日本結晶学会誌 **55**, 00-00（2013）

総合報告

微生物産生ポリエステルの構造，物性および生分解性

東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻 高分子材料学研究室
理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター 高田構造科学研究室
岩田忠久

Tadahisa IWATA: Structure, Mechanical Properties and Biodegradability of Microbial Polyesters

Poly（[*R*]-3-hydroxybutyrate）（P（3HB））and its copolymers are accumulated by a wide variety of microorganisms as intracellular carbon and energy material, and are extensively studied as biodegradable and biocompatible thermoplastics. Recently, we succeeded in obtaining strong fibers and films by new drawing techniques from microbial polyesters produced by both wild-type and recombinant bacteria. The improvement of mechanical properties of fibers and films is due not only to the orientation of molecular chains but also to the generation of a planar zigzag conformation. The structure of strong fiber with tensile strength of over 1.0 GPa was analyzed by micro-beam X-ray diffraction and X-ray micro-tomography with synchrotron radiation. The strong fibers and films were completely degraded in environment or by extracellular PHB depolymerases. In this article, I present the processing, mechanical properties, highly ordered structure and biodegradability of strong fibers and films produced from microbial polyesters.

1. はじめに

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．1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1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（またはバイオベースプラスチック）である（**表1**）．

生分解性プラスチックは分解されることに大きな機能があるため，原料は必ずしもバイオマスである必要はなく，石油から合成されているものもある．実際，生分解性プラスチックとして最初に研究開発されたプラスチックは，石油から合成されたエステル結合を有するポリエステルであった．一方，バイオマスプラスチックは，再生可能

表1　プラスチックの分類．（Classification of plastics.）

生分解性＼原料	バイオマス	石油
あり	生分解性バイオマスプラスチック ・ポリ乳酸 ・微生物産生ポリエステル ・ポリアミノ酸 ・化学修飾多糖類（低置換度）	生分解性石油由来プラスチック ・ポリカプロラクトン ・ポリブチレンサクシネート ・芳香族導入ポリエステル ・ポリビニルアルコール ・ポリグリコール酸
なし	非生分解性バイオマスプラスチック ・セルロースエステル（高置換度） ・ポリテトラメチレンテレフタレート ・ポリウレタン ・（バイオポリエチレン） ・（バイオポリプロピレン）	非生分解性石油由来プラスチック ・ポリスチレン ・ポリエチレンテレフタレート ・ポリ塩化ビニル ・ポリエチレン ・ポリプロピレン

資源であるバイオマスを原料としている点に特徴があるため, すべてのバイオマスプラスチックが必ずしも生分解性という機能をもっているわけではない. したがって, バイオマスプラスチックでは, 最終的に焼却も処理方法の1つとして考えられ, 二酸化炭素の循環を考慮した「カーボンニュートラル」の概念が先行している. さらに付け加えるなら, 生分解性プラスチックやバイオマスプラスチックとは言え, 製造工程で石油から得られる電気や燃料エネルギーを使用していることを理解しておく必要がある.

現在世界各国で研究が進められている環境に優しいプラスチックは, 上記の観点から, バイオマスから生産され生分解性も有する生分解性バイオマスプラスチック (ポリ乳酸, 微生物産生ポリエステル, ポリアミノ酸, 多糖類など), 石油から合成され生分解性を有する生分解性石油由来プラスチック (ポリカプロラクトン, ポリブチレンサクシネートなど), バイオマスから生産され生分解しない非生分解性バイオマスプラスチック (セルロースエステル誘導体, ポリテトラメチレンテレフタレート, バイオポリエチレンなど), の大きく3つに分類される (**表1**).

本報では, 生分解性バイオマスプラスチックの1つである微生物産生ポリエステルの種類と構造および物性, 新規な成形加工技術の開発による高強度・高弾性率繊維の開発, 大型放射光を用いた構造科学研究, 酵素分解性機構の解明, という一連の基礎研究の成果について紹介する.[1)-3)]

2. バイオポリエステルの種類と物性

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, 体内にも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.[4)] **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.

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.[5)] 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, 環境中のほか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**).

P(3HB) は, 生分解性ポリエステルの中でもポリプロピレン (PP) と同程度の高い融点 (180 ℃) をもつ材料であり, 破壊強度もPPに近く, PPと比較されることが多いが,

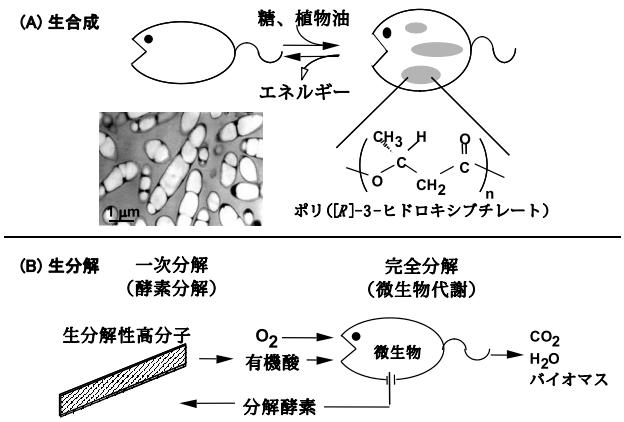

図1 微生物産生ポリエステルの (A) 生合成と (B) 生分解. (Biosynthesis and biodegradation of microbial polyesters.) 写真は, 80 %以上のポリエステルを蓄積した遺伝子組み換え大腸菌の透過型電子顕微鏡像 (図中の白い部分が蓄積したポリエステル).

