

# 木材腐朽担子菌類におけるシュウ酸の酵素的生成と分解

福井県総合グリーンセンター

赤松 やすみ

## 1. 白色腐朽菌と褐色腐朽菌

木材腐朽菌（真菌類）による木材の腐朽型は、褐色腐朽、白色腐朽および軟腐朽の3型に区分され、それぞれの腐朽型を生ずる菌を褐色腐朽菌、白色腐朽菌、軟腐朽菌と呼んでいる。このような区分は、腐朽の進展した木材の外見的特徴から名付けられたものであるが、ある菌の腐朽型は攻撃する樹種や条件に関係なく、遺伝的形質にもとづいた不変なものであるとされている。<sup>1)</sup>

白色腐朽菌と褐色腐朽菌とを比較すると、両者ともに木材細胞壁を構成するセルロースとヘミセルロースを分解するが、前者はリグニンを分解するが後者は完全には分解しないという相違がある。<sup>2), 3)</sup> 両者を区別する最も古い生化学的方法として、パーベンダム反応がある。没食子酸やタンニン酸を添加した寒天培養基上に木材腐朽菌を培養すると、白色腐朽菌は培養基上に褐色の酸化帯を形成するが、褐色腐朽菌は形成しない。約210種の腐朽菌について試験した結果、パーベンダム反応が木材の腐朽型とほぼ一致することが報告されている。<sup>4)</sup>

## 2. 木材腐朽担子菌類によるシュウ酸の集積

シイタケなどの担子菌類によるシュウ酸の集積に関しては、古くから研究されて来た。<sup>5)</sup> また島蘭らは、約40種の木材腐朽菌を培養しシュウ酸の集積量を調べた結果、シュウ酸集積とパーベンダム反応がほぼ一致することを報告した。<sup>6)</sup> すなわち、褐色腐朽菌はその培養液に2次代謝物としてシュウ酸を集積するのに対し、白色腐朽菌は集積せず、その理由は白色腐朽菌はシュウ酸分解酵素系の1つであるシュウ酸脱炭酸酵素を保有するが、褐色腐朽菌は保有しないことで説明されている。<sup>7)</sup>

## 3. 褐色腐朽菌による木質多糖類の分解とシュウ酸の役割

白色腐朽菌、褐色腐朽菌では、腐朽にともなうセルロース重合度の低下の様子に大きな相違がある。白色腐朽菌は腐朽の全期間を通じて比較的緩慢に重合度を低下させるが、褐色腐朽菌は腐朽のごく初期で急激に低下させることが報告されている。<sup>8)</sup> この褐色腐朽材での重合度の急激な低下のメカニズムについて、いくつかの可能性が提案されている。その1つは、シュウ酸により木材中の鉄を還元し、同時に生産した過酸化水素とあわせて強力な酸化剤（水酸化ラジカル）をつくり、セルロース分子の急速な解重合を行っているのではないかとされている。<sup>9)</sup> 一方、シュウ酸溶液は低濃度でも強い酸性を示すことから、褐色腐朽の過程で木材中に分泌されたシュウ酸がセルロースやヘミセルロースを加水分解するという可能性も提案されている。<sup>10), 11)</sup>

木材腐朽におけるシュウ酸の役割については、まだ明らかにされていないが、シュウ酸の生合成と分解は木材腐朽担子菌の重要な生理学的特徴であり、そのメ

カニズムについて研究し、シュウ酸代謝の生化学的意味を総合的に考察することは木材保存学上も重要と考えられる。

#### 4. シュウ酸合成酵素系

シュウ酸生成を触媒する酵素として、オキサロ酢酸加水分解酵素（オキサロアセターゼ）<sup>12)</sup>とグリオキシル酸酸化酵素（グリオキシレートオキシダーゼ）<sup>13)</sup>の2つの酵素を木材腐朽担子菌から初めて抽出した。

