

糖質に依存しない ムコン酸のバイオ生産



弘前大学 農学生命科学部 分子生命科学科
准教授 園木 和典

本内容は、JST 戦略的創造研究推進事業 先端的低炭素化技術開発
(特定重点領域; **ホワイトバイオテクノロジー**) の研究課題として、
長岡技術科学大学 政井英司 教授のグループと共同で実施したものです。



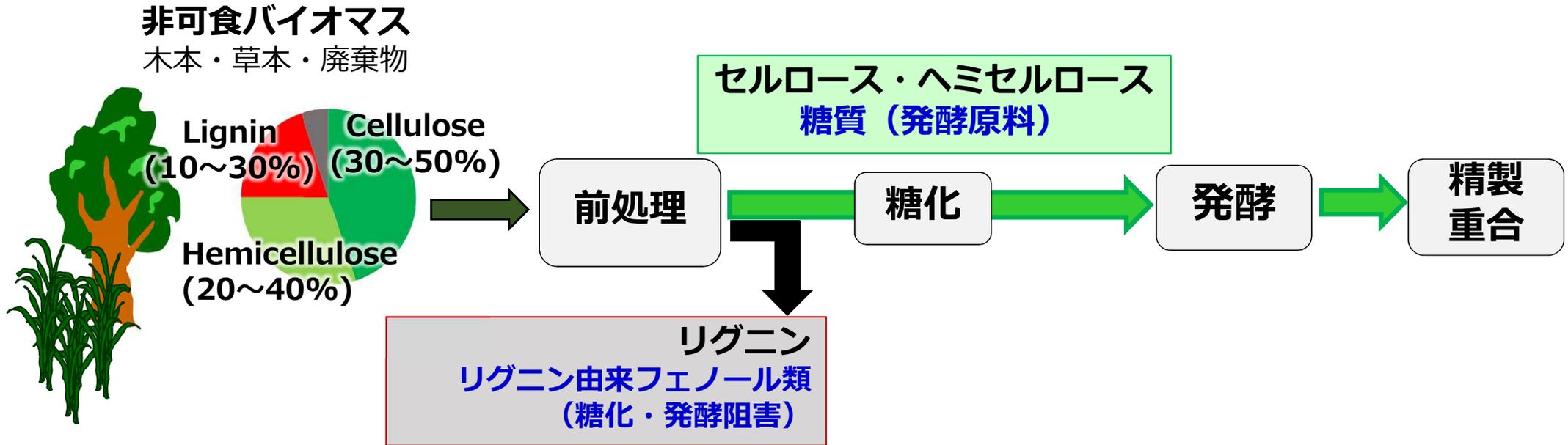
弘前大学
HIROSAKI UNIVERSITY



長岡技術科学大学
Nagaoka University of Technology



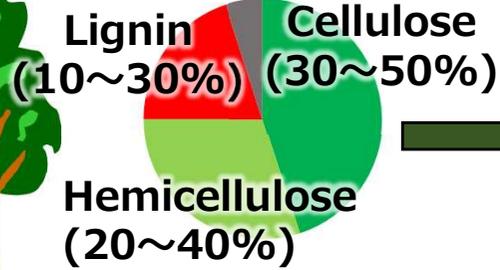
ホワイトバイオテクノロジー：バイオマスを原料に化成品等を製造し、石油製品を代替するクリーンで持続可能な技術



- **低炭素社会創出**に向けて、様々な化成品原料のバイオ生産技術開発は加速している。
- バイオ生産の主な原料は**糖質**である。
- 非可食バイオマス由来の糖質は既存の用途に加え、新材料としての開発が展開されている。
⇒ **糖質の需要競合**や**価格の高騰**が予想できる。

バイオマスから化成品原料を創出するための**技術的ボトルネック**の一つ

非可食バイオマス
木本・草本・廃棄物



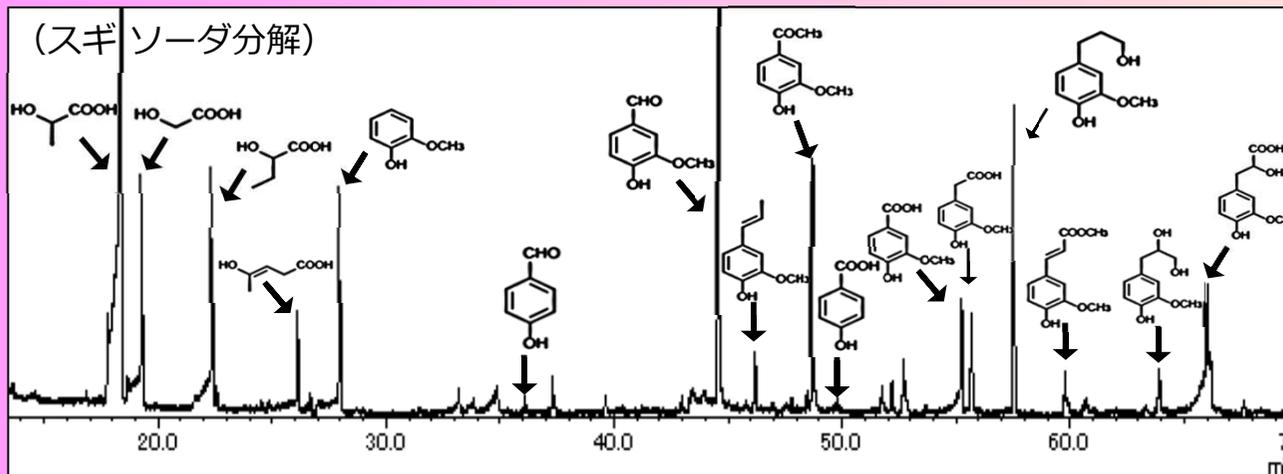
セルロース・ヘミセルロース
糖質 (発酵原料)



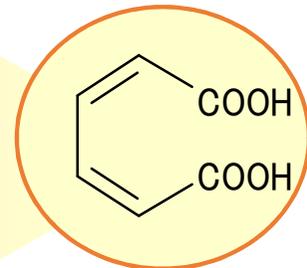
リグニン
リグニン由来フェノール類
(糖化・発酵阻害)

リグニン由来のフェノール類から化成品原料を生産することで、糖質への依存度を低減し、糖質の需要競合を回避する。

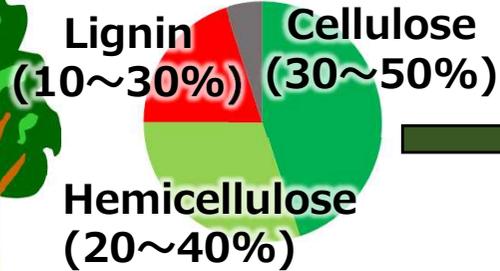
不均一なフェノール類の混合物



微生物の代謝
を利用して
特定の化合物
に収束



非可食バイオマス
木本・草本・廃棄物



セルロース・ヘミセルロース
糖質 (発酵原料)

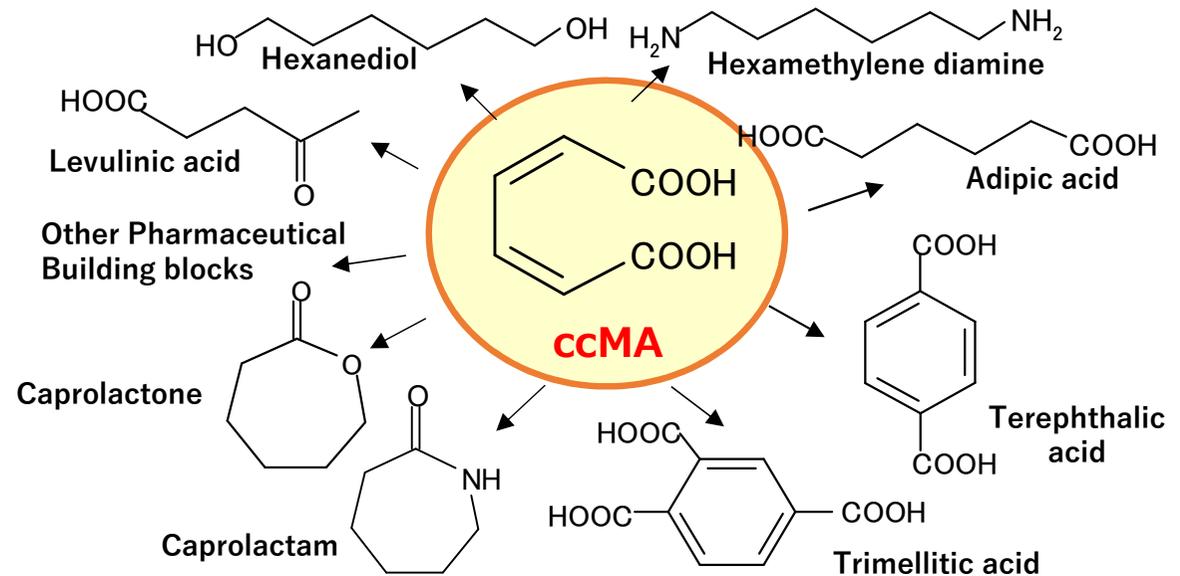


リグニン
リグニン由来フェノール類
(糖化・発酵阻害)

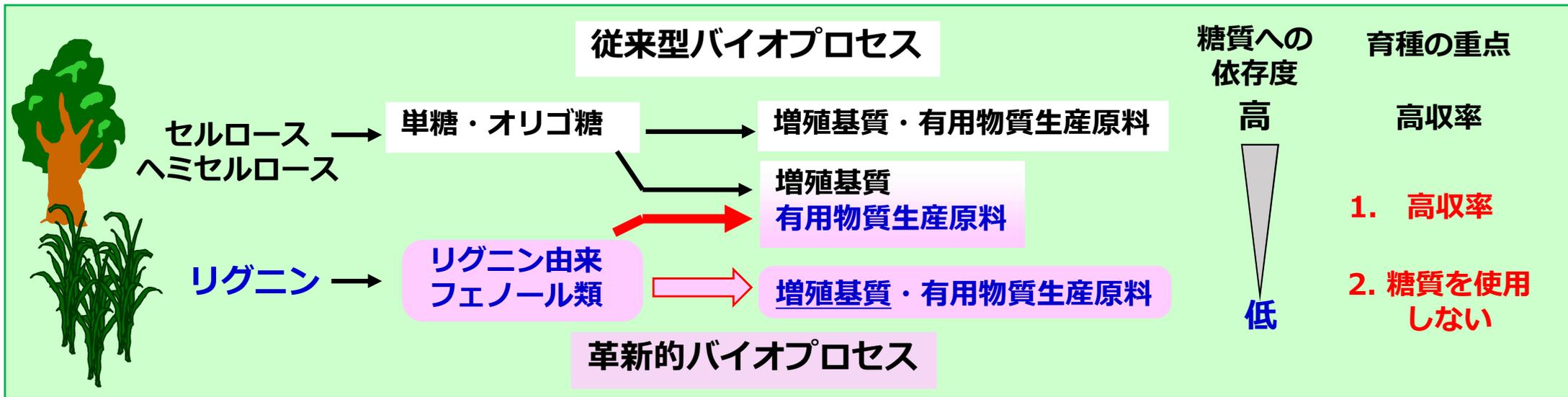
□ *cis,cis*-ムコン酸 (ccMA)

ccMAから展開可能な各化合物は、ポリアミド、ポリエチレン、ポリウレタンなど、多様なポリマーの合成原料として利用されている。

[これらは22億ドル/年の市場
(Wu, W. et al, Sci. Rep. 2017)]



リグニン由来のフェノール類からccMAを生産する微生物株の開発

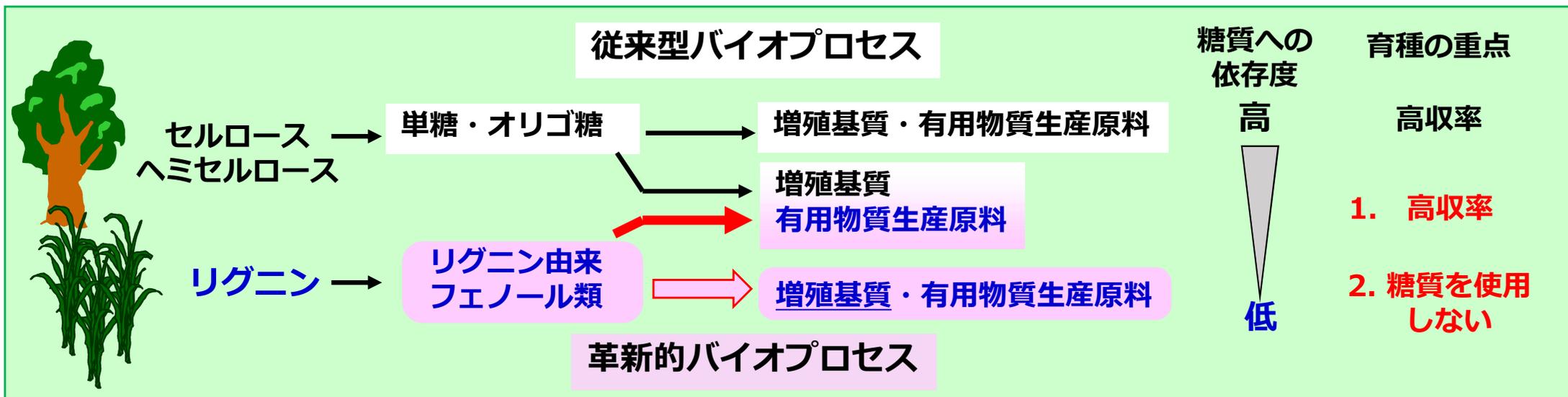


【従来技術】

糖質を微生物株の増殖基質及びccMA生産の原料として用いる。
＜糖質への依存度が高い微生物株＞

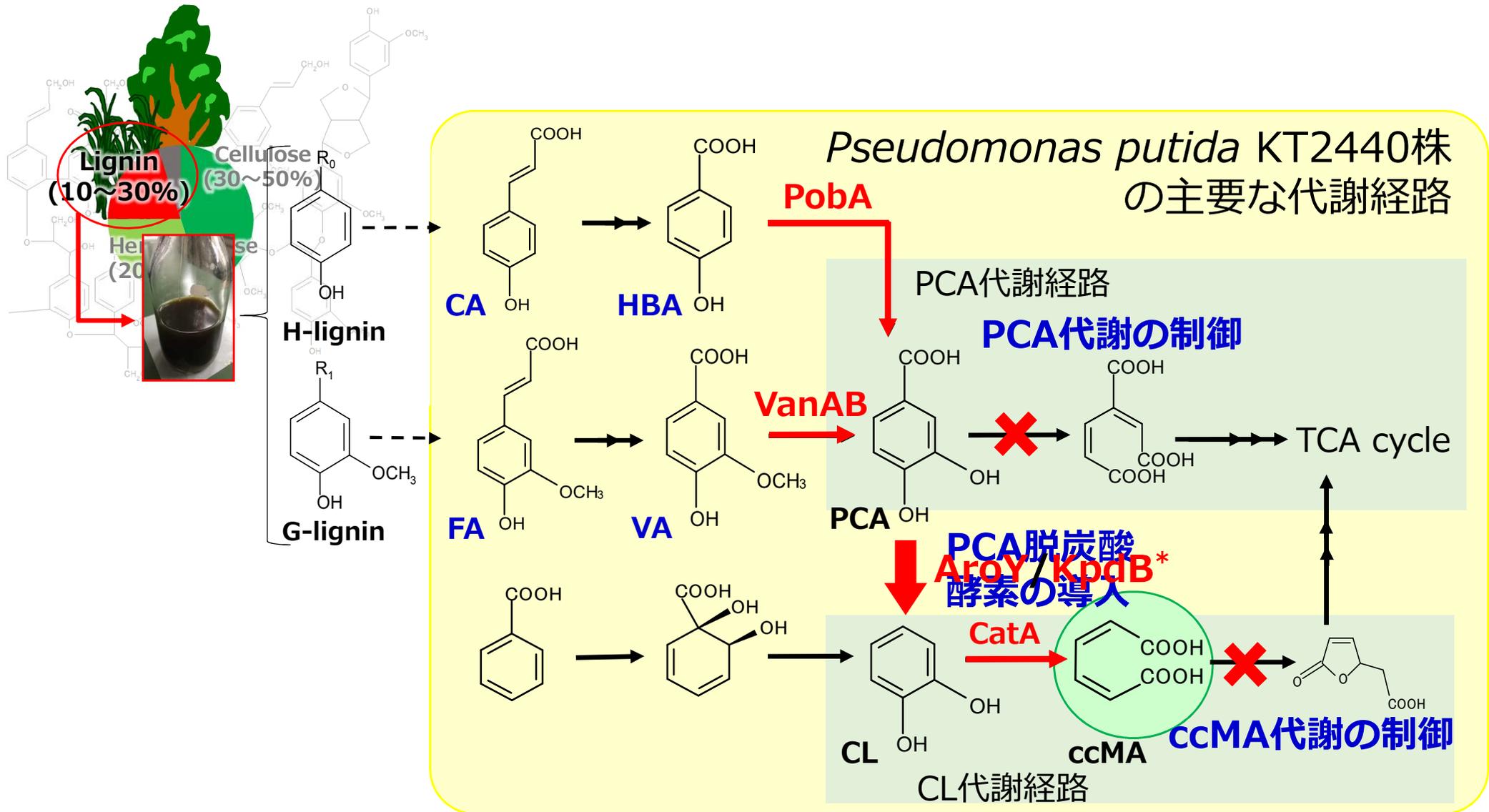
【新技術】

1. 不均一なリグニン由来フェノール類をccMA生産の原料として用いる。
＜糖質への依存度を低減し高収率でccMAを生産できる微生物株＞
2. 微生物株の増殖基質としても、リグニン由来フェノール類を用いる。
＜糖質を使用することなくccMAを生産できる微生物株＞

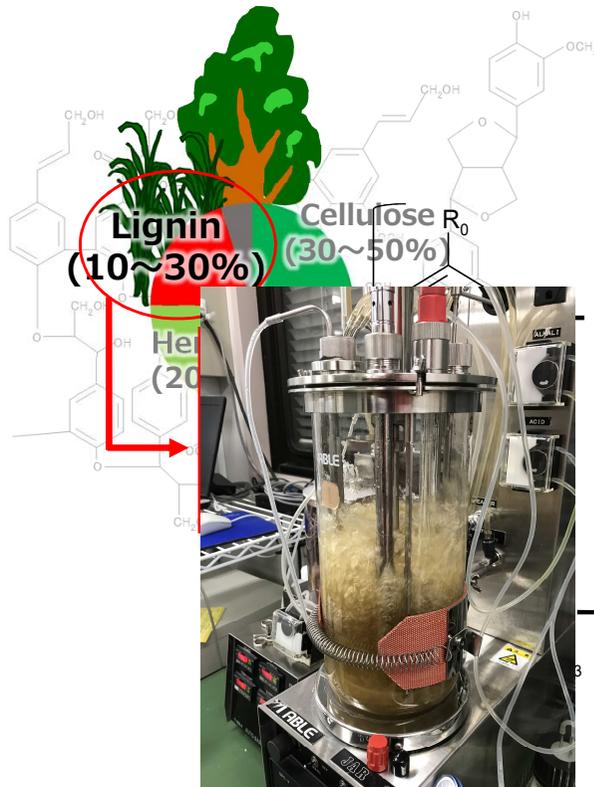


リグニン由来のフェノール類からccMAを生産する微生物株の開発

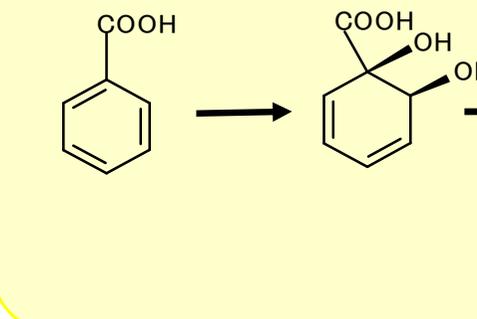
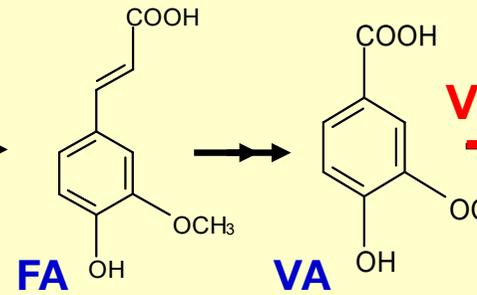
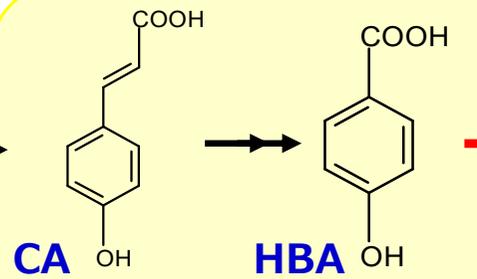
- 1. 糖質への依存度を低減し高収率でccMAを生産できる微生物株**
 多様なリグニン由来フェノール類から高収率でccMAを生産する微生物株
- 2. 糖質を使用することなくccMAを生産できる微生物株**
 リグニン由来フェノール類を利用して増殖し、かつccMAを生産する微生物株



*J. Biotechnol., 2014

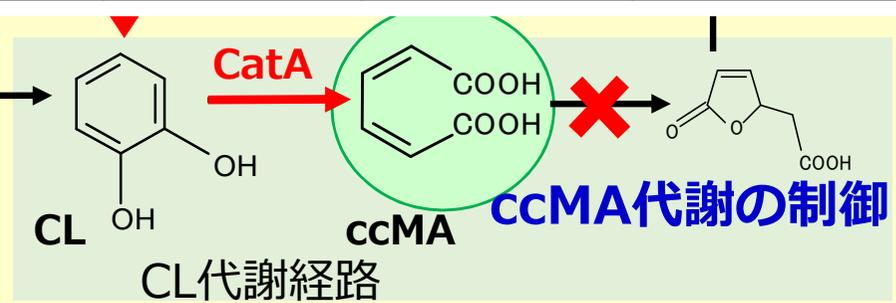


1.0 L培養
30°C, pH 7,
650 rpm, 2 vvm



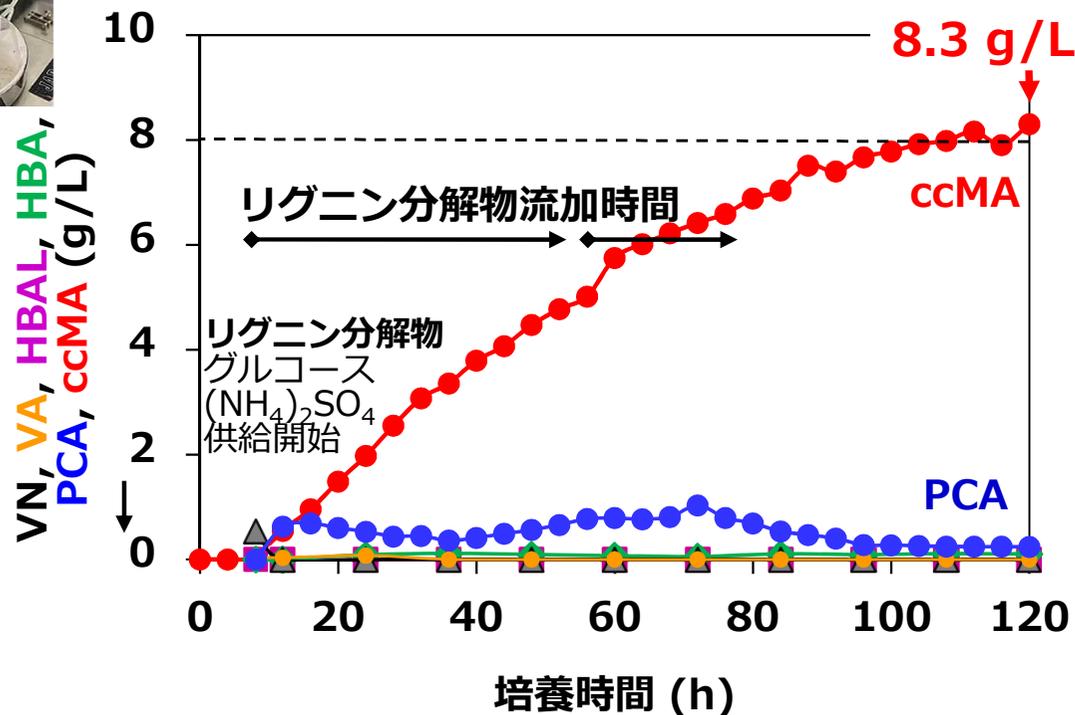
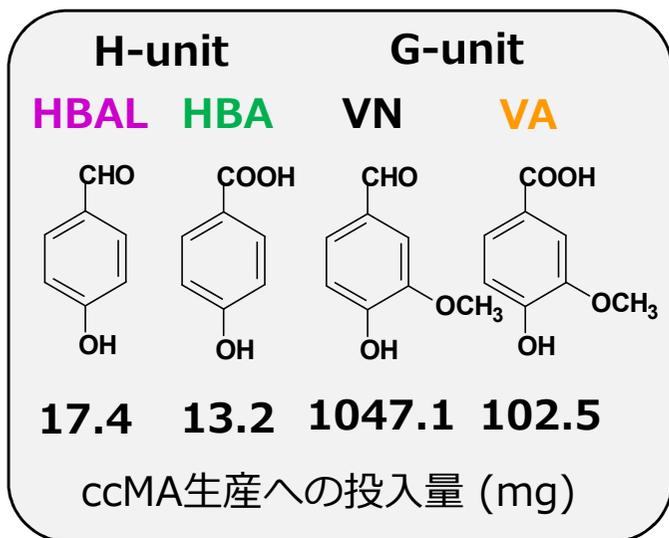
ムコン酸収率 (% 対理論収量)

