

木に学ぶ、きのこに学ぶサイエンス

西村 裕志^{1*}

Biomass science inspired by trees and fungi

Hiroshi Nishimura^{1*}

概要

陸上の炭素循環にとって重要な樹木と、これらを分解する「きのこ」を研究することは、バイオマスの理解と利活用へ向けた重要な知見となる。木材細胞壁中で最も分解しにくい芳香族高分子であるリグニンの分子構造とその生分解機構を明らかにする研究、特に木質バイオマスを包括的に解析する方法として最新の核磁気共鳴法 (NMR 法) を用いる研究により多くの知見が得られている。分子構造に基づいた理解を進めることで、木質バイオマスの特性を活かした利活用へつなげていきたい。

1. はじめに

私たちの周りは生き物であふれている。外に目を向けると、木々や草花をはじめとする植物や昆虫、鳥、動物たちがいる。多くの生物にとって調和がとれた環境は多様な生物の宝庫である。その中で目立たないものの、菌類も重要な役割を担っている。

地球上の炭素循環をみると、陸上では主に樹木をはじめとする植物が太陽エネルギーから二酸化炭素(CO₂)を光合成によって蓄える。したがって、植物は生態系においてはCO₂を有機物へ変換する「生産者」といえる。それに対して、私たち人間を含めた動物は植物を直接あるいは間接的に食べる「消費者」として、菌類は動植物を分解して戻す「分解者」として考えられている。植物が蓄えた有機物を植物バイオマスといい、特に存在量の多い樹木を木質バイオマスという。

近年の急速な化石資源の消費は地下に蓄積された炭素を短期間に大気中に放出することであり、環境のバランス変化が生じている。こうして私たちが直面している環境変動や環境汚染、資源枯渇といった問題に対して、化石資源ではなく地球表層にあるバイオマスを再生産しながら活かすシステムの構築が持続可能な生存圏の未来に必要なだと考えている。

2. 生態系における「きのこ」

化石資源の多くは過去の植物や微生物群が長い時間をかけて還元されて炭素濃縮されたものと考えられている。現在の樹木は木材腐朽菌と呼ばれる「きのこ」によって分解されるが、今からおよそ3億年前の大森林時代(石炭紀)には、まだ現代の「きのこ」が存在せず、多くが石炭化した¹⁻²⁾。

現代の森を形成する樹木は単独ではなく、菌根菌をはじめとする微生物と共生関係にある。たとえばマツタケはアカマツの木と共生し、アカマツから養分をもらいながら、窒素やリンなどの必要な栄養素をアカマツに供給する。そして、枯れた木は木材腐朽菌によって速やかに分解される。これが森の新陳代謝となっている。

2016年7月19日受理.

¹〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所バイオマス変換分野.

*E-mail: hiroshi_nishimura@rishi.kyoto-u.ac.jp

ここで「きのこ」について説明する。「きのこ」と聞いて思い浮かべるシイタケ、シメジ、マツタケなどは、分類学的には担子菌や子囊菌に属している。私たちが食べる部分は子実体と呼ばれる胞子を飛ばす器官で、植物における花のようなものといえる。実際の「きのこ」の本体は菌糸体で地中や木の中にある。菌糸は普段目にするには少ないが、たとえばナラタケの仲間は山一面を覆うこともあり、一例では、菌糸体をまとめると推定重量 100 トン、菌糸が 15 ヘクタールにわたって広がっていたという報告がある。一個体として見れば、とても巨大な生物といえる³⁾。このように菌類は目立たないものの、生態系において重要な役割を担っている。菌類全体では、少なくとも 150 万種が存在すると推定される。現在知られている菌類は 8 万種程度であり、まだまだ未知の菌類がたくさんいる¹⁻²⁾。



