

微生物機能を用いたリグニン低分子化芳香族化合物からの新規ポリマー原料の生産と高機能性ポリマー開発への挑戦

Production of Novel Polymer-Based Material from Lignin Derivatives by Microbial Function

大塚 祐一郎^{1*}, 中村 雅哉¹, 大原 誠資¹, 片山 義博²
YUICHIRO OTSUKA, MASAYA NAKAMURA, SEIJI OHARA, YOSHIHIRO KATAYAMA

重原 淳孝², 政井 英司³, 福田 雅夫³
KIYOTAKA SHIGEHARA, EIJI MASAI and MASAO FUKUDA

¹ 独立行政法人森林総合研究所 〒305-8687 茨城県つくば市松の里1
² 東京農工大学大学院生物システム応用科学研究所 〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16
³ 長岡技術科学大学工学部 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1

* TEL: 029-829-8282 FAX: 029-873-3797

* E-mail: yotuka@ffpri.affrc.go.jp

¹ Department of Applied Microbiology, Forestry and Forest Products Research Institute, 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan

² Graduate School of Bio-Applications and Systems Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Nakamachi, Fuchu, Tokyo 184-8588, Japan

³ Faculty of Engineering, Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomiokamachi, Nagaoka, Niigata 940-2188, Japan

キーワード: リグニン, *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸, 代謝工学, バイオマテリアル
Key words: lignin, *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, 2-pyrone 4,6-dicarboxylic acid, metabolic engineering, bio-material

(原稿受付 2006年10月19日/原稿受理 2006年11月25日)

1. はじめに

21世紀に入ってから地球規模で環境調和型社会・資源循環型社会の確立が盛んに叫ばれ、世界各地で様々な取り組みや研究が行われている。この中で化石資源からの脱却が特に重要な課題として議論されている。20世紀における化石資源の利用は産業を飛躍的に押し上げ、我々の生活を豊かなものにしてくれた。しかし、我々の生活圏とは隔離された地下深くに存在する化石資源を掘り出し、利用することは CO₂ の増加や環境破壊など様々な問題を引き起こしている。この問題を解決する手段として注目を集めているのが、バイオマス資源の利用である。バイオマスは我々の生活圏の中で生産・分解を繰り返し、循環している。したがって、我々がその中で利用と廃棄を繰り返しても、その総量は変化しないため、環境にやさしい資源循環型の社会が構築できると考えられている。

バイオマス資源のうち地球上で最も多量に存在するのは植物バイオマスである。地球上における総陸地面積の30%は森林で覆われており、全バイオマスの90%に相当する1兆6500億トンのバイオマスが蓄積しているといわれている³⁴⁾。毎年地球上では約1500億トンのバイオマスが生産されるが、その内の約1000億トンは陸上におい

て生産されている。陸上で生産されるバイオマスの内、約650億トンは森林地帯にて、また150億トンは草地にて生産されており、このことから植物バイオマスとしては年間約800億トンものバイオマスが生産される。

植物バイオマスはこれまでに我々の生活において、木材、紙として昔から利用されてきた。この植物バイオマスを分子レベルで高度に利用することができれば、最終的には石油由来製品の95%までカバーし得るとの報告が近年なされている⁹⁾。さらに Goldstein の報告では、現在生産されている石油化学由来の製品(プラスチック、合成繊維、合成ゴム等)を植物バイオマスから製造する場合、変換効率、工程ロス等を換算し、目的物質の3.25倍の森林資源でまかなう事が可能であるとしており、年間30~40億トンの原油採掘量に比較して、植物資源の年間生産量が約800億トンであるということから、その量的ポテンシャルは十分なものを秘めていると考えられる。

植物バイオマスの内訳を見てみると、その90%以上が細胞壁成分で占められている。その細胞壁成分のうち、約40%がセルロース、約20~30%がヘミセルロース、15~30%がリグニンで構成されている(図1)。このうち、セルロース、ヘミセルロース等の多糖類においては、紙やパルプの原料、キシリトール等の甘味料や医薬品等

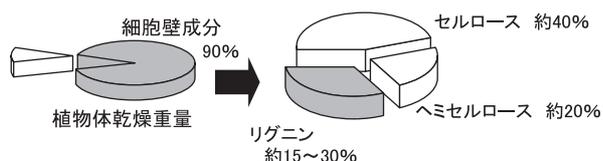


図1. 植物バイオマス。

植物体乾燥重量の90%以上を細胞壁成分が占める。また、細胞壁成分のうち、セルロースが40%、ヘミセルロースが20%、リグニンが15~30%を占める。

様々な分野で高度な利用技術が確立されている。また、近年ではこれら多糖類から燃料用アルコールを生産する技術開発が盛んに行われている^{2,6,11,22)}。このように、植物バイオマスの主要構成成分のうち、セルロース、ヘミセルロース等の多糖類は十分利用されてきているにもかかわらず、15~30%を占めるリグニンについては、製紙工場において燃料として利用されている以外はそのごく一部が香料として利用されているのみで、ほとんどは廃棄されている現状にある。

本総説においては、この未利用バイオマス資源であるリグニンに焦点を当て、我々の研究グループが提案する次世代型リグニン利用技術について述べていきたい。

2. リグニン及びこれまでの利用技術

リグニンは地球上で最も多量に存在する芳香族高分子バイオマスであり、自然界に供給される芳香族化合物の大半は植物リグニン由来であると考えられている。しかし、その膨大な存在量にもかかわらず、これまでリグニンの高度利用技術はほとんど確立されていない。その原因としては、リグニンの構造の複雑さにある。自然界に存在するリグニンは、コニフェリルアルコール、シナピルアルコール、*p*-クマリルアルコールの3種類のモノリグノールがペルオキシダーゼの脱水素反応によって生じたフェノキシラジカル共鳴体が重合して生成し、3次元網状構造を持つ。その構造は安定なC-C結合やC-O-C結合からなるために非常に難分解性である。図2にリグニンのモデル構造を示す。このように、リグニンは非常に複雑な高分子構造を形成しているために、利用技術が確立されてこなかったといえる。しかし、近年ではこのリグニンの高度利用を目的とした様々な研究開発が行われている。

製紙工場などにおいては、パルプを生産する際に多量のリグニンが分離される。クラフトパルプ法によって生成したクラフトリグニンはそのまま燃焼・廃棄することによりエネルギー回収されている。サルファイトパルプを生産することにより生成するリグニンスルホン酸は、コンクリート減水剤や染料分散剤としての利用が多いが、近年では鉛蓄電池の負極添加剤等高付加価値を狙った利用法の開発も進んでいる³⁵⁾。しかし、これらの利用法は製紙過程における副産物としてのリグニンスルホン酸に対して行われている利用研究であり、化学修飾によってある程度の付加価値をつけることには成功しているが、優れた特性を持つ物質の開発には至っていない。

