〔総合論文〕

微生物産生脂肪族ポリエステルの高性能化、高次構造および生分解性

岩田 忠久

(受付 2003 年 3 月 12 日・審査終了 2003 年 4 月 10 日)

要 旨 ポリ([R]-3-ヒドロキシブチレート) (P(3HB)) は、自然環境中の微生物により糖や植物油から生合成され、熱可塑性を有する生分解性の脂肪族ポリエステルである。しかしながら、従来の P(3HB) 成形品は硬くてもろく、物性が経時劣化することから、実用化には至らなかった。今回、遺伝子組換え大腸菌を用いて超高分子量 P(3HB) を生合成することにより、これまで不可能であった P(3HB) フィルムの熱延伸を可能にした。熱延伸・熱処理により、P(3HB) フィルムの破壊強度はポリエチレンテレフタレート並にまで向上させることができた。さらに、いずれの分子量の P(3HB) においても適用できる、ガラス転移点付近での冷延伸法を開発した。冷延伸法と二段階延伸法を組み合わせることにより、破壊強度 1 GPa を超える P(3HB) 単独の高強度繊維の作製に世界で初めて成功した。得られた繊維とフィルムは、物性の経時劣化を生じないこと、および生分解性を保持していることを確認した。本報では、P(3HB) の生合成、固体構造、物性および生分解性について、超高分子量化、フィルムや繊維の冷延伸および熱延伸と二段階延伸による高強度化、高次構造、単結晶を用いた酵素分解機構を中心に総合的に論じる。

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作る方法と、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。

本報では、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

岩田忠久 (IWATA Tadahisa) (特)理化学研究所中央研究所高分子化学研究室・副主任研究員 (☎351-0198 和光市広沢 2-1)

1989 年 3 月京都大学農学部林産工学科卒業、1991 年 3 月京都大学農学研究科林産工学専攻博士前期課程修了、1992 年 8 月～1993 年 7 月フランス国立科学研究センター植物高分子研究所に留学、1994 年 3 月京都大学農学研究科林産工学専攻博士後期課程単位取得退学、京都大学博士（農学）取得、1995 年 4 月日本学術振興会 PD 特別研究員、1995 年 10 月理化学研究所基礎科学特別研究員、1996 年 10 月理化学研究所研究員、2001 年 8 月より現職。

て、筆者が行った一連のフィルム、繊維および単結晶の作製、高強度化、生分解性について、分子鎖構造および高次構造の観点から概説する。

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(3 HB)) 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熱可塑性の脂肪族ポリエステルである⁴⁾。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 (Fig. 1)。

融点 180 °C を有する熱可塑性ポリエステルである P(3 HB) を溶融した後、等温結晶化した溶融-結晶化フィルムにおいては、Fig. 2(A) に示すマルターゼクロスと消光リングを有する三次元球晶が形成される⁵⁾。この球晶は、厚さ数 nm のラメラ結晶が束となったロッド結晶が、ねじれながら三次元的に成長することにより生じ

Fig. 1. Biosynthesis and biodegradation processes of P(3 HB) materials.

Fig. 2. Optical micrographs of P(3 HB) melt-crystallized films⁶⁾: (A) three-dimensional spherulite, (B) growth-direction of lamellar crystals, (C) two-dimensional spherulite. Transmission electron micrograph and electron diffraction diagram of edge-on lamellar crystals in thin film (D).

る (Fig. 2(B)). フィルムの厚さを薄くするに伴い、ロッド結晶のねじれが抑制された Fig. 2(C) に示す二次元成長結晶が見られるようになる⁹⁾. 二次元成長結晶の表面では、ラメラ結晶が積層した様子が透過型電子顕微鏡で観察され、電子回折から分子鎖はラメラ結晶表面に対して垂直に配列していることがわかる (Fig. 2(D)).

P(3 HB) の結晶構造は、格子定数: $a=0.576$ nm, $b=1.320$ nm, c (繊維軸) $=0.596$ nm, 空間群: $P2_12_12_1$ を採り、単位格子中に 2 本の分子鎖を有し、すべての結晶軸に対し 2 回らせんの対称性を有する斜方晶系である⁷⁻⁹⁾. Fig. 3 に、P(3 HB) の結晶構造 (α 構造)⁹⁾ と 2 種類の分子鎖構造^{9), 10)} を示す. 配向結晶性フィルムや単結晶中に存在する P(3 HB) の分子鎖構造は、分子鎖軸に沿って 2 回らせんの対称性を有している.

溶融-結晶化フィルムを P(3 HB) のガラス転移点 ($T_g=4$ °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二次結晶化が生じる. この二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^{11), 12)}. たとえば、室温で 3 週間放置した P(3 HB) 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端に劣る. そのため、これまでは同じ生分解性を有するほか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¹³⁾.

