バイオが演出する“グリーンプラ”

“電気を通す”プラスチックが生まれ、また土に還る“腐る”プラスチック（グリーンプラ）が産声を上げ大きく成長しようとしている。“軽薄短少”の申し子プラスチック製品のおかげで私たちの日常生活は快適になった。しかし、残念ながら多くの石油プラスチックは分解されにくく、じわじわと地球環境に負荷を与えつつある。この問題解決の切り札のひとつが、グリーンプラである。

田 口 精 一

1. 私にとっての「高分子(学)とバイオテクノロジー」

理学部応用化学から出発した私は、学生時代に“高分子化学”を定番講義として受講した。低分子が数珠上に連なると便利なプラスチックになることを知り、化学マジックだと思った。しかし、いわゆる“バイオ”は香りだけ感じることはあっても、味わうほどの場面は少なかった。大学院進学では、当時工学系では珍しいと言われたバイオ講座に入室し、当たり前なのだがバイオを支えるほとんどが生体高分子だということを再認識させられた。その後、農芸化学畑を歩まれた企業出身の先生とご一緒し、新設研究室で応用志向のバイオに目覚めた。また、自分なりに達成感をもって学位論文を仕上げたつもりだが、近年のバイオの進展ぶりとのギャップであまり人様には見せないようにしている。さらに、理研高分子化学研究室に入所し、生分解性プラスチック（通称“グリーンプラ”）研究の世界に飛び込んだ。そこは、高分子学とバイオが融合したワンダーランドである。その後も、職場は変わりつつも、振りかえると私の研究ストーリーは、「高分子」と「バイオテクノロジー」がキーワードになっている。貴重な高分子学会の原稿で大分誌面を私事で割いてしまった。申し上げたかったことは、バイオは紛れもなく学際分野で、所属また基礎・応用問わず細胞融合のように高分子学をはじめとする他分野とフュージョンしながら新領域を開拓できる、というこ

とである。

本稿では、環境に調和する高分子材料であるグリーンプラのバイオによるものづくりについて紹介する。

2. まさか微生物がプラスチックをつくるとは？

というのが、最初にこの事実を知ったときの感想である。教科書に載っていないことほどおもしろいとはいいますが、本当におもしろいと思った（でも最近は、一部中学校の教科書に紹介されている）。といっても、本来微生物が私たちのためにつくっているというわけではなく、私たちがプラスチックとして利用できることに気づいたのである。生化学の講義では、必ず生体高分子の代表3兄弟、核酸、タンパク質、多糖が紹介され、それぞれを構成する部品化合物とその結合の仕方、ポリマーとしての特性について学ぶ。しかし、脂肪酸ポリエステルが細胞内で合成されそれがプラスチックになるとは聞いたことはなかった。後に述べる合成の仕組みを知れば、決して特別なマジックを使って微生物がつくっているのではないことがわかる。よくよく考えると、古来から私たちは、酵母や乳酸菌から生存のためのエネルギーATPを得るために仕方なく副生しているアルコールや乳酸など（彼らにとっての一種の産業廃棄物）の美味しい恵みを受けている。そのような例は枚挙にいとまなく、結核から人類を救った抗生物質もまたその一例である。微生物のつくりだす多くの複雑な生理活性物質（人間側からみた勝手なネーミング）を、人間が一から全合成することはなかなか難しいことも多く、微生物は尊敬すべき有機化学者である。

3. なぜグリーンプラなのか？

そもそも石油プラスチックの「軽くて丈夫で長もち」と

TAGUCHI, Seiichi 北海道大学大学院工学研究科 (060-8628 札幌市北区北13条西8丁目)・教授、理化学研究所 (351-0198 和光市広沢2-1)・客員主幹研究員、工学博士。1989年 東京大学大学院工学研究科博士課程2年中退。専門は環境微生物工学、酵素進化工学、環境・生体に調和するバイオプロダクトの生産システムの開発。

“Green Plastics” Produced by Biotechnology

いう性質が巨大素材産業を支えてきた一番大きな要因である。これらのプラスチック製品を多用したワークマンが出現したときは、多くの人がこのことを実感したであろう。この素晴らしい素材は、大量生産→大量使用→大量廃棄という一方通行の流れの中で、大きな経済効果を生み、効率的な産業形態・便利な日常生活に大きく貢献してきた。プラスチック材料の高付加価値化はさらに加速し、携帯電話にも利用されている「電気を通すプラスチック」という大ヒットをも生み出した。一方、プラスチック開発の陰の部分を見ると、軽くて丈夫で長もちの「丈夫で長もち」という性質が今大きな問題になっている。これまでの石油など化石燃料から合成されるプラスチックの多くは、自然環境中で分解されないために、環境中に半永久的に蓄積して、さまざまな環境問題をひき起こしている。そのような背景のなか、自然界に存在する微生物によって分解されるグリーンプラ^{1), 2)}は、環境に負荷を与えない高分子材料として注目され始めている。同時に生体に調和する性質から、生体機能材料(バイオマテリアル)として、生物・医学領域への新たな展開も期待されている。現在、実用化に向けて優れた性能をもつ材料の開発が行われている。すなわち、「腐るプラスチック」づくりである。

地球温暖化、資源の枯渇など地球環境悪化が深刻になっている今日、脱石油が求められている。折しも、未利用の再生可能有機資源(バイオマス)を積極的にモノづくりに活用しようということで、日本政府が「バイオマス・ニッポン・総合戦略」のシナリオを掲げる時代になった。地球上の年間バイオマス生産量は、人類が1年間に消費する全エネルギーの10倍に達すると見られ、新エネルギーとしての可能性が大きい。また、新産業が生まれ雇用の創出にもつながり、再び日本経済が活況を呈するきっかけになると期待される。最近打ち出されたバイオテクノロジー戦略大綱には、バイオマス有効利用のアイテムのひとつとして、グリーンプラがあげられている。グリーンプラは、バイオマス資源を原料として生物プロセスあるいは化学プロセスによって生産される環境調和型材料である。現在、その一部は、包装容器や家電製品の筐体、自動車の部材としての利用が広がっている。一方、この環境にやさしい材料が化学合成プラスチックと同様に市場に流通するためには、割高な生産コストを低く抑えることが必要である。このような魅力と同時に解決しなければならない問題をもつグリーンプラを、ぜひとも社会にデビューさせるために、次に述べるような高分子学とバイオとのキャッチボールが行われている。

4. 高分子学とバイオとのキャッチボール

動物や植物は、脂肪やデンプンを貯めて飢餓状態に備えることはよく知られている。それでは、目に見えない微生物

物はどうしているのだろうか。たとえば、ある土壌細菌は、胞子に変身して休眠状態に入り、省エネルギー体制に切り替わる。また、多くの微生物は、脂肪酸からなるポリエステルを細胞内に非常用備蓄食(生命活動のエネルギー源)として合成する。1926年に、フランスの微生物研究で有名なパスツール研究所で、これが(R)-3-ヒドロキシブタン酸(3HB)が1万個以上も結合した高分子量のポリエステルであることがわかった。しかし、このポリエステルは非常に結晶性が高いために、硬くてもろいという欠点があり、「使える材料」としてはしばらく受け入れられなかった。しかし、この微生物ポリエステルは、生分解性であるとともに熱可塑性があり、いわゆるプラスチックとしての素質をもっていることから、なんとか改善したいという願望があった。

実際にポリエステルプラスチックができるということは、細胞内にプラスチック合成に必要な酵素群からなる合成経路があり、染色体DNA上にそれら酵素タンパク質が情報化されていることになる³⁾。その概念図を図1に示す。このような分子生物学の知識がなくとも、プラスチック生産微生物を見つけることができれば、あとはプラスチックが大量に生産されるような培養条件を整えてあげればよい。そんな中、土肥博士は糖とともにブタンジオールを与えると、幅広い物性をもつ新しいプラスチックができることを見いだした。つまり、二番目のモノマー成分として4-ヒドロキシブタン酸(4HB)が高分子鎖に混ざり合った共重合体は、その混ざる分率に応じて、結晶性の高いプラスチックから弾性に富むゴムまで多様な性質を示す高分子材料をつくりだせる原理を見いだした。石油プラスチックであるポリエチレンが、単純な直線構造の場合、結晶性の高い硬いプレートになるが、分岐構造が導入されたユニットで共重合化させるとフィルムグレードの軟質の材料に改善できることとよい対応を示す。これが、高分子材料分子設計の基本コンセプト(図2)である。その後、プラスチック生産菌のスクリーニングや培養条件の検討が盛んに行われ、他のモノマー成分が導入された共重合体が次から次へと発見された(第一世代)。しかし、天然菌だけを対象にしていると生産量や物性面での制約を解決できなかった。

