

腐朽菌キノコのシュウ酸代謝*

—木材保護の生化学に向けて—

島田 幹夫**

Oxalic Acid Metabolism of Wood-destroying Basidiomycetes: Toward Biochemistry of Wood Protection*

Mikio SHIMADA**

(平成5年7月31日受理)

1. はじめに

シュウ酸は、植物、菌類、及び動物界に広く分布している^{1a)}。遊離の酸として、スイバ、カタバミ、ホウレン草などには特に多く含まれている。しかし一般的にはカリウムやカルシウム塩として見いだされ、木材組織中にもその結晶がしばしば観察される^{1b,c)}。「シュウ酸」(Oxalic acid)はカタバミ(Oxalis)属の学名に由来し、酸の素という意味で生まれた Oxygen とは同語源のギリシャ語に由来する。古代ギリシャの医学書の記録はもとより近代化学史上、シュウ酸は最も高度に酸素化された有機化合物として、興味を引いた原子論のモデル化合物でもあった^{1a)}。この有機酸は、今ではきわめて日常的な化合物として、高校化学の教科書にも必ず出てくるジカルボン酸である。またシュウ酸カルシウムが人体に蓄積されると、尿路結石症の原因の一つとなり、激痛を体験された読者もおられることと推察する。しかし、動・植物及び菌類におけるシュウ酸の生化学的役割についてはほとんど理解されていない。

本説でシュウ酸の問題を取り上げた理由は、近年、筆者らの研究を含め、木材腐朽菌の生成するシュウ酸が、リグニンとセルロースの生分解に関与していることが明かとなり、シュウ酸が大いに注目されるようになったからであるが、今シュウ酸の生化学的役割についていろいろな観点から調査しておくことは有意義と思うからである。例えば、ヒマワリや農作物を攻撃するある種の植物病原菌 (*Sclerotinium* 属) はシュウ酸を分泌して宿主細胞壁のペクチン酸カルシウムからCaを脱離せしめ植物細胞壁を破壊して侵入すること^{1d)}、および共生菌でもある菌根菌は、シュウ酸を分泌して土壌中のリン酸カルシウムからリン酸を遊離させ、それを宿主に利用できるようにしていること^{1e)} などが報告されており、シュウ酸をめぐる植物病原菌の働きにも強い関心が寄せられているからである。

一般に木材腐朽菌キノコの中、褐色腐朽菌はシュウ酸をその培養液中に集積するのに対し、白色腐朽菌は分解するので集積しない。この生理的差異は、前者はシュウ酸分解酵素を欠落しているのに対し、後者は本酵素を保有していることによって説明されている。シュウ酸の生合成と分解は腐朽菌キノコの重要な生理学

* 第48回木研公開講演会(平成5年5月14日、大阪)において講演した。

** 生化学制御研究分野 (Laboratory of Biochemical Control)

Key words: Oxalic acid, Wood-destroying basidiomycetes, Glyoxylate oxidase, Oxaloacetase, Lignin biodegradation, Cellulose biodegradation.

的特徴であるが、そのメカニズムについてはほとんど研究されていない。シュウ酸代謝の生化学的意味を総合的に考察することは木材腐朽菌学と木材保存学においても重要と考えるが、木材腐朽菌によるシュウ酸の代謝（生成と分解）に関する酵素化学的研究も、この30年余りの間ほとんど行われていない。

一方、リグニンの生合成と生分解の研究を通して、不思議に思ってきたことがある。それは樹木が、なぜ二次代謝物として高いC/N比（300–500）をもつ「木材基質」²⁾を生産し、他方では、腐朽菌キノコがなぜこのような窒素（N）栄養源に乏しい木材を食べて、分解できるのかということである。生化学的観点からすれば、N欠乏ではあるがCリッチな栄養環境下ではNをリサイクル使用しながらNを含まない代謝物（N-free metabolite）を合成したり分解したりすることが基本的な代謝となる。つまり樹木はその進化の過程でN欠乏の栄養環境を逆手にとり、優れた二酸化炭素固定能力を活用して、リグニン、セルロースおよびヘミセルロースのような N-free metabolite を生合成する酵素系を獲得し、逆に、腐朽菌キノコはN栄養素に乏しい木材基質をCO₂やシュウ酸（N-free metabolite）へと変換（排泄）しながら、N栄養素の獲得に成功したように思われる。地球上の生産者と分解者の役割は生態学の観点から、常に問題にされてきたことではあるが、自然界では元々、CO₂を効率よく吸収する植物と、効率よくCO₂を放出してくれるキノコなどの微生物との連携プレーが、少なくとも近代工業の出現以前には、地球上の炭酸ガス濃度維持にうまく機能してきたものと思われる。森林植物によって合成されたリグニンやセルロースが分解されると、最終的にはCO₂になる。このとき、シュウ酸代謝経路は、腐朽菌の進化の過程でグリオキシル酸回路あるいはTCAサイクルから分岐し、TCAサイクルとは別のCO₂発生経路として発達してきたものと推察される。また、この経路は高C/N比の基質を栄養とする生物種に共通する経路として進化してきたものではないかと想像している。この代謝経路の主役は各種の酵素であり、その司令塔は遺伝子である。従って、シュウ酸代謝が木材腐朽においてかなり重要な役割を果たしていることが予想され、関与する酵素系を抑制し、制御することは、木質資源を腐朽から守る上で重要である。また、この基礎生化学的研究を基盤として、地球環境にやさしい木材防腐剤の開発や防護の技術も考案できるのではないかと期待している。

2. 腐朽菌キノコと木材腐朽型の特徴

木材基質をエネルギー源として生育できる主な微生物は白色腐朽菌、褐色腐朽菌、および軟腐朽菌の3種である。前二者は担子菌類、俗にキノコと呼ばれる高等菌類に属する。腐朽した木材の外見的特徴から白色腐朽、褐色腐朽、軟腐朽を引き起こす原因菌としてこのように大別されている。便宜的に区別されるこのような腐朽型は、菌類の内的因子即ち遺伝的生理学的特徴を反映しているとされている^{3a)}。興味あることに、これらの腐朽菌が木質細胞を攻撃するとき三者三様の攻撃方法をとる。白色腐朽菌は木質細胞を、内腔から外側に向かって剥離するかのように分解するのに対し、褐色腐朽菌は、とくにその初期腐朽では菌糸から拡散可能（diffusible）な化学物質を木質細胞壁内に浸透させて、菌体からかなり離れた場所でもセルロース鎖を切断することによって侵食していくということである^{3b)}。

他方、軟腐朽菌は木質細胞壁の木口面から見ると、まるでドリルで掘削するかのように多くの孔隙を作りながら木繊維の軸に沿って侵食していくといわれている。したがって、木材保護の観点から、菌類のこのような異なった攻撃方法の生化学的メカニズムの解明は重要である。

3. シュウ酸を集積する腐朽菌キノコ

シイタケ菌などの担子菌類によるシュウ酸の集積は有機酸発酵の一つとして古くから関心がもたれていた⁴⁾。木材腐朽菌学の観点からは、褐色腐朽菌はシュウ酸をその培養液中に集積するのに対して、白色腐朽菌は集積しないという生理学的差異に興味もたれていた。島菌らは、表1にも示すように、C/N比約30の培養基を用いて各種の腐朽菌を培養して、生成したシュウ酸の集積量を報告している⁵⁾。褐色腐朽菌の中、オオウズラタケ（旧名ワタグサレタケ）が最大のシュウ酸集積量を示しており、菌体あたり17倍ものシュウ

島田：腐朽菌キノコのシュウ酸代謝

酸 (N-free metabolite) を生産していることは驚異である。白色腐朽菌はシュウ酸を集積しないが、カワラタケのように炭酸カルシウムを添加したときにだけ、褐色腐朽菌に匹敵するほどシュウ酸を生産していることが分かる。後に、高尾⁶⁾によっても同様な実験結果が報告されたが、スエヒロタケやシワタケはシュウ酸よりもリンゴ酸やコハク酸を多く集積することを見いだしている。最近、Duttonら⁷⁾も白色腐朽菌 (*Coriolus versicolor* [カワラタケ], *Heterobasidion annosum*, *Pleurotus florida*, *Phanerochaete chrysosporium*) と褐色腐朽菌 (*Agaricus bisporus*, *Coniophora puteana*, *Coniophora marmorata*, と *Poria vaporea* [ワタグサレタケ]) についてシュウ酸が、前者では0.04-10.0mM, 後者では、2.0-20.0 mMほど集積され、いずれの場合も二次代謝物として生産されることを報告している。

