リグニン生化学研究 40 年の回顧—藤原賞受賞にあたって

日本大学農獣医学部 樋 口 隆 昌

Retrospective Review of My 40 Years Research Works on Lignin Biochemistry—On the Occasion of Receiving of Fujiwara Award

Takayoshi Higuchi

Professor of Nihon University, Professor Emeritus of Kyoto University

1. ま え が き

この度、私のリグニンの生化学に関する長年の研究に対して栄えある藤原賞を頂く事ができ、藤原財団、藤原賞選考委員、またこの研究を推薦して頂いた木材学会理事会の皆様深く感謝致します。藤原賞は王子製紙㈱の基盤を築かれた、藤原銀次郎翁によって昭和34年に設立され、毎年、物理・数学、工学、化学、医学、生物、農学の5部門の応募者から優れた業績をあげた科学者2人に贈呈される事になっています。賞の設立者が近代製紙産業の先覚者であった事から、この賞については私なりの思い入れがあり、木材化学のような地味な分野であっても、学問的に優れた内容であれば、将来、受賞の対象になりうるであろうと考えていました。それだけにこの度の受賞に対しては、光栄に思うとともに賞の重さとその責任を痛感しております。受賞にあたって紙パルプ技術協会から、研究生活を振り返ってエピソードなどを交えた原稿を頂きたい旨依頼を受けましたので、私の40年に亘る木質、特にリグニンの生化学の研究を回顧してみたいと思います。

なお今回の受賞の対象になった研究は岐阜大学、京都大学を通じて先輩の諸先生によるご指導、研究室の同僚、大学院及び学部学生の皆さんによる献身的なご協力によるもので心から感謝しております。

2. 生 い 立 ち

私は父が帝室林野局に務めていた関係で少年時代を長野県の本曾で過ごしました。樹齢200年にも及ぶ素

略歴

昭和25年 3月 名古屋大学理学部生物学科卒業
 昭和25年 3月 岐阜大農学部助手
 昭和28年 10月 岐阜大農学部講師
 昭和35年 1月 岐阜大農学部助教授
 昭和42年 4月 岐阜大農学部教授
 昭和43年 4月 京都大学木材研究所教授
 昭和53年 5月 京都大学木材研究所長・京都大学
 昭和59年 5月 評議員
 昭和63年 4月 京都大学木材研究所長・京都大学
 平成 3年 3月 評議員
 平成 3年 3月 京都大学名誉教授

平成 3年 4月 日本大学農獣医学部教授

昭和35年 9月 カナダ国立平原地方研究所客員
 昭和37年 9月 研究員
 昭和38年 9月 グルノーブル大学理学部客員教授
 昭和39年 10月 国際木材科学アカデミー会員
 昭和45年 6月 同副会長
 昭和62年 6月 同会長
 平成 2年 6月 グルノーブル大学名誉理学博士
 昭和62年 1月 米国科学アカデミー外国人会員
 平成 3年 4月

晴らしい檜の神宮備林に囲まれ、子供心に大木の存在感と美しさに感動しておりました。昭和 23 年、名古屋大学理学部に入学して植物生理学を専攻し、植物組織学の実習で、樹木の若い枝の切片にフロログルシン—塩酸溶液を滴下し、赤紫色に染色された木部組織をスケッチしながら、木部母細胞の分裂によって木は年々太くなり、1,000 年にも亘って樹高 100 メートルにも成長することに不思議な感動を覚えておりました。昭和 25 年、大学を卒業と同時に岐阜大学林学科林産化学研究室、川村一次先生の助手に採用され、リグニンの研究をする事になりました。当時は真に大らかなもので、卒業式の当日（3 月 17 日）付けで岐阜大学助手の辞令をもらいました。しかし当時、新製の岐阜大学農学部林学科には助手が私一人だけだったので、川村先生ばかりでなく、木材物理の矢沢亀吉先生のブナ材の防腐・防虫試験、心材形成の研究などのお手伝いもし、学生実習などもありましたので、真に充実した日々であったと記憶しております。

