

氏 名 (本 國 籍)	小 林 孝 行 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 377 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Kinetic Study on Oxidation of Monolignols by Peroxidase (ペルオキシダーゼによるモノリグノール酸化反応 の速度論的解析)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教 授 棚 橋 光 彦 副査 岐阜大学 助教授 重 松 幹 二 副査 静岡大学 教 授 西 田 友 昭 副査 信州大学 教 授 徳 本 守 彦

論 文 の 内 容 の 要 旨

リグニンとはシダ植物以上の高等植物の一次壁、二次壁及び中間層に存在し、年間生産量は植物組織中でセルロースについて多く、埋蔵量も含めると地球上でもっとも豊富な有機化合物であるといわれている。このリグニンは植物体に保水性と物理的な強度を与えるとともに木材腐朽菌や植物病原菌さらには樹木を食害する動物や昆虫などへの抵抗性を付与している。また、植物が食害されたり、病原体に感染したときにその組織に高濃度でリグニンが生合成され、蓄積することにより防御する働きをすることが知られている。このリグニンは植物細胞壁中で部分的にヘミセルロースと結合し、セルロースミクロフィブリル間に堆積し、導管、仮導管等の水分通導組織細胞壁の水浸透性を低くして樹木中での代謝物、栄養、水などの移動を可能にしている。

このようなリグニンは細胞壁の堆積過程において p-ヒドロキシ桂皮アルコール類 (リグニンモノマー) の酵素的一電子酸化により生じたフェノキシラジカルのカップリングによる重合反応によってヘミセルロースマトリックス中で生合成される。生じたモノリグノールのラジカルは数種の共鳴構造を有し、種々の結合様式によりカップリング反応を起こすため、リグニンの化学構造は非常に複雑となり、部分的にマトリックスであるヘミセルロースと化学結合した 3 次元網状構造をしており、リグニン構造の詳細な研究を困難にしている。リグニンの化学構造がこのような複雑であり、分解反応も困難であるため、リグニンの有効な利用法が未だに見出されていないのが現状である。リグニン構造、堆積過程の解明はこれらリグニンの有効利用を促進する上でも重要であると思われる。本研究は植物細胞壁中でのモノリグノールの重合機構を明らかにすることを目的として行われたものであり、特に現在まだ十分な研究がなされていない広葉樹中のシリンギルリグニンの重合機構を中心に反応速度論的な解析を行ったものである。

細胞壁中におけるリグニンの堆積過程について未だ未解明な現象が多く残されている。例えば、広葉樹植物細胞壁中に多く存在するといわれているシリリングル核からなるS-リグニンの生成機構を解明する目的でシナピルアルコールの酵素的脱水素重合が行われているが、この反応によって得られる人工リグニン(S-DHP)は天然のS-リグニンと化学構造や分子量など異なった点が多く十分にリグニンの生合成機構を再現できていない。この要因として溶媒効果、pH、関与している酵素、モノリグノール間の相互作用、モノリグノールの供給速度などが反応に関与していることが考えられる。

そこで本研究ではまず第1章として広葉樹細胞壁中でのシリリングリグニンの反応機構を明らかにすることを目的として、リグニン重合の初期段階であるモノリグノールの酸化機構に関して電子的影響や立体障害の観点から詳細なモデル実験を行っている。3種のモノリグノール及び8種のモノリグノール類縁物質をペルオキシダーゼ(HRP)/過酸化水素系による1電子酸化を行いその反応速度を比較した。一方、基質の酸化されやすさを決定するためにサイクリックボルタンメトリを用いて親水性溶媒中および疎水性溶媒中での電極酸化の反応速度を求めた。さらにMOPAC2000を用いた計算化学的手法により1電子酸化反応の律速段階における活性化エネルギーを求め、モデル化合物の電子密度分布との比較を行い、理論的な反応速度の解析を行っている。また、HRP・プロトドナーの解離定数を既報の方法に従ってUVの差スペクトルから求めている。更にモノリグノール及びその類縁物質の酵素的脱水素重合反応による反応生成物について¹H-NMRにより化学構造およびその生成比率を分析している。またそれらの結果を用いてHRP-H₂O₂による基質の酸化反応に対する電気化学的及び立体的化学的な観点から反応速度に対する影響を調べた。電極酸化では非水系によるフェノール性水酸基からの直接の1電子酸化に比べて、水系によるフェノレートアニオンからの1電子酸化反応の活性化エネルギーが一桁以上低くなり、ペルオキシダーゼによる酵素酸化反応系ではフェノレートアニオンからの1電子酸化が起こっていることを明らかにするとともに、MOPACを用いたモノリグノール類のHOMOエネルギーの計算結果からも酵素反応系での1電子酸化はやはりフェノレートアニオンからの電子引抜であることを明らかにした。また水系での1電子酸化は電極酸化および酵素酸化いずれにおいてもフェノール性水酸基に隣接するオルト位の置換基による電子効果の影響を大きく受け、メトキシ基などの電子供与性置換基により活性化エネルギーが低下し、反応速度が向上することを明らかにした。しかし酵素反応の場合にはフェノールのオルト位置置換基の立体障害による反応速度の低下が観察され、それらは酵素内におけるアミノ酸残基との立体障害に起因していることを明らかにするとともに、メチル基を持つモデル化合物の場合では疎水性の影響によると考えられる酸化速度低下が観測された。特に両オルト位が置換された3,5-2置換のモノリグノールの場合には電子効果による活性化エネルギーの低下を上回る立体障害の影響を大きく受け、反応速度は著しく低下した。またモノマーの酸化に比べ、ダイマーの酸化は非常に遅いことが示され、電極反応などとの比較から立体的要因による影響であると推論している。

