

## 環境低負荷型の高分子物質生産システムの開発

研究代表者 理化学研究所 高分子化学研究室 土肥義治

R & D on sustainable system of polymer production

Yoshiharu Doi, *Research Director of CREST*

Polymer Chemistry Laboratory, RIKEN

### 1. 研究の概要

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た。

### 2. 現在までの中間成果報告

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た。

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た。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共重合ポリエステル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するための基礎研究を行った。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とを試みた。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ための研究を実施した。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下記の3課題の研究を推進した。

#### 2.1 成果内容の要約

##### (1) 新規ポリエステルの生合成と高生産生物の育種

- ①新規ポリエステルを生合成するポリエステル生産菌を探索した。
- ②新規ポリエステルを合成する3種の細菌 (*Aeromonas caviae*, *Pseudomonas* sp., *Comamonas acidovorans*) について、ポリエステル生合成に関与する酵素の遺伝子の取得と解析を行った。
- ③微生物体内でポリエステル微粒子が形成される過程を電子顕微鏡を用いて観察し、ポリエステル生合成機構を形態学的側面から解明した。

- ④ *Pseudomonas* sp. から2種類のポリエステル合成酵素遺伝子を取得し、各合成酵素の基質特異性を詳細に調べるとともに、高性能共重合ポリエステルの効率的生産法の確立をめざして遺伝子工学的検討を行った。
- ⑤ *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た。
- ⑥ ポリエステル生合成酵素の遺伝子操作によって糖類、植物油、有機酸から共重合ポリエステルを高効率で生産する微生物 (*Alcaligenes eutrophus*、大腸菌) を育種した。
- ⑦ 炭酸ガスからの新規ポリエステルの生物生産をめざして、植物体へのポリエステル生合成系遺伝子の導入を試みた。

## (2) 生分解性ポリエステルの材料設計と機能開発

- ① 理化学研究所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、分子構造と物性との相関関係を明らかにした。
- ② バイオポリエステルフィルムを各種条件下で熔融結晶化法により作製し、フィルムの表面構造および固体構造を解析した。バイオポリエステルの高次構造を制御できる材料設計技術の開発を試みた。
- ③ バイオポリエステル材料の高次構造と生体適合性、酵素分解性、細胞接着性など特異機能との相関関係を調べた。
- ④ バイオポリエステルの単結晶を作製して、それらの分子構造を解析した。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。
- ⑤ バイオ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

- ① バイオポリエステルを分解・消化する微生物を種々の環境から単離するとともに、それらの微生物が体外に分泌するポリエステル分解酵素を精製して性質を調べた。
- ② 2種の微生物 (*Pseudomonas stutzeri*, *Comamonas acidovorans*) のポリエステル加水分解酵素の遺伝子を取得・解析し、分解酵素の一次構造を明らかにするとともに、酵素の構造と機能との関係を調べた。
- ③ 遺伝子工学的手法を用いて、加水分解酵素の各ドメインとグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質を作製し、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鎖長との相関を調べた。
- ④ ポリ乳酸の分解微生物を単離するとともに、ポリ乳酸の酵素分解メカニズムを調べた。

## 2.2 主な発表論文の内容

### ① *Macromolecules* (1997) **30**, 833-839

#### Visualization of Enzymatic Degradation of Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals by an Extracellular PHB depolymerase

分子量の異なる2種類のポリ(3-ヒドロキシブチレート) (P(3HB)) 単結晶を、クロロホルムとエタノールの混合溶液より生成した。*Pseudomonas stutzeri* YM1006 由来のPHB分解酵素を用いた単結晶の酵素分解性を、透過型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡および分子量測定により追跡した。PHB分解酵素の単結晶表面への吸着は、免疫電子顕微鏡法を用いて観察した。分解酵素による単結晶表面への吸着は、結晶表面全域で観察されたが、単結晶は分解酵素により結晶表面からの分解を受けず、結晶の側面からのみ分解されることがわかった。したがって、PHB分解酵素の活性部位は単結晶表面に存在するPHB分子鎖の折れ曲がり構造部分を攻撃することができず、主に*exo-type*の分解様式をとるものと結論付けた。

### ② *Journal of Bacteriology* (1997) **179**, 4821-4830

#### Cloning and Analysis of the Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) Biosynthesis Genes of *Aeromonas caviae*

