

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01902

研究課題名(和文) 配列制御機構を利用した高粘弾性ポリマーの微生物生産

研究課題名(英文) Microbial production of elastic polymers with ordered structure

研究代表者

松本 謙一郎 (Matsumoto, Ken'ichiro)

北海道大学・工学研究院・教授

研究者番号：80360642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：微生物産生ポリエステルは、石油ではなく再生可能なバイオマスを原料として合成でき、さらに自然環境中で生分解されごみが蓄積しないことから、持続可能性が高く、環境低負荷なプラスチックとして着目されている。2019年からは国内でも実用化され、用途および使用量の拡大が課題である。目的達成のためには、プラスチックの物性をより幅広く制御することが重要な技術課題である。これまで、ランダム共重合化により軟質性を付与するという戦略で材料開発が行われてきた。本研究では、モノマーが重合する順序を制御する全く新しい手法により新規ポリマーを合成し、既存のポリマーとは異なる有用な物性を示すことを明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高分子が生合成されるという現象は、DNAやタンパク質などの合成に代表されるように生命の根源に関わる現象であり、その反応機構や制御機構には基礎科学的関心が持たれる。本研究成果の学術的意義は、生合成ポリマーの一つであるPHAに関して、これまでに知られていなかった生合成機構が存在することを示したことである。一方で社会的意義は、環境低負荷型材料として期待されるPHAの物性を改良するために、従来法とは異なる構造制御法を見出したことである。これにより、さらに多様な物性を持つPHAの生合成が可能になる可能性が拓けた。

研究成果の概要(英文)：Bacterial polyester polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biobased and biodegradable plastic, which are commercially used in Japan since 2019. To further expand the use of the material, the regulation of physical properties is an important research target. The conventional but effective strategy is random copolymerization, which increases the resistance to impact. We developed a novel method to control the monomer sequence of the polymer. In fact, the obtained sequence-regulated PHAs exhibited superior properties to the conventional polymers. These results indicated the usefulness of the sequence-regulating technique of PHA for creating the next-generation materials.

研究分野：生物化学

キーワード：生分解性プラスチック 生合成 自己組織化

## 1. 研究開始当初の背景

二酸化炭素濃度の上昇による気候変動に対する懸念から、低炭素化社会の実現が大きな社会目標となっている。また、適切に処理されなかったプラスチックごみが海洋に流出し、大量に蓄積していることが広く知られるところとなり、その生態系への悪影響が心配されている。このような背景から、ある種の微生物が産生するポリエステルが着目されている。ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)と呼ばれるこのポリマーは、石油ではなく再生可能な様々なバイオマスを原料として合成できる。さらに海洋を含む自然環境中で微生物の作用により生分解される。生分解性プラスチックは様々な開発されているが、海洋での分解性を十分示すものはごくわずかである。したがって、海洋ゴミの低減を志向した生分解性プラスチックとして、PHA が非常に有望である。PHA の研究の歴史は長く、生産方法や材料物性の改良について研究が積み重ねられてきた。その第一世代とも言える 3-ヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシヘキサ酸のランダム共重合体は、2019 年からは国内でも実用化され、産業界から高い関心を集めている。環境低負荷材料としての真価を発揮するためには、用途および使用量の拡大が今後の重要な目標となる。現在実用化されている上記の共重合体は、耐衝撃性が改善されているものの、単一の材料ですべての用途をカバーすることはできない。石油由来の樹脂も、プラスチック、PET、ナイロンなどの様々なポリマーが使用されていることから分かるように、PHA も多くの用途に使用するためには、ポリマーの物性(すなわち構造)の多様性を持つことが必要とされる。このような背景から、PHA のポリマー構造を制御する新しい手法の開発が望まれていた。

