

2018年度 生物工学技術賞 受賞

微生物による生分解性ポリマー PHBH 製造法の開発

佐藤 俊輔^{1*}・有川 尚志¹・小林 新吾¹・藤木 哲也²・松本 圭司³

Process development of biodegradable polymer PHBH

Shunsuke Sato¹, Hisashi Arikawa¹, Shingo Kobayashi¹, Tetsuya Fujiki², Keiji Matsumoto³ (¹Biotechnology Research Laboratories, KANEKA CORPORATION, 1-8, Miyamae-cho, Takasago-cho, Takasago, Hyogo, 676-8688, ²Corporate R&D Planning Department, KANEKA CORPORATION, 2-3-18, Nakanoshima, Kita-ku, Osaka, 530-8288, ³Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1, Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871) Seibutsu-kogaku 97: 66-74, 2019.



はじめに

1900年代にプラスチックが商業化されたことにより、人々の生活は飛躍的に便利になった。たとえば、スーパーのレジ袋、車の部品、PETボトルや食品トレーなどの食品容器、飲料用ストロー、電子機器の筐体など、軽くて丈夫なプラスチック製品は身の回りに当たり前に存在し、利用する我々はその恩恵を受けている。1950年に約200万トンであったプラスチック樹脂の生産量は2015年には約4億トンにまで増加し、さらに年率約8.4%もの勢いでその生産量を増加させている¹⁾。

1970年代以降、廃棄物埋め立て処分場の不足などが問題となったことから、生分解性プラスチックの研究開発が活発に行われた。1997年の京都議定書採択以降は、地球温暖化対策として、再生可能資源である植物由来原料から製造されるバイオマスプラスチックの開発が加速されている。しかしながら、正しく処分されずに廃棄されたプラスチックや、風雨などの自然現象により環境中に放出されたプラスチックが最終的に河川を通過し、または直接、大量に海洋に流出・蓄積しているのが現状である。これら流出プラスチックを海生生物や鳥などが誤飲・誤食したことによる悲惨な被害に加え、紫外線や波力によって5 mm以下に断片化したプラスチック片(マ

イクロプラスチック)による有害物質の吸着、濃縮といった問題も近年注目されている²⁻⁴⁾。2050年には、海洋に漂うプラスチックの量が重量ベースで魚の重量を上回ることが報告され、漁獲量の急減など、食料、経済問題にまで発展することが国際的に大きな議論になっている。

UNEP(国際環境プロジェクト)のレポートによると、一般的な生分解性プラスチックは、50°Cを超える工業コンポスト条件では加水分解が促進されることで分解されるものの、実海洋環境での生分解性は十分ではないと報告されている⁵⁾。このような状況の中、欧州においては、使い捨てプラスチック製品の生産制限に関するEU指令の準備が進むなど、プラスチック製品のあり方が問われる時代が到来しつつある。最近では、マクドナルドやスターバックスがプラスチック製ストローを廃止することを発表し、大きな注目を集めている。このような社会問題への解決方法を提供すべく、株式会社カネカでは、自然環境で分解するバイオマス由来生分解性プラスチックの実用化を進めている。

ポリヒドロキシアルカノエート(PHA)

ポリヒドロキシアルカノエート(PHA)は、1926年にフランス人研究者Lemoigneによって発見されたバクテリアによって産生されるポリエステルである(図1)⁶⁾。

*著者紹介 (株)カネカ E-mail: Shunsuke.Sato@kaneka.co.jp

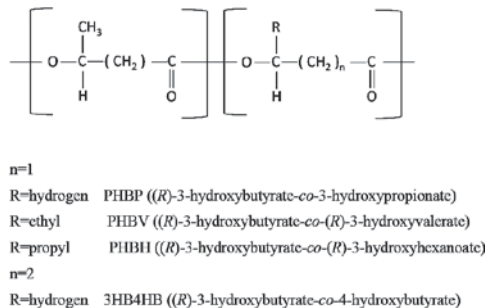


図1. 共重合ポリヒドロキシアルカノエート (PHA) の構造

PHAはバクテリアが炭素ならびにエネルギーの貯蔵物質として生産、蓄積する物質であり、もっとも一般的なものは、Lemoigneが発見した(R)-3-hydroxybutyrate (3HB) のホモポリマー、poly(3-hydroxybutyrate) (以下、PHB) である。PHBは融点や引張強度がポリプロピレンに近く、環境調和型素材としての利用が期待されたものの、融点(約177°C)が熱分解温度(185°C)に近く、プロセスウィンドウ(10°C)が狭いことから熱可塑性樹脂として実用化するうえで致命的な弱点を有している。また、PHBは結晶化度が高く、硬くて脆い物性であるため、適用範囲が制限されることから普及には至らなかった。このため、PHBをより広範な用途に適した物性に改良するために、各社は3HBに第2モノマー成分を導入した共重合ポリエステルを開発している。たとえば、Tianjin GreenBio Material社(中国)は4-hydroxybutyrateを共重合モノマーとするpoly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), P(3HB4HB)を、TianAn Biologic Material社(中国)は3-hydroxyvalerateを共重合モノマーとするpoly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)を商業化している。一方で、先行していたMetabolix社(米国)はP(3HB4HB)の商業化を目指していたものの商業化には至らず、現在はCJ社(韓国)に事業譲渡している。株式会社カネカ(当社)は第2成分として3-hydroxyhexanoateを導入したpoly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH)の商業化を目指している⁷⁾。

