

CO₂を原料とした乳酸ベースポリマーの生合成

熊本県立大学 環境共生学部 教授 松崎 弘美

1. 緒言

現在、普及している化石燃料由来プラスチックは、原油から作られる石油製品の一つであるナフサ（粗製ガソリン）を加熱・分解して得られるエチレンやプロピレンのような石油化学基礎製品から合成される。化石燃料由来プラスチックは、軽くて丈夫、耐久性・透明性に優れる、着色が容易などの利点があることから、レジ袋、ボトル容器、食品包装だけでなく、航空機、自動車、建築材料、漁網など、幅広い用途で使用され、私たちの生活はより豊かなものになった。しかし、その一方で、プラスチック廃棄物による環境問題が深刻化している。2015年までの66年間に生産された83億トンのプラスチックのうち、リサイクルされているのはわずか9%であり、残りは12%が焼却、78%が廃棄されている^{1,2)}。廃棄された78%の中には、埋め立て処理したものだけではなく自然環境中に流出したものも含まれている³⁾。自然環境中に流出したプラスチックは分解されることはなく長期間残存し、景観を汚したり野生動物を傷つけたりする。その中でも、近年問題視されているのが海洋プラスチックごみである。海洋には、すでに1億5000万トンを超えるプラスチックごみが存在している³⁾。さらに、世界で年間約800万トンのプラスチックが新たに流出しており、このまま流出が続けば、2050年には海洋プラスチックごみが魚の量を上回るともいわれている。また、流出したプラスチックは紫外線や波による物理的な刺激を受けるうちに劣化し、マイクロプラスチックと呼ばれる5 mm以下の破片になる⁴⁾。これらの海洋プラスチックごみにより、ウミガメや海鳥などの生物が漁網に絡まったり餌と間違えてマイクロプラスチックを食べたりして死亡する被害が発生している。これに加えて、マイクロプラスチックはPOPs（残留性有機汚染物質）を吸着する性質をもつ。これまでに、魚介類や食塩などからマイクロプラスチックが検出されており、これらを我々人間も摂取することで、さまざまな臓器へ悪影響を及ぼす可能性がある⁵⁾。このような化石燃料由来プラスチックによる環境問題等への対策として注目されているのがバイオプラスチックである。バイオプラスチックは、再生可能な有機資源を原料にしてつくることにより地球温暖化防止に貢献することが特徴のバイオマスプラスチックと、最終的には水と二酸化炭素にまで分解されることが特徴の生分解性プラスチックがある⁶⁾。

バイオマスプラスチックは「原料として再生可能な有機資源由来の物質を含み、化学的または生物的に合成することにより得られる高分子材料」と定義されている⁷⁾。枯渇化が懸念されている化石資源によらずに生産されることやバイオマスのもつカーボンニュートラル性から地球温暖化の主原因である二酸化炭素の濃度上昇を抑制できることが特徴である。

生分解性プラスチックは、ある一定の条件下で微生物の働きにより分解を受け、最終的

には二酸化炭素と水にまで分解される⁶⁾。生分解性プラスチックには生産方法の違いから微生物系、天然物系、化学合成系の3種類に大別される⁷⁾。そのうち、微生物系は糖などを原料として微生物の体内に蓄積されるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)のことであり、バイオマスプラスチックでもある。化石燃料の消費を抑え、二酸化炭素による温暖化防止という観点からもバイオマスを利用して微生物が合成するPHAを石油由来プラスチックの代替とすることが望ましい。しかしながら、野生株が合成するPHAは硬くて脆いものや非晶質なものなど物性に難があり実用的ではない。つまり、PHAを汎用性プラスチックの代替とするには、使用目的に応じた実用性に優れた高性能PHAを創製する必要がある。PHAの性質はそのモノマーの種類と組成比によるところが大きいので、さまざまなモノマーユニットを重合できる低基質特異性PHA重合酵素を用いて宿主微生物の代謝制御・改変を行うことにより、実用的なPHAを創製できる。例えば、代表的なPHAの3-ヒドロキシブタン酸(3HB)をモノマーとするP(3HB)はポリプロピレンと似た物性を示すが、破断伸びはわずか5%程度と硬くて脆い高分子材料であるため、実用性に乏しい。このP(3HB)に第2成分として炭素数6~12の中鎖長3-ヒドロキシアルカン酸(3HA)を6mol%含む共重合体P(94% 3HB-co 6% 3HA)は破断伸びが680%と柔軟性と丈夫さを兼ね備え、レジ袋で代表される低密度ポリエチレンと同等な性質を示す。これは、*Pseudomonas* sp. 61-3の低基質特異性PHA重合酵素(PhaC1)を利用することで生合成された⁸⁾。

現在、最も期待されている生分解性プラスチックとしてポリ乳酸(PLA)がある。これはバイオマスを原料として乳酸発酵を行い、得られた乳酸を化学重合して製造されている。PLAは透明であるため、ペットボトルのような用途に使用できるが、生分解速度が非常に遅く、現状ではコンポスト中でしか分解されないという欠点がある。野生株のPHA重合酵素は乳酸(LA)ユニットを取り込んだポリマーを合成できないが、プロピオニル CoA 転移酵素(Pct)によりD-乳酸(D-LA)をD-LA-CoAへ変換し、*Pseudomonas* sp. 61-3のPhaC1の改変体[PhaC1(STQK)]を用いて重合させることにより、D-LAがポリマー鎖に取り込まれたP(LA-co 3HB)共重合体の合成が可能となった⁹⁾。これは、LA分率を15~30mol%まで高めるとポリマーの透明性が増し、物性も改善する¹⁰⁾。加えて、P(LA-co 3HB)は優れた生分解性をも有する¹¹⁾。また、我々は乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* HTのD-乳酸脱水素酵素遺伝子(*ldhD*)を導入した大腸菌組換え株を作製することにより、LA分率の高いP(LA-co 3HB)を合成させ、中鎖長3HAユニットを含む新規乳酸ベースポリマーの合成にも成功した¹²⁻¹⁴⁾。以上のように、大腸菌を宿主として、透明性・物性・生分解性に優れた乳酸ベースポリマーの生合成法が確立された。

一方、人間活動により排出された温室効果ガスによる地球温暖化問題も深刻である。特に化石燃料由来の二酸化炭素排出量は温室効果ガス総排出量の65%を占める¹⁵⁾。また、我が国における2019年度の二酸化炭素排出量の35%が産業部門であり、そのうちの40%が鉄鋼業関係と最も多く占める¹⁶⁾。すなわち、二酸化炭素排出量の削減、カーボンニュートラル・リサイクルの推進、化石資源消費量の削減が地球温暖化防止に寄与する。それゆ

え、二酸化炭素を利活用して高度環境調和型 PHA 生産システムを確立することは、温暖化問題・エネルギー問題・地球環境問題の解決に大きく貢献することが期待される (図 1)。