一方モノリグノールの単独反応ではもっとも反応の遅い両オルト位に置換基のあるシナピルアルコールが、混合系ではコニフェリルアルコールやp-クマリルアルコールよりも速く反応するとともに、他のモノリグノールの酸化反応を抑制した。このことからペルオキシダーゼによって1電子酸化されたコニフェリルアルコールやp-クマリルアルコールのラジカルはメディエーターとして作用し、酸化還元電位の低いシナピルアルコールにラジカルを転移し、酵素酸化されにくいシナピルアルコールの重合反応を推進することをはじめて反応速度論的に明らかにした。

またシリリングリグニンの場合、天然リグニンと滴下法や混合法により脱水素重合された人工リグニン(DHP)とでは化学構造が大きく異なっている。本論文ではこの相違を解明するために寒天ゲル中での新たな重合法を開発した。寒天培地を用いる理由としてはモノマーをゲル中への拡散により遅い速度で少量ずつ順次供給するシステムを構築するとともに、酵素の移動を抑制し、重合したリグニンといつも接触できる状況を作り出すことが目的であり、植物組織中でのリグニ

ンの重合反応に近い反応環境を与えたものであり、斬新な酵素反応環境の提案を行っている。従来の水溶液中での重合法である滴下法、混合法ではグアイアシルリグニンに関しては β -O-4 エーテル結合の生成割合が天然リグニンのものと比較的一致しているが、シリングリグニンに関しては β -O-4 エーテル結合の生成割合が1%程度で非常に低く、広葉樹植物細胞壁中のリグニンとかなり異なったものになっている。寒天ゲルを用いた重合では5倍程度の β -O-4 エーテル結合量の増加が見られた。このことから寒天ゲル中における重合反応は植物細胞壁中での重合反応をより近い条件で模倣することに成功した。今後ヘミセルロースの添加などによりプロトリグニンに近い人工リグニンの合成及びリグニン堆積メカニズムの解明への手がかりとなることが示された。これらの成果は広葉樹植物細胞壁中でのシリングリグニンの重合機構を理解するうえで重要な情報を提供するものである。

第2章ではリグニン中の β -エーテル結合構造の定量法として開発されたDFRC法に関して詳細な研究を行っている。これまでDFRC法では β -エーテル結合以外のリグニンサブストラクチャーモデル化合物（レジノール構造やクマラン構造など）に対して詳細な研究が行われていない。特にシナピルアルコールの脱水素重合においてシリングレジノール構造の占める割合が多く、この構造からのDFRC法による反応性生物の分析が重要である。本研究ではピノレジノール、シリングレジノール、デヒドロジコニフェリルアルコール、グアイアシルグリセロール- α -コニフェリルエーテル、シリングリグリセロール- α -シナピルエーテルに対してDFRC法を適用しその反応過程を反応性生物の分析を通して解析した。両レジノール構造から4-5%程度の収率でシナピルアルコールアセテートが得られ、この値は β -O-4の定量に最大10%程度の誤差を与えるものである。そこでこの反応メカニズムについて詳細な検討を行った。この研究成果はリグニン中の β -エーテル結合定量の際の重要な補正因子を提供するものであり、リグニン構造解明研究に対して価値ある情報を与えている。

審 査 結 果 の 要 旨

広葉樹リグニンの生合成機構、特にシリングリグニンの重合反応に関してこれまで多くの研究が行われており、ペルオキシダーゼによる1電子酸化反応であることが明らかにされているが、この反応により得られた人工リグニンの分子量や化学構造が植物細胞壁中のシリングリグニンのものとはかなり違っており、植物細胞壁中でのシナピルアルコールの重合機構の詳細はまだ不明である。本論文はシナピルアルコールのペルオキシダーゼによる脱水素重合機構を明らかにすることを目的として、第1章ではペルオキシダーゼに対する各種モノリグノールの単独系および混合系における反応速度の比較を行うとともに、重合生成物の構造比較を行ったものであり、また第2章ではリグニン中の β -エーテル結合構造の定量法として開発されたDFRC法を取り上げ、この反応の反応機構の解明とこの方法の信頼性の評価を行うとともに、植物細胞壁中でのリグニンの重合反応をアガロースゲルを用いて模倣することによりシリングリグニンの重合反応をコントロールすることを試みたものである。

本研究で得られた知見は以下の通りである。

まず第1章では広葉樹細胞壁中でのシリングリグニンの反応機構を明らかにすることを目的として、各種モノリグノールの電極酸化およびペルオキシダーゼ/過酸化水素系による1電子酸化の反応速度を比較した。電極酸化では非水系によるフェノ

