

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651093

研究課題名(和文)被災地の微生物で被災地を救え - がれきを材料としたバイオプロセスの構築を目指して -

研究課題名(英文) The study on biorefinery for transformation from the SANRIKU-rubble to the SANRIK-fine chemical.

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：リグニンは、今日の主要な未利用バイオマスのひとつであり、効果的な有効利用法の開発が望まれている。我々は、微生物機能を利用したリグニンおよび低分子リグニンの高付加価値物質への変換に取り組んでおり、今回、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、これを変換、重合して有機蛍光物質を生産する *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 を単離した。同菌の蛍光物質生産の代謝経路や生産条件の検討から、本蛍光物質は、SYALの酸化、脱メチル化により3-O-メチルガリク酸(3-MGA)を経て、その後重合することにより生産されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined bacteria capable of transforming lignin-derived compounds into industrially or economically valuable substances from the seawater after the Great East Japan Earthquake-caused tsunami. *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 produced water-soluble fluorescent substances from lignin or its derivative, syringaldehyde (SYAL). They are polymeric substances derived from 3-O-methyl gallate produced through transformation of SYAL via syringate; are not known compounds reported previously; have excitation/emission peaks at 365/498 nm, respectively; and have an average molecular weight of 7.2 kDa. Despite the fact that aromatic structure generally plays an important role in the planarity and rigidity of organic fluorescent substance, the spectroscopic analyses revealed that aromatic rings were not detected in the molecules.

研究分野：環境微生物学

キーワード：低分子リグニン 有機蛍光物質 バイオリファイナリー

## 1. 研究開始当初の背景

リグニンは、植物細胞壁の 15-30% を占める主要な成分であり、主要な未利用バイオマスのひとつである。リグニンの複雑な化学構造を、微生物機能を用いて有用物質に変換する取り組みは、未利用バイオマスの有効利用という観点から非常に重要である。

平成 23 年 3 月 11 日に起きた東日本大震災以降、被災地沿岸の海底には、大量のがれき等が沈んでおり、これらの影響による海洋汚染等の実態は未だ概要さえ把握できていない。申請者は、最近 10 年間の三陸海岸各地の海水の微生物群集構造に関する経時的な情報を有しており、これを基に震災後の平成 23 年 5 月、6 月に採取した同じ場所の海水の微生物群集構造を比較したところ、震災前後では、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た。

申請者は、これらのことを踏まえ、「現在の被災地沿岸の海水の複合微生物系は、陸上由来の細菌群の大量流入により群集構造が全体的に変化しているため、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、特に、木材系バイオマスの難分解性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？」という仮説を立てた。

実際にこの仮説を基に、リグニンやその前駆体および関連化合物を使用して、被災地沿岸の海水を菌源とし、基質の代謝・変換などを指標に各種スクリーニングを行った。その結果、例えば、個体の syringaldehyde (SYAL) を出発物質として、水溶性の黒色色素を菌体外に大量に生産する菌株など様々な生理活性、有用物質生産などの複数の機能性を同時に有する菌株、複合微生物系が比較的簡単に取得された。一方で同じサンプリングポイントの海水を使い、同様のスクリーニングを数回、震災前に行った経験があるが、全ての実験において特筆すべき結果は得られなかつ

た。

本研究において、海水の複合微生物群集構造を経時的に解析・評価していく取り組みは、海洋生態系に対する震災の影響を評価する意味で学術的価値は非常に大きいと考えられる。一方で、SYAL 由来の菌体外黒色色素には、pH 指示機能を有する物質、複数種の耐熱性蛍光物質などが含まれているように、上記仮説に基づくスクリーニングは、リグニン系物質利用技術の新たな展開が開ける可能性をもたらすことが示唆され、それに加え、本研究の進展は将来的に被災地の木材系がれきから高付加価値物質を抽出・創生するがれきの資源化にも大きく寄与できるものと考えられることから、得られる結果の意義は、学術的・産業的にも非常に大きいと考えられる。

## 2. 研究の目的

以上のことを踏まえ、本研究では、これらの複合微生物系を利用し、がれき由来の木質系バイオマスから高付加価値物質を抽出・創生するためのバイオプロセスの基盤となる(複合)微生物群を新たに見出し、その中で最も効果的なものについて化学構造、生合成経路などの詳細の一端を明らかにすることを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 海水と集積培養、単離、同定

実験に使用する海水は、2011 年 6 月から 2014 年 1 月までの間、岩手県釜石市、大船渡市、宮城県石巻市、塩釜市沿岸から数回にわたって採取した。採取した海水を用いて natural seawater medium (NSW 培地) を作製し SYAL、vanillin (VNL)、*p*-hydroxybenzaldehyde (PHBA) を終濃度 1 mg/mL になるように添加した。これらを室温、130 rpm で 2 週間振盪培養した。

これらの培養液を、上記化合物を含む寒天培地に塗抹し、生育したコロニーを色素生産

や培地の脱色を指標に単離した。また、必要に応じて、培養液の微生物群集構造を denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) を用いて解析した。得られた単離株を 16S rDNA 解析で同定した。

## (2) 逆相 HPLC 解析

得られた単離株を、SYAL 等を含む液体培地で培養し、これらの培養上清を 12,000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上清を 0.45 μm マイレクスでフィルター濾過した。その後、バイアルピンに 2 ml 程のサンプルを分注し、逆相 HPLC 解析を行った(Alliance 2690 system, Waters)。カラム Xbridge C18 (4.6×150 mm)を用い、解析スタート時は、溶媒を 0.1%TFA + 20%メタノールと 0.1%TFA が 5%と 95%になるように設定し、徐々にグラジエントを変化させ、最終的に 0.1%TFA + 20%メタノールと 0.1%TFA が 95%と 5%になるように流した。カラム温度を 40℃、流出速度 0.5 ml/min、注入量 10 μl、分析時間 55 分間、254 nm の波長の数値を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 蛍光物質生産菌の単離

平成 23 年 5 月に採取した岩手県釜石市の生海水を微生物源として、無機塩培地および完全培地に SYAL などを濃度や組み合わせを変えて添加し、集積培養した後、固体培地上での脱色や新たな色素生産等の培地に変化の見られた菌株を 30 株ほど単離した。その結果、固体の SYAL を出発物質として、菌体外に蛍光活性を示す水溶性黒色色素を生産する菌株 *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を第一の候補とし、以降の解析を行った。

まず初めに、ITH-SA-1 株の培養条件について検討したところ、本黒色色素は、SYAL が初期濃度 0.01-20 mg/ml で添加された場合に、4~28 日で、完全培地の塩濃度、振とうの方法に関係なく菌体の増殖と連動して生産さ

れた。一方で、無機塩培地に SYAL を添加した場合、および完全培地に 0.35%以上のグルコースが存在した場合には、生産が見られなかった。また、黒色色素の蛍光活性は、供試した限り全ての培養条件で見られ、pH の変化、熱処理、タンパク質の不活化処理等では失われなかった。

### (2) 黒色色素の合成経路の検討

中間代謝産物の分析から合成経路の特定を試みた。生産速度を遅くさせるため、静置培養で生産させた本黒色色素を 40 日間経時的にサンプリングし、酸性条件下で逆相 HPLC 解析を行った。SYAL の減少に伴い、様々なピークが出現し、これらピークの消長に伴い、重合体と思われるブロードなピークが出現した(図 1)。得られたいくつかのピークを抽出、精製、単離した後、MS 及び NMR 解析により化合物を同定した。その結果、本黒色色素中には、主要な成分としてシリング酸(SYAC)と 3-メトキシガリク酸(3-MGA)、微量成分としてガリク酸(GA)が含まれていることが明らかとなった。

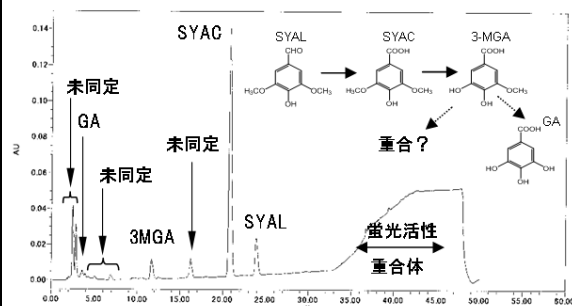
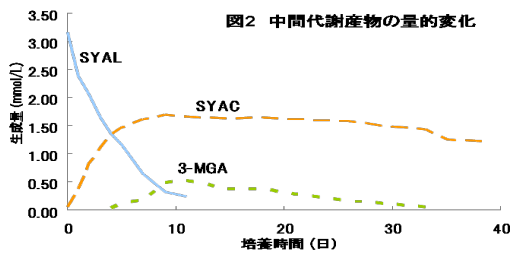


図1 黒色色素のHPLC

続いて、SYAL および中間代謝産物の生産時期と量的関係について検討した(図 2)。その結果、培養当初添加された約 3 mM の SYAL の培養 11 日後までの減少に伴い SYAC の生産が開始され、培養 9 日後、最大で約 1.7 mM 生産された。3-MGA は、培養 4 日後から生産され出し、培養 11 日で最大で約 0.5 mM 生産された。黒色化および蛍光化は、3-MGA の増加後に確認された。



従って、これらの化学構造と生産時期から推定すると本黒色色素は、図1のように酸化反応、脱メチル化反応によりSYALからSYACを経由し3-MGAまで代謝され、重合しているものと示唆された。

一方、これらの生成物は、既報のSYALを起源とする *Pseudomonas* 属や他の菌種由来の生成物（シリングアルガダジン、フルオレセイン、ピロン化合物等）とは溶出時間が異なること、またガリック酸等のフェノール性化合物と鉄とのバーベンダム反応で生じる褐変物質とも色調が大きく異なることが判明している。

### (3) 黒色色素からの蛍光物質群の分離と NMR、FT-IR 解析

まず黒色色素に含まれる蛍光活性成分の性質を検討した。その結果、本黒色色素は 365 nm の光で励起すると青緑色（最大蛍光波長 498 nm）の蛍光を発した。この結果を受け、蛍光検出器と UV 検出器をタンデムに接続した逆相 HPLC で分析したところ、SYAL および中間代謝産物には蛍光活性がなく、重合成分に複数の蛍光活性があることが示された。

次に黒色色素から蛍光物質群を分離する方法を検討したところ、減圧乾固した黒色色素に 100 %メタノールを添加すると、蛍光物質群が溶解することが判明し、これにより蛍光物質群を分離した。分離された黒色色素および蛍光物質群をそれぞれ精製、濃縮し、ゲルろ過にて分析したところ、それぞれ 5.8-16.8 kDa（平均分子量 12.8 kDa）、4.0-8.5 kDa（平均分子量 7.2 kDa）であった。続いて、<sup>1</sup>H-、<sup>13</sup>C-及び各種二次元 NMR 解析を行った。その結果、黒色色素、蛍光物質共にベンゼン

環構造由来のシグナルが見られず、C=O 基や CH-、CH<sub>2</sub>-、CH<sub>3</sub>-基のシグナルが多数確認された(図 3)。

また、黒色色素、蛍光物質共に概ね類似したスペクトルを示したが、蛍光物質特異的に -CO-CH<sub>3</sub> または -CO-CH<sub>2</sub>-CO- のシグナルが確認された。これらのことを確認するため、両者の FTIR 解析を行ったところ、結果は NMR 解析と同様にベンゼン環構造由来のシグナルが見られなかった。

以上の結果は、黒色色素と蛍光物質群は類似した化学構造を有していることを意味しており、また両者には、ベンゼン環構造が含まれないことが示唆された。

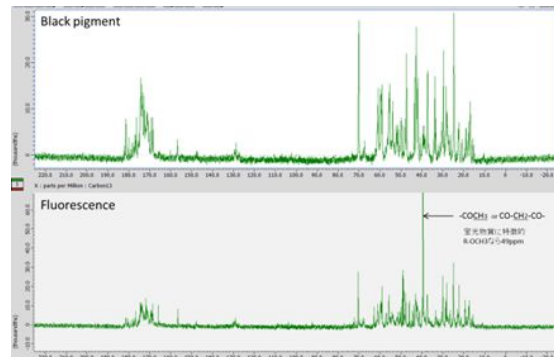


図3 黒色色素、蛍光物質の<sup>13</sup>C-NMRスペクトル

### (4) 総括

本研究では、上述した仮説をもとにスクリーニングを行った結果、SYAL 出発物質として蛍光活性を有する水溶性黒色色素を生産する *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を単離した。黒色色素の化学構造を検討した結果、ベンゼン環構造を有しない有機性の蛍光物質群が含まれていることを明らかにした。著者らが知る限り、現在、化学構造が公開されている有機蛍光物質にはベンゼン環構造が含まれていることから、本蛍光物質群は非常に新規性の高いものと考えられ、今後、詳細な化学構造を決定することが望まれる。

### 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 2 件)

1) H. Takihara, J. Ogihara, N. Iwabuchi, M. Sunairi. 2014. *Rhodococcus rhodochrous* ATCC12674 becomes alkane-tolerant upon GroEL2 overexpression and survives in the n-octane phase in two phase culture. *Micorbes and Environents*. 29(4):346-352. 査読あり.

2) H. Takihara, J. Ogihara, T. Yoshida, S. Okuda, M. Nakajima, N. Iwabuchi, M. Sunairi. 2014. Enhanced translocation and growth of *Rhodococcus erythropolis* PR4 in the alkane phase of aqueous-alkane two phase cultures were mediated by GroEL2 overexpression. *Micorbes and Environents*. 29(4)431-433. 査読あり.

〔図書〕(計 1 件)

Iwabuchi, N. 2013. Selective stimulation of aromatic compound degradation by the indigenous marine bacterium *Cycloclasticus* for bioremediation of oil spills in the marine environment. 2013. In Nojiri H, Tsuda M, Fukuda M, and Kamagata Y (eds), *Biodegradative Bacteria*, Springer, New York, NY. 全 400p, 313-333. 査読あり.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：蛍光物質及びその製造法

発明者：岩淵範之，松藤寛，砂入道夫，瀧原速仁，佐々木太平，白井智也

権利者：日本大学

種類：特許

番号：特願 2014-167282

出願年月日：平成 26 年 8 月 20 日

国内外の別：国内

名称：蛍光物質及びその製造法

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：特願 2013-019971

出願年月日：平成 25 年 2 月 4 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

松藤 寛(MATSUFUJI, Hiroshi)  
日本大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号：70287605