

「環境低負荷型の社会システム」

平成7年度採択研究代表者

土肥 義治

(理化学研究所 主任研究員)

「環境低負荷型の高分子物質生産システムの開発」

1. 研究実施の概要

生物の物質生産機能を利用して、再生可能な生物有機資源（糖、植物油など）や二酸化炭素から優れた性能や特異な機能をもつ新しい高分子材料を創製する科学技術を開拓することは、持続可能な社会を実現する上で重要な課題である。地球上の生物は、生命活動を営むために、核酸、タンパク質、多糖、ポリエステルなど多種多様な高分子物質を合成している。これらの生体高分子は、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。

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

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

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

2. 研究実施内容

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

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

とによって、「環境低負荷型の高分子物質生産システム」という新しい産業の基盤技術を確認する。

(1) 新規ポリエステルの生物合成と高生産生物の育種

- ① 新規ポリエステルを合成する3種の細菌 (*Aeromonas caviae*, *Pseudomonas* sp., *Comamonas acidovorans*) について、ポリエステル生合成に関与する酵素の遺伝子の取得と解析を行った。
- ② 微生物体内でポリエステル微粒子が形成される過程を電子顕微鏡を用いて観察し、ポリエステル生合成機構を形態学的側面から解明した。
- ③ *Pseudomonas* sp. から2種類のポリエステル合成酵素遺伝子を取得し、各合成酵素の基質特異性を詳細に調べるとともに、高性能共重合ポリエステルの効率的生産法の確立をめざして遺伝子工学的検討を行った。
- ④ *Aeromonas caviae* からモノマー供給酵素 (R-特異性エノイル-CoA ヒドラターゼ) 遺伝子を取得し、その酵素の構造と性質を調べた。さらに、ヒドラターゼ酵素の結晶化に成功した。
- ⑤ ポリエステル生合成酵素の遺伝子操作によって糖類、植物油、有機酸から共重合ポリエステルを高効率で生産する微生物 (*Alcaligenes eutrophus*, 大腸菌) を育種した。
- ⑥ 炭酸ガスからの新規ポリエステルの生物生産をめざして、植物体へのポリエステル生合成系遺伝子の導入を試みた。

(2) 生分解性ポリエステルの材料設計と機能開発

- ① 理化学研究所で開発してきた新しいバイオ (共重合) ポリエステルの高分子鎖微細構造を解析し、分子構造と物性との相関関係を明らかにした。
- ② バイオポリエステルフィルムを各種条件下で熔融結晶化法により作製し、フィルムの表面構造および固体構造を解析した。バイオポリエステルの高次構造を制御できる材料設計技術の開発を試みた。
- ③ バイオポリエステルの単結晶を作製して、それらの分子構造を解析した。作製した単結晶を用いて酵素分解反応を行い、結晶表面への酵素吸着および酵素分解反応過程を観察して、ポリエステルの酵素分解機構を調べた。
- ④ バイオポリエステルの超薄膜結晶を作製し、その表面および固体構造を調べた。さらに、超薄膜結の酵素分解反応を行い、構造と酵素分解速度との相関を調べた。

(3) ポリエステル加水分解酵素の構造解析と機能解明

- ① 2種の微生物 (*Pseudomonas stutzeri*, *Comamonas acidovorans*) のポリエステル加水分解酵素の遺伝子を取得・解析し、分解酵素の一次構造を明らかにするとともに、酵素の構造と機能との関係を調べた。
- ② 遺伝子工学的手法を用いて、加水分解酵素の各ドメインとグルタチオン S-ト

ランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質を作製し、各ドメインの機能を詳細に調べた。さらに、各種の3-ヒドロキシブタン酸オリゴマーを合成し、酵素分解活性とオリゴマー鎖長との相関を調べた。

- ③ ポリ乳酸の分解微生物を単離するとともに、ポリ乳酸の酵素分解メカニズムを調べた。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○T. Fukui, N. Shiomi and Y. Doi:

Expression and Characterization of (R)-Specific Enoyl Coenzyme A Hydratase Involved in Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis by *Aeromonas caviae*; J. Bacteriol., 180 667-673(1998)

○H. Abe, Y. Doi, H. Aoki and T. Akehata:

Solid-State Structures and Enzymatic Degradabilities for Melt-Crystallized Films of Copolymers of (R)-3-Hydroxybutyric Acid with Different Hydroxyalkanoic Acids; Macromolecules, 31 1791-1797(1998)

○T. Iwata and Y. Doi:

Morphology and Enzymatic Degradation of Poly(L-lactic acid) Single Crystals; Macromolecules, 31 2461-2467(1998)

○H. Abe, H. Aoki and Y. Doi:

Morphologies and Enzymatic Degradability of Melt-Crystallized Poly(3-hydroxybutyric acid-co-6-hydroxyhexanoic acid); Macromol. Symp., 130 81-89(1998)

○T. Fukui and Y. Doi:

Efficient Production of Polyhydroxyalkanoates from Plant Oils by *Alcaligenes eutrophus* and Its Recombinant Strain; Appl. Microbiol. Biotechnol., 49 333-336(1998)

○K. Kasuya, K. Takagi, S. Ishiwatari, Y. Yoshida and Y. Doi:

Biodegradabilities of Various Aliphatic Polyesters in Natural Waters; Polym. Degrad. Stab., 59 327-332(1998)

○A. Cao, K. Kasuya, H. Abe, Y. Doi and Y. Inoue:

Studies on Comonomer Compositional Distribution of the Bacterial Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypropionic acid)s and Thermal Characteristics of Their Fractionated Component Copolyesters; Polymer, 20 4801-4816(1998)

○M. Shinomiya, T. Iwata and Y. Doi:

The Adsorption of Substrate-Binding Domain of PHB Depolymerases to the

Surface of Poly(3-hydroxybutyric acid); Int. J. Biol. Macromol., 22 129-135(1998)

○J. Li, J. Uzawa and Y. Doi:

Conformational Analysis of Oligomers of (R)-3-Hydroxybutanoic Acid in Solutions by ^1H NMR Spectroscopy; Bull. Chem. Soc. Jpn., 71 1683-1689(1998)

○J. Li, J. Uzawa and Y. Doi:

NMR Spectroscopic Studies on Complex Formation Between Dimeric (R)-3-Hydroxybutanoic Acid and β -Cyclodextrin; Bull. Chem. Soc. Jpn., 71 1953-1957(1998)

○T. Fukui, M. Kato, H. Matsusaki, T. Iwata and Y. Doi:

Morphological and ^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance Studies for Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis in *Pseudomonas* sp. 61-3; FEMS Microbiol. Lett., 164 219-225(1998)

○S. Kusaka, T. Iwata and Y. Doi:

Microbial Synthesis and Physical Properties of Ultra-High-Molecular-Weight Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]; J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem., A35 319-335(1998)

○K. Sudesh, T. Fukui and Y. Doi:

Genetic Analysis of *Comamonas acidovorans* Polyhydroxyalkanoate Synthase and Factors Affecting the Incorporation of 4-Hydroxybutyrate Monomer; Appl. Environ. Microbiol., 64 3437-3443(1998)

○H. Matsusaki, S. Manji, K. Taguchi, M. Kato, T. Fukui and Y. Doi:

Cloning and Molecular Analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) Biosynthesis Genes in *Pseudomonas* sp. Strain 61-3; J. Bacteriol., 180 6459-6467(1998)

○S. Matsumura, Y. Suzuki, K. Tsukada, K. Toshima, Y. Doi and K. Kasuya:

Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of β -Butyrolactone to the Cyclic and Linear Poly(3-hydroxybutyrate); Macromolecules, 31 6444-6449(1998)