

きのこの代謝のひみつとその環境浄化への応用*

服部 武文**

1. はじめに

化石燃料に支えられ、人類はこれまで発展しました。しかし、負の遺産として、大気中の温室効果ガスの濃度が上昇しました。それに起因すると考えられる地球環境の変動は、日々の生活でも感じられるまでになりました。現在、さらなる環境悪化をくい止めるため、再生産可能であり、かつ、カーボンニュートラルなバイオマス資源のエネルギー源としての利用は一部実用化され、更なる有効利用をはかる研究が世界中で行われています。一方、農、鉱、工業は、難分解性の内分泌かく乱物質、重金属を土壌、河川、湖沼、海に分散させ、水質汚濁を引き起こしました。このように、人類は持続的な生存を図るために、多くの問題に直面しています。

演者の研究関連分野では、木材保存剤材に含まれる重金属による環境汚染のおそれが、指摘されています。1933年にS. Kamesanが見出した、クロム・銅・ひ素化合物は、日本では1963年日本工業規格(JIS)にクロム・銅・ひ素化合物系木材防腐剤(CCA)として制定されて以来、20世紀末まで木材保存剤の中核を成して来ましたが¹⁾。今日、日本では、CCA処理工場の排水中のひ素濃度の規準を満たすことが困難になり、CCAは生産されていませんが、遊器具、ベンチ等に用いられるエクステリア材としてCCA処理材が現在でも外国から輸入されています。

1997年の建設副産物適正処理推進要綱に従うと、CCA処理廃材は他の廃棄物と区別して取り扱い、施行計画などの策定時に、適切な処理先を確保する必要があると謳われています。すなわち、CCA処理廃材を分別解体し、分別処理する事が法制度の下求められています。しかし、実質的に分別回収は難しく、具体的な処理方法が法律上定められていない事が、問題点としてあげられます。すなわち、現状は、分別回収がほとんど行われておらず、他の未処理廃材と共に焼却処理されているものもあります。或いはまた、どのように処理されているか不明の部分もあります。CCA処理された廃材の発生量は、研究者により見積もられる量は異なりますが、日本では住宅解体材から年間約20万立米、一方、米国では、その数十倍多い量が発生すると見積もられています。さらに、世界的に今後50年間はその処理廃材量は増加するとも考えられています。実際、京都市ごみ清掃工場の廃木材一時保管場所から採取されたCCA処理廃木材には、クロム750-1,300mg/kg、銅340-550 mg/kg、ひ素340-820 mg/kg含有されていたと報告されています²⁾。従って、適切な処理方法の開発は急務となっています。

そこで、現在、*分別処理としてCCA処理廃材から、CCAを回収する技術が精力的に研究されています。例えば、クロム・銅・ひ素の抽出に、無機酸、有機酸、超臨界二酸化炭素を用いる方法が実験室レベルで検討されています。それらに対して、バクテリア、真菌類、またはその培養液を用いた、生物学的なCCAの回収もしくは変換、すなわちバイオレメディエーションの範疇に入る処理も試みられています³⁾。

この生物学的な処理では、CCAあるいは他の銅系木材防腐剤に耐性を示すある種の木材腐朽菌が注目されています。この点に関連し、演者らは銅耐性を示すJISの木材腐朽試験菌である褐色腐朽菌オオウズラタケ(*Fomitopsis palustris* (Berkely et Curtis Murill))の炭素代謝機構をこれまで解明してきました。

本稿では、銅耐性菌オオウズラタケの炭素代謝機構の特長、すなわち、他の生物とは異なる「きのこの代謝のひみつ」をまとめます。次に、その力を応用し、保存処理木材廃材の処理、重金属捕集を含む「環

* 2008年4月9日作成. 第4回生存圏研究所公開講演会(2007年10月20日)における講演要旨に加筆・変更を行ったものである。

**〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所森林代謝機能化学分野. E-mail: thattori@rishi.kyoto-u.ac.jp

境浄化への応用」の可能性を述べます。

2. 木材腐朽菌オオウズラタケは銅耐性菌の1つである

木材腐朽菌には、我々が食すシイタケ、ナメコ等きのこの仲間が含まれます。木材細胞壁の主要化学成分であるセルロース、ヘミセルロースを炭素源にして生育する木材腐朽菌は、芳香族高分子化合物であるリグニンを部分的に変性するにとどめる褐色腐朽菌と、リグニンを二酸化炭素、水にまで分解する白色腐朽菌に主に分けられます。腐朽残渣は、土壤生物による多くの変化を受けた後、腐植として森林土壌を形成します。すなわち、木材腐朽菌は、豊かな森林形成、ひいては、地球の炭素循環に大きな役割を果たしています。