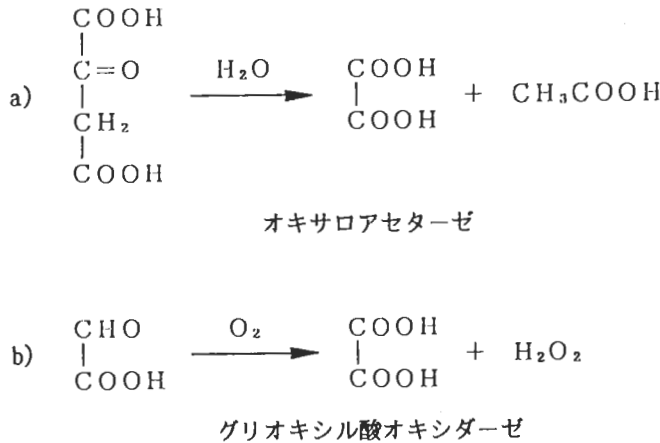


図1 シュウ酸生成を触媒する2つの酵素系

##### (1)オキサロアセターゼ

本酵素はオキサロ酢酸を加水分解しシュウ酸と酢酸を生成する反応を触媒する(図1)。褐色腐朽菌オオウズラタケのオキサロアセターゼの調製条件を検討したところ、抽出用緩衝液には50mMメルカプトエタノールを含むリン酸カリウムを使用することが重要であった。振とう培養より静置培養の方が、高い酵素活性の標品が得られた。酵素を抽出する前に培養液をアルカリ性にすることによって、酵素活性が顕著に増大した。<sup>14)</sup>

さらにオオウズラタケの無細胞抽出液中のオキサロアセターゼ活性に及ぼす影響因子を検討した。<sup>15)</sup> 最適 pHは、イミダゾール緩衝液では6.5、ホウ酸緩衝液では8.1 付近に見いだされた。金属イオンの酵素活性に及ぼす効果を調べたところ、反応液にMn<sup>2+</sup>を添加すると活性は約3倍増加し、最も効果的であった。本酵素は基質としてオキサロ酢酸を利用するが、他のケト酸を利用できず、高い基質特異性をもつことがわかった。Lineweaver-Burk プロットから、オキサロ酢酸に対するKm値は約0.8mMと算出された。オオウズラタケの培養期間中の本酵素活性は、シュウ酸の集積量と平行して増加したが、活性が減少してもシュウ酸の集積量は増加し続けたので、本酵素以外のシュウ酸合成酵素が関与している可能性が示唆された。

7種の木材腐朽菌から本酵素の抽出を試みた。白色腐朽菌カワラタケやPhane-

*rochaete chrysosporium*にも活性が見いだされた。<sup>16)</sup>

## (2) グリオキシル酸酸化酵素

図1に示すように、グリオキシル酸酸化酵素はグリオキシル酸を酸化してシュウ酸を生成する反応を触媒する。オオウズラタケの菌糸体から本酵素を調製するために、抽出前に培養液をアルカリ性にするこの効果を調べた。培養4日目にはアルカリ処理を行わなくても活性が発現したが、培養液のpHが低下した培養7日目にはアルカリ処理をすることによって活性な酵素標品が得られた。確実に活性の高い酵素を得るためには、この処理が必須であることがわかった。オオウズラタケの培養期間中のシュウ酸と本酵素活性の変動を調べた。本酵素の活性はオキサロアセターゼよりやや遅れて発現したが、7日目にピークとなり、活性の増加とシュウ酸集積量の増加は平行関係にあった。<sup>17)</sup>

さらに酵素の性質を解明するため部分精製を行った。硫酸分画、DEAE-Biogel A、Sephadex G-100を用いて60倍まで精製した。<sup>18)</sup> 本酵素の分子量は、ゲルろ過クロマトグラフィー的に約127,000と算出された。また本酵素の基質としては、グリオキシル酸が最も有効であり、その他の基質類縁化合物に対してはほとんど作用せず、高い基質特異性を有した。グリオキシル酸に対する  $K_m$  値は、3.7mMと算出された。本酵素は基質酸化の際、分子状の酸素を電子受容体として利用し、過酸化水素を生成することを証明した。また生成物であるシュウ酸が本酵素反応を強く阻害し、 $K_i$  値は50 $\mu$ Mと算出された。グリオキシル酸の酵素的酸化に及ぼす電子受容体の効果を調べたところ、 $NAD^+$ 、 $NADP^+$  は利用されなかった。以上述べたように、本酵素は①酸素を受容体として利用し過酸化水素を生成する。② $NAD^+$ 、 $NADP^+$  を利用しない。③グリオキシル酸に高い基質特異性を有する。という3つの特徴を有する。これら3条件を満たす他のグリオキシル酸酸化酵素の例は未報告である。

7種の木材腐朽菌について活性を比較したところ、オオウズラタケが最大の活性を示した。カワラタケ、*P. chrysosporium* 及びマツオオジも活性を示した。<sup>17)</sup>

