

## 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

5年間のCREST研究(1996-2000)では、微生物の物質生産機能を利用して、再生可能な植物系資源(糖、植物油)から優れた性能をもつ生分解性高分子物質を生産する新産業の基盤科学技術を開拓することを目的とした基礎研究を実施した。とくに本研究では、核酸、タンパク質、多糖、ポリイソプレノイドにつづく第5の生体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進めた。バイオポリエステルの生合成、関連酵素遺伝子の取得と機能解析、生合成酵素の高次構造解析、高生産微生物の分子育種、効率的生産法の開発、バイオポリエステルの高性能材料化、生分解速度の制御技術開発、バイオポリエステル分解微生物の単離と解析という一連の基礎研究を生物科学と高分子科学との異分野の研究者の共同作業で行った。

### 2. 現在までの成果報告

- (1) まず初めに、優れた物性と生分解性をもつバイオポリエステルを生産する3種の微生物(*Aeromonas caviae*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *Comamonas acidovorans*)のポリエステル生合成系酵素遺伝子を取得し、それらの機能解析を行った。さらに、ポリエステル生合成系酵素の構造と機能を分子レベルで理解するために、ポリエステル合成酵素(PhaC)とモノマー供給系酵素(PhaJ)の大量生産方法を確立し、PhaJ酵素の結晶構造の解明に成功した。
- (2) つぎに、フィルム成形用の低密度ポリエチレン(LDPE)と類似な物性をもつ共重合ポリエステル(ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸]:P(3HB-co-3HHx))を、植物油から高効率(80wt%)で生産する遺伝子組換え微生物(*Ralstonia eutropha*)の分子育種に成功した。まず、*R. eutropha*のポリエステル合成酵素欠損株に、*A. caviae*のポリエステル合成酵素遺伝子(PhaC)とモノマー供給系酵素遺伝子(PhaJ)を導入することで遺伝子組換え微生物を作製した。それに炭素源として植物油(パーム油、なたね油など)を与えて発酵生産を行ったところ、遺伝子組換え *R. eutropha* は、極めて高効率で P(3HB-co-3HHx)を合成し、乾燥菌体重量あたり 80wt%という大量の共重合ポリエステルを体内に蓄積することを見いだした。安価な植物油から高性能バイオプラスチックを生産する実用化プロセスの基盤技術を開発した。
- (3) さらに、超高分子量(300万~2000万)のポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸](P(3HB))を合成する遺伝子組換え大腸菌(*E. coli*)の分子育種に成功した。ポリエステル合成酵素遺伝子(PhaC)とモノマー供給系酵素遺伝子(PhaA, PhaB)を導入した遺伝子組換え *E. coli* は、糖から超高分子量の P(3HB)を生合成し、乾燥菌体重量あたり 75wt%蓄積した。培養条件によ

って、P(3HB)の重量平均分子量(Mw)は 300 万から 2000 万の範囲内で調整できた。従来、バイオポリエステルにおいて物性改善のための延伸処理が困難であった。しかし、分子量 300 万以上の超高分子量 P(3HB)を用いると、160℃付近で容易に延伸ができ、延伸倍率 400%以上で引張り強度が 40Mpa から 100Mpa 以上へと急激に増加するとともに、破壊伸びも 50%以上を示した。延伸 P(3HB)の物性は、ナイロン-6.6 と同程度まで改善できることを明らかにした。

- (4) 熔融-等温結晶化法で調整した P(3HB)およびその共重合体のフィルムを用いてポリエステル分解酵素による酵素分解反応を行い、酵素分解速度と固体構造との相関を調べた。酵素分解反応は、フィルム表面の非晶部から選択的に進行した。P(3HB)非晶部の酵素分解速度は、結晶部の分解速度に比べて、30 倍程度速いことを明らかにした。結晶部の酵素分解速度は、ラメラ結晶厚さの増加とともに急激に低下することを見いだした。これらの知見をもとに、高分子材料の生分解速度を制御する方法を提案した。
- (5) このように、CREST 研究の 5 年間、新しい発想で「再生可能な炭素資源から高性能バイオプラスチックを微生物生産するプロセスの開発」を強力に推進し、新しい産業創出のための基盤技術を開拓してきた。