表2 PHAフィルムの物性. (Mechanical properties of PHA films.)

	Tm (℃)	Tg (℃)	破壊強度 (MPa)	破壊伸び (%)
P(3HB)	177	4	15	5
P(3HB-*co*-8 mol%-3HV)	165	1	19	35
P(3HB-*co*-16 mol%-4HB)	150	−7	26	444
P(3HB-*co*-90 mol%-4HB)	50	−42	65	1,080
P(3HB-*co*-10 mol%-3HHx)	127	−1	21	400
ポリプロピレン	176	−10	38	400
低密度ポリエチレン	130	−36	10	620

破壊伸びが5 %以下と低いため硬い材料である. さらに, ガラス転移温度が4 ℃と室温以下であるため, 室温で保存中に結晶化が進行 (二次結晶化) し, 結晶性の高いもろい材料となる欠点がある. 例えば, 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端に劣る (**表2**).

物性を向上させる方法として, 第2成分モノマーを導入する共重合体化が挙げられる. 微生物の種類や用いる炭素源を変えることにより, さまざまな分子構造をもつ共重合ポリエステルが見出されており, 共重合体の種類や組成を変化させることにより, 結晶性の硬いプラスチックから弾性に富むゴム状まで, 多様な物性を示すことが報告されている (**表2**). 現在, 代表的な共重合ポリエステルとして, 3-ヒドロキシバレリル酸 (3HV) を導入したポリ[(*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] (P(3HB-*co*-3HV)), 3-ヒドロキシヘキサン酸 (3HH) を導入したポリ[(*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] (P(3HB-*co*-3HH)), 4-ヒドロキシブタン酸 (4HB) を導入したポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブチレー

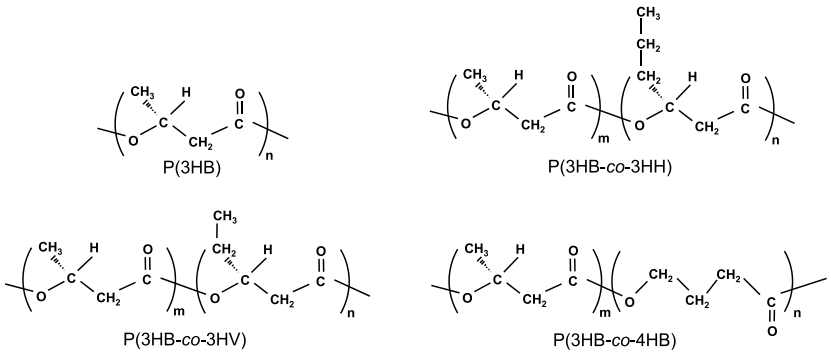

図2　代表的な微生物産生ポリエステルの化学構造式.（Chemical structures of microbial polyesters.）

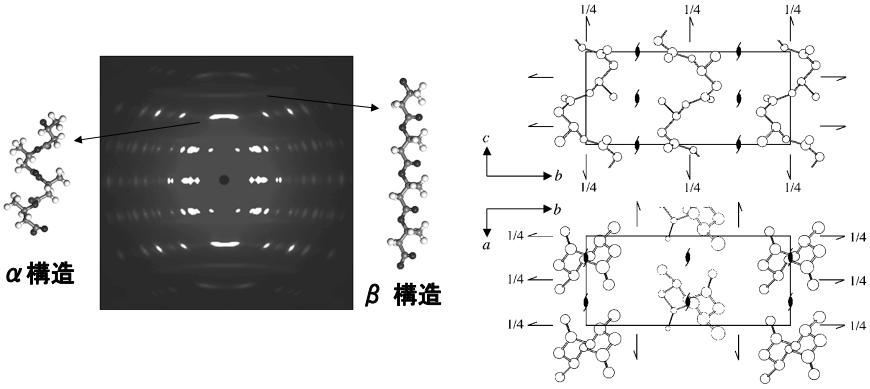

図3　P(3HB)の分子鎖構造と結晶構造.（Molecular and crystal structures of P(3HB).）（左）高強度繊維のX線繊維図と2種類の分子鎖構造（2回らせん構造（α構造）と平面ジグザグ構造（β構造）），（右）α構造の結晶構造.

ト-*co*-4-ヒドロキシブチレート］（P(3HB-*co*-4HB)）などが挙げられる（図2）.

