

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「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」  
研究課題「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」

## 研究終了報告書

研究期間 平成25年10月～平成31年3月

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)

## §1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

#### 【達成目標と戦略】

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が、本研究の達成目標である。PBI はオルトジアミン芳香族カルボン酸を原料とするポリマーであるが、バイオマスからオルトジアミン芳香族が生産された例はない。そこで発酵生産可能な 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸 (3,4-AHBA) を 3,4-ジアミノ安息香酸 (3,4-DABA) に化学変換し、PBI 合成の基幹ジアミンとして用いる。一方、種々の芳香族化合物の微生物生産系の構築と並行して、これらの芳香族化合物あるいはその化学変換産物を基幹ジアミンと共重合させることで、優れた物性を有する新規 PBI を合成する。さらに、化合物や遺伝子のスクリーニング等を通して、芳香族系ポリマーの原料となる化合物の生産に利用できる新規酵素遺伝子の取得を目指す。

#### 【研究内容と成果】

##### ① バイオマスからの 3,4-AHBA 大量発酵生産系の構築

荻野 G は、大西 G で単離された 3,4-AHBA 合成酵素遺伝子を組み込んだ放線菌あるいはコリネ菌を用いて、ソルガム搾汁液および紙パルプをモデル植物バイオマスとして 3,4-AHBA 大量発酵生産系の構築を目指して種々の検討を行った。最終的に組換えコリネ菌を用いた紙パルプ糖化後発酵に絞って研究を進め、3.3 g/L で 3,4-AHBA を培養上清に生産する系を構築した。一方、大西 G は荻野 G と協力して培養上清から 3,4-AHBA を高度に精製するプロセスを開発した。

##### ② バイオマス由来 3,4-AHBA を用いた PBI フィルムの作製

金子 G は、スマイルズ転位を利用して 3,4-AHBA を 3,4-DABA に化学変換するプロセスを開発するとともに、3,4-DABA を重合してポリアミドアミンを合成し、これをさらに 400°C で加熱することで PBI を合成するプロセスを開発した。さらに、溶媒に溶かした PBI をフィルムに成型することに成功した。この PBI フィルムは 10% 重量減少温度が 700°C を超える超耐熱性を示した。荻野 G によって生産され、大西 G によって精製された 3,4-AHBA を用いても同じ性質を有する PBI フィルムが作製でき、世界で初めてセルロースからのエンジニアリングプラスチックの生産が達成された。

##### ③ 種々の芳香族化合物の微生物生産系の構築

高谷 G では、構築済みの 4-アミノフェニルアラニンおよび 4-アミノ桂皮酸生産系に新たな酵素遺伝子を導入し、4-アミノフェニル酢酸、4-アミノフェニルエタノール、4-アミノフェネチルアミンおよび 4-アミノフェニルプロピオン酸を生産する大腸菌を構築するとともに、コリスミ酸から 4-アミノ安息香酸 (4-ABA) を効率よく生産する組換え大腸菌を構築し、紙パルプ糖化液からの 4-ABA の発酵生産を達成するなど、芳香族モノアミン生産プラットフォームを大きく拡張した。

##### ④ 高機能性新規 PBI の開発

金子 G は 3,4-DABA と 4-ABA との共重合に成功し、PBI にアミド結合を導入する分子設計により 10% 重量減少温度 745°C という、あらゆるプラスチックの中で最高の熱分解温度を有する PBI フィルムを開発した。また、微生物生産された 3,4-DABA および 4-ABA を用いて、同等の性質を有するオールバイオポリマーの合成にも成功した。一方、3,4-DABA の単独重合で合成される PBI を高分子修飾法によってイオン化することで、 $10^{-2}$  S/cm にも迫る極めて高い Li イオン導電性を示すイオン性 PBI を開発した。今後、高耐熱・高イオン伝導性擬固体電解質としての利用が期待される。

##### ⑤ 有用芳香族モノアミン・ジアミン生産に利用可能な新規酵素の発見

大西 G は芳香環へのニトロ基の導入酵素を探索し、チロシンの 3 位にニトロ基を導入する新規酵素を見出した。また、芳香族アミンのアミノ基をニトロ基に酸化する酵素の基質特性の改変に取り組

み、4-アミノ安息香酸(4-ABA)だけでなく、3-アミノ安息香酸を基質にする変異体の取得に成功した。高谷 G は新規芳香族ジアミン(ピラジンジアミン)の生合成遺伝子を明らかにし、その高生産系を構築した。これらは新たなポリマー原料の微生物生産に資する成果として今後の研究に大きく貢献するものである。

## (2) 顕著な成果

### <優れた基礎研究としての成果>

#### 1. 芳香族アミンを生産する微生物プロセスを構築

概要: 4-アミノフェニルアラニン(4-APhe)の発酵生産系と各種酵素遺伝子を組み合わせることで世界初の芳香族アミンバイオ生産プラットフォームを構築した。これを用いることで、新たに4-アミノフェニル酢酸、4-アミノフェニルエタノール、4-アミノフェネチルアミンおよび4-アミノフェニルプロピオン酸の微生物生産を可能にした。また、4-アミノ安息香酸(4-ABA)を効率よく生産する組換え大腸菌を構築した。

#### 2. チロシンの芳香環にニトロ基を導入する新規酵素の発見

概要: 放線菌 *Streptomyces atratus* が合成する非リボソームペプチド rufomycin の構造中には3-ニトロチロシンが含まれているため、チロシンの3位をニトロ化する酵素が存在すると予想し、その取得を試みた。rufomycin 生合成遺伝子クラスターを取得し、これにコードされるP450 (RufO) がチロシンのニトロ化を触媒し、3-ニトロチロシンを合成する酵素であることを明らかにした。チロシンニトロ化酵素は報告例がなく、新規性が高い。

