

理化学研究所 主任研究員

土肥 義治

「環境低負荷型の高分子物質生産システムの開発」

## 1. 研究実施の概要

### (1) 研究の概要

生物の物質生産機能を利用して、再生可能な生物有機資源（糖、植物油など）や二酸化炭素から優れた性能や特異な機能をもつ新しい高分子材料を創製する科学技術を開拓することは、持続可能な社会を実現する上で重要な課題である。地球上の生物は、生命活動を営むために、核酸、タンパク質、多糖、ポリエステルなど多種多様な高分子物質を合成している。これらの生体高分子は、さまざまな機能を発現する生体材料として重要な役割を果たしたのちに、体内代謝や環境微生物によって分解され、最終的には二酸化炭素と水とに代謝される。その二酸化炭素を植物や藻類が再び高分子物質に変え、さらに動物がそれを利用するという、地球上の炭素サイクルが確立されている。しかしながら、化石資源を大量に消費する人間活動によって大気中の二酸化炭素濃度が徐々に増大しており、地球環境への影響が心配されている。石油などの化石資源に依存する現行の高分子物質生産体系では、究極的には化石資源を二酸化炭素に転換し、大気中の二酸化炭素濃度を増加させることになる。21世紀には、生物有機資源（バイオマス）や二酸化炭素を原料とする高分子物質生産体系（生物化学工業など）を発展させる必要がある。

このような背景から、地球環境と調和する持続可能な人間社会を実現するための科学技術の一つとして、微生物の物質生産機能を利用して、生物有機資源や二酸化炭素から人間の生活や産業活動に有用な高分子物質を生産する基盤科学技術を確立するための研究課題を提案した。幸いにも、平成7年度の「戦略的基礎研究、環境低負荷型の社会システム」の一研究課題として採択され、平成7年度末から「環境低負荷型の高分子物質生産システムの開発」を目標に研究プロジェクトを開始した。5年間のCREST研究では、微生物の物質生産機能を利用して、再生可能な植物系資源（糖、植物油）から優れた性能をもつ生分解性高分子物質を生産する新産業の基盤科学技術を開拓することを目的とした基礎研究を実施した。とくに本研究では、核酸、タンパク質、多糖、ポリイソプレノイドにつづく第5の生体高分子として注目され始めたバイオポリエステルについて重点的に研究を進めた。バイオポリエステルの生合成、関連酵素遺伝子の取得と機能解析、生合成酵素の高次構造解析、高生産微生物の分子育種、効率的生産法の開発、バイオポリエステルの高性能材料化、生分解速度の制御技術開発、バイオポリエステル分解微生物の単離と解析という一連の基礎研究を生物科学と高分子科学との異分野の研究者の共同作業で行った。

### (2) 研究の成果

まず初めに、優れた物性と生分解性をもつバイオポリエステルを生産する3種の微生物（*Aeromonas caviae*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *Comamonas acidovorans*）のポリエステル生合成系酵素遺伝子を取得し、それらの機能解析を行った。さらに、ポリエステル生合成系酵素の構造と機能を分子レベルで理解するために、ポリエステル合成酵素(PhaC)とモノマー供給系酵素(PhaJ)の大量生産方法を確立し、PhaJ酵素の結晶構造の解明に成功した。

つぎに、フィルム成形用の低密度ポリエチレン(LDPE)と類似な物性をもつ共重合ポリエステル(ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸]:P(3HB-co-3HHx))を、植物油から高効率(80wt%)で生産する遺伝子組換え微生物(*Ralstonia eutropha*)の分子育種に成功した。まず、*R. eutropha*のポリエステル合成酵素欠損株に、*A. caviae*のポリエステル合成酵素遺伝子(PhaC)とモノマー供給系酵素遺伝子(PhaJ)を導入することで遺伝子組換え微生物を作製した。

それに炭素源として植物油(パーム油、なたね油など)を与えて発酵生産を行ったところ、遺伝子組換え *R. eutropha* は、極めて高効率で P(3HB-co-3HHx)を合成し、乾燥菌体重量あたり 80wt% という大量の共重合ポリエステルを体内に蓄積することを見いだした。安価な植物油から高性能バイオプラスチックを生産する実用化プロセスの基盤技術を開発した。

さらに、超高分子量(300 万 ~ 2000 万)のポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸](P(3HB))を合成する遺伝子組換え大腸菌(*E. coli*)の分子育種に成功した。ポリエステル合成酵素遺伝子(*PhaC*)とモノマー供給系酵素遺伝子(*PhaA*, *PhaB*)を導入した遺伝子組換え *E. coli* は、糖から超高分子量の P(3HB)を生合成し、乾燥菌体重量あたり 75wt%蓄積した。培養条件によって、P(3HB)の重量平均分子量(Mw)は 300 万から 2000 万の範囲内で調整できた。従来、バイオポリエステルにおいて物性改善のための延伸処理が困難であった。しかし、分子量 300 万以上の超高分子量 P(3HB)を用いると、160 付近で容易に延伸ができ、延伸倍率 400%以上で引張り強度が 40Mpa から 100Mpa 以上へと急激に増加するとともに、破壊伸びも 50%以上を示した。延伸 P(3HB)の物性は、ナイロン-6.6 と同程度まで改善できることを明らかにした。

溶融-等温結晶化法で調整した P(3HB)およびその共重合体のフィルムを用いてポリエステル分解酵素による酵素分解反応を行い、酵素分解速度と固体構造との相関を調べた。酵素分解反応は、フィルム表面の非晶部から選択的に進行した。P(3HB)非晶部の酵素分解速度は、結晶部の分解速度に比べて、30 倍程度速いことを明らかにした。結晶部の酵素分解速度は、ラメラ結晶厚さの増加とともに急激に低下することを見いだした。これらの知見をもとに、高分子材料の生分解速度を制御する方法を提案した。

このように、CREST 研究の 5 年間、新しい発想で「再生可能な炭素資源から高性能バイオプラスチックを微生物生産するプロセスの開発」を強力に推進し、新しい産業創出のための基盤技術を開拓してきた。

### ( 3 ) 成果内容の要約

優れた物性と生分解性をもつバイオプラスチックを生産する微生物(*Aeromonas caviae* および *Pseudomonas* sp.)のポリエステル生合成系酵素遺伝子を取得し機能解析することに成功した。遺伝子組換え微生物(*Ralstonia eutropha*)を用いて、植物油から高効率(80wt%)で高性能ポリエステルを生産できるプロセスを開発した。

遺伝子組換え大腸菌(*E. coli*)を用いて、糖から超高分子量ポリエステル(分子量  $3-12 \times 10^6$ )を生産するプロセスを開発した。超高分子量ポリエステルのフィルムあるいは繊維は、延伸処理によって物性が著しく改善できることを明らかにした。

