

リグニンの生化学：生合成と微生物分解*

樋 口 隆 昌**

Lignin Biochemistry: Biosynthesis and Biodegradation*

Takayoshi HIGUCHI**

(平成2年7月31日受付)

はじめに

木材の実質(木質)がセルロースとこれを覆っている物質から出来ており、この被覆物質は木粉を硝酸とアルカリで繰返し処理すると除去できる事を明らかにしたのはフランスの化学者 Payen で、1838年のことである。この被覆物質は1857年、Schulz によって木材のラテン語名, lignum に因み lignin と命名された。それ以後多数の化学者、植物学者によってリグニンの化学的性質、化学構造についての研究が積み重ねられ、1930年代の後半から1940年代にかけて、リグニンをニトロベンゼンを含む水酸化ナトリウム溶液中で加圧、加熱すると、多量のバニリン(針葉樹)、バニリンとシリンガアルデヒド(広葉樹)、バニリン、シリンガアルデヒド、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド(稲科植物)が得られる事、また少量の酸を含むエタノール中でのリグニンの加熱や、温和な条件下での水素添加分解によってグワヤシルプロパン、シリンギルプロパン、*p*-ヒドロキシフェニールプロパン誘導体が得られる、木化した細胞壁が 200-280 nm の紫外線を吸収する事などから、ようやくリグニンはメトキシ基を含むフェニールプロパンからなる高分子化合物で、針葉樹、広葉樹、稲科植物では、リグニン構成単位が異なっている事などが明らかにされてきた。しかし依然として正確なリグニンモノマーとその結合様式は不明のままであった。

1950年代になって、Erdtman がイソオイゲノールをマッシュルームの酵素で処理すると、種々の二量体を得られ、その構造がそれまで有機化学的方法によりリグニン単量体間の結合様式として推定されていた構造に良く一致する事を明らかにした。この研究が契機になって、Freudenberg はコニフェリルアルコールの水溶液をマッシュルームから得たフェノール酸化酵素で処理して脱水素重合物を得、その化学的、スペクトルの性質がリグニンとよく一致する事を明らかにした。この Freudenberg の研究はリグニンモノマーからリグニン高分子の生成機構の解明に発展していく事になる最初の重要な研究である。リグニンは他の天然高分子(セルロース、タンパク質等)と異なり、種々のエーテル結合や炭素-炭素結合を含む複雑な化合物で、加水分解あるいはその他の方法によっても定量的に単量体に分解されないため、生合成的方法によってのみ化学構造が明らかにされてきた珍しい例である。

著者は1950年名古屋大学理学部生物学科を卒業し、岐阜大学農学部林学科木材化学講座(川村一次教授)

* 第45回木研公開講演会(平成2年5月18日、大阪)において講演

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

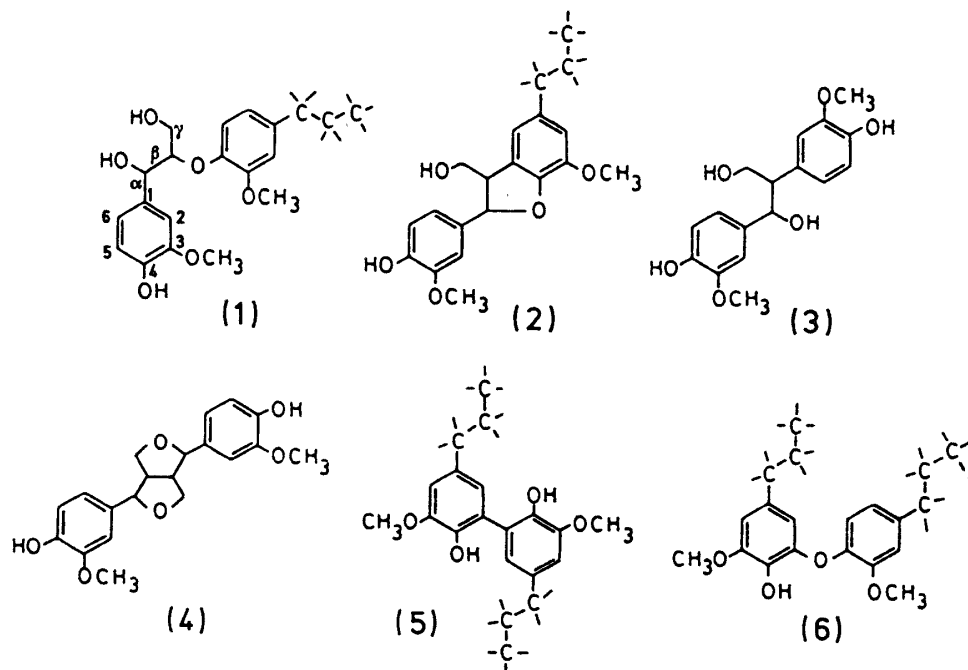
Keywords : Lignin biochemistry, Guaiacyl lignin, Syringyl lignin, *O*-methyltransferase, White rot fungi, Ligninase, Biosynthesis and biodegradation of lignin.

の助手に採用され、川村先生から広葉樹リグニンの化学構造解明の研究課題を与えられた。そこでリグニンについての文献を調べている間に当時大阪大学工学部の八浜義和教授、岡部次郎博士による Freudenberg 一派のリグニンの生合成の研究を紹介する総説が「化学の領域」に掲載された。その内容に強い感銘を受け、その時以来、リグニンの生合成、後にはリグニンの微生物分解の研究を続ける事になった。この総説は著者が40年間にわたり岐阜大学、カナダ国立平原地方研究所、フランス、グルノーブル大学、京都大学木材研究所で行ってきたリグニンの生合成と微生物分解に関する研究を取り纏めたもので、多数の研究者の皆さんから御協力を戴いた結果である。特に島田幹夫、中坪文明、山崎徹、大橋英雄、棚橋光彦、中村吉紀、黒田宏之、久津木英俊、片山健至、釜谷保志、梅沢俊明、河合真吾の各博士、伏木秀文、太田雅彦、野口明雄、難波宏彰、波部豪、横田信三、服部武文の各氏の御協力に心から感謝する。

I. リグニンの生合成

リグニンは維管束植物、シダ、ヒカゲノカズラ類の細胞壁に存在するが、コケ類、及び微生物には存在しない(川村、樋口 1964)、リグニンは一般にヘミセルロースとともに植物細胞壁の一次壁、二次壁のミクロフィブリル間、及び細胞間層に存在して細胞壁どうしを結合し、木部組織の細胞壁を固め組織を強化させている。リグニンは、その単量体の化学構造に基づいて、一般に針葉樹リグニン(グワヤシルリグニン)、広葉樹リグニン(グワヤシルーシリンギルリグニン)、稲科植物リグニン(グワヤシルーシリンギル-p-ヒドロキシフェニールリグニン)に三大別されている。

針葉樹リグニンの研究は木材から化学パルプの製造と関連してヨーロッパで早くから進められ、分解物の化学構造、官能基分析、UV, IR, NMR 等、種々のスペクトル分析等によって、単量体としてのグワヤシルプロパンが、エーテル及び炭素-炭素結合によって結合された芳香族高分子化合物である事が明らかにされてきた(Adler 1977, Sakakibara 1983)。これらの研究によってリグニン高分子中には数種のサブストラクチャーが存在する事が明らかにされてきたが、中でもグワヤシルグリセロール-β-アリアルエーテル構



Substructures (1)-(6). Principal linkage mode between monomeric phenylpropane units in lignin macromolecules

造(1)はリグニン中に最も多量に存在するフェニールプロパン間結合（リグニン中、40-60%）で、次いでフェニールクマラン(2) (<10%), ジアリールプロパン(3) (5-10%), ピノレジノール(4) (≤5%), ビフェニール(5) (5-10%), ジフェニールエーテル(6) (5%) の順である。(図1)

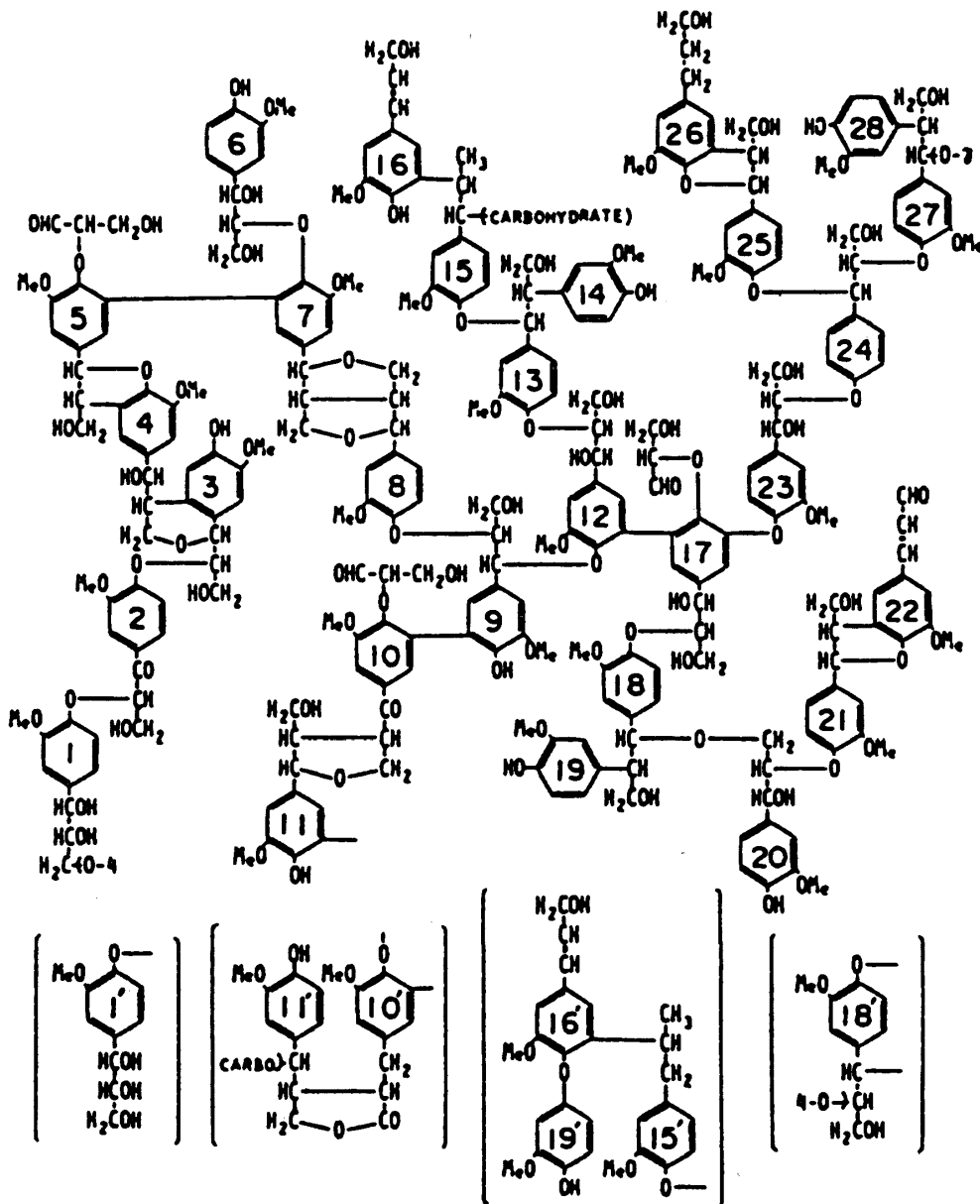


Fig. 1. Structural model of softwood lignin (Sakakibara 1983)

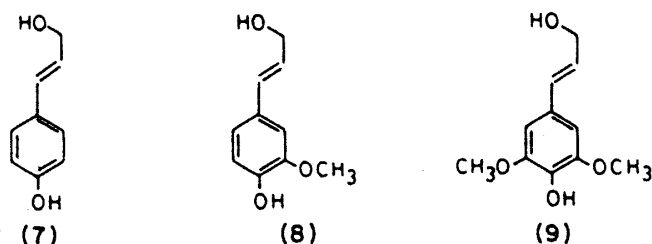
広葉樹リグニンはほぼ同量のグワヤシル及びシリリングルプロパン単量体が、針葉樹リグニンの場合と同様の化学結合によって結合されている。一方、稲科植物リグニンはグアワヤシル、シリリングル及び *p*-ヒドロキシフェニールプロパン単量体が、針葉樹の場合と同様の化学結合で結合された高分子化合物で、5-10%の *p*-クマール酸が主としてリグニンプロピル側鎖の末端の一級水酸基にエステル結合している。

植物細胞壁の木化の過程は、リグニンが 200-280 nm の紫外線を吸収する事を利用して、紫外線顕微鏡によって観察することが出来る。木化は二次壁 S1 層にセルロースが沈着しつつある形成層近くの細胞の一次

壁のコーナーから始まり、次第に細胞間層、一次壁全体に進む (Wardrop, Bland 1959)。また木部組織に放射性リグニン前駆物質を吸収させ、リグニン形成の過程をマイクロオートラジオグラフィによって追跡する事が出来る。トリチウム化フェルラ酸を樹木の若枝に吸収させると、先ず形成層に最も近い木部組織細胞の細胞壁コーナーのリグニン部に取込まれ、次いで放射方向の細胞間層に取込まれる。なお二次壁の木化は一次壁の木化と別に、S1 層にセルロースの沈着が完了してから進行する (Fujita 1983)。

I-1 モノリグノールの生合成経路

放射性同位元素でラベルしたリグニン前駆物質によるトレーサー実験と次いで行われてきた酵素実験によって、グワヤシルリグニンの直接の前駆物質 (モノリグノール) はコニフェリルアルコール (8), シリンギルリグニンはシナピルアルコール (9), *p*-ヒドロキシフェニルリグニンは *p*-クマリルアルコール (7) である事が明らかにされ、下記に示すようにその生合成経路も解明された。



一般に放射性同位元素 (^{14}C , ^3H) によるトレーサー実験では、一定の比活性 ($\mu\text{Ci}/\text{mM}$) の放射性前駆物質(A)の溶液を樹木小枝の切口、あるいは葉の切口から吸収させ、一定時間代謝させてリグニンを生合成させる。生合成されたリグニンはアルカリ性ニトロベンゼン酸化によって、リグニン酸化生成物、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド、バニリン、シリンガアルデヒド(B)とするか、エタノリシスあるいは水添分解によってグワヤシル及びシリンギルプロパンモノマー(B)に分解する。これらの分解物は完全に精製してから放射能を測定して比活性 ($\mu\text{Ci}/\text{mM}$) を算出し、前駆物質からの取込み率を稀釈率 ($A/B \times 100$) で表わす。他にリグニン中への全放射能の取込み率及び転換率(%)も併用されている (Neish 1968)。

1-a シキミ酸経路

シキミ酸(10)はシキミの実から始めて単離され、その化学構造が決定されたが (Eijkman 1885) その後の研究により一般の樹木の葉や若い木部に広く分布している事が明らかにされた (Hasegawa 等1957, Higuchi 1959)。シキミ酸— $\text{G}-^{14}\text{C}$ がリグニンに効率よく転換される事は最初, Brown と, Neish (1955a) によって発見され、次いで Hasegawa (1960), と Gamborg (1967a) によって確認された。Eberhardt と, Schubert (1956) は $[2, 6-^{14}\text{C}]$ -シキミ酸を砂糖キビの茎に与え、生成したリグニンをニトロベンゼン酸化して得られたバニリンの 2, 6 位の炭素に放射能が取込まれる事を見出した。また植物によるシキミ酸の芳香族化合物への転換は微生物による糖からシキミ酸を経て芳香族化合物の形成経路と良く一致していることが明らかにされた。

一方、シキミ酸の L-フェニルアラニン及び L-チロシンへの取込みも種々の植物で証明されてきた (McCalla, Neish 1959a, Gamborg, Neish 1959), また D-グルコース- $1-^{14}\text{C}$ をストロブ松組織培養、ユーカリ切枝に投与するとシキミ酸、ニトロベンゼン酸化によって得られるリグニンからのバニリン、エタノリシス生成物としてのバニロイルメチルケトンに効率よく取込まれる事を見出された (Hasegawa 等1960, Hasegawa, Higuchi 1960)。Kratzl, Faigle (1959), Acerbo (1960) は D- $1-^{14}\text{C}$ グルコースを与えた植物をニトロベンゼン酸化して得られたバニリンの芳香環中の ^{14}C の分布が微生物によってグルコースから生合成された芳香族酸のそれと良く一致している事を見出している。キナ酸(11)も高等植物に広く分布しており、効率良く芳香族アミノ酸に転換され、キナ酸—シキミ酸の相互転換も明らかにされてきた (Weinstein 等 1959a,

b, 1961, Goldschmid, Quimby 1964, Gamborg 1967b)。これらの研究結果及びそれらの反応を触媒する酵素の研究 (Minamikawa, Koshiba 1981) によってキナ酸はキナ酸 (シキミ酸) 脱水素酵素, デヒドロキネートデヒドラターゼ及びシキメートデヒドロゲナーゼによってシキミ酸に転換され, 微生物の場合と同様にフェニールピルビン酸及び *p*-ヒドロキシフェニールピルビン酸を経て芳香族アミノ酸に転換されるものと推定された。

しかし1988年になって Siehl, Conn はプリフェネート→アロゲネート (プレチロシン), アロゲネート→

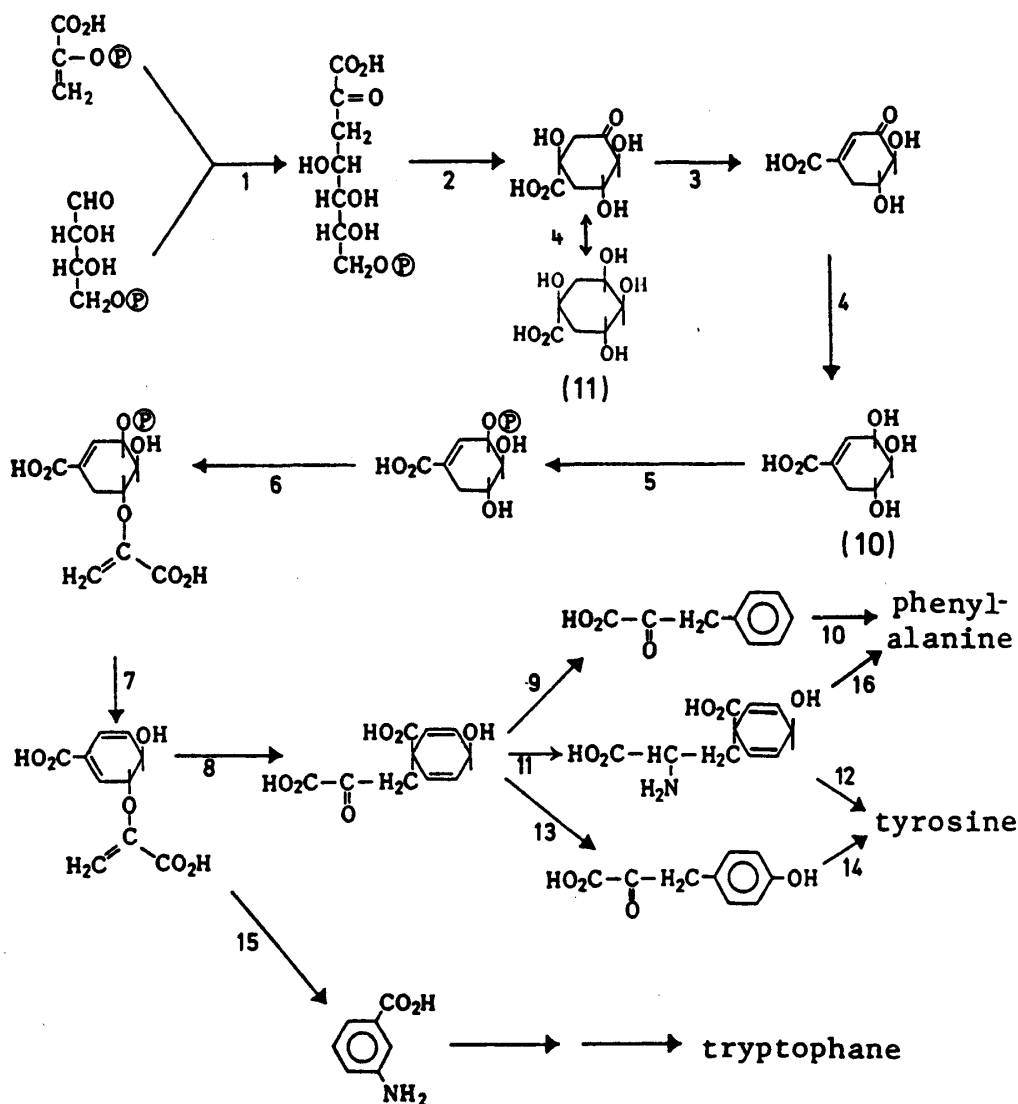


Fig. 2. Shikimate pathway in the biosynthesis of aromatic amino acids in plants. (10), shikimic acid, (11), quinic acid; Enzymes: 1 Phospho-2-keto-3-deoxyheptonate synthase; 2 3-dehydroquinate synthase; 3 3-dehydroquinate dehydratase; 4 quinate (shikimate) dehydrogenase; 5 shikimate kinase; 6 3-phospho-5-enolpyruvylshikimate synthase; 7 chorismate synthase; 8 chorismate mutase; 9 prephenate dehydratase; 10 phenylalanine aminotransferase; 11 prephenate aminotransferase; 12 arogenate dehydrogenase; 13 prephenate dehydrogenase; 14 tyrosine aminotransferase; 15 anthranilate synthase; 16 arogenate dehydratase.

