

Xenobiotic リグニンの微生物変換：キノコの 二次代謝とチトクロム P-450 をめぐって*

島 田 幹 夫**

Xenobiotic Lignin Biodegradation: A Possible Tangent of Secondary Metabolism of White-Rot Fungi with Cytochrome P-450

Mikio SHIMADA

天然物界の「モンスター的存在」Xenobiotic リグニンと果敢に戦うリグニン分解性担子菌（白色腐朽菌）の秘密を探る目的でその生体触媒を考究している中に、酸素活性化装置とも言うべきチトクロム P-450 の意外な重要性に気がついた。

P-450 の研究者には、リグニン生分解の重要性と面白さを、リグニン化学分野ならびに関連林産学分野の研究者には、P-450（変幻自在の忍者的酵素）の重要性を認識して戴くためのブリッジ役ができればいいというのが、本説の始まりである。しかし、両者共に複雑で未解明の部分も多く、解説するには筆者の力量をはるかに越えているが、とりあえず、私共の周辺部の研究領域にしばって考察してみた。

リグニンの微生物変換の研究は、新エネルギーや資源開発を求める産業的要請とあいまって、近年、増々活発に推進されるようになった。関係する論文や総説も多く報告されている^{1~25)}。天然リグニンの腐朽過程を解明しようとしている化学構造論的研究は、Chen 等^{26~32)}によって、最近のモデル化合物の代謝化学的研究は^{125~129)}、樋口、中坪等^{5~9, 122, 129)}、榎等^{16, 127, 123)}および福住^{4, 15)}等によって、微生物生理学的アプローチは、Kirk 等^{33~37)}によって代表されるであろう。白色腐朽菌を応用したバイオメカニカルパルピングや、バイオブリーチングについては、Eriksson と Ander^{10, 11)}、Kirk と Chang⁴⁾ および福住^{41, 42)}等の論文や総説を参考されたい。

また、1978年の日米科学協力セミナーで発表された論文集⁴⁾は、リグニン微生物分解の基礎と応用の研究例を網羅しており、現在の研究発展に多大な貢献をしている。

本説では、担子菌類によるリグニン微生物変換研究に限り、やゝ視点を変えて考察を試みるが、従来の化学構造論的およびモデル化合物の代謝論的考察は割愛した。

本説では新しいアプローチとして筆者のスペキュレーションを混じえ、白色腐朽菌によるリグニンの生分解は二次代謝の一部であると定義する Kirk の先駆的成果を基にリグニン生分解の実体とその本質を探って見ようと思う。そのためには、微生物がリグニンを食べ、代謝変換する時、どんな生体触媒（酵素）を駆使しているかを解明することが先決であるが、残念ながら、リグニン分解酵素（リグニナーゼ？）はまだ分離同定されていない。我々はリグニン生分解の本質に関する鍵酵素として、先ず、チトクロム P-450 電子伝達系をを仮説するに至ったが、その理由は、後述するように、リグニン生分解に観察される諸現象や、

* 第37回木研公開講演会（昭和57年5月14日大阪において講演）

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

Kirk の提案する生分解の5原則等も統一的に説明することができるからである。この発想のおもな立脚点は次のような考え方にある。

1) ラセミ体リグニンは天然物ではあるが、光学不活性体であるという点で、その天然物性を否定し、自然界の異物 (Xenobiotics) と見做す。この考え方に沿って、異物・薬物体質の生体触媒系をモデルとすれば、当然、動物肝の薬物体質に関与するチトクロム P-450 が想起される。従って、非立体特異性のアプローチや活性酸素が重要となる。

2) 担子菌類はL-フェニルアラニンの二次代謝経路を持ち、リグニン生分解は、この中に含まれている酵素系 (チトクロム P-450) によって触媒されていると考えられる。即ち、リグニン代謝は、L-フェニルアラニンアミノ酸代謝の一部として発現されている可能性が強い。NA(D)PH 要求性の P-450 は二次代謝物の生合成で重要である。

3) 担子菌の本来の二次代謝 (例: *Phanerochaete chrysosporium* のペラトリルアルコール生合成) とリグニン生分解は各種の点で平行関係が認められ、二つの二次代謝を結びつける枢軸に、チトクロム P-450 の介在が示唆された。

しかしながら、リグニン高分子に作用するチトクロム P-450 は未発見であり、リグニン生分解研究でもほとんど注目されてはいない。そのため、リグニン生分解の初期反応は非酵素的プロセスであるとする向きもある。それはとも角、我々は P-450 がリグニン代謝の鍵酵素であることを想定し、リグニン微生物変換研究で P-450 とリグニンがどのような接点を持ち得るのか、またその意義と将来の研究の可能性についても以下のような事項に従って話題を提供したいと考える。

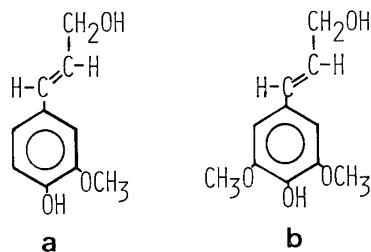
1. 非立体特異性のアプローチと活性酸素
2. チトクロム P-450 とリグニン
3. リグニン生分解の鍵酵素
4. リグニン生分解の5原則
5. L-フェニルアラニンの二次代謝: ペラトリルアルコールの生合成
6. ペラトリルアルコール代謝とリグニン生分解との平行関係
7. 白色腐朽菌の芳香族アミノ二次酸代謝の意義
8. 応用開発研究の可能性

1. 非立体特異性のアプローチと活性酸素種

コニフェリルアルコールやシナピルアルコール (図1) がラジカル重合して生成したリグニン (図2) の化学的本質はラセミ体 (光学不活性) であるという事実に着眼し、リグニン生分解の初発反応もまたラジカルの (非立体特異的) な反応であるという観点に立つのが非立体特異性のアプローチである²¹⁾。

このような考え方は、リグニンと他の不斉性体高分子との対比から生ずる。生命科学上重要な DNA, RNA, タンパク質、多糖類は加水分解可能であるのに反し、リグニンは酸化分解可能である。前者の不斉生体高分子の生合成と生分解を含む生化学反応の基本原則は、基質特異性や立体特異性いわば生物学的特異性の原則で貫かれており、その代謝過程はすべて酵素によって厳密に制御されていることは、周知の事実である。しかし、リグニンの生分解には、上記のような生化学的常識とも言うべき特異性の原則を適用できるであろうか? というのはリグニンがラセミ体ポリマーであるという事実は、酵素の特異性とは調和し難い要素のように思われるからである。ラセミ体という点で、リグニンは天然物であるにも拘らず、異物、薬物に近い非生物物質 (Xenobiotics) の側面を持つ。この構造体を特異的に「区別」し、効果を及ぼし得る酵素が存在するとすれば、きわめてユニークな酵素であろう。

一般的に、キノコなどの担子菌に属する白色腐朽菌が、リグニンを活発に分解代謝できる主要な微生物で



コニフェリルアルコール シナピルアルコール

図1 針葉樹型および広葉樹型リグニンの重合出発原料。針葉樹型（グアイアシル）リグニンはペルオキシダーゼによって生成したaのフリラジカル重合体であり，広葉樹型（グアイアシル-シリンギル）リグニンは主としてa—b（1：1）の共重合体である。

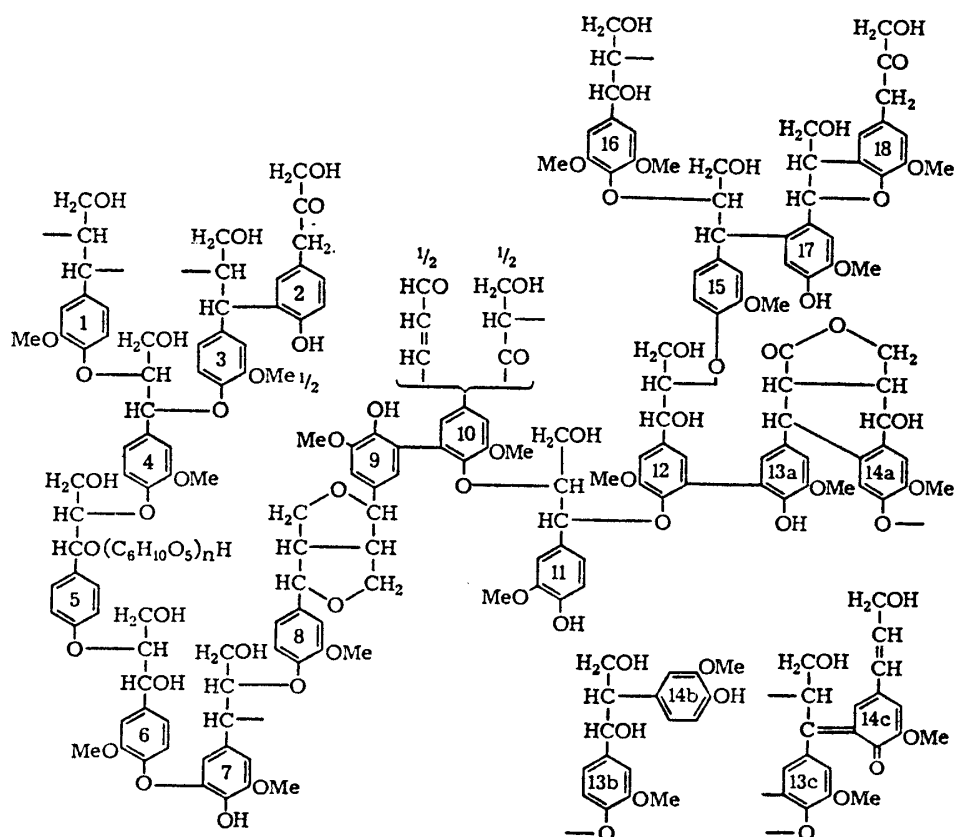


図2 スプルーシリグニンの模式的化学構造の提案 (Freudentberg, 1968)⁴⁷⁾

あると見做されているけれども，リグニンを唯一の炭素源として生育することはできない。この地球上で，リグニンを唯一の炭素源として生育できる新種の微生物や変異株も発見されてはいない。その一つの理由は，生物体がリグニン分解酵素系を，進化の過程で「考案」する際，その生体にとっては，エネルギー経済の点で得策とならなかったものと推論されるからである。

一方，白色腐朽菌はラツカーゼを持つのに反し，褐色腐朽菌はラツカーゼを持たないことが知られている。フェノール性化合物をラツカーゼと同じように酸化するペルオキシダーゼは白色腐朽菌の一種 *Sporotrichum pulverulentum* に特徴的であるが，そのペルオキシダーゼ欠損型変異株 (PO⁻) はリグニン分解力を喪

失することから、筆者はラツカーゼ/ O_2 系やペルオキシダーゼ/ H_2O_2 系のラジカル反応は、立体特異性が無く、リグニンのラセミ構造体に直接攻撃できる有利な反応であると推察した²¹⁾。

1978年の日米科学協力セミナー、及び同年のゴードン研究会議においてラセミ体リグニンの炭素資源循環には、各種の活性酸素種が関係する非立体特異性のラジカル種が不可欠であることを初めて提案した²¹⁾。図3に示すように、植物は、先ず、リグニン生合成の最終段階でラジカル重合を活用してラセミ体リグニンを合成し、一方、リグニン分解菌はラセミ体リグニンを分解するためにやはりラジカル反応を活用していると考えられる。この巨視的観点に立つと、リグニン炭素サイクルの流れの中で、その生合成と生分解に関与するラジカル反応が、重要な意味を持つ。即ち、D, L-アミノ酸の相互変換を触媒するラセマーゼが、パストールの発見に始まった光学活性体の生化学進化の過程で重要な役割を果たしたものと推論されるが、逆に、光学不活性な非生物物質の炭素循環ではこのようなラジカル反応触媒が、生物環境のバランスを維持するために、ラセマーゼに対応する役割を果たしているとも推論できる。D, L-リグニンの起源は陸棲植物の起源まで遡るが、リグニンを攻撃できる微生物はかなり遅れてリグニン分解の秘訣を学びとったものと推論される。

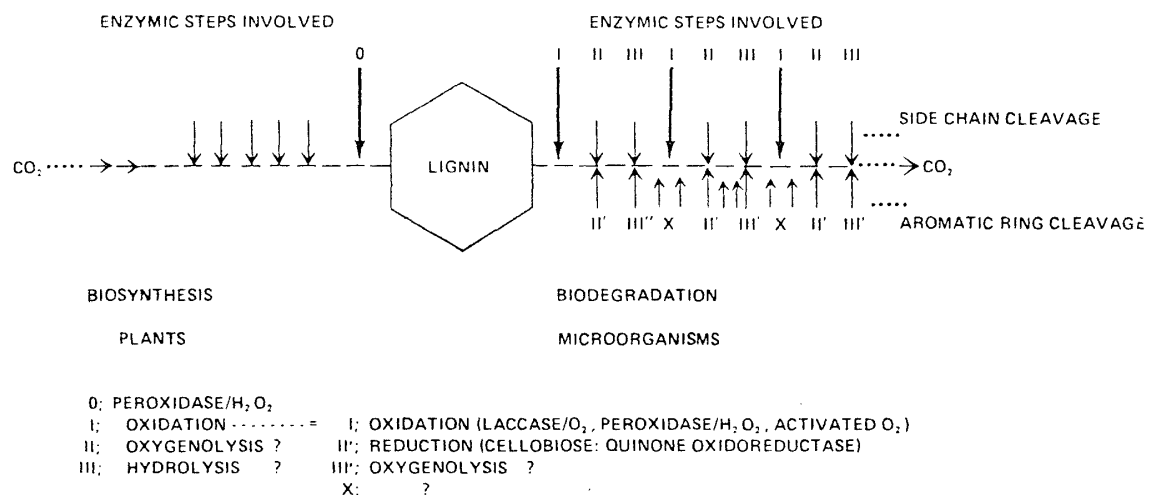
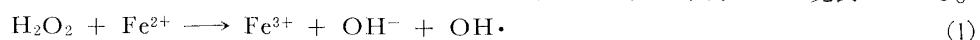


図3 リグニン炭素資源循環系における非立体特異的反応の意義 (島田, 1978)¹⁰⁹⁾

それはとも角、リグニン生分解の初期反応に非立体特異的ラジカル反応を重視したアプローチに対し、ラジカルで重合したリグニンが再びラジカルで脱重合するのは矛盾するという反論も提出されたが、この巨視的観点に立った非立体特異性のアプローチは新しい見解として興味を持たれるようになった。

実際、その後、Hall⁴⁴⁾ もスーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) やヒドロキシルラジカル ($OH\cdot$) を含む活性酸素種の重要性を総説しており、中坪等⁴⁵⁾ は、*Phanerochaete chrysosporium* のリグニン生分解に一重項酸素 (1O_2) が関与する可能性を提案している。最近、Kelley⁴⁶⁾ と Forney 等^{47,48)} は、非立体特異的活性種 $OH\cdot$ が、*P. chrysosporium* のリグニン分解に関与する可能性を提案した。その根拠は a) α -Ketomethylthiobutyric acid (KMTB) は $OH\cdot$ によって酸化分解され、エチレンを発生するが、エチレン発生とリグニン分解の活性化とは平行関係にある。b) グルコースオキシダーゼによる H_2O_2 生成量がリグニン分解力とやはり平行関係にある。c) エチレンの発生が $OH\cdot$ スカベンジャーによって阻害されることを認めている。リグニン生分解に $OH\cdot$ が関与することを始めて実験的に裏付けた。彼等は(1) 式のように H_2O_2 を一電子還元するフェントン反応系をリグニン生分解に不可欠な因子として発表している。



続いて、久津木と Gold⁵⁰⁾ もリグニン生分解がカタラーゼによって阻害されることを見出し *P. chrysosporium* をリグニン生分解に $\text{OH}\cdot$ が関与する可能性を報告している。従って、リグニン分解の初期反応で、活性酸素が生成されることはかなり確実となった。また、その生成系が一旦確立されれば、その活性種は、非（立体）特異的にリグニンを攻撃し、非酵素的に脱重合、分解することが示唆される。 $^1\text{O}_2$ がリグニン生分解に関与する可能性の論拠となった AES⁴⁵⁾ は、 $\text{OH}\cdot$ によっても消光されることを Forney 等⁴⁸⁾ は指摘し、 $^1\text{O}_2$ よりも $\text{OH}\cdot$ の方が主要な活性種であると結論している。

