

# 環境負荷の少ないプラスチック食品容器の微生物合成

管理栄養学科 門屋 亨介

## はじめに

「バイオテクノロジー」という言葉が一般的に用いられるようになったのは、今から約30年ほど前である。この学問から発達した技術を用いることで石油エネルギーからの脱却、難病からの克服、食糧問題など我々が抱えていた問題を解決することができるのではないかと語られていた。それから月日は流れ科学技術も発展していき、現実的な成果として示されていることは新聞・雑誌・テレビ等を通して知ることができる。

昔は「バイオテクノロジー」と一括りで語られていた分野も科学技術が発達した今日ではより細分化されている。欧州連合(EU)では、各細目に対してレッドバイオテクノロジー、グリーンバイオテクノロジー、ホワイトバイオテクノロジーと「色」に関連付けた名称をつけた。レッドというのは血の色から連想されるように医療に応用されるバイオテクノロジーを、グリーンというのは作物・植物等の農業に応用されるバイオテクノロジーを、ホワイトは化学産業に応用されるバイオテクノロジーを指す。このホワイトバイオテクノロジーは、アルコール、プラスチック、ビタミン、アミノ酸、抗生物質、酵素などを環境負荷を減らし生産することを目指している<sup>1)</sup>。言葉自体は目新しいかもしれないが、ワイン、チーズ、酒などの製造に数千年前から利用されてきたバイオテクノロジーも該当する。近年では、さらに遺伝子技術の発達により、より広い分野で利用されている。

## 環境問題を解決するホワイトバイオテクノロジー

石油化学産業において排出される温室効果ガスの増加は、深刻な社会問題となっている。2005年2月に京都議定書が発行され、世界各国で温室効果ガス排出量を削減させることが決定した<sup>2)</sup>。この削減計画においてホワイトバイオテクノロジーが積極的に利用されている。

ホワイトバイオテクノロジーの原料は、カーボンニュートラルなバイオマスである。このバイオマスは大別すると、従来型農林水産資源バイオマス、廃棄物バイオマス、プランテーションバイオマスの三つに分けられる(図1)。これらの中で、再生可能ないしは廃棄物

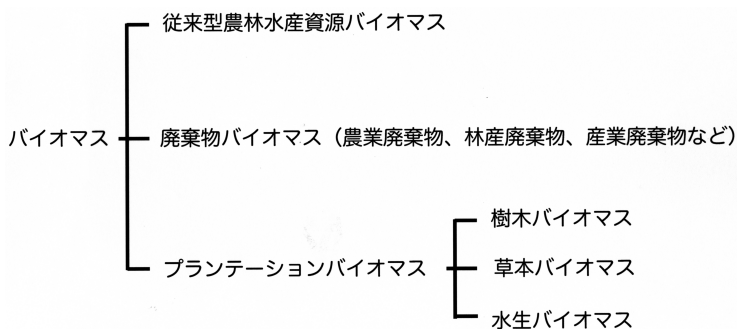


図1 バイオマス資源の分類  
(ホワイトバイオテクノロジー：シーエムシー出版から改変)

の再利用という観点において、廃棄物バイオマス、プランテーションバイオマスの利用に特に高い注目が集まっている。「バイオマス活用推進基本計画」では、食品廃棄物、農作物非食用部、林地残材の利用率向上に注力することが明記されている<sup>3)</sup>。これらバイオマス原料から精製される糖を利用して、バイオアルコール（燃料・バイオナフサ原料）やバイオ化学品（基幹化合物、バイオプラスチック）を生産するのである。

