

## リグニン生合成における酵素学的研究\*

島田 幹夫\*\*

### Enzymic Studies on Lignin Biosynthesis

Mikio SHIMADA

#### はじめに

有機天然物の生合成と生分解は酵素のなせる業で、その機構解明には、酵素の分離、抽出が重要である。それによって生体内の反応を具体的に知ることができ、生化学（酵素学的）研究が可能となる。リグニンの生合成の研究もまた酵素学的研究に大いに依存している。

酵素は高い触媒効率と高度の立体区別能力を持っている。その反応は個々の酵素に特定のものであり、原則的には他の反応を触媒しない。これをわれわれは酵素の基質特異性と呼びその内容は基質分子が酵素表面で吸着される時生ずる立体区別の規則性すなわち立体選択性とか立体特異性と呼ばれるものである。反応の際、酵素と基質の立体構造あるいは生成する酵素-基質 (ES)-複合体の空間配列が酵素機能と直接関係すると考えられる。

次章に述べるリグニン生合成の諸酵素も、この例外ではなく、PAL と TAL, mono-function OMT と di-function OMT, リガーゼ1 と リガーゼ2 の異なった基質特異性が、それぞれイネ科植物、針葉樹 (G)、広葉樹 (G+S) リグニンの特徴の発現に関係している。PAL や TAL はフェニルニルアラニンとチロシンのプロキラル水素原子に対し高度の立体区別能力を持ち、決してメチレン基の2つの水素原子を1/2の確率で引き抜くことはしない。また CoA エステルと桂皮アルデヒドの還元酵素は NADPH 分子のプロキラル水素原子に対し全く正反対の立体区別能力があることも興味深い。

しかし筆者等<sup>43)</sup>はシアン配糖体生合成研究の際、ペルオキシダーゼがフェノールをラジカル的に酸化する時、プロキラル水素原子に対し、上記のような区別をしないことを見出した。これは、ペルオキシダーゼによって生成する DHP やリグニンが光学活性を持たないラセミ体であることとも関係づけられ、ラセミ高分子の生分解の研究の出発点であろうと筆者は考えている。

リグニン生合成の研究は、植物体を使った *in vivo* のトレーサー研究に始まり、今や多くの *in vitro* の酵素学的研究によって、ほぼ解明尽くされようとしているが裸子物では未解決の問題が多い。

ここに、その現状と今後の研究に課せられた問題点を簡単に紹介したい。

#### I. リグニン生合成に関与する酵素

太陽エネルギーの下で光合成されたブドウ糖は、重要な中間体、シキミ酸を経て芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン（チロシン）になり、このアミノ酸が植物細胞壁のリグニン構成素材としてとり込まれてい

\* 第32回 木研公開講演会（大阪，1977，5，20）において講演，

\*\* リグニン化学部門 (Division of Lignin Chemistry)

ることは、今ではもう一般的事実として受け入れられている。

シキミ酸から芳香族アミノ酸への代謝経路は微生物にも共通するものであるが、フェニルアラニンが脱アンモニア後に生ずる桂皮酸経路は植物特有の代謝経路として重要である。(図1)

