

社会人教育プログラム：第1回共通特別講義

(2024年6月12日 at 大阪大学豊中キャンパス・文理融合型棟セミナー室)

物性と生分解性を両立する 次世代ポリ乳酸LAHB

資源循環

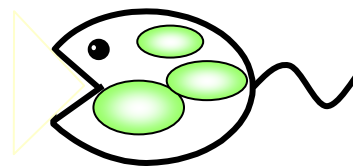
バイオプラスチック

機能材料

生分解

バイオマス

Microbial Plastic Factory

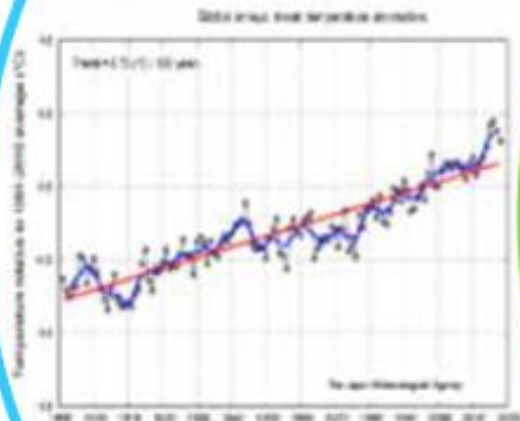


田口 精一

(神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科/
先端バイオ生産研究センター)

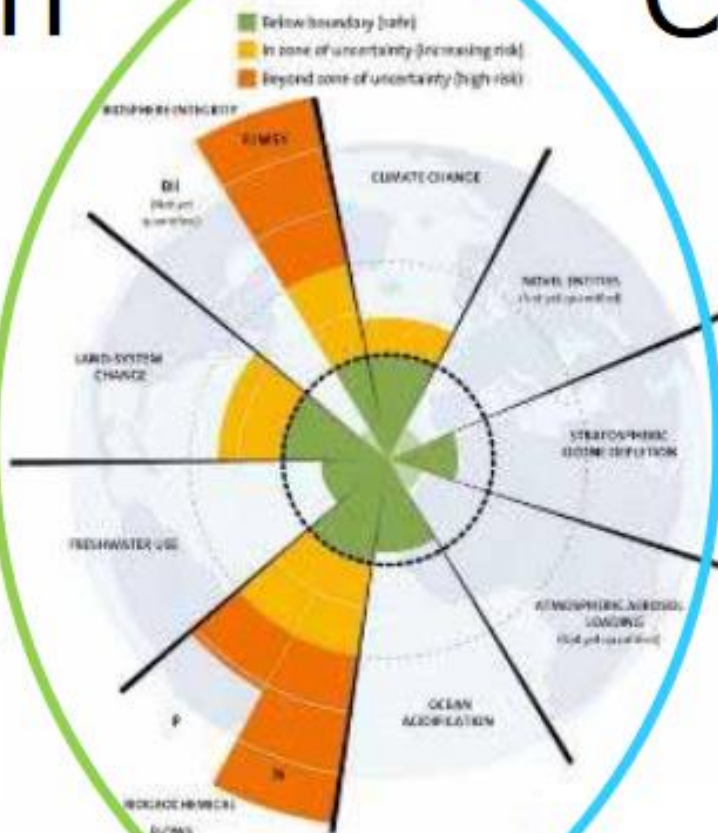
Cool Earth

Clean Earth



地球温暖化

Global warming



プラネタリー
バウンダリー✕



海洋プラスチック
ごみ

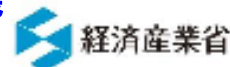
Marine plastic waste

カーボンニュートラル：低炭素 → 脱炭素



13資源循環関連産業

新しい資本主義実現会議
『バイオものづくり』



海洋生分解性プラスチック開発・導入普及ロードマップの概要図

令和元年5月

		2019年	2020年	2021～25年	～2030年	～2050年
① 実用化技術の社会実装 (MBBP1.0) PHBH、PBS等 (主な用途例) レジ袋・ごみ袋 ストロー・カトラリー 洗剤用ボトル 農業用マルチフィルム等	海洋生分解機能に係る信頼性向上	ISO策定 課題整理	ISO提案【産業技術総合研究所、日本バイオプラスチック協会(JBPA)】 生分解機能の評価の充実に向けた試験研究【新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)等】			
	量産化に向けた生産設備拡大、コスト改善		量産能力の増強 生分解性プラスチック製造のバイオプロセスの改善【NEDO等】			
	需要開拓	国内外の出展、ビジネスマッチングの促進【カーン・エシジョン・マテリアル・アライアンス(CLOMA)】				
	識別表示、分別回収・処理に係る検討	レジ袋 ストロー カトラリー	グリーン公共調達	識別表示の整備【JBPA】	分別回収・処理に係る検討	
② 複合素材の技術開発による多用途化 (MBBP2.0) 不織布(マスク等)、発泡成形品(緩衝材等)等			セルロースナノファイバー等のコスト削減、複合方法の加工性の向上【NEDO等】			
③ 革新的素材の研究開発 (MBBP3.0) 肥料の被覆材 漁具(漁業・養殖業用資材等)等			革新的素材の創出に向けた海洋生分解性メカニズムの解明【NEDO等】 生分解コントロール機能の付与 新たな微生物の発見【製品評価技術基盤機構(NITE)】 漁具の代替素材の導入検討【水産庁(産総研との連携)】	海洋生分解性メカニズムを応用した革新的素材の創出		

現行の研究プロジェクト

(1) NEDO新革新

(2) NEDOムーンショット



Game-changing technologies

化学工学(業) ⇒ 生物化学工学(業)

合成生物学: 微生物重合の革新

物性と生分解のジレンマ: 止揚の科学

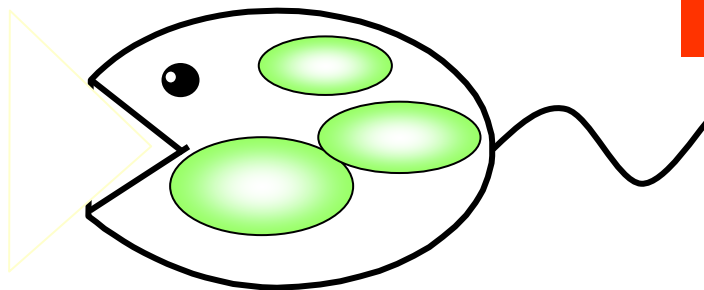
上流と下流: 生物の徹底利用

バイオポリマー: 主役 or 名脇役

微生物はマルチタレント

バイオものづくり

食品



環境

医薬品

抗生物質
抗ガン剤
免疫抑制物質

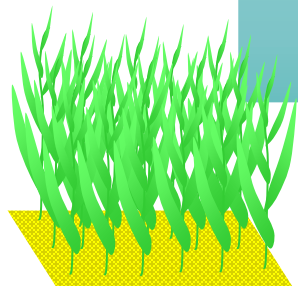
有害汚染物質の分解
排水処理
生分解性プラスチック
の合成



脱石油

再生可能な炭素資源

糖
植物油
CO₂



植物

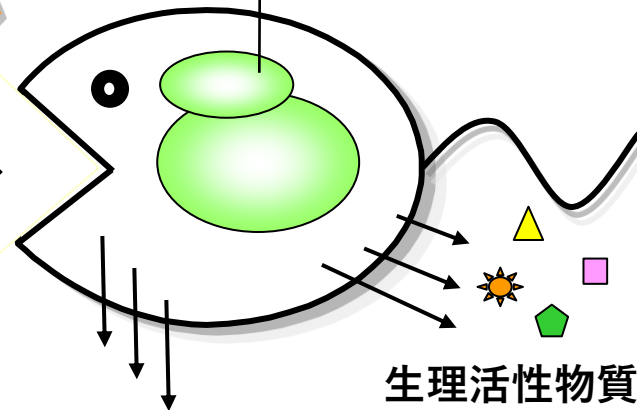
環境微生物
による分解

炭素循環システム

バイオマスリファイナー

Bioeconomy
Circular
Economy

ポリエステル



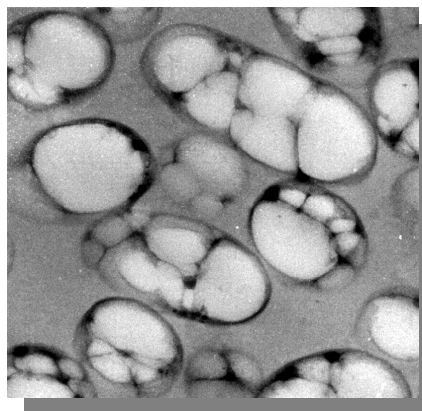
ポリグルタミン酸
ポリリジン
バクテリアルセルロース

生理活性物質
農医薬品素材

合成生物学
代謝工学
ゲノム編集

生産システムの
最適化

バイオプラスチック

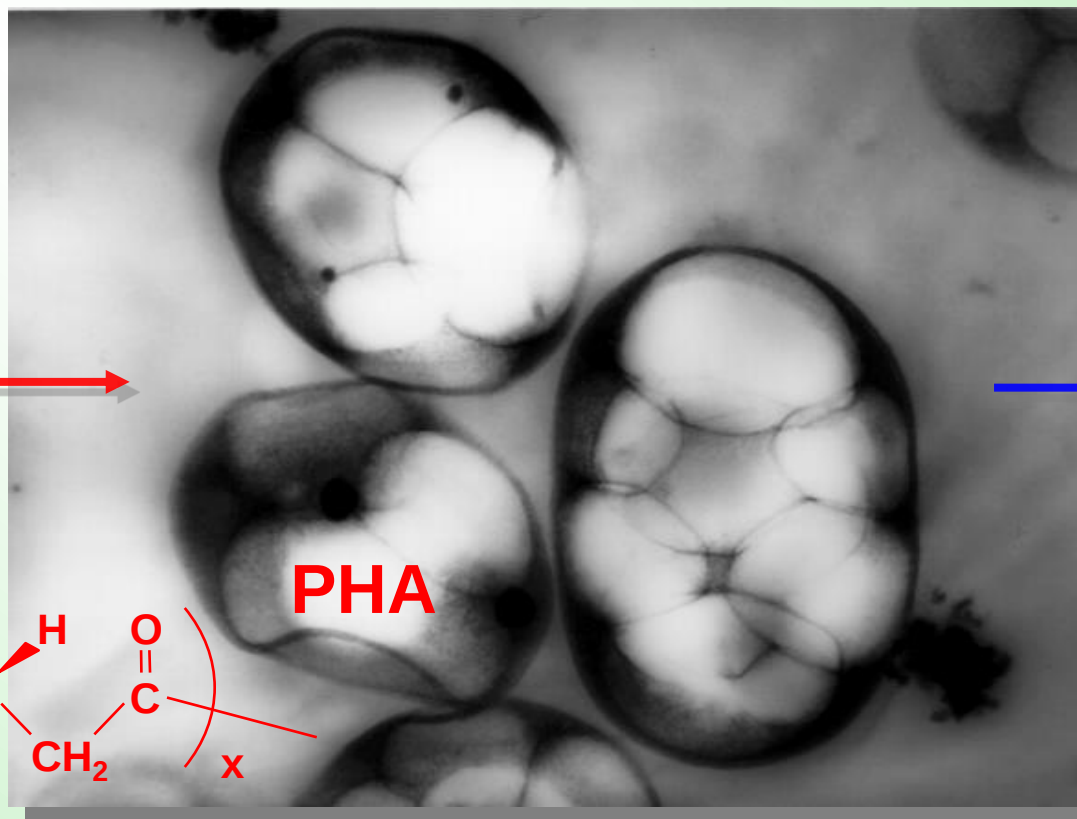
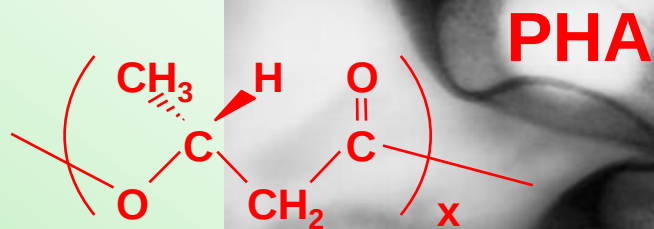


微生物がプラスチックを作る！

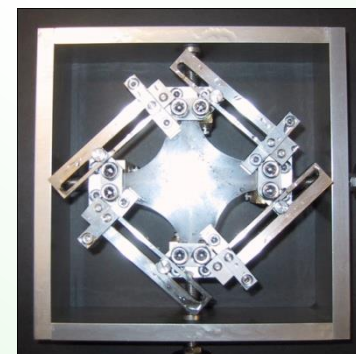
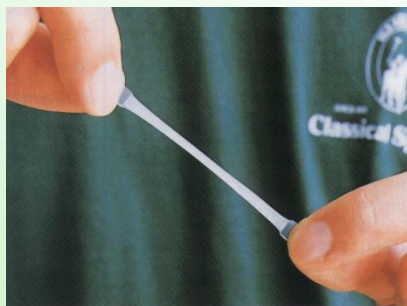
**Carbon
excess**



**Nitrogen
starvation**

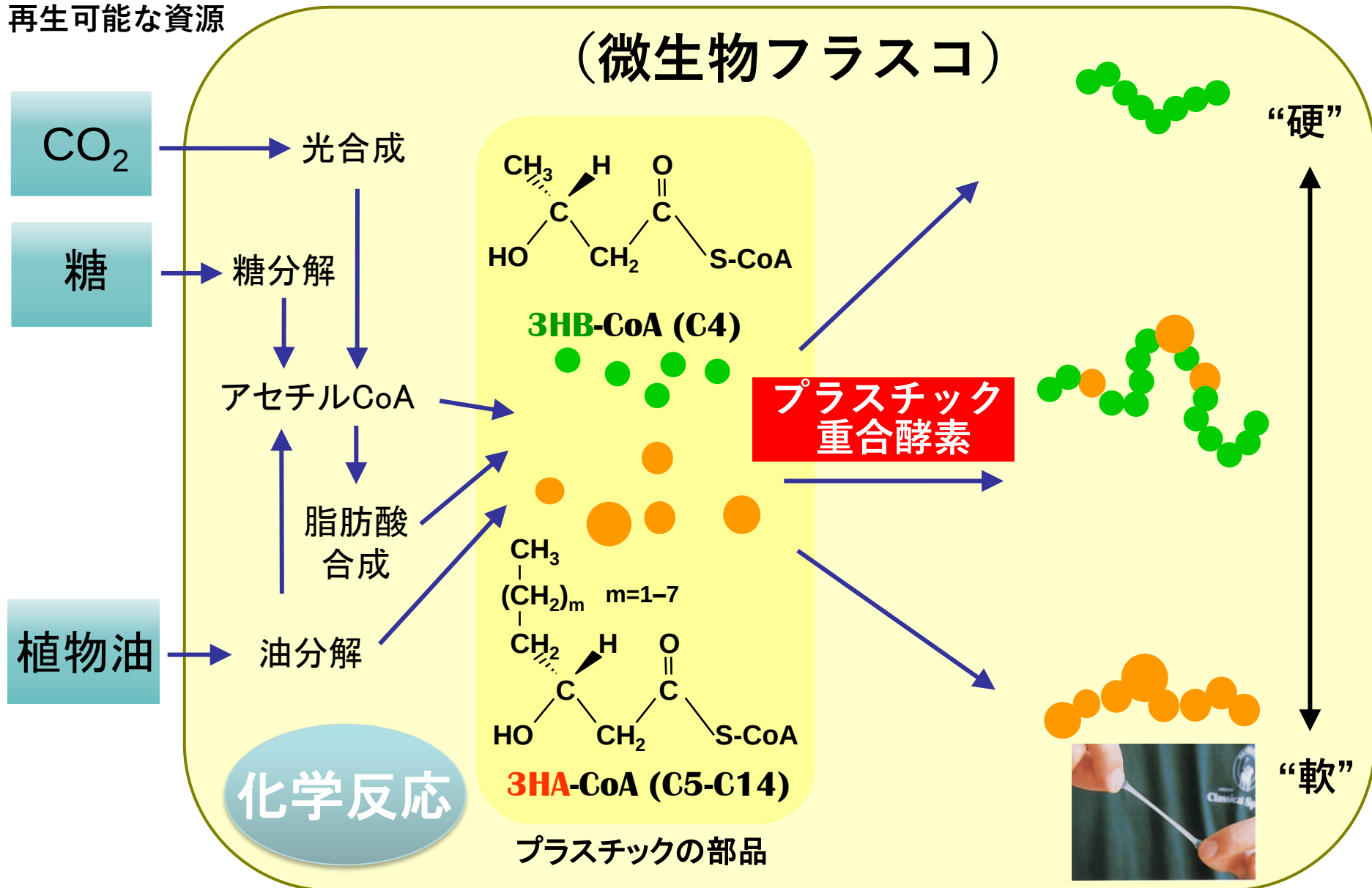


**Energy
storage**

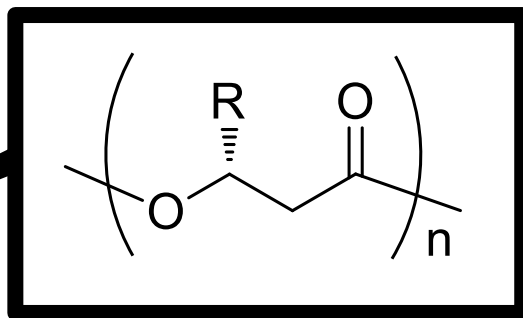
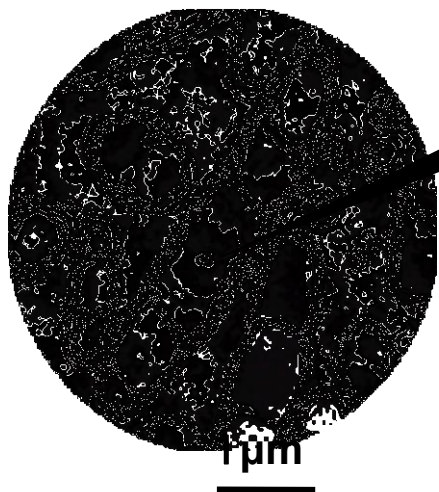