ール性水酸基からの直接の1電子酸化に比べて、水系によるフェノレートアニオンからの1電子酸化反応の活性化エネルギーが一桁以上低くなり、ペルオキシダーゼによる酵素酸化反応ではフェノレートアニオンからの1電子酸化が起きていることを明らかにするとともに、MOPACを用いたモノリグノール類のHOMOエネルギーの計算結果からも酵素反応系での1電子酸化はやはりフェノレートアニオンからの電子引抜であることを明らかにした。また水系での1電子酸化は電極酸化および酵素酸化いずれにおいてもフェノール性水酸基に隣接するオルト位の置換基による電子効果の影響を大きく受け、メトキシル基などの電子供与性置換基により活性化エネルギーが低下し、反応速度が向上することを明らかにした。しかし酵素反応の場合にはフェノールのオルト位置置換基の立体障害による反応速度の低下が観察され、特に両オルト位が置換された3,5-2置換のモノリグノールの場合には電子効果による活性化エネルギーの低下を上回る立体障害の影響を大きく受け、反応速度は著しく低下した。一方モノリグノールの単独反応ではもっとも反応の遅い両オルト位に置換基のあるシナピルアルコールが、混合系ではコニフェリルアルコールやp-クマリルアルコールよりも速く反応するとともに、他のモノリグノールの反応を抑制した。このことからペルオキシダーゼによって1電子酸化されたコニフェリルアルコールやp-クマリルアルコールのラジカルはメディエーターとして作用し、酸化還元電位の低いシナピルアルコールにラジカルを転移し、酵素酸化されにくいシナピルアルコールの重合反応を推進することをはじめて反応速度論的に明らかにした。またシリングリグニンの場合、天然リグニンと滴下法や混合法により脱水素重合された人工リグニン(DHP)とでは化学構造が大きく異なっている。本論文ではこの相違を解明するために寒天ゲル中での新たな重合法を開発した。これらの成果は広葉樹植物細胞壁中でのシリングリグニンの重合機構を理解するうえで重要な情報を提供するものである。

第2章ではリグニン中の β -エーテル結合構造の定量法として開発されたDFRC法に関して詳細な研究を行っている。これまでFDRC法では β -エーテル結合以外のリグニンサブストラクチャーモデル化合物(レジノール構造やクマラン構造など)に対して詳細な研究が行われていない。特にシナピルアルコールの脱水素重合においてシリングレジン構造の占める割合が多く、この構造からのDFRC法による反応性生物の分析が重要である。本研究よりレジノール構造から4-5%程度の収率でシナピルアルコールアセテートが得られ、この値は β -O-4の定量に最大10%程度の誤差を与えるものである。そこでこの反応メカニズムについて詳細な検討を行った。この研究成果はリグニン中の β -エーテル結合定量の際の重要な補正因子を提供するものであり、リグニン構造解明研究に対して価値ある情報を与えている。

以上について、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た。

基礎となる学術論文

- 1) Substituent Effects of 3,5-Disubstituted *p*-Coumaryl Alcohols on Their Oxidation Using Horseradish Peroxidase-H₂O₂ as the Oxidant, Journal of Wood Science, in press, Takayuki Kobayashi, Hiroyasu Taguchi, Mikiji Shigematsu, Mitsuhiko Tanahashi.
- 2) Application of the DFRC (Derivatization Followed by Reductive Cleavage) Method to Dilignols, Journal of Wood Chemistry and Technology, will be published in Issue 1, 25, (2005), Takayuki Kobayashi, Mikiji Shigematsu, Mitsuhiko Tanahashi.

その他の業績

- 1) Analysis of Rate-determining Factors in the Oxidative Reaction of Monolignols by Peroxidase-H₂O₂ System, JCPE Journal, 13, 183-186 (2001). Takayuki Kobayashi, Masashi Suzuki, Hiroyasu Taguchi, Mikiji Shigematsu, Mitsuhiko Tanahashi.
- 2) Solvent Effect on the Conformations of Phenol, Anisole and Guaiacol Simulated with MOPAC2000, JCPE Journal, 13, 177-182 (2001). Mikiji Shigematsu, Takayuki Kobayashi, Mitsuhiko Tanahashi.
- 3) Effective Extraction of Useful Chemicals during the Compressive Molding of Wood with High-Pressure Steam, Transactions of the Materials Research Society of Japan, 27(3), 649-652(2002). Masashi Suzuki, Atsushi Hayano, Takayuki Kobayashi, Chikako Shicchi, Megumi Kamiya, Etsuko Suzuki, Mikiji Shigematsu, Kouzou Yoshitani, and Mitsuhiko Tanahashi.
- 4) Solvent Effect on the Conformation of 2,6-Dimethoxyphenol Simulated with MOPAC2000, J. Comput. Chem. Jpn., 1(4), 129-134(2002). Mikiji Shigematsu, Takayuki Kobayashi, and Mitsuhiko Tanahashi.