

## 木材腐朽菌，菌根菌の二次代謝産物の役割\*

服 部 武 文\*\*

The Role of Secondary Metabolite of Wood-Rotting Fungi and Mycorrhizal Fungi\*

Takefumi HATTORI\*\*

(平成9年8月31日受理)

### 1. は じ め に

自然界で菌類は，植物（生産者）が合成した有機物や動物（消費者）の死骸を，水，二酸化炭素，アンモニア等の無機物に分解し，還元者として地球生態系に必要不可欠な機能をはたしている<sup>1)</sup>。もし，菌類がこの世界から消え去れば，動植物の死骸はあふれ，植物の光合成に必要な二酸化炭素は減少し，地球生態系は破滅してしまうだろう。

植物が生産する有機物の中でも，植物細胞壁の主要化学成分であるセルロース，リグニンは，地球上に最も多量に存在する有機化合物の1，2位を各々占めている<sup>2)</sup>。従って，それらを二酸化炭素，水にまで分解する木材腐朽菌，又，植物と共生しその成長を助けると考えられている菌根菌は，地球生態系において大変重要な役割を果たしていると言えるだろう。近年木材腐朽菌による木材成分の分解機構，共生菌の樹木との共生機構の解明が精力的に行われており，特に木材成分の分解において機能する酵素，遺伝子が明らかにされつつある<sup>3-5)</sup>。それに関連し，菌の生産する二次代謝産物が木材成分の分解過程において重要な役割を果たしていることが明らかにされた。これらの化合物に着目しその機能を明らかにすることは，自然界における還元者としての木材腐朽菌の役割を明らかにする点で重要である。さらに，森林において樹木の栄養摂取を助ける共生菌の役割を明らかにする点でも重要である。そこで本稿では，菌の二次代謝産物，即ちベラトリルアルコールとシュウ酸が，木材腐朽菌と，共生菌に特有な生化学反応において果たす役割について最近の知見を簡単にまとめ問題点を考察する。

### 2. 木材腐朽菌二次代謝産物の木材腐朽過程における役割

木材腐朽菌は，セルロース，ヘミセルロースを中心に分解する褐色腐朽菌と，リグニンをも同時に分解できる白色腐朽菌，それと軟腐朽菌とに大別される。白色腐朽菌の大きな特徴である，リグニン分解過程における二次代謝産物の役割について述べる。

白色腐朽菌は，リグニンペルオキシダーゼ (LiP)，マンガンペルオキシダーゼ (MnP)，ラッカーゼ (Lac) 等のリグニン分解酵素によりリグニンを分解すると考えられている。しかしながら，木材中のブ

\*第52回木研公開講演会(平成9年5月16日, 宇治)において, 「きのこの腐生と共生に関わる物質」と題して講演。

\*\* 生化学制御研究室 (Laboratory of Biochemical Control)

Keywords: Wood-rotting fungi, Mycorrhizal fungi, Lignin biodegradation, Veratryl alcohol, Oxalic acid, Lignin peroxidase, Manganese peroxidase.

ロトリグニンをこれらの酵素で処理し、分解を示した研究報告がない。従って、モノリグノールが3次的に重合し、種々のエーテル結合、炭素-炭素結合を持つ高分子化合物であるリグニンが、果たして酵素タンパク質に埋まっている活性中心にうまく収まり一電子酸化反応が行われるか未解明である。しかし、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* では、同菌の二次代謝産物であるベラトリルアルコールがプロトリグニンと LiP との仲立ちをすることが提案されており、その役割を中心に本章では紹介する。誤解の無いように、予めお断りしておくことをご容赦いただけるのならば、このベラトリルアルコールの役割も、全ての白色腐朽菌に共通したものであるかは、さらなる検討が必要である。本稿は、二次代謝産物の役割を中心に取りまとめているので、リグニン微生物分解機構の一部を紹介するにとどまっている。リグニン微生物分解の全容に関しては、多くの優れた総説があるので是非参照されたい<sup>6~10)</sup>。

## 2.1 ベラトリルアルコールの役割

### 2.1.1 白色腐朽菌 *P. chrysosporium* によるベラトリルアルコール生産

リグニン微生物分解機構解明のため最も良く研究された白色腐朽菌の一つである *P. chrysosporium* が *de novo* に 3, 4-Dimethoxybenzyl alcohol (ベラトリルアルコール) を生合成することは、Lundquist と Kirk により 1978 年に報告された<sup>11)</sup>。ベラトリルアルコールは、窒素制限培養条件下リグニン分解活性の発現と同時期に、二次代謝産物として生合成される<sup>12)</sup>。同化合物の生合成の意義及び、リグニン分解過程での役割が注目されてはいたが、実験的証拠はなかった。

### 2.1.2 リグニン分解過程におけるベラトリルアルコールの役割—メディエーター説とプロテクター説—

リグニン分解酵素の一つである LiP は、基質芳香環の一電子酸化反応を触媒し、その反応がリグニン分解反応の初発反応と考えられている<sup>13)</sup>。LiP による基質の酸化分解反応（以下 LiP 反応系と略記）において、ベラトリルアルコールの添加が、基質の分解に与える影響が研究された。Harvey は、LiP により一電子酸化を受けない 4-Methoxybenzyl alcohol, 4-Methoxymandelic acid が、ベラトリルアルコールを LiP 反応系に共存させると初めて酸化されることを報告した<sup>14)</sup>。先ず Harvey は、LiP の酸化により生成したベラトリルアルコールカチオンラジカル中間体が、これら 2 つの基質を酸化すると推定した。そして、天然の白色腐朽過程においても、ベラトリルアルコールカチオンラジカルがプロトリグニンから一電子酸化を行う、即ちベラトリルアルコールメディエーター説を提案した（図 1）。一方、LiP の触媒サイクルは、図 2 に示すように、休止期から Compound I, Compound II を経て、休止期に戻る間に、基質より一電子ずつ 2 電子の酸化を行う<sup>15)</sup>。しかし、反応に必要な過酸化水素濃度が高い場合、又、Compound II

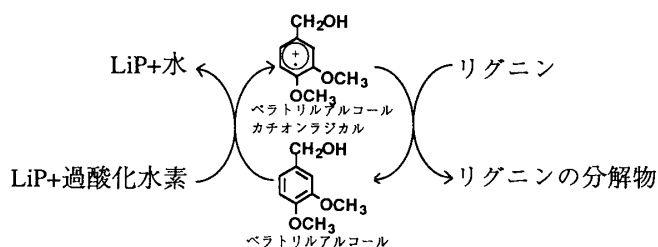


図1 LiPによるリグニン分解過程におけるベラトリルアルコールのメディエーターとしての役割<sup>14)</sup>  
ベラトリルアルコールカチオンラジカルは、LiPの代わりに、リグニンを一電子酸化する

