

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目： 若手研究 (A)  
 研究期間： 2007~2009  
 課題番号： 19681008  
 研究課題名 (和文) 熱分解アルケン酸からのバイオポリエステル酵素再合成・回収プロセスの開発  
 研究課題名 (英文) Study on bio-polyester synthesis from recycled alkenoic acids

研究代表者  
 柘植 丈治 (TSUGE TAKEHARU)  
 東京工業大学・大学院総合理工学研究科・准教授  
 研究者番号： 70332260

## 研究成果の概要 (和文)：

本研究では、立体特異的水和反応を触媒する *R*-ヒドラーゼを利用することで、バイオポリエステル (PHA) を熱分解した際に生成する不飽和脂肪酸 (アルケン酸) を、PHA に再合成する変換システムの開発を行った。これにより、非常に高い分子量を有する PHA やこれまでに合成例のないホモポリマーを、リサイクル資源であるアルケン酸から合成することを可能にした。

## 研究成果の概要 (英文)：

The aim of this study is to develop the chemical recycling system of polyhydroxyalkanoate (PHA) by integrating pyrolysis and enzymatic or microbial synthesis of PHA. The major product obtained from pyrolysis of PHA, alkenoic acids, is the key material of this recycling system. We demonstrated that alkenoic acids are able to be re-synthesized to original PHA.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：ポリヒドロキシアルカン酸、酵素合成、連鎖移動、ケミカルリサイクル、不飽和脂肪酸、熱分解

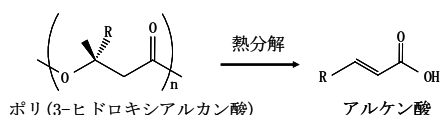
## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、日本国内において年間約 1,500 万トンものプラスチック製品が生産され、1,000 万トン以上が廃棄されている。廃プラスチックの約 60%はマテリアルリサイクル、ケミカルリサイクル、サーマルリサイクルなどの手法により有効利用されているが、残り

の 40%は未だ単純焼却や埋め立てなどの処理により処分されている。環境負荷を低減した持続可能な社会システムを構築するためには、未利用のまま廃棄されるプラスチックを極限まで減らし、最大限に有効利用する方法が必要とされる。

(2) ポリヒドロキシアルカン酸などの脂肪族ポリエステルは、環境中の微生物により分解される生分解性という機能を有する高分子であり、コンポスト化などの手法によって環境中で無機化される環境調和型素材として利用が期待されている。しかしながら、資源の有効利用の観点から、生分解性のポリヒドロキシアルカン酸においても、ケミカルリサイクルなどの手法を適用することにより、より効率的なリサイクルシステムを構築することが望まれる。

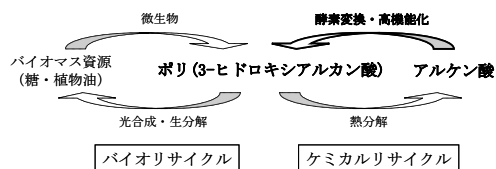
(3) 最近、Kimらによってポリヒドロキシアルカン酸類の熱分解による効率的なケミカルリサイクル手法が提案された (*Polym. Degrad. Stab.*, 2006)。熱分解によって、ポリ乳酸やポリカプロラク톤の生分解性高分子は、ラクチドやカプロラク톤に変換することができ、これらの化合物を再びモノマーとして利用することで、ケミカルリサイクルが可能になる。一方で、ポリ(3-ヒドロキシアルカン酸) (PHA) は、熱分解によって不飽和脂肪酸であるアルケン酸に変換されることが示された。



(4) しかしながら、アルケン酸はそのままではモノマーとしてリサイクル利用することができない。PHAは、バイオマス資源から微生物合成されるバイオポリエステルであり、今後、本格的な普及が期待される高分子材料である。そのため、PHAのケミカルリサイクル法を確立することは、資源の有効利用の観点から考えて重要である。

## 2. 研究の目的

(1) PHAの熱分解によって生成したアルケン酸をR-3-ヒドロキシアルカン酸に変換すれば、重合過程を経ることでケミカルリサイクルが確立できる。



そこで本研究では、立体特異的水和反応を触媒するR-ヒドラーゼを利用することで、熱分解アルケン酸をPHAに再合成する酵素・微生物変換システムおよびその回収プロセスの開発を目的とする。

(2) 酵素合成系では、微生物合成では難しい超高分子量体の合成ができる。そこで、本研究では単にPHAをケミカルリサイクルするのではなく、リサイクルによって機能が向上した材料(超高分子量体)へと再生するための技術開発について検討を行う。

(3) 酵素有効利用の観点から、酵素精製の必要のない微生物合成系についても検討を行い、これまで合成例の無い新規ポリマーを不飽和脂肪酸から合成する手法を開拓する。

## 3. 研究の方法

(1) 我々は、微生物や酵素を利用したPHAの合成について研究を行ってきた。とくに、アルケン酸をR-3-ヒドロキシアルカン酸に立体特異的に水和する酵素であるR-ヒドラーゼを中心に研究を行い、基質特異性の異なる酵素の取得、X線立体構造解析、タンパク質工学的的手法による改変体酵素の作製に成功してきた。これらの研究成果により、C4~C12までの種々の炭素鎖長のアルケン酸をR-3-ヒドロキシアルカン酸に変換することを可能にした。よって、R-ヒドラーゼを利用することで、熱分解により不飽和化した有機酸を重合可能なR体モノマーへと変換させる。

(2) アルケン酸へのCoA付加を行うために、アシルCoAシンターゼ(ACS)の遺伝子から取得し、本実験系で使用する。また、重合酵素は基質特異性の異なる2種類の酵素、短鎖長モノマーに重合活性が高い*Ralstonia eutropha*および中鎖長モノマーに重合活性が高い*P. putida*由来重合酵素を準備し、本実験系に使用する。

(3) PHAを純度良く回収する為には、連鎖移動反応を利用して、酵素とポリマーを分別回収することが重要である。連鎖移動反応とは、酵素の触媒残基であるシステインから、合成されたPHA鎖が解離する反応のことである。しかしながら、連鎖移動のメカニズムは詳細には解明されていない。ここでは、基礎的な知見を得る目的で、連鎖移動を誘発する条件の検討を行う。

(4) 最終的に合成系のスケールアップを行い、合成されたポリマーの分子量および熱的・機械的な性質の検討を行う。酵素合成系および微生物合成系の利点を生かして、高性能ポリマーへと再生する。

## 4. 研究成果

(1) まず、アルケン酸を出発原料としたポ

リエステル酵素再合成系に必要な酵素の調製法について検討を行った。この合成系を確立する上で最も重要となるのが、アシル CoA シンテターゼであるが、市販品は高価であり、また、アルケン酸に対して活性が低いことが問題であった。そこで、アルケン酸に対しても高活性な酵素を探索した。

(2) ゲノム配列が明らかになっている *P. putida* KT2440 の gDNA から、アシル CoA シンテターゼのホモログを 2 種類 (*acs* と *phaE*) 取得し、大腸菌内で発現させ、不飽和脂肪酸に対する活性を評価した。その結果、ACS は中鎖の脂肪酸に対して活性を有しており、C4 のクロトン酸に対しては高い活性を示すことはなかった。また、PhaE に関しては、フェニルアシル CoA シンテターゼであることが分かっているが、大腸菌の粗酵素液中には活性を確認することができなかった。

(3) 短鎖アルケン酸に高活性な酵素を取得できなかったため、酵素を使用せず CoA を付加する簡便な調製法についても検討を行った。具体的には、クロトン酸の酸無水物を作成し、これを CoA と反応させることにより、クロトニル CoA を調製する方法である。この溶液に、*R*-ヒドラーゼおよび PHA 重合酵素を投入することにより、PHA ポリマーへ変換可能であることを確認した。

(4) さらに、疎水性基板を反応場とした酵素重合法についても検討を行い、従来の顆粒を形成させながら重合する方法との重合収率の比較を行った。その結果、表面での重合反応では酵素活性が極端に低くなっており、顆粒形成での重合の方が効率的であることが分かった。従って、以後、顆粒形成法での重合実験を行った。

(5) 反応スケールを大きくし、クロトン酸から PHA [ポリヒドロキシブタン酸 (PHB)] を試験管内合成し、その分子量について測定を行った。その結果、分子量が 400 万を超える超高分子量体のポリエステルが合成できていることが確認できた。分子量の高いポリエステルは、高強度繊維に加工でき利用価値が高い。そのため、熱分解物を用いたケミカルリサイクルにより、付加価値の高いポリマーに再生できたことになる。一方で、反応収率は 60% 程度であった。

(6) 反応収率 60% というのは、回分系で反応を行ったためであり、反応の連続化により高い収率が達成できると考えられるが、それには技術的に解決すべき課題があることが明らかになった。

(7) ポリエステル重合酵素は不安定な酵素が多い。とくに、細胞内の環境とは異なるインビトロ系で使用するためには、酵素の高度安定化が必要である。これまでの研究により、重合酵素の安定化に関する新規な知見を得たので、これに基づいて高度安定化酵素の育種に取り組んだ。詳細についての紹介は、ここでは割愛させて頂く。

