

「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

H24 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 主たる共同研究者: 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㈱、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㈱ 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: 城戸 伸明 (帝人㈱ 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。

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)を用いた。単離リグニンの衝突誘起解離 (CID)による超高分解能の MS/MS 測定をおこない、β-β 構造に β-O-4 結合がついたリグニンユニットが結合した連結構造を明らかにした。

ファージペプチドライブラリーを用いた分子進化工学的手法により、リグニンに対して親和性を持つペプチドを探索した。リグニンのような不溶性物質に対するバイオパンニングの例はこれまでに少なく、実験方法も確立されていない。そのため、まずスクリーニング方法の検討を行った。7～12 個アミノ酸残基のランダムペプチドをファージ表層に提示させたファージライブラリーを用いて、ユーカリまたはスギのリグニンに対してバイオパンニングを行った。結合バッファー、pH 条件、未結合ファージの洗浄条件等について、検討した。バイオパンニングを数ラウンド行った結果、ファージが濃縮され、リグニンに親和性を持つペプチドが有意に選択されたものと推定された。配列解析の結果、同一の配列や相同性の高い配列をもつクローンが複数選抜された。リグニンとの親和性解析を進める予定である。

リグニン分解系の開発については、ポリマー変換グループ、モノマー変換グループと連携して共同研究を行った。モノマー変換グループとは、バニリン、バニリン酸、シリンガアルデヒド、シリンガ

酸を与える反応系を幅広く探索し、反応系の違いによる生成物の違いを明らかにした。次年度は、絞り込んだ反応系を重点的に解析し、これらの生成物の高収率化を図る。

(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核となる同軸線路型の電磁波照射容器を設計・開発した。設計には 3 次元電磁界シミュレータを用い、30℃蒸留水を封入した条件において 0.7 GHz～2.7 GHz の広い周波数範囲で電磁波エネルギー吸収効率 90%以上(反射率 10%以下)の電磁波照射容器を設計した。また実際に容器を製作し、実測結果はシミュレーション結果と一致することを確認した。また電磁波照射容器を用いた電磁波加熱試験を実施し、周波数 2.45 GHz、出力 250 W の電磁波を 360 ml 蒸留水に照射した場合、20 分程度で室温から 60℃まで加熱できることを確認した。本研究期間にて開発した電磁波照射容器は特許を出願した。80MHz～0.7GHz においては現状の装置では反射率が大きい、次年度以降に容器の寸法等を考慮して改良を加える予定である。

(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リグニン類の精密分解反応による有用芳香族分子生産プロセスの開発を目的とした研究を行った。平成 24 年度では、前年度に合成に成功した酸化触媒能の高い Ru 錯体をノルバリン側鎖に結合したメタル化アミノ酸の精密構造決定、N,C-末端の化学変換に関する詳細な検討を行った。その結果、Ru 結合同型ヘキサペプチドの合成に成功した。また、鉄中心を有するヘム酸化酵素の機能モデルである Ru 錯体触媒の酸化機能に関する研究を行い、各種アルコール類やリグニンダイマーモデル(GOSet)および電子豊富な芳香族化合物の触媒的酸化によるキノン合成反応の開発に成功した。また、ファージディスプレイ法により得られるリグニン親和性ペプチドとメタル化ペプチドの融合によるリグニン分解人工酵素の開発を目的として、抗体や蛋白へのメタル化ペプチドの導入手法に関する検討を行った。以下にその詳細を報告する。

我々は平成 23 年度に、高い酸化活性を示す ONO-ピンサー Ru 錯体が酸/塩基条件および熱に安定な Ru 結合同型ノルバリンの合成に成功している。これらがペプチド・抗体触媒への導入後に想定された触媒機能を発現するためには、各種変換反応における化学的、構造的耐久性が担保される必要がある。そのため、我々は光学活性 HPLC や SPring-8 における微小結晶 X 線構造解析を駆使して金属錯体部位の不変性、アミノ酸部位の絶対配置の不変性(光学純度保持)について系統的な研究を行ってきた。その結果、最近 L-/D-体双方の Ru ノルバリンの X 線構造解析による絶対配置の決定に成功した(図 1)。