図 1:大杵社の大杉(大分県) 推定樹齢 1000 年以上とされている。

3. 木質バイオマス

樹木は、よく知られているように大きく長寿命である。図 1 の写真は湯布院の近くにある杉の木であるが、樹高 30 メートル、推定樹齢 1000 年と言われている。このような大きさを維持し支えるためには強固な木質細胞が不可欠である。樹木の生きている細胞は樹皮の下の形成層と辺材の一部までで、大部分の木質細胞は細胞内が抜け落ちて細胞壁だけとなり、樹木を支えている。細胞壁はセルロース、ヘミセルロースなどの高分子多糖とリグニンという芳香族高分子で構成されている。これらをまとめてリグノセルロースと呼ぶ(図 2)⁴⁾。セルロースは紙の原料になるパルプの主要成分である。リグニンは茶色く、難分解性であるので、脱リグニン処理が木材利用の課題になってきた。現在は化学薬品処理や物理粉碎処理によってパルプ化が行われているが、環境に穏和な方法で、植物が作り出した天然の分子構造を活かした利用法の開発が求められている。

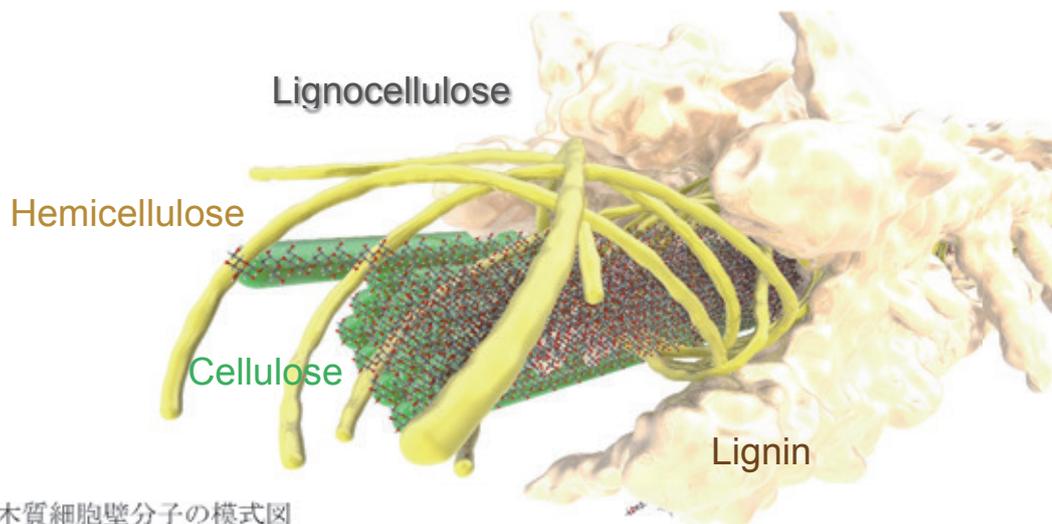


図 2 : 木質細胞壁分子の模式図

セルロースの周りをヘミセルロースとリグニンが覆っている。併せてリグノセルロースと呼ぶ。

4. 木を分解する「きのこ」、木材腐朽菌

木を分解する「きのこ」を木材腐朽菌という。主に木材の白枯れを引き起こす白色腐朽菌と褐変させる褐色腐朽菌とに分けられる。白色腐朽菌はリグニンを分解する能力をもち、自然界における木質バイオマスの分解者として重要である。代表的な例はシイタケやナメコ、エノキタケなどがある。白色腐朽菌はリグニンとともにセルロースを分解するが、一部の選択的白色腐朽菌と呼ばれる種類はセルロースの分解率が低く、リグニンを高選択的に分解する。褐色腐朽菌はリグニンを分解する能力を持たず、もっぱらセルロース、ヘミセルロース多糖を分解、資化する。代表的な例はサルノコシカケやキチリメンタケなどである。最近の研究では、褐色腐朽菌が腐朽過程でリグニンの構造を部分的に分解することが報告されている⁵⁾。

図3は木材細胞の内腔へ選択的白色腐朽菌の菌糸が進入し、リグニンの分解が生じている際の紫外線顕微鏡写真とその模式図である⁶⁾。菌糸は周りにスライム状のグルカン多糖(主に β -1,3グルカンから成る)が覆い、分解酵素や代謝物を分泌し、酵素反応やラジカル反応を駆使して難分解性のリグニンを分解していく。

