



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## 白色腐朽菌によるナイロン分解

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 出口, 哲也 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2320">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2320</a>

氏名(本国籍)	出口 哲也 (広島県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博乙第76号
学位授与年月日	平成15年9月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	白色腐朽菌によるナイロン分解
審査委員会	主査 静岡大学 教授 西田 友昭 副査 信州大学 教授 徳本 守彦 副査 静岡大学 教授 平井 信之 副査 岐阜大学 教授 篠田 善彦

## 論文の内容の要旨

ナイロンは直鎖状のポリアミド系高分子であり、部分的には蛋白質と同様なアミド(—NHCO—)結合を有することから、蛋白質分解酵素による加水分解が期待される合成高分子である。しかしながら、繊維やフィルムとして汎用されているナイロン6や66については高度に生分解されたという報告例がない。一方、天然の生体高分子であるリグニンは、木材を構成する主要成分の一つであり、その構造が複雑で規則性を持たないことから、微生物による分解を受け難いことが知られている。しかしながら、自然界においてリグニンは分解されており、その中心的な役割を白色腐朽菌と称される一群の微生物が担っている。白色腐朽菌は菌体外に酵素を産出してリグニンを分解しており、高分子基質を菌体外で分解しうるシステムを保有する菌群といえる。そこで本論文では、白色腐朽菌の高分子分解システムに着目し、未だ生分解が確認されていない高分子量ナイロンの生分解を試みた。

まず、高活性・高選択性リグニン分解菌(白色腐朽菌)IZU-154株を用い、培地中の窒素および炭素濃度がナイロン生分解に及ぼす影響を検討した。白色腐朽菌は窒素または炭素濃度を制限した条件下でリグニンを効率的に分解することが知られているが、ナイロン66膜についても窒素および炭素濃度を制限した条件下で、顕著な分子量低下と形状崩壊が認められたことから、リグニン分解に関与する酵素系がナイロン66の生分解にも関与する可能性が示唆された。

次いで、白色腐朽菌によるナイロン生分解機構を解明する目的で、IZU-154株で処理したナイロン66膜のNMR分析を行った。その結果、4種の末端基(—CH<sub>3</sub>、—NHCHO、—CHO、—CONH<sub>2</sub>)の生成が確認されたことから、ナイロン66膜の生分解はアミド結合の加水分解によるものではなく、アミド結合中の窒素に隣接したメチレン基から水素を引き抜くことを初発とする一連のラジカル反応で、メチレン基の両サイドが切断されるという酸化的な生分解機構が推定された。

さらに、ナイロン生分解に関与する酵素系を解明する目的で、各種クロマトグラフィーを用いてナイロン分解酵素を精製した結果、白色腐朽菌が産生するリグニン分解酵素の一つであるマンガンペルオキシダーゼ (MnP) がナイロン分解の鍵酵素であることが判明した。また、精製酵素 (MnP) によるナイロン分解においては、MnP と Mn(III) が複合体を形成した状態でナイロンを酸化するという新規な MnP 反応機構が推定された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

石油を原料とする合成高分子は、天然には存在しなかった新しい構造を持つため、微生物によって分解され難いという特徴がある。このため、耐久性に優れるという利点を有するが、一方では廃棄物が自然界で分解されず、地球上に蓄積して様々な環境問題を引き起こしている。このような観点から、微生物による合成高分子の分解が試みられ、ポリエーテル、ポリビニルアルコール、ポリエステル、ポリウレタンなどについては比較的分解されやすいことが示されているが、ナイロンについては高度な生分解が認められるには至っていないのが現状である。そこで本論文では、フェノール性の生体高分子であり、微生物にとって難分解性の物質であるリグニンを白色腐朽菌が特異的に酸化分解しうることに着目し、白色腐朽菌による高分子ナイロンの分解を試みている。

まず、高活性・高選択性リグニン分解菌 (白色腐朽菌) IZU-154 株を用い、培地中の窒素および炭素濃度がナイロン生分解に及ぼす影響を検討している。白色腐朽菌は窒素または炭素濃度を制限した条件下でリグニンを効率的に分解することが知られているが、ナイロン 66 膜についても窒素および炭素濃度を制限した条件下で、顕著な分子量低下と形状崩壊が認められたことから、リグニン分解に関与する酵素系がナイロン 66 の生分解にも関与する可能性を指摘している。

次いで、白色腐朽菌によるナイロン生分解機構を解明する目的で、IZU-154 株で処理したナイロン 66 膜の NMR 分析を行っている。その結果、4 種の末端基 ( $\cdot\text{CH}_3$ 、 $\cdot\text{NHCHO}$ 、 $\cdot\text{CHO}$ 、 $\cdot\text{CONH}_2$ ) の生成が確認されたことから、ナイロン 66 膜の生分解はアミド結合の加水分解によるものではなく、アミド結合中の窒素に隣接したメチレン基から水素を引き抜くことを初発とする一連のラジカル反応で、メチレン基の両サイドが切断されるという酸化的な生分解機構を提案するに至っている。

さらに、ナイロン生分解に関与する酵素系を解明する目的で、各種クロマトグラフィーを用いてナイロン分解酵素を精製している。白色腐朽菌が産生するリグニン分解酵素の一つとして、マンガンペルオキシダーゼ (MnP) が知られているが、精製したナイロン分解酵素の理化学的特性は MnP のそれと完全に一致したことから、MnP がナイロン分解の鍵酵素であることを見いだしている。なお、精製酵素 (MnP) によるナイロン分解においては、フェノール性基質の酸化に必須となる  $\alpha$ -ヒドロキシ酸が、ナイロン分解を阻害するという特異な現象が観察され、これまでに提案されてきた MnP 反応とは矛盾する結果となった。

そこで、 $\alpha$ -ヒドロキシ酸存在下および非存在下での MnP による NADH 酸化挙動を比較している。その結果、①  $\alpha$ -ヒドロキシ酸存在下では、MnP のマンガン結合部位から脱離した Mn(III)  $\cdot$   $\alpha$ -ヒドロキシ酸のキレートが NADH の酸化に関与すること、②  $\alpha$ -ヒドロキシ酸非存在下では、MnP と Mn(III) が複合体を形成した状態で NADH を酸化することを見いだしており、 $\alpha$ -ヒドロキシ酸存在下でナイロン分解が阻害された理由は、MnP と Mn(III) の複合体から Mn(III) が脱離したことによるものと結論している。

以上のように、本論文は、白色腐朽菌が汎用性合成高分子の一種であるナイロンを酸化的に分解しうることを見だし、さらには、その分解に関与する MnP が、これまでに提

案されていない機構でナイロンを分解することも明らかにしている。よって、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認められた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) Deguchi, T., Kakezawa, M., and Nishida, T. 1997. Nylon Biodegradation by Lignin-Degrading Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 329-331.
- 2) Deguchi, T., Kitaoka, Y., Kakezawa, M., and Nishida, T. 1998. Purification and Characterization of a Nylon-Degrading Enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1366-1371.
- 3) Deguchi, T., Matsubara, M., and Nishida, T. 2002. NADH Oxidation by Manganese Peroxidase with or without  $\alpha$ -Hydroxy Acid, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 717-721.

#### 既発表学術論文

- 1) Matsubara, M., Suzuki, J., Deguchi, T., Miura, M., and Kitaoka, Y. 1996. Characterization of Manganese Peroxidases from the Hyperlignolytic Fungus IZU-154. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4066-4072.
- 2) Miura, M., Deguchi, T., Matsubara, M., and Kakezawa, M. 1997. Isolation of Manganese Peroxidase-Producing Mutants of the Hyper-Lignolytic Fungus IZU-154 under Nitrogen Nonlimiting Conditions. *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 191-193.
- 3) Miura, M., Deguchi, T., Yanagi, C., Suzuki, J., Kitaoka, Y., and Kakezawa, M. 1997. The Indicative Culture Parameters of Manganese Peroxidase Production by White Rot Fungus IZU-154. *J. Ferment. Bioeng.*, 84, 414-420.
- 4) Nomura, N., Deguchi, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nakajima-Kambe, T., and Nakahara, T. 2001. Gene Structures and Catalytic Mechanisms of Microbial Enzymes Able to Biodegrade the Synthetic Solid Polymers Nylon and Polyester Polyurethane. *Biotechnol. Genetic Eng. Rev.*, 18, 125-147.