L-チロシンを触媒するプリフェネートアミノトランスフェラーゼ、アロゲネートデヒドラターゼ、アロゲネートデヒドロゲナーゼがソルガムの芽生え中に存在する事を明らかにするとともに、一般に微生物に検出されるプリフェネートデヒドロゲナーゼ及びプリフェネートデヒドラターゼ活性はモヤシマメ以外の高等植物には検出されない事を見出した。従って一般の高等植物ではプリフェネートは主としてアロゲネートを経て L-フェニールアラニンと L-チロシンに転換されるものと結論される (図2)。

1-b ケイヒ酸経路

Brown, Neish (1955b) は L-フェニールアラニンが効率良く小麦及び楓の枝のリグニン中に取り込まれる事を初めて発見した。その後 L-フェニールアラニンが種々の植物のリグニンに取り込まれる事が見出されてきた (Brown, Neish 1956, 1959, Freudenberg, Niedercorn 1958, Higuchi 1962, 1966, Higuchi, Barnoud 1964, Bland, 1963)。

Brown, Neish (1955b) はリグニン生合成の経路を解明するために、 ^{14}C でラベルされた種々の可能性のあるリグニン前駆物質のリグニンへの取込率について研究し、L-フェニールアラニン、フェニールビルビン酸、フェニール酪酸、ケイヒ酸、*p*-クマール酸、カフェー酸、フェルラ酸、5-ヒドロキシフェルラ酸 (Higuchi, Brown 1963a, b), 及びシナップ酸が小麦のリグニン中に効率良く取込まれるが、酢酸、C6-C1 化合物 3, 4-ジヒドロキシ安息香酸、フェニールグリセリン酸、*m*-メトキシケイヒ酸の取込率は少量であることを明らかにした。これらの事実に基づいて、Brown (1961) は図3に示したケイヒ酸経由のリグニン生合成経路を提案した。

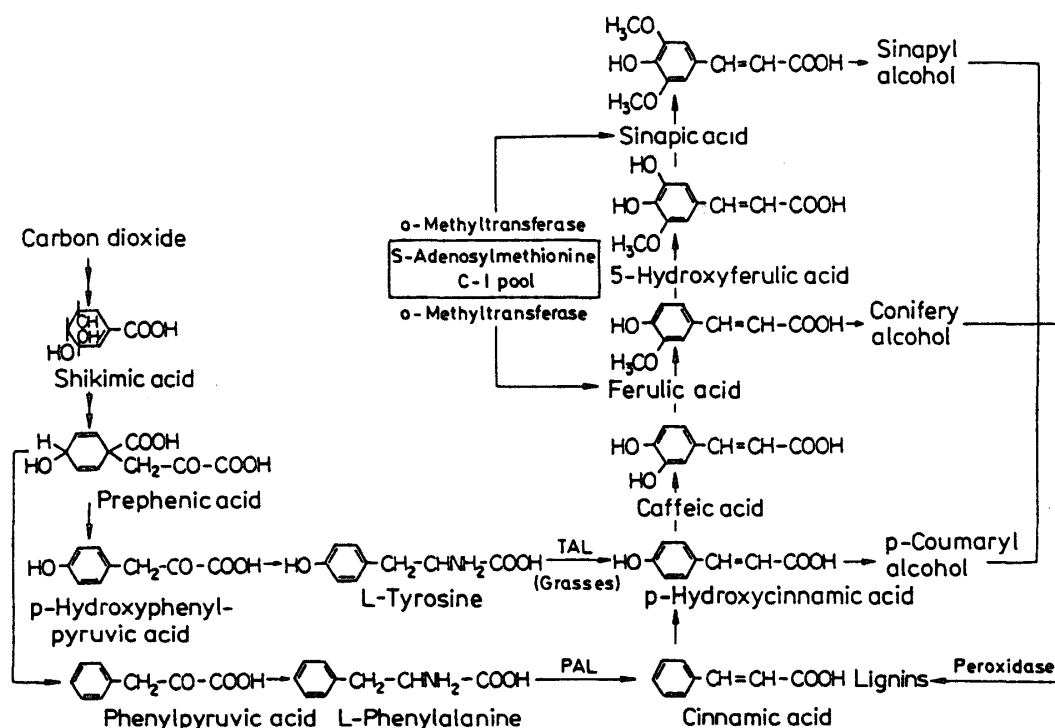


Fig. 3. Cinnamate pathway in the biosynthesis of lignins in higher plants.
TAL, tyrosine ammonia-lyase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase.

McCalla, Neish (1959b) はサルビアを用いた実験で、ケイヒ酸が *p*-クマール酸、カフェー酸、フェルラ酸、シナップ酸の順序で生成し、図3のケイヒ酸経路を経てリグニンが生合成される反応経路と一致する事を明らかにしている。他方、Koukol, Conn (1961) は L-フェニールアラニンのトランスケイヒ酸への脱

アンモニア反応を触媒するフェニールアラニンデアミナーゼ（フェニールアラニンアンモニアリアーゼ、PAL）を小麦茎から発見した。次いで多くの研究者によって同酵素が広く高等植物に分布している事、高等植物中のリグニンを含む種々のフェノール性物質合成の鍵酵素である事が明らかになってきた。同酵素の植物分類の調査（Higuchi, Barnoud 1964, Young 等1966）によると、フェニールアラニンアンモニアリアーゼはリグニンあるいはケイヒ酸誘導体を合成する生物にのみ存在する。また同酵素は種々の植物の木化しつつある組織で活性が高く（Higuchi 1966, Gross 1977）未木化の若い組織、あるいは完全に木化した組織では活性が著しく低い。

一方、Brown, Neish (1956) は L-チロシン、*p*-ヒドロキシフェニールピルビン酸、及び *p*-ヒドロキシフェニール酪酸がよくイネ科植物リグニンに取込まれるが、その他の植物のリグニンには取込まれない事を発見した。この研究により稲科植物では L-チロシンを経由してリグニンを生合成する付加的経路の存在する事が推定された。この L-チロシン経路の存在は後に Neish (1961) がイネ科植物からチラーゼ（チロシンアンモニアリアーゼ TAL）を発見する事によって合理的に説明される事になった。同酵素は L-チロシン→*p*-クマール酸への脱アンモニア反応を触媒し、主としてイネ科植物に分布している。なお我々はタケノコにおける両アンモニアリアーゼの活性が先端部から木化の進行しつつある基部にかけて著しく高い事を見出した（Higuchi 1966）。L-¹⁴C チロシンは針葉樹、及び一般の広葉樹リグニンには取込まれないが、イネ科植物リグニンの *p*-ヒドロキシフェニール、グワヤシル、シリギル核、及びイネ科植物リグニン特有の *p*-クマール酸エステル中に効率良く取込まれる（Higuchi 等 1967a）。これらの研究によりイネ科植物を除く針葉樹、広葉樹ではフェニールアラニンアンモニアリアーゼがリグニン生合成の鍵酵素として関与しているが、イネ科植物では両アンモニアリアーゼがリグニン前駆物質の合成に関与している事が証明された。

1-c ケイヒ酸の水酸化

ケイヒ酸の *p*-クマール酸への水酸化反応は NADPH と酸素を必要とするシナメート-4-ヒドロキシラーゼによって触媒される（Russel 1977）。同酵素は多くの研究者によって幅広く研究され、チトクローム P-450 系のモノオキシゲナーゼで、細胞膜に結合している事が明らかにされた（Hill, Rhodes 1975, Potts 等1974）。

p-クマール酸のカフェー酸への転換は *p*-クマレート-3-ヒドロキシラーゼによって触媒される。この酵素はほうれんそうから分離され（Vaughan, Butt 1970）、NADPH、アスコルビン酸あるいは還元型プテリジンが電子供与体として必要である。

Higuchi, Brown (1963a) は小麦のシリギルリグニン及びシナップ酸に5-ヒドロキシフェルラ酸が効率良く取込まれる事から、フェルラ酸→シナップ酸の転換が5-ヒドロキシフェルラ酸を経て進行する事を明らかにした。その後我々の研究に基づいて Grand (1984) はポプラの若い幹組織からフェルラ酸→5-ヒドロキシフェルラ酸反応を触媒するフェルレート-5-ヒドロキシラーゼを発見した。同酵素はチトクローム P450 モノオキシゲナーゼで基質として酸素分子と NADPH を必要とする。

更に最近、これまで植物から分離されていなかった5-ヒドロキシフェルラ酸がとうもろこし、大麦の細胞壁からエステル状化合物として分離、同定された（Ohashi 等1987）。従ってフェルラ酸が5-ヒドロキシフェルラ酸を経てシナップ酸に転換される事は今や明白である。

1-d ヒドロキシケイヒ酸のメチル化反応

ケイヒ酸経路にはフェルラ酸及びシナップ酸生成の二つのメチル化反応が含まれている。これらの反応で基質の *m*-フェノール性水酸基が *S*-アデノシルメチオニンをメチル基供与体とする *O*-メチル基転移酵素（OMT）の作用でメトキシル基に転換される。カフェー酸をフェルラ酸に転換する植物からの酵素はススキ及び林檎の若枝で初めて発見された（Finkle, Nelson 1963, Finkle, Masri 1964）。その後この酵素は多くの研究者により種々の植物で研究されてきた（Hess 1964a, b, 1965, Poulton 1981）。

我々（Higuchi 等 1967b）はリグニンのメトキシル基の生成機構を解明する目的でタケノコ、ポプラ若

Table 1. Relationship between the SA/FA ratio, the S/V ratio and Mäule reaction of lignins^a

Plant species	SA/FA (OMT)	S/V (lignin)	Mäule reaction
Pteridophyta			
<i>Psilotum nudum</i>	0.2	0	—
<i>Angiopteris lygodifolia</i>	0.3	—	—
Gymnospermae			
<i>Ginkgo biloba</i>	0.1	0	—
<i>Taxus cuspidata</i>	0.1	—	—
<i>Pinus densiflora</i>	0.1	0	—
<i>Pinus thunbergii</i>	0.1	0	—
<i>Pinus taeda</i>	0.3	0	—
<i>Pinus strobus</i>	0.4	0	—
<i>Thuja orientalis</i>	0.83	0	—
<i>Thuja standishii</i>	0.03	0	—
<i>Podocarpus macrophylla</i>	0.6	0	—
Angiospermae (Dicotyledoneae)			
<i>Magnolia grandiflora</i>	3.0	2.2	+
<i>Liriodendron tulipifera</i>	2.5	2.7	+
<i>Trocodendron aralioides</i>	1.6	2.6	+
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	3.2	2.9	+
<i>Euptelea polyandra</i>	3.6	—	+
<i>Nuphar japonicum</i>	2.3	—	+
<i>Ranunculus acris</i>	3.6	—	+
<i>Populus euramericana</i>	3.2	2.1	+
<i>Betula nigra</i>	3.1	2.5	+
<i>Quercus myrsinaefolia</i>	2.5	—	+
<i>Ulmus americana</i>	3.2	2.6	+
<i>Viscum album</i>	2.2	1.7	+
<i>Erythrina japonica</i>	2.3	0.1	—
<i>Tilia japonica</i>	2.3	—	+
<i>Paulownia tomentosa</i>	2.9	1.4	+
<i>Pueraria thunbergiana</i>	2.5	—	+
Angiospermae (Monocotyledoneae)			
<i>Alöe arborescens</i>	1.1	—	+
<i>Tradescantia virginiana</i>	1.6	—	+
<i>Oryza sativa</i>	0.9	1.0	+
<i>Triticum aestivum</i>	1.0	1.0	+
<i>Zizania latifolia</i>	1.0	—	+
<i>Phyllostachys pubescens</i>	1.3	1.1	+
<i>Sparganium stoloniferum</i>	1.5	—	+
<i>Scirpus triqueter</i>	2.2	—	+

^a SA, FA, activity against sinapate and ferulate, respectively. S, syringaldehyde; V, vanillin. The enzyme assay is based on the transfer of ¹⁴CH₃ group of *s*-adenosyl-L-methionine to caffeate or 5-hydroxyferulate forming ferulate (FA) or sinapate (SA)-O-¹⁴CH₃, respectively at 30°C for 30–60 min. The incubation mixture contained enzyme solution 0.2 ml, phenolic substrates 0.5 μmole, K-phosphate (pH 7.5) 20 μmole, NaN₃ 10 μmole, MgCl₂ 1 μmole, cysteine 10 μmole, 2-mercaptoethanol 10 μmole and isoascorbate 10 μmole.

枝、黒松芽生え等種々の木本植物の OMT の特性解明を行ってきた。タケノコの酵素は *S*-アデノシルメチオニンをメチル基供与体としてカフェー酸、5-ヒドロキシフェルラ酸、3, 4, 5-トリヒドロキシケイヒ酸をそれぞれフェルラ酸、シナップ酸、及び5-ヒドロキシフェルラ酸とシナップ酸に効率良くメチル化する。一方、黒松芽生えからの酵素はカフェー酸からフェルラ酸の生成を選択的に触媒するが、5-ヒドロキシフェルラ酸のシナップ酸へのメチル化はほとんどおこなはない (Shimada 等 1973a, Kuroda 等1975)。更に裸子植物と被子植物からの OMT の基質特異性に就いての我々の比較研究によって被子植物酵素はカフェー酸と5-ヒドロキシフェルラ酸がよい基質で、他に3, 4, 5-トリヒドロキシケイヒ酸、5-ヒドロキシバニリン、プロトカテクアルデヒド、クロロゲン酸も可なり良い基質であることがわかった。一方、裸子植物の OMT の基質特異性は非常に異なっており、カフェー酸が最もよい基質で、次いでプロトカテクアルデヒド、3, 4-ジヒドロキシフェニル酢酸であった。しかし5-ヒドロキシフェルラ酸はほとんどメチル化されなかった。また二量体の基質として用いたカテキルグリセロール- β -グワヤシルエーテルは黒松芽生えからの酵素によってメチル化されず、リグニンのメトキシル基生成のためのメチル化反応はモノリグノールが重合する前の段階で起こる事が明らかになった。

OMT によって生成するシナップ酸とフェルラ酸の比 (SA/FA)、リグニンのニトロベンゼン酸化によって生ずるシリンガルデヒドとバニリンの比 (S/V) 及び Mäule 反応間には密接な関係があり、高い SA/FA 値を示す被子植物は高い S/V 値で Mäule 反応陽性を示し、低い SA/FA 値の針葉樹とシダ類は S/V 値が低く、Mäule 反応も陰性であった (表1)。この結果はリグニンの進化と二つの型の OMT 間に密接な関係があることを示唆している。Ephedora, Gnetum, Podocarpus 等、ある種の裸子植物はシリンガル核に基づく Mäule 反応が陽性で、被子植物に似て SA/FA 値の高い OMT を含むようである (Shimada 等 1973a, Higuchi 等1977)。

我々の研究によるとタケノコ OMT の SA/FA 値はクロマトグラフィー、電気泳動による精製によっても変わらず、FA, SA を生成する二つのメチル化反応が単一の酵素蛋白によって触媒されている事を示した (Shimada 等 1973b)。被子植物 OMT によるカフェー酸のフェルラ酸へのメチル化反応は5-ヒドロキシフェルラ酸によって競争的に阻害され、被子植物によるシリンガルリグニンの優先的形成が推定された。

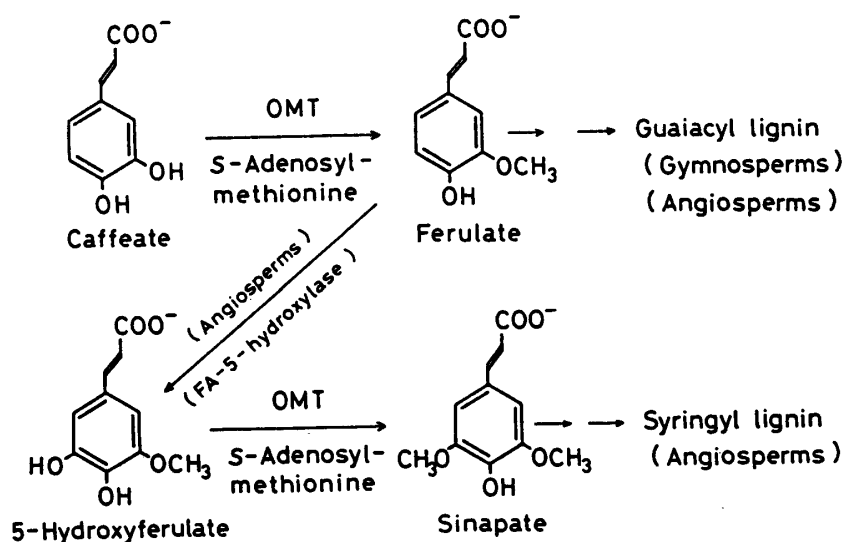


Fig. 4. Preferential formation of guaiacyl lignin via ferulate in gymnosperms, and guaiacyl-syringyl lignin via ferulate and 5-hydroxyferulate in angiosperms. OMT, O-methyltransferase.

