

令和元年6月19日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02978

研究課題名(和文) 木質バイオマスからの次世代化学品の生産と環境負荷低減技術への応用

研究課題名(英文) Production of functional chemicals using wood-biomass and development of new sustainable chemistry

研究代表者

岩淵 範之 (IWABUCHI, Noriyuki)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：90328708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはこれまでに、*Pseudomonas* sp. ITH-SA-1株が、低分子リグニン類を変換・重合し、結果として、ベンゼン環構造を含まない新規有機蛍光物質(NAPSFA)を生産することを明らかにしている。本研究では、その利用技術が限られている木質バイオマスからリグニン画分を抽出し、NAPSFAを効果的に生産するための基礎的基盤を明らかにすることを目的とした。その結果、各種生産条件を検討したところ、微生物を加えない非バイオプロセスでも生産されることが見出された。これは、NAPSFAは、より簡便で反応がシンプルな系でも生産できることを意味しており、今後の応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、これまでに、有機蛍光物質でありながらその構造中にベンゼン環構造を有しない世界初の有機蛍光物質を発見した。本蛍光物質は廃木材等に含まれる低分子成分を微生物が変換して出来ることから、本研究では、その効果的な生産方法を検討した。その結果、微生物を使わない非バイオプロセスでも生産できることが明らかとなり、大量生産への道筋を立てた。本有機蛍光物質は、その性質から幅広い応用の可能性が見出されており、本研究成果は、学術的、産業的に重要な意義をもつものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We recently reported that *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 can transform lignin-derived aromatic, syringaldehyde (SYAL), into non-aromatic polymeric substances with fluorescent activities (NAPSFA). The NAPSFA are particularly rare organic fluorescent substances despite the absence of aromatic rings in its molecules. In this study, we examined a formation mechanism and simplification of production process of the NAPSFA. When a 3-O-methyl gallate (3-MGA) was added to LB medium and then the sample was incubated, fluorescence activity was observed without bacteria. These results suggested that fluorescent substances were produced from 3-MGA by non-biological process. The fluorescent substances produced from non-bio process have excitation/emission peaks at 370/505 nm, respectively. The NMR analyses revealed that aromatic rings were not detected in the molecules. In this study we demonstrated that non-aromatic fluorescent substances can be synthesized by an easy chemical reaction.

研究分野：環境微生物学

キーワード：リグニン 有機蛍光物質 未利用バイオマス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、海洋石油汚染のバイオレメデーションに取り組んでおり、その過程で、1998 年よりの三陸海岸各地の海水微生物群集構造の経時的な変化を追跡して来た。2011 年 3 月に発生した東日本大震災後もその調査を継続したところ、震災前後で海水中に存在する微生物群集構造が極めて大きく変化していることを見出し、「以前の環境に比べ微生物間や微生物 - 外界との相互作用が複雑化したことで、特に木材系バイオマスの難分解性成分であるリグニン類に対し、これまでに見られない生理活性を有するのではないか？」という仮説を立て、リグニンやその前駆体及び関連化合物を使用してスクリーニングを行った。その結果、低分子リグニンの一種であるシリングアルデヒド (SYAL) を基質として菌体外に水溶性の蛍光物質を生産する *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を岩手県釜石市の平田湾の海水より単離し、これまでに以下のことを明らかにした。

Pseudomonas sp. ITH-SA-1 株は添加した SYAL をシリング酸 (SYAC) に酸化し、続いて脱メチル化により 3-O-メチルガリク酸 (3-MGA) を生産し、その後、3-MGA が開環重合することによりベンゼン環を含まない有機蛍光物質 (Non-Aromatic Polymeric Substances with Fluorescent activity; NAPSFA) が生産されることを明らかにした (図 1)。続いて、広葉樹木粉を直接ニトロベンゼン酸化したサンプルを用いて、*Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株による NAPSFA への変換を検討したところ、混合サンプルであっても NAPSFA が生産されることを見出した。