表1 腐朽菌キノコ培養液中と菌体乾重量当たりのシュウ酸の集積量⁵⁾

使 用 菌 名	培養液内(mM) 対菌体乾重量(g)	
褐色腐朽菌		
オオウズラタケ	200	17.7
ツガノサルノコシカケ	61	5.1
シロカイメンタケ	33	3.2
ホウロクタケ	29	1.0
カンバタケ	9	2.8
ヒメシロアマタケ	9	0.3
白色腐朽菌		
シイタケ	4	0.15
カタウロコタケ	3	0.07
マツノネクチャタケ	0	-
ウズラタケ	0	-
モミサルノコシカケ	0	-
ベッコウタケ	0	-
チャウロコタケ	0	-
シュタケ	0	-
ヒイロタケ	0	-
キツネカワラタケ	0	-
カワラタケ	0	-
カワラタケ (CaCO ₃ 添加のとき)	47	1.9

4. 褐色腐朽菌のセルロース分解とシュウ酸

先ず、図1に示すように、褐色腐朽菌によるセルロース分解様式は白色腐朽菌のそれとは対照的であることが、Cowling⁸⁾によって初めて報告された。褐色腐朽菌 (*Poria monticola*) は初期腐朽の段階でセルロースの重合度を急激に低下させるのに対して、カワラタケ (*Coriolus versicolor*) などの白色腐朽菌は比較的緩慢にセルロースの重合度を低下させている。同様なパターンが褐色腐朽菌オオウズラタケ (*Tyromyces palustris*) についても報告された⁹⁾。しかし、このユニークなセルロース劣化が褐色腐朽菌に普遍的か否かは確立されていない。

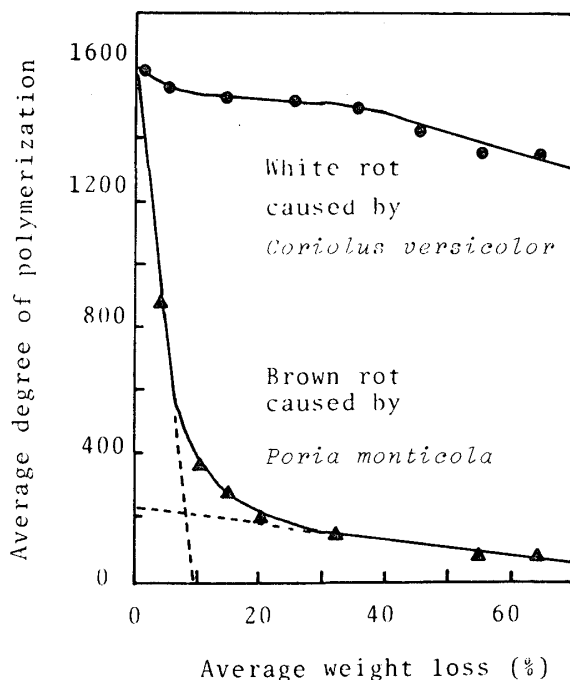


図1 白色腐朽と褐色腐朽におけるセルロース重合度低下⁸⁾
褐色腐朽菌 (*Poria monticola*) 重量減少10%に至るまでに急激にセルロース重合度を低下させる。

この急激なセルロース劣化のメカニズムを説明するために、古くから Halliwell¹⁰⁾ と Koenigs¹¹⁾ によって、フェントン反応 ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$) 系が提案されており、発生するヒドロキシラジカルがセルロース鎖の切断を引き起こしているとされている。

Schmidt ら¹²⁾ は、褐色腐朽菌の分泌するシュウ酸が、 Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元することによってフェントン系をつくりだすことを示唆している。しかし、シュウ酸と鉄イオンのモル比が3を越えると反応が阻害される事実も認めている。したがって、腐朽木材中に蓄積されるシュウ酸は、実際的には空気酸化によっても分解されると同時に過酸化水素を生成するので、フェントン反応系の成立に寄与するが、シュウ酸濃度が高くなれば OH^- ラジカル捕捉剤として作用してフェントン系を阻害することも十分考えられる。

最近、Kremer ら¹³⁾ は、セロビオースオキシダーゼはシュウ酸よりも早く第二鉄イオンを還元できるシステムであることを認め、セルロース劣化をこの酵素系の作用で説明しようとしている。また、シュウ酸が Fe^{3+} を還元するには、光が必要とされるので、Schmidt の「仮説」には批判的見解を示している。

筆者らは Schmidt らの実験を追試することによって、シュウ酸よりも過酸化水素の方が Fe^{3+} を還元

する事を見いだしたので、シュウ酸はフェントン反応に必ずしも必要としないことが明らかになった^{13 a)}。しかし微量のシュウ酸が存在するとフェントン反応系を活性化することは、Schmidt らの実験結果と一致している。このシュウ酸の微妙な役割については不明であるが、今後さらに検討されるべきおもしろい研究課題である。

褐色腐朽の顕微鏡学的観察において注目すべきことは、急激なセルロース切断の原因はセルラーゼのような酵素蛋白ではなく、diffusible な低分子量の化学物質であると推定されていることである。今のところ、「フェントン仮説」は褐色腐朽のセルロース劣化を説明するには好都合である。

表2 シュウ酸溶液によるセルロースの粘度低下¹⁶⁾

シュウ酸処理の有無	粘 度	相 対 値
無 処 理	23.4cp	100
1% シュウ酸溶液	14.2	61
5% シュウ酸溶液	7.6	32

しかし、筆者らはフェントン仮説に代わるか否かは別にしても新しい可能性として、これまで見過ごされてきたシュウ酸の加水分解力に注目し、実験を行った。表2に1%及び5%シュウ酸溶液で各種のセルロースを処理すると重合度が低下することを確認した^{13 b)}。またアカマツ木粉では図2に示すように、ヘミセルロースがより多く還元糖を遊離し、セルロースより分解され易いことも分かった。したがって、褐色腐朽では木材中に分泌されたシュウ酸が酸触媒としてセルロースの非晶領域とヘミセルロースを攻撃するという可能性も無視できない。これをうけて、Green らは褐色腐朽に曝された木材内部の pH は1週間で1.7に落ちることを最近報告し¹⁴⁾、シュウ酸による前処理がセルロースの重合度低下に決定的であるという極めて興味ある知見を報告している¹⁵⁾。もちろん木材が酸性溶液に弱いことは古くから報告されていたが^{16, 17)}、褐色腐朽菌の代謝生理学との関連での研究は報告されていない。

一般に褐色腐朽菌は針葉樹材を好むとされ、木構造建築物には針葉樹材が多く使われることから、褐色腐朽を受けた構造部材は急激な強度低下を招き、危険な状態となる。この強度低下の主たる要因はセルロースの劣化であると推定されている。木質セルロースの分解で興味あるもう一つの問題は、白色腐朽菌はセルラーゼ酵素系としてエンドセルラーゼ (Cx) とエクソセルラーゼ (C1) をもっているのに対し、褐色腐朽菌は、Cx しかもっていない場合が多いということである。また、そのため結晶性セルロースや濾紙を唯一の炭素源として培養した場合、褐色腐朽菌は生育できないと報告されている^{18 a, b)}。そこで褐色腐朽菌は、C1酵素の代わりにフェントン反応系を活用して結晶領域を攻撃していると推定されている。いずれにせよ、褐色腐朽機構の解明は今後の研究にまたねばならない。