プラスチックはどうやって作られるのか？

再生可能な資源



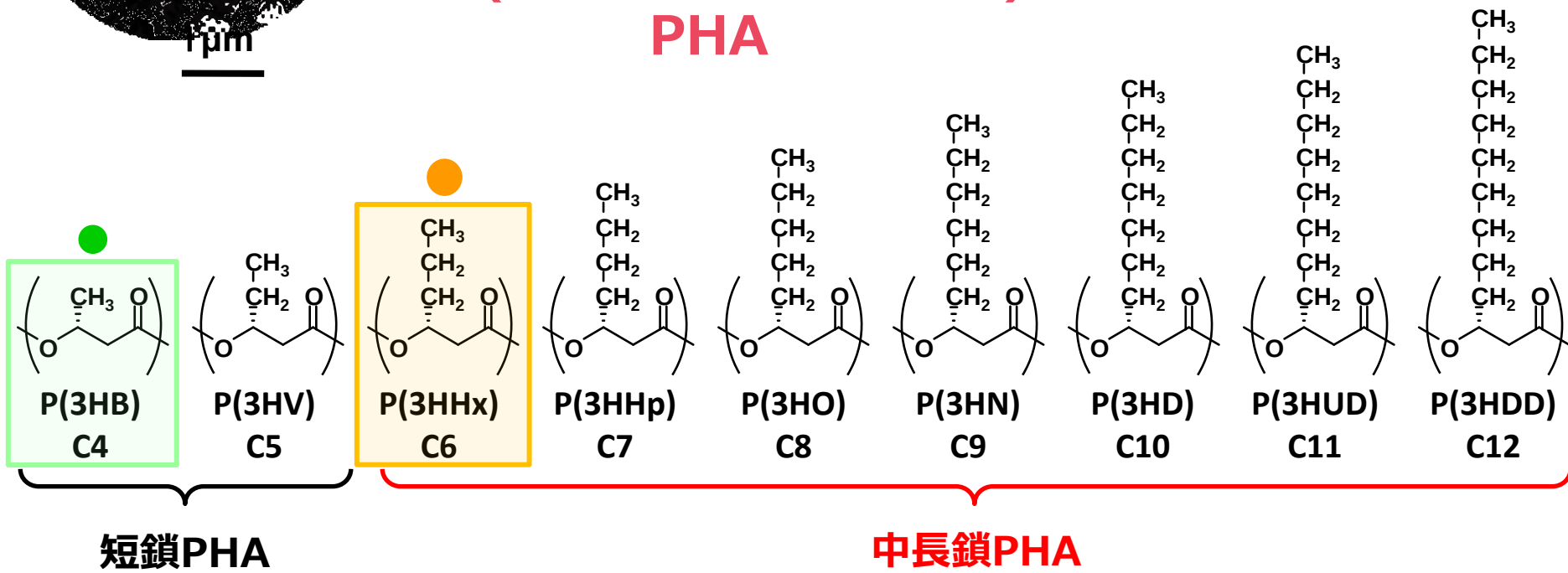
ポリヒドロキシアルカン酸ポリマー



微生物がエネルギー貯蔵物質
として菌体内に蓄える
ポリエステル

- 熱可塑性
- 生体適合性
- 生分解性

ポリ(3-ヒドロキシアルカン酸)
PHA



バイオプラスチック

合成生物学

テラーメイドポリマー合成

キーワード

進化工学

鳥がより高く飛ぶ 原理・戦略



合成生物学

作りながら理解し伸ばす

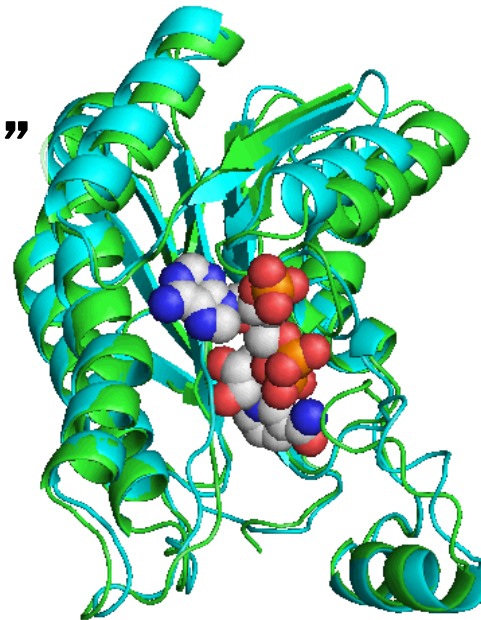
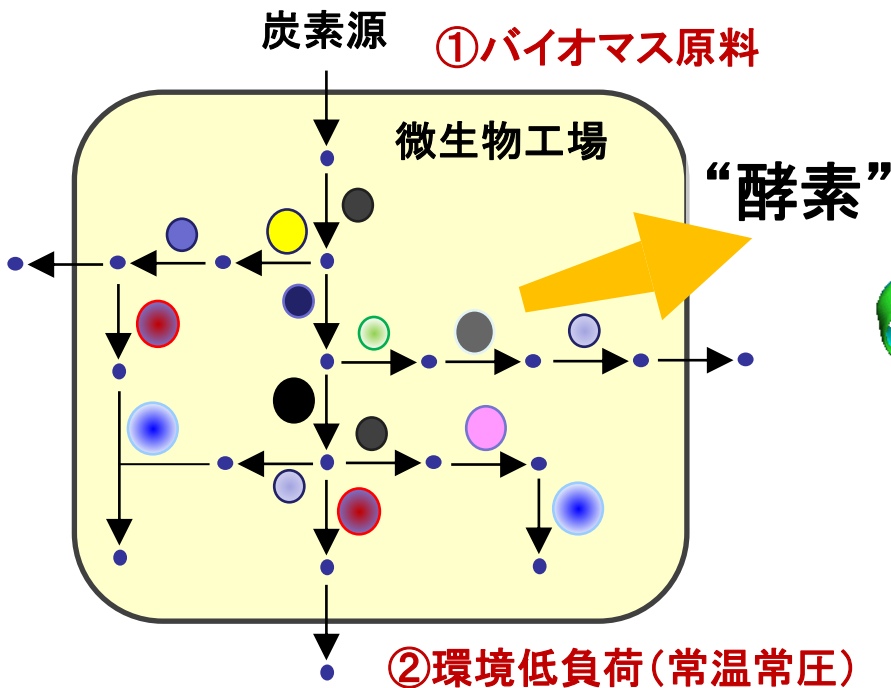
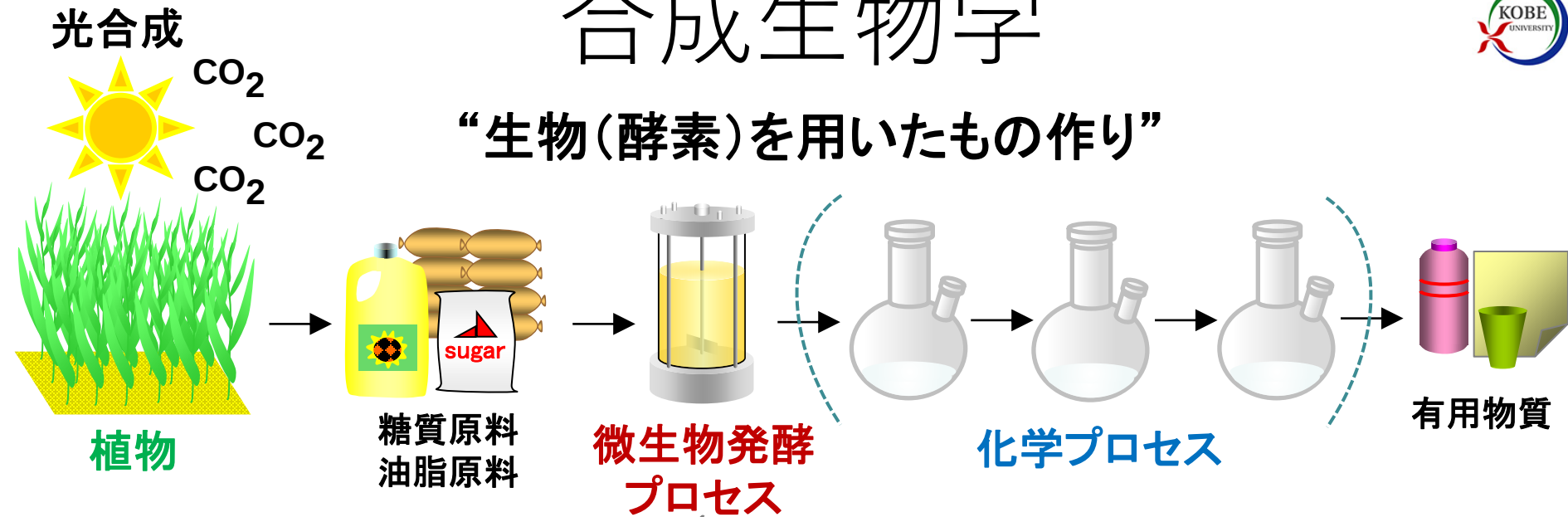


新規バイオポリマー

どうせなら、オリジナル！

合成生物学

“生物(酵素)を用いたもの作り”



高選択性・基質特異性

- ③ 多段階集積反応
- ④ 立体異性体の精密合成

× 反応条件に制限がある
× 安定供給に改善が必要

Polymer



PHA synthase

productivity



Specific activity



“soft”

“weak”

“strong”

physical
property

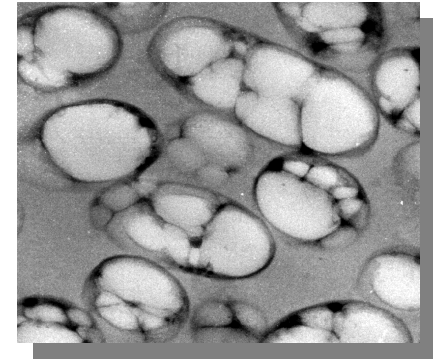
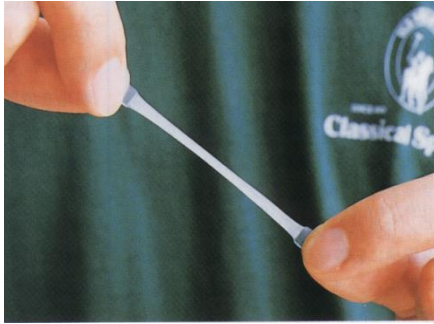
monomeric
composition



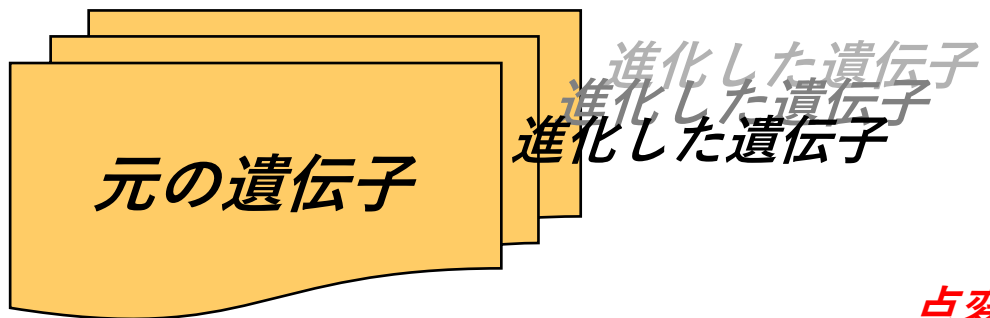
(3HB fraction)

Substrate specificity

molecular
weight



酵素分子の改変 – “機能” からのアプローチ



点変異
挿入変異
欠失変異
融合変異

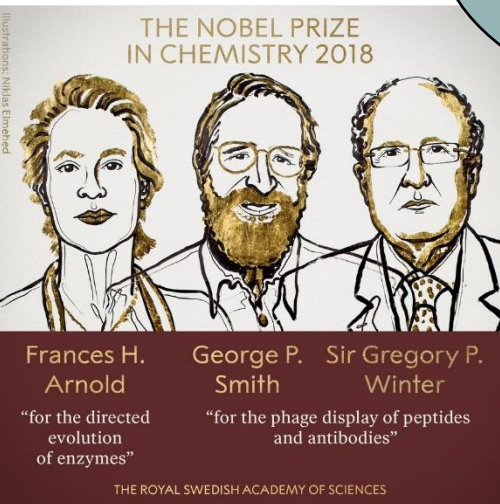
選択された形質
の遺伝子**増幅**

情報と機能の対応づけ

遺伝情報の**変異**

変異遺伝子発現
と
形質の選択

淘汰圧



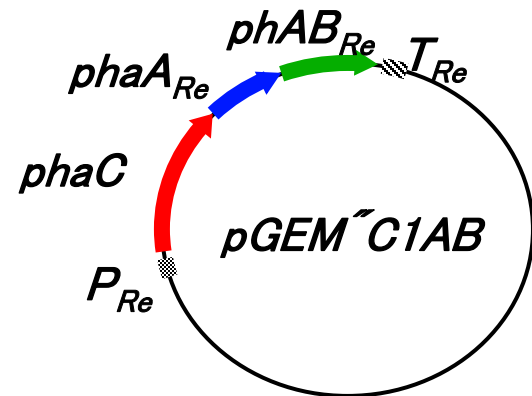
変異・**選択**・**増幅**を要素とする進化サイクルの概念図

酵素進化工学の戦略

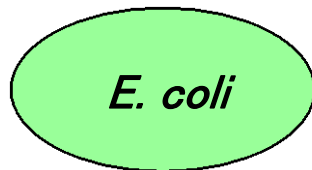
β -ketothiolase
(PhbA_{Re})

Acetoacetyl-CoA
reductase
(PhbB_{Re})

PHA synthase
(PhaC)



transformation



mutant library

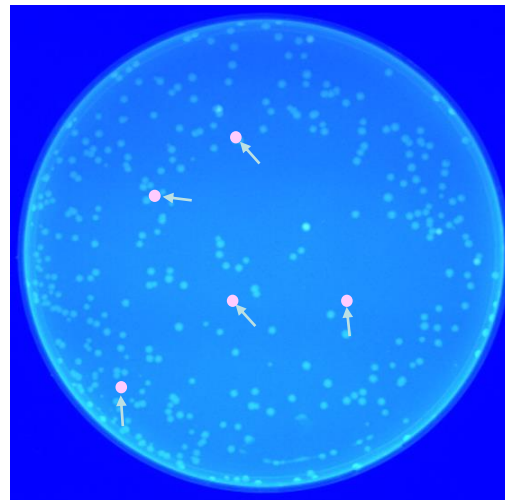


Plate assay

(LB+2% glucose, Nile red)

Positive Selection

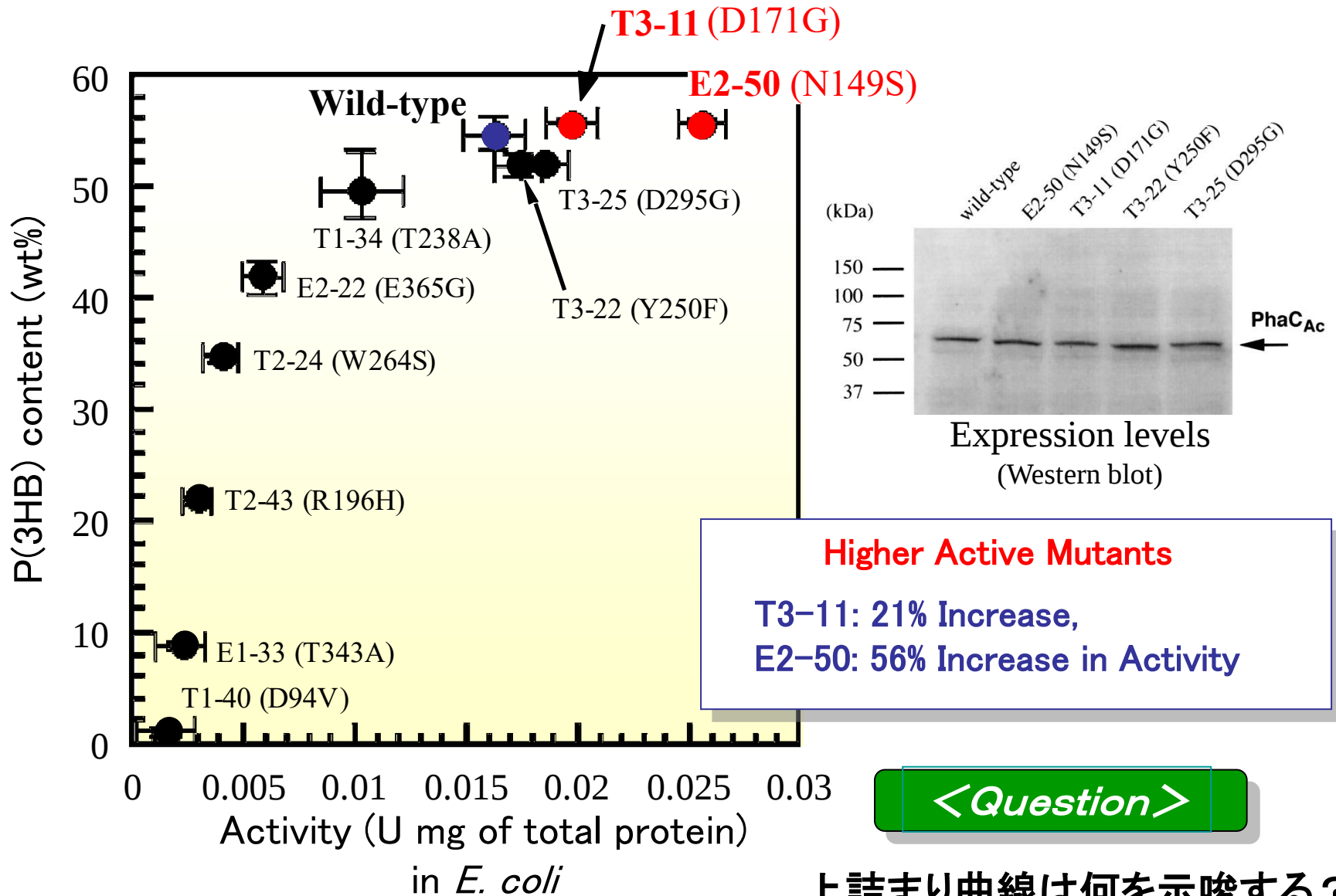
Quantification

HPLC

DNA
sequencing

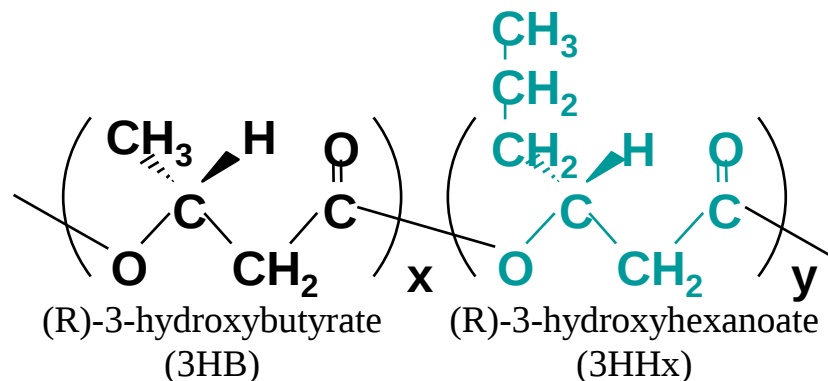
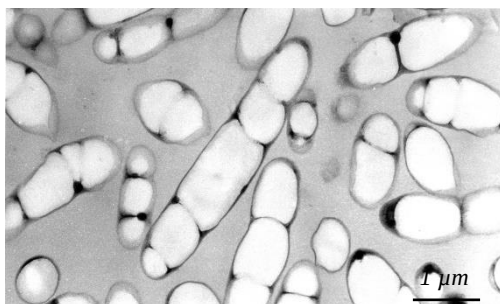
High Through-put Screening

Correlation Between PhaC_{Ac} Activity and P(3HB) Content in *E. coli*

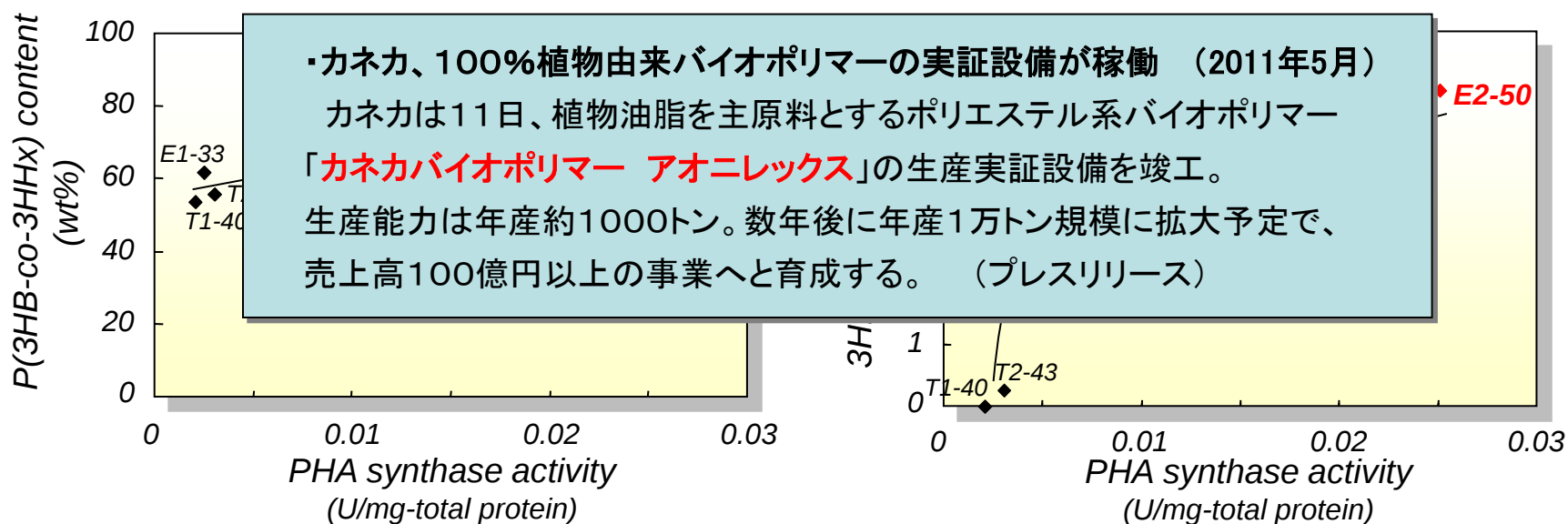


Industrial Production of P(3HB-co-3HHx)

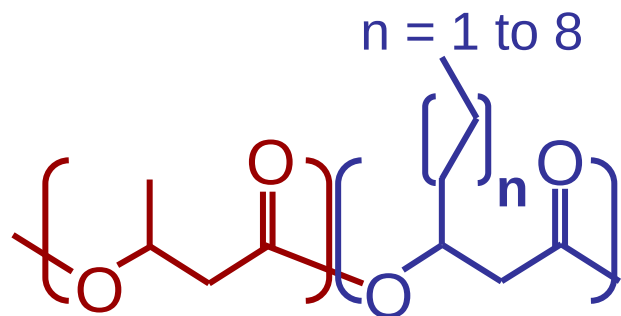
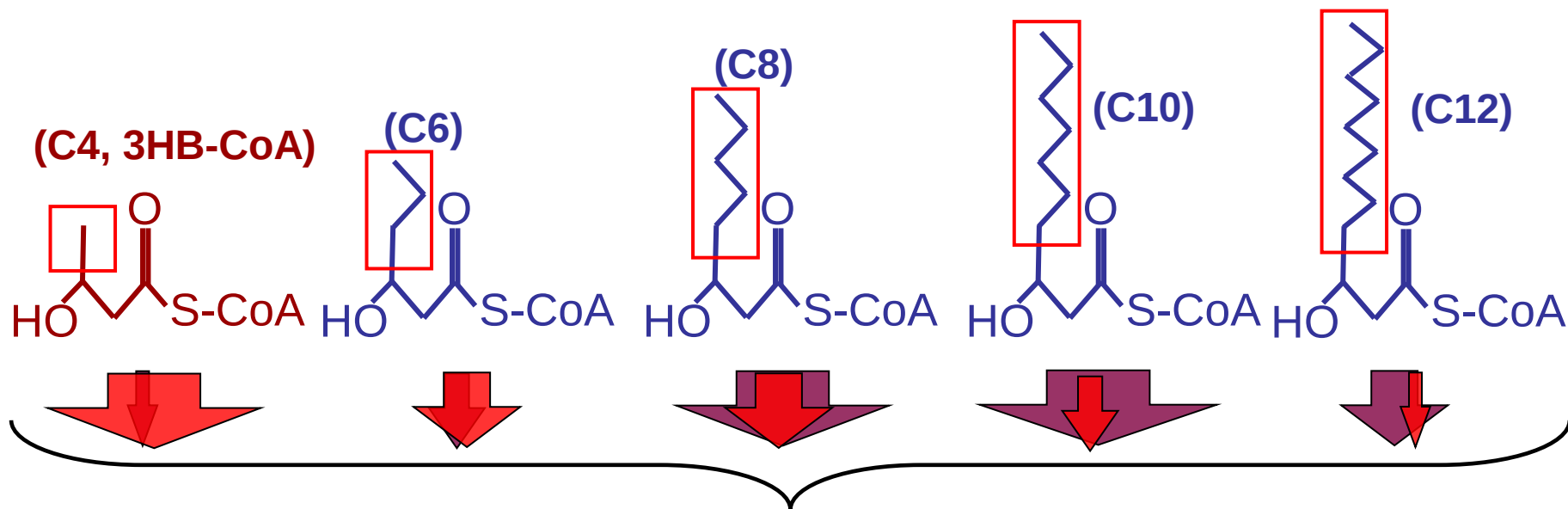
Soybean Oil



P(3HB-co-3HH_x)



合成酵素の基質特異性変換

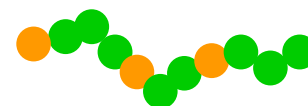
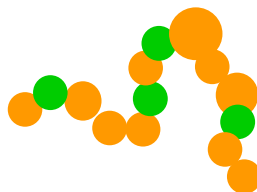


PHA 合成酵素

(*Pseudomonas* sp. 61-3)

