

奨励金No.1531

リグニン高親和性アミノ酸クラスターの創製と分解触媒への応用

田中 知成
京都工芸繊維大学 教授

Synthesis of lignin-high-affinity amino acid clusters and their application to lignin degradation catalysts

Tomonari Tanaka,
Kyoto Institute of Technology, Professor



木材リグニンに結合する分子の探索は、リグニン分解触媒との複合化による分解効率の向上など、リグニン分解技術の発展において重要である。本研究では、ヒスチジンを側鎖に有するポリマーを合成し、スギおよびユーカリ由来の木材リグニンに対する結合性を水中で評価した。ヒスチジン修飾率の高いポリマーは、ヒスチジン修飾率の低いポリマーに比べてリグニンとの結合親和性が高いことが明らかとなった。

The pursuit of molecules capable of binding to wood lignin is pivotal for advancing lignin degradation technology, particularly when combined with lignin degradation catalysts. In this study, synthetic polymers bearing histidine moieties were synthesized and evaluated bind affinities for milled wood lignin derived from Japanese cedar and *Eucalyptus globulus* in aqueous conditions. Their lignin-binding properties were investigated through original spectroscopic analysis and SPR measurements. Polymers with higher histidine substitution exhibited enhanced binding affinity compared to those with lower histidine substitution levels.

1. 研究内容

1.1 背景

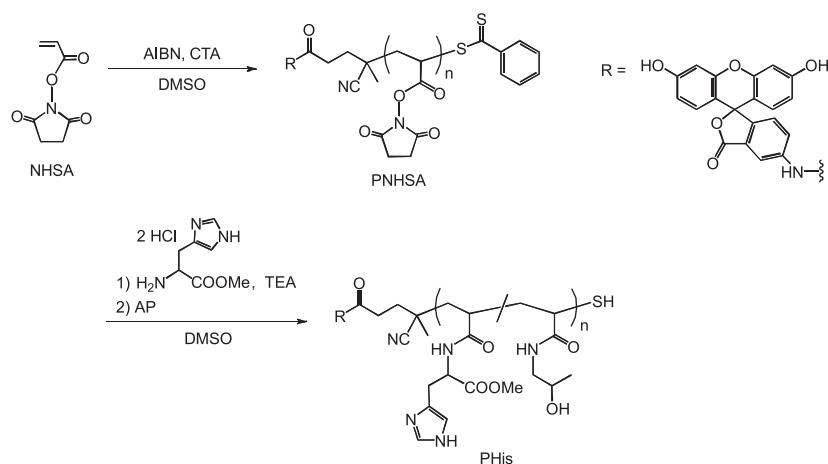
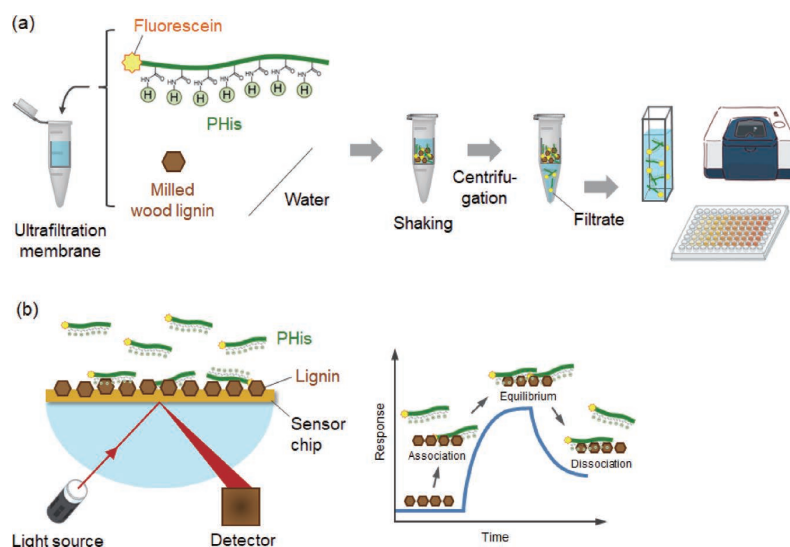
リグニンは木質バイオマスの構成成分であり、セルロースやヘミセルロースなどの多糖類と並ぶ植物細胞壁の主要成分である。リグニンはセルロースとヘミセルロースの間の間隙を占め、細胞壁内のセルロースを強固に結合して隣接する細胞を連結している。そのため、木材からセルロースやパルプを精製するためには、リグニンの分解や除去が不可欠である。しかしリグニンの効率的な分解は、その化学的および物理的安定性によって、依然として容易ではない。リグニンの効果的な分解は、酵素や人工触媒のリグニンに対する結合親和性に大きく依存することも多く、リグニンと親和性の高い分子の探索はリグニン分解触媒の活性を向上させるためにも重要である。本研究では、

リグニン親和性ペプチドとして報告されたペプチド（アミノ酸配列：HFPSPFQRHSH）^[1]に最も多く含まれているヒスチジンに着目し、ヒスチジンを側鎖に有するポリマーを合成して、木材リグニンとの結合親和性を調査した（図1）。木材リグニンとの結合親和性を評価するために、試料溶液の分光分析と表面プラズモン共鳴（SPR）を用いた分子間相互作用測定の実験によって評価した。

1.2 実験と結果

1.2.1 ヒスチジン担持ポリマーの合成

N-スクシンイミジルアクリレート（NHSA）をジメチルスルホキシド（DMSO）中で、2,2'-アゾビス（イソブチロニトリル）（AIBN）を開始剤、フルオレセイン担持 4-シアノ-4-（フェニルカルボ



ノチオイルチオ) ペンタン酸を連鎖移動剤 (CTA) として可逆的付加—開裂連鎖移動 (RAFT) 重合を行い、側鎖に活性エステルを担持したポリマー PNHSA を合成した (図 2)。モノマーと CTA のモル比を変えて重合を行い、重合度 82 と 160 の 2 種類の PNHSA を合成した。その後、L-ヒスチジンメチルエステル (HisOMe) をアミド化反応によってポリマー側鎖に導入、続いて過剰量の 1-アミノ-2-プロパノール (AP) を反応してポリマー側鎖全てを置換し、HisOMe を側鎖に有するポリマー (PHis) を合成した。HisOMe の仕込比率を変えて反応を行い、置換度 (0~30%) の PHis を

得た。

1.2.2 リグニンとの結合評価

(1) 分光学的手法による結合評価

合成した PHis の木材リグニン（スギ（針葉樹）由来：CMWL、ユーカリ（広葉樹）由来：EMWL）との結合特性を、PHis 末端に導入されたフルオレセインを利用して測定した。リグニンは、ボールミル粉碎して各種溶媒による洗浄によって精製したサンプルを用いた。PHis とリグニンを水中で 24 時間、室温で混合した後、限外ろ過膜によって PHis とリグニンの結合体を除去、得られたろ液の

吸光度（490 nm）を測定、リグニンとの混合前の値との差（ ΔA ）をリグニンとの結合性の指標とした（図1a）。CMWLに対しては、側鎖のヒスチジン修飾率15%および30%のPHis（各々PHis15、PHis30）がリグニンとの結合性を示した（図3）。PHis10ではリグニンへの結合性は弱く、PHis4以下では結合性はほとんど検出されなかった。EMWLに対しては、PHis4以上で強い結合を検出した。

(2) SPRによる結合評価

木材リグニンとの水中での結合親和性をヒスチジン修飾率の異なるPHisを用いて、SPR測定によって定量的に調べた（図4）。CMWL固定化SPRチップを用いてPHis30を測定すると、レスポンス値の大きな上昇が観測された。リグニンとの結合を示すレスポンス値はヒスチジン修飾率が高いほど大きく、ヒスチジン修飾率の低いPHis2およ

びPHis4の場合には、レスポンス値の変化は小さかった。一方、ヒスチジンを担持していないポリマーやポリマー化していないHisOMe、さらには、同様の方法で合成したL-グリシンメチルエステルおよびL-アラニンメチルエステルを約30%担持したポリマーでは、レスポンス値の変化はほとんど観測されなかった。

EMWL固定化SPRチップを用いた測定でも、SPRでのレスポンスはCMWLと同様の傾向を示し、ヒスチジン修飾率が高いほど大きなレスポンス値が観測された。PHisの結合親和性はCMWLよりEMWLの方が高く、分光学的手法による結合試験の結果と同等の傾向が得られた。さらに、合成した各ヒスチジン担持ポリマー（PHis10、PHis15、PHis30）のCMWLおよびEMWLに対する結合パラメータを算出した結果、平衡解離定数 K_D は0.8から13 μM の値が得られ、リグニンと

