

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究課題
「高性能バイオプラスチック生産
システムの確立」

研究期間：平成13年3月1日～平成17年3月31日

研究代表者
土肥 義治
理化学研究所 理事

1. 研究テーマ

- (1) 研究領域 : 戦略的創造研究推進事業、継続研究課題
- (2) 研究代表者 : 土肥義治
- (3) 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
- (4) 研究実施機関 : 理化学研究所、東京工業大学
- (5) 研究機関 : 平成13年3月～平成17年3月

2. 研究実施の概要

(1) 研究の概要

生物の物質生産機能を利用して、再生可能なバイオマス（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ともつ新しい高分子物質・材料を創製する科学技術を開拓することは、地球環境問題や化石資源の有限性と考えると、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。これらの生体高分子は、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いる。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。

研究代表者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を進めてきた。再生可能な炭素資源から生分解性プラスチックを生産する実用プロセスを確立することは、持続可能な化学産業体系を構築する上で最重要課題の一つである。

本継続研究では、遺伝子工学、進化分子工学、タンパク質工学などの生物工学的技術を用いて、糖や植物油から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することを目的とした基礎研究を実施した。

(2) 研究の成果

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推進した。数多くの微生物は、エネルギー貯蔵物質として(R)-3-ヒドロキシアルカン酸の光学活性ポリエステルを生合成し、体内に顆粒状に蓄えている。これらのバイオポリエステルは、自然環境中の微生物によって完全に分解され、最終的に無機化される生分解性プラスチックである。これまでに、高性能な共重合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。

本研究では、まず初めに、進化分子工学の手法を用いて、上記3種微生物のポリエステル合成酵素(PhaC)の合目的改質を進めた。すなわち、高性能バイオポリエステルを高速度で合成する酵素の創出を試みるとともに、酵素の構造と機能との相関を調べた。また、結晶構造の解析に成功したモノマー供給系酵素遺伝子 (*phaJ*)については合理的に部位特異的変異を施し、酵素の活性と特異性を合目的に改質した。遺伝子組換え大腸菌(*E. coli*)や *Ralstonia eutropha*を用いて、糖や植物油などの再生可能資源から、高強度繊維の加工に適した超高分子量ポリエステル(ポリ([R]-3-ヒドロキシブタン酸):P(3HB))および高性能フィルムの加工に適した新しいタイプの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-ヒドロキシアルカン酸):P(3HB-co-3HA))を高効率で生産する発酵生産プロセスの開発を進めた。さらに、開発したバイオポリエステルの微生物生産を実用規模で実施した場合を想定し、ライフサイクル・アセスメント(LCA)を実施し、環境に与える影響を定量的に評価した。

つぎに、超高分子量ポリエステル P(3HB)を用いて生分解性の高強度繊維を作製する基盤技術を確立することを目的に、材料の結晶構造、非晶構造、表面構造、界面構造を分子レベルで制御する基礎研究を進めるとともに、構造と生分解性(酵素加水分解性)との相関を調べた。高強度繊維の理想構造は、鎖状高分子の分子鎖を完全に引き伸ばし集束し結晶化させた繊維である。高分子量ポリエステルの熔融紡糸に関する研究を進め、生分解性の高強度繊維の加工技術を開発し、繊維の結晶構造を解析した。生分解性の釣り糸や漁網として実用化されることを目標とした。また、高性能フィルムとして最適な物性を発現する共重合ポリエステルの構造と組成を決定する研究を進めた。さらにポリエステルフィルムの生分解制御技術の開発を試みた。

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。
- 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。さらに、ポリエステル合成酵素の変異構造(部位)と機能との相関を調べ、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ポリ([R]-3-ヒドロキシブタン酸):P(3HB)を生合成する *Ralstonia eutropha* のポリエステル合成酵素の人工進化によって、高活性酵素の取得に成功した。合成酵素の構造と機能との相関を調べた。
- ④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。
- ⑤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共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た。

② 遺伝子組換え微生物を用いて、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。

③ 遺伝子組換え大腸菌を用いて、糖から超高分子量ポリエステルを高速度・高効率で生産できる微生物生産プロセスを開発した。

④ 開発したポリエステルのバイオ生産プロセスの実験室データを用いて、糖および植物油を原料として年間 5,000 トンの高性能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ンベントリ (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生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。

② 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 構造の回析が強くなり、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。

③ 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。

④ 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。さらに、繊維の表面および内部結晶構造と力学的性質との相関を詳細に調べた。

⑤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を検討した。これらのデータをもとに、高強度フィルムの加工条件を最適化した。

⑥バイオポリエステル超薄膜フィルムの結晶化過程を原子間力顕微鏡 AFM を用いて“その場”観察し、結晶の生成メカニズムを調べた。

4) バイオポリエステル材料の生分解制御技術の開発

①バイオポリエステル加水分解酵素の構造と機能を調べた。

②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。

③バイオポリエステル超薄膜フィルムの酵素分解過程を AFM を用いて“その場”観察し、生分解メカニズムを明らかにした。

④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。

3. 研究構想

地球上に生息する全ての生物は、生命活動を営むために、核酸、タンパク質、多糖、ポリイソプレノイド、ポリエステル、リグニンなど、多種多様な生体高分子物質を合成している。これらの生体高分子は、生命体の骨格を形成したり、あるいは生命を維持するために多様な機能を果たしている。

生体高分子をお手本として出発したプラスチック（合成高分子）の科学と技術は、戦後の半世紀の間に大きく進展して、優れた性能と機能をもつ数多くの高分子素材を生み出し、我々の生活を豊かなものにしてきた。現在、プラスチックは全世界で1年間に約1.8億トンも石油や天然ガスから生産され、我が国の生産量は年間で1,500万トンに達している。プラスチックの製品は、衣・食・住のみならず、各種産業、運輸、建設、環境保全、医療、レジャーなど、きわめて多方面で利用さ

れている。

生体高分子をモデルとして出発した合成高分子ではあるが、現在生産されているプラスチック（ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、塩化ビニル樹脂、ポリエチレンテレフタレートなど）の多くは、自然環境中の微生物によって分解されない高分子物質である。そのために、プラスチック製品は環境中に半永久的にとどまり蓄積して、さまざまな環境問題を引き起こしている。たとえば、水圏環境に流出したプラスチック製品が、年々蓄積して海洋や湖沼の生態系に大きな害を与えている。また、生活や産業の場から排出される大量のプラスチック廃棄物を、どのようにリサイクルすべきかが大きな社会問題となっている。

プラスチック製品の10～20%程度が、環境中で微生物によって分解される生分解性プラスチックに代替されれば、プラスチックによる環境低負荷型を低減できると考えられる。生分解性プラスチックは、理想的には、再生可能なバイオマスから低コストで生産でき、使用している間は優れた性能を持続的に発揮し、廃棄後は微生物によって速やかに完全に分解されて自然界の炭素循環に組み込まれることが望ましい。生分解性プラスチックの期待される用途は、次の二分野に大別される。一つは、自然環境中で利用され、使用後は完全に分解されることが期待される分野である。例えば農林水産用資材、土木・建設用資材、野外レジャー製品への応用である。もう一つは、食品容器包装用品、紙オムツなどの衛生用品、ゴミ袋やコップなどの日用品などリサイクル使用が困難な製品であり、使用後は生ゴミとともにコンポスト（堆肥）化処理によって速やかに分解されることが期待される分野である。

生分解性プラスチックを生産するための研究において注目すべきは、原料として再生可能な炭素資源（糖、植物油など）やCO₂を用いようとする新しい動きである。20世紀のプラスチック生産には、石油、天然ガス、石炭などの化石資源を原料に用いてきた。しかしながら、大気中のCO₂濃度の増加あるいは化石資源の枯渇の問題を考えると、21世紀にはCO₂を直接的あるいは間接的に固定して、有用な高分子物質を生産する新しいシステムを確立する必要がある。すなわち、炭素循環を可能とする新しい化学工業の技術確立を図ることが、地球環境と共生する持続可能な産業体系を構築するうえで重要である。

本プロジェクトでは、バイオテクノロジーを用いて糖、植物油、CO₂などの炭素源から、高性能な生分解性プラスチックを遺伝子組換え微生物を利用して生産する方法を検討してきた。化学工業は1950年代に石炭から石油へと原料転換することによって大きく産業体系を変えた。21世紀には、石油化学工業から生物化学工業へ移行する可能性がある。われわれは、微生物の物質生産機能を利用して、再生可能な炭素源から優れた性能や特異な機能をもつ生分解性高分子（炭素循環材料）を生産する新しい産業が大きく発展することを期待し、高分子科学と生物科学との異なる研究分野

の研究者の共同作業で基礎研究を進めた。分子生物学と高分子科学との出会いが、新産業の基盤となる新しい研究領域の開拓に極めて重要であると確信し、SORST プロジェクトでは、「高性能バイオプラスチック生産システムの確立」を目標に、バイオポリエステルの生合成、高生産生物の育種、高効率生産、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4年間にわたり実施してきた。

バイオポリエステルは、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、分子生物学、微生物学、生物工学、高分子科学、材料科学の幅広い学問分野において、世界各国でバイオポリエステルの基礎研究が進められている。また、微生物のつくるバイオポリエステルは、熱可塑性を有する生分解性高分子として多方面への応用が期待されており、実用化をめざした開発研究も活発に進められている。SORST 研究では、植物系バイオマス（糖、植物油）から生分解性ポリエステルを微生物生産する省エネルギープロセスを開発し、強力な繊維や高性能なフィルムに加工できる基盤技術を確認することを目的に基礎研究を進めてきた。

当プロジェクト（JST/SORST）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アメリカ合衆国、ヨーロッパ、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、遺伝子解析、酵素の構造解析と機能評価、酵素の改質、高生産微生物の育種、効率的生産プロセスの開発、環境影響評価、高強度材料化、高機能材料化、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る。

再生可能なバイオマス資源（糖、植物油）から生分解性ポリエステルを微生物生産する環境調和型の高分子生産システムを確認し、それらのポリエステルを高性能材料化する基礎技術を開発することが、本研究プロジェクトの大きな目標であった。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確信し、4年間にわたり強力に基礎研究を推進した。

4. 1 人工進化によるポリエステル合成系酵素の改質

石油ベースの化学合成ポリオレフィンの生産プロセスが、優秀な化学触媒の開発により発展してきた歴史を鑑みると、生体触媒である酵素タンパク質の性能アップあるいは機能改変は、バイオプラスチック PHA の高効率生産システムの確立に非常に有効であると考えられる。微生物細胞内での PHA の生合成は、モノマー供給系酵素と重合酵素の2種類の合成酵素の連携によって成立し、両酵素の活性・基質特異性によって生成するポリマーの蓄積量・モノマー組成比（各種物性に反映）が規定される。

4. 1. 1 PHA 重合酵素の進化工学

まず、最も生化学的解析が進められている *Ralstonia eutropha* 由来重合酵素をモデルターゲットに選定した。進化工学の手順を簡単に述べる。最初に、重合酵素遺伝子全域にエラー誘発 PCR によりランダム変異を導入し、P(3HB) 合成用のモノマー供給系酵素遺伝子群とともに大腸菌に導入し、共発現系を構築する。次いで、細胞内で合成されるポリエステルを特異的に染色する色素ナイルレッドを利用したプレートアッセイと多検体処理可能な定量的 HPLC 分析（化学変換されたクロトン酸の定量）に、変異体集団を順次投入し、目的の変異クローンをハイスループットスクリーニングするというものである。最終的に、P(3HB)の細胞内蓄積率と PHA 重合酵素活性との間に相関性が成立し、微生物の PHA 蓄積率をモニタリングするだけで目的の高活性酵素を選抜できる「インピボモニタリングシステムを確立することができた。その後試行錯誤を経験しながら、活性復帰変異法を取り入れて野生型酵素よりも高活性な変異体を取得することに初めて成功した。通常、野生型酵素から直接進化させる場合、野生型酵素の活性がある程度高いので、野生型酵素と高活性変異酵素の活性を識別することが困難なことが多い。微生物体内で PHA 生産させる場合には、「モノマー供給律速」と「細胞内ポリマー蓄積の物理的制約」という2つの課題を克服する必要があった。そこで、野生型酵素から一度意図的に活性低下させ（「先祖返り」）、そこから新たに野生型活性を超越する人工進化（活性復帰変異）を実施することで、positive selection の形で優良変異を特定するという方法論を採用した。

P(3HB) ホモポリマーは、2次結晶化によって経時的に脆い材料となる欠点がある。さらに、融点近傍で熱分解が起こり熔融成型を自在にできないという

問題もあった。そこで、P(3HB)の分子鎖中に構造の異なる第2モノマー成分を導入した共重合体を合成すれば、柔軟性が向上し同時に融点を下げられるこ

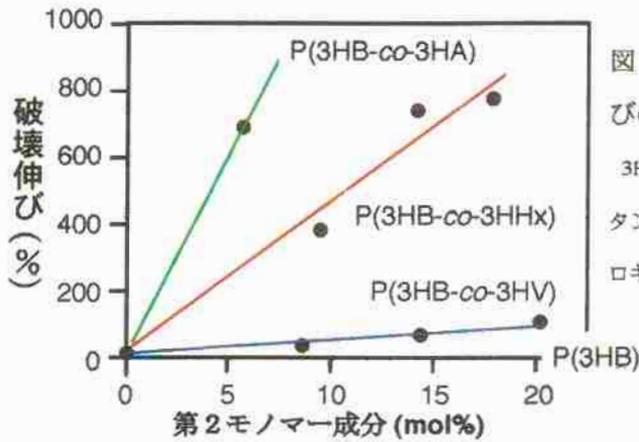


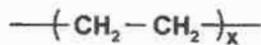
図1. P(3HA)における組成成分比と破壊伸びの関係

3HB: 3 ヒドロキシブタン酸、3HV: 3 ヒドロキシペンタン酸、3HHx: 3 ヒドロキシヘキサン酸、3HA: 3 ヒドロキシアルカン酸

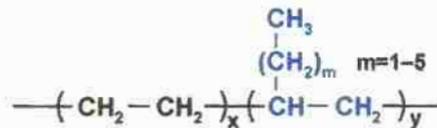
とが期待され、実際その通りになった (図1)。

本研究は、図2に示すような汎用化学合成プラスチックであるポリエチレンの分子設計の指針が生かされたよい例である。すなわち、ポリマー結晶構造中のアモルファス領域が傘高い第2モノマー成分によって拡大し、弾性を増すこ

ポリエチレン

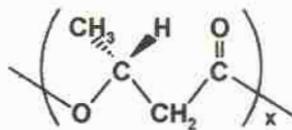


高密度ポリエチレン
(プレートグレード)

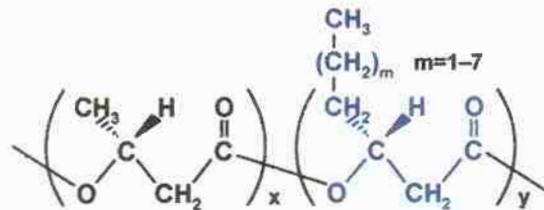


低密度ポリエチレン
(フィルムグレード)

バイオポリエステル



高密度ポリエステル
P(3HB)
(プレートグレード)



低密度ポリエステル
P(3HB-co-3HA)
(フィルムグレード)

とが理由となっている。

図2 ポリエチレンとバイオポリエステルの構造

これらの知見に基づき、“硬軟多様”な 3HB ベースの共重合 PHA を改変重合酵素を用いて創製することにした。そこで、P(3HB-co-3HHx)共重合体を合成できる *Aeromonas caviae* 由来重合酵素を進化工学の第 2 のターゲットとした。先に確立したインピボモニタリングシステムを基盤としてさらに改良した点は、P(3HB)ホモポリマーの生産性で多くの変異体の酵素活性レベルを評価した後、 β 酸化系に変異を有する大腸菌 LS5218 株で、P(3HB-co-3HHx)共重合体を脂肪酸から合成させる系に連動させることである（図 7 に脂肪酸 β 酸化系を中枢に据えた人工代謝経路を示す。）。したがって、使用した遺伝子発現ベクター中には、P(3HB)ホモポリマー合成用と P(3HB-co-3HHx) 合成用の 2 種類の遺伝子セットが搭載してある。この改良型進化分子工学システムによって、高活性変異体そして基質特異性が変化したと推定される変異体が獲得できた。これら進化酵素を用いて P(3HB-co-3HHx)の生産性が増強され、また 3HB ユニットと 3HHx ユニットの組成比がさまざまに変化した共重合体を作製することができた。

さらに、3HB をベースとした多成分モノマーユニットからなる PHA 共重合体を合成できる *Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PHA 重合酵素を対象にした。野生型の本酵素を利用して、買い物袋グレードのフィルムに類似した 3HB ベース共重合体を作製することに成功していたが、3HB ユニットの基質取り込み能力が微弱であるという課題があった。そこで、この性質を逆に利用して 3HB だけから成る P(3HB)ホモポリマーの蓄積能力が向上する（3HB に対する基質特異性向上あるいは全活性の向上）ということを目指したスクリーニング系を構築した。この人工進化実験の特徴は、野生型酵素だと微量のポリマーしか蓄積できない組換え大腸菌と比較することで、より多くポリマー蓄積する進化酵素保有大腸菌株を精度高く識別できるという点にある。人工進化実験により複数特定された各優良変異点において、総アミノ酸置換を実施し、さらに各ポジションにおける優良変異の組み合わせにより野生型の約 400 倍の P(3HB)を生産させることに成功した。本研究より、3HB を含む短鎖基質特異性に関与する部位、または基質鎖長に依存せず全活性上昇に貢献する部位を浮き彫りにすることができた。そして、得られた進化酵素を利用して、図 3 に示した人工代謝経路にしたがい多様な多成分モノマー組成からなる共重合 PHA を創製できた。

以上のことから、ある物性を発現するための共重合 PHA の特定モノマー組成比が要請された場合、“カスタムメイド的”に提供できる改変重合酵素を品揃いすることが大変威力を発揮することがわかる。現在、取得した各種進化酵

素を他の細菌、酵母、植物体（後述）、あるいはインビトロ重合系に導入し始めているところである。国外の研究グループも、最近重合酵素の進化学研究を報告しはじめている。今後は、新規の化学構造からなるモノマーユニットを取り込める重合酵素を分子育種できれば、新規ポリマーの多様性が拡張できるという夢もある。そういう意味で、ポリチオエステル型のポリマーが合成されることを示した成果は多くの研究グループを刺激した。

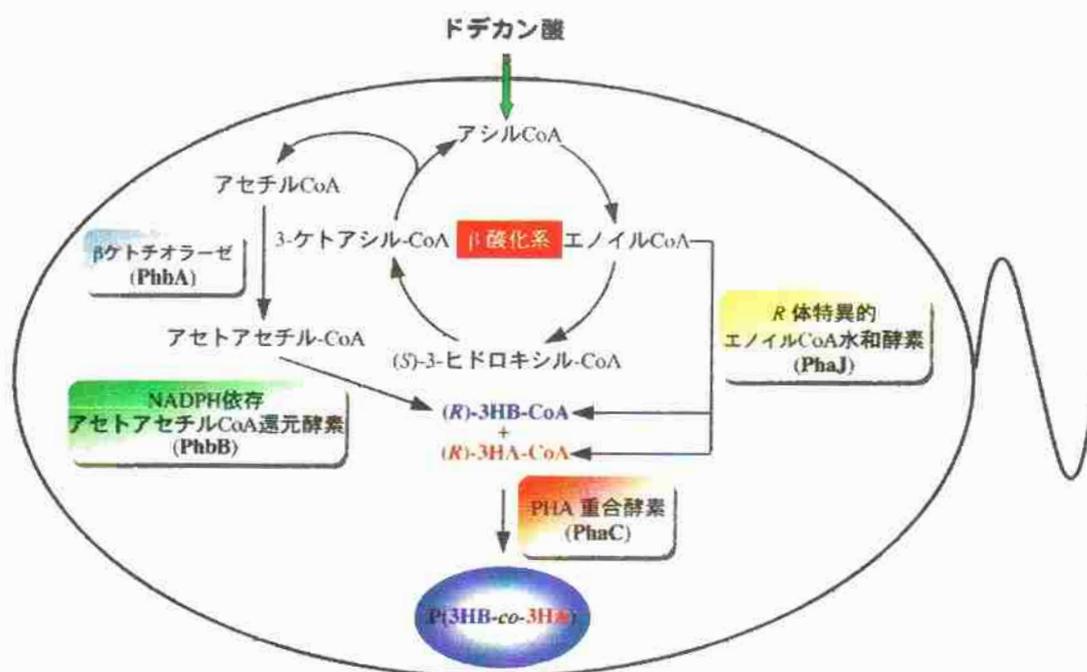


図3 進化学を施した人工代謝

4. 1. 2 モノマー供給酵素 Phaj の立体構造に立脚したタンパク質工学

モノマー供給系酵素として脂肪酸β酸化系に見出された水和酵素（*R*）体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ、Phaj）は、分解能 1.5 Å でX線結晶構造解析に成功した。精密結晶構造から、基質結合部位の最も深い部分には、アミノ酸残基 65 番目のロイシン(Leu:L)と 130 番目のバリン(Val:V)が位置していることが推定された（図8）。本酵素は、本来基質特異性が狭く、炭素鎖数 4 と 6 の基質に対しては高い活性を示すが、それ以上の炭素鎖数の基質に対してほとんど活性を示さない。そこで、基質挿入の立体障害を考慮して、各部位において小さなアミノ酸へ変換した変異酵素（65 番目のロイシンをアラニン（Ala:A）に置

換：L65A と 130 番目のバリンをグリシン (Gly:G) に置換：V130G) を遺伝子工学的に作製し、*in vitro* および *in vivo* での基質特異性の変化を調べた。その結果、いずれの変異酵素も期待通りより長鎖のモノマー基質をも取り込めるようになることが、合成基質を使用した反応速度論解析 (*in vitro*) および PHA 共重合組成の分析 (*in vivo*) での実験によって実証された。この立体構造に立脚した分子設計は、PHA 合成酵素のタンパク質工学研究の先駆的な例である。

4. 1. 3 分子進化した酵素を用いた酵素を用いたバイオポリエステル生産

3-ケトアシル-ACP シンターゼⅢ (FabH) は、元来脂肪酸合成においてマロニル-ACP からアセトアセチル-ACP への脱炭酸反応を触媒する酵素である。しかし、によって元来脂肪酸合成の酵素とされていた FabH の(R)-3-ヒドロキシアルカン酸供給系への関与が明らかになった。FabH は脂肪酸合成系中間体である 3-ケトアシル-ACP を基質として CoA 体に変換し、モノマー供給をする酵素としても働く。*Escherichia coli* 由来の FabH は炭素数 2~4 に基質特異性を持っており、脂肪酸合成経路から炭素数 4 の (R)-3-ヒドロキシブタン酸をモノマーとして供給する、P(3HB)しか得られない酵素である。*Escherichia coli* 由来 FabH と *Mycobacterium tuberculosis* 由来 FabH のタンパク質立体構造から 87 番目のフェニルアラニン残基が基質特異性に関与していると推測されている。

我々の研究によって、*Escherichia coli* は通常 (R)-3-ヒドロキシブタン酸をモノマーとするホモポリマーを菌体内に蓄積していたが、87 番目のフェニルアラニン残基をトリプトファンに置換することで (R)-3-ヒドロキシアルカン酸モノマー供給酵素としての基質特異性の広がりが確認された。このことで (R)-3-ヒドロキシブチリル-CoA 以外の基質 (炭素数 6~12 の (R)-3-ヒドロキシアシル-CoA) の供給が可能になった。本報では変異酵素遺伝子 (*phaC1* および *fabH*) の組み合わせによって、安価な糖 (グルコース) から (R)-3-ヒドロキシブタン酸を主成分とする P(3HA) 共重合体の生合成を大腸菌において検討した結果を示す。

表1. 分子進化させた酵素によるバイオポリエステルの生産

導入遺伝子	乾燥菌体重量 (g/L)	P(3HA) 蓄積率 (wt% of CDW)	P(3HA) 組成 (mol %)		
			3HB	3HHx	3HO
<i>mtphaC1</i> , <i>phbAB</i>	4.4±0.4	52.6±5.6	100	0	0
<i>mtphaC1</i> , <i>phbAB</i> <i>wtfabH</i>	4.1±0.1	16.4±0.7	100	0	0
<i>mtphaC1</i> , <i>phbAB</i> <i>mtfabH</i>	3.9±1.2	36.8±6.9	99.8±0.16	0.1±0.03	0.1±0.03

3HB:3-ヒドロキシブタン酸、3HHx:3-ヒドロキシヘキサン酸、3HO:3-ヒドロキシオクタン酸

4. 1. 4 遺伝子組み換え植物によるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 合成の効率化

微生物発酵による PHA 生産の効率は、遺伝子組換え技術によってかなり改善されてきた。しかし、発酵法による生産では菌の餌となる炭素源のコストの削減に限界があると考えられる。そこで、微生物から単離した PHA 生合成系遺伝子を植物に導入することで、光合成によって直接 PHA を生産することが検討されている。植物に acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) と PHA synthase (PhaC) をコードする遺伝子を導入すると poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] が蓄積されることはすでに報告されているが、蓄積量が非常に少ないのが問題であった。本研究では、前述した進化工学によって取得された高活性型変異酵素を用いて、植物細胞内における PHA 生産の効率化を検討した。

Pseudomonas sp. 61-3 由来の PHA synthase 遺伝子と *Ralstonia eutropha* 由来の β -ketothiolase、acetoacetyl-CoA reductase 遺伝子に葉緑体局在化シグナル配列を付加し 35S cauliflower mosaic virus promoter に連結した。この遺伝子断片をモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に導入した。得られた組換え株の PHA 含量を GC/MS を用いて分析した結果、野生型の PHA synthase 遺伝子を導入した組換え株では最大 0.01 wt% の P(3HB) が蓄積されたのに対し、高活性変異酵素遺伝子を導入した組換え株では最大 0.18 wt% の P(3HB) が蓄積され、変異酵素導入により P(3HB) の蓄積量を大幅に増加させることができた。しかし、

3HB 以外のモノマー成分は検出されず、*Arabidopsis* の葉緑体内には炭素数が6以上の中鎖長のモノマー供給系は存在しないことがわかった。現在、植物細胞内で中鎖長のモノマー供給能力のある酵素の探索をおこなっている。この結果により、大腸菌を用いて選抜された高活性型変異酵素 (PHA synthase) が、細胞環境のかなり異なる植物細胞内でも、PHA を高蓄積する能力があることが明らかとなったことから、大腸菌系 \leftrightarrow 植物系の連携により、さらに優れた遺伝子組換え植物の創出が期待される。

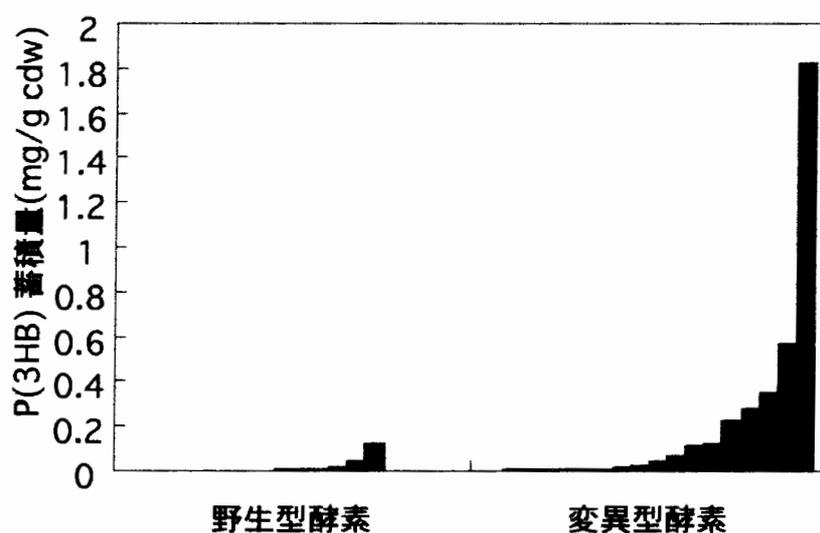


図4 PHA synthase を導入したシロイヌナズナの PHA 蓄積量
(各バーが一植物体に対応する)

4. 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

水素細菌 (*Ralstonia eutropha*) などの代表的な PHA 合成細菌を糖や有機酸、植物油を炭素源として生育させると、乾燥菌体重量あたり最大で 80% を超えるポリマーを蓄積する。典型的な PHA は、(R)-3-ヒドロキシブタン酸からなるホモポリマー[P(3HB)] であり、その重量平均分子量は 10~100 万 g/mol 程度である。しかし、野生型 *R. eutropha* が合成する P(3HB) は結晶性が高く、硬くて脆いという性質のため実用的な高分子物性を備えていない。遺伝子組換え細菌 *R. eutropha* PHB⁻4 (pJRDEE32d13) は、植物油を原料として 3HB と (R)-3-ヒドロキシヘキサン酸 (3HHx) からなる共重合体 P(3HB-co-3HHx) を合成する (図 1)。この共重合体 PHA は柔軟性を有しており、フィルムに加工することができる高性能材料である。

一方、PHA 合成能を付与された遺伝子組換え大腸菌 (*Escherichia coli*) は、グルコースから重量平均分子量で 300 万を超える超高分子量 P(3HB) を合成することができる (図 1)。この超高分子量 P(3HB) も、高強度繊維やフィルムに加工することができる高性能材料である。

本グループでは、P(3HB-co-3HHx) 共重合体および超高分子量 P(3HB) の 2 つの高性能ポリマーの効率的生産手法の開発を目指して研究を行った。そして、これら生産データをもとにライフサイクルインベントリー分析を行い、年 5,000 トンの商業的な生産を仮定した場合に環境に与える影響について調査した。ここでは、その成果について詳述する。

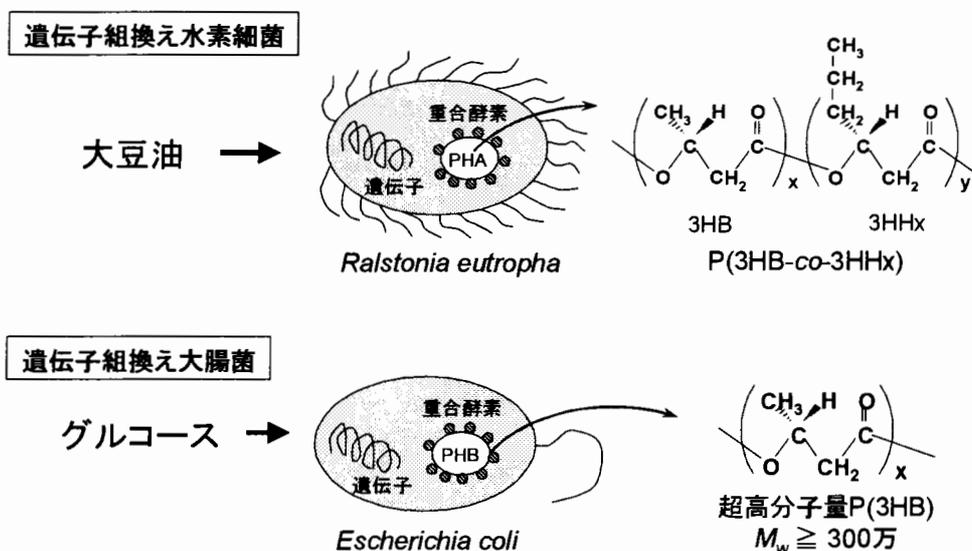


図 1 遺伝子組換え微生物による PHA の合成

(1) 組換え *R. eutropha* による P(3HB-co-3HHx) 生産

土壌から単離された細菌 *Aeromonas caviae* FA440 株は、植物油や脂肪酸を炭素源として P(3HB-co-3HHx) を合成する。しかしながら、*A. caviae* FA440 株が蓄積するポリマー量は最大で 30 wt% 程度であり、P(3HB-co-3HHx) の効率的な生産法を開発するためには生産菌株の育種が必要であった。

本研究プロジェクトの前身にあたる戦略的基礎研究事業 (CREST) において、PHA 蓄積欠損株である *R. eutropha* PHB⁻4 を宿主として、*A. caviae* FA440 株由来の PHA 重合酵素遺伝子 (*phaC_{Ac}*) を組み込んだ組換え株 [*R. eutropha* PHB⁻4 (pJRDEE32d13)] を育種した。この組換え株は、フラスコスケールの培養実験において、大豆油やオリーブオイル、パームオイルなどの植物油から 80 wt% を超える高含率で P(3HB-co-3HHx) を蓄積した。また、その 3HHx 分率は約 5 mol% であり、P(3HB) ホモポリマーよりも柔軟性があり、実用的な高分子物性を有していることを確認した。

本研究プロジェクトでは、この組換え株 *R. eutropha* PHB⁻4 (pJRDEE32d13) を使ってより大きなスケールでの生産研究を行った。ここでは、バイオリアクターとして、10 l 容発酵槽を用い、流加法により炭素源である大豆油を添加しながら生産効率を最大に高めるための制御条件の検討を行った。まず、培地中の大豆油濃度が菌体増殖に与える影響を調べた。その結果、大豆油の濃度が 20 g/l 程度までは菌体増殖に与える阻害的な影響は確認されなかった。そこで、大豆油の制御濃度は 20 g/l 以下にすることにした。次に、P(3HB-co-3HHx) の蓄積を促進させるために制限する栄養素について検討した。窒素源またはリン源を制限して培養を行い、どちらの栄養制限が適しているのかを調べた結果、リン源制限において高いポリマー含率と菌体収量を得ることができた。そこで、リン源制限によってポリマー蓄積を促進させることにした。

実際に、大豆油濃度を 20 g/l 以下となるように炭素源を流加し、かつ、培養 48 時間以降リン源が制限となるようにして培養実験を行った。その結果を図 2 に示す。培養 96 時間で、128 g/l の乾燥菌体量が得られ、そのうちポリマーは 71 wt% 蓄積されていた。共重合組成は、3HB が 95 mol% であり、3HHx が 5 mol% であった。P(3HB-co-3HHx) の生産性は約 1.0 g/l·h が得られ、大豆油からの対原料収率は平均で 0.74 g-PHA/g-大豆油であった。グルコースなどの糖類を炭素源として PHA の合成を行うと、その対原料収率は 0.3–0.4 g-PHA/g-糖であることから、2 倍近く高い対原料収率が得られたことになる。

野生型の *R. eutropha* H16 との比較実験を行った結果 (表 1)、同様の生産成績が得

られ、遺伝子組換えを行ったことによる増殖速度および PHA 含率の低下は認められなかった。また、PHA の平均分子量や多分散度にも大きな影響はなかった。

10 l 発酵槽を使った培養実験においても P(3HB-co-3HHx) を効率的に生産することが可能であったことから、商業的な規模へのスケールアップも可能であると考えられる。また、植物油を炭素源とすることで、従来の用いられている糖類よりも 2 倍近く高い対原料収率でポリマーを生産することができ、生産コストの削減に寄与することが期待される。

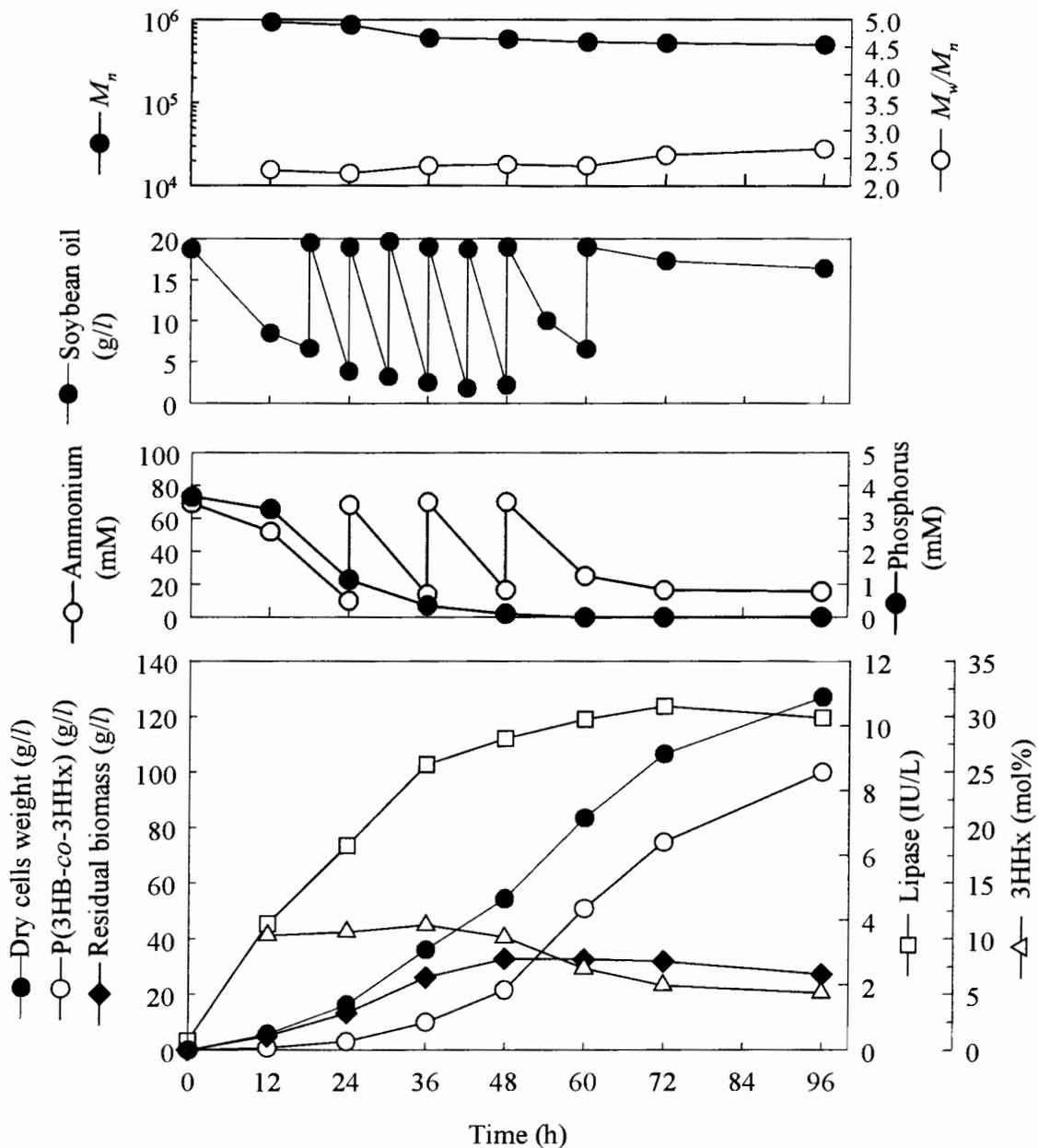


図2 10 l 容発酵槽を用いた大豆油からの P(3HB-co-3HHx) 生産

表1 野生型 *R. eutropha* と組換え株による生産成績の比較

Run No.	Strain	Dry cells weight (g/l)	PHA content (wt%)	Composition (mol%)		Molecular weight		Yield (g-PHA/g-oil)
				3HB	3HHx	M_n ($\times 10^3$)	M_w/M_n	
1	H16	126	76	100	0	330	3.8	0.76
2	H16	118	72	100	0	400	3.2	0.72
3	PHB-4/pJRDEE32d13	138	74	95	5	430	2.5	0.72
4	PHB-4/pJRDEE32d13	128	71	95	5	450	2.8	0.74

(2) 組換え大腸菌による超高分子量 P(3HB)の生産

これまで P(3HB)は、硬くて脆いという物性上の問題で繊維化は困難であった。しかし、超高分子量 P(3HB)を用いて延伸を行うことで、高強度な繊維やフィルムが作製できるようになった。そこで、超高分子量 P(3HB)実用化のためのキーテクノロジーとなる、遺伝子組換え大腸菌による超高分子量 P(3HB)の効率的生産法を確立することを目的として実験を行った。

本実験では増殖力の高い大腸菌 *E. coli* XL1-Blue を宿主菌として用いた。培養にはミネラルリッチ (MR) 培地を用い、グルコースを炭素源として流加して行った。従来の培養方法では P(3HB)の生産は増殖連動型であったために菌体の増殖に負担がかかり、大量の菌体量を得ることはできなかった。そこで本実験では、誘導発現型プラスミドを利用し、菌体増殖と P(3HB)生合成を別々に制御した方法により P(3HB)生産を試みた。この方法では、菌体増殖時にはなるべく P(3HB)の蓄積を抑え、菌体増殖がある目標値に達したときに誘導剤を添加して PHA 合成酵素遺伝子を発現させ、P(3HB)を高含率で得るまでポリマーの生合成を行わせるものである。

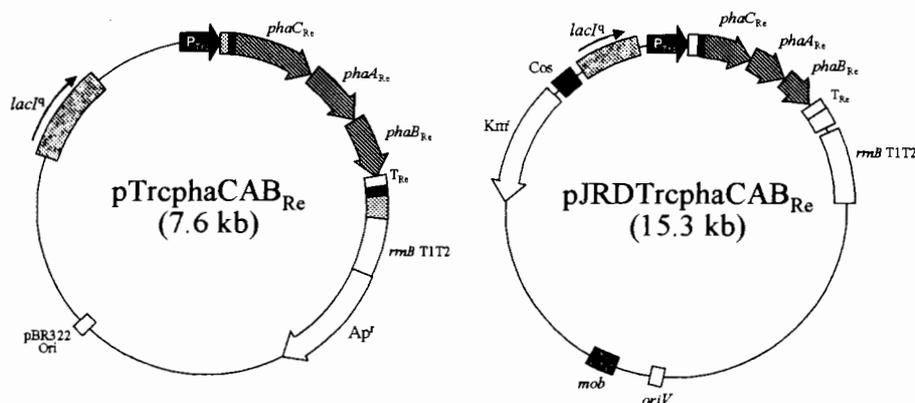


図3 異なるコピー数を有する誘導発現型プラスミド

この培養法を実現するために、誘導剤によって発現制御が可能な *trc* プロモーターを有する高コピープラスミド pTrc99A を利用した。この *trc* プロモーター制御下に *R. eutropha* 由来の PHA 合成酵素遺伝子群 (*phaCAB_{Re}*) を挿入して誘導発現プラスミドを構築した (図 3)。また、異なる複製領域を有するプラスミド pJRD215 にも *trc* プロモーターと *phaCAB_{Re}* 遺伝子群を挿入し、コピー数の低い誘導発現プラスミドを構築した (図 3)。

これらのプラスミドを有した組換え *E. coli* XL1-Blue を作成し、超高分子量 P(3HB) の生産実験を 10 l 容発酵槽を用いて行った (図 4 および図 5)。グルコースの流加方法は、培養液の pH を制御指標とした pH-stat 法に基づいて行った。培養 24 時間までは菌体増殖を優先的に行わせ、その後誘導剤である IPTG を添加して P(3HB) の生合成を行わせた。その結果、高コピー数のプラスミドを使った場合、培養 54 時間で 167 g/l の乾燥菌体重量と 68 wt% の P(3HB) が得られた。一方、低コピー数のプラスミドを使った場合、最大で 201 g/l の乾燥菌体重量と 80 wt% の P(3HB) を得ることができた。また、合成された P(3HB) の重量平均分子量 (M_w) はどちらのプラスミドを用いた場合でも 300 万を超える超高分子量であった。したがって、超高分子量 P(3HB) においては、低コピー数のプラスミドを用いた方が高い生産性を得られることがわかった。

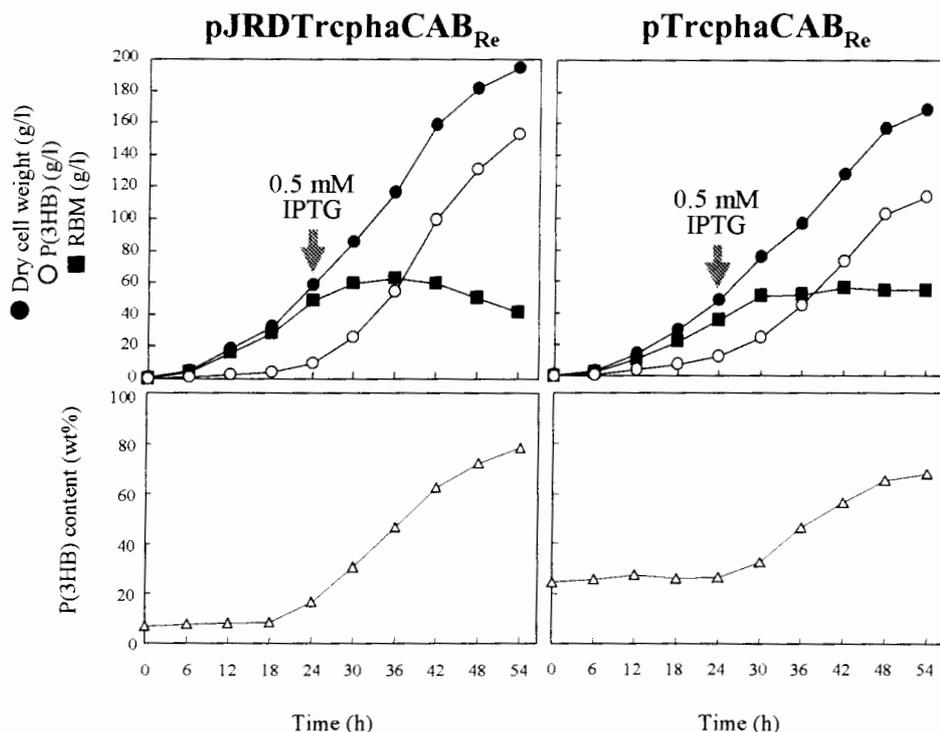


図 4 10 l 容発酵槽を用いた組換え大腸菌による超高分子量 P(3HB) の生産

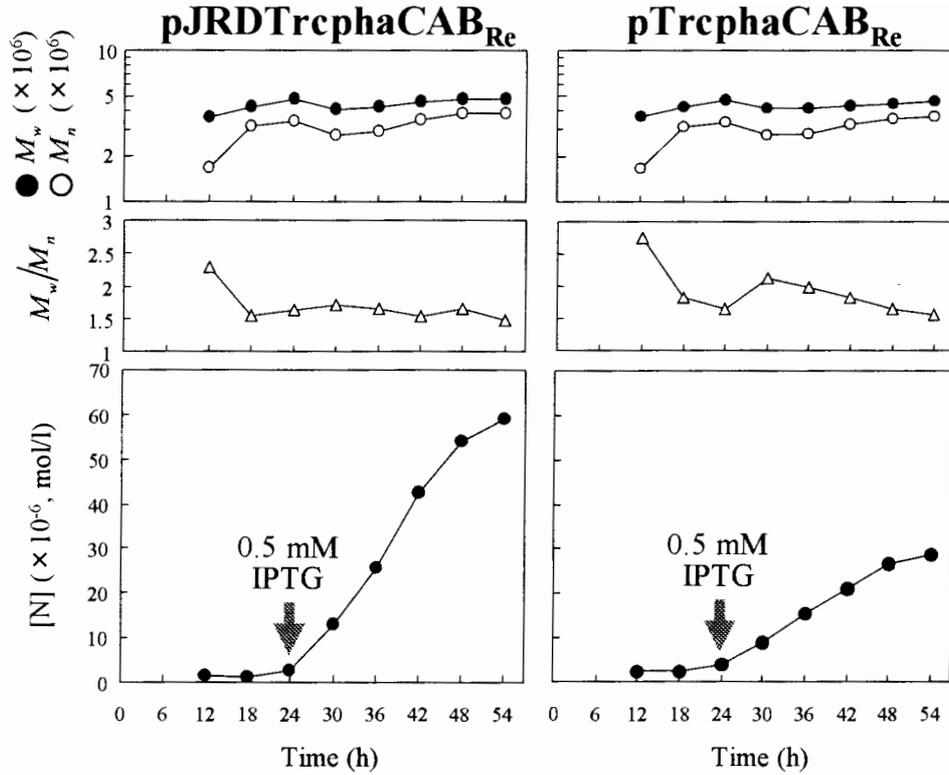


図5 組換え大腸菌内における P(3HB)分子量およびポリマー鎖数[N]の変化

低コピープラスミドを有する大腸菌 *E. coli* XL1-Blue (pJRDtrcphaCAC_{Re}) を4回培養し、その再現性について検討した(表2)。その結果、平均で 190 g/l の乾燥菌体量、77 wt% の P(3HB) が生産できた。これらの培養における P(3HB) の生産性は平均で 2.6 g/l・h であった。分子量を測ったところ、 M_w が 4.8×10^6 の高い分子量を有しており、その多分散度は 1.5 であった(図6)。今回開発した方法により、平均で 0.37 g-P(3HB)/g-グルコースの対原料収率で超高分子量 P(3HB) を生産することができた。これまで同規模の生産スケールでの対原料収率が 0.28 g-P(3HB)/g-グルコースと報告されていることから、従来法より大幅に高い対原料収率を達成することに成功した。

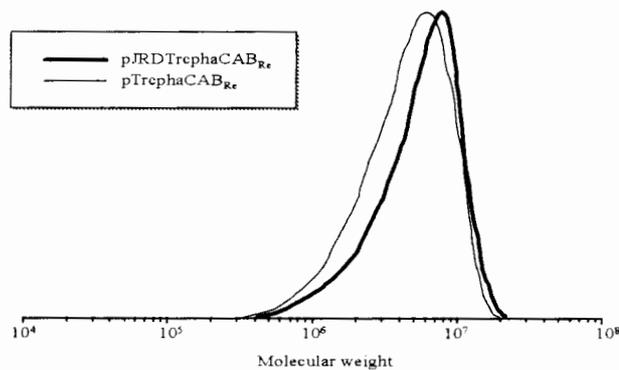


図6 大腸菌で合成した超高分子量 P(3HB) の分子量分布

表 2 超高分子量 P(3HB)生産の再現性試験

No.	Plasmid	Dry cells weight (g/l)	P(3HB) content (wt%)	Molecular weight		Yield [g-P(3HB)/g-glucose]	Productivity (g/l·h)
				$M_w (\times 10^6)$	M_w/M_n		
1-1	pJRDTrephaCAB _{Re}	196	78	4.8	1.5	0.40	2.8
1-2	pJRDTrephaCAB _{Re}	185	76	4.7	1.5	0.36	2.6
1-3	pJRDTrephaCAB _{Re}	175	74	5.0	1.5	0.34	2.2
1-4	pJRDTrephaCAB _{Re}	201	80	4.7	1.6	0.38	2.8
1-average	pJRDTrephaCAB _{Re}	190±11	77±3	4.8±0.1	1.5	0.37±0.03	2.6±0.3
2	pTrephaCAB _{Re}	167	68	4.6	1.7	0.30	2.1

(3) PHA 生産の環境影響評価

バイオマスは再生可能な資源であることから、バイオマスから生産された PHA が使用後に二酸化炭素と水に生分解されたとしても大気中の二酸化炭素濃度をこれ以上増大させる心配はなく、環境低負荷型の高分子材料と考えることができる。では、「どの程度環境に与える負荷が少ないのか」という問いに対して、これまで科学的な根拠に基づいた実証がなされてはいなかった。PHA といえども、その生産工程や精製工程では電気やガスなどの化石燃料に由来するエネルギーを必要とする。そのため、生産時に投入されるエネルギーを考慮すると、PHA は石油をベースにした合成プラスチックよりも環境負荷が大きいのではないかという意見もある。

遺伝子組換え技術を応用した近年の研究開発によって、PHA の物性や生産性の向上が可能になった。野生型の微生物を用いたこれまでの生産プロセスを第一世代とするならば、組換え微生物を用いたプロセスは第二世代に区別することができる。そこで、第二世代生産法の代表的な例として、上述した P(3HB-co-3HHx)と超高分子量 P(3HB)の微生物生産プロセスを取り上げ、ライフサイクルアセスメントの手法にもとづき環境に与える影響について評価を行った。

(3. 1) ライフサイクルアセスメントの手法と意義

はじめに、ライフサイクルアセスメント (LCA) について説明する。ある製品が、生産、使用、リサイクル、廃棄のライフサイクルにおいて、環境に与える影響を定量的に評価する一つの手法が LCA である。LCA は、インベントリー分析、インパクト

分析、インプルーブメント分析の3要素から成っている。

インベントリー分析では、製品のライフサイクルの間における物質およびエネルギーの流れを、原料採取、製造、加工、輸送、使用、再利用、リサイクル、廃棄物処理の全段階で定量的に調査し算出する。次いで、インパクト（環境負荷）分析では、インベントリー分析をベースにして製品の全段階における環境負荷を定量化する。インプルーブメント（環境負荷改善）分析は、前段階までの分析で得られた結果を検討し、その製品の環境負荷を削減するには、どの段階をどのように改善すべきかを検討するものである。LCAの主たる目的は、この環境負荷改善作業にある。

今回は、大気中の二酸化炭素からバイオマスを経てPHAの精製顆粒を得るまでの一連の工程に関して、投入エネルギー量と排出二酸化炭素量を環境負荷項目としたインベントリー分析を行った（表3）。また、これまでグルコースなどの糖を原料としたPHAの生産法が検討されてきたが、大豆油を原料として用いた場合、環境に与える影響が改善されるのかについても分析した。

表3 インベントリー分析の概要

分析範囲	大気中の二酸化炭素からPHAの精製顆粒を得るまで	
環境負荷項目	投入エネルギー量、排出二酸化炭素量	
生産規模	年間5,000トン（使用する発酵槽は1機）	
原料	大豆油	グルコース（コーンスターチ）
生産物	P(3HB-co-3HHx)共重合体	超高分子量P(3HB)

（3. 2）PHAの生産プロセス

今回のインベントリー分析では、上述した2種類の高性能PHAを年間5,000トン生産するプロセスを想定して行った。PHA生産の詳細なプロセスを図7に示した。微生物によるPHA生産工程の後には、界面活性剤（ドデシル硫酸ナトリウム）による菌体成分の溶解、次亜塩素酸ナトリウムによるPHA顆粒の漂白、洗浄、乾燥からなる

精製工程を経て PHA 顆粒を得る。この工程における PHA の回収率は 95%程度と想定した。

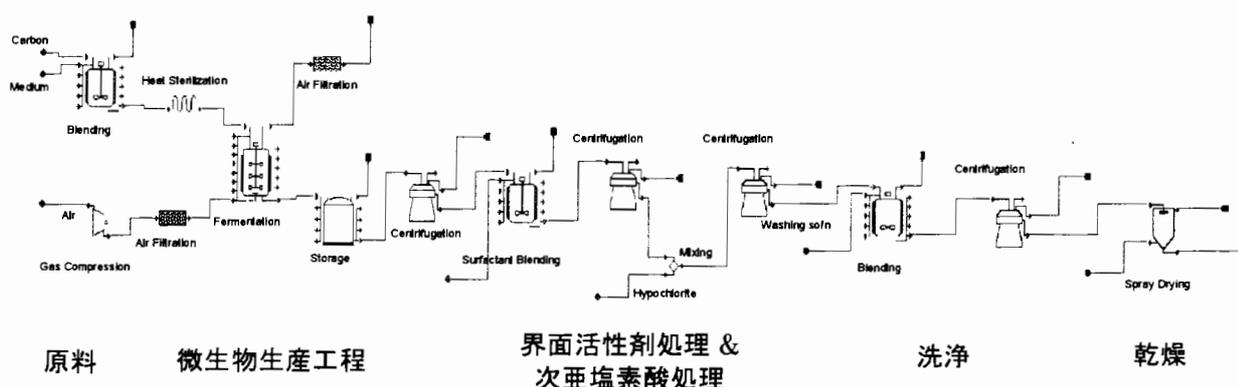


図7 インベントリー分析を行った PHA の生産および精製工程

(3. 3) PHA 生産プロセスのインベントリー分析

(3. 3. 1) 原料生産

大豆油生産のインベントリー分析を行うために、アメリカ農務省 (USDA) や同国エネルギー省 (DOE) の公表値を参考に、積み上げ法により投入エネルギー量と排出二酸化炭素量を計算した (図8)。農業段階では、トラクターの燃料や化学肥料、農薬、種子などの生産、カスタムワークの項目に関して、アメリカの大豆生産が盛んな9つの州の平均値を用いて計算を行った。また、大豆からは大豆油と大豆ミール (大豆粕) の2つの生産物が得られることから、農業・加工段階に投入されたエネルギーや排出二酸化炭素量は生産物の重量を基準にして配分した。その結果、1 kg の大豆油を生産するのに投入されるエネルギーは 4.8 MJ であり、排出される二酸化炭素量は -2.52 kg と算出された。排出二酸化炭素量が負の値になるということは、排出される二酸化炭素量よりも大気中から固定される量の方が多いことを意味する。

同様に、グルコース (コーンスターチ) の投入エネルギー量と二酸化炭素排出量を計算した。その結果、1 kg のグルコース生産のための投入エネルギー量は 7.5 MJ で、排出二酸化炭素量は -0.97 kg であった。

大豆油もグルコースも取引価格は 1 kg あたり約 0.3 ドルでほぼ同じである。しかし、大豆油生産の投入エネルギー量と排出二酸化炭素量はグルコースの場合より顕著に少ない。環境への影響を考慮すると、大豆油の方が原料として適しているといえる。