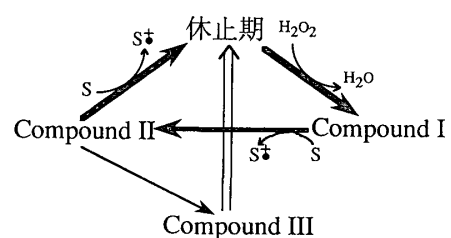


図2 LiP触媒活性サイクル(略記)におけるプロテクターとしてのベラトリルアルコールの役割<sup>17)</sup>

休止期の LiP は過酸化水素と反応し、太線で示すように Compound I になる。Compound I から Compound II, さらに休止期に戻る過程で、基質(S)を酸化する。活性を示さない Compound III が生じた時ベラトリルアルコールは、Compound III を休止期に戻す。

から休止期への反応が何らかの原因で進行しないとき，触媒活性のないCompound IIIが生成してしまう。Tononらは，ベラトリルアルコールが， $H_2O_2$ によりLiPが失活することを防ぐことを発見し<sup>16)</sup>，その機構としてWariishiらは，ベラトリルアルコールが，Compound IIIを休止期まで，直接的にもどす働きがあることを発見した（プロテクターの作用）<sup>17)</sup>。そして，4-Methoxybenzyl alcoholが，ベラトリルアルコール共存下酸化される理由もベラトリルアルコールがプロテクターとして作用するためであると説明した<sup>18)</sup>。その後，類似した実験系で，定常状態，前定常状態の酵素反応速度論を用いて解析が行われた。さらに，1995年ベラトリルアルコールカチオンラジカルが，ESRで検出され<sup>19)</sup>，更に議論が厳密に行われるようになった。

現在までの所，ベラトリルアルコールの役割は，基質との相互作用，LiPとの相互作用と大別すると以下の2点の役割が提案されている。

1. メディエーター（基質との相互作用）

ベラトリルアルコールカチオンラジカルが直接的に，あるいは，ベラトリルアルコールカチオンラジカルとLiPとの複合体が基質を一電子酸化する。

2. プロテクター（LiPとの相互作用）

LiP触媒サイクルをとどこおり無く回すために，Compound IIIから休止期に戻すこと，あるいは，Compound IIから休止期に戻すことを進める。

検討された基質，又，提案された役割について表にまとめる（表1）。

著者らは $\beta$ 型， $\beta$ -O-4型リグニンサブストラクチャーモデル化合物の，ベラトリルアルコール存在下LiP反応系による分解を行い， $\beta$ -1型モデル化合物の分解では，ベラトリルアルコールはメディエーター

表1 LiP反応系による基質の分解におけるベラトリルアルコールの役割

| 基質                                             | 役割                                          | 文献     |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------|
| 4-Methoxybenzyl alcohol                        | メディエーター <sup>a)</sup>                       | 14     |
|                                                | プロテクター (Compound III $\longrightarrow$ 休止期) | 16, 17 |
|                                                | プロテクター (Compound II $\longrightarrow$ 休止期)  | 22     |
| 4-Methoxymandelic acid                         | メディエーター <sup>a)</sup>                       | 14     |
|                                                | メディエーター                                     | 25     |
| $\beta$ -1型リグニンサブストラクチャーモデル化合物 <sup>a)</sup>   | メディエーター <sup>a)</sup>                       | 21     |
|                                                | プロテクター                                      |        |
| $\beta$ -1型リグニンサブストラクチャーモデル化合物 <sup>b)</sup>   | メディエーター <sup>a)</sup>                       | 21     |
|                                                | プロテクター                                      |        |
| $\beta$ -O-4型リグニンサブストラクチャーモデル化合物 <sup>c)</sup> | 分解への影響は観察されなかった                             | 21     |
| Chlorpromazine                                 | メディエーター                                     | 20     |
| Guaiacol                                       | メディエーター <sup>d)</sup>                       | 22     |

<sup>a)</sup> 1, 2-bis (4-methoxyphenyl) propane-1, 3-diol

<sup>b)</sup> 1- (3, 4-dimethoxyphenyl) -2- (4-methoxyphenyl) propane-1, 3-diol

<sup>c)</sup> 1- (4-ethoxy-3-methoxyphenyl) -2- (2-methoxyphenoxy) propane-1, 3-diol

<sup>d)</sup> ここでのメディエーターは，基質よりベラトリルアルコールカチオンラジカルに電子移動が行われるということのみ考察しており，ベラトリルアルコールカチオンラジカルが，LiPに結合した状態なのか，拡散した状態なのかは考察されていない。

一、プロテクターの双方の役割を果たしているが、 $\beta$ -O-4型では、メディエーター、又プロテクターとしての働きが観察されなかったことを報告した<sup>21)</sup>。これに対しKoduriらは、4-Methoxybenzyl alcoholが、Compound IIの基質にならないことをストップフロー法により見出した。さらに、共存させるベラトリルアルコールを増加させると、4-Methoxybenzyl alcoholの酸化速度はむしろ阻害されたが、グアイアコールの酸化速度は増加したため、ベラトリルアルコールは、4-Methoxybenzyl alcoholの酸化に対しては、Compound IIを休止期にする作用しかないが、グアイアコールの酸化に対してはメディエーターとして機能することを見出した<sup>22)</sup>。

その後、ベラトリルアルコールカチオンラジカルがESRで検出されてから、メディエーターの概念をより明確に絞り込まなくてはならなくなった。即ち、ベラトリルアルコールカチオンラジカルが拡散し、基質と直接接し一電子酸化反応が行われるのか、それとも、LiPと結合した状態で例えば酵素表面から一電子酸化反応は行われるのかという事である。Candeiasらは、ベラトリルアルコールカチオンラジカルは、7  $\mu$ mの間拡散できると報告した<sup>23)</sup>。それに対しKhindariaらは、ベラトリルアルコールカチオンラジカルが、LiP存在下では非存在下に比べ、700倍も安定化されることを見出し、ベラトリルアルコールカチオンラジカルは拡散し基質と反応するのではなく、LiPに結合した状態で電子移動を酵素表面から行うことを提案した<sup>24)</sup>。

さらにTienらは、ベラトリルアルコールカチオンラジカルESRシグナルが、4-Methoxymandelic acidを加えることにより減衰することを見出し、ベラトリルアルコールカチオンラジカルがLiPに結合した状態で、4-Methoxymandelic acidから一電子酸化を行うことを提案した<sup>25)</sup>。

しかしながら、LiPはベラトリルアルコールの助けがなければ、リグニンを全く分解できないのだろうか。これに対しては、天然でのプロトリグニンの分解に関しては未解明である。しかし、メチル化されたMWL<sup>26)</sup>や合成リグニン(DHP)は、ベラトリルアルコール共存下<sup>27, 28)</sup>、非共存下<sup>26, 27, 29)</sup> *In vitro*系でLiPにより分解が達成されている。本質的にこの問題が解決されるためには、LiPが一電子酸化する際の基質とLiP間電子移動の詳細な機構が明らかにされなければならない。

### 2. 1. 3 ベラトリルアルコールの生合成と生分解

二つのベラトリルアルコールの生合成経路が提案されている<sup>30, 31)</sup>。さらに、メトキシ基の炭素は、クロロメタンに由来することが示されている<sup>32, 33)</sup>。両者に共通しているのが、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)により触媒されるフェニルアラニンよりケイヒ酸の生成が初発反応であることである。

これまで、*P. chrysosporium*のPALの役割は、ベラトリルアルコール生合成酵素であること以外に知られていない。しかし、PALはフェニルアラニンより、アンモニアを遊離させる酵素である<sup>34)</sup>。したがって、もし菌体が、アンモニアを菌体内で窒素源として再利用しているのであれば、PALの生産は一次代謝、もしくは、移行期で起こる事が考えられ、PALの真の役割は菌体内での窒素のリサイクルを行うことと考えられることになる。従って、PALの真の役割を明らかにするためには、PAL活性が一次代謝、二次代謝のどちらで生産されるかを明らかにすることが重要となる。一方、培地へのフェニルアラニンの添加により、LiP、MnP生産の阻害が起こることはすでに報告されている<sup>35, 36)</sup>。そこで先ず、培地へのフェニルアラニン添加、無添加の系において、PAL活性とベラトリルアルコール蓄積量との関係を調べた。その結果、PALは炭素、又は、窒素制限培地で生産されたが、フェニルアラニン添加、又無添加に関わらずPAL活性が高い時期は、ベラトリルアルコールの蓄積は観察されず、PAL活性が減少してから、ベラトリルアルコールの蓄積が観察された(図3)<sup>37)</sup>。PALの役割の詳細に関し、現在検討を進めている。

生合成されたベラトリルアルコールは、最終的には同菌により芳香環開裂反応を受け代謝分解されると考えられている<sup>38)</sup>。LiPによるベラトリルアルコールの芳香環開裂反応機構を提案した<sup>39, 40)</sup>。

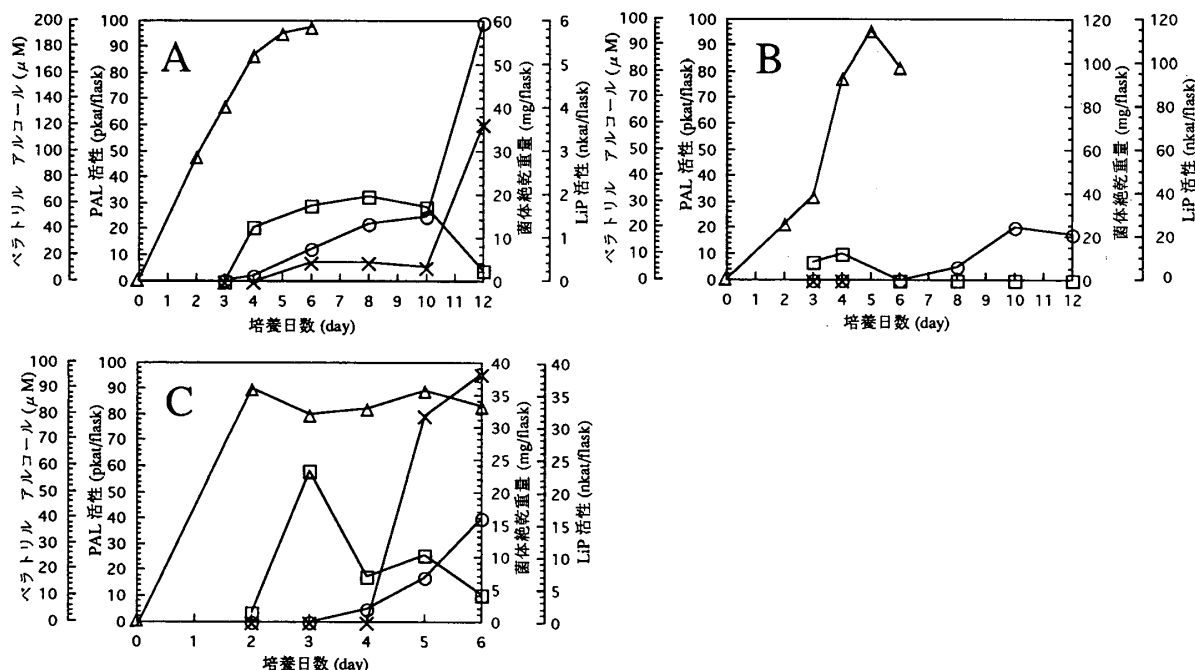


図3 *P. chrysosporium* 培養中の、LiP, PAL活性、ベラトリルアルコールの蓄積と菌体重量の関係<sup>37)</sup>

A：窒素制限培養，B：制限のない培地，C：炭素制限培地，□：PAL活性，○：ベラトリルアルコール蓄積量，×：LiP活性，△：菌体絶乾重量

## 2.2 シュウ酸の役割

### 2.2.1 褐色腐朽菌、白色腐朽菌におけるシュウ酸蓄積量の違い

有機酸は、木材腐朽菌の主要な代謝産物の一つである。一般的に多くの褐色腐朽菌はシュウ酸を培地に蓄積し、白色腐朽菌の多くは培地に蓄積しない事が報告されている<sup>41)</sup>。しかし赤松らは、褐色腐朽菌であつても、*Gloeophyllum saepiarium*, *Gloeophyllum striatum*, *Gloeophyllum trabeum*, *Gloeophyllum unguatum*は、ほとんどシュウ酸を蓄積せず、一方、*Pleurotus ostreatus*の様に、シュウ酸を多量に蓄積する白色腐朽菌もある事を報告した<sup>42)</sup>。

このシュウ酸蓄積の違いは、シュウ酸分解酵素であるシュウ酸脱炭酸酵素が白色腐朽菌にはあり、褐色腐朽菌にはないからであると説明された<sup>43)</sup>。しかしながら最近、褐色腐朽菌 *Postia placenta* からシュウ酸脱炭酸酵素活性が検出され<sup>44)</sup>、さらに、白色腐朽菌のシュウ酸脱炭酸酵素もまだ *Collybia velutipes*, *Coriolus hirsutus*<sup>43, 45, 46)</sup>, *Coriolus versicolor*<sup>47)</sup> から検出、あるいは精製されているくらいであり、今後の研究によっては、この一般原則が崩れてしまう可能性もある。シュウ酸の生産、木材腐朽菌のシュウ酸の役割に関しては総説を参照されたい<sup>48~50)</sup>。

