

学 位 論 文 題 名

Biodegradation of phenolic compounds by  
extracellular peroxidase in suspension cell  
culture of liverwort *Heteroscyphus planus*

(コケ植物 *Heteroscyphus planus* 懸濁培養細胞の細胞外  
ペルオキシダーゼによるフェノール化合物の分解)

学位論文内容の要旨

A number of oxidative enzymes from bacteria, fungi and vascular plants have been reported to degrade aromatic pollutants. However, the oxidative enzymes from lower plants, such as liverwort, attract less attention. Highly oxygenated terpenes and polyphenols have been isolated from intact plant and cultured cells of liverwort *Heteroscyphus planus*. These oxygenated compounds were assumed to be produced by oxidases such as peroxidases within the cells of the liverwort. Therefore, the main objective of this study was to investigate the biodegradation of aromatic compounds by the oxidative enzymes in suspension cell culture of *H. planus*. The study was carried out as follows: 1. Analysis of extracellular peroxidase activity in suspension cell culture of *H. planus* and the enhancement of the peroxidase activity and  $H_2O_2$  concentration by addition of phenolic compounds and monoterpenes, 2. Biodegradation of bisphenol A (BPA) and lignin model compound (LMC, guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether), 3. Partial purification of the extracellular peroxidase induced with chemical stress using column chromatography and analysis by SDS-PAGE.

**Peroxidase activity and  $H_2O_2$  Concentration in Suspension Cell Culture of *H. planus*.**

Peroxidase activity was detected in the medium of a suspension cell culture of *H. planus* using a guaiacol test. However, laccase activity was not detected using 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic acid (ABTS) as a substrate. During incubation at 25°C for 13 days under 3000 lux of continuous light, peroxidase activity increased synchronously with the cell growth. The cultures supplemented with 2,6-dimethoxyphenol, *p*-cresol, and LMC showed peroxidase activity about two times higher than those without phenolic compound for 7 days incubation, suggesting that production of peroxidase may be induced by certain phenolic compounds. The increase in peroxidase activity after addition of those phenolic compounds was accompanied with a high level of  $H_2O_2$  concentration. Addition of ( $\pm$ )-bornyl acetate to the culture increased the peroxidase activity and  $H_2O_2$  concentration about two times higher than those of control, while the peroxidase activity and  $H_2O_2$  concentration were not enhanced by addition of (+)- $\alpha$ -pinene. ( $\pm$ )-Bornyl acetate is often observed as a monoterpene from vascular plants and not detected in *H. planus*, while (+)- $\alpha$ -pinene is a major monoterpene in *H. planus*. These observations clearly indicated that the chemical

stress to the cells of liverwort resulted in the enhancement of peroxidase activity and  $H_2O_2$  concentration.

## Biodegradation of BPA and LMC

Oxidation of BPA by suspension cell culture and culture filtrates were carried out. Eight milligram of BPA was administered to 200 ml of suspension cell culture and culture filtrates and incubated for 5 days. Approximately 63% of the BPA was oxidized to other products in the suspension cell culture, while 41% by the culture filtrates. Oxidation of BPA by the culture filtrates was performed in order to elucidate the degradation process. BPA was mainly oxidized to insoluble polymers (30%), while GC-MS analysis of the EtOAc extracts from the culture filtrates detected the presence of 4-isopropenylphenol (1.69%) and 4-hydroxyacetophenone (0.061%). The formation of these products was examined using  $[^2H_{14}]$ -BPA. Based on the MS spectra of non-labeled and  $^2H$ -labeled 4-isopropenylphenol and 4-hydroxyacetophenone, the possible degradation pathway of BPA was proposed (Fig. 1).

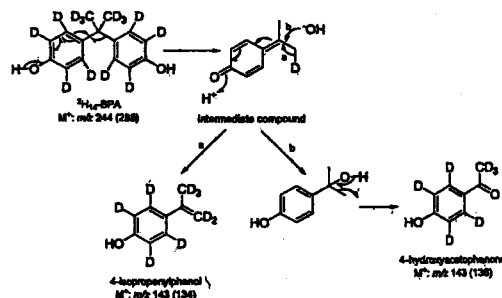


Fig. 1. Biodegradation mechanism of BPA

Since no report about oxidation of lignin by peroxidase from liverwort cell culture, the oxidation of LMC in suspension cell culture of the liverwort was examined. The oxidation of LMC was carried out in suspension cell culture and culture filtrates, each of which contained of 10 mg LMC in 250 ml of culture. The HPLC analysis of EtOAc extracts showed that the residual LMC in the suspension cell culture and culture filtrates were 30.7% and 73.9%, respectively. Biphenyl dehydrodimer was detected in both the reaction mixtures of the cell culture and culture filtrates incubated with LMC (8.6% in the cell culture and 18.8% in the cultured filtrates). GC-MS analysis of the EtOAc extracts from the culture filtrates

