

学 位 論 文 題 名

A New Enzymatic Polymerization
of Natural Phenol Derivatives

(天然フェノール誘導体の新しい酵素重合)

学位論文内容の要旨

環境と資源問題は社会の持続的発展のための最大課題である。そこで本研究では、天然の再生産可能な資源から、環境に低負荷な酵素重合により新しいポリフェノールの合成を目的に検討した。従来のフェノール樹脂の合成は毒性あるホルムアルデヒドを使って、フェノールと縮合させる反応である。この方法は製造における毒性やポリマーからのホルマリンの溶出などの問題がある。酵素重合は、水溶液中での温和な反応なので、このような問題はないと考えられる。本研究は二つの内容が含まれている。一つは、リポキシゲナーゼに関するものである。1,4-cis, cis 二重結合を持つ長鎖不飽和脂肪酸の酸化酵素であるが、これまで報告のない不飽和側鎖あるのフェノール誘導体の新しい酸化重合の触媒となることを見出した。この反応を応用し、リポキシゲナーゼによる酵素重合でカシューシェルオイルに含まれ C15 不飽和側鎖を持つ天然フェノール誘導体カルダノールとカルドールを重合させたところ、高度に架橋した高い熱安定性を持つポリフェノールが得られることが分かった。二つ目は、酵素による、天然の生産量はセルロースに次いで多いと言われているリグニンの C α 位をフェノール誘導体によって置換した誘導体、リグノフェノールをペルオキシダーゼによって重合させ、新規ポリフェノール誘導体が生成できることを明らかにした。これらの結果について以下に簡単に述べる。

第1章では序論として、酵素重合の高分子合成への応用およびフェノール誘導体の酵素重合や自然界におけるポリフェノールの生合成経路などについて概説している。

第2章では、リポキシゲナーゼの基礎反応に関する新しい結果についてまとめた。リポキシゲナーゼは 1,4-cis, cis 長鎖不飽和脂肪酸の酸化酵素としてよく知られている。この酵素はフェノール酸化する活性も持っているので、本章では、生体内でのフェノール脂質の生合成において重合触媒作用を及ぼしているのではないかと考え、3-[(Z, Z)-9'-12-octadecadienyl]phenol (1) および 4-[(Z, Z)-9'-12'-octadecadienyl]catechol をモデル化合物として合成し、リポキシゲナーゼは酸素を用いて重合反応を検討した。その結果、リポキシゲナーゼに重合触媒作用があることを見出し、ポリマーが比較的収率よく得られることが分かった。さらに過酸化水素を用いずにリポキシゲナーゼ-ペルオキシダーゼ複合システムによっても重合できることも見出した。生成したポリマーの構造は、フェノール部分および不飽和側鎖の両方で重合がしていることを示し、ペルオキシダーゼの重合機構とは明らかに異なっていた。重合の鍵ステップは、リポキシゲナーゼによる不飽和側鎖のヒドロペルオキシドの生成である。ヒドロペルオキシドは、すぐに分解すると同時にリポキシゲナーゼまたはペルオキシダーゼによるフェノール部分の酸化反応によりフェノキシラジカルを生成し、続くラジカルカップリングによりフェノール環および不飽和側鎖部分での架橋ポリマーが得られたものと考えた。これは植物生体内での酵素酸化機構のモデ

ルになると思われる。

第3章では、第2章での結果を踏まえ、リポキシゲナーゼによる天然フェノール類のカルダノールとカルドールの酸化重合性について検討した。カルダノールとカルドールは二重結合が0～3程度含むC15炭素数側鎖をフェノール脂質であるが、リポキシゲナーゼは酸化的に重合させる触媒作用を持つことを明らかにした。また、リポキシゲナーゼ-ペルオキシダーゼ複合システムによっても重合することを見出した。1つの二重結合を持つカルダノールでは、酵素の基質特異性のために重合できなかったが、それは、リポキシゲナーゼによるヒドロペルオキシドの生成ができないためと考えられた。NMRによるカルダノールポリマーの構造分析は、フェノール部分と不飽和側鎖の両方で重合が生じることを示した。ペルオキシダーゼではほとんどフェノール部分での重合である。ポリマーの熱分解GC/MS分析では、側鎖でのカップリングを明らかにした。重合の重要なステップはリポキシゲナーゼによる不飽和側鎖のヒドロペルオキシドの生成である。リポキシゲナーゼまたはペルオキシダーゼによるフェノール部のヒドロペルオキシドの分解、フェノール部での脱水素反応は、架橋ポリマーを形成するために必要なラジカルを生成すると考えた。ポリマーの熱特性はDSCとTGAの分析によって行った。

