

白色腐朽菌のフリーラジカル生成プロセス*

渡 辺 隆 司**

Free Radical Generation Process of White Rot Fungi

Takashi WATANABE

(平成12年 8 月31日受理)

1. は じ め に

21世紀は、急激な人口増加と化石資源の消費に伴う CO₂ 濃度の増加、化石資源の埋蔵量の減少に伴うエネルギー、化学原料不足が深刻化すると予測される。こうした次世紀の資源、環境問題に対処するため、再生産可能な資源であるバイオマスからエネルギーのみならず化学原料などを作り出すポストペトロケミストリーの構築は極めて緊急性の高い課題である。バイオマスはその生産の過程において CO₂ を固定化するため、生産と消費のバランスを壊すことなく有効利用すれば、CO₂ 濃度の一方的増大をもたらすことなく化学資源を永続的に生産することができる。

生物的手法を用いて木材から様々な有用ケミカルスを生産するためには、木材の細胞壁を固める役割を果たしているリグニンを選択的に分解し、酵素や微生物が木材成分にアクセス可能な状態に変換しなければならない。また、化学的手法によるバイオマスリファイナリーを完成させるためにも、リグニンを分解してリグニンと多糖を分離することが必要となる。即ち、細胞壁多糖を被覆するリグニンのネットワークを破壊することは、紙の生産のみならず木質バイオマスを有用ケミカルス等に変換するための最重要課題の一つである。しかしながら、現行の工業的リグニン分解法（クラフト法）は 160～170℃ 付近の高温反応を必要とするため、CO₂ 抑制という時代の要請に逆行する。また、反応に伴い硫化水素やメルカプタンなどの悪臭有害物を発生する。さらに、パルプ残留リグニンの除去工程においてはダイオキシンやクロロホルムなどの有害な塩素化合物が副生する。これらの理由から、環境調和型の選択的リグニン分解反応の開発が急がれている。

リグニンを穏和な条件で低分子化するシステムを構築するために、リグニン分解性微生物である白色腐朽菌の酸化的リグニン分解システムを利用することは上記の目的を達成するための合理的なアプローチと思われる。こうした考えからリグニン分解酵素（リグニンペルオキシダーゼ：LiP、マンガンペルオキシダーゼ：MnP、ラッカーゼ：Lac）の機能解明と応用研究が幅広く行われてきた。しかしながら、酵素から遠く離れた場所に存在するリグニンを強力にしかも選択的に分解する白色腐朽菌が存在すること¹⁻³⁾や、リグニン分解酵素を木材チップと反応させても脱リグニンによるパルプ化は起きないこ

* 第55回木研公開講演会（平成12年 5 月25日）、宇治において、「地球を救う木質成分変換—不思議なキノコのミラクル木材分解術—」と題して講演された。

** バイオマス変換研究分野 (Laboratory of Biomass Conversion)

Keywords : Free radical, Lipid peroxidation, Selective white rot fungi, Manganese Peroxidase, Lignin degradation, Biomass conversion

と等から、白色腐朽菌のリグニン分解は、リグニン分解酵素—リグニン間の直接反応のみでは説明されず、低分子物質の関与したフリーラジカル生成システムがリグニン分解の根幹に関与していることが次第に強く認識されつつある。本総説においては、リグニン分解酵素の触媒機構の最近の話題を紹介するとともに、リグニン分解に関連した低分子化合物によるフリーラジカル生成プロセスについて考察する。

2. リグニン分解酵素の触媒サイクル

2.1 マンガンペルオキシダーゼの触媒サイクル

マンガンペルオキシダーゼ (MnP) は、白色腐朽菌が生産する菌体外ペルオキシダーゼであり、Mn(II) を Mn(III) に直接酸化する。MnP によって生成した Mn(III) はシュウ酸、マロン酸、セロビオン酸等の Mn(III) のキレーター存在下で拡散可能な低分子酸化剤となり、酵素から離れた場所のリグニンを酸化する。但し、こうして生成する Mn(III) のキレートはリグニンの骨格構造を形成する非フェノール型エーテル結合は開裂できない。

MnP の触媒サイクルは、Horseradish ペルオキシダーゼと同様、休止型酵素 $[\text{Fe}^{3+}\text{P}]$ が初めに過酸化水素などの電子受容体により2電子酸化されて Compound I $[\text{Fe}^{4+}=\text{O P}^{\cdot+}]$ を生成し、Compound I が基質によって2回1電子還元されることによって Compound II $[\text{Fe}^{4+}=\text{O P}]$ を経て休止型酵素に戻り完結する⁴⁾。*P. chrysosporium* の MnP では、Compound I から Compound II への還元は Mn(II)、フェノールのいずれをも電子供与体としうが、Compound II から休止型への還元は電子供与体として Mn(II) を必ず必要とする(図1)。MnP は遊離の Mn(II) のみでなく Mn(II) が α -ヒドロキシ酸などのキレーターと結合してできた Mn(II) 錯体とも反応しう。 *P. chrysosporium* の MnP Compound II と Mn(II) のシュウ酸錯体の反応速度は MnP と遊離の Mn(II) との反応速度より高く、マンガンイ

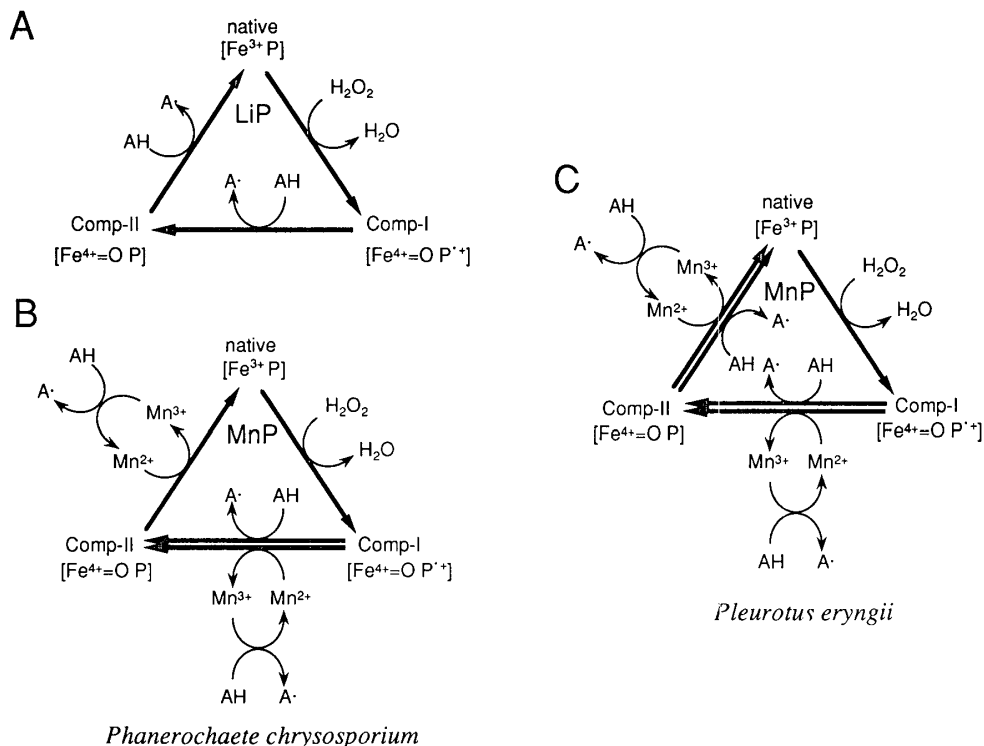


図1 LiP および MnP の触媒サイクル

オンのキレーターは Mn(III) の安定化剤としてのみでなく酵素の turnover にも寄与する^{5,6)}。このように *P. chrysosporium* の MnP では触媒サイクルを回すために Mn(II) を絶対的に要求するため「マンガニン依存性ペルオキシダーゼ」という名称が与えられた。

これに対し、最近報告された *Pleurotus eryngii* の MnP は、Compound I と Compound II の還元の際のステップにおいても、Mn(II)、フェノールのいずれをも電子供与体として利用しうる。言い換えるなら、この酵素は Mn(II) を Mn(III) に直接酸化できるが、触媒サイクルを回転させるために必ずしも Mn(II) を必要としない⁷⁾。同様に、*Ceriporiopsis subvermispota* の MnP も Compound I、Compound II の還元でフェノールなどのマンガニン以外の電子供与体を利用しうる。この場合、触媒サイクルが Mn(II) の非存在下で回転するか否かは基質の酸化還元電位に依存する。即ち、*C. subvermispota* の MnP は *o*-ジアニシジンのような酸化電位の低い基質においては Mn(II) に依存せずに基質を酸化できるが、グアイアコールの酸化においては Mn(II) を必要とする⁸⁾。

ペルオキシダーゼは、過剰の過酸化水素が存在下すると Compound III を経てヘムのブリーチングを起こす。しかしながら、MnP の Compound III は、Mn(III) により休止型酵素に還元され同時に分子状酸素を放出するカタラーゼ用の触媒機構をもつ⁹⁾。この機構のため、MnP は他のペルオキシダーゼに比べて高い過酸化水素耐性をもつ。MnP のカタラーゼ活性は、マンガニンイオンのキレーターが存在しない条件で特に強く観察され、菌体外ペルオキシダーゼを過剰の過酸化水素から守る役割を担う⁹⁾。

一般にペルオキシダーゼの Compound III は、自己崩壊あるいは基質との反応によりスーパーオキシド (O_2^-) を放出して native 型酵素に戻る機構を有する (図 2)¹⁰⁾。実際スーパーオキシドの放出はリグニンペルオキシダーゼ (LiP) の Compound III においても報告されている¹¹⁾。ところが、これまで MnP の反応系においてはラジカルメディエーター非存在下で酵素から直接スーパーオキシドが生成する現象は確認されていなかった。最近、筆者らは、ESR を用いて過剰の過酸化水素存在下で MnP が直接スーパーオキシドを放出する現象を示した¹²⁾。この反応で生成するスーパーオキシドは Mn(II) の Mn(III) への酸化にも関与するため、酵素の kinetics に影響を及ぼす。

