

「環境低負荷型の社会システム」
平成7年度採択研究代表者

土肥 義治

(理化学研究所 主任研究員)

「環境低負荷型の高分子物質生産システムの開発」

1. 研究実施の概要

生物の物質生産機能を利用して、再生可能な生物有機資源（糖、植物油など）や二酸化炭素から優れた性能や特異な機能をもつ新しい高分子材料を創製する科学技術を開拓することは、持続可能な社会を実現する上で重要な課題である。地球上の生物は、生命活動を営むために、核酸、タンパク質、多糖、ポリエステルなど多種多様な高分子物質を合成している。これらの生物高分子は、さまざまな機能を発現する生体材料として重要な役割を果たしたのちに、体内代謝や環境微生物によって分解され、最終的には二酸化炭素と水とに代謝される。その二酸化炭素を植物や藻類が再び高分子物質に変え、さらに動物がそれを利用するという、地球上の炭素サイクルが確立されてる。しかしながら、化石資源を大量に消費する人間活動によって大気中の二酸化炭素濃度が徐々に増大しており、地球環境への影響が心配されている。石油などの化石資源に依存する現行の高分子物質生産体系では、究極的には化石資源を二酸化炭素に転換し、大気中の二酸化炭素濃度を増加させることになる。21世紀には、生物有機資源（バイオマス）や二酸化炭素を原料とする高分子物質生産体系（生物化学工業など）を発展させる必要がある。

このような背景から、地球環境と調和する持続可能な人間社会を実現するための科学技術の一つとして、微生物や植物の物質生産機能を利用して、生物有機資源や二酸化炭素から人間の生活や産業活動に有用な高分子物質を生産する基盤科学技術確立のための研究課題を提案した。幸いにも、平成7年度の「戦略的基礎研究、環境低負荷型の社会システム」の一研究課題として採択され、「環境低負荷型の高分子物質生産システムの開発」を目標に研究プロジェクトを開始することができた。本研究では、高分子科学、材料科学、生物科学、環境科学の異なる学問領域で活躍している研究者の共同作業によって、新しい高分子物質の生合成、高生産生物の育種、効率的生産、高性能材料化、高機能材料化、生分解性制御、環境影響評価という一連の基礎研究を実施して、平成12年度末までの5年間で「環境低負荷型の高分子物質生産システム」を実現するための基礎技術確立することを目標としている。

ところで、微生物は、多様な炭素資源から特定の重合前駆体（モノマー）を合成

し、それを重合酵素の作用で高分子化する、最小単位のポリマー生産工場である。微生物の代謝作用と重合酵素の構造と性質を知ることによって、環境低負荷型の高分子物質生産システムを開発できると確信している。本研究では、核酸、タンパク質、多糖につづく第四の生物高分子として注目され始めたバイオポリエステルについて重点的に研究を推進している。まず初めに、微生物の高分子物質合成反応に関与する酵素群とそれらの遺伝子の構造と機能に関する研究を進め、その知見をもとに遺伝子工学や代謝制御工学などの技術を用いて、合目的構造に分子設計された新規ポリエステルを生合成する手法を開発している。さらに、遺伝子操作によって高性能ポリエステルを高い効率で生産する微生物や植物を育種している。生物合成したバイオポリエステルの材料表面構造および固体構造を制御することによって高性能材料や高機能材料を創製している。これらの高分子材料の微生物分解メカニズムを解明し、分解酵素の構造と特性を理解することによって高分子材料のリサイクリング技術を確立したいと考えている。

本研究では、バイオポリエステル（生分解性高分子）について重点的に研究を推進した。バイオポリエステルの生合成、機能解明、構造解析、遺伝子解析、高生産生物の育種、効率的生産、高性能材料化、高機能材料化、リサイクリング技術開発という一連の基礎研究を異分野の研究者の共同作業で実施している。

2．研究実施内容

本研究では、微生物や植物の物質生産機能を利用して、生物有機資源や二酸化炭素から優れた性能や特異な機能をもつ新しい高分子材料を生産する生物化学工業の基盤科学技術を確立することを目的とした基礎研究を実施している。

まず初めに、微生物の高分子物質合成反応に関与する酵素群とそれらの遺伝子の構造と機能に関する研究を進める。その知見をもとに、遺伝子工学や代謝制御工学などの技術を用いて、合目的構造に分子設計された新規生物高分子を生合成する手法を開発するとともに、遺伝子操作によって特定の生物高分子を高い効率で生産する微生物や植物を育種する。生物合成した高分子物質の表面構造および固体構造を制御することによって高性能材料や高機能材料を創製する。これらの高分子材料の微生物分解メカニズムを解明し、分解酵素の構造と特性を理解することによって高分子材料のリサイクリング技術を確立する。とくに本研究では、核酸、タンパク質、多糖につづく第四の生物高分子として注目され始めたバイオポリエステルについて重点的に研究を推進する。バイオポリエステルの生合成、機能解明、構造解析、遺伝子解析、高生産生物の育種、効率的生産、高性能材料化、高機能材料化、リサイクリング技術開発という一連の基礎研究を異分野の研究者の共同作業で実施することによって、「環境低負荷型の高分子物質生産システム」という新しい産業の基盤技術を確立する。

(1) 新規ポリエステル生合成と高生産生物の育種

新規ポリエステルを合成する2種の細菌 (*Aeromonas caviae*, *Pseudomonas* sp.,) について、ポリエステル生合成に関与する各種酵素の遺伝子の取得と解析を行い、その機能を調べた。

Pseudomonas sp. および *Aeromonas caviae* のポリエステル合成酵素遺伝子をセルフクローニングすることによって、新規共重合ポリエステルの生産能力を向上させることに成功した。

Aeromonas caviae からモノマー供給酵素 (R - 特異性エノイル - CoAヒドラーゼ) 遺伝子を取得し、その酵素の構造と性質を調べた。さらに、ヒドラーゼ酵素の結晶化に成功し、結晶構造のX線構造解析を行った。

ポリエステル生合成酵素の遺伝子操作によって糖類および植物油から共重合ポリエステルの高効率で生産する微生物 (*Alcaligenes eutrophus*、大腸菌) を育種した。

炭酸ガスからのバイオポリエステルの生物生産をめざして、植物体および藻類へのポリエステル生合成系遺伝子の導入を行い、ポリエステル合成能をもつ植物およびらん藻を育種した。

(2) 生分解性ポリエステルの材料設計と機能開発

本プロジェクトで開発してきた新しいバイオ (共重合)ポリエステルの高分子鎖微細構造を解析し、分子構造および固体構造と物性との相関関係を明らかにした。

バイオポリエステルをベースとした生分解性ポリマーアロイを作製し、ポリマーアロイの高性能化および相構造制御について検討した。

各種の脂肪族ポリエステルの単結晶を作製して、それらの結晶構造を解析した。作製した単結晶を用いて酵素分解反応を行い、結晶表面への酵素吸着および酵素分解反応過程を観察して、ポリエステルの酵素分解機構を調べた。

各種の脂肪族ポリエステルの超薄膜結晶を作製し、その表面および固体構造を調べた。さらに、超薄膜結晶の酵素分解反応を行い、構造と酵素分解速度との相関を調べた。

(3) ポリエステル加水分解酵素の構造解析と機能解明

2種の環境微生物 (*Pseudomonas stutzeri*, *Comamonas acidovorans*) のポリエステル加水分解酵素の構造と機能との相関について調べた。とくに、分解酵素のドメイン構造を解析し、各ドメインの機能を調べた。

遺伝子工学的手法を用いて、加水分解酵素の各ドメインの機能を詳細に調べた。さらに、各種の3-ヒドロキシブタン酸オリゴマーを合成し、酵素分解活性とオリゴマーの鎖長および構造との相関を調べた。

ポリ乳酸の単結晶を調製し、ポリ乳酸結晶の酵素分解メカニズムおよび加水分解メカニズムを調べた。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

T. Ohura, Y. Aoyagi, K. Takagi, Y. Yoshida, K. Kasuya and Y. Doi: Biodegradation of Poly(3-hydroxyalkanoic acids) Fibers and Isolation of Poly(3-hydroxybutyric acid)-Degrading Microorganisms under Aquatic Environments; Polym. Degrad. Stab., 63, 23-29 (1999)

T. Ohura, K. Kasuya and Y. Doi: Cloning and Characterization of the Polyhydroxybutyrate Depolymerase Gene of *Pseudomonas stutzeri* and Analysis of the Function of Substrate-Binding Domains; Appl. Environ. Microbiol., 65, 189-197 (1999)

T. Fukui, S. Yokomizo, G. Kobayashi and Y. Doi: Co-expression of Polyhydroxyalkanoate Synthase and (R)-Enoyl-CoA Hydratase Genes of *Aeromonas caviae* Establishes Copolyester Biosynthesis Pathway in *Escherichia coli* ; FEMS Microbiol. Lett., 170, 69-75 (1999)