表 1 に岐阜・京都大学時代を通じて 40 年間の主な研究課題を 6 つに整理して示してあります。

3. 岐阜大学での研究

表 2 は岐阜大学時代の主な研究課題を整理したものです。

理学部の生物学科を卒業した後の私にはリグニンの

化学についての知識はほとんどありませんでしたので、先ずリグニンについての総説や解説を読み始めました。当時、“化学の領域”に大阪大学工学部の八浜義和先生と岡部次郎博士が Freudenberg 教授によるリグニンの生合成の研究を詳しく紹介されました。私はこの内容に強い興味をおぼえ、こよう研究だったら大学で学んだ植物生理学とも関連があり、私にも研究できそ

表 1 リグニン研究 40 年（京都大学木材研究所 樋口隆昌）

-
- I. 木材腐朽菌によるリグニン分解の生化学
 - II. リグニンの生合成
 - (1) モノリグノールの脱水素重合に関する酵素
 - (2) リグニン生合成経路の解明
 - (3) リグニン生合成に関与する酵素
 - III. 心材形成の生化学
 - IV. リグニンの化学構造と反応性
 - (1) タケリグニン
 - (2) シリンギルリグニン
 - (3) リグニンサブストラクチャー化合物の合成
 - V. リグニンの微生物分解機構
 - (1) プロピル側鎖の分解
 - (2) 芳香核の開裂
 - (3) 酵素による側鎖及び芳香核の開裂
 - VI. 爆砕法による木質バイオマスの有効利用
-

表 2 岐阜大学時代の研究（1950—1967）

-
- I. 広葉樹リグニンの化学的性質
 - II. 1 木材腐朽菌の生化学的研究（I—V）1953—56
Bavendamm 反応に関与する酵素
腐朽材リグニンの化学的性質
 - III. 1 タケノコにおけるリグニンの生成（I—VII）1953—59
Biochemical studies of lignin formation（I—III）
（Physiologia Plantarum）
Studies on the biosynthesis of lignin 1959
（4th Intern. Congress Biochemistry, Vienna, Austria）
 - 1. The formation of shikimic acid by plants
 - 2. The formation of lignin building stone
 - 3. Dehydrogenative polymerization of lignin precursors
 - a. Phenol oxidase
 - b. Peroxidase
 - c. Yellow enzyme-peroxidase system
 - d. DHP
 - e. Formation of lignin from phenylpropanes by plant tissues
 - IV. 心材形成機構に関する研究（I—VI）1964—67
-

うな気がしてきました。それでリグニン生合成の研究を始める事にしたわけでありす。幸い名古屋大学理学部化学科での同級生、森本市郎博士が岐阜大学の教育学部化学科に赴任し、工学部にも名古屋大学化学科での1年後輩の井藤佳美君がおりましたので、有機化合物の分析・合成などについて協力してくれました。先ず井藤君の協力を得てコニフェリルアルコールの合成に掛かりました。その当時のリチウムアルミニウムハイドライドは粒状で乳鉢で粉末にしている時、火花がでたりして緊張した事を覚えています。ようやくコニフェリルアルコールを合成し、Freudenberg 教授の研究の追試から始めました。戦時中、火薬庫に利用していたトンネル（関ヶ原町）でマッシュルームを栽培している事を知り、早速、大型の魔法瓶を持って買いに行きました。マッシュルームからフェノールオキシダーゼ（酵素）を抽出し、コニフェリルアルコールの水溶液に加え、空気を送りながら攪拌しました。Freudenberg 教授の論文のとうり、しばらくして白色の沈殿が始め、DHP（コニフェリルアルコールの脱水素重合体）を作る事が出来ました。当時はこんな事にも新鮮な感動をおぼえました。ついでコニフェリルアルコールを脱水素するフェノールオキシダーゼの性質の解明にうつり、Freudenberg 教授の方法で調製したマッシュルームのフェノールオキシダーゼはチロシナーゼとラッカーゼの2種類からなり、子実体に多量に含まれているチロシナーゼではなく、ラッカーゼによってコニフェリルアルコールが脱水素重合される事を明らかにする事が出来ました。さらに高等植物のラッカーゼについて調べるため生漆を購入し、ラッカーゼを抽出して実験し、漆のラッカーゼもコニフェリルアルコールを DHP に転換出来る事を明らかにす

る事が出来ました。しかしラッカーゼは漆のような特定の植物にしかない事、コニフェリルアルコールは植物に広く分布しているペルオキシダーゼによっても DHP を生成する事を発見し、樹木ではリグニンはペルオキシダーゼの働きによって形成されるものと確信しました。

その後、微生物によってフェニルアラニン、チロシンがシキミ酸を経て合成される事、フェニルアラニンがリグニンに効率よく転換される事などがアメリカ、カナダで明らかにされてきました。この分野の研究は始まったばかりで、何時も最新のケミカルアブストラクト、バイオリジカルアブストラクトに目をとうしていましたが、とりあえずこれまでに得られた研究結果を3報に取り纏め、Biochemical studies of lignin formation I-III として Physiologia Plantarum に発表しました。この論文がウイーン大学 Kratzl 教授の目にとまり、1958 年 9 月、ウイーン大学で開かれた第4回国際生化学会でリグニンの生合成について講演するように招待されました。当時、私は英語もろくに話せませんでした、この国際学会に出席出来た事が私のそれからの研究のすべてを決定したように思います。写真1はバンケットで挨拶してられる当時リグニンの化学構造解明の先駆的研究を進めておられたハイデルベルグ大学の Freudenberg 教授。他にアメリカ、フォルダム大学の Nord 教授（左、中央）、ウイーン大学 Kratzl 教授（左、二人目）等が出席されています。私は同時 30 才、岐阜大学の講師でしたが、この国際学会に出席させて頂きこの分野を代表する一流の先生方による最先端の講演をきき、第一線の研究者に接する機会を得て貴重な体験をしました。また会の後にこれらの先生方の研究室を訪問し、先生方の研究に対する

写真 1 第4回国際生化学会（1958 年）バンケットでの Freudenberg 教授の挨拶

強い情熱を感じ、深い感銘を受けました。その後リグニンの研究についてこれらの研究者と密接な情報の交換が始まり、私のその後の研究に強い影響を与える事になりました。このようにしてリグニンの生合成と微生物分解機構の解明が私のライフワークになった訳であります。

4. カナダ・フランス時代の研究

表3はカナダ・フランス時代(1961~64)の研究課題を示したものです。

ウィーンの国際学会でカナダ、サスカツーン国立平原地方研究所(現在の植物バイオテクノロジー研究所)の Neish 博士におめにかかり、当時、放射性炭素 ^{14}C で標識したリグニン前駆物質を用い、リグニン生合成経路解明の研究を始めていた同研究所植物生化学部門の Brown 博士のもとで、リグニン生合成機構解明の研究を行う機会を得ました。その研究内容は放射性炭素 ^{14}C で標識されたリグニン前駆物質を合成して小麦に与え、モノリグノール生合成経路について研究したもので、Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon (X-XIII) として4編とも Can. J. Biochem. Physiol. に掲載されています。そのうち XII の論文は

「シナップ酸の生合成と代謝」でこの研究によって初めてフェルラ酸とシナップ酸の中間体として5-ヒドロキシフェルラ酸が存在し、広葉樹リグニンに特有なシリギルリグニン生合成経路がここから分岐する事が明らかにされてきたわけで、帰国後メチル基転移酵素の研究に発展していった私にとって思い出の多い研究であります。また1963~64年フランス、グルノーブル大学理学部 Barnoud 教授から招待を受け、当時 Barnoud 教授が研究していた樹木の組織培養を使って、リグニンの生合成について研究しました。グルノーブル滞在中、Barnoud 教授とともに企画し、グルノーブル大学で開かれた「セルロース、ヘミセルロース、リグニンの化学と生化学」の国際シンポジウムでも Freudenberg 教授、Kratzl 教授、Adler 教授等リグニン化学の著名な研究者にお会いする事ができ、私にとって忘れる事の出来ない思い出になっています。写真2はシンポジウムの会場で、ワシントン大学の McCarthy 教授(前列、左端)ハイデルベルグ大学の Freudenberg 教授(左、三人目)、スウェーデン Chalmers 工科大学の Adler 教授(前から3列目、左、四人目)、アメリカ林産研究所の Pew 博士、ウィーン大学の Gratzl 博士、Kratzl 教授(3列目、左、五、

表3 カナダ・フランス時代の研究(1961-64)

Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon (X-XIII) 1962-63

XII. The biosynthesis and metabolism of sinapic acid. Can. J. Biochem. Physiol., 41, 613 (1963)

Nature des lignines synthétisées dans les tissus végétaux cultivés *in vitro* (I-IV) 1964

Les lignines dans les tissus végétaux cultivés *in vitro* 1964 (Symp. Intern. Chimie et Biochimie Lignine, Cellulose, Hémicelluloses. Grenoble)

写真2 “セルロース、ヘミセルロース、リグニンの化学と生化学”
国際シンポジウム

六, 七人目) 等が出席されています。この学会で1958年ウィーンでの国際学会以降, リグニンの化学と生化学についてのその後の進歩がFreudenberg教授, Adler教授等によって発表されました。私も「植物培養組織中に生合成されるリグニン」の表題で発表を行いました。

5. 京都大学時代の研究

表4は京都大学時代(1968~1991)の研究の主な課題を示したものです。

カナダ国立平原地方研究所での研究で, モノリグノール生合成経路の概略が ^{14}C によるトレーサー実験によって解明されましたので, 帰国後, 岐阜時代の後半から昭和43年, 京都大学木材研究所(現, 木質科学研究所)に移ってからモノリグニン生合成に關与する酵素の研究を行ってきました。特にカフェー酸以後, フェルラ酸, シナップ酸生成に關与するメチル基転移酵素, これらのヒドロキシケイヒ酸類がモノリグノールに還

元される反応に關与するシナメート:CoA リガーゼ, シナミルアルコールデヒドロゲナーゼの解明に力を入れてきました。またモノリグノールの重・縮合過程での, リグニンと細胞壁多糖との結合, 稲科植物, ポプラ等に見られるp-クマール酸, p-ヒドロキシ安息香酸等の芳香族酸とリグニンとのエステル結合の生合成等についても研究しましたが, 特に針葉樹リグニンと広葉樹リグニンの生合成機構の差異を解明する研究に力を入れてきました。またリグニンの反応性を解明するため, リグニンサブストラクチャー2, 3量体の合成についても研究してきました。

表5は前の表の続きで, 京都時代の後半に力をいれてきたリグニンの微生物分解機構の解明, 特に白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium*, 及びカワラタケの培養菌体と同菌が生産する酵素によるリグニンサブストラクチャー化合物の側鎖及び芳香核の分解反応機構の解明の研究, 木質バイオマスの有効利用の前処理としての木材の水蒸気爆砕とその応用を示しています。

表4 京都大学時代の研究 (1968-1991)

II. 3.

Role of O-methyltransferase in lignification of bamboo Agr. Biol. Chem., 31, 1457 (1967)
O-methyltransferase involved in biosynthesis of lignin (1970)
Evidence for the formation of methoxyl groups of ferulic and sinapic acids in Bambusa by the same O-methyltransferase (1973)
Purification and properties of O-methyltransferase involved in the biosynthesis of gymnosperm lignin (1976)
Distribution and role of p-hydroxycinnamate : CoA ligase in lignin biosynthesis (1982)
Regulatory role of cinnamyl alcohol dehydrogenase in the formation of guaiacyl and syringyl lignins (1982)

IV.

Reaction of guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether with several sugars (I-II) 1976-79

IV. 1.

Ester linkages of p-coumaric acid in bamboo (I-IV) 1976-78
p-Hydroxyphenyl component of grass lignin (1971)
Acidolysis of bamboo lignin (I-III) 1972-73
Enzymatic dehydrogenation of p-coumaryl alcohol (I-IV) 1975-76

IV. 2.

Dehydrogenative polymer of sinapyl alcohol by peroxidase and hydrogen peroxide (1976)
Isolation and characterization of syringyl component-rich lignin (1978)

IV. 3.

Syntheses of 1,2-diarylpropane-1,3-diol,
guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether,
phenylcoumarans,
 β -O-4 trimer, β -5- β -1 trimer, β -O-4- β -1
trimer, β -O-4- β - β trimer etc.

表 5 京都大学時代の研究 (1968—1991)

- V.
- Degradation pathway of arylglycerol- β -aryl ethers by *P. chrysosporium*. Agric. Biol. Chem. (1983)
- Role of guaiacol in the degradation of arylglycerol- β -guaiacyl ether by *P. chrysosporium*. FEBS Lett. (1985)
- A novel C α -C β cleavage of a β -O-4 lignin model dimer with rearrangement of the β -aryl group by *P. chrysosporium*. FEBS Lett. (1985)
- Evidence for deuterium retention in the products after enzymatic C α -C β and ether bonds cleavage of deuterated lignin model compounds. Agric. Biol. Chem. (1985)
- V. 2.
- Aromatic ring cleavage of β -O-4 lignin substructure by *P. chrysosporium*. FEBS Lett. (1985)
- Aromatic ring cleavage of various β -O-4 lignin model dimers by *P. chrysosporium*. (1986)
- V. 3.
- Regiospecific oxygenations during ring cleavage of veratryl alcohol by lignin peroxidase. FEBS Lett. (1987)
- Aromatic ring cleavage of β -O-4 lignin substructure model dimers by lignin peroxidase. FEBS Lett. (1986)
- Formation of a muconate in aromatic ring cleavage of a β -O-4 lignin substructure model by lignin peroxidase. Agric. Biol. Chem. (1987)
- Mechanism of aromatic ring cleavage of β -O-4 lignin substructure models by lignin peroxidase. FEBS Lett. (1987)
- Cleavages of aromatic ring and β -O-4 bond of synthetic lignin by lignin peroxidase. FEBS Lett. (1989)
- Degradation mechanisms of phenolic β -1 lignin substructure model compounds by laccase of *C. versicolor*. Arch. Biochem. Biophys. (1988)
- Aromatic ring cleavage of 4,6-di-(tert)-butylguaiacol by laccase of *C. versicolor*. FEBS Lett. (1988)
- VI.
- Characterization of exploded wood (1983)
- Characterization and nutritional improvement of steam-exploded wood as ruminant feed. Cellulose Chem. Technol. (1985)
- Degradation mechanism of lignin by steam-explosion (I-IV) 1989—1991

以上、私の 41 年間にわたる研究の概略について述べましたので次に今回の藤原賞の対象になったリグニンの生合成と微生物分解の機構について簡単に説明致します。リグニンは芳香族高分子化合物で、220~280 nm の紫外線を吸収するため、紫外線顕微鏡によって木化の進行を観察する事が出来ます。しかしリグニンが樹木中でどのような反応を経て合成されてくるかについては、1950 年代になるまで不明でありました。主として Brown, Neish, 樋口等により 1950 年の後半から放射性炭素 ^{14}C で標識されたリグニン前駆物質によるトレーサー実験によって、モノリグノールの生合成経路が明らかにされてきました。図 1 の経路は植物に与え

た放射性化合物がリグニン中に取り込まれる率、それから化合物の生化学反応性、既知の生化学反応との関係などに基づいて決定されたもので、その後多くの研究者によって経路中の各反応を触媒する酵素が解明されてきました。1980 年代になってプリフェン酸からアロゲン酸を経由する L-フェニルアラニン、L-チロシンの生成反応が高等植物での主要な経路である事が Jensen 等によって発見され、Brown, 樋口等によって提案された経路が一部修正されましたが、その他の部分は始めの提案のままであります。この経路のうち糖から L-フェニルアラニン合成までに含まれる酵素は、微生物、高等植物に共通していますが、L-フェニルア

図 1 植物中におけるモノリグノール及びリグニン生合成経路

PAL, フェニルアラニンアンモニアリアーゼ, TAL, チロシニンアンモニアリアーゼ, O-Methyltransferase, メチル基転移酵素, Peroxidase, ペルオキシダーゼ

ラニンからモノリグノールまでの反応に関わる酵素はリグニン、フラボノイドの生合成など高等植物における二次代謝に特異的な酵素で、特にリグニン生合成の研究から発見されたものが殆どです。

糖からモノリグノールにいたる一般的な生合成経路が確立されてから私達は稲科植物、針・広葉樹リグニンの構造の違いと、それらの植物に含まれる酵素の基質特異性について研究を行ってきました。図 2 は主として稲科植物、針葉樹アテ材に含まれる p-ヒドロキシフェニルリグニン、針・広葉樹・稲科植物に含まれるグワヤシルリグニン、広葉樹・稲科植物に含まれるシリングリグニンの生合成経路と、それらの植物に含まれる酵素の基質特異性との関係を表しています。私達の研究成果を結論的にいえば、上記の植物群によるリグニンの化学構造の差異は、

(1) 針葉樹の O-メチル基転移酵素 (OMT) (図の E 6) は主としてカフェー酸からフェルラ酸の形成を触媒するのに、広葉樹の OMT はフェルラ酸の生成とともに、5-ヒドロキシフェルラ酸からシナップ酸の形成を触媒する (E 8 酵素)。

(2) グワヤシルリグニンからシリングリグニン生合成への分化の鉤酵素であるフェルラ酸-5-ヒドロキシラーゼ (E 7) は広葉樹にのみ分布している。

(3) 針葉樹の p-ヒドロキシシメナート:CoA リガーゼ (E 1') はフェルラ酸と p-クマール酸にのみ活性であるが、広葉樹の酵素 (E 1'') は上記の二つの酸とともにシナップ酸にも活性である。

(4) 針葉樹の p-ヒドロキシシナミルアルコールオキシドレダクターゼ (E 3') はコニフェリルアルデヒド→コニフェリルアルコール反応を優先的に触媒し、広葉樹酵素 (E 3'') はコニフェリルアルコールの生成ばかりでなく、シナップアルデヒド→シナピルアルコール反応も触媒する。

結論として、フェルラ酸以後のモノリグノール中間体の合成に関与する酵素は針葉樹と広葉樹で異なっており、針葉樹ではフェルラ酸からグワヤシルリグニンが優先的に生成するように制御されているのに対し、広葉樹の酵素はグワヤシルリグニンとともにシリングリグニンの生成を触媒する事ができる。なお、稲科植物に特異的に含まれているチロシニンアンモニアリアーゼ (TAL) は、主として同植物の p-ヒドロキシフェニルリグニン及び p-クマール酸エステルの生成に関与している。

この様にして形成されたモノリグノール (コニフェリルアルコール、シナピルアルコール、p-クマリルアルコール) は図 3 に示すように、木部細胞壁に結合し

図 2 稲科植物，針葉樹，広葉樹によるリグニン生合成経路の差異

p-Hydroxyphenyl lignin; 稲科植物及び針葉樹の圧縮アテ材リグニン, Guaiacyl lignin; 稲科植物, 針・広用樹に共通に含まれるリグニン, Syringyl lignin; 広葉樹に含まれるリグニン。E1, E1', E1''; ヒドロキシシナメート; CoA リガーゼ, E2, E2', E2''; ヒドロキシシナモイル-CoA レダクターゼ, E3, E3', E3''; シナミールアルコールデヒドロゲナーゼ, E4, E4', E4''; ペルオキシダーゼ, E5; *p*-クマレート 3-ヒドロキシラーゼ, E6, E8; ヒドロキシシナメート *O*-メチルトランスフェラーゼ, E7; フェルレート 5-ヒドロキシラーゼ, PAL; フェニールアラニンアンモニアリアーゼ, TAL; チロシンアンモニアリアーゼ

