

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 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580178

研究課題名（和文） 縮合型タンニンの生分解に関する研究

研究課題名（英文） Studies on Biodegradation of Condensed tannin

研究代表者

小藤田 久義（KOFUJITA HISAYOSHI）

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：40270798

研究成果の概要（和文）：

担子菌による縮合型タンニンの生分解機構の解明を目的として、同位体標識タンニンモデル化合物を基質としてシイタケ (*Lentinus edodes* Is) による生分解実験を行った。分解物の GPC および GC-MS 分析により、縮合タンニンが生分解される際の初発反応として、構成単位間のインターフラバン結合および C 環が開裂してカテキン、プロトカテクアルデヒドおよびフロログルシノールが生成する経路が提案された。

研究成果の概要（英文）：

For the purpose of elucidation of the mechanism for biodegradation of condensed tannin by basidiomycete, isotopic-labelled model compounds were degraded by shiitake (*Lentinus edodes* Is). The degradation products were analyzed with GPC and GC-MS. The initial reaction pathway was proposed, that is, the interflavan linkage and C-ring were cleaved to produce catechin, protocatechualdehyde and phloroglucinol.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、生分解、シイタケ、プロアントシアニジン、カテキン

1. 研究開始当初の背景

樹木は光合成により大気中の炭酸ガスを固定して、多糖類およびリグニンからなる細胞壁を形成する。これらの細胞壁成分は樹木が枯死した後に、森林内の微生物によって分

解・代謝され、再び炭酸ガスとして大気中に放出される。このような森林の炭素循環サイクルのうち、多糖類であるセルロース・ヘミセルロースやリグニンが微生物により分解されるメカニズムについては、近年までの研

究によりその全容が解明されつつある。

これに対して縮合型タンニンとは天然の芳香族化合物としては地球上でリグニンに次いで多量に存在する物質であるにも関わらず、樹皮特有に含まれる成分であったために同様の研究がほとんどなされておらず、生分解機構は全くわかっていない。研究代表者らは、合成縮合型タンニンモデル化合物を試料として木材腐朽菌による生分解実験を行い、微生物による縮合型タンニンの分解経路および生理的特徴を明らかにすべく研究を展開してきた。

2. 研究の目的

研究代表者らは、これまでの研究において、有機合成した放射性標識タンニンを用いて各種木材腐朽菌による生分解実験を行ない、高分解性菌株としてシイタケ *Lentinus edodes* Is を選抜した。本菌株は、縮合型タンニンを完全代謝して CO₂ まで分解し、その過程で高分子タンニンの低分子化を引き起こすことが明らかにされている。しかしながら、これまでの研究では開裂部位を含めた分解反応のメカニズムについては未解明のままとなっている。

本研究は、縮合型タンニンの部分構造を有するモデル化合物を合成し、本化合物から生じる分解代謝物を分析することにより、微生物による縮合型タンニンの分解経路を明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 培養方法の検討

¹⁴C 放射性標識縮合型タンニンモデル化合物 (図 1) を液体培地に添加して、様々な条件下にて供試菌=シイタケ *Lentinus edodes* Is の培養を行い、本菌株による縮合型タンニンの最適な生分解条件を検討した。培養条件は、炭素源 (グルコース) および窒素源 (ソイトン) の添加量をそれぞれ変化させて、標識縮合型タンニンからの ¹⁴CO₂ 発生量を測定することにより、各条件における生分解活性を評価した。

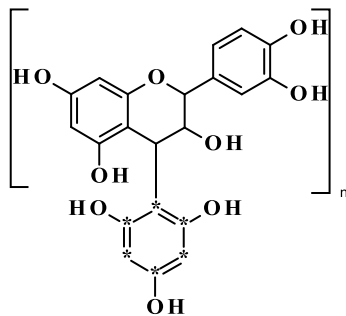


図 1 ¹⁴C 標識タンニンモデル化合物の構造

* ¹⁴C による標識部位

(2) 縮合型タンニンモデル化合物の合成

①低分子モデル 2 量体の合成 : Saito らの方法により tetra-O-benzyl-(+)-chatechin と 3-O-Ac-4-ethoxyethoxy-tetra-O-benzyl-chatechin を Trimethylsilyl-trifluoromethane sulfonate を用いて 5:1 当量で重合させ、順次アセチル基およびベンジル基を脱保護することにより、縮合型タンニン 2 量体モデル化合物 (プロアントシアニジン B3 : 以下 PB3) を得た (図 2)。

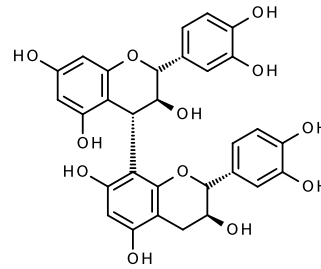


図 2 プロアントシアニジン B3 の構造

②¹³C 標識タンニンモデル高分子の合成 :

Phloroglucinol を出発物質に用いて ¹³C 安定同位体炭素 (酢酸) をアシル基として導入し、合成中間体を調製した。さらに、kawamoto らの方法に準じて合成中間体からタンニン高分子を調製し、Toyopear HW-40EC により分画・精製して ¹³C 標識タンニンモデルを得た (図 3)。

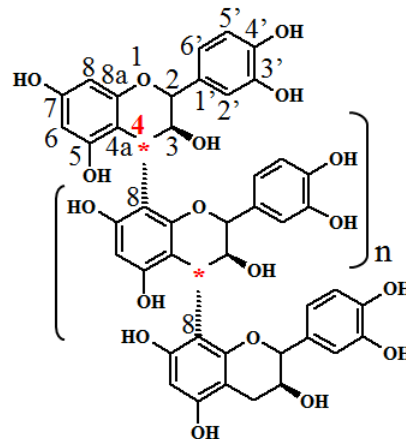


図 3 ¹³C 標識タンニンモデル高分子の構造

* ¹³C 安定同位体炭素、n は繰り返し単位

(3) モデル化合物の生分解および分析

①PB3 の培養ろ液による構造変換 : 縮合型タンニンを含む液体培地にて 10 日間培養後、ろ過して培養ろ液を調製した。加熱処理した培養ろ液をコントロールとした。培養ろ液に PB3 を添加し、所定時間反応させ、アセトン

を加えることによって反応停止した。アセトン溶液を遠心分離し、上清を濃縮してアセトンを留去した後、RP-HPLC に供した。

②PB3 の寒天培養菌体による構造変換：PB3 を含む寒天培地に *L.edodes* Is を接種し、6 日間培養した。培養後、着色帯外側及び内側、着色帯に分画し、個別に凍結乾燥した。凍結乾燥後、70%アセトン水で分解物成分を抽出した。抽出物をアセチル誘導体化したものを GPC に、アセチル誘導体化することなく Sep-pak C18 にて前処理したものを RP-HPLC に供した。

③¹³C 標識タンニンの生分解：¹³C 標識タンニンモデル高分子を含む寒天培地に *L.edodes* Is を接種し、温度 25℃、湿度 85% で 3、5、7、10 日間静置培養した。培養物を凍結乾燥し、70%アセトン水により成分を抽出した。抽出液を凍結乾燥して GPC 分析した。GPC 分析結果に基づき、培養 7 日目の成分を GPC により分子量ごとに分画した。低分子画分を分取 HPLC によりピーク分取し、GC-MS 分析した。

4. 研究成果

(1) タンニン生分解条件の最適化

炭素源の最適化は、0、2、20 g/L グルコースを用いてそれぞれ液体培養し、分解活性を比較することで行った。その結果、20 g/L が最大の活性を示した (図 4)。このグルコース濃度を基準に、窒素源濃度の最適化を行った。窒素源として用いたソイトンの濃度範囲は 0.03、0.15、0.3、1.5、3 g/L で、同様に分解活性を測定した。その結果、0.3 g/L が最大の活性を示した (図 5)。以上より、炭素源および窒素源の最適濃度はそれぞれ 20 および 0.3 g/L と設定された。

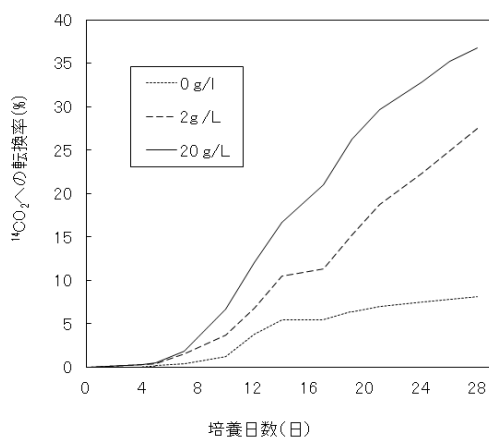


図 4 タンニン生分解に及ぼすグルコース濃度の影響

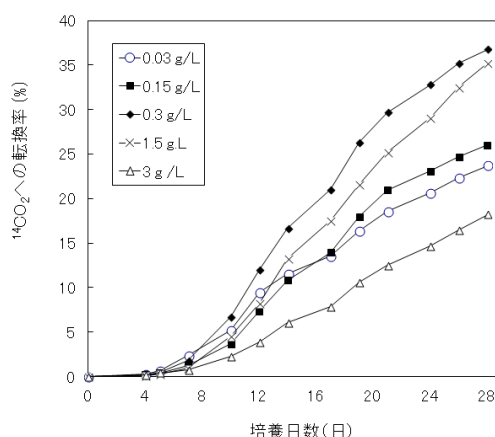


図 5 タンニン生分解に及ぼすソイトン濃度の影響

(2) 低分子モデル化合物 (PB3) の変換

①培養ろ液による構造変換：培養ろ液中の PB3 の挙動分析では、試験区において PB3 (基質) の減少に伴い経時的に増加するピークを検出した。コントロール (加熱処理した培養ろ液) ではこのような変化が見られなかったことから *L.edodes* Is の菌体外酵素による PB3 変換物であると考えられた。この変換物を単離・精製し、構造解析を行ったところ、末端ユニット A 環が酸化された化合物 (PB3 キノン) であると特定された (図 6)。

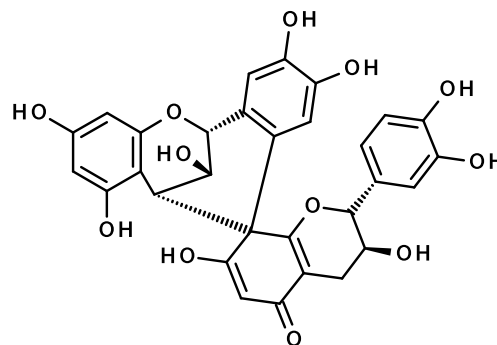


図 6 PB3 変換物 (PB3 キノン) の構造

培養ろ液による PB3 キノンのさらなる変換を追跡した結果、培養ろ液およびコントロールにおいて基質 (PB3 キノン) の減少に伴い経時的に増加するピークを検出した。これより、新規ピークは PB3 キノン由来の非酵素的反応により生成した変換物であると考えられた。この変換物を単離・精製し、構造解析を行ったところ、PB3 キノンの互変異性体であることがわかった (図 7)。

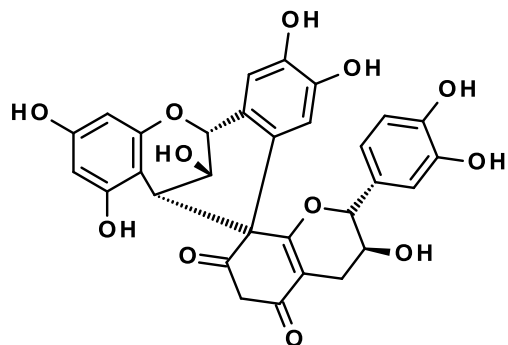


図7 PB3 キノン互変異性体の構造

②寒天培養菌体による構造変換：PB3 を添加した寒天培養では黄色いリング状の着色帯が認められた。培地部位毎の GPC 分析では着色帯外側で PB3、PB3 キノン、その他の異性体及び重合体の分子量に相当するピークを検出した。着色帯及び着色帯内側ではそれらが消失し、低分子物質が生じていた。さらに HPLC 分析では着色帯外側で PB3、PB3 キノン及び異性体を検出した。これらの結果より、PB3 は PB3 キノンおよび異性体の生成を経た後、一旦重合反応を受けてから最終的には低分子化される可能性が示唆された。

(3) 合成タンニンモデル高分子の生分解

低分子モデルにおける結果を踏まえ、高分子タンニンの初発分解機構を解明するため、非標識タンニンもしくは ^{13}C 標識タンニンモデル (図 5) を添加した寒天培地上で *L. edodes* Is の培養を行い、培地中に生じたタンニン分解生成物を分析して、分解過程での構造変化を調べた。

所定期間培養後、培地中の分解物成分を GPC 分析したところ、タンニン由来の高分子ピークの減少とともに新たな低分子ピークが生じた。これらの低分子物質は分取・精製して GC-MS 分析することにより、それぞれプロトカテクアルデヒド、フロログルシノールおよびカテキンと同定された。

また、それぞれの MS スペクトルにおいて非標識および ^{13}C 標識タンニン由来試料の同位体ピーク存在比に差異が認められなかったことから、カテキンは ^{13}C 安定同位体炭素を含まない Terminal Unit 由来であることが示唆された。これらの結果から、培養中に生じたプロトカテクアルデヒド、フロログルシノールおよびカテキンは縮合型タンニン由来の低分子物質であり、構成単位間のインターフラバン結合および C 環の開裂により生成する経路が示唆された (図 8)。

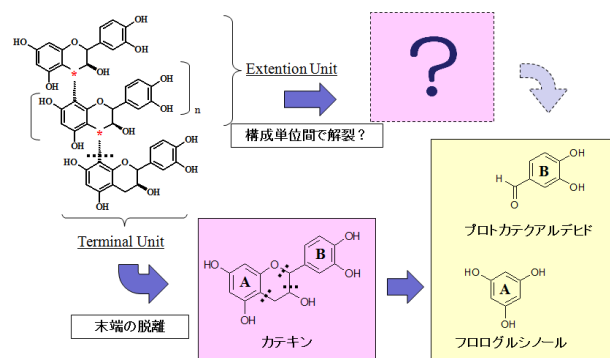


図8 シイタケによる縮合型タンニンの分解経路

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)

[学会発表] (計 2 件)

①片山隼、小藤田久義

安定同位体標識縮合型タンニンモデル化合物の合成および生分解
第 62 回日本木材学会大会
2012. 3. 15、北海道大学 (札幌市)

②笹原康平、小藤田久義

シイタケ (*Lentinus edodes* Is) による Procyanidin B3 の分解—寒天培地上での分解生成物の分布—
第 61 回日本木材学会大会
2011. 3. 18、京都大学 (京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小藤田 久義 (KOFUJITA HISAYOSHI)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号：40270798