## 2 . 5 年間 (1996-2000) の発表論文 (海外 81 件)

### 1. ポリエステル生合成の遺伝子工学に関する研究 Biosynthesis of polyesters by recombinant bacteria

- (1) M. Kato, T. Fukui and Y. Doi:  
Biosynthesis of Polyester Blends by *Pseudomonas* sp. 61-3 from Alkanoic Acids;  
*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69 515-520 (1996)
- (2) Y. Saito, S. Nakamura, M. Hiramitsu and Y. Doi:  
Microbial Synthesis and Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate);  
*Polymer Int.*, 39 169-174 (1996)
- (3) M. Kato, H. J. Bao, C.-K. Kang, T. Fukui and Y. Doi:  
Production of a Novel Copolyester of 3-Hydroxybutyric Acid and Medium-chain-length  
3-Hydroxyalkanoic Acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from Sugars; *Appl. Microbiol.*  
*Biotechnol.* 45 363-370 (1996)
- (4) T. Fukui and Y. Doi:  
Cloning and Analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)  
Biosynthesis Genes of *Aeromonas caviae*; *J. Bacteriol.*, 179 4821-4830 (1997)
- (5) T. Fukui, T. Kichise, Y. Yoshida and Y. Doi:  
Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyheptanoate)  
Terpolymers by Recombinant *Alcaligenes eutrophus*; *Biotechnol. Lett.*, 19 1093-1097  
(1997)
- (6) M. Kato, T. Fukui, T. Iwata and Y. Doi:  
Genetic and Morphological Studies on Biosynthesis of Polyester Blend of Poly(3-  
hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas*  
sp.61-3; "1996 International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates". Eds by G.  
Eggink et al., NRC Research Press, 143-150 (1997)
- (7) T. Fukui, N. Shiomi and Y. Doi:  
Expression and Characterization of (R)-Specific Enoyl Coenzyme A Hydratase Involved  
in Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis by *Aeromonas caviae*; *J. Bacteriol.*, 180 667-673  
(1998)
- (8) T. Fukui and Y. Doi:  
Efficient Production of Polyhydroxyalkanoates from Plant Oils by *Alcaligenes eutrophus*  
and Its Recombinant Strain; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49 333-336 (1998)
- (9) T. Fukui, M. Kato, H. Matsusaki, T. Iwata and Y. Doi:  
Morphological and <sup>13</sup>C-Nuclear Magnetic Resonance Studies for Polyhydroxyalkanoate  
Biosynthesis in *Pseudomonas* sp. 61-3; *FEMS Microbiol. Lett.*, 164 219-225 (1998)
- (10) K. Sudesh, T. Fukui and Y. Doi:  
Genetic Analysis of *Comamonas acidovorans* Polyhydroxyalkanoate Synthase and Factors  
Affecting the Incorporation of 4-Hydroxybutyrate Monomer; *Appl. Environ. Microbiol.*,  
64 3437-3443 (1998)
- (11) H. Matsusaki, S. Manji, K. Taguchi, M. Kato, T. Fukui and Y. Doi:  
Cloning and Molecular Analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-  
hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) Biosynthesis Genes in *Pseudomonas* sp. Strain  
61-3; *J. Bacteriol.*, 180 6459-6467 (1998)
- (12) T. Fukui, S. Yokomizo, G. Kobayashi and Y. Doi:  
Co-expression of Polyhydroxyalkanoate Synthase and (R)-Enoyl-CoA Hydratase Genes of  
*Aeromonas caviae* Establishes Copolyester Biosynthesis Pathway in *Escherichia coli*; *FEMS*  
*Microbiol. Lett.*, 170 69-75 (1999)
- (13) H. Nakashita, Y. Arai, K. Yoshioka, T. Fukui, Y. Doi, R. Usami, K. Horikoshi  
and I. Yamaguchi:  
Production of Biodegradable Polyester by a Transgenic Tobacco; *Biosci. Biotechnol.*  
*Biochem.*, 63 870-874 (1999)
- (14) T. Kichise, T. Fukui, Y. Yoshida and Y. Doi:  
Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates (PHA) by Recombinant *Ralstonia eutropha* and

Effects of PHA Synthase Activity on in vivo PHA Biosynthesis; *Int. J. Biol. Macromol.*, 25 69-77 (1999)

- (15) K. Sudesh, T. Fukui, K. Taguchi, T. Iwata and Y. Doi:  
Improved Production of Poly(4-hydroxybutyrate) by *Comamonas acidovorans* and its Freeze-Fracture Morphology; *Int. J. Biol. Macromol.*, 25 79-85 (1999)
- (16) K. Taguchi, Y. Aoyagi, H. Matsusaki, T. Fukui and Y. Doi:  
Co-expression of 3-Ketoacyl-ACP Reductase and Polyhydroxyalkanoate Synthase Genes Induces PHA Production in *Escherichia coli* HB101 Strain; *FEMS Microbiol. Lett.*, 176 183-190 (1999)
- (17) K. Taguchi, Y. Aoyagi, H. Matsusaki, T. Fukui and Y. Doi:  
Over-Expression of 3-Ketoacyl-ACP Synthase III or Malonyl-CoA-ACP Transacylase Gene Induces Monomer Supply for Polyhydroxybutyrate Production in *Escherichia coli* HB 101; *Biotech. Lett.*, 21 579-584 (1999)
- (18) T. Tsuge, T. Fukui, H. Matsusaki, S. Taguchi, G. Kobayashi, A. Ishizaki, and Y. Doi:  
Molecular Cloning of Two (R)-Specific Enoyl-CoA Hydratase Genes from *Pseudomonas aeruginosa* and Their Use for Polyhydroxyalkanoate Synthesis; *FEMS Microbiol. Lett.*, 184 193-198 (1999)
- (19) H. Matsusaki, H. Abe, and Y. Doi:  
Biosynthesis and Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by Recombinant Strains of *Pseudomonas sp.* 61-3; *Biomacromolecules*, 1 17-22 (2000)
- (20) K. Sudesh, T. Fukui, T. Iwata and Y. Doi:  
Factors Affecting the Freeze-fracture Morphology of in vivo Polyhydroxyalkanoate Granules; *Can. J. Microbiol.*, 46 304-311 (2000)
- (21) H. Matsusaki, H. Abe, K. Taguchi, M. Kato, T. Fukui, and Y. Doi:  
Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by Recombinant Bacteria Expressing the PHA Synthesis Gene *phaC1* from *Pseudomonas sp.* 61-3; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 401-409 (2000)
- (22) K. Matsumoto, H. Matsusaki, S. Taguchi, M. Seki and Y. Doi:  
Cloning and Characterization of the *Pseudomonas sp.* 61-3 *phaG* Gene Involved in Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis; *Biomacromolecules*, 2 142-147 (2001)