(8) 連鎖移動反応を応用する方向性で重合酵素の回収および再利用について検討を行った。まず、大腸菌を用いたインビボの実験から、重合酵素と連鎖移動剤のみで連鎖移動反応が進行していることを示唆する結果を得た。この知見を試験管内合成系に適用し、効率的に重合酵素と生成ポリマーを分離させる基礎条件の探索を行った。

(9) 微生物を用いた系においても、アルケン酸を再び PHA に変換することについて検討を行った。特に、炭素鎖長 8~10 の中鎖 PHA ホモポリマーというのは合成の報告例がなく、材料物性についても分かっていない。そこで、特殊な遺伝子組換え大腸菌 (*fadAB*<sup>-</sup>, *acs*<sub>pp</sub><sup>+</sup>, *phaJ4*<sub>pa</sub><sup>+</sup>, *phaC1*<sub>pp</sub><sup>+</sup>) を作成することで、中鎖長のアルケン酸から PHA ホモポリマーを合成することを試み、ほぼ単一組成から成る PHA (第二モノマー 1 mol% 以下) の合成に成功した。現在、中鎖 PHA ホモポリマーの物性解析を進めているが、これらのポリマーは熱分解により再びアルケン酸に変換可能であることから、資源循環性の高い高分子材料としての利用に期待している。

## 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 3 件)

- ① Tomizawa, S., Saito, Y., Hyakutake, M., Nakamura, Y., Abe, H., Tsuge, T.:  
Chain transfer reaction catalyzed by various polyhydroxyalkanoate synthases with poly(ethylene glycol) as an exogenous chain transfer agent  
*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press. 査読有
- ② Sato, S., Minato, M., Kikkawa, Y., Abe, H., Tsuge, T.:  
In vitro synthesis of polyhydroxyalkanoate catalyzed by class II and III PHA synthases: a useful technique for surface coatings of a hydrophobic support with PHA  
*J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **85**, 779-782 (2010) 査読有

- ③ Sato S, Ono Y, Mochiyama Y, Sivaniah E, Kikkawa Y, Sudesh K, Hiraishi T, Doi Y, Abe H, Tsuge T.:  
Polyhydroxyalkanoate film formation and synthase activity during in vitro and in situ polymerization on hydrophobic surfaces  
*Biomacromolecules*, **9**, 2811-2818 (2008)  
査読有

[学会発表] (計9件)

- ①佐藤俊、石井直樹、阿部英喜、柘植丈治：  
組換え大腸菌によるアルケン酸からの中鎖  
ポリヒドロキシアルカン酸生合成  
高分子学会、パシフィコ横浜、平成 22 年 5  
月 28 日
- ②持山由規子、佐藤俊、阿部英喜、柘植丈治：  
QCM を用いた PHA ナノ薄膜形成過程の解析  
日本生物工学会、名古屋大学、平成 21 年 9  
月 23 日
- ③吉岡真佐子、佐藤俊、阿部英喜、柘植丈治：  
熱分解クロトン酸からのポリヒドロキシブ  
タン酸酵素再合成の検討  
高分子討論会、熊本大学、平成 21 年 9 月 17  
日
- ④富澤哲、阿部英喜、柘植丈治：  
連鎖移動反応を利用した大腸菌産生ポリエ  
ステルの Bio-PEGylation  
高分子討論会、熊本大学、平成 21 年 9 月 16  
日
- ⑤柘植丈治、富澤哲、J・アグス：  
連鎖移動反応を誘発させた大腸菌が合成す  
るポリエステル分子量  
高分子学会、パシフィコ横浜、平成 20 年 5  
月 29 日
- ⑥佐藤俊、持山由規子、吉川佳広、阿部英喜、柘植丈治：  
ポリエステル重合酵素による疎水表面での  
重合反応解析  
高分子学会、パシフィコ横浜、平成 20 年 5  
月 29 日
- ⑦持山由規子、佐藤俊、阿部英喜、柘植丈治：  
QCM を用いたポリヒドロキシアルカン酸 *in  
vitro* 重合反応の解析  
高分子学会、パシフィコ横浜、平成 20 年 5  
月 28 日
- ⑧佐藤俊、小野勇将、吉川佳広、阿部英喜、柘植丈治：  
*R*-ヒドラーゼを利用したポリヒドロキシア

ルカン酸の *in vitro* 重合と AFM 観察  
高分子討論会、名古屋工業大学、平成 19 年 9  
月 20 日

⑨柘植丈治、富澤哲、J・アグス、P・カハル、  
阿部英喜、田口精一：  
微生物合成ポリエステルの分子量特性  
高分子討論会、名古屋工業大学、平成 19 年 9  
月 20 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.iem.titech.ac.jp/tsuge/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

柘植 丈治 (TSUGE TAKEHARU)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・  
准教授

研究者番号：70332260

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし