

氏 名	ときまつとしあき 時 松 敏 明
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1030 号
学位授与の日付	平成 11 年 1 月 25 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	Biochemical Roles of Oxalic Acid in Wood Decay Model Systems and Characteristics of a New Oxalic Acid Producing Enzyme Glyoxylate Dehydrogenase (木材腐朽モデル系におけるシュウ酸の生化学的役割と新規シュウ酸生成酵素グリオキシル酸脱水素酵素の性質)
	(主査)
論 文 調 査 委 員	教 授 島 田 幹 夫 教 授 桑 原 正 章 教 授 中 坪 文 明

論 文 内 容 の 要 旨

シュウ酸は木材腐朽担子菌や共生菌根菌が分泌する代謝産物である。近年，森林資源と環境科学の観点からシュウ酸の木材腐朽過程における役割とそのバイオレメディエーション効果が注目され，内外の研究者により活発に研究が進められている。しかし，木材腐朽過程におけるシュウ酸の代謝機構については未だ不明な点も多く，特に，木材腐朽菌からシュウ酸生成酵素を単離・精製し，その性質を解明した研究報告はほとんど存在しない。本論文は，木材腐朽モデル系においてシュウ酸がリグニン・糖複合体 (LCC) 分解に果たす役割について研究を行い，木材腐朽菌から新規シュウ酸生成酵素であるシトクロム c 依存型グリオキシル酸脱水素酵素を単離・精製し，その酵素化学的性質を解明したものである。その主な内容は以下のようにまとめられる。

1. β -O-4 型リグニンモデル二量体とメチル β -D-グルコシドから構成される LCC モデル化合物を新規経路により合成することに成功した。この方法を用いることにより，本モデル化合物の 4 種のジアステレオマーを合成過程で分離して得ることができた。本モデル化合物は LCC 結合の化学的あるいは酵素的分解に関する研究に有用であった。
2. LCC モデル化合物の C₄-エーテル結合は，褐色腐朽菌が生理的に生産し得る量 (0.1 M, pH 1.8) のシュウ酸溶液で加水分解され，分解生成物としてモデル化合物の β -O-4 型二量体部分が生じることを明らかにした。この実験結果から，褐色腐朽菌の木材腐朽過程において木材中の LCC の C₄-エーテル結合は加水分解される可能性があることを示唆した。
3. 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* のリグニンペルオキシダーゼ (LiP) は非フェノール性 β -O-4 型 LCC モデル化合物を分解することができることを証明した。分解生成物として 4-O-エチルバニリンを生成することを確認し，基質の C₄-C₅ 結合と C₄-エーテル結合が切断されることを明らかにした。また，シュウ酸が LiP 系による LCC 分解を阻害し，この過程でシュウ酸自身は二酸化炭素に分解されることを見いだし，LiP 系による LCC モデル基質の分解はリグニンモデル基質分解の場合と同様に一電子酸化機構によって進むことを明らかにした。
4. シュウ酸生成酵素の一つであるグリオキシル酸脱水素酵素を褐色腐朽菌オオウズラタケ (*Tyromyces palustris*) から電気泳動的に均質なタンパク質として精製し，その酵素化学的性質を解明した。その結果，本酵素はシトクロム c の共存下でグリオキシル酸の脱水素反応を触媒し，シュウ酸を生成することを証明した。本酵素は分子量 331,000 であり，サブユニット (分子量 59,000) の 6 量体が正 8 面体構造を形成していること，活性中心にフラビンモノヌクレオチド (FMN) とヘムをもつフラボヘムタンパク質であること，グリオキシル酸に対して高い基質特異性を有すること，電子受容体としてシトクロム c を利用するか NAD や NADP を利用できないことなどが明らかとなった。また，本酵素は新規のシトクロム c 依存型グリオキシル酸脱水素酵素であることが明らかとなった。さらに，本酵素反応において基質からの電子伝達経路は，基質→FMN→ヘム→シトクロム c の経路をたどることが示唆された。

以上、本研究によって木材腐朽担子菌類から、新規シュウ酸生成酵素であるシトクロムc依存型グリオキシル酸脱水素酵素が発見され、その酵素化学的性質の一端が解明された。また、木材腐朽菌によるLCC分解におけるシュウ酸の役割も明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

きのこなどの森林微生物が分泌する二次代謝物であるシュウ酸は、白色腐朽菌の場合リグニン分解酵素系と共役してバイオレメディエーション効果をもたらす、共生菌根菌の場合樹木の成長に必要なリン酸の供給系として機能することが示唆されている。しかし、木材腐朽過程におけるシュウ酸の生化学的役割とその代謝機構については不明な点も多く、特に木材腐朽担子菌からシュウ酸生成酵素を単離・精製し、その性質を解明した研究例はほとんどない。本論文は、木材腐朽モデル系におけるシュウ酸の役割を解明し、新規シュウ酸生成酵素を褐色腐朽菌から単離・精製しその性質を解明したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. β -O-4型リグニンモデル二量体とメチル β -D-グルコシドから構成されるLCCモデル化合物を新規経路により合成することに成功した。この方法を用いることにより、本モデル化合物の4種のジアステレオマーを合成過程で分離して得ることができた。
2. 非フェノール性 β -O-4型LCCモデル化合物のC_α-エーテル結合は褐色腐朽菌が生理学的に生産し得る量のシュウ酸(0.1 M, pH 1.8)で加水分解されることを証明した。この結果から、褐色腐朽過程で蓄積するシュウ酸は木材中のLCCのC_α-エーテル結合を加水分解し得ることが示唆された。
3. 非フェノール性 β -O-4型LCCモデル化合物はリグニンモデル化合物と同様に、一電子酸化機構により白色腐朽菌のリグニンペルオキシダーゼ(LiP)で分解されることを明らかにした。また、リグニンモデル基質の場合と同様にシュウ酸はLiP系によるLCC分解を阻害し、この過程でシュウ酸自身は酸化的に分解され、二酸化炭素を生成することを見いだした。
4. 褐色腐朽菌からグリオキシル酸脱水素酵素を電気泳動的に均質なタンパク質として単離・精製し、その酵素化学的性質を解明した。その結果、本酵素はグリオキシル酸に対して高い基質特異性を有すること、電子受容体としてシトクロムcを利用するがNADやNADPを利用できないことなどがわかった。また、本酵素はフラボヘムタンパク質に属し、新規のシトクロムc依存型グリオキシル酸脱水素酵素であることが判明した。

以上、本研究は木材腐朽モデル系におけるシュウ酸の生化学的役割を明らかにすると共に、木材腐朽担子菌から従来の研究では未報告のシュウ酸生成酵素を発見し、その酵素化学的性質を明らかにしたものであり、木質生化学、木材腐朽菌学、木材保存学および森林生態生化学の発展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10年12月18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。