

令和元年6月21日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00649

研究課題名(和文) リグニン由来C6-C3プラットフォーム芳香族化合物の高効率バイオ生産系デザイン

研究課題名(英文) Design of bio-production of platform aromatic chemicals with C6-C3 structure from lignin

研究代表者

大田 ゆかり (OHTA, Yukari)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・グループリーダー代理

研究者番号：40399572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：酵素触媒は、リグニンから高価値の芳香族化合物を特異的に製造するための環境に優しい戦略の1つと言える。本研究で、リグニンモデル合成2量体の-0-4結合を切断するNovosphingobium属細菌に由来する4つの酵素について生化学的解析を行い、それらの最適な反応条件を見出した。4種の酵素を木材から抽出したリグニン(ミルドウッドリグニン)に作用させた際の中間体の解析に基づき、これらの酵素が異なる構造の基質を認識できることを示した。続いて、前述の4種を含む5種の酵素を使って、ミルドウッドリグニンから直接フェニルプロパン構造を有する芳香族モノマーを特異的に生成させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リグニンは様々な化学物質の原料として石油に代わる可能性を持つが、そのリグニンの構造上の複雑さのために、天然物に由来するリグニンから芳香族化合物を選択的に製造することには、多くの困難が伴う。酵素触媒は、リグニンから高価値の芳香族化合物を特異的に製造するための環境に優しい戦略の1つと言える。本研究において、酵素を用いた温和な条件下で、天然物に由来するリグニンから直接モノマーを特異的に製造できたことは、持続可能なバイオリファインリーのための新たな可能性を開くことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Enzymatic catalysis is one of the eco-friendly strategies for the specific production of high-value aromatic compounds from lignin. In this study, we biochemically characterized the four enzymes from Novosphingobium sp. The intermediate molecules produced by the four-enzyme reactions with milled wood lignin showed the capacity to accommodate heterologous substrates at the substrate-binding sites of the enzymes. Then, we achieved specific production of aromatic monomers with a phenylpropane structure directly from natural lignin using the five enzymes including above mentioned four enzymes.

