

平成21年 6月12日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19880035
 研究課題名（和文） 微生物機能を用いた樹皮タンニンからの汎用性ポリマー原料生産技術の開発
 研究課題名（英文） Production of polymer-based material from tannins by microbial function.
 研究代表者
 大塚 祐一郎（Otsuka Yuichiro）
 独立行政法人 森林総合研究所・バイオマス化学研究領域・研究員
 研究者番号：80455261

研究成果の概要：樹皮タンニンの構成単位であるカテキン類を炭素源として資化できる微生物を酸性土壌より単離し、*Burkholderia sp.* OX-01 と命名した。代謝機能解析の結果、OX-01 はカテキンの4位を水酸化してロイコシアニジンに変換した後、さらに同部位を酸化してタキシフォリンに変換した後、完全代謝する新規代謝機能により分解することが明らかとなった。また、OX-01 株の詳細同定を行った結果、新種であることが明らかとなり *Burkholderia oxyphila* OX-01 を提唱した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,360,000 | 0 | 1,360,000 |
| 2008年度 | 1,340,000 | 402,000 | 1,742,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,700,000 | 402,000 | 3,102,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林産化学・木質工学

キーワード：タンニン、カテキン、バイオマス、代謝工学、*Burkholderia*

1. 研究開始当初の背景

我が国は世界でも有数の森林大国である。近年地球温暖化対策やバイオマス・ニッポン総合戦略の中で、木質系バイオマスに対する期待が大きくなっている。山林で伐採された木材は、製材工場で製材化されるが、その際に多量の樹皮が発生する。発生する樹皮の全素材量に対する割合は、スギ・ヒノキで約18%、広葉樹では約21%強にも及ぶ。樹皮の特徴としては、縮合型タンニンが多量に含まれることが挙げられる。アカシア類においては縮合型タンニンの含有量が50%を超えるものも存在する。また縮合型タンニンは水や

溶媒等で比較的容易に抽出される。抽出されたタンニンは皮鞣し等に利用されるが、高付加価値な用途は見出されていない。縮合型タンニンはフラバノール構成単位が4-6あるいは4-8位間で炭素-炭素結合して重合した高分子化合物である(図1)。このように多岐な構造を有する縮合型タンニンは、均一な物性の制御が困難であり、これが高付加価値な用途開発を妨げている。

縮合型タンニンは酸性条件下で比較的容易に単位間結合が切断されフラバノール単位となりうることが報告されている(図2)。フラバノール構造は土壌細菌によって比較

的速やかに完全分解されるといわれているが、その分解機能に関する研究は驚くほど少ない。好気性微生物に関しては唯一インドの *Mahadevan* らのグループがその推定分解代謝経路を提案しているのみで、世界的にも他に報告例がない。*Mahadevan* らは、カテキンからプロトカテキュ酸を経由して完全分解される代謝経路を提案しているが、それらの代謝に関わる酵素学的・遺伝学的情報は得られていない。