MnP はリグニンペルオキシダーゼ (LiP) に比較して高い有機溶媒耐性をもつ。水と混和する有機溶媒中での MnP による Mn(II) の酸化は溶媒和の自由エネルギーを示すパラメーター ET30 と高い相関がある^{13,14)}。

2.2 リグニンペルオキシダーゼのレドックスメディエーターと酵素表層での基質の酸化

リグニンペルオキシダーゼ (LiP) は、MnP と同様、プロトヘムⅨ錯体を活性中心にもつ菌体外ペルオキシダーゼである。本酵素はリグニンの骨格構造を形成する非フェノール型エーテル結合を一電子酸化により開裂させる。

P. chrysosporium の LiP は、ベラトリルアルコール (VA) などの低分子の基質の他、還元型シトクロム c ¹⁵⁾ や合成リグニン¹⁶⁾ などの高分子基質を直接酸化できる。ベラトリルアルコール (VA) は *P. chrysosporium* によって生産される二次代謝産物であり、LiP を過剰の過酸化水素から防御する機能を果たす。即ち、LiP は他のペルオキシダーゼと同様過剰の過酸化水素が存在下すると Compound III を経てヘムのブリーチングを起こすが、ベラトリルアルコール (VA) を添加すると触媒サイクルにより生成したカチオンラジカル ($VA^{\cdot+}$) により Compound III が休止型酵素に還元されるため、酵素の不可逆的な失活が回避される¹⁷⁾。VA は LiP の Compound II を速やかに休止型酵素に変換することによって過剰の過酸化水素による酵素失活を防御する^{6,18,19)}。従来、このベラトリルアルコールカチオンラジカル ($VA^{\cdot+}$) が、リグニン分解酵素が入り込めない木材細胞壁中に浸透してリグニン分解の先導役を果たすことが提案されていた。しかし、近年の研究は LiP により生成したベラトリルアルコールカチ

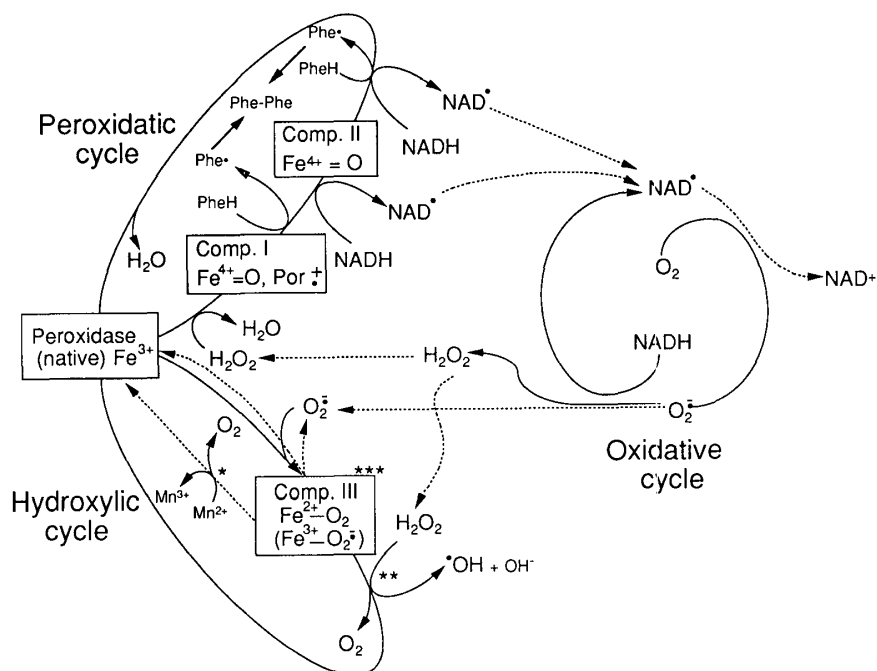


図2 ペルオキシダーゼの触媒機構¹⁰⁾

* MnP では Compound III が Mn(III) と反応して native 酵素へ戻る経路が存在する (Chen らの図にこの反応を加筆)。LiP ではベラトリルアルコールカチオンラジカルによる Compound III から native 酵素へ戻る経路が存在する。
 ** Chen らが示した水酸化ラジカル生成反応。*** Compound III は Compound II と H_2O_2 の反応でも生成する。Compound III がさらに過剰の H_2O_2 と反応するとヘムのブリーチングを起こして失活する。オキシダーゼ反応では NADH が $\text{NAD}^\bullet$ に酸化され、 $\text{NAD}^\bullet$ が酸素を還元してスーパーオキシドを生成し、これが不均化により H_2O_2 となってペルオキシダーゼの電子受容体となる。

オンラジカル ($\text{VA}^{\bullet+}$) が、このような拡散メディエーターとして作用するのではなく、LiP Compound II に結合した状態で高分子基質などの酸化を助ける酵素結合型レドックスメディエーターとして機能することを支持している¹⁹⁻²⁵⁾。遊離の $\text{VA}^{\bullet+}$ の半減期が 0.54 ms 程度なのに対し、酵素結合型の $\text{VA}^{\bullet+}$ の半減期は 370 ms にも及ぶことから^{21, 26)}、 $\text{VA}^{\bullet+}$ が拡散メディエーターとして機能しているとは考えがたい。

Ambert-Balay らは、LiP のベラトリルアルコール結合サイトとしてヘム近傍のグルタミン酸 (E146) を提案した²⁷⁾。しかし、Doyle らは LiP 表面に存在するトリプトファン (W171) をフェニルアラニンやセリンへ置換するとベラトリルアルコール (VA) 酸化能が消失することを示し、LiP 表層の W171 がベラトリルアルコール (VA) の結合に直接関与することを示した²⁸⁾。この酵素表面に位置するトリプトファン残基の $\text{C}\beta$ は自動触媒的に水酸化されており²⁹⁾、報告されているすべての LiP に存在する³⁰⁾。LiP がベラトリルアルコール (VA) 存在下で過酸化水素と反応すると Compound I を経て LiP Compound II- $\text{VA}^{\bullet+}$ 複合体が生成し、酸化電位の高い基質を酵素表層において一電子酸化する。還元型リボヌクレアーゼの LiP による酸化はベラトリルアルコール (VA) の存在に依存する²⁵⁾。同様に、*B. adusta* の生産する 2 次代謝物 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene は、LiP のレドックスメディエーターとして機能し、LiP 単独では酸化が不可能な高分子色素 Poly-R の脱色を起こす³¹⁾。

LiP はベラトリルアルコール (VA) 非存在下において合成リグニンを直接酸化するが、VA の添加は

合成リグニンの LiP への結合に影響を及ぼさない¹⁶⁾。このことから、トリプトファン (W171) は VA 酸化の鍵となるアミノ酸であるがリグニン酸化は別の結合サイトで起こることが示唆されている¹⁶⁾。いずれにしても LiP の幅広い基質特異性、特に高分子基質に対する優れた反応性は、酵素表面からヘムへの電子移動による。

2.3 ペルオキシダーゼの新しい触媒機能

P. chrysosporium の LiP が W171 を介して非フェノール性リグニンモデルを酸化するのであれば、LiP の W171 に相当する MnP のアミノ酸をトリプトファンに置換すれば MnP に非フェノール性リグニンモデルの酸化能を賦与できることが期待される。実際、*P. chrysosporium* の MnP の Ser168 をトリプトファンに変異させると、MnP がベラトリルアルコールを酸化する³⁰⁾。得られた MnP の組替え体は、Mn(II) の酸化活性を保持しているため、LiP と MnP の両方の活性を示す。この組替え体ではベラトリルアルコール (VA) の酸化活性は Mn(II) によって阻害される。

従来、Mn(II) の Mn(III) への酸化は MnP 特有の触媒作用と考えられていたが、Aust らのグループは、*P. chrysosporium* の LiP(H2) が Mn(II) の直接酸化を触媒することを示した。彼らは *P. chrysosporium* の他の LiP アイソザイム (H1 H6, H7, H8, H10) についても解析を進め、これらのアイソザイムの Compound II は Mn(II) を酸化できないが、Compound I は Mn(II) を効率よく Mn(III) へ酸化することを示した^{32,123)}。このように、近年の研究により Mn(II) の直接酸化は MnP 特有の反応ではないことが明らかにされている。Mn(II) の酸化能をもつ菌体外ペルオキシダーゼには、LiP に近い性質を示すものから *P. chrysosporium* の MnP のように Mn(II) に依存するタイプまで様々な酵素が存在する (図1)。例えば、先に述べたように LiP 表層のトリプトファン残基 (W171) は LiP に特徴的であり MnP には存在しないとされてきた。しかしながら、*P. eryngii* の MnP(PS1) は、*P. chrysosporium* の LiP の W171 に相当する位置に W170 をもっており、高分子色素である Reactive Black5 を直接酸化できる^{7,33,34)}。Reactive Black5 の酸化は Mn(II) によって非競争的に阻害され、MnP(PS1) のマンガン結合サイト (Glu36, Glu40, Asp181) と高分子基質の結合サイト (W171) が異なることを示す。*P. eryngii* の MnP(PS1) は、*P. chrysosporium* の MnP1 および LiPH2 と塩基配列でそれぞれ58%および62%の相同性を持ち、結晶構造解析においても11の α -ヘリックスをもつ *P. chrysosporium* の MnP1 より12の α -ヘリックスをもつ LiP により近い構造をもつことが示されている³²⁾。*Bjerkandera adusta* の MnP も Mn(II) 非存在下でグアイアコールなどのフェノール類やベラトリルアルコールなどの非フェノール性化合物を酸化できる³⁵⁾。これらの酵素は、Mn(II) の酸化能をもつため MnP と呼ばれているが、触媒機能と塩基配列から LiP と MnP の両者の機能を併せもつハイブリッド型酵素と呼ぶべきペルオキシダーゼである。*P. ostreatus* の MnP3 のアミノ酸配列も、*C. subvermispora* や *P. chrysosporium* の MnP より、むしろ *P. chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *B. adusta* などの LiP と高い相同性をもつ³⁶⁾。

最近、D'Annibale らは、*Lentinus edodes* の MnP が非フェノール性基質であるベラトリルアルコールの酸化能力をもち、ベラトリルアルコールから芳香環開裂生成物である γ -muconolactone と2量体生成物を与えることを報告した。この反応は Mn(II) を必要とする点で、*P. eryngii* や *B. adusta* の「MnP」と異なり、新しいタイプのマンガン依存性ペルオキシダーゼであると考えられる³⁷⁾。こうした、マンガン依存性ペルオキシダーゼが報告される一方で、*B. adusta* からは Mn(II) によって活性が逆に阻害される菌体外ペルオキシダーゼも分離されている³⁸⁾。

酵素の結晶構造解析と部位特異的改変による研究から、MnP のマンガン結合サイトに関する研究も進んでいる。*P. chrysosporium* の MnP に Glu35→Gln, Glu39→Gln, の変異をかけると Mn(II) との Km 値が50倍上昇し kcat 値が300分の1に減少する。また、Glu35→Gln と Asp179→Gln のダブル変異では Km 値が100倍に上昇し、kcat 値が1,000分の1に減少する³⁹⁾。さらに、Asp179→Gln の変位をか

けた MnP にはヘム近傍にカチオンの存在は認められずマンガン結合能が消失したことが示されている⁴⁰⁾。こうした部位特異的改変と結晶構造解析^{40,41)}から *P. chrysosporium* の MnP のマンガン結合サイトはヘム近傍の Glu35, Glu39, Asp179 からなることが示されている。

Yeung らは、シトクロム c ペルオキシダーゼ (ccp) のヘム近傍に部位特異的改変によって *P. chrysosporium* の MnP に類似したマンガン結合サイト (Gly41→Glu, Val45→Glu, His181→Asp) を作り、ccp にマンガン酸化能を賦与した⁴²⁾。同様に、Wilcox らは、ccp に Asp37→Glu, Pro44→Asp, Val45→Asp, His181→Ser の変異をかけてヘム近傍にマンガン結合サイトを作り、ccp にマンガン酸化能を賦与した⁴³⁾。現在のところ、得られた組替え酵素のマンガン酸化能は低い、ヘム近傍にマンガン結合サイトを作る手法はヘムを補欠分子とするペルオキシダーゼ一般に適用できると考えられ今後の発展が期待される。

ペルオキシダーゼは過酸化水素存在下で基質を一電子酸化するペルオキシダーゼ反応を触媒するが、NADH のように一電子酸化により酸素還元能をもつラジカルを生成する基質に対してはオキシダーゼとして作用する。最近、Chen らは、ペルオキシダーゼの反応として、ペルオキシダーゼ反応、オキシダーゼ反応の他に水酸化ラジカルを生成する新たな反応経路が存在することをホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) を用いて示した¹⁰⁾。図2に示した通り休止型のペルオキシダーゼがスーパーオキシドと反応すると Compound III が生成するが、Compound III は Fe(II) の酸素錯体であり、この Fe(II) 錯体に過酸化水素が反応するとフェントン反応を起こして水酸化ラジカルを生成する。結果として HRP はスーパーオキシドと過酸化水素から水酸化ラジカルを生成することになる。この反応は Harber-Weiss 反応と呼ばれるが、HRP は典型的な Harber-Weiss 触媒である Fe-EDTA 錯体より 10～10² 速く水酸化ラジカルを生成する。

MnP は過酸化水素、Mn(II)、還元型グルタチオン (GSH) 存在下にベラトリルアルコールを酸化する⁴⁴⁾。McEldoon らは、後に HRP も還元型グルタチオンと Mn(II) 存在下でベラトリルアルコールが酸化されることを見出した。彼らは、HRP により Mn(II) 非存在下で生成するグルタチイルラジカル (GS·) ではベラトリルアルコールの酸化が起きないことから、反応の活性種は MnP の反応で予想された GS·ではなく、GS·と Mn(II) のコンプレックスあるいは GSH と Mn(III) のコンプレックスであると推定した⁴⁵⁾。しかしながら、後述のように GSH とラッカーゼにより Mn(II) 非存在下でアントラセンなどの PAH が酸化されたことから、活性種に関してはなお検討が必要であろう。HRP によるベラトリルアルコールの酸化はジチオトレイトール、メルカプトエタノール、システインでも起きるが、同じ還元剤でも SH 基を含まないアスコルビン酸では起きない。GSH は生体内における活性酸素の生成と消去に大きな役割を担っているが、菌体外での木材腐朽に影響を及ぼしているか否かは明らかにされていない。

2.4 ラッカーゼの新しい触媒機能

ラッカーゼ (Lac) は分子状酸素を電子受容体とするフェノールオキシダーゼであり、通常4個の銅原子 (Type I, Type II, 2個の Type III) を補欠分子にもつ。ラッカーゼがフェノール、芳香属アミンなどの基質から奪った電子は、Type I の Cu(II) 原子に受け渡され、そこから1つの Type II と2つの Type III の銅電子からなる3核錯体種に移動し分子状酸素を還元する。

ラッカーゼは LiP と異なりこれまで非フェノール型リグニン構造を分解できなとされてきた。しかしながら、1990年にラッカーゼがレドックスメディエーターである ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) の存在下で非フェノール型リグニン構造を分解することが示されたのを契機に⁴⁶⁾、非塩素系パルプ漂白への応用を目的として各種のラッカーゼメディエーターが化学合成されている。ラッカーゼメディエーターに求められる条件としては、1) 高いレドックスポテンシャ

ル、2) ラッカーゼの失活を起こさない、3) メディエーターが副反応を起こさずにリサイクルされる、4) 毒性が少ない、などの点が求められる。これらの条件を満たす合成メディエーターとして現在のところ N-hydroxy-N-phenylacetamide (NHA) が注目を集めており、ドイツ等で非塩素系パルプ漂白に応用する実用化試験が行われている。ラッカーゼ存在下に非フェノール性リグニンモデルを分解する白色腐朽菌の代謝物としては *Pycnoporus cinnabarius* の生産する 3-hydroxyanthranic acid (3-HAA) が報告されている⁴⁷⁾。しかしながら、3-HAA が合成メディエーターのようにラッカーゼによる酸化と基質による還元の後、再びレドックスサイクルに組み込まれてリサイクルされるかは示されていない。ラッカーゼはシリングアルデヒド存在下でベラトリルアルコールを酸化する⁴⁸⁾。また、フェノール、アニリン、4-ヒドロキシ安息香酸の他、還元型のグルタチオン、システイン、メチオニン存在下に多環式芳香族炭化水素である PAH を分解する⁴⁹⁾。

上述のように、ラッカーゼは酵素単独では非フェノール性リグニン構造を分解できないとされてきた。しかしながら、Leontievsky らは *Panus tigrinus* の麦藁固体培養から精製したラッカーゼが非フェノール性リグニンモデルであるベラトリルアルコールや β -1 型のリグニンダイマーモデルを分解すると報告した。この酵素は、ブルーラッカーゼと同様4個の銅原子を補欠分子としてもつにもかかわらず 610 nm の極大吸収をもたずイエローラッカーゼと命名された。酵素の分子構造は不明であるが、何らかの低分子化合物がレドックスメディエーターとして酵素に結合しているために本酵素が非フェノール性リグニンモデルの分解力をもつのではないかと推定されている⁵⁰⁾。

一方、*P. ostreatus* の生産する2つのラッカーゼアイソザイム (pI p.7, pI 4.0) のうち、pI 4.0 のラッカーゼアイソザイムは他の白色腐朽菌由来のラッカーゼと同様4個の銅をもつブルーラッカーゼであるが、pI 6.7 のアイソザイムは1つの Cu と2つの Zn、1つの Fe 原子をもつ新規なラッカーゼであると報告された。この酵素は、600 nm 付近のブルーラッカーゼ特有の吸収極大をもたないことからホワイトラッカーゼと命名された⁵¹⁾。非フェノール性リグニン構造の分解力をもたず触媒作用に関してはブルーラッカーゼに類似している。また、*Phlebia radiata* のラッカーゼは、Type I、Type II の2つの銅原子しかもたないが、補酵素として PQQ をもつ⁵²⁾。

一般にラッカーゼは直接 Mn(II) を Mn(III) に酸化する活性はもたないが、最近 *Trametes versicolor* ラッカーゼが高濃度のピロフォスフェート存在下で微弱ながら Mn(II) の酸化活性をもつと報告された⁵³⁾。Mn(II) を直接酸化できないラッカーゼも基質であるフェノールが存在するとフェノキシラジカルを介して Mn(II) を酸化する。フェノキシラジカルの還元は、ラジカルカップリングによる高分子化を抑制する。

3. 低分子化合物の関与したフリーラジカル生成プロセス

3.1 選択的リグニン分解菌とフリーラジカル発生系による木材分解

MnP と Lac 生産菌である *Ceriporiopsis subvermispora* は、木材腐朽がかなり進行した段階になっても、自分の生産した菌体外酵素を木材細胞壁内に進入させることなく、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選択的に分解する¹⁻³⁾。選択的リグニン分解菌と呼ばれる本菌は、細胞壁リグニンのみならず、酵素から最も遠い位置にある細胞間層のリグニンを腐朽の初期から激しく攻撃する(図3)。木材の細胞同士を接着している細胞間層のリグニンが腐朽初期からダメージを受けるため、この菌で2~4週間処理した後に機械的なパルピングを行うと重量減少をそれほど伴うことなく最大47%ものエネルギー削減効果が得られる^{1,54)}。しかも、得られたパルプは菌処理をしない機械パルプより最大2.2倍も引き裂き強度が強い^{1,54)}。また、本菌でスプルスおよびカバ材を4週間処理した後にサルファイトパルプ化を行うとそれぞれ48%と30%のカップパ値の減少が見られる¹⁾。同一の処理を *Phanerochaete chrysosporium* で行った際のカップパ値の減少率は、カバ材で20%、スプルス材では0%に過

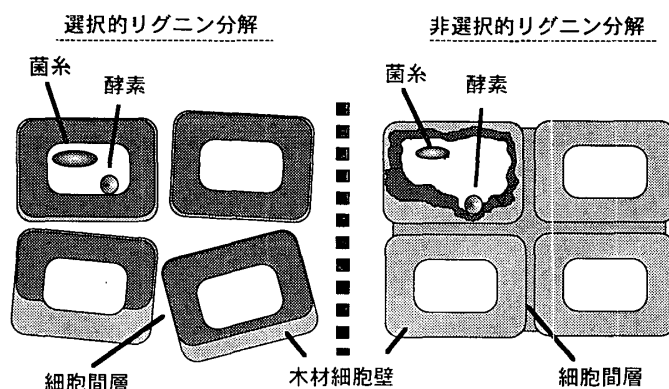


図3 選択的および非選択的リグニン分解菌の木材腐朽様式

ぎない¹⁾。こうした結果からも、*C. suvermispora* が針葉樹および広葉樹材の細胞間層リグニンと細胞壁リグニンを単期間のうちに高選択的に分解していることがわかる。木材の細胞壁には小さな孔があいているが、その孔の直径はおおむね $10\sim 20\text{ \AA}$ 以下である。これに対し、酵素の分子直径は $40\text{ \AA}$ 以上はあるため、白色腐朽菌は木材細胞壁に大きな孔を開けない限り、自分の出す酵素を木材細胞壁内に進入させることができない。カワラタケなど多くのリグニン分解性白色腐朽菌は、木材に孔をあけて自分の出す菌体外酵素を木材細胞壁中に進入させることにより木材を分解する。結果として木材細胞壁はぼろぼろに浸食され³⁾、パルプ原料や化学資源としての価値が著しく低下する。これに対し、*C. subvermispora* 等の選択的白色腐朽菌は、木材細胞壁に酵素が進入できる孔を開けないまま、酵素から遠く離れた場所に存在する細胞壁や細胞間層のリグニンを広範囲にしかも高選択的に分解している（図3）。この例から明らかなように、選択的白色腐朽菌においては、酵素以外の低分子化合物がリグニン分解に直接関与している。

選択的白色腐朽菌のリグニン分解機構には、酵素から遠く離れたリグニン分解の現場付近で発生したラジカル種が関与しているものと推定される。何故なら、仮に酵素が細胞内腔（ルーメン）内で強力なラジカルを作ったとしても、生成したラジカルは単寿命なため酵素から遠く離れたリグニン分解の現場に行く前に自己分解してしまうであろうし、細胞内腔で生成したラジカルは細胞壁表層で優先的に反応するためである（図3、4）。このため我々は、選択的白色腐朽菌のリグニン分解に *in situ* 型のラジカル発生機構が関与していることを提唱し⁵⁵⁾、ラジカル発生系の解析と応用研究を進めている。*in situ* 型のリグニン分解機構が成立するためには、フリーラジカル連鎖反応のみで木材中のリグニンが高選択的に分解することの証明が必要である。

従来フリーラジカル連鎖反応のみで“木材中の”リグニンが穏和な条件で分解するとは考えられていなかった。例えば、最も酸化力の強いラジカル種の一つである水酸化ラジカル発生系で木材を処理した場合でも多糖の分解は進行するがリグニンの重量減少は軽微であり、細胞間層リグニンの分解による木材細胞の剥離、即ちパルプ化は観察されない⁵⁶⁾。我々は、制御されたフリーラジカル反応の可能性を追求すべく過酸化中間体となる有機ヒドロペルオキシドから強力なフリーラジカルを発生させる系を探索した。その結果、これまでに白色腐朽菌の代謝物であるピリジンおよびその誘導体の銅錯体と有機ヒドロペルオキシドの反応によるカーボンセンターラジカル発生系が室温・水溶液中という穏和な条件下で非フェノール性高分子リグニンを強力に分解させることを見出した⁵⁵⁻⁶³⁾。さらに、この反応系を木材に対して作用させると、*C. subvermispora* や *Dichomitus squalens* などの選択的白色腐朽菌と同じく細胞同士を接着している細胞間層のリグニンが反応の初期から分解し、反応が進行すると針葉樹材、広葉樹材とも細胞剥離の現象が見られた⁵⁶⁾。このように、ヒドロペルオキシドがホモリティックに開裂して

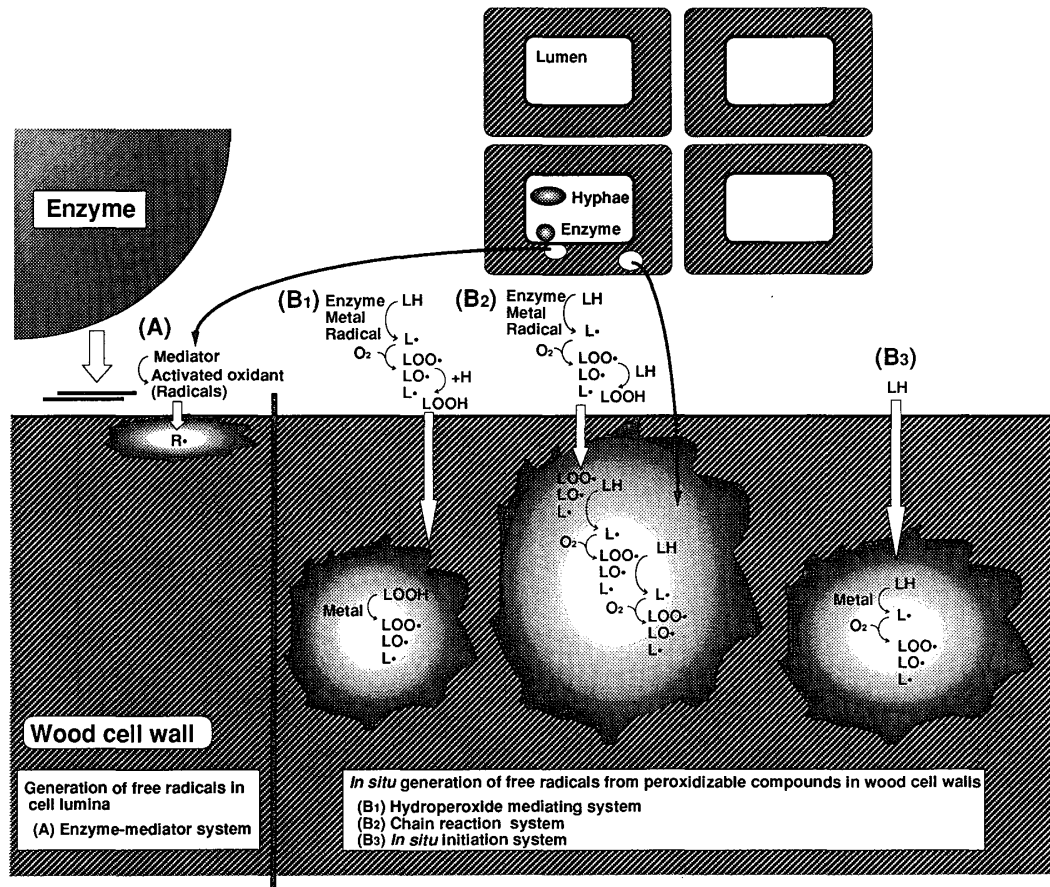


図4 選択的白腐におけるフリーラジカル発生様式とリグニン分解の関係*

* 選択的白腐において、細胞壁深層や細胞間層のリグニンを攻撃するためには、細胞内腔の酵素によって生成したラジカル（反応様式A）ではなく、リグニン分解の現場付近で発生したラジカルが有利である（反応様式B₁₋₃）。

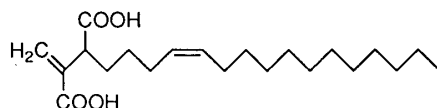
次々と過酸化中間体やラジカル種を生成する反応系は、ラジカル連鎖反応の制御により細胞壁リグニンのみならず細胞間層リグニンに対しても攻撃的な反応となる。LiPの活性中心のモデルであるヘムをヒドロペルオキシドを電子受容体として反応させる一電子酸化型ペルオキシダーゼモデル反応⁽⁶⁴⁾で木材を処理した場合においては、細胞内腔に近い細胞壁表層からリグニン分解が進行し、細胞間層のリグニンの分解は二次壁が脱リグニンされた後に起こるため細胞剥離の現象は観察されていない⁽⁶⁵⁾。こうした分解のパターンの違いは木材腐朽菌でも観察されており、菌体外酸化機構と腐朽様式の関係を考える上でも興味深い。

以上のように、ヒドロペルオキシドのラジカル連鎖反応により木材中のリグニンが水溶液中で高選択的に分解し、それによる木材の分解形態が選択的白腐菌のものと近いという現象は、選択的リグニン分解菌による *in situ* ラジカル発生系の関与を強く示唆するとともに、過酸化前駆体からのラジカル連鎖反応の制御を用いて多様なリグニン分解反応を構築できることを示す。

3.2 リピッドペルオキシデーションによるフリーラジカル発生システム

上述のように、*in situ* ラジカル発生系が白腐菌のリグニン分解に関与しているとすれば、木材腐朽時にラジカルの発生源となる過酸化前駆体が必要となる。*C. subvermispora* は試験されている白腐菌の中で最も効率よく木材中の脂肪酸類を分解除去する⁽⁶⁶⁾。脂肪酸類は過酸化によりフリーラジカル

を発生する代表的な化合物である。最近、我々は脂肪酸類の過酸化（リピッドペルオキシデーション）に関連する本菌の新規な脂質関連代謝物（図5）を示すとともに⁶⁷⁾、本菌が木材腐朽の際に遊離の脂肪酸とリピッドヒドロペルオキシドを生産し、それらの消費に伴ってリピッドペルオキシデーション分解産物の指標となる TBARS が蓄積されていくことを示した⁶⁸⁾。これらのことは、本菌が木材中の過酸化前駆体を最大限有効利用するとともに、菌自身もラジカル発生源となる低分子過酸化前駆体を生産していることを示す。ラジカル発生源となる過酸化前駆体としては、脂肪酸の他にもテルペンやアルデヒド、ケトンなど多数の低分子化合物があり、過酸化の開始機構も二重結合やカルボキシル基に隣接するメチレン基からの水素引き抜き、カルボキシル基自身の過酸化など多様である。*C. subvermispora* は、LiP でも酸化分解できない難分解性 PAH であるフルオレンを2日間で83%分解する。同一の培養条件で LiP 生産菌である *P. chrysosporium* の3つの菌株の分解率は14~36%である⁶⁹⁾。菌体外での酸化システムの発現は培養条件に大きく左右されるため、菌株間の優劣の判断は下せないが、LiP 非生産菌である *C. subvermispora* が極めて強力な酸化機構を有していることは明らかである。