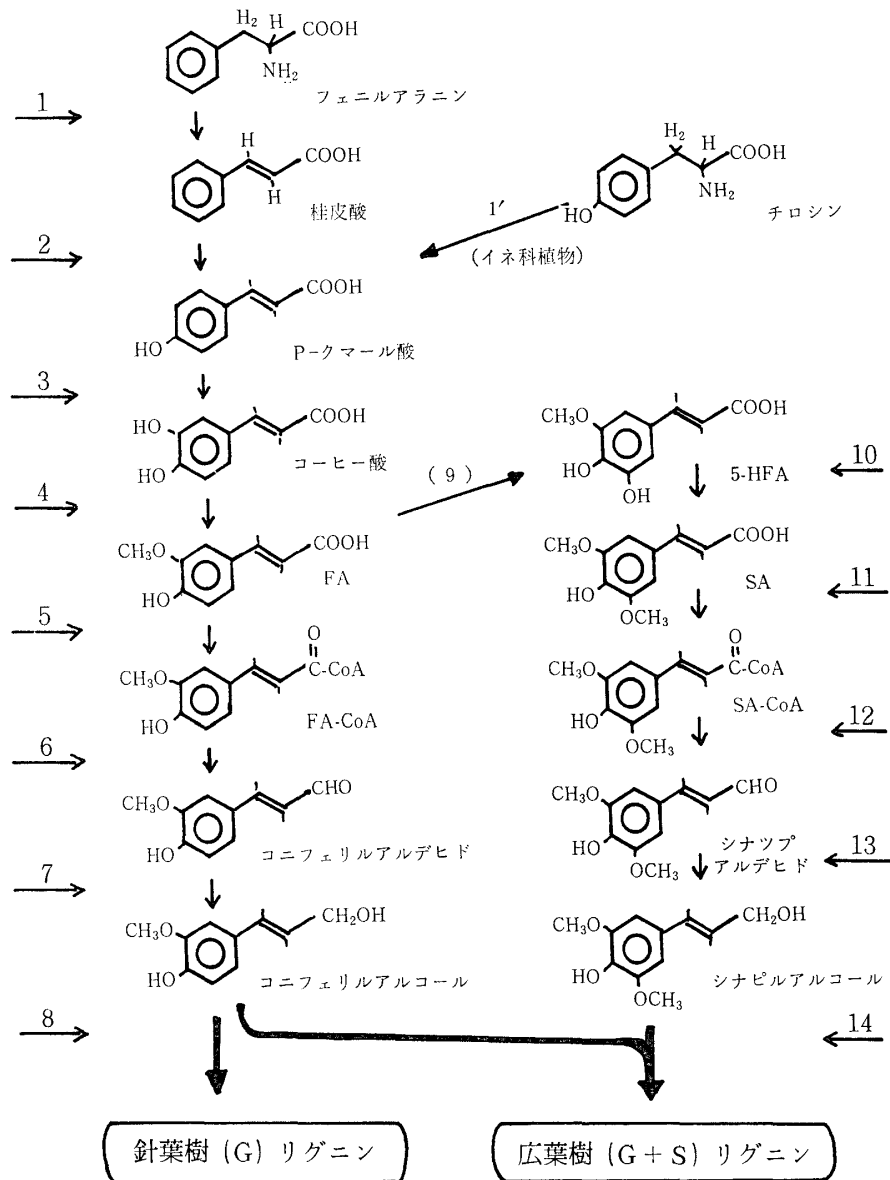


図1 針, 広葉樹リグニンの生合成経路

図1の各反応段階に關与する酵素名を番号に従って記載すると次のようになる。

1. フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL)
2. 桂皮酸4-水酸化酵素 (C-4-H)
3. *p*-クマール酸 3-水酸化酵素 (PC-3-H)
4. 10. *O*-メチル基転移酵素 (OMT)
9. フェルラ酸-5-水酸化酵素 (FA-5-H) (未証明)
5. 11. 桂皮酸-CoAリガーゼ (C-CoA-L)

- 6. 12. 桂皮酸-CoA 還元酵素 (C-CoA-R)
- 7. 13. 桂皮アルコール酸化還元酵素 (C-Al-OR)
- 8. 14. ペルオキシターゼ

反応9を触媒する酵素はまだ植物体から分離抽出されていないが、これを除けば、被子植物ではリグニン生合成に関与する酵素は全部証明されたことになる。以下、これらの酵素の特徴について略記する。

I-1. フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL)

上記の酵素群の中で最も重要な酵素である。というのは、この酵素の活性化によって初めてリグニンのみならず、多種多様なフェノール性化合物が生合成されるようになるからである。フェニルアラニンからアンモニアを脱離し、トランス-桂皮酸を生成する。1961年、カリフォルニア大学の CONN と KOUKOL<sup>1)</sup> によって、大麦の植物体から初めて発見され、光やエチレンによって活性が急激に増大するので、植物生理学上での脚光を浴びる酵素となった。