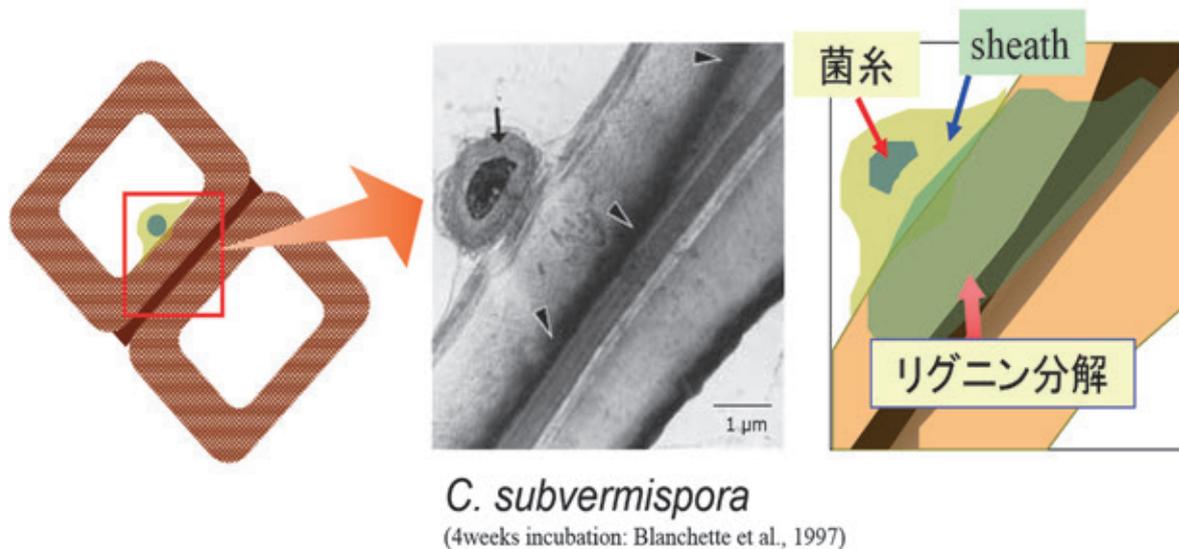


図3：選択的白色腐朽菌の菌糸と木材細胞壁の分解

紫外線顕微鏡写真と模式図。菌糸を覆うグルカン層(sheath)との接触面からリグニンの分解がみられる。

図4は典型的な選択的白色腐朽菌と通常の白色腐朽菌による分解後の木材細胞の模式図および電子顕微鏡写真である。選択的白色腐朽菌においては、細胞壁内と、特に細胞間層のリグニンが強力に分解されているのに対して、通常の白色腐朽ではリグニンとともに多糖であるセルロースが分解され、細胞壁の薄壁化が観察される。このような腐朽形態の違いは、木材細胞内腔に侵入した菌糸から分泌されるリグニンやセルロースの分解酵素が直接、木材細胞壁内に浸透するかどうかによって考えられている。通常、菌体外に分泌される分解酵素の分子サイズは木材細胞壁の細孔より大きいため、木材細胞壁内へは侵入できない。このため、多くの白色腐朽菌は、活性酸素種であるヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)をフェントン反応(遷移金属のレドックス反応)サイクルを介して発生させることにより木材細胞壁中の多糖をぼろぼろにし、分解酵素を侵入させていく。これに対し、*Ceriporiopsis subvermispora*に代表される選択的白色腐朽菌は、木材腐朽がかなり進行した段階になっても、分泌した分解酵素を木材細胞壁内に侵入させることなく、酵素から遠く離れた細胞間層や細胞壁深層のリグニンを高選択