(Z)-1,7-Nonadecadiene-2,3-dicarboxylic acid (NDA)

図5 *Ceriporiopsis subvermispora* 培養液から分離した新規脂質関連物質⁶⁷⁾

リピッドペルオキシデーションによるリグニン分解に関して Hammel らのグループは、MnP が不飽和脂肪酸の存在下で非フェノール性リグニンモデルや PAH を分解することを報告した^{70,71)}。フェナントレンやフルオレンなどイオン化ポテンシャルが 7.55 eV 以上の PAH は LiP でも酸化できないが、MnP によるリピッドペルオキシデーションではこれらの化合物が酸化される^{72~75)}。これらの機構には、脂肪酸由来のフリーラジカルが関与していると推定されていたが、これまでこの反応系で発生するラジカル種を検出した例はなかった。また、そもそもマンガンの酸化酵素である MnP がなぜ不飽和脂肪酸の酸化を触媒できるかという問題と、強い抗酸化剤である Mn(II) の存在下で脂質の過酸化が起きる理由についても謎であった。筆者らは、最近 *C. subvermispora* と *B. adusta* の MnP の単一アイソザイムをリノール酸およびリノール酸のヒドロペルオキシドと反応させ、この反応系によってリピッドヒドロペルオキシド中間体からアシルラジカルが生成することを示した⁷⁶⁾。MnP/リピッドの反応系においては、MnP の触媒サイクルで生成した Mn(III) が遊離の脂肪酸のエノール型構造から水素を引き抜いてカルボキシアシルラジカルを生成し、この開始反応によって生じたラジカル種がビスアリル位の水素を引き抜くことによってラジカル連鎖反応が開始される（図6）。この一連の反応で生成するリピッドヒドロペルオキシドは、Mn(II) とは反応しないが Mn(III) と反応してラジカルを発生させる。Mn(II) はペルオキシラジカルをトラップする強い抗酸化作用があるが、この停止反応で生成するリピッドヒドロペルオキシドは MnP の触媒サイクルで生成する Mn(III) によって再びホモリティックに分解されるために、ラジカル連鎖反応が継続する。この現象は、従来フェノール酸化剤として考えられていた Mn(III) が過酸化前駆体やリピッドヒドロペルオキシドの存在下では、酵素から離れた場所で強力なラジカルを発生させるラジカル連鎖の鍵物質となることを示している⁷⁶⁾。

リポキシゲナーゼはシス型 1,4-ブタジエン構造をもつ不飽和脂肪酸の酸化を起こすオキシゲナーゼである。リポキシゲナーゼの反応では、ビスアリル位からの水素引き抜きを経由してリピッドヒドロペルオキシドが生成し、リピッドヒドロペルオキシドが Fe(II) 型のリポキシゲナーゼを Fe(III) 型に酸化してアルコキシルラジカルを生じる。この反応系には遊離の脂肪酸やフェノールなどの水素供与体が

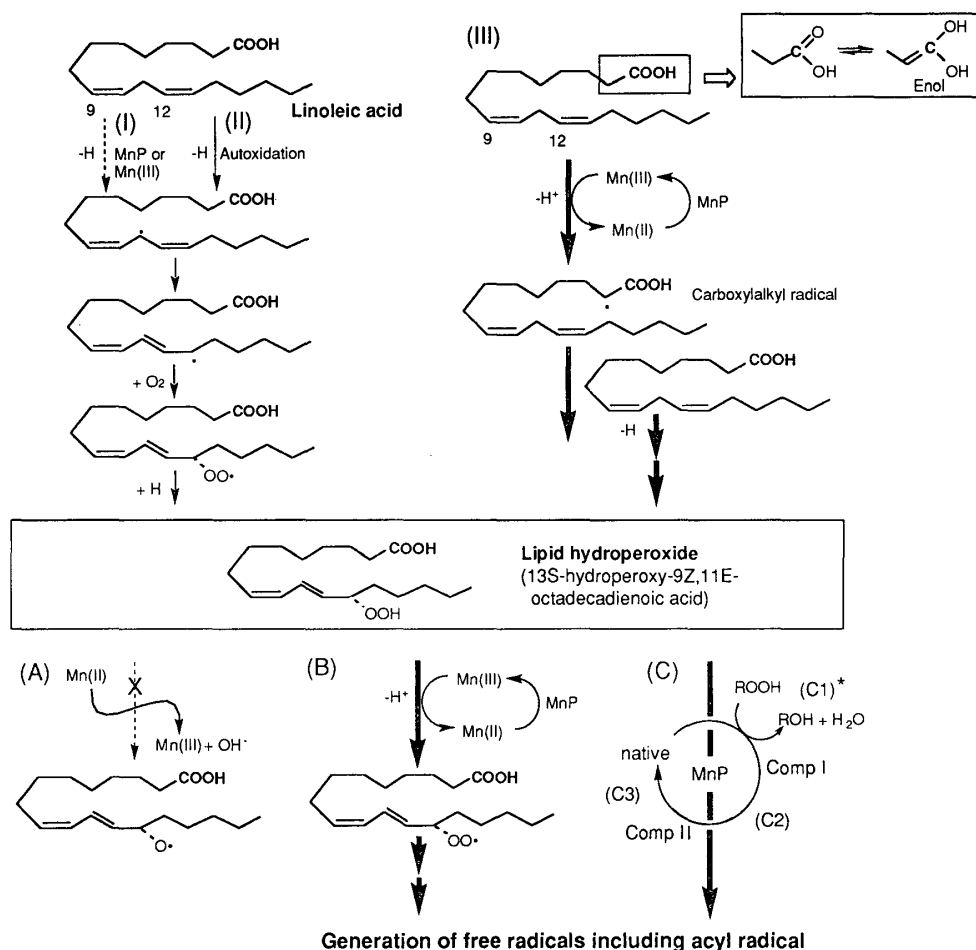


図6 マンガンペルオキシダーゼによるリピッドペルオキシデーション開始機構⁷⁶⁾
 * ヒドロペルオキシドと休止型ペルオキシダーゼの反応には図に示したヘテロリティックな開裂の他にホモリティックな開裂がある。ホモリティックな開裂ではアルコキシラジカルと Compound II が生成する。13S-ヒドロペルオキシ-9Z, 11E-オクタデカジエン酸は *Ceriporiopsis subvermispota* の MnP の良い電子受容体とはならない。従って、 O_2^- の不均化によって生じた H_2O_2 (R=H) が休止型ペルオキシダーゼ酸化の中心的役割を担う。

必要である。リピッドヒドロペルオキシドからのアルコキシラジカルの生成は $Fe(II)$ など反応系に共存する微量遷移金属によっても起こる。リピッドヒドロペルオキシドから生じたアルコキシラジカルは、 β -開裂、エポキシ化、水素移動などにより、カーボンセンターラジカル、ペルオキシラジカル、アルコキシラジカル、スーパーオキシド、アシルラジカルが生じる⁷⁷⁾。リピッドヒドロペルオキシドからのこれらのラジカルの生成は、シトクロム P-450 においても観測されている (図7)⁷⁸⁾。シトクロム P-450-脂質過酸化系によるリグニン分解は試験されていないが、リポキシゲナーゼ反応系では MnP-脂質過酸化系⁷⁹⁾と異なりクラフトパルプの脱色は促進されないことが報告されている⁸⁰⁾。

また、先に述べたラッカーゼ-メディエーター反応は PAH であるフェナントレンをほとんど酸化できないが、この系に不飽和脂肪酸を加えるとマンガンイオンの非存在下でもフェナントレンの分解が起きる⁷³⁾。これらの結果は、脂肪酸などの過酸化前駆体由来のある特定のラジカル種の発生が難分解性化合物の酸化分解を引き起こしていることを示している。このようなラジカル種を特定し、それを効果