### 2.2.2 褐色腐朽菌におけるシュウ酸の役割

これまで、褐色腐朽菌におけるシュウ酸の役割は、セルロース及びヘミセルロース分解に関連して、大きく二つ報告されている。まず1つは、褐色腐朽初期段階での主要なセルロース分解機構と考えられているフェントン反応<sup>51)</sup>をシュウ酸は促進又は、阻害することである。田中らは、図4に示すように、フェントン系によるブナパルプ分解反応にシュウ酸の濃度を変えて共存させ、ブナパルプの粘度低下に対する影響を調べた<sup>52)</sup>。その結果、モル比で  $\text{Fe}^{2+}$  の10倍量までシュウ酸が共存している場合は、分解反応を促進するが、50倍以上では、逆に阻害することが明らかになった。従って、シュウ酸が高濃度で存在している場合は、第2番目のシュウ酸の役割である酸としてのシュウ酸の作用で、セルロース、ヘミセルロースの加水分解反応が優先する可能性がある。実際、*Postia placenta* で腐朽した材のpHが1.6ま

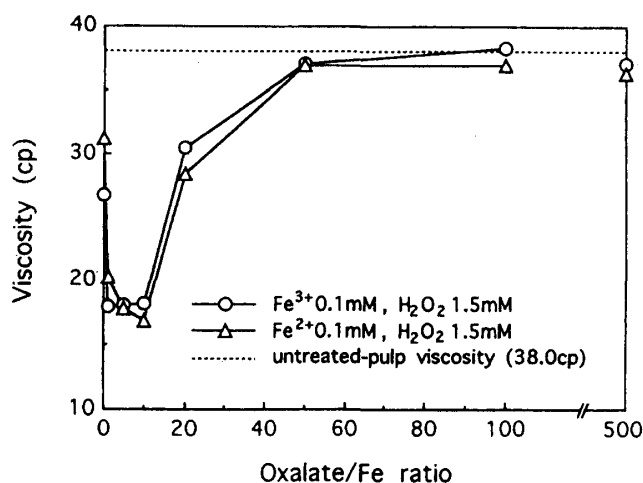


図4 フェントン系によるセルロース分解における共存するシュウ酸の影響<sup>52)</sup>

ブナクラフトパルプを図中に示した条件下処理し、セルロースの分解を粘度で評価した。共存する鉄イオンとシュウ酸の比率により、フェントン系が増強又は、阻害される。

で下がることが報告されている<sup>53)</sup>。島田らは、1%、5%シュウ酸溶液が容易にセルロースの粘度低下を起こすことを報告した<sup>54)</sup>。さらに、LCCモデル化合物の、糖、リグニンモデル化合物間のエーテル結合も容易に、シュウ酸により開裂することが示されている<sup>55)</sup>。これらのデータは、褐色腐朽菌のセルロース分解において、フェントン反応、又、最近田中らにより報告されている一電子酸化活性を持つ糖タンパク質複合体の関与<sup>56)</sup>を否定するものではないにしても、シュウ酸の影響が無視できないことを示している。

### 2.2.3 白色腐朽菌におけるシュウ酸の役割

白色腐朽菌におけるシュウ酸の役割は、シュウ酸として機能する役割とシュウ酸が分解することによって果たされる役割に大別される。

シュウ酸としての役割は、リグニン分解酵素の一つである、MnPの酸化反応で生じたMn<sup>3+</sup>をキレート剤として作用し安定化させる事である。この濃度は、二次代謝過程に生産されるシュウ酸濃度で十分であることが示されている<sup>57)</sup>。一方、シュウ酸は、多くの白色腐朽菌の培地中には蓄積されない。従って、白色腐朽菌におけるシュウ酸の役割の多くは、シュウ酸が酸化的に分解され、新たに生成する酸素活性種による、木材成分の分解を考察することにより提案されている。

島田らは、LiPによるベラトリルアルコールのベラトルムアルデヒドへの酸化反応が、シュウ酸緩衝液中では阻害された実験結果を基にして、反応系中<sup>14</sup>C標識したシュウ酸が、二酸化炭素に分解されることを見出した<sup>58)</sup>。シュウ酸は、非競争阻害剤であり、ベラトリルアルコールカチオンラジカルがシュウ酸を酸化分解する機構を提案した<sup>59)</sup>(図5)。同時期に、Poppらも、同じ反応を空気下で行うとフォルメートアニオンラジカル、又、スーパーオキシドアニオンラジカルが生成することをESRで確認した<sup>60)</sup>。これらの発見から、LiP反応系にFe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>を共存させることにより、さらに、ヒドロキシルラジカルの生成も確認されている<sup>61)</sup>。一方、シュウ酸共存下のMnP反応系においても、<sup>14</sup>C標識したシュウ酸が二酸化炭素に分解されることが報告され<sup>62)</sup>、同様にこの反応系でも、フォルメートアニオンラジカル、又、スーパーオキシドアニオンラジカルが生成することがESRで確認されている<sup>63)</sup>。

BarrとAustは、このようにシュウ酸存在下での*in vitro*の実験で生成が確認された酸素活性種に着目し、バイオレメディエーションへのこれら反応系の応用を提案している<sup>64)</sup>。しかしながら、これまで、シュウ酸共存下でのLiP系又MnP系による、難分解性の化合物の分解は報告されていない。筆者らも試みたが、分解反応は確認できなかった<sup>65)</sup>。しかし、Mn<sup>3+</sup>/シュウ酸存在下ジメチルスルホキシド、1,4-ジオキ

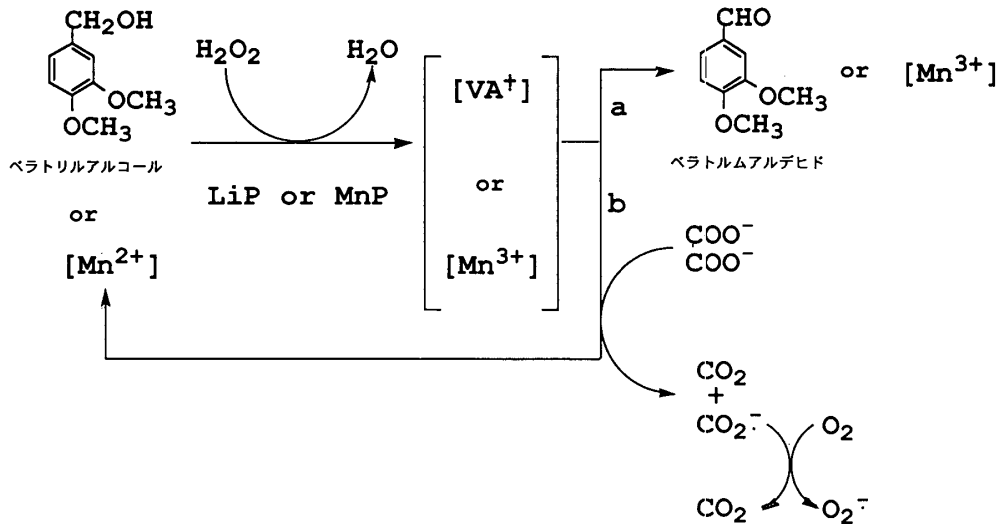


図5 ペラトリルアルコールカチオンラジカルによるシュウ酸の酸化分解<sup>50)</sup>

LiPにより酸化されたペラトリルアルコールカチオンラジカルは、シュウ酸非存在下、ペラトルムアルデヒドに変換される。(経路a) シュウ酸存在下では、シュウ酸がペラトリルアルコールカチオンラジカルにより酸化分解され、好氣的条件では、様々な酸素活性種が生じる(経路b)。MnPとMn<sup>2+</sup>による分解系でも同様の現象が見出されている。

サン、またはエタノール中での $\alpha$ 位にカルボニル基を持つリグニンサブストラクチャーモデル化合物の分解は成功しているの、さらに検討する余地はあると思われる<sup>66)</sup>。

一方、LiP系MnP系においては、シュウ酸の存在により、各々、ペラトリルアルコール、Mn<sup>2+</sup>が再生されて来る。従って、もしこの系が、天然の白色腐朽過程でも起こっているならば、再度生成するであろうペラトリルアルコールカチオンラジカル、又Mn<sup>3+</sup>により、リグニン分解がさらに進行するとも考えられる。しかし、逆に共存するシュウ酸の濃度によっては、LiP系MnP系共シュウ酸の分解が進行してしまい、生成する可能性のある酸素活性種が十分なりグニン分解力を持たないとすれば、リグニンの分解が阻害されてしまう可能性も考えられる。従って、*in vitro*系で考察されている前述のシュウ酸の寄与が、天然の白色腐朽過程でもどれほどあてはまるかは、出来る限り天然での腐朽に近い系において生産されたシュウ酸の分布、リグニン分解酵素の分布、プロトリグニンの分布を十分考慮し、さらに検討しなくてはならない。

#### 2. 2. 4 シュウ酸の生合成

微生物のシュウ酸生合成経路は、1. オキサロ酢酸の加水分解反応、2. グリオキシル酸の酸化反応の2つに大別される。1を触媒する酵素(Oxaloacetase)は、*Aspergillus niger*より活性が報告され<sup>67, 68)</sup>、2を触媒する酵素(Glyoxylate dehydrogenase)は、*Sclerotium rolfsii*より精製され、NADを要求する<sup>69)</sup>。その以前に、*Pseudomonas oxalitica*よりGlyoxylate dehydrogenase活性が検出され、NADP<sup>+</sup>とCoAを要求した<sup>70)</sup>。さらに、*Acetobacter dioxyacetonicus*より、Glyoxylate Oxidase活性が検出され<sup>71)</sup>、さらに、*Aspergillus niger*からは、Glyoxylate dismutase活性が得られた<sup>72)</sup>。しかし、木材腐朽菌からの報告は、*Phanerochaete chrysosporium*、*Trametes (Coriolus) versicolor*、*Tyromyces palustris*よりOxaloacetaseの活性を、*Tyromyces palustris*よりGlyoxylate oxidaseを赤松らが部分精製、キャラクタリゼーションの報告をしているのみであった<sup>73~75)</sup>。しかし最近、三井らは、*Trametes (Coriolus) versicolor*のGlyoxylate oxidase粗酵素につき、部分的なキャラクタリゼーションを行った<sup>76)</sup>。時松らは、*Tyromyces palustris*の酵素の精製をさらに進め、スペクトル分析により、補欠分子族として、FADもしくはFMNを含んでいることを報告し<sup>77, 78)</sup>、さらに最近、SDS-PAGEで単一バンドまで精製した(時松ら、未発表)。

### 3. 菌根菌におけるシュウ酸の役割

前章では、腐生菌の一種である木材腐朽菌が分泌するベラトリルアルコール、シュウ酸が、木材成分の分解に際し果たす役割について取りまとめた。本章では、植物共生菌の一種である菌根菌の分泌するシュウ酸が、土壤中のリンを植物が獲得する際果たす役割について取りまとめる。

#### 3.1 菌根菌と植物との共生

はじめに、菌根菌と植物との共生について簡単に紹介する。菌根菌の中の代表的なものとして、主に接合菌類によって形成されるアーバスキュラー菌根菌、担子菌類と子囊菌類によって形成される外生菌根菌がある。アーバスキュラー菌根菌は、吸収根の表皮細胞、又、皮層細胞内に菌糸を進入させ、細胞壁と細胞膜との間に、樹枝状体 (Arbuscule)、のう状体 (Vesicule) という組織を作る<sup>79)</sup>。古くアーバスキュラー菌根菌はVA菌根菌と呼ばれていたが、のう状体がギガスポラ科に見られないのに対し、樹枝状体は、全てに共通してみられる点が強調され、単にアーバスキュラー菌根と呼ばれることが多くなった<sup>80)</sup>。

一方外生菌根菌は、表皮細胞、又、皮層細胞間層に菌糸をのばし、細胞を菌糸が包む形態をとり、このネット状の菌糸をハルティッヒネットと呼ぶ。さらに、根の周りをマントルと呼ばれる菌糸の厚い層を形成する<sup>79)</sup>。

この様に、アーバスキュラー菌根菌と外生菌根菌は菌根の形態は異なっている。しかし植物から、炭素源として、糖、糖アルコールを受け取り、植物へは、土壤中より窒素源、無機栄養源を供給している事は、その詳細な機構は不明であるが、双方の菌で報告されている<sup>81)~83)</sup>。この植物と菌根菌との共生は、小川が述べているように植物に有益であるか否か、その程度は、菌と植物の組合せや、性質によって異なっていると推定される<sup>84)</sup>。しかし岡部らによると、種子植物の3%が外生菌根を形成し、種子植物の80%がアーバスキュラー菌根を作る<sup>85)</sup>。さらに、オーストラリアにおける松の植林の際に、菌根が必須であった事例<sup>86)</sup>をあわせて考えてみると、植物の生育を助けること、即ち、土壌より水分、栄養分を植物に供給することに対し、菌根菌が大きな役割を果たしていると推定される。

#### 3.2 菌根菌におけるシュウ酸の生産とリン獲得における役割

植物の生長にとって必須の無機栄養源の一つであるリンは、野外では、50%が有機リンとして存在し、一方無機リンにおいても、土壌中の鉄、アルミニウム、カルシウムと結合し、不可給態のリンとして存在している<sup>87)</sup>。従って、植物がリンを獲得するためには、リンが遊離し、可給態のリンが形成されなければならない。菌根菌が生産するシュウ酸は、不可給態リン中に含まれる鉄、アルミニウム、カルシウムとキレート剤として結合し、リンを遊離させる働きがある事が提案されている<sup>88), 89)</sup>。