一方、精製した黒松芽生えからの OMT は主としてフェルラ酸の生成を触媒し (Kuroda 等1975), フェルラ酸及びシナップ酸に対する K_m 値は夫々 $5.1 \cdot 10^{-5}$, $2.8 \cdot 10^{-4} M$ で、シナップ酸の生成がカフェー酸によって競争的に阻害され、針葉樹におけるグワヤシルリグニンの優先的形成を示唆した。

植物系統発生と関連して被子植物 OMT はフェルラ酸とシナップ酸の生成を触媒する二機能酵素で、シリギルリグニンの形成に適しており、裸子植物及びシダ類 OMT は基本的に一機能酵素で、フェルラ酸の形成を優先的に触媒してグワヤシルリグニンの形成に適している事は特記すべき事である (図4)。

1-e *p*-ヒドロキシケイヒ酸の *p*-ヒドロキシケイヒアルコール (モノリグノール) への還元

トレーサー実験によって Higuchi, Brown (1963b) はフェルラ酸がコニフェリルアルデヒドとコニフェリルアルコールに還元される事を初めて発見し、コニフェリルアルコールがコニフェリルアルデヒドを経て形成されるものと推定した。引きつづく酵素実験によって *p*-ヒドロキシケイヒ酸は *p*-ヒドロキシケイヒアルデヒドを経て相当するアルコールに転換される事が明らかにされた。

すなわちフェルラ酸及びシナップ酸は三つの異なった酵素, ヒドロキシシナメート: CoA リガーゼ, ヒドロキシシナモイル-CoA レダクターゼ, ヒドロキシシナミルアルコールオキシドレダクターゼの作用によって相当するアルコールに還元される。これらの酵素は *Salix*, *Forsythia* から Mansell 等 (1972) によって初めて単離され、次いで Ebel, Grisebach (1973) によって大豆の細胞培養からも単離された。同様な酵素系は後に *Brassica* (Rhodes, Wooltorton 1975) その他多くの植物から単離された (Gross 1977)。

フェルラ酸還元最初の段階はカルボキシル基の CoA エステル形成による活性化で、フェルラ酸は ATP の存在下でフェルロイルアデニレートに転換され、フェルロイルアデニレートは CoA によってフェルロイル-CoA と AMP に転換される (図5)。これらの酵素は種々の植物、特に若い木化しつつある組織に分布している。*Forsythia*, *Brassica* から単離された酵素はよく似た基質特異性を持ち、*p*-クマレート、フェルレートはよい基質である。メチル化あるいはグリコシル化されたフェルレートは基質とならず、またシ

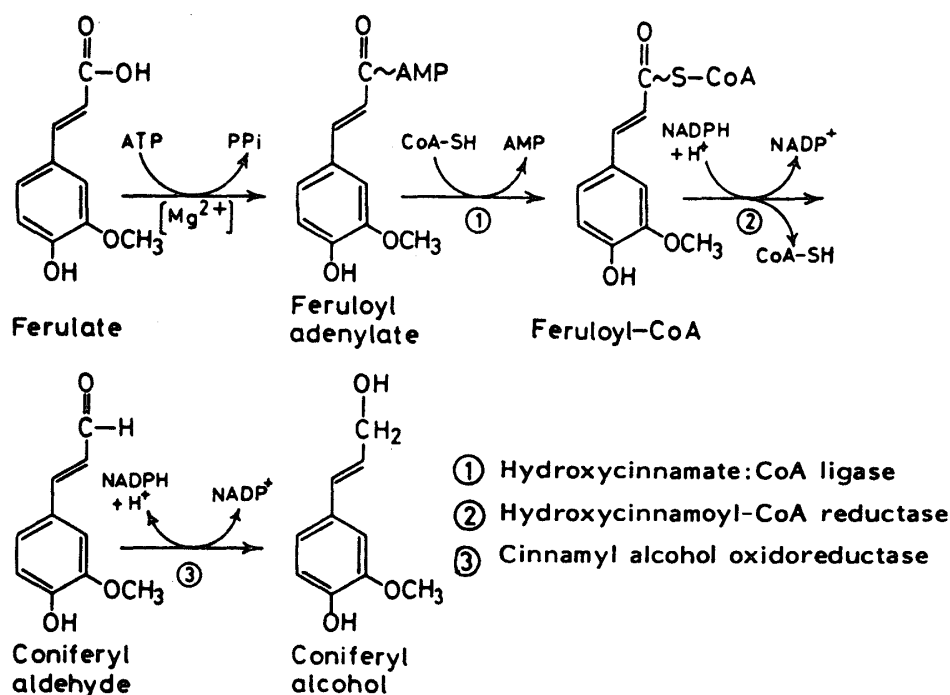


Fig. 5. Enzymatic reduction of ferulate to coniferyl alcohol mediated by three different enzymes.

ナップ酸も作用されなかった (Gross 1977)。

しかし Hahlbrock, Grisebach (1979) は大豆培養細胞のリガーゼ活性が二つのアイソザイムに分離出来ることを見出した。アイソザイム 1 は三つの典型的なリグニン前駆物質である *p*-クマール酸, フェルラ酸, シナップ酸に対して比較的低い Km 値と高い V/Km 値をしめした。一方, アイソザイム 2 は *p*-クマール酸とカフェー酸に比較的高い親和性をしめし, シナップ酸は不活性であった。従って彼等はアイソザイム 1 がリグニン生合成に, アイソザイム 2 はフラボノイド生合成に関与しているものと推定している。我々の最近の研究 (Kutsuki 等 1982a) によると大抵の被子植物及び裸子植物の CoA リガーゼはフェルラ酸に活性で, シナップ酸には不活性であるが, タケノコ, ニセアカシア, デイゴの酵素はシナップ酸に活性である (表 2)。

Table 2. Substrate specificities of *p*-hydroxycinnamate: CoA ligases of gymnosperms and angiosperms^a

Plant species	Activity (μ KAT/mg)				
	PA	FA	SA	CA	5-HFA
Gymnospermae					
<i>Chamaecyparis psifera</i>	—	73	0	—	—
<i>Juniperus chinensis</i>	—	51	0	—	—
<i>Thuja orientalis</i>	206	213	0	144	100
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	337	289	0	179	91
Angiospermae					
<i>Erythrina crista-galli</i>	128	70	30	55	15
<i>Robinia pseudoacacia</i>	301	143	57	112	49
<i>Sophora japonica</i>	—	44	0	—	—
<i>Populus euramericana</i>	155	137	0	95	51
<i>Paulownia tomentosa</i>	190	141	0	110	48
<i>Liriodendron tulipifera</i>	—	63	0	—	—
<i>Acer buergeriana</i>	—	260	0	—	—
<i>Prunus yedoensis</i>	—	43	0	—	—
Angiospermae (Monocotyledoneae)					
<i>Phyllostachys bambusoides</i>	27	34	13	—	—

^a PA, *p*-hydroxycinnamate; FA, ferulate; SA, sinapate; CA, caffeate; 5-HFA, 5-hydroxyferulate. The incubation mixture contained 500 nmole cinnamates, 2 μ mole ATP and MgSO₄, 50 nmole CoASH and 10–100 μ g enzymes in 2.74 ml of Tris buffer (pH 7.3) 100 mM. The reaction mixture was incubated at 30°C for 5 min in UV cuvettes, and the increase in absorbance of $\lambda_{\max}$ values of respective cinnamoyl-CoA esters was measured.

ヒドロキシシナモイル-CoA は *p*-ヒドロキシシナモイル-CoA レダクターゼによって相当するアルデヒドに還元される (Ebel, Grisebach 1973, Stöckigt 等 1973, Rhodes, Woollorton 1975)。この酵素は水素供与体として NADPH を必要とし, フェルロイル-CoA が最良の基質で, 次いで *p*-クマロイル-, シナポイル-, 5-ヒドロキシフェルロイル-CoA の順であった。この酵素はシナモイル-CoA に特異的で他の芳香族あるいは脂肪族 CoA エステルには不活性であった。

p-ヒドロキシシナミルアルコール形成の最後の段階はヒドロキシシナミルアルコールオキシドレダクター

ゼの作用による *p*-ヒドロキシシナミルアルデヒドの相当するアルコールへの還元である。Forsythia 及び大豆培養細胞から単離された酵素 (Mansell ら1974) は *p*-クマールアルデヒド, コニフェリルアルデヒド, シナップアルデヒド, それらのメチル誘導体に広い基質特異性をしめし, 水素供与体として NADPH を必要とした。

一方, 我々 (Kutsuki 等 1982b) の研究によると被子植物酵素はコニフェリル-, シナピル-両アルデヒドを相当するアルコールに還元するが, 裸子植物酵素はコニフェリルアルデヒドの還元活性が強い (表3)。

Table 3. Specific activities of *p*-hydroxycinnamyl alcohol oxidoreductases of gymnosperms and an-giosperms^a

Plant species	Activity (pKAT/mg)		
	Calc	Salc	Salc/Calc
Gymnospermae			
<i>Pinus thunbergii</i>	330	37	0.11
<i>Pinus densiflora</i>	—	—	0.16
<i>Larix leptolepis</i>	—	—	0.22
<i>Ginkgo biloba</i>	300	15	0.05
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	—	—	0.07
<i>Thuja orientalis</i>	1500	500	0.33
<i>Cryptomeria japonica</i>	680	290	0.43
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	3300	1800	0.55
Angiospermae			
<i>Populus euramericana</i>	29	43	1.50
<i>Liriodendron tulipifera</i>	460	380	0.83
<i>Robinia pseudoacacia</i>	1600	1900	1.20
<i>Erythrina crista-galli</i>	200	130	0.65
<i>Prunus yedoensis</i>	860	1320	1.53
<i>Prunus persica</i>	1300	840	0.65
<i>Zelkova serrata</i>	—	—	1.20
Angiospermae (Monocotyledoneae)			
<i>Phyllostachys bambusoides</i>	—	—	1.69

^a Calc, coniferyl alcohol; Salc, sinapyl alcohol. The incubation mixture contained 150 nmole cinnamaldehydes, 300 nmole NADPH, 100 μ l enzyme solution in 2.7 ml, 200 mM K-phosphate buffer (pH 6.5). Incubations were carried out at 30°C for 5 min in UV cuvettes, and the decrease in A_{340} was measured continuously.

精製した黒松芽生えの酵素は NADPH 及びコニフェリルアルデヒドに対する K_m 値が6.8及び 9.1 μ M で, シナピルアルデヒドに対する V_{max} はコニフェリルアルデヒドのそれのたった2.2%であった。従って我々は *p*-ヒドロキシシナミルアルコールオキシドレダクターゼは, グワヤシル-, シリンギルリグニン形成を制御する *O*-メチルトランスフェラーゼ (OMT) のように, リグニン代謝制御酵素の一つであると考えている。この酵素の活性はシナミルアルデヒドに特異的で維管束植物の種々の組織に分布し, 特に形成層で活性である。

以上のように, トレーサー実験によって推定されてきたグワヤシル-, シリンギル-, *p*-ヒドロキシフェ

ニールリグニンのモノリグノール形成に関与する全ての酵素が過去数年の間に単離され、その性質が解明された。

I-2 モノリグノールのリグニンへの脱水素重合

Freudenberg 等はコニフェリルアルコールがマッシュルームのフェノールオキシダーゼによって高分子物質（脱水素重合高分子, DHP）に脱水素重合し、生成した脱水素重合高分子の化学的・スペクトルの性質がリグニンのそれらの性質によく似ている事を発見した (Freudenberg 1965)。彼らはこの脱水素重合反応において主要なリグニンサブストラクチャーを含む多くのオリゴリグノールを中間体として分離し、これらのオリゴリグノールが更に酵素的に脱水素重合し、DHP を生成する事を見出した。これらの研究結果、及び DHP の化学的及びスペクトルの性質は針葉樹リグニンがコニフェリルアルコールの脱水素重合によって生成される事を示した。さらに Freudenberg (1968) は酵素によって形成されたモノリグノールラジカルが自由に結合してキノンメチドを生じ、キノンメチドは水あるいは一級アルコール、キノンのベンジル炭素への分子内親核攻撃によって種々のジリグノールに転換される事を明らかにした。ジリグノールはさらに酵素によってラジカルに脱水素され、ジリグノールラジカルはラジカル重合、次いで生成したオリゴリグノールキノンメチドのベンジル炭素への水、リグノールの水酸基、及び細胞壁多糖の糖残基の水酸基の親核攻撃によって最終的にリグニン及びリグニン-炭水化物複合体 (LCCs) を生成する (図 6)。

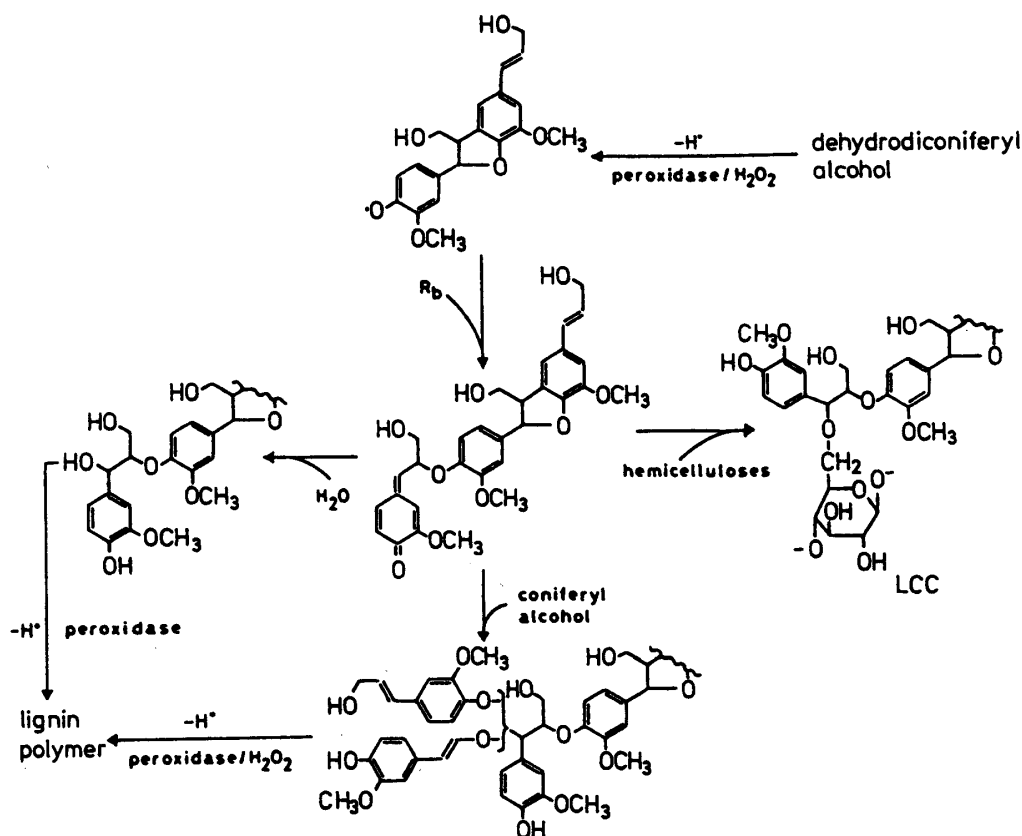


Fig. 6. Formation of lignin and lignin-carbohydrate complexes (LCCs) via oligolignol quinone methide. R_b, C_β radical of coniferyl alcohol.

2-a ペルオキシダーゼ

Freudenberg 等 (1951) はコニフェリルアルコールがマッシュルーム (*Psalliota campestris*) からの酵

素標品により空気下で薄褐色の沈澱物に脱水素重合され、その沈澱 (DHP) がスプールの MWL によく似ていることを初めて発見した。一方、著者 (1958) は Freudenberg 法で調製したマッシュルームの酵素はラッカーゼ (*p*-ジフェノールオキシダーゼ) とチロシナーゼ (*o*-ジフェノールオキシダーゼ) の混合物で、この中ラッカーゼだけが DHP の生成を触媒することを明らかにした。Higuchi, Ito (1958) は更に植物のペルオキシダーゼ/ H_2O_2 がコニフェリルアルコールの DHP 生成を触媒し、生成した DHP の化学的性質はマッシュルームラッカーゼ/ O_2 によって得られた DHP とよく似ている事を見出し、ペルオキシダーゼが植物組織の木化に関与している事を提案した Higuchi (1959)。その後、Nakamura (1967) は日本ウルシから分離精製した植物ラッカーゼはコニフェリルアルコールの脱水素重合を触媒しないが、精製したタケノコのペルオキシダーゼはコニフェリルアルコールを脱水素して DHP を生成する事を見出している。これらの研究結果はラッカーゼではなくペルオキシダーゼが高等植物によるモノリグノールの脱水素重合に関与している事を確認するもので、後に Harkin, Obst (1973) も我々の研究を支持する結果を得ている。

その後モノリグノールの脱水素重合におけるペルオキシダーゼ反応に必要な H_2O_2 の起源についてホースラディッシュの細胞壁 (Eltner, Heuper 1976)、レンギョウ木部から分離された細胞壁 (Gross 等 1977) を用いて研究された。その結果 H_2O_2 は O_2 の NAD^+ による還元によって生じたスーパーオキシドラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$) のディスムテーションを含む複雑な反応によって生成し、 NAD は細胞壁に結合した NAD : マレートオキシドレダクターゼによるマレートの酸化によって供給される NADH のフェノキシラジカルによる酸化によって生成することが明らかになった。なお、フェノキシラジカルは図 7 に示すようにペルオキシダーゼ- M^{2+} 系によるフェノールの酸化によって生成する。実際 Gross 等 (1977) はコニフェリルアルコールが結合型マレートデヒドロゲナーゼ及びペルオキシダーゼを含むレンギョウの細胞壁によって H_2O_2 を加えなくてもマレートの存在下で脱水素重合する事を証明している。

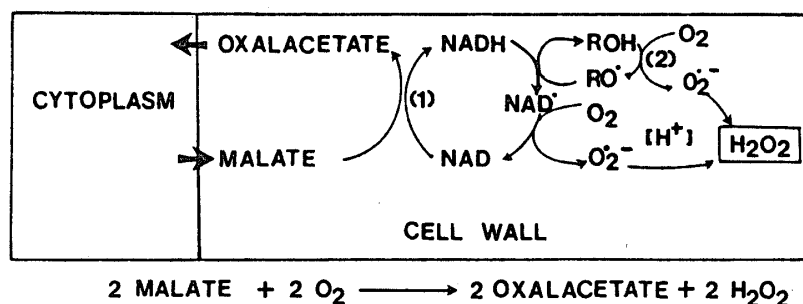


Fig. 7. A hypothetical scheme for the formation of hydrogen peroxide via dismutation reaction of superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in plant cell walls. (1), NAD : malate oxidoreductase; (2), peroxidase- Mn^{2+} complex.

この反応系では細胞壁の木化部分で H_2O_2 が形成され、細胞毒である H_2O_2 を木化部位まで転送する必要がない事などリグノールの脱水素重合反応を合理的に説明することができる。

2-b リグニンと多糖あるいは芳香族酸との化学結合

Freudenberg, Grion (1959) はコニフェリルアルコールをシュクロースあるいはソルビトール溶液中で脱水素重合させると、キノンメチド中間体の C_α 位にこれらの糖が結合して DHP の糖-*p*-ヒドロキシベンジルエーテルを生成する事を明らかにした。しかし、彼らの研究では糖のどの水酸基がリグニン側鎖 C_α に結合するかは不明であった。我々 (Tanaka 等 1976, 1979) はグワヤシルグリセロール- β -グワヤシルエーテルのキノンメチド溶液に D -グルクロン酸及び D -グルコースを加えると D -グルクロン酸のカルボキシル基及び D -グルコースの C_6 位の水酸基がキノンメチドの C_α 位を優先的に攻撃し、それぞれエステルあるいはエーテルを生じる事を明らかにした (図 6)。また反応生成物の分析によってウロン酸のカルボキシル基

あるいはグルコースの C₆ 位の水酸基はキノンメチドの C_α 位に優先的にエステル及びエーテル結合し、これらの糖のグリコシド結合は生成しない事を証明した。

更に我々は LCC 形成の機構を解明するため、コニフェリルアルコールをペクチン、マンナンあるいはキシランの溶液中でペルオキシダーゼ/H₂O₂ により脱水素重合させた (Tanahashi 等1981)。生成物は有機溶媒に不溶であるので熱軟化点法及び誘電率法によって分析した。コニフェリルアルコールの DHP とマンナン、及びその混合物の熱軟化点 (Ts) はそれぞれ 140°C 及び 228°C であった。

一方、コニフェリルアルコールとマンナンから調製した DHP は熱軟化点で 245°C で、140°C 及び 228°C では軟化せず、DHP の全てが LCC に転換されている事が明らかになった。また DHP-マンナンの共重合物を温和なアシドリシスによって加水分解すると 245°C の熱軟化点は消失し、DHP がマンナンとベンジルーエテル結合していた事を示した。

また DHP-ペクチンの熱軟化点は 213°C で 140°C には軟化点は認められないが、温和な加水分解によって 213°C の軟化点は消失し、136°C (DHP) 及び 199°C (ペクチン) に新しい軟化点が現われ、213°C の軟化点が DHP とペクチン間のベンジルーエステル結合によるものである事を示した。

これらの研究に基づいて、我々はコニフェリルアルコールが糖溶液中でペルオキシダーゼ/H₂O₂ によって重合する際、キノンメチド中間体への糖残基のカルボキシル基及び一級アルコールの親核的付加反応によって LCC が形成されるものと推定した。植物細胞壁及び細胞間層ではリグニン分子の相当の部分が C_α でヘミセルロース及びペクチンの一級アルコール及びカルボキシル基と結合しているものと考えられる。Eriksson 等 (1980) 及び Takahashi, Koshijima (1988) は最近ブラックスプルー及びブナ LCC 中で、リグニンはヘミセルロースのグルクロン酸とベンジルーエステルで、又ヘミセルロースの他の糖残基にベンジルーエテルで結合している事を推定しており、我々のモデル実験とよく一致している。

5-10% の *p*-クマール酸及び *p*-ヒドロキシ安息香酸が稲科植物リグニン及びポプラリグニンにそれぞれエステル結合している事が知られている。(Smith, 1955)

我々はベラトル *p*-クマレート、3-(3, 4-ジメトキシフェニル) プロピル *p*-クマレートの様なモデル化合物とタケ及びポプラ MWL をアルカリ加水分解及びアシドリシスし (Nakamura, Higuchi 1976), 約 80% の *p*-クマール酸及び *p*-ヒドロキシ安息香酸がタケ及びポプラリグニンのプロピル側鎖の末端一級アルコールとエステル結合している事を確かめた。なお側鎖の α 位でのエステル結合は 20% 以下と測定された。更に、これらのエステル結合の部位がリグニン側鎖の末端一級アルコールである事を証明するため、コニフェリル *p*-クマレート及びコニフェリル *γ*-ヒドロキシ安息香酸エステルを合成し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ/H₂O₂ によって脱水素重合させた (Nakamura, Higuchi 1978a, b)。これらのエステル化合物はコニフェリルアルコールの存在下で容易に重合し、*p*-ヒドロキシ安息香酸及び *p*-クマール酸はエステルとして DHP 中に取り込まれた。なおコニフェリル *p*-クマレートの DHP ではエステルの *p*-クマール酸部及び脱水素重合反応中に一部加水分解されて生成した遊離の *p*-クマール酸がともに脱水素重合され、*γ*-エステル結合ばかりでなく部分的にエーテルあるいは C₅ 位で C-C 結合、C_β あるいは *p*-クマール酸側鎖の C_β での結合を含む DHP を生じた (図 8)。

アルカリ加水分解によって測定された DHP 中のこれらの酸の *γ*-エステル、タケ MWL の *p*-クマール

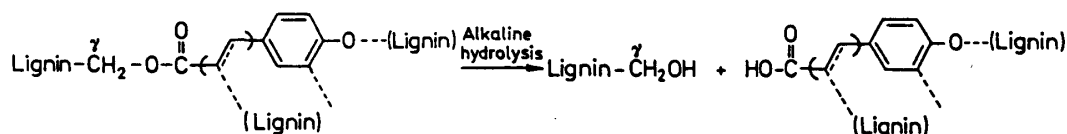


Fig. 8. Structures of dehydrogenation polymers prepared from coniferyl *p*-coumarate or coniferyl *p*-hydroxybenzoate by horseradish peroxidase.

酸及びポプラ MWL の *p*-ヒドロキシ安息香酸量は5-16%であった。これらの結果はほとんどの芳香族酸がリグニン側鎖の一級水酸基に結合しており、しかもキノンメチド中間体を通しての C_α 位でのエステル及びエーテル結合は少量である事を示した。なおタケ材中には微量のフェルラ酸が含まれているが *p*-クマール酸はリグニン中に、フェル酸は多糖中に特異的にエステル結合していることが報告されている (Shimada 1972)。

2-c 組織及び植物内におけるリグニン生合成の差

Musha, Goring (1975) はカバ材のリグニンのスペクトル分析によって同材木繊維の二次壁リグニンはシリングルリグニンに富み、導管リグニンはグワヤシルリグニンが多い事を示した。また最近 Monties (1985) はポプラリグニンのグワヤシル-シリングルリグニンの分布と関連してリグニンの細胞化学的不均一性、小麦及びポプラリグニン中のリグニンサブストラクチャー、フェノール酸の量等に差があることを指摘している。また小麦のプロトリグニンと合成リグニン (DHP) 間の化学的性質の差異についても ^{13}C -フェルラ酸を投与して得られたプロトリグニンの固体 ^{13}C -NMR の分析に基づいて指摘されている (Lewis 等 1987)。

我々 (Higuchi, Barnoud 1964) は早くから広葉樹の組織培養カルスのリグニンがグワヤシルリグニンに富んでいる事を明らかにした。Terashima, Fukushima (1988) は最近 ^3H -ラベルしたモノリグノールグルコシドを分化しつつあるマツの木部に投与し、ラジオオートグラフ分析によって *p*-ヒドロキシフェニルリグニンは細胞壁分化の初期段階で複合中間膜及び細胞のコーナーに形成され、一方グワヤシルリグニンは木化の初期に複合中間層に、後期に二次壁に沈着し、またグワヤシルリグニンの縮合型量が二次壁リグニンより中間膜リグニン中に多い事を示した。また針葉樹リグニンには少量しか存在しないシリングルリグニンは木化後期に二次壁の内層部に形成された。彼らは木部組織のリグニンは化学的に不均一で、木化は個々の細胞によって制御されており、リグニン生合成の様式は細胞の老化に伴って変化すると推定している。

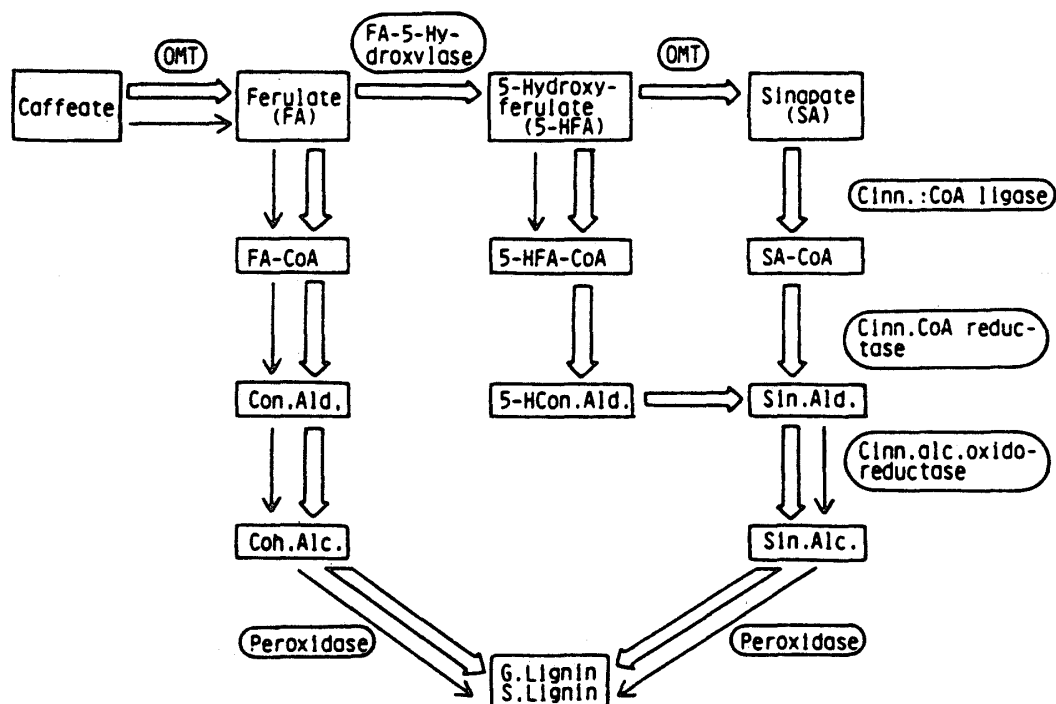


Fig. 9. Regulatory enzymes involved in the biosynthesis of guaiacyl lignin in conifers, and guaiacyl-syringyl lignin in angiosperms. →, pathway in gymnosperm; ⇔, pathway in angiosperm.

我々は ^{14}C -フェルラ酸を裸子植物に投与すると主としてグワヤシルリグニンになるが、フェルラ酸を被子植物に与えるとグワヤシル-シリンギルリグニンになる事を明らかにしてきた。Higuchi 等 (Higuchi 1983, 1985) は裸子植物におけるグワヤシルリグニンの形成、被子植物におけるグワヤシル-シリンギルリグニン形成の機構について研究し、両者間におけるグワヤシル及びグワヤシル-シリンギルリグニンの形成の差には次の因子が含まれる事を明らかにした (図9)。

1. 裸子植物の OMT は主としてカフェー酸からフェルラ酸の形成を触媒するのに、被子植物の OMT はフェルラ酸の生成ばかりでなく、5-ヒドロキシフェルラ酸からシナップ酸の形成を触媒する。
2. グワヤシルリグニンからシリンギルリグニン生合成への分化のカギ酵素であるフェルレート-5-ヒドロキシラーゼは被子植物にのみ分布している。
3. 被子植物の *p*-ヒドロキシシナメート:CoA リガーゼはフェルラ酸と *p*-クマール酸にのみ活性であるが、被子植物の酵素は *p*-クマール酸、フェルラ酸及びシナップ酸にも活性である。
4. 幾つかの被子植物ではシナビルアルコールの合成が5-ヒドロキシフェルラ酸→5-ヒドロキシフェルロイル-CoA→5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒド→シナップアルデヒド経路でも起こる可能性が大きい。
5. *p*-ヒドロキシシナミルアルコールオキシドレダクターゼは裸子・被子植物間で基質特異性が異ってお

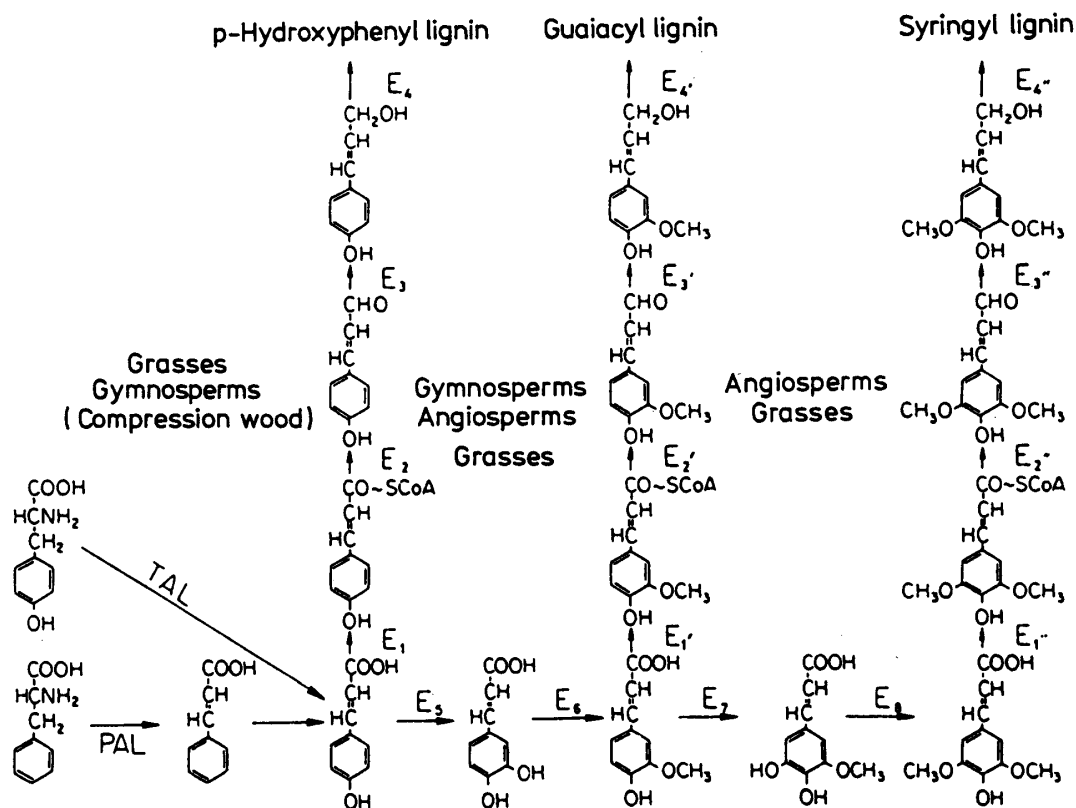


Fig. 10. Biosynthetic pathways for *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl lignins in higher plants. Enzymes; (E1), (E1'), and (E1''), hydroxycinnamate: CoA ligase; (E2), (E2') and (E2''), hydroxycinnamoyl-CoA reductase; (E3), (E3') and (E3''), cinnamyl alcohol oxidoreductase; (E4), (E4') and (E4''), peroxidase; (E5), *p*-coumarate 3-hydroxylase; (E6) and (E8), hydroxycinnamate *O*-methyltransferase; (E7), ferulate 5-hydroxylase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; TAL, tyrosine ammonia-lyase.

り、針葉樹酵素はコニフェリルアルデヒド→コニフェリルアルコール反応を優先的に触媒し、広葉樹酵素はコニフェリルアルコールの生成ばかりではなく、シナップアルデヒド→シナピルアルコール反応も触媒する。

シナペート: CoA リガーゼの生成は被子植物組織の木部分化と密接に関連している様である。何故ならば、ポプラ及び桜の若枝はフェルラ酸→コニフェリルアルコール、シナップ酸→シナピルアルコールの両反応を触媒したが、木部分化の不充分な被子植物のカルスはフェルラ酸をコニフェリルアルコールに還元したが、シナップ酸をシナピルアルコールへは還元出来なかったからである (Nakamura 等 1974)。またフェニールアラニンアンモニアリアーゼ, OMT, *p*-ヒドロキシシナメート: CoA リガーゼ, シナミルアルコールオキシドレダクターゼの活性もリグニン量の高い圧縮ア材材のほうが、対象材に比べて数倍高い値をしめした (Kutsuki, Higuchi 1981)。

Grand 等 (1983) はポプラの幹の木部及び師部組織から基質特異性の異なる三つのヒドロキシシナメート: CoA リガーゼを分離し、これらのアイソザイムの基質特異性と組織のリグニンの構成モノマーとの間に関連がある事を明らかにしている。

いずれにしてもフェルラ酸以後のモノリグノール中間体の合成に関与する酵素は裸子植物と被子植物間で基本的に異なっていると結論づける事ができる。裸子植物ではフェルラ酸, フェルロイル-CoA, コニフェリルアルデヒド等グワヤシルリグニン中間体の生成を優先的に活性化する酵素的作用によってグワヤシルリグニンを合成するように制御されており、被子植物はグワヤシルリグニン中間体とともにシナップ酸, シナピル-CoA, シナップアルデヒドの様なシリリングリグニン中間体を合成出来る酵素の触媒作用によってグワヤシル-シリリングリグニンを合成する事が出来る。グワヤシル-シリリング-*p*-ヒドロキシフェニルリグニンを含むイネ科植物の酵素の基質特異性はグワヤシル及びシリリングリグニン中間体を合成する一般の被子植物の場合と似ている。*p*-ヒドロキシフェニルリグニン及びイネ科リグニン特有な *p*-クマール酸エステルの形成はチロシンアンモニアリアーゼによって *L*-チロシンから直接供給される高い *p*-クマール酸濃度に依存している様である (図10)。

II. 微生物分解

リグニンは多くの異なった炭素-炭素結合及びエーテル結合を含む枝分かれたフェニルプロパン高分子で容易に加水分解されない。したがって多糖や他の天然高分子化合物と比べて微生物によって分解されにくいにもかかわらず、カワラタケ, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata* 等の白色朽菌は典型的なリグニン分解菌として知られている。過去10年間に白色朽菌によるリグニン分解の化学と生化学は主として次の二つの方法によって著しく進展した。1) 白色朽菌によって分解されたプロトリグニンの化学分析, 2) リグニンサブストラクチャーモデル化合物の微生物分解機構の解明。

II-1 リグニン分解担子菌による木材中のリグニンの分解

腐朽材リグニンの化学分析 (Hata 1966, Kirk, Chang 1974, 1975, Chang 等1980, Chua 等1982, Tai 等1983a, b) によって白色朽菌によって腐朽されたリグニンはメトキシル基, β -0-4サブストラクチャー量が著るしく少く、逆に酸素及び脂肪族及び芳香族性のカルボン酸量が増大している事が明らかになった。また、バニリン酸, シリリング酸, デヒドロジバニリン酸及び数種の二量体フェノール化合物がリグニン分解物として腐朽木粉から分離同定されてきた (Henderson 1961, Higuchi 等 1955, Chen 等 1982a, 1983, Tai 等 1983b, Terazawa 等1983)。これらの研究結果に基づいて Kirk, Chang (1975) 及び Chen, Chang (1985) は白色朽菌によるリグニン分解には少なくとも次の三つの分解様式が含まれているものと推定した。

- 1) プロピル側鎖の $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 間酸化開裂による安息香酸の生成
- 2) β -アリアルエーテル結合の開裂と側鎖構造の修飾

3) 芳香環の酸化開裂

Chen, Chang (1985) は更に *P. chrysosporium* によるカバ材リグニンの分解は部分的に酸化及び還元反応の組合せによって進行するものと推定した。

プロトリグニンの腐朽菌による分解についての研究は後に述べる様にほとんどの場合、リグニンサブストラクチャーモデル化合物の分解様式と一致している。しかし両者の間に二・三の相違も見られ、この相違は培養条件の差、基質の分子量、その存在状態（プロトリグニンは多糖と結合している）の相違などに起因するものと思われる。

II-2 リグニンサブストラクチャーモデル化合物の側鎖の開裂機構

我々 (Higuchi, Nakatsubo 1980) は *P. chrysosporium*, カワラタケ及びそれらが分泌する酵素（ラッカーゼ等）によるリグニン分解機構を解明するため種々のオリゴリグノールを合成した。オリゴリグノールをリグニンを分解しつつある担子菌の培養に加えて一定時間培養し、分解生成物は酢酸エチルで抽出してから NMR, GC-MS によって分離同定し、オリゴリグノールの分解経路を解明した。

2-a β -O-4 モデル化合物

β -O-4 リグニンサブストラクチャーはリグニン中に最も多く（40～60%）含まれているフェニルプロパン間結合のため、早くからリグニンの分解機構の解明のためリグニンモデル化合物として利用されてきた (Russel 等1961, Ishikawa 等 1963a, b, Fukuzumi, Shibamoto 1965)。我々は一連の研究によって *P. chrysosporium* 及びカワラタケがフェノール性及びエーテル化された β -O-4 化合物をほぼ同様の経路にしたがって分解する事を見出した。すなわち、グワヤシルグリセロール- β -コニフェリルエーテルはグワヤシルグリセロール- β -グワヤシルグリセロールエーテルに転換され、次いでグリセロール側鎖が $C_{\alpha}C_{\beta}$ 開裂され、バニリンエーテルを経てバニリン酸エーテルを生じる。次いでバニリン酸エーテルはアルキルフェニル開裂によりグリセロール-2-バニリン酸エーテルと *p*-ベンゾキノンを生じるか、 $C_{\alpha}C_{\beta}$ 開裂によってバニリンを経てバニルアルコールとグリコールアルデヒドを経てグリコールを生じる (Higuchi 1985)。

我々 (Umezawa 等1983) は更に *P. chrysosporium* の培養菌体により4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリセロール- β -バニリンエーテルの γ -ベンジルエーテル(1)が $O-C_4$ 開裂によって4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリセロールの γ -ベンジルエーテル(2)と、 $C_{\alpha}C_{\beta}$ 開裂によってベンジロキシエタノール(3)と4-エトキシ-3-メトキシベンジルアルコール(4)に転換される事を初めて明らかにした (図11)。又 4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリセロール- β - ^{18}O -グワヤシルエーテルを合成して *P. chrysosporium* の培養菌体に加え (Umezawa, Higuchi 1985a), 分解物として得られた4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリセロールの C_{β} 位の酸素及びグワヤコールのフェノール性水酸基の酸素が定量的に ^{18}O を保持しており、基質のエーテル酸素に由来することを見出した。この事は図12に示す様に4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリセロールは基質の $O-C_4$ 開裂により、またグワヤコールは $O-C_{\beta}$ 開裂による別々の反応によって生成した事を示している。

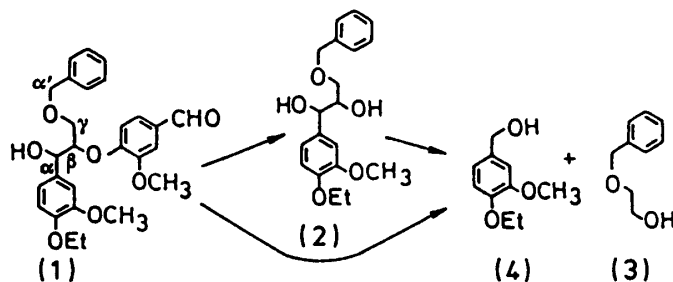


Fig. 11. Degradation pathways of a (β -O-4)-(α -O-4) trimer, the γ -benzyl ether of a β -O-4 lignin substructure model, by *Phanerochaete chrysosporium*.

