遺伝子組換え大腸菌により生合成された 生分解性ポリエステルの高強度繊維

岩 田 忠 久

資源問題や環境問題がクローズアップされている現在、糖や植物油などの再生可能資源から微生物により生合成される生分解性高分子の高性能・高機能化技術の開発および生分解性制御技術の確立は、生分解性高分子の実用化に向けての重要な課題である。本稿では、遺伝子組換え大腸菌により生合成された超高分子量生分解性脂肪族ポリエステルの高強度繊維について紹介する。

1. はじめに

近年、地球温暖化、化石資源の枯渇、プラスチック廃棄物による環境汚染など、高分子材料が関係する地球環境と資源・エネルギーに関する諸問題が提起され、地球環境と調和する人間社会の形成に「環境循環型高分子の高性能化」が世界的な課題となっている。わが国では2002年に、農林水産省のバイオ生分解性素材開発普及研究会による政策提言、バイオマス・ニッポン総合戦略閣議決定、経済産業省の生物機能活用型循環産業システム創造プログラムなど、環境循環型高分子材料の開発・普及が国策として採り上げられている。

世界各国で研究が進められている環境循環型高分子材料には、微生物でつくる高分子（ポリエステル、セルロース、ポリアミノ酸など）、植物や動物のつくる天然高分子（セルロース、デンプン、キチン、コラーゲンなど）、化学合成でつくる高分子（ポリ乳酸、ポリカプロラクトン、ポリブチレンサクシネートなど）があげられる^{1)~3)}。

このように、環境循環型高分子は、微生物、植物、動物などの生物由来の生体高分子を利用してつくる方法と、従来の合成プラスチックと同様に石油から化学的に合成する方法とがある。生物由来の生体高分子は、もともと自然界に存在するものを利用するために優れた生分解性を示す一方、多くの生体高分子は物性上の問題や、材料への加工性および生産効率に問題があり、いかに物理的性質や加工性を向上させるかが大きな研究課題となっている。一方、化学合成でつくる高分子は、優れた物性や加工性を有してい

るが、十分な生分解性をもつものは少ない。優れた物性や加工性を保ちつつ、その分子構造を生体高分子に似せて、微生物の酵素によって分解されやすい生分解性高分子を化学合成によりいかにしてつくるかがもっとも大きな研究課題となっている。

筆者らは最近、微生物産生脂肪族ポリエステルであるポリ([R]-3-ヒドロキシブチレート) (P(3HB))を対象として、冷延伸法、熱延伸法、2段階延伸法、および遺伝子組換え菌を用いた超高分子量化法により、P(3HB)単独材料での高強度繊維およびフィルムの作製に成功した^{4)~13)}。本稿では、筆者らが行った超高分子量化、冷延伸・2段階延伸法による高強度繊維の作製、高次構造、および生分解性について概説する。

2. ポリ([R]-3-ヒドロキシブチレート)

ポリ([R]-3-ヒドロキシブチレート) (P(3HB))は、水素細菌、窒素固定菌、光合成細菌など100種類以上の原核生物によって、糖や植物油から合成される融点約180℃を有する熱可塑性の脂肪族ポリエステルである¹⁴⁾。このポリエステルは、3-ヒドロキシブタン酸といわれる光学活性モノマーが直鎖状につながった立体規則性ポリマーであり、土壌、海、河川などの環境中に存在する微生物により水や二酸化炭素にまで完全分解される環境調和型の生分解性プラスチックである（図1）。

しかしながら、P(3HB)の成型品をガラス転移点($T_g = 4^\circ\text{C}$)以上の室温で保存した場合、ラメラ結晶間に存在する非晶部の分子鎖が、分子運動によって結晶部に取り込まれるという2次結晶化が生じる。この2次結晶化により非晶部の分子鎖には張力が働き、クラックが発生し、経時的に劣化する^{15), 16)}。たとえば、室温で3週間放置したP(3HB)フィルムの破壊強度、破壊伸びおよびヤング率は、それぞれ14 MPa、11%、0.48 GPaであり、汎用高分子に比べ極

IWATA, Tadahisa

理化学研究所中央研究所高分子化学研究室 (351-0198 和光市広沢2-1)・副主任研究員、博士(農学)。1994年京都大学大学院博士課程退学、2001年より現職。専門は高分子結晶学、高分子物性。

Biodegradable Strong Fibers Produced by Recombinant Escherichia coli

端に劣る。そのため、これまでは同じ生分解性を有する他の脂肪族ポリエステルとの共重合体化などにより物性および加工性の向上が図られてきたが、現在のところ研究段階にとどまっている^{17), 18)}。

