

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380180

研究課題名(和文)リグニンから新規プラットフォームケミカルの変換技術開発と高分子材料開発

研究課題名(英文)Production of novel platform chemicals from lignin by microbial function

研究代表者

中村 雅哉(Nakamura, Masaya)

独立行政法人森林総合研究所・きのこ・微生物研究領域・室長

研究者番号：50353793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：リグニン分解微生物*Sphingobium* sp. SYK-6株と芳香族化合物分解菌*Pseudomonas putida* KT 2440株の遺伝子機能を用いて、低分子リグニンから新規プラットフォームケミカルになり得るジカルボン酸化合物である2-pyrone 4,6-dicarboxylic acid (PDC)、及び3-carboxymuconolactone (3CML)の生産技術を確立し、得られたPDC、3CMLを基にした新たな高分子材料開発を行った。PDCからはポリアリレート系高分子へと展開することが出来た。3CMLからは高分子化の基本となるジクロリド誘導体、アミド誘導体を合成することが出来た。

研究成果の概要(英文)：We have produce 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC) and 3-carboxymuconolactone (3CML) as a platform chemicals with genes coding for vanillin dehydrogenase (lig V), vanillic acid demethylase (van AB), protocatechuic acid 4,5-dioxygenase (lig AB) and 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase (lig C) from the lignin degrading soil bacterium, *Sphingobium* sp. SYK-6, and protocatechuic acid 3,4-dioxygenase (pca HG) from aromatic compound degrader *P. putida* KT2440, 3-carboxy-cis,cis-muconate lactonizing enzyme gene (pca B) from *Neurpsora crassa* respectively. The PDC polyesters bearing the aromatic groups adjacent to the PDC nuclei exhibited high Td5 (5 wt% loss temperature), good enough to utilize them as thermoplastics. The 3-CML was converted into the corresponding acid chloride derivative, 3-CML dichloride and amid derivative with n-hexyl isocyanate respectively for polymerization.

研究分野：森林化学

 キーワード：リグニン プロトカテク酸3,4-ジオキシゲナーゼ 2-ピロン - 4,6-ジカルボン酸 3-カルボキシムコノ
 ラクトン バニリン プロトカテク酸4,5-ジオキシゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

化石資源の代替、温室効果ガス削減などを旨とした資源循環型社会の形成が 2002 年バイオマス・ニッポン総合戦略に謳われ、バイオマス資源活用に立脚した産業体系の創出が重要視されている。地球上に存在するバイオマス資源のうち最も多量に存在ものは植物系バイオマスで、その中の 90% を木質系バイオマスが占めている (賦存量 1 兆 6,500 億トン)。木質系バイオマスセルロース、ヘミセルロース、リグニンから構成され、セルロース、ヘミセルロースの利用技術は確立している。しかし、芳香族成分のリグニンは一部、セメント分散材等に利用されているだけで、殆どは焼却され熱エネルギーとして利用されるのみにとどまっている。しかし、リグニンは、化石資源に含まれる成分に類似の化合物から構成され、本来は非常に応用価値の高いものであるが、その複雑な化学構造のため均一な成分に分離、精製する事が難しく、バルクな利用として分散剤、凝集剤、土壌改良剤、紙・パルプ産業での燃料としてのみの利用にとどまり、リグニンから得られるファインケミカルスを基にしたマテリアル変換技術開発はほとんど進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

リグニンやタンニンなど複雑な化学構造を持つ芳香族バイオマス成分から、均一なプラットフォームケミカルを誘導し、高付加価値を持つ新規高機能材料を生産する新しい植物バイオマス利用技術を確立することである。

(1) リグニン分解微生物の多様な芳香族化合物代謝機能を代謝工学により再構成した新規バイオリクターを構築し、リグニン、タンニンなどから新規の特定代謝中間物質 3-カルボキシムコノラクトン (CML)、 β -ケトアジピン酸 (KAD)、2-ピロン-4,6-ジカルボン酸 (PDC) 等、有用中間物質に高収率変換する技術を確立する。

(2) CML、KAD、PDC を原料に新規な高機能材料を設計・合成して新しい用途開発を行う。CML、KAD、PDC は、2 つのカルボキシル基を有することから、それらの基を利用したポリエステル、ポリウレタン、ポリアミドを合成することが出来る可能性がある。

3. 研究の方法

(1) パルプ工場排水路から単離されたリグニン分解菌 *Spingobium* sp. SYK-6 株と芳香族分解菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株、*P. putida* PpY1100 株、糸状菌 *Neurospora crassa* を供試菌とした。

Spingobium sp. SYK-6 株からはバニリン脱水素酵素遺伝子 (*lig V*)、プロトカテク酸 4,5-ジオキシゲナーゼ酵素遺伝子 (*lig AB*)、4-カルボキシ-2-ヒドロキシムコノ酸-6-セミ

アルデヒドデヒドロゲナーゼ酵素遺伝子 (*lig C*) をクローニングした。

P. putida PpY1100 株からはバニリン酸デメチラーゼ酵素遺伝子 (*van AB*) をクローニングした。

P. putida KT2440 株からは、プロトカテク酸 3,4-ジオキシゲナーゼ酵素遺伝子 (*pca HG*) をクローニングした。

N. crassa からは、3-カルボキシ-cis,cis-ムコノ酸ラクトン化酵素遺伝子 (*pca B(E)*) をクローニングした。

lig V、*van AB*、*lig AB*、*lig C* を再構成した発現プラスミドをプロトカテク酸、分解・資化能を欠落した変異株 *P. putida* PpY1100 に導入して組換え微生物バイオリクターを構築してバニリン、バニリン酸、プロトカテク酸を出発物質とした PDC の発酵生産を行った。

lig V、*van AB*、*pca HG*、*pca B(E)* を再構成した発現プラスミドを *P. putida* PpY1100 に導入して組換え微生物バイオリクターを構築してバニリン、バニリン酸、プロトカテク酸を出発物質とした 3-CML の発酵生産を行った。

(2) 発酵生産により得られた、プラットフォームケミカルをベースに高分子化するための誘導体及び高分子化を試みた。

PDC のカルボン酸を塩素化するために過剰量の塩化チオニルをベンジルトリメチルアンモニウムクロライド存在下、ジクロロエタン溶液として還流した。還流後、溶媒を留去し、ヘキサンで再結晶化を行い、PDC ジクロライド化合物を得た。

PDC ジクロライド化合物のポリエステル化は各種フェニル基を有するジオール化合物と PDC ジクロライド化合物をトリメチルアミンに溶解して反応させることにより、ポリアリレート系高分子を得た。

PDC ジクロライド化合物とアジ化ナトリウム等でアジド化して PDC アジド化合物 (PDCAz) を得た。得られた PDCAz 化合物をクロロホルムに溶解し、熱処理によるクルチウス転移により PDC イソシアネート (PDCI) とした。

3-CML のカルボン酸を塩素化するために過剰量の塩化チオニルをベンジルトリメチルアンモニウムクロライド存在下、ジクロロエタン溶液として還流した。還流後、溶媒を留去し、ヘキサンで再結晶化を行い、3-CML ジクロライド化合物を得た。

3-CML を DMSO に溶解し、イソシアネート類としてヘキサメチレンジイソシアネート、触媒として 2-エチルヘキサン酸スズを添加して、室温で 24 時間攪拌して、ポリアミド化合物を得た。

また、ヘキサメチレンジイソシアネートの代わりにイソシアネート n-ヘキシルを用多反応も行いアミド化合物を調製した。

4. 研究成果

(1) 微生物機能を再構成したプラットフォームケミカルの発酵生産

①PDC の発酵生産

lig V、*van AB*、*lig AB*、*lig C* を再構成した発現プラスミド pVapolidVABC を構築し、*P. putida* PpY1100 に導入して組換え微生物バイオリアクターを構築した (図1)。

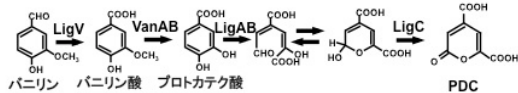


図1. pVapolidVABC を用いた PDC の発酵生産

組換え微生物バイオリアクターの発酵生産力増強のため発酵制御技術の検討を行い、PDC 生産力の大幅な改善を図った。

微生物のメタボローム解析情報を活用することにより、実験室スケールの培養 (5L 容培養器) での細胞密度と細胞活性の最適化のための発酵制御法を検討し、商業ベースに繋がる PDC 生産力 (培養液 1 リッター当たり 50g 以上/33h: 従来の 3 倍以上) へ増強させるための技術開発を行った。グルコースの添加とともに無機塩類および酵母エキスを連続的に添加した結果、菌体密度は従来の 4 倍 ($OD_{660}=80$) に上昇し、PDC 生産効率は大幅に上昇して商業ベースに繋がる十分なレベルである 100g/L を達成した。

一方、高密度培養発酵技術により大量に発酵槽内に蓄積する PDC は酸性条件下で、培養液中のナトリウムイオンと配位して極めて水や有機溶媒に解けにくい PDC ナトリウム塩を形成する。この現象が PDC の分離精製の大きな障壁となっていた。この課題を解決するため、培養液成分として加えるナトリウム塩をアンモニウム塩に変更すること、バイオリアクターに添加するバニリン酸をナトリウム塩からアンモニウム塩に切り替える方法を検討した。その結果、培地成分のアンモニア塩への変更によって組換え微生物の増殖は殆ど影響を受けない事、またバニリン酸アンモニウム塩を添加した場合も、バニリン酸 100g/L の PDC への完全変換を達成し有機溶媒での効率的抽出が可能となった。

②3-CML の発酵生産

lig V、*van AB*、*pca HG*、*pca B(E)* を再構成した発現プラスミド pKTVDHBG を *P. putida* PpY1100 に導入して組換え微生物バイオリアクターを構築した (図2)。バクテリア由来の *pca B* を用いると理論的には 4-CML が得られるはずであるが、4-CML が不安定なのか、ホストに用いた *P. putida* PpY1100 の 4-CML 代謝遺伝子が働いてしまうのか不明であるが、 β -ケトアジピン酸エノールラクトンが蓄積してしまうことが明らかとなり、真確生物 (*N. crassa*) 由来の *pca B(E)* を用いて

3-CML を発酵生産することとした。

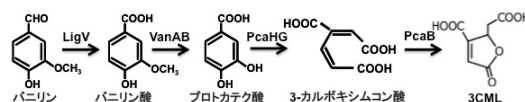


図2. pKTVDHBG を用いた 3-CML の発酵生産

基質添加から 26 時間で 3-CML への変換を確認した。酢酸エチルで抽出後、再結晶を行い高純度の 3-CML を得た。回収率は約 33% であった。また、発酵過程で生成する 3-カルボキシ-*cis,cis*-ムコン酸を酸性雰囲気下に置くことで、自発的に閉環して 3-CML が得られることも明らかとなった。

(2) 発酵生産により得られた、プラットフォームケミカルをベースに高分子化するための誘導体及び高分子化

①PDC をベースにした高分子開発

PDC を多数の芳香環から成るポリアリレート系高分子へと展開した (図3)。PDC ジクロライド化合物を各種ジオールと重縮合させ、ポリアリレート系高分子を得た。図3に示す通り、Ar 部の構造は芳香環部位ないしアルキレン部位から成り、その比率により得られる高分子の熱的性質が大きく変化する。特に炭素数 6 以上のアルキレン鎖を芳香環の間に持つ高分子は 100 ~ 180 °C 付近に軟化点を示すため、熱溶融による加圧成型ないし紡糸成型が可能であった。引張応力-歪挙動を評価したところ一般的なプラスチックとして利用するに値する力学特性を示した。加えて 290 ~ 350 °C 付近に 5% 質量減少温度を持つことから PDC 含有ポリアリレート系高分子は一般的にエンジニアリングプラスチックと定義される高分子群と同等の耐熱性を示すことが明らかとなった。以上の結果は PDC の高機能グリーンプラスチックとしての応用可能性を提示するものである。

