

博 士 論 文

Phanerochaete crassa WD1694 株の未晒クラフトパルプ漂白と
リグニン分解酵素に関する研究

高野 麻理子

序章

森林は地上のバイオマスのうち最も大量に蓄積された有機化合物体であり、2015年現在、森林バイオマスの約半分に相当する地上部および地下部のバイオマスは2960億炭素トンと見積もられている（世界森林資源評価2015概要、林野庁）。リグニンは木本植物の細胞壁を構成する主要成分であり、木材細胞壁構成比率としては、セルロースの50%に次ぐ25-30%を占めるとされている（中野1979）。地上を循環する有機炭素のうち、森林バイオマス量から換算して、740～890億トンがリグニン相当の有機炭素として合成、生分解により代謝されると推定される。

リグニンは、木材細胞間の接着、および、木材細胞壁内のセルロース繊維の結束という組織構造上重要な機能を持ち、樹体を組織レベルで支持している（樋口1993、福島1994）。一般的な生体高分子は、単位分子が単一結合様式で連なった直鎖構造を持つが、リグニンの化学構造は、シリングル、グアヤシル、p-ヒドロキシルの3種のC6-C3のフェニルプロパン単位が不規則にラジカル重合した高分子であり、単位間結合に単一な様式を持たない（Higuchi 1985）。そのため、リグニンを分解代謝できる微生物は限られている。

これまでに、多少ともリグニンを変質または分解する微生物として、担子菌の白色腐朽菌、褐色腐朽菌、植物遺体分解菌と、子囊菌の白色菌、軟腐朽菌、および不完全菌の軟腐朽菌が知られている（Kirk and Shimada 1985）。そのうち、リグニンの分解に主要な役割を果たし、高いリグニン分解力を持つとして担子菌の白色腐朽菌、植物遺体分解菌（リター分解菌）が知られている（樋口、近藤1979）。木材細胞壁中のリグニンを効率的に分解できる生物は白色腐朽菌のみであるとされており（Cheng and Chang 1985, Ander 1990）、白色腐朽菌のリグニン分解は地上の有機炭素循環を考える上で重要な意義を持つ。

森林バイオマスの重要な用途の一つに紙パルプ産業がある。2015年現在、世界の木材パルプ生産量は176億トンに達している（FAO STAT 2015）。国内の木材需要（7516万 m^3 ）のうちパルプチップに42.3%（3178万 m^3 ）が消費されている（平成27年木材需給表、平成29年1月 林野庁企画課）。紙パルプの主要な製造工程では、木材チップ

を解繊するパルプ化と着色したパルプの漂白工程に、脱リグニン反応が行われている。紙パルプ産業の脱リグニン工程には、莫大なエネルギーと薬剤が消費されており、環境負荷が高いことが課題となっている。近年、紙パルプ製造による環境負荷を低減する目的で、化学的・物理的な製造工程の改良とともに、バイオテクノロジーの導入が研究されてきた（バイオテクノロジーの環境技術への応用、平成12年8月、経済産業省特許庁；（バイオテクノロジーと21世紀の産業、1999、バイオインダストリー協会）（紙パルプ産業のバイオテクノロジー（1992）紙パルプ技術タイムス 1992.7月 pp7-15）。白色腐朽菌は、木材中のリグニンを効率的に分解できる微生物であり、紙パルプ産業の脱リグニン工程に応用することで、環境に優しい紙パルプの製造法の開発につながる可能性がある。

リグニン分解に関与する酵素として、白色腐朽菌とラッカーゼ (Lac)の関連性が古くから指摘されていたが、Lac がリグニン分解に寄与するかは証明されず、リグニンを分解する酵素は長らく不明とされていた（樋口 1953、Kirk and Kelman 1964）。1979年に、現在、白色腐朽研究のモデル株となっている *Phanerochaete chrysosporium* より、未晒しクラフトパルプの脱リグニンが生じることが報告された(Kirk and Yang 1979)。さらに、1983、1984年にこの菌からリグニンペルオキシダーゼ (LiP) とマンガンペルオキシダーゼ (MnP) の二つの酵素が発見されると (Glenn et al. 1983, Kuwahara et al. 1984, Tien and Kirk 1983)、初のリグニン分解酵素の発見として大いに注目と期待を集め、その後、白色腐朽菌のリグニン分解能力を紙パルプ製造工程に応用しようとする研究が盛んに行われた (Tran and Chambers 1987、Paice et al. 1989、坂井 1993、西田 2001、Martínez et al. 1994、Call and Mücke 1997、桃原、松本 1991)。1990年代にパルプ漂白工程に使用されていた塩素系薬剤に起因する工場排液にダイオキシン等の有害物質が含まれることが社会問題になると(尾鍋、1991)、化学的、物理的、生物的手法による無塩素漂白法開発の研究が進められた(飯塚、1994)。その一環として、白色腐朽菌のリグニン分解能力をパルプ漂白に利用するバイオブリーチングの研究が国内外で精力的に進められた (Paice et al. 1989、Reid and Paice 1994、Archivald et al. 1997、西田 1992、Kondo et al. 1994)。

白色腐朽菌によるパルプ漂白の研究では、パルプの高漂白菌が選抜され、生菌によるパルプ漂白が検討されたが、多くの白色腐朽菌はリグニン分解と同時にセルロースを分解する活性も高く、パルプの粘度低下や強度低下といった問題が生じることが明らかになり、反応の選択性を高めることが課題となった (Kirk and Yang 1979、 Paice et al. 1989、 Nishida et al. 1988、 Hirai et al. 1994、 Iimori et al. 1994)。そこで、白色腐朽菌そのものではなく、菌の持つ木質分解機能のうち、リグニン分解に関する系を解明し、生物系からこれを取り出して再構築することで、無細胞系での脱リグニンプロセスの完成が目標とされた (Kondo et al. 1994、 Bourbonnais et al. 1995、 Harazono et al. 1996、 Kaneko et al. 1995)。そのため、白色腐朽菌やリグニン分解酵素を用いたパルプ漂白法の開発と並行して、リグニン分解に関する各菌株や酵素の機能解明のための研究が行われてきた (Paice et al. 1993、 Reid and Paice 1994、 Moreira et al. 1997、 Addleman et al. 1995、 Archibald 1992、 Katagiri et al. 1995、 Kondo et al. 1994)。

現在、リグニン分解酵素としては、Lac、LiP、MnP とバーサタイルペルオキシダーゼ (VP) の 4 種類が主な酵素として知られており、各酵素について紙パルプ製造工程での脱リグニン反応に応用できる可能性が示されている (Archivald et al. 1997、 Paice et al. 1993、 Martínez et al. 1994、 Katagiri et al. 1995)。

リグニン分解酵素類のうち、Lac を除く LiP、MnP、VP はリグニン分解ペルオキシダーゼ類 (LPO) であり、触媒機構に過酸化水素を必要とすることが知られている (割石 2002、渡辺 2000)。過酸化水素は白色腐朽菌のオキシダーゼ (OX) によって生産されるとされ、菌体内外から数種の OX 酵素がリグニン分解系に過酸化水素を供給する酵素として提案されている (Kersten and Kirk, 1987、 Guillen et al. 1992、 Daniel et al. 1992、 Eriksson et al. 1986、 Kelley and Reddy 1986、 Nishida and Eriksson 1987、 Green and Gould 1984)。LPO は過酸化水素を供給されないと機能しないため、OX による LPO への過酸化水素供給は白色腐朽菌によるパルプ漂白やリグニン分解において重要な役割を果たしている。

白色腐朽菌の生産するオキシダーゼは、菌体内から、脂肪酸アシル-CoA-オキシダー

ゼ (Green and Gould 1984) やメタノールオキシダーゼ (Nishida and Eriksson 1987) およびグルコース-1-オキシダーゼ (Kelley and Reddy 1986)、グルコース-2-オキシダーゼ (Eriksson et al. 1986) が検出されている。菌体内で生産されるオキシダーゼ類は、菌体内に高いカタラーゼ活性が検出されることから、実際にリグニン分解に機能する過酸化水素生成酵素として、菌体外オキシダーゼ類の重要性が指摘されている (Green and Gould 1983、Kersten and Kirk 1987)。菌体外で活性が検出されたオキシダーゼとして、グリオキサルオキシダーゼ (GLOX)、アリルアルコールオキシダーゼ、2-ピラノースオキシダーゼが報告されている (Kersten and Kirk 1987、Guillen et al. 1992、Daniel et al. 1992)。

菌体外に分泌される LPO や OX は、リグニン分解に機能する可能性が高いとされ、各酵素の物理化学的性質と触媒機構が報告されている (Tien et al. 1986、Gold et al. 1989、Martínez et al. 1996、Kersten 1990、Guillen et al. 1992)。また、各酵素の遺伝子構造が解明され、酵素の立体構造と触媒機能の関連性について分析されている (Cullen 1997、Gold and Alic 1993、Hakala et al. 2006、Martínez 2002)。分泌酵素であるこれらのリグニン分解酵素類は、免疫染色を用いた電子顕微鏡観察で、組織学的な存在場所が示されている (Daniel 1994、Joseleau and Ruel 1992、Barrasa et al. 1998、Daniel et al. 1992)。

このように、リグニン分解に主要な役割を持つ LPO や OX に関しては、各酵素の機能と構造、存在場所について詳細に分析されている。しかし、各酵素の触媒機構から、LPO や OX はいずれも単体では生体系でのリグニン分解には機能しないと考えられる。従って、生体系でのリグニン分解機構を解明するには、LPO と OX がどのように関連して反応するかを明らかにする必要がある。

本研究では、未晒シクラフトパルプ (LUKP) の高漂白菌を選抜し、選抜株のリグニン分解酵素を特定し、その酵素を中心としたパルプの脱リグニン機構の一端を解明することを目的とした。具体的には、パルプ漂白というリグニン分解が生じている条件下で、MnP と GLOX というリグニン分解に不可欠な 2 つの酵素がどのような形で連携しているのかを分析した。研究内容の概要を以下に記載する。

第 1 章では、リグニン分解能力を持つとされる白色腐朽菌とリター分解菌を対象にスク

リーニングを行い、未晒しクラフトパルプの高漂白能力を持つ一株を選抜した。

第2章では、選抜株の LUKP 漂白に作用するリグニン分解酵素種を分析し、選抜株由来のリグニン分解酵素による LUKP の酵素漂白について検討した。

第3章では、選抜株のリグニン分解酵素とその遺伝子を分析し、酵素機能の詳細を確認した。

第4章では、選抜株のリグニン分解酵素に過酸化水素を供給するオキシダーゼ酵素を検索し、特定した。

第5章では、LUKP 培地中でのリグニン分解酵素とオキシダーゼ酵素の関連性を、組織学的方法を併用して分析し、LUKP 漂白培地中でリグニン分解酵素にオキシダーゼ酵素から過酸化水素が供給される仕組みの一端を示した。

第6章では、以上の研究結果を総括し、得られた研究結果の意義と今後の課題について論じた。

1. パルプ高漂白菌株のスクリーニング

1.1 緒言

従来知られている白色腐朽菌であるカワラタケや *P. chrysosporium* は、未晒しクラフトパルプの漂白効果が十分ではなく、また、*P. chrysosporium* は、植物防疫法に基づく輸入検疫有害菌に該当するため、バイオブリーチングに用いる菌株は、改めてスクリーニングを行い、選抜した。リグニンを変質または分解する微生物は、担子菌の白色腐朽菌、褐色腐朽菌、植物遺体分解菌と、子囊菌の白色菌、軟腐朽菌、および不完全菌の軟腐朽菌が報告されているが、特に高いリグニン分解力を持つ微生物として、担子菌の白色腐朽菌、植物遺体分解菌（リタ-分解菌）がとして知られている。（樋口,近藤、リグニンの化学、p 307）そこで、森林総研保有の白色腐朽菌、植物遺体分解菌 420 株を対象に、パルプの高漂白菌のスクリーニングを行った。

リグニン分解菌の選抜法としては、古くからバーベンダム反応が知られている。バーベンダム反応は、フェノールオキシダーゼによるガリック酸、タンニン酸の酸化重合による着色帯形成を利用して、白色腐朽菌と褐色腐朽菌の選別に用いられてきた。西田らおよび平井らは、グアヤコール添加木粉・寒天培地上での赤色着色帯の形成によるリグニン分解菌、パルプ漂白菌のスクリーニングを報告した（Nishida et al., 1988、Hirai et al., 1994）グアヤコールは、フェノール性水酸基を持つ芳香族化合物であり、着色帯形成はバーベンダム反応と同様にフェノールオキシダーゼ活性の検出に適した方法だと考えられる。

これらの方法の他に、白色腐朽菌のリグニン分解を検出する手法の一つとして、高分子色素の脱色が提案された。Glenn と Gold は、高分子色素 Poly B-411, Poly R-481, Poly Y-606 の *P. chrysosporium* による脱色は、リグニン分解と同様に二次代謝期に生じること、窒素源の増加やリグニン分解の阻害剤の添加によって色素の脱色が阻害されることを確認している。また、リグニン分解能力を失活した突然変異株は、高分子色素の脱色能力を失うが、復帰変異株は脱色能力を回復することを報告した。（Glenn and Gold 1983、Gold et al.1988）。これらの報告は白色腐朽菌のリグニン分解の検出法として、高分子色

素の脱色が適していることを示唆していた。高分子色素は、分光法による検出や定量も可能であり、取り扱いも容易であるため、リグニン分解菌の簡易スクリーニングに適していると考えられる。これらの報告の後、リグニン分解菌やリグニン分解酵素に関する色素の脱色試験について多くの報告がなされたが、ほとんどの実験では少数の菌株を対象としたものに限られていた(Paszczynski et al. 1991; Cripps et al., 1990; Kim et al., 1995; Thorn, 1993、 Ollikka et al., 1993)。

このような背景から、バイオブリーチングに用いるリグニン分解菌の選抜法として、高分子色素の脱色によるスクリーニングを行うこととした。Glennらは、リグニンの代用基質として、高分子色素 Poly B-411, Poly R-481, Poly Y-606 が白色腐朽菌やリグニン分解酵素のリグニン分解力の指標となることを報告したが、これらの色素は入手不可であったため、入手可能かつ色素構造が Poly R-481 と類似する Poly R-478 色素を用いた (Glenn and Gold 1983、 Gold et al.1988)。Poly R-478 (Poly(vinylamine) Sulfonate Backbone Anthrapyridone Chromophore)はアントラピリドン骨格を持つ高分子色素であり(Fig.1)、Poly R-478 の脱色は、静置培養した白色腐朽菌 *Chrysosporium lignorum* CL1 による LiP と MnP の生産を示すことが報告されている (Buckley and Dobson 1988)。

1.2 材料と方法

1.2.1 菌株

森林総合研究所所有の担子菌（木材腐朽菌およびリタ-分解菌、計 420 株 158 種類、表 1 参照）を供試した。供試した担子菌は、ポテトデキストロース寒天培地(PDA)上で、4℃で保持した。後述の各試験培養に際し、供試菌株を別の PDA に植菌し、室温で所定日数培養後、生長した菌糸の輪郭部から、コルクボーラーで菌糸ペレット(直径:6mm)を打ち抜き、試験用プレートの中央に植菌することにより行った。

(ポテトデキストロース寒天培地の作成)

オートクレーブで滅菌処理したポテトデキストロース寒天培地溶液 (20ml) を、滅菌シ

シャーレ（直径：90 mm）に入れ、冷却して寒天培地を作成した。

ポテトデキストロース寒天培地溶液

真菌用ポテトデキストロース寒天培地（日水製薬製）	39 g
蒸留水	1000 ml

1.2.2 パルプ

下記の2種類のパルプを準備した。

- 広葉樹酸素アルカリ漂白クラフトパルプ(LOKP)（Kappa 価：9.1）（日本製紙（株）八代工場製）
- 広葉樹未晒しクラフトパルプ(LUKP-A)（Kappa 価：20.0）（自製）

LUKP-A は、以下の条件でカバ材チップをパルプ化して調製した（収率：49.4%）ものを森林総合研究所木材化学研究室より入手した。

処理条件

活性アルカリ	13.5	%	（対チップ）
硫化度	25	%	
液比	4	L/Kg	（比率）
最高処理温度	170	°C	
最高処理温度到達時間	90	分	

1.2.3 Poly R-478 脱色一次スクリーニング

下層用培地溶液(10 ml)を滅菌シャーレ（径 90 mm）に入れ、冷却して下層を作成した。次いで、滅菌した上層用培地溶液(10 ml)を下層培地上に注ぎ、冷却して一次スクリーニング用のプレートを調製した。

上層用培地

シヨ糖 (Wako 製)	5 g
Poly R-478 (Sigma-Aldrich 製)	0.05 %
Agar purified (Sigma-Aldrich 製)	25 g
蒸留水	1000 ml

下層用培地

Agar purified (Sigma-Aldrich 製)	25 g
蒸留水	1000 ml

供試菌株 (420 株 158 種類) を、一次スクリーニング用のプレートに植菌し、26°Cで 14 日間培養し、上層培地の Poly R-478 由来の赤色の脱色の有無を確認した。

1.2.4 Poly R-478 脱色二次スクリーニング

上層用培地として、シヨ糖の代わりに、LOKP を用い、一次スクリーニングと同様にして、二次スクリーニング用のプレートを調製した。

上層用培地

LOKP	10 g
Poly R-478 (Sigma-Aldrich 製)	0.05 %
Agar purified (Sigma-Aldrich 製)	25 g
蒸留水	1000 ml

下層用培地

Agar purified (Sigma-Aldrich 製)	25 g
蒸留水	1000 ml

1.2.3 で脱色が認められた菌株（119 株）を 1-2-1 記載の方法で、二次スクリーニング用のプレートの中央部に植菌し、26°C で 7 日間培養し、上層培地の Poly R-478 由来の色の脱色の脱色円の直径を測定した。

1.2.5 パルプ漂白テスト

1.2.5.1 種菌の調製

下記の組成の種菌用液体培地溶液（100 ml）を 300ml 容三角フラスコに入れ、滅菌処理を行った。この種菌用液体培地に、Poly R-478 脱色二次スクリーニングで脱色能力の高かった菌株（10 種類）の各菌糸ペレット 5 個を植菌し、30°C で 7 日間培養した後、三角フラスコ内でハンディホモジナイザーで菌体を粉碎し、種菌溶液とした。

種菌用液体培地

グルコース	10 g
リン酸 2 水素アンモニウム	1 g
リン酸 2 水素カリウム	600 mg
リン酸水素 2 カリウム	400 mg
硫酸マグネシウム 7 水和物	500 mg
塩化カルシウム	5 mg
酵母エキス	100 mg
超純水（milli Q 水）	1000 ml

1.2.5.2 パルプの菌処理

LUKP-A（絶乾重量：10 g）を 1000 ml 容三角フラスコに入れ、滅菌処理を行った。

次いで、上述の種菌溶液（25ml）を加え（パルプ濃度：25%に相当）、26°Cで10日間静地培養した。菌処理したパルプは、装置附属の6カットスクリーンプレートを設置した試験用フラットスクリーン（熊谷理機工業製）を用いて洗浄回収後、遠心脱水装置（コクサン製）で1200 rpm で10分間脱水した。アルカリ処理は、10日間静置培養した各パルプ試料を0.1Nの水酸化ナトリウム水溶液200ml（パルプ濃度5%）に1時間浸漬、水洗後、前記載と同様に試験用フラットスクリーンで洗浄回収し、遠心脱水装置で脱水した。対照用のパルプは、植菌せずに試験パルプと同じ処理をした。試験法に変更があった場合にはそれぞれ文中で記載した。

1.2.5.3 パルプ・ハンドシートの分析

菌処理したパルプのカッパー価を、TAPPIスタンダードT236m-60に従って、測定した。菌処理したパルプのハンドシートをJIS P8222に準拠して作成し、ハンドシートの白色度をJIS P8123に従って、測定した。ハンドシートの作成には、パルプ解離機（熊谷理機工業製）、スタンダードシートマシン抄紙装置（熊谷理機工業製）、角形シートマシンプレス（熊谷理機工業製）、シートマシン乾燥装置（熊谷理機工業製）を用いた。白色度の測定には、分光反射率計Elrepho-2000A（Datacolor製）を使用した。

1.2.6 菌株の生長速度に及ぼす温度の影響

パルプ漂白用に選抜した10菌株の生育温度特性を分析するため、培養温度を19°Cから40°Cまで3°C間隔で設定し、各菌株をPDAプレート上で培養した。培養3日後の菌糸の生育量をPDAプレート上に伸長した菌糸帯の直径として測定した。

1.3 結果

森林総合研究所所有の木材腐朽菌とリター分解菌、計420株158種類を、Poly R-478脱色一次スクリーニングに供した。各菌株をサッカロース5gとPoly R-478 0.05%を含む寒天プレートに植菌し、26°Cで培養し、培養後14日間以内にPoly R-478の脱色が

認められた 119 株を一次スクリーニング選抜株とした。

次に、これら 119 株を Poly R-478 脱色二次スクリーニングに供した。選抜した各菌株を OKP 10 g と Poly R-478 0.05 % を含む寒天プレートに植菌し、26°C で培養した。Fig.1-2 は、26°C で 7 日間培養後の各菌株の Poly R-478 脱色円の直径を測定した結果を示す。

Poly R-478 の脱色円の直径が 5.0 cm 以上を示した上位 10 株、*Phanerochaete chrysosporium* BKMF-1767、*Phanerochaete crassa* WD1694、*Coriolus brevis* F148、*Trametes versicolor* WD1670、*Phanerochaete crassa* F150、*Pleurotus species* A119、*Pleurotus pulmonarius* PSC-T, PSC-H, PSC-M、*Trametes hirsuta* WD1674 を二次スクリーニング選抜株とした(Table 1-1)。

二次スクリーニングした 10 株のパルプ漂白試験を行う培養温度について検討した。菌株により成長に適した培養温度が異なるため、培養温度はパルプの菌漂白結果に影響する。パルプ漂白試験を行う培養温度を決定するため、選抜した菌株の培養温度による菌の成長速度への影響を調べた。PDA プレートに各菌株を植菌し 19~40°C の温度条件で培養し、菌の成長量を広がった菌糸の直径として測定した (Fig.1-3)。培養温度 28°C 以上で、PSC-T, PSC-H, PSC-M, A119 の各菌株の成長に低下が認められた。一方、*P. chrysosporium* BKMF は 25°C 以下で成長が低下した。これらの結果より、パルプ漂白試験の培養温度は 26°C に決定した。

次に二次スクリーニング選抜株 10 株のパルプ漂白試験を行った。各菌株を LUKP-A に植菌し、26°C で 10 日間静置培養後、菌処理したパルプを水で良く洗浄、脱水し、カップー価と白色度を測定した (Table 1-1)。選抜した 10 株のうち、6 株(*P. crassa* WD1694, F150, *P. species* A119, *P. pulmonarius* PSC-T, PSC-H, PSC-M)は、カップー価を 16.4 から 10.0 以下に減少させ、白色度を 27.7 から 42.0 以上に増加させた。他の 4 株(*P. chrysosporium* BKMF-1767, *C. brevis* F148, *T.versicolor* WD1670, *T. hirsuta* WD1674)はこれら 6 株より低い漂白能力を示した。さらに、パルプの菌処理後に、アルカリ処理を行い、LUKP 漂白効果の増加を検討した。試験したすべての株について、菌処理後のアルカリ処理により、菌処理のみの場合と比較して白色度の高いパルプが得られた (Table 1-1)。

アルカリ洗浄によって、漂白力の高い上位 6 株では、白色度は 4.0~5.7 増加し、下位 4 株では、白色度は 1.2~4.4 増加した。一方、銅価は、上位 6 株で 0.4~2.0、下位 4 株で 0.4~1.9 減少し、顕著な差は認められなかった。これらの結果より、アルカリ洗浄は、漂白能力の高い上位 6 株において、白色度の増加に効果を示すことが明らかになった。

最もパルプ漂白効果が高い菌株は、*P. crassa* WD1694 株であり、菌処理後にアルカリ処理をした場合、銅価を 15.7 から 6.1 に減少させ、白色度を 28.2 から 54.3 に増加させた。

次に、*P. crassa* WD1694 株によるパルプの菌漂白条件について検討した。

P. crassa WD1694 株と *P. crassa* F150 株の各種菌 10ml を LUKP-A に植菌し、26°C で 10 日間、静置培養(パルプ濃度 25%)またはしんとう培養(パルプ濃度 2%)した。菌処理後、試験用フラットスクリーンでパルプを洗浄回収し、銅価と白色度を測定した (Table 1-2)。*P. crassa* WD1694 株によって処理されたパルプの銅価は、静置培養では 16.4 から 7.4、しんとう培養では 16.2 から 9.5 に減少し、白色度は、静置培養で 27.7 から 48.6、しんとう培養で 28.2 から 46.8 に増加した。一方、*P. crassa* F150 株によって処理されたパルプの銅価は、静置培養では 16.4 から 9.5、しんとう培養では 16.2 から 15.8 に減少し、白色度は静置培養で 27.7 から 41.9、しんとう培養で 28.2 から 31.7 に増加した。*P. crassa* WD1694 株は静置培養としんとう培養の両条件下で、ほぼ同程度の銅価の低下と白色度の増加を示したが、*P. crassa* F150 株は、しんとう培養条件下では、静置培養条件下より、漂白効果が低下することが示された。

P. crassa WD1694 株の最適生育温度は 34°C であるため (Fig.1-2)、選抜株のパルプ漂白試験を行った 26°C と 34°C で LUKP-A を菌処理し、経時的に白色度を測定して、培養温度の漂白への影響を分析した (Fig.1-4)。*P. crassa* WD1694 株で菌処理したパルプの白色度は、26°C と 34°C とともに培養 1-5 日目に急激に増加し、培養 6 日目以後は緩やかに増加した。*P. crassa* WD1694 株の処理によるパルプの漂白は、培養温度 26°C、34°C とともに、培養初期に顕著に生じることが示された。34°C で培養した場合は、26°C で培養した場合よ

り、培養期間中を通じてやや高い白色度が得られた。

1.4 考察

森林総研保有の白色腐朽菌、植物遺体分解菌 420 株を対象に、Poly R-478 脱色能力を指標としたパルプ漂白菌の一次スクリーニングを行った。一次スクリーニングでは、完全合成培地の寒天プレートを用いて培養 14 日間以内に Poly R-478 脱色能を示す株を 119 株選抜した。さらに、二次スクリーニングとして培地条件を完全合成培地よりパルプ漂白条件に近い LOKP 寒天プレートとし、その培地上での色素脱色能を菌の生成する脱色円の直径として評価した。その結果、119 株の Poly R-478 脱色菌から、培養 7 日間で、5.0 cm 以上の Poly R-478 脱色円を生成した 10 株を Poly R-478 脱色能の最も高い菌株として選抜した。選抜された 10 菌株には白色腐朽菌のリグニン分解のモデル菌株である *P. chrysosporium* およびカワラタケが含まれていた。これら 10 菌株を対象に広葉樹未晒しパルプ LUKP-A の漂白試験を行った(Table 1-1)。その結果、6 株 (*P. crassa* WD1694,F150, *P. species* A119; *P. pulmonarius* PSC-T, PSC-H, PSC-M) に *P. chrysosporium* およびカワラタケよりも高い漂白能力が認められた。最も高い漂白能力を示した株は *P. crassa* WD1694 菌株であり、10 日間室温での静置培養処理およびその後のアルカリ処理によって、LUKP-A のカップー価は 16 から 6 に低下し、白色度は 28 から 54 に増加した。*P. crassa* WD1694 株の至適生育温度は 34°C であり、培養温度 26 - 37°C で *P. chrysosporium* に次いで良好な生育を示した。*P. crassa* WD1694 株は、静置培養、しんとう培養の両条件下、および生育温度 26°C、34°C の両条件下で、ほぼ同程度の LUKP-A の漂白効果を示しており、これらの培養条件の変化に適応して高い漂白効果を示すことが明らかになった。

本研究では予備スクリーニングとして、Poly R-478 色素を含む寒天プレートの脱色試験を行った。Poly R-478 脱色試験によって、リグニン分解力の高いモデル菌株である *P. chrysosporium*, *T. versicolor* が選抜され、さらに、これらの株よりかなり高い漂白能力を示す菌株が 6 株選抜された結果より、パルプ漂白菌の一次スクリーニング法として

Poly R-478 脱色試験が有効であることが示された。

しかし、選抜した 10 株の結果に見られたように、Poly R-478 脱色円の面積はパルプの漂白能力を直接反映するものではなく、さらなるパルプ漂白能力の評価が必要であった(Table 1-1)。選抜した 10 株の中で、Poly R-478 の脱色円の直径が 5–6cm であった *P. pulmonarius* の 3 菌株は、Poly R-478 の脱色円の直径が 7.5cm 以上を示した *P.*

chryso sporium BKMF-1767 と *T. versicolor* WD1670 の 2 株より高いパルプの漂白能力を示した。Poly R-478 脱色試験はパルプ漂白菌の一次スクリーニング法として有効であるが、菌のパルプ漂白能力の定量的な指標とはならないことが示唆された。

パルプ漂白菌のスクリーニングとしては、グアヤコール添加木粉・寒天培地上での赤色着色帯の形成によるリグニン分解菌のスクリーニング、および、未晒パルプ寒天培地での脱色帯形成によるパルプ漂白菌の方法などが報告されている (Nishida et al.,1988、Hirai et al.,1994、Iimori et al., 1994)。しかし、いずれのスクリーニング法も、パルプ漂白に最良の株を選抜するには実際にパルプを漂白し、カップー価や白色度を測定する評価を必要とした (Nishida et al.,1988、Hirai et al.,1994、Iimori et al., 1994)。本研究で用いた Poly R-478 脱色法を含め、いずれの方法も簡易スクリーニングとしては有効であるが、微生物のパルプ漂白能力を定量するには限界があると考えられる。

本研究では微生物によるリグニン分解活性の検出法として提示された Poly R-478 脱色試験を予備スクリーニング法としたパルプ漂白菌の選抜試験を行った。Poly R-478 脱色試験はパルプ漂白菌の一時スクリーニング法として有効であり、420 株の木材腐朽菌とリター分解菌より、最も高い未晒クラフトパルプの漂白能力を示した *P. crassa* WD1694 株の選抜に成功した。

2. LUKP 漂白に関与するリグニン分解酵素の特定と酵素漂白

2.1 緒言

白色腐朽菌を用いたクラフトパルプの漂白では、十分な漂白効果を得るための反応時間に長時間を必要とし、また、漂白とともにパルプ繊維強度が低下するため反応の選択性が問題とされ、パルプ漂白に作用するリグニン分解酵素を解明し、菌から単離した酵素を用いた漂白法が研究された。

白色腐朽菌のリグニン分解酵素としてこれまでに、LiP、MnP、VP、Lac が知られており、白色腐朽菌のパルプ漂白にもこれらの酵素が関与することが報告されている。

パルプの脱リグニンや漂白が始めに研究された *P.chrysosporium* は(Kirk1979, Tran1987)、LiP と MnP を高生産することで知られているが、Lac は持たないことがゲノムレベルで報告されている(Hernandez-ortega et al., 2012)。また、代表的な白色腐朽菌のモデル菌であるカワラタケ(*Trametes(Coriolus) versicolor*)のパルプ漂白に関連して、リグニン分解酵素として Lac と MnP を生産することが確認されている(Paice et al., 1989, 1993、 Bourbonnais et al., 1995、 Moreira et al., 1997)。 *Bjerkandera sp.* Strain BOS55 株のクラフトパルプ漂白では Mn が必要でないことから、MnP 以外の酵素のパルプ漂白への寄与が示唆される結果が得られており、後にこの株からは VP が検出されている(Moreira et al., 1997、 Mester and Field, 1998)。 *Pleurotus* 類のパルプ漂白も報告されているが、この菌類の生産する MnP は VP であることが近年明らかになっている。(Martínez et al, 1994)

その後、各リグニン分解酵素の漂白への効果について検証する研究が報告された。LiP については、*P. chrysosporium* のパルプ漂白には、MnP と LiP の両方の累積活性が相関すること(Katagiri et al, 1995)、また、ヴェラトリルアルコールを添加した条件で LiP による広葉樹未晒クラフトパルプの漂白効果が報告されたが(Harazono et al., 1996)、その一方で、*T. versicolor* の未晒クラフトパルプ漂白では LiP は重要でないとする報告がある (Archibald, 1992)。Lac に関しては、*T. versicolor* から精製した Lac が、単独ではクラフトパルプの脱リグニンを示さないが、ABTS を添加した条件下では脱リグニンす

ることが報告されている (Bourbonne et al, 1995、 Archibald et al., 1997)。

一方、MnP についてはパルプ漂白への重要性を指摘した実験結果が多く報告されている。MnP を分泌しない *T. versicolor* の変異株はパルプ漂白能力を失うことが報告された (Addleman et al., 1995)。平井らはパルプ漂白能の高い菌株ほど高い MnP 活性を示し、これらの菌株のバイオブリーチング時には MnP が主なリグニン分解酵素活性として測定されることを報告している (Hirai et al., 1994)。パルプ漂白用に選抜された *Phanerochaete sordida* YK-624 株と白色腐朽菌 *IZU-154* 株は、高い MnP 活性を有すること、また、生産する MnP は *P. chrysosporium* の MnP と同様のクラシック型 MnP であることが報告されている (Matsubara et al., 1996、 Kondo et al., 1994、 Rüttimann-Johnson et al., 1994)。

これらの報告は、パルプの漂白系に関与するリグニン分解機構は菌株やリグニン分解酵素の種類によって異なることを示唆している。

本章では、WD1694 株のパルプ漂白に関与するリグニン分解機構を解明するため、この株の生産するリグニン分解酵素を分析し、その酵素を用いたパルプの酵素漂白について検討した。

2.2 リグニン分解酵素の特定

2.2.1 材料と方法

2.2.1.1 菌株

白色腐朽菌 *Phanerochaete crassa* WD1694 株 (*Porostereum crassa*) (和名：カミウロコタケ、農林水産省ジーンバンク登録番号：MAFF420737) は森林総合研究所腐朽病害研究室より入手した。*P. crassa* WD1694 株は、第 1 章と同様に、ポテトデキストロース寒天培地上で、4 °C で維持した。各試験前に、新たにポテトデキストロース寒天培地に植菌し、室温で培養後、生長した菌糸の輪郭部から、コルクローラーで径 6 mm の菌糸ペレットを打ち抜き、種菌調整に用いた。

2.2.1.2 パルプ

本章以降の試験には広葉樹未晒シクラフトパルプ(LUKP-B) (Kappa 価：12.7) (日本製紙(株) 八代工場製) を用いた。

2.2.1.3 パルプの菌(微生物) 処理

第1章「種菌の調製」の記載に従い、種菌を調製した。LUKP-B(乾燥重量2.5g)を300mlの三角フラスコに入れて滅菌し、*P. crassa* WD1694株の種菌8mlを駒込ピペットで植菌した後、26°Cで所定期間静置培養した。

2.2.1.4 酵素試料およびパルプ試料の調整

エースホモジナイザー AM-1(日本精機製)を用いて、*P. crassa* WD1694株を培養したパルプ培地を解繊した。試料培地を装置付属のステンレス製カップに入れ、リン酸緩衝液(0.01N, pH7.0)50mlを加えて氷温浴上で5分間粉碎した。解繊した試料はブフナー漏斗(経90mm)を用いて吸引濾過し、残渣をパルプ試料、ろ液を酵素試料として回収した。パルプ試料は蒸留水で良く洗浄し、濾過して脱水した後、カップー価、白色度および粘度測定に供した。ろ液はPD-10カラム(Sephadex G-25M、ファルマシア製)で脱塩後、リグニン分解酵素活性測定に用いた。

2.2.1.5 酵素活性測定

リグニン分解酵素活性として、LiP, MnP, Lac および PO の各活性を、下記に従って測定した。リグニンペルオキシダーゼ活性とマンガンペルオキシダーゼ活性は文献記載の方法を下記のように一部改変して測定した。(Tien and Kirk,1988、 Gold and Glenn,1988) キュベットに酵素と過酸化水素を除く各酵素活性測定用反応溶液(全容500 μ l)を入れた後、酵素試料を加えて良く混合した。LiP, MnP, および PO 測定の場合には反応溶液に最後に過酸化水素を加えて酵素反応を開始した。Lac 活性は Lac 反応溶液をキュベットに入れ、最後に Lac を加えて酵素反応を開始した。各酵素反応溶液中、基質の酸化に

よる生成物の増加に伴う吸光度の増加を室温（26°C）で HP Agilent 8452A UV-VIS フォトダイオードアレイ分光光度計（ヒューレットパッカー製）を用いて経時的に追跡し酵素活性を測定した。2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸 (ABTS) の酸化活性は 414nm、ベラトリルアルコールの酸化活性は 310nm の吸光度を測定した。モル吸光係数として ABTS($\epsilon_{at\ 414nm} = 36\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Mester and Field,1998)、ベラトリルアルコール($\epsilon_{at\ 310nm} = 9.3\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)を用いた(Tien and Kirk, 1988)。1 kat の酵素量は 1 秒間に 1 モルの基質を酸化する酵素量と定義した。

マンガンペルオキシダーゼ(MnP)反応溶液

乳酸緩衝液 (pH 3.5, 100mM)	340 μ l
ABTS 水溶液 (40mg/l)	25 μ l
硫酸マンガン水溶液 (10mM)	25 μ l
酵素試料	100 μ l
過酸化水素水溶液 (1mM)	10 μ l

ペルオキシダーゼ(PO)反応溶液

乳酸緩衝液 (pH 3.5, 100mM)	365 μ l
ABTS 水溶液 (40mg/l)	25 μ l
酵素試料	100 μ l
過酸化水素水溶液 (1mM)	10 μ l

リグニンペルオキシダーゼ(LiP)反応溶液

乳酸緩衝液 (pH 3.5, 100mM)	365 μ l
ベラトリルアルコール水溶液 (5mM)	25 μ l
酵素試料	100 μ l

過酸化水素水溶液 (1mM)	10 μ l
ラッカーゼ(Lac)反応溶液	
乳酸緩衝液 (pH 3.5, 100mM)	375 μ l
ABTS 水溶液 (40mg/l)	25 μ l
酵素試料	100 μ l

2.2.1.6 パルプの性質

カップー価は、TAPPI スタンドアード T236m-60 によって測定した。粘度は TAPPI 236 om-82 によって測定した。パルプ試料の一部を採取し、桐山アールト (径 60 mm) で濾過してハンドシートを作成し、JIS P8123 法によって白色度を測定した。

2.2.2 結果

P. crassa WD1694 株の LUKP 漂白に関与するリグニン分解酵素種を特定するため、菌処理したパルプの漂白効果と培地に分泌されるリグニン分解酵素活性を経時的に分析した。*P. crassa* WD1694 株を LUKP に植菌し、26°C で静置培養した後、カップー価、白色度、粘度の変化を測定した (Fig.2-1)。*P. crassa* WD1694 株で処理した LUKP のカップー価は、培養初期の 2-7 日後に 10 から 5 へ急激に減少したが、培養後期の 10-20 日間は殆ど変化しなかった。白色度は培養初期の 1-7 日後に 38 から 64 へ急激に増加したが、培養後期の 10-20 日間は 68 から 71 の増加幅に減少した。粘度は、培養初期の 1-10 日間に 21 から 12 に減少し、培養後期の 10-20 日間は殆ど変化しなかった。

カップー価、白色度、粘度の経時変化の測定と平行して、上述の LUKP 培地中に分泌されたリグニン分解酵素活性を経時的に追跡した (Fig.2-2)。リグニン分解酵素活性として、MnP、LiP、Lac 及び PO の活性を測定した。MnP 活性は培養 1-5 日間に急激に増加し、7-10 日間に急激に減少した。培養 3-7 日間に高い MnP 活性が検出され、培養 5 日後に最大値として 34×10^{-8} kat の MnP 活性が測定された。MnP 活性は培養 10 日以降減

少しだが、培養 20 日後まで観測された。PO 活性と Lac 活性は極微量、検出された。

LiP 活性は培養期間中検出されなかった。

LUKP の脱リグニンが生じる時期に顕著な MnP 活性が検出された一方、LiP と Lac の活性は殆ど検出されなかったことから、*P. crassa* WD1694 株の LUKP 漂白には MnP が主要な酵素として作用することが示された。

2.3 MnP 酵素漂白

2.3.1 材料と方法

2.3.1.1 MnP 粗酵素の採取

第 1 章「種菌の調製」の記載に従い、種菌を調製した。下記記載の MnP 生産用培地 2 リットルに、種菌を 200ml 加え、100rpm、34°C で 4 日間回旋しんとう培養後、菌体を濾過して除去し、培養ろ液 30°C で 4 日間培養した。培地を濾過して、ろ液を回収し、限外濾過濃縮後、脱塩し、MnP 粗酵素として使用した。

MnP 生産用培地

KH ₂ PO ₄	600	mg
K ₂ HPO ₄	400	mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	500	mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5	mg
Yeast extract	100	mg
Glucose	10	g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1	g
MnSO ₄ · 5H ₂ O	50	mg
Tween 80	0.05	%
milli Q 水	1000	ml

2.3.1.2 MnP 酵素漂白の条件検討①

MnP 酵素漂白の条件を決定するため、絶乾 1 g の LUKP-B を 0.07 μ kat の MnP で漂白する場合の pH、グルコースオキシダーゼ量、硫酸マンガン量、パルプ濃度を変化させた MnP 酵素漂白溶液に(下記表記載)、未晒しクラフトパルプを添加し、室温で 6 時間攪拌処理した。酵素処理後、反応溶液に 1N 水酸化ナトリウム水溶液 5 ml を添加し、5 分間攪拌後、パルプを濾過し、さらに蒸留水でろ液が中性になるまで洗浄し、濾過してシートを作成し、白色度を測定した。酵素処理条件によるパルプの白色度を比較し、pH、グルコースオキシダーゼ量、硫酸マンガン量、パルプ濃度条件を決定した。

MnP 酵素漂白溶液

MnP	0.07	μ kat
LUKP-B	1	g
硫酸マンガン	0.01 - 10	mM
グルコースオキシダーゼ	0.028 - 0.28	μ kat
グルコース	0.05	M
乳酸緩衝液 (pH4.0、100mM)	10 - 50	ml
パルプ濃度	1 - 10	%

2.3.1.3 MnP 酵素漂白の条件検討②

MnP によるパルプ漂白では、Tween 80 の添加によって、カップー価の低下や白色度の増加に効果のあることが報告されている。そこで、Tween 80 の添加による MnP 漂白効果の増加について分析した。MnP 酵素漂白の条件検討①によって決定した MnP 酵素漂白溶液に Tween 80 (0.005-0.5 %)を添加して酵素処理を行い、白色度を測定した。

2.3.1.4 MnP 酵素漂白の条件検討③

反応温度と反応時間は、MnP 酵素漂白の条件検討①②によって決定した Tween 80 を 0.05 % 添加した反応溶液を、30 °C と 40 °C、および 6 時間と 24 時間の条件で未晒シクラフトパルプを MnP 酵素漂白した後、白色度を測定した。

2.3.1.5 MnP 酵素量の効果

下記表のように酵素漂白溶液を調製し、添加する MnP 量を 0.07 – 0.7 μ kat の範囲で変化させ、40°C で 24 時間、攪拌処理した。酵素処理後のパルプは 0.1N 水酸化ナトリウム溶液で洗浄し、さらに良く水洗した後、Berzins の方法で銅価を測定した (Berzins 1966)。

MnP 酵素漂白溶液

MnP	0.07 – 0.7 μ kat
LUKP-B	1 g
硫酸マンガン	1 mM
グルコースオキシダーゼ	0.28 μ kat
グルコース	0.05 M
Tween 80	0.05 %
乳酸緩衝液 (pH4.0、100mM)	50 ml

2.3.1.6 MnP 酵素多段処理

上記「MnP 酵素量の効果」記載の一連の操作を、MnP 酵素処理 1 段とし、処理段数 0、1、2、4 と変化させ、パルプを処理した。試料の銅価を Berzins の方法 (Berzins 1966) で測定し、粘度を TAPPI 236 om-82 によって測定した。

2.3.1.7 生菌漂白

2.1-2-4 に記載の方法に従い、26°C で 2-7 日間パルプを菌処理した。菌処理後のパルプ

試料は 0.1N 水酸化ナトリウム溶液で洗浄し、さらに良く水洗した後、上記と同様にカップー価と粘度を測定した。

2.3.2 実験結果

MnP 酵素漂白の反応条件を決めるため、絶乾 1 g の LUKP-B を 0.07 μ kat の MnP で漂白する場合の酵素反応溶液の pH、グルコースオキシダーゼ量、硫酸マンガン量、パルプ濃度を変えて酵素処理を行い、パルプの白色度を比較した(Fig.2-3 A-D)。その結果、反応条件 pH3.5-4.0、グルコースオキシダーゼ量 0.28 μ kat、硫酸マンガン 1 mM、パルプ濃度 2-4 % のときにそれぞれ最も高い白色度が得られた(Fig.2-3 A-D)。Tween 80 の添加によって MnP 酵素漂白に効果があることが報告されている。そこで、酵素漂白溶液に添加する Tween 80 量を変化させてパルプの白色度を測定した(Fig.2-3 E)。Tween 80 を 0.005%から 0.05%に増加した場合、白色度は 39 から 45 と顕著に増加したが、0.5%まで増加しても白色度は 47 までしか増加しなかった。さらに、同条件で反応温度と処理時間を検討した結果、反応温度は 40°C、反応時間は 24 時間の条件下で白色度の増加が最大となった(Fig.2-3 F)。これらの結果より、MnP 酵素漂白の最適条件として、pH 4.0、グルコースオキシダーゼ量 0.28 μ kat、硫酸マンガン 1 mM、パルプ濃度 2 %、Tween 80、0.05%、40°C、24 時間の条件を決定した。

MnP 量の増加によってさらに漂白効果が増加する可能性があるため、MnP 量を 0.07 から 0.7 μ kat まで増加してパルプを MnP 酵素処理した結果を示した(Table 2-1)。MnP の添加量を 0.07 μ kat から 0.28 μ kat に増加すると、パルプのカップー価は 9.1 から 8.1 に減少したが、さらに 0.42 μ kat、0.7 μ kat と増加させてもカップー価は殆ど変化しなかった。対照実験として、MnP を除いた反応溶液で処理した場合は、カップー価は 9.7 までしか低下しなかった。これらの結果より、MnP 量の増加によるカップー価の低下には限界のあることが示唆された。

次に MnP 酵素処理を繰り返した場合の LUKP-B のカップー価の変化を分析した (Table 2-2)。添加する MnP 量は、上記の結果より 0.28 μ kat とし、0.1N 水酸化ナトリウ

ムで洗浄後、水洗する工程を MnP 処理 1 段とした。処理段数を変化させ、パルプ試料のカッパー価を測定した。LUKP-B のカッパー価 12.6 は、MnP 酵素 1 段処理によって 9.5、2 段処理で 7.4、4 段処理で 5.8 に減少し、処理段数の増加によってカッパー価の減少が認められた。対照実験として、MnP を加えない反応溶液で同様に 4 段処理した場合は、カッパー価は 9.6 までしか減少しなかった。

生菌処理と MnP 酵素多段処理した LUKP-B のカッパー価と粘度を測定し、比較した (Table 2-2)。MnP 酵素処理 1 段では、生菌処理 1 回に相当するカッパー価の低下は生じなかった。生菌処理 7 日間によってパルプのカッパー価 6.0、粘度 16.3 だったのに対し、粗酵素処理 4 段ではカッパー価 5.8、粘度 29.3 であった。これらの結果より、MnP 処理の場合は生菌処理と比較して、カッパー価の低下に伴う粘度の低下が少なく、反応の選択性が向上した。また、カッパー価を約 6 まで低下するのに要した時間は、生菌処理で 7 日間、MnP 処理では 4 段処理、4 日間であり、酵素処理によって反応時間が短縮した。

2.4 考察

白色腐朽菌の生産するリグニン分解酵素として、これまで LiP, MnP, VP, Lac の 4 種の酵素が知られており、各酵素にパルプの脱リグニンに関与する可能性が示唆されている。パルプの高漂白菌 WD1694 株のパルプ漂白時に生産されるリグニン分解酵素を分析した結果、高い Mn 依存性の PO 活性を検出したが、それ以外のリグニン分解酵素活性は殆ど検出されなかった。また、*P. crassa* WD 1694 株由来の MnP 粗酵素を用いた粗酵素処理によって LUKP-B のカッパー価の低下と白色度の増加が認められ、MnP による LUKP-B の脱リグニン効果が確認された。これらの結果は、WD1694 株によるパルプ漂白では MnP が主要な酵素として作用することを示していた。

MnP 酵素処理による LUKP-B の漂白では、生菌を用いた場合と比較してカッパー価の低下に伴う粘度低下が少なく、反応の選択性が向上した。LUKP-B のカッパー価を 6 に低下するのに、生菌漂白では 7 日間を要したが、粗酵素処理では 4 段、4 日に処理時間が短縮した。しかし、酵素処理一段に使用する MnP の量を増加しても漂白効果に限

界があり、生菌処理一回に相当する漂白効果を得るためには、MnP 処理を繰り返し行う必要があった。これらの結果より、MnP 粗酵素漂白系と生菌による漂白系には、MnP の作用条件に相違のある可能性が示唆された。

3. パルプ高漂白菌株(WD1694 株)のリグニン分解酵素の特定と分析

3.1 MnP 酵素の分析

3.1.1 緒言

白色腐朽菌の生産するリグニン分解に関する酵素は、LiP、MnP、VP、Lac が主要な酵素として知られている。Lac は、活性中心に銅を持つオキシダーゼ酵素であり、電子受容体として分子状酸素を利用し、フェノール性水酸基のフェノキシラジカルへの 1 電子酸化を行うことにより、種々のフェノール性芳香族化合物を酸化する (Wariishi, 2002)。一方、Lac 以外の LiP、MnP、VP はいずれも活性中心にヘムを持つペルオキシダーゼ (PO) 類であり、PO 型触媒サイクルを持つことが知られている。休止状態にある PO は、酸化基質である過酸化水素によって、二電子酸化型中間体 (compound I) に活性化され、還元基質の一電子酸化によって一電子酸化型中間体 (compound II) となり、再度の還元基質の一電子酸化によって休止型に戻る。PO が、この触媒サイクルを繰り返すことにより、基質の酸化反応が進行する (Wariishi, 2002)。LiP、MnP、VP は、触媒サイクルの基本的なメカニズムとフェノール性芳香族化合物を酸化しうる高い酸化力、および基質特性の広さという点で共通する性質を持つが、各酵素はそれぞれ異なった酵素機能を有している。LiP は、非フェノール性芳香族化合物をも酸化できる高い酸化還元電位を有する (Tien et al., 1986)。MnP は、最も良好な基質として Mn(II) を Mn(III) に酸化する機能を持ち、Mn(III) がフェノール性芳香族化合物を酸化する特有の触媒機構を持つ (Wariishi et al., 1988, 1992)。VP は LiP の持つ非フェノール性芳香族化合物の酸化能力と MnP の持つ Mn(II) 酸化能力の両方の機能を持つことが報告されている (Palma et al., 2000、Mester and Field, 1998、Martínez et al., 1996、Sarkar et al., 1997)。

本研究では、パルプ高漂白菌として *P. crassa* WD1694 株を選抜し、パルプ漂白を生じるリグニン分解酵素が、Mn(II) 存在下で ABTS 活性を示す Mn 依存性の PO であることを明らかにした。上述したように白色腐朽菌の生産する Mn 依存性の PO には、MnP と VP があり、異なる触媒機構を持つ。そこで、*P. crassa* WD1694 株によるパルプ漂白に機能する Mn 依存性 PO 酵素種を特定するため、酵素の精製と分析を行った。

3.1.2 材料と方法

3.1.2.1 菌株

本項目については、第2章「材料と方法」と同様に行った。

3.1.2.2 種菌の調整

種菌の培養には文献記載の培地を下記記載のように一部改変して用いた(Eriksson and Nishida, 1988)。種菌用培地 100ml を 300ml の三角フラスコに入れて滅菌し、予め、*P. crassa* WD1694 株を植菌した PDA プレートから 1-2-1 に記載の方法で得た菌糸ペレット 10 個を植菌した。100rpm、34°C で 4 日間回旋しんとう培養後、フラスコ内で菌体をハンディホモジナイザーで粉碎し、種菌として用いた。

種菌用培地			*Stock solution D		
KH ₂ PO ₄	600	mg	Fe(C ₆ H ₆ O ₇) · 3H ₂ O	12	g
K ₂ HPO ₄	400	mg	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	6.6	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	500	mg	MnSO ₄ · 8H ₂ O	5	g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5	mg	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1	g
Yeast extract	100	mg	CuSO ₄ · 7H ₂ O	1	g
Glucose	10	g	Thiamin · HCl	0.1	g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1	g	milli Q 水	1000	ml
Stock solution D*	1	ml			
milli Q 水	1000	ml			

3.1.2.3 MnP の生産

下記記載の MnP 生産用培地 100ml を 300ml の三角フラスコに入れて滅菌し、種菌 10ml を植菌した。100 rpm、34°C で 4 日間回旋しんとう培養後、菌体を濾過して除去し、培養ろ液を MnP の精製に用いた。

MnP 生産用培地

KH ₂ PO ₄	600	mg
K ₂ HPO ₄	400	mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	500	mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5	mg
Yeast extract	100	mg
Glucose	10	g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1	g
MnSO ₄ · 5H ₂ O	200	mg
Tween 80	0.05	%
milli Q 水	1000	ml

3.1.2.4 MnP の精製

P. crassa WD1694 株の培養 4 日後の培地をブフナー漏斗で吸引濾過し、培養濾液を回収した。1M NaOH 溶液を用いて、培養濾液(2.1 リットル)の pH を 5.9 に調整した後、10mM リン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したイオン交換樹脂 DEAE-セファロース CL-6B 20ml に粗酵素を吸着した。粗酵素を DEAE-セファロース CL-6B から 0.5M の NaCl を含む 10mM 酢酸緩衝液(pH5.5)50ml を用いて抽出した後、Waters W650 Advanced Protein Purification System (Waters 製)を用いて精製した。抽出液を脱塩濃縮し、装置に取り付けた 10mM リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化した DEAE-トヨパールカラム (1×5 cm) に添加した。20mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) を用いて NaCl の 0-0.5M の直線濃度勾配で溶出し、フラクションコレクター CHF121SA (ADVANTEC 製)を用いて、溶出液を 0.5 ml ずつ試験管に分取し、MnP 活性を示す画分を集めた。MnP 活性画分を PD-10 (Sephadex G-25M、GE ヘルスケア) で脱塩後、VIVASPIN 20 (VS2002、ザルトリウス製)を用いて限外濾過濃縮した。精製過程はすべて 4°C で行った。

3.1.2.5 酵素活性測定

MnP 酵素活性測定は MnSO_4 の酸化による 270 nm の吸光度の測定によって解析した。1 ユニットの酵素活性は 1 分間に 1 μ モルの基質を酸化する酵素量と定義した。標準的な反応条件は、50 mM マロン酸緩衝液 (pH 3.5)、5 mM 硫酸マンガン、20 μ M H_2O_2 及び、*P. crassa* WD1694 の MnP 適量 (約 0.07 μ g/ml) を含む反応溶液であった。MnP の基質特異性は、ABTS、DMP、ヴェラトリルアルコールのいずれかを上記の反応溶液に加え、ABTS は 414nm、DMP は 470 nm、ヴェラトリルアルコールは 310nm の吸光度の観測によって解析した。酵素反応は過酸化水素の添加によって開始した。1 unit の酵素活性は 1 分間に 1 μ mol の基質を酸化する酵素量と定義した。各基質のモル吸光係数は 2.1 章記載に従って用いた。

3.1.2.6 電気泳動

電気泳動には、Multiphor II 電気泳動システム (GE ヘルスケア社製、バッキンガム、英国) を用い、等電点電気泳動は、ゲルに Ampholine PAG plate pH 4.0-6.5 (GE ヘルスケア)、陽極液に 0.1M グルタミン酸 in 0.5M リン酸、陰極液に 0.1M β -アラニンを使用し、電圧 2000 V、電流 25 mA、電力 25 W、泳動時間 2.5 時間の条件で行った。SDS-PAGE はゲルに ExcelGel SDS Homogeneous 12.5 (GE ヘルスケア)、電極に PhastGel Buffer Strips SDS (GE ヘルスケア) を使用し、電圧 200 V、電流 50 mA、電力 30 W で 20 分間泳動後、さらに、電圧 600 V、電流 50 mA、電力 30W で 60 分間泳動泳動した。

3.1.2.7 ゲルの染色

クマシー染色には、以下の溶液を調製して行った。脱色液として 8% 酢酸を含む 25% エタノール水溶液を調製した。脱色液 100ml にクマシーブリリアントブルー R-250 (CBBR-250) 100 mg を加え、60°C で加温しながら溶解後、ゲルを染色した。30 分間染色後、脱色液を取り替えながらバックグラウンドの染色がなくなるまで脱色し、さらに蒸

留水を取り替えながら洗浄した。

3.1.2.8 活性染色

電気泳動ゲルを、2 mM β -ナフトール、2 mM 3-アミノ-9-エチルカルバゾール、100 μ M 硫酸マンガン、200 μ M 過酸化水素 H_2O_2 、20 % アセトンを含む 80mM 酢酸緩衝液(pH 4.5)からなる活性染色溶液に浸漬し MnP 酵素を染色した。MnP のバンドを染色した後、ゲルを 25 %エタノールと 8 % 酢酸からなる洗浄液で洗浄し、さらに蒸留水で洗浄した。

染色したゲルは、ゲル乾燥装置 AE-3701(ATTO 社製)を用いて加熱減圧吸引乾燥した。乾燥したゲルの画像データをスキャナー (Epson GT9800-F) で取り込み、分析に用いた。

3.1.2.9 N 末端アミノ酸配列の決定

Multiphor II 電気泳動システム(GE ヘルスケア社製、バッキングラム、英国)を用い、MnP を分離した等電点電気泳動ゲルを PVDF 膜 (バイオラッド社製、CA、USA) にブロッキングした。褐色の MnP の各バンドを PVDF 膜から切り出し、エドマン法で N 末端アミノ酸配列を決定した。

3.1.3 結果

MnP の生産条件

MnP は LiP と同様に *P. chrysosporium* の二次代謝期に生産されることが知られている (Buswell and Odier, 1987, Kirk, 1987)。また、*P. chrysosporium* において、窒素制限培地中の Mn (II) 濃度が MnP 活性に影響し、硫酸マンガン濃度 0-0.18 mM の場合に最大活性が検出されたことが報告されている (Brown et al., 1990)。そこで、*P. crassa* WD1694 株の MnP を高生産するための培養条件として、硫酸マンガン濃度と培養日数について検討した。Fig.1 は、硫酸マンガン濃度が 0.22mM と 2.2mM の窒素制限液体培地で *P. crassa* WD1694 株をしんとう培養し、経時的に培養液中の MnP 活性を測定した結果

を示す (Fig.3.1-1)。硫酸マンガン濃度が 0.22mM の条件下では、MnP 活性は培養 1 日目から 3 日目にかけて急激に増加し、3 日目以降は減少したが、培養 6 日目まで検出された。硫酸マンガン濃度が 2.2mM の条件下では、MnP 活性は培養 1 日目から 3 日目にかけて増加し、培養 3 日目以降減少したが、MnP 活性は培養期間中を通して、硫酸マンガン濃度 0.22mM のときより低かった。いずれの硫酸マンガン濃度においても、MnP の最大活性は、培養 3 日目に検出され、硫酸マンガン濃度 0.22mM のときは約 15×10^{-3} unit、2.2mM のときは約 5×10^{-3} unit の MnP 活性が検出された。この結果は、硫酸マンガン濃度 0.18 mM の場合に MnP 活性が最大となったとする *P. chrysosporium* の報告と一致する結果であった。

MnP の精製

P. crassa WD1694 株の MnP を精製するため、硫酸マンガン濃度 0.22mM の MnP 生産培地を用いて *P. crassa* WD1694 株を培養し、MnP の最大活性が測定された培養 3 日目の培養ろ液を濾過して回収した。培養ろ液中の MnP を DEAE-セファロース CL-6B に吸着、回収後、DEAE-トヨパールで精製した。精製段階を Table 3.1-1 に示した。*P. crassa* WD1694 株の MnP は 2 段階のカラムクロマトグラフィーにより、収率 28.9% で 432 倍に精製され、約 0.9 mg の精製 MnP を得た。精製 MnP は RZ 値 (タンパク質中のヘムタンパク質の精製度を表す値) (A_{406}/A_{280}) 3.67 を示し、SDS アクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分子量 48.3kDa に単一バンドとして確認された (Fig. 3.1-2)。精製 MnP は、等電点電気泳動 (IEF) で、非常に近接した等電点 (MnP 1: 4.61, MnP 2: 4.59, MnP 3: 4.52, MnP 4: 4.50) を持つ 4 本のバンドに分離した (Fig. 3.1-3)。これら 4 本のバンドはいずれも MnP の活性染色に陽性を示した。

N 末端アミノ酸配列

等電点電気泳動で分離した *P. crassa* WD1694 株の 4 つの MnP アイソザイムの N 末端アミノ酸配列をエドマン法で解析した。4 つの N 末端アミノ酸配列は 12 残基まで同一

であった。*P. crassa* WD1694 株由来の MnP の N 末端アミノ酸配列を、他の白色腐朽菌由来の MnP の N 末端アミノ酸配列と比較した結果を Table 3.1-2 に示した。*P. crassa* WD1694 株由来の MnP の N 末端アミノ酸配列は、*P. chrysosporium*、*P. sordida*、*IZU-154* の N 末端アミノ酸配列と高い相同性を示した。一方、*Bjerkandera sp.*BOS1, 2、*Bjerkandera sp.*BOS55、*Pleurotus eryngii*、*Trametes versicolor* 由来の MnP の N 末端アミノ酸配列とは相同性が低かった。

MnP の触媒特性

P. chrysosporium 由来の MnP は非フェノール性基質を酸化しないことが知られている。一方、*Pleurotus ostreatus* 由来の MnP では非フェノール性基質を酸化することが報告されており、異なる菌株由来の MnP には基質特異性に違いのある可能性がある。*P. crassa* WD1694 株の MnP の触媒活性の性質を明らかにするため、精製した *P. crassa* WD1694 株の MnP を用いて、基質特異性の解析を行った。MnP は Mn(II)の存在下、2,6-ジメトキシフェノール(DMP)と ABTS を酸化したが、ヴェラトリルアルコールは酸化しなかった。Mn(II)非存在下では、測定された酵素活性は低かったが、M(II)存在下と同様に DMP と ABTS に対する酸化活性を示し、ヴェラトリルアルコールは酸化しなかった。

P. crassa WD1694 の MnP の触媒機能を分析するため、定常状態で速度論的解析を行い、 K_m 値を測定した。*P. crassa* WD1694 株の MnP の Mn(II)に対するミカエリス定数は、 35.8×10^{-3} mM であった (Table 3.1-3)。一方、DMP に対する K_m 値は、Mn(II)存在下の場合に 7.75×10^{-3} mM であるのに対し、Mn(II)非存在下の場合は 30.7 mM と非常に高く、基質を効率的に酸化するには Mn(II)の存在が不可欠であることを示した。

P. crassa WD1694 株の MnP の温度安定性および pH 安定性を分析した。MnP を異なる温度条件下で 30 分間保持した後、残存活性を測定した結果、MnP は 40°C までは安定であったが、60°C 以上で失活した。また、異なる pH の緩衝液中、25°C で 18 時間酵素を保持した後の残存活性を測定した。MnP は pH 3.0-6.5 で安定だったが、pH 2.5 以下、及び、pH 7.0 以上では失活した。MnP の最適 pH は pH 3.0-4.0 であった。

以上の結果より、*P. crassa* WD1694 株の MnP は生産条件、触媒特性、N 末端アミノ酸配列、分子量、等電点について、*P. chrysosporium* 由来の MnP と類似性が高く、Mn(II) とフェノール性基質を酸化するが、非フェノール性基質を酸化しないクラシック型 MnP であることが明らかになった。

3.1.4 考察

未晒しクラフトパルプの漂白能力の高い *P. crassa* WD 1694 株は、Mn 依存性 PO を主要なリグニン分解酵素として生産していた。本章では、*P. crassa* WD 1694 株の Mn 依存性 PO の生産条件、精製、N 末端アミノ酸配列、及び、触媒特性について分析した。

P. crassa WD1694 株の MnP 生産において最適な Mn 濃度は 0.22mM であり、*P. chrysosporium* の場合の 0.73mM、および *P.sodida* の場合の 0.2mM と同様であった (Bonnarne and Jeffries, 1990、Rüttimann-Johnson et al., 1994)。

精製した *P. crassa* WD1694 株の MnP は、SDS-PAGE で 48.3kDa に単一バンドとして検出され、等電点電気泳動によって 4 本のバンドに分離した。*P. crassa* WD1694 株の MnP の分子量は 48.3kDa であり、*P. chrysosporium* (46 kDa)、*P. sordida* (45 kDa)、IZU-154 (43 kDa)分子量とほぼ同じ分子量を示した (Glenn 1985、Rüttimann-Johnson 1994、Matsubara et al., 1996)。*P. crassa* WD1694 株の 4 つのアイソザイムは pI4.5~4.6 の非常に狭い範囲に存在していた。これは、*P. sordida* (pI 3.3, 4.2, 5.3)、*P. chrysosporium* (pI 4.2, 4.5, 4.9)、IZU-154 (pI 3.7, 4.5, 4.9)と比較すると非常に近接する等電点だった

(Rüttimann-Johnson et al.,1994、Matsubara et al., 1996、 Pease and Tien,1992)。多くの白色腐朽菌の MnP の報告では、各菌株の持つ MnP アイソザイムは、同一分子量ではあるが、異なる等電点を持つことが知られており、*P. crassa* WD1694 株の MnP アイソザイムについても同様の結果が得られた(Leisola et al., 1987、Pease and Tien, 1992)。

P. crassa WD1694 株の MnP アイソザイムの N 末端アミノ酸配列は、クラシック型 MnP である *P. chrysosporium* 由来の N 末端アミノ酸配列、及び、*P.sodida*、IZU-154 由来の MnP の N 末端アミノ酸配列と相同性が高く、VP 活性を示す *Bjerkandera* の VP 及

び *P. ostreautus* 由来の MnP とは相同性が低かった (Table 3.1-2)。 *P. crassa* WD1694 株の 4 つのアイソザイムの N 末端アミノ酸配列は、12 アミノ酸残基までは同一であった。これまで等電点の異なる MnP アイソザイムは、N 末端アミノ酸配列が異なり、従って各 MnP は異なる遺伝子由来であることが多数報告されている。前述した *P.*

chryso sporium、 *P. sodida*、 IZU-154 の MnP の各アイソザイムも、異なる N 末端アミノ酸配列を持つことが報告されている。しかし、 *P. crassa* WD1694 株の 4 つの MnP アイソザイム(MnP 1, MnP 2, MnP 3, MnP 4)の N 末端アミノ酸配列は同一であったため、各タンパク質の起源が、同一遺伝子由来である可能性がある。しかし、カワラタケについて、同じ N 末端アミノ酸配列 10 残基を有し、異なる遺伝子に由来する 3 つの MnP と 2 つの LiP のアイソザイムの存在が報告された例もあるため(Johansson et al.,1993)、 *P. crassa* WD1694 株の 4 つの MnP アイソザイムの起源を明らかにするには遺伝子配列について更なる検討が必要である。

P. crassa WD1694 株の MnP の触媒特性について分析した。*P. crassa* WD1694 株の MnP は Mn(II)および Mn(II)存在下でのフェノール性基質 (DMP) に対して強いペルオキシダーゼ活性を示したが、Mn(II)存在下でも非フェノール性基質 (ヴェラトリルアルコール) は酸化しなかった。このような *P. crassa* WD1694 株の MnP の触媒特性は、 *P.*

chryso sporium 由来の MnP について報告された性質と一致するものであった (Glenn and Gold, 1985)。近年、MnP-LiP ハイブリッド型アイソザイムとして、*Bjerkandera sp.* BOS55 から VP、*P. ostreautus* から MnP、 *P. eryngii* から MnP1 and MnP2 が、報告された(Palma et al., 2000、 Mester and Field, 1998、 Martínez et al., 1996、 Sarkar et al., 1997)。VP は、基質として芳香族化合物よりマンガンが適している点では MnP と共通する性質を持つが、LiP と同様に非フェノール性の化合物を酸化する能力を持つ(Palma et al., 2000、 Martínez et al., 1996、 Sarkar et al., 1997)。MnP と VP を区別するには、触媒特性の解析が必要である。Table 3.1-4 に示したように、VP は、Mn(II)非存在下の DMP の酸化における Km 値は 41 - 950 μ M の範囲内にあり、Mn(II)非存在下においても基質の酸化が効率よく行われることを示している。一方、 *P. crassa* WD1694 株の MnP の Mn(II)非存在

下での DMP の酸化における K_m 値は、 $30.7 \times 10^3 \mu\text{M}$ と非常に高く、基質を効率的に酸化するには Mn(II) の存在が不可欠であることを示した。これらの結果より、*P. crassa* WD1694 株の MnP は VP ではなく、*P. chrysosporium* 由来の MnP と同様にクラシック型の MnP であることが明らかになった。

以上の結果より、*P. crassa* WD1694 株の MnP は、*P. chrysosporium* 由来のクラシック型 MnP とよく似た触媒特性と N 末端アミノ酸配列を持つことが明らかになった。これらの結果は、*P. crassa* WD1694 株の高い未晒クラフトパルプ漂白能力はクラシック型 MnP の高生産によるものであることを示唆した。しかし、*P. crassa* WD1694 株の 4 つの MnP アイソザイムは、同一の N 末端アミノ酸配列を示した点で、既往の報告とは異なっており、この点を解明するためには遺伝子についての解析が必要であることが示された。

3.2 MnP 遺伝子の分析

3.2.1 緒言

近年、多数蓄積された PO 類の遺伝子配列情報に基づいた分子系統学研究によって、植物と菌類の PO 類が、3つの異なるスーパーファミリー、すなわち、バクテリアと細胞内 PO を含むクラス I、菌類の分泌 PO 類を含むクラス II、植物の分泌 PO 類を含むクラス III に分類できることが報告された(Welinder, 1992)。クラス II の菌類の分泌 PO 類に含まれるリグニン分解 PO 類(LPO)は、遺伝子およびタンパク質の構造を根拠として、さらに LiP、MnP、VP の3つのグループに細分される(Martínez, 2002)。また、外生菌根菌、担子菌、子囊菌に及ぶ広範な菌類のリグニン分解ペルオキシダーゼ類の偏在性と多様性を示す系統学的な解析が報告されている(Morgenstein et al., 2008, 2010、 Bodeker et al., 2009、 Lundell et al., 2010)。これらの報告より、LPO の遺伝子構造によって、LPO の種類を区別することが可能になっている。

本研究では、*P. crassa* WD1694 株の生産する LPO を分析し、Mn 依存性の PO が主要な酵素であることを示した。また、この酵素を精製し、触媒機構を分析した結果、*P. crassa* WD1694 株の生産する Mn 依存性の PO は、VP ではなく、MnP であることを示した。しかし、VP と MnP の触媒機構には、共通する性質があり、*P. ostreatus* と *P. eryngii* の場合には、MnP が後に VP として再確認された例があった (Sarkar et al., 1997、Martínez et al., 1996、Martínez, 2002)。

白色腐朽菌の生産する LPO は複数のアイソザイムとして生産される例が多く、各アイソザイムが異なる遺伝子由来であることが報告されている (Rüttimann-Johnson et al., 1994、 Matsubara et al., 1996、 Pease and Tien, 1992)。しかし、*P. crassa* WD1694 株由来の4個の MnP タンパク質は、同一の N 末端アミノ酸配列を持つことが示され、これまでの報告とは異なる結果が得られた (Table 3.1-2)。

そこで、本章では、*P. crassa* WD1694 株の MnP 遺伝子を分析し、遺伝子配列情報に基づいた LPO 酵素種の特定を行った。また、*P. crassa* WD1694 株の遺伝子から推定された N 末端アミノ酸配列を、先に分析した *P. crassa* WD1694 株の MnP の N 末端アミノ

酸配列と比較し、MnP 酵素をコードする遺伝子を分析した。

3.2.2 材料と方法

遺伝子解析

P. crassa WD1694 株のゲノム遺伝子は、培養菌体から CTAB 法を用いて単離精製した。*P. chrysosporium* 由来の MnP 遺伝子の既知配列から degenerated primer を作成し、*P. crassa* WD1694 株のゲノムから、4 個の MnP 遺伝子部分配列を得た。これをもとにインバース PCR を行い、*P. crassa* WD1694 菌の MnP 遺伝子断片を取得した。pTA2 ベクター (Target Clone TOYOBO Co., LTD) と大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α (Competent Quick DH5 α , TOYOBO Co., LTD)を用いて *P. crassa* MnP 遺伝子断片をクローニングし、シーケンス解析した。

3.2.3 結果と考察

P. crassa WD1694 株の MnP 遺伝子を分析し、3 組のアレル *P. crassa mnpA2* (DDBJ Accession number LC020094, LC020095), *P. crassa mnpB2* (LC020097, LC020098), *P. crassa mnpB3* (LC020099, LC020100)と、*P. crassa mnpA3* (LC020096) からなる 4 ゲノム遺伝子を決定した (Table 3.2-1)。次いで、これら *P. crassa* MnP の 4 ゲノム遺伝子のエクソン-イントロン構造を解析した結果を Fig. 3.2-1 に示す。4 個の *P. crassa mnp* 遺伝子は、いずれも *P. chrysosporium* 由来の MnP 遺伝子と相同性が高かった。特に、*P. crassa mnpB2* と *P. crassa mnpB3* は *P. chrysosporium* 由来の MnP 遺伝子 *P. chrysosporium mnp2* と相同性が高く、*P. crassa mnpA3* は *P. chrysosporium mnp3* と相同性が高いことが明らかになった。しかし、*P. crassa* MnP の 4 ゲノム遺伝子は、*P. chrysosporium* 由来の LiP 遺伝子、および、*P. eryngii* 由来の VP 遺伝子と *T. versicolor* 由来の MnP (VP)遺伝子とは明確に構造が異なっていた。これらの結果より、*P. crassa* WD1694 株の MnP 酵素が VP ではなく、MnP であることが遺伝子構造からも確認された。

次に、*P. crassa* WD1694 株の 4 個の MnP 遺伝子から推定された N 末端アミノ酸配列

を、3.1 章で分析した MnP 酵素の N 末端アミノ酸配列と比較した (Fig. 3.2-2)。WD1694 株の 4 個の MnP 遺伝子、すなわち *P. crassa mnpA2*、*P. crassa mnpB2*、*P. crassa mnpB3*、*P. crassa mnpA3* の各塩基配列から推定された N 末端アミノ酸配列は、それぞれ異なっていた。そのうち、*P. crassa mnpB3* 遺伝子配列から推定された N 末端アミノ酸配列のみが、*P. crassa* WD1694 株の MnP の N 末端アミノ酸配列と一致した。これらの結果より *P. crassa mnpB3* 遺伝子一個から 4 個の異なる MnP タンパク質が生成したことが示唆された。これまで、等電点の異なる MnP アイソザイムは異なる遺伝子でコードされることが多数報告されているが、この結果は MnP 遺伝子一個から複数の MnP タンパク質が生じることを示唆していた。

以上の結果より、*P. crassa* WD1694 株のパルプ漂白に機能する Mn 依存性 PO は、VP ではなく MnP であることが遺伝子構造からも明らかになった。

4. *P. crassa* WD1694 株のオキシダーゼ酵素の決定と MnP との関連

4.1 緒言

白色腐朽菌はリグニン分解酵素を菌体外に分泌してリグニンを分解することが知られている。リグニン分解酵素として LiP, MnP, VP 及び Lac が知られており、そのうち Lac を除く LiP, MnP, VP はペルオキシダーゼ類であるため、触媒機能の発現に過酸化水素を必要とすることが明らかになっている。

白色腐朽菌では、オキシダーゼがリグニン分解ペルオキシダーゼ類に過酸化水素を生産供給するとされており、以前より様々なオキシダーゼ酵素がその候補として報告されてきた。その中には、脂肪酸アシル-CoA-オキシダーゼ(Green and Gould, 1984)やメタノールオキシダーゼ(Nishida and Eriksson, 1987)およびグルコース-1-オキシダーゼ(Kelley and Reddy, 1986)、グルコース-2-オキシダーゼ(Eriksson, 1986)など、細胞内のオキシダーゼ酵素も含まれていた。ジアミノベンチジン (DAB) を用いた PO 活性染色によって、細胞膜と細胞壁の間隙にあるペリプラズムに過酸化水素の生産を指摘した報告もある (Forney et al., 1982)。物理的には、過酸化水素は分子量が低く、容易に拡散するため、細胞内に生産されても菌体外に拡散する可能性はある。しかし、細胞内では過酸化水素を含む活性酸素は厳密に生成利用消去が制御されているため、細胞内で生成した過酸化水素が菌体外で利用されることは考えにくい。特に白色腐朽菌の細胞はカタラーゼ活性が高く (Green and Gould 1983)、細胞内で生成された過酸化水素が細胞外に供給される可能性は低いと考えられている。

一方、菌体外で活性が検出されたオキシダーゼとして、2-ピラノースオキシダーゼ、グリオキサールオキシダーゼ、アリルアルコールオキシダーゼについての報告がある。グルコース酸化活性を持つ 2-ピラノースオキシダーゼは、細胞が分解する過程 (オートリシスに付随して) で菌体外に検出されることが報告されている (Daniel et al., 1992)。グリオキサールオキシダーゼは、*P. chrysosporium* のリグニン分解性培地に見いだされ、グリオキサールオキシダーゼの基質となるグリオキサールとメチルグリオキサールも、同じ培地中に生産されることが確認された (Kersten and Kirk 1987)。アリルアルコールオ

キシダーゼは *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* と *Bjerkandera adustai* などから、菌体外酵素として検出され、4-メトキシベンジルアルコールなどの第一級芳香族アルコールを酸化することが知られている(Bourbonnais and Paice, 1988、Sannia et al,1991、 Guillen et al., 1992、 Muheim et al., 1990)。

P. crassa WD1694 株は、パルプの脱リグニンを生じるリグニン分解酵素として主に MnP を生産することを示した。本章では、*P. crassa* WD1694 株のリグニン分解系で作用しているオキシダーゼ酵素の分析を行い、酵素の種類と MnP との関連性について検討した。

4.2 材料と方法

4.2.1 菌株

4.2.2 種菌の調整

4.2.3 培養条件

以上の項目については、第2章「2.2-2 材料と方法」と同様に行なった。

4.2.4 酵素活性

オキシダーゼ活性及びグリオキサールオキシダーゼ活性は、下記の各反応溶液（全容 500 μ l）を調製しペルオキシダーゼ共役試験法によって測定した(Kersten, 1990)。キュベットにリン酸緩衝液、オキシダーゼ基質、試料を入れ良く混合し、室温（26°C）で3分間オキシダーゼとオキシダーゼ基質（グルコース、メタノール、メチルグリオキサール、4-メトキシベンジルアルコール）を反応させた後、ABTS とホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を加えた。オキシダーゼによる過酸化水素の生成を、HRP による ABTS の酸化によって検出測定した。ABTS の酸化に伴う吸光度の増加を「2.1-2-6 酵素活性測定」記載と同様にして測定した。1 unit の酵素活性は1分間に1 μ mol の基質を酸化する酵素量と定義した。

オキシダーゼ反応溶液

リン酸緩衝液 (pH 6.0、10mM)	340 μ l
オキシダーゼ基質 (70mM)	25 μ l
オキシダーゼ試料	100 μ l
ABTS 水溶液 (40mg/l)	25 μ l
HRP type II (SIGMA-ALDRICH)	1 μ g

グリオキサールオキシダーゼ反応溶液

リン酸緩衝液 (pH 6.0、10mM)	440 μ l
メチルグリオキサール (70mM)	25 μ l
グリオキサールオキシダーゼ	10 μ l
ABTS 水溶液 (40mg/l)	25 μ l
HRP type II (SIGMA-ALDRICH)	1 μ g

4.2.5 精製

P. crassa WD1694 株の培養 4 日後の培地をブフナー漏斗で吸引濾過し、菌体を除去した。培養濾液を回収し、10mM 酢酸緩衝液(pH 3.0)で平衡化したイオン交換樹脂 SP-セファロース(GE ヘルスケア) 20ml に粗酵素を吸着した。粗酵素を 0.5M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.0) 50ml を用いて抽出後、VIVASPIN 20 (VS2002,ザルトリウス製)を用いて限外濾過濃縮した。濃縮した試料を PD-10 (Sephadex G-25M、GE ヘルスケア) で脱塩した後、10 mM リン酸緩衝液 (pH6.0)で平衡化した DEAE-セファロースカラム(1x5 cm)に添加した。これを 10 mM 酢酸緩衝液 (pH5.6) 2 ml で溶出し、得られたタンパク質溶液を VIVASPIN 20 を用いて限外濾過濃縮した。精製過程はすべて 4°Cで行った。

4.2.6 電気泳動

本項目については、第2章「2.2-2 材料と方法」と同様に行なった。

4.3 結果

白色腐朽菌のリグニン分解ペルオキシダーゼ反応では、オキシダーゼがペルオキシダーゼに過酸化水素を生産し供給すると考えられている。これまでに、リグニン分解に過酸化水素を供給する可能性がある酵素として、グルコースオキシダーゼ、グリオキサールオキシダーゼ、アリルアルコールオキシダーゼ、メタノールオキシダーゼが報告されている。

P. crassa WD1694 株の MnP に過酸化水素を供給するオキシダーゼの種類を明らかにするため、MnP 生産用培地 (3.1.2 材料と方法に記載) で *P. crassa* WD1694 株を培養し、4 日間培養後の培養ろ液を採取し、オキシダーゼ酵素活性を解析した。グルコースオキシダーゼ、メタノールオキシダーゼ、グリオキサールオキシダーゼ(GLOX)、アリルアルコールオキシダーゼ活性を測定するため、既報に従って、オキシダーゼ基質としてそれぞれグルコース、メタノール、メチルグリオキサール、4-メトキシベンジルアルコールを用いた。*P. chrysosporium* の GLOX を用いた分析結果より、メチルグリオキサールのほうがグリオキサールより良好な基質であることが報告されているため(Kerstern 1990)、本研究ではメチルグリオキサールを基質に用いた。試料は、各オキシダーゼ基質を含む 10mM リン酸緩衝液 (pH6.0)中、ホースラディッシュペルオキシダーゼ存在下、生じた過酸化水素量を ABTS の酸化活性として測定した。その結果、GLOX 活性を検出した(Fig.4-1)。メタノールオキシダーゼ活性とグルコースオキシダーゼ活性がわずかに検出されたが、アリルアルコールオキシダーゼは検出されなかった。

培養 4 日後の培養ろ液を回収し、GLOX を精製した。回収した培養ろ液を SP-セファロースに吸着し、0.5M NaCl in 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.0)で溶出し、脱塩、および限外濾過濃縮した。得られた試料を 10 mM リン酸緩衝液 (pH6.0)で平衡化した DEAE-セファロースカラム(1x5 cm)に添加した後、10 mM 酢酸緩衝液 (pH5.6)で GLOX 活性画

分を溶出し、得られたタンパク質溶液を限外濾過して脱塩濃縮した。精製した GLOX は SDS-PAGE で分子量 66kDa に単一バンドを示した(Fig.4-2)。精製した GLOX の N 末端アミノ酸配列を解析した結果、Ala Pro Gly Trp Lys Phe Thr Leu Gln Pro のシーケンスが得られた。*P. chrysosporium* の GLOX は SDS-PAGE で分子量 68kDa を示すこと (Kerstern 1993 PNAS)、および N 末端アミノ酸配列が Ala Pro Gly Trp Ala Phe Ala Leu Leu Pro であることが報告されており、*P. crassa* WD1694 株の GLOX は *P. chrysosporium* の GLOX と相同性が高いことが明らかになった (Table 4-1)。

以上の結果より、*P. crassa* WD1694 株は MnP の生産条件下で GLOX を生産することが明らかとなり、*P. crassa* WD1694 株では、GLOX が MnP に過酸化水素を供給する可能性が高いことが示唆された。次に、*P. crassa* WD1694 株の MnP 活性と GLOX 活性の生産に相関が認められるか分析した。

P. chrysosporium では、LiP および MnP が生産される培養条件で、GLOX の生産が認められることが報告されている。*P. crassa* WD1694 株のパルプ漂白培地および窒素制限液体培地からは高い MnP 活性が検出されるが、LiP 活性は検出されないことを報告した。そこで、MnP の高生産条件として知られている $MnSO_4$ の添加の効果について、*P. crassa* WD1694 株の GLOX の生産に及ぼす影響を解析した。培地に添加する $MnSO_4$ 濃度を 0-400 mM の範囲で変化させ、MnP 活性と GLOX 活性を測定した (Fig.4-3)。MnP 活性は $MnSO_4$ 濃度 100 mM の時に最大となり、GLOX も $MnSO_4$ 濃度 100 mM の時に最大活性を示した。また、培地への Tween 80 の添加は *P. crassa* WD1694 株の MnP の活性を増加することを第 2 章で示したが、GLOX 活性も増加することが確認された (Fig.4-4)。以上の結果、GLOX 活性は MnP 活性と同様に $MnSO_4$ と Tween 80 の添加により生産量が増加しており、MnP と GLOX の生産量に相関のあることが明らかになった。

次に、MnP 活性と GLOX 活性を経時的に測定し、酵素生産の時期的な関連性を分析した。MnP 活性は培養ろ液を直接試料として測定することが可能であったが、GLOX は活性量が低く、活性を測定するために、培養ろ液の濃縮が必要であった (Fig.4-5)。MnP と GLOX の各酵素活性の最大値が測定されたときのタンパク質の量比は、GLOX :

MnP は 1 : 100 であった。培養ろ液中の各酵素活性を経時的に測定した結果では、GLOX 活性は MnP 活性が検出された 3 日後に検出され、菌体外への分泌時期は GLOX が MnP の 2-3 日後であることが示された。(Fig.4-5)。また、GLOX 活性の最大値は、MnP 活性の最大値の 2 日後に測定された。これらの結果は、MnP と GLOX が同時期に生産されることを示していた。

以上の結果より、*P. crassa* WD1694 株の MnP と GLOX の生産には生産量と生産時期に相関が認められることが示された。*P. crassa* WD1694 株は、GLOX が過酸化水素を生産し MnP に供給している可能性が高いことが示唆された。

4.4 考察

P. crassa WD1694 株は、リグニン分解酵素として MnP を生産することを示した。MnP を含むリグニン分解ペルオキシダーゼ類は、過酸化水素を必要とする触媒機構を持つことが明らかになっている。白色腐朽菌のリグニン分解ペルオキシダーゼ類の過酸化水素の供給源として、古くからオキシダーゼ酵素の関与が提案されている。

本章では、*P. crassa* WD1694 株の MnP に過酸化水素を供給するオキシダーゼを解明するため、MnP 生産条件下で検出されるオキシダーゼ酵素を分析した。リグニン分解酵素系への関与が提案されたオキシダーゼ酵素のうち、菌体内で検出された fatty-acyl-CoA oxidase を除く、グリオキサールオキシダーゼ、アリルアルコールオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、メタノールオキシダーゼ活性を測定した。その結果、グリオキサールオキシダーゼ活性を検出した。グルコースオキシダーゼとメタノールオキシダーゼは、ごくわずかに検出されたが、アリルアルコールオキシダーゼは全く検出されなかった。*P. crassa* WD1694 株の GLOX を生産し、精製して、分子量と N 末端アミノ酸配列を分析し、いずれも *P. chrysosporium* 由来の GLOX と相同性が高いことを示した(Kerstern PNAS 1990,1993)。これらの結果から、*P. crassa* WD1694 株は、MnP 生産条件下でグリオキサールオキシダーゼを主なオキシダーゼとして生産することを明らかにした。

グリオキサールオキシダーゼは、*P. chrysosporium* の窒素制限培地中、LiP の生産と同時期に検出され、同じ培地中にグリオキサールオキシダーゼの基質となるグリオキサールとメチルグリオキサール(MG)も生産されることが報告されている(Kerstern1987J Bac)。また、精製した GLOX は MG の添加のみではオキシダーゼ活性による酸素消費を示さず、LiP とベラトリルアルコールの添加によって触媒機能が活性化されることが示された (Kerstern1990 PNAS)。これらの結果から *P. chrysosporium* では、GLOX と LiP の生理的な関連性の高さが明らかになっている。

P. crassa WD1694 株はリグニン分解酵素として MnP を高生産するが、LiP 活性は検出されないことを 2.1 章で示した。そこで、*P. crassa* WD1694 株の MnP 生産と GLOX 生産に関連性があるか分析した。

MnP と LiP はいずれも二次代謝期に窒素源の制限下で生産されるが、その生産条件には異なる点もある。Mn(II)の窒素制限培地への添加は *P. chrysosporium* の LiP 活性を低下する一方、MnP 活性を増加する効果を示すことが報告されている(Bonnarme and Jeffries 1990, Brown et al.1990, Perie and Gold 1991)。窒素制限培地への $MnSO_4$ の添加によって、*P. crassa* WD1694 株の GLOX 活性は、MnP 活性と同様に増加し、いずれの酵素活性も $MnSO_4$ 濃度 100 mM の時に最大活性を示した。*P. chrysosporium* の LiP 生産は、しんとう培養によって抑制されるが、Tween 80 の添加が LiP 生産量を増加することが報告されている (Asther M and Corrieu G 1987)。*P. crassa* WD1694 株の窒素制限培地に Tween 80 を添加し、しんとう培養した結果、MnP と GLOX の両方の活性量の増加が確認された。

P. crassa WD1694 株の GLOX と MnP の活性を経時的に測定した結果 (Fig.5-6, 7)、GLOX と MnP 活性の分泌と最大活性は、ほぼ同時期に検出されることが明らかになった。これらの結果より、*P. crassa* WD1694 株のリグニン分解系では、MnP と GLOX が関連して生産され、主要なリグニン分解系として機能することが示唆された。

Fig.5-6, 7 のグラフでは、MnP と GLOX の活性量に約 200 倍の差が認められた。また、MnP と GLOX のタンパク量に顕著な差があることは、各酵素の精製過程でのタンパク

質量の定量結果と、電気泳動での各酵素のバンドの濃度差から明確に確認された。

MnP や LiP が培地溶液中で主要タンパク質であるのに対し、GLOX が微量タンパク質であることは、*P. chrysosporium* の GLOX に関する報告に記載されている。Kerstern らは、GLOX (198kcat) と LiP (7.8kcat) の分子活性(kcat)を比較し、GLOX の活性効率が LiP の活性効率よりはるかに高いことで、GLOX が少量であることが補われる可能性を指摘した。

上述したように、GLOX と LiP、MnP には強い関連性のあることが示されたが、生体中や培地中で、GLOX と LiP、MnP がどのように関連して反応するかについて分析された例は殆どない。そこで、次章以降では、培地中での GLOX と MnP との関連性について分析を進めることにした。

5. *P. crassa* WD1694 株の MnP 反応の組織化学的分析

5.1 パルプ培地中の WD1694 株の MnP 反応の検出

5.1.1 緒言

白色腐朽菌によるパルプ漂白の研究では、高い漂白能力を示した菌株の多くから MnP が検出されている(Paice et al. 1993, Hirai et al., 1994, Kondo et al., 1994, Kaneko et al., 1995, Katagiri et al., 1995)。MnP は触媒機構上、過酸化水素を必要とするが、過剰な過酸化水素の供給によって失活することが知られている (Wariishi et al. 1992, 割石 2002)。

カワラタケによるパルプの漂白では、MnP が主要酵素として作用すること、パルプのカッパー価の低下と白色度の増加に伴い、メタノールが生成することが示された (Paice et al. 1993)。カワラタケの菌漂白培地にカタラーゼを添加するとカッパー価の低下とメタノール生成が阻害されることが確認され、カワラタケの菌漂白に過酸化水素が必要とされることが確認された (Paice et al. 1993)。白色腐朽菌はオキシダーゼによってリグニン分解に必要とされる過酸化水素を生産するとされ、ヒラタケ類からベラトリルアルコールオキシダーゼ、および *P. chrysosporium* からグルコース-1 オキシダーゼ、GLOX が報告されている (Eriksson et al., 1986, Kerstern and Kirk 1987)。しかし、カワラ

タケの菌漂白培地からは、これらのオキシダーゼ類は検出されなかった(Bourbonnais and Paice 1988、Reid and Paice, 1994、Archibald et al., 1997)。

近藤らは *P. sordida* YK-624 株由来の MnP による酵素漂白系で、MnP の酵素量が 100U と 1000U の場合で過酸化水素の添加量の影響を分析し、100U の場合には過酸化水素の添加量が 5-10 mM の場合に最大となることを示した。また、MnP 酵素反応系に過酸化水素を外部から継続的に直接添加する方法およびグルコースオキシダーゼとグルコースを加えて反応系内で過酸化水素を生成する方法が検討され、いずれの方法でもパルプ漂白が生じることが確認された (Kondo et al., 1994、Harazono et al., 1996)。

これらの報告では、白色腐朽菌や MnP による酵素漂白系では過酸化水素の供給法が重要であることが指摘され、低濃度で継続的に供給される場合に最も効果のあることが指摘されたが、生菌漂白系で過酸化水素が MnP に供給される機構の詳細は明らかになっていない(Paice et al., 1993、Kondo et al., 1994、Harazono et al., 1996)。

一般に、白色腐朽菌は、MnP などのリグニン分解酵素を窒素制限条件の液体培地に分泌することが知られている (割石 2002)。生菌によるパルプ漂白系では、分泌されたリグニン分解酵素が培地溶液部に分泌され、菌体外酵素として単純に作用し、リグニン分解が進行している可能性が高いものの、一方で、MnP は、触媒サイクルの関係から、過酸化水素の供給を必要とするため (Wariishi et al. 1992、割石 2002)、任意の場所で MnP が作用することには無理があるとも考えられる。また、生菌によるパルプ漂白系において、MnP によるリグニン分解反応の反応場所に関する組織学的な知見も乏しいのが現状である。

本研究では、*P. crassa* WD1694 株の LUKP 漂白には主に MnP が作用することを解明し、この株由来の MnP を用いて LUKP の漂白が生じることを確認した。また、*P. crassa* WD1694 株の窒素制限液体培地から MnP の生産時期と同時期に GLOX が検出され、また、MnP 活性量と GLOX 活性量には相関のあることを明らかにした。これらの結果より、*P. crassa* WD1694 株によるパルプ漂白系では、菌体外で GLOX により MnP に過酸化水素が供給されている可能性がある。そこで、本章では、*P. crassa* WD1694 株のパル

ブ培地中で MnP に過酸化水素が供給される機構を解明するため、始めに過酸化水素が供給される場所の特定を試みた。菌体外で GLOX が生成した過酸化水素や MnP が生成した Mn(III) は培地溶液中に容易に拡散すると想定されるため、MnP に過酸化水素が供給される場所を検出するには、これらの拡散を防ぎ、その場で固定する検出法を選択する必要がある。

これまで、MnP 活性の分析には、ABTS やグアヤコールなどの発色性基質が利用されてきた (Gold and Glenn 1988, Paszczyński et al. 1988)。しかし、これらの発色性基質の生成物は可溶性であるため、MnP の反応場所の検出には適していなかった。一方、ジアミノベンジジン (DAB) やアミノエチルカルバゾール (AEC) などのように、ペルオキシダーゼ (PO) 酸化により発色と同時に重合して沈殿を生成し、組織に沈着する発色性基質がある。実際、白色腐朽菌の研究例として、*P. chrysosporium* のリグニン分解 PO 類の分布状態をベンジジン染色によって分析した報告や *Pycnoporus cinnabarinus* のラッカーゼの分布を 2,6-ジメトキシフェノール (2,6-DMP) で分析した報告などがある (Mouhka et al. 1993, Jones and Lonergan 1999)。テトラメチルベンジジン (TMBZ) は、DAB、AEC、2,6-DMP と同様に重合性の PO 基質であるが、DAB、AEC、2,6-DMP が褐色系であるのに対し、TMBZ は青色に発色するため、褐色に着色した未晒シクラフトパルプ培地でも発色が明確に識別できる (Liem et al. 1979, Cattabeo and Luong 1994)。

以上のことから、本章では、TMBZ を用いて *P. crassa* WD1694 株の生菌が生産した MnP に過酸化水素が供給される場所、すなわち MnP の反応場所を検出し、組織化学的に分析した。

5.1.2 材料と方法

5.1.2.1 菌株

5.1.2.2 パルプ

本項目については、第 2 章「材料と方法」と同様に行った。

5.1.2.3 種菌の調製

本項目については、第3章「3.1.2 材料と方法」と同様に行なった。

5.1.2.3 試薬

MnP 反応の検出には、BM Blue POD Substrate, precipitating (沈殿性 3,3'-5,5'-テトラメチルベンチジン溶液、ロシュ・ダイアグノスティックス製、TMBZ)、菌体およびスライムの染色には、クマシーブリリアントブルーR250 (フルカ製、CBB) およびフロキシニン B (ナカライテスク製) を使用した。

5.1.2.4 顕微鏡

顕微鏡観察には、Optiphot 顕微鏡 (ニコン製) または倒立顕微鏡 Nikon Eclipse TE2000-U (ニコン製) を使用した。

5.1.2.5 TMBZ 発色の予備試験

P. crassa WD1694 株由来の MnP を、既報に従って得た (Takano et al. 2004)。次いで、MnP 0.1 unit、広葉樹未晒シクラフトパルプ (LUKP) 2%、2 mM MnSO₄、0.02 mM 過酸化水素を含むマロン酸緩衝液 (pH3.5, 50mM) を、酵素溶液 (全容量 1.0 ml) として調製した。酵素溶液に TMBZ 0.1 ml を加え、室温で 15 分間反応後、その反応溶液を目視観察および顕微鏡観察に供した。

5.1.2.6 *P. crassa* WD1694 株の TMBZ 添加 LUKP 培地での培養

3 種類の TMBZ 添加 LUKP 培地 (パルプ濃度 25%、2.5%、0.5%) を調製、滅菌後、種菌を植菌し、Table 5.1-1 の条件で、所定期間培養を行った。その後、培地試料を目視観察および顕微鏡観察に供した。

5.1.2.7 CBB 染色

0.1% CBB R250 染色液 (エタノール : 25%、酢酸 : 8%、蒸留水 : 67%、体積比) を調製した。培養した培地試料を 500 μl 採取し、染色液 (1ml) を加え室温で 30 分間放

置した。次いで、培地試料を上清の着色がなくなるまで蒸留水で静かに洗浄し、顕微鏡観察に供した。

5.1.2.8 フロキシシン B 染色

20% フロキシシン B 水溶液を調製した。上述の培地試料を 500 μ l 採取し、染色液 1ml を加え室温で 30 分間放置した。菌体試料を上清の着色がなくなるまで蒸留水で静かに洗浄し、顕微鏡観察に供した。

5.1.3 結果

TMBZ 発色の予備試験

市販の PO 染色用試薬 TMBZ は、PO 類による酸化によって発色と同時に重合沈殿する性質があり、これにより、PO 類の反応場所を特定することが期待される。そこで、培養実験に先立ち、*P. crassa* WD1694 株が分泌する MnP と TMBZ の反応性を検討した。最初に、*P. crassa* WD1694 株から採取した MnP、LUKP、硫酸マンガン、過酸化水素を含むマロン酸緩衝液に TMBZ を加えた反応液を調製し、室温で 15 分間反応させたところ、反応液全体が均一に呈色した (Fig.5.1-1a)。また、反応液の一部を採取し、顕微鏡観察したところ、パルプが分散している反応液中に、TMBZ の発色した沈殿が多数認められた (Fig.5.1-1b)。これにより、TMBZ が、*P. crassa* WD1694 株の MnP により発色沈殿を生じることが確認された。

TMBZ 発色試験

P. crassa WD1694 株を TMBZ とともに、3 種類の培養条件で 3 日間培養した。なお、培養条件 A はパルプを多く含む固体培地、B は液体培地 (静置培養)、C は液体培地 (振盪培養) のモデルとして設定した。3 条件の培養結果を Fig. 5.1-2 に示す。培養条件 A では、*P. crassa* WD1694 株とパルプが小塊状に固まり、TMBZ の発色沈殿は、その小塊表面に認められた (Fig. 5.1-2a)。一方、培養条件 B では、パルプを含む溶液部のほぼ全

体がゲル化し、TMBZ の発色沈殿は、ゲル化しなかった少量の溶液部には認められず、ゲルの上部表面に観察された (Fig. 5.1-2b)。また、培養条件 C では、直径 1-1.5 mm 程度のパルプ小塊が多数生成し、TMBZ の発色沈殿は、培地溶液中には認められず、その小塊の表面に存在していた (Fig. 5.1-2c)。なお、各培養条件において、TMBZ 無添加の系、および、*P. crassa* WD1694 株無添加の系を対照実験として実施したが、培地に発色は認められなかった。

次に、所定日数培養後の TMBZ 発色沈殿を含む菌体試料を採取し、光学顕微鏡で観察した。その結果を Fig. 5.1-3 に示す。培養条件 A, B, C の全てにおいて、*P. crassa* WD1694 株とパルプが凝集し、パルプ菌糸塊を生成した様子が観察された。培養条件 A では、培養 1 日目に、菌糸端部に顕著な TMBZ の発色沈殿が検出された (Fig. 5.1-3a)。培養条件 B では、TMBZ の発色沈殿は、培養 2 日後は、菌糸端部に、培養 4 日後は、パルプ菌糸塊内部で、菌糸に沿って菌糸上に認められた (Fig. 5.1-3b, c)。一方、培養条件 C では、TMBZ の発色沈殿は、パルプ菌糸塊の表面、および菌糸端部に認められた (Fig. 5.1-3d)。これらの結果より、TMBZ の発色沈殿は、各培養条件下で、パルプ菌糸塊上、特に菌糸端部と菌糸上に局在して存在することが判明した。この結果は、*P. crassa* WD1694 株によるリグニン分解反応が、分泌された MnP が菌体外酵素として培養液中で均一に働くのではなく、菌体近傍部で局在的に効率よく進行することを示唆した。

TMBZ 発色と他の染色法の併用

タンパク質の染色法である CBB 染色は、パルプを染色せず、菌糸のみを染色することが可能である。また、筆者らは、*P. crassa* WD1694 株の菌糸表面はスライム層によって覆われており、スライム層の染色にフロキシシン B が有効であることを報告した (Takano et al. 2008)。そこで、パルプ菌糸塊中の TMBZ の発色沈殿の場所をより明確に解析するために、最初に、*P. crassa* WD1694 株を培養条件 B で 3 日間培養した培地試料について、パルプ菌糸塊を構成する菌糸を CBB 染色、スライムをフロキシシン B 染色し、顕微鏡観察した (Fig. 5.1-4a, b)。Fig. 5.1-4a では、青く染色された菌糸がパルプに絡みつ

に生長する様子が観察された。一方、Fig. 5.1-4b では、パルプ菌糸塊全体が赤く染色され、スライム層が菌糸とパルプを覆っている様子が観察された。これらのパルプ菌糸塊とスライムの様子は、培養条件 A と C でも認められた。これらの結果より、パルプ培地で培養した *P. crassa* WD1694 株は、菌糸とスライムでパルプを凝集して、パルプ菌糸塊を生成することが示唆された。スライム層は白色腐朽菌の菌糸表層に存在し、古くから菌体外酵素の保持輸送などの生理機能に関与する可能性が報告されている (Palmer et al. 1983、 Ruel and Joseleau 1991、 Joseleau and Ruel 1992)。また一方、LiP、MnP の分布を免疫染色し、電子顕微鏡で分析した結果では、スライム層に菌体外酵素の存在が報告されている (Daniel, 1994)。そのため、白色腐朽菌の菌糸表層のスライム層で MnP によるリグニン分解反応が進行している可能性が考えられた。しかしながら、Fig. 5.1-3 と Fig. 5.1-4 の比較からは、MnP によるリグニン分解反応を示す TMBZ の発色沈殿が、パルプ菌糸塊全体を覆うスライム層に特異的に生じる明確な結果は得られなかった。

次に、パルプ菌糸塊中の TMBZ の発色沈殿の場所の経時変化を追うために、培養日数の異なる TMBZ 添加 LUKP 培地試料に、フロキシシン B 染色を行った。培養条件 C のパルプ培地試料の染色結果を Fig. 5.1-5 に示す。フロキシシン B 由来の赤色染色は、培養 6 時間後には、すでに認められたが、培養 2 日後に変色が起こり、培養 3 日後に退色が認められた。一方、TMBZ 由来の濃青色の発色は、培養 1 日後に検出され、培養 2 日目にも観察されたが、培養 3 日以降には退色が認められた。これらの結果は、スライムの生成と MnP の分泌に関連性のあることを示唆していた。試験した A, B, C の全培養条件下で、培養開始後 15 時間以内に菌糸の成長とともにパルプの凝集が生じ、その後培養 1 日以降に TMBZ の発色がパルプ菌糸塊上に検出されることが確認された。

5.1.4 考察

本研究では重合性の PO 基質 TMBZ を用いてパルプ培地中の MnP 反応の組織化学的な分析を検討した。パルプ培地中の MnP 反応の検出では、生成した Mn (III) が培地中

で拡散する可能性や、反応が微量で短時間では検出できない可能性が想定された。そこで、TMBZを含むパルプ培地で *P. crassa* WD1694 株を培養することで、生じた MnP 反応を即時に検出し、また、培養経過中の MnP 反応を蓄積して検出する条件を設定した。

重合性の PO 基質を用いてリグニン分解酵素を分析した研究としては、糸状菌の菌体外酵素分泌の分析を目的とした報告がある。*P. cinnabarinus* のラッカーゼの分布を 2,6-DMP で検出し、菌糸頂端部と菌糸垂頂端部にラッカーゼを検出したことが報告された (Jones and Lonergan 1999)。*P. chrysosporium* の LiP や MnP の分布をベンジジンで検出した例では、LiP や MnP は二次代謝期にある菌糸頂端部にしか検出されなかった (Moukha et al. 1993)。この実験では、ベンジジンの添加の際に過酸化水素を添加しない対照実験の系では、LiP や MnP が検出されず、過酸化水素を添加した条件下でのみ LiP や MnP の存在を検出している (Moukha et al. 1993)。これらの研究はいずれもリグニン分解酵素の存在場所を検出したものであり、反応に過酸化水素を必要とする MnP の反応場所を分析したものではなかった。

本研究では TMBZ を含む培地中で菌を培養することで、菌の生産した MnP と過酸化水素による反応を検出することに成功した。試験した 3 種の培養条件は、第 1 章の結果より、いずれもパルプの脱リグニンと白色化が認められた条件である。これらの培地では、パルプ濃度および静置、攪拌の培養条件が異なっており、分泌された菌体外酵素の拡散性が異なるよう条件を設定した。しかし、いずれの培養条件でも TMBZ によって MnP 反応を検出した結果では、MnP 反応は培地溶液部ではなく、菌が生成したパルプ菌糸塊の表面上、特に菌糸端部と菌糸上に局在的に生じていた。また、いずれの培養条件でも、菌糸端部と菌糸上の発色は、第 1 章でパルプのカッパー価の低下と白色度の増加が顕著に認められた培養初期に生じた。これらの結果は、WD1694 株のパルプ漂白に菌糸端部の発色で検出された反応機構が重要であることを示唆している。

また、いずれの培養条件下でも、菌によるパルプの凝集が認められ、TMBZ の発色は、菌によるパルプの凝集後に、パルプ菌糸塊上で TMBZ 発色を生じていた。本研究結果で、菌体表面上で TMBZ 発色が生じたことは、菌によるパルプ漂白時に菌糸とパルプ

が接触することを示唆していた。

パルプの漂白に菌糸とパルプの接触が必要かについては、古くから関心を持たれてきた。*P. sordida* YK-625 株をメンブランフィルターでパルプと分離して培養した場合でもクラフトパルプを漂白することが確認された(Kondo et al. 1994)。カワラタケをポリウレタンフォームに固定化し、菌糸とパルプの接触を制限しても、漂白効果が生じることが示された (Kirkpatrick et al. 1990)。より厳密にパルプと菌を分離した条件で、クラフトパルプに培養液を還流し、部分的な漂白効果が達成された(Archibald 1992)。しかし、単純にパルプ漂白培地の上清をパルプに加えても生菌に匹敵する脱リグニンは生じなかった(Archibald 1992, Paice et al. 1989)。これらの結果より、パルプ漂白には菌糸とパルプの接触は必要ではないが、培養液にはパルプ漂白に必要な全てが含まれておらず、菌から継続的に供給される物質を必要とすることが指摘された (Reid et al. 1994)。

本研究の結果は、パルプと菌糸の接触を制限してパルプ漂白効果を確認したこれらの報告の結果と対立するように見える。しかし、パルプ菌糸塊表面上の MnP 反応で生じた Mn(III)は、培地溶液中に容易に拡散することが想定されるため、本研究結果と、パルプと菌糸の接触なしでパルプ漂白が生じることは矛盾しない。また、Mn(III)が菌糸端部や菌糸上で生成する可能性があることは、パルプ漂白に菌から継続的に供給されるものがあるという点には一致する。

本研究で明らかになった菌糸端部の TMBZ 発色は、先述した *P. cinnabarinus* のラッカーゼの分布や *P. chrysosporium* の LiP や MnP の分布結果と一致するものであった。*P. crassa* WD1694 株の生産する LPO は MnP であるため、菌糸端部の TMBZ 発色は、MnP が菌糸端部に局在化したために生じた可能性がある。

そこで次章では *P. crassa* WD1694 株の菌糸端部の TMBZ 発色と MnP と GLOX の分布の関連性についてより詳細な分析を行った。

5.2 MnP と GLOX による菌糸端部の MnP 反応の分析

5.2.1 緒言

WD1694 株の LUKP 漂白時に生産されるリグニン分解酵素の殆どは MnP であり、この酵素を用いて LUKP の粗酵素漂白が可能であったことから、WD1694 株の LUKP 漂白では、MnP が主要な酵素として作用することを示した。また、WD1694 株の MnP の最適生産培地では、MnP の生産量と相関して、GLOX が生産されることから、GLOX が MnP に過酸化水素を供給する可能性が高いことを示した。5.1 章では、WD1694 株の LUKP 漂白において、MnP に過酸化水素が供給される場所を解明するため、パルプ培地に重合性の PO 発色基質 TMBZ を添加して WD1694 株を培養し、その結果、菌体上、特に菌糸端部と菌糸上に顕著な発色を検出した。これらの結果より、WD1694 株の TMBZ 発色は、MnP と GLOX によって生じた可能性がある。

本章では、菌糸端部に TMBZ 発色として検出された MnP 反応と、MnP および GLOX との関連性を分析するため、各酵素の分布と TMBZ 発色との関連性について検討を進めた。

5.2.2 材料と方法

5.2.2.1 菌株

5.2.2.2 パルプ

以上の項目については、第 2 章「2.2.2 材料と方法」と同様に行なった。

5.2.2.3 試薬

以上の項目については、第 5 章「5.1.2 材料と方法」と同様に行なった。

5.2.2.4 種菌の調整

以上の項目については、第 3 章「3.1.2 材料と方法」と同様に行なった。

5.2.2.5 培養条件

MnP 生産最適培地を用いた WD1694 株の培養は、第 3 章「3.1.2 材料と方法」と同様に行なった。LUKP 培地を用いた培養は、TMBZ を添加せずに Table 5.1-1 C に記載した

条件で行った。

5.2.2.6 等電点電気泳動

5.2.2.7 ゲルの染色

以上の項目については、第3章「3.1.2 材料と方法」と同様に行なった。

5.2.2.8 培地試料の TMBZ 発色試験

LUKP 培地 800 μ l を試験管に採取し、結果の項に記載した試験条件によって、カタラーゼ、過酸化水素、メチルグリオキサールを添加した後、TMBZ 基質 200 μ l を添加した。室温で 30 分から 1 時間静置し、TMBZ の発色を観察した。

5.2.2.9 顕微鏡

以上の項目については、第5章「5.1.2 材料と方法」と同様に行なった。

5.2.2.10 培地の分画

WD1694 株を培養した LUKP 培地を濾過し、培養ろ液を回収した。濾過残渣を 0.05% Tween 80 水溶液で抽出し、抽出液を回収した。

5.2.2.11 酵素活性測定

MnP 活性測定は、第3章「3.1.2 材料と方法」と同様に行なった。GLOX 活性測定は、第4章「4.2 材料と方法」と同様に行なった。

5.2.3 結果

4 章では、MnP の最適生産培地において、MnP の生産量と相関して、GLOX が生産されることから、GLOX が MnP に過酸化水素を供給する可能性が高いことを示した。同様に、MnP と GLOX が *P. crassa* WD1694 株のパルプ培地においても生産されているか確認するため、*P. crassa* WD1694 株をパルプ培地と MnP 生産培地で培養し、菌体外に分泌した酵素試料を等電点電気泳動で分析した。パルプ培地由来の試料と MnP 生産培地由来の試料の各タンパク質のバンドを比較した結果、両培地で分泌された酵素種がほぼ同種であることを確認した(Fig. 5.2-1)。

次に、WD1694 株のパルプ培地で TMBZ 染色に関与するオキシダーゼを確認するた

め、培地から採取した試料に、白色腐朽菌から検出が報告された各オキシダーゼ基質を添加し、発色の有無を観察した(Fig. 5.2-2)。 *P. crassa* WD1694 株を LUKP を含む液体培地でしんとう培養し、培地の一部を採取し試料とした。培地試料に各種オキシダーゼの基質と TMBZ を添加し、30 分間室温で静置後、各試料の TMBZ 発色を比較した。GLOX の基質であるメチルグリオキサールを添加した試料は TMBZ の発色が認められた(Fig. 5.2-2 B)。しかし、メチルグリオキサールを添加しない試料、および、他のオキシダーゼ基質(グルコース、メタノール、4-メトキシベンジルアルコール)を添加した試料では、TMBZ の発色は殆ど生じなかった(Fig. 5.2-2 A,C,D,E)。これらの結果より、TMBZ 発色に GLOX が関与することが示唆された。

次に、パルプ培地中で MnP に過酸化水素を供給するオキシダーゼの分析を行った。電気泳動の結果より、パルプ培地と MnP 生産用培地で生産される酵素の種類が同じであったため、MnP 生産培地で活性が検出されたメチルグリオキサール (GLOX の基質) とグルコース(GOX の基質)の酸化活性について分析した。*P. crassa* WD1694 株のパルプ培地からろ液と菌体抽出液を採取し、各試料の GLOX と GOX 活性を測定した。メチルグリオキサールの酸化活性は菌体抽出液から検出されたが、ろ液からは検出されなかった(Fig. 5.2-3)。グルコースの酸化活性はいずれの試料からも検出されなかった。従って、パルプ培地中で作用するオキシダーゼは GLOX であることが明らかになった。また、GLOX は菌体抽出液からのみ検出されたため、菌体上に局在する可能性が示唆された。

次に、パルプ培地から培養ろ液と菌体抽出液を採取し、MnP 活性を分析した。菌体抽出液からは、MnP 活性が検出されたが、Lac や PO は殆ど検出されず、LiP は検出されなかった(Fig. 5.2-4)。従って菌体抽出液の主要なリグニン分解ペルオキシダーゼ類は MnP であることが示された。また、培養ろ液画分においても、MnP が主要なリグニン分解酵素であることが確認された。

パルプ培地試料の培養ろ液と菌体抽出液の MnP と GLOX の活性を比較した結果を (Fig. 5.2-5)に示す。GLOX は菌体抽出液からのみ検出されたが、MnP は培養ろ液と菌体

抽出液からほぼ同様に検出された。これらの結果より、パルプ培地では、MnP が菌体外に広く拡散しているのに対し、GLOX は菌体上に局在することが示唆された。

これらの MnP と GLOX の培地試料の分画結果より、*P. crassa* WD1694 株のパルプ培地で MnP と GLOX が作用する場所を分析するため、以下に記載する各条件下で試料に TMBZ を添加し、発色部を顕微鏡観察した(Fig. 5.2-6)。試料に TMBZ を添加し 1 時間室温で静置した条件では、*P. crassa* WD1694 株の菌糸端部に TMBZ 発色が認められた(Fig. 5.2-6 A)。試料にカタラーゼを過剰に加え、試料中の過酸化水素を分解後に TMBZ を添加した場合には、試料に TMBZ 発色は生じなかった。従って、TMBZ の発色は、過酸化水素が供給されて生じていたことが示唆された。(Fig. 5.2-6 B)。次に、試料に過酸化水素を加えた後、TMBZ を添加した場合は、試料の溶液部に TMBZ の発色沈殿が生じた(Fig. 5.2-6 C)。この結果は、溶液中に MnP が存在することを示唆しており、MnP が培養ろ液から検出された結果(Fig.5.2-4)と一致した。また、培地溶液中の MnP は、過酸化水素が供給されると TMBZ を発色することが示された。メチルグリオキサールを試料に添加後、TMBZ を添加した場合は、反応 30 分間以内に、強い TMBZ 発色が菌糸端部に生じ、GLOX が菌糸端部と菌糸上に局在することが示唆された(Fig. 5.2-6 D)。しかし、メチルグリオキサールの添加によって溶液部が発色することはなく、GLOX は溶液部には存在しない、または、存在しても反応しないことが示唆された。

菌糸端部の TMBZ 発色をより詳細に観察した結果、菌糸端部周囲に菌糸から遊離した場所での発色沈殿が認められた(Fig. 5.2-7)。また、菌糸端部の TMBZ 発色を経時的に観察した結果、菌糸端部で内側から外側に TMBZ 沈殿が増加することが判明した(Fig. 5.2-8)。

これらの結果より、*P. crassa* WD1694 株のパルプ培地では、菌体外に広く拡散した MnP に、菌糸端部から GLOX により過酸化水素が供給されることが示された。

5.2.4 考察

本章では、*P. crassa* WD1694 株のパルプ漂白培地の主要なリグニン分解酵素が MnP

と GLOX であることを明らかにし、さらに、MnP と GLOX の酵素活性測定と TMBZ 発色法を併用し、MnP と GLOX の関連性を分析した。*P. crassa* WD1694 株のパルプ培地をろ液と菌体抽出液に分画し、酵素活性を測定した結果、MnP は培養ろ液と菌体抽出液を含む培地全体に広く拡散していたが、GLOX 活性は *P. crassa* WD1694 株の菌体抽出液からのみ検出され、ろ液からは検出されなかった。したがって、パルプ培地で、菌体表面から GLOX が菌体外に広く拡散した MnP に過酸化水素を供給する可能性が示唆された。

そこで、GLOX による MnP への過酸化水素供給についてより詳細に分析するため、沈殿性ペルオキシダーゼ基質 TMBZ を用いた組織化学的な分析を試みた。

培地試料を採取し、TMBZ を添加すると、試料の菌糸端部に菌糸に沿った発色が検出された。試料に過酸化水素またはカタラーゼを添加して、TMBZ 発色への影響を分析した結果、MnP は培地溶液部に存在するが、GLOX は菌糸端部に局在することが示唆された。

菌糸端部の発色をより詳細に観察した結果、菌糸端部近傍に、菌糸から遊離した TMBZ 発色沈殿が生じることが確認された。また、菌糸端部の発色は、時間経過によって菌糸表面から外側へ発色が増加することが観察された。これらの結果は、過酸化水素が菌糸端部の GLOX によって生産され、拡散して、培地溶液中の MnP に供給されることを示唆していた。

P. chrysosporium の LiP や MnP の分布をベンジジンで検出した例では、LiP や MnP は二次代謝期にある菌糸頂端部に検出されたことが報告されている。(Moukha et al. 1993)。*P. crassa* WD1694 株の菌糸端部の発色は、MnP が菌糸端部に局在するために生じた可能性が考えられた。しかし、培地を分画して MnP 活性を測定した結果、培地溶液部から MnP 活性が検出された。また、培地試料に過酸化水素を添加すると TMBZ 発色が培地溶液部にも生じたこと、および、菌糸端部近傍に、菌糸から遊離した TMBZ 発色沈殿が生じたことから、MnP は、培地溶液部にも存在することが示された。

一方、GLOX は、培地分画試料の酵素活性測定結果、および、TMBZ 発色試験の結果

より、菌体表面、菌糸端部に局在することが示唆された。

白色腐朽菌を含む糸状菌の分泌酵素は、菌糸先端から分泌され、菌糸端部表面上に滞留する段階を律速として、その後、菌体外へ拡散することが報告されている(Cai et al., 1999、 Chung and Trevithick 1970、 Sprey 1988、 Pugh and Cawson 1977、 Wösten et al., 1991、 Wessels 1993)。GLOX は菌体外から検出された分泌酵素であり、その遺伝子には MnP と同様に分泌シグナルを含むことが報告されている(Kerstern and Cullen, 1993)。

4 章で培養ろ液の MnP と GLOX 活性を経時的に測定した結果では、MnP が培養ろ液から検出された 2 日後に GLOX が検出されており、MnP の分泌に続いて GLOX が分泌されることが示された。*P. crassa* WD1694 株のパルプ培地でも MnP と GLOX の分泌が同様に連続して生じる場合、MnP が培地溶液部に分泌拡散された後、GLOX が分泌されて菌糸端部に局在する時期があると考えられる。

この過程を模式化し、Fig. 5.2-9 に示した。始めに菌糸端部から MnP が分泌され、培地溶液に拡散する。その後、GLOX が分泌され、菌糸端部に滞留する培養 2-3 日間に、菌糸端部から過酸化水素が MnP に供給され、その結果、菌糸端部に TMBZ 発色が検出される。すなわち、菌糸端部の発色は、培地溶液中の過剰量の TMBZ と MnP 存在下、菌糸端部で生成される過酸化水素の生成を検出したと結論できる。

TMBZ を含む PO 発色基質は、多くの酸化酵素や酸化剤によって発色するので、特異性をいかに担保するかが課題となる。本研究で検出した菌糸端部の発色には、過酸化水素を生産する GLOX と、過酸化水素を基質とする MnP の二つの酵素が関与することを示し、過酸化水素を検出したことを特定した。

4 章では、培地溶液中の MnP 活性量に対して GLOX 活性量が著しく少なく、両酵素の総生産量に顕著な差のあることを示した。本研究結果では、MnP は培地溶液中に拡散し、GLOX は菌糸端部に集中した条件下で、菌糸端部の発色が生じたことから、菌糸端部では両酵素の活性量が均衡して反応することが示唆された。

これまで MnP と GLOX の各酵素の触媒機構については詳細に検討されてきたが、これらの酵素はいずれも菌体外に分泌拡散するため、これらの酵素が菌体外のどこでどの

ように関連して作用するかは明らかになっていなかった。また、これまで白色腐朽菌のリグニン分解には、過酸化水素が必要であることは示されていたが、培地中で菌体外に生産された過酸化水素を検出した例は殆ど報告されていなかった。

WD1694 株の菌糸端部の TMBZ 発色が検出された培養後 2-4 日には、MnP と GLOX の最大活性が検出され、同時期には、パルプのカッパー価の低下と白色度の増加が顕著に確認されたことから、WD1694 株によるパルプの脱リグニンは、菌糸端部からの過酸化水素供給により生じたことが示された。

第 6 章

総括

白色腐朽菌のリグニン分解は、OX によって生成した過酸化水素が、LPO に供給されて生じるとされている。LPO と OX はいずれも菌体外から検出されているが、培地中で各酵素が反応する組織化学的な場所は明らかになっていなかった。本研究では、未晒しクラフトパルプの高漂白菌 *P. crassa*WD1694 株を選抜し、リグニン分解酵素として MnP、また、過酸化水素の生産酵素として GLOX を、菌体外から検出した。PO 発色基質は、PO や酸化剤の種類を分析特定できないため、予め、*P. crassa*WD1694 株の生産する MnP と GLOX の酵素機能を分析した。次いで、沈殿性 PO 発色基質 TMBZ を用いて、培地中で MnP に過酸化水素が供給される場所を分析し、菌糸端部に TMBZ の発色を検出した。さらに、酵素活性分析と TMBZ を用いた組織化学的な分析手法を併用し、菌糸端部の発色は、菌体外に拡散した MnP に、菌糸端部に局在する GLOX が過酸化水素を供給することで生じたことを示し、MnP に過酸化水素が供給される具体的なしくみを提示した。以下に各章の研究結果を要約する。

1. LUKP の高漂白菌を選抜するため、420 株の白色腐朽菌およびリター分解菌を対象に、高分子色素 Poly R-478 の脱色試験を一次スクリーニング法に用い、脱色能力の高い上位 10 株を選抜した。選抜された 10 株の LUKP 漂白試験を行い、最も高い漂白能力を示した *Phanerochaete crassa* WD1694 株を選抜した。
2. WD1694 株の LUKP 漂白に作用するリグニン分解酵素を分析した。WD1694 株を植菌した LUKP のカップー価の低下と白色度の増加が顕著に認められた時期には、高い Mn 依存性の PO 活性が検出された。一方、Mn 非依存性の PO と Lac は殆ど検出されず、LiP は検出されなかった。したがって、WD1694 株の LUKP 漂白に作用する酵素は Mn 依存性の PO であることが示唆された。WD1694 株から Mn 依存性の PO を採取し、この酵素による LUKP 漂白を検討した結果、MnSO₄、過酸化水素、マロン酸の存在下で脱リグニンと白色化が確認された。さらに酵素処理とア

ルカリ洗浄の繰り返し処理により、LUKP 漂白に高い効果が認められた。

3. WD1694 株の Mn 依存性の PO 酵素を生産、精製し、その性質を分析した。WD1694 株の Mn 依存性の PO は分子量、等電点、触媒活性が *P. chrysosporium* の MnP と高い類似性を示した。次に WD1694 株の MnP のゲノム遺伝子を分析し、4つのゲノム遺伝子を特定した。WD1694 の MnP 遺伝子のエキソン・イントロン構造を分析した結果、*P. chrysosporium* の MnP 遺伝子構造と高い相同性を示した。白色腐朽菌の生産する Mn 依存性の PO は、MnP と VP が知られており、WD1694 株は、有機化合物を直接の基質とせず、Mn(II)を基質とする MnP を生産することを確認した。
4. WD1694 株の MnP に過酸化水素を供給するオキシダーゼを決定するため、MnP の最適生産培地のオキシダーゼを分析した結果、GLOX 活性が検出された。また、培地条件および培養期間による MnP 活性の増減と相関して、GLOX 活性の増減が認められた。これらの結果より WD1694 株は、MnP に GLOX が過酸化水素を供給する可能性が示唆された。
5. WD1694 株の LUKP 培地で MnP に過酸化水素が供給される場所、すなわち MnP が反応する場所を分析するため、TMBZ を添加した LUKP 培地で WD1694 株を培養し、MnP 反応を TMBZ の発色として検出した。WD1694 株の LUKP 培地では、菌とパルプが凝集塊を生成し、その表面上、特に菌糸端部と菌糸上に MnP 反応が検出された。次に、WD1694 株の菌糸端部の発色と MnP、GLOX との関連性を組織化学的に分析した。WD1694 株の LUKP 培地を分画し、培地溶液と菌体抽出液の MnP と GLOX 活性を分析した結果、MnP 活性を両画分から検出し、GLOX 活性を菌体抽出画分から検出した。また、WD1694 株の LUKP 培地試料の PO 発色試験で、カタラーゼ、メチルグリオキサール、過酸化水素を添加した後、重合性 PO 発色基質を添加したところ、カタラーゼによる試料の発色阻害と、メチルグリオキサールによる菌糸端部の発色促進、および過酸化水素による培地溶液部の発色沈殿の生成が確認された。この結果は、培地を画分して MnP 活性と GLOX 活性を分析した結果に一致する結果であった。TMBZ による菌糸端部の発色を経時的に観

察した結果、菌糸表面上から発色が増加する様子が確認された。これらの結果より、WD1694株のLUKP培地中では、MnPが菌体外に広く拡散した後、菌糸端部からGLOXが過酸化水素を供給することで、MnP反応が生じること、菌糸端部の発色はGLOXが生成した過酸化水素を検出したことが明らかになった。

白色腐朽菌のリグニン分解研究では、LPOやOXの各単離酵素の触媒機構が詳細に研究されてきたが、これらの酵素が菌体外で反応する組織化学的な関連性については殆ど分析された例がない。本研究では、MnPとGLOXが菌体外で連携してMnP反応を生じることを組織化学的に明らかにした。また、菌糸端部の発色は、菌糸端部で生成した過酸化水素を検出したものであることを示した。従来、白色腐朽菌のリグニン分解において、過酸化水素の重要性は指摘されてきたが、白色腐朽菌のリグニン分解時に菌体外に生成する過酸化水素を直接検出した例はほとんどなかった。本研究では、沈殿性PO発色基質を用いて、菌体外に生産された過酸化水素の拡散を防止し、過酸化水素の検出に成功した。PO発色基質による検出では、発色結果が示す特異性の証明が重要となるが、組織化学的な発色試験と酵素分析を併用することで、反応にMnPとGLOXが関与することを示し、これらの酵素と過酸化水素の関連性から過酸化水素を検出したことを明確に示した。

本研究の結果、*P. crassa* WD1694株によるパルプの脱リグニン反応は、主に菌糸端部で集中して生じることが明らかになり、均一な酵素溶液の反応系にはない、組織化学的なしくみの存在が示された。今後、菌糸端部での反応系を詳細に分析し、*P. crassa* WD1694株の高リグニン分解能力が生じる仕組みを解明する。

過酸化水素は、白色腐朽菌のリグニン分解だけでなく、褐色腐朽菌のセルロース分解にも重要な機能を持つことが示唆されている。本研究で用いた過酸化水素の検出法は、菌体外での過酸化水素生産の分析に有効な選択肢となることが期待される。

图 表



Fig. 1-1 Poly R-478 の構造とスクリーニングプレート。

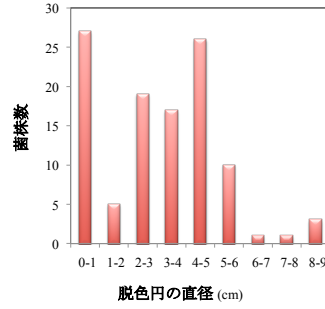


Fig. 1-2 試験株のPoly R-478脱色試験の結果

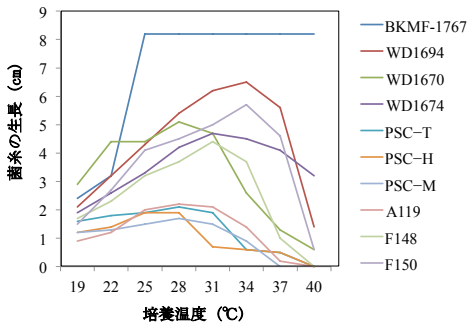


Fig. 1-3 選抜した10菌株の成長への培養温度の影響。

Table 1-1. 選抜した白色腐朽菌10株のPoly R-478脱色試験とパルプ漂白

Strain No.	Name of strain	Diameter of Poly R decoloration (cm)	Before alkali treatment		After alkali treatment	
			Kappa No.	Brightness (%)	Kappa No.	Brightness (%)
WD1694	<i>Phanerochaete crassa</i>	8.5	7.4	48.6	6.1	54.3
F150	<i>Phanerochaete crassa</i>	5.0	9.5	41.9	7.5	45.9
A119	<i>Pleurotus species</i>	5.5	8.6	45.4	8.1	49.9
PSC-T	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	5.0	8.7	43.1	8.3	47.8
PSC-H	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	5.0	9.8	42.7	8.4	46.7
PSC-M	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	5.0	10	43.1	8.3	48.1
BKMF1767	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	8.5	12.6	32.6	12.2	33.8
F148	<i>Coriolus brevis</i>	7.5	13.7	28.8	12.8	33.2
WD1670	<i>Trametes versicolor</i>	8.0	14.8	27.2	12.9	30.8
WD1674	<i>Trametes hirsuta</i>	6.0	14.5	28.3	13.3	311.7
Control			16.4	27.7	15.7	28.2

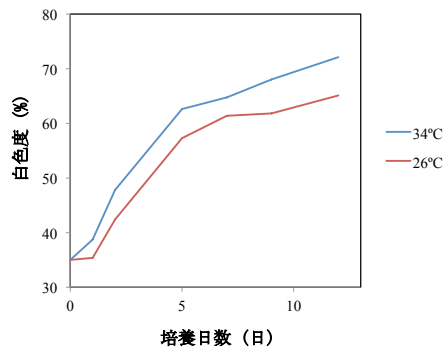


Fig. 1-4 *P. crassa* WD1694株を植菌したLUKPの白化度

Table 1-2. *P. crassa* WD1694 と *P. crassa* F150によるLUKPの漂白結果

菌株	静置培養		しんとう培養	
	カップー価	白色度	カップー価	白色度
WD1694	7.4	48.6	9.5	46.8
F150	9.5	41.9	15.8	31.7
control	16.4	27.7	16.2	28.2

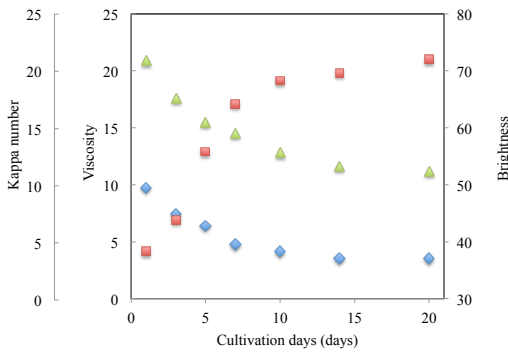


Fig. 2-1 *P. crassa* WD1694株によるLUKP-Bの菌処理効果

◆ Kappa number
▲ Viscosity
■ Brightness

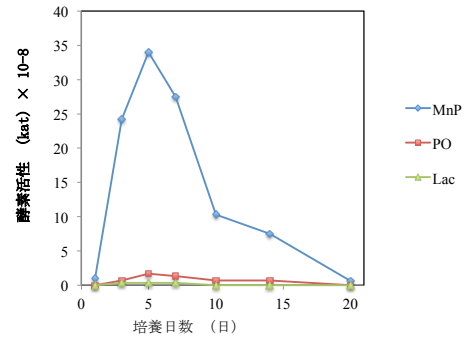


Fig. 2-2 LUKP-Bに植菌した*P. crassa* WD1694株のリグニン分解酵素活性

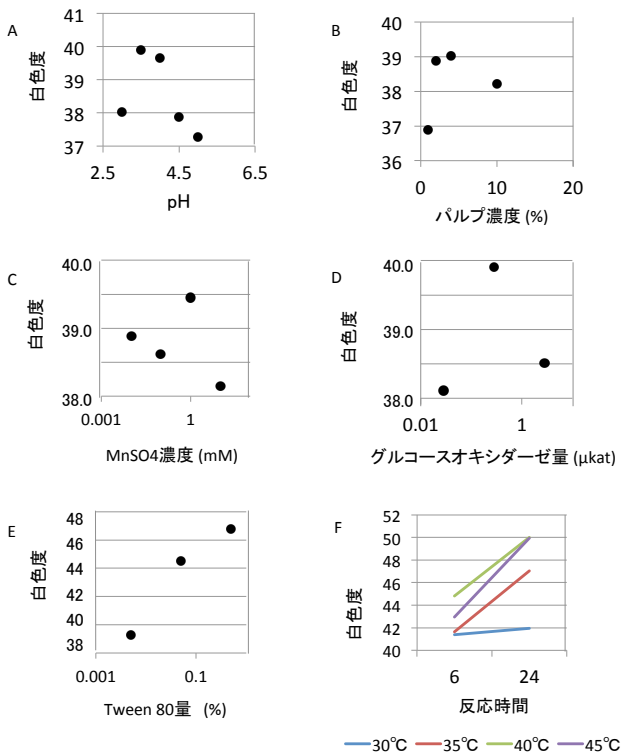


Fig. 2-3 MnP酵素漂白の条件検討

Table 2-1. MnP 酵素量と MnP 酵素漂白したパルプのカッパー価

No.	MnP 量(ml)	MnP 量(μkat)	カッパー価	粘度
1	1	0.07	9.1	46.8
2	4	0.28	8.1	47.4
3	6	0.42	8.1	45.4
4	10	0.70	7.9	44.8
5	0	0	9.7	43.2
6	0	0	10.3	54.8
7	0	0	12.6	53.3

No. 5 : MnP 無添加の酵素反応溶液、No. 6 : 緩衝液のみ、No. 7 : 無処理

Table 2-2. 生菌処理と MnP 酵素多段処理によるパルプの漂白

処理法	処理時間 処理段数	カッパー価	粘度	収率 (%)
生菌処理	0 日	11.8	46.0	95.9
	2 日	10.9	37.1	96.7
	5 日	6.7	19.9	95.9
	7 日	6.0	16.3	96.8
MnP 酵素多段処理	1 段	9.5	44.9	99.6
	2 段	7.4	38.0	97.7
	4 段	5.8	29.3	99.1
コントロール (MnP 無添加)*	4 段	9.6	38.4	100.3
無処理	0 段	12.6	48.0	100.0

*コントロール処理は、MnP 無添加の反応溶液で同様の 4 段処理を行った。

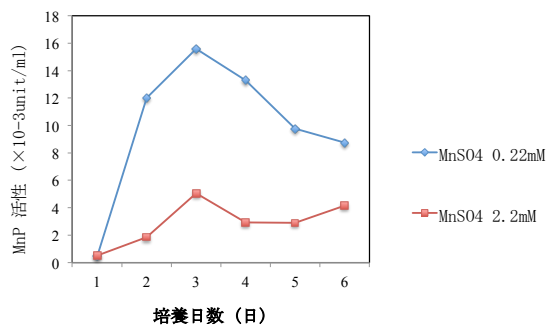


Fig. 3.1-1 培養中の MnP 活性の変化.

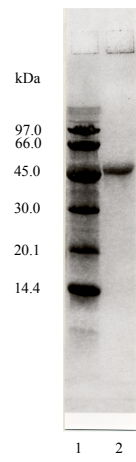


Fig. 3.1-2 精製した *P. crassa* WD1694株のMnPのSDS-PAGE.
1, 分子量マーカー
2, *P. crassa* WD1694株のMnP

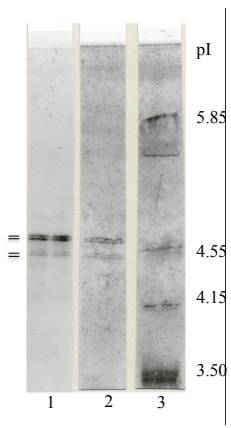


Fig. 3.1-3 *P. crassa* WD1694株のMnP酵素の等電点電気泳動.
1, *P. crassa* WD1694 MnP の活性染色.
2, *P. crassa* WD1694 MnP のクマシー染色.
3, pI スタンダードのクマシー染色.

Table 3.1-1 *P. crassa* WD1694株のMnPの精製段階.

