

「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と
生産物活用のための基盤技術の創出」

平成23年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

渡辺 隆司

京都大学生存圏研究所・教授

電磁波応答性触媒反応を介した植物からのリグニン系機能性ポリマーの創成

§1. 研究実施体制

(1)「統括」グループ

- ① 研究代表者: 渡辺 隆司 (京都大学生存圏研究所、教授)
- ② 研究項目: リグニンの精密構造解析および分解・分離システムの研究開発

(2)「生存研・電磁波解析」グループ

- ① 主たる共同研究者: 篠原 真毅 (京都大学生存圏研究所、教授)
- ② 研究項目: 電磁波照射システムの研究開発

(3)「メタル化ペプチド」グループ

- ① 主たる共同研究者: 高谷 光 (京都大学化学研究所、准教授)
- ② 研究項目: リグニン精密分解のためのメタル化ペプチド触媒の開発
・リグニン高親和性・電磁波感受性メタル化ペプチド触媒の合成

(4)「精密構造解析」グループ

- ① 主たる共同研究者: 片平 正人 (京都大学エネルギー理工学研究所、教授)
- ② 研究項目: NMR による植物包括精密構造分析法の開発
・試料調製法の開発
・定量法の開発
・バイオマスの分解・変換物の同定・定量

(5)「プロセス開発」グループ

- ① 主たる共同研究者: 近田 司 (日本化学機械製造(株)、次長)
- ② 研究項目: 電磁波反応システム及びリグニン精製プロセスの開発

(6)「ポリマー変換」グループ

- ① 主たる共同研究者: 林 利夫 (花王(株)エコイノベーション研究所、主任研究員)
- ② 研究項目: リニア型リグニンポリマーの分離と構造・機能変換
・リニア型リグニンポリマー分離反応系の開発

(7)「モノマー変換」グループ

- ① 主たる共同研究者: 友納 茂樹 (帝人(株)融合技術研究所、室長)
- ② 研究項目: リグニンモノマーの分離と機能性ポリマーへの変換システムの開発

§ 2. 研究実施内容

(1)「統括」グループ

統括グループでは、各グループと共同で、リグニン分解反応系の開発、バイオマスおよびリグニン分解物の構造解析を行った。このうち、リグニン分解物の質量分析に関する成果を報告する。

リグニンを高付加価値な芳香族系ポリマーに変換するためには、リグニンの分子量や配列、ネットワーク構造を明らかにしなければならない。そこで、本研究では超高分解能質量分析 FT-ICR MS を用いたリグニンの構造解析法の構築を行った。質量分析の標準試料には、脱脂した針葉樹および広葉樹材のボールミル粉碎物からジオキサン水溶液で抽出したミルドウッドリグニンを用いた。質量分析計には、FT-ICR MS (Solarix 7.0T, Bruker Daltonics)を用い、イオン化法には MALDI-および ESI 法を用いた。 β -O-4 型二量体リグニンモデルおよび単離リグニンの衝突誘起解離 (CID)による MS/MS 測定も行い、開裂パターンを解析した。測定したマススペクトルでは、リグニン側鎖の β -O-4 結合をはじめ、単量体単位間の主要な結合を示唆するピークが観測できた。さらに、それぞれのマススペクトルにおいて、樹種間でのモノマー構造の相違や、広葉樹樹種内での内部配列の違いが見られた。 β -O-4 型二量体リグニンモデルの MS/MS では、エーテル結合の開裂を主とした MS/MS スペクトルが得られた。この手法を単離リグニンに適用させたところ、特定のイオンをプリカーサーイオンとして選択した場合、 $m/z=226$ および 196 の間隔で、プロダクトイオンが観測された。これらは、シリギル型およびグアイアシル型の β -O-4 結合の開裂パターンと一致した。以上のように、超高分解能質量分析 FT-ICR MS を用いてリグニンの構造解析が行えることを明らかにした。

(2)「生存研・電磁波解析」グループ

生存研・電磁波解析グループでは、広帯域電磁波照射システムの全体仕様を検討するための 3次元電磁界シミュレータおよび熱解析シミュレータの導入を行い、同軸線路型の広帯域電磁波照射容器の設計を実施した。同軸線路内は、遮断周波数のない TEM(Transverse Electromagnetic)モードで電磁波が伝搬するため、本研究課題で実施する 80MHz ~ 2700MHz の広い周波数範囲での電磁波加熱に向いている。平成 23 年度においては、被加熱

物として水を模擬した同軸線路型電磁波照射容器を設計し、電磁波が容器内に伝搬し水が電磁波を吸収する様子を確認した。現状の課題として、電磁波照射容器の反射率低減および広帯域化が挙げられるため、平成24年度においては電磁波照射容器の解析を継続実施し、試作評価を行う予定である。