近年では膨大な未利用バイオマスとして、リグニンをターゲットにした利用研究も盛んに行われてきている。

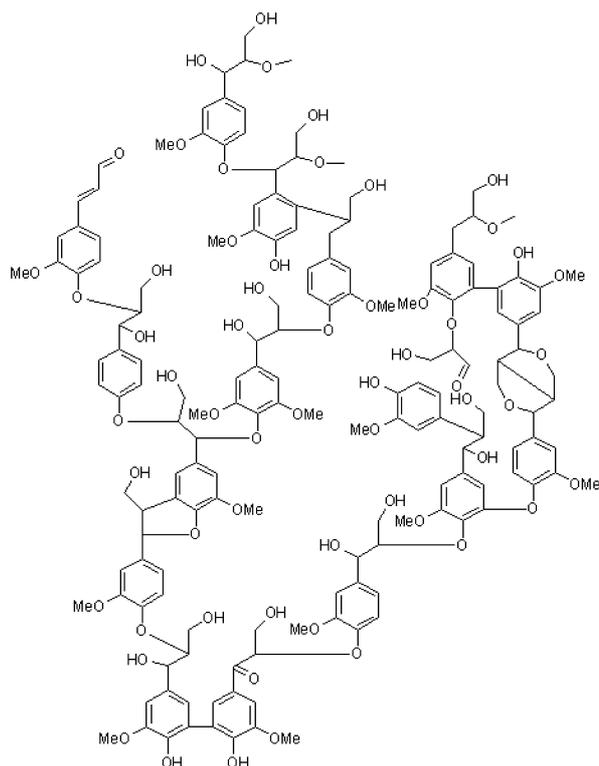


図2. リグニンのモデル構造。

リグニンはモノリグノールのランダムな脱水素重合によって生成されるために、C-C結合やC-O-C結合を多く含む非常に複雑な三次元網状構造を形成している。

その中の代表的な研究としては、船岡らの相分離系変換システムからの溶媒抽出操作により得られるリグノフェノールの応用がある。具体的には、任意のフェノール物質を添加した植物細胞壁成分（リグニンと多糖類の複合体）に72%硫酸を添加し、攪拌することにより、セルロースを水相に、リグニンを添加したフェノール相に移行させ分離する。このとき添加したフェノール物質と酸水溶液の境界面での作用により1,1-ビス(アリアル)プロパン型構造を基本ユニットとするリグノフェノールが生成する(相分離系変換システム)。これにより、フェノール相を回収することによりリグノフェノール画分を容易に抽出・分離することが可能となるだけでなく、添加するフェノール物質の構造を変化させることにより、得られるリグノフェノールの機能性にバリエーションを持たせることが可能である。船岡らはこの方法により、様々なリグノフェノールを作成し、コーティング剤、機能性塗料、バイオポリエステルとの複合プラスチックなどの開発に取り組んでいる³⁶⁾。

また、この他にリグニンの利用を目的として Xiang らの報告³³⁾にあるようなリグニン低分子化処理技術の開発もいくつか行われている。彼らの報告では、アルカリ条件下での酸化分解により、高分子芳香族物質であるリグニンを高い割合で低分子化することができ、バニリン、シリングアルデヒド、バニリン酸、シリング酸に変換することができるが、得られた芳香族混合物を高度に利用するシステムの確立には至っていない。

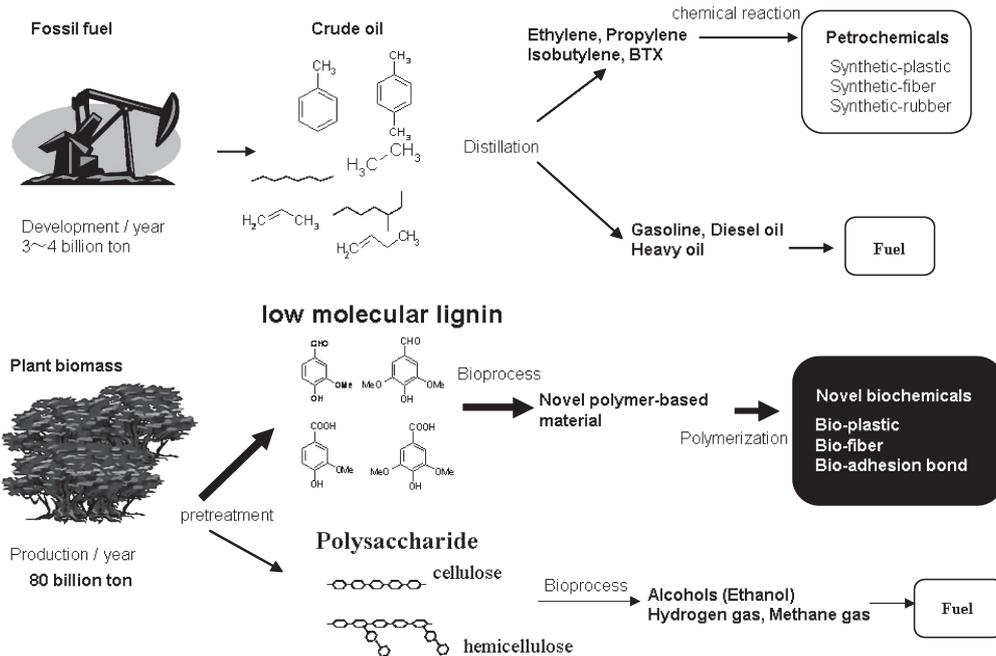


図3. 植物バイオマスの高度利用戦略。

植物バイオマスから多糖類とリグニンを分離し、多糖類からは発酵によりアルコールや水素ガス・メタンガス等のバイオ燃料に、リグニンからは低分子化処理した後、微生物発酵によりポリマー原料となる物質を生産できれば、化石資源の高度利用システムに匹敵するバイオマス高度利用技術が確立できると考えられる。

3. 次世代型リグニン高度利用戦略

以上のことから、これまでに行われてきたリグニン利用研究は、製紙過程で発生するリグニスルホン酸やリグノフェノール等があるが、これらはいずれも高分子芳香族物質であるリグニンを高分子物質のまま、その物性を保持しつつ利用する方法である。これらの利用技術は、リグニンをリグニンとしての優れた特性を生かしつつ、さらに化学修飾により高付加価値をつけ利用する技術であるが、逆にリグニンとしての特性に縛られた限定的な利用技術になりかねないとも言える。それでは、膨大に存在する未利用バイオマスであるリグニンを、高度に利用する技術としてどのような観点で開発していく必要が有るのだろうか？我々の生活において、現在工業的に非常に高度に利用されている化合物を考えると、圧倒的に石油由来の物質が多いことがわかる。図3に示すように、地中深くから採掘された原油は様々な有機物の混合物であるが、蒸留精製によりそれら一つ一つが精製され、それらを高度に利用するシステムが確立している。特に燃料として使用できない芳香族物質混合物を高度に利用できるようになったのは、この蒸留精製システムが大きく貢献している。すなわち、石油が高度に利用されている最大の要因は、混合物から物質の一つ一つを化成品の原料として利用可能なまでに精製し、そこから自由に設計・合成が可能であるという点にある。従って、我々はこの石油の高度利用技術に倣って、例えば Xiang らが報告しているリグニン低分子化技術³³⁾によって生成するリグニン低分子化芳香族混合物をファインケミカル製造の原料として利用可能な物質に変換・生成することができれば、リグニンの高度利用が可能になると考えた。そこで、芳香族物質を分解する微生物に着目した。土

壤中に存在する無数の微生物群の中には、低分子化リグニン芳香族混合物を網羅的に資化し、二酸化炭素と水にまで完全に分解できるバクテリアが存在する^{3,4,10,16,20,21,27)}。これらのバクテリアは、リグニン由来の芳香族物質を対象にした代謝機能を長い進化の過程で獲得してきた。これらバクテリアは、リグニン関連の芳香族物質を複雑な代謝経路で分解してエネルギーを得るだけでなく、生命活動の維持に必要な DNA やタンパク、脂質などを合成している。すなわち、これらのバクテリアは、リグニン低分子化芳香族物質を我々が考えもつかないような複雑且つ精密な代謝システムにより高度に利用しているといえる。もし、このような微生物機能を代謝工学技術により利用することができれば、リグニン低分子化芳香族混合物から有用な物質を生産・精製することができると期待される。そして、それにより、これまで成し遂げられなかったリグニンの高度利用技術が確立される可能性も考えられる。また、近年植物バイオマス由来のセルロース・ヘミセルロース等の多糖類からの微生物発酵によるバイオ燃料生産技術の開発が盛んに行われている。さらにリグニン低分子化芳香族混合物からポリマー原料となる物質を生産することができれば、図3に示すように、膨大な存在量を誇る植物バイオマスから、石油の高度利用技術に代替できるバイオマス利用技術が確立できると考える。

