

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281043

研究課題名(和文)非天然モノマー導入による配列制御型ポリマーの合成

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(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80360642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：再生可能なバイオマスから合成可能な微生物産生ポリエステルの有効活用のために、優れた材料物性を発揮させることが重要な課題となる。通常、微生物合成を用いるとランダム共重合体が合成されるが、我々はランダム性が低いポリマーが得られる条件を偶然見出した。本研究課題では、この発見を端緒に、新規なポリマー合成系の確立を目指した。モノマー配列の一次構造を解析するとともに、機械的・熱的物性を測定した。さらに、酵素を細胞から単離精製して生化学的な解析を行い、関連する酵素の活性を評価した。これら一連の実験結果に基づいて、対象としたポリエステル合成系について、合成から物性に至るまで幅広い情報を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Microbial polyesters are useful material, which are produced from renewable biomass. For the practical use of the material, polymer properties are critical factors. It is well-known that microbial copolyesters are random polymer. However, we found a condition that generated copolymer with low randomness. This study addressed optimization of the polymer production, structure and property analysis, and kinetic analysis of relevant enzymes. As the results, the copolymer, in which the monomer composition was regulated, was successfully synthesized with good yield. The copolymers exhibit transparent and flexible properties. The enzymatic activity of relevant enzymes accounted for the intracellular intermediate levels. Overall, the study contributed to the significantly improved the efficiency of the polymer production system, and provided insight into the mechanism of the polymer synthesis.

研究分野：生物化学

キーワード：バイオベースプラスチック 微生物合成 生分解性材料

### 1. 研究開始当初の背景

微生物産生ポリエステルは、ある種の微生物が細胞内に合成蓄積する貯蔵物質であり、単離するとプラスチック物性を示すことから、再生可能なバイオマスから合成されるプラスチックとして利用可能である。このポリマーを産業利用するためには、優れた材料物性を発揮させることが重要な課題となる。ポリマーの物性は、材料中の高分子結晶の割合と、非晶部の運動性によって大きく影響される。複数のモノマーユニットを含む共重合体は、構造の異なるモノマーユニットが高分子鎖にランダムに取り込まれたランダム共重合体が合成される。ランダム共重合体は結晶の成長が抑制されることから、材料の柔軟性が向上するメリットがある。我々の研究グループでは、共重合体の合成研究の中で、ポリマー中のモノマー配列のランダム性が低いポリマーが合成される条件を偶然見出した。本研究課題では、この発見を端緒に、ポリマー合成方法の確立、合成されたポリマーの構造・物性解析、ポリマー生成に関わる酵素群の生化学的解析を行うことを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、ポリエステル合成系遺伝子群を導入した組換え微生物を用いて適切な炭素源を含む液体培地で培養することにより、菌体内にポリマーが合成・蓄積される系を研究対象とし、典型的なポリマー合成系と比較してランダム性の低いポリマーが合成される系について、ポリマーの合成方法、ポリマーの構造解析、関連する酵素の生化学的解析を目的とした。合成方法としては、菌株や培養条件の検討により、組成の制御および生産性の効率化を行うことを目的とした。構造解析では、モノマー配列の一次構造を解析することを第一の目的とし、より高次構造の解析にも取り組んだ。酵素の生化学的解析では、主要な酵素を細胞より単離精製し、人工合成基質との反応速度を測定することにより、酵素の性質を評価した。

### 3. 研究の方法

ポリマー生産微生物の培養にはトリプトン、酵母エキスに適切な炭素源、ミネラル等を添加した培地を高圧蒸気滅菌して用いた。培養容器は、10 mL の試験管および500 mL の坂口フラスコを主に用い、120 - 180 rpm 程度の往復震盪培養を行った。培養後の培養液を遠心分離することにより、菌体と培地上清に分離した。菌体は純粋で洗浄したのち凍結乾燥を行い、乾燥菌体を得た。乾燥菌体をクロロホルム中に分散させ、菌体内のポリエステルを溶解させて抽出し、後に菌体残さをろ過により除去することで、ポリマー溶液を得た。これを適切に精製することにより、ポリマーサンプルとした。