PAL の植物界での分布は普遍的であるが、イネ科植物には PAL のほかに TAL (チロシンアンモニアリアーゼ) も存在し、チロシンを *p*-クマール酸に変える。これはカナダの NEISH によって発見された<sup>2)</sup>。TAL の存在の証明によりチロシンもイネ科植物ではリグニン前駆物質となる理由が解明された。また TAL の存在は、イネ科植物リグニンの特徴である *p*-クマール酸エステル存在とも関係づけられる。しかし TAL 活性は PAL 活性の1/10位なので、TAL 活性は PAL の基質特異性の広さによるものか<sup>3)</sup>、別種の酵素<sup>4)</sup>によるものかは、イネ科植物の中でも差異があるようである。

HANSON 等は、PAL と TAL には、フェニルアラニンとチロシン中のメチレン (-CH<sub>2</sub>-) 基のプロキラル水素原子を区別する立体特異性があることを証明した<sup>5,6)</sup>。図2に示すようにジャガイモの PAL とトウモロコシの TAL が共に pro-S 水素原子だけを脱離することが明らかにされた。

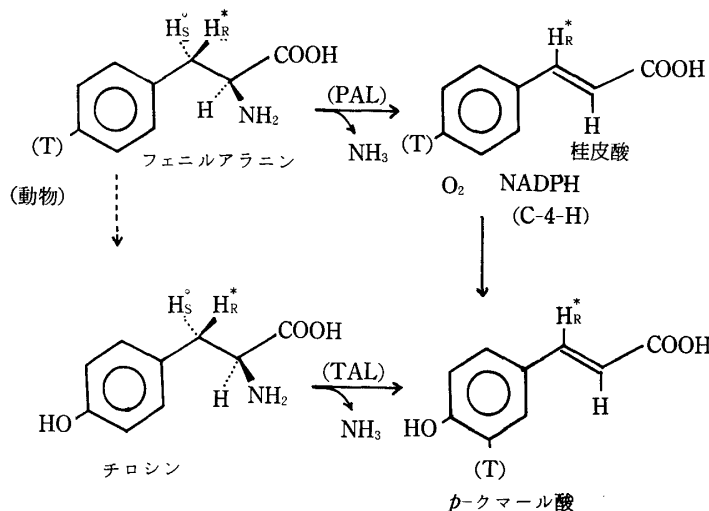


図2 PAL と TAL の立体区別 (pro-S 特異的) 脱アンモニア反応と、C-4-H による NIH シフト水酸化反応

I-2. 桂皮酸 4-水酸化酵素 (C-4-H)

C-4-H は、O<sub>2</sub> と NADPH の存在下で桂皮酸の *p* (パラ) -位に、1 原子の酸素を導入し、フェノール性水酸基を生成し、水分子を生成する一原子添加酵素である<sup>7)</sup>。本酵素は植物体のミクロソーム分画に存在する不溶性酵素であり、同じく CONN のグループによって発見され、その分離法も確立された<sup>8,9)</sup>。興味あることは、桂皮酸のパラー位をトリチウム (T) でラベルしておくとそのラベルが生成物中の *p*-クマール酸の

メタ位に移動している現象 (NIH シフト) が観察されることである<sup>10,11)</sup>。しかし、ペルオキシターゼによる水酸化反応ではこのような NIH シフトは存在しないことは注目すべきである<sup>12)</sup>。

### I-3. *P*-クマール3-水酸化酵素 (PC-3-H)

*p*-クマール酸のメタ位を水酸化し、コーヒー酸を生成する。

VAUGHAN 等は、ビートの葉から分離した PC-3-H について電子供与体として NADPH NADH, アスコルビン酸, テトラヒドロプテリジンが有効であることを報告している<sup>13)</sup>。STAFFORD は、ソルガム芽生えのミクロソーム分画に本酵素の存在を報告しているが、酵素の特徴づけはまだ不明確である<sup>14)</sup>。

