

「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力
強化と生産物活用のための基盤技術の創出」
平成24年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

田口 精一

北海道大学大学院工学研究院・教授

植物バイオマス原料を利活用した微生物工場による
新規バイオポリマーの創製および高機能部材化

§1. 研究実施体制

(1) 田口グループ

- ① 研究代表者: 田口 精一 (北海道大学大学院工学研究院、教授)
- ② 研究項目
 - ・多元ポリ乳酸 P(LA-co-3HB)の微生物合成系の構築
 - ・P(LA-co-3HB)合成大腸菌の培養工学的検討
 - ・各種 P(LA-co-3HB)の基礎物性解析
 - ・植物バイオマスからのポリマー合成一貫プロセスの開発(追加検討項目)

(2) 柘植グループ

- ① 主たる共同研究者: 柘植 丈治 (東京工業大学大学院総合理工学研究科、准教授)
- ② 研究項目
 - ・ホモ PHA 生産性の向上
 - ・ホモ PHA の種類拡充

(3) 岩田グループ

- ① 主たる共同研究者: 岩田 忠久 (東京大学大学院農学生命科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・多元ポリ乳酸及びホモ PHA の基礎物性解析
 - ・ポリ乳酸に対する結晶核剤効果の検討
 - ・多元ポリ乳酸及びホモ PHA に対する結晶核剤効果の検討
 - ・中鎖 PHA の結晶構造解析(追加検討項目)

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

・多元ポリ乳酸 P(LA-co-3HB)の微生物合成系の構築

田口グループは、グルコースを炭素源とした大腸菌での P(LA-co-3HB)コポリマー合成系の構築を進展させた。乳酸重合酵素は、*Pseudomonas* sp. 61 由来の PHA 重合酵素の改変体 (STQK 二重変異)を使用し、D体乳酸合成量の異なる数種の大腸菌株にモノマー供給系酵素と一緒に遺伝子導入した。特にギ酸合成経路遮断株 (JW0885)では、好氣的培養条件で良好にポリマー合成できることがわかった。現在、その再現性を確認している。

・P(LA-co-3HB)合成大腸菌の培養工学的検討

上記項目の成果に基づき、JW0885株を用いて特に通気度を精密制御することで、乳酸分率が数%から 50%以上の幅で制御されたポリマーサンプルを安定的に回収できる技術基盤を確立しつつある。今後は、培養液あたり 5g/L 以上のポリマー生産を目指す。

・各種 P(LA-co-3HB)の基礎物性解析

乳酸分率 29%からなる二元コポリマーの熱的性質として、ガラス転移温度が P(3HB)ホモポリマーとポリ乳酸との中間を示し、機械的性質としてヤング率と破壊伸びが向上し、硬質の両ホモポリマーと比べて柔軟性が増大することが分かった。詳細は、岩田グループとの共同で進めている。しかし、乳酸分率の向上とともに分子量が低下することがわかり、今後解決すべき課題である。



乳酸コポリマーのフィルム



乳酸コポリマーフィルムの延伸

・植物バイオマスからのポリマー合成一貫プロセスの開発(追加検討項目)

当初の計画を早めて着手した。粉碎稲ワラを脱リグニン処理して得たホロセルロースを、セルラーゼにより加水分解し、グルコースとキシロースが主成分の混合糖化液を調製した。この混合糖化液を炭素源に組換え大腸菌で P(3HB)ホモポリマーが生産できた。その生産能力は、同組成で混合した純粋糖液と同程度であることが分かった。以上のことから、植物バイオマスからポリマー合

成までの一貫プロセスの基本形を構築できた。

・ホモ PHA 生産性の向上

遺伝子組換え大腸菌の菌株、発現プロモータ、重合酵素遺伝子の組み合わせを検討し、ホモ PHA のさらなる生産性の向上について検討を行った。また、培養スケールを大きくし、生産量の向上についても検討を行った。これらの結果に基づいて、生産条件を最適化し、ポリヒドロキシデカン酸(C10 ホモポリマー)の合成および精製を行った。精製ポリマーは、立体構造解析に供するために、東京大学の岩田グループに提供した。今後は、C6 および C8 ホモポリマーについても合成および精製を行う予定である。一方で、ホモ PHA の分子量の向上を目指して、高分子量 PHA を合成する大腸菌の代謝解析を行い、高分子量化は重合酵素の発現量に起因していることがわかった¹⁾。

・ホモ PHA の種類拡充

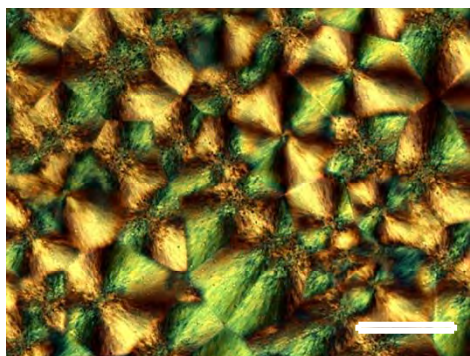
C12 以上のホモポリマーを単一組成で合成すべく、脂肪酸酸化経路の一部強化について検討を進めている。現在のところ、第二成分が 5 mol%程度導入されているが、1 mol%以下になるように条件の検討を行う。また、大腸菌以外で、組成の単一化および生産性の向上が可能な宿主を探索する。

・多元ポリ乳酸及びホモ PHA の基礎物性解析

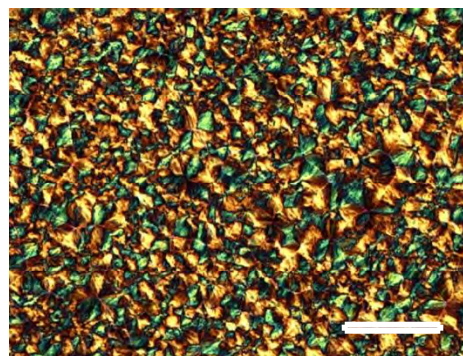
北海道大学・田口研究室で生合成された P(LA-co-3HB)コポリマーのガラス転移点・結晶化温度・融点などの熱的性質、ソルベントキャストフィルム作製条件の検討、フィルムの光透過率、反射型X線による分子鎖配列の検討、破壊強度・破壊伸びなどの機械的性質を測定した。今後も生合成される様々な P(LA-co-3HB)コポリマーの基礎物性を解析し、有用ポリマー選別の指標とする。

・ポリ乳酸に対する結晶核剤効果の検討

北海道大学・田口研究室で生合成される P(LA-co-3HB)コポリマーは、これまで市場で実用部材化が進んでいるポリ(L-乳酸)(PLLA)の光学異性体であるポリ(D-乳酸)(PDLA)である。これまで東京大学で開発したキシランエステル誘導体は、PLLA に対し効果的な結晶核剤効果を示すことがわかっている。そこで、本年度はPLLAに対する更なる詳細な検討²⁾と PDLA に対して同様の効果が出るか否かの検討を行った。その結果、PLLA に対してよりもさらに優れた核剤効果を示すことがわかった。



PDLA



PDLA+1% xylan butyrate

・多元ポリ乳酸及びホモ PHA に対する結晶核剤効果の検討

前項目の通り、キシランエステル誘導体が PDLA に対して有効であることが明らかになったので、多元ポリ乳酸及びホモ PHA に対しても有効であるかの検討を始めた。現在、大量のキシランエステル誘導体を合成中で、平成 25 年度以降に詳細な検討に入る予定である。

・ホモ PHA の結晶構造解析(追加検討項目)

東京工業大学で生合成されたホモ中鎖 PHA の一つである C10 ポリマーの配向結晶性フィルムを作製し、大型放射光施設で広角および小角 X 線回折を行った。分解能の高い X 線繊維図を得ることが出来、現在、三次元結晶構造解析を遂行中である。今後は、C6、C8 ポリマーと種類を増やし、順次構造解析を行い、側鎖の長さや構造および物性の相関を解明する予定である。



配向結晶性フィルムの広角 X 線繊維図と分子鎖構造

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. A. Hiroe, K. Ushimaru, and T. Tsuge, “Characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase derived from *Delftia acidovorans* DS-17 and the influence of PHA production in *Escherichia coli*”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 115, pp. 633-638, 2013 (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.12.015).
2. N. G. Fundador, Y. Enomoto-Rogers, A. Takemura, and T. Iwata“, Xylan esters as bio-based nucleating agents for poly(L-lactic Acid)”, *Polymer Degradation and Stability*, vol. 98, pp. 1064-1071, 2013 (DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.01.010).