

総説

木材腐朽菌の代謝生理：銅耐性とシュウ酸，  
そして腐朽の生化学

島田 幹夫\*， J.J. Yoon\*， E. Munir\*， 服部 武文\*

\*京都大学 木質科学研究所

木材保存 (Wood Preservation) Volume 28, No. 3, 86-97 (2002)

## 木材腐朽菌の代謝生理：銅耐性とシュウ酸、 そして腐朽の生化学

島田 幹夫\*, J.J.Yoon\*, E.Munir\*, 服部 武文\*

### 1. はじめに

当研究室では、1991年のIRG京都大会以来、木材腐朽とシュウ酸 (oxalic acid) の役割について研究してきた<sup>1)2)</sup>。その後、再びIRG (奈良) 大会に参加する機会を得、銅耐性菌のひとつであるオオウズラタケのシュウ酸合成の新しい生理学的概念を提案し<sup>3)</sup>、米国科学アカデミー紀要 (PNAS) に投稿したが、幸運にも迅速に掲載される運びとなった<sup>4)</sup>。その間、ポストCCAの問題と関連して銅シンポジウム「木材保存剤としての銅の現在・未来」に招かれて他の諸先生とともに講演をする機会にも恵まれた<sup>5)</sup>。このような縁もあって、本誌への投稿依頼を受けることができたのは大変光栄である。本総説では、木材腐朽菌の代謝生理学という基礎研究の立場から木材保存への応用とも関係づけて、われわれの研究成果を中心に最近の話題を混じえて紹介したい。

### 2. 木材腐朽菌の代謝生理と腐朽型

天敵に襲われることがなければ、数千年も生きながらえる樹木の長寿命性は、まさに自然界の驚異である。長寿命の秘密として木材成分には、天敵に対する抵抗性物質が含まれていることのほかに、木部細胞内にはほとんど栄養源が無いという木の特性 (C/N比, 300~500) を挙げることができる。翻って、N-含量が極度に低い木材を攻撃し、エネルギー源として好んで(?)食べる生物はシロアリとこの (木材腐朽性担子菌) くらいのものである<sup>6)</sup>。シロアリは生息分布が限られているから、地球上でのこの種の森林微生物の木材分解力

は圧倒的である。しかしその秘密は木材腐朽菌に特有な代謝生理とその特異な生化学反応に帰因する。多種多様な植物の進化に伴って、攻撃側のきのこもまた共進化してきたことを考えれば、その生物多様性は想像を越え、その生理学的特徴も様々である。

木材腐朽菌は担子菌に属する白色腐朽菌、褐色腐朽菌そして子囊菌あるいは不完全菌に属する軟腐朽菌の3種類に大別される。これらの呼び名は腐朽木材の外見の色微から便宜的に用いられているのであるが、腐朽型は概して菌類の内的因子すなわち遺伝的生理学的特徴を反映しているとされている<sup>7)</sup>。腐朽型の分類のみで代謝生理を論ずることは問題であるが、原則的なものとして表1に褐色腐朽菌と白色腐朽菌の生化学的特徴を比較した。

両者はともに木材多糖 (セルロースとヘミセルロース) を分解することができる点では共通する。しかし、褐色腐朽菌は白色腐朽菌と違ってリグニンの分解能力をもたない。また前者はシュウ酸を集積する生理的特徴をもち、セルロース分解のメカニズムも後者のそれとはかなり異なる局面もあることがわかってきた。さらに、同じ褐色腐朽菌でも銅耐性を示すものとそうでないもの、あるいは白色腐朽菌の中でもリグニン分解酵素系が異なりその分解反応メカニズムが微妙に異なる場合もあることがわかってきた。

腐朽菌が木材細胞壁を侵食する場合、白色腐朽菌は細胞壁内腔に接し、剥離するようなやり方 (エロージョン型) で腐朽し、リグニンと多糖類をほぼ同時に分解する。これに対し褐色腐朽菌は、

\*京都大学 木質科学研究所

表1 褐色腐朽菌と白色腐朽菌の生化学的特徴の比較

性 質	褐色腐朽菌	白色腐朽菌
木材成分の分解性		
セルロース	+++	+++
ヘミセルロース	+++	+++
リグニン	+	+++
セルロース分解酵素系		
エンドセルラーゼ	+++	+++
エクソセルラーゼ	+	+++
(酸化ラジカル分解系)	(+/-)	
リグニン分解酵素系		
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)	-	+++
パーベンダム反応	-	+++
シュウ酸の集積性	+++	+
シュウ酸脱炭酸酵素	-	+++

\*: +++, 顕著である。+, 微小または例外あり。( +/- ), ユニークな特徴。  
-, ほとんど無い。

菌糸体と接触する内壁とかS<sub>3</sub>層ではなく菌糸体はもちろん酵素分子から離れた場所、S<sub>2</sub>層内部で劣化を引き起こす<sup>8)</sup>。腐朽が進むと木繊維を横断するような形でひび割れが多く観察される。また非常に脆くなって指でよじればほろほろと崩れ落ちることを経験した人は多いのではないかと思う。また白色腐朽とは対照的に、褐色腐朽の初期段階では重量減少に先立ち、セルロース重合度が急激に低下する<sup>9)</sup>。したがって腐朽材の強度も急激に低下することは古くから知られている。このような褐色腐朽菌に攻撃された家屋が地震に見舞われれば、ひとたまりもないことは容易に想像できる。

腐朽菌の個性とも言うべき腐朽形態と腐朽生化学反応には、菌類の代謝物(シュウ酸など)、酵素、金属イオン、酸素と過酸化水素の供給系などが複雑に絡んでいる。以下、木材腐朽菌の銅耐性、シュウ酸の生合成とその生理的意義、シュウ酸が白色腐朽菌のリグニン分解と褐色腐朽菌のセルロース分解におよぼす効果、そして銅耐性菌の一つであるオオウズラタケ(*Fomitopsis palustris*, 旧名 *Tyromyces palustris*)の子実体形成の生理学的特徴について述べる。

### 3. 木材腐朽菌と銅耐性

銅化合物の毒性は、一般的にはSH基をもつ各種の酵素・タンパク質と銅イオンが非特異的に結

合して、呼吸・エネルギー代謝、核酸代謝など生命活動に不可欠な生体反応を阻害することによって生ずると考えられている。銅耐性の問題がクローズアップされてきたのは、CCA利用の廃止に伴い、少なくとも銅だけ引き続き他の薬剤とのコンビネーションを図って活用したいというニーズとの兼ね合いからであると聞いている。木材腐朽菌の木材保存薬剤に対する耐性(抵抗性)を考えると、腐朽菌の代謝生理との関連で解毒作用のメカニズムを解明することが重要となる。