一方、木材腐朽菌のいくつかは、居住圏において建造物の構造部材を腐朽し、その力学的強度を著しく損なわせる害菌としても位置づけられます。そこで、木材腐朽菌等による腐朽を防止するために、前述のCCA等、銅を有効成分の1つとする木材防腐剤が多年に渡り使用されてきました。

しかし、これらにより処理された木材からも、ある種の木材腐朽菌が繰り返し単離され、この観察から、*Poria* 属、他、特異的な木材腐朽菌が銅耐性を示すと報告されてきました⁴⁾。

その中で、演者らの研究対象菌であるオオウズラタケは、銅耐性菌である事が報告されています。例えば、Greenらはクエン酸銅で防腐処理した southern yellow pine の腐朽試験を行い、銅耐性菌としてオオウズラタケを含む6属の褐色腐朽菌を報告しています⁵⁾。さらに、Hastrupらは、クエン酸銅、alkaline copper quaternary-type D (ACQ-D), *N, N*-naphthaloylhydroxylamine (NHA)で防腐処理した southern yellow pine をオオウズラタケは、処理をものともせず腐朽した事を報告しています⁶⁾。また、岩本らは、アゼライン酸溶液とアゼライン酸銅溶液処理したスギ辺材を、オオウズラタケは16-40%程度重量を減少するほど腐朽し、銅耐性菌である事を認めています⁷⁾。さらに、鈴木らはオオウズラタケによるベイツガの防腐では、CCA1号銅成分の最小換算吸収量で15.24kg/m³以上必要である事を報告しています⁸⁾。

3. シュウ酸は銅耐性をひきおこす

これらの菌の銅耐性機構には、菌が分泌するシュウ酸が重要な働きをする事が提案されています。まず、木材腐朽におけるシュウ酸の役割に関しては、木材腐朽菌が分泌するシュウ酸は、酵素、ラジカル活性種によるセルロース、ヘミセルロース、リグニンの分解を多面的に支えています⁹⁾。シュウ酸は白色腐朽過程では、リグニン分解酵素の活性を維持させる働きが提案されています。また、褐色腐朽過程では多糖類、リグニン-炭水化物複合体の酸加水分解を触媒します。さらに、濃度に応じフェントン反応を促進、又は、阻害すると提案されています¹⁰⁾。また、白色・褐色腐朽菌各々に特異的な生理学的特長として、褐色腐朽菌は多量のシュウ酸を蓄積するが白色腐朽菌は少量しか蓄積しない事があげられます。一方、銅耐性機構としては、これら銅耐性菌が分泌するシュウ酸が、銅を水不溶性のシュウ酸銅に変換する事により、菌糸への吸収を防止し菌糸に無害な状態にすることが、提案されてきています。文献には当たれなかったが、古くは、Rabanus は^{11), 12)}硫酸銅を含む寒天培地で *P. incrassata*, *P. vaporaria* を培養すると、シュウ酸銅が沈殿する事を観察し、そこから可溶性の硫酸銅が不溶性のシュウ酸銅に変換される事により、無毒化され、菌が耐性を付与されているという仮説が始まったと述べられています⁶⁾。

木材腐朽過程でもシュウ酸銅が蓄積する事は、Sutterらにより、pine 辺材を硫酸銅処理し、それを *P. placenta* で処理すると、菌糸表面でシュウ酸銅の結晶が観察される事で示されています⁴⁾。その際、*P. vaillantii* がシュウ酸カリウムを分泌する事は、標品とのIRスペクトルを比較し示されました。さらに、角田らも白色腐朽菌、褐色腐朽菌の銅に対する耐性を比較し、耐性の強さと菌が分泌するシュウ酸の蓄積量(文献値)とが、正の相関があるようだと報告しています¹³⁾。また、*F. palustris* 菌糸表面に固形物が蓄積する事を走査型電子顕微鏡、EDXAで認めており、本菌がシュウ酸を分泌する事から、シュウ酸銅が形成されていると提案しました。さらに岩本らも、*F. palustris* 菌糸表面に固形物の存在を認めています⁷⁾。

このように、オオウズラタケの銅耐性機構は、分泌されたシュウ酸によるシュウ酸銅形成に起因してい

ると強く示唆されています。

4. オオウズラタケにおけるシュウ酸生合成酵素

では、シュウ酸はどのようにして生合成されるのでしょうか。まず、オオウズラタケにおいて直接シュウ酸を合成する酵素として、オキサロ酢酸加水分解酵素 (OXA, EC3.7.1.1) とチトクローム *c* 依存性グリオキシル酸脱水素酵素 (GLOXDH) の2つが提案されています。

赤松らは、オオウズラタケの無細胞抽出液より、オキサロ酢酸を加水分解しシュウ酸と酢酸を生成させる OXA 活性を報告しました¹⁴⁾。OXA 活性は培養初期に高い活性を示しその後減少に転じたため、培養初期のシュウ酸生成に重要性が高い酵素と提案されています¹⁵⁾。

赤松と島田は OXA の他に、グリオキシル酸をシュウ酸に酸化するグリオキシル酸酸化酵素を見出し、その部分精製を報告した¹⁶⁾。本酵素はフラビヌクレオチドを補欠分子族とし、酸素も電子受容体となり過酸化水素を生成する新規酵素であると記述されました。

この魁となった研究の後、時松らはオオウズラタケより GLOXDH の精製を報告しました¹⁷⁾。本酵素はグリオキシル酸を脱水素し、チトクローム *c* を電子受容体に要求しシュウ酸を生成する新規酵素でした。また、精製 GLOXDH をタンパク質分解酵素パパイニンで消化し、FMN とヘムを各々含むドメインに分解し特性を解明しました¹⁸⁾。その結果、FMN を含むドメインは、赤松と島田が報告したグリオキシル酸酸化酵素¹⁶⁾ と類似した性質を示すことが分かりました。

5. シュウ酸の前駆物質を供給するグリオキシル酸回路の鍵酵素の性質

OXA の基質オキサロ酢酸は TCA 回路とグリオキシル酸 (GLOX) 回路により、グリオキシル酸は GLOX 回路により生成すると考えられます。そこで、演者らはまず、GLOX 回路の鍵酵素であるイソクエン酸リアーゼ (EC4.1.3.1, オオウズラタケ ICL を演者らは FPICL1 と名を付けた) を精製しその諸性質を明らかにしました¹⁹⁾。本酵素はイソクエン酸をコハク酸とグリオキシル酸に変換します。さらに、グリオキシル酸とアセチル-CoA を縮合させてリンゴ酸を合成するリンゴ酸合成酵素 (MS, EC2.3.3.9) を精製しその諸性質を明らかにしました²⁰⁾。

6. 木材腐朽菌の特異な TCA 回路と GLOX 回路の役割

6.1 オオウズラタケのシュウ酸生合成機構 (酵素レベルでの検討)

グルコース炭素源を用いてオオウズラタケを培養すると、9g のグルコースが炭素源として利用されると 7g のシュウ酸が蓄積する事を見出し、オオウズラタケのシュウ酸蓄積は発酵現象として捉えられる事を提案しました²¹⁾。さらに、Green と Clausen は southern yellow pine を本菌で腐朽させた場合には、平均値で 442-581 micromoles of oxalic acid per gram of final dry weight of wood 生成したと報告しています⁵⁾。演者らは、シュウ酸生合成に関連が深いと考えられる TCA 回路と GLOX 回路の各酵素活性を検討し、シュウ酸生合成の原動力となる TCA, GLOX 回路に以下に示す特徴があることを見出しました。

6.2 2-オキソグルタル酸脱水素酵素活性の未検出

2-オキソグルタル酸脱水素酵素 (図1, ODH[3]) は TCA 回路の鍵酵素の1つであり、2-オキソグルタル酸をコハク酸-CoA に変換する可逆反応を触媒します。しかし、グルコース炭素源で培養した白色腐朽菌 11 種 14 菌株、褐色腐朽菌 7 種 7 菌株からは、本酵素活性が検出されませんでした²²⁾。

もし、ODH が十分機能していないのならば、木材腐朽菌における TCA 回路は教科書に記載されている TCA 回路とはずいぶん異なる特徴を持つことになります。演者らの研究以前は、木材腐朽菌では 2-オキソグルタル酸からグルタミン酸、GABA (γ-アミノ酪酸)、コハク酸セミアルデヒド、を経て、コハク酸を形成させる GABA 経路が提案されていました。一方演者らは GLOX 回路が、TCA 回路のアナプレロティック (補填

的) な役割を持つことに着目しました。そこで、前述のオオウズラタケにおける大きなシュウ酸生合成能力がどのように導き出されているか、GLOX、TCA 回路との相互連携を解明する事により、上記のなぞを解こうとしました。