ポリマーサンプルは、濃硫酸中で加熱分解することにより、モノマー単位に分解される。これをイオン排除モードのカラムを装備した液体クロマトグラフィーで分離することにより、各モノマー成分を検出した。また、培地上清の成分分析にも液体クロマトグラフィーを用いた。ピークの検出には紫外吸光度計および示差屈折率検出器を用いた。これと並行して、ガスクロマトグラフィーによる分析も行った。ポリマーを硫酸とメタノールの混合液中で加熱することにより、ポリマーをモノマーのメチルエステルへとメタノリシス分解した。こうして得られるメチルエステルは、揮発性を有するため、ガスクロマトグラフィーでの分析が可能となる。これらの解析に加えて、核磁気共鳴によるポリマーの解析を行った。ポリマーのフィルムを重クロロホルムに溶解させ、核磁気共鳴測定を行った。分析後のサンプルは、ゲル浸透クロマトグラフィーに供することにより、ポリマーの相対分子量を推定した。

得られたポリマーの物性の測定のために、示差走査熱量測定と引っ張り試験を行った。ポリマーのクロロホルム溶液を水平なガラス容器内で揮発させ、平坦なソルベントキャストフィルムを作成した。厚みを計測したのち、所定の量のフィルムを切り出して示差走査熱量測定装置で温度を連続的に変化させた際の吸熱・発熱挙動をモニターした。この熱流に基づいて、ポリマーの融点、ガラス展移転、結晶化度などを決定した。同様に、ソルベントキャストフィルムから矩形フィルムを切り出し、引っ張り試験機を用いて、等速で伸長し、その際にフィルムの上下にかかる応力を測定した。こうして得られる応力ひずみ曲線と呼ばれるデータから、このフィルムの引っ張り強度、伸び率、固さに相当するヤング率を計測した。

酵素活性の解析のため、微生物細胞内のタンパク質の精製を行った。培養後の組換え微生物の菌体を超音波処理することにより、菌体を破碎し、細胞内の可溶性タンパク質を抽出した。得られたタンパク質溶液をアフィニティークロマトグラフィーのカラムに通して分離することにより、目的とする精製タンパク質を得た。得られた酵素に基質を添加し、一定時間ごとに反応液の一部をトリクロロ酢酸と混合して反応を停止させた。このように調整した反応液中の基質の濃度を測定することにより、酵素の反応速度を決定した。

### 4. 研究成果

使用菌株、基本培地組成、培養温度、培養スケールなどについて条件検討を行い、良好なポリマー生産が得られる培養条件を決定できた。さらに、培地に添加する炭素源の組成をより細かく変えることにより、ポリマー中のモノマー組成を概ね狙い通りに調節できる条件を決定できた。培養時間についても、

培養中の基質の消費、菌体増殖、ポリマー合成について、経時的なモニタリングを行い、目的とするポリマーが合成される適切な培養時間を決定した。

培養温度に関しては、適切な温度の使用が非常に重要であることが見出された。細菌には生育速度が最大になる至適生育温度があり、この温度以下では生育が遅くなることが知られている。ただし、生育に最適な温度が目的とする物質合成に対しても最適とは限らない。今回検討した系については、30 が最適温度であり、これよりも培養温度を高くすると、ポリマーの生産性が大幅に低下することが分かった。

得られた菌体から上述した方法によりポリマーを抽出し核磁気共鳴測定を行った。化学シフトから判断されるポリマー中のモノマー配列のランダム性に基いてポリマーを評価したところ、いずれのモノマー組成においても同様の配列性を有していることが示唆された。ポリマー分子量は、通常の微生物産生ポリエステルの分子量と同程度であり、フィルム化等の加工が十分可能な範囲であることが確認できた。

フィルムの引っ張り試験の結果、合成したポリマーの多くについて、応力ひずみ曲線の測定に成功した。実験結果の解析により、合成したポリマーのモノマー組成に依存して破壊伸びなどの機械的性質が変化することが分かった。合成したフィルムは200%以上の伸び率を示し、伸張性を有していることが明らかとなった。また、代表的な微生物産生ポリエステルであるポリヒドロキシブタン酸が硬質な材料であるのに対して、本研究で合成した共重合体は、より軟質な材料であることが示された。

同じフィルムサンプルを用いて示差走査熱量測定を行った。-50 から200 まで温度を変化させ、昇温中の熱流を測定した。その結果、核磁気共鳴分析により予想されたポリマー構造に対応する温度に融点ピークが観測され、先の分析結果と一致した。ポリマー中の結晶領域の割合は、ポリヒドロキシ酪酸よりも低く見積もられ、この結果は、機械的性質やフィルムの透明性などの結果とよく一致した。ポリマーのガラス転移温度もポリマーの一次構造と矛盾しない温度に観測された。

酵素の解析のため、関連酵素の発現精製を行った。栄養リッチな培地を用いて菌を培養し、ポリエステルの合成に関与する複数の酵素を菌体内で発現させ、上述したアフィニティークロマトグラフィーの方法により酵素分子を生成した。その結果、タンパク質電気泳動により単一バンドに見える程度の純度に精製されたタンパク質溶液を調整できた。