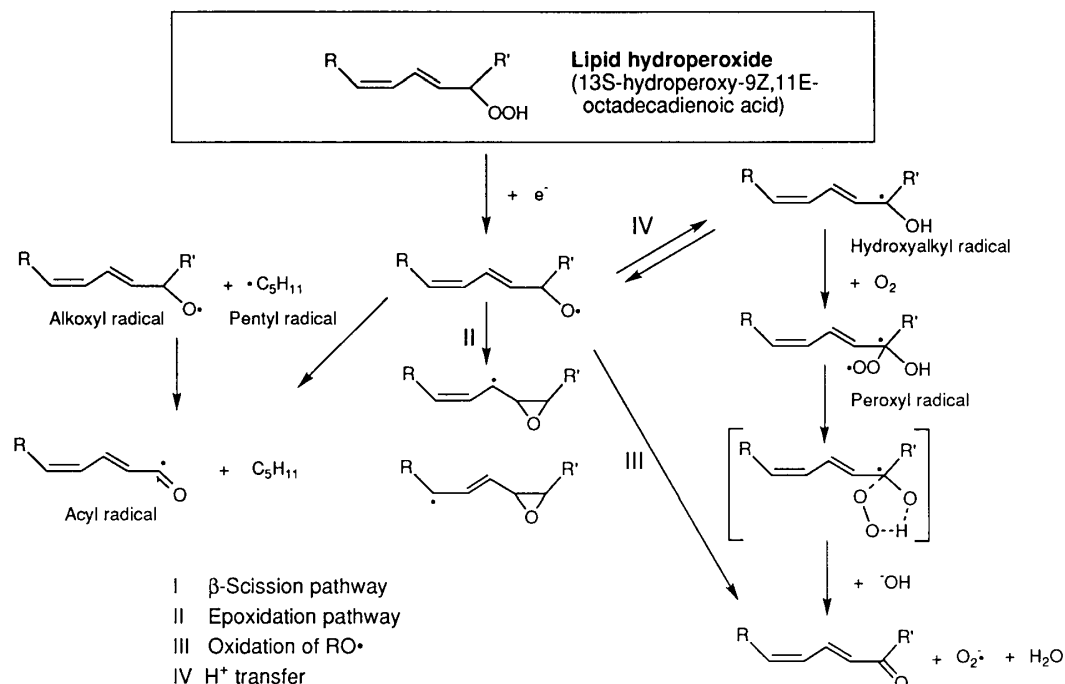


図7 シトクロム P-450 によるリピッドヒドロペルオキシドからのフリーラジカル生成反応⁷⁸⁾

的に発生させる制御機構の解明が、白色腐朽菌のリグニン分解能力の増強や新規なリグニン分解反応開発の鍵となるであろう。

MnP は Mn(II) 存在下でナイロンを直接酸化分解する他⁸¹⁾，不飽和および飽和脂肪酸を含む界面活性剤である Tween 80 や Tween 20 を添加することによりポリエチレンを分解する⁸²⁾。前者の反応系ではマンガンイオンのキレーターが反応を阻害するのに対して，後者の反応系ではマンガンイオンのキレーターの添加が必要である。これらの反応では，ラッカーゼ/メディエーター/脂肪酸反応系のようにフリーラジカルそのものが活性種である可能性の他に，HRP-GSH の反応で提案されたようにフリーラジカルのマンガンコンプレックスが関与している可能性も否定できない。いずれにしても，反応が過酸化水素を添加しなくても進行することから，有機ラジカルによる酸素の還元と，それによって生成したスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) の不均化が関与していると推定される。

3.3 活性酸素種と金属酸素錯体反応

空气中に存在する酸素分子は，三重項酸素と呼ばれ分子中に不対電子を 2 個もつラジカルである。この三重項酸素は，金属錯体，ラジカル，光，放射線などの刺激により活性酸素種と呼ばれる攻撃的な分子になる。活性酸素種の中で，水酸化ラジカル ($OH\cdot$)，一重項酸素，スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) はリグニンを酸化する。これらの中で，酸素（三重項酸素）の光増感反応や次亜塩素酸と過酸化水素の反応によって生成する一重項酸素は，単離した爆砕リグニンとアセトニトリル-エタノール (1:1) 中で反応してシナピルアルコールやバニリンなどの低分子化合物を与える^{83,84)}。リグニンの微生物分解における一重項酸素の関与が1980年代を中心に議論されたが，現在まで菌分解におけるこの活性酸素種の関与を示す明確な証拠は得られていない。一重項酸素は光励起によって生成するため，リグニン分解に関しては主に紙の光劣化との関係で研究が進められている。一重項酸素はリピッドの 2 重結合に直接付加してリピッドヒドロペルオキシドを与える。

一方、酸素の一電子還元体である O_2^- は高分子リグニンモデルを低分子化できるほど酸化力が強いが、フェノキシラジカルとの反応では芳香環開裂生成物を与える。また、 α - β 不飽和リグニンモデルの β -ラジカルと反応して共役 2 重結合の $C\alpha$ - $C\beta$ 開裂を起こす⁸⁵⁾。従って、酵素など何らかの酸化分解系でリグニンからラジカルが生成すると O_2^- は生成したリグニン由来のラジカルと直接反応して分解を促進する。 O_2^- はキサンチンオキシダーゼなどの酵素反応の他、ペルオキシラジカルの崩壊や有機ラジカルによる酸素の還元により生じる。例えば、LiP がベラトリルアルコール (VA) を酸化して生じるベラトリルアルコールカチオンラジカル ($VA^{\cdot+}$) や MnP の反応で生じる Mn(III) は、木材腐朽菌の代謝物であるシュウ酸と反応してフォーマートアニオンラジカル ($CO_2^{\cdot-}$) を生じ、これが酸素を還元して O_2^- が生じる⁸⁶⁻⁹⁰⁾。結果としてこれらのリグニン分解酵素による VA や Mn(II) の酸化が非競争的に阻害される。同様に、Mn(III) は、マロン酸、グリオキシル酸からも酸素存在下で $CO_2^{\cdot-}$ と O_2^- を生成する⁹¹⁾。これらの反応で生成する $CO_2^{\cdot-}$ の標準還元電位は $CO_2/CO_2^{\cdot-} = -1.80$ V に達し、プロモトリクロロエタンの脱ブロム化⁹²⁾、トリクロロ酢酸の脱塩素化⁹³⁾、Fe(III) の Fe(II) への還元⁹²⁾を起こす。リピッドペルオキシ化の過程でもフリーラジカルによる酸素の還元により O_2^- が生成し、これが不均化して H_2O_2 が生成する。

リグニン分解物から生じるヒドロキノンやラッカーゼや MnP によって酸化されてセミキノンラジカルとなる。このセミキノンラジカルは、キノンリダクターゼやセロピオースデヒドロゲナーゼ (CDH) によってヒドロキノンに還元されるが、この一連の過程で生成するセミキノンラジカルも酸素を還元して O_2^- を発生する。*P. chrysosporium* や *P. eryngii* など多くの白色腐朽菌はリグニン分解酵素とキノン還元酵素の両者を生産する菌であり、強力な O_2^- 発生系をもつ。こうして生成する O_2^- は上述のようにラジカルと反応してリグニン側鎖や芳香環の分解を起こす他に、Mn(II) の Mn(III) への酸化、不均化による H_2O_2 の発生、Fe(III) の Fe(II) への還元など木材腐朽において多様な働きをしている。 O_2^- によって Fe(III) が Fe(II) に還元されると H_2O_2 との反応によってさらに水酸化ラジカル ($OH\cdot$) あるいは鉄の酸素錯体が生成する。フェントン反応と呼ばれるこの反応はセルロースを激しく損傷させるため選択的なリグニン分解への寄与は少ないと思われるが、セルロースを優先的に分解する褐色腐朽菌やリグニンとセルロースをほぼ同時に分解していく白色腐朽菌では菌体外酵素を木材細胞壁内に進入させるためにこうした $OH\cdot$ 発生系を積極的に利用していると推定されている。 $OH\cdot$ は、白色腐朽菌 *Pleurotus eryngii* の MnP の発現も誘導する⁹⁴⁾。褐色腐朽菌 *Gloeophyllum trabeum* は、2,5-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンを生産し、このキノンと相当するヒドロキノンとのレドックスサイクルにより、Fe(III) を Fe(II) へ還元する。同時に、 O_2^- 由来の H_2O_2 が生産され、結果として $OH\cdot$ が生成する。この系は、ポリエチレングリコールを分解する⁹⁵⁾。Fe(III) の Fe(II) への還元系には、この他シデロフォア用物質⁹⁶⁾、や糖ペプチドなどの低分子代謝物^{97,98)}、セロピオースデヒドロゲナーゼなどの糖酸化酵素^{99,100)} も関与する。

木材には、遷移金属としてマンガン、鉄とともに銅が含まれているが、これまで低分子銅錯体による室温水溶液中での高分子リグニンの分解は報告されておらず、リグニン分解における銅錯体反応はそれほど注目されていなかった。しかしながら、Cu(I) が H_2O_2 と反応すると Fe(II) と H_2O_2 の反応と同様 $OH\cdot$ を発生させ、しかもその生成速度は、Fe(II) と H_2O_2 の場合より一桁以上速い。従って、木材腐朽菌による $OH\cdot$ の発生に木材中にもともと含まれている銅イオンが関与していることは十分予想されることである。また、エチレンジアミン銅錯体等多くの銅の配位化合物は遊離の銅イオンと同様 H_2O_2 と反応して $OH\cdot$ を発生させるが、銅のピリジン錯体と過酸化水素の水溶液中での反応は $OH\cdot$ を発生させないにも関わらず、非フェノール性 β -O-4 型 2 量体モデルの β -エーテルを開裂させ、クラフトパルプを漂白する。本反応系は POLY-R も酸化分解し、フェントン反応に比べてセルロースに与えるダメージが少ない。また、木材チップと作用させた場合広葉樹材を部分的に脱リグニンする⁵⁵⁻⁶³⁾。

ピリジンは白色腐朽菌の代謝物として知られており、ピリジン骨格をもつ誘導体は菌代謝物として普遍的に存在する。また、3.1 にヒドロペルオキシドによるラジカル連鎖反応により針葉樹材と広葉樹材の細胞壁と細胞間層リグニンが分解されることを記したが、このラジカル発生系にもピリジン骨格をもちカーボンセンターラジカルを発生させる銅錯体が有効であった。リグニン分解酵素であるラッカーゼは活性中心に銅をもち、酸素を電子受容体としてフェノールを酸化する。従来よりこのラッカーゼの触媒サイトを模倣する試みが行われているが、上述のような銅錯体とヒドロペルオキシドの反応はリグニン分解酵素の触媒機構にはない組み合わせであり、リグニン分解に関しては研究の扉がようやく開きかけたところとも言える^{55,57)}。過酸化前駆体あるいは過酸化中間体からのラジカル連鎖反応を鉄、マンガン、銅などの金属錯体で制御したり、ペルオキシ錯体など $\text{OH}\cdot$ 以外の活性種を金属錯体と過酸化水素反応によって生成させる方法がリグニン分解の戦略として今後重用視されていくであろう。

以上のように、木材腐朽菌によるリグニン分解においては、嫌気性微生物によるリグニン分解¹⁰¹⁻¹⁰⁵⁾とは対照的に、酸素およびそれから派生する活性酸素種が基質との反応や酵素の発現に深く関与しており、酸素を巧みに操る能力がこの種の微生物の優れた木材分解力の一つの決め手となっている。

4. 終 わ り に

C. suvermispora などの選択的リグニン分解菌はセルロースのダメージを最小にしてリグニンを効率良く分解する。しかもこの反応は酵素から離れた場で起きている。白色腐朽菌のこうした絶妙なラジカル制御機構の解明は、環境調和型のリグニン分解反応の構築に対して革命的な恩恵をもたらすものと期待される¹⁰⁶⁾。リグニン分解酵素の発現、制御、触媒機構の解明と合わせて、木材腐朽におけるフリーラジカル生成機構の全体像の解明が白色腐朽菌のリグニン分解力の遺伝子工学的増強^{107,108)}や環境汚染物質の分解¹⁰⁹⁾、さらには木質バイオマスの成分分離とそれに続くケミカルス、エネルギー^{110,111)}、機能性ポリマー¹¹²⁾、紙・パルプ^{55-63,113)}、生分解性材料^{114,115)}、食品素材¹¹⁶⁻¹²⁰⁾、等への総合変換プロセス構築^{110,121,122)}に大きく寄与するであろう。

