

論文の内容の要旨

論文題目 *Phanerochaete crassa* WD1694 株の未晒クラフトパルプ漂白と
リグニン分解酵素に関する研究

氏 名 高野 麻理子

紙パルプ産業の脱リグニン工程には、莫大なエネルギーと薬剤が消費されており、環境負荷が高いことが課題となっている。白色腐朽菌は、木材中のリグニンを効率的に分解できる微生物であり、紙パルプ産業の脱リグニン工程に応用することで、環境に優しい紙パルプの製造法の開発につながる可能性がある。

白色腐朽菌のリグニン分解をパルプ漂白に応用するためには、パルプ漂白時の脱リグニンに関与する酵素の作用について解明する必要がある。白色腐朽菌のパルプ漂白には、リグニン分解ペルオキシダーゼ類(LPO)の関与が明らかになっており、LPO および LPO を用いたパルプ漂白について詳細に研究されている。LPO は触媒作用に過酸化水素を必要とし、白色腐朽菌では、オキシダーゼ(OX) が過酸化水素を生産するとされている。しかし、白色腐朽菌のパルプ漂白の研究では、LPO に過酸化水素を供給するオキシダーゼは殆ど分析されていない。また、菌体外で LPO と OX がどのように関連して脱リグニンが生じるか殆ど明らかになっていない。

本研究では、未晒クラフトパルプ (LUKP) の高漂白菌 *P. crassa* WD1694 株を選抜し、リグニン分解酵素としてマンガンペルオキシダーゼ (MnP) を特定し、MnP による未晒クラフトパルプの漂白を確認した。また、過酸化水素の生産酵素として、グリオキサールオキシダーゼ (GLOX) を菌体外から検出し、GLOX と MnP の関連性を分析した。次いで、沈殿性 PO 発色基質を用いて、WD1694 株のパルプ培地中で、MnP に過酸化水素が供給される場所を分析し、菌糸端部に発色を検出した。さらに、酵素活性分析と PO 発色基質を用いた組織化学的な分析手法を併用し、菌糸端部の発色は、菌糸外に拡散した MnP に、菌糸端部に局在する GLOX が過酸化水素を供給することで生じたことを示し、MnP に過酸化水素が供給される具体的なしくみを提示した。

未晒シクラフトパルプ高漂白菌株のスクリーニング

未晒シクラフトパルプ (LUKP) の高漂白菌を選抜するため、420 株の白色腐朽菌およびリター分解菌を対象に、高分子色素 Poly R-478 の脱色試験を一次スクリーニング法に用い、脱色能力の高い上位 10 株を選抜した。選抜された 10 株の LUKP 漂白試験を行い、最も高い漂白能力を示した *Phanerochaete crassa* WD1694 株を選抜した (Table 1)。

Table 1. 未晒シクラフトパルプ高漂白菌株のスクリーニング

菌株No.	菌株名	カップー価	白色度	Poly R-478 脱色 (cm)
WD1694	<i>P. crassa</i>	6.1	54.3	8.5
F150	<i>P. crassa</i>	7.5	45.9	5.0
A119	<i>Pleurotus sp.</i>	8.1	49.9	5.5
PSC-M	<i>P. pulmonarius</i>	8.3	48.1	5.0
PSC-H	<i>P. pulmonarius</i>	8.3	47.8	5.0
PSC-T	<i>P. pulmonarius</i>	8.4	46.7	5.0
BKMF1767	<i>P. chrysosporium</i>	12.2	33.8	8.5
F148	<i>C. brevis</i>	12.8	33.2	7.5
WD1670	<i>T. versicolor</i>	12.9	30.8	8.0
WD1674	<i>T. hirsuta</i>	13.3	31.2	6.0
control	-	15.7	28.2	-

P. crassa WD1694 株のリグニン分解酵素の特定と酵素漂白

WD1694 株の LUKP 漂白に作用するリグニン分解酵素を分析した。WD1694 株を植菌した LUKP のカップー価の低下と白色度の増加が顕著に認められた時期には、高い Mn 依存性の PO 活性が検出された (Fig1, 2)。一方、Mn 非依存性の PO とラッカーゼ (Lac) は殆ど検出されず、リグニンペルオキシダーゼ (LiP) は検出されなかった (Fig.2)。従って、WD1694 株の LUKP 漂白に作用する酵素は Mn 依存性の PO であることが示唆された。WD1694 株から Mn 依存性の PO を採取し、この酵素による LUKP 漂白を検討した結果、MnSO₄、過酸化水素、マロン酸の存在下で脱リグニンと白色化が確認された。さらに酵素処理とアルカリ洗浄の繰り返し処理により、LUKP 漂白に高い効果が認められた (Table 2)。