## 2. 研究の目的

従来の物性制御方法は、上述したポリマーに代表されるように、硬質材料である 3-ヒドロキシ酪酸のホモポリマーに、その結晶構造を崩すような第二成分をランダムに挿入することにより、ポリマーの結晶化度を低下させ、軟質性を付与するという原理に基づいている。この方法は有用であるが、軟質性を上昇させるために第二成分を増やしていくと、結晶化度が低くなりすぎて、糊のようなべとべとの材料になる。したがって、柔軟性が非常に高く、かつ強度も高い材料を作ることに限界がある。また、3-ヒドロキシ酪酸ユニットの結晶が含まれるため、不透明な座利用になる。ランダム共重合の原理を用いて物性を制御する限り、これらの制限を突破することは難しい。

異なる原理によるポリマーの物性制御方法として、配列制御が知られている。例えば、モノマー A と B から構成される共重合体を考えると、A と B がランダムに重合したポリマーと、A のホモポリマーと B のホモポリマーが結合した構造を持つブロック共重合体とでは、全く異なる物性を示すことが知られる。A と B に性質の異なるポリマーを選んだ場合、通常は A と B はポリマー同士が混合せずに分離するが、A と B が共有結合で結ばれている場合、そのような分離ができないため、ナノスケールのナノ相分離を起こす。例えば、A と B をそれぞれ軟質・硬質ポリマーとした場合、軟質な材料の内部にナノスケールの硬質構造を含む構造や、逆に硬質構造の内部にナノスケールの軟質構造を含む構造など、ナノスケールで物性の異なるポリマーが分散した特殊な構造を創り出すことができる。

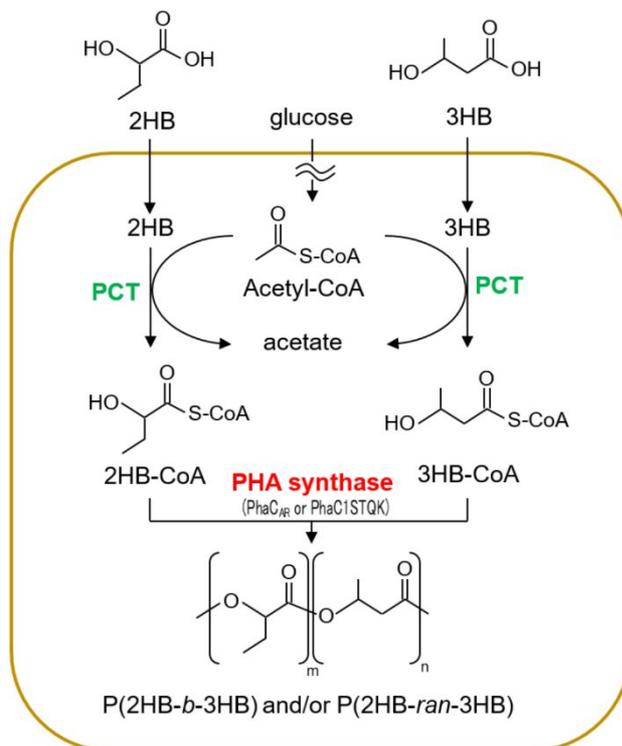
このような背景から、PHA の生合成においても、ブロック共重合体を作るという試みは以前から報告されていた。しかしながら、これらの試みには致命的な欠陥があった。化学合成によるポリマー合成では、A と B のブロック共重合体を合成する際、例えば A のホモポリマーを合成し、その反応が停止してからモノマー B を追加することで、ブロック共重合体を合成することができる。当然同様の方法で PHA も合成できると思われるが、実際にはそうはいかない。微生物培養により PHA を合成するには、2、3 日程度の培養期間が必要である。そこで、培養 1 日目・2 日目に違う炭素源を与えてブロック化させる試みは多くある。ところが、PHA の生合成を詳しく調べると、各ポリマー分子の合成速度は、培養の時間スケールよりもずっと速いことが推定される。典型的な合成条件の場合、ポリマー鎖一本の合成に必要な時間は 1 分程度と推定される。つまり、培養条件の変更によりポリマーをブロック化させるには、30 秒ごとに培養条件を変更する必要がある。これはあまり現実的な方法とは言えない。

さらにもう一つ難しい問題は、得られたポリマーが本当にブロック共重合体であるかを判定する方法がないことである。NMR は非常によく用いられる方法であるが、ブロックの各セグメント間の接続部分は非常にわずかしか存在しないため、通常は検出できない。したがって、ホモポリマーが混合されたポリマーブレンドとブロック共重合体を区別することは非常に困難である。このような技術的困難を克服し、PHA のブロック共重合体を合成し、且つブロック共重合体であることを証明することが求められた。

## 3. 研究の方法

本研究は、ある人工改変重合酵素を用いて、3-ヒドロキシ酪酸と 2-ヒドロキシ酪酸との共重合体を合成した際、ランダムではない共重合体が合成されることを偶然発見したことを端緒として開始した。上述したように、ポリマーブレンドとブロック共重合体を区別することは簡単ではないが、この条件では、ポリマーブレンドが合成されることも不自然だと考えられた。なぜな

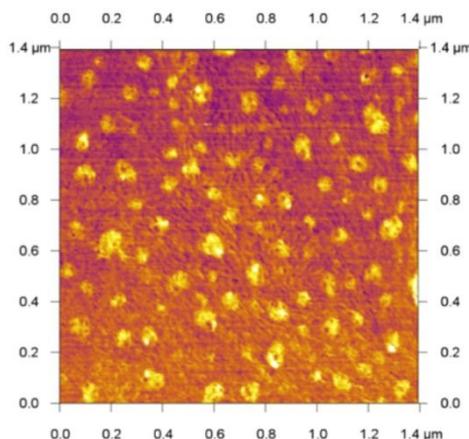
ら、単一の細胞・単一の遺伝子・単一の培地の条件で、2つの全く異なるポリマーがそれぞれ作られることになるからである。そのため、本ポリマーがブロック共重合体であると推定し、その構造を証明することを試みた。さらに、得られたポリマーの物性も評価した。方法としては、ポリマーが有機溶媒に溶解する溶解度がポリマーごとに異なることを利用した溶媒分別法と、ブロック共重合体がナノ相分離を起こすことに着目し、ナノスケールの構造を直接観測する原子間力顕微鏡による表面観察を用いた。右図は、ポリマーの生成に用いた組換え大腸菌内の代謝経路である。



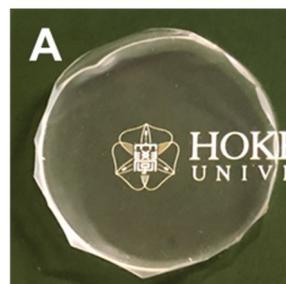
#### 4. 研究成果

2-ヒドロキシ酪酸のポリマーはテトラヒドロフランによく溶解する。一方、3-ヒドロキシ酪酸のポリマーはテトラヒドロフランに全く溶解しない。そのため、2-ヒドロキシ酪酸のポリマーと3-ヒドロキシ酪酸のポリマーを別々に合成して混合したポリマーブレンドを調整し、このサンプルをテトラヒドロフランで抽出すると、2-ヒドロキシ酪酸のポリマーのみを完全に回収することができ、3-ヒドロキシ酪酸のポリマーは完全に不溶画分に残る。つまり完全に分離することができる。同じ実験条件を生合成で得られた2-ヒドロキシ酪酸と3-ヒドロキシ酪酸の共重合体に適用すると、このような分離が起こらず、テトラヒドロフランに可溶な画分、不溶な画分の両方から、2-ヒドロキシ酪酸と3-ヒドロキシ酪酸の両方を含むポリマーが検出された。これは、2-ヒドロキシ酪酸のポリマーと3-ヒドロキシ酪酸のポリマーが共有結合で結ばれていることを意味しており、得られたポリマーがブロック共重合体であることを支持した。

次に、本ポリマーをスピコート装置を用いて薄膜として、その表面を原子間力顕微鏡によって観察した。原子間力顕微鏡は、カンチレバーと呼ばれる分子サイズの微細な針を使って、サンプル表面の計上を測定する装置であるが、原子間力顕微鏡の有用な機能は、形だけでなく、表面の硬さも測定できることである。上記のポリマーのうち、2-ヒドロキシ酪酸のポリマーは軟質性であるのに対し、3-ヒドロキシ酪酸のポリマーは硬質性であるので、表面観察により何らかの違いが見出されると期待された。実際、期待通り、今回生合成した共重合体では、右図に示すように軟質性の2-ヒドロキシ酪酸のポリマーの中に、硬質性の3-ヒドロキシ酪酸のポリマーが斑点様に点在する構造を持つことが分かった。このような構造は海島構造と呼ばれる。一つの島の大きさは、20 nm程度であり、目標としていたナノ構造が形成できていることが確認できた。加えて、ポリマーブレンドではこのような海島構造は見られず、ナノ相分離がブロック共重合体に特徴的な現象であるという知見と合わせて考えると、得られたポリマーがブロック共重合体であることがさらに指示された。加えて、本ポリマーで作成したフィルムの機械的性質も測定した。既存のポリマーとは明らかに異なる有用な物性を示すことを明らかにできた。



これらの結果から、研究代表者が構築したシステムにより生合成したポリマー(右図のフィルム写真)はブロック共重合体であることが証明できた。ブロック共重合体の生合成を目指した報告例は多いが、ブロック共重合体であることを証明できた研究はこれが初めてである。今後は得られたポリマーの生分解性について評価することが重要な課題となる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ken'ichiro Matsumoto, Midori Iijima, Chiaki Hori, Camila Utsunomia, Toshihiko Ooi, and Seiichi Taguchi	4. 巻 19
2. 論文標題 In Vitro Analysis of d-Lactyl-CoA-Polymerizing Polyhydroxyalkanoate Synthase in Polylactate and Poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) Syntheses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 2889-2895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biomac.8b00454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto K, Hori C, Fujii R, Takaya M, Ooba T, Ooi T, Isono T, Satoh T, Taguchi S	4. 巻 19
2. 論文標題 Dynamic Changes of Intracellular Monomer Levels Regulate Block Sequence of Polyhydroxyalkanoates in Engineered Escherichia coli	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 662-671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biomac.7b01768	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Ken'ichiro, Kageyama Yuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Increased Production and Molecular Weight of Artificial Polyhydroxyalkanoate Poly(2-hydroxybutyrate) Above the Glass Transition Temperature Threshold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2019.00177	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 松本謙一郎
2. 発表標題 プラスチックの微生物合成：細胞の中で起こっていること
3. 学会等名 アグリバイオ公開シンポジウム -植物バイオテクノロジーの最前線-（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsumoto K
2. 発表標題 New insight into synthetic mechanism of bacterial polyhydroxyalkanoate for fine polymer structure control
3. 学会等名 The 10th International Conference of Modification, Degradation and Stabilization of Polymers (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsumoto K
2. 発表標題 Copolymerization Kinetics of Engineered Polyhydroxyalkanoate Synthase in Production of 2-Hydroxyalkanoate-containing Polymers
3. 学会等名 16th International Symposium on Biopolymers (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsumoto K, Kaodya R, Takisawa K, Ooi T, Hori C, Yamada T, and Taguchi S
2. 発表標題 Microbial synthesis of unusual polyhydroxyalkanoate (PHA) from lignocellulosic biomass
3. 学会等名 International Symposium on Biomass Refinery: From Biomass Crops to Chemicals and Fuels (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 圭悟、影山 友基、藤井 隆之輔、松本 謙一郎
2. 発表標題 微生物産生ブロック共重合体ポリマーの構造機能相関の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ブロック共重合体、及びその製造方法	発明者 松本謙一郎	権利者 北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-34109	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大井 俊彦  (Ooi Toshihiko)  (40223713)	北海道大学・工学研究院・准教授   (10101)	
研究 分 担 者	佐藤 敏文  (Satoh Toshifumi)  (80291235)	北海道大学・工学研究院・教授   (10101)	