<p>2. 高分子加水分解酵素の構造と機能に関する研究 Structure and function of PHA depolymerases</p>
---

- (23) K. Kasuya, Y. Inoue and Y. Doi:  
Adsorption Kinetics of Bacterial PHB Depolymerase on the Surface of Polyhydroxyalkanoate Films; *Int. J. Biol. Macromol.* 19 35-40 (1996)
- (24) Y. Doi, K. Kasuya, H. Abe, N. Koyama, S. Ishiwatari, K. Takagi and Y. Yoshida:  
Evaluation of Biodegradabilities of Biosynthetic and Chemosynthetic Polyesters in River Water; *Polym. Degrad. Stab.*, 51 281-286 (1996)
- (25) J. Li, J. Uzawa and Y. Doi:  
Conformational Behavior of Methyl(3R)-3-[(3'R)-3'-Hydroxybutanoyl]oxybutanoate in Solutions: Effect of Intramolecular Hydrogen Bond; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 70 1887-1893 (1997)
- (26) M. Shinomiya, T. Iwata, K. Kasuya and Y. Doi:  
Cloning of the Gene for Poly(3-hydroxybutyric acid) Depolymerase of *Comamonas testosteroni* and Functional Analysis of Its Substrate-Binding Domain; *FEMS Microbiol. Lett.*, 154 89-94 (1997)
- (27) K. Kasuya, Y. Inoue, T. Tanaka, T. Akehata, T. Iwata, T. Fukui and Y. Doi:  
Biochemical and Molecular Characterization of the Polyhydroxybutyrate Depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM 1609, Isolated from Freshwater; *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 4844-4852 (1997)
- (28) M. Uefuji, K. Kasuya and Y. Doi:  
Enzymatic Degradation of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: Secretion and Properties of PHB Depolymerase from *Pseudomonas stutzeri*; *Polym. Degrad. Stab.*, 58 275-281 (1997)