的に分解する。このユニークな腐朽メカニズムは、細胞壁の侵食なしに広範囲のリグニンを分解する、いわば遠隔攻撃であり、その主役は菌糸から分泌される低分子量の代謝物であると考えられている。これまでの研究で、特徴的な二次代謝物であるセリポリック酸を分泌し、これが選択的リグニン分解反応において重要な役割を担っていることがわかっている。セリポリック酸は遊離脂肪酸を部分構造に含むジカルボン酸で、類似した構造の天然物には地衣類が産生するケトメリック酸などの地衣酸がある⁷⁻¹⁰。

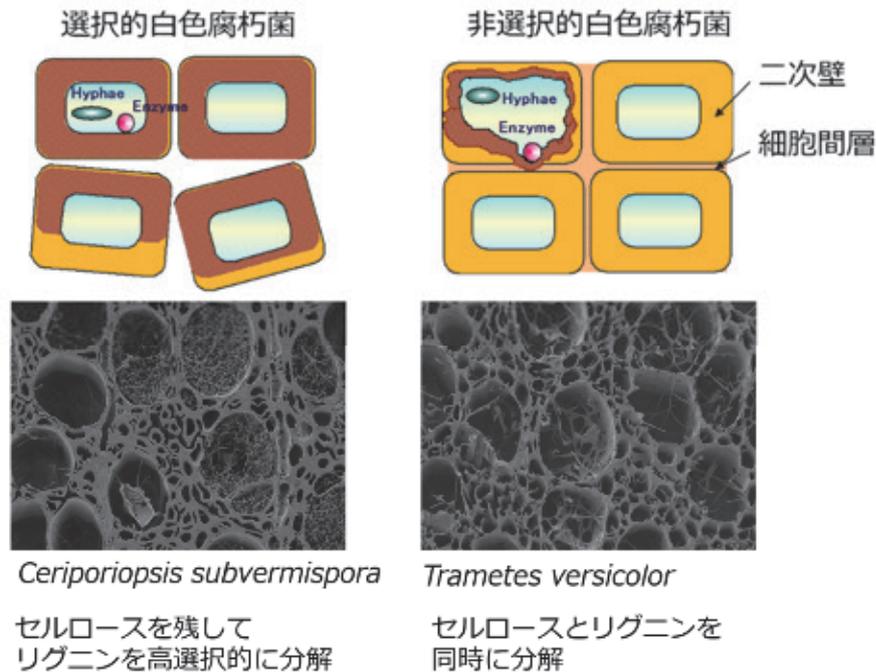


図4: 選択的的白色腐朽と非選択的的白色腐朽後の木材細胞の模式図および電子顕微鏡写真

5. 木質細胞壁の分子構造を見る方法

リグノセルロースは互いに多様な結合で三次元の網目状高分子を形成している。この高分子ネットワークの結合構造を正確に把握することは木質バイオマスの戦略的な変換、利用につながる上で大変重要である。特に、リグニンの分岐構造やリグニンと糖の結合構造は、その存在量は少ないもののバイオマスの高分子ネットワークを“ほどく”ための鍵となる構造である。

リグノセルロースの分子構造を解析する有力な方法に核磁気共鳴法（NMR法）がある。NMR法は非破壊測定法で、試料中の有機物を包括的に観測することができ、医療機関にあるMRIと同様の原理を利用している。MRIでは主に水分子のプロトン(^1H)密度と状態の違いを画像化する。例えばプロトンのT1、T2緩和をそれぞれ強調することで体内組織を観察することができる。NMR法では、有機分子のプロトン(^1H)とカーボン(^{13}C)の核スピン情報から、1次元または2次元スペクトルデータとして分子構造情報を得る。これを基に、化学分解や成分分離、微生物分解など、さまざまなバイオマスの変換反応過程における構成成分の変化を観測することができ、バイオマスの利活用を進める基盤となる。私たちは溶液NMR法を用いて、リグノセルロースの構造解析や木材腐朽菌による生分解過程の分析を行っている。単一の有機分子の分析と異なり、木質バイオマスは分子量分布をもった高分子の混合物であり、多様な結合構造が存在するため、分析と構造解析が難しいという問題があり、分析技