進化分子工学

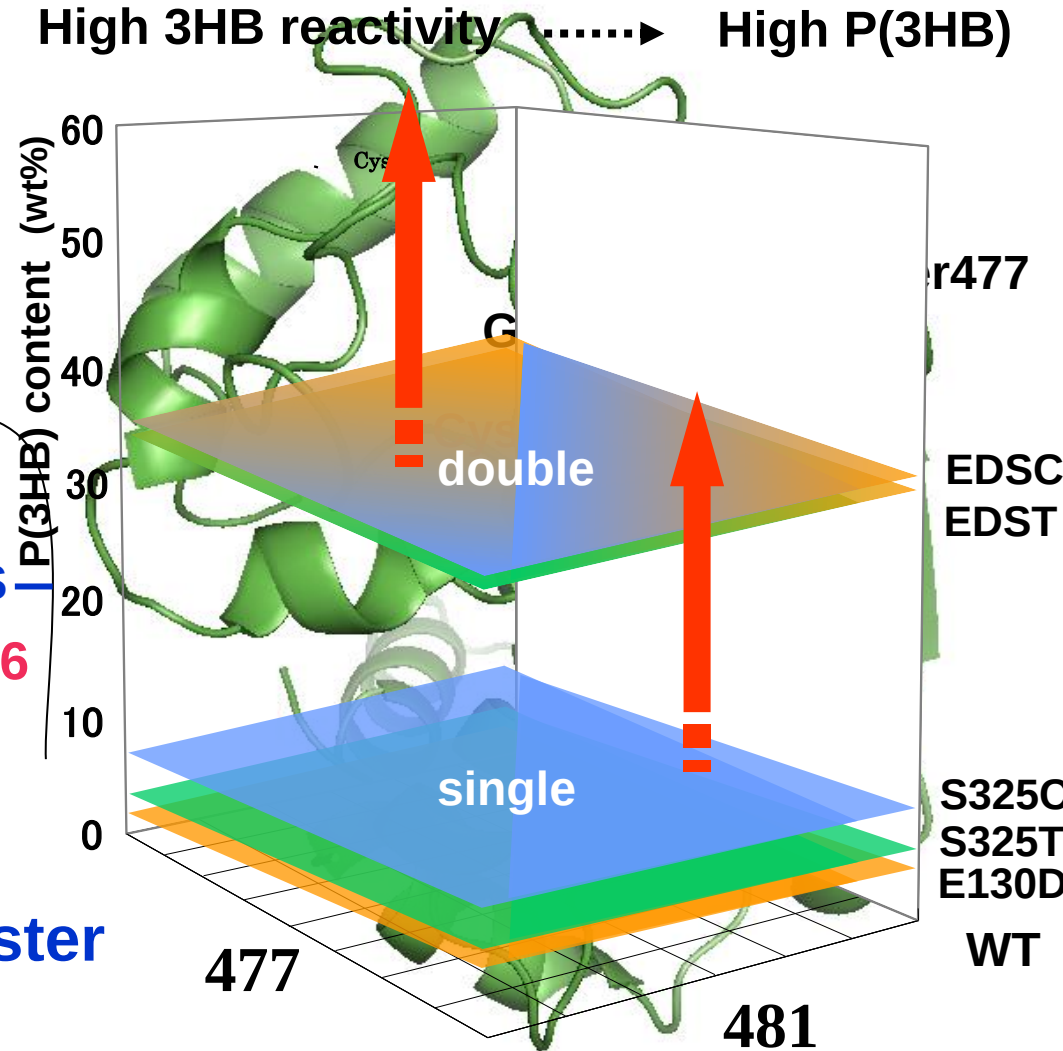
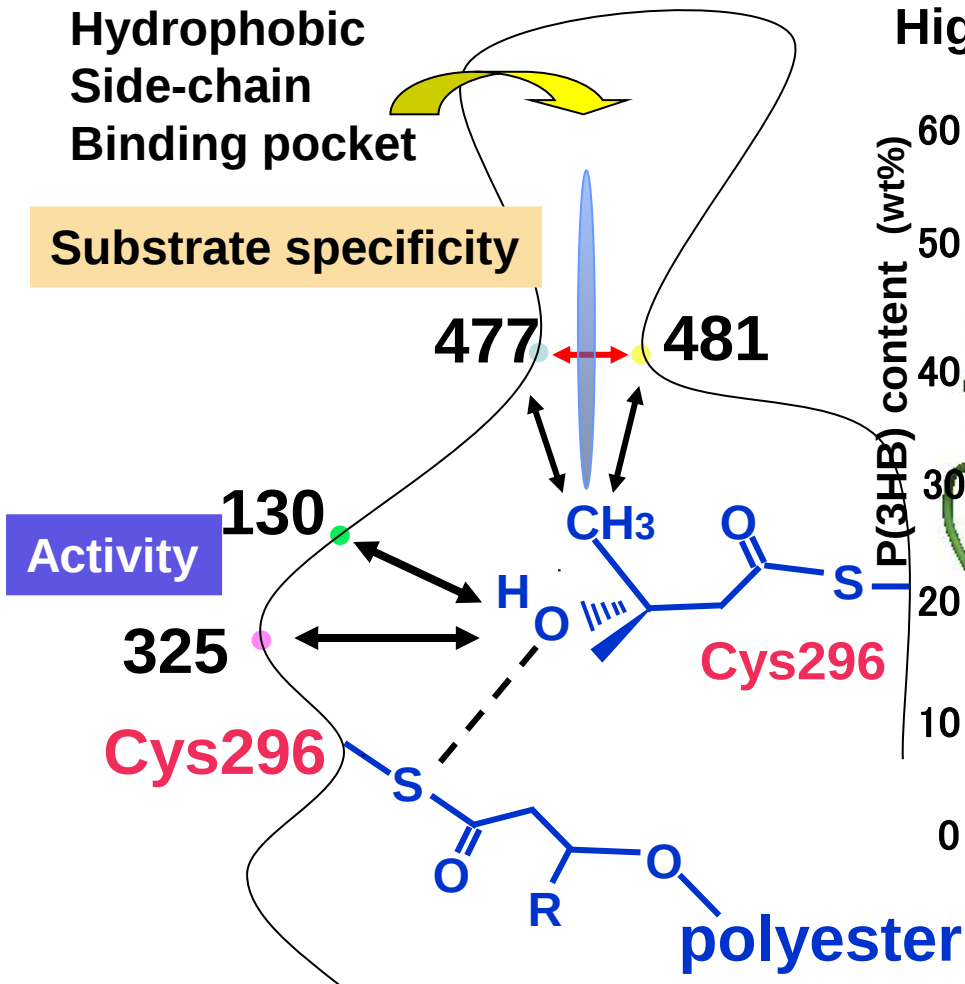
“軟”



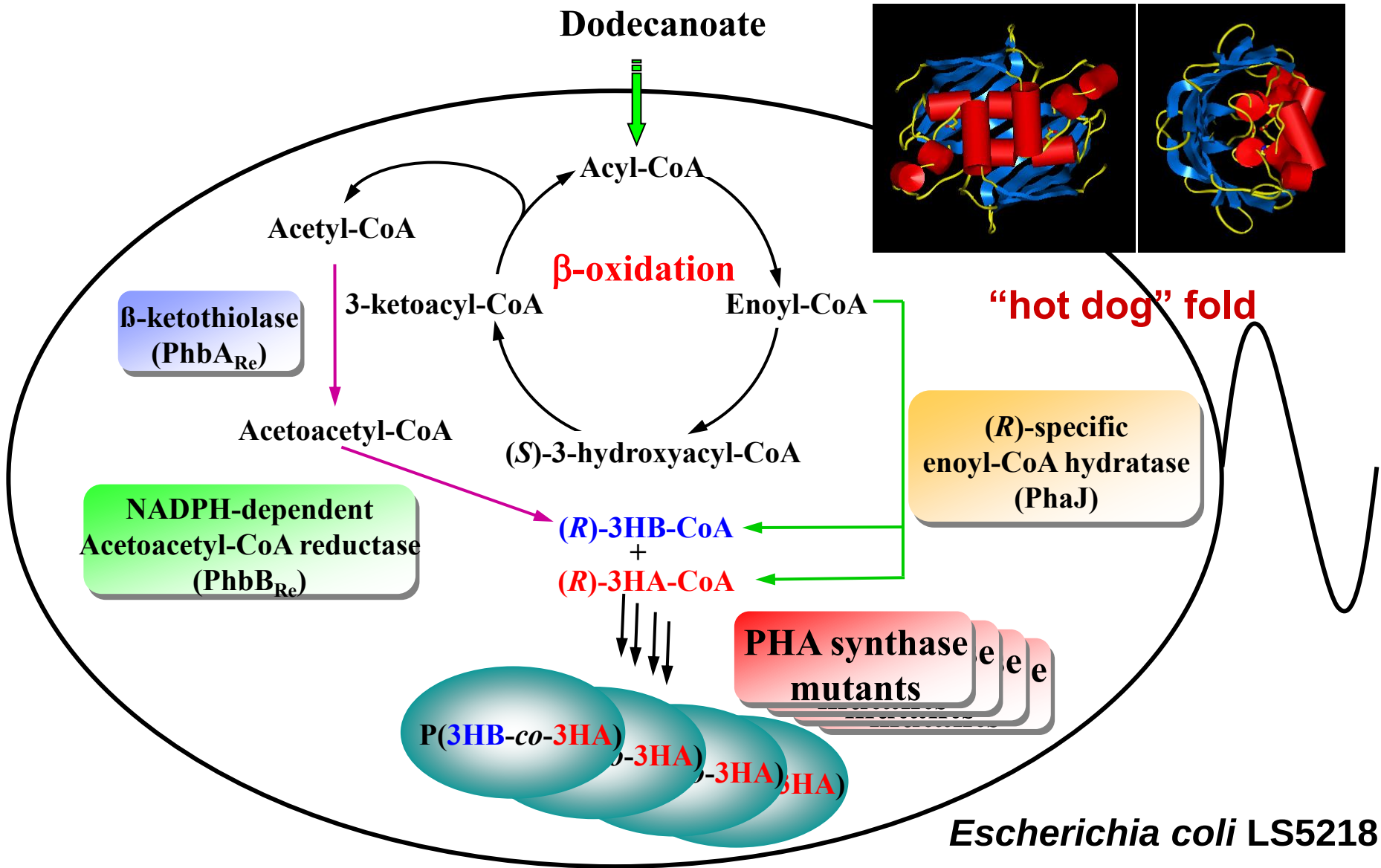
“硬”

A proposed reaction pocket

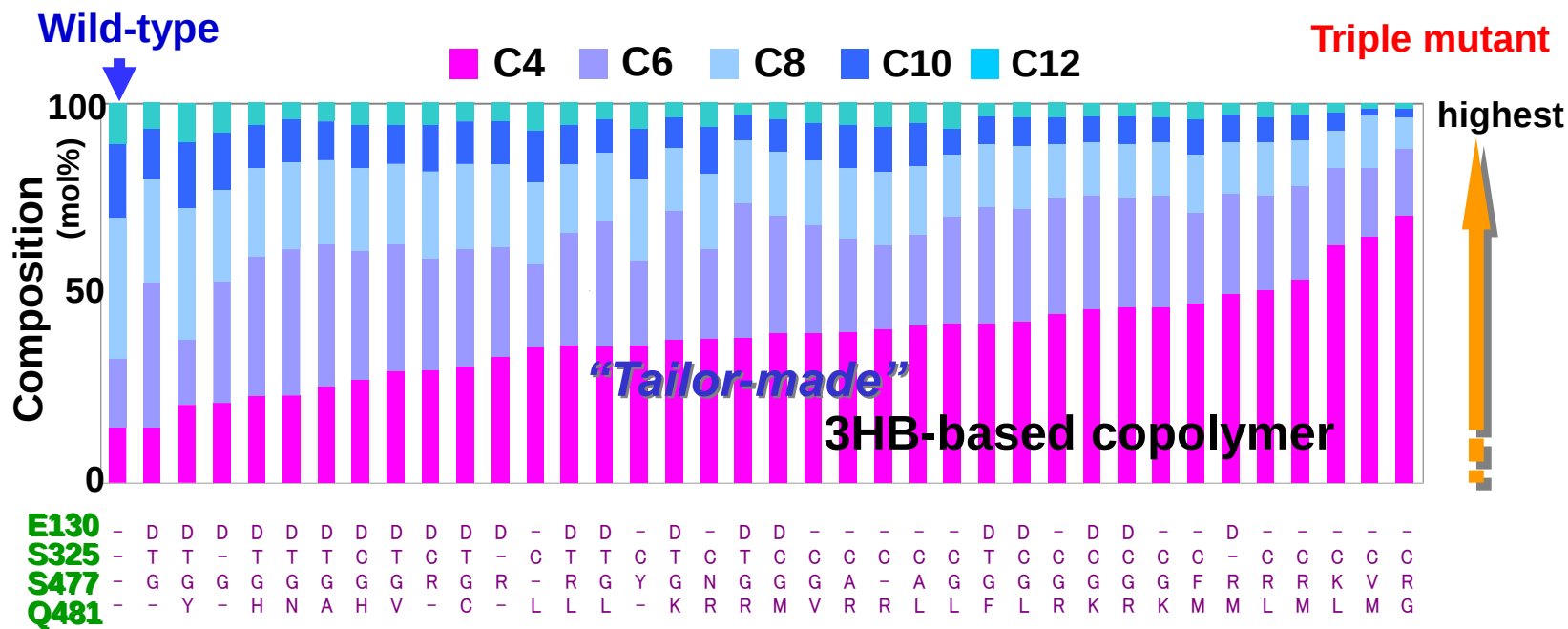
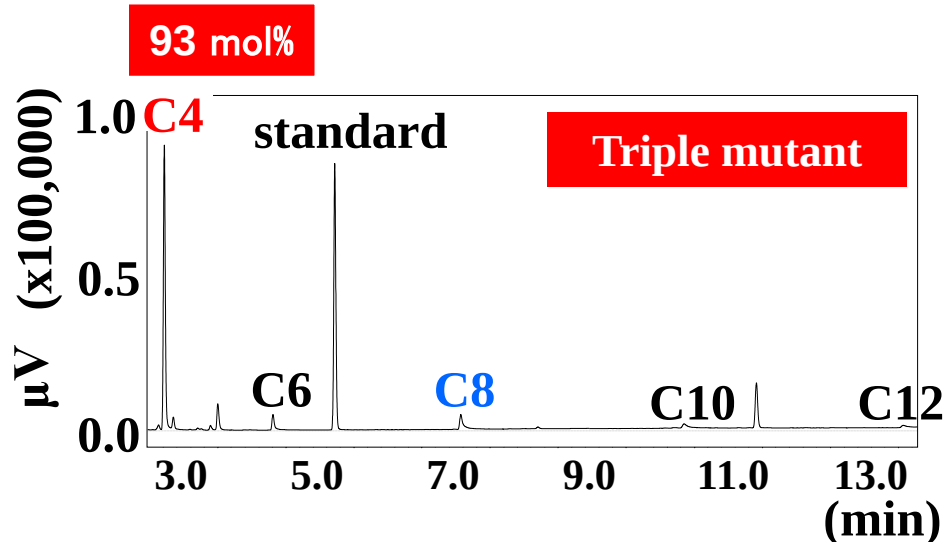
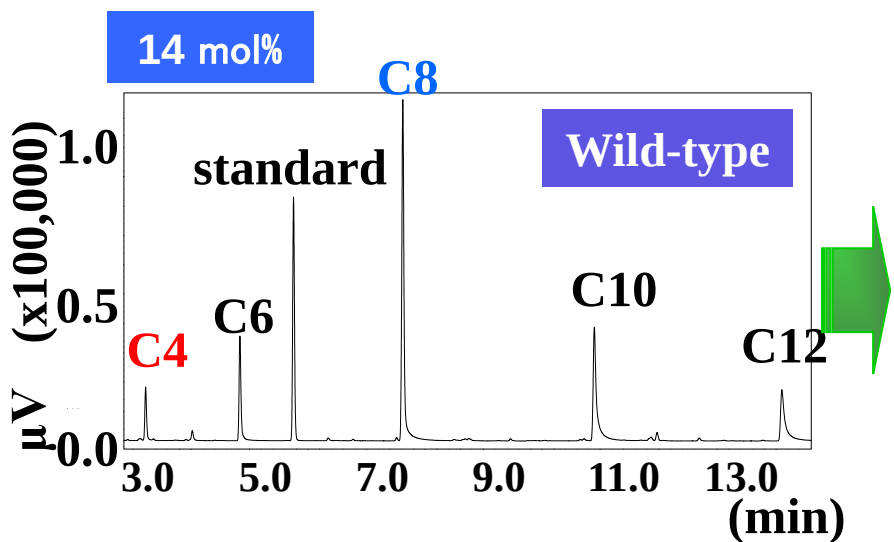
Mutation scrambling



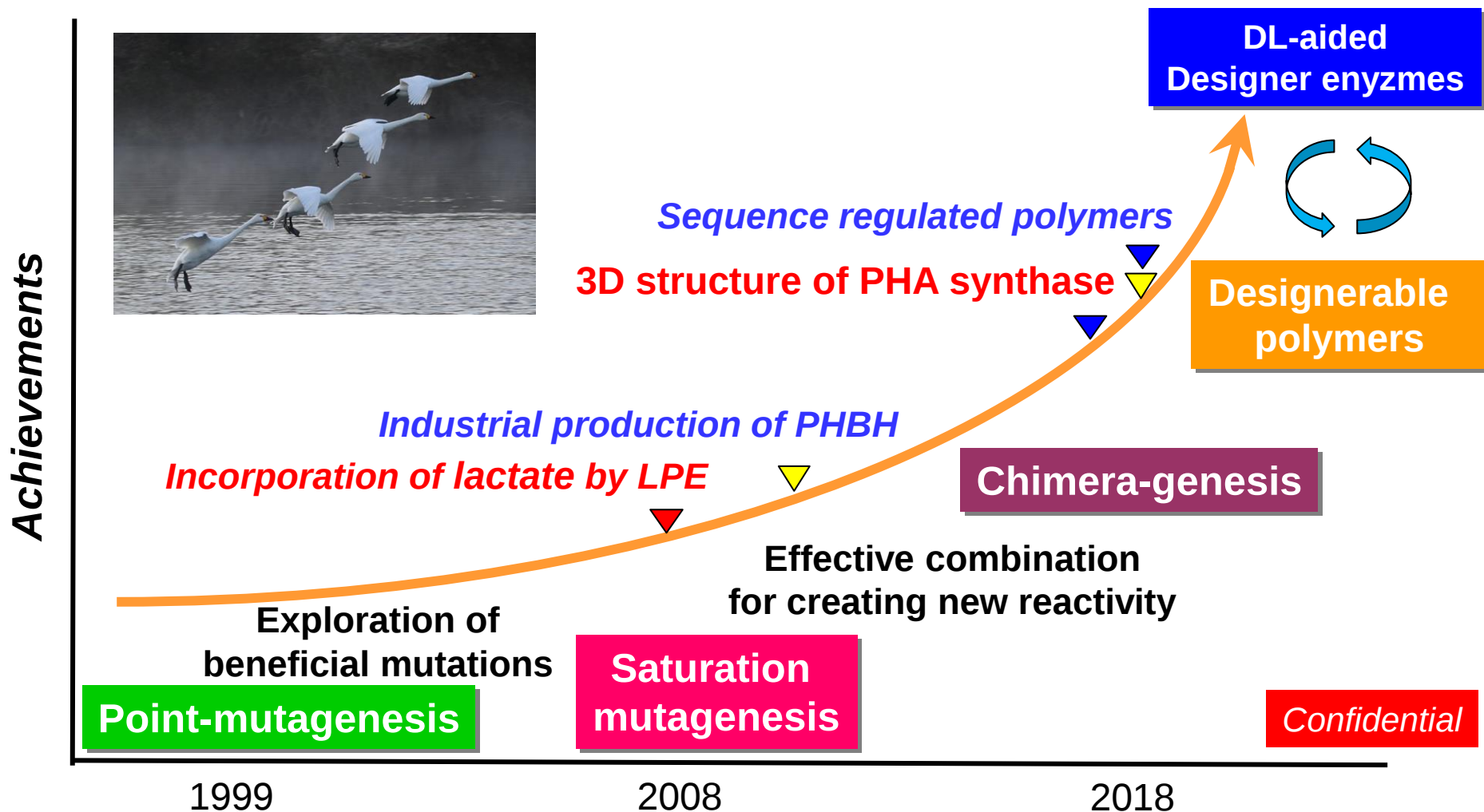
PHA コポリマー合成のための人工代謝経路



テーラーメイド組成制御



Directed evolution of PHA synthase



(1) PHA synthase from *R. eutropha*

(2) PHA synthase from *A. caviae*

(3) PHA synthase from *Pseudomonas* sp. 61



(1) S. Taguchi and Y. Doi: *Macromol. Biosci.*, (Review) 2004

(2) C.T. Nomura and S. Taguchi: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (Review) 2007

(3) S. Taguchi and T. Tsuge: *Protein Engineering Handbook* 2009

(4) K. Matsumoto and S. Taguchi: *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2013

(5) S. Taguchi and K. Matsumoto: *Polymer J.*, 2022

(6) N. M. John and S. Taguchi: *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022

(7) K. Matsumoto, M. Yamada, S. Koh and S. Taguchi: *Comp. Polym. Sci.*, 2024

バイオプラスチック

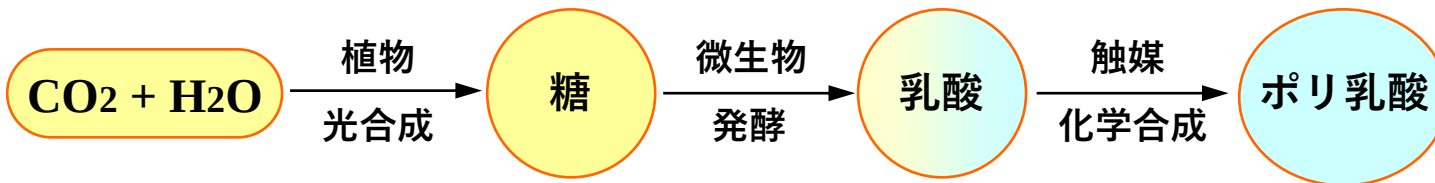
合成生物学
新規ポリマー創製

バイオプラスチックの生産プロセス



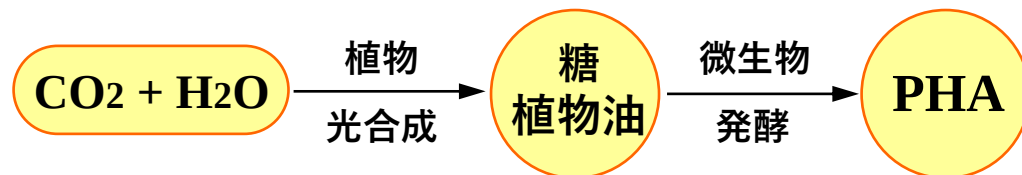
Eco/human friendly

ポリ乳酸（3ステップ生産）



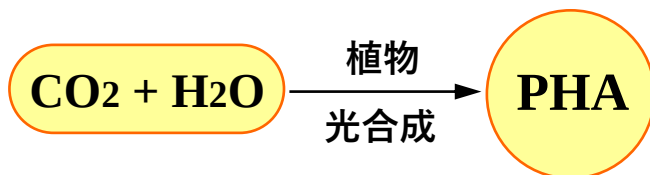
化学工場

ポリエステル（2ステップ生産）



微生物工場

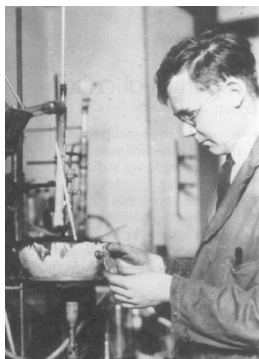
ポリエステル（1ステップ生産）



バイオプロセス

- ・水系
- ・常温・常圧
- ・脱重金属触媒

植物工場



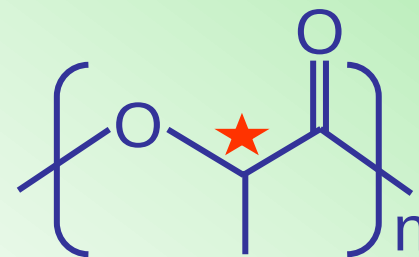
乳酸ポリマー生産用微生物工場の開発

化学工場



可能

?