基質	基質の添加量		
	1 g	2.5 g	5 g
FA	100.0±1.1	99.3±3.9	103.0±2.5
CA	93.2±2.3	100.9±3.0	100.1±3.0
VA	102.1±2.4	109.6±0.8	97.9±2.5
HBA	103.7±3.9	100.2±0.5	100.6±1.8



多様なリグニン由来フェノール類モデルから
理論収量のccMAを生産できる基本株を分子育種

アルカリニトロベンゼン酸化分解処理により脱脂スギ木粉からリグニン分解物を調製



スギリグニン分解物から、8 g/L以上のccMAを生産できることを確認した。
 スギリグニン分解物を添加の間、直線的にccMAを生産。
 スギリグニンの34.5*%(w/w)をccMAへと利用可能。

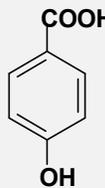
$$* \frac{[\text{HBL} + \text{HBA} + \text{VN} + \text{VA}] (\text{g})}{\text{Klason リグニン} (\text{g})} \times 100$$

代謝中間体であるPCAの蓄積が観察された

⇒ 反応機構解析から、PCA代謝の活性化因子を同定 (詳細解析中)

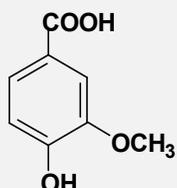
スグリグニン 分解物モデル組成

HBA



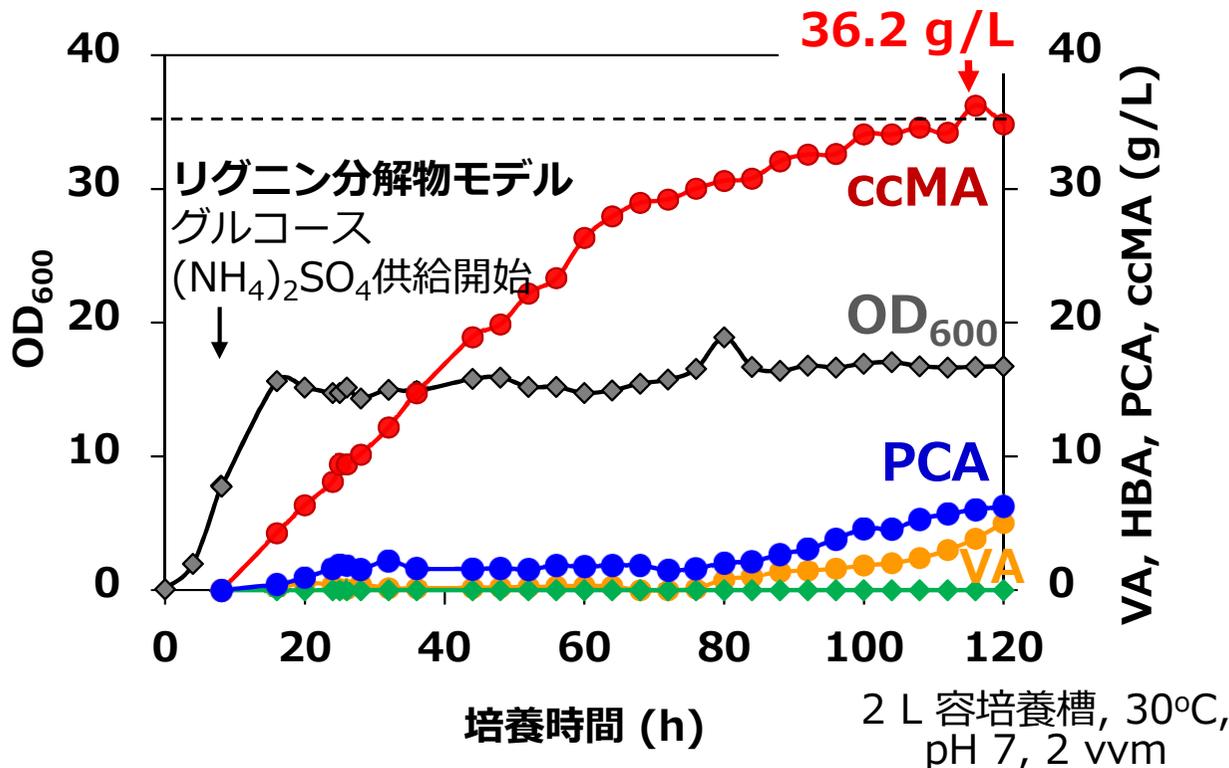
1.5 g

VA

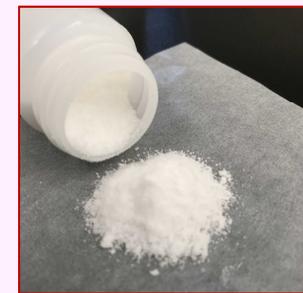


82.0 g

(120 hまでの投入量)



培養液から 精製したccMA



リグニン分解物モデルから、35 g/L以上のccMAを生産できることを確認した。

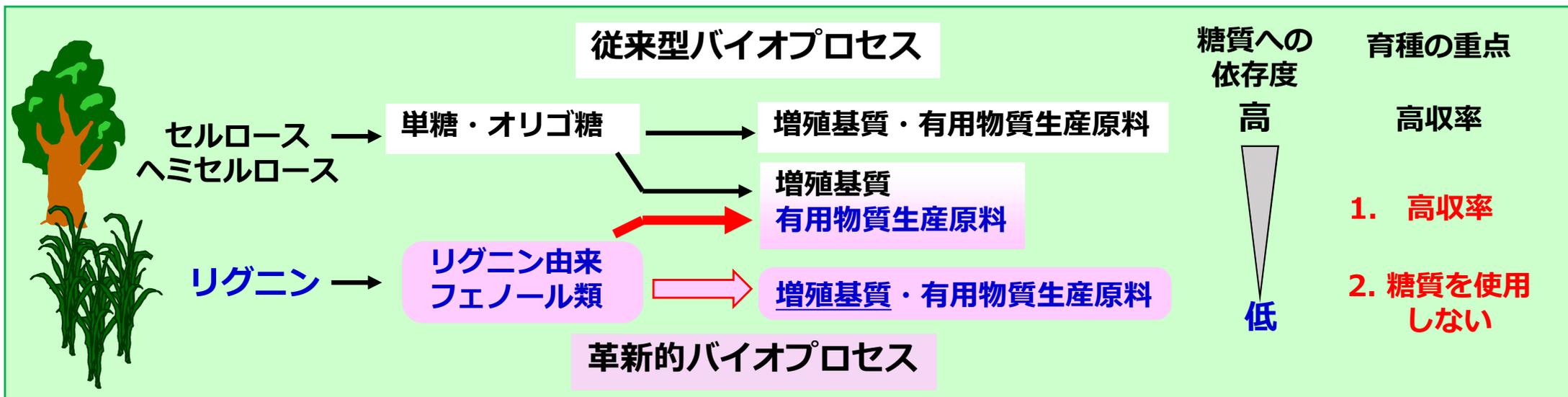
- 同培養規模でのグルコースからのccMA生産*における最高生産濃度 (36.8 g/L)と**同レベルの生産濃度**を達成。
- リグニン分解物モデルからのccMA生産では**世界最高生産濃度**。

*Niu, W. et al, 2002.

園木和典, 政井英司, 月刊 BIOINDUSTRY, 2018.