術の開発を行っている。

図5に木質バイオマスのNMR分析の流れを示す。木材は固体であるので、溶液NMR測定のためには、できるだけ試料調製段階での構造変化の影響を防ぎつつ溶解する必要がある。そこで、できる限り温和な条件として、窒素雰囲気下、乾式遊星型ボールミル粉碎を行い、数ミクロンの微粉末木粉を調製する。これを有機溶媒に溶解させてNMR測定を行うと、図6に示すような ^1H - ^{13}C 相関二次元HSQC NMRスペクトルを取得することができる。二次元HSQC NMR法はプロトン(^1H)とカーボン(^{13}C)の直接結合を観測する方法で、一次元のNMRスペクトルではオーバーラップするシグナルを分離することができるため、バイオマス分子の構造、特に多様な結合ユニットの状態を判別することができる。また、ロングレンジ相関NMR法であるHMBC法(2結合~3結合離れた位置の炭素と水素の相関を観測する手法)を用いて、さらに詳細な構造情報を得ることができる。

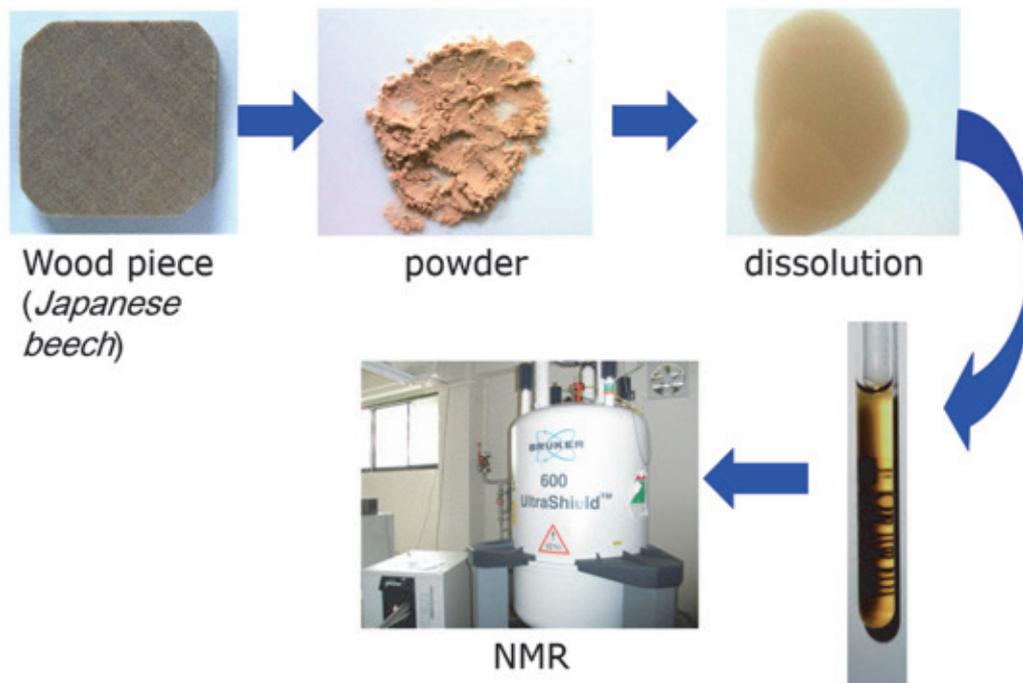


図5：木質バイオマスのNMR分析の流れ

固体の木材を微粉末化し、溶解後、サンプル管へ入れ溶液NMR測定を行う。

木質バイオマスの特徴として、高分子であり比較的粘性が高いという点がある。これはNMRスペクトル上において、ブロードで分解能が低いシグナルを与える原因となる。そこで私たちは、主に蛋白質などの生体高分子に適用されていたTROSY法をバイオマス分子に初めて応用し、より高分解能のスペクトルを得ることに成功している。また、2次元NMRスペクトルから直接、バイオマスの構成成分の定量を行う方法を開発している¹¹⁾。このようにして、これまでなかなか難しかったバイオマスの分子情報を直接観測できるようになってきた。

NMR法は木材腐朽菌(きのこ)による木質生分解過程の解析にも有効である。図7に、木材腐朽菌の種類による腐朽パターンの違いを解析した結果を示す。異なる種類の木材腐朽菌によって30日間分解した木粉のスペクトルから、分解前のスペクトルを差し引いた差スペクトルを得ることにより、木質構成成分の構造変化の特徴を効果的に解析することができる。

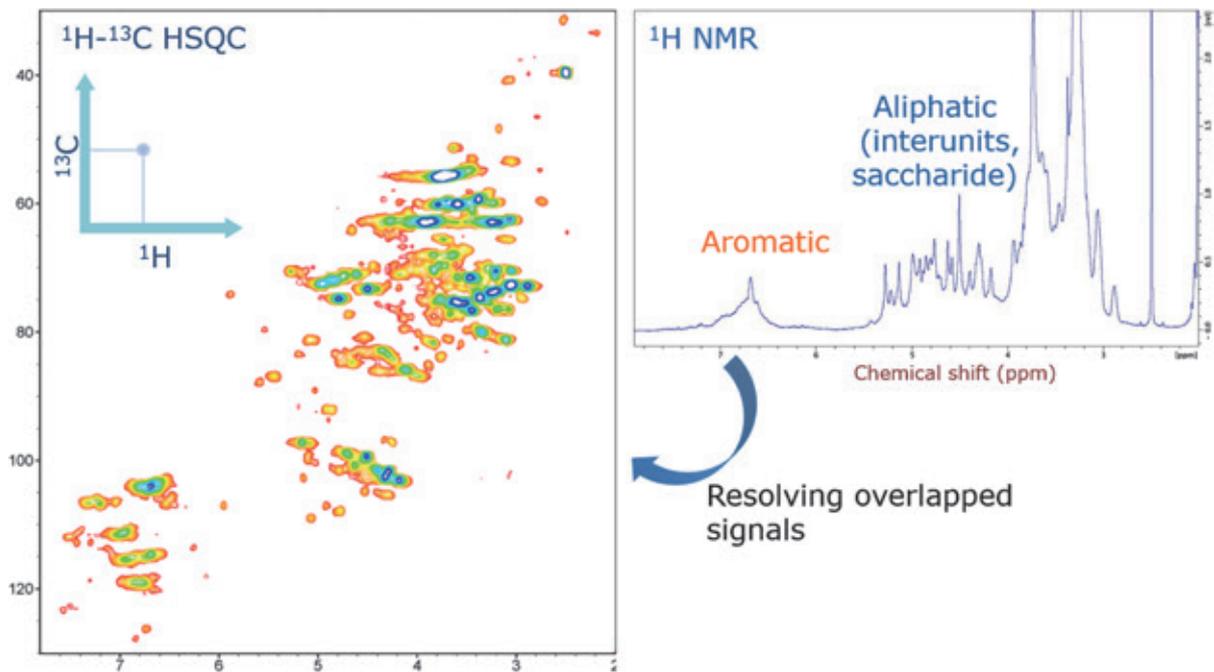


図6：木質バイオマスの ^1H NMR スペクトル(右)と2次元 ^1H - ^{13}C HSQC NMR スペクトル(左)。2次元上に有機分子の構造を反映するシグナルを呈示することで、詳細な分子構造情報を得ることができる。