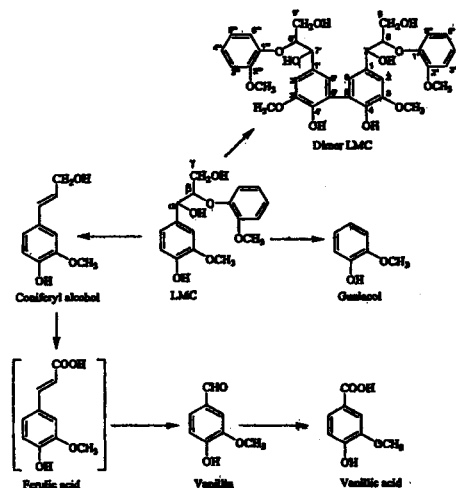


Fig. 2. Major degradation pathway of LMC

detected the presence of coniferyl alcohol, ferulic acid, vanillin and guaiacol as degraded products of LMC. By oxidizing vanillin and coniferyl alcohol the possible degradation pathway of LMC was proposed (Fig. 2).

## Partial purification of the extracellular peroxidase

The extracellular peroxidase was separated by combinations of column chromatography with 37.7 fold purification. However, further purification could not be done, because the amount of the protein was not enough to be analyzed. A large scale production of the enzyme is necessary to purify the secreted peroxidase of *H. planus*.

The results described above open up a possibility for liverwort cell culture as new alternative method in bioremediation studies. A possible ecological relationship between liverworts and vascular plants via chemicals was hypothesized. The released spores from gametophytes of liverworts may drop and germinate on the surface of a bark. Then the intracellular peroxidase which may be involved in the cell elongation during germination, may be enhanced by volatile phenolic compounds or monoterpenes emitted from vascular plants.

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	鍋田	憲助
副査	教授	生方	信
副査	准教授	伊藤	浩之
副査	准教授	松浦	英幸
副査	助教	高橋	公咲

## 学位論文題名

### Biodegradation of phenolic compounds by extracellular peroxidase in suspension cell culture of liverwort *Heteroscyphus planus*

(コケ植物 *Heteroscyphus planus* 懸濁培養細胞の細胞外ペルオキシダーゼによるフェノール化合物の分解)

微生物、真菌類、維管束植物由来の酸化酵素を用いた環境汚染芳香族化合物の分解に関して多くの研究報告がなされているが、コケ植物由来の酸化酵素による芳香族化合物の分解に関する研究はほとんどない。コケ植物 *Heteroscyphus planus* の母植物あるいはその培養細胞から多くの高度に酸素化されたテルペンやポリフェノール化合物が見出されているが、これらの化合物は細胞内で酸化酵素により生成する酸素活性種の作用により生成すると考えられる。本研究は、コケ植物 *H. planus* 懸濁細胞培養中の酸化酵素による芳香族化合物の生分解に関して、以下の点について研究したものである。1) *H. planus* 懸濁細胞培養中の細胞外ペルオキシダーゼ活性の分析とフェノール化合物及びモノテルペン類の添加による酵素活性の誘導。2) *H. planus* 細胞培養による環境汚染物質ビスフェノール A (BPA) 及びリグニンモデル化合物 (LMC, guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacylether) の生分解。3) 化学的ストレスにより誘導される細胞外ペルオキシダーゼの部分精製。

その結果、以下の点を明らかにした。

#### *H. planus* 懸濁培養中のペルオキシダーゼ活性と過酸化水素濃度。

*H. planus* 細胞培養中の細胞外ペルオキシダーゼ活性を guaiacol 試験で、また、ラッカーゼ活性を 2,2'-azino-bis-(3-methylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) で検出を行った。*H. planus* 培養細胞を 3000 lux 連続光照射下 13 日間の培養した結果、細胞外ペルオキシダーゼ活性は細胞の増殖と同調的に増加することが確認されたが、ラッカーゼ活性は検出されなかった。また、種々のフェノール化合物 (2,6-dimethoxyphenol、*p*-cresol、LMC)

