質, 色素等は除去され, お互いに不規則に入り組んだ微小繊維が観察された。溶剤処理による影響のためか, 繊維の連続性が失われている部分も見られた。微小繊維の太さにバラつきが大きく (Table 1), Fig. 2 に見られた繊維の幅と同じくらいのも (約200 Å), 非常に細いもの (約10 Å) とが混在していた。厚さは約5~80 Åであった。

Fig. 5 は, 乾燥マコンブをエタノールとアセトンで数回洗滌し, 熱水 (90°C) で12時間抽出後, さらに水酸化カリウムで4時間抽出してヘミセルロース ( $\beta$ -セルロース,  $\gamma$ -セルロース) や, アルカリ可溶性成分を除去したものである。ヘミセルロースのキシランは D-キシロースからなり, マンナンは D-マンノピラノースが  $\beta$ -1, 4 結合で直鎖状をした多糖類で, アルカリによって容易に溶出される。フコイダン, アルギン酸等の細胞間基質やその他の多糖類は完全に除かれており, Fig. の微小繊維はかなり純度の高いセルロースと考えられる。微小繊維の形態は Fig. 4 に近く, 繊維の幅, 厚さともに Fig. 4 に類似していた (Table 1)。しかし, Fig. 2 に比較すると, 繊維の密度は粗になっており, 寸断され, 連続性が失われていた。セルロースはグルコース  $\beta$ -1, 4 結合からなる重合度3000~10000の巨大分子で, これらの分解が生じたものと考えられる。

Fig. 6 は, Fig. 5 の試料をさらに亜塩素酸ナトリウムで処理し, たん白質 (乾量中約4~7.5%) や色素等もほぼ完全に除去することによって得られた, 純粋な標準セルロースと考えられる,  $\alpha$ -セルロースの超微細構造である。Fig. 1~Fig. 5 の微小繊維の構造とはその形態を異にしていた。一本ずつの微小繊維は判別しにくい, 細いものは約10 Åくらいであった。数本の細い繊維が一緒になって, 太いものは約600 Å (Table 1) の縄状になってよじれ, これらの繊維が密に, 複雑によじれあって, ほぼ同方向に流れていた。乾燥マコンブを熱水, エタノール, アルカリ抽出, および, 亜塩素酸ナトリウムで処理し, 細胞壁から  $\alpha$ -セルロースを分離する過程で,  $\alpha$ -セルロースの分子量の低下が起きている可能性が考えられる。

#### IV 要 約

2年生の天然マコンブ (*Laminaria japonica* Areschoug) を天日乾燥させた材料を用い, 細胞壁の微小繊維と  $\alpha$ -セルロースの超微細構造を観察する方法を検討し, 次のような結果を得た。

1. 熱水で加熱 (90°C, 60 min.) 抽出したものは, 最も微小繊維の損傷が少なかった。

2. エタノールで抽出したものは、アモルファスな細胞壁基質の中に、微小繊維が半ば埋まった状態で観察された。

3. 熱水、エタノール、および、アルカリで抽出したものは、微小繊維に損傷が見られた。

4. 細胞壁から完全に分離された  $\alpha$ -セルロースは、上記の微小繊維とは異なる繊維構造が観察された。

終りに、終始御懇切な御指導を頂いた広島大学 川上いつる元教授、広島大学原爆放射能医学研究所 佐藤幸男教授に深く感謝申し上げます。御協力を頂いた広島県立食品工業技術センター 中川禎人氏に心から厚く御礼申し上げます。