ているペルオキシダーゼの作用によって、それぞれのモノリグノールラジカルに酸化され、ラジカル間の結合によって生成したキノンメチド中間体を経て 2 量体フェノールになり、2 量体フェノールは同様な反応の繰り返しのによって次第に重合してリグニン（ポリリグノール）及びリグニン-多糖複合体（LCC）を生成する。モノリグノールのリグニンへの重合反応にペルオキシダーゼが関与する事は私達の研究によって初めて明らかにされました。木部細胞壁のリグニンはヘミセルロース等の多糖と化学結合している事が知られていますが、私達はアリールグリセロール- β -アリールエーテル（モノリグノールの 2 量体）のキノンメチドに糖を添加する LCC 生成のモデル実験によって、LCC 生成反応は多糖を構成している単糖の一級アルコール基及びカルボキシル基（ウロン酸）がリグニンの α 炭素とエーテル及びエステル結合している事を明らかにしました。また稲科植物リグニンに含まれる *p*-クマール酸は主としてリグニンの γ 炭素にエステ

ル結合している事も私達の研究によって明らかにされました。

1978 年 5 月、日本学術振興会の援助によってリグニンの微生物分解に関する日米共同セミナーがアメリカ、ウィスコンシン州マジンソン市で開かれ、私をふくむ 10 名の日本側研究者が参加しました。その成果は Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications, Vol. I, II ed. T. Kent Kirk, T. Higuchi, and H. -m. Chang, CRC Press Inc. 1980 に纏められています。1983 年 5 月、日本学術振興会の援助で再びリグニン微生物分解のセミナーが京都の平安会館で開催されました。写真 3 は平安会館でのセミナー参加者でアメリカ 11 名、ヨーロッパ 6 名、日本 23 名、計 40 名でした。Kirk, Chang, Gold, D. Crawford, R. Crawford, Gratzl, Glasser, Brunow, Buswell, Gierer, Hattaka, Odier, Reddy, Robert, Eaton, Chen, Hodson, Pellinen 等が、また日本からはリグニンの微生物分解の研究者の殆どが参加しました。

図 3 ペルオキシダーゼによって生じたモノリグノールラジカルからリグニン及びリグニン多糖複合体 (LCC) の生成

写真 3 リグニン微生物分解セミナー (1983 年, 於 京都)

1970年代になってリグニンの微生物分解の化学と生化学が、担子菌によって腐朽されたリグニン及び分解生成物の分析、リグニンサブストラクチャー化合物の分解機構の解明によって著しく発展しました。私達はリグニン中の主要なサブストラクチャー2量体を合成して *P. chrysosporium* 培養菌体の基質として用い、分解生成物の構造決定によって、それら化合物の分解経路を明らかにしてきました。その結果、主要な分解経路として、①プロピル側鎖の α - β 炭素間での酸化開裂、② β -アリールエーテル結合の開裂、③芳香核の開裂によって分解されていく事が明らかになってきました。

私達の研究によって *P. chrysosporium* の培養菌体によるアリールグリセロール- β -アリールエーテルのプロピル側鎖の分解経路が明らかにされてきましたが、京都セミナーで Kirk 等、Gold 等によって別々に *P. chrysosporium* の培養濾液からリグニンペルオキシダーゼが分離され、この酵素によってアリールグリセロール- β -アリールエーテル及びジアリールプロパン-1,3-ジオールの α , β -炭素間が開裂される事が明

らかにされました。又、その後 Kersten 等の研究により、この酵素はメトキシベンゼン類の一電子酸化を触媒し、カチオンラジカルを生成させる事が明らかにされました。そこで私達は α , β -水素を重水素で標識した β -O-4 化合物を基質として用い、その分解生成物に基づいて図4に示す分解機構を明らかにしました。

しかし、リグニンの芳香核の開裂反応の機構については1985年に至るまで不明でした。私達は芳香核開裂反応の機構を解明するため、芳香核(B)の全炭素を ^{13}C で標識した β -O-4 化合物を合成して *P. chrysosporium* の菌体に与え、芳香核分解生成物として初めてアリールグリセロールの環状炭素エステル、蟻酸エステルを単離・同定する事ができました。

その後これら芳香核開裂化合物の生成を触媒する酵素について検索した結果、側鎖開裂の場合と同様に芳香核の開裂にもリグニンペルオキシダーゼが関与している事が明らかになりました。またリグニンペルオキシダーゼ反応における最初の芳香核開裂化合物としてアリールグリセロール- β -シス、シス・ムコネートエステルを単離・同定しこれら分解物への酸素の取込機構