一般的なプラスチック材料の熱特性を表1にまとめた。

PHBH

PHBHは上述したように、3HBならびに(R)-3-hydroxyhexanoate (3HHx) からなる共重合ポリエステルである(図2)。PHBH実用化の歴史は、遡ること28年前、カネカ高砂工業所内の土壌より新規ポリマー生産菌として*Aeromonas caviae* FA440株が発見されたことから始まった。

PHBは3HBの連鎖部分に形成されたラメラ構造が水素結合によって結ばれることで結晶化する、結晶性のプラスチックである。PHBHでは3HHxモノマーは、その側鎖のプロピル基が障害となり、3HB連鎖部分が形成する結晶構造に入ることができない。このため、3HHx比率が高まるほど結晶性が低下し、結果として軟質性が向上する。たとえば、3HHx比率5 mol%のPHBHでは、引張り伸びは数%、融点151°Cであるが、3HHx比率10 mol%になると、引張り伸び400%、融点127°Cとなる。このように、PHBHは3HHx比率を調節することで、ポリプロピレン(PP)や高密度ポリエチレン(HDPE)を含む広範な物性をカバーすることのできる樹脂である(図3)。また、上述したように3HHxモノマーを導入することで、PHB(融点177°C)に比べて融点が低下するため、熱分解温度(約185°C)よりも十分低い温度で成型加工が可能となり、プロセスウィンドウが広がるメリットもある。

以上のように、PHBHの物性を左右する3HHx比率の制御は非常に重要である。また、PHBHのポリマーとしての機械的、物理的特性にはその分子量が重要要素である。次章以降は、筆者らが取り組んだPHBH生産微生物の分子育種技術、特に3HHx比率制御、ならびに分子量制御技術を紹介する。

PHBH生産菌の分子育種

研究開発の初期段階においては、弊社にて取得した*A. caviae* FA440株を用いた生産を試みた⁸⁾。しかしながら、そのPHBH生産性は非常に低く(10 g/L/60 h)、実生産への応用は断念せざるを得なかった。そこで筆者らは、PHB高生産株として知られている*Cupriavidus necator*(旧名:*Ralstonia eutropha*) H16株を宿主に選定し、PHBH生産株の分子育種を開始した。

1997年に福居俊昭氏(現:東京工業大学教授、当時:理化学研究所)らが*A. caviae*よりPHBH重合酵素遺伝子(*phaC_{Ac}*)のクローニングに成功されたことから、本遺伝子を*C. necator*に導入することから生産菌株の分子育種を始めた⁹⁾。筆者が入社した当時、宿主*C. necator*にて使用可能なベクターはpBBR系やpJRD系しか知られていなかった。筆者もそれらプラスミドベクターを利用して、育種を開始したものの、これらのプラスミドは、宿主細菌がPHAを高蓄積させた際に非常に不安定になるということが明らかとなった。たとえば、PHB非蓄積条件でのpJRD215系のベクターは、抗生物質非存在下で4回植え継いだ時に約80%の細胞がプラスミドを保持しているにも関わらず、PHB蓄積条件では、同4回植え継いだ時に30%しかプラスミドを保持していない結

表1. PHAと一般的なプラスチックの熱特性

constituent		T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_g (°C)	Tensile strength (Mpa)	Elongation tp break (%)	References
homopolymr							
PHB		177	97	4	43	5	26
poly(3HP)		77	64	-20	27	634	
poly(3HV)		119	-16	-15	31	14	
poly(4HB)		53	ND	-45	104	1000	
copolymer							
PHBH	3HHx = 5 mol%	151	69	0	—	—	27
	3HHx = 10 mol%	127	77	-1	21	400	
	3HHx = 15 mol%	115	54	0	23	760	
	3HHx = 17 mol%	120	34	-2	20	850	
PHBV	3HV = 10 mol%	150	—	—	25	20	28
	3HV = 20 mol%	135	—	—	20	100	
3HB4HB	4HB = 3 mol%	—	—	—	28	45	29
	4HB = 10 mol%	—	—	—	24	242	
	4HB = 16 mol%	—	—	—	26	444	
	4HB = 18 mol%	150	—	—	—	—	
PHBP	3HP = 7 mol%	160	71	3	—	—	30
	3HP = 11 mol%	152	36	1	—	—	
	3HP = 20 mol%	143	18	-1	—	—	
	3HP = 67 mol%	44	5	-10	—	—	
others							
PLA		164	57	62	55	5	26
PP		174	148	-13	34	400	
PS		110	ND	100	54	4	
HDPE		130	293	-36	10	620	
PET		262	—	—	56	7300	