3 ポリ([R]-3-ヒドロキシブチレート) の高性能化

3.1 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(3 HB) 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もろ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一つとして、高分子量化がある. そこで筆者らは、P(3 HB) 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(3 HB) を、P(3 HB) 合成菌である *Ralstonia eutropha* H 16 由来の PHB 生合成遺伝子 (*phbCAB*) を導入した組換え大腸菌 *Escherichia coli* XL 1-Blue (pSYL 105)¹⁴⁾ 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 段階分培養において、通気酸素量、かくはん速度、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¹⁵⁾. その結果、遺伝子組換え大腸菌を用いた P(3 HB) 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. Fig. 4 に、一例として 37 °C、グルコース濃度 20 g/L 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(3 HB) 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 と 4 g/L であった. 本研究で得られた P(3 HB) の絶対分子量は最大で 14×10^6 (pH 6.0) と、従来にない極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

Fig. 3. Crystal structure of P(3 HB)⁹⁾ and two types of molecular conformations (2_1 helix conformation⁹⁾ and planar zigzag conformation¹⁰⁾).

Fig. 4. Time-dependent changes in the cell dry weight (A), P(3HB) levels (B), the concentration of glucose, and the weight-average-molecular-weight (M_w) of P(3HB) (D), during the batch cultivation of *E. coli* XL 1-Blue (pSYL 105) in LB media containing 20 g/L glucose at 37 °C at a pH of (●) 6.0 or (■) 7.0^{15),18)}.

Table 1. Molecular weights of P(3HB) produced by a recombinant *E. coli* and the reproducibility of hot-drawings and cold-drawings for P(3HB) films

pH of medium	Molecular weight ($M_w \times 10^{-4}$) ^{b)}	hot-drawing ^{c)}	cold-drawing ^{d)}
6.0	1400	○	○
6.5	960	○	○
6.7	490	○	○
7.0	330	○	○
7.0	110	×	○
— a)	60	×	○

a) Produced by *Ralstonia eutropha* H 16 from butyric acid.

b) Absolute molecular weight measured by MALLS. c) Hot-drawing was applied in a silicone oil bath at 165 °C by the loosely-hanging-weights method. d) Cold-drawing was applied in ice water.

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。Table 1 に、さまざまな pH 条件下で得られた P(3HB) の絶対分子量を示す¹⁶⁾。

今回筆者らが絶対分子量 1400 万の超高分子量 P(3HB) の生合成に成功したのは、微生物が菌体内に普遍的にもつと考えられている連鎖移動剤の発生を pH を酸性側にするにより抑制したことにあると考えられる。現在、この連鎖移動剤がどのような物質であるかは不明であるが、この連鎖移動剤の濃度は菌の種類や培養

Fig. 5. Transmission electron micrograph of *E. coli* XL 1-Blue (pSYL 105) cells that accumulated ultra-high-molecular-weight P(3HB)¹⁷⁾. Scale bar represents 500 nm.

Fig. 6. Wide-angle X-ray diffraction patterns of *E. coli* XL 1-Blue (pSYL 105) cells that accumulated ultra-high-molecular-weight P(3HB) granules¹⁷⁾.

条件によって変化するものと考えられる。

Fig. 5 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 0.5~10 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ールとして蓄積されていた¹⁷⁾。菌体内に存在するグラニューール中の P(3HB) の構造を、広角 X 線回折により調べたところ、湿潤状態においては、結晶由来のピークが確認できず、非晶状態であった。ところが、菌体の乾燥が進行することに伴い、P(3HB) の結晶性は著しく増加した (Fig. 6)。このことは、P(3HB) は分子量に依存せず、非常に高結晶性の材料であることを示唆している¹⁷⁾。

3.2 熱延伸による高強度フィルムの作製と物性および構造

一般にフィルムの物性は、高温でゆっくり延伸した後、

等温結晶化することにより向上する。延伸により配向結晶化したフィルム中では分子鎖が一定方向に配列し、運動性が低下することから二次結晶化が生じず、物性の経時劣化を抑制でき、力学強度の改善も合わせて期待できる。

これまで野生株が合成した P(3 HB) では、分子量の低さと高結晶性のため延伸処理は困難であった。しかし、超高分子量 P(3 HB) から作製したフィルムにおいては、フィルムに重りを付け、融点より約 15 °C 低い 160 °C 付近のオイルバス中に 1 秒間浸して引き上げる、加重延伸法により容易に再現性よく延伸することができた (Table 1)^{16), 18)}。延伸倍率の物性に及ぼす効果を検討したところ、Fig. 7 に示すように延伸倍率の増加に伴い破壊強度は増加した。延伸倍率を 10 倍にし、100 °C で 2 時間熱処理を施したところ、破壊強度が 36 MPa から 277 MPa へと急激に増加した (Table 2)¹⁹⁾。ポリエチレンやナイロンー

Fig. 7. Mechanical properties of hot-drawn films produced from ultra-high-molecular-weight P(3 HB), as functions of draw ratio; (●) tensile strength, (▲) elongation to break and (■) Young's modulus of hot-drawn film annealed at 100 °C, and (○) tensile strength of hot-drawn film annealed at 160 °C.

6, 6 などの結晶性高分子は、高配向するとフィブリル状に配列した分子鎖のシシの部分と、そこから垂直方向に派生成長したラメラ結晶のカバブの部分により構成されるシシカバブ構造を採ることが知られている^{20)~22)}。P(3 HB) の熱延伸フィルムも同様のシシカバブ構造を内部に有していると考えられる。

一般に高温で熱処理を行い、結晶化を促進させた方が、破壊強度は向上すると考えられている。しかし、P(3 HB) においては、160 °C より 100 °C で熱処理した方が破壊強度の向上に対しては効果的であった。その原因を解明するために、小角 X 線回折と球晶成長速度を測定した。小角 X 線回折によりフィルム中のラメラ結晶の長周期を測定したところ、100 °C では 12 nm であった長周期が、160 °C では 18 nm に増大していることがわかった。P(3 HB) は、結晶化温度の上昇に伴い長周期およびラメラ厚が増大することが知られている²³⁾。よって、延伸熱処理フィルムにおいても、ラメラ厚が熱処理温度に伴い増大していると考えられる。一方、Fig. 8 の結晶化温

Fig. 8. Radial growth rate (G) of spherulites as a function of crystallization temperature (T_c) for (■) ultra-high-molecular-weight P(3 HB) ($M_w=3.72 \times 10^6$) and (●) bacterial P(3 HB) ($M_w=0.41 \times 10^6$)²⁴⁾.

Table 2. Mechanical properties of P(3 HB) films

Sample	Drawing method	Draw ratio (λ)	Tensile strength (MPa)	Elongation to break (%)	Young's modulus (GPa)
Conventional P(3 HB) ($M_w=60 \times 10^4$)	—	—	14	9	0.9
	cold-drawing	10	195	100	2.0
Ultra-high-molecular-weight P(3 HB) ($M_w=330 \times 10^4$)	—	—	36	14	1.3
	cold-drawing	10	237	112	1.5
	two-step cold-drawing ^{a)}	15(10 $\times$ 1.5)	287	53	1.8
	hot-drawing	10	277	84	2.3
	two-step hot-drawing ^{b)}	15(10 $\times$ 1.5)	388	25	2.9

^{a)} Ten times drawing was applied in ice water, and then further 1.5 times drawing was performed at room temperature. ^{b)} Ten times drawing was applied in a silicone oil bath at 165 °C, and then further 1.5 times drawing was performed at room temperature.

Fig. 9. Schematic models of the finger-joint structure of lamellar crystals in shishkebab structure of ultra-high-molecular-weight P(3 HB) films¹⁹⁾.

Fig. 10. Tensile strength of ultra-high-molecular-weight P(3 HB) two-step drawn and annealed films, as functions of second draw ratio at 25 °C. Firstly, the solvent-cast films were drawn at (●) 9 or (■) 10 times in a silicone oil bath (165 °C). Subsequently, two-step drawing at room temperature (25 °C) was applied to the hot-drawn films, which were then annealed at 100 °C for 2 h¹⁹⁾.

度と球晶成長速度の関係より、最大球晶成長速度は 80 ~ 100 °C の間であることがわかった²⁴⁾。P(3 HB) の結晶成長方向は、結晶学上の a 軸に沿っていることが知られている²⁵⁾。この球晶成長速度は、ラメラ結晶の a 軸方向への擬似的な成長速度として捉えることができる。熱延伸・熱処理フィルムにおいて、最大球晶成長速度の温度付近である 100 °C での熱処理により、カバブに相当するラメラ結晶がシシに対して垂直な a 軸方向に沿って速やかに成長したと考えられる。その結果、Fig. 9(B) に示すラメラ結晶が重なった finger-joint 構造が形成されたと考えられる。一方、160 °C で熱処理した場合、 a 軸方向に沿ったラメラ結晶の成長速度は 100 °C に比べて遅い。しかし高温での熱処理のため分子運動性は増大する。よって、 c 軸方向（延伸方向）に沿ってラメラは厚化する。しかし、ラメラ結晶が成長しぶつかり合った際、ラメラが厚いために交互に重なり合うことができず (Fig. 9(C))、破壊強度が向上しなかったと考えられる。

Fig. 11. Wide-angle X-ray diffraction diagrams of ultra-high-molecular-weight P(3 HB) films: (A) hot-drawn film at draw ratio of 10 times in a silicone oil bath and annealed at 100 °C for 2 h, and (B) two-step drawn and annealed film. Two-step drawing of 1.5 times at room temperature was applied to 10 times hot-drawn film, which was then annealed at 100 °C for 2 h. The arrow indicates the equatorial reflection derived from β -form (planar zigzag conformation)¹⁹⁾.

これらのことより、P(3 HB) フィルムの物性を向上させるには、延伸倍率を上げること、シシカバブ間のラメラ結晶の重なりを作ることが必須条件であると考えられる。

超高分子量 P(3 HB) を用い、熱延伸・熱処理を施す

Fig. 12. Schematic model by two-step drawing of P(3 HB) stretched film. The zigzag conformation (β -form) generates from amorphous regions^{(10), (19)}.

ことにより破壊強度 277 MPa, 破壊伸び 84%, ヤング率 2.26 GPa を有する高強度・高弾性率フィルムの作製に成功した。興味深いことに、熱延伸のみのフィルムでは、100% 近くも破壊伸びが残っていることがわかった (Table 2)。そこで、フィルム内の結晶相の再配向、および非晶相の分子鎖の配向を促すために二段階延伸法を試みた^{(19), (26)}。その結果、10 倍熱延伸フィルムを、室温でさらに 1.5 倍に延伸した後、熱処理を施した二段階延伸・熱処理フィルムでは、破壊強度 388 MPa, 破壊伸び 25%, ヤング率 2.94 GPa と劇的に物性が向上した (Fig. 10, Table 2)。

熱延伸・熱処理フィルムと二段階延伸・熱処理フィルムの X 線繊維図を Fig. 11 に示す。二段階延伸・熱処理フィルムの X 線繊維図におけるすべての回折点は、赤道線上に矢印で示した 1 点を除き、これまで報告されている繊維軸方向に 2 回らせんの対称性を有する α 構造で指数付けすることができた。一方、赤道線上に新たに現れた回折点は、ポリ([R]-3-ヒドロキシブチレート-co-[R]-3-ヒドロキシバレレート) の延伸フィルム⁽¹⁰⁾ や繊維⁽²⁷⁾ で報告されている回折点に一致していた。この回折点は、六方晶系を有する平面ジグザグ構造 (β 構造) に起因すると考えられている。今回の二段階延伸・熱処理フィルムにおける β 構造の発生メカニズムを Fig. 12 に示す^{(10), (19)}。二段階延伸・熱処理フィルムの X 線繊維図には、2 回らせんの分子鎖構造を有するラメラ結晶の回折が残っている。したがって、二段階延伸によって、 α 型ラメラ結晶間の非晶部に存在するフリーな分子鎖が引き延ばされることにより、平面ジグザグ構造 (β 構造) が形成されたと考えられる。この平面ジグザグ構造の形成が劇的な破壊強度の増加をもたらしたと考えられる。

二段階延伸・熱処理フィルムの物性は、同じ生分解性ポリエステルであり現在もっとも実用化の進んでいるポリ乳酸や汎用高分子である芳香族ポリエステルのポリエ

Fig. 13. Cold-drawn and annealed P(3 HB) films: (A) uniaxially oriented film, (B) X-ray fiber diagram of (A), and (C) biaxially oriented film.

チレンテレフタレート (PET) の物性と同程度かそれ以上であり、超高分子量化、熱延伸、二段階延伸、熱処理が P(3 HB) の高強度化に非常に有用な手段であることを示唆している。

3.3 冷延伸による高強度フィルムの作製と物性および構造

熱延伸は分子鎖の配向性を向上させ、強度を増大させるには非常に有用な手段である。しかし、Table 1 に示すように、熱延伸の行える P(3 HB) の分子量には制限があり、大量生産が確立されている野生株の合成する P(3 HB) には残念ながら適応できない。

そこで筆者らは、分子量に依存しない延伸方法として、冷延伸法を開発した^{(24), (28)}。P(3 HB) を完全融解した後、

ただちに T_g (4℃) 以下に強制冷却して非晶質のフィルムを作製する。この非晶質フィルムを T_g 付近で冷延伸することにより、分子量に依存することなく高配向性フィルムを作製することに成功した (Table 1, Fig. 13)。冷延伸においては、7 倍以上の延伸倍率が破壊強度の向上には必要であった。これは、低延伸倍率での冷延伸では、おもに分子鎖の滑りが生じており、分子鎖の配向がうまくいっていないことに起因する。その証拠に、Fig. 14(A) に示した 4 倍冷延伸フィルムの偏光顕微鏡写真に

Fig. 14. Optical micrographs of cold-drawn and annealed films of P(3 HB) at the draw ratio of 400% (A) and 1000% (B)²⁴⁾. The arrows indicate the draw direction.

は、小さな球晶が確認された。一方、非晶質フィルムから作製した 10 倍にまで冷延伸した高配向性フィルムは、熱処理を行うことにより形状を保持し、Table 2 に示すような高い物性を示すようになった。10 倍冷延伸フィルムの偏光顕微鏡写真において (Fig. 14(B))、延伸方向と垂直方向にラメラの重なり構造が観察された。このフィブリルとラメラ結晶によって形成されたネットワーク構造が、冷延伸による破壊強度や破壊伸びを向上させた要因であると考えられる。

さらに、この冷延伸法は、1 軸延伸だけでなく、Fig. 13(C) に示すように 2 軸延伸にも適応できた。延伸の際に不完全熔融状態にある結晶間に張力が働くことから亀裂を生じる熱延伸に対し、冷延伸は完全熔融状態から強制的に作られた非晶状態において分子鎖の配向を促す方法であり、高結晶性高分子材料には非常に有用な手段であると考えられる。

また、熱延伸と同様に、冷延伸においても二段階延伸は破壊強度を向上させるのに非常に有効であった。10 倍に冷延伸したフィルムを、室温で 1.5 倍に二段階延伸した後、熱処理を施した二段階冷延伸・熱処理フィルムの破壊強度は、287 MPa にまで向上した。X 線回折より、二段階冷延伸・熱処理フィルムにおいても平面ジグザグ構造の回折点を確認された。

本研究において得られた熱延伸、冷延伸、二段階延伸いずれの配向結晶性フィルムは、室温において 4 カ月間放置しても経時劣化が起らず、物性変化がないことを確認した。すなわち、熱延伸または冷延伸と熱処理を施した配向結晶性フィルムは、室温での長期安定性にも優れ、P(3 HB) は高強度・高弾性率・高耐久性を兼ね備えた優れた生分解性高分子材料になりうることが実証された。

3.4 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(3 HB) は、結晶化速度が遅いことや二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

Table 3. Mechanical properties of fibers processed from common and biodegradable polymers

			Tensile strength (MPa)	Elongation to break (%)	Young's modulus (GPa)
Biodegradable polymers	P(3 HB)	Gordeyev <i>et al.</i> ²⁹⁾	190	54	5.6
		Schemack <i>et al.</i> ³⁰⁾	330	37	7.7
		Yamane <i>et al.</i> ³¹⁾	310	60	3.8
		Iwata <i>et al.</i> ⁴⁶⁾	1320	35	18.1
			520~570	25~35	4~6
	Poly(lactic acid) ⁴⁵⁾		890	30	8.0
Common polymers	Poly(ethylene) ⁴⁵⁾		400~800	8~35	3~8
	Poly(propylene) ⁴⁵⁾		400~700	25~60	3~10
	Poly(ethylene terephthalate) ⁴⁵⁾		530~640	25~35	11~13
	Poly(vinyl alcohol) ⁴⁵⁾		400~1000	12~26	7~10

あった。最初に繊維化に成功したのは、Gordeyev ら²⁹⁾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 (Table 3)。最近、Schmack らは³⁰⁾, 2000~3500 m/min 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、山根らも³¹⁾, 28 m/min 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) からの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。

今回筆者らは、超高分子量 P(3HB) を用い、前述した冷延伸法を繊維の延伸加工に応用することにより、Fig. 15 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^{32), 33)}。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二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初めて成功した (Table 3)。

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) に加えて平面ジグザグ構造 (β 構造) の回折点が確認された。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。

4 ポリ([R]-3-ヒドロキシブチレート) の生分解性

4.1 フィルムの生分解性

生分解性ポリエステルの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。

超高分子量 P(3HB) のソルベントキャストフィルム、熱延伸フィルム、熱延伸・熱処理フィルムの生分解性を *Ralstonia pickettii* T1 由来の PHB 分解酵素を用いて調べたところ、ソルベントキャストフィルム > 延伸フィルム > 熱延伸・熱処理フィルムの順で分解速度は低下した (Fig. 16)^{18), 34)}。超高分子量 P(3HB) の分解速度を従来の P(3HB) のものと比較すると、P(3HB) フィルムの分解速度は、結晶化度が等しければ分子量や処理方法には依存しないことがわかった (Fig. 17)^{34), 35)}。すなわち、フィルムの結晶化度のみに分解速度は大きく依存するものと考えられる。Fig. 18 に、PHB 分解酵素により部分加水分解を受けたフィルムの走査型電子顕微鏡像を示す。フィルム表面に存在する非晶部が分解され、フィルム内部の結晶領域が現れている。とくに、熱延伸・熱処理フィルムにおいては、シシカバ構造が確認でき、結

Fig. 15. (A) P(3HB) fiber processed by cold-drawn and two-step drawn procedures, (B) scanning electron micrograph, and (C) X-ray fiber diagram.

Fig. 16. Enzymatic degradation of ultra-high-molecular-weight P(3HB) films in an aqueous solution of PHB depolymerase from *Ralstonia pickettii* T1 at 37°C: (■) solvent-cast film, (●) stretched film, and (▲) stretched-annealed film^{18), 34)}.

Fig. 17. Relation between rate of enzymatic erosion and X-ray crystallinity for (■) solvent-cast, (●) melt-crystallized, (◆) stretched, and (▲) stretched-annealed films of ultra-high-molecular-weight P(3 HB) ($M_w=5.2 \times 10^6$) and (○) melt-crystallized films of conventional P(3 HB) ($M_w=0.6 \times 10^6$)³⁴.

Fig. 18. Scanning electron micrographs of (A) melt-crystallized and (B) stretched-annealed films of ultra-high-molecular-weight P(3 HB) after partial enzymatic degradation¹⁷. The arrow indicates the draw direction.

晶部の配向性を表している。

荒川河川水を用いた微生物分解実験においては、経時的な生物化学的酸素要求量の値 (BOD 値) の変化を測定することにより、生分解度を評価した。この評価法で

Fig. 19. BOD-biodegradability curves of ultra-high-molecular-weight P(3 HB) films in Arakawa river water¹⁷.

Fig. 20. Scanning electron micrograph of P(3 HB) fiber after partial enzymatic degradation³⁶.

は、BOD 生分解度は 80% 程度で頭打ちになるが、これは微生物分解を受けたフィルムの一部が、微生物の増殖に伴い菌体成分へと変換され培養液中に固定されるためであり、BOD 生分解度 80% は完全分解を意味している。Fig. 19 に示すように、28 日間ですべてのフィルムは分解され、フィルムの重量減少量から算出した重量生分解性度は 100% であった¹⁷。冷延伸・熱処理フィルムにおいてもまったく同様の傾向を示した³⁶。すなわち、本研究で作製した P(3 HB) フィルムは、高強度、高耐久性に加え、優れた生分解性を有する高性能な生分解性高分子材料であることが実証された。

4.2 繊維の生分解性

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示された³⁶。酵素分解途中の走査型顕微鏡像を Fig. 20 に示す。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ブ構造が観察された。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。酵素分解は、繊維表面から進行することを考えると、繊維表層部分に平面ジグザグ構造が多く存在すると考えられる。

4.3 単結晶の酵素分解機構

高分子物質には大きく分けて結晶領域と非晶領域が存在し、単結晶は材料中の結晶領域の一つを取り出したものと考えることができる。高分子を稀薄溶液から結晶化させると、厚さが10 nm程度の薄いラメラ結晶が電子顕微鏡で観察される。単結晶の構造や諸物性を解明することにより得られる知見は、高分子材料の結晶領域の構造や性質を理論付ける上において重要な役割を果たすものと考えられる。

Fig. 21に、クロロホルム/メタノールの希薄溶液から等温結晶化により生成したP(3HB)単結晶の透過型電子顕微鏡像と電子回折図を示す³⁷⁾。単結晶の電子回折図における各回折点から得られた面間隔値が、配向結晶性フィルムのX線繊維図(Fig. 11)から得られている面間隔値と一致することから、単結晶はフィルム内の結晶領域を反映していると考えられる。単結晶は、一つの凝集核を中心とし、幅1~3 μm のラメラ状結晶である。原子間力顕微鏡により測定された単結晶の厚さが約5 nmであること、ポリエチレン修飾を施したP(3HB)単結晶表面において長軸に対して垂直にポリエチレンの縞模様が確認できることから(Fig. 21(C))、単結晶表面で分子鎖の折れ曲がり規則正しく生じていると考えら

れる。また、結晶の成長方向が電子回折図の a 軸と一致していることから、単結晶中に生じている分子鎖の折れ曲がり a 軸に沿って生じていると考えられる^{37), 38)}。

P(3HB)単結晶の酵素による吸着および分解機構を、活性汚泥より単離された*Ralstonia pickettii* T1由来のPHB分解酵素³⁹⁾を用い、視覚的見地から分子論的に解明した透過型電子顕微鏡像をFig. 22に示す。PHB分解酵素は、高分子鎖を切断する触媒ドメイン、基質に吸着する吸着ドメイン、両者を結ぶリンカードメインを有する多機能酵素である。免疫電子顕微鏡法により酵素の単結晶表面への吸着を可視化したところ(Fig. 22(A))、単結晶表面に対する酵素の吸着には、明確な位置的特異性は確認されず、結晶表面全体に酵素が吸着している様子が観察された⁴⁰⁾。

酵素分解過程の電子顕微鏡写真では、Fig. 22(B)に示すように単結晶が周囲から分解され小さくなっていくとともに単結晶の長軸に平行な割れ目が確認された。また、原子間力顕微鏡を用いて酵素分解の過程を詳細に観察したところ、単結晶の長軸に垂直方向から分解が進行したことにより生じたと思われる結晶の小さなフラグメントが確認された(Fig. 22(C))⁴¹⁾。しかしながら、酵素分解後の単結晶の厚さおよび分子量においては、分解前とほとんど変化が見られなかった。さらに、酵素分解途中の単結晶表面にポリエチレンを真空蒸着したところ、酵素分解前と同じように結晶表面に分子鎖の折れ曲がり構造を示唆するポリエチレンの縞模様が確認された⁴²⁾。以上のことから、酵素による単結晶の分解は、酵素の吸着が結晶中の分子鎖の運動性を向上させる何らかの要因を果

Fig. 21. (A) Transmission electron micrograph of solution-grown single crystals of P(3HB), (B) selected-area electron diffraction diagram, (C) P(3HB) single crystal decorated with polyethylene, and (D) schematic display of P(3HB) chain-folded lamellar crystal.

Fig. 22. (A) Visualization of the adsorption of an extracellular PHB depolymerase purified from *Ralstonia pickettii* T 1 to P(3 HB) single crystal by an immuno-gold labeling technique (the black dots indicate the adsorption position of enzymes), (B) electron micrograph of P(3 HB) single crystal after partial enzymatic degradation, (C) atomic force micrograph of P(3 HB) single crystal during enzymatic degradation, and (D) schematic display of the stages of adsorption and degradation of P(3 HB) single crystals with extracellular PHB depolymerase. The orthogonal a , b and c arrows are the unit cell directions of P(3 HB). The direction of chain-folding is parallel to the long axis of the single crystal, that is, the crystallographic a axis. The enzymatic degradation of P(3 HB) single crystal progresses from crystal edges and ends rather than from the chain-folding surface of crystal, in spite of the homogeneous adsorption of enzyme molecules on the crystal surface by substrate-binding domain.

たし、その結果として運動性の高まった分子鎖が結晶中から露出し、結晶は側面および分子鎖充填の弱い領域から酵素により分解されると考えられる。これらの実験結果をもとに考えられる酵素分解モデルを Fig. 22(D) に示す⁴³⁾。結晶の分解が側面から優先的に進行するという知見は、同じ結晶化度を有する材料でも微結晶の量（結晶側面の量）により分解速度を制御できることを意味している。フィルムの結果を合わせると、材料の分解性は結晶化度と微結晶量でコントロールすることが可能であると考えられる。

5 おわりに

本報では、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)に焦点を当て、フィルム、繊維および単結晶の作製、高性能化、高次構造、生分解性について最近の筆者の研究を概説した。

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1億5000万トン生産され、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、本報で概説した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⁴⁴⁾。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二つの大きな目的を果たすことができると考えられる。そのためには、汎用高分子の原料となる化石燃料の使用を極力控え、高分子材料を酵素などの生物学的な手法によって低分子量の原材料にまで戻す技術確立が必要がある。穏和な生物学的条件による「バイオリサイクル」が確立すれば、新たな化石燃料を使用することなく、常に高物性・高品質の高分子材料が得られることになる。筆者は、ポリエチレンやポリプロピレンなどの汎用高分子を低分子量モノマーにまで分解する「人工酵素の開発」が必要になると考えている。そのためには、セルラーゼやPHBデポリメラーゼなどの微生物が分泌する高分子加水分解酵素の高次構造を早急に解明し、データを蓄積する必要がある。

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当たり、一貫してご指導いただきました東京工業大学大学院総合理工学研究科の土肥義治教授、共同研究者である京都工芸繊維大学大学院先端ファイブロ科学研究科の山根秀樹助教授、曙ブレーキ(株)中央研究所の日下聡博士、青柳佳宏博士に深く感謝いたします。本研究は、科学技術振興事業団の戦略的発展研究ならびに文部科学省の科学研究費補助金(基盤研究B(展開))のもと推進している研究である。

文 献

- 1) “生分解性プラスチックのおはなし”, 土肥義治編, 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) M. Lemoigne, *Ann. Inst. Pasteur*, **39**, 144 (1925).
- 5) 岡村圭造, 学位論文, State University of New York, Syracuse, N. Y. (1967).
- 6) H. Abe, Y. Kikkawa, T. Iwata, H. Aoki, T. Akehata and Y. Doi, *Polymer*, **41**, 867 (2000).
- 7) K. Okamura and R. H. Marchessault, “Conformation of Biopolymers”, **2**, Academic Press, London (1967), p. 709.
- 8) J. Cornibert and R. H. Marchessault, *J. Mol. Biol.*, **71**, 735 (1972).
- 9) M. Yokouchi, Y. Chatani, H. Tadokoro, K. Teranishi and K. Tani, *Polymer*, **14**, 267 (1973).
- 10) W. J. Orts, R. H. Marchessault, T. L. Bluhm and G. K. Hamer, *Macromolecules*, **23**, 5368 (1990).
- 11) G. J. M. De Koning and P. J. Lemstra, *Polymer*, **34**, 4089 (1993).
- 12) M. Scandola, G. Ceccorulli and M. Pizzoli, *Macromol. Chem. Rapid Commun.*, **10**, 47 (1989).
- 13) “グリーンプラスチックの最新技術”, 井上義夫監修, シーエムシー出版, 東京 (2002).
- 14) S. Y. Lee, K. M. Lee, H. N. Chang and A. Steinbüchel, *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1337 (1994).
- 15) S. Kusaka, H. Abe, S. Y. Lee and Y. Doi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 140 (1997).
- 16) S. Kusaka, T. Iwata and Y. Doi, *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.*, **35**, 319 (1998).
- 17) S. Kusaka, T. Iwata and Y. Doi, *Int. J. Biol. Macromol.*, **25**, 87 (1999).
- 18) T. Iwata, S. Kusaka and Y. Doi, “Polymer from renewable resources: biopolyesters and biocatalysis”, C. Scholz and R. A. Gross eds., *ACS Symp. Ser.*, **764**, American Chemical Society, Washington, DC (2000), pp. 67–76.
- 19) Y. Aoyagi, Y. Doi and T. Iwata, *Polym. Degrad. Stab.*, **79**, 209 (2003).
- 20) J. A. Odell, D. T. Grubb and A. Keller, *Polymer*, **19**, 617 (1978).
- 21) E. H. Andrews, *Proc. Roy. Soc., London, A* **277**, 562 (1964).
- 22) A. J. Pennings and A. M. Kiel, *Kolloid Z. Z. Polym.*, **205**, 160 (1965).
- 23) H. Abe, Y. Doi, H. Aoki and Y. Doi, *Macromolecules*, **31**, 1791 (1998).
- 24) T. Iwata, K. Tsunoda, Y. Aoyagi, S. Kusaka, N. Yonezawa and Y. Doi, *Polym. Degrad. Stab.*, **79**, 217 (2003).
- 25) P. J. Barham, A. Keller and E. L. Otun, *J. Mater. Sci.*, **19**, 2781 (1984).
- 26) 岩田忠久, 土肥義治, 青柳佳宏, 特願 2002-123347 (2002).
- 27) T. Yamamoto, M. Kimizu, T. Kikutani, Y. Furuhashi and M. Cakmak, *Int. Polym. Process.*, **XII**, 29 (1997).
- 28) 岩田忠久, 土肥義治, 特願 2002-044513 (2002).
- 29) S. A. Gordeyev and Y. P. Nekrasov, *J. Mater. Sci. Lett.*, **18**, 1691 (1999).
- 30) G. Schmack, D. Jehnichen, R. Vogel and B. Tandler, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **38**, 2841 (2000).
- 31) H. Yamane, K. Terao, S. Hiki and Y. Kimura, *Polymer*, **42**, 3241 (2001).
- 32) 岩田忠久, 土肥義治, 山根秀樹, 特願 2002-054423 (2002).
- 33) 岩田忠久, 土肥義治, 特願 2002-054428 (2002).
- 34) 日下 聡, 学位論文, 埼玉大学大学院 (1998).
- 35) 岩田忠久, 日下 聡, 土肥義治, 高分子加工, **48**, 434 (1999).
- 36) 青柳佳宏, 学位論文, 埼玉大学大学院 (2003).
- 37) T. Iwata, Y. Doi, K. Kasuya and Y. Inoue, *Macromolecules*, **30**, 833 (1997).
- 38) C. Birley, J. Briddon, K. E. Sykes, P. A. Barker, S. J. Organ and P. J. Barham, *J. Mater. Sci.*, **30**, 633 (1995).
- 39) T. Tanio, T. Fukui, Y. Shirakura, T. Saito, K. Tomita, T. Kaiho and S. Masamune, *Eur. J. Biochem.*, **124**, 71 (1982).
- 40) T. Iwata, Y. Doi, T. Tanaka, T. Akehata, M. Shiromo and S. Teramachi, *Macromolecules*, **30**, 5290 (1997).
- 41) T. Murase, Y. Suzuki, Y. Doi and T. Iwata, *Biomacromolecules*, **3**, 312 (2002).
- 42) T. Iwata, M. Shiromo and Y. Doi, *Macromol. Chem. Phys.*, **203**, 1309 (2002).
- 43) T. Iwata and Y. Doi, *Macromol. Chem. Phys.*, **200**, 2429 (1999).
- 44) “生分解性プラスチックハンドブック”, 土肥義治代表編, エヌ・ティ・エス, 東京 (1995).
- 45) “エコマテリアル学”, 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, 日科技連出版社, 東京 (2002).
- 46) T. Iwata, Y. Aoyagi, H. Yamane and Y. Doi, in preparation.

[Comprehensive Papers]**High-Functionability, Highly-Ordered Structure and Biodegradability of Biosynthesized Aliphatic Polyesters**Tadahisa IWATA^{*1}^{*1}*Polymer Chemistry Laboratory, RIKEN Institute (Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan)*

Poly([R]-3-hydroxybutyrate) (P(3 HB)) is accumulated by a wide variety of microorganisms as intracellular carbon and energy material, and is extensively studied as a biodegradable and biocompatible thermoplastic. However, the mechanical properties of P(3 HB) homopolymer films markedly deteriorate by secondary crystallization. Recently, we succeeded in obtaining strong P(3 HB) films and fibers by cold-drawing and two-step drawing procedures. The tensile strength of P(3 HB) fiber is over 1.3 GPa. The improvement of mechanical properties is due not only to the orientation of molecular chains but also to the generation of a zigzag conformation and network structure formed by fibril and lamellar crystals. The mechanical properties remained unchanged for 6 months. These strong films and fibers were completely degraded in natural river freshwater within 4 weeks. The rate of erosion of P(3 HB) films was controlled by the crystallinity of materials. P(3 HB) single crystals were prepared from a dilute solution by isothermal crystallization. Adsorptions of PHB depolymerase on P(3 HB) single crystals were examined using an immuno-gold labeling technique. The results demonstrated a homogeneous distribution of enzymes on the surface of crystals. Enzymatic degradation of single crystals progressed from the edge of the crystals, or along their long axis while making small fragments.

KEY WORDS Poly([R]-3-hydroxybutyrate) / Ultra-High-Molecular-Weight / Hot-Drawing / Cold-Drawing / Two-Step Drawing / High-Ordered Structure / Planar Zigzag Conformation / Mechanical Properties / Single Crystals / Biodegradability /

(Received March 12, 2003; Accepted April 10, 2003)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **60**(8), 377—390 (2003)]