## 2.1 成果内容の要約

- (1) 優れた物性と生分解性をもつバイオプラスチックを生産する微生物(*Aeromonas caviae* および *Pseudomonas* sp.)のポリエステル合成系酵素遺伝子を取得し機能解析することに成功した。
- (2) 遺伝子組換え微生物(*Ralstonia eutropha*)を用いて、植物油から高効率(80wt%)で高性能ポリエステルを生産できるプロセスを開発した。
- (3) 遺伝子組換え大腸菌(*E.coli*)を用いて、糖から超高分子量ポリエステル(分子量  $3 \cdot 10^6$  -  $12 \cdot 10^6$ )を生産するプロセスを開発した。超高分子量ポリエステルのフィルムあるいは繊維は、延伸処理によって物性が著しく改善できることを明らかにした。

## 2.2 主な発表論文の内容

### ① *Journal of Bacteriology* (1998) **180**, 6459-6467

Cloning and Molecular Analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) Biosynthesis Genes in *Pseudomonas* sp. Strain 61-3 (H. Matsusaki, S. Manji, K. Taguchi, M. Kato, T. Fukui and Y. Doi)

*Pseudomonas* sp. 61-3 は糖や脂肪酸を炭素源として 3-ヒドロキシブタン酸からなるホモポリマー[P(3HB)]と炭素数 4 から 12 の 3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) で構成される新規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。これは、本菌が基質特異性の異なる 2 種類のポリエステル合成酵素を有するためであり、それぞれのポリエステル合成酵素遺伝子のクローニングを行った。塩基配列分析から、PHB シンターゼ遺伝子は、アセトアセチ

ル CoA レダクターゼ、 $\beta$ -ケトチオラーゼ遺伝子とオペロンを形成していた。一方、PHA シンターゼ遺伝子については、PHA シンターゼ 1、PHA デポリメラーゼ、PHA シンターゼ 2 をコードするオープンリーディングフレームを同定した。ポリエステル合成能欠損株である *P. putida* GPp104 および *Alcaligenes eutrophus* PHB-4 を宿主として用い、これらの組換え体でポリエステル合成を試みたところ、PHB シンターゼ遺伝子導入株では P(3HB)が合成され、本酵素が 3HB ユニットに特異的であることが示された。PHA シンターゼ 1 および 2 遺伝子導入株ではどちらも P(3HB-co-3HA)を合成し、中鎖長(炭素数 6~12)の 3HA ユニットの他に 3HB ユニットも導入された。

② *Applied Microbiology and Biotechnology* (1998) **49**, 333-336

Efficient Production of Polyhydroxyalkanoates from Plant Oils by *Alcaligenes eutrophus* and Its Recombinant Strain (T. Fukui and Y. Doi)

*Alcaligenes eutrophus* 細菌が油脂を資化しポリエステルを合成をすることを見だし、本野生株を用いて安価な再生可能資源である植物油(オリーブ油、コーン油、パーム油)を唯一の炭素源として PHB ホモポリマーを乾燥菌体重量あたり 80%生産させることに成功した。また、*Aeromonas caviae* 由来の PHA シンターゼ遺伝子を *Alcaligenes eutrophus* の PHB 合成能欠損株に導入したところ、優れた物性をもつ 3-ヒドロキシヘキサン酸(3HHx)を含むランダム共重合体、P(3HB-co-3HHx)を植物油から効率よく合成することができた。

③ *FEMS Microbiology Letters* (1999) **176**, 183-190

Co-expression of 3-Ketoacyl-ACP Reductase and Polyhydroxyalkanoate Synthase Genes Induces PHA Production in *Escherichia coli* HB101 strain (K. Taguchi, Y. Aoyagi, H. Matsusaki, T. Fukui and Y. Doi)

ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)生産と脂肪酸代謝の関係を調べるため、PCR法を用いて大腸菌 *Escherichia coli* の 3-ケトアシル ACP レダクターゼ遺伝子(*fabG<sub>Ec</sub>*)をクローニングした。*Aeromonas caviae* と *Pseudomonas* sp. 61-3 から単離された PHA 重合酵素遺伝子(*phaC<sub>Ac</sub>*, *phaC<sub>Ps</sub>*)とともに *fabG<sub>Ec</sub>* を含んだプラスミドを構築し、*E. coli* HB101 株に導入した。この遺伝子組換え株は炭素数 4~10 の 3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとする PHA を蓄積した。この結果から、FabG の過剰発現を施すことで PHA 生産が向上することが明らかとなった。

④ *Biomacromolecules* (2000) **1**, 17-22

Biosynthesis and Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by Recombinant Strains of *Pseudomonas* sp. 61-3 (H. Matsusaki, H. Abe and Y. Doi)

*Pseudomonas* sp. 61-3 のポリヒドロキシブタン酸重合酵素遺伝子欠損株に、*Ralstonia eutropha* のβケトチオラーゼ遺伝子 (*phbAR<sub>c</sub>*)、アセトアセチル CoA レダクターゼ遺伝子 (*phbB<sub>Re</sub>*) とともに、*Pseudomonas* sp. 61-3 のポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 重合酵素遺伝子 (*phaCI<sub>Ps</sub>*) を過剰発現させたところ、3-ヒドロキシブタン酸組成の非常に高い (94 mol%) 共重合 PHA が生産された。NMR 解析、DSC 解析、引張強度解析から、生産された PHA は良好な物性と適度な強度を有し、低密度ポリエチレンと類似の物性をもつ共重合ポリエステルであることを実証した。

⑤ *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 (T. Ohura, K. Kasuya and Y. Doi)

*Pseudomonas stutzeri* の分泌するポリ(3-ヒドロキシブタン酸)(PHB)分解酵素遺伝子のクローニングおよびシークエンシングを行った。その結果、本酵素は 538 アミノ酸残基からなり、推定される分子量は 57,506 であった。また、本酵素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およびこれら二つのドメインを結合するリンカーペプチドから構成されていることが明らかとなった。さらに、本酵素の基質吸着機構に関する詳細な知見を得るため、基質吸着ドメインとグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質を作製し、PHB およびキチンへの吸着実験を行った。その結果、本酵素の基質吸着ドメインは特異的に PHB 表面へ吸着していることが示唆された。

⑥ *Biomacromolecules* (2000) **1**, 320-324

Function of the Catalytic Domain of Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase from *Pseudomonas stutzeri* (T. Hiraishi, T. Ohura, S. Ito, K. Kasuya and Y. Doi)

*Pseudomonas stutzeri* 由来ポリ(3-ヒドロキシブタン酸)(PHB)分解酵素の触媒ドメインの機能を調べるため、基質吸着ドメインの欠損した二種類の変異酵素を作製し、PHB および(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸(3HB)オリゴマーの分解反応を行った。その結果、変異酵素は不溶性 PHB に対する分解能を欠失していたが、水溶性の 3HB オリゴマーに対する分解能は野生型酵素のものと同様であることがわかった。このことから、本酵素の触媒ドメインと基質吸着ドメインはそれぞれ独立に機能していることが示唆された。また、3HB オリゴマーの分解生成物を HPLC で分析したところ、本酵素の触媒ドメインは二量体以上の 3HB オリゴマーを認識していることが分かった。さらに、分解反応の速度論的解析を行った結果、本酵素は三量体以上の 3HB オリゴマーを速やかに分解することが明らかとなった。

⑦ *Macromolecular Chemistry and Physics* (1999) **200**, 2429-2442

Crystal Structure and Biodegradation of Aliphatic Polyester Crystals (T. Iwata and Y. Doi)

本論文は、これまで我々のグループで行ってきた生分解性脂肪族ポリエステルの単結晶生成、透過型電子顕微鏡と原子間力顕微鏡を用いた結晶構造および表面構造の解析、酵素による単結晶の分解機構に関する知見を総合的にまとめた総説である。10種類以上に及ぶ生分解性脂肪族ポリエステルの等温結晶化法により生成した単結晶は、高分解能な電子回折を与え、分子鎖充填様式に関する様々な知見を得ることができた。分解酵素の結晶表面への吸着様式と分解様式を解析することにより、生分解性高分子材料における結晶領域の酵素による分解機構に関する新たな理論を提唱することができた。

⑧ *Macromolecules* (2000) **33**, 5559-5565

Morphology and Crystal Structure of Solution-Grown Poly([R]-3-hydroxyvalerate) Single Crystals  
(T. Iwata and Y. Doi)

ポリ([R]-3-ヒドロキシバレレート)(P(3HV))の単結晶をメタノールとクロロホルムの混合希薄溶液より生成した。単結晶は、正方形の形態を示し、高分解能な電子回折を与えた。配向結晶性フィルム of X線繊維図と単結晶の電子回折図を用いて、P(3HV)の結晶構造を解析した。また、傾斜X線回折と傾斜電子回折により、三次元空間群を解明した。さらに、原子間力顕微鏡の横振動測定モードと透過型電子顕微鏡のポリエチレン修飾法を併用することにより、単結晶表面における分子鎖の折れ曲がり構造を視覚的に解析することに成功した。