PLA: polylactide, PP: polypropylene, PS: polystyrene, HDPE: high density polyethylene, PET: polyethylene terephthalate

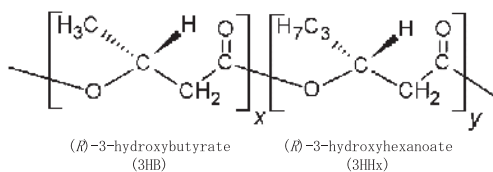


図2. PHBHの構造

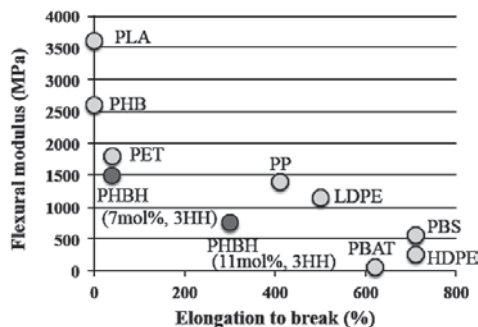


図3. 各種ポリマーの伸びと弾性率

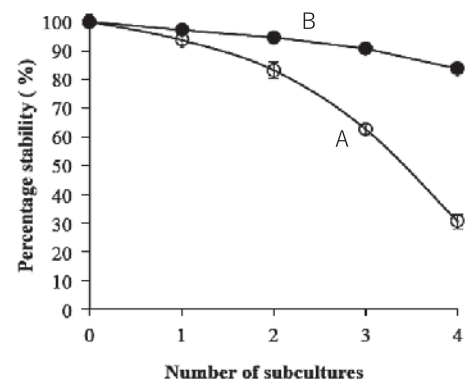


図4. pJRD215プラスミドベクターの保持率. A: PHB高蓄積条件, B: PHB低蓄積条件.

果となった(図4)¹⁰⁾. また, pBBR系のベクターも同様に不安定であった. したがって, 導入遺伝子の機能解析や培養条件などの評価において, プラスミドを保持させ

るために抗生物質を添加せざるを得なかった。しかしながら、ジャー培養による高密度培養系においては、抗生物質を添加してもプラスミドの安定保持は困難であり、培養ロットごとに導入遺伝子の安定性（保持率）が変化する結果となった。このような状況により、遺伝子導入効果が正しく評価できず、研究開発に支障をきたすこととなった。一方で、当時すでに確立していた *C. necator* H16 染色体への挿入技術を利用すればプラスミド不安定性の回避は可能であったが、同技術の適用には時間を要することから、網羅的に多くの菌を作製・評価するには安定プラスミドの開発が必須であると判断した。さらに、工業生産における抗生物質の使用は、コスト、ならびに排水処理の観点から困難であることを付け加えたい。

安定 宿主—ベクター系の開発

工業生産を目指して育種を進める際、導入遺伝子安定性が一定であり、実験ごとの評価結果が信頼できること、また、育種した菌株がそのまま工業的に使用可能であることが必須である。筆者らは、PHBH 生産菌を育種するにあたり、*C. necator* H16 にて使用可能な安定プラスミドベクターの開発を進めた。プラスミドを安定に保持させるシステムとしては、抗生物質により選択圧をかける方法の他に、par システムが知られている^{11,12)}。Par システムが働くと、複製したプラスミドが娘細胞に確実に分配されるため、抗生物質による選択圧を掛けなくてもプラスミドを安定に保持させることが可能となる。これまでに大腸菌にて使用可能な RP4 プラスミドの par システムを組み込んだプラスミドベクター¹³⁾や R1 プラスミドの par 領域を組み込んだプラスミドベクター¹⁴⁾が知られていたが、筆者らの使用宿主である *C. necator* H16 株にて使用可能な安定プラスミドベクターは報告されていなかった。そこで、筆者らは *C. necator* H16 と同属である *Cupriavidus metallidurans* CH34 が保有するメガプラスミド (pMOL28) の par システム (*parABS*) と複製開始点 (oriV) を利用することで、*C. necator* H16 において安定なプラスミドベクターを開発することを着想した。同 *parABS*, oriV を大腸菌プラスミドベクターと連結し、新規プラスミドベクター (pCUP3) を作製した (図5)。pCUP3 はポリエステル (PHA) を多量に蓄積する条件においても、抗生物質非添加条件にて、非常に高い安定性を示した。一方で、oriV のみを導入したベクター (pCUP2) は *C. necator* に形質転換可能であるものの、安定性は顕著に低かった (図6)。この結果より、*C. metallidurans* の par システムおよび、oriV が *C. necator* にて機能することが証明された。また、pCUP3 は既存のプラスミドベクターと比較して、形質転換効率