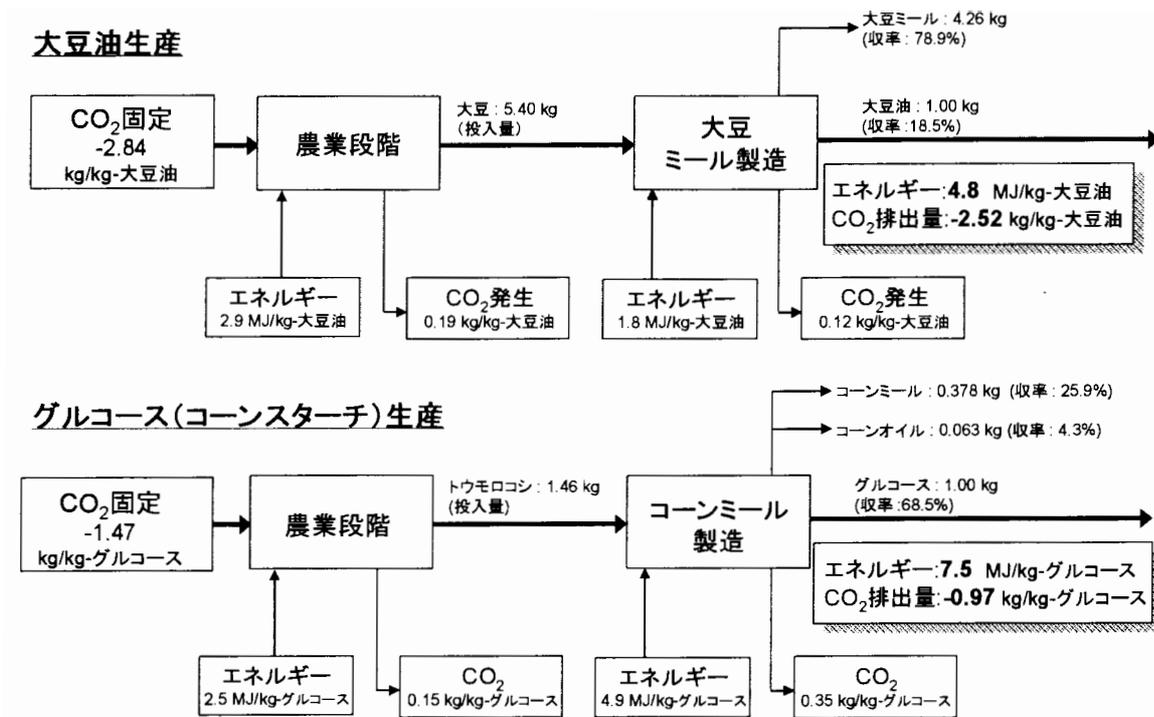


図8 原料生産のインベントリー分析

(3. 3. 2) PHA の生産と精製

微生物による PHA の生産工程では、表 4 に示す 6 つの条件で分析を行った。大豆油を原料に用いた場合には、菌体濃度、PHA 含有率、収率がそれぞれ異なる 4 つのケースを設定した（ケース 1～4）。これらの値は、我々の実験結果や公表されているデータに基づいて決定した。グルコースを原料とした場合には、韓国の研究グループによって報告された最も高い生産性のデータを参考にした場合（ケース 5）と、アメリカのモンサント社によって行われた実際の生産データを参考にした場合（ケース 6）の 2 つを想定した。ここで特筆すべきは、大豆油またはグルコースを原料とした場合の対原料収率の違いである。大豆油からの対原料収率は 0.7–0.8 g-PHA/g-大豆油であり、グルコースの場合と比較して約 2 倍ほど高い。

使用する発酵槽は 1 機とした。運転間隔を 12 時間あけて年間 330 日運転すると、それぞれの条件で 128–188 回の培養が可能である。このような運転条件で年間 5,000 トンの PHA 生産を達成するためには、300–750 m³ の発酵槽を使用する必要がある。発酵槽の運転は国内で行うことを想定して、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）などの公開データを利用してインベントリー分析を行った。PHA 生産工程

においては、化学薬品（アンモニア）や殺菌用の水蒸気の製造、工業用水や電力、冷却水の使用、そして、微生物代謝によって排出される二酸化炭素量を考慮して計算した。また、精製工程においては、化学薬品（ドデシル硫酸ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム）の製造、電力や水蒸気、冷却水の使用を考慮して計算した。

表4 PHA生産（年産5,000トン）における運転条件の設定と推定生産コスト

ケース	原料	生産物	培養時間 (h)	菌体濃度 (g/l)	PHA含有率 (重量%)	収率 (g/g)	年間運転回数	発酵槽 (m ³)	コスト (\$/kg)
1	大豆油	P(3HB-co-3HHx)	50	100	80	0.70	128	750	4.77
2	大豆油	P(3HB-co-3HHx)	50	150	80	0.70	128	500	3.92
3	大豆油	P(3HB-co-3HHx)	50	100	85	0.80	128	700	4.27
4	大豆油	P(3HB-co-3HHx)	50	150	85	0.80	128	460	3.73
5	グルコース	P(3HB)	30	200	75	0.37	188	300	3.88
6	グルコース	P(3HB)	48	190	79	0.30	132	400	4.24

インベントリー分析の結果を表5に示すように、大豆油を原料としたケースのうち3つで、グルコースを原料とした場合より少ない投入エネルギー量を示した。これは、大豆油生産に投入されるエネルギー量がグルコース生産と比較して少なく、大豆油からのPHA生産収率が高いことが要因として挙げられる。また、場合によっては二酸化炭素排出量を負の値に抑制することも不可能ではないことがわかった。これらのことから、LCAをベースにした比較において、グルコースよりも大豆油の方がPHA生産の原料として適していると結論できる。

表5 PHAの生産工程におけるインベントリー分析の結果

ケース	必要原料 (kg/kg)	原料生産		PHA生産工程		精製工程		合計	
		CO ₂ (kg/kg)	エネルギー (MJ/kg)						
1	1.50	-3.84	7.31	3.74	35.58	0.92	19.24	0.82	62.13
2	1.50	-3.84	7.31	3.11	24.82	0.92	19.25	0.19	51.38
3	1.32	-3.27	6.23	3.10	31.99	0.65	16.27	0.48	54.49
4	1.32	-3.27	6.23	2.58	23.01	0.65	16.25	-0.04	45.49
5	2.84	-2.77	21.44	2.25	14.75	1.00	22.98	0.48	59.17
6	3.51	-3.35	25.94	3.72	21.77	1.02	20.66	1.39	68.37

(3. 3. 3) PHA と汎用樹脂の比較

PHA 生産におけるケース 2 と 6 を、ヨーロッパプラスチック生産者協会 (APME) から公表されている石油ベースの汎用樹脂 5 種類のインベントリー分析と比較した (図 9)。汎用樹脂では 1 kg の製品あたり 77–87 MJ のエネルギーが投入されるが、PHA 生産では 50–68 MJ であり、PHA 生産の方が 1–3 割程度投入エネルギーが少ない。ここで注意すべきは、PHA 生産は国内で行った場合の予測結果であり、汎用樹脂の生産はヨーロッパで行った場合の値であるという点である。そのため、国や地域によってエネルギー事情が若干異なることを考慮する必要があるが、それを考慮したとしても、PHA 生産プロセスは省エネルギーなプロセスであると言える。

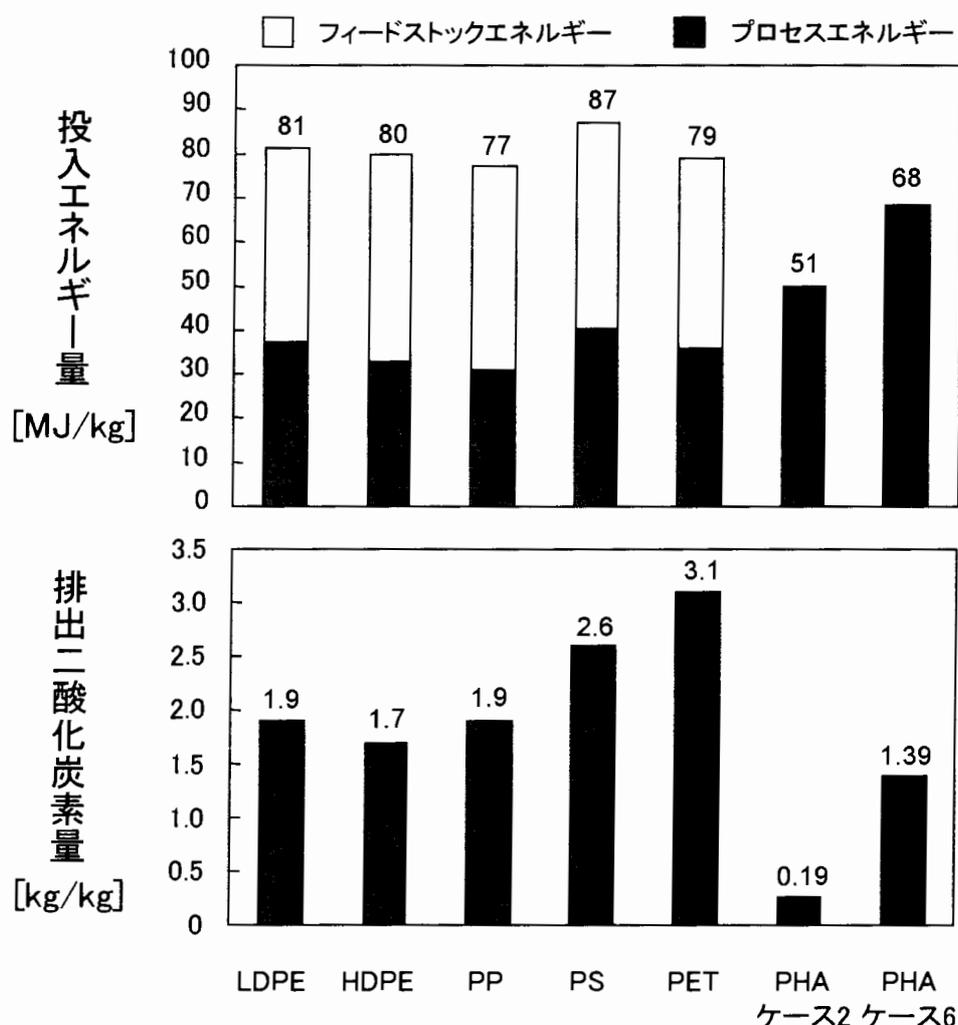


図 9 PHA と汎用樹脂生産の投入エネルギー量と排出二酸化炭素量の比較。
LDPE：低密度ポリエチレン、HDPE：高密度ポリエチレン、PP：ポリプロピレン、
PS：ポリスチレン、PET：ポリエチレンテレフタレート

投入エネルギーの内訳を見てみると、汎用樹脂では約半分が原料として用いられるフィードストックエネルギーであるが、PHA 生産では全てがプロセスエネルギーである。現時点では、汎用樹脂の生産プロセスの方がプロセスエネルギーの投入量は少ない。しかし、これらのプロセスは長い時間をかけて改良され、既に確立された生産方法である。例えばポリオレフィンの場合、現時点では第六世代の生産プロセスが使われている。先に述べた第一世代の PHA 生産プロセス (81 MJ) から第二世代への移行で 2-3 割のプロセスエネルギーが削減されている。第二世代のプロセスもまだまだ改良の余地があり、それに伴い投入されるプロセスエネルギーも低下していくと期待できる。次に、二酸化炭素排出量を比較した。汎用樹脂では 1 kg の製品あたり 1.7-3.1 kg の二酸化炭素が排出されるが、PHA 生産では-0.04-1.39 kg と著しく少ない。PHA 生産においてこのような低い値になるのは、大気中の二酸化炭素に由来する原料を用いているためである。

これらの比較結果から、PHA 生産プロセスは投入エネルギー量と排出二酸化炭素量が共に汎用樹脂の生産プロセスよりも少なく、環境低負荷型のプロセスと結論できる。

(4) 総括

PHA のような生分解性を兼ね備えたバイオ高分子素材は、将来、全プラスチック生産量の 10~20% を占めると予想されている。食品用包装用フィルムや紙おむつなどの回収が困難でリサイクル化が難しい製品に利用されていくだろう。一方で、現在の PHA が抱えている問題点は、コスト、化石燃料の使用、物性の 3 点と言われている。

本研究では、大豆油からの P(3HB-co-3HHx) 合成およびグルコースからの超高分子量 P(3HB) 合成について検討を行い、10 l 容発酵槽を用いて効率的な生産手法を開発することに成功した。そして、これらの生産データにもとづいて、年 5,000 トンの PHA を生産するプロセスについてインベントリー分析を行い、バイオプラスチックの生産プロセスは、石油ベースの汎用樹脂と比較して優れていることが実証できた。特に、排出二酸化炭素量は著しく低く、バイオマスを原料として用いることの優位性が示された。原料に関しては、大豆油はグルコースより対原料収率が高く、生産段階に投入されるエネルギーが少ないことから、PHA 生産の原料として適していることがわかった。

生産プロセスの改良と高分子物性の改善、加工技術の開発により、現在、PHA が抱える問題点は次第に解決されていくだろう。21 世紀の重要な課題である持続可能な循

環型社会の実現に向けて、PHAの生産が新しい高分子産業として大きく発展することを期待したい。

4.3 高分子加水分解酵素の構造と機能に関する研究

4.3.1 水不溶性バイオポリマー分解酵素

ポリヒドロキシブタン酸(PHB)分解酵素の構造と機能

水不溶性高分子材料の微生物分解は、一般的に図1に示すプロセスで進行する。まず、微生物は体外に高分子加水分解酵素を分泌し、その酵素が材料表面に吸着し、表面の高分子鎖を加水分解することによって低分子量化合物（有機酸、糖およびアミノ酸など）を生成する。ついで、分解生成物は微生物体内に取り込まれた後、さまざまな代謝経路を経て、各種生体物質（バイオマス）の合成に用いられれたり、あるいはエネルギー生産のために用いられ好氣的条件下で二酸化炭素に変換されたりする。

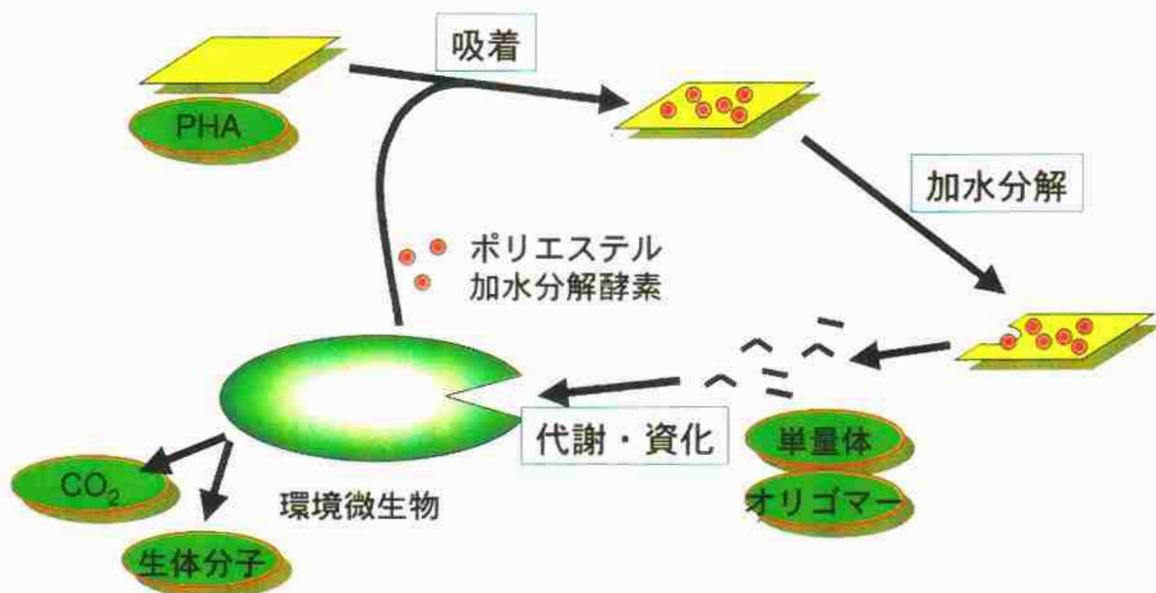
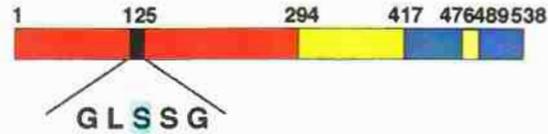


図1 水不溶性高分子材料の微生物分解

本研究グループでは、水不溶性高分子材料を加水分解する微生物酵素の作用機構を分子レベルで解明することを目的として、高分子分解酵素の構造と機能に関する研究を推進してきた。現在までに、30株以上のPHB分解微生物から19種類以上のPHB分解酵素遺伝子がクローニングされ、分解酵素の一次構造が明らかにされている。当研究室では、4種類のPHB分解微生物（*Pseudomonas stutzeri*、*Comamonas testosteroni*、*Marinobacter* sp.）から分解酵素遺伝子を取得し解析を行った。その結果、いずれのPHB分解酵素も触媒活性部位（270～400 アミノ酸残基）、基質吸着部位（35～55 アミノ酸残基）および両機能部位を連結するリンカー領域（50～100 アミノ酸残基）の3つの明確な領域から構成されていることが明らかとなった（図2）。そして、PHB分解酵素による脂肪族ポリエステル分解反応は、酵素の基質表面への吸着と、それに続く触媒ドメインによるエステル結合の加水分解の2段階で進行すると考えられている。

Type A

Pseudomonas stutzeri
(Ohura, Kasuya & Doi, 1998)



Type B

Comamonas acidovorans
(Kasuya et al., 1997)



Comamonas teststeroni
(Kasuya et al., 1997)



■ Catalytic domain
 ■ Linker region
 ■ Binding domain
 ■ Lipase box
 (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly)

Properties of PHA Depolymerase

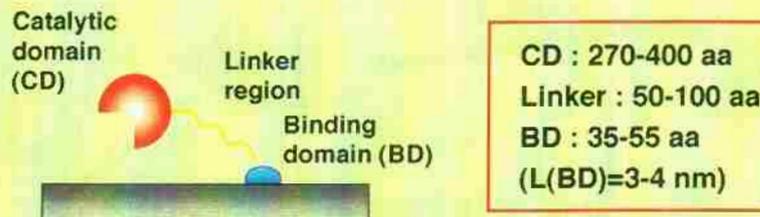


図2 PHB分解酵素の一次構造

しかしながら、これらの素過程は固液界面の反応であるため分析手段に制限があり、従来から反応追跡に用いられてきた重量減少法や UV 法では、検出感度が低い・リアルタイムでの追跡が困難であるなどの問題があり、また吸着過程の解析が困難で、基質吸着に関する知見はほとんど得られていなかった。本研究グループでは、酵素分解反応の追跡手段として水晶発振子マイクロバランス法(QCM)を用いた解析システムを開発し、また原子間力顕微鏡(AFM)によって吸着酵素分子を直接観察した。

PHB 分解酵素による脂肪族ポリエステルの酵素分解反応解析では、基質重量が酵素吸着によって増加し、それに続く加水分解では減少することに着目し、ナノグラムオーダーでの重量変化をリアルタイムで追跡できる QCM を用いて、PHB 分解酵素の吸着機構・加水分解機構を解析した (図3)。

PHB 分解酵素の吸着過程を追跡するため、*Ralstonia pickettii* T1 由来 PHB 分

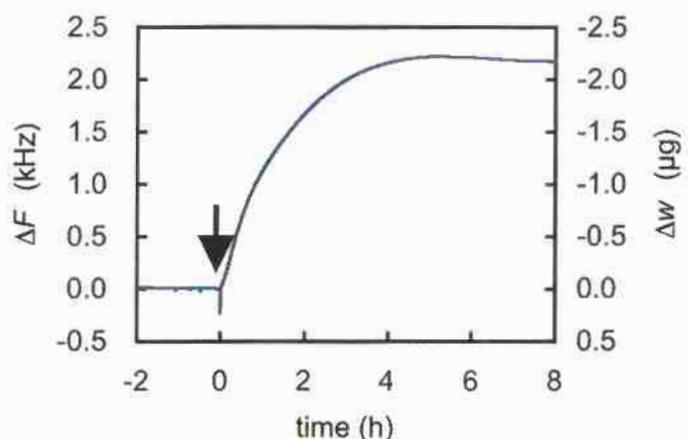


図3 酵素分解反応に伴う基質の質量変化

解酵素の活性中心のセリンをアラニンに置換して加水分解活性をなくした変異体酵素を用いた。

これをポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート] (P(3HB))フィルムと反応させたところ、酵素注入直後に QCM の振動数が減少し、その後一定になった(図 4)。この振動数の減少は、酵素吸着によるフィルムの重量増加を反映しており、この振動数シフト量から酵素吸着を定量的に検出することができた。図 4 に示したように PHB 分解酵素の吸着は極めて速く、数分で平衡に達しており、このことは 5 分以内に吸着が平衡に達するというこれまでの報告と一致している。この時、共振抵抗には変化が認められず、酵素は硬い吸着層を形成していることが示唆された。

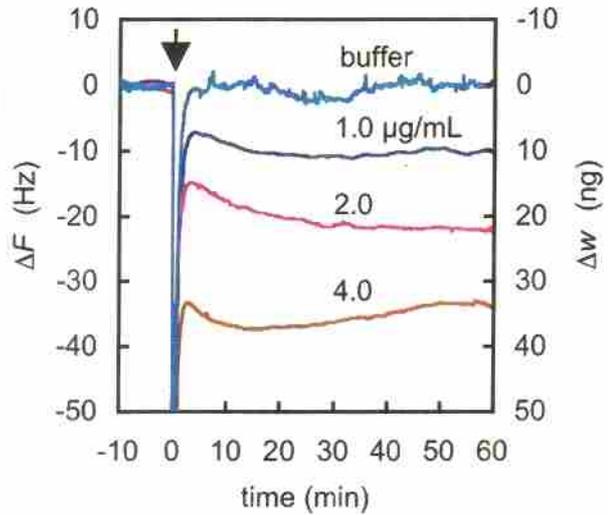


図 4 *R. pickettii* T1由来PHB分解酵素変異体のP(3HB)フィルムへの吸着で観測された振動数(ΔF)とフィルム重量(Δw)の経時変化

振動数変化量から算出した平衡吸着量の酵素濃度依存性を図 5 に示した。平衡吸着量は酵素濃度に比例して増加し、2.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 以上で飽和して一定となった。飽和吸着量は $182 \pm 44 \text{ ng} / \text{cm}^2$ で、酵素はフィルム表面に密に詰まった単分子層で吸着し、その上には酵素は吸着しないと考えられる。これまで PHB 分解酵素の基質吸着は Langmuir 型として取り扱われてきたが、図 5 の吸着等温線には Langmuir の式を適用することはできなかった。さらに、吸着平衡に達した後、酵素溶液を緩衝溶液で入れ換えても、吸着酵素の脱離は観測されず、酵素の吸着は不可逆的であった。以上の事実から、PHB 分解酵素の基質表面への吸着過程は非 Langmuir 型であると結論できる。

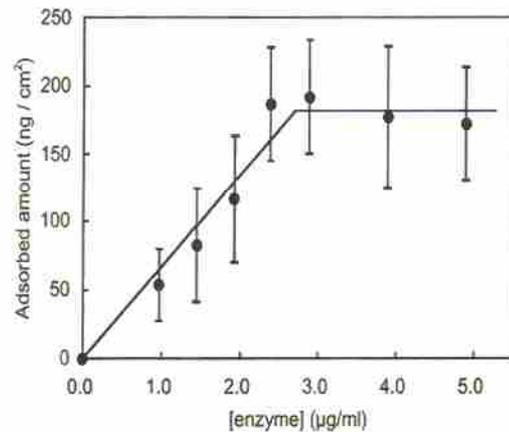


図 5 PHB分解酵素変異体のP(3HB)フィルムに対する平衡吸着量の酵素濃度依存性

さらに、PHB 分解酵素の結合ドメインの特徴を明らかにするため、酵素分解されない 4 種類のポリマーフィルム (ポリ(2-ヒドロキシプロピオン酸)(P(2HP))、ポリ(3-ヒドロキ

シオクタン酸)(P(3HO))、ポリスチレン(PS)ならびにポリエチレン(PE)) について、PHB 分解酵素の吸着反応を調べた(図 6)。これらのフィルムへの酵素反応では、PHB 分解酵素のフィルムへの吸着のみが定量的に検出され、加水分解の進行は検出されなかった。このことは、分解酵素の結合ドメインと触媒ドメインが独立して機能していることを示唆している。興味深いことに、結合ドメインは脂肪族ポリエステルだけでなく PS にも親和性があり、疎水性相互作用が部分的ではあるが結合ドメインの結合能に寄与していると思われる。また、PE への酵素吸着が認められなかったことから、この疎水性相互作用は結合ドメインとポリマー側鎖間で働いていると推測される。しかし、酵素吸着速度と吸着量は脂肪族ポリエステルの方が PS よりも大きいことから、結合ドメインは、エステル結合に強い親和性を持っていると考えられる。また P(2HP)に比べて P(3HO)との親和性が小さいことから、このエステル結合認識は側鎖の立体障害により阻害されると思われる。

野生型 PHB 分解酵素を用いた P(3HB)フィルムの分解反応では、反応開始直後からフィ

ルム重量の減少にともなう振動数の増加が観測され、フィルムが完全に分解されるまで 6 時間以上にわたって連続的に分解反応を追跡できた。全ての酵素濃度において、分解速度は反応の進行とともに変化した。反応初期においては、フィルム重量が減少するにつれて分解速度が増加した。これは、分解にともなってフィルム表面が粗くなり、表面積が増加したためであると考えられる。しかし、重量減少率が 10~20%を超えると分解速度は減少していった。これは、酵素分解を受けやすい非晶部分が先に分解され、分解速度の遅い結晶部分の割合が増えていくためであると推測される。

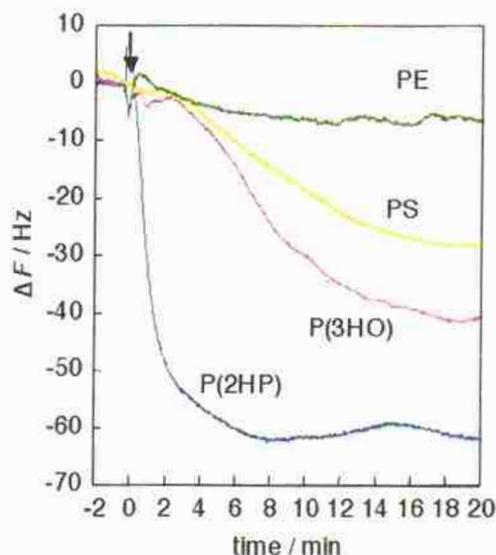


図 6 各種ポリマーフィルムに対するPHB分解酵素吸着における振動数の経時変化

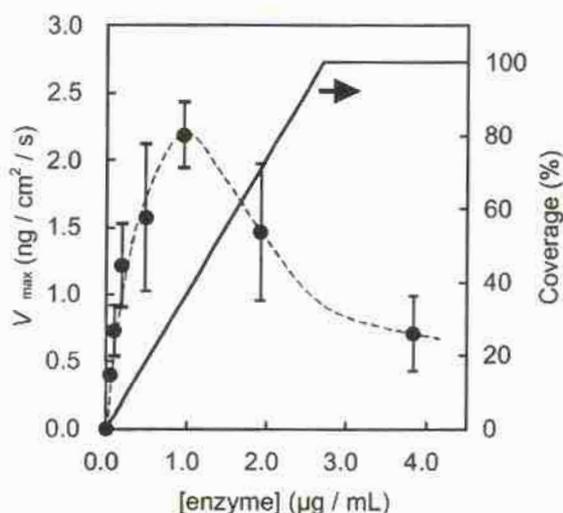


図 7 P(3HB)フィルムの酵素分解速度とフィルム表面の吸着酵素による被覆率の酵素濃度依存性

分解速度は酵素濃度にも依存し、これまでの報告と同様に 1.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ で最大となり、それ以上の濃度では減少した(図 7)。吸着酵素によるフィルム表面の被覆率を計算すると、1.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ではフィルム表面の約 1/3 が酵素によって覆われているものの、酵素の周囲は完全に空いていて触媒ドメインが基質表面に容易に接近できる。それ以上の濃度では、隣接する他の酵素が障害となって触媒ドメインの接近が困難になることが分かる。

次に、酵素分解反応の途中で、酵素溶液を緩衝液で入れ換えたところ、分解速度は減少せず、フィルムは完全に分解された(図 8 (a))。このことは、フィルムに一旦吸着した分解酵素は、溶液中の酵素がなくなっても脱離することなく、分解反応を継続するという意味している。すなわち、先に述べた吸着反応の場合と同様に、PHB 分解酵素の吸着が見かけ上不可逆であることを示している。

一方、変異酵素の溶液で入れ換えると、分解速度は著しく減少し、未分解のフィルムが残った(図 8 (b))。したがって、吸着した分解酵素は、変異酵素との入れ換わりによって容易に脱離したと考えられる。さらに、他のタンパク質の溶液で入れ換えた場合には、分解速度は減少することなく、フィルムは完全に分解された。以上の結果から、P(3HB)フィルムへの PHB 分解酵素の吸着は見かけ上不可逆であるが、同じ結合ドメインを持つ変異酵素とは容易に入れ替わって脱離することが分かった。

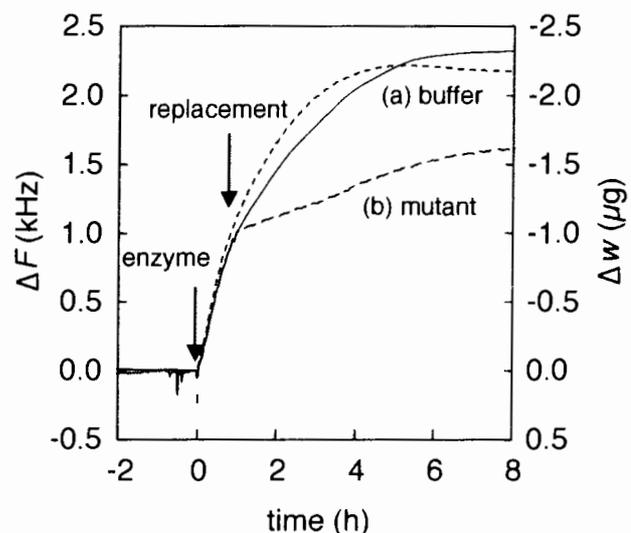


図 8 P(3HB)フィルムの酵素反応において、反応途中で酵素溶液を、(a)緩衝溶液あるいは(b)酵素変異体溶液で入れ替えた時の振動数(ΔF)とフィルム重量(Δw)の経時変化

以上のように、QCM 法により PHB 分解酵素の吸着反応と加水分解反応を同じ条件下で連続的に高感度に測定できるようになった。また酵素の吸着は、P(3HB)フィルムの分解速度を支配する重要な過程であるが、非 Langmuir 型の極めて複雑な挙動が吸着等温線と吸着の不可逆性として観測された。

PHB 分解酵素は基質である水不溶性のバイオポリエステル表面に強く吸着することが知られている。そこで、PHB 分解酵素の基質吸着に関する詳細な知見を得るために、ナノメートルオーダーの空間分解能を有する原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、PHB 分解酵素のポリ乳酸フィルム上への吸着を観察した(図 9)。分解酵素としてモデル酵素である *Ralstonia pickettii* T1 由来の分解酵素、および当研究室で取得した *Pseudomonas*

stutzeri YM1006 由来のものを用いた。

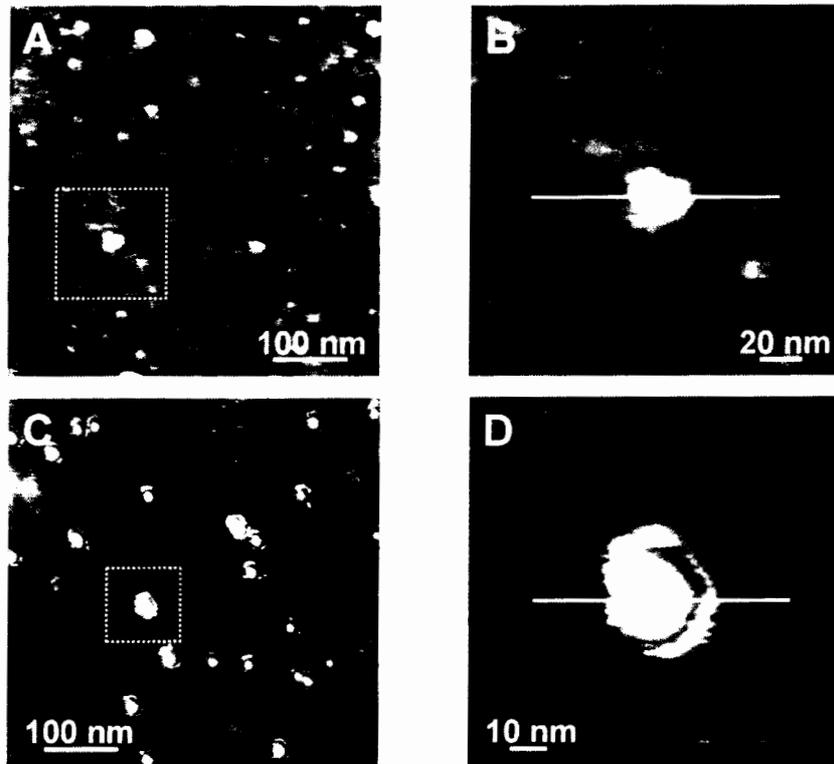
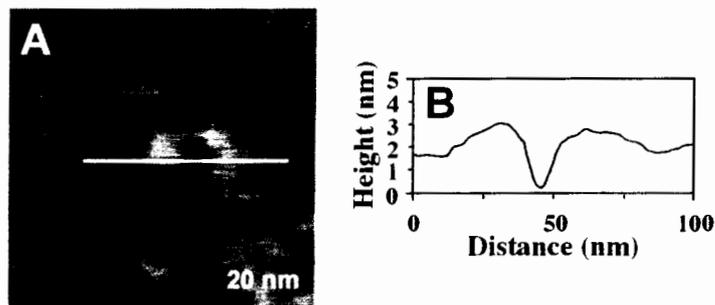


図9 PLA膜上に吸着したPHB分解酵素のAFMイメージ Kikkawa *et al.*, 2003

A; *R. pickettii* T1由来PHB分解酵素、B; フレームAの拡大図

C; *P. stutzeri*由来PHB分解酵素、D; フレームCの拡大図

その結果、膜上の *R. pickettii* 由来 PHB 分解酵素の大きさは、高さ 2.8 ± 0.5 nm、幅 23 ± 3 nm であることが分かった。また、酵素分子の周囲に高さ 0.9 ± 0.3 nm の隆起が観測された。一方、膜上の *P. stutzeri* 由来 PHB 分解酵素は、高さ 3.0 ± 0.4 nm、幅 23 ± 3 nm の粒子であり、周囲には 1.1 ± 0.3 nm の隆起が見られた。次に、これら吸着した分解酵素と膜との相互作用を調べるため、膜表面を 40%エタノールで洗浄して吸着酵素を除去して AFM 観察を行った(図 10)。その結果、いずれの酵素を除去した場合にも直径 25-30 nm、深さ 1.6-4.0 nm のくぼみが見られた。従って、これらの分解酵素は楕円形の形状を有しており、ポリ乳酸との吸着には基質吸着部位を介して膜表面をえぐるように膜と相互作用していることが明らかとなった。



Kikkawa *et al.*, 2003

図 10 PHB分解酵素吸着後、エタノール洗浄したPLA膜のAFMイメージ

A; *R. pickettii* T1由来PHB分解酵素、B; フレームAの高さプロファイル

4.3.2 水溶性バイオポリマー分解酵素

ポリアスパラギン酸分解酵素の構造と機能

現在、水溶性合成高分子は洗剤のピルダラーや塗料、廃水処理などの様々な分野で利用されている。水溶性合成高分子の多くは、高性能と長期安定性を求めて開発されてきたため、生分解性に劣ることが指摘されている。さらに、これらの水溶性合成高分子は水不溶性合成高分子と異なり、使用後の回収やリサイクルが非常に困難であるため、自然環境中に蓄積することが懸念されている。そこで環境保全の観点から、水溶性合成高分子の代替物質として生分解性を有する水溶性高分子の開発が望まれている。生分解性を有する水溶性高

分子化合物として実用化が期待されているポリアスパラギン酸(tPAA)は、L-アスパラギン酸の熱重合を経て合成されるため複雑な構造を有しており、分解挙動に関する詳細な知見が得られていない。当研究室では、tPAA 分解微生物を自然環境中から単離することに世界で初めて成功し、*Sphingomonas* sp. KT-1 (JCM 10459)と *Pedobacter* sp. KP-2 (JCM 10638)の性質が異なる2種類の tPAA 分解微生物を河川水から単離している。

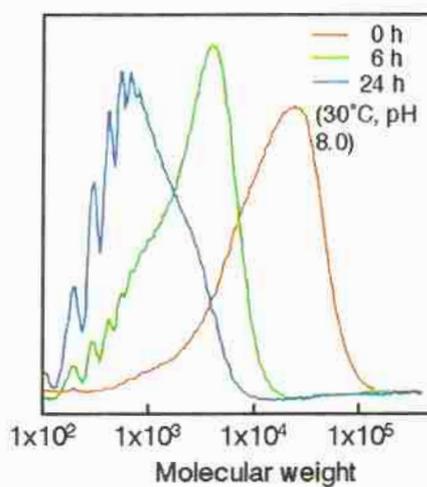


図 11 *Sphingomonas* sp. KT-1由来PAA hydrolase-1によるtPAA分子量変化

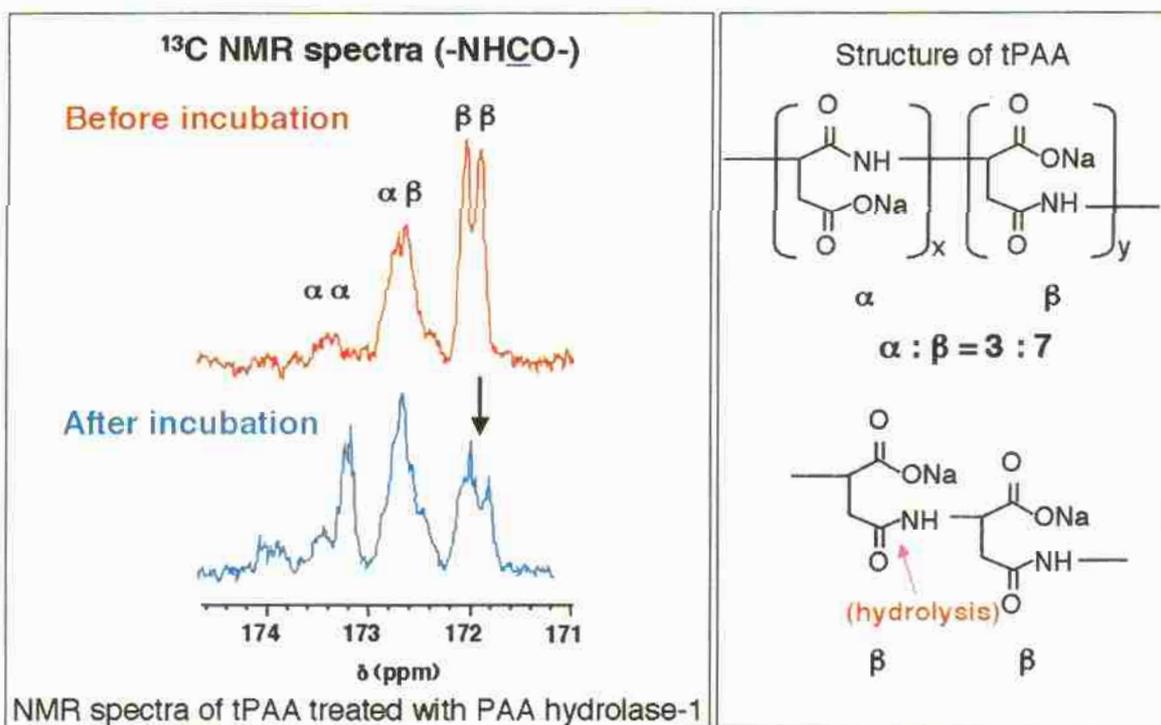


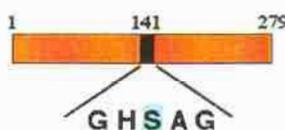
図 12 KT-1由来PAA hydrolase-1によるtPAAの分解機構

Sphingomonas sp. KT-1 の菌体破砕液は tPAA を単量体にまで分解することから、本菌体の可溶性画分から PAA 分解酵素の精製を行い、その性質を調べた。その結果、2 種類の PAA 分解酵素の分離精製に成功した。PAA 分解酵素(PAA hydrolase-1)は分子量が 30 kDa であり、PAA をオリゴマー(OAA)にまで分解することを明らかにした (図 11)。また、本酵素は阻害剤を用いた研究から、セリンプロテアーゼであることが示唆された。¹H および ¹³C-NMR を用いた PAA 分解生成物の解析から、本分解酵素(PAA hydrolase-1)は tPAA 分子中の連なるβ-アスパラギン酸ユニット間のペプチド結合を切断していることを明らかにした (図 12)。

PAA hydrolase-1 の一次構造を明らかにするため、構造遺伝子のクローニングを行った。クローニングには、効率的に目的遺伝子のみを増幅できる LA PCR in vitro クローニング法を用いた。その結果、本酵素遺伝子は 969bp からなり、Edman 分解によって決定された本酵素の N 末端と比較したところ、本酵素は 35 アミノ酸残基からなるシグナルペプチドを有していることが示唆された。また、本酵素は 279 アミノ酸残基からなるタンパク質で推定される分子量は 30,812 であり、SDS-PAGE における分子量約 30kDa と良く一致していた。さらに本推定アミノ酸残基中には Gly-His-Ser-Ala-Gly からなるリパーゼボックスが保存されていることが分かった(図 13)。そこで、リパーゼボックスに含まれる Ser を Ala に部位特異的に変異させた変異酵素(S176A)を作製し、活性中心の決定を行った。その結果、S176A は大腸菌の可溶性画分に発現するものの、tPAA 分解能を有していないことが分かった。このことから、本酵素の活性中心はリパーゼボックスに含ま

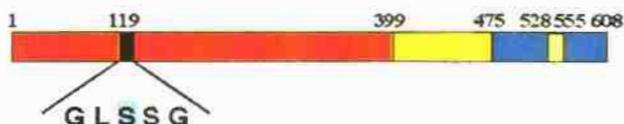
PAA hydrolase-1

Sphingomonas sp. KT-1



PHB depolymerases

Alcaligenes faecalis AE122
(26.5 %, 257 a.a.)



Paucimonas lemoignei PhaZ2
(25.8 %, 244 a.a.)

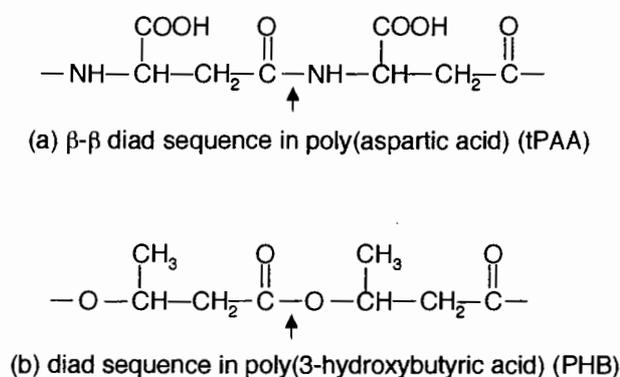


■ Catalytic domain
 ■ Linker region
 ■ Binding domain
 ■ Lipase box
 (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly)

Hiraishi *et al.*, 2003

図 13 KT-1由来PAA hydrolase-1およびPHB分解酵素のドメイン構造

れる 176 番目の Ser であることが明らかとなった。さらに、PAA hydrolase-1 の推定アミノ酸配列の相同性検索を行った結果、相同性を示すものとしてポリヒドロキシブタン酸 (PHB) 分解酵素がみられた。PHB 分解酵素は、PHB 中に含まれる β 位のエステル結合を加水分解する酵素である。tPAA 中の β - β アミド結合の連鎖構造と PHB の連鎖構造が類似していることを考慮する(図 14)と、PAA hydrolase-1 と PHB 分解酵素は同一の祖先型タンパク質から分散進化したと推測される。



Hiraishi et al., 2003

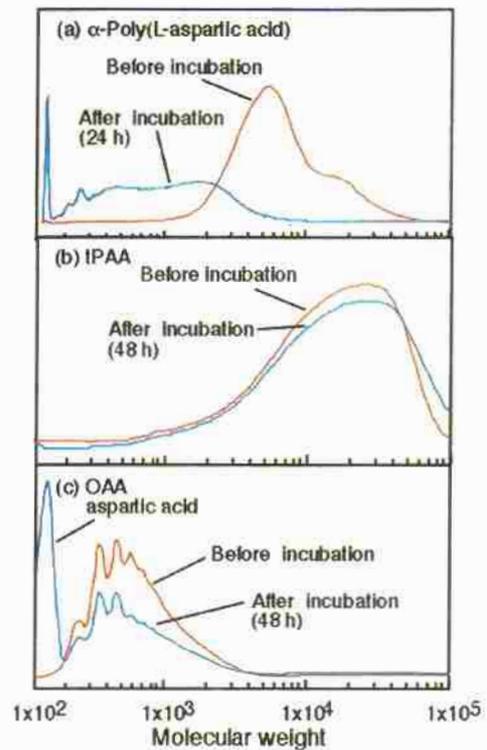
図 14 β - β アスパラギン酸配列と PHB の分子鎖構造

PAA hydrolase-1 は、tPAA 中に含まれる β - β アミド結合を選択的に認識し、OAA にまで分解した。一方、*Sphingomonas* sp. KT-1 株の細胞破碎液は、tPAA をモノマーであるアスパラギン酸にまで分解した。これらのことから、本菌体中には OAA をアスパラギン酸にまで分解する酵素が存在していることが示唆された。そこで、本菌体の可溶性画分から第 2 の酵素(PAA hydrolase-2)の精製を行い、その性質を調べた。

PAA hydrolase-2 の一次構造に関する知見を得るために、酵素遺伝子のクローニングを行った。その結果、PAA hydrolase-2 は 425 アミノ酸残基からなるタンパク質で、21 アミノ酸残基からなるシグナルペプチドを有していることが示唆された。また、PAA hydrolase-2 の推定される分子量は 42,584 であった。PAA hydrolase-2 の推定アミノ酸配列の相同性検索を行った結果、*Caulobacter crescentus* CB15 および *Pseudomonas* sp. RS-16 由来の金属ペプチダーゼと高い相同性を有することが分かった。

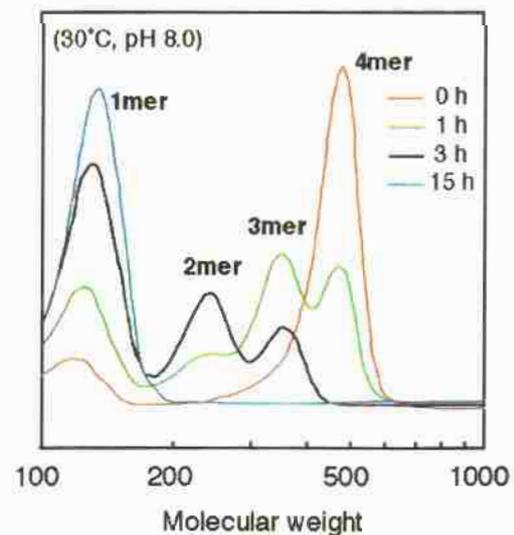
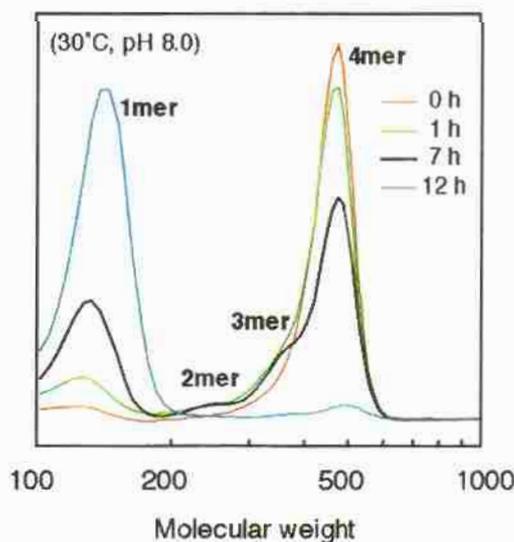
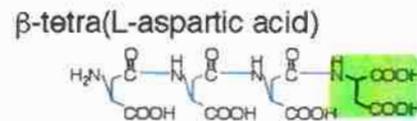
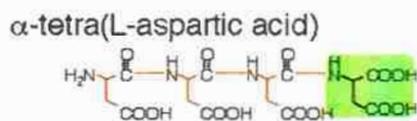
次に、tPAA 分解における PAA hydrolase-2 の役割を明らかにするため、PAA hydrolase-2 による α -poly(L-aspartic acid)、tPAA および OAA を基質とした分解反応を行った(図 15)。その結果、PAA hydrolase-2 は α -poly(L-aspartic acid)を容易に分解するものの、tPAA をほとんど分解しなかった。これは、tPAA 中に含まれるイレギュラー末端が PAA hydrolase-2 による分解を阻害しているためと考えられる。また、PAA

hydrolase-1 による tPAA 分解産物である OAA を基質として用いたところ、PAA hydrolase-2 は OAA を分解しアスパラギン酸を生成することがわかった。これらのことから、OAA 分解では tPAA 分解により新たに生じた末端を PAA hydrolase-2 が認識し、加水分解していることが示唆された。次に、PAA hydrolase-2 の基質認識機構を解明するため、 α -および β -oligo(L-aspartic acid)の分解反応を行った。いずれのオリゴアスパラギン酸を用いた場合においても、PAA hydrolase-2 はこれらの基質を末端から分解した(図 16)。 α -および β -oligo(L-aspartic acid)の構造を比較したところ、C 末端のみが同じ構造を有していることから、PAA hydrolase-2 は α および β -oligo(L-aspartic acid)の C 末端を認識して加水分解を行っていることが示唆された。以上の結果から、*Sphingomonas* sp. KT-1 における tPAA 分解機構を提案した(図 17)。まず、tPAA は菌体内に取り込まれた後、PAA hydrolase-1 により分子鎖中の β -アスパラギン酸ユニット間が加水分解され、4 量体ほ



Hiraishi et al., 2003

図 15 *Sphingomonas* sp. KT-1由来PAA hydrolase-2による分子量変化



Hiraishi et al., 2003

図 16 *Sphingomonas* sp. KT-1由来PAA hydrolase-2によるオリゴアスパラギン酸分解

どのオリゴマーとなる。次いで、PAA hydrolase-2 によりオリゴマーが C 末端からモノマーにまで分解されると結論づけた。

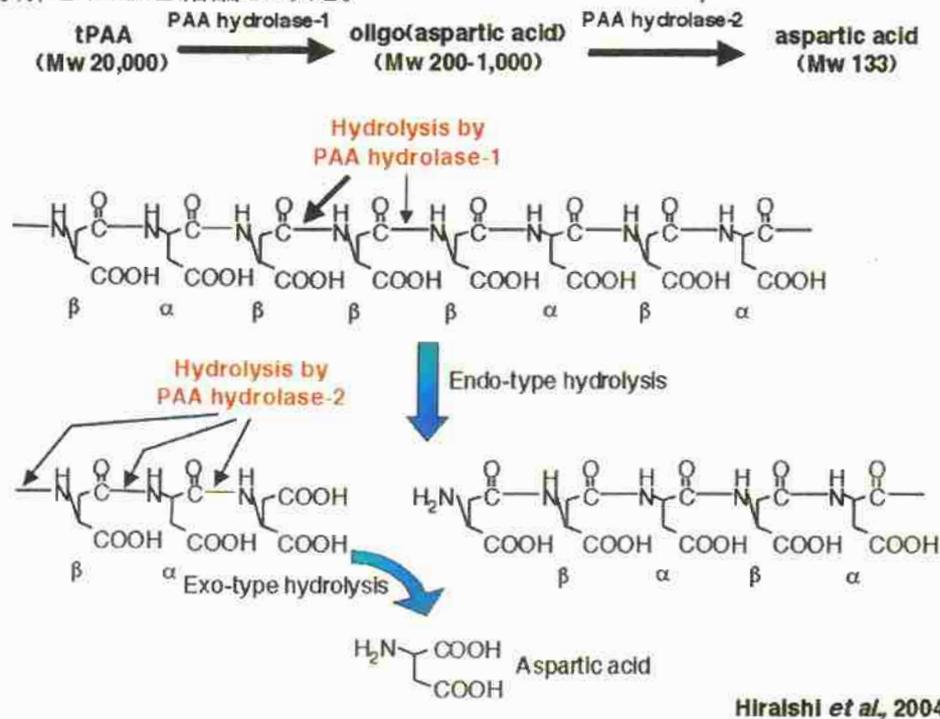


図 17 *Sphingomonas* sp. KT-1におけるtPAA生分解機構

さらに、*Sphingomonas* sp. KT-1 と異なる分解様式を示す *Pedobacter* sp. KP-2 から PAA 分解酵素を精製し、その性質を調べた。その結果、本分解酵素は分子量 30kDa のタンパク質であった。また、tPAA 分解挙動を NMR により調べたところ、*Sphingomonas* sp. KT-1 由来 PAA hydrolase-1 と同様に β -アスパラギン酸ユニット間を特異的に分解する酵素(PAA hydrolase-1)であった。次に、本酵素の一次構造に関する知見を得るため、

酵素遺伝子のクローニングを行ったところ、本酵素遺伝子は 918bp のポリヌクレオチドであり、306 アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしていた。また、本 PAA 分解酵素は 41 アミノ酸残基からなるシグナルペプチドを有しており、成熟タンパク質の分子量は 30,274 と推定された。そこで、*Pedobacter* sp. KP-2 由来 PAA hydrolase-1

```

1 -----MITTKHLTTIAAFCIVMANSVCEAHKAHKQPHRQTINPKIDEGVGEELY
1 MRPQKATARALGLAVLVLAMTGGALGSPVTAGAAAPAAASKGKAAALPDLKPGAGSEIF
51 QQYKPLDNKPIKVGYYNPK--NDAQVLFIMFNGRNAEGYFKAMLKHADQHNVLVWPE
61 TGW---AGKPLKVHYAPDKITETRILFVIHACRNADGYRDWIPYAKEGQYIVLTPE
109 FDEQFSSR-EYHQGCLLDKQSKLRPREDWTFSTIEPLFDYVKKLTGNTSAGYLYGFSA
118 YSMADFPSTLTYNVGIVDEAGNRPREINISFASTIEPMFDQVRKALGSKVPTYAIYGHSA
168 GSQFVHRFLMFPENRVTIRAIAGSAGTYTMPDYNLDYSGLKNVNLPKNLNKKFAKNLM
178 GSQFVHRFVELWPDARYSRAVAANAGWYTMPDLATKYPYGLKDAPTDAAGLKATLEKPLT
228 VIVGDADTIVLSRTDLVKITPAANQGRDRVERGQTFNRFKAIAECLKTPFNKFKQLIPHV
238 ILLGTDTDVNHHLQSRITPEAMTQGVHRLARGEFFAYGRKVAHELNNAKFNKLDYAPDI
288 GHSQGEVAGPVAKLLFEDK
298 AHSNTGHSQYAKLWEE--
  
```

図 18 *Pedobacter* sp. KP-2 および *Sphingomonas* sp. KT-1 由来 PAA hydrolase-1 のアミノ酸配列

の推定アミノ酸配列の相同性検索を行った結果、*Sphingomonas* sp. KT-1 由来 PAA hydrolase-1 と非常に高い相同性を有することが分かった(図 18)。本酵素のホモロジーモデリングを行ったところ、予測される活性残基が一カ所に存在していた(図 19)。このように、自然環境中における PAA 生分解反応では、PAA hydrolase-1 のように連なる β アスパラギン酸を特異的に認識する酵素が普遍的に関与していることが推測される。

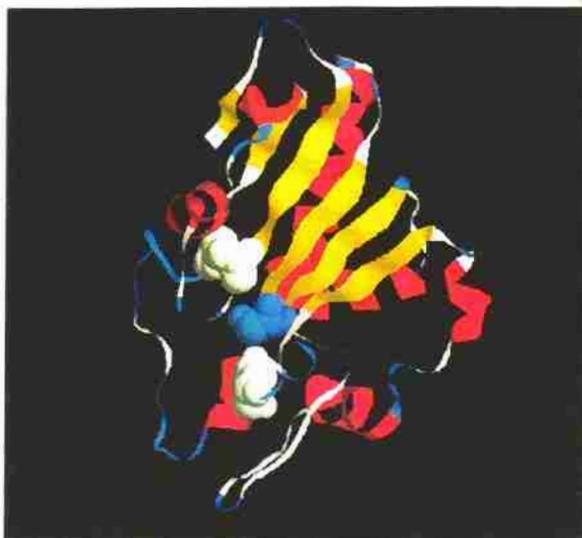


図 19 *Pedobacter* sp. KP-2由来PAA hydrolase-1 のホモロジーモデリング

4. 4 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

ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブチレート] (P(3HB))は、水素細菌、窒素固定菌、光合成細菌など 100 種類以上の原核生物によって、糖や植物油から合成される熱可塑性の脂肪族ポリエステルである。このポリエステルは、3-ヒドロキシブタン酸といわれる光学活性モノマーが直鎖状につながった立体規則性ポリマーであり、土壌、海、河川などの環境中に存在する微生物により水や二酸化炭素にまで完全分解される環境調和型の生分解性プラスチックである。

しかしながら、P(3HB)をガラス転移点($T_g=4^{\circ}\text{C}$)以上の室温で保存した場合、ラメラ結晶間に存在する非晶部の分子鎖が、分子運動によって結晶部に取り込まれるという二次結晶化が生じる。この二次結晶化により非晶部の分子鎖には張力が働き、クラックが発生し、経時的に劣化する。例えば、室温で3週間放置したP(3HB)フィルムの破壊強度、破壊伸びおよびヤング率は、それぞれ14MPa、11%、0.48GPaであり、汎用高分子に比べ極端に劣る。そのため、これまでは同じ生分解性を有する他の脂肪族ポリエステルとの共重合体化などにより物性および加工性の向上が図られてきたが、現在のところ研究段階にとどまっている。

本研究では、P(3HB)およびその共重合体の高強度フィルムおよび繊維の作製技術を開発すると共に、大型放射光を用いた新たな構造解析に着手した。

4.4.1. 高強度フィルムの作製、物性および構造

4.4.1.1. 遺伝子組換え大腸菌による P(3HB)の超高分子量化

一般に、野生のポリエステル合成菌が生産するP(3HB)の重量平均分子量は約60万程度に制限され、その成形品は硬くて脆いという物性上の問題点から現在のところ実用化には至っていない。

物性を向上させる方法の一つとして、高分子量化がある。そこで、P(3HB)の物性を改善するために、自然界に存在しない超高分子量のP(3HB)を、P(3HB)合成菌である *Ralstonia eutropha* H16 由来の PHB 生合成遺伝子(*phbCAB*)を導入した組換え大腸菌 *Escherichia coli* XL1-Blue (pSYL105) から合成することを目的とした。炭素源としてグルコースを用い、Luria-Bertani 培地中、2 段階分培養において、通気酸素量、攪拌速

度、炭素源濃度、培養温度、培地の pH など様々な培養条件を検討した。その結果、遺伝子組換え大腸菌を用いた P(3HB)の発酵合成において、培地の pH が分子量に大きな影響を与えることがわかった。本研究で得られた P(3HB)の絶対分子量は最大で 14×10^6 (pH6.0)と、従来にない極めて分子量の高いポリマーを生合成させることに成功した。また、培養時の pH をコントロールすることにより、様々な分子量を有する生分解性ポリエステルを合成することができた。

4.4.1.2. 熱延伸による高強度化と構造

一般にフィルムの物性は、高温でゆっくり延伸した後、等温結晶化することにより向上する。延伸により配向結晶化したフィルム中では分子鎖が一定方向に配列し、運動性が低下することから二次結晶化が生じず、物性の経時劣化を抑制でき、力学強度の改善も合わせて期待できる。

これまで野生株が合成した P(3HB)では、分子量の低さと高結晶性のため延伸処理は困難であった。しかし、超高分子量 P(3HB)から作製したフィルムにおいては、フィルムに重りを付け、融点より約 15°C 低い 160°C 付近のオイルバス中に 1 秒間浸して引き上げる、加重延伸法により容易に再現性良く延伸することができた。延伸倍率の物性に及ぼす効果を検討したところ、延伸倍率の増加に伴い破壊強度は増加した。延伸

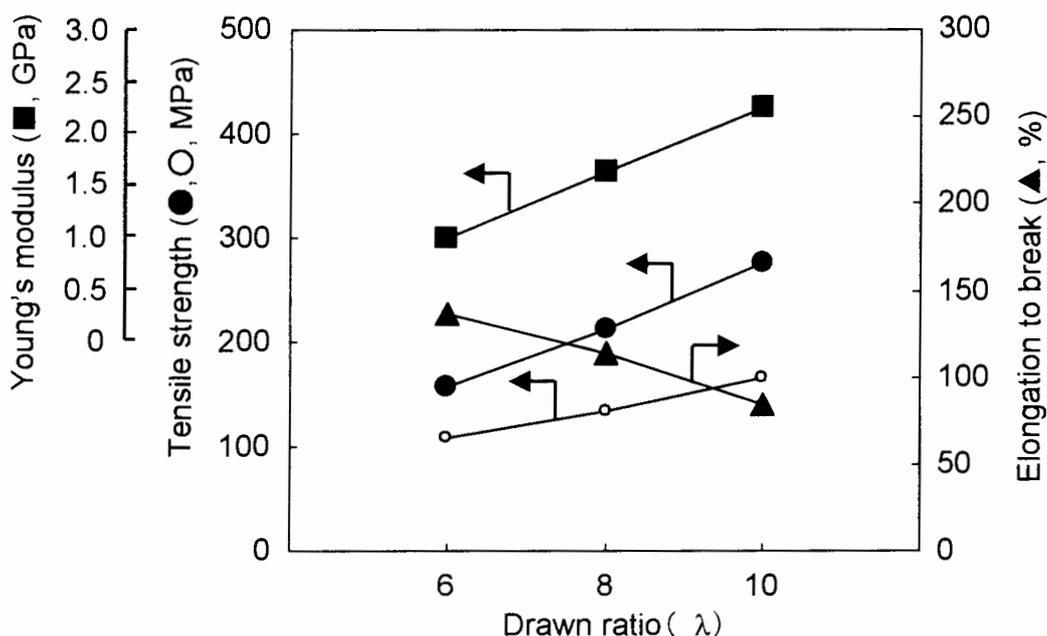


図1 P(3HB)フィルムの熱延伸・熱処理条件 (黒： 100°C 、白： 160°C)と物性

倍率を10倍にし、100°Cで2時間熱処理施したところ、破壊強度が36MPaから277MPaへと急激に増加した(図1)。ポリエチレンやナイロン-6、6などの結晶性高分子は、高配向するとフィブリル状に配列した分子鎖のシシの部分と、そこから垂直方向に派生成長したラメラ結晶のカバブの部分により構成されるシシカバブ構造を採ることが知られている。P(3HB)の熱延伸フィルムも同様のシシカバブ構造を内部に有していると考えられる。

一般に高温で熱処理を行い、結晶化を促進させた方が、破壊強度は向上すると考えられている。しかし、P(3HB)においては、160°Cより100°Cで熱処理した方が破壊強度の向上に対しては効果的であった(図1)。その原因を解明するために、小角X線回折と球晶成長速度を測定した。小角X線回折によりフィルム中のラメラ結晶の長周期を測定したところ、100°Cでは12nmであった長周期が、160°Cでは18nmに増大していることがわかった(図2)。P(3HB)は、結晶化温度の上昇に伴い長周期およびラメラ厚が増大することが知られている。よって、延伸熱処理フィルムにおいても、ラメラ厚が熱処理温度に伴い増大していると考えられる。超高分子量P(3HB)を用い、熱延伸・熱処理を施すことにより破壊強度277MPa、破壊伸び84%、ヤング率2.2GPaを有する高強度・高弾性率フィルムの作製に成功した(表1)。

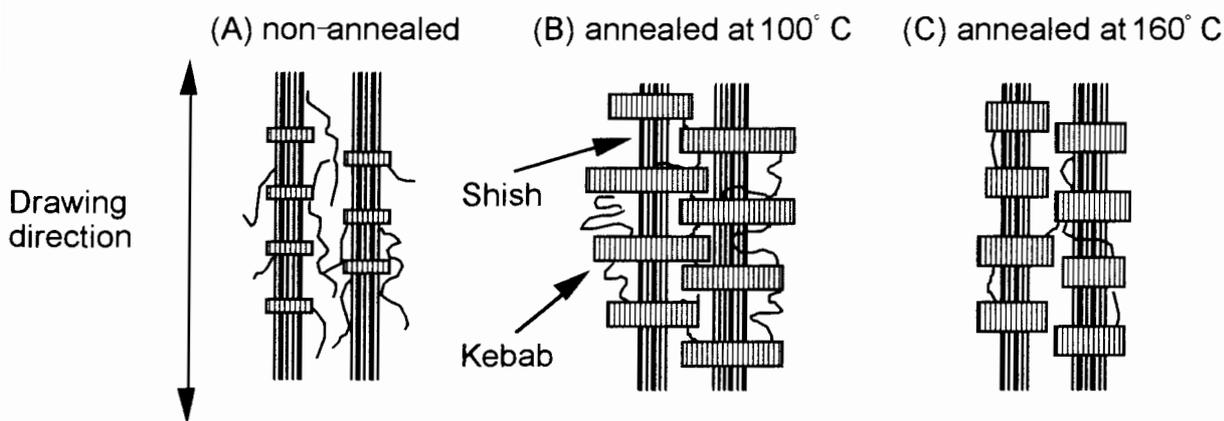


図2 熱延伸フィルムの熱処理温度の違いによる推定されるシシカバブ構造

興味深いことに、熱延伸のみのフィルムでは、100%近くも破壊伸びが残っていることがわかった。そこで、フィルム内の結晶相の再配向、および非晶相の分子鎖の配向を促すために二段階延伸法を試みた。その結果、10倍熱延伸フィルムを、室温で更に1.5倍に延伸した後、熱処理を施した二段階延伸・熱処理フィルムでは、破壊強度388MPa、破壊伸び25%、ヤング率2.94GPaと劇的に物性が向上した(表1)。

熱延伸・熱処理フィルムと二段階延伸・熱処理フィルムのX線繊維図を比較することにより、二段階延伸によって、2回らせん構造（ α 構造）を有するラメラ結晶間の非晶部に存在するフリーな分子鎖が引き延ばされることにより、平面ジグザグ構造（ β 構造）が形成されたことがわかった。この平面ジグザグ構造の形成が劇的な破壊強度の増加をもたらしたと考えられる（図3）。

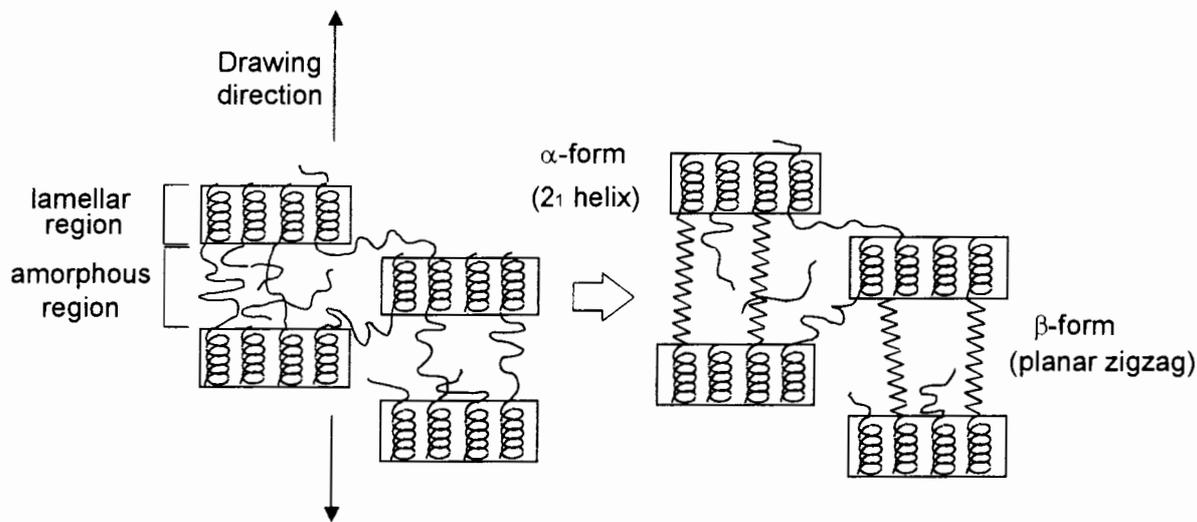


図3 二段階延伸による平面ジグザグ構造の発現機構

表1 P(3HB)熱延伸、冷延伸、二段階延伸フィルムの物性

Sample	Drawing method	Draw ratio (λ)	Tensile strength (MPa)	Elongation to break (%)	Young's modulus (GPa)
Conventional P(3HB) ($M_w=60 \times 10^4$)	-	-	14	9	0.9
	cold-drawing	10	195	100	2.0
Ultra-high-molecular-weight P(3HB) ($M_w=330 \times 10^4$)	-	-	36	14	1.3
	cold-drawing	10	237	112	1.5
	two-step cold-drawing*	15 (10 \times 1.5)	287	53	1.8
	hot-drawing	10	277	84	2.3
	two-step hot-drawing**	15 (10 \times 1.5)	388	25	2.9

* Ten times drawing was applied in ice water, and then further 1.5 times drawing was performed at room temperature.

** Ten times drawing was applied in a silicone oil bath at 165°C, and then further 1.5 times drawing was performed at room temperature.

二段階延伸・熱処理フィルムの物性は、同じ生分解性ポリエステルであり現在最も実用化の進んでいるポリ乳酸や汎用高分子である芳香族ポリエステルのポリエチレンテレフタレート(PET)の物性と同程度かそれ以上であり、超高分子量化、熱延伸、二段階延伸、熱処理が P(3HB)の高強度化に非常に有用な手段であることを示唆している。

4.4.1.3. 冷延伸による高強度化と構造

熱延伸は分子鎖の配向性を向上させ、強度を増大させるには非常に有用な手段である。しかし、熱延伸の行える P(3HB)の分子量には制限があり、大量生産が確立されている野生株の合成する P(3HB)には残念ながら適応できない。

そこで我々は、分子量に依存しない延伸方法として、冷延伸法を開発した(図 4A)。P(3HB)を完全融解した後、直ちに T_g (4°C) 以下に強制冷却して非晶質のフィルムを作製する。この非晶質フィルムを T_g 付近で冷延伸することにより、分子量に依存することなく高配向性フィルムを作製することに成功した。冷延伸においては、7 倍以上の延伸倍率が破壊強度の向上には必要であった。これは、低延伸倍率での冷延伸では、主に分子鎖の滑りが生じており、分子鎖の配向がうまくいっていないこと

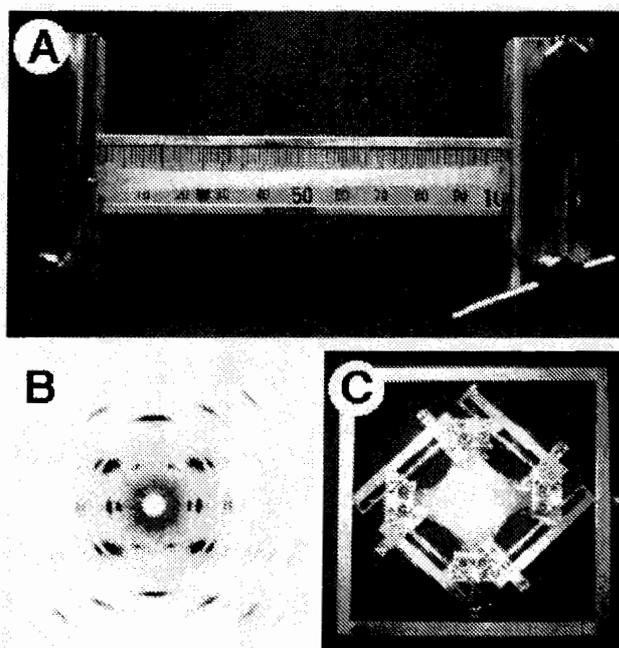


図4 P(3HB)冷延伸フィルム：(A)一軸冷延伸、(B)一軸冷延伸フィルムのX線繊維図、(C)二軸冷延伸フィルム

に起因する。非晶質フィルムから作製した 10 倍にまで冷延伸した高配向性フィルムは、熱処理を行うことにより形状を保持し、高い物性を示すようになった。10 倍冷延伸フィルムの偏光顕微鏡写真において、延伸方向と垂直方向にラメラの重なり構造が観察された。このフィブリルとラメラ結晶によって形成されたネットワーク構造が、冷延伸による破壊強度や破壊伸びを向上させた要因であると考えられる。

この冷延伸法は、一軸延伸だけでなく、二軸延伸にも適応できた (図 4B)。延伸の際に不完全熔融状態にある結晶間に張力が働くことから亀裂を生じる熱延伸に対し、冷延伸は完全熔融状態から強制的に作られた非晶状態において分子鎖の配向を促す方法であり、高結晶性高分子材料には非常に有用な手段であると考えられる。

また、熱延伸と同様に、冷延伸においても二段階延伸は破壊強度を向上させるのに非常に有効であった。10 倍に冷延伸したフィルムを、室温で 1.5 倍に二段階延伸した後、熱処理を施した二段階冷延伸・熱処理フィルムの破壊強度は、287MPa にまで向上した (表 1)。X線回折より、二段階冷延伸・熱処理フィルムに於いても平面ジグザグ構造の回折点を確認された。

本研究において得られた熱延伸、冷延伸、二段階延伸いずれの配向結晶性フィルムは、室温において 6 ヶ月間放置しても経時劣化が起こらず、物性変化がないことを確認した。すなわち、熱延伸または冷延伸と熱処理を施した配向結晶性フィルムは、室温での長期安定性にも優れ、P(3HB)は高強度・高弾性率・高耐久性を兼ね備えた優れた生分解性高分子材料に成り得ることが実証された。

4.4.1.4. 冷延伸による P(3HB)共重合体フィルムの高強度化

微生物に様々な種類の炭素源を与えることにより、前述した P(3HB)に同じ生分解性を有する脂肪族ポリエステルを第二成分として導入した P(3HB)共重合体を生合成させることが出来る。P(3HB)共重合体は、第二成分の導入により、融点を下げることやしなやかで伸びのある物性の発現が可能であり、これまで積極的に生合成されてきた。その結果、現在では 100 種類を越す共重合体が存在している。P(3HB)共重合体として最も研究が盛んに行われているのが、(*R*)-3-ヒドロキシバレレート(HV)を第二成分としたポリ [(*R*)-3-ヒドロキシブチレート-co-(*R*)-3-ヒドロキシバレレート] (P(3HB-co-3HV))である。しかしながら、HV の導入により融点は 25°C程度低下するが、HV ユニットが HB ユニットに入り込む共結晶化を生じるため、物性は全く改善されず、実用化には至らなかった。

最近、当研究室で共結晶化を生じない第二成分を導入したポリ [(*R*)-3-ヒドロキシブチレート-co-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサノエート] (P(3HB-co-3HH))が生合成され、融点が P(3HB)に比べ 70°C低く、非常に伸びのあるしなやかなフィルムを作製できることがわかった。しかし、この P(3HB-co-3HH)の破壊強度は極端に低く、いかにして伸び

としなやかさを保持したままで破壊強度を増大させるかが大きな問題であった。

そこで本研究で開発した冷延伸法および二段階延伸法の有用性を実証するために P(3HB-co-3HH) の高強度化を試みた。その結果、破壊強度 140 ± 20 MPa、破壊伸び $116 \pm 10\%$ 、ヤング率 1.48 ± 0.15 GPa の強くてしなやかなフィルムを得ることに成功した。すなわち、本研究で開発した手法は P(3HB) 共重合体にも適用でき、幅広くフィルム物性を向上させる手段として非常に有用であることが分かった。今回用いた P(3HB-co-3HH) の分子量は約 100 万程度であることから、超高分子量化に成功すれば、非常に強くしなやかな材料になると考えられる。

4.4.2. P(3HB)高強度・高弾性率繊維の作製と物性および構造

これまで P(3HB) は、結晶化速度が遅いことや二次結晶化に伴う室温での経時劣化のため、繊維化は困難であった。最初に繊維化に成功したのは、Gordeyev らであるが、破壊強度 190 MPa と汎用高分子のそれにはほど遠いものであった。最近、Schmack らは、2000-3500 m/min で高速紡糸を行った後、4.0-6.9 倍に延伸することにより、破壊強度 330 MPa、ヤング率 7.7 GPa、破壊伸び 37% の高強度繊維を得ている。また、山根らも、28 m/min で紡糸を行った後、110°C で 6 倍に延伸、さらに 100 MPa の張力をかけた状態で熱処理を施すことにより、破壊強度 310 MPa、ヤング率 3.8 GPa、破壊伸び 60% の高強度繊維を得ている。しかしながら、両研究グループとも、若干の脂質を含む P(3HB) グラニュールからの繊維化の成功例であり、残念ながら、精製した P(3HB) を用いての高強度繊維化には至っていない。不純物のない P(3HB) からの高強度繊維の作製は、手術用縫合糸などの生体機能材料への利用に

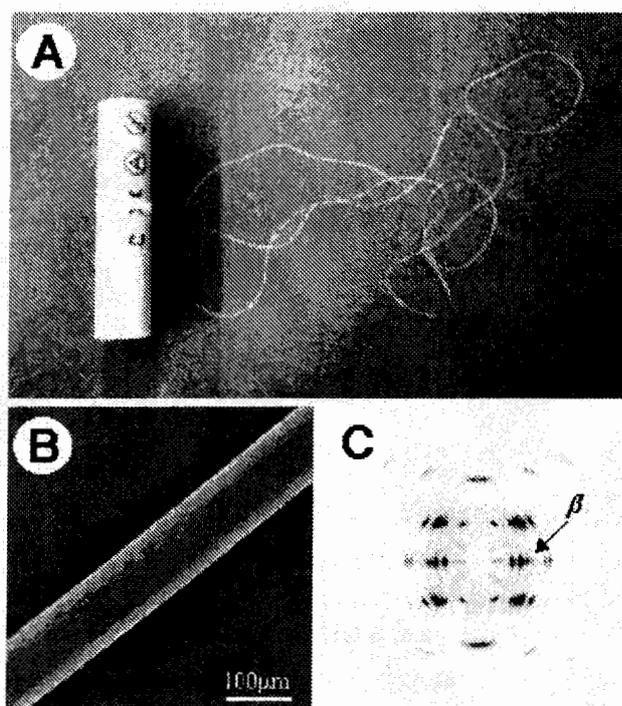


図5 (A)P(3HB)高強度繊維、(B)SEM 写真、(C)X線繊維図

大いなる貢献が期待でき、いかにして純粋の P(3HB)から高強度繊維を作製するかが大きなカギであった。

今回、超高分子量 P(3HB)を用い、前述した冷延伸法を繊維の延伸加工に応用することにより、精製した純粋の P(3HB)より高強度繊維を作製することに成功した(図 5)。すなわち、熔融押出 P(3HB)を氷水中に強制的に急冷することにより非晶質繊維を作製し、氷水中で冷延伸することにより、配向非晶質繊維を得る。ついで、この配向非晶質繊維を室温で更に延伸することにより二段階冷延伸された高配向非晶質繊維を得る。高配向非晶質繊維を熱処理することにより、破壊強度 1.3GPa、破壊伸び 35%、ヤング率 18.1GPa の生分解性および生体適合性を有する高強度繊維の作製に世界で初めて成功した(表 2)。

高強度・高弾性率繊維の X線繊維図において、2 回らせん構造 (α 構造)に加えて平面ジグザグ構造 (β 構造)の回折点を確認された(図 5)。延伸比の増大と共に、 β 構造の回折が強くなったことから、高延伸による破壊強度の増加は β 構造に起因すると考えられる。

表 2 P(3HB)繊維、生分解性繊維、汎用高分子繊維の物性比較

		Tensile strength (MPa)	Elongation to break (%)	Young's modulus (GPa)	
Biodegradable polymers	P(3HB)	Gordeyev <i>et al.</i>	190	54	5.6
		Schemack <i>et al.</i>	330	37	7.7
		Yamane <i>et al.</i>	310	60	3.8
		Iwata <i>et al.</i>	1320	35	18.1
		Poly(lactic acid)	520-570	25-35	4-6
	Poly(glycolic acid)	890	30	8.0	
Common polymers	Poly(ethylene)	400-800	8-35	3-8	
	Poly(propylene)	400-700	25-60	3-10	
	Poly(ethylene terephthalate)	530-640	25-35	11-13	
	Poly(vinyl alcohol)	400-1000	12-26	7-10	

4.4.3. 大型放射光を用いた高分子科学研究の創出

高分子材料の物性を目的に応じてナノオーダーでコントロールするには、その結晶化過程、高次構造形成過程、熱的挙動などの動的構造をその場観察する必要がある。しかしながら、高分子は回折強度が弱い、熱によって容易に融解する、反応速度が非常に速いことなどから、これまでの実験室レベルでのX線回折装置では動的構造を解析することは不可能であった。

我が国には、世界最高の強度を有する第三世代の放射光である SPring-8 が播磨研究所に存在する。これまで放射光を用いた研究は、タンパク質構造解析、鉱物の構造解析などその用途は限られてきた。それは、高分子科学研究者が装置開発を含めた研究開発に従事してこなかったことによる。

本研究では、高感度検出器や回折法の開発を含めた放射光を用いた新規高分子科学研究分野の創出を目的とした。

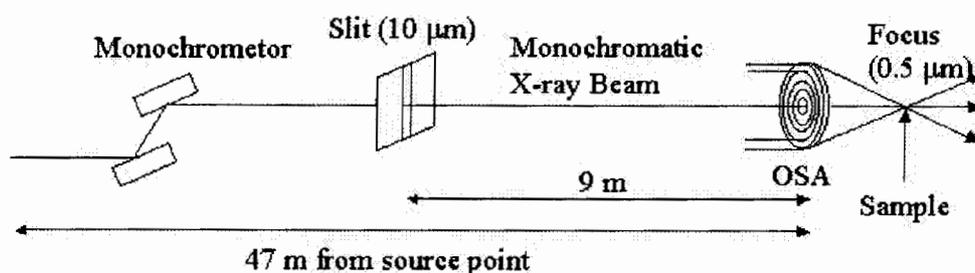


図6 フレーネルゾーンプレートを用いたマイクロビーム回折の概略

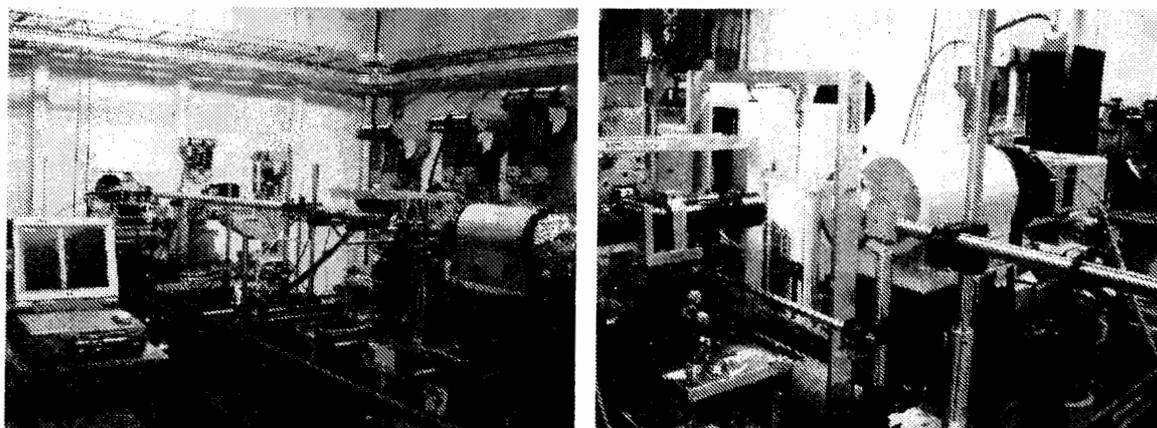


図7 マイクロビーム回折装置をセットアップしたBL47XU 実験ビームライン

4.4.3.1. マイクロビーム回折による高強度繊維の分子鎖局所構造の解析

日本高輝度光科学研究センターが保有するBL47XUビームラインを用いて、先の方法で作製されたP(3HB)高強度繊維のマイクロビーム回折を行った。これまでの実験室レベルでのX線回折では、ビーム径を300マイクロンにしか収束できないため、直径数十マイクロンの単繊維の内部構造の解析は不可能であった。今回、我々はフレネルゾーンプレート法を用い、ビーム直径を0.5マイクロンに収束させ、2マイクロン間隔で測定した(図6、図7)。

図8に、氷水中で冷延伸、室温で二段階延伸した後、50°Cで熱処理したP(3HB)高強度繊維のマイクロビーム回折の結果を示す。繊維の外側では、2回らせん構造(α 構造)を有する斜方晶系の結晶のみで構成されていることが分かった。一方、繊維中心部では、新たに平面ジグザグ構造(β 構造)を示唆する回折点が赤道線上に現れた。この結果は、繊維の外側では α 構造を有する結晶のみで構成され、内部では、 α 構造と β 構造の2種類の結晶が存在していることを示唆している。

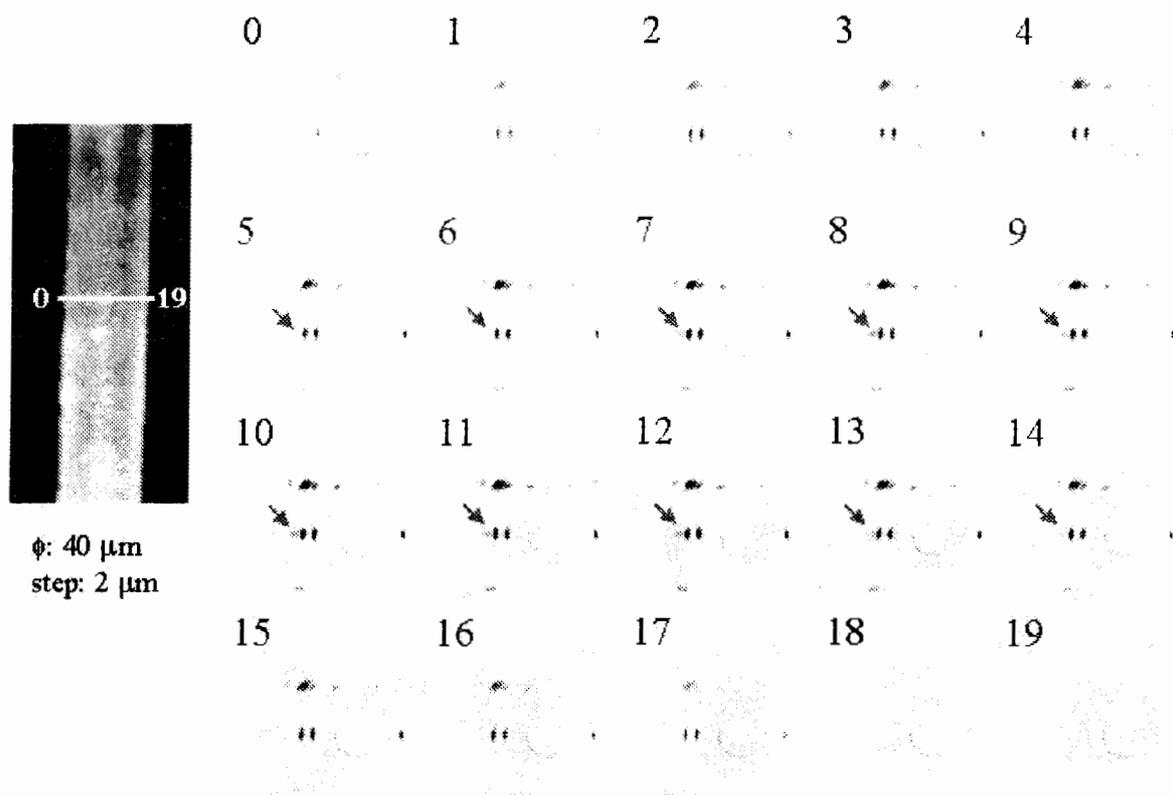


図8 P(3HB)繊維のマイクロビーム回折

一般に、繊維では内部より表層部の分子鎖の方が延ばされていると考えられている。しかし、今回の結果はこれまでの常識と反対の結果となった。これには、2つの理由が考えられる。これまで、ビームを1ミクロンにまで収束させ、1本の繊維に端から順に照射した実験例がないこと、すなわち、これまで誰も繊維の微細構造を実験的に証明した例がないこと。もう一つは、ネッキングを伴う二段階延伸であるため、あらかじめ存在していた α 構造間の非晶部が延ばされ β 構造となる際、力の掛かり具合が中心部は真っ直ぐ均等にかかるのに対し、表層部では不均一にかかることによるためと考えられる。