図4 アリールグリセロール- β -アリールエーテル (β -O-4 型化合物) のリグニンペルオキシダーゼによる分解機構。芳香核の一電子酸化によるカチオンラジカルを経て、側鎖の C_α - C_β 間開裂、 $\text{O}-\text{C}_4$ 間開裂、 $\text{O}-\text{C}_\beta$ 間開裂が起こる。D；重水素，R；ベンジル基，OEt；エトキシル基

1. 4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリセロール- β -バニリン- γ -ベンジルジエーテル
2. 4-エトキシ-3-メトキシフェニルグリセロール- γ -ベンジルジエーテル
3. 4-エトキシ-3-メトキシベンズアルデヒド
4. ベンジロキシアセトアルデヒド
5. バニリン

図 5 リグニペルオキシダーゼによるアリールグリセロール-β-アリールエーテルの芳香核 (B) の分解機構

B核の一電子酸化によって生成したカチオンラジカル (a) に水が反応してラジカル (b) が生じ、bは酸素と反応して c, dを経てアリールグリセロール-β-シス、シスムコネートに変換される。H₂●；¹⁸Oを含む水，●₂；¹⁸O₂

についても ¹⁸O₂ 及び H₂¹⁸O を用いる実験によって明らかにすることができました。図 5 はリグニペルオキシダーゼによってアリールグリセロール-β-アリールエーテルの芳香核 (B 核) がカチオンラジカルに酸化され、カチオンラジカルへの水分子の攻撃及び酸素分子とのラジカルカップリングによってシス、シスムコネートエステルが生成する事を示しております。

このようにして私達は *P. chrysosporium* による β-O-4 リグニサブストラクチャーモデル 2 量体の分解の初期段階の反応の殆どが、リグニペルオキシダーゼによる触媒作用の結果である事を明らかにしました。なおリグニン分子の末端には 10~15% の遊離フェノール基が存在しますが、このフェノール部分の側鎖及び芳香核は担子菌が生産するラッカーゼによっても分解されます。最近、私達は合成リグニン (DHP) もリグニペルオキシダーゼによって同様に分解される事を明らかにすることが出来ました。

リグニン生合成経路及びその反応に関与する酵素が殆ど解明されましたので、これらの知見に基づいてリグニン生合成の酵素の遺伝子を制御するなど、遺伝子工学的的方法によって木材中のリグニン量及びモノリグノールの組成を制御し、建築用、パルプ用に適した材質の改良が可能になると思います。一方、リグニンの微生物分解反応機構、及び反応に関与する酵素の解明により、遺伝子工学的によるリグニン分解酵素の大量生産が期待されます。さらにリグニン分解菌及びリグ

ニン分解酵素の利用によって塩素を用いないパルプの漂白と改質、環境汚染物質の除去、木質バイオマスの生化学的変換などが期待されます。

6. ま と め

以上、私の 41 年に亘る木質及びリグニン生化学を中心とする研究経過についてお話をしてきました。今振り返ってみると長かったようでもあり、また一瞬であったようにも感じられます。私の性格が楽観的であったせいも、落ち込んだ事もなく、何時も若い優秀な人達に囲まれて、毎日前を見つめながら充実した日々を送り定年を迎える事ができました事を心から感謝しております。私の体験から、研究者は若い時から出来るだけ国際学会に出席して、自分の研究成果を問い、自分の研究課題及び分野の学問上の役割を見定め、絶えず検証を受ける事が重要であると思います。自分がそうさせてもらい感謝しておりましたので、研究室の若い人達(助手、院生)には出来るだけ早く学位を取ってもらい、学位取得後は計画的に、それぞれの分野で一番良いと思う外国の大学で研究してもらう機会を作ってきました。また外国からも関連する研究者を積極的に招くようにしてきました。これらの努力によって私達の研究分野が多少とも評価されてきているように感じています。

なお、微力ながら今後もこの分野の研究の発展に努力していきたいと考えております。