図1 プラスチックがDNA上に暗号化されている酵素タンパク質によってつくられる様子を示した概念図

図2 グリーンプラの分子設計
石油プラスチックの代表ポリエチレンをお手本として、分岐構造をポリマー内に導入すると、柔軟性が高くなる。

微生物細胞内にインプットされた再生可能な原料から、いかに効率よく合成経路を運用しながら目的のプラスチックづくりをするかは、遺伝子組換え技術の得意とするところである。細胞をプラスチック工場に見立てると、プラスチック合成を担当する工具（酵素）の数を増やしたり、工具が働きやすいような環境づくりをしてあげることが、遺伝子工学の使命である。この技術は非常に有効で、プラスチック合成遺伝子さえ入手できれば、生産させたい微生物体内に新たに合成経路を構築して、効率的なプラスチック合成が可能になる。すなわち、元々のプラスチック合成菌にしばらく必要はなくなる。この第二世代とでもいうべきプラスチック生産法の発展は、多くのプラスチック合成経路の発見によってもたらされた。とくに、ドイツのミュンスター大学、米国のMIT、スイス連邦工科大学などの研究グループによる貢献は大きかった。筆者らも、買い物袋グレードの微生物ポリエステルフィルムを作製することに成功している⁴⁾。しかし、この技術の活用もほぼ飽和し、ある程度の限界が見えてきた。

5. 自然に学び自然を超える—人工進化の可能性—

先ほどの、プラスチック工場のたとえ話に戻ると、確かに工具の増員はプラスチック製品の生産能力を高め、画一的な製品の大量生産には有効であり、実際多くの成功例が報告された。しかし、もし匠（たくみ）の技が冴えた工具に活躍してもらえるようになれば、微に入り細に入りのさらにクオリティーの高い製品づくりが可能になるかもしれない。ということで、自らの手で非凡な工具を育てることにした。具体的には、「タンパク質工学」あるいは「進化分子工学」というアプローチで臨んだ。

天然の酵素タンパク質を磨くためのアプローチとして、まずはその対象タンパク質の姿形をよく観察することが大切である。そのためには、きれいに精製した十分量のタン

パク質を準備し、結晶化させるというハードルを越えなければならぬ。近年、多くの生物種のゲノム配列が続々と明らかにされ、次にタンパク質の立体構造解析を中核としたポストゲノム研究の時代が到来している。構造生物学の視点から、生命現象を理解しようとする動きが活発である。ということで、多くのタンパク質の結晶構造を解くということは、一タンパク質分子の振舞を理解することにとどまらず、タンパク質の構築原理を多様な構築パターンから理解するというより高次のレベルでの議論を目指している。ただ、実際はすべてのタンパク質がすんなり結晶化できるわけでない。幸いモノマー供給系酵素としてβ脂肪酸酸化系に見いだされた水和酵素（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⁵⁾。精密立体構造から、基質結合ポケットのもっとも深い部分には、65 番目の Leu と 130 番目の Val が位置していることが推定された。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 (L65 A と V130G) を遺伝子工学的に作製し、*in vitro* および *in vivo* で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どお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*) および共重合組成の分析 (*in vivo*) での実験によって実証された⁶⁾。この立体構造に立脚した分子設計は、プラスチック合成酵素のタンパク質工学研究の先駆的な例である。

また、同じくプラスチック重合反応にモノマーを供給できる脂肪酸合成酵素 FabH についても理論的分子改変を試みた。対象とした大腸菌由来の FabH は、まだ立体構造が不明だったので、他種の相同タンパク質の立体構造を参考に、基質特異性を支配する部位でのアミノ酸置換を