まず、菌根菌においてシュウ酸は、シュウ酸カルシウムとして、アーバスキュラー菌根菌、又外生菌根菌菌糸表面に検出されている。天然での外生菌根での観察では、Douglas firに菌根を形成した *Hysterangium crassum* の菌糸マットの下<sup>90)</sup>、さらに、*Pinus radiata* と *Eucalyptus marginata* に菌根を形成した外生菌根菌 *Rhizopogon luteolus* のマントルにシュウ酸カルシウム<sup>91)</sup> が確認されている。

実験室的には、外生菌根菌 *Paxillus involutus* の菌糸表面にシュウ酸カルシウムが同定され<sup>92)</sup>、さらに、*Paxillus involutus* (Batsh. Ex Fr.) の培養により16日で900  $\mu$  Mol g<sup>-1</sup> fungal d wt.のシュウ酸が生産される事が報告された<sup>93)</sup>。

この様なシュウ酸生産の事例から、さらに、Grausteinらは外生菌根菌 *Hysterangium* では、シュウ酸が土壌中の鉄、アルミニウム、カルシウムを捕捉することにより可給態のリンを増加させることを提案した<sup>88)</sup>。一方アーバスキュラー菌根菌において、Jurinakらは、シュウ酸がカルシウムイオンを捕捉する熱力学的モデルを提案している<sup>89)</sup>。

さらに、遊離したリンが、アーバスキュラー菌根菌、外生菌根菌の菌糸内を移動することも報告され



ている<sup>94)~98)</sup>。したがって、菌根菌の菌糸は、菌根形成に由来しその栄養分吸収表面が増大しただけの作用<sup>99)</sup>、さらに、枯渇帯よりさらに菌糸をのばし、栄養分を獲得するだけの働き<sup>100)</sup>だけではなく、より積極的にリンを獲得する機構を備えていると考えられる。しかしながら、リン獲得に対してのシュウ酸の役割がどれくらい普遍性を持つのか、さらに検討が必要と思われる。

### 3.3 菌根形成の機構

前述のように、菌根菌が生産するシュウ酸により不可給態のリンが減少することが示されている<sup>101)</sup>。しかしながら、菌根によるシュウ酸の生産が例えば植物のリンの欠乏が原因かどうかは明かでなく、他の理由により生産されるシュウ酸が、二次的にリンの生産を助けている可能もある。従って、菌根菌により菌根を形成させシュウ酸生合成機構を検討することがシュウ酸生合成の意義を明らかにする点においても重要と考える。そのためには、まず菌根形成の機構が物質レベルで解明される必要がある。

菌根菌の最大の特徴である菌根形成は、植物と菌類という異種生物同士の共生関係の確立という点で、その機構を検討することは、大変興味を持たれることである。しかしながら、機構解明の研究は、まだその途についたばかりであり、例えば同じ植物と相互作用する菌である植物病原菌、又、根粒菌と植物との相互作用が明らかになっている<sup>102)</sup>ことに比べると詳細は不明である。例えばMartinらは、菌根形成に伴い、特異的に発現、又、生産が抑制されるタンパク質を、*Eucalyptus globulus* 又、*Eucalyptus grandis* と *Pisolithus tinctorius* の菌根において、二次元電気泳動で検出している<sup>103)</sup>。しかしながら、それらのタンパク質の機能は未解明である。遺伝子レベルでの検討では、菌根共生において、特異的に発現する遺伝子の単離が始められたところであり<sup>104)</sup>、今後、この分野を発展させる必要がある。

## 4. 終わりに

熱帯雨林の枯渇に対し、早生樹と呼ばれる、松、ユーカリ、アカシア、ユーカリ、ポプラ、さらには、フタバガキ科の樹木が植林されている。その際、外生菌根を形成させることにより、これら樹木の成長が促進されることから、アーバスキュラー菌根性の樹木が優先する熱帯においても、外生菌根の重要性が認識されている。菌根形成機構の解明は、地球生態系において重要な働きをしている熱帯雨林の再生においても基礎的知見を供給できる。

本稿では、シュウ酸とペラトリルアルコールという低分子量化合物について、木材腐朽菌と菌根菌における役割について取りまとめた。本稿の内容は、細胞外での相互作用についての考察であったので、今後は、生命活動をしている細胞同士の相互作用、つまりは、菌根形成の機構の解明を進めたい。

誤りや、不十分な点につき、ご教示賜るようお願い申しあげる次第である。

## 引用文献

- 1) 今関六也：“日植病報”，**28**：101-104（1963）
- 2) K. V. SARKANEN, C. H. LUDWIG, Lignins, Wiley-Interscience, New York, 1971, p. 916
- 3) 桑原正章：“木材研究”・資料，No. 27, 12（1991）
- 4) 本田与一：“木材研究”・資料，No. 32, 6（1996）
- 5) D. CULLEN : *J. Biotechnology*, **53** : 273-289 (1997)
- 6) T. HIGUCHI : in “Biosynthesis and biodegradation of wood components” ed. by T. Higuchi, Academic Press, London, 1985
- 7) K. -E. L. ERIKSSON, R. A. BLANCHETTE, P. ANDER: in “Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components” ed. by K. -E. L. Eriksson, R. A. Blanchette, P. Ander, Springer-verlag, Heidelberg, 1990, p. 225-397
- 8) T. K. KIRK, R. L. FARRELL: *Ann. Rev. Microbiol.*, **41** : 465-505 (1987)
- 9) M. SHIMADA, T. HIGUCHI : in “Microbioal, Enaymatic, and Biomimetic degradation of lignin” ed. by D. N. - S. Hon, N. Shiraishi, marcel dekker, inc., New York and Basel, 1991, pp.557-619