油脂やアルカン酸から(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸と(*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸の共重合ポリエステル (P(3HB-co-3HHx)) を生産する細菌、*Aeromonas caviae*より5.0-kbpの*EcoRV*-*EcoRI* DNA断片を単離し、それを解析した。この断片にはポリ(3-ヒドロキシアルカン酸) (PHA) 重合酵素遺伝子 (*phaCac*) と4つの遺伝子枠 (ORF1, -3, -4, -5)、1つのプロモーターが存在した。この断片は*Alcaligenes eutrophus*や*Pseudomonas putida* PHA合成能欠損株の変異を相補するばかりか、P(3HB-co-3HHx)合成能も付与した。*Alcaligenes eutrophus*変異株に*phaCac*とORF1、ORF3を共発現させると、ポリエステル蓄積量が増加することがわかった。その遺伝子発現から、ORF3はエノイル-CoAを(*R*)-3-hydroxyacyl-CoAへ特異的に水和することがわかった。*phaCac*遺伝子だけを発現させた株でもオクタン酸からの一段培養で乾燥菌体重量当たり96%ものP(3HB-co-3HHx)を蓄積した。

### ③ *Macromolecules* (1997) **30**, 5290-5296

#### Enzymatic Degradation and Adsorption on Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals with Two Types of Extracellular PHB Depolymerases from *Comamonas acidovorans* YM1609 and *Alcaligenes faecalis* T1

稀薄混合溶液より生成した異なった結晶表面を有する2種類のポリ(3-ヒドロキシブチレート) (P(3HB)) 単結晶を、遺伝子の一次構造の異なる2種類のPHB分解酵素、*Comamonas acidovorans* YM1609 と *Alcaligenes faecalis* T1 を用いて分解実験および吸着実験を行った。いずれの分解酵素においても、酵素の吸着は結晶表面全域にわたって観察された。しかし、

単結晶は結晶表面から分解されず、結晶の側面からのみ分解された。また、分解前後の単結晶の分子量と厚さに変化がないことから、単結晶表面から分解が進行していないことが示唆された。分解途中の単結晶に、分子鎖の折れ曲がり方向に沿った裂け目と小さな結晶フラグメントが見られたことから、両酵素はいずれも*endo-exo* type の分解様式を有するものと考えられた。

④ *Appl. Environ. Microbiol.* (1997) **63**, 4844-4852

Biochemical and Molecular Characterization of the Polyhydroxybutyrate Depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM 1609, Isolated from Freshwater

湖水から単離されたポリ(3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB)) 分解菌 *Comamonas acidovorans* は、P(3HB)を唯一の炭素源として培養すると、その上清にP(3HB)分解酵素を分泌した。本分解酵素は、37℃以下およびpH 6～10の間で安定に分解活性を保持し、一方典型的なセリンエステル加水分解酵素の阻害剤によって失活した。また、本分解酵素は、P(3HB)を3-ヒドロキシブタン酸の2量体あるいは単量体にまで加水分解した。さらに、本分解酵素遺伝子のクローニングおよびシーケンシングを行った。その結果、本酵素蛋白質は、高分子鎖を切断するための触媒ドメインと高分子表面に吸着するための基質吸着ドメインさらにこの2つのドメインをつなぐリンカーペプチドから構成されていることがわかった。基質吸着ドメイン (SBD) の機能を解明するために、P(3HB)単結晶表面へのSBDとグルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合蛋白質の吸着反応挙動を免疫電顕手法を用いて解析した。融合蛋白質が、P(3HB)単結晶の全表面へ均一かつ強固に吸着したことから、推定した基質吸着ドメインは分解酵素のP(3HB)固体表面への吸着に必須な領域であることが明らかとなった。

⑤ *Macromolecules* (1998) **31**, 1791-1797

Solid-State Structures and Enzymatic Degradabilities for Melt-Crystallized Films of Copolymers of (*R*)-3-Hydroxybutyric Acid with Different Hydroxyalkanoic Acids

(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸とその他のヒドロキシアルカン酸との共重合ポリエステルの溶融-結晶化フィルムを調製し、その固体構造と酵素分解性を調べた。ポリ(ヒドロキシアルカン酸)のラメラ結晶の厚さは、結晶化温度の上昇とともに厚化することがわかった。ポリ(ヒドロキシアルカン酸)の溶融-結晶化フィルムの酵素分解速度は、フィルムの結晶化度の増大とともに指数関数的に低下することがわかった。また、ポリ(ヒドロキシアルカン酸)の結晶領域の酵素分解速度は、ラメラ結晶の厚さの増大とともに低下することを見出した。したがって、ポリエステルフィルムの酵素分解速度には、結晶化度(結晶の量)とラメラ結晶の厚さ(結晶の形態)の両因子によって規定されるものと結論付けた。

⑥ *Macromolecules* (1998) **31**, 2461-2467

Morphology and Enzymatic Degradation of Poly(L-lactic acid) Single Crystals

ポリ乳酸の単結晶を*p*-キシレンの稀薄溶液より生成した。単結晶の形態は、主に六角形と菱形の2種類が観察されたが、電子回折を用いた構造解析の結果、両形態とも格子定数

