

氏名	さの めい 佐野 芽生
学位(専攻分野)	博士 (工学)
学位記番号	博甲第979号
学位授与の日付	令和2年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオベースマテリアル学専攻
学位論文題目	Studies on screening for microbes producing vinyl compounds and its application to development of biobased polymers (ビニル化合物生産微生物の探索とバイオベースポリマー開発への利用に関する研究)
審査委員	(主査)准教授 麻生祐司 教授 小原仁実 教授 鈴木秀之 准教授 田中知成

論文内容の要旨

本学位論文では、環境中からイタコン酸 (IA) や IA 類縁体などのビニル化合物を生産する微生物の選択的分離法の開発と、これらビニル化合物をモノマーとした新規バイオベースポリマーの合成に関する研究について述べた。

第一章では、IA 類縁体の構造、機能、生合成機構と工業利用の可能性について論じた。IA 類縁体はアクリロイル基を持ち、抗菌性、抗炎症性、抗がん活性などを示すことから、高分子原料や創薬シード化合物として利用できる可能性があることを述べた。

第二章では、Mizoroki-Heck 反応を用いてアクリル酸にヨードベンゼンを付加する手法を開発した。また、TLC と組み合わせることで水溶液中のアクリル酸の簡便定量法を開発した。Mizoroki-Heck 反応によりアクリル酸にヨードベンゼンを付加することで桂皮酸に変換した。アクリル酸を不揮発性でモル吸光係数のより高い桂皮酸にすることで TLC による高感度検出と定量が可能となった。TLC プレート上での桂皮酸の検出限界量は 0.1 nmol であった。

第三章では、第二章で開発した付加反応の手法を改良し、土壌より IA 生産微生物の選択的分離を試みた。具体的には、最大 96 種類の培養液 (10 μ L) を 1.5 h で解析することを可能とした。また、付加反応の進行をヨウ素染色により簡易に判別できるようにした。本法での IA の検出限界濃度は 0.13 mM であった。本法を用いて土壌より得た 240 株の微生物から 37 株を IA 生産微生物として分離し、そのうち、IA 生産微生物として *Aspergillus terreus* S12-1 を得た。

第四章では、土壌から IA 生産微生物をコロニーとして分離することを目指して、Thiol-ene 反応に基づく IA 生産微生物の分離用寒天培地を開発した。抗菌剤 α -チオグリセロールはラジカル開始剤 VA-044 の存在下で IA と Thiol-ene 反応を起こすと抗菌性が消失する。本原理を用いて、モデル IA 生産微生物として *A. terreus* を選択的に分離するための分離用寒天培地の開発を試みた。その結果、*A. terreus* は分離用寒天培地上で優先的にコロニーを形成することがわかった。開発した分離用寒天培地に土壌を塗布培養後、得られたコロニーの培養液を第二章で開発した付加反応に供し、IA 生産微生物をスクリーニングした結果、*A. terreus* S13-1 を得た。本スクリー

ニング法を DISCOVER (direct screening method based on coupling reactions for vinyl compound producers) と名付けた。

第五章では、第三章で土壌より分離した 37 株の生産するビニル化合物を HPLC で解析した。その結果、11 株は IA を生産、8 株は IA とは異なる 2 つのビニル化合物を生産することが示された。この 8 株のうち、*Aspergillus niger* S17-5 の生産する 2 つのビニル化合物を MS と NMR により同定した。その結果、両化合物は IA 類縁体である 9-ヒドロキシヘキシルイタコン酸(9-HHIA) および 10-ヒドロキシヘキシルイタコン酸 (10-HHIA) であることがわかった。これらは抗菌性と抗炎症性を示さないが、9-HHIA は HeLa と MRC-5、10-HHIA は MRC-5 に対して細胞毒性を示すことがわかった。