第4章では、リグニンから得られたマクロモノマー(リグノフェノール)であるリグノクレゾール、リグノカテコールおよびリグノフロログルシノールを用いてペルオキシダーゼ酵素重合性を検討した。一般にリグニンは、フリーのフェノール性水酸基が少なく、このままペルオキシダーゼ酵素重合を行っても有用なポリマーは得られにくい。そこで反応性の高いリグノフェノール誘導体を用いてメタノールなど水と親和性の高い溶媒と水との混合溶媒を用いて酵素重合を検討した。リグノフェノールは、クレゾール、カテコールおよびフロログルシノールを用いリグニンから相分離システムにより合成した(三重大・船岡正光教授が開発)。リグノクレゾールとリグノカテコールはクロスリンクしたポリマーを与えることが分かった。最も高いポリマー収率(87%)はリグノカテコールの重合で得られた。また、リグノクレゾールでは最大収率は55%であった。リグノフロログルシノールは反応率高かったが、ポリマーは生成せず分解生成物を与えた。ポリマーの熱分解GC-MS分析により、リグノカテコールとリグノクレゾールの重合では、カテコールおよびクレゾールの酸化によるカップリング反応が含まれていることが示唆された。合成されたポリマーは、DSCとTGの測定により原料のリグノフェノールよりも高い熱安定性を持つことが分かった。

第5章では、リグニンから誘導されたリグノフェノールを用いて、ペルオキシダーゼとラッカーゼによる分解反応を行った。リグノフェノールはペルオキシダーゼに対して高い反応性を示した。NMRによる構造解析の結果、分解したリグノフェノールが脂肪鎖を含むことが明らかになった。この脂肪鎖は主に芳香環の開裂物が還元されたものと考えられる。分解生成物に占める芳香環の割合が、リグノフェノールに比較し減少していることから芳香環が開裂しているものと示唆された。分解したリグノフェノールはリグニンの生分解物と違い、カルボニル基を有する構造を持っていなかった。リグノフェノールも *Rhus vernicifera* ラッカーゼによって分解されることを見出した。

第6章では、本論文の総括であり、各章において得られた重要な結果をまとめている。この論文は、リポキシゲナーゼのポリフェノール合成への新しい酵素重合について述べた。リポキシゲナーゼの触媒作用によるポリフェノールの合成は初めての結果であり、新しいフェノール系材料の合成への応用が期待できる。後半部分では、リグニンの高分子材料への応用のため、新しい材料であるリグノフェノールを用いるペルオキシダーゼ酵素重合について検討し大きな成果が得られた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 教 授 吉 田 孝

(北見工業大学工学部化学システム工学科)

副 査 助教授 龔 劍 萍

副 査 助教授 門 出 健 次

学 位 論 文 題 名

A New Enzymatic Polymerization of Natural Phenol Derivatives

(天然フェノール誘導体の新しい酵素重合)

酵素重合は環境に優しいポリマーを合成するよい方法である。酵素重合の大きな利点は穏やかな条件で反応が進行し、高い立体的、光学的な選択性、基質特異性があることである。従来のフェノール樹脂の合成は毒性あるホルムアルデヒドを使って、フェノールを縮合させる反応であるが、この方法は製造における毒性やポリマーからのホルマリンの溶出などの問題がある。酵素重合では、有毒な化合物を使わず、しかも水溶液中での温和な反応なので、このような問題はないと考えられる。また酵素によるフェノール誘導体の重合は生成したポリマーの分子量、分散度、サイズなどが反応条件によって制御することが可能である。生成したポリマーは良い導電性や光学性をもっているので、機能材料として様々な応用が期待される。

この様な背景にあって申請者は、天然の再生産可能な植物資源から、環境に低負荷な酵素重合により新しいポリフェノールの合成に着目し、フェノールを重合する新しい酵素の発見と天然フェノール誘導体から新たなポリマーの合成に関する研究を行った。