- (29) K. Kasuya, K. Takagi, S. Ishiwatari, Y. Yoshida and Y. Doi:  
Biodegradabilities of Various Aliphatic Polyesters in Natural Waters; *Polym. Degrad. Stab.*, 59 327-332 (1998)
- (30) M. Shinomiya, T. Iwata and Y. Doi:  
The Adsorption of Substrate-Binding Domain of PHB Depolymerases to the Surface of Poly(3-hydroxybutyric acid); *Int. J. Biol. Macromol.*, 22 129-135 (1998)
- (31) J. Li, J. Uzawa and Y. Doi:  
Conformational Analysis of Oligomers of (R)-3-Hydroxybutanoic Acid in Solutions by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 71 1683-1689 (1998)
- (32) J. Li, J. Uzawa and Y. Doi:  
NMR Spectroscopic Studies on Complex Formation Between Dimeric (R)-3-Hydroxybutanoic Acid and  $\beta$ -Cyclodextrin; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 71 1953-1957 (1998)
- (33) S. Matsumura, Y. Suzuki, K. Tsukada, K. Toshima, Y. Doi and K. Kasuya:  
Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of  $\beta$ -Butyrolactone to the Cyclic and Linear Poly(3-hydroxybutyrate); *Macromolecules*, 31 6444-6449 (1998)
- (34) T. Ohura, Y. Aoyagi, K. Takagi, Y. Yoshida, K. Kasuya and Y. Doi:  
Biodegradation of Poly(3-hydroxyalkanoic acids) Fibers and Isolation of Poly(3-hydroxybutyric acid)-Degrading Microorganisms under Aquatic Environments; *Polym. Degrad. Stab.*, 63 23-29 (1999)
- (35) T. Ohura, K. Kasuya and Y. Doi:  
Cloning and Characterization of the Polyhydroxybutyrate Depolymerase Gene of *Pseudomonas stutzeri* and Analysis of the Function of Substrate-Binding Domains; *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 189-197 (1999)
- (36) K. Kasuya, T. Ohura, K. Masuda and Y. Doi:  
Substrate and Binding Specificities of Bacterial Polyhydroxybutyrate Depolymerases; *Int. J. Biol. Macromol.*, 24 329-336 (1999)
- (37) K. Tabata, K. Kasuya, H. Abe, K. Masuda and Y. Doi:  
Poly(aspartic acid) Degradation by a *Sphingomonas* sp. Isolated from Freshwater; *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 4268-4270 (1999)
- (38) Y. Suzuki, T. Ohura, K. Kasuya, K. Toshima, Y. Doi and S. Matsumura:  
Enzyme-catalyzed Ring-opening Polymerization of  $\beta$ -Butyrolactone Using PHB Depolymerase; *Chem. Lett.*, 2000 318-319 (2000)
- (39) K. Tabata, H. Abe and Y. Doi:  
Microbial Degradation of Poly(aspartic acid) by Two Isolated Strains of *Pedobacter* sp. and *Sphingomonas* sp.; *Biomacromolecules*, 1 157-161 (2000)
- (40) K. Kasuya, H. Mitomo, M. Nakahara, A. Aiba, T. Kudo and Y. Doi:  
Identification of a Marine Benthic P(3HB)-Degrading Bacterium Isolate and Characterization of Its P(3HB) Depolymerase; *Biomacromolecules*, 1 194-201 (2000)
- (41) T. Hiraishi, T. Ohura, S. Ito, K. Kasuya and Y. Doi:  
Function of the Catalytic Domain of Poly(3-hydroxybutyrate) Depolymerase from *Pseudomonas stutzeri*; *Biomacromolecules*, 1 320-324 (2000)

<p>3. 高分子結晶の構造と機能に関する研究 Structure and enzymatic hydrolysis of polyester crystals</p>
--

- (42) T. Iwata, Y. Doi, K. Kasuya and Y. Inoue:  
Visualization of Enzymatic Degradation of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals by an Extracellular PHB Depolymerase; *Macromolecules*, 30 833-839 (1997)
- (43) S. Kusaka, H. Abe, S. Y. Lee and Y. Doi:  
Molecular Mass of Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] Produced in a Recombinant *Escherichia coli*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47 140-143 (1997)
- (44) T. Iwata, Y. Doi, T. Tanaka, T. Akehata, M. Shiromo and S. Teramachi:  
Enzymatic Degradation and Adsorption on Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals with Two Types of Extracellular PHB Depolymerases from *Comamonas acidovorans* YM 1609