3. 遺伝子組換え大腸菌による超高分子量化

一般に、野生のポリエステル合成菌が生産するP(3HB)の重量平均分子量は約60万程度に制限され、その成形品は硬くて脆いという物性上の問題点から現在のところ実用化には至っていない。

物性を向上させる方法のひとつとして、高分子量化がある。そこでわれわれは、P(3HB)の物性を改善するために、自然界に存在しない超高分子量のP(3HB)を、P(3HB)合成菌である*Ralstonia eutropha* H16由来のPHB合成遺伝子(*phbCAB*)を導入した組換え大腸菌*Escherichia coli* XL1-Blue (pSYL105)¹⁹⁾から合成することを目的とした。炭素源としてグルコースを用い、Luria-Bertani培地中、2段階回分培養において、通気酸素量、攪拌速度、炭素源濃度、培養温度、培地のpHなどさまざまな培養条件を検討した^{4), 7)}。その結果、遺伝子組換え大腸菌を用いたP(3HB)の発酵合成において、培地のpHが分子量に大きな影響を与えることがわかった。図2に、一例として37℃、グルコース濃度20 g l⁻¹で培地のpHを変えて培養を行ったときに得られた乾燥菌体量、P(3HB)の回収量および分子量の経時変化を示す。いずれのpHにおいても、炭素源に用いたグルコースは12時間で完全消費され、乾燥菌体量およびポリマー回収量は、8 g l⁻¹と4 g l⁻¹であった。本研究で得られたP(3HB)の絶対分子量は最大で14×10⁶ (pH 6.0)と、従来にないきわめて分子量の高いポリマーを生合成させることに成功した。また、培養時のpHをコントロールすることにより、さまざまな分子量を有する生分解性ポリエステルを合成することができた⁵⁾。図3は、P(3HB)を蓄積した遺伝子組換え大腸菌の透過型電子顕微鏡写真である。遺伝子組換え大腸菌の形態は、長さ2~10 μm、幅0.5

図2 遺伝子組換え大腸菌による超高分子量P(3HB)の生合成(培地のpH=(●) 6.0 or (■) 7.0): (A) 乾燥菌体量, (B) P(3HB)回収量, (C) グルコース消費量, (D) 重量平均分子量

図3 超高分子量P(3HB)を蓄積した遺伝子組換え大腸菌のTEM像

~10 μmの楕円形をしており、超高分子量のP(3HB)は大腸菌体内でグラニュールとして蓄積されていた⁶⁾。

4. 高強度・高弾性率繊維の作製と物性および構造

これまでP(3HB)は、結晶化速度が遅いことや2次結晶化に伴う室温での経時劣化のため、繊維化は困難であった。最初に繊維化に成功したのは、Gordeyevら²⁰⁾であるが、破壊強度190 MPaと汎用高分子のそれにはほど遠いものであった(表1)。最近、Schmackら²¹⁾、2,000~3,500 m min⁻¹で高速紡糸を行った後、4.0~6.9倍に延伸することにより、破壊強度330 MPa、ヤング率7.7 GPa、破壊伸び37%の高強度繊維を得ている。また、山根ら²²⁾も、28 m min⁻¹で紡糸を行った後、110℃で6倍に延伸、さらに100 MPaの張力をかけた状態で熱処理を施すことにより、破壊強度310 MPa、ヤング率3.8 GPa、破壊伸び60%の高強度繊維を得ている。しかしながら、両研究グ

表 1 P(3HB) 繊維と汎用高分子繊維の物性

	試料	研究グループ	破壊強度 (MPa)	破壊伸び (%)	ヤング率 (GPa)
生分解性高分子	P(3HB)	Gordeyev ら ²⁰⁾	190	54	5.6
		Schmack ら ²¹⁾	330	37	7.7
		Yamane ら ²²⁾	310	60	3.8
		本研究 ²⁴⁾	1,320	35	18.1
	ポリ乳酸 ²⁹⁾ ポリグリコール酸 ²⁹⁾		520~570 890	25~35 30	4~6 8.0
汎用高分子	ポリエチレン ²⁹⁾		400~800	8~35	3~8
	ポリプロピレン ²⁹⁾		400~700	25~60	3~10
	ポリエチレンテレフタレート ²⁹⁾		530~640	25~35	11~13
	ビニロン ²⁹⁾		400~1,000	12~26	7~10

