

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780169

研究課題名（和文） 同時酸分解・発酵処理による樹皮タンニンからの汎用性ポリマー原料生産システムの構築

研究課題名（英文） Design a system of raw material production from condensed tannin by using microbial function and acidic decompose reactions.

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・主任研究員

研究者番号：80455261

研究成果の概要（和文）：縮合型タンニンという物質は樹木の樹皮に多量に蓄積していますが、その利用方法については革鞣し剤などの利用以外に有効な利用方法が確立していません。カラマツなどに含まれる縮合型タンニンは酸性条件下で低分子化されカテキンとなることが報告されています。本研究では酸性条件下でカテキンを分解出来るバクテリアの諸性質を明らかにし、カテキン分解機能を解析することにより、タンニンからカテキンへと酸分解された後に微生物機能によってカテキンから汎用性ポリマー原料へと変換するシステムを設計可能であることを明らかにしました。

研究成果の概要（英文）：Catechin, that is one of the flavonoids, is secondary metabolite of plants, and is major precursor of condensed tannin that was the second most abundant aromatic biomass following lignin. Thus, it is very interested that how decomposed and carbon recycled the catechin, that was produced in large quantities by plants, by soil micro-organisms. In this study, we described that the OX-01 could convert (+)-catechin and (-)-epicatechin to protocatechuic acid via taxifolin. These results suggested that it is possible to design a system of raw material production from condensed tannin by using microbial function and acidic decompose reactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：タンニン、代謝工学、ポリマー原料、酸分解、バイオマス

## 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 (Ikami ら、*Bulletin of FFPRI*, 2003, Vol.2(2):111-114)。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

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。

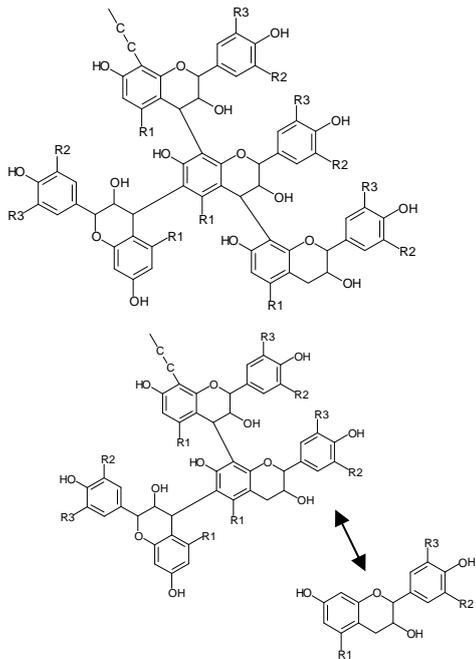


図 1 縮合型タンニンの構造 (上) と酸性条件下で容易に低分子化されフラバノール単位 (カテキン) を遊離する (下)

縮合型タンニンは、酸処理によって比較的容易に単位間結合が切断されフラバノール末端単位 (主にカテキン) が遊離することが報告されている (Jeremy P. E. Spencer et al. 2000, *Bioche. Biophys. Res. Commu.* 272, 236-241) (図 1)。この処理により生成するカテキンは、非常に高い抗菌・抗酸化活性を有する物質であるが、インドの Mahadevan のグループはこのカテキンがいくつかの土壌細菌によりプロトカテキュ酸を経由して完全分解されることを報告している (Mahadevan et al. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 1991, 35, 411-415)。また申請者は H20 年度までの科研費 (スタートアップ) において、世界で初めて pH3.5 以下の酸性環境でカテキンを完全分解できる土壌細菌 *Burkholderia sp.* OX-01 株を単離し、その分解機能に関する報告を行っている。さらに筆者は、代謝工学技術を用いてプロトカテキュ酸から汎用性ポリマーの原料となる 2-ピロ

ン-4,6-ジカルボン酸 (PDC) を高生産する技術を世界で初めて開発し、それによって生産された PDC からフィルムシートやプラスチックを製造することに成功している (図 3, 4)。

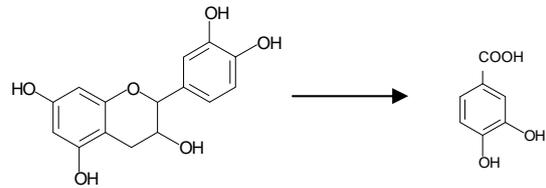


図 2 OX-01 の機能によりカテキンからプロトカテキュ酸へと変換する。

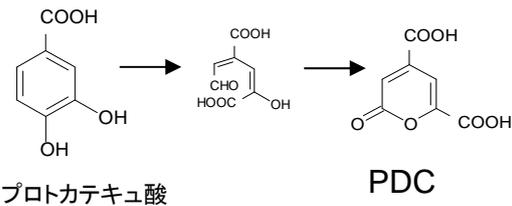


図 3 プロトカテキュ酸から汎用性プラスチック原料となる PDC へと変換出来る。

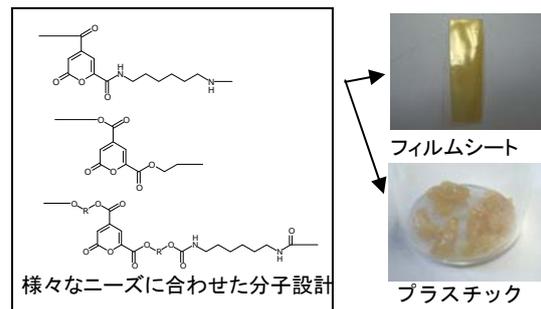


図 4 PDC から様々なポリマーを合成することができる。

以上のことを踏まえて新しい樹皮の高度利用技術として次のことが可能になると考えられる。樹皮から多量に得られる縮合型タンニンを好酸性カテキン分解細菌である OX-01 株とともに酸処理を行うと、縮合型タンニンからカテキンが遊離し、そのカテキンを OX-01 株が取り込み代謝する。このとき、OX-01 株のカテキン分解代謝経路をプロトカテキュ酸から PDC へと変換・蓄積するよう代謝工学技術により改変すると、縮合型タンニンから直接ファインケミカルズとして利用可能な汎用性ポリマー原料である PDC を生産することが可能になり、樹皮から様々な用途に利用可能なグリーンプラスチックを製造する技術が構築できる。これは樹皮の高度利用技術に大きく貢献できると考え

られる。

## 2. 研究の目的

樹皮は他の主要な木質系残廃材（背板、鋸屑）に比べて未利用率がかなり高く、高付加価値な利用技術の開発が望まれている。樹皮には、タンニンと総称されるポリフェノール成分が多量に存在することが知られている。本研究課題においては、申請者が独自に単離・解析している好酸性カテキン分解細菌 *Burkholderia* sp. の機能を代謝工学的に応用した、樹皮タンニンの同時酸分解・発酵処理という全く新しいアプローチによって、樹皮タンニンから直接ファインケミカルスとして利用できる汎用性ポリマー原料を生産する技術開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

好酸性カテキン分解細菌 *Burkholderia oxyphila* OX-01 株の諸性質を解析する。また、トランスポゾン導入によって作成したミュータントライブラリーからカテキン分解機能を欠損した変異体を選抜し、変異部位特定によるカテキン分解に関わる遺伝子を特定する。OX-01 株をジャーファーメンターにて高密度培養し、カテキン分解代謝機能の発現が高密度培養条件で可能かどうか検討し、縮合型タンニンが酸分解される条件下で、OX-01 株のカテキン分解機能の発現が可能であるか確認する。また代謝工学によりカテキンからプロトカテキユ酸を経由して PDC へと変換する代謝経路の設計が可能であるか検討する。

## 4. 研究成果

好酸性カテキン分解細菌 *Burkholderia oxyphila* OX-01 株の 16SrDNA 配列及び炭素源資化性試験、脂肪酸組成解析等の結果からこの細菌が新種であることが強く示唆されたため、近縁種との DNA-DNA ハイブリダイゼーション比較を行ったところ新種であることが明らかとなったため、*International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology* 誌に論文を投稿し掲載され、新種提唱を行った。また、OX-01 株のゲノムに一カ所変異を導入することによってカテキン資化能を失った変異体 12 株の変異導入部位を全て決定した。その結果、OX-01 株のカテキン資化能に必要な遺伝子機能として、6 種の遺伝子が見いだされた。相同性検索の結果、これら 7 つの遺伝子はそれぞれ、phosphoenolpyruvate syntase, LysR type transcriptional regulator, phosphoglycerate kinase, exporter protein, homocysteine hydrolase, gamma-glutamyl kinase であつた。このうち LysR type transcriptional

regulator を欠損した変異株においてはそれによって発現が制御されるオペロンの遺伝子配列をさらに精査した。

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用いた相補試験により、LysR ファミリー転写因子により制御されるカテキン分解遺伝子クラスターを発見した。この遺伝子クラスターは 13 個の ORF から構成されており、これまでの粗酵素試験によって明らかとなっているカテキンからロイコシアニジンを経由してタキシフォリンへと変換された後、C 環の開裂により芳香族モノマーに分解され代謝されていくことが示唆された。この遺伝子クラスター中の遺伝子群と既に単離している芳香族モノマーから PDC へと変換する遺伝子群を連結することで、カテキンから PDC を生産蓄積するための代謝遺伝子の設計が可能であることが明らかとなった。また、樹皮から抽出した縮合型タンニンの同時酸分解発酵の培養条件を明らかにするため、ジャーファーメンターを用いた OX-01 株の培養試験を行った。様々な条件検討の結果、pH3.5 の酸性条件でグルコースを炭素源として 0. D. 600=40 以上の高密度培養が可能であること、さらにその条件で炭素源を徐々にカテキンへとシフトすることでカテキン代謝機能を効率よく発現誘導出来ることが明らかとなった。以上の結果から、OX-01 株のカテキン代謝遺伝子群に芳香族モノマーから PDC へと変換する遺伝子群を連結した遺伝子クラスターを作成し、それを導入した組換え微生物を作成した後、ジャーファーメンターによる pH3.5 の酸性条件での高密度培養からカテキン代謝遺伝子の発現誘導を行うことで、縮合型タンニンの同時酸分解発酵技術の構築が可能になると考えられる。

## 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)

Yuichiro Otsuka, Yuki Muramatsu, Yasuyoshi Nakagawa, Motoki Matsuda, Masaya Nakamura, Hitoshi Murata, Burkholderia oxyphila sp. nov., isolated from acidic forest soil that catabolizes (+)-catechin and its putative aromatic derivatives, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61:249-254、査読有、2011

[学会発表] (計 1 件)

Yuichiro Otsuka, Hitoshi Murata, Motoki

Matsuda, Tomonori Sonoki, Masaya Nakamura  
Isolation of novel (+)-catechin degrading  
bacterium, *Burkholderia oxyphila* sp. nov.  
OX-01, from acidic forest soil and its  
(+)-catechin metabolic pathway. 14th  
International Biothechnology Symposium  
and Exhibition IBS2010, 2010年9月17日、  
Palacongressi (Rimini, Italy)

## 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・主任研究員

研究者番号：80455261