

微生物によるリグニン分解*

榎 章 郎**

Lignin Biodegradation*

Akio ENOKI**

リグニンはセルロースおよびヘミセルロースと共に植物体の主要な構成成分であり、針葉樹材では27～30%、広葉樹材では20～25%草木類においても15～25%含まれている。そして再生産可能な天然高分子としてセルロースに次いで多量に地球上に存在する物質である。光合成を通して地球全体で約167gの炭素が毎年CO₂から生物圏に取り込まれており、この中で2/3は陸上の植物の光合成によるものである¹⁾。そして前述したようにリグニンは植物中に15～30%含まれており、さらに炭素含量の高いことから、毎年地球上で光合成を通して個定される総エネルギー量に対するリグニンに固定されるエネルギー量の占める割合は非常に大きい。それ故にこの莫大な量で再生産可能なリグニン中に含まれるエネルギーを目的意識的にとりだして、われわれの生活に使用することができるようにすることの意義は極めて大きい。微生物はリグニン中に含まれるエネルギーを目的意識的に取りだし利用するための道具として最も有力視されている。しかしながらセルロースの有効利用に必要な biotechnology は極めて高度に発達しているのに比べると、リグニンの有効利用に要求される biotechnology は非常に遅れている。この遅れはリグニンの biodegradation そのものに関する知識が遅れていることおよびリグニン分解を行う微生物の遺伝学技法の開発が遅れていることによるところが大きい。

リグニンの化学、分布あるいは生合成についてはすぐれた本²⁾および reviews^{3,4)}があるので詳しいことはそれらを参照されたい。

現在までに発表されたリグニンの微生物分解に関する論文はおおまかに次の4つに分類される。

- 1) リグニンを分解できる能力を有する微生物の発掘、単離。およびリグニン分解を活発に行うのに必要とされる物理的条件に関する研究
- 2) リグニンおよびリグニンモデル化合物の代謝機構に関する研究。
- 3) 微生物によるリグニン分解システムの応用に関する研究
- 4) リグニン分解およびリグニン分解微生物に関する遺伝学的研究

以下順に現在までになされたこれらの分野での研究についておおまかにとりまとめたのち、現在最もそのリグニン分解について研究がなされている白色朽菌 (White-rot fungi), *phanerochaete chrysosporium* のリグニンモデル化合物の分解機構についてのべる。

1. リグニン分解微生物およびリグニン分解に必要とされる環境に関する研究

1978年頃までに確実にリグニンを分解できることがわかっていた菌はほんの2, 3であった⁵⁾。そして一般

* 第36回木研公開講演会 (昭和56年5月29日, 大阪) において講演

** 木材化学部門 (Research Section of Wood Chemistry)

に褐色朽菌と共にバクテリアはリグニンの分解に一定の役割を果たしているのであろうがその役割は主要なものではなく、バクテリアあるいは褐色朽菌だけではリグニン分解は不完全で、分解速度も遅いと考えられていた。しかし最近ある種のバクテリアはリグニンを分解する能力を有することが報告されている⁷⁾。しかし大部分のリグニンの微生物分解に関する研究は白色朽菌によるリグニン分解についてのものである。典型的な白色朽菌としてカワラタケ、キンイロアナタケ、*Phanerochaete chrysosporium* などがよく研究されている。*Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Nocardia* 等のバクテリアがリグニンを分解する能力を有することが知られている。

この数年間に、¹⁴C-リグニンが¹⁴CO₂に分解されるのに重要な培養条件について多くの研究が発表されている。これらの研究の大部分は T.K. Kirk およびその共同研究者達によるものである⁸⁾。これらの研究は次のようにまとめられる。a) 微生物の一次増殖が本質的に完了したのち、はじめてリグニン分解は行われる。すなわちリグニン分解は二次代謝としてあらわれる。b) リグニンはリグニン分解代謝のための十分な炭素源、エネルギー源とはなりえず、セルロースまたはグルコースのようなリグニンとはちがった炭素源をリグニン分解のために必要とする。c) リグニン分解は培養培地中の炭素含量が高濃度(2%グルコース)で窒素含量が低濃度(1.2 mM NH₄⁺) のとき、最も活発に行われる。そして活発にリグニン分解が行われている時に、培地に ammonium または glutamate を加えるとリグニン分解は抑制される。d) 高濃度の酸素条件(50~100%)はリグニン分解を活発にする。e) リグニン分解は静置培養下において活発に起り、振とう培養はリグニン分解をおさえる。f) 培地中のリグニンの存在はリグニン分解システムの形成を誘導することはない。これらの発見はそれ以後のリグニン分解に関する研究の進展に大きく寄与した。

リグニン分解代謝産物の1つであるバニリン酸⁹⁾の decarboxylation は高濃度窒素含量(12 mM NH₄⁺)の振とう培地において *P. chrysosporium* によってその一次増殖中に活発に行われる。そしてその菌をその基質と共に育成すると酸化脱炭酸を行う vanillate hydroxylase の活性は誘導される^{10,11)}。この事実はこの vanillate hydroxylase の調節はリグニン分解系酵素の調節から独立していることを示している。一方 β-aryl ether 型二量体リグニンモデル化合物は前述したリグニンが最もよく活発に分解される a, b, c, d, e の条件下で同じく最も活発に分解される¹²⁾。この現象はこの二量体の分解系とリグニンを分解する系とは同じものである可能性を示している。言いかえると二量体はリグニンが代謝される機構により分解される。最近 Kirk 等¹³⁾はさらに酸素分圧はリグニン分解システムが生じる直前においては ligninolytic activity の量に影響を与え、その分解系が発達したのちは酸素分圧は酸化速度に影響することを報告している。

2. リグニンおよびリグニンモデル化合物の代謝機構に関する研究

リグニンの代謝の化学についての研究は三つの型に分類することができる。a) 高分子化合物を微生物によって腐朽させたのち、分解をうけていない高分子化合物と分解をうけた高分子化合物の化学的性質を比較し、その異なり具合を明らかにすることよりリグニンの代謝機構を推定する研究、b) 高分子化合物を腐朽させ、生成された低分子化合物の化学構成を推定する研究。c) 基本的な低分子リグニンモデル化合物を微生物により代謝させ、代謝産物の分離同定を行い、リグニン分解反応および酵素の種類を明らかにする研究。

a) 幡¹⁴⁾は腐朽リグニンが、多量のカルボニル基およびカルボキシル基を含み、加水分解すると多量のバニリン酸と少量のコニフェニルアルコール、コニフェニルアルデヒド、バニリン、フェラ酸が得られることから、リグニンは分子末端のコニフェニルアルコール基がバニリン酸基に酸化される反応を経て分解されていくものと推定している。この推定された分解反応はリグニンモデル化合物のバクテリア、白色朽菌による分解中に実際に行われることがその後示された。

Kirk and Chang 等¹⁵⁾は白色腐朽菌で腐朽させた spruce wood より分離した腐朽リグニンと健全材の

MWL との性質を比較して次のような結論を行った。(イ) 菌による腐朽中に、リグニン側鎖の開裂が生じる。(ロ) リグニン芳香環の脱メチル反応および環開裂が高分子中で起る。一方 Hall 等¹⁶⁾のクラフトリグニンの腐朽の研究では分解されたリグニン中の酸素含量は増加するが、芳香環の広範な脱メチル反応は示されなかった。微生物によるリグニン分解において、側鎖開裂反応に対する環開裂反応の相対的重要性については現在活発に研究が行われている分野である。