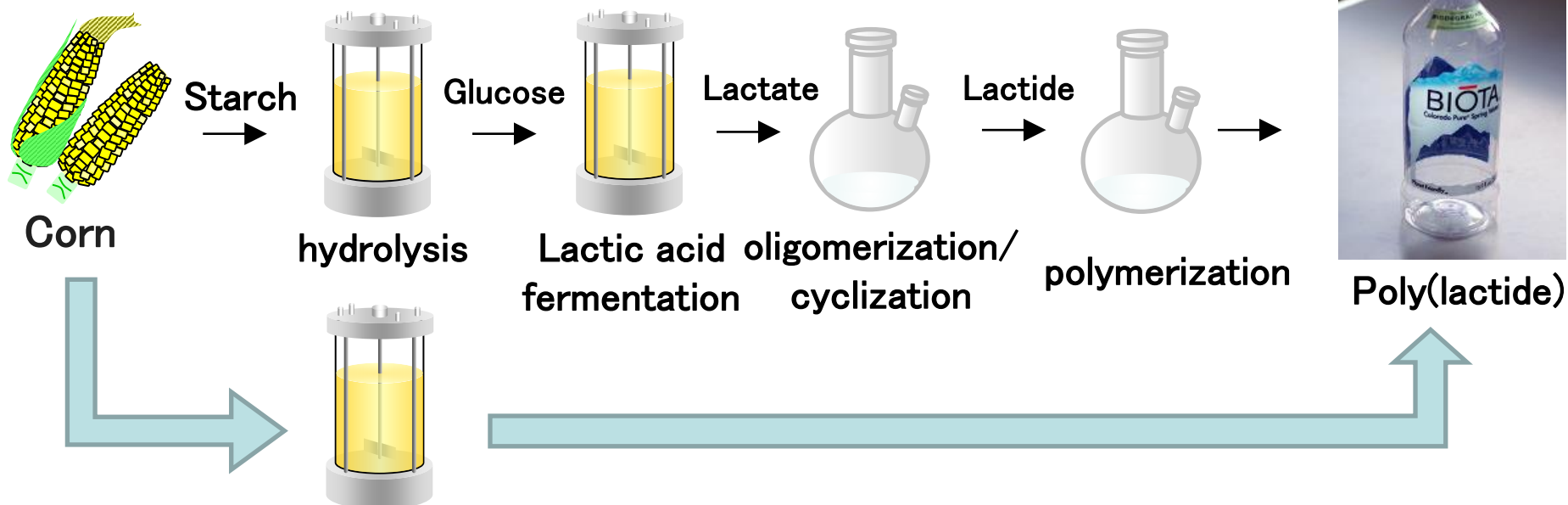


PLLA or PDLA

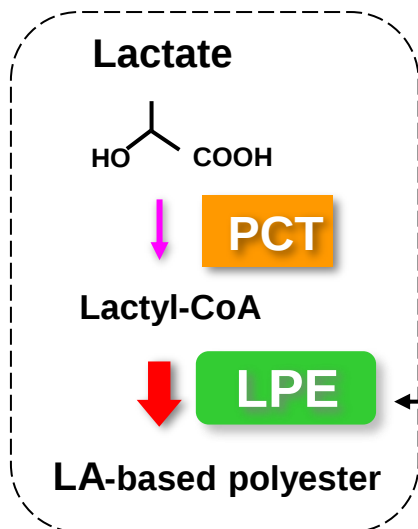


微生物工場

One step production of PLA by developing lactate-polymerizing enzyme



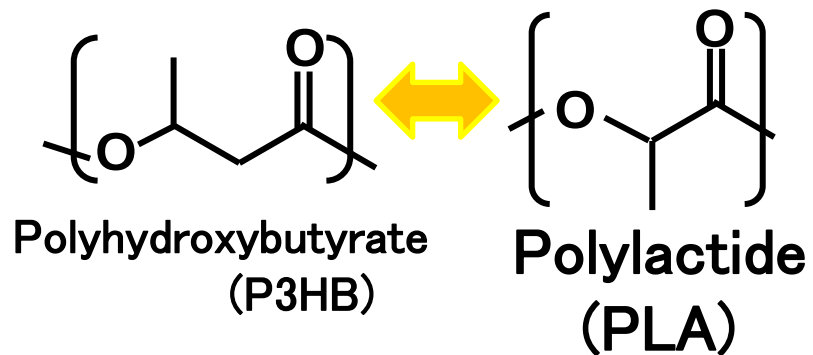
Microbial Factory for direct PLA production



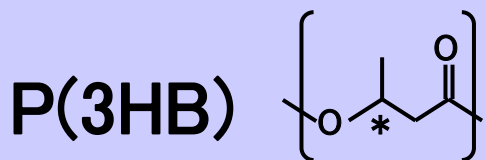
Lactate-Polymerizing Enzyme (LPE)

Natural monomer

Unnatural monomer

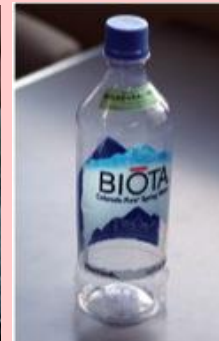
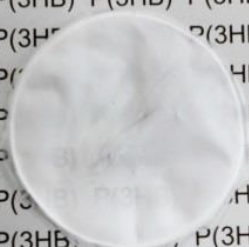


多元ポリ乳酸 P (LAHB)



硬質・不透明

海洋生分解性



硬質・透明

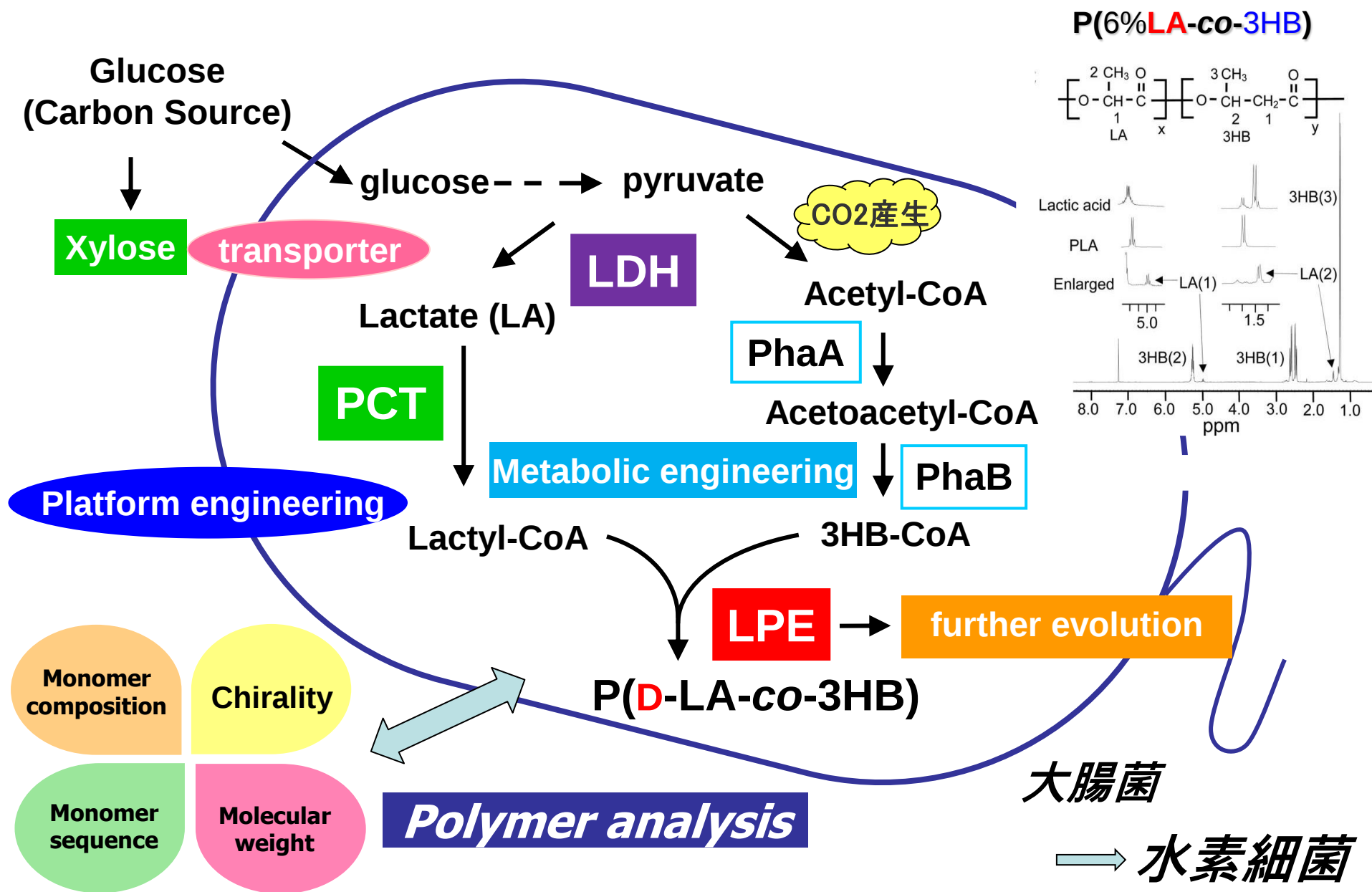
海洋難分解性

新規な物性を発現！

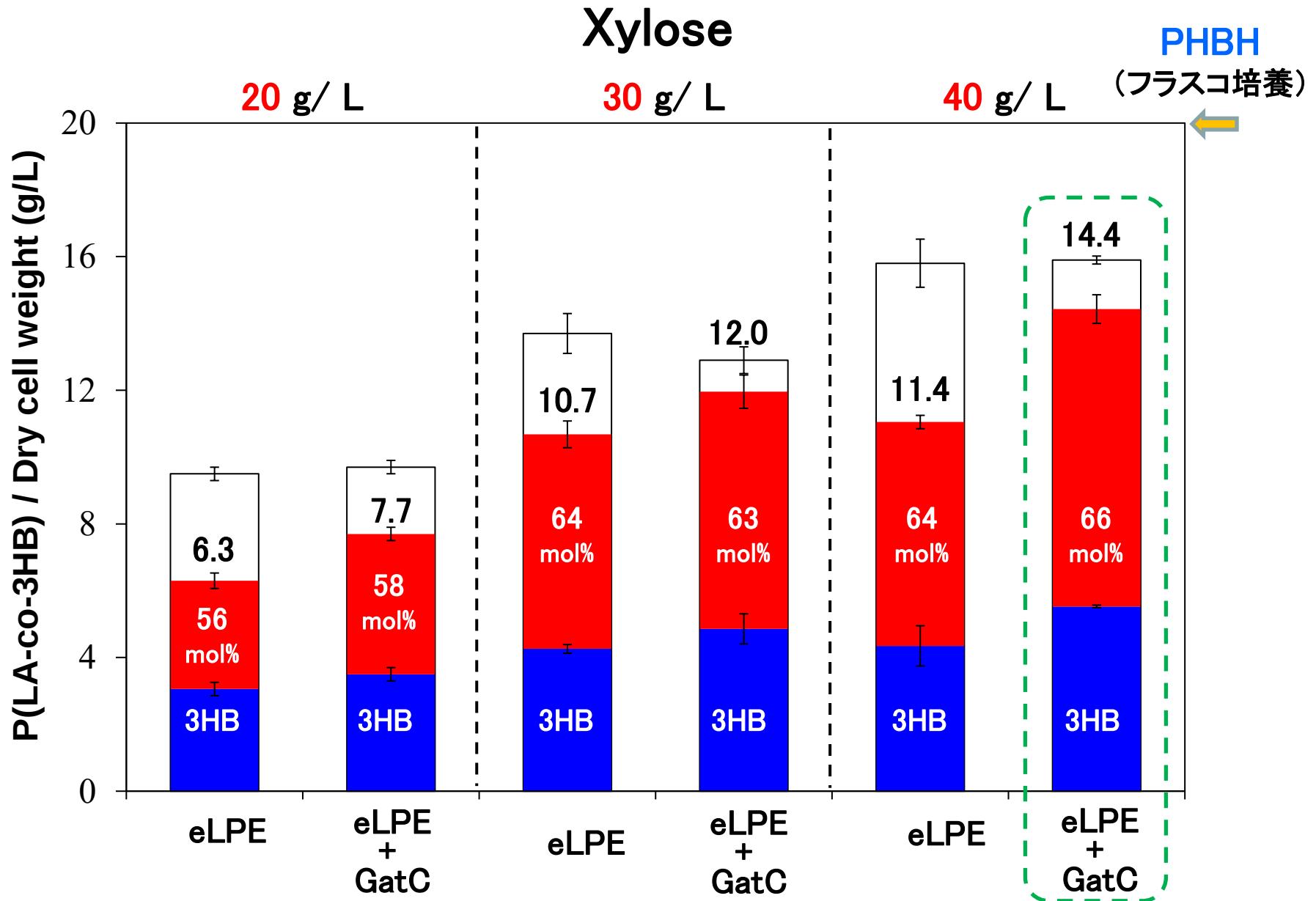


→ さらに拡張
軟質・透明

多元ポリ乳酸 LAHBの合成生物学



乳酸分率とポリマー合成量の向上



バイオプラスチック

合成生物学
一貫プロセスの開発

二酸化炭素資源化プロジェクトが始まった

戦略的創造研究推進事業
JST Strategic Basic Research Programs

二酸化炭素資源化を目指した
植物の物質生産力強化と生産物活用のための
基盤技術の創出



 科学技術振興機構

本研究領域では、**植物の光合成能力の増強**を図るとともに、光合成産物としての**各種のバイオマスを活用**することによって、二酸化炭素を資源として利活用するための基盤技術の創出を目的とします。

一貫プロセス(CREST法)

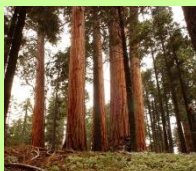
植物
バイオマス



キーテクノロジー

資源
としての
CO₂

材料・ツール



酵素変換
化学変換
物理変換

セルロース
キシラン
油脂画分

各種技術開発

微生物工場

酵素進化工学
代謝工学

極めて高い
取り込み選択性

低分子糖
天然多糖
脂肪酸

乳酸重合酵素
代謝改変株

農大・北大
東工大

高機能部材化

ポリマーの
高次構造制御

全く新しい

多元ポリ乳酸
ホモPHA (ポリヒドロキシ酸)

成形加工技術
X線構造解析

東大



高性能
プラスチック



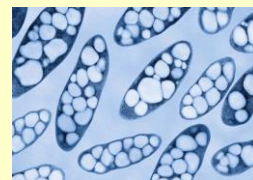
稲わらからバイオプラスチックができた！



糖化



- (1)風船型大腸菌の利用
- (2)カタボライト抑制の解除
(混合糖液の同時資化)
- (3)転写因子のノックアウト



多元ポリ乳酸の用途開発

~100 mL



2



100 L



P(31mol%LA-co-3HB)	P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)
P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)
P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)
P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)
P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)
P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)
P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)
P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)
P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)
P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)	P(3HB-co-31mol%LA)

乳酸分率に依存した柔軟性制御

ポリプロピレンに匹敵する柔軟性

1. 成型体（食品容器）
透明性・柔軟性



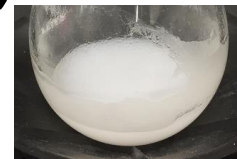
2. 溶融紡糸繊維（釣り糸、縫合糸）
生体適合・吸収性



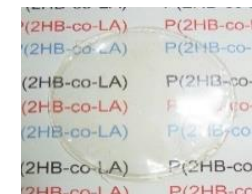
3. ナノファイバー（細胞培養足場）
立体構築・生体適合・吸収性の両立



4. 微粒子（ビルダー、ヘルスケア製品）
環境分解性



5. 光学材料への展開
高透明性



NEDO「クリーンエネルギー分野における革新的技術の国際共同研究開発事業」(2021年1月～)



International co-funding

UPM **BIOFORE**
BEYOND FOSSILS

欧州製紙企業

Industry leader in sustainability

has been listed as the forest and paper industry leader in the Dow Jones European and Sustainability Indices (DJSI) for 2019-2020, for the seventh time.

神戸大学

NAIST
AIST

国内製紙企業

原料供給

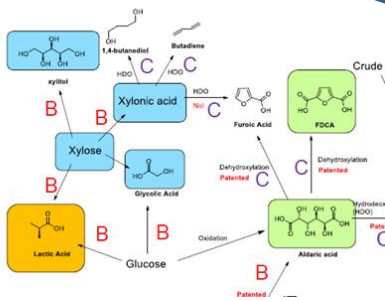
原料供給

VTT

KANEKA

PLA生産企業

VTT Biochemicals offer



- ・Xylose利用技術
- ・セルロース糖化
- ・Pilot試作

- ・産業微生物育種
- ・樹脂物性評価
- ・バリューチェーン

多元ポリ乳酸LAHBの生産プロセス

高密度培養

フィンランドVTT

油原料

Plant oils

β -oxidation pathway

3HB-CoA 3HHx-CoA
3HDD-CoA

Synthase

代謝工学

Evolutionary engineering

水素細菌

Polyhydroxyalkanoates (PHAs)

Sugars

Glycolysis pathway

LDH

Lactic acid

Lactyl-CoA

Acetyl-CoA

3HB-CoA

LPE

乳酸重合酵素

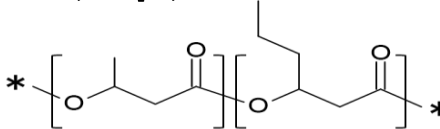
糖原料



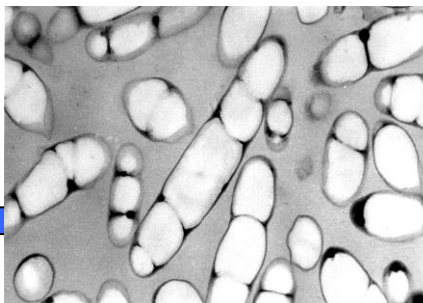
CO₂

Green Planet™

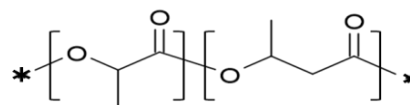
カネカPHBH



P(3HB-co-3HHx)

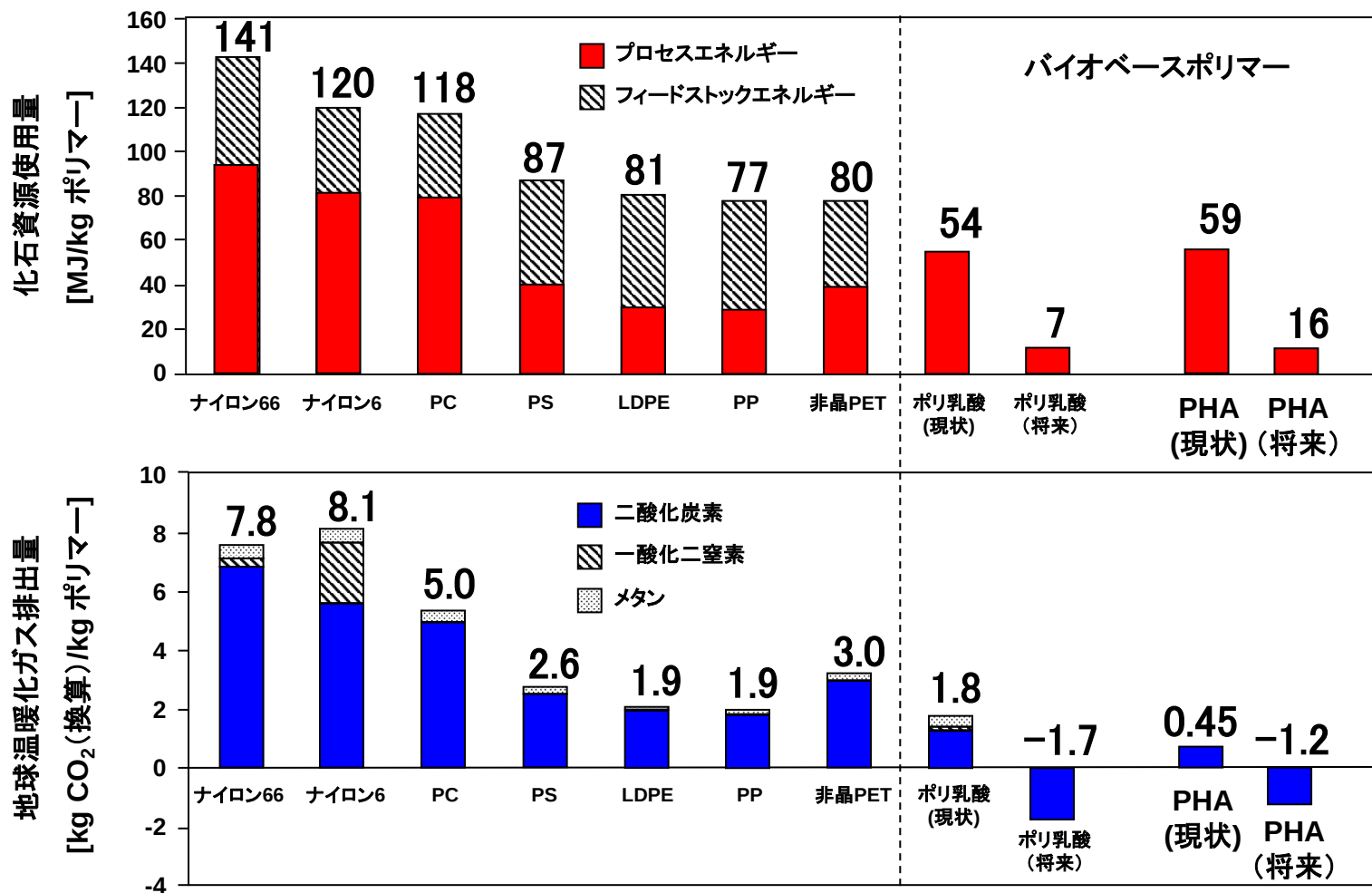


多元ポリ乳酸LAHB



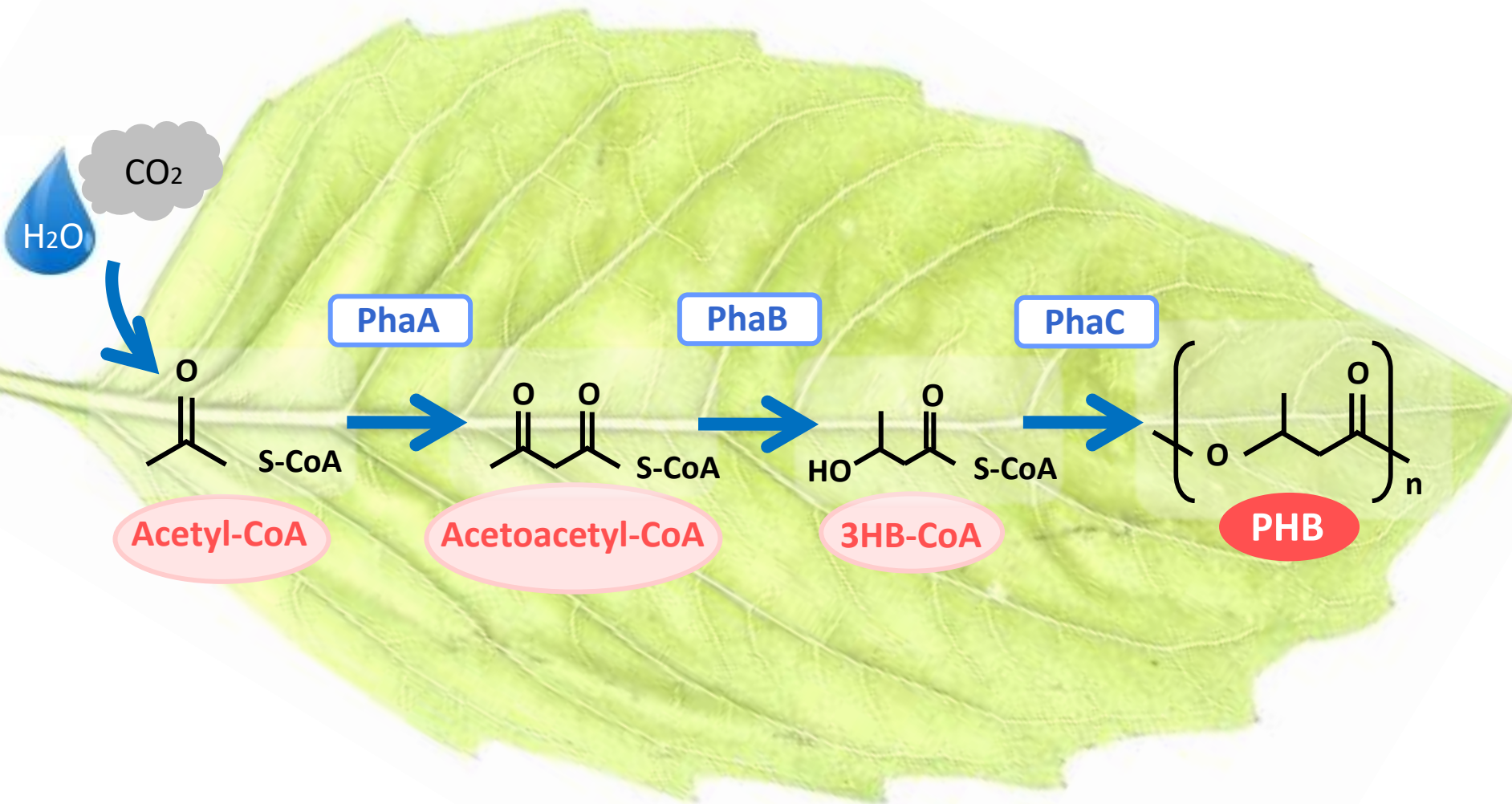
P(LA-co-3HB)

