

(論文内容の要旨)

白色腐朽菌は自然界において、木材中のリグニンを単独で無機化できる唯一の微生物であるといわれ、陸上生態系の炭素循環において重要な役割を担っている。中でも白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* は、セルロースを残してリグニンを高選択的に分解するというユニークな木材腐朽特性を有しており、その反応機構の解明は、環境調和型木質バイオマス変換法の開発に大きく寄与すると期待される。

C. subvermispora による木材腐朽においては、菌体外酵素の木材細胞壁内への侵入が観察されず、細胞間層および細胞壁内のリグニンが優先的に分解されていることから、セルロースなどの多糖を強力に分解して細胞壁を侵食するフェントン反応を抑制する機構と、酵素から遠く離れた場所での低分子代謝物を介したリグニン分解機構が存在すると考えられている。これまでに、本菌の主要な菌体外代謝物としてアルキルあるいはアルケニル基を側鎖にもつイタコン酸誘導体 ceriporic acid A, B, C が単離された。また、ceriporic acid が Fe^{3+} の還元を抑制することによりフェントン反応系によるヒドロキシルラジカルの生成を阻害し、これによりセルロースの解重合が強力に抑制されることが示されている。しかしながら、ceriporic acid の不斉炭素の絶対配置は未解明であり、ceriporic acid A, B, C 以外の ceriporic acid 類縁体は単離・同定されていない。一方、*C. subvermispora* の低分子代謝物を介したリグニン分解機構に関しては、腐朽初期にマンガンペルオキシターゼ (MnP) を介した遊離脂肪酸の過酸化によりラジカル連鎖反応が起こり、このラジカル連鎖反応がリグニン分解を起こす機構が提示されているが、遊離脂肪酸の産生と酸化分解が終息する腐朽の中期以降において、リグニン分解を説明する機構は示されていない。そこで本研究では、*C. subvermispora* の選択的リグニン分解機構の解明を目的とし、未解明であった ceriporic acid の絶対配置の決定と新規類縁体の構造決定を行った。また、本菌のリグニン分解に関与する低分子代謝物として過氧化物および被過酸化性物質に注目して探索を行い、ceriporic acid のメチルエステルが過酸化水素の存在下にリパーゼによる過加水分解を受けて ceriporic peracid monomethyl ester となり、この過酸が金属錯体や $\text{MnP}/\text{Mn}^{2+}$ と反応して、非フェノール性リグニン二量体モデルを分解することを初めて示した。その主な内容は以下の通りである。

1. Ceriporic acid はセルロース分解抑制に関与する重要な代謝物であり、これまでに ceriporic acid A, B, C の3種が単離・同定されている。本研究では ceriporic acid の新規類縁体を単離し、カルボキシ基のメチルエステル化と dimethyl disulfide によるアルケニル側鎖二重結合のチオメチル化の後、GC-EIMS 分析に供した。その結果、本類縁体は ceriporic acid C と同じ ω -9 位に二重結合を有していることが判明した。そこで ceriporic acid C とそのトランス異性体である (*E*)-7-hexadecenylitaconic acid の標品をそれぞれ化学合成し、NMR, HPLC および GC-EIMS のデータを天然物と比較したところ、標品とよく一致したことから、本化合物を (*E*)-7-hexadecenylitaconic acid と決定し、ceriporic acid D と命名した。また、 $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{glucose}$ の取り込み実験から ceriporic acid D は本菌により *de novo* に生合成されることを明らかにした。トランス型アルケ

ニル鎖を有した代謝物は、構造的に類似した地衣酸を含めて報告がなく新規性が高い。さらに 14:0, 16:1 n-7, 16:1 n-9, 17:0, 18:2, 19:0, 19:1, 20:0, 20:1 の脂肪酸構造を分子内にもつ新規 ceriporic acid 類縁体を見出し、これらがすべて *de novo* に生合成されることを示した。

2. 天然より単離した ceriporic acid A, B, C と化学合成したラセミ体 ceriporic acid B, C を、それぞれキラルシフト試薬を利用した NMR 分析に供し、天然型 ceriporic acid の絶対配置を *R* と決定した。この ceriporic acid の絶対配置から、ceriporic acid 生合成における鍵ステップと考えられるオキサロ酢酸とアシル CoA の縮合が、ほとんどのクエン酸合成酵素の反応とは逆に *re* 面から進むと推察した。
3. *C. subvermispora* による木材腐朽においては、菌糸表面を覆う多糖マトリックスである sheath が木材細胞壁と接触する領域からリグニン分解が進行する現象が観察されている。そこで、sheath 中のリグニン分解に関与する代謝物の探索を行った。培地および成分分画法を検討し、得られた sheath 画分を HPLC で分画後、蛍光試薬 SPY-LHP を用いて脂質過酸化物のプロファイリングを行い、新規過酸化物を見出した。Sheath 中に見出された新規過酸化物の LCMS におけるマススペクトルおよび保持時間は、ceriporic acid のモノメチルエステルあるいはジメチルエステルをリパーゼにより過酸化水素で過加水分解した生成物と一致した。生成物の LC-IT-TOF MS 分析, ^1H , ^{13}C NMR 分析からその構造を ceriporic acid monomethyl ester B の過酸 ceriporic peracid monomethyl ester B と決定し、さらに、LC-IT-TOF MS 分析により、sheath 画分に ceriporic acid monomethyl ester A, B, C が含まれることを見出した。Ceriporic peracid monomethyl ester B は銅錯体、あるいは $\text{MnP}/\text{Mn}^{2+}$ と反応して、難分解性の非フェノール性リグニン二量体モデル化合物 (GOS-Et) を分解したことから、本代謝物が木材腐朽中における低分子代謝物を介したリグニン分解機構を担っていることが示唆された。また、ceriporic acid monomethyl ester は菌体内と菌体外に存在し、sheath 中の酵素により過酸となることを示した。この過酸生成反応は、ceriporic acid ではほとんど進行しないことから、*C. subvermispora* は、ceriporic acid がもつフェントン反応抑制機能を、ceriporic acid のメチルエステル化により、過酸生成反応を介したリグニン分解機能へと切り替えることが明らかとなった。また、ceriporic acid の過酸生成反応は様々な微生物起源のリパーゼにより触媒されたことから、自然界においてセルロースを残して木材を腐朽する *C. subvermispora* と共存する微生物との間に協力関係が存在する可能性を指摘した。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* が産生する二次代謝物 **ceriporic acid** の絶対配置の決定と類縁体の構造多様性を示すとともに, **ceriporic acid** の過酸化が関与するリグニン分解機構を解明した研究であり, 評価すべき点は以下のとおりである.

- 1) トランス型アルケニル鎖を有する 新規 **ceriporic acid** 類縁体を単離し, 化学合成と機器分析により構造決定して, **ceriporic acid D**と命名した. さらに, 様々なアルキルおよびアルケニル鎖を有する新規 **ceriporic acid** 類縁体9種を見出した. $[U-^{13}C]$ glucose の取り込み実験から, これらの新規 **ceriporic acid** 類縁体が, 本菌により *de novo* に生合成されることを明らかにした. このように, **ceriporic acid** の類縁体を網羅的に解析し, **ceriporic acid** の多様性や **ceriporic acid D** の構造的新規性を指摘した.
- 2) **Ceriporic acid** は分子内に不斉炭素を一つ有するが, その絶対配置が不明であった. 本論文では, 天然型と化学合成した **ceriporic acid** をそれぞれ, キラルシフト試薬を利用したNMRにより分析し, 天然型の絶対配置を*R*と決定した. これにより, **ceriporic acid** 生合成におけるオキサロ酢酸とアシルCoAとの縮合反応を *re* 面選択的に触媒する酵素が関与する可能性を指摘した. また本分析法は, **ceriporic acid** の他, **ceriporic acid** と類似構造をもつ他の天然物のエナンチオマー判別法として有用である.
- 3) 菌体外多糖マトリックスである **sheath** に含まれる新規過酸化代謝物およびその前駆体に着目し, **ceriporic acid** が菌体内でメチルエステル化された後, 本菌の **sheath** 内酵素や, 様々な微生物起源のリパーゼにより, 位置選択的に過酸化水素で過加水分解されて **ceriporic peracid monomethyl ester** に変換されることを見出した. さらに, 生成した過酸は遷移金属錯体や MnP/Mn^{2+} と反応して非フェノール性リグニンモデルを分解することを示した. **Ceriporic acid** が従来考えられていたセルロース分解抑制のみならずリグニン分解にも寄与し, その二つの重要な機能がメチルエステル化によって切り替えられることを示した.

以上のように, 本論文は **ceriporic acid** の化学に関する新しい知見と, リグニン分解への関与の機構を初めて示したものであり天然物化学, 菌類学, 酵素化学, バイオマス変換学の発展に寄与するところが多い.

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21年2月10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.