⑨ *Macromolecules* (2000) **33**, 9423-9431

Structure and Morphology of the Aliphatic Polyester Poly( $\beta$ -propiolactone) in Solution-Grown Chain-Folded Lamellar Crystals (Y. Furuhashi, T. Iwata, P. Sikorski, E. Atkins and Y. Doi)

ポリ( $\beta$ -プロピオラクトン)(PPL)単結晶の結晶構造を、透過型電子顕微鏡による電子回折、単結晶マットのX線回折、コンピュータによる分子構築とエネルギー計算により解析した。PPLの結晶構造は、結晶系：斜方晶系、格子定数： $a=0.700\text{nm}$ 、 $b=0.490\text{nm}$ 、 $c(\text{繊維軸})=0.493\text{nm}$ 、単位胞中の分子鎖数：2本、分子鎖構造：平面ジグザグ構造を採ることが分かった。また、分子鎖は結晶格子中で逆平行鎖構造を採り、それぞれ分子鎖軸回りに $51.5^\circ$ 回転した状態で充填されていることが分かった。単結晶表面における分子鎖の折れ曲がり構造を計算したところ、結晶表面にメチレン基が露出し、エステル基は結晶中に埋没していることが分かった。

⑩ *Macromolecules* (1998) **31**, 1791-1797

Solid-State Structure and Enzymatic Degradabilities for Melt-Crystallized Films of Copolymers of (R)-3-Hydroxybutyric Acid with Different Hydroxyalkanoic Acids (H. Abe, Y. Doi, H. Aoki and T. Akehata)

(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熔融-

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)の熔融-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。

⑪ *Biomacromolecules* (2000) **4**, 704-712, 713-720

Biodegradable Poly(ethylene succinate) (PES).

1. Crystal Growth Kinetics and Morphology

2. Crystal Morphology of Melt-Crystallized Ultrathin Film and Its Change after Enzymatic Degradation

(Z. Gan, H. Abe and Y. Doi)

ポリ(エチレンサクシネート) (PES) を熔融状態から様々な温度で結晶化し、その結晶形態を観察した。PES の結晶形態は、結晶化温度の低下にしたがって板状の結晶から針状の結晶へと変化することがわかった。また、その形態変化が、結晶の二次核成長様式(レジーム)の転移温度である 71°C を境界にして起こることを見出した。さらに、*Pseudomonas stutzeri* 由来のポリエステル加水分解酵素を用いた PES 超薄膜試料の分解実験を行い、酵素分解前後における PES の結晶形態変化を原子間力顕微鏡によって調べた。酵素分解実験後の PES の板状結晶には、結晶側面から垂直に方向に裂け目があらわれ、さらに、小さな結晶フラグメントが形成された。この結果より、分解酵素は PES の結晶側面から分子鎖を加水分解し、とくに結晶内部に存在する分子のパッキングが乱れた領域を優先的に攻撃していくものと考えられた。

⑫ *Polymer* (2001) **42**, 2707-2710

In Situ Observation of Lamellar Growth in Thin Film for Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid-co-6-hydroxyhexanoic acid] at a High Crystallization Temperature of 110 °C by Atomic Force Microscopy

(Y. Kikkawa, Y. Inoue, H. Abe, T. Iwata and Y. Doi)

(R)-3-ヒドロキシブタン酸と 6-ヒドロキシヘキサン酸との共重合ポリエステルの超薄膜試料を作製し、熔融状態から等温結晶化を行った際の共重合ポリエステルの結晶化過程を、原子間力顕微鏡を用いて直接観察した。結晶化温度 110°C という高温条件下における共重合ポリエステルの結晶化過程を、原子間力顕微鏡を用いて観察することに世界で初めて成功した。共重合ポリエステルは、超薄膜試料中において、二次元的に成長した球晶構造を形成し、その球晶中には幅数マイクロメートルのラメラ結晶が観察された。成長途中のラメラ結晶の成長先端には、幅 50~100 ナノメートルの繊維状結晶が形成されることがわかった。複数の繊維状結晶が伸長しながら寄り集まることによって、ポリエステルのラメラ結晶が形成・成長するものと考えられた。