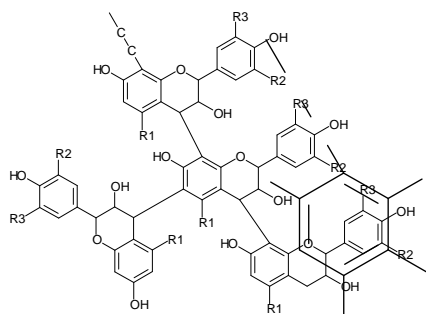


図1 縮合型タンニンの構造

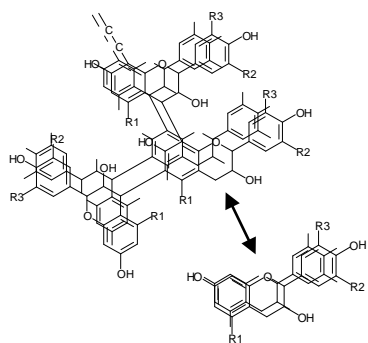


図2 縮合型タンニンは酸性条件下で比較的容易に低分子化されフラバノール単位を遊離する

本研究代表者はこれまでに、リグニン由来の芳香族物質から微生物の代謝遺伝子を代謝工学的に応用し、汎用性プラスチック原料になりうる 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸 (PDC) の生産技術開発に成功している。この研究開発過程において、プロトカテキュ酸からの PDC 生産システムも構築している。また、生産した PDC から様々なコポリマーを合成し、それらがフィルムシートやプラスチック、接着剤などとして有効であることを明らかにしてきた。カテキンからプロトカテキュ酸への代謝機能を酵素学的・遺伝学的に詳細に解析することが出来れば、代謝工学技術によりプロトカテキュ酸から PDC への変換機能と組み合わせることで、カテキンからの PDC 生産システムが構築できると考えられる。すなわち、樹皮から得られる縮合型タンニンから酸化分解処理によってカテキンを得て、さらに微生物発酵処理により工業的

汎用性プラスチック原料である PDC 生産システムが構築できると考えられる。

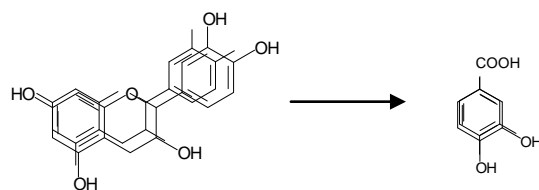


図3 微生物機能によりカテキンからプロトカテキュ酸へと変換する

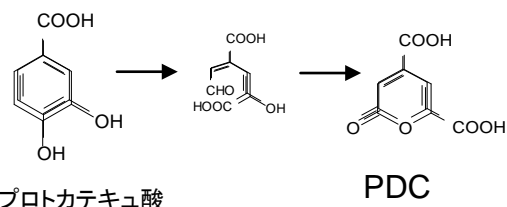


図4 プロトカテキュ酸から汎用性プラスチック原料となる PDC へと変換する。

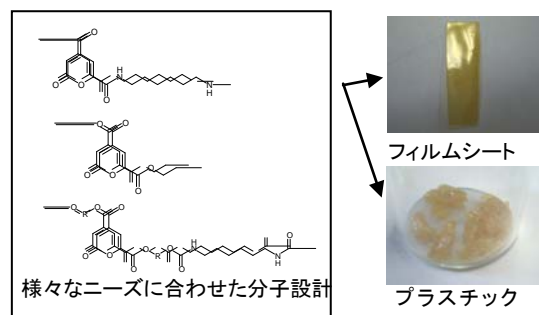


図5 PDC から様々なポリマーを合成することが出来る。

2. 研究の目的

本研究においては、樹皮タンニンの構成単位であるカテキン類を分解する微生物を探索し、その代謝機能を詳細に調べることによって、樹皮に多量に蓄積されている樹皮タンニンから汎用性ポリマー原料を生産する技術開発の可能性を検証する。

3. 研究の方法

カテキン分解微生物を様々な土壌から探索する。得られたカテキン分解微生物の代謝機能を酵素学的に解析する。また、カテキン分解微生物のカテキン分解能欠損ミュータントライブラリー及びゲノムライブラリーを作成し、相補実験によるカテキン分解機能をコードする遺伝子の取得を試みる。さらに単離されたカテキン分解微生物の同定試験を行う。

4. 研究成果

カテキン分解微生物の報告は世界的にも殆どなされていない。そこで、カテキン分解微生物を土壤中から探索することを試みた。これまでに報告例の少ないカテキン分解微生物を探索するにあたって、樹木由来の成分が非常に豊富で、微生物の活動が活発であると考えられる森林酸性土壤に焦点を当て、探索を行った。その結果、pH3.5の酸性条件下でカテキンを単一の炭素源として生育できるバクテリア OX-01 株の獲得に成功した。この OX-01 株の 16srDNA 配列解析の結果、OX-01 株は *Burkholderia* 属に分類されることが明らかとなり、新規カテキン分解菌を *Burkholderia* sp. OX-01 とした（以下 OX-01）。