また Nimz 等⁵¹⁾ は、 $^1\text{O}_2$ は、リグニン中のフェノール性末端基に主として作用する程度で、脱重合する程反応性が高くないことを報告している。従って、リグニン生分解に関与する活性酸素種として、 $\text{OH}\cdot$ が今のところ最も有力な反応試剤と考えられる。

実際、辰巳と寺島⁵²⁾ は、 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ -光系で発生する $\text{OH}\cdot$ によって、クラフトリグニンが、分解脱色されることを報告している。従って、生体系でも $\text{OH}\cdot$ が連続的に供給されるならば、リグニン高分子は容易に分解されるだろう。

しかしながら、リグニン生分解に本当に $\text{OH}\cdot$ が関与するか否かについては、注意深く解釈する必要がある。KMTB やメチオナルは、しばしば $\text{OH}\cdot$ の間接的証明に利用されているが^{54,55)}、 $\text{OH}\cdot$ が直接の反応試剤であることに反論を唱える論文もある⁵⁶⁾。ワサビペルオキシダーゼも一定の条件下では、KMTB やメチオナルを酸化しエチレンを発生することが知られている^{56,57)}。ペルオキシダーゼはリグニンを完全分解できる程強いラジカル種を生成できない。 $\text{OH}\cdot$ の反応性は非常に強く、生体自身にとっても危険なラジカル種であるので、Forney 等⁴⁸⁾ が提案するようなフェントン系反応が、リグニン生分解に関与しているか否かについては、まだ疑問が残されている。

筆者は、既に提案したようにリグニン生分解において活性酸素種が関与することには疑いを持たないが²¹⁾、この分野で見過されているもう一つの活性酸素発生装置であるチトクロム P-450 電子伝達系についても調べてみる必要があると考えている²³⁾。その理由は、チトクロム P-450 は生物界に広く分布し、この酵素系によって分子状の酸素は NA(D)PH によって、二電子還元され、 H_2O_2 と等価なレベルに達した後、反応性の高い活性酸素種がヘム鉄上で生成されるからである⁵⁸⁾。フェントン系によって発生する遊離の $\text{OH}\cdot$ ラジカルを放出するのでなく、生体触媒によって制御されたラジカル種（酸化剤）が想定される。

そこで、分子状酸素を活性化させるようなチトクロム P-450 電子伝達系の触媒特性についても知識を深めておくことは、多種多様なリグニン分解反応を統一的に理解する上にも、また、活性酸素種の本体を解明する上にも重要と考える。興味あることに、最近、中坪等¹²²⁾ は非立体特異的な酸素添加反応をジアリルプロパン型二量体モデル化合物の代謝について証明している。

チトクロム P-450 モノオキシゲナーゼによって発生する活性酸素種は $\text{OH}\cdot$ とオキセン説がある⁵⁸⁾。P-450 のヘム鉄に結合した二電子欠損型の酵素原子がオキセン中間体であることを提唱した Hamilton の仮説は⁵⁹⁾、各種のモノオキシゲナーゼ反応群を類型化し P-450 がラジカル反応を起こす可能性についても統一的に説明している。「オキセン」の命名はそれが有機化学反応では良く知られたカルベンやナイトレンの反応性にちなんでつけられたものである。

最近、P-450 によるラジカル（非立体特異的）反応例も報告されつつある^{60~62)}。しかし、P-450 による活性酸素種はオキセン型の方が合理的なものとして有力視されている⁵⁸⁾。いずれにしてもリグニン生分解に発現する活性酸素種の前駆体は H_2O_2 であることに集約される。Forney 等は H_2O_2 供給系として、 $\text{O}_2/\text{グルコースオキシダーゼ系}$ を想定しているが、チトクロム P-450 電子伝達系も NADPH 等の存在下で O_2 を還元して H_2O_2 を生成すると同時に、 H_2O_2 を利用することもできるので、やはりこの可能性をも考慮、検討すべきであろう。

なお、生体と活性酸素種との関りについては、浅田の優れた解説^{63~65)}があり、他の成書^{66,67,123,124)}も参照

されたい。

2. チトクロム P-450 とリグニン

林産学分野では馴染みの薄い用語であるが、チトクロム P-450 は、生物界に広く分布し、物質代謝には必ず登場するといっても過言ではない。図4に示すように、リグニンを天然の Xenobiotics と見做せば、菌類によるリグニン代謝は、P-450 をめぐって動物、昆虫、植物、魚類等の Xenobiotic 代謝、即ち肝臓内の解毒機構とも関係づけられる。そこで、リグニン微生物変換の研究は、生命科学の一環としてかつ学際領域の研究課題として総合的にアプローチされる必要がある。残念ながら、リグニンを分解する微生物から、関係する P-450 の存在が証明されたわけではなく、我々は、目下その存在を求めて研究中である。

チトクロム P-450 は、分子状酸素を活性化させると同時に、多種多様な酸化反応を行ないリグニン生分解には好都合な触媒モデルとなる。

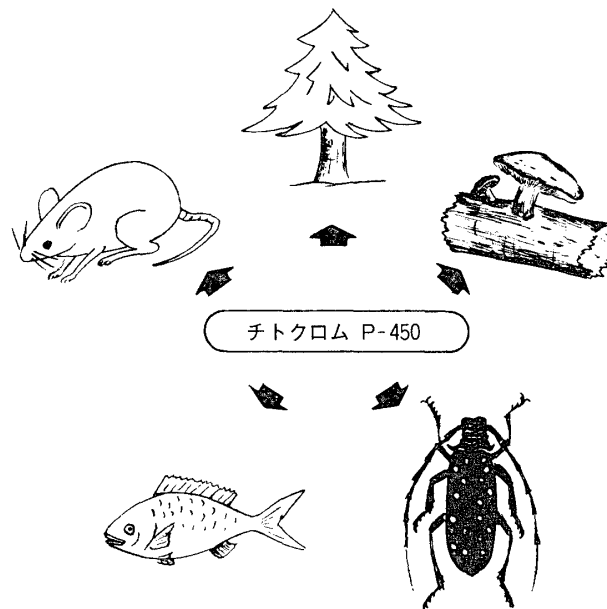


図4 あらゆる生物が P-450 をめぐって関連する

P-450 の専門家ではないが、林産学分野の方のために敢て P-450 について紹介させて戴く。

チトクロム P-450 は、通常、ミクロソーム膜に結合した電子伝達系の末端酸化酵素であり、一原子酸素添加酵素（モノオキシゲナーゼ）の一種である。大村と佐藤⁶⁸⁾によって命名されて以来、P-450* が、薬物代謝や分子状酸素の活性化のみならず、発癌等の重要な問題とも関係しているため、生化学では最も著名な用語の一つとなっている。P-450 は、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、呼吸系電子伝達系のチトクロム類、酸素運搬体としてのヘモグロビン等と同じように鉄原子を含むヘムタンパク質の一種である⁶⁹⁾。

ちなみに、Xenobiotics という新語を作り出したのは、モノオキシゲナーゼの発見者 Mason⁷⁰⁾ であり、二原子酸素添加酵素（ジオキシゲナーゼ）は早石⁷¹⁾によって発見された。その後オキシゲナーゼに関する生化学の新分野が開かれ、早石等によって体系化されるに至ったことは、あまりにも有名である^{72,73)}。

チトクロム P-450 は、下記の一般式で示されるように、NADPH (NADH) のような電子供与体の存

* 還元型で一酸化炭素と結合するとその差スペクトルが 450 nm に特徴ある吸収帯を持つようなチトクロムという意味で便宜上 P-450 と命名された。

在下で、基質 (SH) に分子状の酸素の一原子を導入 (添加) し、他方を水分子に還元するような反応を触媒する。



上記の反応式から判るように、P-450 は、Mason に従えば混合型酸化酵素 (mixed-function oxidase) と呼ばれ、水酸化反応を引き起こす為、水酸化酵素とも呼ばれている。更に、二重結合をエポキシ化したり、隣接ジオール結合を切断したり、芳香核はもちろん炭化水素系アルキル基にも水酸基を導入する。またアルキルフェニルエーテルに対しては、OH 導入後、アルキルアルデヒドとフェノールを生成するので、この場合は、脱アルキル化酵素と呼ばれる。また、P-450 は、N-、および S-脱アルキル化ならびに脱ハロゲン反応をも触媒することで知られている。特に動物肝 P-450 は、10 種類、あるいはそれ以上の分子多様性を持つのみならず、広い特異性をも持つことが、面白い特徴であり⁷⁷⁻⁷⁸⁾、反応パターンは多彩である。

しかし、実際の反応機構となると、(2) 式のように単純ではなく、はるかに複雑である。その裏側にある電子伝達系による分子状酸素の活性化の機構は、未解明であり、薬物代謝に関与する P-450 の触媒機構の解明に対し、複雑な問題を投げかけている^{74,75)}。しかし、(2) 式の意味する重要事項は、この反応には NA(D)PH (3ATP に相当する生体エネルギー) が要求され、分子状酸素の活性化に使用されるということである。

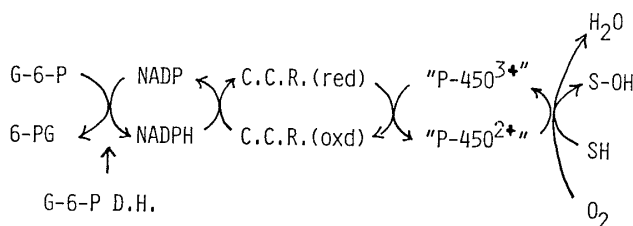


図5 チトクロム P-450 電子伝達系による有機基質の水酸化反応ならびに電子供与体、NADPH からの電子伝達様式

さて、(2) 式の内側にある P-450 電子伝達系についてももう少し立ち入って説明させて戴く。例えば、図5に示すように、電子伝達系 (一般的に、細胞内のミクロソームやミトコンドリア膜に結合している) はチトクロムC還元酵素 (CCR) と P-450 の二成分 (三成分の場合もある) から成り立つ。まず、電子供与体の一例として、ヘキソースモノフォスフェート (HMP) 経路に位置するグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-P D.H.) が、グルコース-6-リン酸 (G-6-P) を、6-フォスフォグルコン酸 (6-PG) へ脱水素して、NADPH (電子供与体) を生成し、それが電子伝達系に伝えられることが第一段階である。次に、NADPH の2電子は、チトクロムC還元酵素 (フラボプロテイン) に伝達され、 O_2 が P-450 と結合した状態で2電子還元され、一つの酸素原子は反応性の高い活性酸素種 (オキセン?) を経て、基質分子 (S) に導入 (添加) され、他方は還元されて水分子になり、(2) 式の反応は完結する。しかし、実際には、基質の種類によってまた P-450 の分子種の違いから、前述したような多種多様な反応パターンが展開される。

これで、(2) 式の内側にある隠れた部分 (電子伝達系) について理解されたと思うが、それは生物体の種類 (細菌、他の高等動物)、動物の臓器、細胞内微小器官 (ミトコンドリアと小胞体等) によっても、触媒特性が異なることが知られている⁷⁶⁻⁷⁸⁾。

しかし、我々を幻惑させる P-450 の多機能性や分子多様性を統一的に理解するためには、図5の電子伝達系を知るだけでは不十分である。そこで、P-450 を各種ヘム-鉄タンパク質の機能を類型化する中で考察する。図5に示した水酸化反応の際に見られる $\text{P-450}^{3+} \leftrightarrow \text{P-450}^{2+}$ の回転の内側に潜むもう一つの側面として、ヘム-鉄の酸化還元状態 (電荷) の遷移に着眼することが重要であろう。

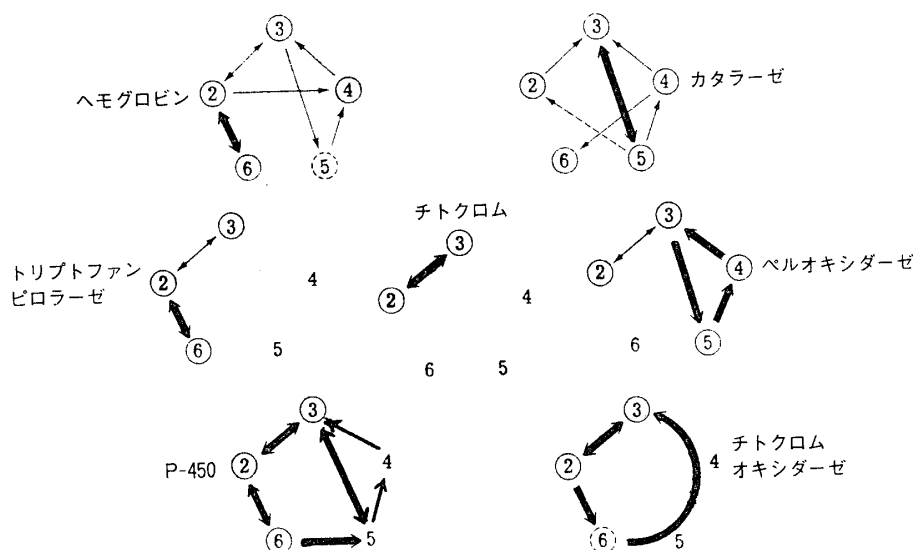


図6 各種ヘム-鉄タンパク質の5つの酸化還元状態と機能¹⁴⁸⁾
 →; 主要な機能 (電荷の遷移を示す)。

図6には、P-450の酸化還元状態の遷移を始め、各種ヘム-鉄タンパク質の電荷移動の経路を体系的に捉え、説明しようとした山崎⁷⁹⁾の判り易い「ペンタゴンダイアグラム」を紹介する。

まず、P-450の酸化還元状態は、基質(S)と結合した後、一電子還元されて、③から②に移る(数字はプラス電荷を示す)。次に、O₂が結合に入り、⑥に移る。再びもう一電子が伝達され、⑤の状態に移って、初めの③の状態に帰ることによって、(2)式の水酸化反応は完結する。

従って、図5のP-450³⁺ ↔ P-450²⁺の意味する内容は、水酸化反応の際、図6のダイアグラム中の、③→②→⑥→⑤→③の回転に対応していることになる。前述したように、単純に見えた(1)式の反応の裏側に潜在するメカニズムについて大体理解されたと思う。

次に、P-450が時には、カタラーゼ活性やペルオキシダーゼ活性を持ったり、逆に、本来、酵素作用を持つ筈がないヘモグロビンが、P-450活性を発現したりする現象¹¹²⁾は、一体どのような機構にもとづくのであろうか。図6のP-450電荷移動の経路(回路)はヘモグロビン、トリプトファンピロラーゼ、チトクロム、カタラーゼ、チトクロムオキシダーゼ、ペルオキシダーゼの経路と部分的に重なり合っているということに気づかれたと思う。

例えば、H₂O₂ (O₂が2電子還元されたレベル)を与えると、P-450は、前述のような経路を取る必要はなく、③→⑤→④→③の経路を通り、これは、ペルオキシダーゼの経路とまったく同じになってしまう。有機基質が無ければ、P-450は、③→⑤→③というピストン型の(カタラーゼ)経路を通る。従って、P-450は、状況次第でペルオキシダーゼやカタラーゼ活性を示し、両者の区別は困難となる。しかし、なぜこのような現象が発現されるかは、鉄ヘムタンパク質の三次元的構造や活性中心の触媒原理が解明されていないため、現在では、十分説明されていない。

以上のように、チトクロムP-450は、往々にして我々の生化学的常識を超えたふるまいをするために驚くのであるが、P-450を含めヘムタンパク質の触媒特性の発現の機構については、この分野で今なお、活発に研究が続けられている。チトクロムP-450については多くのわかり易い総説があるので参照されたい⁷⁶⁻⁷⁸⁾。

以上、リグニンのラセミ体という特徴から非立体特異的な活性酸素種に着眼し、それを駆使する生体触媒、チトクロムP-450をリグニン生分解のマーカーストリーとして話を進めてきた。

しかし、リグニンがもつもう一つの大事な化学的特徴は、それが、加水分解不可能な芳香族性エーテルポリマーであることに総括される。図2からも判るように β -O-4 エーテル構造は針葉型リグニンでは約樹40%，広葉型では約60%であると見積られているが、メトキシル基の数も加えるとそのエーテル結合数は倍加する。従って、ベラトリン酸や、バニリン酸の脱メチル化反応が、しばしばリグニン中のエーテル結合切断反応のモデルとして、類推されてはきたが^{351,136)}、リグニン高分子分解に直接適用できる脱メチル化反応は報告されてはいない。

白色腐朽菌（キンイロアナタケ）の無細胞抽出液を使い β -O-4 型二量体モデル化合物の酵素的エーテル開裂反応を最初に報告したのは福住等⁸⁴⁾であった。彼等はベラトリル-グリセロール- β -グアイアシルエーテルの脱メチル化反応も認め、生成物として、グアイアシルジヒドロキシアセトン（ヘミケタール中間体を経る）とグアイアシルグリセロール（直接開裂？）が生成することを推定している。榎等¹⁶⁾は脱メチルを経ない直接的開裂を初めて証明した。この酵素はチトクロム P-450 モノオキシゲナーゼの一種と考えられるが、残念ながら十分検討されていない。エーテル二量体の開裂反応の機構もまだ確立されていないが、樋口等の最新の研究によると *P. chrysosporium* は直接エーテルを開裂する経路があることを重水素ラベルを用いた実験で証明しており¹¹³⁾、P-450 の触媒特性と付合するか否か興味深い知見である。

Dagley⁸⁰⁾ はシリンガ酸が微生物によって代謝される時、一つのメチルエーテルは NA(D)PH の存在下でホルムアルデヒドの形で遊離し、他方は芳香核開裂後、メチルエステル（メタノール）を経て代謝されることを見い出している。前者をエネルギーコストのかかる「高価」な反応と呼び、エステルの加水分解反応を「安価」な反応として類別している。「安価」な反応経路を活用できる微生物は、「高価」な反応経路しか持たない微生物よりは、その生存競争において、優位に立つことができると推論されるが、これは前者がエネルギーを節約しているということで理解できる。

担子菌がリグニン高分子を、代謝するとき常にグルコースを要求するけれども²⁾、これは一つにはグルコースが NADPH のような生化学的エネルギーを作り出すために必要だからであろう。NADPH/O₂/P-450 系反応として、リグニン中の各種エーテル結合の切断等に関与することが推論される⁸⁴⁾。また、チトクロム系は「高価」P-450 はエーテル結合の開裂以外に、前述のような多機能性を持つので、「高価」な反応ではあるがバラエティに富むリグニン構造体を攻撃するのに好都合な生体触媒であることは前述した通りである。

3. リグニン生分解の鍵酵素

リグニン高分子を構成する基本的結合を崩壊させる鍵酵素は果たしてチトクロム P-450 かどうか確証はまだ無い。しかし、ラッカーゼやペルオキシダーゼが鍵酵素ではないことも確かであろう。白色腐朽菌からリグニン分解性の P-450 が単離同定されていない今日、各種の P-450 阻害剤等でリグニン生分解反応が阻止されるか否か間接的に知ることも有意義であろう。P-450 に最も特異的な阻害剤は一酸化炭素であるが、菌体そのものを用いた、実験系では、エネルギー供給系としての解糖系の電子伝達系も阻害されるため、この阻害剤を *in vivo* で用いることは、不都合である。そこで我々は、動物肝ミクロソーム P-450 によるニトロアニソールの脱メチル化反応を特異的に阻害する チロシン-Cu²⁺ 複合体 (TCC と略す) 阻害剤が、Richter 等⁸¹⁾によって報告されていることを知り、リグニン生分解の阻害実験に応用して見た²³⁾。

図7に示すように、リグニン分解活性を持つ *P. chrysosporium* の培養フラスコに 10⁻⁴ M TCC を添加すると、無添加のものに比べ著しく阻害されることが判った。リグニン分解活性は ¹⁴CO₂ の発生量によって測定しているので、グルコース-U-¹⁴C からの ¹⁴CO₂ 発生は TCC によって影響を受けないことを確かめおく必要がある。図8に示すように、解糖系-TCA サイクルにおける ¹⁴CO₂ 発生は TCC 阻害剤によっては阻害されることが実際に証明された。従って、TCC 阻害剤は、呼吸系の電子伝達系を阻害するのではなく、Richter 等⁸¹⁾ が示したようにチトクロム P-450 電子伝達系を阻害するものと考えている。

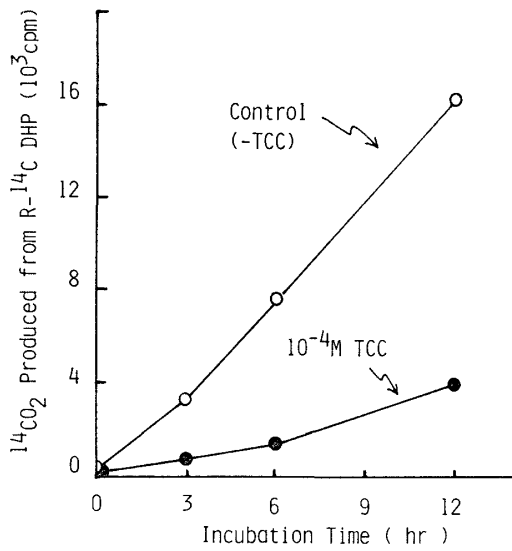


図7 *P. chrysosporium* によるリグニン分解を阻害する TCC 阻害剤の効果 (島田等, 1982)²⁵⁾

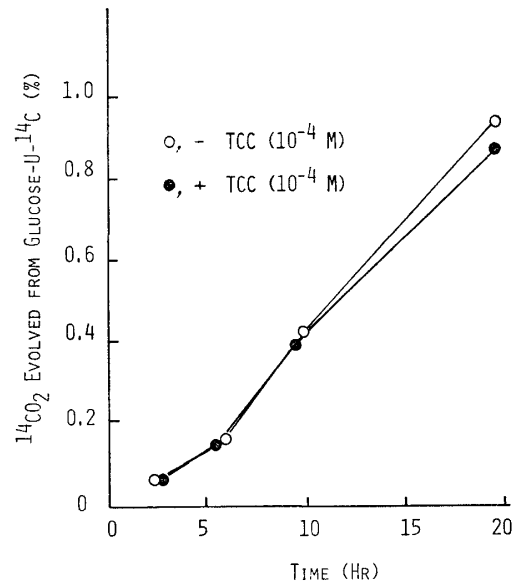


図8 グルコースを酸化する呼吸系電子伝達系に及ぼす TCC の非阻害的效果 (島田等, 1982)²⁵⁾

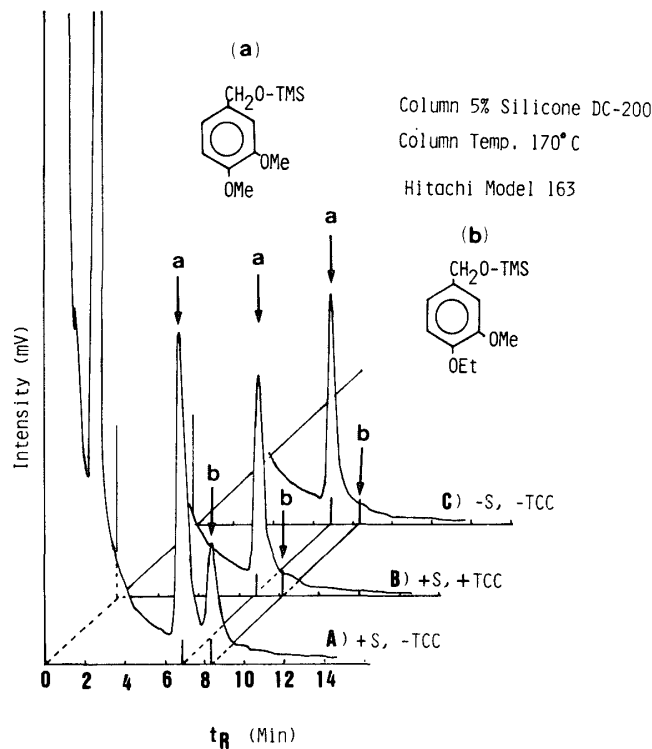


図9 二次代謝物、Vとエーテル結合開裂反応生成物4-エトキシ-3-メトキシベンジルアルコール(P)のガスクロマトグラフィー (島田等, 1982)²⁵⁾
a : Vの TMS 誘導体。b : Pの TMS 誘導体

そこで、リグニンの、 β -O-4 型モデル化合物 (4-ethoxy-3-methoxyphenylglycerol- β -vanillic acid ether) (図24, B) を基質として用いた時、そのエーテル結合の開裂反応が阻害されるか否か検討した。図 9 のガスクロマトグラフィーの分析結果からも明らかなように、4-ethoxy-3-methoxy benzylalcohol の生成が TCC によって阻害された²³⁾。従って、 β -O-4 型、エーテル開裂反応にも、チトクロム P-450 が関与することが示唆される。後述するが、本菌は二次代謝物としてベラトリルアルコールが生合成されかつ生分解されているが、その生合成反応およびベラトリン酸の脱メチル化反応も TCC によって阻害されたことは注目に値する。ベラトリルアルコール代謝にチトクロム P-450 モノオキシゲナーゼが関与していることが示唆され、リグニン生分解との接点があることが推論された (第 5 で記述)。

興味あることに、*P. chrysosporium* 菌体の抽出酵素液に含まれる G-6-PDH, チトクロム C 還元酵素は TCC によって阻害されないが、ペルオキシダーゼによるテトラメチルフェニレンジアミン (TMPD) の酸化は、微量の還元剤 (メルカプトエタノール等) が共存する場合に限り阻害された。還元剤無添加の時、逆に TMPD の酸化は TCC によって促進された。チトクロム P-450 はペルオキシダーゼ活性を持ち得ることは、既に述べたが、TCC によるペルオキシダーゼ活性の阻害現象の中味は、本来のペルオキシダーゼ活性を持つ P-450 の活性が阻害されたのか不明瞭であり⁸²⁾、TMPD のような基質を用いた反応系では両者を区別することはできない。従って、TCC の阻害実験だけからチトクロム P-450 の存在を論議することは危険でもあるので、更に他の情況証拠についても考察する。

Ander と Eriksson⁸³⁾ が分離した *S. pulverulentum* の、ペルオキシダーゼ欠損 PO^- 変異株はリグニン分解活性を持たない。通常のペルオキシダーゼ (またはラッカーゼ) がリグニンの基本的構造を攻撃破壊するだけ強力なラジカル反応を誘起するとは思われないので、この場合、 PO^- 変異株は、ペルオキシダーゼ活性を併せ持つチトクロム P-450 が、他のペルオキシダーゼと同時に、欠損し、見かけ上ペルオキシダーゼ欠損型の変異株が得られたというふうに、解釈することもできる。実際、Gold と筆者等⁸⁵⁾ の共同研究でも、*P. chrysosporium* から得られた PO^- 変異株は、ペルオキシダーゼだけが特異的に欠損しているのではなく、二次代謝系 (ベラトリルアルコール 生合成) に関与する PAL も含め複数個の酵素 (系) が欠損しており、上述の P-450 欠損の可能性は高いと言える⁸⁵⁾。

そこで、各種のモデル化合物を用いて、既に述べた多種多様な、P-450 モノオキシゲナーゼに特徴的な反応パターンが PO^- 変異株ではブロックされているか否かを知ることは重要である。

図10に示すように、 PO^- 変異株は、二重結合のジオール化 (エポキシ化が重要)、隣接ジオール基の切断反応、ベラトリン酸-4位の脱メチル化反応、 β -O-4 型エーテル結合の開裂反応をすべて触媒できない「dysfunction, 機能障害」型になっていることが判った⁸⁵⁾。

これらの中エーテル開裂反応パターンはペルオキシダーゼによっては、見られないので、より反応性の高い活性酸素種を発生し得るチトクロム P-450 の欠損によってエーテル開裂反応等がブロックされたものと推論される。リグニン生分解に OH ラジカルが関与する可能性があることは、前述の通りであるが、この知見は OH ラジカルの発生は動物肝ミクロソーム/NADPH/ O_2 系で生ずるという事実をもとにしている⁵⁴⁾。この場合も、ミクロソーム系にはチトクロム P-450 が存在し、OH $\cdot$ のみならずそれに匹敵するオキセン型の活性酸素種が、生成されている可能性もある。しかし予備的ではあるが、ネズミ肝ミクロソームを用いて、ベラトリン酸脱メチル化反応とジヒドロアニソインのジオール開裂反応を検討して見ると、リグニン分解菌とは逆にジヒドロアニソイン化合物は作用を受けず、OH $\cdot$ 生成に対しては否定的結果が得られた⁸⁶⁾。

リグニン生分解研究で提案された OH ラジカル説は、非立体特異的で活性酸素種であるというリグニン分解に必須の条件を満足させており合理的なメカニズムではある。筆者は、生化学的観点からして、Forney⁴⁸⁾ 等の非酵素的フェントン系反応の意義を認めつつも、上記の二つの条件を満足するエネルギー効

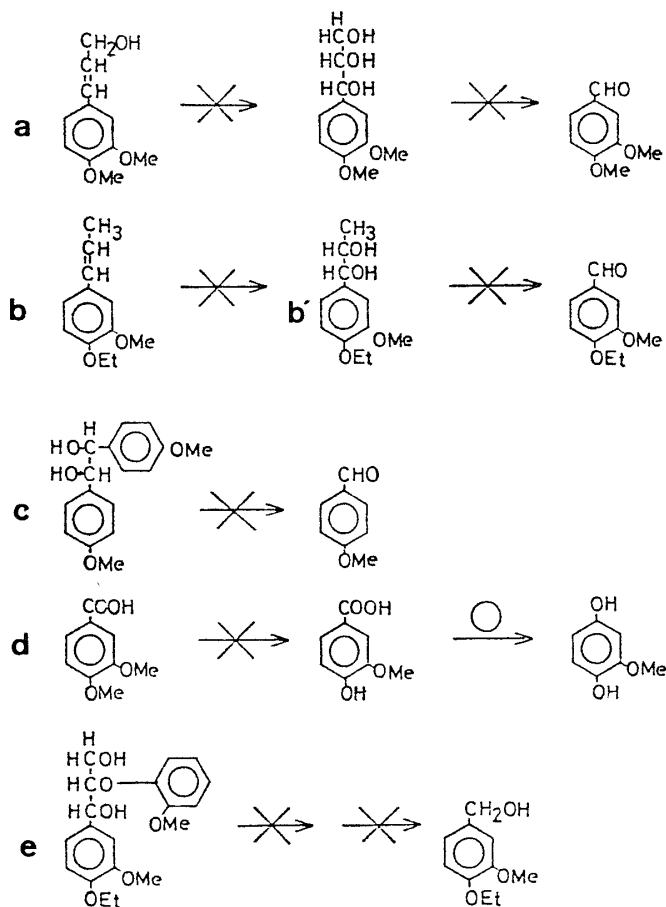


図10 PO^- 変異株に見られた各種の代謝反応段階の欠損 (島田等, 1982)²²⁾
 ×: 欠損反応段階, ○: 保持されている反応段階

率の高い生体触媒, 即ち, ペルオキシダーゼ活性を同時に発揮できるチトクロム P-450 系による酸化反応も, 見過してはならないもう一つの可能性と考える。また, 次に述べるようにリグニン生分解の5原則やL-フェニルアラニンに始まるベラトリルアルコールの二次代謝 (生合成と生分解) の意味を 鍵酵素としてチトクロム P-450 を仮説することによって, 統一的に解釈することも可能である。

4 リグニン生分解の5原則

リグニン生分解が, どのような生理学的パラメーターによって影響を受けるかを調べ, *P. chrysosporium* のリグニン分解の特徴を, 初めて確立したのは, Kirk 等³⁷⁾である。彼等は, モデル化合物を使わずに, ^{14}C -合成リグニン $\rightarrow^{14}CO_2$ という最終生成物だけに焦点を合わせ (途中の反応経路を一切無視し), 全体反応を追跡して, リグニン生分解の最適条件を決定した。この着想と, 方法論は成功しており, 数々の知見を集積させ, ついに次のようなリグニン生分解の5原則を提案するに至った¹⁷⁾。

- 第1原則: リグニン分解の酵素系は, 二次代謝の一部として発現する。
- 第2原則: リグニン分解の酵素系は, リグニン基質によって誘導されない。
- 第3原則: リグニン分解酵素系は, 酸化的な反応過程に関与する。
- 第4原則: リグニン分解の酵素系は, 非特異的である。
- 第5原則: リグニンの低分子化 (脱重合) は, 初発反応として必須ではない。

Table 1 Contrasts between the cellulolytic and ligninolytic systems of white-rot basidiomycetes (Kirk, 1981)¹⁷⁾

Characteristic	Cellulose System	Ligninolytic System
Occurs during primary and secondary phases	Yes, Cellulose serves as sufficient growth/energy source	No, only during secondary phase. Lignin does not serve as sufficient growth/energy source
Induced by substrate	Yes ^{1/}	No
Shows specificity for substrate	Yes	No
Degrades polymer oxidatively	No ^{2/}	Yes
Depolymerizes as obligatory first step	Yes	No ^{3/}

^{1/} Induction in presence of cellulose is established; actual inducer is unclear.

