

氏名	いけなが まこと <b>池永 誠</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第943号
学位授与の日付	令和2年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	<b>漆に含まれる成分の機能と新規な漆硬化法の研究</b>
審査委員	(主査)准教授 北島佐紀人 教授 半場祐子 教授 鈴木秀之 京都府立大学大学院生命環境科学研究科 教授 椎名 隆

### 論文内容の要旨

植物由来で、有機溶剤を必要としない、酵素により硬化する等の特徴により、漆は環境対応型の優れた材料である。本研究では、漆を科学的に理解し、その普及と発展を図るために取り組んだ。本論文では、第1章で研究の背景と概要を、第2章では漆中に見いだされたタンパク質 TvFe2D の機能解析を、第3章ではウルシオールフェノール部位における非酵素的酸化を、第4章では塩基性下での漆の硬化方法の開発と漆中ペルオキシダーゼの役割について、それぞれ論じている。

第1章では、漆が7000年以上の昔から今日まで寺社や仏像の文化財、食器等、装飾品に用いられ、近年は自動車やエレベータの塗装等新たな用途へと展開し、それに合わせて新たな加工法・模倣材料が開発されていることを紹介している。漆はウルシノキという植物の樹液から作られること、提案されている硬化機構が、漆の主成分でフェノール化合物のウルシオールが内在の酵素ラッカーゼにより酸化・フェノキシラジカル化されてこれが重合していく反応と、不飽和脂肪酸側鎖の非酵素的な重合の2つであることを述べている。一方、漆には機能の不明な高分子成分が多数含まれる複雑な系であり、そのことも原因となり詳細な硬化機構が不明であることを指摘している。

第2章では、漆の成分分析により新規に見出したフェリチンドメイン2タンパク質(TvFe2D)とプラントシアニンという2つのタンパク質に注目し、特に前者の機能解明に取り組んだ。TvFe2DのcDNAを用いて組換えタンパク質を作成し、これをラッカーゼとそのモデル基質の反応系に添加して、ラッカーゼ反応に与える影響を検討した。その結果、TvFe2Dが、ラッカーゼにより生成する着色酸化物の蓄積を抑制すること、しかしながらラッカーゼによる酸化反応自体を抑制しないことを見出した。以上の結果に基づき、漆中においては、TvFe2Dがラッカーゼの酸化により生成するウルシオールの酸化物の蓄積を抑制し、これによりウルシオールの重合および漆の硬化の制御に関与している可能性がある結論している。さらに、*in vitro*系においてはTvFe2Dによる抑制効果が永続的でなかったことから、TvFe2Dと協働する成分が漆中に存在する可能性を指摘している。

第3章では、従来から知られるラッカーゼによるウルシオールフェノキシラジカル化とその重合、および不飽和脂肪酸側鎖の非酵素的な重合に加えて、ウルシオールフェノール部位が溶存酸素と非酵素的に反応して過酸化水素を生成することを発見した。その生成量はカテコール等

水溶性ポリフェノール類と比べて 1/10-1/20 程度であったが、pH が塩基性になると酸性条件下での生成量に比べて約 1000 倍にまで増加した。漆に塩基性化合物を添加すると硬化が著しく遅延または阻害されることが以前より知られている。これまでその原因は漆ラッカーゼの至適 pH が塩基側ではないことが原因とされてきた。申請者は上記の結果に基づき、塩基性下で起こる漆の硬化不良にウルシオールから生成する過酸化水素が関与する可能性を指摘した。

第 4 章では、塩基性条件下でウルシオールの酸化により生成する過酸化水素が硬化に与える影響を検討した。過酸化水素を添加すると、漆ラッカーゼは阻害され、漆の硬化時間は遅延した。過酸化水素消去酵素の一種、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP)を添加したところ、塩基性下でも漆が硬化した。HRP が漆中で過酸化水素を消去する際にはウルシオールが電子供与体となるためにフェノキシラジカルが生じるが、HRP により生じるフェノキシラジカルは、おそらく量が不十分であるため硬化に寄与しなかった。さらに、この硬化において、漆ラッカーゼの活性が不可欠であった。以上の結果より、塩基性下での硬化における HRP の役割は過酸化水素の攻撃からラッカーゼを保護することであると結論づけた。一方、漆中にも微量のペルオキシダーゼが含まれており、これまでその機能は明確にされていない。申請者は本研究の結果に基づき、弱酸性である通常の漆では、過酸化水素の発生は微量なのでこれを微量の内在パーオキシダーゼが消去してラッカーゼを保護していると推定している。今回の結果に基づいて、塩基性物質の添加あるいは塩基性の下地への使用を可能にする展望が開けたこと、およびパーオキシダーゼが新規酵素反応型塗料の開発に活用される可能性が述べられている。