Sutterらによれば、1930年代にCCAが英国で実用化されて間もなく銅耐性問題が浮上し、腐朽菌が産生するシュウ酸との関係が指摘されていると報告しておりその歴史は古い<sup>10)11)</sup>。また、銅耐性発現の特徴についてSutterらは次のようにまとめている。

- 銅耐性現象はシュウ酸集積能力が大きい *Poria* 属 (*P. placenta*, *P. monticola*, *P. vaillantii*, *P. cocos*, *P. xantha* など) によく観察される。
- 耐性菌の多くは菌糸の周囲で硫酸銅を脱色し、シュウ酸銅の結晶を堆積している。
- 木材の腐朽過程において銅薬剤で処理した木片にはやはりシュウ酸銅の集積が観察され無処理木片の場合はシュウ酸カルシウムやシュウ酸カリウムの集積が観察されている。

このように、銅耐性発現のメカニズムは、シュウ酸による可溶性硫酸銅の不溶化と腐朽菌細胞内

表2 クエン酸銅 (CC) 処理区分と無処理区分におけるサザンイエローパインの褐色腐朽に見られるシュウ酸集積量と銅耐性との関係<sup>12)</sup>

褐色腐朽菌名	クエン酸銅処理区		銅耐性	無処理区	
	シュウ酸集積量 (max) (mM)	重量減少 (max) (%)		シュウ酸集積量 (max) (mM)	重量減少 (max) (%)
<i>Antrodia vaillantii</i> FP90877	624	32	+	380	38
<i>Antrodia radiculosa</i> FP90848T	580	49	+	490	26
<i>Laetiporus sulphureus</i> Boat206	518	32	+	438	54
<i>Serpula incrassata</i> TFFH-294	486	45	+	426	37
<i>Wolfiporia cocos</i> MD106R	474	57	+	126	61
<i>Postia placenta</i> MAD698	468	39	+	403	65
<i>Serpula incrassata</i> Mad563	446	51	+	148	59
<i>Tyromyces palustris</i> Typ6137	442	51	+	581	42
<i>Postia placenta</i> TRL2556	429	55	+	386	63
<i>Wolfiporia cocos</i> FP97438sp	405	32	+	99	50
<i>Tyromyces palustris</i> L15755sp	373	39	+/-	45	35
<i>Coniphora puteana</i> MAD515	239	6	-	291	34
<i>Serpula lacrymans</i> Bam Ebers315	178	2	-	169	53
<i>Gloeophyllum trabeum</i> MAD617	73	0	-	36	50
<i>Serpula lacrymans</i> Harm888-R	49	5	-	27	15

への浸透阻止ということによって説明されている<sup>11)</sup>。

Green らは砒素とクロムを含まないクエン酸銅処理木片 (southern yellow pine) と無処理木片を10週間褐色腐朽菌によって腐朽させ、褐色腐朽菌のシュウ酸集積性と銅耐性の相関性を調べ、興味ある実験結果を発表している<sup>12)</sup>。表2に示すように、注目すべきことは、一株を例外として銅処理木片培養系では無処理系より多量のシュウ酸を集積し、対照区に匹敵するほどの重量減少率を示していることである。木片あたり400mM以上のシュウ酸を集積する9種類の褐色腐朽菌は銅耐性を示したが、シュウ酸集積性の小さいキチリメンタケ (*Gloeophyllum trabeum*) などの腐朽菌の場合は、腐朽力は弱く、ほとんど銅耐性もたないことを明らかにした。

*Poria* 属以外でシュウ酸をよく産生する銅耐性菌としては、JIS 防腐試験の検定菌でもあるオオウズラタケ<sup>13)</sup>と一名“dry rot”としても著名なナミダタケをあげねばならない。ナミダタケが北海道の家屋に多大な被害をもたらしたことは土居氏の研究報告で明らかであるが<sup>14)</sup>、欧米においても最も注目されている銅耐性菌の一つである。

この他に、軟腐朽菌の *Philaphora* 属が銅耐性菌であることが Sutter と Jones によって報告されている<sup>10)</sup>。この場合の銅耐性メカニズムは、担子菌

類と違って、細胞外で不溶化するというよりは細胞内に侵入した銅イオンを硫化銅、ポリリン酸銅、あるいはタンパク質結合型の不活性体に変換し、液胞内あるいは細胞壁内に閉じ込める仕組みとして説明されている。

以上、銅耐性を考えるとき、一般的に菌類が重金属イオンの負荷 (ストレス) に対してどのように抵抗し耐性を備えるのか、そのメカニズムについて知ることが重要である。たとえば、重金属イオンの毒性の強いものから列挙すると Ag, Hg, Cu, Ni, Pb, Co, Zn, Cd, Fe, Mn, Mg の順になり、酵母とカビ類 (*Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* など) についての金属耐性の研究が遺伝子レベルから研究されているが、そのメカニズムは軟腐朽菌の場合と類似する点が多い<sup>15)</sup>。

#### 4. 木材腐朽菌のシュウ酸集積性

シュウ酸集積性の腐朽菌が示す銅耐性は、多分にシュウ酸の化学的性質に起因するが、その化学的性質はおもしろい。ジカルボン酸類の中では最も単純な有機酸であるが、図1に示すように1つの分子で3つの化学的性質をもっているからである。すなわちプロトン供与体であり (1式)、その第一解離定数、 $pK_1$  は2以下、0.1M 溶液の pH は1.3である。長期間この pH 下に置かれるならば、木材多糖類の加水分解あるいは金属の腐蝕も

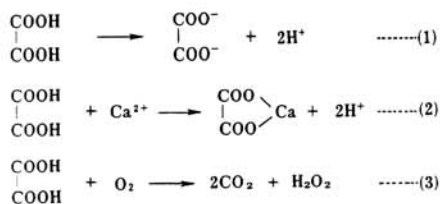


図1 シュウ酸の3つの化学的性質

免れないほどの強い有機酸なのである。一方、銅などの重金属イオンのほか、特にカルシウムイオンに対しては優れたキレート剤としてはたつき、不溶性シュウ酸カルシウムを生成する（2式）。また、シュウ酸は酸素によってゆっくりではあるが、酸化分解される。逆に酸素は還元されて過酸化水素を生成する（3式）。シュウ酸の還元力を利用した過マンガン酸カリウム滴定によるシュウ酸定量法はこの反応に基づく。3式の反応は大麥などの植物において初めて見出されたが、最近、白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* から初めて同様なシュウ酸酸化酵素が発見された<sup>16)</sup>。この腐朽菌がシュウ酸を酸化して過酸化水素を発生させ、リグニン分解に活用していることは興味深い。シュウ酸を生態生化学の観点から眺めると、木材腐朽菌以外の微生物はもちろん、動物、植物にいたるまで多数の生体反応に関与している例に遭遇するのであるが、これはすべてシュウ酸の多彩な化学的性質に基づくものである<sup>17)</sup>。