次に基質の合成を行った。ポリエステルの生合成にはコエンザイム A の誘導体が関与している。コエンザイム A を有機化学的手法および酵素反応を用いて有機酸と結合し、使用

するコエンザイム A の誘導体を得た。合成産物を液体クロマトグラフィー・質量分析計を用いて分析し、化合物の保持時間と質量電化比を測定することにより、目的の化合物が合成されていることを確認した。

調整した精製酵素と基質を用いて酵素活性の評価を行った。ポリエステルの合成は、モノマーの合成と重合の反応に大別されるが、共重合体を構成する複数のモノマーについての反応速度を測定した。その結果、各基質と酵素の組み合わせについての反応速度を測定することに成功した。相対的な反応速度については、モノマーの合成の方が反応速度が速い組み合わせや、重合の方が反応速度が速い組み合わせなど、多様な状況がありうることを示された。

細胞内に、ポリエステルの合成中間体が存在するかどうかを調べる実験を行った。ポリエステル合成条件で培養した菌体を冷却した有機溶媒で急速にクエンチすることにより、代謝を停止させるとともに、細胞内の代謝中間体を抽出した。得られた溶液を液体クロマトグラフィー・質量分析計を用いて分析することにより、細胞由来抽出液に含まれるコエンザイム A の誘導体の濃度を測定した。その結果、一部の条件からコエンザイム A の誘導体が検出されたことから、酵素活性の測定から推定された代謝経路と、実際の菌体内に存在した代謝中間体との間により一致を見た。これらの代謝中間体と合わせて、基本的な一次代謝経路の重要な代謝中間体であるアセチルコエンザイム A も過去の報告と矛盾しない濃度で検出されたことから、本実験で検討した代謝中間体の検出は適切に行われたと推定された。

これら一連の実験結果に基づいて、本研究課題で対象としたランダム性の低い共重合体が合成される微生物ポリエステル合成系について、ポリマーの合成方法、酵素の解析からポリマー物性に至るまで幅広い情報を得ることができた。

## 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 3 件)

Ken'ichiro Matsumoto, Tetsufumi Shiba, Yukikazu Hiraide, and Seiichi Taguchi, Incorporation of glycolate units promotes hydrolytic degradation in flexible poly(glycolate-co-3-hydroxybutyrate) synthesized by engineered *Escherichia coli*, ACS Biomaterials Science & Engineering, in press  
Jian Sun, Ken'ichiro Matsumoto, Yuta Tabata, Ryosuke Kadoya, Toshihiko Ooi, Hideki Abe and Seiichi Taguchi, Molecular weight-dependent

degradation of D-lactate-containing polyesters by polyhydroxyalkanoate depolymerases from *Variovorax* sp. C34 and *Alcaligenes faecalis* T1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 99, pp. 9555-9563, 2015.11.  
Nduko JM1, Matsumoto K, Ooi T, Taguchi S. Enhanced production of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) from xylose in engineered *Escherichia coli* overexpressing a galactitol transporter, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014 98(6):2453-60. doi: 10.1007/s00253-013-5401-0

〔学会発表〕(計 3 件)

松本謙一郎、門屋亨介、滝沢憲治、大井俊彦、田口精一：“バイオマスを利用した非天然バイオプラスチックの生合成”、日本農芸化学会大会シンポジウム、札幌コンベンションセンター、平成 28 年 3 月 30 日

田口精一、松本謙一郎、大井俊彦：“酵素代謝複合変化による「多元ポリ乳酸」生合成システムの創成”、第一回デザイン生命工学研究会、東京工業大学すずかけ台キャンパス大学会館、横浜、平成 28 年 3 月 30 日

K. Matsumoto, Y. Hiraide, J. Sun, T. Ooi, S. Taguchi: “Biosynthesis of glycolate-based polyesters with hydrolytic degradability”, The 4th Frontier Chemistry Center International Symposium, Hokkaido University, Sapporo, Japan 2016.2.23.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 謙一郎 (MATSUMOTO Ken' ichiro)  
北海道大学・工学研究院・准教授  
研究者番号：80360642

(2) 研究分担者

田口 精一 (TAGUCHI Seiichi )  
北海道大学・工学研究院・教授  
研究者番号：70216828

大井 俊彦 (OOI Toshihiko )  
北海道大学・工学研究院・准教授  
研究者番号：40223713

佐藤 敏文 (SATO Toshiyumi )  
北海道大学・工学研究院・教授  
研究者番号：80291235

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )