

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780172

研究課題名(和文)木質系芳香族バイオマスから微生物発酵で生産される選択的セシウムキレート剤の研究

研究課題名(英文) Production and properties of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid biosynthesized from lignin for use as a unique platform chemical and as an alkali metal chelator for disaster remediation

研究代表者

大塚 祐一郎 (Yuichiro, Otsuka)

独立行政法人森林総合研究所・バイオマス化学研究領域・主任研究員

研究者番号：80455261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：福島第一原子力発電所の事故により、現在多量の放射能汚染水が生産され続けている。本研究により、我々が独自に開発した組換え微生物発酵によって生産される2-ピロン4,6-ジカルボン酸は、同じアルカリ金属の中でも特にCsと選択的に錯体を形成して沈殿を生じることが明らかとなった。またその錯体構造をX線結晶回折により決定し、その結果Naとの錯体と比較して水分子が配位せずより巨大な分子となることでより沈殿が生じやすくなることを明らかにした。また、PDCをアンモニア処理してバレロラクトンに変換するとゲル担体へ化学的に結合できることがわかり、高効率放射性Csを除去するゲル担体の合成経路を設計することができた。

研究成果の概要(英文)：We have established a production system for 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC) as a novel platform chemical from lignin via fermentation by genetically-modified bacterial. We have also successfully synthesized various polymers such as polyesters, polyamides and polyurethanes from PDC. Unexpectedly, we have also now discovered a unique function of PDC as an alkali metal chelator. In this research, PDC preferentially chelated ¹³³Cs as compared to other Alkali metals. ¹³³Cs was precipitated as a Cs-PDC complex. PDC was able to remove about 90% of Cs in a mixed Na-Cs solution, even when the concentration ratio of Na and Cs was 10 to 1. Comparing the structures of the Cs-PDC and Na-PDC complexes, the Cs-PDC complex does not contain water and it is larger than the Na-PDC complex. The size and hydrophobic nature of the Cs-PDC complex explains why it more readily precipitates in water compared to the Na-PDC complex.

研究分野：代謝工学、微生物学、木材化学

キーワード：放射性セシウム 除染 代謝工学 2-ピロン4,6-ジカルボン酸 リグニン キレーター Spingobium 錯体化学

1. 研究開始当初の背景

森林大国日本で膨大に存在する木質バイオマスのうち、特に高効率な利用方法が確立されていないリグニンやタンニンなどの芳香族バイオマスを利用する技術として、図1に示すような組換え微生物発酵技術を用いた2-ピロン-4,6-ジカルボン酸 (PDC) というポリマー原料の生産技術開発を行ってきた。このシステムにより芳香族バイオマスから低分子化処理によって得られるバニリン・バニリン酸といった成分から約36時間でほぼ100%の変換率でPDCを生産することが出来るようになってきている。また最近では2000Lの大型タンクを用いたプラントレベルでの試運転も行っている。この技術によって得られたPDCはさまざまなポリマーの原料として使用でき、フィルム・プラスチック・ポリウレタン・強力なエポキシ接着剤などさまざまな製品が開発されてきており、木質系芳香族バイオマスの次世代型利用技術として期待されている。

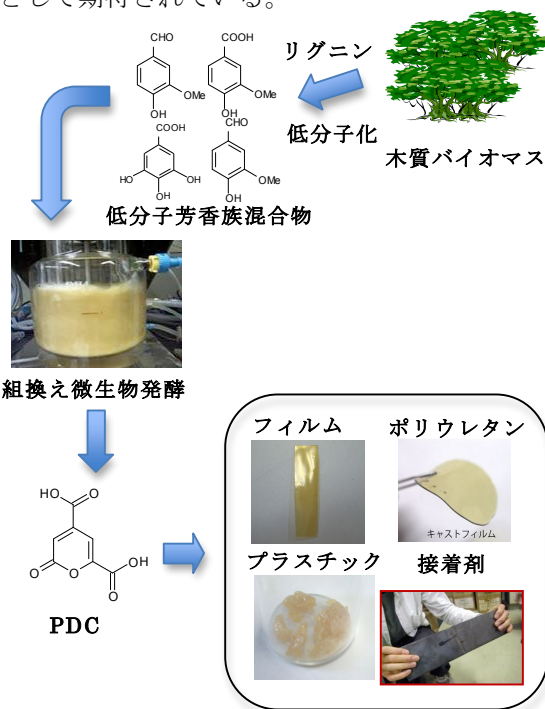


図1.木質バイオマスから微生物発酵によるPDCの生産

この木質系芳香族バイオマスからPDCを発酵生産する際に、培養液中のナトリウム (Na) 濃度が高い場合に、PDCがNaと錯体を形成する場合は発酵生産の現場では経験上知られていた。このPDC-Na錯体の構造は道信らにX線回折分析によって明らかにされた (Michinobu et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2007, 80(12):2436-2442)。その結果PDC-Na錯体は2分子のPDCがカルボニルの位置でNaを挟むような形であることがわかり、PDCは非常に珍しいアルカリ金属キレーターとしての機能も持ち合わせていることが明らかとなった(図2)。そこで、他のI族のアルカリ金属とPDCの相互作用

も検討したところ、セシウム (Cs) とPDCは特に強力に結合して錯体の結晶沈殿を生じることが明らかとなっていた (図3)。

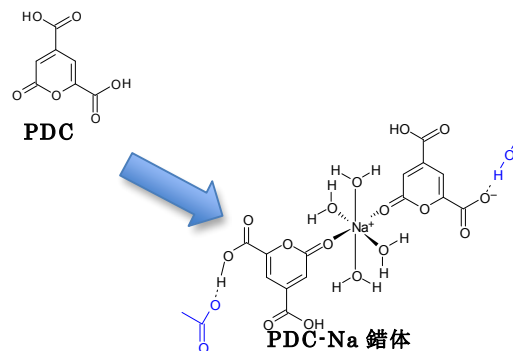


図2.PDC-Na 錯体の構造



- ①1%Cs 水溶液 + PDC
- ②1%Cs 水溶液 + PDC

図3.PDCはアルカリ金属の中でも特にCsと優先的に錯体を形成し沈殿する

2. 研究の目的

これまでに明らかにされた結果を総合すると、PDCを用いれば水溶液中に溶けたCsを沈殿として回収できることを示唆している。このことは現在、深刻な問題となっている東京電力福島第一原発の事故によって放出された放射性セシウムの回収、特に炉心の冷却によって多量に生成される汚染水の浄化にPDCが貢献できる可能性を示している。現在のところ放射性セシウムを化学的に吸着できる化合物としては仏アレバ社が採用するフェロシアン化合物が知られているが、この化合物は劣化するとシアン化合物となるためそれ自体の環境負荷が懸念される物質である。PDCがこれに代わることが出来れば、PDC自体が木質バイオマスから土壌細菌の分解によって作られるクリーンな物質であることから、環境負荷が少なく、大胆な大量投与などの処理も可能になると考えられる。よって本申請課題では、木質系芳香族バイオマスから発酵生産したPDCを用いて、PDC-Cs相互作用の基礎データを収集することによって、日本発・林産分野発の放射性セシウム浄化技術の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

PDCは人工的に合成することが困難であり、全く市販されていないことから、木質系芳香

族バイオマス中から低分子化処理した際に主要成分として得られるバニリン・バニリン酸等を原料として、既に作成している組換え微生物を用いて PDC の発酵生産を行い、発酵液から PDC を抽出・精製して実験に使用する必要がある。

バニリン・バニリン酸から PDC へと変換する代謝遺伝子群を組み込んだ *Pseudomonas putida* PpY1100 組換え細菌を 10L スケールのジャーファーメンターにて高密度培養し、そこに 1L あたり 50g のバニリン・バニリン酸等を添加し、PDC 発酵を行った。濃塩酸を添加し発酵を停止した後、連続溶媒抽出により PDC を抽出した。抽出した PDC は乾燥して粉末状にした後、再結晶法により精製した。

発酵生産した PDC の Cs 捕捉能を明らかにするために様々な濃度の Cs 水溶液を作成し、そこに PDC を添加して生じた沈殿をフィルターにて除去し、水溶液に残存する Cs 量を ICP-MS 分析装置を用いて分析した。

PDC-Cs 錯体の構造を明らかにするために、様々な条件を検討して PDC-Cs 結晶を作成した。得られた PDC-Cs 結晶を用いて X 線結晶回折により錯体の構造を分析した。