## 投棄プラスチック問題

今日、海などの自然環境には少なくとも800万トンのプラスチックゴミが一年間に投棄され、さらに既に1億5000万トンが海洋中にあるといわれ、年々増加している<sup>4)</sup>。これらゴミはペットボトル、スーパーのレジ袋、肉や魚の梱包材である。プラスチックは軽くて加工しやすく耐水性があり、かつ安価であるなどとても便利な素材である。またプラスチックを利用した梱包材は、食品や飲料品の賞味期限を延ばすなどの効果があり広く一般に普及している。しかしながら、プラスチック製のレジ袋が海洋中に投棄された場合、それらは長期間海中を漂い、クジラやカメが餌と間違えて誤飲し、そのまま腸閉塞での死亡などの危機を引き起こすなどの問題が多発している<sup>5)</sup>。2019年3月にフィリピンの海岸に打ち上げられたクジラの胃袋から40kgものプラスチック製品が出てきたニュースは記憶に新しいと思う<sup>6)</sup>。

さらに近年話題になっている事案が、海洋中のマイクロプラスチック問題である。マイクロプラスチックとは、5mm以下の細かいプラスチックの粒子のことをいう。このマイクロプラスチックは、海洋中に投棄されたペットボトルなどのプラスチック製品が波により破碎された、または、紫外線で細かく分解されたものなどがある。さらに近年では、歯磨き粉などに含まれる研磨剤が海洋中に流れ出たものもある<sup>7、8)</sup>。これらマイクロプラスチックは、有毒成分を吸着し、海洋生物に摂取される。摂取されたマイクロプラスチックが海洋生物にどのような影響を及ぼすかは研究段階ではあるが、悪影響が予想されている（図2）。

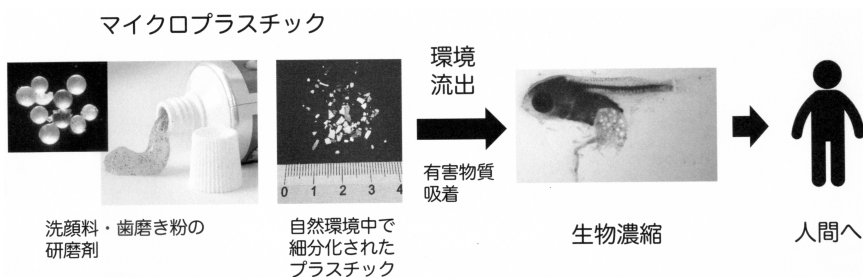


図2 マイクロバイオプラスチックの生物への影響

これら海洋投棄プラスチック問題は、食品業界にとっても対岸の火事というわけにはいかず、深刻な問題である。先に書かれているように、多くの食品の梱包材や飲料品容器にはペットボトルのようなプラスチックが利用されている。また、食器やストロー、飲料カップなどにもプラスチックは利用されている。このように食品業界で広く使われるプラス

チックだが、近年では政府及び企業を中心に「脱プラスチック」が行われている<sup>9)</sup>。既に欧米では動き始めており、スターバックスやマクドナルド等ではプラスチック製の使い捨てストローや梱包材を他の物質に変更している。

### 生分解性バイオプラスチック

これらプラスチック問題の答えの一つが「生分解性バイオプラスチック」である。生分解性バイオプラスチックは、植物性の廃棄バイオマスを用いて微生物で生合成される<sup>10)</sup>。この生分解性バイオプラスチックは、既存のプラスチックと同等の物性を持ちながら環境中では水と二酸化炭素に分解される。このとき発生した二酸化炭素は植物の生育に利用されることから、完全循環型の環境に優しい新しい素材として注目を集めている（図3）。

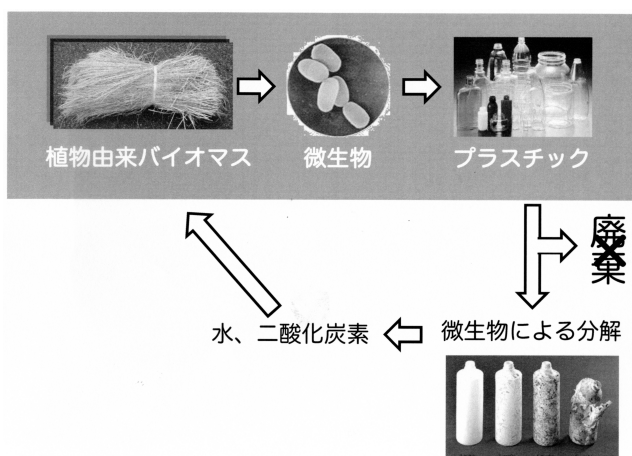


図3 植物由来バイオマスを用いた成分解性プラスチックの生産

バイオプラスチックの代表格であるポリ乳酸（PLA）は、熱可塑性を持ち、透明性に優れ、ペットボトルのような容器に加工することができ、また、生体医療材料としても積極的に展開されている高分子材料であり、1932年に Carothers によって合成が報告されたことに始まった<sup>11)</sup>。PLA はバイオマスから得られた糖を原料として微生物発酵で得られた乳酸から多段階反応を経て化学重合される（図4A）。現代では先に述べたような石油枯渇問題や温室効果ガス削減対策、マイクロプラスチック問題等により重要素材として注目を集めている。

一方、自然界には微生物の体内でプラスチックが生合成されることが知られている。3-ヒドロキシブタン酸（3HB）からなるバイオプラスチック [P(3HB)] で、1926年にパスツール研究所の Lemoigne によって発見された<sup>12)</sup>。多くの微生物は栄養源（窒素やリンなど）の枯渇した条件下で、高分子量バイオプラスチックを細胞内に合成・蓄積する。生物学的には微生物にとって貧栄養時に備えて蓄えるエネルギー貯蔵物質であり、高等生物によるところの脂肪と同じ働きをする。微生物が生産する代表的なバイオプラスチックは、炭素数4からなる3HBのホモポリマーであるP(3HB)であり、これはポリプロピレンとほぼお

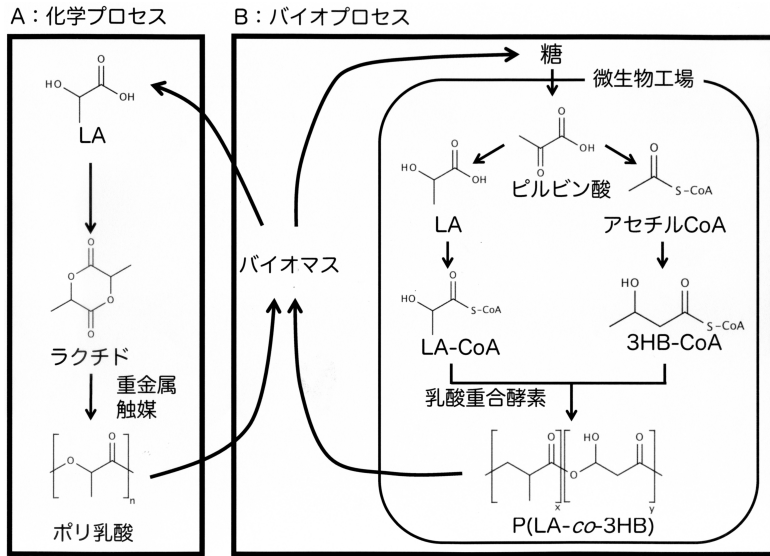


図4 バイオプラスチック生産。A：化学プロセス、B：バイオプロセス

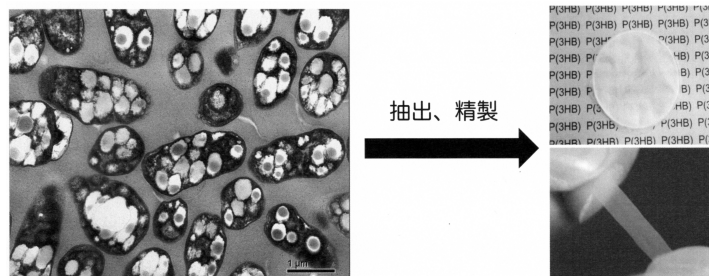
なじ融点を持つ<sup>13)</sup>。この他にも、炭素数6から14の中鎖長ヒドロキシアリカン酸をモノマーとするコポリマーも存在する。これらは、ポリヒドロキシアリカン酸 (PHA) と総称される<sup>14)</sup>。

両プラスチックの合成は、バイオマスを原料に用いる点では環境に調和したバイオプロセスが基盤となる。しかし、PLAがバイオと化学の融合プロセスで合成されるのに対して、PHAは一段階の「オールバイオプロセス」で合成される。このプロセスは、PLA生産法と比較して、生産ステップが減ることや、原料となるバイオマスを高度に精製する必要がないことから生産コストの削減が期待できる。さらに生体触媒の酵素によって水系で温和に反応が進むので、化学合成での重合反応に用いる重金属触媒や有機溶媒を使用しないことや、高温高压条件を要求しないことから環境負荷の軽減が予想される。当然、PLAのオールバイオプロセスでの生合成も検討されたが、3HB重合酵素は乳酸に対する重合活性を持っていなかった。しかし、「進化学」を用いて3HB重合酵素を乳酸重合能力を持つように人工進化させた変異酵素で、乳酸と3HBの共重合体を「オールバイオプロセス」で生合成することに世界で初めて成功した(図4B)<sup>15)</sup>。このバイオプラスチックは、石油由来のプラスチックと同様の物性を示し、自然環境中で生分解される。

### 生分解性バイオプラスチック生産の主役「微生物」

前項で記述したように、天然で生分解性バイオプラスチックを生産する微生物の発見は様々な環境問題の解決に一石を投じた。微生物は、物質変換に必要な触媒である酵素を合成し、細胞外から基質を取り込んで目的物質を生産する小さな工場(我々は微生物工場と呼んでいる)として機能できる。細胞内で生産された有用物質の多く(エタノール、アミノ酸のような低分子化合物、セルラーゼなどの酵素)は、細胞外に分泌され、培地から回

収される<sup>16)</sup>。一方で、生成物が細胞内に蓄積されるタイプもある。例として、株式会社カネカが生産しているアオニレックスに代表されるバイオプラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸、スパイダーシルク、シアノフィシン、ポリリン酸などが知られる<sup>17)</sup>。この場合、微生物工場は「製造」だけでなく、「倉庫」の機能も担うことになる(図5)。



細胞内にある白い顆粒が  
バイオプラスチック

図5 細胞内に蓄積したバイオプラスチックと精製したバイオプラスチック

微生物工場のパフォーマンスは、目的物質の合成経路の効率はもちろんであるが、宿主となる微生物細胞の性能にも影響される。近年、有用物質生産強化のための新しい方法として、宿主細胞そのものをモノ作りに適するように改変することが試みられている。そのためには、微生物工場の設計図ともいえるゲノム DNA を改変する必要がある。例えば、花王株式会社グループは、セルラーゼやアミラーゼなどの酵素の微生物生産系において、宿主ゲノムから生育に不要な遺伝子を大量に欠失させることによって、酵素生産量を増加させることに成功している<sup>18)</sup>。

### 「風船型」微生物の発見

基本的なアイデアは、微生物細胞の体積(すなわち「倉庫」)を大きくすれば生産性が向上するであろう、ということであった。微生物の細胞形態を決定する因子の一つに細胞骨格がある。微生物細胞は、ペプチドグリカンと呼ばれる多糖がペプチドで架橋されることにより網目状の構造を形成した高分子により覆われており、それにより細胞形態を一定に保っている(図6A)。細胞骨格構成に関与する酵素が欠失した細胞は、桿状形態が維持できなくなり、球形状に膨らむものがあることが知られていた<sup>19)</sup>。もう一つの細胞の大きさに影響する因子として、細胞分裂関連タンパク質がある。細胞は増殖する際、まず体積が増大し、分裂するが、細胞分裂関連タンパク質が欠失した細胞では、増大した細胞が2つに別れることができずに、細胞は繊維状に長くなっていく<sup>7)</sup>。これらの背景に基づいて、細胞体積に影響を与える可能性がある微生物遺伝子を、遺伝子情報データベースおよび文献より選抜し<sup>20, 21)</sup>、それらの遺伝子欠失株を用いて、バイオプラスチックの生産を行った。その結果、野生型微生物(バイオプラスチック合成遺伝子を導入した組換え株)と比較して、生育に影響なく、バイオプラスチック生産量が約40%向上する遺伝子欠失株を発見した。また期待通り、本欠失株では細胞体積が約40%増加していた。それ

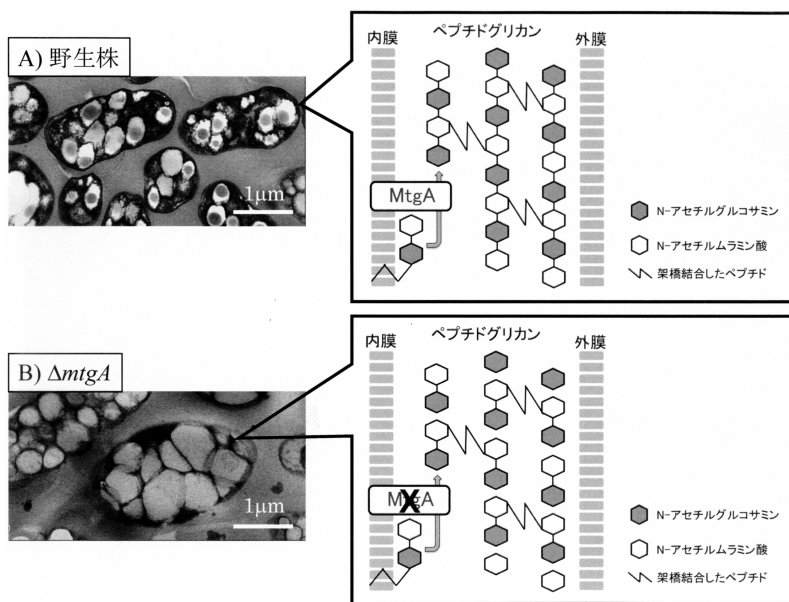


図6 細胞内バイオプラスチック生合成とペプチドグリカンとの関連性。  
A：野生株、B：ペプチドグリカン合成酵素欠失株

に伴い、糖の消費量も増大していた。

本株は、細胞骨格因子のペプチドグリカン合成に関与する酵素をコードする *mtgA* (mono-functional peptidoglycan glycosyltransferase) 遺伝子の欠失変異株であった。MtgA は、ペプチドグリカンの多糖部分を構成するアミノ糖である N-アセチルグルコサミンと N-アセチルムラミン酸との重合を行う酵素である<sup>22)</sup>。したがって、*mtgA* 欠失株では、アミノ糖同士の結合が不完全になったペプチドグリカンが合成されている可能性が考えられた (図 6B)。ところが驚いたことに、本欠失株は、バイオプラスチックを蓄積していない状態では、野生株と細胞体積を含めて表現系の違いは見出せなかった。したがって、MtgA はペプチドグリカンの合成において補助的な役割を果たしており、その欠失だけでは細胞の状態に大きな影響を与えないが、細胞内部でバイオプラスチックが合成されたことにより内圧が高まると、不完全なペプチドグリカンがその内圧に抗しきれないことにより、細胞の膨張が引き起こされると考えられた。この機構がゴム風船を膨らます過程と似ていることから、本欠失株を「風船型」微生物と名付けた。MtgA はペプチドグリカンの合成に関わっていることは以前から知られていたが、欠失株の表現系がないため、その生理的意義は不明であった。今回、細胞内でバイオプラスチックを蓄積させるという人工的な条件により、*mtgA* 欠失の表現系を発見できたことは、特筆すべきことである。本研究成果は、ペプチドグリカンの生合成という細菌の基本的な機能の探求に、プラスチック合成系という人工的なシステムが貢献できる可能性を示唆している。