研究分野：応用微生物学

キーワード：リグニン 芳香族モノマー 酵素 GST SDR Novosphingobium

1. MBES04

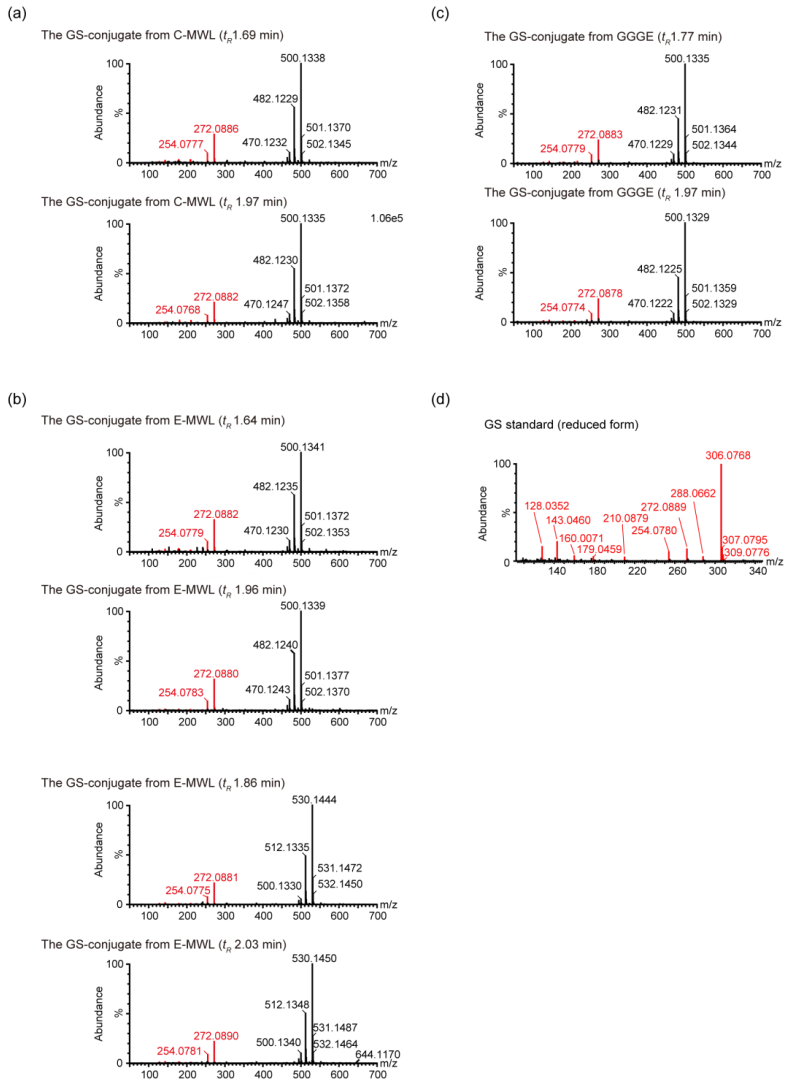
SDR GST

	SDR3	SDR5	GST4	GST5
optimal pH	9	9-10	9	7-8
optimal Temperature (°C)	15	30	35	40
specific activity (mU/mg)	3.4E+02	4.3E+04	1.0E+03	8.2E+01
V _{max} (mU)	4.2E+02	4.6E+04	1.3E+03	9.8E+01
K _M (mM)	1.5E+00	1.1E+00	4.7E-01	2.9E-01
k _{cat} (min ⁻¹)	3.9E+00	1.4E+03	4.5E+01	3.5E+00
k _{cat} /K _M (min ⁻¹ mM ⁻¹)	2.5E+00	1.3E+03	9.5E+01	1.2E+01

GST3 88006K X)zS4078 3.4b0X S4

(2) -O-4)D(Lb2A1b0
 MWL C-MWL MWL E-MWL SDR3 SDR5 GST4 6
 SDR3 SDR5 GST5 b 3 b4 8IQbo LCMS [OKS
 (W 1) C-MWL 2AKSbz0[BE GGGE 2AKSbBM+
 KS E-MWL 2AKSε GGGE 2AKSbB

30 A8(S
 SGε C-MWL
 GGGE b
 9A
 MG E-MWL
 XOX
 g
 bg
 9A K8 G
 gK8
 4(z ob MS
 BQK S
 G
 Bb



(m/z 306
 272)IS
 C-MWL E-MWL
 2AKS7
 S o(KS
) m/z 306 272
 IS IS
 b m/z jgt
 (b))BNKS
 IS
 NB/ 2 gKS
) GST4 rS
 c GST5 2A[A
 b4(S4
 ε6 t(X
 10-30 b#I
 K8 GN
 IS Gb
 LCMS (I
 S qb m/z bE

1. C-MWL E-MWL SDR GST
 LCMS

/□ 2. MWL □ 4 □ (SDR3, SDR5, GST4 GST5) □
 □ LCMS □

Detected parent ion [M-H] ⁻ ; [HRMS, m/z]	Source	Retention time [min] ^[a]	Detected fragment ion ^[b] [m/z]	Detected parent ion [M-H] ⁻ ; [HRMS, m/z] ^[c]
500.1342	C-MWL	1.59, 1.94	482, 470, 464, <u>272</u> , <u>254</u> , <u>210</u> , <u>179</u> , <u>143</u> , <u>128</u>	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₁₆ S [GS-C ₁₀ H ₁₁ O ₄]
500.1318	E-MWL	1.52, 1.93	482, 470, 464, <u>272</u> , <u>254</u> , <u>210</u> , <u>179</u> , <u>143</u> , <u>128</u>	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₁₆ S [GS-C ₁₀ H ₁₁ O ₄]
530.1464	E-MWL	1.95	512, 500, 494, 383, <u>272</u> , <u>254</u> , 239, <u>210</u> , <u>179</u> , <u>143</u> , <u>128</u>	C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₁₁ S [GS-C ₁₁ H ₁₃ O ₅]
636.1857	C-MWL	2.31	363, <u>306</u> , <u>288</u> , <u>272</u> , 137	ND
678.1962	C-MWL	2.58	660, 648, 642, <u>272</u>	C ₃₀ H ₃₇ N ₃ O ₁₃ S [GS-C ₂₀ H ₂₁ O ₇]
678.1972	E-MWL	2.57	660, 648, <u>272</u>	ND
706.1913	E-MWL	2.51	688, 419, <u>272</u> , <u>254</u>	ND
738.2160	E-MWL	2.43	720, <u>306</u> , <u>272</u> , <u>254</u>	ND
856.2609	C-MWL	2.92	855, 838, <u>306</u>	ND
874.2701	C-MWL	2.56	856, <u>306</u> , <u>272</u>	C ₄₀ H ₄₉ N ₃ O ₁₇ S [GS-C ₃₀ H ₃₃ O ₁₁]
874.2723	E-MWL	2.56	856, 843, 838, 802, 782, 519, 466, <u>321</u> , <u>272</u> , <u>207</u> , <u>143</u> , 140	C ₄₀ H ₄₉ N ₃ O ₁₇ S [GS-C ₃₀ H ₃₃ O ₁₁]
932.3058	E-MWL	3.06	<u>306</u> , 305, <u>272</u>	ND
964.3091	E-MWL	2.55	963, 946, 782, 536, <u>306</u> , <u>272</u>	ND