4.4.3.2. 時分割測定法による構造発生機構の解析

フィルムの延伸や繊維の紡糸過程など、成型過程における分子鎖構造および高次構造変化の解明は、高分子材料の高性能化において最も重要かつ必要不可欠な研究課題である。本研究では、延伸過程のその場観察を行うための装置開発を行った。図9は、大型放射光実験ハッチ内で使用できるように作製した強度測定と延伸操作を同時に行える延伸装置と、220cm小角回折用実験装置である（図9）。

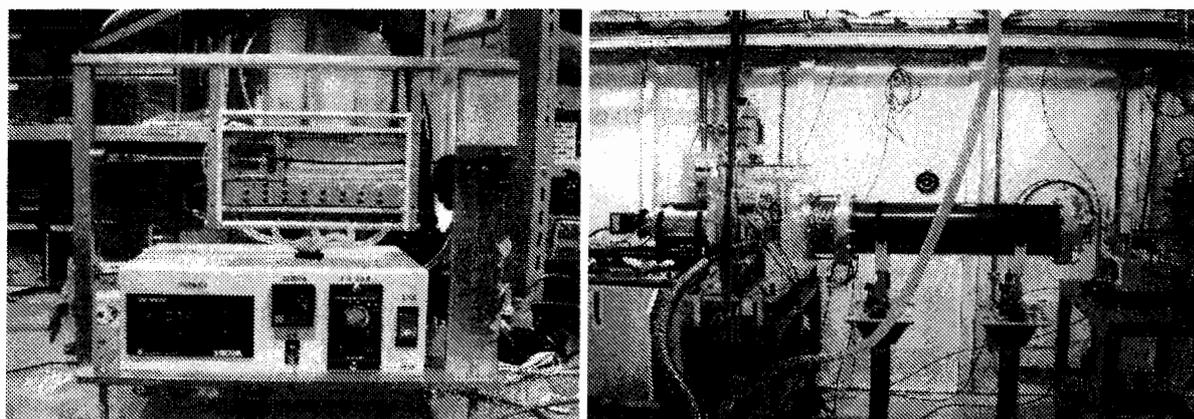


図9 BL45XU内にセットアップされた自動延伸装置と小角測定装置

図10に、10倍熱延伸したP(3HB)フィルム
の二段階延伸時における広角・
小角X線時分割測定の結果を、破
壊伸びおよび破壊強度と共に示す。

二段階延伸前は、2回らせん構造（ α
構造）を有する斜方晶系の結晶のみ
で構成され、小角散乱に於いても、

子午線方向にのみ回折が見られた。
降伏点付近までは、広角回折にお
ける回折点強度および面間隔値、小角

回折における長周期に変化はなかつ
た。しかし、降伏点以降は、 α 構造
由来の回折点（110, 020など）強度は

減少し、分子鎖軸方向の回折点（012
）の面間隔値は増大した。更に、新
たに平面ジグザグ構造（ β 構造）を

4.4.4. おわりに

以上、本研究では、熱延伸法や冷延伸法を用いることにより、これまで硬くて脆いとされた P(3HB)のフィルムや繊維の物性を、汎用樹脂以上に高強度化することに成功した。

今後の課題としては、まず P(3HB)の高効率生産方法の確立が挙げられる。P(3HB)の低物性に加え、高価格であることが、これまでP(3HB)が普及しなかった理由の一つである。本研究における、熱延伸法や冷延伸法により P(3HB)フィルムや繊維の物性が大きく改善されたことから、P(3HB)の低コスト化が実現されれば、今後の普及が十分に期待される。さらに、P(3HB)の生合成における分子量制御機構を明らかに出来れば、

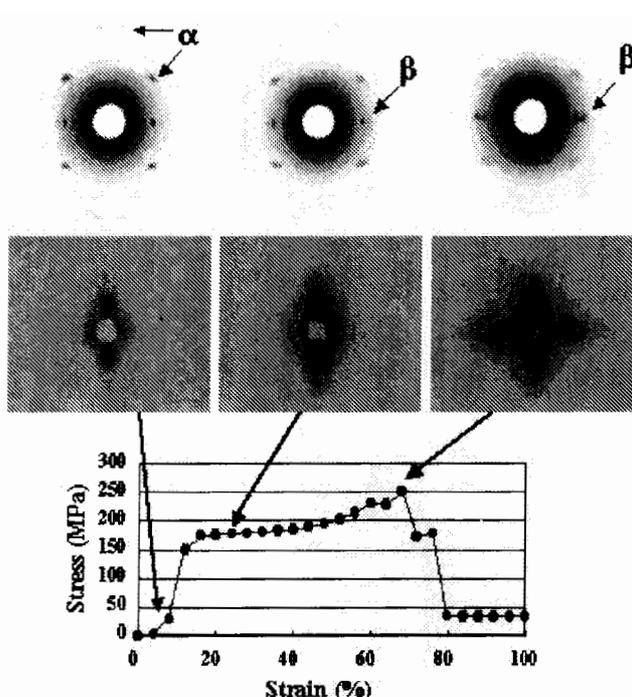


図 10 P(3HB)フィルム延伸時の広角・小角 X 線回折図

より高性能な P(3HB)が供給されると思われる。また、通常分子量で幅広い物性を示す P(3HB)共重合体の超高分子量化による物性改善も興味を持たれる。

P(3HB)の更なる物性向上として、超延伸によって2回らせん構造を持たない平面ジグザグ構造のみからなる超強力繊維の作製が期待される。そのためには、高強度化に関与すると考えられる伸びきり鎖構造の発生機構や高次構造の形成機構について、詳細に分子レベルで解明することが重要である。

4. 5 バイオポリエステル分解性制御技術の開発

(1) 分子鎖末端修飾によるバイオポリエステルフィルムの表面改質と生分解速度の制御技術の確立

ポリ(ヒドロキシアリカン酸)をはじめとするバイオポリエステルの生分解反応は、ポリエステル材料の表面にポリエステル加水分解酵素が吸着することによって進行する。したがって、ポリエステル材料表面へのポリエステル加水分解酵素の吸着反応をコントロールすることにより、材料の分解速度を制御できるものと考えられる。ここで、ポリエステル加水分解酵素は、ポリエステル材料に特異的に吸着することが報告されている。また、高分子の分子鎖末端は材料表面に偏析することが知られている。そこで本研究では、バイオポリエステルの分子鎖末端をさまざまな官能基で置換することにより、材料表面の特性を改変し、ポリエステル加水分解酵素の吸着・分解反応を制御することを試みた。

まず、バイオポリエステルの一つであるポリ乳酸に着目し、分子鎖末端に官能基を導入したポリ乳酸試料を調製した。ジエチル亜鉛とアルコールとの反応によって亜鉛アルコキシドを調製し、この亜鉛アルコキシドを重合開始剤として、L-ラクチドの開環重合を行った。アルコールとして n-ドデカノールおよびトリエチレングリコールを用いることにより、疎水性および親水性官能基をポリ乳酸の分子鎖末端に導入した。重合の結果、分子量が数千から数万の範囲で、比較的分散度の狭い生成物を得ることに成功した(表1)。NMRによる解析より、得られたポリ乳酸のカルボン酸末端に、ドデカノールあるいはトリエチレングリコールがエステル結合して導入されていることを確認した。末端官能基を導入したポリ乳酸の融解温度および結晶構造は、末端修飾を施していないポリ乳酸とほとんど変化が認められなかった。

表1 Molecular Weights and Thermal Properties of End-Capped PLLA Samples.

Sample	$M_n^{(SEC)^a}$	M_w/M_n^b	$M_n^{(NMR)^c}$	T_g^d (°C)	T_m^e (°C)	ΔH_m^f (J/g)
PLLA-D4K	7,800	1.26	4,000	48	160	58
PLLA-D6K	11,000	1.21	5,500	47	162	60
PLLA-D11K	25,000	1.19	11,000	51	169	51
PLLA-D19K	39,000	1.18	19,000	54	178	60
PLLA-MEEE5K	8,000	1.29	5,400	43	150	45
PLLA-5K	9,400	1.76	5,300	45	164	65

^a Number-average molecular weight determined by SEC. ^b Polydispersity. ^c Number-average molecular weight determined from ¹H NMR spectra. ^d Glass-transition temperature. ^e Melting temperature. ^f Enthalpy of fusion.

末端に疎水性および親水性官能基を導入したポリ乳酸のフィルムをクロロフォルム溶液よりキャスト法により作成した。このキャストフィルムを 200℃で熔融後、室温に急冷することにより非晶質フィルムを、また、熔融後、所定温度で等温結晶化することにより、結晶化フィルムをそれぞれ作製した。ついで、これらフィルムの表面特性を水の接触角測定によって評価した。各フィルムの接触角測定の結果を図 1 に示してある。非晶質のポリ乳酸フィルムの接触角は、いずれも 90° 前後であり、官能基の導入による効果はほとんど認められないことがわかる。一方、135℃で結晶化したフィルムの接触角は、導入した官能基の種類によって大きく変化することがわかった。末端未修飾のポリ乳酸の場合、結晶化によってフィルム表面が疎水的になり、結果として接触角は 100° まで増大した。疎水性官能基であるドデカノールを末端に導入したポリ乳酸フィルムを結晶化させると、接触角は 120° まで増大し、末端未修飾試料よりもさらに疎水的な試料表面になることがわかった。一方、親水性官能基であるトリエチレングリコールを末端に導入したポリ乳酸フィルムを結晶化すると、非晶質フィルムよりも低い接触角の値を示した。以上の結果より、ポリ乳酸の分子鎖末端に導入した疎水性および親水性官能基は結晶化によってフィルム表面に偏析し、ポリ乳酸フィルム表面の親疎水性は偏析された末端官能基の特性とその量によって制御されることが明らかとなった。

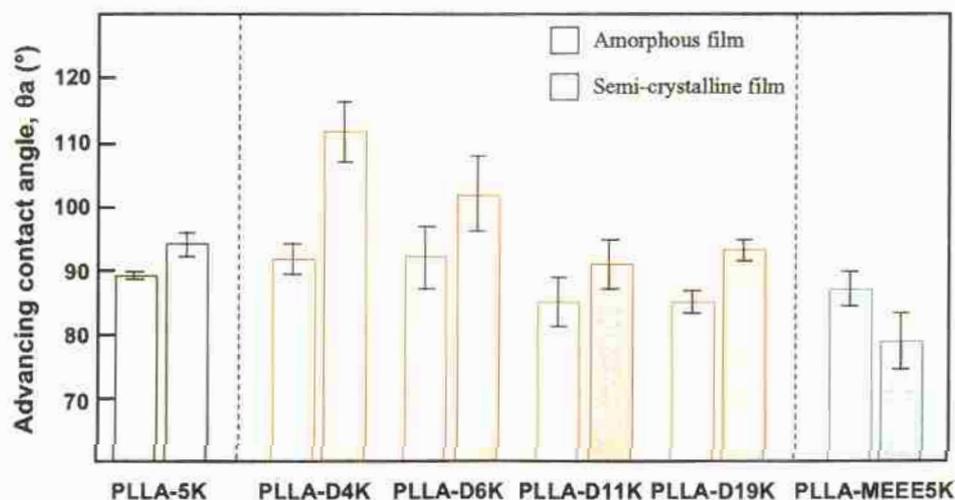


図 1 Advancing contact angles (θ_a) with water on the surface of PLLA thin films.

さらに、ドデカノールの導入によってフィルム表面を疎水化したポリ乳酸の、プロテナーゼ K を用いた酵素加水分解実験を実施した。分解反応初期における微少な重量変化を追跡するために、水晶振動子マイクロバランス法を用いて分解挙動を解析した。その結果、ドデカノールを導入したポリ乳酸フィルムのプロテナーゼ K による分解速度は、反応初期において、末端未修飾ポリ乳酸フィルムの分解速度の約 2 分の 1 程度まで低下することがわかった (図 2, 3)。また、分解反応後のフィルム表面の形態を AFM を用いて観察したところ、末端未修飾ポリ乳酸フィルムの表面

は、均一に分解反応が進行して粗雑化するのに対して、ドデカノールを導入したポリ乳酸フィルムでは、酵素分解反応が進行した領域と進行していない領域が認められた。これは、表面に偏析されたドデカノール基が存在することにより、酵素分解反応が抑制されるためと考えられる。

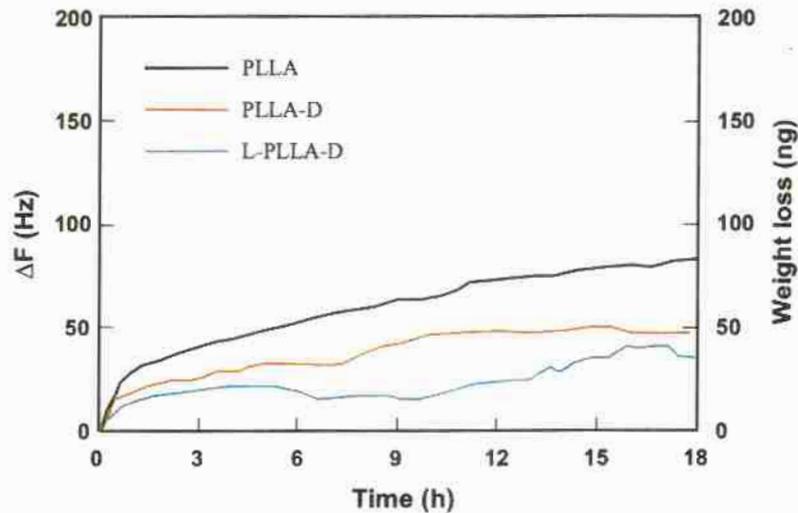


図2 Time-courses of frequency changes (ΔF) and weight loss during enzymatic degradation of end-capped PLLA thin films crystallized at 140°C by proteinase K.

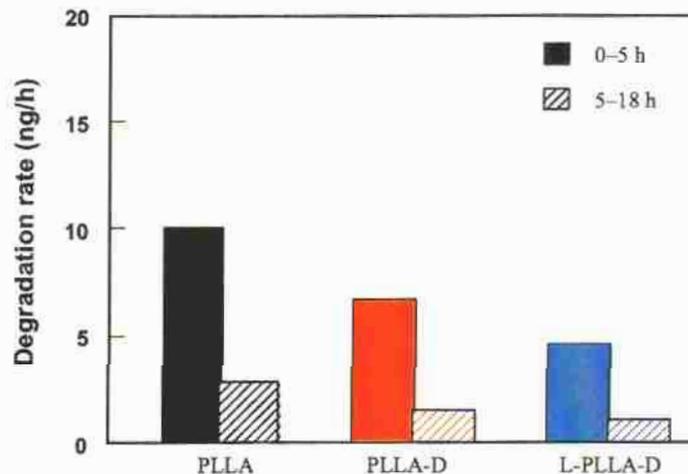


図3 Enzymatic degradation rate of PLLA and end-capped PLLA thin films crystallized at 140°C .

(2) バイオポリエステル熱分解メカニズムの解明

バイオポリエステルである P(3HB)の熱分解反応は、その融解温度付近から開始され、分子量の低下を引き起こすことが知られている。分子量の低下は、材料の物性低下や熱成型加工性の低下を引き起こすため、熱分解反応を極力低減できる技術開発が望まれている。本研究では、バイオポリエステルの熱分解反応メカニズムを解

明し、熱分解反応を抑制する技術の構築を目指した。

P(3HB)の熱分解挙動を昇温過程および等温保持過程における重量変化および分子量変化から調査した。P(3HB)の昇温過程における重量変化の測定結果を図4に示してある。粗精製のみのP(3HB)試料は、約240℃付近から重量減少が開始し、280℃において重量がゼロとなった。図5には、P(3HB)を180℃で等温保持した際の分子量の時間変化を示してある。粗精製のみのP(3HB)試料の分子量は、180℃において保持時間とともに減少した。分子量と保持時間から関数計算を行ったところ、分子量の逆数と保持時間との間に比例関係が認められ、180℃におけるP(3HB)の熱分解は分子鎖がランダムに切断される反応機構で進行することがわかった。

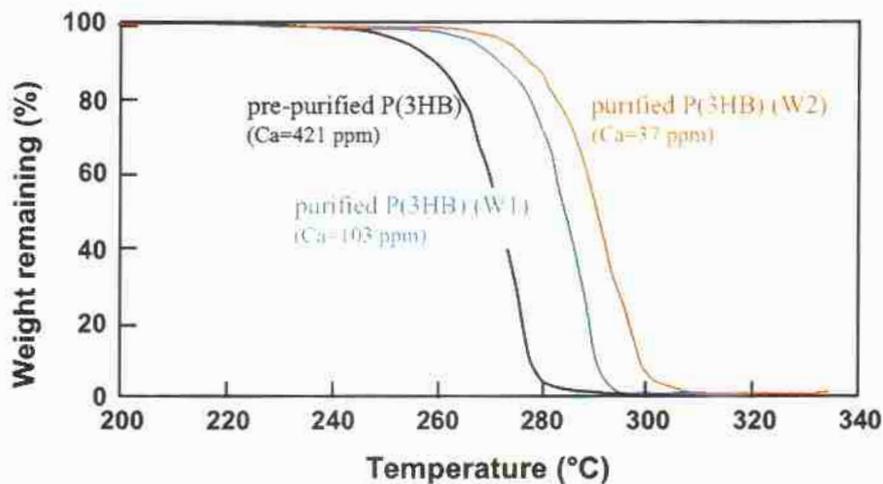


図4 TGA curves of thermal degradation of P(3HB) samples with different Ca content at heating rate of 10 °C/min.

この粗精製したP(3HB)試料をさらに酸性条件下でクロロフォルムに溶解させ、貧溶媒であるメタノール中に沈殿し、再精製を行った。再精製を施したP(3HB)について熱重量変化測定を行ったところ、重量減少の開始温度が約260℃となり、粗精製試料に較べて約20℃高温側にシフトすることがわかった。180℃における等温分解実験を行ったところ、再精製処理を施したP(3HB)試料もランダム分解機構で熱分解反応が進行し、保持時間とともに分子量が低下するものの、粗精製試料に較べるとその速度は約半分まで低減していることがわかった(図6)。再精製前後におけるP(3HB)試料について、試料中の金属イオンの濃度を調査したところ、粗精製P(3HB)には多量のカルシウムおよびマグネシウムが含まれており、再精製処理によりこれら金属が除去されていることがわかった。

そこで、再精製処理を施したP(3HB)試料にカルシウムおよびマグネシウムをそれぞれ再添加して、熱重量変化測定をした。その結果、カルシウムおよびマグネシウムの添加量の増大とともに、重量減少開始温度が低温側にシフトすることを確認した。したがって、P(3HB)の熱分解反応には、含有されるカルシウムおよびマグネシ

ウムなどの金属が大きく関与していることがわかった。一方、再精製処理した P(3HB) にカルシウムおよびマグネシウムと同様に二価の金属イオンである亜鉛を添加したところ、カルシウムおよびマグネシウムを添加した場合と異なり、重量減少開始温度の低温側へのシフトが認められなかった。この結果より、P(3HB) の熱分解反応には、カルシウムおよびマグネシウムなどの 7 A 族に属する金属の存在が影響していることがわかった。

以上の結果より、P(3HB) の熱分解反応は、分子鎖がランダムで分解する反応において低分

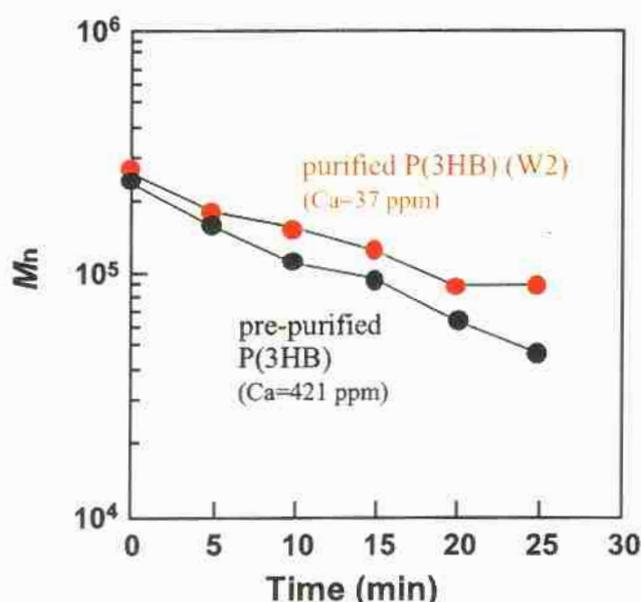


図 5 Changes in number-average molecular weight (M_n) during isothermal degradation of P(3HB) at 180 °C.

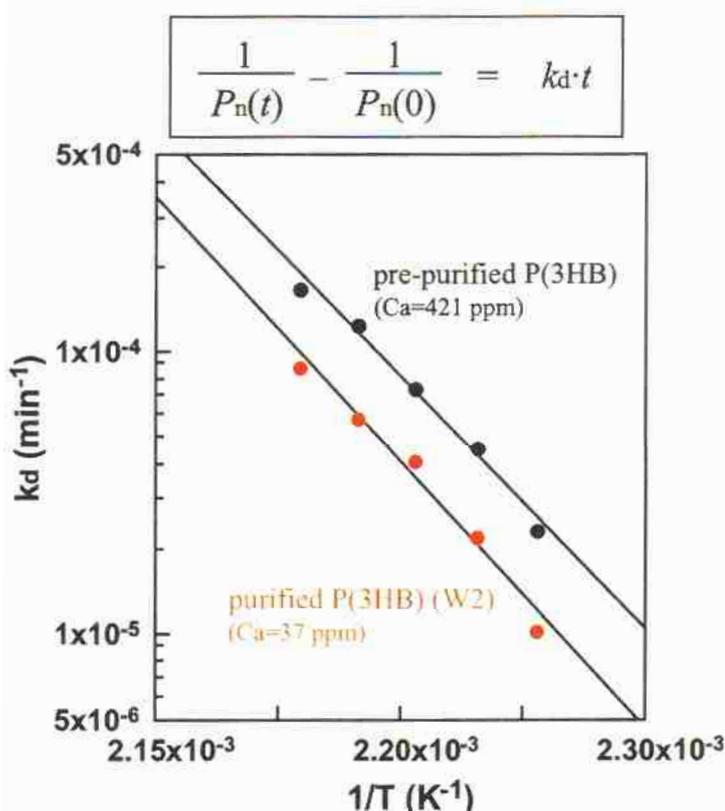


図 6 Relationship between degradation constant (k_d) and temperature for thermal degradation of P(3HB).

子量化することがわかった。その際、マグネシウムやカルシウムなどの 7 A 族に属する金属が存在すると、それらの金属がルイス酸として作用し、分子鎖のランダム分解反応を促進する作用を示すものと考えられる。その結果、7 A 族に属する金属が残存した P(3HB) 試料において、分子量の熱分解反応が促進されるものと結論できる。

これらカルシウムおよびマグネシウムなどの金属は、P(3HB) の微生物合成時における必須金属イオンとして培地中に添加されており、微生物体中と取りこまれた金属が試料中に混入したものと考えられる。微生物体内からの P(3HB) の抽出時において、

これら金属を除去することにより、P(3HB)の熱安定性が向上するものと結論できる。

さらに、ポリ乳酸やポリカプロラクトンなどの脂肪族ポリエステルについて、同様な熱分解挙動の解析を行い、いずれの試料においても含有する金属化合物が熱分解反応を促進する働きを示すことを明らかにした。

(3) バイオポリエステルの表面構造・物性と酵素分解性

前述の通り、バイオポリエステルの生分解性は、分子構造のみならず、材料中の固体構造や物性に大きく依存する。ゆえに固体構造制御は同時に生分解性の制御につながる。生分解性ポリエステル材料の構造・物性および生分解性を制御する基盤技術の確立を目指す研究の一環として、ここでは固体構造の結晶化および融解様式を、一方で酵素分解様式をナノメートルオーダーで視覚的にリアルタイム解析し、固体構造と生分解性との相関を解明することを目的とした。本研究では、代表的な生分解性脂肪族ポリエステルであるポリ(L-乳酸)(PLLA)、ポリヒドロキシブタン酸(P(3HB))とその共重合体を対象にした。バルク材料のモデル試料として、それらの結晶化薄膜、単結晶を用いて主に原子間力顕微鏡(AFM)により評価した。

(3.1) 生分解性ポリエステルの固体構造形成と酵素分解性

PLLA 薄膜における結晶成長過程と酵素分解性との相関について調べた結果について以下に詳述する。温度制御型原子間力顕微鏡(TC-AFM)を用い、真空下での結晶化その場観察を試みた結果を図7に示す。結晶形態は膜厚に依存し、厚さ20nmの薄膜中では樹枝状結晶、膜厚が50nmの場合には六角形のラメラ晶が形成されることがわかった。これらの形態は、結晶化初期段階において先ずedge-on結晶が形成し、それが時間と共に伸長していきながらS字形あるいは弓形の形態を示す。さらに時間が進行するとedge-on結晶の成長先端部からflat-on結晶が成長し始め、最終的な形態として六角形状の結晶となることを明らかにした。一連のAFM像をもとに結晶成長速度を求めたところ、edge-onならびに転移後のflat-on結晶の成長速度は同一であることが判明した。

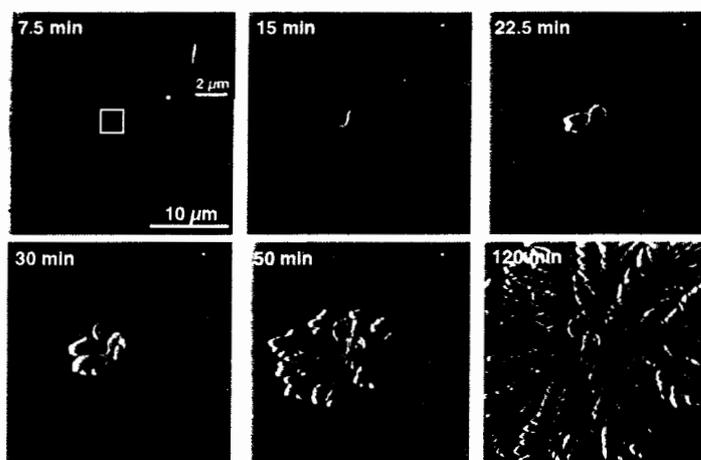


図7 Isothermal crystallization of PLLA thin film at 165 °C, which images were taken at 7.5, 15, 22.5, 30, 50, and 120 min.

この PLLA 結晶化薄膜をプロテナーゼ K により酵素分解させた結果を図 8 に示す。結晶周辺部のフリーな非晶領域から分解が優先的に生じ、続けて空間的に拘束されている非晶部へと進行していく様子が捉えられた。このことから酵素分解性は分子鎖充填の規則性や運動性に大きく依存すると言える。

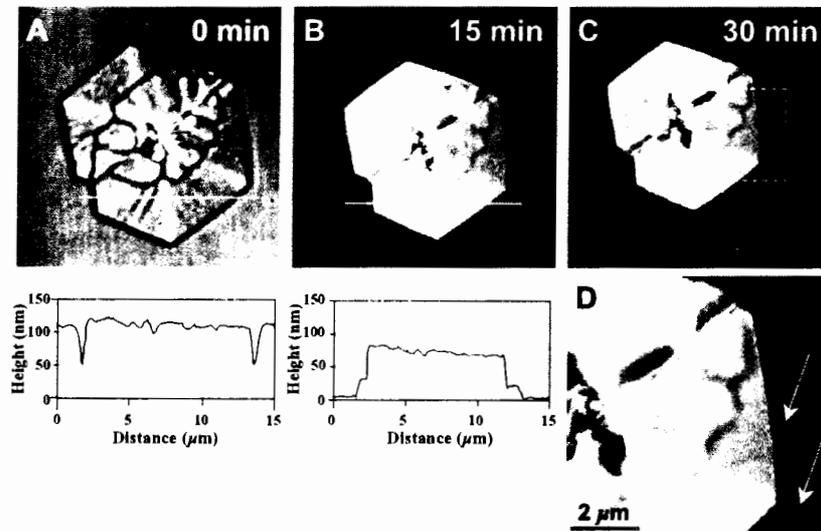


図 8 AFM images of PLLA thin film, crystallized at 160 °C for 20 min, before (A) and after enzymatic degradation for 15 min (B) and 30 min (C, D). The (D) is enlarged image from the rectangular area in (C). The cross-section profile data correspond to the lines in (A) and (B).

