

「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 25 年度採択研究代表者

H27 年度 実績報告書

大西 康夫

東京大学 大学院農学生命科学研究科
教授

高性能イミダゾール系バイオプラスチックの一貫生産プロセスの開発

§ 1. 研究実施体制

(1) 大西グループ

- ① 研究代表者: 大西 康夫 (東京大学大学院農学生命科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ポリマー原料となる芳香族化合物を生産する微生物の創製

(2) 金子グループ

- ① 主たる共同研究者: 金子 達雄 (北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・新規バイオベースポリベンズイミダゾールの開発

(3) 荻野グループ

- ① 主たる共同研究者: 荻野 千秋 (神戸大学大学院工学研究科、准教授)
- ② 研究項目
 - ・植物バイオマスを原料とした芳香族ポリマー原料の発酵生産

(4) 高谷グループ

- ① 主たる共同研究者: 高谷 直樹 (筑波大学生命環境系、教授)
- ② 研究項目
 - ・ポリマー原料となる芳香族化合物を生産する微生物の創製

§ 2. 研究実施の概要

本研究の達成目標は、セルロースを原料とした芳香族化合物の微生物発酵生産システムを確立し、発酵生産される芳香族化合物を原料としたポリベンズイミダゾール (PBI) 系新規ポリマーを開発することにより、実バイオマスから PBI 系ポリマーを生産する一貫プロセスを構築することである。本年度は昨年度に引き続き、各研究グループが今後の連携ポイントを意識しつつ、それぞれの要素技術開発を進めた。その結果、以下のような研究成果が得られた。

3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸 (3,4-AHBA) のセルロースバイオマスからの発酵生産 (課題 1-1) に関しては、3,4-AHBA 合成酵素遺伝子を導入した組換えコリネ菌を用いて、紙パルプから 3,4-AHBA を高収量に発酵生産するためのプロセス開発を進めた。一方、培養液からの 3,4-AHBA の精製効率を改善するために、固相抽出と膜分離技術を併用する生産・精製プロセスの開発に取り組んだ。

PBI 合成における基幹ジアミン 3,4-ジアミノ安息香酸 (3,4-DABA) を 3,4-AHBA からの化学合成で生産すること (課題 1-2) に関しては、アミノ基を還元してニトロ基にすることで、隣接するヒドロキシル基のスマイルズ転移を誘導するルートを確認し、グラムスケールの合成を行うことができた (純度 99% 以上)。また、3,4-DABA の重合による PBI の合成と評価 (課題 1-3) を前倒しで行い、3,4-DABA を一般のポリアミド合成の手法により溶液中で重合しポリアミドアミンを得る条件を確認し、続く加熱処理によりポリベンズイミダゾールへと変換する手法を見出した。

昨年度構築した共重合用アミンの原料となるカフェ酸を生産する大腸菌 (課題 2-1) を用いて、バイオマスからのカフェ酸の生産 (課題 2-4) の検討を続けた。紙パルプを炭素源とした糖化後発酵ではカフェ酸の生産量は 2.8 mg/L と低く、顕著な発酵阻害が認められた。発酵阻害を抑制するために、バイオマスの酵素糖化とグルコースからのカフェ酸発酵を同時に進行させる同時糖化発酵を最適化した結果、紙パルプから 233 mg/L の生産量でカフェ酸を生産することができた。

共重合用アミンの原料化合物としてのモノアミンの生産 (課題 2-2) に関しては、昨年度構築したグルコースを原料とした 4-アミノフェニル酢酸の発酵生産系を効率化することに成功した。また、これと各酵素遺伝子を組合せ、他の共重合用アミンの候補化合物である 4-アミノフェネチルアルコールと 4-アミノフェニルエタノールも生産できた。一方、モノアミンの 3 位水酸化酵素に関しては、4-アミノ安息香酸の 3 位を水酸化する変異型酵素を取得した。

カフェ酸 (3,4-ジヒドロキシ桂皮酸) からのジアミン合成 (課題 2-3) に関しては、カフェ酸よりも 1 つ OH 基が少ないパラクマル酸から 3,4-ジアミノ桂皮酸の合成を行うルートを確認した。また、共重合による新規 PBI の合成 (課題 3-1) を前倒しを行い、3,4-DABA と 4-アミノ安息香酸との共重合を試みた結果、共重合可能な条件を見出すに至った。

新規モノアミン、ジアミン化合物の探索 (課題 4-1) に関しては、ジアミン系芳香族モノマーの呈色反応を利用したスクリーニング系を用いて、18 種の候補化合物を得ていた。NMR 等を用いてこのうち 4 種の構造を決定し、2 つの新規化合物を得た。

新たなジアミン化合物生産のための戦略として、芳香環にニトロ基を導入する酵素および芳香族アミノ基をニトロ基に変換する酵素の利用を検討した (課題 4-1)。前者として、トリプトファンニトロ化酵素 TxtE の基質特異性の改変を試みたが良好な結果は得られなかった。一方、新たにチロシン

ニトロ化酵素と考えられる酵素遺伝子を取得し、組換え酵素を用いた機能解析を進めた。一方、後者では *p*-アミノ安息香酸を *p*-ニトロ安息香酸に変換する反応を触媒する AurF を用いて、*p*-アミノ安息香酸を *p*-ニトロ安息香酸に効率的に変換可能なバイオコンバージョン系を確立した。

【発表論文】

Kawaguchi, H., Sasaki, K., Uematsu, K., Tsuge, Y., Teramura, H., Okai, N., Nakamura-Tsuruta, S., Katsuyama, Y., Sugai, Y., Ohnishi, Y., Hirano, K., Sazuka, T., Ogino, C., Kondo, A. 3-Amino-4-hydroxybenzoic acid production from sweet sorghum juice by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresour Technol.* 198, 410-417 (2015).

Kawaguchi, H., Hasunuma, T., Ogino, C., Kondo, A. (Review) Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks. *Curr Opin Biotechnol.* 42, 30–39 (2016).