(3)「メタル化ペプチド」グループ

電磁波感受性の高い遷移金属錯体触媒とリグニンに対して高い親和性を有するペプチド類を化学結合したペプチド触媒(メタル化ペプチド触媒)を合成し、これらを触媒として過酸化水素および分子状酸素を酸化剤とするリグニン類の環境調和型酸化分解反応を開発することを目的とし研究を行った。

平成23年度に、酸化触媒能の高い8族遷移金属錯体をノルバリン側鎖に結合した各種メタル化ペプチドの合成に成功した。特に、鉄中心を有するヘム酸化酵素モデルであるRu錯体を結合したRu-結合型ノルバリン誘導体の合成に成功し、これらが各種アルコール類やリグニンモデル化合物の酸化分解反応の良い触媒となる事を見出した。また、ファージディスプレイ法によって生成させたリグニン親和性抗体にメタル化ペプチドを結合したリグニン分解能を有する人工酵素系開発を目的として、各種抗体や蛋白へのメタル化ペプチドの導入手法に関する基礎的手法を確立した。

我々は高い酸化活性を示すONO-ピンサーRu錯体に着目し、これらが酸/塩基条件および熱に安定なノルバリン誘導体に結合したRu-結合型ノルバリンの合成に成功した(図1)。また、SPring-8における微小結晶X線構造解析によって、これらの分子構造およびアミノ酸α位の絶

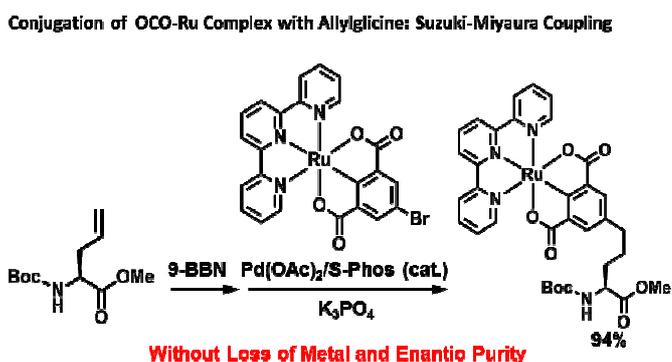


図1. ONO-ピンサーRu錯体結合ノルバリンの合成

対配置を明らかにすることに成功し、塩基性条件下のカップリング反応においてアミノ酸α位の不斉が失われることなく原料アリルグリシン由来の光学純度が保持されていることを明らかとした(図2)。メタル化アミノ酸は、1958年にSchloglらによってフェロセニルアラニンが初めて合成されて以来60年以上に渡って生化学、機能性材料分野において様々に利用されてきたが、アミノ酸α位の光学純度が確認されたものはわずか4例であり、L-/D-体双方のメタル化アミノ酸を合成し、キ

ラル HPLC 分析とX線構造解析を用いて絶対配置が正確に決定されたのは上記 Ru-結合型ノルバリンが初めての例である。

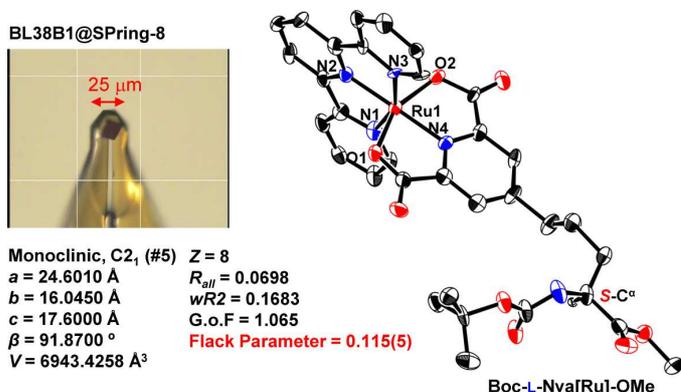


図 2. ONO-ピンサーRu 錯体結合ノルバリンの単結晶 X 線構造解析

ONO-ピンサーRu 錯体は優れた酸化触媒となることが報告されている。そこで、我々は過酸化水素を酸化剤として Ru-結合型ノルバリン触媒による各種アルコール類の酸化反応を試みたところ、母体となる Ru 錯体の 10 倍近い触媒活性を示す事を見出した(図 3)。触媒溶液の小角 X 線散乱測定 (SPring-8, BL40B2)を行ったところ、ミセル状の微小集合体の生成を示唆する結果が得られ、これが水層-有機層での物質輸送を促進すると共に、Ru 錯体の酸化分解を防ぐ保護膜の役割を果たしていると考えている。さらに、本触媒を用いて β -O-4 リグニンダイマーモデルの酸化