^{2/} Principal mode of cellulose polymer degradation is hydrolytic, although oxidative reactions might play a role.

^{3/} Oxidative degradation of the polymer occurs without obligatory depolymerization. Actually, the initial oxidative attack probably results in limited, partial depolymerization.

また、白色腐朽菌によるリグニン分解系とセルロース分解系とで対比される各種の特徴を Table 1 にまとめているが、まったく対照的で興味深い。

先ず第1原則であるが、図 11 から判るように、リグニン分解力は菌体増殖が静止する（培養開始3日目）頃立ち上り増加するという典型的な二次代謝パターンを示している。N-栄養源は、最も速やかに消費されて、菌体増殖が抑えられる。N-欠乏の時期とリグニン分解活性および菌体増殖の静止時期とが、ほぼ一致することから、彼等は、この現象をN-飢餓によるリグニン分解酵素系の活性化（誘導）と呼び、リグニン基質とは無関係に、その意味では、構成酵素系として合成されていることを指摘している。同様なことが、C-およびS-制限培地でも生ずることを観察している¹⁷⁾。

既に指摘したように、リグニンを培養開始と同時に添加したとしても、リグニン分解の活性化が早められたりすることはない。N-制限培地では、グルコース（エネルギー源）がある限り、リグニン分解の速度は多少遅くなるが、培養後20日以上でも続くのである。

リグニン分解に影響を与える培養条件のパラメーターは、後述するペラトリアルコール（V）の合成と相関性があるので、それと対応させるため、a～fまでの特徴を示した。詳しくは、Kirk等の文献を参照されたい^{17,34-37)}。

a) 静置培養でリグニン分解活性が高く、しんとう培養では抑制される。

b) 100% O₂ 下の培養条件で、酸素毒性の影響を受けず、空気（21% O₂）下のものより速やかにリグニンが分解される。

c) 菌体生育が停止する（3日目）頃から活性化され、二次代謝パターンである。

d) 培養3日目頃、アンモニアを添加すると、リグニン分解活性の発現は、約3日間程遅れる。培養後6日目の菌体、つまりリグニン分解酵素系を既に合成しているものに、同様にL-グルタミン酸のような栄養源を添加すると、約10時間後にリグニン分解活性は、ほとんど消失し、L-グルタミン酸によって抑制効果

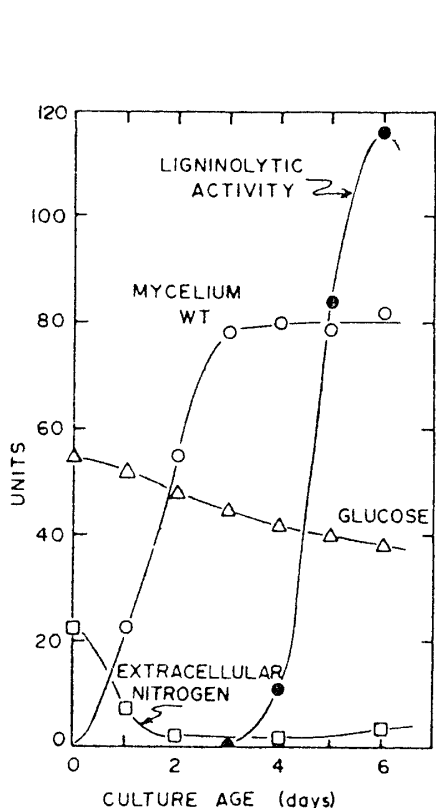


図11 N-制限培養基で開始されるリグニン生分解の二次代謝パターン (Kirk, 1981)¹⁷⁾

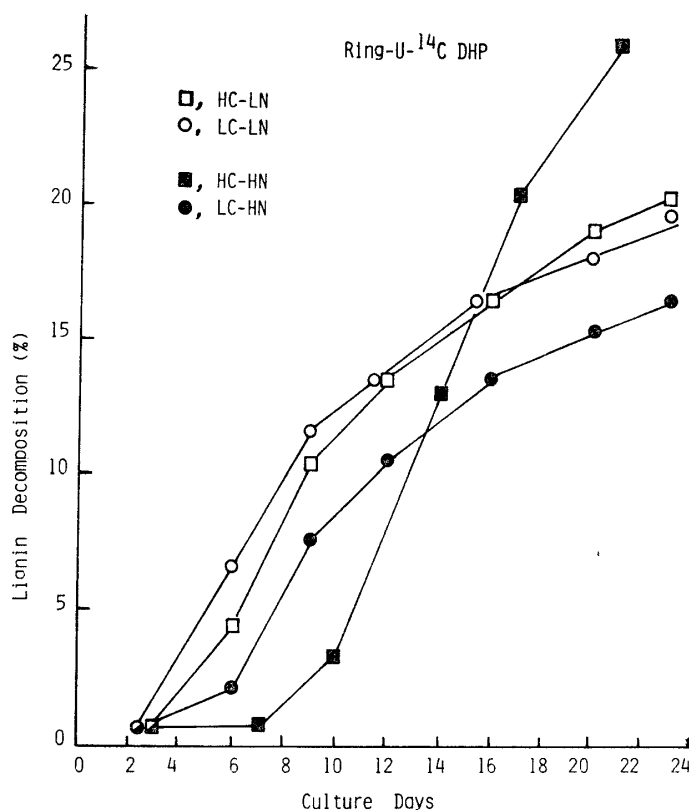


図12 *P. chrysosporium* によるリグニン分解に及ぼす培養基のN-源の抑制効果 (島田等, 1982)²²⁾. HC: 2% グルコース, LC: 0.5% グルコース, HN: 12 mM 酒石酸アンモン, LN: 1.2 mM 酒石酸アンモン

を受ける。この理由は、L-グルタミン酸によって二次代謝が、一次代謝に移行すると解釈されるが、その生化学的メカニズムは不明である。

e) リグニンによって誘導されない。

f) タンパク合成阻害剤、シクロヘキシイミドを、L-グルタミン酸の代りに上記のように3日目、又は6日目に添加すると、全く同様の抑制効果が観察される。これは、基質誘導とは関係なく、N-欠乏によってのみ酵素合成が3日目頃から開始するけれども、一旦でき上がった酵素もめまぐるしく代謝回転（合成と分解をくり返）し、その酵素系が、約10時間内にほとんどが入れ替わっていることが、示唆される。

以上が、第1～第2原則の要点であるが、リグニン分解を開始する引き金の実体や機構については、未解明である。

筆者と Gold 等²²⁾との共同研究の中でも、Kirk 等³⁷⁾の実験を追試し、それを再確認した。その一部を図12に示した。即ち HC-LN (N-制限) 培地、LC-LN (N, C-制限) LC-HN (C-制限) 培地では、リグニン分解活性が早く立ち上るのに対し、最も栄養条件の良い HC-HN 培地では、その立ち上りが遅いことが、明らかとなった。この場合、芳香核-U-¹⁴C 標識の合成リグニンで得られたデータを示したが、側鎖-2-¹⁴C およびメトキシル基 ¹⁴C-標識の試料についても、ほぼ同じパターンをとることが判った。

次に第3原則の酸化的プロセスの内容は、第5原則とも関係するが、リグニン生分解は60～80% O₂ 下で最も効率が高く、腐朽リグニンには α-カルボニル、バニリン酸および脂肪族カルボン酸類が増加し、メトキシル基も逆に減少して、親水性官能基が増える現象を意味している。この原則からも、リグニン生分解にオキシゲナーゼ反応が大きな役割を持つことが推論される。

第4原則の非特異性とは、リグニン分子はバラエティーに富んだ化学種の集合体であり、このような構造体を分解できるリグニン分解酵素系は、色々な有機基質を非特異的に代謝する潜在能力を持つことを指している。これは、筆者が提案した非立体特異性のアプローチやラセミ体リグニンは Xenobiotics であるとする視点と軌を一にするものである²¹⁾。

第5原則は、リグニン分子中の芳香核が、単一モノマーにならなくても、そのまま開裂して、カルボン酸官能基に変換されることを示唆している (図 13, 14)。実際、腐朽リグニン中にこのような官能基が増加することは、Haider 等^{29,30)}, Chen 等^{31,32)}の ¹³C-NMR の解析によって確証されるに至った。一般的に、芳香核開環には、カテコール生成が不可欠であり、高分子リグニン中にカテコール構造が果たしてどのように生ずるかを解明することは、第5原則を確立するためにも重要である。

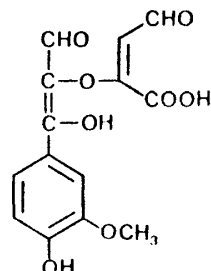


図13 エーテル構造を保持したまま
で開環したと思われる分解生
成物 (Chen 等, 1982)⁷⁸⁾

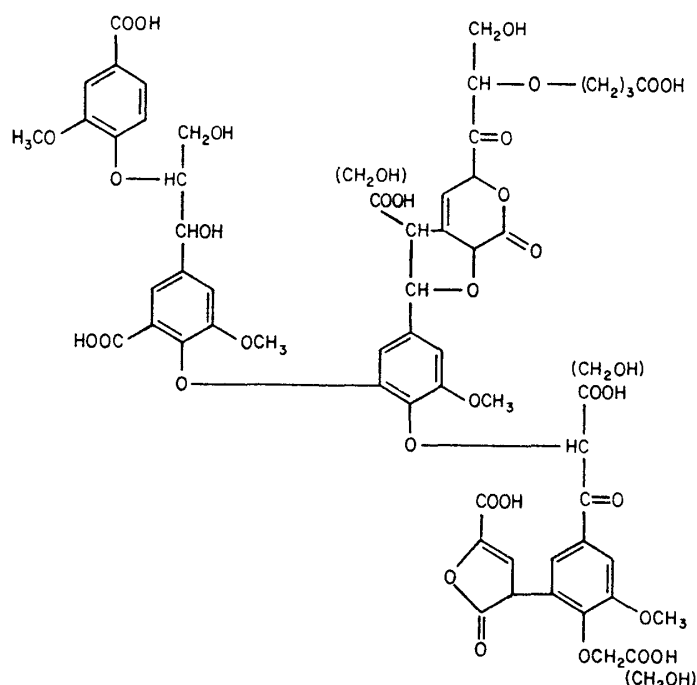


図14 白色腐朽を受けたスプルスリグニンの部分構造の提
案 (Kirk, 1981)¹³⁶⁾

カテコール生成のためには、先ず脱メチル化や水酸基の導入反応が考えられる。実際、高分子のままだでもリグニン中の芳香核に水酸化や脱メチル化が先行することについては、Chen 等¹³⁰⁾によって、指摘されており、我々は^{21,25)} ³H/¹⁴C 二重ラベル法によって DHP 中のメチル基が、ラジカル反応によって脱離することを認めている。このようなカテコール生成反応は、一般的にはチトクロム P-450 による活性酸素あるいはフェントン系反応由来の OH ラジカルによっても遂行されるだろう。

カテコール核開裂反応は、「安価」な反応であり、一度、カテコールが生成されれば、それ以後の代謝経路はスムーズに流れることが予想される。しかし、カテコール生成という「高価」な反応が、カテコール開裂反応より代謝の順位で先行するので、カテコール生成反応が、代謝的に制御を受けるならば、リグニン分解の全体反応もまた制御されることになる。即ち、カテコール生成反応は、リグニン生分解の律速段階となり得るし、カテコール開裂反応よりも重要な意味を持つことが推察される。

第5原則は、不斉生体高分子の加水分解的脱重合と対比できるユニークな脱重合プロセスを指摘しているが、これが主要なものか否か、かつリグニン代謝の律速段階を担う反応であるか否か、検討の余地がある。

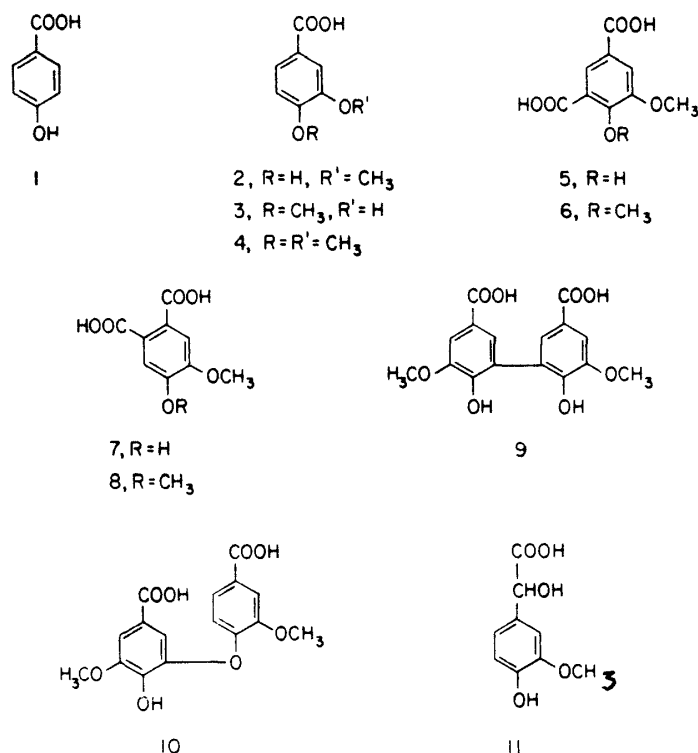


図15 スプルース腐朽材リグニンから分離同定された芳香族酸 (Chen 等, 1982)⁸⁰⁾

なぜなら、図15に示されるように、リグニン分解代謝物として、バニリン酸等の芳香族酸類も生成されているからである。これは、明らかに、芳香核開裂が先行しないで、モノマー単位が先ず生成する代謝経路が存在することを意味している。

P-450 の「高価」で非立体特異的な反応が、リグニン分解の初期段階に関与することを仮定すれば、前述の問題は、図16のようにスペキュレートされ統一的に説明できる。この図から得られる一つの示唆は、不斉生体高分子とリグニンの脱重合過程と対比できる代謝的特徴は前者には「安価」な反応が、後者には「高価」な反応がキーステップとなることに総括されるであろう。

そこで一つの可能性として、Chen 等¹³⁰⁾の見出した水酸化、脱メチル化および芳香環裂反応との関連で、我々の提唱する P-450 モノオキシゲナーゼの役割を総合的に考察してみると、図16に示されるように、Ⅰ～Ⅴの反応経路が推論される。(Ⅴ)の経路のようにリグニン高分子中の芳香核が、エポキシ化される例は報告されていないが、あっても不思議ではなからう。

重要なことは、NADPH/O₂/P-450 というエネルギー要求性の「高価」な反応系が、核開裂の初発反応に位置づけられることを認識することにある。即ち、直接的な側鎖のエーテル結合開裂反応(図16-Ⅰ)およびエーテル結合の開裂を経ないで(Ⅱ～Ⅴ)芳香核が開環する反応にせよ、リグニン生分解の全体反応が、P-450 のレベルに大きく依存することになる。

ここで、P-450 活性は前述のように、TCC 阻害、L-グルタミン酸、抑制(阻害)効果を受け、遺伝子変異(PO⁻)によって欠損すること等を想起し必要がある。環開裂のための前処理が阻害されれば、リグニン分解も阻害されることが、これで容易に推察できる。例えば、Ⅰのアルキルフェニルエーテル結合が先ず開裂すれば、バニリン酸等の芳香族酸類(図15)が生成し、バニリン酸は、バニリン酸モノオキシゲナーゼによって代謝されることは、既に述べた。つまり、この芳香族酸は *P. chrysosporium* の本来の二次代謝系へと合流することが想定される(図21参照)。