## 引 用 文 献

- 城所清一・大石圭一 市販昆布加工品の“かたさ”について. 調理科学. 1971. 4 : 54-57.
- 奥田弘枝・中川禎人 乾燥コンブの軟化度に及ぼす調味成分の影響 (第1報). 調理科学. 1987④. 20 (4) : 印刷中
- 奥田弘枝・中川禎人 乾燥コンブの軟化度に及ぼす調味成分の影響 (第2報). 調理科学. 1987⑤. 20 (4) : 印刷中
- 中川禎人・奥田弘枝 乾燥コンブの軟化度に及ぼす調味成分の影響と微細構造 (2). 昭和61年度日本調理科学会研究発表要旨集. 1986. 47.
- Cronshaw, A. and Preston, R. D. A chemical and physical investigation of the cell walls of some marine algae. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1958. 27: 89-103.
- 奥田弘枝 褐藻マコンブの粘液腔道および分泌細胞の電顕的観察. 日本藻類学会第6回春季大会講演要旨. 1982. 95.
- 奥田弘枝 乾燥マコンブの復水特性とその微細構造 (1). 広島女学院大学論集. 1983. 33 : 251-271.
- 奥田弘枝 乾燥マコンブの復水特性とその微細構造 (2). 広島女学院大学論集. 1984. 34 : 215-236.
- Chapman, A. R. O. *Biology of seaweeds*. 1979. University Park Press. Maryland. U. S. A. 千原光雄訳. 1981. 10-11. 共立出版. 東京.
- 入来義彦・森田克己 紅藻カモガシラノリ *Nemalion pulvinatum* の  $\beta$ -セルロース区分の多糖類について. 農化. 1972. 46 (11) : 585-590.
- 入来義彦・三輪知雄 日本植物学会大会. 1960.
- Iliki, Y. and Miwa T. Chemical nature of the cell wall of the green algae, *Codium*, *Acetabularia* and *Halicoryne*. *Nature*. 1960. 185:178-179.
- Maeda, M. Kuroda, K. Iliki, Y. Chihara, M. Nisizawa, K. and Miwa, T. Chemical nature of major cell wall constituents of *Vaucheria* and *Dichotomosiphon* with special reference to their phylogenetic positions. *Bot. Mag. Tokyo*. 1966. 79:634-643.
- Frei, E. and Preston, R. D. Non-cellulosic structural polysaccharides in algal cell wall II. Association of xelan and mannan in *Porphyra umbilicalis*. *Proc. Roy. Soc. B*. 1964. 160:314-327.
- Miwa, T. *Biochemische Studien über die Zellmembran von Braun und Rotalgen*. *Jap. J. Bot.* 1940. 11:41-128.
- 前田昌徹・西澤一俊 総合多糖類科学 (下). 1974. 311-321. 原田篤也・三崎 旭編. 講談社. 東京.
- Fischer, F. G. and Dörfel, H. Die Polyuronsäuren der Braunalgen. *Z. Physiol. Chem.* 1955④. 302: 186-203.



- Fischer, F. G. and Dörfel, H. Die papierchromatographische Trennung und Bestimmung der Uronsäuren. Z. Physiol. Chem. 1955⑥. **301**:224-234.
- 殖田三郎・岩本康三・三浦昭雄 水産植物学. 1967. 403-405. 恒星社厚生閣. 東京.
- 西澤一俊 海藻の生化学と利用. 1983. 15-16. 恒星社厚生閣. 東京.
- Okazaki, M. Furuya, K. Tsukayama, K. and Nisizawa, K. Isolation and identification of alginic acid from a calcareous red alga. *Serraticardia maxima*. Botanica Marina. 1982. **25**:123-131.
- 西澤一俊 藻類研究法. 1976. 616. 西澤一俊, 千原光雄編. 共立出版. 東京.
- Mian, A. J. and Percival, E. Carbohydrates of the brown seaweeds *Himanthalia lorea*, *Bifurcaria bifurcata* and *Padina pavonia* Part I. Extraction and fractionation. Carbohydr. Res. 1973. **26**:133-146.

### Explanations of the Figures

- Figs. 2-6** Electron micrographs of cell wall materials of *Laminaria japonica* Areschoug. Specimens shadowed with Pt-carbon.
- Fig. 2** Cell wall was extracted by hot water at 90°C for 60 minutes. Irregularly arranged microfibrils are seen. ×30000
- Fig. 3** Cell wall was extracted by ethanol for 30 minutes. Some of the microfibrils are embedded in amorphous materials. ×30000
- Fig. 4** Specimen was extracted by hot water and then by ethanol for 30 minutes. Continuity of the microfibrils are lost. ×30000
- Fig. 5** Specimen was extracted by ethanol for 30 minutes, hot water at 90 °C for 12 hours and then KOH for 4 hours. The density of the microfibrils are rough and are cut to pieces. ×30000
- Fig. 6** Specimen was extracted by ethanol for 30 minutes, hot water at 90 °C for 12 hours, KOH for 4 hours, and chlorite for 4 hours. The extracted  $\alpha$ -cellulose show specific figures of the microfibrils. ×30000