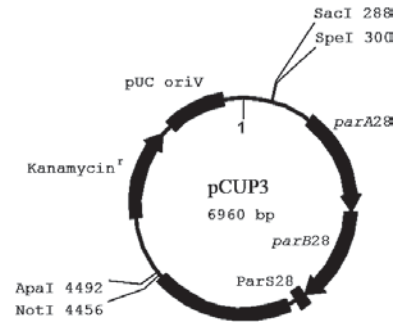


図5. pCUP3 プラスミドベクター

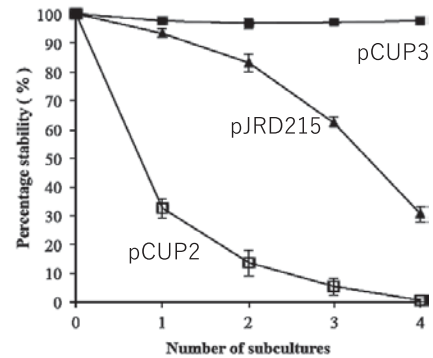


図6. PHB 高蓄積条件でのプラスミド保持率

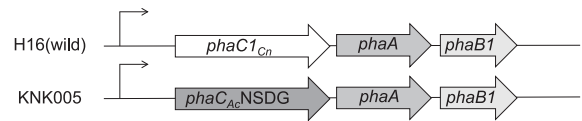


図7. KNK-005 株の遺伝型

が著しく向上しており、以後、この pCUP3 ベクターを利用することで、分子育種の方法が飛躍的に向上することとなった。さらに、pCUP3 は接合伝達に関わる遺伝子群を保有しないことから、工業的に利用可能なプラスミドベクターである¹⁰⁾。

PHBH 生産経路

筆者らは、*C. necator* H16 株の PHB 重合酵素遺伝子 (*phaC1_Cn*) を *A. caviae* FA440 株由来の PHBH 重合酵素遺伝子 (*phaC_AcNSDG*) に置換した PHBH 生産菌 (KNK-005 株) を育種した (図7)。図8に植物油を原料とした PHBH 生産経路を示す。植物油はリパーゼによって脂肪酸とグリセリンに分解され、それぞれの代謝経路に入る。ここではグリセリンは割愛させていただき、主成分である脂肪酸から PHBH までの代謝を説明する。

細胞に取り込まれた脂肪酸は、 β 酸化経路にて代謝され、炭素数2のアセチル-CoA が生産される。アセチル

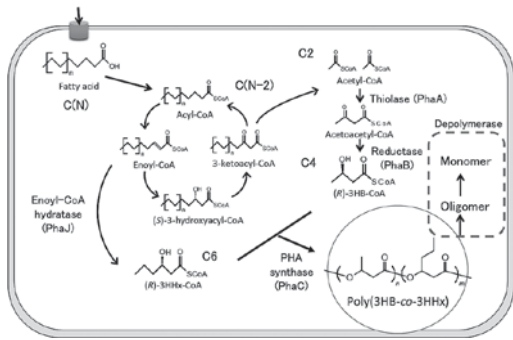


図8. PHBH生産経路

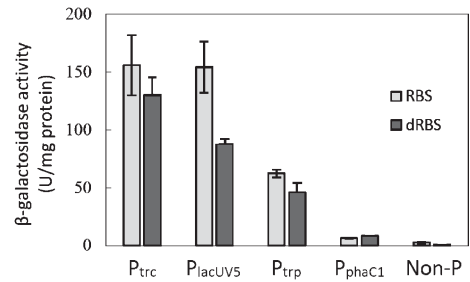


図10. β-ガラクトシダーゼ活性

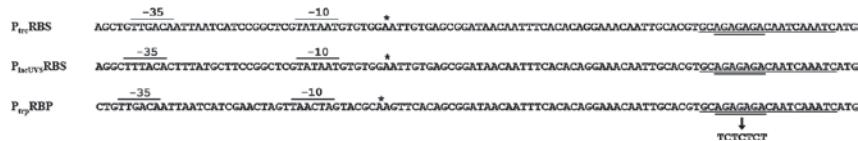


図9. 遺伝子発現カセットの配列

-CoA2分子はβ-ケトチオラーゼ (PhaA) が触媒する重縮合反応によって炭素数4のアセトアセチル-CoAに変換され、さらに(R)-特異的還元酵素 (PhaB) によってPHBHのモノマーの一つである(R)-3-ヒドロキシブチリル-CoAへと変換される。もう一つのモノマーである(R)-3-ヒドロキシヘキサノイル-CoAはβ酸化中間体である2-ヘキセノイル-CoAが(R)-特異的エノイルCoAヒドラーゼ (PhaJ) によって水和されることで生産される^{15,16}。生合成された2種類のモノマーはPHBH重合酵素 (PhaC_{Ac}NSDG) によって重合される。

3HHx比率制御技術開発

初期に育種したKNK-005株はパーム油を原料として培養した場合に3HHx比率が3~7 mol%程度のPHBHを生産した。幅広い用途展開のためには、その3HHx比率を自在に調節し、要求物性 (異なる共重合比率) に応じたPHBHを作り分ける必要がある。特に、軟質PHBHの生産が難しく、さらに3HHx比率を高める技術が必要であった。そこで筆者らは、3HHxモノマー供給経路の鍵酵素である *phaJ* の精密発現制御を試みた。これまでの研究において、*C. necator* では、さまざまな物質生産研究がなされており、そのためにさまざまな遺伝子発現系の検討がなされてきた。たとえば、プロモーターについては、*E. coli* で一般的に使用される Plac, PlacUV5, P_{trc}, T7, PBADや、*C. necator* 自身が持つ P_{phaC1}, P_{phaP}, P_{pacoE}, P_{pacoD}, P_{ppdhE} などが利用されている¹⁷⁻²¹。筆者らは、*E. coli* に由来するプロモーター、PlacUV5, P_{trc}, P_{trp}、ならびに *C. necator* のPHB重合酵素遺伝子 *phaC1*_{Cn} のプロモーター P_{phaC1} とそのリボソーム結合

配列 (RBS) もしくはその破壊体 (dRBS: 図9中二重下線) を連結した複数の新規遺伝子発現カセットを作製し (図9)、それらカセットのプロモーター活性をレポーター遺伝子 (*lacZ*) の発現によるβ-ガラクトシダーゼ活性を指標に評価した (図10)。次に、それらプロモーター配列を *phaJ4a*、ならびに *phaJ4b* 遺伝子に連結し、3HHx比率を評価したところ、プロモーター活性に応じて、3HHx比率を変化させることに成功した。筆者らが育種した *C. necator* は、さまざまな異なる3HHx比率のPHBHを再現良く生産可能であったことから、使用した発現カセットの強度によって代謝フラックスの微調整が可能であることを実証した (表2)。生産されたPHBHの熱特性解析を実施した結果、3HHx比率の増加に伴う融点 (*T_m*) の低下が確認された (表3)。PHBの融点はその熱分解温度に近く、成形加工を著しく難しくさせている。一方で、3HHx成分を共重合しているPHBHは3HHx成分による結晶化阻害により融点が低下し、成形加工のプロセスウィンドウが広がっており、成形加工性が向上している。また、結晶化度が低下することで、柔軟な性質も付与されている²²。

本技術開発により、所望の物性のPHBHを生産する生産菌株の育種に成功した。育種した生産株は、実生産と同様の高密度流加培養条件下においても生産性に影響を与えることなく、さまざまな3HHx比率のPHBHを生産することが可能であり、工業的な生産株として使用可能であることを確認している。今後の工業生産規模拡大に対して、異なる培養槽や原料の使用が想定されるが、本技術により、生産株の変更のみで変化に対応可能となったことは大きなメリットであると考えられる。

表2. phaJ発現調節株によるPHBH培養生産結果

Strain	Dry cell weight (mg/ml)	PHA content (% dry cell weight)	PHA (mg/ml)	Real cell mass ^a (mg/ml)	3HHx composition (mol%)
005dZ126	19.1 ± 0.1	84.2 ± 0.2	16.1 ± 0.1	3.0 ± 0.1	2.8 ± 0.1
005dZ126C1A	19.3 ± 0.2	84.7 ± 2.0	16.4 ± 0.2	2.9 ± 0.4	5.3 ± 0.1
005dZ126TRPDA	19.1 ± 0.6	84.2 ± 2.7	16.1 ± 0.0	3.0 ± 0.6	7.8 ± 0.0
005dZ126TRPA	19.1 ± 0.3	82.3 ± 1.5	15.8 ± 0.0	3.4 ± 0.3	8.6 ± 0.1
005dZ126UV5DA	19.2 ± 0.5	83.4 ± 0.9	16.0 ± 0.3	3.2 ± 0.3	9.1 ± 0.0
005dZ126UV5A	18.7 ± 0.8	84.0 ± 1.1	15.7 ± 0.4	3.0 ± 0.3	9.9 ± 0.2
005dZ126TRCDA	19.1 ± 0.5	82.1 ± 0.2	15.7 ± 0.3	3.4 ± 0.1	9.6 ± 0.0
005dZ126C1DB	18.8 ± 0.2	85.0 ± 0.6	16.0 ± 0.1	2.8 ± 0.2	5.8 ± 0.2
005dZ126C1B	19.3 ± 0.5	84.2 ± 0.7	16.3 ± 0.3	3.0 ± 0.2	6.7 ± 0.6
005dZ126TRPB	18.8 ± 0.1	84.7 ± 1.3	15.9 ± 0.3	2.9 ± 0.2	10.0 ± 0.1
005dZ126UV5B	19.0 ± 0.0	84.1 ± 1.9	16.0 ± 0.3	3.0 ± 0.4	10.6 ± 0.0
005dZ126TRCB	18.2 ± 0.4	84.0 ± 3.3	15.3 ± 1.0	2.9 ± 0.5	10.7 ± 0.1