[a] The MS chromatograms obtained from LCMS/MS analysis after enzymatic reactions with C- and E-MWLs are shown in Figure S9 in the Supporting Information. [b] The fragment ions derived from glutathione (Figure S8d in the Supporting Information) are underlined. [c] ND, not determined and GS, conjugated glutathione (elemental composition: C₁₀H₁₆N₃O₆S⁻).



(3) MPM4(b) 8 □
 SDR3 □ SDR5 □ GST3 □ GST4 □ GST5 b 5 b4 (STOG) [KS] □
 (□) C3-C6 S4 X, 96 □ guaiacylhydroxypropanone
 syringylhydroxypropanone Y

3 [z]1e □
 3e 2 □




- 1) **Ohta, Y.**, Hasegawa, R., Kurosawa, K., Maeda, A., Koizumi, T., Nishimura, H., Okada, H., Qu, C., Saito, K., Watanabe, T., Hatada, Y. (2017) Enzymatic specific production and chemical functionalization of phenylpropanone platform monomers from lignin. *ChemSusChem*, 10, 425-433 (17)
- 2) **Ohta, Y.**, Nishi, S., Hasegawa, R., Hatada, Y. (2015) Combination of six enzymes of a marine *Novosphingobium* converts the stereoisomers of β-O-4 lignin model dimers into the respective monomers. *Sci Rep.* 5, 15105 (15)

- 1) 2018 □ 4 □ 26 □
- 2) 2018 □ 3 □ 16 □
- 3) 2018 □ 1 □ 28 □
- 4) 2017 □ 6 □ 3 □
- 5) **Ohta, Y.**, Nishi, S., Hasegawa, R., Hatada, Y., Enzymatic cascade of a marine *Novosphingobium* cleaving β-O-4 linkages of a wood component, lignin, *Extremophiles* 2016, 2016 □ 9 □ 13 □
- 6) Maeda AH., Hasegawa. R., Kurosawa, K., Koizumi, T., Nishimura, H., Okada, H., Qu, C., Saito, K., Hatada, Y., Watanabe T., **Ohta, Y.**, Enzymatic Production of Functional Chemicals from Wood Lignin -New development of white biotechnology, *The 2nd Asia*




Research Node Symposium on Humanosphere Science (The 343rd Symposium for Sustainable Humanosphere), Kyoto University, Kyoto, JAPAN, 2016 □ 7 ▯ 19 □

7)  
□ □ 2016 □ 4 ▯ 22 □

57G p d □



8)  
□ 

43G9% □
2015 □ 11 ▯ 27 □

9)  


0 N. 2015 □ 10 ▯ 13 □

W0 □ 1 □

1)  
x 5 (B(642A)pQbw □
195 □

 " 4 ▯ 
□ 2016 □ 312 □ 185 ▯

4 9) °

(1) *

  §

8 HATADA, Yuji

d%268 

48 d4 □

8 M5

%2 □ 8 B □ 20399562

  % c % b 0 \ 2 8  M  b x  b 1. -
 \ b 03. - ö  - 6 M 0 x 2 c  - M