第六章では、IA と 10-HHIA を共重合させてポリマーを合成し、その熱特性を解析した。IA と 10-HHIA を水中で KPS を開始剤としてフリーラジカル重合し、異なるモノマー組成比の共重合体を合成した。NMR および GPC の結果、共重合体の収率、転化率、分子量はいずれも 10-HHIA 含有率の増加に伴い減少することがわかった。よって、10-HHIA のヒドロキシヘキシル基が重合を阻害することが示唆された。TGA の結果、共重合体は加熱により連続的に重量減少を示すことがわかった。また、FT-IR の結果、加熱により IA と 10-HHIA のカルボキシ基間の水素結合の形成が促進され脱水が起こることが示唆された。本章で得られた共重合体は微生物が生産する IA 類縁体を用いて合成された初めてのポリマーである。

第七章では、本研究により得られた結論を述べた。

論文審査の結果の要旨

微生物が生産するビニル化合物のうち、工業的に利用されているものは *Aspergillus terreus* が生産するイタコン酸のみである。ビニル化合物生産微生物を自然界から選択的に分離するための手法がないことがその主な理由である。そこで本研究では、ビニル化合物の選択的カップリング反応である Mizoroki-Heck 反応と Thiol-ene 反応を組み合わせることで、イタコン酸およびイタコン酸類縁体などのビニル化合物を生産する微生物を土壌から簡便かつ迅速に分離するための手法の開発を行っている。有機合成反応の微生物分離への利用という世界初の試みに取り組んだことは評価できる。

本研究では、開発した分離技術を用いて、土壌よりイタコン酸生産微生物のほか、イタコン酸類縁体である 9-ヒドロキシヘキシルイタコン酸と 10-ヒドロキシヘキシルイタコン酸を生産する微生物 *Aspergillus niger* S17-5 を新たに分離している。また、それらイタコン酸類縁体が細胞毒性を有することを明らかにしている。さらには、10-ヒドロキシヘキシルイタコン酸を重合し新規なバイオベースポリマーを合成している。このように本研究では、土壌からのビニル化合物生産微生物の分離、得られたビニル化合物の構造解析と機能解析、得られたビニル化合物の精製と重合による新規ポリマー合成という一連のバイオベースポリマー開発に関わる研究を行っており評価できる。また、イタコン酸類縁体をポリマー原料として利用できることを明らかにしており、バイオベースポリマー開発の新たな可能性を拓いた点で評価できる。

本論文の基礎となる学術論文は以下の通り、申請者を筆頭著者とする公開済みの論文 3 報と、申請者を共著者とする公開済みの論文 2 報である。すべてレフェリー制度の確立した国際的に著名な学術誌に掲載されており、二重投稿等の研究者倫理に反するような背徳行為のないことを確認した。

- 1) Mei Sano, Taejun Chin, Tetsuya Takahashi, Hitomi Ohara, Yuji Aso, “A simple TLC-densitometric method for the quantification of acrylic acid in aqueous solutions” *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 28(1) 12–16 (2015)
- 2) Mei Sano, Hikari Kuroda, Hitomi Ohara, Hiroshi Ando, Keiji Matsumoto, Yuji Aso, “A high-throughput screening method based on the Mizoroki-Heck reaction for isolating itaconic acid-producing fungi from soils” *Heliyon* 5(7) e02048 (2019)
- 3) Yuji Aso, Mei Sano, Hikari Kuroda, Hitomi Ohara, Hiroshi Ando, Keiji Matsumoto, “DISCOVER: A facile structure-based screening method for vinyl compound producing microbes” *Scientific Reports* 9(1) 16007 (2019)
- 4) Mei Sano, Ryoki Yada, Yusuke Nomura, Takahiro Kusukawa, Hiroshi Ando, Keiji Matsumoto, Kazuhito Wada, Tomonari Tanaka, Hitomi Ohara, Yuji Aso, “Microbial screening based on the Mizoroki-Heck reaction permits exploration of hydroxyhexylitaconic-acid-producing fungi in soils” *Microorganisms* 8(5) 648 (2020)
- 5) Yuji Aso, Mei Sano, Ryoki Yada, Tomonari Tanaka, Takashi Aoki, Hitomi Ohara, Takahiro Kusukawa, Keiji Matsumoto, Kazuhito Wada, “Biobased poly(itaconic acid-co-10-hydroxyhexylitaconic acid)s: Synthesis and thermal characterization” *Materials* 13(12) 2707(2020)