

林産工学におけるバイオテクノロジー

樋 口 隆 昌*

Biotechnology in the Forest Products Research

Takayoshi HIGUCHI*

(昭和60年9月19日受理)

はじめに

近年我国および欧米各国においてバイオテクノロジー分野の研究が急速に進められている。バイオテクノロジーとは生命科学の成果に基づいて、生物またはその一部の機能を活用することにより我々の生活を豊かにし、また健康の維持・増進をはかる科学技術と行うことができる。なかでも現在特に強い関心を集めているのは異種生物細胞間の「遺伝子組換え」や「細胞融合」によって生物機能を改良し、これまでの方法では多量に得られなかった有用物質（生理活性物質、抗生物質、ホルモン、ビタミン、アミノ酸、食品等）を生産することであるが、この他に細胞のもつ酵素活性を利用し、固定化細胞、固定化酵素、人口酵素などを用いて複雑な化合物を少ないエネルギーで効率よく生産するためのバイオリクター、バイオセンサーの開発もバイオテクノロジーの重要な分野である¹⁾。

林産工学におけるバイオテクノロジー分野としては、第1に住宅・パルプ用その他需用目的に適した優良樹種を組織培養・細胞融合・遺伝子組換え技術などを応用して選抜・育種することが考えられる。この問題を根本的に解明するためには生長・環境・病虫害・農薬などに対する抵抗性、窒素固定、タンニン、色素など有用副成分の合成などに関与する遺伝子の解明と組換え技術の開発が不可欠である。

また、未利用木材および森林残渣の有用化学物質への生化学変換をはかるには、セルロース、ヘミセルロース、リグニンを分解する微生物の選抜、分解酵素の性質解明と遺伝子組換え技術によりこれらの酵素を大量生産する菌の選抜が必要である。さらに、これらの細胞あるいは酵素の固定化、酵素機能を模倣した人口酵素およびこれらの生物触媒を用いるバイオリクターの開発が必要である。

林産工学分野におけるこれらの試みはまだほんの発足したばかりであるが、ここでは優良樹種選抜の基礎となる組織培養による優良樹種の育成、植物の光合成能向上のための遺伝子組換え研究の現状、バイオマス変換、生物的脱リグニンなどを目標とした木材腐朽菌の遺伝子組換えによるセルラーゼ、リグニン分解酵素大量生産菌の開発計画、リグニン分解人口酵素開発の試みなどについて紹介する。

1. 組織培養による優良樹種の育成

近年、植物の組織培養技術を利用して優良林木の育成、苗木の大量生産、苗木生長期間の短縮などを目的とする研究が行われている²⁾。これらの目的のためにはいろいろの方法が利用されているが、大別すると、1、クローン繁殖（器管培養）、2、細胞・カルス培養、3、ハプロイド培養、4、プロトプラスト培養、5、遺伝子組換えなどがある。ここでは主に林木で研究が行われている器管培養、細胞・カルス培養と、遺

* リグニン化学部門 (Research Section of Lignin Chemistry)

伝子組換えの現状について述べることにする。

1.1. 器官培養による優良林木の選抜

器官培養による林木の優良クローンの選抜・育成については多数の例が知られている⁴⁾が一例として1984年 Marcus Wallenberg 賞に輝いたアラクルーズ (Aracruz) 研究グループによる優良ユーカリ樹の選抜と森林造成³⁾について紹介する。アラクルーズ計画は1967年、ブラジル、エスピリトサント州、アラクルーズ地区(リオデジャネーロから400 km 北方)で、当時サンパウロの晒パルプ用チップとして用いられていた *Eucalyptus grandis*, *E. saligna*, *E. alba* の生長量と材質の改善をめざして開始された。その結果、1973年にはユーカリ林面積 26,650 ha、材の生長量は 26~39 m³/ha/年に達し、ブラジルの他地域と比べて好成績が得られたが、それに伴って二つの重要な問題、(a) 病気、特に病原菌による腫瘍に対する抵抗性が低い、b) 伐採後の株からの萌芽率が低い)が生じ、このため400,000トン/年の晒パルプ生産プラントのチップ供給が不足する恐れがでてきた。このことから、アラクルーズ研究グループはブラジルのユーカリはこの地区の木材の生産に適格ではないと考えるにいたり、南アフリカ、オーストラリア、インドネシア、チモールなどからユーカリ種子を輸入して優良樹種選抜に対する遺伝的研究を始めた。

しかし、その後長年にわたりいろいろの面からユーカリ林の分析を行った結果、1975年には遺伝的選抜によってユーカリの優良種子を得るには時間的余裕がないとの結論に達し、1978/1979年ブラジル産ユーカリの“さし木”によるアラクルーズ林の再構成にとりかかっている。その後、遺伝的形質の不明なアラクルーズのユーカリ樹種とその交雑種を使って根つきのさし木 (rooted cuttings) の大量生産と、それによる優良ユーカリ林の大規模な造成に成功した。この計画においてさし木の発根、苗木の造成に関する多くの問題が解決された。1) さし木の発根を促進する培養基の調製、2) 発根したさし木を植えるコンテナの開発、3) 発根さし木を季節に関係なく生産可能にするための圃場の環境制御、4) 高価な輸入品に代る発根促進ホルモンの開発、5) さし木コンテナに加える肥料の開発、6) さし木生産に適した萌芽の年齢、大きさ、収穫時期の決定、7) 発根さし木生産歩止り70%の達成。

また、優良樹種の選抜規準として次の15条件を適用している。1) 高い材積生長、2) 耐病性、3) 害虫に対する抵抗性、4) 材の通直性、5) 林内での下枝の自然落下性、6) 正常な樹冠、7) 樹皮量、8) 樹皮の性質、9) 伐根からの萌芽性、10) さし木の発根性、11) 材の比重、12) パルプ収率、13) 代謝効率(光合成能など)、14) 森林特性(クローンテスト)、15) 材の形態的・解剖的分析。

これらの選抜基準に基づいて達成された成果の一例を表示すると図1のとおりで、7年伐期での生産性は材積 70 m³/ha/年、年間 ha 当りのパルプ収率は18.45トンと何れも改良前のユーカリ林と比較して倍増している。このようなアラクルーズ計画の成功は、ブラジルにおける林業の活性化ばかりでなく、現地における貧困の解消、地域社会生活環境の改善などに大きく貢献してきた。なお、1984年には460,000トンの晒パルププラントの建設が企画されたが、この計画の成功によってパルプの国際的競争力も強まり、ブラジル全体の経済・労働者の雇用、技術者養成など社会面にも著しい波及効果を与えている。

1.2. 細胞・カルス培養による選抜²⁾

カルス・培養細胞からの幼植物への分化については、[広葉樹では *Corylus avella*, *Betula pendula*, *Populus tremuloides*, *P. tremula*, *Ulmus americana* (以上カルスから)、*Liquidamber styraciflua* (培養細胞から)において成功しているが、針葉樹においては現在のところ *Pseudotsuga menziesii* *Pinus radiata* で成功している。また、プロトプラスト培養から幼植物形成の成功例は樹木では知られていないが、プロトプラストからカルス形成までにいたった例として *Pinus pinaster*, *P. coulteri*, *P. taeda*, *Picea excelsa*, *Pseudotsuga menziesii* が知られている。さらに細胞融合の成功例として *Paulownia taiwaniana* × *Populus euramericana* がある。これら培養細胞あるいはカルスから幼植物への分化に対しては培養基の組成、生長調整物質(植物ホルモン)の種類と濃度など数々の解決を要する問題を含んでいるが、これらの問題が解決されれば母樹の年齢、生