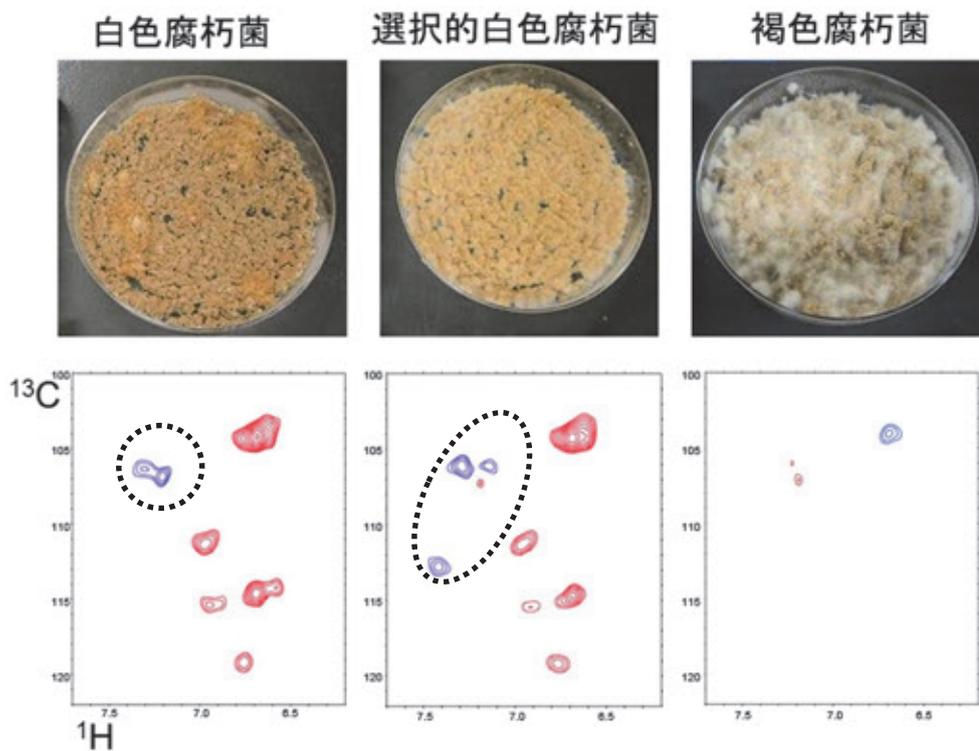


図7：木材腐朽菌によるブナ木粉の腐朽試験写真および腐朽前後の ^1H - ^{13}C HSQC 差スペクトル。横軸、縦軸はそれぞれ ^1H 、 ^{13}C の化学シフトを示し、シグナルの断面が等高線で表示されている。シグナルの正負と大きさ、位置からリグニン構造の変化と増減がわかる。図中の点線で囲ったシグナルはきのこのこのリグニン分解反応により増加した酸化型リグニン構造を反映している。

6. 生存圏の未来へ向けて

自然が豊かな環境と聞いてどのような風景を思い浮かべるだろうか。さまざまな木々で緑にあふれた山々とそこに流れる清流、あるいは澄んだ海の情景は心を落ち着かせてくれる。そうした環境は地球上で当たり前の光景ではなく、荒涼とした地域も多くある。また、一旦自然が猛威をふるえば大きな災害となって風景は一変する。樹木は根をはり、水をため、風を防ぎ、大気循環へ作用することで気候を調節し災害を緩和する役割を担っている。そのため森は人々の畏敬と信仰の対象にもなってきた。人類は産業革命以前、木材に代表されるバイオマスエネルギーとして利用してきた。その後、現代社会は化石資源をエネルギー源として利用することで発展してきたが、化石資源は何億年もの時間をかけてエネルギーが利用しやすい形に集約・蓄積されたバイオマスともいえ、このエネルギーを短時間に解放することによる不均衡がさまざまな問題を引き起こしている。