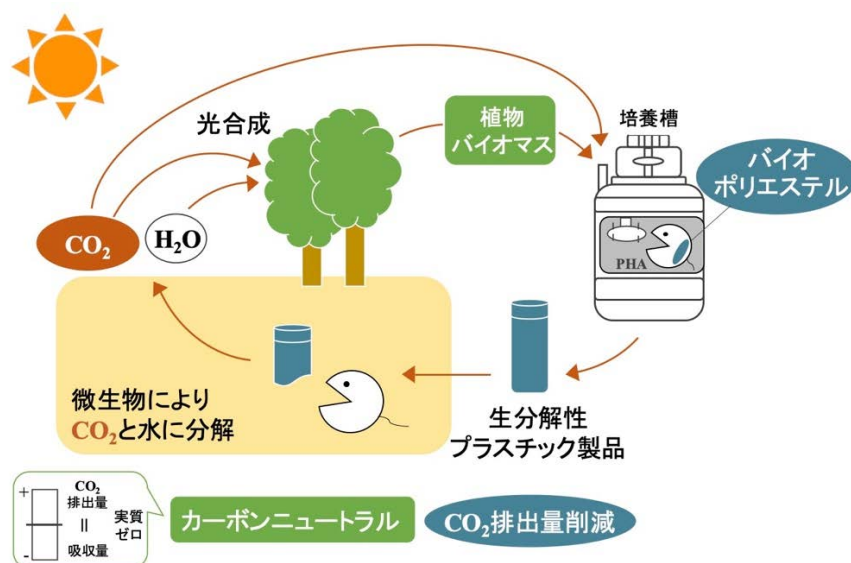


図 1 高度環境調和型 PHA 生産システムの概念図

一部の独立栄養細菌はラン藻と比較して 50～70 倍高い炭素固定能力を持つことから、二酸化炭素の吸収源として有望である¹⁷⁾。独立栄養細菌の中でも水素細菌は、光エネルギーに依存せず、水素の化学エネルギーで二酸化炭素を固定できるため、高速・高密度での培養が可能であり、産業化へのポテンシャルが高いといえる。化石資源由来の物質生産と比べて、生産過程における二酸化炭素排出削減だけでなく、二酸化炭素を吸収するダブルの効果により、排出量が大幅に削減される可能性が示唆されている。

本研究では、大腸菌を宿主とした乳酸ベースポリマー合成の研究を発展させ、糖や植物油の他に二酸化炭素を利用できる化学合成独立栄養細菌の一つ、水素細菌 *Cupriavidus necator* を宿主に用いて、二酸化炭素を原料として透明性に優れる P(LA-co-3HB) を生合成する株を作製することを目的とした。現在、工場などの排ガス源に対応可能な二酸化炭素の分離回収技術が開発されていることから、回収された二酸化炭素をバイオプラスチック生合成に利用できると期待する。本研究では、まずは糖を炭素源として P(LA-co-3HB) を合成する *C. necator* の組換え株を作製することを第一の目的とした。

2. 実験方法

水素細菌 *C. necator* はバイオマスのみならず二酸化炭素を炭素源とし、水素の酸化エネルギーを利用して増殖し、PHA を合成することができる。しかし、*C. necator* が糖や二酸化炭素から合成する PHA は P(3HB) であり、ポリプロピレンと似た物性を示すものの、破断伸びがわずか 5 % の硬くて脆い不透明なポリマーである。これは、*C. necator* が有する PHA 重合酵素 (PhbC) の基質特異性による。そこで、PhbC の代わりに LA ユニットを

も重合できる低基質特異性 PHA 重合酵素の改変体 PhaC1(STQK)を用いて代謝制御を行った (図 2)。

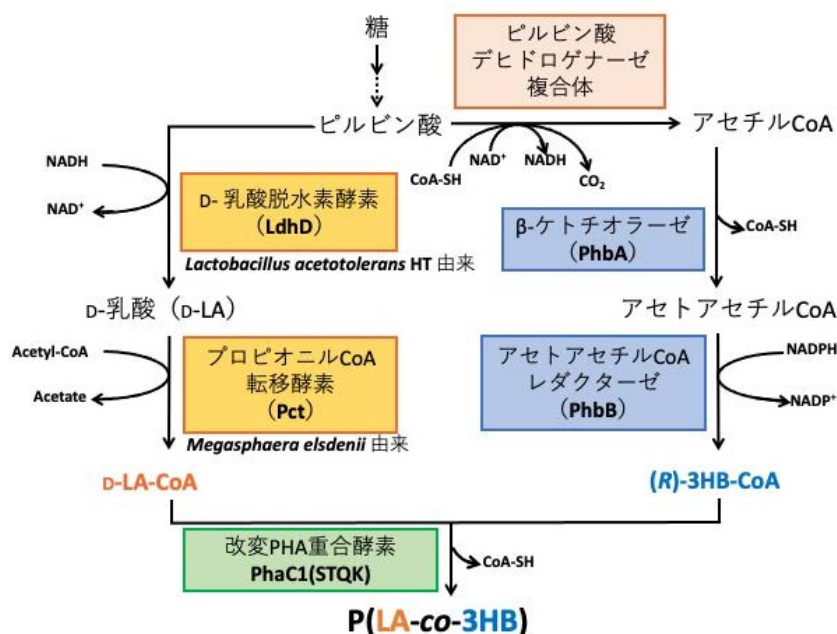


図 2 糖を炭素源とした P(LA-co-3HB)合成における代謝制御

2-1. 使用した菌株とプラスミド

本研究で使用した菌株およびプラスミドを表 1 に示した。プロピオニル CoA 転移酵素遺伝子 (*pct*)、*phaC1(STQK)* 遺伝子、D-乳酸脱水素酵素遺伝子 (*ldhD*) を *lac* プロモーター (P_{lac}) 支配下で発現するように、広宿主域ベクター (pBBR1MCS-2 および pBBR1MCS-3) へ挿入したプラスミドを構築した。さらに、*ldhD* 遺伝子の発現強化を目的として、コドン最適化した *ldhD* 遺伝子 (*ldhD_{opt}*) や強力な *trc* プロモーター (P_{trc}) を挿入したプラスミドを構築した。また、宿主とする *C. necator* の遺伝子改変株 (各種遺伝子の破壊株および置換株) の作製には、自殺ベクターの pK18*mobsacB* を用いた相同組換えにより、*C. necator* H16 の短鎖長特異的 PHA 重合酵素遺伝子 (*phbC*) を破壊した *C. necator* H16dC、*phbC* 遺伝子を *phaC1(STQK)* 遺伝子に置換した *C. necator* H16C1STQK を作製した。さらに、グルコース資化能をもつ *C. necator* NCIMB 11599 の *phbC* 遺伝子を *phaC1(STQK)* 遺伝子に置換した *C. necator* GC1STQK を作製し、その株から 3HB ユニット供給系を弱化した株 (GdCAB 株、GC1TQKdA 株および GC1STQKdAB 株) を作製した。

構築したプラスミドは *Escherichia coli* S17-1 を介した接合伝達法により *C. necator* に導入して組換え株を作製した。大腸菌株の培養には LB 培地 (1 % peptone, 1 % NaCl, 0.5 % yeast extract, pH 7.0) を用い、プラスミド維持のため必要に応じてカナマイシン (50 μ g/mL) あるいはテトラサイクリン (12.5 μ g/mL) を培地に添加した。

表 1 本研究で使した菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristics
Strains	
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>deoR</i> , <i>endAI</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>relAI</i> , <i>supE</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(lacZYA-argFV169)$ $\Phi 80 \Delta lacZ \Delta M15F^{\lambda}$
<i>Escherichia coli</i> S17-1 ¹⁸⁾	<i>recA</i> and <i>tra</i> genes of plasmid RP4 integrated into the chromosome; auxotrophic for proline and thiamine
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Wild strain (ATCC 17699)
<i>Cupriavidus necator</i> NCIMB 11599	Wild strain (glucose-utilizing strain)
<i>Cupriavidus necator</i> H16dC	<i>phbC</i> -disruptant of <i>Cupriavidus necator</i> H16
<i>Cupriavidus necator</i> GdCAB	<i>phbCAB</i> -disruptant of <i>Cupriavidus necator</i> NCIMB 11599
<i>Cupriavidus necator</i> H16C1STQK	A strain in which <i>phbC</i> of <i>C. necator</i> H16 is replaced with <i>phaC1(STQK)</i>
<i>Cupriavidus necator</i> GC1STQK	A strain in which <i>phbC</i> of <i>C. necator</i> NCIMB 11599 is replaced with <i>phaC1(STQK)</i>
<i>Cupriavidus necator</i> GC1STQKdA	<i>phbA</i> -disruptant of <i>Cupriavidus necator</i> GC1STQK
<i>Cupriavidus necator</i> GC1STQKdAB	<i>phbAB</i> -disruptant of <i>Cupriavidus necator</i> GC1STQK
Plasmids	
pBBR1MCS-2 ¹⁹⁾	Km ^r , broad host range vector, <i>lacPOZ</i>
pBBR1MCS-3 ¹⁹⁾	Tc ^r , broad host range vector, <i>lacPOZ</i>
pRKmpctC1(STQK)ldhD	pBBR1MCS-2 derivative; P _{lac} , <i>pct</i> , <i>phaC1(STQK)</i> , <i>ldhD</i>
pRTcpctC1(STQK)ldhD	pBBR1MCS-3 derivative; P _{lac} , <i>pct</i> , <i>phaC1(STQK)</i> , <i>ldhD</i>
pRTcpctC1(STQK)ldhD _{opt}	pBBR1MCS-3 derivative; P _{lac} , <i>pct</i> , <i>phaC1(STQK)</i> , optimized <i>ldhD</i>
pRTcpctC1(STQK)trclldhD _{opt}	pBBR1MCS-3 derivative; P _{lac} , <i>pct</i> , <i>phaC1(STQK)</i> , <i>trc</i> promoter, optimized <i>ldhD</i>
pRKmpctldhD	pBBR1MCS-2 derivative; P _{lac} , <i>pct</i> , <i>ldhD</i>
pRTcpcttrclldhD _{opt}	pBBR1MCS-3 derivative; P _{lac} , <i>pct</i> , P _{trc} , optimized <i>ldhD</i>
pK18mobsacB ²⁰⁾	Km ^r , <i>oriT</i> , <i>sacB</i> , <i>lacZα</i> , suicide vector
pK18P _{Cn} AB	pK18mobsacB derivative; P _{Cn} , <i>phbAB</i>
pK18C1(STQK)AB	pK18mobsacB derivative; P _{Cn} , <i>phaC1(STQK)</i> , <i>phbAB</i>
pK18XPdCAB	pK18mobsacB derivative; upstream and downstream of <i>phbCAB</i>
pK18C1(STQK)A'B	pK18mobsacB derivative; P _{Cn} , <i>phaC1(STQK)</i> , 5'-truncated <i>phbA</i> , <i>phbB</i>
pK18C1(STQK)	pK18mobsacB derivative; P _{Cn} , <i>phaC1(STQK)</i> , 5'-truncated <i>phbB</i>

2-2. 乳酸ベースポリマーの生産と分析

C. necator の組換え株は 1.5 mL の LB 培地にて 30 °C、120 strokes/min で一晩培養後、その培養液を窒素源を制限した 100 mL のミネラル塩 (MS) 培地²¹⁾ (2 %の糖) を含む 500 mL 容振とうフラスコに接種量 1 % (v/v) で接種し、30 °C、130 strokes/min で 120 時間培養した。組換え株のプラスミド維持のため、カナマイシン (200 μ g/mL) あるいはテトラサイクリン (12.5 μ g/mL) を培地に添加した。

二酸化炭素を炭素源とした独立培養では、混合ガス (H₂:O₂:CO₂=80~84:6~10:10) によるフラスコ培養およびジャーファメンター培養を行った。

培養後の菌体を遠心分離で回収、蒸留水で 2 回洗菌後、凍結乾燥させた。その後、乾燥菌体をメタノリシスし、ガスクロマトグラフィーにてポリマー蓄積率とモノマー組成を決定した^{13, 14)}。

3. 結果および考察

C. necator H16dC を宿主とした組換え株の培養を行った結果、pRTcpctC1(STQK)ldhD 導入株において、グルコン酸を炭素源とした場合にわずかであるが LA 分率が 0.2 mol% 取り込まれた P(LA-co-3HB) が 64 wt% 合成された (表 2)。LA 分率が低い原因として、*ldhD*

遺伝子の発現量が少ないことが考えられた。実際、導入遺伝子の発現量をウェスタンブロットティングで調べたところ、LdhD の発現量が他の導入遺伝子と比べて少ないことがわかった。そこで、*ldhD* 遺伝子を *C. necator* へコドン最適化した *ldhD_{opt}* 遺伝子を挿入したプラスミド pRTcpctC1(STQK)*ldhD_{opt}* を構築した。このプラスミドを導入した H16dC 株 (H16dC/ pRTcpctC1(STQK)*ldhD_{opt}*) はポリマー蓄積率は 77 wt% と高くなったが、LA ユニットは検出されなかった。

C. necator H16C1STQK を宿主とした組換え株の培養を行った結果、H16C1STQK/pRKmpctC1(STQK)*ldhD* において LA 分率が 4.5 mol% の P(LA-*co*-3HB) を 74.2 wt% 合成した (表 2)。また、*ldhD_{opt}* 遺伝子を含む pRTcpctC1(STQK)*ldhD_{opt}* または pRTcpcttr*ldhD_{opt}* を導入した H16C1STQK の組換え株では、ポリマーの蓄積率が約 90 wt% 以上と非常に高くなったが、LA 分率は 1.6 mol% 以下であった。

