

芳香族化合物の新たな微生物代謝の発見とバイオマス材料の開発

筑波大学生命環境系, 微生物サステナビリティ研究センター 梶尾 俊介

はじめに

人類は古くから微生物を利用して発酵・醸造を行い、その生活を豊かにしてきた。我が国では優れた発酵生産技術により、抗生物質やアミノ酸、核酸等が生産され、近代日本の発展に貢献してきた。近年では、バイオマスを原料に燃料・化成品を生産するバイオリファイナリーが重要視され、持続可能な社会を実現するための切り札となっている。筆者らは、微生物が有する芳香族化合物の新規代謝経路の解明を進め、これを基にした多様な芳香族化合物の生産システムの開発を行った(図1)。また、発酵産物から優れた性能を持つバイオプラスチックやリチウムイオン二次電池などのバイオ材料を開発した。以下にその概要を紹介する。

1. 発酵と高分子化学の融合が生み出す新たなバイオプラスチック

ベンゼン環にアミノ基が結合したアニリン骨格を有する芳香族アミンはポリマー原料として有用であり、そのバイオマス原料を用いた生産が期待されている。筆者らは、芳香族アミンの発酵生産からポリマー開発までの合理的な分子設計を進め、芳香族アミノ酸である4-アミノフェニルアラニン(4APhe)のエンジニアリングプラスチック原料としての有用性を見出した。さらに、4APheの生合成経路と多様な芳香族アミノ酸の代謝経路を融合し、様々な芳香族アミンの人工生合成経路を設計した(図1)。さらに、独自に取得した*Pseudomonas fluorescens*由来の4APhe生合成遺伝子*papABC*および自身が発見した代

謝酵素遺伝子を含む、真菌、植物、細菌由来の様々な代謝酵素遺伝子を用いて、大腸菌の細胞内でこれらの生合成経路を構築した¹⁾。発酵液中の芳香族アミンの回収・精製手法を確立し、発酵生産物からポリマーを合成することを可能にした。特に、糖を原料として生産させた4-アミノ桂皮酸は、北陸先端大・金子達雄教授らとの共同研究により、芳香族ジアミンやジカルボン酸モノマーへと光二量化させることで、世界最高の耐熱性を示す透明バイオポリアミドを開発した²⁾。糖由来の4-アミノフェニルエチルアミンをモノマー原料とした高耐熱性のバイオポリウレアも開発した³⁾。また、東京大・大西康夫教授、神戸大・近藤昭彦教授らとの共同研究により、セルロースバイオマスから超高耐熱性のポリベンズイミダゾールを開発した⁴⁾。これらの成果は、芳香族化合物の発酵生産からバイオ材料の開発までの一貫プロセスを示した学際研究として評価される。また、芳香族アミンの発酵生産の道を拓く先駆的な研究であり、発酵産物の実利用を促進する成果である。

2. 自在な代謝デザインが生み出す有用バイオ芳香族

糸状菌の芳香族アミノ酸代謝の有用性に着眼し、様々な糸状菌の代謝産物解析を行った。その結果、麹菌*Aspergillus oryzae*がフェニルアラニンから2-フェニルエタノール(2-PE)を生産することを見出した。2-PEの生合成にはフェニルピルビン酸を中間体とする酵母のEhrlich経路と、フェニルエチルアミンを中間体とする植物の経路が知られていたが、麹菌はその異なる生合成経路の両方を発現することを見出した⁵⁾。本経路

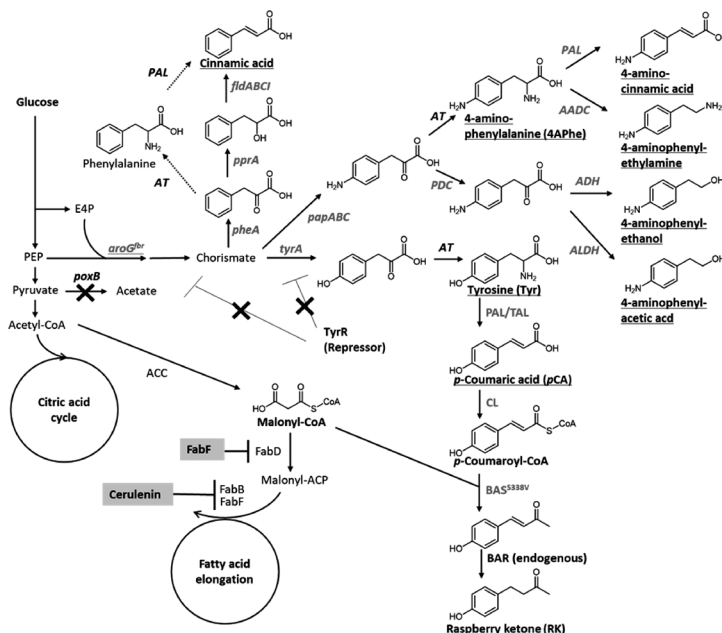


図1. これまでに開発した芳香族化合物の発酵生産プラットフォーム

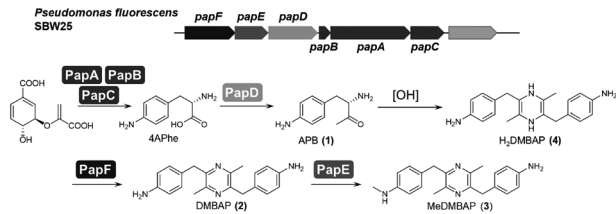


図2. 新たに見出したピラジン生合成経路

PapD: α -オキソアミン合成酵素,

PapF: ジヒドロピラジン酸化酵素, PapE: メチル基転移酵素.