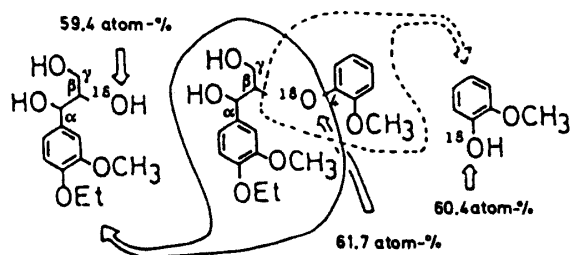


Fig. 12. Degradation of $[2-^{18}\text{O}]$ aryl glycerol- β -guaiacyl ether by *Phanerochaete chrysosporium*. β -Oxygen atom of the aryl glycerol and phenolic oxygen atom of the guaiacol were derived quantitatively from β -ethereal oxygen of the substrate.

この間に Tien, Kirk (1983) 及び Glenn 等 (1983) により *P. chrysosporium* の培養濾液からジアリールプロパン-1, 3-ジオール (β -1) リグニンサブストラクチャーモデル化合物の $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ 開裂を触媒するリグニナーゼ (リグニネルオキシダーゼ) が発見された。彼等はこの酵素が β -O-4 リグニンサブストラクチャーモデル化合物の $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ 開裂も触媒して分解物としてベンズアルデヒドを与え、 $^{18}\text{O}_2$ はベンズアルデヒドには取り込まれない事を見出した。そこで我々 (Habe 等1985) は α , β -ジ ^2H -4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリセロール- β -バニリン- γ -ベンジルジエーテル(5)を合成してリグニネルオキシダーゼの基質にしたところ、 $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ 開裂の生成物として4-エトキシ-3-メトキシベンズアルデヒド(6), ベンジロキシアセトアルデヒド(7)及びバニリンが、O- C_4 開裂生成物として4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリセロールの γ -ベンジルーエーテル(2)が得られた。さらに分解物の MS 分析によって(2)の C_α 及び C_β の重水素、(6)及び(7)の重水素は殆んど定量的に保持されている事を見出した。

これらの結果は β -O-4モデル化合物の $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ あるいは O- C_4 開裂にあたって水素の脱離は起こらない事の証明である。後に Kersten 等 (1985) は ESR による研究によってリグニネルオキシダーゼがエーテル化フェノール化合物の芳香環を一電子酸化して不安定なカチオンラジカルを生成し、このカチオンラジカルが種々の分解物に転換される事を明らかにした。これらの事実を考え合わせると β -O-4モデル化合物の

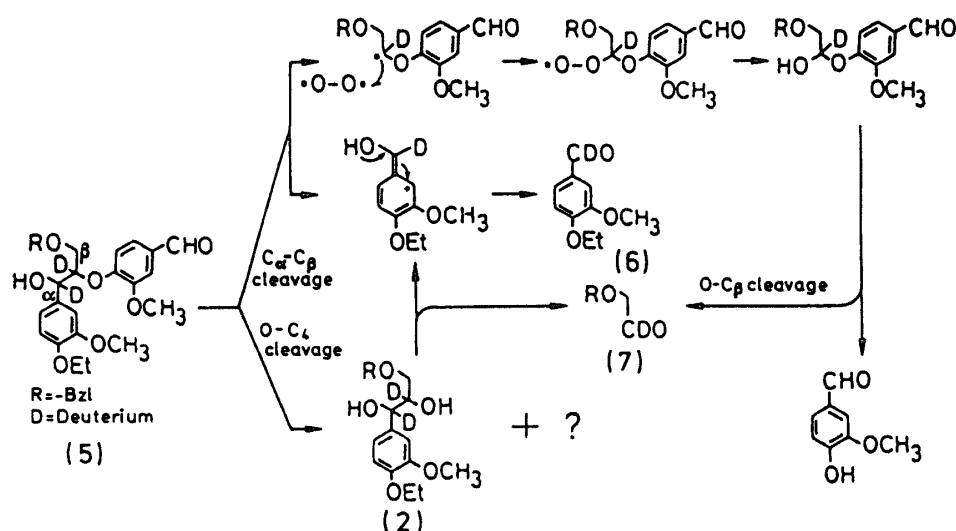


Fig. 13. Degradation of a deuterated aryl glycerol- β -aryl ether lignin substructure model by lignin peroxidase of *P. chrysosporium*.

リグニンペルオキシダーゼによる側鎖の開裂機構は図13のように示すことができる。

更に我々 (Umezawa, Higuchi 1985b) は β -O-4 モデル化合物から2-グワヤコキシエタノール(8)とベンジルアルコール(4)を生じる別の $C_{\alpha}C_{\beta}$ 開裂反応の機構を明らかにした。我々はこの研究で4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリセロール- β - ^{18}O -グワヤシルエーテルを基質として *P. chrysosporium* の培養菌体に加え、分解物の GC-MS 分析によって基質の ^{18}O が2-グワヤコキシエタノールに含まれていない事を明らかにした。次いで4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリセロール-(γ - ^{13}C)- β -グワヤシルエーテルを合成して基質に用い、分解物として得られた2-グワヤコキシエタノール(8)は C_2 が ^{13}C でラベルされ、 C_1 はラベルされていない事を明らかにした。我々はこれらの結果に基づいてグワヤコキシエタノールの生成機構として図14を提案した。図14は基質の C_{β} に結合していたグワヤシル基が γ 位に転移して中間体Cになり、Cが $C_{\alpha}C_{\beta}$ 開裂をうけて4-エトキシ-3-メトキシベンズアルデヒドと2-グワヤコキシアセトアルデヒドを生じ、両アルデヒドは培養菌体によってそれぞれアルコールに還元される事を示している。この反応は Enoki 等によって提案されたグワヤコキシエタノールの生成機構と全く異なるもので、最近になって Miki 等 (1988) によりリグニンペルオキシダーゼを用いて確認された。

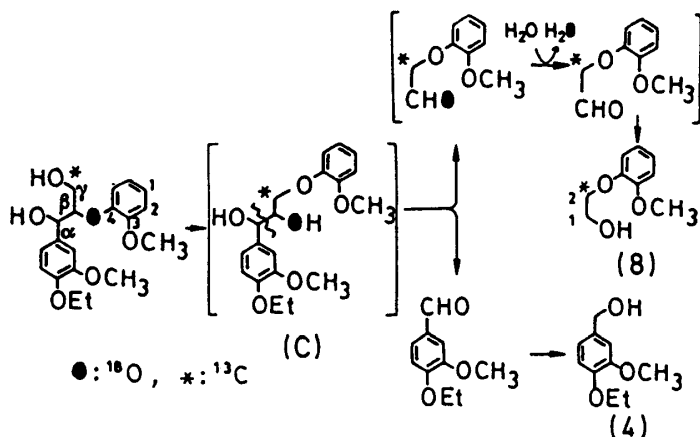


Fig. 14. Mechanism of guaiacoxyethanol formation from a β -O-4 lignin substructure model by *P. chrysosporium*.

一方、フェノール性 β -O-4化合物の分解について Wariishi (1987) はシリングルグリセロール- β -グワヤシルエーテルがカワラタケラッカーゼによって $C_{\alpha}C_{\beta}$ 開裂されシリングアルデヒドとグワヤコキシエタノールを、またアルキルフェニル開裂により 2, 6-ジメトキシベンゾキノンとグリセル酸-2-グワヤシルエーテルを、さらに O- C_{β} 開裂によりグワヤコールを生成すると報告している。しかし乍ら我々 (Kawai 等 1990) はシリングルグリセロール- β -グワヤシルエーテル(9)はカワラタケラッカーゼによって主として α -カルボニル化合物(10)、アルキルフェニル開裂による 2, 6-ジメトキシヒドロキノン(11)、グリセルアルデヒド-2-グワヤシルエーテル(12)及び O- C_{β} 開裂によるグワヤコール(13)に分解されるが、シリングアルデヒド、グワヤコキシエタノールは生成しない事を見出した。更に α -カルボニル化合物(10)は $C_{\alpha}C_{\beta}$ 開裂を受けてシリング酸(14)とグワヤコールになり、シリング酸は急速に脱炭酸を経て分解される事が明らかになった(図15)。従来フェノール性 β -O-4 化合物はラッカーゼにより主としてアルキルフェニル開裂をうけるとされてきたが、我々の研究によってアルキルフェニル開裂ばかりでなく $C_{\alpha}C_{\beta}$ 開裂化合物を与える事が示された。

以上、我々の研究 (Higuchi 1988) はリグニンペルオキシダーゼがフェノール性及び否フェノール性 β -O-4 化合物を一電子酸化してフェノキシラジカル及びアリールカチオンラジカルを生成すること、アリール

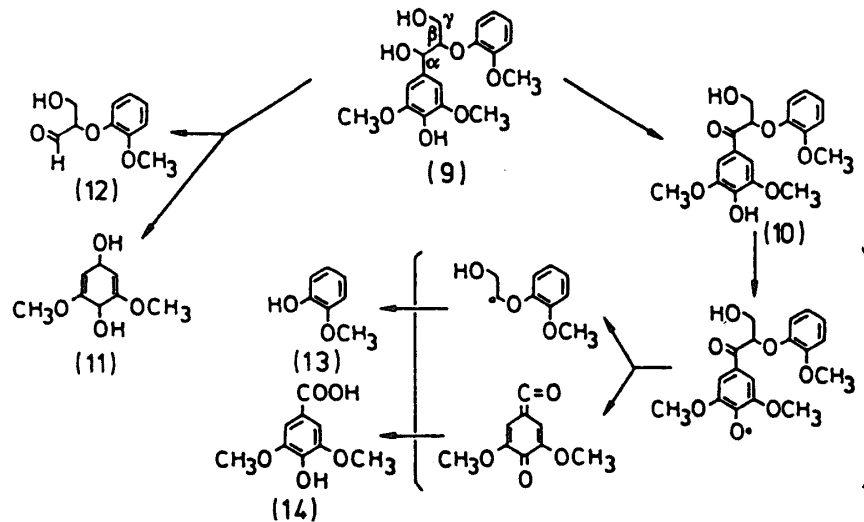


Fig. 15. Possible mechanism for side chain cleavage of a phenolic β -O-4 lignin substructure model by laccase of *Coriolus versicolor*.

カチオンラジカルは水あるいは基質の水酸基の攻撃を受け、炭素中心ラジカル中間体を生成することを示した。これらの C-ラジカル中間体及びフェノキシラジカルは酸素の攻撃を受けて種々の分解生成物を与えるが、ラジカル-ラジカルカップリングによって再重合する。なお、ラッカーゼはフェノール性の基質の酸化のみを触媒してフェノキシラジカルを生成するが、否フェノール性化合物は酸化しない。

2-b β -1 モデル化合物

ジアリールプロパン-1, 3-ジオールは主要なリグニンサブストラクチャーの一つでリグニン中に 5~10% 存在する。我々 (Kamaya, Higuchi 1984a) は *P. chrysosporium* の培養菌体がフェノール性モデルとしての 1, 2-ジシリングルプロパン-1, 3-ジオールを $C_{\alpha}C_{\beta}$ 開裂によりシリングルグリコールとシリングアルデヒドに分解することを明らかにした。一方, Nakatsubo 等 (1982) は否フェノール性ジアリールプロパンである 1, 3-ビス (4-エトキシ-3-メトキシフェニル) プロパン-1, 3-ジオールは *P. chrysosporium* の培養菌体によって 4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリコール及びその α -ケト化合物と 4-エトキシ-3-メトキシベンジルアルコールに開裂されることを発見した。また Enoki, Gold (1982) も同様の結果を得ている。Kirk, Nakatsubo (1983) は ^2H -ラベルした β -1 基質を $^{18}\text{O}_2$ 雰囲気下で *P. chrysosporium* の培養菌体を与えると、 α 位及び β 位の ^2H は分解物中に保持されており、さらにフェニルグリコールの α 位水酸基の酸素は ^{18}O でラベルされている事を見出している。別に我々 (Kamaya, Higuchi 1984b) はカワラタケ培養菌体でもジアリールプロパン-1, 3-ジオールを同様の経路にしたがって分解する事を見出している。

これらの実験結果に基づいて Tien, Kirk (1983) は否フェノール性 β -1 化合物の $C_{\alpha}C_{\beta}$ 開裂によるフェニルグリコールとベンズアルデヒドの生成を触媒する酵素リグニナーゼ (リグニネルオキシダーゼ) を発見した。その後 Renganathan, Gold (1986) 等の酵素のスペクトル的研究によってこの酵素はホースラディッシュペルオキシダーゼとよく似ており、 H_2O_2 によって化合物 I に酸化され、化合物 I はフェノールの様な一電子基質によって還元されて化合物 II になる事が明らかにされた。リグニンのフェノール性及び否フェノール性部分はリグニネルオキシダーゼの化合物 I 及び II によってアリールカチオンラジカル及びフェノキシラジカルに酸化される。なおリグニネルオキシダーゼについての最近の研究 (Higuchi 1968, Kirk, Farrell 1987, Odier, 1987, Umezawa, Higuchi 1987b) はリグニンサブストラクチャーモデル化合物の芳香環の開裂を含むほとんどの分解反応がリグニネルオキシダーゼによって触媒される事を示している。

最近、我々 (Yokota 等 1990, Kawai 等 1987) はフェノール性 β -1 モデル化合物はカワラタケのリグニンペルオキシダーゼ及びラッカーゼによって同様の経路を経て分解される事を見出した。すなわち、ジフェノール性及び1-(3, 5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-(3, 5-ジメトキシ-4-エトキシフェニル) プロパン-1, 3-ジオール(15)と1-(3, 5-ジメトキシ-4-エトキシフェニル)-2-(3, 5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル) プロパン-1, 3-ジオール(16)はカワラタケのラッカーゼによって分解される (Kawai 等 1988a)。この反応で(15)は C_α 酸化により1-(3, 5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-2-(3, 5-ジメトキシ-4-エトキシフェニル)-3-ヒドロキシプロパン(17)に酸化され、 C_α - C_β 開裂により1-(3, 5-ジメトキシ-4-エトキシフェニル)-2-ヒドロキシエタノン(18)とシリンガアルデヒド(19)に、さらにアルキルフェニル開裂により2-(3, 5-ジメトキシ-4-エトキシフェニル)-3-ヒドロキシプロパナール(20)と2, 6-ジメトキシ- p -ヒドロキノン(11)及び p -ベンゾキノン(11')を生じる。

さらに我々はその分解機構を解明するため $^{18}O_2$, $H_2^{18}O$ を用いたトレーサー実験を行い、エタノンには分子状酸素が、ヒドロキノン及びキノンには水の酸素が取り込まれる事を明らかにした。基質(16)はラッカーゼによって C_α - C_β 開裂を受け 1-(3, 5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル) エタン-1, 2-ジオール(21)と3, 5-ジメトキシ-4-エトキシベンズアルデヒド(22)を生じた。またこの反応で水の酸素原子がフェニルグリコールに取り込まれる事も明らかになった。我々はこれらの研究結果に基づいて次の三つの様式の反応が基質のフェノキシラジカルを経て進行するものと考えている。1) C_α - C_β 開裂, 2) アルキルフェニル開裂, 3) C_α の酸化 (図16, 17)。

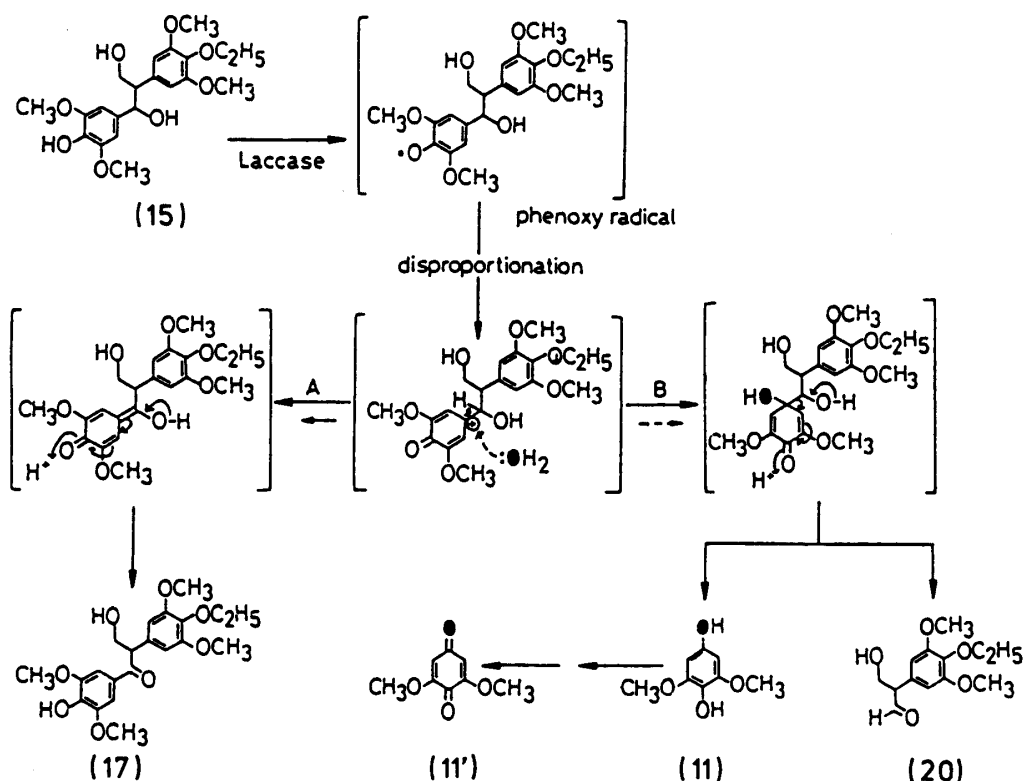


Fig. 16. Possible mechanisms for C_α oxidation (A) and alkyl-phenyl cleavage (B) of a phenolic β -1 model compound by laccase of *C. versicolor*.

2-c β -5 モデル化合物

リグニン中主要なサブストラクチャー (リグニン中10%) であるデヒドロジコニフェリルアルコールは

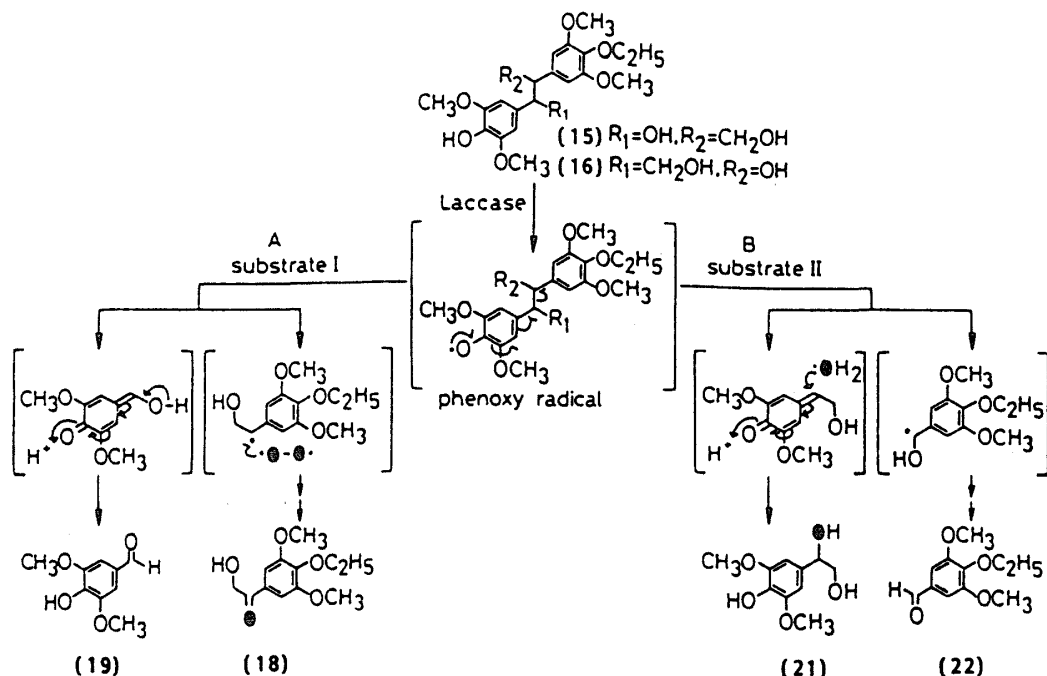


Fig. 17. Possible mechanism for $C_{\alpha}-C_{\beta}$ cleavage of phenolic β -1 model compounds by laccase of *C. versicolor*.