Y. He, T. Masuda, A. Cao, N. Yoshie, Y. Doi and Y. Inoue: Thermal, Crystallization, and Biodegradation Behavior of Poly(3-hydroxybutyrate) Blends with Poly(butylene succinate-co-butylene adipate) and Poly(butylene succinate-co-ε-caprolactone); Polym. J., 31, 184-192 (1999)

Y. Yoshie, M. Fujiwara, K. Kasuya, H. Abe, Y. Doi and Y. Inoue: Effect of Monomer Composition and Composition Distribution on Enzymatic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate); Macromol. Chem. Phys., 200, 977-982 (1999)

H. Nakashita, Y. Arai, K. Yoshioka, T. Fukui, Y. Doi, R. Usami, K. Horikoshi and I. Yamaguchi: Production of Biodegradable Polyester by a Transgenic Tobacco; Biosci. Biotechnol. Biochem., 63, 870-874 (1999)

K. Kasuya, T. Ohura, K. Masuda and Y. Doi: Substrate and Binding Specificities of Bacterial Polyhydroxybutyrate Depolymerases; Int. J. Biol. Macromol., 24, 329-336 (1999)

T. Kichise, T. Fukui, Y. Yosida and Y. Doi: Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates (PHA) by Recombinant *Ralstonia eutropha* and Effects of PHA Synthase Activity on in vivo PHA Biosynthesis; Int. J. Biol. Macromol., 25, 69-77 (1999)

K. Sudesh, T. Fukui, K. Taguchi, T. Iwata and Y. Doi: Improved Production of Poly(4-hydroxybutyrate) by *Comamonas acidovorans* and its Freeze-Fracture Morphology; Int. J. Biol. Macromol., 25, 79-85 (1999)

S. Kusaka, T. Iwata and Y. Doi: Properties and Biodegradability of Ultra-high-molecular-weight Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Produced by a Recombinant *Escherichia coli*; Int. J.

Biol. Macromol., 25, 87-94 (1999)

T. Iwata, Y. Doi, S. Nakayama, H. Sasatsuki and S. Teramachi: Structure and Enzymatic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) Copolymer Single Crystals with an Extracellular PHB Depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1; Int. J. Biol. Macromol., 25, 169-176 (1999)

H. Abe, Y. Kikkawa, H. Aoki, T. Akehata, T. Iwata and Y. Doi: Crystallization Behavior and Thermal Properties of Melt-Crystallized Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid-co-6-hydroxyhexanoic acid] Films; Int. J. Biol. Macromol., 25, 177-183 (1999)

H. Abe and Y. Doi: Structural Effects on Enzymatic Degradabilities for Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and Its Copolymers; Int. J. Biol. Macromol., 25, 185-192 (1999)

H. Mitomo and Y. Doi: Lamellar Thickening and Cocrystallization of Poly(hydroxyalkanoate)s on Annealing; Int. J. Biol. Macromol., 25, 201-205 (1999)

K. Taguchi, Y. Aoyagi, H. Matsusaki, T. Fukui and Y. Doi: Co-expression of 3-Ketoacyl-ACP Reductase and Polyhydroxyalkanoate Synthase Genes Induces PHA Production in *Escherichia coli* HB101 Strain; FEMS Microbiol. Lett., 176, 183-190 (1999)

T. Iwata and Y. Doi: Enzymatic Degradation of Biosynthetic and Chemosynthetic Polymers; "Biochemical Principles and Mechanisms of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers" Ed. by A. Steinbuehl, Wiley-VCH, 214-221 (1999)

K. Tabata, K. Kasuya, H. Abe, K. Masuda and Y. Doi: Poly(aspartic acid) Degradation by a *Sphingomonas* sp. Isolated from Freshwater; Appl. Environ. Microbiol., 65, 4268-4270 (1999)

K. Taguchi, Y. Aoyagi, H. Matsusaki, T. Fukui and Y. Doi: Over-Expression of 3-Ketoacyl-ACP Synthase III or Malonyl-CoA-ACP Transacylase Gene Induces Monomer Supply for Polyhydroxybutyrate Production in *Escherichia coli* HB 101; Biotech. Lett., 21, 579-584 (1999)

A. Cao, Y. Arai, N. Yoshie, K. Kasuya, Y. Doi and Y. Inoue: Solid Structure and Biodegradation of the Compositionally Fractionated Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypropionic acid)s; Polymer, 40, 6821-6830 (1999)

T. Iwata and Y. Doi: Crystal Structure and Biodegradation of Aliphatic Polyester Crystals; Macromol. Chem. Phys., 200, 2429-2442 (1999)

T. Iwata, Y. Doi, F. Kokubu and S. Teramachi: Alkaline Hydrolysis of Solution-Grown Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals; Macromolecules, 32, 8325 - 8330 (1999)