## 5. シュウ酸分解酵素系

シュウ酸分解を触媒する酵素として、木材腐朽菌ではエノキタケからシュウ酸脱炭酸酵素が発見されており、この酵素は白色腐朽菌には存在するが褐色腐朽菌には存在しないと報告されている。<sup>7)</sup> 最近、筆者らは新しいタイプのシュウ酸分解酵素系を発見した。<sup>19)</sup> *P. chrysosporium* から分離されたりグニン分解酵素の1つであるリグニンペルオキシダーゼ (LiP) /ベラトリルアルコール (VA) / $H_2O_2$ 系が、シュウ酸を二酸化炭素に分解することを見いだした。その反応のメカニズムを図2に示した。VA基質 (I) からベラトルアルデヒド (III) を生じるリグニンペルオキシダーゼ反応において、その中間体であるVAカチオンラジカル活性種 (II) が、シュウ酸の還元作用によって還元され、その結果、みかけ上 LiP 活性が非競争的に阻害されているものと解釈される。

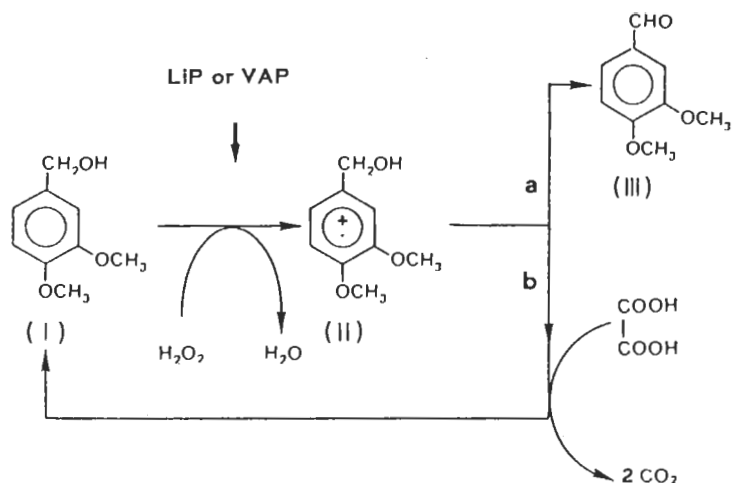


図2 リグニンペルオキシダーゼ系によるシュウ酸分解機構

このように、LiP系で生成されるVAカチオンラジカルがシュウ酸によって還元されると、リグニン分解活性が阻害されることになる。したがって、リグニン分解の場におけるシュウ酸のレベルが高くなればリグニン分解は抑制されてしまうので、白色腐朽においては、リグニン分解に関連してシュウ酸脱炭酸酵素やリグニン分解酵素系によるシュウ酸分解が重要であると考えられる。

## 文 献

- 1)高橋旨象：“きのこと木材”、築地書館、141pp (1989).
- 2)川瀬清：北海道大学農学部演習林研究報告、19(2), 1 (1958).
- 3)Kirk, T.K. :*Ann. Rev. Phytopathol.*, 9, 185 (1971).
- 4)Davidson, R.W. and Campbell, W.A. :*J. Agricul. Res.* 57, 683 (1938).
- 5)坂口謹一郎、他：日本農芸化学会誌, 33, 393 (1931).
- 6)島菌平雄, 田窪健次郎：林業試験所研究報告, No.53, 117 (1952).
- 7)Shimazono, H. :*J. Biochem.* 42, 321 (1955).
- 8)Cowling, E.B. :*US Department Agri. Techn. Bull.* No.1258, 1 (1961).
- 9)Schmidt, C.J., Whitten, B.K., and Nicholas, D.D. :*Amer. Wood-Pres. Assoc.* 77, 157 (1981).
- 10)Green, F. III, Larsen, M.J., Winandy, J.E., and Highley, T.L. :*Material und Organismen.* 26, 191 (1991).
- 11)Shimada, M., Akamatsu, Y., Ohta, A., and Takahashi, M. :*Internat. Res. Group on Wood Preserv., Doc. No. IRG/WP/1472* (1991).
- 12)Akamatsu, Y., Ohta, A., Takahashi, M., and Shimada, M. :*Mokuzai Gakkaishi.* 37, 575 (1991).

- 13) Akamatsu, Y. : *Mokuzai Gakkaishi*. 39, 860 (1993).
- 14) Akamatsu, Y., Takahashi, M., and Shimada, M. : *Mokuzai Gakkaishi*. 38, 495 (1992).
- 15) Akamatsu, Y., Takahashi, M., and Shimada, M. : *Mokuzai Gakkaishi*. 39, 352 (1993).
- 16) Akamatsu, Y., Takahashi, M., and Shimada, M. : *Wood Research*. 79, 1 (1993).
- 17) Akamatsu, Y., and Shimada, M. : *Mokuzai Gakkaishi*. 41(2) (1995, in press).
- 18) Akamatsu, Y., and Shimada, M. : *Phytochem*. 37, 649 (1994).
- 19) Akamatsu, Y., Ma, D.B., Higuchi, T., and Shimada, M. : *FEBS Lett*. 269, 261 (1990).