#### 3. 超高耐熱性を発現させる新たな分子設計概念を提唱

概要: 3,4-ジアミノ安息香酸(3,4-DABA)の重合体は700°C近い10%重量減少温度を示すポリマーであるが、アラムドのモノマーである4-アミノ安息香酸(4-ABA)を少量導入することで、この温度を745°Cまで上昇させることができた。これは、直線性の高い骨格とカルボニルを介した高い水素結合能を与えることにより、分子鎖全体としての水素結合能が高められたためであると考えられ、このような新たな分子設計概念の提唱につながった。

### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

#### 1. 紙パルプからPBIを生産する一貫プロセスを構築

概要: 紙パルプ糖化液を調製し、組換えコリネ菌による3,4-AHBAの発酵生産に供した。培養液から3,4-AHBAを精製し、3,4-DABAに化学変換した。この3,4-DABAを重合してPBIを合成し、フィルムに成型した。また、同様に組換え大腸菌を用いて紙パルプ糖化液から発酵生産した4-ABAを3,4-DABAと共重合させたPBIフィルムを作製した。これらはセルロース系バイオマスからの高機能性ポリマーを合成した世界初の成果である。

#### 2. 紙パルプから高濃度グルコースを含む糖化液を作るプロセスの開発

概要: 社会のペーパーレス化が進む中、紙パルプは有望な植物バイオマス資源となってきた。紙パルプの酵素糖化において、これまでにない高いグルコース濃度を達成できるプロセスを開発した。糖化液に含まれるグルコースの高濃度化はエネルギー密度の観点から、植物資源を高度に利用するバイオリファイナリーの社会実装に向けた重要な基盤技術であり、実際、このプロセスのおかげでポリマー合成の試行が可能な量の3,4-AHBAおよび4-ABAの発酵生産が達成された。

#### 3. 高耐熱・高イオン伝導性擬固体電解質として有望なイオン化PBIを作製

概要: PBIを化学修飾することで、イオン性ポリマーとしての性質を有する全く新しい機能性PBIを合成することができた。得られたイオン性PBIに可塑剤としてイオン液体を混合したところ、固体としては極めて優れたイオン伝導率およびリチウムイオン輸率を示し、高耐熱・高イオン伝導性擬固体電解質として有望な性質を保有していることを明らかにした。

### <代表的な論文>

1. Shunsuke Masuo, Shengmin Zhou, Tatsuo Kaneko, and Naoki Takaya, "Bacterial fermentation platform for producing artificial aromatic amines", Scientific Reports, vol. 6, article number: 25764 (2016)
2. Hiroya Tomita, Yohei Katsuyama, Hiromichi Minami, and Yasuo Ohnishi, "Identification and characterization of a bacterial cytochrome P450 monooxygenase catalyzing the 3-nitration of tyrosine in rufomycin biosynthesis", Journal of Biological Chemistry, vol. 292, No. 38, pp. 15859-15869 (2017)
3. Yukie Kawasaki, Nag Aniruddha, Hajime Minakawa, Shunsuke Masuo, Tatsuo Kaneko, and Naoki Takaya, "Novel polycondensed biopolyamide generated from biomass-derived 4-aminohydrocinnamic acid", Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 102, No. 2, pp. 631-639 (2018)

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ① 「大西」グループ

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)

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

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)

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

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)

研究項目: 植物バイオマス为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

主たる共同研究者: 高谷 直樹 (筑波大学生命環境系 教授)

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) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

① 金子 G では、北陸先端科学技術大学院大学の松見教授およびインド工科大学マドラス校の Raman 博士との共同研究により、イオン化によって PBI に導電性を付与することに成功し、燃料電池固体電解質としての PBI の機能化に研究を展開しつつある。これを機に、自動車用電池という当初予定していなかった新たな PBI の用途が生まれ、この業界の研究者とのネットワークが生まれつつある。

② 大西 G では、平成 28 年度 JSPS「日中韓フォーサイト事業(募集テーマ:ケミカルバイオロジー)」に採択され、中国・上海交通大学の Deng 教授、Bai 教授、韓国・仁荷大学の Kim 教授と「ゲノマイニングと合成生物学の融合による放線菌二次代謝産物のケミカルバイオロジー」に関する共同研究を開始した。本 CREST プロジェクトとの関連では、rufomycin の異種放線菌宿主での生産を共同研究の 1 つとして行なっている。日中韓フォーサイト事業と本 CREST プロジェクトとの連携は極めて

て限定的であるが、中国、韓国での微生物を利用した有用物質生産研究に関する情報は、年に一度開催する三ヶ国共同シンポジウム等を通して、入手しやすい状況となっている。

③荻野 G では、神戸大で実施している文部科学省先端融合イノベーション拠点創出事業「バイオプロダクション次世代農工連携拠点」のメンバー、および名古屋大学生物機能開発利用研究センター・植物分子育種分野・佐塚准教授と連携し、実バイオマス(製紙業界で利用されている紙パルプおよびソルガムバイオマス)の有効利用に関する検討を実施しており、実バイオマスからの物質生産に向けての情報共有が可能な状況にある。

④JST/ALCAにおいて、金子 G と高谷 G による実用技術化プロジェクトがスタートし、バイオマス由来 4-アミノ桂皮酸を利用したバイオスーパーエンブラの開発とそれを利用したフレキシブル太陽電池などの有機エレクトロニクスデバイスの開発がスタートした。また、環境省関連事業として、このポリマーをはじめとするバイオスーパーエンブラの二酸化炭素削減効果の検証が開始される見込みである。これらは、本 CREST プロジェクトの成果の実用化のための重要なリファレンスデータとなる。