引 用 文 献

- 1) K. MESSNER and E. SREBOTNIK: *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**, 351-364 (1994)
- 2) R.A. BLANCHETTE, E.W. KRUEGER, J.E. HAIGHT, M. AKHTAR and D.E. AKIN: *J. Biotechnol.*, **53**, 203-213 (1997)
- 3) E. SREBOTNIK and K. MESSNER: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1383-1386 (1994)
- 4) H. WARIISHI, L. AKILESWARAN and M.H. GOLD: *Biochemistry*, **27**, 5365-5370 (1988)
- 5) I.-C. KUAN, K.A. JOHNSON and M. TIEN: *J. Biol. Chem.*, **268**, 20064-20070 (1993)
- 6) L.S. ZAPANTA and M. TIEN: *J. Biotechnol.*, **53**, 93-102 (1997)
- 7) S. CAMARERO, S. SARKAR, F.J. RUIZ-DUENAS, M.J. MARTINEZ and A.T. MARTINEZ: *J. Biol. Chem.*, **274**, 10324-10330 (1999)
- 8) U. URZÚA, L.F. LARRONDO, S. LOBOS, J. LARRAIN and R. VICUÑA: *FEBS Lett.*, **371**, 132-136 (1995)
- 9) S.L. TIMOFEEVSKI, N.S. READING and S.D. AUST: *Arch. Biochem. Biophys.*, **356**, 287-295 (1998)
- 10) S.-X. CHEN and P. SCHOPFER: *Eur. J. Biochem.*, **260**, 726-735 (1999)
- 11) H. WARIISHI and M.H. GOLD: *J. Biol. Chem.*, **265**, 2070-2077 (1990)
- 12) T. WATANABE, H. KAMITSUJI, M. ENOKI, Y. HONDA and M. KUWAHARA: *Chem. Lett.*, 44-445 (2000)
- 13) S. YOSHIDA, T. WATANABE, Y. HONDA and M. KUWAHARA: *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, **2**, 243-251 (1997)
- 14) S. YOSHIDA, A. CHATANI, Y. HONDA, T. WATANABE and M. KUWAHARA: *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, **9**, 173-182 (2000)
- 15) H. WARIISHI, D. SHENG and M.H. GOLD: *Biochemistry*, **33**, 5545-5552 (1994)
- 16) T. JOHJIMA, N. ITOH, M. KABUTO, F. TOKIMURA, T. NAKAGAWA, H. WARIISHI and H. TANAKA: *Proc. Nat.*

- Acad. Sci. USA*, **96**, 1989-1994 (1999)
- 17) D.P. BARR and S.D. AUST: *Arch. Biochem. Biophys.*, **312**, 511-515 (1994)
 - 18) R.S. KOUDORI and M. TIEN: *J. Biol. Chem.*, **270**, 22254-22258 (1995)
 - 19) 服部武文: 木材研究・資料, **33**, 1-12 (1997)
 - 20) A. KHINDARIA, I. YAMAZAKI and S.D. AUST: *Biochemistry*, **34**, 16860-16869 (1995)
 - 21) A. KHINDARIA, I. YAMAZAKI and S.D. AUST: *Biochemistry*, **35**, 6418-6424 (1996)
 - 22) A. KHINDARIA, G. NIE and S.D. AUST: *Biochemistry*, **36**, 14181-14185 (1997)
 - 23) M. TIEN and D.B. MA: *J. Biol. Chem.*, **272**, 8912-8917 (1997)
 - 24) D. SHENG and M.H. GOLD: *Biochemistry*, **37**, 2029-2036 (1998)
 - 25) D. SHENG and M.H. GOLD: *Eur. J. Biochem.*, **259**, 626-634 (1999)
 - 26) A. KHINDARIA, T.A. GROVER and S.D. AUST: *Biochemistry*, **34**, 6020-6025 (1995)
 - 27) K. AMBERT-BALAY, S.M. FUCHS and M. TIEN: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**, 283-286 (1998)
 - 28) W.A. DOYLE, W. BLODIG, N.C. VEITCH, K. PIONTEK and A.T. SMITH: *Biochemistry*, **37**, 15097-15105 (1998)
 - 29) T. CHOINOVSKI, W. BLODIG, K.H. WINTERHALTER and K. PIONTEK: *J. Mol. Biol.*, **286**, 809-827 (1999)
 - 30) S.L. TIMOFEEVSKI, G. NIE, N. S. READING and S.D. AUST: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 500-504 (1999)
 - 31) P.J.M. TEUNISSEN and J.A. FIELD: *FEBS Lett.*, **439**, 219-223 (1998)
 - 32) G.R.J. SUTHERLAND, A. KHINDARIA and S.D. AUST: *Arch. Biochem. Biophys.*, **327**, 20-26 (1996)
 - 33) A. HEINFING, J. RUIZ-DUENAS, M.J. MARTINEZ, M. BERGBAUER, U. SZEWZYK and A.T. MARTINEZ: *FEBS Lett.*, **428**, 141-146 (1998)
 - 34) A. HEINFING, M.J. MARTINEZ, A.T. MARTINEZ, M. BERGBAUER and U. SZEWZYK: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2788-2793 (1998)
 - 35) T. MESTER and J.A. FIELD: *J. Biol. Chem.*, **273**, 15412-15417 (1998)
 - 36) T. IRIE, Y. HONDA, H.-C. HA, T. WATANABE and M. KUWAHARA: *J. Wood Sci.*, **46**, 230-233 (2000)
 - 37) A. D'ANNIBALE, C. CRESTINI, E.D. MATTIA and G.G. SERMANI: *J. Biotechnol.*, **48**, 231-239 (1996)
 - 38) E. DE JONG, J.A. FIELD and J.A. M. DE BONT: *FEBS Lett.*, **299**, 107-110 (1992)
 - 39) K. KISHI, M.K. VAN SOMEREN, M.B. MAYFIELD, J. SUN, T.M. LOEHR and M.H. GOLD: *Biochemistry*, **35**, 8986-8994 (1996)
 - 40) M. SUNDARAMOORTHY, K. KISHI, M.H. GOLD and T.L. POULOS: *J. Biol. Chem.*, **272**, 17574-17580 (1997)
 - 41) M. SUNDARAMOORTHY, K. KISHI, M.H. GOLD and T.L. POULOS: *J. Biol. Chem.*, **269**, 32759-32767 (1994)
 - 42) B.K. YEUNG, X. WANG, J.A. SIGMAN, P.A. PETILLO and Y. LU: *Chemistry & Biology*, **4**, 215-221 (1997)
 - 43) S.K. WILCOX, C.D. PUTNAM, M. SASTRY, J. BLANKENSHIP, W.J. CHAZIN, D.E. McREE and D.B. GOODIN: *Biochemistry*, **37**, 16853-16862 (1998)
 - 44) H. WARIISHI, K. VALLI, V. RENGANATHAN and M.H. GOLD: *J. Biol. Chem.*, **264**, 14185-14191 (1989)
 - 45) J.P. McELDOON and J.S. DORDICK: *J. Biol. Chem.*, **266**, 14288-14293 (1991)
 - 46) R. BOURBONNAIS and M. PAIGE: *FEBS Lett.*, **267**, 99-102 (1990)
 - 47) C. EGGERT, U. TEMP, J.F.D. DEAN and K.E.L. ERIKSSON: *FEBS Lett.*, **391**, 144-148 (1996)
 - 48) S. KAWAI, T. UMEZAWA and T. HIGUCHI: *Wood Res.*, **76**, 10-16 (1989)
 - 49) C. JOHANNES and A. MAJCHERCZYK: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 524-528, (2000)
 - 50) A. LEONTIEVSKY, N. MYASOEDOVA, N. POZDNYAKOVA and L. GOLOVLEVA: *FEBS Lett.*, **413**, 446-448 (1997)
 - 51) G. PALMIERI, P. GIARDINA, C. BLANCO, A. SCALONI, A. CAPASSO and G. SANNIA: *J. Biol. Chem.*, **272**, 31301-31307 (1997)
 - 52) E. KARHUNEN, M.-L. NIKU-PAAVOLA, L. VIHARI, T. HALTIA, R.A. VAN DER MEER and J.A. DUINE: *FEBS Lett.*, **267**, 6-8 (1990)
 - 53) C. HOFER and D. SCHLOSSER: *FEBS Lett.*, **451**, 186-190 (1999)
 - 54) M. AKHTAR, M.C. ATTRIDGE, R.A. BLANCHETTE, G.C. MYERS, M.B. WALL, M.S. SYKES, J.W. KONING JR., R.R. BURGESS, T.H. WEGNER and T.K. KIRK: *Proc. of 5th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, ed. by M. Kuwahara and M. Shimada, Uni Publishers, Tokyo, 3-8 (1992)
 - 55) T. WATANABE, K. KOLLER, and K. MESSNER: *J. Biotechnol.*, **62**, 221-230 (1998)