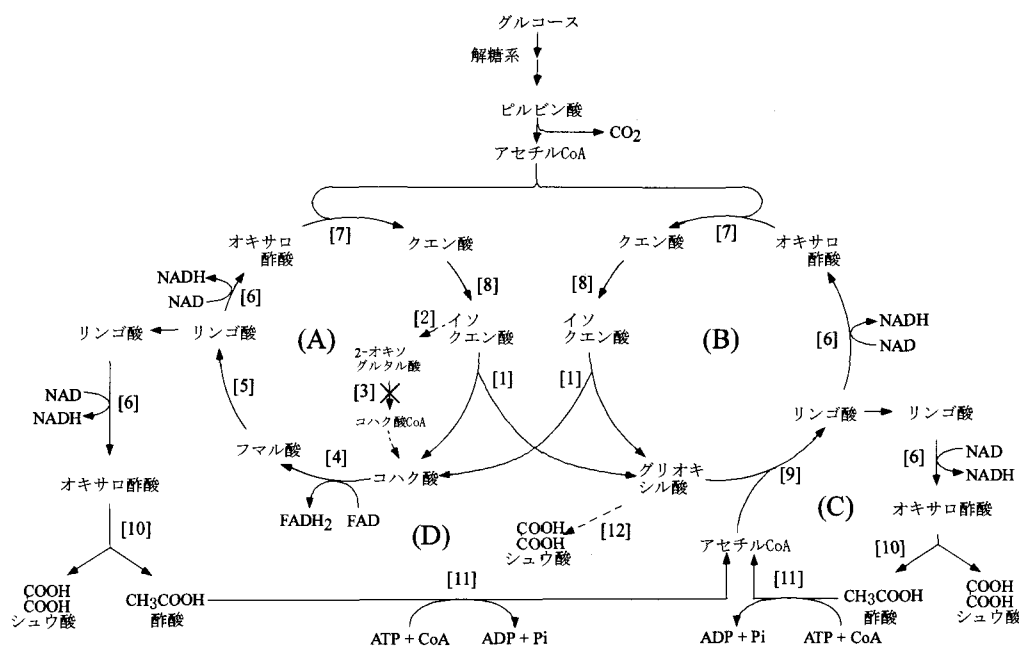


図1 褐色腐朽菌オオウズラタケにおけるショートカット TCA 回路(A)と GLOX 回路(B)と連動するシュウ酸生合成機構の提案(CとDは酢酸リサイクリング経路)²¹⁾

関係酵素：[1]イソクエン酸リアーゼ(FPICL1), [2]イソクエン酸脱水素酵素(IDH), [3]2-オキソグルタル酸脱水素酵素(ODH), [4]コハク酸脱水素酵素, [5]フマル酸ヒドラターゼ, [6]リンゴ酸脱水素酵素(MDH), [7]クエン酸合成酵素, [8]クエン酸イソメラーゼ, [9]リンゴ酸合成酵素(MS), [10]オキサロアセターゼ, [11]アセチル CoA 合成酵素, [12]チトクローム c 依存性グリオキシル酸脱水素酵素(GLOXDH)

6.3 木材腐朽菌における TCA 回路と GLOX 回路の調節

オオウズラタケにおける TCA 回路 GLOX 回路 (図1) の特徴として、以下3点が見出されました。

- ①多くの他の微生物においてカタボライト抑制を受ける GLOX 回路が、本菌では構成的に機能し不完全な TCA 回路をおこなっています。
- ②本菌の栄養菌糸生育に必要なエネルギーは、シュウ酸生合成により獲得しています。
- ③GLOX 回路の鍵酵素である FPICL1 と MS は、グルコース炭素源で培養した他の木材腐朽菌からも高い活性が得られています。

GLOX 回路は、多くの微生物ではエタノール、酢酸、脂質などの C2 化合物または等価体を炭素源として生育する時誘導されます。そして、一般的にグルコース炭素源が存在すると遺伝子発現および翻訳後修飾のレベルでも阻害を受け機能しない性質があります。しかし、演者らは白色腐朽菌 11 属 14 種 15 菌株、褐色腐朽菌 7 属 8 種 8 菌株、軟腐朽菌 3 属 3 種 4 菌株の GLOX 回路の ICL, MS 活性が、グルコース炭素源においても検出される事を見出しました²²⁾。特に、オオウズラタケにおいては、トップクラスの活性が見出されました。そこで、図1に示すように、ODHが十分作用しなくとも、栄養菌糸生育時には、主に FPICL1 によりイソクエン酸はコハク酸とグリオキシル酸に転換され、コハク酸は TCA 回路で代謝されます。グリオキシル酸は GLOX 回路を経てシュウ酸に代謝されます。さらに、オキサロ酢酸は OXA によりシュウ酸と酢酸に分解されます。酢酸は、菌体外には蓄積せず、菌体内で再利用されます。このシュウ酸生合成により、