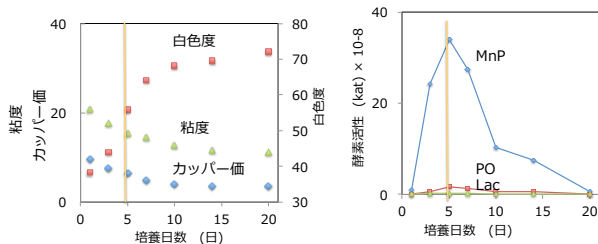


Fig. 1 WD1694株によるLUKPの漂白

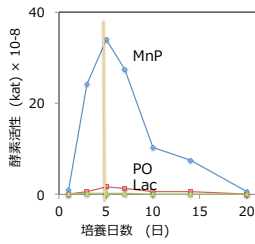


Fig. 2 リグニン分解酵素活性

Table 2. WD1694株とMnPによる LUKP漂白

処理法	処理時間 処理段数	カップー価	粘度	収率 (%)
生菌処理	0日	11.8	46.0	95.9
	2日	10.9	37.1	96.7
	5日	6.7	19.9	95.9
	7日	6.0	16.3	96.8
MnP 酵素多段処理	1段	9.5	44.9	99.6
	2段	7.4	38.0	97.7
	4段	5.8	29.3	99.1
コントロール (MnP 無添加)*	4段	9.6	38.4	100.3
無処理	0日	12.6	48.0	100.0

P. crassa WD1694 株の MnP の分析

WD1694 株の Mn 依存性の PO を生産、精製し、その性質を分析した。WD1694 株の Mn 依存性の PO は分子量、等電点、触媒活性が *P. chrysosporium* の MnP と高い類似性を示した。次に WD1694 株の MnP のゲノム遺伝子を分析し、4つのゲノム遺伝子を特定した。WD1694 の MnP 遺伝子のエキソン・イントロン構造を分析した結果、*P.*

chryso sporium の MnP 遺伝子構造と高い相同性を示した (Fig. 3)。白色腐朽菌の生産する Mn(II)を基質とする PO には、MnP とバーサタイル PO が知られているが、WD1694 株は MnP を生産することを確認した。

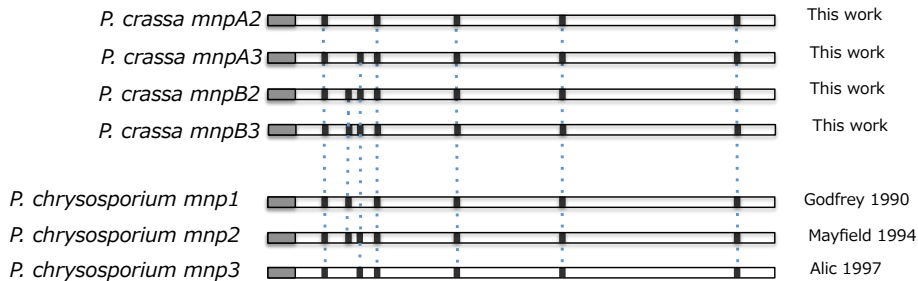


Fig. 3 *P. crassa* WD1694株と *P. chryso sporium* の *mnp* 遺伝子構造

P. crassa WD1694 株の OX の特定と MnP との相関

WD1694 株の MnP に過酸化水素を供給する OX を決定するため、MnP の最適生産培地の OX を分析した結果、GLOX 活性が検出された(Fig. 4)。また、培地条件および培養期間による MnP 活性の増減と相関して、GLOX 活性の増減が認められた(Fig. 5, Fig. 6)。これらより、WD1694 株は、MnP に GLOX が過酸化水素を供給する可能性が示唆された。

