

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：高性能バイオプラスチック生産システムの確立

2. 研究代表者：土肥 義治（理化学研究所 理事）

3. 研究概要：

本研究はバイオテクノロジーを用いて糖や植物油などの再生可能資源から、高性能な生分解性ポリエステルを遺伝子組換え微生物を利用して効率的に生産するプロセスの開発である。

特にSORSTでは、CREST時代に見出した遺伝子工学などの生物工学的技術を用いて、高性能バイオポリエステルを生合成する遺伝子組換え微生物を分子育種し、それらのポリエステルを高い効率で生産するバイオプロセスの開発を進めた。さらに、バイオポリエステルを高強度繊維や高強度フィルムに加工する基盤技術を確立した。

以下、要点をまとめる。

① 人工進化によるポリエステル合成系酵素の改質

1) 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)を生合成する *Aeromonas caviae* のポリエステル合成酵素遺伝子にランダム変異操作を施し、人工進化を通してポリエステル合成酵素の重合活性を向上させることに成功した。また、酵素の基質特異性を変えることにも成功し、植物油から共重合組成の異なるP(3HB-co-3HHx)を生合成する手法を開発した(特許出願)。

2) ポリ([R]-3-ヒドロキシブタン酸-co-[R]-3-ヒドロキシアルカン酸) : P(3HB-co-3HA)を生合成する *Pseudomonas sp.61-3* のポリエステル合成酵素の活性と基質特異性を、進化分子工学の手法を用いて改変し、3HB 組成が 90%以上の高性能共重合ポリエステルを合成する酵素を創出した。ポリエステル合成酵素の変異構造(部位)と機能の相関を調べ、活性と基質特異性をそれぞれ制御するアミノ酸部位を明らかにした。

3) 結晶構造を解明したモノマー合成系酵素 PhaJ の活性と基質特異性をタンパク質工学的手法(特定アミノ酸部位の置換操作)により改変し、合目的な組成の共重合ポリエステルを生合成するための数種の改質酵素を創出した。

4) 高性能バイオポリエステル(超高分子量ポリエステル、特定組成の共重合ポリエステル)を高速度で生合成するポリエステル合成酵素の進化分子工学的研究およびモノマー合成酵素のタンパク質工学的研究を進展させ、新しい研究分野を確立した。

② 環境調和型の高性能ポリエステル微生物生産プロセスの開発

1) 人工進化した各種のポリエステル合成系酵素遺伝子は大腸菌あるいは微生物 *R. eutropha* に導入し、遺伝子発現機構を制御して、糖や植物油から合目的な分子量と重合組成のポリエステルを高速度・高効率で生合成する微生物を分子育種し、植物油から効率よく共重合ポリエステルを生産する高密度培養条件を確立した(特許出願)。

2) 開発したバイオ生産プロセスの実験室データを用いて、植物油を原料として年間 5,000 トンの共重合ポリエステルを製造するプロセスを想定して、PHA 製造におけるライフサイクルイベントリ (LCI) の分析を行い、石油プラスチックの製造プロセスと比較してどの程度環境に与える負荷が低下できるのかを検討した。ポリエステルのバイオ生産プロセスは汎用の石油プラスチックと比較して、二酸化炭素排出量は7~9割も削減できる環境低負荷型の製造プロセスであることを明らかにした。

③ バイオポリエステル繊維およびフィルムの高強度化と構造解析

1) 遺伝子組換え大腸菌で合成した超高分子量ポリ([R]-3-ヒドロキシブタン酸) : P(3HB)を用いて、熔融紡糸を行い、冷延伸、二段階延伸、熱処理を組み合わせた延伸技術を適用することによって高強度P(3HB)繊維が作製できることを見出した。破壊強度 1.3Gpa、破壊伸び 35%、ヤング率 18.1Gpa の高強度P(3HB)繊維を得ることに成功した(特許出願)。

また高強度 P(3HB)繊維のX線構造解析により、2回らせん構造の α 構造に加えて、平面ジグザク構造の β 構造が確認された。延伸比の増大とともに β 構造の回折が強くなり、破壊強度が向上した。P(3HB)繊維の高強度は、 β 構造の発現に起因していることを明らかにした。