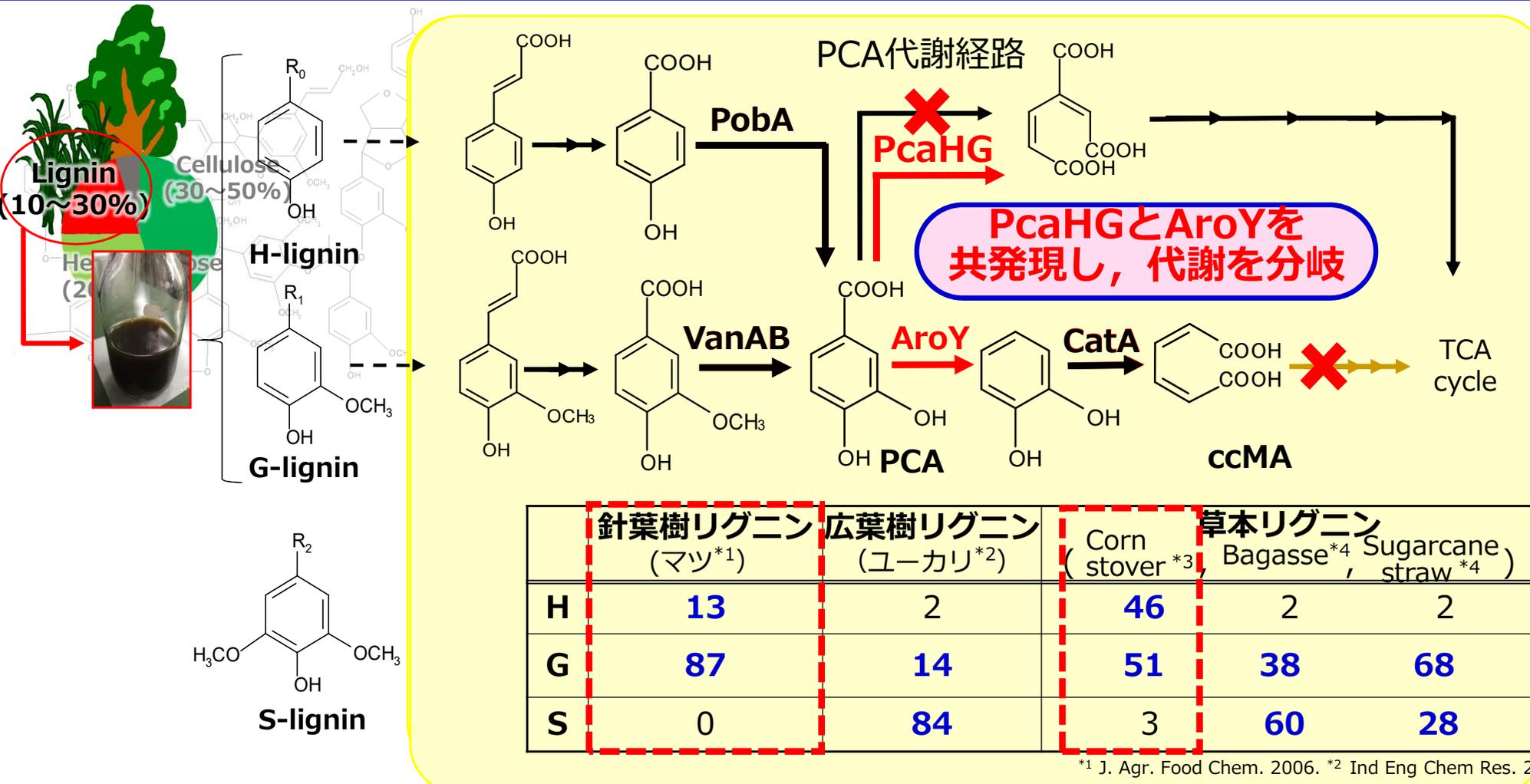
培養後半に基質であるVAと代謝中間体であるPCAが蓄積

代謝能と培養条件の最適化によりさらなる高生産期待できる



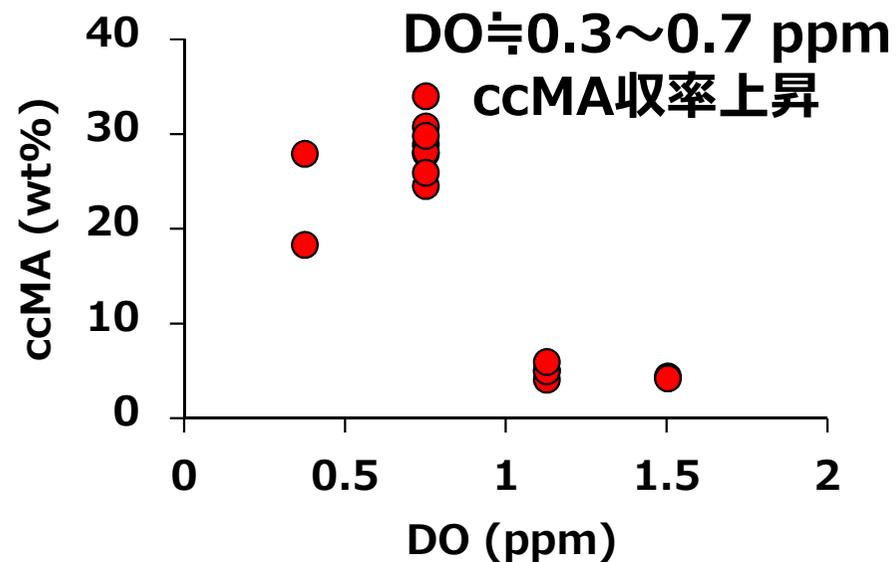
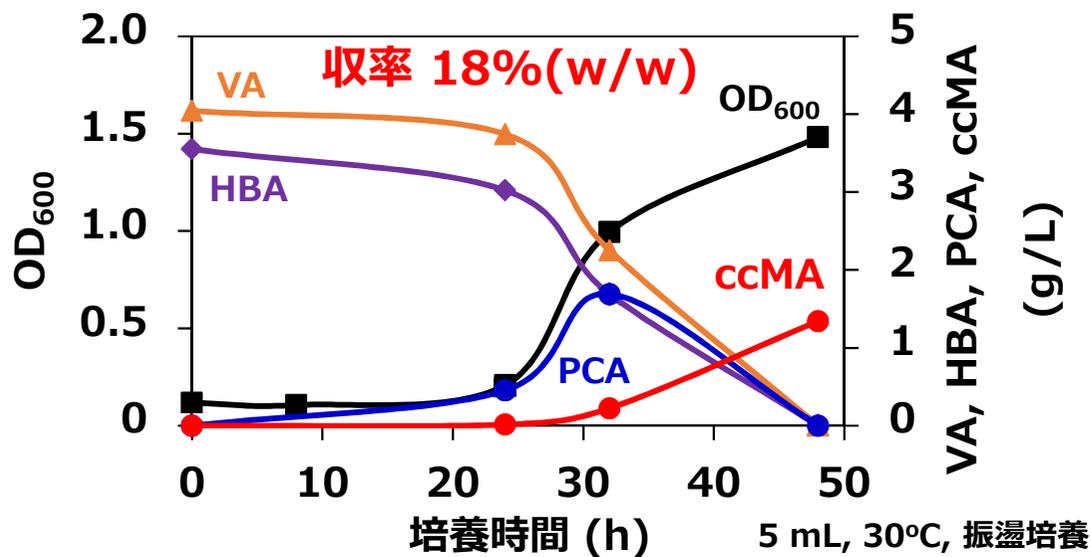
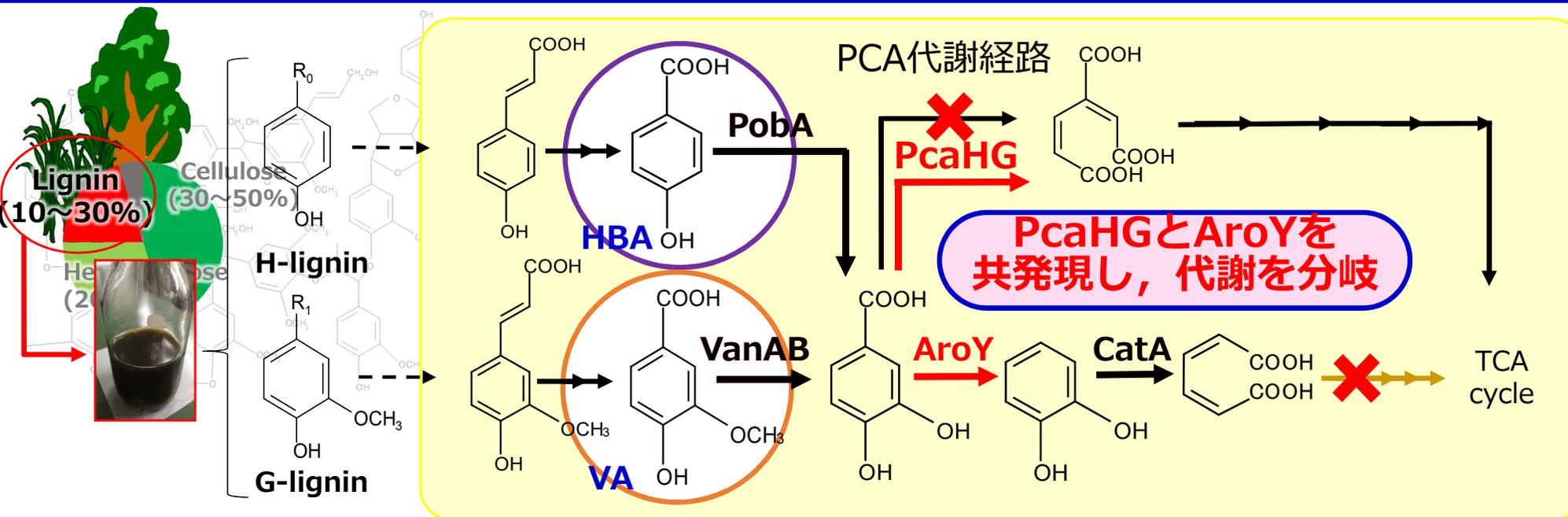
リグニン由来のフェノール類からccMAを生産する微生物株の開発

1. 糖質への依存度を低減し高収率でccMAを生産できる微生物株
 多様なリグニン由来フェノール類から高収率でccMAを生産する微生物株
2. 糖質を使用することなくccMAを生産できる微生物株
 リグニン由来フェノール類を利用して増殖し、かつccMAを生産する微生物株



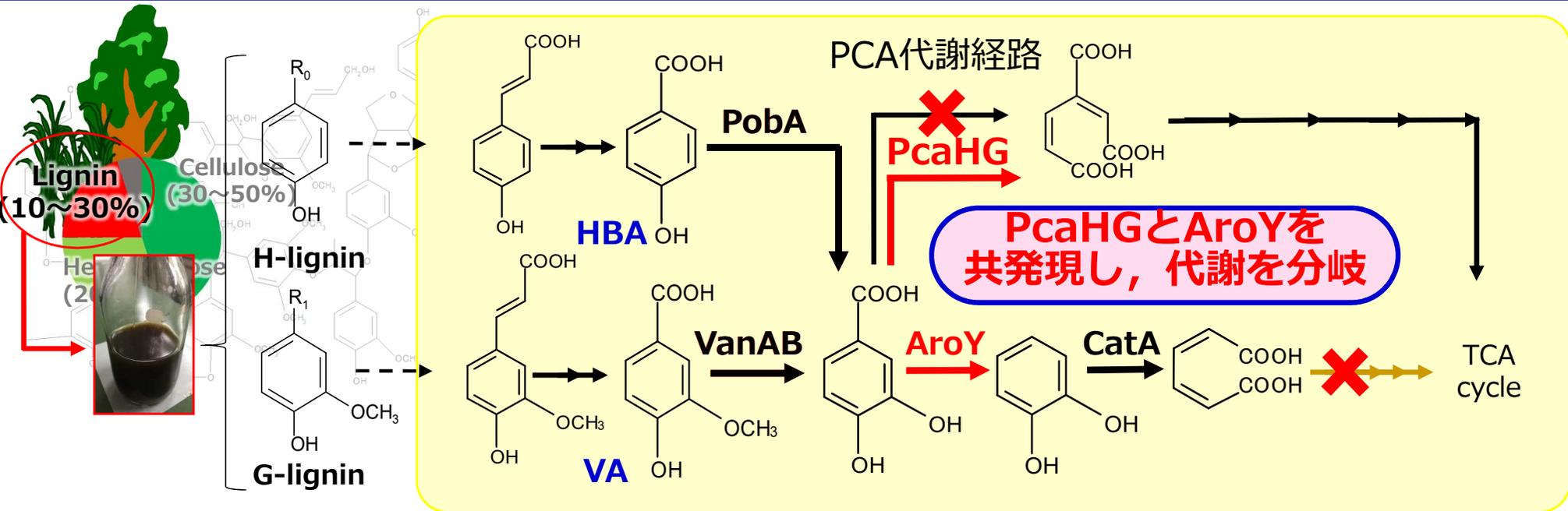
針葉樹リグニンや草本リグニンの一部はG-リグニンとH-リグニンから成り、ccMA生産基本株の代謝経路では、糖質など他の炭素源が必須

PCAに収束したフェノール類を、増殖 (PcaHG) とccMA生産 (AroY) に分岐



VAとHBAを利用して増殖しccMAを生産

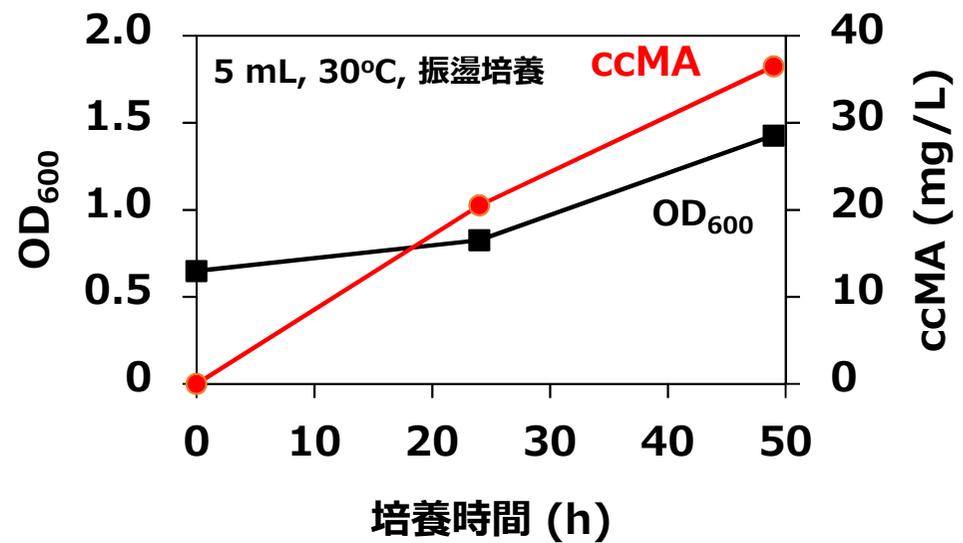
DO-stat培養により収率向上が可能



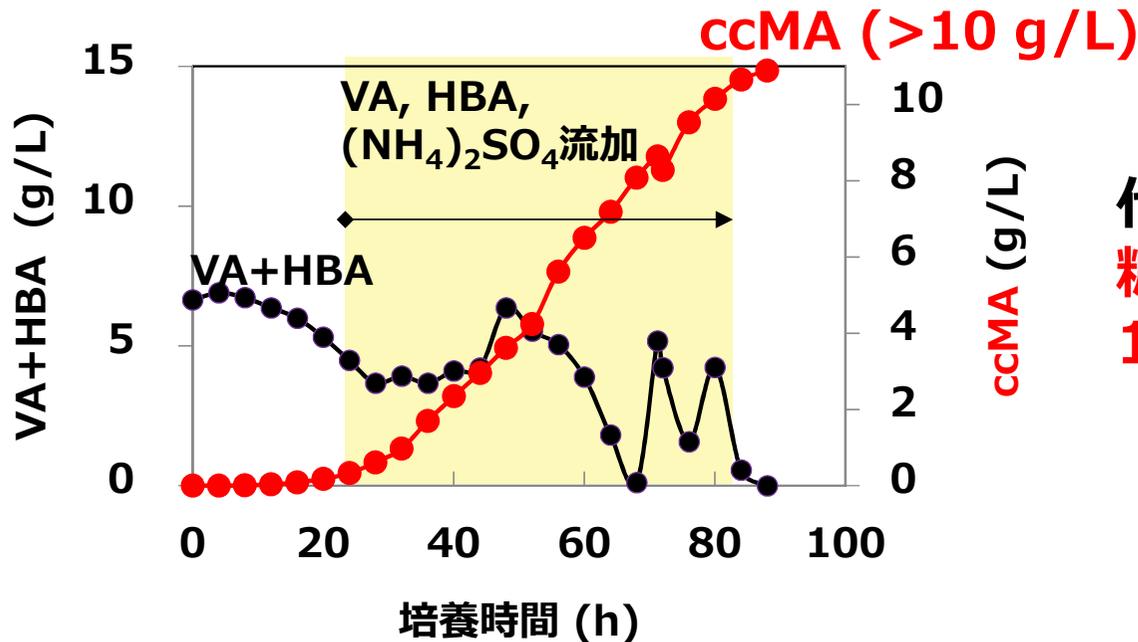
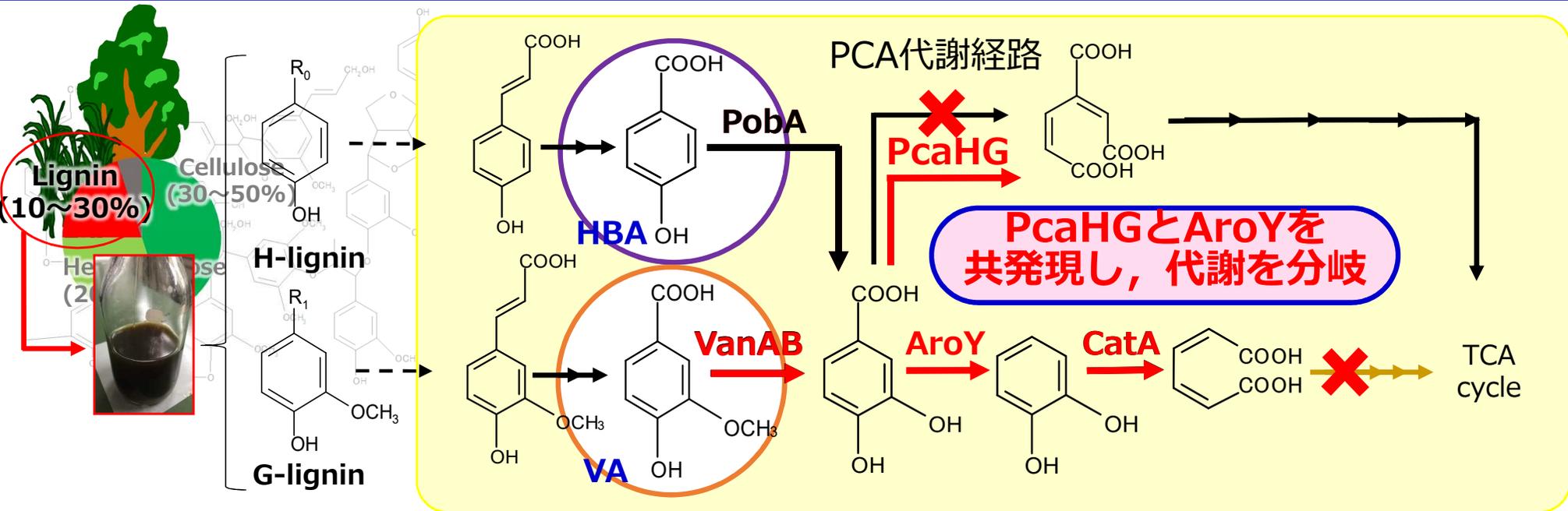
スギリグニン分解物中の代謝可能なフェノール類

HBAL	HBA	VN	VA
<chem>O=C1C=CC(=C1)O</chem>	<chem>OC(=O)C1=CC=C(O)C=C1</chem>	<chem>O=C1C=CC(=C1)C=C(O)C</chem>	<chem>OC(=O)C1=CC=C(O)C=C1C</chem>
28.3	9.9	1450	138

ccMA生産試験への投入量 (μg)

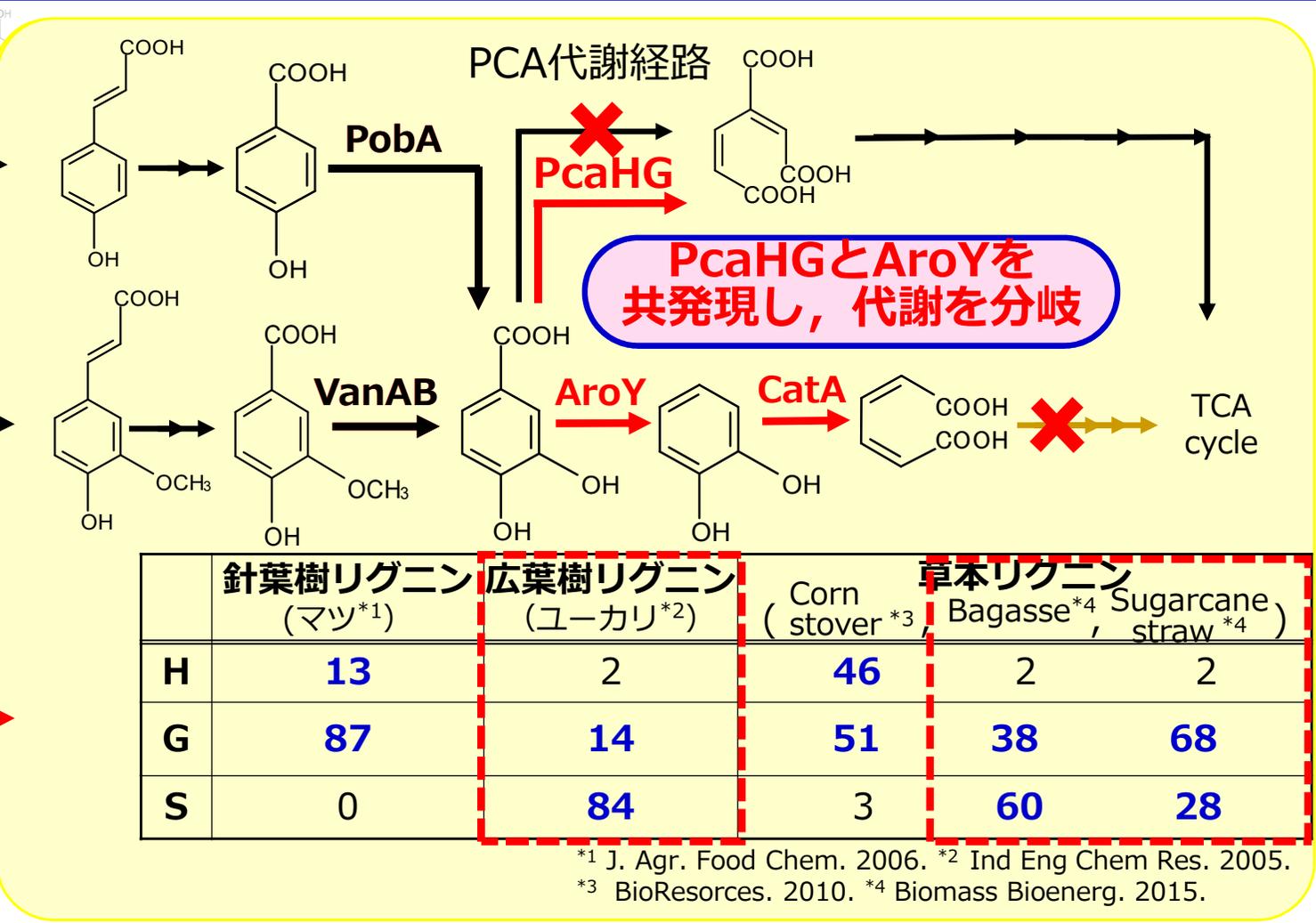
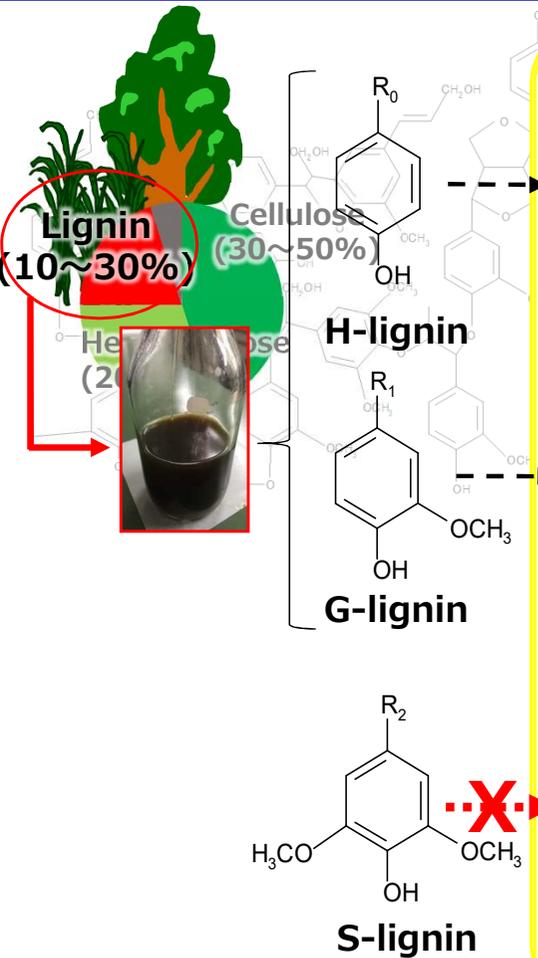


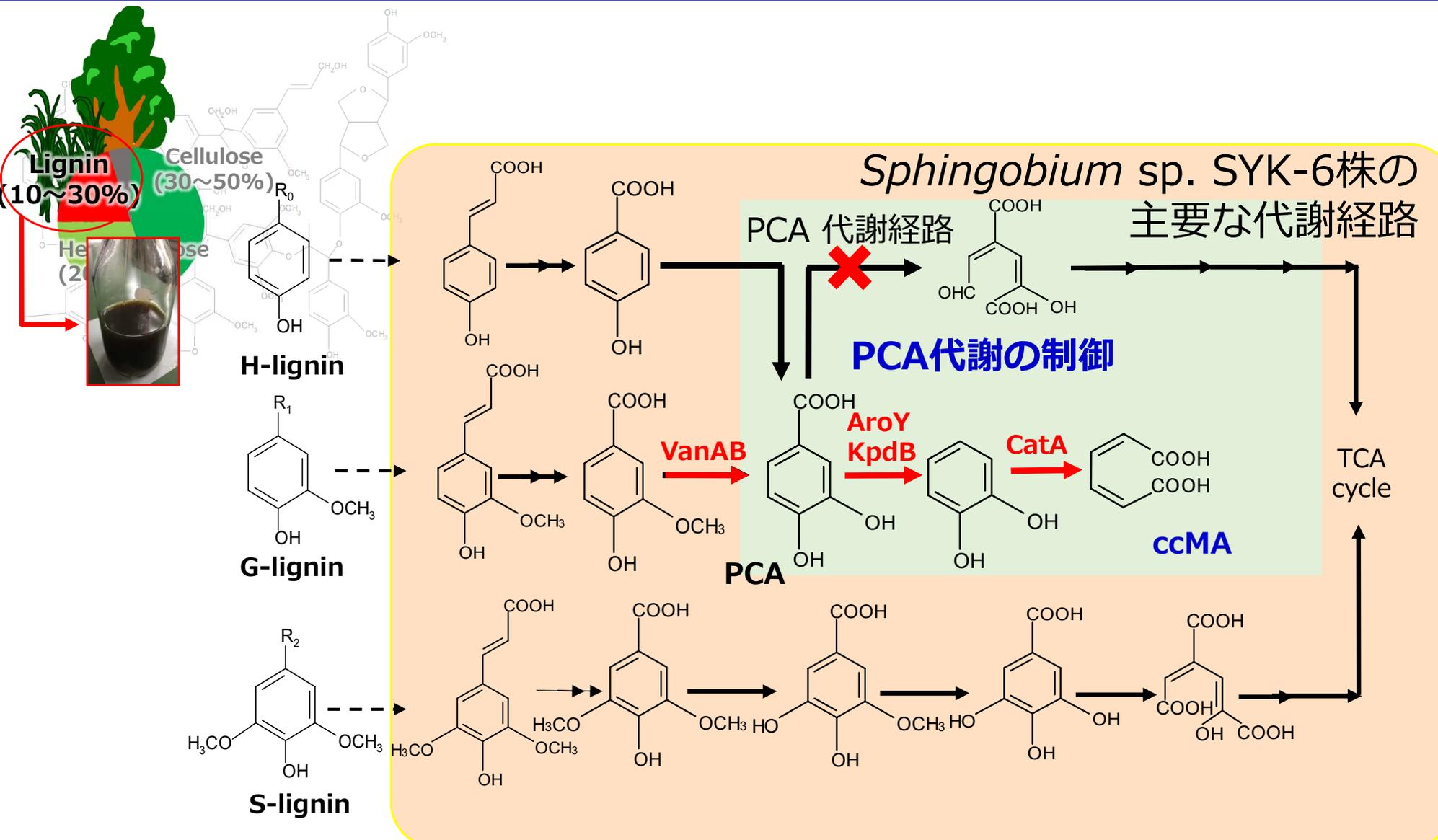
スギリグニン分解物を利用して増殖し、ccMAを生産



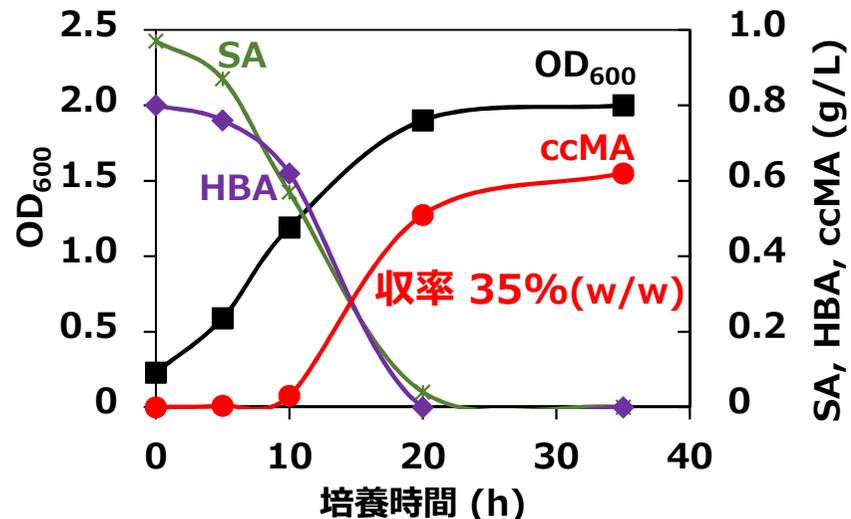
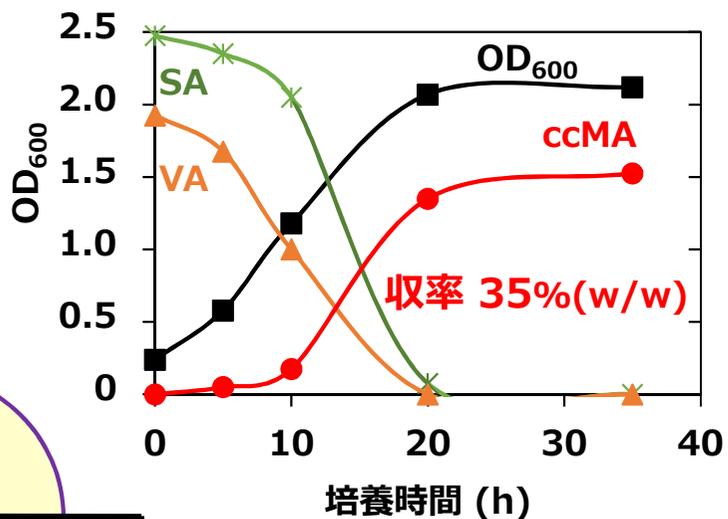
代謝の最適化, 培養条件検討を進め
糖質を使用することなく,
10 g/L以上のccMA生産が可能