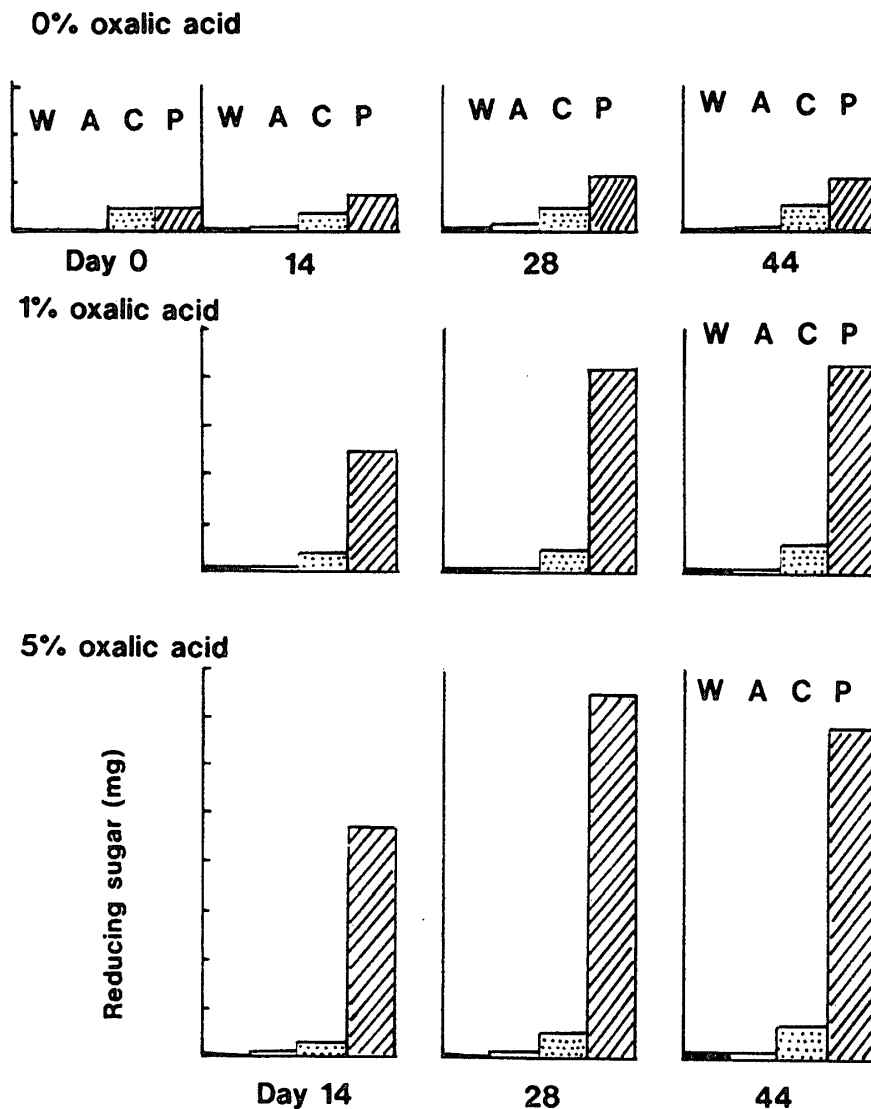


図2 木粉と各種セルロース試料に及ぼすシュウ酸溶液の加水分解効果
W, 燐酸溶液で処理した Walseth-セルロース; A, アビセルロース;
C, CM-セルロース; P, アカマツ木分粉

5. 白色腐朽菌のリグニン分解とシュウ酸

白色腐朽菌と褐色腐朽菌とを比較すると、両者は木材多糖を分解できるという点で差異はないが、前者はリグニンを分解できるが後者は分解できないという点で異なる。リグニン分解酵素系として古くからラッカーゼ、最近では、リグニネルオキシダーゼ(LiP)とマンガネルオキシダーゼ(MnP)が注目されている。そこで筆者は、白色腐朽菌のシュウ酸を集積しない生理学的特徴とリグニン分解酵素系との間に何か関係があるのではないかと考えて研究を開始した。

その結果、実際に LiP 系と MnP 系は、ともにシュウ酸を CO_2 に分解するポテンシャルをもつことを初めて証明することができた。しかし、ラッカーゼはそのような分解活性を示さなかった³⁴⁾。最近、他の研究者によっても白色腐朽菌のリグニン分解酵素系との関連で新しいシュウ酸の役割が報告されるようになった。

5.1 リグニンペルオキシダーゼ(LiP)系におけるシュウ酸の役割

LiP 活性がシュウ酸分解活性を発揮するにはベラトリルアルコール (VA) の共存が必須であるが、興味深いことに LiP 活性、すなわち VA の酸化反応は、シュウ酸によって顕著に阻害されることが分かった¹⁹⁾。このことは、図3に示すようにシュウ酸はベラトリルカチオンラジカル中間体 (VA⁺) を還元して再び基質レベルに戻し、シュウ酸は VA⁺ によって一電子酸化された後フォーメイトラジカルを生成しつつ炭酸ガスへと分解されていくものと推定される。シュウ酸による LiP 活性の阻害型式は典型的な非競争型であり、阻害機構の解析の結果、アロステリック阻害の関係式とは異なった新しい非競争型の関係式が導かれた (Ki値は約 2mM)²⁰⁾。そこで、LiP 酵素反応系に VA の代わりに他の非フェノール性またはフェノール性のリグニンモデル化合物を加えるとシュウ酸の分解あるいはそれらのリグニンモデル基質の酸化反応がどのような影響を受けるかを検討した。その結果、非フェノール性基質の場合は、シュウ酸の分解が観察されると同時にそれらのモデル基質の酸化は非競争的に阻害された²¹⁾。しかし、図4に示すように、フェノール性基質の場合、基質は酸化されたが、シュウ酸の分解は観察されなかった。興味あることは、DHP (人工リグニン) はフェノール性基質よりも効率よくシュウ酸を分解することに寄与したことである。

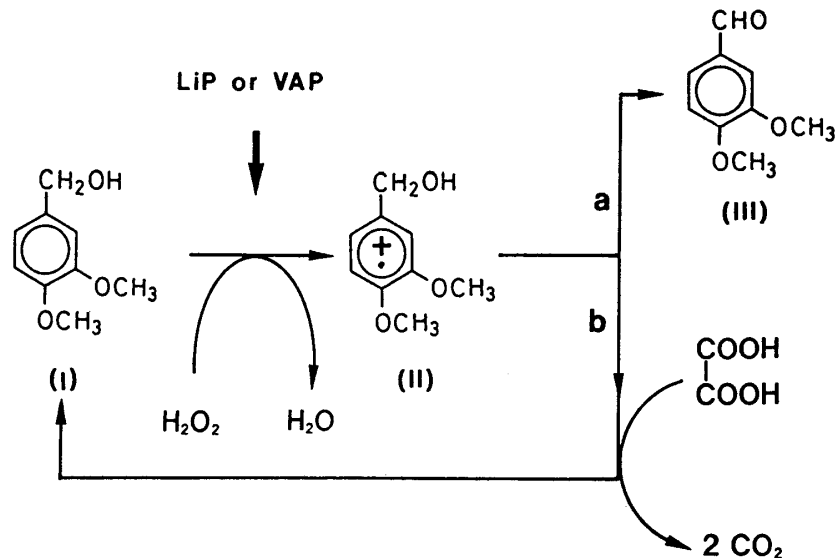


図3 リグニン分解酵素系によるシュウ酸分解機構¹⁹⁾
VAカチオンラジカル (II) はシュウ酸の存在下ではシュウ酸をCO₂に分解してVA (I) へと還元される。

DHP は LiP 系に VA が共存すると分解を受けやすいことは梅澤らによって報告されており²²⁾、ごく最近、リグニン分解酵素系にやはり VA が共存することによって DHP を効率よく低分子化することが、Hammel らによって、確立された²³⁾。従って、シュウ酸とリグニンは VA カチオンラジカル の共通の還元物質として作用し、三者が共存する天然の反応系では、リグニンとシュウ酸の分解が互いに拮抗し合うことによって、リグニン分解がシュウ酸によって制御されるものと推定される (図4)。

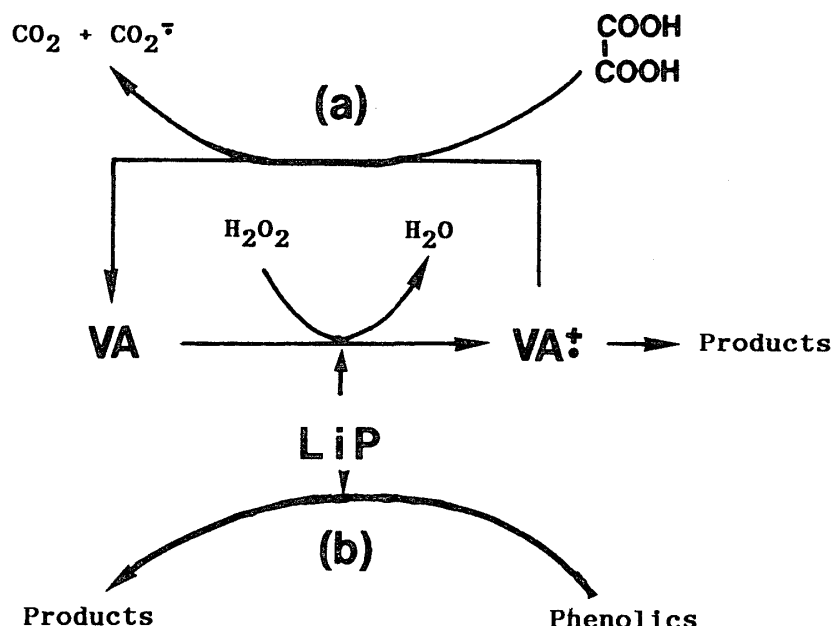


図4 LiP/VA/H₂O₂ 反応におけるシュウ酸とフェノール化合物との競合物との競合的關係

VAなどの非フェノール性化合物はシュウ酸またはフェノール性化合物が存在すると、VAカチオンラジカルは、優先的にシュウ酸またはフェノール化合物を酸化分解し、LiP 活性は空まわりすることになる。シュウ酸はC-C結合開裂を受けね CO₂ とフォーメートラジカル（炭酸アニオンラジカル）を生成するが最終的には酸素分子を還元して CO₂ を生成する。

