



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	生体触媒の連携が実現する” 一気通貫型” の乳酸ポリマー生合成プロセス : 乳酸重合酵素の発見から物性解析まで
Author(s)	松本, 謙一郎; 田口, 精一
Citation	高分子論文集, 68(5), 271-280 https://doi.org/10.1295/koron.68.271
Issue Date	2011-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71536
Type	journal article
File Information	matsumotoFinal.pdf



1 [総合論文]

2
3 生体触媒の連携が実現する“一気通貫型”の乳酸ポリマー生合成プロセス
4 -乳酸重合酵素の発見から物性解析まで-

5
6
7 松本 謙一郎 ・ 田口 精一

8
9 北海道大学工学研究院 生物機能高分子部門

10 (〒060-8628 北海道札幌市北区北13条西8丁目)

11
12 TEL: 011-706-6612

13 e-mail: mken@eng.hokudai.ac.jp

和文要旨（400 字程度）

ポリ乳酸は、透明性に優れ、現在最も使用されているバイオマス由来プラスチックであり、石油を原料として合成されるプラスチックの代替材料として期待されている。通常ポリ乳酸は、乳酸発酵によって得た乳酸から重金属触媒を使用した化学的重合によって合成されるが、筆者らは微生物が合成するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）の生合成系を改変することにより、乳酸ポリマーを一気通貫のバイオプロセスで合成する新たなシステムを開発した。この技術を可能としたブレークスルーは、乳酸モノマーを重合可能な生体触媒「乳酸重合酵素」の発見であった。乳酸重合酵素は、乳酸の光学異性体に対して高い特異性を持つため、非常に光学純度の高いポリマーが合成できる。加えて、本酵素により合成される乳酸ポリマーは、PHA モノマーとの共重合化によって、透明性と柔軟性を兼ね備えた多様な物性を示し、これまでポリ乳酸の欠点とされていた柔軟性の低さを克服した新たなバイオポリマーとしての利用が期待される。

1. はじめに

近年、プラスチックを生産するの原料として、石油に代わり再生可能なバイオマスを利用しようとする研究が盛んに行われている。二酸化炭素の排出量を削減することが国際的に大きな目標となっているだけでなく、日本のように石油資源を持たない国においては、石油への依存度を減らすことは産業の安定化のためにも重要であると考えられている。バイオマス原料から生産されるプラスチック（バイオベースプラスチック）の代表格として、ポリ乳酸が挙げられる。ポリ乳酸は、乳酸菌の発酵により得られる乳酸を化学的に重合させて得られるポリエステルであり、優れた透明性を有し、パッケージやボトルなどに加工できるため、現在最も実用化の進んでいるバイオベースプラスチックである。しかし、生産コストが高いことや柔軟性に欠けることなど、ポリ乳酸が克服しなければならない課題も多い。本報では、これらの問題にアプローチできる可能性のある、微生物細胞内の酵素反応の連携を利用した新しい乳酸ポリマーの合成技術について紹介する。鍵となるのは、細胞内で乳酸モノマーを重合できる乳酸重合酵素である。この画期的な酵素が発見されるまでの経緯と、それにより合成される新たな乳酸ポリマーの性質についてポリ乳酸と比較

1 しながら述べる。

2. バイオマス由来プラスチックの生産プロセス比較

6 ポリ乳酸の合成には、微生物発酵と化学合成の複合プロセスが用いられる (Figure 1)。
7 ¹⁻²⁾ まず、コーンスターチなどを糖化して得られるグルコースを原料として、乳酸発酵によ
8 り乳酸を合成する。次に、得られた乳酸を重縮合により低分子量のポリ乳酸を合成し、そ
9 れを環状ラクチドへと変換する。このラクチドをオクタン酸スズなどの重金属触媒を用い
10 て開環重合することにより、高分子量のポリ乳酸が合成される。この際、細胞由来のピル
11 ビン酸など乳酸以外の有機酸が存在すると重合を阻害するため、乳酸の高度精製プロセス
12 も必要になる。このように、ポリ乳酸は多くのステップを経て合成されるため、その過程
13 で多くのプロセスエネルギーとコストが必要であることが指摘されている。

14 一方で、ある種の微生物が細胞内にポリエステルを合成・蓄積することが知られている。
15 ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) と総称されるこれらのポリエステルは、熱可塑性を持ち、
16 バイオマス由来プラスチックとしての利用が可能である。³⁻⁵⁾ PHA の中で最も単純な構造を持
17 つ P(3-hydroxybutyrate (3HB)) の生合成経路を Figure 1 に示す。微生物によるポリエステ
18 ル合成では、複数の酵素が触媒する反応が連続して進行することにより、常温常圧で稼動
19 する一気通貫型の培養プロセスでポリマーが合成される。また、酵素は特定の基質に対し
20 て特異的に反応するため、純度の低いバイオマスを直接利用してもポリマーを合成するこ
21 とができるというメリットがある。しかし、P(3HB) は脆い物性を有しているため、汎用樹
22 脂の代替材料として利用できる用途は非常に限定されていた。

23 筆者らの研究グループでは、この 2 つのプロセスを融合し、微生物細胞内で乳酸ポリマ
24 ーを直接生合成可能なプロセスを開発した (Figure 1 中段)。⁶⁻⁸⁾ この新規な代謝経路により、
25 生体触媒の連携反応が可能な微生物工場を稼動させて優れた物性を有する乳酸ポリマーを
26 合成することが可能になった。また、このポリマー生合成系は PHA の生合成系の性質を継
27 承しているため、乳酸ポリマーが 3HB などの PHA モノマーとの共重合体として合成される。
28 この共重合体は、ポリ乳酸とは異なる物性を示す。では、この乳酸ポリマー生合成系の開
29 発過程を説明するために、その基礎となった PHA 生合成の研究について述べる。

3. PHA 重合酵素の基質特異性と合成ポリマーの物性

PHA の生合成系は、モノマーの供給と重合の二段階に大別できる。重合反応を触媒する PHA 重合酵素 (PhaC) は、その性質がポリマーの量や組成に大きく影響するため、PHA 合成の鍵酵素と呼ばれている。PHA 重合酵素の推定上の反応メカニズムを、P(3HB) の合成を例として Figure 2 に示している。モノマーとなるのは、3HB と CoA がチオエステルで結合した 3HB-CoA である。PHA 重合酵素は、分子内に活性中心となるチオール基を 2 つ有しており、そこに伸長中のポリマーとモノマーが結合すると考えられている。まず、エステル交換反応によりモノマーが酵素に結合すると、CoA が遊離される。続いて、酵素に結合したポリマーが新たに結合したモノマーに転移することにより、1 ユニット分ポリマーが伸長する。順次この反応を繰り返すことによりポリエステルが合成され则认为られている。⁹⁾微生物細胞内のように水系の反応で高分子量のポリエステルが生成するのは驚くべきことであるが、このような反応が可能なのは、モノマー自体がチオエステルであり、エステル合成ではなくエステル交換によってポリマーが生成しているためである。

