

論文内容の要旨

氏名	金子 昌平
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農 第 7 6 号
学位授与の日付	平成 16 年 9 月 11 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Mechanism of wood decay by brown-rot fungi 褐色腐朽菌による木材分解機構に関する研究
論文審査委員 (主査)	教授 榎 章 郎
(副主査)	教授 岡 本 忠
(副主査)	教授 寺 下 隆 夫

菌類による木材腐朽はその腐朽の様式に従って、白色腐朽、褐色腐朽、軟腐朽の 3 つに大別される。白色腐朽と褐色腐朽は担子菌により、軟腐朽はきのう菌および不完全菌によって生じる。それぞれの腐朽形態を行う菌を白色腐朽菌、褐色腐朽菌および軟腐朽菌と呼ぶ。白色腐朽菌は一般に菌糸が木材細胞内腔において、二次壁内層→二次壁中層→二次壁外層→細胞間層へと内側から全ての細胞構成成分(セルロース、ヘミセルロース、リグニン)を分解代謝しながら腐朽を進行させる。ある種の白色腐朽菌は木材細胞壁中のリグニンを選択的に分解・除去する。白色腐朽菌は木材細胞壁中のリグニンを選択的に分解・除去しながら腐朽を進行する。したがって白色腐朽材の外観は白っぽくなる。軟腐朽は木材細胞壁の二次壁中層に小さな空洞(cavity)を形成する Type 1 と内腔で二次壁内層に接触する菌糸が二次壁内層を溶融(erosion)して凹みを生じる Type 2 の二つの腐朽タイプがある。軟腐朽菌は木材細胞壁中の多糖類(セルロース、ヘミセルロース)を選択的に分解・代謝する。しかしリグニンも少しではあるが確実に分解する。褐色腐朽菌は一般にセルロースの結晶構造に作用して加水分解する exo-1,4-glucanase を欠くにもかかわらず、木材細胞壁中のセルロースを選択的に分解・代謝する。しかしリグニンも少量ではあるが、確実に分解する。菌糸は木材細胞壁内腔に存在して、菌糸から離れた二次壁中層内の多糖類を選択的に分解するのが一般的な褐色腐朽様式である。褐色腐朽においては、木材質量減少率が 10%程度になると、木材細胞壁中に残存しているセルロースの平均分子量は健全材のその約 4 分の 1 程度に激減する(すなわち分裂して短くなったセルロース鎖の大部分は代謝されずに残存している)。したがって褐色腐朽が進行すると、腐朽材は褐色化するとともに、表面に縦横の亀裂が入り、その強度は急激に減少する。

以上のことから、褐色腐朽菌は木材を腐朽する際、水酸化ラジカルを菌糸から離れた木材細胞壁で生成し、これで細胞壁中のセルロースの結晶構造を壊し、endo-1,4-glucanase の通路を形成し、無定形になったセルロース領域を endo-1,4-glucanase で加水分解するものと推論し以下の実験を行った。供試菌として褐色腐朽菌に分類されている *Gloeophyllum trabrum*, *Tyromyces palustris*, *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*, *Postia placenta*, *Daedalea dickinsii*, *Lentinus lepideus*, *Coniophora puteana* の 7 種類を用いた。これらの菌のろ紙とリグニンの分解速度は木材を炭素源とする培地(木粉培地)およびグルコースを炭素源とする培地(グルコース培地)で測定した。さらに木粉培地とグルコース培地でこれら

の菌が生成する水酸化ラジカル量を経時的に測定した。褐色腐朽ではシュウ酸が木材分解に重要な働きをしているという説も提唱されているので、両培地に蓄積しているシュウ酸量を経時的に測定した。キチリメンタケ、オオウズラタケ、マスタケおよび *P. placenta* の4種類の菌は木材を褐色腐朽した。すなわち木材中の多糖類を選択的に分解・除去した。そして木粉培地では、大量の水酸化ラジカルを生成し、ろ紙およびリグニンモデル化合物を分解した。水酸化ラジカル生成量と木材、ろ紙およびリグニン分解速度は比例した。キチリメンタケは木粉培地とグルコース培地の両培地において、水酸化ラジカルを大量に生成し、3種類の基質のすべてをよく分解した。しかしオオウズラタケ、マスタケおよび *P. placenta* はグルコース培地では、水酸化ラジカルをほとんど生成せず、ろ紙およびリグニンモデル化合物をほとんど分解できなかった。これら4種の菌の培地における水酸化ラジカル生成速度はその培地における木材、ろ紙およびリグニンモデル化合物の分解速度と比例した。しかしそれらの培地中のシュウ酸の蓄積量と3種の基質の分解速度とは反比例した。ホクロタケとマツオウジは両培地で水酸化ラジカルをほとんど生成せず、3種の基質もほとんど分解しなかった。*P. placenta* は、両培地において、水酸化ラジカルを極少量しか生成せず木材とリグニンモデル化合物をほとんど分解しなかった。しかし7種の菌のうちで *P. placenta* が1番速い速度でろ紙を分解した。*P. placenta* は強い Avicelase 活性と CMCCase 活性を示したが、Avicelase 活性はほとんど示さなかった。7種の菌すべてがフェノールオキシダーゼ活性を示さなかった。したがって、*P. placenta* は褐色腐朽菌ではなく、強いセルロース分解力をもつが、リグニン分解力を持たず、したがって木材を分解できないトリコデルマやフサリウムなどの菌に属すると考えられる。以上の結果は、褐色腐朽菌が木材や結晶性セルロースを分解する際には必ず大量の水酸化ラジカルを生成し、これでセルロースの結晶構造を壊すことを示唆している。

著者は、すでに以下の事実を明らかにしていた。(1)日本の代表的褐色腐朽菌オオウズラタケは、木材を腐朽する際には必ず分子量が1,000~5,000(ゲルろ過法による)の低分子物質を細胞外に分泌する。(2)この低分子物質は酸素分子と電子供与体間の酸化・還元反応を触媒して、水酸化ラジカルを生成する。(3)この低分子物質は、木材腐朽の初期に内腔から二次壁中層に拡散・浸透する。そこで次に、オオウズラタケの分泌する水酸化ラジカル生成低分子物質を分

離・精製し、その物理化学的性質を解明する目的で以下の実験を行った。木粉培地にオオウズラタケを植菌した。30日培養後、培養培地に水を加えて、菌体外分泌物質を水抽出した。この水溶液にアセトンを加え(70%V/V)、生じた沈殿物を回収した。このアセトン沈殿物を Sephadex G-50 と G-25 とを用いて gel filtration chromatography、ついで DEAE Sepharose ion-exchange chromatography を行い、酸素分子と NADH の間の酸化・還元反応を触媒して水酸化ラジカルを生じさせる低分子物質 (Mw 1,000~5,000) を分離した。この低分子物質は Tricine-SDS-PAGE では分子量が 7,200~10,000 のところにバンドを示した。この物質は 54%のタンパク質と 42%の中性糖よりなっていた。Fe(II)を 0.06% (W/W) 含んでいた。この糖-ペプチド 1mg は 1.7  $\mu$ mol の Fe(III)を Fe(II)に、1.3  $\mu$ mol の Cu(II)を Cu(I)に還元した。アルデヒド基はほとんど含んでいなかった。またこの糖-ペプチド 1mg は 0.6  $\mu$ mol のカルボニル基を、そして少なくとも 0.5  $\mu$ mol 以上の 1-amino-2-ketoses を含んでいた。以上の結果から低分子物質はペプチドの遊離のアミノ基が糖のアルデヒド基とグリコシド結合したアマドリ化合物であることがわかった。アマドリ結合は糖-ペプチド 1mg 当たり少なくとも 0.5  $\mu$ mol のアマドリ結合を含んでいる。そして糖-ペプチド中に存在するエン・ジオール構造が酸素分子を過酸化水素に、Fe(III)を Fe(II)に還元し、生じた過酸化水素と Fe(II)がフェントン反応で水酸化ラジカルを生じるものと結論した。

以上の結果に基づいて、褐色腐朽菌による木材腐朽機構は以下のようなものであると結論した。木材細胞内腔にいる菌糸が内腔でアマドリ結合を持つ糖-ペプチドを分泌する。この糖-ペプチドは二次壁内層から中層、外層、細胞間層に浸透・拡散する。そこで Fe(III)を Fe(II)に還元し、吸着するか、あるいは二次壁内層に浸透する前に Fe(III)を Fe(II)に還元し、吸着し細胞壁内に浸透・拡散する。細胞壁内で、Fe(II)を吸着した糖-ペプチドは酸素分子とある種の電子供与体間の酸化還元反応を触媒し、水酸化ラジカルを生成する。生じた水酸化ラジカルは周囲のセルロースの結晶領域および非晶領域に作用して、セルロースを脱重合する。またリグニンを攻撃して種々の化学反応を行う。これらの過程は細胞壁を変形して、二次壁内層から中層に通じる酵素の通路を形成する。Endoglucanases 等の酵素がこの通路を通して二次壁中層に拡散してきて、水酸化ラジカルによって生じたセルロースの非晶領域やヘミセルロースに作用して加水分解する。