このようなシュウ酸による LiP の非競争阻害は Popp らによっても報告され^{24a)}、セロビオースキノン酸化還元酵素 (CBQ) による LiP の非競争阻害は、鮫島らによっても報告されている^{24b)}。Popp らは、シュウ酸分解の際、発生する炭酸アニオン（フォーメイト）ラジカルは、分子状の酸素を還元してスーパーオキシドアニオンラジカルを生成し、このラジカルがさらに共存する Mn²⁺ を酸化して Mn³⁺ を生成する機構を提案している。続いて Barr らは、Fe³⁺ が共存する場合、LiP 系で生成したフォーメイトラジカルは Haber-Weiss 反応を成立させ、OH ラジカルを発生する機構を提案している²⁵⁾。しかし、Barr らは、シュウ酸が OH ラジカル消去剤としても作用することを示している。したがって、自然界の白色腐朽過程でシュウ酸が共存する場合、OH ラジカルが発生し、リグニンを攻撃する可能性は少ないと考えられる。LiP 酵素系に VA とシュウ酸が共存することは、白色腐朽過程のリグニン分解を説明するための新しい反応モデルといえる。いずれにせよ、LiP 反応系での ベラトリルアルコールはメディエータとして機能しており、このコンセプトは Harvey²⁶⁾ らによって最初に提案されたが、リグニン以外にシュウ酸のような生理的代謝物の分解系として機能していることが解明されたことは興味深い。

5.2 マンガンペルオキシダーゼ系におけるシュウ酸の役割

白色腐朽材にはしばしば二酸化マンガン (MnO₂) の堆積が観察されるので、リグニン分解との関係が Blanchette によって示唆された^{27a, b)}。MnP は *Phanerochaete chrysosporium* から桑原²⁸⁾ によって最初に発見され、Gold ら²⁹⁾ によって詳しく研究されてきた。シュウ酸が Mn (Ⅲ) によって酸化されること^{30a, b)}、及び植物起源のペルオキシダーゼも Mn イオンの共存下でシュウ酸を分解すること³¹⁾ を考慮すれば、白色腐朽菌の MnP 酵素系が、シュウ酸を分解しても特に驚くに当たらないかも知れない。

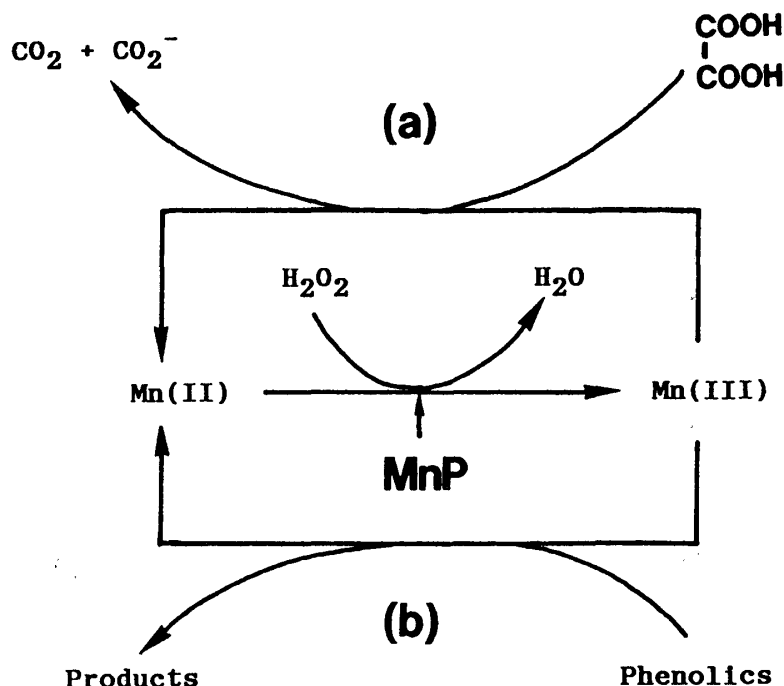


図5 MnP/Mn/H₂O₂ 反応系におけるシュウ酸とフェノールとの競合的關係
Mn(III)は、シュウ酸を酸化分解するが、フェノール性化合物が共存すると後者を優先的に酸化する。

筆者らは実際、LiP 反応系と同じように、MnP/Mn/H₂O₂ 反応系に ¹⁴C-シュウ酸を加えると放射性の炭酸ガスが生成することを認め、シュウ酸によって Mn³⁺ の生成が阻害されることを報告した³²⁾。Mn³⁺ 生成の阻害機構は同じく非競争阻害のパターンが得られた。(K_i 値は約 2 mM)。シュウ酸を含む MnP/Mn/H₂O₂ 系にバニリン酸などのフェノール性基質を添加すると、フェノール性基質が優先的に酸化されて、シュウ酸はほとんど分解されないことが分かった。Mn³⁺ 生成のシュウ酸とフェノール性基質の阻害機構の模式を図5に示した。Mn³⁺ はシュウ酸あるいはフェノール性化合物によって還元されて、Mn²⁺ に戻されるが、フェノールが存在しないとき、シュウ酸は一電子酸化されてフォーメイトラジカルを生成するが、これはさらに酸素分子と反応してスーパーオキシドアニオンラジカルを生成すると思われる。この点では、LiP の場合と同様にシュウ酸は酸素分子の活性化に寄与している。シュウ酸と低分子フェノール性物質が反応系から消失したときにのみリグニン高分子は酸化され始めることが予想される。最近 Tien らはシュウ酸が高濃度では MnP を阻害し、低濃度では MnP を活性化することを報告した^{33a)}。従って、シュウ酸の濃度がリグニン分解にも微妙な役割を演じていることは確かである。

図6にリグニン分解酵素活性をもつ培養後6日目の *Phanerochaete chrysosporium* の培養液 (21 μM Mn) 中に 6 mM の放射性シュウ酸を添加すると速やかに CO₂ に分解 (無機化) されることが証明された。このシュウ酸のミネラルゼーションは LiP と MnP の作用によるものと思われる。さらに、¹⁴C-DHP (人工リグニン) と非放射性的シュウ酸を加えるとリグニンの分解は抑制されることが証明され、³⁴⁾ この実験結果は既に述べた in vitro の結果と一致している。しかし、高濃度 (740 μM) の Mn イオンが存在する場合、シュウ酸などの有機酸キレーターが LiP 生成そのものを阻害してしまうことが報告されており³³⁾、Mn 濃度と有機酸の共同作用にも関心が寄せられている。

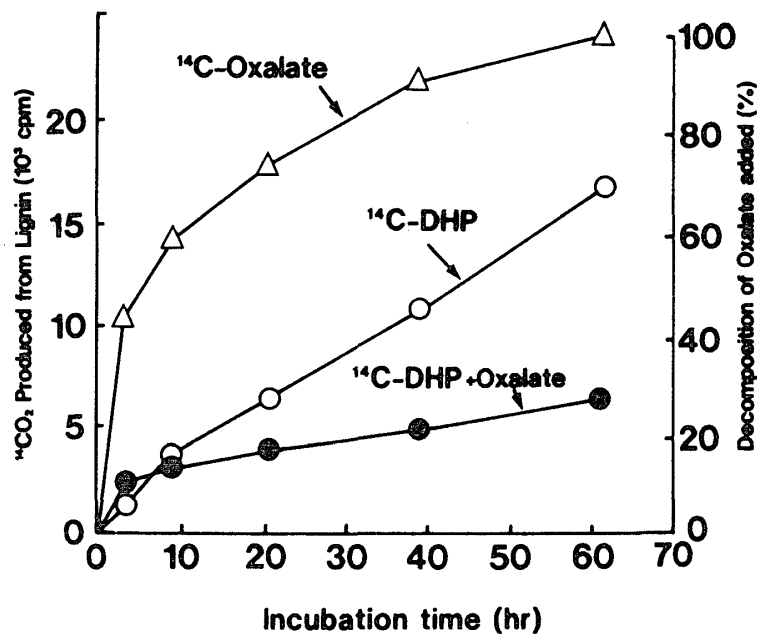


図6 リグニンノ完全分解を抑制するシュウ酸の阻害効果³⁴⁾
 リグニン分解活性を有する *Phanerochaete chrysosporium*
 にシュウ酸を添加すると、DHP の CO₂ への分解は抑制される。

以上、シュウ酸はリグニン生分解において少なくとも次の3つの役割をもっている。①比較的高い濃度でのシュウ酸は LiP や MnP 活性を抑制するので白色腐朽過程で、リグニン分解を制御していると示唆される。②シュウ酸は酸素活性化のための電子供与体となる。③適度に低能度のシュウ酸は MnP 活性を高めている、などの点で、リグニン分解活性の発現と調節に寄与している可能性は高い。

翻って、LiP はベラトリルアルコールペルオキシダーゼとして機能しておりリグニンとシュウ酸の分解に重要な役割を果たしていると思えることもできる。

6. シュウ酸合成酵素系

生物界でのシュウ酸の生合成経路については、一般的にはオキザロ酢酸などのC4代謝物、グリオキシル酸などのC2代謝物からのものが主要であろうが、アスכולビン酸^{34a)}、グリオキシル酸とシステインとの抱合体を経るもの、単に、酵素の基質特異性の広さのために別の酵素に利用されることによって生成する経路などがある。

Vitucci と Nord はシュウ酸はリンゴ酸または酢酸から生成すると推定していたが、シュウ酸生成酵素に関する研究はほとんど進展していなかった^{34b)}。しかし最近、シュウ酸を生成する酵素としてオキザロアセターゼとグリオキシル酸酸化酵素が 木材腐朽菌 (オオウズラタケ、カワラタケ、*P. chrysosporium* など) から、赤松らによって初めて抽出された^{35-38b)}。

6.1 オキザロアセターゼ

オキザロアセターゼ (EC.3.7.1.1) はオキザロ酢酸を加水分解してシュウ酸と酢酸を生成する反応を触媒する (図7)。本酵素は軟腐朽菌の仲間である *Aspergillus niger* からアルカリ誘導される菌体内酵素画分として早石ら³⁹⁾によって抽出された。その後、Lenz ら⁴⁰⁾は約50倍に精製して立体化学的反応機構を解析した。植物体のオキザロアセターゼは Beevers ら⁴¹⁾によって研究されているがいずれも均一な酵素標品に

なるまで精製されていない。動物やバクテリアについての研究例はない。

オオウズラタケのオキザロアセターゼは、図8に示すようにアルカリ誘導処理をしてもしなくても構成的に発現し、本酵素の活性は培養3日後に最高となりその後減少した。しかしシュウ酸の生成は増加し続けているので、もう一つのシュウ酸生成酵素の存在が示唆された³⁷⁾。粗酵素標品はオキザロ酢酸とグリオキシル酸の両方を利用してシュウ酸を生成することから、グリオキシル酸酸化酵素またはグリオキシル酸デヒドロゲナーゼ活性も粗酵素標品に含まれていると推定された。白色腐朽菌であるカワラタケや *P. chrysosporium* にもオキザロアセターゼ活性が存在することも最近の研究で明らかになった³⁸⁾。本酵素は不安定であり生成には成功していないので今後さらに酵素の安定化あるいは最適の酵素源を検討する必要がある。

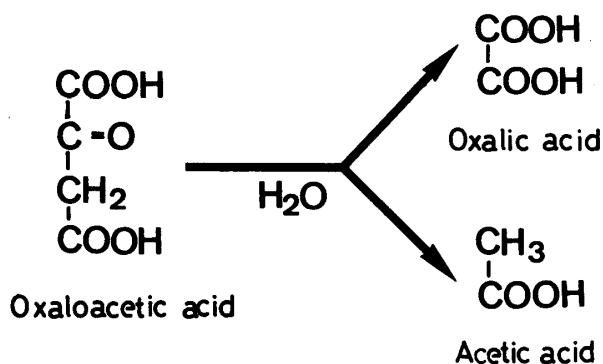


図7 オキザロアセターゼによるシュウ酸の生成

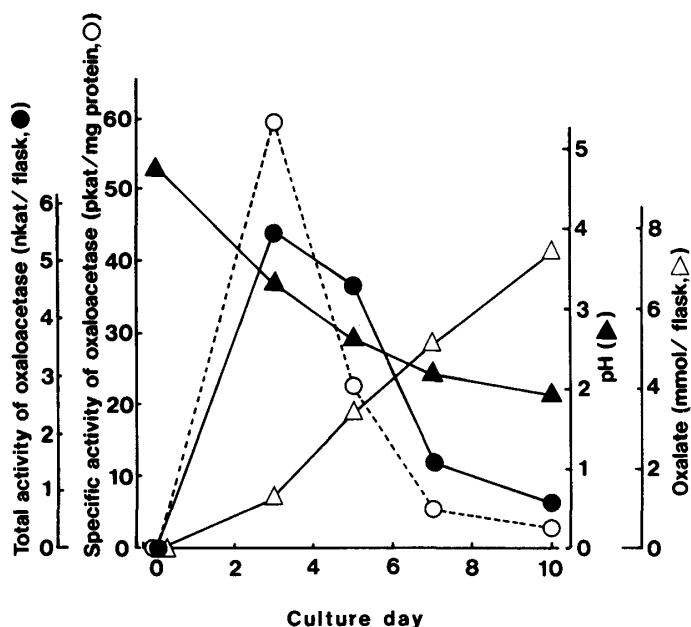


図8 オオウズラタケ培養期間におけるオキザロアセターゼの活性変動³⁷⁾
○オキザロアセターゼ (全活性) ; ●オキザロアセターゼ (比活性)
△シュウ酸生成量 ; ▲pH 変化

6.2 グリオキシル酸酸化酵素

グリオキシル酸酸化酵素はシュウ酸生成に関係する酵素というよりむしろアミノ酸合成などの一次代謝の調節酵素として古くから注目されてきた。グリオキシル酸回路と TCA サイクルとの連結点に位置しており重要な酵素である。これまでに、シュウ酸を生成する酵素として *Pseudomonas oxalaticus* のグリオキシル酸デヒドロゲナーゼ (CoA-acylating) (EC.1.2.1.17)⁴²⁾, *Sclerotium rolfsii* のグリオキシル酸デヒドロゲナーゼ (EC. ?)⁴³⁾ および *Acetobacter dioxyaceticus* の膜結合型グリオキシル酸酸化酵素 (EC.1.2.3.5; ?)⁴⁴⁾ が報告されている。植物のグリコール酸酸化酵素はグリコール酸のほかにグリオキシル酸をも酸化してシュウ酸を生成することが報告されている^{45 a)}。それ以来、本酵素系がこれら二つの反応を触媒していると信じられてきたが、最近、グリコール酸オキシダーゼが二つの酵素蛋白複合体から構成されている可能性が高いということが、Havir によって示唆された^{45 b)}。生物界に広く分布する NAD-依存型および酵母の cytochrome c- 依存型乳酸デヒドロゲナーゼ類は、グリオキシル酸にも作用してシュウ酸を生成する^{45 c)}。また哺乳動物の場合、グリオキシル酸とシステインとの抱合体がアミノオキシダーゼに因って酸化された後シュウ酸を生成する事も知られている^{45 d)}。しかし白色、褐色、および軟腐朽菌のいずれについてもグリオキシル酸酸化酵素の研究は行われていない。

そこで、オオウズラタケのグリオキシル酸酸化酵素活性について検討した。図9に示すように、本酵素はオキサロアセターゼ活性よりも遅れて発現してくることが分かった。オオウズラタケの培養期間中酵素活性とシュウ酸の蓄積量には相関性が認められている。本酵素もアルカリ誘導処理をしてもしなくても酵素活性を得ることができるが、抽出前にアルカリ処理をした方が、より良好な結果が得られた。部分精製した酵素標品を用いて得られた実験結果から、本酵素はグリオキシル酸を酸化してシュウ酸を生成するが、分子状酸素が電子受容体としてはたらく過酸化水素が生成するものと推定される (図10)⁴⁷⁾。

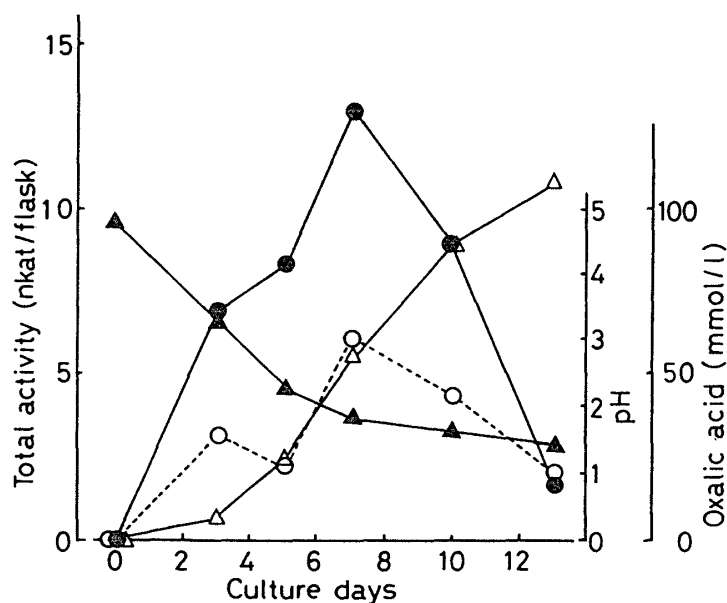
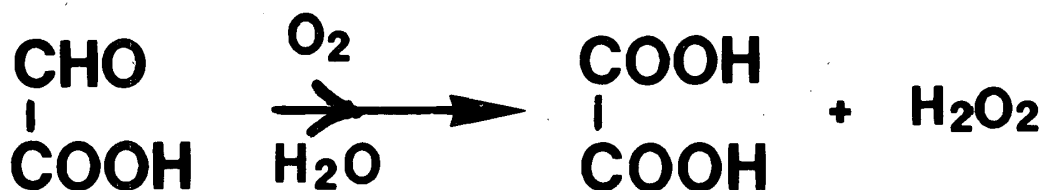


図9 オオウズラタケ培養期間におけるグリオキシル酸酸化酵素の活性化酵素の活性変動

- グリオキシル酸酸化酵素 (シュウ酸キット法) ;
- グリオキシル酸酸化酵素 (DCIP法) ;
- △シュウ酸生成量 ; ▲pH 変化



Glyoxylate oxidase

図10 グリオキシル酸酸化酵素によるシュウ酸の生成

類似の酵素について文献を精査してみると、膜結合型電子伝達成分と共役したグリオキシル酸酸化酵素に関する研究は、笠井らのものが酵素ハンドブックに紹介してあるのみである⁴⁴⁾。しかし紹介者の誤解のためオリジナル文献⁴⁵⁾とは異質の反応が記載されている。その後の文献(1964年)によれば笠井らは *A. dioxyacetonicus* のグリオキシル酸酸化酵素がシュウ酸を生成する時、電子受容体として酸素を利用するけれども、その生成物は過酸化水素ではなく水分子であると報告している⁴⁶⁾。従って過酸化水素を副成するグリオキシル酸酸化酵素は未報告であり、オオウズラタケのグリオキシル酸酸化酵素は、既報のいずれとも異なった新規な酵素である可能性が高い⁴⁷⁾。

興味あることに、本酵素は生成物であるシュウ酸によって強く競争的に阻害されることが判明した (Ki; 10-4M)。細胞内でのシュウ酸の生成は、シュウ酸自身によってフィードバック機構で調節されていると示唆される。一方、白色腐朽菌 (*P. chrysosporium*) はグリオキシル酸回路を導くイソクエン酸リアーゼを含むことが、Buswell⁴⁸⁾ によって最近報告されたので、褐色腐朽菌にもグリオキシル酸回路が存在しているか否か興味深い。

シュウ酸が腐朽木材中に生成すれば、pH の低下にともなって先ずヘミセルローズが、続いてセルローズが、酸によってあるいはフェントン酸化によって攻撃を受け、さらにセルラーゼなどの酵素系も活発に作用し、腐朽は加速度的に促進されることは想像に難くない。したがって、図11に示すように、木材の初期腐朽では、先ずシュウ酸の生成を何らかの方法で阻止することが重要であろう。

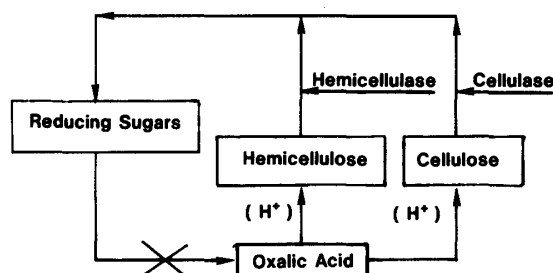


図11 褐色腐朽防止におけるシュウ酸生成阻害の重要性¹⁶⁾
初期腐朽の段階で利用され易い還元糖からシュウ酸が生成すると、これが酸触媒として働き、木質多糖を加水分解するのみならず、適度のpHの下ではセルラーゼやヘミセルラーゼの作用を促進する可能性が高い。

6.3 シュウ酸分解酵素系

これまでの研究で知られているシュウ酸脱炭酸酵素系には、①シュウ酸脱炭酸酵素 (EC 4.1.1.2), ② シュウ酸オキシダーゼ (EC.1.2.3.4), ③ LiP/VA/H₂O₂ ④ MnP/Mn/H₂O₂ が挙げられる。

シュウ酸脱炭酸酵素の研究の歴史は古く、本酵素は先ずエノキタケから島菌⁴⁹⁾によって発見されており、その後、カビの仲間である *Aspergillus niger* と *Myrothecium verrucaria* から分離抽出されている^{49a)}。白色腐朽菌には存在するが、褐色腐朽菌には存在しないとされている。しかし、褐色腐朽菌でも、*Gloeophyllum trabeum* のようにシュウ酸を良く分解して集積しない菌類も報告されており、⁵⁰⁾ この褐色腐朽菌にはシュウ酸脱炭酸酵素が含まれているかも知れない。シュウ酸オキシダーゼは土壤微生物⁵¹⁾、苔類および麦芽から抽出されているが、腐朽菌からは見つかっていない。

筆者らは、新しいタイプのシュウ酸分解酵素系を見いだしたことについては既に述べた。即ち、*P. chrysosporium* から分離されたリグニン分解酵素系 (LiP/VA/H₂O₂ 及び MnP/Mn/H₂O₂) は、シュウ酸を二酸化炭素に分解する³⁴⁾。しかし、*P. chrysosporium* にシュウ酸脱炭酸酵素が存在しているか否かまだ検証されていないので、もし欠落していることが立証されれば、リグニン分解酵素系と呼称されている LiP はペラトリルアルコールペルオキシダーゼと呼ぶ方が適切かも知れない。シュウ酸は「見かけ上」LiP や MnP 活性を阻害するので、シュウ酸のレベルが上がれば、リグニン分解は抑制されることになり、白色腐朽菌がリグニンを効率良く分解しようとするれば、そのレベルを下げる必要がある。シュウ酸脱炭酸酵素とリグニン分解酵素系 (LiP/VA/H₂O₂, および MnP/M/H₂O₂) は、それぞれ細胞の内と外で、シュウ酸のレベルを下げるために重要な役割を果たしていると思われる。

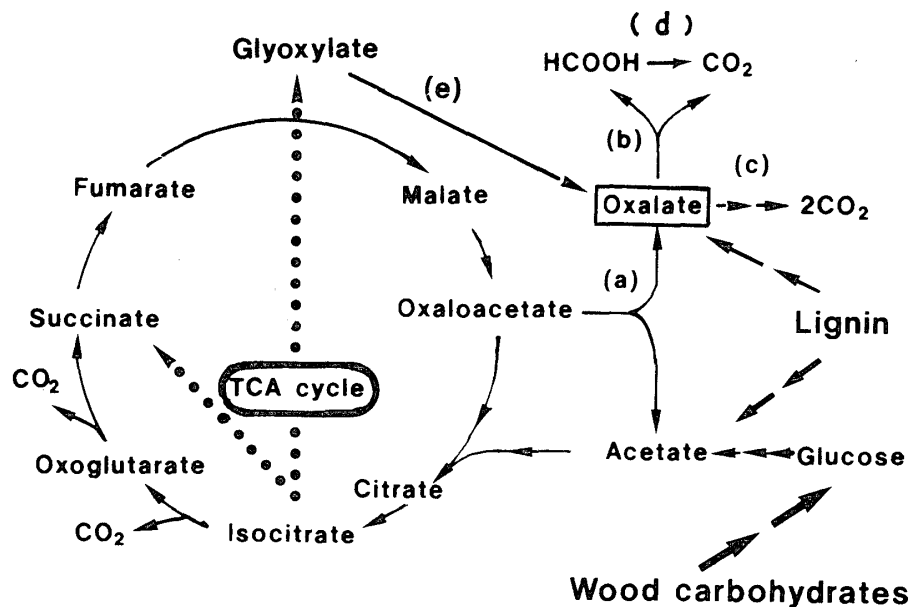


図12 白色腐朽におけるシュウ酸経路と TCA サイクルとの連繋プレー

リグニンと木質多糖は TCA サイクル系で無機化されるが、シュウ酸代謝酵素系によっても無機化される。反応経路, (a), (b), (c), (d) および (e) はそれぞれ、オキサロアセターゼ、シュウ酸脱炭酸酵素、LiP と MnP 酵素系、ギ酸脱炭酸酵素およびグリオキシル酸化酵素によって触媒される。