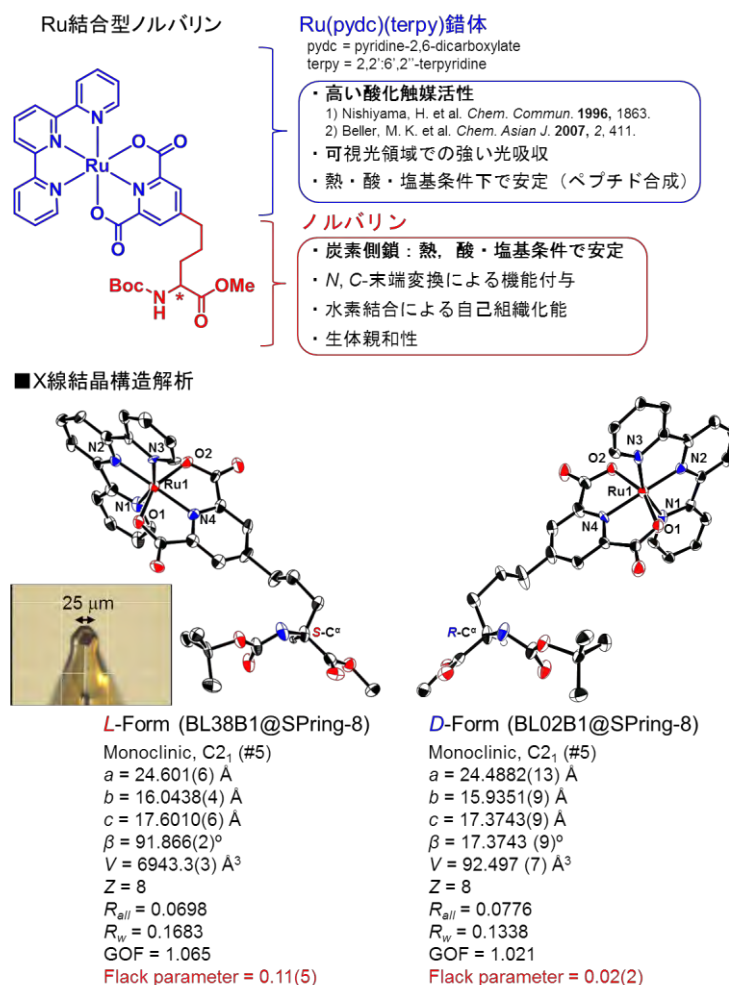


図 1. ONO-ピンサーRu 錯体結合ノルバリンとL-およびD-体の単結晶 X 線構造解析

また、Ru ノルバリンの各種ペプチドや蛋白質(酵素, 抗体)への導入手法を検討する目的で、*NC*末端の化学変換による各種官能基変換やペプチド化に関する基礎的検討を行った。その結果、*NC*末端に長鎖アルキル、エチレングリコール、芳香族基、ウレア構造を導入することによって、両親媒性あるいは親水性、疎水性の Ru ノルバリン合成が可能となる事を明らかにし、両末端の化学変換・修飾に基づくメタル化アミノ酸の高機能化と物性のチューニングが可能であることを見出した。また、液相法によるペプチド化について詳細な検討を行った結果、ほぼ等量の *N*-末端フリーおよび *C*-末端フリーの Ru ノルバリン誘導体の縮合反応による Ru ヘキサノルバリン(図 2)の合成に成功し、従来型の固相合成法では不可能なマルチグラムスケールでの実用的なメタル化ペプチド合成手法の開発に先鞭をつけた。また十分な物質量の Ru ノルバリンペプチドが得られたことによって、NMRをはじめ各種分光法による精密構造分析が可能となり、4 残基以上になると Ru ノルバリンペプチドが安定なヘリックス構造を形成する事など今まで報告例の全くないメタル化ペプチドの詳細な基礎物性を明らかにすることに成功した。

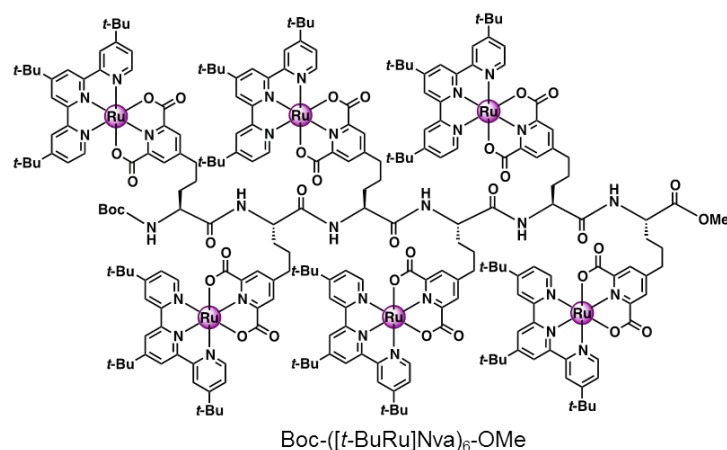
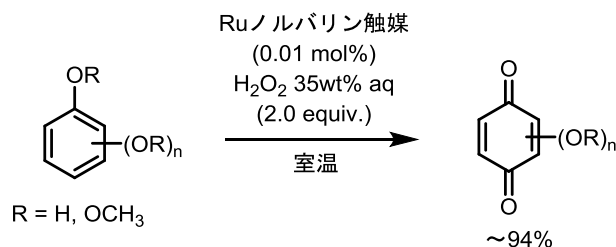