PHA 重合酵素が重合可能なモノマーの構造 (基質特異性) は、酵素の種類によって異なり、それに依存してさまざまなホモポリマーおよび共重合体が合成される (Figure 3)。¹⁰⁾ 基本的には、3 位にヒドロキシ基を有する 3-ヒドロキシアルカン酸の CoA 体がモノマーとなる。PHA 重合酵素は、アミノ酸配列などの構造上の特徴により 4 つの Class に分類されるが、最もよく研究されている PHA 合成細菌である *Ralstonia eutropha* 由来の PHA 重合酵素に代表される Class I の酵素は、炭素数が 4 から 5 の短鎖モノマーからなるポリマーを合成する。光合成細菌に多くみられる Class III の酵素も類似の基質特異性を有する。一方、*Pseudomonas* 属細菌が有する Class II の PHA 重合酵素の多くは、炭素数が 6 から 12 の中鎖モノマーを含む PHA[P(3HA)] を合成する。このように、ほとんどの PHA 重合酵素は、短鎖・中鎖いずれかのモノマーのみを重合できる。しかし、いくつかの PHA 重合酵素は例外的に幅広い基質特異性を持ち、短鎖・中鎖の両方のモノマーを含む共重合体を合成する。その一例が、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の PHA 重合酵素 (PhaC_{1ps}) である。本酵素は、Class II に分類されるが、炭素数が 4~12 の短鎖・中鎖共重合 PHA[P(3HB-co-3HA)] を合成できる。これらの酵素が合成する 3 タイプのポリマー (短鎖 PHA、中鎖 PHA、短鎖・中鎖共重合体) は物性が大きく異なっている。P(3HB) のような短鎖 PHA は、固く柔軟性が低いのに対して、中鎖ポリマーである P(3HA) は非常に柔らかく粘着性の物性を示す。興味深いことに、これ

らの共重合体である P(3HB-co-3HA)は、P(3HB)と同様にフィルムなどに加工でき、さらに P(3HB)よりも柔軟な性質を持つ。¹¹⁻¹²⁾このことから、P(3HB-co-3HA)はより多くの用途に利用でき、このポリマーを効率的に生産することが、PHA の実用化に向けて重要な目標であった。

4. PHA 重合酵素の進化工学

PhaC1_{ps} は元々 3HB モノマーに活性を示さない Class II に属する酵素の亜種であるので、3HB モノマーに対する活性は非常に低かった。しかし一方で、フィルムに加工した際に好ましい物性を示す P(3HB-co-3HA)は、3HB を主成分(90 mol%程度)とするものであった。¹¹⁾この重合酵素の基質特異性と合成したいポリマーのモノマー組成との間のギャップにより、本共重合体の生産性が非常に制限されていると考えられた。そこで筆者らの研究グループでは、PhaC1_{ps} の 3HB モノマーの重合能力の向上を目的として、PHA 重合酵素の進化工学的改変を行った。¹³⁻¹⁴⁾

進化工学とは、変異と淘汰を繰り返して機能を高めてきたと考えられている生命進化の仕組みを実験室内で応用し、天然から単離した酵素に人工的な変異を加えて機能改良を行うものである。¹⁵⁾自然界ではすでに数十億年にわたって淘汰が行われてきていると考えられるが、自然界においては 3HB モノマーに対する重合活性が高いことが必ずしも生存に有利になるとは限らないため、酵素の活性が上がる“余地”が存在する。しかし、数百アミノ酸から構成され非常に複雑な立体構造を形成する酵素に改変を加えた際に、活性が向上する可能性は当然ながら極めて低い。そのため、高活性体を取得するためには、効率のよい選抜系の設計と、膨大な量の実験が必要となる。

筆者らは、微生物が細胞内に蓄積したポリエステル顆粒を色素染色することにより可視化する方法を応用し、ポリマー蓄積率の高い変異体を選抜する手法を確立した(Figure 4)。¹⁶⁾高瀬らは、PhaC1_{ps} の遺伝子にランダムに変異を導入した 10 万を超える変異体ライブラリーを作成して大腸菌に導入し、色素を含む寒天培地上で P(3HB)を合成させた。細胞内に蓄積された P(3HB)の量を染色して蓄積率の高いコロニーを選抜することにより、3HB-CoA に対して活性の向上した優良変異体を多数単離した。¹⁷⁾この改変研究を通じて、PHA 重合酵素の活性に大きな影響を与える重要部位が 4 つ見つかった。¹⁸⁻²⁰⁾これらの部位にさまざまな組合せで変異を導入することにより、組換え大腸菌内での P(3HB)の蓄積率を 0.1%から約

70%まで増加させることができた。²¹⁾この中でも ST/QK と名付けられた変異体は、P(3HB)と P(3HB-co-3HA)の合成能力が高かった。筆者は、人工的に合成したモノマー基質を用いて、ST/QK 変異体の重合速度を測定する実験を行った。その結果、この変異体では C₄ から C₁₀までの基質に対して活性が向上し、とくに C₄の基質 (3HB-CoA) の重合速度が野生型 PhaC1_{ps}と比べて大幅に増加していることが分かった。²²⁾

5. ポリ乳酸の微生物直接生産への試みと乳酸重合酵素の発見

ここまで見てきたように、PHA 重合酵素は 3 位にヒドロキシ基を有するモノマーに高い活性を有し、乳酸のように 2 位にヒドロキシ基を有する基質を重合した例はなかった。しかし、乳酸と 3HB は構造が類似していることから、もしかしたら乳酸モノマーを重合可能な PHA 重合酵素があるのではないかとすることは考えることであつた。もし、乳酸の重合が可能になれば、優れた物性を有する乳酸ポリマーが生産できるため、産業上大きな価値があると考えられた。実際、このアイディアはこれまで多くの研究者によって試みられている。ポリ乳酸を生合成する微生物は、現在まで天然からは見つかっていないため、人工的に合成した乳酸モノマー (ラクチル CoA) と精製した PHA 重合酵素を用いて、乳酸モノマーを重合するかどうかを検討された。PHA 重合酵素を用いて乳酸モノマーを重合させる試みとして筆者らが把握している最初の報告は、1994 年の Valentin らの論文である。²³⁾彼らはいくつかの人工基質に対する PHA 重合酵素の活性をインビトロの活性測定系を用いて調査し、乳酸モノマーに対してほとんど活性がないことを示している。2001 年にも、Zhang らが、PHA 重合酵素がラクチル CoA に対して活性を示さないことを示している。²⁴⁾2002 年には、Yuan らが放射線標識体を用いた精密な実験を行い、酵素とラクチル CoA とのごく微弱な結合が起こることを報告しているが、最終的に乳酸の重合物を得ることはできなかった。²⁵⁾

筆者らは、北大内の共同研究において、乳酸モノマーを重合可能な PHA 重合酵素を世界で初めて発見した。⁶⁾PHA 重合酵素の機能スクリーニングには、田島らが構築したインビトロの活性測定系を用いた (Figure 5)。通常のインビトロの酵素活性測定系では、ラクチル CoA を基質として、重合する際に遊離する CoA の量を測定して重合活性とする。しかし、田島らのシステムでは、有機相に溶解させた乳酸のチオフェニルエステルと、水相に溶解している CoA を界面でエステル交換させることにより、ラクチル CoA を連続的に合成することができる。²⁶⁾そのため、通常の酵素活性測定法よりも多量のモノマーが供給でき、生

成したポリマーの白濁により重合活性を直接観察できる。この方法の優れた点は、複数の基質を混合して重合を行うことができる点である。通常の活性測定では、複数の基質（モノマーとなる CoA 体）が存在すると、両方のモノマーから CoA が遊離されるため、どちらのモノマーが重合されたのか分からなくなってしまう。しかし本システムでは、複数の基質を用いても生成したポリマーを GC 分析することにより、重合されたモノマーの比率を知ることができる（後述するが、このことが非常に重要な結果を生むことになった）。