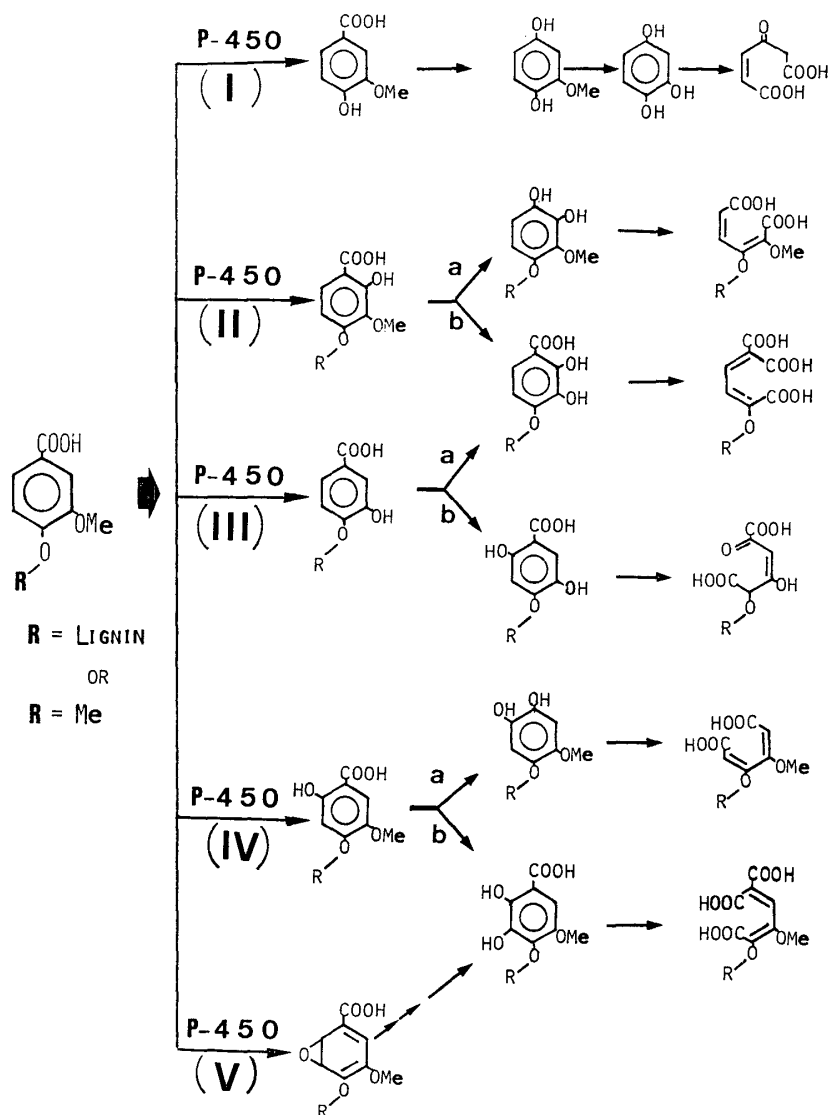


図16 非フェノール性末端基を持つリグニンの芳香核開裂反応を準備する P-450 の可能性

このように、リグニン高分子の生分解は、Mason 等の発見したモノオキシゲナーゼと、早石等の発見したジオキシゲナーゼとの協同作業によって遂行されると推論される。Kirk 等は、細胞外二原子酸素添加酵素を我々は、細胞膜結合型一原子酸素添加酵素の重要性を強調することになった。

もちろん P-450 が関与する反応段階は、I～Vの初発反応ばかりでなく、後続する似たような水酸化や脱メチル化反応やエーテル構造以外の、ジアリルプロパン型やクラマン型の構造分解にも関与しているであろうし、フェノール性末端基に対しては、ペルオキシダーゼやラッカーゼのようなふるまいによって、アルキルフェニル結合を切断することも予想される。図16の経路は、まったく筆者のスペキュレーションであり、P-450 反応と Kirk の提唱する環開裂反応の重要性を比較検討するためにまとめたに過ぎないことをお断りする。

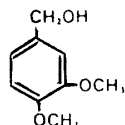
ちなみに、I-経路では、Buswell 等は、バニリン酸水酸化反応⁷¹⁾、ヒドロキシキノール (1,3,4-トリヒドロキシベンゼン) から Maleylacetate が生成することを酵素的に証明している¹³³⁾。また、おもしろいことに、Eggeling 等¹³⁴⁾、カテコールでなくゲンチジン酸の環開裂反応を *Nocardia* を用いて推論しているが、III-b経路 (図16) のようなものもリグニンポリマーそのものに作用できるか否か興味深い。

以上, Kirk 等が集約した 5 原則は, 複雑多岐にわたるリグニン生分解の全体像を非常に理解し易いものになっている。しかし, 二次代謝の実体とは何か? 生分解がなぜ生合成的現象として観察されるのか? 酸化のプロセスに関与する 活性酸素種は何か? それを発生し, コントロールする生体触媒系はどんなものか? Kirk の提案する 5 原則が他の典型的な白色腐朽菌 (キノコ) にも普遍的に適用できるか否か? 等々まだ多くの問題が残されている。これらの問題を根本的に解明するには, 一重にリグニン生分解の鍵酵素を証明する実証的研究にかかっている。

5. L-フェニルアラニンの二次代謝: ベラトリルアルコール (V) 生合成と生分解

リグニンの生分解は二次代謝であるというユニークな特徴については前節で学んだ。その生理学的現象は, 他の不斉生体高分子の微生物分解とはまったく対照的である。即ち, リグニン基質によってリグニンの分解酵素系は誘導されないこと, リグニンの代謝過程から, 生育に必要な十分なエネルギーが引き出されないこと, 従って, 逆にグルコースのような生育基質が, リグニン分解には常に必要とされることである。不斉生体高分子の生分解は「安価」な水解反応に始まって, エネルギー獲得性のカタボリックな代謝過程が営まれるのに反し, 「高価」なリグニンの生分解はエネルギーコストのかかるアナボリック (合成的) なプロセスとして二次代謝を構成していると見ることができる。

ここでは, リグニンの「生分解」がなぜ, 「生合成」(二次代謝) 的現象に見えるのか, その実体は L-フェニルアラニンの二次代謝である可能性について論究する。既に述べて来たように, リグニン生分解には, NADPH を必要とする, チトクロム P-450 によって触媒される「高価」な反応が, 主要であると理解できた。その「生合成」的現象を部分的には NADPH の要求性ということで説明可能である。しかし, 本菌は, N-栄養飢餓 (二次代謝) の過程で, V (3,4-ジメトキシベンジルアルコール) (図17) を生合成することは知られており^{87,88)}, それがリグニンの二次代謝の謎を解く鍵となることが予想される。



VERATRYL ALCOHOL (V)

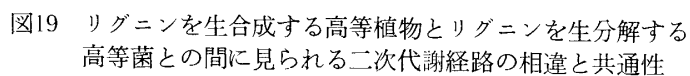
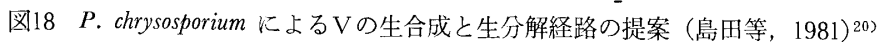
図17 *P. chrysosporium* が生産する二次代謝物, ベラトリルアルコール (V)

我々は Kirk との共同研究の中で, Vが L-フェニルアラニンと L-メオニンから生合成されるが, L-グルタミン酸添加後 10 時間後にその生合成系が消失することを見出した^{19,20)}。

図 18 に示すように, L-フェニルアラニンから始まってフェルラ酸や, 3,4-ジメトキシ桂皮酸, 3,4-ジメトキシ桂皮アルコール, 続いてベラトリルグリセリンが生成, その側鎖が切断されてベラトリナルデヒドが生成し, 還元後, V となる。本菌は, バニリン酸脱炭酸酵素を持つことが Buswell 等⁸⁹⁾ や矢島⁹⁰⁾等によって証明されている。V はベラトリン酸に酸化されて 4-位脱メチル化後バニリン酸を経て代謝されるような 4-脱メチル化反応を確認している²³⁾。

白色腐朽菌の L-フェニルアラニンに始まる二次代謝物の生合成例はこれが最初の報告であるが¹⁴⁾, 褐色腐朽菌 (マツオウジ) はフェニルアラニンから *p*-メトキシ桂皮酸メチルエステルを生合成することが, 島藺等⁹¹⁾によって報告されている。

担子菌類は桂皮酸類や芳香族酸類を対応するアルコール類へと還元することは, 西田⁹²⁾, 南等⁹³⁾, 島藺⁹¹⁾, 榎等⁹⁴⁾によって報告されている。また二重結合側鎖がジオール体を経て切断されることは, *Fusarium*^{95,96)} や *Nocardia*⁹⁷⁾ の場合と異なって興味深い。後者では, 桂皮アルコールは桂皮酸を経て側鎖が切断されるが



グルセリン中間体を経ない。

ここでもう一つの興味あることは、*P. chrysosporium* は、他の担子菌類⁹⁸⁾と同様に、フェニルアラニンから桂皮酸への脱アミノ反応を触媒するフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) を持っていることであり⁹⁹⁾、その活性がN-源によって、調節されることである(表4、後述)。高等植物でリグニン生合成の調節酵素は、PAL であり、その PAL がリグニン生分解の二次代謝でも調節酵素となることは、単なる偶然の一致か興味深い(図19)。両者は共にヒドロキシ桂皮酸経路を持つ。最も重要な相違点は 4-位のメチル化酵素 (OMT) と側鎖分解性の酵素等がリグニン生合成には存在しない、このリグニン分解菌には存在するという点である^{138~140)}。

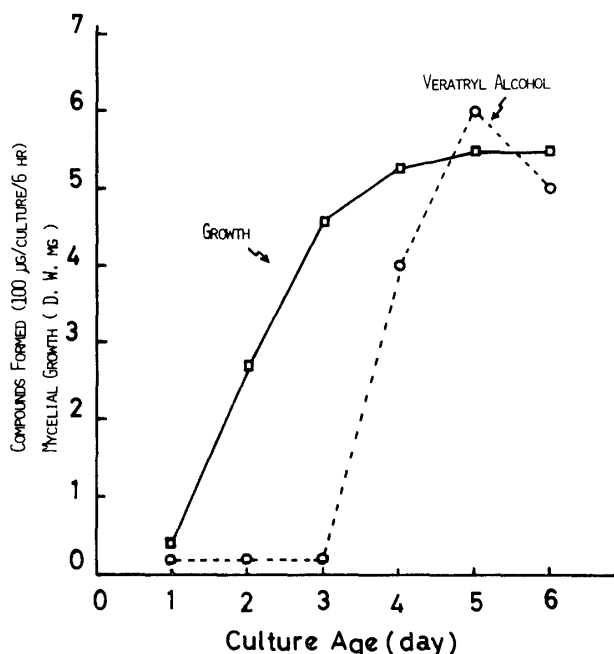


図20 *P. chrysosporium* 生育時の二次代謝物 (V) とベラトリルグリセロールの生成パターン (島田等, 1981)²⁰⁾

図20に *P. chrysosporium* の生育パターンと V 生合成パターンを示した。V の生成は培養後3日後に始まり二次代謝パターンを示している。

さてV生合成は二次代謝であり、リグニンとは無関係に表現されていることは明白である。この二次代謝が構成されている培養後6日目のフラスコにリグニンや諸々の Xenobiotics を添加してそれらが分解されるとすれば、これは、何を意味するのであろうか。V生合成 (L-フェニルアラニンアミノ酸の二次代謝) の一環として活性化されたチトクロム P-450 が、フラスコ中に添加された、異物 (リグニン) をたまたま分解する触媒特性を持っていたとすればこのような白色腐朽菌はリグニンを偶然的の基質として代謝変換 (Fortuitous metabolism) することができるということになる。

このような観点に立ち、リグニン生分解とV生合成との間に平行関係があるか否かを検討してみることは重要であり、それによって二次代謝の意味を解明する手がかりが得られるであろう。

6. V-代謝とリグニン生分解との平行関係

結論からすると、上記二つの代謝過程は次のような条件下で平行関係にあることが認められた²⁰⁾。

- a) リグニン分解酵素系とV生合成系は、共に静置培養下で、その代謝能が高く、しんとう培養すると著

しく抑制される。

b) 100% O₂ 下では、21% (空気) 下よりも活性が高く、共に酸素分圧に依存する。V 生合成は 100% 酵素下では、21% 下よりも約 5 倍高い。

c) 共に対応する基質 (リグニンや、ベラトリルグリセリン) の添加によっては活性化 (誘導) されない。

d) 共に、一次増殖が停止する頃、即ち N-源欠乏状態が生ずる頃、活性化される。

e) 共に、培養後 3 日目に、2~3 mM のグルタミン酸やアンモニア等の N-源を添加すると活性誘導が抑制される。かつ、既に活性化されている 6 日目の培養フラスコに添加すると 10 時間後に、活性は消失している。

f) タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシイミドを添加すると、既に活性化されている酵素系は 1~2 時間以内では影響を受けない (以上 Table 2 に集約される)。

Table 2 Physiological and biochemical correlations between lignin biodegradation and biosynthesis of veratryl alcohol in *Phanerochaete chrysosporium*

Characteristic	Lignin	V
	Biodegradation	Biosynthesis
a. Suppressed by culture agitation ?	Yes	Yes
b. Affected by O ₂ tension ?	Yes	Yes
c. Repressed by L-glutamate ?	Yes	Yes
d. Not induced by substrates ?	No	No
e. Secondary metabolic event ?	Yes	Yes

g) ペルオキシダーゼ欠損型の PO⁻ 変異株はリグニン分解能力と V 生合成能力とを同時に欠損している。

h) P-450 電子伝達係阻害剤として用いた TCC は、リグニン生分解反応 (図 7) と V-生合成を共に阻害した (Tabl 3)。

Table 3 Effect of "P-450" inhibitor on biosynthesis of veratryl alcohol

Culture System	I (10 ³ cpm)	II (μmole)
Control	289 (100%)	2.1 (100%)
10 ⁻⁴ M TCC	54 (19%)	2.0 (95%)

I, ¹⁴C-Labeled veratryl alcohol formed from L-phenylalanine, during 2 hr incubation.

II, The amounts of cold veratryl alcohol accumulated in 6-day old cultures used for this experiment.

以上、述べた平行関係を、ペルオキシダーゼ (P-450) によるオルソアニジンの酸化反応の肯否としても観察される。即ち、L-グルタミン酸効果、PO⁻ の変異効果、H₂O₂ 除去 (カタラーゼ) 効果、や TCC 阻害剤で、共通して阻害されることは興味深い。写真 1 に示すように、阻害効果を受けた場合オルソアニジンの呈色 (ペルオキシダーゼ/P-450 活性) 反応が抑えられていることは明日である。

Table 4 には、V 生成量と PAL 活性とが、N-栄養源によって支配されることを示した。PAL と V-

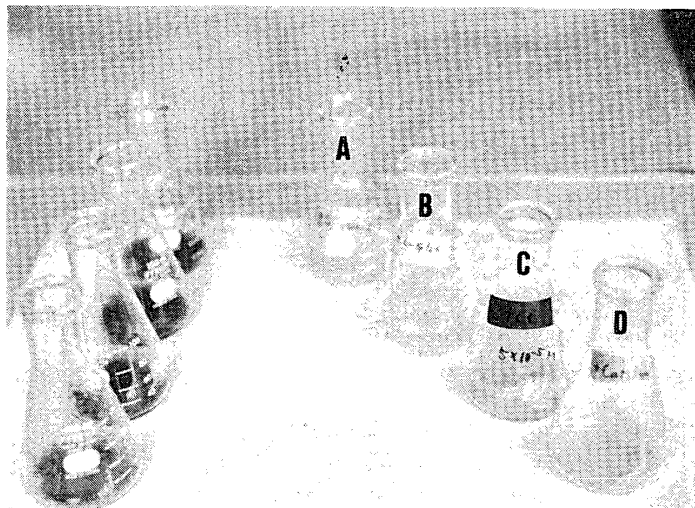


写真1 P-450 阻害剤, カタラーゼ, L-グルタミン酸抑制効果と遺伝変異による P-450/ペルオキシダーゼ活性の抑制。A: PO^- 変異株, B: 2 mM L-グルタミン酸投与後 10 時間後, C: 5×10^{-5} M TCC 添加, D: カタラーゼ (34,000 U/mg) を 55,700 units 添加した。左側の着色は, *Phanerochaete* 菌による *o*-アニシジンの酸化反応である。

Table 4 Effects of culture media on biosynthesis of veretryl alcohol and PAL activity in *Phanerochaete chrysosporium* (島田等, 1982)²²⁾

Culture Media	V	(nmoles/culture)	PAL*
	Day 7	Day 14	Activity
HC-LN	1786	7142	100
HC-HN	0	294	15
LC-LN	1595	857	27
LC-HN	250	0	16

* PAL (phenylalanine ammonia-lyase) was assayed for the 6-day old cultures and expressed as relative values.
HC, 2% glucose; LC, 0.5% glucose, HN, 12 mM ammonium tartarate; LN, 1.2 mM ammonium tartarate.