持続的な生存圏を実現するためには自然の調節力を生かしながら、自然に調和しながら発展を続ける必要がある、そのためには人類の消費活動を現在の生態系に即した形にしていく必要がある。バイオマスを再生産しながら、エネルギーと有機資源として利用していくシステムを作ることが益々重要になっている。バイオマスはエネルギー生産量として、化石資源の代替となるポテンシャルは十分にあるが、化石資源のように地球の地下で長年の炭素濃縮を受けて集約していない“生の”資源であるため、構成成分を利用可能な形に分離する必要がある。この戦略を立てる上で、分子レベルでバイオマスの構成成分を把握し、バイオマスのポテンシャルを生かして利用する方法を開発する視点が重要だと考えている。また、バイオマスは持続可能な分散型の資源であるため、将来の地産地消型の循環社会の実現へ向けて、その利活用法の開発が期待される。NMR法を用いてバイオマス成分の全体像を把握し、NMRスペクトルから直接、構成分子の精密情報を取得し、定量的に評価することが可能になってきた¹¹⁾。今後、木質バイオマスの樹種や部位の相違による特性評価や、化学変換・微生物変換過程の解析への応用が期待される。特に自然界における木質バイオマスの分解者である「きのこ」に学び、その反応のエッセンスを活かすことは重要なアプローチだと考えている。さまざまなバイオマスを巧みに使いこなすには、人類の英知を結集しなければならず、バイオマスの成り立ちから構造利用までを分子レベルで捉える研究は、その基盤として今後ますます重要になってくると考えている。

参考文献

- 1) 発酵研究所監修, “IFO微生物学概論”, 培風館, 2010, pp.41-53, 409-413.
- 2) 国立科学博物館編, “菌類のふしぎ—形とはたらきの驚異の多様性”, 東海大学出版, 2008, pp.3-19, 164-173.
- 3) Smith, M., Bruhn, J., Anderson, J., The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature*, **356**, 428-431, 1992.
- 4) Heitner, C., Dimmel, D., Schmid, J.A., *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry*, CRC Press, 2010, pp.1-10, 137-151.
- 5) Yelle, D.J., Ralph, J., Lu, F., Hammel, K.E., Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. *Environ. Microbiol.*, **10**, 1844-1849, 2008.
- 6) Blanchette, R.A., Krueger, E.W., Haight, J.E., Akhtar, M., Akin, D.E., Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*, *J. Biotechnol.*, **53**, 203-213, 1997.
- 7) Enoki, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T., Chemical synthesis, iron redox interactions and charge transfer complex formation of alkylitaconic acids from *Ceriporiopsis subvermispora*. *Chem. Phys. Lipids*, **120**, 9-20, 2002.
- 8) Nishimura, H., Setogawa, Y., Watanabe, T., Honda, Y., Watanabe, T., Epoxy ceriporic acid produced by selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chem. Phys. Lipids*, **164**, 707-712, 2011.
- 9) Nishimura, H., Sasaki, M., Seike, H., Nakamura, M., Watanabe, T., Alkadienyl and alkenyl itaconic acids (ceriporic acids G and H) from the selective white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*: a new class of metabolites initiating ligninolytic lipid peroxidation, *Org. Biomol. Chem.* **10**, 6432-6342, 2012.

- 10) Nishimura, H., Murayama, K., Watanabe, T., Honda, Y., Watanabe, T., Diverse rare lipid-related metabolites including ω -7 and ω -9 alkenylitaconic acids (ceriporic acids) secreted by a selective white rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chem. Phys. Lipids*, **165**, 97-104, 2012.
- 11) Okamura, H., Nishimura, H., Nagata, T., Kigawa, T., Watanabe, T., Katahira, M., Accurate and molecular-size-tolerant NMR quantitation of diverse components in solution, *Sci. Rep.*, **6**, 21742, 2016.

著者プロフィール



西村 裕志 (Hiroshi Nishimura)

<略歴>2003 年京都大学工学部工業化学科卒業／2009 年京都大学大学院農学研究科博士後期課程修了、博士（農学）／京都大学生存圏研究所博士研究員、ミッション専攻研究員、京都大学エネルギー理工学研究所日本学術振興会特別研究員を経て 2012 年京都大学生存圏研究所助教、現在に至る。<研究テーマと抱負>木質バイオマス、リグノセルロースの精密構造解析と、木材腐朽菌（きのこ）による炭素分解システムを通じて環境調和型バイオマス変換法を探っています。<趣味>旅行、子どもと公園めぐり