

「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

H28 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、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、紙パルプを原料とする 3,4-AHBA の発酵生産を昨年度に引き続いて検討した。紙パルプの糖化と得られた糖化液の発酵を2段階で行なう糖化後発酵では、450 mg/Lの 3,4-AHBA が得られたが、生産性はグルコースを炭素源とするモデル培地の 41%まで低下した。なお、紙パルプを原料とした場合の収率低下の原因は、細胞増殖の促進であることが強く示唆された。また、ポリマー合成に用いる 3,4-AHBA を培養液から精製するための検討では、3,4-AHBA を高収率で吸着(0.1 g/g 樹脂)・溶出する条件を確立した。

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、1回で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)に関しては、ポリアミドアミンを加熱処理することによりポリベンズイミダゾールを合成する手法を確立した。

当初、共重合用アミンの原料となると考えたカフェ酸に関しては、すでに作製した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)を検討してきたが、本年度、さらに実験データを追加し論文発表した(論文1)。

共重合用モノアミンの生産(課題2-2)については新たに有用と判明した4-アミノフェニルプロピオン酸の生産に取り組んだ。バイオマス由来のアミノ桂皮酸から、組換え大腸菌を用いた生物変換によって 2 g/Lの 4-アミノフェニルプロピオン酸を得ることに成功した(変換効率>95%)。また、反応上清からバイオポリマーの原料となる純度の高い 4-アミノフェニルプロピオン酸を精製することができた。

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が、その純度は 90%にとどまった。また、共重合による新規 PBI の合成(課題 3-1)に取り組み、3,4-DABAと4-アミノ安息香酸との共重合体を合成した。続いて、PBI の成形条件確立と各種成型体の性能評価(課題 3-2)を前倒して行い、基幹 PBI および本共重合体の両方のフィルム作製に成功した。また新規化合物由来 PBI の合成(課題 4-2)に関しても前倒して進め、基幹 PBI へのイオン性官能基の導入方法を確立し、新規構造の PBI を作製した。

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、これまでに行った 1,158 種の糸状菌培養液の水抽出画分をジアミン系芳香族モノマーの呈色反応を利用してスクリーニングした。新たに 2 種の候補化合物を得たが、いずれも目的のジアミン化合物ではなかった。一方、芳香族

アミンの基礎研究の過程で、ポリマー原料として有望な新規芳香族ジアミンの生産に関わる *papABCDEF* を見出した。組換え大腸菌を用いて本化合物を発酵生産することに成功した。

新たなジアミン化合物生産のための戦略(課題 4-3)として、チロシンにニトロ基を導入して 3-ニトロチロシンを合成する新規酵素 *RufO* を同定した。この酵素遺伝子を導入した大腸菌を用いて 3-ニトロチロシンの生産を試みた結果、3-ニトロチロシンが還元、アセチル化された化合物の蓄積を確認した。並行して、芳香族アミノ基をニトロ基に変換する酵素 *AurF* の基質特異性の改変を試みた。パラアミノ安息香酸のカルボキシル基を認識する *Tyr93*, *Asn200* に点変異を導入し、その酵素活性を検証したが、3,4-AHBA に対しては活性を示さなかった。また、大腸菌のゲノム縮小株を用い、今後 3,4-AHBA のアミノ基をニトロ基に変換する変異体をスクリーニングする上で有用な分析系を構築することができた。

【発表論文】

(1) Hideo Kawaguchi, Yohei Katsuyama, Danyao Du, Prihardi Kahar, Sachiko Nakamura-Tsuruta, Hiroshi Teramura, Keiko Wakai, Kumiko Yoshihara Hiromichi Minami, Chiaki Ogino, Yasuo Ohnishi, Akihiko Kondo. "Caffeic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of kraft pulp using recombinant *Escherichia coli*" *Applied Microbiology and Biotechnology* (2017) in press