3. 結晶構造と球晶構造

P(3HB)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.[6] 図3に，P(3HB)の結晶構造（α構造）[6] と2種類の分子鎖構造[7),8)] を示す．配向結晶性フィルムや単結晶中に存在するP(3HB)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（α構造）．一方，高強度フィルムや繊維には，高強度化に寄与する平面ジグザグ構造（β構造）の存在が知られている.

融点180℃を有する熱可塑性ポリエステルであるP(3HB)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，図4Aに示すマルテ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．この球晶は，厚さ数ナノメーター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る（図4B）．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図4C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（図4D）.

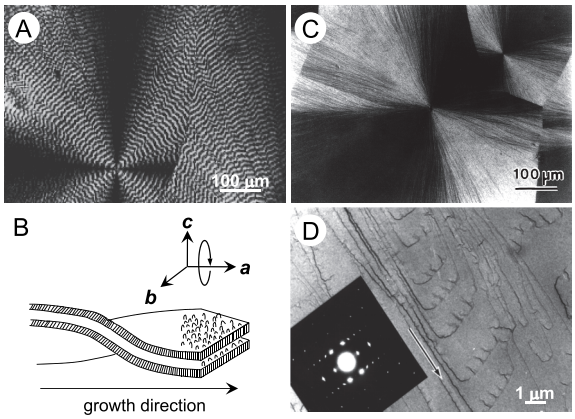

図4　溶融結晶化フィルムの高次構造.（Highly ordered structure of melt-crystallized film.）（A）三次元球晶の偏光顕微鏡像，（B）ねじれを伴ったラメラ結晶，（C）二次元球晶の偏光顕微鏡像，（D）薄膜中に形成した二次元球晶の透過型電子顕微鏡像と電子回折.

4. 単結晶の構造

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1つを取り出したもの

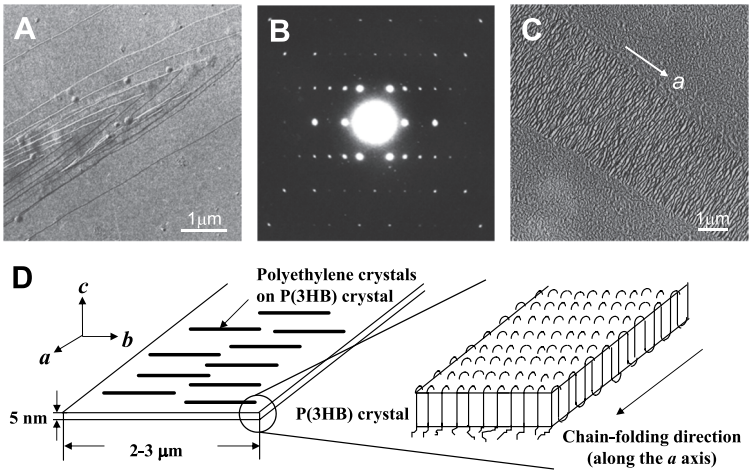

図5　P(3HB)単結晶の透過型電子顕微鏡像.（Transmission electron micrographs of solution-grown crystals of P(3HB).）（A）ラメラ結晶像,（B）電子回折図,（C）単結晶表面にポリエチレンを修飾した単結晶像,（D）折れ曲がり分子鎖構造を有するラメラ結晶の模式図.

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, 分子鎖が規則正しく折りたたまれて成長する厚さが10 nm程度の薄いラメラ（板状）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.

図5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.[10] 単結晶の電子回折図（図5B）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（図3）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. 単結晶の大きさや厚さは透過型電子顕微鏡（TEM）や原子間力顕微鏡（AFM）で測定することが可能であり, P(3HB)単結晶は, 1つの凝集核を中心とし, 幅1～3 μm, 厚さが約5 nmのラメラ結晶である. ラメラ結晶表面における分子鎖の折りたたみ構造を直接可視化することは不可能である. そこで, ラメラ結晶表面に低分子量のポリエチレンを真空蒸着し, 間接的にTEMで観察するポリエチレンデコレーション法が用いられる. 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（図5C）,[11] 単結晶表面で分子鎖の折りたたみが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りたたみは*a*軸に沿って生じていると考えられる.[10)-12)]

5. 超高分子量ポリエステルからの高強度繊維

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. 一般に高分子材料は, 分子量が増大すると物性が向上することから, P(3HB)においても, まず高分子量化を検討した.

筆者らは, P(3HB)合成菌である*Ralstonia eutropha* H16由来のPHB生合成遺伝子（*phbCAB*）を導入した組み換え大腸菌*Escherichia coli* XL1-Blue（pSYL 105）を用い, 炭素源としてグルコースを用い, Luria-Bertani培地中, 2段回分培養において, 通気酸素量, 撹拌速度, 炭素源濃度, 培地温度, 培地のpHなどさまざまな培養条件を検討した. その結果, 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わかった. 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.[13] 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. しかし現在のところ, この連鎖移動剤が何であるかは解明されていない.

これまでP(3HB)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, 繊維化は困難であった. 最初に繊維化に成功したのは, Gordeyevら[14] であるが, 破壊強度190 MPaと汎用高分子の物性にはほど遠いものであった（表3）. Schmackら[15] は, 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％の繊維を得ている. また, Yamaneら[16] は, 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％の繊維を得ている（表3）.