Data represent mean ± SD from three experiments performed in triplicate

^a Real cell mass = dry cell minus polyhydroxyalkanoates (PHAs)

表3. PHBHの熱特性

3HHx composition (mol%)	First heating process			Cooling process			Second heating process	
	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)	T_g (°C)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{cc} (°C)	ΔH_{cc} (J/g)
0 (PHB) ^b	175.1	103	70.5	0.4	77.4	80.2	—	—
2.7	150.8	72.9	49.9	-2.3	50.2	25	50.3	21.7
5.2	142	70.8	48.5	-2.9	41	3.6	58.8	47.1
5.9	138.9	69.5	47.6	-2.4	—	—	68.2	43.3
7.1	133.5	66.3	45.4	-2.1	—	—	74.5	27.2
7.9	131.1	67.5	46.2	-2.2	—	—	76.7	20.2
9.1	116.4	65.9	45.1	-3.4	—	—	77	12.2
10	114.7	60.4	41.4	-3.6	—	—	78.9	1.9
10.8	113.5	55.8	38.2	-4.7	—	—	79.9	1.2

DSC analysis of PHBH with various 3HHx composition.^a

^a T_m : melting temperature; ΔH_m : melting enthalpy; X_c : crystallinity; T_g : glass transition temperature; T_c : crystallization temperature; ΔH_c : crystallization enthalpy; T_{cc} : cold-crystallization temperature; ΔH_{cc} : cold-crystallization enthalpy

^b Purchased from Sigma-Aldrich

PHBH分解酵素遺伝子破壊による分子量制御

分子量はプラスチックの機械的、物理的性質を左右する重要因子の一つである。菌体内に蓄積されたPHBHは、環境影響を考慮した水系精製工程にて菌体内から取り出され、続いて熱加工プロセスによってさまざまなアプリケーションへと成形加工され、使用される。PHBHはポリエステルであることから、熱やアルカリ条件下で比較的加水分解を受けやすく、ダウンストリームプロセスの間に分子量が低下することが問題である。この分子量の低下を考慮すると、微生物発酵工程では、できるだけ高い分子量のPHBHを生産することが要求される。

生合成されるPHBHの分子量は、一般的な触媒重合

と同じく、PHBH重合酵素の発現量と基質供給速度によって変化するが、そのような代謝状態の変化により3HHx比率やPHBH生産速度にも影響を与えてしまう。そこで、それらに影響を与えずに分子量を向上させる手段として、PHBH分解酵素に着目した。PHBH生産宿主である*C. necator* H16株は9つのPHB分解酵素遺伝子を保有している。これらは、7つのPHBデポリメラーゼ(PhaZ1からPhaZ7)と2つの3HBオリゴマーハイドrolラーゼ(PhaY, PhaY2)をコードする。しかしながら、これら分解酵素のPHBHの蓄積期における関与については、とりわけ、分子量制御への関与に関しては、十分に分かっていなかった(表4)。

一般論として、細胞内に蓄積されたPHBHをエネルギー

表4. *C. necator*H16が保有するPHB分解酵素

Name	Locus tag	Substrate specific activity (μmol/min/mg) ^a						Localization	Reference(s)
		3HB oligomers				PHB granules			
		Dimer	Trimer	Tetramer	Pentamer	n-PHB ^b	a-PHB ^c		
PhaZ1	H16_A1150	0	0	1.1	1.2	0	0.71	PHB	31 32
PhaZ2	H16_A2862	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	33
PhaZ3	H16_B0339	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	34
PhaZ4	PHG178	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	35
PhaZ5	H16_B1014	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	34
PhaZ6	H16_B2073	1.2	2.6	0	ND	0.43	110	PHB and cytosol	31 36
PhaZ7	H16_B2401	ND	ND	ND	ND	Active ^d	ND	? ^e	36
PhaY1	H16_A2251	58	59	54	50	0	3	Cytosol and PHB	31 37
PhaY2	H16_A1335	31	200	240	310	0	3	Cytosol	31 37