表 2 *C. necator* H16dC および H16C1STQK の組換え株によるポリマー合成

Strain	Plasmid (Relevant markers)	Carbon source	Dry cell weight (g/L)	Polymer content (wt%)	Polymer composition (mol%)	
					LA	3HB
H16dC	pRKmpctC1(STQK) <i>ldhD</i>	Fructose	1.06	10.9	0	100
	(<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>phaC1</i> (STQK), <i>ldhD</i>)	Gluconate	0.86	2.0	0	100
	pRTcpctC1(STQK) <i>ldhD</i>	Fructose	1.85	52.5	0	100
	(<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>phaC1</i> (STQK), <i>ldhD</i>)	Gluconate	2.09	64.0	0.2	99.8
	pRTcpctC1(STQK) <i>ldhD_{opt}</i>	Gluconate	3.64	77.0	0	100
	(<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>phaC1</i> (STQK), <i>ldhD_{opt}</i>)					
H16C1STQK	pRKmpctC1(STQK) <i>ldhD</i>	Fructose	2.92	71.8	0.7	99.3
	(<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>phaC1</i> (STQK), <i>ldhD</i>)	Gluconate	2.79	74.2	4.5	95.5
	pRTcpctC1(STQK) <i>ldhD</i>	Fructose	2.83	50.2	0	100
	(<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>phaC1</i> (STQK), <i>ldhD</i>)	Gluconate	3.11	79.0	0	100
	pRKmpct <i>ldhD</i>	Fructose	2.21	61.8	0.1	99.9
	(<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>ldhD</i>)	Gluconate	2.30	72.6	0.3	99.7
	pRTcpctC1(STQK) <i>ldhD_{opt}</i>	Gluconate	5.53	88.9	0	100
	(<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>phaC1</i> (STQK), <i>ldhD_{opt}</i>)					
	pRTcpcttr <i>ldhD_{opt}</i>	Gluconate	5.94	96.2	1.6	98.4
	(<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>P_{trc}</i> , <i>ldhD_{opt}</i>)					

Cells were cultivated at 30 °C for 120 h in a 500-mL shaking flask (130 strokes/min) containing 100 mL of MS medium containing 2% (w/v) fructose or sodium gluconate as the sole carbon source. LA, D-lactate; 3HB, 3-hydroxybutyrate

以上より、LA ユニットがわずかに取り込まれた P(LA-*co*-3HB) の合成には成功したが、目標とする透明なポリマーの合成のためには、LA 分率を 15~30 mol% まで高める必要があった。そこで、コドン最適化した *ldhD_{opt}* 遺伝子を用いて培養してもポリマーの LA 分率が高まらないのは、大腸菌を宿主とした場合と異なり *C. necator* 自身の代謝フラックスに原因があると考えられた。その原因の一つは、*C. necator* においては 3HB ユニット供給量が非常に多く、*ldhD* 遺伝子を導入してもピルビン酸からの D-乳酸生成量はわずかであると予想された。そこで、3HB ユニット供給量を弱化させて、ポリマー鎖中の LA 分率を相対的に高めることを検討した。*C. necator* は β-ケトチオラーゼ (PhbA) およびアセトアセチル CoA レダクターゼ (PhbB) のアイソザイムを複数有している。それゆえ、*C. necator* NCIMB 11599 の P(3HB) 生合成に関わる *phbCAB* オペロンを破壊した株 (GdCAB 株)、さらには GC1STQK 株の *phbA* 遺伝子および *phbAB* 遺伝子を破壊した

GC1STQKdA 株および GC1STQKdAB 株をそれぞれ作製した。それらを培養した結果、遺伝子破壊株の P(3HB)合成量が低下した（表 3）。これらを宿主に用いて組換え株を作製すれば、さまざまなモノマー分率からなるポリマーの合成が可能になると考えられる。

表 3 *C. necator* 改変株による P(3HB)合成

Strain	Dry cell weight (g/L)	P(3HB) content (wt%)
NCIMB 11599	4.72	82.1
GC1STQK	5.77	89.0
GC1STQKdA	4.60	78.9
GC1STQKdAB	1.29	21.8
GdCAB	0.73	0

Cells were cultivated at 30 °C for 120 h in a 500-mL shaking flask (130 strokes/min) containing 100 mL of MS medium containing 2% (w/v) glucose as the sole carbon source.

GdCAB 株を宿主とした組換え株のうち、GdCAB/pRKmpctC1(STQK)ldhD は LA 分率が 24.6 mol% からなる P(LA-co-3HB) を 20 wt% 合成した（表 4）。このポリマーは透明性を有していると考えられた。そこで、この組換え株を二酸化炭素を炭素源とした独立栄養培養を行ったところ、フラスコ培養にて LA 分率が 6 mol% の P(LA-co-3HB) を 3.2 wt%、ジャーファメンターにて LA 分率が 8.2 mol% の P(LA-co-3HB) を 6.8 wt% 合成した。ポリマー蓄積率およびポリマー鎖中の LA 分率は低く、十分ではないが、これまで二酸化炭素を炭素源として P(LA-co-3HB) を合成した報告例はなく、本研究が初めての結果と考えられる。しかし、この組換え株は植え継ぎとともに増殖およびポリマー合成能が著しく低下した。つまり、非常に不安定な株であり、組換え株を再度作製しても再現性を得ることができなかった。*C. necator* を宿主とするプラスミドとして広宿主域プラスミドの pJRD215 や本研究でも使用した pBBR1MCS 系が広く用いられているが、*C. necator* でのプラスミドの保持率は低下していくことが報告されている²²⁾。これは導入遺伝子の種類によっても左右されると思われる。それゆえ、LA ベースポリマーを安定に高生産するのに適した *C. necator* を作製するためには、ポリマー生合成に関わる遺伝子を *C. necator* のゲノムの中へ挿入・置換、あるいは、代謝の流れを制御するために遺伝子を欠失させる必要があると考えられた。野生株の *phbC* 遺伝子を *phaC1(STQK)* 遺伝子に置換した GC1STQK 株を親株として、3HB ユニット供給系を弱化した GC1STQKdA および GC1STQKdAB 株を宿主として、その他のポリマー生合成遺伝子を有するプラスミドを導入した組換え株を作製したが、合成されたポリマーには LA ユニットは取り込まれなかった（表 4）。

以上より、透明性を有する P(LA-co-3HB) を安定的に合成する *C. necator* 株の作製には至っていないが、本研究結果を踏まえて、*C. necator* の分子育種を鋭意進めており、将来的には二酸化炭素を原料として透明で高性能な生分解性バイオプラスチック P(LA-co-

3HB)の生産を確立させたい。

表4 *C. necator*組換え株によるポリマー合成

Strain	Plasmid (Relevant markers)	Dry cell weight (g/L)	Polymer Content (wt%)	Polymer composition (mol%)	
				LA	3HB
GdCAB	pRKmpctC1(STQK)ldhD (<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>phaC1(STQK)</i> , <i>ldhD</i>)	1.02	20.0	24.6	75.4
	pRTcpctC1(STQK)ldhD (<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>phaC1(STQK)</i> , <i>ldhD</i>)	1.13	32.2	0	100
	pRTcpctC1(STQK)ldhD _{opt} (<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>phaC1(STQK)</i> , <i>ldhD_{opt}</i>)	0.93	25.3	0	100
C1STQKdA	pRTcpcttrclhdhD _{opt} (<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>ldhD_{opt}</i>)	2.82	60.7	0	100
	pRTcpcttrclhdhD _{opt} (<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>P_{trc}</i> , <i>ldhD_{opt}</i>)	3.22	55.1	0	100
GC1STQKdAB	pRTcpcttrclhdhD _{opt} (<i>P_{lac}</i> , <i>pct</i> , <i>P_{trc}</i> , <i>ldhD_{opt}</i>)	1.34	22.7	0	100

Cells were cultivated at 30 °C for 120 h in a 500-mL shaking flask (130 strokes/min) containing 100 mL of MS medium containing 2% (w/v) glucose as the sole carbon source. LA, D-lactate; 3HB, 3-hydroxybutyrate