オオウズラタケは栄養菌糸生育に必要なエネルギーを獲得する新たな炭素代謝機構を提案しました²¹⁾。

また、志水らもグルコース炭素源で培養した白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、ODH 活性が低いと報告しました。しかし、リグニン分解物の一つであるバニリンを添加し分解活性が発揮されると、イソクエン酸脱水素酵素活性、ODH 活性が著しく誘導を受ける事を報告しています²³⁾。一方、リグニン分解能力を持たない褐色腐朽菌オオウズラタケにおいては、まだこのような調節機構が存在するか否かは、明らかにされておりません。しかし、オオウズラタケの子実体形成過程ではシュウ酸生合成が阻害されアミノ酸合成が活発化し、アミノ酸からの TCA 回路への炭素の回収がより活性化する事を見出しました²⁴⁾。

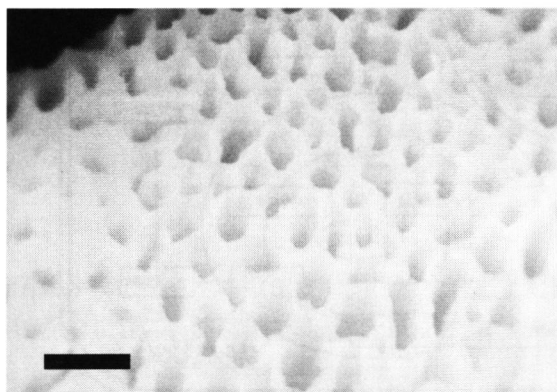


図2 液体培地で生成したオオウズラタケ子実体²⁴⁾
倍率 40 倍、バーは 0.3 mm

6.4 オオウズラタケのシュウ酸生合成機構（遺伝子・オルガネラレベル）

続いて演者らは、FPICL1 をコードする cDNA をクローニングし、大腸菌を用いてその一部を組換えタンパク質として発現させました。それを抗原に用いて、ウサギに免疫し抗体を調製した。その抗体により、免疫電子顕微鏡観察を行った結果 FPICL1 はペルオキシソームに局在していることが分かりました²⁵⁾。同様に、GLOXDH はペルオキシソームに局在することが示されました（未発表）。さらに、MS はペルオキシソームに、OXA は細胞質に局在することが、細胞分画により示されました²⁵⁾。

これらの酵素の局在を考慮すると、シュウ酸生合成をエネルギー獲得の手段と考えられるオオウズラタケの細胞内代謝には以下の特徴が考察されます。

- ①シュウ酸生合成は、細胞質とペルオキシソームで行われると示唆されます。ペルオキシソームでは、グリオキシル酸を供給する FPICL1 と、グリオキシル酸を脱水素しシュウ酸に酸化する GLOXDH が同じオルガネラに存在し、双方が連携しシュウ酸生合成を行っていると考えられます。一方、細胞質では、OXA によりオキサロ酢酸が加水分解されシュウ酸が生合成されていると考えられます。
- ②このシュウ酸生合成および炭素代謝を効率よく行わせるために、ミトコンドリアとペルオキシソームの間では代謝産物の輸送が円滑に行われている事が想像されます。すなわち、イソクエン酸またはクエン酸がミトコンドリアからペルオキシソームに輸送され FPICL1 により代謝されている可能性が示唆されます。また、コハク酸はペルオキシソームからミトコンドリアに輸送され、コハク酸デヒドロゲナーゼにより代謝されている事が示唆されます。さらに、このような輸送は、オオウズラタケにおいて誘導的ではなく、恒常的に行われている事が示唆されます²⁵⁾（図3）。
- ③GLOXDH は試験管内の反応では、電子受容体としてチトクローム *c* を要求します¹⁷⁾。しかし、チトクローム *c* がペルオキシソームにおいて電子受容体として機能していると言う報告例を演者は知りません。特異的な電子伝達システムがオオウズラタケのペルオキシソームに存在しているのかもしれませんが、あるいは、生体内においてはまったく別の電子受容体がペルオキシソームで機能しているのかもしれませんが、今後の研究がさらに必要とされます。