日本生物工学会2018年大会



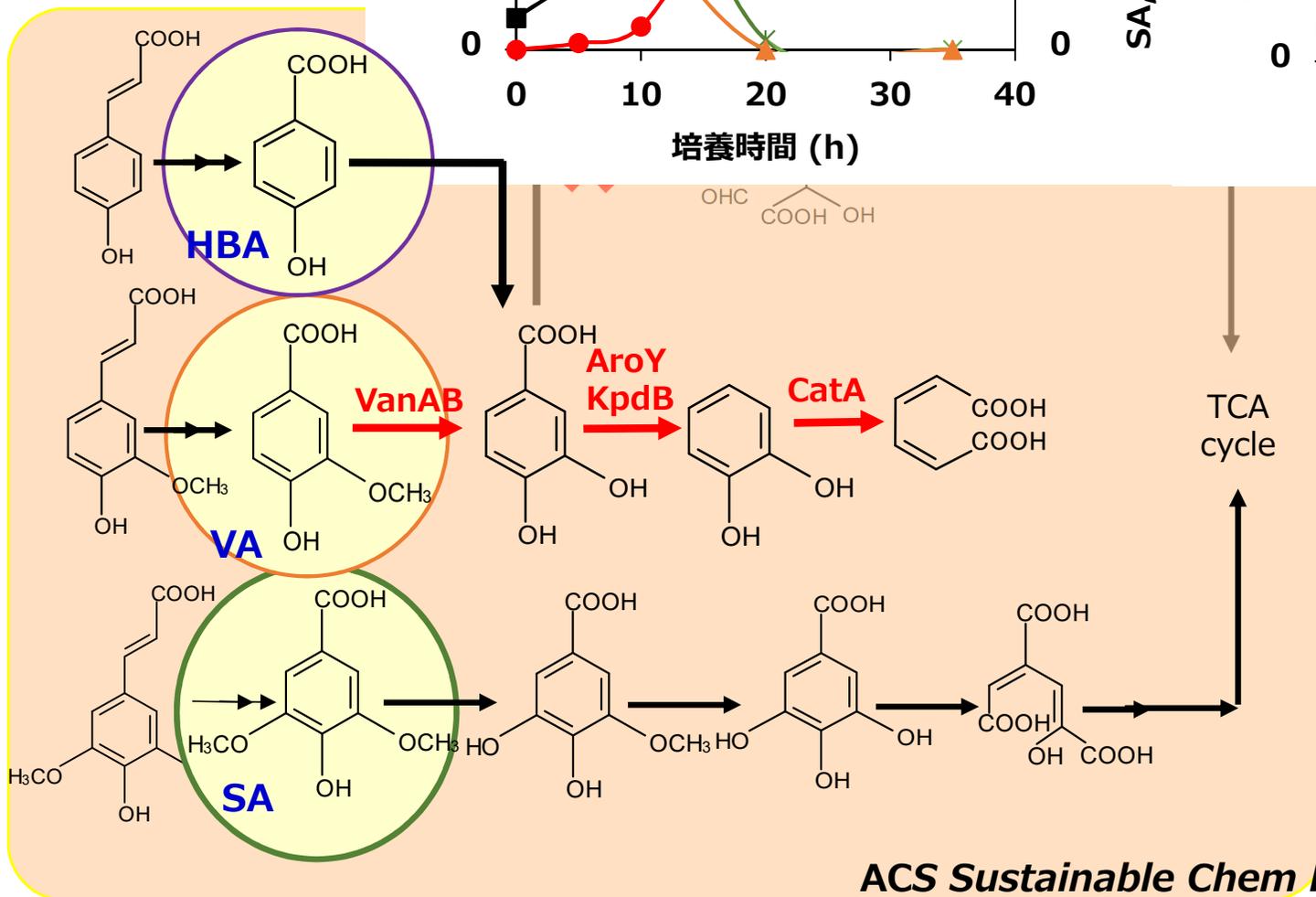


PCA 4,5-dioxygenase遺伝子破壊株を作成し、ccMA合成に関わる酵素遺伝子を組込んだ。



10 mL, 30°C, 振盪培養

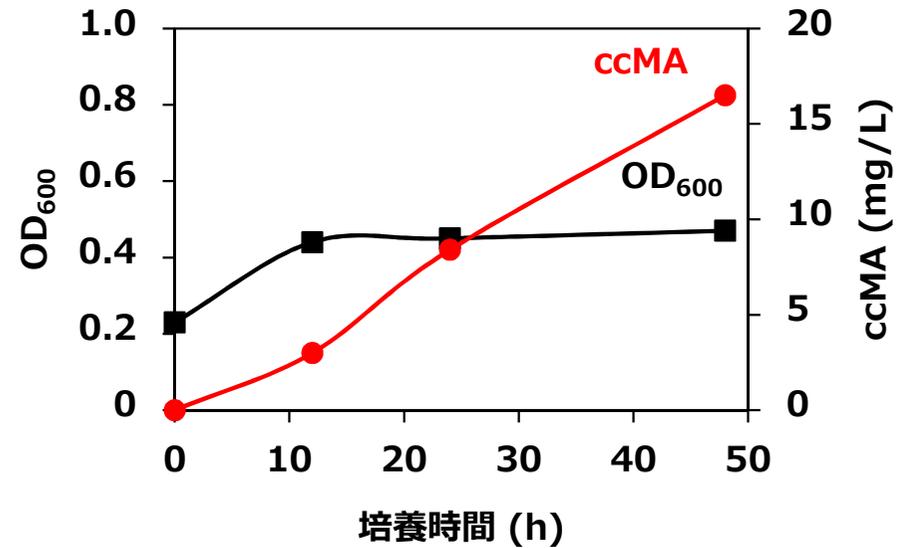
**SAを利用して増殖し、
HBAまたはVAから
ccMAを生産**



シラカバリグニン分解物中の代謝可能なフェノール類

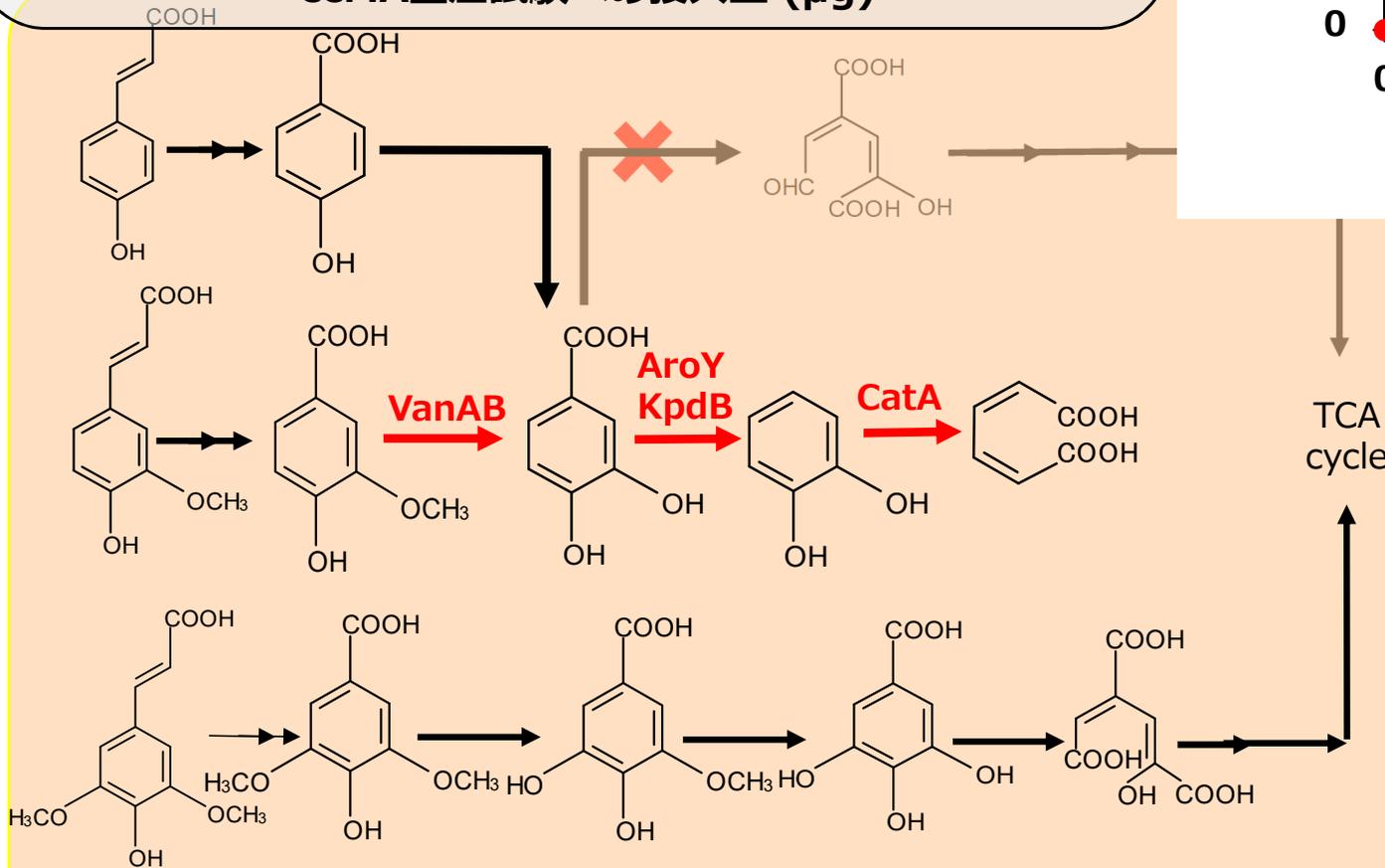
HBAL	HBA	VN	VA	SAL	SA
11.7	1.8	517.4	42.9	1162.9	145.6

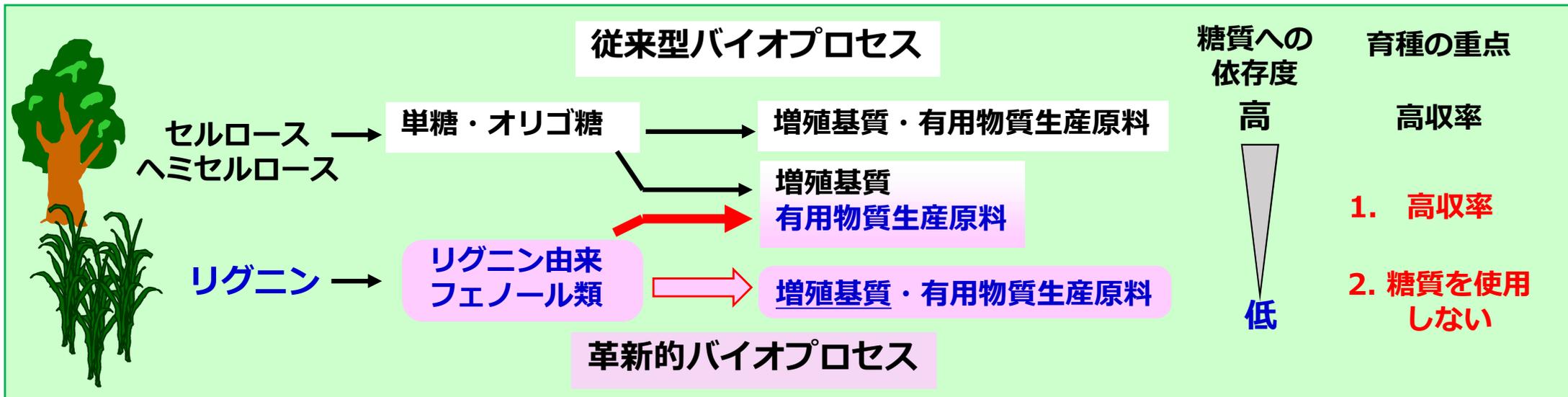
ccMA生産試験への投入量 (μg)