図 2. ONO-ピンサーRu 錯体結合ヘキサノルバリリンペプチド

我々は Ru 結合型ノルバリリンが ONO-ピンサーRu 錯体由来する優れた酸化機能を有し、過酸化水素を酸化剤とするアルコール類の酸化反応に高い活性を示すことを見出している。H24 年度では、これらの酸化触媒機能について基質適応範囲と反応機構の両面から詳細な研究を行った。その結果、Ru 錯体に結合したノルバリリン部位の両親媒性がミセル状のナノパーティクルの形成を促し、その結果、水層－有機層での物質輸送効率が向上すること。また、ナノパーティクルが Ru 錯体の酸化分解を防ぐ保護膜の役割を果たす可能性が示された。また、本触媒を用いて β -O-4 リグニンダイマーモデル GOSet の酸化分解反応について詳しい検討を行ったところ、アミノ酸部位を持たない Ru 錯体が全く酸化活性を示さないのにもかかわらず、Ru ノルバリリンでは転化率がほぼ 100% の高い酸化活性を示し、GOSet の芳香族部位に由来する様々な芳香族性分子が得られることを見出した。またリグニン中に豊富に含まれる電子豊富な芳香族であるメキシベンゼン類の過酸化水素について検討を行ったところ、下式に示した様に 0.01 mol% というごく少量の Ru ノルバリリンの存在下に直接酸化が効率良く進行し、対応するキノン類が得られることを見出した。同反応は同種の Ru 錯体やヘム酵素のモデルとなる各種ポルフィリン錯体でも報告例があるが、Ru ノルバリリンを用いたケースではこれらと比べて触媒活性が $\sim 10^3$ 程度であるだけでなく、選択性もはるかに高いものである。



H25 年度では本年度の研究から得られた知見を基に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さらに進めていくとともに、より実用的な MW リグニン、オルガノソルブリグニン、木粉等の分解反応へと展開を図るとともに、代表者グループとの共同研究によりリグニン親和性ペプチドとメタル化ペプチドからの人工酵素系の開発とこれらを用いた触媒的リグニン分解の検討を行う。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の開発およびマイクロ波照射による触媒中心金属の直接活性化に基づく新しいタイプの酸化反応の開発について検討を行う。

(4)「精密構造解析」グループ

①植物性バイオマスの試料調製法の確立

試料調製時の試料の変性を抑え、なおかつ高分解能の NMR スペクトルを与える植物性バイオマスの試料調製法を確立した。具体的にはミリングの時間・強度の最適化、窒素雰囲気下でのミリングの実施、溶媒への金属イオンの添加等により、溶液 NMR 法による分析に供する為に最適な調製法が確立できた。

②植物性バイオマスの定量法の開発

上記①の方法で調製された試料を用い、TROSY法によってCHカップリング定数をあらかじめ決定する事によって、植物性バイオマス及びその分解物の物質量を、各物質のCHカップリング定数に左右されずに定量する手法を開発した。

③リグニンの分解産物の解析

ポリマー変換グループや代表者グループと連携して、リグニン分解生成物の構造を上記①、②の方法を活用して解析する事を開始しており、次年度も分解物の構造解析に開発した新規方法を適用させる。

(5)「プロセス開発」グループ

プロセス開発グループは、電磁波解析グループと共同で 900~2700MHz の広帯域で使用可能な周波数可変型マイクロ波照射容器を試作した。この容器はマイクロ波周波数が可変で有るばかりでなく、特殊な気相バッファ構造を案画、採用することにより 3MPa 迄の加圧反応が可能となった(2012.09.25 特許出願済)。

また、今後グループ内で使用するリグニン原料を安定的に大量製造するための大型装置について検討を開始し、一部の部品について購入を行った。H25 年度には主要部品の製作、購入を行い、大型装置の完成を図る予定である。

一方、リグニン分離精製システムの開発に関しては、今年度は次年度以降の本格的検討に備えて膜分離等の技術調査を行った。次年度は、小型の周波数可変型マイクロ波照射容器を「電磁波」グループと共同で開発し、周波数依存性を解析する。

5)「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、「代表者」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。