## 論文審査の結果の要旨

今日広く用いられる塗料は化石資源を原料とし、有機溶剤を用い、また硬化にはしばしば熱エネルギーが必要となる。これに対し日本を含む東アジア地域で古来より用いられてきた漆は、ウルシノキの樹液を原料とするので 100%バイオマス由来であり、有機溶剤は不要で、内在の酵素ラッカーゼによる酵素反応により重合・硬化する。本論文では、以下にまとめられるように漆の成分とそれらに関わる反応過程を科学的に詳細に解明し、漆の改良、新たな用途開発に活かすための新規な基礎的知見を提供した。

1. 漆はカテコールに不飽和脂肪酸が付加した構造のウルシオールを主成分とし、その重合に主要な役割を果たす酵素ラッカーゼを含む。本質的にはこれら 2 つの要素で硬化が完了するが、多数の種類の高分子等が漆に含まれるため実際の硬化過程はもっと複雑であると推定される。本研究では、まず漆に含まれるタンパク質成分を詳細に調べた結果、新たに見いだされたフェリチンドメイン 2 タンパク質(TvFe2D)とプラントシアニンに着目し、特に生化学的機能が不明の前者の機能解析を試みた。組換えタンパク質を用いた *in vitro* 解析に基づき、本タンパク質がラッカーゼによるウルシオールの酸化を負に制御する可能性が指摘された。
2. 漆中のウルシオールにおいては、フェノール部分がラッカーゼに酸化されてフェノキシラジカルとなりこれが重合すること、それに遅れて不飽和脂肪酸側鎖が非酵素的な酸化反応により重合するという 2 つの酸化反応が提唱されてきた。これに対し本論文では、第 3 の酸化反応として、フェノール部分が溶存酸素と非酵素的に反応してフェノキシラジカルと過酸化水素を生成する反応を報告している。この反応による過酸化水素生成量は、通常の漆の条件であ

る弱酸性下(pH4 ないし 5)ではカテコール等水溶性ポリフェノールと比べて 1/10 ないし 1/20 に過ぎなかったが、塩基性条件下(pH10)では弱酸性に比べて約 1000 倍にまで上昇した。

3. 漆に塩基性の添加物を加えると著しい硬化不良を起こすことが従来より知られており、このことが漆の利用範囲を制限している。この原因が上記 2 に述べた過酸化水素の大量生成とそれによるラッカーゼの失活にあることを示した。さらに、ペルオキシダーゼを添加することによりラッカーゼを過酸化水素による攻撃から保護して、その結果塩基性化合物を含む漆の硬化能力を回復させることを示した。

以上のように、申請者の研究は漆の成分と硬化に関する新規知見を含む、漆と塗料の化学に貢献する学術的基礎研究であると評価した。

これらの研究は、申請者が筆頭著者のものを含む査読制度の確立した下記の国際科学雑誌 2 篇を基礎としている。これらのうち 1 篇は、申請者が筆頭著者かつ責任著書である。

- 1) Ikenaga, M., Tachibana, Y., Kitajima, S. Curing of Urushi under basic pH conditions by a dual enzyme system. (2020) Progress in Organic Coatings, 138, art. no. 105429, . DOI: 10.1016/j.porgcoat.2019.105429
- 2) Kitajima, S., Imamura, T., Iibushi, J., Ikenaga, M., Tachibana, Y., Andoh, N., Oyabu, H., Hirooka, K., Shiina, T., Ishizaki, Y. Ferritin 2 domain-containing protein found in lacquer tree (*Toxicodendron vernicifluum*) sap has negative effects on laccase and peroxidase reactions. (2017) Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 81 (6), pp. 1165-1175. DOI: 10.1080/09168451.2017.1289814