

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655145

研究課題名(和文)野生株PHA産生菌によるポリ乳酸の生合成

研究課題名(英文)Bio-synthesis of poly(lactic acid) by wild type PHA-producing bacteria

研究代表者

青木 隆史 (AOKI, Takashi)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・准教授

研究者番号：80231760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：PLAは、植物由来成分から有機合成で得られる代表的なバイオベースポリマーである。われわれの最近の研究で、PLAのオリゴマーが野生型の菌体内でも合成されていることを見出した。本研究課題では、より高分子量の、または高産生量のPLAが得られる培養条件を見つけ出し、温和な条件下で得られるPLAの新たな合成方法を確立することを目的とした。微生物の種類によって生合成されるポリマー中の乳酸の光学純度が異なることなどが分かったが、これまで検討したいずれの培養条件においても、より高分子量の、または高産生量のPLAが得られないことも分かった。現在、これまでの計画とは異なる別の観点で実験を試みている。

研究成果の概要(英文)：Poly(lactic acid) (PLA) is one of bio-based polymers synthesized from renewable resources in plants. We have recently found that PLA oligomers existed in a microbial cultured system of *Ralstonia eutropha* (*R. eutropha*), which is known to form other aliphatic polyester, poly(3-hydroxybutyrate) within its body. This research aimed to find optimal cell-culture conditions for both better mass production and higher molecular weight of PLA, establishing the suitable accumulation manner of the polyester under mild conditions. PLA obtained from *R. eutropha* culture system was found to composed of D-formed lactic acid repeating units, while that from other strain cell, *Bacillus megaterium*, contained D- and L-formed ones. The optical purity of lactic acid units in PLA depended on the cell strains. It was also found that our cell conditions could not result in large mass production or high molecular weight of PLA. Even now, we are trying to find out the optimal cell-culture conditions.

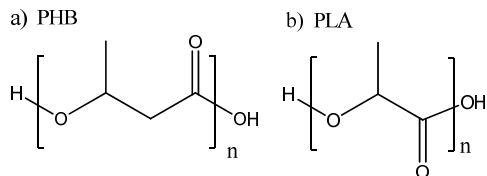
研究分野：機能性高分子化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：バイオベースポリマー 生体材料 生分解性・生体吸収性 応用微生物 バイオテクノロジー

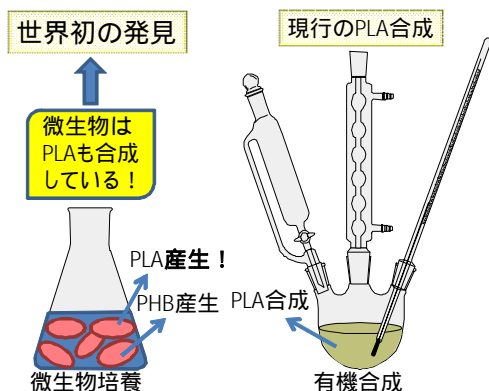
1. 研究開始当初の背景

バイオベースマテリアルの中で、ポリ乳酸 (PLA) とポリヒドロキシアルカネート (PHA) (スキーム 1) は、代表的なバイオベース素材である。これらのポリマーは、既存の石油成分から作られるポリマーと異なり、植物成分から合成される。しかし、両者は、生成プロセスが違ふことから、バイオベースマテリアルの中でも、異なる部類に属している。PLA は、モノマーである乳酸の縮重合反応やラクチドの開環重合などの有機合成から得られるケモ・バイオ系の代表的なポリエステルであり、PHA は、微生物が産生するバイオ合成系の微生物ポリエステルである。PHA の中でもポリヒドロキシ酪酸 (PHB) は、野生株菌体である *Ralstonia eutropha* (*R. eutropha*) で産生され、その重合の生長・停止反応機構についても詳細に検討されている。さらには、遺伝子工学の手法を採用し、その重合酵素を大腸菌で発現させ精製し、*in vitro* 重合による PHB やその誘導体の合成も広く研究されている。



スキーム 1 PHB と PLA の構造式

われわれは、最近、*R. eutropha* での PHB 合成の開始反応を NMR や質量分析法から詳細に解析し、その高分子鎖の生長開始点にコハク酸やグルタル酸が存在していることを明らかにした (K. Yamanaka, Y. Kimura, T. Aoki, T. Kudo, *Macromolecules*, 42, 4038 (2009)、K. Yamanaka, Y. Kimura, T. Aoki, T. Kudo, *Polymer Degradation and Stability*, 95, 1284 (2010).)。さらにこれらの研究過程で、*R. eutropha* により PLA が産生されていることを発見した。今までに、遺伝子組み換え操作により、大腸菌内で PLA の共重合体を合成した研究報告例 (S. Taguchi, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 105, 17323 (2008)) はあるが、野生株の微生物がホモポリマーの PLA を合成しているという報告例



スキーム 2 微生物による PLA 合成

は、国内外とも無い (スキーム 2)。PLA が野生株の菌体内で合成されているという事象は、生化学的にも材料科学的にも興味深い。これまで知られていなかった、この PLA の微生物合成の機構を理解し、産生能の向上方法を確立することにより、触媒や有機溶媒を用いない新規の PLA 合成法を構築する意義は大きい。この研究課題では、世界で初めて発見した PLA の微生物合成の基礎的な解析と微生物の至適培養条件の検討を行うこととした。

2. 研究の目的

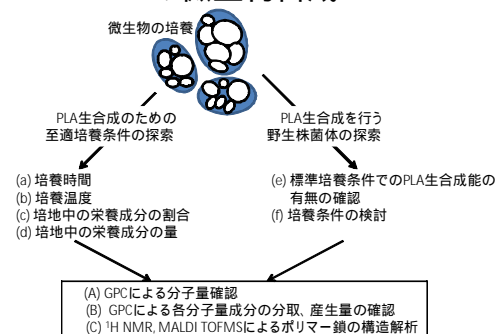
PLA は、植物由来成分から有機合成で得られる代表的なバイオベースポリマーとして分類されてきた。しかし、われわれは、最近の研究で、PLA が野生型の菌体内でも合成されていることを見出した。この PLA の微生物合成は、これまでに国内外で報告されてはあらず世界で初めての発見といえる。これまでのわれわれの知見からは、微生物より得られる PLA の分子量は 1,000 程度のオリゴマーであることから、本研究課題では、より高分子量の、または高産生量の PLA が得られる培養条件を見つけ出し、温和な条件下で得られる PLA の新たな合成方法を確立することを目的として、以下のような項目を検討内容として挙げた。

- (1) PLA が産生される野生株の *R. eutropha* の培養条件を検討する。
- (2) 高分子量の PLA、もしくは高産生量の PLA を得るための至適培養条件を見出す。

3. 研究の方法

- (A) *R. eutropha* での至適培養条件の検討
- (i) Nutrient Broth 培地で *R. eutropha* を増やす。
  - (ii) 3 wt% の炭素源を含む窒素制限培地で、種々の時間をかけて培養を行う。
  - (iii) 培養終了後に集菌し乾燥する。
  - (iv) 乾燥菌体から chloroform で抽出操作を行う。
  - (v) 可溶画分を diethyl ether に再沈殿して生合成されたポリマーを精製する。
- これまでに、培養初期段階において、PHB の他に少量の低分子量の PLA が生成されて

PLA の微生物合成



スキーム 3 PLA の微生物合成条件の検討

いることを確認している。PLA と PHB を分離精製し、それぞれのポリマーを NMR や質量分析装置などの構造解析方法で調べ、両ポリマーの産生量の動態を追跡する(スキーム 3)。

#### 4. 研究成果

##### 【1年目】

初年度である平成 23 年度では、一緒に回収される 2 種類のポリエステル PHB と分子量が 1,000 程度の PLA (オリゴマー) を単離精製する手法を確立した。*R. eutropha* による PHB の産生過程において PLA の存在が確認されているが、培養後の微生物から水を除去するために乾燥し、クロロホルムを用いて、この有機溶媒に溶解する化合物のみを抽出し、貧溶媒で再沈殿させて PLA と PHB を得ている。しかし、スキーム 1 に示したように、両者の化学構造の違いは、主鎖に存在するメチレン基の有無だけであり、有機溶媒には、共通して溶解するか不溶化し、両者を分別するために使用する有機溶媒を探す必要があった。検討の結果、ジオキソランやジオキサンに PLA は溶解し、PHB は沈殿を形成することが判り、これらの溶媒を利用することにより PLA と PHB を分別することができるようになった。これにより、PLA の精製とその後の種々の分析を容易に行うことができるようになった。

##### 【2年目】

2 年目の平成 24 年度には、PLA を構成する乳酸のキラリティーが、培養する微生物の種類に依存して変化することを見出した。

PLA の生合成が認められたのは、*R. eutropha* であったが、*Bacillus megaterium* (*B. megaterium*) の培養においても、同様に PLA の存在を確認した。しかし、これら 2 種類の微生物による PLA の産生には、以下の点で異なっていた。

(1) 両者の微生物とも 2 段階培養を行い、2 段階目の窒素制限培地での所定時間の培養後に PLA の抽出を行うが、産生量の経時変化が両者の微生物で異なっていた。*R. eutropha* では 2 段階培養開始時で最も産生量が多く、*B. megaterium* では 2 段階培養 5 時間後で産生量が最大であった。

(2) *R. eutropha* から得られた PLA の構成成分は、D-乳酸であったのに対し、*B. megaterium* から得られたそれは、D-乳酸と L-乳酸の両方が存在した。

(3)  $^{13}\text{C}$ -NMR で両者の微生物から得られた PLA の立体規則性を測定したところ、いずれのポリマーも *mmm* のアイソタクティック性のシグナルが観測された。特に *B. megaterium* では、D 体と L 体の乳酸ユニットが存在して

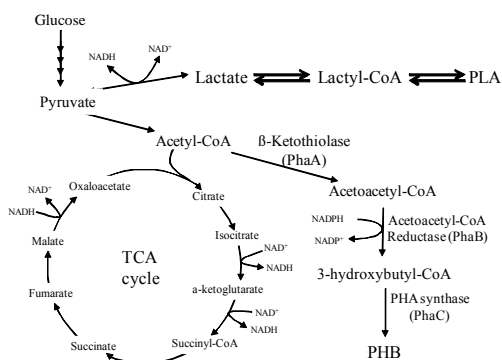
いるにもかかわらず、その重合鎖がアイソタクティックであったことは、これらのユニットがランダムに連結しているのではなく、ポリ(D-乳酸)とポリ(L-乳酸)の混合物であるか、もしくはブロック共重合体を形成している可能性を支持している。得られているポリマーの質量が少ないため、ポリマーの熱的性質や結晶性などを調べるに至っていない。融点や結晶状態の構造などの情報が得られれば、構造についての詳細な議論をすることができる。

以上、これら 3 つの点で差異が認められたことは、PLA が微生物内で生化学的に合成されていることを示唆するものである。

しかし、高分子量の PLA、もしくは高生成量の PLA を得るための至適培養条件を見出すまでには至っていない。例えば、低分子量であっても高生成量の PLA が得られるための至適培養条件を見出すことが、今後の課題である。

##### 【3年目】

3 年目である平成 25 年度では、1 年目と 2 年目で行ってきた高分子量の PLA、もしくは高産生量の PLA を得るための至適培養条件の検討を継続して行った。培地の調製方法や組成、そして培養時のエアレーションの回転数や空気中の酸素の割合などを調整した環境下での培養を行い、生合成される PLA の産生量や分子量の変化を追った。しかしながら、当初から得られている結果と本質的には変わらないことが判った。したがって、現在、これまでの計画とは異なる別の観点で実験を試みている。これまでは、PLA の生成経路については、Pyruvate > Lactate > Lactyl-CoA > PLA の生成過程を経由すると考えて検討してきた。したがって、この経路の生理活性物質と、これら物質を基質とする酵素の存在を確認することも研究対象としていた(スキーム 4)。しかし、この代謝経路とは異なる経路で、PLA の生合成が行われているのではないかと、現在考えている。その観点が正しかった場合に、非常に新規性



スキーム 4 これまで考えてきた PHB の生合成経路と PLA 生合成の推定代謝経路

の高い実験結果となることから、その内容をここで説明することができないが、これまで重要視してこなかった微生物の生理現象に深くかかわっているのではないかという仮説に基づいている。そのため、現在は、あえて学会発表やその他の外部発表を控え、その仮説に基づいた培養条件の探索を、現在も継続して行っている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 隆史 (AOKI, Takashi)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：80231760