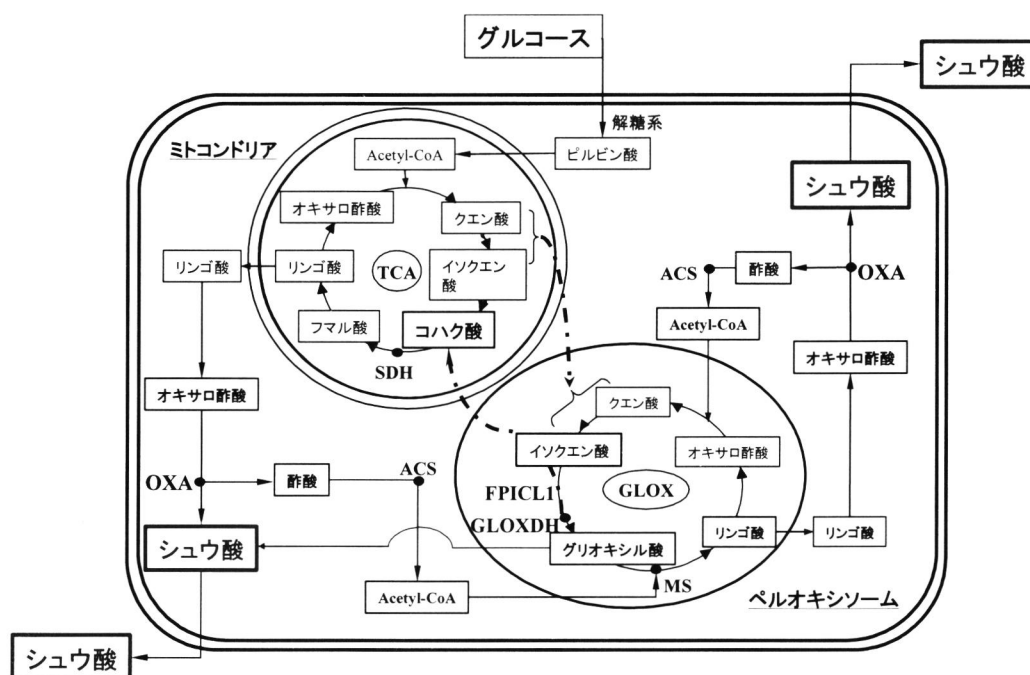


図3 酵素局在を考慮したオオウズラタケ炭素代謝機構^{2,5)}

OXA: オキサロ酢酸加水分解酵素、FPICLI: イソクエン酸リアーゼ、GLOXDH: チトクローム *c* 依存性グリオキシル酸脱水素酵素、MS: リンゴ酸合成酵素、SDH: コハク酸脱水素酵素、ACS: Acetyl-CoA 合成酵素

- ④シュウ酸は、オオウズラタケ菌糸体から細胞外に、効率的に排出される必要があります。さらに、シュウ酸は、詳しい生体反応機構は未解明の点が多いが、生物体に活性酸素を発生させ、また、毒性を示す事例も報告されています。その観点に立つと、オオウズラタケは前述の高濃度のシュウ酸が存在している環境下でも活発に生長するため、シュウ酸に対する耐性機構が備わっている可能性が考えられました。最近シュウ酸耐性を発揮する、可溶性と予測されるタンパク質をコードする cDNA をクローニングしました^{2,6)}。この明らかにされた cDNA によりコードされるタンパク質は、一つの可能性として、シュウ酸の細胞外への輸送を何らかの形で手助けしている可能性が考えられ、オオウズラタケの高いシュウ酸蓄積能力、またその環境下での強い生長能力を支える機構に組み込まれている可能性があります。

7. 保存処理木材からの CCA の除去

銅耐性木材腐朽菌は、銅、クロム、ヒ素を処理木材から除く作用があることが報告されています。Sutterらは、pine sapwood を硫酸銅 5 水和物や、copper naththenate で処理した木材を、*P. placenta* や *P. vailantii* で 4、8 週間腐朽させ、その後菌糸を取り除いて木材の銅の含量を測定すると、銅の含量が始めの 10% にまで最大減少する事を見出しました⁴⁾。また、そのメカニズムの一つとして、菌糸の周りに存在するムシゲルに存在するシュウ酸によって銅を抽出し、沈殿させると示唆されると述べています。また、岩本らも木材に一旦固着した銅をオオウズラタケが移動させ集積させたと提案しています⁷⁾。この現象を Gadd^{2,7)} に従い考察すると、2 価の銅イオンにシュウ酸がキレートし複合体を作る反応では、2 種類の塩が出来る可能性があります。一つは、 $\text{Cu}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot \text{XH}_2\text{O}$ であり、二つ目は $\text{Cu}(\text{C}_2\text{O}_4)_2^{2-}$ である。 $\text{Cu}(\text{C}_2\text{O}_4)_2^{2-}$ の solubility constant の値は 2.87×10^{-8} とされている。一方、 $\text{Cu}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot \text{XH}_2\text{O}$ の値は明確ではないが、一般的に電化を持たないシュウ酸塩が形成された場合には、結晶化またはアモルファス状態で沈殿する傾向が