P. chrysosporium によってケイヒアルコール側鎖がグリセロールに転換されてから $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 開裂を受けてフェニルクマラン α' -アルデヒドを生じる。生じたフェニルクマラン α' -アルデヒドは部分的にフェニルクマロンあるいはプロピオシリンゴンに転換される。プロピオシリンゴンは $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 開裂によって5-カルボキシシバニリン酸とシリンガ酸を生成するか、アルキルフェニル開裂によって5-カルボキシシバニリン酸と2,6-ジメトキシ-*p*-ベンゾキノンを生成する (Umezawa 等 1982a)。否フェノール性 β -5モデル化合物としての4-O-メチルデヒドジコニフェリルアルコールも同様にフェニルクマロンを経てペラトルム酸に分解される (Nakatsubo 等 1981)。この場合、 $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 開裂及びアルキルフェニル開裂はともにリグニンペルオキシダーゼによって触媒されているものと推定される。

2-d β - β モデル化合物

我々 (Kamaya, Higuchi 1983) は広葉樹リグニンの主要なサブストラクチャーの一つであるシリンガレジノールが *P. chrysosporium* の培養菌体によって先づ α 位が酸化され、次いで α 位の酸化物はアルキルフェニル開裂を受けて γ -ラクトンと2,6-ジメトキシ-*p*-ベンゾキノンを生成することを見出した。 γ -ラクトンは更に分解され C_6-C_1 化合物を生成した。シリンガレジノールのジベンジル及びジメチルエーテルは分解されず、モノメチルエーテル及びDL-ピノレジノールのモノメチルエーテルは上記と類似した。分解生成物を与えた。更にシリンギル基の3位の脱メチルによるカテコール化合物も生成されたが、否フェノール性基からの脱アルキル反応は見出されなかった。

II-3 β -O-4 2量体, ペラトリルアルコール及びグワヤコール化合物の芳香環開裂反応機構

我々 (Umezawa, Higuchi 1985c) は初めて *P. chrysosporium* の培養菌体による β -O-4 サブストラクチャーモデル化合物の芳香環開裂化合物, β , γ -サイクリックカーボネート (23) を分離同定した。次いで *P. chrysosporium* による β -O-4モデル化合物の芳香環開裂化合物として数種のアリールグリセロールのエステルが分離同定された (Umezawa 等 1986a) (図18)。

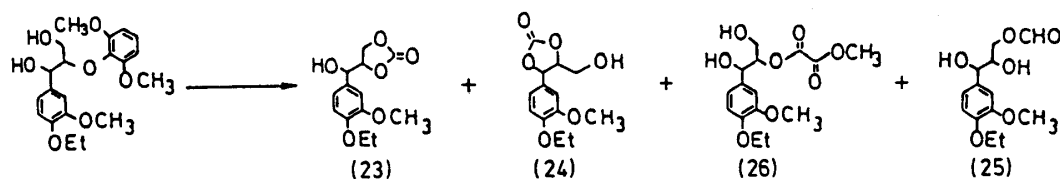


Fig. 18. Aromatic ring cleavage products of lignin substructure models by ligninolytic cultures and lignin peroxidase.

更に 1, 3-ジヒドロキシ-1-(4-エトキシ-3-メトキシフェニル)-2-[U-リング ^{13}C] (2-メトキシフェノキシ) プロパン(27)及び 1, 3-ジヒドロキシ-1-(4-エトキシ-3-メトキシフェニル)-2-[U-リング ^{13}C] (2, 6-ジメトキシフェノキシ) プロパン(28)を基質とするトレーサー実験によってこれらアリアルグリセロールのエステルはすべて ^{13}C でラベルされており, 芳香環開裂によって生じた化合物である事を証明した (図19)。

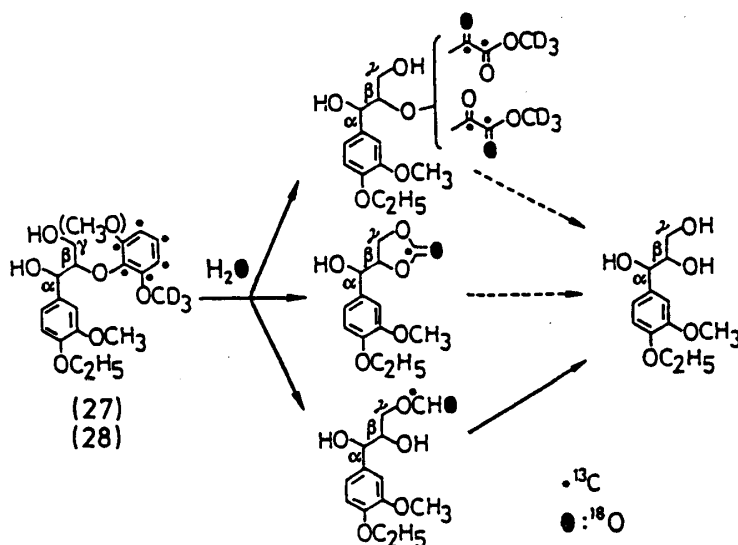


Fig. 19. Formation of aromatic ring cleavage products from arylglycerol-β-aryl-U- ^{13}C , OCD₂ ethers by lignin peroxidase of *P. chrysosporium*.

次いで, 我々はこれらの芳香環開裂化合物の生成が *P. chrysosporium* に特異的なものではなく, カワラタケ (Kawai 等 1985) 及びアラゲカワラタケ (Yoshihara 等 1988) によっても生成する事を確かめた。

これらの培養菌体によって形成された芳香環開裂化合物は β-O-4モデル化合物のリグニンペルオキシダーゼによる分解生成物としても得られ (Umezawa, Higuchi 1986b), サイクリックカーボネート(23), (24), フォルメート(25), メチルオギザレート(26), さらに最近になってアリアルグリセロールのムコネートエステル(29)が分離同定された。なお, 後に Miki 等 (1987) もリグニンペルオキシダーゼによる β-O-4サブストラクチャーモデル化合物の分解物として我々と同様な生成物を分離同定している。ムコネートエステル(29)は芳香環の最初の開裂化合物として基質 B 環の 6 炭素原子全部を保持しており, H₂¹⁸O あるいは $^{18}\text{O}_2$ 下での酵素による分解生成物はムコネート及びメチルオギザレートエステルの二つのカルボニル酸素の一つは水から, 他の一つは分子状酸素に由来することが生成物の GC-MS 分析によって明らかになった (Umezawa, Higuchi 1987a)。

さらに 1, 3-ジヒドロキシ-1-(4-エトキシ-3-メトキシフェニル)-2-(2-[OC²H₃]-メトキシフェノキシ) プ

ロパン(27')の酵素による分解生成物であるメチルオギザレートエステルは基質のB環のメチル基を保持している事も分解物の GC-MS 分析により明らかになった (Umezawa, Higuchi 1986c) (図19)。

これらの結果はこれまで推定されていた (Chen 等 1983) 白色朽菌による芳香環の開裂に先だつ脱メチル反応は必要ではない事を示した。したがって、リグニンペルオキシダーゼによる芳香環の開裂反応は従来から知られているジオキシゲナーゼによる芳香環開裂反応 (Cain 1980) と全く異なる反応である。またマスマスペクトル分析の結果はサイクリックカーボネート及びフォルメートエステルのカルボニル酸素は水に由来する事も明らかになった (図19)。

^{13}C , ^2H , ^{18}O によるこれらのトレーサー実験に基づいて我々 (Umezawa, Higuchi 1987b) は β -O-4リグニンサブストラクチャーモデル化合物のリグニンペルオキシダーゼによる芳香環開裂反応機構として図20を提案した。すなわち、基質のB環の一電子酸化によってカチオンラジカルを生成し、カチオンラジカルは水あるいは基質水酸基による親核反応、次いで酸素分子 (あるいは酸素分子由来のラジカル) による攻撃を受けてエステル(23), (26), (29)を生成する。

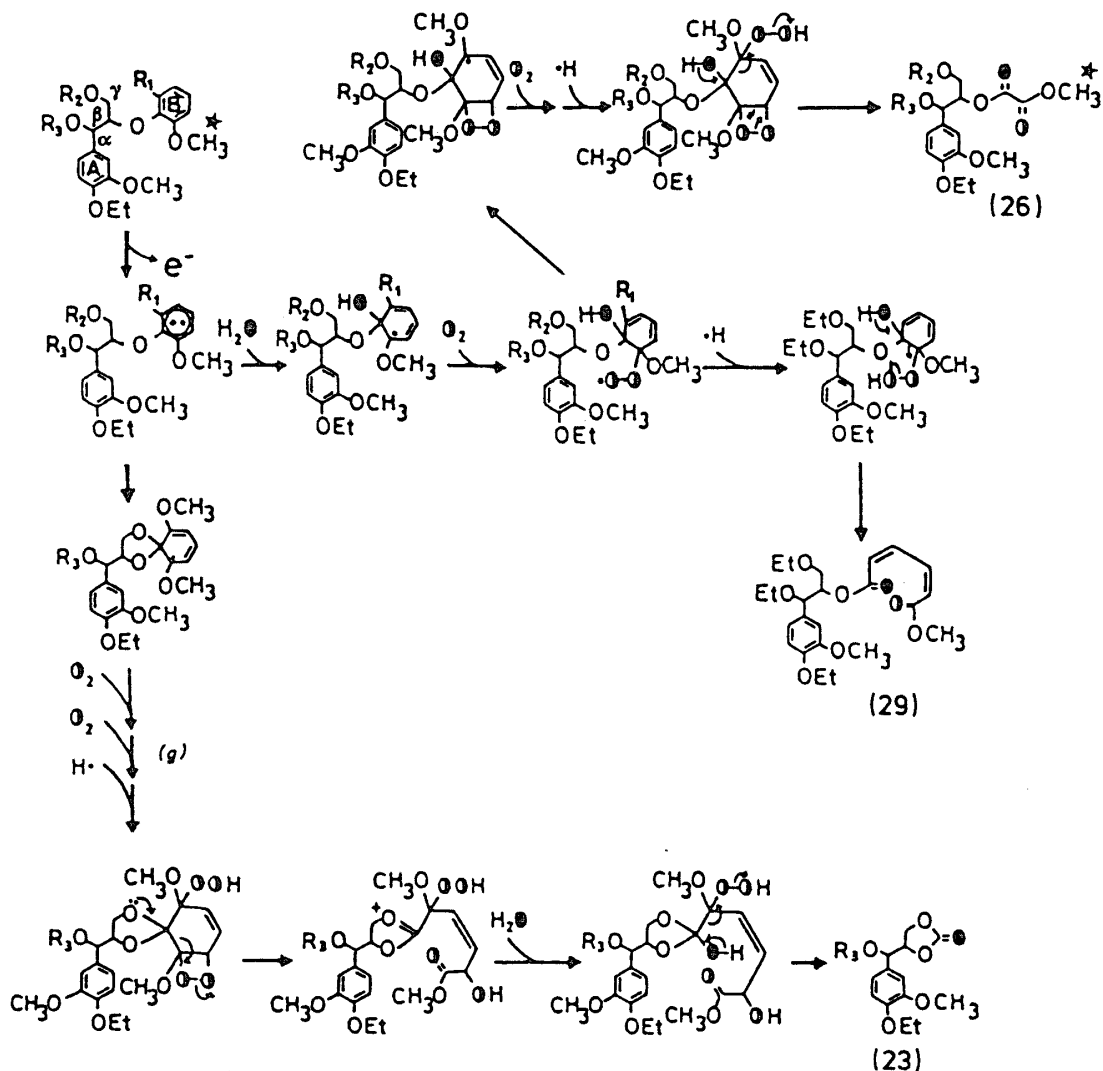


Fig. 20. Mechanisms for aromatic ring cleavage of β -O-4 lignin substructure models by lignin peroxidase of *P. chrysosporium*.

前述した様にこれらの芳香環開裂化合物はカワラタケ及びアラゲカワラタケによっても生成するが、最近カワラタケ (Biswas-Haukes 等 1987) 及び *Phlebia radiata* (Niku-Paavola 等 1988) からリグニンペルオキシダーゼを分泌する事が明らかにされている。

一方, Leisola 等 (1985) は *P. chrysosporium* のリグニンペルオキシダーゼによるベラトリルアルコールの芳香環開裂によってシス及びトランス- γ -ラクトン (31), (32) が生成する事を報告している。我々 (Shimada 等 1987, Hattori 等 1988) はこれらの二化合物の構造を確認するとともに更に δ -ラクトン (33) を分離同定した。さらに我々は $^{18}\text{O}_2$ 及び H_2^{18}O を用いるトレーサー実験によって水の酸素原子はベラトリルアルコールの 3 位, 酸素分子からの酸素原子は 4 位にそれぞれ取り込まれて γ -ラクトン (芳香環開裂化合物) を与え, その機構は β -O-4 化合物の芳香環開裂反応と一致している事を明らかにした (図 21)。

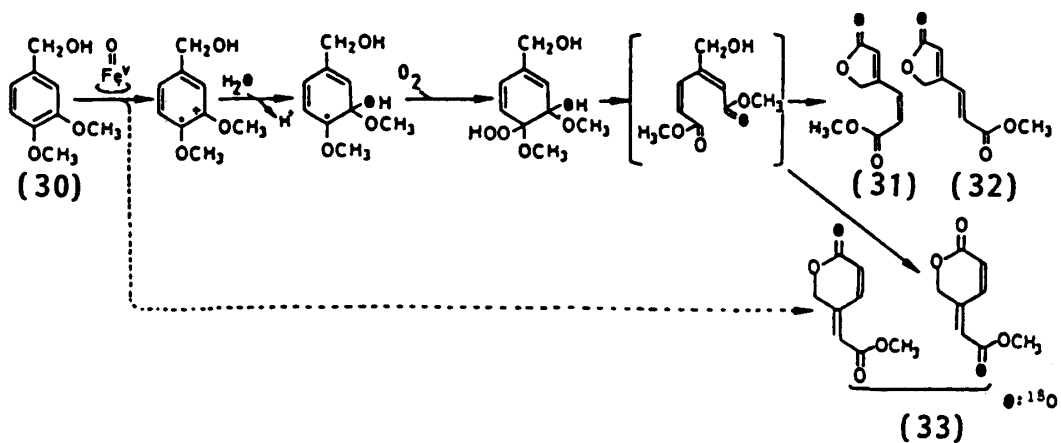


Fig. 21. Mechanisms for degradation of veratryl alcohol by lignin peroxidase of *P. chrysosporium*.

また, 近年我々 (Kawai 等 1988b) は 4, 6-ジ-*t*-ブチルグワヤコール (34) がカワラタケのラッカーゼによっても芳香環開裂化合物であるムコノラクトン誘導体 (35) に転換される事を明らかにした。ムコノラクトン化合物 (35) は Gierer, Imsgard (1977) によって同じ基質 (34) を酸素-アルカリ酸化した際に生成することが認められている。我々はこの研究で (35) 中に分子状酸素原子が取り込まれ, 水の酸素原子は取り込まれ

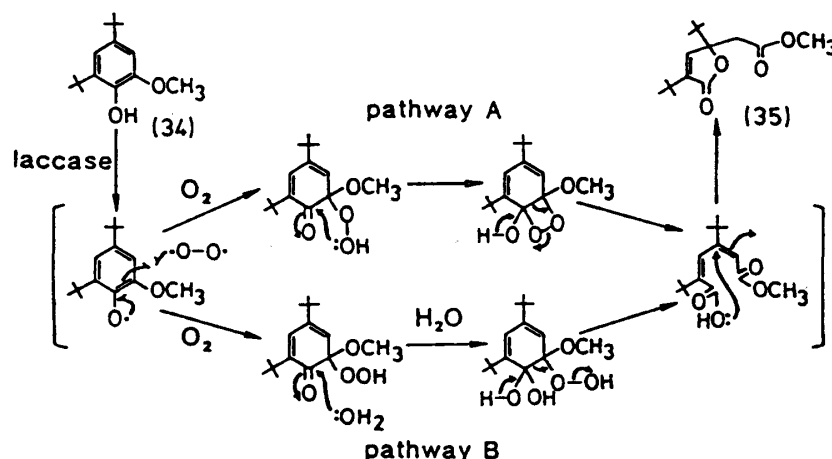


Fig. 22. Mechanisms for degradation of 4,6-di-*t*-butylguaiacol by laccase of *C. versicolor*.

ない事を見出し、図22のA経路を4, 6-ジ-*t*-ブチルグワヤコールのラッカーゼによる分解反応経路として提案した。

これらのすべての研究結果はリグニンモデル化合物の側鎖及び芳香環の開裂反応がリグニンペルオキシダーゼ及びラッカーゼによるフェノール性（ラッカーゼ、リグニンペルオキシダーゼ）及び否フェノール性（リグニンペルオキシダーゼ）化合物の一電子酸化によって引き起こされたこと、リグニンサブストラクチャーモデル化合物の酸化分解の初期の段階に両酵素が関与している事を示している。

II-4 合成リグニン（DHP）の側鎖及び芳香環の開裂機構

Tien, Kirk (1983) はメチル化したスプルースリグニンがリグニンペルオキシダーゼによって分解される事を報告している。彼等はリグニンペルオキシダーゼによって一部低分子リグニンが得られること、また $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 開裂化合物が生成する事をアイソトープトラッピング法で確かめている。他方、Haemmerli 等 (1986) 及び Odier 等 (1987) は遊離の水酸基を含む否アルキル化リグニンをリグニンペルオキシダーゼで処理するとリグニンは一層重合する事を見出している。これらの研究はリグニンペルオキシダーゼによって生成したアリールカチオンラジカル及びフェノキシラジカル、特にフェノキシラジカルが分解反応よりも再重合反応する事を示唆している。

前述した様に、我々は否フェノール性 β -O-4 モデル化合物がリグニンペルオキシダーゼによって最初の芳香環開裂化合物としてシス、シス-ムコネートを与える事を明らかにした。しかし乍ら、リグニンペルオキシダーゼがリグニンに対しても同様の作用をするかどうか明らかではない。我々 (Umezawa, Higuchi 1988) はこの問題を解決するため (β -O-4)-(β - β) トリマー (37) とコニフェリルアルコール (38) のコポリマー (β -O-4)-(β - β)-DHP (36) を合成した (図23)。このコポリマーをジアゾエタンでエチル化後、ゲルろ過 (LH-20/DMF) によって低分子部分を除き、高分子部分 (M. W. > 2200) をリグニンペルオキシダーゼで分解させた。分解生成物はエチルアセテートで抽出し、アセチル化してから TLC で精製し、GC-MS で分析した。その結果、 β -O-4 リグニンサブストラクチャーの分解生成物の場合と同様にサイクリックカーボネート (23), (24), フォルメート (25), アリールグリセロール, α -カルボニルアリールグリセロールが $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 開裂化合物とともに分離同定された。この結果はリグニンペルオキシダーゼが β -O-4 サブストラクチャー化

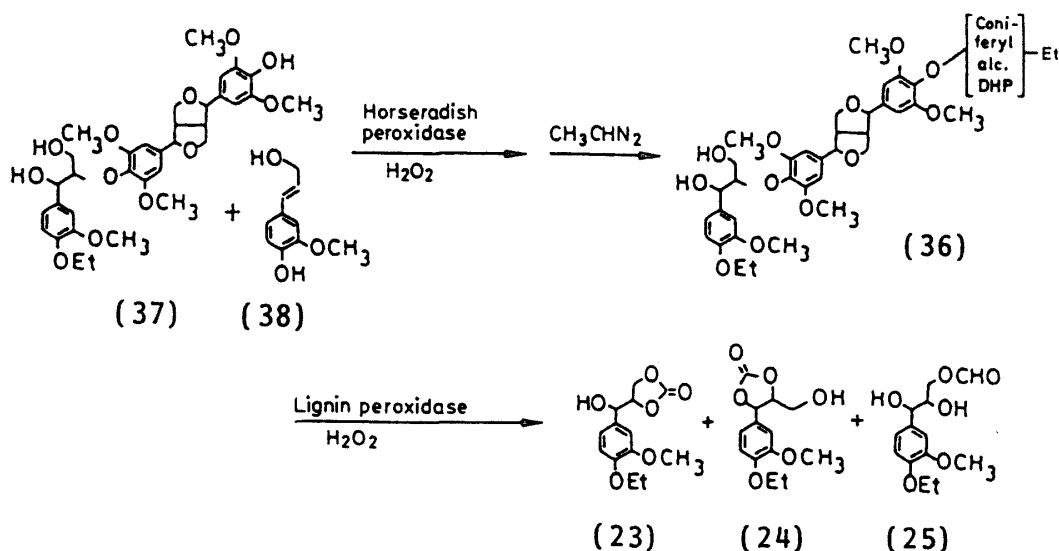


Fig. 23. Aromatic ring cleavage of DHP prepared from a mixture of 4-ethoxy-3-methoxyphenylglycerol- β -syngaresinol ether and coniferyl alcohol by lignin peroxidase of *P. chrysosporium*.