筆者らは、乳酸重合酵素の探索にあたり、候補として上述した PHA 重合酵素の Class の分類に基づいて、各 Class から代表的な野生型酵素を一つずつ選んだ。これらに加え、以前作成していた進化型酵素の中から、ST/QK 変異体を候補とした。これらの重合酵素に対して、インビトロ活性測定系を用いてラクチル CoA に対する活性を調べたが、活性を示すものは見つからなかった。そこで、ラクチル CoA だけでなく 3HB-CoA を同時に供給したところ、ST/QK 変異体のみににおいて重合物らしき沈殿が得られた。この沈殿物を分析すると、乳酸が検出されたことから、この変異体が乳酸重合活性を有することが示唆された。後の実験により、ST/QK 変異体が確かに乳酸 CoA を重合することが確認され、世界初の乳酸重合酵素 (Lactate-Polymerizing Enzyme) となった。

この乳酸重合酵素の発見について、重要なポイントが 2 つある。まず一つ目は、ラクチル CoA に対する活性を調べる際に、天然基質である 3HB-CoA を添加したことである。乳酸重合酵素は、ラクチル CoA のみでは、重合反応を行うことができず、3HB-CoA の共存下でのみ共重合体を合成する。共重合体を合成できるインビトロ系を用いて実験を行ったことが、乳酸重合酵素を発見できた成功の鍵の一つであった。2 つ目は、最も重要なことであるが、乳酸重合活性を有する変異体を作成し、それを実験対象に加えていたことである（どんなに優れたスクリーニングシステムも、母集団の中に当たりが存在しなければ見つけることが出来ないのは当然である）。乳酸重合活性を持つ PHA 重合酵素の候補としては、PHA のモノマーの中で最も乳酸と構造の近い 3HB モノマーに対して高い活性を有する酵素が有望であるように思われた。実際、Valentin、Zhang および Yuan らも 3HB-CoA に高い活性を有する Class I および III の酵素を調査している。中鎖のモノマーに高い活性を有する Class II の変異体 (ST/QK) が乳酸重合活性を持つことは理論的に予想できることではなく、筆者らも当初は Class I の酵素を有望視していた。しかし、筆者と田島らは、前述したように ST/QK 変異体の反応速度解析を行うため、ST/QK 変異体のタンパク質を発現・精製するシステムを共同で開発していた。²²⁾そのため、乳酸重合活性を調べる際に、ST/QK 変異体を候

補に加えるという選択を比較的容易に行うことができたのである。結果的に、乳酸重合活性を有するのは ST/QK 変異体とそれに極めて似た配列を有する類縁体のみであり、調べられた他の酵素は乳酸に対する重合能力を持たないことが分かった。すなわち、乳酸に対する活性は、PHA 重合酵素の中でも非常に珍しいものであると考えられた。インビトロの活性測定系では、対象となる酵素を大腸菌で発現させ精製しなければならないため、多数の酵素を並行して調べるのには適していない。したがって、調査対象としたわずか数種類の酵素の中に乳酸重合活性を有する ST/QK 変異体が含まれており、それを上記の 3HB モノマーを共存させる独自の反応検出法によって発見できたことは、偶然が積み重なって起きた非常な幸運であった。

6. 初の生合成乳酸ポリマー

インビトロ重合系の利用による乳酸重合酵素探索の時期に、すでにトヨタ自動車グループとの産学連携共同プロジェクトでは組換え大腸菌をベースとしたインビボ系での乳酸重合酵素の探索・利用の研究も着手していた。早速、大腸菌内での乳酸ポリマーの生合成系を設計した。⁶⁾その際、インビトロのポリマー合成系の実験結果により得られた知見を応用した。すなわち、PhaC1_{ps} の ST/QK 変異体が乳酸重合酵素であることに加え、ラクチル CoA の重合は 3HB-CoA の存在下でしか起こらないこと、そして重合される乳酸は D 乳酸のみであることである。^{6, 26)}

微生物細胞内において、乳酸はピルビン酸が乳酸脱水素酵素 (LDH) によって還元されることによって合成される (Figure 1)。LDH には D, L 体の乳酸をそれぞれ選択的に合成するものが知られているが、大腸菌は D 体選択的な乳酸脱水素酵素を一つだけ有するので、ほぼ D 体 100% の乳酸が合成されると予想された。次に、乳酸をラクチル CoA に変換する酵素が必要であった。ラクチル CoA は propionyl-CoA transferase (PCT) と呼ばれる酵素によって合成されることが以前から知られていたが、この PCT は大腸菌で機能的に発現できないと報告されていた。²⁷⁾そこで大野らは、いくつかの PCT について大腸菌内での機能を調査し、*Megasphaera elsdenii* 由来の PCT が大腸菌内でラクチル CoA を効率よく合成することを見出した。この酵素を用いて乳酸モノマーの供給が可能になった。⁶⁾

乳酸重合酵素、PCT に加え、3HB-CoA の供給経路として知られている PhaA, PhaB をコードする遺伝子を導入した組換え大腸菌を作成し、グルコースを炭素源として培養すると、

乾燥菌体重量の 40%のポリマーが蓄積され、GC/MS 分析によってこのポリマーが 6 モル%の乳酸 (LA) を含む P(LA-co-3HB) であることが分かった。これが、乳酸ポリマーを生合成した最初の例となった。一方、3HB-CoA の供給系を含まない遺伝子構成をコントロールとして行ったが、この場合には、検出可能な量のポリマーは合成されなかった。このことは、インビトロのポリマー合成系での結果と一致した。なお、本プロジェクトでは、博士課程学生山田が大車輪の活躍をした。

次に注力したのは、乳酸が 3HB のポリマーと共重合しているということを証明することであった。乳酸が細胞内で重合されうるという事実は過去に報告例がなく、加えて、乳酸は非常にありふれた代謝産物であり、大腸菌から抽出した物質に微量の乳酸が含まれていることは大いにありえるので、ポリマー分解物の GC/MS 分析で乳酸のピークが検出されただけでは、直ちに乳酸を含む共重合体が合成されたことの証明にはならなかった。そこで筆者らは、得られたポリマーの溶媒沈殿による精製を繰り返し、さらに分取 GPC を用いてサンプル中の低分子量画分の除去を行い、その過程で乳酸分率が変わらないことを確認した。さらに、ポリマーの ^1H NMR 解析から、乳酸に帰属されると思われるピークが、乳酸モノマー、ポリ乳酸の該当するシグナルと、ケミカルシフトがわずかに異なっていることを見出した (Figure 6)。そこで、 ^1H , ^{13}C NMR 二次元 NMR 解析を行ったところ、乳酸とほぼ同じ位置にクロスシグナルが現れたことから、このピークを乳酸に帰属した。また、観測されたケミカルシフトの変化は、乳酸ユニットの電子密度が、隣接する 3HB ユニットの影響を受けて変化したためだと考えられた。これらの結果により、乳酸ユニットが 3HB ユニットと共重合していることを証明できた。

