

# 農産物食品製造・加工残渣の高付加価値化に向けた リグニン分解酵素の開発

群馬大学食健康科学教育研究センター 大田ゆかり



## 【略歴】

1993年 広島大学院医学系研究科・分子薬学系専攻後期 単位取得退学  
2001年 海洋研究開発機構 (JAMSTEC) 研究推進スタッフ  
2005年 博士 (工学) 取得  
2007年 JAMSTEC 研究員 (2009年 主任研究員・2016年 グループリーダー代理)  
2019年 群馬大学食健康科学教育研究センター・講師 (現在に至る)

## 1. はじめに

リグニンは地上のすべての植物が持つ主要成分であり、再生可能な芳香族化合物資源である。高度にヘテロな構造を持つため、その有効利用のためには一定基準内の化学的特性を示す分子に選択的に変換することが望ましい。リグニン内の最も主要な結合は  $\beta$ -O-4 エーテル結合であり、リグニン変換の重要なターゲットとなる。本結合を特異的に切断する酵素に glutathione-S- transferase / GST があり、グルタチオンの還元力を補酵素として利用する特異的酸化還元反応である。本反応に限らず、GST は広範な生物が利用する普遍的な酵素であり、酸化ストレスに対する生体防御や解毒機構に関与することで広く知られている。しかしながら、GST が基質とする物質の多様性を物質生産に生かすことができれば、酵素応用の範囲は飛躍的に広がることが期待される。 $\beta$ -O-4 エーテル結合開裂酵素群はこれまでに発見例が極わずかしかなく、酵素化学的な知見が乏しい。さらに酵素や補酵素生産にかかるコストが膨大であることが、GST 利用技術開発のボトルネックとなっている。

## 2. リグニンの下流代謝を担う細菌の探索と酵素群の解析

まず我々は、海底沈木や堆積物を分離源としてリグニンから派生する低分子芳香族代謝細菌の分離を試みた<sup>1</sup>。この探索の過程で単離した *Novosphingobium* sp. MBES04 株は、多様な芳香族モノマー代謝能を持ち、加えて  $\beta$ -O-4 型リグニンモデルダイマー (guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether / GGGE) のエーテル結合を開裂した<sup>2</sup>。MBES04 株は、非常に興味深いことに GGGE を増殖のためのエネルギー源として利用せず、開裂の結果生じる芳香族モノマーをほぼ定量的に菌体外に排出することがわかった<sup>2</sup>。

MBES04 株のゲノム配列を解析したところ、早くから精力的な研究がなされてきた *Sphingobium* sp. SYK-6 株と同様に  $\beta$ -etherase システムを有すると判断された。本システムは3段階のカスケード反応で構成される。第1段階目の反応を触媒する酵素は、 $\text{NAD}^+$  を補酵素とする short chain dehydrogenase/reductase (SDR) ファミリーに分類され、その活性に基づき  $\text{C}\alpha$ -dehydrogenase と呼ばれる。第2、3段階の反応を触媒する酵素は、GST ファミリーに分類され、前者は  $\beta$ -etherase、後者は glutathione lyase と呼ばれる。 $\beta$ -etherase はリグニン断片中の  $\beta$ -ether 結合をグルタチオン付加により特異的に開裂し、glutathione lyase は、前段の反応で生じたグルタチオン付加体からグルタチオンを脱離させる。

MBES04 株のゲノム配列解析の結果、4 個の GST 遺伝子が並んで配置されていることが分かった。そのうちの3個の遺伝子がコードするタンパク質 (GST4~6) は既報 GST と高いアミノ酸配列相同性 (65-80%) を示したが、残る1個の遺伝子は既報 GST との相同性は30%未満にとどまった。各遺伝子から組換え酵素を作製して機能を確認したところ、GST4、5は  $\beta$ -etherase 活性を、GST3、6は glutathione lyase 活性を示した。これらの酵素の基質選択性を調べたところ、GST4~6は既報酵素と同様に基質立体配置

に高い選択性を示したが、GST3 は許容範囲が広い“stereo-compatible”な酵素であると判断された<sup>2</sup>。

GST の反応機構解明を目指し、京都大学エネルギー理工学研究所、片平正人教授らと共同で、GST 反応を NMR 法によってリアルタイムで追跡することを試みた。etherase 反応で生じるグルタチオン付加体は容易にラセミ化してしまうため、反応生成物の正確な立体配置を決定することが困難であった。そこで、反応中の NMR スペクトルに基づいて直接的に基質への GSH の結合部位の立体構造に関する情報を取得した。本解析によって、GST4 の反応が基質の  $\beta$  位炭素の立体配置が S から R 配置へと反転する反応であることを示し、 $S_N2$  により進行することを示唆した<sup>3</sup>。