各種の木材腐朽菌のシュウ酸集積能力を報告した例は多いが<sup>18)</sup>、C/N比が異なる培養条件下でシュウ酸集積性を比較した研究例はなかった。そこで、C/N比の高低によってシュウ酸合成が影響を受けるか否かを調べることは、高いC/N比をもつ木材の腐朽モデル実験系との関係で興味深い。実験の結果としては明白な一般則を引き出すには至らなかったが、褐色腐朽菌のオオウズラタケ、イダタケとワタゲサレタケが低N培地で顕著なシュウ酸の集積増加を示したことは対照的に、白色腐朽菌では高N培地で高いシュウ酸集積を示すもの（ヒラタケ、カワラタケ、*Phanerochaete chrysosporium*）が認められた<sup>19)</sup>。

腐朽菌が生理学的にシュウ酸を培養液に集積する現象は褐色腐朽菌の特徴であるが、炭酸カルシウムの共存下では、白色腐朽菌培地でもシュウ酸

カルシウムとして堆積することが古くから観察されている<sup>19a)</sup>。また、腐朽木においてもシュウ酸カルシウム、銅木材防腐剤処理材の腐朽木においてはシュウ酸銅の結晶が見られることから、培養系と自然界での木材腐朽過程におけるシュウ酸生成の生化学反応には本質的な差は無いものと思われる。

## 5. 白色腐朽と褐色腐朽の酸化的分解反応

木材の生分解という観点からすると、白色腐朽菌と褐色腐朽菌とは一味違ったラジカル反応を利用していることが分かってきた。それはリグニンやセルロースの酸化的分解反応のメカニズムの違いと関係しているが、これらの反応にシュウ酸が関わることによってそのラジカル反応が大いに影響を受けることになる。化学反応はわかりやすく言えば、イオン反応とラジカル反応に大別されるが、両者の腐朽に共通する木材多糖類の酵素的加水分解は前者に、ここで述べる酸素や過酸化水素が関与する酸化的リグニン分解とセルロース分解は後者に属する。2つの腐朽過程で問題となるのはカチオンラジカル、アニオンラジカル、それに中性の炭素または酸素ラジカル種の反応性とその発生機構である。

### 5.1 白色腐朽におけるラジカル反応

リグニン分解酵素系に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) とラッカーゼ (Lac) の3種類がある。LiPは過酸化水素の存在下で、図2に示すようにリグニン基質の代わりに利用されているペラトリルアルコール (VA) から1電子を引き抜きカチオンラジカル ( $\text{VA}^+\cdot$ ) を発生させる。これが反応の開始である。VAは白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* が生合成した二次代謝物質であるが、リグニン分解時のメディエータの役割をもつと考えられている。しかし、反応場にシュウ酸が共存すると図示するように分解経路(a)に進まないで、シュウ酸によって還元され、もとの基質レベルまで引き戻されるので、シュウ酸が1電子酸化される反応経路(b)だけが進行することになる<sup>2)20)</sup>。したがってシュウ酸が存在する限り、酸化分解反応、経路(a)はブロック(阻害)され、経路(b)が主反応となる。シュウ酸はアニオンラジカルを経て二酸化炭素と

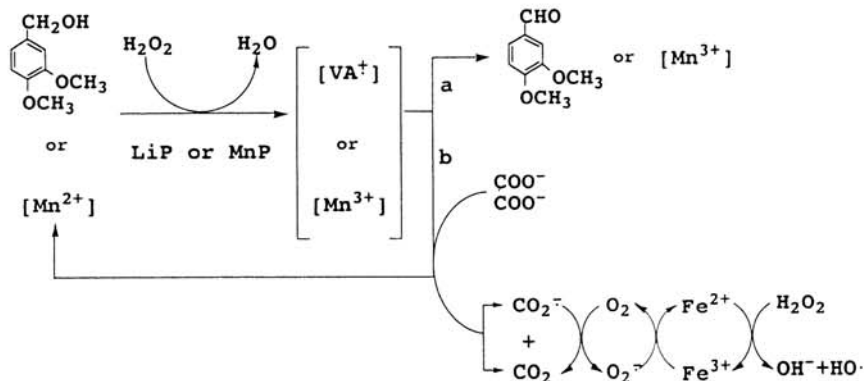


図2 ベラトリルアルコール (VA) または Mn をメディエータとするリグニン分解酵素系 (LiP と MnP) によるシュウ酸の一電子酸化に伴う活性酸素スーパーオキシドアニオンラジカル(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) とヒドロキシルラジカル (HO<sup>·</sup>) の発生機構

フォーメートラジカルを生成し、酸素分子を還元してスーパーオキシドアニオンラジカルを生成する。さらに、このアニオンラジカルは Fe<sup>3+</sup> が存在すればこれを還元して Fe<sup>2+</sup> を生成し酸素分子に戻す。この第一鉄イオンは共存する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を還元、すなわちフェントン反応をおこして HO<sup>·</sup> を発生するという連鎖共役系が Aust らによって提案された<sup>21)</sup>。彼らは、シュウ酸が電子供与体として働くフェントン系の形成は、木材腐朽のみならず難分解性公害物質の分解にも役立つとしている。しかし、この反応連鎖が効率よく進むか否か、つまり経路 (a) と (b) のどちらが優先的に進むかは不確定である。また反応場に酸素と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が存在しなければ HO<sup>·</sup> の生成はおこりえず、嫌気下ではフォーメートラジカルはむしろ四塩化炭素やトリクロロエチレンなどの脱ハロゲン反応に関与することを示唆している<sup>22)</sup>。

MnP を含む通常のリグニン分解反応において、Mn<sup>3+</sup> がリグニンを攻撃すると考えられている。しかし、シュウ酸が共存すれば LiP 系と同様にフェントン反応を引き起こすのみならず他のラジカル反応を起こす可能性もある (図 2)。いずれにせよ、リグニンの分解には過酸化水素の供給系が必要であるが、腐朽菌の代謝物であるグリオキサールとシュウ酸が酸化されて過酸化水素を発生させる酵素系が、それぞれ Kersten と Urzua らによって報告されている<sup>16) 23) 24)</sup>。