今回筆者らは, 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に成功した. まず, 溶融押出したP(3HB)を氷水中に急冷

表3 ポリヒドロキシアルカン酸繊維とほかの高分子繊維の物性.[33]（Mechanical properties of PHA and common plastic fibers.）

試料		破壊強度（MPa）	破壊伸び（%）	ヤング率（GPa）
野生株産生P(3HB)	Gordeyevら[14]	190	54	5.6
	Schmackら[15]	330	37	7.7
	Yamaneら[16]	310	60	3.8
	本研究[19]	740	32	6.4
超高分子量P(3HB)	本研究[17]	1320	35	18.1
野生株産生P(3HB-*co*-3HV)	Ohuraら[30]	183	6.5	9
	Yamamotoら[31]	210	30	1.8
	本研究[26]	1322	31	8.1
P(3HB-*co*-4HB)	Martinら[32]	545	60	0.7
ポリ乳酸		520～570	25～35	4～6
ポリエチレン		400～800	8～35	3～8
ポリプロピレン		400～700	25～60	3～10
ポリエチレンテレフタレート		530～640	25～35	11～13

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．この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（**表3**）.[17),18)]

6. 野生株産生ポリエステルからの高強度繊維

われわれは遺伝子組み換え大腸菌を用いて生成した超高分子量ポリエステル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，通常の分子量（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.[19),20)] 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，溶融－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．この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（**表3**）.

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，今回われわれ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.[20)] 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，ほか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されている．

7. 大型放射光を用いた単繊維の局所構造解析

今回作製したP(3HB)高強度繊維のX線繊維図において，結晶状態で最も安定とされる分子鎖構造である2回らせん構造（α構造）に加え，分子鎖が伸びきった平面ジグザグ構造（β構造）に由来する回折点が確認された（**図6A**）．破壊強度の増大とともにβ構造の回折強度が強くなったことから，β構造の発現は，高強度化に重要な因子であると考えられる．

繊維内部をさらに詳細に解析するために，兵庫県播磨にある大型放射光施設SPring-8（BL47XUビームライン）において，0.5 μmに集束させたマイクロビーム（波長＝1.54 Å，8 keV）を単繊維（直径20 μm）に照射するマイクロビームX線測定を行った．SPring-8のビームは非常に平行性が高いため，このようにナノオーダーでの収束が可能であり，局所領域の回折実験が可能となる．単繊維の端から中心に対して順次マイクロビームX線測定を行ったところ，冷延伸・二段階延伸を施したP(3HB)高強度繊維は，外側がα構造を有する結晶のみで構成され，内部はα構造とβ構造の2種類の結晶が存在する，つまり2つの結晶構造が局在した芯鞘構造であることがわかった（**図6B**）.[17),18)]

一方，微結晶核延伸法により作製したP(3HB)高強度繊維は，マイクロビームX線測定よりα構造とβ構造の2種類の結晶が繊維全体に均一に存在する構造であることがわかった.[20)] このように単繊維の局所構造解析を行い，P(3HB)の2種類の分子鎖構造を，材料中に目的に応じて

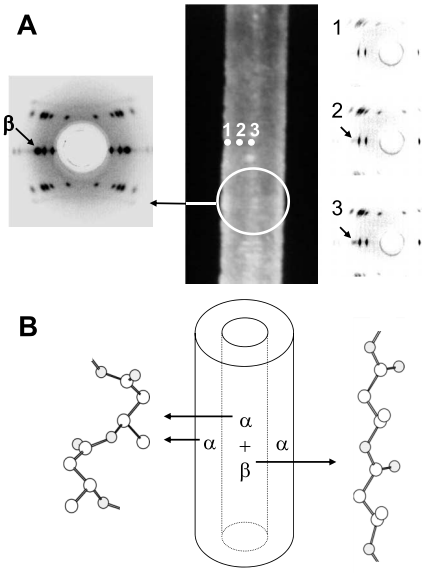

図6　微生物産生ポリエステルから作製した高強度繊維のマイクロビームX線回折図と芯鞘構造模式図.（Micro-beam X-ray diffraction diagrams of high tensile strength fiber and schematic display of core-sheath structure.）（A）左は繊維全体からのX線回折図，右は真ん中の繊維写真における1～3の箇所からそれぞれ得られたマイクロビームX線回折図，（B）芯鞘構造模式図とP（3HB）の2種類の分子鎖構造（らせん構造（α）と平面ジグザグ構造（β））.

配列することができれば，多様な物性の要求に応えられる生分解性材料の作製が可能となると考えられる.

8. 繊維内部の非破壊的観察

冷延伸・二段階延伸法と微結晶核延伸法で作製したPHA繊維の小角X線回折をBL45XUビームラインで撮影を行った. 通常，単繊維一本の小角X線回折を得ることは，輝度の低い研究室レベルでのX線回折装置では非常に困難であるが，SPring-8の強力線源を用いればミリ秒で測定できることから，静的な測定だけでなく，昇温下や延伸過程などの動的な測定も可能となる.

