

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658151

研究課題名(和文) ムコン酸類の嫌氣的生分解の評価とエタノール発酵技術の検討

研究課題名(英文) The evaluation of anaerobic muconates metabolism and ethanol fermentation

研究代表者

重富 顕吾 (Shigetomi, Kengo)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20547202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではリグニンを始めとする芳香族化合物からの新規発酵技術の可能性を探ることを目的とし、芳香族化合物の代謝中間体であるムコン酸類の嫌氣的条件における資化微生物の探索を検討した。代表的なムコン酸類であるcis,cis-muconic acidを単一炭素源とした集積培養により、嫌氣的条件においてムコン酸類を資化可能な微生物を4菌株単離した。また、同様にムコン酸類の一種である2-hydroxymuconic semialdehydeの調製を検討し、その前駆物質の合成を達成した。

研究成果の概要(英文)：Muconates are the key intermediates in biodegradation of natural or unnatural aromatic compounds (e.e. lignin, plastics and dyes), which means that the exploration of novel fermentation process of muconates can give a new insight for utilization of waste aromatic compounds, such as ethanol production. The present study focused on the anaerobic mineralization of muconates as a sole carbon source. The anaerobical enrichment culture of soil samples by using cis,cis-muconic acid as a sole carbon source gave 4 microbial strains which can mineralize this compounds in anaerobic condition. The precursor compound of 2-hydroxymuconic semialdehyde, the other type of muconate, could be successfully synthesized.

研究分野：森林科学

キーワード：lignin muconate anaerobic culture

1. 研究開始当初の背景

リグニンセルロースに次ぐ第2位の資源量を誇る木質バイオマスである。そのため、リグニンの利用技術の確立は、「再生可能資源の有効利用」の観点から今なお、重要な研究対象である。申請者は、複雑な構造を持つリグニンを有効利用するためには、生物分解により均一な有用分子へと変換することが効果的ではないかと考えた。研究開始当初から現在においても、既存のリグニン生分解に関する研究は、バイオパルピングやバイオブリーチング、もしくはダイオキシンなどに対するバイオレメディエーションについての研究が殆どで、一部の例(Otsuka *et al.*)を除きリグニンの、いわゆる発酵技術の開発についての研究は希であった。

2. 研究の目的

リグニンをはじめとする芳香族を有用物質へ変換するため、申請者はその生分解経路のうち、芳香族構造の崩壊段階に着目した。リグニンや、他の芳香族化合物はその生分解過程において、鍵中間体として、芳香族環構造の開裂したムコン酸類を形成することが知られている。この開裂反応は劇的な酸化反応であるため、酸素の存在が必須であるが、それ以降のムコン酸代謝過程においてはその酸化数の変化から、必ずしも酸素は必要と考えられない。申請者はこの点に着目し、ムコン酸を嫌気的条件下において資化できる菌の探索を目的とした。これまでムコン酸類の嫌氣的代謝については Balcke らの報告を除き検討された例は無い。嫌氣的条件下において微生物はエタノールや乳酸など、人類に有益な資源を与えることが知られており、ムコン酸の中でも 2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドはこれらの前駆物質であるピルビン酸へと代謝されることが既に知られている。将来的にムコン酸までの好氣的代謝とムコン酸以降の嫌氣的代謝を組み合わせることで目的とするリグニン発酵技術が確立できるのではないかと企図し、本課題ではムコン酸の嫌氣的代謝について検討した。

3. 研究の方法

生分解過程において芳香族化合物は主にカテコール構造を経て、2種類のムコン酸類へ導かれる。カテコール構造からカテコール1,2-ジオキシゲナーゼによる *ortho* 開裂を経ることで *cis, cis*-ムコン酸が生成し、カテコール2,3-ジオキシゲナーゼによる *meta* 開裂を経た場合 2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドが生成する。本課題においては、これらを単一炭素源として含む液体培地を用いて、ムコン酸類資化菌の探索を行うこととした。

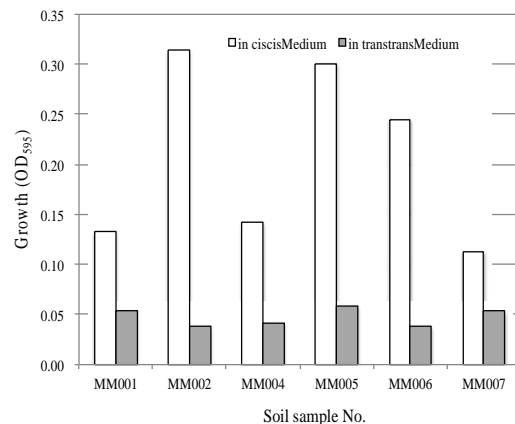
資化菌探索のスクリーニングソースとして、北海道内の浄水場から得られた活性汚泥、有機物の堆積した森林土壌、積雪下のリター

分解層から採取した土壌サンプルを含む33地点の土壌サンプルを用いた。

また、上記に示したムコン酸類のうち、2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドは市販されていないため、この化学合成についても併せて検討を行った。

4. 研究成果

(1) 液体培養による集積化においては、微生物の競合により有望株の見落としが懸念されたため、最初に寒天培地を用いたコロニーのスクリーニングを行った。*cis, cis*-ムコン酸 (3.0 g/L), KH_2PO_4 (3.88 g), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.13 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.0 g/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g/L), agar (17 g/L) ならびに微量金属 (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mo^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}) 溶液を含む寒天培地を調製し、当初採取した10地点の土壌サンプルを塗布した後、脱酸素剤アネロパックケンキを同梱した嫌気ジャー内において、30°Cにて静置培養した。4日間の培養の後、生育の見られたプレートから目視で形態の異なる細菌と想定されるコロニーを複数採取した。採取したコロニーを



新たな平板培地にさらに画線し、継代培養を繰り返すことで、概ね単一コロニーとなった菌株を複数分離できた。しかしながら、寒天培地上で一定の生育を示した株も、液体培地ではいずれも有意な生育を示さなかった。

このため、次いで液体培地を用いた集積培養を行った。寒天を含まない同様の組成の液体培地を調製し、6穴、もしくは48穴マイクロウェルプレートに培地と土壌サンプルを分注した。嫌気ジャー内で静置培養したところ、6地点の土壌サンプルで有意な生育が見られた。当初これらは数日で目視可能な生育を示していたが、継代培養を行うごとに生育に数週間以上の長期間を要するようになった。それぞれのサンプルについて30日ごとの継代培養を8回繰り返した。*cis, cis*-ムコン酸を単一炭素源とする集積培養によりえられた集積培養物(土壌サンプルMM001, 002, 004, 005, 006, 007由来)について *trans, trans*-ムコン酸を単一炭素源とする液体培地で同様に嫌気培養を行ったところ、これらに含まれる微生物は *cis, cis*-ムコン酸培地のみで生育を示した。このことにより

cis, cis-ムコン酸に高い嗜好性を持つ微生物(郡)の集積化が達成されたことが確認できた。一方、当初行っていた平板培養におけるスクリーニングにより得られた株は *trans, trans*-ムコン酸ならびに *cis, cis*-ムコン酸の培地においても同様の生育を示した。以上のようにして得られた培養物を *cis, cis*-ムコン酸を含む寒天培地に塗布し、嫌気培養を行ったところ、4種の異なる形態を持つ単離可能な微生物を見出した。これらの種同定について現在解析を進めている。

さらに追加で22地点の土壌を採取し、同様の集積培養を行うことで2種の有望な集積培養物も得られた。

(2) ムコン酸類のうち、*cis, cis*-ムコン酸は既知のムコン酸類資化過程においてβ-ケトアジピン酸経路を経てコハク酸とアセチル CoA へと変換され、TCA 回路に導入されるとされている。一方、2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドは4-オキサロクロトン酸経路を経てピルビン酸とアセチル CoA へと代謝されるため、最終目的とする発酵技術において、より有望な生分解中間体である。したがって2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドについても同様に、単一炭素源として集積培養と菌の分離を行うべきである。しかしながら、2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドは市販されておらず、これを用いるには独自の調製が必要である。このため、申請者は2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドの化学合成について検討した。

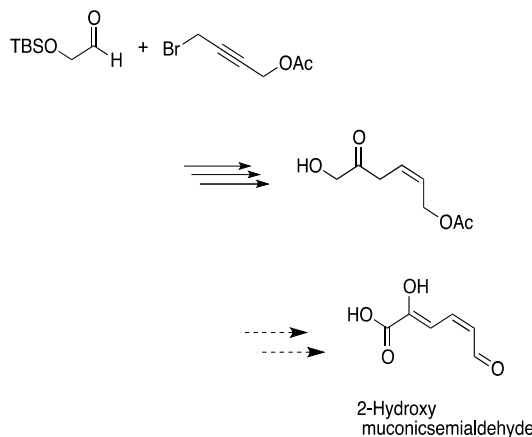
合成計画の立案にあたっては、将来的な代謝過程の解析を考慮し、同位体ラベル化の容易なC2ブロックとC4ブロックのカップリングへと逆合成し、これらのカップリングにより2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド骨格の構築を行うこととした。

C2ブロックの出発物質として、当初、酒石酸エステル過ヨウ素酸開裂による合成を検討した。しかしながら、エステルの種類や用いる過ヨウ素酸・塩の種類によらず、得られたアルデヒドは痕跡量であった。そこで、代替案として2-ブテン-1,4-ジオールの酸化開裂を検討した。2-ブテン-1,4-ジオールの2つの水酸基のTBS化に次ぐオゾン分解により、C2ブロックに相当する[(*tert*-ブチルジメチルシリル)オキシ]アセトアルデヒドを高収率で得た。また、同様に後の保護基の条件検討に向けてメトキシメチル保護体、アセチル保護体についても合成を行った。

次いで、C4ブロックの構築を検討した。C2ブロック同様、2-ブテン-1,4-ジオールから導かれるプロモ化体について合成を行ったが、続くC2構造とのGrignardカップリングの際に異性化が生じ、所望の4*Z*体ではなく4*E*体が得られた。このため、*Z*アルケンの導入を合成反応の後期に行うこととし、合成経路を改めた。代替案としてアルキニル体である2-ブチン-1,4-ジオールを出発物質として

保護、プロモ化を経てC4ブロックとなる4-プロモ-2-ブチニルアセテートを構築した。また、C2ブロック同様、保護基の検討を目的としてTBS保護体についても合成を行った。

次いで合成したC2ブロック、C4ブロックをBarbier反応に供することで収率34-45%と低収率ではあるが、グラムスケールで目的とするC6構造を合成することに成功した。低収率の原因は反応中に生じるアレン成績体であったが、検討したいずれの条件においてもこの副生成物の生成を抑制することは



できなかった。

得られた化合物についてLindlar触媒による*Z*選択的還元、脱保護、酸化反応について検討した。当初、2-オキソカルボン酸を短段階で合成するため、1,2-ジオールの一斉酸化について検討を行ったが、検討したデス・マーチン酸化、PDC酸化、TEMPO酸化、TPAP酸化、モリブテン酸化のいずれも目的とする酸化体を与えず、概ね酸化的開裂成績体を与えのみであった。このため、一斉酸化ではなく、段階的酸化について検討した。保護基を含めた種々の条件検討の結果、2位水酸基の酸化を先んじて行い、次いで1位の脱保護、酸化を行うことが有望な合成経路であると結論づけた。以上の合成ルートの検討を経て、2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドの前駆物質の合成を達成した。

<引用文献>

Balcke et al., *Biodegradation*, **18**, 755, 2007

Otsuka et al., *J. Environ. Biotech.*, **6**, 93, 2006

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕該当なし

〔図書〕該当なし

〔産業財産権〕該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重富 顕吾 (SHIGETOMI, Kengo)

北海道大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：20547202

(2)研究分担者

生方 信 (UBUKATA, Makoto)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：60168739

三橋 進也 (MITSUHASHI, Shinya)
北海道大学・大学院農学研究院・特任講師
研究者番号：60526672