7. 高乳酸分率ポリマーの生合成

初めて乳酸ポリマーの生合成に成功した当時は、ポリ乳酸を合成する努力も盛んに行っていた。乳酸重合酵素はラクチル CoA を重合可能なのであるから、他のモノマーが供給されなければポリ乳酸ができるように思われた。しかし、条件を変えて実験を行ってもポリ乳酸は全く合成されなかった。筆者は、乳酸を含む共重合体が合成できるにも関わらずホモポリマーが合成できないのは、重合の初期反応が乳酸モノマーだけでは進行しないためと考えた。PHA 重合酵素は、重合の初期反応が、それ以降の伸長反応よりも速度が遅いことは以前より報告されていた。PHA 重合酵素にとって、非天然基質であるラクチル CoA は、

1 初期反応を進行させることができないと考えた。もしこの仮説が正しければ、3HB-CoA が
2 存在する条件下で、乳酸モノマーの割合を高めることで、より乳酸分率の高いポリマーの
3 合成が可能だと考えられた。そこで、共重合体の合成条件で、乳酸の比率を高めることを
4 検討した。²⁸⁾

5 一般に、乳酸は酸素の少ない嫌気状態になると合成が促進される性質がある。一方で、
6 もう一つのモノマーである 3HB-CoA は、酸素の多い好气的条件下で効率的に合成されるこ
7 とが知られている。²⁹⁾したがって、培養時の酸素の供給量を意図的に低下させれば、乳酸
8 の合成が増し、逆に 3HB-CoA の合成量は減るため、共重合体中の乳酸ユニットの分率が上
9 昇すると考えた。筆者らは、組換え大腸菌をプラスチックチューブに詰めて栓をして酸素
10 が入らないようにして培養を行い（嫌気培養法）、この状態で合成されたポリマーを抽出
11 した。ポリマーの蓄積率は非常に少なかったが、得られたポリマーには乳酸が 47 モル%含
12 む P(LA-co-3HB)が合成できた。このことにより、乳酸分率を高めたポリマーの生合成に初
13 めて成功し、後述するさまざまな分析が可能になった。

14 15 8. 乳酸重合酵素の高活性化

16
17 乳酸分率は、乳酸モノマーと 3HB モノマーの供給比率を変えれば、さらに高くできるよ
18 うに思われるが、実際には、3HB モノマーの供給量が少なすぎるとポリマーが合成されなく
19 なるため、乳酸分率を 47 モル%以上に高めることは困難であった。そこで筆者らは、進化
20 工学的手法を用いて、乳酸重合酵素の乳酸モノマーの取り込み能力をさらに増強させるこ
21 とを試みた。³⁰⁾PHA 重合酵素の立体構造は未だ明らかになっていないが、由来の異なる PHA
22 重合酵素の間にはアミノ酸配列の相同性があるため、互いに類似の立体構造と機能を持っ
23 ていると推定できる。そこで、当研究グループで過去に取得した *R. eutropha* 由来 PHA 重
24 合酵素の活性を高める優良変異部位（420 番目）に着目し、³¹⁾この部位に相当する乳酸重合
25 酵素のアミノ酸残基（392 番目）に変異を導入する実験を行った(Figure 7)。その結果、乳
26 酸重合活性の異なる変異体を多数作成することができ、一番乳酸分率の高いポリマーを合
27 成する酵素（ST/FS/QK 変異体）を用いて嫌気培養を行ったところ、62 モル%まで乳酸分率
28 を高めることができた。この結果は、PHA 重合酵素同士が互いに類似の構造や反応メカニズ
29 ムを持っていることを示唆していた。現時点では、重合酵素の乳酸モノマーに対する重合
30 速度だけを上昇させるような改変は難しい。しかし、この結果は、酵素活性全体を上昇さ

せるような変異を見出すことにより、乳酸モノマーの重合活性を改善することができることを示している。

9. NMR による乳酸ポリマーのモノマー配列解析

乳酸分率の高い共重合体が合成できたことによって、ポリマー中のモノマー配列を NMR により解析することが可能となった。³⁰⁾ 高分子の NMR においては、隣接するモノマーユニットの種類によりケミカルシフトが微妙に変化する。とくに乳酸ユニットは主鎖の長さが短く左右両方のモノマーユニットの影響を受けるため、二元共重合体の場合は乳酸のシグナルが 4 つに分裂すると予想された。この分裂を観測するため、 ^1H - ^{13}C の二次元 NMR 測定を行った。Figure 8 は、ヒドロキシ基の隣のメチン基のクロスシグナルを拡大したものである。得られたポリマーは、予想通り、乳酸に帰属されるシグナルが 4 つに分裂していた。乳酸分率が 6 モル%のポリマーでは、乳酸が孤立した 3HB-LA-3HB の配列が多数になると考えられるので、このポリマーで観測される ^1H が最も高磁場側のクロスシグナルを 3HB-LA-3HB と帰属した。また、化学合成 PLA と一致する低磁場側のシグナルを LA-LA-LA と帰属した。残り 2 つが、3HB-LA-LA か LA-LA-3HB のいずれかであると考えられた。ここで、乳酸が 3 ユニット結合したことに相当するシグナル(LA-LA-LA)を鮮明に検出できたことから、乳酸重合酵素が乳酸同士を結合することができることが分かった。さらに、これらの 4 つのクロスシグナルの強度が、配列がランダムだと仮定した場合の計算上の強度比とほぼ一致したことから、乳酸重合酵素が乳酸ユニット同士を結合するのに、大きな障害がないことが分かった。このことは、適切にモノマーを供給すれば、乳酸分率をさらに向上させることが可能であることを意味していた。

この 3HB-LA-3HB のシグナルは、乳酸重合酵素がモノマーを 1 ユニットずつ、ランダムに重合していることによって生じるものであり、開環重合を用いて合成したポリマーには存在しない。たとえば、ラクチドと γ ブチロラク톤を開環共重合すると似た構造を有する共重合体 $\text{P}[(\text{LA}, \text{LA})\text{-}co\text{-}3\text{HB}]$ を合成できるが、³²⁾ このポリマー内には乳酸ユニットが dyad (LA-LA) の単位で存在するため、3HB-LA-3HB の配列は存在しないと予想できる。また、ポリ乳酸と P(3HB) のブレンドでは、乳酸と 3HB の結合がないので、このような複数のシグナルは観測されない。したがって、乳酸ユニットのメチン基のプロトンが示す 3HB-LA-3HB のシグナルは、乳酸重合酵素によって合成されたポリマーに特徴的であり、共重合乳酸ポリ

マーが合成されているか判断するための指紋領域となる。例えば、韓国の Cho らは、2007 年に微生物を用いて乳酸ポリマーが生合成できるという内容の特許を提出している。³³⁾ この特許明細の中で、乳酸と 3HB の共重合体の NMR データを示しているが、このチャートには 5 ppm 付近のメチン基に相当するピークが全く観測されていないことから、乳酸の共重合体は合成されていないと判断できる。しかも、1.6 ppm 付近に観測されるピークが乳酸のメチル基に帰属されているが、メチル基が観測され、メチン基が観測されないことはありえないため、この 1.6 ppm 付近のピークは、おそらく水に由来すると推定される。2010 年には、同グループから論文が発表されているが、³⁴⁾ この論文に示された NMR においても、メチン基のピークがごく小さいことから、ポリマーに含まれている乳酸ユニットは痕跡量であり、論文で示されているような高い乳酸分率のポリマーは合成されていないことがわかる。

10. 光学異性体解析

ポリ乳酸の物性は、構成する乳酸ユニットの光学異性体(D, L)の純度により大きく変化する。光学純度の高い PLA (PLLA または PDLA) は硬質の材料になるが、光学異性体の混ざった PLA (PDLLA)は、軟質性の材料になる。さらに、PLLA と PDLA を等量混合すると、融点が大幅に上昇するステレオコンプレックスを形成する。³⁵⁻³⁶⁾ このような性質のため、乳酸重合酵素によって合成された乳酸の光学異性体および光学純度は非常に重要であった。上述したように、LDH と乳酸重合酵素の性質から、得られたポリマーは D 乳酸をおもに含むことが予想された。山田らは、P(LA-co-3HB)を水酸化ナトリウムで加水分解した後、光学分離カラムを用いた HPLC 分析に供することで、ポリマー中の乳酸の光学異性体を直接確認した。その結果、D 乳酸のみが検出され、L 乳酸は検出感度以下であり、非常に光学純度が高いポリマーであることが分かった。したがって、大腸菌細胞内では、まず D 体選択的な LDH の働きにより炭素源から D 乳酸だけを無駄なく合成し、それをさらに乳酸重合酵素が D 体特異的に厳密に重合することにより、高光学純度のポリマーを効率よく生産していると言える。通常、化学重合されるポリ乳酸は、乳酸発酵の段階では生物学的に乳酸が合成されるため光学純度が高い原料を生産できるが、続くラクチド化と開環重合の段階で高温の反応を行うため(Figure 1)、異性体反転現象により光学純度が低下することが知られている。大腸菌による P(LA-co-3HB)合成では、常温下で酵素的にポリマーが重合されるため、このような光学異性体の反転は起こらないと考えられる。これは、生合成系の長所の一つであ

る。

11. ポリ乳酸の生合成？

これまでの研究により、乳酸分率を 62 モル%まで上昇させることができたが、それでは乳酸分率はどこまで上げられるのであろうか？筆者の仮説通り、ポリ乳酸が合成出来ない理由が重合の開始反応が進行しないためだとすれば、重合開始初期の数ユニットだけ 3HB ユニットが重合されれば、後は乳酸ユニットが連続して伸長することもできるはずである。このようなポリマーができれば、乳酸分率を 100%近くにまで上昇させることが可能なのである。しかし、乳酸分率を上げようとして 3HB の供給を低下させすぎるとポリマーが合成されなくなるため、62 モル%以上の乳酸分率が達成可能なモノマー供給系を設計することは非常に難しかった。

しかし筆者らは、偶然の発見によって、このようなモノマー供給が可能であることを見出した。³⁷⁾正瑞らは、乳酸と 3HB に加え、第三のモノマーを含む多元共重合体の生合成条件を検討していた。³⁸⁻³⁹⁾その一例として、第三モノマーの前駆物質として、吉草酸を培地に添加し、3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) ユニットが取り込まれた三元共重合体 P(LA-co-3HB-co-3HV) の合成を試みた。その際、目的の 3 元共重合体は合成されたが、添加する吉草酸がある濃度範囲の時、乳酸分率が非常に高いポリマーが合成されることを見出した。ポリマーの GC/MS 分析の結果、乳酸分率は 96 モル%に達していることが分かった。NMR 解析により、ポリ乳酸と一致するシグナルが観測され (Figure 6)、また GPC 解析により、生成物が確かにポリマーであったことから、高乳酸分率のポリマーが生合成されたことが確認された。この結果は、乳酸分率が実際に 100%近くまで上昇するということを証明した。また、重合の途中で 3HB ユニットが必要になるなら、これほどの高乳酸分率のポリマーは合成できないと考えられるので、乳酸重合酵素は重合の初期段階で 3HB ユニットの必要とするという仮説が支持された。しかし、もしこの作業仮説に基づいて考えると、現状の乳酸重合酵素では、乳酸分率が 100%のポリ乳酸の生合成は不可能と言うことになる。では、乳酸分率がどの程度まで上昇すれば、ポリ乳酸と同等の物性を示すのであろうか？正瑞らは、この問題を検証するため、大腸菌が合成した乳酸分率 96 モル%の乳酸ポリマーと、化学重合により合成したポリ乳酸との熱的性質を比較した。その結果、生合成ポリマーはガラス転移温度がわずかに低いものの、全く同一の融点を示した。さらに、生合成乳

酸ポリマーと化学合成 PLLA とを溶融混合することにより、ステレオコンプレックスの形成が可能か調べた。この混合物は、期待通り単一のポリマーよりも有意に高い融点を示し、ステレオコンプレックスが形成されたことが分かった。これらの結果から、乳酸分率が 96 モル%の生合成乳酸ポリマーは、化学合成 PLA とほぼ同等の熱的性質を持つことが分かった。すなわち、ポリ乳酸が合成できないという現在の乳酸重合酵素の性質は、物質生産の観点からは、致命的な欠点にはならないと言える。

12. 乳酸ベースポリマーの物性解析

ポリ乳酸は透明であり、ボトルなどに加工すると、長期間安定で透明性を保持する。一方 P(3HB) は、経時的に劣化して脆化するだけでなく透明性も低下し、ほぼ完全に不透明になる。このような物性の違いは、ポリマーのガラス転移温度 (T_g) に起因する。ポリ乳酸の T_g は 60°C 付近であるため、アモルファス状態で成型すれば、室温では非晶状態に保たれる。一方、P(3HB) は T_g が 0°C 付近であるため、室温において二次結晶化が進行し、透明性と物理的強度が低下する。

それでは、P(LA-co-3HB) は、どのような物性を持っているのであろうか？筆者らは、これまで合成した乳酸分率の異なる共重合体の熱的性質を DSC で調べた。その結果、これらの共重合体の物性は、乳酸分率と分子量によって変化することがわかった。³⁰⁾ ガラス転移温度は P(3HB) と PLA の中間の値を示し、乳酸分率が増加するにつれて上昇した。この結果は、非晶部分に存在する 3HB ユニットの運動性が、乳酸ユニットの存在によって抑えられていることを示唆していた。また、DSC のセカンドスキャン（一度溶融したサンプルを急冷し、非晶状態から再加熱した際のサーモグラム）では、乳酸分率が 20% を超えると融点ピークが急激に小さくなり、62 モル%では完全に消失した (Figure 9)。この結果は、乳酸ユニットの導入によりポリマー中に結晶ができにくくなっていることを示しており、3HB の二次結晶化が抑制されることを示唆していた。この熱的性質は、材料の透明性にも大きく影響する。P(LA-co-3HB) 共重合体は、乳酸分率が 10 モル%程度でも、P(3HB) や P(3HB-co-3HV) などのポリマーよりも明らかに高い透明性を示す。このことから、P(LA-co-3HB) 共重合体はポリ乳酸の透明性という長所を継承していることがわかる。加えて、これらのポリマーは P(3HB)、PLA ホモポリマーよりも柔らかく、柔軟な性質を示す。このことは、乳酸ユニットの導入により、柔軟性を有する 3HB の非晶部分が増大したため

