

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2020

課題番号：15K16147

研究課題名(和文)反応性末端を有するバイオポリエステルの微生物合成と構造制御による高性能化

研究課題名(英文) Biosynthesis of carboxy-terminal modified polyhydroxyalkanoate and improving the physical property using its structure

研究代表者

百武 真奈美 (Hyakutake, Manami)

東京工業大学・物質理工学院・JSPS特別研究員

研究者番号：90733957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では分子鎖末端に官能基を有するPHAを生合成し、その末端構造を活用し物性を向上させることを目指した。一部の重合酵素のみが示す加アルコール分解反応に着目し、培養条件を検討することで、カルボキシ末端に官能基を有するPHAを生合成することに成功した。付与した末端基は反応性を有し、他分子と反応することを確認した。また、得られた末端修飾PHAを添加剤として用いた場合、末端構造によって核剤効果が変化することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題では、カルボキシ末端に官能基を有するPHAの生合成法を開発した。これまでに報告のあった手法では、PHAの末端修飾に、PHAの微生物合成、熱分解、化学修飾と三段階を要していたが、本手法により目的のPHAをダイレクトに生合成できるようになった。付与した官能基は反応点として利用できることから、マクロモノマーとしての活用が期待でき、バイオマスを原料とした物質生産への活用が期待できる。また、有用な核剤となりうる可能性も示唆され、本結果を出発点として今後研究が進むことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed the biosynthesis of carboxy-terminal modified polyhydroxyalkanoate (PHA) using PHA synthase from *Bacillus*, which shows both PHA polymerization and alcoholysis activities. Through the use of bifunctional compounds, the PHA carboxy terminus could be modified with functional group including thiol, ethenyl, and ethynyl group. These functional groups shows a reactivity towards other compounds. This result indicated that these carboxy-terminal modified PHAs could be used as biobased macromonomers. Furthermore, it was suggested that these PHAs show different nuclear agent effect depending on terminal structure.

研究分野：生体高分子

キーワード：ポリヒドロキシアリカン酸 末端構造 重合酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生可能なバイオマス資源を原料とした物質生産は、地球温暖化の一因である二酸化炭素の発生を抑制できるため早期実用化が期待されている。微生物の一部は、糖や植物油などのバイオマスからバイオポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を合成し細胞内に蓄積する。PHAはバイオマス由来であるだけでなく、生分解性・生体適合性・熱可塑性といった特徴を有し、包装材料、農業用マルチフィルム、手術用縫合糸、ドラッグデリバリーシステムなど、広範囲での応用が期待される材料である。しかしながら自然界で最も一般的なPHAであるポリヒドロキシブタン酸(PHB)は固く脆い材料であり、実用には困難が伴う場面がある。これを解決するため、第二モノマー成分の導入や、分子量、加工法といった様々な方面から研究が進められてきた。

高分子材料の物性は、直鎖、分岐、グラフトといった高分子の構造にも大きく依存している。しかしながら微生物合成されるPHAはその重合機構ゆえ直鎖型構造のみであり、かつ殆どがランダムな配列である。PHAの分子鎖末端に官能基を付与できれば、それを反応点として構造を大きく変えることができ、物性の幅を広げられる可能性がある。しかしながら官能基を分子鎖末端に有するPHAの合成は、化学的手法での報告があるのみで、手間やコストが課題であった。

以上のような背景から、分子鎖末端に官能基を有するPHAを生合成にてダイレクトに生産できるようにすれば、構造制御されたPHA合成に向けた新たな一歩となる。PHAの使い勝手を向上させることは、バイオマス資源を原料とした物質生産を後押しにつながり環境問題解決の一助となる。

2. 研究の目的

本申請課題では、構造制御された材料合成に向けて、分子鎖末端に官能基を有するPHAの微生物合成を第一の目的とした。次いで、付与した末端官能基を生かし、バイオマス資源由来材料の高性能化を行う。具体的には、末端基を反応点として他分子と結合させることにより構造制御し物性を制御することや、末端構造そのものによる物性への影響について調査を行う。

3. 研究の方法

分子鎖末端に官能基を付与する方法として、一部のグラム陽性細菌由来のPHA重合酵素(PhaRC。本研究では*Bacillus cereus*由来のPhaRCを使用)のみが触媒するPHAの加アルコール分解反応を利用した。この分解反応により生じたPHAは、カルボキシ末端にアルコールが付与された構造となる。本現象は当初、PHA合成に伴い代謝されるエタノールを用いエトキシ末端を有するPHAが生産されるものであった。この反応に関して、特定のアルコールを用いて加アルコール分解反応を誘導できれば、任意の末端を有するPHAを合成できると考えた。この考えを出発点に、本申請課題では以下の項目について研究を実施した。

(1) PHA末端に導入可能なアルコール種の特定と、生合成条件の最適化

自然由来のPHA合成細菌はPHAを加水分解する分解酵素を有するため、本研究ではPHA分解能を有さない大腸菌をPHA合成の宿主として実験系を構築した。具体的にはPhaRCと、PHA合成に必要な遺伝子を導入した遺伝子組換え大腸菌を構築し、以降の実験に使用した。

導入可能なアルコール種の特定のため、二段培養を実施した。まず、炭素源を含む培地にて培養しPHAを合成(培養一段目)後、菌体を回収し、これをアルコールを供給した培地で引き続き培養することで加アルコール分解を誘導した(培養二段目)。加アルコール分解による末端修飾にはPHAの分子量低下を伴うため、アルコール供給後に分子量が低下していればPHAが末端修飾されたと判断できる。最終的な末端修飾の確認にはNMRでの構造解析を行った。本反応は酵素反応であるため、基質特異性の影響を考えアルコール中の炭素鎖長や供給濃度を変えて生合成条件の最適化を行った。

(2) 末端官能基の反応性の調査と構造制御型PHAの合成

付与した末端官能基の反応性を調査するため、モデルケースとしてチオール基を末端に有するPHAを、クロロホルム中にてチオール標識試薬と反応させて精製後、RIDとPDAを備えたHPLCにて分析を行った。次いで、チオール末端PHAをクロロホルム/ヘキサンを任意の割合で混合させた溶液中にて分子量分画した。また、エテニル基末端に着目し、炭素鎖長の異なる末端エテニルアルコールを供給し合成されるPHAについて調査した。得られた末端エテニルPHAと、市販のチオール末端ポリマーと反応させた。

(3) 末端構造の核剤効果への影響

添加するアルコールの種類や濃度、大腸菌宿主を変更することで、PHA 部分の分子量が類似しながら末端構造の異なる複数種の低分子量 PHA を作成した。これを、母材である PHB に 1 重量部混合し、DSC にて等温結晶化速度を測定した。

4. 研究成果

本研究の主な成果、得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望は以下の通りである。

(1) PHA 末端に導入可能なアルコール種の特定

様々な構造の直鎖アルコールを用いて検討したところ、チオール基やエチニル基を有するアルコールを供給した場合においても PhaRC による加アルコール分解反応が引き起こされ、これらがカルボキシ末端に導入された PHA を生合成できることが分かった。二段培養だけでなく、培養初期からアルコールを添加する一段培養においても末端にこれらのアルコールが結合した PHA が合成されることを確認した。炭素源から大腸菌の代謝により生産されるエタノールも加アルコール分解の基質となるため、目的の末端構造を有する PHA の割合を高めるために、エタノール生産が少ないことが報告されている大腸菌株 *E. coli* XL1-Blue を宿主とすることで、修飾率 97%、単峰性の分子量分布を示す末端エチニル PHA の合成を可能にした。これは、カルボキシ末端が修飾された PHA の生合成法を提供する初めての報告である。

(2) 末端官能基の反応性の調査と構造制御型 PHA の合成

二段培養にてチオール基を末端に有する PHA を生合成したところ、二峰性の分子量分布を示した。これをチオール標識試薬と反応させたところ生成物は標識試薬由来の黄色を呈した。HPLC 分析したところ、低分子量側の PHA と標識試薬が反応したことが確認され、末端チオール基が反応性を有することを確認した。末端官能基は PhaRC が加アルコール分解反応により PHA を切断する際に付与されるものであり、官能基を有する PHA の多くは低分子量側に存在するためにこのような結果になったと考えられる。この結果を元に、二峰性のポリマーのうち、溶媒分画により低分子量側のみを取得することを試みた。分画自体は可能であったものの回収率を十分に高めるに至らず、研究期間との兼ね合いもありその後の分析に十分な量を取得することは困難であると判断した。しかしながら付与した末端官能基の反応性を明らかにでき、本手法で得られる PHA の、バイオマス由来マクロモノマーとしての利用可能性を示すことができた。

着目する末端基を切り替えることとし、末端エチニル基を有する PHA の生合成法を検討した。先に実施した、エチニル基を導入する実験にて、アルコールの炭素鎖長によって末端修飾が異なったことを参考に、末端にエチニル基を有し炭素鎖長の異なる複数種のアルコールを用いて PHA 合成を試みた。二段培養にて分子量低下を調査したところ、炭素鎖長が長いほど PHA が低分子量化することを確認し、加アルコール分解の頻度が高くなることが分かった。これを受けて炭素数 7 の末端エチニル直鎖アルコールを用いて一段培養を行うことで、数平均分子量が 1 万以下、末端修飾率 97% 以上の末端エチニル PHA を合成することができた。得られた PHA と市販のチオール末端ポリマーを用いてチオールエン反応を行ったところ、末端エチニル基の消失を確認でき、反応の進行が示唆された。これを受けて、炭素鎖長の異なる PHA 同士のブロック化を目指し、末端にチオール基を有する中鎖 PHA の合成を試みた。PhaRC は中鎖 PHA の重合能が低いいため、*Pseudomonas* 属細菌由来の重合酵素を用い、連鎖移動反応を介してチオール基含有アルコールを PHA のカルボキシ末端に導入することを試みたが、培養液にアルコールを供給すると菌体の増殖が大きく抑制され、目的の PHA を取得することは出来なかった。一方で PhaRC を用いた場合には、同じアルコールを培養液に添加しても PHA が合成されることを確認している。これは、PHA の生合成を阻害する化合物の存在下でも PhaRC では PHA 合成に大きな影響が出ないことを示している。

(3) 末端構造の核剤効果への影響

先の実験から、加アルコール分解反応に用いるアルコールの炭素鎖長を変えることで、PHA 部分の分子量(重合度)を制御できることが分かった。この知見をもとに培養条件を検討し、PHA 部分の分子量が類似しながら末端構造の異なる複数種の低分子量 PHA を、いずれも末端修飾率 90% 以上にて作成した。PHA の加工性向上の手段として低分子量の PHA を添加すると結晶化が促進されることが報告されている、そこで、本研究で得られた様々な末端構造を有する低分子量 PHA を結晶核剤として用い、結晶化速度の変化を調査した。その結果、末端構造の違いによって結晶化促進効果が異なることが確認された。核剤添加により結晶化速度を促進することができれば加工性の向上につながる一方で、母材との相溶性や、PHA の特徴の一つである生分解性を有する添加剤の開発が望ましい。本申請課題の研究期間は終了してしましたが、この核剤効果と末端構造を明らかにすることは学術的に有用であると考えており、今後も引き続き研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Manami Hyakutake, Satoshi Tomizawa, Imari Sugahara, Emi Murata, Kouhei Mizuno, Hideki Abe, Takeharu Tsuge	4. 巻 117
2. 論文標題 Carboxy-terminal modification of polyhydroxyalkanoate (PHA) via alcoholysis reaction catalyzed by Class IV PHA synthase	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Polymer Degradation and Stability	6. 最初と最後の頁 90-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.polymdegradstab.2015.04.002	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Manami Hyakutake, Satoshi Tomizawa, Kouhei Mizuno, Takeharu Tsuge, Hideki Abe
2. 発表標題 Production of carboxy-terminal modified polyhydroxyalkanoate (PHA) via alcoholysis reaction catalyzed by PHA synthase from Bacillus
3. 学会等名 International conference of biobased polymers (ICBP) 2015（国際学会）
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------