## 論文審査結果の要旨

褐色腐朽は以下の特徴をもつことが明らかにされていたが、その腐朽機構については長いあいだ謎であった。褐色腐朽菌は一般にセルロースの結晶構造に作用して加水分解する *exo-1,4-glucanase* を欠くにもかかわらず、木材細胞壁中のセルロースを選択的に分解・代謝する。その際多糖類の分解量に比べればはるかに少量ではあるがリグニンも確実に分解・除去される。褐色腐朽菌は木材を腐朽する際、菌糸は木材細胞壁内腔に存在して、菌糸から離れた二次壁中層内の多糖類を選択的に分解するのが一般的な腐朽様式である。褐色腐朽においては木材質量減少率が10%程度になると、腐朽が進行している木材細胞壁中に残存しているセルロースの平均分子量は健全材のその約4分の1程度に激減する(すなわち分裂されて短くなったセルロース鎖の大部分は代謝されずに木材細胞壁中に残存している)。したがって褐色腐朽が進行すると、腐朽材は褐色化するとともに、材表面に縦横の亀裂が入り、その強度は急激に減少する。

以上の褐色腐朽の特徴から、本論分は褐色腐朽菌が木材を腐朽する時は、水酸化ラジカルを菌糸から離れた木材細胞壁中で生成し、これで細胞壁中のセルロースの結晶構造を壊し、さらにリグニンの高次構造を壊し、*endo-1,4-glucanase* の通路を形成し、無定型になったセルロース領域を *end-1,4-glucanase* で加水分解するという機構を仮定している。そして褐色腐朽菌とみなされている七種類の担子菌を用いて、水酸化ラジカル生成量と木材分解量、結晶性セルロース分解量およびリグニン分解量を種々の条件下で測定している。さらに褐色腐朽でシュウ酸が木材分解に重要な働きをしているという説が提唱されていたので、培地中のシュウ酸蓄積量も測定している。そして褐色腐朽菌とみなされている担子菌の水酸化ラジカル生成量と木材分解量、ロ紙分解量およびリグニンモデル分解量は比例する結果を得ている。水酸化ラジカルをほとんど生成しない場合は、木材、ロ紙およびリグニンモデル化合物を分解できない事を証明している。またシュウ酸の培地中での蓄積量は水酸化ラジカル生成量と反比例する結果から、生成されたシュウ酸は水酸化ラジカルによって分解されて、木材分解に直接には関与していないことを明らかにしている。

つぎに本論分は日本の代表的褐色腐朽菌、*Tyromyces palustris* (オオウズラタケ)を用いて、水酸化ラジカルはこの菌が菌体外に分泌する分子量が5,000~10,000の糖一ペプチドによって生成されることを明らかにしている。そしてこの糖一ペプチドをオオウズラタケの培地から分離・生成し、その物理・化学的性質について検討している。この糖一ペプチドは0.6%のFe(II)を含み、酸素分子をO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を経て・OHまで還元することを明らかにしている。さらにこの糖一ペプチド1mgは1.7μmolのFe(III)をFe(II)に、1.3μmolのCu(II)をCu(I)に還元すること、少なくとも0.5μmolの1-amono-2-ketosesを持ってい

ることを明らかにしている。以上の結果からこの低分子糖一ペプチドはペプチドの遊離のアミノ基が糖のアルデヒド基とグリコシド結合したアマドリ化合物であり、

アマドリ結合がエン・ジオール構造をとり、このエン・ジオール構造が酸素分子を過酸化水素に、Fe(III)をFe(II)に還元し、生じた過酸化水素とFe(II)がフェントン反応で水酸化ラジカル生じるものと結論している。

以上の結果に基づいて、本論分は褐色腐朽菌による木材腐朽機構を以下のようであると結論している。木材細胞内腔に存在する菌糸がアマドリ結合を持つ糖一ペプチドを菌体外に分泌する。この糖一ペプチドは二次壁内層から、中層、外層、細胞間層に浸透・拡散する。そこでFe(III)をFe(II)に還元し、吸着するか、あるいは二次壁内層に拡散する前にFe(III)をFe(II)に還元し、吸着し、細胞壁内に浸透・拡散する。細胞壁内で、Fe(II)を吸着した糖一ペプチドは酸素分子とある種の電子供与体の間の酸化還元反応を触媒し、水酸化ラジカルを生成する。生じた水酸化ラジカルは周囲のセルロースの結晶領域および非晶領域に作用して、セルロースを脱重合する。またリグニンを攻撃して種々の化学反応を行なう。これらの過程で細胞壁は変形し、二次壁内層から中層に通じる酵素の通路が形成される。そして、*endo-1,4-glucanase* 等の酵素がこの通路を通じて二次壁中層に拡散して、水酸化ラジカルによって生じたセルロースの非晶領域やヘミセルロースを選択的にグルコースにまで加水分解する。本論分は以上のごとく、長い間謎であった褐色腐朽機構を見事に解き明かしている。

よって、本論分は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成16年7月26日、農学研究科委員会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。