生合成量は HC-LN で最も高く, HN 区分では, V-生合成量と PAL 活性も低い。ちなみに PO^- は PAL 活性も喪失している。

次に, リグニンは, 複雑な化学構造を持つため, 上記のような平行関係だけでは, リグニン分解と V-生合成を結びつけるには飛躍があるように思われる。V-生合成と生分解 (図18) の代謝物の 4-位のメチル基をリグニン末端 ($Me=L$) に置き換えると, 図21に示すように, リグニン化学構造と相関する要素が出て来る。実際, 腐朽材リグニン中に, バニリン酸基が生ずることは, 幡²⁶⁾, Kirk と Chang^{27,28)} 等によって, また, ベンジルアルコール官能基が増加することは, Haider^{29,30)} 等, Chang 等^{31,32)} によって報告されている。健全材リグニンにもグリセロール側鎖やバニリン構造が存在することは Nimz¹⁰⁰⁾ や大森と榎原¹⁰¹⁾ によって報告されている。これで, V-代謝 (図21, I~VI) がリグニン末端構造部と重なり合う部分

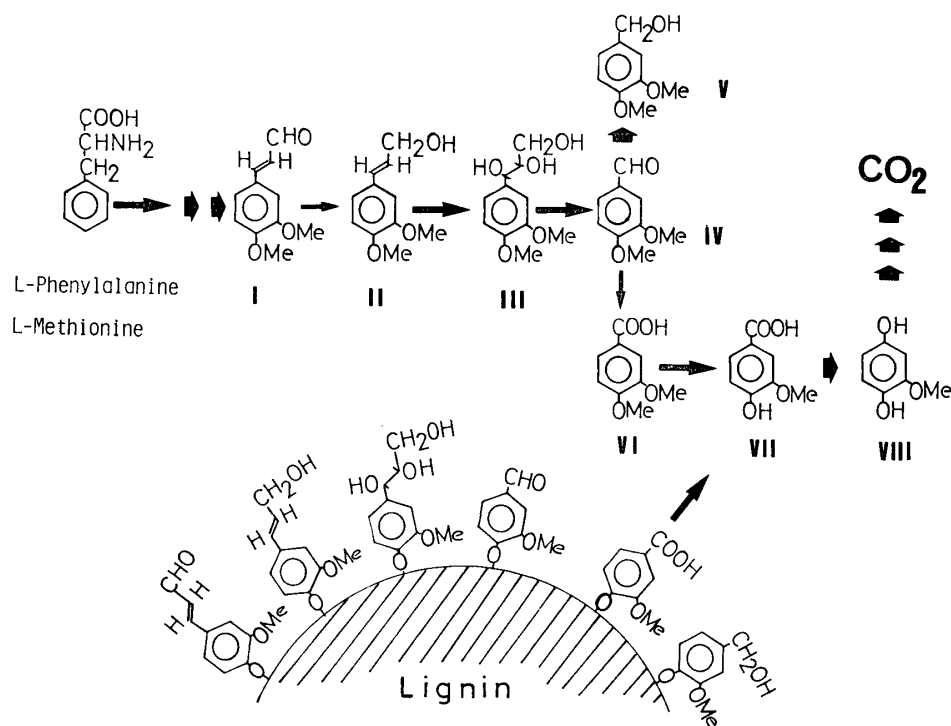


図21 *P. chrysosporium* 担子菌の営むフェニルプロパン代謝とリグニン生分解と化の学構造的共通点 (島田等, 1982)²⁵⁾

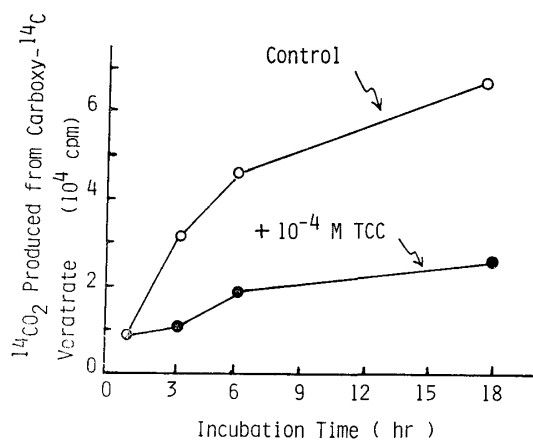


図22 ベラトリン酸の脱メチル化反応に及ぼすTCCの阻害的效果 (島田等, 1982)²⁵⁾

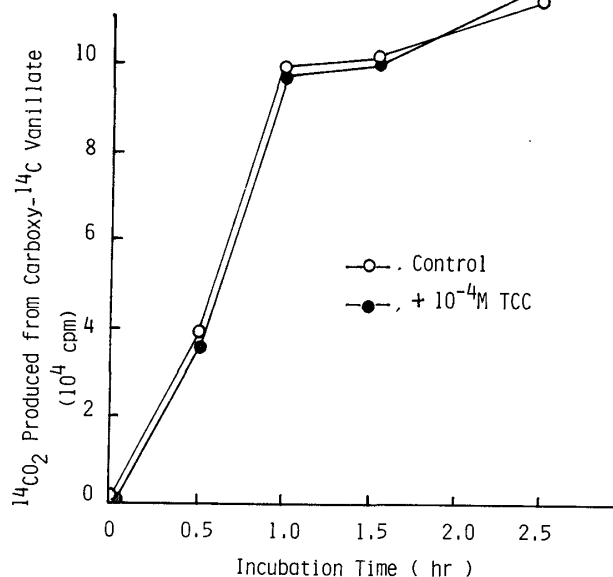


図23 バニリン酸モノオキシゲナーゼに及ぼすTCCの非阻害的效果 (島田等, 1982)²⁵⁾

が、あることは理解できる。従って、Vは最も単純なリグニンモデル化合物と言える。この中、リグニン代謝と最も重要な接点を持つ部位は、4-位脱メチル化によってペラトリン酸からバニリン酸を生成するステップであろう。この 4-位脱メチル化酵素がリグニン巨大分子にも作用し得るような基質特異性を持つか否かは興味深い。それがチトクロム P-450 であればこのデメチラーゼがリグニン生分解の鍵酵素であり、V 代謝の生化学的研究はきわめて重要な意味を持つ。しかしそのようなデメチラーゼは未報告である。

そこで、リグニン生分解と V-生合成を阻害した TCC 阻害剤が、ペラトリン酸 4-位脱メチル化反応をも阻害するか否かを検討すると効率良く阻害することが判った (図22)。

一方、4-位が脱メチルした後生成したバニリン酸- $^{14}\text{COOH}$ の脱炭酸反応は、TCC によって阻害されないことは、前もって確認している (図23)。このほか TCC によって阻害されなかった反応は、前述の呼吸系電子伝達系 (図8), バニリン酸のペラトリン酸への 4-O-メチル化反応およびペラトリン酸のVへの還元反応等であった²³⁾。従ってこの TCC 阻害剤は、かなり特異性の高い阻害剤と考えて良いであろうし、チトクロム P-450 電子伝達系が、この種の脱メチル化反応に関与することが推論される。

次に我々は、前述したマンニトール、チオ尿素、KMTB、安息香酸等の OH ラジカルスカベンジャーが、ペラトリン酸 4-位脱メチル化反応をも阻害するか否かを検討したところ、脱メチル化反応を効率良く阻害することが判った¹⁶²⁾。従って、 $\text{OH}\cdot$ がこの脱メチル化反応にも関与する可能性は高くなるが、P-450 上で $\text{OH}\cdot$ あるいはオキセン中間体が関与するのかがまだ結論を下すことはできない。とに角、 $\text{OH}\cdot$ スカベンジャーを用いた実験結果からもペラトリン酸 4-位の脱メチル化反応は、リグニン生分解との重要な接点を持つことが示唆された。現在、この脱メチル化酵素をリグニン分解の鍵酵素として追求している。

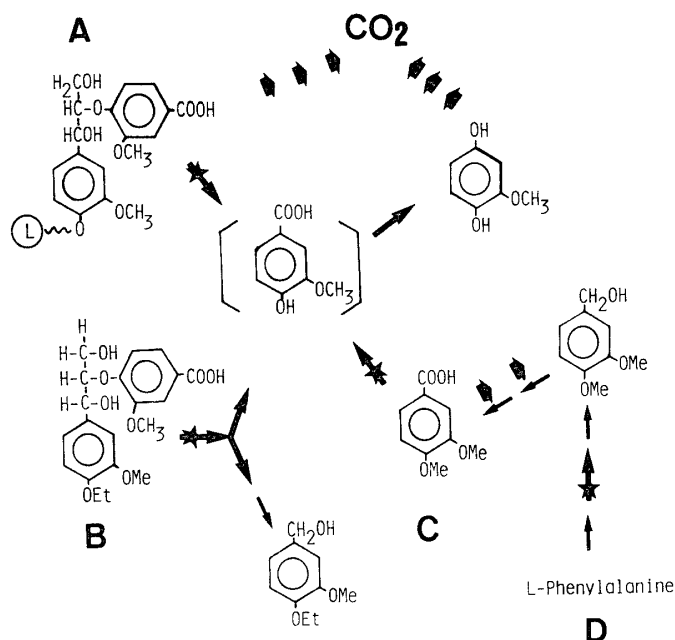


図24 リグニン、エーテル二量体およびペラトリン酸の代謝と V-生合成を阻害する P-450 阻害剤 (島田等, 1982)²⁵⁾
星印: 阻害をする反応段階

図24に、リグニン生分解、 β -O-4-モデル化合物のエーテル開裂反応、V の生合成、ペラトリン酸脱メチル化反応は、チトクロム P-450 で連結される接点を (※→) で示した。

フェニルアラニンの二次代謝 (ペラトリンアルコールの生合成と生分解) がN-源欠乏下で活性化される

意義については明確ではないが、この代謝経路は *P. chrysosporium* が進化の過程で「考案」したメカニズムであり、その菌にとってメリットがあると推察される。一般に、二次代謝はそれを営む、生物体の生命維持や種の生存淘汰に有利な代謝上のメカニズムとして働いていると考えられるからである¹⁰³⁾。

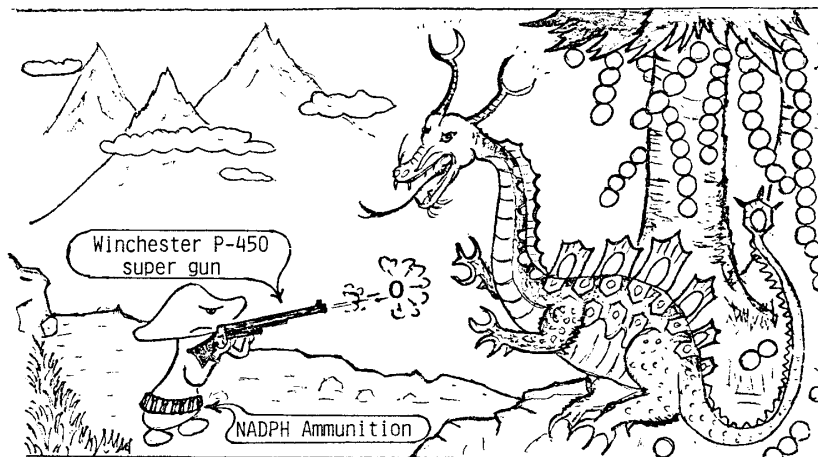
そこで、エネルギー消費型の二次代謝の意義について考察しよう。

7. 白色腐朽菌の芳香族アミノ酸二次代謝の意義

リグニンを分解するにはグルコースが必須であるがリグニン分解性のキノコは多糖類（木材中約70～75%を占める）を食べて、エネルギーを獲得しながらリグニンを分解し、木材という極めてN-源の少ない（いわばN-制限培養）条件下で、繁殖し木材腐朽を進めていることは明らかである。しかも、一度、木材中に潜入することに成功すれば、他の微生物と競合する必要もなく多糖栄養源を完全腐朽するまで独占することが可能となる。

ちなみに、セルロースの熱量は約 4000 cal/g、クラソシリグニンの熱量は約 6000 cal/g であると言われる。セルロースの1.5倍の熱量があっても、リグニンだけで生育できない白色腐朽菌はリグニンからは、生物学的に利用可能なエネルギーをほとんど獲得できていないものと推論される¹⁷⁾。既に触れたようにその理由は、リグニンの低分子化（エーテル結合等の切断）のために、NA(D)PH が先ず多量に入力される必要があり、その後、出力される ATP の量はかなり少ないものと推定される。一方、Kirk 等によれば、リグニンによってリグニン分解酵素系が誘導されない事実は、リグニン分子内に貯えられたエネルギー量は、腐朽菌にとっては重要ではなく、その生命維持の代謝にも主要なものでないことを示唆している¹¹⁾。実際、四方八方多糖類という栄養に囲まれた木材中では、難分解性リグニンにエネルギーを依存しなければならない理由は見当たらない。リグニン障壁を、少々エネルギーを使っても除去（脱リグニン）することの方が重要であるということが理解される。また、白色腐朽菌による芳香族化合物の代謝パターンも他の微生物（バクテリア等）に見られるようなエネルギー獲得（カタボリック）型でなく、L-フェニルアラニンの二次代謝に見られるエネルギー消費（生合成）型の一種独特のものであることが推論されるリグニンの分解はエネルギー（グルコース）を必要とする「高価」な反応ではあるが、キノコはこれを活用して、過剰の多糖類（エネルギー）という見返り品を獲得しており、このプロセスが生命維持のメリットになっていると考えられる。

L-フェニルアラニン等の芳香族アミノ酸の二次代謝の意義は、根源的にはもっと別の重要性が指摘され



In the beginning was a story about a mushroom conquering guaiacyl- and syringyl-monomers for carbohydrate foods.