だと予想される。これらの分析から、この共重合体は、ポリ乳酸の透明性を取り込みつつ、柔軟性という新たな性質が付与されたバイオポリマーであることが分かった。

13. おわりに

PHA は 1926 年にフランスの Lemoigne らによって発見された。⁴⁰⁾ 1988 年に初めての PHA 生合成遺伝子が単離されてから後、⁴¹⁾ 分子生物学の進歩とともに、PHA の生合成にかかわる重要な酵素の性質が次々と明らかになった。その研究の中で、PHA の生合成系を利用した乳酸の重合が試みられてきた。最初の Valentin らの試みから実に 14 年後に、筆者らの研究グループが乳酸ポリマーの生合成に初めて成功した。乳酸ポリマーの生合成系が確立されるまでには、いくつもの偶然があった。しかし、本稿でも紹介したように、乳酸重合酵素が発見されるまでには、多くの研究者の積み重ねがあり、必然的に今日に至っていると言うこともできる。乳酸重合酵素の発見は、単にスズ触媒を無害な酵素に置き換えたということに留まらず、ポリ乳酸と PHA が融合した新たなタイプのバイオポリマーの合成を可能にした。現在筆者らは、この乳酸ポリマーの性質について調査しているが、ポリ乳酸の透明性と PHA の柔軟性を兼ね備えた優れた物性を示すことが分かって来た。今後、モノマー組成の多様性を広げるとともに生産性の効率化を進めることにより、バイオマス由来プラスチックに新たなメンバーとして加えられることを期待している。

リファレンス

1. Auras, R., Harte, B. and Selke, S.: An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol. Biosci.*, 4, 835-864 (2004).
2. Garlotta, D.: A literature review of poly(lactic acid). *J. Polym. Environ.*, 9 63-83 (2001).
3. Doi, Y.: *Microbial Polyesters*; VHC Publishers: New York, (1990).
4. Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y.: Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, 25, 1503-1555 (2000).
5. Steinbüchel, A. and Hein, S.: Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 71,

- 81-123 (2001).
6. Taguchi, S., Yamada, M., Matsumoto, K., Tajima, K., Satoh, Y., Munekata, M., Ohno, K., Kohda, K., Shimamura, T., Kambe, H. and Obata, S.: A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 17323-17327 (2008).
7. Taguchi, S.: Current advances in microbial cell factories for lactate-based polyesters driven by lactate-polymerizing enzymes: Towards the further creation of new LA-based polyesters. *Polym. Degrad. Stab.*, 95, 1421-1428 (2010).
8. Matsumoto, K. and Taguchi, S.: Enzymatic and whole-cell synthesis of lactate-containing polyesters: toward the complete biological production of polylactate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 921-932 (2010).
9. Stubbe, J., Tian, J., He, A., Sinskey, A.J., Lawrence, A.G. and Liu, P.: Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 433-480 (2005).
10. Rehm, B.H.A.: Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem. J.*, 376, 15-33 (2003).
11. Matsusaki, H., Abe, H. and Doi, Y.: Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, 1, 17-22 (2000).
12. Noda, I., Green, P.R., Satkowski, M.M. and Schechtman, L.A.: Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers. *Biomacromolecules*, 6, 580-586 (2005).
13. Nomura, C.T. and Taguchi, S.: PHA synthase engineering toward superbio-catalysts for custom-made biopolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 969-979 (2007).
14. Taguchi, S. and Doi, Y.: Evolution of polyhydroxyalkanoate (PHA) production system by "enzyme evolution": Successful case studies of directed evolution. *Macromol. Biosci.*, 4, 145-156 (2004).
15. Taguchi, S. and Tsuge, T. In *Protein Engineering Handbook*; Lutg, S. a. B. U. T., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008; pp 877-914.
16. Taguchi, S., Maehara, A., Takase, K., Nakahara, M., Nakamura, H. and Doi, Y.: 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).
17. Takase, K., Taguchi, S. and Doi, Y.: 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.

- 1 J. Biochem., 133, 139-145 (2003).
- 2 18. Matsumoto, K., Aoki, E., Takase, K., Doi, Y. and Taguchi, S.: *In vivo* and *in vitro*
3 characterization of Ser477X mutations in polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase 1 from
4 *Pseudomonas* sp. 61-3: effects of beneficial mutations on enzymatic activity, substrate
5 specificity, and molecular weight of PHA. Biomacromolecules, 7, 2436-2442 (2006).
- 6 19. Matsumoto, K., Takase, K., Aoki, E., Doi, Y. and Taguchi, S.: Synergistic effects of
7 Glu130Asp substitution in the type II polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: Enhancement
8 of PHA production and alteration of polymer molecular weight. Biomacromolecules, 6,
9 99-104 (2005).
- 10 20. Takase, K., Matsumoto, K., Taguchi, S. and Doi, Y.: Alteration of substrate
11 chain-length specificity of type II synthase for polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *in vitro*
12 evolution: *in vivo* and *in vitro* enzyme assays. Biomacromolecules, 5, 480-485 (2004).
- 13 21. Shozui, F., Matsumoto, K., Sasaki, T. and Taguchi, S.: Engineering of
14 polyhydroxyalkanoate synthase by Ser477X/Gln481X saturation mutagenesis for efficient
15 production of 3-hydroxybutyrate-based copolyesters. Appl. Microbiol. Biotechnol., 84,
16 1117-1124 (2009).
- 17 22. Matsumoto, K., Shozui, F., Satoh, Y., Tajima, K., MuneKata, M. and Taguchi, S.:
18 Kinetic analysis of engineered polyhydroxyalkanoate synthases with broad substrate
19 specificity. Polym. J., 41, 237-240 (2009).
- 20 23. Valentin, H.E. and Steinbüchel, A.: Application of enzymatically synthesized
21 short-chain-length hydroxy fatty acid coenzyme A thioesters for assay of
22 polyhydroxyalkanoic acid synthases. Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 699-709 (1994).
- 23 24. Zhang, S., Kamachi, M., Takagi, Y., Lenz, R.W. and Goodwin, S.: Comparative
24 study of the relationship between monomer structure and reactivity for two
25 polyhydroxyalkanoate synthases. Appl. Microbiol. Biotechnol., 56, 131-136 (2001).
- 26 25. Yuan, W., Jia, Y., Tian, J.M., Snell, K.D., Muh, U., Sinskey, A.J., Lambalot, R.H.,
27 Walsh, C.T. and Stubbe, J.: Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from *Ralstonia*
28 *eutropha* and *Allochromatium vinosum*: Characterization and substrate specificity studies.
29 Arch. Biochem. Biophys., 394, 87-98 (2001).
- 30 26. Tajima, K., Satoh, Y., Satoh, T., Itoh, R., Han, X.R., Taguchi, S., Kakuchi, T. and
31 MuneKata, M.: Chemo-enzymatic synthesis of poly(lactate-co(3-hydroxybutyrate)) by a
32 lactate-polymerizing enzyme. Macromolecules, 42, 1985-1989 (2009).
- 33 27. Selmer, T., Willanzheimer, A. and Hetzel, M.: Propionate CoA-transferase from
34 *Clostridium propionicum* - Cloning of the gene and identification of glutamate 324 at the
35 active site. Eur. J. Biochem., 269, 372-380 (2002).