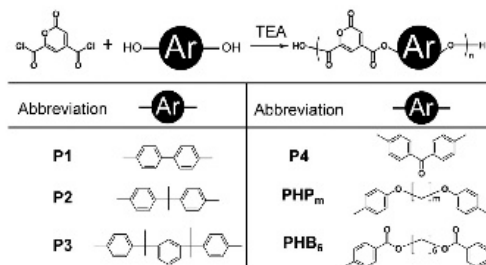


図3. PDC アリレートの構造

PDCAz と様々な炭素数のジオール (アルコール) を結合させることで、炭素数に応じた様々な物性を有する PDC ポリウレタンを製造した。ジオールとしてオリゴテトラヒドロフラン (オリゴ THF) を用いた PDC ポリ

ウレタンから溶液キャスト法により調製したキャストフィルムの場合、THFが3量体の場合は柔軟かつ強靱なエラストマーが、約9量体の場合は柔軟性、伸縮性に富む、市販品のスパンデックスに似たエラストマーとなり(図4)、約14量体の場合は柔軟なゴム状のエラストマーとなった。

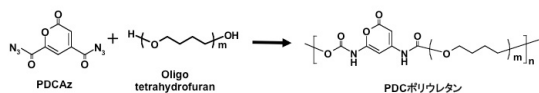


図4. PDC ポリウレタンの構造

②3-CML をベースとした高分子開発

PDC 同様に 3-CML のカルボキシル基の酸クロライド化を行い、重縮合系モノマーとして、ジオールの反応または 3-CML そのものとジイソシアネートの反応により 3-CML を単位として組み込んだ高分子の合成を行った。その結果 3-CML を組み込んだ高分子の合成が確認され、PDC とは異なる植物バイオマス単位を組み込んだ新規グリーンプラスチックとしての展開が示された。また 3-CML をジカルボン酸分子と見なし、剛直円筒状無機高分子「イモゴライト」の架橋剤として適用した。イモゴライトと 3-CML 混合の結果、イモゴライトの網目構造から成る新規ハイドロゲルが得られた。本ゲルはカルボン酸とイモゴライトの水素結合から成るため、衝撃に応じたネットワークの可逆的崩壊/再構築を経たチクソトロピー性挙動(可逆的ゾル/ゲル転移)を示し、3-CML を構成単位とした新規刺激応答性素材として、その材料応用が見込まれる。

3-CML とヘキサメチレンジイソシアネートからポリアミドの合成を行った(図5)。

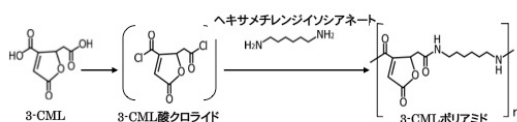


図5. 3-CML ポリアミドの構造

3-CML ポリアミドは、5%重量減少温度=174℃、20%重量減少温度=258℃、50%重量減少温度=441℃を示し、高耐熱性であることが示されたので、生分解性を有する、高耐熱性繊維、プラスチック材料としての使用が想定される。一方、3-CML とイソシアネート n-ヘキシルとを反応させ、N-ヘキシル-2-[2-(ヘキサアミノ)-2-オキソエチル]-5-オキソ-2,5-ジヒドロフラン-3-カルボキサミドを得た(収率 11.9%)。本アミド誘導体は医薬品に使用できる可能性があるとともに 3-CML のラクトン環を開環し重合を行うことでポリエステル等のポリマーや誘導体に変換することができ、新規生分解性プラスチックを