### I-4. *O*-メチル基転移酵素 (OMT)

針葉樹型 (mono-function) OMT と広葉樹型 (di-function) OMT が存在することが、筆者等の研究により明らかにされた<sup>15,16)</sup>。その相違点は基質特異性にある。針葉樹型 OMT は、*S*-アデノシルメチオニンのメチル基供与体の存在下で、コーヒー酸をメチル化してフェルラ酸 (FA) を生成するが、5-ヒドロキシフェルラ酸 (5-HFA) は、メチル化され難く、シナップ酸 (SA) をほとんど生成しない。すなわちシリギル (S)-リグニンの前駆物質を生成する能力が欠損しているのが特徴である。一方、広葉樹型 di-function OMT は、コーヒー酸と5-HFA に作用するが、5-HFA に対しより高い親和性を持ち、それぞれ FA と SA を生成し、グワヤシル (G)-および S-リグニンの生合成に関与するのが重要な特徴である。広葉樹材と針葉樹材のリグニン組成の差に基く、モイレ呈色反応は古くから簡便な呈色試験として活用されてきたが、これと関連し、S-リグニンが広葉樹に存在し、針葉樹には極く微量にしか存在しない理由は、このような OMT の基質特異性の差によって説明されることになった<sup>15)</sup>。

筆者等は、タケノコとクロマツの OMT をそれぞれ100倍と90倍に精製し、電気永動分析からもこの基質特異性は植物固有のものであることを明らかにした<sup>17,18)</sup>。最近 POULTON 等<sup>19,20)</sup>大豆培養細胞からフラボノイド生合成に特異的な OMT とリグニン生合成に特異的な OMT をそれぞれ分離精製した。後者の OMT は、di-function 型であり、5-HFA に強い親和性を持ち、S-リグニン前駆物質を作るのに有利であることは筆者等の知見と一致している。

### I-5. FA-5-水酸化酵素 (FA-5-H)

FA が SA の直接の中間体でありうるということは、樋口等のトレーサー研究から示唆されている<sup>21,22)</sup>が、本酵素の分離はまだ成功していない。この酵素は、FA から S-リグニン生合成への代謝経路を分岐させる時の初期反応に関与するものであり、これを欠損する植物は、当然S-リグニンを合成し得なくなるので、針葉樹は FA-5-H をも欠如しているものと推定されている。従って、本酵素の分離抽出が今後の重要課題である。

### I-6. 桂皮酸 CoA リガーゼ

本酵素は *p*-ヒドロキシ桂皮酸が、CoA と ATP の存在下で桂皮酸 CoA のエステルとなる反応を触媒する (FA, SA の -COOH 基の活性化)。

FA-CoA や SA-CoA が還元されると、リグニンの最終前駆物質であるコニフェリアルアルコールとシナピルアルコールが生成するので、FA と SA のカルボン酸基の活性化および還元機構には強い関心が寄せられていた。1970年 GRISEBACH と HAHLBROCK<sup>23)</sup> (ドイツ) および WALTON と BUTT<sup>24)</sup> (イギリス) によって植物体からこの種のリガーゼが分離されていたが、十分な特徴づけはなされていなかった。1972年ドイツのもう一つの研究グループ、ZENK 等<sup>25-27)</sup>によって FA が FA-CoA を経てコニフェリアルアルコールにまで還元する酵素が、ヤナギ (*Salix alba*) とレンギョウ (*Forsythia suspensa*) の若枝から分離、証明されるにおよび、リグニン生合成の還元機構に関する酵素的研究は、飛躍的に進展した。

リガーゼについて問題となったことは、その基質特異性についてであり、それが G-および S-リグニンの

生合成経路の証明に微妙にからみ合っていたからである。ZENK 等のリガーゼは FA から FA-CoA エステルの生合成を効率よく触媒するのに反し、SA には作用し得ず、イギリスの RHODES<sup>28, 29)</sup> 等が見い出した十字科植物のリガーゼも同様な基質特異性を示した。この知見に従えば、SA は S-リグニンの前駆物質となり得ないことが示唆され、ZENK 等は S-リグニン生合成の SA-中間体性については否定的な見解を抱いていたようだ。これに反論するかのように1975年 HAHNBROCK 等<sup>30)</sup>は大豆培養細胞からアイソザイムとして二つのリガーゼを分離精製し、詳細な研究を展開し、リガーゼ1はFAとSAの両方を活性化し、リガーゼ2はFAだけに作用することを証明した。従って、ZENK 等のリガーゼはリガーゼ2にあたるようであり、リガーゼ1はG-、およびS-リグニン生合成と密接に結びつくことが明らかにされた。

一方、樋口等<sup>31)</sup>は針葉樹(スギ)と広葉樹(ポプラ)にFAとSAを投与するとスギではコニフェリルアルコールだけが生成しポプラではコニフェリルアルコールとシナピルアルコールが共に生成されることを見出し、mono-function OMT と同じように針葉樹のリガーゼも、S-リグニン欠損の生化学因子であることを示唆している。

#### I-7. 桂皮酸-CoA 元酵素

桂皮酸-CoA エステルを NADPH の存在下で桂皮アルデヒドに還元する酵素である。

ZENK<sup>25)</sup> が最初に植物からの酵素系を分離し、FA と SA の還元機構解明の突破口となったことは高く評価される。GROSS 等<sup>32)</sup>はこの還元酵素が FA-CoA に最も有効に作用するが、SA-CoA に対する還元力は前者の1/5であることを報じ、RHODES<sup>33)</sup> 等も FA-CoA を還元する2つのアイソザイムを十字科植物 (*Brassica napo-brassica*) から分離したが、SA-CoA に対する還元力を認めていないので、彼等の酵素は S-リグニンの生合成には関与していない可能性が強い。

一方、GRISEBUCH 等<sup>34)</sup>はやはり大豆培養細胞から CoA エステル還元酵素を1660倍に精製し、基質特異性を検討した。それによると、本酵素の親和性は FA-CoA に対し、最も大きく SA-CoA に対しては比較的小さく、最大反応速度を SA-CoA について1とすれば、後者はその1/3である。このことは GROSS 等の知見と特にならなれたものではなく、この酵素がS-リグニン生成にはやはり不利ではないかと考えられる。しかし GRISEBACH 等は培養細胞のリグニンが、G-およびS-核を含むことから<sup>35)</sup>その酵素が SA-CoA の還元に寄与し、G-、およびS-リグニン生合成に重要な役割を果しているものと判断している。しかしながら、GRISEBACH や ZENK の還元酵素の SA-CoA に対する親和性が小さいことは、気にかかる問題であり、広葉樹型 di-function OMT と似たようなS-核生成に有利な、すなわち SA-CoA の高い親和性をもつ別種のアイソザイムがまだ隠されているようにも思われる。

CoA エステル還元酵素は NADH でなく NADPH に特異的であるが NADPH 分子中のプロキラル水素原子の立体特異性を調べたのは Mansell<sup>32)</sup> 等である。本酵素は B-[H]-NADPH に特異的であることが示された。

#### I-8. 桂皮アルコール酸化還元酵素

桂皮アルデヒドを NADPH の存在下で桂皮アルコールに還元し NADP を生成する反応とその逆反応をも触媒する。本酵素はフェニルアラニンから始まったコニフェリルアルコールやシナピルアルコールに至る生合成経路の最終段階に位置する。(図1)

前述した酵素とは対照的にこの酵素の基質特異性はかなり広いようであり、この点では ZENK<sup>36)</sup> 等と GRISEBACH 等<sup>37)</sup>の実験観察もほぼ一致している。ZENK 等<sup>36)</sup>は、本酵素が植物界に広く分布することを調べ、レンギョウの若枝から得られ酵素を600倍に精製し、その性質を詳細に検討した。この還元反応は NADPH に特異的に依存し、コニフェリルアルデヒドとその関連桂皮アルデヒドも良好な基質として役立つ。GRISEBACH 等<sup>37)</sup>はアイソザイム1とアイソザイム2を分離精製した。二つのアイソザイムがNADPH 依存

性であることは、ZENK 等<sup>36)</sup>の知見と一致するがアイソザイム 1 はコニフェリルアルデヒドの還元力をまったく持たないが、アイソザイム 2 はリグニン前駆体を含む 5 種類の桂皮アルコールとそのアルデヒド体をそれぞれ酸化還元することを示した。アイソザイム 2 はコニフェリルアルデヒドとシナプアルデヒドに高い親和性を有し、最大反応速度は 2 つの基質について大差はないので、G-および S-リグニン生合成に大いに寄与することは明らかであろう。

一方、樋口等<sup>37)</sup>はスギとポプラについて、この酵素の基質特異性を比較したが、針葉樹と広葉樹の間でも、やはり基質特異性の差はなかった。このことは、mono- および di-function OMT とは異なる点であり、この還元酵素は、針葉樹—広葉樹リグニンのメトキシルパターンを決定する因子ではないことが明らかにされた。

NADPH のプロキラル水素原子に対する本酵素の立体特異性は ZENK 等<sup>36)</sup>によって示され、[A]-NADPH に特異的である。この酵素が前述の FA-CoA 還元酵素とは正反対の立体特異性を持つことは興味深い。

しかし、まだ立体化学上の問題が残されており、桂皮アルデヒドのエナンチオ区別還元の仕事は未決定である。

以上、述べて来た酵素学的研究はシリングルリグニンを含む被子植物について行なわれており、それをほとんど含まない裸子植物については、OMT を除き、研究はほとんど成されていないので今後の研究課題となる。

#### I-9. ペルオキシダーゼ

各種のフェノール性化合物を  $H_2O_2$  の存在下で酸化重合する反応を触媒し、 $H_2O_2$  には高い親和性を持つ。高等植物には広く分布するが、その生理的意義については必ずしも明確ではなかった。樋口等<sup>38)</sup>はその生理学的一面として高等植物の場合、ペルオキシダーゼがリグニンの重合化に関与することを示したが、このことは、最近の HARKIN 等<sup>39)</sup>のシリングルダジン呈色反応を用いた組織化学的実験によっても証明された。

植物細胞壁内でコニフェリルアルコールやシナピルアルコールがペルオキシダーゼの作用によってフェノール性 OH が脱水素されてフェノキシラジカルとなり生じたラジカルはその後酵素の支配を受けずランダムにカップリングし重合する。このラジカル重合理論は、天然リグニンが不斉炭素原子を持つにも拘らず、D, L-ラセミ体で（光学不活性）である事実によって強く支持され、ペルオキシダーゼに立体化学的制御能力がないことは明らかである。この点、ペルオキシダーゼはこれまで述べてきた各種の酵素とはきわだって異なっている。

FREUDENBERG<sup>40)</sup> はスプルースリグニンのモデル構造を提出しているが、最近コンピューターで描かれたリグニンの化学構造が GLASSER<sup>42)</sup> 等によっても提出された。いずれにしてもリグニン化学構造の的確な全体像を構築することは、依然として大きな課題である。

以上、植物リグニンの G-核、S-核の生成機構と関連し、酵素の基質特異性とその構成単位とどのように結びつけられるかを述べてきた。紙面に限りがあるので詳細は省略したのでリグニン形成の化学については、樋口<sup>41)</sup>、榊原<sup>42)</sup>の総説を参照してもらいたい。

#### 引用文献

- 1) J. KOUKOL, E. E. CONN, J. Biol. Chem, **236**, 2692 (1961).
- 2) A. C. NEISH, Phytchem., **1**, 1 (1961).
- 3) H. V. MARSH, E. A. HAVIR, K. R. HANSON, Biochemistry, **1**, 1915 (1965).
- 4) M. R. YOUNG, A. C. NEISH, Phytochem., **5** 1121 (1966).
- 5) R. H. WIGHTMAN, J. STAUNTON, A. R. BATTERSBY, K. R. HANSON, J. Chem. Soc., **1862**, 2355.
- 6) P. G. STRANGE, J. STAUNTON, H. R. WILSHIRE, A. R. BATTERSBY, K. R. HANSON, E. A. HAVIR, J. Chem. Soc., **1862**, 2364.

- 7) 早石 修, 野崎光洋 編, 酸素添加酵素, 東京大学出版会 (1973)
- 8) D. W. RUSSELL, E. E. CONN, Arch. Biochem. Biophys., **1122**, 2526 (1967).
- 9) D. W. RUSSELL, J. Biol. Chem., **246**, 3870 (1971)
- 10) D. W. RUSSELL, E. E. CONN, H. GRISEBACH, Biochem. Biophys. Acta., **170**, 210 (1968).
- 11) M. H. ZENK, Phytochem., **8**, 107 (1969).
- 12) J. W. DALY, D. M. JERINA, Biochem. Biophys. Acta., **208**, 340 (1970)
- 13) P. F. T. VAUGHAN, D. BUTT, Biochem. J. **113**, 109 (1969).
- 14) H. A. STAFFORD, Metabolism of Regulation of Secondary Plant Products, (Edited, by, RONECKLES and CONN) Academic Press., (1974) p. 53.
- 15) M. SHIMADA, H. FUSHIKI, T. HIGUCHI, 木材誌 **19**, 13 (1973).
- 16) M. SHIMADA, H. FUSHIKI, T. HIGUCHI, Phytochem., **11**, 2657 (1972)
- 17) M. SHIMADA, H. KURODA, T. HIGUCHI, Phytochem., **12**, 2873 (1973).
- 18) H. KURODA, M. SHIMADA, T. HIGUCHI, Phytochem., **14**, 17 (1975)
- 19) J. POULTON, H. GRISEBACH, J. EBEL, B. S. HECKELER, K. HAHLBROCK, Arch. Biochem. Biophys. **173**, 301 (1976).
- 20) J. POULTON, K. HAHLBROCK, H. GRISEBACH, Arch. Biochem. Biophys. **176**, 449 (1976).
- 21) T. HIGUCHI, S. A. BROWN, Can. J. Biochem. Physiol., **11**, 2247 (1972).
- 22) M. SHIMADA, H. FUSHIKI, T. HIGUCHI, Phytochem. **11**, 2247 (1972).
- 23) K. HAHLBROCK, D. H. GRISEBACH, FEBS-Lett. **11**, 62 (1970).
- 24) E. WALTON, V. S. BUTT, J. Exp. Botany., **21**, 887 (1970).
- 25) R. L. MANSELL, J. STÖCKIGT, M. H. ZENK, Z. Pflanzen. Physiol, **68**, 296 (1972).
- 26) G. G. GROSS, J. STÖCKIGT, R. L. MANSELL, M. H. ZENK, FEBS. Lett., **31**, 283 (1973).
- 27) G. G. GROSS, M. H. ZENK, Eur. J. Biochem., **42**, 453 (1974).
- 28) M. J. C. RHODES, L. S. C. WOOLFORTON, Phytochem., **12**, 2381 (1972).
- 29) M. J. C. RHODES, L. S. C. WOOLFORTON, Phytochem., **13**, 107 (1973).
- 30) K. H. KNOBLOCH, D. K. HAHLBROCK, Eur. J. Biochem. **52**, 311 (1975).
- 31) Y. NAKAMURA, H. FUSHIKI, T. HIGUCHI, Phytochem., **13**, 1777 (1974).
- 32) G. G. GROSS, W. KREITEN, FEBS Lett., **54**, 259 (1975).
- 33) M. J. C. RHODES, L. S. C. WOOLFORTON, Phytochem., **14**, 1225 (1975).
- 34) H. WENGENMAYER, J. EBEL, H. GRISEBACH, Eur. J. Biochem., **65**, 529 (1976).
- 35) H. NIMZ., J. EBEL, H. GRISEBACH, Z. Naturforschung, **30c**, 442 (1975).
- 36) R. L. MANSELL, G. G. GROSS, J. STÖCKIGT, FRANKE, M. H. ZENK, Phytochem., **13**, 2427 (1974).
- 37) D. WYRAMBIK, H. GRISEBACH, Eur. J. Biochem., **59**, 9 (1975).
- 38) T. HIGUCHI, Y. ITOH, J. BIOCHEM, (Japan) **45**, 575 (1958).
- 39) J. M. HARKIN. J. R. OBST., Science, **180**, 296 (1973).
- 40) K. FREUDENBERG, A. C. NEISH., "Constitution and Biosynthesis of Lignin" Springer. Verlag. (1968) p. 103).
- 41) 樋口隆昌, 化学と生物, **13**, 206 (1975).
- 42) 榊原 彰, 化学と生物, **12**, 508 (1974).
- 43) 島田幹夫 化学と生物, **14**, 686 (1976).