以上、白色腐朽菌の場合、シュウ酸の生成と分解の代謝経路は TCA サイクルとグリオキシル酸回路と連繋してセルロースとリグニンの生分解、特にその無機化において重要な働きをしていると推定される。図12に、白色腐朽菌によって木材多糖とリグニンが二酸化炭素にまで無機化される時の代謝経路を示した⁵²⁾。リグニンの芳香核炭素は環開裂の後、一部シュウ酸を経て分解される⁵³⁾。木材中の大過剰な炭素源はほとんど TCA サイクルを経て無機化されると推定されるが、シュウ酸経路もその無機化に大きな役割を担っていると思われる。しかし褐色腐朽菌の場合、リグニン分解酵素系とシュウ酸脱炭酸酵素系を含まないのでやや単純な代謝経路になるであろう。

7. お わ り に

白色腐朽菌と褐色腐朽菌のシュウ酸代謝とリグニンとセルロース分解に関与する酵素系などを比較しながら、木材腐朽機構を考察した。図13に示すように、N-free metabolite (シュウ酸) は木材腐朽の生化学において中心的な位置を占めており、その生成と分解は過酸化水素の生成と分解とにからんで白色と褐色腐朽におけるリグニンや多糖類の分解とは密接に関係し合っていることが示唆される。従って、このような生化学的観点から特異的な酵素阻害剤をスクリーンして、その中から環境を汚染しない「地球にやさしい」木材防腐剤を開発することも大切ではなかろうかと考える。

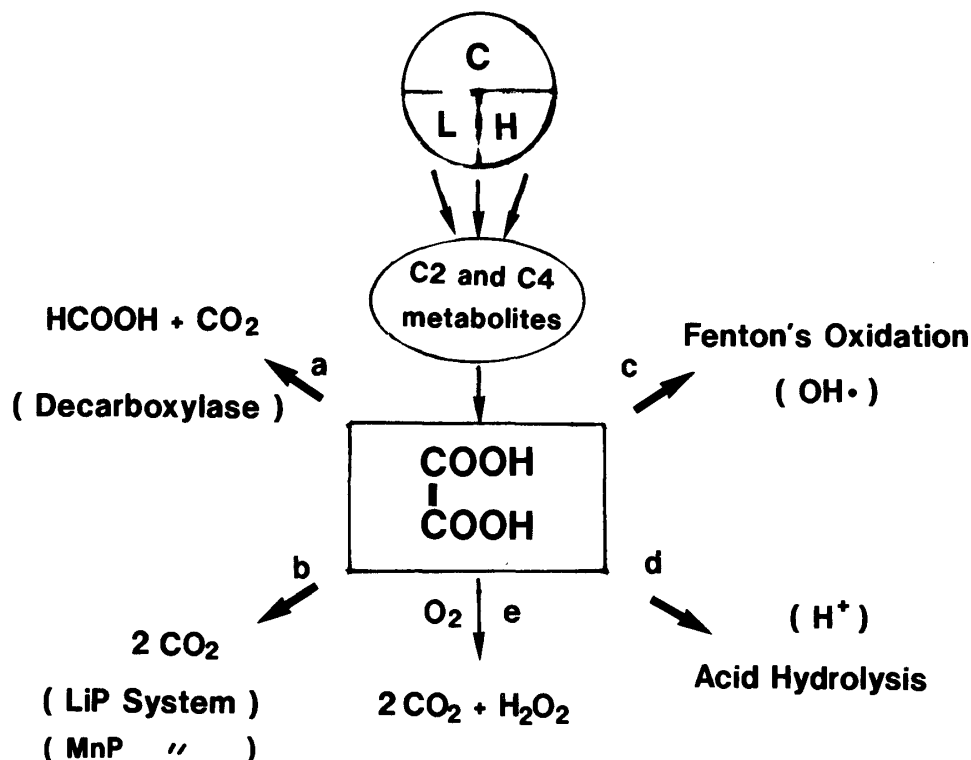


図13 白色腐朽と褐色腐朽過程におけるシュウ酸の役割

木質高分子のセルロース (C)、ヘミセルロース (H) およびリグニン (L) はグリオキシル酸 (C 2) とオキザロ酢酸 (C 4) などを経て、シュウ酸を生成する。シュウ酸は白色腐朽過程ではおもに脱炭酸的分解 (a, b) を受け、褐色腐朽過程ではフェントン酸化 (c)、酸加水分解反応 (d) あるいは自動酸化による過酸化水素 (e) の発生などに寄与する。

一方、高 C/N 比の基質を分解する腐朽菌キノコが営むシュウ酸代謝系の役割は、効率よく CO₂ を森林植物に供給することの他に、木材中に微量に存在する N 栄養素を獲得する生化学的手段であると推定される。逆に、森林植物は絶え間ない CO₂ の供給を受けながらかつ微量の N 栄養素をリサイクリング利用しながら高 C/N 比の基質、即ち木質の生産を営んでいると考えられる。^{54,55)}

翻って、低 C/N 比の基質（タンパク質）を好む動物などは尿素（CO(NH₂)₂）の形で、むしろ N を排泄していることは当然といえは当然のことであろう。窒素欠乏というアンバランスな栄養環境下に置かれた生物種に特有な二次代謝系はシュウ酸代謝系の他にも多くあり、N-free metabolite であるエタノールや他の有機酸発酵系も例外ではない。このような二次代謝物の生合成経路は、元来人間に利用されるために進化発展してきたものではなく、栄養飢餓という逆境を克服し、生き残るために発達してきたものとするのが妥当である。従って、キノコの場合にも人知を越えた極秘の生化学的メカニズムが作動していると推察される。この点で、木材腐朽菌キノコのシュウ酸代謝を制御する酵素活性と遺伝子の発現と調節の機構を解明することは、興味深かつ重要な研究課題である。この分野はまだ未開拓であり生化学制御に関する研究が進展すれば、応用研究も進展することが期待される。

謝 辞

本総説の調査研究の一部は文部省科学研究費補助金（総合研究（A）代表・佐伯 浩 京都大学農学部教授）によって行われた。

文 献

- 1 a) A.HODGKINSON,: "Oxalic Acid in Biology and Medicine", Academic Press, New York, pp.1-325 (1977)
- 1 b) 佐伯浩: "走査電子顕微鏡図説・木材の構造", 日本技術協会, pp.1-218 (1982)
- 1 c) TANIGUCHI et al.: *Mokuzai Gakkaishi*, 33, 1 (1987)
- 1 d) A.MOLULY, D.RUMEAU, M.T.T.TUGAYE,: *Plant Science*, 85, 5 (1992)
- 1 e) J.J.JURINAK, L.M.DUDLEY, M.F.ALLEN, W.G.KNIGHT,: *Soil Science*, 142, 255 (1986)
- 2) E.B.COWLING, W.MERILL,: *Can. J.Botany*, 44, 1539 (1966)
- 3 a) 高橋旨象著: "きのこと木材", 築地書館, pp.141 (1989)
- 3 b) 高橋旨象: 木材研究・資料, No.22, 19 (1986)
- 4) 坂口謹一郎, 他, 日本農芸化学会誌, 33, 393 (1931)
- 5) 島蘭平雄, 田窪健次郎: 林業試験場研究報告, No.53, 117 (1952)
- 6) S.TAKAO, : *Appl. Microbiol.*, 13, 732 (1965).
- 7) M.V.DUTTON, C.S.EVANS, P.T.ATKEY, : D.A.WOOD, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 5 (1993)
- 8) E.B.COWLING,: *US Department Agri. Techn. Bull. No. 1258*, pp.1-79 (1961)
- 9) M.ISHIHARA, K.SHIMIZU,: *Mokuzai Gakkaishi*, 30, 79 (1984)
- 10) G.HALLIWELL,: *Biochem. J.*, 95, 35 (1965)
- 11) J.W.KOENIGS,: *Wood and Fiber*, 6, 66 (1974)
- 12) C.J.SCHMIDT, B.K.WHITTEN, D.D.NICHOLAS,: *Am. Wood Preserv. Assoc.*, 77, 157 (1981)
- 13) S.M.KREMER, P.M.WOOD,: *Eur. J.Biochem.*, 205, 133 (1992)
- 13a) 田中憲文, 服部武文, 島田幹夫: 第43回日本木材学会大会研究発表要旨集(盛岡), p.363 (1993)
- 13b) M.SHIMADA, Y.AKAMATSU, A.OHTA,: M.TAKAHASHI,: *Intern. Res. Group on Wood Preserv.*, Document No.IRG/WP/1472 (1991)
- 14) F.GREEN, III., M.J.LARSEN, J.E.WINANDY, T.L.HIGHLEY,: *Material und Organismen*, 26, 191 (1992)
- 15) F.GREEN, III., J.M.HACKNEY, C.A.CLAUSEN, M.J.LARSEN, T.L.HIGHLEY,: *Intern. Res. Group on Wood Preserv.*, No. IRG/WP/93-10028 (1993)
- 16) L.F.HAWLEY, W.G.CAMPBELL,: *Industrial and Engineering Chemistry*, 19, 742 (1927)