4. リグニン低分子化芳香族混合物分解細菌 *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6

S. paucimobilis SYK-6 株は、パルプ廃液中から 5,5'-dehydrodivanillic acid (DDVA) の分解菌として単離されたグラム陰性細菌である。DDVA はビフェニル型の

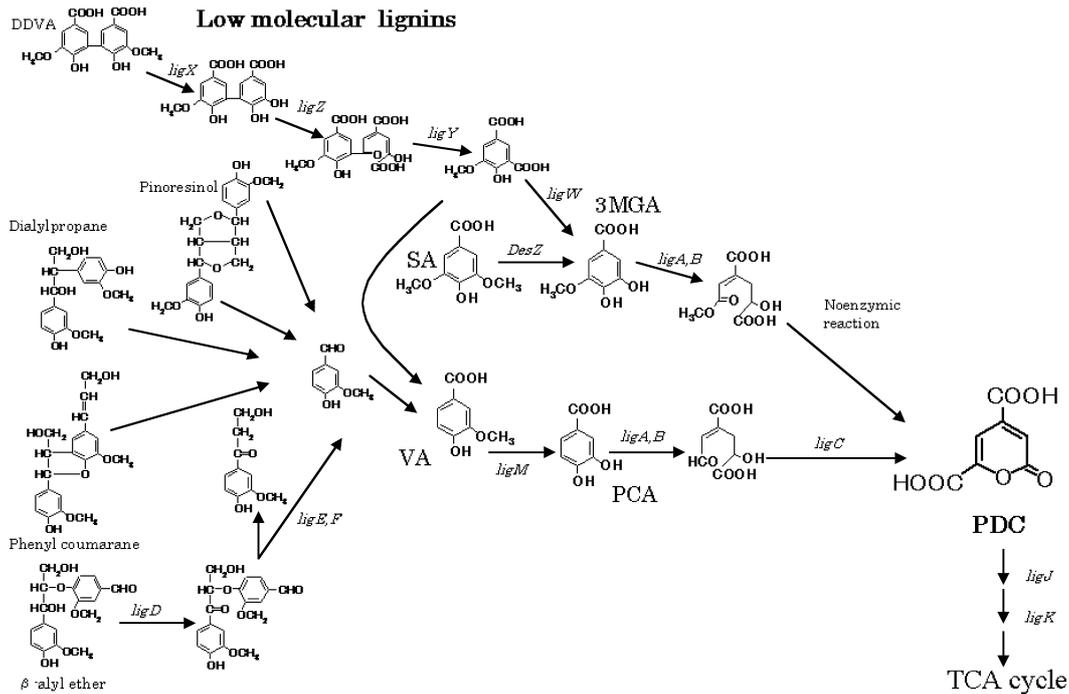


図4. *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 の分解代謝経路。

既に獲得及び解析されている機能遺伝子は矢印に示している。SYK-6 は様々なリグニン由来の二量体・単量体芳香族化合物をこごとく PDC を経由して分解・資化することができる。

リグニンモデル化合物であり、縮合型構造のため難分解性とされている。その後、分解能の解析が行われた結果、*S. paucimobilis* SYK-6 株は、リグニン由来の単量体でありシリング骨格の核であるシリング酸 (SA)、グアイアシル骨格の核であるバニリン酸 (VA) をはじめ、二量体化合物であるビフェニル、β-アリアルエーテル、ジアリアルプロパンなど様々なリグニンモデル化合物を炭素源として生育できることが明らかとなった^{16,23,24}。さらに各リグニンモデル化合物の分解経路が解明され、β-アリアルエーテル型二量体化合物グアイアシルグリセロール β-グアイアシルエーテルの分解機構においては、政井らの研究により Ca-dehydrogenase (*ligD*) によって Ca 位がカルボニル型に変換された後、β-etherase (*ligE, F*) により特異的に β-アリアルエーテル結合が切断されることが明らかとなった¹²⁻¹⁵。近年では SYK-6 のゲノム上には立体異性体特異的な複数の β-etherase が存在することが判明し、その機能についても詳細に解析されている¹⁸。また、4,5-cleavage pathway の律速となる VA, SA に対する demethylase (*ligM, desA* 遺伝子産物) がテトラヒドロ葉酸依存型の demethylase であることが明らかにされ^{1,19}、さらにこの demethylase により脱メチル化された後のメチルは C1 代謝経路により、アミノ酸合成や DNA 合成に必要な要素として利用されていることが明らかにされた^{31,32}。脱メチル機能によって生じるプロトカテキ酸 (PCA) は、PCA 4,5-dioxygenase によって 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde へと代謝され、このものは 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase によってさらに下流の代謝物へと代謝される^{7,8}。PCA 4,5-dioxygenase をコードする遺伝子 *ligA, B*、及び 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase をコードする遺伝子 *ligC* が発見さ

れ、これら 3 つの遺伝子はクラスターを形成していることが明らかにされた。また 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase による代謝産物は 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC) であることが明らかにされた⁷。現在までに明らかとなっている SYK-6 のリグニン低分子化芳香族物質分解代謝経路を図 4 に示す。この代謝図を見ると、SYK-6 はリグニン低分子化芳香族混合物に含まれる二量体・単量体の芳香族物質をこごとく分解・資化することが可能であり、さらにこれら様々な芳香族物質は PDC という一つの物質に収斂した後、完全分解されていることがわかる。すなわち、これまでの研究によって明らかにされてきた SYK-6 株は、長い進化の過程で様々なリグニン低分子化芳香族混合物を一旦 PDC に変換することにより生命活動に必要な炭素骨格を作り出す機能を獲得してきたといえる。

我々はこの中間代謝物である PDC に着目した。PDC はピロン環に 2 つのカルボキシル基がついた化合物であるが、カルボキシル基という腕を 2 つ持つためにポリマー化が可能である。さらに PDC は①分極性の強い 3 つのカルボニル基、②弱アルカリ・生分解性を受けやすいラクトン部分、③共役二重結合、等の特徴的な極性剛直構造を有する。PDC 骨格を有するポリマーは、剛直環構造からなり親疎水性であると同時に、容易なラクトン環の加水分解開裂、共役二重結合の酸化・水和開裂などが予想できるため生分解性高分子材料として期待できる。図 5 に示すような PDC を単位に含むポリアミドやポリエステル、ポリウレタン等は、生分解性を保持したまま幅広い物性を発現でき、例えば PET と同等品の合成も可能である。よってこの微生物機能と物理化学的リグニン低分子化技術を組み合わせることにより、リグニンから PDC へ変換する事が可能であり、まさに

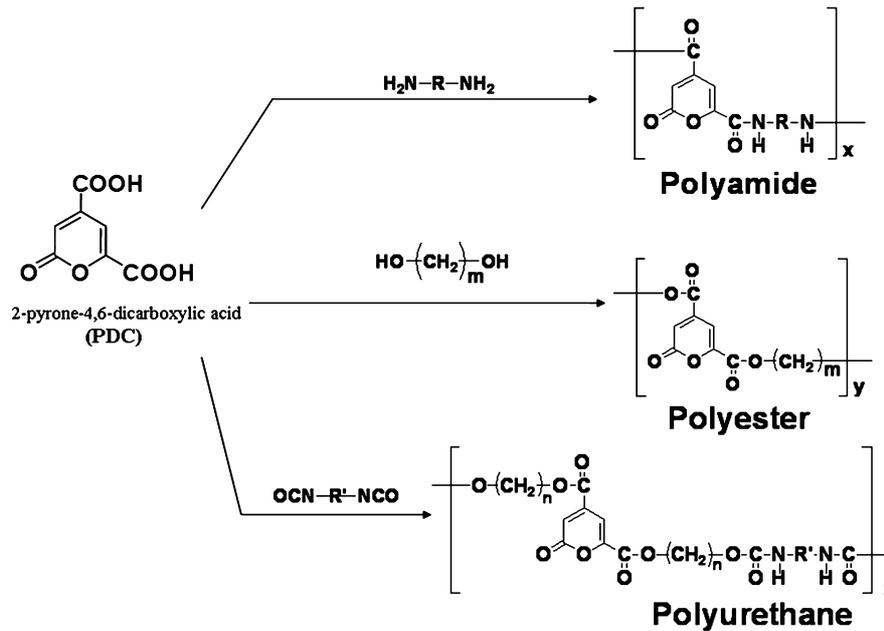


図5. PDCを骨格とした様々なポリマー物質。

PDCをファインケミカルスとして利用可能なレベルで獲得できれば、このように自由な分子設計・合成が可能になる。

我々の目指す石油化学物質に代替可能なレベルでのリグニン高度利用技術の確立が可能になると考えられる。

5. 微生物機能を用いた PDC 生産システムの構築 1 (PCA からの PDC 生産システム)

SYK-6の代謝経路を利用したPDC生産システムを確立するためには、非常に生育が遅く扱いにくいSYK-6の代謝機能を生育が早く扱いやすい宿主に導入し、高発現させることが必要である。そこでまず、PDCを代謝工学により安定に生産することが出来るかどうかを検討するために、PCAからPDCへと変換するPCA 4,5-dioxygenase及び4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde (CHMS) dehydrogenaseをそれぞれコードする*ligAB*と*ligC*を、PCAを細胞内に取り込むが代謝できないmutantである*Pseudomonas putida* PpY1100に導入し、PDCの蓄積が可能であるか、またPDCを高生産できるかどうかを検討した。

まず、SYK-6株のゲノムライブラリーから*ligABC*を獲得し、広宿主域高発現ベクターpKT230MCに導入し、pDVABCを得た。*P. putida* PpY1100にpDVABCを導入したtransformantを*P. putida* PpY1100/pDVABCと命名した。*P. putida* PpY1100/pDVABCはsuccinateを単一炭素源として生育できる。0.2% succinateを含むW mediumで*P. putida* PpY1100/pDVABCを前培養し、そこに15 mMのPCAを添加し更に培養したところ、310 nmに最大吸収を持つ物質が蓄積していることが明らかとなった。また、蓄積した物質を精製し、 1H -NMRで分析した結果、確かにPDCが蓄積していることが明らかとなった。この結果から、pDVABC上のPCA 4,5-dioxygenaseとCHMS dehydrogenaseは*P. putida* PpY1100/pDVABC内において活性型で発現し、PCAからPDCを生産・蓄積できることが明らかとなった。しかし、添

加したPCAの全てがPDCに変換されることはなく、その変換は24時間以内で停止してしまった。

Succinate単一炭素源培地においてPCAからPDCへの変換が完全に進行しない原因として、酵素の活性に問題があると考えられた。酵素活性の維持には、安定なタンパクの生産だけでなく、補因子の存在が必要である。PCA 4,5-dioxygenaseは外因の補因子を必要としないが、CHMS dehydrogenaseは補酵素としてNADP⁺を必要とすることが明らかとなっている。*P. putida* PpY1100/pDVABC内で十分量のNADP⁺を供給させるには、細胞内で解糖系を強く発現させ細胞内活性を高めることにより達成できると考えた。そこで、*P. putida* PpY1100/pDVABCをglucose単一炭素源培地に培養し、そこに15 mMのPCAを添加して更に培養したところ、24時間で添加したPCAは完全に代謝され、PDCに変換された。このことから、glucoseを炭素源とすることにより、細胞内で解糖系が働き、NADP⁺が十分供給されることにより、PCAが完全にPDCへと変換されることが強く示唆された。

P. putida PpY1100/pDVABCはglucose炭素源培地に15 mMのPCAを完全にPDCへと変換し蓄積できることが明らかとなった。そこで、さらに大規模なスケールで大量にPDCを生産することが出来るかどうか検討した。前培養した*P. putida* PpY1100/pDVABCを5Lのglucose炭素源培地でOD₆₆₀が13.0になるまで培養した。そこに10% (w/v)のPCA溶液をペリスタポンプを用い、43.3 ml/hの流量で6時間添加した。結果的に、50 gのPCAを添加したことになる。吸光度計を用いてPCAからPDCへの変換をモニタリングしたところ、PCA添加開始36時間後には、添加したPCAはほぼPDCへと変換されることが明らかとなった。この結果から、*P. putida* PpY1100/pDVABCを用いることで、PCAからの変換で10 g/L以上の濃度までPDCを蓄積

できることが明らかとなった。上記の研究についての詳細は文献26を参照していただきたい。

6. 微生物機能を用いた PDC 生産システムの構築 2 (VA, SA からの PDC 生産システム)

PCA からの PDC 生産システムの構築によって、PDC は微生物の細胞内において生産・蓄積が可能であることが明らかとなった²⁶⁾。そこで、次にさらに機能遺伝子を加えることによって、実際に天然のリグニンを Xiang らの方法により低分子化した際に生成する VA, SA からの PDC 生産システムの構築を試みた。VA, SA からの PDC 生産システムの構築には、さらに demethylase 酵素をコードする遺伝子を追加する必要がある。しかし、SYK-6 の demethylase 酵素はテトラヒドロ葉酸に依存した酵素であるために、この酵素機能を高発現させるためには非常に複雑なテトラヒドロ葉酸合成経路及び C1 代謝経路を同時に高発現する必要があるため、この demethylase 酵素をコードする遺伝子 *ligM*, *desZ* を導入した PDC 生産システムの開発は困難であることが考えられた¹⁹⁾。しかし一方で、*Pseudomonas* 属などいくつかの細菌で報告されている VA 脱メチル化機能は酸素添加型の反応はシンプルなシステムで機能している。すなわち、demethylase 機能を持つ VanA, VanA のレダクターゼ機能を持つ VanB という2つのタンパク質が酸素と NADH を基質として VA 脱メチル化を行っているのである³⁾。このシステムを活用して脱メチル化活性を発言させるには、これらの酵素をコードする遺伝子 *vanA*, *vanB* をクローニングしさえすればよい。しかし、これまでの *Pseudomonas* における *vanA, B* に関する3つの報告は、いずれも VA 資化性欠損変異株へのゲノムライブラリーの導入による変異復帰実験と、塩基配列解析に関するものである^{3,28)}。Priefert らによってクローニングされた遺伝子を heterologous に発現させた VanA, B の活性の検定も行われているが、それにしても組換え大腸菌において VA から PCA へのわずかな変換をもってその活性が得られたと結論づけられているに過ぎず、より高い活性を得るための条件などについての詳細な研究はなされていない²⁸⁾。

そこで、*P. putida* PpY101 株より回収したゲノムをテンプレートに PCR を行い *vanA, B* 遺伝子を獲得し、pUC119 の *Hinc* II サイト上にクローニングした。さらにこのプラスミドを pvanAB と名づけ、*E. coli* XL1-blue 株に導入し、脱メチル活性を評価した。15 mM の VA を含む LB 培地における PCA への変換量は、24時間で 2.7 mM であった。これまで Van A, B の SA に対する挙動については報告されていなかったが、この pvanAB を持つ組換え XL1-Blue 株は SA の脱メチル化活性も持っており、15 mM の SA から 3-O-methylgallate (3MGA) への変換量は VA から PCA への変換の場合とほぼ同量で24時間で 2.5 mM であった。

クローニングされた *vanA, B* から VA, SA の脱メチル化活性を持つタンパク質が発現されることが確認されたので、この遺伝子断片を *P. putida* PpY1100 株に導入し、発現させることを試みた。pvanAB を *EcoR* I, *Hind* III で消化して得られる *vanA, B* 全長を広宿主域ベクター

pKT230MC の *EcoR* I サイト上にクローニングした (pDV01)。pDV01 を *P. putida* PpY1100 株に導入し、組換え株の VA 脱メチル化活性を検定したが、この組換え株は VA 脱メチル化活性を全く示さなかった。

そこで、脱メチル活性の得られた pvanAB と活性の得られなかった pDV01 を詳細に比較したところ、pUC119 のマルチクローニングサイト上に *vanAB* を挿入した pvanAB においてはレポーター遺伝子としての *lacZ* と同一フレーム上に挿入されており、*lacZ'* とのフュージョンタンパク質として *vanA* が発現していることが考えられた。そこで、*vanAB* を pUC119 上で *lacZ'* とは異なるフレームで挿入したところ活性は全く得られなかった。さらに *vanA* 遺伝子の5'側に6個のヒスチジンをコードする遺伝子断片を加え、6×ヒスチジンペプチドとのフュージョンタンパク質として *vanA* が発現するように設計したプラスミド pQvAB を作成し活性を評価したところ、15 mM の VA から24時間で 2.9 mM の PCA が、同じく SA から 2.5 mM の 3MGA が検出された。このことから組換え株を用いた heterologous な VanA, B の発現のためには VanA の N 末にペプチドが付加することが必要であることが明らかとなった。

しかし *P. putida* PpY101 株の中での VanA の翻訳ではもともとの SD 配列が使われているので、この様に N 末にペプチドが付加して存在するという事は考えにくい。ひとつの可能性として、*P. putida* PpY101 株の中では VanA がシャペロン様タンパク質など他のタンパク質と複合体を形成している、ということが考えられる。すなわち、VanA は N 末がそのタンパク質複合体の中に組み込まれている状態で初めて活性を示す、ということが考えられる。従って VanA, B だけを発現させるようなプラスミドを導入した組換え株は VanA の安定な活性を持ちえず、VanA の N 末端に LacZ α フラグメントの一部や6×ヒスチジンといった小さなペプチドが付加されることで模倣的にタンパク質複合体中の VanA に近い形が再現され、それによって組換え株が脱メチル化活性を持つようになると思われる。Priefert らの報告²⁸⁾ において非常に弱い脱メチル活性しか得られなかったことは、おそらく彼らの作成したプラスミド上にも VanA と複合体を形成すべきタンパク質をコードする遺伝子が存在していなかったことが原因かもしれない。

このようにして確立した脱メチル化酵素の安定な発現システムと先の研究によって確立している PCA から PDC を生産するシステムを組み合わせ、VA, SA からの PDC 生産システムの構築を行った。pKT230MC 上に N 末端にオリゴペプチドを付加した *vanA*, *vanB*, *ligA*, *ligB*, *ligC* をタンデムに並べて挿入した pDVZ21 を作成し、*P. putida* PpY1100 株に導入した組換え微生物 *P. putida* PpY1100/pDVZ21 を作成した (図6)。この *P. putida* PpY1100/pDVZ21 株において、VA, SA からの PDC 生産能を評価したところ、VA, SA 両方から PDC の生産が確認された。そこで、この *P. putida* PpY1100/pDVZ21 を用いてジャーファーメンターによる VA, SA からの PDC 大量生産システムの構築を試みた。PCA から PDC を生産する際に LigC タンパクが補因子として NADP⁺ を必要とすることから、組換え微生物の炭素源としてグルコースを過剰に加え細胞内活性を高めること

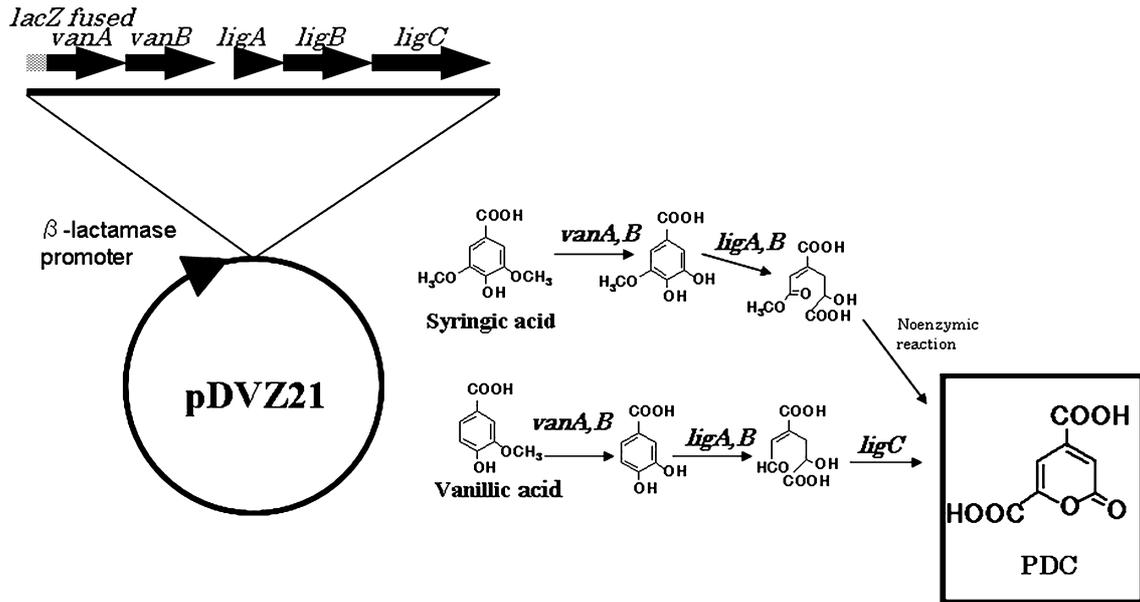


図6. pDVZ21 の構造と導入した代謝遺伝子。

挿入された機能遺伝子は β -lactamase promoter により一つのオペロンとして非誘導的に高発現する。またこれらの機能遺伝子により, VA, SA は PDC へと変換される。

が必要であることは先に述べたとおりである²⁶⁾。更に, pDVZ21 によって発現させる VanAB 酵素及び LigABC 酵素においては, LigC タンパクが NADP⁺ を必要とするだけでなく, VanA 酵素の reductase として働く VanB が NADH を必要とすることが明らかとなっている。そこで, さらに細胞内活性を高めるためにグルコースの他に yeast extract 等をさらに加えた栄養豊富な PDC production medium を作成し, 試験を行った。その結果, 5L スケールのジャーフェルメンターシステムにおいて, VA では24時間以内に SA でも36時間以内にそれぞれ 15 g/L の濃度の基質をほぼ完全に PDC へと変換することができた (図7)。VA と比較して SA からの PDC 変換にはより多くの反応時間を要する。VanAB が VA, SA に対して同等の活性を示していることから, これはおそらく ligAB にコードされる PCA 4,5-dioxygenase 酵素が VA から変換される PCA と比較して SA から変換される 3MGA に対するアフィニティーが低いためと考えられる。

7. 発酵液からの PDC 精製システムの確立

PDC をポリマーの原料として取り扱うためには, ファインケミカルスとして利用可能なレベルまで精製する必要がある。なぜならば, その後のポリマー化などの重縮合反応に不純物が存在するとポリマー化反応の妨げとなり, 目的の分子量まで高分子化することが困難になってしまうからである。PDC を生産した発酵液内には, PDC だけでなく菌体由来の成分, 培地成分など様々な物質を含む複雑な混合物であるといえる。そこで, これらの混合物から PDC を精製する技術の開発を試みた。PDC は水に可溶であり, 発酵終了時には培養液に溶けた状態で存在する。しかし, PDC の溶解度は通常の条件では 182 mM (35 g/L) であるのに対し, NaCl との共存下では Na⁺ との複塩を形成し, その溶解度が 1/20 以

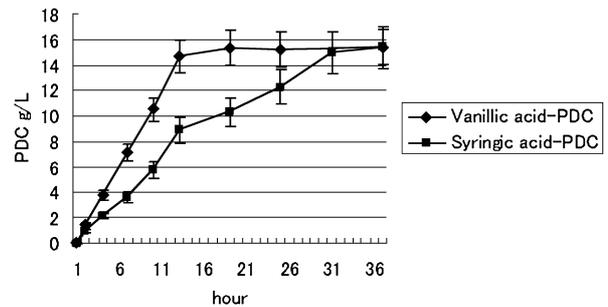


図7. *P. putida* PpY1100/pDVZ21 株による VA, SA からの PDC 生産。

VA, SA どちらにおいても PDC の生産・蓄積が認められたが, SA においては, VA と比較して PDC への変換に約 2 倍の時間を要する。

下になることが明らかとなった。そこで, 発酵層から遠心分離により菌体及び不溶物を除去した発酵液に NaCl を添加し pH 3.5 以下の条件にすると, PDC が Na⁺ との複塩として容易に回収でき, さらにイオン交換, 脱塩, 再結晶操作により, 高純度の PDC を得ることができた。現在80%以上の回収率でファインケミカルスとして利用可能なレベルで発酵層から PDC を精製するシステムが確立している。

8. PDC を原料としたポリマー物質の生産

我々はリグニンの高度利用技術の確立を目的として, 組換え微生物を用いた発酵によりリグニンを低分子化した際に得られる芳香族物質のうち, VA, SA から PDC を生産・蓄積・精製する技術を確立した。PDC は有機合成では作ることが困難であることから, 本研究成果は PDC を用いたポリマー物質の生産実験の道を初めて拓いたことになる。PDC は, 3つのカルボニル基, 環内エーテル酸素, 共役二重結合を持ち, 擬芳香族二塩基酸の構造をもつことから, 種々の重縮合系ポリマーの原料にな

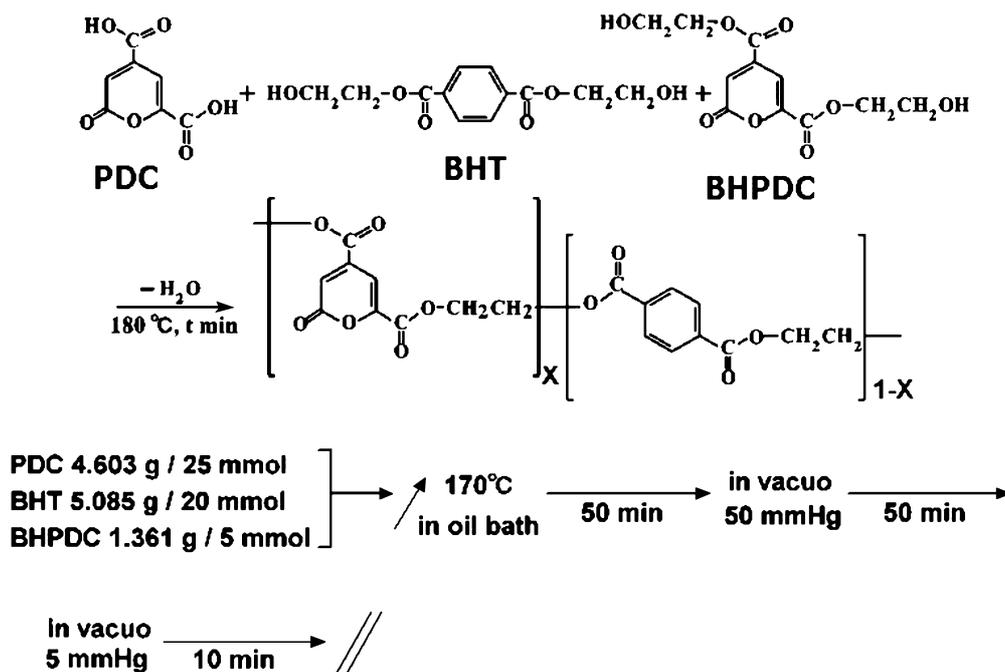


図8. PDC-BHT コポリエステルの合成戦略。

り得るだけでなく、PDC環が容易に二つのケトカルボン酸へと分解されていくので、PDCポリエステルでは、主鎖エステル結合の切断だけでなく環構造自体の開裂も起こり、より使用後の処理が容易な生分解性高分子材料の開発も期待できる。

我々はこれまでに、PDCを基本骨格としたポリアミド、ポリウレタン、ポリエステルの合成法を確立してきた^{9,25,29,30}。ポリアミド、ポリウレタンポリマーについては現在、物性評価等を行っている段階であるために、本論文においてはPDCポリエステルを中心に述べる。

PDCのポリエステルポリマーとして現在合成系が確立しているのは、PDCとbis(beta-hydroxyethyl)terephthalate (BHT)とのPDC-BHTコポリエステルである。PDCとBHTのみの共重合反応では、 $\text{PDC}_x\text{-BHT}_{(1-x)}$ コポリエステル体はxが0.5以下までのものしか合成することができなかった。そこで、PDCと過剰のエチレングリコールを反応させることによってBHPDCを作成することに成功し、これを用いることによってxが1.0までの様々なコポリエステル体を作成することが可能となった。実際の構造と重合反応の手順を図8に示す。PDC, BHT, BHPDCを混合し170°Cのオイルバスにて50 min加熱し、50 mmHgの減圧下で50分、5 mmHgの減圧下で10分間重縮合反応を行うことにより、PDC-BHTコポリエステルを得ることに成功した。このとき混合割合を変化させることにより、xが0~1.0の範囲の様々なコポリエステルを作成することが可能である。図9にはx=0.6のコポリエステルについて熱安定性を評価したTG-DTA曲線を示している。この結果から、260°C程度まで優れた熱安定性を示すことが明らかとなった。また、このコポリエステルは融点を持たず、高温で軟化する性質をもつことが示された。

このようにPDCをポリマー原料としたPDC-BHTコポリエステルの合成に成功したのであるが、このコポリ

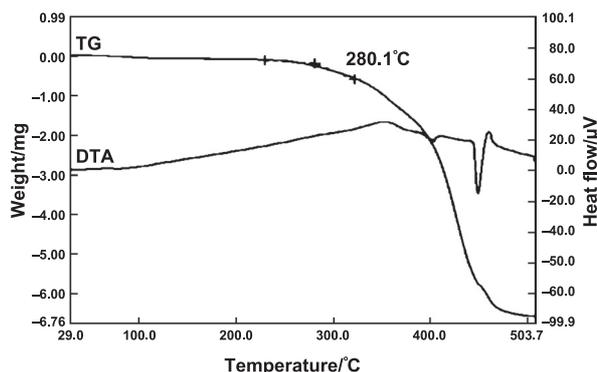


図9. PDC含有量60%のPDC-BHTコポリエステルにおけるTG-DTA曲線。
この結果から、このPDC-BHTコポリエステルは260°C程度までは安定であることと、融点を持たず軟化することが明らかとなった。

エステルポリマーは様々な金属に対して優れた接着性を示すことがわかってきた。そこで、図8のフローチャートに示す手順により分子量4,000程度の熱可塑性オリゴエステルを作成し、これを金属板の間に挟んで所定時間加熱してポリマー化させ、金属板同士の接着を行った。その結果を表1に示す。PDC含量が0.1~1.0の範囲のコポリエステルでアルミニウム、真鍮、銅、鉄、ステンレスに対する接着強度を測定した結果、約30~60 MPaと非常に強い接着強度を得ることができた。当初、PDC含量が1.0に近づくに従って破断応力が大きくなることが予想されていたが、実験に用いた金属において破断応力が最大値を示したのはPDC含量が0.4~0.6の範囲であった。また、アルミニウムにおいてPDC含量が0.6のとき57.0 MPaという非常に大きな接着強度が得られた。同時にガラスに対する接着強度の測定も試みたが、接着面が破断される前にガラス自身が破壊されるため接

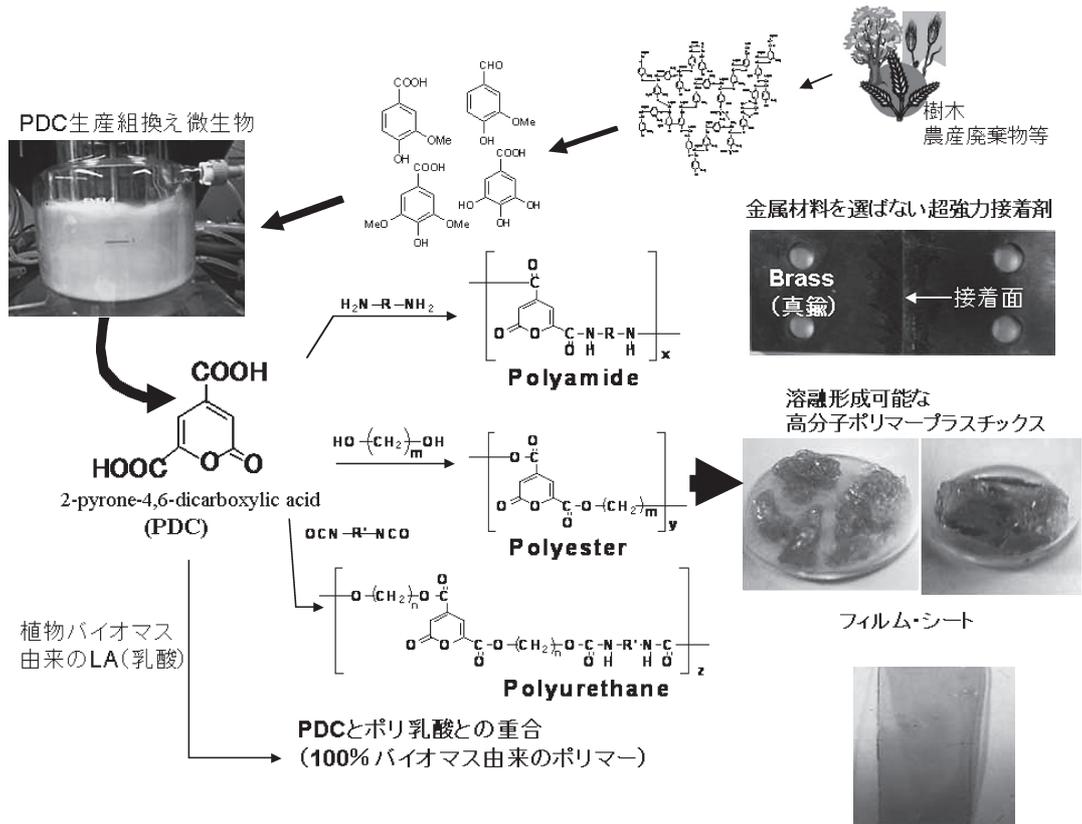


図10. 次世代型リグニン高度利用戦略。

表1. 各種 PDC_x-BHT_(1-x) コポリエステルにおける接着強度評価。

Sample	Adhesion term		Maximum fracture stress/MPa					
	Content of PDC/x	Adhesion temperature/°C	Adhesion time/min	Al	Brass	Cu	Fe	SUS
0.1		250	60	3.9	16.7	5.5	x	11.1
0.2		250	60	6.0	20.6	11.1	14.3	15.0
0.3		250	60	9.5	23.5	0.8	29.7	30.4
0.4		250	60	40.9	35.5	21.9	33.5	31.4
0.5		250	60	34.2	30.2	26.3	31.7	49.9
0.6		250	50	57.0	18.5	12.3	40.6	15.0
0.7		220	40	23.2	21.5	12.5	36.7	31.5
0.8		210	30	24.3	27.9	17.0	29.0	23.9
0.9		200	10	13.8	12.8	8.1	15.8	19.7
1.0		180	5	4.2	4.6	4.3	6.0	4.4

X=0.4~0.6 のコポリエステルにおいて非常に強い接着強度を示すことが明らかとなった。

着強度を測定することができないほどの接着強度を示した。

また、同様の方法でホットプレス法により PDC-BHT コポリエステルポリマーからフィルムシートを作成することにも成功している。このシートに対する物性及び生分解性については現在調査中である。

9. おわりに

化石資源の高度利用技術の発展によって支えられて劇的な産業発展を見た20世紀から21世紀に突入し、我々の課題はクリーンで再生産可能なエネルギー・マテリアルの利用に移行してきている。クリーンで再生産可能な資

源とはすなわちバイオマス資源である。化石資源の利用技術開発では、採掘された混合物から精製により得られる物質に対する、化学工学/合成化学分野の飛躍的な発展によって支えられてきたといえる。しかし、これまで高度に利用されていなかったバイオマスに対して新たに利用技術を開発していくためには、太古からそれらを高度に利用してきた分解微生物が持つ「物質変換技術」を活用することが最も効率的であると考えられる。なぜならば、分解微生物は我々人類が想像もつかない数億年という非常に長い期間をかけて独自に利用技術を開発させてきたからである。このことから、21世紀におけるバイオマス利用技術開発には、これまで飛躍的に発展してきた化学工学/合成化学分野に加え、生化学・代謝学な

ど生物工学分野の発展, さらにはこれらの分野を融合した生物・合成化学工学分野の発展が必要不可欠である。

リグニンは, 地球上で最も多量に存在する芳香族バイオマスである。リグニンはその圧倒的な存在量にもかかわらず, これまで非常に限定的な分野でしか利用されてこなかった。リグニンの利用技術を飛躍的に向上させるためには, やはりこれまで発展してきた化学工学分野との融合が必要であるが, その構造の複雑さや扱いにくさがこれまで発展を阻んでいたといえる。しかし, 前述のようにリグニンを分解する土壌微生物は我々の想像を超える複雑且つ緻密な代謝機能により見事なまでに高度に利用する手段を発展させており, これらの微生物代謝機能を応用することにより, 全く新しいリグニン高度利用技術の確立が期待できると考えられた。

我々は, *S. paucimobilis* SYK-6 の芳香族分解代謝経路を代謝工学的に応用することにより, リグニン低分子化芳香族混合物として生成される VA, SA から新規生分解性ポリマーの原料となりうる PDC を生産・蓄積・精製することに成功した。今後さらに図4に示す SYK-6 株の代謝遺伝子を追加すれば, バニリン, シリंगाアルデヒド等アルデヒド型芳香族物質から PDC を生産することが可能になるだけでなく, C₆C₃ 構造の物質や二量体化合物からの PDC が生産できるようになると期待される。本稿で述べたように, 我々はこの PDC を用いて実際に PDC-BHT コポリエステルポリマーを作成し, それが非常に優れた金属接着性を示し, またホットプレス法によりフィルムシートに加工できることを明らかにしてきた。これらの研究の最大の特徴は, リグニン低分子化芳香族混合物を単一の物質である PDC に収斂させることにより, 合成化学分野と直結して開発研究ができるということにある。現在はポリマー物質としては PDC-BHT コポリエステルのみであるが, ファインケミカルスとして利用可能な PDC を出発物質として扱えることから, 自由な分子設計が可能であり, 今後様々なポリマーが作られていくだろう。特にポリ乳酸などのバイオプラスチック原料と組み合わせた PDC ポリマーを作成することにより100%バイオマスからのバイオプラスチックの生産も可能であると考えられる。最後に筆者らが提案する次世代型リグニン高度利用戦略の概要を図10に示す。近い将来我々の生活において, バイオマス由来の製品が石油化学由来の製品に取って代わる時代が来るのかもしれない。