- and *Alcaligenes faecalis* T1; *Macromolecules*, 30 5290-5296 (1997)
- (45) T. Iwata, Y. Doi and J. Azuma:  
Direct Imaging of Single Crystals of Regioselectively Substituted Cellulose Heteroesters by Atomic Force Microscopy; *Macromolecules*, 30 6683-6684 (1997)
- (46) T. Iwata and Y. Doi:  
Morphology and Enzymatic Degradation of Poly(L-lactic acid) Single Crystals; *Macromolecules*, 31 2461-2467 (1998)
- (47) S. Kusaka, T. Iwata and Y. Doi:  
Microbial Synthesis and Physical Properties of Ultra-High-Molecular-Weight Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]; *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.*, A35 319-335 (1998)
- (48) H. Mitomo and Y. Doi:  
Lamellar Thickening of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Annealing; *Rep. Prog. Polym. Phys. Jpn.*, 41 239-241 (1998)
- (49) S. Kusaka, T. Iwata and Y. Doi;  
Properties and Biodegradability of Ultra-High-Molecular-Weight Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Produced by a Recombinant *Escherichia coli*; *Int. J. Biol. Macromol.*, 25 87-94 (1999)
- (50) T. Iwata, Y. Doi, S. Nakayama, H. Sasatsuki and S. Teramachi:  
Structure and Enzymatic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) Copolymer Single Crystals with an Extracellular PHB Depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1; *Int. J. Biol. Macromol.*, 25 169-176 (1999)
- (51) H. Mitomo and Y. Doi:  
Lamellar Thickening and Cocrystallization of Poly(hydroxyalkanoate)s on Annealing; *Int. J. Biol. Macromol.*, 25 201-205 (1999)
- (52) T. Iwata and Y. Doi:  
Enzymatic Degradation of Biosynthetic and Chemosynthetic Polymers; "Biochemical Principles and Mechanisms of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers" Ed. by A. Steinbüchel, Wiley-VCH, 214-221 (1999)
- (53) T. Iwata and Y. Doi:  
Crystal Structure and Biodegradation of Aliphatic Polyester Crystals; *Macromol. Chem. Phys.*, 200 2429-2442 (1999)
- (54) T. Iwata, Y. Doi, F. Kokubu and S. Teramachi:  
Alkaline Hydrolysis of Solution-Grown Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals; *Macromolecules*, 32 8325-8330 (1999)
- (55) T. Iwata and Y. Doi:  
Morphology and Crystal Structure of Solution-Growth Single Crystals of Poly[(R)-3-hydroxyvalerate]; *Macromolecules*, 33 5559-5565 (2000)
- (56) T. Iwata, S. Kusaka and Y. Doi:  
Characterization of Ultra-High-Molecular-Weight Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Accumulated in a Recombinant *Escherichia coli* and its Biodegradability; *ACS Symposium Series*; No.764, *Polymer from Renewable Resources: Biopolyesters and Biocatalysis*, Chapter 5, 67-76 (2000)

<p>4 . 生分解性高分子の材料設計に関する研究 Material design of biodegradable polyesters</p>
---

- (57) Y. Furuhashi, T. Iwata, P. Sikorski, E. Atkins and Y. Doi:  
Structure and Morphology of the Aliphatic Polyester Poly( $\beta$ -propiolactone) in Solution-Grown Chain-Folded Lamellar Crystals; *Macromolecules*, 33 in press (2000)
- (58) W. K. Lee, T. Iwata, H. Abe and Y. Doi:  
Studies on the Enzymatic Degradation of Solution-Grown Lamellar Crystals of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: Defects in Crystals; *Macromolecules*, 33 in press (2000)