今回作製した2種類の繊維のうち，冷延伸・二段階延伸法で作製した繊維は子午線方向にラメラ結晶の周期性を示す回折点が観察されたが，微結晶核延伸法で作製した繊維では子午線方向の回折は観察されず（図7A），赤道線上に大きなストリーク回折が見られた（図7B）. 高強度繊維の小角回折において，赤道線上に見られるストリーク回折は一般に繊維中に存在するボイドの影響であると考えられているが，いまだその直接的な証拠は示されていない. そこで，筆者らは大型放射光を用いて非破壊的に内部構造を可視化できるX線トモグラフィーの測定を行った.

図7Cに，微結晶核延伸法で作製した高強度繊維の三次元X線トモグラフィー像を示す. 繊維内部に存在する無

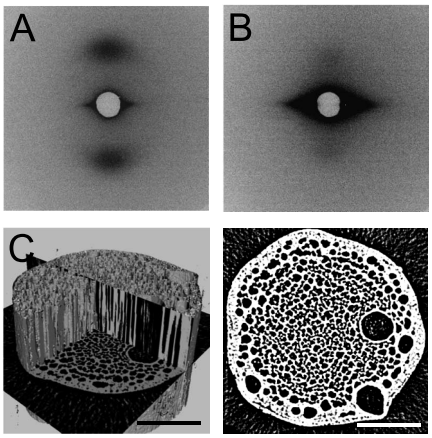

図7　高強度繊維の小角X線散乱とX線トモグラフィー像.（Small-angle X-ray patterns and X-ray tomographic images.）（A）冷延伸・二段階延伸法により作製されたP（3HB）高強度繊維，（B）微結晶核延伸法により作製されたP（3HB-*co*-3HV）高強度繊維，（CとD）微結晶核延伸法で作製されたP（3HB-*co*-3HV）繊維のX線トモグラフィー像，スケール＝20 μm

数の小さなボイドの存在を，世界で初めて明らかにすることができた.[21] 一方，冷延伸・二段階延伸法で作製した繊維にはボイドは認められなかった. したがって，赤道線上のストリークは繊維内部に存在するボイドに起因すると考えられる. 微結晶核延伸法により作製した繊維の破壊強度を，ボイドの平均サイズおよび繊維断面積に対するボイドの存在率を考慮して再計算すると，約2倍の2.2 GPaとなることがわかった. すなわち，PHA繊維はさら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ボイドにより，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および作製方法の適用が期待できる. 最近われわれの研究室では，内部ポアにバンコマイシンなどの抗生物質を含浸させることにより，生体吸収性と長期薬物徐放性を併せもった繊維を開発することにも成功している.[22]

9. 生分解性速度の制御

生分解性ポリエステルの生分解性試験評価法には，微生物由来のポリヒドロキシブチレート（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. 精製酵素を用いて加水分解実験を行った場合，材料の分解速度は，用いた酵素の特性や材料の固体構造によって変化する. 一方，自然環境中での微生物分解は，多種多様な微生物や酵素の共存のもとに加水分解を受けるとともに，季節や気候によって大きな影響を受け

る．したがって，現実的な生分解性の評価のためには，両者を併用することが望ましい．

9.1　結晶化度

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[23]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(図8)．[1),24)] すべてのフィルムの分解速度を結晶化度に対してプロットすると，分解速度は成型条件ではなく，結晶化度に大きく依存することがわかった．図9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．特に，熱延伸・熱処理フィルムにおいては，積層したラメラ結晶の束が周期的に配向している様子が確認できた．長時間の酵素分解により，最終的にはすべての結晶は加水分解される．その分解様式については単結晶の項で詳述する．

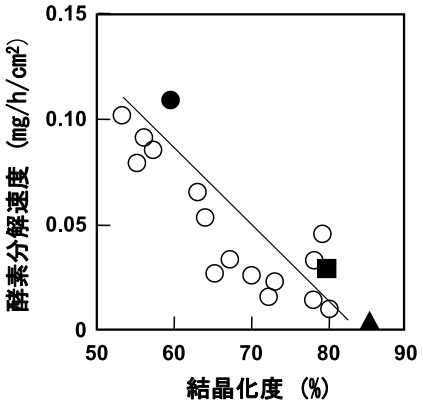

図8　結晶化度と酵素加水分解速度の関係．(Relationship between Rate of enzymatic degradation and crystallinity.)○：溶融結晶化フィルム，●キャストフィルム，■：熱延伸フィルム，▲：熱延伸・熱処理フィルム．

9.2　分子鎖構造

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週間程度で生物化学的酸素要求量(BOD)生分解度が80％に達し，28日間試験後では重量生分解度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．[25)]