### 3. リグニン主要結合の特異的分解酵素の利用

MBES04 株のゲノムにコードされる遺伝子配列を利用して、 $\beta$ -O-4 結合開裂酵素 5 種を組換え生産し、これらの酵素をワンポットでスギやユーカリから抽出したミルドウッドリグニン (MWL) に作用させることにより、MWL からフェニルプロパン構造を有する芳香族モノマーを生産することに成功した (図 1)<sup>4</sup>。その後、京都大学生存圏研究所 西村裕志助教と共同でリグニン抽出方法の改良を重ね、酵素反応に適した高純度リグニン画分を高収率で得るための環境調和型抽出法を開発した。当初は約 6w/w% だったリグニン画分からのフェニルプロパンモノマーへの酵素変換収率を >10w/w% にまで向上させることができた<sup>3</sup>。

フェニルプロパン系化合物は、工業分野においては、香水、香料、精油、殺菌剤、麻酔薬、抗酸化剤などの医薬品や機能性食品及びそれらの合成中間体となる有用な化合物群である。そこで我々は上記芳香族モノマーを基幹低分子化合物としてリグニンの有効利用に寄与する可能性を探るために、本モノマーから誘導可能な化合物の合成について検討を行った。これまでに、新規な各種ポリマー、例えば、エポキシ樹脂、ポリカーボネート樹脂、アクリレート樹脂、ポリウレタンなどへの誘導化にも成功した<sup>4</sup>。京都大学化学研究所、中村正治教授らのグループにおいて同モノマーを起点とする新素材「スーパーウルシ」を開発し、天然漆に匹敵する素材を得ることに成功している<sup>3</sup>。

### 4. 今後の展望

農産物からの食品製造、加工工程で生じる残渣、例えば大豆搾りかす、米ぬか、草木本の伐採物などに含まれるリグニンの分解や高付加価値化に高い関心が集まっている。これまでの諸検討で酵素を用いたリグニン変換に向けての基礎的知見が蓄積されつつあるが、リグニンの全体利用、産業利用の観点からすると解決すべき課題は多い。より活性や安定性の高い酵素の新規取得や改良、その大量生産・利用技術開発に向けて引き続き研究を続ける所存である。

1. Ohta, Y. et al. Open Journal of Marine Science, 2, 177-187 (2012)

2. Ohta, Y. et al. Sci Rep, 5, 15105 (2015)

3. 大田ら、リグニン利活用のための最新技術動向 (監修: 梅澤敏明) シーエムシー出版, 201~207 (2020)

4. Ohta, Y. et al. ChemSusChem, 10, 425-433 (2017)

謝 辞 本研究を遂行するに当たり、多大なるご指導とご協力を賜りました京都大学 渡辺隆司教授、片平正人教授、中村正治教授、西村裕志助教、海洋研究開発機構の皆様、群馬大学食健康科学教育研究センター 粕谷健一センター長ならびに研究室の皆様に深謝申し上げます。本研究は、JST 先端的低炭素化技術開発 (ALCA)、科研費、京都大学生存圏研究所生存圏ミッション研究より支援を頂きました。

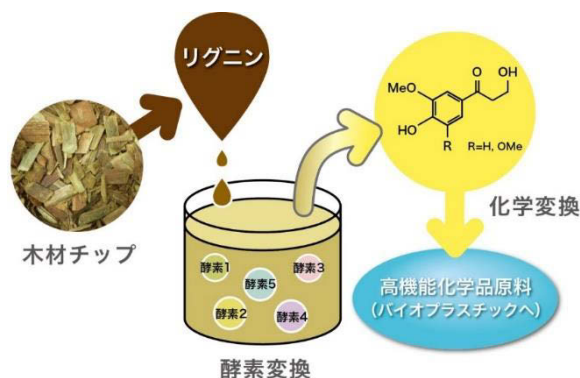


図1. ミルドウッドリグニンからの5種の酵素を用いたフェニルプロパンモノマーのワンポット生産 (©JAMSTEC)