しかし、最近もう一味ちがった興味ある MnP 反応系によるリグニン分解 (リビドペルオキシド

オキシダーゼ) 機構が渡辺らによって提案されている<sup>25)</sup>。それは、菌体および MnP 酵素と離れたところ (細胞間層付近) でリグニンが選択的に攻撃されるという白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* のユニークなリグニン分解機構を説明しようとするものである<sup>26)</sup>。この場合不飽和脂肪酸が介在しその酸素酸化で生ずる各種の炭素またはアルコキシラジカルがリグニン切断反応に関与すると提案している。Mn<sup>2+</sup> が不飽和脂肪酸を 1 電子酸化した時に生ずる過酸化物の生成と引き続いて生ずるリビドペルオキシドオキシダーゼがリグニン分解の原動力であるとみなしている<sup>28) 29)</sup>。この反応系にシュウ酸が存在するとリビドペルオキシドオキシダーゼ系がどのような影響を受けるかは不明である。しかし、腐朽菌の代謝物 1,7-nonadecadien-2,3-dicarboxylic acid の強い Fe<sup>3+</sup> に対するキレート作用のために Fe<sup>2+</sup> の生成が阻止され、フェントン反応 (HO<sup>·</sup> の生成) もまた抑制されることは注目すべきことである。結果として、セルロースの分解は抑制され、リグニンの分解が優先的に進行すると説明している<sup>27)</sup>。

Lac 酵素はフェノールオキシダーゼの一種であり、分子状酸素を利用してフェノール性基質からの水素引き抜きまたは ABTS のような人工メディエータの関与により 1 電子酸化を触媒する。しかしリグニン分解系への寄与については懐疑的な研究者も多い。またどのような天然のメディエータ代謝物が介在するかはまだ十分解明されていない。しかし Eggert らは白色腐朽菌 *Pycnoporus cin-*

*nabarinus* が生産する二次代謝物アントラニル酸が VA (図 2) に対応するメディエータとして機能し非フェノール性リグニンモデル化合物が酸化分解されることを報告している<sup>30)</sup>。最近では、Lac 酵素系がこの二次代謝物をメディエータしてセロビオースデヒドロゲナーゼと共役してセロビオース酸化に寄与している可能性をも提案している<sup>31)</sup>。

以上、リグニン分解性の白色腐朽といってもシユウ酸がこれらのラジカル反応に参与する場合、予想外のラジカル反応が生ずる可能性もある。

## 5.2 褐色腐朽におけるラジカル反応

褐色腐朽過程で見られる急激なセルロースの重合度低下を説明する仮説として水酸化ラジカル ( $\text{HO}\cdot$ ) を生成するフェントン反応が提案されてきた<sup>32)</sup>。また、菌糸体およびその分泌酵素から離れた木部細胞壁内の  $\text{S}_2$  層でセルロースが選択的に分解されることを説明するためにはそれなりの理由が無ければならない。白色腐朽菌 *C. subvermisporea* の場合と同様に、拡散可能 (diffusible) な低分子物質から構成される反応系の同定とメカニズムの解明に大きな関心が寄せられてきた。

まず、Schmidt らは、拡散可能な低分子物質として褐色腐朽菌が産生するシユウ酸を例に挙げて説明しようとした<sup>33)</sup>。褐色腐朽において、 $\text{Fe}^{3+}$  がシユウ酸によって還元され、その  $\text{Fe}^{2+}$  が  $\text{H}_2\text{O}_2$  と反応して  $\text{HO}\cdot$  ラジカルを発生させるフェントン反応を提案したが、この反応には光の関与が必要であることが指摘され、現在では受け入れられていない。しかし、興味深いことは、微量のシユウ酸の存在はフェントン反応を促進し、逆に鉄イオンに比べ過剰なシユウ酸の存在はフェントン系を阻害することを報告している<sup>33)</sup>。また、2 つ目のモデルとして、Hyde と Wood は  $\text{Fe}^{3+}$  の還元はシユウ酸ではなくセロビオースデヒドロゲナーゼによって遂行されることを示した<sup>34)</sup>。しかし、反応場の pH が 2 以下でなく、4 付近であれば、生成したジアニオン形のシユウ酸鉄錯体は分子状酸素を容易に還元するので  $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成しながら、 $\text{HO}\cdot$  を発生させる反応系が成立することを提案している<sup>34)</sup>。3 つ目の  $\text{HO}\cdot$  発生機構は褐色腐朽菌キチリメンタケ (*Gleophyllum trabeum*) のセルロース分解をミミックするものとして提案された (図

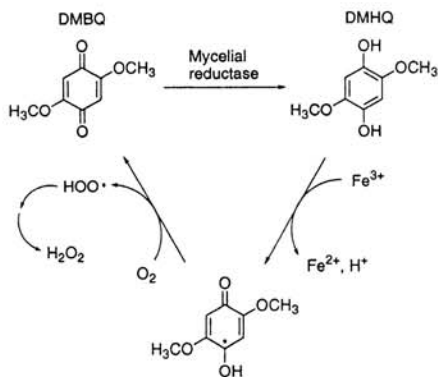


図 3 褐色腐朽菌キチリメンタケ細胞壁結合型酵素系による細胞外  $\text{Fe}^{3+}$  の還元と  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成機構の提案<sup>35)</sup> (生成した  $\text{Fe}^{2+}$  が  $\text{H}_2\text{O}_2$  と反応して ( $\text{HO}\cdot$ ) を発生する。)

3)<sup>35)</sup>。この機構によれば、褐色腐朽菌 *G. trabeum* の細胞膜結合型還元酵素と二次代謝物である 2,5-dimethoxyhydroquinone (DMHQ) が重要な役割を果たしている。2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ) がまず還元酵素によって還元されて DMHQ を生成し、それが  $\text{Fe}^{3+}$  と  $\text{O}_2$  を順次 1 電子還元し、フェントン系に必要な  $\text{H}_2\text{O}_2$  と  $\text{Fe}^{2+}$  を生成する巧妙な仕組みである。

ちなみに、DMHQ は日本の研究グループによって、同じ *Gleophyllum* 属のキカイガラタケから 25 年前に発見されている<sup>36)</sup>。また、この二次代謝物とその類縁体 4,5-dimethoxycatechol の *de novo* 合成は Paszczynski らによって報告された<sup>37)</sup>。実際、Kerem らはセルロースの代わりにポリエチレングリコールを用いて、この試験管内反応系で重合度が減少することを証明している<sup>35)</sup>。この種の褐色腐朽においてセルロースが優先的に攻撃される理由については、Xu と Goodell は鉄イオンのセルロースに優先的に吸着される性質を挙げている<sup>39)</sup>。他方、シユウ酸集積性の高い腐朽菌ではフェントン系はシユウ酸あるいは pH 2 付近で阻害されることを考える<sup>33)</sup>と、すべての褐色腐朽における急激なセルロース重合度低下を説明することはできない。このような場合、われわれと Green らが報告したように、長年月の褐色腐朽過程ではシユウ酸による pH 低下がヘミセルロースやセルロースをゆっくりではあるが加水分解する反応も無視できないのではないと思われる<sup>1)</sup>。

## 6. シュウ酸の生合成機構

シュウ酸の合成を触媒する酵素はオキサロ酢酸加水分解酵素（オキサロアセターゼ）とグリオキシル酸化酵素（グリオキシル酸デヒドロゲナーゼ）が代表的である。木材腐朽担子菌のオキサロアセターゼ（OXA）とグリオキシル酸デヒドロゲナーゼ（GLOXDH）の酵素の酵素的性質についての研究は、われわれの研究報告が最初である<sup>41)43)</sup>。時松らは、シトクロム *c* を電子受容体とする新規な GLOXDH 酵素を単離、精製し、本酵素が FMN を含む新規なフラボヘムタンパク質であることを証明した<sup>43)</sup>。

シュウ酸合成酵素の役割と関連して、シュウ酸がグルコースに由来する有機酸代謝とどのように関係づけられるかを明らかにしたが、以下にその概要を述べる<sup>41)</sup>。

オオウズラタケを液体静置培養したとき、消費グルコースの大部分がシュウ酸に変換される条件を見出した。菌体重量分を補正すると、概してシュウ酸の生成収率は補正消費グルコースの約80%にも達するのである。つまり、この培養系ではグルコースは不完全燃焼をしており、脱炭酸をつかさどる呼吸系で重要な Krebs (TCA) 回路をもっていないか、あるいは TCA 回路が非常に制限されていることを示している。いずれにせよ、オオウズラタケはこの条件下ではカビの仲間 (*Aspergillus*, *Penicillium* 属など) でも知られているシュウ酸発酵をおこなっていることがわかった。その化学量論は以下のようなになる (式4)。



この反応の意味するところは、1モルのグルコース (180g) から2モルのシュウ酸 (180g) を合成するのに5モルの酸素があればよく、完全燃焼するための6モルは必ずしも必要としないのである。少々酸素の可給性が悪くてもシュウ酸にまでは分解できるのでエネルギー獲得にはさほど不便はないということになる。

そこで、グルコースからシュウ酸ができる代謝過程、特に TCA 回路とグリオキシル酸 (GLOX) 回路に関係すると思われる12種類の酵素活性を調べて見ると、2-オクソグルタル酸脱水素 (脱炭

酸) 酵素を除いてすべての酵素活性が存在することがわかった。図4に示すように、変則型 (ショートカット) の TCA 回路(A), GLOX 回路(B), 酢酸のリサイクリング経路(CとD)が連動する新規なシュウ酸合成機構を提案した<sup>41)</sup>。この代謝機構が示すように第一段階目の酸化的脱炭酸を触媒するイソクエン酸脱水素酵素 (IDH) 活性は非常に弱くかつ第二段階の脱炭酸反応を触媒する酵素 (ODH) を含む経路 (図4のブロック印) は欠落していることが明らかになったので、前述したグルコースの不完全燃焼の理由は酵素系の欠落によって説明できる。イソクエン酸は脱炭酸経路を経ないでイソクエン酸リアーゼ (ICL) によって1段階でコハク酸とグリオキシル酸に変換される。

ここで注目すべきことは、グルコースで培養された木材腐朽担子菌が通説に反して、初めから構成的にグリオキシル酸 (GLOX) 回路(B)を保有しているということである。一般的には、微生物が非糖質の炭素源、たとえばエタノールや酢酸などで培養されたときに限って、あるいは脂肪に富んだ植物種子が発芽するときにだけ、糖を新たに合成する必要があつて誘導的に発現してくるのが、GLOX 回路である。すなわち TCA 回路のバックアップ (補充) 経路として発現してくる。TCA 回路の発見者 Krebs の門下生、Kornberg が発見した代謝回路であるが、動植物には通常は存在しない<sup>44)</sup>。またその鍵酵素である ICL とリンゴ酸合成酵素 (MS) 活性が共にシュウ酸合成酵素 (OXA と GLOXDH) の活性と連動していることも明らかにされた<sup>41)</sup>。糖新生の場合、TCA 回路(A)からリンゴ酸 (オキサロ酢酸) (C4) が流出するため、それを補うために GLOX 回路(B)から生成するコハク酸 (C4) を供給する必要がある。褐色腐朽菌オオウズラタケの場合、TCA 回路(A)と GLOX 回路(B)の両方からリンゴ酸が流出し、シュウ酸合成のために使用されるため、2つの回路の機能を維持するためにはイソクエン酸 (C6) を切断して、TCA 回路(A)は GLOX 回路(B)にグリオキシル酸 (C2) を、逆に GLOX 回路(B)は TCA 回路(A)にコハク酸 (C4) を供給しなければならない。このような A・B 回路の共同作業は前代未聞の代謝機構であり、木材腐朽菌独特のエネルギー獲得代謝である可能性が高い。

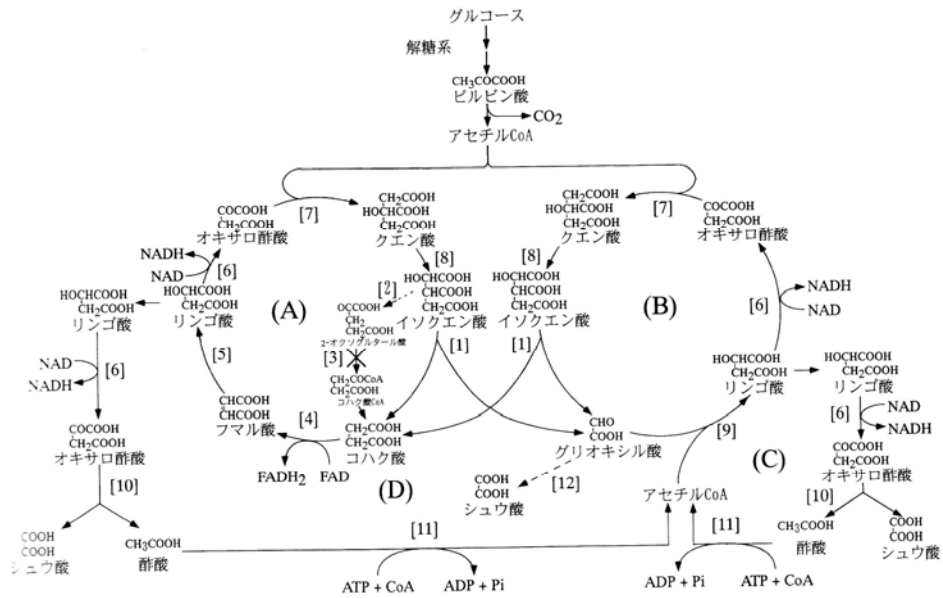


図4 褐色腐朽菌オオズラタケにおけるTCA(A)とGLOX(B)回路と連動するシュウ酸生成機構の提案<sup>4)</sup>。(CとDは酢酸リサイクリング経路；1モルのグルコースから2モルのシュウ酸が生成するエネルギー代謝を意味する。)  
 関係酵素：[1] ICL, [2] IDH, [3] ODH, [4] コハク酸脱水素酵素, [5] フマラーゼ, [6] リンゴ酸脱水素酵素, [7] クエン酸合成酵素, [8] クエン酸イソメラーゼ, [9] MS, [10] OXA, [11] アセチルCoA合成酵素, [12] GLOXDH

このイソクエン酸のC-C結合切断反応を触媒する酵素(ICL)は、二つの回路の枢軸に位置づけられ、シュウ酸生成において中心的役割を果たしていることは明らかである。そこで、この酵素を阻害すれば、シュウ酸合成は完全に阻止されるはずであり、エネルギー獲得代謝が停止すれば腐朽菌も生育することはできないことが予想される。実際ICLの特異的阻害剤のひとつであるイタコン酸を用いて培養系に添加すると、図5に示すように、2つの鍵酵素の活性低下、シュウ酸合成阻害および、菌体の生育阻害が同時に観察された。したがって、銅耐性菌を制圧するためには、イタコン酸は有力な阻害剤として利用できる。しかし、コストパフォーマンスなどの問題のため、直ちに木材防腐に実用化することはできないが、防腐剤・創薬開発のターゲット酵素の一つとして、ICLが特定されたことは、大きな成果ではないかと思われる。最近、結核菌(*Corynebacterium tuber-*

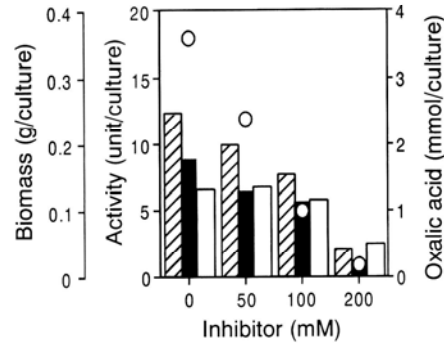


図5 阻害剤イタコン酸のシュウ酸生成、酵素活性、およびオオズラタケの生育におよぼす阻害効果。  
 ○, シュウ酸生成量；斜線部, ICL酵素活性；黒区分, MS酵素活性；白区分, 菌体重量<sup>4)</sup>。

culosis) やカンジダ症を引き起こす病原性酵母 (*Candida albicans*) を制圧するポストゲノム創薬開発のターゲットとして、同じく ICL 酵素が注目されていることは興味深い<sup>(45)(46)</sup>。しかし、人命を守る目的と、木材を保護するための創薬開発とでは、相当のギャップを感じざるを得ないが、動物と植物には存在しない酵素を特定し、その高選択的で環境にも調和する阻害剤を探索することはひとつのコンセプトであろう。

## 7. グリオキシル酸回路鍵酵素の分布

GLOX 回路は一般的には動物や植物には存在しない。しかし、最近の研究では、人工的に糖尿病を引き起こさせたネズミの肝<sup>(47)</sup>、あるいは絶食・飢餓状態に追い込まれたネズミ、冬眠中の熊の皮下脂肪組織内<sup>(48)</sup>で検出されている。GLOX 回路が構成酵素として存在するか否かを確認するためには、ICL と MS の両方が同時に存在することを示す必要がある。どちらかの酵素が欠損している場合、別のバイパス経路が機能している可能性があるからである。

そこで、オオウズラタケで発見された GLOX 回路が、他の木材腐朽菌にも分布するか否かを検討した。実験したすべての白色腐朽菌 (カワラタケなど14種類) はグルコース抑制を受けることなく ICL と MS 活性をもち、褐色腐朽菌 (マスタケなど7種類) ではマツオオジとナミダタケだけが、MS 活性をもたない例が見つかったが、その他のものは2つの活性を同時に保有していることがわかった<sup>(49)</sup>。軟腐朽菌の場合、4種類の内 *A. niger* と *Chaetomium globosum* は2つの酵素活性をもつが、トリコアルマ属はともに2つの酵素活性を構成的にはもっていないことがわかった。しかしこの場合、通説どおりエタノールで誘導されることが確認された。

以上の点で、木材腐朽担子菌類はグルコース培養系においても GLOX 回路を普遍的に有することが示唆される。また、その回路はシュウ酸合成と連動している可能性が高い。ごく最近 Munir らは、オオウズラタケの ICL と MS を均一なタンパク質として分離することに成功し、それらの特徴を報告している<sup>(50)(51)</sup>。

## 8. オオウズラタケの子実体形成期の代謝生理

きのこは、まず胞子の発芽、そして栄養菌糸の成長、最終段階で子実体 (担子胞子) の形成という3つの過程を含むユニークな生活環をもって繁殖している。食用菌類として木材腐朽菌の子実体形成は古くから注目され、発生学、生理・生化学的観点から最も関心を集めてきた課題の一つである。しかし、木材保存学においてはナミダタケを除いて殆ど研究されていなかった。ナミダタケの場合、建物の屋内で子実体が発生した場合、その100cm<sup>3</sup>あたり5×10<sup>7</sup>個にも及ぶ多数の胞子が発生し、胞子が飛散すると、人によっては呼吸器系統のアレルギー症状を引き起こしたりする危険性も指摘されている。ナミダタケの駆除作業に従事した木材保存士なども帰宅する場合、靴や着衣に付着した胞子の拡散を防ぐような注意が必要であると指摘されている<sup>(52)</sup>。一度ナミダタケに攻撃されると、同じ建物の別の個所で再び被害を受ける場合もあると報告されており、この胞子の完全除去はかなり困難のようである。胞子の生命力、あらゆる環境ストレスにたいして強い抵抗性を考えれば当然であろう。

以上、胞子形成を防ぐことも重要な研究課題となるが、オオウズラタケの場合シュウ酸合成と GLOX 回路が子実体形成とどのような関わりをもつかは興味深い。オオウズラタケが寒天培地やおが屑培地で子実体を形成することは既に報告されているが<sup>(53)(54)</sup>、その形状の写真記録は菱田の論文を除くと皆無である<sup>(54)</sup>。そこで、われわれは、液体培地で子実体形成の実験系を確立して、その生理化学的解析を試みることにした。実験の結果、5%グルコースを含む液体培地を用いると比較的簡単に平均28日間の培養でオオウズラタケの子実体が形成されることが分かった。意外にもオオウズラタケ子実体の写真はキノコ図鑑に掲載されていないので、その子実体と胞子の顕微鏡写真を図6に示した<sup>(56)</sup>。

一般に、担子菌胞子は脂肪に富み、植物の発芽種子と同様に、GLOX 酸回路が起動する可能性が指摘されている<sup>(57)</sup>。腐朽菌の生理的特徴としてその多くが栄養菌糸の成長段階においても GLOX

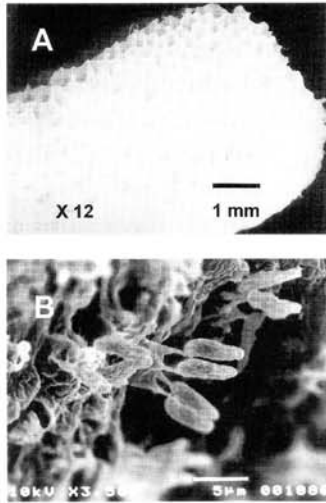


図6 オオウズラタケ子実体のスポンジ構造(A)と担子孢子(B)の顕微鏡写真<sup>36)</sup>。

回路酵素をもつことは既に示したとおりである。そこで、オオウズラタケの子実体形成期間においても GLOX 回路が機能しているか否かが問題となる。培養期間中のシュウ酸合成とグルコース消費の量的関係および培地内の酸素濃度の変動について調査した(図7A, B)。この結果, 図7Aに示すように, 子実体の形成は初期グルコース量に対

して50%位の時点で始まり, 28日目には最高重量に達する。また, 図7Bに示すようにグルコースの消費にしたがってシュウ酸集積量は15日ごろに最高値に達するが, 子実体形成期に差しかかると減少する。したがって, 子実体(孢子)形成段階で酵素系のスイッチが行われ, シュウ酸分解酵素系が活性化された可能性が示唆される。因みに, 褐色腐朽菌でも例外的にシュウ酸脱炭酵素を保有するものもある(*Postia placenta*)<sup>36)</sup>。一方, 当然のことかもしれないが, 菌体重量とシュウ酸集積量とは逆に培地内の溶存酸素濃度は減少し, 10%以下まで落ち込むが, 子実体形成の進行とともに回復し, 初期酸素濃度(20%)よりは若干低いところで落ち着く。以上, 生理学的に見て培養初期の栄養菌糸の成長, シュウ酸合成と酸素吸収とはよく相関している。

木材保護の観点で重要なことはやはり, 初期腐朽の防止がネックであり, 建造物にきのこ(子実体)が発生した場合, 手遅れといわねばならない。しかし, 腐朽の最終段階と見なされる子実体形成の生理学を生化学レベルで探求することは, 担子菌類の代謝生理学の全体像を把握する上に重要であろう。

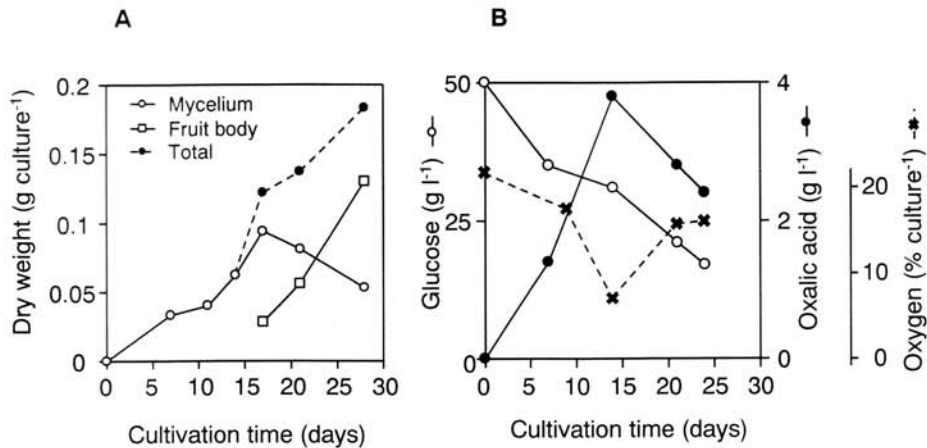


図7 オオウズラタケ子実体形成期間における菌体および子実体重量変化(A)とシュウ酸集積量, グルコースの消費量, 培養液内の酸素濃度変化(B)との関係<sup>36)</sup>。

## 9. おわりに

木材腐朽菌の代謝生理学の観点から、現在関心を集めている3つの課題、すなわち、銅耐性発現のメカニズムとリグニンとセルロースに及ぼすラジカルの生分解反応のメカニズムを概観し、腐朽菌類の代謝物であるシュウ酸をキーワードとして腐朽メカニズムの考察を試みた。銅耐性問題の歴史は古い、褐色腐朽菌の銅耐性にはやはりシュウ酸が深く関わっていることが再確認された。また、白色腐朽菌によるリグニン分解系と褐色腐朽菌によるセルロース分解系にはシュウ酸のほかに各種の代謝物（ペラトリルアルコール（VA）、DMHQ, 1,7-nonadecadien-2,3-dicarboxylic acid, アントラニル酸, グリオキサール, 不飽和脂肪酸など）が関与するのみならず、共存する金属イオンの種類、酸素と過酸化水素の供給系によっても反応系が微妙に影響をうけることがわかってきた。さらに、栄養に乏しい木材を食べる腐朽菌キノコがシュウ酸を生理的に産生する必然性は、第一義的にはTCAとGLOX回路と連携してエネルギーを獲得するためであることがわかったが、その代謝物をさらに自己防衛（銅耐性など）や木材分解反応に活用していることはまさにキノコの英知である。

木造家屋などの保全・保護の観点からすれば、木材防腐剤の開発はfail and safe機構、「予防学」の一環として位置付けられるが、やはり不慮の被害に備えて菌類の代謝生理に基づいた高選択的で環境に調和する試薬を開発することも重要な課題であろう。

