

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 羅 鋒

自然界では、様々な微生物間に共同作用やシナジー効果、競争関係などの相互作用がみられる。本研究では、種間相互作用によるラッカーゼ産生の促進効果を検証し、さらにはそのようにして生産されたラッカーゼをリグノセルロース系バイオマス分解の前処理プロセスへ利用することを目的とした。

1. ラッカーゼ発現を誘導する種間相互作用

まず、木材腐朽菌 10 種から高効率リグニン分解菌 *Dichomitus squalens* (Ds) および *Armillaria mellea* と、高効率セルロース分解菌 *Trichoderma reesei* (Tr) および *Aspergillus nidulans* を選抜した。稲わらをリグノセルロース源とした培地で、これらリグニン分解菌とセルロース分解菌を様々な組み合わせで共培養し(同時接種および逐次接種)、リグニン分解活性に対する菌株間の相乗効果を評価した。意外なことに、すべての組み合わせで、同時接種した系ではラッカーゼ活性が全く検出されなかったのに対して、逐次接種(リグニン分解菌単独で 20 日間培養後、セルロース分解菌を接種)した系では、リグニン分解菌単独に比べてラッカーゼ活性が顕著に増加した。特に、Ds を Tr と共培養した際には、Ds 単独の 20 倍および 10 倍以上の大幅な活性上昇がみられた。そこで、Ds と Tr の組み合わせについてより詳細に解析した。

本実験条件では Tr 純粋培養ではラッカーゼ活性が検出されず、また、逐次接種した共培養系ではラッカーゼ活性の上昇時にも総菌体量は増加していなかったことから、Tr の存在が Ds のラッカーゼ発現を誘導していることが示された。

リグニン非存在培地(PDB)で同様に共培養をおこなった際にはラッカーゼの誘導はみられなかったが、稲わらを基質とした培地での Tr 純粋培養液を遠心分離した上清(5 日間)を PDB 培地に添加したところ、Ds のラッカーゼは誘導された。オートクレーブした上清にも同様の誘導効果がみられたことから、なんらかの熱安定性の誘導物質が、Tr によって稲わらから生産されたと考えられた。また、分子量による文革の結果から、誘導物質は単一物質ではないことが示唆された。誘導物質としてリグニンの部分分解物が考えられたため、リグニンの基本構造ユニットである p-ヒドロキシフェニル酸(H)、グアイアシル酸(G)、シリング酸(S)の 3 種について、誘導効果を検証した結果、PDB 培地に S を添加することで、Ds 純粋培養系でも稲わらと同程度のラッカーゼ誘導現象がみられた。Tr 培養上清中の各基本構造ユニットの濃度を測定したところ、S 成分の濃度が Ds 培養上清のおよそ 3 倍程度高かった。したがって、Tr が稲わらを分解する過程で、S 成分を含む可溶性のリグニン部分分解物が生じ、Ds のラッカーゼ産生を誘導したと考えられた。実際、S 成分含量のほとんどないリグニンを有する基

質 (red pine) を用いて同様に共培養実験をおこなった際には、Ds ラッカーゼの誘導は全くみられなかった。

2. 純粋培養時および誘導時のラッカーゼの精製とその特性

Ds 純粋培養時および Tr との共培養時の培養上清から、ラッカーゼ活性を指標に精製をおこなったところ、異なるピークを示す 2 種のラッカーゼが得られ (Lac1 と Lac2)、どちらの上清でも Lac2 が主要活性画分であった。それぞれの Lac2 を詳細に性状解析したところ、分子量、等電点、至適温度、至適 pH、N 末端アミノ酸配列がすべて一致した。したがって、ラッカーゼ Lac2 が共培養によって誘導されていることが示された。

3. 粗精製ラッカーゼによるバイオマス前処理

粗精製ラッカーゼに活性を向上させるメディアエータを添加して稲わら処理を行なった。その結果、処理前後でリグニン含量が 59%減少し、24.7%のリグニンが部分分解された。これに対して通常用いられるアルカリ処理では 95%のリグニンが分解された。処理後の液体画分における可溶性リグニンを調べると、アルカリ処理にくらべてラッカーゼ処理したものでは完全酸化されたものの割合が非常に大きかった。

しかし、ラッカーゼ処理した稲わらの糖化効率は、未処理の稲わらと同程度であった。ラッカーゼ処理後の稲わらの表面構造を解析したところ、セルロースの露出程度は未処理のものと同様であった。成分分析の結果とあわせると、ラッカーゼ前処理によってリグニン含有量は減少するものの、セルロースをおおうシリカの割合は変化しなかったため、糖化効率に影響を与えなかったと考えられた。

以上、本研究は、*T. reesei* との共培養によって *D. squalens* のラッカーゼの生産性が著しく高まる現象を発見し、さらに生産されたラッカーゼによって稲わらのリグニンが効率よく分解することを実証したものであり学術上・応用上貢献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。