二酸化炭素の排出の抑制への波及効果



バイオベースポリマー製造における石油資源使用量と地球温暖化ガス排出量

植物バイオテクノロジー

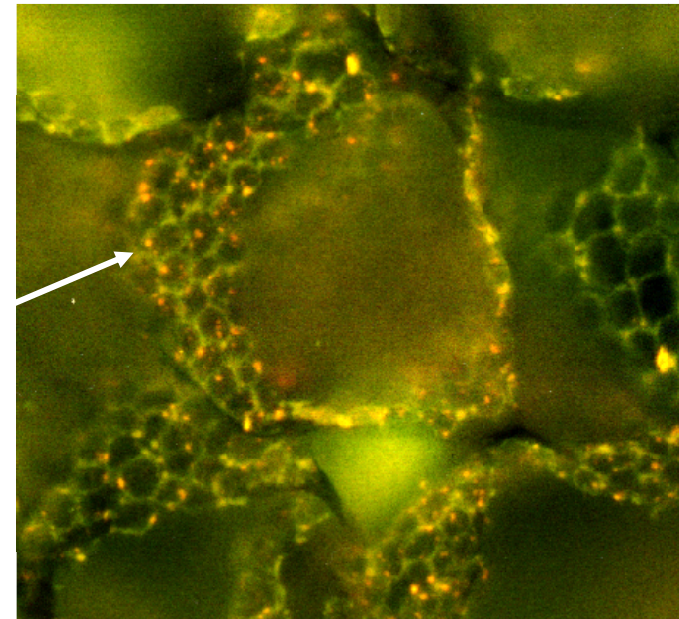
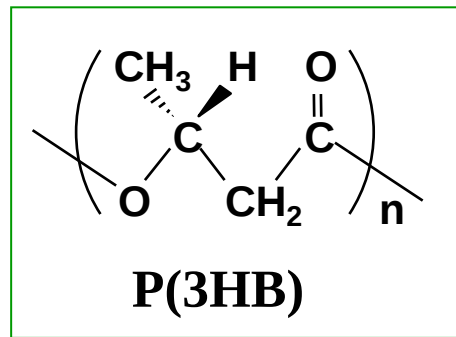
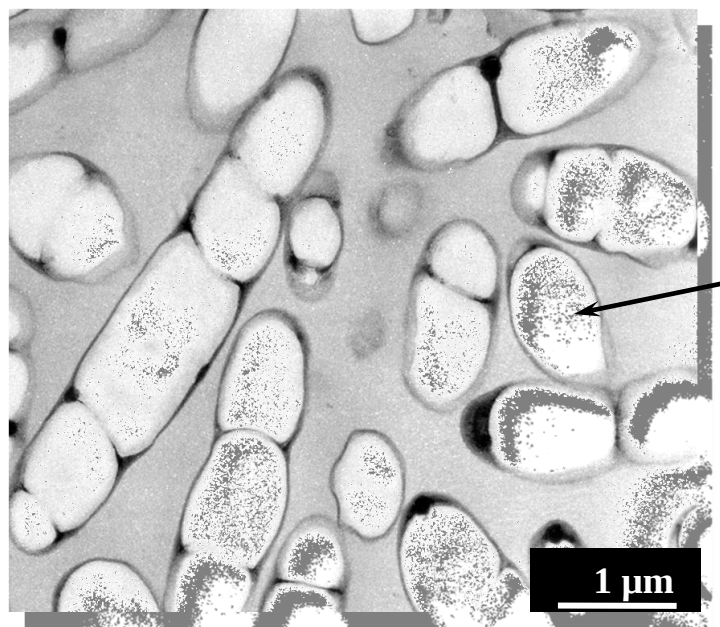
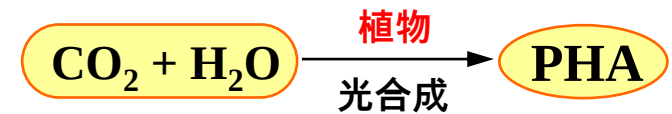


微生物から植物へ

2 ステップ生産



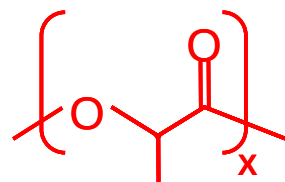
1 ステップ生産



遺伝子組換え *R. eutropha*
(80-90 wt% PHA)

遺伝子組換えタバコ
(1 wt% PHA)

Expanding microbial polyesters



PLA



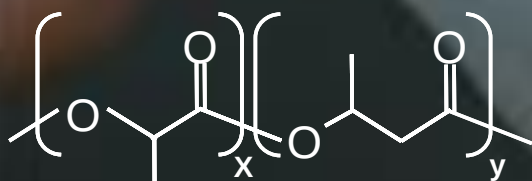
higher transparency

Increasing
LA fraction

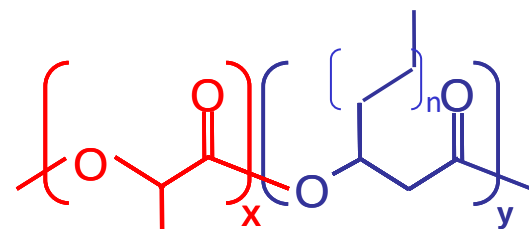


Composition regulation

**Transparency &
flexibility**



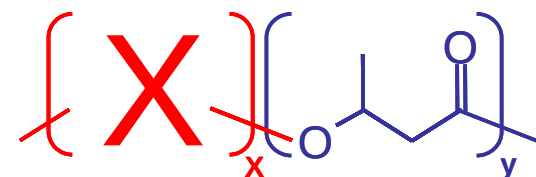
P(LA-co-3HB)



P(LA-co- MCL 3HA)

MCL = medium-chain-length (C6-C12)

Copolymer variation



P(X-co-3HB)

New Monomer

Structural diversity

II

Variety in properties

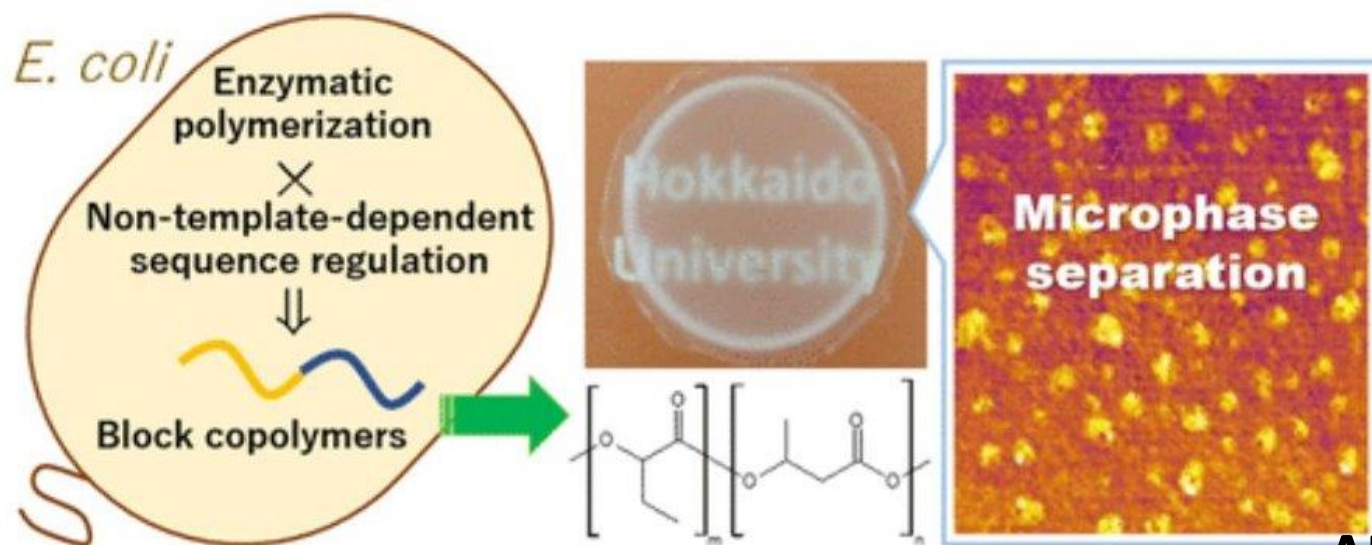
Dynamic Changes of Intracellular Monomer Levels Regulate Block Sequence of Polyhydroxyalkanoates in Engineered *Escherichia coli*

Ken'ichiro Matsumoto* , Chiaki Hori, Ryunosuke Fujii, Masahiro Takaya, Takashi Ooba, Toshihiko Ooi, Takuya Isono , Toshifumi Satoh , and Seichi Taguchi† 

Division of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Hokkaido University, N13W8, Kita-ku, Sapporo 060-8628, Japan

Biomacromolecules, 2018, 19 (2), pp 662–671

 **Cite this:** *Biomacromolecules* 19, 2, 662–671



AFM image

Biological polymer synthetic systems, which utilize no template molecules, normally synthesize random copolymers. We report an exception, a synthesis of block polyhydroxyalkanoates (PHAs) in an engineered *Escherichia coli*. Using an engineered PHA synthase, block copolymers poly[(R)-2-hydroxybutyrate(2HB)-*b*-(R)-3-hydroxybutyrate(3HB)] were produced in *E. coli*. The covalent linkage between P(2HB) and P(3HB) segments was verified with solvent fractionation and microphase separation. Notably, the block sequence was generated under the simultaneous consumption of two monomer precursors, indicating the existence of a rapid monomer switching



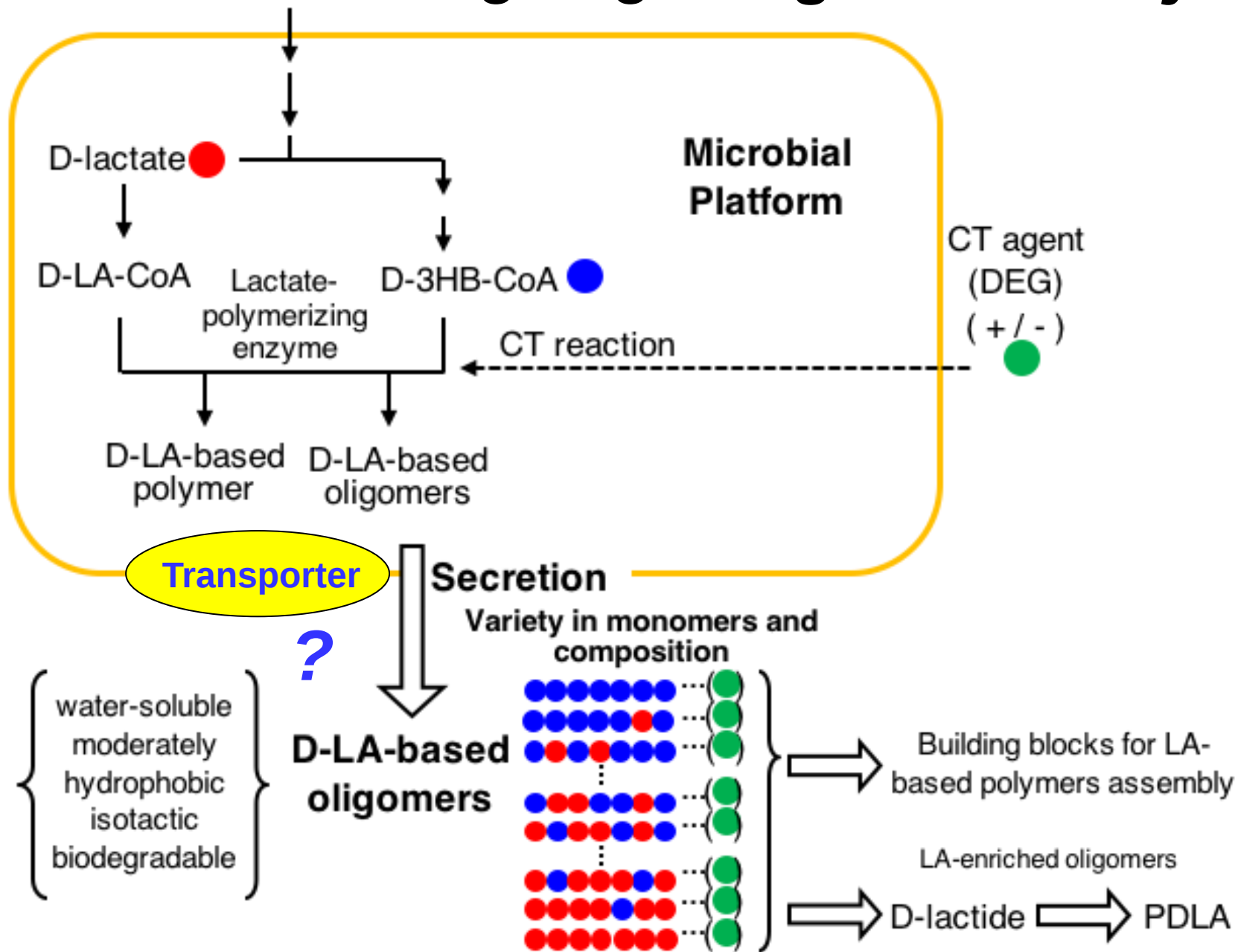
Camila Utsunomia
(Ph.D. student)

P(31mol%LA-co-3HB)

Secretion **?**

***LPE: LA-polymerizing enzyme**

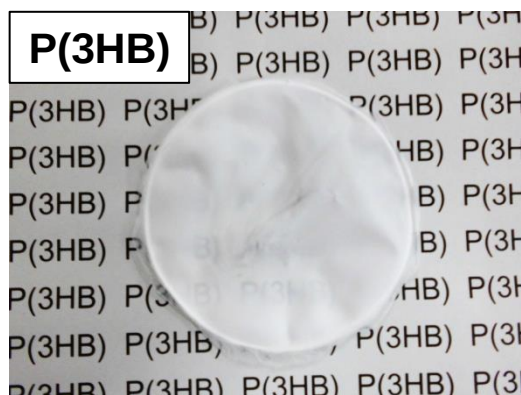
on-going “*Oligomers Project*”



バイオプラスチック

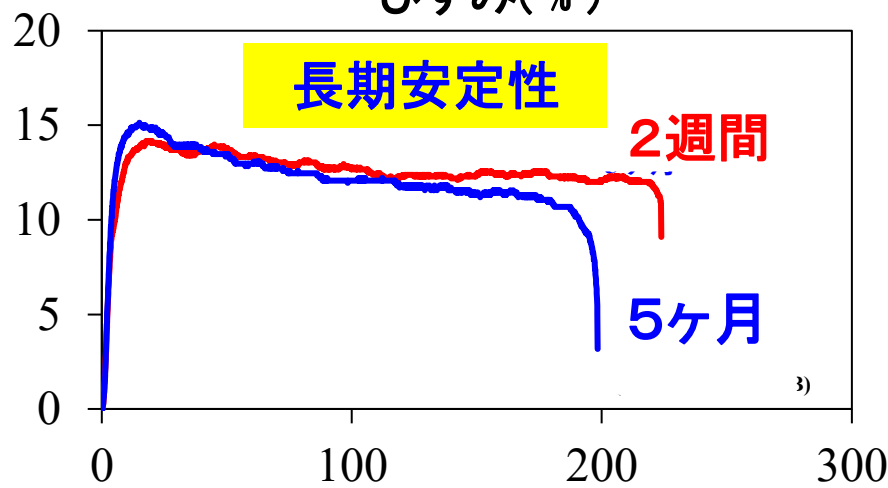
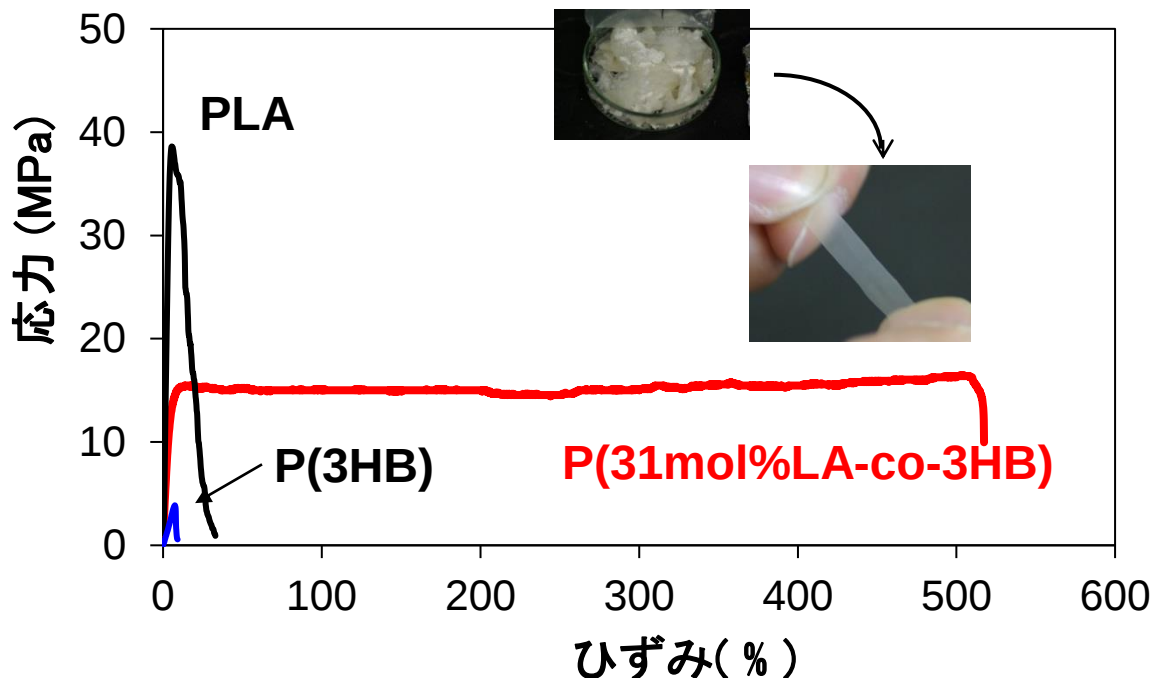
高分子化学
高機能部材化

乳酸分率に依存した柔軟性制御

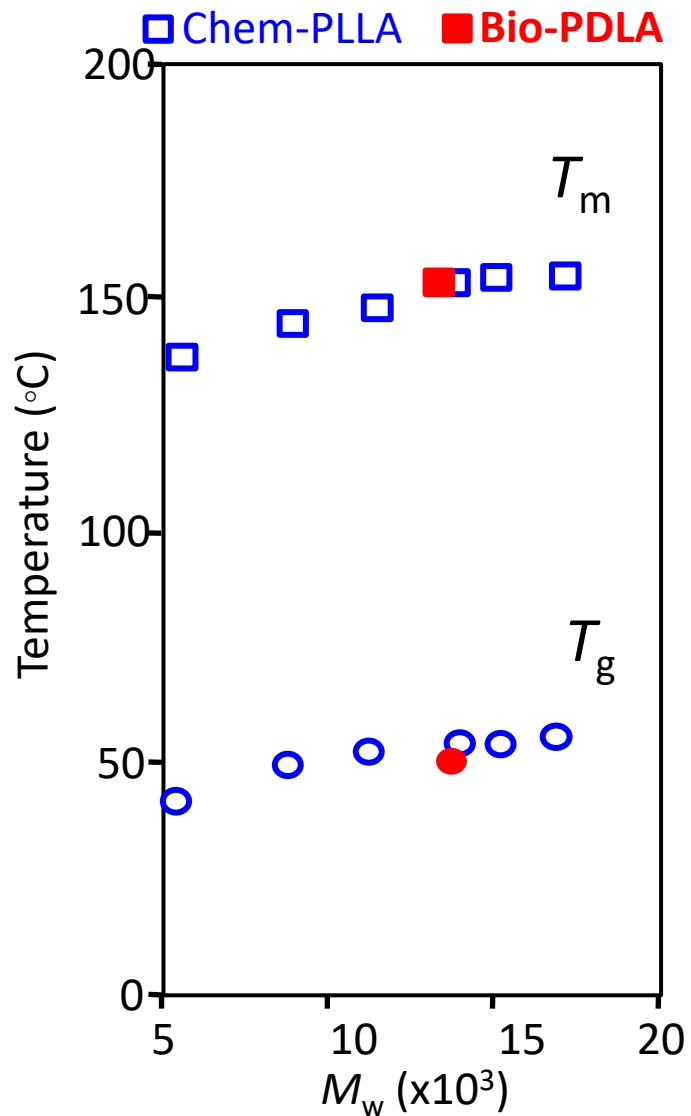


既存バイオポリエステルより
透明でしなやかなフィルムを形成

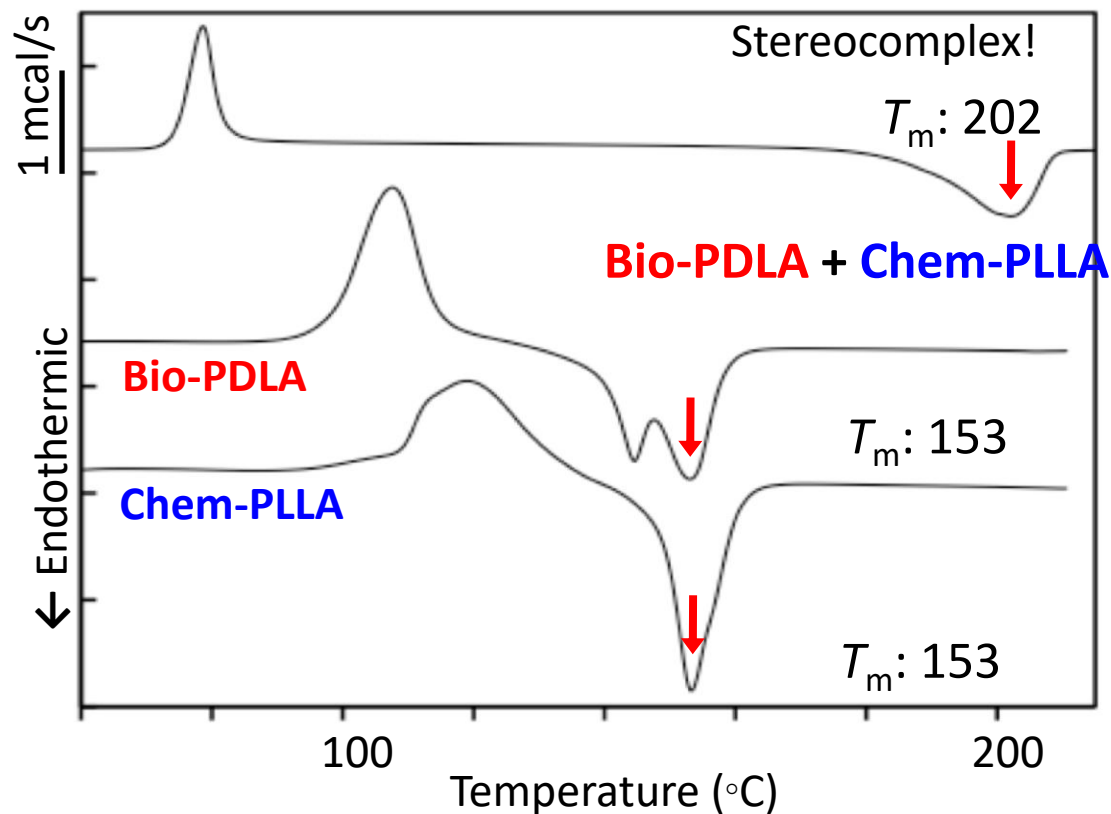
ポリプロピレンに匹敵する柔軟性



Chemical vs. *Biological* ?