Martin 等¹⁷⁾は側鎖の α , β , γ 位, ベンゼン環および OCH_3 基をそれぞれ ^{14}C でラベルしたコニフエニルアルコールをトウコロモンおよびゴムギにすわせて, そのリグニン中に取り込ませた。そして cornstals, および wheatstraw より ^{14}C でラベルされた位置が異なるリグニンを分離した。これらのリグニンを微生物が生息している土壌中に加えて, 放出される $^{14}\text{CO}_2$ を測定した。2年間の培養で, 側鎖 α , β 位がラベルされたリグニン, 環がラベルされたリグニン中の ^{14}C の約40%が $^{14}\text{CO}_2$ として放出された。 γ 位, β 位および OCH_3 がラベルされたリグニンは52%, 63%, 69%の ^{14}C が $^{14}\text{CO}_2$ として放出された。またどのリグニンも培養の最初の3~6カ月の間が最も活発に $^{14}\text{CO}_2$ を放出した。2年間で放出される $^{14}\text{CO}_2$ の56~75%が最初の6カ月に放出された。そしてそれ以後は放出速度はだんだん遅くなり完全に分解されるには極めて長年月を要することが示された。以上のことは土壌中ではリグニンはどの位置もほぼ同じ速度で土壌微生物により分解されることを示している。またリグニンは土壌中で最初は速く分解して, 腐植を形成し, それ以後は長期間腐植として土壌中に存在することが推定される。

b) Chen 等⁹⁾は腐朽させた木材よりリグニンの代謝生成物として数多くの aromatic acids を分離同定している。この低分子の aromatic acid が多数分離されたことは側鎖開裂反応がリグニンの微生物分解において重要な反応であることを示している。一般的に巨大分子のリグニンの代謝速度は極めて遅い。一方それに比べると低分子の分解生成物の代謝はずっと速い。このためにリグニン中間分解生成物は蓄積されにくい。それ故巨大分子のリグニンあるいはリグニンモデル化合物の微生物分解より生じる低分子分解生成物を単離同定することによってリグニンの微生物分解を解明することは難しい。そして蓄積される構造決定が可能な程の低分子中間生成物は微生物に対して安定であるが故に蓄積されるので, このものを単離同定することによりリグニン分解反応経路を推定することは, 副次的あるいは二次的の反応をリグニン代謝経路の主要な反応とみなす誤りをおかす危険がある。

c) 天然のリグニンは巨大分子であり, 前述した理由により, 微生物による分解の機構を解明するためにはリグニンの主要な基本的結合様式を有する低分子のモデル化合物を用いることが必要となる。主要な結合様式として, アリルグリセロール- β -アリルエーテル, フェニルクマラン, ビフェニル, リグニン分子末端に存在する C_6 - C_3 のフェニルプロパン単位, ピノレジノールが考えられる。中でもアリルグリセロール- β -アリルエーテル結合はリグニン中最も多く存在する結合で, フェニルプロパン単位あたり, 針葉樹リグニンで40%, 広葉樹リグニンでは60%を占める。したがってリグニンの分解機構を知る上でこの結合の分解過程の解明はきわめて重要である。福住¹⁸⁾はキンイロアナタケ菌体より, ベラトリルグリセロール- β -グアイアシルエーテルを分解し, グアイアコールと脱メチルの起ったグアイアシルグリセロールを生成する反応を触媒する酵素を分離している。この反応を触媒するのに NADH と O_2 を要求することから, この酵素は一種のモノオキシゲナーゼと推定した。グアイアコールが分離されるためにベンゼン環のメトキシ基の脱メチルが必要かどうかについては明らかにされていない。石川等¹⁹⁾はグアイアシルグリセロールおよびその β -グアイアシルエーテルを基質として白色腐朽菌に与えて, 分解生成物としてバニリン, バニリン酸, 4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニルピルビン酸等をペーパクロマトグラフィーで同定している。そしてベンゼン環のメトキシ基の脱アルキル反応がまず行われ続いて β 位で酸化的脱エーテル反応が起って, アリルグリセロールグリセロール- β -アリルエーテル結合は分解されるものと推定している。最近 Enoki 等^{20,21)}は (イ) *Phanerochaete chrysosporium* により4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリセロール- β -グアイアシルエーテルお

よびその誘導体は容易に酸化的 β -エーテル開裂を受けること。ロ) 生成したジオールは α - β 間で開裂して C_6-C_1 化合物になること。ハ) この酸化的 β -エーテル開裂, α , β の炭素間でジオール開裂が行われるために, 上記の例で示されたような前もってベンゼン環の脱エーテル反応 (脱メチル) が行われる必要はないこと。ニ) 酸化的脱エーテル, ジオール開裂反応は基質特異性は極めて小さいことを報告している。遊離のフェノール性水酸基をもたない β -エーテル二量体は酸代的 β -エーテル開裂と共に α - β 間の炭素-炭素結合開裂により分解されることが Enoki 等²²⁾により いらされている。同様の α - β 間の炭素-炭素結合がバクテリアにより直接的に開裂されることがみいらされている²³⁾。この反応はアルドラーゼ開裂によるものと推定されている。しかしこの反応は加水分解酵素によっても可能であるのでさらに詳しい検討が必要である。ジオール化合物のジオール間炭素-炭素結合の開裂反応が異なったいくつかのリグニンモデル化合物において行われることが示された^{24,25)}。これらの報告では分子末端のフェニルプロパン単位の α - β 間の二重結合がジオール化され, 次いで α - β 間の開裂が行われることが示されている。

福住等²⁶⁾は上記の反応とは異った反応で *Pseudomonas* FK-2 はグアイアシルグリセロール- β -コニフェニルエーテルを代謝することを報告している。すなわちグアイアシルグリセロール- β -コニフェニルエーテルはこのバクテリアにより β -ヒドロキシプロピオバロンとコニフェリルアルコールに分解される。