化合物ばかりでなく、合成リグニン (DHP) の $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 開裂, $O-C_4$ 開裂, 芳香環開裂作用にも関与する事を示している。したがって我々は白色朽菌によって分解されたリグニンの分析 (Chen, Chang 1985) によって推定されてきたリグニンの分解反応のほとんどがリグニンペルオキシダーゼ及びラッカーゼによって触媒される事が確かめられたと考えている。

結 論

リグニンの生合成経路及びその反応に関与する酵素がほとんど解明されたので、これらの知見に基づいてリグニン生合成の酵素の遺伝子を制御するなど遺伝子工学的的方法によって木材中のリグニン量及びモノリグノールの組成をコントロールし、消費者に適した材質の改良が可能になるであろう (Trotter 1986)。この目的のためにはアンチセンス遺伝子法を用いるのがよい様である。アンチセンス遺伝子は発現によってアンチセンス mRNA を生成させ、その mRNA は正常の mRNA とハイブリッドを作り、リグニン生合成に関与する一連の遺伝子の全体としての発現を減少させると考えられている (Boudet, Grand 1988)。Boudet 等 (1988) はモノリグノール合成に特異的なシナモイル-CoA レダクターゼ及びシナミルアルコールデヒドロゲナーゼの cDNA を分離し、これら両酵素の遺伝子の発現について研究中である。

一方、リグニンの微生物分解機構は最近になって解明され、リグニンペルオキシダーゼ及びラッカーゼがリグニンのフェノール性 (ラッカーゼ及びリグニンペルオキシダーゼ) 及び否フェノール性 (リグニンペルオキシダーゼ) 芳香環の一電子酸化を触媒してフェノキシラジカル及びアリールカチオンラジカルが生成し、生成したアリールカチオンラジカル及びフェノキシラジカルは主として水、酸素分子との反応を通して側鎖及び芳香環の開裂生成物を与える。

他に H_2O_2 と Mn^{+2} を必要とするマンガンペルオキシダーゼが *P. chrysosporium* の培養濾液から分離された (Kuwahara 等1984, Paszczynski 等1985)。この酵素はフェノールと、 Mn^{+2} を Mn^{+8} に酸化し生成した、 Mn^{+8} はリグニンの様な有機化合物を酸化する。

リグニンペルオキシダーゼ及びマンガンペルオキシダーゼに必要な H_2O_2 の生成にはグルコース-1-オキシダーゼ、グルコース-2-オキシダーゼ、グリオキサールオキシダーゼ及び Mn-ペルオキシダーゼそのものが関与している (Kelley, Reddy 1986, Eriksson 等1988, Kersten, Kirk 1988)。

ごく最近、Hammel ら (1990) は合成リグニンをリグニンペルオキシダーゼで分解させる際、基質及び H_2O_2 濃度を低くすると著しい低分子化が起こり、重合はほとんど起こらない事を明らかにしている。従来プロトリグニンの *in vivo* 分解では分解が円滑に進行することが知られているので、更に腐朽リグニンの重合を防ぐ機構などについても一層の研究が必要である。

リグニンの芳香環開裂はリグニンペルオキシダーゼによって起こるが、バニリン酸、シリング酸等の単純なリグニン分解物の芳香環開裂にはジオキシゲナーゼも関与するのであろう。

P. chrysosporium のリグニナーゼの遺伝子 (Tien, Tu 1987, Farrell 1987, Asada 等1988) 及びカワラタケラッカーゼの遺伝子 (Nakamura 等1987) の解明とそのクローニングが進行している。

リグニン微生物分解の生化学的及び遺伝子工学的的方法が将来、バイオマス変換、バイオパルピング、バイオブリーチング、クラフトパルプ廃液処理等にも新分野を開くものと期待されている。

References

Biosynthesis of lignin

- S.N. ACERBO, W.J. SCHUBERT, F.F. NORD. 1960: Investigations on lignins and lignification XXII. The conversion of D-glucose into lignin in Norway spruce. J. Amer. Chem. Soc. 82: 725-739
E. ADLER. 1977: Lignin chemistry-past, present and future. Wood Sci. Technol. 11: 169-218

- D.E. BLAND. 1963: Lignification in *Eucalyptus*. Incorporation of phenylalanine, tyrosine and methionine into *Eucalyptus sideroxylon* and *Eucalyptus camaldulensis*. Biochem. J. 88: 523-525
- S.A. BROWN, A.C. NEISH. 1955a: Shikimic acid as a precursor in lignin biosynthesis. Nature 175: 688-690
- S.A. BROWN, A.C. NEISH. 1955b: Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon IV. Formation from some aromatic monomers. Can. J. Biochem. Physiol. 33: 948-962
- S.A. BROWN, A.C. NEISH. 1956: Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon V. Comparative studies on different plant species. Can. J. Biochem. Physiol. 34: 767-778
- S.A. BROWN, A.C. NEISH. 1959: Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon VIII. Isolation of radioactive hydrogenolysis products of lignins. J. Amer. Chem. Soc. 81: 2419-2424
- S.A. BROWN. 1961: Chemistry of lignification. Science 134: 305-313
- B.D. DAVIS. 1955: Intermediates in amino acid biosynthesis. Adv. Enzymology 16: 247-312
- H. EBEL, H. GRISEBACH. 1973: Reduction of cinnamic acids to cinnamyl alcohols with an enzyme preparation from cell suspension cultures of soybean, (*Glycine max.*) FEBS Lett. 30: 141-143
- G. EBERHARDT, W.J. SCHUBERT. 1956: Investigations on lignins and lignification XVII. Evidence for the mediation of shikimic acid in the biogenesis of lignin building stone. J. Amer. Chem. Soc. 78: 2835-2837
- E.F. ELSTNER, A. HEUPEL. 1976: Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Aromoracia lapathifolia* Gilib.). Planta 130: 175-180
- O. ERIKSSON, D.A.I. GORING, B.O. LINDGREN. 1980: Structural studies on the chemical bonds between lignins and carbohydrates in spruce wood. Wood Sci. Technol. 14: 267-279
- B.J. FINKLE, R.F. NELSON. 1963: Enzyme reactions with phenolic compounds: a meta-O-methyltransferase in plants. Biochim. Biophys. Acta 76: 747-749
- B.J. FINKLE, M.S. MASRI. 1964: Methylation of polyhydroxyaromatic compounds by pampas grass O-methyltransferase. Biochim. Biophys. Acta 85: 167-169
- K. FREUDENBERG, R. KRAFT, W. HEIMBERGER. 1951: Über den Sinapin alkohol, den Coniferyl alkohol und ihre Dehydrierungspolymerisate. Chem. Ber. 84: 472-476
- K. FREUDENBERG, F. NIEDERCORN. 1958: Anwendung radioaktiver Isotope bei der Erforschung des Lignins VIII. Umwandlung des Phenylalanins in Coniferin und Fichtenlignin. Cem. Ber. 91: 591-597
- K. FREUDENBERG, G. GRION. 1959: Beitrag zum Bildungsmechanismus des Lignins und der Lignin-Kohlenhydratbindung. Chem. Ber. 92: 1355-1363
- K. FREUDENBERG. 1965: Lignin: its constitution and formation from *p*-hydroxycinnamyl alcohols. Science 148: 595-600
- K. FREUDENBERG. 1968: The constitution and biosynthesis of lignin. In: Freudenberg, K.: Neish, A. C.: Constitution and Biosynthesis of Lignin Berlin: Springer 47-122
- M. FUJITA, H. SAIKI, H. HARADA. 1983: Deposition of cellulose, hemicelluloses and lignin in the differentiating tracheids. Proc. 1983 Intern. Symp. Wood Pulping Chemistry 1: 14-19
- O.L. GAMBORG, A.C. NEISH. 1959: Biosynthesis of phenylalanine and tyrosine in young wheat and buckwheat plants. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 1277-1285
- O.L. GAMBORG. 1967a: Aromatic metabolism in plants V. The biosynthesis of chlorogenic acid and lignin in potato cell cultures. Can. J. Biochem. 45: 1451-1457
- O.L. GAMBORG. 1967b: Aromatic metabolism in plants IV. The interconversion of shikimic acid and quinic acid by enzymes from plant cell cultures. Phytochem. 6: 1067-1073
- O. GOLDSCHMIDT, G.R. QUIMBY. 1964: The role of quinic acid. Tappi 47: 528-533
- C. GRAND, A. BOUDET, A.M. BOUDET. 1983: Isoenzymes of hydroxycinnamate: CoA ligase from poplar stems. Properties and tissue distribution. Planta 158: 225-229
- C. GRAND. 1984: Ferulic acid-5-hydroxylase: a new cytochrome P-450 dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin biosynthesis FEBS Lett. 169: 7-11
- G.G. GROSS. 1977: Biosynthesis of lignin and related monomers Recent Adv. in Phytochemistry 11: 141-187
- G.G. GROSS, C. JANSE, E.F. ELSTNER. 1977: Involvement of malate, monophenols, and superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish (*Aromoracia lapa-*

- thifolia* Gilib). *Planta* 136: 271-276
- J.M. HARKIN, T.R. OBST. 1973: Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. *Science* 180: 296-297
- M. HASEGAWA, T. NAKAGAWA, S. YOSHIDA. 1957: Occurrence of shikimic acid in plant tissues II. *J. Jpn. Forest Soc.* 39: 159-163
- M. HASEGAWA, T. HIGUCHI, H. ISHIKAWA. 1960: Formation of lignin in tissue culture of *Pinus strobus*. *Plant & Cell Physiology* 1: 173-182
- M. HASEGAWA, T. HIGUCHI. 1960: Formation of lignin from glucose in *Eucalyptus* tree. *J. Jpn. Forest Soc.* 42: 305-308
- K. HAHLBROCK, H. GRISEBACH. 1979: Enzymic control in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Ann. Rev. Plant Physiology* 30: 105-130
- D. HESS. 1964a: Methionin als Methylgruppendonator für Zimtsäure und Anthocyane. *Z. Naturforsch.* 16b: 148-150
- D. HESS. 1964b: Der Einbau Methylgruppen-markierter Ferulasäure und Siapinsäure in die Anthocyane von *Petunia hybrida*. *Planta* 60: 568-581
- D. HESS. 1965: Vergleich der methylierenden Potenzen von Genotypen mit verschiedenartig methylierten Anthocyanen im zellfreien System. *Z. Pflanzenphysiol.* 53: 1-18
- T. HIGUCHI. 1958: Further studies on phenol oxidase related to the lignin biosynthesis. *J. Biochem. (Japan)* 45: 515-528
- T. HIGUCHI, Y. ITO, 1958: Dehydrogenation products of coniferyl alcohol formed by the action of mushroom phenol oxidase, rhus-laccase and radish peroxidase. *J. Biochem. (Japan)* 45: 575-579
- T. HIGUCHI. 1959: Studies on the biosynthesis of lignin. In: Kratzl, K.; Billek, G. (eds): *Biochemistry of Wood*. New York: Pergamon Press 161-188
- T. HIGUCHI. 1962: Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon X. Formation of lignin from phenylpropanoids in tissue culture of white pine. *Can. J. Biochem. Physiol.* 40: 31-34
- T. HIGUCHI, S.A. BROWN. 1963a: Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon XII. The biosynthesis and metabolism of sinapic acid. *Can. J. Biochem. Physiol.* 41: 613-620
- T. HIGUCHI, S.A. BROWN. 1963b: Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon XIII. The phenylpropanoid system in lignification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 41: 621-628
- T. HIGUCHI, F. BARNOUD. 1964: Les lignines les tissus végétaux cultivés in vitro. *Chimie Biochimie de la Lignine, Cellulose, Hémicelluloses. Les Imprimeries Réunies de Chambéry* 255-274
- T. HIGUCHI. 1966: Role of phenylalanine deaminase and tyrase in the lignification of bamboo. *Agric. Biol. Chem.* 30: 667-673
- T. HIGUCHI, Y. ITO, I. KAWAMURA. 1967a: *p*-Hydroxyphenylpropane component of grass lignin and role of tyrosine ammonia-lyase in its formation. *Phytochem.* 6: 875-881
- T. HIGUCHI, M. SHIMADA, H. OHASHI. 1967b: Role of *O*-methyltransferase in the lignification of bamboo. *Agric. Biol. Chem.* 31: 1459-1465
- T. HIGUCHI, M. SHIMADA, F. NAKATSUBO, M. TANAHASHI. 1977: Differences in biosynthesis of guaiacyl and syringyl lignins in woods. *Wood Sci. Technol.* 11: 153-167
- T. HIGUCHI. 1983: Biosynthesis and microbial degradation of lignin. In: Akazawa, T.; Asahi, T.; Imaseki, H. (eds) *The New Frontiers in Plant Biochemistry*. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press 23-46
- T. HIGUCHI. 1985: Biosynthesis of lignin. In: Higuchi, T. (ed) *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components* Orlando: Academic Press 141-160
- A.C. HILL, M.J.C. RHODES. 1975: The properties of cinnamic-4-hydroxylase of aged swede root disks. *Phytochem.* 14: 2387-2391
- I. KAWAMURA, T. HIGUCHI. 1964: Comparative studies of milled wood lignins from different taxonomical origins by IR spectrometry. *Chimie Biochimie de la Lignine, Cellulose, Hémicelluloses. Les Imprimeries Réunies de Chambéry* 439-456
- J. KOUKOL, E.E. CONN. 1961: The metabolism of aromatic compounds in higher plants IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* 236: 2692-2698
- K. KRATZL, H. FAIGLE. 1959: Der Einbau von D-Glucose-1-¹⁴C in das Phenylpropanegerüst des Fich-

- tenlignins. *Monatsh. Chem.* 90 : 768-770
- H. KURODA, M. SHIMADA, T. HIGUCHI. 1975 : Purification and properties of *O*-methyltransferase involved in the biosynthesis of gymnosperm lignin. *Phytochem.* 14 : 1759-1763
- H. KUTSUKI, T. HIGUCHI. 1981 : Activities of some enzymes of lignin formation in reaction woods of *Thuja orientalis*, *Metasequoia glyptostroboides* and *Robinia pseudoacacia*. *Planta* 152 : 365-368
- H. KUTSUKI, M. SHIMADA, T. HIGUCHI. 1982a : Distribution and role of *p*-hydroxycinnamate : CoA ligase in lignin biosynthesis. *Phytochem.* 21 : 267-271
- H. KUTSUKI, M. SHIMADA, T. HIGUCHI. 1982b : Regulatory role of cinnamyl alcohol dehydrogenase in the formation of guaiacyl and syringyl lignins. *Phytochem.* 21 : 19-23
- N.G. LEWIS, E. YAMAMOTO, J.B. WOOTEN, G. JUST, H. OHASHI, G.H.N. TOWERS. 1987 : Monitoring biosynthesis of wheat cell wall phenylpropanoids in situ. *Science* 237 : 1344-1346
- R.L. MANSELL, J. STÖCKIGT, M.H. ZENK. 1972 : Reduction of ferulic acid to coniferyl alcohol in a cell free system from a higher plant. *Z. Pflanzenphysiol.* 68 : 286-288
- R.L. MANSELL, G.G. GROSS, J. STÖCKIGT, H. FRANK, M.H. ZENK. 1974 : Purification and properties of cinnamyl alcohol dehydrogenase from higher plants involved in lignin biosynthesis. *Phytochem.* 13 : 2427-2435
- D.R. MCCALLA, A.C. NEISH. 1959a : Metabolism of phenylpropanoid compounds in *Salvia* I. Biosynthesis of phenylalanine and tyrosine. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 : 531-536
- D.R. MCCALLA, A.C. NEISH. 1959b : Metabolism of phenylpropanoid compounds in *Salvia* II. Biosynthesis of phenolic cinnamic acids. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 : 537-547
- T. MINAMIKAWA, K. KOSHIBA. 1981 : Synthesis of phenylpropanoids, In : Asahi, T. (ed) *Metabolism I. Plant Physiology* (in Japanese) Tokyo : Asakura Shoten 215-222
- B. MONTIES. 1985 : Recent advances on lignin inhomogeneity. In : Van Sumere, C. F.; Lea, P. J. (eds) *Annu. Proceedings of Phytochem. Soc. Europe* 25 : 161-181 Oxford : Clarendon Press
- Y. MUSA, D.A.I. GORING. 1975 : Distribution of syringyl and guaiacyl moieties in hardwoods as indicated by ultraviolet microscopy. *Wood Sci. Technol.* 9 : 45-58
- W. NAKAMURA. 1967 : Studies on the biosynthesis of lignin I. Disproof against the catalytic activity of laccase in the oxidation of coniferyl alcohol. *J. Biochem. (Japan)* 62 : 54-60
- Y. NAKAMURA, T. HIGUCHI. 1976 : Ester linkage of *p*-coumaric acid in bamboo lignin. *Holzforsch.* 30 : 187-191
- Y. NAKAMURA, T. HIGUCHI. 1978a : Ester linkages of *p*-coumaric acid in bamboo lignin II. Syntheses of coniferyl *p*-hydroxybenzoate and coniferyl *p*-coumarate as possible precursors of aromatic acid esters in lignin. *Cellulose Chem. Technol.* 12 : 199-208
- Y. NAKAMURA, T. HIGUCHI. 1978b : Ester linkage of *p*-coumaric acid in bamboo lignin III. Dehydrogenative polymerization of coniferyl *p*-hydroxybenzoate and coniferyl *p*-coumarate. *Cellul. Chem. Technol.* 12 : 209-221
- Y. NAKAMURA, H. FUSHIKI, T. HIGUCHI. 1974 : Metabolic differences between gymnosperms and angiosperms in the formation of syringyl lignin. *Phytochem.* 13 : 1777-1784
- A.C. NEISH. 1961 : The formation of *m*- and *p*-coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. *Phytochem.* 1 : 1-24
- A.C. NEISH. : Monomeric intermediates in the biosynthesis of lignin. In : Freudenberg, K.; Neish, A.C. : *Constitution and Biosynthesis of Lignin*. Berlin : Springer-Verlag 3-37
- H. OHASHI, E. YAMAMOTO, N.G. LEWIS, G.H.N. TOWERS. 1987 : 5-Hydroxyferulic acid in *Zeamays* and *Hordeum vulgare* cell walls. *Phytochem.* 26 : 1915-1916
- J.R.M. POTTS, R. WEKLYCH, E.E. CONN. 1974 : Metabolism of aromatic compounds in higher plants XI. 4-Hydroxylation of cinnamic acid by sorghum microsomes and the requirement for cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 249 : 5019-5026
- J.E. POULTON. 1981 : Transmethylation and demethylation reactions in the metabolism of secondary plant products. In : Conn, E. E. (ed) *The Biochemistry of Plants* 7 : 667-723 New York : Academic Press
- M.J.C. RHODES, L.S.C. WOOLTORTON. 1975 : Enzymes involved in the reduction of ferulic acid to coniferyl alcohol during the aging of discs of swede root tissues. *Phytochem.* 14 : 1235-1240