第1章では本研究の背景、目的、およびその意義を明確に述べている。第2章では、リポキシゲナーゼの基礎反応に関する新しい結果について述べられている。生体内でのフェノール脂質の生合成において重合触媒作用を及ぼしているのではないかと考え、3-[(Z, Z)-9', 12'-octadecadienyl]phenol(1)および 4-[(Z, Z)-9', 12'-octadecadienyl]catecholをモデル化合物として合成し、リポキシゲナーゼは酸素を用いて重合反応を検討した。その結果、リポキシゲナーゼに重合触媒作用があることを見出し、ポリマーが比較的収率よく得られることが分かった。生成したポリマーの構造は、フェノール部分および不飽和側鎖の両方で重合がしていることを示し、ペルオキシダーゼの重合機構とは明らかに異なっていた。重合の鍵ステップは、リポキシゲナーゼによる不飽和側鎖のヒドロペルオキシドの生成である。ヒドロペルオキシドは、すぐに分解すると同時にリポキシゲナーゼまたはペルオキシダーゼによるフェノール部分の酸化反応によりフェノキシラジカルを生成し、続くラジカルカップリングによりフェノール環および不飽和側鎖部分での架橋ポリマーが得られたものと考えた。これは植物生体内での酵素酸化機構のモデルになると思われる。

第3章では、第2章での結果を踏まえ、リポキシゲナーゼによる天然フェノール類の

カルダノールとカルドールの酸化重合性について検討。カルダノールとカルドールは二重結合が0～3程度含む C15 炭素数側鎖をフェノール脂質であるが、リボキシゲナーゼは酸化的に重合させる触媒作用を持つことを明らかにした。NMR によるカルダノールポリマーの構造分析は、フェノール部分と不飽和側鎖の両方で重合が生じることを示しました。ポリマーの熱分解 GC/MS 分析では、側鎖でのカップリングを明らかにした。ポリマーの熱特性は DSC と TGA の分析によって行った。

第4章では、リグニンから得られたマクロモノマー(リグノフェノール)であるリグノクレゾール、リグノカテコールおよび リグノフロログルシノールを用いてペルオキシダーゼ酵素重合性を検討している。一般にリグニンは、フリーのフェノール性水酸基が少なく、このままペルオキシダーゼ酵素重合を行っても有用なポリマーは得られにくい。そこで反応性の高いリグノフェノール誘導体を用いてメタノールなど水と親和性の高い溶媒と水との混合溶媒を用いて酵素重合を検討した。リグノクレゾールとリグノカテコールはクロスリンクしたポリマーを与えることが分かった。最も高いポリマー収率(87%)はリグノカテコールの重合で得られた。リグノフロログルシノールは反応率高かったが、ポリマーは生成せず分解生成物を与えた。ポリマーの熱分解 GC-MS 分析により、リグノカテコールとリグノクレゾールの重合では、カテコールおよびクレゾールの酸化によるカップリング反応が含まれていることが示唆された。合成されたポリマーは、DSC と TG の測定により原料のリグノフェノールよりも高い熱安定性を持つことが分かった。

第5章では、リグニンから誘導されたリグノフェノールを用いて、ペルオキシダーゼとラッカーゼによる分解反応を行っている。リグノフェノールはペルオキシダーゼに対して高い反応性を示した。NMR による構造解析の結果、分解したリグノフェノールが脂肪鎖を含むことが明らかになった。この脂肪鎖は主に芳香環の開裂物が還元されたものと考えられる。分解生成物に占める芳香環の割合が、リグノフェノールに比較し減少していることから芳香環が開裂しているものと示唆された。分解したリグノフェノールはリグニンの生分解物と違い、カルボニル基を有する構造を持っていなかった。リグノフェノールも *Rhus vernicifera* ラッカーゼによって分解されることを見出した。

第6章では、本論文の総括している。

以上のように申請者は、リボキシゲナーゼのポリフェノール合成への新しい酵素重合を発見し、リボキシゲナーゼの酵素触媒作用によるポリフェノールの合成はこれまでに報告は無く、初めての結果である。新しいフェノール系材料の合成への応用が期待できる。また、リグニンの高分子材料への応用のため、新しい材料であるリグノフェノールを用いるペルオキシダーゼ酵素重合について検討し、これまで酵素重合されにくいリグニンをうまく重合させて新しいポリマーを合成するという大きな成果が得られた。よって審査員一同は、申請者が博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認定した。