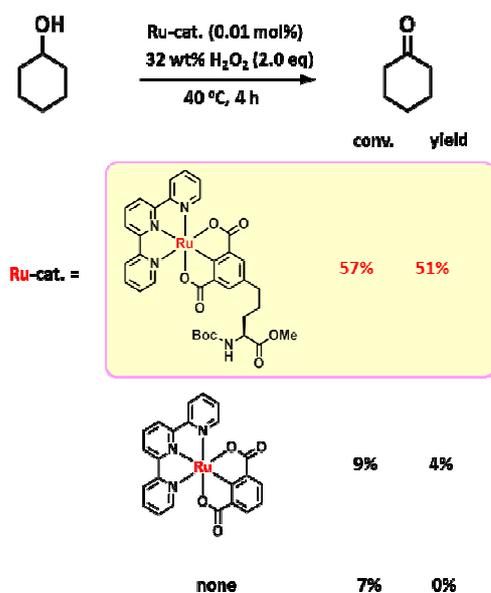


図 3. Ru-結合型ノルバリン触媒によるアルコール類の過酸化水素酸化

分解反応について検討したところ、高い活性を示し選択的に対応するフェノール誘導体を与える事を見出した。様々な官能基を有する Ru-結合型ノルバリンおよびペプチドを触媒として用い、リグニンモデル化合物の酸化分解に関する詳細な検討を進めている。リグニン結合活性を有する抗体に各種メタル化ペプチド触媒を結合することによって、リグニン親和性の高い酸化触媒系の開発が可能になると考えられる。そこで、メタル化ペプチドとヒト抗体や各種タンパク質への結合について基礎的検討を行ったところ、一般的な縮合条件を用いることでタンパク質1分子当たり 6~10 個程度のメタル化アミノ酸が結合可能であることを明らかとした。

今後、本年度の研究で開発した Ru-結合型ノルバリンをリード触媒分子として用い、さらなる触媒能の向上を目的として水溶性、自己集合特性を示す各種置換基を導入した新規なメタル化アミノ酸触媒を合成する。これらの高機能化 Ru-結合型ノルバリンを触媒として用い、過酸化水素および分子状酸素を酸化剤とするリグニンモデルの酸化分解反応の検討を行う。この際、反応溶媒、触媒濃度、マイクロ波および超音波照射による反応加速効果について詳細な調査を行うとともに、LC-FT-ICR-MS/MS および GC-MS/MS を駆使してリグニンモデル分解物のライブラリー構築を行う。これらの研究から分解反応の機作および反応機構を明らかとし、触媒の分子構造と反応活性の相関に関する包括的な検討を進める。また、Fe、Ni、Co 等の電磁場応答性の高い金属を結合したペプチド触媒を開発し、マイクロ波照射によって触媒を直接活性化することで作用する新しいタイプの酸化触媒の開発を行う。

リグニンへの親和性を有する触媒開発については統括グループと共同研究を行い、ファージディスプレイ法を利用して新リグニン活性を示すリグニン親和性抗体の開発を進めるとともに、30-40 残基のヘリックス性ペプチドからなるマイクロ抗体ライブラリーを用いたリグニン親和性ペプチドの探索を行う。

(4)「精密構造解析」グループ

2D-NMR によるバイオマスの精密構造解析法の開発を目的とし、試料調製法、定量法の検討を行うとともに、バイオマス分解・変換物の同定・定量を行った。

・試料調製法の開発

木質バイオマスに関し、ボールミルの条件(ミリングの強さと時間、窒素充填の有無等)、前処理の条件、溶解溶液のイオン条件等を最適化した結果、従来の調製法に比べてはるかにシャープなNMRシグナルを与える調製法の確立に成功した。その結果、従来より高い分解能と S/N を示す ^1H 、 ^{13}C -HSQC スペクトルを取得する事ができた。これによりNMR法を用いた今後の解析が促進されると考えられる。

・定量法の開発

^1H 、 ^{13}C -HSQC スペクトルは分解能が高く、木質バイオマスの各成分の解析に適しているが、ピーク強度が $^1\text{J}_{\text{CH}}$ によって変調を受ける為、定量性が担保されない。今回 TROSY 法を用いる事によって、木質バイオマスの各成分に関して 1 ボンドの C-H 結合定数 $^1\text{J}_{\text{CH}}$ を取得した。得られた $^1\text{J}_{\text{CH}}$ 値を用いて HSQC ピークの強度の補正を行う事で、定量性を保証する事ができるようになっ

た。

・バイオマスの分解・変換物の同定・定量

木質バイオマスの分解物の解析をNMR法によって行い、分子構造の同定に成功した。また担子菌による木質分解過程を、NMR法によってモニタリングする系を立ち上げた。菌種に固有の分解過程を追跡できる目途が立った。