謝辞

本研究は、公益財団法人JFE21世紀財団2022年度技術研究助成の支援を受けて実施されました。関係各位に心より感謝いたします。

参考文献

- 1) R. Geyer, J. Jambeck, K. Law K. (2017) Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.*, 3, e1700782
- 2) WWF ジャパン (<https://www.wwf.or.jp/activities/basicinfo/3776.html>)
- 3) World Economic Forum (2016) The new plastics economy rethinking the future of plastics (https://www3.weforum.org/docs/WEF_The_New_Plastics_Economy.pdf)
- 4) 西岡真由美 (2020) ファーストブック身近なプラスチックがわかる, 技術評論社
- 5) Y.D. Lin, P.H. Huang, Y.W. Chen, C.W. Hsieh, Y.L. Tain, B.H. Lee, C.Y. Hou, M.K. Shih (2023) Sources, degradation, ingestion and effects of microplastics on humans: a review. *Toxics*, 11, 747
- 6) 日本バイオプラスチック協会 (2009) 今日からモノ知りシリーズ トコトンやさしいバイオプラスチックの本, 日刊工業新聞社
- 7) 日本バイオプラスチック協会 (<http://www.jbpaweb.net/>)
- 8) H. Matsusaki, H. Abe and Y. Doi (2000) Biosynthesis and properties of poly(3-

- hydroxybutyrate- ϵ -3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, 1, 17-22
- 9) S. Taguchi, M. Yamada, K. Matsumoto, K. Tajima, Y. Satoh, M. Munekata, K. Ohno, K. Kohda, T. Shimamura, H. Kambe, and S. Obata (2008) A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, 17323-17327
 - 10) M. Yamada, K. Matsumoto, S. Uramoto, R. Motohashi, H. Abe and S. Taguchi (2011) Lactate fraction dependent mechanical properties of semitransparent poly(lactate- ϵ -3-hydroxybutyrate)s produced by control of lactyl-CoA monomer fluxes in recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 154, 255-260
 - 11) J. Sun, K. Matsumoto, J.M. Nduko, T. Ooi and S. Taguchi (2014) Enzymatic characterization of a depolymerase from the isolated bacterium *Variovorax* sp. C34 that degrades poly(enriched lactate- ϵ -3-hydroxybutyrate). *Polym. Degrad. Stab.*, 110, 44-49
 - 12) S. Goto, A. Motomura, A. Kawahara, H. Shiratsuchi, K. Tanaka and H. Matsusaki (2018) Cloning and heterologous expression of lactate dehydrogenase genes from acid-tolerant *Lactobacillus acetotolerans* HT. *Food Sci. Technol. Res.*, 24, 861-868
 - 13) S. Goto, N. Suzuki, K. Matsumoto, S. Taguchi, K. Tanaka and H. Matsusaki (2019) Enhancement of lactate fraction in poly(lactate- ϵ -3-hydroxybutyrate) synthesized by *Escherichia coli* harboring the D-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus acetotolerans* HT. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 65, 204-208
 - 14) S. Goto, A. Hokamura, H. Shiratsuchi, S. Taguchi, K. Matsumoto, H. Abe, K. Tanaka and H. Matsusaki (2019) Biosynthesis of novel lactate-based polymers containing medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli* strains from glucose. *J. Biosci. Bioeng.*, 128, 191-197
 - 15) 全国地球温暖化防止活動推進センター (<https://www.jccca.org/>)
 - 16) 国立研究開発法人国立環境研究所 (<https://www.nies.go.jp>)
 - 17) 重富徳夫 (1999) 微生物の機能を活用した CO₂ 固定化の検討, 三菱総合研究所/所報 No.34
 - 18) R. Simon, U. Priefer, and A. Pühler (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering. Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*, 1, 784-791
 - 19) M.E. Kovach, P.H. Elzer, D.S. Hill, G.T. Robertson, M.A. Farris, R.M. Roop, and K.M. Peterson, (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166, 175-176
 - 20) A. Schäfer, A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach and A. Pühler, (1994)

Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145, 69-73

- 21) H. Matsusaki, S. Manji, K. Taguchi, M. Kato, T. Fukui and Y. Doi (1998) Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *J. Bacteriol.*, 180, 6459-6467
- 22) 佐藤俊輔, 有川尚志, 小林新吾, 藤木哲也, 松本圭司 (2019) 微生物による生分解性ポリマーPHBH 製造法の開発, *生物工学会誌*, 97, 66-74