## 草本系バイオマスを用いたバイオプラスチック生産

バイオプラスチック生産の産業化に向けて、原料の安定供給は重要な要素となる。特に、食糧との競合を避ける意味において、セルロース系バイオマス資源は有望な原料候補である。ここでは未利用バイオマスとして稲わら、また資源作物としてススキに着目して言及する。

日本における稲わらの生産量は約 900 万トンであり、その多くは水田に鋤きこまれている。農地に還元させることによる稲作への効果に関して十分留意しなければならないが、一方で利用されない稲わらが焼却処理されている現状もあり、バイオプラスチック生産原料として利用できる可能性が十分に考えられる。またススキは資源作物として期待されているセルロース系バイオマスである。その理由として 1) 多年生 2) 低温条件下での高い光合成能力 3) 効率的な養分循環が挙げられ、持続的なバイオマス生産に優れている。

稲わらおよびススキを水酸化ナトリウムおよび次亜塩素酸を用い前処理を行った後、酵素糖化された糖化液からバイオプラスチックの生産を行った結果、同濃度のグルコース / キシロース試薬を用いた場合と同等の乾燥菌体量およびバイオプラスチック含量が得られた<sup>23)</sup>。このことから稲わらおよびススキの糖化液はバイオプラスチック生産のための有望なバイオマス原料として期待できる (図 7)。

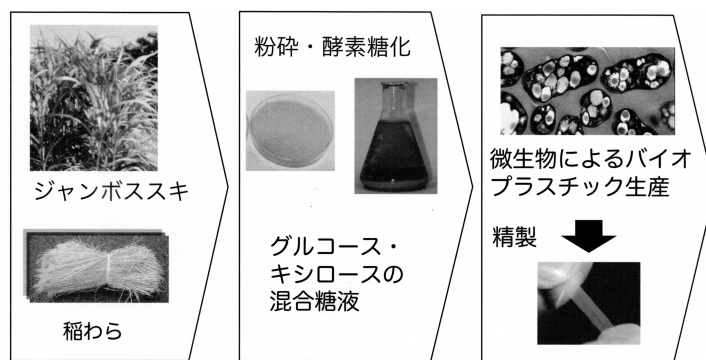


図7 草本系バイオマスを用いたバイオプラスチックの一貫合成システム

## 展望

ホワイトバイオテクノロジーの強力なプラットフォームである微生物工場は、ゲノム改変技術により、細胞そのものの性質を物質生産に合わせて改良することができる。微生物宿主は、本稿で紹介したように、物質生産を行う「製造」の機能にとどまらず「倉庫」の役割も果たす。*mtgA* 欠失により実現する「風船型」微生物工場は、冒頭に述べたような種々の細胞内蓄積型の物質生産系に対しても、生産性向上のための新たなアプローチとなりうる。また、細胞内に蓄積された目的物質を遠心分離により容易に回収 (培地成分を除去) できる半面、目的物質を細胞から抽出しなければならないという制約も存在する。我々は、この抽出工程においても、類似の手法により微生物工場の性能は改善しうると考えている。