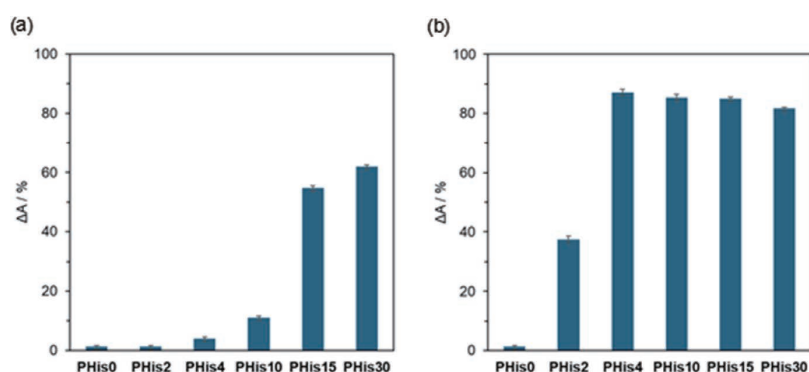


図3 PHisと（a）CMWLおよび（b）EMWLの水中での結合試験における吸光度変化

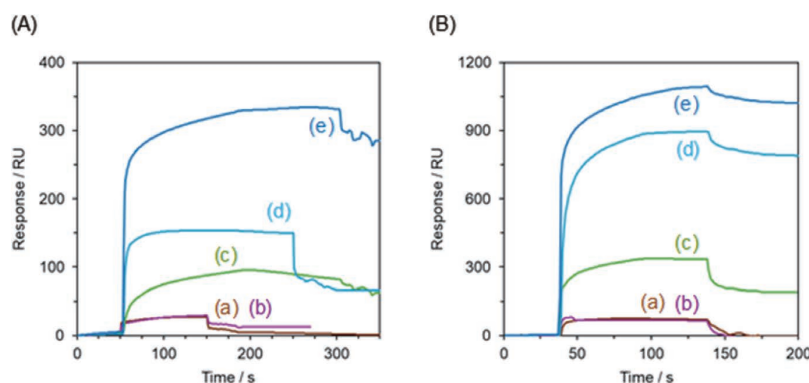


図4 PHisと（A）CMWLおよび（B）EMWLの水中でのSPR分析。（a）PHis2、（b）PHis4、（c）PHis10、（d）PHis15、（e）PHis30。

の結合が強いことが示された。

1.3 結言

ヒスチジンメチルエステルを側鎖に有するポリマーを合成し、水中でボールミル粉碎木材リグニンとの結合を分光分析および SPR 測定によって調べた。ポリマーとリグニンの混合液から得た濾液の吸光度変化を測定することによって、容易に評価を行うことができた。また、SPR 測定でも同様にリグニンとの結合が観測でき、ポリマーのリグニンに対する平衡解離定数 K_D を決定したところ、 μM オーダーの値が得られた。 K_D 値は、ヒスチジン修飾率が高くなるにつれて低下したことから、ヒスチジン修飾率が高いポリマーがリグニンとの親和性が高いことが示された。今後、ヒスチジン担持ポリマーを人工触媒や酵素などのリグニン分解触媒と複合化させることでリグニンに対する親和性を高め、リグニン分解活性の高い触媒の開発につながると期待できる。

1.4 参考文献

[1] A. Yamaguchi *et al.*, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 21833.

2. 発表（研究成果の発表）

2.1 学会発表

- ・日野原利香、田中知成、リグニン高親和性アミノ酸担持ポリマーの探索、第 72 回高分子討論会、高松、2023 年 9 月.
- ・田中知成、日野原利香、リグニンに結合するアミノ酸担持ポリマーの合成と機能評価、第 73 回高分子学会年次大会、仙台、2024 年 6 月.

2.2 論文

- ・Rika Hinohara, Yuji Aso, Naoko Kobayashi, Kaori Saito, Takashi Watanabe, Tomonari Tanaka, Synthesis and Binding Properties of High-affinity Histidine-bearing Polymers for Wood Lignin, Submitted.