- (59) Y. Inoue, F. Sano, K. Nakamura, N. Yoshie, Y. Saito, H. Satoh, T. Mino, T. Matsuo and Y. Doi:  
Microstructure of Copoly(3-hydroxyalkanoates) Produced in the Anaerobic-Aerobic Activated Sludge Process; *Polymer Int.*, 39, 183-189 (1996)
- (60) M. Ichikawa, K. Nakamura, N. Yoshie, N. Asakawa, Y. Inoue and Y. Doi:  
Morphological Study of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate); *Macromol. Chem. Phys.*, 197 2467-2480 (1996)
- (61) N. Koyama and Y. Doi:  
Miscibility, Thermal Properties, and Enzymatic Degradability of Binary Blends of Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] with Poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-lactide); *Macromolecules*, 29 5843-5851 (1996)
- (62) A. Cao, M. Ichikawa, K. Kasuya, N. Yoshie, N. Asakawa, Y. Inoue, Y. Doi and H. Abe:  
Composition Fractionation and Thermal Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate); *Polym. J.*, 28 1096-1102 (1996)
- (63) H. Abe and Y. Doi:  
Enzymatic and Environmental Degradation of Racemic Poly(3-hydroxybutyric acid)s with Different Stereoregularities; *Macromolecules*, 29 8683-8688 (1996)
- (64) N. Koyama and Y. Doi:  
Miscibility of Binary Blends of Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and Poly[(S)-lactic acid]; *Polymer*, 38 1589-1593 (1997)
- (65) N. Koyama and Y. Doi:  
Effects of Solid-State Structures on the Enzymatic Degradability of Bacterial Poly(hydroxyalkanoic acids); *Macromolecules*, 30 826-832 (1997)
- (66) G. Beaucage, S. Rane, S. Sukumaran, M. M. Satkowski, L. A. Schechtman and Y. Doi:  
Persistence Length of Isotactic Poly(hydroxy butyrate); *Macromolecules*, 30 4158-4162 (1997)
- (67) Y. Doi and H. Abe:  
Structural Effects on Biodegradation of Aliphatic Polyesters; *Macromol. Symp.*, 118 725-731 (1997)
- (68) H. Abe, Y. Doi, Y. Horii and T. Hagiwara:  
Physical Properties and Enzymatic Degradability of Copolymers of (R)-3-Hydroxybutyric Acid and (S,S) Lactide; *Polymer*, 39 59-67 (1997)
- (69) H. Abe, Y. Doi, H. Aoki and T. Akehata:  
Solid-State Structures and Enzymatic Degradabilities for Melt-Crystallized Films of Copolymers of (R)-3-Hydroxybutyric Acid with Different Hydroxyalkanoic Acids; *Macromolecules*, 31 1791-1797 (1998)
- (70) H. Abe, H. Aoki and Y. Doi:  
Morphologies and Enzymatic Degradability of Melt-Crystallized Poly(3-hydroxybutyric acid-co-6-hydroxyhexanoic acid); *Macromol. Symp.*, 130 81-89 (1998)
- (71) A. Cao, K. Kasuya, H. Abe, Y. Doi and Y. Inoue:  
Studies on Comonomer Compositional Distribution of the Bacterial Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypropionic acid)s and Thermal Characteristics of their Fractionated Component Copolyesters; *Polymer*, 20 4801-4816 (1998)
- (72) Y. He, T. Masuda, A. Cao, N. Yoshie, Y. Doi and Y. Inoue:  
Thermal, Crystallization, and Biodegradation Behavior of Poly(3-hydroxybutyrate) Blends with Poly(butylene succinate-co-butylene adipate) and Poly(butylene succinate-co- $\epsilon$ -caprolactone); *Polym. J.*, 31 184-192 (1999)
- (73) Y. Yoshie, M. Fujiwara, K. Kasuya, H. Abe, Y. Doi and Y. Inoue:  
Effect of Monomer Composition and Composition Distribution on Enzymatic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate); *Macromol. Chem. Phys.*, 200 977-982 (1999)
- (74) H. Abe, Y. Kikkawa, H. Aoki, T. Akehata, T. Iwata and Y. Doi:  
Crystallization Behavior and Thermal Properties of Melt-Crystallized Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid-co-6-hydroxyhexanoic acid] Films; *Int. J. Biol. Macromol.*, 25 177-183 (1999)



- (75) H. Abe and Y. Doi:  
Structural Effects on Enzymatic Degradabilities for Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and Its Copolymers; *Int. J. Biol. Macromol.*, 25 185-192 (1999)
- (76) A. Cao, Y. Arai, N. Yoshie, K. Kasuya, Y. Doi and Y. Inoue:  
Solid Structure and Biodegradation of the Compositionally Fractionated Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypropionic acid)s; *Polymer*, 40 6821-6830 (1999)
- (77) H. Abe, Y. Kikkawa, T. Iwata, H. Aoki, T. Akehata, and Y. Doi:  
Microscopic Visualization on Crystalline Morphologies of Thin Films for Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its Copolymer; *Polymer*, 41 867-874 (2000)
- (78) I. Ohkoshi, H. Abe, and Y. Doi:  
Miscibility and Solid-state Structures for Blends of Poly[(S)-lactide] with Atactic Poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate]; *Polymer*, 41 5985-5992 (2000)
- (79) Z. Gan, H. Abe and Y. Doi:  
Biodegradable Poly(ethylene succinate) (PES). 1. Crystal Growth Kinetics and Morphology; *Biomacromolecules*, 1 704-712 (2000)
- (80) Z. Gan, H. Abe and Y. Doi:  
Biodegradable Poly(ethylene succinate) (PES). 2. Crystal Morphology of Melt-Crystallized Ultrathin Film and Its Change after Enzymatic Degradation; *Biomacromolecules*, 1 713-720 (2000)