文 献

- 1) Abe, T., E. Masai, K. Miyauchi, Y. Katayama, and M. Fukuda. 2005. A tetrahydrofolate-dependent *O*-demethylase, LigM, is crucial for catabolism of vanillate and syringate in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* 187(6): 2030–2037.
- 2) Ballesteros, I., M.J. Negro, J.M. Oliva, A. Cabanas, P. Manzanares, and M. Ballesteros. 2006. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129–132: 599–611.
- 3) Brunel, F., and J. Davison. 1988. Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes encoding vanillate demethylase. *J. Bacteriol.* 170(10): 4924–4930.
- 4) Frank, C., U. Schwarz, C. Matthies, and H.L. Drake. 1998. Metabolism of aromatic aldehydes and cosubstrates by the acetogen *Clostridium formicoaceticum*. *Arch. Microbiol.* 170(6): 427–434.
- 5) Goldstein, I.S. 1975. Potential for Converting Wood into Plastics: Chemicals from wood may regain importance as the cost of petroleum continues to rise. *Science* 189: 847–852.
- 6) Gray, K.A. 2006. *Bioethanol. Curr. Opin. Chem. Biol.* 10(2): 141–146.
- 7) Hara, H., E. Masai, Y. Katayama, and M. Fukuda. 2000. The 4-oxalomesaconate hydratase gene, involved in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway, is essential to vanillate and syringate degradation in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* 182(24): 6950–6957.
- 8) Hara, H., E. Masai, K. Miyauchi, Y. Katayama, and M. Fukuda. 2003. Characterization of the 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase gene and operon structure of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* 185(1): 41–50.
- 9) Kawai, H., M. Matsumoto, K. Shigehara, Y. Katayama, and S. Nishikawa. 2001. Synthesis of aromatic polyamides with pyranone unit. *Polymer Preprints, Japan (English Edition)* 50: 356.
- 10) Kuhner, C.H., C. Frank, A. Griesshammer, M. Schmittroth, G. Acker, A. Gossner, and H.L. Drake. 1997. *Sporomusa silvacetica* sp. nov., an acetogenic bacterium isolated from aggregated forest soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47(2): 352–358.
- 11) Lin, Y., and S. Tanaka. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69(6): 627–642.
- 12) Masai, E., Y. Katayama, S. Nishikawa, M. Yamasaki, N. Morohoshi, and T. Haraguchi. 1989. Detection and localization of a new enzyme catalyzing the beta-aryl ether cleavage in the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6). *FEBS Lett.* 249(2): 348–352.
- 13) Masai, E., Y. Katayama, S. Kawai, S. Nishikawa, M. Yamasaki, and N. Morohoshi. 1991. Cloning and sequencing of the gene for a *Pseudomonas paucimobilis* enzyme that cleaves beta-aryl ether. *J. Bacteriol.* 173(24): 7950–7955.
- 14) Masai, E., Y. Katayama, S. Kubota, S. Kawai, M. Yamasaki, and N. Morohoshi. 1993. A bacterial enzyme degrading the model lignin compound beta-etherase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *FEBS Lett.* 323(1-2): 135–140.
- 15) Masai, E., S. Kubota, Y. Katayama, S. Kawai, M. Yamasaki, and N. Morohoshi. 1993. Characterization of the C alpha-dehydrogenase gene involved in the cleavage of beta-aryl ether by *Pseudomonas paucimobilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57(10): 1655–1659.
- 16) Masai, E., Y. Katayama, S. Nishikawa, and M. Fukuda. 1999. Characterization of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 genes involved in degradation of lignin-related compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23(4-5): 364–373.
- 17) Masai, E., K. Momose, H. Hara, S. Nishikawa, Y. Katayama, and M. Fukuda. 2000. Genetic and biochemical characterization of 4-carboxy-2-hydroxy-6-semialdehyde dehydrogenase and its role in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* 182(23): 6651–6658.
- 18) Masai, E., A. Ichimura, Y. Sato, K. Miyauchi, Y. Katayama, and M. Fukuda. 2003. Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether. *J. Bacteriol.* 185(6): 1768–1775.
- 19) Masai, E., M. Sasaki, Y. Minakawa, T. Abe, T. Sonoki, K. Miyauchi, Y. Katayama, and M. Fukuda. 2004. A novel tetrahydrofolate-dependent *O*-demethylase gene is essential for growth of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* 186(15): 4951–4959.
- 20) Merkens, H., G. Beckers, A. Wirtz, and A. Burkowski. 2005. Vanillate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Curr. Microbiol.* 51(1): 59–65.
- 21) Milstein, O., J. Trojanowski, A. Huttermann, and J. Gressel. 1988. Catabolism of single ring aromatic acids by four

- Aspergillus* species. *Microbios*. 55(222): 7–16.
- 22) Nakata, T., H. Miyafuji, and S. Saka. 2006. Bioethanol from cellulose with supercritical water treatment followed by enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129–132: 476–485.
 - 23) Nishikawa, S., T. Sonoki, T. Kasahara, T. Obi, S. Kubota, S. Kawai, N. Morohoshi, and Y. Katayama. 1998. Cloning and sequencing of *Sphingomonas (Pseudomonas) paucimobilis* gene essential for the *O*-demethylation of vanillate and syringate. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 836–842.
 - 24) Noda, Y., S. Nishikawa, K. Shiozuka, H. Kadokura, H. Nakajima, K. Yoda, Y. Katayama, N. Morohoshi, T. Haraguchi, and M. Yamasaki. 1990. Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase gene of *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* 172: 2704–2709.
 - 25) Okamura, N., M. Matsumoto, K. Shigehara, C. Seki, and S. Nishikawa. 1999. Synthesis of polymer with 2*H*-pyran-2-one-4,6-dicarboxylic acid (PDC) nuclei. *Polymer Preprints, Japan (English Edition)* 48: 502.
 - 26) Otsuka, Y., M. Nakamura, K. Shigehara, K. Sugimura, E. Masai, S. Ohara, and Y. Katayama. 2006. Efficient production of 2-pyrone 4,6-dicarboxylic acid as a novel polymer-based material from protocatechuate by microbial function. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71(5): 608–614.
 - 27) Pelmont, J., M. Barrelle, M. Hauteville, D. Gamba, M. Romdhane, A. Dardas, and C. Beguim. 1985. A new bacterial dehydrogenase oxidizing the lignin model compound guaiacyl-glycerol beta-*O*-4-guaiacyl ether. *Biochimie*. 67(9): 973–986.
 - 28) Priefert, H., J. Rabenhorst, and A. Steinbuchel. 1977. Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. *J. Bacteriol.* 179(8): 2595–2607.
 - 29) Sato, M., H. Inoue, M. Matsumoto, K. Shigehara, Y. Katayama, S. Nishikawa, and T. Kimura. 2003. Mechanical properties and degradability of polyesters carrying PDC nuclei. *Polymer Preprints, Japan (English Edition)* 52: 359.
 - 30) Shigehara, K., N. Okamura, M. Matsumoto, C. Seki, Y. Katayama, and S. Nishikawa. 1998. Synthesis of polyamide with 2*H*-pyran-2-one-4,6-dicarboxylic acid (PDC) nuclei. *Polymer Preprints, Japan (English Edition)* 47: 415.
 - 31) Sonoki, T., T. Obi, S. Kubota, M. Higashi, E. Masai, and Y. Katayama. 2000. Coexistence of two different *O*-demethylation systems in lignin metabolism by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6: Cloning and sequencing of the lignin biphenyl-specific *O*-demethylase (ligX) gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2125–2132.
 - 32) Sonoki, T., Y. Otsuka, S. Ikeda, E. Masai, S. Kajita, and Y. Katayama. 2002. Tetrahydrofolate-dependent vanillate and syringate *O*-demethylation links tightly to one-carbon metabolic pathway associated with amino acid synthesis and DNA methylation in the lignin metabolism of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Wood Sci.* 48: 434–439.
 - 33) Xiang, Q., and Y.Y. Lee. 2001. Production of oxychemicals from precipitated hardwood lignin. *Appl. Biochem. Biotech.* 91–93: 71–80.
 - 34) 安部 勲ほか. 1998. 木材科学講座 I. 海青社. p. 12.
 - 35) 飯塚 堯介. 2000. ウッドケミカルの最新技術. シーエムシー.
 - 36) 船岡正光. 2005. 木質系有機資源の新展開. シーエムシー.