28. Yamada, M., Matsumoto, K., Nakai, T. and Taguchi, S.: Microbial production of lactate-enriched poly[(*R*)-lactate-co(*R*)-3-hydroxybutyrate] with novel thermal properties. *Biomacromolecules*, 10, 677-681 (2009).
29. Mat-Jan, F., Alam, K.Y. and Clark, D.P.: Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J. Bacteriol.*, 171, 342-348 (1989).
30. Yamada, M., Matsumoto, K., Shimizu, K., Uramoto, S., Nakai, T., Shozui, F. and Taguchi, S.: Adjustable mutations in lactate (LA)-polymerizing enzyme for the microbial production of LA-based polyesters with tailor-made monomer composition. *Biomacromolecules*, 11, 815-819 (2010).
31. Normi, Y.M., Hiraishi, T., Taguchi, S., Sudesh, K., Najimudin, N. and Doi, Y.: Site-directed saturation mutagenesis at residue F420 and recombination with another beneficial mutation of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase. *Biotechnol. Lett.*, 27, 705-712 (2005).
32. Abe, H., Doi, Y., Hori, Y. and Hagiwara, T.: Physical properties and enzymatic degradability of copolymers of (*R*)-3-hydroxybutyric acid and (*S,S*)-lactide. *Polymer*, 39, 59-67 (1998).
33. Cho, J.Y., Park, S.J., Lee, S.Y. and Jung, Y.K.: US patent, 2007; Vol. US2007/0277268 A1.
34. Yang, T.H., Kim, T.W., Kang, H.O., Lee, S.H., Lee, E.J., Lim, S.C., Oh, S.O., Song, A.J., Park, S.J. and Lee, S.Y.: Biosynthesis of polylactic acid and its copolymers using evolved propionate CoA transferase and PHA synthase. *Biotechnol. Bioeng.*, 105, 150-160 (2010).
35. Ikada, Y., Jamshidi, K., Tsuji, H. and Hyon, S.H.: Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactides). *Macromolecules*, 20, 904-906 (1987).
36. Bouapao, L. and Tsuji, H.: Stereocomplex crystallization and spherulite growth of low molecular weight poly(L-lactide) and poly(D-lactide) from the melt. *Macromol. Chem. Physic.*, 210, 993-1002 (2009).
37. Shozui, F., Matsumoto, K., Motohashi, R., Sun, J., Satoh, T., Kakuchi, T. and Taguchi, S.: Biosynthesis of a lactate (LA)-based polyester with a 96 mol% LA fraction and its application to stereocomplex formation. *Polym. Degrad. Stab.*, in press, (2011).
38. Shozui, F., Matsumoto, K., Motohashi, R., Yamada, M. and Taguchi, S.: Establishment of a metabolic pathway to introduce the 3-hydroxyhexanoate unit into LA-based polyesters via a reverse reaction of β -oxidation in *Escherichia coli* LS5218. *Polym. Degrad. Stab.*, 95, 1340-1344 (2010).
39. Shozui, F., Matsumoto, K., Nakai, T., Yamada, M. and Taguchi, S.: Biosynthesis of

1 novel terpolymers poly(lactate-*co*-3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate)s in
2 lactate-overproducing mutant *Escherichia coli* JW0885 by feeding propionate as a precursor
3 of 3-hydroxyvalerate. Appl. Microbiol. Biotechnol., 85, 949-954 (2010).

4 40. Lemoigne: Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide b-oxybutyrique.
5 Bull. Soc. Chim. Biol., 8, 770-782 (1926).

6 41. Schubert, P., Steinbüchel, A. and Schlegel, H.G.: Cloning of the *Alcaligenes*
7 *eutrophus* genes for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in
8 *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 170, 5837-5847 (1988).

[Comprehensive Papers]

One-pot production of lactate-based polyesters using engineered microbes expressing lactate-polymerizing enzyme

Ken'ichiro Matsumoto and Seiichi Taguchi

Division of Biotechnology and Macromolecular Chemistry, Graduate School of Engineering, Hokkaido University, (N13-W8, Kita-ku, Sapporo 060-8628, Japan)

Poly(lactic acid) (PLA) is the most widespread biobased plastic with excellent transparency. Such biobased plastics are expected to be an alternative to petroleum-derived materials. Although PLA is currently produced from fermentative lactate(LA) via chemical polymerization using heavy metal catalysts, we developed a new bioprocess producing LA-based polyester by one-pot reaction. The breakthrough for establishing this process was the discovery of lactate-polymerizing enzyme (LPE). LPE is capable of synthesizing LA-based polyesters with extremely high enantiomer excess. Moreover, the LA-based copolyesters incorporating PHA constituents showed improved flexibility. Therefore, the microbial LA-based polyester is a potent candidate for an environmental friendly

plastic.

KEY WORDS Poly (lactic acid) / PLA / Lactate-polymerizing enzyme / Microbial factory / Chiral polymer / Biomass / Bio-based plastic

Figure captions

Figure 1. Processes for production of biobased polyesters. LDH, lactate dehydrogenase; PDH, pyruvate dehydrogenase complex; PCT, CoA transferase; LPE, lactate-polymerizing enzyme; PhaA, β -ketothiolase; PhaB, NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; PhaC, PHA synthase.

Figure 2. Proposed polymerizing mechanism for PHA synthase.

Figure 3. Variety in monomer composition of PHAs and their property. Monomer composition of PHAs greatly depends the substrate specificity of PHA synthases.

Figure 4. Evolutionary engineering of PHA synthase to enhance the polymerizing activity.

Figure 5. In vitro chemo-enzymatic synthesis of polyesters. The starting material are added in organic phase (hexane). CoA monomers are generated in buffer phase by ester exchange and polymerized by PHA synthase (PhaC).

Figure 6. ^1H NMR analysis of LA-based polyesters. In the chart of 96 mol% LA, the trace signals for 3-hydroxyalkanoate units are observed.

Figure 7. Strategy for creation of new LA-polymerizing enzyme (LPE) with enhanced

activity. The bars indicate primary structure of enzymes. Introduction of the beneficial mutation in a homologous enzyme into LPE led to an increase in LA-polymerizing activity.

Figure 8. 2D NMR analysis of LA-based polyesters. This is direct evidence for generation of LA-LA linkage by LA-polymerizing enzyme.

Figure 9. DSC analysis of P(LA-*co*-3HB)s, PLA and P(3HB). The melting peak around 170 °C is decreased by the increase in LA fraction, indicating the less crystallinity of the copolymers.

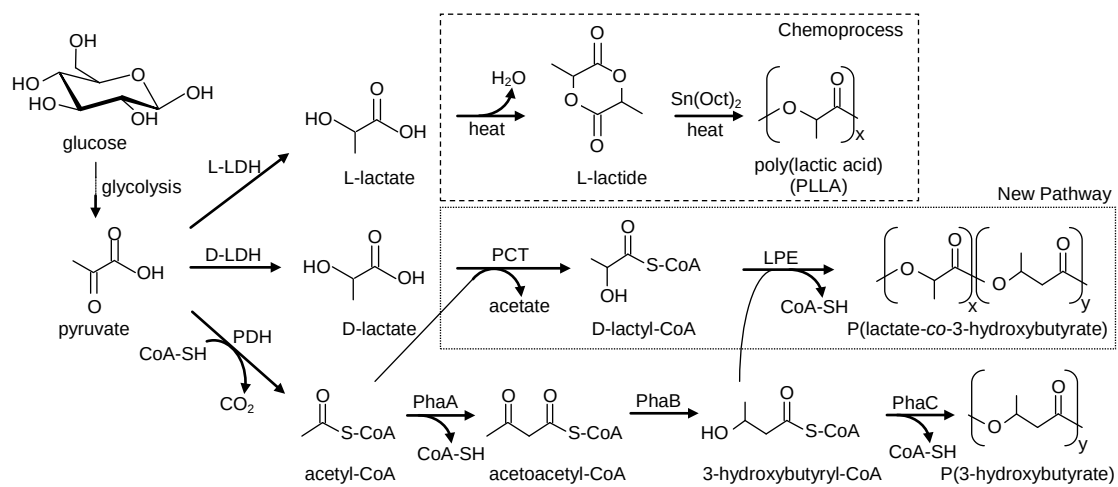


Figure 1.

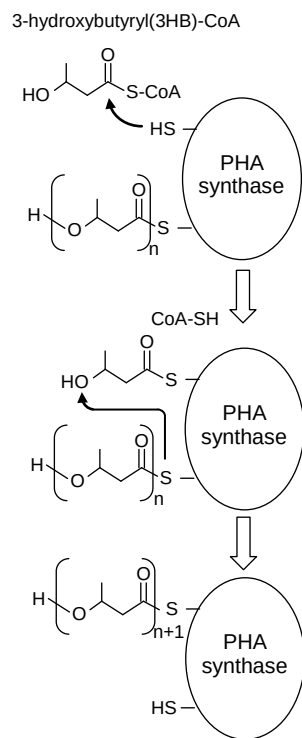


Figure 2.

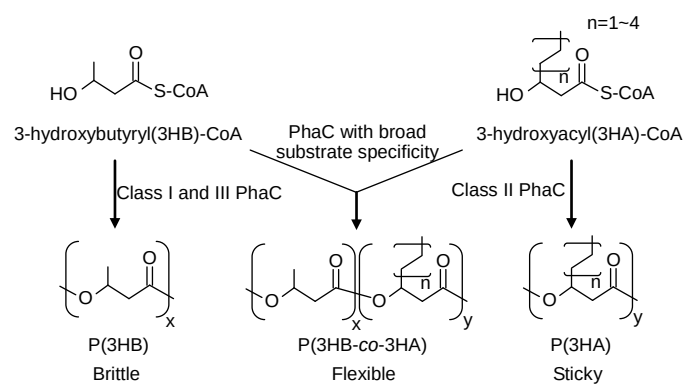


Figure 3.

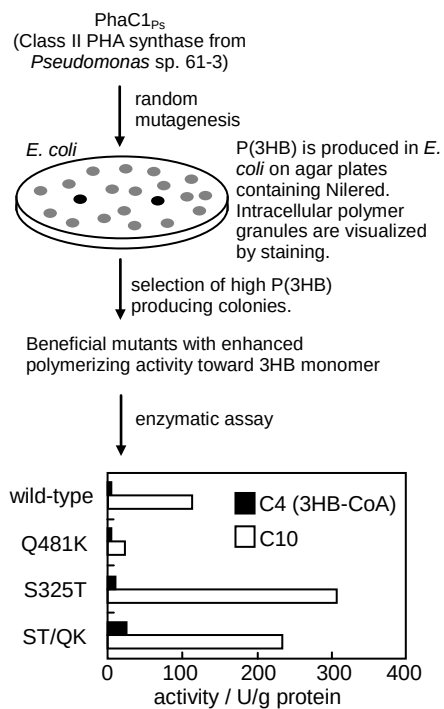


Figure 4.

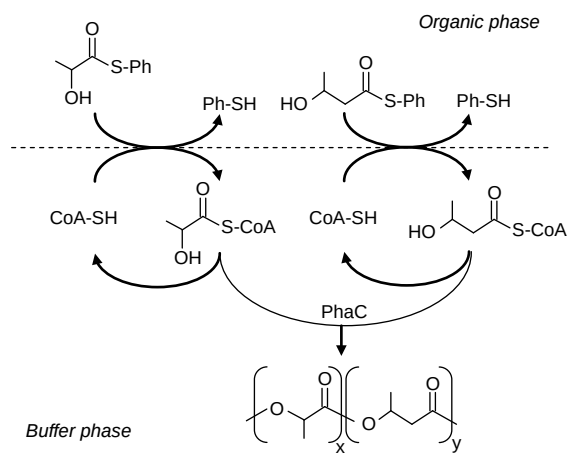


Figure 5.

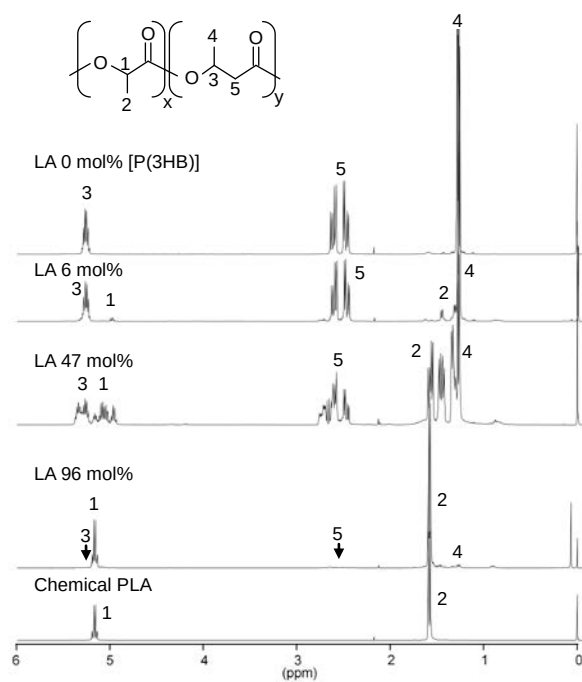


Figure 6.

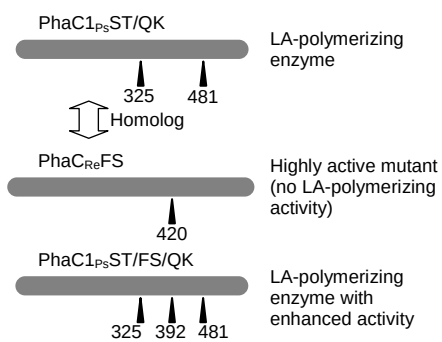


Figure 7.

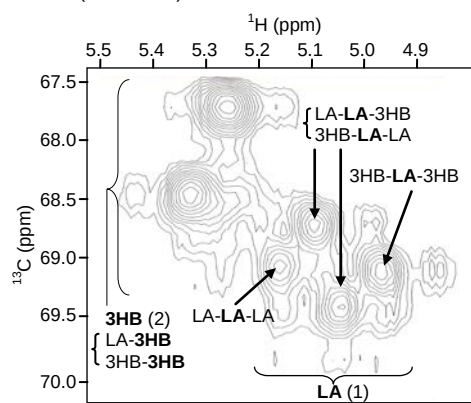
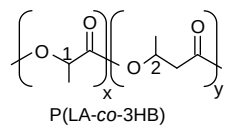


Figure 8.

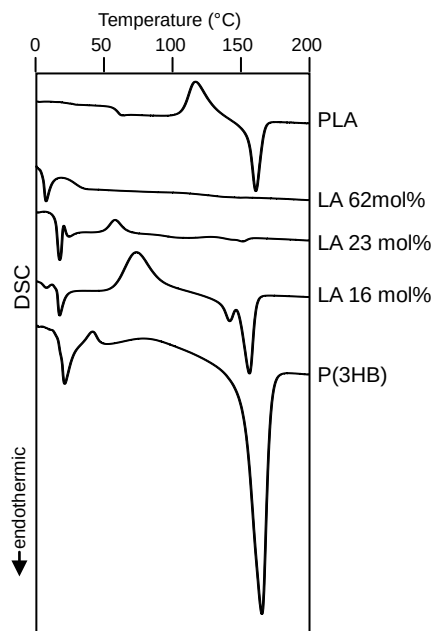


Figure 9.