製造することが可能となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

- ① 中村 雅哉, 大塚 祐一郎, 政井 英司, 敷中 一洋, 重原 淳孝, 片山 義博, リグニンの微生物代謝中間体 2 ピロン 4, 6-ジカルボン酸 (PDC) の生産と利用技術開発、木材工業技術短報、査読有、Vol.32、No.1、2014、pp.1-11
- ② Keisho Okura, Ryuichi Tamura, Kiyotaka Shigehara, Eiji Masai, Masaya Nakamura, Yuichiro Otsuka, Yoshihiro Katayama, Yoshiaki Nakao, Synthesis of Polysubstituted Benzenes from 2-Pyrone-4,6-dicarboxylic Acid, Chemistry Letters, 査読有、Vol.43、No.8、2014、pp.1349-1351
- ③ 敷中 一洋, 重原 淳孝, 植物バイオマス「リグニン」由来低分子”PDC”を用いたバイオベース材料、接着の技術、査読有、Vol.33、No.2、2013、pp.11-16
- ④ Kazuhiro Shikinaka, Yoshiki Hashimoto, Shinya Kajita, Eiji Masai, Yoshihiro Katayama, Masaya Nakamura, Yuichiro Otsuka, Seiji Ohara, Kiyotaka Shigehara, Thermoplastic Polyesters of 2-Pyrone-4,6-Dicarboxylic Acid (PDC) Obtained from a Metabolic Intermediate of Lignin, J. Soc. Fiber Sci. Technol.、査読有、Vol.69、No.2、2013、pp.39-47
- ⑤ 中村 雅哉, 大塚 祐一郎, 政井 英司, 敷中 一洋, 重原 淳孝, 片山 義博, リグニンからバイオプロセスにより誘導されるグリーンケミカルス 2 ピロン 4, 6-ジカルボン酸 (PDC) の生産と利用技術開発、AROMA RESEARCH、査読有、Vol.13、No.4、2012、pp.323-327

[学会発表](計6件)

- ① Masaya Nakamura, Yasumasa Miyazaki, Yuichiro Otsuka, Kazuhiro Shikinaka, Yoshihiro Katayama, Production of novel platform chemicals from Aromatic wood biomass by Microbial fermentation, Australian Society for Microbiology Annual Scientific Meeting, 2014年7月8日、Melbourne, Australia,
- ② Yuichiro Otsuka, Yun Qian, Lam Thieu, Masaya Nakamura, Barry Goodell, Production of Novel Platform Chemicals from Aromatic Wood Biomass by Microbial Fermentation, Macromolecules and Interfaces Institute's Technical Conference and Review, 2013年10月24日、Blacksburg, USA
- ③ Masaya Nakamura, Yuichiro Otsuka, Kazuhiro Shikinaka, Kiyotaka Shigehara, Yoshihiro Katayama, Functional metabolic

- intermediate (2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid) from lignin、14th International Waste Management and Landfill Symposium、2013年9月30日～10月3日、Sardinia、Italy
- ④ 敷中 一洋、金田 恵介、片山 義博、政井 英司、中村 雅哉、大塚 祐一郎、大原 誠資、重原 淳孝、リグニン生分解中間物PDCが形成する自己組織化材料、第62回高分子討論会、2013年9月12日、金沢大学、金沢
- ⑤ Masaya Nakamura、Yuichiro Otsuka、Eiji Masai、Kiyotaka Shigehara、Kazuhiro Shikinaka、Yoshihiro Katayama、2-PYRON-4,6-DICARBOXYLIC ACID AS A SOURCE OF GREEN-PLASTICS FROM LIGNIN-DERIVED STABLE METABOLIC INTERMEDIATE、International Symposium on Energy From Biomass and Waste、2012年11月14日、Venice、Italy
- ⑥ 敷中 一洋、橋本 佳樹、政井 英司、大塚 祐一郎、中村 雅哉、大原 誠資、片山 義博、重原 淳孝、リグニン生分解中間物「PDC」由来エンジニアリングプラスチックフィルム、第61回高分子討論会、2012年9月20日、名古屋工業大学、名古屋

〔図書〕(計1件)

- ① 中村 雅哉 他、シーエムシー出版、リグニン利用の最新動向、2013、235

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 雅哉 (NAKAMURA Masaya)
森林総合研究所・きのこ・微生物研究
領域・室長
研究者番号：50353793

(2) 研究分担者

敷中 一洋 (SHIKINAKA Kazuhiro)
東京農工大学・工学系研究科・助教
研究者番号：00507189

片山 義博 (KATAYAMA Yoshihiro)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：10214339

大塚 祐一郎 (OTSUKA Yuichiro)
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