

氏名	よし だ しん いち 吉 田 晋 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 921 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 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 林 産 工 学 専 攻
学位論文題目	DEGRADATION AND SYNTHESIS OF LIGNIN AND ITS RELATED COMPOUNDS BY FUNGAL LIGNINOLY- TIC ENZYMES (糸状菌酵素を用いるリグニンとその関連化合物の合成と分解)
論文調査委員	(主 査) 教 授 栞 原 正 章 教 授 島 田 幹 夫 教 授 江 崎 信 芳

論 文 内 容 の 要 旨

リグニンは、木材中の三主要成分の一つであり、地球上に最も多量に存在する芳香族化合物としても知られているが、その化学構造の複雑さ故、いまだに有効な生化学的な分解反応系や利用方法などが見いだされていない。糸状菌類のうち担子菌類は、リグニンペルオキシダーゼ (LiP)、マンガンペルオキシダーゼ (MnP) およびラッカーゼなどのリグニン分解酵素を生産することが知られている。本研究では、リグニン分解酵素によるリグニン並びにその関連化合物の有用物質への変換のための反応系の開発を行うとともに、これら酵素の大量生産を行うことを目的とした。特に、基質となる化合物には水に難溶なものも多いため、有機溶媒を用いた反応系について検討を行った。本論文は、これらの研究の結果をまとめたものであり、その内容は以下のように要約される。

1. 有機溶媒中におけるリグニン分解酵素によるリグニンの分解

Phanerochaete chrysosporium の生産する LiP を用いて有機溶媒中での反応を検討した結果、グリコール系の溶媒を中心とする水混和性有機溶媒中で、高い 3,3'-ジメトキシベンジジン酸化活性を有することが明らかとなった。また、基質は水中では反応中間体として電荷移動錯体を経由するが、有機溶媒中ではこれを経由せず効率よく最終酸化生成物まで酸化されていることを見いだした。さらに、有機溶媒が酵素活性に及ぼす影響について検討した結果、活性が保持される溶媒は溶媒和力およびミセル形成能が大きいことから、酵素の立体構造への影響が少ないことが推察された。また、溶媒中での酵素の吸収スペクトルによる分析からこれらの溶媒は活性中心への影響も少ないことが推定された。加えて、基質特異性について検討したところ、有機溶媒中ではイオン化ポテンシャルが低く疎水性の大きな基質に対する酸化活性が大きいことが示された。さらに、脂肪酸やポリエチレングリコールの誘導体で LiP の分子表面を修飾することにより、グリコール系溶媒中での活性の増加が観察された。続いて、*Bjerkandera adusta* (ヤケイロタケ) の MnP を用いてアセトン中における合成リグニンの酸化反応について検討を加えたところ、

シリリングタイプリグニンモデルで高分子化反応を伴うものの低分子化も触媒することが明らかとなった。さらに、重合反応はアスコルビン酸を添加して過剰のフェノキシラジカルの濃度を減少させることにより抑制され、この条件下では分解反応が優先することが示された。

2. 有機溶媒中におけるリグニン分解酵素によるリグニンの合成

合成高分子モデルリグニンは、種々の方法により調製され、リグニンの反応性や生成機構の解明に用いられてきたが、天然のリグニンと同等の分子量並びに化学構造を有することが必要となる。より天然に近いリグニンを合成するため、その合成反応に及ぼす反応場の影響について検討を加えた結果、有機溶媒中では、シナピルアルコールから天然リグニン中の主要結合様式である、 β -O-4タイプの二量体が、水中ではレジノールタイプの二量体が生成することを見だし、モデルリグニンの合成には有機溶媒の存在が重要であることを明らかにした。また、*B. adusta*のMnPは、従来からリグニンの合成に用いられる西洋わさびのペルオキシダーゼ（HRP）と比較して、アセトン中での活性の保持率が高いことが見いだされた。そこで、アセトン中で*B. adusta*のMnPを用いてリグニンの合成を行い、HRPから調製されたものと比較したところ、天然に近い化学構造を持つ高分子量のリグニンモデル化合物が高収率で得られることが明らかとなった。

3. バイオリアクターを用いるリグニン分解酵素の生産

天然の条件に類似した、木粉を主体とした固体培地を用いて*B. adusta*の培養を行い、生産されるリグニン分解酵素活性について検討した結果、LiPおよびMnPの生産が認められた。また、回転式固体培養装置を作成し酵素生産について調べたところ、フラスコ培養と同程度のレベルで生産されていることが示された。

論文審査の結果の要旨

リグニンの生化学的な分解並びに変換は製紙工業における脱リグニン処理、廃液処理、リグニンの化学合成原料としての利用などの点から重要である。本論文は、担子菌類の生産するリグニン分解酵素を用いたリグニン並びに関連化合物の分解および変換のための反応系、特に有機溶媒を用いた反応系の開発を行うとともに、これら酵素の大量生産を試みた結果を取りまとめたもので、評価すべき点は次の通りである。

1. *Phanerochaete chrysosporium*の生産するLiPの有機溶媒中における反応性について詳細に検討を加え、3,3'-ジメトキシベンジジンに対しグリコール系の溶媒中で酸化活性を示し、かつ水中よりも高い活性が認められることを見だし、さらに反応中間体の違いから水中と溶媒中の反応の差異を明らかにした。また、有機溶媒が酵素活性に及ぼす影響についても検討を加え、活性が保持される溶媒は酵素の立体構造と活性中心の両方への影響が少ないことを推定した。ついで、溶媒中の基質特異性についても検討を加え、有機溶媒中では基質のイオン化ポテンシャルと疎水性がLiPによる酸化反応に影響することも推定した。さらに、種々の修飾剤を用いて、LiPの化学修飾を行い、化学修飾法は、有機溶媒中でのLiPの反応性の改善に有効であることを示した。続いて、*Bjerkandera adusta*の生産するMnPは70%アセトン中で、合成リグニンを低分子化することを認め、さらに付随する重合反応はアスコルビン酸の添加によるフェノキシラジカル濃度の減少により抑制することができ、この条件下では分解反応が優先することも見出した。

2. 合成リグニン調製の際、有機溶媒中では、シナピルアルコールから天然リグニン中の主要結合様式である β -O-4 型二量体が、水中ではレジノール型二量体が生成することを見だし、モデルリグニンの合成には有機溶媒の存在が重要であることを明らかにし、反応系への有機溶媒の添加によりランダムに進行するラジカル反応を制御することが可能であることを示した。また、有機溶媒中で、従来から用いられる西洋わさびペルオキシダーゼや Fe^{3+} の代わりに *B. adusta* の MnP を用いて、化学構造、分子量などの点で天然に近いリグニンを高収率で得ている。

3. 木粉を主体とする固体培地を用いた回転式固体培養装置を作成し、本装置によるリグニン分解酵素生産はフラスコ培養と同程度であることを示した。

以上のように、本論文では新たに、反応系として有機溶媒を用いることで、担子菌類の生産するリグニン分解酵素がリグニンとその関連物質の合成および分解の両反応を触媒することが可能となることを示しており、本酵素による新規の生分解性ポリマーの合成への利用の可能性も強く示唆するものである。また、酵素の大量生産により、リグニン分解酵素を用いた工業レベルでの反応の可能性も示唆され、バイオマス変換学、応用酵素化学、木材化学、林産工学などの諸分野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9年2月19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。