10 mL, 30°C, 振盪培養

シラカバリグニン分解物を利用して増殖し、
ccMAを生産

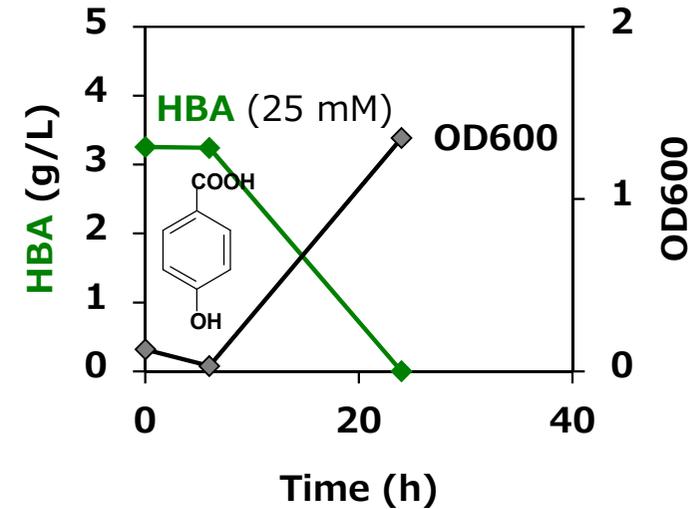
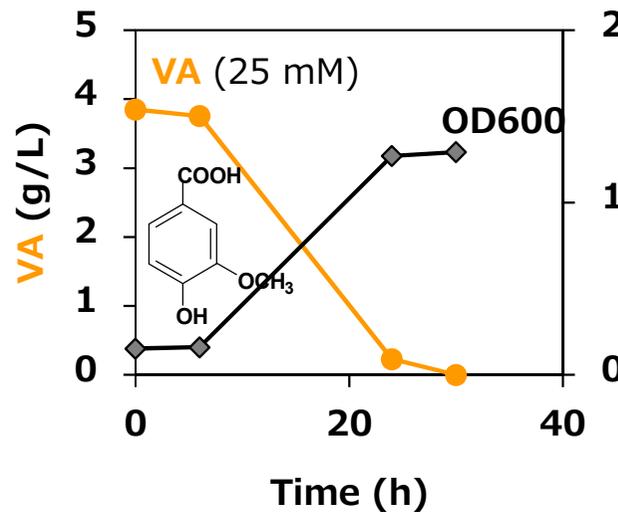
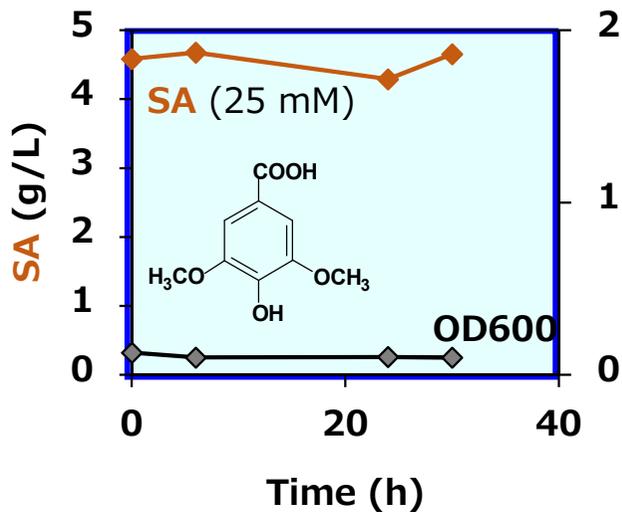




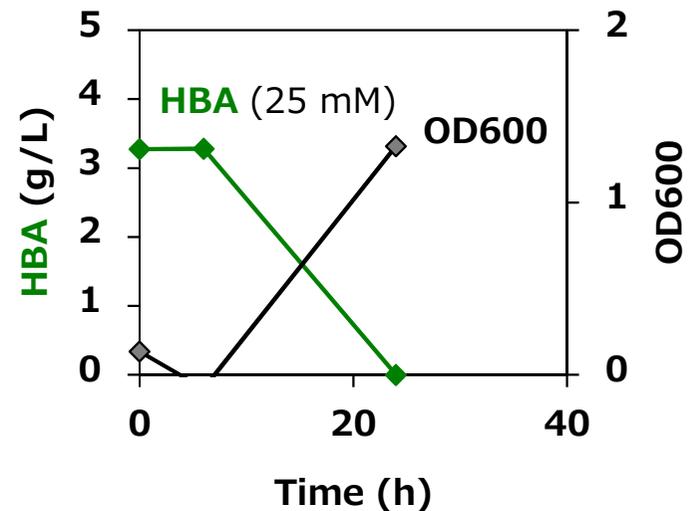
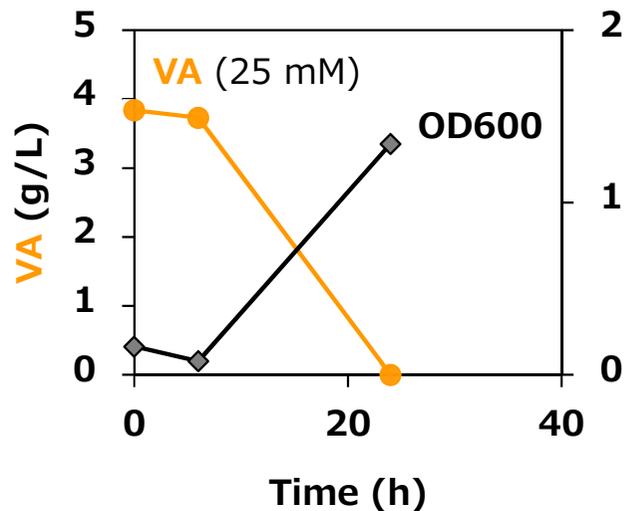
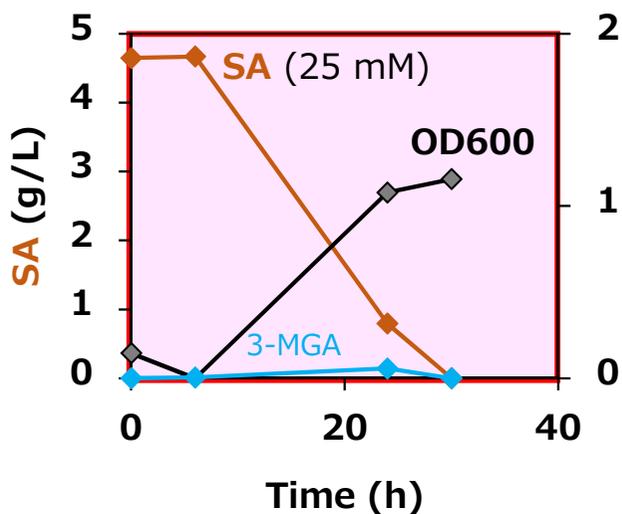
リグニン由来のフェノール類からccMAを生産する微生物株の開発

- 1. 糖質への依存度を低減し高収率でccMAを生産できる微生物株**
多様なリグニン由来フェノール類から高収率でccMAを生産する微生物株
リグニン分解物 (スギ由来) からccMAを生産可能な微生物株
- 2. 糖質を使用することなくccMAを生産できる微生物株**
リグニン由来フェノール類を利用して増殖し、かつccMAを生産する微生物株
針葉樹用・広葉樹用 2種類の微生物株

P. putida KT2440株

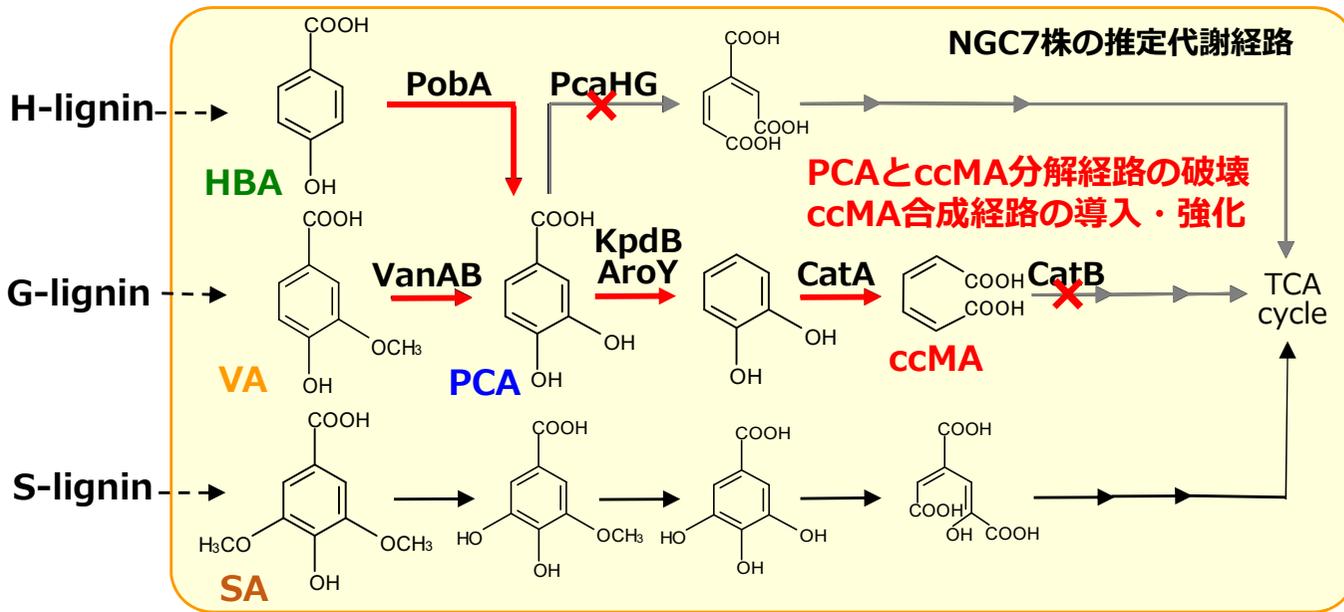


Pseudomonas sp. NGC7株

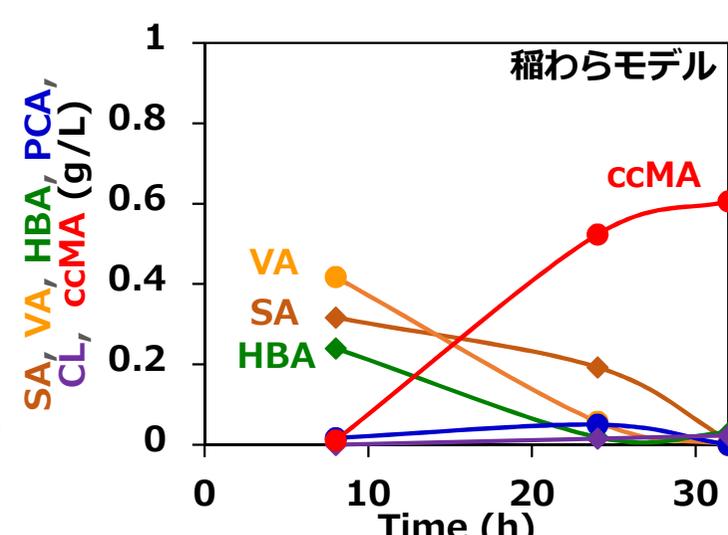
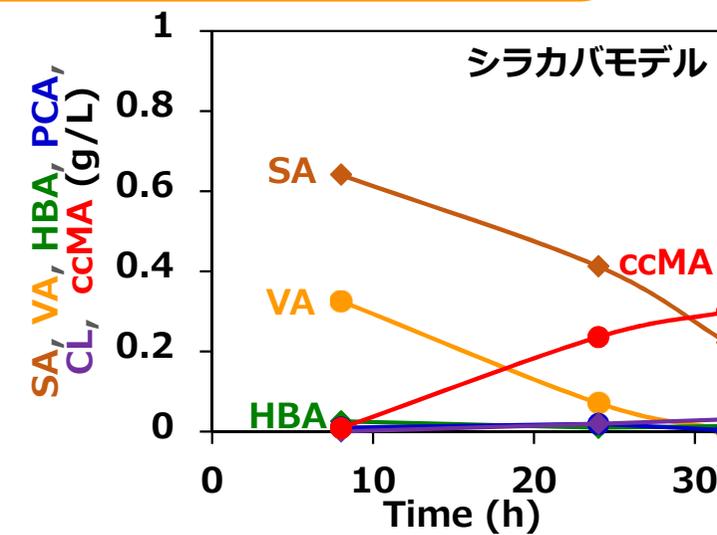
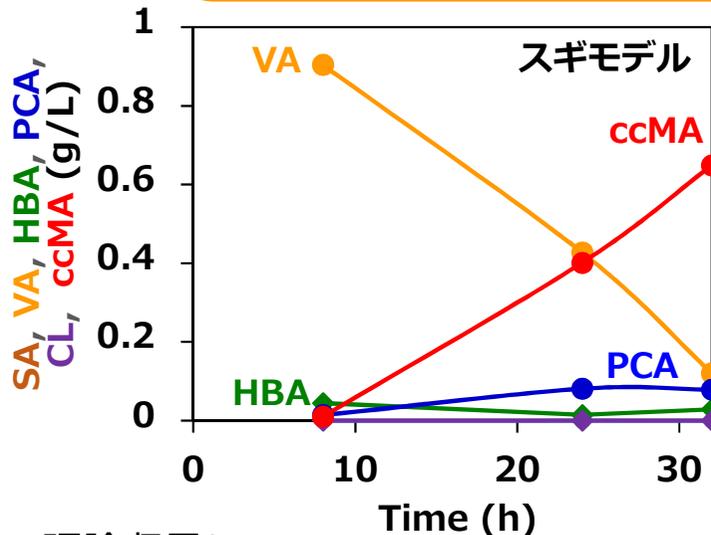