(5)「プロセス開発」グループ

プロセス開発グループは、バイオマスをマイクロ波熱分解して目標性状のリグニンを獲得するための広帯域周波数可変型電磁波照射バイオマス分解装置の製作に向けて、生存研・電磁波解析グループと共同で反応容器の概念設計を行った。また、これに付随して反応容器内の温度計測法について検討し、電磁界分布に悪影響を及ぼすことなく正確な測温が可能な光ファイバー式温度計を調査、購入した。更に、反応容器からの電磁波漏洩を抑止するため、種々の周波数に対応可能な電磁波漏洩強度測定器(マイクロウェーブサーベイメータ)を選択、取得した。

平成24年度は、生存研・電磁波解析グループによる反応容器の詳細シミュレーション結果に基づいて反応容器の製作を行い、バイオマス分解実験に着手する予定である。

(6)「ポリマー変換」グループ

従来からリグニンのエステル化、ウレタン化、エポキシ化、スルホン化、フェノール樹脂化などによる高分子の合成研究は行われてきたが、それらは変性したパルプ廃液由来のリグニンをを使うなど、リグニンの高分子構造を精密に分子設計して高機能ポリマーを生産する試みは行われてこなかった。このような高分子は、バルクの低品質用途に利用され得るが、高度な産業利用には不適であった。そこで本グループは、統括グループ、他の共同研究グループと連携し、当該高分子を選択分離する反応系を開発し、リグニンの構造上の特徴を活かした、有用かつ高機能性ポリマー材料の創製を目指す。

平成23年度は、原料バガスからリニア型の高分子リグニンを選択分離する反応系を開発するために、これまでにリグニン分解に適用された実績の少ない反応剤を用いて分解検討を行い、分離によって得られるリグニン分解物の収率や分子量、高分子のリニア性を評価した。分解検討は反応剤を、有機溶媒中、比較的低温でマイクロ波加熱処理する条件で行った。そして、収率は有機溶媒可溶物中のリグニン分解物の重量比率を、分子量はGPC分析により重量平均分子量(Mw)を、また、高分子のリニア性については、DFRC法によってジアシレート体量(β -O-4結合量の指標)を測定して評価した。その結果、検討した反応剤(酸および塩基)ではジアシレート体量が、既存反応剤(NaOH、HCl)よりも高い値となり、また Mw5000 以上の高分子リグニンが、比較的高収率で得られる傾向が認められた。

今後、得られたリグニン分解物のリニア性を、より精密に評価するために、全 β -O-4結合量の定量を目的として NMR 精密解析(^{13}C -NMR定量的測定、HSQC 測定)を行う予定である。また今回検討を行った反応剤のリグニンおよび多糖類に対する分解機構を明らかにしていく。

(7)「モノマー変換」グループ

1. リグニン分解モノマーの構造解析

市販されている針葉樹サルファイトリグニン、草本系リグニン、スギ木粉、ブナ木粉について酸化分解試験を実施した。ニトロベンゼンを用いた酸化分解では、マイクロ波を用いてもオートクレーブを用いた場合と同じ生成物が得られることが確認できた。GC-MS 分析の結果、主な生成物はバニリン、バニリン酸、アセトバニロン、(広葉樹では更にシリンガアルデヒド、シリンガ酸、アセトシリンゴン)であった。今後は、条件最適化を行い、より高収率な反応条件の確立を目指す。

2. リグニン分解モノマーからなるポリマーの分子量測定

リグニン分解物の一つであるバニリン酸の誘導体である、ポリ(メチル-4-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-メトキシベンゾエート) (以下、VaC2と略す。)は高耐熱性、低熔融粘度という特徴を有する。ポリマー開発においてその分子量把握は重要であるが、VaC2 は耐溶剤性に優れるため一般の溶媒に溶解せず、GPC 測定には特殊な装置が必要となる。そこで、今回は固有粘度と GPC 測定による分子量との相関を求めた。その結果、固有粘度と分子量に良好な相関があることが確認された。これによって、溶液粘度を測定することで分子量を推計できるようになった。

3. メチル-4-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-メトキシベンゾエートの変異毒性試験

VaC2 を実用化するにあたって、そのモノマーであるメチル-4-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-メトキシベンゾエートの有害性把握は重要である。そこで、本年度は該化合物の変異原性試験 (Ames 試験) を実施した。その結果、代謝活性系の有無にかかわらず、微生物に対して遺伝子突然変異誘発性を示さない(陰性)ことが確認された。

4. VaC2 の特性評価

VaC2 の特徴把握の一環として、物性評価を実施した。VaC2 はエンブラである PPS や PBT と比較して、同等以上の力学物性、優れた成型性を有することが確認された。また、電気特性も同等であることが確認できた。