次にこれら高強度P(3HB)繊維の酵素分解実験および微生物分解実験を行い、生分解性を有することを確認した。また、 α 構造と β 構造の分子鎖構造によって分解速度が異なることを明らかにした。さらに大型放射光施設において、P(3HB)繊維作製過程におけるX線構造解析を経時的に条件を変えて行い、 α 構造と β 構造の生成過程を調べた。insitu で繊維の表面および内部の結晶構造の変位が見えた世界初のデータである。

2) 各種バイオポリエステル(P(3HB), P(3HB-co-3HHx), P(3HB-co-3HA))を用いて、低温延伸法によってフィルムを作製し、フィルム強度とポリエステルの分子量、組成、延伸倍率との相関を調べ、高強度フィルムの作製条件がほぼ確立した(特許出願)。

④ バイオポリエステル材料の生分解制御技術の開発

各種バイオポリエステルフィルムの生分解速度を、自然環境下や実験室内微生物分解試験装置を用いて測定し、ポリエステルの固体構造と生分解速度との相関を調べた。また加水分解酵素とポリエステル材料表面との相互作用をAFMを用いて分子レベルで調べた。‘その場’観察による生分解メカニズムの解明は世界的にも例がない。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

- ・発表論文 112件
- ・その他著作、レビュー 6件
- ・口頭発表 269件
- ・特許出願 国内 7件・外国 2件

本研究は、CREST環境低負荷領域「環境低負荷型の高分子物質生産システムの開発」の研究成果を受けて、そのさらなる発展、工業化を視野に入れた発展研究を、平成13年3月から平成17年3月まで、4年1ヶ月にわたって行ったものである。これは5年間の期間中に、研究代表者が、平成16年10月理化学研究所 理事に就任したため、SORST研究の計画を前倒して平成17年3月に終了した。ただし、この期間内でも当初目標は充分達成できており、特にバイオポリエステルの生合成と物性・機能に関する研究で多くの新たな知見が得られた。中でも安価な再生可能資源(グルコース、大豆油)からの高効率生産技術の基礎が構築されたことは特筆すべき成果である。また、高分子量 PHA からの高性能繊維・フィルムの作製についても新しい概念を導入し、既存の繊維と同等の性能を得ることができ、PHA の工業的利用に途を拓いた。次に基礎研究の側面からいうと、結晶構造のわかっていない PHA 生産酵素の改質を、分子進化工学を巧みに利用して達成したことや、PHA 繊維の結晶化に関する基礎知見をSPring-8を利用して見出した点など、ともすれば応用に走りがちな研究ジャンルの中で、基礎のメスを磨いてきたことも評価できる。これらの知見は、たとえば既存の繊維の結晶化メカニズムの解明などにつながれば、繊維の高性能化にも結びつき応用面からもインパクトが高い。

これらの成果は極めて多数の論文として一流誌に発表されているのと同時に、研究代表者のリーダーシップのもと戦略的に特許出願され、日本発信の技術の「柱」となるものと思われる。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

バイオマスからの高分子材料開発は循環型社会構築に必須の技術である。SORST の成果は PHA の工業生産の糸口を示すものであり、その工業化は地球全体の環境保全に大きく貢献できるため、重要性は極めて高い。先行するポリ乳酸ではカバーできない用途が期待されるので、多くの化学企業からあつい視線を浴びている。本研究ではこれらのシステム確立をするとともに、PHA 合成酵素の開発を進化工学を用いて大きく前進させたことや極めて強い繊維や強力なフィルムに加工する基盤技術、PHA の紡糸時の結晶解析など学術面においてもそのジャンルの中での波及効果が大きい。

本研究はこのように分子生物学から高分子物性まで幅広いジャンルの仕事をお互いの研究を融合させることで学術・応用両面で優れた成果を出しており、この異分野融合が SORST 中で結実した。

4-3. 特記事項

SORST 土肥チーム主催により、2003年11月に開催された国際会議(First IUPAC International Conference on Bio-based Polymers, November 12-14, 2003, 理化学研究所)には、国内から140名と海外から80名が参加し、講演47件とポスター論文91件が発表された。バイオポリエステル研究は、基礎と応用の両面からUS, EU, 日本を中心に推進されている。しかしながら、バイオポリエステルの生合成と効率的生産プロセスの開発、環境影響評価、高機能材料化技術、生分解性制御技術の開発という一連の研究を、生物科学と高分子科学との異分野の研究者が共同作業を実施している研究グループは、全世界でも理化学研究所・東京工業大学・SORSTグループが唯一であり、世界的な評価も高く、体制は変わってもこの研究を継続的に進める必要がある。