- 56) K. MESSNER, K. FACKLER, K. KOLLER, P. LAMAIPIS, E. SREBOTNIK, W. GINDL and T. WATANABE : *Proc. of 2000 Tappi Conf. : Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, in press (2000)
- 57) T. WATANABE, K. KOLLER and K. MESSNER : *PCT Worldwide Patent* (1998)
- 58) T. WATANABE, K. KOLLER and K. MESSNER : *Proc. of 7 th Intern. Conf. on Biotechnol. in the Pulp and Paper Industry*, **A**, 157-160 (1998)
- 59) K. KOLLER, K. MESSNER and T. WATANABE : 29 th The Intern. Res. Group on Wood Preservation, IRG/WP 98-10282, 1-7 (1998)
- 60) K. MESSNER, K. KOLLER, K. FACKLER, E. SREBOTNIK and T. WATANABE : *Proc. of 10th Intern. Symp. on Wood and Pulping Chem.*, **I**, 550-555 (1999)
- 61) T. WATANABE, M. ENOKI, S. KATAYAMA, S. NAKAGAME, K. KOLLER, K. MESSNER, Y. HONDA and M. KUWAHARA : *Proc. of 10th Intern. Symp. on Wood and Pulping Chem.*, **I**, 528-533 (1999)
- 62) K. MESSNER, K. FACKLER, K. KOLLER, P. LAMAIPIS, E. SREBOTNIK and T. WATANABE : *Biokonversion Nachwachsender Rohstoffe, Schriftenreihe Nachwachsender Rohstoffe-Band*, **15**, 76-84 (1999)
- 63) P. LAMAIPIS, W. GINDL, T. WATANABE and K. MESSNER : 30th The International Research Group on Wood Preservation, IRG/WP 00-10340, 1-18 (2000)
- 64) M. SHIMADA, T. HABE, T. UMEZAWA, T. HIGUCHI and T. OKAMOTO : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1247-1252 (1984)
- 65) A. PASZCZYNSKI, R. CRAWFORD and R.A. BLANCHETTE : *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 62-68 (1988)
- 66) A. GUTIÉRREZ, J.C.D. RÍO, M.J. MARTÍNEZ and A.T. MARTÍNEZ : *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1367-1371 (1999)
- 67) M. ENOKI, T. WATANABE, Y. HONDA and M. KUWAHARA : *Chem. Lett.*, 54-55 (2000)
- 68) M. ENOKI, T. WATANABE, S. NAKAGAME, K. KOLLER, K. MESSNER, Y. HONDA and M. KUWAHARA : *FEMS Microbiol. Lett.*, **180**, 205-211 (1999)
- 69) D. GARON, S. KRIVOBOK and F. SEIGLE-MURANDI : *Chemosphere*, **40**, 91-97 (2000)
- 70) W. BAO, Y. FUKUSHIMA, K.A. JENSEN JR, M.A. MOEN and K.E. HAMMEL : *FEBS Lett.*, **354**, 297-300 (1994)
- 71) M.A. MOEN and K.E. HAMMEL : *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 19 56-1961 (1994)
- 72) B.W. BOGAN, R.T. LAMAR and K.E. HAMMEL : *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1788-1792 (1996)
- 73) S. BÖHMER, K. MESSNER and E. SREBOTNIK : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**, 233-238 (1998)
- 74) A. KAPITCH, M. HOFTRICHTER, T. VARES and A. HATAKKA : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **259**, 212-219 (1999)
- 75) A.N. KAPITCH, K.A. JENSEN and K.E. HAMMEL : *FEBS Lett.*, **461**, 115-119 (1999)
- 76) T. WATANABE, S. KATAYAMA, M. ENOKI, Y. HONDA and M. KUWAHARA : *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4222-4231 (2000)
- 77) W. CHAMULITRAT, M.F. HUGHES, T.E. ELING and R.P. MASON : *Arch. Biochem. Biophys.*, **290**, 153-159 (1991)
- 78) C. ROTA, D.P. BARR, M.V. MARTIN, F.P. GUENGERICH, A. TOMASI and R.P. MASON : *Biochem. J.*, **328**, 565-571 (1997)
- 79) R. KONDO, K. HARAZONO and K. SAKAI : *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4359-4363 (1994)
- 80) K. EHARA, Y. TSUTSUMI and T. NISHIDA : *J. Wood Sci.*, **46**, 137-142 (2000)
- 81) T. DEGUCHI, Y. KITAOKA, M. KAKEZAWA and T. NISHIDA : *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1366-1371 (1998)
- 82) Y. IIYOSHI, Y. TSUTSUMI and T. NISHIDA : *J. Wood Sci.*, **44**, 222-229 (1998)
- 83) G. BENTIVENGA, C. BONINI, M. D'AURIA and A. DE BONA : *J. Photochem. Photobiol. A : Chemistry*, **128**, 139-143 (1999)
- 84) C. BONINI, M. D'AURIA, L. D'ALESSIO, G. MAURIELLO, D. TOFANI, D. VIGGIANO and F. ZIMBARDI : *J. Photochem. Photobiol. A : Chemistry*, **113**, 119-124 (1998)
- 85) J. GIERER : *Holzforschung*, **51**, 34-46 (1997)
- 86) Y. AKAMATSU, D.B. MA, T. HIGUCHI and M. SHIMADA : *FEBS Lett.*, **269**, 261-263 (1990)
- 87) J.L. POPP, B. KALYNARAMAN and T.K. KIRK : *Biochemistry*, **29**, 10475-10480 (1990)
- 88) A. KHINDARIA, T.A. GROVER and S.D. AUST : *Arch. Biochem. Biophys.*, **314**, 301-306 (1994)

- 89) M. SHIMADA, D.-B. MA, Y. AKAMATSU and T. HATTORI: *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**, 285-296 (1994)
- 90) I.M. KOLTHOFF, E.J. MEEHAN and M. KIMURA: *J. Phys. Chem.*, **75**, 3343-3349 (1971)
- 91) M. HOFRICHTER, D. ZIEGENHAGEN, T. VARES, M. FRIEDRICH, M.G. JÄGER, W. FRITSCHÉ and A. HATAKKA: *FEBS Lett.*, **434**, 362-366 (1998)
- 92) M.D. CAMERON and S.D. AUST: *Arch. Biochem. Biophys.*, **367**, 115-121 (1999)
- 93) A. NISHIYAMA, T. HATTORI and M. SHIMADA: *Wood Res.*, **87**, 17-18 (2000)
- 94) F.J. RUIZ-DUENAS, F. GUILLEN, S. CAMARERO, M. PEREZ-BOADA, M.J. MARTINEZ and A.T. MARTINEZ: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4458-4463 (1999)
- 95) Z. KEREM, K.A. JENSEN and K.E. HAMMEL: *FEBS Lett.*, **446**, 49-54 (1999)
- 96) A. PASZCZYNSKY, R. CRAWFORD, D. FUNK and B. GOODELL: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 674-679 (1999)
- 97) A. ENOKI, G. FUSE and H. TANAKA: *Intern. Res. Group on Wood Preservation*, IRG/WP/1516, 1-15 (1991)
- 98) A. ENOKI, S. ITAKURA and H. TANAKA: *J. Biotechnol.*, **53**, 265-272 (1997)
- 99) P.M. WOOD: *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**, 313-320 (1994)
- 100) S.M. HYDE and P.M. WOOD: *Microbiol.*, **143**, 259-266 (1997)
- 101) W. CHEN, K. OHMIYA, S. SHIMIZU and H. KAWAKAMI: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 211-216 (1985)
- 102) W. CHEN, K. SUPANWONG, K. OHMIYA, S. SHIMIZU and H. KAWAKAMI: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1451-1456 (1985)
- 103) R. BENNER, A.E. MACCUBBIN and R.E. HODSON: *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 998-1004 (1984)
- 104) T. KONDO, T. WATANABE, T. OHSHITA and T. KYUMA: *J. Sci. Food Agric.*, **68**, 383-388 (1995)
- 105) H. KAJIKAWA, H. KUDO, T. KONDO, K. JODAI, Y. HONDA, M. KUWAHARA and T. WATANABE: *FEMS Microbiol. Lett.*, **187**, 15-20 (2000)
- 106) 渡辺隆司, 桑原正章: 化学と生物, **35**, 161-66 (2000)
- 107) Y. HONDA, T. MATSUYAMA, T. IRIE, T. WATANABE and M. KUWAHARA: *Curr. Genet.*, **37**, 209-212 (2000)
- 108) 本田与一: 木材研究・資料, **32**, 6-15 (1996)
- 109) T. HIRANO, Y. HONDA, T. WATANABE and M. KUWAHARA: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1958-1962 (2000)
- 110) T. SAWADA, Y. NAKAMURA, F. KOBAYASHI, M. KUWAHARA and T. WATANABE: *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 719-724 (1995)
- 111) 桑原正章: バイオサイエンスとインダストリー, **56**, 22-25 (1998)
- 112) K. IWAHARA, Y. HONDA, T. WATANABE and M. KUWAHARA: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 104-111 (2000)
- 113) T. WATANABE, K. MIKAME, Y. HONDA and M. KUWAHARA: *J. Wood Chem. Technol.*, **16**, 109-120 (1996)
- 114) T. YAMANAKA, H. YANO, T. WATANABE, Y. HONDA and M. KUWAHARA: *Wood Res.*, **87**, 25-27 (2000)
- 115) T. HIRAOKA, M. UEDA, Y. TAKAMI, T. WATANABE, N. SHIRAISHI and T. KOSHIJIMA: *Holzforchung*, **51**, 273-280 (1997)
- 116) T. WATANABE, T. SATO, S. YOSHIOKA, T. KOSHIJIMA and M. KUWAHARA: *Eur. J. Biochem.*, **209**, 651-659 (1992)
- 117) T. WATANABE, R. MATSUE, Y. HONDA and M. KUWAHARA: *Carbohydr. Res.*, **275**, 215-220 (1995)
- 118) T. WATANABE, S. KATAYAMA, M. MATSUBARA, Y. HONDA and M. KUWAHARA: *Curr. Microbiol.*, **41**, 210-213 (2000)
- 119) 里内美津子, 渡辺隆司, 若林 茂, 大隈一裕, 越島哲夫, 桑原正章: 日本栄養・食糧学会誌, **49**, 143-148 (1996)
- 120) 渡辺隆司: *Cellulose Commun.*, **5**, 91-97 (1998)
- 121) 渡辺隆司: 化学経済, **47**, 104-111 (2000)
- 122) 渡辺隆司: 「ウッドケミカルの最新技術」, シーエムシー出版, 東京, 66-84 (2000)
- 123) 本原稿印刷中に LiP H2 による Mn(II) の直接酸化を否定する結果が報告された; M.D.S. GELPKE, D. SHENG and M.H. GOLD: *Arch. Biochem. Biophys.*, **381**, 16-24 (2000)