あると Gadd は述べています²⁷⁾。Kartal らは CCA 処理した Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) の木粉をオオウズラタケを培養したシュウ酸を含む培養口液で処理するとヒ素が 100%、銅が 72%、クロムが 87% 除去できる事を報告しました²⁸⁾。

CCA 処理した木材から銅イオンが溶離することが出来る理由のひとつとしては、上記のようにシュウ酸に由来したシュウ酸銅が生成しその結果として、比較的溶解性がある塩が形成されることにより一旦可溶化し、その後溶解度が低い塩が形成される事により菌糸近傍に沈殿物が形成されると考えられます。しかしそればかりではなく、菌糸内部に銅の毒性が発揮されない形態で銅を取り込み移動させている可能性も推定される。既に、Chou らは、菌糸体の乾燥重量あたり 3-4%の銅がとりこまれ、細胞内で固定化される機構があるのではと示唆しています²⁹⁾。他の生物においては、金属イオンにキレートするペプチドの存在が報告され研究も進んでいますが、オオウズラタケでは未だ十分検討されてはいません。木材腐朽菌は、このように重金属の除去にも用いられる可能性が考えられます。今後さらに研究する意義があると考えます。

8. 終わりに

褐色腐朽菌オオウズラタケのシュウ酸生合成を含めた炭素代謝機構の基礎知見と、防腐処理された木材の実際の腐朽現象並びに、防腐剤の開発で得られた知見とが融合する事により、新たな展開が期待されると考えます。ご教示、ご指導賜れば幸甚に存じます。

ここに記述された研究結果は、現福井工業大学教授島田幹夫先生（京都大学名誉教授）のご指導の下、当時の多くの学生、共同研究者の皆様、演者により行われ、現在の森林代謝機能化学研究室においても、演者らにより引き続き進められている成果です。

本稿をまとめるにあたり、筑波大学土居修一先生、京都大学大生存圏研究所今村祐嗣先生、角田邦夫先生、吉村 剛先生、畑 俊充先生、越井木材工業(株) 荘保伸一様には、貴重なご助言を賜りました。さらに、(財) 廃棄物研究財団、近藤和義様には、資料収集でお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 岩崎克己, わが国における CCA 木材保存剤の開発とその処理木材市場の盛衰の技術的背景, 木材保存, 29, 192-216 2003.
- 2) 酒井伸一, 他, 薬剤処理木材の循環処理に関する研究, 平成 13 年度廃棄物処理等科学研究総合研究報告書「化学物質の循環・廃棄過程における制御方策に関する研究」, (財) 廃棄物研究財団 諸頭達夫 研究代表者, p. 3-1, p. 3-36, 2002 年 3 月.
- 3) Kartal, S.N., Imamura, Y., Chemical and biological remediation of CCA-treated waste wood, Wood Research, No. 90, 111-115, 2003.
- 4) Sutter, H.-p., Jones, E.B.G., and Wälchli, O., The mechanism of copper tolerance in *Poria placenta* (Fr.) Cke. and *Poria vaillantii* (Pers.) Fr., *Material und Organismen*, 18, 241-262, 1983.
- 5) Green III, F. and Clausen, C.A., Copper tolerance of brown-rot fungi: time course of oxalic acid production, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 145-149, 2003.
- 6) Hastrup, A.C.S., Green III, F., Clausen, C.A., Jensen, B., Tolerance of *Serpula lacrymans* to copper-based wood preservatives, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56, 173-177, 2005.
- 7) 岩本頼子, 酒井温子, 伊藤貴文, 中村嘉明, 木材に対する銅の固着性評価 (第 3 報) アゼライン酸銅の防腐効力とオオウズラタケによる銅の移動・集積, 奈良県森林技術センター研究報告, 30, 39-45, 2000.
- 8) 鈴木利克, 檜垣宮都, クロム・銅・ヒ素系木材防腐剤に関する研究 (第 2 報), 東京農大農学集報, 32, 303-316, 1988.
- 9) 島田幹夫, 木質資源の循環系に対する一考察 - 森林微生物キノコの立場から, 木材研究・資料, 39, 1-22, 2003.
- 10) 島田幹夫, Yoon, J.-J., Munir, E., 服部武文, 木材腐朽菌の代謝生理: 銅耐性とシュウ酸, そして腐朽の生化学, 木材保存, 28, 86-97, 2002.

