

| | | | |
|----------|--|---------|---------|
| 氏名 | えのき 榎 | まさ 牧 | こ 子 |
| 学位(専攻分野) | 博士(農学) | | |
| 学位記番号 | 農博第1173号 | | |
| 学位授与の日付 | 平成12年11月24日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 | | |
| 研究科・専攻 | 農学研究科応用生命科学専攻 | | |
| 学位論文題目 | Studies on extracellular lipid peroxidation and novel lipid-related metabolites produced by selective white rot fungus, <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> (選択的的白色腐朽菌 <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> の生産する新規脂質関連代謝物と菌体外脂質過酸化に関する研究) | | |
| 論文調査委員 | (主査) 教授 柴原正章 | 教授 島田幹夫 | 教授 江崎信芳 |

論文内容の要旨

選択的的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* は木材腐朽菌の一つで、木材細胞壁に形態的損傷を与えずにリグニンを選択的に分解することが知られている。本研究では木質バイオマス成分の環境調和型利用への応用を目的として、選択的リグニン分解機構として脂質過酸化反応によるフリーラジカル生成に着目し、本菌の木材腐朽中における菌体外脂質過酸化反応を観察した。本論文は Chapter I, II, および, III から構成されており、得られた主な結果はそれぞれ以下のとおりである。

Chapter I では本菌の木粉培養における菌体外脂質過酸化反応を観察した。培養1週間後の木粉培地有機溶媒抽出画分では、主要な成分が9,12-オクタデカジエン酸とヘキサデカン酸であり、これらの培地中濃度は培養期間の延長とともに減少した。また、この他に9-オクタデセン酸、11-オクタデセン酸、および、オクタデカン酸の生産が確認された。9,12-オクタデカジエン酸については単離・精製し、NMRとMSで構造を確認した。

次に、過酸化反応の進行を上述の木粉培地・有機溶媒抽出画分の Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) と Diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) を用いた試験により観察した。培地の TBARS は培養とともに増加し続けた。また、DPPP を用いて過酸化濃度を観察した結果、培養期間とともに増加し、3週間目で最高となることが明らかとなった。

以上の結果は、*C. subvermispora* によって脂肪酸が培地中に生産され、過酸化を受け、過酸化反応生成物が蓄積していることを示す。

Chapter II では *C. subvermispora* による脂質過酸化反応およびフリーラジカル生成機構に関与する化合物を解析するため、培養後の木粉培地の脂溶性画分における主要成分を分析した。本菌の培地の有機溶媒抽出成分には、上述の5種類の脂肪酸の他に、3つの未知化合物の蓄積が見られた。それらの化合物は培養とともに増加し、脂肪酸が消費された培養4週間後には主要な成分となった。化合物1~3をメチル化誘導体として単離・精製し、NMRおよびMSで構造を検討した。化合物1は1-heptadecene-2,3-dicarboxylic acid, 化合物2は(Z)-1,7-nonadecadiene-2,3-dicarboxylic acid, 化合物3は1-nonadecene-2,3-dicarboxylic acid であり、全てイタコン酸骨格の3位に直鎖状の脂質側鎖が結合した構造を有する新規化合物であった。

これらの3つの新規イタコン酸誘導体は、末端の α , β -不飽和カルボニル構造、二つのカルボキシル基、および長い脂質側鎖を有し、その化学構造上の特徴からフリーラジカル生成反応への関与が予想された。そこで Chapter III では、反応性の検討を行う目的で、化合物1~3のうち、3の化学的合成経路の確立を検討した。イタコン酸を出発物質とし、臭素化、Grignard 反応、アシドリシスを順次行い、目的物の1-nonadecene-2,3-dicarboxylic acid を得た。本化合物が *C. subvermispora* の木粉培地より単離した化合物3と同一であることは NMR および GC-MS で確認した。また、合成した化合物3を用いて反応性を検討したところ、Mn(III) または HRP-H₂O₂ で酸化した2,6-dimethoxyphenol または 3,3'-dihyd-

roxy-4,4'-dimethoxystilbene と水中で青色の化合物を形成した。このことは化合物 3 が一電子酸化されたフェノール性化合物と相互作用することを示している。また、Fe (II) または Fe (III) とアスコルビン酸を用い、bathophenanthroline-disulfonate (BPS) で Fe (II) の呈色を観察すると、化合物 3 は Fe (II) および Fe (III) の電子の授受を妨げた。以上の結果は *C. subvermispora* の生産する新規代謝物 1~3 が、鉄イオンの酸化還元反応を阻害することによってフェントン反応など鉄イオンの関与する反応を制御し、また、キノイド構造と電荷移動錯体を形成することによってフェノール性化合物の一電子酸化生成物を安定化することを示唆している。

論文審査の結果の要旨

木質バイオマスの利用を困難にする最大の原因は、主成分の一つであるリグニンが難分解性の高分子で、化学的・生物的反応に強い抵抗性をもつことにある。本論文は最も優れた選択的的白色腐朽菌である *Ceriporiopsis subvermispora* のリグニン分解機構を扱い、木材腐朽中の菌体外脂質過酸化反応と関連する低分子の新規代謝物の分析結果をまとめたものである。成果として評価できるのは以下の点である。

(1) 脂質過酸化反応がリグニンモデル化合物を分解することはすでに知られているが、本論文では初めて *C. subvermispora* の木粉培養における菌体外脂質過酸化反応を証明した。本菌の木粉培地有機溶媒抽出画分より、ヘキサデカン酸、9,12-オクタデカジエン酸、9-オクタデセン酸、11-オクタデセン酸、および、オクタデカン酸の生産を確認した。このうち、生産の顕著だったヘキサデカン酸と9,12-オクタデカジエン酸が培養とともに消費されていることを示した。また、脂質過酸化生成物量、および、脂質過酸化濃度をそれぞれ TBA 試験と DPPH 試験によって観察し、*C. subvermispora* の木粉培養において脂質過酸化が進行していることを観察した。

(2) *C. subvermispora* の木粉培地およびセルロース-寒天培地において、新規の脂質関連代謝物を検出し、木粉培地より単離して構造決定を行った。それらは、1-heptadecene-2,3-dicarboxylic acid, (Z)-1,7-nonadecadiene-2,3-dicarboxylic acid, 1-nonadecene-2,3-dicarboxylic acid であり、全てイタコン酸骨格の3位に直鎖状の脂質側鎖が結合した構造を有する新規性の高い化合物であった。これらの3つのイタコン酸誘導体は培養期間中に蓄積され、培養後半では有機溶媒抽出画分の主要成分となった。

(3) 上述の新規代謝物のうち、1-nonadecene-2,3-dicarboxylic acid (NDA) の化学的合成経路を確立した。このことは3つのイタコン酸誘導体の反応性の検討や生合成の研究などを可能にする。合成して得た NDA が *C. subvermispora* の木粉培地より単離したものと同一であることは NMR および GC-MS で確認した。また、合成 NDA を用いた実験により、フェノール性化合物の一電子酸化生成物が、NDA とともに水中で青色の電荷移動錯体を形成し、安定化することを見出した。さらに、Fe (II) または Fe (III) とアスコルビン酸を用い、NDA が鉄イオンの酸化還元反応を阻害することを確認した。

以上のように、本論文は白色腐朽性担子菌による選択的リグニン分解過程において、脂質過酸化反応および新規脂質関連代謝物の存在と性質を初めて明らかにしたものであり、微生物生理学および木質変換化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。