本総説では、特に言及はしなかったが、その他の成書と文献を参考にしたので付記する<sup>59)~63)</sup>。

### 謝辞：

オオウズラタケ子実体形成に関する資料・情報を提供して戴いた東京農業大学檜垣宮都教授と韓国林業研究院李東治博士に深謝する。

本研究は文科省科学研究費補助金基盤研究(B)(2)(課題番号13556024)の一環としてまとめたものである。

### 参考文献：

- 1) Shimada, M., Akamatsu, Y., Ohta, A. and Takahashi, M. : IRG Documents, IRG/WP 1472(1991).
- 2) Akamatsu, Y., Ma, D. B., Higuchi, T. and Shimada, M. : FEBS Letters, 269, 261-263 (1990)
- 3) Munir, E., Hattori, T., and Shimada, M. IRG Documents, 10394 (2001)
- 4) Munir, E. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 11126-11130 (2001)
- 5) 岩本頼子：木材保存, 23-, 296-299 (1997)
- 6) Cowling, E. B., Merrill, W. : Can. J. Botany, 44, 1539-1545 (1952)
- 7) 高橋旨像：きのこと木材（築地書店）pp.141 (1989)
- 8) Highley, T. L. and Murmanis : L. Holzforschung, 39, 73-78 (1985)
- 9) Cowling, E. B. : US Department Agri. Techn. Bull. No. 1258pp 1-79 (1961)
- 10) Sutter, H. P. and Jones, G. E. B. : Rec. Annu. Conv. Br. Wood Preserv. Association, pp. 29-41 (1985)
- 11) Sutter, H. P., Jones, G. E. B. and Walchili, O. : Material und Organismen, 18, 241-262 (1983)
- 12) Green, F. and Clausen, C. A. : IRG Document, IRG/WP 01-10388 (2001)
- 13) Tsunoda, K., Nagashima, K. and Takahashi, M. : Material und Organismen, 31, 34-44 (1971)
- 14) Doi, S., "Serpula lacrymans : Fundamental Biology and Control Strategies" (Eds., D. H. Jennings and A. f. Bravery) John Wiley & Sons Ltd. pp. 171-187 (1991)
- 15) Tomsett, A. B., in "Stress Tolerance of Fungi", pp.69-95, Ed. D. H. Jennings, Marcel Dekker, New York (1993)
- 16) Anguilar, C. urzua. U., Koenig, C., Vecuna, R. : Arh. Biochem. Biophys., 366, 275-282 (1999)
- 17) Hodgkinson, A. : "Oxalic Acid in Biology and Medicine" (Academic, London pp. 1-324 (1977)
- 18) Dutton, M. V. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 5-10 (1993)
- 19) Akamatsu, Y., Takahashi, M. and Shimada, M. : Mater. und Org., 28, 251-264 (1994)
- 19 a) 島蘭平雄, 林業試験場研究報告, No. 33,

- 393-397 (1951)
- 20) Popp, J. L., Kalyanaraman, B., and Kirk, T. K. : *Biochem J.* 29, 10475-10480 (1990)
- 21) Barr, D. P. and Aust, S. D. : *Environ. Sci. Technol.*, 28-79-87A (1994).
- 22) Khindra, A., Grover, T. A. and Aust, S. D. : *Environ. Sci. Technol.*, 29, 710-725 (1995)
- 23) Kersten, P. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2936-2940 (1990)
- 24) Urzua, U., Kersten, P. J., and Vecuna, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 68-73 (1998)
- 25) Watanabe, T., Koller, K. and Messner, K. : *J. Biotechnol.*, 62, 221-230 (1998)
- 26) Messner, K. and Srebotnik, F. : *FEMS Microbiol. Rev.*, 13, 351-364 (1994)
- 27) Enoki, et al. : *Chem. Letters*, 54-55 (2000).
- 28) Watanabe, T. et al. : *Eur. J. Biochem.* 267, 4222-4231 (2000)
- 29) 渡辺隆司 : 木材研究・資料, No. 36, 34-50 (2000)
- 30) Eggert C. et al. : *FEBS Letters*, 391, 144 - 148 (1996)
- 31) Temp, U. and Eggert, C. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 389-495 (1999)
- 32) Caron, D., Krivobok, S. and Murandi, F. S. : *Chemosphere*, 40, 91-97 (2000)
- 32 a) Koenig, J. W. : *Wood and Fiber*, 6, 66-80 (1974)
- 33) Schmidt, D. J., et al. : *Am. Wood Preserv. Assoc.*, 77, 157-164 (1981)
- 34) Hyde, S. M. and Wood, P. : *Microbiology* 143-259 (1997)
- 35) Kerem, Z., Jensen, K. A., and Hammel, K. E. : *FEBS Letters*, 446, 49-54 (1999)
- 36) Nakajima, S., et al. : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 811-812 (1976)
- 37) Paszczynski, A., et al. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 674-679 (1999)
- 38) Tanaka, N. et al. : *Wood Research*, 81, 8-10 (1994)
- 39) Xu, G. and Goodell, B. : *J. Biotechnol.*, 87, 43-57 (2001)
- 40) Green et al. : *Material und Oganismen*, 26, 191-213 (1992)
- 41) Akamatsu, Y., Takahashi, M., and Shimada, M. : *Mokuzai Gakkaishi*, 38, 495-500 (1992)
- 42) Akamatsu, Y. and Shimada, M. : *Phytochem.* 37, 649-653 (1994)
- 43) Tokimatsu et al. : *FEBS Letters*, 437, 117-121 (1998)
- 44) Kornberg, H. L. : *Biochem J.* 99, 1-11 (1966)
- 45) Lorenz, M. C. : *Nature*, 412, 83-86 (2001)
- 46) McKenny, J. D., et al. : *Nature* 406, 735-738 (2000)
- 47) Popov, V. N. et al. : *FEBS Lettees*, 440, 55-58 (1998)
- 48) Davis, et al. : *Biochim. Bioohys. Acta*, 1051, 276-278 (1990)
- 49) Munir, E. : et al., *J. Wood Sci.*, 47, 368-373 (2001)
- 50) Munir, E., Hattori, T. and Shimada, M. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 399, 225-231 (2002)
- 51) Munir, E., Hattori, T., and Shimada, M. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 576-581 (2002)
- 52) Ridout, B., "TimberDecay in Buildings", E & FN SPON, London, p 1-232 (1999)
- 53) 青島清雄 : 木材工業, 17, 579 (1962)
- 54) 菱田敦之 : 東京農業大学博士論文, pp 1-88 (1999)
- 55) Nobles, M. : *Can. J. Botany*, 43, 1097-1139 (1965)
- 56) Yoon, J. J., Hattori, T. and Shimada, M. : *IRG/WP Document*, Cardiff, England (2002)
- 57) Ruch, D. G., et al. : *Mycologia*, 83, 821-825 (1991)
- 58) Micales, J. A. : *Mater. und org.*, 29, 176-186 (1995)
- 59) 田中裕美 : 木材保存, 24, 2-15 (1998)
- 60) 福田清春 : 木材研究・資料, No. 36, 1-16 (2000)
- 61) 屋我嗣良, 河内進策, 今村祐嗣 : 保存・耐久性 (木材科学講座12) 海星社 (1997)
- 62) 井上嘉幸 : 木材保護化学, 内田老鶴園新社 (1969)
- 63) 真宮靖治編 : 森林保護学 (現代の林学 7) 文永堂出版 (1992)
- (2002. 3. 27受理)