- D.W. RUSSELL. 1971: The metabolism of aromatic compounds in higher plants. J. Biol. Chem. 246: 3870-3878
- A. SAKAKIBARA. 1983: Chemical structure of lignin related mainly to degradation products. In: Higuchi, T.; Chang, H-m.; Kirk, T. K. (eds): Recent Advances in Lignin Biodegradation Research. Tokyo: UNI Publisher 12-33
- T. M. SALEH, L. LENEY, K.V. SARKANEN. 1967: Radioautographic studies of cotton wood, Douglas fir and wheat plants. Holzforsch. 21: 116-120
- F. SARNI, C. GRAND, A.M. BOUDET. 1984: Purification and properties of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase from poplar stems (*Populus × euramericana*). Eur. J. Biochem. 139: 257-265
- M. SHIMADA, H. OHASHI, T. HIGUCHI. 1970: O-Methyltransferases involved in the biosynthesis of lignins. Phytochem. 9: 2463-2470
- M. SHIMADA. 1972: Biochemical studies on bamboo lignin and methoxylation in hardwood and softwood. Wood Research No. 53: 19-65.
- M. SHIMADA, H. FUSHIKI, T. HIGUCHI. 1973a: Mechanism of biochemical formation of the methoxyl groups in soft and hardwood lignins. Mokuzai Gakkaishi 19: 13-21
- M. SHIMADA, H. KURODA, T. HIGUCHI. 1973b: Evidence for the formation of methoxyl groups of ferulic and sinapic acids in Bambusa by the same O-methyltransferase. Phytochem. 12: 2873-2875
- D.C.C. SMITH. 1955: Ester groups in lignin. Nature 176: 267
- D.L. SIEHL, E.E. CONN. 1988: Kinetics and regulatory properties of arogenate dehydratase in seedlings of *Sorghum bicolor* (L) Moench. Arch. Biochem. Biophys. 260: 822-829
- D.B. SPRINSON. 1960: The biosynthesis of aromatic compounds from D-glucose. Adv. Carbohydrate Chemistry 15: 235-270
- J. STÖCKIGT, R.L. MANSELL, G.G. GROSS, M.H. ZENK. 1973: Enzymic reduction of *p*-coumaric acid via *p*-coumaroyl-CoA to *p*-coumaryl alcohol by a cell free system from *Forsythia* sp. Z. Pflanzenphysiol. 70: 305-307
- N. TAKAHASHI, T. KOSHIIJIMA. 1988: Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. Wood Sci. Technol. 22: 231-241
- M. TANAHASHI, T. AOKI, T. HIGUCHI. 1981: Dehydrogenative polymerization of monolignols by peroxidase and H₂O₂ in a dialysis tube III. Formation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs). Mokuzai Gakkaishi 27: 116-124
- K. TANAKA, F. NAKATSUBO, T. HIGUCHI. 1976: Reaction of guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether with sugars I. Reaction of quinone methide with D-glucuronic acid. Mokuzai Gakkaishi 22: 587-590
- K. TANAKA, F. NAKATSUBO, T. HIGUCHI. 1979: Reaction of guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether with sugars II. Reaction of quinone methide with pyranohexoses. Mokuzai Gakkaishi 25: 653-659
- N. TERASHIMA, K. FUKUSHIMA. 1988: Heterogeneity in formation of lignin XI. An autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin. Wood Sci. Technol. 22: 259-270
- P.F.T. VAUGHAN, V.S. BUTT. 1970: The action of *o*-dihydric phenols in the hydroxylation of *p*-coumaric acid by a phenolase from leaves of spinach beet (*Beta vulgaris* L.). Biochem. J. 119: 89-94
- A.B. WARDROP, D.E. BLAND. 1959: The process of lignification in woody plants. In: Kratzl, K.; Billek, G. (eds): Biochemistry of Wood. New York: Pergamon Press 92-116
- L.H. WEINSTEIN, C.A. PORTER, H.J. LAURENCOT. 1959a: Evidence for the conversion of quinic acid to shikimic acid in roses. Nature 183: 326
- L.H. WEINSTEIN, C.A. PORTER, H.J. LAURENCOT. 1959b: Quinic acid as a precursor in aromatic biosynthesis in the rose. Contrib. Boyce Thompson Inst. 20: 121-134
- L.H. WEINSTEIN, C.A. PORTER, H.J. LAURENCOT. 1961: Role of quinic acid in aromatic biosynthesis in higher plants. Contrib. Boyce Thompson Inst. 21: 201-214
- S. YOSHIDA. 1969: Biosynthesis and conversion of aromatic amino acids in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 20: 41-62
- M.R. YOUNG, G.H.N. TOWERS, A.C. NEISH. 1966: Taxonomic distribution of ammonia-lyases for L-phenylalanine and L-tyrosine in relation to lignification. Can. J. Botany 44: 341-349

Microbial degradation of lignins

- Y. ASADA, Y. KIMURA, M. KUWAHARA, A. TSUKAMOTO, K. KOIDE, A. OKA, M. TAKANAMI. 1988: Cloning and sequencing of a ligninase gene from a lignin degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 469-473
- D. BISWAS-HAWKES, A.P.J. DODSON, P.J. HARVEY, J.M. PALMER. 1987: Ligninases from white-rot fungi. In: Odier, E. (ed) Lignin Enzymatic and Microbial Degradation. Paris: INRA 125-130
- A.M. BOUDET, C. GRAND. 1988: Lignin synthesis inhibitors: Potential tools for improving nutritional value of plant crops. Plant Growth Regulators and Agricultural Uses, in press
- A.M. BOUDET. 1988: Personal communication
- R.B. CAIN. 1980: The uptake and catabolism of lignin-related aromatic compounds and their regulation in microorganisms. In: Kirk, T. K.; Higuchi, T.; Chang, H.-m. (eds) Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications I: 21-60 Boca Raton: CRC Press
- H.-m. CHANG, C.-L. CHEN, T.K. KIRK. 1980: The chemistry of lignin degradation by white-rot fungi. In: Kirk, T. K.; Higuchi, T.; Chang, H.-m. (eds) Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications I: 215-230 Boca Raton: CRC Press
- C.-L. CHEN, H.-m. CHANG, T.K. KIRK. 1982a: Aromatic acids produced during degradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium*. Holzforsch. 36: 3-9
- C.-L. CHEN, M.G.S. CHUA, J. EVANS, H.-m. CHANG, T.K. KIRK. 1982b: ^{13}C -NMR spectroscopic study of spruce lignin degraded by *Phanerochaete chrysosporium* II. Synthesis and chemical shift of model compounds. Holzforsch. 3: 239-247
- C.-L. CHEN, H.-m. CHANG, T.K. KIRK. 1983: Carboxylic acids produced through oxidative cleavage of aromatic rings during degradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Wood Chem. Technol. 3: 35-57
- C.-L. CHEN, H.-m. CHANG. 1985: Chemistry of lignin biodegradation. In: Higuchi (ed) Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Orlando: Academic Press 535-556
- M.G.S. CHUA, C.-L. CHEN, H.-m. CHANG, T.K. KIRK. 1982: ^{13}C -NMR spectroscopic study of spruce lignin degraded by *Phanerochaete chrysosporium* I. New structures. Holzforsch. 36: 165-172
- A. ENOKI, G.P. GOLDSBY, M.H. GOLD. 1980: Metabolism of the lignin model compounds veratrylglycerol- β -guaiacyl ether and 4-ethoxy-3-methoxyphenylglycerol- β -guaiacyl ether by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 125: 227-232
- A. ENOKI, M.H. GOLD. 1982: Degradation of the diarylpropane lignin model compound 1-(3',4'-diethoxyphenyl)-1,3-dihydroxy-2-(4"-methoxyphenyl) propane and derivatives by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 132: 123-130
- K.-E. ERIKSSON, B. PETTERSON, J. VOLE, V. MUSILEK. 1986: Formation and partial characterization of glucose-2-oxidase, a H_2O_2 producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. App. Microbiol. Biotechnol. 23: 257-262
- R.L. FARRELL. 1987: A new key enzyme for lignin degradation. Enzyme Engineering 8, 501: 150-158
- T. FUKUZUMI, T. SHIBAMOTO. 1965: Enzymatic degradation of lignin IV. Splitting of veratrylglycerol- β -guaiacyl ether by enzyme of *Poria subacida*. Mokuzai Gakkaishi 11: 248-252
- J. GIERER, F. IMSGARD. 1977: Studies on the autoxidation of *t*-butyl-substituted phenols in alkaline media 1. Reactions of 4-*t*-butylguaiacol. Acta Chem. Scand. B 31: 537-545
- J. K. GLENN, M.A. MORGAN, M.B. MAYFIELD, M. KUWAHARA, M.H. GOLD. 1983: An extracellular H_2O_2 requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114: 1077-1083
- T. HABE, M. SHIMADA, T. UMEZAWA, T. HIGUCHI. 1985: Evidence for deuterium retention in the products after enzymatic C-C and ether bond cleavages of deuterated lignin model compounds. Agric. Biol. Chem. 49: 3505-3510
- S.D. HEAMMERLI, M.S.A. LEISOLA, A. FIECHTER. 1986: Polymerization of lignins by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Lett. 35: 33-36
- K.E. HAMMEL, M.A. MOEN. 1990: Depolymerization of a synthetic lignin *in vivo* by lignin peroxidase. Biophys. Res. commun, in press

- K. HATA. 1966: Investigations on lignins and lignification XXXIII. Studies on lignins isolated from spruce wood decayed by *Poria subacida*. *Holzforsch.* 20: 142-147.
- T. HATTORI, M. SHIMADA, T. UMEZAWA, T. HIGUCHI, M.S.A. LEISOLA, A. FIECHTER. 1988: New mechanism for oxygenative ring cleavage of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase model. *Agric. Biol. Chem.* 52: 879-880
- M.E.K. HENDERSON. 1961: The metabolism of aromatic compounds related to lignin by some hymenomycetes and yeast-like fungi of soil. *J. Gen. Microbiol.* 26: 155-165
- T. HIGUCHI, I. KAWAMURA, H. KAWAMURA. 1955: Properties of the lignin in decayed wood. *J. Jpn. Forest. Soc.*, 37: 298-302
- T. HIGUCHI, F. NAKATSUBO. 1980: Synthesis and biodegradation of oligolignols. *Kemia-Kemi* 9: 481-488
- T. HIGUCHI. 1985: Degradative pathways of lignin model compounds In: Higuchi (ed) *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. Orlando: Academic Press 557-578
- T. HIGUCHI. 1986: Catabolic pathways and role of ligninases for the degradation of lignin substructure models by white-rot fungi. *Wood Research (Kyoto)* 73: 58-81
- T. HIGUCHI. 1988: Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi. *Proc. ACS Symp. Biogenesis and Biodegradation of Plant Cell Wall Polymers* 482-502
- H. ISHIKAWA, W.J. SCHUBERT, F.F. NORD. 1963a: Investigation on lignins and lignification XXVII. The enzymic degradation of softwood lignin by white-rot fungi. *Arch. Biochem. Biophys.* 100: 131-139
- H. ISHIKAWA, W.J. SCHUBERT, F.F. NORD. 1963b: Investigations of lignins and lignification XXVIII. The degradation by *Polyporus versicolor* and *Fomes formentarius* of aromatic compounds [structurally related to softwood lignin. *Arch. Biochem. Biophys.* 100: 140-149
- Y. KAMAYA, T. HIGUCHI. 1983: Degradation of D,L-syringaresinol and its derivatives, β - β linked lignin substructure models by *Phanerochaete chrysosporium*. *Mokuzai Gakkaishi*, 29: 789-794
- Y. KAMAYA, T. HIGUCHI. 1984a: Metabolism of 1, 2-disyringylpropane-1, 3-diol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Mokuzai Gakkaishi* 30: 237-239
- Y. KAMAYA, T. HIGUCHI. 1984b: Metabolism of nonphenolic diarypropane lignin substructure model compound by *Coriolus versicolor*. *FEMS Microbiol. Lett.* 22: 89-92
- S. KAWAI, T. UMEZAWA, T. HIGUCHI. 1985: Arylglycerol- γ -formyl ester as an aromatic ring cleavage product of nonphenolic β -O-4 lignin substructure model compounds degraded by *Coriolus versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1505-1508
- S. KAWAI, T. UMEZAWA, M. SHIMADA, T. HIGUCHI, K. KOIDE, T. NISHIDA, N. MOROHOSHI, T. HARAGUCHI. 1987: α -C β cleavage of phenolic β -1 lignin substructure model compound by laccase of *Coriolus versicolor*. *Mokuzai Gakkaishi* 33: 792-797
- S. KAWAI, T. UMEZAWA, T. HIGUCHI. 1988a: Degradation mechanisms of phenolic β -1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. *Arch. Biochem. Biophys.* 262: 99-110
- S. KAWAI, T. UMEZAWA, M. SHIMADA, T. HIGUCHI. 1988b: Aromatic ring cleavage of 4, 6-di (tert-butyl) guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*. *FEBS Lett.* 236: 309-311
- S. KAWAI, T. HIGUCHI, K. NABETA, H. OKUYAMA, 1990: Degradation mechanisms of phenolic β -O-4 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor* In: *Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture*. Butterworth-Heinemann. 359-365
- R.L. KELLEY, C.A. REDDY. 1986: Identification of glucose oxidase activity as primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 144: 248-253
- P.J. KERSTEN, M. TIEN, B. KALYANARAMAN, T.K. KIRK. 1985: The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.* 260: 2609-2612
- P.J. KERSTEN, T.K. KIRK. 1987: Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169: 2195-2202
- T.K. KIRK, H.-m. CHANG. 1974: Decomposition of lignin by white-rot fungi I. Isolation of heavily degraded lignins from decayed spruce. *Holzforsch.* 28: 218-222
- T. K. KIRK, H.-m. CHANG. 1975: Decomposition of lignin by white-rot fungi II. Characterization of

- heavily degraded lignins from decayed spruce. *Holzforsch.* 29: 56-64
- T.K. KIRK, F. NAKATSUBO. 1983: Chemical mechanisms of an important cleavage reaction in the fungal degradation of lignin. *Biochem. Biophys. Acta* 756: 376-384
- T.K. KIRK, R.L. FARRELL. 1987: Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 465-505
- M. KUWAHARA, J.K. GLENN, M.A. MORGAN, M.H. GOLD. 1984: Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169: 247-250
- M.S.A. LEISOLA, B. SCHMIDT, U. THANEI-WYSS, A. FIECHTER. 1985: Aromatic ring cleavage of veratryl alcohol by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 189: 267-270
- K. MIKI, V. RENGANATHAN, M.H. GOLD. 1986: Novel aryl ether rearrangement catalyzed by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 203: 235-238
- K. MIKI, V. RANGANATHAN, M.B. MAYFIELD, M.H. GOLD. 1987: Aromatic ring cleavage of a β -biphenyl ether dimer catalyzed by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 210: 199-203
- M. NAKAMURA, A. YOSHITAKE, Y. KATAYAMA, N. MOROHOSHI, T. HARAGUCHI. 1987: Cloning of enzyme genes of *Coriolus versicolor* II. Analysis of sugar residue of laccase II, and synthesis of cDNA. *Abst. 32th Lignin Symposium. Fukuoka, Japan* 83-86
- F. NAKATSUBO, T.K. KIRK, M. SHIMADA, T. HIGUCHI. 1981: Metabolism of a phenylcoumaran substructure lignin model compound in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 128: 416-420
- F. NAKATSUBO, I.D. REID, T.K. KIRK. 1982: Incorporation of $^{18}O_2$ and absence of stereospecificity in primary product formation during fungal metabolism of a lignin model compound. *Biochim. Biophys. Acta* 719: 284-291
- M.-L. NIKU-PAAVOLA, E. KARHUNEN, P. SALOLA, V. PAUNIO. 1988: Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem. J.* 254: 877-884
- E. ODIER, M.D. MOZUCH, B. KALYANARAMAN, T.K. KIRK. 1987: Cellubiose: quinone oxidoreductase does not prevent oxidative coupling of phenols or polymerization of lignin by lignin peroxidase. In: Odier, E. (ed) *Lignin Enzymic and Microbial Degradation* 131-136 Paris: INRA
- A. PASZCZYŃSKI, V.-B. HUYNH, R.L. CRAWFORD. 1985: Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 29: 37-41
- V. RENGANATHAN, M.H. GOLD. 1986: Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 25: 1626-1631
- J.D. RUSSEL, M.E.K. HENDERSON, V.C. FARMER. 1961: Metabolism of lignin model compounds by *Polystictus versicolor*. *Biochim. Biophys. Acta* 52: 565-570
- M. SHIMADA, T. HATTORI, T. UMEZAWA, T. HIGUCHI, K. UZURA. 1987: Regiospecific oxygenations during ring cleavage of a secondary metabolite, 3, 4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by lignin peroxidase. *FEBS Lett.* 221: 327-331
- D. TAI, M. TERAZAWA, C.-L. CHEN, H.-m. CHANG, T.K. KIRK. 1983a: Biodegradation of guaiacyl and guaiacyl-syringyl lignins in wood by *Phanerochaete chrysosporium*. In: Higuchi, T.; Chang, H.-m.; Kirk T. K. (eds) *Recent Advances in Lignin Biodegradation Research*. 44-63 Tokyo: UNI Publisher
- D. TAI, M. TERAZAWA, C.-L. CHEN, H.-m. CHANG, T.K. KIRK. 1983b: Characterization of biodegraded lignin isolated from birch wood decayed by *Phanerochaete chrysosporium* by ^{13}C NMR spectroscopy. *Proc. Intern. Symp. Wood Pulping Chem.* 4: 144-149
- M. TERAZAWA, D. TAI, C.-L. CHEN, H.-m. CHANG, T.K. KIRK. 1983: Identification of the constituents of low molecular weight fraction obtained from birch wood degraded by *Phanerochaete chrysosporium*. *Proc. Intern. Symp. Wood Pulping Chem.* 4: 150-155
- M. TIEN, T.K. KIRK. 1983: Lignin degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Burds. Science* 211: 661-663
- M. TIEN, C.-p. D. TU. 1987: Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Nature* 326: 520-523

- P.C. TROTTER. 1986: Biotechnology and the economic productivity of commercial forests. Tappi Journal July: 22-28
- T. UMEZAWA, F. NAKATSUBO, T. HIGUCHI. 1982: Lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Metabolism of a phenolic phenylcoumaran substructure model compound. Arch. Microbiol. 131: 124-128
- T. UMEZAWA, F. NAKATSUBO, T. HIGUCHI. 1983: Degradation pathway of arylglycerol- β -aryl ethers by *Phanerochaete chrysosporium*. Agric. Biol. Chem. 47: 2677-2681
- T. UMEZAWA, T. HIGUCHI. 1985a: Role of guaiacol in the degradation of arylglycerol- β -guaiacyl ether by *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Lett. 26: 123-126
- T. UMEZAWA, T. HIGUCHI. 1985b: A novel C α -C β cleavage of a β -O-4 lignin model dimer with rearrangement of the β -aryl group by *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 192: 147-150
- T. UMEZAWA, T. HIGUCHI. 1985c: Aromatic ring cleavage in degradation of β -O-4 lignin substructure by *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 182: 257-259
- T. UMEZAWA, S. KAWAI, S. YOKOTA, T. HIGUCHI. 1986a: Aromatic ring cleavage of various β -O-4 lignin model dimers by *Phanerochaete chrysosporium*. Wood Research (Kyoto) 73: 8-17
- T. UMEZAWA, M. SHIMADA, T. HIGUCHI, K. KUSAI. 1986b: Aromatic ring cleavage of β -O-4 lignin substructure model dimers by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 205: 287-292
- T. UMEZAWA, T. HIGUCHI. 1986c: Aromatic ring cleavage of β -O-4 lignin model dimers without prior demeth(ox)ylation by lignin peroxidase. FEBS Lett. 205: 293-298
- T. UMEZAWA, T. HIGUCHI. 1987a: Formation of a muconate in aromatic ring cleavage of a β -O-4 lignin substructure model by lignin peroxidase. Agric. Biol. Chem. 51: 2281-2284
- T. UMEZAWA, T. HIGUCHI. 1987b: Mechanism of aromatic ring cleavage of β -O-4 lignin substructure models by lignin peroxidase. FEBS Lett. 218: 255-260
- T. UMEZAWA, T. HIGUCHI. 1989: Cleavages of aromatic ring and β -O-4 bond of synthetic lignin (DHP) by lignin peroxidase. FEBS Lett. 242: 325-329
- H. WARIISHI, N. MOROHOSHI, T. HARAGUCHI. 1987: Degradation of lignin by the extracellular enzymes of *Coriolus versicolor* VII. Effective degradation of syringyl type β -aryl ether lignin model compound by laccase III. Mokuzai Gakkaishi 33: 892-898
- S. YOKOTA, T. UMEZAWA, T. HIGUCHI, S. KAWAI. 1990: Degradation of phenolic β -1 lignin substructure model dimers by *Phanerochaete chrysosporium* and its lignin peroxidase. Holzforsch. 44: 271-276
- K. YOSHIHARA, T. UMEZAWA, T. HIGUCHI, M. NISHIYAMA. 1988: Degradation of a nonphenolic β -O-4 lignin substructure model compound by *Coriolus hirsutus*. Agric. Biol. Chem. 52: 2345-2346