PDC の 2 つのカルボキシル基および 1 つのカルボニル基を保持したまま、担体へ化学的に結合するために、様々な修飾方法を検討した。1%アンモニア水中に PDC を溶解し反応させることで高効率にピロン環の環内酸素が窒素に置換されたバレロラクトンが生成することが HPLC および GC-MS, NMR 分析により示された。

4. 研究成果

実験に使用する PDC を生産するために、バニリン・バニリン酸から PDC へと変換する代謝遺伝子群を組み込んだ *Pseudomonas putida* PpY1100 組換え細菌を 10L スケールのジャーファーメンターにて高密度培養し発酵試験を行った。およそ 3 6 時間ほどで添加したバニリン・バニリン酸の 99%以上が PDC へと変換された。最終的に一回の発酵あたり 200~250g の PDC が得られた。

得られた PDC を用いて PDC 水溶液による Cs 捕捉試験を行ったところ、ナトリウム塩が 10 倍モル溶解した溶液中においても高効率かつ選択的に Cs を補足できることが明らかとなり、ナトリウムを多く含む汚染水においても有効であることが示唆された。

組換え微生物発酵により得られた PDC を再結晶処理を繰り返すことにより高純度 PDC を作成した。この高純度 PDC を用いて PDC-Cs 錯体結晶を作成し、X 線結晶回折により構造を特定した。その結果、PDC-Cs 錯体は 2 つの Cs 原子を 12 の PDC 分子が取り囲むように相互作用し、巨大かつ複雑な錯体を形成していることが明らかとなった。また、PDC-Na 錯体はその錯体中に 4 つの水分子を配位する水和物であったが、PDC-Cs 錯体は水分子を配位しないことが明らかとなり、より

疎水的で沈殿を生じやすいことが明らかとなった。しかし、500mM の高濃度 PDC 水溶液を用いても 100ppm 程度の Cs までには捕捉することが出来るがそれ以上低濃度になると、錯体を形成できなくなり、除去できないことが示された。

PDC 単体では低濃度 (10ppm 以下) に溶解した Cs を効率よく捕捉することができないことが明らかとなったため、PDC をぶら下げのような構造で高密度に固定した担体を合成してアフィニティーカラムを作成することが必要であると考えられた。しかし、本研究で明らかにされた PDC-Cs 錯体の構造から PDC の 2 つのカルボキシル基およびカルボニル基すべてが Cs と相互作用していることが明らかとなっている。そのため、そのままでは PDC を担体と結合させる足がかりが無い場合、合成は難しいと思われた。様々な PDC 修飾試験の結果、PDC をアンモニアと反応させることでピロン環の環内酸素を窒素に置換したバレロラクトンに変換可能であることが明らかとなった。このことから分子内の 2 つのカルボキシル基及び 1 つのカルボニル基を保存しつつ、バレロラクトンの環内窒素を足がかりに、担体へと化学的に結合させることができるようになった。また、文献調査とバージニア工科大学のグループとの議論により PDC から変換したバレロラクトンのある程度自由に動けるような形でぶら下げた構造のゲル担体を合成する合成経路の設計ができた。

今後、設計した合成経路で実際にゲル担体を合成し、高効率かつ選択的放射性セシウム除去カラムを作成したい。

以上の結果をチリ共和国で行われた Lignobiotech III にて発表し、ポスターアワードを獲得した。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

Yuichiro Otsuka, Masaya Nakamura, Tomonori Sonoki, Yun Qian, Barry Goodell, Hironori Ogata

Production of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid as a platform chemical and a unique alkaline metal chelator from Lignin and its properties.

Proceedings of 3rd Symposium on Biotechnology Applied to Lignocelluloses, p. 154

Lignobiotech III, Concepcion, Chile

2014 年 10 月 26~29 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 放射性セシウム処理システム

発明者: 大塚祐一郎、中村雅哉、伊藤優子、大原誠資、緒方啓典、ジーン フレデリック デラ グェバ ガガベ、政井英司

権利者：独立行政法人森林総合研究所、法政
大学、長岡技術科学大学
種類：特許
番号：特願 2013-042747
出願年月日：2013 年 3 月 5 日
国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 祐一郎 (Yuichiro Otsuka)
独立行政法人森林総合研究所 バイオマ
ス化学研究領域 主任研究員
研究者番号：80455261