Step	Total protein (mg)	Total activity (μunit)	Specific activity (μunit/mg)	Yield (%)	Fold
Culture	1378	831.7	0.603	100	1
DEAE-sepharose	5.62	634.6	113	76.3	187
DEAE-toyopearl	0.924	240.9	260.7	28.9	432

Table 3.1-2 白色腐朽菌のMnPのN-末端アミノ酸配列

Name of strain		N-terminal sequences	References
<i>Phanerochaete crassa</i> WD1694	MnP 1	A V X P D G T R V T N E	This work
	MnP 2	A V X P D G T R V T N E	This work
	MnP 3	A V X P D G T R V T N E	This work
	MnP 4	A V X P D G T R V T N E	This work
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MP1	A V C P D G T R V T N A	Pease et al., 1989
	H4	A V X P D G T ? V T N A	Pease et al., 1992
	PULP	A V X P D G T R V ? N A	Datta et al., 1991
	MnP1	A V C P D G T R V S H A	Privnow et al., 1989
<i>Phanerochaete sordida</i>	MnP1	A V X S Q G T A V S N A	Rüttimann-Johnson et al., 1994
	MnPII	A V X P D G T X V N N E	Rüttimann-Johnson et al., 1994
	MnPIII	A V X P D G T A V P S T	Rüttimann-Johnson et al., 1994
IZU-154	MnP1	A V C P D G T R V S N S	Matsubara et al., 1996
	MnP2	A V C F D G T R V S N S	Matsubara et al., 1996
<i>Bjerkandera</i> sp. BOS1.2		V A C P D G V N T A T N	Palma et al., 2000
<i>Bjerkandera</i> sp. BOS55		V A C P D G V N T A T N	Mester et al., 1998
<i>Pleurotus ostreatus</i>		A T C A D G R T T A	Sarkar et al., 1997
<i>Pleurotus eryngii</i>	MnP1	A T D A D G R T T A · N	Martinez et al., 1996
	MnP2	A T D D D G R T T A · D	Martinez et al., 1996
<i>Trametes versicolor</i>	MP1	V A C P D G V N T A S N	Johansson et al., 1993
	MP2	V A C P D G V N T A T N	Johansson et al., 1993
	MP5	V A C P D G V N T A S N	Johansson et al., 1993

Table 3.1-3 *P. crassa* WD1694株のMnPの速度定数.

Substrate	Km (mM)	Vmax (unit)	Vmax / Km (U _m M ⁻¹)
Mn(II)	35.8×10^{-3}	34.5	0.964
DMP with Mn(II)	7.75×10^{-3}	20.8	2.68
DMP without Mn(II)	30.7	7.55	2.45×10^{-1}

Table 3.1-4 白色腐朽菌のMnPとVPの速度定数.

Strains	Enzyme group	Km (μM)		References
		Mn(II)	DMP	
<i>P. crassa</i> WD1694	MnP	35.8	30.7×10^3	This work
<i>P. chrysosporium</i>	MnP	53.7	-	Matsubara et al., 1996
IZU-154	MnP	44.7	-	Matsubara et al., 1996
<i>P. chrysosporium</i> PCH6	MnP	45	-	Palma et al., 2000
<i>Bjerkandera</i> sp. BOS55	VP	51	41	Mester et al., 1998
<i>P. eryngii</i> MnP SSF1	VP	40	200	Martinez et al., 1996
<i>P. ostreatus</i> MnPL	VP	18	950	Sarkar et al., 1997

Table 3.2-1 N末端相当部分の*P. crassa* WD1694株の*mnp* 遺伝子の塩基配列

Gene	DDBI Accession No.	ORF size (bp)	Nucleotide sequences coding N-terminal amino acids sequences of <i>P. crassa</i> WD1694 MnP
<i>P. crassa mnpA2</i>	LC020094	1444	G C T A C T T G C C C T G A C G G C A C G C A G G T C A A C A A C G A G G C T
	LC020095	1438	
<i>P. crassa mnpA3</i>	LC020096	1501	G C T A C G T G C C C T G A T G G T A C G C A G G T T A A C A A C G A A G C G
	LC020097	1499	
<i>P. crassa mnpB2</i>	LC020098	1499	G C A G T C T G C C C C G A C G G C A C C A G G G T C T C C A A C G C G G C T
	LC020099	1548	
<i>P. crassa mnpB3</i>	LC020100	1546	G C T G T G T G C C C C G A C G G C A C C A G G G T C A C C A A C G A G G C T

P. crassa WD1694株由来のマンガンペルオキシダーゼ (MnP) 遺伝子を分析し、4ゲノム遺伝子*P. crassa mnpA2*, *P. crassa mnpA3*, *P. crassa mnpB2*, *P. crassa mnpB3*を決定した。

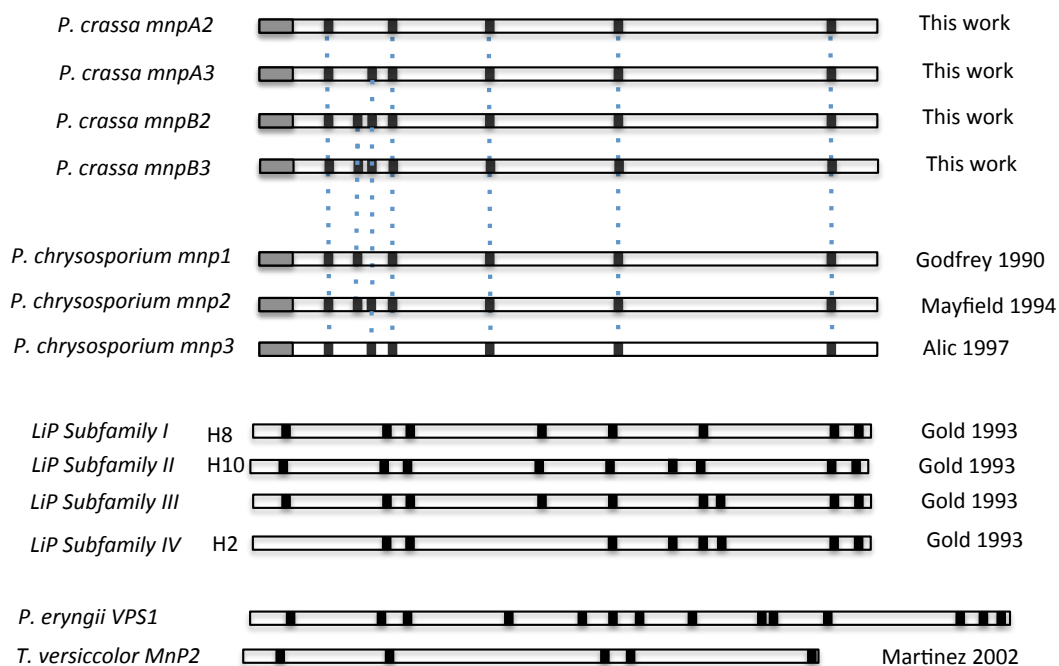


Fig. 3.2-1 白色腐朽菌のリグニン分解酵素遺伝子のエキソン・イントロン構造の比較

P. crassa mnp 遺伝子構造は*P. chrysosporium*由来の*mnp* 遺伝子構造と高い相同性を示した。

MnP	MnP 1	A	V	C	P	D	G	T	R	V	T	N	E	A
	MnP 2	A	V	C	P	D	G	T	R	V	T	N	E	A
	MnP 3	A	V	C	P	D	G	T	R	V	T	N	E	A
	MnP 4	A	V	C	P	D	G	T	R	V	T	N	E	A
gene	<i>mnt B3</i>	A	V	C	P	D	G	T	R	V	T	N	E	A
	<i>mnt B2</i>	A	V	C	P	D	G	T	R	V	S	N	A	A
	<i>mnt A2</i>	A	T	C	P	D	G	T	Q	V	N	N	E	A
	<i>mnt A3</i>	A	T	C	P	D	G	T	Q	V	N	N	E	A

Fig. 3.2-2 *P. crassa* WD1694株のMnP酵素および*mnt* 遺伝子から推定したN末端アミノ酸配列
P. crassa WD1694株の4つのMnPのN末端アミノ酸配列(MnP 1-4)は同一であり、
P. crassa mnt B3 遺伝子のみと一致した。

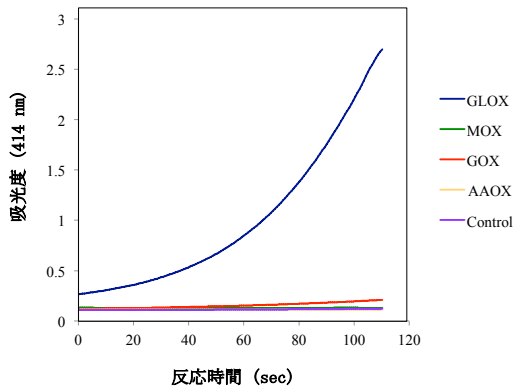


Fig. 4-1 *P. crassa* WD1694株のオキシダーゼ活性の分析

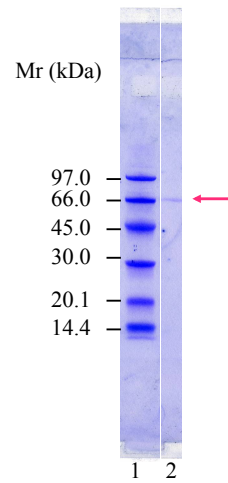


Fig. 4-2 精製した*P. crassa* WD1694株のGLOXのSDS-PAGE. 1, マーカー; 2, GLOX.

Table 4-1 GLOXのN末端アミノ酸配列

株	N-末端アミノ酸配列	文献
<i>Phanerochaete crassa</i> WD1694	A P G T L P T L G P	Takano, 2010
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	A P G T A P A L L P	Kersten, 1993

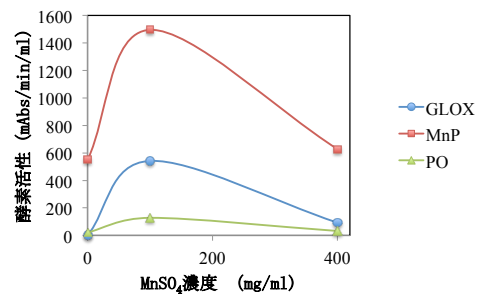


Fig. 4-3 *P. crassa* WD1694株の培地中のマンガン濃度によるGLOX、MnP、POの酵素活性への影響

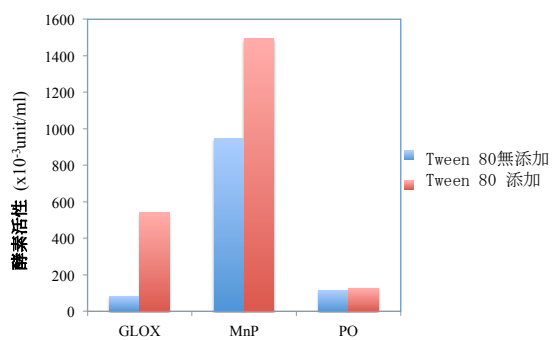


Fig. 4-4 *P. crassa* WD1694株の培養ろ液中のGLOX活性MnP活性への Tween 80の影響.

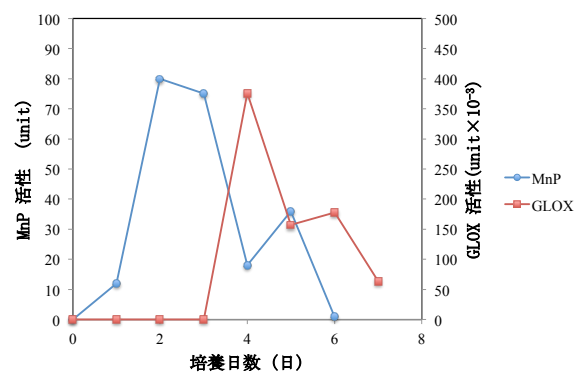


Fig. 4-5 *P. crassa* WD1694株のGLOX活性とMnP活性の経時変化. 培養ろ液 (4-L) 中の総活性を酵素活性としてプロットした.

Table 5.1-1 TMBZを添加したLUKP培地の培養条件

培養条件	A	B	C
バルブ濃度 (%)	25	2.5	0.5
TMBZ (ml)	3	2	6
蒸留水 (ml)	1	10	50
種菌量 (ml)	6	10	10
培養温度 (°C)	26	26	34
攪拌条件 (rpm/min)	0 (静置)	0 (静置)	100 (振盪)

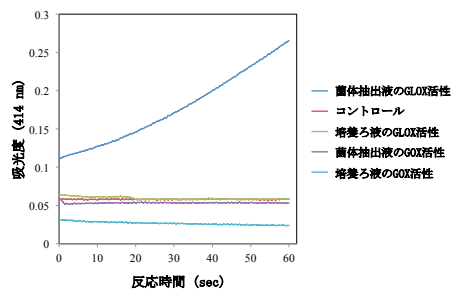


Fig. 5.2-3 *P. crassa* WD1694株のバルブ培地のGLOXとGOX 活性。菌体抽出液からGLOX活性が検出されたが、培養ろ液からは検出されなかった。

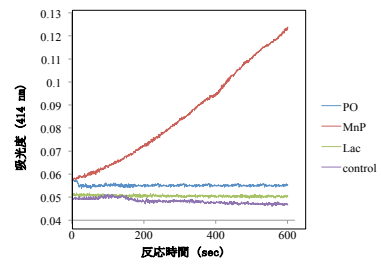


Fig. 5.2-4 *P. crassa* WD1694株のバルブ培地のLPO活性。MnP活性が検出されたが、PO(LiPを含む)とLacは殆ど検出されなかった。

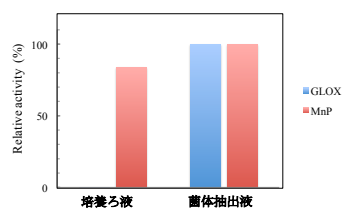


Fig. 5.2-5 バルブ培地材料の培養ろ液と菌体抽出液のMnPとGLOXの活性の比較。MnPは培養ろ液と菌体抽出液の両方から検出されたが、GLOXは菌体抽出液からのみ検出され、培養ろ液からは検出されなかった。

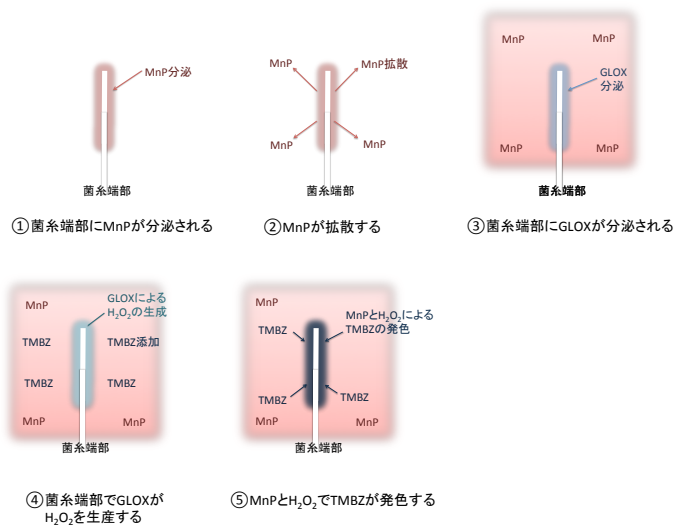


Fig. 5.2-9 菌糸端部のH₂O₂の生成を検出したTMBZの発色機構

Fig. 5.2-9 TMBZ発色による菌糸端部のH₂O₂の生成の検出機構

序章参考文献

1. 世界森林資源評価 2015 概要、林野庁
2. 中野 順三 (1979) 植物中のリグニン. 中野 順三編、リグニンの化学 -基礎と応用-、ユニ出版、pp20-36
3. 樋口 隆昌 (1993) 2次壁の形成、樋口 隆昌著、木質生化学、pp167-170
4. 福島 和彦 (1994) 木材細胞壁へのリグニンの堆積、樋口 隆昌編、木質分子生物学、pp74-86
5. Higuchi T. (1985) Biosynthesis of lignin. In: Higuchi T (ed) Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Academic Press, pp141-160
6. Kirk, T. K. and Shimada, M. (1985) Lignin biodegradation :The microorganisms involved, and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. In: Higuchi T (ed) Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Academic Press, pp579-605
7. 樋口 隆昌、近藤 民雄 (1979) 微生物分解. 中野 順三編、リグニンの化学 -基礎と応用-、ユニ出版、pp303-346
8. Chen C.L., Chang H.M. (1985) Chemistry of lignin biodegradation. In: Higuchi T (ed) Biosynthesis and biodegradation of wood components, Academic press, Inc. London, pp535-556
9. Ander P. (1990) Biodegradation of lignin. In: Eriksson K.E.L., Blanchette R.A., Ander P. (ed) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, Springer-verlag, Berlin, pp225-333
10. (FAO STAT 2015)
11. 林野庁企画課、平成 27 年木材需給表、平成 29 年 1 月
12. 経済産業省特許庁、バイオテクノロジーの環境技術への応用、平成 12 年 8 月
13. バイオテクノロジーと 21 世紀の産業、1999、バイオインダストリー協会
14. 紙パルプ技術タイムス編集部、紙パルプ産業のバイオテクノロジー (1992) 紙パルプ技術タイムス 1992.7 月 pp7-15
15. 樋口 隆昌 (1953) 木材腐朽菌の生化学的研究 (第 1 報) Bavendamn 反応に關与する酵素について. 林学会誌 35:77-85
16. Kirk T.K., Kelman A. (1964) Lignin degradation as related to the phenoloxidases of selected wood-decaying Basidiomycetes. Phytopathology 55:739-745
17. Kirk T.K., Yang H.H. (1979) Partial delignification of unbleached kraft pulp with ligninolytic fungi. Biotechnol Lett 1:347-352
18. Glenn J.K., Morgan M.A., Mayfield M.B.,Kuwahara M., Gold M.H. (1983) An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem Biophys Res Commun

114:1077-1083

19. Kuwahara M., Glenn J.K., Morgan M.A., Gold M.H. (1984) Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett 169: 247-250
20. Tien M., Kirk T.K. (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. Science 221:661-663
21. Tran A.V., Chambers R.P. (1987) Delignification of an unbleached hardwood kraft pulp by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Mic Biotech 25:484-490
22. 坂井 克己 (1993) パルプ化プロセスへのリグニン分解菌の応用. 紙パルプ技術協会誌 47: 933-943.
23. 西田 友昭 (2001) 白色腐朽菌 IZU-154 株を用いるバイオメカニカルパルピング・バイオブリーチング. 紙パルプ技術協会誌, 55: 1080-1091
24. Martínez A.T., Camarero S., Guillén F., Gutiérrez A., Muñoz C., Varela E., Martínez M.J., Barrasa J.M., Ruel K., Pelayo J.M. (1994) Progress in biopulping of non-woody materials: chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. FEMS Microbiol Rev 13:265-274
25. Call H.P., Mücke I. (1997) History, overview and applications of mediated ligninolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym[®]-process). J Biotechnol 53: 163-202
26. 桃原 郁夫, 松本 雄二 (1991) パルプ化工程における生物学的プロセスの適用. 紙パルプ技術協会誌 45: 1297-1315.
27. 尾鍋 史彦 (1991) 紙・パルプ産業におけるダイオキシン問題の現状と将来の展望. 紙パルプ技術協会誌, 45: 462-474.
28. 飯塚 堯介 (1994) 無塩素漂白法. 繊維学会誌 50:25-29
29. Paice, M. G., Jurasek, L., Ho C., Bourbonnais, R., Archibald, F. S. and (1989) Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*. Tappi J 72:217-221
30. Reid, I. D. and Paice, M. G. (1994) Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. FEMS Microbiol Rev 13: 369-376.
31. Archivald FS, Bourbonnais R, Jurasek L, Paice MG, Reid ID (1997) Kraftpulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. J Biotechnol 53:215-236
32. 西田 友昭 (1992) 微生物によるリグニン分解とパルプ漂白. 木材学会誌 38: 811-819
33. Kondo, R., Harazono, K. and Sakai, K. (1994) Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase secreted from *Phanerochaete sordida* YK-624. Appl Environ

- Microbiol 60: 4359-4363
34. Nishida, T., Kashino, Y., Mimura, A. and Takahara, Y. (1988) Lignin biodegradation by Wood-rotting fungi I. Screening of lignin-degrading fungi. Mokuzaï Gakkaishi 34: 530-536
 35. Hirai, H., Kondo, R. and Sakai, K. (1994) Screening of lignin-degrading fungi and their ligninolytic enzyme activities during biological bleaching of kraft pulp. Mokuzaï Gakkaishi 40: 980-986
 36. Iimori, T., Kaneko, R., Yoshihara, H., Machida, M., Yoshioka, H. and Murakami, K. (1994) Screening of pulp-bleaching fungi and bleaching activity of newly isolated fungus SKB-1152. Mokuzaï Gakkaishi 40: 733-737
 37. Bourbonnais R., Paice M.G., Reid I.D., Lanthier P., Yaguchi M. (1995) Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. Appl Environ Microbiol 61:1876-1880
 38. Harazono K., Kondo R., Sakai K. (1996) Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase from *Phanerochaete sordida* YK-624 without addition of MnSO₄. Appl Environ Microbiol 62:913-917
 39. Kaneko R., Iimori T., Miyawaki S., Machida M., Murakami K. (1995) Biobleaching with manganese peroxidase purified from the pulp bleaching fungus SKB-1152. Biosci Biotechnol Biochem 59:1584-1585
 40. Paice, M. G., Reid, I. D., Bourbonnais, R., Archibald, F. S. and Jurasek, L. (1993) Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. Appl Environ Microbiol 59: 260-265
 41. Reid, I. D., Paice, M. G. (1994) Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. FEMS Microbiol Rev **13**, 369-376
 42. Moreira, M. T., Feijoo, G., Sierra-Alvarez, R., Lema, J., Field, J. A. (1997) Manganese is not required for biobleaching of oxygen-delignified kraft pulp by the white rot fungus *Bjerkandera sp.* Strain BOS55. Appl Environ Microbiol 63: 1749-1755
 43. Addleman K., Dumonceaux T., Paice M.G., Bourbonnais R., Archibald F.S. (1995) Production and characterization of *Trametes versicolor* mutants unable to bleach hardwood kraft pulp. Appl Environ Microbiol 61: 3687-3694
 44. Archibald, F. S. (1992) Lignin peroxidase activity is not important in the biological bleaching and delignification of kraft brownstock by *Trametes versicolor*. Appl Environ Microbiol 56: 3101-3109
 45. Archibald, F. S. (1992) The role of fungus-fiber contact in the biobleaching of kraft

- brownstock by *Trametes(Coriolus) versicolor*. *Holzforschung* 46: 305-310
46. Katagiri N., Tsutsumi Y., Nishida T. (1995) Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white rot fungi in the solid state fermentation system. *Appl Environ Microbiol* 61: 617-622
 47. Kondo, R., Kurashiki, K. and Sakai, K. (1994) In vitro bleaching of hardwood kraft pulp by extracellular enzymes excreted from white rot fungi in a cultivation system using a Membrane Filter. *Appl Environ Microbiol* 60: 921-926
 48. 割石 博之 (2002) リグニン分解酵素. 宍戸和夫編、キノコとカビの基礎科学とバイオ技術、アイピーシー、pp141-153
 49. 渡辺 隆司 (2000) 白色腐朽菌のフリーラジカル生成プロセス、木材研究・資料 36: 34-50
 50. Kersten P.J., Kirk T.K. (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 169:2195-2201
 51. Guillén F., Martínez A.T., Martínez M.J. (1990) Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl Micro Biotechnol* 32:465-469
 52. Daniel G., Volc J., Kubatova E., Nilsson T. (1992) Ultrastructural and immunocytochemical studies on the H₂O₂-producing enzyme pyranose oxidase in *Phanerochaete chrysosporium* grown under liquid culture conditions. *Appl Environ Microbiol* 58:3667-3676
 53. Eriksson K.E., Pettersson B., Volc J., Musilek V. (1986) Formaiton and partial characterization of glucose-2-oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 23:257-262
 54. Kelley R.L., Reddy C.A. (1986) Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Microbiol* 144:248-253
 55. Nishida A., Eriksson K.E. (1987) Formaiton, purification and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Appl Biochem* 9:325-338
 56. Green R.V., Gould J.M. (1984) Fatty acyl-coenzyme A oxidase activity and H₂O₂ production in *Phanerochaete chrysosporium* mycelia. *Biochem Biophys Res Commun* 118:437-443
 57. Green R.V., Gould JM (1983) Substrate-induced production in mycelia from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun*