図25 木の番人「リグニンモンスター」と戦かう白色腐朽菌

るかもしれないが、次のように要約されるであろう。

高等植物の進化の過程で、L-フェニルアラニンの二次代謝経路を難分解性リグニンの生合成に応用したのは、樹木の知恵であり、逆に、その二次代謝経路をリグニン分解に応用し、木材腐朽に成功したのは、白色腐朽菌の知恵であろう。白色腐朽菌は当然優位な生存権を獲得することになったと推論される。ちなみに、白色腐朽菌は褐色腐朽菌より高等であるとされている¹⁴²⁾。また、樹木も白色腐朽菌も互いに攻撃と防禦という自然淘汰の中で共進化してきたものと考えられる。このスペキュレーションが正しければ白色腐朽菌と褐色腐朽菌との生化学的進化の問題をアミノ酸の二次代謝の側からアプローチすることも可能である。

二次代謝であるリグニン生分解とV-代謝を繋ぐ、枢軸にある鍵酵素は、「高価」な反応を触媒するチトクロム P-450 系ではないかというワーキングハイポセスを提案することになった。まわりくどい話であったかも知れないが、キノコのリグニン生分解という「物語」は図25のようなイラストによって集約されるであろう。

キノコの仲間の白色腐朽菌は、進化の過程で活性酸素銃 (P-450 電子伝達系) を「発明」し、NADPH (火薬) を用いた活性酸素 (弾丸) で樹木を護るリグニンモンスターを攻撃し、食糧 (セルロースとヘミセルロース) を獲得している光景が想像されないだろうか。

8. 応用開発研究の可能性

現状の問題を概観してみると、リグニン分解を触媒する酵素 (系) が分離同定されていないということは、この分野の応用開発研究を阻む最大のボトルネックとなっているように思われる。

リグニン生分解に特異的な酵素が関与しているというスペキュレーションは、疑問視されるけれども、自然界では白色腐朽菌によってリグニンが代謝・分解されていることは明白である。その主要な反応はかなりエネルギーのかかる「高価」な生化学反応であることには異論はない。実際、最近の Forney⁴⁶⁾ 等が初めて提案した $\text{OH}\cdot$ ラジカルによるリグニン生分解においてグルコース/ O_2 /グルコースオキシダーゼ系は、グルコースを消費して、 H_2O_2 を供給せねばならず、やはり「高価」な反応である。我々が想定している NADPH/O_2 /チトクロム P-450 系も、酸素活性化のため、グルコースを消費するのでコストのかかる反応ではある。辰巳等⁵²⁾ が示した H_2O_2 /UV-光系によるクラフトリグニンの分解法も H_2O_2 のほかに電気エネルギーが必要であり、かなりコストがかかるようである。しかし、脱リグニン処理に要するコストを生体触媒系と H_2O_2 /UV-光系とを比較するとき、どちらの系がコスト高になるであろうか。微生物を使った脱リグニン法は絶えずグルコースが必要とされるからコスト高になるが、生体触媒や合成触媒が安価に生産され、長期間の使用に耐えるなら、触媒系を用いる脱リグニン処理の方が省エネルギー的であるばかりでなく、副生する芳香族酸類を化学原料として利用することも容易になるので H_2O_2 /UV-光系よりも優れた方法であろう。

既に学んだように、白色腐朽菌の脱リグニン処理技術は「高価」ではあるが、自然の理法に適っていると見做される。それは生体触媒の利用という点で、エネルギーを食う工業的脱リグニン法に比較し、はるかに無公害で省エネルギー的な「安価」な方法となるであろう。

リグニン生分解の生体触媒がチトクロム P-450 であるなしに拘らず、それに匹敵するような触媒が開発されるならば、多方面に応用できることが予想される。実際、バイオマス利用を目指したセルラーゼによる木材糖化醗酵も注目されているが、多糖類水解酵素はリグニンのために著しく阻害され、目下、省エネルギー的脱リグニン法が切望されている。実際、脱リグニン処理をほどこせば、セルラーゼ作用が促進され、木材腐朽も促進されることは証明済みである^{104~107)}。そこで、オガクズに最高度の力価を持つセルラーゼ製剤とリグニン分解酵素製剤とを加えて、インキュベートし、数時間後に水あめや、アルコール醗酵原料が製造できたとしよう。セルロース糖化の際、多糖類のセルラーゼを混入して使用すると、相乗的に糖化が促

進されるが^{108,109)}、当然セルラーゼとリグニン分解酵素とを併用すれば、更に大きな相乗効果が期待され、現在高度に開発されたセルラーゼ利用の道は、まさに『相乗的』に拡大されるであろう。この手法はまた、LCC (リグニン多糖類複合体) の研究¹¹⁰⁾にも応用できる。例えば、多糖水解酵素と、リグニン分解酵素の両面攻撃によって、糖-リグニンの結合接点となっているフラグメントを、温和な条件下で大量に分離抽出することが可能となり、長年にわたって論争されている LCC 化学結合接点の本体を証明できるようになるかも知れない。

また、パルプ原料のセルロースを食べないで、リグニンとヘミセルロースを食べる腐朽菌の変異株も、Eriksson 等^{10,11)}によって開発され、バイオメカニカルパルピング (近藤^{38~40)}の解説を参照されたし) が世界的に注目されている。福住等^{41,42)}が報告した白色腐朽菌によるパルプ廃液の脱色法は Chang や Kirk 等³⁾によるパルプ第一漂白液のバイオブリーチングの新技术として発展しつつある。前述のように、リグニンを唯一の炭素源として生育する微生物は発見されていないし、リグニンだけを代謝し生育できるような変異株も創り出されていない。従って、リグニンの生化学変換を微生物の能力だけに依存することは、グルコース消費のため得策とは言い難い。

リグニン分解酵素のもつ触媒能力をミミック (模倣) して、あるいは酵素以上の触媒能力を有する合成触媒 (シンザイム) の開発研究も展望を開く道となろう。

リグニン分解酵素製剤 (又は触媒) が遺伝子工学を応用して生産されるようになれば、微生物そのものを使う必要が無く、酵素膜フィルターを使ったパルプ廃液の省エネルギー (生化学) 的处理技術の開発も可能ではなからうかと考える。

以上応用開発研究の可能性について考えてみたが、リグニンの微生物変換研究の意義は、炭素資源循環における環境保全とも関係する。森林ではリグニンの公害が発生しないのに、河川や海浜に流されたら公害源となる理由についても NADPH/O₂/P-450 系で説明可能である。リグニン生分解には、NADPH, O₂ および P-450 の三要素が不可欠であると考えれば、川や海には、1) リグニン分解性の P-450 を持つ生物 (キノコ) がいないし、2) 十分なグルコース (NADPH 供給源) が無いこと、3) O₂ は水に溶けにくく、十分な供給が保障されないためにリグニン公害が生ずる。ラジカル的な反応原理を活用するキノコの基礎研究が有効なバイオマス資源の省エネルギー変換や合理的な環境保全対策に役立つことが予想される。

図 26 に示すように、植物は太陽エネルギーを NADPH を介して、グルコースに固定しており、リグニン分解に必要なエネルギー (NADPH) を太陽エネルギーから獲得することができれば、分子状の酸素を活性化させるためにグルコースを使う必要は無く、太陽エネルギーの生化学的変換技術が、省資源、省エネルギーで無公害の脱リグニン処理法、パルプ製造法や環境を汚染する各種のプラスチックや変異原性の薬物

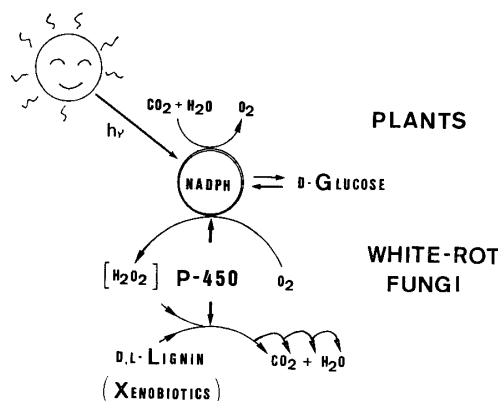


図26 NADPH によって連結される植物の光合成と、白色朽菌の P-450 によって触媒されるリグニン生分解との関係

(Xenobiotics)^{131,132)} の浄化法にも応用できると考えるのは果して夢であろうか。

9. おわりに

リグニン微生物変換の基礎と応用開発研究のボトルネックは、リグニン代謝に関与する鍵酵素の発見と同定にあると言える。その重要性和面白さを知ってもらうため、かつ担子菌類の生化学に興味を持つ研究者人口が増えることを切望した余り、話が広がり過ぎたかもしれない。リグニン生分解現象を V-代謝として位置づけ、それを担うのは、P-450 と仮定して論究して来た。

担子菌のリグニン生分解の生化学は、学際領域の課題であり、相互の情報交換と総合解析がいかに大切か理解されたと思う。担子菌によるリグニン生分解は、二次代謝、Co-metabolism (随伴代謝)、Xenobiotic metabolism (薬物代謝) や、Fortuitous metabolism (偶然代謝) の側面を持つことも理解されたと思う。ラセミ体リグニンは、天然物ではあるが、もう一度、パスツールが見い出した光学活性の原則に適合しない Xenobiotics として見直すことが大切であろう。リグニン分解菌は、自然界の肝臓の役割を果たしていると思ふことは、本説の第4図に関連して触れたが、連想や類推によって浮び上る興味ある問題は、ほかにもある。

例えば、動物肝ミクロソーム P-450 は、薬物の解毒作用もあるが、ペンツピレンを発ガン物質にも変換する。しかし、高等植物のミクロソーム (P-450) は、その発ガン物質をリグニンと共重合して解毒化することが示唆されている¹¹⁴⁾。雑(多)食性の魚類や昆虫は、単食性のものに比べて P-450 レベルが高いことも報告されている¹¹⁵⁾。リグニン分解と関連し、白色腐朽菌と褐色腐朽菌との間では前者の P-450 が高いことによるのか、基質特異性の差異によるのか、細胞表面の構造が、リグニンを分解するようになっていないのか、興味ある問題が出てくる。Kirk は、後者では核開裂を引き起こすジオキシゲナーゼが無いことを想定しているが、類推をきかせるとすれば、褐色腐朽菌を単食性(多糖類を代謝)白色腐朽菌は多糖類と同時に、リグニンも食べるから多食性のカテゴリーに入ると考えることもできる。リグニン Xenobiotics を代謝できる能力は P-450 に帰因するとすれば褐色腐朽菌よりも白色腐朽菌の方が、P-450 のレベルが高く、かつその基質特異性もはるかに広いことが推定される。

また、アミノ酸の二次代謝の面から眺めると、白色腐朽菌と褐色腐朽菌の間には、共通の L-フェニルアラニン-桂皮酸経路が指摘されたがその差異はまた、リグニン分解性とどう結びつくのか(?), 木を食う担子菌と、担子菌の攻撃から身を守る木との間には、共通の L-phenylalanine-二次代謝が存在しており、その違いは、本論で大体理解できたと思うが、その進化学上の意味は何か等々と興味を引かれる。また、木材腐朽防除対策と関連した防腐剤や薬物の解毒の生化学的機構解明など興味は尽きない。

前述のパルプ廃液の処理や、木材糖化醗酵に、リグニン分解酵素を利用することのほかに、まだ面白い応用生化学の分野がある。それは、日本の伝統的キノコ産業である。シイタケ、ヒラタケ、エノキタケ、ナメコの栽培である。これらの食用キノコは全てリグニンを食う白色腐朽菌であるが、キノコ生産と、PAL- や P-450 の活性化に、何か関係があるであろう。

キノコは巧妙にも P-450 触媒を活用し、エーテル結合を一度ヘミケタルにした後、切断分解してしまうのである⁸⁴⁾。エーテル結合一個を、1モルの NADPH (3ATP) を消費して「高価」な反応を利用するのであるが、生体触媒を使わない通常の反応に比べれば、はるかに温和な条件下で、はるかに省エネルギー的にリグニン分解を遂行していることは、想像に難くない。これは、生体触媒の威力であろう。即ち、この原理を、バイオミメティックなアプローチ¹¹⁶⁾として解明し、応用すれば省エネルギー的脱リグニンや、省エネルギー的漂白法のみならず、水アム並びにアルコール醗酵原料を造るための新木材糖化法を開発する可能性が開かれるであろう。実際、ペンシルエーテル結合は、中間媒体を使ったエレクトロケミカルプロセスによって¹¹⁷⁾切断されることは報告されており、田伏¹¹⁸⁾は、マンガン錯体の強力な酸化力を応用して、同様の

脱エーテル化反応を証明している。しかし高分子リグニンに応用するならば、 α -位ではなくて β -位の脱エーテル化反応が重要であり、今後の研究の発展が期待される。

その他、言い忘れたので、付け加えるとすれば、リグニン生分解を植物病理学的立場、即ち、植物と木材腐朽菌との co-evolution¹¹⁹⁾ という立場から、腐朽菌を眺めても白いことが想像される。即ち、針葉樹型 OMT より広葉樹型 OMT の方が、基質特異性が広いことを考慮すると^{138~140)}、腐朽菌には *p*-特異的な OMT があることや¹⁴¹⁾、またその脱メチル化反応も、褐色よりは白色腐朽菌の P-450 の特異性が広くなり、よりかさばったリグニンのエーテル構造を含めあらゆる箇所を攻撃することが推定される。従って、非特異的な脱メチル化酵素 (P-450) は、両菌の生化学的進化のマーカーエンザイムになる可能性もある。

次に植物病理学上極めて重要であるが、高等植物が感染を受けると、感染菌と宿主側との攻防戦 (植物によるファイトアレキシンの生合成と感染菌によるその生分解) が、ダイナミックに展開されることは周知の事実である。この際、両者の間では特異性の原理を駆使したやりとりが観察されるのに対し宿主のリグニンの生合成 (重合) とその寄生菌によるリグニン生分解 (脱重合) との間には非特異的なラジカル反応の原理が介在しており前者の活物寄生とは対照的な関係が存在すると言えよう。リグニンには積極的な抗菌作用はないけれども、浅田¹²⁰⁾は植物を守る防壁効果を重視して、それを「機械的ファイトアレキシン」と呼んでいるが、きわめて興味深い見方である。

以上筆者の興味の赴くままに、リグニンの生分解と L-フェニルアニンの二次代謝 (V の生合成) を繋なく鍵酵素チトクロム P-450 (?) をめぐって、関係する学際領域の研究課題にも論及し、基礎と応用、学問と実益の両面から新しい研究法を模索しつつ、本論を展開してきた。森林生産物質は再生産可能 (renewable) な資源として、今日、大きな期待と注目を集めているが、同時に我々の発想や研究法が既成の概念にとらわれない renewable なものか否か問われているようでもある。一方、国際的な技術開発研究が競合する最近の情勢では、増々、我が国独自の生活、文化、伝統に根ざした独創的な研究開発を根本的に目指すことの重要性が痛感される。

リグニンとチトクロム P-450 —— 一見奇妙なとり合せに見えたかもしれないが、活性酸素で二つを結びつけた。この組合せに興味を持って戴ければ幸いである。しかし、現段階では、リグニン分解性チトクロム P-450 の存在は一つのスペクレーションであり、今後、これを確証する実証的研究が不可欠であることには言をまたない。また、リグニン、P-450、活性酸素種およびキノコ等はいずれをとり挙げて、筆者の力量を超える大きなテーマであり、それらが交錯する広範で複雑な問題を簡潔に説明し得ず、思弁的傾向に流れたことを許されたい。また、これらの情報洪水の中で大事なものを見落しているかも知れないが御批判と御教示が得られれば幸甚である。

10. 謝 辞

本総説の研究の一部は、日本学術振興会、日米科学協力事業 (リグニン微生物分解・樋口隆昌教授代表者)、ならびに文部省科学研究費一般研究 C (No. 57560166) によって成されたことを附記する。

チトクロム P-450 について御教示戴いた本学薬学部齊藤光実博士に、活性酸素種についてお本学食糧科学研究所、浅田浩二博士に、また腐朽菌学、木材成分の熱量について当研究所高橋旨象博士と石原茂久博士にそれぞれ、御教示を戴いたことを深謝します。

シメジ (ヒラタケ) の栽培法に関し、大津市小田原シメジ組合、村田定一氏から情報・資料を提供して戴いたことを深謝します。

本総説の校閲を賜ったリグニン化学部門樋口隆昌教授に深謝すると共に、多くの共同研究者の方々に、御批判と討論を戴いたことを深謝します。

文 献

- 1) T. K. KIRK: Annu. Rev. Phytopathol., **9**, 185 (1971)
- 2) T. K. KIRK: "Biological Transformation of Wood by Microorganisms." ed. W. LIESE, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 154 (1975).
- 3) T. K. KIRK, H-m. CHANG: Enzyme Microb. Technol., **3**, 189 (1981)
- 4) T. K. KIRK, T. HIGUCHI, H-m. CHANG: "Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications" CRC Press, Boca Raton, Florida, **Vol. 1** and **2** (1980)
- 5) T. HIGUCHI: Wood Research, No. 67, 47 (1981)
- 6) T. HIGUCHI: Experientia, **38**, 159 (1982)
- 7) T. HIGUCHI, F. NAKATSUBO: Kemia-Kemi, No. 9, 481 (1980)
- 8) T. HIGUCHI, M. SHIMADA, F. NAKATSUBO, T. K. KIRK: In "Biosnversion and Bischemical Engineering" ed., T. K. GHOSE, IIT Delhi and SEIT, Zurich, Vol. I, 205 (1980)
- 9) T. HIGUCHI: The Ekman-Days 1981 (International Symp. no Wood and Pulping Chemistry) (Stockholm) **Vol. 3**, 16, (1981)
- 10) K. E. ERIKSSON: In, "Advances in Biochemical Engineering" ed. A. FIECHTER, Springer-Verlag, Berlin, **20**, 193 (1981).
- 11) P. ANDER, K. E. ERIKSSON: Progress in Industrial Microbiol., **14**, 1 (1978)
- 12) D. L. CRAWFORD, R. L. CRAWFORD: Enzyme Microb., Technol., **2**, 11 (1980)
- 13) H. W. KERN: Proceedings of FEMS Symp. p. 299 (1980)
- 14) R. L. CRAWFORD: "Lignin Biodegradation and Transformation." John Wiley and Sons, New York (1981)
- 15) 福住俊郎: 発酵と工業, **37**, 1041 (1979)
- 16) 榎 章郎: 木材研究・資料, **No. 16**, 1 (1981)
- 17) T. K. KIRK: The Ekman-Days 1981, International Symp. on Wood and Pulping Chemistry, Stockholm **Vol. 3**, 66 (1981)
- 18) C. L. CHEN, M. G. S. CHUA, J. E. EVANS, H-m. CHANG, T. K. KIRK: *ibid.*, **Vol. 3**, 75 (1981)
- 19) M. SHIMADA, F. NAKATSUBO, T. K. KIRK, T. HIGUCHI: Arch. Microbiol., **129**, 321 (1981)
- 20) M. SHIMADA, F. NAKATSUBO, T. HIGUCHI, T. K. KIRK: The Ekman-Days 1981, International Symp. Wood, Chemistry (Stockholm) Vol. 3, 66 (1981)
- 21) M. Shimada: Ref. 4, **Vol. 1**, p. 195 (1980)
- 22) 島田幹夫, 榎 章郎, K. KRISNANGKURA, M. H. GOLD: 第32回, 日本木材学会大会 (福岡) 要旨集, p. 232 (1982)
- 23) M. SHIMADA, T. KATAYAMA, T. HIGUCHI: Tappi R & D Conference (Ascheville, USA), p. 243 (1982)
- 24) 島田幹夫: 文部省科学研究費・資源循環・植物廃棄物の有効利用に関する研究 (R-33-8, 班代表者: 樋口隆昌) (1982)
- 25) A. NOGUCHI, M. SHIMADA, T. HIGUCHI: Holzforschung, **34**, 86 (1980)
- 26) K. HATA: Holzforsch., **20**, 143 (1966)
- 27) T. K. KIRK, H-m. CHANG: Holzforsch., **28**, 217 (1974)
- 28) T. K. KIRK, H-m. CHANG: *ibid.*, **29**, 56 (1975)
- 29) P. C. ELLWARDT, K. HAIDER, L. ERNST: *ibid.*, **35**, 103 (1981)
- 30) K. HAIDER, P. Ch. ELLWARDT, L. ERNST: The Ekman-Days 1981, International Symp on Wood and Pulping Chemistry, (Stocholm), Vol. 3, 93 (1981)
- 31) C. L. CHEN, M. G. S. CHUA, J. E. EXANS: H-m. CHANG, T. K. KIRK: *ibid.*, Vol. 3, 75 (1981)
- 32) C. L. CHEN, H-m. CHANG, T. K. KIRK: Holzforsch., **36**, 3 (1982)
- 33) T. K. KIRK, W. J. CONNORS, R. D. BLEAM, W. F. HACKET, J. G. ZEIKUS: Pro. Nat. Acad. Sci. USA., **72**, 2515 (1975)
- 34) P. KEYSER, T. K. KIRK, J. G. ZEIKUS: J. Bacteriol., **135**, 790 (1978)
- 35) P. FENN, T. K. KIRK: Arch. Microbiol., **130**, 59 (1981)
- 36) P. FENN, S. CHOI, T. K. KIRK: Arch. Microbiol., **130**, 66 (1981)
- 37) T. K. KIRK, E. SCHULZ, W. J. CONNORS, L. F. LORENZ, J. G. ZEIKUS: Arch. Microbiol., **117**, 277

- (1978)
- 38) 近藤民雄：紙パ技協紙, **31**, 13 (1977)
 - 39) 近藤民雄：防菌防黴, **5**, 23 (1977)
 - 40) 近藤民雄：「リグニンの化学」p. 232, 中野準三編, ユニ広報 (1978)
 - 41) 福住俊郎, 西田篤実, 青島清雄, 南 享二：木材誌, **23**, 290 (1977)
 - 42) T. FUKUZUMI: Ref. 4, Vol. II, p. 162 (1980)
 - 43) K. FREUDENBERG, A. C. NEISH: Constitution and Biosynthesis of Lignin, in "Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics" 2. Springer-Verlag, p. 42 (1968)
 - 44) P. HALL: Enzyme Microb. Technol., **2**, 170 (1980)
 - 45) F. NAKATSUBO, I. REID, T. K. KIRK: Biochem. Biophys. Res. Comm., **102**, 484 (1981)
 - 46) L. J. FORNEY, A. C. REDDY, M. TIEN, S. D. AUST: J. Biol. Chem., **257**, 11455 (1982)
 - 47) P. L. KELLEY, C. A. REDDY: Biochem. J., **207**, 423 (1982)
 - 48) L. J. FORNEY, C. A. REDDY, H. S. PANKRATZ: Appl. Environ. Microbiol., **44**, 732 (1982)
 - 49) H. KUTSUKI, M. H. GOLD: Biochem. Biophys. Res. Comm., **131**, 124 (1982)
 - 50) H. KUTSUKI, M. H. GOLD: 第27回リグニン化学討論会 (名古屋) (1982)
 - 51) H. NIMZ, G. TURZNIK, M. NEMR, D. ROBERT: Tappi R & D Conference Paper (Asheville, USA), p. 51 (1982)
 - 52) 辰巳憲司, 寺島典二：木材誌, **27**, 210 (1981)
 - 53) J. BEAUCHAMP, I. FRIDOVICH: J. Biol. Chem., **245**, 4641 (1970)
 - 54) G. COHEN, A. I. CEDERBAUM: Science, **204**, 66 (1979)
 - 55) W. BORS, E. LENGFELDER, M. SARANM, C. MICHEL: Biochem. Biophys. Res. Comm., **70**, 81 (1976)
 - 56) S. F. YANG: J. Biol. Chem., **244**, 4369 (1969)
 - 57) S. F. YANG: Arch. Biochem. Biophys., **122**, 481 (1967)
 - 58) R. E. WHITE, M. J. CONN: Ann. Rev. Biochem., **49**, 315 (1980)
 - 59) G. HAMILTON: In, "Molecular Mechanism of Oxygen Activation" Ed., O. Hayaishi, Academic Press, p. 405 (1969)
 - 60) A. D. RAHIMTULA, P. J. O'BRIEN: Biochem. Biophys. Res. Comm., **62**, 268 (1975)
 - 61) J. T. GROXES, G. A. MCCLUSKY, R. E. WHITE, M. J. COON: Biochem. Biophys. Res. Comm., **81**, 154 (1978)
 - 62) B. W. GRIFFIN, C. MARTH, Y. YASUKOCHI, B. S. S. MASTERS: Arch. Biochem. Biophys., **205**, 543 (1980)
 - 63) 浅田浩二：化学と生物, **10**, 358 (1972)
 - 64) 浅田浩二：生化学, **48**, 226 (1976)
 - 65) 浅田浩二：蛋白質, 核酸, 酵素, **23**, 200 (1978)
 - 66) O. HAYAISHI, K. ASADA: In, "Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen", Tokyo University Press (1977)
 - 67) Ciba Foundation Symposium: Oxygen Free Radicals and Tissue Damage (1979)
 - 68) T. OMURA, R. SATO: J. Biol. Chem., **237**, PC1375 (1962)
 - 69) 奥貫一男教授退官記念会編：チトクロムの研究, 東京大学出版会 (1973)
 - 70) H. S. MASON, W. L. FOWLKI, E. PETERSON: J. Am. Chem. Soc., **77**, 2914 (1955)
 - 71) O. HAYASHI, M. KATAGIRI, S. ROTHBERG: J. Am. Chem. Soc., **77**, 5450 (1955)
 - 72) 早石 修, 野崎光洋：「酸素添加酵素」東大出版会 (1973)
 - 73) O. HAYAISHI: "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation" Academic Press. (1969)
 - 74) 佐藤 了：「薬物代謝」講談社サイエンティフィック (1973)
 - 75) ULLRICH, I. ROOTS, A. HILDEBRANDT, R. W. ESTABROOK, A. H. CONNEY: Microsomes and Drug Oxidations (Proceedings of the Third International Symp.) Pergamon Press (1976)
 - 76) 市川佳幸：生化学, **53**, 221 (1981)
 - 77) 斎藤光実：化学, **36**, 454 (1981)
 - 78) 今井嘉郎, 青山俊之：生化学, **54**, 232 (1982)
 - 79) I. YAMAZAKI: Ref. 73, p. 535 (1969)
 - 80) S. DAGLEY: Naturwissenschaften, **65**, 85 (1978)
 - 81) C. RICHTER, A. AZZI, U. WESER, A. WENDEL: J. Biol. Chem., **252**, 5061 (1977)

- 82) P. J. O'BRIEN, A. D. RAHIMTULA: *Methods in Enzymol.*, **52**, 407 (1978)
- 83) P. ANDER, K. E. ERIKSSON: *Arch. Microbiol.*, **109**, 1 (1976)
- 84) T. FUKUZUMI, H. TAKATSUKA, K. MINAMI: *Arch. Biochem. Biophys.* **129**, 396 (1969)
- 85) M. H. GOLD, *et al.*: *Arch. Microbiol.*, **131**, 124 (1982)
- 86) 島田幹夫, 樋口隆昌, 斉藤光実: 未発表論文
- 87) K. LUNDQUIST, T. K. KIRK: *Phytochemistry*, **17**, 1676 (1978)
- 88) P. ANDER, A. HATAKKA, K-E. ERIKSSON: *Arch. Microbiol.*, **125**, 189 (1980)
- 89) J. A. BUSWELL, P. ANDER, P. PETERSON, K-E. ERIKSSON: *FEBS Letters*, **103**, 98 (1979)
- 90) Y. YAJIMA, A. ENOKI, M. H. GOLD: *Arch. Microbiol.*, **123**, 319 (1979)
- 91) H. SHIMAZONO: *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 206 (1959)
- 92) A. NISHIDA, T. FUKUZUMI: *Phytochemistry*, **17**, 417 (1978)
- 93) 南 享二, 土屋正彦, 福住俊郎: *木材誌*, **11**, 179 (1965)
- 94) A. ENOKI, Y. YAJIMA, M. H. GOLD: *Phytochemistry*, **20**, 1543 (1981)
- 95) S. IWAHARA: *Ref. Vol. I*, 151 (1980)
- 96) T. HIGUCHI: *Ref. Vol. I*, 172 (1980)
- 97) L. EGGELING, H. SAHM: *Arch. Microbiol.*, **126**, 141 (1980)
- 98) D. M. POWERS, G. H. N. TOWERS, A. C. NEISH: *Can. J. Biochem.*, **43**, 1397 (1965)
- 99) 島田幹夫, 樋口隆昌, M. H. GOLD: 第26回リグニン化学討論会 (筑波), p. 25 (1981)
- 100) H. NIMZ: *Chem. Ber.*, **100**, 181 (1967)
- 101) S. OMORI, A. SAKAKIBARA: *Mokuzai Gakkaishi*, **18**, 577 (1972)
- 102) 島田幹夫, 樋口隆昌: 未発表データ
- 103) G. K. スクリビアノー, L. A. M. ゴロブルーバー著 (福井三郎・監訳): 微生物による有機化合物の変換, 学会出版センター (1976)
- 104) 高橋旨象: *Wood Research No.* **63**, 11 (1978)
- 105) 須藤賢一, 村松義人, 志水一允: *木材誌*, **22**, 670 (1976)
- 106) 広居忠量: *木材誌*, **27**, 684 (1981)
- 107) 棚橋光彦, 樋口隆昌, 高田信輔: 第27回リグニン化学討論会 (名古屋), p. 81 (1982)
- 108) 東 順一, 越島哲夫: *木材研究・資料*, No. **17**, 1 (1983)
- 109) T. M. WOOD, *et al.*: *Advances in Chemistry Series*, **181**, 181 (1979)
- 110) 越島哲夫: *化学と生物*, **20**, 23 (1982)
- 111) T. K. KIRK: In, "Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals." (Basic Life Sciences) Vol. 18, Eds.: A. HOLLAENDER *et al.*, Plenum Press, N.Y. and London, p. 131 (1981)
- 112) J. J. MIEYAL, R. S. ACKERMAN, J. L. BLUMER, L. S. FREEMAN: *J. Biol. Chem.*, **251**, 3436 (1976)
- 113) 樋口隆昌, 中坪文明, 梅澤俊明, 釜谷保志: *ISWPC Proceeding* (筑波) (1983)
- 114) TH. V. D. TRENCK, H. SANDERMANN, JR.: *FEBS letters*, **125**, 72 (1981)
- 115) L. B. BRATTSTEN: In, "Herbivores" Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. Eds., G. A. TOSENTHAL and D. H. JANZEN, Academic Press, p. 199 (1979)
- 116) 井口洋夫, 水野伝一, 吉田善一 (共編): 生体機能の化学, 化学増刊 89, 化学同人 (1981)
- 117) 長 哲郎, 庄野達哉, 本田健一 (共編): 電子を用いる新しい有機化学, 化学増刊86, 化学同人 (1980)
- 118) 田伏岩夫: 環境科学特別研究 R-32, 領域班シンポジウム要旨集, p. 17 (1978)
- 119) J. B. HARBORNE, J. L. INGHAM: In, "Biochemical Aspects of Plant and Animal Coevolution." Ed., J. B. Harborne, Academic Press, London, N.Y. San Francisco, p. 343 (1978)
- 120) 浅田泰次: *化学と生物*, **13**, 34 (1975)
- 121) M. SHIMADA, M. H. GOLD: 未発表論文
- 122) F. NAKATSUBO, I. REID, T. K. KIRK: *Biochim. Biophys. Acta*, **719**, 284 (1982)
- 123) 松浦輝男: 「酸素酸化反応」(丸善) (1977)
- 124) 松浦輝男: 「バイオミメティックケミストリー」日本化学会編, 化学総説, No. 35, p. 111 (1982)
- 125) H. ISHIKAWA, W. J. SCHUBERT, F. F. NORD: *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 140 (1963)
- 126) F. NAKATSUBO, T. K. KIRK, M. SHIMADA, T. HIGUCHI: *Arch. Microbiol.*, **128**, 484 (1981)
- 127) A. ENOKI, G. P. GOLDSBY, M. H. GOLD: *ibid.*, **129**, 141 (1981)
- 128) A. ENOKI, M. H. GOLD: *ibid.*, **132**, 123 (1982)
- 129) T. UMEZAWA, F. NAKATSUBO, T. HIGUCHI: *ibid.*, **131**, 124 (1982)

- 130) D. S. TAI, M. TERAZAWA, V. B. HUYNH, C. L. CHEN, H. M. CHANG, T. K. KIRK: Tappi R & D Conference Papers (Ascheville, USA), p. 263 (1982)
- 131) K. P. KRINGSTAD, K. LINDSTROM: *ibid.*, p. 191 (1982)
- 132) G. P. DONNINI, S. G. JANKY: *ibid.*, p. 201, (1982)
- 133) J. A. BUSWELL, K. E. ERIKSSON: FEBS Lett., **104**, 258 (1979)
- 134) L. EGGELING, H. SAHM: Arch. Microbiol., **126**, 141 (1980)
- 135) D. W. RIBBONS, J. E. HARRISON: In, "Degradation of Synthetic Organic Molecules" Ed., S. Dagley (Nat. Acad. Sci., Wash. D.C.), p. 91 (1972)
- 136) D. A. BROADBENT, N. J. CARTWRIGHT: Microbios., **4**, 7 (1971)
- 137) A. J. BAKER, M. A. MILLET, L. D. SATTER: Cellulose, Technol. Research. ACS Symp. Ser., **10**, 75 (1975)
- 138) 島田幹夫, 伏木秀文, 樋口隆昌: 木材誌, **19**, 13 (1973)
- 139) M. SHIMADA, K. KURODA, T. HIGUCHI: Phytochemistry, **12**, 2873 (1973)
- 140) J. E. POULTON: In, "The Biochemistry of Plants", ed. E. E. CONN, Academic Press, **7**, 627, (1981)
- 141) C. K. WATT, G. H. N. TOWERS: Phytochemistry, **14**, 663 (1975)
- 142) 青島清雄 (私信)