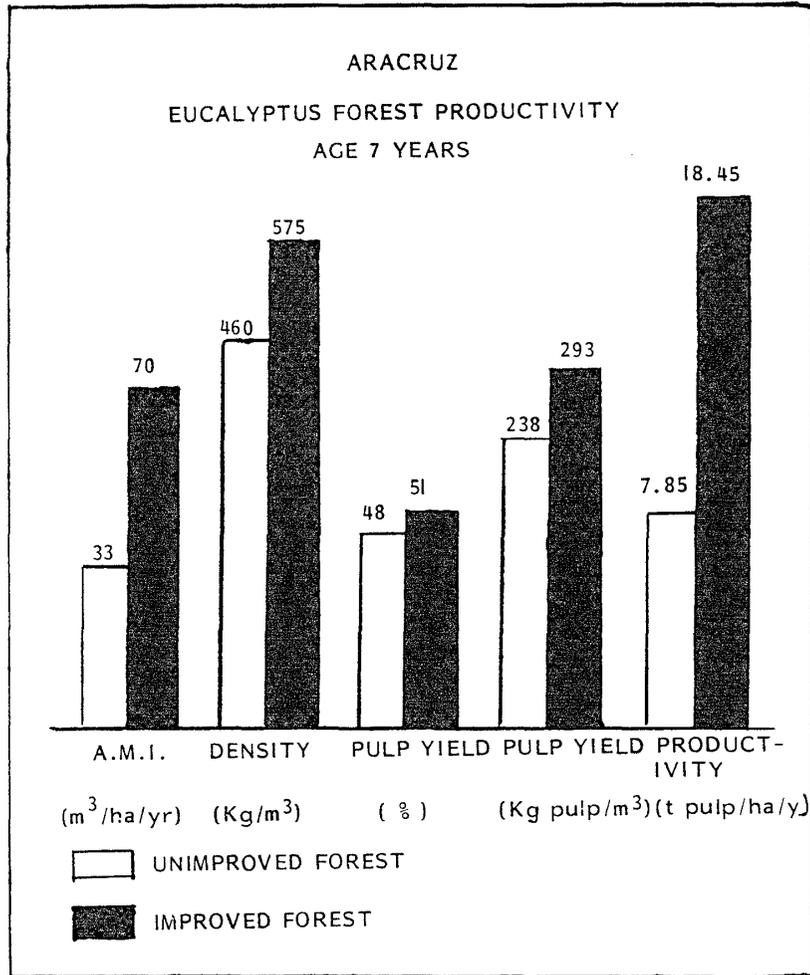


図1 アラクルーズユーカリ林の生産性

理的条件、気候などによって影響をうける種子の豊作、不作になやまされることなく、優良木の細胞組織を分化させる (micropropagation) ことによって材質、生長量、耐病性などに優れた幼植物を大量に得ることができる。したがって組織培養技術の確立は短期的には林木育種上最も有力な方法であり、既に成功例も多い。

1.3. 遺伝子組換

1.3.1. 光合成

高等植物は微生物、特に細菌のような原核生物に比べて遺伝的に複雑で、遺伝子組換えによる品種の改良までにいたっていない。したがって、ここでは高等植物における有機物生産の基本的な反応である光合成能の改善およびグニンレス植物育成における遺伝子組換えの可能性について説明する。光合成による CO₂ の糖への還元反応は基本的にはカルビン (Calvin) 回路 (図2) によって行われるが、植物によって CO₂ 固定の反応経路に差があり、次の三種類に大別されている⁵⁾ (図3 A, B, C)。

A, C₃-植物——カルビン回路として知られている光合成経路を経て初期産物として3-ホスホグリセリン酸 (PGA, C₃ 化合物) を生成する。主要作物の多くと一般の林木は C₃-植物に属し、光合成能は次の C₄ 植物に比べると低い。

B, C₄-植物——トウモロコシ、サトウキビなど主として熱帯原産のイネ科植物では、CO₂ は先づ葉肉中

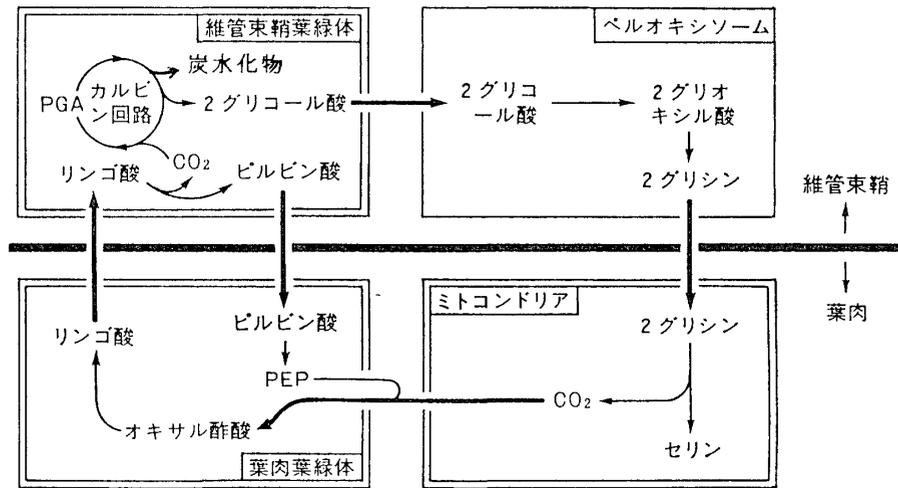


図3 B C₄植物におけるCO₂の固定及び光呼吸との関係

PGA: 3-ホスホグリセリン酸 PEP: ホスホエノールピルビン酸
 C₄植物では光呼吸によって生じたグリコール酸は維管束細胞を経て、葉肉細胞に達し、ミトコンドリアでセリンとCO₂に転換される。しかし、生成したCO₂はC₃-植物の場合と異なり、葉肉細胞の葉緑体で直ちにPEPに固定され、リンゴ酸を経て再びカルビン回路に入るので光合成産物の損失量は少ない。