本研究では、酵素分解挙動のその場 AFM 観察を測定することにも成功した。対象として微生物産 P(3HB)共重合体薄膜を用いている。P(3HB)共重合体薄膜の場合、AFM による結晶成長過程の追跡に成功していたため、構造形成と酵素分解性の相関を詳細にすることが可能となる。そこで水中にて *R. pickettii* T1 由来の PHB 分解酵素による結晶化薄膜の分解メカニズムのリアルタイム解析を行った (図 9)。P(3HB)共重合体結晶化薄膜には、厚さ約 10 nm の flat-on ラメラ晶が形成される。酵素を添加すると、ラス状のラメラ晶先端部分から不均一に分解され、フィブリル化していく様子が観察された。一方、結晶成長過程では、成長先端部において a 軸に沿って多数のフィブリルを形成し、フィブリル間を埋めながら構造を形成していた。フィブリル間の結晶構造は乱れた構造と予期される。ゆえにに我々はその乱れた領域から優先的に酵素による加水分解が進行するというメカニズムを提案した。

一方で、ラメラ晶のみならず繊維構造 (シシカバブ構造) の酵素分解のリアルタイム解析も行った。繊維構造は、分子鎖が配向した状態で結晶化されるときに見られる特有の構造であり、繊維材料中に見られる代表的な結晶高次構造体である。ここでは超高分子量 P(3HB)を対象に、その薄膜作製時にずり変形を与えることで P(3HB)配向結晶化薄膜を作製し用いた。この試料からの電子線回折図形は典型的な繊維図形を示し、変形方向に分子鎖が配向した結晶構造が形成されていた。*R. pickettii*

T1 由来の PHB 分解酵素による配向薄膜の分解を液中 AFM で追跡したところ、反応時間の経過とともに膜表面が粗くなっていき、分子鎖軸方向とは垂直方向に成長した edge-on ラメラ晶（折りたたみ鎖）が出現してくる様子が分かった（図 10）。また、幅数十 nm の細いフィブリル（伸びきり鎖）がラメラ晶を貫通している様子も観察された。これは、膜表面の非晶相が優先的に分解された結果、結晶相である繊維構造（シシカバブ構造）が出現したものである。その後シシカバブ様の構造も分解されていったが、フィブリルの分解は意外と速いことが判明した。これは、edge-on ラメラ晶を繋ぐフィブリル内の分子鎖充填や結晶構造が乱れていることを示唆している。以上の結果をまとめると、構造形成と酵素分解に関する研究より、ポリエステル分解は分子鎖の充填力の弱い領域、すなわち運動性の高いと考えられる分子鎖より優先的に進行していくことが示唆された。そしてこのような構造の乱れは、結晶成長様式に起因していると結論付けた。

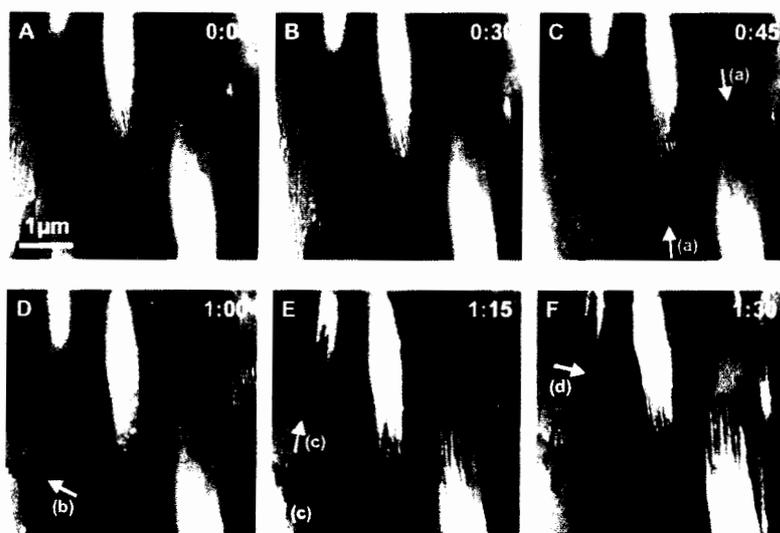


図 9 Time-sequential AFM images of P[(R)-3HB-co-10mol%-6HH] crystalline thin film before (A) and during enzymatic degradation by PHB depolymerase at 20 °C (B-F). Enzymatic degradation heterogeneously occurred as indicated by arrows.

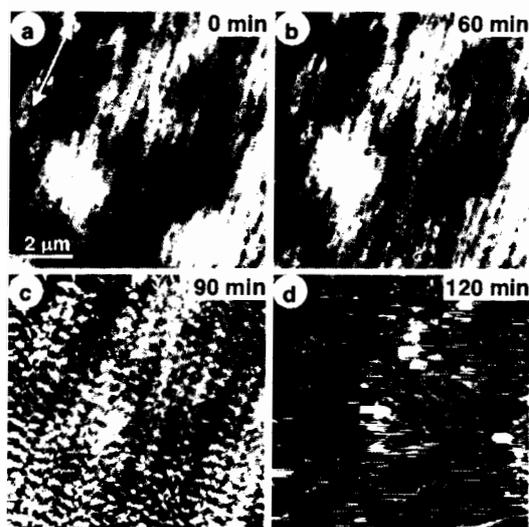


図 10 Time-sequential AFM images of oriented thin film of ultrahigh molecular weight P[(R)-3HB] before (a) and during enzymatic degradation by PHB depolymerase at 25 °C.

(3. 2) 生分解性ポリエステル固体構造の融解様式と酵素分解性

結晶内の構造の乱れは、材料の酵素分解性のみならず、熱的な挙動にも影響を与えと考えられる。そこで、ここではポリエステル結晶の融解様式の考察から結晶領域中の構造を検証することにした。

昇温過程における P(3HB)単結晶の熱的挙動を TC-AFM でその場観察した結果 (図 11) について述べる。P(3HB)単結晶を加熱していくと、単結晶の長軸に垂直な方向 (b 軸) に沿い、結晶側面から不均一に侵食されていくことが分かった。この鋸歯状の侵食は、昇温につれ結晶中心部に進行していった。このような形態変化は結晶の局所的融解に起因するもので、結晶の中心付近と比べると側面領域の分子鎖の運動は熱により容易に活発化する、また融解を容易に誘発する構造欠陥が結晶中に存在すると考えられる。一方で、結晶の長軸 (a 軸) に沿っても溝が形成されるのも認められた。以上の結果は P(3HB)単結晶の酵素分解挙動と類似していた。

次に、PLLA 単結晶についても同様の検討を行った (図 12)。室温から温度を上げていくと、六角形状の PLLA 結晶側面において顕著な形態変化が認められた。特に図に示すような側面域の厚化が生じた。さらに温度を上昇させると結晶の融解が始まり、単結晶の側面域から中心に向かって進行して行き、その進行は不均一であった。P(3HB)単結晶の場合と同様に、側面領域の分子鎖の運動性は熱によって容易に活発化される。さらに六角形状の PLLA 結晶は二つの異なる分子鎖の折りたたみ様式を有するセクターからなると考えられるが、この様式の安定性を反映して融解して行くことも判明した。

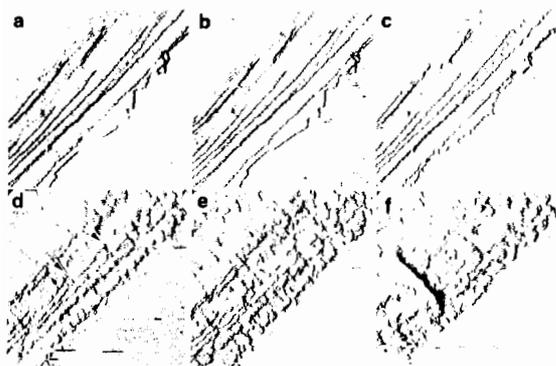


図 11 Morphological changes of P(3HB) single crystals at elevated temperatures: (a) 25 °C, (b) 100 °C, (c) 122 °C, 127 °C, 132 °C, and 138 °C, respectively.

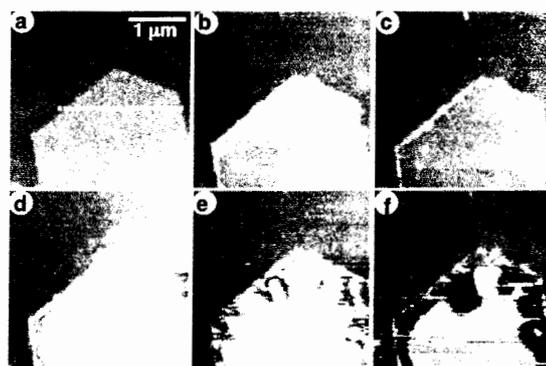


図 12 Morphological changes of PLLA single crystal at elevated temperatures: (a) 25 °C, (b) 126 °C, (c) 139 °C, 145 °C, 158 °C, and 168 °C, respectively.

他に、ポリ (ε-カプロラク톤) 単結晶も検討を行い同様の結果を得た。また生分解性のみならず幾つかの高分子単結晶の熱的挙動においても上述の融解挙動を示すことが最近報告されていることから、高分子単結晶の側面領域は分子鎖の充填が疎であるため分子鎖の運動性が高く、そこが起点になって融解や酵素による加水分解が進行していくものと説明される。

(3.3) 生分解性ポリエステルと分解酵素との相互作用評価の試み

上述のとおり、酵素分解性は固体構造に大きく依存することをナノメートルオーダーで視覚的に明らかにしてきた。AFM は、ナノメートルオーダーで材料表面の凹凸（構造）に追従した信号を検知して画像化するのみならず、表面物性（粘弾性や吸着）に応じた信号変化を検知することも可能である。高分子材料表面物性もまた分解酵素による加水分解反応に影響を与えられとされる。そこで、AFM プローブによるバイオポリエステルの表面物性ならびに分解酵素の吸着特性解析を検討した。

(3.3.1) ポリエステル表面物性解析

本研究では、PLLA 薄膜表面のガラス転移点 (T_g) に着目した。 T_g は分子鎖のミクロブラウン運動に起因するものである。これをナノオーダーで評価することで、材料表面における分子鎖の運動性と分解性との相関を考察することにした。

PLLA の非晶性薄膜を作製した。水中あるいは真空中にて温度を可変させながら薄膜表面を AFM プローブで走査した。AFM プローブと材料表面との間には常に摩擦力が生じている。昇温することで表面物性に变化が起きると、プローブの捻れ信号として摩擦力の変化が現れてくる。その結果を図 13 に示す。摩擦力の急激な増大し始める温度は T_g に対応している。真空中に比べると、水中の方がより低温で摩擦力が変化していることが判明した。これは水分子が材料表面域の PLLA 分子鎖の運動性を活性化させているためだと考えられる。PLLA パルク材料の T_g はおよそ 60°C であるため、室温で行う酵素分解反応では分子鎖の運動性は極めて低いと考えられる。それにも関わらず、酵素分解が進行することは、水分子による PLLA 分子鎖運動の活性化が関与していると考えられる。

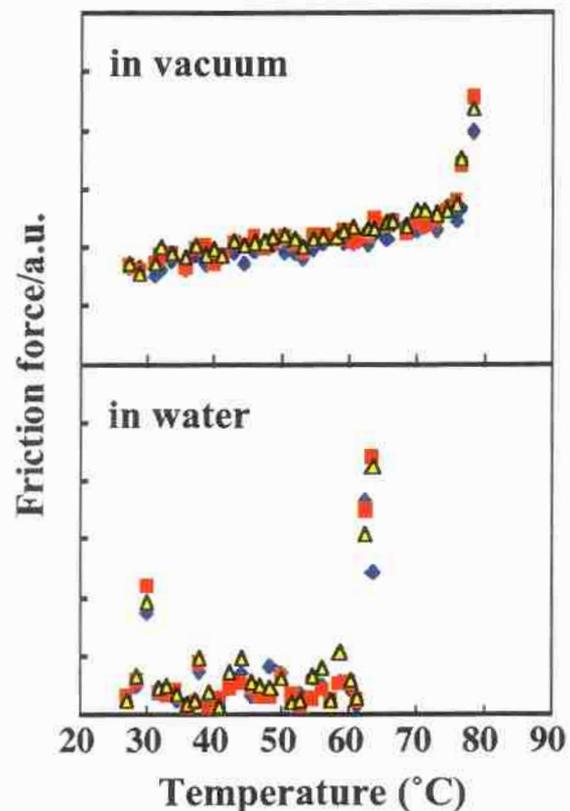


図 13 Temperature dependency of friction force between PLLA surface and AFM cantilever during scanning. The measurements were performed in vacuum and in water.

(3.3.2) ポリエステル表面に対する分解酵素の吸着特性解析

生分解性高分子材料の酵素分解は、分解酵素の材料表面への吸着とそれにつづく分子鎖の加水分解という固液界面での分解反応である。本研究では、酵素の吸着制

御から生分解性を制御するという視点に立ち、分解酵素の吸着機構を解明することを目指している。そのために、AFM 用カンチレバーに修飾し、それを用いて基質材料表面との吸着力を分子レベルで測定する実験手法の構築を試みた。ここでは、*R. pickettii* T1 由来の PHB 分解酵素の基質吸着部位をカンチレバー上に自己組織化単分子膜を介し固定化させる方法を検討した。6 個の His 残基を基質吸着部位の末端に導入するよう発現ベクターを設計し、得られたベクターを用いて大腸菌内で目的タンパク質を発現させた。次に、目的タンパク質の固体基板上への固定化の検討を行った。まず、モデル基板としてシリコンウエハーを用い、その表面に金を蒸着した。ニトリロ三酢酸を末端に有する自己組織化単分子膜を金表面上に作製し、その後 Ni(II)を加えて錯形成させた。その後基質吸着部位を加えた。高感度赤外反射吸収法により固体基板上に目的タンパク質が固定化されていることを確認した。

カンチレバー表面に同様の手法で基質吸着部位を固定化させた。そのカンチレバーを用い、リン酸緩衝液中にて PLLA 非晶薄膜との間でフォースカーブ測定を行った (図 14)。この場合、カンチレバー先端が試料表面に吸着したことを示す明瞭な信号が得られた。一方、酵素を修飾していないカンチレバーを用いた場合、吸着を示す信号は得られなかった。このことは、PHB 分解酵素の基質吸着部位が PLLA 表面に吸着したことを意味する。以上より、分解酵素と基質材料表面との間の吸着力を分子レベルで直接評価する手法を確立したといえる。

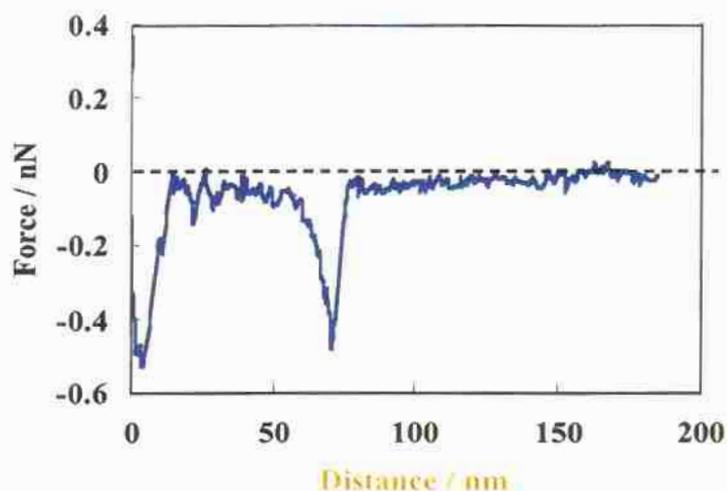


図 14 Force-distance curve recorded for the interaction between PLLA surface and functionalized AFM tip with substrate binding domain of PHB depolymerase.

5. 研究実施体制

(1) 体制

東京工業大学と理化学研究所で集中研究を実施した。

研究代表者（土肥義治）

- ① 人工進化によるポリエステル合成系酵素の改質
理化学研究所、東京工業大学
- 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
東京工業大学
- ③ 高分子加水分解酵素の構造と機能に関する研究
理化学研究所
- ④ 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
理化学研究所
- ⑤ バイオポリエステルの分解性制御技術の開発
理化学研究所、東京工業大学

(2) メンバー表

基礎的研究発展推進事業参加者一覧

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
土肥義治	東京工業大学 理化学研究所	総合理工学研究科教授 高分子化学研究室主任研究員	研究総括および立案	2001年3月～2005年3月
柘植丈治	東京工業大学	総合理工学研究科助手	ポリエステル生合成の遺伝子工学	2001年3月～2005年3月
秋山 稔	東京工業大学	科学技術振興事業団研究員	ポリエステル微生物生産の環境影響評価	2001年7月～2002年9月
Z. Gan	東京工業大学 理化学研究所	科学技術振興事業団研究員	ポリエステル結晶化機構の解明	2001年12月～2003年3月 2003年4月～2004年3月
Pri. Kahar	東京工業大学	科学技術振興事業団研究員	ポリエステルの効率的微生物生産法の開発	2002年4月～2005年3月
吉川佳広	東京工業大学 理化学研究所	科学技術振興事業団研究員 高分子化学研究室特別研究員	ポリエステルの結晶化と物性	2002年10月～2003年3月 2003年4月～2005年3月
J. Agus	東京工業大学	大学院博士課程	ポリエステル生合成の遺伝子工学	2002年4月～2005年3月
手塚裕昭	東京工業大学	大学院博士課程	ポリエステルの合成と評価	2004年4月～2005年3月
沢柳知治	東京工業大学	大学院博士課程	生分解性高分子の機能評価	2004年4月～2005年3月
K. J. Kim	東京工業大学	大学院博士課程	生分解性高分子の物性評価	2003年10月～2005年3月
井上義夫	東京工業大学	生命理工学研究科教授	ポリエステル固体構造の制御	2001年4月～2005年3月

吉江尚子	東京工業大学	生命理工学研究科助手	ポリエステルの構造と物性	2001年4月～2003年3月
岩田忠久	理化学研究所	高分子化学研究室副主任 研究員	高強度繊維の作製と構造 解析	2001年3月～2005年3月
阿部英喜	理化学研究所	高分子化学研究室研究員	高性能フィルム <small>の</small> 作製と構造 解析	2001年3月～2005年3月
藤田雅弘	理化学研究所	高分子化学研究室研究員	ポリエステル結晶の構造解析 と物性評価	2002年4月～2005年3月
山下宏一	理化学研究所	高分子化学研究室前任研究員	ポリエステル生分解性評価	2001年3月～2005年3月
田口一徳	理化学研究所	高分子化学研究室研究員	ポリエステル合成の遺伝子 工学	2001年3月～2005年3月
平石知裕	理化学研究所	高分子化学研究室研究員	ポリエステル合成の進化分子 工学	2001年3月～2005年3月
鈴木義勝	理化学研究所	高分子化学研究室副主任 研究員	ポリエステルの構造解析と機能 評価	2002年4月～2005年3月
J. W. Park	理化学研究所	科学技術振興事業団研究員	高強度繊維の作製と構造 解析	2003年4月～2005年3月
田口精一	理化学研究所 明治大学 北海道大学	高分子化学研究室前任研究員 農学部助教授 大学院工学研究科教授	ポリエステル合成酵素の進化分 子工学	2001年3月～2002年3月 2002年4月～2004年3月 2004年4月～2005年3月
中江純子	理化学研究所	科学技術振興事業団技術員	ポリエステルの微生物合成	2001年4月～2002年3月
前原 晃	理化学研究所	高分子化学研究室特別研究員	ポリエステル合成の分子 生物学	2001年3月～2001年12月
村瀬友英	理化学研究所	高分子化学研究室特別研究員	ポリエステル結晶の酵素分解	2001年4月～2001年12月
高瀬和真	理化学研究所	高分子化学研究室特別研究員	ポリエステル合成の進化分子 工学	2001年4月～2004年3月
桑原和弘	理化学研究所	高分子化学研究室特別研究員	ポリエステル固体構造の解析	2001年4月～2003年9月
榎 牧子	理化学研究所	高分子化学研究室特別研究員	高分子分解酵素の構造と 機能	2001年4月～2004年1月
松本謙一 郎	理化学研究所	高分子化学研究室特別研究員	ポリエステル合成酵素の構造 と機能	2003年4月～2005年3月
Chris. Nomura	理化学研究所	高分子化学研究室特別研究員	ポリエステル合成の進化分子 工学	2004年4月～2005年3月
澤渡千枝	静岡大学	教育学部助教授	高強度繊維の作製技術の 開発	2001年4月～2002年3月
田中文男	京都大学	木質研究所講師	高強力繊維の分子設計論	2001年4月～2005年3月
山根秀樹	京都工芸繊維 大学	工芸科学研究科助教授	高強力繊維の作製技術の 開発	2001年7月～2005年3月
粕谷健一	群馬大学	工学部助手	高分子分解酵素の構造と 機能	2002年4月～2004年8月

6. 研究期間中な主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

- ① 平成 14 年 3 月 1 日(金) (10:00-19:30)、第 1 回基礎的研究発展ワークショップ、理化学研究所、参加者 70 名
- ② 平成 15 年 3 月 11 日(火) (10:00-19:30)、第 2 回基礎的研究発展ワークショップ、理化学研究所、参加者 50 名
- ③ 平成 15 年 11 月 12 日(水)～14 日(金)、First IUPAC International Conference on Bio-based Polymers(ICBP2003)、理化学研究所(口頭発表 47、ポスター発表 91、国内参加者 140 名、海外参加者 80 名)
- ④ 平成 16 年 3 月 11 日(木) (10:00-19:30)、第 3 回基礎的研究発展ワークショップ、理化学研究所、参加者 50 名
- ⑤ 平成 17 年 3 月 1 日(火) (10:00-17:30)、第 4 回基礎的研究発展ワークショップ、理化学研究所、参加者 60 名

(2) 招聘した研究者等

氏名 (所属、役職)	招聘の目的	用務先	滞在期間
A. Steinbuechel (ドイツ) (University of Muenster, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
A. C. Albertsson (スウェーデン) (Royal Institute of Technology, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
E. Chiellini (イタリアー) (University of Pisa, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
R. Narayan (USA) (Michigan State University, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
G.-Q. Chen (中国) (Tsinghua University, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
F. Srieenc (USA) (University of Minnesota, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
D. L. Kaplan (USA) (Tufts University, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
F. Rypacek (チェコ) (Institute of Macromolecular Chemistry, 教授, 部長)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
P. Guerin (フランス) (University of Paris, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
M. Scandola (イタリアー) (University of Bologna, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
S. S. Im (韓国) (Hanyang University, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
S. Y. Lee (韓国) (KAIST, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
Prof. M. Vert (フランス) (University of Montpellier, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
J. V. Seppala (フィンランド) (Helsinki University of Technology,	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日

S. H. Kim (韓国) (KIST, 教授, 室長)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
R. H. Marchessault (カナダ) (McGill University, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
S. Penczek (ポーランド) (Polish Academy of Sciences, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
C. Wu (中国) (The Chinese University of Hong Kong, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
D. Wititsuwannakul (タイ) (Mahidol Univeristy, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
J. L. Willet (USA) (USDA, 室長)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
R.-J. Mueller (ドイツ) (GBF, 室長)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
B. Hazer (トルコ) (Zonguldak Karaelmas University, 教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
Y. H. Kim (韓国) (KIST, 教授, 部長)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 15日
M. Potter (ドイツ) (University of Muenster, 研究員)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 18 日
M. Obst (ドイツ) (University of Muenster, 研究員)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 18 日
T. Lutke-Eversloh (ドイツ) (University of Muenster, 研究員)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 18 日
M. Patel (オランダ) (Utrecht University, 助教授)	第1回 Bio-based Polymers 国際会議で講演、および 研究成果の討議	理化学研究所	2003年11月 11日～11月 18 日

7. 4年間 (2001-2004) の発表論文 (海外 112 件)

1. 人工進化によるポリエステル合成系酵素の改質

- (1) K. Matsumoto, H. Matsusaki, S. Taguchi, M. Seki and Y. Doi:
Cloning and Characterization of the *Pseudomonas* sp. 61-3 *phaG* Gene Involved in Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis; *Biomacromolecules*, **2** 142-147 (2001)
- (2) S. Taguchi, A. Maehara, K. Takase, M. Nakahara, H. Nakamura and Y. Doi:
Analysis of Mutational Effects of a Polyhydroxybutyrate (PHB) Polymerase on Bacterial PHB Accumulation Using an in vivo Assay System; *FEMS Microbiol. Lett.*, **198** 65-71 (2001)
- (3) Y. Suzuki, S. Taguchi, T. Saito, K. Toshima, S. Matsumura and Y. Doi:
Involvement of Catalytic Amino Acid Residues in Enzyme-Catalyzed Polymerization for the Synthesis of Polyesters; *Biomacromolecules*, **2** 541-544 (2001)
- (4) A. Maehara, Y. Doi, T. Nishiyama, Y. Takagi, S. Ueda, H. Nakano and T. Yamane:
PhaR, a Protein of Unknown Function Conserved Among Short-Chain-Length Polyhydroxyalkanoic Acids Producing Bacteria, is a DNA-Binding Protein and Represses *Paracoccus denitrificans phaP* Expression in vitro; *FEMS Microbiol. Lett.*, **200** 9-15 (2001)
- (5) K. Matsumoto, S. Nakae, K. Taguchi, H. Matsusaki, M. Seki and Y. Doi:
Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) Copolymer from Sugars by Recombinant *Ralstonia eutropha* Harboring the *phaCl_{Ps}* and the *phaG_{Ps}* Genes of *Pseudomonas* sp. 61-3; *Biomacromolecules*, **2** 934-939 (2001)
- (6) K. Sudesh, K. Taguchi and Y. Doi:
Effect of Increased PHA Synthase Activity on Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC6803; *Int. J. Biol. Macromol.*, **30** 97-104 (2002)

- (7) T. Kichise, S. Taguchi and Y. Doi:
Enhanced Accumulation and Changed Monomer Composition in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Copolyester by In Vitro Evolution of *Aeromonas caviae* PHA Synthase; *Appl. Environ. Microbiol.*, **68** 2411-2419 (2002)
- (8) A. Maehara, S. Taguchi, T. Nishiyama, T. Yamane and Y. Doi:
A Repressor Protein, PhaR, Regulates Polyhydroxyalkanoate(PHA) Synthesis via Its Direct Interaction with PHA; *J. Bacteriol.*, **184** 3992-4002 (2002)
- (9) S. Taguchi, H. Nakamura, T. Hiraishi, I. Yamato and Y. Doi:
In Vitro Evolution of a Polyhydroxybutyrate Synthase by Intragenic Suppression-Type Mutagenesis; *J. Biochem.*, **131** 801-806 (2002)
- (10) K. Matsumoto, H. Matsusaki, K. Taguchi, M. Seki and Y. Doi:
Isolation and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Inclusions and Their Associated Proteins in *Pseudomonas* sp. 61-3; *Biomacromolecules*, **3** 787-792 (2002)
- (11) S. Taguchi, H. Matsusaki, K. Matsumoto, K. Takase, K. Taguchi and Y. Doi:
Biosynthesis of Biodegradable Polyesters from Renewable Carbon Sources by Recombinant Bacteria; *Polym. Int.*, **51** 899-906 (2002)
- (12) Y. Suzuki, M. Kurano, Y. Arai, H. Nakashita, Y. Doi, R. Usami, K. Horikoshi and I. Yamaguchi:
Enzyme Inhibitors to Increase Poly-3-hydroxybutyrate Production by Transgenic Tobacco; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66** 2537-2542 (2002)
- (13) K. Takase, S. Taguchi and Y. Doi:
Enhanced Synthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) in Recombinant *Escherichia coli* by Means of Error-Prone PCR Mutagenesis, Saturation Mutagenesis, and *In Vitro* Recombination of the Type II Polyhydroxyalkanoate Synthase Gene; *J. Biochem.* **133**, 139-145 (2003)

(14) S. Taguchi, H. Nakamura, T. Kichise, T. Tsuge I. Yamato and Y. Doi:

Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Renewable Carbon Sources in Recombinant *Ralstonia eutropha* Using Mutants of Original PHA Synthase; *Biochem. Eng. J.*, **16** 107-113 (2003)

(15) C. Nomura, K. Taguchi, S. Taguchi and Y. Doi:

Coexpression of Genetically Engineered 3-Ketoacyl-ACP Synthase III (*fabH*) and Polyhydroxyalkanoate Synthase (*phaC*) Genes Leads to Short-Chain-Length-Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Copolymer Production from Glucose in *Escherichia coli* JM 109; *Appl. Environ. Microbiol.*, **70** 999-1007 (2004)

(16) K. Takase, K. Matsumoto, S. Taguchi and Y. Doi:

Alteration of Substrate Chain-Length Specificity of Type II Synthase for Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis by in Vitro Evolution; in Vivo and in Vitro Enzyme Assays; *Biomacromolecules*, **5** 480-485 (2004)

(17) S. Taguchi and Y. Doi:

Evolution of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production System by “Enzyme Evolution”: Successful Case Studies of Directed Evolution; *Macromol. Biosci.* **4** 145-156 (2004)

(18) C. Nomura, T. Tanaka, Z. Gan, K. Kuwabara, H. Abe, K. Takase, K. Taguchi and Y. Doi:

Effective Enhancement of Short-Chain-Length-Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Copolymer Production by Coexpression of Genetically Engineered 3-Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein Synthase III (*fabH*) and Polyhydroxyalkanoate Synthesis Genes; *Biomacromolecules*, **5** 1457-1464 (2004)

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

(19) T. Hisano, T. Fukui, T. Iwata and Y. Doi:

Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of (*R*)-Specific Enoyl-CoA Hydratase from *Aeromonas caviae* Involved in Polyhydroxyalkanoate Biosyntheses; *Acta Cryst.*, **D57** 145-147 (2001)

- (20) H. Mitomo, W.-C. Hsieh, K. Nishiwaki, K. Kasuya and Y. Doi:
Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) Produced by *Comamonas acidovorans*; *Polymer*, **42**, 3455-3461 (2001)
- (21) T. Fukui, T. Kichise, T. Iwata and Y. Doi:
Characterization of 13 kDa Granule-Associated Protein in *Aeromonas caviae* and Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates with Altered Molar Composition by Recombinant Bacteria; *Biomacromolecules*, **2** 148-153 (2001)
- (22) H. Nakashita, Y. Arai, T. Shikanai, Y. Doi and I. Yamaguchi:
Introduction of Bacterial Metabolism into Higher Plants by Polycistronic Transgene Expression; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** 1688-1691 (2001)
- (23) Y. Arai, H. Nakashita, Y. Suzuki, Y. Kobayashi, T. Shimizu, M. Yasuda, Y. Doi and I. Yamaguchi:
Synthesis of a Novel Class of Polyhydroxyalkanoates in Arabidopsis Peroxisomes, and Their Use in Monitoring Short-Chain-Length Intermediates of β -Oxidation; *Plant Cell Physiol.*, **43** 555-562 (2002)
- (24) T. Fukui, H. Abe and Y. Doi:
Engineering of *Ralstonia eutropha* for Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from Fructose and Solid-State Properties of the Copolymer; *Biomacromolecules*, **3** 618-624 (2002)
- (25) K. Sudesh, Z. Gan, K. Matsumoto and Y. Doi:
Direct Observation of Polyhydroxyalkanoate Chains by Atomic Force Microscopy; *Ultramicroscopy*, **91** 157-164(2002)
- (26) T. Hisano, T. Tsuge, T. Fukui, T. Iwata, K. Miki and Y. Doi:
Crystal Structure of the (*R*)-Specific Enoyl-CoA Hydratase from *Aeromonas caviae* Involved in Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis; *J. Biol. Chem.*, **278** 617-624 (2003)