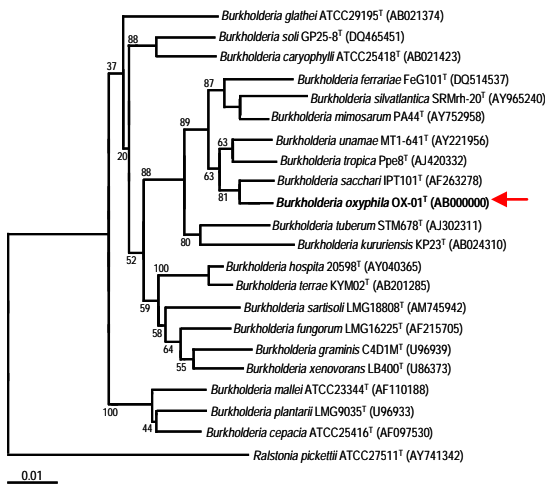


図 6 新規カテキン分解菌 *Burkholderia oxyphila* OX-01 株の分子系統樹

この OX-01 のカテキン分解機能を調査する為に、粗酵素液を調製しカテキン分解試験を行ったところ、細胞膜酵素ではなく細胞内の酵素により分解されることが明らかとなった。さらに HPLC、GC-MS、NMR 等の分析と標準物質との比較により、OX-01 株はカテキンの 4 位を水酸化し Leucocyanidin へと変換、さらに同 4 位の水酸基を酸化し Taxifolin へと変換して代謝することを明らかにした。また、カテキン分解遺伝子を獲得する為に OX-01 株のゲノムライブラリーとミュータントライブラリーを作成し、カテキン分解相補実験により、カテキン分解に必須な機能をコードする遺伝子断片の獲得に成功した。今後、OX-01 株のカテキン代謝機能を遺伝学的・酵素学的に詳細に解析することにより、樹皮タンニンの高度利用技術確立に大きく貢献できると考えている。

