

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25620168

研究課題名(和文) 超高分子量バイオポリエステルを生合成と超延伸による高強度・高弾性率繊維の開発

研究課題名(英文) Synthesis of ultra-high-molecular-weight microbial polyesters and development of high-tensile-strength and high-modulus fibers by ultra-stretching technique

研究代表者

岩田 忠久 (Iwata, Tadahisa)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30281661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超高分子量バイオポリエステルを生合成するとともに、新たに開発した冷延伸・二段階延伸法、微結晶核延伸法、冷延伸・中間熱処理法などの延伸法を用いて、破壊強度1GPa以上の生分解性を有するバイオベースプラスチック繊維の開発に成功した。また、通常分子量のバイオポリエステルに超高分子量バイオポリエステルを少量添加することにより、超高分子量からのみで作製した繊維以上の破壊強度を有する高強度繊維の作製に成功した。さらに、一部の繊維にはミクロンサイズの空孔が存在することがわかり、空孔に薬剤を埋入することにより長期に薬剤をゆっくりと徐放できる高機能性繊維の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study are the synthesis of ultra-high-molecular-weight microbial polyesters (UHMW-PHA) by using a recombinant *E. coli* and the development of new drawing techniques to process the high tensile strength and high modulus fibers. High tensile strength and high modulus fibers with tensile strength = 1.3 GPa, elongation at break = 35%, and Young's modulus = 18 GPa were succeeded by the combination of cold-drawing and two-step drawing methods. When added the normal molecular weight PHA into UHMW-PHA, the mechanical properties of fibers was further improved. Furthermore, the fibers processed by one-step drawing method after partially growing the crystal nuclei have micro-pores into fibers. Furthermore, the porous fibers were impregnated with an antibiotic drug and the enzymatic degradation and controlled drug release tests were carried out by using an extracellular PHB depolymerase purified from *Ralstonia pickettii* T1 is also addressed.

研究分野：高分子材料学

キーワード：バイオベースプラスチック 生分解性プラスチック 微生物産生ポリエステル フィルム 繊維 酵素  
分解 超高分子量ポリエステル 生合成

1. 研究開始当初の背景

近年、プラスチック廃棄物による環境破壊、地球温暖化、化石資源の枯渇など、高分子材料が関係する地球環境と資源・エネルギーに対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おいて、「環境に優しい高分子の創成と高機能化」が世界的な課題となっている。

現在、世界各国で研究および開発が進められている環境に優しいプラスチックは、大きく分けて2つのカテゴリーに分類できる。一つは、環境中の微生物の分泌する分解酵素により低分子量化合物に分解された後（一次分解、酵素分解）、微生物体内に取り込まれ二酸化炭素と水にまで完全に分解される（完全分解、微生物代謝）、生分解性プラスチックである。もう一つは、再生可能資源であるバイオマスを原料として生産されたバイオマスプラスチック（又はバイオベースプラスチック）である。

現在、バイオマスから生産され、環境中で分解する生分解性バイオマスプラスチックの開発が望まれている。特に、実用に耐える高強度な生分解性バイオマスプラスチック繊維の開発が強く期待されている。

2. 研究の目的

自然界に存在する多くの微生物は、植物がデンプンを貯蔵炭水化物として蓄積するのと同じように、ポリヒドロキシアルカノエート(PHA)と呼ばれるポリエステルをエネルギー貯蔵物質として体内に蓄積する。このポリエステルは、微生物が飢餓状態に陥ると、体内に持つ分解酵素によって分解されエネルギーとなることから、ちょうど動物の脂肪に相当する。図1は、ポリエステル（白い部分）を乾燥重量当たり 86%にまで体内に蓄積した微生物の電子顕微鏡写真である。

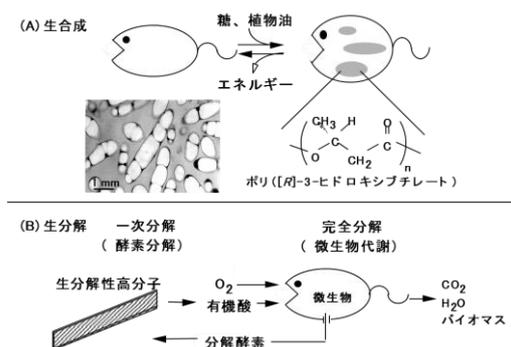


図1. 微生物産生ポリエステルの

(A)生合成と(B)生分解。

写真は、80%以上のポリエステルを蓄積した遺伝子組換え大腸菌の透過型電子顕微鏡像 (図中の白い部分が蓄積したポリエステル)