2. 研究の目的

上述したように、申請者らは、*Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株が、低分子リグニン類の一種であるシリングアルデヒド (SYAL) を変換・重合し、結果として、ベンゼン環構造を含まない新規有機蛍光物質、NAPSFA を生産することを明らかにしている。一般的に有機蛍光物質は、共役電子の由来としてベンゼン環構造を含んでいるが、本有機蛍光物質はその分子構造中にベンゼン環構造を含まない希少な有機蛍光物質であり、臨床診断薬や有機 EL などへの応用が期待されている有用な次世代化学品である。本研究では、その利用技術が限られている木質バイオマスからリグニン画分を抽出し、*Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を用いて蛍光物質を効果的に生産するための基礎的基盤を明らかにすることを目的とした。

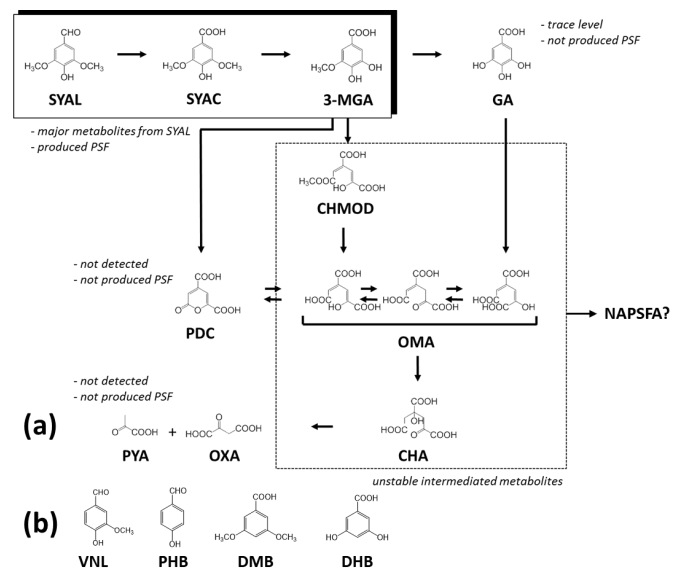


図1 SYALの代謝系とNAPSFAの生産およびSYAL類似化合物

3. 研究の方法

(1) 低変性リグニンの取得と低分子化

同時糖化粉碎処理装置に供し抽出したポプラ由来の低変性リグニンを室温に戻し、風乾させるために薬さじでろ紙に広げた (平均 1.57 g)。これらの重量を経時的に測定し、重量の減少が起こらなくなった時点で全てのろ紙からリグニンを回収し、乳鉢で粉末にした。後続のニトロベンゼン酸化を効率よく行うため、ニトロベンゼン 20 μ l と 2 N 水酸化ナトリウム 8 ml を 24 試験管に分注し、25、40 kHz で超音波処理にかけて乳化させた。

ステンレス製耐圧容器に風乾した低変性リグニン 100 mg を入れた後、上記乳化液 7 ml 加え、170 の恒温機中で 8 rpm ほどで振盪しながら 4 時間反応させた。反応後、容器を室温まで冷やし、中身を三角フラスコに回収した。このサンプルの pH を 1 N 硫酸を用いて pH 2.0 に調整しなおし、酢酸エチル抽出を行った。得られた酢酸エチル抽出から HPLC 解析等で含有成分を解析し、後続の実験に用いた。

(2) UPLC 解析による低分子化の確認

機器は ACQUITY UPLC H-Class システム (Waters) を使い、ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 \times 50 mm カラム (Waters) を使って、基本的に以下の要領で行った。A 溶媒に 0.1% ギ酸-水、B 溶媒に 0.1% ギ酸-アセトニトリルを用い、流速 0.7 ml/min、カラム温度 40、分析時間 10 分、注入量 2 μ l、グラジエントは分析開始時 A 溶媒:98%、B 溶媒:2% で、8.93 分で A:48%、B:52%、9.78 分と 10.27 分で A:20%、B:80%、10.37 分で A:2%、B:98% となるよう変化させた。UV の検出波長は 280 nm と 340 nm、蛍光の検出波長は Ex 365 nm、Em 500 nm で測定した。

(3) バイオプロセス、非バイオプロセスの各種培養

Pseudomonas sp. ITH-SA-1、ITH-B52 株などを用いたバイオプロセスによる蛍光物質の生産では、基本的に以下のように行った。培地は Marine Broth 2216 (MB)、Luria-Bertani broth (LB)、minimal medium (MM) などを用い、蛍光物質生産のための基質として、上記サンプルに加え、SYAL (Wako)、SYAC (Wako)、3-MGA (EXTRASYNTHESSE)、gallate (GA) (Wako)、p-hydroxybenzaldehyde (PHBA) (Wako)、3,5-dimethoxybenzoic acid (DMB) (Sigma-Aldrich)、3,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) (Sigma-Aldrich)、or VNL (Wako) のような低分子リグニン類、およびその類似化合物を用いた。基本的に、初期菌数は約 10^7 cfu/ml とし、基質は終濃度 1 mg/ml になるように加え、28 °C で数日から 1 週間程度、振とう培養した。

一方で、微生物を使わない非バイオプロセスでも基本的に同様の条件を構築し、同様の条件で培養した。また非バイオプロセスの場合、必要に応じて、基質濃度を上昇させ培養した。

(4) 蛍光物質の分離、精製、化学分析

培養後のサンプル上清を取得し、透析、凍結乾燥などの操作を行った後、メタノール抽出を行った。凍結乾燥後の固形成分をメタノールに溶解し、容器した画分を Sephadex LH-20 glass column (25 mm i.d. × 270 mm) に供して分画した。その後、得られたサンプルは、必要に応じて濃度調節を行った後、後続の化学分析に供された。蛍光スペクトルの分析は、FP-6500、FP-8300ST (日本分光) を用い、ATR-FTIR 解析は、FTIR 4100 (日本分光) で行った。 ^1H (500 MHz)、 ^{13}C (150 MHz) NMR は ECA-500 (日本電子) を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 低変性リグニンの取得と低分子化

先行研究で、実際の木粉から NAPSFA が生産できる可能性が見出されたことから、本取り組みを行った。広葉樹木粉 (ポプラ) を約 1 kg 用意し、これを数回に分け、同時糖化粉碎処理装置に供した。この処理では、リグニンと多糖画分の分離にはビーズを用い、多糖画分の低分子化には、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ等の酵素カクテルを用いた。結果として合計で約 200 g の低変性リグニンを取得した。続いて得られたサンプル 200 mg を用いてニトロベンゼン処理により低分子化したところ、結果として、22.3% の SYAL 画分を取得した。得られた SYAL 画分を用いて NAPSFA の生産を検討したところ、試薬を使った場合と同等レベルの変換が行われた。しかし、それ以上の生産性の向上は難しかった。それ故、菌株、基質の取得条件、反応条件など更なる改良が必要であると考えられたことから、本検討を深く追求することは一旦中止し、後続の研究では別な角度からの検討を行った。

(2) 非バイオプロセスの発見

Pseudomonas sp. ITH-SA-1 株の生産する NAPSFA は、平均分子量 7.2 kDa で励起光 365 nm、蛍光 498 nm のスペクトルを有する水溶性の有機蛍光物質であり、その分子内にベンゼン環構造が含まれていない。本結果が得られて以来、そのコア構造の決定を試みてきたが、高分子であるがために、その研究は難航していた。もし、何らかの方法でより低分子化されたサンプルが得られるなら、それは構造決定を大きく支援することになるため、本章ではこの点を中心に検討を加えた。

Pseudomonas sp. ITH-SA-1 株を MB-SYAL 培地で静置培養

した場合、NAPSFA の生産には 7 日間を要するが、一方で、初期菌量の増加と好気的な培養は、NAPSFA の生産開始時期を早めることが分かっている。このことから、培養初期の段階で得られる蛍光物質は、より重合度が低いものと想定し、培養初期の蛍光観察を行った。また、同時に、SYAL の中間代謝産物やそれらのアナログ物質 (SYAC、3-MGA、DMB、DHB、GA、PDC、PHB、VNL) にも検討を加えた (図 1)。その結果、SYAL、SYAC、3-MGA のみで培養 2 日後から蛍光活性が観察された。これらの結果は先行研究の結果と一致した。また、化合物の構造的に、3-MGA の 4 位のカルボキシ基が、NAPSFA の生産に重要であることが示された。

興味深いことに、MB+3-MGA 培地を用いた場合、*Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を添加しないコントロール条件において、培養 4 日後に蛍光活性が確認された。このことを再確認するため、

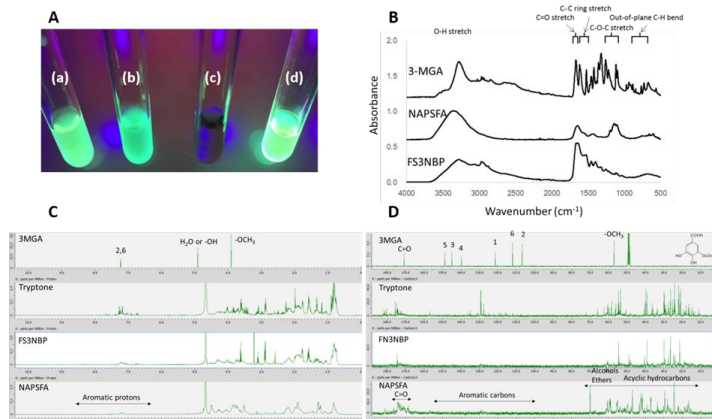


図2. 非バイオプロセスで生産された蛍光物質について

A、非バイオプロセスでの蛍光の様子。(a)はMB+3-MGA、(b)はLB+3-MGA、(c)はMM+3-MGA、(d)はFAPSFAを示す。

B、ATR-FTIR スペクトル

C、 ^1H -NMR

D、 ^{13}C -NMR

再度培養試験を行ったところ、MB 培地、LB 培地に 3-MGA を添加した場合には、菌体無添加条件でも蛍光活性が確認された(図 2A)。これらの結果は、蛍光物質は非バイオプロセスでも生産できることを意味しており、構造決定の強力な支援になることから、本蛍光物質を fluorescent substances derived from 3-MGA by a nonbiological process (FS3NBP) と名付け、以降の解析を行った。

(3)FS3NBP の化学的性質の検討

後続の化学分析のため、生産条件を検討、最適化し、蛍光物質を大量に取得した。まず初めに、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーで分析したところ、FS3NBP の平均分子量は 4.2 kDa であった。これは、*Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株の生産する NAPSFA と比較してかなり小さいこと、および両者の蛍光スペクトルが類似していることから、FS3NBP は NAPSFA と同様のコア構造を有しているが重合度が低い物質であることが推測された。

次に、ATR-FTIR 解析を行ったところ、ヒドロキシ基、カルボキシ基、エステルの存在が確認されたが、通常ベンゼン環由来のシグナルが検出される 900-650 cm^{-1} や 1500、1650 cm^{-1} には強いシグナルは検出されなかった(図 2B)。この傾向は NAPSFA と類似していた。最後に ^1H 、 ^{13}C NMR 解析を行ったところ、双方の解析からベンゼン環由来のシグナル検出はされなかった(図 2C、D)。また、これらの結果も NAPSFA と類似していた。

以上の結果は、FS3NBP にはベンゼン環構造が含まれていないことを強く示唆しており、ここから、ベンゼン環構造を含まない有機蛍光物質が非バイオプロセスでの生産できることが示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1) N. Iwabuchi, Y. Sakano, H. Takiguchi, H. Takihara, M. Sunairi, H. Matsufuji. Development of a simple nonbiological method for converting lignin-derived aromatics into nonaromatic polymeric substances with fluorescent activity. ACS Sustainable Chem. Eng., 4(8), 4411-4416 (2016). 査読有.

[学会発表](計 13 件)

1) Moriya Y., Matsufuji H., Sunairi M., Iwabuchi N. Transformation of lignin-derived aromatics into nonaromatic polymeric substances with fluorescent activities by *Pseudomonas* sp. ITH-B52. The 12th SPSJ International Polymer Conference (IPC2018). In Hiroshima (International Conference Center Hiroshima), 2018 年 12 月 4-7 日. 査読有.

2) 廣川侑美, 大槻崇, 岩淵範之, 松藤寛, 市販牛乳酵素分解物からの有機蛍光物質生産について, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 名城大学(愛知県名古屋市), 2018 年 3 月 15-18 日.

3) 岩淵範之, 坂野優稀, 坂本遼, 松藤寛, 砂入道夫, リグニン由来の芳香族化合物を変換して生産されるベンゼン環構造を含まない新規有機蛍光物質について, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 名城大学(愛知県名古屋市), 2018 年 3 月 15-18 日.

4) 守屋佑里子, 遠藤実夏, 坂野優稀, 松藤寛, 岩淵範之, 砂入道夫, *Pseudomonas* sp. ITH-B52 の生産する有機蛍光物質の化学的性質の検討, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 名城大学(愛知県名古屋市), 2018 年 3 月 15-18 日.

5) 廣川侑美, 大槻崇, 岩淵範之, 松藤寛, 食品廃棄物中未利用たんぱく質の有機蛍光物質への変換について, 日本食品科学工学会第 64 回大会, 日本大学(神奈川県藤沢市) 2017 年 8 月 28-30 日.

6) 廣川侑美, 大槻崇, 岩淵範之, 松藤寛, 食品廃棄物系バイオマスからのベンゼン環を含まない新規有機蛍光物質の生産, 日本食品化学学会第 23 回総会・学術大会, 伊勢志摩ロイヤルホテル(三重県志摩市), 2017 年 6 月 1-2 日. **若手優秀発表賞** ポスター発表部門(66 件中 4 名)

7) 岩淵範之, 坂野優稀, 砂入道夫, 松藤寛, 木質バイオマスからのベンゼン環を含まない新規有機蛍光物質の生産, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都女子大(京都), 2017 年 3 月 17-21 日.

8) 坂野優稀, 砂入道夫, 松藤寛, 岩淵範之, ベンゼン環を含まない新規有機蛍光物質の非バイオプロセスによる生産, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都女子大(京都), 2017 年 3 月 17-21 日.

9) 廣川侑美, 高野浩樹, 関華奈子, 坂野優稀, 岩淵範之, 大槻崇, 松藤寛, タンパク質 - パンクレアチン分解物と 3-MGA の反応により生成する有機蛍光物質について, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都女子大 (京都), 2017 年 3 月 17-21 日 .

10) 松藤寛, 菅原一真, 廣川侑美, 坂野優稀, 岩淵範之, 大槻崇, アミンと 3-MGA の反応により生成する有機蛍光物質について, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都女子大 (京都), 2017 年 3 月 17-21 日 .

11) Y. Sakano, H. Matsufuji, M. Sunairi, N. Iwabuchi, Transformation of lignin-derived aromatics into nonaromatic polymeric substances with fluorescent activities by *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1. The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016), Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, December 13-16, 2016. 査読有.

12) 廣川侑美, 大槻崇, 千野誠, 坂野優稀, 岩淵範之, 松藤寛: 未利用たんぱく質の有機蛍光物質への簡易化学変換に関する研究, 日本食品科学工学会第 63 回大会, 名城大学 (名古屋), 2016 年 8 月 25-27 日 .

13) 岩淵範之, 坂野優稀, 砂入道夫, 松藤寛: 木質バイオマスからの新規有機蛍光物質の生産 (ポスター), 第 5 回 JACI/GSC シンポジウム (ANA クラウンプラザホテル神戸), 2016 年 6 月 2-3 日. 査読有.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

1) 名称: 蛍光物質の製造方法

発明者: 岩淵範之, 松藤寛, 砂入道夫, 坂野優稀, 遠藤実夏

権利者: 日本大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-030189

出願年: 2017

国内外の別: 国内

2) 名称: 蛍光物質及びその製造方法

発明者: 岩淵範之, 松藤寛, 砂入道夫, 坂野優稀

権利者: 日本大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-160123

出願年: 2016

国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

1) 名称: 蛍光物質及びその製造方法

発明者: 岩淵範之, 松藤寛, 砂入道夫, 滝口 肇, 濱口 峻

権利者: 日本大学

種類: 特許

番号: 6090830

取得年: 2017

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 片山 義博

ローマ字氏名: KATAYAMA, Yoshihiro

所属研究機関名: 日本大学

部局名：生物資源科学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：10214339

研究分担者氏名：松藤 寛
ローマ字氏名：MATSUFUJI, Hiroshi
所属研究機関名：日本大学
部局名：生物資源科学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：70287605

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。