***Pseudomonas* sp. NGC7株はG-リグニンモデル (VA)、H-リグニンモデル (HBA) に加えてS-リグニンモデル (SA) の資化能を有する。**

高収率のccMA生産系への適用



	<chem>O=C(O)c1ccc(O)cc1</chem> HBA	<chem>O=C(O)c1ccc(O)c(OC)c1</chem> VA	<chem>O=C(O)c1c(OC)c(O)c(OC)c1</chem> SA
スギモデル	4.4	95.6	nd
シラカバモデル	2.7	33.8	63.5
稲わらモデル	25.8	43.5	30.7



理論収量に
対する収率 (%)

95.7

104.8

106.8

全てのリグニン分解物モデルから高収率でccMAを生産した

フラスコ培養 (120 rpm, 30°C)
二回の繰返し試験の平均値

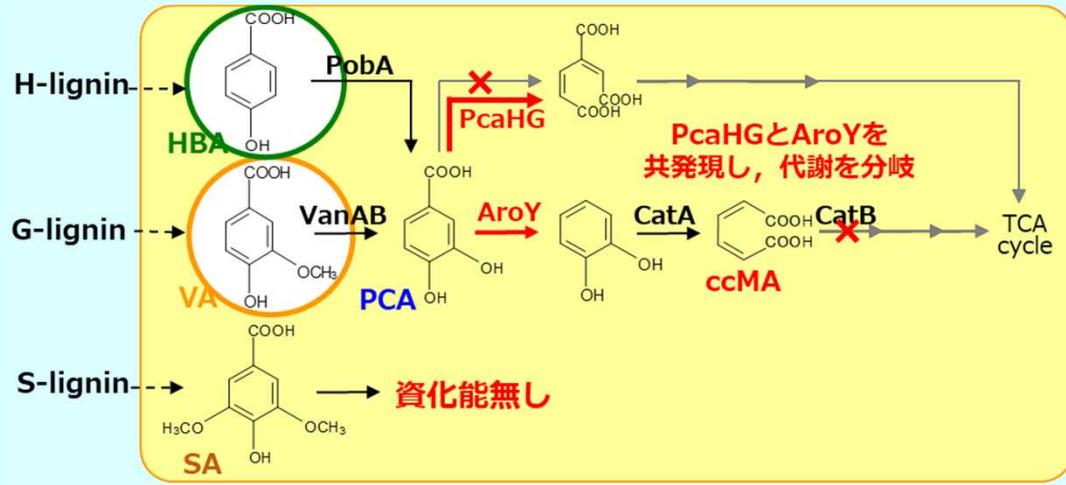
糖質を使用しないccMA生産系への適用

針葉樹用と広葉樹用
2つの宿主株

成果を適用

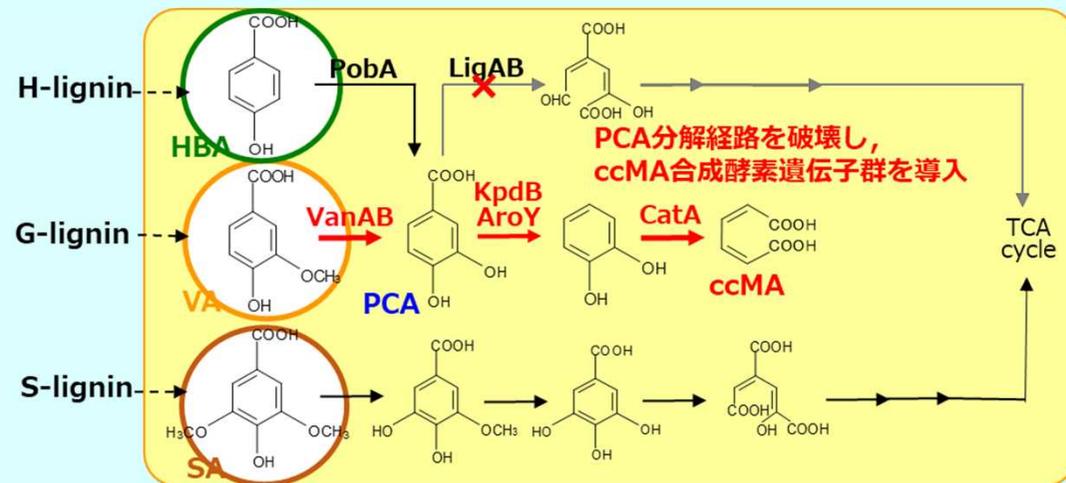
1つの宿主株で多様な
リグニン組成に対応可能

P. putida KT2440株 (針葉樹用)



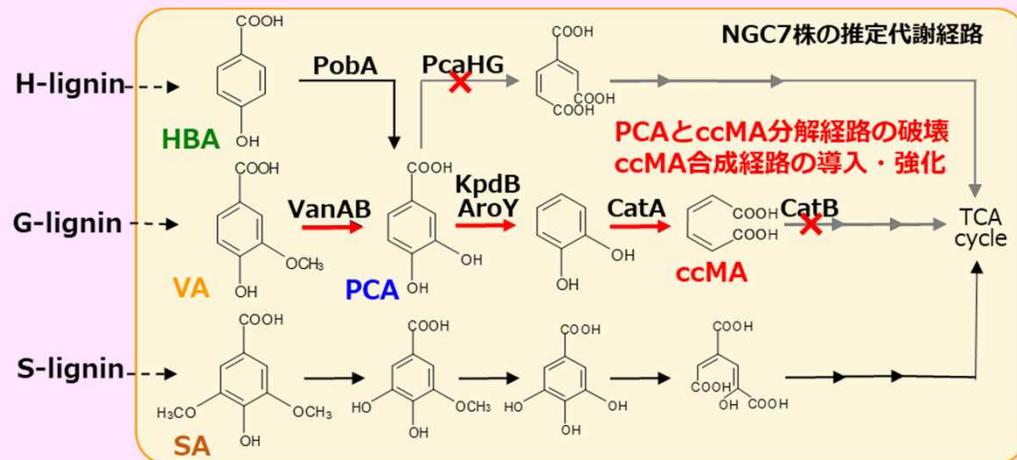
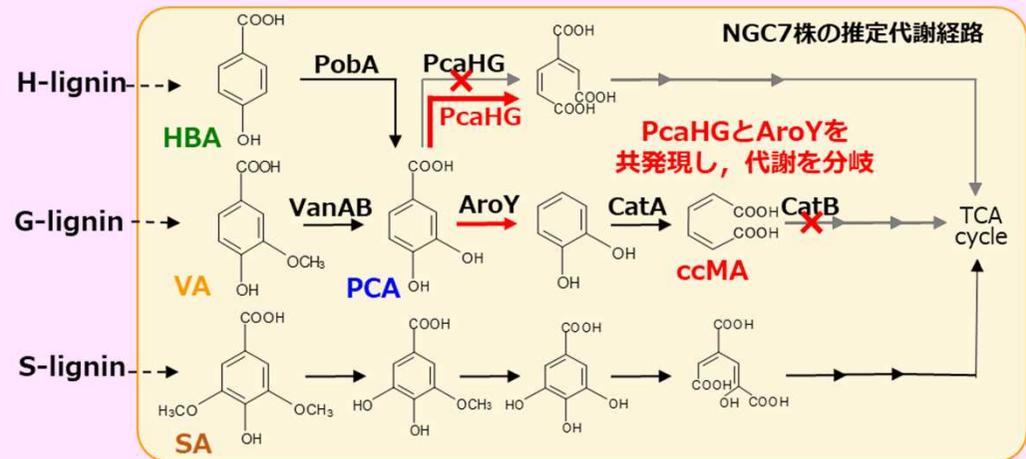
PCT/JP2018/16674

Sphingobium sp. SYK-6株 (広葉樹用)



PCT/JP2018/16675

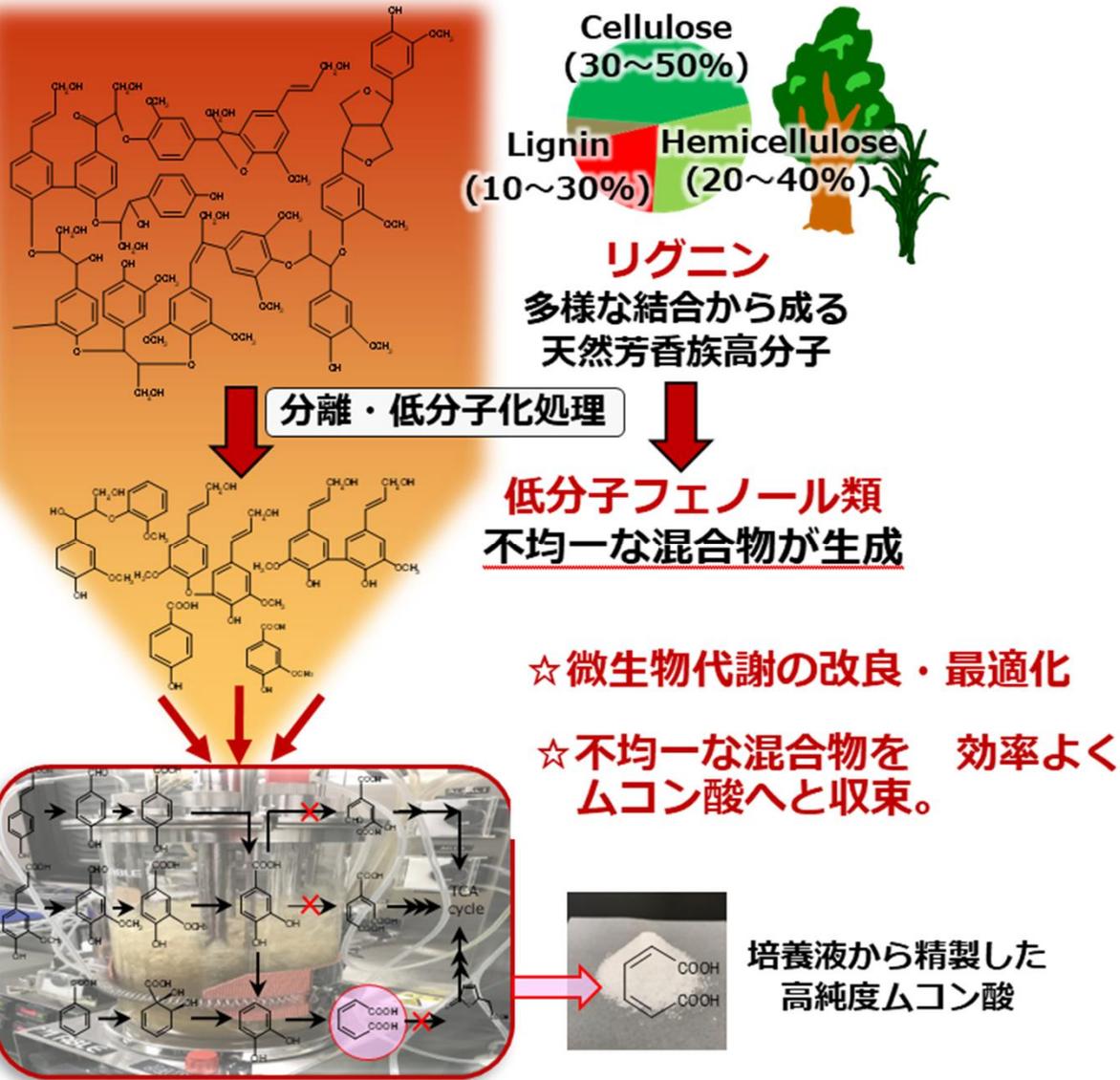
Pseudomonas sp. NGC-7株



特願2018-196001

日本農芸化学会2019大会にて発表

【新技術の概要】



【今後の展開】

- 工業利用できる様々な脂肪族，芳香族化合物を生産する微生物反応創出へと応用
石油化学由来ポリマーの代替，高機能性ポリマー合成等の原料
- **川上から川下まで連携した研究体制**によるリグニンからのccMA等有用物質生産の推進

Keywords

- ・ リグニンの**分離・低分子化**
- ・ 原料の組成に対する**代謝経路など微生物機能の最適化**
- ・ **培養方法の最適化**
- ・ 生産物の**精製，重合** など

リグニンの不均一な構造を，微生物の代謝を利用し特定の化合物へ収束するための要素技術を確立した。

- 発明の名称 : **ムコン酸産生形質転換微生物及びその利用**
- 出願番号 : **PCT/JP2018/16674**
- 出願人 : **弘前大学**
- 発明者 : **園木和典、政井英司、上村直史**

- 発明の名称 : **形質転換微生物およびその利用**
- 出願番号 : **PCT/JP2018/16675**
- 出願人 : **弘前大学、長岡技術科学大学**
- 発明者 : **政井英司、上村直史、園木和典**

- 発明の名称 : **ムコン酸産生形質転換微生物及びその利用**
- 出願番号 : **特願2018-196001**
- 出願人 : **弘前大学、長岡技術科学大学**
- 発明者 : **園木和典、政井英司、上村直史**

国立大学法人弘前大学
研究・イノベーション推進機構（東京事務所）
URA 渡部 雄太

TEL 03-3519-5060

FAX 03-3519-5061

E-mail j-tokyo@hirosaki-u.ac.jp