微生物産生ポリエステルは、1925年にフランス・パスツール研究所の Lemoigne 博士に

より微生物培養中に発見され、光学的に100%R体の規則性を有する3-ヒドロキシブタン酸が直鎖状につながったポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート](P(3HB))である<sup>3)</sup>。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、有機酸、炭酸ガスなどの炭素源から合成されるバイオマスプラスチックであり、環境中の他の微生物が分泌する分解酵素によって完全に分解される生分解性プラスチックでもある(図1)。

微生物産生ポリエステルは、バイオマスから生産され、環境中で分解される優れた性質を有しているが、硬くてもろいことが物性上の大きな欠点である。また、これまで繊維への成型加工例はない。

本研究では、遺伝子組換え大腸菌を用いて、超高分子量微生物産生ポリエステルを生合成し、新たな成型加工技術を開発することにより高強度繊維を作製するとともに、その応用および生分解性に関する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 超高分子量 P(3HB)の生合成

自然環境中に存在する野生のポリエステル合成菌が生産する野生株産生 P(3HB)の重量平均分子量は、約60万程度である。P(3HB)合成菌である *Ralstonia eutropha* H16 由来の PHB 生合成遺伝子(*phbCAB*)を導入した組換え大腸菌 *Escherichia coli* XL1-Blue (pSYL105)を用い、炭素源としてグルコースを用い、Luria-Bertani 培地中、2段階培養において、通気酸素量、攪拌速度、炭素源濃度、培地温度、培地の pH など様々な培養条件を検討した。

3-2. 冷延伸・二段階延伸法による超高分子量 P(3HB)からの高強度繊維作製

超高分子量 P(3HB)を用いて、新たな延伸法を開発することにより、高強度・高弾性率繊維の作製を行った。まず、溶融押出した P(3HB)を氷水中に急冷し、非晶質繊維を作製した。次いで、この非晶質繊維を、氷水中で約6~12倍に冷延伸することにより、配向非晶質繊維を作製した。さらに、この配向非晶質繊維を室温で約6~8倍に延伸することにより、冷延伸・二段階延伸された高配向非晶質繊維を得た。

3-3. 微結晶核延伸法による野生株産 PHA からの高強度繊維作製

遺伝子組み換え大腸菌を用いて生合成した超高分子量 P(3HB)を用いて高強度繊維の作製には成功したが、これでは汎用性に乏しく、コストパフォーマンスにも欠ける。そこで、前述の冷延伸・二段階延伸法を改良することにより、通常分子量(60万程度)の野生株産生 P(3HB)からでも高強度繊維を作製できる微結晶核延伸法を開発した。微結晶核延伸法とは、急激な結晶化を抑制しながら微小な結晶核を形成させ、その結晶核を起点と

して分子鎖を高配向させる延伸方法である。まず、熔融—急冷によって非晶質繊維を作製し、これを氷水浴中にて一定期間静置することで、微結晶核を形成させ、その後、室温で延伸することにより、分子量に依存することなく、高配向繊維の作製を可能にした。

#### 3-4. 繊維の解析

作製した繊維の内部構造をX線回折およびSEMを用いて詳細に解析した。

#### 3-5. 薬物徐放性評価

薬剤として抗生物質の一つであるバンコマイシン塩酸塩、溶媒としてジメチルスルホキシドを用いて、含浸条件(温度/時間)を変えて繊維への薬剤溶液の浸透性を観察した。さらに、酵素分解を行い薬物徐放性の評価も併せて行った。

### 4. 研究成果

#### 4-1. 超高分子量 P(3HB)の生合成

遺伝子組み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分かった。培養時の pH を酸性側にシフトすることにより、重量平均分子量 500-2000 万を有する超高分子量 P(3HB)の生合成に成功した (図 2)。これは、分子量の増大を抑制する因子である連鎖移動剤の発生を、培地の pH を酸性側にシフトしたことにより抑制できたためと考えられる。

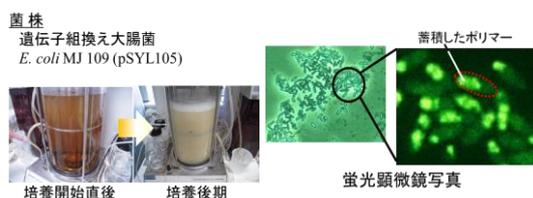


図 2. 超高分子量 PHA の培養

#### 4-2. 冷延伸・二段階延伸法による超高分子量 P(3HB)からの高強度繊維作製

50 倍以上に延伸された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。

#### 4-3. 微結晶核延伸法による野生株産 PHA からの高強度繊維作製

微結晶核延伸法によって、市販の P(3HB)からでも破壊強度 740 MPa を有する高強度繊維を得ることができた。

この微結晶核延伸法は、P(3HB)共重合体にも有効であった。P(3HB-co-3HV)は、これまでいくつか繊維化の報告例はあるが、破壊強度は 200 MPa 程度と低いものであった。しかし、今回我々が開発した微結晶核延伸法を P(3HB-co-3HV)に適用することで、低分子量である市販の P(3HB-co-3HV)ではこれまで得ることができなかった、破壊強度 1.3 GPa と

いう高強度繊維の作製に成功した。この微結晶核延伸法は、微生物産生ポリエステルだけでなく、他の生分解性ポリエステルの繊維化にも適用でき、簡便に高強度繊維を作製できる技術として期待できる。

#### 4-4. 繊維の解析

微結晶核延伸法で作製した微生物産生ポリエステル繊維の小角X線回折を撮影すると、通常の繊維で確認されるラメラ結晶の周期構造に由来する子午線方向の回折は観察されず、赤道線上に大きなストリーク回折が見られた。このストリークは繊維の内部構造に由来するものと考え、繊維断面の SEM 観察を行ったところ、図 3 に示すように、繊維内部に無数の小さな細孔 (サブミクロンポア) が存在することがわかった (平均ポアサイズ=1.74 $\mu$ m)。さらに、繊維軸に平行に切断した SEM 写真より、この細孔は三次元的につながっていることも分かった。また、微結晶核形成時間を変えることにより、ポアサイズも制御できることも可能である。これまで繊維の中心に空間が存在する中空繊維は様々なポリマーで開発され、多くのすばらしい機能を発現しているが、本繊維のように無数のサブミクロンポアが繊維中を貫通している例は初めてである。

微結晶核延伸法で作製した高強度繊維の繊維断面積に対するポアの存在率を測定すると約 50%であった。このポアの存在率を考慮して強度を再計算すると、微生物産生ポリエステルの破壊強度は実測値の 2 倍以上となることがわかった。すなわち、微生物産生ポリエステル繊維は更なる高強度化が可能であることを示唆している。さらに、繊維軸方向にきれいに入ったポアにより、繊維自体の重量が約半分になっていると考えられる。考え方を変えれば、軽量高強度繊維の作製に成功したともいえ、高強度を保ちながら軽量化が必要な分野で本繊維の利用が期待できる。

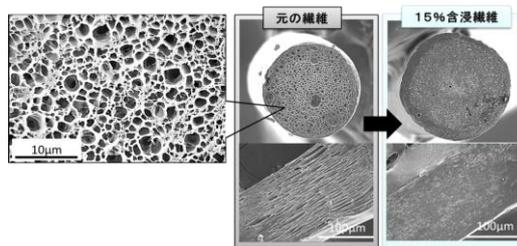


図 3 マイクロポーラス繊維の SEM 像  
繊維軸方向に垂直な切断面 (中央、上) とその拡大図 (左)、繊維軸方向に平行な切断面 (中央、下)、15% のバンコマイシンを含浸させた後、乾燥させた繊維の SEM 像: 繊維軸方向に垂直な切断面 (右上) と平行な切断面 (右下)

#### 4-5. 薬物徐放性評価

ポーラス繊維への薬剤溶液の浸透を光学顕微鏡で観察すると、含浸温度を 80  $^{\circ}$ C まで

高くすることにより最大 15 % の薬剤溶液の含浸が可能になった。また、薬剤含浸後の繊維中央部の断面を SEM で観察すると、薬剤濃度に比例して薬剤の浸透量が上昇し、繊維のポア内に薬剤粒子が詰まっている様子が観察できた(図 3)。

図 4 (上) は、薬剤を含有した繊維に対して PHB 分解酵素を作用させ、繊維が徐々に分解するに伴い、繊維内部から放出された薬剤の量を酵素分解時間に対してプロットした図である。また、図 4 (下) は酵素分解途中における繊維の形態を SEM により観察した像である。繊維が時間と共に表面から分解され、それに伴い薬剤をゆっくりと長時間に亘って放出させることに成功した。また、繊維が完全分解した後の酵素溶液を用いて抗菌活性試験を行ったところ、繊維から放出された薬剤は、失活や分解することなく抗菌活性を保持していることが明らかになった。

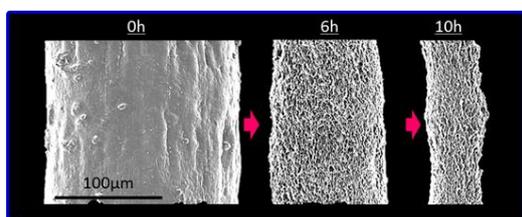
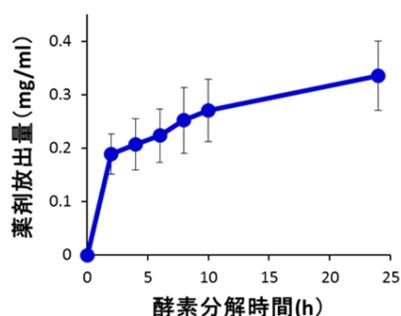


図 4 (上) 酵素分解過程における繊維からの薬剤放出量と (下) 酵素分解過程における繊維の SEM 像: 左から酵素分解前、6 時間および 10 時間酵素分解後

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

原著論文

1. Properties and enzymatic degradation of poly(acrylic acid) grafted polyhydroxyalkanoate films by plasma-initiated polymerization: Jiaqi Zhang, Kenichi Kasuya, Akio Takemura, Akira Isogai, and Tadahisa Iwata; *Polymer Degradation and Stability*, **98**, 1458-1464 (2013).
2. Transition of Spherulite Morphology in a Crystalline/Crystalline Binary Blend of Biodegradable Microbial Polyesters: Taizo Kabe, Tomoko Sato, Ken-ichi Kasuya, Takaaki Hikimae, Masaki Takata, and

Tadahisa Iwata; *Polymer*, **55**, 271-277 (2014).

3. Crystallization behaviors of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate]/polyethylene glycol graft TEMPO-oxidized cellulose nanofiber blends : Jiaqi Zhang, Hidetugu Fujizawa, Akira Isogai, Takaaki Hikima, Masaki Takata, Tadahisa Iwata; *Polymer Degradation and Stability*, **110**, 529-536 (2014).
4. High tensile strength fiber of poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate] processed by two-step drawing with intermediate annealing: Taizo Kabe, Chizuru Hongo, Takaaki Hikima, Masaki Takata, and Tadahisa Iwata; *Journal of Applied Polymer Science*, **132**, 41258-41265 (2015).
5. Investigating thermal properties of and melting-induced structural changes in cold-drawn P(3HB) films with  $\alpha$ - and  $\beta$ -structures using real-time X-ray measurements and high-speed DSC: Taizo Kabe, Toshihisa Tanaka, Hironori Marubayashi, Takaaki Hikima, Masaki Takata, Tadahisa Iwata; *Polymer*, **93**, 181-188 (2016).

総説

1. 微生物産生ポリエステルの高性能化を目指して: 岩田忠久; 日本結晶学会, **55**, 188-196 (2013).
2. 未利用バイオマスからの新規バイオベースプラスチック開発の取り組み: 岩田忠久、柘植丈治、石井大輔; オレオサイエンス, **14**, 123-129 (2014).
3. 微生物産生ポリエステルの物性と分子構造及び高次構造の相関: 加部泰三、岩田忠久; 高分子論文集, **71**, 527-539 (2014)
4. Biodegradable and Bio-based Polymers: Future Prospects of Eco-Friendly Plastics: Tadahisa Iwata; *Angewandte Chemie International Edition*, **54**, 3210-3215 (2015).
5. 環境に優しい生分解性素材の特性と加工技術～微生物より生合成される生分解性ポリエステル材料の高強度化～: 田中稔久、岩田忠久; 月刊「加工技術」、Vol. **50**, No.9, 7-18 (2015).

〔学会発表〕 (計 15 件)

招待講演

1. High performance materials from polysaccharide derivatives and microbial polyesters: T. Iwata; The 8th International Conference on Green Composites (ICGC-8), May 5/21-23 2014, Seoul National University, Korea
2. High Performance Materials from Microbial Polyesters and Polysaccharide Derivatives:

- T. Iwata; International Symposium on Materials for Enabling Nanodevices 2014 (ISMEN2014), 2-5 September, 2014, Tainan, Taiwan
- High-Performance Microbial Polyesters and Polysaccharide Derivatives: T. Iwata; 5th Asian Symposium on Advanced Materials (ASAM-5), November 1-4, 2015, Pusan National University, Busan, South Korea
  - Challenge of Eco-friendly Plastics -For the establishment of a sustainable society: T. Iwata; BASF Science Symposium: Sustainable Urban Living, November 10-11, 2015, Shanghai, China
  - 高分子の性能を構造から考える！-電子線、X線、大型放射光を用いて、岩田忠久、関東高分子若手研究会 2014 春の講演会、主題=高分子を「観る」、2014 年 6 月 28 日、東京大学（東京）
  - バイオベースポリマーの高機能化を目指して、岩田忠久、近畿バイオインダストリー振興会議、バイオマス研究会公開セミナー、2015 年 9 月 11 日、大阪科学技術センター（大阪）
  - バイオプラスチックの挑戦～バイオマスの特徴を活かした分子・材料設計～、岩田忠久、新化学技術推進協会 ライフサイエンス技術部会・反応分科会 講演会、2015 年 12 月 2 日、新化学技術推進協会（東京）

#### 一般発表

- 二段階延伸法の適用による微生物産生ポリエステル繊維の高強度化、加部泰三、岩田忠久、引間孝明、高田昌樹、平成 26 年度繊維学会年次大会、2014 年 6 月 11-13 日、タワーホール船堀（東京）
- 微生物産性ポリエステルの物性および球晶形成に対する分子量効果、杉浦高士、加部泰三、丸林弘典、竹村彰夫、岩田忠久、大竹勝人、平成 26 年度繊維学会年次大会、2014 年 6 月 11-13 日、タワーホール船堀（東京）
- 微生物産生ポリエステルの熱分解特性と紡糸条件に関する研究、加部泰三、岩田忠久、松本謙一郎、田口精一、柘植文治、引間孝明、高田昌樹、第 63 回高分子討論会、2014 年 9 月 26 日、長崎大学文教キャンパス（長崎）
- 様々な新規微生物産性ポリエステルの熱物性と光学特性、加部泰三、松本謙一郎、柘植文治、檀上隆寛、信川省吾、山口政之、田口精一、岩田忠久、第 64 回高分子学会年次大会、2015 年 5 月 28 日、札幌コンベンションセンター（北海道）
- 加圧処理を施した微生物産生ポリエステルフィルムの物性と高次構造、加部泰三、岩田忠久、叶芸、大竹勝人、引間孝明、高田昌樹、平成 27 年度繊維学会年次大会、2015 年 6 月 10-12 日、タワーホ

- ール船堀（東京）
- 超高分子量ポリ [(R)-3-ヒドロキシブチレート-co-(R)-3-ヒドロキシヘキサノエート]を用いた高強度フィルムおよび繊維の作製と高次構造解析、杉浦高士、加部泰三、竹村彰夫、岩田忠久、引間孝明、高田昌樹、平成 27 年度繊維学会年次大会、2015 年 6 月 10-12 日、タワーホール船堀（東京）
  - 熔融工程を含まない冷圧プレス処理延伸法の開発と微生物産生ポリエステルに対する適用、加部泰三、岩田忠久、叶芸、大竹勝人、引間孝明、高田昌樹、平成 27 年度繊維学会年次大会、2015 年 10 月 22-23 日、京都工芸繊維大学（京都）
  - 超高分子量ポリ [(R)-3-ヒドロキシブチレート-co-(R)-3-ヒドロキシヘキサノエート]を用いた高強度フィルムの作製と高次構造解析、杉浦高士、竹村彰夫、岩田忠久、加部泰三、引間孝明、高田昌樹、平成 27 年度繊維学会年次大会、2015 年 10 月 22-23 日、京都工芸繊維大学（京都）

#### 〔図書〕（計 3 件）

- 3.3 Polyhydroxyalkanoate: Tadahisa Iwata, Takeharu Tsuge, Sei-ichi Taguchi, Hideki Abe, and Toshihisa Tanaka; Bio-based Polymers, Handbook of R&D Information in Japan, CMC, 71-85 (2013).
- 高機能性繊維の最前線 ～医療、ヘルスケア分野への挑戦～、第四編医療用機能性繊維、第 6 章 微生物産生ポリエステルの医療用繊維としての応用を目指して：岩田忠久；シーエムシー出版、監修：阿部康次、森川英明、梶原完爾、2014 年 10 月 31 日、pp.140-147.
- 進化する医療用バイオベースマテリアル、第 1 編、第 1 章、バイオポリエステルの基礎物性：岩田忠久；シーエムシー出版、監修：大谷裕一、相羽誠一、pp.13-20 (2015).

#### 〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

#### 〔その他〕

東京大学・大学院農学生命科学研究科・生物材料科学専攻・高分子材料科学研究室 HP <http://www.fp.a.u-tokyo.ac.jp/lab/polymer/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

岩田 忠久 (IWATA, Tadahisa)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30281661