将来的には、製品を「出荷」する機能も強化した微生物工場の開発を目指したい。

#### 参考文献

- 1) Bachamm. R., Industrial Biotech-New Value Creation Opportunities. McKinsey & Company, Presentation at the Bio Conference. New York, 2003
- 2) No auther listed., The Kyoto Protocol: in force? CMAJ. 172(4):437-439. 2015 Feb 15
- 3) 農林水産省. バイオマス活用計画書. 2018
- 4) Jambeck, J.R., R. Geyer, C. Wilcox, T.R. Siegler, M. Perryman, A. Andrady, R. Narayan, and K.L. Law. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science 347:768-771, 2015
- 5) Gall, S.C., and R.C. Thompson. The impact of debris on marine life. Mar. Pollut. Bull. 92:170-179. 2015
- 6) BBC News., Dead Philippines whale had 40kg of plastic in stomach. 2019
- 7) Bakir, A., I.A. O'Connor, S.J. Rowland, A.J. Hendriks, and R.C. Thompson. Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life. Environ. Pollut. 219:56-65. 2016
- 8) Chubarenko, I., and N. Stepanova. Microplastics in sea coastal zone: Lessons learned from the Baltic amber. Environ. Pollut. (Barking, Essex: 1987). 2017
- 9) Steensgaard IM, Syberg K, Rist S, Hartmann NB, Boldrin A, Hansen SF. From macro- to microplastics - Analysis of EU regulation along the life cycle of plastic bags. Environ Pollut. May;224:289-299. doi: 10.1016/j.envpol.2017.02.007. Epub 2017 Feb 17.
- 10) Brandl H, Knee EJ Jr, Fuller RC, Gross RA, Lenz RW. Ability of the phototrophic bacterium Rhodospirillum rubrum to produce various poly (beta-hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. Int J Biol Macromol. 11(1):49-55. 1989 Feb
- 11) Carothers, H., Dorough, G. L., and Van Natta, F. J., J. Am. Chem. Soc., 54, 761, 1932
- 12) M. Lemoigne: Etudes sur L'autolyse Microbienne Acidification par Formation D'acide  $\beta$ -Oxybutyriq Ann. Inst. Pasteur, 39, 144. 1925
- 13) Merrick, J.M. and Doudoroff, M. Enzymatic synthesis of poly-  $\beta$  -hydroxybutyric acid in bacteria. Nature, 189, 890-892. 1961
- 14) Davidson, J., Heusterspreute, M., Chevalier, N., Ha-Thi, V. and Brunel, F. Vectors with restriction site banks V. pJRD215, wide-host-range cosmid vector with multiple cloning sites. Gene, 51, 275-280. 1987
- 15) S. Taguchi et al.: A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105, 17323-17327. 2008
- 16) 土肥義治：微生物のつくるバイオプラスチック？生命と環境を保全する夢の素材？, 現代化学, 12月号, 44-49. 1988
- 17) Francisco B., Pereira P M. et al., Selection of Saccharomyces cerevisiae for efficient very high



- gravity bio-ethanol fermentation processes., *Biotechnol Lett*, 32 1655-1661. 2010
- 18) Morimoto T, Kadoya R, Endo K, Tohata M, Sawada K, Liu S, Ozawa T, Kodama T, Kakeshita H, Kageyama Y, Manabe K, Kanaya S, Ara K, Ozaki K, Ogasawara N. Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*. *DNA Res.* 2008 Apr 30;15(2):73-81. doi: 10.1093/dnares/dsn002. Epub 2008 Mar 11
  - 19) Bang Shen and Joe Lutkenhaus, Differences in MinC/MinD Sensitivity between Polar and Internal Z Rings in *Escherichia coli*., *J. Bacteriol.*, 193 (2), 367-376. 2011
  - 20) T. Baba et al.: Construction of *Escherichia coli* K - 12 in - frame, single - gene knockout mutants: the Keio collection, *Mol. Syst. Biol.*, 2. 2006
  - 21) J.V. Holtje: Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 (1), 181-203. 1988
  - 22) H. Hara, H. Suzuki: A novel glycan polymerase that synthesizes uncross-linked peptidoglycan in *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, 168, 155-160. 1984
  - 23) Sun, J., Utsunomia, C., Sasaki, S., Matsumoto, K., Yamada, T., Ooi, T., and Taguchi, S.: Microbial production of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) from hybrid *Miscanthus*-derived sugars, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80, 818e820. 2016