- 10) U. TUOR, K. WINTERHALTER, A. FIECHTER : *J. Biotechnology*, **41** : 1-17 (1995)
- 11) K. LUNDQUIST, T. K. KIRK : *Phytochemistry*, **17** : 1676 (1978)
- 12) T. K. KIRK: in "Lignin biodegradation: microbiology, chemistry, and potential applications", Vol 2. ed. by T. K. Kirk, T. Higuchi, H. -M. Chang, CRC, Boca Raton, 1980, p. 51-63
- 13) P. J. KERSTEN, M. TIEN, B. KALYANARAMAN, T. K. KIRK : *J. Biol. Chem.*, **260** : 2609 (1985)
- 14) P. J. HARVEY, H. E. SCHOEMAKER, J. M. PALMER : *FEBS Lett.*, **195** : 242-245 (1986)
- 15) V. RENGANATHAN, M. H. GOLD : *Biochemistry*, **25** : 1626-1631 (1986)
- 16) F. TONON, E. ODIER : *Appl. Environ. Microbiol.*, **576** : 466-472 (1988)
- 17) H. WARIISHI, M. H. GOLD : *J. Biol. Chem.*, **265** : 2070-2077 (1990)
- 18) K. VALLI, H. WARIISHI, M. H. GOLD : *Biochemistry*, **29** : 8535-8539 (1990)
- 19) A. KHINDARIA, T. A. GROVER, S. D. AUST : *Biochemistry*, **34** : 6020-6025 (1995)
- 20) D. G. GOODWIN, S. D. AUST, T. A. GROVER : *Biochemistry*, **34** : 5060-5065 (1995)
- 21) T. HATTORI, T. HIGUCHI : *Mokuzai Gakkaishi*, **37** : 548-554 (1991)
- 22) R. S. KODURI, M. TIEN : *J. Biol. Chem.*, **270** : 22254-22258 (1995)
- 23) L. P. CANDEIAS, P. J. HARVEY : *J. Biol. Chem.*, **270** : 16745-16748 (1995)
- 24) A. KHINDARIA, I. YAMAZAKI, S. D. AUST : *Biochemistry*, **35** : 6418-6424 (1996)
- 25) M. TIEN, D. B. MA : *J. Biol. Chem.*, **272** : 8912-8917 (1997)
- 26) M. TIEN, T. K. KIRK : *Science*, **221** : 661-662 (1983)
- 27) T. UMEZAWA, T. HIGUCHI : *Mokuzai Gakkaishi*, **35** : 1014-1020 (1989)
- 28) K. E. HAMMEL, K. A. JENSEN, Jr., M. D. MOZUCH, L. L. LANDUCCI, M. TIEN, E. A. PEASE : *J. Biol. Chem.*, **268** : 12274-12281 (1993)
- 29) S. KAWAI, K. A. JENSEN, Jr., W. BAO, K. E. HAMMEL : *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** : 3407-3414 (1995)
- 30) M. SHIMADA, F. NAKATSUBO, T. K. KIRK, T. HIGUCHI : *Arch. Microbiol.*, **129** : 321-324 (1981)
- 31) K. A. JENSEN Jr., K. M. C. EVANS, T. K. KIRK, K. E. HAMMEL : *Appl. Environ. Microbiol.*, **60** : 709-714 (1994)
- 32) C. COULTER, J. T. G. HAMILTON, D. B. HARPER : *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** : 1461-1466 (1993)
- 33) C. COULTER, J. T. KENNEDY, W. C. McROBERTS, D. B. HARPER : *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** : 706-711 (1993)
- 34) J. KOUKOL, E. E. CONN : *J. Biol. Chem.*, **236** : 2692-2698 (1961)
- 35) Y. AKAMATSU, M. SHIMADA : *FEMS Microbiol. Lett.*, **131** : 185-188 (1995)
- 36) Y. AKAMATSU, M. SHIMADA : *FEMS Microbiol. Lett.*, **145** : 83-86 (1996)
- 37) T. HATTORI, M. SHIMADA : Proceedings of 9th ISWPC, Montreal, Canada, p. F6-1-F6-4 (1997)
- 38) M. S. A. LEISOLA, B. SHIMIDT, U. THANEI-WYSS, A. FIECHTER : *FEBS Lett.*, **189** : 267-270 (1985)
- 39) M. SHIMADA, T. HATTORI, T. UMEZAWA, T. HIGUCHI, K. UZURA : *FEBS Lett.*, **221** : 327-331 (1987)
- 40) T. HATTORI : *Wood Research*, No. 78 : 15-73 (1992)
- 41) 島藺平雄, 田窪健次郎 : 林業試験場研究報告, No53, 117 (1952)
- 42) Y. AKAMATSU, M. TAKAHASHI, M. SHIMADA : *Mater. Org.*, **28** : 251-264 (1994)
- 43) M. SHIMAZONO : *J. Biochemistry*, **42** : 321 (1955)
- 44) J. A. MICALES : *Mater. Org.*, 29/3 : 177-186 (1995)
- 45) H. SHIMAZONO, O. HAYAISHI : *J. Biol. Chem.*, **227** : 151-159 (1957)
- 46) A. MEHTA, A. DATTA : *J. Biol. Chem.*, **266** : 23548-23553 (1991)
- 47) M. V. DUTTON, M. KATHIARA, I. M. GALLAGHER, C. S. EVANS : *FEMS Microbiol. Lett.*, **116** : 321-326 (1994)
- 48) Y. AKAMATSU : "きのこの科学", **2** : 7-15 (1995)
- 49) M. V. DUTTON, C. S. EVANS : *Can. J. Microbiol.*, **43** : 881-895 (1996)
- 50) M. SHIMADA, Y. AKAMATSU, T. TOKIMATSU, K. MII, T. HATTORI : *J. Biotechnology*, **53** : 103-113 (1997)
- 51) J. W. KOENIGS : *Wood Fiber*, **6** : 66-80 (1974)
- 52) N. TANAKA, Y. AKAMATSU, T. HATTORI, M. SHIMADA : *Wood Research*, No.81, 8-10 (1994)
- 53) F. GREEN III, J. M. HACKNEY, C. A. CLAUSEN, M. J. LARSEN, T. L. HIGHLEY : Inter. Res. Group /Wood Preserv., IRG/WP, 93-10028, 1-9.46. In : Hodgkinson, A., (Ed.), *oxalic Acid in Biology and Medicine*. Academic Press, London, pp. 1-325.
- 54) M. SHIMADA, Y. AKAMATSU, A. OHTA, M. TAKAHASHI : Intern. Res. Group on Wood Preserv., document no. IRG/WP/1472 (1991)

- 55) T. TOKIMATSU, S. MIYATA, S. H. AHN, T. UMEZAWA, T. HATTORI, M. SHIMADA : *Mokuzai Gakkaishi*, **42** : 173-179 (1996)
- 56) H. TANAKA, S. ITAKURA, T. HIRANO, A. ENOKI : *Holzforschung*, **50** : 541-548 (1996)
- 57) I. C. KUAN, M. TIEN : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90** : 1242-1246 (1993)
- 58) M. SHIMADA, Y. AKAMATSU, D. B. MA, T. HIGUCHI : A new enzymatic decarboxylation of oxalic acid by lignin peroxidase (LiP) system and its physiological role, Proceedings of the 35th Lignin Symposium, Tokyo, pp. 65-68 (1990)
- 59) Y. AKAMATSU, D. B. MA, T. HIGUCHI, M. SHIMADA : *FEBS Lett.*, **269** : 261-263 (1990)
- 60) J. L. POPP, B. KALYNARAMAN, T. K. KIRK : *Biochemistry*, **29** : 10475-10480 (1990)
- 61) D. P. BARR, M. M. SHAH, T. A. GROVER, S. D. AUST : *Arch. Biochem. Biophys.*, **298** : 480-485 (1992)
- 62) D. B. MA, T. HATTORI, Y. AKAMATSU, M. ADACHI, M. SHIMADA : *Biosci. Biochem. Biotechnol.*, **56** : 1378-1381 (1992)
- 63) A. KHINDARIA, T. A. GROVER, S. D. AUST : *Arch. Biochem. Biophys.*, **314** : 301-306 (1994)
- 64) D. P. BARR, S. D. AUST : *Environ. Sci. Technol.*, **28** : 79-87A (1994)
- 65) 宮田 聡 : 京都大学農学研究科修士論文 (1997)
- 66) T. HATTORI, N. KÔUDOU, M. SHIMADA : *Mokuzai Gakkaishi*, **41** : 1176-1178 (1995)
- 67) O. HAYASHI, H. SHIMAZONO, M. KATAGIRI, Y. SAITO : *J. Am. Chem. Soc.*, **78** : 5126-5127 (1956)
- 68) H. LENZ, P. WUNDERWALD, H. EGGERER : *Eur. J. Biochem.*, **65** : 225-236 (1976)
- 69) A. J. BALMFORTH, S. THOMSON : *Biochem. J.*, **218** : 113-118 (1984)
- 70) J. R. QUAYLE, G. A. TAYLOR : *Biochem. J.*, **78** : 611-615 (1961)
- 71) I. KASAI, T. ASAI : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9** : 49-58 (1963)
- 72) W. FRANKE, W. DE BOER : *Z. Physiol. Chem.*, **314** : 70-89 (1959)
- 73) Y. AKAMATSU, M. TAKAHASHI, M. SHIMADA : *Mokuzai Gakkaishi*, **39** : 352-356 (1993)
- 74) Y. AKAMATSU, M. TAKAHASHI, M. SHIMADA : *Wood Research*, No 79, 1-6 (1993)
- 75) Y. AKAMATSU, M. SHIMADA : *Phytochemistry*, **37** : 649-653 (1994)
- 76) K. MII, T. HATTORI, M. SHIMADA : *Wood Research*, No 83, 23-26 (1996)
- 77) 時松敏明, 三井香代子, 服部武文, 赤松やすみ, 島田幹夫 : 第46回日本木材学会大会研究発表要旨集 (熊本), pp. 592 (1996)
- 78) 時松敏明, 服部武文, 島田幹夫 : 第47回日本木材学会大会研究発表要旨集 (高知), pp. 604 (1997)
- 79) J. L. HARLEY, S. E. SMITH : Academic press, "Mycorrhiza symbiosis" (1983)
- 80) H. OKABE : "わかりやすい林業研究解説シリーズ, 森づくりと菌根菌", 財団法人, 林業科学技術振興所, pp. 69
- 81) I. JAKOBSEN : in "Mycorrhiza, structure, function, molecular biology and biotechnology" ed. by A. VARMA and B. HOCK, Springer-Verlag, Heidelberg, 1995, pp.299-314
- 82) D. H. LEWIS, J. L. HARLEY : *New Phytol.*, **64** : 238-255, 256-269 (1965)
- 83) B. BOTTON, M. CHALOT : in "Mycorrhiza, structure, function, molecular biology and biotechnology" ed. By A. VARMA and B. HOCK, Springer-Verlag, Heidelberg, 1995, pp. 325-364
- 84) 小川真 : "微生物と農業", pp. 79-116, 全国農林教育協会, 東京 (1986)
- 85) H. OKABE : "わかりやすい林業研究解説シリーズ, 森づくりと菌根菌", 財団法人, 林業科学技術振興所, pp. 11, 69
- 86) P. MIKOLA : "Ectomycorrhizae" ed. by G.C. Marks et al., Academic Press, New York, 1973, pp. 383-428
- 87) 若尾紀夫, 土壌生化学, 朝倉書店, 仁王 以智夫, 木村真人他11名著, 1994, pp. 132-139
- 88) V. C. GRAUSTEIN, K. CROMACK, JR., P. SOLLINS : *Science*, **198** : 1252-1254 (1977)
- 89) J. J. JURINAK, L. M. DUDLEY, M. F. ALLEN, W. G. KNIGHT : *Soil Science*, **142** : 255-261 (1986)
- 90) K. CROMACK, JR., P. SOLLINS, W. C. GRAUSTEIN, K. SPEIDEL, A. W. TODD, G. SPYCHER, C. Y. LI, L. TODD : *Soil. Biol. Biochem.*, **11** : 463-468 (1979)
- 91) N. MALAJCZUK, K. CROMACK, JR. : *New Phytol.*, **92** : 527-531 (1982)
- 92) F. LAPEYRIE, M. PEPIN, R. PEPIN, G. BRUCHET : *Can. J. Bot.*, **62** : 1116-1121 (1984)
- 93) F. LAPEYRIE, G. A. CHILVERS, C. A. BHEM : *New Phytol.*, **106** : 139-146 (1987)
- 94) F. W. WOODS, K. BROCK : *Ecology*, **45** : 886-889 (1964)
- 95) L. H. RHODES, J. W. GERDEMANN : *New Phytol.*, **75** : 555-561 (1975)
- 96) R. HERRERA, T. MERIDA, N. STARK, C. F. JORDAN : *Naturwissenschaften*, **65** : 208-209 (1978)

- 97) M. J. HATTINGH, L. E. GRAY, J. W. GERDEMANN : *Soil Science*, **116** : 383-387 (1973)
- 98) P. J. KRAMER, K. W. WILBUR : *Science*, **110** : 8-9 (1949)
- 99) F. E. SANDERS, P. B. TINKER : *Nature (London)* , **233** : 278-279 (1971)
- 100) L. H. RHODES, J. W. GERDEMANN : *New Phytol.*, **75** : 555-561 (1975)
- 101) E. OWUSU-BENNOAH, A. WILD : in *Tropical Mycorrhiza Research*, ed. by P. MIKOLA, Charendon Press Oxford, 1980, pp. 231
- 102) M. A. DJORDJEVIC, D. W. GABRIEL, B. G. ROLFE : *Ann. Rev. Phytopath.*, **25** : 145-168 (1987)
- 103) F. MARTIN, D. TAGU : in "Mycorrhiza, structure, function, molecular biology and biotechnology" ed. by A. VARMA and B. HOCK, Springer-Verlag, Heidelberg, 1995, pp. 29-58
- 104) F. MARTIN, D. TAGU : in "Mycorrhiza, structure, function, molecular biology and biotechnology" ed. by A. VARMA and B. HOCK, Springer-Verlag, Heidelberg, 1995, pp. 45-50