の添加によってペルオキシダーゼ活性(1.8 倍)及び過酸化水素量が増加することが示された。一方、モノテルペン化合物である(±)-bornyl acetate の添加によってペルオキシダーゼ活性と過酸化水素量が 2.0 倍に増加したが、内在性の (+) - $\alpha$ -pinene の添加では両者とも増加しなかった。

#### H. planus 培養細胞による BPA の生分解

H. planus 懸濁培養細胞に BPA を添加すると不溶性の反応生成物を生成し、BPA が細胞外ペルオキシダーゼによって酸化される可能性が示唆された。

すなわち、非標識及び  $^2\text{H}_{14}$ -BPA (8 mg) を 200 ml の培養液に加え、5 日間培養した結果、63%が他の化合物に転換した。また、培養細胞を取り除

いた培養濾液のみでも、41%の BPA が他の化合物に転換した。生成物の大部分は不溶性の重合体であるが、可溶性生成物を GC-MS 分析した結果、4-isopropenylphenol および 4-hydroxyacetophenone を分解物として検出した。 $^2\text{H}_{14}$ -BPA から生成したこれらの化合物の重水素の標識パターンから Fig.1 に示した分解過程を推定した。

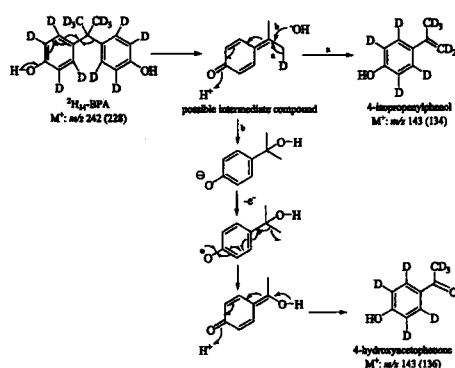


Fig. 1. Biodegradation mechanism of BPA

#### H. planus 培養細胞による LMC(guaiacylglycerol- $\beta$ - guaiacylether) の分解

今までコケ培養細胞によるリグニン及びリグニンモデル化合物の生分解に関する研究報告はない。

リグニンモデル化合物として guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacylether を選び、細胞培養並びに培養濾液による生分解を試みた。LMC (10 mg) を 250 ml の培養液および培養濾液に加え、5 日間培養した。反応生成物を酢酸エチル抽出し、生成物を HPLC 分析した結果、添加した LMC のうち、それぞれ、70%, 26%が生物転換した。生成物のうち主要成分は biphenyl dehydrodimer (Fig. 2 中 dimer LMC) であるが、そのほか、coniferyl alcohol、ferulic acid、vanillin、guaiacol を分解産物として検出した。

Vanillin 及び coniferyl alcohol の培養液による転換実験により、Fig. 2 に示すような LMC の分解過程が推定された。

なお、細胞外ペルオキシダーゼ活性を種々のカラムクロマトグラフィーを組み合わせると約 38 倍まで精製したが、最終的な生成に至らなかった。

以上の研究成果により、コケ培養細胞によって、芳香族化合物が酸化的に転換、分解することが示された。なお、維管束植物から放出されるフェノール物質やモノテルペンによりコケの細胞外ペルオキシダーゼ活性が誘導されることから、化学物質を介したコケ植物—維管束植物間での情報伝達の可能性が示唆された。よって審査員一同は Leily Tjandrawaskitasari が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。

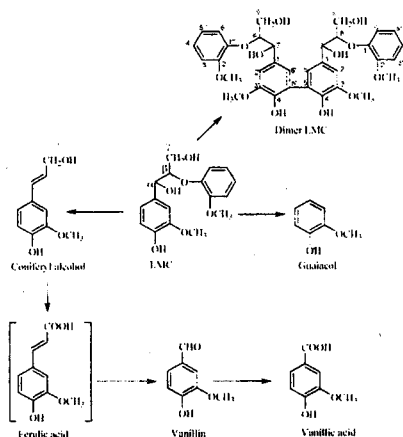


Fig. 2. Major degradation pathway of LMC