図10に，PHB分解酵素による分解前後の高強度繊維の走査型電子顕微鏡像とX線回折パターンを示す．図10Bの写真から，酵素分解は繊維表面から一様に分解されるのではなく，虫食いが起こるように繊維内部へと進行していく様子が観察された．[18)] 通常，繊維内部には結晶領域と非晶領域が存在し，酵素はまず非晶領域を優先的に分解しているためと考えられる．次に，前述のように，高強度繊維には2回らせん構造(α構造)と平面ジグザグ構造(β構造)の2種類の分子鎖構造が存在する．分解前後のX線回折において，α構造の回折強度は変化しないのに対し，β構造の回折強度は極端に減少したことから，β構造のほうがα構造より速く分解されることがわかった．[18)] すなわち，分解酵素は繊維中の非晶領域を分解しながら繊維内部に進入し，繊維中のβ構造を優先的に分解した後，α構造を分解したと考えられる．この結果は，同じ化学構造を有していても，分子鎖構造により分解速度をコントロールできることを示唆している．

9.3　単結晶の酵素分解

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

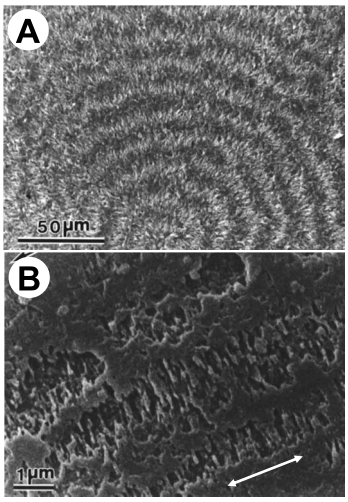

図9　酵素分解途中のフィルムのSEM像．(SEM images of films after partially enzymatic degradation.)(A)溶融結晶化フィルム，(B)熱延伸フィルム，矢印は延伸方向．

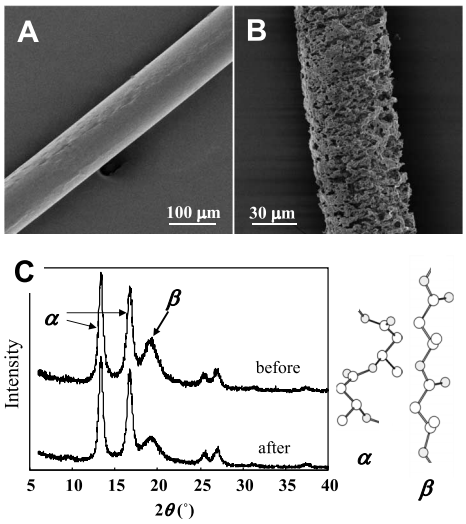

図10　P(3HB)高強度繊維の酵素分解．(Enzymatic degradation of high-strength fibers.)(A)酵素分解前と(B)酵素分解途中の走査型電子顕微鏡像および(C)X線回折パターン．

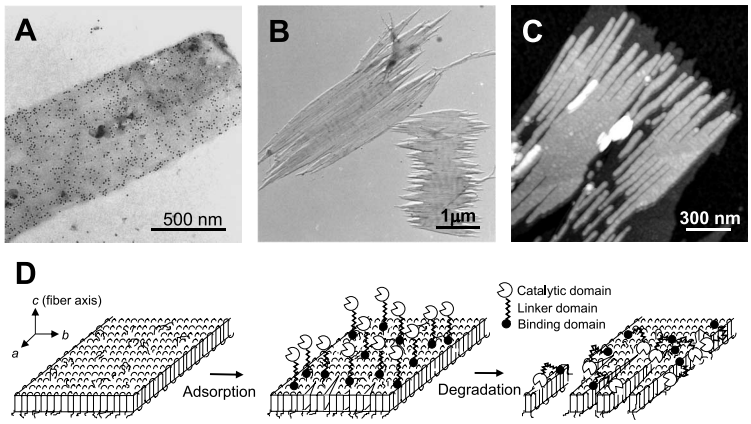

図11　P(3HB)単結晶の酵素分解.（Enzymatic degradation of P(3HB) lamellar crystals.）(A)免疫電子顕微鏡法により可視化された分解酵素の結晶表面への吸着を示すTEM像,（B）酵素分解途中の単結晶TEM像,（C）酵素分解途中の単結晶AFM像,（D）単結晶の酵素分解様式.

分解酵素[23]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図11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(図11A), 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.[26]

酵素分解過程の電子顕微鏡写真では, 図11B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(図11C).[27] 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りたたみ構造を示唆するポリエチレンの縞模様が確認された.[11] 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図11Dに示す.[28] 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.

9.4　分解酵素の結晶構造

最近われわれは, 大型放射光を用いたタンパク質構造解析により, 世界で初めてPHB分解酵素の結晶構造解析に成功した(図12).[29] PHBの2種類の分子鎖構造(2回らせん構造と平面ジグザグ構造)を分解酵素の触媒部位に結合させるシミュレーションモデルを構築したところ, 平面ジグザグ構造のほうが触媒部位にうまく収まることがわかった. 本結果は, 高分子材料学からのアプローチと構造生物学からのアプローチが相補しあえることを示している. さらに, われわれの分子動力学シミュレーションの結果, 2回らせん構造を採っているP(3HB)分子鎖は延伸によりコンフォメーション角が動くことにより, 容易に延ばされ平面ジグザグ構造へと転移することがわかっている.[8] したがって, いったんらせん構造から平面ジグザグ構造へと分子鎖が転移してから酵素の触媒部位に取り込まれると考えられる. また, 分子レベルで分解酵素の機能を解明することにより, 生分解性速度をコントロールするだけでなく, 難分解性高分子材料を分解する新規な分解酵素の構築も可能になると考えられる.

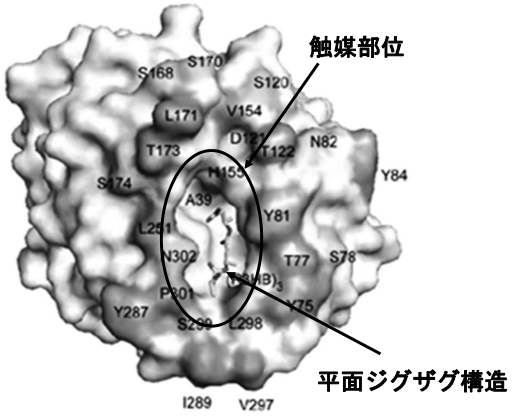

図12　PHB分解酵素の立体構造と3HBトリマーとのドッキングモデル.（A molecular surface of depolymerase and a model of the R3HB trimer bound in the crevice.）

10. おわりに

炭素物質の循環型社会を構築するには，バイオマスを原料とした生分解性を有するバイオマスプラスチックの生産を第一に考えなければならない．しかし，現在開発されているバイオマスプラスチックは，トウモロコシやサトウキビなどから得られるデンプンを原料として生産されている．穀物を利用した高分子生産から脱却し，稲わらやコーン残渣などの農業廃棄物あるいは牧草などの草本類，さらには廃材や木質チップなどを含む木質バイオマスへとその原材料を変えていかなければならない．いかにして，食料と競合しないバイオマス資源から，新規で高性能なバイオマスプラスチックを生み出すかが今後の最も大きな課題である．

さらに，汎用樹脂以上の機械的物性や熱的性質を有するバイオマスプラスチックを実用部材化するためには，新規な成型加工技術の開発に加え，分子鎖構造から高次構造まで高分子構造を目的に応じて制御する技術の開発が必要であり，構造と物性の相関解明が今後ますます重要になると考えられる．

謝　辞

本研究は播磨SPring-8のBL45XUとBL47XUビームラインを用いて行われた成果であり，理化学研究所の高田昌樹主任研究員，伊藤和輝博士，引間孝明博士，JASRIの竹内晃久研究員，鈴木芳生副主任研究員，上杉健太朗研究員に厚く御礼申し上げます．本研究の一部は，科研費基盤A（22245026），NEDO，CRESTの予算により実施しており，ここに感謝いたします．

文　献

1）岩田忠久：高分子論文集 **60**, 377 (2003).
2）T. Iwata: *Macromol. Biosci.* **5**, 689 (2005).
3）岩田忠久：高分子 **4**, 188 (2012).
4）R. W. Lenz and R. H. Marchessault: *Biomacromolecules* **6**, 1 (2005).
5）M. Lemoigne: *Ann. Inst. Pasteur* **39**, 144 (1925).
6）M. Yokouchi, Y. Chatani, H. Tadokoro, K. Teranishi and K. Tani: *Polymer* **14**, 267 (1973).
7）W. J. Orts, R. H. Marchessault, T. L. Bluhm and G. K. Hamer: *Macromolecules* **23**, 5368 (1990).
8）T. Tanaka, Y. Doi and T. Iwata: *Polym. Degrad. Stab.* **85**, 893 (2004).
9）H. Abe, Y. Kikkawa, T. Iwata, H. Aoki, T. Akehata and Y. Doi: *Polymer* **41**, 867 (2000).
10）T. Iwata, Y. Doi, K. Kasuya and Y. Inoue: *Macromolecules* **30**, 833 (1997).
11）T. Iwata, M. Shiromo and Y. Doi: *Macromol. Chem. Phys.* **203**, 1309 (2002).
12）C. Birley, J. Briddon, K. E. Sykes, P. A. Barker, S. J. Organ and P. J. Barham: *J. Mater. Sci.* **30**, 633 (1995).
13）S. Kusaka, T. Iwata and Y. Doi: *J. Macromol. Sci.- Pure Appl. Chem.* **A35(2)**, 319 (1998).
14）S. A. Gordeyev and Y. P. Nekrasov: *J. Mater. Sci.* **18**, 1691 (1999).
15）G. Schmack, D. Jehnichen, R. Vogel and B. Tandler: *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* **38**, 2841 (2000).
16）H. Yamane, K. Terao, S. Hiki and Y. Kimura: *Polymer* **42**, 3241 (2001).
17）T. Iwata, Y. Aoyagi, M. Fujita, H. Yamane, Y. Doi, Y. Suzuki, A. Takeuchi and K. Uesugi: *Macromol. Rapid Commun.* **25**, 1100 (2004).
18）T. Iwata, Y. Aoyagi, T. Tanaka, M. Fujita, A. Takeuchi, Y. Suzuki and K. Uesugi: *Macromolecules* **39**, 5789 (2006).
19）田中稔久，青柳佳宏，山根秀樹，土肥義治，岩田忠久：繊維学会誌 **60**, 309 (2004).
20）T. Tanaka, M. Fujita, A. Takeuchi, Y. Suzuki, K. Uesugi, K. Ito, T. Fujisawa, Y. Doi and T. Iwata: *Macromolecules* **39**, 2940 (2006).
21）T. Tanaka, K. Uesugi, A. Takeuchi, Y. Suzuki and T. Iwata: *Polymer* **48**, 6145 (2007).
22）市野洋之：修士論文，東京大学大学院農学生命科学研究科 (2013).
23）T. Tanio, T. Fukui, Y. Shirakura, T. Saito, K. Tomita, T. Kaiho and S. Masamune: *Eur. J. Biochem.* **124**, 71 (1982).
24）T. Iwata, S. Kusaka and Y. Doi, In: C. Scholz and R. A. Gross, editors. Polymer from renewable resources: biopolyesters and biocatalysis. ACS Symp. Ser., 764. Washington: ACS, pp.67-76 (2000).
25）青柳佳宏：学位論文，埼玉大学大学院理工学研究科 (2003).
26）T. Iwata, Y. Doi, T. Tanaka, T. Akehata, M. Shiromo and S. Teramachi: *Macromolecules* **30**, 5290 (1997).
27）T. Murase, Y. Suzuki, Y. Doi and T. Iwata: *Biomacromolecules* 3, 312 (2002).
28）T. Iwata and Y. Doi: *Macromol. Chem. Phys.* **200**, 2429 (1999).
29）T. Hisano, K. Kasuya, Y. Tezuka, N. Ishii, E. Oroudjev, H. Hansma, T. Kobayashi, M. Shiraki, T. Iwata, Y. Doi, T. Saito and K. Miki: *J. Mol. Biol.* **356**, 993 (2006).
30）T. Ohura *et al.*: *Polym. Degrad. Stab.* **63**, 23 (1999).
31）T. Yamamoto *et al.*: *Int. Polym. Processing* XII, 29 (1997).
32）D. P. Martin and S. F. Williams: *Biochemical Engineering J.* **16**, 97 (2003).
33）未踏科学技術研究会,「エコマテリアル研究会」監修：エコマテリアル学，日科技連出版社，東京 (2002).

プロフィール

岩田忠久　Tadahisa IWATA
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学研究室
Science of Polymeric Materials, Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan
e-mail: atiwata@mail. ecc. u-tokyo. ac. jp
最終学歴：京都大学大学院農学研究科博士課程
専門分野：高分子材料学
現在の研究テーマ：バイオマスプラスチックの高性能化，未利用バイオマスからの新規バイオマスプラスチックの創製，大型放射光を用いた高分子構造解析，生分解性制御技術の開発
趣味：1000円以下のおいしいワイン，水泳

クリスタリット

ラメラ
Lamella

高分子は，溶液中あるいは融解状態では規則性のないランダムコイルの状態をとっている．この状態から結晶化すると，分子鎖が約5～10 nmの周期で規則正しく折りたたまれたラメラ（板状）結晶が成長する．ラメラ結晶の厚さは，結晶化温度が高いほど増加する傾向にある．一方，ラメラ結晶の大きさは数～数十μmであり，分子鎖の折れたたみ方向により長方形，菱形，三角形などさまざまな形状を採る．希薄溶液から成長させると，ラメラ結晶が独立して成長した単結晶が透過型電子顕微鏡などで観察される．高分子鎖はこのラメラ結晶面に垂直に折りたたまれているが，ラメラ結晶表面における分子鎖の折れ曲がり方向や規則性についてはポリマーによっても異なり，さまざまなモデルが提案されている．一方，溶融状態から成長させるとラメラ結晶が集まったロッド結晶を形成し，そのロッド結晶が三次元的に成長した球晶となる．

（東京大学大学院農学生命科学研究科　岩田忠久）

ポリエチレン真空蒸着
Polyethylene Decoration

高分子のラメラ結晶表面では，分子鎖は規則正しく折りたたまれていると考えられているが，折りたたみ構造を直接観察した報告例はない．そこで，ラメラ結晶表面に低分子量のポリエチレンを真空蒸着することにより（デコレーション法），分子鎖の折りたたみ構造を，透過型電子顕微鏡を用いて間接的に観察する方法が用いられている．低分子量のポリエチレンは，ラメラ結晶表面において，分子鎖の折りたたみ周期の間に蒸着されるため，縞状に観察される．分子鎖の折りたたみ方向は，蒸着されたポリエチレンの縞に垂直に生じていると考えられている．

（東京大学大学院農学生命科学研究科　岩田忠久）