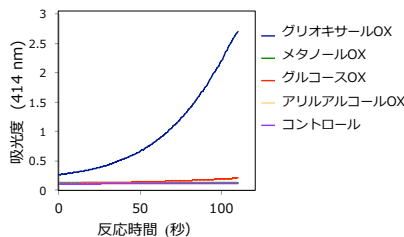


Fig.4 WD1694株のオキシダーゼ活性

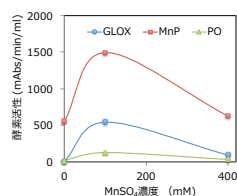


Fig. 5 マンガン濃度の各酵素活性への影響

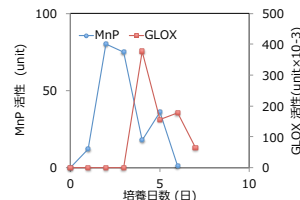


Fig. 6 WD1694株のGLOX活性とMnP活性の経時変化。

P. crassa WD1694 株の MnP 反応の組織化学的分析

WD1694 株の LUKP 培地で MnP に過酸化水素が供給される場所、すなわち MnP が反応する場所を分析するため、沈殿性 PO 発色基質 (TMBZ) を添加した LUKP 培地で WD1694 株を培養し、MnP 反応を TMBZ の発色として検出した。WD1694 株の LUKP 培地では、菌とパルプが凝集塊を生成し、

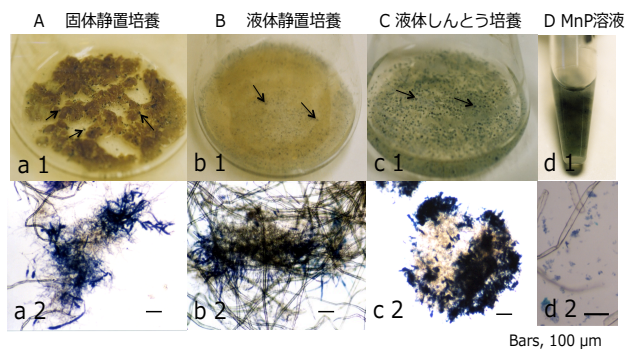


Fig. 7 LUKP 培地中の WD1694 株の TMBZ 発色試験

その表面上、特に菌糸端部と菌糸上に MnP 反応が検出された (Fig.7)。

次に、WD1694 株の菌糸端部の発色と MnP、GLOX との関連性を組織化学的に分析した。WD1694 株の LUKP 培地を分画し、培地溶液と菌体抽出液の MnP と GLOX 活性を分析した結果、MnP 活性を両画分から検出し、GLOX 活性を菌体抽出画分から検出した。

また、WD1694 株の LUKP 培地試料に、カタラーゼ、過酸化水素、GLOX 基質のメチルグリオキサール(MG)を添加した後、TMBZ を添加したところ、カタラーゼによる試料の発色阻害と、過酸化水素による培地溶液部の発色沈殿の生成、および、MG による菌糸端部の発色促進が確認された (Fig.8)。この結果は、菌糸端部の発色が、MnP 存在下、過酸化水素と GLOX に依存すること、また、MnP は菌糸外の培地溶液部に分布するが、GLOX は菌糸端部に局在することを示した。

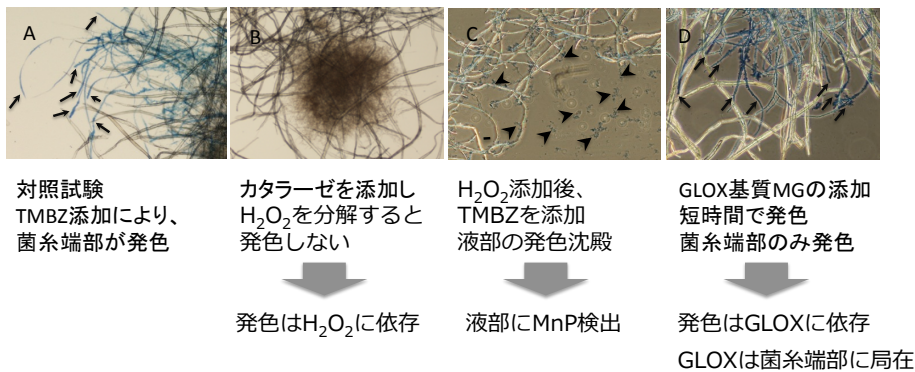


Fig. 8 *P. crassa* WD1694 株の TMBZ 発色試験

以上の結果より、WD1694 株の LUKP 培地中では、MnP が菌糸外に分泌拡散した後、GLOX が菌糸端部で過酸化水素を生産することで、菌糸端部で MnP 反応が優先的に進行することが明らかになった。

WD1694株のMnPとGLOXの関連性の模式図