- (27) T. Tsuge, K. Taguchi, S. Yaguchi, and Y. Doi:
Molecular Characterization and Properties of (*R*)-Specific Enoyl-CoA Hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: Metabolic Tools for Synthesis of Polyhydroxyalkanoates via Fatty Acid β -Oxidation; *Int. J. Biol. Macromol.*, **31** 195-205 (2003)
- (28) M. Akiyama, T. Tsuge, and Y. Doi:
Environmental Life Cycle Comparison of Polyhydroxyalkanoates Produced from Renewable Carbon Resources by Bacterial Fermentation; *Polym. Degrad. Stab.*, **80** 183-194 (2003)
- (29) Y. Suzuki, S. Taguchi, T. Hisano, K. Toshima, S. Matsumura and Y. Doi:
Correlation between Structure of the Lactones and Substrate Specificity in Enzyme-Catalyzed Polymerization for the Synthesis of Polyesters; *Biomacromolecules*, **4** 537-543 (2003)
- (30) L. Feng, T. Watanabe, Y. He, Y. Wang, T. Kichise, T. Fukuchi, G-Q. Chen, Y. Doi and Y. Inoue:
Phase Behavior and Thermal Properties for Binary Blends of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate)s with Narrow-Monomer-Unit Compositional Distribution; *Macromol. Biosci.*, **3** 310-319 (2003)
- (31) S. J. Park, J. P. Park, S. Y. Lee and Y. Doi:
Enrichment of Specific Monomer in Medium-Chain-Length Poly(3-hydroxyalkanoates) by Amplification of *fadD* and *fadE* Genes in Recombinant *Escherichia coli*; *Enzyme and Microbial Technology* **33** 62-70 (2003)
- (32) T. Tsuge, T. Hisano, S. Taguchi and Y. Doi:
Alteration of Chain Length Substrate Specificity of *Aeromonas caviae* *R*-Enantiomer-Specific Enoyl-Coenzyme A Hydratase through Site-Directed Mutagenesis; *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** 4830-4836 (2003)

- (33) T. Tsuge, M. Akiyama and Y. Doi:
Life Cycle Inventory Analysis of Bio-based Polyester Production by Genetically Engineered Bacteria from Renewable Carbon Sources: "Ecomaterials and Ecoprocesses" Ed. By M. Mostaghaci, Met. Soc., 281-293 (2003)
- (34) Y. Suzuki, M. Kurano, Y. Esumi, I. Yamaguchi and Y. Doi:
Biosynthesis of 5-alkylresorcinol in Rice: Incorporation of a Putative Fatty Acid Unit in the 5-Alkylresorcinol Carbon Chain; *Bioorganic Chemistry*, **31** 437-452 (2003)
- (35) P. Kahar, T. Tsuge, K. Taguchi and Y. Doi:
High Yield Production of Polyhydroxyalkanoates from Soybean Oil by *Ralstonia eutropha* and Its Recombinant Strain; *Polym. Degrad. Stab.*, **83** 79-86 (2004)
- (36) K. Sudesh, A. Maehara, Z. Gan, T. Iwata and Y. Doi:
Direct Observation of Polyhydroxyalkanoate Granule-Associated-Proteins on Native Granules and on Poly(3-hydroxybutyrate) Single Crystals by Atomic Force Microscopy; *Polym. Degrad. Stab.*, **83** 281-287 (2004)
- (37) T. Tsuge, S. Imazu, K. Takase, S. Taguchi and Y. Doi:
An Extra Large Insertion in the Polyhydroxyalkanoate Synthase from *Delftia acidovorans* DS-17: Its Deletion Effects and Relation to Cellular Proteolysis; *FEMS Microbiol. Lett.*, **231** 77-83 (2004)
- (38) T. Tsuge, Y. Saito, Y. Kikkawa, T. Hiraishi and Y. Doi:
Biosynthesis and Compositional Regulation of Poly[(3-hydroxybutyrate)-*co*-(3-hydroxyhexanoate)] in Recombinant *Ralstonia eutropha* Expressing Mutated Polyhydroxyalkanoate Synthase Genes; *Macromol. Biosci.* **4** 238-242 (2004)
- (39) T. Tsuge, Y. Kikkawa and Y. Doi:
Microbial Synthesis and Enzymatic Degradation of Renewable Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate-*co*-(*R*)-3-hydroxyhexanoate]; *Science and Technology of Advanced Materials*, **5** 449-453 (2004)

- (40) T. Tsuge, Y. Saito, M. Narike, K. Muneta, Y. Normi, Y. Kikkawa, T. Hiraishi and Y. Doi:
Mutation Effects of a Conserved Alanine (Ala510) in Type I Polyhydroxyalkanoate Synthase
from *Ralstonia eutropha* on Polyester Biosynthesis-; *Macromol. Biosci.* **4** 963-970 (2004)

3. 高分子加水分解酵素の構造と機能に関する研究

- (41) K. Yamashita, Y. Aoyagi, H. Abe and Y. Doi:
Analysis of Adsorption Function of Polyhydroxybutyrate Depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1
by Using a Quartz Crystal Microbalance; *Biomacromolecules*, **2** 25-28 (2001)
- (42) Y. He, X. Shuai, A. Cao, K. Kasuya, Y. Doi and Y. Inoue:
Enzymatic Biodegradation of Synthetic Atactic Poly(*R,S*-3-hydroxybutyrate) Enhanced by an
Amorphous Nonbiodegradable Polymer; *Polym. Degrad. Stab.*, **73** 193-199 (2001)
- (43) Y. He, X. Shuai, K. Kasuya, Y. Doi and Y. Inoue:
Enzymatic Degradation of Atactic Poly(*R,S*-3-hydroxybutyrate) Induced by Amorphous Polymers and
the Enzymatic Degradation Temperature Window of an Amorphous Polymer System;
Biomacromolecules, **2** 1045-1051 (2001)
- (44) K. Tabata, M. Kajiyama, T. Hiraishi, H. Abe, I. Yamato and Y. Doi:
Purification and Characterization of Poly (aspartic acid) Hydrolase from *Sphingomonas* sp. KT-1;
Biomacromolecules, **2** 1155-1160 (2001)
- (45) Y. Aoyagi, K. Yamashita and Y. Doi:
Thermal Degradation of Poly[*(R)*-3-hydroxybutyrate], Poly[ϵ -caprolactone], and Poly[*(S)*-lactide];
Polym. Degrad. Stab., **76** 53-59 (2002)
- (46) Y. Wang, Y. Inagawa, T. Saito, K. Kasuya, Y. Doi and Y. Inoue:
Enzymatic Hydrolysis of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxypropionate)s by
Poly(3-hydroxyalkanoate) Depolymerase from *Acidovorax* Sp. TP4; *Biomacromolecules*, **3** 828-834
(2002)

- (47) Y. Wang, Y. Inagawa, Y. Osanai, K. Kasuya, T. Saito, S. Matsumura, Y. Doi and Y. Inoue:
Enzymatic Hydrolysis of Chemosynthesized Atactic Poly(3-hydroxybutyrate) by
Poly(3-hydroxyalkanoate) Depolymerase from *Acidovorax* Sp. TP4 and *Ralstonia pickettii* T1;
Biomacromolecules, **3** 894-898 (2002)
- (48) N. Yoshie, Y. Oike, K. Kasuya, Y. Doi and Y. Inoue:
Change of Surface Structure of Poly(3-hydroxybutyrate) Film upon Enzymatic Hydrolysis by PHB
Depolymerase; *Biomacromolecules*, **3** 1320-1326 (2002)
- (49) T. Hiraishi, M. Kajiyama, K. Tabata, I. Yamato and Y. Doi:
Genetic Analysis and Characterization of Poly(aspartic acid) Hydrolase-1 from *Sphingomonas* sp.
KT-1; *Biomacromolecules*, **4** 80-86 (2003)
- (50) T. Hiraishi, M. Kajiyama, K. Tabata, H. Abe, I. Yamato and Y. Doi;
Biochemical and Molecular Characterization of Poly(aspartic acid) Hydrolase-2 from *Sphingomonas*
sp. KT-1; *Biomacromolecules*, **4** 1285-1292 (2003)
- (51) K. Kasuya, T. Takano, Y. Tezuka, W.-C. Hsieh, H. Mitomo and Y. Doi:
Cloning, Expression and Characterization of a Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase from
Marinobacter sp. NK-1; *Biological Macromolecules*, **33** 221-226 (2003)
- (52) K. Yamashita, T. Funato, Y. Suzuki, S. Teramachi and Y. Doi:
Characteristic Interactions between Poly(hydroxybutyrate) Depolymerase and
Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Films Studied by a Quartz Crystal Microbalance; *Macromol. Biosci.* **3**
694-702 (2003)
- (53) T. Hiraishi, M. Kajiyama, I. Yamato and Y. Doi:
Enzymatic Hydrolysis of α - and β -Oligo(L-aspartic acid)s by Poly(aspartic acid) Hydrolases-1 and 2
from *Sphingomonas* sp. KT-1; *Macromol. Biosci.* **4** 330-339 (2004)

(54) Y. Kikkawa, M. Fujita, T. Hiraishi, M. Yoshimoto and Y. Doi:

Direct Observation of Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase Adsorbed on Polyester Thin Film by Atomic Force Microscopy; *Biomacromolecules*, **5** 1642-1646 (2004)

4. 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

(55) T. Iwata and Y. Doi:

Alkaline Hydrolysis of Solution-Grown Poly(L-lactic acid) Single Crystals; *繊維学会誌*, **57** 172-177 (2001)

(56) Y. Furuhashi, T. Iwata and Y. Doi:

Enzymatic Degradation and Adsorption on Solution-Grown Lamellar Crystals of Poly(β -propiolactone) with an Extracellular PHB Depolymerase; *繊維学会誌*, **57** 184-190 (2001)

(57) T. Fujiwara, M. Miyamoto, Y. Kimura, T. Iwata and Y. Doi:

Self-Organization of Diblock and Triblock Copolymers of Poly(L-lactide) and Poly(oxyethylene) into Nanostructured Bands and Their Network System. Proposition of a Doubly Twisted Chain Conformation of Poly(L-lactide); *Macromolecules*, **34** 4043-4050 (2001)

(58) W-K. Lee, T. Iwata, F. Su, Y. Furuhashi and Y. Doi:

Visualization of the Recrystallization of Solution-Grown Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] Lamellar Crystals; *Macromol. Rapid Commun.*, **22** 629-632 (2001)

(59) T. Murase, T. Iwata and Y. Doi:

Direct Observation of Enzymatic Degradation Behavior of Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] Lamellar Single Crystals by Atomic Force Microscopy; *Macromolecules*, **34** 5848-5853 (2001)

(60) F. Su, T. Iwata, K. Sudesh and Y. Doi:

Electron and X-ray Diffraction Study on Poly(4-hydroxybutyrate); *Polymer*, **42** 8915-8918 (2001)

- (61) Y. Furuhashi, P. Sikorski, E. Atkins, T. Iwata and Y. Doi:
Structure and Morphology of the Aliphatic Polyester Poly(δ -valerolactone) in Solution-Grown, Chain-Folded Lamellar Crystals; *J. Polym. Sci., Polym. Phys.* **39** 2622-2634 (2001)
- (62) T. Iwata, Y. Doi, K. Isono and Y. Yoshida:
Morphology and Enzymatic Degradation of Solution-Grown Single Crystals of Poly(ethylene succinate); *Macromolecules*, **34** 7343-7348 (2001)
- (63) Y. Furuhashi, T. Iwata and Y. Doi:
Morphology of Solution-Grown Poly(β -propiolactone) Single Crystals; *J. Mater. Sci.*, **36** 4307-4313 (2001)
- (64) T. Murase, T. Iwata and Y. Doi
Atomic Force Microscopy Investigation of Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] Lamellar Single Crystals: Relationship between Molecular Weight and Enzymatic Degradation Behavior; *Macromol. Biosci.*, **1** 275-281 (2001)
- (65) T. Murase, Y. Suzuki, Y. Doi and T. Iwata:
Nonhydrolytic Fragmentation of a Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] Single Crystal Revealed by Use of a Mutant of Polyhydroxybutyrate Depolymerase; *Biomacromolecules*, **3** 312-317 (2002)
- (66) T. Iwata, M. Shiromo and Y. Doi:
Surface Structures of Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] and Its Copolymer Single Crystals Before and After Enzymatic Degradation with an Extracellular PHB Depolymerase; *Macromol. Chem. Phys.*, **203** 1309-1316 (2002)
- (67) T. Iwata and Y. Doi:
Morphology and Enzymatic Degradation of Poly(ϵ -caprolactone) Single Crystals: Does a Polymer Single Crystal Consist of Micro-crystals?; *Polym. Int.*, **51** 852-858 (2002)

- (68) Y. Aoyagi, Y. Doi and T. Iwata:
Mechanical Properties and Highly Ordered Structure of Ultra-High-Molecular-Weight Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] Films: Effects of Annealing and Two-Step Drawing; *Polym. Degrad. Stab.*, **79** 209-216 (2003)
- (69) T. Iwata, K. Tsunoda, Y. Aoyagi, S. Kusaka, N. Yonezawa and Y. Doi:
Mechanical Properties of Uniaxially Cold-Drawn Films of Poly([*R*]-3-hydroxybutyrate); *Polym. Degrad. Stab.*, **79** 217-224 (2003)
- (70) M. Enoki, Y. Doi and T. Iwata:
Oxidative Degradation of *cis*- and *trans*- 1,4-Polyisoprenes and Vulcanized Natural Rubber with Enzyme-Mediator Systems; *Biomacromolecules*, **4** 314-320 (2003)
- (71) F. Su, T. Iwata, F. Tanaka and Y. Doi:
Crystal Structure and Enzymatic Degradation of Poly(4-hydroxybutyrate); *Macromolecules*, **36** 6401-6409 (2003)
- (72) Y. Furuhashi, T. Iwata, Y. Kimura and Y. Doi:
Structural Characterization and Enzymatic Degradation of α -, β -, and γ -Crystalline Forms for Poly(β -propiolactone); *Macromol. Biosci.*, **3** 462-470 (2003)
- (73) M. Enoki, Y. Doi and T. Iwata:
Oxidative Degradation of *trans*-1,4-Polyisoprene Cast Films and Single Crystals by Enzyme-Mediator Systems; *Macromol. Biosci.* **3** 668-674 (2003)
- (74) J. Fischer, Y. Aoyagi, M. Enoki, Y. Doi and T. Iwata:
Mechanical Properties and Enzymatic Degradation of Poly([*R*]-3-hydroxybutyrate-*co*-[*R*]-3-hydroxyhexanoate) Uniaxially Cold-Drawn Films; *Polym. Degrad. Stab.*, **83** 453-460 (2004)

- (75) T. Iwata, S. Kobayashi, K. Tabata, N. Ynezawa and Y. Doi:
Crystal Structure, Thermal Behavior and Enzymatic Degradation of Poly(tetramethylene adipate) Solution-Grown Chain-Folded Lamellar Crystals; *Macromol. Biosci.* **4** 296-307 (2004)
- (76) M. Enoki, S. Kaita, Y. Wakatsuki, Y. Doi and T. Iwata:
Oxidative Degradation of *cis*- and *trans*- 1,4-Polybutadienes by Horseradish Peroxidase/1-Hydroxybenzotriazole; *Polym. Degrad. Stab.*, **84** 321-326 (2004)
- (77) T. Iwata, Y. Aoyagi, M. Fujita, H. Yamane, Y. Doi, Y. Suzuki, A. Takeuchi and K. Uesugi:
Processing of a Strong Biodegradable Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] Fiber and a New Fiber Structure Revealed by Micro-Beam X-Ray Diffraction with Synchrotron Radiation; *Macromol. Rapid Commun.*, **25** 1100-1104 (2004)
- (78) J. Park, Y. Doi and T. Iwata:
Uniaxial Drawing and Mechanical Properties of Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate]/Poly(L-lactic acid) Blends; *Biomacromolecules*, **5** 1557-1566 (2004)
- (79) E. Kim, H. Uyama, Y. Doi, C.-S. Ha and T. Iwata:
Crystal Structure and Morphology of Poly(11-undecalactone) Solution-Grown Single Crystals; *Macromolecules*, **37** 7258-7264 (2004)
- (80) F. Tanaka, Y. Doi and T. Iwata:
The Deformation of the Chain Molecules and Crystallites in Poly([*R*]-3-hydroxybutyrate) and Poly(4-hydroxybutyrate) under Tensile Stress; *Polymer Degradation and Stability*, **85** 893-901 (2004)
- (81) T. Tanaka, Y. Aoyagi, Y. Doi and T. Iwata:
Processing of Strong Fibers of Microbial Biodegradable Aliphatic Polyesters -Drawing and Annealing Conditions of Polyhydroxyalkanotes Fibers-; *SEN'I GAKKAISHI*, **60** 309-315 (2004)

5. バイオポリエステルの分解性制御技術の開発

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

In Situ Observation of Lamellar Growth in Thin Films for Poly[(*R*)-3-hydroxybutyric acid-*co*-6-hydroxyhexanoic acid] at a High Crystallization Temperature of 110°C by Atomic Force Microscopy; *Polymer*, **42** 2707-2710 (2001)

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

Crystallization, Melting and Enzymatic Degradation of Biodegradable Poly(butylene succinate-*co*-14 mol% ethylene succinate) Copolyester; *Biomacromolecules*, **2** 313-321 (2001)

(84) Z. Gan, H. Abe, H. Kurokawa and Y. Doi:

Solid-State Microstructures, Thermal Properties, and Crystallization of Biodegradable Poly(butylene succinate) (PBS) and Its Copolyesters; *Biomacromolecules*, **2** 605-613 (2001)

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

In Situ Observation of Crystal Growth for Poly[(*S*)-lactide] by Temperature-Controlled Atomic Force Microscopy; *Biomacromolecules*, **2** 940-945 (2001)

(86) H. Abe, Y. Kikkawa, Y. Inoue and Y. Doi:

Morphological and Kinetic Analyses of Regime Transition for Poly[(*S*)-lactide] Crystal Growth; *Biomacromolecules*, **2** 1007-1014 (2001)

(87) H. Abe and Y. Doi:

Crystalline Morphology and Thermal Properties for Random Copolymers of (*R*)-3-Hydroxybutyric Acid with Different Hydroxyalkanoic Groups; *Macromol.Symp.*, **174** 43-50 (2001)

(88) H. Abe and Y. Doi:

Side-Chain Effect of Second Monomer Units on Crystalline Morphology, Thermal Properties, and Enzymatic Degradability for Random Copolyesters of (*R*)-3-Hydroxybutyric Acid with (*R*)-3-Hydroxyalkanoic Acids; *Biomacromolecules*, **3** 133-138 (2002)

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

Crystallization, Stability, and Enzymatic Degradation of Poly(L-lactide) Thin Film; *Biomacromolecules*, **3** 350-356 (2002)

(90) K. Kuwabara, Z. Gan, T. Nakamura, H. Abe and Y. Doi:

Crystalline/Amorphous Phase Structure and Molecular Mobility of Biodegradable Poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate) and Related Polyesters; *Biomacromolecules*, **3** 390-396 (2002)

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

Crystal Morphologies and Enzymatic Degradation of Melt-Crystallized Thin Films of Random Copolyesters of (*R*)-3-hydroxybutyric Acid with (*R*)-3-hydroxyalkanoic Acids; *Polym. Degrad. Stab.*, **76** 467-478 (2002)

(92) K. Sudesh, Z. Gan, A. Maehara and Y. Doi:

Surface Structure, Morphology and Stability of Polyhydroxyalkanoate Inclusions Characterised by Atomic Force Microscopy; *Polym. Degrad. Stab.*, **77** 77-85 (2002)

(93) K. Kuwabara, Z. Gan, T. Nakamura, H. Abe and Y. Doi:

Molecular Mobility and Phase Structure of Biodegradable Poly(butylene succinate) and Poly(butylene succinate-co-butylene adipate); *Biomacromolecules*, **3** 1095-1100 (2002)

(94) L. Feng, T. Watanabe, Y. Wang, T. Kichise, T. Fukuchi, G. Chen, Y. Doi and Y. Inoue:

Studies on Comonomer Compositional Distribution of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)s and Thermal Characteristics of Their Fractions; *Biomacromolecules*, **3** 1071-1077 (2002)

- (95) Y. H. Na, Y. He, X. Shuai, Y. Kikkawa, Y. Doi and Y. Inoue:
Compatibilization Effect of Poly(ϵ -caprolactone)-*b*-poly(ethylene glycol) Block Copolymers and Phase Morphology Analysis in Immiscible Poly(lactide)/Poly(ϵ -caprolactone) Blends; *Biomacromolecules*, **3** 1179-1186 (2002)
- (96) Z. Gan, H. Abe and Y. Doi:
Temperature-Induced Polymorphic Crystals of Poly(butylene adipate); *Macromol. Chem. Phys.*, **203** 2369-2374 (2002)
- (97) Y. Kikkawa, T. Murase, H. Abe, T. Iwata, Y. Inoue and Y. Doi:
Real-Time Enzymatic Degradation Study of Poly[(*R*)-3-hydroxybutyric acid] Copolymer Thin Film by Atomic Force Microscopy in Buffer Solution; *Macromol. Biosci.*, **2** 189-194 (2002)
- (98) M. Fujita, T. Iwata and Y. Doi:
In situ Observation of Heterogeneous Melting of Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals by Temperature-controlled Atomic Force Microscopy; *Polym. Degrad. Stab.*, **81** 131-139 (2003)
- (99) Y. Kikkawa, H. Abe, M. Fujita, T. Iwata, Y. Inoue and Y. Doi:
Crystal Growth in Poly(L-lactide) Thin Film Revealed by in situ Atomic Force Microscopy; *Macromol. Chem. Phys.* **204** 1822-1831 (2003)
- (100) M. Fujita and Y. Doi:
Annealing and Melting Behavior of Poly (L-lactic acid) Single Crystals as Revealed by In Situ Atomic Force Microscopy; *Biomacromolecules*, **4** 1301-1307 (2003)
- (101) Z. Gan, K. Kuwabara, H. Abe and Y. Doi:
The Solid-State Structure, Thermal and Crystalline Properties of Bacterial Copolyesters of (*R*)-3-Hydroxybutyric Acid with (*R*)-3-Hydroxyhexanoic Acid; "Biodegradable Polymers and Plastics" Ed. By E. Chiellini and R. Solaro 167-182 (2003)

- (102) Z. Gan, K. Kuwabara, M. Yamamoto, H. Abe and Y. Doi:
Solid-State Structures and Thermal Properties of Aliphatic-Aromatic Poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate) Copolyesters; *Polym. Degrad. Stab.*, **83** 289-300 (2004)
- (103) Z. Gan, K. Kuwabara, H. Abe, T. Iwata and Y. Doi:
Metastability and Transformation of Polymorphic Crystals in Biodegradable Poly(butylene adipate); *Biomacromolecules*, **5** 371-378 (2004)
- (104) Y. Kobori, T. Iwata, Y. Doi and H. Abe:
Synthesis, Solid-State Structure, and Surface Properties of End-Capped Poly(L-lactide); *Biomacromolecules*, **5** 530-536 (2004)
- (105) K. Kuwabara, Z. Gan, T. Nakamura, H. Abe and Y. Doi:
Molecular Mobility and Crystalline Phase Structure of Biodegradable Poly[(*R*)-3-hydroxybutyric acid-co-(*R*)-3-hydroxyhexanoic acid]; *Polym. Degrad. Stab.*, **84** 135-141 (2004)
- (106) Y. Kikkawa, T. Hirota, K. Numata, T. Tsuge, H. Abe, T. Iwata and Y. Doi:
In-Situ Atomic Force Microscopy Observation of Enzymatic Degradation in Poly(hydroxyalkanoic acid) Thin Films: Normal and Constrained Conditions; *Macromol. Biosci.* **4** 276-285 (2004)
- (107) K. Kuwabara, Z. Gan, T. Nakamura, H. Abe and Y. Doi:
Temperature Dependence of the Molecular Motion in the Crystalline Region of Biodegradable Poly(butylene adipate), Poly(ethylene succinate), and Poly(butylene succinate); *Polym. Degrad. Stab.*, **84** 105-114 (2004)
- (108) Y. Kikkawa, M. Fujita, H. Abe and Y. Doi:
Effect of Water on the Surface Molecular Mobility of Poly(lactide) Thin Films: An Atomic Force Microscopy Study; *Biomacromolecules*, **5** 1187-1193 (2004)

- (109) H. Abe, N. Takahashi, K. Kim, M. Mochizuki and Y. Doi:
Effects of Residual Zinc Compounds and Chain-End Structure on Thermal Degradation of Poly(ϵ -caprolactone); *Biomacromolecules*, **5** 1480-1488 (2004)
- (110) H. Abe, N. Takahashi, K. Kim, M. Mochizuki and Y. Doi:
Thermal Degradation Processes of End-Capped Poly(L-lactide)s in the Presence and Absence of Residual Zinc Catalyst; *Biomacromolecules*, **5** 1606-1614 (2004)
- (111) H. Abe and Y. Doi:
Novel Biodegradable Copolymers with a Periodic Sequence Structure Derived from Succinate Butan-1,4-diol, and Butan-1,4-diamine; *Macromolecular Rapid Communications*, **25** 1303-1308 (2004)
- (112) M. Fujita, Y. Takikawa, S. Teramachi, Y. Aoyagi, T. Hiraishi and Y. Doi:
Morphology and Enzymatic Degradation of Oriented Thin Film of Ultrahigh Molecular Weight Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate]; *Biomacromolecules*, **5** 1787-1791 (2004)

8. 結び

戦略的基礎研究 (CREST) プロジェクトの5年間と継続研究 (SORST) プロジェクトの4年間の計9年間にわたり、微生物のポリエステル生産機能を利用して、再生可能な植物資源 (糖や植物油) から生分解性ポリエステルを高効率で生産し、それらバイオポリエステルを高性能材料化するための基礎研究を進めてきた。環境低負荷型の高分子物質生産システムを開発することが、持続可能な社会と新しい高分子産業を構築する上で重要な基礎研究課題であると考え、高分子科学と分子生物学との異分野の研究者の共同作業で新しい研究領域の開拓を行ってきた。

とくに、分子生物学と高分子科学との出会いによって、高性能材料となる分子構造の生分解性ポリエステルを高収率・高速度で生合成する酵素をタンパク工学的あるいは進化工学的手法を用いて設計し創出することに成功した。CRESTの5年間は、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、高生産微生物の分子育種に関する遺伝子工学的研究を進め、遺伝子組換え微生物を用いて植物油からバイオポリエステルを生産する基礎・基盤技術を確立した。SORSTの4年間では、生合成関連酵素の構造と機能の相関を調べ、酵素の重合活性や基質特異性を制御する基礎技

術を開発した。これらの成果は、80年の歴史をもつバイオポリエステル研究において第3世代研究の幕開けとして国際的に高い評価を得ている。

また、遺伝子組換え大腸菌を用いると糖から超高分子量ポリエステルが生合成できることを発見し、ついで超高分子量ポリエステルの熔融紡糸時に冷延伸技術を適用することによって、極めて高強度の生分解性ポリエステル繊維を作製できることを見出した。さらに、バイオポリエステル超薄膜フィルムや繊維の酵素分解過程を原子間力顕微鏡AFMを用いて“その場”観察する手法を開発し、結晶の生分解メカニズムを明らかにした。これらの知見をもとに、バイオポリエステル材料の生分解性制御技術を提案した。

現在、バイオポリエステルの生合成、遺伝子解析、酵素の構造解析と機能評価、高生産微生物の育種、効率的生産プロセスの開発、高強度材料化、高機能材料化、生分解メカニズムの解明に関するそれぞれの要素技術の基礎研究を進めている研究室や研究グループはアメリカ合衆国、ヨーロッパ、日本を中心に数多くあり、新しい生物化学産業の確立を目指して活発な研究活動が進められている。しかしながら、高分子科学と分子生物学との異分野の研究者の共同作業によって一連の研究を同一グループで推進しているのは、全世界でも東京工業大学・理化学研究所 SORST グループが唯一である。研究代表者の研究室は、バイオプラスチック研究の国際中核研究室となっている。

平成15年6月に発表された戦略的創造研究推進事業評価報告書（第二部資料編、211ページ）において、「この研究グループの成果から波及して、産業分野形成以外の大きな社会還元が現在までに派生している」項目に関し特に優れた研究者としてCREST研究代表者4名の名前が記載されているが、そのなかの一人として研究代表者（土肥義治、バイオプラスチック）が選出されている。

今後も、地球環境と調和する持続可能科学技術の開拓を目指して、生物科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、「高性能バイオプラスチック生産システムの確立」を実現し、社会還元への貢献のみならず、「この研究グループの成果から波及して、新たな産業分野が成長している」と評価されるよう努力したいと考えている。