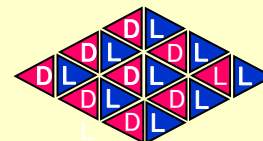


DSC data



Chem-PLLA

Bio-PDLA



バイオポリエステルを足場とする細胞培養

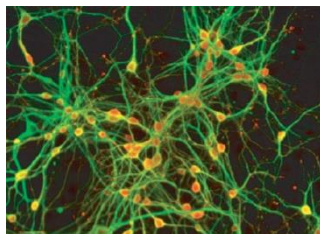
各種細胞



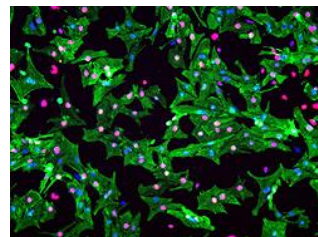
チューニング

ポリマーのバリエーション
(硬さ・表面形状・親疎水性)

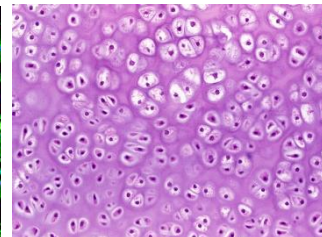
神経



筋肉・皮膚



軟骨



足場の硬さ

軟

硬

細胞

増殖・分化

軟骨組織

軟骨組織

コラーゲン等

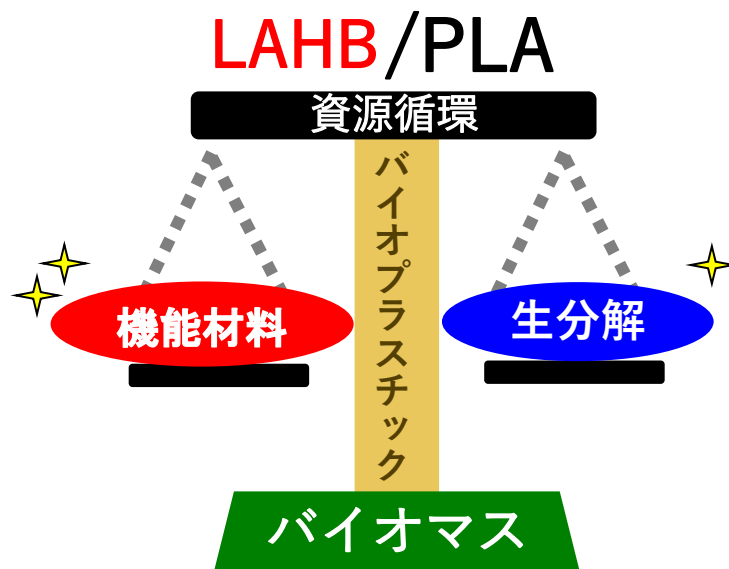
酵素的剥離

バイオポリエステル足場

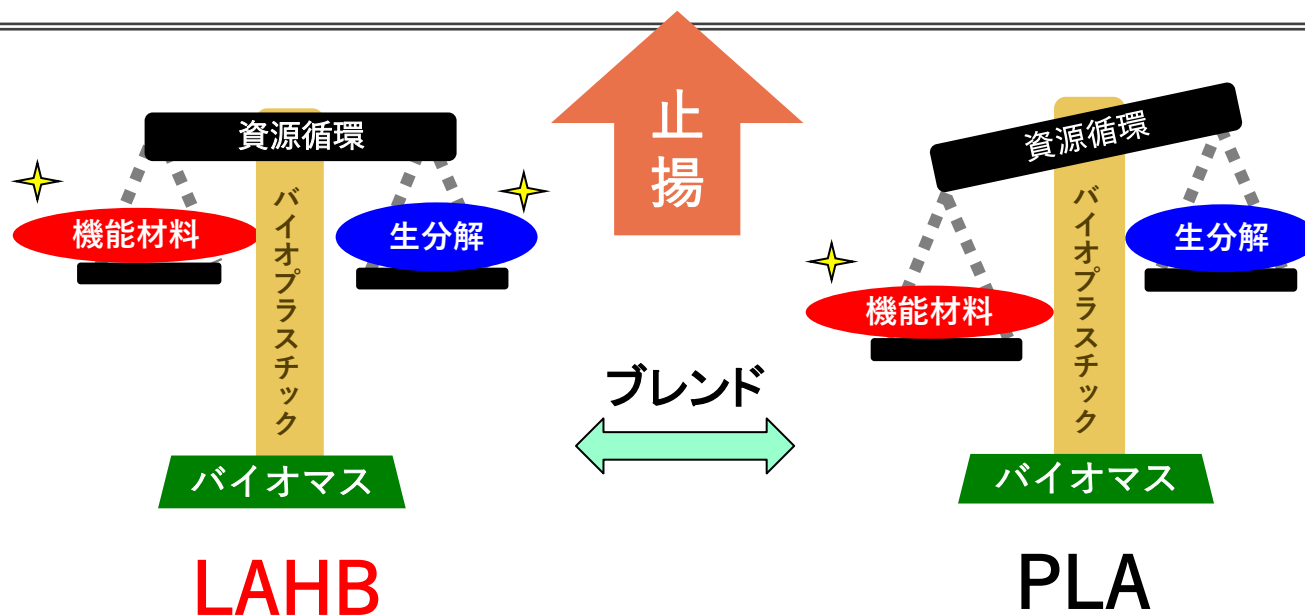
・フィルム
・ナノファイバー

生分解/生体吸収

解決

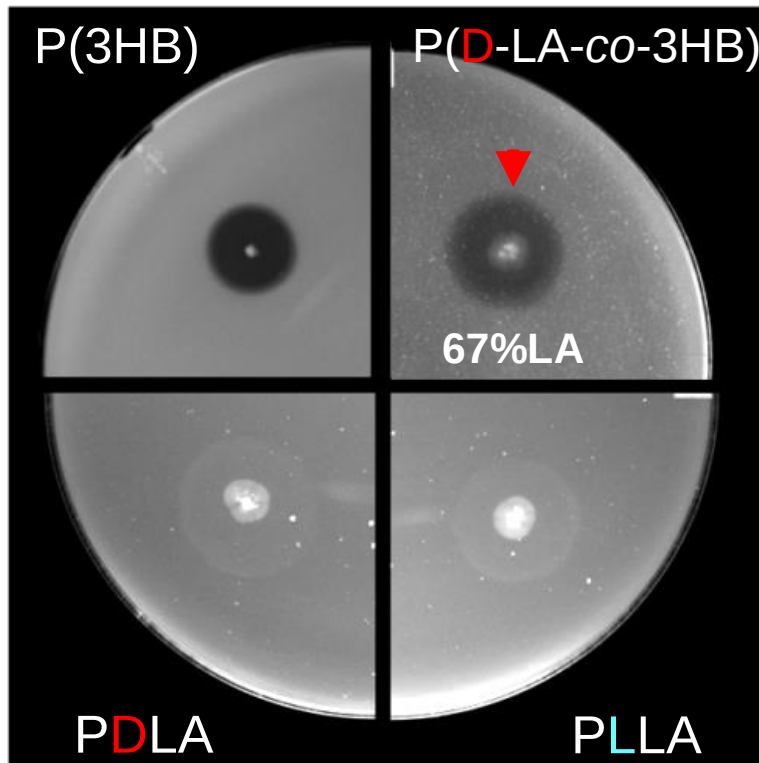


課題

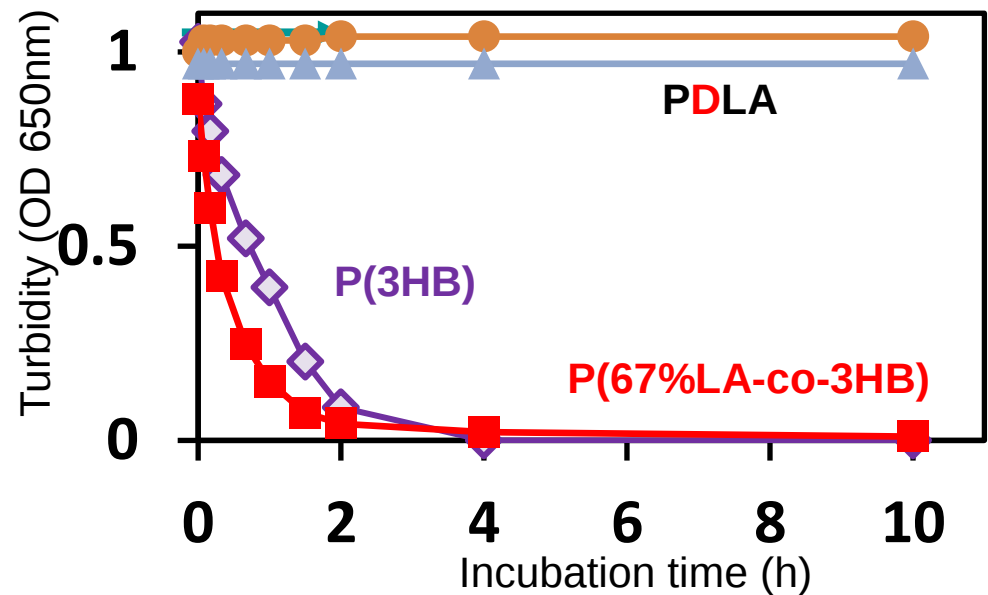
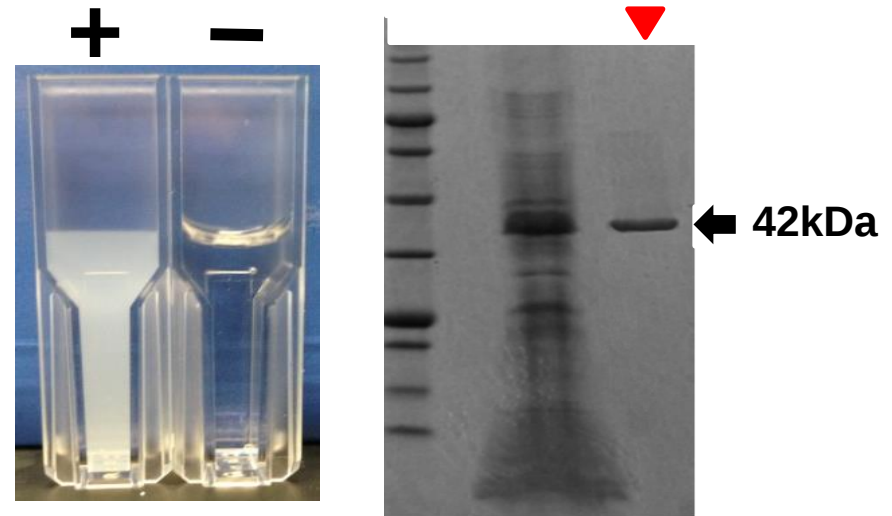


PHAの合成菌と分解菌は
海洋に普遍的に存在

微生物・酵素分解



Purified enzyme



PDLA degradation by PhaZ_{VC}

MALDI TOF MS

10 mer



Red: PDLA oligomers (before degradation)

Black: PDLA oligomers treated with PhaZ_{VC}

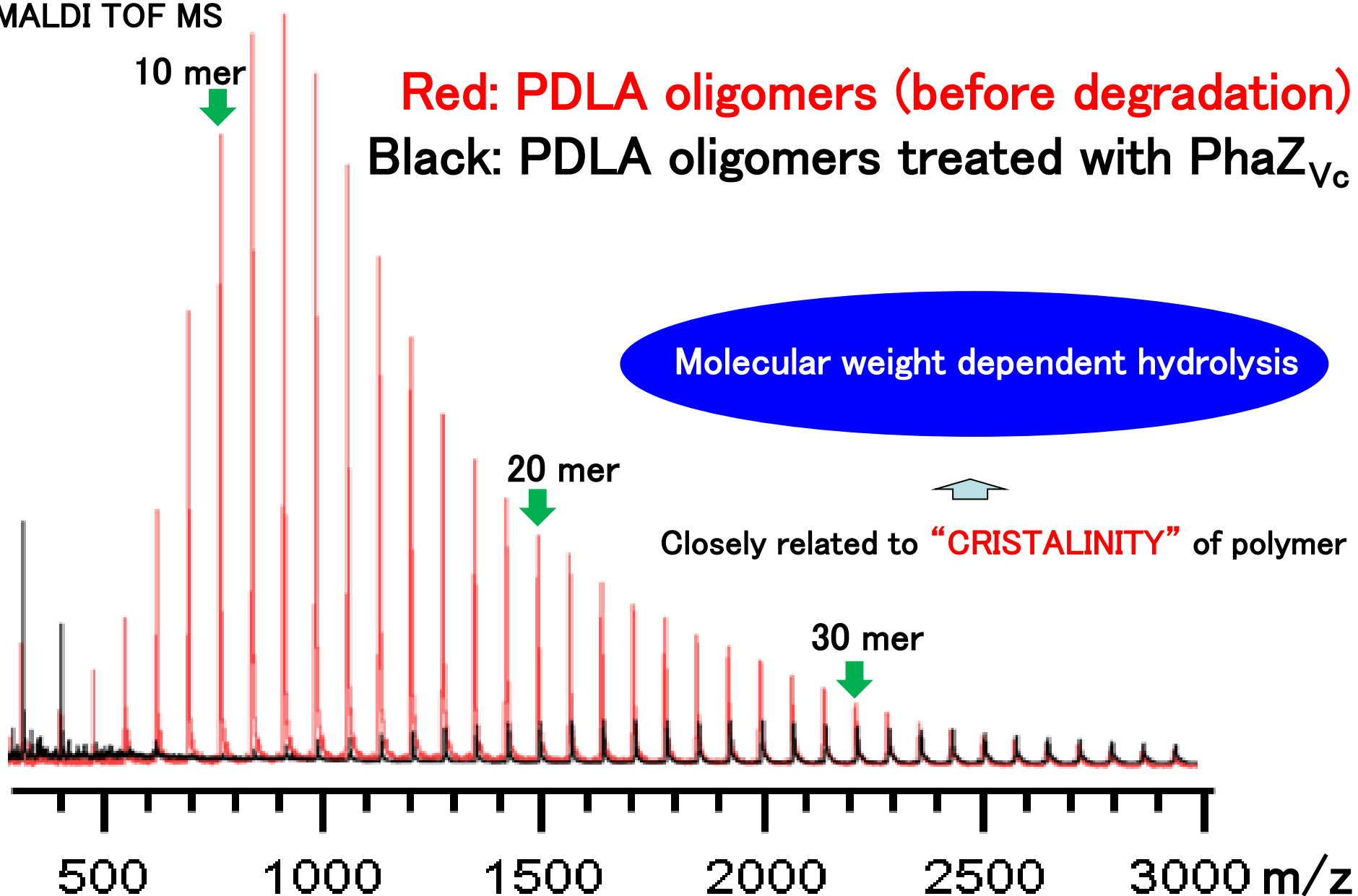
Molecular weight dependent hydrolysis

20 mer



Closely related to **“CRISTALINITY”** of polymer

30 mer

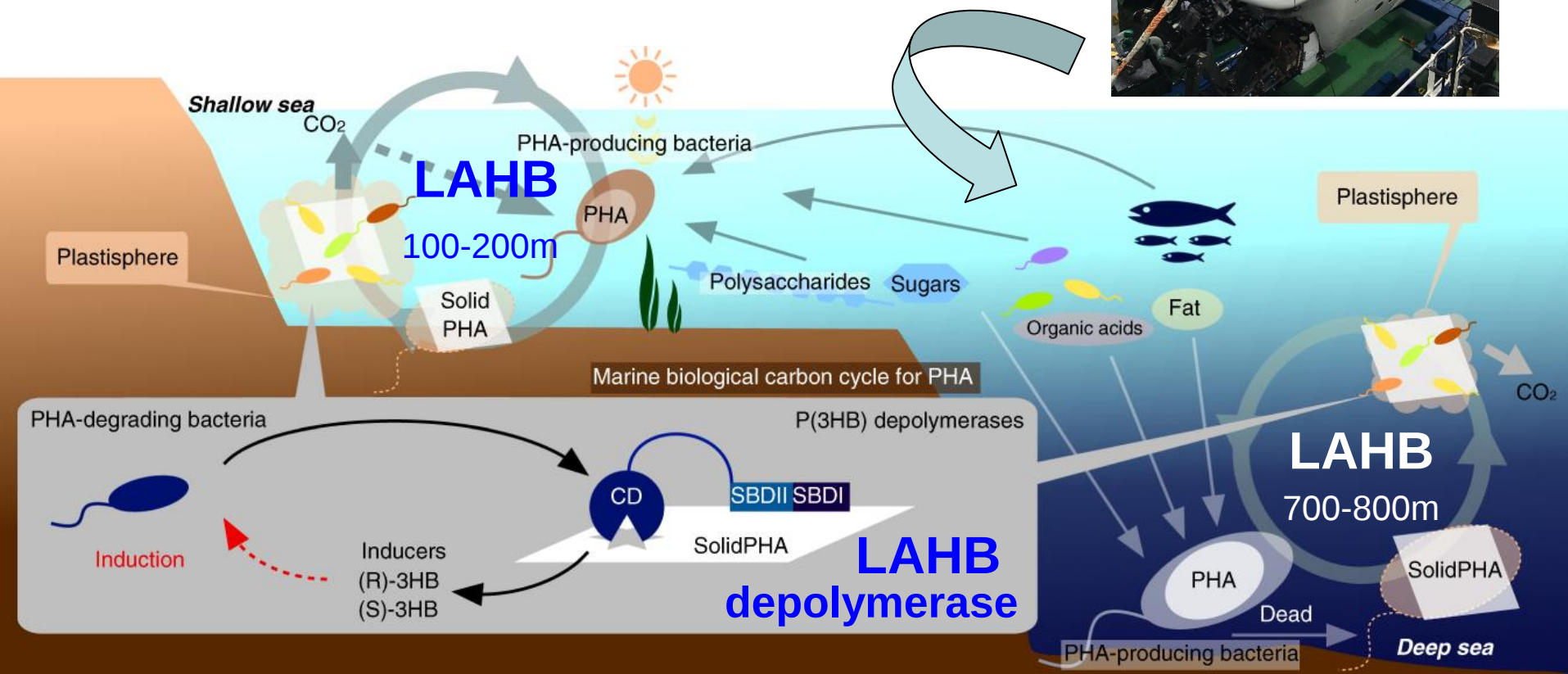




NEDOMーンショット

Submarine
“Shinkai 6500”
(150,000\$/1 run)
about 7 months

Recycling of PHA in marine



NEDO「クリーンエネルギー分野における革新的技術の国際共同研究開発事業」(2021年1月～)



International co-funding

UPM **BIOFORE**
BEYOND FOSSILS

欧州製紙企業

Industry leader in sustainability

has been listed as the forest and paper industry leader in the Dow Jones European and Sustainability Indices (DJSI) for 2019-2020, for the seventh time.

神戸大学

NAIST
AIST

国内製紙企業

原料供給

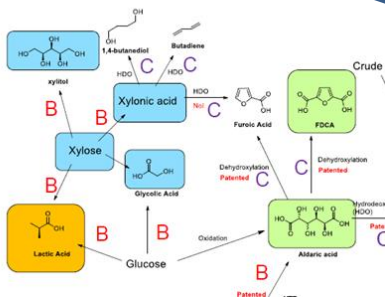
原料供給

VTT

KANEKA

PLA生産企業

VTT Biochemicals offer



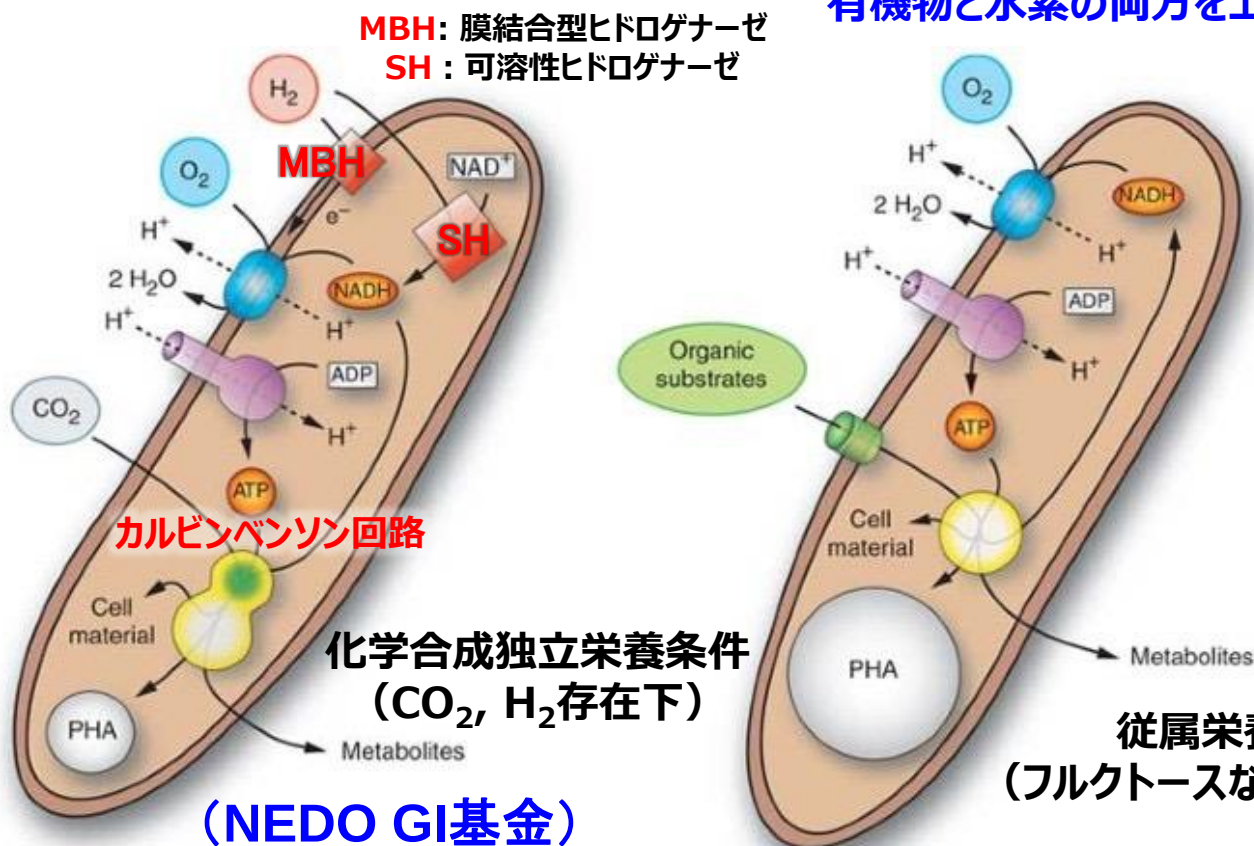
- ・Xylose利用技術
- ・セルロース糖化
- ・Pilot試作

- ・産業微生物育種
- ・樹脂物性評価
- ・バリューチェーン

水素細菌 *Cupriavidus necator* (カプリアビダス・ネカトール)