- 17) M.W.JENNISON,: Final Report, ONR Research Contract NR 132-159. Syracuse Univ., Syracuse, N.Y. (1952)
- 18a) T.HIGLEY,: *Wood and Fiber*, 5, 50 (1973)
- 18b) T.NILSSON,: *Material und Organismen*, 9, 173 (1974)
- 19) Y.AKAMATSU, D.B.MA, T.HIGUCHI, M.SHIMADA,: *FEBS Lett.*, 269, 261 (1990)
- 20) D.B.MA, T.HATTORI, Y.AKAMATSU, M.ADACHI, M.SHIMADA,: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1378 (1992)
- 21) D.B.MA, T.HATTORI, Y.AKAMATSU, M.ADACHI, M.SHIMADA,: "Biotechnology in Pulp and Paper Industry", M.KUWAHARA and M.SHIMADA, eds. Uni Publisher, Tokyo, p.321 (1992)
- 22) T.UMEZAWA, T.HIGUCHI,: *Mokuzai Gakkaishi*, 35, 1014 (1989)
- 23) K.E.HAMMEL, K.E.JENSEN, Jr., M.D.MOZUCH, L.C.LANDUCCI, M.TIEN, E.A.PEASE,: *J. Biol. Chem.*, 268, 12274 (1993)
- 24a) J.L.POPP, B.KALYANARAMAN, T.K.KIRK,: *Biochemistry*, 29, 10579, (1990)
- 24b) M.SAMEJIMA, K.E.L.ERIKSSON,: *FEBS Lett.*, 292, 151 (1992)
- 25) D.P.BARR, M.M.SHAH, T.A.GROVER, S.D.AUST,: *Arch. Biochem. Biophys.*, 298, 480 (1992)
- 26) P.J.HARVEY, H.E.SCHOEMAKER, J.M.PALMER,: *FEBS Lett.*, 195, 242 (1986)
- 27a) R.E.BLANCHETTE,: *Phytopathol.*, 74, 725 (1984)
- 27b) R.E.BLANCHETTE,: *Ann. Re. Phytopathol.*, 29, 381 (1991)
- 28) M.KUWAHARA, J.K.GLENN, M.A.MORGAN, M.H.GOLD,: *FEBS Lett.*, 169, 247 (1984)
- 29) H.WARIISHI, K.VALLI, and M.H.GOLD,: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176, 269 (1991)
- 30a) H.F.LAUNERR,: *J. Am. Chem. Soc.*, 55, 865 (1933)
- 30b) H.TAUBE,: *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 1216 (1947)
- 31) R.H.KENTEN, P.J.E.MANN,: *Biochem. J.* 53, 498 (1953)
- 32) D.B.MA, T.HATTORI, Y.AKAMATSU, M.ADACHI, M.SHIMADA,: *Proceedings of 7th ISWPC*, Beijing, China, Vol.II, p.640 (1993)
- 33a) M.KUANG, M.TIEN,: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90, 1242 (1993)
- 33b) J.PEREZ, T.W.JEPPERIES,: *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2402 (1992)
- 34) 島田幹夫, 馬登波, 赤松やすみ, 樋口隆昌, 第35回リグニン討論会要旨集 (東京) pp.65-69 (1990)
- 34a) K.SAITO, F.A.LOEWUS,: *Phytochemistry*, 31, 3341 (1992)
- 34b) F.F.NORD, J.C.VITUCCI,: *Arch. Biochem.*, 14, 229 (1947)
- 35) Y.AKAMATSU, M.OHTA, M.TAKAHASHI, M.SHIMADA,: *Mokuzai Gakkaishi*, 37, 575 (1991)
- 36) Y.AKAMATSU, M.TAKAHASHI, M.SHIMADA, *ibid*, 38, 495 (1992)
- 37) Y.AKAMATSU, M.TAKAHASHI, M.SHIMADA,: *ibid*, 39, 352 (1993)
- 38a) Y.AKAMATSU, and M.SHIMADA,: *FEMS Symp. Lignin Biodegradation and Transformation*, J.C.Duarte, M.C.Ferreira, P.Ander, eds. (1993)
- 38b) Y.AKAMATSU,: *Mokuzai Gakkaishi*, 39, 860 (1993)
- 38c) Y.AKAMATSU, M.TAKAHASHI, M.SHIMADA,: *Wood Research*, No.79,1 (1993)
- 39) O.HAYAISHI, H.SHIMAZONO, M.KATAGIRI, Y.SAITO,: *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 5126 (1956)
- 40) H.LENZ, P.WUNDERWALT, H.EGGERER,: *Eur. J. Biochem.*, 65, 225 (1976)
- 41) C.C.CHANG, H.BEEVERS,: *Plant Physiol.*, 43, 1821 (1968)
- 42) J.R.QUAYLE, G.A.TAYLOR, *Biochem. J.*, 78, 611 (1961)
- 43) A.J.BALMFORTH, S.THOMPSON,: *Biochem. J.*: 218, 113 (1984)
- 44) 笠井崇, 他: *酵素化学シンポジウム*, 17, 218 (1962)
- 45) 八木国雄 "酵素ハンドブック," (田宮信雄, 丸尾文治監修) 朝倉書店, p.88 (1982)
- 45a) I.ZELITCH, S.OCHOA,: *J. Biol. Chem.*, 201, 707 (1953)
- 45b) E.A.HAVIR,: *Plant Physiol.*, 71, 874 (1983)
- 45c) V.SHARMA, P.O.SCHEWILLE,: *Biochemistry International*, 27, 431 (1992)
- 45d) G.A.HAMILTON,: *Adv. Enzymol.*, 57, 85 (1985)

- 46) 笠井他, 第16回酵素化学シンポジウム (予稿集) p.263 (1964)
- 47) 赤松やすみ, 島田幹夫: 第43回日本木材学会大会要旨集, (盛岡), p.364 (1993)
- 48) J.A.BUSWELL,: *FEMS Symp. on Lignin Biodegradation and Transformation* J.C.Duarte, P.Ander, M.C.Ferreira, eds. p.25 (1993)
- 49) H.SHIMAZONO, O.HAYAISHI,: *J. Biol. Chem.*, 227, 151 (1957)
- 49a) E.B.LILLEHOJ, F.G.SMITH,: *Arch. Biochem. Biophys.*: 105, 488 (1964)
- 50) E.ESPENJO, E.AGOSIN,: *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1980 (1991)
- 51) H.KOYAMA,: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 143 (1988)
- 52) M.SHIMADA, Y.AKAMATSU, D.B.MA, T.HATTORI,: *FEMS Symposium on Lignin Biodegradation and Transformation* Duarte, J.C., Ander, P., Ferreira, M.C. eds.p.111 (1993)
- 53) T.UMEZAWA, M.SHIMADA, T.HIGUCHI, K.KUSAI,: *FEBS Lett.*, 205, 287 (1986)
- 54) M.SHIMADA, T.HIGUCHI, "Wood and Cellulosic Chemistry" Hon,D.N.S., Shiraishi, N. eds. Marcel Dekker, New York, pp. 557-619 (1991)
- 55) M.SHIMADA, M.TAKAHASHI,: *ibid*, pp.621-663 (1991)