を利用して、4-アミノフェニルエタノールや4-アミノフェニルエチルアミンなどの発酵生産系を構築した(図1).

バイオ芳香族の裾野を拡大するため、医薬、香料の中間体として重要な桂皮酸類、および天然香料として需要が大きいラズベリーケトンの新たな発酵生産系を構築した。桂皮酸類については、従来の生産経路をバイパスする新たな手法として、嫌気性細菌 *Clostridium sporogenes* のフェニル乳酸脱水酵素複合体 F1bABC1 を用いた桂皮酸類の生産系を開発した(図1)⁶⁾。この発酵生産効率、既存の発酵生産の効率を大きく上回る有用なものであった。ラズベリーケトンについては、細菌と植物のハイブリッドな生合成経路を構築し、経路を段階的に最適化していくことで発酵生産系を改良した(図1)⁷⁾。その結果、既存の発酵生産系の12倍の生産性でラズベリーケトンを生産し、植物原料を代替する新たなバイオ香料を供給することが可能となった。

3. 新たな生合成経路が拓く新たなバイオ材料

ピラジン化合物はベンゼン環の1位と4位の炭素原子が窒素に置き換わった複素芳香族化合物であり、香料、医薬品、色素原料などとして広く利用されている。筆者らは、*P. fluorescens* の *papABC* 遺伝子に隣接する機能未知遺伝子の解析から、*papDEF* が新規なピラジン化合物 DMBAP の生合成に関わることを発見した(図2)。PapABCにより生合成された4APheが、PapDによりアミノケトンへと変換され、この自然重合により生じたジヒドロピラジンがPapFにより酸化されピラジン環が形成されるという、酵素・化学反応を介した新たな生合成メカニズムを明らかとした(図2)⁸⁾。

新たに見出したピラジン生合成経路を活用し、*papABCDEF* を高発現させた大腸菌を用いた DMBAP の発酵生産系を構築した。また、その回収・精製系を構築し、北陸先端大・松見紀佳教授らとの共同研究により、バイオ由来 DMBAP を用いた新たなリチウムイオン二次電池材料を開発した⁹⁾。さらに、マイクロドロプレットを用いた PapDEF の基質特異性のハイ

スループット改変による多様なピラジン化合物の発酵生産や、アミノ酸発酵技術を活用した新たなピラジン生産系の構築を進めている。

おわりに

本研究では、生物の多様な代謝を活用して様々な芳香族化合物の新規発酵生産系を構築した。この過程で、麹菌の独特な2-PE生合成経路や細菌のピラジン生合成経路を発見し、これを基に新たな芳香族の生産系とバイオ材料を開発した。筆者らの基礎研究と応用研究の成果は、微生物の多様な芳香族代謝の理解に貢献し、独自の分子・代謝デザインに基づく新たな合成生物学の創出に資する。また、発酵から素材開発に至る一連の新たな技術は、バイオマス利用の可能性を広げ、持続可能な社会の構築に貢献すると期待される。新たな医薬品、香料、ポリマー原料などに広く利用される芳香族化合物に焦点を当てた本研究は、農芸化学が扱う広い科学分野と産業分野の発展に貢献するものと考えている。今後も、微生物の多様な代謝の理解を進めるとともに、その成果を生かした物質生産や材料開発を進展させていきたい。

(引用文献)

- 1) Masuo S, *et al.*, *Sci. Rep.*, 6, 25764 (2016)
- 2) Tateyama S and Masuo S, *et al.*, *Macromolecules*, 49, 3336–3342 (2016)
- 3) Minakawa H, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 86, 1114–1121 (2022)
- 4) Nag A, *et al.*, *Adv. Sustainable Syst.*, 5, 2000193 (2020)
- 5) Masuo S, *et al.*, *Fungal Genet. Biol.*, 77, 22–30 (2015)
- 6) Masuo S, *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 8701–8709 (2016)
- 7) Masuo S, *et al.*, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 10, 843843 (2022)
- 8) Masuo S, *et al.*, *ChemBioChem*, 21, 353–359 (2020)
- 9) Gupta A, *et al.*, *Sci. Rep.*, 12, 19888 (2022)

謝辞 本研究は筑波大学理工情報生命学術院生命地球科学研究群 負荷適応微生物学研究室で行われたものです。研究の機会をいただき、終始ご指導ご鞭撻を賜りました筑波大学教授 高谷直樹先生に心より御礼申し上げます。本研究成果の多くは、共同研究者の方々のご協力により達成されました。多大なるご支援を頂いた共同研究者の皆様に深く感謝致します。また、日頃からご支援を頂いている筑波大学教授 野村暢彦先生をはじめとした筑波大学微生物サステナビリティ研究センターの諸先生方、そして研究室メンバーに感謝申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦頂きました日本農芸化学会関東支部長 東京農業大学教授 松島芳隆先生に厚く御礼申し上げます。