行い、期待どおりの結果を得た⁷⁾。このように、基質特異性変換という目的には、立体構造を基にした部位指定分子改変はたいへん有効であることがわかる。

では、なかなか結晶化がままならず立体構造を決めようがないプラスチック重合酵素の場合は、どう対応したらよいのだろうか？生物は、35億年という長い時間をかけて外界の環境と折り合いをつけながら生き長らえてきており、それを可能にしたのが進化である。進化とは、遺伝情報DNAに変異が入り、修正されぬままタンパク質構造の配列変化に直接反映し、場合によっては細胞の生理・形態に影響を及ぼす抜本的变化である。この進化原理をプラスチック合成酵素にもそのまま応用できないか？⁸⁾。といっても、まったく白紙の状態から出発するのではなく、自然が丹念につくりあげてきた天然酵素を雛形に少々手を加えて、“常に長し襷に短し”酵素から“GOOD JOB!”型酵素に育てるのである。その分子育種法とは、先入観なくプラスチック合成酵素遺伝子に適度に変異を与え、たくさんプラスチックをつくる酵素（高活性体）、モノマーユニットを選び好みする酵素（基質特異性変換体）、分子量が変化する酵素（メカニズム不明）、反応耐久力が向上する酵素（高安定体）など、目的にかなった進化酵素を創成単離するものである。細かい話は、専門の論文や総説を読んでいただければ幸いである^{9)~19)}。目的に合致した微生物酵素を自然界からランダムスクリーニング（宝探し）するのも重要な攻め方だが、試験管内で天然酵素類似体を高速かつ大量につくりだし、目をつけた性質をもっている進化分子を拾い出すこのアプローチはたいへん強力である。とくに立体構造解明が難航しているこのタイプの酵素タンパク質に対して、改変する場所を絞り込みながら手を加えていく作業は不可能に近い。すなわち、先の“構造”生物学的研究手法に対して、“機能”生物学的研究手法といえよう。この新しい取り組みにより、「このような物性（モノマーユニットの分率あるいは分子量）を発現するプラスチックをつくりだすためには、この進化酵素を」というような、カスタムメイド型の酵素供給ができつつある。

6. これからの夢

今現在は、遺伝子操作、発酵技術が発達している微生物によるプラスチック生産が中心だが、植物体で太陽光と二酸化炭素からプラスチックを生産させるプロジェクトも進

めている。微生物に比べて生産体積は圧倒的に大きく、芋デンプンの代わりにプラスチックが置き換わったら世界も変わるだろう。当然、食物用とは一線を画しながら周囲の生態系にも配慮しながら育てなければならない技術体系である。その道のりは決してたやすくはないが、夢のある未来科学であることは間違いなく、今後もこれまでの道のりがそうであったように、高分子学とバイオのタイアップを機軸にして、他の研究分野と連携しながら本プロジェクトが発展していくことを期待している。

本稿で紹介した多くの研究は、科学技術振興事業団の基礎的研究発展プロジェクト「高性能バイオプラスチック生産システムの確立」（統括責任者：土肥義治 現理化学研究所理事）の一環として行われた。

文 献

- 1) 松崎弘美, 田口精一, 土肥義治: 日本油化学会誌, **48**, 1353 (1999)
- 2) 田口精一, 田口一徳, 土肥義治: プラスチックエージ (進歩編), p. 131 (2000)
- 3) K. Taguchi, S. Taguchi, K. Sudesh, A. Maehara, T. Tsuge, Y. Doi: *Biopolymers*, **3a**, 217 (2002)
- 4) H. Matsusaki, H. Abe, Y. Doi: *Biomacromolecules*, **1**, 17 (2000)
- 5) T. Hisano, T. Tsuge, T. Fukui, T. Iwata, K. Miki, Y. Doi: *J. Biol. Chem.*, **278**, 617 (2002)
- 6) T. Tsuge, T. Hisano, S. Taguchi, Y. Doi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4830 (2003)
- 7) C. T. Nomura, K. Taguchi, S. Taguchi, Y. Doi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 999 (2004)
- 8) 田口精一: 生命工学, 第五章 進化学, 共立出版, 2000, p. 134
- 9) 田口精一, 土肥義治: 化学工業, **53**, 22 (2002)
- 10) 田口精一: バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 30 (2002)
- 11) 田口精一: 農化, **78**, 748 (2004)
- 12) S. Taguchi, A. Maehara, K. Takase, M. Nakahara, Y. Doi: *FEMS Microbiol. Lett.*, **198**, 65 (2001)
- 13) S. Taguchi, H. Nakamura, T. Hiraishi, I. Yamato, Y. Doi: *J. Biochem.*, **131**, 801 (2002)
- 14) T. Kichise, S. Taguchi, Y. Doi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2411 (2002)
- 15) S. Taguchi, H. Matsusaki, K. Matsumoto, K. Takase, K. Taguchi, Y. Doi: *Polym. Int.*, **51**, 899 (2002)
- 16) S. Taguchi, H. Nakamura, T. Kichise, T. Tsuge, I. Yamato, Y. Doi: *Biochem. Eng. J.*, **16**, 107 (2003)
- 17) K. Takase, S. Taguchi, Y. Doi: *J. Biochem.*, **133**, 139 (2003)
- 18) K. Takase, K. Matsumoto, S. Taguchi, Y. Doi: *Biomacromolecules*, **5**, 480 (2004)
- 19) S. Taguchi, Y. Doi: *Macromol. Biosci.*, **4**, 145 (2004)
- 20) 田口精一, 柘植丈治, 土肥義治: 化学経済, **51**, 32 (2004)