$a^*=0.935\text{nm}^{-1}$ ,  $b^*=1.626\text{nm}^{-1}$  and  $g^*=90^\circ$ で指数付けでき、ポリ乳酸繊維に見られるa構造を有していることがわかった。ポリ乳酸の単結晶を、*Tritirachium album* 由来のproteinase-Kを用いて酵素分解実験を行い、透過型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡、分子量測定および分解生成物分析により解析を行った。分解の進行に伴い、結晶周囲は丸みを帯びてきたが、分子量と結晶の厚さには変化が見られなかった。このことから、単結晶の表面から分解の進行は生じておらず、側面の分子鎖から順番に分解されていることがわかった。

⑦ *Appl. Environ. Microbiol.* (1998) **64**, 3437-3443

#### Genetic Analysis of *Comamonas acidovorans* Polyhydroxyalkanoate Synthase and Factors Affecting the Incorporation of 4-Hydroxybutyrate Monomer

*Comamonas acidovorans* のpolyhydroxyalkanoate (PHA) synthase遺伝子(*phaCCa*)の取得を *Ralstonia eutropha* の PHA synthase遺伝子(*phaCRe*)をprobeに用いた。 *phaCCa*は1,893-bpからなり、1,182-bpからなる $\beta$ -ketothiolase 遺伝子(*phaACa*)の上流に存在した。同定した *phaCCa*は短鎖PHAを合成する既知のPHA synthaseに高い相同性(80%)を示した。取得した遺伝子を *R. eutropha* のPHA-株に導入した結果、 *C. acidovorans* のように高い4-hydroxybutyrate (4HB)を含むPHAが4-ヒドロキシブタン酸から蓄積されなかった。このことから、 *phaCCa*は4HBユニットに対して特に高い基質特異性を示さないと考えられた。

⑧ *Journal of Bacteriology* (1998) **180**, 6459-6467

#### Cloning and Molecular Analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and the Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) Biosynthesis Genes in *Pseudomonas* sp. Strain 61-3

ポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)]と炭素数4から12の3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA)で構成される共重合ポリエステル[P(3HB-co-3HA)]とのブレンド体を合成する *Pseudomonas* sp. 61-3株より、2種類のポリエステル生合成系遺伝子を単離し、解析した。一つは、PHBシンターゼを含むPHB生合成系遺伝子であり、これらの遺伝子の転写を活性化する調節遺伝子も見いだされた。もう一つは、PHAシンターゼ1および2を含むPHA生合成系遺伝子であった。これらの生合成系遺伝子を *P. putida* と *Ralstonia eutropha* のポリエステル合成能欠損変異株に導入し、ポリエステル生合成系遺伝子の機能について検討した結果、PHBシンターゼは短鎖長の3HAユニットに特異的であり、PHAシンターゼ1および2は、炭素数4から12の短鎖長から中鎖長の3HAユニットを幅広く基質として利用できることがわかった。

⑨ *Appl. Environ. Microbiol.* (1999) **65**, 189-197

#### Cloning and Characterization of the Polyhydroxybutyrate Depolymerase Gene of *Pseudomonas stutzeri* and Analysis of the Function of Substrate-Binding Domains

海水より単離されたポリ(3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB)) 分解菌 *Pseudomonas stutzeri* 由来の菌体外P(3HB)分解酵素の構造および機能を調べた。クローニングおよびシーケンシ

ングの結果、本分解酵素は538アミノ酸からなり、アミノ末端側から触媒ドメイン、リンカー領域、および基質吸着ドメインの順に構成されていることが推定された。本分解酵素のリンカー領域は、キチナーゼのリンカー領域にみられるカドヘリン様ドメインと高い相同性を示した。グルタチオン S-トランスフェラーゼと基質吸着ドメインとの融合蛋白質によるP(3HB)グラニュールの吸着実験から、本分解酵素は基質吸着ドメインが2つ存在していることが明かとなった。また、3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) オリゴマーの加水分解実験から、本分解酵素は少なくとも2つの3HBユニットを認識し、分解が進行することがわかった。

### 3. 今後の研究の方向

今後の2年間についても、生物学と高分子科学との異分野の研究者の共同作業によって、3研究課題（1. 新規ポリエステルを生合成と高生産生物の育種、2. 生分解性ポリエステルの材料設計と機能開発、3. ポリエステル加水分解酵素の構造解析と機能解明）を強力に推進する予定である。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研究を、生物学と高分子科学との異分野の研究者が共同作業で実施している研究グループは、全世界でも理化学研究所CRESTグループが唯一である。

再生可能な炭素資源（炭酸ガス、糖類、植物油など）から生分解性ポリエステルを生物生産する高分子生産システムを確立することが、本研究プロジェクトの大きな目標である。この目標を達成するには、異分野の研究者の共同研究が最も有効であると信じている。