117:275-281

58. Tien M., Kirk T.K., Bull C., Fee J.A. (1986) steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. J Biol Chem 261:1687-1693
59. Gold M.H., Wariishi H., Valli K. (1989) Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In Biocatalysis in agricultural biotechnology, ACS Symp Ser 389:127-140
60. Martínez, M.J., Ruiz-Dueñas, F.J., Guillén, F., Martínez, Á.T. (1996) Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isozymes from *Pleurotus eryngii*. Eur J Biochem 237, 424-432
61. Kersten P.J. (1990) Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. Proc Natl Acad Sci USA 87: 2936-2940
62. Guillén F., Martínez A.T., Martínez M.J. (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Eur J Biochem 209: 603-611
63. Cullen D. (1997) Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. J. Biotechnol. 53:273-289
64. Gold M.H., Alic M. (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiol Rev 57:605-622
65. Hakala T.K., Hildén K., Maijala P., Olsson C., Hatakka A. (2006) Differential regulation of manganese peroxidases and characterization of two variable MnP encoding genes in the white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. Appl Microbiol Biotechnol 73:839-849
66. Martínez A.T. (2002) Molecular biology and structure function of lignin-degrading heme peroxidases. Enz Microb Technol 30:425-444
67. Daniel G. (1994) Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. FEMS Microbial Rev 13:199-233
68. Joseleau J.P., Ruel K. (1992) Ultrastructural examination of lignin and polysaccharide degradation in wood by white-rot fungi. In: Kuwahara M, Shimada M (ed) Biotechnology in pulp and paper industry, Uni publishers, Co.,LTD., Tokyo, pp195-201
69. Barrasa J.M., Gutiérrez A., Escaso V., Guillén F., Martínez M.J., Martínez A.T. (1998) Electron and Fluorescence microscopy of extracellular glucan and aryl-alcohol oxidase during wheat-straw degradation by *Pleurotus eryngii*. Appl Environ Microbiol 64:325-332
70. Daniel G., Volc J., Kubatova E., Nilsson T. (1992) Ultrastructural and immunocytochemical studies on the H₂O₂-producing enzyme pyranose oxidase in *Phanerochaete chrysosporium* grown under liquid culture conditions. Appl Environ

1. パルプ高漂白菌株のスクリーニング文献

1. 樋口隆昌、近藤民雄、リグニンの化学、 p 307
2. Nishida, T., Kashino, Y., Mimura, A. and Takahara, Y. (1988) Lignin biodegradation by Wood-rotting fungi I. Screening of lignin-degrading fungi. *Mokuzai Gakkaishi* 34, 530-536
Hirai, H., Kondo, R. and Sakai, K. (1994) Screening of lignin-degrading fungi and their ligninolytic enzyme activities during biological bleaching of kraft pulp. *Mokuzai Gakkaishi* 40: 980-986
3. Glenn J.K., Gold M.H. (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 45:1741-1747
4. Gold M.H., Glenn J.K., Alic M. (1988) Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. *Methods Enzymol* 161:74-78
5. Paszyński A., Pasti M.B., Goszczyński S., Crawford D.L., Crawford R.L. (1991) New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. And *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microbiol Technol* 13:378-384
6. Cripps C., Bumpus J.A., Aust S.D. (1990) Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 56:1114-1118
7. Kim S.J., Ishikawa K., Hirai M., Shoda M. (1995) Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. *J Ferment Bioeng* 79:601-607
8. Thorn R.G. (1993) The use of cellulose azure agar as a crude assay of both cellulolytic and ligninolytic abilities of wood-inhabiting fungi. *Proc Jpn Acad* 69:29-34
9. Ollikka P., Alhoniemi K., Leppänen V.M., Glumoff T., Rajioli T., Suominen I. (1993) Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isozymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 59:4010-4016
10. Buckley K.F., Dobson A.D.W. (1998) Extracellular ligninolytic enzyme production and polymeric dye decolorization in immobilized cultures of *Chrysosporium lignorum* CL1. *Biotechnol Lett* 20:301-306
11. Iimori, T., Kaneko, R., Yoshihara, H., Machida, M., Yoshioka, H. and Murakami, K. (1994) Screening of pulp-bleaching fungi and bleaching activity of newly isolated fungus SKB-1152. *Mokuzai Gakkaishi* 40: 733-737

2. LUKP 漂白に関与するリグニン分解酵素の特定と酵素漂白

1. Kirk T.K., Yang H.H. (1979) Partial delignification of unbleached kraft pulp with ligninolytic fungi. *Biotechnol Lett* 1:347-352
2. Tran A.V., Chambers R.P. (1987) Delignification of an unbleached hardwood kraft pulp by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Mic Biotech* 25:484-490
3. Hernandez-ortega A., Ferreira P., Martínez A.T. (2012) Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1395-1410
4. Paice, M.G., Jurasek, L., Ho C., Bourbonnais, R., Archibald, F. S. (1989) Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*. *Tappi J* 72:217-221
5. Paice, M. G., Reid, I. D., Bourbonnais, R., Archibald, F. S., Jurasek, L. (1993) Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl Environ Microbiol* 59, 260-265
6. Bourbonnais R, Paice MG, Reid ID, Lanthier P, Yaguchi M (1995) Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl Environ Microbiol* 61:1876-1880
7. Moreira, M. T., Feijoo, G., Sierra-Alvarez, R., Lema, J., Field, J. A. (1997) Manganese is not required for biobleaching of oxygen-delignified kraft pulp by the white rot fungus *Bjerkandera sp.* Strain BOS55. *Appl Environ Microbiol* 63: 1749-1755
8. Mester, T., Field, J. A. (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the Absence of Manganese. *J Biol Chem* 273:15412-15417
9. Martínez A.T., Camarero S., Guillén F., Gutiérrez A., Muñoz C., Varela E., Martínez M.J., Barrasa J.M., Ruel K., Pelayo J.M. (1994) Progress in biopulping of non-woody materials: chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol Rev* 13:265-274
10. Katagiri N., Tsutsumi Y., Nishida T. (1995) Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white rot fungi in the solid state fermentation system. *Appl Environ Microbiol* 61:617-622
11. Harazono K., Kondo R., Sakai K. (1996) Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase from *Phanerochaete sordida* YK-624 without addition of MnSO₄. *Appl Environ Microbiol* 62:913-917
12. Archibald, F. S. (1992) Lignin peroxidase activity is not important in the biological bleaching and delignification of kraft brownstock by *Trametes versicolor*. *Appl Environ*

Microbiol 56:3101-3109

13. Bourbonnais R., Paice M.G., Reid I.D., Lanthier P., Yaguchi M. (1995) Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl Environ Microbiol* 61:1876-1880
14. Archibald, F. S., Bourbonnais R., Jurask L., Paice M.G., Reid I.D. (1997) Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *J Biotechnol* 53: 215-236
15. Addleman K., Dumonceaux T., Paice M.G., Bourbonnais R., Archivald F.S. (1995) Production and characterization of *Trametes versicolor* mutants unable to bleach hardwood kraft pulp. *Appl Environ Microbiol* 61:3687-3694
16. Hirai, H., Kondo, R. and Sakai, K. (1994) Screening of lignin-degrading fungi and their ligninolytic enzyme activities during biological bleaching of kraft pulp. *Mokuzai Gakkaishi* 40: 980-986
17. Matsubara, M., Suzuki, J., Deguchi, T., Miura, M., Kitaoka, Y. (1996) Characterization of manganese peroxidases from the hyper ligninolytic fungus IZU-154. *Appl Environ Microbiol* 62: 4066-4072
18. Kondo, R., Kurashiki, K., Sakai, K. (1994) In Vitro Bleaching of Hardwood Kraft Pulp by Extracellular Enzymes Excreted from White Rot Fungi in a Cultivation System Using a Membrane Filter. *Appl Environ Microbiol* , 60: 921-92
19. Rüttimann-Johnson, C., Cullen, D., Lamar, R. T. (1994) Manganese Peroxidase from the white rot fungus *Phanerochaete sordida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 599-605
20. Tien M., Kirk T.K. (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In: Wood WA, Kellogg ST (ed) *Methods in Enzymology*, 161 Part B, 238-249
21. Gold M.H., Glenn J.K. (1988) Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. In: Wood WA, Kellogg ST (ed) *Methods in Enzymology*, 161 Part B, 258-264
22. Mester, T., Field, J. A. (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species Strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem.* 273(25), 15412-15417
23. Berzins V. (1966) Micro kappa numbers. *Pulp and Paper Magazine of CANADA* T-206-T208

3. パルプ高漂白菌株(WD1694 株)のリグニン分解酵素の特定と分析

3.1 MnP 酵素の分析

1. Wariishi, H. (2002) Ligninolytic enzymes. In: Shishido K (ed) *Basic science and biotechnology in mushrooms and molds (In Japanese)*. Industrial Publishing & Consulting,

- Inc., Tokyo, pp 141-153
2. Tien M., Kirk T.K., Bull C., Fee J.A. (1986) Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 261:1687-1693
 3. Wariishi H., Akileswaran L., Gold M.H. (1988) Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry* 27:5365-5370
 4. Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1992) Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **267**(33), 23688-23695
 5. Palma, C., Martínez, A. T., Lema, J. M., Martínez, M. J. (2000) Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: a comparison between *Bjerkandera sp.* and *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biotechnol* 77, 235-245
 6. Mester, T., Field, J. A. (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species Strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem.* **273**(25), 15412-15417
 7. Martínez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F. and Martínez, Á. T. (1996) Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isozymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* **237**, 424-432
 8. Sarkar, S., Martínez, Á. T. and Martínez, M. J. (1997) Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1339**, 23-30
 9. Eriksson A.E., Nishida A. (1988) Methanol oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In: Wood WA, Kellogg ST (ed) *Methods in Enzymology*, 161 Part B, 322-326
 10. Buswell J.A., Odier E. (1987) Lignin biodegradation. *CRC critical reviews in biotechnology* 6:1-60
 11. Kirk T.K. (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Ann Rev Microbiol* 41:465-505
 1. Brown J.A., Glenn J.K., Gold M.H. (1990) Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bac* 172:3125-3130
 12. Bonnarne, P., Jeffries, T. W. (1990) Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl Environ Microbiol* 56(1), 210-217
 13. Rüttimann-Johnson, C., Cullen, D. and Lamar, R. T. (1994) Manganese Peroxidase from the white rot fungus *Phanerochate sordida*. *Appl Environ Microbiol* 60: 599-605

14. Glenn, J. K. and Gold, M. H. (1985) Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 242(2), 329-341
15. Matsubara, M., Suzuki, J., Deguchi, T., Miura, M. and Kitaoka, Y. (1996) Characterization of manganese peroxidases from the hyper ligninolytic fungus IZU-154. Appl. Environ. Microbiol. 62(11), 4066-4072
16. Pease, E. A. and Tien, M. (1992) Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 174(11), 3532-3540
17. Leisola, M. A., Kozuliv, B., Meussdoerffer, F. and Fiechter, A. (1987) Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 262: 419-424
18. Johansson, T., Weiland, K. G. and Nyman, P. O. (1993) Isozymes of lignin peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. II. Partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. Arch. Biochem. Biophys. 300 (1), 57-62
19. Datta, A., Bttermann, A., Kirk, T. K. (1991) Identification of a specific manganese peroxidase among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1453-1460
20. Pease, E. A., Andrwawis, A., Tien, M. (1989) Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 264: 13531-13535
21. Pribnow, D., Mayfield, M. B., Nipper, V. J., Brown, J. A., Gold, M. H. (1989) Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase, from the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 264: 5036-5040

3.2 MnP 遺伝子の分析

1. Welinder K.G. (1992) Superfamily of plant, fungal, and bacterial peroxidases. Curr. Opin. Struct. Biol. 2:388-393
2. Martínez A.T. (2002) Molecular biology and structure function of lignin-degrading heme peroxidases. Enz. Microb. Technol. 30:425-444
3. Morgenstein I., Klopman S., Hibbert D.S. (2008) Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the Agaricomycetes. J Mol Evol 66:243-257
4. Morgenstern I., Robertson D.L., Hibbert D.S. (2010) Characterization of three mnp genes of *Formitiporia mediterranea* and report of additional class II peroxidases in the order hymenochaetales. Appl. Environ. Microbiol. 76:6431-6440
5. Bodeker I.T.M., Nygen C.M.R., Taylor A.F.S., Olson A., Lindahl B.D. (2009) Class II

peroxidase-encoding genes are present in a phylogenetically wide range of ectomycorrhizal fungi. ISME J 3:1387-1395

6. Lundell T.K., Mäkelä M.R., Hildén K. (2010) Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review. J Basic Microbiol 50:5-20
7. Godfrey B.J., Mayfield M.B., Brown J.A., Gold M.H. (1990) Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Gene 93:119-124
8. Mayfield M.B., Godfrey B.J., Gold M.H. (1994) Characterization of the *mnp2* gene encoding manganese peroxidase isozyme 2 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Gene 142:3687-3694
9. Alic A., Akileswaran L., Gold M.H. (1997) Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from *Phanerochaete chrysosporium*. Biochim Biophys Acta 1338:1-7
10. Gold M.H., Alic M. (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiol Rev 57:605-622

4. *P. crassa* WD1694 株のオキシダーゼ酵素の決定と MnP との相関

1. Green R.V., Gould J.M. (1984) Fatty acyl-coenzyme A oxidase activity and H₂O₂ production in *Phanerochaete chrysosporium* mycelia. Biochem Biophys Res Commun 118:437-443
2. Nishida A., Eriksson K.E. (1987) Formaiton, purification and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol Appl Biochem 9:325-338
3. Kelley R.L., Reddy C.A. (1986) Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. J Bacteriol 166:269-274
4. Kelley R.L., Reddy C.A. (1986) Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Arch Microbiol 144:248-253
5. Eriksson K.E., Pettersson B., Volc J., Musilek V. (1986) Formaiton and partial characterization of glucose-2-oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Microbiol Biotechnol 23:257-262
6. Forney L.J., Reddy C.A., Pankratz H.S. (1982) Ultrastructural localization of hydrogen peroxide production in ligninolytic *Phanerochaete chrysosporium* cells. Appl Environ Microbiol 44:732-736
7. Green R.V., Gould J.M. (1983) substrate-induced H₂O₂ production in mycelia from the lignin degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem Biophys Res

Commun.117:275-281

8. Daniel G., Volc J., Kubatova E., Nilsson T. (1992) Ultrastructural and immunocytochemical studies on the H₂O₂-producing enzyme pyranose oxidase in *Phanerochaete chrysosporium* grown under liquid culture conditions. Appl Environ Microbiol 58:3667-3676
9. Bourbonnais R., Paice M.G. (1988) Veratryl alcohol oxidases from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. Biochem J 255:445-450
10. Sannia G., Limongi P., Cocca E., Buonocore F., Nitti G., Giardina P. (1991) Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Biochim Biophys Acta 1073:114-119,
11. Guillén F., Martínez A.T., Martínez M.J. (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Eur J Biochem 209:603-611
12. Muheim A., Waldner R., Leisola M.S.A., Fiechter A. (1990) An extracellular aryl-alcohol oxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. Enzyme Microbiol Technol 12:204-209
13. Kersten P.J. (1990) Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. Proc Natl Acad Sci USA 87:2936-2940
14. Kersten P.J., Cullen D. (1993) Cloning and characterization of a cDNA encoding glyoxal oxidase, a H₂O₂-producing enzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Proc Natl Acad Sci USA 90:7411-7413
15. Kersten P.J., Kirk T.K. (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. J Biol Chem 169:2195-2201
16. Bonnarne P., Jeffries T.W. (1990) Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. AEM 56:210-217
17. Brown J.A., Glenn J.K., Gold M.H. (1990) Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. J Bac 172:3125-3130
18. Perie F.P., Gold M.H. (1991) Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. AEM 57:2240-2245
19. Asther M., Corrieu G. (1987) Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. Enzyme Microb. Technol. 9:245-249

5. *P. crassa* WD1694 株の MnP 反応の組織化学的分析

1. Paice, M. G., Reid, I. D., Bourbonnais, R., Archibald, F. S. and Jurasek, L. (1993) Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 260-265
2. Hirai, H., Kondo, R. and Sakai, K. (1994) Screening of lignin-degrading fungi and their ligninolytic enzyme activities during biological bleaching of kraft pulp. *Mokuzai Gakkaishi* 40, 980-986
3. Kondo, R., Harazono, K. and Sakai, K. (1994) Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase secreted from *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4359-4363
4. Kaneko R, Iimori T, Miyawaki S, Machida M, Murakami K (1995) Biobleaching with manganese peroxidase purified from the pulp bleaching fungus SKB-1152. *Biosci Biotechnol Biochem* 59:1584-1585
5. Kaneko R, Iimori T, Yoshikawa H, Machida M, Murakami K (1994) A possible role of manganese peroxidase during biobleaching by the pulp bleaching fungus SKB-1152. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:1517-1518
6. Katagiri N, Tsutsumi Y, Nishida T (1995) Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white rot fungi in the solid state fermentation system. *Appl Environ Microbiol* 61:617-622
7. Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1992) Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 267(33), 23688-23695
8. 割石 博之 (2002) リグニン分解酵素. 宍戸和夫編、キノコとカビの基礎科学とバイオ技術、アイピーシー、pp141-153
9. Eriksson K.E., Pettersson B., Volc J., Musilek V. (1986) Formaiton and partial characterization of glucose-2-oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 23:257-262
10. Kersten PJ, Kirk TK (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 169:2195-2201
11. Bourbonnais R., Paice M.G. (1988) Veratryl alcohol oxidases from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem J* 255:445-450
12. Reid, I. D. and Paice, M. G. (1994) Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 369-376
13. Archivald F.S., Bourbonnais R., Jurasek L., Paice M.G., Reid I.D. (1997) Kraft pulp

- bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. J Biotechnol 53:215-236
14. Kondo, R., Harazono, K. and Sakai, K. (1994) Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase secreted from *Phanerochaete sordida* YK-624. Appl. Environ. Microbiol. **60**, 4359-4363
 15. Harazono K., Kondo R., Sakai K. (1996) Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase from *Phanerochaete sordida* YK-624 without addition of MnSO₄. Appl Environ Microbiol 62:913-917
 16. Gold M.H., Glenn J.K. (1988) Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. In: Wood WA, Kellogg ST (ed) Methods in Enzymology, 161 Part B, 258-264
 17. Paszczyński, A., Crawford, C. and Huynh, V. B. (1988) Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, purification. In Wood, W. A. and Kellogg, S. T. (ed) "Methods in Enzymology Volume 161 Biomass Part B Lignin, Pectin, and Chitin". Academic Press, 264-270.
 18. Moukha, S. M., Wösten, H. A. B., Asther, M. and Wessels, J. G. H. (1993) In situ localization of the secretion of lignin peroxidases in colonies of *Phanerochaete chrysosporium* using a sandwiched mode of culture. J General Microbiol, 139, 969-978.
 19. Jones, C. L. and Lonergan, G. T. (1999) Histochemical detection of laccase in *Pycnoporus cinnabarinus* using microwave-enhanced colloidal gold microcrystallization. Biotechnol Techniq, 13, 871–875.
 20. Liem, H. H., Cardenas, F., Tavassoli, M., Poh-Fitzpatrick, M. B. and Muller-Eberhard, U. (1979) Quantitative determination of hemoglobin and cytochemical staining for peroxidase using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, a safe substitute for benzidine. Anal Biochem 98, 388-393
 21. Cattaneo, M. V. and Luong, J. H. T. (1994) A stable water-soluble tetramethylbenzidine-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex and its applications in enzyme assays. Anal Biochem 223, 313-320
 22. Takano M., Nakamura M., Nishida A., Ishihara M. (2004) Manganese peroxidase from *Phanerochaete crassa* WD1694. Bulletin of the forestry and forest products research institute 3:7-13
 23. Takano M., Hayashi N., Kuroda K. (2008) Selective staining and visualization of hyphal sheath of a white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694 with Phloxine B. J Wood Sci 54:76-80
 24. Palmer J.G., Muranis L., Highly T.L. (1983) Visualization of hyphal sheath in wood-decay hymenomycetes. II. White-rotters. Mycologia 75: 1005-1010
 25. Ruel K., Joseleau J.P. (1991) Involvement of an extracellular glucan sheath during

- degradation of Populus wood by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Environ Microbiol 57:374-384
26. Joseleau J.P., Ruel K. (1992) Ultrastructural examination of lignin and polysaccharide degradation in wood by white-rot fungi. In: Kuwahara M, Shimada M (ed) Biotechnology in pulp and paper industry, Uni publishers, Co.,LTD., Tokyo, pp195-201
 27. Daniel G. (1994) Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. FEMS Microbiol Rev 13:199-233
 28. Kondo, R., Kurashiki, K. and Sakai, K. (1994) In Vitro Bleaching of Hardwood Kraft Pulp by Extracellular Enzymes Excreted from White Rot Fungi in a Cultivation System Using a Membrane Filter. Appl Environ Microbiol 60:921-92
 29. Kirkpatrick, N., Reid, I. D., Ziomek, E., Paice, M. (1990) Biological bleaching of hardwood kraft pulp using *Trametes (Coriolus) versicolor* immobilized in polyurethane foam. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 105-108
 30. Archibald, F. S. (1992) The role of fungus-fiber contact in the biobleaching of kraft brownstock by *Trametes(Coriolus) versicolor*. Holzforschung. **46**, 305-310
 31. Paice, M. G., Jurasek, L., Ho C., Bourbonnais, R., Archibald, F. S. and (1989) Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*. Tappi J. 72:217-221
 32. Cai Y.J., Chapman S.J., Buswell J.A., Chang S. (1999) Production and distribution of Endoglucanase, cellobiohydrolase, and β -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. Appl Environ Microbiol 65:553-559
 33. Chung P.L.Y., Trevithick J.R. (1970) Biochemical and histochemical localization of invertase in *Neurospora crassa* during conidial germination and hyphal growth. J Bacteriol 102:423-429
 34. Sprey B. (1988) Cellular and extracellular localization of endocellulase in *Trichoderma reesei*. FEMS Microbiol. Lett. 55:283-294
 35. Pugh D., Cawson R.A. (1977) The cytochemical localization of acid hydrolases in four common fungi. Cell Mol Biol 22:125-132
 36. Wösten H.A.B., Moukha S.M., Siestsma J.H., Wessels J.G.H. (1991) Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. J Microbiol 137:2017-2023
 37. Wessels J.G.H. (1993) Wall growth, protein secretion and morphogenesis in fungi. New Phytol 123:397-413
 38. Kersten P.J., Cullen D. (1993) Cloning and characterization of a cDNA encoding glyoxal oxidase, a H₂O₂-producing enzyme from the lignin-degrading basidiomycete

Phanerochaete chrysosporium. Proc Natl Acad Sci USA 90:7411-7413