^a ND, not determined

^b native PHB

^c artificial amorphous PHB

^d active, but it could not be compared with other data because the experimental methods were different

^e examined but unclear

表5. PHB分解酵素破壊株の培養評価結果

PHA production from palm kernel oil by various gene deletion mutants of <i>Cupriavidus necator</i> . ^a					
Strain	Dry cell weight (mg/ml)	PHA content (% dry cell weight)	PHA (mg/ml)	3HHx composition (mol%)	M _w (× 10 ⁶)
KNK-005	18.1 ± 0.4	73.3 ± 2.2	13.3 ± 0.5	3.3 ± 0.12	1.4 ± 0.05
005dZ1	16.9 ± 0.1	73.8 ± 1.2	12.5 ± 0.2	3.4 ± 0.07	1.2 ± 0.05
005dZ2	17.0 ± 1.0	75.5 ± 6.4	12.9 ± 1.7	3.2 ± 0.14	1.3 ± 0.03
005dZ12	17.4 ± 0.6	72.0 ± 5.8	12.5 ± 1.2	3.3 ± 0.13	1.2 ± 0.03
005dZ6	17.1 ± 1.7	74.7 ± 3.3	12.8 ± 1.7	3.5 ± 0.23	2.9 ± 0.23
005dZ16	18.3 ± 1.1	74.8 ± 4.2	13.7 ± 1.5	4.1 ± 0.10	2.8 ± 0.19
005dZ126	17.3 ± 1.7	73.0 ± 3.9	12.7 ± 1.9	4.1 ± 0.11	2.7 ± 0.17
005dZ1246	18.4 ± 1.7	74.8 ± 1.6	13.8 ± 1.6	4.0 ± 0.28	2.9 ± 0.11
005dZ1267	17.4 ± 2.3	70.6 ± 6.3	12.4 ± 2.6	4.0 ± 0.16	2.8 ± 0.55
005dZ126Y1	17.7 ± 2.4	73.2 ± 5.4	13.0 ± 2.6	3.9 ± 0.24	2.8 ± 0.20
005dZ126Y2	17.1 ± 1.8	72.8 ± 3.8	12.5 ± 1.9	4.1 ± 0.11	2.7 ± 0.08

^a The cells were cultured in the mineral salt medium with 0.129 w/v% (NH₄)₂SO₄ and 1.5 w/v% palm kernel oil for 90 h. Data represent mean ± SD from three experiments performed in triplicate

ギーや炭素供給源として利用するには、いったんモノマーまで分解する必要がある。したがって、培地中の栄養枯渇時に速やかに分解利用されるためには、合成の段階からある程度、分子量を小さく（分子数を多く）制御しておくことが、微生物にとって好ましいと考えられる。すなわち、PHBHの蓄積においても、何らかの分子量制御機構が働いている可能性が推測された。PHB分解酵素の中では、PhaZ6とPhaZ7が強いエンド型活性を

有することが報告されている^{22,23}。そこで筆者らは、野生型の*C. necator* H16に対してPHB分解酵素の網羅的な遺伝子破壊を行い、生産されるPHBの分子量に与える影響の確認を行った。その結果、*phaZ6*遺伝子破壊によって、分子量が顕著に向上することを発見した(表5)。

KNK-005株の*phaZ6*破壊株を作製し、パーム油を用いてPHBHを生産させた結果、その分子量は*phaZ6*非破壊株に対して約2倍となり、重量平均分子量約300万



図 13. OK bio-degradable MARINE 認証マーク

謝 辞

まずは、本賞に選出いただいたことに対し、深く感謝いたします。本技術開発は、25年以上にわたる産学連携研究の成果であり、多くの研究者、技術者による数々のブレイクスルーによるものです。すべての方々に深く感謝申し上げます。

特に、本研究に対し、当初より多大なるご指導を頂きました。土肥義治先生、また、生産菌の分子育種に関する基礎研究において、多くの貴重な技術指導、アドバイスを頂きました。田口精一教授（東京農業大学）、福居俊昭教授（東京工業大学）、柘植丈治准教授（東京工業大学）、阿部英明チームリーダー、沼田圭司チームリーダー（理化学研究所）、岩田忠久教授（東京大学）には深謝いたします。