マイクロ波加熱装置を用いて、前処理バガスを酵素糖化した後の残渣(原料リグニン)を各種有機溶媒、水およびこれらの混合溶媒系で分解した。また、混合溶媒系の酸度を高めた場合、さらに縮合反応の防止を目的にラジカル捕捉剤を添加した場合のリグニン抽出率、分解物の物性(分子量、アルカリニトロベンゼン酸化(ANBO)法によるアルデヒド収率)に及ぼす影響を検討した。また、本分解法の比較のために、バガスに対し、 $\text{NaOH}/\text{Na}_2\text{S}/\text{Na}_2\text{CO}_3 = 103.7/41.4/32.7$ (Na_2O 換算)、活性アルカリ量 16.5%で 170℃、90 分処理することで、クラフト蒸解リグニンを調製した。

糖化残渣リグニン原料を種々の条件で分解した結果、いずれも単独溶媒中では 30%以下の低リグニン抽出率であったのに対し、アセトン/水の混合溶媒条件下では 65.4%にリグニン抽出率が向上した。得られた溶媒可溶リグニンの重量平均分子量 $M_w = 22,000$ であった。また、この系に対して、種々の酸を添加して処理したところ、リグニン抽出率が 85.2%に達し、 $M_w = 3,400$ を示した。さらに、前記反応系にラジカル捕捉剤を添加したところ、リグニン抽出率が 95%に達し、 $M_w = 2,800$ となり、バイオマス中のリグニンを、ほぼ定量的に溶媒可溶リグニンとして抽出できることが分かった。

次に、得られた各溶媒可溶リグニンの ANBO 法により、アルデヒド収率を評価した。その結果、混合溶媒分解系、酸添加混合溶媒分解系、ラジカル捕捉剤+酸添加混合溶媒系で得られたリグニンは、アルデヒド収率がそれぞれ 33.1%、20.1%、16.1%を示し、クラフト蒸解リグニンの同 8.9%に比べて高いアルデヒド収率となった。よって、本分解法で得られたリグニンは、クラフト蒸解リグニンに比べて、低変性であることが示唆された。

以上の検討より、糖化残渣リグニン原料を用いて混合溶媒分解系で分解することにより、機能的芳香族ポリマー創製に向けて優位と考えられる低変性な溶媒可溶リグニンを高収率に得られることが明らかとなった。

得られたリグニン分解物の構造を NMR 精密解析(^{13}C - NMR測定、HSQC 測定)により明らかにしていくと同時に、機能的芳香族ポリマー創製に向けた修飾・誘導体化の検討を行っていく。

6)「モノマー変換」グループ

1. 酸化触媒スクリーニング

リグニン分解が期待できる酸化触媒についてスクリーニングを実施した。検討した触媒系としては、金属酸化物およびアセチルアセトナート錯体を使用し、酸化剤に過酸化水素を用いた。原料としては、草本系アルカリリグニンを使用した。比較のために、ニトロベンゼン酸化での芳香族物質

の収量を比較したところ、いずれの系も芳香族収率は 1wt%以下であり、ニトロベンゼン酸化(芳香族収率約 8wt%)には及ばない。ニトロベンゼン酸化ではアルデヒドが優先して生成する一方、金属酸化物を触媒に用いた場合、芳香族収率は 0.5wt%程度であるが、アルデヒドよりもカルボン酸が優先して生成することが明らかとなった。

2. ニトロベンゼンでの分解反応

ニトロベンゼンでのリグニン分解が収量の点で最も高いため、反応について解析を行った。ニトロベンゼンで酸化反応を行う上では多量のニトロベンゼンが必要であるが、ほとんどが回収されており、酸化反応に関与している量は少ない事が分かった。また、反応生成物の解析も実施し、ニトロベンゼンの還元体が数種類確認できた。

3. ポリマー重合反応条件の検討

バニリン酸を利用した高融点ポリマーの重合時の課題の抽出を行い、対策を実施した。溶融重合法で重合を行う場合、融点以上での反応が必須となる。一般に高温になるほど副反応が起こりやすくなるために、高い重合度のものを得ることが困難であり、また、高重合度のものが得られても、熱分解による劣化が避けがたいものとなる。そこで、副反応生成物の分析とその反応速度解析を実施し、副反応低減のため、触媒、安定剤、反応条件等の検討を実施した。その結果、重合反応中の劣化の少ないポリマー重合の反応条件を見出し、樹脂材料としての物性を確認することが可能となった。

今後、バイオマス中のリグニンからバニリン酸、シリング酸等芳香族化合物を高効率で分離生産する反応を「代表者」グループと共同でスクリーニングする。また、リグニンモノマーからのポリマー合成の反応条件を検討する。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

(3-2) 知財出願

① 平成 24 年度特許出願件数(国内 2 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 2件)