- 11) Rabanus, A., Die Toximetrische prüfung von Holzkonservierungsmitteln. In: Proceedings of the annual meeting of the American Wood Preservers' Association, pp. 34-43, 1933.
- 12) Rabanus, A., Über die Säureproduktion von Pilzen und deren Einfluß auf die Wirkung von Holzschutzmitteln. Mitt. Dt. Forstverein 23, 77-89, 1939.
- 13) Tsunoda, K., Nagashima, K. and Takahashi, M., High tolerance of wood-destroying brown-rot fungi to copper-based fungicides, *Material und Organismen*, 31, 31-44, 1997.
- 14) Akamatsu, Y., Ohta, A., Takahashi, M. and Shimada, M., Enzymatic formation of oxalate from oxaloacetate with cell-free extracts of the brown-rot fungus *Tyromyces palustris* in relation to the biodegradation of cellulose, *Mokuzai Gakkaishi*, 37, 575-577, 1991.
- 15) Akamatsu, Y., Takahashi, M. and Shimada, M., Influences of various factors on oxaloacetase activity of the brown-rot fungus *Tyromyces palustris*, *Mokuzai Gakkaishi*, 39, 352-356, 1993.
- 16) Akamatsu, Y. and Shimada, M., Partial purification and characterization of glyoxylate oxidase from the brown-rot Basidiomycete *Tyromyces palustris*, *Phytochemistry*, 37, 649-653, 1994.
- 17) Tokimatsu, T., Nagai, Y., Hattori, T. and Shimada, M., Purification and characteristics of a novel cytochrome *c* dependent glyoxylate dehydrogenase from a wood-destroying fungus *Tyromyces palustris*, *FEBS Letters*, 437, 117-121, 1998.
- 18) Nagai, Y., Tokimatsu, T., Hattori, T. and Shimada, M., A possible intramolecular electron transfer pathway of glyoxylate dehydrogenase in a brown-rot fungus *Tyromyces palustris*, *Wood Research*, No. 86, 35-36, 1999.
- 19) Munir, E., Hattori, T. and Shimada, M., Purification and characterization of isocitrate lyase from the wood-destroying basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on glucose, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399, 225-231, 2002.
- 20) Munir, E., Hattori, T. and Shimada, M., Purification and characterization of malate synthase from the glucose-grown wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 576-581, 2002.
- 21) Munir, E., Yoon, J.J., Tokimatsu, T., Hattori, T. and Shimada, M., A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*, *PNAS*, 98, 11126-11130, 2001.
- 22) Munir, E., Yoon, J.-J., Tokimatsu, T., Hattori, T. and Shimada, M., New role for glyoxylate cycle enzymes in wood-rotting basidiomycetes in relation to biosynthesis of oxalic acid, *J. Wood Sci.*, 47, 368-373, 2001.
- 23) Shimizu, M., Yuda, N., Nakamura, T., Tanaka, H. and Wariishi, H., Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* against exogenous addition of vanillin, *Proteomics*, 5, 3919-3931, 2005.
- 24) Yoon, J.-J., Hattori, T. and Shimada, M., A metabolic role of the glyoxylate and tricarboxylic acid cycles for development of the copper-tolerant brown-rot fungus *Fomitopsis palustris*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 217, 9-14, 2002.
- 25) Sakai, S., Nishide, T., Munir, E., Baba, K., Inui, H., Nakano, Y., Hattori, T. and Shimada, M., Subcellular localization of glyoxylate cycle key enzymes involved in oxalate biosynthesis of wood-destroying basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on glucose, *Microbiology*, 152, 1857-1866, 2006.
- 26) Watanabe, T., Shitan, N., Umezawa, T., Yazaki, K., Shimada, M. and Hattori, T., Involvement of FpTRP26, a thioredoxin-related protein, in oxalic acid-resistance of the brown-rot fungus *Fomitopsis palustris*, *FEBS Letters*, 581, 1788-1792, 2007.
- 27) Gadd, G.M., Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metalspeciation, physiology and biogeochemical processes, *Advances in Microbial Physiology*, 41, 47-92, 1999.
- 28) Kartal, S.N., Munir, E., Kakitani, T. and Imamura, Y., Bioremediation of CCA-treated wood by brown-rot fungi *Fomitopsis palustris*, *Coniophora puteana*, and *Laetiporus sulphureus*, *J. Wood Sci.*, 50, 182-188, 2004.
- 29) Chou, C.K., Chandler, J. A., and Preston, R.D., Uptake of metal toxicants by fungal hyphae colonizing

C.C.A.-impregnated wood. *Wood Sci. Technol.*, 7, 206-211, 1973.