また、本事業は当社のプロセス開発チーム、成形加工技術研究チームの方々や開発チームの方々の顕著な成果無しでは、成り立たない事業であります。PHBHの基礎研究、工業生産プロセス開発、樹脂加工技術開発、製品開発に携わったすべての方々に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Geyer, R., Jambeck, J. R., and Law, K. L.: *Sci. Adv.*, **3**, e1700782 (2017).
- 2) Gall, S. C. and Thompson, R. C.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **92**, 170–179 (2015).
- 3) Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., and Law, K. L.: *Science*, **347**, 768–771 (2015).
- 4) Mato, Y., Isobe, T., Tanaka, H., Kanehido, H., Ohtake, C., and Kaminuma, T.: *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 318–324 (2001).
- 5) UNEP: *Biodegradable Plastics and Marine Litter: Misconceptions, concerns and impacts on marine environments* (2015).
- 6) Lemoigne, M.: *Bull. Soc. Chem. Biol.*, **8**, 770–782 (1926).
- 7) Kourmentza, C., Placido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., and Reis, M. A. M.: *Bioengineering*, **4**, 55 (2017).
- 8) 松本圭司：生物工学, **94**, 242 (2016).
- 9) Fukui, T. and Doi, Y.: *J. Bacteriol.*, **179**, 4821–4830 (1997).
- 10) Sato, S., Maruyama, H., Fujiki, T., and Matsumoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 667–681 (2013).
- 11) Easter, C. L., Stobecky, P. A., and Helinski, D. R.: *J.*

- Bacteriol.*, **179**, 6472–6479 (1997).
- 12) Youngren, B., Radnedge, L., Garcia, E., and Austin, S.: *J. Bacteriol.*, **182**, 3924–3928 (2000).
- 13) 特許US6143518号
- 14) 特許US4760022号
- 15) Sato, S., Fujiki, T., and Matsumoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 246–251 (2015).
- 16) Kawashima, Y., Cheng, W., Mifune, J., Orita, I., Nakamura, S., and Fukui, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 493–502 (2012).
- 17) Barnard, G. C., Henderson, G. E., Srinivasan, S., and Gerngross, T. U.: *Protein Expr. Purif.*, **38**, 264–271 (2004).
- 18) Bi, C., Su, P., Müller, J., Yeh, Y. C., Chhabra, S. R., Beller, H. R., Singer, S. W., and Hillson, N. J.: *Microb. Cell Fact.*, **12**, 107 (2013).
- 19) Delamarre, S. C. and Batt, C. A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 668–679 (2006).
- 20) Fukui, T., Suzuki, M., Tsuge, T., and Nakamura, S.: *Biomacromolecules*, **10**, 700–706 (2009).
- 21) Fukui, T., Ohsawa, K., Mifune, J., Orita, I., and Nakamura, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 1527–1536 (2011).
- 22) Arikawa, H., and Matsumoto, K.: *Microb. Cell Fact.*, **15**, 184 (2016).
- 23) Abe, T., Kobayashi, T., and Saito, T.: *J. Bacteriol.*, **187**, 6982–6990 (2005).
- 24) Sznajderm, A. and Jendrosek, D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 4936–4946 (2014).
- 25) Arikawa, H., Sato, S., Fujiki, T., and Matsumoto, K.: *J. Biotechnol.*, **227**, 94–201 (2016).
- 26) Morohoshi, T., Ogata, K., Okura, T., and Sato, S.: *Microbes Environ.*, **33**, 19–25 (2018).
- 27) Andreeßen, B., Taylor, N., and Steinbüchel, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 6574–6582 (2014).
- 28) Doi, Y., Kitamura, S., and Abe, H.: *Macromolecules*, **28**, 4822–4828 (1995).
- 29) Chen, GQ., Wu, Q., Zhao, K., and Yu, P. H.: *Chin. J. Polym. Sci.*, **18**, 389–396 (2000).
- 30) Doi, Y., Segawa, A., and Kuroda, K.: *Int. J. Biol. Macromol.*, **12**, 106–111 (1990).
- 31) Shimmura, E., Scadola, M., and Doi, Y.: *Macromolecules*, **27**, 4429–4435 (1994).
- 32) Abe, T., Kobayashi, T., and Saito, T.: *J. Bacteriol.*, **187**, 6982–6990 (2005).
- 33) Saegusa, H., Shiraki, M., Kanai, C., and Saito, T.: *J. Bacteriol.*, **183**, 94–100 (2001).
- 34) York, G. M., Lupberger, J., Tian, J., Lawrence, A. G., Stubbe, J., and Sinskey, A. J.: *J. Bacteriol.*, **185**, 3788–3794 (2003).
- 35) Brigham, C. J., Reimer, E. N., Rha, C., and Sinskey, A. J.: *AMB Express*, **2**:26 (2012).
- 36) Schwartz, E., Henne, A., Cramm, R., Eitingier, T., Friedrich, B., and Gottschalk, G.: *J. Mol. Biol.*, **332**, 369–383 (2003).
- 37) Sznajder, A. and Jendrossek, D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 4936–4946 (2014).
- 38) Kobayashi, T., Uchino, K., Abe, T., Yamazaki, Y., and Saito, T.: *J. Bacteriol.*, **187**, 5129–5135 (2005).