

審査の結果の要旨

氏名 高野 麻理子

白色腐朽菌は難分解性物質であるリグニンを分解することができるため、その分解能を産業的に応用する試みは過去数十年にわたって全世界で広く行われてきた。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。申請者である高野氏が研究を始めた頃には、すでに、白色腐朽菌のパルプ漂白への応用は世界で広く試みられており、リグニン分解ペルオキシダーゼ類 (LPO) の関与も明らかにされていた。また、LPO の触媒作用に必要な過酸化水素は、オキシダーゼ (OX) により生産されると想定されていた。しかし、実際に LPO に過酸化水素を供給するオキシダーゼ自体は殆ど分析されておらず、また、菌体外で LPO と OX がどのように協働して脱リグニンに至るかは殆ど明らかになっていなかった。

高野氏は、まず、約 420 種に及ぶ菌からスクリーニングによって未晒シクラフトパルプ (LUKP) の高漂白菌 *P. crassa* WD1694 株を選抜し、解析の対象として定めた。この菌株の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 によって未晒シクラフトパルプが実際に漂白される事を確認した。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、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、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の併用によって、菌体外に拡散した MnP に、菌糸端部に局在する GLOX が過酸化水素を供給する仕組みを具体的に明らかにした。以下、各章ごとに結果を述べる。

第 2 章では、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に用い、脱色能力の高い上位 10 株を選抜し、実際の LUKP 漂白試験を行い、最も高い漂白能力を示した *Phanerochaete crassa* WD1694 株を研究対象に定めた。

第 3 章では *P. crassa* WD1694 株のリグニン分解酵素の特定と酵素漂白を行った。WD1694 株の LUKP 漂白に作用するリグニン分解酵素を分析し、WD1694 株を植菌した LUKP のリグニン量 (カップー価による分析) 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 活性が検出される一方、Mn 非依存性のペルオキシダーゼ (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。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。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。

第4章では、*P. crassa* WD1694 株の MnP の分析を行った。WD1694 株の Mn 依存性の PO を精製し、その性質を分析したところ、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。次にこ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. chrysosporium* の MnP 遺伝子構造と高い相同性を示した。

第5章では、*P. crassa* WD1694 株の OX の特定と MnP との相関を調べた。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。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。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。

第6章では、MnP の反応と GLOX の過酸化水素供給が実際にどのように協働して起きているかを明らかにするために、一連の組織化学的実験を行った。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 株を培養することによって、MnP が実際に反応している事を 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、その表面、特に菌糸端部と菌糸上に MnP の反応が検出された。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。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。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。