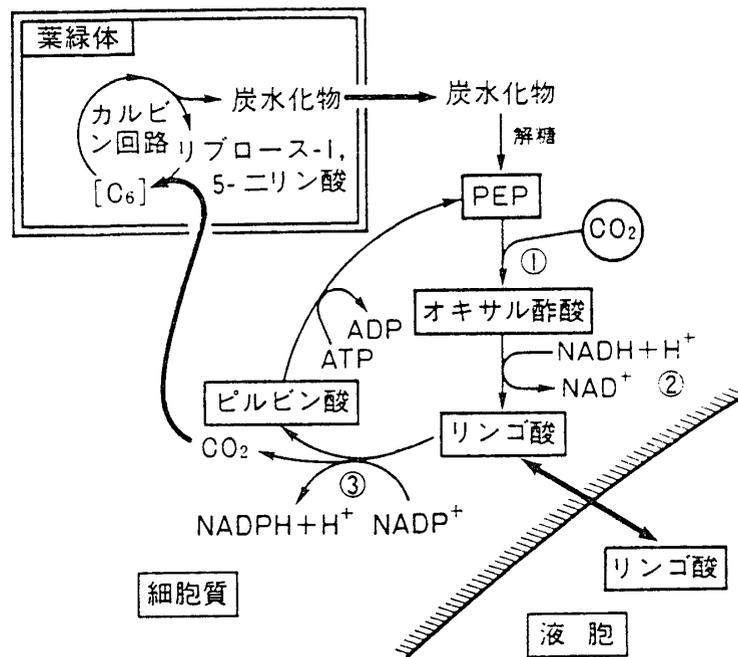


図3 C 多肉植物におけるCO₂の固定

PEP: ホスホエノールピルビン酸
 ①: PEP カルボキシラーゼ
 ②: リンゴ酸デヒドロゲナーゼ
 ③: リンゴ酸酵素

樋口：林産工学におけるバイオテクノロジー

のホスホエノールピルベエートカルボキシラーゼ (PEP Cal) によってオギザロサク酸を経てリンゴ酸 (C₄-化合物) に転換される。C₄ 化合物は維管束に転流され、脱炭酸作用をうけて CO₂ とピルビン酸となり、生じた CO₂ は維管束葉緑体中でカルビン回路を経て糖に還元される。一方、ピルビン酸は葉肉に戻されて再び C₄ 化合物を生じ、反応をくり返す。PEP Cal は CO₂ に高い親和性を持ち、上記の経路で光合成を行う C₄ 植物は C₃ 植物に比べて光合成能が著しく高い。

C, CAM-植物——ベンケイ草など多肉植物は、夜間に細胞質中の PEP Cal によって多量の CO₂ を固定してリンゴ酸として蓄積し、昼間は気孔をとじ水分の損失を防ぎながら、リンゴ酸を CO₂ とピルビン酸に転換し、生じた CO₂ を葉緑体中でカルビン回路を経て糖に転換する。

C₃ 植物の光合成能が低い大きな原因は図 3 A に示したように、いったん固定した有機物の一部をグリコール酸を経てただちに分解し、気孔から CO₂ として放出する光呼吸を行うため、光呼吸による損失は総光合成量の 30~40% にも達する。光呼吸は C₄ 植物でも行われるが、生成した CO₂ は大気中に放出されることなく直ちに PEP Cal によって PEP に固定されるため光合成量の損失は少い。したがって、C₃ 植物の光合成を C₄ 型にすることができれば光合成能は大いに改善されるわけである。

最近、分子生物学、遺伝子工学の急速な発展により、細胞中でのタンパク質の合成の機構が解明され、20 種の L-アミノ酸から特定のタンパク質が合成される際、アミノ酸が配列される順序は表 1 に示されているように遺伝子 DNA を構成しているヌクレオチド塩基三個の配列順序が遺伝暗号 (コドン) となって決定されることが明らかになった⁶⁾。

表 1 遺伝暗号

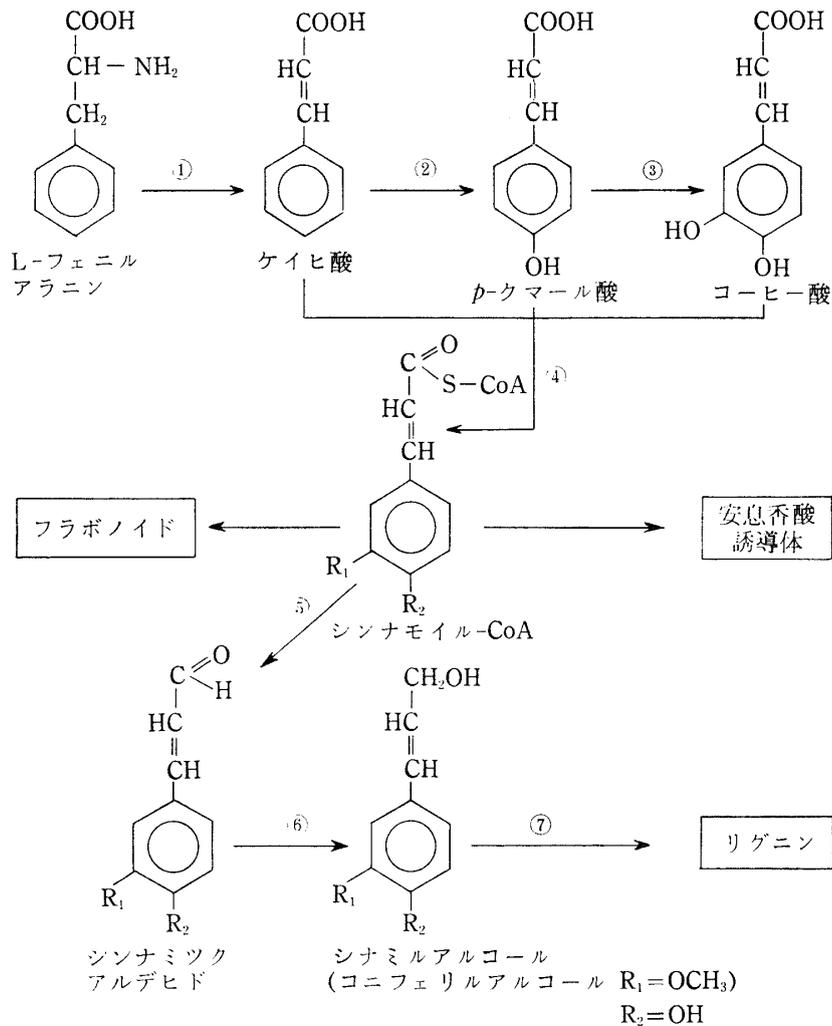
第一番目の文字 (5' 末端)	第二番目の文字				第三番目の文字 (3' 末端)
	U	C	A	G	
U	フェニルアラニン	セリン	チロシン	システイン	U
	フェニルアラニン	セリン	チロシン	システイン	C
	ロイシン	セリン	オーカー(停止)	(停止)	A
	ロイシン	セリン	アンバー(停止)	トリプトファン	G
C	ロイシン	プロリン	ヒスチジン	アルギニン	U
	ロイシン	プロリン	ヒスチジン	アルギニン	C
	ロイシン	プロリン	グルタミン	アルギニン	A
	ロイシン	プロリン	グルタミン	アルギニン	G
A	イソロイシン	トレオニン	アスパラギン	セリン	U
	イソロイシン	トレオニン	アスパラギン	セリン	C
	イソロイシン	トレオニン	リジン	アルギニン	A
	メチオニン	トレオニン	リジン	アルギニン	G
G	バリン	アラニン	アスパラギン酸	グリシン	U
	バリン	アラニン	アスパラギン酸	グリシン	C
	バリン	アラニン	グルタミン酸	グリシン	A
	バリン	アラニン	グルタミン酸	グリシン	G

U：ウラシル C：シトシン A：アデニン G：グアニン

さて C₃ 植物の場合、CO₂ は葉緑体中に存在するリブローズニリン酸カルボキシラーゼ (RuBisco) によってリブローズ 1,5-ニリン酸にとりこまれて 2 分子の 3-ホスホグリセリン酸 (PGA) となり、3-ホス

ホグリセリン酸は一連の反応を経てシュクロース、デンプンなどに転換される。最近の研究⁵⁾によると、RuBiscoは分子量50,000~55,000の大サブユニット8個と、分子量12,000~14,000の小サブユニット8個からなる分子量56万の巨大分子で、この酵素中にはCO₂を固定するカルボキシルラーゼ活性とともにオキシゲナーゼ活性があり、光呼吸におけるCO₂放出の初発反応はRuBiscoのオキシゲナーゼ作用によるものであることが明らかにされた。

さらに、大、小各サブユニットのアミノ酸配列、遺伝子の塩基配列、大サブユニットの遺伝子は葉緑体DNA中にあり、小サブユニットの遺伝子は核のDNA中にあって両遺伝子の協同作用によってRuBiscoが合成されること、大サブユニットの活性部位は配列アミノ酸の166~178、321~340、451~463付近であ



- ① フェニルアラニンアンモニアリアーゼ
- ② シンナメート 4-ヒドロキシラーゼ
- ③ 4-ヒドロキシシンナメート 3-ヒドロキシラーゼ
- ④ シンナメート (*p*-クマレート) CoA リガーゼ
- ⑤ シンナモイル CoA レダクターゼ
- ⑥ シンナミックアルデヒドレダクターゼ
- ⑦ ペルオキシダーゼ

図4 リグニンの生合成経路

ることも推定された。一方、タバコ、トウモロコシ、ハウレン草、コムギなどの大サブユニットの遺伝子が大腸菌 DNA 中に組換えられ、大腸菌によって大サブユニットタンパク質が合成されることも確認されてきた。したがって、光合成能の高い植物を育成するために次のような戦略が考えられる。大サブユニットの活性部位の DNA 塩基配列を遺伝子操作技術で変化させ、えられた変異遺伝子を入れた大腸菌に入れてタンパク質を合成させる。合成された変異タンパク質と小サブユニットから RuBisco を再構成する。再構成された RuBisco のオキソゲナーゼ活性が低ければ、その変異遺伝子を葉緑体に戻すことによって、光呼吸の少ない、したがって光合成能の高い植物を得ることができる。現在既にこの目標に向って幾多の研究が行われており、将来その成果が樹木にも応用されることが期待される。

1.3.2. リグニンレス植物⁷⁾

木材をバイオマス変換・紙パルプ用に用いる場合、リグニンのない、あるいは少ない樹木が育成できれば、パルプ蒸解試薬をおおいに節約することができ、セルロースの糖化・発酵にも寄与するところが大きい。リグニンレス植物育成の方法としてはリグニン生合成に関与している酵素の遺伝子の塩基配列を遺伝子組換え技術によって変化させるか欠落させればよいであろう。図4に示すようにリグニンの生合成反応においてヒドロキシシナモイル-CoA 還元酵素⑤、ヒドロキシシナミックアルデヒド還元酵素⑥はモノリグノール生成の最後の反応に関与する木化に特異的な酵素である。いまこのいずれかの酵素の遺伝子の DNA の塩基配列を遺伝子操作によって変化させ、モノリグノールの生成能をカットできれば、その変異遺伝子を樹木組織に戻すことによってリグニンレス植物を得ることができるであろう。そのためには、両酵素の精製、酵素のアミノ酸配列および遺伝子 DNA の塩基配列の決定、遺伝子組換え技術による塩基配列の変更などが必要である。この分野の研究は未だ行われていないが近い将来可能になるものと思われる。

1.3.3. 木材腐朽菌の遺伝子工学

木材を生化学的方法で変換・利用するためには、先ず木材の主要成分である多糖類あるいはリグニン分解能の高い微生物を選抜することが先決である。選抜された微生物（主として木材腐朽菌）から多糖類分解酵素（セルラーゼ）あるいはリグニン分解酵素（リグニナーゼ）を分離精製し、それらの酵素のアミノ酸配列を決定する。アミノ酸配列に基づいてそれぞれの酵素の遺伝子を分離し、適当なベクターに結合させる（図5）。このようにして、得られた遺伝子+ベクターを微生物（大腸菌・イーストなど）に導入し、培養によって大量生産を計ることができる。

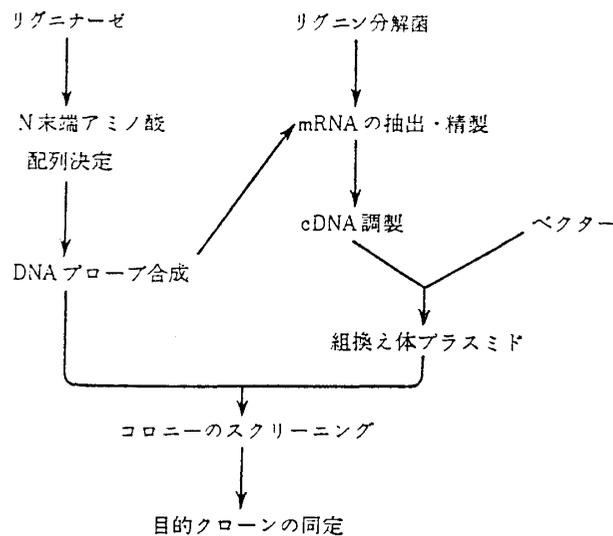


図5 組換え DNA によるリグニナーゼのクローニング

実際に、細菌、糸状菌類の多糖類分解酵素系遺伝子の大腸菌あるいはイーストへのクローニングについては次のような研究が報告されている。

*Cellulomonas fimi*⁸⁾, cellulose → 大腸菌

*Clostridium thermocellum*⁹⁾, endoglucanase → 大腸菌

*Thermomonospora XY*¹⁰⁾, endoglucanase → 大腸菌

Trichoderma reesei L27¹¹⁾, exocellobiohydrolase → 大腸菌 (PBR 322系)

*Aspergillus niger*¹²⁾, β-glucosidase → イースト (Cosmid P3030)

リグニンの微生物分解についてはリグニンの構成単位間結合様式として最も多量に含まれている β-O-4 型構造の α-β 間開裂を触媒する酵素 (リグニナーゼ) が Kirk らによって *Phanerochaete chrysosporium* から分解精製された^{13,14)}ので、現在欧米においてこの酵素の遺伝子のクローニングの研究が行われつつある。

例えば、Broda¹⁵⁾ らは *P. chrysosporium* を用いリグニン分解活性の発現に伴って出現する特異的な mRNA の検出, *P. chrysosporium* と *Sporotorichum pulverulentum* の DNA のホモロジーなどについて、また Reddy¹⁶⁾ らは *P. chrysosporium* DNA のイーストでの複製などについて研究している。その他の研究室においても上記リグニナーゼのクローニングの研究が行われつつあるので、この酵素のクローニングについては近い将来に達成されるものと期待される。

しかし、リグニンが完全に分解されるためには芳香環の開裂が不可欠で、リグニンの芳香環の開裂機構については現在のところほとんどわかっていない。おそらく α-β 間開裂酵素以外のリグニナーゼが関与しているものと考えられる。芳香環開裂リグニナーゼの分離精製とその遺伝子のクローニングについては未だ時間を要するが、将来これらのリグニナーゼの特性が解明され、α-β 間開裂リグニナーゼとともにクローニングされ、リグニナーゼの大量生産が可能になれば、エネルギー消費の少ない生化学的脱リグニンによるいろいろの応用分野が開かれるであろう。

2. バイオミメティック反応の応用

動物・植物・微生物を通じ、生体中では多数の複雑な分解および合成反応が酵素の触媒作用によって常温で効率よく進行している。最近バイオテクノロジーの一環として従来の化学工業を微生物あるいは生体

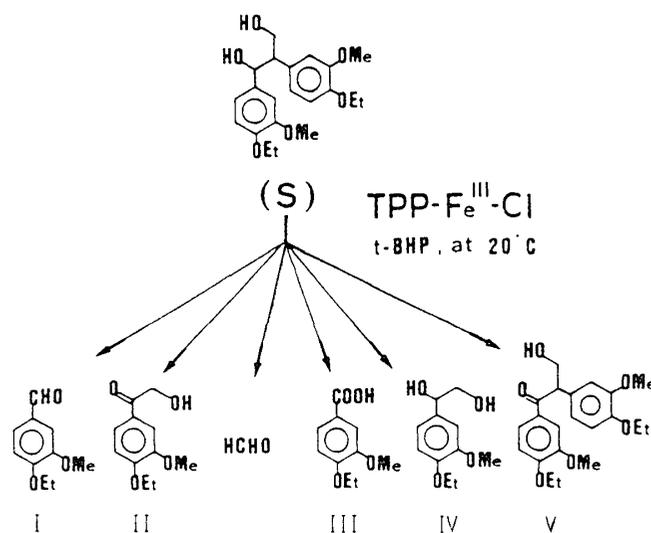


図6 人口酵素モデル, テトラフェニルポルフィリン鉄塩化物 (TPP-Fe^{III}-Cl) によるリグニンモデル化合物の酸化分解

内で行われている酵素反応を模倣することにより効率よく進行させるためのいわゆるバイオミメティック (biomimetic) 反応についての研究が急速に進歩している。林産工学分野におけるバイオミメティック反応の研究は未だほとんど行われていないが、ここでは近年リグニン化学部門で行われているリグニンの微生物分解のバイオミメティック研究^{17), 18)}を一例として紹介する。

前節に述べたように、リグニンの微生物分解においてリグニン中の β -1 および β -O-4 サブストラクチャーの C_{α} - C_{β} 間結合が酸化的に開裂されること、その酸化開裂反応を触媒する酵素リグニナーゼは酸化剤として H_2O_2 を利用するヘムタンパク質であることが明らかにされた。

そこでリグニン化学部門では、リグニナーゼの作用機構の解明と関連して種々のヘム化合物による β -1 および β -O-4 型 2 量体の酸化開裂反応について研究を行ない、図 6 に示す結果を得た。ヘム酵素のモデルとして用いたテトラフェニルポルフィリン鉄 (III) 塩化物は tert-ブチルヒドロペルオキシドあるいはヨードシルベンゼンの存在下で効率よく 1, 2 ビス (4-エトキシ-3-メトキシフェニルプロパン)-1, 3-ジオール (S) の C_{α} - C_{β} 間を開裂させて 4-O-エチルバニリン (I), α -ヒドロキシ-4-エトキシ-3-メトキシアセトフェノン (II), 4-O-エチルバニリン酸 (III), 4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリコール (IV), 4-エトキシ-3-メトキシ- α -(4-エトキシ-3-メトキシフェニル)- β -ヒドロキシピロピオフェノン (V), およびホルムアルデヒドを与え、リグニナーゼによる反応をミミックする。また、同様な反応は酵素モデルとしてヘミン + H_2O_2 を用いても容易に進行し、 β -1 型化合物ばかりでなく、 β -O-4 および β -5 型のリグニンサブストラクチャー化合物もこのモデル酵素系によって C_{α} - C_{β} 間で開裂することが明らかになってきた。現在この系による脱リグニン反応に関する研究も進行中であり、将来バイオミメティック反応による脱リグニン、リグニンの変換が林産工業の分野でも広く応用されていくことが期待される。

引用文献

- 1) 福井三郎：バイオテクノロジーの新展開，化学増刊103号，1 (1984)
- 2) DUNSTAN, D.I. and THORPE, T.A.: Fifth Canadian Bioenergy R & D Seminar (ed. S. Hasnam) Elsevier Applied Science Pub. pp. 23~35 (1984)
- 3) BRANDAO, L.G., IKEMORI, Y.K. and CAMPINHOS, E.: The New Eucalypt Forest. The Marcus Wallenberg Foundation Symposia Proceedings pp. 1-29 (1984)
- 4) McCOWN, B.H.: Tappi Journal, **68**, 116 (1985)
- 5) 杉浦昌弘：現代化学 No. 128, 42 (1981)
- 6) J. チャーフアス著. 鈴木撃之訳：人工生命 (遺伝子工学の誕生) 培風館
- 7) 樋口隆昌：木材研究・資料19号, 33 (1984)
- 8) WHITTLE, D.J., KILBURN, D.G., WARREN, R.A.J. and MILLER, Jr. R.C.: Gene **17**, 139 (1982)
- 9) CORNET, P. TRONIK, D. MILLET J. and AUBERT, J.P.: FEMS Microbiol. Lett., **16**, 137 (1983)
- 10) COLLMER, A. and WILSON, D.B.: Biotechnol. Sept. 594 (1983)
- 11) SHOEMAKER, S., SCHWEICKART, V., LANDER, M., GELFAND, D., KWOK, S., MYAMBO, K. and INNIS, M.: Biotechnol. Oct. 691 (1983)
- 12) PENTTILA, M.E., NEVALAINEN, K.M.H., RAYNAL, A. and KNOWLES, J.K.C.: Mol. Gen. Genet., **194**, 494 (1984)
- 13) TIEN, M. and KIRK, T.K.: Science, **221**, 661 (1983)
- 14) TIEN, M. and KIRK, T.K.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 2280 (1984)
- 15) RAEDER, U. and BRODA, P.: Current Genetics, **8**, 499 (1984)
- 16) RAO, T.R. and REDDY, A.: Biochem. Biophys. Res. Comm., **118**, 821 (1984)
- 17) SHIMADA, M., HABE, T., UMEZAWA, T. HIGUCHI, T. and OKAMOTO, T.: Biochem. Biophys. Res. Comm., **122**, 1247 (1984)
- 18) HABE, T., SHIMADA, M. and HIGUCHI, T.: Mokuzai Gakkaishi **31**, 54 (1985)