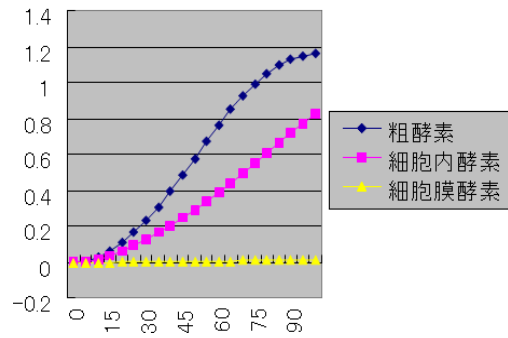


図 7 カテキン分解酵素の細胞局在性

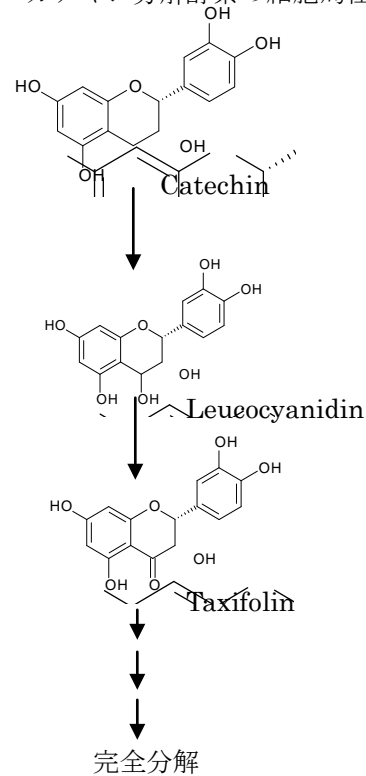


図 8 OX-01 株のカテキン代謝経路

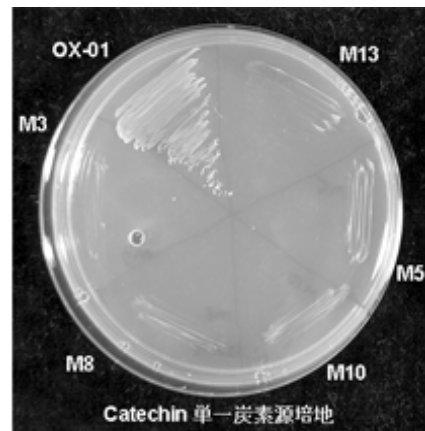
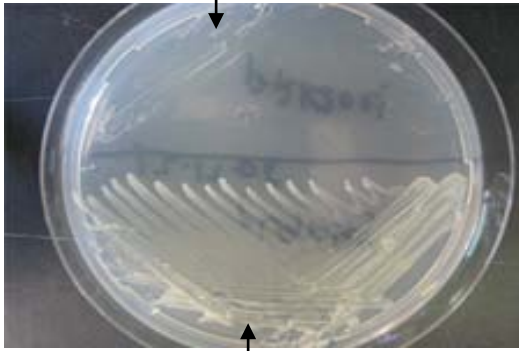


図 9 カテキン分解能欠損株の作出 5 株の欠損株の選抜に成功

カテキン分解能欠損株



欠損株にゲノムライブラリーを導入し
カテキン分解能が相補された組換え体

図10 ゲノムライブラリーからカテキン分解機能をコードする遺伝子のスクリーニング

さらに森林酸性土壌から得られた OX-01 株の詳細な同定解析を行った。16srDNA 配列決定及び詳細な生理・生化学的同定解析を行ったところ本菌は、グラム陰性桿菌、不動、無孢子、好嫌気性、主たるユビキノンが Q-8、主たる脂肪酸組成が C16:0, C17:0 cyclo, C18:1 ω 7c でありまた、ペントース、ヘキソース、オリゴ糖を含む多くの炭水化物を代謝できない代わりにカテキンの他多くの芳香族物質を代謝できることが明らかとなった。また、ゲノムの特徴としては G+C 含量が 64mol% で、DNA-DNA ハイブリダイゼーションにおいては近縁とされた種とは相同性が低いことが明らかとなった。以上の結果から、新規カテキン分解細菌を *Burkholderia oxyphila* OX-01 と命名し、新種提唱を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Motoki Matsuda, Yuichiro Otsuka, Shigeki Jin, Jun Wasaki, Jun Watanabe, Toshihiro Watanabe, Mitsuru Osaki. Biotransformation of (+)-catechin into taxifolin by a two-step oxidation: Primary stage of (+)-catechin metabolism by a novel (+)-catechin-degrading bacteria, *Burkholderia* sp. KTC-1, isolated from tropical peat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2008), 366: 414-419 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

① 大塚祐一郎、村田仁、松田元規、大崎満、中村雅哉 *Burkholderia* sp. nov., 熱帯酸性土壌由来の芳香族化合物代謝細菌 日本農芸化学会 2009年3月28日 福岡国際会議場

② Yuichiro Otsuka, Motoki Matsuda, Masaya Nakamura, Sigeki Jin, Jun Wasaki, Jun Watanabe, Toshihiro Watanabe, Mitsuru Osaki. Isolation of Novel (+)-Catechin Degrading Bacterium, *Burkholderia* sp. KTC-1, from Tropical Peat and Detection of Taxifolin as Intermediate of (+)-Catechin Metabolism. American Society for Microbiology General Meeting, 2008年6月2日, Boston

③ 松田元規、大塚祐一郎、神繁樹、和崎淳、渡辺純、渡部敏裕、大崎満 熱帯泥炭より単離した新規 (+)-catechin 資化細菌 *Burkholderia* sp. KTC-1 による (+)-catechin の taxifolin への変換 日本農芸化学会 2008年3月28日 名古屋名城大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 祐一郎 (Otsuka Yuichiro)
独立行政法人森林総合研究所
バイオマス化学研究領域・研究員
研究者番号: 80455261

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者