

(論文内容の要旨)

本論文は、嫌気性、特に硫酸塩還元条件下で不溶性高分子リグニンの生物分解を定量的・定性的に検討した結果をまとめたもので、6章から構成されている。

第1章は序論であり、本研究の目的を設定している。化石燃料消費による地球温暖化を防ぐための代替原料として豊富な炭素源である木質に対しての注目が高まっている。木材などの木質は昔から人類の重要なエネルギー源であり、生活に必要な資源であった。現在では木質を原料にした Biorefinery 工程で多くの有用な物質を生産しており、その代表的なものは紙である。木質は主にセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンといった化学成分で構成されている。木質に関する研究は長い歴史を持つものの、現在でも多くの難題が存在する。その一つはリグニンの生物分解に関する研究領域である。

本論文の第2章は、リグニン分解に関する文献考察を実施している。リグニンは地球上に存在する炭素源として、セルロースに次いで多い天然高分子である。このリグニンは芳香族有機化合物を多く含み、分解性が極めて低い物質として知られている。構造的には 3 つのモノリグノール (*p*-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol, sinapyl alcohol) の重合体からなる不規則な 3 次元網目状構造を持ち、微生物分解を受け難く、木材に耐腐朽性を与えている。リグニンの生物分解に関する研究は植物などの自然界における物質循環の解明やパルプ製造における選択的リグニン分離の立場から重要な研究課題となっている。環境の分野では、リグニンを生物分解する際に生成される Ligninolytic 酵素がダイオキシン類などの有害な難分解物質を分解できることでも注目されている。これまでリグニンを分解する微生物としては好気性白色腐朽菌がよく知られているが、嫌気性条件下におけるリグニン分解に関する研究はほとんど行われていない。嫌気性条件下におけるリグニン分解は、木質材料由来の廃棄物が多い家庭ゴミ埋立地の安定化やパルプ廃水の嫌気性処理等に重要である。木材成分の嫌気性分解に関する研究分野では、セルロースおよびヘミセルロースは分解されるものの、高分子リグニンの分解は見出されていない。それはリグニンの生物分解において、リグニンの低分子化に深く関与する Extracellular 酵素が酸素を必要とするので、嫌気性でのリグニンの生物分解は起こらないからであると報告されている。

一方、リグニン含量が多いほどセルロースの分解率は低くなることも知られている。埋立地のような嫌気性条件下で、硫酸塩還元菌はメタン生成菌より強い電子親和力を持つため、難分解物質の分解で注目されている。

第3章では、セルロース分解におけるリグニンの影響を硫酸塩還元条件下で定量的に調べた結果を記述している。リグニンに対するセルロースの含量比を 42.15、4.59、2.51、1.14、0.7 とし、回分実験を行った結果、リグニンの含量が多いほどセルロースの分解速度は低くなることを示した。

第4章では、嫌気性条件下で電子受容体として硫酸塩を利用する硫酸塩還元条件下で高分子リグニンの分解を化学的、生物学的に調べている。特に、分解において律速段階と考えられる反応を考慮し、低分子化され可溶化したリグニンを定量的に分析した。微生物によるリグニンの分解は、その構造的特性から直接的には炭素源にならないため、糖類などの別の基質を必要とする。さらにリグニン分解は加水分解反応ではなくラジカル反応によるもので、そのラジカルの生成に必要な過酸化水素は糖類の代謝を通じて生成される場合がある。そこで、本研究ではセルロースを共存基質として与え、微生物の活性度を高めながらリグニンの分解を調査した。本研究の実験結果から、硫酸塩還元条件下でセルロースの分解とともに不溶性高分子リグニンであるクラーソンリグニンが減少することが確認された。その分解率は約 60 日間で 11.9%にとどまり、分解能は最大 3.49 mg/L/day と高くはなかった。しかし、分解産物である可溶化したリグニンの定量、定性的変化とリグニンモノマーである芳香族が検出されたことで、硫酸塩還元条件下で高分子リグニンが分解されることが認められた。また、本研究結果から、高分子リグニンの分解に関する指標として可溶化した低分子リグニンと芳香族の定量が有効であることが示唆された。

第5章では、リグニン分解に関与する微生物を調べるため、16S rDNA クローンライブラリーによる微生物群集解析を行い、系統図に基づいて比較している。対象試料としてはセルロースのみを分解した試料および高分子リグニン同時分解が確認された試料を用いた。その結果、セルロース分解においては 70 クローン中 11 種類の系統型が見つかった。高分子リグニンを同時に与えた試料では 91 クローン中 18 種類の系統型が見つかり、リグニン分解を伴うほうが多くの種類の微生物が関与していることが示唆された。特に、硫酸塩還元菌のクローンと *Clostridia* に近い菌の種類が高分子リグニンも含む試料で多いことから、その菌がリグニン分解に関与しているのではないかと推察された。最大数のクローンは *Firmicutes* 属の *Clostridia* に近い菌で、セルロース分解では 61%、高分子リグニンを同時に分解した試料では 45%を占めた。硫酸塩還元菌のクローンは *delta Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Archaea* 網に属するのが存在した。

第 6 章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は地球上に存在する炭素源として最も多いリグノセルロースの嫌気性生物分解を研究したものである。特に、硫酸塩還元条件における高分子リグニンの分解を充実した実験結果を基にし、化学的、生物学的な観点から考察を行った。得られた主な成果は次の通りである。

1. セルロース分解におけるリグニンの影響を硫酸塩還元条件で定量的に調べた。リグニンに対するセルロースの含量比を 42.15、4.59、2.51、1.14、0.7 として、回分実験を行った結果、リグニンの含量が多いほどセルロースの分解速度が低くなることを示した。また、硫酸塩還元条件におけるセルロース分解に与える高分子リグニンの影響を定量的に評価した。
2. セルロースを共存基質として与え、微生物の活性度を高めながら高分子リグニンの分解を実験的に検討した。高分子リグニンの分解能は最大 3.49 mg/L/day と高くはなかった。しかし、分解産物である可溶化したリグニンおよびリグニンモノマーである芳香族の定量・定性的変化から、硫酸塩還元条件下で高分子リグニンは分解できることを明らかにした。
3. 高分子リグニン分解に関与する微生物を調べるため、16S rDNA クローンライブラリーによる微生物群集解析を行い、系統図を作成した。セルロースのみを分解した試料と高分子リグニンを同時に分解する試料を比較し、高分子リグニン分解に関与する硫酸塩還元菌の役割を検討した結果、硫酸塩還元条件における硫酸塩還元菌が同定でき、その結果、微生物相も多様であることを明らかにした。

本論文では、嫌気性硫酸塩還元条件で高分子リグニンが分解され、分解産物が生成されることを示した。また、その分解に関与する微生物群集解析を行った。これらの結果は今後、木質廃棄物の嫌気性微生物処理、木質炭素源を利用した醗酵によるエネルギー生産、木質を分解する嫌気性微生物のバイオレメディエーションへの適用など、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成21年2月24日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。