図 4 P(3HB) の高強度・高弾性率繊維

ループとも、若干の脂質を含む P(3HB) グラニュールからの繊維化の成功例であり、残念ながら、精製した P(3HB) を用いての高強度繊維化には至っていない。不純物のない P(3HB) から高強度繊維の作製は、手術用縫合糸などの生体機能材料への利用に大いなる貢献が期待でき、いかにして純粋の P(3HB) から高強度繊維を作製するかが大きなカギである。

今回われわれは、超高分子量 P(3HB) を用い、冷延伸法を繊維の延伸加工に応用することにより、図 4 に示すように、精製した純粋の P(3HB) より高強度繊維を作製することに成功した^{23), 24)}。すなわち、熔融押出 P(3HB) を氷水中に強制的に急冷することにより非晶質繊維を作製し、氷水中で冷延伸することにより、配向非晶質繊維を得る。ついで、この配向非晶質繊維を室温でさらに延伸することにより 2 段階冷延伸された高配向非晶質繊維を得る。高配向非晶質繊維を熱処理することにより、破壊強度 1.3 GPa、破壊伸び 35%、ヤング率 18.1 GPa の生分解性および生体適合性を有する高強度繊維の作製に世界ではじめて成功した(表 1)。

高強度・高弾性率繊維の X 線繊維図において、2 回らせん構造 (α 構造)^{25)~27)} に加えて平面ジグザグ構造 (β 構造)²⁸⁾ の回折点が確認された(図 5)。延伸比の増大とともに、 β 構造の回折が強くなったことから、高延伸による破壊強度の増加は β 構造に起因すると考えられる。

図 5 P(3HB) 高強度繊維の X 線繊維図と 2 種類の分子鎖構造^{27), 28)}

図 6 P(3HB) 高強度繊維の酵素分解前 (A) と後 (B) の SEM 像

5. 高強度繊維の生分解性

生分解性ポリエステル生分解性試験評価法には、微生物由来の PHB 分解酵素を用いる酵素分解法と、土壌、堆肥中、海洋、河川などに埋設、浸漬し自然環境中に生息する微生物によって分解を行う微生物分解法がある。

高強度繊維の微生物分解を荒川河川水を用いて行ったところ、2 週間程度で BOD 生分解度が 80% に達し、28 日間試験後の重量生分解度が 100% を示したことから、高強度繊維は完全に微生物分解されることがわかった¹²⁾。図 6 に、ポリヒドロキシブチレート加水分解酵素により部分的に分解された繊維の走査型電子顕微鏡像を示す。繊維表面において、延伸方向に沿ったフィブリル状のシシと、そのシシから垂直方向に成長したラメラ結晶からなるシシカバ構造が観察された。酵素分解前後の X 線繊維図を比較すると、赤道線上の平面ジグザグ構造に由来する回折強度

が分解とともに減少した。したがって、平面ジグザグ構造のほうが2回らせん構造より分解速度が速いと考えられ、同じ化学構造を有していても、分子鎖構造により酵素分解速度を制御できるという新たな可能性を得ることができた。

6. おわりに

現在、プラスチックは石油や天然ガスなどの化石燃料を原料に、全世界で1億5,000万トン生産され、生活や産業の多くの場面で使用されている。このうち、全体あるいは一部が自然環境中に拡散するプラスチック製品を、生分解性プラスチックに代替できれば、プラスチック廃棄物による環境問題を著しく低減できると考えられる³⁰⁾。生分解性プラスチックの生産量・消費量は、使用用途、物性、社会的要求を考慮すると、全プラスチック製品の10~20%程度が今のところ現実的であると考えられる。

汎用高分子と生分解性高分子は共存することにより、人類のさらなる発展と子々孫々にまで美しい地球環境を残すという2つの大きな目的を果たすことができると考えられる。炭素物質の循環型社会を構築するには、再生可能資源を原料とした生分解性高分子の生産を第一に考えなければならぬ。いかにして再生可能資源から高分子を生み出すかが今後のもっとも大きな課題である。実際、欧米では最終製品中に再生可能資源を原料としたものを50%以上含めようという動きがあり、今後ますますこの傾向は強くなっていくものと思われる。

最後に、生分解性高分子の物性に関してであるが、今後の研究はいかにして高次構造を自由自在にコントロールできるかにかかっていると考えられる。たとえば、同じ物質でも分子鎖の立体構造がらせん構造か平面ジグザグ構造かで、破壊強度や破壊伸びは変わってくる。また、分子鎖間の距離や分子鎖の充填様式が異なれば、発生する水素結合や分子鎖間力は異なり、発現する物性も変化する。分子レベルで、生分解性高分子の高次構造をコントロールすることにより、多様な物性の要求レベルに応じることができるとともに、生分解性の速度もコントロールできると考えられる。

再生可能資源からの生分解性高分子材料の創製、有限資源のバイオリサイクル、分子レベルでの物性コントロールと、高分子科学研究者と生物科学研究者の共同作業による研究・技術開発がさらに求められる研究分野であり、21世紀に大きく発展することを期待している。

謝 辞 本研究を遂行するにあたり、共同研究者である東京工

業大学大学院総合理工学研究科の土肥義治教授、京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科先端ファイブ科学専攻の山根秀樹助教授、曙ブレーキ(株)中央研究所の青柳佳宏博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 土肥義治編：生分解性プラスチックのおはなし，日本規格協会，東京(1991)
- 2) 岩田忠久，土肥義治：繊維学会誌，**58**，11(2002)
- 3) 岩田忠久，土肥義治：コンバーテック，**2**，6(2002)
- 4) S. Kusaka, H. Abe, S. Y. Lee, Y. Doi: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 140(1997)
- 5) S. Kusaka, T. Iwata, Y. Doi: *J. Macromol. Sci.-Pure Appl. Chem.*, **35**, 319(1998)
- 6) S. Kusaka, T. Iwata, Y. Doi: *Int. J. Biol. Macromol.*, **25**, 87(1999)
- 7) T. Iwata, S. Kusaka, Y. Doi: *ACS symp. Ser.*, **764**, 67(2000)
- 8) 日下 聡：学位論文，埼玉大学大学院理学研究科(1998)
- 9) 岩田忠久，日下 聡，土肥義治：高分子加工，**48**，434(1999)
- 10) Y. Aoyagi, Y. Doi, T. Iwata: *Polym. Degrad. Stab.*, **79**, 209(2003)
- 11) T. Iwata, K. Tsunoda, Y. Aoyagi, S. Kusaka, N. Yonezawa, Y. Doi: *Polym. Degrad. Stab.*, **79**, 217(2003)
- 12) 青柳佳宏：学位論文，埼玉大学大学院理学研究科(2003)
- 13) 岩田忠久：高分子論文集，**60**，377(2003)
- 14) M. Lemoigne: *Ann. Inst. Pasteur*, **39**, 144(1925)
- 15) G. J. M. De Koning, P. J. Lemstra: *Polymer*, **34**, 4089(1993)
- 16) M. Scandola, G. Ceccorulli, M. Pizzoli: *Macromol. Chem. Rapid Commun.*, **10**, 47(1989)
- 17) 井上義夫監修：グリーンプラスチックの最新技術，シーエムシー出版，東京，2002
- 18) 福居俊昭，今中忠行監修：微生物利用の大展開，エヌ・ティ・エス出版，東京，2002，第2章，第4節
- 19) S. Y. Lee, K. M. Lee, H. N. Chang, A. Steinbüchel: *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1337(1994)
- 20) S. A. Gordeyev, Y. P. Nekrasov: *J. Mater. Sci. Lett.*, **18**, 1691(1999)
- 21) G. Schmack, D. Jehnichen, R. Vogel, B. Tandler: *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **38**, 2841(2000)
- 22) H. Yamane, K. Terao, S. Hiki, Y. Kimura: *Polymer*, **42**, 3241(2001)
- 23) 岩田忠久，土肥義治，山根秀樹：特願2002-054423(2002)
- 24) 岩田忠久，土肥義治：特願2002-054428(2002)
- 25) K. Okamura, R. H. Marchessault: "Conformation of Biopolymers," Vol. 2, Academic Press, London, 1967, p. 709
- 26) J. Cornibert, R. H. Marchessault: *J. Mol. Biol.*, **71**, 735(1972)
- 27) M. Yokouchi, Y. Chatani, H. Tadokoro, K. Teranishi, K. Tani: *Polymer*, **14**, 267(1973)
- 28) W. J. Orts, R. H. Marchessault, T. L. Bluhm, G. K. Hamer: *Macromolecules*, **23**, 5368(1990)
- 29) 未踏科学技術協会「エコマテリアル研究会」監修，教科書作製委員会編，「エコマテリアル学」，日科技連出版社，東京，2002
- 30) 土肥義治代表編集：「生分解性プラスチックハンドブック」，エヌ・ティ・エス出版，1995