リグニンモデル化合物が遊離のフェノール性水酸化基を有し, さらにその側鎖の α 位の炭素に水酸基がつ

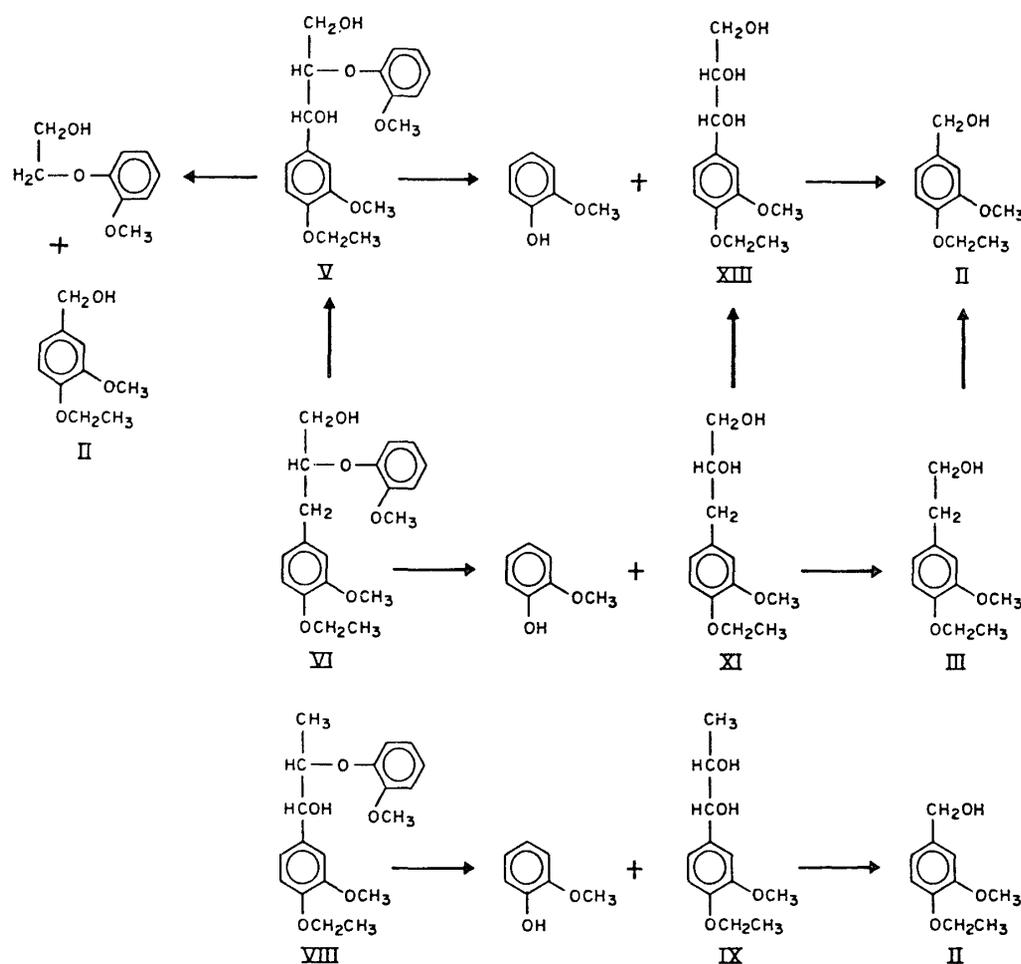


Fig. 1. Products identified and proposed metabolic scheme for the substrates by *P. chrysosporium*.

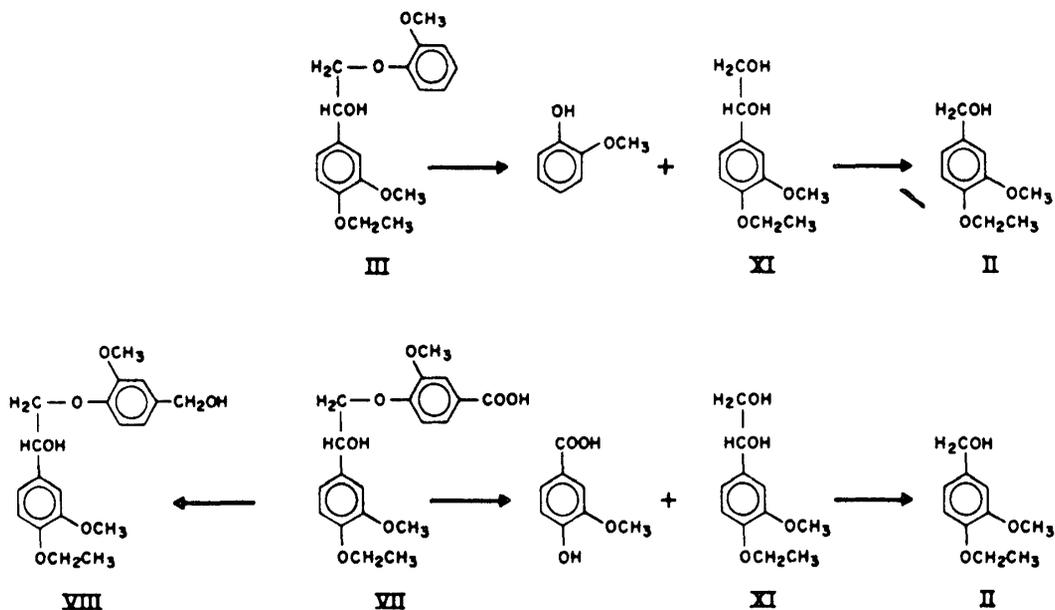


Fig. 2. Products identified and proposed catabolic scheme for the substrates by *P. chrysosporium*.

いている場合には、アルキルフェニル開裂による反応物が極めて低収量得られる^{27~30}。この反応はラッカーゼ、ペルオキシダーゼ等のオキシダーゼによって基質が重合反応する際に極一部行われるものと推定される。このアルキルフェニル開裂はリグニンが代謝されない培養条件下においても行われることやリグニンを分解できないバクテリアによっても行われること等から、このアルキルフェニル開裂反応は主要なリグニンの微生物分解反応とは考えられない。

フェニルクマラン骨格を有するリグニンモデル化合物がフサリウム³¹と *P. chrysosporium*²⁴) によって分解されることが報告されている。しかし推定されたフェニルクマラン結合の主要な代謝経路と同じであるかどうかは明確でない。

Phanerochaete chrysosporium は1,2-ジアリールプロパン型化合物を図3に示されたような代謝経路によって分解することがみいだされている^{32,33}。

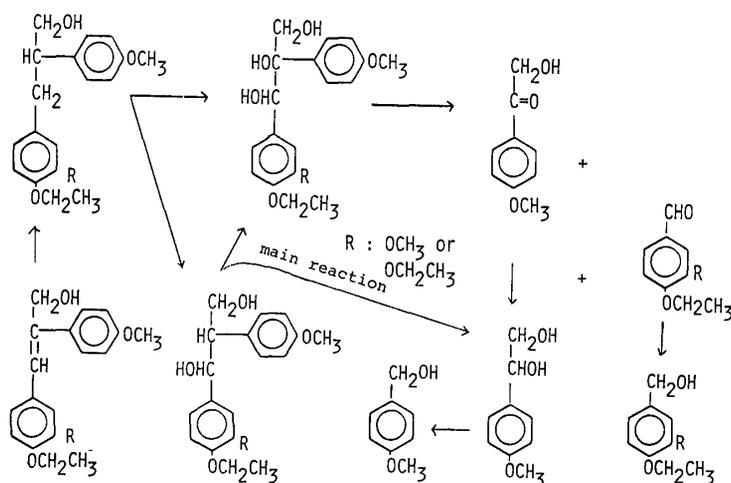


Fig. 3. Catabolism of 1,2-Diarlylpropane-3-ols by *P. chrysosporium*.

後の文献では、さらにこの反応が一重頃励起酸素によって引き起されること、一重頃励起酸素の捕獲剤 (specific trapping agent) である anthracene-9,10-bisethansulfonic acid (AES) を培地中に加えると、この酸化反応を抑えること、さらに AES は *Phanerochaete chrysosporium* の C^{14} -リグニンの $^{14}CO_2$ への代謝を強く抑制することをみだし微生物は一重頃励起酸素を菌体外に放出し、この生産された一重頃励起酸素はリグニン分解に重要な役割を演じていると結論している。

ビフェニル結合を有するデヒドロバニリン酸のカワラタケによる代謝生成物としていくつかの分解生成物が片山等³⁴⁾により分離同定されている。脱炭素反応、重合反応、ベンゼン環開裂反応等が行われたことが同定された分解生成物よりわかる。しかしビフェニル結合が直接開裂されたことを示唆するような分解生成物は検出されていない。同様にビフェニル結合がリグニン中の他の結合に比べて微生物による開裂を受けにくいことが Krinsnangkura 等³⁵⁾の DHP の *Phanerochaete chrysosporium* による分解実験によって示されている。

一般に微生物はすべての天然の有機化合物を代謝できると言われている。しかし初期基質の構造が複雑なときは、エネルギー源として利用されるためにはまず段階的に分解されて、TCA 回路にはいろいろな1つもしくはそれ以上の小さい分子になるという基本原則がある。このような特殊な微生物代謝系は多く存在する。芳香族化合物を呼吸基として利用する好気性細菌の多くは β -ケトアジピン酸に収束する二つの経路を通してこれらの化合物を分解する。 β -ケトアジピン酸は次のアセチル-S-CoA とコハク酸に変わり、この両者は TCA 回路に入る³⁶⁾。したがって微生物によるリグニン代謝によって生じたバニリン酸等の C_6 - C_1 化合物やグアイアコール等の C_6 化合物も脱メチル反応、脱炭酸反応、水酸化反応等を受けながら β -ケトアジピン酸を経て TCA 回路に入ってゆくものと考えられる。このような C_6 - C_1 、 C_6 化合物の脱メチル^{37,38)} 酸化的脱炭酸¹¹⁾、非酸化的脱炭酸³⁹⁾、リング開裂⁴⁰⁾、水酸化反応⁴¹⁾についての報告は数多く存在する。

以上みてきたように白色腐朽菌によるリグニン分解は二次代謝であり、また分解反応を触媒する酵素はほとんど基質特異性を示さない。培地中のリグニン分解酵素を誘導しない。リグニンは不均一な巨大分子である。これらのことから微生物はリグニンのみを特異的に代謝する酵素いわゆる“ligninase”を生産しないものと考えられる。そしてさらにリグニンポリマーやモデル化合物の微生物分解は細胞外での種々の酸化反応で行われることが明らかになった。これらのことをふまえて Hall⁴²⁾ は実際は高分子化合物を攻撃するのは酵素よりむしろスーパーオキシドアニオン O_2^- のような活性酸素種であるという仮説を提唱した。また活発にリグニンを分解している菌株は H_2O_2 を産生することより、 H_2O_2 もまたリグニンの代謝調節に関係しているものと考えられていた⁴³⁾。Khun 等⁴⁴⁾は *Phanerochaete chrysosporium* は遊離のフェノール性水酸基をもたないオレフィン化合物を主反応としてジオール化すること、さらにこのオレフィンのジオール化反応は酸素存在下でラッカーゼにより、 H_2O_2 の存在下にペルオキシダーゼによっても行われること、スーパーオキシドアニオンによってもこのジオール化反応が行われることをみだし、*Phanerochaete chrysosporium* によるジオール化反応はペルオキシダーゼ等のオキシダーゼにより生産されたスーパーオキシドアニオンによって行われるものと推定している。これらの発見に加えて前述したように *Phaerochaete chrysosporium* は一重頃酸素分子を生産し、これがリグニンを分解することが報告されるに至りリグニンポリマーを非立体特異的に直接攻撃して分解する活性酸素種の存在がほぼ確実視されるにいたった。しかし現在までに明らかにされたリグニンの微生物代謝と関係していると思われる反応すべてが活性酸素種によって行われるとの証明はされていない。DHP が一重頃酸素分子やスーパーオキシドアニオンのみで微生物の代謝によって行われるように低分子化され、炭酸ガスにまで分解されることはありえず、リグニンの代謝にはこれらの活性酸素種に加えて他の酵素の触媒作用が必要であると思われる。

筆者等は後に詳述する *Phanerochaete chrysosporium* が行うリグニン代謝に必要な一連の反応の中で、一重頃酸素、スーパーオキシドアニオンが行うことのできる反応はどれとどれかについて検討している。シトクロ

μ P-450 は細菌類カビ類も含めて大部分の生物のその膜系に存在することが知られており、リグニンの代謝に必要な水酸化反応、脱アルキル化反応を NADH, NADPH で O₂ を活性化して行うので、リグニンの代謝に関係することは十分に予想できる。福住等によって報告された酸化的エーテル開裂を行うモノオキシゲナーゼ¹⁸⁾、ベンゼンリング開裂を行うジオキシゲナーゼ等もリグニンの代謝に関係していると思われる。

3. Lignin degrading systems の応用に関する研究

潜在的な応用は少くとも次の4つの型に分けられる。a) リグニン含有廃水の微生物処理。b) 生物パルプ生産 (biological pulping) c) リグニンセルロースの食物飼料への変換 d) リグニンを原料にした有益な化学製品の生産。

a) リグニン含有廃水の処理

リグニンスルホン酸、チオリグニンの微生物分解についてはすぐれた総括^{45,46)}があるのでそれらを参照されたい。パルプ廃液処理の目的としてはリグニンそのものを分解して廃液の浄化をはかることの他に、廃液の脱色および消泡がある。廃液の微生物による脱色は実用化の点からみてもかなり大きな成功をおさめている^{47,48)}。Eaton 等の方法では、反応容器中で微生物がかなり長期間有効に働く。さらに振とう培養において、より速く廃液の脱色ができる菌株の発掘が望まれる。福住等⁴⁹⁾は KP および SP 廃液に消泡作用のある微生物を分離している。

b) Biological pulping

一般的にリグニン分解力の強いといわれる白色腐朽菌でも木材の腐朽の過程では、リグニンの代謝と同時にヘミセルロース、セルロースを代謝と同時にヘミセルロース、セルロースを代謝する。それ故白色腐朽菌といえどもそのままでは生物パルプ生産には利用できない。そこでリグニン分解酵素あるいはリグニンを分解できる物質を生成できる酵素あるいはリグニンを分解できる物質を生成できる酵素は強力に生産するが、セルロース分解酵素 (cellulase) の生産は無しか極めて弱く、ヘミセルロース分解酵素 (hemicellulase) はほとんどに生産するか無いような変異株をつくりだす試みがなされてきた。Ander 等⁵⁰⁾は上記の条件をみたすような変異株を *S. pulverulentum* に紫外線を照射して得ている。生物パルプ生産のために木材からリグニンを特異的に除去することを目的とした研究がいくつかなされており、それらは総括されている⁵¹⁾。しかしながら最近では生物パルプに関する研究の動向は *theromechanical pulp* からリグニンを選択的に除去することにむけられてきた^{52,53)}。これらの報告は微生物によって処理したのちの *refining* に要するエネルギー量はかなり少なくて済むことを示している。この微生物処理はパルプの漂白に対しても用いられている⁵⁴⁾。

c) リグノセルロースの食物、飼料への変換

最近白色腐朽菌を用いて、麦わらを家畜の飼料に変換した研究がいくつかある^{55,56)}。これらのすべての研究はスケールを大きくすることおよび他の微生物の夾雑を防ぐことのための技術的問題に直面している。

d) リグニンより有益な化学製品の生産

リグニンの微生物分解により低分子化合物が得られたとしてもリグニンの代謝の項でのべたように得られる低分子化合物は極めて不均一でその収量も極めて低いであろう。それ故にリグニンに直接微生物を作用させて低分子の有益な化合物を生産させることは実際的でない。リグニンの分解機構の解明およびそれらの反応を触媒する物が明らかになり、次にその触媒を用いてリグニン分解反応の中で必要とする反応のみが自由に行える技術の確立がなされるならば、リグニンより有益な低分子化合物の生産も可能になるであろう。もし、Hall⁴²⁾ が推定したようにリグニン分解を行う触媒が酵素ではなくて拡散しうる活性種酸素種のようなものである場合は、リグニンの代謝をコントロールすることは極めて難しくなる。反対にリグニン分解系が非特異性に膜に結合した酵素系であれば、そのコントロールは可能であろう。

4. リグニン分解およびリグニン分解菌に関する遺伝学的研究

リグニン分解およびリグニン分解菌に関して少くとも次のような遺伝学分野のより進んだ基礎的研究が行われる必要がある。

a) リグニン分解生物の遺伝学に関する研究。 b) リグニン分解システムの解明に向けられた遺伝生化学 (biochemical genetics) 的な研究。 c) リグニンをより速く、より大きなスケールで分解できる菌株の分離。 d) リグニン分解の生化学特に分解に関する触媒の性質と局在 (localization) に関する研究。

a) *Phanerochaete chrysosporium* はリグニン分解菌としては世界で最、材料として用いられ、また研究されている。しかしこの菌は遺伝学の立場からはあまり研究されていない。Gold 等⁵⁷⁾はこの菌を用いてコロニーの増殖を誘導および replica plating のための信頼度が高く有効な方法を確立している。そして *Phanerochaete chrysosporium* を突然変異生成させたのち、この replica plating 法で最初の栄養要求性マーカー菌株 (auxotrophic marker strains) を分離している⁵⁸⁾。

そしてこれらのマーカー菌株でもって、相補効果 (complementation) および異核共存体 (heterokaryon) 形成の研究を行っている。古典的組換えを達成させるためには、子実体 (fruit body, basidiocarp) の発現およびその結果として担子孢子 (basidiospore) の合成が行われる適当な条件をみいだすことが必要である。Gold 等⁵⁹⁾はこの菌の子実体形のために必要とされる条件をみいだし、子実体形成は炭素カタボライト抑制 (carbon catabolite repression) であると報告している。

b) 基質非利用変異株 (substrate nonutilization mutants) を分離しその特徴を明らかにすることは、種々の代謝経路の遺伝学的解明にしばしば役だってきた。*P. chrysosporium* はリグニンまたはリグニンモデル化合物を唯一の炭素源としては利用できないので、リグニン非利用変異株 (lignin nonutilization mutants) を分離することは不可能なことであった。それにもかかわらず、リグノセルロース分解に関する遺伝生化学的研究がいくつか報告されている。それらのうちで初期のものは Eriksson 等⁵⁰⁾のセルラーゼ欠損型変異株に関するものおよびフェノールオキシダーゼ欠損型変異株 (PO mutants)^{60,61)}に関するものである。

リグニンモデル化合物のある結合をフェノールオキシダーゼは開裂することができると言われていたけれども⁶²⁻⁶⁴⁾、フェノールオキシダーゼのリグニンに対する主要な役割は縮合とポリメリゼーションである。Ander 等⁶⁰⁾は、フェノールオキシダーゼネガティブミュータントおよびその復帰変異株 (revertant) を分離し、PO⁻ミュータントはクラフトリグニンを分解できなかったと報告している。また彼等はこのミュータントはフェノール化合物やクラフトリグニンの存在下ではエンド 1, 4-グリカナゼは多分リグニン代謝調節においてある役割を果たしていると結論している。またこの PO⁻ミュータントは¹⁴C-バニリン酸を分解できることを報告している。同様に Gold 等も彼等の分離した PO⁻ミュータントは DHP を分解できないことを報告している。そしてフェノールオキシダーゼ活性を取りもどしたリバータントは再びフェノール化合物を分解できるとのべている。さらに最近島田等、リグニン代謝と関係している一連の反応——側鎖 α 位の水酸化、オレフィンの水酸化、 α , β -ジオール開裂、脱炭酸反応、酸化的脱エーテル反応、芳香環の酸化的開裂等——のうちオレフィンのジオール化、ジオール開裂酸化的脱エーテル反応をこの PO⁻変異株は触媒できないことをみいだしている。それ故にこの変異株はオキシダーゼのみならずリグニンの代謝に重要と思われるいくつかの反応を触媒する酵素を欠いているので、リグニンの代謝にペルオキシダーゼが決定的因子かどうかはこの変異株を用いても明らかにすることはできない。

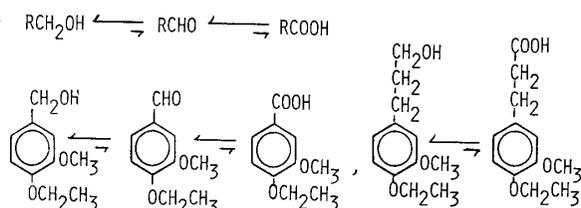
5. *Phanerochaete chrysosporium* が行うリグニン代謝と関係している一連の反応

リグニンを代謝しない培養条件下では菌は活発にリグニン代謝を行う条件下とは異った反応によってリグニンモデル化合物を代謝したり、あるいはまったくそのモデル化合物を代謝しない場合がある。それ故にモデル物質を用いて微生物によるリグニン分解機構に関する研究を行う場合はあらかじめ用いる微生物がリグ

梗：微生物によるリグニン分解

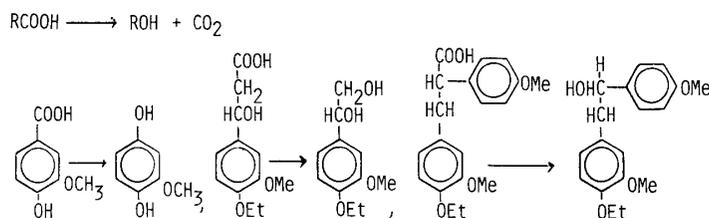
ニンをよく分解できる培養条件について検討し、最も活発にリグニンを分解する条件下でモデル物質の分解を行わせることが重要である。Kirk 等^{66,67)}によって検討された最も活発にリグニンを分解する培養条件下で種々のモデル物質をこの菌に与えた場合に示された一連の代謝反応を以下に示す。以下にみられるようにこれらの反応においては菌はほとんど基質特異性を示さなかった。

(1) 酸化還元反応

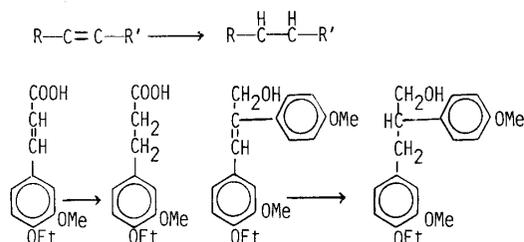


この菌では平衡は還元系のほうにずれ、アルデヒドまたはカルボン酸を基質として加えると、ほとんどがアルコールになる。

(2) カルボキシル基の水酸基への変換

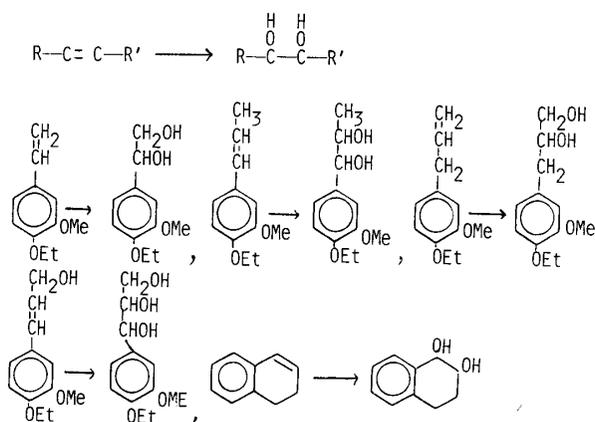


(3) オレフィンの飽和



培地が高い窒素含量で振とう培養のときはオレフィンのジオール化は行われず、飽和反応が主反応になる⁶⁸⁾。

(4) オレフィンのジオール化

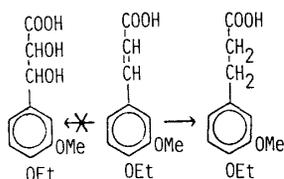


過酸化水素存在下でペルオキシダーゼはこのオレフィンのジオール化反応を触媒する。同様に酸素存在下

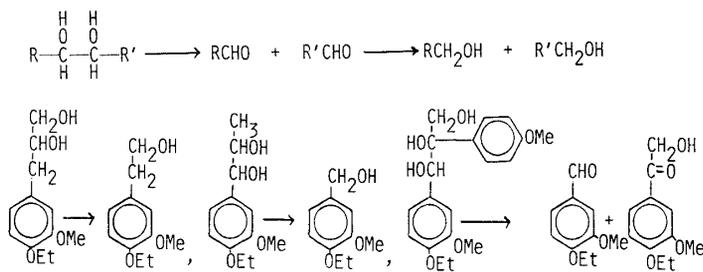
でラッカーゼもこの反応を触媒する。

またこの反応はスーパーオキサイドアニンによっても引き起される。これらの酵素はオレフィンをジオール化すると同時に極く一部分のオレフィンを酸化的切断でアルデヒドにする。

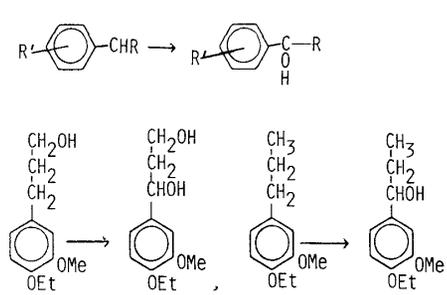
ただし γ 位がカルボキシル基のときは二重結合はジオール化されずに飽和される。



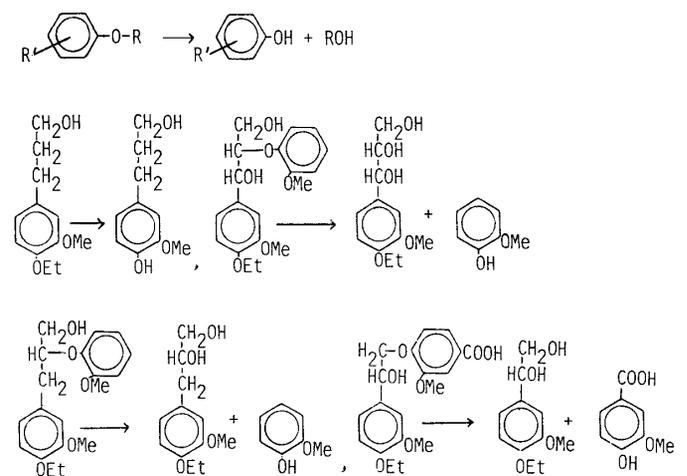
(5) Vicinal ジオール化合物の炭素-炭素結合の解裂



(6) ベンジル位への水酸基の付加

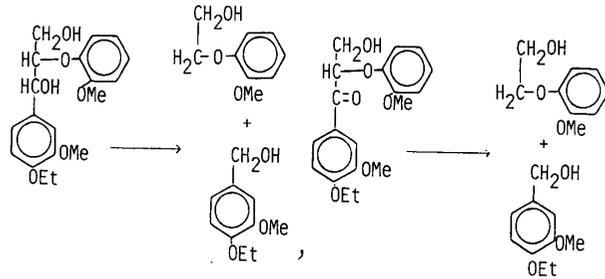
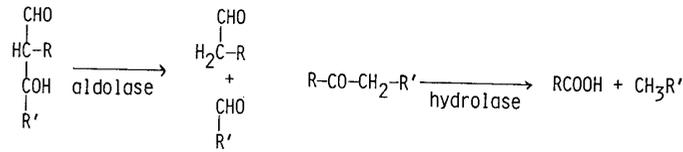


(7) Aryl ether の oxidative deetherification

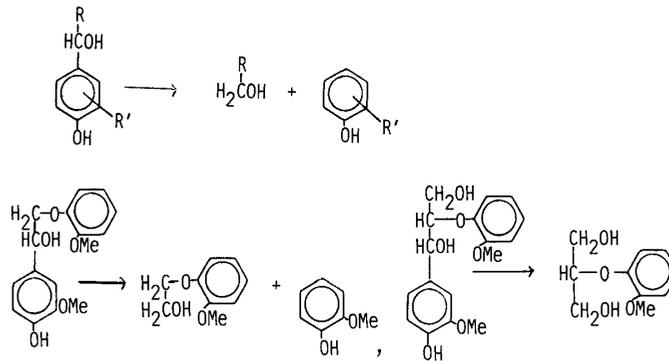


(8) Aldolase による Schiffb 塩基を経る反応または hydrolase による加水分解反応による炭素-炭素結合の開裂

榎：微生物によるリグニン分解



(9) フェノール性水酸基と α 位に水酸基をもつ化合物 α アルキルフェニル開裂
この反応はラッカーゼ，ペルオキシダーゼ等のオキシダーゼによって行われる。



(10) ベンゼンリングの解裂

現在までに低分子芳香環は脱アルキル，脱炭酸を受けたのち，ジオキシゲナーゼにより酸化的環開裂されるとい報告が多数ある。*Phanerochaete chrysosporium* も同じような反応で酸化的開裂を行うものを推定される。

A hypothetical catabolic sequence for the microbial degradation of lignin

(1)

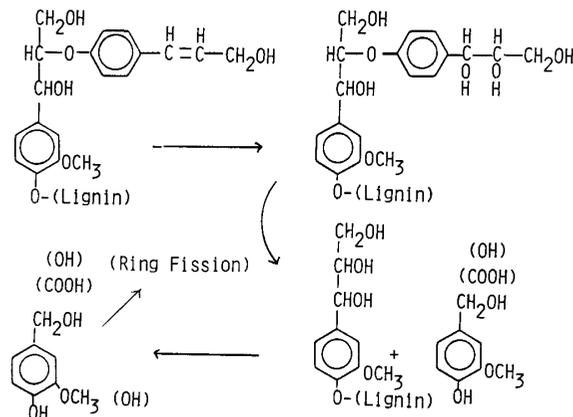


Fig. 4

以上の一連の反応を総括すると *Phanerochaete chrysosporium* のリグニン代謝経路として次のような代謝経路が推定される。側鎖が切断されリグニンの末端に位置することになる C₆-C₁ 単位あるいは C₆ 単位の芳香環は酸化あるいは非酸化的脱炭酸、メトキシル基の脱メチル反応を受けたのち、マクロリグニンに結合したままでも酸化的環開裂をうけるものと思われるが、以下の推定リグニンの代謝経路においてはどのようにして低分子化されるかに重点をおき、反応を単純下するために省略した。

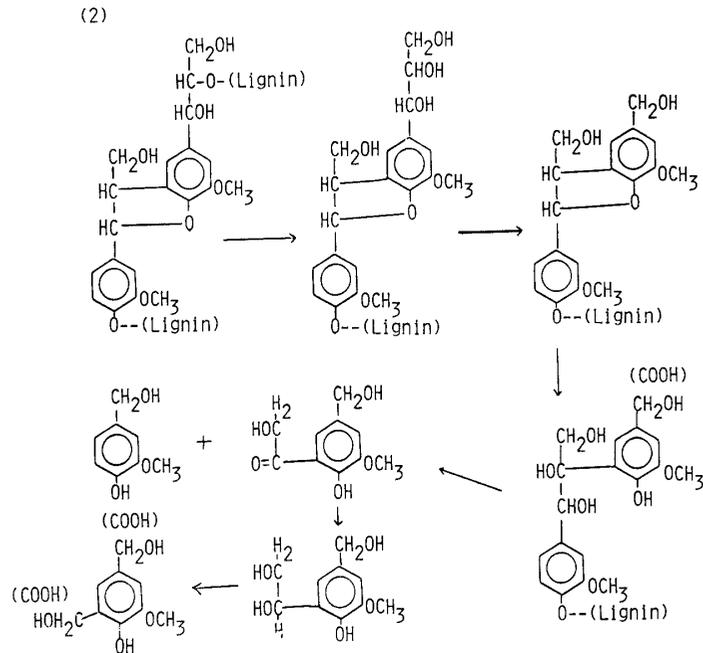


Fig. 5.

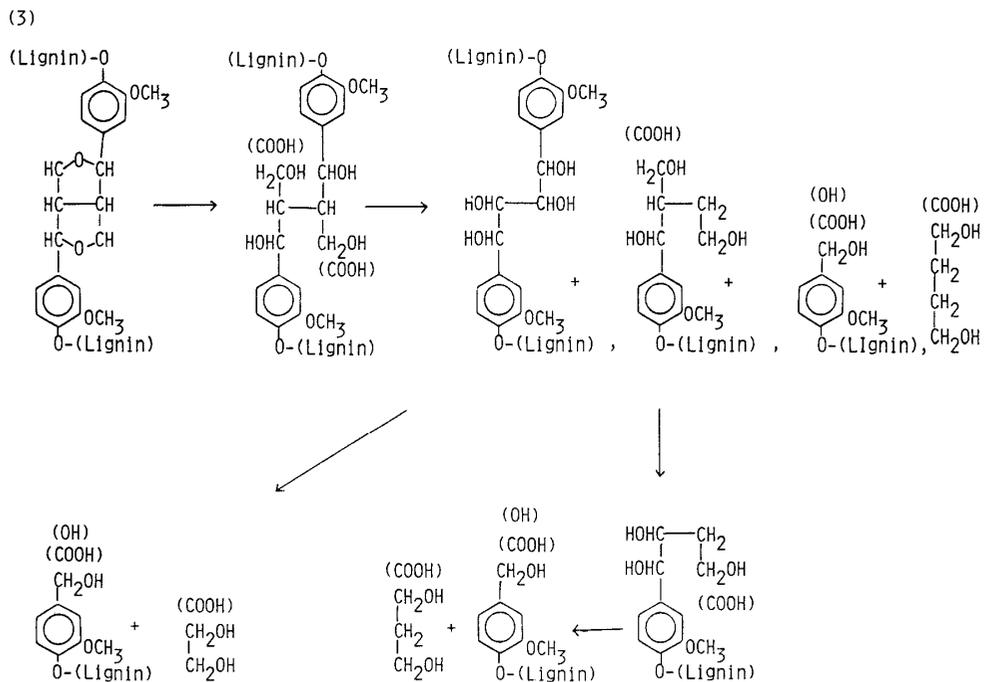


Fig. 6.

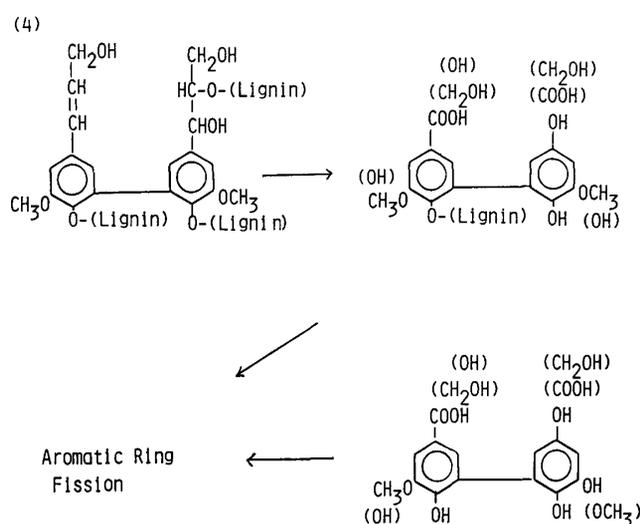


Fig. 7

謝 辞

本論文を書くにあたって、リグニンの微生物代謝研究の現在の到達点、早急に解明されなければならない問題点、微生物分解研究の今後のあるべき姿、将来性について討論に参加していただき、終始有益な助言を賜った米国オレゴン州 Oregon Graduate Center の M.H. Gold 博士、(京都大学木材研究所リグニン化学部門の島田幹夫博士) に感謝いたします。

文 献

- 1) 野田春彦：物質と生命，培風館（1981）
- 2) D. V. SARKANEN and C. H. LUDUSIG : Lignins, Wiley-Interscience, N.Y. (1971)
- 3) T. HIGUCHI : In Lignin Biodegradation, Microbiology, Chemistry and Applications (T. K. KIRK, T. HIGUCHI and H.-m. CHANY, eds.) (RC Press, West Palm Beach, Fla., 1980, I, 1-19)
- 4) E. ADLER : Wood Science Technol. **11**, 169-218 (1976)
- 5) T. K. KIRK : Annu Rev Phytopathol, **9**, 182-210 (1971)
- 6) P. ANDER and K. E. ERIKSSON : Prog. Ind. Microbiol, **14**, 1-58 (1978)
- 7) D. L. CRAWFORD and R. L. CRAWFORD : Enzyme Microb. Technol., **2**, 11-22 (1980)
- 8) T. K. KIRK and P. FENN : In Decomposition by Basidiomycetes, J. HEDGER and J. FRANKLAND (ed.) Cambridge Univ. Press 1981.
- 9) C. L. CHEN, H. M. CHANG and T. K. KIRK : ACS/CSJ Chemical Congress, Honolulu Abstracts, Cellulose, Paper and Textile Division (1979)
- 10) Y. YAJIMA, A. ENOKI, M. B. MAYFIELD and M. H. GOLD : Arch. Microbiol., **123**, 139 (1980)
- 11) P. ANDER, A. HATAKKA and K. E. ERIKSSON : Arch. Microbiol., **125**, 189 (1980)
- 12) D. A. WEISTEIN, K. KRISNANGKURA, M. B. MAYFIELD and M. H. GOLD : App. Env. Microbiol. **39**, 535 (1980)
- 13) S. S. BAR-LEV and T. K. KIRK : B.B.R.C. in Press (1981)
- 14) K. HATA : Holzforschung, **20**, 142 (1966)
- 15) T. K. KIRK and H. M. CHANG : Holzforschung **28**, 217 (1974), *ibid*, **29**, 56 (1975)
- 16) P. L. HALL, S. W. DREW and W. G. GLASSER in ref. 3, Vol. 2, 33.
- 17) J. P. MARTIN, K. HAIDER and G. KASSIM : Soil Sci. Soc. AM. J., **44**, 1250 (1980)
- 18) T. FUKUZUMI, H. TAKATSUKA, K. MINAMI : Arch. Biochem. Biophys., **129**, 396 (1969)
- 19) H. ISHIKAWA, W. J. SCHUBERT, J. J. NORD : Arch. Biochem. Biophys **100**, 140 (1963)

- 20) A. ENOKI, G. P. GOLDSBY and M. H. GOLD : Arch. Microbiol. **129**, 141 (1981)
- 21) A. ENOKI, G. P. GOLDSBY, K. KRISNANGKURA and M. H. GOLD : FEMS Microbiol. Lett., **10**, 373 (1981)
- 22) A. ENOKI, G. P. GOLDSBY and M. H. GOLD : Arch. Microbiol. **125**, 227 (1980)
- 23) H. G. RAST, G. ENGLEHARDT, W. ZIEGLER and P. R. WALLNOFER : FEMS Microbiol. Lett. **8**, 259 (1980)
- 24) F. NAKATSUBO, T. K. KIRK, M. SHIMADA and T. HIGUCHI : Arch. Microbiol., **128**, 416 (1981)
- 25) M. SHIMADA, F. NAKATSUBO, T. HIGUCHI, T. K. KIRK : Arch. Microbiol., **129**, 321 (1981)
- 26) 福住俊郎, 片山義博 : 木材誌, **23**, 2141 (1977)
- 27) T. K. KIRK, J. M. HARKIN, E. B. COWLING : Biophys. Acta, **165**, 145 (1968)
- 28) J. C. PEW and W. J. CONNORS : J. Org. Chem., **34**, 580 (1969)
- 29) G. P. GOLDSBY, A. ENOKI and M. H. GOLD : Arch. Microbiol. **128**, 190 (1980)
- 30) T. KATAYAMA, F. NAKATSUBO and T. HIGUCHI : Arch. Microbiol., **126**, 127 (1980)
- 31) M. OHTA, T. HIGUCHI and S. IWAHARA : Arch. Microbiol. **121**, 23 (1979)
- 32) A. ENOKI and M. H. GOLD : Arch. Microbiol. (in press 1982)
- 33) F. NAKATSUBO, I. D. REID and T. K. KIRK : Biochem. Biophys. Res. Comm. (in press 1981)
- 34) 片山義博 : 第31回日本木材学会大会 研究発表要旨集 P273 (1981)
- 35) K. KRISNANGKURA and M. H. GOLD : Holzforschung, **33**, 173 (1979)
- 36) R. Y. STANIER, E. A. ADELBERG and J. L. INGRAM : "The Microbiol World", 4th ed., Prentice-Hall, New Jersey
- 37) R. L. CRAWFORD, E. MCCOY, J. M. HARKIN, T. K. KIRK and J. R. OBST : Appl. Microbiol. **26**, 176 (1973)
- 38) 桑原正章, 鹿島健司, 波川 渉, 岩原章二郎 : 醗工 **55**, 248 (1977)
- 39) R. L. CRAWFORD, P. P. OLSON : Appl. Environ. Microbiol. **36**, 539 (1978)
- 40) J. A. BUSWELL and K. E. ERIKSSON : FEBS Letters **104**, 258 (1979)
- 41) M. RAMANARAYANAN and C. S. VAIDYANATHAN : Ind. J. Exp. Biol. **13**, 393 (1975)
- 42) P. L. HALL : Enz. Microbiol Technol. **2**, 170 (1980)
- 43) J. W. KOENIGS : Phytopathology **62**, 100 (1972)
- 44) R. KUHN, A. ENOKI, Y. YASUO and M. H. GOLD : Unpublished data, Oregon Graduate Center 修士論文 (1981)
- 45) M. Shimaba: 文献 3) P195 (1980)
- 46) 中野準三編 : "リグニンの化学", 11章 4節, ユニ広報株式会社 1979)
- 47) 有 馬啓, 田村学造編 : "生物による環境浄化", P274, 東京大学出版会 (1980)
- 48) 福住俊郎, 西田篤実, 青島 清雄, 南 享二 : 木材誌, **23**, 290 (1970)
- 49) D. EATON, H.-m. CHANG, T. K. KIRK : Tappi **63**, 103 (1980)
- 50) T. FUKUZUMI, T. KADOYA, M. USUDA, Y. SSBURI, F. OUABE : Microbiol. For Environment Clearng. eb K. Arina. P564 (1978)
- 51) P. ANDER and K. E. ERIKSSON : Svensk Papperstidn., **78**, 643 (1975)
- 52) P. ANDER and K. E. ERIKSSON : Prog. Ind. Microbiol. **14**, 1 (1978)
- 53) H. H. YANG, M. J. EFFLAND and T. K. KIRK : Biotechnol. Bioeng. **22**, 65 (1980)
- 54) L. SAMUELSSON, P. J. MJOBERG, N. HARTLER, L. VOLLAENDER and K. E. ERIKSSON : Sven. Papperstid. **83**, 221 (1980)
- 55) T. K. KIRK and H. H. YANG : Biotechnol. Lett. **1**, 347 (1979)
- 56) L. A. LINDENFELSER, R. W. DETROY, J. M. RAMSTACK and K. A. WORDEN : Dev. Ind. Microbiol. **20**, 541 (1979)
- 57) P. P. MATTEAN and D. H. BONE : Biotechnol. Lett. **2**, 127 (1980)
- 58) M. H. GOLD and T. M. CHENG : App. Env. Microbiol. **35**, 1223 (1978)
- 59) M. H. GOLD, T. M. CHENG and M. B. MAYFIELD : Amer. Sco. Microbiol Abstr. Ann. Mtg. (1981)
- 60) M. H. GOLD and T. M. CHENG : Arch. Microbiol. **121**, 37 (1979)
- 61) P. ANDER and K. E. ERIKSSON : Arch. Microbiol. **109**, 1 (1976)
- 62) M. H. GOLD, T. M. CHENG, K. KRISNANGKURA, M. B. MAYFIELD and C. M. SMITH : in reference 3, Vol.2, 65.

榎：微生物によるリグニン分解

- 63) K. KRISNANGKURA and M. H. GOLD : *Phytochem.* **18**, 2019 (1979)
- 64) T. K. KIRK, J. M. HARKIN and E. B. COWLING : *Biochem. Biophys. Acta* **165**, 134 (1968)
- 65) T. ISHIHARA and M. ISHIHARA : *Mokuzai Gakkaishi* **22**, 371 (1976)
- 66) M. SHIMADA and M. H. GOLD : Unpublished data
- 67) T. K. KIRK, E. SCHULTZ, W. J. CONNERS, L. F. LORENZ and J. G. ZEIKUS : *Arch. Microbiol.* **117**, 227 (1978)
- 68) P. FENN and T. K. KIRK : *Arch. Microbiol.* **123**, 307 (1979)
- 69) A. ENOKI, Y. YAJIMA and M. H. GOLD : *Phytochem.* **20**, 1543 (1981)