有機物と水素の両方をエネルギー源として利用できる。

Pohlmann et al.
Nat Biotechnol (2006)



太陽光とCO₂を利用した面積当たりの糖生産効率の比較 (～ton/年・ヘクタール)

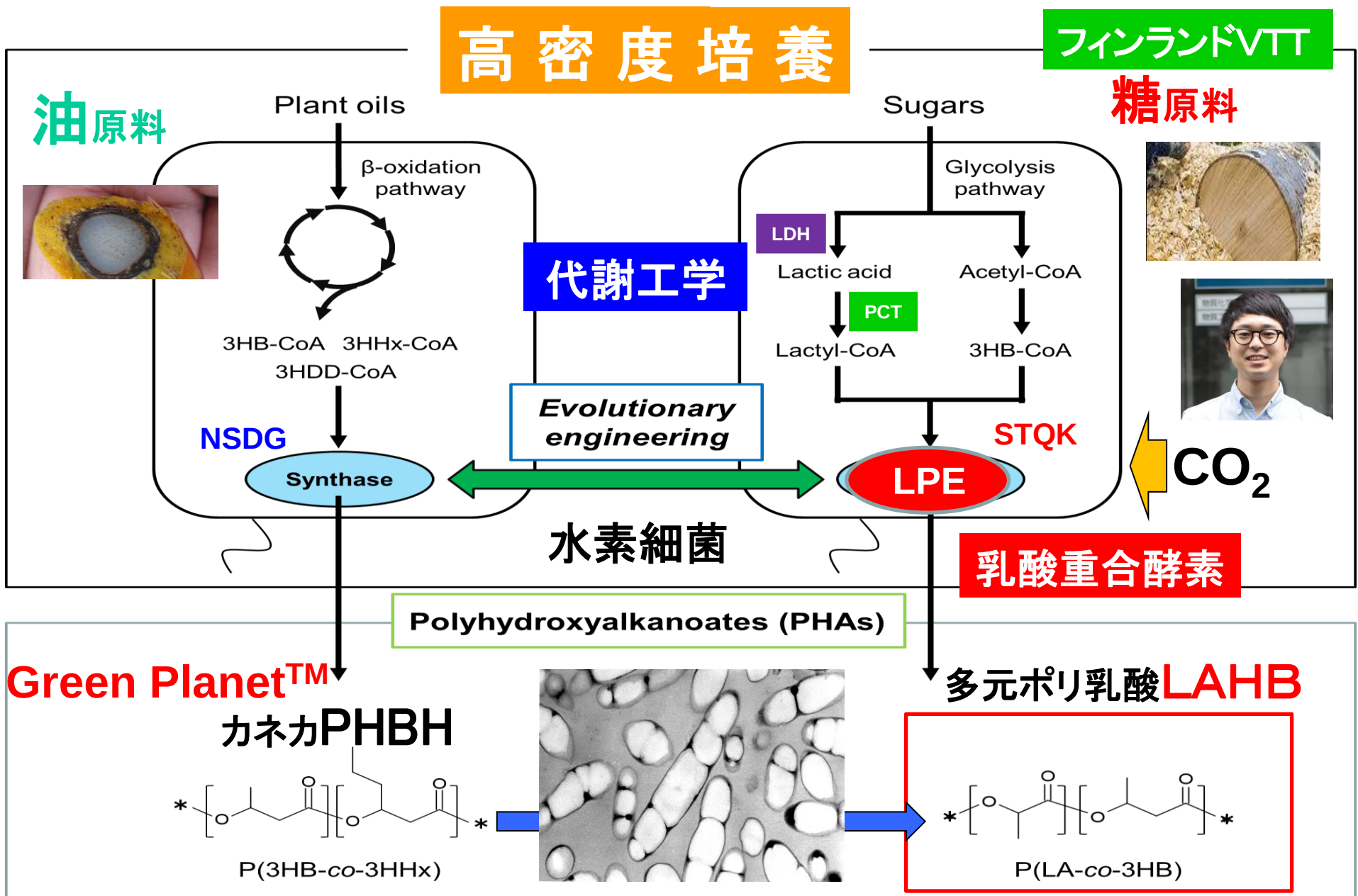
炭素固定能：植物の65倍

※太陽光発電由来水素の利用

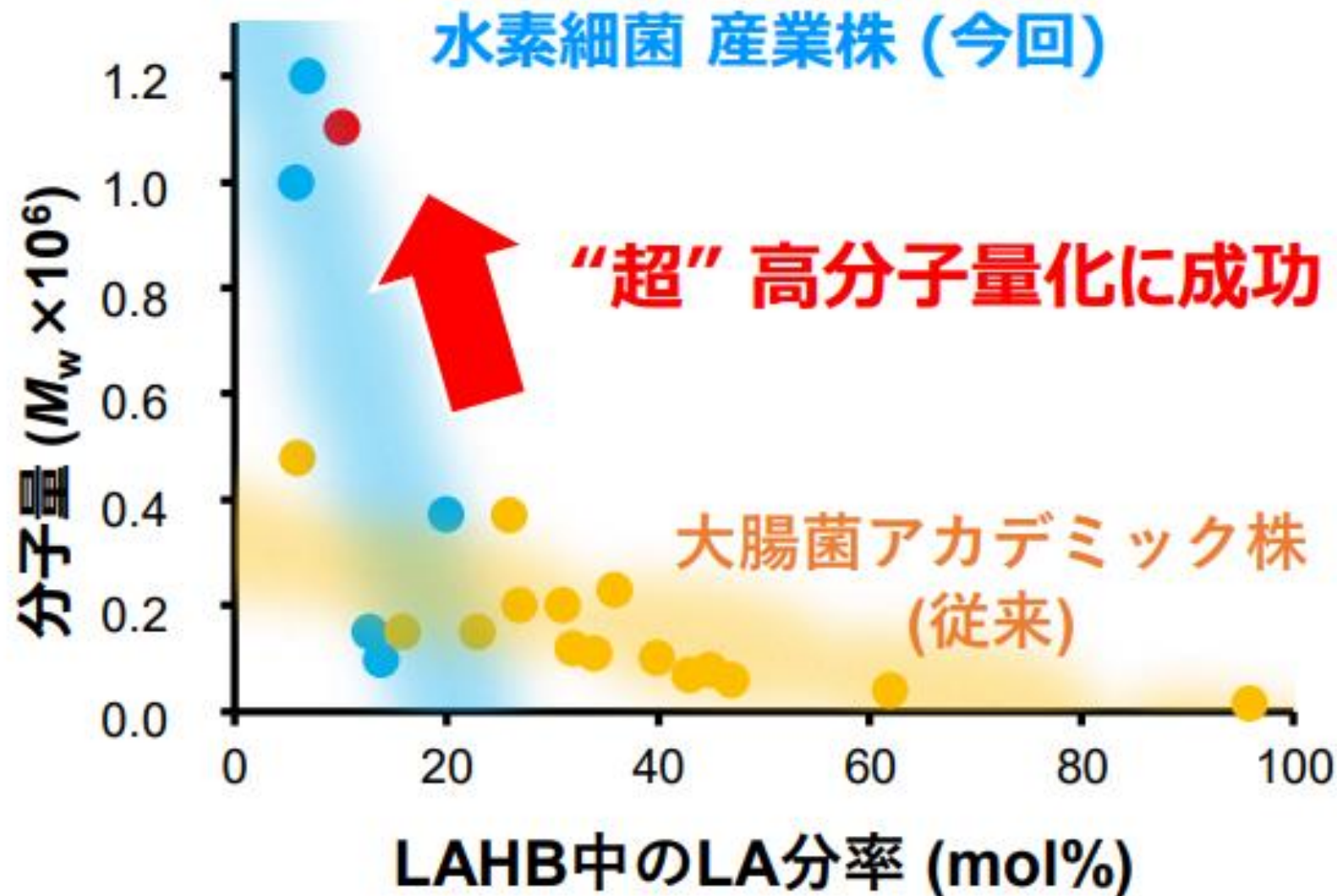
物質生産効率：植物の35倍

ポリマー生産によるGHG排出量：バイオマス発酵の1/3以下

多元ポリ乳酸 P(LAHB) の生産プロセス



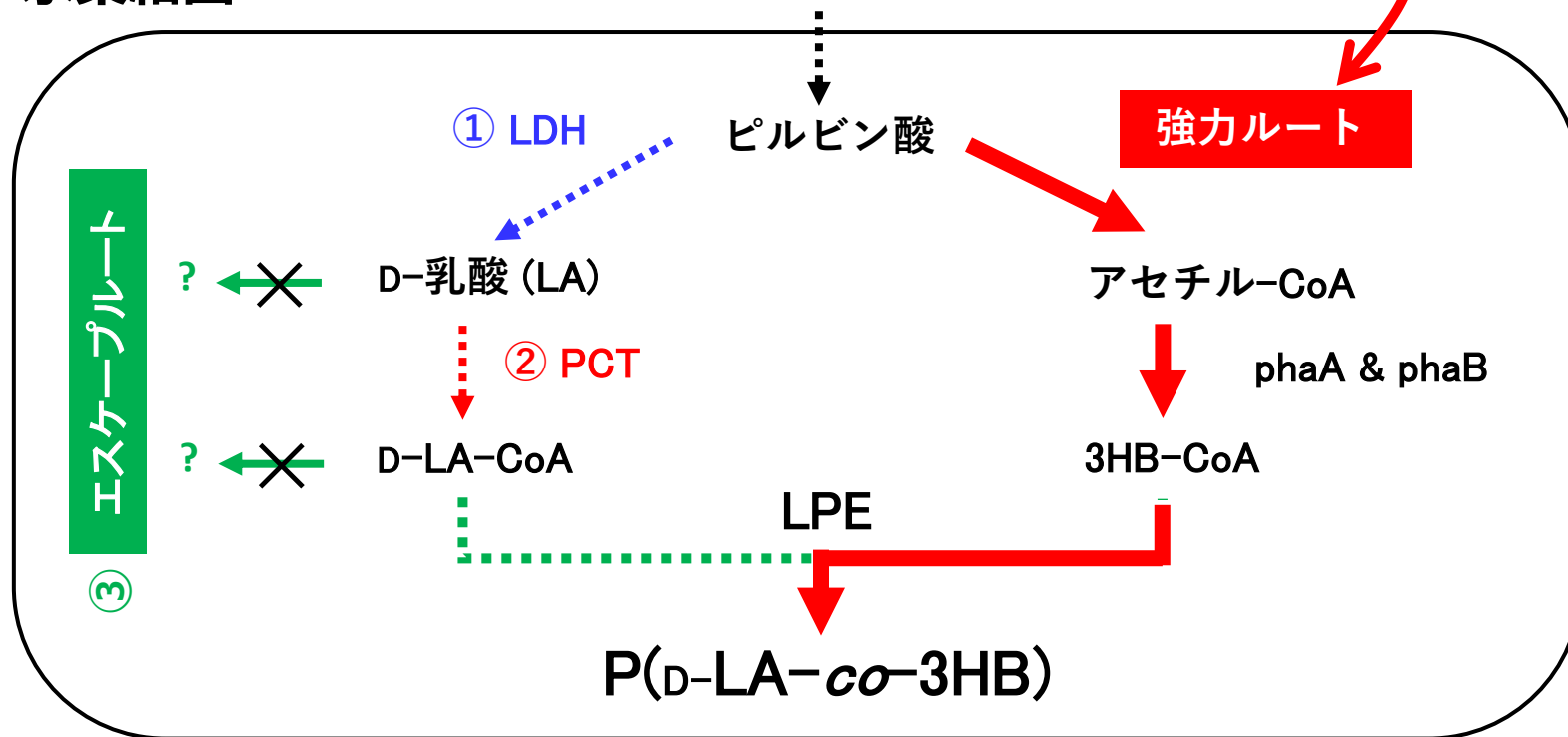
水素細菌のアドバンテージ



LAHB “合成最大化” の戦略ー

水素細菌

グルコース・キシロース



① LDH, ② PCTの強化

×

③ エスケープ経路の遮断

(出願特許①, ①')

(出願特許②, ②')

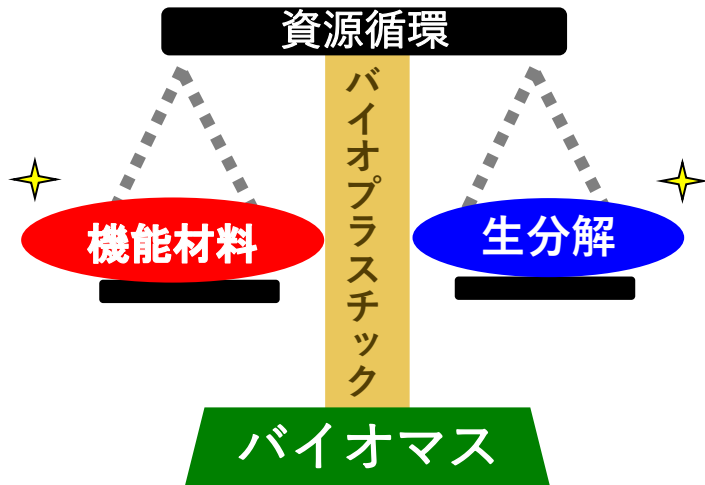
LAHB生産の“飛躍的”向上

① LDH_{Lm} × ② PCT_{Es} × ③ $\Delta dld/glc$ → 高密度培養 (増殖とポリマー合成が分離)

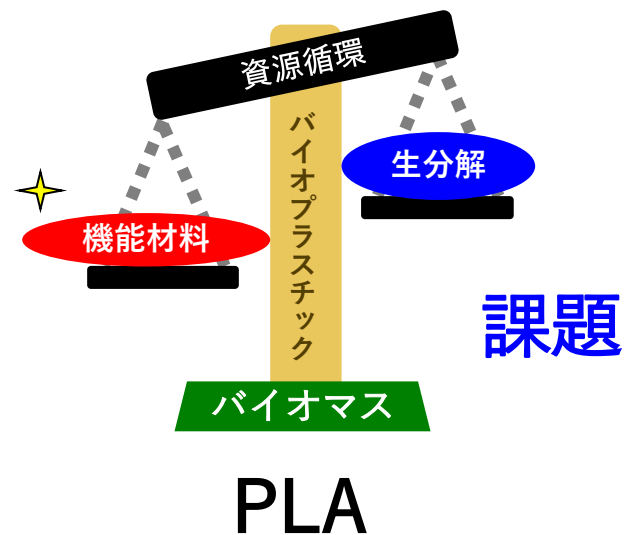
	グルコース (これまで) 大腸菌	グルコース (本プロジェクト) 水素細菌	混合糖液  × 
	LB培地	安価な合成培地で実現	
菌体重量	7 g/L 65 wt%	97 g/L/48h 70 wt%	90 g/L/48h 57 wt%
乳酸分率	14 mol%	15.4 mol%	18.2 mol%
分子量	約10 万	110万	

LAHB

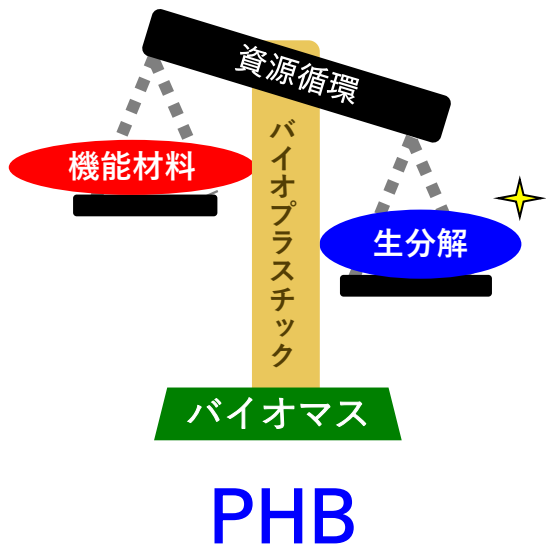
解決



解決

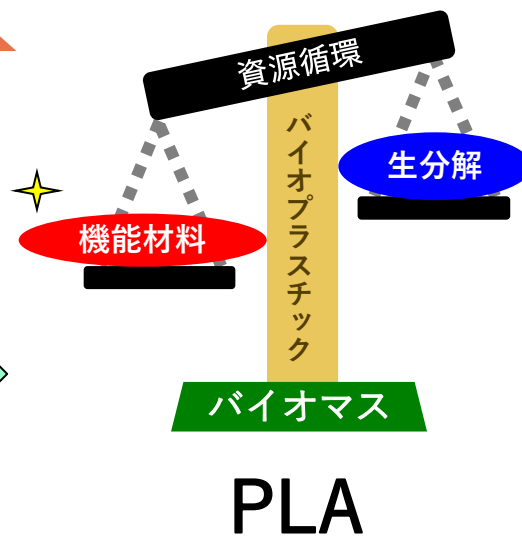
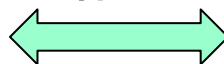


課題



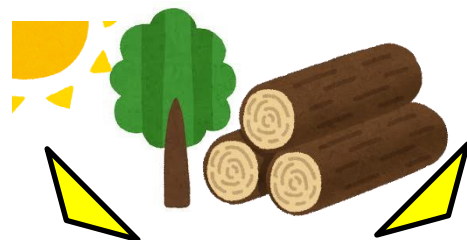
止揚

二律背反



PHAの合成菌と分解菌は
海洋に普遍的に存在

LAHB×ポリ乳酸 → 新素材 “創発”



LAHBシリーズ

α

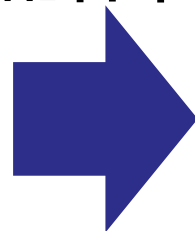
β

γ



LA分率 × 分子量

配合率



PLA
(L/D体)



⑤ 生分解付与



- ① 伸び ↑
- ② 耐衝撃性 ↑
- ③ 結晶化促進
- ④ 成型加工性 ↑

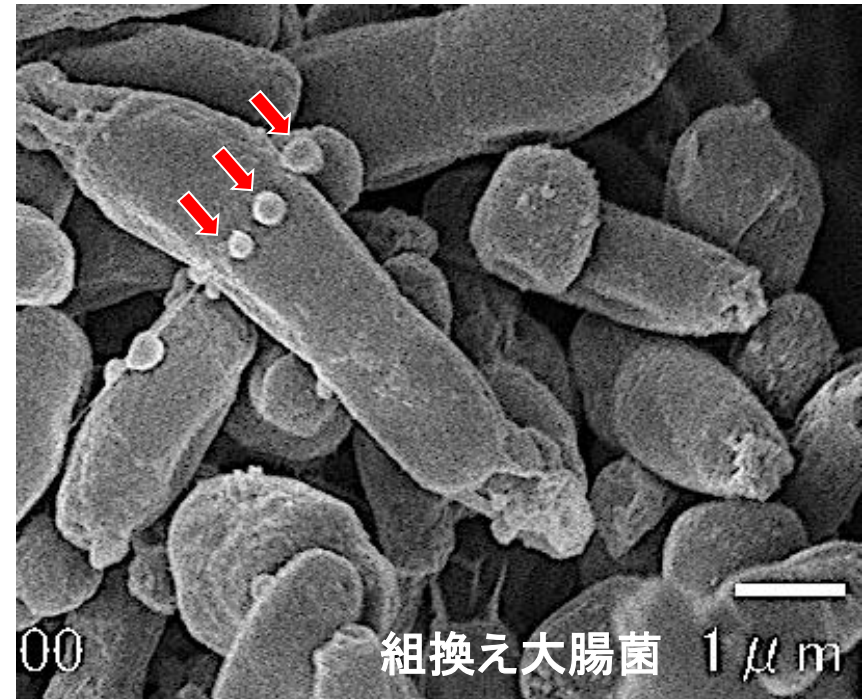


微生物の「内」と「外」



TEM

細胞内でポリマー蓄積

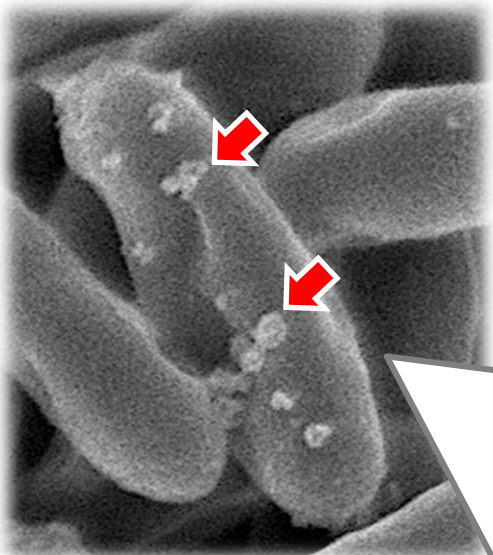


SEM

細胞外で何が？

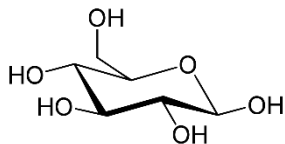
瓢箪（PHB）から駒（メンブレンベシクル）

バイオポリマー生産
大腸菌



イボ状の隆起物

糖（グルコース）



↓ 代謝

組換え
大腸菌

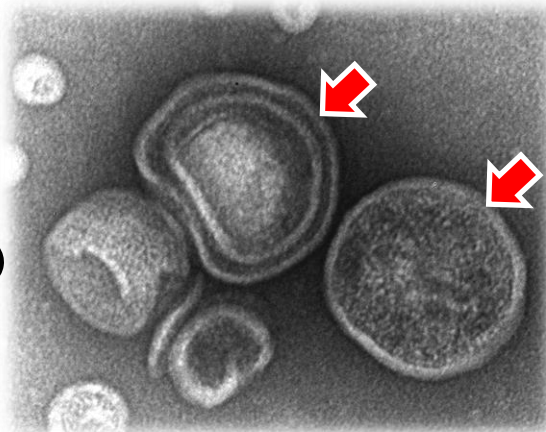
合成・蓄積

メンブレンベシクル (MV)

MV ○ ○

ストレス

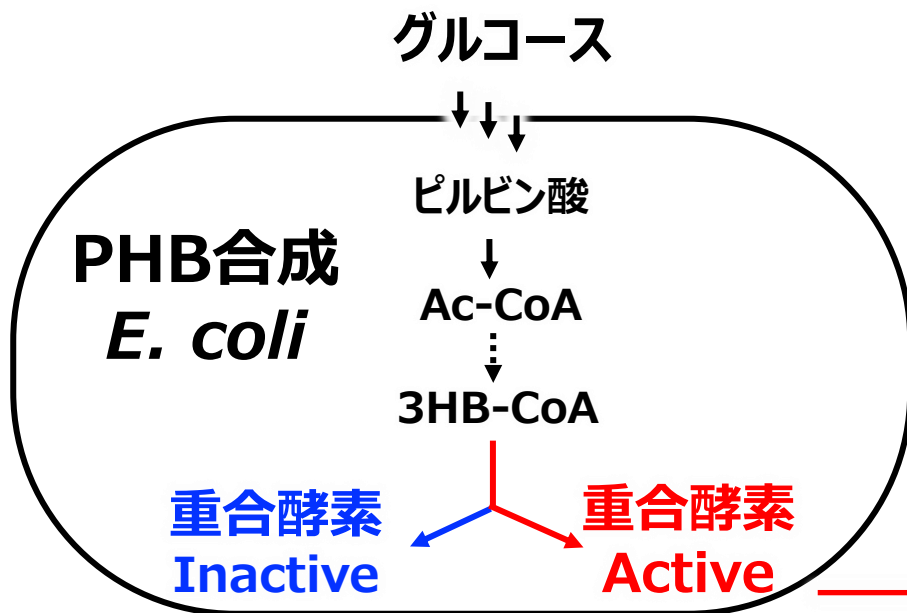
バイオ
ポリマー



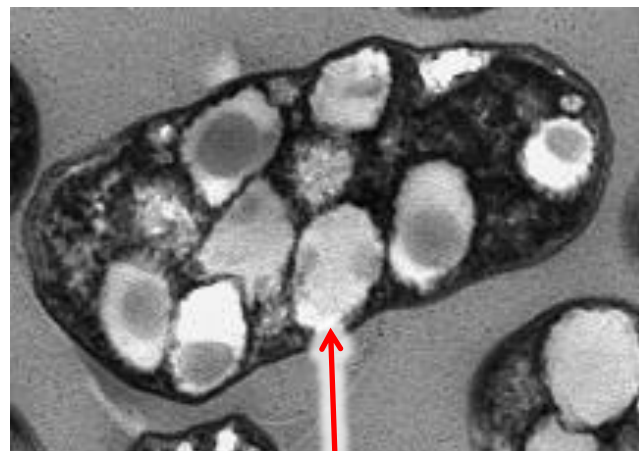
(粒径 : 50-200 nm)

リン脂質と膜蛋白質からなる
膜小胞

発見のきっかけ “泡”



PHB生産大腸菌



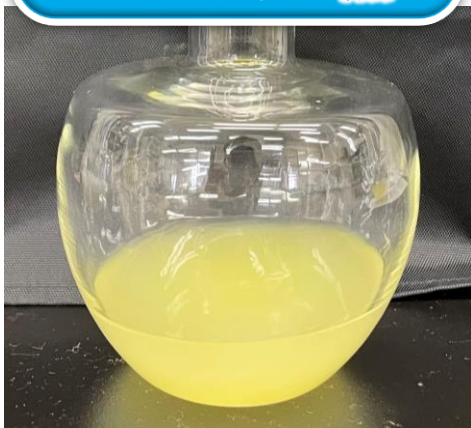
ポリヒドロキシ酪酸
(PHB)

生分解性
プラスチック素材

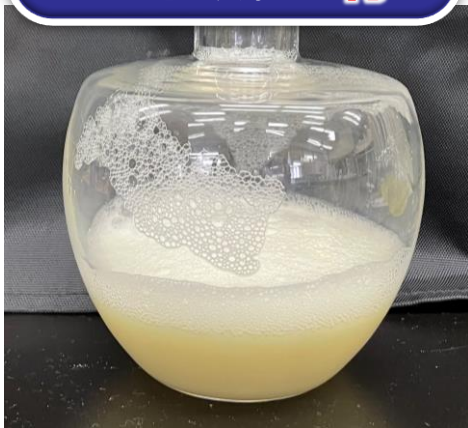


← この泡は何？

PHB合成 - 無 -



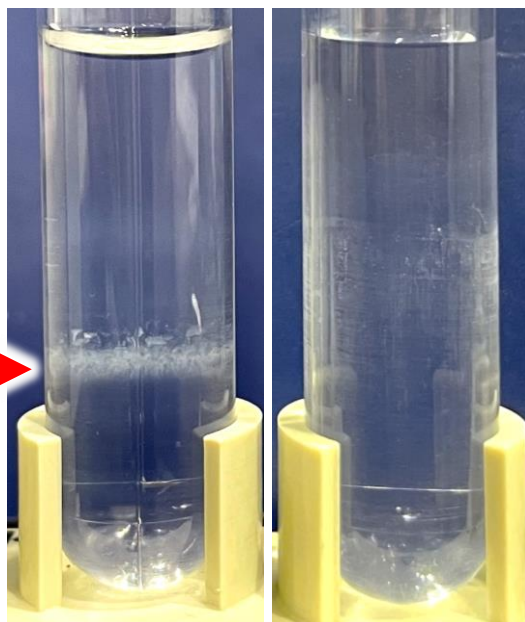
PHB合成 - 有 -



LB+2%Glc培地、30℃、125 strokes/min

メンブレンベシクルだった

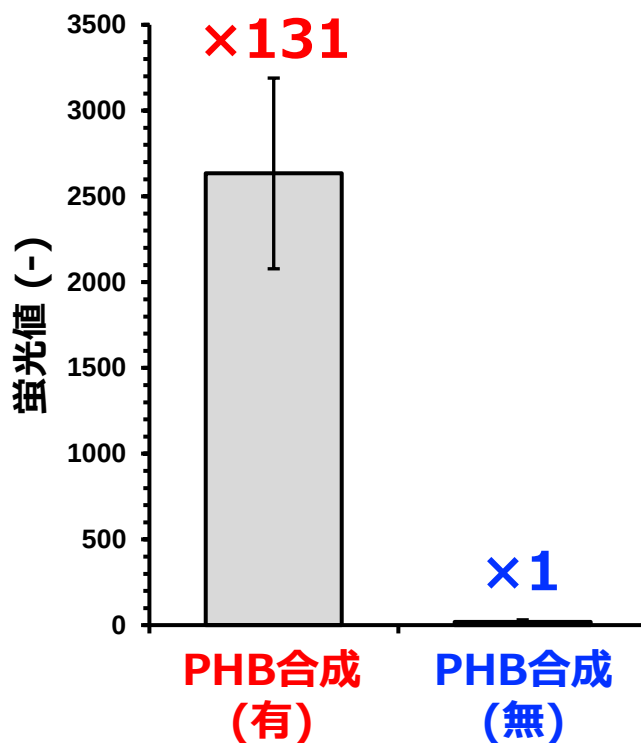
密度勾配超遠心



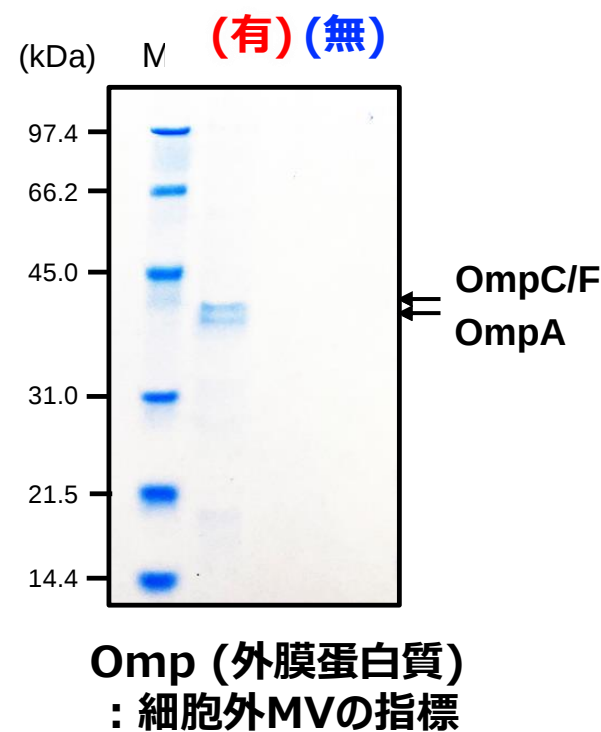
PHB合成
(有)

PHB合成
(無)

リン脂質の検出 (FM1-43)



膜蛋白質の検出

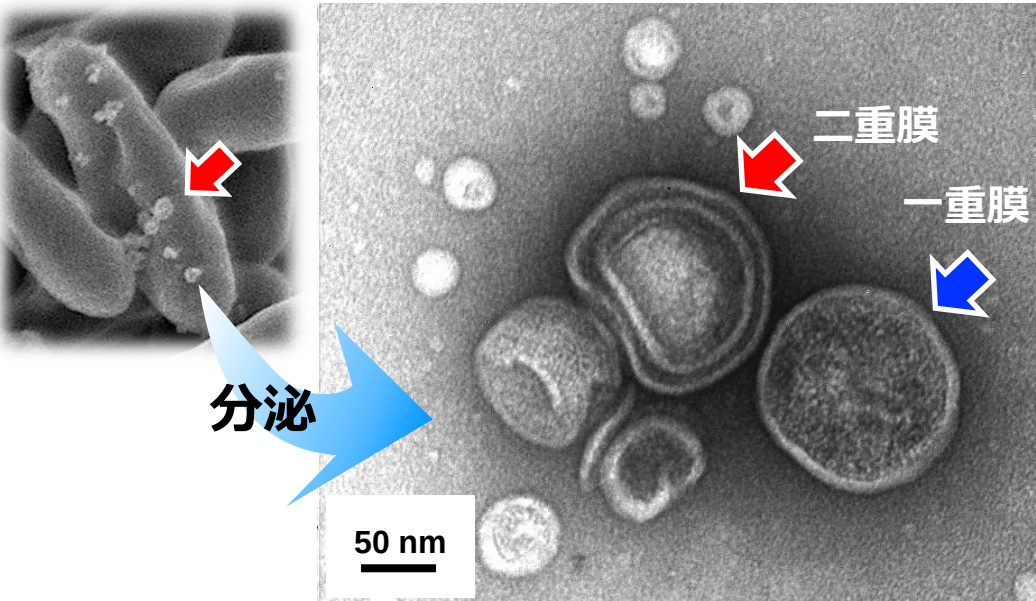


メンブレンベシクルだった

TEMによる形態観察

形成段階

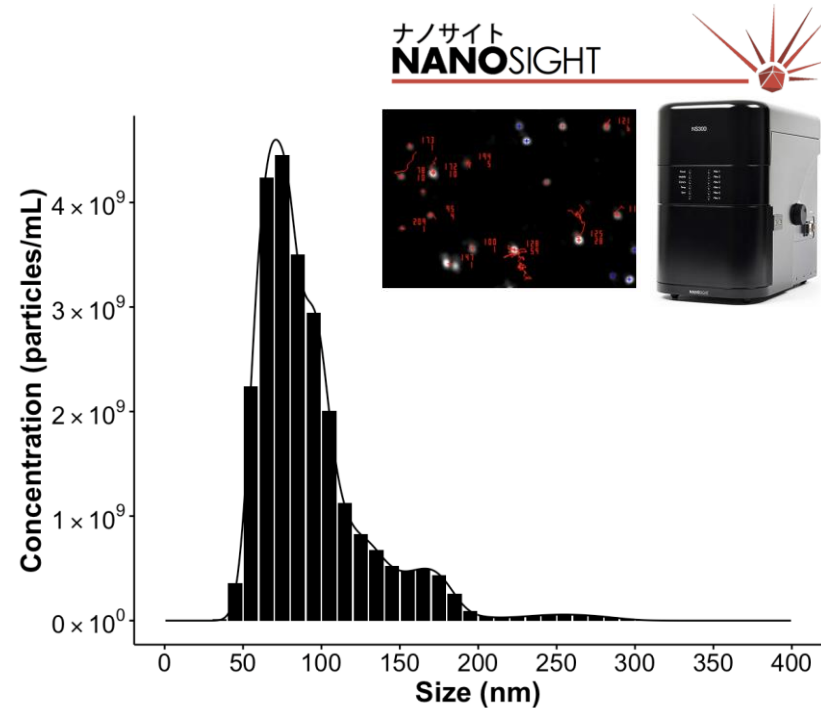
放出後



“二重膜”と“一重膜”の膜小胞

(筑波大学の野村・豊福グループとの共同研究)

粒径分布 (トラッキング解析)

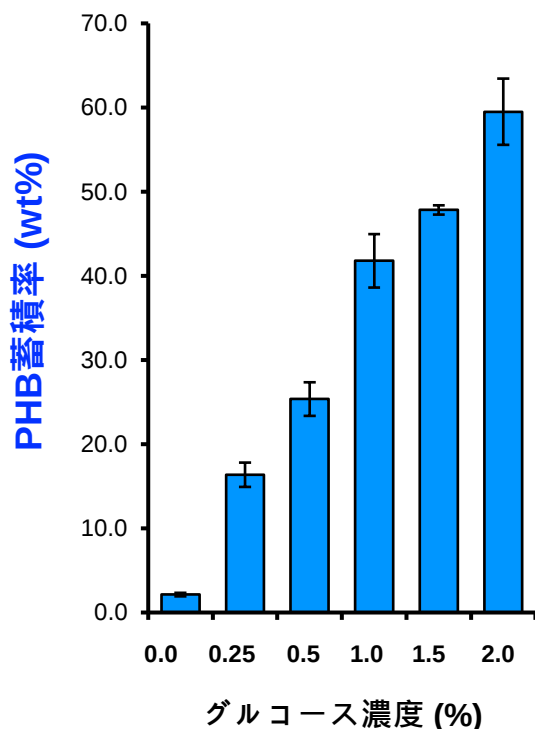


分布 : 50-200 nm

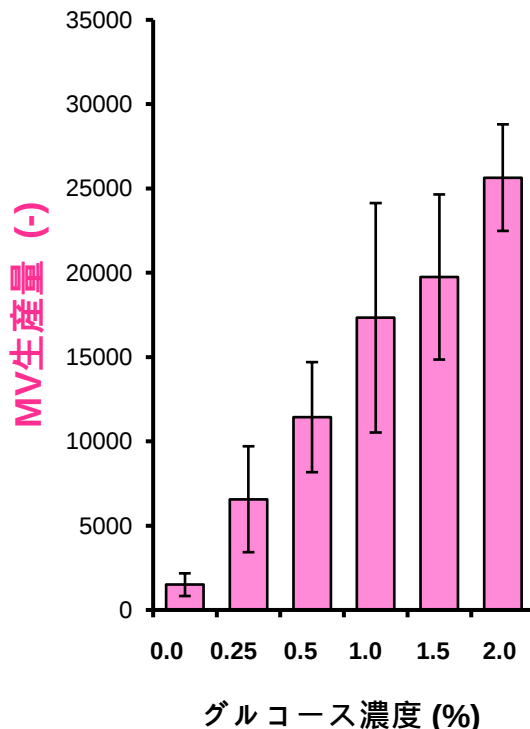
平均 93.2 ± 3.1 nm

グルコース濃度で精密制御

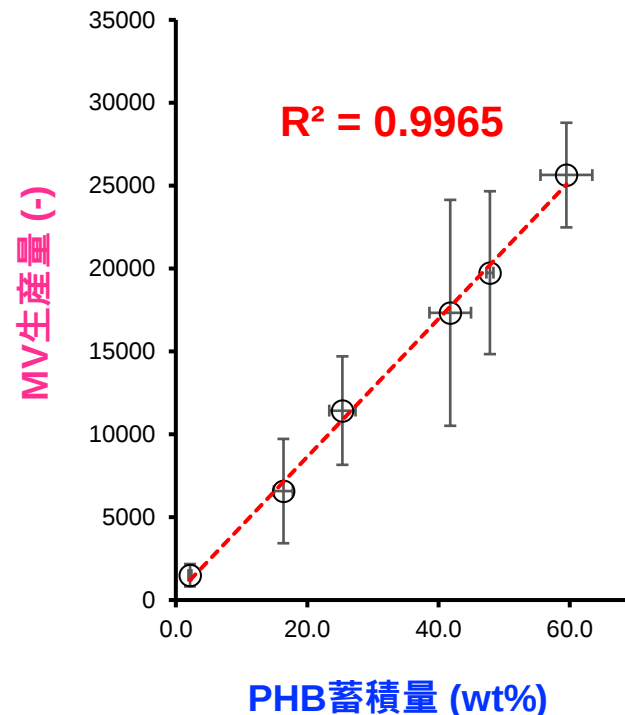
細胞内PHB



細胞外MV



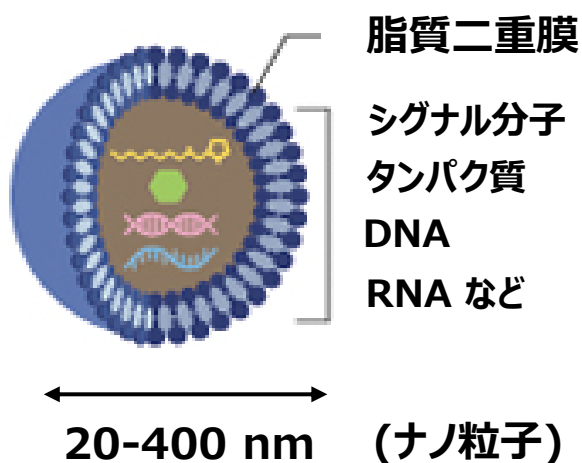
相関関係 (MV & PHB)



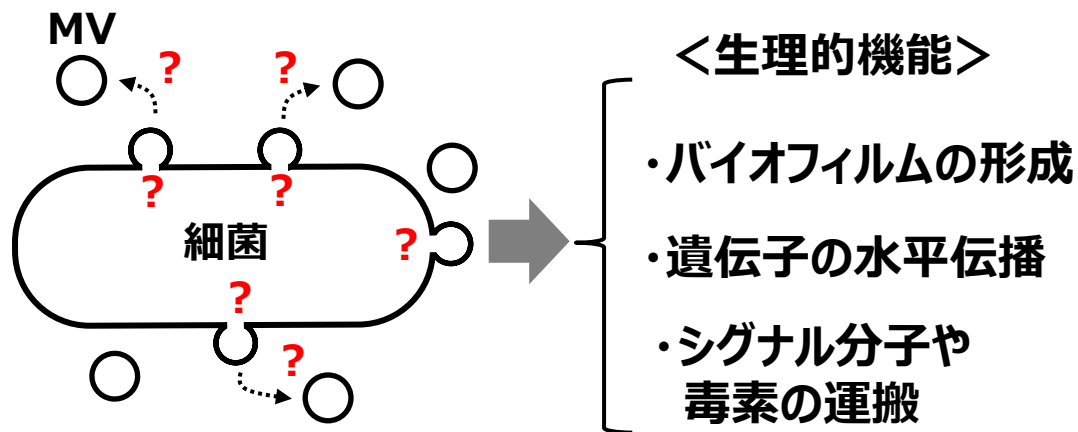
グルコース濃度によって制御可能な連続MV発生装置

「膜小胞」の生理機能と応用

メンブレンベシクル (MV)



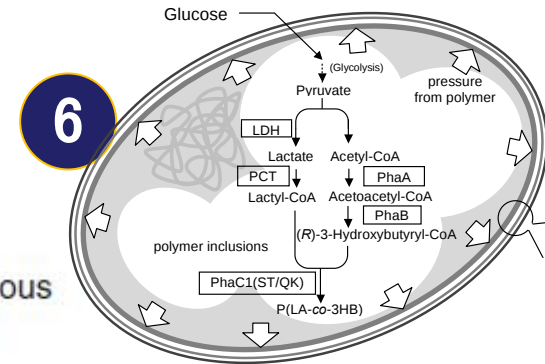
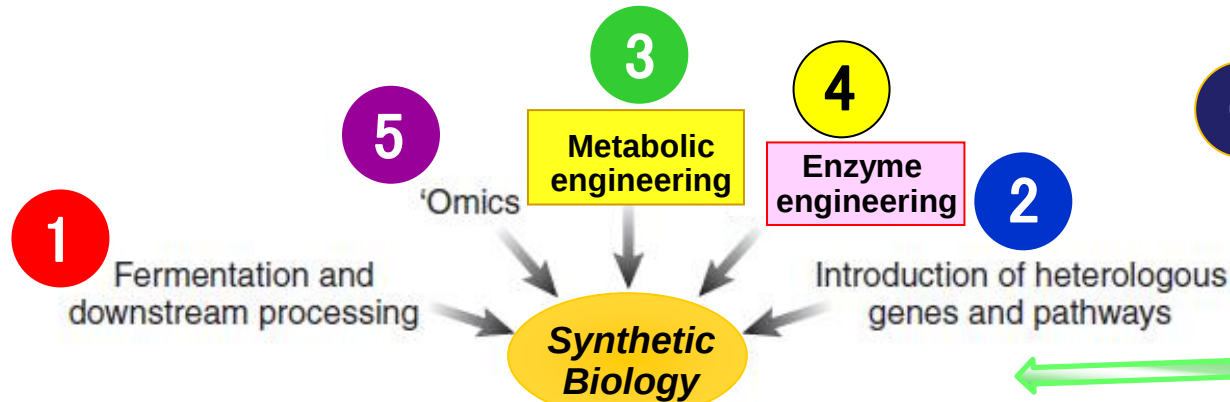
細胞間コミュニケーションの媒体



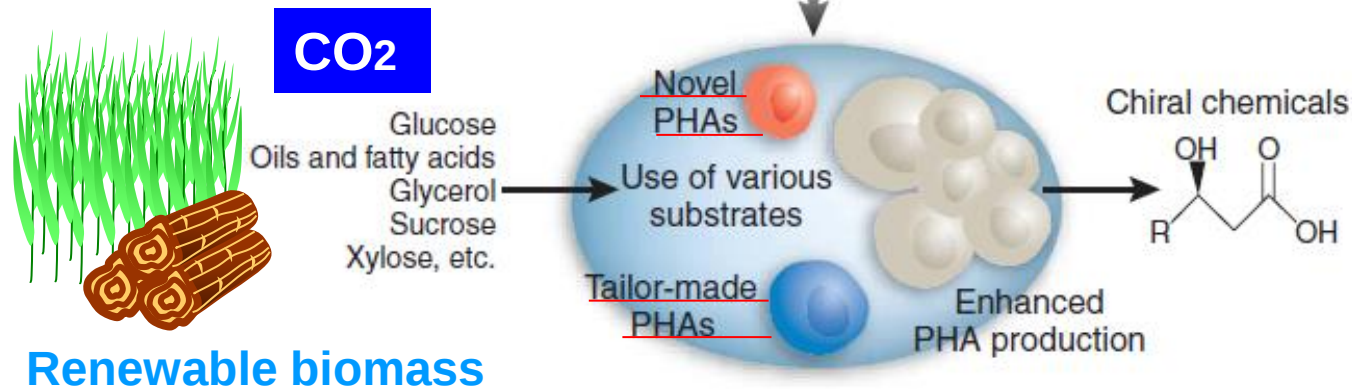
応用展開

- ワクチン開発の抗原として利用
- DDSを指向したナノキャリアー
- 有用酵素の内包による化学反応工場

Synthetic biology



"Balloon"-type platform



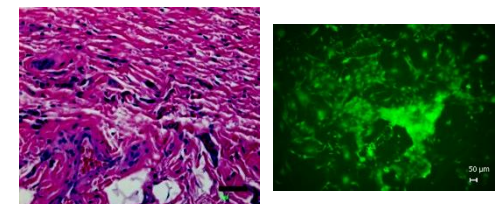
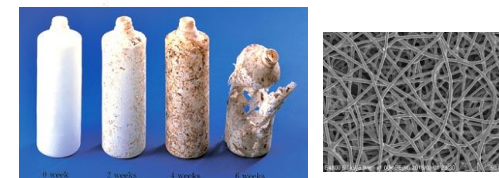
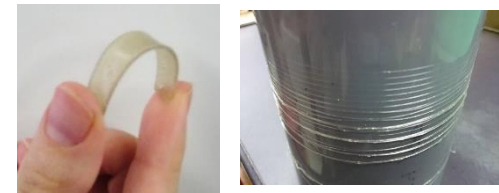
**Microbial
factory**

monomers

secretory production

Polymerized products

Yes



夢の エコライフ

..... 二酸化炭素を資源に

ご清聴ありがとうございました！

